

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอ็น โคไฟต์ที่แยกจากกระท่อม *Mitragyna speciosa* Korth.



นายสินทวี สิงหวัชว์ฒนะ

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

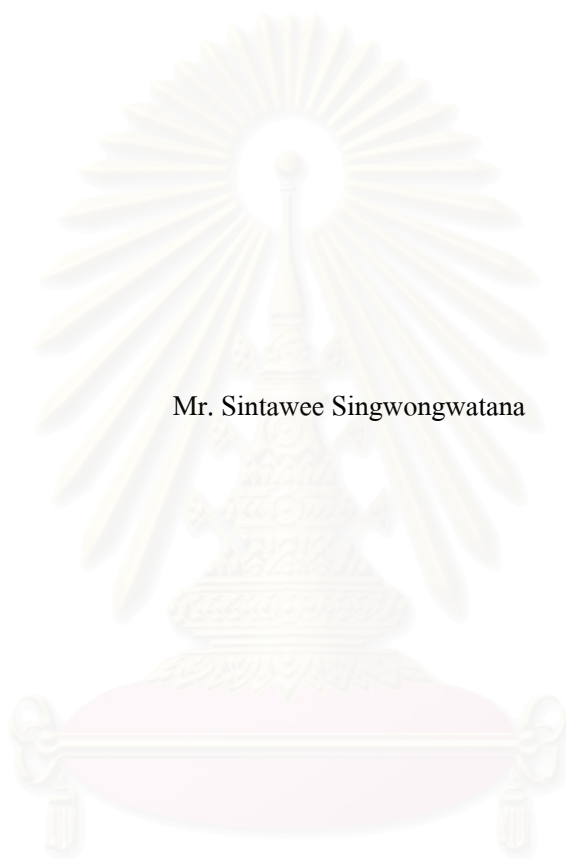
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1887-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM

Mitragyna speciosa Korth.



Mr. Sintawee Singwongwatana

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1887-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากกระท่อม

Mitragyna speciosa Korth.

โดย นายสินทวี สิงหวงศ์วัฒน์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เรืองสำราญ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สินี สีहनันทน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธราพงษ์ วิทิตสานต์)

รองคณบดีฝ่ายบริหาร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ศาสตราจารย์ โสภณ เรืองสำราญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สินี สีहनันทน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นาดยา งามโรจนวิชัย)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ พรภักกุล)

สินทวี สิงหวิงศ์วัฒน์: สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากกระท่อม

Mitragyna speciosa Korth. (BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM *Mitragyna speciosa* Korth.) อาจารย์ที่ปรึกษา: ศ. ดร. โสภณ เรืองสำราญ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. ประกิตต์สินี สีहनันทน์ 113 หน้า, ISBN 974-53-1887-6

การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบกระท่อม *Mitragyna speciosa* Korth. โดยนำใบกระท่อมจากจังหวัดปทุมธานี, อุยธยา และสุราษฎร์ธานี มาคัดแยกโดยผ่านวิธีฆ่าเชื้อที่ผิวนอก และวางบน potato dextrose agar สามารถแยกได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลต ทำการทดสอบฤทธิ์ของราเอนโดไฟต์ ด้วย วิธี dual-culture agar diffusion พบว่าราเอนโดไฟต์ ไอโซเลต P03 สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด เมื่อนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ วิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของ rDNA พบว่าราเอนโดไฟต์ P03 คือ *Glomerella cingulata* จากนั้นทำการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยนำราเอนโดไฟต์ P03 มาเลี้ยงใน อาหารเหลว sabouraud dextrose ทำการแยกสารบริสุทธิ์จากน้ำหมักและเส้นใยของราด้วยวิธีโครมาโทกราฟีและ การตกผลึก และหาสูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวโดยอาศัยสมบัติทางกายภาพและเทคนิคทางสเปกโทสโกปี พบว่า เมื่อแยกส่วนสกัดเอทิลเอซิเตดจากเส้นใยได้ของผสม 1 ชนิดคือ น้ำมัน (ของผสม 1) และสารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ ergosterol peroxide (สารบริสุทธิ์ 1) เมื่อแยกส่วนสกัดเมทานอลจากเส้นใย ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ ursolic acid (สารบริสุทธิ์ 2) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และทดสอบ ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งคน 5 ชนิด พบว่าสารบริสุทธิ์ 1 มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albican* ATCC 10231 ด้วยค่า MIC เท่ากับ 15.6 (36.4), 15.6 (36.4), 15.6 (36.4), 15.6 (36.4) และ 61.25 (143.1) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2), เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 5.0 (11.7), 6.3 (14.7), 5.2 (12.1), 5.8 (13.6) และ 8.5 (19.2) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ สำหรับสารบริสุทธิ์ 2 มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albican* ATCC 10231 ด้วยค่า MIC เท่ากับ 125 (274.1), 125 (274.1), 250 (548.2), 125 (274.1) และ 125 (274.1) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2), เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 5.4 (11.8), 5.6 (12.3), 0.8 (1.7), 0.5 (1.1) และ 0.7 (1.5) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ

สาขาวิชา...เทคโนโลยีชีวภาพ... ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา.....2547..... ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4572531323: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: ENDOPHYTIC FUNGI / *Mitragyna speciosa* Korth. / ANTIMICROBIAL
ACTIVITY/ ERGOSTEROL PEROXIDE / URSOLIC ACID

SINTAWEE SINGWONGWATANA: BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ENDOPHYTIC
FUNGI ISOLATED FROM *Mitragyna speciosa* Korth. THESIS ADVISOR: PROF. SOPHON
ROENGSUMRAN, THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PRAKITSIN SIHANONTH
113 pp. ISBN 974-53-1887-6

The purpose of this research was to isolate bioactive compounds from endophytic fungi isolated from *Mitragyna speciosa* Korth. Plant samples were collected from 3 provinces; Pathumthani, Ayuthaya and Surathani. Fungal endophytes were isolated from leaves by surface sterilization and placed on potato dextrose agar. Thirty-nine fungal isolates were obtained and tested for the production of antimicrobial compounds by dual culture agar diffusion technique. Fungal isolate P03 was chosen for the study of bioactive compounds because this isolate produced the compounds that were against a large number of test microorganisms. Based on morphology and nucleotide sequencing of internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA, isolate P03 was identified as *Glomerella cingulata*. Chromatographic techniques and crystallization were used to isolate bioactive compounds from sabouraud dextrose broth ethyl acetate crude, mycelium ethyl acetate crude and mycelium methanol crude. Structure elucidations of the pure compounds were investigated using physical properties and spectroscopic techniques. Mycelium ethyl acetate crude gave oil (mixture 1) and ergosterol peroxide (compound 1). Mycelium methanol crude gave ursolic acid (compound 2). Antimicrobial activities and cytotoxicity of the pure compound were tested. Ergosterol peroxide (compound 1) was found to exhibit activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Candida albican* ATCC 10231 with the MIC value of 15.6 (36.4), 15.6 (36.4), 15.6 (36.4), 15.6 (36.4) and 61.25 (143.1) µg/ml (µM), respectively; and exhibit cytotoxic activity against HEP-G2, CHAGO, SW620, KATO-3 and BT474 with IC₅₀ 5.0 (11.7), 6.3 (14.7), 5.2 (12.1), 5.8 (13.6) and 8.5 (19.2) µg/ml (µM), respectively. Ursolic acid (compound 2) was found to exhibit activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Candida albican* ATCC with the MIC value of 125 (274.1), 125 (274.1), 250 (548.2), 125 (274.1) and 125 (274.1) µg/ml (µM), respectively; and exhibit cytotoxic activity against HEP-G2, CHAGO, SW620, KATO-3 and BT474 with IC₅₀ 5.4 (11.8), 5.6 (12.3), 0.8 (1.7), 0.5 (1.1) and 0.7 (1.5) µg/ml (µM), respectively.

Field of study....Biotechnology.....

Student signature.....

Academic year....2004.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เรืองสำราญ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ประภคิต์สิน สีहनนท์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมคอยให้คำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบ รวมทั้ง รองศาสตราจารย์ ดร. นาดยา งามโรจนวิชัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัชช์ พรภคกุล ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบและให้คำแนะนำต่อผู้เขียนในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอบคุณทุนวิจัย Research Centre for Bioorganic Chemistry (RCBC) และ บัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือสนับสนุนทุนวิจัย

ขอบคุณอาจารย์ ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการจำแนกสายพันธุ์ราแอนโดไฟต์ด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยาโมเลกุล

ขอบคุณ คุณทรงจันทร์ ภูทอง สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นิสิตหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต เทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจ

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดาและมารดาของผู้เขียน ให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์และทุนทรัพย์ในการศึกษา และเป็นกำลังใจแก่ผู้เขียนตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ญ
คำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 ทัศนวิสัยที่เกี่ยวกับ.....	3
2.1 ราเอนโคไฟต์.....	3
2.2 การศึกษาสารพิษที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโคไฟต์ที่น่าสนใจ.....	4
2.3 ต้นกระท่อม.....	11
3 วิธีการทดลอง.....	16
3.1 การเก็บตัวอย่างใบกระท่อม.....	16
3.2 การแยกราเอนโคไฟต์.....	16
3.3 การคัดเลือกราเอนโคไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	16
3.4 การพิสูจน์ทางเอกลักษณ์ของราเอนโคไฟต์ P03.....	17
3.5 การเลี้ยงเชื้อและสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จากราเอนโคไฟต์ P03.....	19
3.6 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ.....	21
3.7 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากราเอนโคไฟต์P03.....	24
3.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	27
3.9 การวิเคราะห์การพิสูจน์เอกลักษณ์สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคสเปกโทสโกปี.....	29
4 ผลการทดลอง.....	30
4.1 การเก็บตัวอย่างและแยกราเอนโคไฟต์จากใบกระท่อม.....	30
4.2 การคัดเลือกราเอนโคไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	37
4.3 การพิสูจน์ทางเอกลักษณ์ของราเอนโคไฟต์ P03.....	40
4.4 การเลี้ยงเชื้อ, สกัดและแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จากราเอนโคไฟต์ P03.....	44
4.5 การหาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากราเอนโคไฟต์ P03.....	45

	หน้า
4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	69
5 สรุปผลการทดลอง.....	71
รายการอ้างอิง.....	73
ภาคผนวก.....	80
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	113



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 การแยกสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโคไฟต์ P03.....	21
3.2 การแยกสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตตจากเส้นใยเชื้อราเอนโคไฟต์ P03.....	22
3.3 การแยกสารสกัดหยาบเมทานอลจากเส้นใยเชื้อราเอนโคไฟต์ P03.....	23
4.1 จำนวนราเอนโคไฟต์ที่แยกได้จากใบกระท่อม จากแหล่งต่างๆของประเทศไทย.....	30
4.2 ลักษณะและการจัดจำแนกของราเอนโคไฟต์ที่แยกได้จากใบกระท่อม.....	35
4.3 ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่ใช้ทดสอบฤทธิ์.....	38
4.4 วงใส (มิลลิเมตร) จากราเอนโคไฟต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์...	38
4.5 งานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวกับ <i>Glomerella cingulata</i> (anamorph: <i>Colletotrichum</i> sp.).....	43
4.6 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 1.....	45
4.7 HSQC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1.....	48
4.8 เปรียบเทียบ ¹³ C-NMR และ ¹ H-NMR ของสารบริสุทธิ์ 1 กับ Ergosterol peroxide...	49
4.9 ข้อมูล HSQC, HMBC, COSY และ NOESY ของสารบริสุทธิ์ 1.....	50
4.10 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ Ergosterol peroxide ที่พบในราและพืชชนิดต่างๆ.....	55
4.11 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 2.....	56
4.12 HSQC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2.....	59
4.13 เปรียบเทียบ ¹³ C-NMR และ ¹ H-NMR ของสารบริสุทธิ์ 2 กับ Ursolic acid.....	60
4.14 ข้อมูล HSQC, HMBC, COSY และ NOESY ของสารบริสุทธิ์ 2	61
4.15 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ Ursolic acid ที่พบในพืชชนิดต่างๆ.....	66
4.16 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของของผสม 1.....	67
4.17 ปริมาณกรดไขมันชนิดต่างๆในน้ำมัน (ของผสม 1).....	68
4.18 โครงสร้างและชื่อทางเคมีของกรดไขมันชนิดต่างๆที่พบในของผสม 1	68
4.19 MIC ของสารบริสุทธิ์ที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	69
4.20 ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากราเอนโคไฟต์.....	70

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ต้นกระท่อม (ช้าย) และ ดอกกระท่อม (ขวา).....	11
2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารชนิดต่างๆที่พบในต้นกระท่อม.....	12
3.1 บริเวณ ITS ของ rDNA	19
3.2 แผนภาพแสดงการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใย.....	20
4.1 ราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆที่แยกได้จากใบกระท่อม จังหวัดปทุมธานี.....	30
4.2 ราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆที่แยกได้จากใบกระท่อม จังหวัดอยุธยา.....	35
4.3 ราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆที่แยกได้จากใบกระท่อม จังหวัดสุราษฎร์ธานี.....	33
4.4 วงใสจากราเอนโดไฟต์ P03 ในการยับยั้งการเจริญของ <i>Escherichia coli</i>	35
4.5 ราเอนโดไฟต์ P03 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดต่างๆ.....	39
4.6 ลักษณะของเพอริซิเทียม (บน) และเส้นใย (ล่าง) ของราเอนโดไฟต์ P03.....	40
4.7 ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ P03.....	41
4.8 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ P03 กับฐานข้อมูลGenBank.	42
4.9 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 1.....	52
4.10 คาร์บอนเคมีคัลชิฟท์ของสารบริสุทธิ์ 1.....	52
4.11 HMBC ของสารบริสุทธิ์ 1.....	53
4.12 COSY ของสารบริสุทธิ์ 1.....	53
4.13 NOESY ของสารบริสุทธิ์ 1.....	54
4.14 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 2.....	63
4.15 คาร์บอนเคมีคัลชิฟท์ของสารบริสุทธิ์ 2.....	63
4.16 HMBCของสารบริสุทธิ์ 2.....	64
4.17 COSY ของสารบริสุทธิ์ 2.....	64
4.18 NOESY ของสารบริสุทธิ์ 2.....	65
4.19 TOCSY ของสารบริสุทธิ์ 2.....	65

คำย่อ

$[\alpha]_D^{20}$	=	Specific rotation at 20 ^o and Sodium D line (589 nm)
ATCC	=	American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A
br s	=	broad singlet (for NMR spectral data)
¹³ C-NMR	=	carbon-13 nuclear magnetic resonance
CDCl ₃	=	deuterated chloroform
CHCl ₃	=	chloroform
CD ₃ OD	=	deuterated methanol
COSY	=	¹ H- ¹ H correlation spectroscopy
δ	=	chemical shift
d	=	doublet (for NMR spectral data)
dd	=	doublet of doublet (for NMR spectral data)
dt	=	doublet of triplets (for NMR spectral data)
ϵ	=	molar absorptivity
EI-MS	=	electron impact mass spectroscopy
Eq	=	equatorial
EtOAc	=	ethylacetate
HMBC	=	¹ H- ¹³ C heteronuclear correlation
HSQC	=	¹ H- detected heteronuclear single quantum coherence
¹ H-NMR	=	proton nuclear magnetic resonance
Hz	=	hertz
IR	=	infrared spectroscopy
ITS	=	internal transcribed spacer
μ l	=	microliter
λ_{\max}	=	wavelength of maximum absorption

คำย่อ (ต่อ)

$[M+H]^+$	=	protonated molecular ion
m	=	multiplet (for NMR spectral data)
MEA	=	Malt extract agar
MHB	=	Mueller- Hinton broth
MeOH	=	methanol
MIC	=	Minimum inhibitory concentration
μg	=	microgram
MHz	=	megahertz
ml	=	millilitre
mm	=	millimeter
V_{max}	=	wave number at maximum absorption
NMR	=	nuclear magnetic resonance
N.	=	Number
ppm	=	part per million
s	=	singlet (for NMR spectral data)
SEM	=	scanning electron microscope
t	=	tripet (for NMR spectral data)
TLC	=	thin layer chromatography
UV	=	Ultraviolet

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงมีความพยายามในการหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเดิมเพื่อใช้ต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ความเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงและเป็นแหล่งสำคัญที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่ามีรายอยู่จำพวกหนึ่งที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช นอกจากนี้ร่ายงชนิดยังสามารถสร้างสารชนิดเดียวกันกับพืชที่ราอาศัยอยู่ เรียกรายชนิดนี้ว่าราเอนโดไฟต์

จากการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ พบว่ามีสารที่น่าสนใจและสามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นยาชนิดใหม่ๆ ได้ เช่น สารที่ฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive agents), สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anticancer agents) และสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial agents) ตัวอย่างเช่น ราเอนโดไฟต์ *Acremonium* sp. ที่อาศัยอยู่ในต้น European yew (*Taxus baccata*) สามารถสร้างสารกลุ่ม Leucino statins ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราและเซลล์มะเร็ง (Strobel และคณะ, 1996) และจากการศึกษาราเอนโดไฟต์ที่พบในต้น *Taxus mairei* และ *Torreya grandis* พบราเอนโดไฟต์ 2 ชนิดคือ *Paecilomyces* sp. และ *Aspergillus clavatus* ที่สามารถสร้างสาร Brefeldin A ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Wang และคณะ, 2002) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรไทยเพื่อเป็นแหล่งของสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่

ต้นกระท่อม (*Mitragyna speciosa* Korth.) เป็นพืชที่มีคุณสมบัติในการรักษาโรคหลายชนิด เช่น รักษาอาการปวดท้อง แก้ท้องเสีย โรคบิด นอกจากนี้ใบกระท่อมยังเป็นแหล่งของสารอินโดลแอลคาลอยด์หลายชนิด โดยเฉพาะ Mitragynine ที่มีคุณสมบัติในการระงับปวด โดยมีการทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารดังกล่าวโดยทำการทดลองในหนูขาวและหนูตะเภา พบว่า Mitragynine จาก ใบกระท่อมมีฤทธิ์ในการระงับปวดในลักษณะเดียวกับแอลคาลอยด์ที่ได้จากฝิ่น เช่น มอร์ฟีน (Opiate-like action) โดยไปออกฤทธิ์ต่อ Opioid receptor (Agonistic effects) แต่มีความรุนแรงน้อยกว่ามอร์ฟีน 10 เท่า (Watanabe และคณะ, 1997)

ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจทำการศึกษาแยกราเอนโดไฟต์จากใบกระท่อม ซึ่งอาจจะทำให้พบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และสารที่ใกล้เคียงหรือเป็นสารชนิดเดียวกันกับสารที่พบในใบกระท่อม เพื่อนำไปพัฒนาให้เกิดประโยชน์ต่อไปในอนาคตได้

วัตถุประสงค์

1. แยกราเอนโคไฟต์จากใบของต้นกระท่อม (*Mitragyna speciosa* Korth.)
2. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโคไฟต์ที่แยกได้
3. พิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโคไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
4. ทำการสกัดและแยกสารจากราเอนโคไฟต์ ให้บริสุทธิ์
5. ระบุชนิดและโครงสร้างของสารที่แยกได้จากราเอนโคไฟต์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi)

ราเอนโดไฟต์ เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตบริเวณทั้งในและช่องว่างระหว่างเซลล์พืช ในส่วนของเปลือกไม้, เนื้อไม้, ก้านใบ, ใบ และรากของพืชชั้นสูง โดยมีความสัมพันธ์กับพืชในลักษณะที่เป็นภาวะพึ่งพากัน (mutualism symbiotic) เช่น การที่ราเอนโดไฟต์สร้างสารพิษป้องกันแมลงและสัตว์ให้แก่พืช ในขณะที่พืชให้ที่อยู่อาศัยและอาหารแก่รา (Ju และคณะ, 1998 และ Daisy และคณะ, 2002) และ ภาวะอิงอาศัย (commensalisms) จนถึงกระทั่งทำให้เกิดโรคกับพืชได้ ถ้าต้นพืชมีภาวะอ่อนแอหรือมีความเครียดเกิดขึ้น ราเอนโดไฟต์อาจจะอาศัยอยู่ในช่วงใดช่วงหนึ่งหรือทั้งหมดของวงชีวิตพืช และเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ไม่ปรากฏอาการในเนื้อเยื่อพืช ทั้งนี้ไม่รวมราไมคอร์ไรซา แต่รวมราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช ในระยะเวลาที่ยาวนานก่อนที่จะเป็นสาเหตุให้เกิดอาการของโรคในพืชที่ราอาศัยอยู่ ถึงแม้ว่าราเหล่านี้จะถูกจัดเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคแต่ก็ยังสามารถดำรงชีวิตแบบเอนโดไฟต์ได้ในวงชีวิต

เมื่อจัดกลุ่มราเอนโดไฟต์ในทางนิเวศวิทยา แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้ (กฤต เพชสุวรรณ, 2543)

1. Clavicipitaceous grass endophyte คือราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในหญ้าซึ่งเป็นราในวงศ์ Clavicipitaceae การค้นพบราเอนโดไฟต์ในกลุ่มนี้ เริ่มต้นจากการพบราในเมล็ดของหญ้าชนิดหนึ่ง (*Lolium tumulentum* L.) ซึ่งเป็นวัชพืชที่เกิดในแปลงโดย Vogl ในปีค.ศ.1989 นับจากนั้นจึงมีรายงานการศึกษา ซึ่งทำให้เห็นว่าราในกลุ่มนี้มีแหล่งที่อยู่อาศัยในพืชอีกมาก ซึ่งทั้งหมดจะเป็นพวกหญ้าได้แก่หญ้าตระกูล Poaceae, หญ้าจำพวกหญ้าแห้วหมู (Sedge) ตระกูล Cyperaceae และหญ้าทรงสูงชนิดหนึ่ง (rush) ตระกูล Juncaceae โดยมีหญ้ากว่า 80 สกุลและหลายร้อยชนิดที่ราอาศัยอยู่

2. Non- Clavicipitaceous grass endophyte คือราเอนโดไฟต์ในไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่มแต่รวมราเอนโดไฟต์ในหญ้าที่ไม่ได้อยู่ในวงศ์ Clavicipitaceae ราเอนโดไฟต์ในกลุ่มนี้ได้แก่ในราในดิวิชันย่อย Ascomycotina, Deuteromycotina, Zygomycotina และ Basidiomycotina ราเอนโดไฟต์ของพืชตระกูลหญ้าเป็นที่รู้จักกันมานานกว่า 70 ปีแล้ว แต่การศึกษาราเอนโดไฟต์ของไม้ยืนต้นและไม้พุ่มเพิ่งเริ่มศึกษาเมื่อประมาณ 20 ปีที่ผ่านมา โดยเริ่มศึกษาจากต้นสนพันธุ์ยุโรป หลังจากนั้นก็มีรายงานที่รวบรวมรายชื่อของพืชที่มีราเอนโดไฟต์ เพื่อสรุปถึงราเอนโดไฟต์ที่กระจายอยู่ในอาณาจักรของพืช และพบว่าพืชที่มีเนื้อไม้พวกจิมโนสเปิร์ม และแองจิโคสเปิร์มทั้งหมดที่ถูกตรวจสอบมีราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่และพบว่าราเหล่านี้ มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง

2.2 การศึกษาสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่น่าสนใจ

การศึกษาสารทุติยภูมิจากราเอนโดไฟต์ ผู้ทำการวิจัยส่วนใหญ่มักเลือกต้นไม้ที่เป็นพืชประจำถิ่นของประเทศต่างๆ ส่วนมากเป็นพืชเขตร้อนและพืชสมุนไพร เนื่องจากผู้ทำการวิจัยคาดว่าราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับต้นพืชดังกล่าวอาจสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้เช่นเดียวกับพืชที่ราอาศัยอยู่ จากงานวิจัยต่างๆสามารถแยกประเภทของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ราเอนโดไฟต์สร้างขึ้นออกเป็น 3 ประเภทได้แก่ สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์, สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งและสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น ยับยั้งการเจริญของไวรัส หรือ นำแมลงได้

2.2.1 สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial agents)

การออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารที่ราเอนโดไฟต์ผลิตได้ จัดเป็นฤทธิ์เบื้องต้นของรายการทดสอบ นิยมทดสอบกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรคโดยวัดจากขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น, ค่า MIC (minimum inhibitory concentrations) หรือค่า IC (inhibition concentration) มีรายงานการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจของราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ ดังนี้ (รูปโครงสร้างของสารต่างๆ ที่แยกได้จากราเอนโดไฟต์แสดงรูปที่ ข1 ภาคผนวก ข)

Horn และคณะ (1995) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Phomopsis sp.* จาก *Salix gracilostyla* var. *melanostachys* ซึ่งสามารถผลิตสาร Phomopsichalasin ศึกษาโครงสร้างสารดังกล่าวด้วยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี พบว่าอยู่ในกลุ่มของ Cytochalasin ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis*, *Salmonella gallinarum*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida tropicalis* ได้

Munday-Finch และคณะ (1998) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Neotyphodium lolii* จาก *Lolium perenne* ซึ่งสามารถผลิตสาร Lolicine A และ B ศึกษาโครงสร้างสารดังกล่าวด้วยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี พบว่าอยู่ในกลุ่มของ indole-diterpenoids ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด

Strobel และคณะ (1999) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Cryptosporiopsis cf. quercina* จาก *Tripterigeum wilfordii* ซึ่งสามารถผลิตสาร Cryptocandin ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.03 – 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้หลายชนิด

Brandy และคณะ (2000) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. จากต้น *Selaginella pallescens* ซึ่งสามารถผลิตสาร CR377 ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม pentaketide ชนิดใหม่ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* โดยเกิดวงใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 19 – 24 มิลลิเมตร

Li และคณะ (2000) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* จากต้น *Tripterogyium wilfordii* ซึ่งสามารถผลิตสาร Cryptocin ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *Pythium ultimum*, *Phytophthora cinnamoni*, *Phytophthora citrophthora*, *Sclerotinia sclerotiorum* และ *Pyricularia oryzae* โดยมีค่า MIC น้อยกว่า 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

Lu และคณะ (2000) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum* sp. จากต้น *Artemisia annua* ซึ่งสามารถผลิตสาร ในกลุ่ม ergosterol 7 ชนิด, indole-3-acetic acid (IAA) ที่เป็นฮอร์โมนพืชและสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ 3 ชนิด ได้แก่ 6-isoprenylindole-3-carboxylic acid, 3 β ,5 α -dihydroxy-6 β -acetoxy-ergosta-7,22-diene และ 3 β ,5 α -dihydroxy-6 β -phenylacetyloxy-ergosta-7,22-diene ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิด (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* และ *Pseudomonas* sp.) โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 25 – 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *Candida albicans* และ *Aspergillus niger* โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 50 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

Zou และคณะ (2000) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum gloeosporioides* จากต้น *Artemisia mongolica* ซึ่งสามารถผลิตสาร colletotric acid ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* และ *Helminthosporium sativum* โดยมีค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentrations) อยู่ในช่วง 25 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

Krohn และคณะ (2001) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Mycelia sterila* จากต้น *Atropa belladonna* ซึ่งสามารถผลิตสาร preussomerins J, K และ L และศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus megaterium*, *Microbotryum violaceum*, *Mycotypha microspora* และ *Chlorella fusca* ด้วยวิธี agar diffusion

Li และคณะ (2001) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis* sp. และ *Monochaetia* sp. จากพืชเขตร้อนหลายชนิดซึ่งสามารถผลิตสาร amburic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช เช่น *Fusarium cubense*, *Helminthosporium sativum*, *Diplodia natalensis* และ *pythium ultimum* ได้

Liu และคณะ (2001) ศึกษาสารเอนโดไฟต์หลายชนิดจากต้น *Artemisia annua* ที่เป็นแหล่งของยาต้านมาเลเรีย artemisinin พบว่าราเอนโดไฟต์ IV403 สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้มากที่สุด

Harper และคณะ (2003) ศึกษาสารเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspora* จากต้น *Terminalia morobensis* ซึ่งสามารถผลิตสาร Pestacin และจัดอยู่ในกลุ่ม Isobenzofuran ที่มีนอกจากจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดแล้วและยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Stinson และคณะ (2003) ศึกษาสารเอนโดไฟต์ *Gliocladium sp.* จากต้น *Eucryphia cordifolia* ซึ่งสามารถผลิต 1,3,5,7 cyclooctatetraene และสารอินทรีย์ที่ระเหยได้หลายชนิด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและฆ่าราก่อโรคเช่น *Sclerotinia sclerotiorum* และ *Pythium ultimum* โดยมีค่า IC_{100} อยู่ในช่วง 0.18 – 0.66 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Kim และคณะ (2004) ศึกษาสารเอนโดไฟต์ *Periconia sp.* จากต้น *Taxus cuspidata*. ซึ่งสามารถผลิตสาร periconicins A และ B ที่เป็นสารชนิดใหม่ในกลุ่ม fusicoccane diterpenes ทั้ง 2 ชนิดและมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Klebsiella pneumoniae* IFO 1354 โดยมีค่า MIC ตั้งแต่ 3.12 จนถึงมากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย

Liu และคณะ (2004) ศึกษาสารเอนโดไฟต์ *Aspergillus fumigatus* CY018 จากต้น *Cynodon dactylon* ซึ่งสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด และมีสารชนิดใหม่ 2 ชนิดคือ asperfumoid และ asperfumin และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราหลายชนิดเช่น *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* และ *Aspergillus niger* โดยมีค่า MIC ตั้งแต่ 75 จนถึงมากกว่า 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Weber และคณะ (2004) ศึกษาสารเอนโดไฟต์ *Phomopsis species* จากต้น *Erythrina crista-galli* ซึ่งสามารถผลิตสาร phomol ที่เป็นสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ โดยจัดเป็นสารในกลุ่ม polyketide lactone และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราหลายชนิด

2.2.2 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (anticancer agents)

นอกจากฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นฤทธิ์ทั่วไปของราเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แล้ว การออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งนับเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาราเอนโดไฟต์เป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากสถิติของผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ของประชากรโลกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี และสารเคมีและยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นการทดสอบและสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจสำหรับรายงานการศึกษาศาสตร์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ที่น่าสนใจของราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ มีดังนี้ (รูปโครงสร้างของสารต่างๆ ที่แยกได้จากราเอนโดไฟต์แสดงรูปที่ ข2 ภาคผนวก ข)

Stierle และคณะ (1995) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Taxomyces andreanae* จากต้น *Taxus brevifolia* และวิธีการสกัดสาร Taxol ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากราเอนโดไฟต์

Lee และคณะ (1996) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspora* จากต้น *Torreya taxifolia* ซึ่งสามารถผลิตสาร Torreyanic acid พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งหลายชนิด โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 9.4 – 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

Stroble และคณะ (1997) พบว่า *Acremonium* sp. ที่อาศัยอยู่ในต้น European yew (*Taxus baccata*) สามารถสร้างสารกลุ่ม Leucino statins ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและเซลล์มะเร็ง

Stierle และคณะ (1999) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Aspergillus parasiticus* จากต้น *Sequoia sempervirens* ซึ่งสามารถผลิตสาร Sequoiatones A and B ศึกษาโครงสร้างสารดังกล่าวด้วยเทคนิคทาง สเปกโทสโกปี นอกจากนี้พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งหลายชนิด

Metz และคณะ (2000) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspora* จาก *Taxus wallichiana* เปรียบเทียบกับราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ต่างๆ ในพืชชนิดอื่นๆ ที่สามารถสร้าง taxol ได้ เช่นเดียวกัน พบว่า ราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspora* จากต้น *Taxus wallichiana* สามารถผลิตได้มากที่สุดปริมาณ 2.92 มิลลิกรัมต่อลิตร

Wagenaar และคณะ (2000) ศึกษาารานโดไฟต์ *Rhinocladiella* sp. จากต้น *Tripterygium wilfordii* ซึ่งสามารถผลิตสาร cytochalasin ชนิดใหม่ 3 ชนิด ที่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด ได้แก่ A2780S (ovarian tumor cell line), SW-620 (colon tumor cell line) และ HCT-116 (colon tumor cell line) เปรียบเทียบกับ cytochalasin E พบว่า IC_{100} ($\mu\text{g/ml}$) ของ cytochalasin ทั้ง 3 ชนิด มีค่ามากกว่า IC_{100} ของ cytochalasin E โดยมีค่าอยู่ในช่วง 3.91 – 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Wang และคณะ (2000) ศึกษาารานโดไฟต์ *Tubercularia* sp. สายพันธุ์ TF5 จากต้น *Taxus mairei* ซึ่งสามารถผลิตสาร Taxol ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 2 ชนิดคือ KB (เซลล์มะเร็งในช่องปาก) และ P388 (เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว) โดยมีค่า ID_{50} 1/2400 และ 1/38,400 ตามลำดับ

Shrestha และคณะ (2001) ศึกษาารานโดไฟต์จากต้น *Taxus wallichiana* พบว่ามีรานโดไฟต์ชนิดใหม่ 3 ชนิดที่สามารถผลิตยา paclitaxel ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ที่มีมูลค่าสูงทางการค้า

Wagenaar และคณะ (2001) ศึกษาารานโดไฟต์ *Phomopsis longicolla* จากต้น *Dicerandra frutescens* ซึ่งสามารถผลิตสาร Dicerandrols A, B และ C ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 2 ชนิดคือ A549 and HCT-116 โดยมีค่า IC_{100} อยู่ในช่วง 1.8 - 7.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Wang และคณะ (2002) ศึกษาารานโดไฟต์จากต้น *Taxus mairei* และ *Torreya grandis* พบรานโดไฟต์ 2 ชนิดคือ *Paecilomyces* sp. และ *Aspergillus clavatus* ที่สามารถสร้าง Brefeldin A ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.3 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ

ราเอนโดไฟต์สามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย นอกจากฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งแล้ว ยังมีราเอนโดไฟต์อีกหลายชนิดที่สามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของไวรัสต่างๆ หรือมีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงได้ มีรายงานการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆที่น่าสนใจของราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ ดังนี้ (รูปโครงสร้างของสารต่างๆ ที่แยกได้จากราเอนโดไฟต์แสดงรูปที่ ข3 ภาคผนวก ข)

Lee และคณะ (1995) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Fusarium subglutinans* ที่อาศัยอยู่ใน *Tripterygium wilfordii* ที่สามารถผลิตสาร Subglutinol A และ B จัดอยู่ในกลุ่ม diterpene ที่มีฤทธิ์เป็น Immunosuppressive

McBrien และคณะ (1996) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. จากต้น *Oxydendron arborcum* ซึ่งสามารถผลิตสาร Fusaricide ศึกษาโครงสร้างสารดังกล่าวด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี นอกจากนี้พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัส HIV

Ju และคณะ (1998) ศึกษาสารทุติยภูมิ จากราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ใน Blue grass (*Poa ampla*) พบสาร ฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ 3 ชนิด คือ Tricin, 7-*o*-(β -D-glucopyranosyl)tricin และ Isoorientin ซึ่งมีคุณสมบัติในการฆ่าลูกน้ำยุง

Guo และคณะ (2000) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Cytospora* sp. ที่สามารถผลิตสาร Cytonic Acids A และ B ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม tridepside ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของไวรัส human cytomegalovirus (hCMV)

Daisy และคณะ (2002) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Muscodora vitigena* จากต้น *Paullinia paullinioides* ซึ่งสามารถผลิตสาร Naphthalene ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าแมลง *Cephus cinctus*

Popay และคณะ (2003) ศึกษาสารสกัดราเอนโดไฟต์ *Neotyphodium uncinatum* จากต้น *Festuca pratensis* พบว่ามีฤทธิ์ในการฆ่าแมลง Grass grub (*Costelytra zealandica*)

Singh และคณะ (2003) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Penicillium chrysogenum* ที่สามารถผลิตสาร Xanthoviridicatin E และ F มีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัส HIV โดยทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ integrase ของไวรัส นอกจากนี้ยังพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นเช่น 8-O-methylanthro gallol, xerocomic acid, deoxyfunicone, altenusin และ rugulosin

Kumar และคณะ (2004) ศึกษาสารสกัดของราเอนโดไฟต์จากต้น *Tripterygium wilfordii* พบราเอนโดไฟต์ 3 ชนิดคือ *Acremonium* sp. A, C และ *Pestalotiopsis suffocata* ที่สามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการกกดภูมิคุ้มกัน

Schwarz และคณะ (2004) ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Phomopsis phaseoli* ที่อาศัยอยู่ในต้น *Quercus suber* ที่สามารถผลิตสาร 3-Hydroxypropionic acid ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าปรสิตพืช *Meloidogyne incognita* ด้วยค่า LD₅₀ ในช่วง 12.5–15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 ต้นกระท่อม (Kratom)

2.3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้นกระท่อม (*Mitragyna speciosa* Korth.) อยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางสูง 10-15 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงตัวเป็นคู่ตรงข้ามและมีหูใบ 1 คู่ (interpetiolar stipules) ใบมีรสขมฝาด แผ่นใบสีเขียว เป็นรูปไข่รี แกนขอบขนาน ปลายแหลมมีขนาด กว้างประมาณ 5-10 เซนติเมตร ยาวประมาณ 8-14 เซนติเมตร ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ ฐานใบมน ก้านใบออกจากรูขุมขนใบ มีความยาวประมาณ 2-4 เซนติเมตร เส้นใบเรียงตัวแบบขนาน เส้นกลางใบและเส้นแขนงใบ มีสีแดงเรื่อ มีขนอ่อนสั้นๆ บริเวณเส้นใบที่อยู่ด้านท้องใบ มีเส้นแขนงใบ 10-15 คู่ ดอกออกเป็นช่อ ตุ่มกลม (head) ขนาด 3-5 เซนติเมตร ใบ 1 ช่อประกอบด้วยดอกย่อยขนาดเล็กสีขาวอมเหลืองจำนวนมาก ดอกย่อยสมบูรณ์เพศ (รูปที่ 2.1) ผลเป็นรูปไข่ขนาดเล็กประมาณ 5-7 มิลลิเมตร กระท่อมพบได้ในบางจังหวัดของภาคกลาง เช่น ปทุมธานี แต่จะพบมากในป่าธรรมชาติบริเวณภาคใต้ เช่น สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ตรัง สตูล พัทลุง สงขลา ยะลา ปัตตานี นราธิวาส และตอนบนของประเทศไทย กระท่อมเป็นพืชเสพติดให้โทษประเภท 5 ตาม พ.ร.บ. ยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522



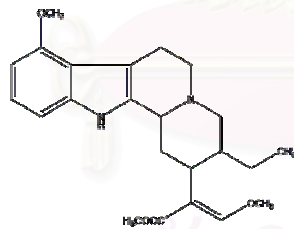
รูปที่ 2.1 ต้นกระท่อม (ซ้าย) และ ดอกกระท่อม (ขวา)

2.3.2 สรรพคุณทางยา

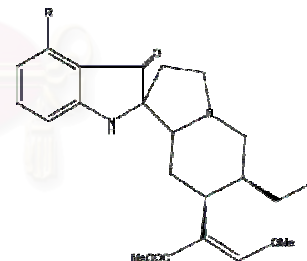
ใบกระท่อมมีรสขมฝื่อนเมา ใช้เป็นยาแก้ปวดท้อง แก้บิด ท้องเสีย แก้ปวดเมื่อยร่างกาย ระวังประสาท ช่วยให้ทำงานทนไม่หิวง่าย วิธีใช้ให้นำใบสด 3-4 ใบ มาลอกเอาแก่นใบและเส้นใบ ออก เคี้ยวให้ละเอียด ต้มน้ำอุ่นกลั้วกลืนลงไป หรือนำใบมาตากแดดให้แห้ง บดเป็นผง รับประทาน กับน้ำอุ่นครั้งละ 1 ช้อน กาแฟพูนๆ แก้ท้องเสีย บรรเทาอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อและทำให้เกิดอาการ เคลิบเคลิ้มสบายตัวได้นานประมาณ 4-5 ชั่วโมง การรับประทานใบกระท่อมช่วยให้ทำงานได้ทน เวลาไม่แสงแดดจัด แต่จะเกิดอาการหนาวสั่นเวลาอากาศครึ้มฟ้าครึ้มฝน (เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2514)

2.3.3 สารเคมีที่สำคัญ

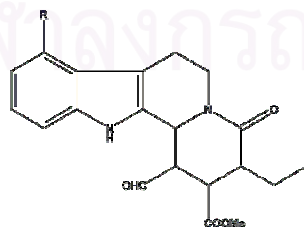
ใบกระท่อมประกอบด้วยแอลคาลอยด์ทั้งหมดประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในจำนวนนี้เป็น mitragynine ครึ่งหนึ่ง ที่เหลือส่วนมากเป็น speciogynine และ paynanthine ส่วน speciogynine พบปริมาณน้อย พบ oxindole alkaloid ปริมาณน้อยมาก ใบกระท่อมสด 1 ใบ มีน้ำหนักเฉลี่ย 1.7 กรัม (ใบแห้งหนัก 0.43 กรัม) ใบสด 20 ใบ จะได้ mitragynine ประมาณ 17 มิลลิกรัมหรือ 850 ไมโครกรัมต่อใบ ชนิดและปริมาณแอลคาลอยด์ที่พบ แตกต่างกันตามสถานที่และเวลาที่เก็บเกี่ยว แอลคาลอยด์ที่พบในใบกระท่อมมีประมาณ 40 ชนิด ส่วนใบอ่อนพบแอลคาลอยด์ปริมาณ น้อยมาก แอลคาลอยด์ที่มีการตรวจสอบหาสูตร โครงสร้างได้แล้ว แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ Indole alkaloid และ oxindole alkaloid นอกจากนี้ยังพบ flavonoid, phytosteorid และ taninin โครงสร้างสารเคมี ชนิดต่างๆ ที่พบในใบกระท่อมแสดงดังรูปที่ 2.2 (นิวัตี แก้วประดับ, 2533)



mitragynine

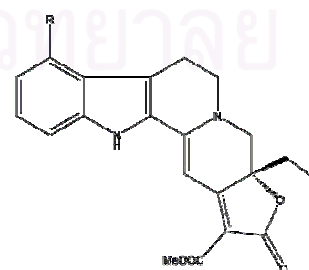


mitragynine pseudoindoxyl



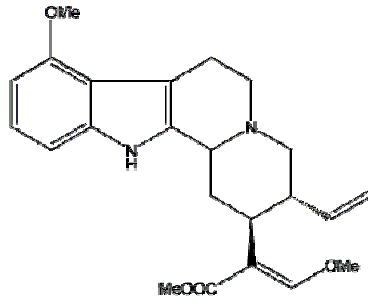
mitragynaline (R = OMe)

corynantheidaline (R = H)

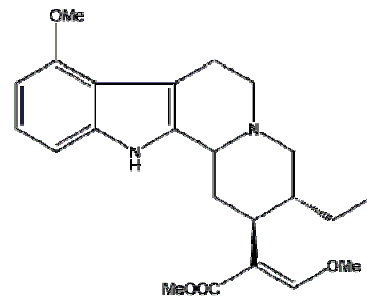


9-methoxymitralactonine

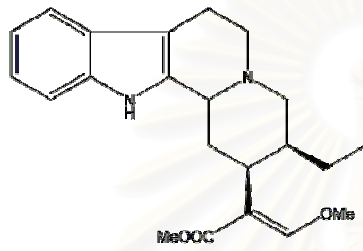
รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารชนิดต่างๆ ที่พบในต้นกระท่อม



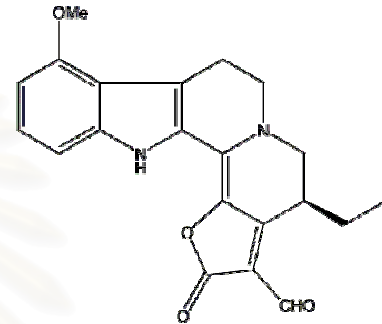
paynantheine



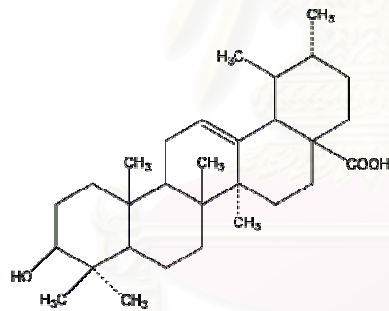
speciogynine



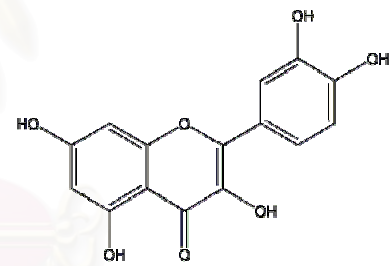
corynanthediene



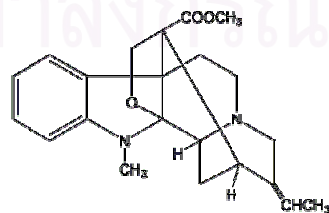
mitralactonol



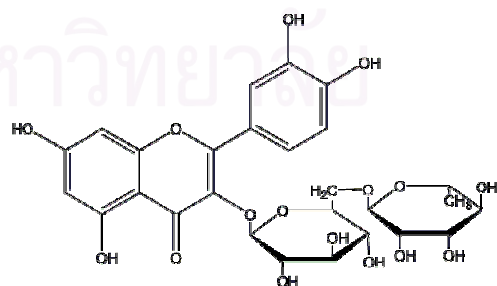
ursolic acid



quercetin



akuammigine



rutin

รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารชนิดต่างๆที่พบในต้นกระท่อม (ต่อ)

2.3.4 งานวิจัยเกี่ยวกับต้นกระท่อม

งานวิจัยที่เกี่ยวกับต้นกระท่อมและสาร mitragynine ยังมีไม่มากนักทั้งที่พืชชนิดนี้เป็นที่รู้จักกันมากกว่า 100 ปีแล้ว ทั้งนี้เนื่องจาก ต้นกระท่อมเป็นพืชเฉพาะถิ่นที่พบบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เท่านั้น รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับต้นกระท่อมมีดังนี้

Grewel (1932) ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ mitragynine ต่อเนื้อเยื่อสัตว์ทดลองและรายงานว่า mitragynine ลดแรงบีบ (tone) และความกว้าง (amplitude) ของการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบ จึงมีฤทธิ์ทำให้เกิดการซาเฉพาะที่ได้ และยังมีฤทธิ์ฆ่าโปรโตซัวทั่วไปได้ แต่ไม่ฆ่าแบคทีเรียและโปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ รวมถึงมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางคล้ายโคเคน และให้ข้อสังเกตด้วยว่า คนไทยบริโภคกันแพร่หลายมานานแล้ว เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานกลางแจ้ง

Marcan (1934) ศึกษาเปรียบเทียบผลทางจิตวิทยากับชาย 6 คน โดยให้ mitragynine acetate 50 - 100 มิลลิกรัม และผงบดใบกระท่อมแห้ง 650 - 1300 มิลลิกรัม พบว่า การให้ทั้งสองรูปแบบให้ผลเหมือนกัน คือ ลดเวลาการเกิดปฏิกิริยาต่อสิ่งเร้า เพิ่มความอดทนต่อสิ่งเร้า เพิ่มสมรรถภาพในการทำงาน ผิวหนังเป็นสีแดง เนื่องจากผลการขยายหลอดเลือดบริเวณผิวหนัง

Macko และคณะ (1972) รายงานฤทธิ์ระงับปวดและแก้ไอได้ดีพอๆกับโคดีนีนในขนาดเท่ากันแต่ไม่ทำให้อาเจียนหรือหายใจขัดและไม่ทำให้เกิดอาการติดเหมือนฝิ่น ซึ่งสามารถยับยั้งฤทธิ์ของฝิ่นได้ เมื่อให้ mitragynine ในขนาดสูงจะกดระบบทางเดินหายใจน้อยกว่าโคดีนีนมาก นอกจากนั้นยังทำการทดสอบในหนูพบว่า การให้ mitragynine ทาง subcutaneous ให้ผลในการแก้ปวดได้น้อยกว่า การให้ทางปาก แสดงว่าสาร metabolite ของ mitragynine น่าจะออกฤทธิ์แก้ปวดได้ดีกว่าตัว mitragynine เอง

วิเชียร ลีลาสง่าลักษณ์ (1996) ทดสอบหากลไกออกฤทธิ์แก้ปวดของสาร mitragynine ที่สกัดจากใบกระท่อม 3 วิธี โดยใช้หนูถีบจักรสรุปได้ว่ากลไกการออกฤทธิ์เกิดขึ้นในระบบประสาทส่วนกลาง โดยที่อาจมีการเข้าจับตัวรับใน 2 ตำแหน่งคือที่ตัวรับ 5-HT₂ หรือ α₂

Watanabe และคณะ (1997) ทำการทดลองในหนูขาวและหนูตะเภาพบว่า mitragynine จากใบกระท่อมมีฤทธิ์ในการระงับปวด ในลักษณะเดียวกับ alkaloid ที่ได้จากยางฝิ่นเช่นมอร์ฟีน (opiate-like action) โดยไปออกฤทธิ์ต่อ opioid receptor (agonistic effects) แต่มีความรุนแรงน้อยกว่ามอร์ฟีน 10 เท่า

Yamamoto และคณะ (1999) ทดสอบโดยใช้ ileum ของหนูตะเภาเพื่อแสดงว่า mitragynine pseudoindoxyl สามารถลดแรงบีบตัวของ ileum ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าได้ดีกว่า mitragynine 100 เท่า และดีกว่ามอร์ฟีน 20 เท่า และฤทธิ์นี้ถูกยับยั้งได้ด้วย naloxone (non-selective opioid receptor antagonist) และ naloxonazine (μ -antagonist)

Tsuchiya และคณะ (2002) ทำการทดลองฉีด mitragynine ขนาด 3 – 30 ไมโครกรัม เข้าที่โพรงสมองที่ 4 ของหนูที่ถูกวางยาสลบ พบว่าสามารถยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารได้เช่นเดียวกับมอร์ฟีน

Horie และคณะ (2005) สกัดแยกสารจากใบกระท่อมพบ mitragynine, speciogynine, paynantheine และ speciociliatine จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์กับลำไส้หนู พบว่าสารกลุ่มนี้สามารถลดแรงบีบตัวของลำไส้ได้ดีเทียบเท่ากับมอร์ฟีน

จะเห็นได้ว่าใบกระท่อมเป็นแหล่งของแอลคาลอยด์และสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการแยกแราเอนโคไฟต์จากใบกระท่อม ที่เป็นพืชเฉพาะถิ่นในแถบประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งอาจจะทำให้พบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสารที่เป็นชนิดเดียวกันหรือใกล้เคียงกันกับสารที่พบในใบกระท่อม เพื่อนำไปพัฒนาให้เป็นประโยชน์ต่อไปได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเก็บตัวอย่างใบกระท่อม

เก็บใบแก่จากต้นกระท่อมที่แข็งแรง ไม่เป็นโรค จากประเทศไทย 3 แหล่งคือ อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี อำเภอเสนา จังหวัดอยุธยา และอำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี ในช่วงเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2546 จำนวน 20 ใบ/จังหวัด นำใบกระท่อมที่ได้มาเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดมิดชิด นำเข้าสู่เย็น ใบพืชที่จะนำมาใช้ในการทดลอง ต้องเก็บจากต้นมาไม่น้อยกว่า 48 ชั่วโมง

3.2 การแยกราเอนโคไฟต์

การแยกราเอนโคไฟต์ใช้เทคนิค surface sterilization (Blodett, 2000) โดยนำใบกระท่อมที่เก็บตัวอย่างมาล้างน้ำทำความสะอาด ตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร บริเวณต่างๆของใบ นำชิ้นส่วนของใบพืชที่ตัดมาฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที และแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ อีกเป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง แล้วซับให้แห้งบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

นำส่วนใบกระท่อมที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้ายไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ เพื่อให้แน่ใจว่าราที่แยกได้เป็นราเอนโคไฟต์ ไม่ใช่ราที่ปนเปื้อนมาจากผิวใบ สังเกตการงอกของเชื้อราออกมาจากเนื้อเยื่อส่วนใบกระท่อม เมื่อพบว่ามีเส้นใยของราเอนโคไฟต์เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อใบกระท่อม จึงแยกส่วนปลายเส้นใยของเชื้อราไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แยกจนได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ เชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้เก็บ เพื่อทำการทดลองต่อไป

3.3 การคัดเลือกราเอนโคไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำราเอนโคไฟต์ที่แยกให้บริสุทธิ์แล้ว มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MCA (malt czapek agar), MEA (malt extract agar), PDA (potato dextrose agar), SDA (sabouraud dextrose agar) และ YES (yeast extract sucrose agar) เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นตัดชิ้นส่วนของเชื้อราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยการสังเกตวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี

เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคที่ใช้ในการทดลองมี 5 ชนิด แบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดคือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และเชื้อยีสต์ *Candida albican* ATCC 10231 ก่อนการทดสอบนำแบคทีเรียมาเลี้ยงใน nutrient broth (NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 6 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.1 (ความเข้มข้นของแบคทีเรีย ประมาณ 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร) สำหรับเชื้อยีสต์ เลี้ยงในอาหาร SGB (sabouraud glucose broth) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 - 6 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.1 (ความเข้มข้นของยีสต์ประมาณ 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร)

นำไม้พินสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาจุ่มลงในน้ำเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และนำมาทา (swab) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งจะทำการหมุนจานเลี้ยงเชื้อไปประมาณ 60 องศา เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั่วจานเลี้ยง จากนั้นนำชิ้นวุ้นของเชื้อรา เอนโดไฟต์มาวางทับลงบนอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 - 24 ชั่วโมง วัดวงใสที่เกิดขึ้นในหน่วยมิลลิเมตรด้วยไม้บรรทัด ทำการเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.4 การพิสูจน์ทางเอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์ P03

3.4.1 การพิสูจน์ทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ P03 โดยนำรามาเลี้ยงในอาหารแข็ง ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ MCA, MEA, PDA, SDA และ YES บ่มราที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน ดูลักษณะของเส้นใย และการผลิต fruiting body ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำเชื้อรามาข้อมด้วย lactophenol blue เพื่อดูการผลิตสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.2 การพิสูจน์ทางอนุชีววิทยา

วิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS (internal transcribe spacer) ของ rDNA (รูปที่ 3.1) ของราเอนโดไฟต์ P03 โดยส่งไปวิเคราะห์ที่ บริษัท Macrogen จำกัด กรุงโซล ประเทศเกาหลีใต้ ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

3.4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

การเตรียมจีโนมิกดีเอ็นเอทำได้โดยการนำเส้นใยของราเอนโดไฟต์มาทำให้เป็นเนื้อเดียวด้วย FastPrep FP120 homogenizer (Savant, faxmingdale, NY, USA) จากนั้นนำมาสกัดด้วย cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ตามวิธีของ Zhou และคณะ (1991) นำสารเนื้อเดียวที่ได้มาเติม CTAB buffer (2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 20mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl และ 0.5% 2-mercaptoethanol) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดด้วย phenol chloroform และ isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) และสกัดซ้ำด้วย chloroform-isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) 2 ครั้ง ตกตะกอนดีเอ็นเอของราด้วย isopropanol และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดีเอ็นเอของราเอนโดไฟต์ P03 ที่ได้ นำมาละลายใน TE buffer (10mM Tris-HCl (pH8.0) และ 1mM EDTA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.4.2.2 การเพิ่มลำดับเบสบริเวณ ITS_{1F4}

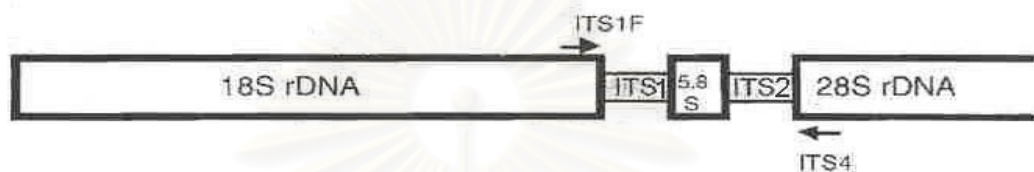
ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ P03 นำมาเพิ่มจำนวน ด้วยไพรเมอร์ ITS1f (Gardes และ Bruns, 1993) และ ITS4 (White และคณะ, 1990) ในหลอดทำปฏิกิริยา ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย template DNA 5 นาโนกรัม, dNTP อย่างละ 0.2 mM, 1xPCR buffer, 1.5mM Mg²⁺, Ampli Taq Gold 0.5 ยูนิต (Ampli Taq Gold kit; Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA) และ 0.5 μ M ของ primer pair เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย thermal cycler (TP 3000; Takara Shuzo, Tokyo, Japan) ปฏิกิริยา เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาซ้ำ จำนวน 38 รอบ โดยในแต่ละรอบประกอบด้วย ขั้นตอนการแยกคู่สายดีเอ็นเอ (denaturing step) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, การจับเข้าคู่กันใหม่ของดีเอ็นเอ (annealing step) ที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ การเพิ่มความยาวสายดีเอ็นเอ (extension step) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และสิ้นสุดปฏิกิริยาด้วยการเพิ่มความยาวสายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Kanchanaprayudh และคณะ, 2003)

3.4.2.3 การหาลำดับดีเอ็นเอ

นำลำดับเบสบริเวณ ITS_{1F4} ที่เพิ่มจำนวนได้ มาเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pT7 Blue (Novagen, Madison, WI, USA) และนำไปทรานส์ฟอร์มเข้าไปใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue MFR นำ *Escherichia coli* ที่ได้รับพลาสมิดไปเลี้ยง จากนั้นสกัดพลาสมิดและนำมาหาลำดับเบสด้วย

Thermo Sequence Pre-mixed Cycle Sequencing kit (Hitachi) ที่มี T7 and M13 เป็นไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย Texas red (Hitachi) ด้วยเครื่อง SQ-5500E sequencer (Kanchanaprayudh และคณะ, 2003) ลำดับเบสบริเวณ ITS_{1F-4} นำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบส บริเวณ ITS_{1F-4} ของราสายพันธุ์ต่างๆ กับฐานข้อมูลจีโนมใน GenBank ([http:// www.ddbj.nig.ac.jp](http://www.ddbj.nig.ac.jp))

ลำดับเบสของไพรเมอร์ ITS1f คือ CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA และ ITS4 คือ TCCTCCGCTTATTGATATGC

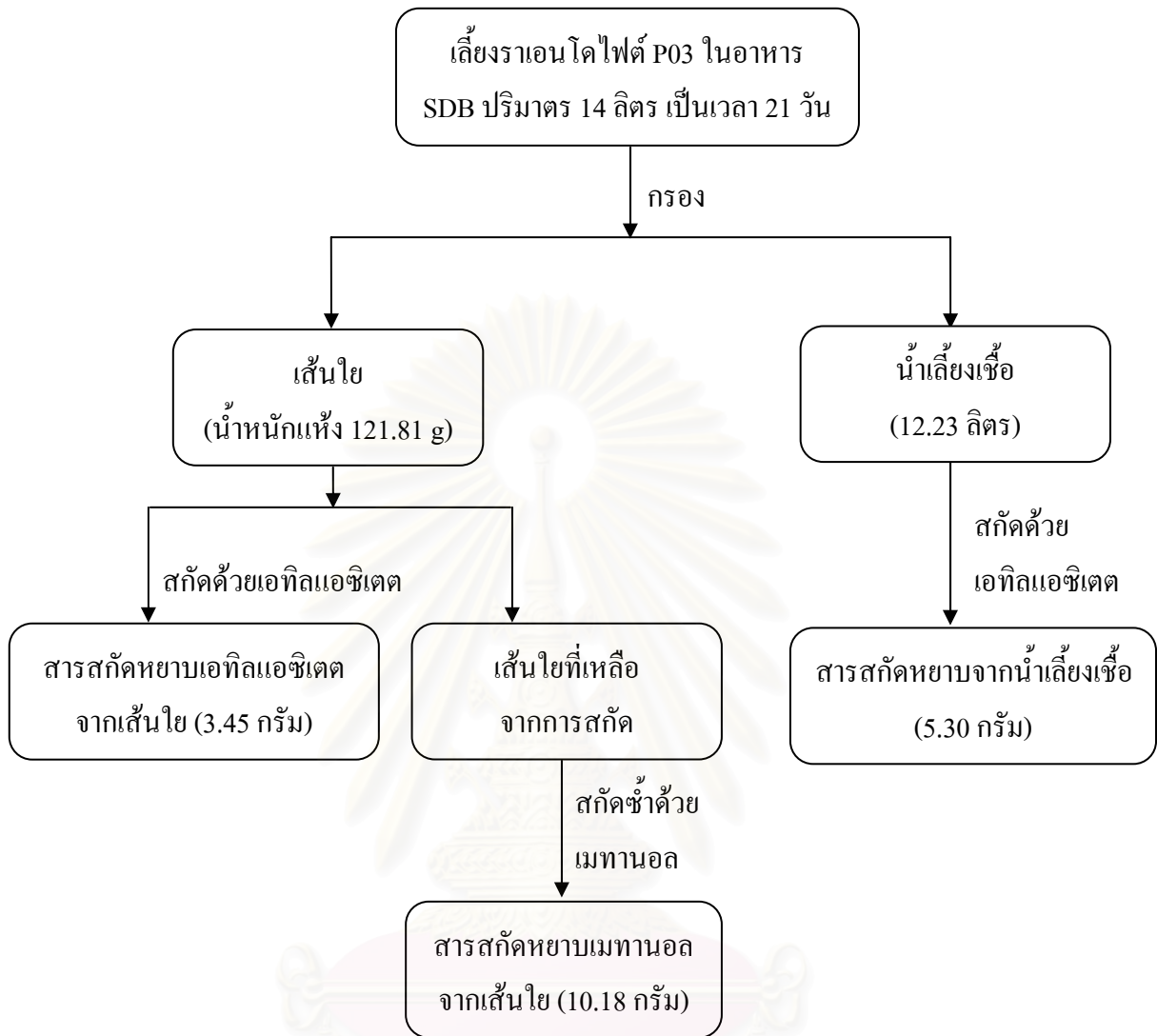


รูปที่ 3.1 บริเวณ ITS ของ rDNA (Kanchanaprayudh และคณะ, 2003)

3.5 การเลี้ยงเชื้อและสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จากราเอนโดไฟต์ P03

นำราเอนโดไฟต์ P03 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง SDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ตัดชิ้นเชื้อราจากอาหารแข็งออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร นำชิ้นเชื้อราจำนวน 5 ชิ้น ถ้ายใส่ลงในอาหารเหลว SDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เตรียมให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 14 ลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่ราเอนโดไฟต์มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด เมื่อครบกำหนดนำอาหารเลี้ยงเชื้อมารอง ด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น จะได้ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อราและส่วนเส้นใย ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ปริมาตรเท่ากับน้ำเลี้ยงเชื้อ สกัดซ้ำ 4 ครั้ง สารสกัดที่ได้นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลือง ปริมาณ 5.30 กรัม

ส่วนเส้นใยนำไปตากเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ทำการสกัดซ้ำ 5 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 รวมสารสกัดที่ได้ได้นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลือง ปริมาณ 3.45 กรัม จากนั้นนำเส้นใยมาทำการสกัดซ้ำด้วยเมทานอล กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 รวมสารสกัดที่ได้ได้นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ ปริมาณ 10.18 กรัม การสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดงการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใย

3.6 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ

3.6.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ P03 (5.30 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่มีซิลิกาเป็นตัวดูดซับ คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 35 เซนติเมตร ใช้ตัวชะหลายชนิด โดยการเพิ่มขั้วของตัวชะ เริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลเอซิเตต, เอทิลเอซิเตต, เอทิลเอซิเตต – เมทานอล และ เมทานอล ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การแยกสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ P03

แฟรกชันที่	ตัวชะ	ลักษณะ	น้ำหนัก(มิลลิกรัม)
	เฮกเซน : เอทิลเอซิเตต		
B1 (1-19)	100 : 0 ถึง 90 : 10	ไม่พบสาร	0
B2 (20-24)	90 : 10 ถึง 85 : 15	ของเหลวหนืดสีเหลือง	114.1
B3 (25-46)	85 : 15 ถึง 55 : 45	ของแข็งสีน้ำตาล หนืด	371.2
B4 (47-58)	55 : 45 ถึง 40 : 60	ของแข็งสีน้ำตาล หนืด	145.8
B5 (59-67)	40 : 60 ถึง 20 : 80	ของแข็งสีขาว ปนกับ ของแข็งสีน้ำตาล หนืด	85.5
B6 (68-80)	20 : 80 ถึง 0 : 100	ของแข็งสีน้ำตาล หนืด	119.3
	เอทิลเอซิเตต : เมทานอล		
B7 (81-101)	100 : 0 ถึง 100 : 0	ของแข็งสีน้ำตาล หนืด	168.1
B8 (102-120)	100 : 0 ถึง 80 : 20	ของแข็งสีน้ำตาล หนืด	2530.6

3.6.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตตจากเส้นใย

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟต์ P03 (3.45 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่มีซิลิกาเป็นตัวดูดซับ คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 35 เซนติเมตร ใช้ตัวชะหลายชนิด โดยการเพิ่มหัวของตัวชะ เริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลเอซิเตต, เอทิลเอซิเตต, เอทิลเอซิเตต – เมทานอล และ เมทานอล ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 การแยกสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตตจากเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟต์ P03

แฟรกชันที่	ตัวชะ	ลักษณะ	น้ำหนัก(มิลลิกรัม)
	เฮกเซน : เอทิลเอซิเตต		
ME1 (1-11)	100 : 0 ถึง 98 : 2	ไม่พบสาร	0
ME2 (12-13)	98 : 2 ถึง 98 : 2	ของเหลวสีเหลืองใส คล้ายน้ำมัน	1250.1
ME3 (14-23)	98 : 2 ถึง 80 : 20	ของเหลวสีน้ำตาล	252.4
ME4 (24-38)	80 : 20 ถึง 65 : 35	ของเหลวสีเหลือง หนืด	102.6
ME5 (39-53)	65 : 35 ถึง 40 : 60	ของแข็งสีน้ำตาล หนืด	195.8
ME6 (54-59)	40 : 60 ถึง 35 : 65	ผลึกรูปเข็มสีขาว ปนกับ ของแข็งสีเหลือง หนืด	250.2
ME7 (60-71)	35 : 65 ถึง 25 : 75	ของแข็งสีเหลือง	117.3
ME8 (72-90)	27 : 75 ถึง 5 : 95	ของแข็งไม่มีสี คล้ายพาราฟิล์ม	82.4
ME9 (91-100)	5 : 95 ถึง 0 : 100	ของแข็งสีเหลือง หนืด	320.2
	เอทิลเอซิเตต : เมทานอล		
ME10 (101-115)	100 : 0 ถึง 97 : 3	ของแข็งสีน้ำตาล หนืด	225.3
ME11 (116-140)	97 : 3 ถึง 80 : 20	ของแข็งสีน้ำตาล หนืด	1203.5

3.6.3 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเส้นใย

นำสารสกัดหยาบเมทานอลที่ได้จากเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟต์ P03 (10.18 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่มีซิลิกาเป็นตัวดูดซับ คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 35 เซนติเมตร ใช้ตัวชะหลายชนิด โดยการเพิ่มขั้วของตัวชะ เริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลเอซิเตต, เอทิลเอซิเตต, เอทิลเอซิเตต – เมทานอล และ เมทานอล ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 การแยกสารสกัดหยาบเมทานอลจากเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟต์ P03

แฟรกชันที่	ตัวชะ	ลักษณะ	น้ำหนัก(มิลลิกรัม)
	เฮกเซน : เอทิลเอซิเตต		
MM1 (1-12)	100 : 0 ถึง 95 : 5	ของแข็งสีขาว	81.9
MM2 (13-33)	95 : 5 ถึง 80 : 20	ของแข็งสีดำ	185.1
MM3 (34-52)	80 : 20 ถึง 60 : 40	ของแข็งสีขาวปนกับ ของเหลวสีเหลือง	820.2
MM4 (53-80)	60 : 40 ถึง 10 : 90	ของเหลวหนืดสีเหลือง	415.3
MM5 (81-100)	10 : 90 ถึง 0 : 100	ของเหลวหนืดสีเหลือง	95.0
	เอทิลเอซิเตต : เมทานอล		
MM6 (101-140)	100 : 0 ถึง 80 : 20	ของแข็งสีน้ำตาล หนืด	2818.1

3.7 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากราเอนโคไฟด์ P03

3.7.1 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 1 จากแฟรกชัน ME6

ผลิตภัณฑ์เพิ่มสีขาว ที่ได้จากแฟรกชัน ME6 ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้เฮกเซน : เอทิลเอซิเตต ในอัตราส่วน 40:60 ถึง 35:65 เป็นตัวชะ สารที่ได้นำมาตกผลึกใหม่ด้วยเอทิลเอซิเตต จากนั้นล้างผลึกด้วยเฮกเซน : เอทิลเอซิเตต ในอัตราส่วน 50 : 50 ที่เย็น 5 – 8 ครั้ง จะได้ผลิตภัณฑ์เพิ่มสีขาว ปริมาณ 178 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 1) สารบริสุทธิ์ที่ได้มีจุดหลอมเหลวที่ 181 - 183 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography: TLC) โดยใช้เฮกเซน : เอทิลเอซิเตต ในอัตราส่วน 50 : 50 เป็นตัวชะ แล้วย้อมด้วย vanillin และทำให้แห้ง พบว่ามีจุดเดียว ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.63 สารบริสุทธิ์ 1 ที่ได้ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม, เอทิลเอซิเตตและเมทานอล

สารบริสุทธิ์ 1 เป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มสีขาว (178 มิลลิกรัม), UV λ_{max} , $CHCl_3$ (ϵ): 273 นาโนเมตร (รูปที่ ค1 ในภาคผนวก ค.)

FT-IR สเปกตรัม (KBr), ν_{max} (cm^{-1}): 3424 (br), 2953 (s), 2863 (s), 1633 (m), 1535 (m), 1450 (m), 1365 (m), 1267 (w), 1225 (w), 1155 (w), 1038 (m), 960 (m). (รูปที่ ค2 ในภาคผนวก ค.)

โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (1H -NMR spectrum) ($CDCl_3$, 400 MHz.) δ (ppm): 6.53 (1H, d, $J = 4.8$, H-6), 6.27 (1H, d, $J = 8.4$, H-7), 5.25 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$, H-22), 5.18 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$, H-23), 4.00 (1H, m, H-3), 2.14 (1H, m, H-1), 2.07 (1H, m, H-20), 2.04 (1H, m, H-12), 1.98 (1H, m, H-4), 1.95 (1H, m, H-1), 1.89 (1H, m, H-24), 1.87 (1H, m, H-2), 1.78 (1H, m, H-15), 1.74 (1H, m, H-4), 1.64 (1H, m, H-11), 1.60 (1H, m, H-14), 1.58 (1H, m, H-2), 1.53 (1H และ 1H, m และ m, H-9 และ H-16), 1.52 (1H, m, H-25), 1.42 (1H, m, H-11), 1.38 (1H, m, H-2), 1.28 (1H, m, H-12), 1.26 (1H และ 1H, m และ m, H-16 และ H-17), 1.03 (3H, d, $J = 6.0$, H-27), 0.95 (3H, d, $J = 6.8$, H-28), 0.93 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, d, $J = 6.0$, H-26), 0.85 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, d, $J = 6.0$, H-21). (รูปที่ ค3 ในภาคผนวก ค.)

คาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (^{13}C -NMR spectrum) ($CDCl_3$, 100 MHz) δ (ppm): 135.44 (CH-7), 135.22 (CH-23), 132.31 (CH-22), 130.75 (CH-6), 82.20 (C-8), 79.46 (C-5), 66.46 (CH-3), 56.19 (CH-17), 51.69 (CH-14), 51.08 (CH-9), 44.58 (C-13), 42.79 (CH-24), 39.77 (CH-20), 39.35 (CH-12), 36.98 (C-10), 36.92 (CH_2 -1), 33.08 (CH-25), 30.10 (CH_2 -2), 28.68 (CH_2 -15), 23.42 (CH_2 -16), 20.90 (CH_3 -27), 20.65 (CH_2 -11), 19.98 (CH_3 -26), 19.67 (CH_3 -21), 18.21 (CH_3 -19), 17.59 (CH_3 -28), 12.89 (CH_3 -18). (รูปที่ ค4 ในภาคผนวก ค.)

EI-MS สเปกตรัม (m/z) 428.3 (2%), 410.3 (12%), 396.2 (100%) (รูปที่ ค9 ในภาคผนวก ค.)

3.7.2 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 2 จาก MM3

ผงสีขาว ที่ได้จากแฟรกชัน MM3 ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้เฮกเซน : เอทิลเอซิเตต ในอัตราส่วน 40 : 60 ถึง 20 : 80 เป็นตัวชะ สารที่ได้นำมาล้างด้วยเอทิลเอซิเตต 7 ครั้ง และเมทานอล 3 – 4 ครั้ง จะได้ผงสีขาว ปริมาณ 622.6 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 2) สารบริสุทธิ์ที่ได้มีจุดหลอมเหลวที่ 260 - 262 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography: TLC) โดยใช้เฮกเซน : เอทิลเอซิเตต ในอัตราส่วน 50 : 50 เป็นตัวชะ แล้วย้อมด้วย vanillin และทำให้แห้ง พบว่ามีจุดเดียว ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.68 สารบริสุทธิ์ 2 ที่ได้ ละลายได้น้อยในเมทานอล ละลายได้ดีใน DMSO

สารบริสุทธิ์ 2 เป็นผงสีขาว (622.6 มิลลิกรัม), $UV \lambda_{max}$, DMSO (ϵ): - นาโนเมตร. (รูปที่ ค10 ในภาคผนวก ค.)

FT-IR สเปกตรัม (KBr), ν_{max} (cm^{-1}): 3444 (br), 2937 (s), 2816 (s), 1962 (s), 1565 (m), 1451 (s), 1380 (m), 1238 (s), 1140 (s), 1097 (s), 1031 (s). (รูปที่ ค11 ในภาคผนวก ค.)

โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (1H -NMR spectrum) (DMSO, 400 MHz.) δ (ppm) : 5.14 (1H, s, H-12), 4.32 (1H, d, $J = 4.8$, OH), 3.01 (1H, t, H-3), 2.52 (1H, d, $J = 2.0$, OH), 2.12 (1H, d, $J = 10.8$, H-18), 1.86 (1H, m, H-11), 1.84 (1H, s, H-11), 1.56 (2H, m, H-1), 1.53 (1H, m, H-16), 1.50 (2H, m, H-6), 1.47 (2H และ 1H, m และ m, H-2 และ H-9), 1.46 (1H และ 1H, m และ m, H-7 และ H-21), 1.33 (1H, m, H-20), 1.30 (1H, m, H-21), 1.28 (1H, m, H-7), 1.06 (1H, s, H-16), 1.05 (3H, s, H-27), 1.03 (1H, m, H-15), 0.99 (1H, m, H-15), 0.93 (1H และ 3H, m และ m, H-19 และ H-30), 0.92 (2H, m, H-1), 0.91 (3H, s, H-23), 0.88 (3H, s, H-25), 0.83 (3H, d, $J = 6.4$, H-29), 0.76 (3H, s, H-26), 0.69 (3H และ 3H, s และ s, H-5 และ H-24). (รูปที่ ค12 ในภาคผนวก ค.)

คาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (^{13}C -NMR spectrum) (DMSO, 100 MHz) δ (ppm): 178.78 (C-28), 138.65 (C-13), 125.05 (CH-12), 77.30 (CH-3), 55.26 (CH₃-5), 52.84 (CH-18), 47.49 (CH-9), 47.23 (C-17), 42.11 (C-14), 39.57 (C-8), 39.32 (C-4), 38.99 (CH-19), 38.85 (CH-20), 38.72 (CH₂-1), 37.00 (C-10), 36.80 (CH₂-22), 33.19 (CH₂-7), 30.68 (CH₂-21), 28.73 (CH₃-23), 28.02 (CH₂-15), 27.46 (CH₂-2), 24.29 (CH₂-16), 23.74 (CH₃-27), 23.32 (CH₂-11), 21.56 (CH₃-30), 18.48 (CH₂-6), 17.50 (CH₃-29), 17.38 (CH₃-26), 16.56 (CH₃-24), 15.71 (CH₃-25). (รูปที่ ค13 ในภาคผนวก ค.)

EI-MS สเปกตรัม (m/z) 456 (2%), 300.2(2%), 248.2 (71%) (รูปที่ ค19 ในภาคผนวก ค.)

3.7.3 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของของผสม 1 จาก ME2

ของเหลวสีเหลืองใส ลักษณะคล้ายน้ำมัน ปริมาณ 1.25 กรัม (ของผสม 1) ที่ได้จาก แพรกชัน ME2 แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้เฮกเซน : เอทิลเอซิเตต ในอัตราส่วน 98 : 2 เป็นตัวชะ เมื่อนำไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography: TLC) โดยใช้ เฮกเซน : เอทิลเอซิเตต ในอัตราส่วน 95 : 5 เป็นตัวชะ แล้วย้อมด้วย vanillin และ ทำให้แห้ง พบว่ามีจุดเดียว ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.85 ของผสม 1 ที่ได้ละลายได้ดีในเฮกเซนและเอทิลเอซิเตต

ของผสม 1 เป็นของเหลวสีเหลืองใส ลักษณะคล้ายน้ำมัน (1.25 กรัม)

FT-IR สเปกตรัม (KBr), $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: 2927 (s), 2856 (s), 1739 (s), 1462 (m), 1363 (m), 1167 (s), 1091 (m). (รูปที่ ค20 ในภาคผนวก ค.)

โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^1\text{H-NMR}$ spectrum) (CD_3CO , 400 MHz.) δ (ppm) : 5.39 (s), 4.16 (d, $J = 6.8$), 2.81 (s), 2.33 (s), 2.08 (s), 1.65 (s), 1.30 (s), 0.92 (s). (รูปที่ ค21 ในภาคผนวก ค.)

คาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^{13}\text{C-NMR}$ spectrum) (CD_3CO , 100 MHz) δ (ppm): 173.89, 130.17, 130.02, 129.97, 129.74, 128.03, 127.91, 68.88, 62.08, 60.15, 34.37, 34.19, 34.04, 31.95, 31.54, 29.79, 29.73, 29.69, 29.60, 29.56, 29.50, 29.40, 29.37, 29.30, 29.19, 29.13, 27.21, 25.63, 24.92, 24.87, 22.72, 22.59, 14.25, 14.13, 14.08. (รูปที่ ค22 ในภาคผนวก ค.)

ของผสม 1 วิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ได้ผลดังรูปที่ ค23 ในภาคผนวก ค.

3.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.8.1 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์

ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์ ด้วยวิธี micro dilution (Wood and Washington, 1995) โดยทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ 5 ชนิด แบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดคือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และเชื้อยีสต์ *Candida albican* ATCC 10231

3.8.1.1 การเตรียมสารบริสุทธิ์

นำสารบริสุทธิ์ และ ยาปฏิชีวนะ อย่างละ 2 มิลลิกรัม มาละลายใน 2 มิลลิลิตรของ 10 เปอร์เซ็นต์ DMSO ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ยาปฏิชีวนะ (penicillin G, streptomycin และ ketoconazole) ใช้เป็นชุดควบคุมบวก

3.8.1.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นในการทดสอบฤทธิ์

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ ทำตามขั้นตอนในหัวข้อ 3.3 โดยความเข้มข้นของยีสต์และแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ประมาณ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3.8.1.3 การทดสอบฤทธิ์

นำสารละลายของสารบริสุทธิ์มาเจือจางด้วย Mueller-Hinton Broth (MHB) และ YEB สำหรับใช้ในการทดสอบฤทธิ์ที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ นำสารที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของ microtiter plates (96 well bottom well) เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามลงไป สำหรับหลุมที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นชุดควบคุมลบ และ หลุมที่ไม่เติมสารทดสอบ เป็นชุดควบคุมบวก นำ microtiter plates ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง สำหรับเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ

3.8.1.4 การอ่านผลการทดสอบฤทธิ์

การวัดผลการทดสอบฤทธิ์ที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์ ทำได้โดยการวัดความขุ่นของหลุม microtiter plates แต่ละหลุม ด้วยเครื่อง Sunrise microplate reader (Tecan, Austria) ก่อนและหลังการบ่ม วัดค่า MIC (minimal inhibitory concentration) โดยวัดจากค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้งหมด

3.8.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2), เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW 620), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) ในหลอดทดลอง ด้วยวิธี colorimetric โดยใช้สาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Carmichael และคณะ, 1987) ซึ่งมีหลักการคือ จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต/หลุม จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณการผลิตสาร formazan ที่สามารถวัดได้โดยการนำ ส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

นำเซลล์มะเร็งมาเลี้ยง และเก็บเซลล์ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด (exponential-phase) นับจำนวนเซลล์ด้วย trypan blue exclusion นำเซลล์มะเร็งที่ทราบจำนวนมาใส่ลงในหลุม ทั้ง 96 หลุมของ microtiter plates หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเซลล์ในบรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ต้องการทดสอบอยู่ลงไป ในแต่ละหลุม (ในกลุ่มควบคุม N เท่ากับ 6 และในกลุ่มทดลอง N เท่ากับ 3) ส่วนหลุมที่อยู่รอบๆ microtiter plates (lacking cells) ใช้สำหรับชุดควบคุม (N เท่ากับ 2) และกลุ่มควบคุมลบ ที่เติมสาร tetrazolium (N เท่ากับ 6) จากนั้นนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 4 วัน ก่อนที่จะเติมสารละลาย tetrazolium MTT stock solution มีวิธีการเตรียมดังนี้ นำ MTT 5 มิลลิกรัมมาละลายใน 1 มิลลิลิตรของ PBS นำไปบ่มทิ้งแล้วกรองผ่าน 0.45- μ l filter units สำหรับ MTT working solutions เตรียมโดยนำ MTT stock solution มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิในอัตราส่วน 1:5 (ปริมาตร/ปริมาตร) นำ MTT working solution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติกลงในหลุมแต่ละหลุม จากนั้นบ่มต่อไปอีก 4 – 24 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับการทดลอง นำสารในหลุมไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่ำ เป็นเวลา 5 นาที ถ้าในหลุมดังกล่าวมีสารที่แขวนลอยอยู่ ดูดส่วนน้ำใสในแต่ละหลุมออก ประมาณ 10 – 20 ไมโครลิตร แล้วเติม DMSO ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การวัดอัตราการเจริญและอัตราการยับยั้งการเจริญ คำนวณจากเปอร์เซ็นต์ของค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

3.9 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี

3.9.1 UV – Visible spectrometry

นำสารบริสุทธิ์ที่ได้ มาละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่สารดังกล่าวละลายได้ดี ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสง ให้อยู่ในช่วง 0.2 -0.8 จากนั้นสแกนตั้งแต่ความยาวคลื่น 400 ถึง 200 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ Varian Cary 50 Probe

3.9.2 Fourier transform infrared spectrophotometry (FT-IR)

เตรียมสารตัวอย่างให้เป็นของแข็งโดยนำตัวอย่างมาผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปอัดให้เป็นแผ่นบางๆ แล้วนำไปทดสอบ FT-IR ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer Model 1760x Fourier Transform Infrared Spectrophotometer ตั้งแต่เลขคลื่น 4000 ถึง 400 cm^{-1}

3.9.3 Mass spectrometry (MS)

วัดมวลโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Polaris Q finnigan Mass Spectrometer โดยใช้ EI mode

3.9.4 Nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR)

วัด $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, gCOSY, gHSQC, gHMBC, gNOESY และ gTOCSY spectra ด้วย Varian Spectrometer ที่ความถี่ 400 MHz สำหรับโปรตอนและความถี่ 100 MHz สำหรับคาร์บอน-13 ปริมาณเคมีคัลชิฟท์ วัดในหน่วยพีพีเอ็ม (ppm) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน protonated chloroform ที่ เคมีคัลชิฟท์ เท่ากับ 7.26 ppm.

3.9.5 Gas chromatography (GC)

นำ mixture 1 มาวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ขนาด 15 มิลลิเมตร ของ 15 เปอร์เซ็นต์ DEGS บน 60/80 Chromasorb S AW ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ของเครื่อง Shimadzu 15A Gas Chromatograph ซึ่งนำไปวิเคราะห์ที่ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.9.6 เครื่องวัดจุดหลอมเหลว

นำสารบริสุทธิ์มาบดให้ละเอียด จากนั้นบรรจุลงในหลอดแก้วสำหรับตรวจหาจุดหลอมเหลว (capillary tube) ให้ได้ความสูงพอประมาณ นำไปหาจุดหลอมเหลวด้วย เครื่อง Stuart scientific melting point SMP1

บทที่ 4

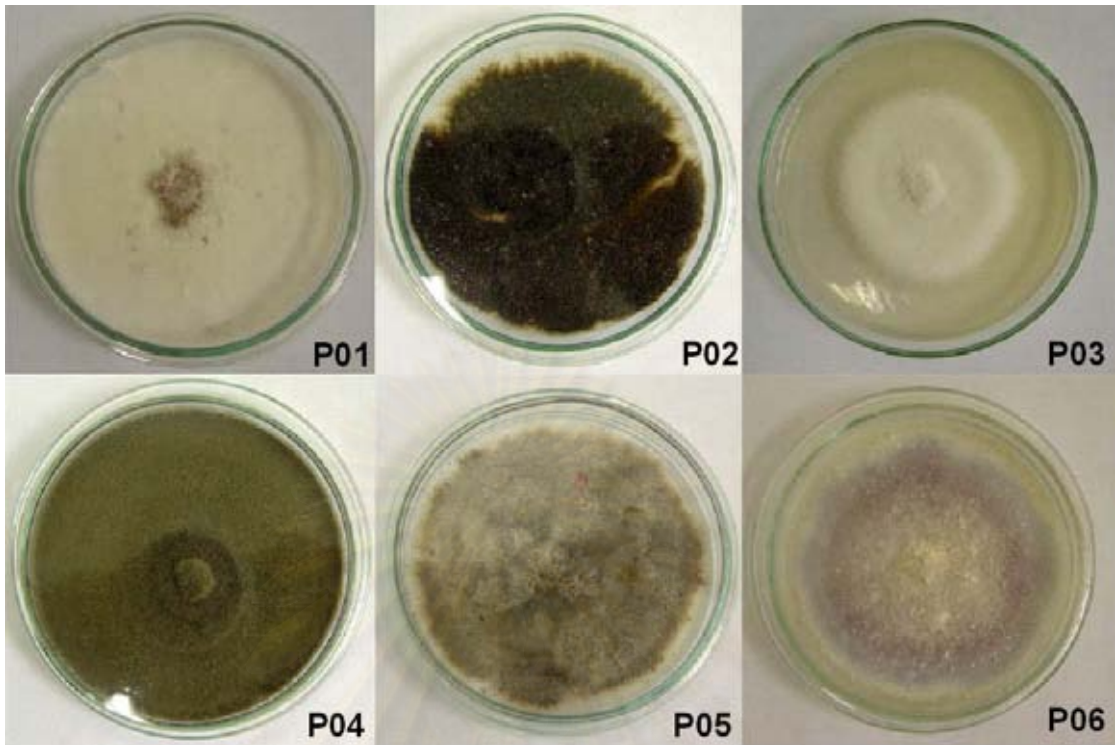
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างและแยกราเอนโดไฟต์จากใบกระท่อม

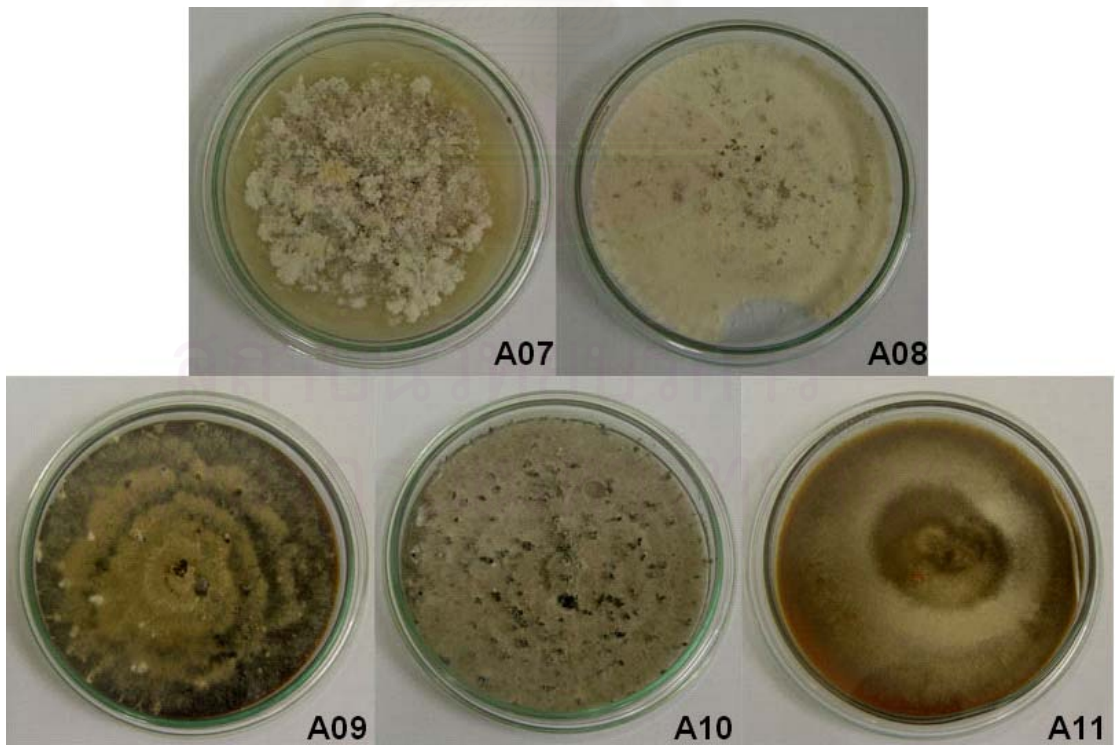
ราเอนโดไฟต์จำนวน 39 ชนิด ที่แยกได้จากใบแก่จากต้นกระท่อมที่แข็งแรง ไม่เป็นโรค จากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย 3 แหล่งคือ อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี อำเภอเสนา จังหวัดอยุธยา และอำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี ในช่วงเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2546 แสดงในตารางที่ 4.1 ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ นำเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA เก็บไว้เพื่อทำการทดลองต่อไป สำหรับรูปราเอนโดไฟต์ทั้ง 39 ชนิด แสดงในรูปที่ 4.1 ถึง 4.3

ตารางที่ 4.1 จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบกระท่อม จากแหล่งต่างๆของประเทศไทย

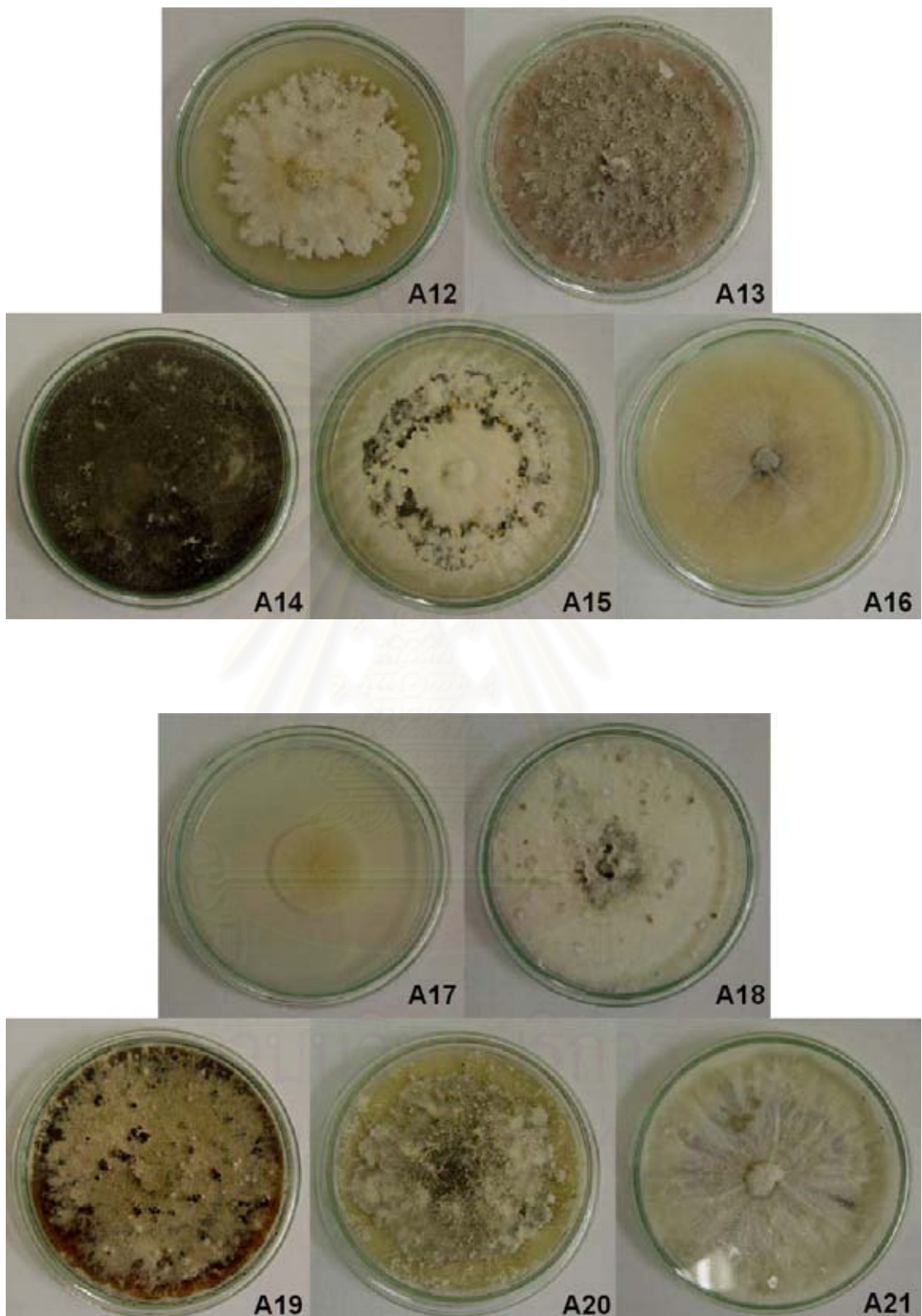
แหล่งใบกระท่อม	จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้	ไอโซเลต
จังหวัดปทุมธานี	6	P01 - P06
จังหวัดอยุธยา	15	A07 – A21
จังหวัดสุราษฎร์ธานี	18	S22 – S39



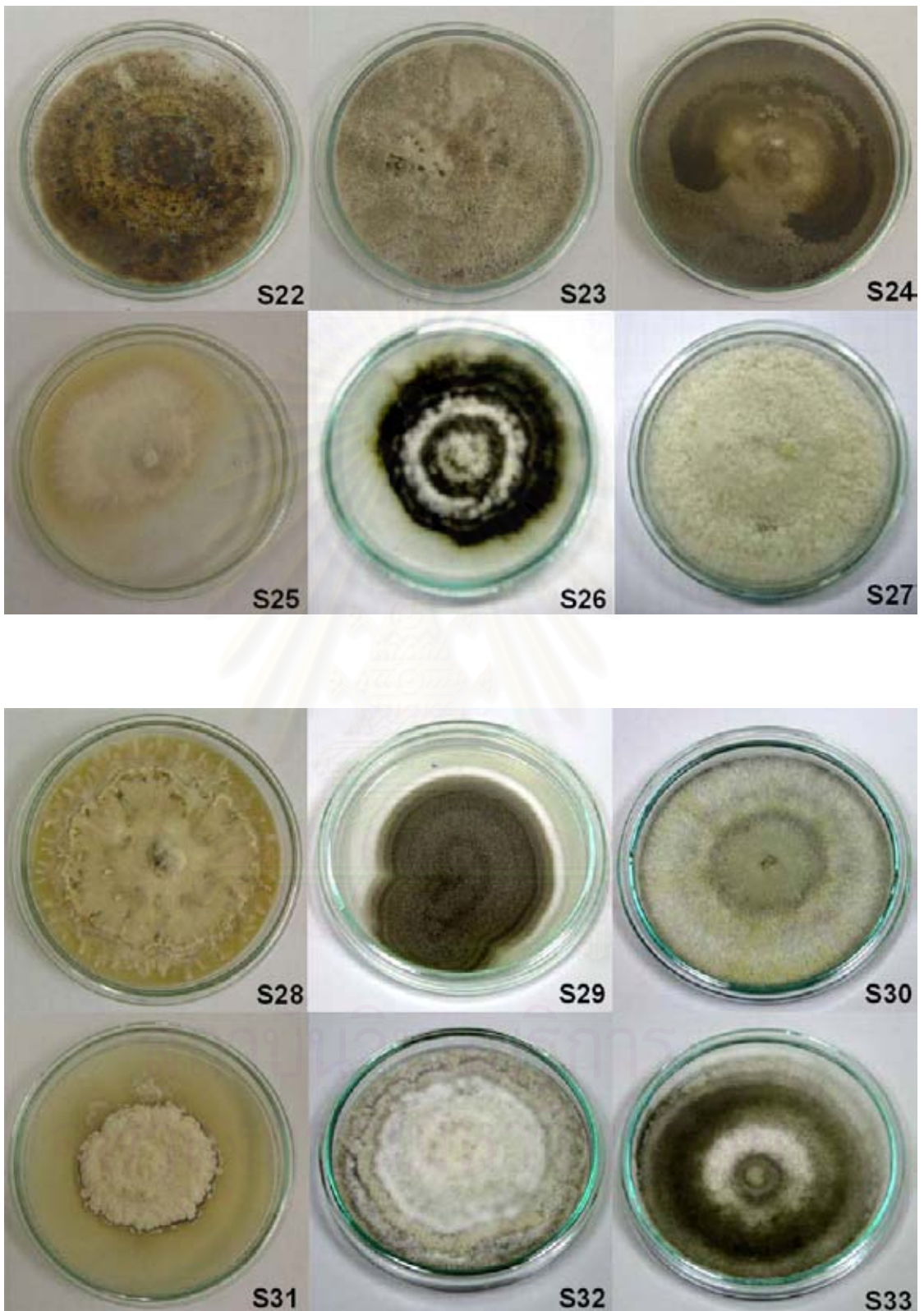
รูปที่ 4.1 ราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆที่แยกได้จากใบกระท่อม จังหวัดปทุมธานี



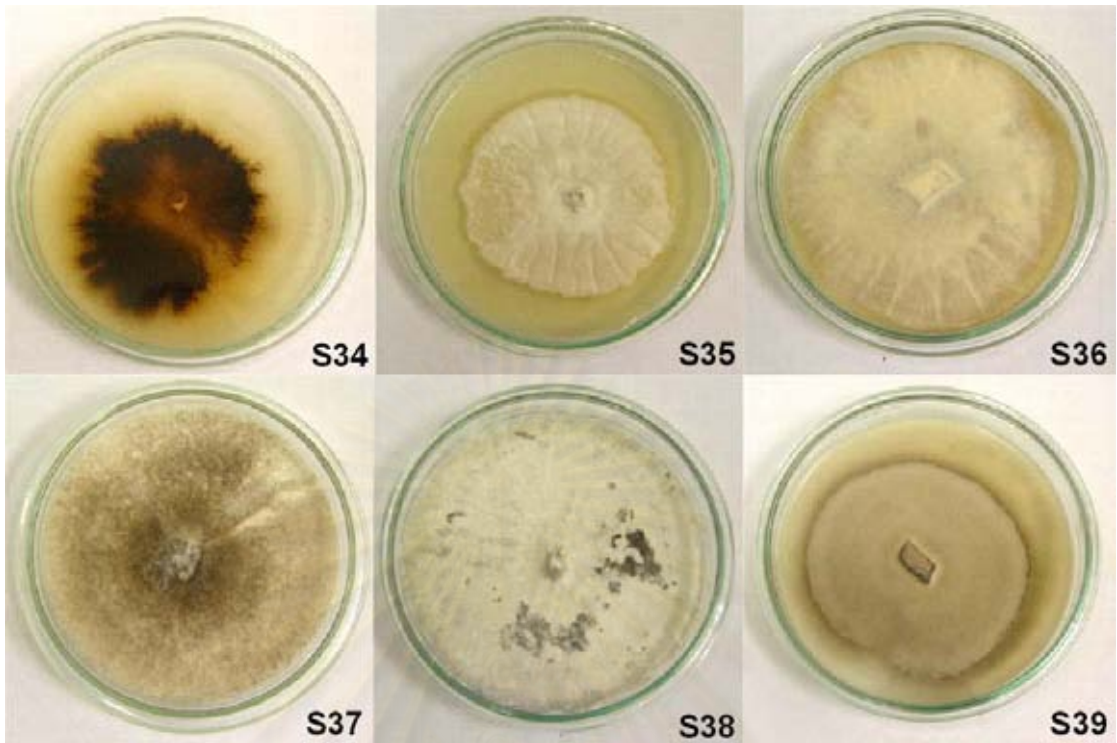
รูปที่ 4.2 ราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆที่แยกได้จากใบกระท่อม จังหวัดอยุธยา



รูปที่ 4.2 ราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆที่แยกได้จากใบกระท่อม จังหวัดอุรยา (ต่อ)



รูปที่ 4.3 ราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆที่แยกได้จากใบกระท่อม จังหวัดสุราษฎร์ธานี



รูปที่ 4.3 ราเอนโคไฟต์ชนิดต่างๆที่แยกได้จากใบกระท่อม จังหวัดสุราษฎร์ธานี (ต่อ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการแยกราเอนโคไฟต์จากใบกระท่อมพบว่าราเอนโคไฟต์ทั้ง 39 ชนิด มีความหลากหลายทางชีวภาพ เมื่อนำมาจัดจำแนกตามลักษณะของราเช่นลักษณะโคโลนี, สี, รังควัตถุที่สร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อ และจากการส่องดูเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถจัดจำแนกราเอนโคไฟต์ที่แยกจากใบกระท่อม ได้ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะและการจัดจำแนกของราเอนโคไฟต์ที่แยกได้จากใบกระท่อม

ไอโซเลต	ลักษณะของราเอนโคไฟต์บนอาหาร PDA			การจัดจำแนก
	ลักษณะโคโลนี	สีโคโลนี	รังควัตถุที่สร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อ	
P01	ขอบเรียบ ไม่ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	เส้นใย
P02	ขอบเรียบ ไม่ฟู	ดำ	ไม่สร้าง	เส้นใย
P03	ขอบเรียบ ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	<i>Colletotrichum</i> sp.
P04	ขอบเรียบ ไม่ฟู	ดำ	ไม่สร้าง	เส้นใย
P05	ขอบเรียบ ฟู	เทา	ไม่สร้าง	เส้นใย
P06	ขอบเรียบ ไม่ฟู	ขาวและม่วง	ไม่สร้าง	<i>Fusarium</i> sp.
A07	ขอบไม่เรียบ ไม่ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	เส้นใย
A08	ขอบเรียบ ไม่ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	เส้นใย
A09	ขอบเรียบ ไม่ฟู	น้ำตาล	น้ำตาล	<i>Phomopsis</i> sp.
A10	ขอบเรียบ ไม่ฟู	เทา	ไม่สร้าง	<i>Phomopsis</i> sp.
A11	ขอบเรียบ ไม่ฟู	น้ำตาล	น้ำตาล	เส้นใย
A12	ขอบไม่เรียบ ไม่ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	เส้นใย
A13	ขอบเรียบ ไม่ฟู	เทาอมชมพู	ไม่สร้าง	<i>Phomopsis</i> sp.
A14	ขอบเรียบ ไม่ฟู	ดำ	ไม่สร้าง	เส้นใย
A15	แผ่เป็นรูปขนนก มี stroma	ขาวและดำ	ไม่สร้าง	Xylariaceae
A16	ขอบเรียบ ไม่ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	เส้นใย
A17	ขอบเรียบ ไม่ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	เส้นใย
A18	ขอบเรียบ ไม่ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	เส้นใย
A19	ขอบเรียบ ไม่ฟู	น้ำตาล	น้ำตาล	<i>Phomopsis</i> sp.
A20	แผ่เป็นรูปขนนก มี stroma	ขาว	ไม่สร้าง	Xylariaceae

ตารางที่ 4.2 ลักษณะและการจัดจำแนกของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบกระท่อม (ต่อ)

ไอโซเลต	ลักษณะของราเอนโดไฟต์บนอาหาร PDA			การจัดจำแนก
	ลักษณะโคโลนี	สีโคโลนี	รงควัตถุที่สร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อ	
A21	แผ่เป็นรูปขนนก	ขาว	ไม่สร้าง	Xylariaceae
S22	ขอบเรียบ ไม่ฟู	น้ำตาล	ไม่สร้าง	<i>Phomopsis</i> sp.
S23	ขอบเรียบ ฟู	น้ำตาล	ไม่สร้าง	เส้นใย
S24	ขอบเรียบ ไม่ฟู	น้ำตาลเข้ม	ไม่สร้าง	เส้นใย
S25	ขอบเรียบ ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	เส้นใย
S26	ขอบเรียบ ไม่ฟู	ขาวและเขียว	ไม่สร้าง	เส้นใย
S27	ขอบเรียบ ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	เส้นใย
S28	แผ่เป็นรูปขนนก มี stroma	ขาว	ไม่สร้าง	Xylariaceae
S29	ขอบเรียบ ไม่ฟู	เขียวขอบขาว	ไม่สร้าง	<i>Cladosporium</i> sp.
S30	ขอบเรียบ ฟู	ขาว เขียว เทา	ไม่สร้าง	เส้นใย
S31	ขอบไม่เรียบ ไม่ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	เส้นใย
S32	ขอบเรียบ ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	เส้นใย
S33	ขอบเรียบ ไม่ฟู	ดำ	ไม่สร้าง	เส้นใย
S34	ขอบเรียบ ไม่ฟู	น้ำตาล	ไม่สร้าง	เส้นใย
S35	ขอบเรียบ ไม่ฟู	ขาว	ไม่สร้าง	เส้นใย
S36	แผ่เป็นรูปขนนก	ขาว	ไม่สร้าง	เส้นใย
S37	ขอบเรียบ ฟู	น้ำตาล	ไม่สร้าง	เส้นใย
S38	แผ่เป็นรูปขนนก	ขาว	ไม่สร้าง	Xylariaceae
S39	ขอบเรียบ ไม่ฟู	น้ำตาล	ไม่สร้าง	เส้นใย

จากการจัดจำแนกพบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกจากใบกระท่อมจังหวัดปทุมธานีพบ *Fusarium* sp. 1 ชนิด และ *Colletotrichum* sp. 1 ชนิด จากจังหวัดอุทัยพบ *Phomopsis* sp. 4 ชนิด และ Xylariaceae 3 ชนิด จากจังหวัดสุราษฎร์ธานีพบ *Phomopsis* sp. 1 ชนิด, Xylariaceae 2 ชนิด และ *Cladosporium* sp. 1 ชนิด นอกนั้นเป็นราที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกกลุ่มได้ เนื่องจากสร้างเส้นใยเพียงอย่างเดียว ไม่มีการสร้างสปอร์ (spore) และคอนิเดีย (conidia)

4.2 การคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

คัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยนำราเอนโดไฟต์แต่ละชนิดมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด ได้แก่ MCA (malt czapek agar), MEA (malt extract agar), PDA (potato dextrose agar), SDA (sabouraud dextrose agar) และ YES (yeast extract sucrose agar) เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นตัดชิ้นวุ้นของเชื้อราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร จากไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยการสังเกตวงใสที่เกิดขึ้น สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองมี 5 ชนิด แบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดคือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และเชื้อยีสต์ *Candida albican* ATCC 10231 ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบแสดงในตารางที่ 4.2 สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์แสดงในตารางที่ 4.3

ผลการทดลองพบว่ามีราเอนโดไฟต์ 4 ชนิด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต P03, A16, A19 และ S 31 โดยราเอนโดไฟต์ P03 มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด โดยเฉพาะในอาหาร SDA จึงคัดเลือกราเอนโดไฟต์ P03 มาใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิดและมีวงใสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ขนาดใหญ่ที่สุด

สำหรับรูปร่างใสในการยับยั้ง *E. coli* ของราเอนโดไฟต์ P03 และราเอนโดไฟต์ P03 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดต่างๆ แสดงในรูปที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่ใช้ทดสอบฤทธิ์

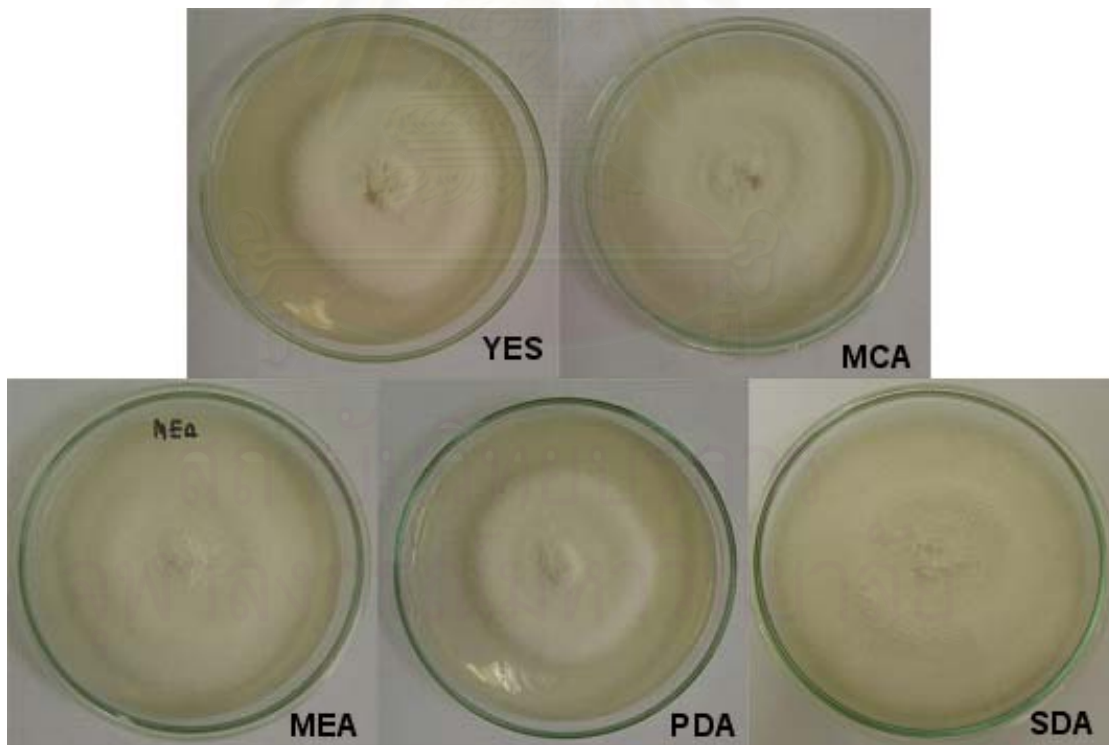
เชื้อจุลินทรีย์	ความเข้มข้น (จำนวนโคโลนี/มิลลิลิตร)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	8.70×10^7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3.53×10^7
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1.41×10^7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1.38×10^7
<i>Candida albican</i> ATCC 10231	4.32×10^7

ตารางที่ 4.4 วงใส (มิลลิเมตร) จากราเอนโคไฟต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ราเอนโคไฟต์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	วงใส (มิลลิเมตร) ที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์				
		B.S.	S.A.	E.C.	P.A.	C.A.
P03	MCA	7.5	10.0	11.0	9.0	8.0
	MEA	7.3	8.9	8.7	7.4	8.5
	PDA	7.3	7.7	8.0	7.5	7.3
	SDA	9.0	12.0	16.0	10.0	12.0
	YES	8.0	8.5	8.2	7.4	7.8
A16	MCA	8.0	-	-	-	-
A19	MCA	-	9.5	10.0	-	-
	MEA	-	8.0	9.0	-	-
	YES	-	9.0	9.0	-	-
S31	MCA	8.0	-	-	-	-
	MEA	9.0	-	-	-	-



รูป 4.4 วงใสจากราเอนโดไฟต์ P03 ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*



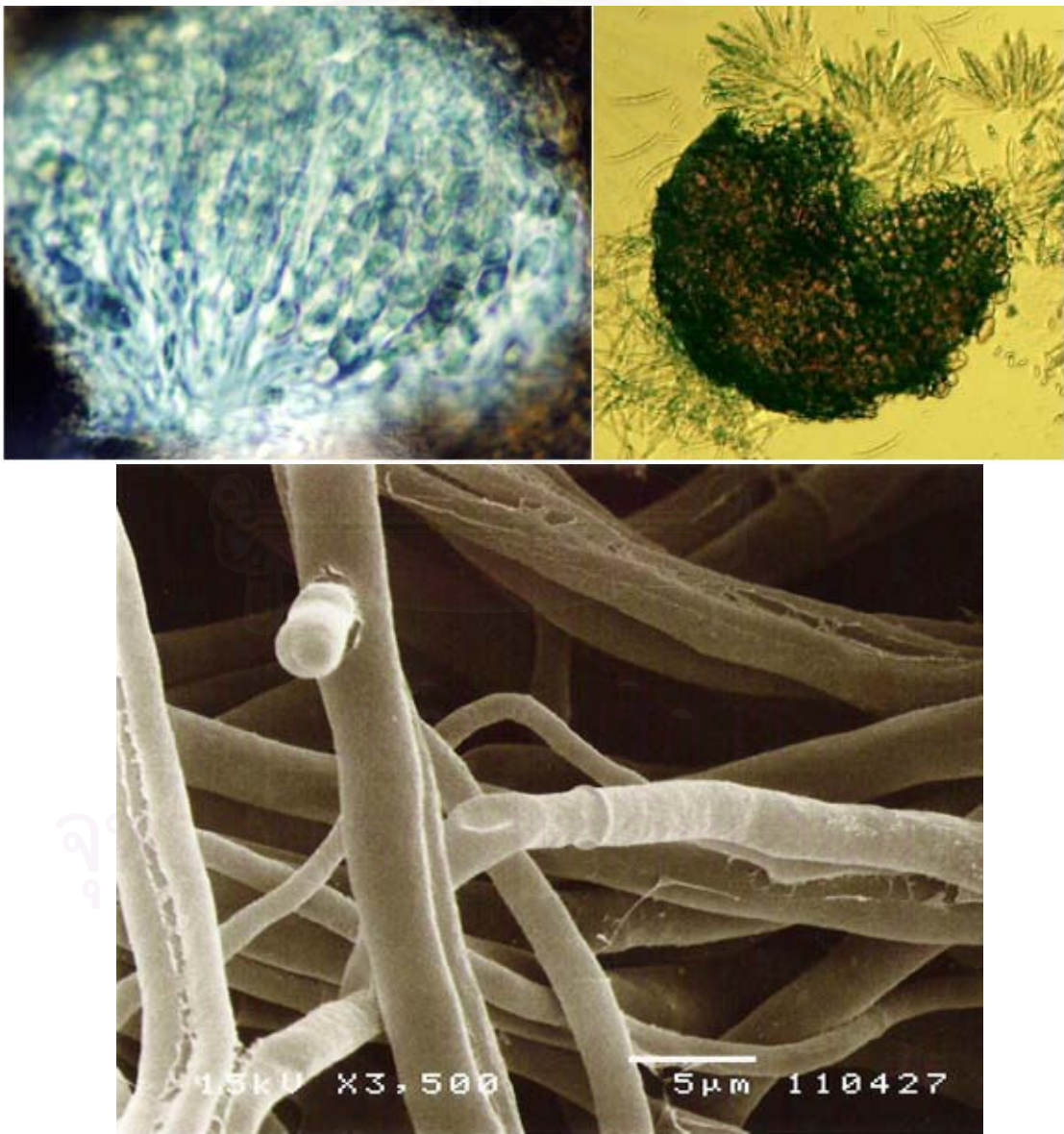
รูปที่ 4.5 ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต P03 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดต่างๆ

4.3 การพิสูจน์ทางเอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์ P03

คัดเลือกราเอนโดไฟต์ P03 เนื่องจากเป็นราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการทดลองได้

4.3.1 การพิสูจน์ทางสัณฐานวิทยา

จากการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อราสร้างแอสโคคาร์ปเพอริซิเทียม (perithecium) ที่มีรูปร่างคล้ายขูดรูปชมพู ภายในเพอริซิเทียม บรรจุแอสคัส (ascus) และภายในแอสโคคาร์ปมี 8 แอสโคสปอร์ (ascospore) แอสโคสปอร์มีรูปร่างกลมรี ไม่มีสี (hyaline) ส่วนเส้นใยมีลักษณะตรง ไม่แผ่กิ่งก้าน มีผนังกั้น ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ลักษณะของเพอริซิเทียม (บน) และเส้นใย (ล่าง) ของราเอนโดไฟต์ P03

4.3.2 การพิสูจน์ทางอนุชีววิทยา

ลำดับเบสบริเวณ ITS (internal transcribe spacer) ของ rDNA ที่ประกอบด้วยส่วนของ 18S, ITS1, 5.8S และ 28S นำมาเพิ่มจำนวน ด้วย ไพรเมอร์ ITS1f และ ITS4 มีความยาว 726 คู่เบส แสดงดังรูปที่ 4.7

จากการพิสูจน์ทางอนุชีววิทยา พบว่าราเอนโดไฟต์ P03 มีความคล้ายคลึงกับรา *Glomerella cingulata* 95 เปอร์เซ็นต์ และสอดคล้องกับผลทางสัณฐานวิทยา

GGCTCGCTGG	TGACCAGCGG	CAGGGATCAT	TACTGAGTTT
ACCCTTTGTG	AACATACCTA	TAAGTGTGCT	TCGGCGGGTA
GGGTCTCCGT	GACCCTCCCG	GCCTCCCGCCC	CCGGGCGGGT
CGGCGCCCGC	CGGAGGATAA	CCAAACTCTGA	TTTAACGACGT
TTCTTCTGAGT	GGTACAAGCA	AATAATCAAA	ACTTTTAACAA
CGGATCTCTTG	GTTCTGGCATC	GATGAAAAAN	GCAGCGAAAT
GCGATAAGTA	ATGTGAATTG	CAGAATTCAG	TGAATCATCN
AATCCGGCGC	CCGCCGGAGG	ATAACCAAAC	TCTGATTTAAC
GACGTTTCTTC	TGAGTGGTACA	AGCAAATAATC	AAAACCTTTTAA
CAACGGATCTC	TTGGTTCTGGC	ATCGATGAAA	AANGCAGCGAA
ATGCGATAAG	TAATGTGAAT	TGCAGAATTC	AGTGAATCAT
CNAATCTTTG	AACNCACATT	GCGCCCGCCA	GCATTCTGGC
GGGNATGCCT	GTTNGAGCGT	NATTTNAACC	CTCAAGCTCT
GCTTGGTGTN	GGGGCCCTAC	AGCTGATGTA	GGCCCTCAAA
GGTAGTGGCG	GACCCTCCCG	GAGCCTCCTTT	GCNNAGTAAC
TTTACGTCTC	GCACTGGGAT	CCGGAGGGAC	TCTTGNCNTA
AAACCCCAA	TTCTNCAAAG	GTTGACCTCG	GATCAGGNA
NGAATACCC	GCTGAANTT	AANNNTATC	AANAAGNAG
GAGGAA			

รูปที่ 4.7 ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ P03

นำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าราเอนโคไฟต์ P03 มีความใกล้เคียงกับ *Glomerella cingulata* 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำลำดับเบสเอนโคไฟต์ไปเปรียบเทียบกับด้วยโปรแกรม Clustal W ได้ผลดังรูปที่ 4.8

CLUSTAL W (1.8) multiple sequence alignment

```

P03 -----GGCTC-GCTGGTGA-CCAGCGGCAGGGATCATTACTGAG
Glomerella GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCTCCGTTGGTGAACCAGCGG-AGGGATCATTACTGAG
* * * * *

P03 TTTACGCTCTATAACCCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCT
Glomerella TTTACGCTCTATAACCCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTCT
*****

P03 CCGTGACCCTCCCGCCCTCCCGCCCCGGGCGGGTCCGCGCCCCGCCGAGGATAACCCAAA
Glomerella CCGTGACCCTCCCGCCCTCCCGCCCCGGGCGGGTCCGCGCCCCGCCGAGGATAACCCAAA
*****

P03 CTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTAACAAC
Glomerella CTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTAACAAC
*****

P03 GGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAAAANGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
Glomerella GGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
*****

P03 GCAGAATTCAGTGAATCATCNAATCTTTGAACNCACATTGCGCCGCCAGCATTCTGGCG
Glomerella GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCGCCAGCATTCTGGCG
*****

P03 GGNATGCCTGTTNGAGCGTNAATTTNAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTNGGGCCCTACA
Glomerella GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTNGGGCCCTACA
** *****

P03 GCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCNNAGTAAC
Glomerella GCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCNNAGTAAC
*****

P03 TTTACGCTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGNCNTAAAAACCCCAATTTCCAAAG
Glomerella TTTACGCTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAAACCCCAATTTCCAAAG
*****

P03 GTTGACCTCGGATCAGGNANGAATACCCGCTGAANTTAANNNTATCAANAAGNAGGAGGA
Glomerella GTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAANTTAAGCATATCAATAAGC-GGAGGA
*****

P03 A
Glomerella -

```

รูปที่ 4.8 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโคไฟต์ P03 กับฐานข้อมูล GenBank

Glomerella cingulata จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Sordariomycetes อันดับ Phyllachorales วงศ์ Phyllachoraceae สกุล *Glomerella* ได้มีผู้ทำการวิจัยเกี่ยวกับสารที่ราชนิดนี้สร้างได้และฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.5 งานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวกับ *Glomerella cingulata* (anamorph: *Colletotrichum* sp.)

ผู้วิจัย	งานวิจัย
Walker (1962)	ศึกษาแอกติวิตี, ความจำเพาะต่อสับสเตรทและตัวยับยั้งของ diphenol oxidase (laccase) ที่ได้จากเส้นใยของ <i>Glomerella cingulata</i>
Burwood และคณะ (1970)	ศึกษาความสามารถในการย่อยสลาย hydroxybenzoic acid (salicylic acid) ของ <i>Glomerella cingulata</i>
Young และคณะ (1982)	สกัดและแยก mycosporine ที่เป็นสารป้องกันแสงอัลตราไวโอเล็ตและสารป้องกันการเกิดออกซิเดชัน จาก <i>Glomerella cingulata</i>
Gomaa และคณะ (1992)	สกัดและแยก 1→3/1→6 glucan จาก <i>Glomerella cingulata</i> ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง P815 โดยมีค่า IC ₅₀ เท่ากับ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Abou-zaid และคณะ (1997)	สกัดและแยกสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา <i>Collectotrichum</i> sp. พบสารกลุ่ม flavone ชนิดใหม่ 2 ชนิดคือ 5,4'-dihydroxy-3,7,8-trimethoxy-6-C-methylflavone และ 5,4'-dihydroxy-3,6,7-trimethoxy-8-C-methylflavone
Lu และคณะ (2000)	ศึกษาราเอนโดไฟต์ <i>Colletotrichum</i> sp. จากต้น <i>Artemisia annua</i> ซึ่งสามารถผลิตสารในกลุ่ม ergosterol และสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ชนิดใหม่ คือ 6-Isoprenylindole-3-carboxylic acid, ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิด เช่น <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Sarcina lutea</i> และ <i>Pseudomonas</i> sp. โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 25 – 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
Zou และคณะ (2000)	ศึกษาราเอนโดไฟต์ <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> จากต้น <i>Artemisia mongolica</i> ซึ่งสามารถผลิตสาร colletotric acid ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Sarcina lutea</i> และ <i>Helminthosporium sativum</i> โดยมีค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentrations) อยู่ในช่วง 25 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
Lumyong และคณะ (2002)	ศึกษาราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นไม้หลายชนิดในอุทยานแห่งชาติ ดอยสุเทพ พบราเอนโดไฟต์หลายชนิดที่มีความสามารถในการสร้าง cellulase, xylanase และ protease โดย 19.7 เปอร์เซ็นต์ของราเอนโดไฟต์ที่พบคือ <i>Glomerella cingulata</i>

4.4 การเลี้ยงเชื้อ, สกัดและแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จากราเอนโคไฟต์ P03

นำราเอนโคไฟต์ P03 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง SDA เนื่องจากเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้ราสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด โดยนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ตัดชิ้นเชื้อราจากอาหารแข็งออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร นำชิ้นเชื้อราจำนวน 5 ชิ้น ถ่ายใส่ลงในอาหารเหลว SDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เตรียมให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 14 ลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่ราเอนโคไฟต์มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด โดยพิจารณาจากวงใสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและการทำโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin-layer chromatography: TLC) พบว่าเมื่อรามีอายุครบ 3 สัปดาห์ ว่าจะสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด เมื่อครบกำหนด นำอาหารเลี้ยงเชื้อมากรอง ด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น จะได้ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อราและส่วนเส้นใย ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อนำมาสกัดด้วยเอทิลเอซิเตต ปริมาตรเท่ากับน้ำเลี้ยงเชื้อ สกัดซ้ำ 4 ครั้ง สารสกัดที่ได้นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลือง ปริมาณ 5.30 กรัม

ส่วนเส้นใยนำไปฝึกเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำมาสกัดด้วยเอทิลเอซิเตต ทำการสกัดซ้ำ 5 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 รวมสารสกัดที่ได้ได้นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลือง ปริมาณ 3.45 กรัม จากนั้นนำเส้นใยมาทำการสกัดซ้ำด้วยเมทานอล กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 รวมสารสกัดที่ได้ได้นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ ปริมาณ 10.18 กรัม นำสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อราและเส้นใย มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่มีซิลิกา เป็นตัวดูดซับ คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 35 เซนติเมตร ใช้ตัวชะหลายชนิด โดยการเพิ่มหัวของตัวชะ เริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลเอซิเตต, เอทิลเอซิเตต, เอทิลเอซิเตต – เมทานอล และ เมทานอล ได้สาร 5 ชนิด (สารบริสุทธิ์ 1–4 และ ของผสม 1)

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากกราเอนโดไฟต์ P03

4.5.1 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของ สารบริสุทธิ์ 1

ผลึกรูปเข็มสีขาว ที่ได้จากส่วน ME6 ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีและใช้เฮกเซน: เอทิลเอซิเตต ในอัตราส่วน 40:60 ถึง 35:65 เป็นตัวชะ สารที่ได้นำมาตกผลึกใหม่ด้วยเอทิลเอซิเตต จากนั้นล้างผลึกด้วยเฮกเซน : เอทิลเอซิเตต ในอัตราส่วน 50 : 50 ที่เย็น 5 – 8 ครั้ง จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว ปริมาณ 178 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 1) สารบริสุทธิ์ที่ได้มีจุดหลอมเหลวที่ 181 – 183 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography: TLC) โดยใช้ เฮกเซน : เอทิลเอซิเตต ในอัตราส่วน 50 : 50 เป็นตัวชะ แล้วย้อมด้วย vanillin และทำให้แห้ง พบว่ามีจุดเดียว ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.63 สารบริสุทธิ์ 1 ที่ได้ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม, เอทิลเอซิเตตและเมทานอล

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีได้ผลดังรูปที่ ค2 ในภาคผนวก ค. พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3424 (br), 2953 (s), 2863 (s), 1633 (m), 1555 (m), 1450 (m), 1365 (m), 1267 (w), 1225 (w), 1155 (w), 1038 (m) และ 960 (m) cm^{-1} ดังแสดงในตาราง ที่ 4.5

ตารางที่ 4.6 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 1

เลขคลื่น (cm^{-1})	ความเข้ม	ลักษณะ
3424	กว้าง	O-H stretching vibration of alcohol
2953, 2863	สูง	C-H stretching vibration of $-\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2$
1633, 1555	ปานกลาง	C=C stretching vibration of double bond
1450, 1365	ปานกลาง	C-H bending vibration of CH_3 and CH_2
1267, 1225, 1155	ต่ำ	C-O stretching vibration
1038	ปานกลาง	C-O stretching vibration
960	ปานกลาง	CH out of plane bending

จากโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^1\text{H-NMR}$ spectrum) ของ สาร
บริสุทธิ์ 1 แสดงในรูปที่ ค3 ภาคผนวก ก. พบตำแหน่งของโปรตอนที่ 6.53 (1H, d, $J = 4.8$, H-6),
6.27 (1H, d, $J = 8.4$, H-7) 5.25 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$, H-22), 5.18 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ
 $J_2 = 14.8$, H-23), 4.00 (1H, m, H-3), 2.14 (1H, m, H-1), 2.07 (1H, m, H-20), 2.04 (1H, m, H-12),
1.98 (1H, m, H-4), 1.95 (1H, m, H-1), 1.89 (1H, m, H-24), 1.87 (1H, m, H-2), 1.78 (1H, m, H-15),
1.74 (1H, m, H-4), 1.64 (1H, m, H-11), 1.60 (1H, m, H-14), 1.58 (1H, m, H-2), 1.53 (1H และ 1H,
m และ m, H-9 และ H-16), 1.52 (1H, m, H-25), 1.42 (1H, m, H-11), 1.38 (1H, m, H-2), 1.28 (1H,
m, H-12), 1.26 (1H และ 1H, m และ m, H-16 และ H-17), 1.03 (3H, d, $J = 6.0$, H-27), 0.95 (3H, d,
 $J = 6.8$, H-28), 0.93 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, d, $J = 6.0$, H-26), 0.85 (3H, s, H-18) และ 0.84 (3H, d,
 $J = 6.0$, H-21) ppm

ที่ตำแหน่งของโปรตอน 6.53, 6.27, 5.25 และ 5.18 ppm แสดงโปรตอนของคาร์บอนที่มี
พันธะคู่

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

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

ที่ตำแหน่งโปรตอน 1.03, 0.95, 0.91, 0.87, 0.85 และ 0.84 ppm แสดงโปรตอนของเมทิล
คาร์บอน

จากคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^{13}\text{C-NMR}$ spectrum) ของ
สารบริสุทธิ์ 1 แสดงในรูปที่ ค4 ภาคผนวก ก. พบตำแหน่ง 135.44 (CH-7), 135.22 (CH-23), 132.31
(CH-22), 130.75 (CH-6), 82.20 (C-8), 79.46 (C-5), 66.46 (CH-3), 56.19 (CH-17), 51.69 (CH-14),
51.08 (CH-9), 44.58 (C-13), 42.79 (CH-24), 39.77 (CH-20), 39.35 (CH-12), 36.98 (C-10), 36.92
(CH₂-1), 34.70 (CH₂-4), 33.08 (CH-25), 30.10 (CH₂-2), 28.68 (CH₂-15), 23.42 (CH₂-16), 20.90
(CH₃-27), 20.65 (CH₂-11), 19.98 (CH₃-26), 19.67 (CH₃-21), 18.21 (CH₃-19), 17.59 (CH₃-28) และ
12.89 (CH₃-18) ppm

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 135.44, 135.22, 132.31 และ 130.75 ppm แสดงถึงคาร์บอนที่มีพันธะคู่
ที่ตำแหน่งคาร์บอน 82.20, 79.46, 44.58 และ 36.98 ppm แสดงถึงควอเตอร์นารีคาร์บอน
ที่ตำแหน่งคาร์บอน 56.19, 51.69, 51.08, 42.79, 39.77 และ 33.08 ppm แสดงถึงเทอร์เชียรี
คาร์บอน

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 39.35, 36.92, 34.70, 30.10, 28.68, 23.42 และ 20.65 ppm แสดงถึง
เมทิลีนคาร์บอน

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 20.90, 19.98, 19.67, 18.21, 17.59 และ 12.89 ppm แสดงถึงเมทิล
คาร์บอน

จากแมสสเปกตรัม (LC-MS spectrum) ของสารบริสุทธิ์ 1 แสดงในรูปที่ ค9 ภาคผนวก ก.
พบว่าสารบริสุทธิ์ 1 มีมวลโมเลกุล 428.3



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 HSQC spectra ของสารบริสุทธิ์ 1

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)	$^1\text{H-NMR}$ (ppm), coupling constant (Hz)
135.44	6.27 (1H, d, $J = 8.4$, H-7)
135.22	5.18 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$, H-23)
132.31	5.25 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$, H-22)
130.75	6.53 (1H, d, $J = 4.8$, H-6)
82.20, 79.46	-
66.46	4.00 (1H, m, H-3)
56.19	1.26 (1H, m, H-17)
51.69	1.60 (1H, m, H-14)
51.08	1.53 (1H, m, H-9)
44.58	-
42.79	1.89 (1H, m, H-24)
39.77	2.07 (1H, m, H-20)
39.35	2.04 (1H, m, H-12), 1.28 (1H, m, H-12)
36.98	-
36.92	2.14 (1H, m, H-1), 1.95 (1H, m, H-1)
34.70	1.98 (1H, m, H-4), 1.74 (1H, m, H-4)
33.08	1.52 (1H, m, H-25)
30.10	1.87 (1H, m, H-2), 1.58 (1H, m, H-2)
28.68	1.78 (1H, m, H-15), 1.38 (1H, m, H-15)
23.42	1.53 (1H, m, H-16), 1.26 (1H, m, H-16)
20.90	1.03 (3H, d, $J = 6.0$, H-27)
20.65	1.64 (1H, m, H-11), 1.42 (1H, m, H-11)
19.98	0.87 (3H, d, $J = 6.0$, H-26)
19.67	0.84 (3H, d, $J = 6.0$, H-21)
18.21	0.93 (3H, s, H-19)
17.59	0.95 (3H, d, $J = 6.8$, H-28)
12.89	0.85 (3H, s, H-18)

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบ $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสารบริสุทธิ์ 1 กับ Ergosterol peroxide

Position	สารบริสุทธิ์ 2		Ergosterol peroxide (Bok, 1999)	
	δC	δH	δC (50 MHz)	δH (500 MHz)
1	36.92 (t)	2.14 (m), 1.95 (m)	39.4 (t)	ไม่รายงาน
2	30.10 (t)	1.87 (m), 1.58 (m)	30.1 (t)	ไม่รายงาน
3	66.46 (d)	4.00 (m)	66.3 (d)	3.92 (m)
4	34.70 (t)	1.98 (m), 1.74 (m)	51.2 (t)	ไม่รายงาน
5	79.46 (s)	-	79.4 (s)	-
6	130.75 (d)	6.53 (d, $J = 4.8$)	130.7 (d)	5.95 (d, $J = 4.8$)
7	135.44 (d)	6.27 (d, $J = 8.4$)	135.4 (d)	6.29 (d, $J = 8.4$)
8	82.20 (s)	-	82.7 (s)	-
9	51.08 (d)	1.53 (m)	34.7 (d)	ไม่รายงาน
10	36.98 (s)	-	36.9 (s)	-
11	20.65 (t)	1.64 (m), 1.42 (m)	20.9 (t)	ไม่รายงาน
12	39.35 (d)	2.04 (m), 1.28 (m)	39.4 (d)	ไม่รายงาน
13	44.58 (s)	-	44.6 (s)	-
14	51.69 (d)	1.60 (m)	51.7 (d)	ไม่รายงาน
15	28.68 (t)	1.78 (m), 1.38 (m)	28.6 (t)	ไม่รายงาน
16	23.42 (t)	1.53 (m), 1.26 (m)	23.4 (t)	ไม่รายงาน
17	56.19 (d)	1.26 (m)	56.3 (d)	ไม่รายงาน
18	12.89 (q)	0.85 (s)	12.9 (q)	0.61 (s)
19	18.21 (q)	0.93 (s)	18.7 (q)	0.67 (s)
20	39.77 (d)	2.07 (m)	39.7 (d)	ไม่รายงาน
21	19.67 (q)	0.84 (d, $J = 6.0$)	19.6 (q)	1.00 (d, $J = 6.49$)
22	132.31 (d)	5.25 (dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$)	132.3 (d)	5.25 (dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 15.3$)
23	135.22 (d)	5.18 (dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$)	135.2 (d)	5.14 (dd, $J_1 = 8.4$ และ $J_2 = 15.3$)
24	42.79 (d)	1.89 (m)	42.8 (d)	ไม่รายงาน
25	33.08 (d)	1.52 (m)	33.0 (d)	ไม่รายงาน
26	19.98 (q)	0.87 (d, $J = 6.0$)	19.9 (q)	0.91 (d, $J = 6.8$)
27	20.90 (q)	1.03 (d, $J = 6.0$)	20.7 (q)	0.91 (d, $J = 6.7$)
28	17.59 (q)	0.95 (d, $J = 6.8$)	17.5 (q)	0.99 (d, $J = 6.6$)

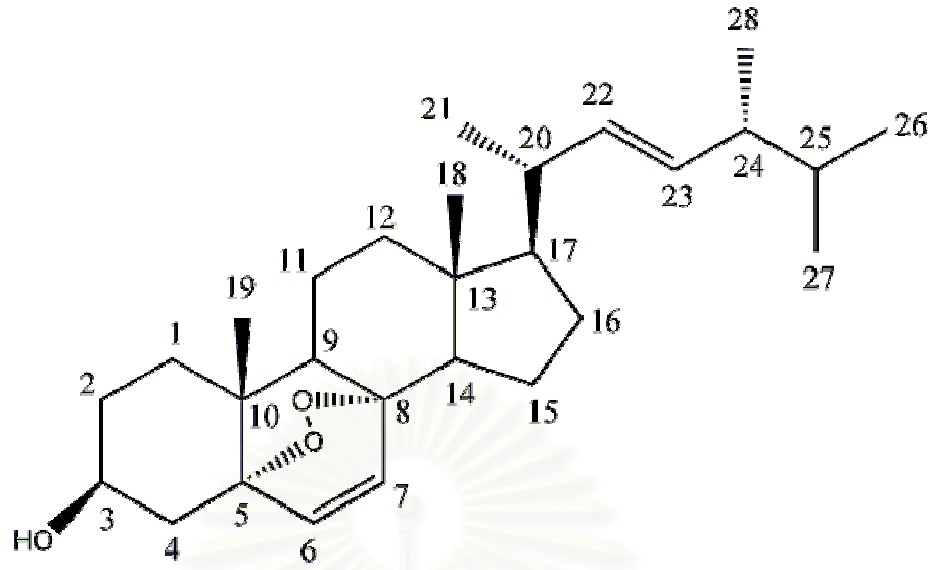
ตารางที่ 4.9 ข้อมูล HSQC, HMBC, COSY และ NOESY ของสารบริสุทธิ์ 1

Position	δ_C	δ_H	HMBC (H to C)	COSY	NOESY
1	36.92	2.14 (1H, m), 1.95 (1H, m)	C2, C-3, C-8, C-10 C-3	- -	H-19 -
2	30.10	1.87 (1H, m), 1.58 (1H, m)	C-4 -	- H-3	H-9, H-16 (1.53) -
3	66.46	4.00 (1H, m)	-	H-2 (1.58)	-
4	34.70	1.98 (1H, m), 1.74 (1H, m)	- -	-	H-4, H-16, H-17, H-27 -
5	79.46	-	-	-	-
6	130.75	6.53 (1H, d, $J = 4.8$)	C-5, C-8, C-9	H-7	H-7
7	135.44	6.27 (1H, d, $J = 8.4$)	C-5, C-8	H-6	H-6
8	82.20	-	-	-	-
9	51.08	1.53 (1H, m)	C-5, C-7, C-14	-	H-2, H-4, H-16, H-17, H-19
10	36.98	-	-	-	-
11	20.65	1.64 (1H, m), 1.42 (1H, m)	C-9 C-14	- H-18	- H-14, H-15
12	39.35	2.04 (1H, m), 1.28 (1H, m)	C-17 C-9	- -	H-18 -
13	44.58	-	-	-	-
14	51.69	1.60 (1H, m)	C-11, C-13, C-15	-	H-11
15	28.68	1.78 (1H, m), 1.38 (1H, m)	- C-14, C-17	- -	H-11 -
16	23.42	1.53 (1H, m), 1.26 (1H, m)	C-13, C-14 C-13, C-15	H-18, H-21 -	H-2, H-4 H-4, H-9, H-18, H-19

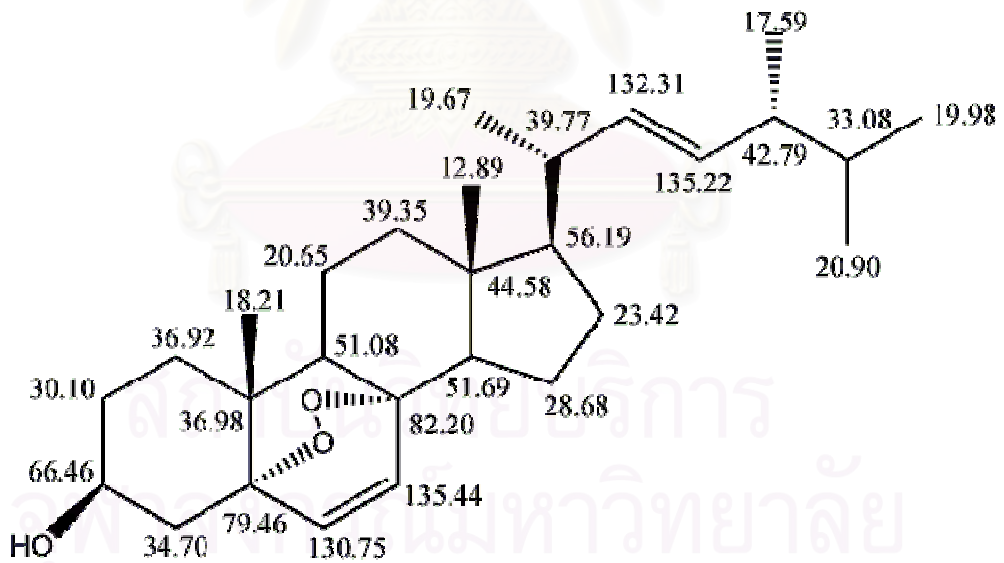
ตารางที่ 4.9 ข้อมูล HSQC, HMBC, COSY และ NOESY ของสารบริสุทธิ์ 1 (ต่อ)

Position	δ_C	δ_H	HMBC (H to C)	COSY	NOESY
17	56.19	1.26 (1H, m)	C-13, C-15	-	H-4, H-9, H-18, H-19
18	12.89	0.85 (3H, s)	C-14, C-17	H-11 (1.42), H-16 (1.53)	H-12, H-16, H-17, H-25
19	18.21	0.93 (3H, s)	C-1, C-4, C-8, C-9, C-10	-	H-1, H-9, H-16, H-17
20	39.77	2.07 (1H, m)	C-17	-	-
21	19.67	0.84 (3H, d, $J = 6.0$)	C-13, C-14, C-17, C-20, C-24, C-25, C-26	H-16 (1.53)	-
22	132.31	5.25 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$)	C-20, C-24, C-26	H-23	-
23	135.22	5.18 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$)	C-20, C-24	H-22, H-24	-
24	42.79	1.89 (1H, m)	C-22, C-23	H-23, H-28	-
25	33.08	1.52 (1H, m)	C-22, C-24, C-26, C-28	H-26	H-18
26	19.98	0.87 (3H, d, $J = 6.0$)	C-24, C-27	H-25	-
27	20.90	1.03 (3H, d, $J = 6.0$)	C-23, C-23	-	H-4
28	17.59	0.95 (3H, d, $J = 6.8$)	C-22, C-24, C-25	H-24	-

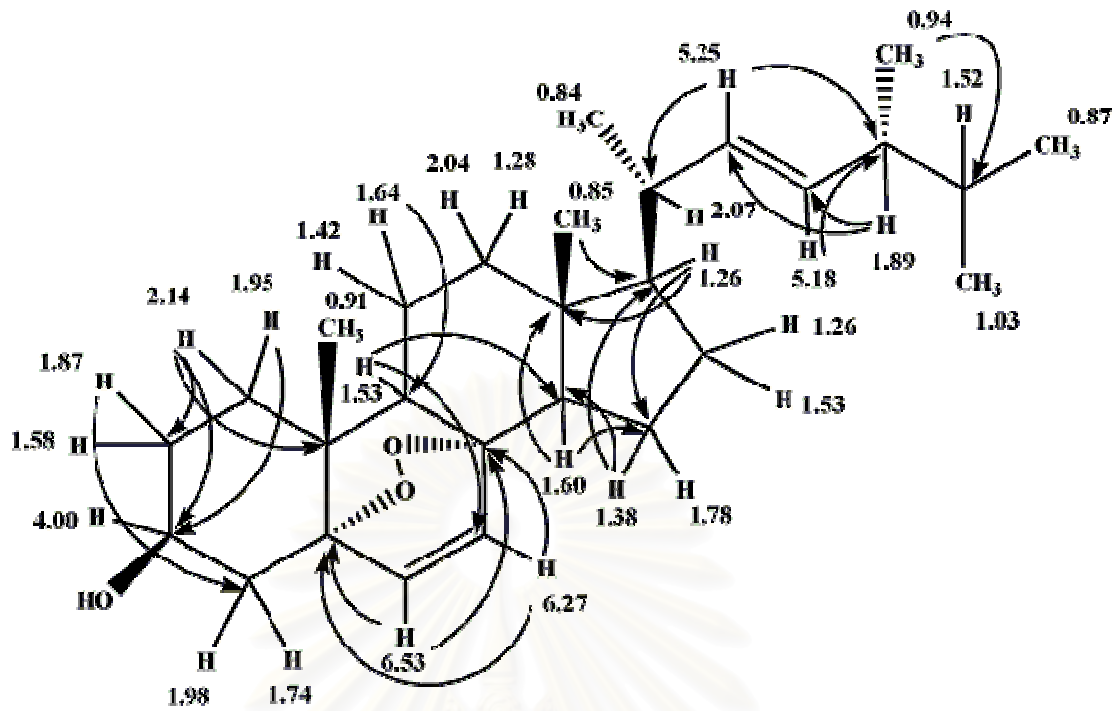
จากข้อมูลทางสเปกโทสโกปี และการเปรียบเทียบค่าเคมีคัลซิฟท์ของคาร์บอน-13 และโปรตอนของสารบริสุทธิ์ 1 กับ ergosterol peroxide (Bok, 1999) พบว่า สารทั้งสองมีค่าเคมีคัลซิฟท์ใกล้เคียงกัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารบริสุทธิ์ 1 คือ ergosterol peroxide ($5\alpha,8\alpha$ -epidioxy-24(R)-methyl-cholesta-6,22-dien-3 β -ol) ที่มีโครงสร้างดังรูปที่ 4.10



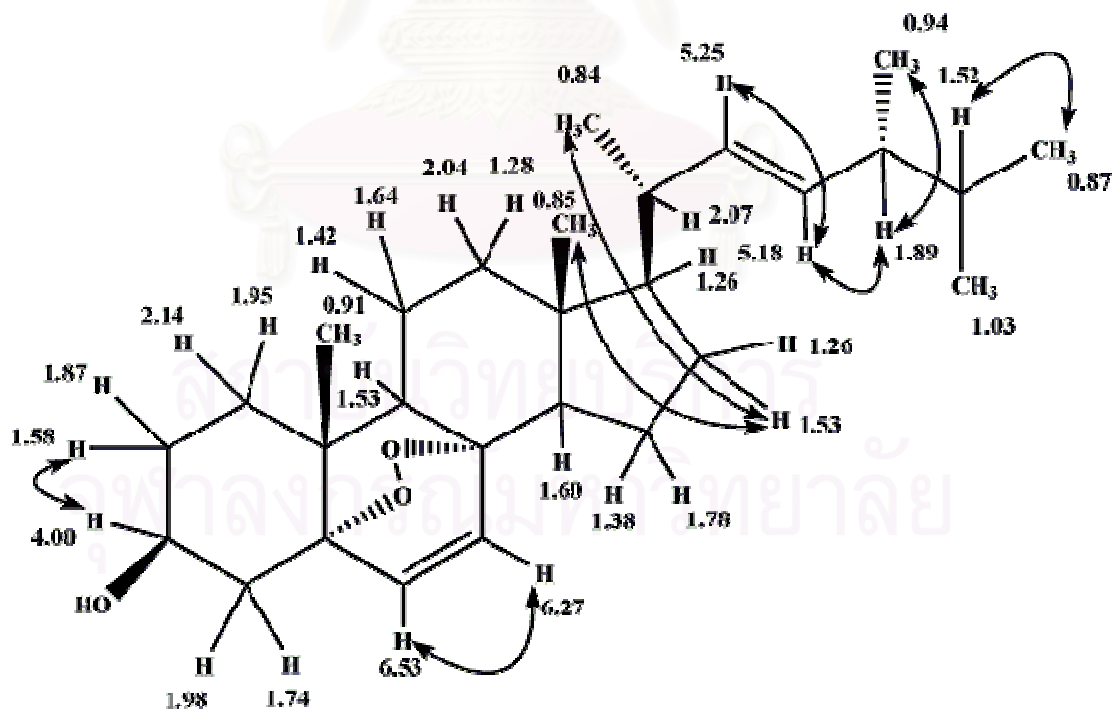
รูปที่ 4.9 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 1



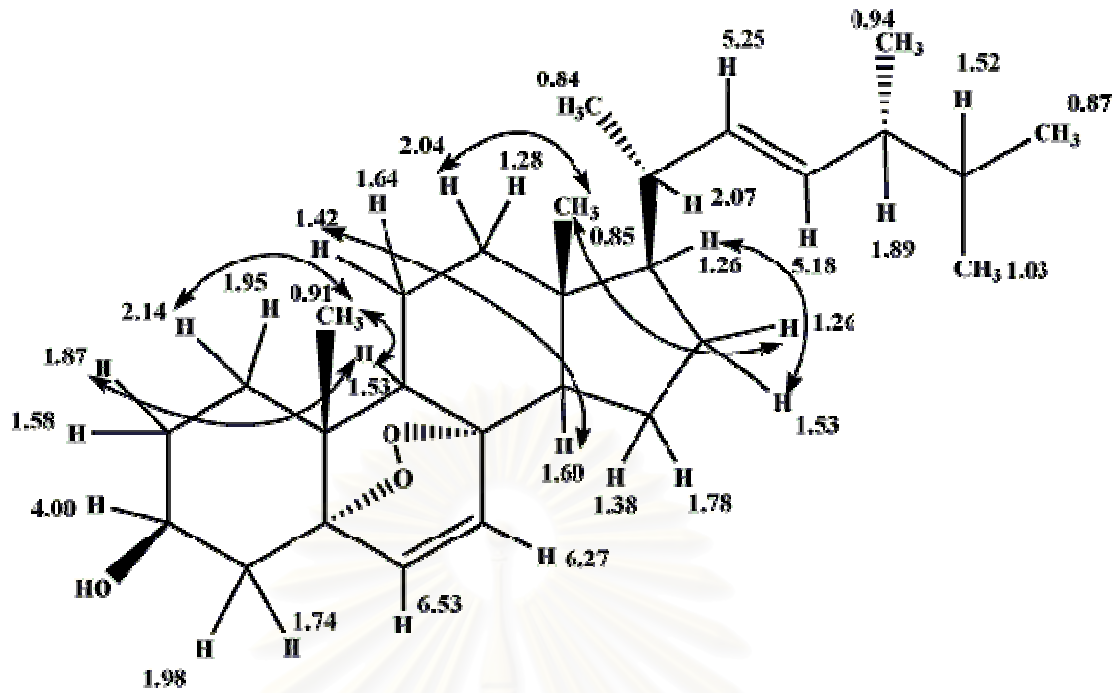
รูปที่ 4.10 คาร์บอนเคมีคัลชีพของสารบริสุทธิ์ 1



รูปที่ 4.11 HMBC ของสารบริสุทธิ์ 1



รูปที่ 4.12 COSY ของสารบริสุทธิ์ 1



รูปที่ 4.13 NOESY ของสารบริสุทธิ์ 1

Ergosterol peroxide เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถพบได้ในราและพืชบางชนิด มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารดังกล่าว โดยสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิดดังตารางที่ 4.9 นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบปริมาณของ ergosterol peroxide ที่ราและพืชผลิตได้ กับงานวิจัยชิ้นนี้ จะเห็นได้ว่าราเอนโดไฟต์ P03 สามารถผลิต ergosterol peroxide ได้ในปริมาณมาก

ตารางที่ 4.10 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ Ergosterol peroxide ที่พบในราและพืชชนิดต่างๆ

ผู้วิจัย	งานวิจัย	ปริมาณที่ได้ (มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง)
Kahlos และคณะ (1989)	สกัดและแยก ergosteol peroxide จากเชื้อรา <i>Inonotus rariatus</i> และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งซาร์โคมา (Walker 256) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 42 และ 35 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ	0.0075
Bok และคณะ (1999)	สกัดและแยก ergosteol peroxide จากเชื้อรา <i>Cordyceps sinensis</i> และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (K526, Jurkat, HL-60 และ RPMI-8226), เซลล์มะเร็งผิวหนัง (WM-1341) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 65, 48, 60, 63 และ 49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ	0.69
Cantrell และคณะ (1999)	สกัดและแยก ergosteol peroxide จากต้น <i>Ajuga remota</i> Benth. และทดสอบความเป็นพิษต่อ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	0.031
Nam และคณะ (2001)	สกัดและแยก ergosteol peroxide จากเชื้อรา <i>Paecilomyces tenuipes</i> และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (SNU-1), เซลล์มะเร็งตับ (SNU-354) และ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SNU-C4) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.2, 2.2 และ 4.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ	-
Takei และคณะ (2005)	สกัดและแยก ergosteol peroxide จากเห็ด <i>Sarcodon asparatus</i> และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ	0.51
งานวิจัยนี้	สกัดและแยก ergosteol peroxide (สารบริสุทธิ์ 2) จากราเอนโดไฟต์ P03 (<i>Glomerella cingulata</i>) ที่แยกได้จากใบกระท่อม (<i>Mitragyna speciosa</i> Korth.)	1.47

4.5.2 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 2

ผงสีขาว ที่ได้จากส่วนMM3 ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้เฮกเซน : เอทิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 40 : 60 ถึง 20 : 80 เป็นตัวชะ สารที่ได้นำมาล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 7 ครั้ง และเมทานอล 3 – 4 ครั้ง จะได้ผงสีขาว ปริมาณ 622.6 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 2) สารบริสุทธิ์ที่ได้ มีจุดหลอมเหลวที่ 260 - 262 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography: TLC) โดยใช้ เฮกเซน : เอทิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 50 : 50 เป็นตัวชะ แล้วข้อมด้วย vanillin และทำให้แห้ง พบว่ามีจุดเดียว ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.68 สารบริสุทธิ์ 2 ที่ได้ ละลายได้น้อยในเมทานอล ละลายได้ดีใน DMSO

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีได้ผลดังรูปที่ 4.11 ในภาคผนวก ค. พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3444 (br), 2937 (s), 2816 (s), 1685 (s), 1565 (m), 1451 (s), 1380 (m), 1238 (s), 1140 (s), 1097 (s) และ 1031 (s) cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 2

เลขคลื่น (cm^{-1})	ความเข้ม	ลักษณะ
3444	กว้าง	O-H stretching vibration of alcohol
2937, 2861	สูง	C-H stretching vibration of $-\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2$
1685	สูง	C=O stretching vibration of double bond
1565	ปานกลาง	C=C stretching vibration of double bond
1451	สูง	C-H bending vibration of CH_3 and CH_2
1380	ปานกลาง	C-H bending vibration of CH_3 and CH_2
1238, 1140, 1097, 1031	สูง	C-O stretching vibration

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^1\text{H-NMR}$ spectrum) ของ สาร
บริสุทธิ์ 2 แสดงในรูปที่ ค12 ภาคผนวก ก. พบตำแหน่งของโปรตอนที่ 5.14 (1H, s, H-12), 4.32
(1H, d, $J = 4.8$, OH), 3.01 (1H, t, H-3), 2.52 (1H, d, $J = 2.0$, OH), 2.12 (1H, d, $J = 10.8$, H-18),
1.86 (1H, m, H-11), 1.84 (1H, s, H-11), 1.56 (2H, m, H-1), 1.53 (1H, m, H-16), 1.50 (2H, m, H-6),
1.47 (2H and 1H, m and m, H-2 and H-9), 1.46 (1H and 1H, m and m, H-7 and H-21), 1.33 (1H,
m, H-20), 1.30 (1H, m, H-21), 1.28 (1H, m, H-7), 1.06 (1H, s, H-16), 1.05 (3H, s, H-27), 1.03 (1H,
m, H-15), 0.99 (1H, m, H-15), 0.93 (1H and 3H, m and m, H-19 and H-30), 0.92 (2H, m, H-1),
0.91 (3H, s, H-23), 0.88 (3H, s, H-25), 0.83 (3H, d, $J = 6.4$, H-29), 0.76 (3H, s, H-26) และ 0.69
(3H and 3H, s and s, H-5 and H-24) ppm

ที่ตำแหน่งโปรตอน 5.14 ppm แสดงโปรตอนของคาร์บอนที่มีพันธะคู่

ที่ตำแหน่งโปรตอน 3.01 ppm แสดงโปรตอนของคาร์บอนที่ติดกับหมู่ไฮดรอกซิล

ที่ตำแหน่งโปรตอน 2.12, 1.47, 1.33 0.93 และ 0.69 ppm แสดงโปรตอนของเทอร์เชียรี
คาร์บอน (-CH)

ที่ตำแหน่งโปรตอน 1.86, 1.84, 1.56, 1.53, 1.50, 1.47, 1.46, 1.29, 1.30, 1.06, 0.99 และ
0.92 ppm แสดงโปรตอนของเมทิลีนคาร์บอน (-CH₂)

ที่ตำแหน่งโปรตอน 1.06, 0.93, 0.91, 0.88, 0.83, 0.76 และ 0.69 ppm แสดงโปรตอนของ
เมทิลคาร์บอน

จากคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^{13}\text{C-NMR}$ spectrum) ของ
สารบริสุทธิ์ 2 แสดงในรูปที่ ค13 ภาคผนวก ก. พบตำแหน่ง 178.78 (C-28), 138.65 (C-13), 125.05
(CH-12), 77.30 (CH-3), 55.26 (CH₃-5), 52.84 (CH-18), 47.49 (CH-9), 47.23 (C-17), 42.11 (C-14),
39.57 (C-8), 39.32 (C-4), 38.99 (CH-19), 38.85 (CH-20), 38.72 (CH₂-1), 37.00 (C-10), 36.80
(CH₂-22), 33.19 (CH₂-7), 30.68 (CH₂-21), 28.73 (CH₃-23), 28.02 (CH₂-15), 27.46 (CH₂-2), 24.29
(CH₂-16), 23.74 (CH₃-27), 23.32 (CH₂-11), 21.56 (CH₃-30), 18.48 (CH₂-6), 17.50 (CH₃-29), 17.38
(CH₃-26), 16.56 (CH₃-24) และ 15.71 (CH₃-25) ppm

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 178.78 ppm แสดงถึงคาร์บอนของหมู่คาร์บอกซิล

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 138.65 และ 125.05 ppm แสดงถึงคาร์บอนที่มีพันธะคู่

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 77.30 ppm แสดงถึงคาร์บอนที่อยู่ติดกับหมู่ไฮดรอกซิล

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 47.23, 42.11, 39.57, 39.32 และ 37.00 ppm แสดงถึงควอเทอร์นารีคาร์บอน

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 55.26, 52.84, 47.49, 38.99 และ 38.85 ppm แสดงถึงเทอร์เชียรีคาร์บอน

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 38.72, 36.80, 33.19, 30.68, 28.02, 27.46, 24.29, 23.32 และ 18.48 ppm แสดงถึงเมทิลีนคาร์บอน

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 28.73, 23.74, 21.50, 17.50, 17.38, 16.56 และ 15.71 ppm แสดงถึงเมทิลคาร์บอน

จากแมสสเปกตรัม (LC-MS spectrum) ของสารบริสุทธิ์ 2 แสดงในรูปที่ ค19 ภาคผนวก ค. พบว่าสารบริสุทธิ์ 2 มีมวลโมเลกุล 456



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.12 HSQC spectra ของสารบริสุทธิ์ 2

¹³ C-NMR (ppm)	¹ H-NMR (ppm), coupling constant (Hz)
178.78, 138.65	-
125.05	5.14 (1H, s, H-12)
77.30	3.01 (1H, t, H-3)
60.24	-
55.26	0.69 (3H, s, H-5)
52.84	2.12 (1H, d, $J = 10.8$, H-18)
47.49	1.47 (1H, m, H-9)
47.23, 42.11, 39.57, 39.32	-
38.99	0.93 (1H, s, H-19)
38.85	1.33 (1H, m, H-20)
38.72	0.92 (2H, m, H-1)
37.00	-
36.80	1.56 (2H, m, H-22)
33.19	1.46 (1H, m, H-7), 1.28 (1H, m, H-7)
30.68	1.46 (1H, m, H-21), 1.30 (1H, m, H-21)
28.73	0.91 (3H, s, H-23)
28.02	1.03 (1H, m, H-15), 0.99 (1H, m, H-15)
27.46	1.47 (2H, m, H-2)
24.29	1.53 (1H, m, H-16), 1.06 (1H, m, H-16)
23.74	1.05 (3H, s, H-27)
23.32	1.86 (1H, m, H-11), 1.84 (1H, m, H-11)
21.56	0.93 (3H, m, H-30)
18.48	1.50 (2H, m, H-6)
17.50	0.83(3H, d, $J = 6.4$, H-29)
17.38	0.76 (3H, s, H-26)
16.56	0.69 (3H, s, H-24)
15.71	0.88 (3H, s, H-25)
	4.32 (1H, d, $J = 4.8$) OH (COOH)
	2.52 (1H, d, $J = 2.0$) OH

ตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบ ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR ของสารบริสุทธิ์ 2 กับ Ursolic acid

Position	สารบริสุทธิ์ 2		Ursolic acid (Reher, 1992)	
	δC	δH	δC (125.7 MHz)	δH (500 MHz)
1	38.72 (t)	0.92 (2H,m)	39.8 (t)	ไม่รายงาน
2	27.46 (t)	1.47 (2H, m)	27.9 (t)	ไม่รายงาน
3	77.30 (d)	3.01 (1H, t)	79.7 (d)	3.15 (dd, $J_1 = 10.4$, $J_2 = 5.9$)
4	39.32 (s)	-	40.0 (s)	-
5	55.26 (q)	0.69 (3H, s)	56.8 (q)	ไม่รายงาน
6	18.48 (t)	1.50 (2H, m)	19.5 (t)	ไม่รายงาน
7	33.19 (t)	1.46 (1H, m), 1.28 (1H, m)	34.4 (t)	ไม่รายงาน
8	39.57 (s)	-	40.8 (s)	-
9	47.49 (d)	1.47 (1H, m)	-	ไม่รายงาน
10	37.00 (s)	-	38.1 (s)	-
11	23.32 (t)	1.86 (1H, m), 1.84 (1H, s)	24.4 (t)	ไม่รายงาน
12	125.05 (d)	5.14 (1H, s)	128.9 (d)	5.22 (1H, t)
13	138.65 (s)	-	139.7 (s)	-
14	42.11 (s)	-	43.3 (s)	-
15	28.02 (t)	1.03 (1H, m), 0.99 (1H, m)	29.2 (t)	ไม่รายงาน
16	24.29 (t)	1.53 (1H, m), 1.06 (1H, s)	25.3 (t)	ไม่รายงาน
17	47.23 (s)	-	-	-
18	52.84 (d)	2.12 (1H, d, $J = 10.8$)	54.4 (d)	2.20 (1H, br s)
19	38.99 (d)	0.93 (1H, m)	40.5 (d)	ไม่รายงาน
20	38.85 (d)	1.33 (1H, m)	40.4 (d)	ไม่รายงาน
21	30.68 (t)	1.46 (1H, m), 1.30 (1H, m)	31.8 (t)	ไม่รายงาน
22	36.80 (t)	1.58 (2H, m)	38.1 (t)	ไม่รายงาน
23	28.73 (q)	0.91 (3H, s)	28.8 (q)	0.97 (3H, s)

ตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบ ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR ของสารบริสุทธิ์ 2 กับ Ursolic acid (ต่อ)

Position	สารบริสุทธิ์ 2		Ursolic acid (Reher, 1992)	
	δC	δH	δC (125.7 MHz)	δH (500 MHz)
24	16.56 (q)	0.69 (3H, s)	16.4 (q)	0.78 (3H, s)
25	15.71 (q)	0.88 (3H, s)	16.0 (q)	0.85 (3H, s)
26	17.38 (q)	0.76 (3H, s)	17.7 (q)	1.12 (3H, s)
27	23.74 (q)	1.06 (3H, s)	24.8 (q)	0.96 (3H, s)
28	178.78 (s)	-	178.6 (s)	-
29	17.50 (q)	0.83 (3H, d, $J = 6.4$)	17.8 (q)	0.96 (3H, d, $J = 6.5$)
30	21.56 (q)	0.93 (3H, m)	21.6 (q)	0.88 (3H, d, $J = 6.3$)

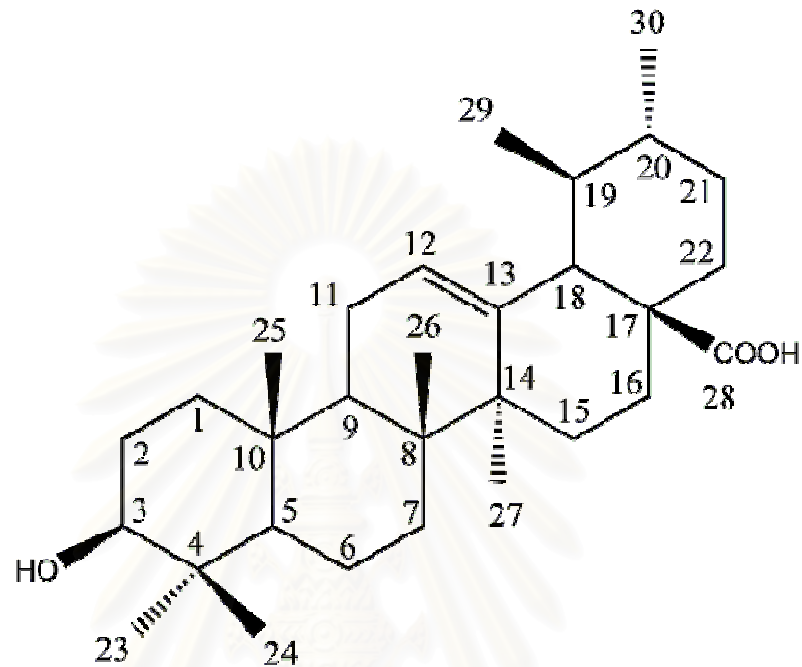
ตารางที่ 4.14 ข้อมูล HSQC, HMBC, COSY และ NOESY ของสารบริสุทธิ์ 2

Position	δC	δH	HMBC (H to C)	COSY	NOESY	TOCSY
1	38.72 (t)	0.92 (2H,m)	-	-	H-3	-
2	27.46 (t)	1.47 (2H, m)	C-8, C-10, C-26	H-3, H-11	-	-
3	77.30 (d)	3.01 (1H, t)	-	H-2	H-1	-
4	39.32 (s)	-	-	-	-	-
5	55.26 (q)	0.69 (3H, s)	C-3, C-5, C-6, C-9	-	-	-
6	18.48 (t)	1.50 (2H, m)	-	-	-	-
7	33.19 (t)	1.46 (1H, m)	-	-	-	-
		1.28 (1H, m)	-	-	-	-
8	39.57 (s)	-	-	-	-	-
9	47.49 (d)	1.47 (1H, m)	-	-	H-25	-
10	37.00 (s)	-	-	-	-	-
11	23.32 (t)	1.86 (1H, m)	-	-	-	-
		1.84 (1H, s)	-	H-12	H-25	H-12

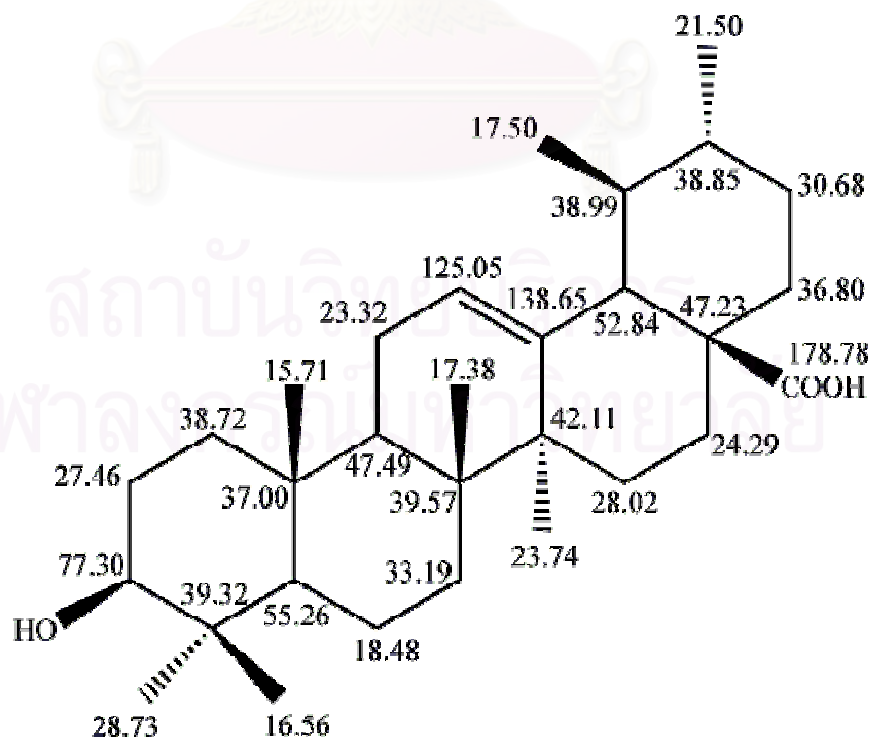
ตารางที่ 4.14 ข้อมูล HSQC, HMBC, COSY และ NOESY ของสารบริสุทธิ์ 2 (ต่อ)

Position	δ_C	δ_H	HMBC (H to C)	COSY	NOESY	TOCSY
12	125.05 (d)	5.14 (1H, s)	-	H-11	H-26	H-11
13	138.65 (s)	-	-	-	-	-
14	42.11 (s)	-	-	-	-	-
15	28.02 (t)	1.03 (1H, m) 0.99 (1H, m)	- -	- -	- -	- -
16	24.29 (t)	1.53 (1H, m) 1.06 (1H, s)	- -	- -	- -	- -
17	47.23 (s)	-	-	-	-	-
18	52.84 (d)	2.12 (1H, d, $J = 10.8$)	C-1, C-14, C-16, C-17, C-20, C-28, C-29	-	H-29	H-29
19	38.99 (d)	0.93 (1H, m)	C-21	-	-	-
20	38.85 (d)	1.33 (1H, m)	-	-	-	-
21	30.68 (t)	1.46 (1H, m) 1.30 (1H, m)	- -	- -	- -	- -
22	36.80 (t)	1.58 (2H, m)	-	-	-	-
23	28.73 (q)	0.91 (3H, s)	C-3, C-5	-	-	H-24
24	16.56 (q)	0.69 (3H, s)	-	-	H-25	H-23
25	15.71 (q)	0.88 (3H, s)	C-5, C-10, C-20, C-21, C-24	- -	H-9, H- 11, H-24	- -
26	17.38 (q)	0.76 (3H, s)	C-7, C-8, C-9, C-14	-	H-12	-
27	23.74 (q)	1.06 (3H, s)	C-8, C-13, C-14, C-15	-	-	-
28	178.78 (s)	-	-	-	-	-
29	17.50 (q)	0.83 (3H, d, $J = 6.4$)	C-18, C-20	-	H-18	H-18, H-30
30	21.56 (q)	0.93 (3H, m)	-	-	-	H-29

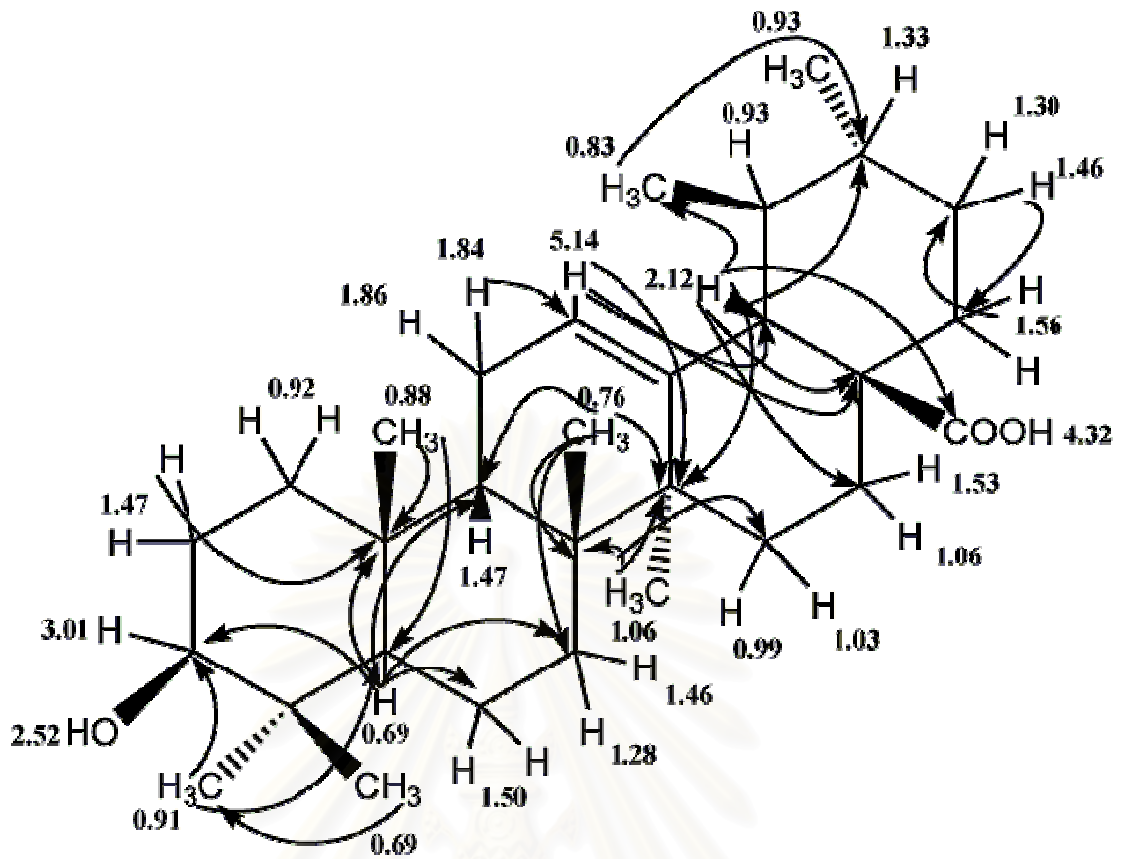
จากข้อมูลทางสเปกโทสโกปี และการเปรียบเทียบค่าเคมีคัลซิฟท์ของคาร์บอน-13 และโปรตอนของสารบริสุทธิ์ 2 กับ ursolic acid (Reher, 1992) พบว่า สารทั้งสองมีค่าเคมีคัลซิฟท์ใกล้เคียงกัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารบริสุทธิ์ 2 คือ ursolic acid (3β -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid) ที่มีโครงสร้างดังรูปที่ 4.10



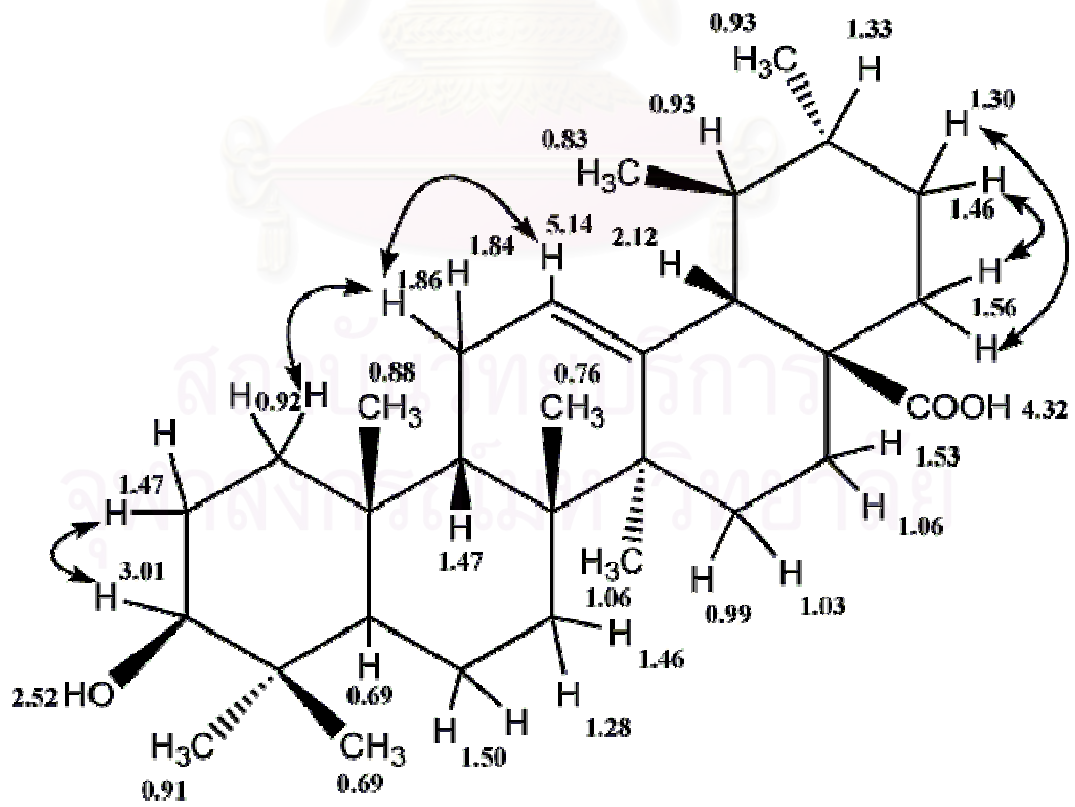
รูปที่ 4.14 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 2



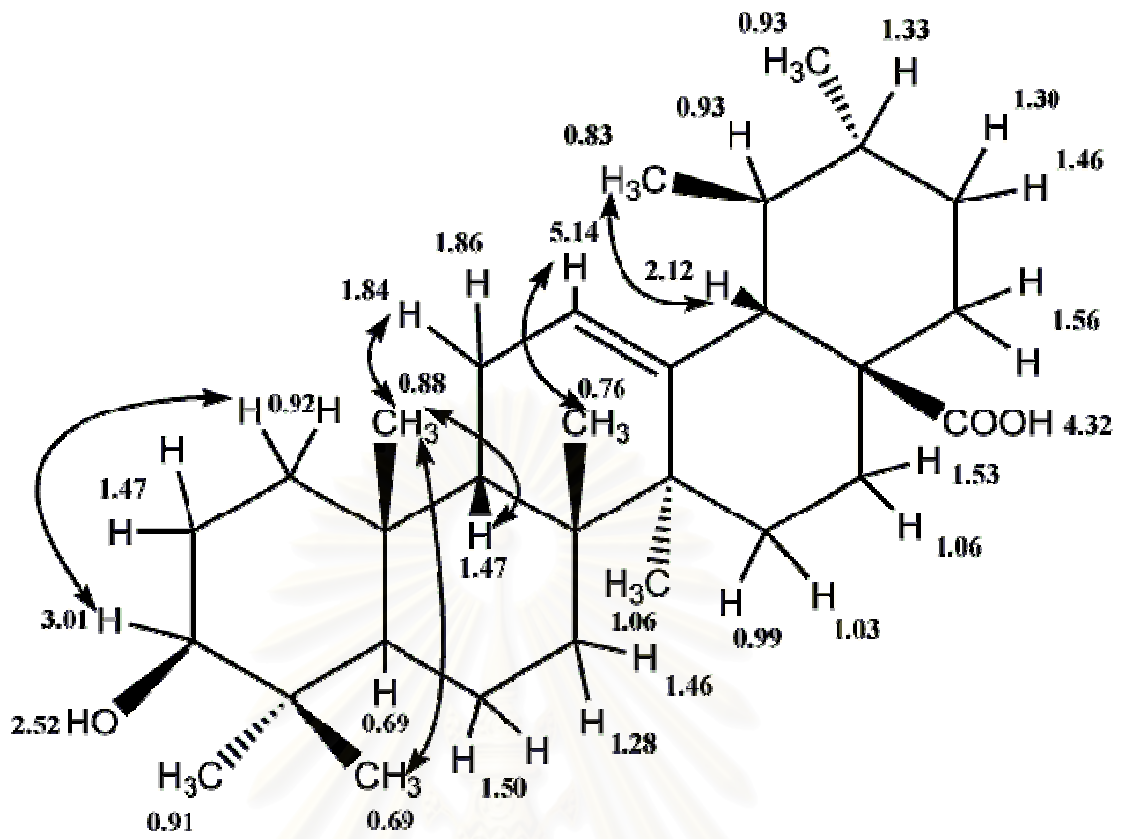
รูปที่ 4.15 คาร์บอนเคมีคัลซิฟท์ของสารบริสุทธิ์ 2



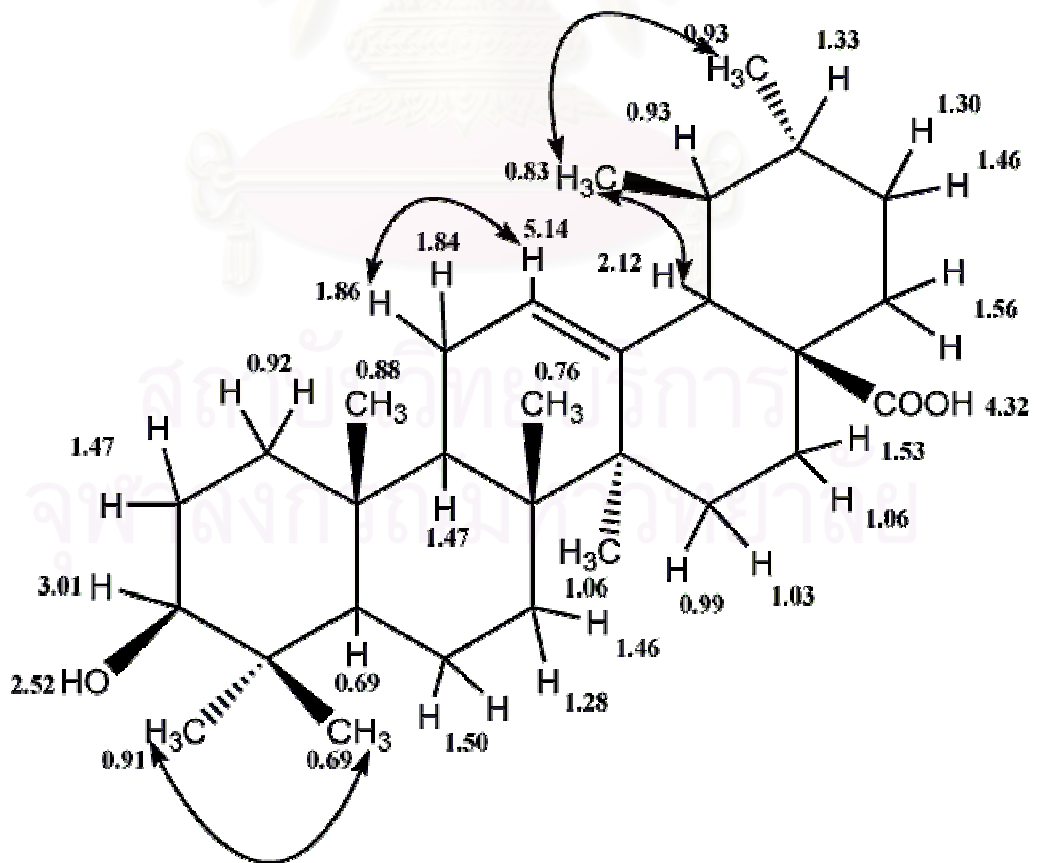
รูปที่ 4.16 HMBC ของสารบริสุทธิ์ 2



รูปที่ 4.17 COSY ของสารบริสุทธิ์ 2



รูปที่ 4.18 NOESY ของสารบริสุทธิ์ 2



รูปที่ 4.19 TOCSY ของสารบริสุทธิ์ 2

Ursolic acid เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถพบได้ในพืชบางชนิด มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารดังกล่าว โดยสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิดดังตารางที่ 4.15 นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบปริมาณของ ursolic acid ที่พืชผลิตได้ กับงานวิจัยชิ้นนี้ จะเห็นได้ว่าราเอนโดไฟต์ P03 สามารถผลิต ursolic acid ได้ในปริมาณมาก

ตารางที่ 4.15 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ Ursolic acid ที่พบในพืชชนิดต่างๆ

ผู้วิจัย	งานวิจัย	ปริมาณที่ได้ (มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง)
Collins และคณะ (1987)	สกัดและแยก Ursolic acid จากใบ <i>Rosmarinus officinalis</i> และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>Staphylococcus aureus</i> และ <i>Escherichai coli</i> โดยมีค่า MIC เท่ากับ 18.1 และ 20.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ	-
Hamzah และคณะ (1998)	สกัดและแยก Ursolic acid จากต้น <i>Hedyotis herbacea</i> ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี	0.07
Kashiwada และคณะ (2000)	สกัดและแยก Ursolic acid จากต้น <i>Potentilla glandulosa</i> และทดสอบความสามารถในการยับยั้งไวรัส HIV และเซลล์ที่ติดไวรัส (H-9) โดยมีค่า EC_{50} และ IC_{50} เท่ากับ 4.4 และ 14.3 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ	-
Tapondjou และคณะ (2002)	สกัดและแยก Ursolic acid จากต้น <i>Mitragyna stipulosa</i> และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60 และ U-937), เซลล์มะเร็งปอด (A-549 และ 3LL) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.5, 31.8, 42.6 และ 31.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ	0.107
Liu และคณะ (2004)	สกัดและแยก Ursolic acid จากต้น <i>Engelhardtia serrata</i> และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (K-562) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ	0.003
งานวิจัยนี้	สกัดและแยก Ursolic acid (สารบริสุทธิ์ 4) จากราเอนโดไฟต์ P03 (<i>Glomerella cingulata</i>) ที่แยกได้จากใบกระท่อม (<i>Mitragyna speciosa</i> Korth.)	5.124

4.5.3 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของของผสม 1

ของเหลวสีเหลืองใส ลักษณะคล้ายน้ำมัน ปริมาณ 1.25 กรัม (ของผสม 1) ที่ได้จาก ส่วน ME2 แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้เฮกเซน : เอทิลเอซิเตต ในอัตราส่วน 98:2 เป็นตัวชะ เมื่อนำไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography: TLC) โดยใช้ เฮกเซน : เอทิลเอซิเตต ในอัตราส่วน 95 : 5 เป็นตัวชะ แล้วช้อมด้วย vanillin และทำให้แห้ง พบว่ามีจุดเดียว ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.85 ของผสม 1 ที่ได้ละลายได้ดีในเฮกเซนและเอทิลเอซิเตต

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีได้ผลดังรูปที่ ค20 ในภาคผนวก ก. พบมีการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 2927 (s), 2856 (s), 1739 (s), 1462 (m), 1363 (m), 1167 (s) และ 1091(m) cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของของผสม 1

เลขคลื่น (cm^{-1})	ความเข้ม	ลักษณะ
2927, 2856	สูง	C-H stretching vibration of $-\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2$
1739	สูง	C=O stretching vibration of double bond
1423, 1363	ปานกลาง	C-H bending vibration of CH_3 and CH_2
1167	สูง	C-O stretching vibration
1091	ปานกลาง	C-O stretching vibration

จากโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^1\text{H-NMR}$ spectrum) ของของผสม 1 แสดงในรูปที่ ค21 ภาคผนวก ก. พบตำแหน่งของโปรตอนที่ 5.39 (s), 4.16 (d, $J = 6.8$), 2.81 (s), 2.33 (s), 2.08 (s), 1.65 (s), 1.30 (s) และ 0.92 (s) ppm

จากคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^{13}\text{C-NMR}$ spectrum) ของของผสม 1 แสดงในรูปที่ ค22 ภาคผนวก ก. พบตำแหน่ง 173.89, 130.17, 130.02, 129.97, 129.74, 128.03, 127.91, 68.88, 62.08, 60.15, 34.37, 34.19, 34.04, 31.95, 31.54, 29.79, 29.73, 29.69, 29.60, 29.56, 29.50, 29.40, 29.37, 29.30, 29.19, 29.13, 27.21, 25.63, 24.92, 24.87, 22.72, 22.59, 14.25, 14.13 และ 14.08 ppm

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 173.89 ppm แสดงถึงคาร์บอนของหมู่คาร์บอกซิล

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 130.17, 130.02, 129.97, 129.74, 128.03 และ 127.91 ppm แสดงถึงคาร์บอนที่มีพันธะคู่

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 68.88, 62.08, 60.15, 34.37, 34.19, 34.04, 31.95, 31.54, 29.79, 29.73, 29.69, 29.60, 29.56, 29.50, 29.40, 29.37, 29.30, 29.19, 29.13, 27.21, 25.63, 24.92, 24.87, 22.72, 22.59, 14.25, 14.13 และ 14.08 ppm แสดงถึงเมทิลลีนและเมทิลคาร์บอน

จากผลทางสเปกโทสโกปีพบว่าของผสม 1 คือ น้ำมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันหลายชนิด จึงนำมาวิเคราะห์กรดไขมันชนิดต่างๆในน้ำมัน ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ได้ผลดังรูปที่ ค23 ในภาคผนวก ค. เปรียบเทียบกับเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาปริมาณกรดไขมันที่ได้จากพื้นที่ใต้กราฟ ปริมาณกรดไขมันชนิดต่างๆ พบว่ากรดไขมันชนิดอิ่มตัวที่พบมากที่สุด ในของผสม 1 คือ palmitic acid และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่พบมากที่สุดคือ oleic acid แสดงดังตารางที่ 4.17 และ 4.18

ตารางที่ 4.17 ปริมาณกรดไขมันชนิดต่างๆในน้ำมัน (ของผสม 1)

ชนิดกรดไขมัน	ปริมาณกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)/น้ำหนักเส้นใยแห้ง (กรัม)
C14:0	1.76	0.18
C16:0	58.96	6.05
C18:0	27.13	2.78
C18:1	7.10	0.73
C18:3	1.25	0.13

ตารางที่ 4.18 โครงสร้างและชื่อทางเคมีของกรดไขมันชนิดต่างๆที่พบในของผสม 1

ชื่อทางเคมี	ชื่อทั่วไป	สัญลักษณ์	โครงสร้างทางเคมี
กรดไขมันชนิดอิ่มตัว			
Tetradecanoic acid	Myristic acid	C14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Hexadecanoic acid	Palmitic acid	C16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Octadecanoic acid	Stearic acid	C18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว			
9-Octadecanoic acid	Oleic acid	C18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
9,12,15-octadecadienoic acid	α -linolenic acid	C18:3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7[\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)]_3\text{COOH}$

4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.6.1 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์

ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์ ด้วยวิธี micro dilution (Wood and Washington, 1995) โดยทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ 5 ชนิด แบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดคือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และเชื้อยีสต์ *Candida albican* ATCC 10231 หาค่า MIC (minimal inhibitory concentration) โดยวัดจากค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้งหมด แสดงในตารางที่ 4.19 ความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ที่ให้อยู่ในช่วง 0.48 – 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.19 MIC ของสารบริสุทธิ์ที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

สาร	MIC ของสารบริสุทธิ์ที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ [$\mu\text{g/ml}$ (μM)]				
	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		เชื้อยีสต์
	<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
สารบริสุทธิ์ 1	15.6 (36.4)	15.6 (36.4)	15.6 (36.4)	15.6 (36.4)	61.25 (143.1)
สารบริสุทธิ์ 2	125 (274.1)	125 (274.1)	250 (548.2)	125 (274.1)	125 (274.1)
Penicillin G	15.6 (43.8)	15.6 (43.8)	-	-	-
Streptomycin	-	-	1.95 (1.3)	7.81 (5.4)	-
Ketoconazole	-	-	-	-	125 (235.2)

จากตารางที่ 4.19 จะเห็นได้ว่า สารบริสุทธิ์ 1 (ergosterol peroxide) และสารบริสุทธิ์ 2 (ursolic acid) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ตลอดจนเชื้อยีสต์ โดยที่สารบริสุทธิ์ 1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีกว่า สารบริสุทธิ์ 2 และยังมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีเทียบเท่ากับ penicillin G และยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ดีกว่า Ketoconazole

4.6.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์

นำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2), เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW 620), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) ในหลอดทดลองด้วยวิธี colorimetric ได้ผลดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.20 ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากราเอนโดไฟด์

สาร	IC ₅₀ [µg/ml (µM)]				
	HEP-G2	CHAGO	SW 620	KATO-3	BT474
สารบริสุทธิ์ 1	5.0 (11.7)	6.3 (14.7)	5.2 (12.1)	5.8 (13.6)	8.5 (19.2)
สารบริสุทธิ์ 2	5.4 (11.8)	5.6 (12.3)	0.8 (1.7)	0.5 (1.1)	0.7 (1.5)
Doxorubicin	0.7 (1.2)	0.7 (1.2)	0.09 (0.2)	> 10 (17.2)	> 10 (17.2)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ พบว่าสารบริสุทธิ์ 1 (ergosterol peroxide) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบได้ทุกชนิด โดยมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 11 – 19 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับ Doxorubicin พบว่าสารบริสุทธิ์ 1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) ได้ดีกว่า และเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (SNU-354), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (SNU-1) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SNU-C4) ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 5.1, 2.8 และ 9.3 ไมโครโมลาร์ (Nam และคณะ, 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งอื่นๆ ดังตารางที่ 4.10 (หน้า 55)

สำหรับสารบริสุทธิ์ 2 (ursolic acid) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบได้ทุกชนิด โดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW 620), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) ได้ดีโดยมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 1.1 – 1.7 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับ Doxorubicin พบว่า สารบริสุทธิ์ 2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) ได้ดีกว่า และเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด (A549, K562 และ 3LL) ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 93.4, 27.4 และ 68.6 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Tapondjou และคณะ, 2002) และฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT15) ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 30.0 ไมโครโมลาร์ (Li และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งอื่นๆ ดังตารางที่ 4.15 (หน้า 66)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโคไฟต์ที่แยกจากใบกระท่อม สามารถแยกราเอนโคไฟต์ได้ทั้งหมด 39 ชนิด ในจำนวนนี้มีราเอนโคไฟต์ 4 ชนิดที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยราเอนโคไฟต์ ไอโซเลต P03 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร sabouraud dextrose สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด

เมื่อนำราเอนโคไฟต์ไอโซเลต P03 มาจำแนกสายพันธุ์ด้วยการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอนุวิทยาพบว่า ราเอนโคไฟต์ ไอโซเลต P03 คือ *Glomerella cingulata*

เมื่อทำการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยนำราเอนโคไฟต์ ไอโซเลต P03 มาเลี้ยงในอาหารเหลว sabouraud dextrose ทำการแยกสารบริสุทธิ์จากน้ำหมักและเส้นใยของราด้วยวิธี โครมาโตกราฟีและการตกผลึก และหาสูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวโดยอาศัยสมบัติทางกายภาพและเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี พบว่า เมื่อแยกส่วนสกัดเอทิลเอซิเตดจากเส้นใยได้ของผสม 1 ชนิดคือน้ำมัน และสารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ ergosterol peroxide (สารบริสุทธิ์ 1) และเมื่อแยกส่วนสกัดเมทานอลจากเส้นใย ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ ursolic acid (สารบริสุทธิ์ 2)

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งคน 5 ชนิด พบว่าสารบริสุทธิ์ 1 มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albican* ATCC 10231 ด้วยค่า MIC เท่ากับ 15.6 (36.4), 15.6 (36.4), 15.6 (36.4), 15.6 (36.4) และ 61.25 (143.1) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2), เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 5.0 (11.7), 6.3 (14.7), 5.2 (12.1), 5.8 (13.6) และ 8.5 (19.2) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ สำหรับสารบริสุทธิ์ 2 มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC และ *Candida albican* ATCC 10231 27853 ด้วยค่า MIC เท่ากับ 125 (274.1), 125 (274.1), 250 (548.2), 125 (274.1) และ 125 (274.1) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2), เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) โดยมีค่า IC₅₀

เท่ากับ 5.4 (11.8), 5.6 (12.3), 0.8 (1.7), 0.5 (1.1) และ 0.7 (1.5) ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครโมลาร์) ตามลำดับจากผลการทดลองจะเห็นว่าสารบริสุทธี 1 (ergosterol peroxide) และสารบริสุทธี 2 (ursolic acid) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ตลอดจนเชื้อยีสต์ โดยที่สารบริสุทธี 1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีกว่า สารบริสุทธี 2 และยังมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้เทียบเท่ากับ penicillin G และยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ดีกว่า Ketoconazole

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ พบว่าสารบริสุทธี 1 (ergosterol peroxide) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบได้ทุกชนิด โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 11 – 19 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับ Doxorubicin พบว่าสารบริสุทธี 1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) ได้ดีกว่า สำหรับสารบริสุทธี 2 (ursolic acid) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบได้ทุกชนิด โดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW 620), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 1.1 – 1.7 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับ Doxorubicin พบว่า สารบริสุทธี 2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) ได้ดีกว่า

ergosterol เป็นสารที่ราหลายชนิดสามารถสร้างได้ แต่ ergosterol peroxide เป็นสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่พบในราบางชนิดเท่านั้น ในขณะที่ ursolic acid เป็นสารที่สามารถพบได้ในพืชบางชนิดและสามารถพบในต้นกระท่อมได้แต่ในปริมาณที่น้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณที่ราแอนโดไฟต์ P03 ผลิตได้จากงานวิจัยชิ้นนี้จะเห็นได้ว่า ergosterol peroxide และ ursolic acid ที่ราแอนโดไฟต์ P03 ผลิตได้ นอกจากจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพแล้ว ยังมีปริมาณมากเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กฤต เพชรสุวรรณ, วินัส สุวรรณนันต์ และ ศวรี ดันติกุล. 2543. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราของเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรไทย โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ สาขาวิจัยและพัฒนาเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิวัติ แก้วประดับ. 2533 แอลคาลอยด์จากใบสดของต้นกระท่อม วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชเวท บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พิมพ์กมล นวลศรีฉาย. 2544. การคัดกรองสารยับยั้งจุลินทรีย์จากราเอนโดไฟท์ โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิเชียร ลีลาสง่าลักษณ์. 2539. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของมิตราคัยนีน วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2514. ไม้เทศเมืองไทย เกษมบรรณกิจ, กรุงเทพฯ หน้า 22-24.

ภาษาอังกฤษ

- Abou-Zaid, M., Dumas, M., Chauret, D., Watson, A., and Thompson, D. 1997. C-methyl flavonols from the fungus *Colletotrichum Dematium* f. sp. *Epilobii*. Phytochemistry. 45(5): 957 – 961.
- Bok, J. W., Lerner, L., Chinton, J., Hans, G. K., and Tower, G. H. 1999. Antitumor sterols from the mycelia of *Codyceps sinensis*. Phytochemistry. 51: 591-598.
- Blodett, J. T., Swart, W. J., Louw, S. M., and Weeks, W. J. 2000. Species composition of endophytic fungi in *Amaranthus hybridus* leaves, petioles, stems, 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. J. Nat. Prod. 63: 1447-1448.
- Burwood, R., and Spencer, D. M. 1970. Metabolism by phytopathogenic fungi: the degradation of hydroxybenzoic acid by *Glomerella cingulata*. Phytochemistry. 9: 333-335.
- Cantrell, T., Rajab, M. S., Franzblau, S. G., Fronczek, F. R., and Fischer, N. H. 1999. Antimycobacterial ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*. Planta Medica. 65: 732 – 734.

- 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 assay. Cancer Res. 47: 5875 - 5879.
- Collins, M. A., and Charles, H. P. 1987. Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. Food Microbiology. 4: 311 – 315.
- 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.
- Gardes, M., and Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2: 113-118.
- Gomaa, K., Kraus, J., Rokopf, F., Roper, H., and Franz, G. 1992. Antitumour and immunological activity of a β 1 \rightarrow 3/1 \rightarrow 6 glucan from *Glomerella cingulata*. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 118: 136 – 140.
- Grewel, W. S. 1932. Observation on the pharmacology of mitragyna, in pharmacology of mitragynine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 46:273-275.
- Guo, B., Dai, J., Ng, S., Huang, Y., Leong, C., Ong, W., and Carte, B. K. 2000. Cytotoxic acid A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora* species. J. Nat. Prod. 63: 602-604.
- Hamzah, A. S., and Lajis, N. H. 1998. Chemical constituents of *Hedyotis herbacea*. ARBEC. 2: 1-6.
- Harper, J. K., Arif, A. M., Ford, E. J., Strobel, 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.
- 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.
- Ju, Y., Sacalis, J. N., and Still, C. C. 1998. Bioactive Flavonoids from Endophyte-Infected Blue Grass (*Poa ampla*). J. Agric. Food Chem. 46(9): 3785-3788.
- Kahlos, K., Kangas, L., Hiltunen, R. 1989. Ergosterol peroxide, an active compound from *Inonotus radiatus*. Planta Medica. 55: 389-390.

- Kanchanaprayudh, J., Zhou, Z., Yomyart, S., Sihanonth, P., and Hogetsu, T. 2003. Molecular phylogeny of ectomycorrhizal *Pisolithus* fungi associated with pine, diterocarp, and eucalyptus trees in Thailand. Mycoscience. 44: 287-294.
- Kashiwada, Y., Nagao, P., Hashimoto, A., Ikeshiro, Y., Okabe, H., Cosentino, L. M., and Lee, K. H. 2000. Anti-AIDS agents 38. Anti-HIV activity of 3-*O*-acyl ursolic acid derivatives. J. Nat. Prod. 63: 1619 – 1622.
- Kim, S., Shin, D., Lee, T., and Oh, K. 2004. Periconicins, Two New Fusicoccane Diterpenes Produced by an Endophytic Fungus *Periconia* sp. with Antibacterial Activity. J. Nat. Prod. 67: 448-450.
- Krohn, K., Florke, 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.
- Kumara, S. S. Cheungb., H. Y. Lauc, C. S. Chend, F., and Hydea K. D. 2004 In vitro studies of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii* with anti-proliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells Journal of Ethnopharmacology 94: 295–300.
- Lee, J., Lobkovsky, E., Pliam N. B., Strobel G. A., Clardy, J. 1995. Subglutinols A and B: Immunosuppressive Compounds from the Endophytic Fungus *Fusarium subglutinans*. J. Org. Chem. 60: 7076-7077
- Lee, J., Strobel G. A., Lobkovsky, E., Clady, J. C. 1996. Torreyanic Acid: A Selectively Cytotoxic Quinone Dimer from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis microspora* J. Org. Chem 61:3232-3233.
- Li, J. Y., Strobel, G. A., Harper, J. K., Lobkovsky, E., and Clardy, J. 2000. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf quercina*. Org. Lett. 2: 767-770.
- Li, J. Y., Harper, J. K., Grant, D. M., Tombe, B. O., Bashyal, B., Hess, W. M., and Strobel, G. A. 2001. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monocheatia* sp. Phytochemistry 56: 463-468.
- Li, J., Guo, W., Yang Q. 2002. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. World J. Gastroenterol. 8(3): 493-495.

- Liu, C. H., Zou, W. X., Lu, H., and Tan, R. X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. J. Biotech. 88: 277-282.
- Liu, H., Wang, S., Cia, B., and Yao, X. 2004. Anticancer activity of compounds isolated from *Engelhardtia serrata* stem bark. Pharmaceutical Biology. 42 (7): 475 – 477.
- Liu, J. Y., Song, Y. C., Zhang, Z., Wang, L., Guo, Z. J., Zou, W. X., and Tan, R. X. 2004 *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. J. Biotech. 114: 279-287.
- Lu, H., Zou, W. X., Meng, J. C., Hu, J., and Tan, R.X. 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum sp.*, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. Plant Sci. 151: 67-73.
- Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E. H. C., and Hyde, K. D. 2002. Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seedling species from Doi Suthep-Pui national park, Thailand. Can. J. Microbiol. 48: 1109 – 1112.
- McBrien, K. D., Gao, Q., Huang, S., Klohr, S. E., Wang, R. R., Pirnik, D. M., Neddermann, K. M., Bursuker, I., Kadow, K. F., and Leet, J. E. 1996. Fusaricide, a New Cytotoxic *N*-Hydroxypyridone from *Fusarium sp.* J. Nat. Prod. 59: 1151-1153.
- Macko, E., Weisbach, J. A., and Douglas, B. 1972. Some observations on the pharmacology of mitragynine. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 198(1): 145-61.
- Marcan, A. 1934. Report of the Government Laboratory of Siam: Physiological action of Kratom. Analyst. 59: 753-754.
- Metz, A. M., Haddad, A., Worapong, J., Long, D. M., Ford, E. J., Hess, W. M., and Strobel G. A. 2000. Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. Microbiology 146: 2079 - 2089.
- Munday-Finch, S. C., Wilkins, A. L., and Miles, C. O. 1998. Isolation of Lolicine A, Lolicine B, Lolitriol and Lolitrem N from *Lolium perenne* infected with *Neotyphodium lolii* and evidence for the natural occurrence of 31-Epilolitremin N and 31-Epilolitremin F. J. Agric. Food Chem. 46: 590 - 598.
- Nam, K. S., Jo, Y. S., Kim, Y. H., Hyun, J. W., and Kim, H. W. 2001. Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. Life Science. 69: 229 – 237.
- Popay, A. J., Townsend, R. J., and Fletcher, L.R. 2003. The effect of endophyte (*Neotyphodium Uncinatum*) in meadow fescue on grass grub larvae. Pasture. 123 – 128.

- Reher, G., and Budesinsky, M. 1992. Triterpenoids from plants of the Sanguisorbeae. Phytochemistry. 31(11): 3909 – 3914.
- Schwarz, M., Barbel, K., Roland, W. S., Weber, Sterner, O., and Heidrun, A. 2004. 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi Phytochemistry 65: 2239–2245.
- Shrestha, K., Strobel, G. A., Prakash, S., and Gewali, M. 2001. Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of Himalayan yew of Nepal. Planta Med. 67: 374 –376.
- Singh, S. B., Jayasuriya, H., Dewey, R., Polishook, J. D., Dombrowski, A. W., Zink, D. L., Guan, Z., Collado, J., Platas, G., Pelaez, F., Felock, P. J., and Hazuda, D. J. 2003. Isolation, structure, and HIV-1-integrase inhibitory activity of structurally diverse fungal metabolites. J Ind Microbiol Biotechnol 30(12): 721-31.
- Stierle, A. and Strobel, G. 1995. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific Yew, *Taxus brevifolia*. J.Nat Prod. 58(9):1315-1324.
- Stierle, A. A., Strierle D. B., Bugni T. 1999. Sequiatones A and B m: Novel Antitumor Metabolites Isolated from a redwood endophyte. J. Org Chem. 64: 5479-5484.
- Stinson, M., Ezra, D., and Strobel, G. A. 2003. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. Plant Sci. 165: 913-922.
- Strobel, G. A., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R. S., and Hess, W. M.1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. Microbiology 142: 435-440.
- Strobel, G. A., and Hess, W. M. 1997. Glucosylation of the peptide leucinostatin A, produced by an endophytic fungus of European yew, may protect the host from leucinostatin toxicity. Chem. Biol. 4(7): 529-36.
- 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.
- Takei, T., Yoshida, M., Ohnishi-kameyama, M., and Kobori, M. 2005. Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from *Sarcodon asparatus* (Berk.) S.ito. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 212 – 215.

- Tapondjou, L. A., Sondengam, B. L., Choudhary, M. L., Park, H. J., Choi, J., and Lee, K. T. 2002. Structure-activity relationship of triterpenoids isolated from *Mitragyna stipulosa* on cytotoxicity. Arch. Pharm. Res. 25 (3):270 – 274.
- Tsuchiya, S., Miyashita, S., Yamamoto, M., Horie, S., Sakai, S., Aimi, N., Takayama, H. and Watanabe, K. 2002. Effect of mitragynine, derived from Thai folk medicine, on gastric acid secretion through opioid receptor in anesthetized rats. European J. Pharmacol. 443: 185-188.
- Wagenaar, M., Corwin, J., Strobel, G. A., and Clardy, J. 2000. Three new chytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinocladiella*. J. Nat. Prod. 63: 1692-1695.
- Wagenaar, M. M. and Clardy, J. 2001. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an Endangered Mint. J.Nat.Prod. 64: 1006-1009.
- Walker, J. R. L. 1968. Studies on the phenol oxidase of the phytopathogenic fungus *Glomerella cingulata*: inhibition by quaternary ammonium compounds. Phytochemistry. 7: 1231 – 1240.
- 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 Microbiol. Lett. 193: 249-253.
- Wang, J., Huang, Y., Fang, M., Zhang, Y., Zheng, Z., Zhao, Y., 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.
- Watanabe, K., Yano, S., Horie, S. and Yamamoto, L.T., 1997. Inhibitory effect of mitragynine, an alkaloid with analgesic effect from Thai medicinal plant *Mitragyna speciosa*, on electrically stimulated contraction of isolated guinea-pig ileum through the opioid receptor. Life Sci. 60: 933-942.
- Weber, D., Sterner, O., Anke, T., Gorzalczancy, S., Martino, V., and Acevedo, C. 2004. Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. J. Antibiot. 57(9): 559-563.

- White, J.F., Jr., and Morgan-Jones, G. 1996. Morphological and physiological adaptations of Balansieae and trend in the evolution of grass endophytes. In S.C. Redin, and L.M. Carris (eds.), *Endophytic fungi in grasses and Woody plants* 2nd ed., pp.133-154. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society.
- Yamamoto, L. T., Horie, S., Takayama, H., Aimi, N., Sakai, S., Yano, S., Shan, J., Pang, P. K., Ponglux, D., and Watanabe, K. 1999. Opioid receptor agonistic characteristics of mitragynine pseudoindoxyl in comparison with mitragynine derived from Thai medicinal plant *Mitragyna speciosa*. Gen Pharmacol 33(1): 73-81.
- Young, H., and Patterson, V. J. 1982. A UV protective compound from *Glomerella cingulata*: a mycosporine. Phytochemistry 21(5): 1075 – 1077.
- Zhou, Z.; Miwa, M.; and Hogestsu, T. 1999. Analysis of genetics structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of Inter simple sequence repeat (ISSR). New Phytol 144: 55-63.
- Zou, W. X., Meng, J. C., Lu, H., Chen, G. X., Shi, G. X., Zhang, T. Y., and Tan, R. X. 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. J. Nat. Prod. 63: 1529-1530.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1. Malt czapek agar (MCzA)

Czapek stock solution A	50.0	มิลลิลิตร
Czapek stock solution B	50.0	มิลลิลิตร
Malt extracts	40	กรัม
Sucrose	30	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Czapek stock solution A

NaNO ₃	4.0	กรัม
KCl	1.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10.0	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Czapek stock solution B

K ₂ HPO ₄	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Malt extract agar (MEA)

Malt extracts	20.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

3. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

4. Sabouraud's dextrose agar (SDA)

Dextrose	40.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

5. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่งปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ต้มมันฝรั่งปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ 200 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองและปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เติม dextrose และ agar จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Yeast extract sucrose agar (YES)

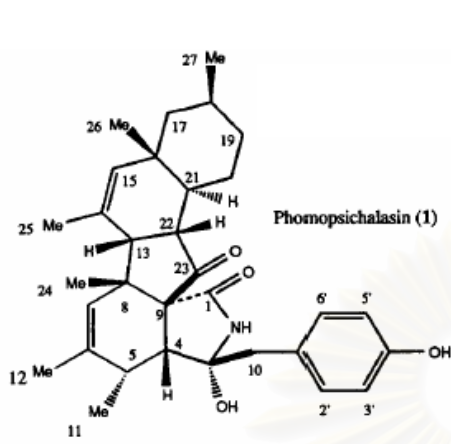
Yeast extracts	20.0	กรัม
Sucrose	150.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

7. Yeast-malt extract medium (YMA)

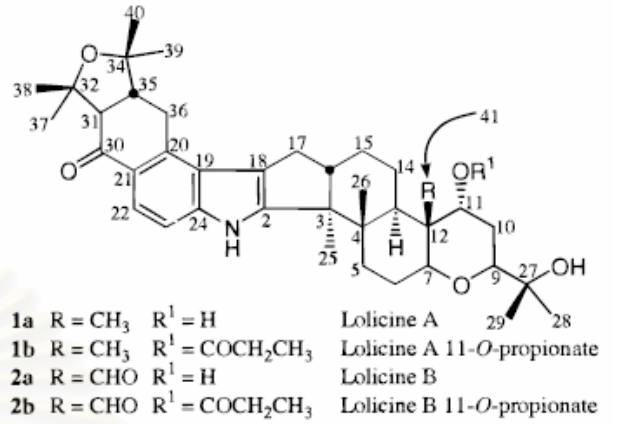
Yeast extracts	3.0	กรัม
Malt extracts	3.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

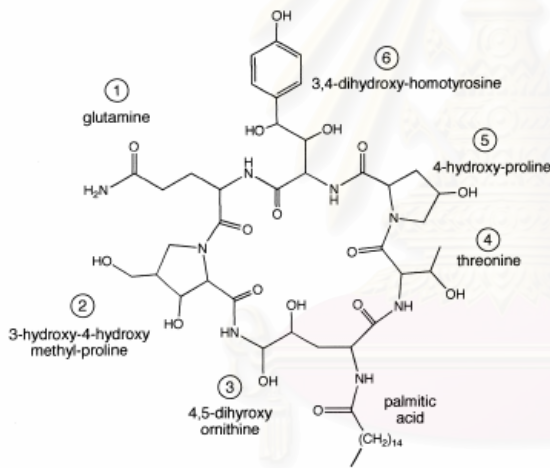
โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกจากราเอนโดไฟต์



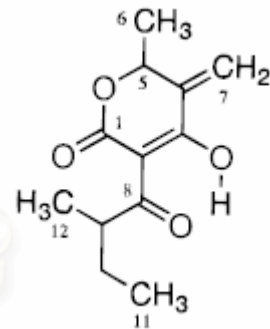
Phomopsichalasin



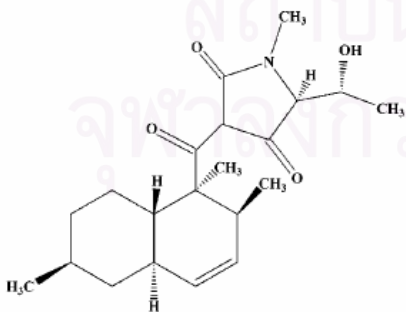
Lolicine A และ B



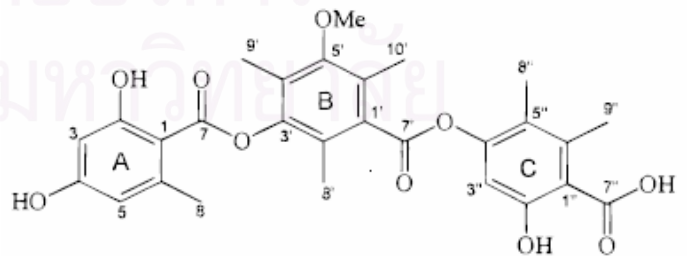
Cryptocandin



CR377

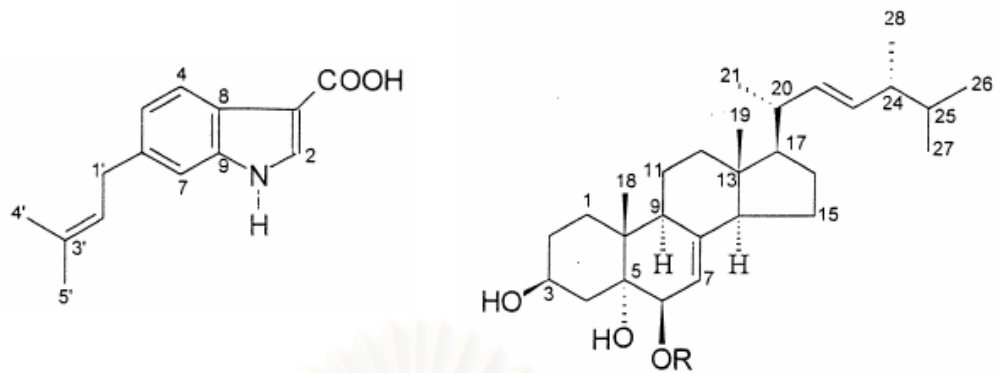


Cryptocin



Colletotric acid

รูป ข1 โครงสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ

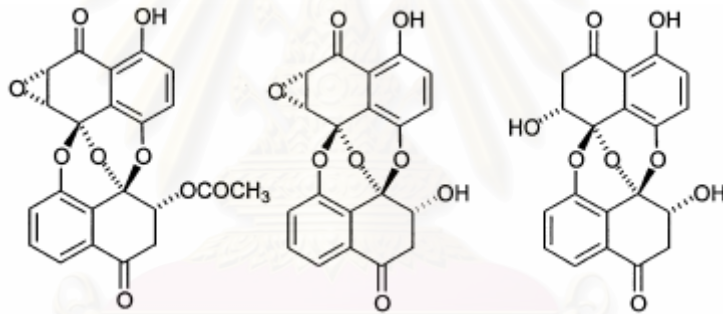


Isoprenylindole- 3-carboxylic acid

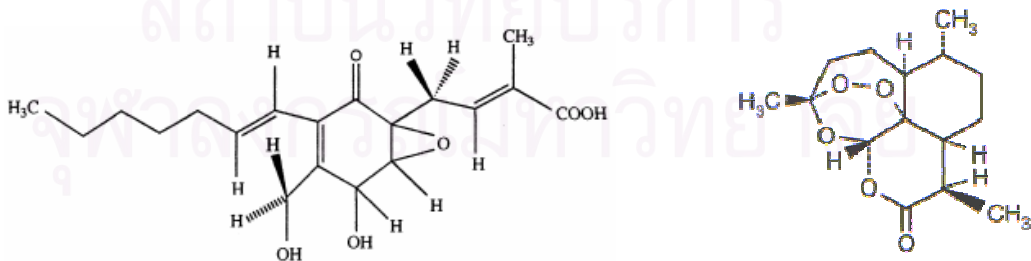
- 2 R = COCH₃
- 3 R = COCH₂C₆H₅

2 = 3 β , 5 α -Dihydroxy- 6b-acetoxy-ergosta- 7, 22-diene

3 = 3 β , 5 α -Dihydroxy- 6b-phenylacetyloxyergosta-7, 22-diene



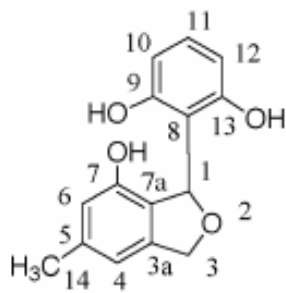
Preussomerins J, K และ L ตามลำดับ (จากซ้ายไปขวา)



Amburic acid

Artemisinin

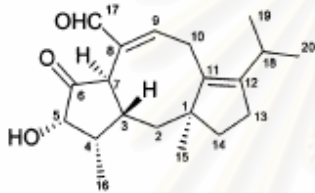
รูป ข1 โครงสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของราเอนโคไฟต์ชนิดต่างๆ (ต่อ)



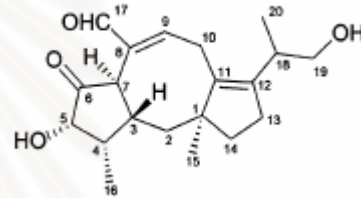
Pestacin



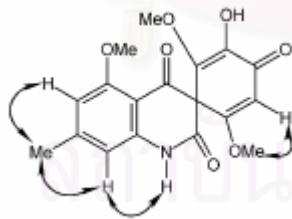
1,3,5,7 cyclooctatetraene



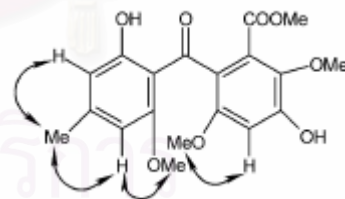
Periconicins A



Periconicins B

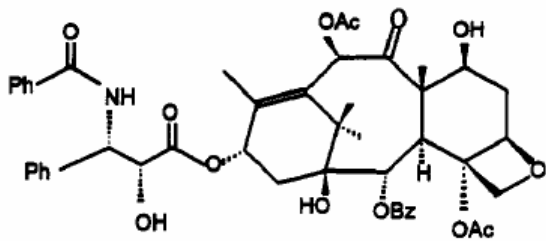


Asperfumoid

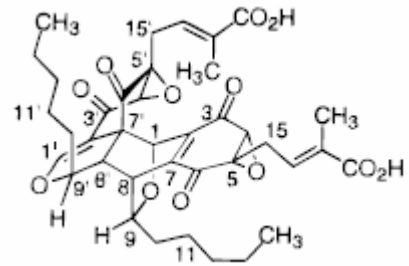


Asperfumin

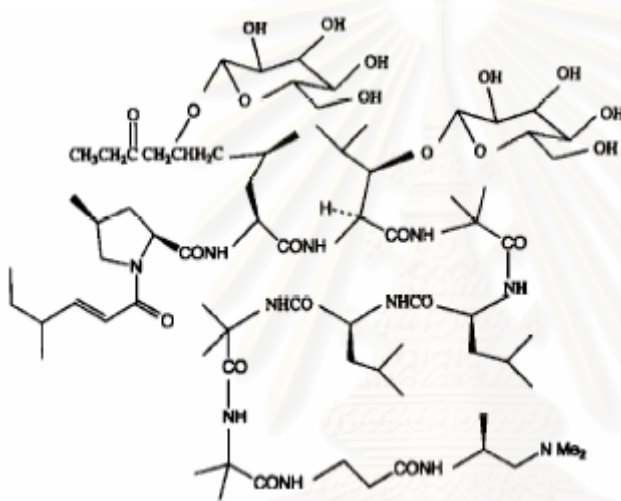
รูป ข1 โครงสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ (ต่อ)



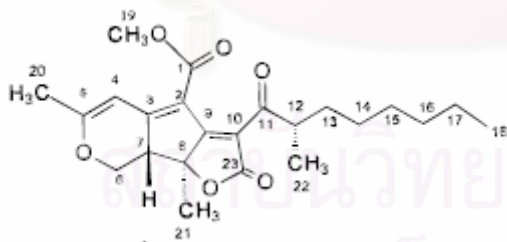
Taxol



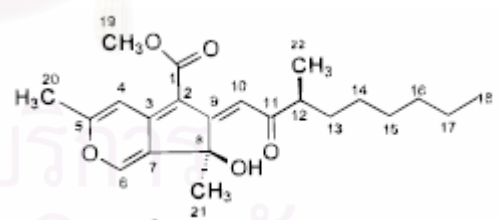
Torreyanic acid



Leucino statin

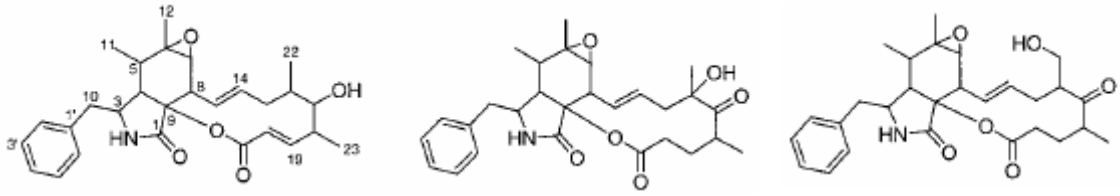


Sequoiatone A

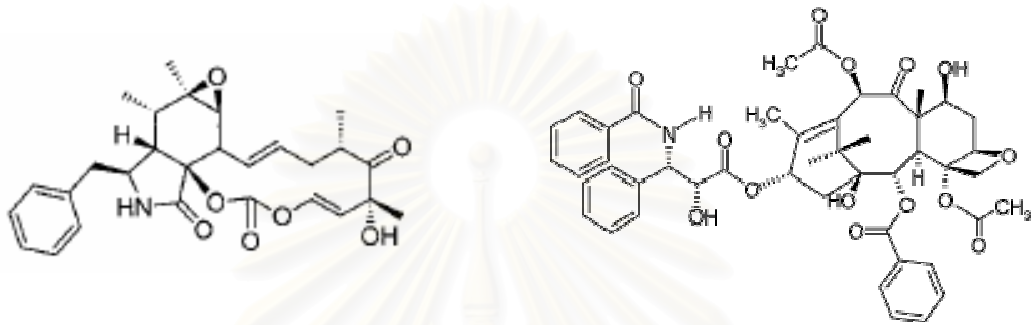


Sequoiatone B

รูป ข2 โครงสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ของราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ

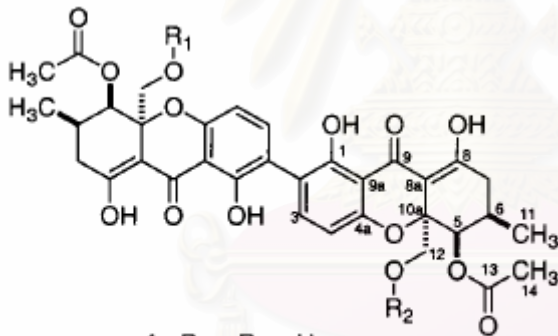


Cytochalasin ชนิดใหม่ 3 ชนิด



Cytochalasin E

Paclitaxel

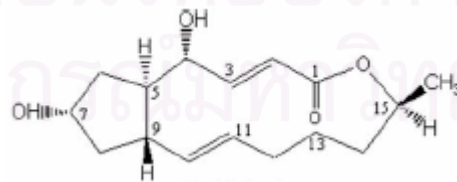


1 = Dicerandrols A

2 = Dicerandrols B

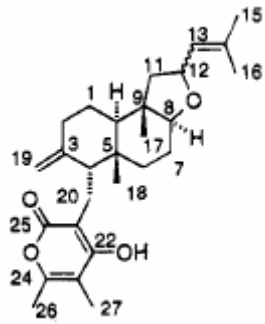
3 = Dicerandrols C

1 : $R_1 = R_2 = H$
 2 : $R_1 = Ac$ $R_2 = H$
 3 : $R_1 = R_2 = Ac$

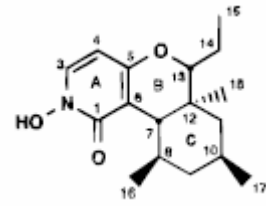


Brefeldin A

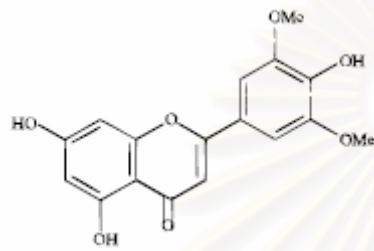
รูป ข2 โครงสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ของราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ (ต่อ)



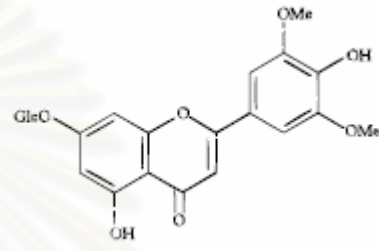
Subglutinol



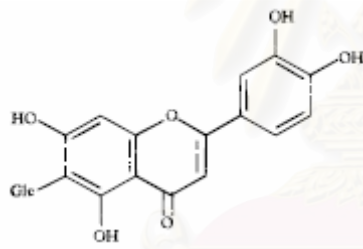
Fusaric acid



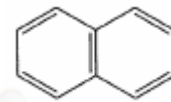
Tricin



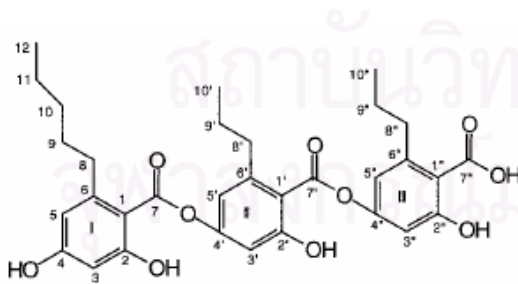
7-O-(β -D-glucopyranosyl)tricin



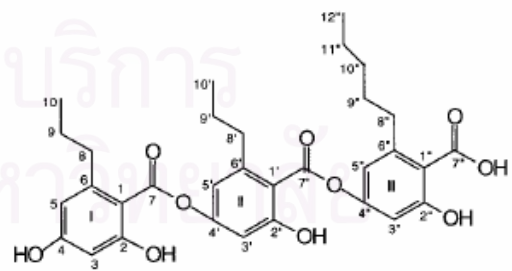
Isoorientin



Naphthalene

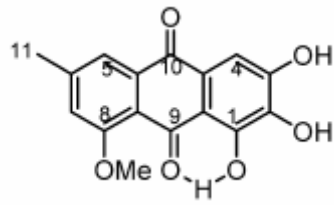


Cytonic Acid A

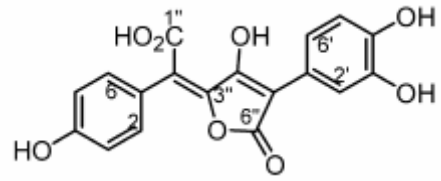


Cytonic Acid B

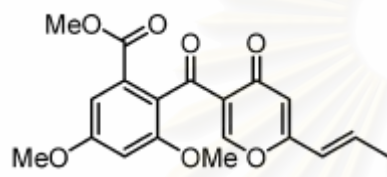
รูป ข3 โครงสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ของราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ



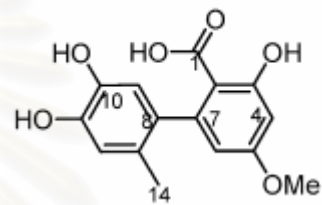
8-O-methylanthro gallol



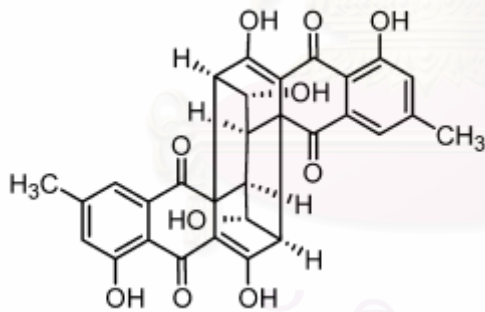
Xerocomic acid



Deoxyfunicone



Altenusin

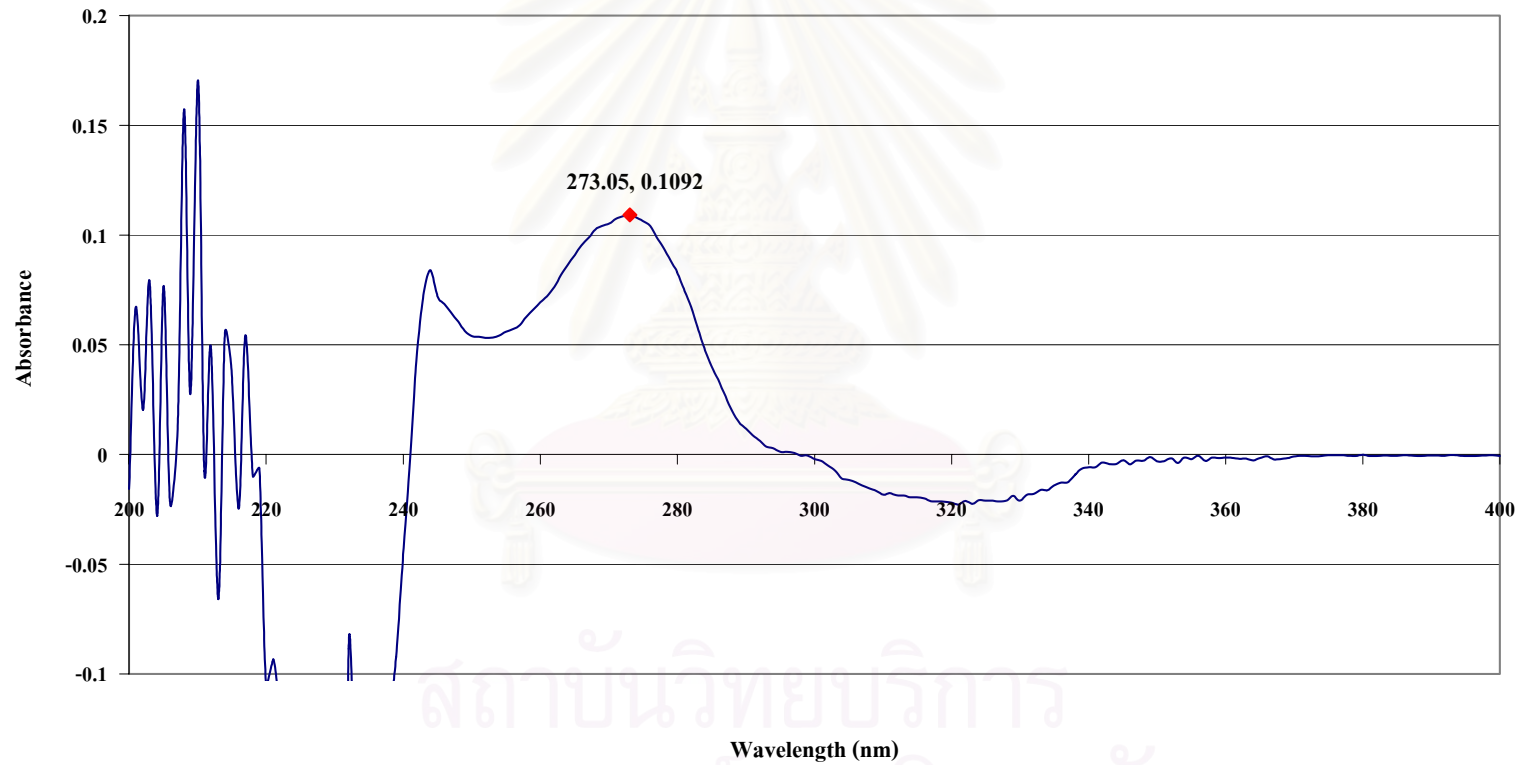


Rugulosin

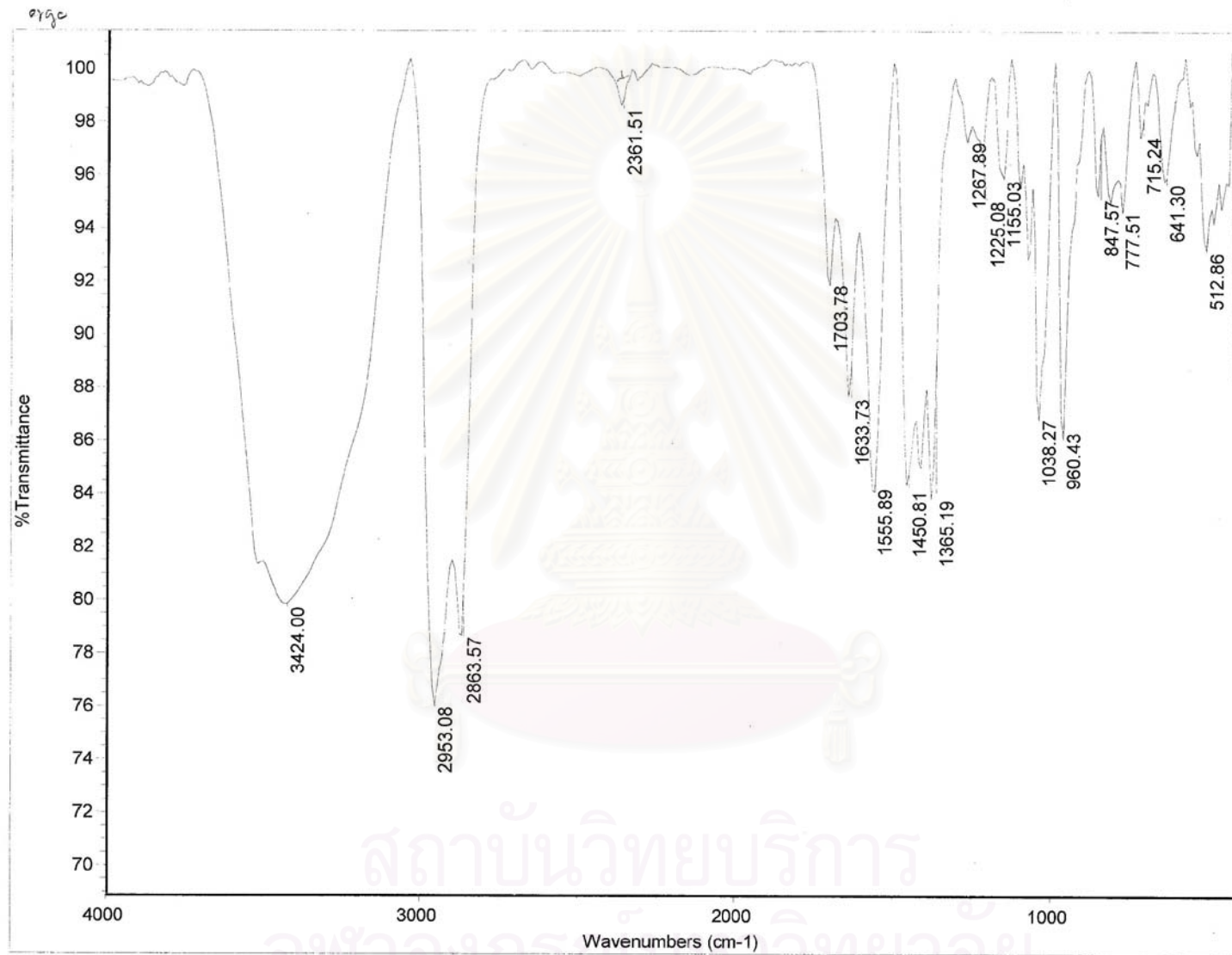
รูป ข3 โครงสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ของราเอนโคไฟต์ชนิดต่างๆ (ต่อ)

ภาคผนวก ค

สารบริสุทธิ์ 2 ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ ค1 อัลตราไวโอเลตสเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1

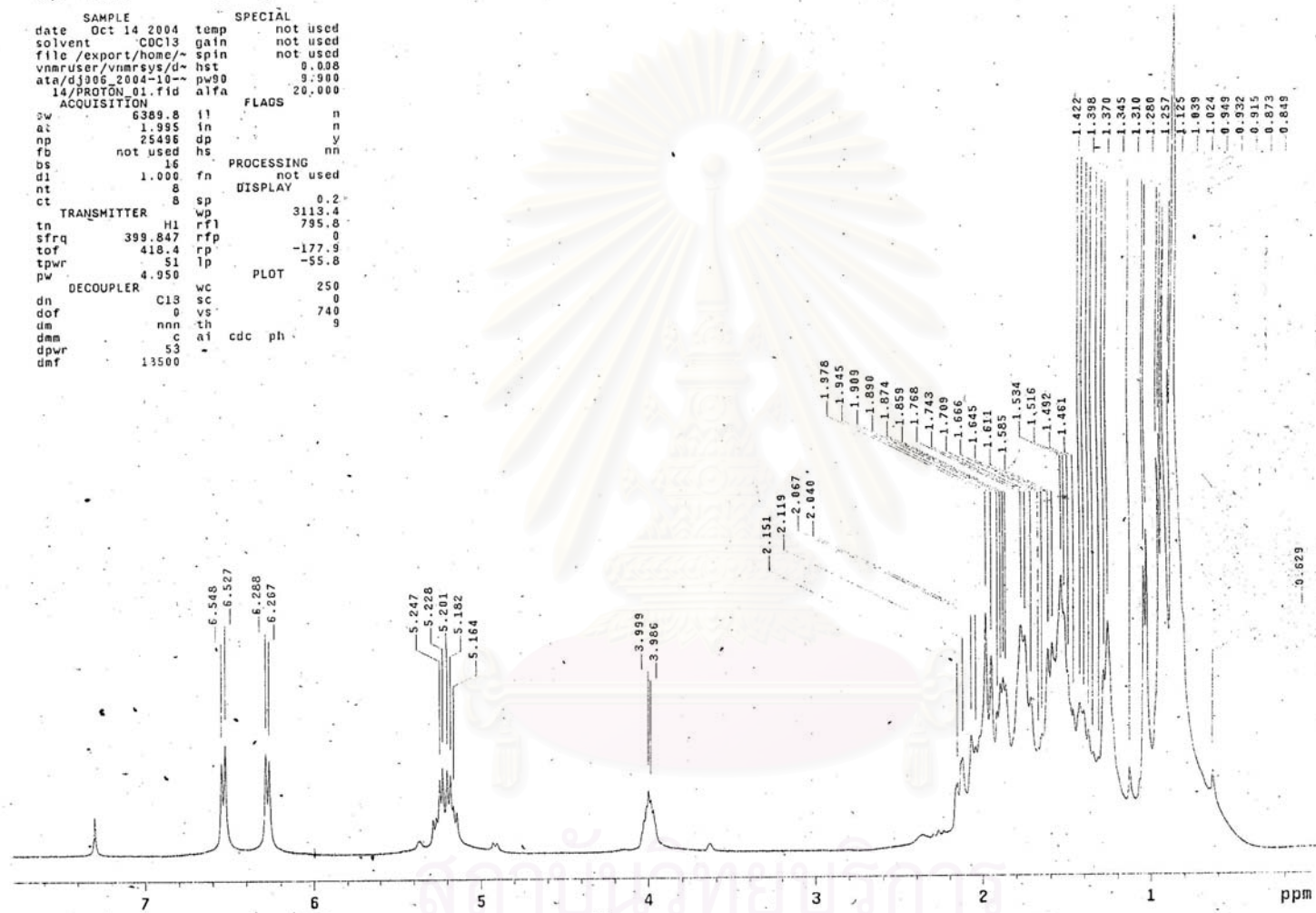


รูปที่ ค2 อินฟราเรดสเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1

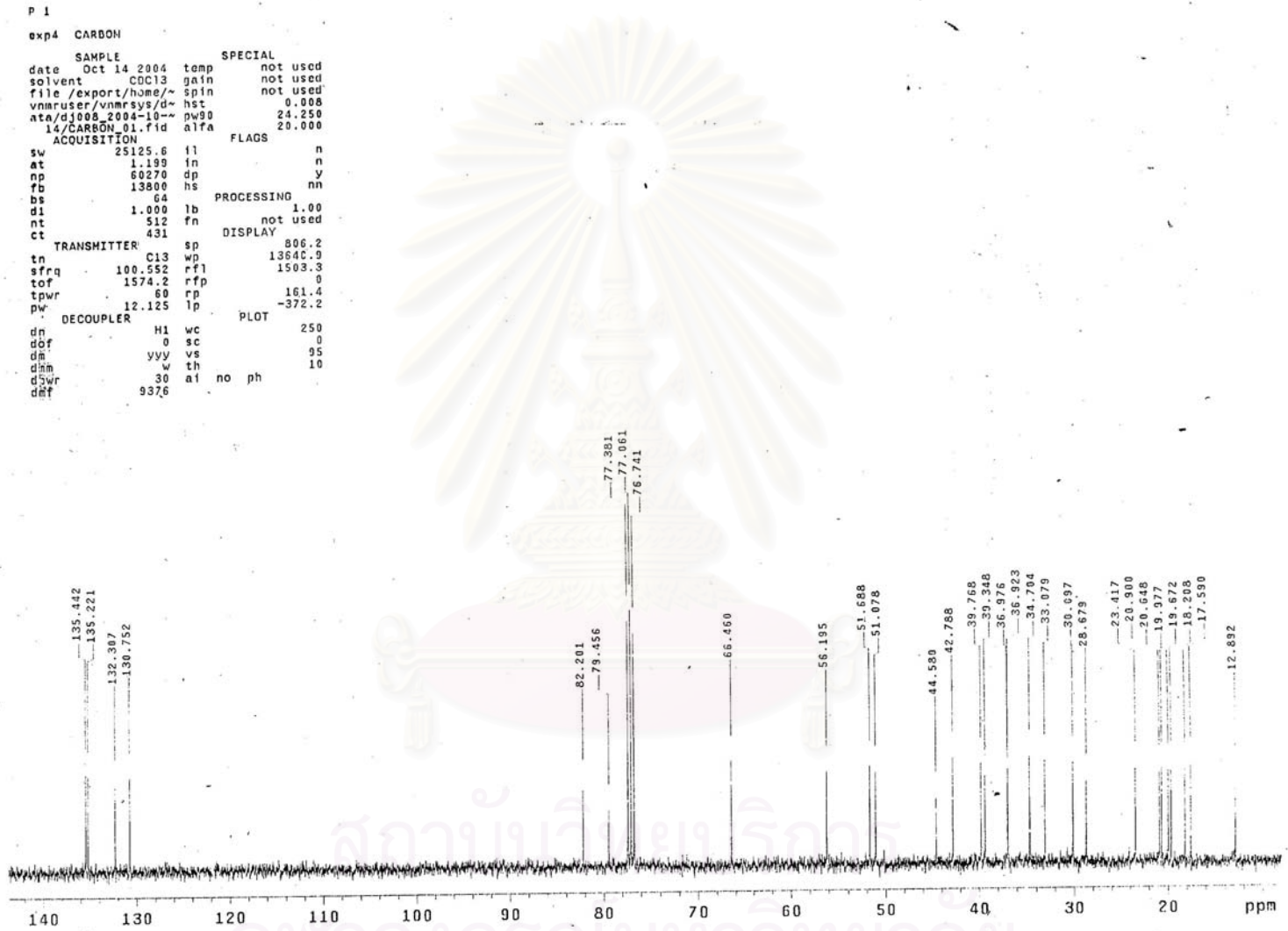
```

P 1
exp4 PROTON
SAMPLE
date Oct 14 2004 temp not used
solvent CDCl3 gain not used
file /export/home/ spin not used
vnmrusr /vnmr/sj/d hsr 0.006
ata/dj906_2004-10- pw90 9.900
14/PROTON_01.fid alfa 20.000
ACQUISITION FLAGS
sw 6389.8 f1 n
al 1.955 f2 n
np 25496 dp y
fb not used hs nn
bs 16 f3 PROCESSING
d1 1.000 f4 not used
nt 8 f5 DISPLAY
ct 8 sp 0.2
TRANSMITTER H1 wp 3113.4
tn sfrq 399.847 rfl 795.8
tof 418.4 rfp 0
tpwr 51 rp -177.9
pw 4.950 lp -55.8
DECOUPLER wc 250
dn C13 sc 0
dcf 0 vs 740
dm nnn th 9
dmm c ai cdc ph
dpwr 53
dmf 13500

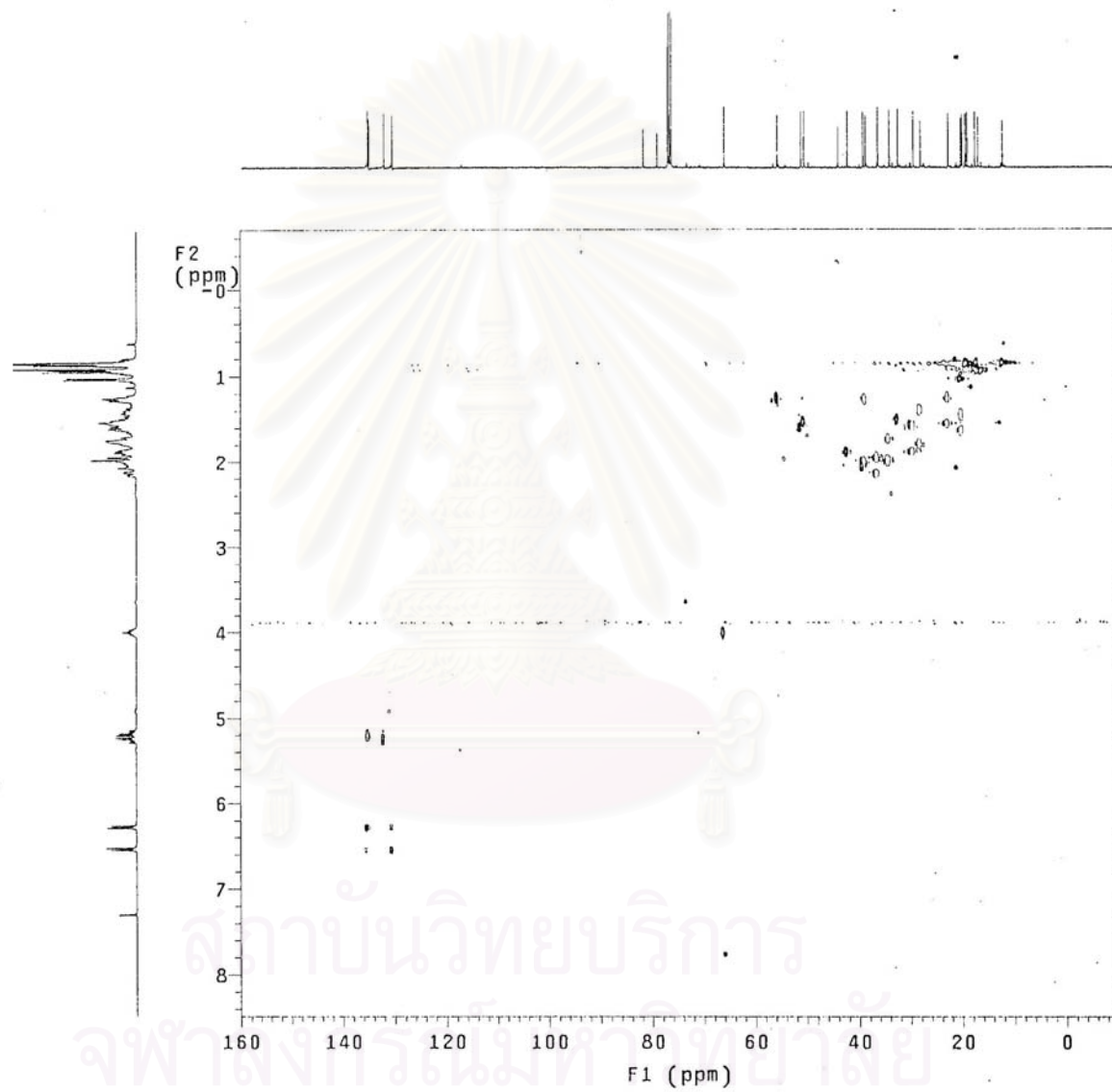
```



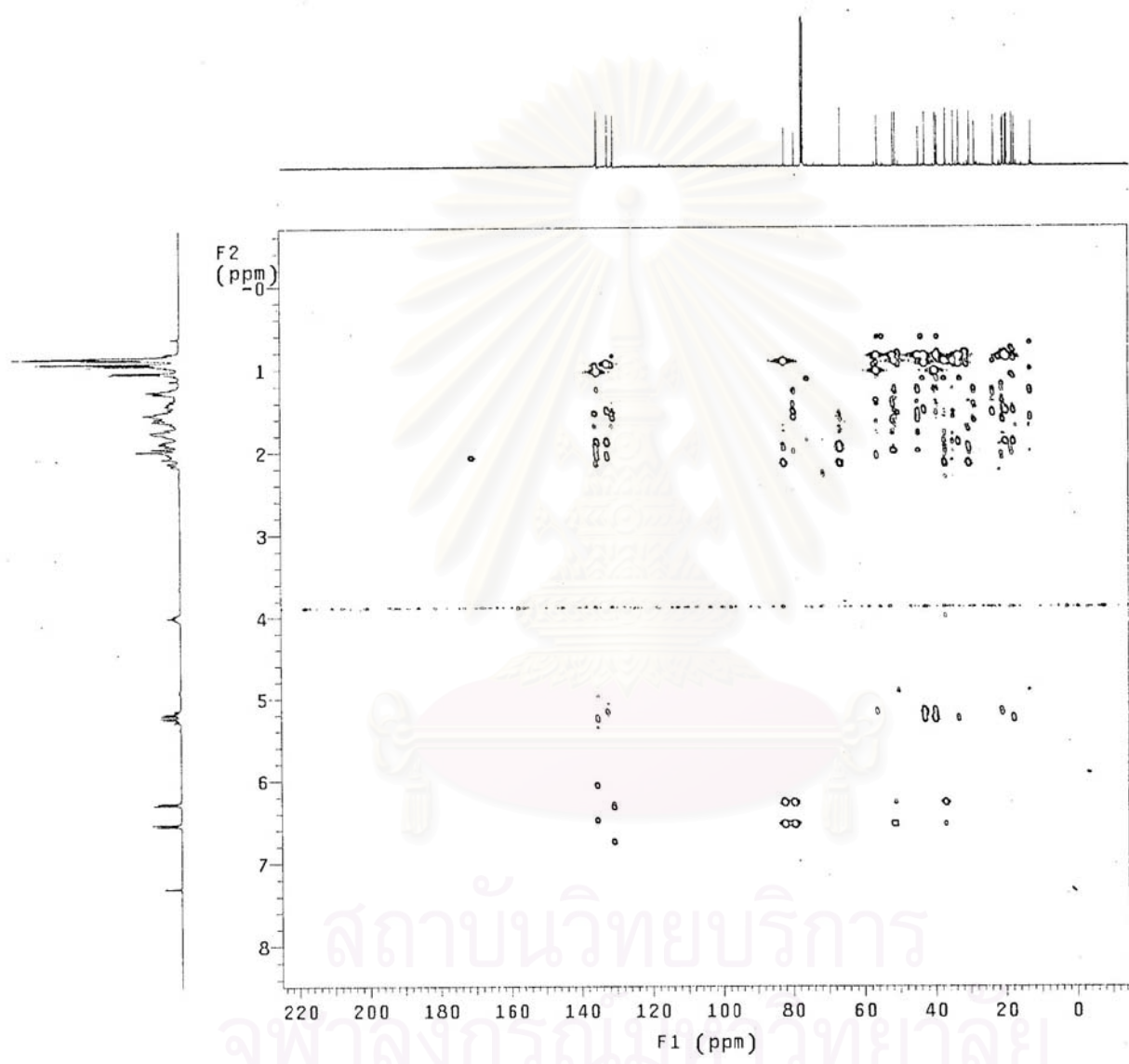
รูปที่ ค3 โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^1\text{H-NMR}$ spectrum) ของสารบริสุทธิ์ 1



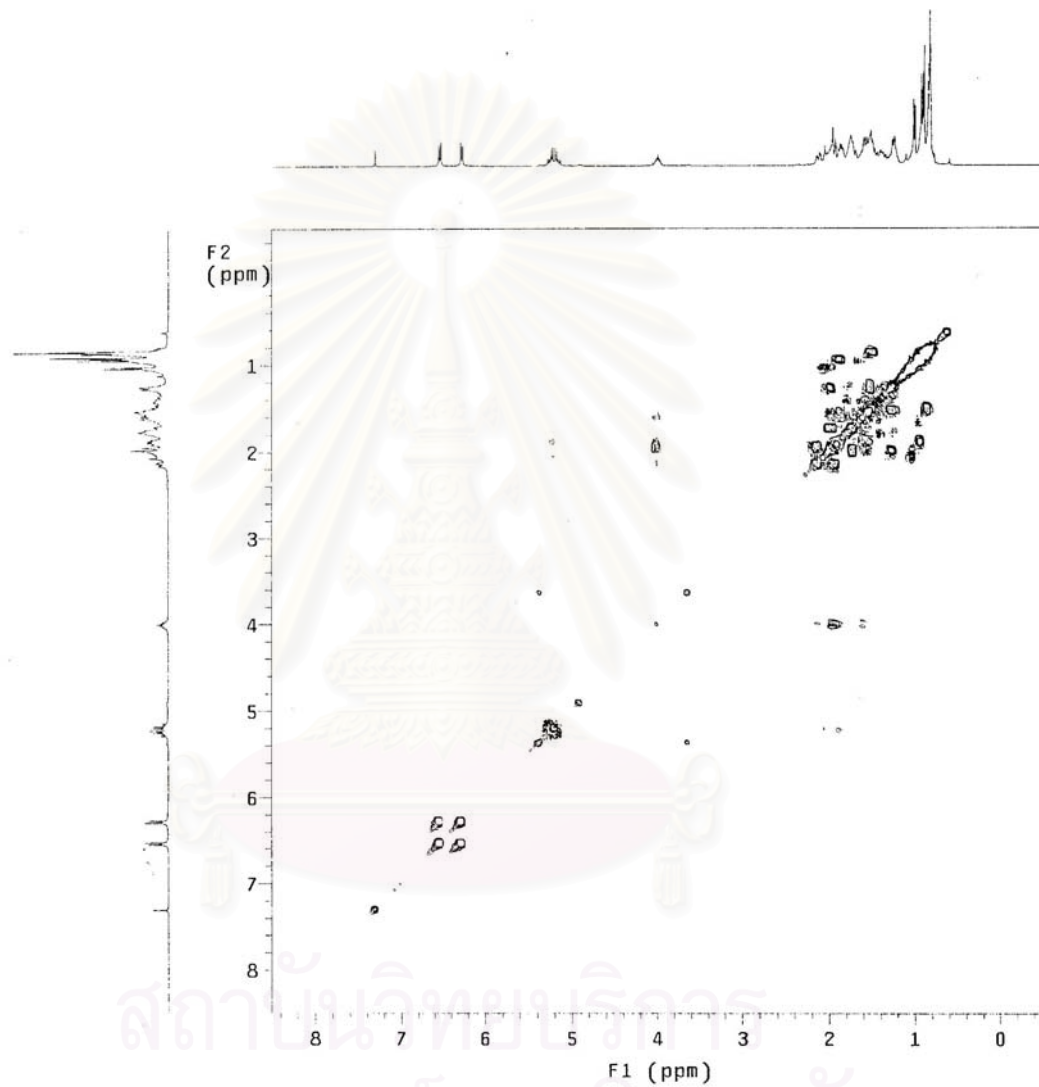
รูปที่ ๓4 คาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^{13}\text{C-NMR}$ spectrum) ของสารบริสุทธิ์ที่ 1



รูปที่ ค5 HSQC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1

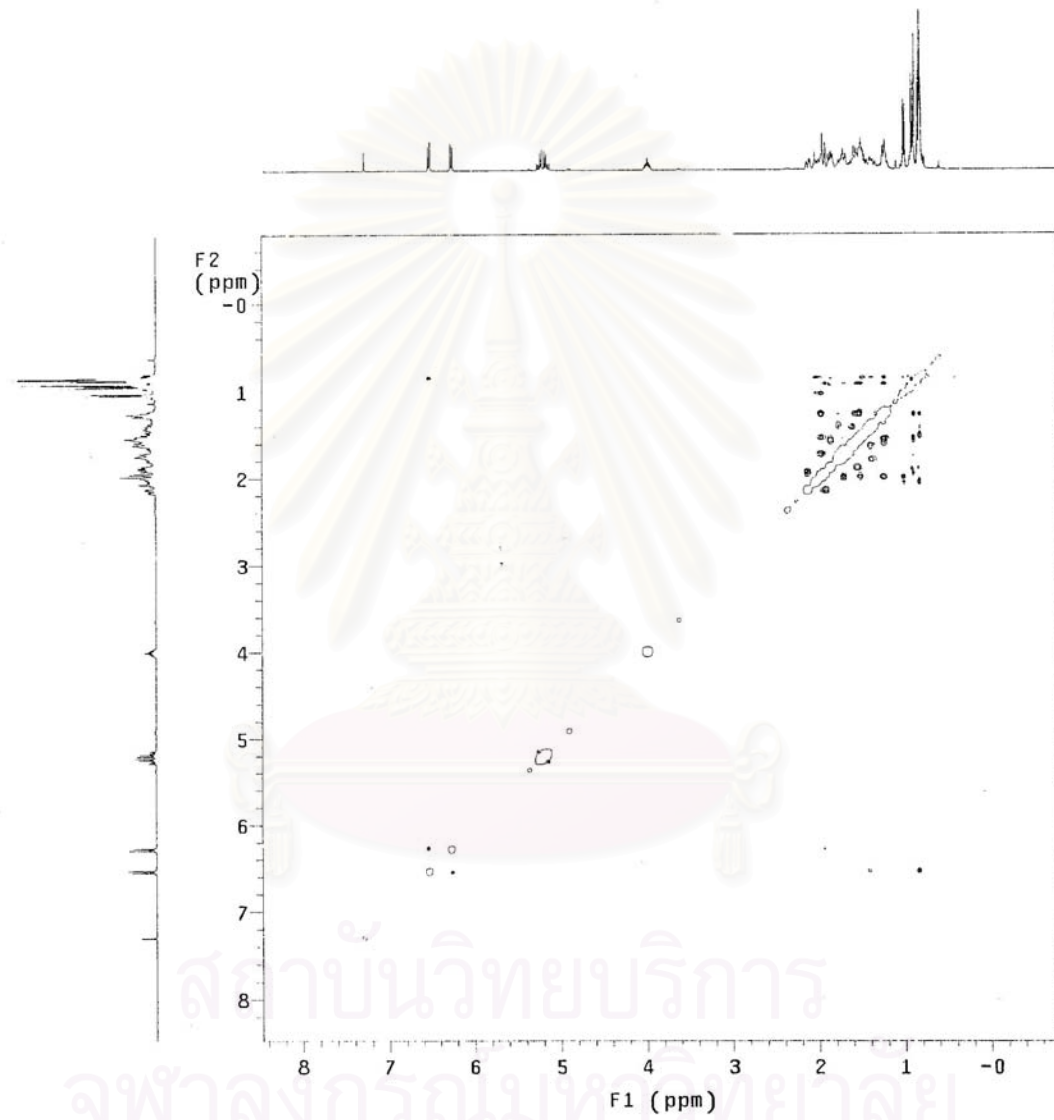


รูปที่ ค6 HMBC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

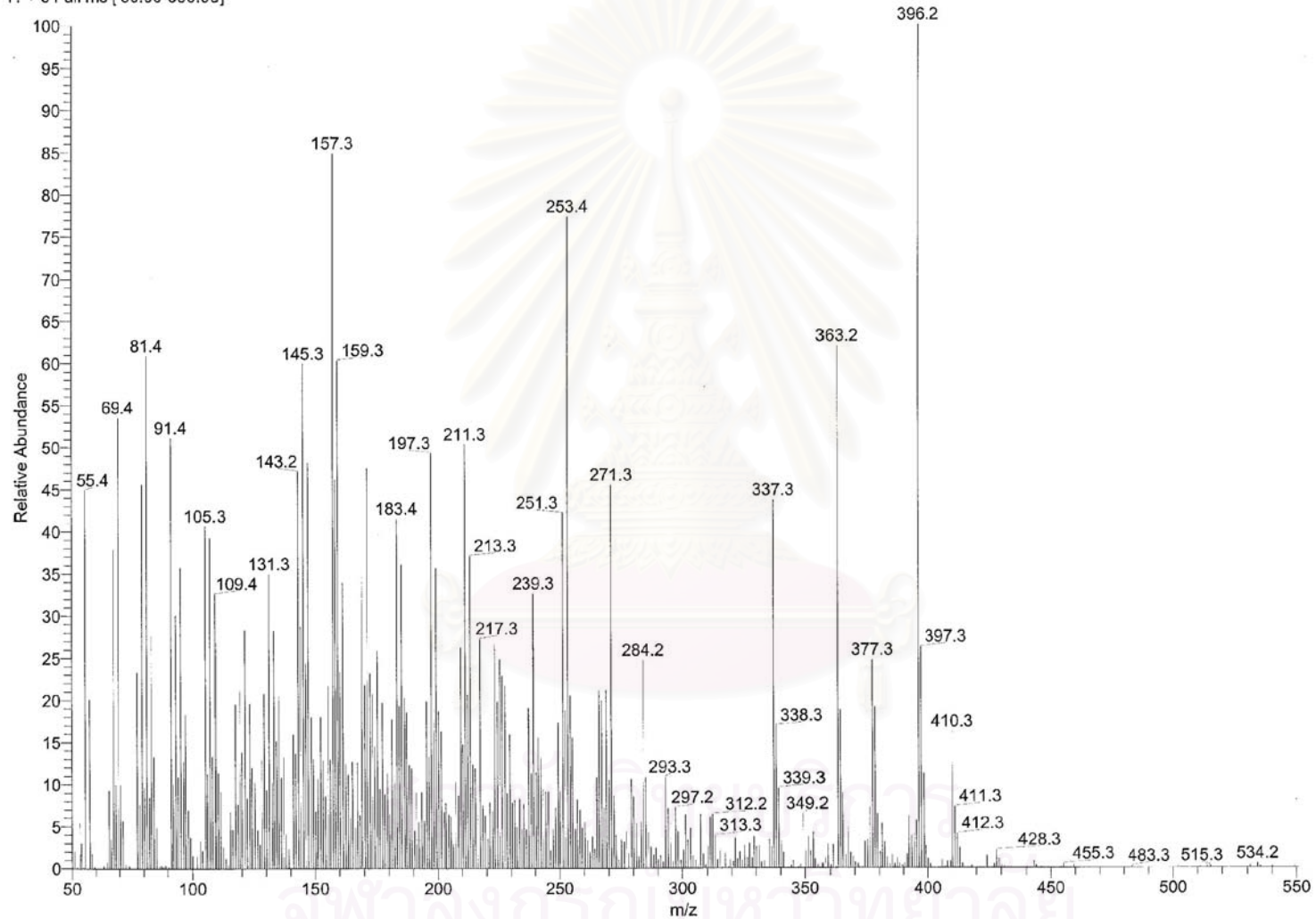
รูปที่ ค7 COSY สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1



รูปที่ ค8 NOESY สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 1

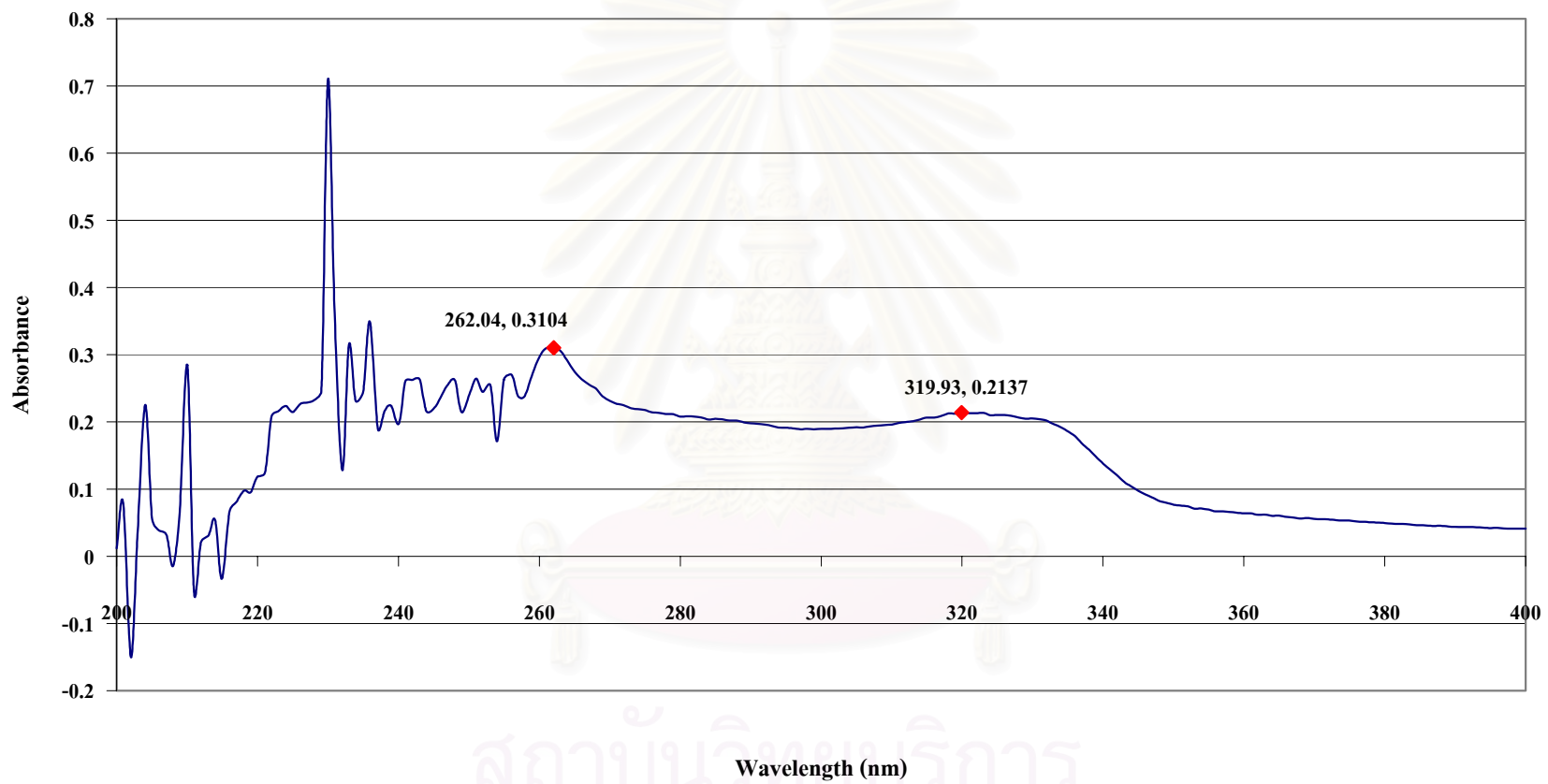
D:\Xcalibur\Data\PO1
DIP,temp40-300,time30,rate20/min,hold30sec
PO1 #725 RT: 7.22 AV: 1 NL: 3.62E5
T: + c Full ms [50.00-650.00]

3/22/2005 4:02:10 PM



รูปที่ ๑๑ แมสสเปกตรัม (EI-MS) ของสารบริสุทธิ์ ๑

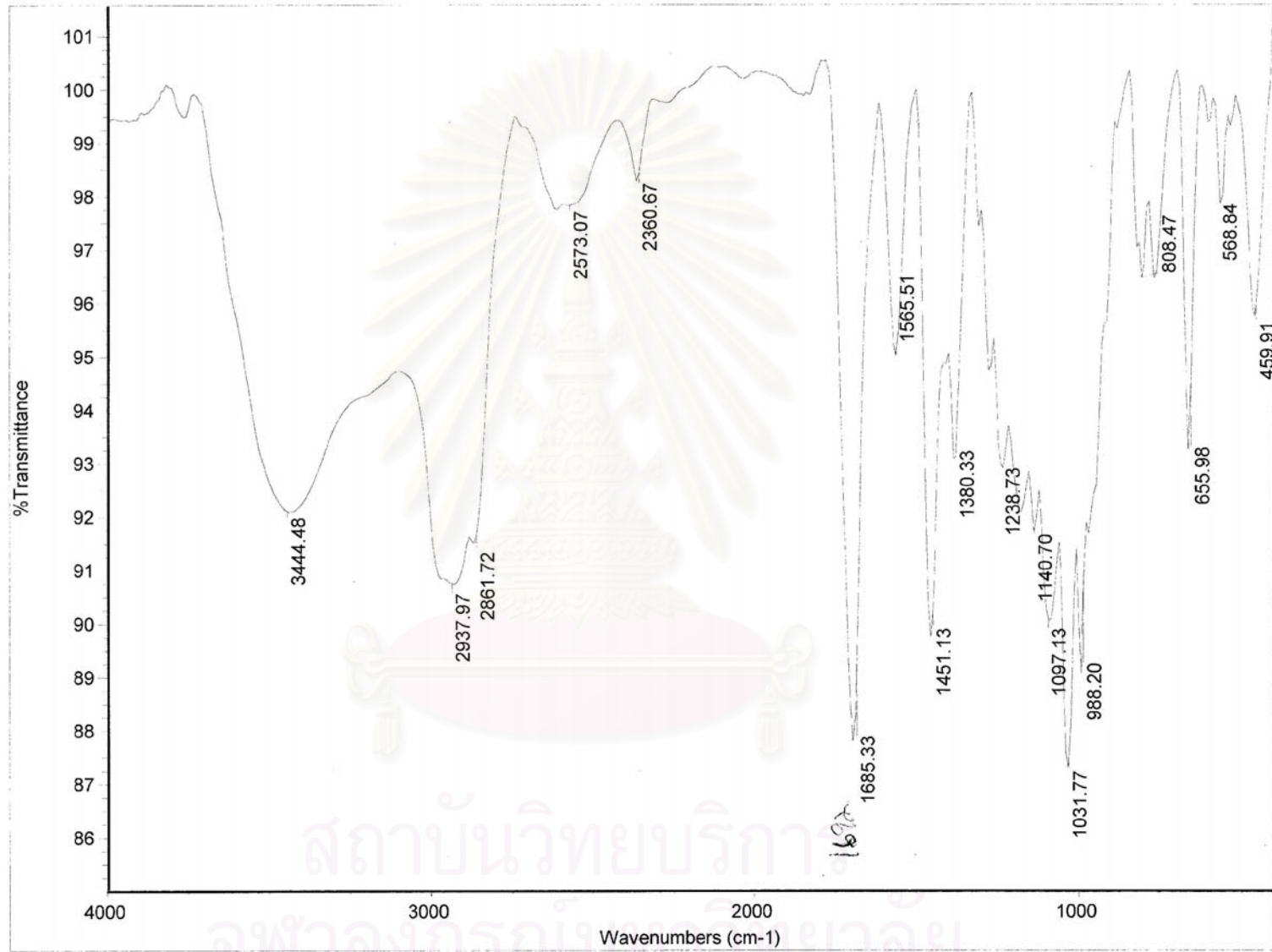
สารบริสุทธิ์ 4 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



สถาบันวิจัยบริการ

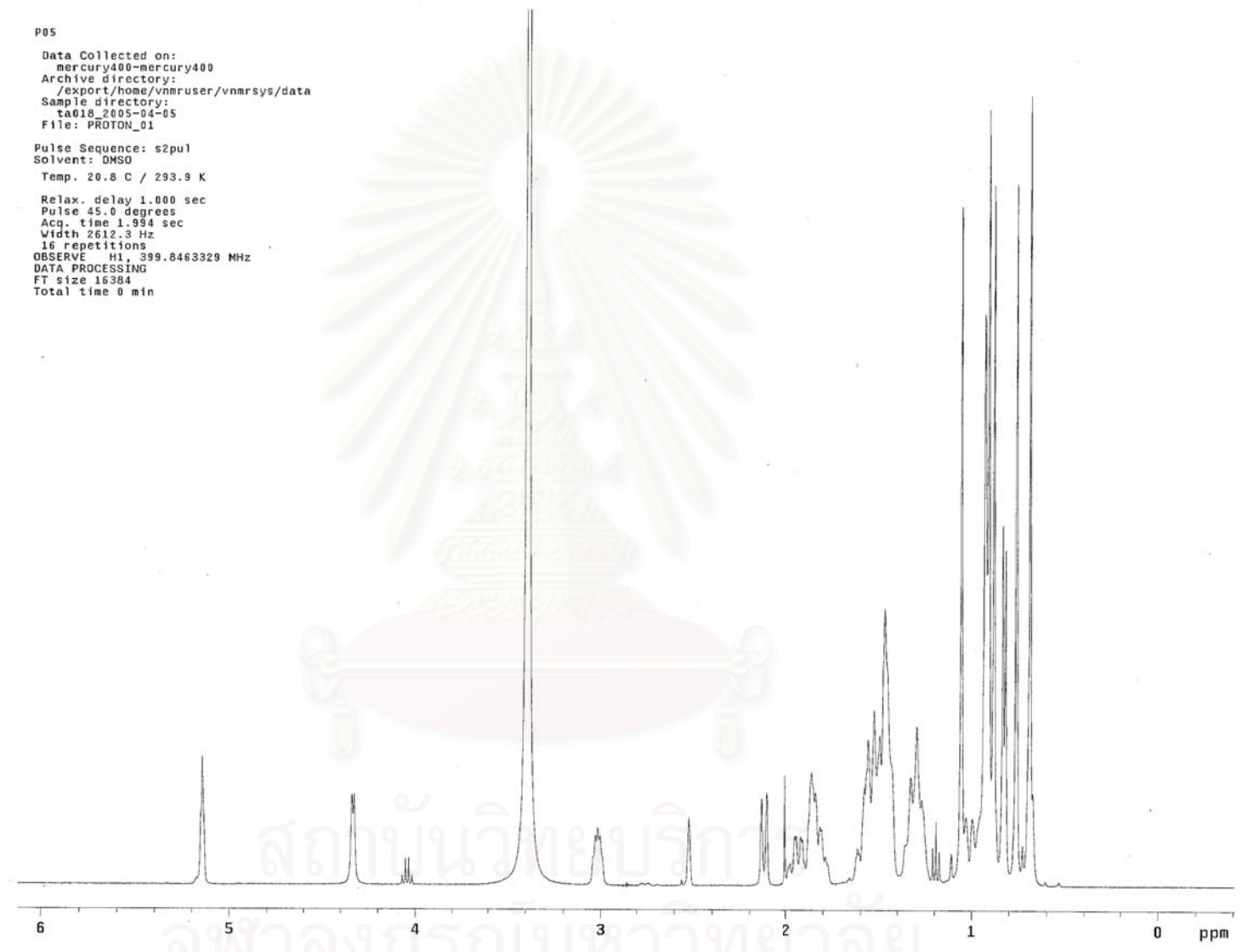
รูปที่ ค10 อัลตราไวโอเลตสเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ค11 อินฟราเรดสเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2

P05
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/vnmruser/vnmrsys/data
Sample directory:
ta018_2005-04-05
File: PROTON_01
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: DMSO
Temp. 20.8 C / 293.9 K
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.994 sec
Width 2612.3 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 399.8463329 MHz
DATA PROCESSING
FT size 16384
Total time 0 min



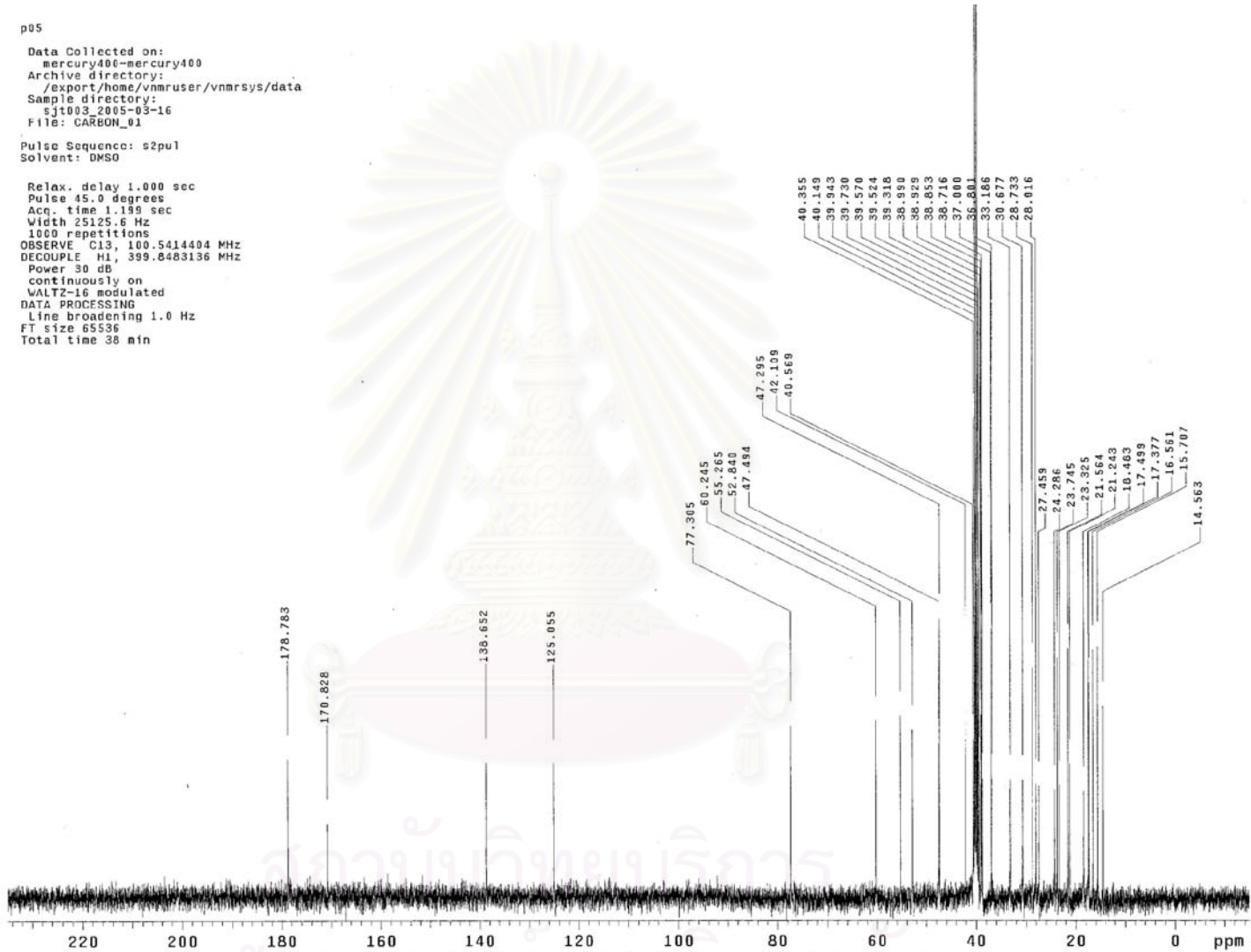
รูปที่ ๑๒ โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (¹H-NMR spectrum) ของสารบริสุทธิ์ ๒

p05

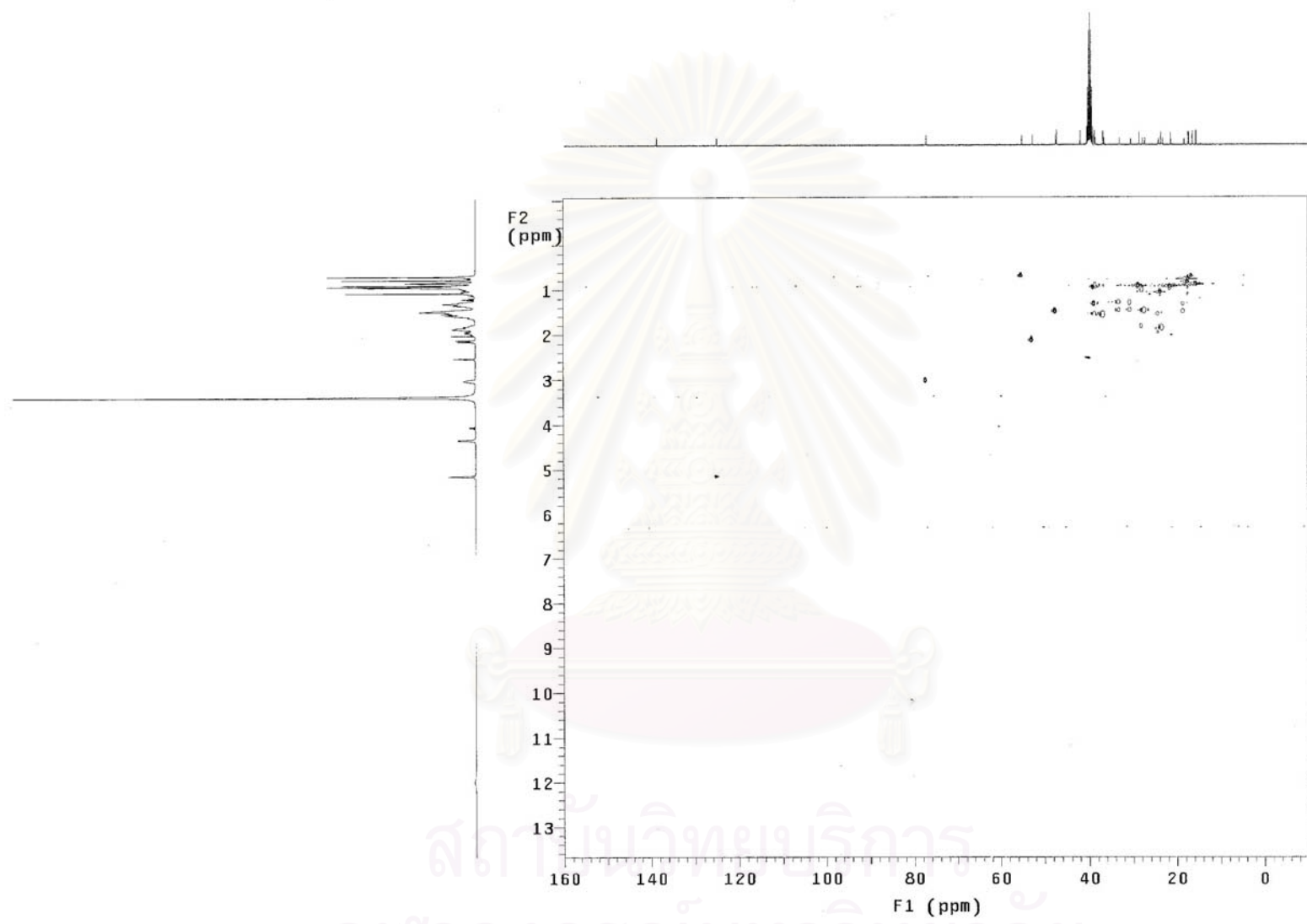
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/vnmruser/vnmrsys/data
Sample directory:
sjt003_2005-03-16
File: CARBON_01

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: DMSO

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.199 sec
Width 25125.6 Hz
1000 repetitions
OBSERVE C13, 100.5414404 MHz
DECOUPLE H1, 399.8483136 MHz
Power 30 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 38 min

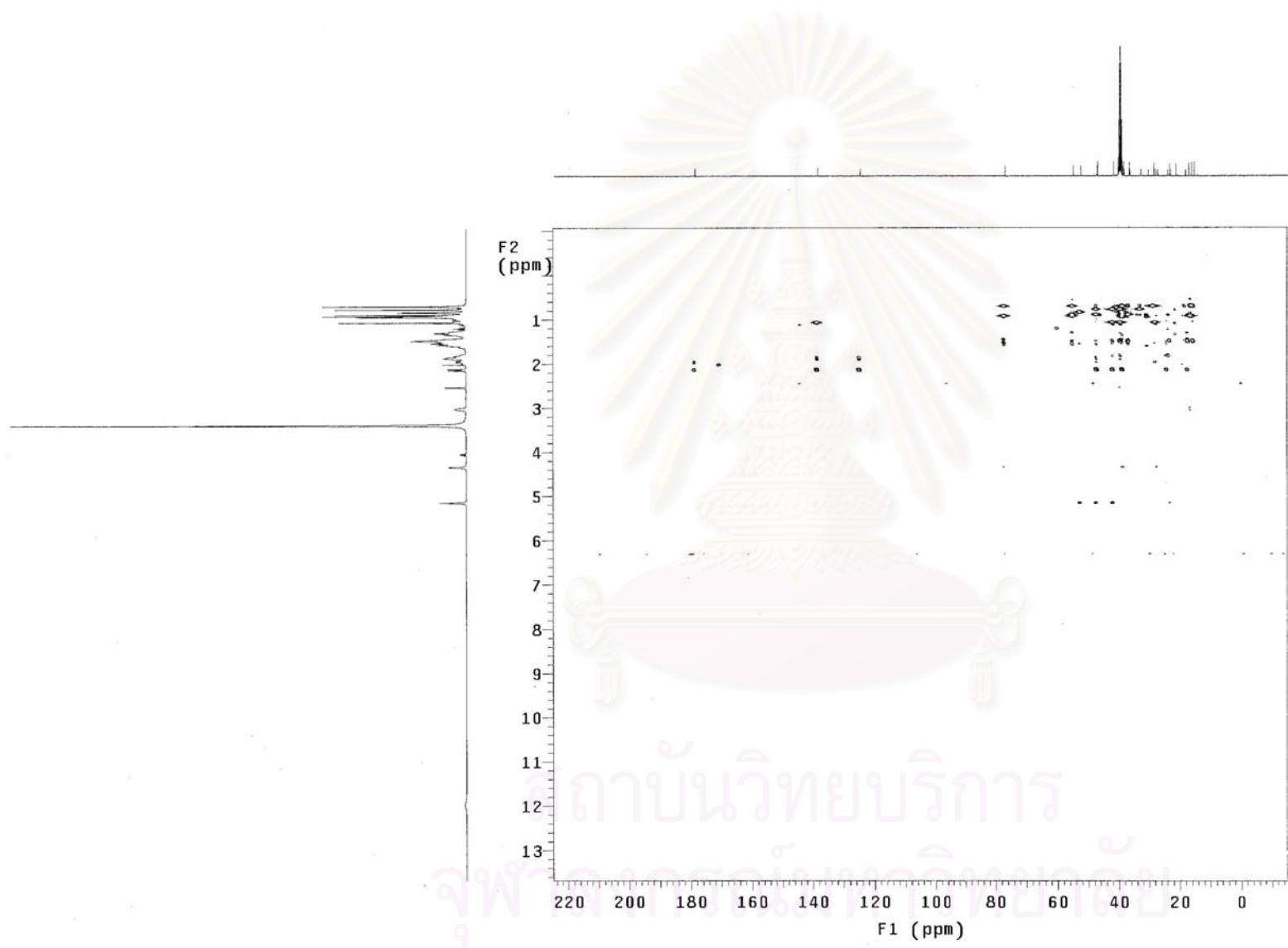


รูปที่ 13 คาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (^{13}C -NMR spectrum) ของสารบริสุทธิ์ที่ 2

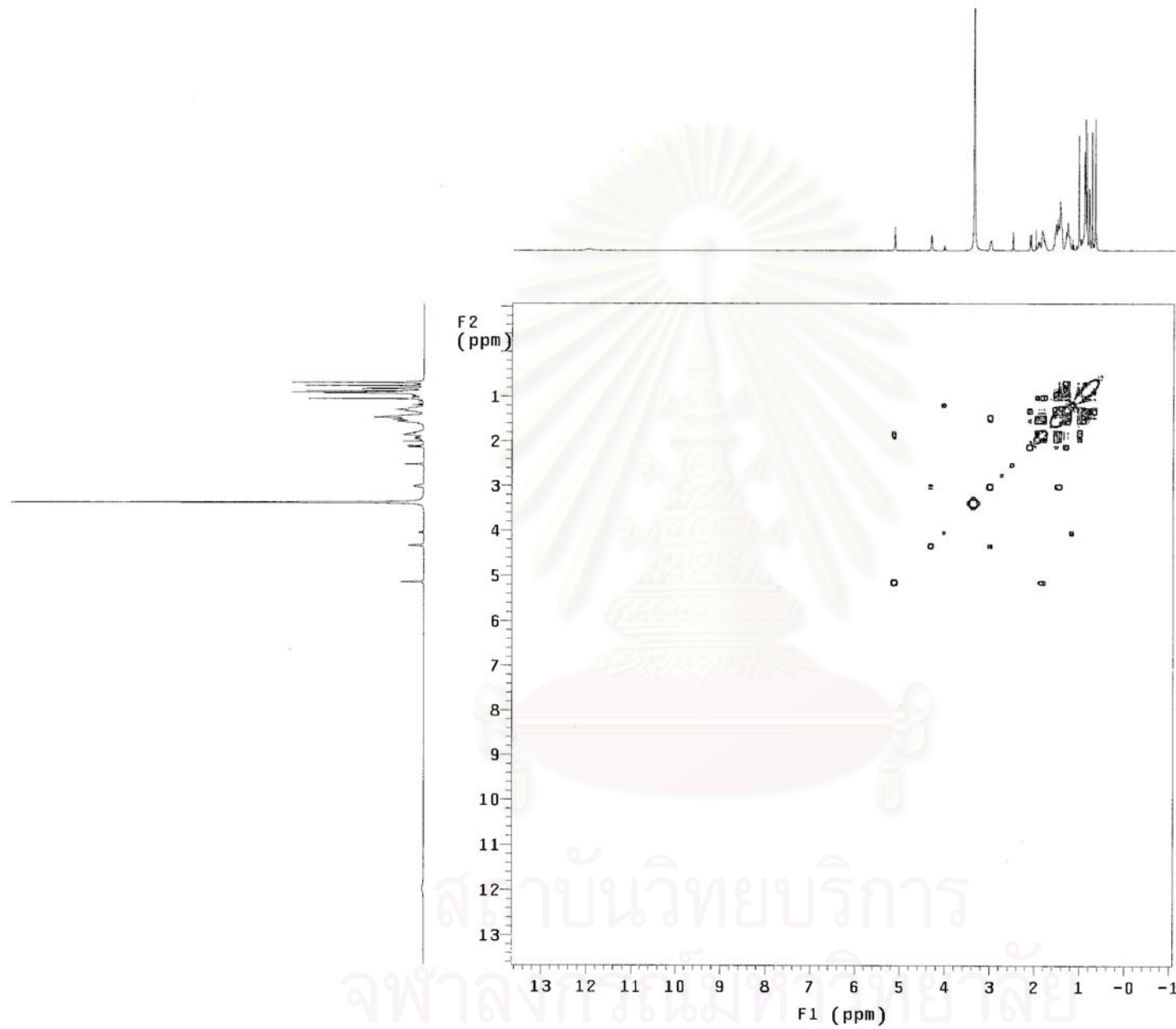


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

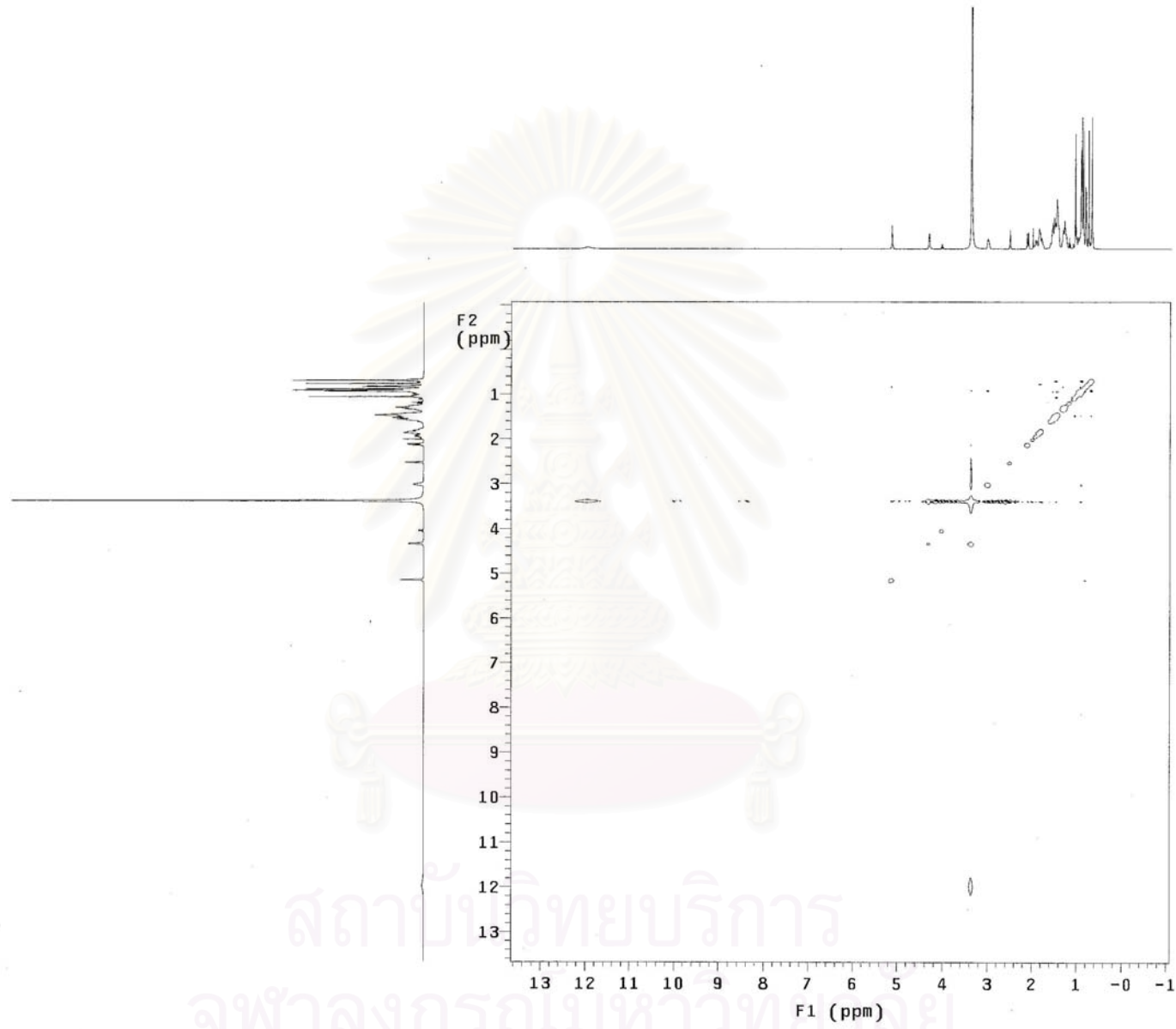
รูปที่ ค14 HSQC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2



รูปที่ ค15 HMBC สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2

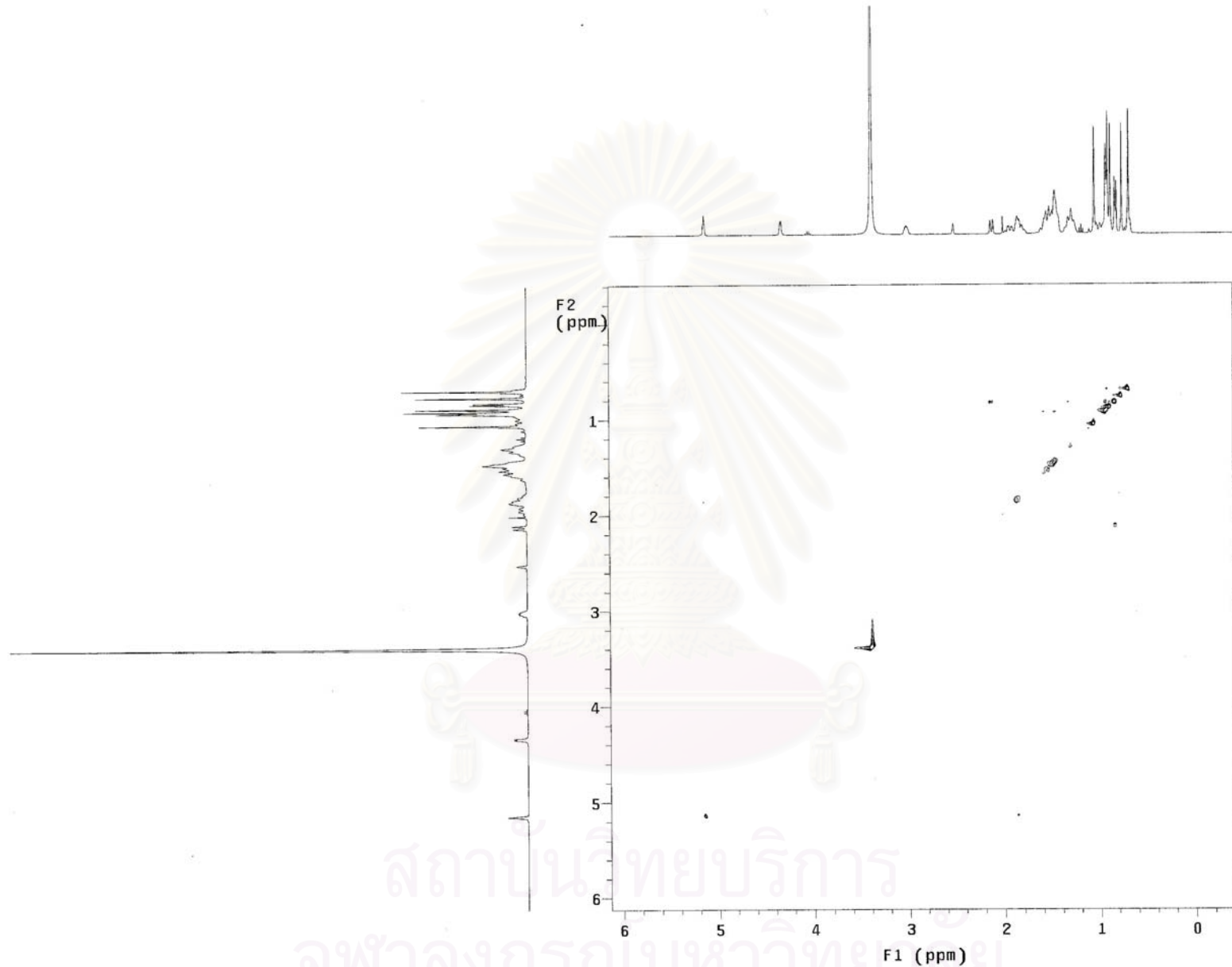


รูปที่ ค16 COSY สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ค17 NOESY สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2

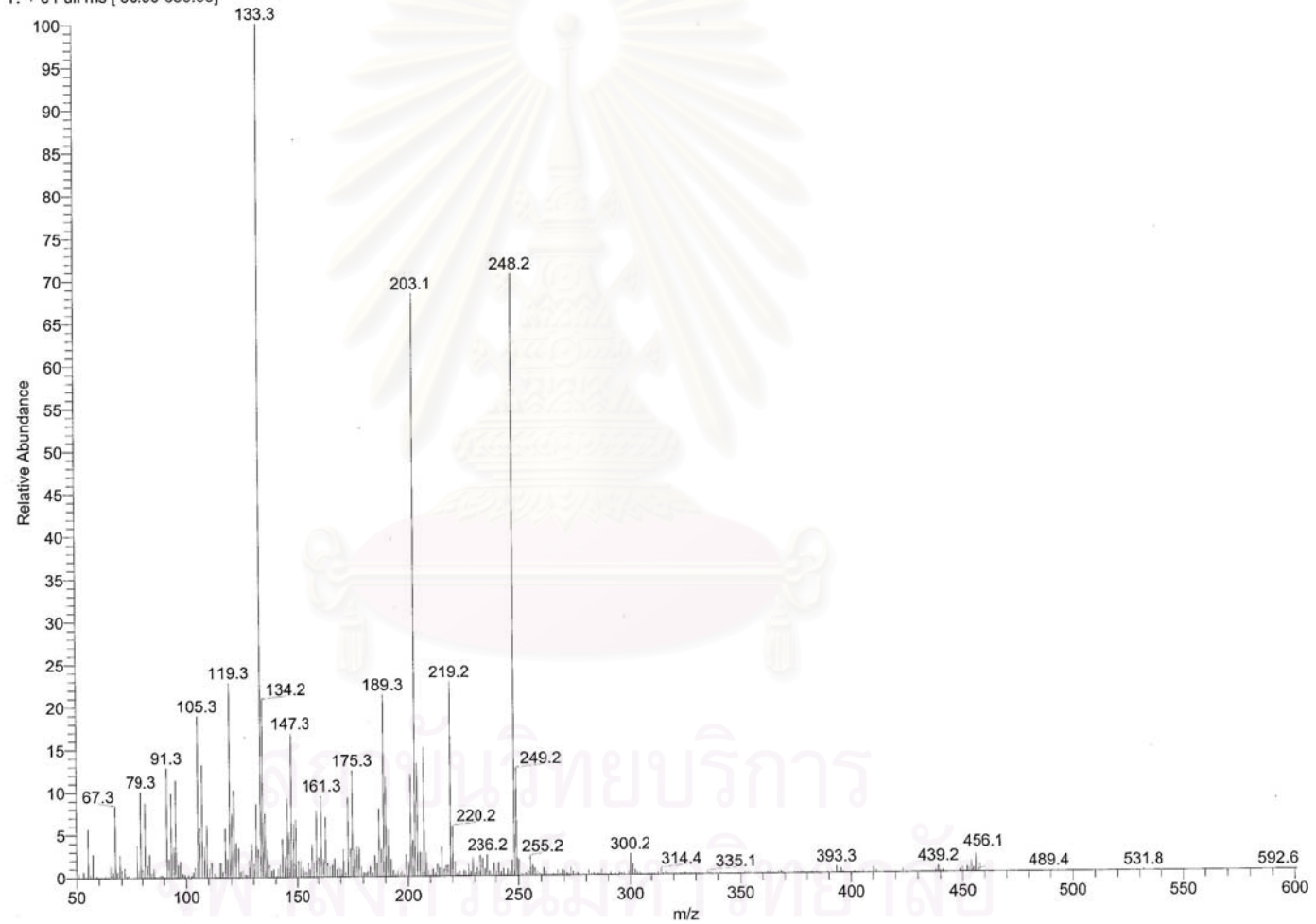


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

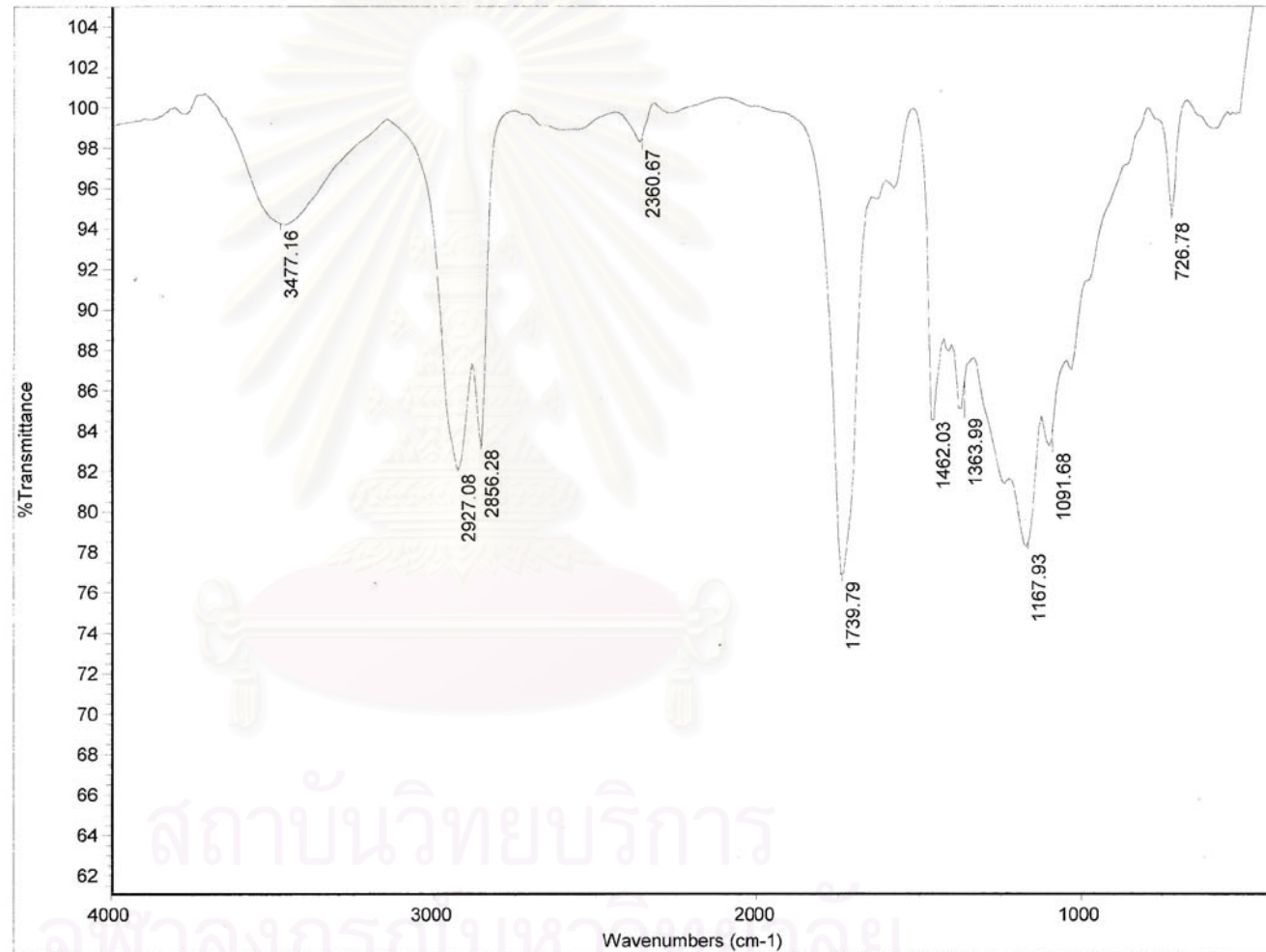
รูปที่ ค18 TOCSY สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ 2

D:\Xcalibur\data\PO5_050405181133
DIP_temp40-300,time30,rate10/min,hold30sec
PO5_050405181133 #879 RT: 8.96 AV: 1 NL: 1.58E5
T: + c Full ms [50.00-650.00]

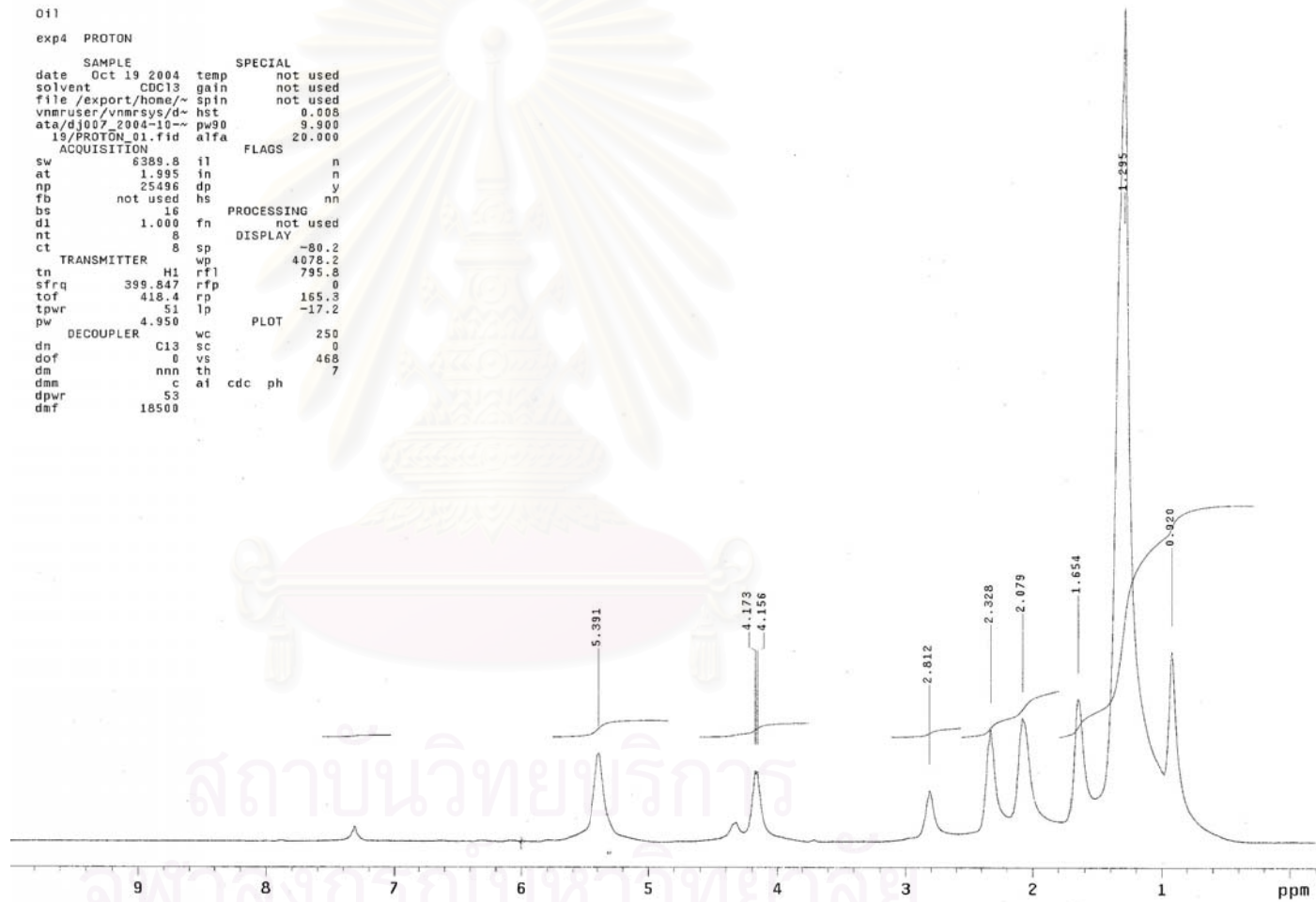
4/5/2005 6:11:33 PM



รูปที่ ค19 แมสสเปกตรัม (EI-MS) ของสารบริสุทธิ์ 2



รูปที่ ค20 อินฟราเรดสเปกตรัมของของผสม 1

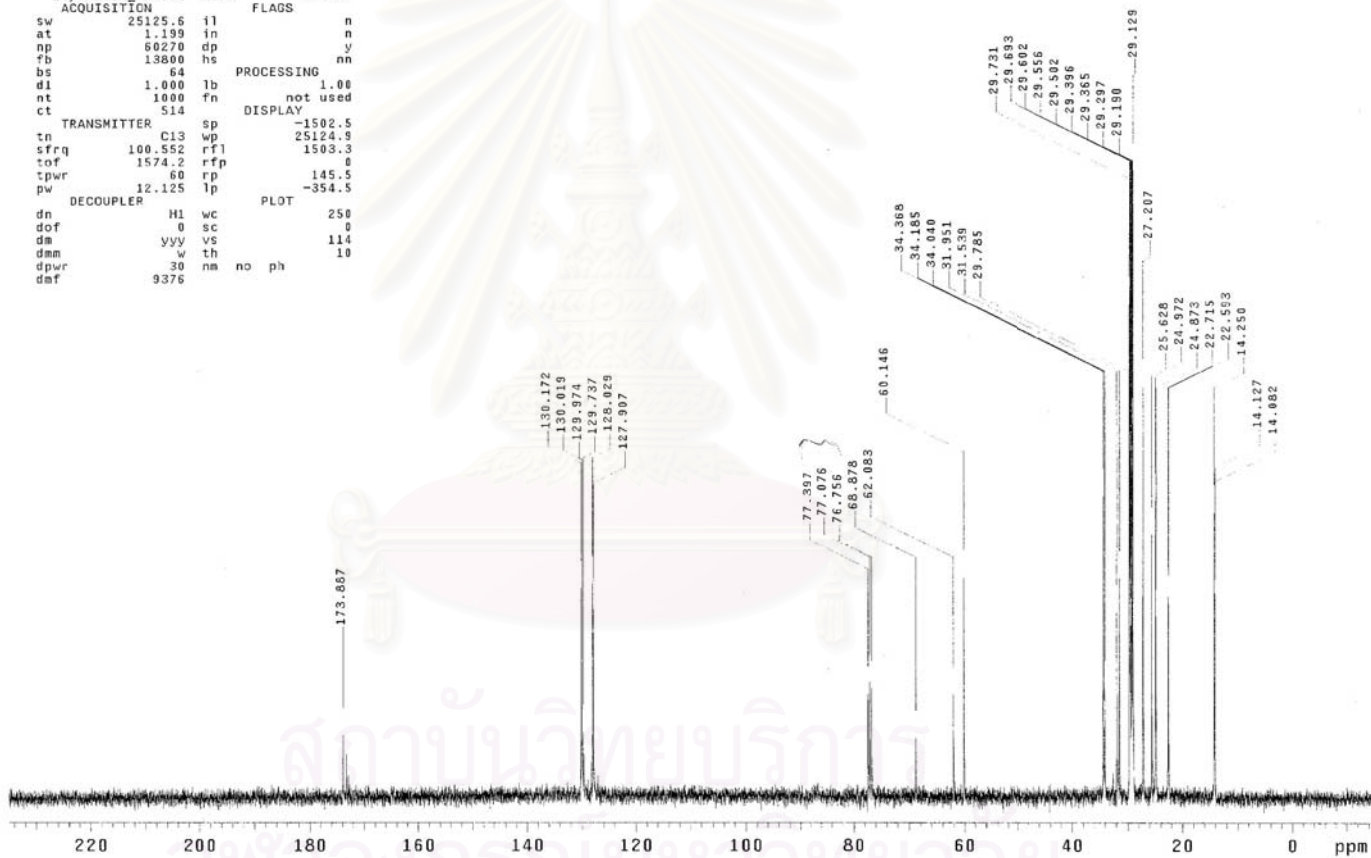


รูปที่ ค21 โพรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^1\text{H-NMR}$ spectrum) ของของผสม 1

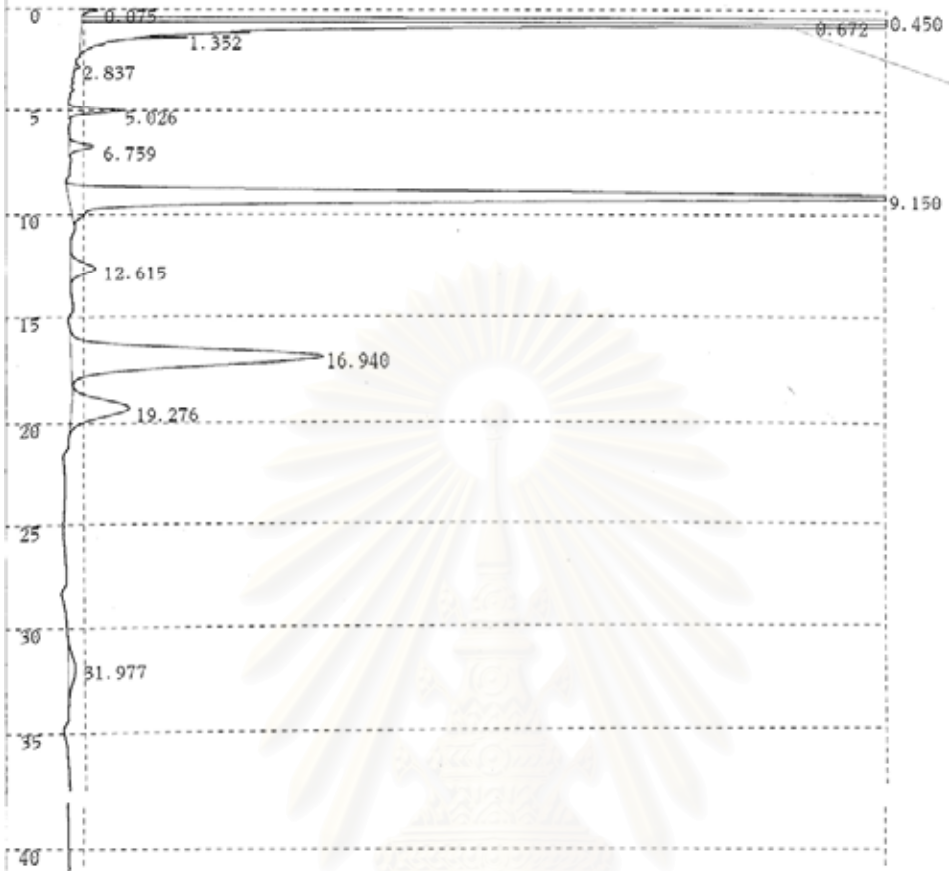
```

011
exp4 CARBON
SAMPLE SPECIAL
date Oct 14 2004 temp not used
solvent CDC13 gain not used
file /export/home/~ spin not used
vnmruser/vnmrsys/d~ hst 0.008
ata/dj004_2004-10~ pw90 21.250
14/CARBON_01.fid alfa 20.000
ACQUISITION FLAGS
sw 25125.6 il n
at 1.199 in n
np 60270 dp y
fb 13800 hs nn
bs 64
d1 1.000 lb PROCESSING 1.00
nt 1000 fn not used
ct 514 DISPLAY
TRANSMITTER sp -1502.5
tn C13 wp 25124.9
sfrq 100.552 rf1 1503.3
tof 1574.2 rfp 0
tpwr 60 rp 145.5
pw 12.125 lp -354.5
DECOUPLER H1 wc PLOT 250
dn dof 0 sc 0
dmm dmm w th 114
dpwr dpwr na no ph 10
dof 9376

```



รูปที่ ค22 คาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (¹³C-NMR spectrum) ของของผสม 1



ALCULATION REPORT **

KNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.075	310	46				
2	0.45	8685853	1205732	E			
3	0.672	471795	143362	SV			
4	1.352	1005	222	T			
5	2.837	322	24				
6	5.026	4216	263				
7	6.759	2578	122				
8	9.15	141306	4894				
9	12.615	4907	125				
10	16.94	65010	1263				
11	19.276	17004	292				
12	31.977	2992	34				
TOTAL		9397293	1356380			0	

สำนักงานวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ค23 ก๊าซโครมาโทกราฟีสเปกตรัมของของผสม 1

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสินทวี สิงห์วงศ์วัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 24 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2524 สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาจาก โรงเรียนสตรีวิทยา 2 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี) จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2544 และได้เข้าศึกษาต่อที่สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย