

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอ็นโดไฟต์ที่แยกจากกระท้อน *Sandoricum koetjape*
จังหวัดจันทบุรี



นางสาวทศวรรณ สมลีมี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

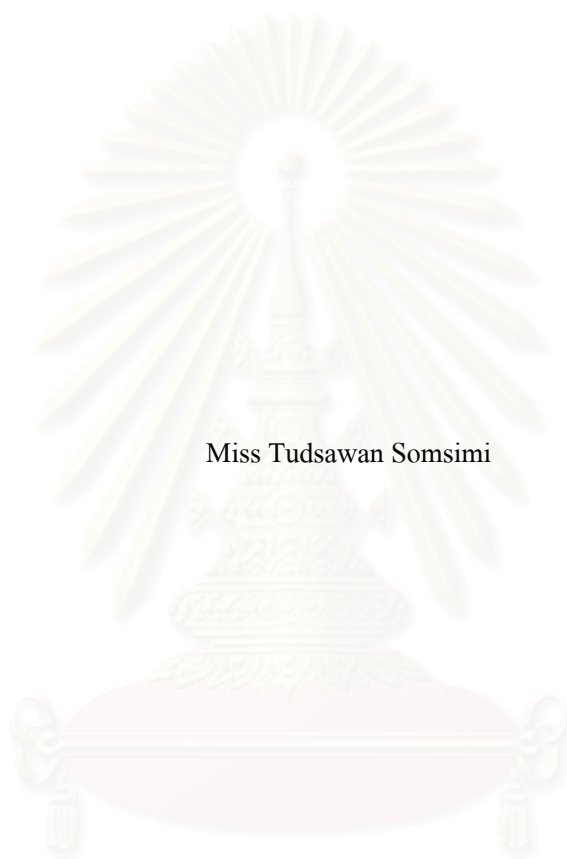
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-5698-4

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM *Sandoricum*
koetjape IN CHANTHABURI PROVINCE



Miss Tudsawan Somsimi

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

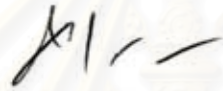
Chulalongkorn University

Academic Year 2005

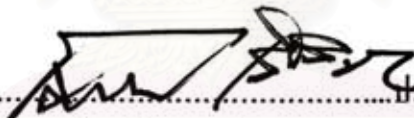
ISBN 974-17-5698-4

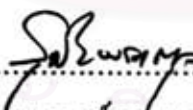
หัวข้อวิทยานิพนธ์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราแอนโดไฟต์ที่แยกจากกระท้อน
Sandoricum koetjape จังหวัดจันทบุรี
โดย นางสาวทศวรรณ สมสีมี
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัชช์ พรภคกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. ประภคิต์สิน สีहनนท์

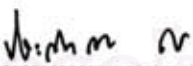
คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าตามหลักสูตรปริญญาโท



.....รองคณบดีฝ่ายบริหารรักษาราชการแทน
.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชราพงษ์ วิทิตสานต์)

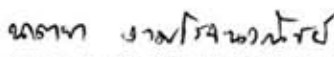
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. ไสภณ เริงสำราญ)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัชช์ พรภคกุล)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา (ร่วม)
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประภคิต์สิน สีहनนท์)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาดยา งามโรจนวิชัย)

ทำศรรณ สมสิมี: สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากกระถ่อน
Sandoricum koetjape จังหวัดจันทบุรี (BIOACTIVE COMPOUNDS FROM
 ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM *Sandoricum koetjape* IN CHANTABURI
 PROVINCE) อ. ที่ปรึกษา: ศศ.ดร. สุรัชช พรภคกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม รศ.ดร.
 ประกิตต์สิน สีहनนท์ 147 หน้า. ISBN 974-17-5698-4

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อแยกสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้
 จากใบกระถ่อน *Sandoricum koetjape* จากจังหวัดจันทบุรีโดยใช้เทคนิคฆ่าเชื้อที่ผิว สามารถแยกรา
 ได้ 20 ไอโซเลต ประกอบด้วย *Mycelia sterilia* จำนวน 12 ไอโซเลต, *Colletotrichum* sp. จำนวน 1
 ไอโซเลต, *Fusarium* sp. จำนวน 2 ไอโซเลตและราในกลุ่ม Xylariaceae จำนวน 5 ไอโซเลต ทำการ
 ทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Dual culture agar diffusion technique พบว่า ราเอนโดไฟต์ที่
 แยกได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 8 ไอโซเลต เมื่อนำราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 มาพิสูจน์
 เอกลักษณะโดยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นราในตระกูล Xylariaceae และสามารถสร้าง
 สารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC 10231 จึงเลือกราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 มาเลี้ยง
 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว malt extract เป็นเวลา 42 วัน แล้วนำส่วนสกัดเอธิลเอซิคัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ
 และส่วนสกัดเอธิลเอซิคัดจากเส้นใยรามาสกัดแยกสารที่ราผลิตโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี
 และการตกผลึก ได้สาร 3 ชนิดประกอบด้วย คือ Cytochalasin D, griseofulvin และสารใหม่ 1 ชนิด
 คือ 4-hydroxy-5-methoxycarbonylmellein และ นำสารบริสุทธิ์มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินท
 รีย์ และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสาร Cytochalasin D มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *B.*
subtilis ATCC 6633 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.81(15.37) $\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$ มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง
 SW620, KATO-3 และ HEP-G2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.9(19.49), 8.8(17.32) และ 8.2(16.14)
 $\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$ ตามลำดับ Griseofulvin มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C.*
albicans ATCC 10231 ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.81(22.18) และ 7.81(22.18) $\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$ ตาม
 ลำดับ 4-hydroxy-5-methoxycarbonylmellein มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *P. aeruginosa* ATCC
 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.81(30.98) และ 7.81(30.98)
 $\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$ ตามลำดับ

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....ทำศรรณ สมสิมี
 ปีการศึกษา.....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4572309423: PROGRAMME OF BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: ENDOPHYTIC FUNGI / *Sandoricum koetjape* / ANTIMICROBIAL ACTIVITY

TUDSAWAN SOMSIMI: BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ENDOPHYTIC FUNGI
ISOLATED FROM *Sandoricum koetjape* IN CHANTABURI PROVINCE

THESIS ADVISOR: ASST. PROF. SURACHAI PORNPAKAKUL, Ph.D., THESIS

COADVISOR: ASSOC. PROF. PRAKITSIN SRIHANONTH, Ph.D. 147 pp. ISBN 974-
17-5698-4

The purpose of this research was to isolate bioactive compounds from endophytic fungi isolated from *Sandoricum koetjape* leaves in Chantaburi province. The endophytic fungi were isolated using surface-sterilization technique and obtained 20 isolates including twelve isolates of *Mycelia sterilia* one isolate of *Colletotrichum* sp., two isolates of *Fusarium* sp. and five isolates of members of Xylariaceae. All isolates were examined antimicrobial activity using dual culture agar diffusion technique. The result showed that 8 isolates exhibited antimicrobial activities. The isolate CHB18 produced metabolites against *C. albicans* ATCC 10231. On basis of morphology the endophytic fungal isolate CHB18 was identified as the fungus in Xylariaceae family. The Ethyl acetate extract of malt culture broth and mycelia of the isolate CHB18 was isolated by extraction, chromatographic technique and crystallization to give 3 compounds. On basis of physical properties and spectroscopic data, they were elucidated as cytochalasin D, griseofulvin and a novel compound 4-hydroxy-5-methoxycarbonylmellein. Antimicrobial activities and cytotoxicity of isolated compounds were tested. Cytochalasin D showed activities against *B. subtilis* ATCC 6633 with MIC value of 7.81(15.37) $\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$ and exhibited cytotoxic activities against SW620, KATO-3 and HEP-G2 with IC_{50} value of 9.9(19.49), 8.8(17.32) and 8.2(16.14) $\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$, griseofulvin showed activities against *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *C. albicans* ATCC 10231 with MIC value of 7.81(22.18) $\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$ and 4-hydroxy-5-methoxycarbonylmellein showed activities against *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *C. albicans* ATCC 10231 with MIC value of 7.81(30.98) $\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$.

Field of study.....Biotechnology.....Student's signature.....Tudsawan Somsimi

Academic year.....2005.....Advisor's signature.....S. Pornpakakul,

Co-advisor's signature.....Prakitsin Srihanonth

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ พรภคกุล อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนได้ศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เรืองสำราญ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตต์สิน สีहनนท์ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม และ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวิชัย กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำแก่ผู้เขียน

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ และ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ ที่หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ และที่หน่วยวิจัยไบโอออร์แกนิกเคมี (Research Centre for Bioorganic Chemistry, RCBC) ทุกท่านที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ เป็นอย่างดีตลอดเวลาที่ได้ทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และเพื่อนๆทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีแก่ผู้เขียนจนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำย่อ.....	ฏ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างราเอ็น โคไฟต์กับพืช.....	3
2.2 การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตสารทุติยภูมิจากราเอ็น โคไฟต์.....	4
2.3 ต้นกระท้อน.....	36
3 วิธีการทดลอง.....	41
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	41
3.2 สารเคมี.....	42
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	43
3.4 การเก็บตัวอย่างใบกระท้อน.....	43
3.5 การแยกราเอ็น โคไฟต์จากใบกระท้อน.....	43
3.6 การคัดกรองหาราเอ็น โคไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....	44
3.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์และการจัดจำแนกราเอ็น โคไฟต์สายพันธุ์ CHB18.....	46
3.8 การวัดการเจริญเติบโตของราเอ็น โคไฟต์สายพันธุ์ CHB18.....	47
3.9 การสกัดสารทุติยภูมิจากราเอ็น โคไฟต์สายพันธุ์ CHB18.....	47
3.10 การแยกสกัดสารทุติยภูมิจากราเอ็น โคไฟต์ให้บริสุทธิ์.....	48
3.11 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากราเอ็น โคไฟต์ CHB18.....	52

	หน้า
3.12 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่แยกได้.....	56
4 ผลการทดลอง.....	58
4.1 ราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้จากใบกระท้อน <i>Sandoricum koetjape</i> จากจังหวัด จันทบุรี.....	61
4.2 ราเอ็นโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....	67
4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอ็นโดไฟต์ CHB18.....	69
4.4 การวัดการเจริญเติบโตและทดสอบฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์สาย พันธุ์ CHB18.....	73
4.5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ของสารทุติยภูมิที่สร้างจากราเอ็นโดไฟต์ CHB18.....	74
4.6 การแยกสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ จากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18.....	77
4.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	98
5 สรุปผลการทดลอง.....	105
รายการอ้างอิง.....	106
ภาคผนวก.....	115
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	147

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอ็นโดไฟต์.....	11
3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	44
3.2 จำนวนจุลินทรีย์ทดสอบ (CFU/ml) ที่มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland standard	44
3.3 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (BeO1).....	49
3.4 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบจากเส้นใย (MeO1).....	51
4.1 ลักษณะของโคโลนีและการจัดจำแนกราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้จากใบกระท้อนจาก จังหวัดจันทบุรี.....	61
4.2 เปรียบเทียบราเอ็นโดไฟต์ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยเทคนิค Dual culture Agar diffusion.....	68
4.3 เปอร์เซ็นต์ของราเอ็นโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ.....	68
4.4 ข้อมูลน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา.....	73
4.5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ของสารแต่ละลำดับส่วนที่แยกจากสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตด จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (BeO1) จากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18.....	75
4.6 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ของสารแต่ละลำดับส่วนที่แยกจากสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตด จากเส้นใยรา (MeO1) จากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18.....	76
4.7 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 1.....	79
4.8 gHSQC spectra ของสารบริสุทธิ์ 1.....	81
4.9 เปรียบเทียบ ¹³ C-NMR และ ¹ H-NMR ของสารบริสุทธิ์ 1 เทียบกับ Cytochalasin D	83
4.10 ข้อมูล gHMBC และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 1.....	85
4.11 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 2.....	88
4.12 gHSQC spectra ของสารบริสุทธิ์ 2.....	89
4.13 ข้อมูล gHMBC และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 2.....	90
4.14 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 3.....	92
4.15 gHSQC spectra ของสารบริสุทธิ์ 3.....	94
4.16 เปรียบเทียบ ¹³ C-NMR และ ¹ H-NMR ของสารบริสุทธิ์ 3 เทียบกับ Griseofulvin...	95
4.17 ข้อมูล gHMBC และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 3.....	96

ตารางที่	หน้า
4.18 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนเอทิล แอสซิเตต (Be01) สารสกัดหยาบจากเส้นใยราส่วนเอทิลแอสซิเตต (Me01) และสาร สกัดหยาบจากเส้นใยราส่วนเมทานอล (Mm01) เปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวก Streptomycin.....	98
4.19 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารแต่ละลำดับส่วนที่แยกจากสาร สกัดหยาบเอทิลแอสซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (Be01) จากราเอ็น โคไฟต์ CHB18 โดยใช้ วิธี Paper disk diffusion method เปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวก Streptomycin.....	100
4.20 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารแต่ละลำดับส่วนที่แยกจาก สารสกัดหยาบเอทิลแอสซิเตตจากเส้นใยรา (Me01) จากราเอ็น โคไฟต์ CHB18 โดยใช้วิธี Paper disk diffusion method เปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวก Streptomycin.....	101
4.21 ผลการทดสอบฤทธิ์เพื่อหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สารสามารถยับยั้งเชื้อจุลิน ทรีย์ได้ (MIC).....	103
4.22 ฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ 1.....	104
ก1 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากชิ้นราราเอ็น โคไฟต์ที่แยกจากใบ กระท้อนด้วยเทคนิค Dual culture Agar diffusion.....	118

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 Phomopsichalasin.....	5
2.2 Cryptocandin.....	5
2.3 collectotric acid.....	6
2.4 artemisinin.....	6
2.5 Paclitaxel.....	7
2.6 Fusaricide.....	7
2.7 (ก) Cytonic acid A และ (ข) Cytonic acid B.....	8
2.8 (ก) 7- <i>O</i> -(β -D-glucopyranosyl) (ข) Tricin (ค) Isoorientin.....	9
2.9 Naphthalene.....	9
2.10 Subglutinol A.....	10
2.11 โครงสร้างทางเคมีของสารทุติยภูมิที่สร้างโดยราเอ็นโดไฟต์ชนิดต่างๆ.....	20
2.12 ต้นกระท้อน.....	36
2.13 แสดงโครงสร้างของสาร (ก) Sandoricin และ (ข) 6-hydroxysandoricin.....	37
2.14 แสดงโครงสร้างของสาร (ก) koetjapic acid (ข) 3-oxo-olean-12-en-29-oic acid และ (ค) katonic acid.....	38
2.15 แสดงโครงสร้างของสาร (ก) bryononic acid (ข) secobryononic acid และ (ค) secoisobryononic acid.....	39
2.16 แสดงโครงสร้างของสาร (ก) Benzyloximo-olean-12-en-29-oic acid (ข) 3-Methyloximo-olean-12-en-29-oic acid และ (ค) 3-Oximo-olean-12-en-29-oic acid.....	40
3.1 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 1.....	53
3.2 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 2.....	54
3.3 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 3.....	55
4.1 ราเอ็นโดไฟต์ที่แยกจากใบกระท้อนไอโซเลต CHB01-CHB09.....	63
4.2 ลักษณะโคโลนี เส้นใยและสปอร์ของราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้.....	66

รูปที่	หน้า
4.3 ลักษณะของโคโลนี เส้นใย สี และการสร้างรงควัตถุของราเอ็นโดไฟต์ CHB18 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิด ได้แก่ PDA, MEA, YES, GYEA, SDA และ CMA.....	69
4.4 ลักษณะสโตรมาของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว MEA.....	70
4.5 การสร้างสโตรมาของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบนกิ่งไม้ ในขวดทรงสูง.....	71
4.6 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของราเอ็นโดไฟต์ CHB18.....	74
4.7 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 1.....	87
4.8 HMBC ของสารบริสุทธิ์ 1.....	87
4.9 โครงสร้างทางเคมีของสาร 5-methoxycarbonylmellein.....	91
4.10 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 2.....	91
4.11 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 3.....	97
4.12 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบของสารสกัดหยาบเอทิลเอซิติเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (Be01) สารสกัดหยาบเอทิลเอซิติเตตจากเส้นใยรา (Me01) และสารสกัดหยาบเมทานอลจากเส้นใยรา (Mm01) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม บวก Streptomycin.....	99
4.13 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบของสารแต่ละลำดับส่วน	102
ข1 UV สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1.....	123
ข2 IR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1.....	124
ข3 ¹ H-NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1.....	125
ข4 ¹³ C-NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1.....	126
ข5 MS สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1.....	127
ข6 HSQC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1.....	128
ข7 HMBC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1.....	129
ข8 COSY สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1.....	130
ข9 UV สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2.....	131
ข10 IR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2.....	132
ข11 ¹ H-NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2.....	133

รูปที่	หน้า
ข12 ^{13}C -NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2.....	134
ข13 MS สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2.....	135
ข14 HSQC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2.....	136
ข15 HMBC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2.....	137
ข16 UV สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3.....	138
ข17 IR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3.....	139
ข18 ^1H -NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3.....	140
ข19 ^{13}C -NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3.....	141
ข20 MS สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3.....	142
ข21 HSQC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3.....	143
ข22 HMBC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3.....	144
ข24 COSY สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3.....	145



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18.....	48
4.1 แสดงการแยกสารสกัดหยาบให้ได้สารบริสุทธิ์.....	78



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

$[\alpha]_D^{20}$	=	Specific rotation at 20° and Sodium D line (589 nm)
ATCC	=	American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A
br s	=	broad singlet (for NMR spectral data)
°C	=	degree Celsius
$^{13}\text{C-NMR}$	=	carbon-13 nuclear magnetic resonance
CDCl_3	=	deuterated chloroform
CD_3OD	=	deuterated methanol
CHCl_3	=	chloroform
CH_2Cl_2	=	dichloromethane
cm	=	centimeter
COSY	=	^1H - ^1H correlation spectroscopy
CFU	=	Colony forming unit
δ	=	chemical shift
d	=	doublet (for NMR spectral data)
dd	=	doublet of doublet (for NMR spectral data)
dt	=	doublet of triplet (for NMR spectral data)
ϵ	=	molar absorptivity
EIMS	=	electron impact mass spectroscopy
eq	=	equatorial
EtOAc	=	ethyl acetate
g	=	gram
HMBC	=	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	=	Heteronuclear Single Quantum Coherence
$^1\text{H-NMR}$	=	Proton Nuclear Magnetic Resonance
Hz	=	hertz
IR	=	infrared spectroscopy
l	=	liter
μl	=	micro liter

คำย่อ (ต่อ)

λ_{\max}	=	wavelength of maximum absorption
$[M+H]^+$	=	protonated molecular ion
m	=	multiple (for NMR spectral data)
MEA	=	Malt extract agar
MHB	=	Mueller- Hinton broth
MeOH	=	methanol
MIC	=	Minimum inhibitory concentration
mg	=	milligram
μg	=	microgram
MHz	=	megahertz
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
ν_{\max}	=	wave number at maximum absorption
NMR	=	nuclear magnetic resonance
No.	=	Number
ppm	=	part per million
PDA	=	Potato Dextrose Agar
q	=	quartet (for NMR spectral data)
s	=	singlet (for NMR spectral data)
SDA	=	Sabouraud's Dextrose Agar
SEM	=	scanning electron microscope
t	=	triplet (for NMR spectral data)
TLC	=	thin layer chromatography
UV	=	Ultraviolet
YES	=	Yeast Extract Agar

บทที่ 1

บทนำ

พืชสมุนไพรถูกนำมาใช้ในการบำบัดรักษาโรคต่างๆ มาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรหลายชนิด รวมทั้งมีการศึกษาเกี่ยวกับราที่อาศัยร่วมกับพืชสมุนไพรและการสร้างสารออกฤทธิ์ของราดังกล่าว

ราเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มหนึ่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากและอาศัยอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ในน้ำจืด น้ำทะเล ดิน ซากพืช ซากสัตว์ มูลสัตว์ หรือในเนื้อเยื่อพืชและเนื้อเยื่อสัตว์ที่มีชีวิต (Hawksworth และคณะ, 1991) สำหรับราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้พืชนั้นมีอาการของโรคใด ๆ ปรากฏให้เห็น เรียกว่า ราเอ็นโดไฟต์ (Petriani และคณะ, 1991) ราเอ็นโดไฟต์อาศัยอยู่ในเซลล์หรือระหว่างเซลล์ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ ใบ ก้านใบ ลำต้น หรือราก มีรายงานว่าพบราเอ็นโดไฟต์ในพืชแทบทุกชนิด ส่วนใหญ่แล้วจะพบว่าราเอ็นโดไฟต์มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพากับพืชโดยพืชให้ที่อยู่อาศัย เป็นแหล่งของสารอาหารให้รา ส่วนราเอ็นโดไฟต์ก็อาจจะผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิบางชนิดที่เป็นประโยชน์กับพืชหรือมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับราเอ็นโดไฟต์อย่างแพร่หลายและที่สำคัญคือราเอ็นโดไฟต์สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ มีรายงานว่าราเอ็นโดไฟต์ *Taxomyces andreanae* ที่แยกจากเปลือกในของต้นแปซิฟิก ยิว (*Taxus brevifolia*) สามารถสร้างสาร Paclitaxel ได้เช่นเดียวกับต้นแปซิฟิก ยิว ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่ส่วนเปลือกมี Taxol ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า Taxol และในปัจจุบันใช้เป็นยาด้านมะเร็งแล้ว (Stierle และคณะ, 1993) ราเอ็นโดไฟต์ *Neotyphodium coenophialum*, *Neotyphodium loli*, *Epichloe festucae* และ *Epichloe typhina* ซึ่งพบในหญ้าหลายชนิด เช่น tall fescue หรือ perennial ryegrass เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสามารถสร้างสาร peramine ซึ่งเป็น pyrrolopyrazine alkaloid ที่เป็นพิษ ต่อแมลง (Schardl และ Philips, 1997) และมีรายงานว่าราเอ็นโดไฟต์ *Crytosporiosis cf. quercina* ที่แยกจากพืชสมุนไพร *Tripterygium wilfordii* เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสามารถสร้างสาร cryptocandin ซึ่งเป็นสารประเภท lipopeptide ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคในคน (Strobel และคณะ, 1999)

จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่าราเอ็นโดไฟต์จากพืชสมุนไพรบางชนิด สร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้เช่นเดียวกับที่สร้างโดยพืชสมุนไพรหรือไม่ก็สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างจากพืชสมุนไพรที่มันอาศัยอยู่และมีความเป็นไปได้ในการนำสารเหล่านั้นมาพัฒนาไปใช้ประโยชน์

ทางเภสัชกรรมหรือเกษตรกรรมได้ ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงศึกษาราดเอ็นโดไฟต์จาก กระท้อน ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีสรรพคุณแก้ท้องร่วง บิดมูกเลือด ถอนพิษไข้ และดับพิษร้อนใน โดยใช้ราก ใช้ขี้ผึ้ง ใช้คั้นน้ำอาบแก้ไข้ โดยใช้ใบ รักษาโรคผิวหนัง โดยใช้เปลือก และใช้ผล เป็นยาฝาดสมาน มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกระท้อนพบว่า มีสารกลุ่ม sesquiterpenoid และ triterpenoid ซึ่งมีสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่น katonic acid และ 3-oxo-olean-12-en-29-oic acid มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง P-388 (murine lymphocytic leukemia) (Kaneda และคณะ, 1992) สารกลุ่ม pentacyclic triterpenoid มีฤทธิ์ยับยั้ง lymphocyte proliferation (Tanaka และคณะ, 2001) จึงคาดหวังว่าจะได้ราดเอ็นโดไฟต์ที่แยกจากใบกระท้อนที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่อาจสร้างสารที่มีฤทธิ์เช่นเดียวกับต้นกระท้อน หรือสร้างสารที่มีฤทธิ์อื่นๆ ที่น่าสนใจ ในงานวิจัยนี้ทำการแยกราดเอ็นโดไฟต์จากส่วนใบของกระท้อน นำราดที่แยกได้มาเพาะเลี้ยง สกัดสารทุติยภูมิจากน้ำเลี้ยงเชื้อและจากเส้นใยด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทุติยภูมิและแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารทุติยภูมิโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี และศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ รวมทั้งการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราดเอ็นโดไฟต์

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อแยกราดเอ็นโดไฟต์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบกระท้อน จังหวัดจันทบุรี
2. แยกองค์ประกอบทางเคมีของสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ราดเอ็นโดไฟต์สร้างขึ้น
3. พิสูจน์เอกลักษณ์ของราดเอ็นโดไฟต์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
4. พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบบริสุทธิ์ที่แยกได้
5. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบบริสุทธิ์ที่แยกได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ราดเอ็นโดไฟต์จากใบกระท้อนที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างราเอ็นโดไฟต์กับพืช

ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีการอาศัยอยู่ร่วมกันพบได้ทั่วไปในธรรมชาติซึ่งมีอยู่ มากมายหลายชนิด มีการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้มานานแล้ว อย่างเช่นการอาศัยอยู่ร่วมกันระหว่างจุล ชีพและพืช โดยจุลชีพจะอาศัยอยู่ในส่วนของเนื้อเยื่อพืช พบทั้งพืชที่อยู่บนบกและพืชที่อยู่ในน้ำ (Bacon และ White, 2000)

เอ็นโดไฟต์ (endophyte fungi) หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชที่มีชีวิต ซึ่ง อาจอยู่ช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตหรือตลอดชีวิต ความหมายของราเอ็นโดไฟต์ คือ ราที่เมื่อเข้าไป อาศัยในส่วนของใบและเนื้อเยื่อพืชที่สมบูรณ์แล้วไม่ทำให้พืชปรากฏอาการใดๆที่ผิดปกติหรือเป็น โรค ราเอ็นโดไฟต์พบในพืชแทบทุกชนิด รวมทั้ง มอส เฟิร์น และลิเวอร์เวิร์ด (Petrini, 1986, Carroll, 1986, 1988) ในพืชที่เป็นผู้ให้อาศัย (host) มีราหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในขณะเดียวกัน และยัง ไม่สามารถศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของราได้ในขณะที่มันอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช ราเอ็นโด ไฟต์ที่พบส่วนใหญ่มีอยู่ 2 กลุ่มหลักๆ คือ Ascomycetes และ Deuteromycetes และยังพบกลุ่ม Basidiomycetes และ Oomycetes อีกบ้างเล็กน้อย

ราเอ็นโดไฟต์เมื่ออาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชจะเจริญโดยการแทรกผ่านเส้นใยไประหว่างเซลล์ ของพืชหรืออาจแทรกเข้าไปในเซลล์พืช และได้รับสารอาหารจากพืชที่มันอาศัย (Issac, 1992) ความสัมพันธ์ระหว่างราเอ็นโดไฟต์และพืชเป็นแบบ พึ่งพา ซึ่งพืชจะปกป้องจากภาวะที่ไม่ เหมาะสมต่างๆ ส่วนราเอ็นโดไฟต์สร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิบางชนิดที่เป็นประโยชน์กับพืช หรือมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารที่ทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น สารต้านแบคทีเรีย สารต้าน รา และสารฆ่าแมลง ซึ่งมีประโยชน์ต่อพืช (Strobel และ Long, 1998)

เมื่อจัดกลุ่มราเอ็นโดไฟต์ในทางนิเวศวิทยา แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้ (Petrini, 1996)

1. Clavicipitaceous grass endophyte คือราเอ็นโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในหญ้าซึ่งเป็นราในวงศ์ Clavicipitaceae การค้นพบราเอ็นโดไฟต์ในกลุ่มนี้ เริ่มต้นจากการพบราในเมล็ดของหญ้าชนิดหนึ่ง (*Lotium tumulentum* L.) ซึ่งเป็นวัชพืชที่เกิดในแปลงโดย Vogl ในปีค.ศ.1989 นับจากนั้นจึงมี รายงานการศึกษาซึ่งทำให้เห็นว่าราในกลุ่มนี้ มีแหล่งที่อยู่อาศัยในพืชอีกมาก ทั้งหมดจะเป็นพวก หญ้าได้แก่หญ้าตระกูล Poaceae หญ้าจำพวกหญ้าแห้วหมู (Sedge) ตระกูล Cryperaceae และหญ้า ทรงสูงชนิดหนึ่ง (rush) ตระกูล Jancaceae โดยมีหญ้ายากว่า 80 สกุลและหลายร้อยชนิดที่ราอาศัยอยู่

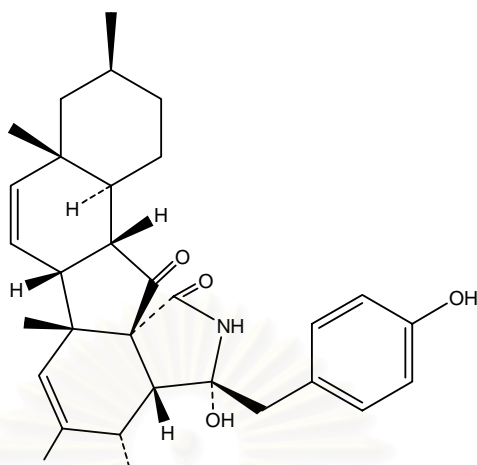
2. Non-Clavicipitaceous grass endophyte คือราเอ็นโดไฟต์ในไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่มแต่รวมราเอ็นโดไฟต์ในหญ้าที่ไม่ได้อยู่ในวงศ์ Clavicipitaceae ราเอ็นโดไฟต์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ราในไฟลัม Ascomycota Deuteromycota Zygomycota และ Basidiomycota ราเอ็นโดไฟต์ของพืชตระกูลหญ้าเป็นที่รู้จักกันมานานกว่า 70 ปีแล้ว แต่การศึกษาราเอ็นโดไฟต์ของไม้ยืนต้นและไม้พุ่มเพิ่งเริ่มศึกษาเมื่อประมาณ 20 ปีที่ผ่านมา โดยเริ่มศึกษาจากต้นสนพันธุ์ยุโรป หลังจากนั้นก็มีรายงานที่รวบรวมรายชื่อของพืชที่มีราเอ็นโดไฟต์ เพื่อสรุปถึงราเอ็นโดไฟต์ที่กระจายอยู่ในอาณาจักรของพืชและพบว่าพืชที่มีเนื้อไม้จำพวกจิมโนสเปิร์มและแองจิโอสเปิร์มทั้งหมดที่ถูกตรวจสอบมีราเอ็นโดไฟต์อาศัยอยู่และพบว่าราเหล่านี้ มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง

2.2 การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตสารทุติยภูมิจากราเอ็นโดไฟต์

ราเป็นจุลชีพที่เป็นแหล่งผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญ ซึ่งผลิตโดยราหลากหลายชนิด ราเอ็นโดไฟต์เป็นแหล่งของสารทุติยภูมิที่มีความแตกต่างในทางเคมีและชีววิทยาคือไม่ใช่เพียงแต่นำสารที่ได้มาเพื่อรักษามนุษย์เท่านั้น แต่นำมาเพื่อใช้รักษาสัตว์และพืชได้ด้วย จากที่กล่าวมาแล้วว่าราเอ็นโดไฟต์นั้นมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพากับพืช จึงน่าสนใจที่จะศึกษาราเอ็นโดไฟต์จากพืชหลากหลายชนิดซึ่งอาจจะผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์น่าสนใจ (Tan และ Zou, 2001) จากงานวิจัยต่างๆ สามารถแยกประเภทของสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ราเอ็นโดไฟต์สร้างขึ้นได้แก่ สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของไวรัส สารที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลง สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมาลาเรียและสารที่มีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

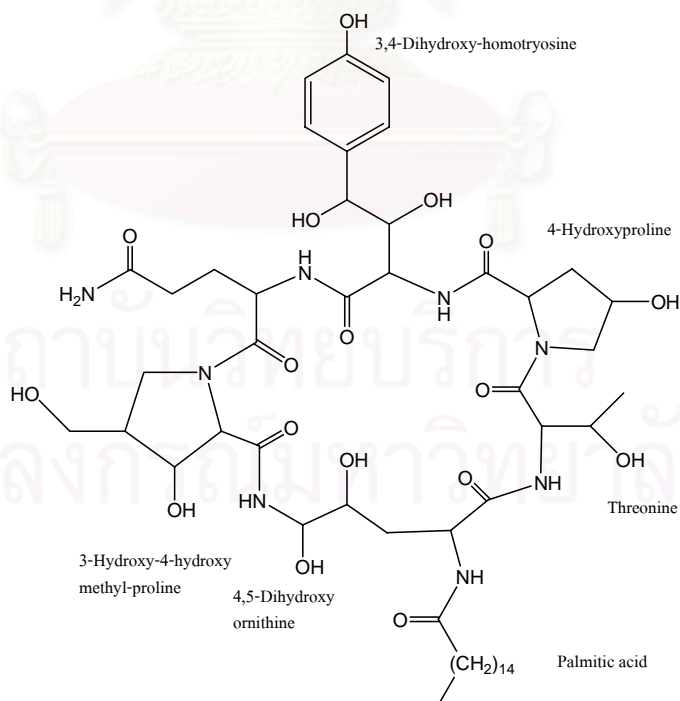
2.2.1 สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial Agent)

ในปี 1995 มีรายงานการวิจัยว่าราเอ็นโดไฟต์ *Phomopsis sp.*, *Salix gracilostyla var. melanostachys* สามารถผลิตสาร Phomopsichalasin (รูปที่ 2.1) ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของ Cytochalasin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella gallinarum* และ *Candida tropicalis* ได้ (Horn และคณะ, 1995)



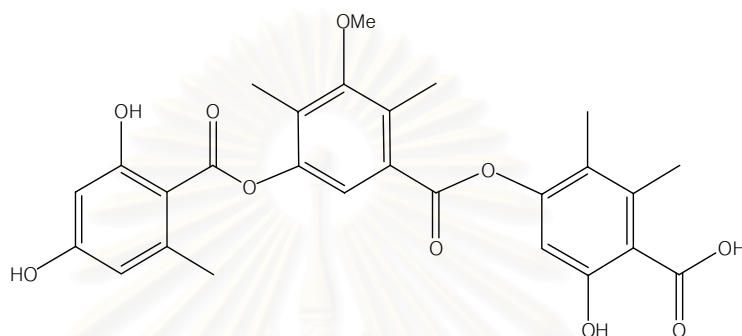
รูปที่ 2.1 Phomopsichalasin

ปี 1999 มีรายงานการวิจัยว่าราเอ็นโดไฟต์ *Cryptosporiosis cf. quercin* จาก *Tripterygium wilfordii* สามารถผลิตสาร Cryptocandin (รูปที่ 2.2) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* (Strobel และคณะ, 1999)



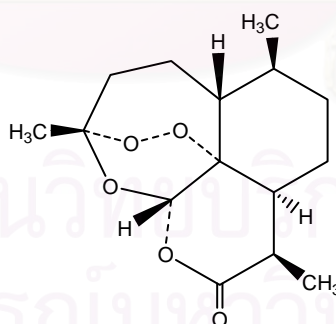
รูปที่ 2.2 Cryptocandin

ปี 2000 มีรายงานการวิจัยว่าราเอ็นโดไฟต์ *Collectotrichum gloeosporioides* จากต้น *Artemisia mongolica* สามารถผลิตสาร collectotric acid (รูปที่ 2.3) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* และ *Helminthosporium sativum* (Zou และคณะ, 2000)



รูปที่ 2.3 collectotric acid

ปี 2001 มีรายงานการวิจัยว่าราเอ็นโดไฟต์หลายชนิดจากต้น *Artemisia annua* ที่เป็นแหล่งของยาต้านมาลาเรีย artemisinin (รูปที่ 2.4) พบว่าราเอ็นโดไฟต์ IV403 สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้มากที่สุด (Liu และคณะ, 2001)

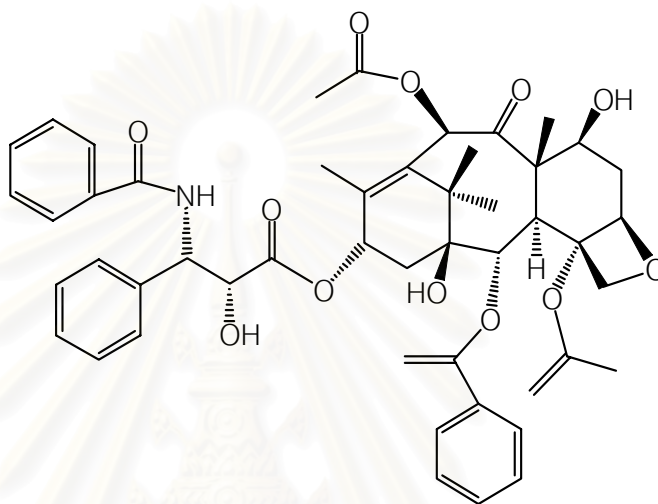


รูปที่ 2.4 artemisinin

2.2.2 สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anticancer Agent)

ในปี 1993 มีรายงานการวิจัยว่าสามารถแยกสาร Paclitaxel (รูปที่ 2.5) จากราเอ็นโดไฟต์ *Taxomyces andreanae* จากต้น แปซิฟิกยิว (*Taxus brevifolia*) ซึ่งปัจจุบันได้นำมาใช้เป็นยารักษา มะเร็งและมีชื่อทางการค้าว่า Taxol[®] (Strobel และคณะ, 1993) นอกจากนี้ยังพบสาร Paclitaxel ใน ราเอ็นโดไฟต์อีกหลายชนิดได้แก่ ราเอ็นโดไฟต์ *Pestalotiopsis guenpinii* จาก *Wollemia nobilis*

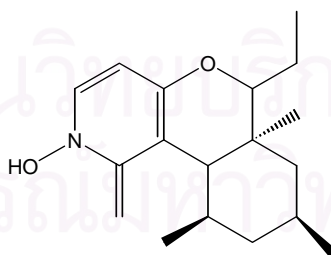
(Strobel และคณะ, 1997) ราเอ็นโดไฟต์ *Periconia sp.* จาก *Torreya grandifolia* (Li และคณะ, 1998) ราเอ็นโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspora* จาก *Taxus wallachina* (Metz และคณะ 2000, Li และคณะ, 1998) ราเอ็นโดไฟต์ *Tubercularia sp.* *Taxus mairei* (Wang และคณะ, 2000) ราเอ็นโดไฟต์ *Aspergillus niger* จาก *Taxus chinensis* (Wang และคณะ, 2001) ราเอ็นโดไฟต์ *Stegolerium kukenani* จาก *Stegolepis guianensis* (Strobel และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.5 Paclitaxel

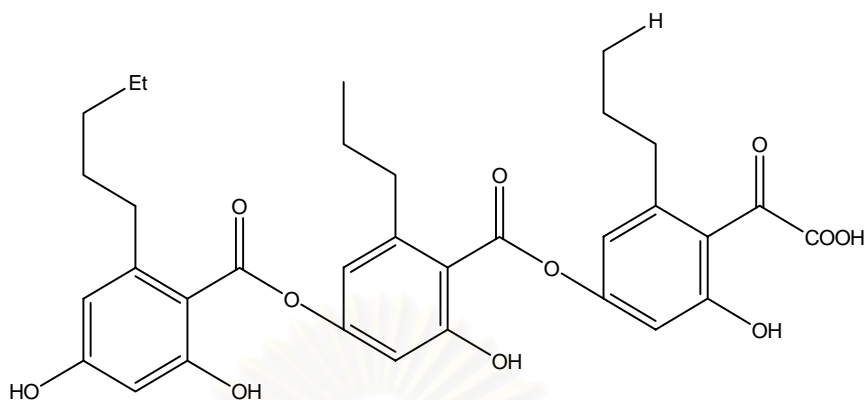
2.2.3 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของไวรัส (Antiviral Agents)

ในปี 1996 มีรายงานการวิจัยว่าสามารถแยกสาร Fusaricide (รูปที่ 2.6) จากราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium sp.* จากต้น *Oxydendron arborcum* ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง HIV (McBrien และคณะ, 1996)

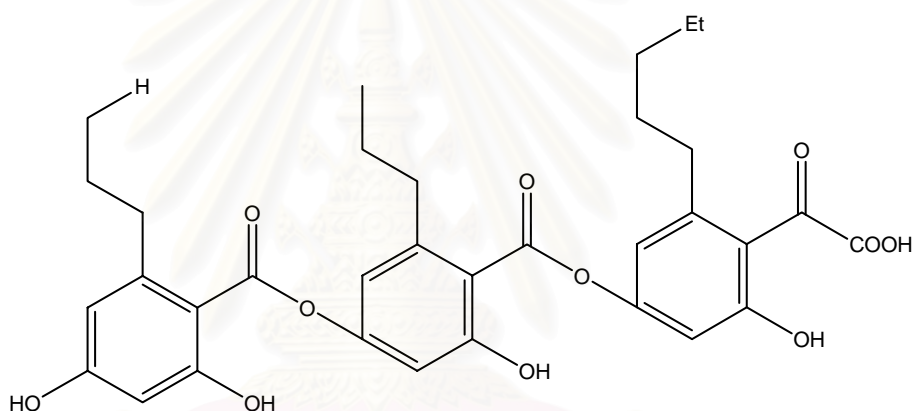


รูปที่ 2.6 Fusaricide

ปี 2000 มีรายงานการวิจัยว่าราเอ็นโดไฟต์ *Cytonaema sp.* สามารถผลิตสาร Cytonic acid A และ B (รูปที่ 2.7 ก และ ข) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม tridepside มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของไวรัส human cytomegalovirus (hCMV) (Guo และคณะ, 2000)



(ก) Cytonic acid A

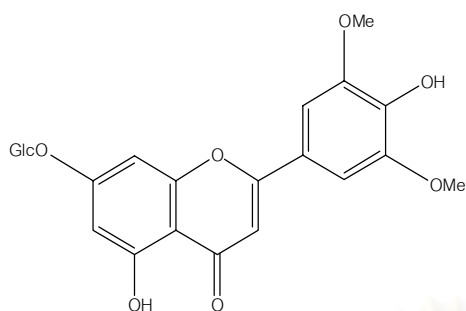


(ข) Cytonic acid B

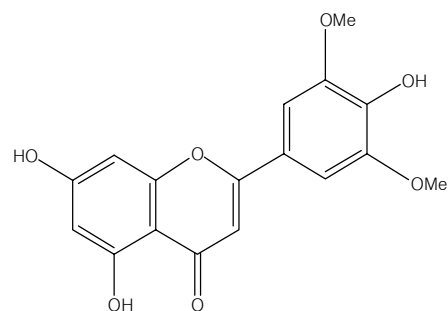
รูปที่ 2.7 (ก) Cytonic acid A และ (ข) Cytonic acid B

2.2.4 สารที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลง (Insecticide Agent)

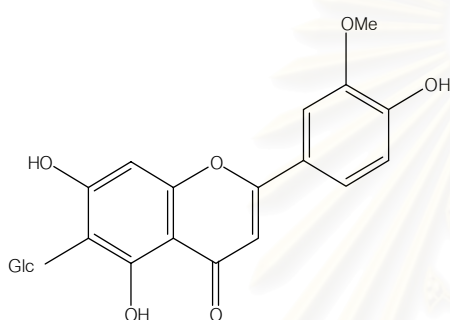
ในปี 1998 มีรายงานการวิจัยว่าพบสารฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ 3 ชนิดคือ 7-O-(β -D-glucopyranosyl) (รูปที่ 2.8 ก) Tricin (รูปที่ 2.8 ข) และ Isoorientin (รูปที่ 2.8 ค) จากราเอ็นโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ใน Blue grass (*Poa ampla*) ซึ่งมีสมบัติในการฆ่าลูกน้ำยุง (Ju และคณะ, 1998)



(ก) 7-O-(β-D-glucopyranosyl)



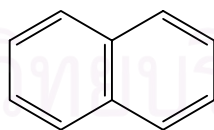
(ข) Tricin



(ค) Isoorientin

รูปที่ 2.8 สารฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่แยกได้จากราเอ็นโดไฟต์ใน Blue grass

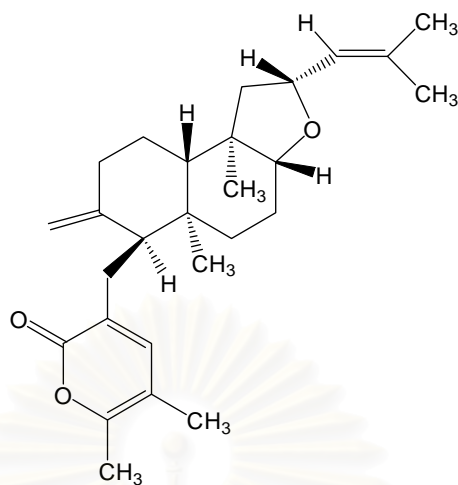
ปี 2002 มีรายงานการวิจัยว่าราเอ็นโดไฟต์ *Muscodor vitigenus* จากต้น *Paullinia paullinioides* ซึ่งสามารถผลิตสาร Naphthalene (รูปที่ 2.9) มีฤทธิ์ในการฆ่าแมลง *Cephus cinctus* (Daisy และคณะ, 2002)



รูปที่ 2.9 Naphthalene

2.2.5 สารที่มีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive Agents)

ในปี 1995 มีรายงานการวิจัยว่าราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium subglutinans* ที่อาศัยอยู่ใน *Triptergium wilfordii* สามารถผลิตสาร Subglutinol A (รูปที่ 2.9) และ B จัดอยู่ในกลุ่ม diterpene มีฤทธิ์เป็น Immunosuppressive (Lee และคณะ 1995)



รูปที่ 2.10 Subglutinol A

นอกจากฤทธิ์ทางชีวภาพและสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่ได้กล่าวมาเป็นตัวอย่างแล้วนั้น ยังมีสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจที่ราเอ็นโดไฟต์ชนิดต่างๆ สร้างขึ้นอีกมากมายหลายชนิด ดังแสดงข้อมูลไว้ในตารางที่ 2.1 และรูปโครงสร้างทางเคมีแสดงในรูปที่ 2.11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 สารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอ็นโดไฟต์

ลำดับ	สารประกอบ	ราเอ็นโดไฟต์	พืชที่ราอาศัย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	รายการอ้างอิง
1	Taxol	<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	Anticancer	Strobel และคณะ, 2003, Stierle และ Strobel, 1995, Stierle และคณะ, 1993, Strobel และ Stierle, 1993
		<i>Stegolerium kukenani</i>	<i>Stegolepis guianensis</i>	Anticancer	Strobel และคณะ, 2001
		<i>Aspergillus niger</i>	<i>Taxus chinensis</i>	Anticancer	Wang และคณะ, 2001
		<i>Tubercularia</i> sp.	<i>Taxus mairei</i>	Anticancer	Strobel และคณะ, 2003, Wang และคณะ, 2000
		<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxus wallachina</i>	Anticancer	Strobel และคณะ, 2003, Metz และคณะ, 2000, Li และคณะ, 1998, Strobel และคณะ, 1996
			<i>Taxodium distichum</i>	Anticancer	Li และคณะ, 1996
		<i>Periconia</i> sp.	<i>Torreya grandifolia</i>	Anticancer	Li และคณะ, 1998
	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	<i>Wollemia nobilis</i>	Anticancer	Strobel และคณะ, 1997	

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ลำดับ	สารประกอบ	ราเอ็นโดไฟต์	พืชที่รื้ออาศัย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	รายการอ้างอิง
2	1,3,5,7 cyclooctatetraene or [8]annulene	<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Eucryphia cordifolia</i>	Antimicrobial	Stinson และคณะ, 2003
3	Lactones 1893 A	Endophytic fungus No.	<i>Kandelia candel</i>	Cytotoxic	Chen และคณะ, 2003
4	Lactones 1893 B	1893			
5	Pestacin	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Rainforest	Antioxidant and antimycotic	Harper และคณะ, 2003
6	7-Butyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pent-11-enylisochroman-1-one	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Crassocephalum crepidioides</i>	Antimalarial, antituberculous and antifungal	Kongsaree และคณะ, 2003
7	7-Butyl-15-enyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pent-11-enylisochroman-1-one				
8	7-Butyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pentylisochroman-1-one				

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ลำดับ	สารประกอบ	ราเอ็นโดไฟต์	พืชที่รื้ออาศัย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	รายการอ้างอิง
9	Brefeldin A	<i>Paecilomyces</i> sp. and <i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Taxus mairei</i> and <i>Torreya grandis</i>	Cytotoxic	Wang และคณะ, 2002
10	Isopestacin	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Terminalia morobensis</i>	Antifungal and antioxidant	Strobel และคณะ, 2002
11	Preaustinoid A	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Melia azedarach</i>	Bacteriostatic	Santos และ Rodrigues-Fo, 2002
12	Preaustinoid B				
13	Alkaloid verruculogen				
14	Ambuic acid	<i>Pestalotiopsis</i> spp., <i>Monochaetia</i> sp.	Rainforests	Antifungal	Li และคณะ, 2001
15	Jesterone	<i>Pestalotiopsis jesteri</i>	<i>Fragraea bodenii</i>	Antioomycete	Li และคณะ, 2001
16	hydrosy-jesterone				
17	Preussomerin G	Mycelia sterila	<i>Atropa belladonna</i>	Antibacterial, antifungal and antialgal	Krohn และคณะ, 2001
18	Preussomerin H				
19	Preussomerin I				

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ลำดับ	สารประกอบ	ราเอ็นโดไฟต์	พืชที่รื้ออาศัย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	รายการอ้างอิง
20	Preussomerin J	Mycelia sterila	<i>Atropa belladonna</i>	Antibacterial, antifungal and antialgal	Krohn และคณะ, 2001
21	Preussomerin K				
22	Preussomerin L				
23	Dicerandrols A	<i>Phomopsis longicolla</i>	<i>Dicerandra frutescens</i>	Antibiotic and cytotoxic	Wagenaar และ Clardy, 2001
24	Dicerandrols B				
25	Dicerandrols C				
26	Microcarpalide	Unidentified endophytic fungus	<i>Ficus microcarpa</i>	Microfilament disrupting agent	Ratnayake และคณะ, 2001
27	Nomofungin	Unidentified endophytic fungus	<i>Ficus microcarpa</i> L.	Microfilament disruptin agent and cytotoxic	Ratnayake และคณะ, 2001
28	Isoprenylindole-3- carboxylic acid	<i>Collectotrichum</i> sp.	<i>Artemisia annua</i>	Antibacterial and antifungal	Lu และคณะ, 2000

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ลำดับ	สารประกอบ	ราเอ็นโดไฟต์	พืชที่รื้ออาศัย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	รายการอ้างอิง
29	3beta,5alpha-Dihydroxy-6beta-acetoxy-ergosta-7,22-diene	<i>Collectotrichum</i> sp.	<i>Artemisia annua</i>	Antibacterial and antifungal	Lu และคณะ, 2000
30	3beta,5alpha-Dihydroxy-6beta-phenylacetyloxy-ergosta-7,22-diene				
31	Indole-3-acetic acid (IAA)	<i>Epichloe/Neotyphodium</i> spp.	Grasses	Antifungal	Yue และคณะ, 2000
32	Indole-3-ethanol (IEtOH)				
33	Methylindole-3-carboxylate				
	Indole-3-carboxaldehyde				
34	Diacetamide				
35	Cyclonerodiol				
36					
37	Colletotric acid	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Artemisia mongolica</i>	Antimicrobial	Zou และคณะ, 2000

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ลำดับ	สารประกอบ	ราเอ็นโดไฟต์	พืชที่รื้ออาศัย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	รายการอ้างอิง
38	CR377, pentaketide	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Selaginella pallescens</i>	Antifungal	Brady และ Clardy, 2000
39	Cytochalasin 1	<i>Rhinocladiella</i> sp.	<i>Tripterygium wilfordii</i>	Cytotoxic	Wagenaar และคณะ, 2000
40	Cytochalasin 2				
41	Cytochalasin 3				
42	Cytochalasin E				
43	Cryptocandin	<i>Cryptosporiopsis</i> cf. <i>quercina</i>	<i>Tripterigeum wilfordii</i>	Antimycotic	Strobel และคณะ, 1999
44	Geniculol	<i>Geniculosporium</i> sp.	<i>Teucrium scorodania</i>	Antialgal	Konig และคณะ, 1999
45	Cytochalasin F				
46	Sequoiatones A	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Sequoia sempervirens</i>	Antitumor	Stierle และคณะ, 1999
47	Sequoiatones B				
48	Terpendole M	<i>Neotyphodium lolii</i>	<i>Lolium perenne</i>	neurotoxins	Gatenby และคณะ, 1999
49	Tricin (1)	<i>Neotyphodium typhnium</i>	<i>Poa ampla</i>	Insecticidal	Ju และคณะ, 1998
50	7-O-(β -D-glucopyranosyl) tricin				
51	Isorientin (3)				

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

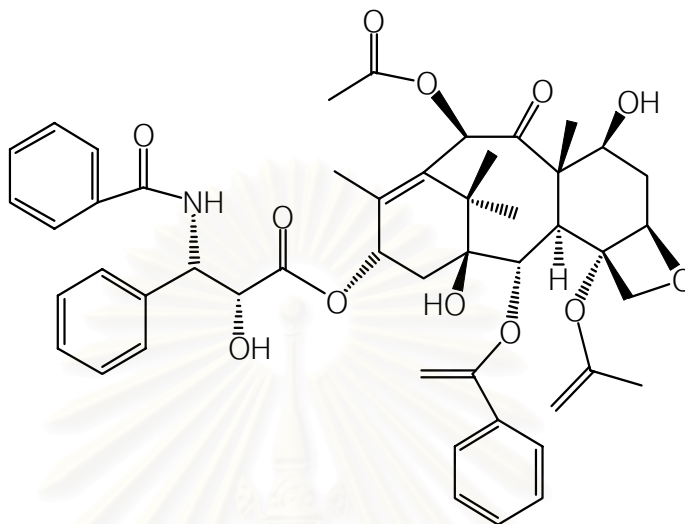
ลำดับ	สารประกอบ	ราเอ็นโดไฟต์	พืชที่รื้ออาศัย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	รายการอ้างอิง
52	7-O-[α -L-Rhamnopyranosyl(1-6)- β -D-glucopyranosyl]tricin	<i>Neotyphodium typhnium</i>	<i>Poa ampla</i>	Insecticidal	Ju และคณะ, 1998
53	Lolitrein B	<i>Acremonium lolii</i>	<i>Lolium perenne</i>	Neurotoxic	Berny และคณะ, 1997
54	Leucinostatin A	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Taxus baccata</i>	Antifungal and anticancer	Strobel และคณะ, 1997
55	Oreganic acid (1)	Endophytic fungus (MF 6046)	<i>Berberis oregana</i>	Anticancer	Jayasuriya และคณะ, 1996
56	Trimethylester (2)				
57	Desulfated analog (3)				
58	Desulfated analog (4)				
59	Pestalotiopsins A	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Taxus brevifolia</i>	-	Pulici และคณะ, 1996
60	Pestalotiopsins B				
61	(R)-mellein	<i>Pezizula</i> sp.	Deciduous and coniferous trees	Fungicidal, herbicidal, algicidal and antibacterial	Schulz และคณะ, 1995
62	(-)-mycorrhizin A				

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

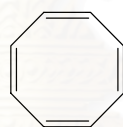
ลำดับ	สารประกอบ	ราเอ็นโดไฟต์	พืชที่รื้ออาศัย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	รายการอ้างอิง
63	2-methoxy-4-hydroxy-6-methoxymethyl-benzaldehyde	<i>Pezizula</i> sp.	Deciduous and coniferous trees	Fungicidal, herbicidal, algicidal and antibacterial	Schulz และคณะ, 1995
64	(+)-cryptosporiopsin				
65	4-epi-ethiosolide				
66	Altersolanol A	<i>Phoma</i> sp.	<i>Taxus wallachiana</i>	Antibacterial	Yang และคณะ, 1994
67	2-hydroxy-6-methylbenzoic acid				
68	Preussomerin D	<i>Hormonema dematioides</i>	Conifer wood	Antifungal	Polishook และคณะ, 1993
69	Lolitrem C	<i>Acremonium lolii</i>	<i>Lolium perenne</i>	Neurotoxic and insect antifeedant	Rowan และคณะ, 1993
70	Peramine R=H				
71	Diacetylperamine R=Ac				
72	Paxilline				
73	Loline alkaloid				
74	Ergovaline				

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

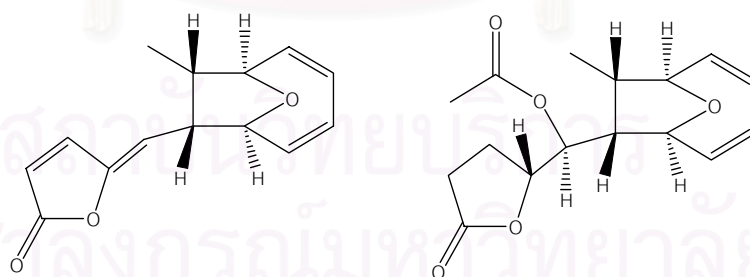
ลำดับ	สารประกอบ	ราเอ็นโดไฟต์	พืชที่รอาศัย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	รายการอ้างอิง
75	Lysergic acid	<i>Acremonium coenophialun</i>	<i>Festuca arundinacea</i>	Toxin	Garner และคณะ, 1993
76	Isolysergic acid				
77	Pospalic acid				
78	Lysergol				
79	Lysergic acid amide				
80	Lysergic acid diethyl- amide				
81	Lycergic acid-2- propanolamide or (Ergonovine)				



Taxol



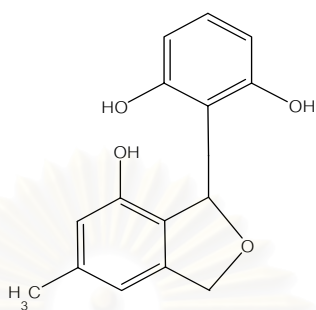
1,3,5,7 cyclooctatetraene or (8)-annulene



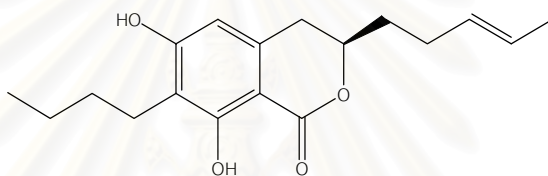
Lactones 1893 A

Lactones 1893 B

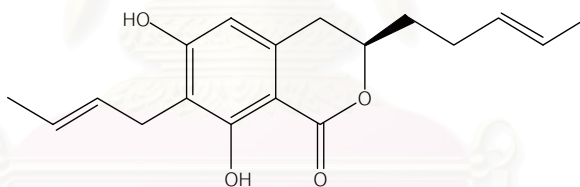
รูปที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของสารทุติยภูมิที่สร้างโดยราเอ็นโดไฟต์ชนิดต่างๆ



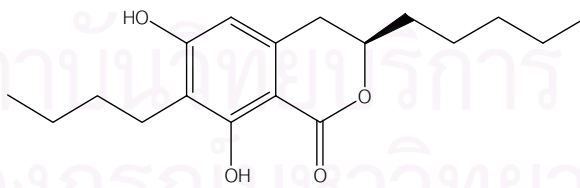
Pestacin



7-Butyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pent-11-enylisochroman-1-one



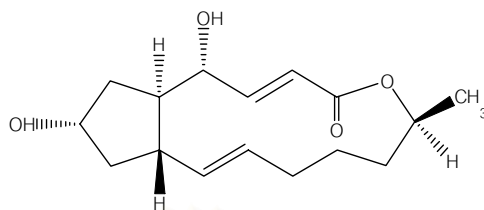
7-Butyl-15-enyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pent-11-enylisochroman-1-one



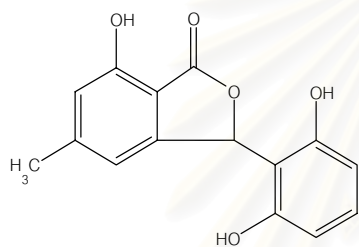
7-Butyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pentylisochroman-1-one

Dihydroisocumarins [6-8]

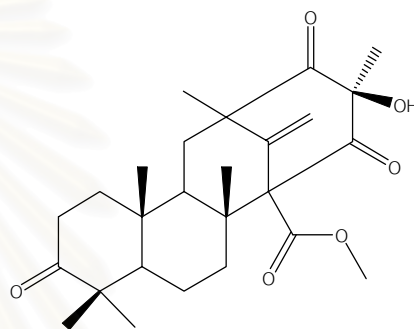
รูปที่ 2.11 (ต่อ)



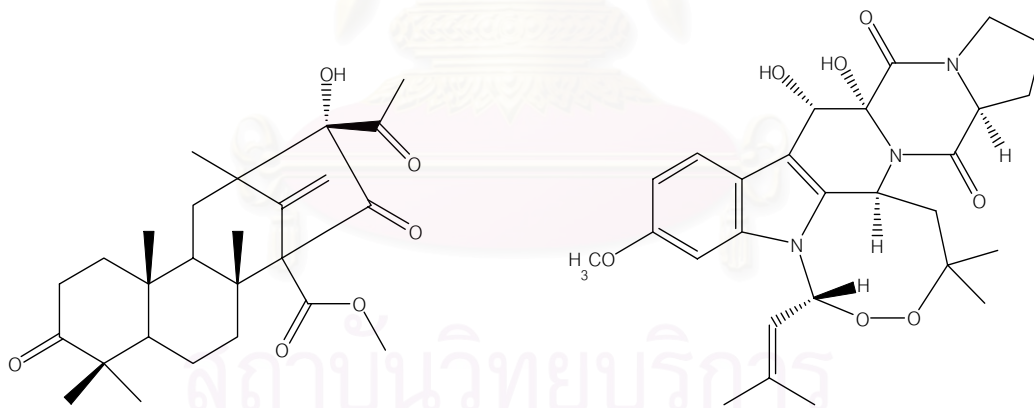
Brefeldin A



Isopestacin



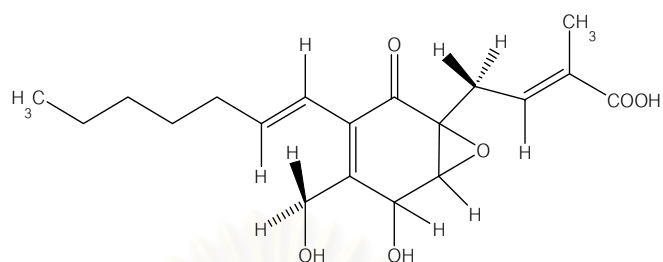
Preaustinoid A



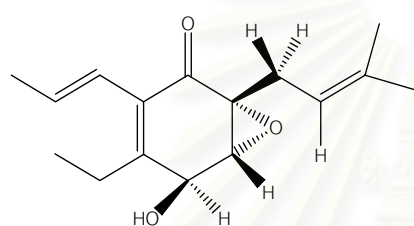
Preaustinoid B

Alkaloid verruculogen

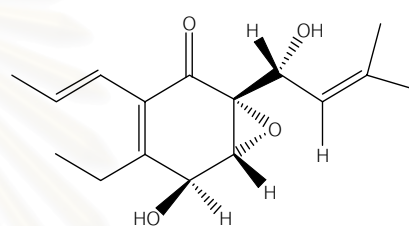
รูปที่ 2.11 (ต่อ)



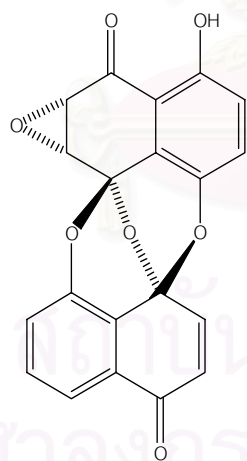
Ambuic acid



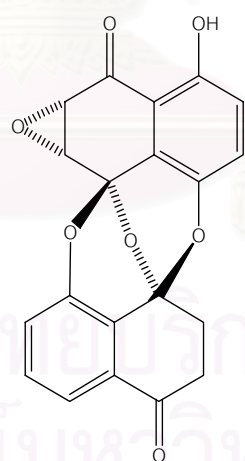
Jesterone



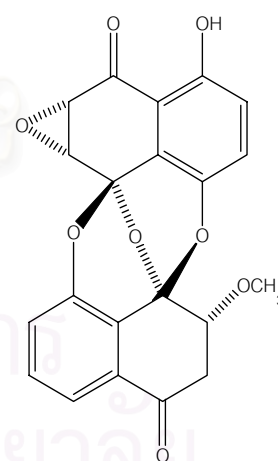
Hydroxy-jesterone



Preussomerin G

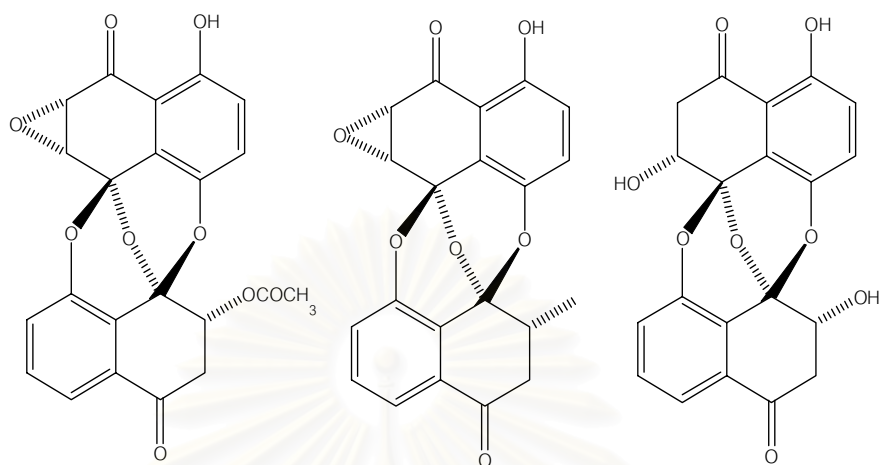


Preussomerin H



Preussomerin I

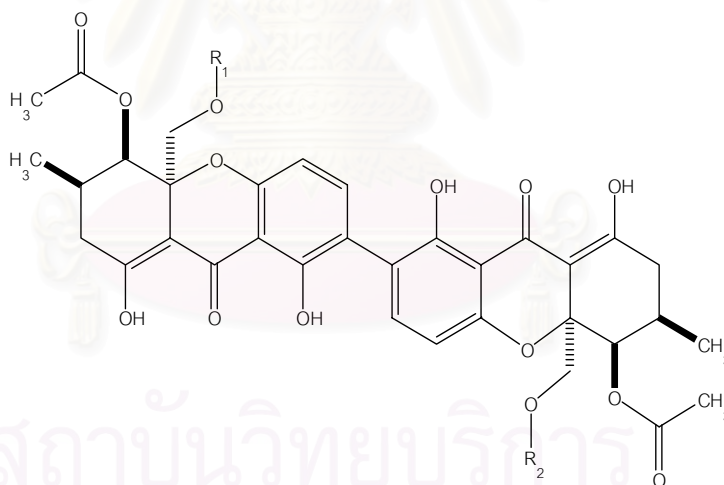
รูปที่ 2.11 (ต่อ)



Preussomerin J

Preussomerin K

Preussomerin L

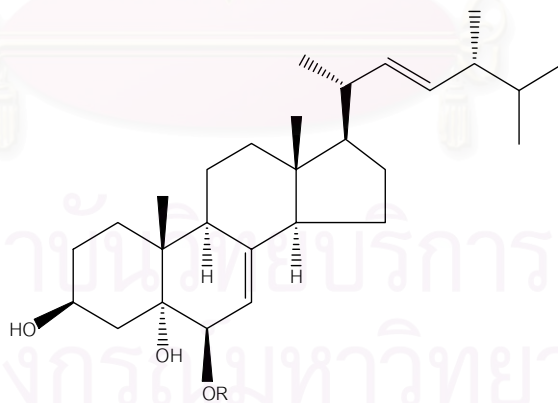
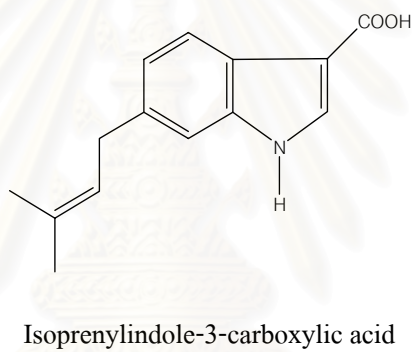
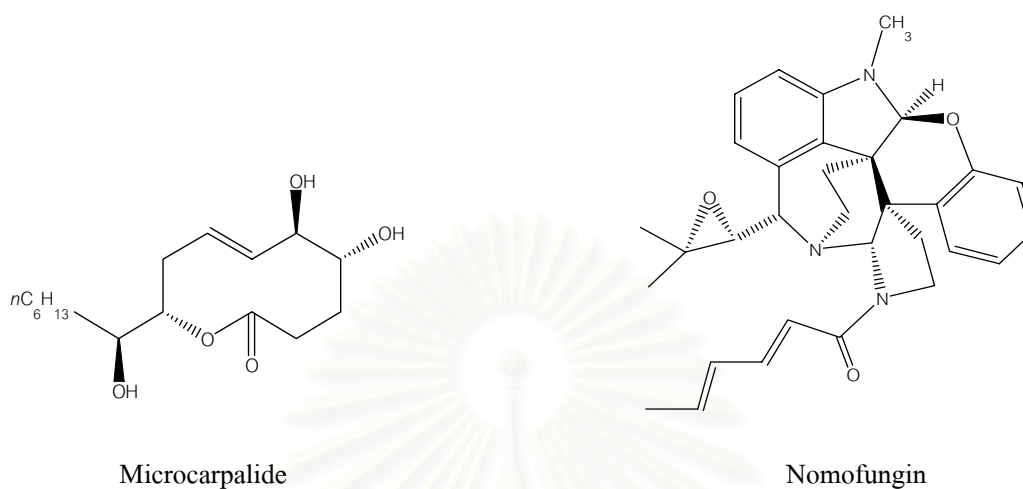


Dicerandrols A, R1=R2=H

Dicerandrols B, R1=Ac, R2=H

Dicerandrols C, R1=R2=Ac

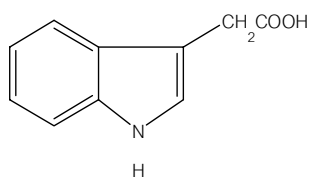
รูปที่ 2.11 (ต่อ)



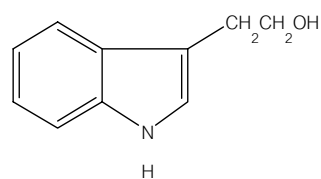
3beta, 5alpha-Dihydroxy-6beta-acetoxy-ergosta-7, 22-diene, R=COCH₃

3beta, 5alpha-Dihydroxy-6beta-phenylacetyloxy-ergosta-7, 22-diene, R=COCH₂C₆H₅

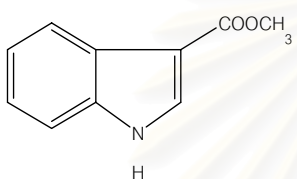
รูปที่ 2.11 (ต่อ)



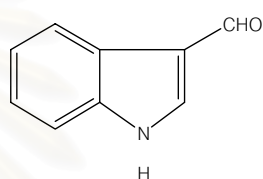
Indole-3-acetic acid (IAA)



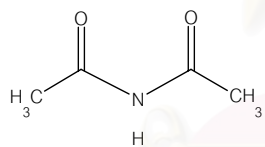
Indole-3-ethanol (IEtOH)



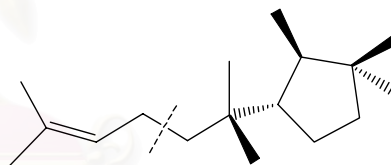
Methylindole-3-carboxylate



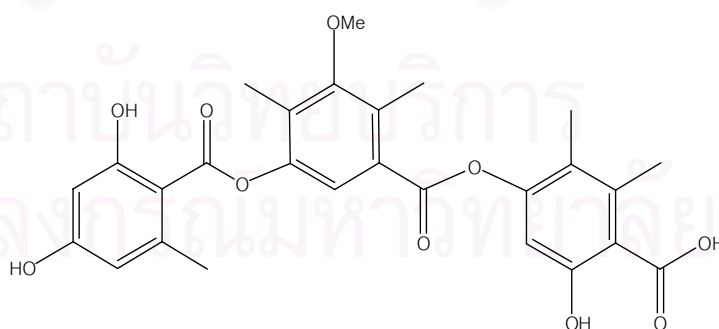
Indole-3-carboxaldehyde



Diacetamide

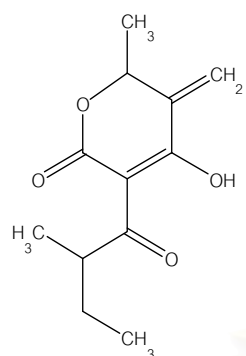


Cyclonerodiol

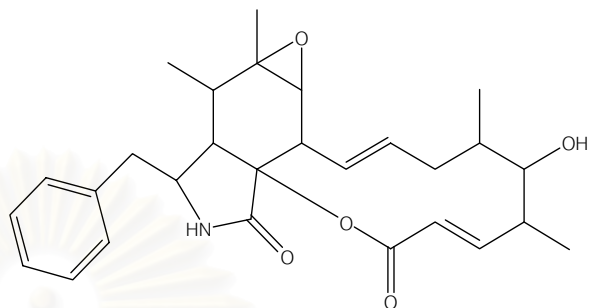


Colletotric acid

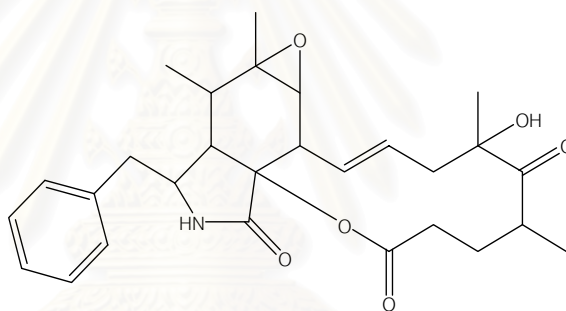
รูปที่ 2.11 (ต่อ)



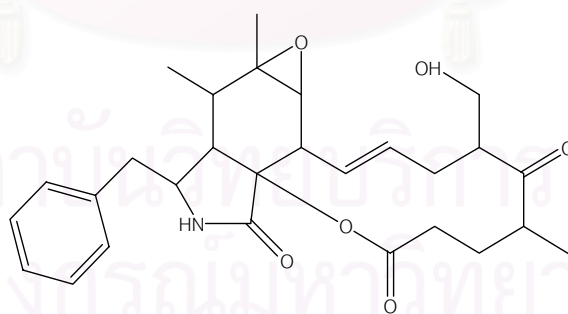
CR377, pentaketide



Cytochalasin 1

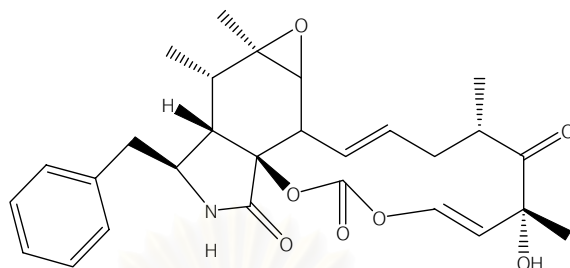


Cytochalasin 2

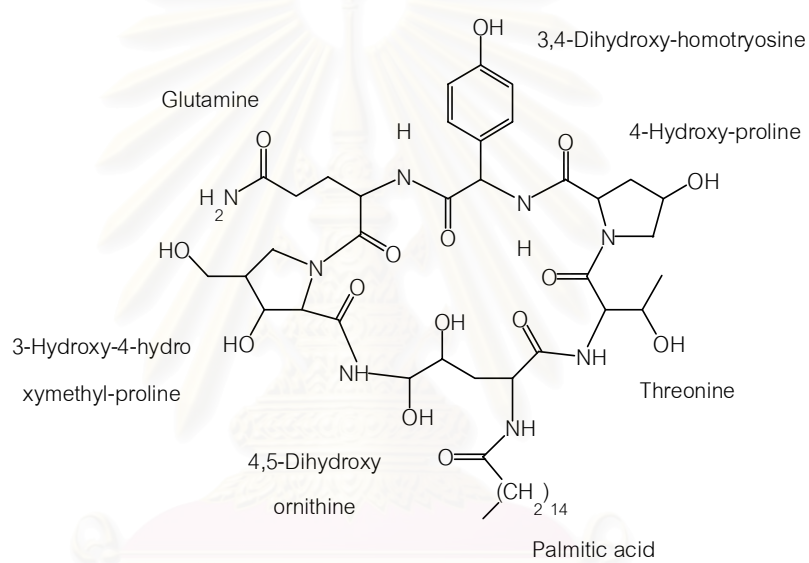


Cytochalasin 3

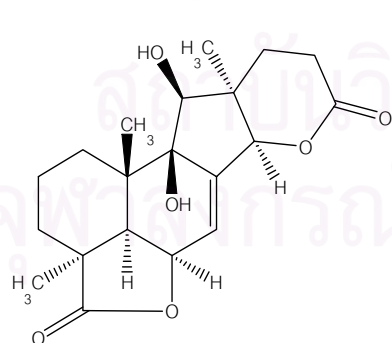
รูปที่ 2.11 (ต่อ)



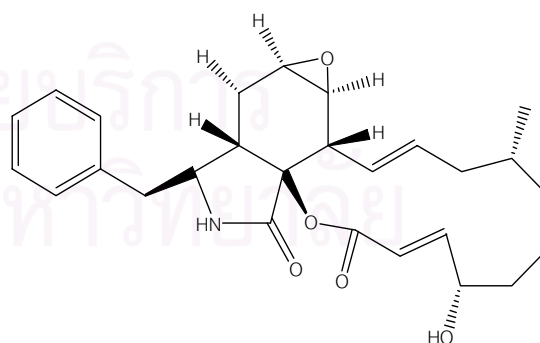
Cytochanlasiin E



Cryptocandin

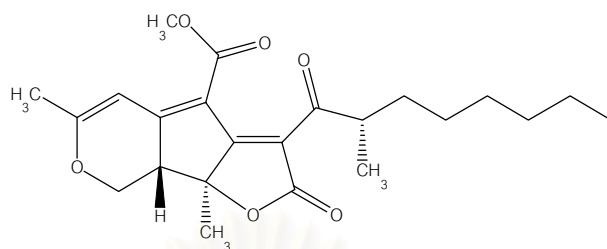


Geniculol

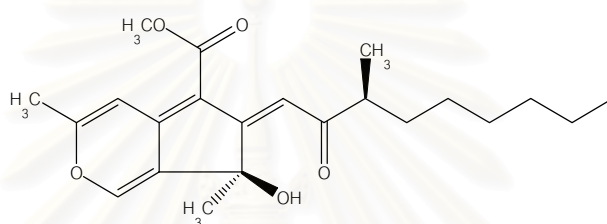


Cytochalasin F

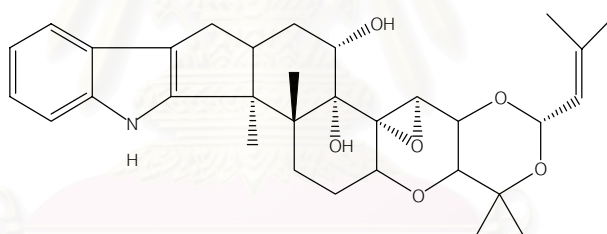
รูปที่ 2.11 (ต่อ)



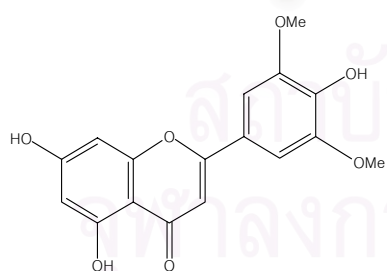
Sequoiatones A



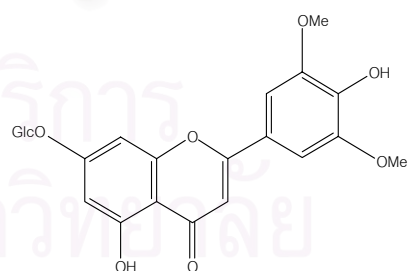
Sequoiatones B



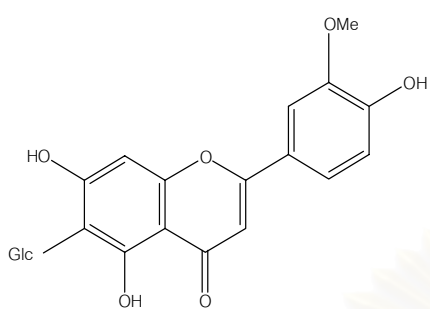
Terpendole M



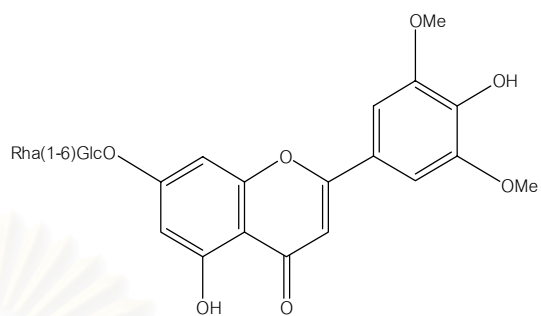
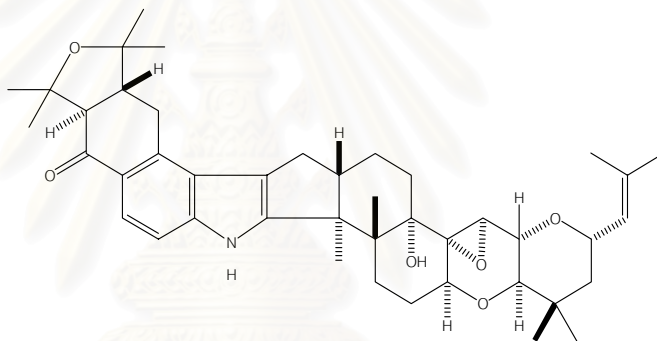
Tricin

7-O-(β -D-glucopyranosyl)tricin

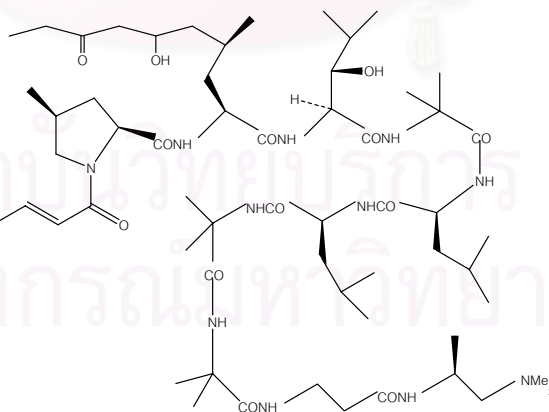
รูปที่ 2.11 (ต่อ)



Isoorientin

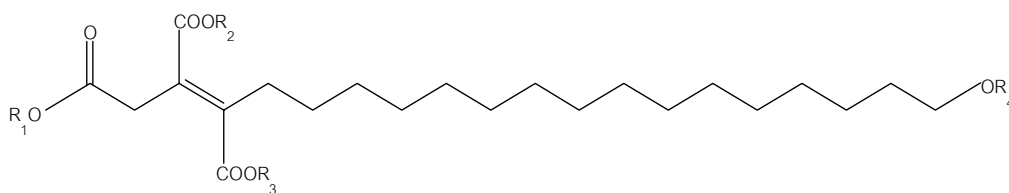
7-O-[\alpha-L-Rhamnopyranosyl(1-6)-
 β -D-glucopyranosyl]tricin

Lolitre B



Leucinostatin A

รูปที่ 2.11 (ต่อ)

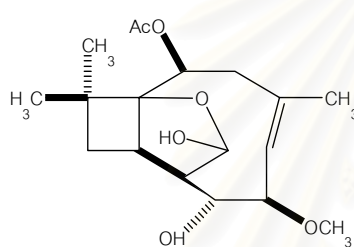


1: Oreganic acid, R1=R2=R3=H, R4=SO3H

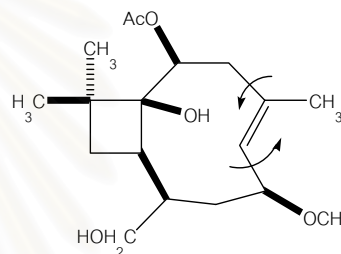
2: Trimethylester, R1=R2=R3=CH3, R4=SO3H

3: Desulfated analog, R1=R2=R3=CH3, R4=H

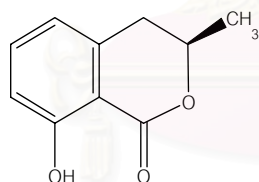
4: Desulfated analog, R1=R2=R3=R4=H



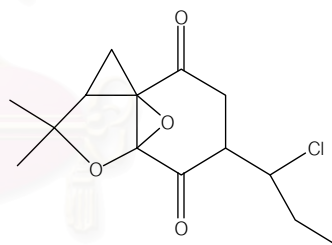
Pestalotiopsins A



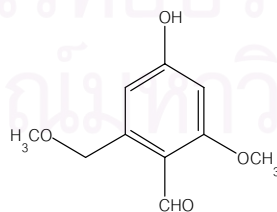
Pestalotiopsins B



(R)-mellein

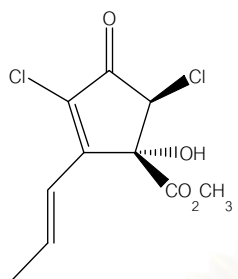


(-)-mycorrhizin A

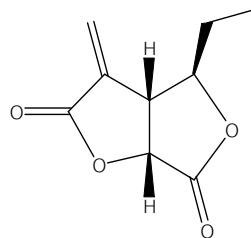


2-methoxy-4-hydroxy-6-methoxymethyl-benzaldehyde

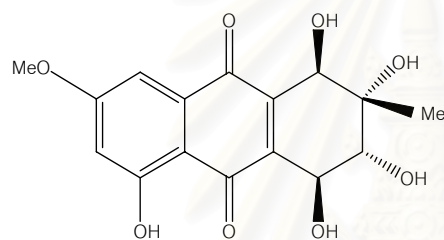
รูปที่ 2.11 (ต่อ)



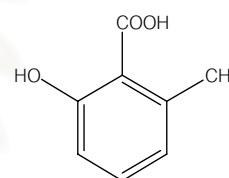
(+)-cryptosporiopsin



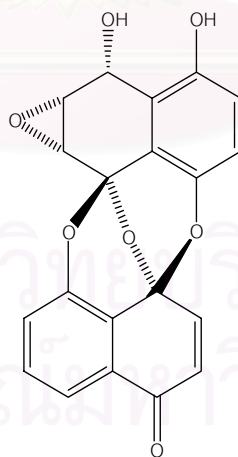
4-epi-ethiosolide



Altersolanol A

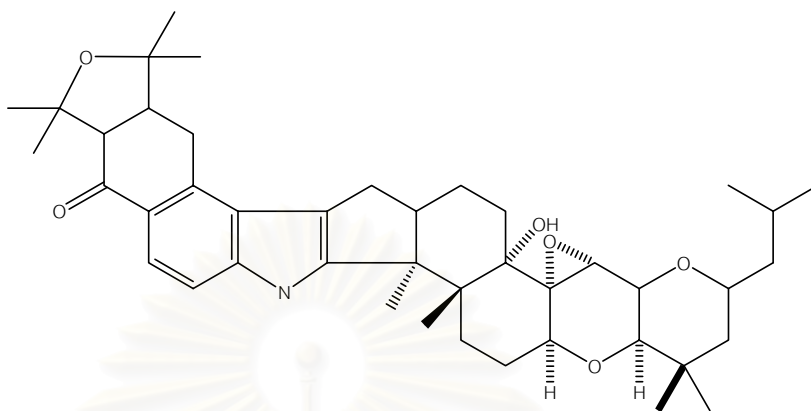


2-hydroxy-6-methyl benzoic acid

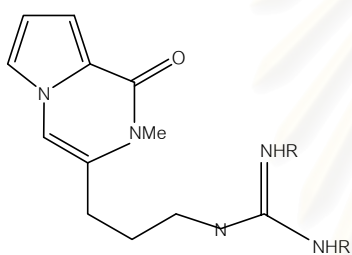


Preussomerin D

รูปที่ 2.11 (ต่อ)

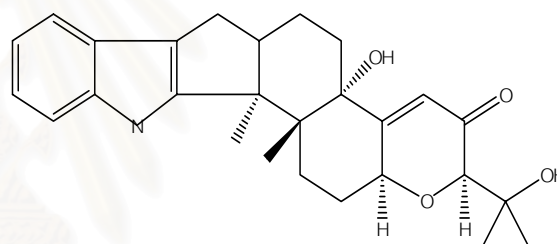


Lolitrem C

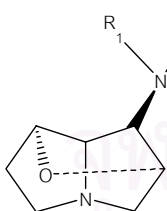
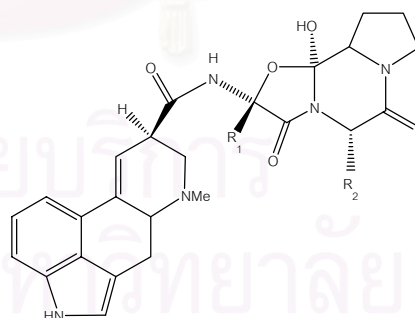


Peramine R=H

Diacetylperamine R=Ac



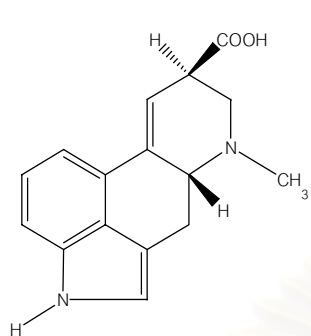
Paxilline

Loline alkaloid, $R_1=H, Me,$ $R_2= H, HCO, Ac$ 

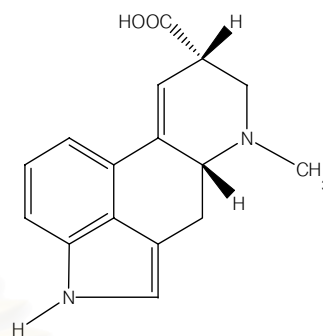
Ergopeptine alkaloids

Ergovaline $R_1=Me, R_2=i-Pr$

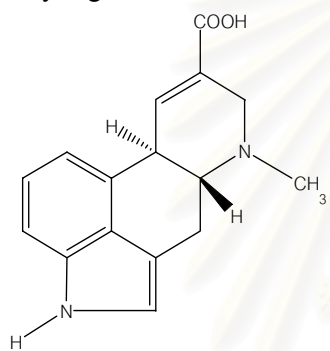
รูปที่ 2.11 (ต่อ)



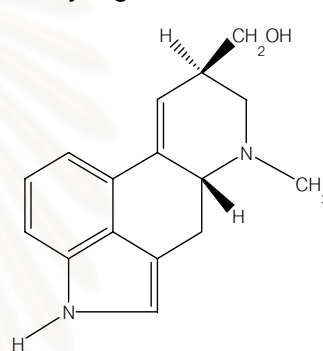
Lysergic acid



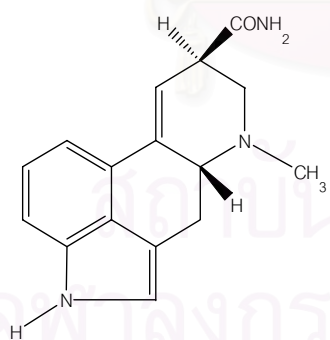
olysergic acid



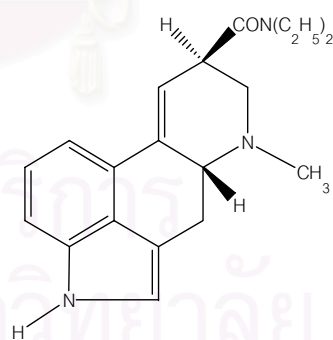
Paspalic acid



Lysergol

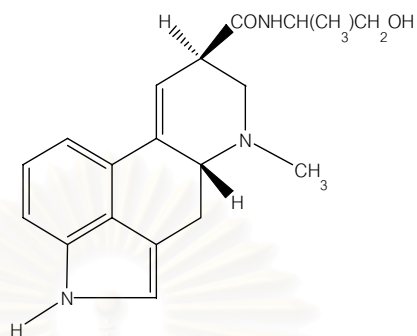


Lysergic acid amide



Lysergic acid diethyl amide

รูปที่ 2.11 (ต่อ)



Lysergic acid-2-propanolamide (Ergonovine)

รูปที่ 2.11 (ต่อ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 ต้นกระท้อน (Santol)

2.3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กระท้อน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sandoricum koetjape* จัดอยู่ในวงศ์ Meliaceae กระท้อนพบได้ทั่วไปในประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบในประเทศอื่นๆ ในเขตร้อนของเอเชีย เช่น อินเดียตอนใต้ ศรีลังกา พม่า ภูมิภาคอินโดจีน และภูมิภาคมาเลเซีย กระท้อนมีชื่อสามัญว่า Santol, Sentul, Red Santol และ Yellow Santol มีชื่อเรียกตามท้องถิ่นของไทยว่า กระท้อน เตียน ล่อน สะท้อน(ภาคใต้) มะต๋อง (ภาคเหนือ, อูรธานี) มะคั้ง(ภาคเหนือ) สติยา สะตุ(มลายู-นราธิวาส) สะโต(มลายู-ปัตตานี)

กระท้อน (รูปที่ 2.11) เป็น ไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ สูง 15-30 เมตร เรือนยอดเป็นพุ่มกลมแน่นทึบ แตกกิ่งต่ำ ปลายกิ่งลู่ลง เปลือกสีน้ำตาลอ่อนอมชมพู ใบประกอบ แบบขนนกมีใบย่อยสามใบ เรียงเวียนสลับ ใบย่อยรูปไข่ หรือรูปรี ช่อดอกแบบช่อแยกแขนง ยาว 4-16 ซม. ออกตามง่ามใบใกล้ปลายกิ่ง มีขนสีเหลืองทั่วไป ดอกเล็กสีเขียวอมเหลือง มีจำนวนมาก กลีบเลี้ยง 5 กลีบ กลีบดอก 5 กลีบ รูปขอบขนาน ยาว 4-5 มม. แยกกันเป็นอิสระ ผลใหญ่ กลมแป้น น้ำน้ำ เส้นผ่านศูนย์กลาง 6-10 ซม. เปลือกมีขนนุ่ม เนื้อหนานุ่ม มียางสีขาวเล็กน้อย ผลสุกผิวสีเหลืองนวล กลิ่นหอม มี 3-4 เมล็ด เมล็ดมีเนื้อหนาเป็นปุยสีขาวหุ้ม รสเปรี้ยว หรือหวาน (สถาบันการแพทย์แผนไทยกรมการแพทย์กระทรวงสาธารณสุข, 2542)



รูปที่ 2.12 ต้นกระท้อน

2.3.2 สรรพคุณทางยา

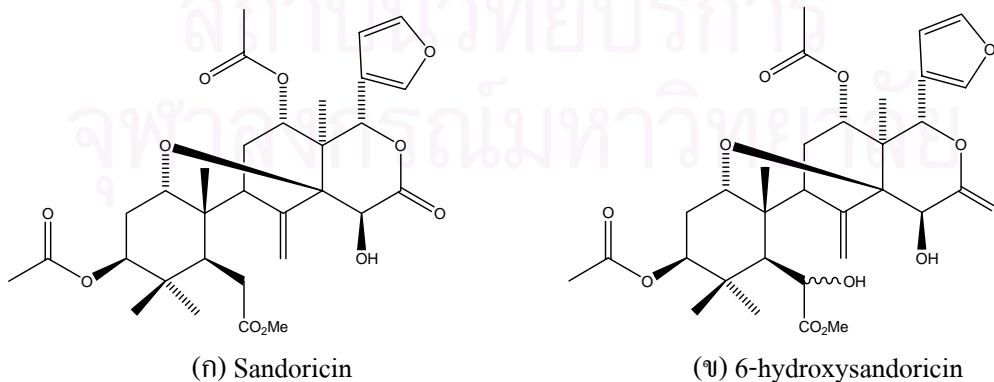
สรรพคุณของกระถ่อนที่ใช้เป็นสมุนไพรไทยคือ ราก มีสรรพคุณแก้ท้องร่วง บิดมูกเลือด ถอนพิษไข้ ดับพิษร้อนใน ไบสด ไข้จับเหวี่ยง ต้มน้ำอาบแก้ไข้ เปลือก ใช้รักษาโรคผิวหนัง ผล เป็นยาฝาดสมาน(สถาบันการแพทย์แผนไทยกรมการแพทย์กระทรวงสาธารณสุข, 2542)

2.3.3 สารเคมีที่สำคัญ

มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกระถ่อนพบว่า ในเปลือกผลมีสาร bryononic acid, bryonolic acid, mesoinositol และ dimethyl mucate (Kim และ Lee,1972) ในแก่นไม้มีสาร triterpenoid acid, katiconic acid และ indicic acid (King และ Morgan,1960)ในเมล็ดมีสาร limonoids (Powell และคณะ,1991) ในเปลือกไม้มีสาร koetjape acid, 3-oxo-olean-12-en-29-oic acid, (-)-alloaromadendrene, (-)-caryophyllene oxide และ (+)-spathulenol (Kaneda และคณะ, 1992) และพบสาร triterpenoids ชนิด secomultiflorane อีกสองตัวคือ secobryononic acid และ secoisobryononic acid (Kosela และคณะ, 1995) อีกด้วย

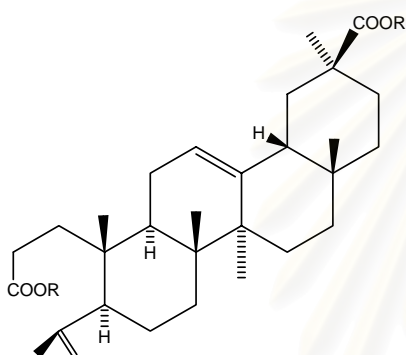
2.3.4 งานวิจัยเกี่ยวกับต้นกระถ่อน

ปี 1991 มีรายงานการวิจัยว่าสารกลุ่ม limonoids ได้แก่ sandoricin (รูปที่ 2.13 ก) และ 6-hydroxysandoricin (รูปที่ 2.13 ข) ที่สกัดจากเมล็ดกระถ่อนมีฤทธิ์ยับยั้งการกิน (antifeedants) เมื่อนำสารนี้ไปผสมในอาหารสังเคราะห์ให้ของแมลง armyworm (*Spodoptera frugiperda*) และ ตัวอ่อนของแมลง European corn borer (*Ostrina nubilalis*) (Richard และคณะ, 1991)

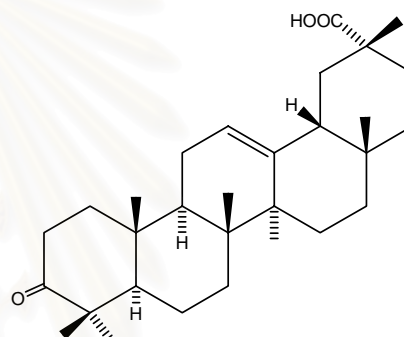


รูปที่ 2.13 แสดงโครงสร้างของสาร (ก) Sandoricin และ (ข) 6-hydroxysandoricin

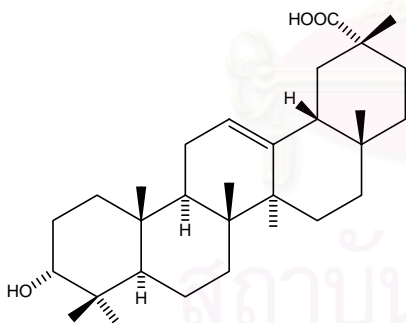
ปี 1992 มีรายงานการวิจัยว่าสามารถสกัดสารกลุ่ม Triterpenes ได้แก่ secotriterpene (koetjapic acid) (รูปที่ 2.14 ก) 3-oxo-olean-12-en-29-oic acid (รูปที่ 2.14 ข) katiconic acid (รูปที่ 2.14 ค) (-)-alloaromadendrene, (-)-caryophyllene oxide และ (+)-spathulenol จากต้นกระท้อนและนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง P-388 (murine lymphocytic leukemia) พบว่ามีสาร 2 ตัวคือ 3-oxo-olean-12-en-29-oic acid และ katiconic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งดังกล่าว (Kaneda และคณะ, 1992)



(ก) koetjapic acid



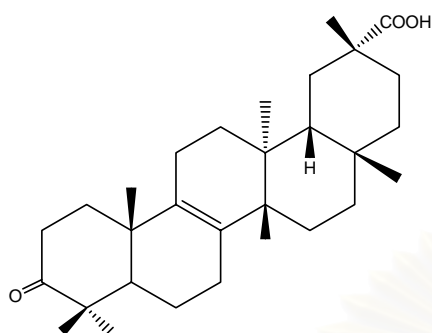
(ข) 3-oxo-olean-12-en-29-oic acid



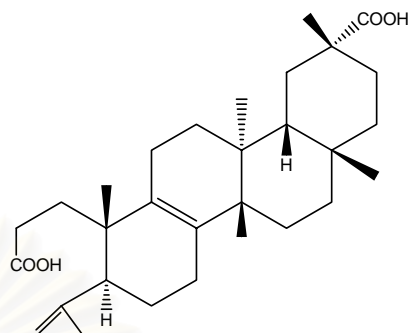
(ค) katiconic acid

รูปที่ 2.14 แสดง โครงสร้างของสาร (ก) koetjapic acid (ข) 3-oxo-olean-12-en-29-oic acid และ (ค) katiconic acid

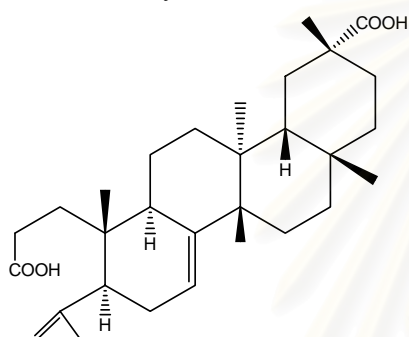
ปี 1995 มีรายงานการวิจัยว่า สามารถแยกสาร bryononic acid (รูปที่ 2.15 ก), secobryononic acid (รูปที่ 2.15 ข) และ secoisobryononic acid (รูปที่ 2.15 ค) จากเปลือกไม้ต้นกระท้อน (Kosela และคณะ, 1995)



(ก) bryononic acid



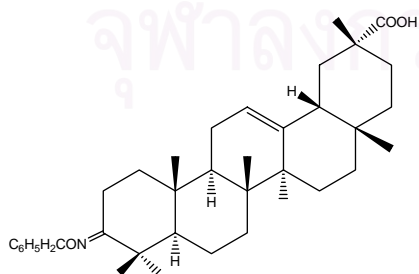
(ข) secobryononic acid



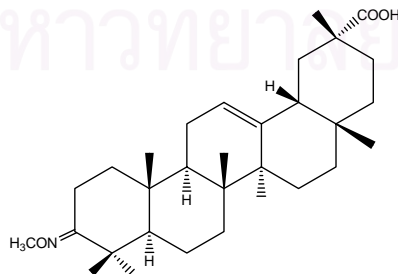
(ค) secoisobryononic acid

รูปที่ 2.15 แสดงโครงสร้างของสาร (ก) bryononic acid (ข) secobryononic acid และ (ค) secoisobryononic acid

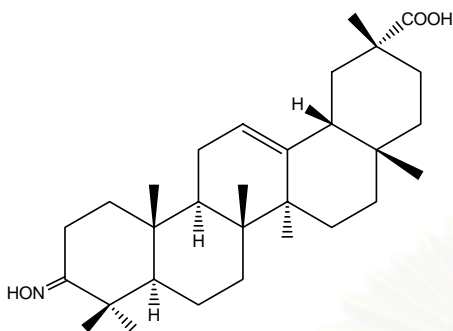
ปี 1999 มีรายงานการวิจัยว่า สารอนุพันธ์ของ 3-oxo-olean-12-en-29-oic acid ได้แก่ 3-benzyloximo-olean-12-en-29-oic acid (รูปที่ 2.16 ก), 3-methyloximo-olean-12-en-29-oic acid (รูปที่ 2.16 ข) และ 3-oximo-olean-12-en-29-oic acid (รูปที่ 2.16 ค) มีฤทธิ์ในการยับยั้ง DNA polymerase β (Sun และคณะ, 1999)



(ก) benzyloximo-olean-12-en-29-oic acid



(ข) 3-methyloximo-olean-12-en-29-oic acid



(ค) 3-oximo-olean-12-en-29-oic acid

รูปที่ 2.16 แสดงโครงสร้างของสาร (ก) Benzyloximo-olean-12-en-29-oic acid

(ข) 3-Methyloximo-olean-12-en-29-oic acid และ (ค) 3-Oximo-olean-12-en-29-oic acid

ปี 2001 มีรายงานการวิจัยว่า สามารถแยกสาร 12β -hydroxymultiflorane triterpenoid acids ได้แก่สาร Sandorinic acids A, B และ C จากเปลือกไม้ต้นกระท้อน นำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยา lymphocyte proliferation พบว่ามีสาร 2 ตัวคือ Sandorinic acids A และ B มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาดังกล่าว (Tanaka และคณะ, 2001)

ปี 2003 มีรายงานการวิจัยว่า สามารถแยกสาร Trijugin-type limonoids ได้แก่ sandrapins A, B และ C จากใบกระท้อน (Intan และคณะ, 2003)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 Ultraviolet-visible Spectrophotometer (UV-VIS)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Varian Cary 50 Probe

3.1.2 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR)

เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) ของบริษัท Nicolet Impact รุ่น 410 สำหรับวัดอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร สารตัวอย่างที่เป็นของแข็งตรวจวัดโดยบดผสมกับโปตัสเซียมโบรไมด์ (KBr) แล้วอัดเป็นแผ่น (pellet) เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร หนา ประมาณ 1 มิลลิเมตร

3.1.3 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR)

เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (nuclear magnetic resonance, NMR) รุ่น Varian Mercury 400 NMR สำหรับการวิเคราะห์โปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ โดยวัดค่าเคมีคัลชิฟท์เป็นพีพีเอ็ม (ppm) สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยละลายในสารละลาย deuterated chloroform (CDCl_3) หรือเมทานอล-ดี (MeOH-d_4) โดยวิเคราะห์สเปกตรัมของ $^1\text{H-NMR}$ ที่ 400 MHz และอ้างอิงกับค่าเคมีคัลชิฟท์ของตัวทำละลายที่ตกค้างอยู่ใน CDCl_3 ที่ค่าเคมีคัลชิฟท์ (δ) 7.26 (s) ppm และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่ 100 MHz ที่อ้างอิงกับตัวทำละลายที่ตกค้างอยู่ใน CDCl_3 ที่มีค่าเคมีคัลชิฟท์ (δ) 77.1 (t) ppm

3.1.4 Mass spectrometer

สำหรับใช้ในการหามวลโมเลกุลของสารประกอบวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High resolution electrospray true of flight (HRES/TOF) Mass Spectrometer รุ่น LCT บริษัท Micromass UK Limited

3.1.5 จุดหลอมเหลว (Melting Point)

สำหรับการหาจุดหลอมเหลวใช้เครื่อง Stuart scientific melting pointing point SMP1 apparatus

3.1.6 Rotary Vacuum Evaporator

เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ของบริษัท Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.7 Specific Optical Rotation

Polarimeter รุ่น 341 โดยใช้ sodium lamp ที่ความยาวคลื่น 589 นาโนเมตร ของบริษัท Perkin-Elmer

3.2 สารเคมี

3.2.1 ตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน เอทิลเอซิเตตและเมทานอล เป็นตัวทำละลายชั้นคุณภาพอุตสาหกรรม (commercial grade) โดยตัวทำละลายแต่ละชนิดนำไปกลั่นให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง และใช้ตัวละลายชั้นคุณภาพห้องแลปเพื่อการตกผลึกสาร

3.2.2 สารเคมีชนิดอื่นๆ

1. ตัวดูดซับสำหรับ column chromatography ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60G F₂₅₄ Art. 7730 ของบริษัท E.Merck

2. TLC aluminum sheets รุ่น silica gel 60G F₂₅₄ ของบริษัท E.Merck ขนาด 20x20 ซม.หนา 0.2 มิลลิเมตร สำหรับเทคนิคทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี

3. ตรวจหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC โดยส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือนำแผ่น TLC ไปส่องในภาชนะที่อ้อมตัวด้วยไอของไอโอดีน หรือพ่นด้วย vanillin/H₂SO₄ พอให้สารซึมเข้าแผ่น TLC จนทั่ว แล้วนำแผ่น TLC ไปให้ความร้อนจนปรากฏจุดของสารบนแผ่น TLC (สารละลาย vanillin/H₂SO₄ ประกอบด้วย เอทานอล 95 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 4.5 มิลลิลิตร)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potatoes Dextrose Agar (PDA) และ Malt Extract Agar (MEA) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้ต่อเชื้อแบคทีเรียและราทดสอบนั้น จะเลี้ยงราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้ในอาหาร 6 ชนิดได้แก่ Potatoes Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Yeast Extract Sucrose Agar (YES), Cornmeal Agar (CMA), Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) และ Glucose Yeast Extract Agar (GYEA) ส่วนเชื้อแบคทีเรียทดสอบจะเลี้ยงในอาหาร Nutrient agar (NA) and nutrient broth (NB) และอาหาร Yeast-malt extract medium agar (YMA) and Yeast-malt extract medium broth (YMB) สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในภาคผนวก ก

3.4 การเก็บตัวอย่างใบกระท้อน

เก็บตัวอย่างใบกระท้อนที่มีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง ไม่เป็นโรค จากจังหวัดจันทบุรี บรรจุในถุงพลาสติกปิดสนิท และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ในตู้เย็น ก่อนทำการแยกเชื้อราภายใน 24-48 ชั่วโมง

3.5 การแยกราเอ็นโดไฟต์จากใบกระท้อน

นำตัวอย่างใบกระท้อนที่เก็บมาล้างน้ำทำความสะอาด ตัดใบกระท้อนให้เป็นชิ้นขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร แล้วฆ่าเชื้อที่ผิวโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Blodgett (2000) ดังนี้ นำส่วนใบที่ตัดเป็นชิ้นแล้วไปแช่ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรต์ที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และสุดท้ายแช่ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ อีก 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วซับให้แห้งบนกระดาษที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำส่วนใบกระท้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °C) แล้วสังเกตการงอกของเส้นใยของเชื้อราออกมาจากเนื้อเยื่อส่วนใบกระท้อน ทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ เมื่อพบว่ามีเส้นใยของราเอ็นโดไฟต์เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อส่วนใบกระท้อน จึงเขี่ยส่วนปลายเส้นใยของเชื้อราไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) จนได้เชื้อบริสุทธิ์ต่อไป

3.6 การคัดกรองหาเอ็นโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

นำราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราดังแสดงในตาราง 3.1 ด้วยเทคนิค Agar-well Diffusion Method (Jorgensen และคณะ, 1999)

ตาราง 3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ทดสอบ		สายพันธุ์
แบคทีเรีย	แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
	แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
รา	ยีสต์ (ราไม่สร้างเส้นใย)	<i>Candida albicans</i> ATTC 10231

เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่นำมาใช้ทดลอง จะต้องวัดความขุ่นของเชื้อก่อนนำมาทดสอบ โดยปรับความขุ่นเทียบกับ 0.5 McFarland standard อ่านค่าจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.1 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^6 - 10^7 CFU/ml เป็นค่ามาตรฐานสำหรับใช้เปรียบเทียบกับเชื้อราเอ็นโดไฟต์ที่นำมาทดสอบฤทธิ์ด้วย ซึ่งจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่อ่านค่าได้จะมีหน่วยเป็น (CFU/ml) ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตาราง 3.2 จำนวนจุลินทรีย์ทดสอบ (CFU/ml) ที่มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland standard

จุลินทรีย์ทดสอบ	จำนวนจุลินทรีย์ทดสอบ (CFU/ml)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	5.1×10^6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6.1×10^6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2.3×10^6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2.1×10^6
<i>Candida albicans</i> ATTC 10231	2.4×10^6

3.6.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบซิด (steak) บนอาหาร NA เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ใช้ลูป (loop) เชี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Nutrient broth , NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C จนสังเกตเห็นว่าในหลอดเชื้อ มีความขุ่น (ประมาณ 2-8 ชั่วโมง) แล้วปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland standard (ซึ่งประกอบด้วย BaCl₂ 0.048 M ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ NH₂SO₄ 0.36 M ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร) โดยอ่านค่าจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.1 เพื่อให้มีเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10⁶-10⁷ CFU/ml

3.6.2 การเตรียมยีสต์ทดสอบ

นำยีสต์ทดสอบซิด (steak) บนอาหาร Yeast-Malt Extract agar (YMA) เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30 °C) นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปเชี่ยโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast-Malt Extract broth (YMB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของยีสต์ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast-Malt Extract broth (YMB) ให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland standard

3.6.3 การเตรียมราเอ็นโดไฟต์เพื่อทดสอบฤทธิ์

นำราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้แต่ละไอโซเลต (isolate) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิด ได้แก่ PDA, MEA, YES, CMA, SDA และ GYEA บ่มเชื้อราให้เจริญที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน แล้วใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 7 มิลลิเมตร เจาะตรงส่วนที่มีเส้นใยราเจริญแล้ว ใช้เข็มเชี่ยเชื้อราที่ปลอดเชื้อเชี่ยขึ้นราที่เจาะไว้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ดังข้อ 3.6.4

3.6.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้

นำก้านสำลีที่ปลอดเชื้อมาจุ่มลงในเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้แล้วมากวาด (swab) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีผิวหน้าอาหารแห้งให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อ ส่วนยีสต์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YMA ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 3-5 นาที แล้วนำราเอ็นโดไฟต์ที่เตรียมไว้ จากข้อ 3.6.3 มาวางลงบนผิวหน้าอาหารดังกล่าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยวัดบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบขึ้นของราที่ทดสอบ

3.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์และการจัดจำแนกราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.7.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่ต่างกัน 5 ชนิด

นำราเอ็นโดไฟต์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิดได้แก่ PDA, MEA, YES, CMA, SDA และ GYEA แล้วสังเกตลักษณะของโคโลนี เส้นใย สี สปอร์ และการสร้างรงควัตถุของราดังกล่าว

3.7.2 การทำ slide culture

การทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใย สปอร์ ก้านชูสปอร์ หรือลักษณะอื่นๆ ของเชื้อราสามารถเตรียมโดยทำดังนี้

1. นำกระดาษกรองหรือผ้าก๊อชที่ฆ่าเชื้อแล้ววางลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว วางแท่งแก้วรูปตัววีหรือแท่งไม้ที่มีความยาวพอเหมาะ 2 แท่ง ที่ฆ่าเชื้อแล้วทับบนกระดาษกรองหรือผ้าก๊อช จากนั้นวางแผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนแท่งแก้วหรือแท่งไม้อีกที

2. ตัดชิ้นวุ้นขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร หนาประมาณ 1-2 มิลลิเมตรวางลงบนแผ่นสไลด์ แล้วเขียนเชื้อราที่ต้องการศึกษาไว้ลงที่ด้านข้างของชิ้นวุ้นทั้ง 4 ด้าน จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยการจุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟ

3. เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเพาะเชื้อพอให้ชุ่มกระดาษกรองหรือผ้าก๊อช ปิดฝาจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 30 °C เป็นเวลา 3-5 วันหรือจนกว่าเชื้อราจะเจริญเต็มที่ สังเกต การเจริญของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน โดยยกทั้งจานเพาะเชื้อขึ้นมาวางบนแท่นกล้องจุลทรรศน์ เปิดฝาทิ้งแล้วจึงส่องดูด้วยเลนส์กำลังขยายต่ำสุด

4. เมื่อสังเกตเห็นว่าเชื้อราเจริญเต็มที่แล้ว เช่น มีโครงสร้างของสปอร์ และก้านชูสปอร์ หรือลักษณะอื่นๆ ตามที่ต้องการแล้ว จึงหยดสีย้อมแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู (Lactophenol cotton blue) ลงบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่เส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่ นำไปศึกษาลักษณะเส้นใยของสปอร์ หรือลักษณะอื่นๆ ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทาขอบสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บเพื่อป้องกันสีย้อมแห้งหากเก็บไว้ศึกษาต่อไป

3.8 การจัดการเจริญเติบโตของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18

เลี้ยงราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 ในอาหาร MEA บนจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นใช้ cork borer ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตรมาเจาะลงบนเส้นใยรา 5 ชิ้น แล้วเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อ 1 ขวดขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30 °C) เป็นเวลา 51 วัน ทำการชั่งน้ำหนักของเส้นใยราทุกๆ 3 วัน โดยกรองแยกจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 93 ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองที่อบแล้วก่อนนำไปกรอง จากนั้นนำเส้นใยราที่ติดบนกระดาษกรองไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C 48 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

3.9 การสกัดสารทุติยภูมิจากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18

3.9.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์

เลี้ยงราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 ในอาหาร MEA บนจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นใช้ cork borer ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตรมาเจาะลงบนเส้นใยรา นำชิ้นเส้นใยราที่เจาะไว้ 5 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวทั้งหมดปริมาตร 10 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30 °C) โดยการตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 สัปดาห์

3.9.2 การสกัดสารทุติยภูมิจากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18

นำราเอ็นโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวจากข้อ 3.9.1 มากรองแยกเส้นใยราและน้ำเลี้ยงเชื้อโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ใต้น้ำเลี้ยงเชื้อ 7.2 ลิตรและเส้นใยรา 1289 กรัม เดิมตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ลงในน้ำเลี้ยงเชื้อแล้วเขย่าเพื่อสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแล้วระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่เหลือจากการสกัดนำไปทำให้แห้ง 3.52 กรัม ได้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนเอทิลแอลกอฮอล์ 1.06 กรัม

เส้นใยรานำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (blender) เดิมตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ไปเพื่อสกัดสารจากเส้นใยราแล้วระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน ได้ส่วนสกัดจากเส้นใยรา 2.37 กรัม กากที่เหลือของเส้นใยราจะสกัดต่อด้วยเมทานอล ได้ส่วนสกัดน้ำหนัก 2.43 กรัม ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18

3.10 การแยกสกัดสารทุติยภูมิจากราเอ็นโดไฟต์ให้บริสุทธิ์

3.10.1 การแยกสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (Be01) ให้บริสุทธิ์

เตรียมตัวอย่าง โดยนำสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (Be01) น้ำหนัก 1.05 กรัม บดผสมกับซิลิกาเจลประมาณ 4 กรัม ให้เป็นเนื้อเดียวกันบรรจุลงเหนือคอลัมน์ แล้วชะด้วยการเปลี่ยนอัตราส่วนตัวทำละลายดังนี้ เฮกเซน, เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม, คลอโรฟอร์ม, คลอโรฟอร์ม-เมทานอล, เมทานอล ตามลำดับ ผลการแยกสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (Be01) แสดงในตาราง 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบเอทิลเอซิติเตจจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (BeO1)

ลำดับ ส่วนที่ (เริ่มต้น)	ลำดับ ส่วนที่ (หลัง)	ตัวทำละลาย	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1-21	BeO1.1	5-30%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	ครูดสีเหลือง	4.1
22-32	BeO1.2	30-70%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	ครูดสีเหลือง	8.2
33-41	BeO1.3	70-80%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	ครูดสีน้ำตาล	2.8
42-56	BeO1.4	90%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	ครูดสีเหลือง	20.1
57-63	BeO1.5	90-95%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	ครูดสีน้ำตาล	5.5
64-70	BeO1.6	95-98%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	ครูดสีน้ำตาล	41.2
71-74	BeO1.7	99%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	ครูดสีน้ำตาล	38.0
75-90	BeO1.8	100%คลอโรฟอร์ม	ผลึกสีขาวปนน้ำมัน	55.3
91-114	BeO1.9	1-5%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	ครูดสีน้ำตาล	28.4
115-118	BeO1.10	8%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	ครูดสีน้ำตาล	98.5
119-129	BeO1.11	10-20%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	ครูดสีน้ำตาล	73.4
130-140	BeO1.12	20-30%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	ครูดสีน้ำตาล	58.7
141-158	BeO1.13	35-50%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	ครูดสีน้ำตาล	158.8
159-173	BeO1.14	50-100%เมทานอลใน คลอโรฟอร์ม	ครูดสีน้ำตาล	128.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10.2 การแยกสารสกัดหยาบเอทิลเอซีเตตจากเส้นใยรา (Me01) ให้บริสุทธิ์

เตรียมตัวอย่าง โดยนำสารสกัดหยาบเอทิลเอซีเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ(Me01) หน้าที่ 2.37 กรัม บดผสมกับซิลิกาเจลประมาณ 4 กรัม ให้เป็นเนื้อเดียวกันบรรจุลงเหนือคอลัมน์แล้วชะด้วยการเปลี่ยนอัตราส่วนตัวทำละลายดังนี้ เฮกเซน, เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล, เมทานอล ตามลำดับ ผลการแยกสารสกัดหยาบจากเส้นใยรา (Me01) แสดงในตาราง 3.4



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.4 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบเอทิลเอซิติเตตจากเส้นใยรา (Me01)

ลำดับส่วน ที่ (เริ่มต้น)	ลำดับส่วน ที่ (หลัง)	ตัวทำละลาย	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1-11	Me01.1	5-30% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	น้ำมันสีเหลือง	53.9
12-14	Me01.2	30% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	น้ำมันสีเหลือง	67.1
15-16	Me01.3	40% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	ไขสีเหลือง	65.6
17-20	Me01.4	40% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	ไขสีขาวเหลือง	409.5
21-22	Me01.5	40% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	ไขสีส้ม	503.6
23-25	Me01.6	40-50% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	น้ำมันสีน้ำตาลแดง	747.9
26-27	Me01.7	50% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	ครูดสีน้ำตาลแดง	51
28-29	Me01.8	50% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	ผลึกสีขาวปนน้ำมัน	20.1
30	Me01.9	50% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	ผลึกสีขาวปนน้ำมัน	10.1
31-33	Me01.10	60% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	กึ่งของแข็งสีน้ำตาล	44.8
34-41	Me01.11	60% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	กึ่งของแข็งสีน้ำตาล	130.8
42-46	Me01.12	60% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	กึ่งของแข็งสีน้ำตาล	90.4
47-50	Me01.13	70% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	กึ่งของแข็งสีน้ำตาล	78.1
51-53	Me01.14	80% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	กึ่งของแข็งสีน้ำตาล	92.7
54-57	Me01.15	80% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	ครูดสีน้ำตาล	91.8
58-61	Me01.16	90% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	ครูดสีน้ำตาล	101.7
62-65	Me01.17	90% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	ครูดสีน้ำตาล	88.7
66-71	Me01.18	100% ไดคลอโรมีเทน	ครูดสีน้ำตาล	120.5
72-73	Me01.19	10% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน	ของแข็งสีน้ำตาล	103
74-80	Me01.20	20% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน	ของแข็งสีน้ำตาล	352.4
81-88	Me01.21	30% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน	ของแข็งสีน้ำตาล เข้ม	773.4
89-99	Me01.22	30-50% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน	ของแข็งสีน้ำตาล	103.2
100-114	Me01.23	50-100% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน	ของแข็งสีน้ำตาล	33.9

3.11 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากกราเอ็นโดไฟต์ CHB18

3.11.1 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 1 จากลำดับส่วนที่ Be01.8 และจากลำดับส่วน Me01.8

ผลึกสีขาวปนน้ำมันที่ได้จากลำดับส่วนที่ Be01.8 และ Me01.8 ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีและใช้ เฮกเซน: คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 50:50 เป็นตัวชะ สารที่ได้นำมาตกผลึกซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม จากนั้นล้างผลึกด้วยเฮกเซน: คลอโรฟอร์ม 80:20 ได้ผลึกรูปเข็มสีขาวปริมาณ 54.4 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 1) สารบริสุทธิ์ที่ได้มีสมบัติดังนี้

m.p. : 267 °C ;

λ_{\max} (CHCl₃,) : 0.788, 0.656 nm ;

$[\alpha]_{\text{D}}$: -43 (1 mg/ml, CHCl₃) ;

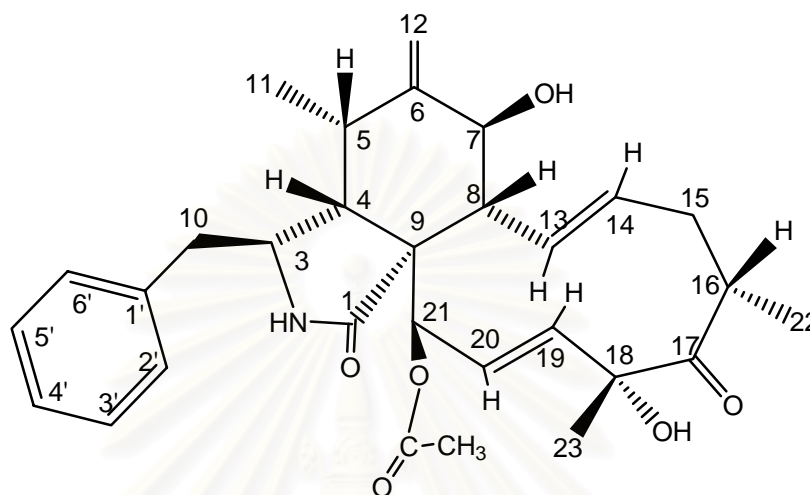
ν_{\max} (cm⁻¹): 3412(s) 1746(m) 1696(m) 1567(s) 1408(s) 1271(w) 1007(w) cm⁻¹ (รูปร่างที่ 2 ในภาคผนวก ข) ;

δ_{H} (CDCl₃, 400 MHz): 7.351 (2H, dd, $J = 6.8$ และ 7.6 Hz, 3'-H และ 5'-H), 7.278 (1H, dd, $J = 8.8$ และ 7.2 Hz, 4'-H), 7.167 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, 2'-H และ 6'-H), 6.141 (1H, dd, $J = 2.8$ และ 16 Hz, 20-H), 5.720 (1H, dd, $J = 9.6$ และ 15.6 Hz, 13-H), 5.663 (1H, t, $J = 2.4$ และ 2.4 Hz, 21-H), 5.370 (1H, dd, $J = 5.2$ และ 10.4 Hz, 14-H), 5.329 (2H, s, 12-H), 5.171 (1H, dd, $J = 2.8$ และ 16 Hz, H-19), 5.122 (2H, s, H-12), 3.841 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-7), 3.266 (1H, dt, $J = 4.4$ และ 8.8 Hz, 3-H), 2.885 (1H, dd, $J = 10$ และ 9.6 Hz, 8-H), 2.853 (2H, dd, $J = 4.8$ และ 12.4 Hz, 10-H), 2.780 (1H, 16-H), 2.762 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, 5-H), 2.707 (2H, dd, $J = 9.2$ และ 13.2 Hz, 10-H), 2.543 (2H, q, $J = 11.2$ Hz, 15-H), 2.298 (3H, s, H-CH₃(Ac)), 2.181 (1H, dd, $J = 3.6$ และ 4.4 Hz, 4-H), 2.056 (2H, dd, $J = 5.6$ และ 13.6 Hz, 15-H), 1.542 (3H, s, 23-H), 1.230 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 22-H), 0.980 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-11) ppm (รูปร่างที่ 3 ในภาคผนวก ข) ;

δ_{C} (CDCl₃, 100 MHz): 210.319 (C-17), 173.712(C-1), 169.761(CH₃C(O)), 147.545(C-6), 137.272(C-1'), 134.161(C-14), 132.323(C-20), 130.630(C-13), 129.127(C-2'), 128.975(C-3'), 127.617(C-19), 127.121(C-4'), 114.538(C-12), 77.732(C-18), 77.137(C-21), 69.854(C-9), 53.587(C-3), 53.312(C-9), 50.010(C-4), 46.998(C-8), 45.327(C-10), 42.361(C-16), 37.754(C-15), 32.690(C-5), 24.202(C-23), 20.885(C-CO), 19.420(C-22) และ 13.693(C-11) ppm (รูปร่างที่ 4 ในภาคผนวก ข) ;

MS สเปกตรัม $[M+Na]^+$ m/z : 507.2519 (รูปที่ 5 ในภาคผนวก ข);

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D NMR (HSQC, HMBC, COSY) แสดงไว้ในรูป 6, 7 และ 8
ในภาคผนวก ข



Cytochalasin D

รูปที่ 3.1 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.11.2 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 2 จากลำดับส่วนที่ Be01.4

ครูดสีเหลืองที่ได้จากลำดับส่วนที่ Be01.4 ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีและใช้
เฮกเซน: คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 10: 90 เป็นตัวชะ ครูดแล้วนำมาทำการแยกสารต่อด้วยวิธี
Preparative TLC โดยใช้ 100% เอทิลเอซิเตตเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้ของแข็งสีขาวหนัก 1.0
มิลลิกรัมที่ค่า $R_f = 0.61$ (สารบริสุทธิ์ 2) สารบริสุทธิ์ที่ได้มีสมบัติดังนี้

m.p. : 133-134 °C ;

λ_{\max} (CHCl₃,) : 310 nm ;

$[\alpha]_D^{25}$: +10(1 mg/ml, MeOH) ;

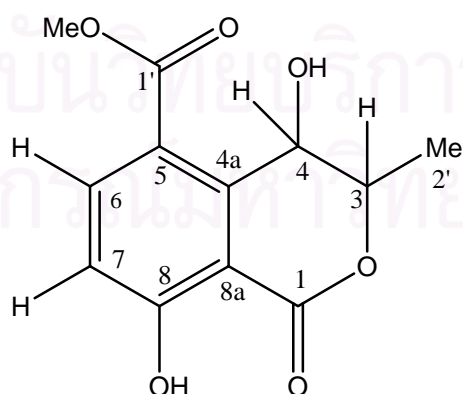
ν_{\max} (cm⁻¹) 3489(m), 2919(s), 2856(m), 1670(s), 1585(m), 1256(s) และ 1045(m) cm⁻¹ (รูป
ที่ 10 ในภาคผนวก ข) ;

δ_H (CDCl₃, 400 MHz): 11.91(1H, s, H-O), 8.06(1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 6.99(1H, d, $J =$
7.2 Hz, H-7), 5.03(1H, s, H-4), 4.98(1H, q, $J = 6.4$ Hz, H-3), 3.88(3H, s, H-1'), 1.28(3H, d, $J =$
7.2 Hz, H-2')ppm (รูปที่ 11 ในภาคผนวก ข)

δ_C (CDCl₃, 100 MHz): 168(C-1), 167(C-OMe), 165.4(C-8), 142.0(C-4a), 138.5(C-6),
121.5(C-5), 118.1(C-7), 79.5(C-3), 65.1(C-4), 52.7(C-1'), 18.7(C-2')ppm (รูปที่ 12 ในภาคผนวก
ข) ;

MS สเปกตรัม $[M+Na]^+$ m/z : 252.0632 (รูปที่ 13 ภาคผนวก ข) ;

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D NMR (HSQC, HMBC, COSY) แสดงไว้ในรูป 14, 15 และ
16 ในภาคผนวก ข



4-hydroxy-5-methoxycarbonylmellein

รูปที่ 3.2 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 2

3.11.3 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 3 จากลำดับส่วนที่ Be01.4

ครูดสีเหลืองที่ได้จากลำดับส่วนที่ Be01.4 ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีและใช้
 เฮกเซน: คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 10: 90 เป็นตัวชะ ครูดแล้วนำมาทำการแยกสารต่อด้วยวิธี
 Preparative TLC โดยใช้ 100% เอทิลเอซิเตตเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้ผลึกรูปเข็มไม่มีสีหนัก 1.5
 มิลลิกรัมที่ค่า $R_f = 0.49$ (สารบริสุทธิ์ 3) สารบริสุทธิ์ที่ได้มีสมบัติดังนี้

m.p. : 133-134 °C ;

λ_{\max} (CHCl₃,) : 310 nm ;

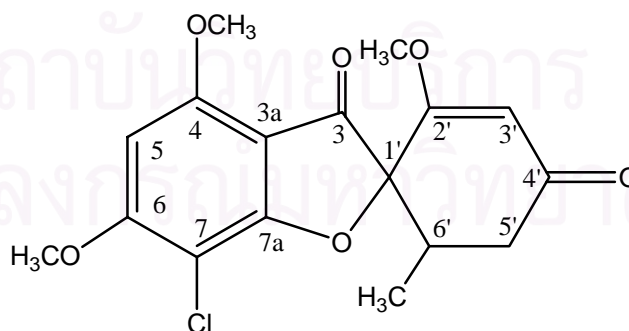
$[\alpha]_D^{25}$: +10(1 mg/ml, MeOH) ;

V_{\max} (cm⁻¹) 2939(w), 1705(m), 1610(s), 1464(w), 1220(m) และ 772 (w) cm⁻¹ (รูปที่ 18 ใน
 ภาคผนวก ข);

δ_H (CDCl₃, 400 MHz): 0.95(3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-(6'-CH₃)), 2.42(2H, dd, $J = 4.8$ and
 16.8 Hz, H-5'), 2.83(1H, m, $J = 4.8, 14$ and 6.4 Hz, H-6'), 3.02(2H, dd, $J = 16.8$ and 14 Hz, H-
 5'), 3.61 (3H, s, H-(2'-OCH₃)), 3.97 (3H, s, H-(6-OCH₃)), 4.02 (3H, s, H-(4-OCH₃)), 5.53(1H, s,
 H-3'), 6.12(1H, s, H-5)ppm (รูปที่ 19 ในภาคผนวก ข);

δ_C (CDCl₃, 100 MHz): 197.0(C-4'), 192.5(C-3), 170.7(C-2'), 169.5(C-7a), 164.5(C-4),
 157.7(C-6), 105.1(C-3a), 104.8(C-3'), 97.2(C-7), 90.7(C-1'), 89.4(C-5), 56.9(C-(4-OCH₃)),
 56.6(C-(2'-OCH₃)), 56.3(C-(6-OCH₃)), 40.0(C-5'), 36.4(C-6'), 14.2(C-(6'-CH₃))ppm (รูปที่ 20 ใน
 ภาคผนวก ข);

MS สเปกตรัม $[M]^+$: 352.6011 (รูปที่ 21 ในภาคผนวก ข);



Griseofulvin

รูปที่ 3.3 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 3

3.12 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่แยกได้

3.12.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

3.12.1.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18

นำสารที่สกัดได้จากราเอ็นโดไฟต์มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 โดยใช้วิธี Paper disk diffusion method (Jorgensen และคณะ, 1999) ซึ่งมีวิธีดังนี้

3.12.1.1.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

การเตรียมแบคทีเรียทดสอบใช้วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

3.12.1.1.2 การเตรียมยีสต์ทดสอบ

การเตรียมยีสต์ทดสอบใช้วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2

3.12.1.1.3 การเตรียมสารสกัดหยาบเพื่อทดสอบ

นำสารสกัดหยาบมา 50 มิลลิกรัมมาละลายใน DMSO 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วย 0.1% Tween 80 ในน้ำ

3.12.1.1.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากหยาบราเอ็นโดไฟต์

นำก้อนสำลีที่ปลอดเชื้อมาจุ่มลงในเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้แล้ว มาวางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีผิวหน้าอาหารแห้งให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อ ส่วนยีสต์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YMA ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 3-5 นาที นำสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ 0.02 มิลลิลิตรหยดลงบน paper disk ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร จากนั้นนำไปวางลงบนผิวหน้าอาหารดังกล่าว แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ววัดบริเวณใสที่เกิดรอบ paper disk

3.12.1.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารแต่ละลำดับส่วน

นำสารแต่ละลำดับส่วนมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 โดยใช้วิธี Paper disk diffusion method โดยใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.13.1.1

3.12.1.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบด้วยวิธี The Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) (Jorgensen, J.H., 1999) เป็นการหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้โดยใช้ Microtiter Plate Broth Dilution Technique มีขั้นตอนการทดสอบ ดังนี้

3.12.1.3.1 การเตรียมสารละลายสารบริสุทธิ์

นำสารบริสุทธิ์ 1.0 มิลลิกรัม ผสมกับตัวทำละลาย 10 % DMSO ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสารประกอบที่ความเข้มข้น 250 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นแรกในระดับความเข้มข้นที่เราต้องการ หลังจากนั้นก็เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ระดับความเข้มข้น 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 และ 3.91 µg/ml ตามลำดับ

ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ คือ

ความเข้มข้นสุดท้าย 125 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย 62.5 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย 31.25 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย 15.63 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย 7.82 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย 3.91 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย 1.96 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายสารบริสุทธิ์ที่วัดได้ใน 96 well microtiter plate หลังจากเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบลงไป

3.12.1.3.12 การเตรียมสารละลายสารชุดควบคุมบวก (Positive Control)

ใช้ Penicillin G, Erythromycin, Sulfadimidine, Streptomycin, Iprodine และ Ketoconazole เป็นสารชุดควบคุมบวก ในการเจือจางสารละลายทำเช่นเดียวกับการเจือจางสารละลายสารประกอบในข้อ 3.13.1.3.1

3.12.1.3.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์สำหรับทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อรา 1 ชนิด ได้แก่ *Candida albicans* การเตรียมเชื้อทดสอบจะเตรียมตามข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 โดยแบคทีเรียจะนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) และราจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast-Malt Extract Broth (YMB)

3.12.1.3.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์จะทำการทดสอบใน 96 well microtiter plate โดยก่อนการหยอดสารละลายสารบริสุทธิ์และสารชุดควบคุมบวก ให้ทำแผนผังระบุชนิดและตำแหน่งของสารที่จะหยอดลงใน 96 well microtiter plate เสียก่อนเพื่อความถูกต้องของการแปลผลการทดสอบที่ได้สารที่จะหยอดลงใน 96 well microtiter plate มีดังนี้

Blank

- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว
- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบ
- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและสารละลายสารบริสุทธิ์ตามระดับความเข้มข้น

Positive Control

- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบ + ระดับความเข้มข้นของยา

Test Sample

- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบ + ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารบริสุทธิ์

ปริมาตรที่ใช้ คือ สารจุลินทรีย์แขวนลอย 50 μ l และ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว+ สารละลายสารบริสุทธิ์ 50 μ l ซึ่งจะรวมได้ปริมาตรที่ใช้ 100 μ l / หลุม

3.12.1.3.5 การแปรผล

อ่านผลการทดลองเป็นค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Sunrise Microtiter Plate Reader ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหหลวงและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบของเชื้อก่อนบ่มเชื่อกับค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหหลวงและสารละลายสารบริสุทธิ์ตามระดับความเข้มข้น โดยให้เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อเหหลวงและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบ + ถ้าระดับความเข้มข้นของสารละลายสารบริสุทธิ์หลังจากบ่มเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมง

หากค่าการดูดกลืนแสง ของ Test Sample หรือยา Positive Control มีค่าสูงกว่า แสดงว่าสารละลายสารบริสุทธิ์หรือยาในความเข้มข้นนั้นๆ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ แต่ถ้าค่าการดูดกลืนแสงของ Test Sample หรือยา Positive Control มีค่าต่ำกว่า แสดงว่าสารละลายสารบริสุทธิ์หรือยาในความเข้มข้นนั้นๆ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ความเข้มข้นของสารละลายสารบริสุทธิ์ต่ำสุดที่ยังมีค่าต่ำกว่า ค่านั้นคือค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration)

หมายเหตุ อาจมีการเพิ่มระดับความเข้มข้น หรือลดระดับความเข้มข้นของสารละลายสารบริสุทธิ์ เพื่อหาค่า MIC

3.12.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ต่อเซลล์มะเร็ง ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยเลี้ยงเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2) เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW 620) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) ในหลอดทดลองด้วยวิธี colorimetric โดยใช้สาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Carmichael และคณะ, 1987) ซึ่งมีหลักการคือจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต/หลุม จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณการผลิตสาร formazan ที่สามารถวัดได้โดยการนำส่วนในหลอดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

นำเซลล์มะเร็งมาเลี้ยงและเก็บเซลล์ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด (exponential phase) นับจำนวนเซลล์ด้วย trypan blue exclusion นำเซลล์มะเร็งที่ทราบจำนวนมาใส่ลงในหลุมทั้ง 96 หลุมของ microtiter plates หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเซลล์ในบรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37

°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ต้องการทดสอบอยู่ลงไปในแต่ละหลุม (ในกลุ่มควบคุม N เท่ากับ 6 และในกลุ่มทดลอง N เท่ากับ 3) ส่วนหลุมที่อยู่รอบๆ microtiter plates (lacking cells) ใช้สำหรับชุดควบคุม (N เท่ากับ 2) และกลุ่มควบคุมลบ tetrazolium (N เท่ากับ 6) จากนั้นนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 4 วัน ก่อนที่จะเติมสารละลาย tetrazolium MTT stock solution มีวิธีการเตรียมดังนี้ นำ MTT 5 มิลลิกรัมมาละลายใน 1 มิลลิตรของ PBS นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อแล้วกรองผ่าน 0.45 µl filter units สำหรับ MTT working solutions เตรียมโดยนำ MTT stock solution มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุ่นในอัตราส่วน 1:5 (ปริมาตร/ปริมาตร) นำ MTT working solution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมลงในหลุมแต่ละหลุม จากนั้นบ่มต่อไปอีก 4-24 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °C ขึ้นอยู่กับการทดลอง นำสารในหลุมไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่ำ เป็นเวลา 5 นาที ถ้าในหลุมดังกล่าวมีสารแขวนลอยอยู่ คูดส่วนน้ำใสในแต่ละหลุมออกประมาณ 10-20 ไมโครลิตร แล้วเติม DMSO ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การวัดอัตราการเจริญและอัตราการยับยั้งการเจริญ จำนวนจากเปอร์เซ็นต์ของการ
ดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้จากใบกระท้อน *Sandoricum koetjape* จากจังหวัดจันทบุรี

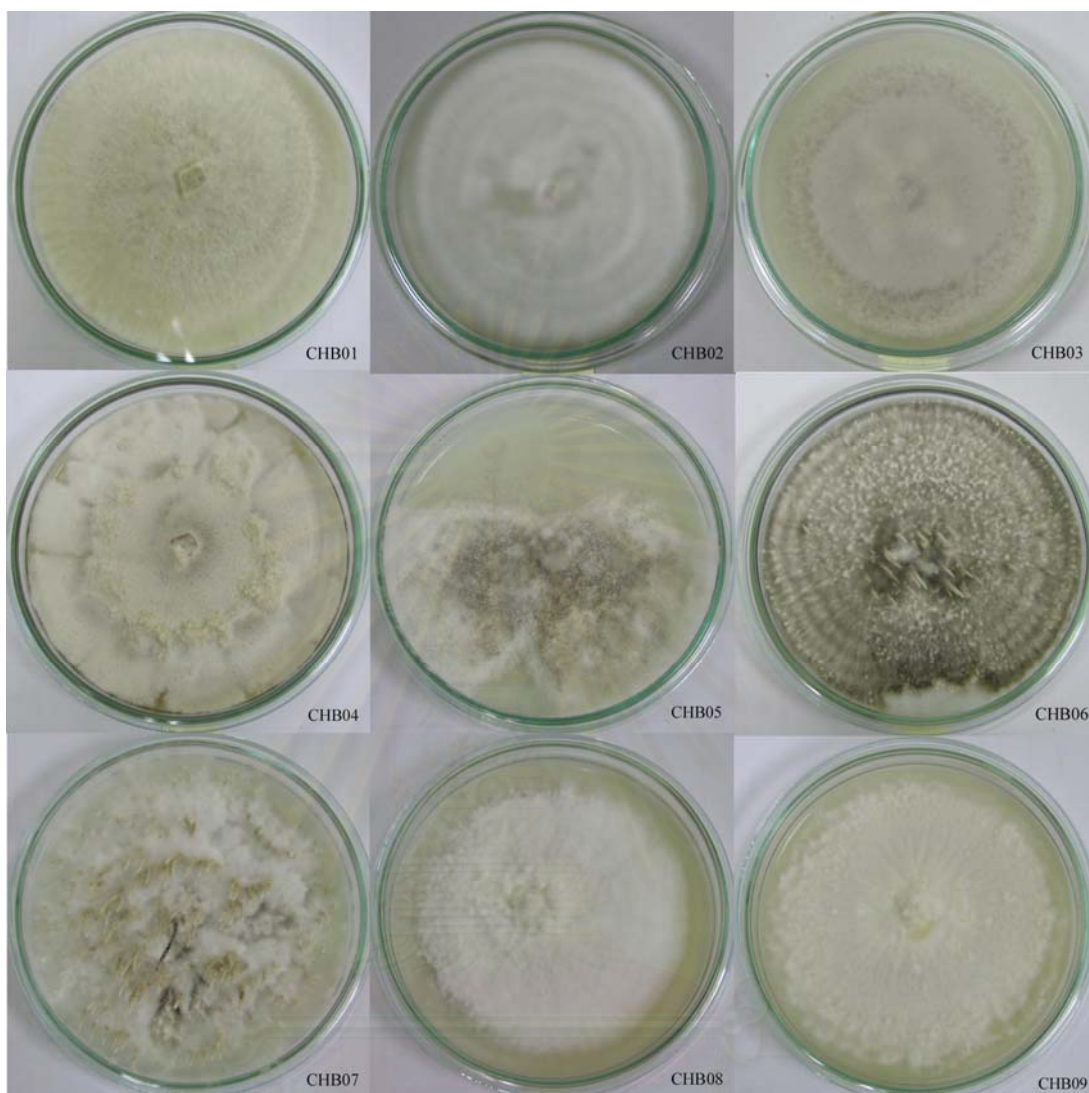
ในการทดลองนี้ได้เก็บตัวอย่างใบกระท้อนจากจังหวัดจันทบุรีทำการแยกจากใบกระท้อนได้ทั้งหมด 20 สายพันธุ์ และได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้โดยการทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยสปอร์ ก้านชูสปอร์ หรือลักษณะอื่นๆ ของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รายละเอียดและลักษณะโคโลนีของราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้แสดงในตารางที่ 4.1 รูปราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้ลักษณะเส้นใยและสปอร์แสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของโคโลนีและการจัดจำแนกรราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้จากใบกระท้อนจากจังหวัดจันทบุรี

สายพันธุ์	ลักษณะโคโลนีของราเอ็นโดไฟต์บนอาหาร MEA			ชนิดของรา
	ลักษณะโคโลนี	สีของโคโลนี	สีที่สร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อ	
CHB01	เรียบไม่ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	Mycelia sterilia
CHB02	เรียบไม่ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	Mycelia sterilia
CHB03	เรียบไม่ฟู	เทา	ไม่สร้าง	<i>Colletotrichum</i> sp.
CHB04	เรียบไม่ฟู	ขาวอมเหลือง	น้ำตาลเข้ม	Mycelia sterilia
CHB05	ฟูคล้ายสำลี	ขาว	ไม่สร้าง	Mycelia sterilia
CHB06	สร้างสโตรมา	เทาดำ	ไม่สร้าง	<i>Xyralia</i> sp.
CHB07	สร้างสโตรมา	ขาว	ไม่สร้าง	<i>Xyralia</i> sp.
CHB08	ฟูคล้ายสำลี	ขาว	ไม่สร้าง	Mycelia sterilia
CHB09	ฟูคล้ายสำลี	ขาว	ไม่สร้าง	Mycelia sterilia
CHB10	สร้างสโตรมา	ขาว	ไม่สร้าง	<i>Xyralia</i> sp.
CHB11	เรียบไม่ฟู	เหลืองอมเขียว	เหลือง	Mycelia sterilia
CHB12	ฟูคล้ายสำลี	ขาว	ไม่สร้าง	Mycelia sterilia
CHB13	ฟูคล้ายสำลี	ขาวอมส้ม	ส้มอ่อน	<i>Fusarium</i> sp.
CHB14	ผิวเรียบไม่ฟู	ขาวปนน้ำตาล	เหลืองอ่อน	Mycelia sterilia
CHB15	สร้างสโตรมา	ขาวปนดำ	ไม่สร้าง	<i>Xyralia</i> sp.

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะของโคโลนีและการจัดจำแนกราเอ็นโคไฟต์ที่แยกได้จากใบกระท้อนจาก จังหวัดจันทบุรี

สายพันธุ์	ลักษณะโคโลนีของราเอ็นโคไฟต์บนอาหาร MEA			ชนิดของรา
	ลักษณะโคโลนี	สีของโคโลนี	สีที่สร้างในอาหาร เลี้ยงเชื้อ	
CHB16	ผิวเรียบไม่ฟู	ขาว	เหลืองอ่อน	<i>Mycelia sterilia</i>
CHB17	ฟูคล้ายสำลี	ขาว	ไม่สร้าง	<i>Mycelia sterilia</i>
CHB18	สร้างสโตรมา	ขาวปนน้ำตาล	น้ำตาล	<i>Xyralia</i> sp.
CHB19	ผิวเรียบไม่ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	<i>Mycelia sterilia</i>
CHB20	ฟูคล้ายสำลี	ขาว	แดง	<i>Fusarium</i> sp.



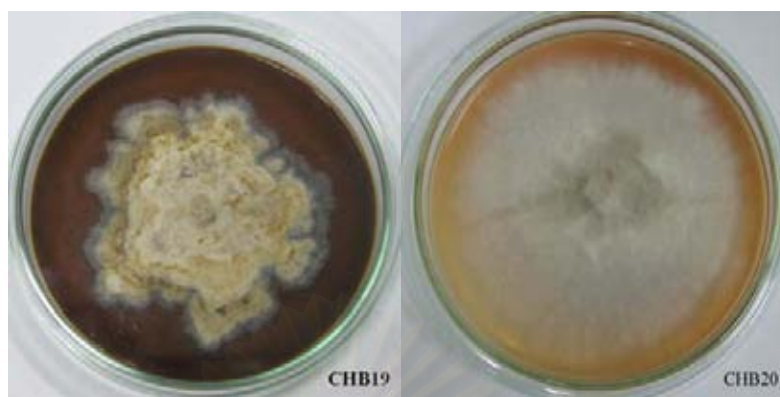
รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB01-CHB09 ที่แยกจากใบกระท้อนที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



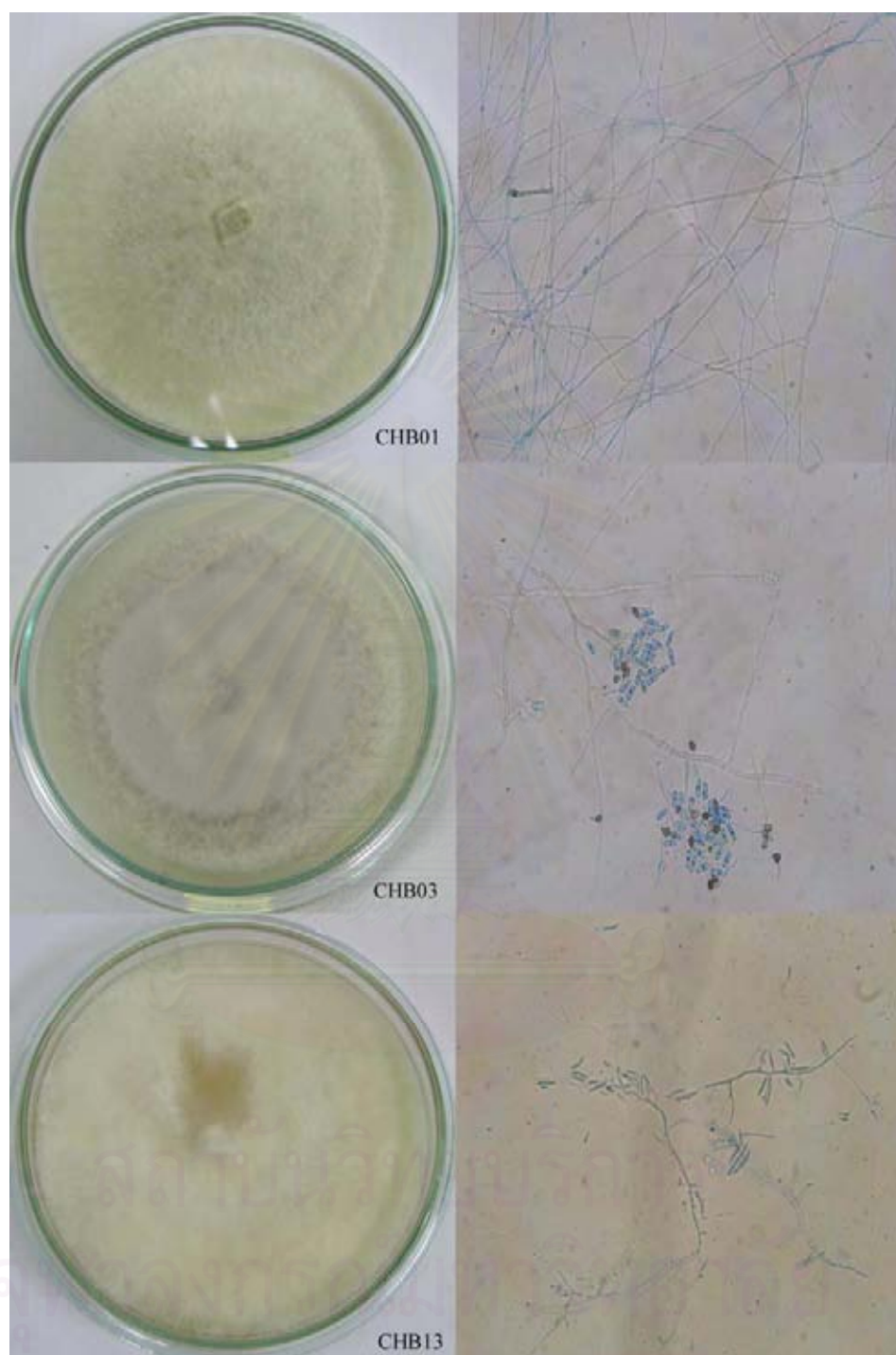
รูปที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB10-CHB18 ที่แยกจากใบกระท้อนที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB19-CHB20 ที่แยกจากใบกระถ�อนที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนี เส้นใยและสปอร์ของราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้

- (a) แสดงลักษณะเส้นใยของ *Mycelia sterilia* ราสายพันธุ์ CHB01 (40x)
- (b) แสดงลักษณะสปอร์ของ *Colletotrichum* sp. ราสายพันธุ์ CHB03 (40x)
- (c) แสดงลักษณะสปอร์ของ *Fusarium* sp. ราสายพันธุ์ CHB13 (40x)

4.2 ราเอ็นโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้ 19 สายพันธุ์ในอาหารเพาะเลี้ยง 6 ชนิด โดยใช้เทคนิค Dual culture Agar diffusion พบว่ามีราเอ็นโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ CHB02, CHB03, CHB08, CHB10, CHB12, CHB13, CHB18 และ CHB20 ราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB02 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* วัดบริเวณใสรอบขึ้นราได้ 1.0 ซม สายพันธุ์ CHB03 สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* วัดบริเวณใสรอบขึ้นราได้ 1.1 ซม สายพันธุ์ CHB08 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *E. coli* วัดบริเวณใสรอบขึ้นราได้ 0.9 ซม และ 0.8 ซม ตามลำดับ สายพันธุ์ CHB10 สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* วัดบริเวณใสรอบขึ้นราได้ 0.8 ซม และ 0.8 ซม ตามลำดับ สายพันธุ์ CHB12 สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* วัดบริเวณใสรอบขึ้นราได้ 0.9 ซม สายพันธุ์ CHB13 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* วัดบริเวณใสรอบขึ้นราได้ 1.0 ซม และ 1.0 ซม ตามลำดับ สายพันธุ์ CHB18 สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* วัดบริเวณใสรอบขึ้นราได้ 1.2 ซม สายพันธุ์ CHB20 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* วัดบริเวณใสรอบขึ้นราได้ 1.1 ซม และ 0.8 ซม ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงใน(ตารางที่ 4.2 ภาคผนวก ข) ราเอ็นโดไฟต์ทั้งหมดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ

จุลินทรีย์แสดงในตารางที่ 4.2 และเปอร์เซ็นต์ของราเอ็นโดไฟต์ทั้งหมดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบราเอ็นโคไฟต์ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยเทคนิค Dual culture Agar diffusion

สายพันธุ์	บริเวณยับยั้งการเจริญ(เซนติเมตร)				
	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
	<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
CHB02	1.0	-	-	-	-
CHB03	-	-	-	1.1	-
CHB08	0.9	-	0.8	-	-
CHB10	-	0.8	-	0.8	-
CHB12	-	-	-	-	0.9
CHB13	1.0	1.0	-	-	-
CHB18	-	-	-	-	1.2
CHB20	1.1	0.8	-	-	-

หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

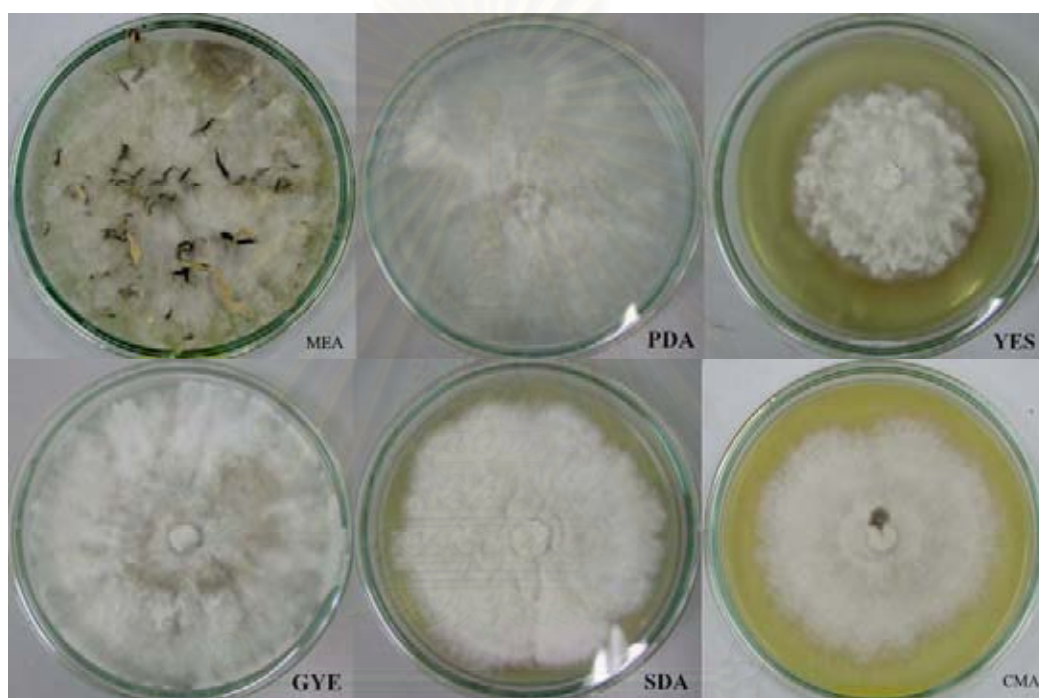
ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ของราเอ็นโคไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบ		จำนวนสายพันธุ์ ราที่มีฤทธิ์	เปอร์เซ็นต์ของสาย พันธุ์ราเอ็นโคไฟต์ที่มี ฤทธิ์ทางชีวภาพ (%)
แบคทีเรียแกรม บวก	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	4	20
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3	15
แบคทีเรียแกรมลบ	<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	5
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2	10
ยีสต์	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2	10

4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอ็นโดไฟต์ CHB18

4.3.1 การพิสูจน์ทางสัณฐานวิทยา

นำราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB 18 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิดได้แก่ PDA, MEA, YES, CMA, SDA และ GYEA แล้วสังเกตลักษณะของโคโลนี เส้นใย สี สปอร์ และการสร้างรงควัตถุของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 ลักษณะของโคโลนี เส้นใย สี และการสร้างรงควัตถุของราเอ็นโดไฟต์ CHB18 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิดได้แก่ PDA, MEA, YES, GYEA, SDA และ CMA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 ลักษณะสโตรมาของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEA

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (รูปที่ 4.3) เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า ส่องดูด้วยกล้อง และทำ slide culture พบว่าไม่มีสปอร์ จึงเป็นไปได้ที่ราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 เป็นราที่ไม่มีการสร้างสปอร์หรือยังไม่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมที่จะสร้างสปอร์ และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MEA จะพบเส้นสีขาวปนค้างอกขึ้นมาจากเส้นใยที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 4.4) ซึ่งส่วนที่งอกขึ้นมานั้นเรียกว่า สโตรมา ดังนั้นจึงได้นำราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 ไปเลี้ยงบนท่อนไม้เพื่อดูลักษณะของสโตรมาที่สมบูรณ์เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 การสร้างสโตรมาของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบนกิ่งไม้ในขวดทรงสูง

จากรูป 4.5 เมื่อนำราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 มาเพาะเลี้ยงในขวดทรงสูงและใส่กิ่งไม้ลงไปเพื่อให้เชื้อเจริญไปยังกิ่งไม้และกระตุ้นให้เชื้อมีการสร้างสโตรมาหรือสปอร์เกิดขึ้น พบว่า ราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 จะมีการสร้างสโตรมาเกิดขึ้นทั้งบริเวณกิ่งไม้ที่ใส่ลงไปและบริเวณผิวหน้าอาหารแข็ง ลักษณะของสโตรมาที่สร้างขึ้นมานั้นจะเป็นเส้นสีดำ มีปมสีขาวตรงปลายของสโตรมาแต่ละเส้น

จากการลักษณะการสร้างสโตรมาของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 สามารถจัดจำแนกได้ว่าราชนิดนี้เป็นราเอ็นโดไฟต์ในตระกูล Xylariaceae (Christin และคณะ, 2003) หรืออาจเรียกว่า Endophytic Xylariaceae ราชนิดนี้จะมีลักษณะที่ต่างจากราชนิดอื่นอย่างชัดเจน คือ ราเอ็นโดไฟต์ส่วนใหญ่จะไม่มีการสร้างสโตรมา แต่ราเอ็นโดไฟต์ในตระกูล Xylariaceae นี้จะมีการสร้างของสโตรมาอย่างชัดเจนและสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

รา Xylariaceae นี้เป็นราตระกูลหนึ่งในคลาส Ascomycetes ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Non-Clavicipitaceous grass endophyte ซึ่งประกอบด้วยจีโนมประมาณ 40 จีโนม แม้ว่าราตระกูลนี้จะสามารถพบได้เกือบทุกประเทศในโลก แต่ก็ยังพบว่ารา Xylariaceae จะมีความหลากหลายทางชีวภาพมากในเขตประเทศแถบโซนร้อน ในเริ่มแรกของการศึกษาการจัดแบ่งรากลุ่ม Xylariaceae มักจะเกิดความสับสนอันเนื่องมาจากรากลุ่มนี้มีความหลากหลายทางรูปร่างลักษณะมาก และปัญหาอีกอย่างก็คือการขาดแคลนสปีชีส์ที่ได้จากประเทศแถบโซนร้อน รากลุ่มนี้มีสกุลที่รู้จักกันดีคือ Xylaria, Hypoxylon และ Daldinia มีรายงานถึง 11 สกุล ของรา Xylariaceae ที่พบว่าเป็นราเอ็นโดไฟต์ ซึ่งจะมีการรวม Camillea เข้าเป็นสกุลที่ 12 ที่พบว่าเป็นราเอ็นโดไฟต์ สกุลที่เป็นตัวแทนของ

ราเอ็นโดไฟต์ คือ *Biscogniauxia*, *Daldinia*, *Hypoxyton*, *Kretzschmaria*, *Nemania*, *Rosellinia* และ *Xylaria* (Petrini, 1985 และ Whalley, 1993, 1996) โดยคุณสมบัติที่น่าสนใจของราในกลุ่มนี้คือ รา *Xylariaceae* จะสามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีความหลากหลายอยู่หลายชนิด ซึ่งจะต่างเชื้อรา *Ascomycetes* ทั่วไป สารประกอบหลักที่รา *Xylariaceae* สร้างขึ้นได้แก่ ไดไฮโดรไอโซคูมาริน (Dihydroisocoumarins) พังตาโพโรนิน (Punctaporonins) ไซโตคาลาซิน (Cytochalasins) บิวโทโรแลคโตน (Butyroactones) และอนุพันธ์ของกรดซักซินิก (Succinic acid Derivatives) (Whalley และ Edwards, 1995) เป็นต้น



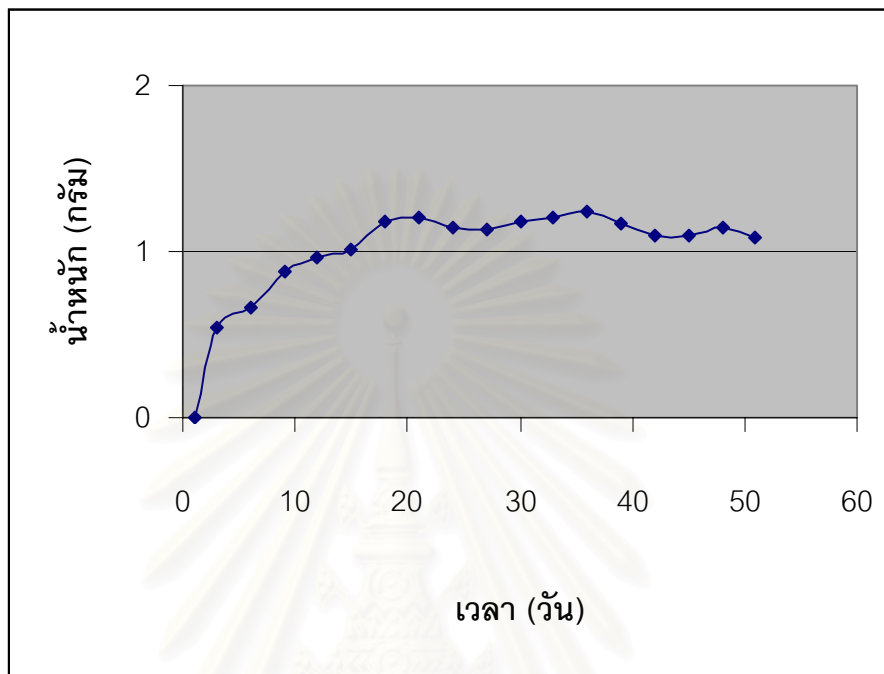
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การจัดการเจริญเติบโตและทดสอบฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18

การจัดการเจริญเติบโตของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 โดยชั่งน้ำหนักของเส้นใยรา ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 51 วัน พบว่าในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 21 ราเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว หลังจากวันที่ 21 การเจริญเติบโตจะเริ่มน้อยลงเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่ราจะมีการสร้างสารเมแทบอไลต์ขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมภายนอกหลังจากที่ราใช้อาหารไปกับการเจริญเติบโตในช่วง 21 วันแรก ข้อมูลน้ำหนักของเส้นใยราแสดงในตาราง 4.5 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของราแสดงในรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.4 ข้อมูลน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา

วันที่	น้ำหนักแห้งของเส้นใยรา (กรัม)
1	0.00
3	0.54
6	0.66
9	0.88
12	0.96
15	1.01
18	1.18
21	1.21
24	1.15
27	1.13
30	1.18
33	1.20
36	1.24
39	1.17
42	1.10
45	1.10
48	1.14
51	1.08



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18

4.5 เปอร์เซนต์ (w/w) ของสารทุติภูมิที่สร้างจากราเอ็นโดไฟต์ CHB18

จากการแยกสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (Be01) ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารทั้งหมด 12 ลำดับส่วน และแยกสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตตจากเส้นใยรา (Me01) ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารทั้งหมด 23 ลำดับส่วน นำมาคำนวณน้ำหนักสารที่แยกได้แต่ละลำดับส่วนคิดเป็นเปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ แสดงผลในตารางที่ 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซนต์ (w/v) ของสารแต่ละลำดับส่วนที่แยกจากสารสกัดหยาบเอทิลเอซิติเดจาก น้ำเลี้ยงเชื้อ (Be01) จากราเอ็นโคไฟต์สายพันธุ์ CHB18

ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก(มิลลิกรัม)	% w/v จากน้ำเลี้ยงเชื้อ
Be01.1	ครูดสีเหลือง	4.1	0.00041
Be01.2	ครูดสีเหลือง	8.2	0.00082
Be01.3	ครูดสีน้ำตาล	2.8	0.00028
Be01.4	ครูดสีเหลือง	20.1	0.00201
Be01.5	ครูดสีน้ำตาล	5.5	0.00055
Be01.6	ครูดสีน้ำตาล	41.2	0.00412
Be01.7	ครูดสีน้ำตาล	38.0	0.0038
Be01.8	ผลึกสีขาวปนน้ำมัน	55.3	0.0053
Be01.9	ครูดสีน้ำตาล	28.4	0.00284
Be01.10	ครูดสีน้ำตาล	98.5	0.00985
Be01.11	ครูดสีน้ำตาล	73.4	0.00734
Be01.12	ครูดสีน้ำตาล	58.7	0.00587
Be01.13	ครูดสีน้ำตาล	158.8	0.01588
Be01.14	ครูดสีน้ำตาล	128.1	0.01281

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 เปอร์เซนต์ (w/w) ของสารแต่ละลำดับส่วนที่แยกจากสารสกัดหยาบเอทิลเอซิติเตตจากเส้นใยราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18

ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก(มิลลิกรัม)	% w/w จากเส้นใยรา
MeO1.1	น้ำมันสีเหลือง	53.9	0.004
MeO1.2	น้ำมันสีเหลือง	67.1	0.005
MeO1.3	ไขสีเหลือง	65.6	0.005
MeO1.4	ไขสีขาวเหลือง	409.5	0.031
MeO1.5	ไขสีส้ม	503.6	0.039
MeO1.6	น้ำมันสีน้ำตาลแดง	747.9	0.058
MeO1.7	ครูดสีน้ำตาลแดง	51	0.003
MeO1.8	ผลึกสีขาวปนน้ำมัน	20.1	0.001
MeO1.9	ครูดสีน้ำตาล	10.1	0.0007
MeO1.10	ครูดสีน้ำตาล	44.8	0.003
MeO1.11	ครูดสีน้ำตาล	130.8	0.01
MeO1.12	ครูดสีน้ำตาล	90.4	0.007
MeO1.13	ครูดสีน้ำตาล	78.1	0.006
MeO1.14	ครูดสีน้ำตาล	92.7	0.007
MeO1.15	ครูดสีน้ำตาล	91.8	0.007
MeO1.16	ครูดสีน้ำตาล	101.7	0.007
MeO1.17	ครูดสีน้ำตาล	88.7	0.006
MeO1.18	ครูดสีน้ำตาล	120.5	0.009
MeO1.19	ของแข็งสีน้ำตาล	103.0	0.007
MeO1.20	ของแข็งสีน้ำตาล	352.4	0.027
MeO1.21	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม	773.4	0.06
MeO1.22	ของแข็งสีน้ำตาล	103.2	0.008
MeO1.23	ของแข็งสีน้ำตาล	33.9	0.002

4.6 การแยกสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18

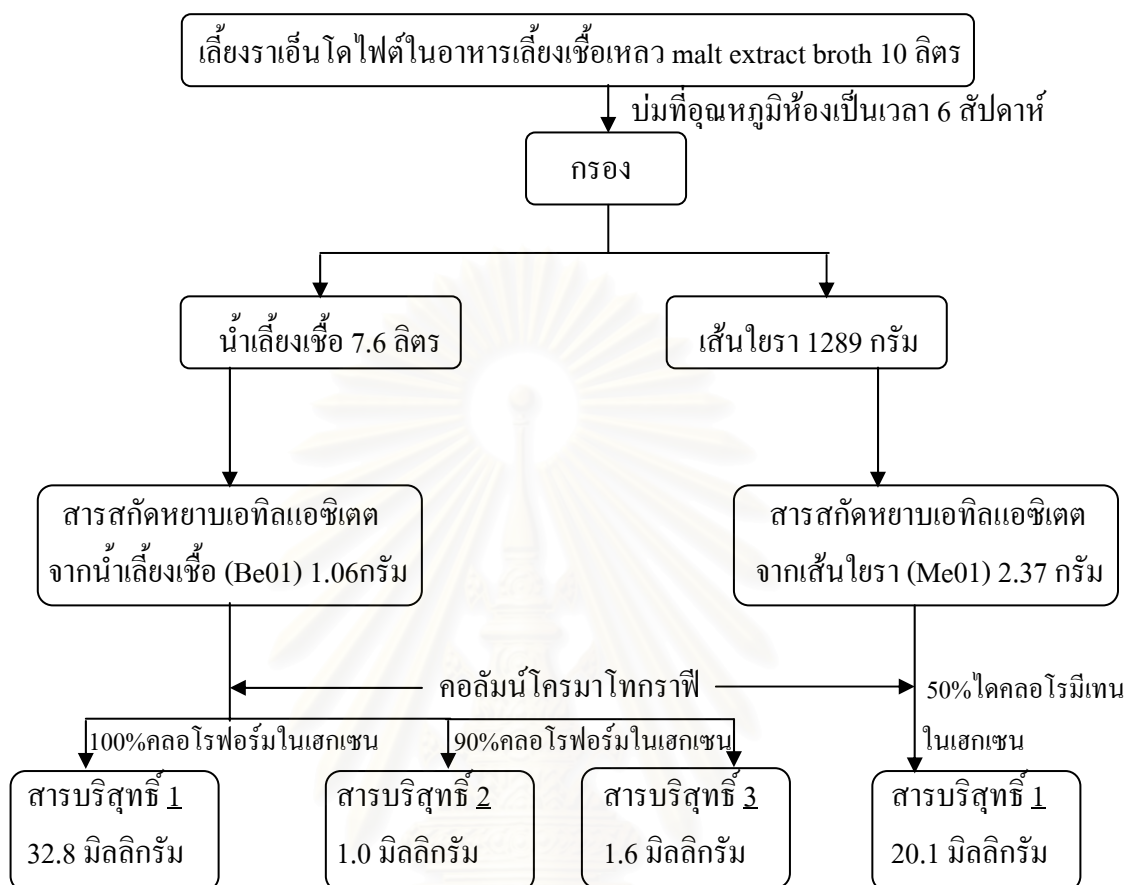
4.6.1 การแยกสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์ 1 เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ Be01.8 ของสารสกัดหยาบเอทิลเอซิติเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ(Be01) ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ คลอโรฟอร์ม 100 %เป็นตัวชะ และได้มาจากลำดับส่วนที่ Me01.8 ของสารสกัดหยาบเอทิลเอซิติเตตจากเส้นใยรา(Me01) ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน 50:50 เป็นตัวชะ ได้ผลึกสีขาวปนน้ำมัน แล้วนำมาตกผลึกซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม จากนั้นล้างผลึกด้วยเฮกเซน: คลอโรฟอร์ม 80:20 จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 52.8 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 1)

สารบริสุทธิ์ 2 เป็นของแข็งสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วน Be01.4 ของสารสกัดหยาบเอทิลเอซิติเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ(Be01) ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ เฮกเซน: คลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 10: 90 จะได้ครุคสีเหลือง แล้วนำมาทำการแยกสารต่อด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ 100% เอทิลเอซิติเตตเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ของแข็งสีขาวหนัก 2.2 มิลลิกรัมที่ค่า $R_f = 0.61$ (สารบริสุทธิ์ 2)

สารบริสุทธิ์ 3 เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี ซึ่งได้มาจากลำดับส่วน Be01.4 ของสารสกัดหยาบเอทิลเอซิติเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ(Be01) ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ เฮกเซน: คลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 10: 90 จะได้ครุคสีเหลือง แล้วนำมาทำการแยกสารต่อด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ 100% เอทิลเอซิติเตตเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ ผลึกรูปเข็มไม่มีสีหนัก 1.6 มิลลิกรัมที่ค่า $R_f = 0.49$ (สารบริสุทธิ์ 3)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.1 แสดงการแยกสารสกัดหยาบให้ได้สารบริสุทธิ์

4.6.2 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

สารบริสุทธิ์ 1 เป็นผลึกสีขาวสามารถละลายได้ในคลอโรฟอร์ม และเมทานอล มีจุดหลอมเหลว 267°C โดยมีค่า $[\alpha]^{25}$: -43 (c 0.10, CHCl_3) , -42 (c 0.74, CHCl_3) (Lebet และ Tamm, 1974)

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีได้ผลดังรูปที่ 2 ในภาคผนวก ข พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3412(s), 1746(m), 1696(m), 1567(s), 1408(s), 1271(w) และ 1007(w) cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์

เลขคลื่น (cm^{-1})	ความเข้ม	ลักษณะ
3412	สูง	O-H stretching vibration
1746	ปานกลาง	C=O stretching vibration
1696	ปานกลาง	C=O stretching vibration
1567	สูง	N-H stretching vibration
1408	สูง	C-H bending vibration of CH_3 and CH_2
1271	ต่ำ	C-N
1007	ต่ำ	C-O stretching vibration

จากข้อมูลโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 1 ดังแสดงไว้ในรูป 3 ภาคผนวก ข ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟ δ_{H} ของ 3 aromatic proton ที่ δ_{H} 7.16, 7.35 และ 7.27 ppm; 11 methine proton ที่ δ_{H} 6.14, 5.72, 5.66, 5.37, 5.17, 3.841, 3.26, 2.88, 2.78, 2.76 และ 2.18 ppm; 6 methylene proton ที่ δ_{H} 5.32, 5.12, 2.85, 2.70, 2.54 และ 2.05 ppm และ 4 methyl proton ที่ δ_{H} 2.29, 1.54, 1.23 และ 0.98 ppm

จากข้อมูลคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมและ gHSQC ของสารบริสุทธิ์ 1 แสดงในรูปที่ 4 ภาคผนวก ข พบว่าสารบริสุทธิ์ 1 มีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 30 อะตอม ซึ่งประกอบด้วย 6 aromatic methine carbon ที่ δ_{C} 137.3, 129.1(C 2 อะตอม), 128.9(C 2 อะตอม) และ 127.1 ppm; 11 methine carbon ที่ δ_{C} 134.1, 132.3, 130.6, 127.6, 77.1, 69.8, 53.5, 50.0, 46.9, 42.3 และ 32.6 ppm; 3 methylene carbon ที่ δ_{C} 114.5, 45.3 และ 37.7 ppm; 4 methyl carbon ที่

δ_c 24.2, 20.8, 19.4 และ 13.6 ppm; 1 quaternary bon ที่ δ_c 53.3 ppm; 2 methoxy carbon ที่ δ_c 69.8 และ 77.7 ppm; และ carbonyl group ที่ δ_c 210.3, 173.7 และ 169.7 ppm

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารบริสุทธิ์ 1 (รูปที่ 5 ภาคผนวก ข) พบว่าสารประกอบ 1 m/z : 507.2519 $[M+H]^+$; cal 507.2519 ทำให้ทราบสูตรโมเลกุลของ สารประกอบ 1 คือ $C_{30}H_{37}NO_6$ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 13

จากข้อมูล 2D-NMR ผลจากการวิเคราะห์ด้วย gHSQC, gHMBC และ gCOSY ประกอบกับ ข้อมูล 1H -NMR และ ^{13}C -NMR ที่สรุปไว้ในตารางที่ 4.8 และ 4.10 และข้อมูลจาก MS สเปกตรัม (m/z) (รูปที่ 9 ในภาคผนวก ข) จะได้ว่าสารบริสุทธิ์ 1 คือ cytochalasin D (Graf และคณะ, 1974) รูปโครงสร้างสารและ HMBC ของสารบริสุทธิ์ 1 แสดงในรูปที่ 4.7 และ 4.8 ตามลำดับ Cytochalasin เป็นสารเมแทบอลิต์ของราซึ่งผลิตโดยราหลายชนิด เช่น ราในจีนัส Phomopsis, Chaetomium, Hypoxylon, Xylaria และ Daldinia ซึ่งมีการรายงานครั้งแรกในปี 1967 ว่าพบสารกลุ่ม Cytochalasin ที่ผลิตโดยราหลายชนิด ได้แก่ รา *Helminthosporium dematioideum* สามารถผลิต Cytochalasin A และ B รา *Metarrhizium anisopliae* สามารถผลิต Cytochalasin C และ D ออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อและมีฤทธิ์ทางชีวภาพกับเซลล์สัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม (Aldridge และคณะ, 1967) ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาการเพิ่มสายของโปรตีน actin ในกระบวนการสร้างโครงสร้างของเซลล์ที่เรียกว่า cytoskeleton ซึ่งเป็นตัวกำหนดตำแหน่งของ organelle ต่างๆ ในเซลล์และเป็นตัวกำหนดรูปร่างของเซลล์ (Schliwa, 1982) ฤทธิ์ยับยั้งไวรัส *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis โดยไปยับยั้งที่กระบวนการ packaging ของไวรัส (Oppenheimer และคณะ, 1995) ฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง histamine ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการอักเสบ (Shin และคณะ, 1997) ฤทธิ์กระตุ้นให้โปรตีน p53 ทำงานเมื่อ actin filament ถูกทำลาย (Rubtsova และคณะ, 1998) ฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการเจริญเติบโตของ human colon adenocarcinoma cell line (HT29) (Cohen และคณะ, 1999) ฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของโปรโตซัว *Entamoeba invadens* (Makioka และคณะ, 2000) ฤทธิ์ยับยั้งความสามารถในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (Bruijns และ Bult, 2001)

ตารางที่ 4.8 gHSQC spectra ของสารบริสุทธิ์ 1

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)	$^1\text{H-NMR}$ (ppm) ค่าคงตัวการคู่ควบ (Hz)
210.3	-
173.7	-
169.7	-
147.5	-
137.2	-
134.1	5.37 (1H, dd, $J = 5.2$ and 10.4 Hz, H-14)
132.3	6.14 (1H, dd, $J = 2.8$ and 16 Hz, H-20)
130.6	5.72 (1H, dd, $J = 9.6$ and 15.6 Hz, H-13)
129.1	7.16 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-2', H-6')
128.9	7.35 (1H, dd, $J = 6.8$ and 7.6 Hz, H-3', H-5')
127.6	5.17 (1H, dd, $J = 2.8$ and 16 Hz, H-19)
127.1	7.27 (1H, dd, $J = 8.8$ and 7.2 Hz, H-4')
114.5	5.12 (2H, s, H-12), 5.329 (2H, s, H-12)
77.7	-
77.2	-
77.1	5.66 (1H, t, $J = 2.4$ and 2.4 Hz, H-21)
69.8	3.84 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-7)
53.5	3.26 (1H, dt, $J = 4.4$ and 8.8 Hz, H-3)
53.3	-
50.0	2.18 (1H, dd, $J = 3.6$ and 4.4 Hz, H-4)
46.9	2.88 (1H, dd, $J = 10$ and 9.6 Hz, H-8)
45.3	2.85 (2H, dd, $J = 4.8$ and 12.4 Hz, H-10) 2.70 (2H, dd, $J = 9.2$ and 13.2 Hz, H-10)
42.3	2.78 (1H, s, H-16)
37.7	2.54 (2H, q, $J = 11.2$ Hz, H-15) 2.05 (2H, dd, $J = 5.6$ and 13.6 Hz, H-15)

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) gHSQC spectra ของสารบริสุทธิ์ 1

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)	$^1\text{H-NMR}$ (ppm) ค่าคงตัวการคู่ควบ (Hz)
32.6	2.76 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-5)
24.2	1.54 (3H, s, H-18(CH ₃))
20.8	2.29 (3H, s, H-CH ₃ (Ac))
19.4	1.23 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-16(CH ₃))
13.6	0.98 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-11)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบ ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR ของสารบริสุทธิ์ 1 เทียบกับ Cytochalasin D

Position		สารบริสุทธิ์ 1		Cytochalasin D	
		δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (400 MHz)	δ_{H} (100MHz)	δ_{C} (100 MHz)
1	C	173.712	-	-	174.90
2	N	-	5.587	8.92	-
3	C	53.587	3.266	3.54	54.00
4	C	50.010	2.181	2.43	50.00
5	C	32.690	2.762	2.70	33.12
6	C	147.545	-	-	151.40
7	C	69.854	3.481	4.36	71.20
8	C	46.998	2.885	3.34	48.70
9	C	53.312	-	-	54.37
10	C	45.327	2.583	2.92	45.49
11	C	13.693	2.707	0.97	13.65
12	C	114.538	5.122 5.329	5.42 5.07	112.20
13	C	130.630	5.720	6.23	132.10
14	C	134.161	5.370	5.64	132.70
15	C	37.754	2.543 2.056	2.70 1.95	38.58
16	C	42.361	2.780	2.00	42.45
17	C	210.319	-	-	210.70
18	C	77.732	-	-	78.32
19	C	127.617	5.171	5.55	127.70
20	C	132.323	6.141	6.79	133.70
21	C	77.137	5.663	5.98	77.92
22	C	19.420	1.230	1.09	19.44
23	C	24.202	1.542	1.54	24.64
1'	C	137.272	-	-	138.30
2',6'	C	129.127	7.167	7.24	129.90

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) เปรียบเทียบ ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR ของสารบริสุทธิ์ 1 เทียบกับ Cytochalasin

D

Position		สารบริสุทธิ์ 1		Cytochalasin D	
		δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (400 MHz)	δ_{H} (100 MHz)	δ_{C} (100 MHz)
3', 5'	C	128.975	7.351	7.24	128.70
4'	C	127.121	7.278	7.24	126.80
C=O(Ac)	C	169.761	-	-	170.30
CH ₃ (Ac)	C	20.885	2.298	2.35	20.61

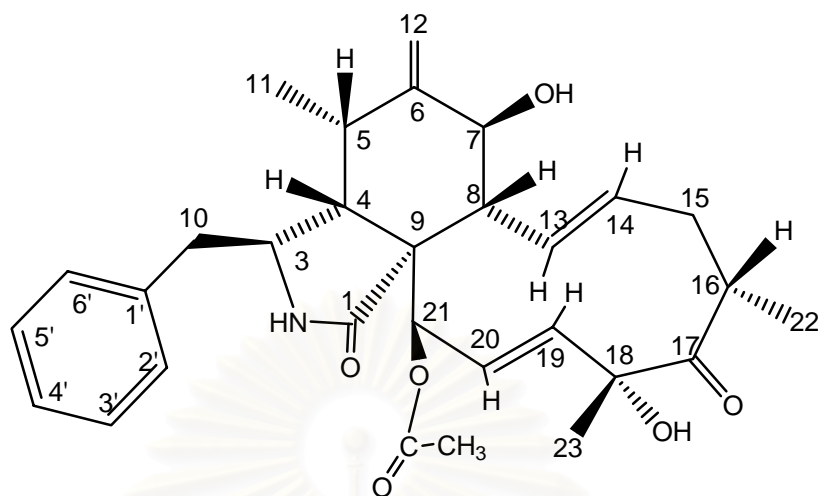
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.10 ข้อมูล gHMBC และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 1

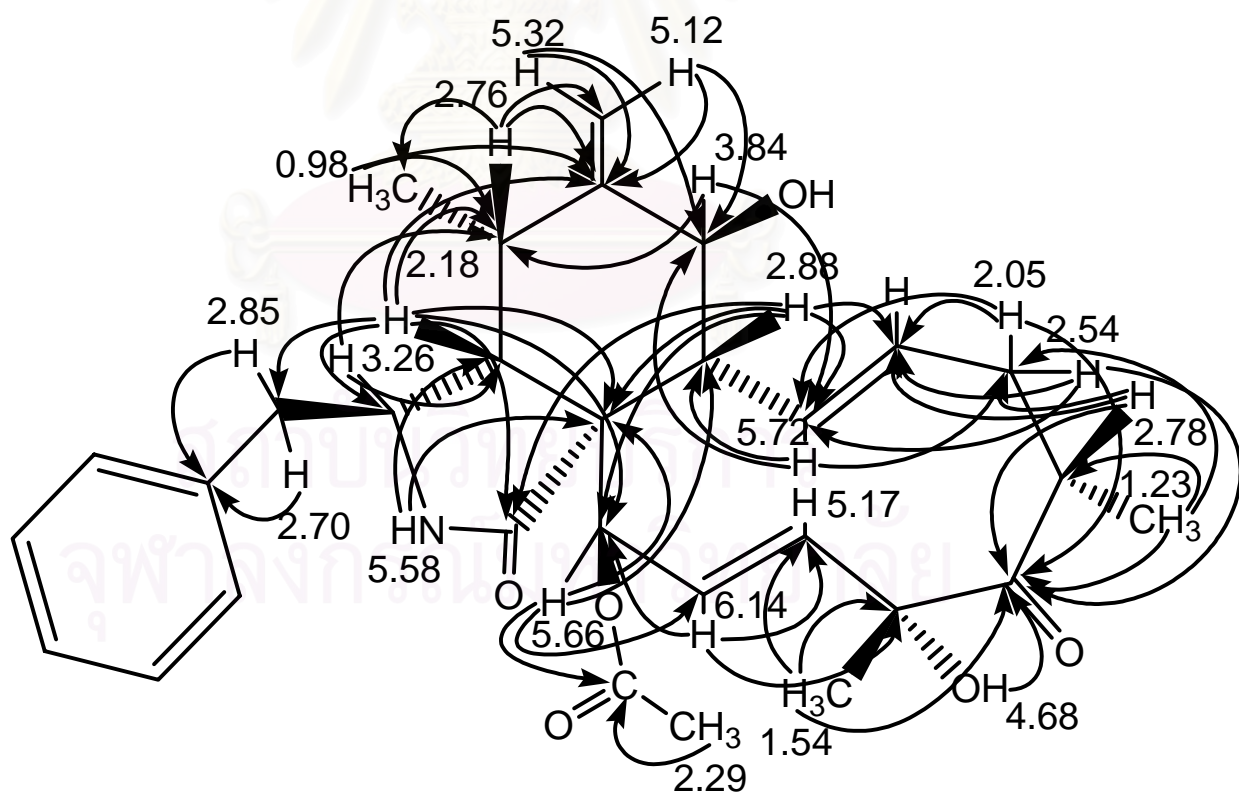
Position		δ_c	δ_H	gHMBC (H to C)	gCOSY
1	C	173.712	-	-	-
2	N	-	5.587	C-3, C-4, C-12	-
3	C	53.587	3.266	C-1, C-4, C-5, C-10	H-4, H-10
4	C	50.010	2.181	C-1, C-2, C-5, C-6, C-9, CH ₃ (Ac)	H-3, H-5, H-16
5	C	32.690	2.762	C-4, C-7, C-11	H-4, H-15
6	C	147.545	-	-	-
7	C	69.854	3.841	C-5, C-6, C-12, C-13	H-8, H-10
8	C	46.998	2.885	C-1, C-7, C-13, C-14, C-16, C-21	H-7, H-10
9	C	53.312	-	-	-
10	C	45.327	2.853 2.707	C-3, C-4, C-7, C-9, C-1' C-3, C-4, C15, C-1'	H-3, H-7, H-8, H-10 H-3, H-10
11	C	13.693	0.980	C-4, C-5, C-6	H-16
12	C	114.538	5.122 5.329	C-4, C-5, C-6, C-7, C-12 C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-12, C-15	H-13, H-19
13	C	130.630	5.720	C-4, C-5, C-7, C-8, C-9	H-12, H-14
14	C	134.161	5.370	C-6, C-7, C-8, C-15	H-13
15	C	37.754	2.543 2.056	C-13, C-14, C-16, C-17 C-13, C-14, C-17, C-16(CH ₃)	H-5, H-16
16	C	42.361	2.78	C-3, C-6, C-12, C-14, C-15, C-16(CH ₃)	H-4, H-11, H- 15, H-16(CH ₃)
17	C	210.319	-	-	-
18	C	77.732	-	-	-

ตารางที่ 4.10 (ต่อ) ข้อมูล gHMBC และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 1

Position		δ_C	δ_H	gHMBC (H to C)	gCOSY
19	C	127.617	5.171	C-18, C-20, C-21, C-18(CH ₃)	H-12, H-20, H-21
20	C	132.323	6.141	C-18, C-19, C21	H-19, H-21
21	C	77.137	5.663	C-8, C-9, C-16, C-20, C=O(CH ₃)	H-19, H-20
22	C	19.420	1.230	C-15, C-16, C-17	H-16
23	C	24.202	1.542	C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-2', C-3', C-4'	
1'	C	137.272	-	-	-
2', 6'	C	129.127	7.167	C-10, C-4'	H-3'
3', 5'	C	128.975	7.351	C-1', C-2', C-3'	H-2', H-4'
4'	C	127.121	7.278	C-2', C-3'	H-3'
C	C=O(Ac)	169.761	-	-	-
CH ₃ (Ac)	C	20.885	2.298	C-21, C=O(CH ₃)	



รูปที่ 4.7 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 1



รูปที่ 4.8 HMBC ของสารบริสุทธิ์ 1

สารบริสุทธิ์ 2 เป็นของแข็งสีขาวสามารถละลายได้ในคลอโรฟอร์ม และเมทานอล มีจุดหลอมเหลว 133-134 °C โดยมีค่า $[\alpha]_D^{25} : +10$ (c 0.10, MeOH)

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีได้ผลดังรูปที่ 10 ในภาคผนวก ข พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 2939(w), 1705(m), 1610(s), 1464(w), 1220(m) และ 772 (w) cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 2

เลขคลื่น (cm^{-1})	ความเข้ม	ลักษณะ
2939	ต่ำ	O-H stretching vibration
1705	ปานกลาง	C=O stretching vibration
1610	สูง	C=C stretching vibration
1464	ต่ำ	C-H bending vibration of CH_3
1220	ปานกลาง	C-O stretching vibration
772	ต่ำ	C-Cl stretching vibration

จากข้อมูลโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 2 ดังแสดงไว้ในรูป 11 และ 15 ภาคผนวก ข ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟ δ_H ของ 2 aromatic proton ที่ δ_H 8.06 และ 6.99 ppm; 2 methine proton ที่ δ_H 5.03 และ 4.98 ppm; และ 2 methyl proton ที่ δ_H 3.88 และ 1.28 ppm

จากข้อมูลคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมและ gHSQC ของสารบริสุทธิ์ 2 แสดงในรูปที่ 12 และ 14 ภาคผนวก ข พบว่าสารบริสุทธิ์ 2 มีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 12 อะตอม ซึ่งประกอบด้วย 4 aromatic methine carbon ที่ δ_C 165.4, 138.5, 121.5 และ 118.0 ppm; 2 quaternary bon ที่ δ_C 142.0 และ 108.0 ppm; 2 methine carbon ที่ δ_C 79.5 และ 65.1 ppm; 1 methyl carbon ที่ δ_C 18.7 ppm; 1 methoxy carbon ที่ δ_C 52.7 ppm; และ 2 carbonyl group ที่ δ_C 167.0 และ 168.0 ppm

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารบริสุทธิ์ 2 (รูปที่ 13 ภาคผนวก ข) พบว่าสารประกอบ 1 m/z : 252.0532 $[\text{M}+\text{H}]^+$; cal 252.0532 ทำให้ทราบสูตรโมเลกุลของ สารประกอบ 2 คือ $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_6$ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 5

จากข้อมูล 2D-NMR ผลจากการวิเคราะห์ด้วย gHSQC, gHMBC และ gCOSY ประกอบกับ ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่สรุปไว้ในตารางที่ 4.12 และ 4.13 และข้อมูลจาก MS สเปกตรัม (m/z) (รูปที่ 13, 14, 15 และ 16 ในภาคผนวก ข) จะได้สารบริสุทธิ์ 2 มีชื่อว่า 4-hydroxy-5-methoxycarbonylmellein พบว่าไม่มีการรายงานถึงการค้นพบสารนี้ และมีรายงานว่าพบสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสารนี้คือ 5-methoxycarbonylmellein ผลิตโดยรา *Hypoxyylon mammatum* และ 5-carboxymellein ผลิตโดยรา *H. mammatum*, *H. illitum* และ *Numularia discreta* ซึ่งราทั้งหมดนี้อยู่ใน Family Xylariaceae (Anderson และคณะ, 1983) สาร 5-carboxymellein มีฤทธิ์ยับยั้ง Human epidermoid carcinoma in the mouth และ Human breast cancer cells โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3 และ 3 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (Chinworrungsee และคณะ, 2001) ดังนั้นสารบริสุทธิ์ 2 คือ 4-hydroxy-5-methoxycarbonylmellein หรือ methyl-4,8-dihydroxy-3-methyl-1-oxoisochroman-5-carboxylate ซึ่งเป็นสารใหม่ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโครงสร้างทางเคมีของ 5-methoxycarbonylmellein เปรียบเทียบกับ สารบริสุทธิ์ 2 แสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ

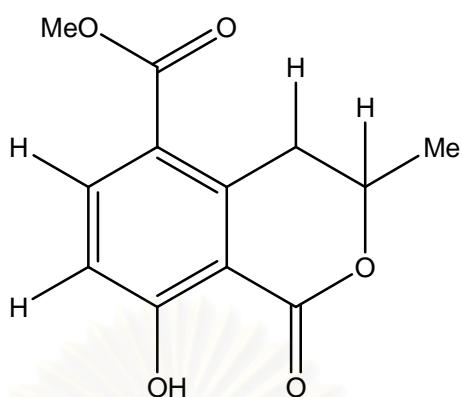
ตารางที่ 4.12 gHSQC spectra ของสารบริสุทธิ์ 2

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)	$^1\text{H-NMR}$ (ppm) ค่าคงตัวการคู่ควบ (Hz)
168.0	-
167.0	-
165.4	-
142.0	-
138.5	8.06 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 6-H)
121.5	-
118.5	6.99 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, 7-H)
108.0	-
79.5	4.98 (1H, q, $J = 6.4$ Hz, 3-H)
65.1	5.03 (1H, s, 4-H)
52.7	3.88 (3H, s, (OCH ₃)-H)
18.7	1.28 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, 2'-H)
-	11.91 (1H, s, O-H)

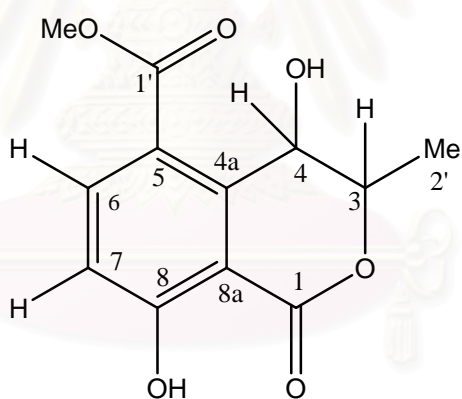
ตารางที่ 4.13 ข้อมูล gHMBC และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 2

Position		δ_C	δ_H	gHMBC (H to C)	gCOSY
1	C	168.0	-	-	-
2	O	-	-	-	-
3	C	79.5	4.98	C-1, C-4a, C-4	H-4
4	C	65.1	5.03	C-8a, C-4a, C-7	H-3
5	C	121.5	-	-	-
6	C	138.5	8.06	C-1, C-8, C-OMe, C-4a	H-7
7	C	118.1	6.99	C-5, C-8a	H-6
8	C	165.4	-	-	-
4a	C	142.0	-	-	-
8a	C	108.0	-	-	-
1'	C	52.7	3.88	C-1, C-OMe	-
2'	C	18.7	1.285	C-3, C-4	H-4
OMe	C	167.0	-	-	-
OH	-	-	11.91	C-8, C-7, C-8a	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 โครงสร้างทางเคมีของสาร 5-methoxycarbonylmellein



รูปที่ 4.10 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบริสุทธิ์ 3 เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี สามารถละลายได้ในคลอโรฟอร์ม และเมทานอล โดยมีค่า $[\alpha]_D^{25}$: +19(c 0.10, MeOH), +104(c 0.0035, Acetone) (Cafeu และคณะ, 2005)

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีได้ผลดังรูปที่ 18 ในภาคผนวก ข พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3489(m), 2919(s), 2856(m), 1670(s), 1585(m), 1256(s) และ 1045(m) cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 3

เลขคลื่น (cm^{-1})	ความเข้ม	ลักษณะ
3489	ปานกลาง	O-H stretching vibration
2919	สูง	C-H stretching vibration
2856	ปานกลาง	C-H stretching vibration
1670	สูง	C=O stretching vibration
1585	ปานกลาง	C-H bending vibration of CH_3
1256	สูง	C-O stretching vibration
1045	ปานกลาง	C-O stretching vibration

จากข้อมูลโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 3 ดังแสดงไว้ในรูป 19 และ 24 และ ภาคผนวก ข ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟ δ_H ของ 1 aromatic proton ที่ δ_H 6.07 ppm; 1 methine proton ที่ δ_H 2.83 ppm; 2 methylene proton ที่ δ_H 3.02 และ 2.42 ppm; 1 methyl proton ที่ δ_H 0.95 ppm; 3 methoxy proton ที่ δ_H 4.02, 3.97 และ 3.61 ppm

จากข้อมูลคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมและ gHSQC ของสารบริสุทธิ์ 3 แสดงในรูปที่ 20 และ 22 ภาคผนวก ข พบว่าสารบริสุทธิ์ 3 มีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 17 อะตอม ซึ่งประกอบด้วย 6 aromatic carbon ที่ δ_C 169.5, 165.4, 157.7 และ 105.1 ppm; 1 quaternary carbon ที่ δ_C 90.0 ppm; 1 methine carbon ที่ δ_C 36.4 ppm; 1 methylene carbon ที่ δ_C 40.0; methyl carbon ที่ δ_C 14.2 ppm; 3 methoxy carbon ที่ δ_C 56.9, 56.6 และ 56.3 ppm; และ 2 carbonyl group ที่ δ_C 197.0 และ 192.5 ppm

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารบริสุทธิ์ 3 (รูปที่ 21 ภาคผนวก ข) พบว่าสารประกอบ 1 m/z : 352.0611 $[M+H]^+$; cal 352.0611 ทำให้ทราบสูตรโมเลกุลของ สารประกอบ 3 คือ $C_{17}H_{17}ClO_6$ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 6

จากข้อมูล 2D-NMR ผลจากการวิเคราะห์ด้วย gHSQC, gHMBC และ gCOSY ประกอบกับ ข้อมูล 1H -NMR และ ^{13}C -NMR เปรียบเทียบกับสาร griseofulvin ที่สรุปไว้ในตารางที่ 4.15, 4.16 และ 4.17 และข้อมูลจาก MS สเปกตรัม (m/z) (รูปที่ 21, 22, 23 และ 24 ในภาคผนวก ข) จะได้สารบริสุทธิ์ 3 มีชื่อ griseofulvin (Sato และ Oda, 1976) มีรายงานว่าพบสารนี้ครั้งแรกในปี 1939 จากน้ำเลี้ยงเชื้อของราในจีนัส *Penicillium* ได้แก่ *P. griseofulvum*, *P. janczewski* และ *P. patulum* ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรากลุ่ม Dermatophytic ได้แก่ราในจีนัส *Microsporum*, *Trychophyton* และ *Epidermophyton* (Carli และ Larizza, 1988) และยังพบสารนี้ในรา *Xylaria* sp. ซึ่งเป็นราเอ็นโดไฟต์ของ *Palicourea marcgravii* (Cafeu และคณะ, 2005)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.15 gHSQC spectra ของสารบริสุทธิ์ 3

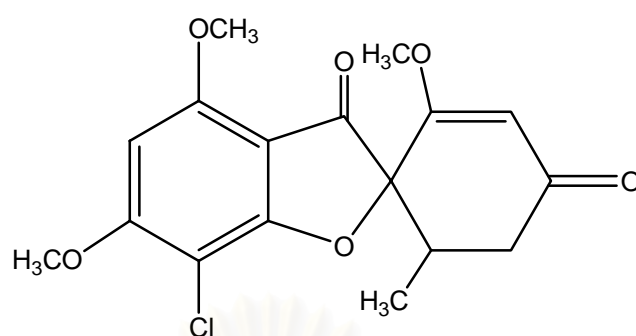
$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)	$^1\text{H-NMR}$ (ppm) ค่าคงตัวการคู่ควบ (Hz)
197.0	-
192.5	-
170.7	-
169.5	-
164.5	-
157.7	-
105.1	-
104.8	5.539(1H, s, H-3a)
97.2	-
90.7	-
89.4	6.125(1H, s, H-5)
56.9	4.02(3H, s, H-(2'-OCH ₃))
56.6	3.61(3H, s, H-(6-OCH ₃))
56.3	3.97(3H, s, H-(4-OCH ₃))
40.0	2.42(2H, dd, $J = 4.8$ and 16.8 Hz, H-5') 3.02(2H, dd, $J = 16.8$ and 14 Hz, H-5')
36.4	2.83(1H, m, $J = 4.8, 14$ and 6.4 Hz, H-6')
14.2	0.95(3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-6-CH ₃)

ตารางที่ 4.16 เปรียบเทียบ ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR ของสารบริสุทธิ์ 3 เทียบกับ Griseofulvin

Position	สารบริสุทธิ์ 3		Griseofulvin	
	δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (400 MHz)	δ_{H} (500 MHz)	δ_{C} (125 MHz)
3	192.5	-	-	192.6
4	164.5	-	-	164.8
5	89.5	6.12	6.07	89.8
6	157.7	-	-	158.0
7	97.2	-	-	97.6
3a	105.1	-	-	105.4
7a	169.5	-	-	169.8
4-OCH ₃	56.9	4.02	3.97	57.2
6-OCH ₃	56.3	3.97	3.92	56.6
2'-OCH ₃	56.6	3.61	3.56	56.9
1'	90.7	-	-	91.0
2'	170.7	-	-	171.0
3'	104.8	5.53	5.48	105.1
4'	197.0	-	-	197.2
5'	40.0	2.42 3.02	2.37 2.97	40.3
6'	36.4	2.83	2.68	36.7
6'-CH ₃	14.2	0.95	0.89	14.4

ตารางที่ 4.17 ข้อมูล gHMBC และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 3

Position		δ_C	δ_H	gHMBC (H to C)	gCOSY
4	C	164.5	-	-	-
5	C	89.5	6.12	6'-CH ₃ , 5', 6', 3a	H-(4-OCH ₃)
6	C	157.7	-	-	-
7	C	97.2	-	-	-
3a	C	105.1	-	-	-
7a	C	169.5	-	-	-
4-OCH ₃	C	56.9	4.02	4	H-6
6-OCH ₃	C	56.3	3.97	6	H-(6-OCH ₃), H-(2'-OCH ₃)
2'-OCH ₃	C	56.6	3.61	7a	H-3a, H-(4-OCH ₃)
3	C	192.5	-	-	-
1'	C	90.7	-	-	-
2'	C	170.7	-	-	-
3'	C	104.8	5.53	7a, 5, 5'	H-(2'-OCH ₃)
4'	C	197.0	-	-	-
5'	C	40.0	2.42	3, 5, 6'	H-6', H-(6'-CH ₃)
			3.02	4', 6'	H-6'
6'	C	36.4	2.83	3, 5	H-5', H-(6'-CH ₃)
6'-CH ₃	C	14.2	0.95	5, 5', 6'	H-(4-OCH ₃), H-(6-OCH ₃), H-6'



รูปที่ 4.11 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 3



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

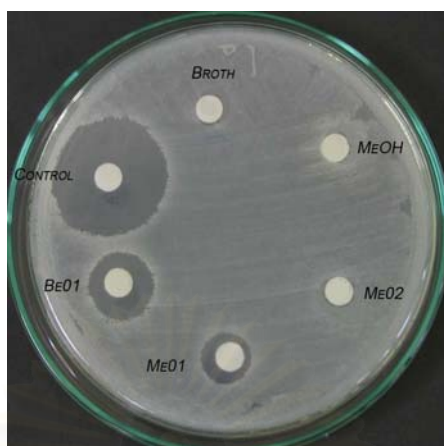
4.7.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

4.7.1.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18

เลี้ยงราเอ็นโดไฟต์ CHB18 ในอาหารเหลว MEB 10 ลิตร ได้สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนเอทิลแอลกอฮอล์ (Be01) 1.06 กรัม สารสกัดหยาบจากเส้นใยราส่วนเอทิลแอลกอฮอล์ (Me01) 2.37 กรัม และสารสกัดหยาบจากเส้นใยราส่วนเมทานอล (Me02) 2.43 กรัม จากนั้นนำสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนมาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้วิธี Paper disk diffusion method พบว่าสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนเอทิลแอลกอฮอล์ และสารสกัดหยาบจากเส้นใยราส่วนเอทิลแอลกอฮอล์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แสดงผลในตารางที่ 4.18 และรูปที่ 4.12

ตารางที่ 4.18 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบเอทิลแอลกอฮอล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (Be01) สารสกัดหยาบเอทิลแอลกอฮอล์จากเส้นใยรา (Me01) และสารสกัดหยาบเมทานอลจากเส้นใยรา (Me02) เปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวก Streptomycin

สาร	ความเข้มข้น สาร (มก./มล.)	บริเวณยับยั้งการเจริญ (เซนติเมตร)				
		แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
		<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
Be01	1	1.2	-	-	-	-
Me01	1	1.1	-	-	-	-
Me02	1	-	-	-	-	-
Streptomycin	1	2.3	2.2	2.3	1.8	-



รูปที่ 4.12 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดหยาบเอทิลแอลกอฮอล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (Be01) สารสกัดหยาบเอทิลแอลกอฮอล์จากเส้นใยรา (Me01) และสารสกัดหยาบเมทานอลจากเส้นใยรา (Mm01) เปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวก Streptomycin

4.7.1.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารแต่ละลำดับส่วน

นำสารแต่ละลำดับส่วนมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 โดยใช้วิธี Paper disk diffusion method ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.19 และ 4.20 และรูปที่ 4.13

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

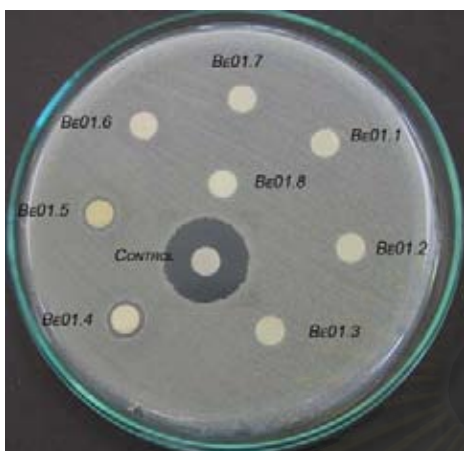
ตารางที่ 4.19 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารแต่ละลำดับส่วนที่แยกจากสารสกัด
 หยาบเอทิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (Be01) จากราเอ็นโดไฟต์ CHB18 โดยใช้วิธี Paper disk
 diffusion method เปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวก Streptomycin

ลำดับส่วนที่	บริเวณยับยั้งการเจริญ (เซนติเมตร)				
	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
	<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
BeO1.1	-	-	-	-	-
BeO1.2	-	-	-	-	-
BeO1.3	-	-	-	-	-
BeO1.4	0.8	-	-	-	-
BeO1.5	0.7	-	-	-	-
BeO1.6	-	-	-	-	-
BeO1.7	-	-	-	-	-
BeO1.8	-	-	-	-	-
BeO1.9	-	-	-	-	-
BeO1.10	-	-	-	-	-
BeO1.11	-	-	-	-	-
BeO1.12	-	-	-	-	-
Streptomycin	2.6	2.4	2.4	2.6	-

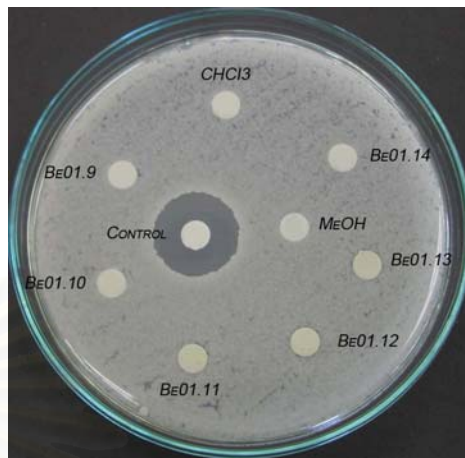
สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.20 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารแต่ละลำดับส่วนที่แยกจากสารสกัด
 หยาบเอทิลแอซิเตตจากเส้นใยรา (Me01) จากราเอ็น โค ไฟล์ CHB18 โดยใช้วิธี Paper disk diffusion
 method เปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวก Streptomycin

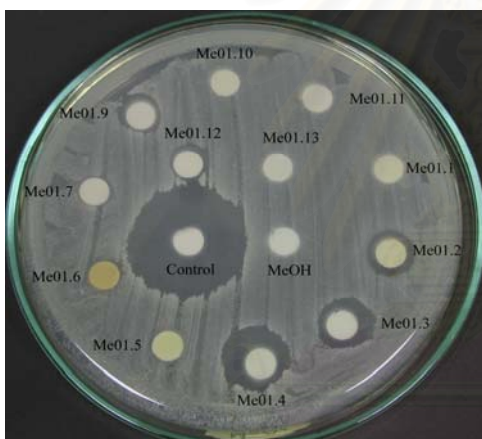
ลำดับส่วนที่	บริเวณยับยั้งการเจริญ (เซนติเมตร)				
	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Me01.1	-	-	-	-	-
Me01.2	1.0	-	-	-	-
Me01.3	1.1	-	-	-	-
Me01.4	1.2	-	-	-	-
Me01.5	-	-	-	-	-
Me01.6	-	-	-	-	-
Me01.7	-	-	-	-	-
Me01.8	-	-	-	-	-
Me01.9	0.8	-	-	-	-
Me01.10	-	-	-	-	-
Me01.11	-	-	-	-	-
Me01.12	0.8	-	-	-	-
Me01.13	-	-	-	-	-
Me01.14	-	-	-	-	-
Me01.15	-	-	-	-	-
Me01.16	-	-	-	-	-
Me01.17	-	-	-	-	-
Me01.18	-	-	-	-	-
Me01.19	-	-	-	-	-
Me01.20	-	-	-	-	-
Me01.21	-	-	-	-	-
Me01.22	-	-	-	-	-
Me01.23	-	-	-	-	-
Streptomycin	2.6	2.4	2.4	2.6	-



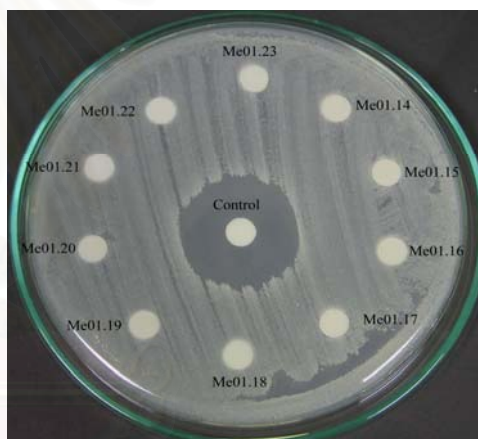
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 4.13 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของสารแต่ละลำดับส่วน
 (ก) แยกจากสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (Be01) ลำดับส่วนที่ Be01.1-Be01.8
 (ข) แยกจากสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (Be01) ลำดับส่วนที่ Be01.9-Be01.14
 (ค) แยกจากสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตดจากเส้นใยรา (Me01) ลำดับส่วนที่ Me01.1-Me01.13
 (ง) แยกจากสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตดจากเส้นใยรา (Me01) ลำดับส่วนที่ Me01.14-Me01.23

4.7.1.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์

นำสารบริสุทธิ์มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เพื่อหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สารสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Minimum Inhibitory concentration, MIC) เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 โดยใช้วิธี microdilution broth susceptibility testing ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.21

ตารางที่ 4.21 ผลการทดสอบฤทธิ์เพื่อหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สารสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ (MIC)

สาร	MIC $\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$				
	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Cytochalasin D	7.81(15.37)	-	-	-	-
4-hydroxy-5-methoxycarbonylmellein	-	-	-	7.81(30.98)	7.81(30.98)
Griseofulvin	-	-	-	7.81(22.18)	7.81(22.18)
Streptomycin	-	-	15.63(10.71)	62.5(42.81)	-
Penicillin G	15.63(43.88)	7.82(21.96)	-	-	-
Ketoconazole	-	-	-	-	31.25(58.80)

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

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เพื่อหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สารสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้พบว่า Cytochalasin D (สารบริสุทธิ์ 1) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ $7.81(15.37) \mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$ สาร 4-hydroxy-5-methoxycarbonylmellein สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ $7.81(30.98)$ และ $7.81(30.98)$ ตามลำดับ สาร

Griseofulvin สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.81(22.18) และ 7.81(22.18) ตามลำดับ

4.7.1.4 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์

นำสารบริสุทธิ์มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620) เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) เซลล์มะเร็งกระเพาะ (KATO-3) เซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2) และเซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) ในหลอดทดลองด้วยวิธี colorimetric ได้ผลดังตารางที่ 4.22

ตารางที่ 4.22 ฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ 1

สารบริสุทธิ์	IC ₅₀ , µg/ml(µM)				
	SW620 (colon)	HEP-G2 (hepatoma)	CHAGO (lung)	BT474 (breast)	KATO-3 (gastric)
1	9.9(19.49)	8.8(17.32)	>10	>10	8.2(16.14)
Doxorubicin	0.09(0.15)	0.7(1.21)	0.7(1.21)	>10	>10

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ พบว่าสารบริสุทธิ์ 1 (cytochalasin D) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW 620) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 9.9(19.49), 8.8(17.32) และ 8.2(16.14) µg/ml(µM) ตามลำดับ มีการทดลองว่า สาร cytochalasin D สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง human colon adenocarcinoma cell line (HT29) (Cohen และคณะ, 1999)

ในการทดลองนี้ไม่ได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ 2 และสารบริสุทธิ์ 3 เนื่องจากมีปริมาณสารไม่เพียงพอในการทดสอบ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอ็นโดไฟต์ที่แยกจากใบกระถ่อนจากจังหวัดจันทบุรี สามารถแยกราเอ็นโดไฟต์ได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต มีราเอ็นโดไฟต์ที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้งหมด 8 ไอโซเลต ราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ CHB18 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร malt extract สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับราตัวอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์เช่นเดียวกัน และสามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ATCC 10231

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอ็นโดไฟต์ไอโซเลต CHB18 พบว่าเป็นราในตระกูล Xylariaceae

เมื่อนำราเอ็นโดไฟต์ไอโซเลต CHB18 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว malt extract เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทำการแยกสารบริสุทธิ์จากน้ำหมักและเส้นใยของราด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีและการตกผลึก และหาสูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวโดยอาศัยสมบัติทางกายภาพและเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี พบว่าส่วนสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและส่วนสกัดจากเส้นใยราได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิดคือ Cytochalasin D (สารบริสุทธิ์ 1) 4-hydroxy-5-methoxycarbonylmellein (สารบริสุทธิ์ 2) และ griseofulvin (สารบริสุทธิ์ 3)

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์พบว่า Cytochalasin D มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* ATCC 6633 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.81(15.37) $\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$

4-hydroxy-5-methoxycarbonylmellein สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.81(30.98) และ 7.81(30.98) ตามลำดับ

Griseofulvin สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.81(22.18) และ 7.81(22.18) ตามลำดับ

และนำสารบริสุทธิ์มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งคน 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW 620) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.9(19.49), 8.8(17.32) และ 8.2(16.14) $\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$ ตามลำดับ ไม่ได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ 2 และสารบริสุทธิ์ 3 เนื่องจากมีปริมาณสารไม่เพียงพอในการทดสอบ

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2542. ผักพื้นบ้านภาคใต้.
องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก กรุงเทพฯ. หน้า 16-17.

ภาษาอังกฤษ

- Aldridge, D.C., Armstrong, J.J., Speake, R.N., and Turner, W.B. 1967. The cytochalasins, a new class of biologically active mould metabolites. Chemical Communication. 26-27.
- Anderson, J. R., Edwards, R.L., and Whalley A.J.S. 1983. Metabolites of the higher fungi. Part 21. 3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins and related compounds from the Ascomycete family Xalariaceae. Journal of chemical society Perkin Trans I. 2185-2192.
- Bacon, C. W. and White, J. F., Jr. 2000. Microbial endophytes. New York: Marcel Dekker,
- Berny, P., Jaussaud, P., Durix, A., Ravel, C. and Bony, S. 1997. Rapid determination of the mycotoxin lolitrem B in endophyte-infected perennial ryegrass by high-performance thin-layer chromatography a validated assay. Journal of Chromatography A 769: 343-348.
- Berny, P., Jaussaud, P., Durix, A., Ravel, C., and Bony, S. 1997. Rapid determination of the mycotoxin lolitrem B in endophyte-infected perennial ryegrass by high-performance thin-layer chromatography a validated assay. Journal of Chromatography A. 769: 343-348.
- Blodgett, J.T., Swart, W.J., Louw., and Weeks, W.J. 2000. Species composition of endophytic fungi in *Amaranthus hybridus* leaves, petioles, stem, and roots. Mycologia. 92(5): 853-859.
- Brady, S.F., and Clardy, J. 2000. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. Journal of Natural Product. 63: 1447-1448.
- Brujins, R.H.J., and Bult, H. 2001. Effects of local cytochalasin D delivery on smooth muscle cell migration and on collar-induced intimal hyperplasia in the rabbit carotid artery. British Journal of Pharmacology. 134: 473-483.
- Cafeu, M.C., Silva, G.H., Teles, and Araujo, R.A. 2005. Substancias antifungicas de *Xylaria* sp., um fungo endofitico isolado de *Palicourea marcgravi*(Rubiaceae). Quim. Nova. 28: 991-995
- Carli, L.D., and Larizza, L. 1988. Griseofulvin. Mutation Research. 195: 91-126.

- Carmichael, J., Park, J.G., Kramer, B.S., Steinberg, S.M., Collins, J.M., Minna, J.D., and Gazdar, A.F. 1987. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assays. Cancer Research. 47: 5875-5879.
- Carroll, G.C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiot. Ecology 69: 2-9.
- Carroll, G.C. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. pp. 205-222. In Microbiology of the Phyllosphere (eds N.J. Fokkema and J. Van den Heuvel). Cambridge: Cambridge University Press.
- Chen, G., Lin, Y., Wen, L., Vrijmoed, L.L.P. and Gareth Jones, E.B. 2003. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (No. 1893) from an estuarine mangrove on the south china sea coast. Tetrahedron 59: 4907-4909.
- Chinworrungsee, M., Kittakoop, P., Isaka, M., Rungrod, A., Tantichareon, M., and Thebtaranonth, Y. 2001. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 11: 1965-1969.
- Christine Davis, E., Franklin, J.B., Jonathan Shaw, A., and Vilgalys, R. 2003. Endophytic Xylaria (Xylariaceae) among Liverworts and Angiosperm: Phylogenetics, Distribution and Symbiosis. American Journal of Botany. 90(11): 1661-1667.
- Cohen, E., Ophir, I., and Shaul, Y.B. 1999. Induced differentiation in HT29, a human adenocarcinoma cell line. Journal of cell science. 112: 2657-2666.
- Daisy, B.H., Strobel, G.A., Castillo, U., Ezra, D., Sears, J., Weaver, D., and Runyon, J.B. 2002. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. Microbiology. 148: 3737-3741.
- Ganer, G.B., Rottinghaus, G.E., Cornell, C.N. and Testereci, H. 1993. Chemistry of compounds associated with endophyte/grass interaction: ergovaline- and ergopeptine-related alkaloids. Agriculture, Ecosystems and Environment 44: 65-80.
- Gatenby, W.A., Munday-Finch, S.C., Wilkins, A.L. and Miles, C. O. 1999. Terpendole M, a novel indole-diterpenoid isolated from *Lolium perenne* infected with the endophytic fungus *Neotyphodium lolii*. Journal of Agricultural & Food Chemistry. 47: 1092-1097.
- Graf, W., Robert, J.L., Vederas, J.C., and Tamm, C. 1974. Biosynthesis of the cytochalasins part III ¹³C-NMR of cytochalasin B (Phomin) and cytochalasin D incorporation of [^{1-¹³C}]-and [^{2-¹³C}]-sodium acetate. Helvetica Chimica Acta. 57: 1801-1815.

- Guo, B., Dai, J., Ng, S., Huang, Y., Leong, C., Ong, W., and Carte, B.K. 2000. Cytonic acid A and B : novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* sp. Journal of Natural Product. 63: 602-604.
- Harper, J.K., Arif, A.M., Ford, E.J., Strobe, G.A., Porco, J.A., Tomor, D.P., Oneill, K.L., Heider, E. M. and Grant, D. M. 2003. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. Tetrahedron 59: 2471-2476.
- Hawksworth, D. L. 1991. Presidential Address 1990. The fungal dimension of diversity: magnitude, significance and conservation. Mycological Research. 95: 641-655.
- Horn, W.S., Simmonds, M.S.J., Schwartz, R.E., and Blaney, W.M., 1995. Phomopsichalasin, a Novel Antimicrobial Agent from an Endophytic *Phomopsis* sp. Tetrahedron. 51: 3969.
- Intan, S.I., Hideyuki, I., Tsuyomu, H., Shoko, T., and Takashi, Y. 2003. Modified limonoids from the leaves of *Sandoricum koetjape*.
- Issac, S. 1992. Fungal-Plant Interaction. 1st ed. London: Chapman & Hall.
- Jayasuriya, H., Bills, G.F., Cascales, C., Zink, D.L., Goetz, M.A., Jenkins, R.G., Silverman, K.C., Lingham, R.B. and Singh, S.B. 1996. Oreganic acid: a potent novel inhibitor of ras farnesyl-protein transferase from an endophytic fungus. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 6(17): 2081-2084.
- Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D., and Washington, J.A. 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disc diffusion method. In P.R. Murray; E.J. Baron; M.A. Pfaller; F.C. Tenover and R.H. Tenover (eds.) Manual of clinical microbiology (7th edition). Washington D.C., ASM press. pp. 1526-1542.
- Ju, Y., Sacalis, J.N. and Still, C.C. 1998. Bioactive flavonoids from endophyte-infected blue Grass (*Poa ampla*). Journal of Agricultural & Food Chemistry. 46: 3785-3788.
- Kaneda, N., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., Farnsworth, N. R., Santisuk, T., Tuchida, P., Udchachon, J. and Reutrakul, V. 1992. Journal of Natural Product. 55: 654.
- King, F. E. and Morgan, J. W. W. 1960. Journal of the Chemical Society. 4738.
- Kongsaeree, P., Prabpai, S., Sriubolmass, N., Vongvein, C. and Wiyakrutta, S. 2003. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. Journal of Natural Product. 66: 709-711.

- Konig, G.M., Wright, A.D., Aust, H., Draeger, S. and Schulz, B. 1999. Gemiculol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. Journal of Natural Product. 62: 155-157.
- Kosela, S., Yulizar, Y., Chairul., Tori, M., and Asakawa, Y. 1995. Secomultiflorane-type triterpenoid acids from stem bark of *Sandoricum koetjape*. Phytochemistry 38: 691-694.
- Krohn, K., Florde, U., John, M., Root, N., Steingrover, K., Aust, H., Draeger, S., Schulz, B., Antus, S., Simonyi, M. and Zsila, F. 2001. Biologically active metabolites from fungi. Part 16: New preussomerins J, K and L from an endophytic fungus: structure elucidation, crystal structure analysis and determination of absolute configuration by CD calculations. Tetrahedron 57: 4343-4348.
- Lebet, C.R., and Tamm, C. 1974. Biosynthese der Cytochalasane. Teil II die grundbausteine von cytochalsin D. Helvetica Chimica Acta. 57: 1785-1801.
- Lee, J., Lobkovsky, E., Pliam, N.B., Strobel, G.A., Clardy, J. 1995. Subglutinols A and B : Immunosuppressive Compound from the Endophytic Fungus *Fusarium subglutinans*. Journal of Organic Chemistry. 60: 7076-7077.
- Li, J.Y. and Strobel, G.A. 2001. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycetes cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. Phytochemistry 57: 261-265.
- Li, J., Sidhu, R.S., Bollon, A. and Strobel, G.A. 1998. Stimulation of taxol production in liquid cultures of *Pestalotiopsis microspora*. Mycological Research. 102(4): 461-464.
- Li, J., Sidhu, R.S., Ford, E.J., Long, D.M., Hess, W.M. and Strobel, G.A. 1998. The induction of taxol production in the endophytic fungus *Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 20: 259-264.
- Li, J., Strobel, G., Sidhu, R. and Hess, W.M. 1996. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. Microbiology 142: 2223-2226.
- Liu, C.H., Zou, W.X., Lu, H., and Tan, R.X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophytic cultures against phytopathogenic fungi. Journal of Biotechnology. 88:277-282
- Lu, H., Zou, W.X., Meag, J.C., Hu, J. and Tan, R.X. 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. Plant Science 151: 67-73.

- Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., and Takeuchi, T. 2000. Effect of cytochalasin D on the growth, encystations, and multinucleation of *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 86: 599-602.
- McBrien, K.D., Gao, Q. Huang, S., Klohr, S.E., Wang, R.R., Pimik, D.M., Neddermann, K.M., Bursuker, J., Kadom, K.F., and Leet, J.E. 1996. Fusaricide, a New Cytotoxic N-Hydroxypyridone from *fusarium* sp. Journal of Natural Product. 59:1151-1153.
- Metz, A.M., Haddad, A. and Worapong, J. 2000. Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. Microbiology 146: 2079-2089.
- Oppenheimer, D.I., and Volkman, L.E. 1995. Proteolysis of p6.9 induced by cytochalasin D in *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus-infected cells. Virology. 207: 1-11.
- Petrini, O. 1996. Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi. In S.C. Redlin, and L.M. Carris(eds.), Endophytic fungi in grasses and Woody Plants 2nd ed., APS Press St. Paul, MN 87-100. St. 87-100.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophyte of tree leaves. In Andrews, J.H., and Hirano, S.S. (eds.), Microbial Ecology of leaves. pp. 179-187. NewYork: Springer-Verlag.
- Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. Pages 175-178 in: Microbiology of the phyllosphere. N.J. Foddema and J. van den Heuvel, eds. Cambridge: Cambridge University Press.
- Petrini, L., and Petrini O. 1985. Xylariaceous fungi as endophytes. Sydowia 38: 216-234.
- Polishook, J.D., Dombrowski, A.W., Tsou, N.N., Salituro, G.M. and Curotto, J.E. 1993. Preussomerin D from the endophyte *Hormonema dematioides*. Mycologia 85(1): 62-64.
- Powell, R. G., Mikolajczak, K. L., Zilkowski, B. W., Mantus, E. K., Cherry, D. and Clary, J. 1991. Journal of Natural Product. 54:241.
- Pulici, M., Sugawara, F., Koshino, H., Uzawa, J. and Yoshida, S. 1996. Pestalotiopsis A and B: New caryphyllenes from an endophytic fungus of *Taxus brevifolia*. Journal of Organic Chemistry. 61: 2122-2124.
- Ratnayake, A.S., Yoshida, W.Y., Mooberry, S.L. and Hemscheidt, T. 2001. The structure of microcarpalid, a microfilament disrupting agent from an endophytic fungus. Organic Letters 3(22): 3479-3481.

- Ratnayake, A.S., Yoshida, W.Y., Mooberry, S.L. and Hemscheidt, T.K. 2001. Nomofungin: a new microfilament disrupting agent. Journal of Organic Chemistry. 66: 8717- 8721.
- Richard, G.P., Kenneth. L.M., and Bruce. W.Z. 1991. Limonoid Antifeedants from Seed of *Sandoricum Koetjape*. Journal of Natural Products. 54: 241-246.
- Rowan, D.D. 1993. Loitrems, peramine and paxilline: mycotoxins of the ryegrass/endophyte interaction. Agriculture, Ecosystems and Environment 44: 103-122.
- Rubtsova, S.N., Kondratov, R.V., Kopnin, P.B., Chumakov, P.M., Kopnin, B.P., and Vasiliev, J.M. 1998. Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53. FEBS Letters. 430: 353-357.
- Santos, R.M.G. and Rodrigues-Fo, E. 2002. Meroterpenes from *Penicillium* sp. found in association with *Melia azedarach*. Phytochemistry 61: 907-912.
- Sato, Y., and Oda, T. 1976. Griseofulvin Biosynthesis: New evidence of two acetate-disposition in the ring A from ^{13}C nuclear magnetic resonance studies. Tetrahedron Letters. 44: 3971-3974.
- Schardl, C.L., and Phillips, T.D. 1997. Protective grass endophytes: Where are they from and where are they going?. Plant disease Reporter. 81: 430-438.
- Schliwa, M. 1982. Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. The Journal of cell biology. 92: 79-91.
- Schulz, B., Sucker, J., Aust, H.J., Krohn, K., Ludewig, K., Jones, P.G. and Doring, D. 1995. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. Mycological Research. 99(8): 1007-1015.
- Shin, H.Y., Lee, E.H., Shin, T.Y., and Kim, H.M. 1997. Effect of cytochalasin D on systematic and local anaphylaxis in murine model. Pharmacological Research. 36: 141-146.
- Stinson, M., Ezra, D., Hess, W.M., Sears, J. and Strobel, G. 2003. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. Plant Science 165: 913-922.
- Stierle, A.A., Stierle, D.B. Bugni, T. 1999. Sequoiatones A and B: Novel antitumor metabolites isolated from a redwood endophyte. Journal of Organic Chemistry. 64: 5479-5484.

- Stierle, A. and Strobel, G. 1995. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific Yew, *Taxus brevifolia*. Journal of Natural Products. 58(9): 1315-1324.
- Stierle, A., Strobel, G. and Stierle, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. Science 260: 214-216.
- Strobel, G. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. Microbes and Infection 5: 535-544.
- Strobel, G., Ford, E., Worapong, J., Harper, J.K., Arif, A.M., Grant, D.M., Fung, P.C.W. and Chau, R.M.W. 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. Phytochemistry 60: 179-183.
- Strobel, G., Hess, W.M., Baird, G., Ford, E., Li, J.Y. and Sidhu, R.S. 2001. *Stegolerium kukenani* gen. et sp. nov. an endophytic, taxol producing fungus from the Roraima and Kukenan tepuis of Venezuela. Mycotaxon LXXVIII: 353-361.
- Strobel, G.A., Miller, R.V., Martinez-Miller, C., Condrón, M.M., Teplow, D.B. and Hess, W.M. 1999. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. Microbiology.145: 1919-1926.
- Strobel, G.A., and Long, D.M. 1998. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. ASM News. 64: 263-268.
- Strobel, G.A., Hess, W.M., Li, J., Ford, E. and Sears, J. 1997. *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophytic of the Wollemi Pine, *Wollemia nobilis*. Australian Journal of Botany. 45: 1073-1082.
- Strobel, G.A., Torczynski, R. and Bollon, A. 1997. *Acremonium* sp. –a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). Plant Science. 128: 97-108.
- Strobel, G., Yang, X., Sears, J. and Kramer, R. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. Microbiology. 142: 435-440.
- Strobel, G. and Stierle, A. 1993. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbiferous hyphomycete associated with Pacific Yew (*Taxus brevifolia*). Mycotaxon. XLVII: 71-80.
- Sun, D.I., Starck, S.R., Locke, E.P., and Hecht, S.M. 1999. DNA Polymerase β Inhibitors from *Sandoricum koetjape*. Journal of Natural Products. 62: 1110-1113.

- Tan, R.X., and Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. Natural product report. 18: 448-459.
- Tanaka, T., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Fujimoto, H., Okuyama, E., Hayashi, M., Komiyamam, K., and Ishibashi, M. 2001. New Multiflorane-Type Triterpenoid Acids from *Sandoricum indicum*. Journal of Natural Products. 64: 1243-1245.
- Wang, J., Huang, Y., Fang, M., Zhang, Y., Zheng, Z., Zhao, Y. and Su, W. 2002. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 34: 51-57.
- Wang, C., Wu, J. and Mei, X. 2001. Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. Appl.Microbiol.Biotechnol. 55: 404-410.
- Wang, J., Li, G., Lu, H., Zheng, Z., Huang, Y. and Su, W. 2000. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. FEMS Microbiology Letters 193: 249-253.
- Wagenaar, M.M. and Clardy, J. 2001. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an Endangered Mint. Journal of Natural Products. 64: 1006-1009.
- Wagenaar, M.M., Corwin, J., Strobel, G., and Clardy, J. 2000. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinocladiella*. Journal of Natural Products. 63: 1692-1695.
- Whalley, A.J.S., 1996. The xylariaceous way of life. Mycological Research. 100(8): 897-922.
- Whalley, A.J.S., and Edwards, R.L. 1995. Secondary metabolites and systematics arrangement within the Xylariaceae. Canadian Journal of Botany. 73(suppl. 1): S802-S810.
- Whalley, A.J.S., 1993. Tropical Xylariaceae: their distribution and ecological characteristic. In S. Issac; J.C. Frankland; R. Watling; A.J.S. Whalley(eds.), Aspects of tropical mycology, pp. 103-119. U.K.: Cambridge University Press.
- Yang, X., Strobel, G., Stierle, A., Hess, W.M., Lee, J. and Clardy, J. 1994. A fungal endophyte-tree relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana*. Plant Science. 102: 1-9.

Yue, Q., Miller, C.J., White, J.F. and Richardson, M.D. 2000. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloe festucae*. Journal of Agricultural & Food Chemistry. 48: 4687-4692.

Zou, W.X., Meng, J.C., Lu, H., Chen, G.X., Shi, G.X., Zhang, T.Y. and Tan, R.X. 2000. Metabolites of *Colletrichum gloeosporioides*, and endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. Journal of Natural Product. 63: 1529-1530.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตรที่เตรียมส่วนประกอบต่างๆ ครบถ้วน ให้นำมาผสมกันและละลายเข้ากันดี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1. สูตรอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ต้มมันฝรั่งที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก กรองชิ้นมันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบางเอาแต่น้ำต้มมันฝรั่ง ผสมส่วนประกอบต่างๆ ละลายให้เข้า ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหาร Malt Extract Agar (MEA)

Malt extract	20	กรัม
Glucose	20	กรัม
Peptone	1	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

3. สูตรอาหาร Cornmeal Agar (CMA)

Cornmeal	30	กรัม
Peptone	20	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

4. สูตรอาหาร Yeast-Malt Extract Agar (YMA)

Yeast extracts	3	กรัม
Malt extracts	3	กรัม
Glucose	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

5. สูตรอาหาร Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	4	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

6. สูตรอาหาร Sabouraud's Dextrose Agar (SDA)

Dextrose	40	กรัม
Peptone	10	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

7. สูตรอาหาร Yeast Extract Sucrose Agar (YES)

Yeast Extract	20	กรัม
Sucrose	15	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

8. Mueller-Hinton Broth (MHB)

Mueller-Hinton	34	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากชิ้นราราเอ็น โดไฟต์ที่แยกจากใบ
กระท้อนด้วยเทคนิค Dual culture Agar diffusion

สายพันธุ์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริเวณยับยั้งการเจริญ (เซนติเมตร)				
		แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
		<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
CHB01	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-
CHB02	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	1.0	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-
CHB03	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	1.1	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-
CHB04	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

ตารางที่ 1 (ต่อ) ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากชิ้นราราเอ็น โคไฟต์ที่แยกจากใบกระท้อนด้วยเทคนิค Dual culture Agar diffusion

สายพันธุ์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริเวณยับยั้งการเจริญ (เซนติเมตร)				
		แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
		<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
CHB05	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-
CHB06	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-
CHB07	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-
CHB08	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	0.9	-	0.8	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

ตารางที่ 1 (ต่อ) ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากชิ้นราราเอ็น โคไฟต์ที่แยกจากใบกระท้อนด้วยเทคนิค Dual culture Agar diffusion

สายพันธุ์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริเวณยับยั้งการเจริญ (เซนติเมตร)				
		แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
		<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
CHB09	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-
CHB10	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	0.8	-	0.8	-
CHB11	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-
CHB12	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	0.9
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

ตารางที่ 1 (ต่อ) ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากชิ้นราราเอ็น โคไฟต์ที่แยกจากใบ
กระท้อนด้วยเทคนิค Dual culture Agar diffusion

สายพันธุ์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริเวณยับยั้งการเจริญ (เซนติเมตร)				
		แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
		<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
CHB13	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	1.0	1.0	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-
CHB14	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-
CHB15	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-
CHB16	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

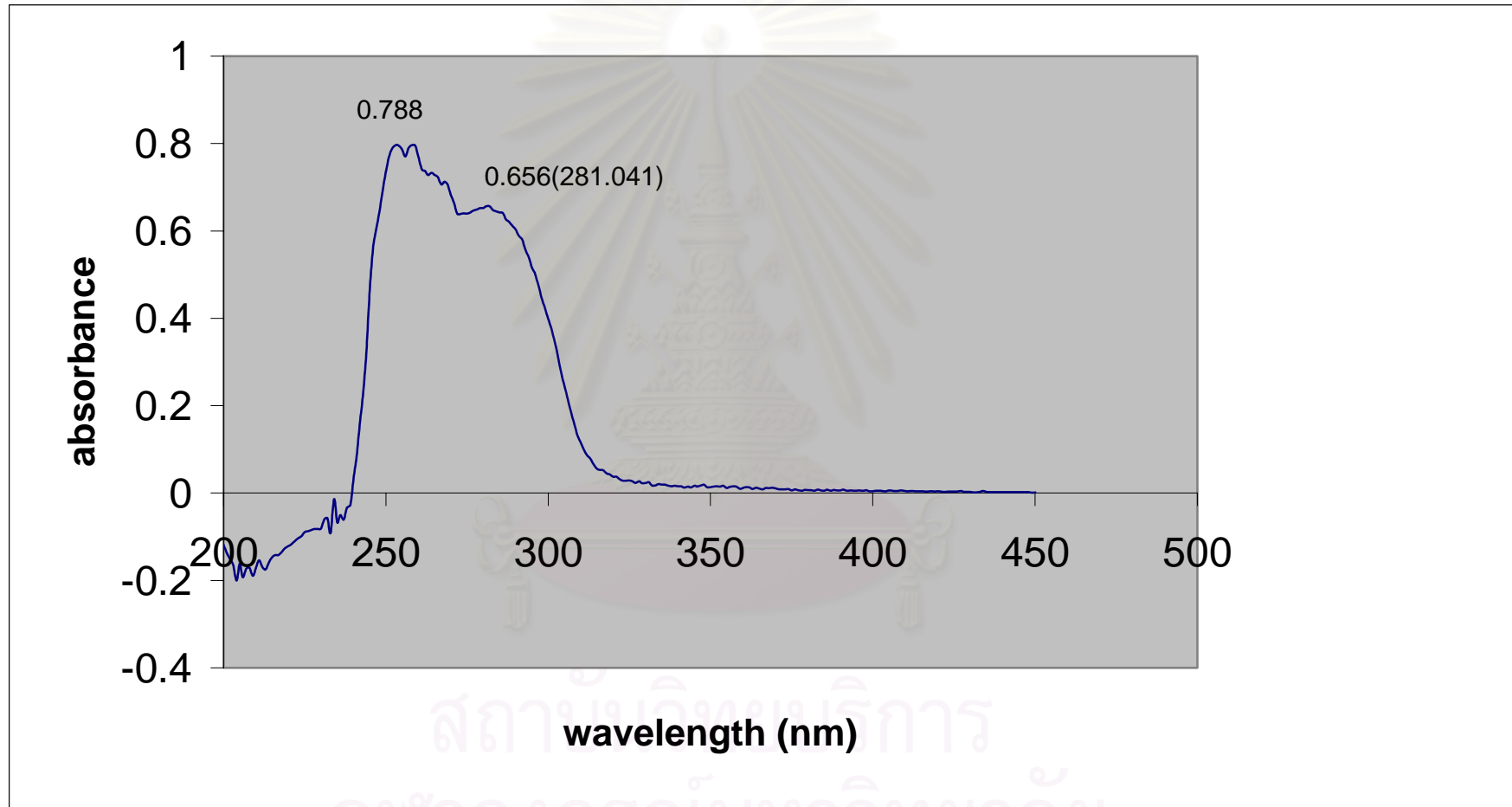
ตารางที่ 1 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากชิ้นราราเอ็น โด ไฟต์ที่แยกจากใบ
กระท้อนด้วยเทคนิค Dual culture Agar diffusion

สายพันธุ์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริเวณยับยั้งการเจริญ (เซนติเมตร)				
		แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
		<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
CHB17	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-
CHB18	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	1.2
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	1.0
CHB19	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-
CHB20	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	1.1	0.8	-	-	-
	SGA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	GYE	-	-	-	-	-

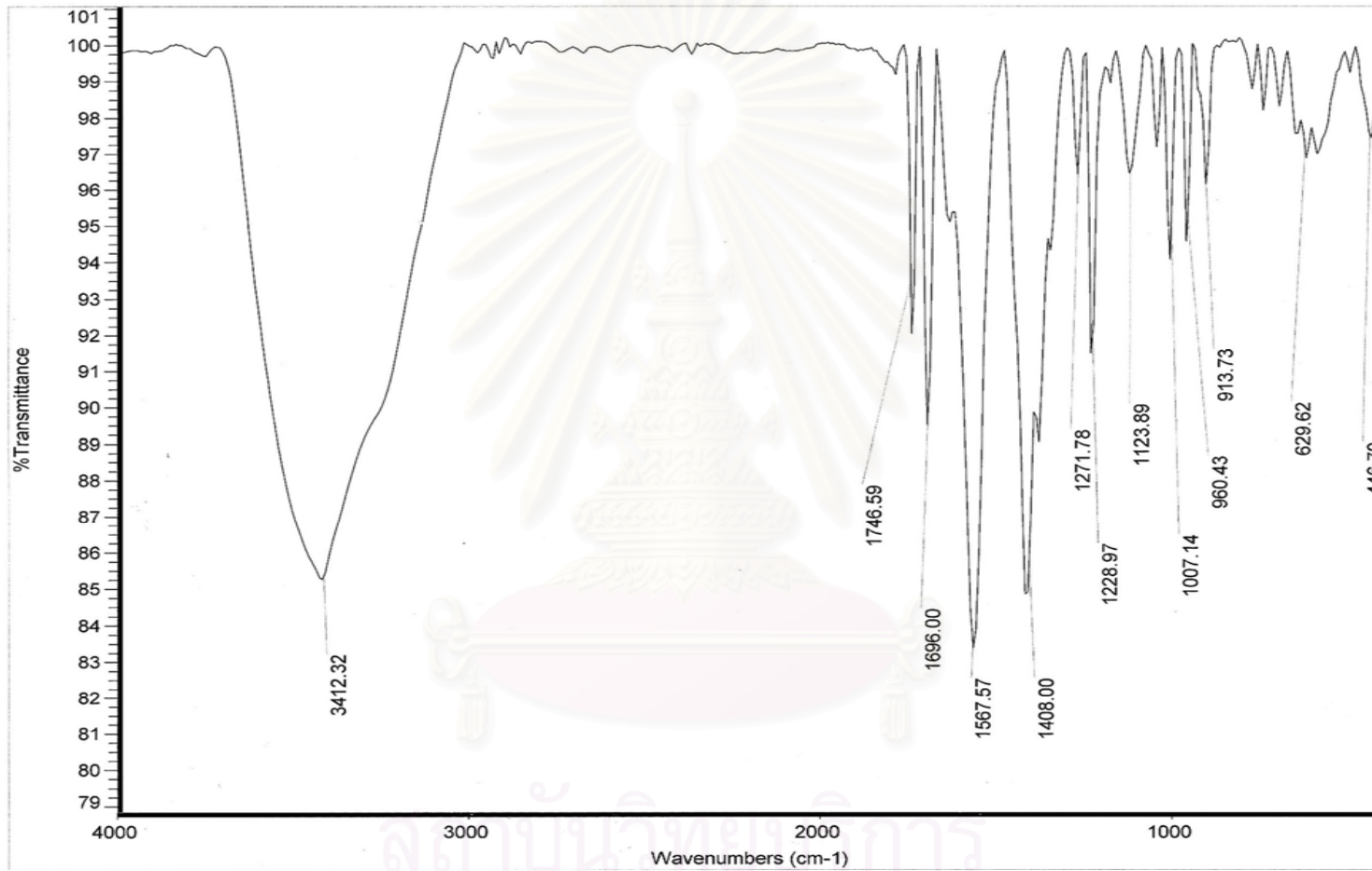
หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

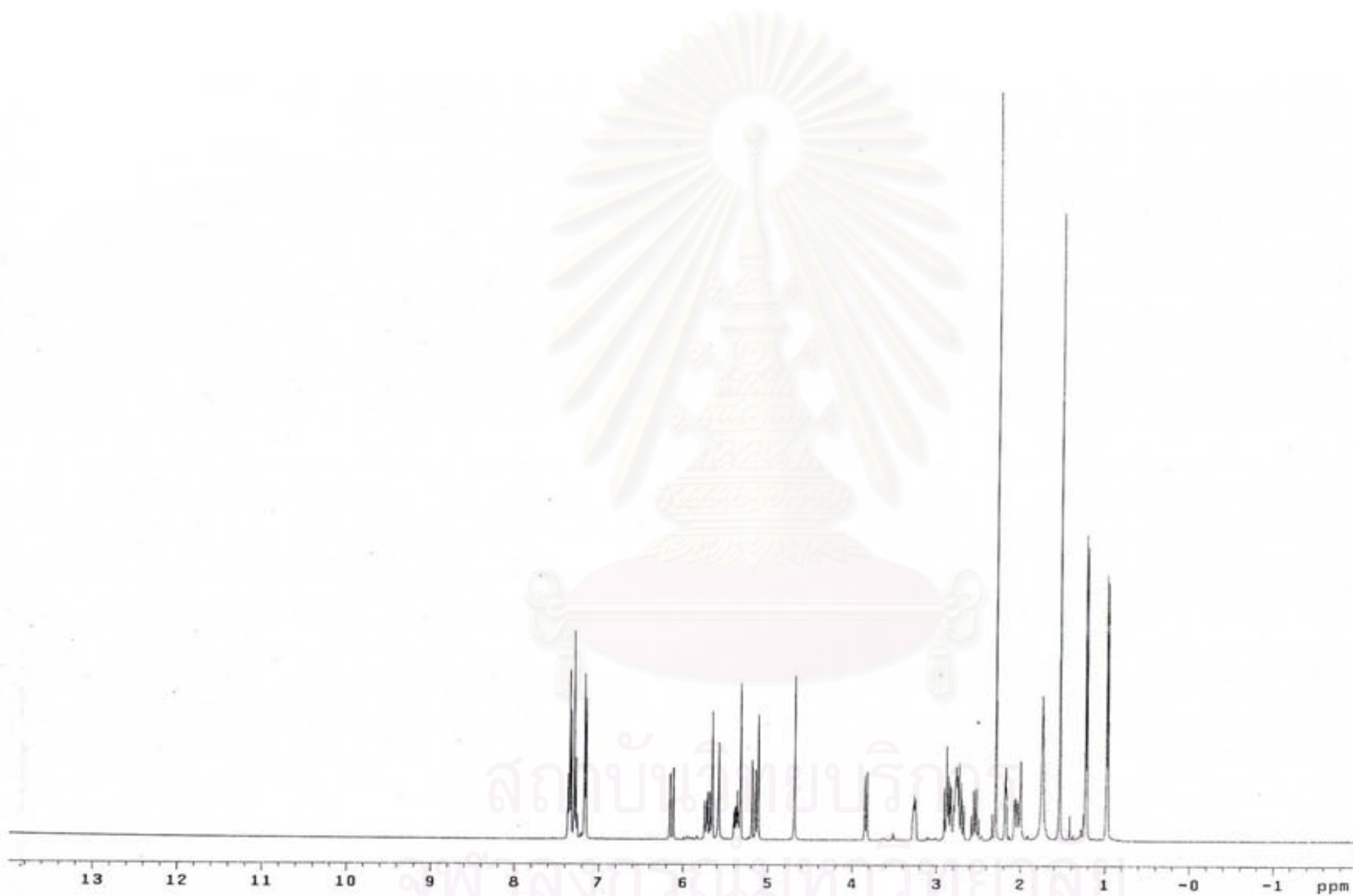
ภาคผนวก ข



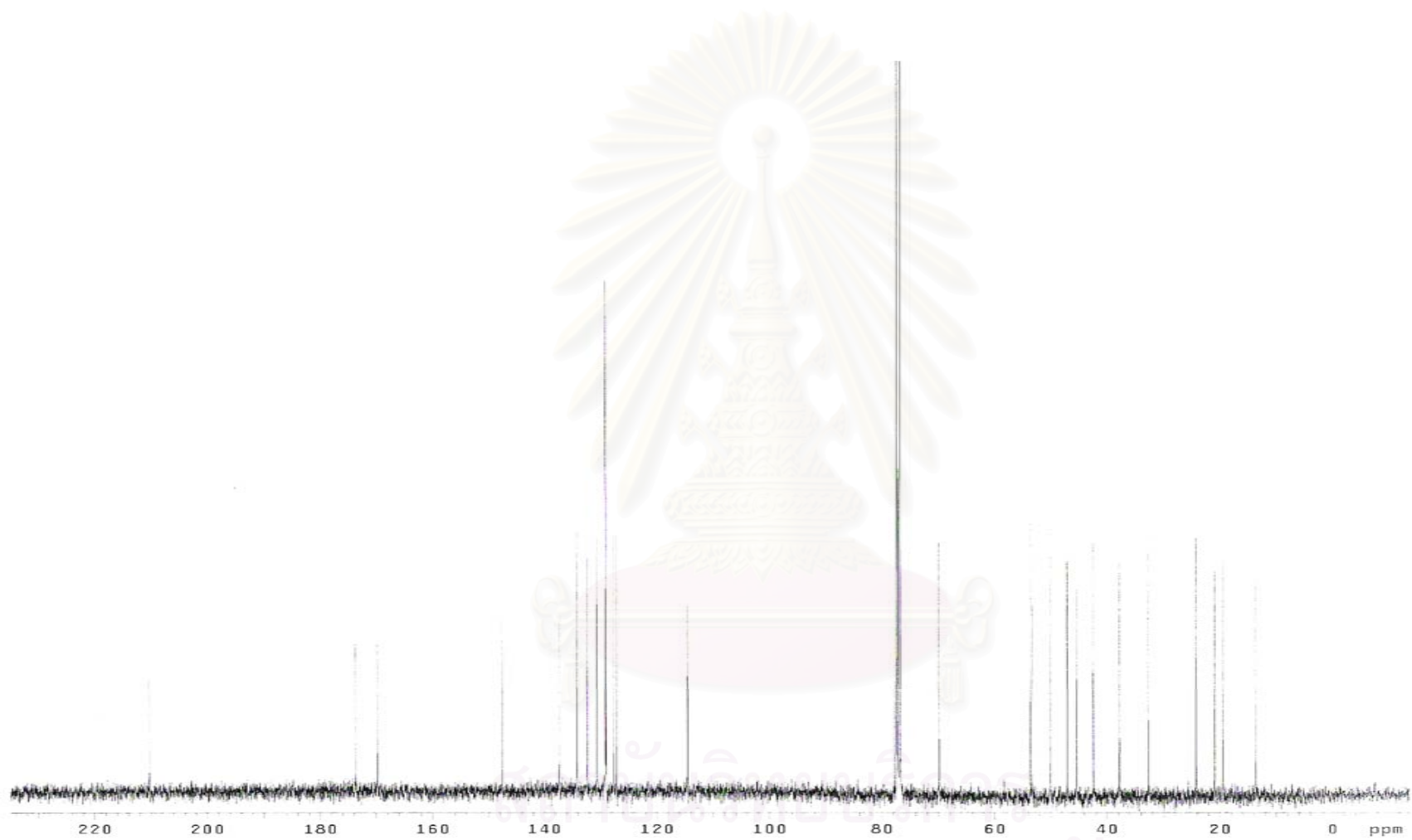
รูปที่ 1 UV สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1



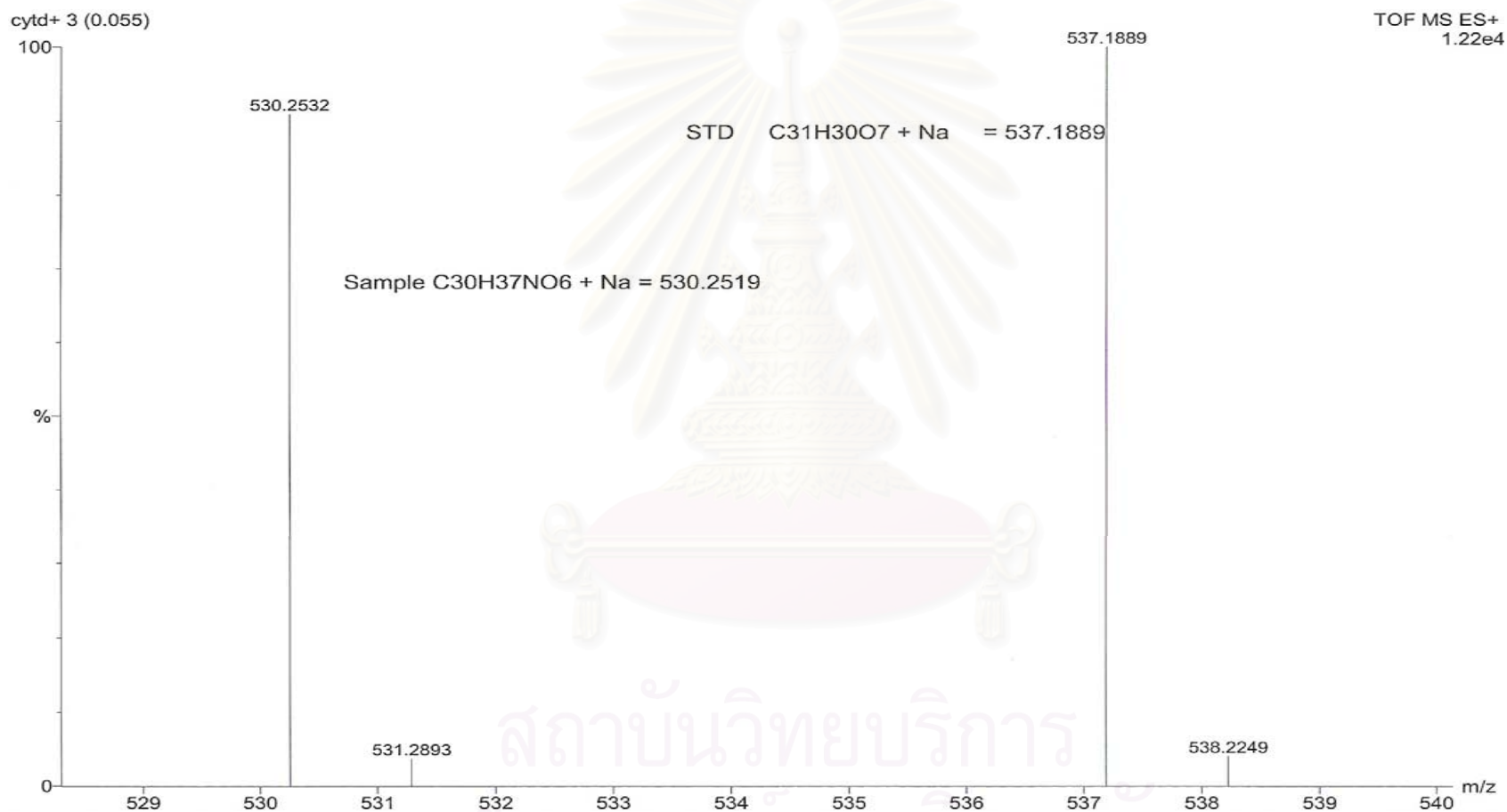
รูปที่ 2 IR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1



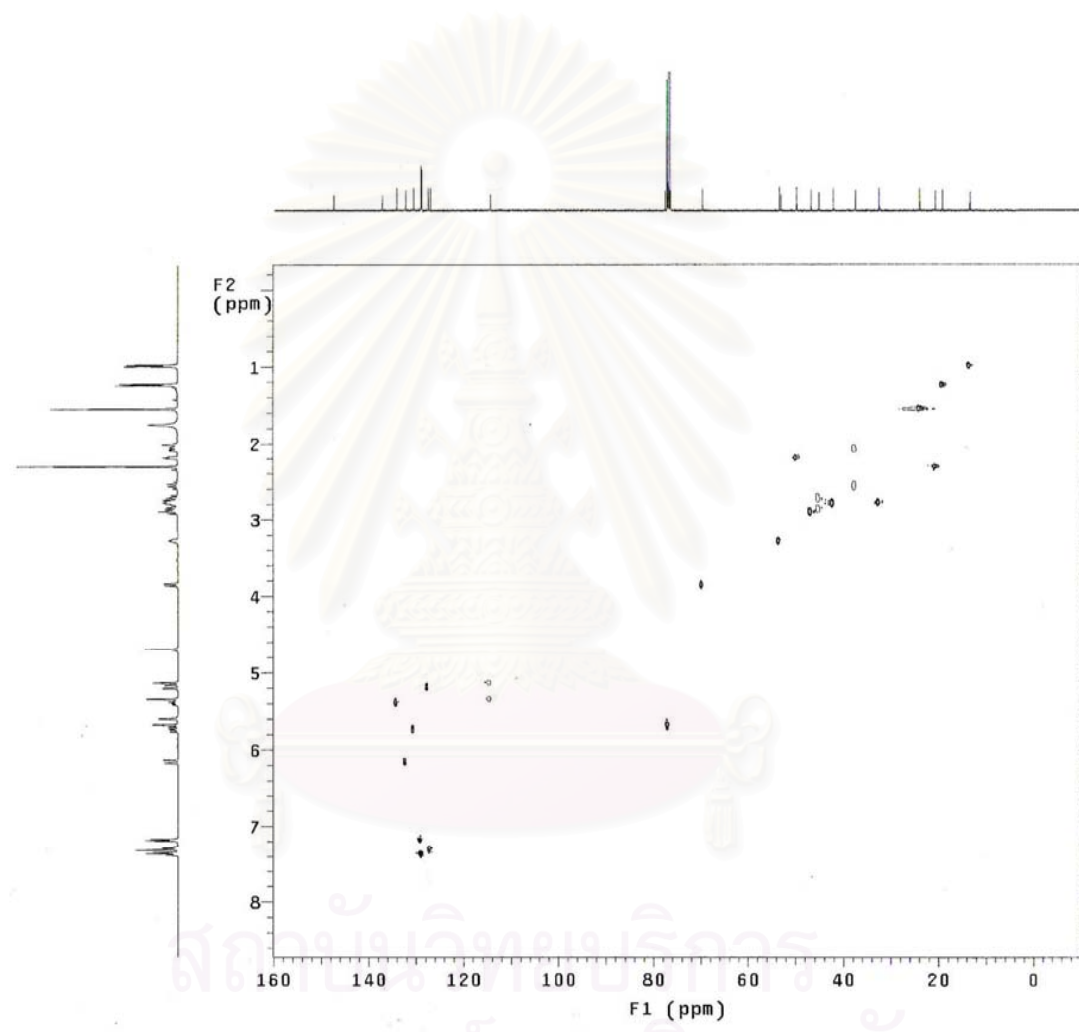
รูปที่ 3 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1



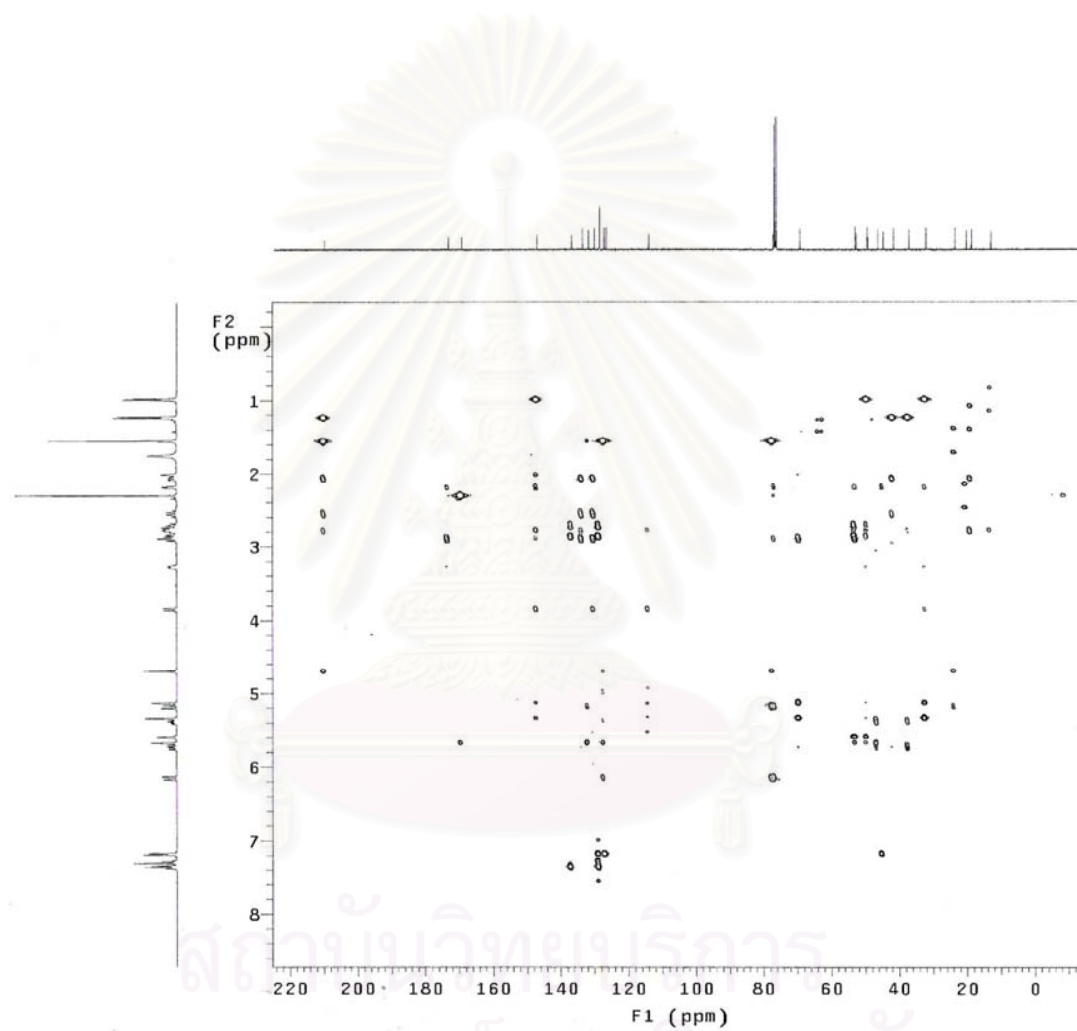
รูปที่ 4 $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1



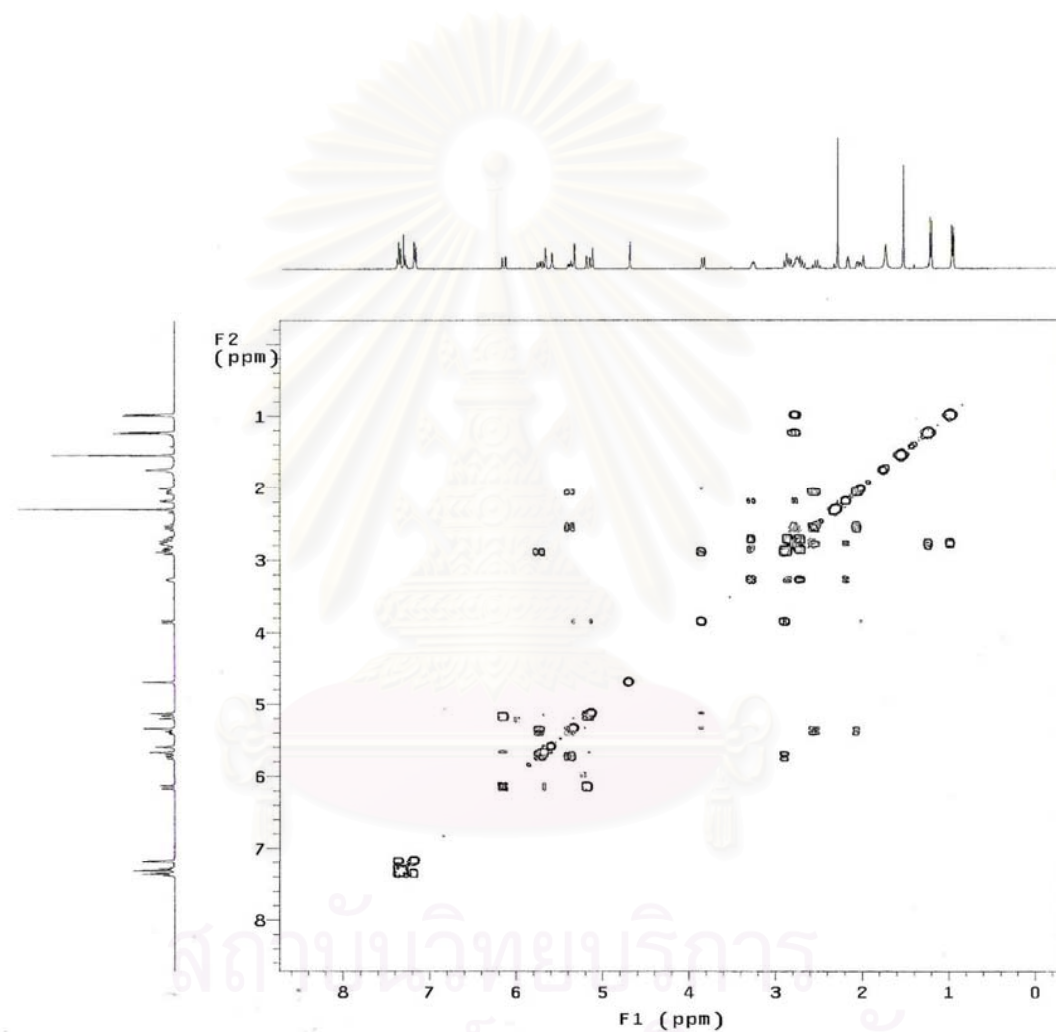
รูปที่ 5 MS สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1



รูปที่ 6 HSQC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1

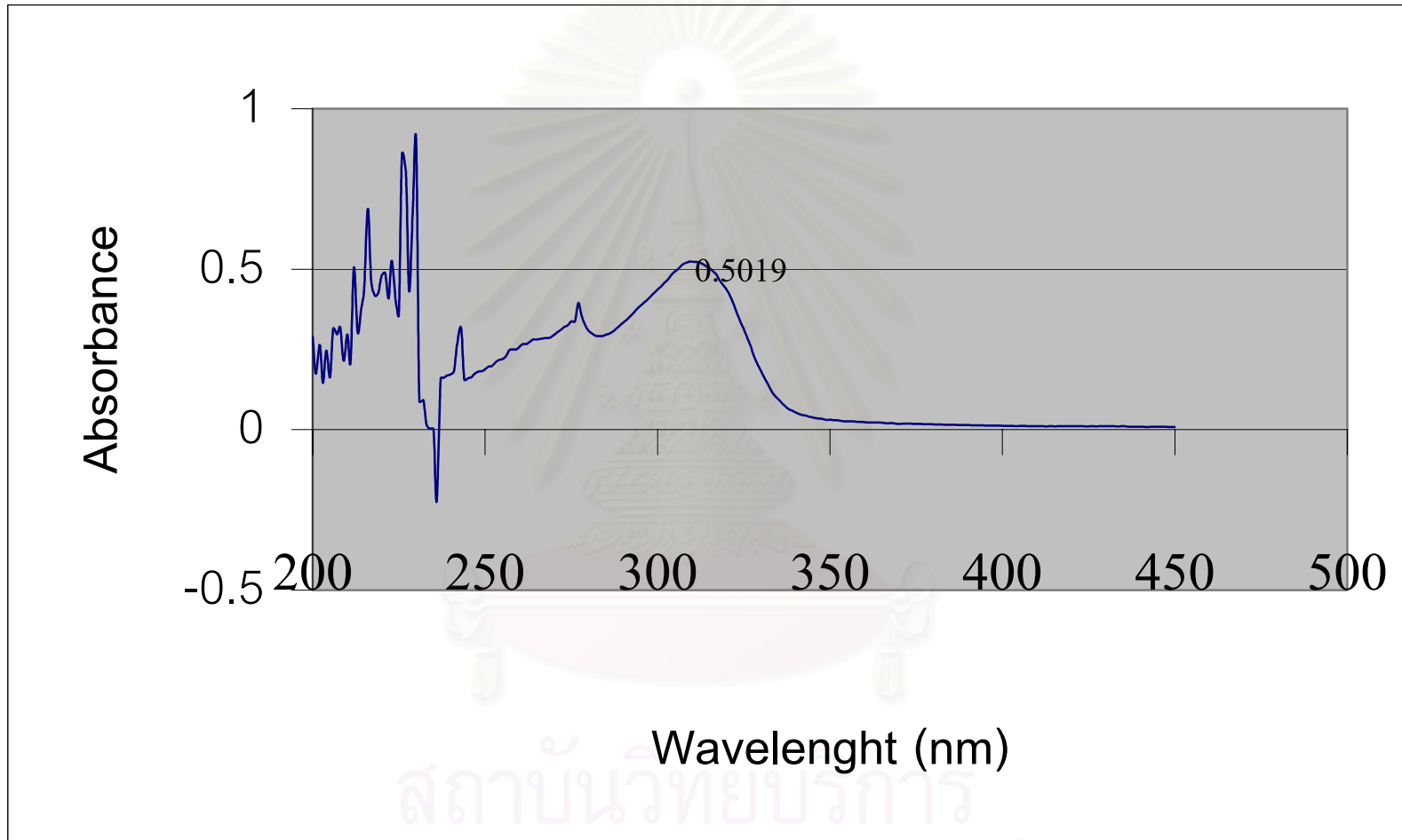


รูปที่ 7 HMBC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1



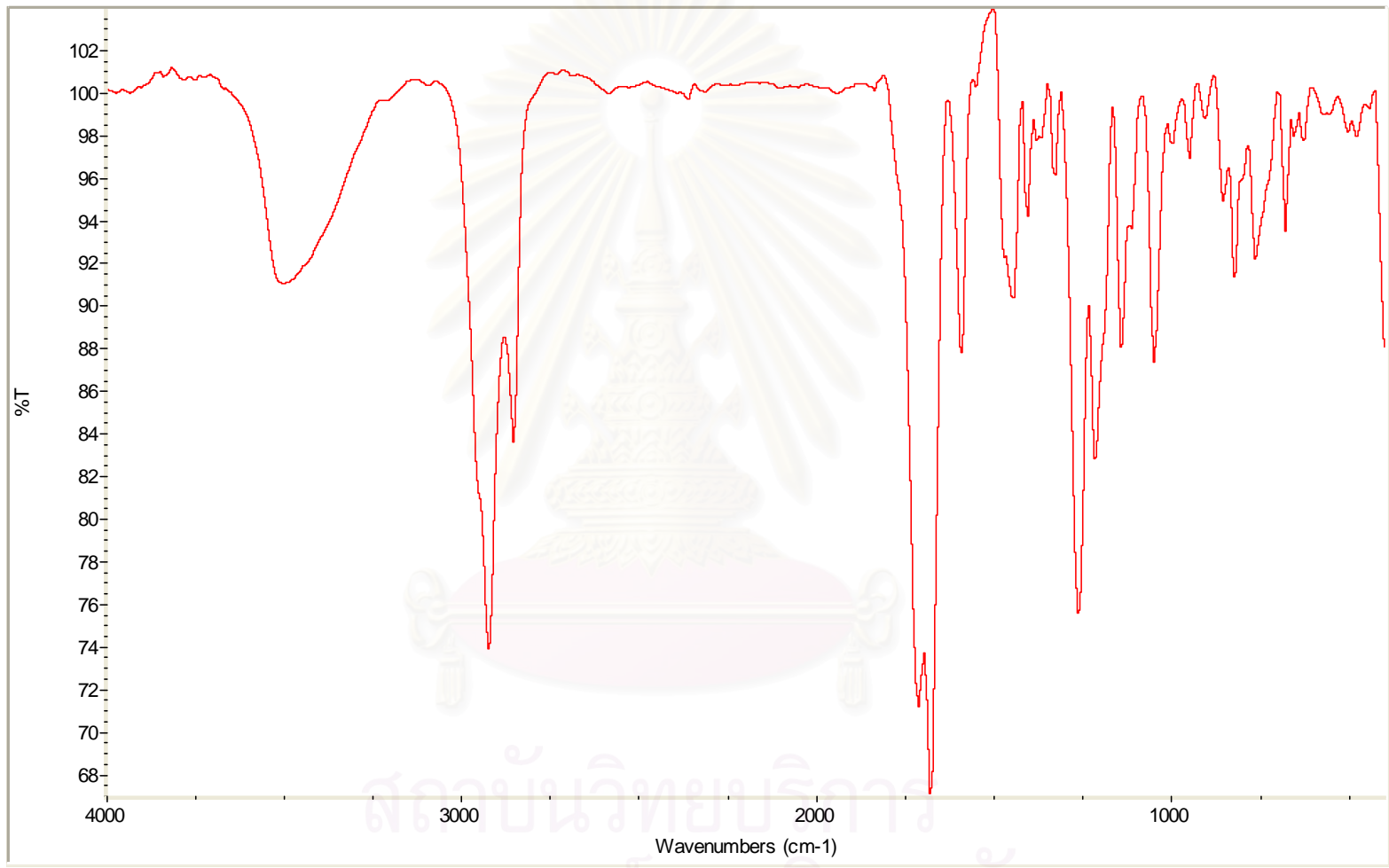
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 COSY สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1

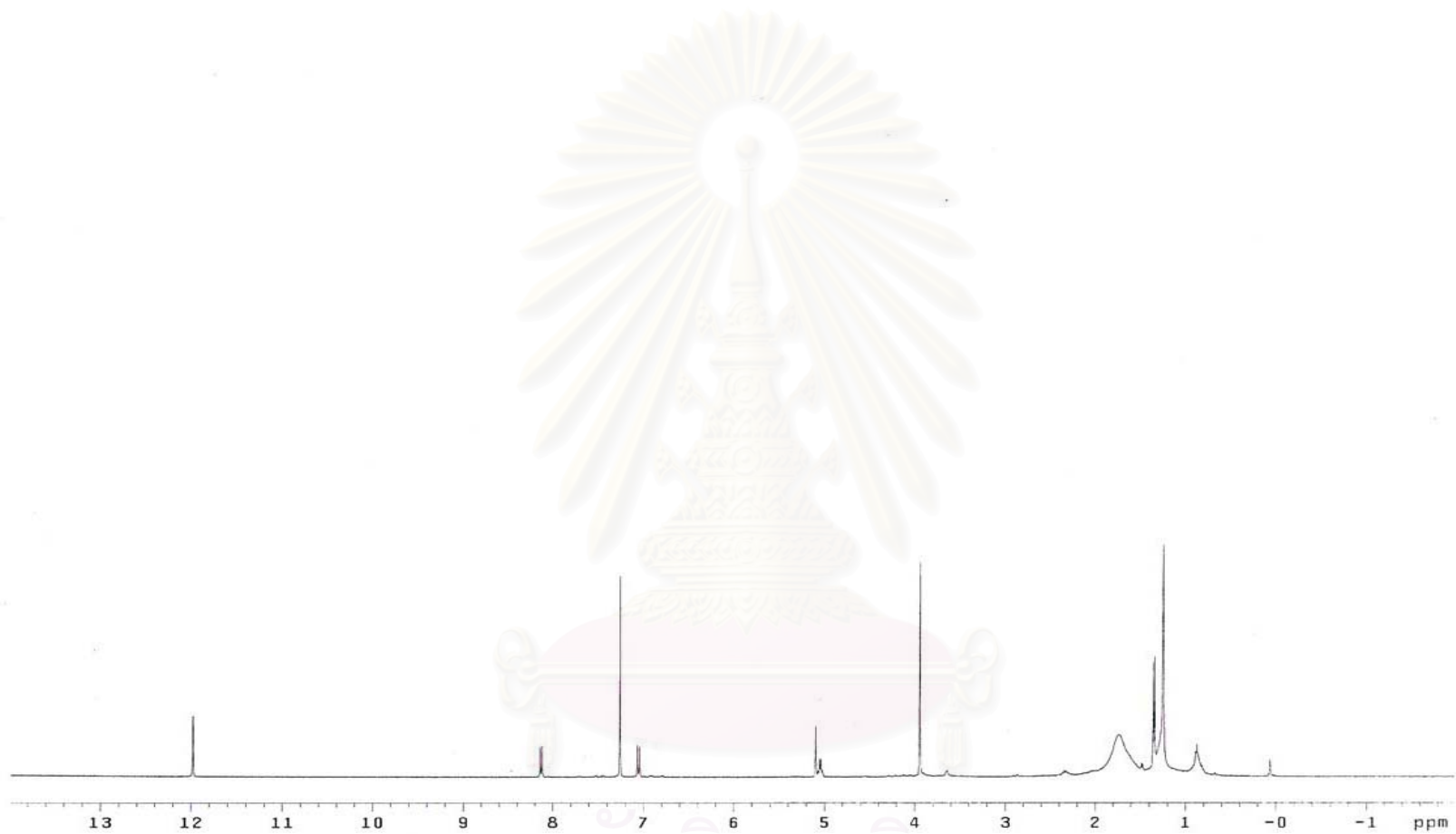


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

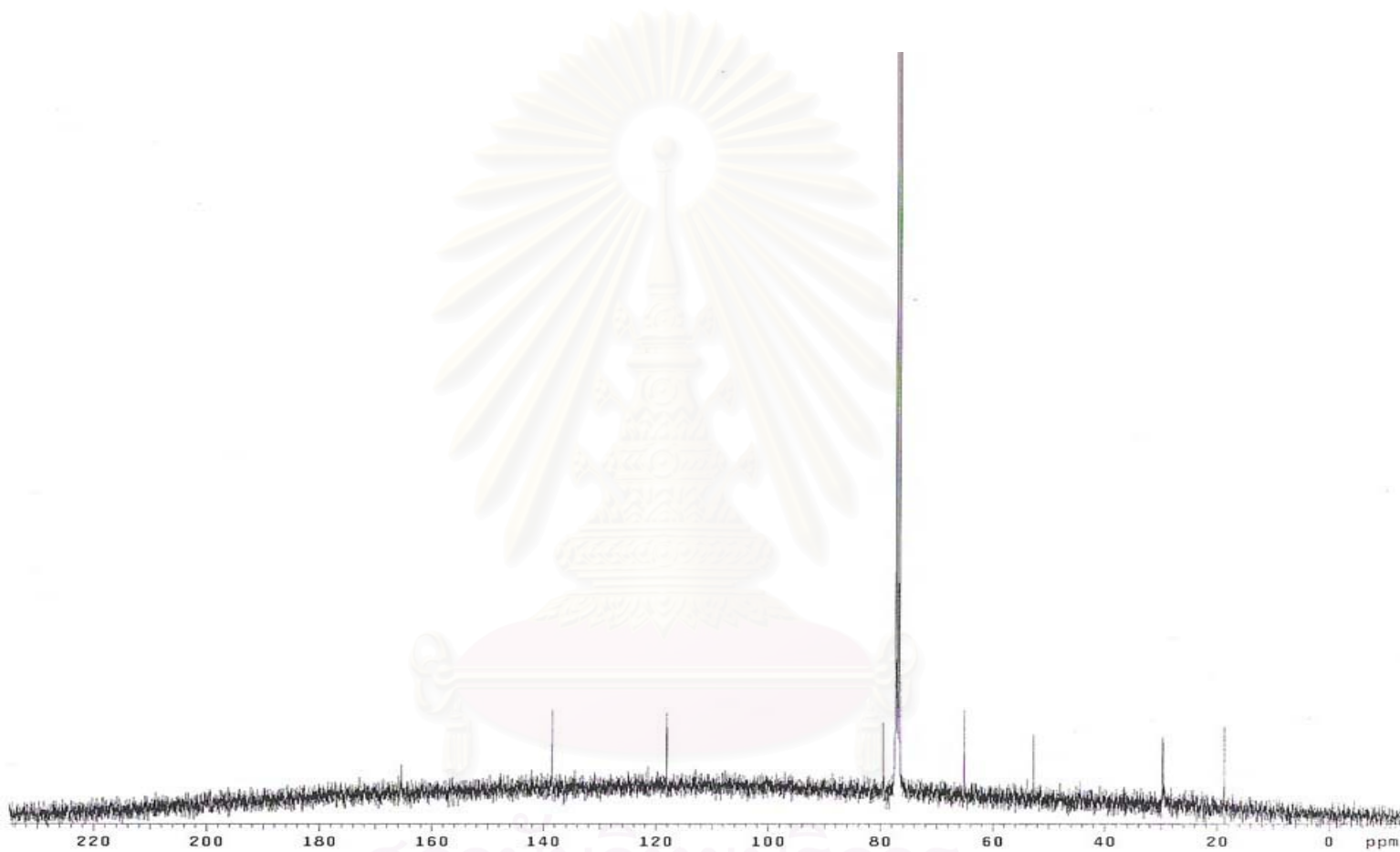
รูปที่ 9 UV สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2



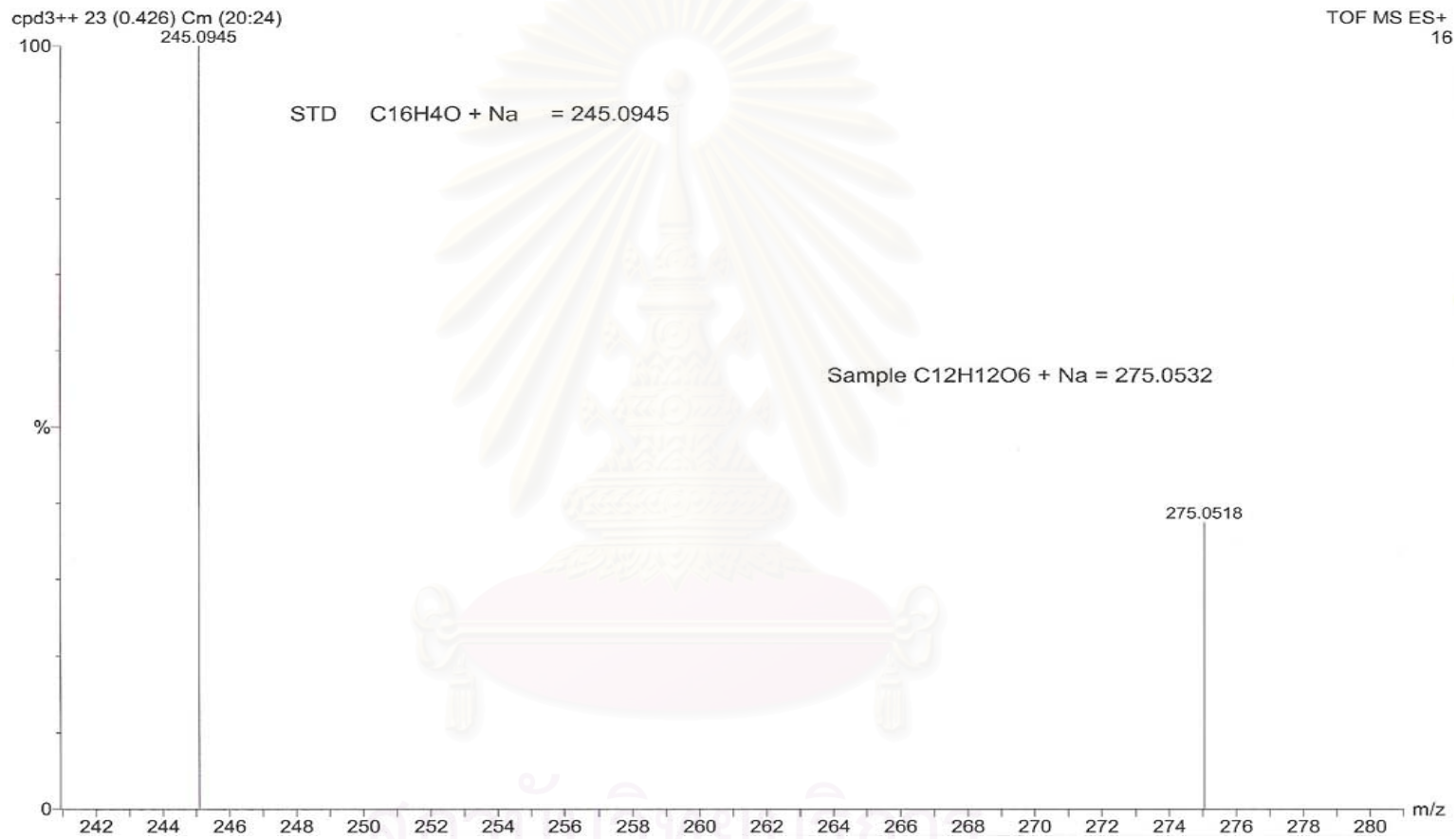
รูปที่ 10 IR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2



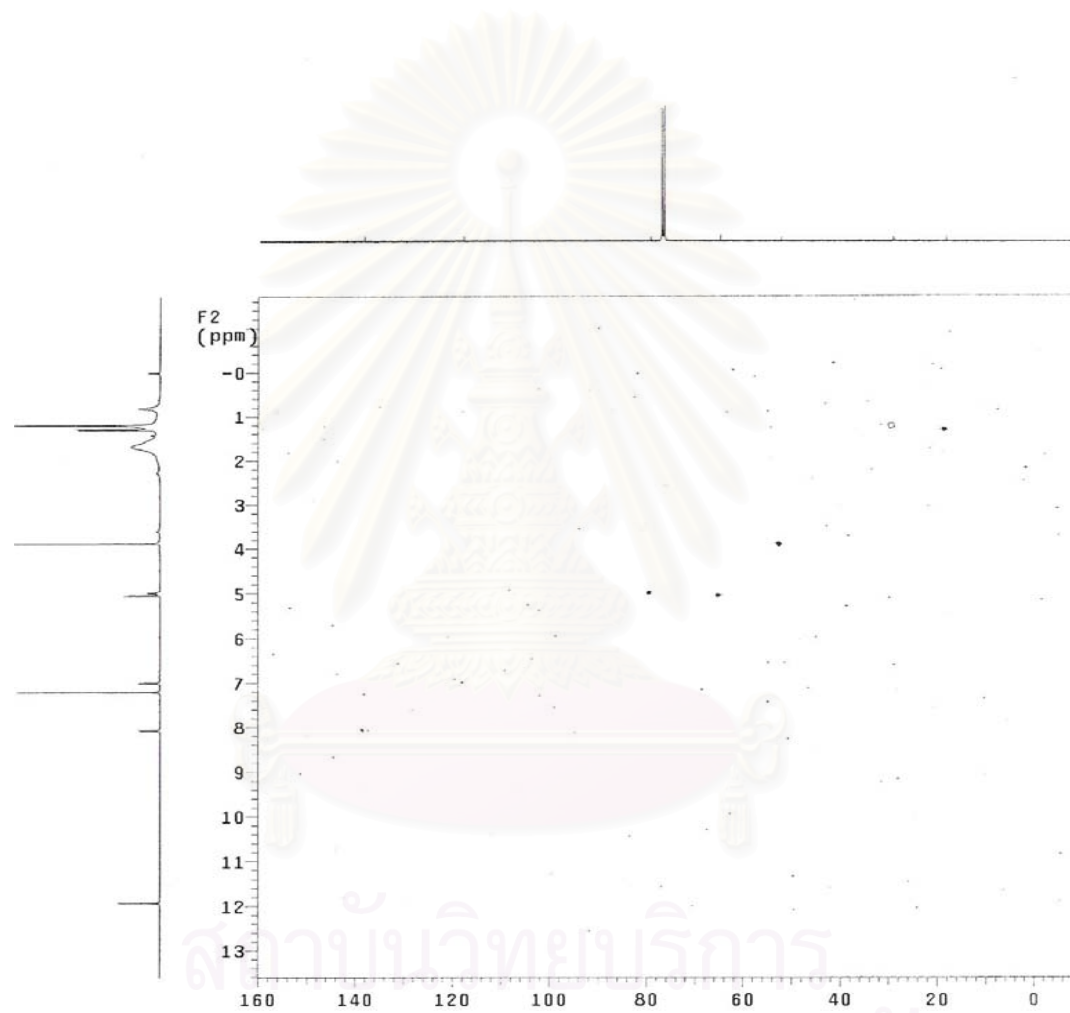
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รูปที่ 11 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2



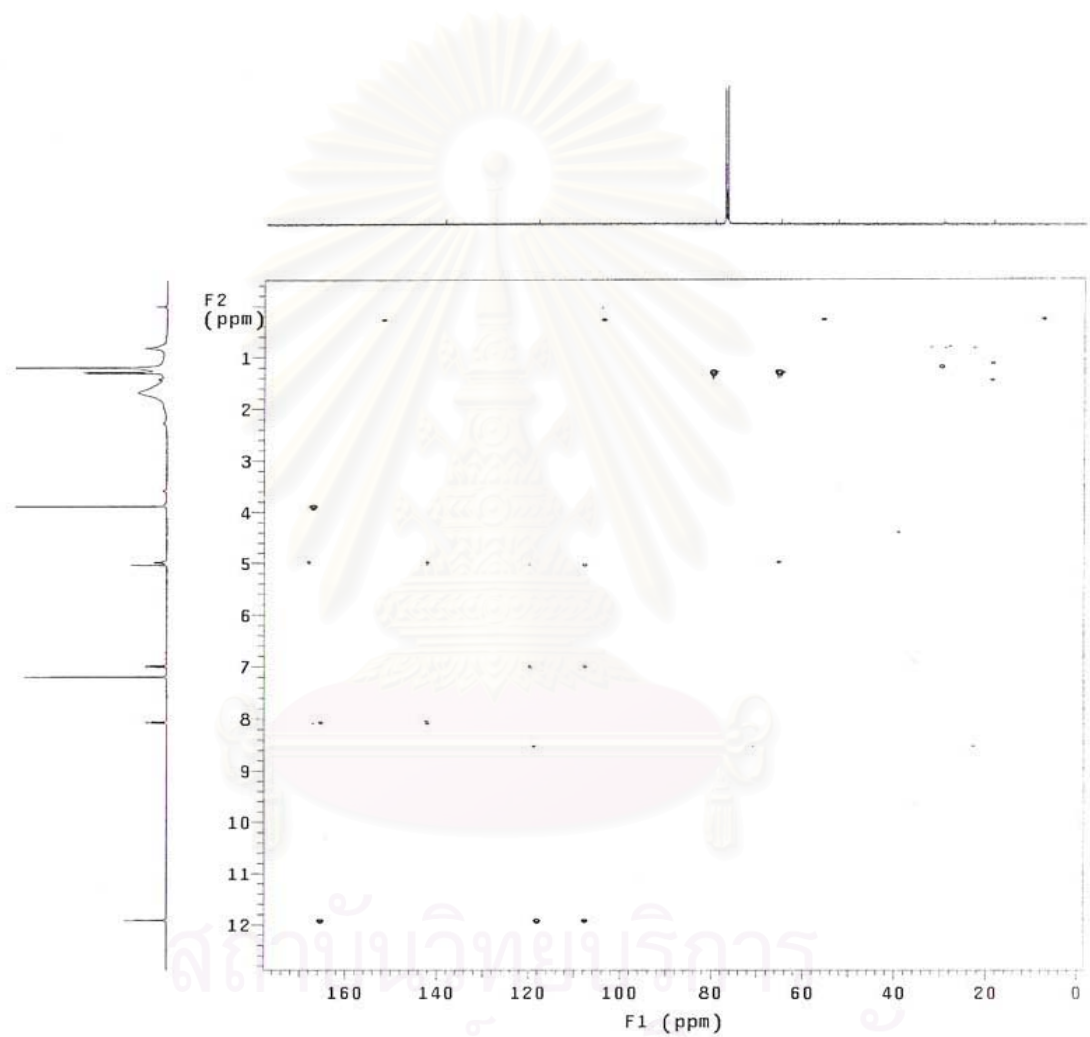
รูปที่ 12 ^{13}C -NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2



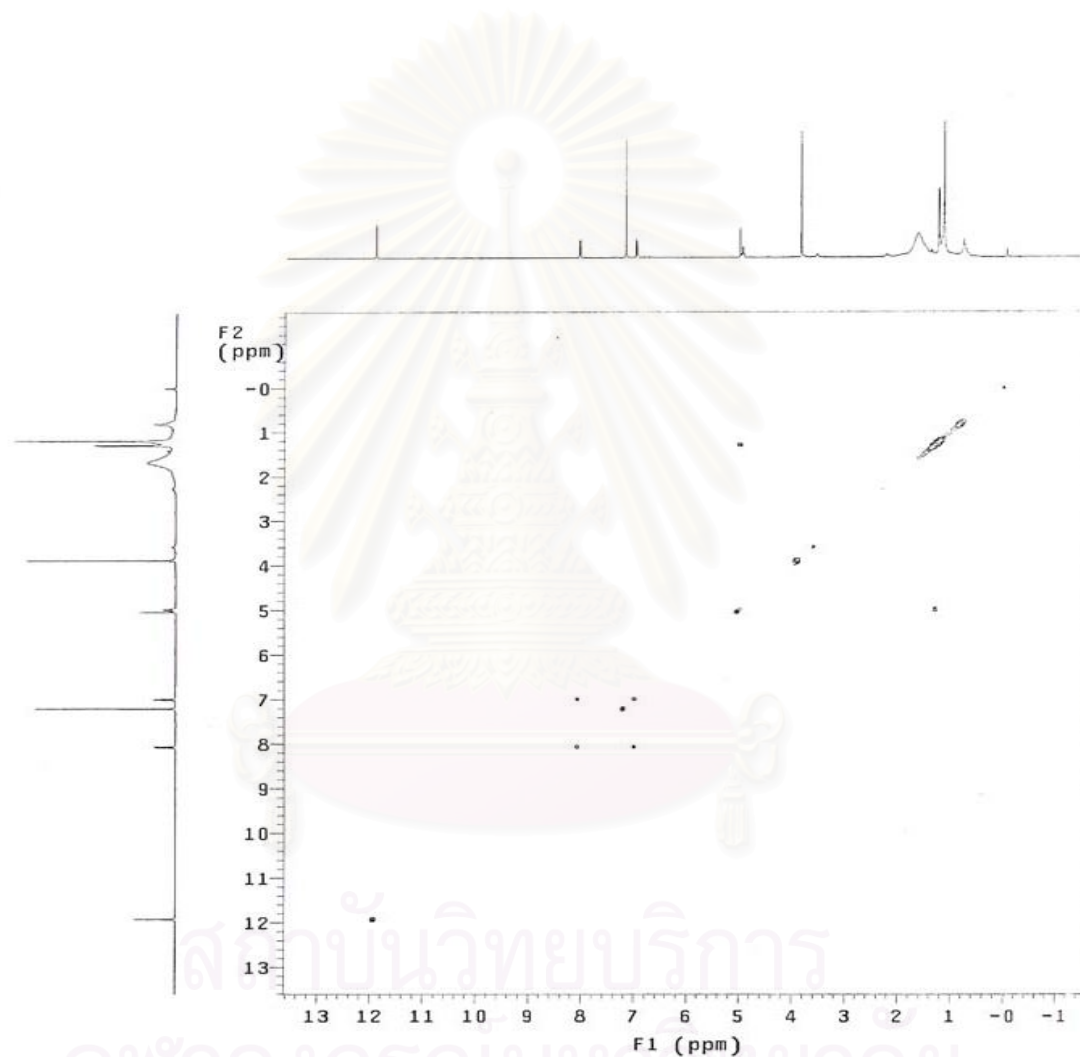
รูปที่ 13 MS สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



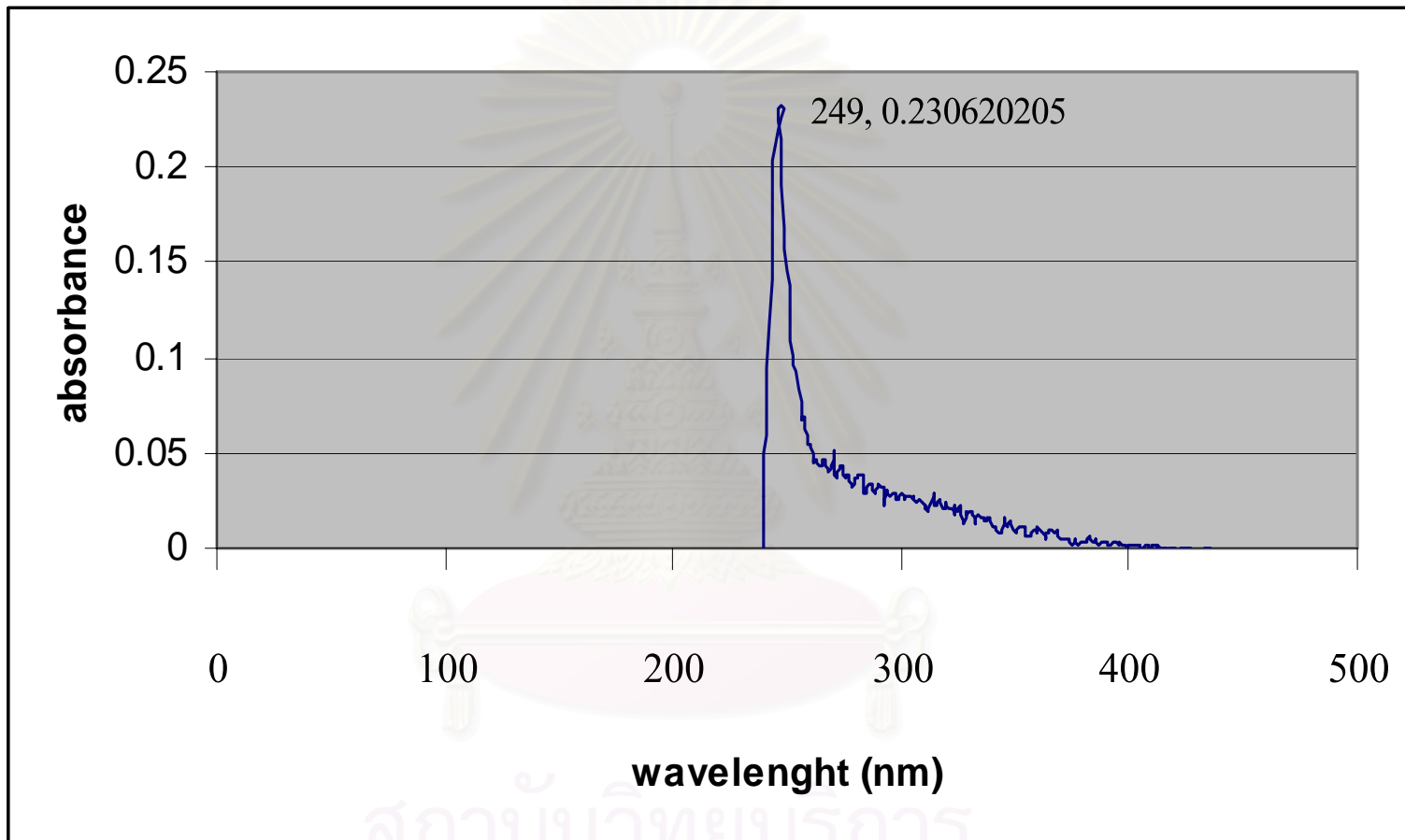
รูปที่ 14 HSQC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2



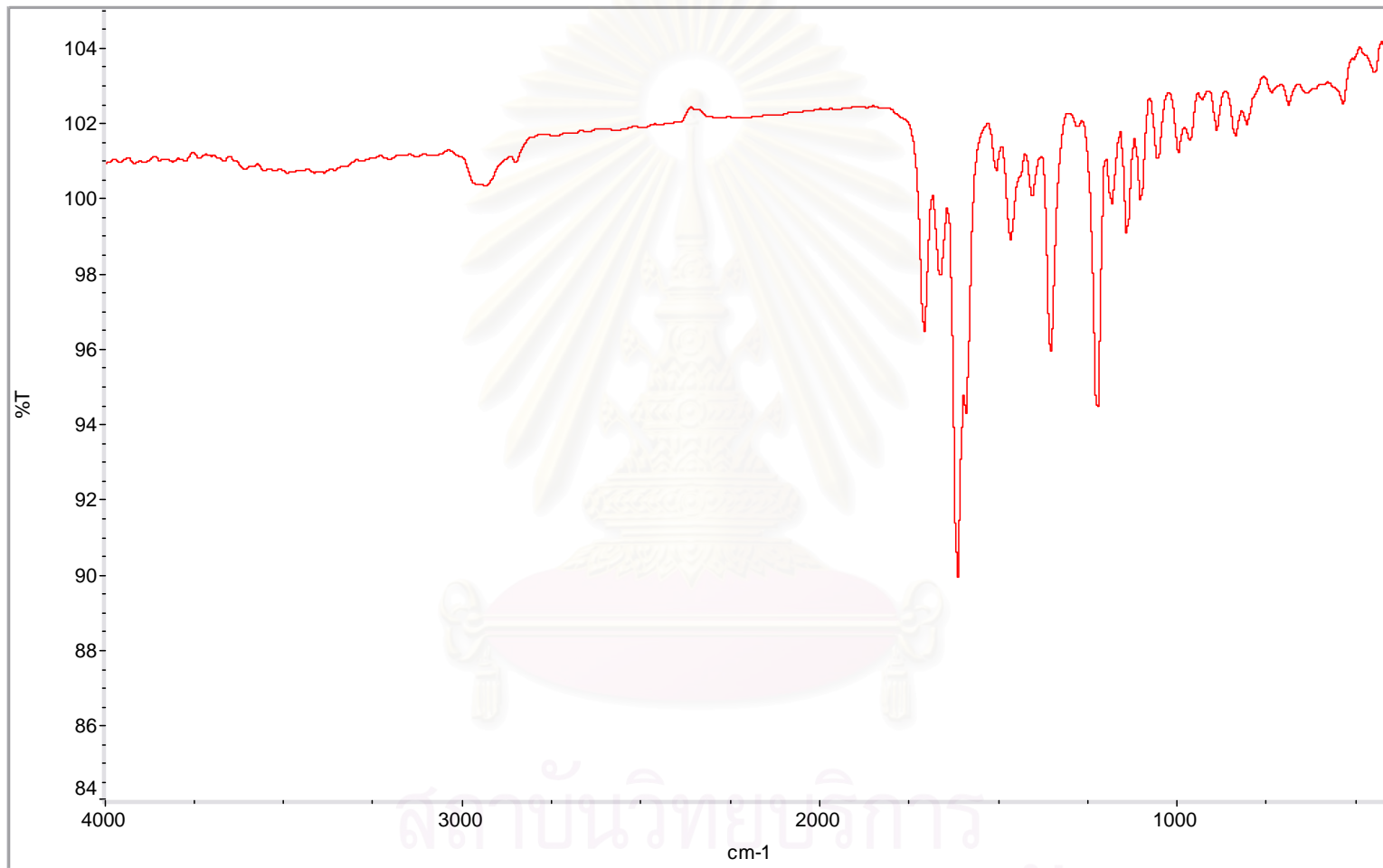
รูปที่ 15 HMBC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2



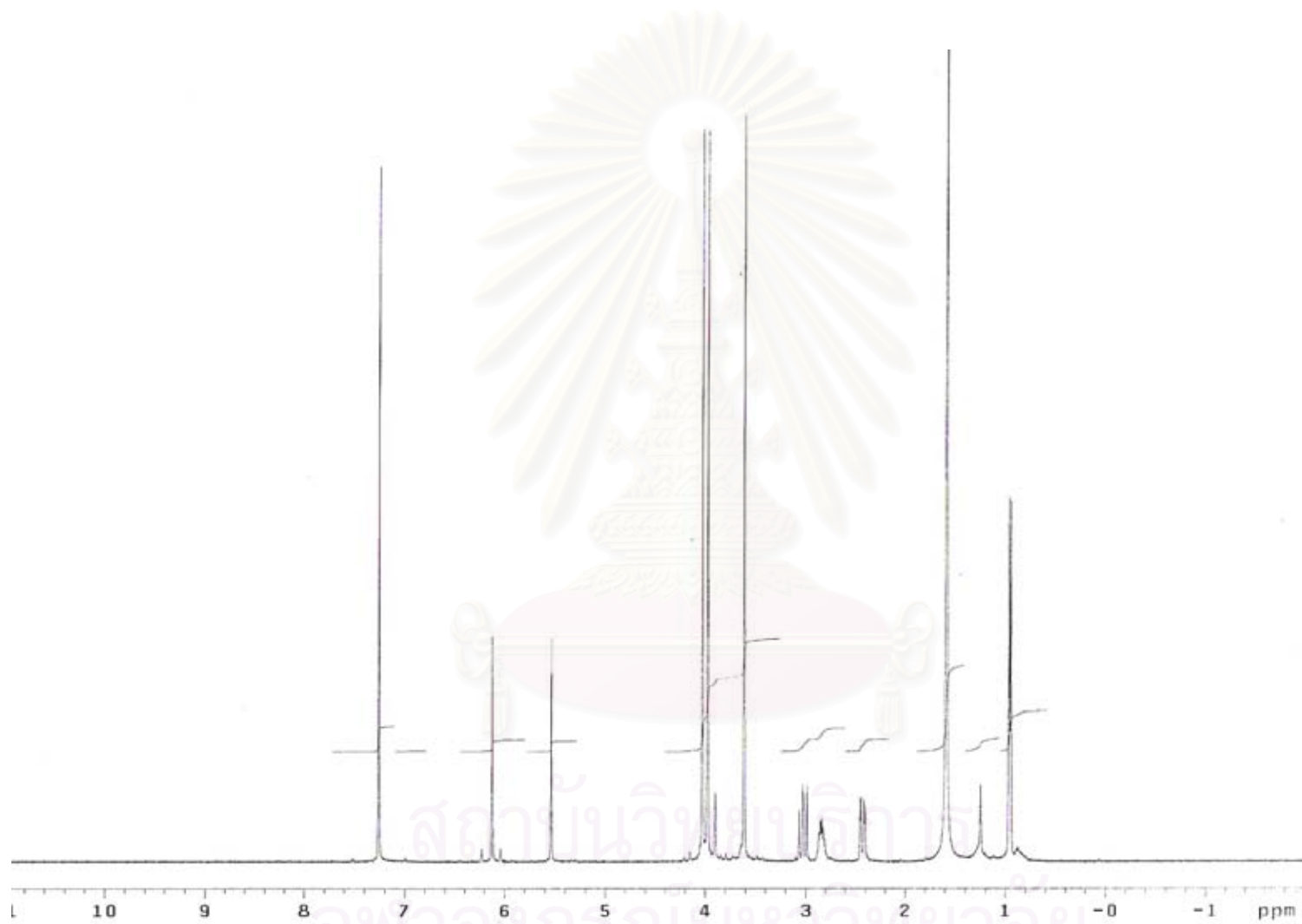
รูปที่ 16 COSY สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2



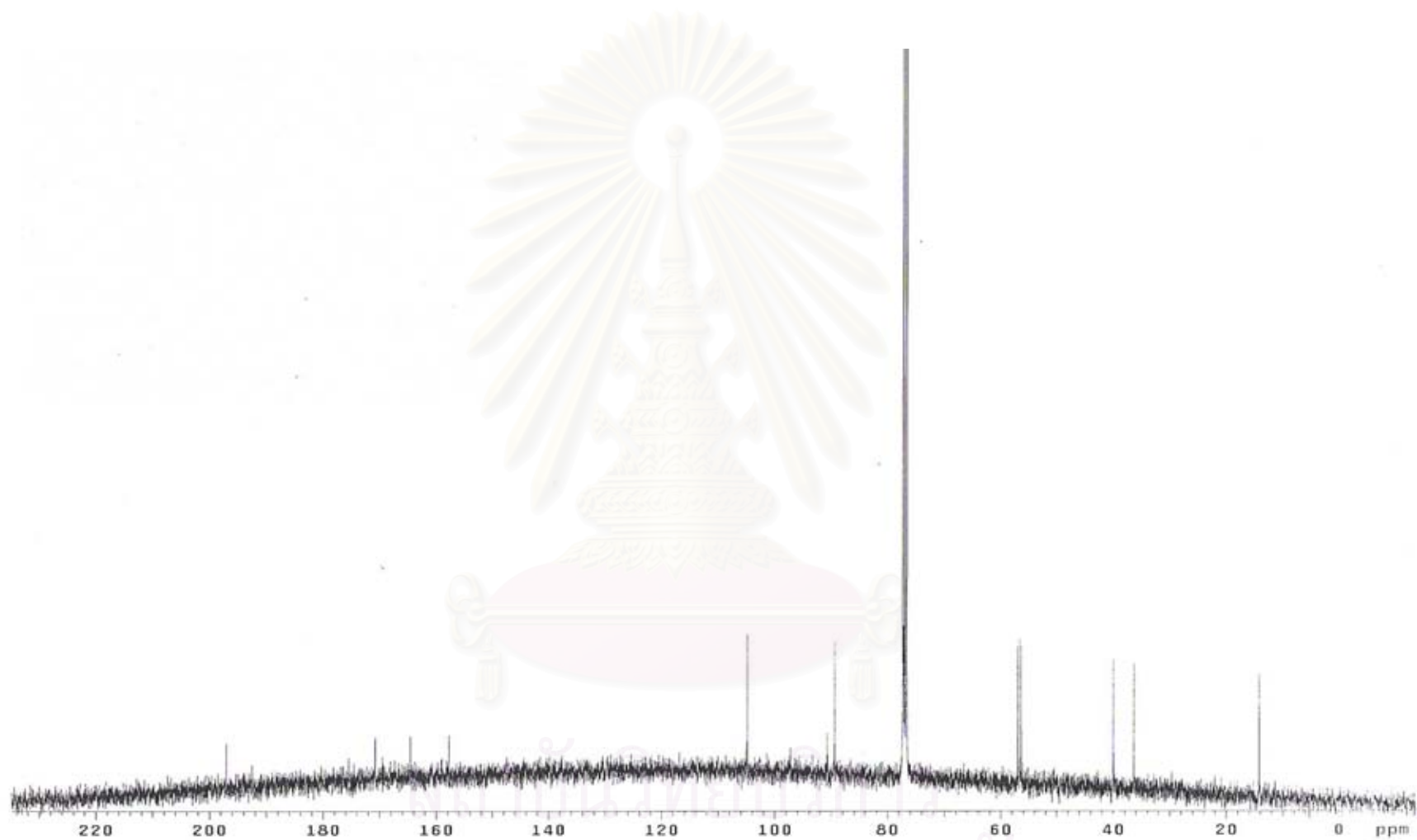
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รูปที่ 17 UV สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2



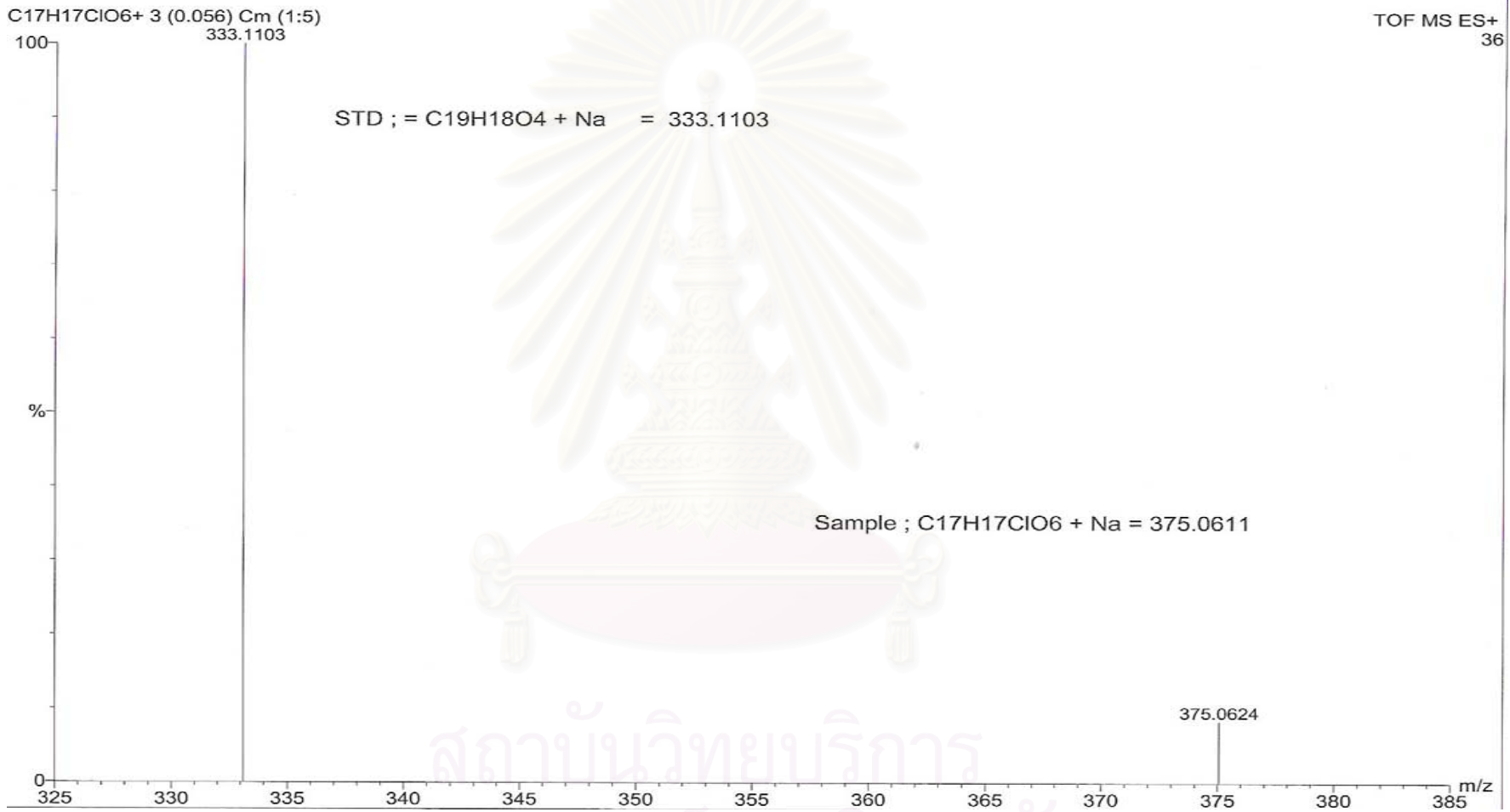
รูปที่ 18 IR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3



รูปที่ 19 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3

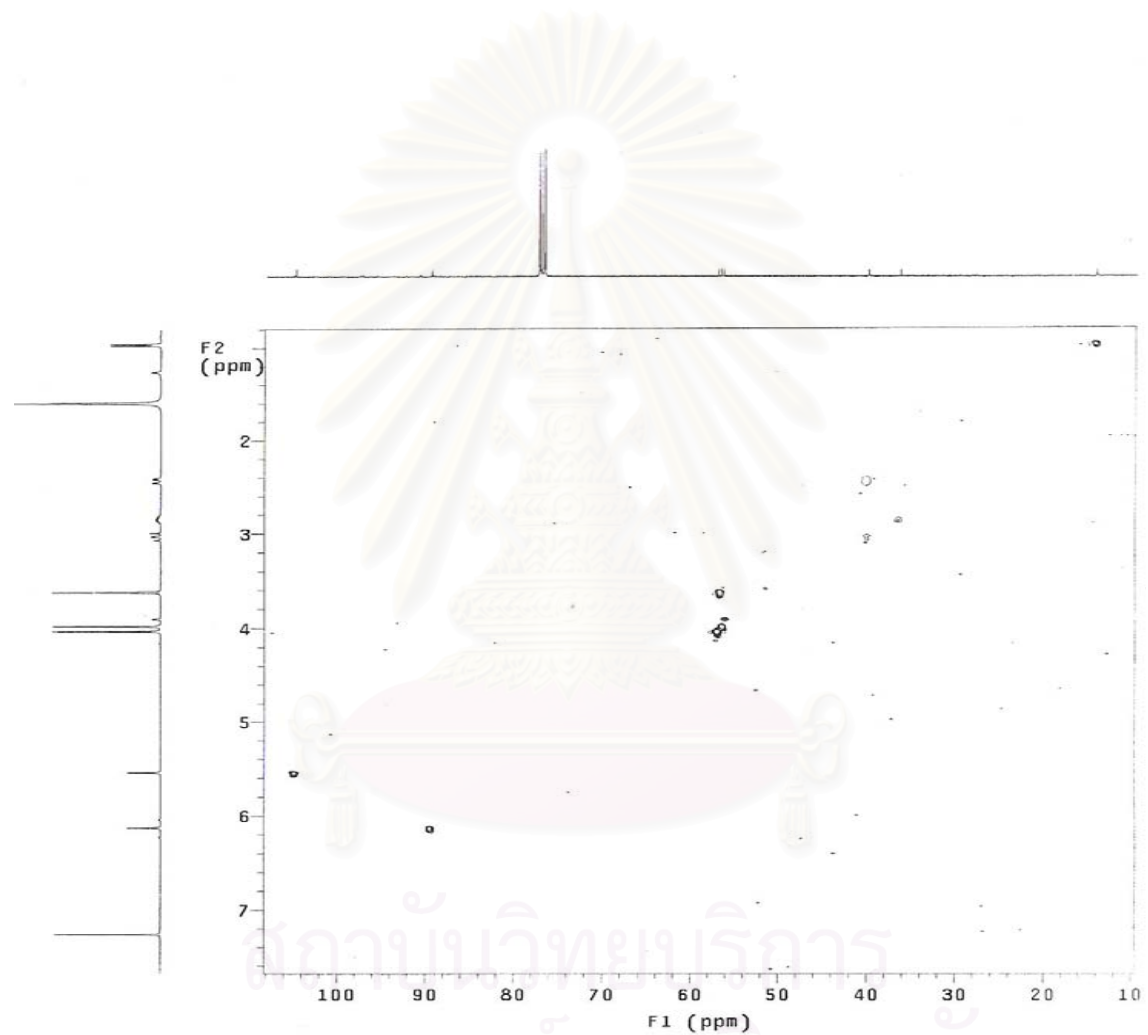


รูปที่ 20 ^{13}C -NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3

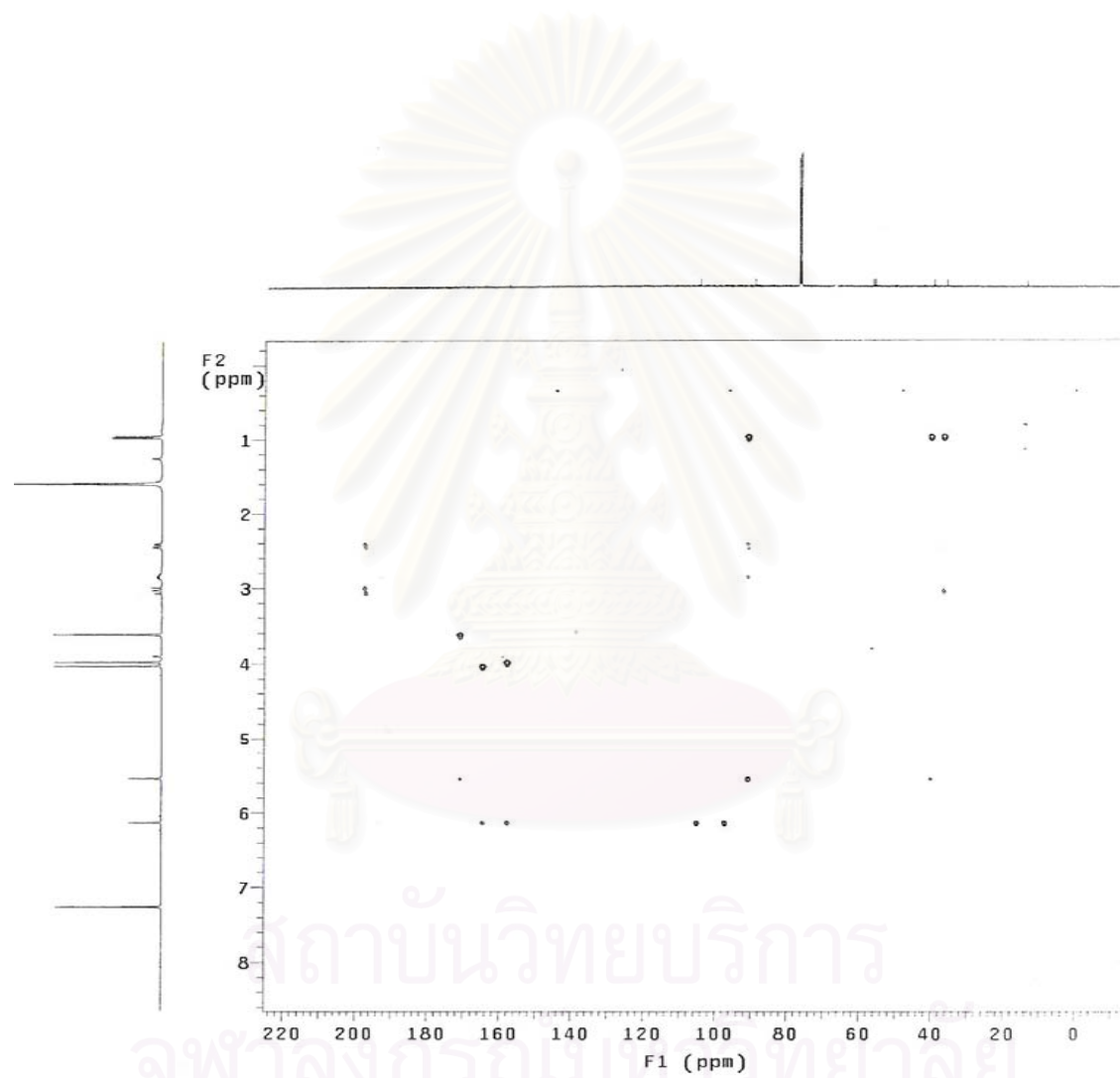


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

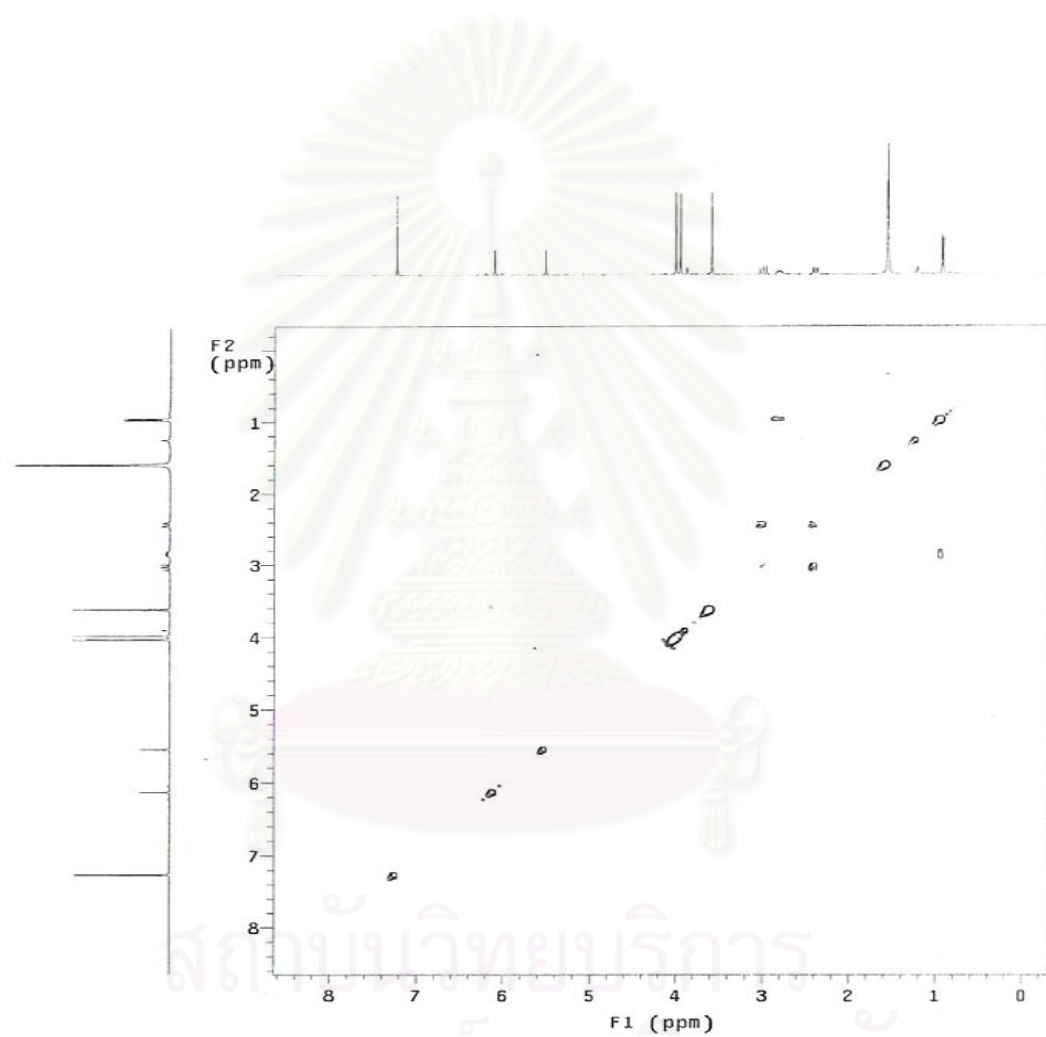
รูปที่ 21 MS สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3



รูปที่ 22 HSQC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 23 HMBC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3



รูปที่ 24 COSY สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 3

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทศวรรณ สมสีมี เกิดเมื่อวันที่ 3 มีนาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดอุดรธานี จบการศึกษาระดับปริญญาตรีจากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เมื่อปี พ.ศ. 2545 เข้าศึกษาระดับปริญญาโทที่คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2545



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย