รายงานการวิจัย

สารเมแทบอไลท์ต้านจุลชีพและต้านมะเร็งจากราเอ็นโดไฟท์

Antimicrobial and anticancer metabolites from endophytic fungi

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2554 สำหรับเป็นค่าใช้จ่ายในการดำเนินการวิจัยตลอดทั้งโครงการจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้องในการให้ความช่วยเหลือโครงการนี้ อันได้แก่ ฝ่ายวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ ฝ่ายวิจัยมหาวิทยาลัย และฝ่ายการเงิน ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในเรื่องการเบิกและจ่ายเงินทุนวิจัย อาจารย์ปราณี อินวาทย์ ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเห็ดเผาะ รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ ที่ช่วยเหลือในการพิสูจน์เอกลักษณ์ราเอ็นโดไฟท์และเห็ดเผาะ รวมทั้งหน่วยปฏิบัติการวิจัยไบโอออแกนิคเคมี (Research Center for Bioorganic Chemistry) และ ภาควิชาเคมี ที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือในการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2554

บทคัดย่อภาษาไทย

การวิจัยภายใต้โครงการนี้ ได้ทำการศึกษาสารเมแทบอไลท์ของราเอ็นโดไฟท์ *Emericella variecolor* ในอาหารเพาะเลี้ยง Malt Czapek-Dox broth (MCzB) และ Czapek-Dox broth (CzB) และสารเมแทบอไลท์ของเห็ดเผาะ *Astraeus odoratus*

ส่วนสกัดเอธิล แอซิเทตของส่วนน้ำเลี้ยงและเส้นใยราเอ็นโดไฟท์ *E. variecolor* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Malt Czapek-Dox นำไปแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน, เฮกเซน-เอธิล แอซิเทต, เอธิล แอซิเทต, เอธิล แอซิเทต-เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ นำส่วนแยกมาทำให้บริสุทธิ์ สารที่แยกได้จากส่วนสกัดเอธิล แอซิเทตจากเส้นใย ได้แก่ stellatic acid (**1**), ergosterol (**2**), สารกลุ่ม xanthones 2 ชนิด [14-methoxy tajixanthone 25-acetate (**3**) และ tajixanthone hydrate (**8**)], สารกลุ่ม anthraquinone 2 ชนิด [1-hydroxy-6,8-dimethoxy-3-methylanthraquinone (**4**) และ 4,6-dihydroxy-5,7-dimethoxy-2-methylanthraquinone (**5**)] และสารชนิดใหม่ 2 ชนิด [สารประกอบ (**6**) และ (**7**)] ส่วนการแยกสารจากส่วนสกัดเอธิล แอซิเทตจากน้ำเลี้ยงได้ 4,6-dihydroxy-5,7-dimethoxy-2-methyl anthraquinone (**5**) และ dermoglaucin (**9**) และ และสารใหม่หนึ่งชนิด [สารประกอบ (**10**)] ขณะที่ การแยกสารเมแทบอไลท์ของราเอ็นโดไฟท์ *E. variecolor* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek-Dox ได้ stellatic acid (**1**) และ ergosterol (**2**) จากสารสกัดเส้นใยเท่านั้น

การแยกสารเมแทบอไลท์จากเห็ดเผาะที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดน่านสามารถแยกสารได้สารประกอบไตรเทอร์พีน 4 ชนิด และสารประกอบสเตียรอยด์ที่มีรายงานแล้ว 3 ชนิด (Ergosterol, ergosterol peroxide และ 5,8-epidioxy-(3β,5*a*,8*a*,24*R*)-ergosta-6-en-3-ol).

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

In this research metabolites of the endophytic fungus *Emericella variecolor*, cultured in malt czapek-dox broth (MCzB) and czapek-dox broth (CzB), and of Hed Por (*Astraeus odoratus*) were investigated.

Ethyl acetate crude extracts of mycelia and broth of *E. variecolor* were isolated using silica gel column chromatography eluting with hexane, hexane-ethyl acetate, ethyl acetate, ethyl acetate-methanol and methanol in step-wise fashion. The combined fractions were further isolated. From the culture in MCzB, the ethyl acetate crude extract of *E. variecolor* mycelia was isolated to afford stellatic acid (**1**), ergosterol (**2**), two known xanthones [14-methoxy tajixanthone 25-acetate (**3**) and tajixanthone hydrate (**8**)], two known anthraquinones [1-hydroxy-6,8-dimethoxy-3-methylanthraquinone (**4**) and 4,6-dihydroxy-5,7-dimethoxy-2-methylanthraquinone (**5**)] and two new compounds **6** and **7** while the ethyl acetate crude extracts of the culture broth was isolated to afford two known anthraquinones [4,6-dihydroxy-5,7-dimethoxy-2-methyl anthraquinone (**5**) and dermoglaucin (**9**)] and a new compound **10**. In addition the ethyl acetate crude extracts of *E. variecolor* mycelia cultured in CzB was isolated to afford stellatic acid (**1**) and ergosterol (**2**).

Metabolites of Hed Por (*A. odoratus*), collected from Nan province, were also isolated to afford four new triterpenoids together with three known steroids [ergosterol, ergosterol peroxide and 5,8-epidioxy-(3β,5*a*,8*a*,24*R*)-ergosta-6-en-3-ol)].

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	
บทคัดย่อภาษาไทย	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	
สารบัญ	
คำอธิบายสัญญาลักษณ์และคำย่อ	
บทนำ	1
วิธีการดำเนินการวิจัย	4
ผลและอภิปรายผลการวิจัย	8
สรุปผลการวิจัย	22
บรรณานุกรม	25
ประวัติผู้วิจัย	27

คำอธิบายสัญญาลักษณ์และคำย่อ

μg/mL	microgram per milliliter
^{13}C-NMR	carbon-13 nuclear magnetic resonance
COSY	^{1}H-^{1}H correlation spectroscopy
d	doublet (for NMR spectral data)
dd	doublet of doublet (for NMR spectral data)
δ	chemical shift
ε	molar absorptivity
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
^{1}H-NMR	proton nuclear magnetic resonance
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IR	infared spectrophotometer
J	coupling constant (for NMR spectral data)
λ_{max}	wavelength of maximum absorption
MHz	megahertz
MS	mass spectrometer
MTT	3-(4,5-dimethylthiaozol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
Mw	molecular weight
$[M+H]^{+}$	protonated molecular ion
NMR	nuclear magnetic resonance
ppm	part per million
s	singlet (for NMR spectral data)
t	triplet (for NMR spectral data)
TLC	thin layer chromatography (โครมาโทกราฟีแบบบาง)
TOF	Time of flight
UV	ultraviolet
Vis	visible

บทนำ

ด้วยปัจจุบันนี้มีความต้องการหาสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดรักษาโรคที่ยังไม่มียาที่ให้ผลในทางการรักษาหรือเพื่อนำมาทดแทนยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันซึ่งแสดงผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ โดยแหล่งที่มาของสารเหล่านั้นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก คือ รา เนื่องจากรามีความหลากหลายทางสายพันธุ์และยังมีราอีกจำนวนมากที่ยังไม่มีผู้ค้นพบ นอกจากนี้รายังเป็นแหล่งที่สำคัญแหล่งหนึ่งในการสร้างสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้

ราเอ็นโดไฟท์เป็นกลุ่มราประเภทหนึ่งที่เจริญอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชที่ยังมีชีวิตอยู่โดยไม่ทำให้พืชชนิดนั้นเกิดโรค ราเอ็นโดไฟท์สามารถเจริญอยู่ได้ทุกส่วนของพืช ได้แก่ ใบ กิ่ง ก้าน เปลือก ลำต้น และราก ราเอ็นโดไฟท์นั้นได้มีการศึกษาอย่างจริงจังตลอดระยะเวลาเกือบ 20 ปี โดยพบว่าราเอ็นโดไฟท์มีประโยชน์ต่อพืชที่มันอาศัยอยู่ ตัวอย่างเช่น การสร้างสารที่เป็นประโยชน์เพื่อป้องกันการคุกคามพืชผู้ให้อาศัยโดยสัตว์และแมลง การสร้างสารที่ยับยั้งหรือป้องกันจุลชีพก่อโรคพืช การสร้างสารที่ช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืชและการช่วยให้พืชผู้ให้อาศัยทนแล้งได้ดีขึ้น เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานแสดงสัดส่วนการพบโครงสร้างของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิชนิดใหม่เปรียบเทียบกับโครงสร้างสารที่เคยรายงานแล้วของราเอนโดไฟต์พบว่ามีโอกาสได้สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิชนิดใหม่จากราเอ็นโดไฟท์มากถึง 51% ในขณะที่ราบนพื้นแผ่นดินในกลุ่มอื่นๆมีโอกาสได้สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิชนิดใหม่ในสัดส่วนที่น้อยกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการศึกษาเพื่อแยกราจากแหล่งใหม่จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะแยกได้ราสายพันธุ์ใหม่และ/หรือราที่สร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ยังพบอีกว่าราเอ็นโดไฟท์สามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และ รา ฤทธิ์การทำลายเชื้อมาลาเรีย และฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง การค้นพบซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้ราเอ็นโดไฟท์ได้รับความสนใจอย่างมาก คือ การพบราเอ็นโดไฟท์ *Taxomyces andreane* ซึ่งแยกได้จากเปลือกลำต้นของ *Taxus brevifolia* (Pacific yew) สามารถสร้าง Taxol ซึ่งเป็นยารักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน ได้เช่นเดียวกับพืชที่มันอาศัยอยู่ นอกจากนี้ยังพบว่าราเอ็นโดไฟท์ *Pestalotiopsis microspore* ซึ่งเป็นราที่เจริญอยู่ในต้น *Taxus wallachiana* ก็สามารถสร้าง Taxol ได้เช่นเดียวกัน

ข้าพเจ้าและหน่วยวิจัย RCBC ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาวิจัยสารเมแทบอไลท์และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเมแทบอไลท์ที่สร้างโดยราเอ็นโดไฟท์พืชสมุนไพรไทย พบว่าราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรสามารถสร้างสารเมแทบอไลท์ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ตัวอย่างเช่น รา *Diaporthe* sp. ที่แยกได้จากใบเปล้าน้อยสร้างสารยับยั้ง CYP3A4 ชนิดใหม่ คือ Diaporthichalasin ที่มีการยับยั้ง CYP3A4 ด้วย IC_{50} 0.626 μM ราเอ็นโดไฟท์ *Xylaria* sp. ที่แยกได้จากใบกระท้อนพบสารเมแทบอไลท์ชนิดใหม่สองชนิดที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย นั่นคือ 2-chloro-5-methoxy-3-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione และ xylariaquinone A ซึ่งสารทั้งสองนี้มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียสายพันธุ์ *Plasmodium falciparum*, K1, ด้วยค่า IC_{50} 1.84 และ 6.68 ไมโครโมลาร์ และมีความเป็นพิษต่อ African green monkey kidney fibroblasts (Vero cells) ซึ่งเป็นเซลล์

ปรกติด้วยค่า IC_{50}1.35 และ >184 ไมโครโมลาร์, ตามลำดับ ซึ่งจากผลที่ได้นี้ สาร xylariaquinone A มีการออกฤทธิ์ที่ดีและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปรกติต่ำ

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าราเอ็นโดไฟท์เป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงให้ความสนใจในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอ็นโดไฟท์ ซึ่งในอนาคตราเอ็นโดไฟท์มีแนวโน้มว่าจะเป็นแหล่งผลิตสารสำคัญที่มีประโยชน์ในทางยาหรือแหล่งผลิตสารชนิดใหม่ๆที่สามารถพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่างๆหรือแหล่งผลิตสารชนิดใหม่ๆที่อาจนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานหรือเครื่องมือในการศึกษาวิจัยได้ เมื่อมานานมานี้ได้แยกราเอ็นโดไฟท์จากพืชสมุนไพรไทยและได้ทำการคัดกรองฤทธิ์ต้านจุลชีพและความเป็นพิษต่อไรทะเล (brine shrimp) พบว่าได้ราเอ็นโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลชีพและมีความเป็นพิษต่อไรทะเล ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีความมุ่งหมายเพื่อศึกษาสารเมแทบอไลท์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพและต้านมะเร็งของราเอ็นโดไฟท์เหล่านั้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการสร้างสารเมแทบอไลท์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพและต้านมะเร็งของราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทย
2. เพื่อสกัด แยกและวิเคราะห์สารเมแทบอไลท์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพและต้านมะเร็งซึ่งสร้างโดยราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาสารเมแทบอไลท์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพและต้านมะเร็งซึ่งสร้างโดยราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร โดยราเอ็นโดไฟท์ที่ได้ทำการคัดกรองฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์เป็นพิษต่อไรทะเลที่ได้รวบรวมไว้ นำมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณ แล้วทำการสกัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำเลี้ยงและจากเส้นใย ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

วิธีการดำเนินการวิจัยโดยทั่วไป

1 ศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องทั้งหมด
2 ศึกษาการสร้างสารเมแทบอไลท์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพและต้านมะเร็งโดยการเพาะเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ที่คัดเลือกไว้
3 สกัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนน้ำเลี้ยงและจากส่วนเส้นใยราโดยวิธีทางโครมาโทกราฟี หรือวิธีการสกัดแยกอื่นๆที่เหมาะสม
4 ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยใช้ IR, NMR, MS
5 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง
6 รวบรวมผลการทดลอง วิเคราะห์และสรุปผล เขียนรายงาน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สายพันธุ์ราที่สร้างสารต้านจุลชีพและ/หรือสารต้านมะเร็ง ซึ่งเป็นแหล่งผลิตสารสำคัญที่มีประโยชน์ในทางยาหรือแหล่งผลิตสารชนิดใหม่ๆที่สามารถพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่างๆหรือแหล่งผลิตสารชนิดใหม่ๆที่อาจนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานหรือเครื่องมือในการศึกษาวิจัย
2. ได้สารต้านจุลชีพและ/หรือสารต้านมะเร็งชนิดใหม่ซึ่งมีประโยชน์ในทางยาหรือสามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่างๆหรือการนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานหรือเครื่องมือในการศึกษาวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการทั่วไป

เอ็นเอ็มอาร์ สเปกตรัม (NMR spectra) วิเคราะห์ได้จากด้วย Mercury Varian 400 Spectrometer ซึ่งทำงานที่ 400 MHz สำหรับ ^{1}H และที่ 100 MHz สำหรับ ^{13}C สัญญาณ เอ็นเอ็มอาร์ ที่ได้อ้างอิงกับโปรตอนของตัวทำละลายที่เหลืออยู่ใน $CDCl_3$ ที่ δ_H 7.26 ppm และที่ δ_H 77.00 ppm ยูวี สเปกตรัม (UV spectra) วิเคราะห์ได้จากเครื่อง Varian Cary 50 Probe spectrophometer ไออาร์ สเปกตรัม (IR spectra) วิเคราะห์ได้จากเครื่อง Nicolet Impact 410 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer แมส สเปกตรัม (mass spectra) วิเคราะห์ได้จากเครื่อง Micromass LCT (LC/MS) โดยใช้เทคนิค Electrospray ionization การหมุนระนาบแสงจำเพาะ (Specific rotations) วิเคราะห์ได้จากเครื่อง Perkin Elmer 341 จุดหลอมเหลววัดได้ด้วยเครื่องหาจุดหลอมเหลว Electrothermal 9100

สารเมแทบอไลท์ของ *Emericella variecolor* ที่เพาะเลี้ยงในในอาหารเหลว Malt Czapek-Dox (MCzB)

ตัดต้นเชื้อ *Emericella variecolor* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Malt Czapek-Dox ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ให้ได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 mm จากนั้นใส่ห้าชิ้นที่ตัดไว้ลงในขวดเพาะเลี้ยง 250 ml ที่มี MCzB อยู่ 100 ml (x 203) เพาะเลี้ยงราโดยตั้งอยู่กับที่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง. กรองแยกน้ำเลี้ยงและเส้นใยออกจากกันโดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1 ได้น้ำเลี้ยง (16 L) และเส้นใย (1.53 กก. ของน้ำหนักเปียก)

ระเหยน้ำเลี้ยงให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบเยือกแข็งได้กากของแข็งสีน้ำตาลดำ (118.9 g) สกัดกากด้วย เอธิล แอซิเทต (500 ml x 5) ในอ่างอัลตราโซนิก ระเหยสารสกัด เอธิล แอซิเทต ภายใต้การลดความดันได้ของแข็งสีน้ำตาลดำ (1.53 g) การที่เหลืออยู่ (116.6 g) สกัดต่อด้วยเมธานอล (500 ml x 5) ในอ่างอัลตราโซนิก หลังจากการระเหยเมธานอล) ได้กาก (70 g)

สกัดเส้นใย (1.53 กก. ของน้ำหนักเปียก) ด้วยเมธานอล (2 L x 5) แล้วระเหยตัวทำละลายได้ของแข็งสีน้ำตาลดำ (128.38 g) สกัดของแข็งสีน้ำตาลดำด้วย เอธิล แอซิเทต (2 L x 5) และ เมธานอล (2 L x 5), โดยลำดับ หลังจากการระเหยตัวทำละลายออกไป, ได้สารสกัดหยาบ เอธิล แอซิเทต (77.5 g) และกากสกัดหยาบเมธานอล (48.54 g)

แยกสารสกัดหยาบ เอธิล แอซิเทต ของเส้นใยราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน MCzB ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ 312 ลำดับส่วนแยก ล้างของแข็งจากส่วนแยก 23-44 ซึ่งได้จากการชะด้วย 15-20% เอธิล แอซิเทต (EtOAc) ในเฮกเซน ด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ได้สารประกอบ **1** (48 mg) เป็นของแข็งสีขาว ล้างของแข็งจากส่วนแยก 45-52 ซึ่งได้จากการชะด้วย 20-25% EtOAc ในเฮกเซน ด้วย 15-20% เอธิล แอซิเทต (EtOAc) ในเฮกเซน ด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ได้สารประกอบ **2** (15 mg) เป็นผลึกสีขาว ในระหว่างการระเหยส่วนแยก 53-63 ซึ่งได้จากการชะด้วย 25 % EtOAc ในเฮกเซน สารประกอบ **3** ตะกอนออกมา หลังจากการกรอง ได้สารประกอบ **3** (15 mg) เป็นของแข็งสีเหลือง ในระหว่างการระเหย

แยกสารสกัดหยาบ เอธิล แอซิเทต ของน้ำเลี้ยง MCzB ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ 330 ลำดับส่วนแยก ล้างของแข็งที่ได้จากส่วนแยก 34-48 ซึ่งได้จากการชะด้วย 20-25 % EtOAc ในเฮกเซน ด้วยของผสม เฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ได้สารประกอบ **9** (4 mg) เป็นของแข็งสีส้ม ล้างของแข็งที่ได้จากส่วนแยก 49-52 ซึ่งได้จากการชะด้วย 25-30 % EtOAc ในเฮกเซน ด้วยของผสม เฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ทำให้ได้สารประกอบ **5** (4 mg) เป็นของแข็งสีส้ม ล้างของแข็งที่ได้จากส่วนแยก 81-110 ซึ่งได้จากการชะด้วย 50 % EtOAc ในเฮกเซน ด้วยของผสม เฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ทำให้ได้สารประกอบ **10** (7 mg) เป็นของแข็งสีส้ม

สารเมแทบอไลท์ของ *Emericella variecolor* ที่เพาะเลี้ยงในในอาหารเหลว Czapek-Dox (CzB)

ตัดต้นเชื้อ *Emericella variecolor* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Czapek-dox ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ให้ได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 mm จากนั้นใส่ห้าชิ้นที่ตัดไว้ลงในขวดเพาะเลี้ยง 250 ml ที่มี CzB อยู่ 100 ml (x 211) เพาะเลี้ยงราโดยตั้งอยู่กับที่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง. กรองแยกน้ำเลี้ยงและเส้นใยออกจากกันโดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1 ได้น้ำเลี้ยง (14 L) และเส้นใย (1.30 กก. ของน้ำหนักเปียก)

ระเหยน้ำเลี้ยงให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบเยือกแข็งได้กากของแข็งสีน้ำตาลดำ (87.45 g) สกัดกากด้วย เอธิล แอซิเทต (2L x 5) ในอ่างอัลตราโซนิก ระเหยสารสกัด เอธิล แอซิเทต ภายใต้การลดความดัน ได้ของแข็งสีน้ำตาลดำ (790 mg) การที่เหลืออยู่ (85.38 g) สกัดต่อด้วยเมธานอล (2 L x 5) ในอ่างอัลตราโซนิก หลังจากการระเหยเมธานอล) ได้กาก (56.68 g)

สกัดเส้นใย (1.30 กก. ของน้ำหนักเปียก) ด้วยเมธานอล (2 L x 5) แล้วระเหยตัวทำละลายได้ของแข็งสีน้ำตาลดำ (41.95 g) สกัดของแข็งสีน้ำตาลดำด้วย เอธิล แอซิเทต (2 L x 5) และ เมธานอล (2 L x 5), โดยลำดับ หลังจากการระเหยตัวทำละลายออกไป, ได้สารสกัดหยาบ เอธิล แอซิเทต (26.27 g) และกากสกัดหยาบเมธานอล (13.46 g)

แยกสารสกัดหยาบ เอธิล แอซิเทต ของเส้นใยราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน CzB ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ 280 ลำดับส่วนแยก การระเหยส่วนแยก 36-48 ซึ่งได้จากการชะด้วย 20-25% EtOAc ในเฮกเซน ทำให้สารประกอบ **1** ตกตะกอนออกมา หลังจากการกรองและล้างตะกอนด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล

การแยกสารเมแทบอไลท์เห็ดเผาะ (*Astraeus odoratus*)

นำเห็ดเผาะจากจังหวัดน่าน 2.20 กิโลกรัม (น้ำหนักเปียก)มาบดให้ละเอียดแล้วนำไปแช่ในตัวทำละลายต่างๆ ดังนี้ ได้แก่ เฮกเซน เอธิล แอซิเทต และ เมทานอล ตามลำดับ ระเหยตัวทำละลายที่แช่เห็ดเผาะจนแห้ง ได้สารสกัดหยาบเฮกเซน 9.49 กรัม สารสกัดหยาบเอธิล แอซิเทต 16.27 กรัม และสารสกัดหยาบเมธานอล 119.46 กรัม วิเคราะห์สารประกอบโดยใช้ TLC และ ^{1}H-NMR

แยกส่วนสกัดหยาบเอธิล แอซิเทตโดยใช้ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายดังนี้ Hexane, Hexane : EtOAc, EtOAc, EtOAc: MeOH, MeOH ตามลำดับ ได้ 130 ลำดับส่วนแยก นำมาวิเคราะห์โดยใช้ TLC และ ^{1}H NMR จากนั้นลำดับส่วนแยกที่มีสารประกอบคล้ายคลึงกันนำมารวมเข้าด้วยกัน ได้ 23 ส่วนแยก ล้างของแข็งที่ได้จากส่วนแยกที่ 15-22 ซึ่งได้จากการชะด้วย 25 %EtOAc ในเฮกเซน ด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ได้ Ergosterol (4 mg) เป็นตะกอนสีขาว ส่วนแยก 27-30 ซึ่งได้จากการชะด้วย 30% EtOAc ในเฮกเซน นำมาแยกโดย semi-preparative reverse phase HPLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์ H_2O:MeOH (20:80) ไปจนถึง MeOH อัตราการไหล 3.0 ml/min และตรวจวัดโดยใช้ UV ที่ช่วงคลื่น 220 และ 254 nm ได้สาร Triterpene 1 (4 mg) ที่เวลาการกักเก็บ 21.5 นาที, ergosterol peroxide (11.3 mg) ที่เวลาการกักเก็บ 27.5 นาที และ 5,8-epidioxy-(3β,5*a*,8*a*,24*R*)-ergosta-6-en-3-ol (6.8 mg) ที่เวลาการกักเก็บ 29 นาที ส่วนแยก 31-34 ซึ่งได้จากการชะด้วย 40% EtOAc ในเฮกเซน นำมาแยกโดย semi-preparative reverse phase HPLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์ H_2O:MeOH (30:70) ไปจนถึง MeOH อัตราการไหล 3.0 ml/min และตรวจวัดโดยใช้ UV ที่ช่วงคลื่น 220 และ 254 nm ได้สาร Triterpene 2 (4.8 mg) ที่เวลาการกักเก็บ 19.5 นาที และ Triterpene 1 (24.2 mg) ที่เวลาการกักเก็บ 23 นาที

ส่วนแยก 43-46 ซึ่งได้จากการชะด้วย 50% EtOAc ในเฮกเซน นำมาแยกโดย semi-preparative reverse phase HPLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์ H_2O:MeOH (30:70) ไปจนถึง MeOH อัตราการไหล 3.0 ml/min และตรวจวัดโดยใช้ UV ที่ช่วงคลื่น 220 และ 254 nm ได้สาร Triterpene 3 (4.45 mg) ที่เวลาการกักเก็บ 25.0 นาที และ Triterpene 4 (3.8 mg) ที่เวลาการกักเก็บ 30 นาที

การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity activity) สำหรับสายพันธุ์เซลล์มะเร็งคน 5 ชนิด ประกอบด้วย BT474 (breast), CHAGO (lung), HEP-G2 (hepatoma), KATO-3 (gastric) และ SW620 (colon) โดยวิธีการวัดสี MTT (MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide] colorimetric method) (Carmichael et. al., 1987).

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 โดยวิธี microdilution ซึ่งทำในถาดไมโครไตเตอร์ปลอดเชื้อ 96 หลุม

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

สารเมแทบอไลท์ของ *Emericella variecolor* ที่เพาะเลี้ยงในในอาหารเหลว Malt Czapek-Dox (MCzB)

การแยกสารสกัดหยาบ เอธิล แอซิเทต ของเส้นใยราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน MCzB ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ 312 ลำดับส่วนแยก ทำการแยกของแข็งจากส่วนแยก 23-44 ซึ่งได้จากการชะด้วย 15-20% เอธิล แอซิเทต (EtOAc) ในเฮกเซน โดยการล้างด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ได้สารประกอบ **1** เป็นของแข็งสีขาว:

m.p. 228-230 ^{o}C;

$[\alpha]_D^{25}$ +8 ($CHCl_3$, c 0.3);

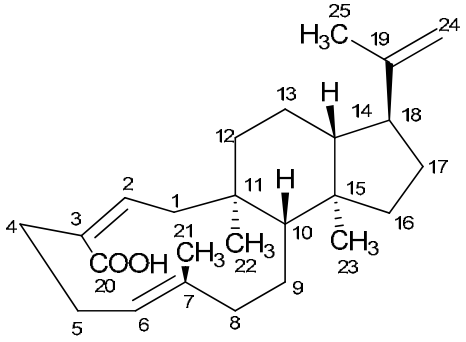
EIMS (EI 70 eV) *m/z* 370 [M^+, 53 %], 355 (23), 327 (32), 257 (12), 246 (15), 203 (29), 189 (100), 175 (24), 161 (40), 147 (52), 135 (40), 121 (45), 107 (60), 95 (50), 93 (48), 81 (42), 67 (28) and 55 (24);

λ_{max} ($CHCl_3$) (ε) 245 (5617) nm;

ν_{max} (KBr) 3435 (br.s), 2945 (w), 2855 (w), 1745 (m), 1649 (m), 1563 (m), 1411 (m), 1264 (w) and 1022 (w) cm^{-1};

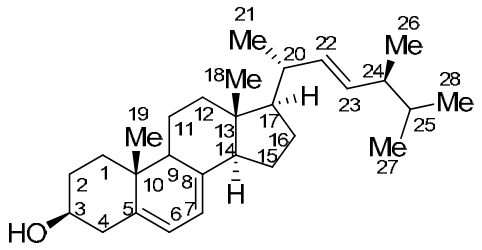
δ_H ($CDCl_3$, 400 MHz) 5.94 (1H, d, 4.4 Hz, 2-H), 4.97 (1H, dd, 4.8 and 4.8 Hz, 6-H), 4.75 (s, 1H, H-24), 4.73 (1H, s, 24-H), 2.89 (1H, d, 12.0 Hz, 4-H), 2.71 (1H, dd, 6.8 and 7.6 Hz, 1-H), 2.31 (1H, m, 5-H), 2.26 (1H, m, 18-H), 2.11 (1H, m, 5-H), 2.09 (1H, m, 1-H), 2.06 (1H, m, 8-H), 1.97 (1H, m, 8-H), 1.90 (1H, m, 16-H), 1.87 (1H, m, 4-H), 1.75 (3H, s, 25-H), 1.57 (1H, m, 13-H), 1.54 (1H, m, 16-H), 1.50 (1H, m, 9-H), 1.48 (1H, m, 17- H), 1.46 (1H, m, 12-H), 1.32 (3H, s, 21-H), 1.31 (1H, m, 13-H), 1.30 (1H, m, 17-H), 1.28 (1H, m, 12-H), 1.26 (1H, m, 10-H), 1.20 (1H, m, 12-H), 1.17 (1H, m, 14-H), 0.90 (s, 3H, 22-H) and 0.84 (3H, s, 23-H) ppm;

δ_C ($CDCl_3$, 100 MHz) 173.19 (20-CO), 150.16 (2-CH), 148.12 (19-C), 138.74 (7C), 125.28 (3-C), 123.68 (6-CH), 109.61 (24-CH_2), 54.43 (14-CH), 49.63 (10-CH), 47.59 (18-CH), 45.85 (15-C), 42.64 (1-CH_2), 41.15 (13-CH_2), 40.37 (8-CH_2), 39.17 (12-CH_2), 37.92 (11-C), 34.85 (4-CH_2), 27.69 (16-CH_2), 27.35 (5-CH_2), 24.13 (22-CH_3), 22.27 (9-CH_2), 21.03 (17-CH_2), 19.98 (25-CH_3), 15.98 (21-CH_3) and 15.57 (23-CH_3) ppm.



จากข้อมูล ^{1}H, ^{13}C, gHSQC, gHMBC, gCOSY, TOCSY และ NOESY ทำให้ระบุได้ว่าสารประกอบ **1** คือ stellatic acid ข้อมูลการหมุนระนาบแสงจำเพาะของ stellatic acid ที่แยกได้ $[\alpha]_D^{25}$ +10 (*c* 0.3, $CHCl_3$) ที่สอดคล้องกับรายงานไว้ก่อนหน้า [Quereshi et. al., 1980 $[\alpha]_D^{25}$ +13.5 ($CHCl_3$, c 0.3)] ทำให้ยืนยันได้ว่าสาร **1** คือ stellatic acid

การล้างของแข็งจากส่วนแยก 45-52 ซึ่งได้จากการชะด้วย 20-25% EtOAc ในเฮกเซน ด้วย 15-20% เอธิล แอซิเทต (EtOAc) ในเฮกเซน ด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ได้สารประกอบ **2** (15 mg) เป็นผลึกสีขาว:



2

m.p. 167-168 °C;

$[\alpha]_D^{20}$ -84($CHCl_3$, c 0.1);

ESIMS: $[M+H]^+$ 397.3421;

λ_{max} 325(967), 345 (864) nm;

ν_{max} (KBr) 3427 (br, s), 2956 (s), 2871 (s), 1654 (w), 1553 (w), 1459 (m), 1382 (m), 1370 (m), 1241 (w), 1158 (w), 1127 (w), 1111 (w), 1058 (m), 1039 (m), 983 (m), 969 (m), 834 (w), 802 (w) cm^{-1};

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 5.56 (1H, dd, *J* = 1, 5.2 Hz, H-6), 5.38 (1H,dd, *J* = 1, 5.2 Hz, H-7), 5.19 (1H, m, H-22), 5.18 (1H, m, H-23), 3.63 (1H, H-3), 2.47(1H, ddd, J = 2.8, 4.8,14.0 Hz, H-4), 2.27 (1H, dd, J =12.4, 13.6, m, H-4), 2.07(1H, m, H-12), 2.04 (1H, m, H-20), 1.98 (1H, m, H-9),1.92 (1H, m, H-2), 1.91 (1H, m, H-1), 1.90 (1H, m, H-14), 1.72 (1H, m, H-16), 1.64 (1H, m, H-11), 1.64 (1H, m, 15), 1.58 (1H, m, H-11), 1.50 (1H, m, H-2), 1.47(1H, m, H-25),1.35 (1H, m, H-15), 1.32 (1H, m, H-1), 1.28 (1H, m, H-16), 1.25 (1H, m, H-17), 1.24 (1H, m, H-12), 1.03 (3H, d, *J* = 6.4 HzH-27), 0.93(3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.82 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-26), 0.82 (3H, *J* = 6 Hz, H-21), 0.62 (3H, s, H-18) ppm;

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): 141.37 (s, C-8), 139.77 (s, C-5), 135.56 (d, C-23), 131.94 (d, C-22), 119.57 (d, C-6), 116.26 (d, C-7), 70.44 (d, C-3), 55.68 (d, C-17), 54.54 (d, C-14), 46.21 (d, C-9), 42.80(d, C-24), 42.80 (s, C-13), 40.73 (t, C-4), 40.45 (d, C-20), 39.05 (t, C-12), 38.35 (t, C-1), 37.00 (s, C-10), 33.07 (d, C-25), 31.93 (t, C-2), 28.30 (t, C-16), 22.99 (t, C-15), 21.09 (q, C-27), 21.09 (t, C-11), 19.96 (q, C-26), 19.65 (q, C-21), 17.61 (q, C-28), 16.27 (q, C-19), 12.04 (q, C-18) ppm.

จากข้อมูล ^{1}H, ^{13}C, gHSQC, gHMBC, gCOSY, TOCSY และ NOESY ทำให้ระบุได้ว่าสารประกอบ **2** คือ ergosterol จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^{13}C NMR กับที่รายงานไว้โดย Abraham และ Monasterios, 1974 และ $[\alpha]_D^{21}$ -130.7° ซึ่งรายงานไว้โดย Pruess, Peterson, และ Fred, 1932 ทำให้ยืนยันได้ว่าสารประกอบ **2** คือ ergosterol

ในระหว่างการระเหยส่วนแยก 53-63 ซึ่งได้จากการชะด้วย 25 % EtOAc ในเฮกเซน สารประกอบ **3** ตะกอนออกมา หลังจากการกรอง ได้สารประกอบ **3** (15 mg) เป็นของแข็งสีเหลือง

m.p. 219-220°C;

$[\alpha]_D^{20}$ -38 (c 0.1, $CHCl_3$);

EIMS *m/z* 494 [M^+, 8%], 451 (6), 434 (16), 423 (16), 363(100), 347 (12), 333 (14), 307 (10), 293 (8);

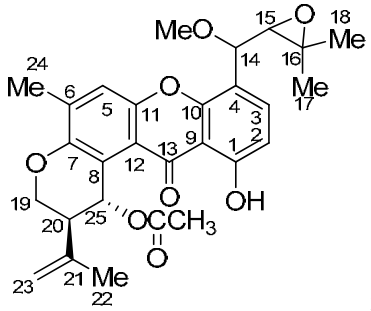
λ_{max} ($CHCl_3$): (ε) 385 (10167), 294 (12953), 270 (42563), 250 (36428) nm;

ν_{max} (KBr) cm^{-1}: 3447 (OH), 2921, 1746 (C=O), 1637, 1559, 1470, 1423, 1369, 1236, 1077, 1018, and 828 cm^{-1}:

^{1}H-NMR($CDCl_3$,400 MHz) δ_H (ppm): 1.23 (3H, s, CH_3 -17), 1.31 (3H, s, CH_3-18), 1.89 (3H, s, CH_3 -23), 2.08 (3H, s, OAc-25), 2.35 (3H, s, CH_3-24), 2.72 (1H, s, H-20), 3.17 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-15), 4.31 (1H, dd, *J* = 3.2, 11.2 Hz, H-19b),4.55 (1H, d, *J* = 11.2 Hz, H-19a), 4.63, (1H, d, *J* = 8.0 Hz,H-14b), 4.76 (1H, s, H-22b), 4.81 (1H, s, H-22a), 6.83(1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2), 6.90 (1H, s, H-25), 7.26 (1H, s,H-5), 7.66 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3), 13.14 (1H, s, 1-OH) ppm;

^{13}C-NMR (100 MHz, CDCl) δ_C (ppm):183.2 (C-13), 170.0(-O*C*CH_3), 162.2 (C-1), 152.5 (C-10), 151.6 (C-11), 150.3 (C-7), 141.4 (C-21), 138.0 (C-6), 135.1 (C-3), 120.3 (C-5), 116.2 (C-12), 115.5 (C-9), 114.9 (C-8), 112.8 (C-22), 110.8 (C-2), 109.1 (C-4), 76.1 (C-14), 66.7 (C-15), 65.5 (C-25), 63.8 (C-19), 57.8 (C-16), 42.4 (C-20), 24.8 (C-17), 22.4 (C-23), 21.3 (-OC*C*H_3), 19.8 (C-18), 17.4 (C-24) ppm.

จากข้อมูล ^{1}H, ^{13}C, gHSQC, gHMBC, gCOSY, TOCSY และ NOESY ทำให้ระบุได้ว่าสารประกอบ **3** คือ 14-methoxy tajixanthone 25-actate จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR กับที่รายงานไว้โดยคณะผู้วิจัย (Pornpakakul, S และคณะ 2005) ทำให้ยืนยันโครงสร้างสารประกอบ **3** ได้



3

ในระหว่างการระเหย ของแข็งที่ได้จากส่วนแยก 71-75 ซึ่งได้จากการชะด้วย 25-30 % EtOAc ในเฮกเซน ล้างด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ทำให้ได้สารประกอบ **4** (10 mg) เป็นของแข็งสีส้ม

m.p. 207-208 °C;

ESIMS *m/z* 321.08 $[M+Na]^+$, 619.16 $[2M+Na]^+$, 917.25 $[3M+Na]^+$;

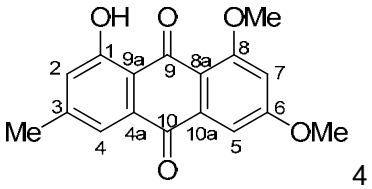
λ_{max} ($CHCl_3$): (ε) 270 (9611), 280 (9387), 303 (4865)420.07 (3859) nm;

ν_{max} (KBr) 3430 (br), 3087 (w), 2933(w), 2845(w), 1665 (w), 1625(s), 1598(s), 1558(m), 1493(m), 1456(m),1363(m), 1327(s), 1263(s), 1226(s), 1167(w), 1131(w), 1054(w), 1011(w), 941(w), 882(w), 842(w) cm^{-1};

^{1}H-NMR (400 MHz) 13.08 (1H, s, OH-1), 7.56 (1H, s, H-4), 7.45 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-7), 7.06 (1H, s, H-2), 6.78 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 4.02 (3H, s, OCH_3-6), 3.98 (3H, s, OCH_3-8), 2.42 (3H, s, CH_3-3)

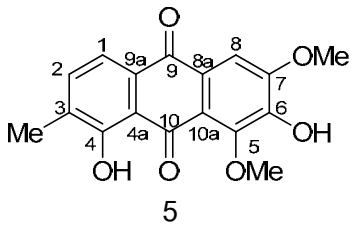
^{13}C-NMR (100 MHz) 187.48 (s, C-9), 182.98 (s, C-10), 165.25 (s, C-8), 162.94 (s, C-6), 162.61 (s, C-1), 146.93 (s, C-3), 137.67 (s, C-10a), 132.30 (s, C-4a), 124.80 (d, C-2), 120.00 (d, C-4), 115.20 (s, C-8a), 114.76 (s, C-9a), 104.71 (d, C-7), 103.93 (d, C-5), 56.61 (q, OCH_3-6), 56.05 (q, OCH_3-8), 21.97 (q, CH_3-3)

จากข้อมูล ^{1}H, ^{13}C, gHSQC, gHMBC, gCOSY, TOCSY และ NOESY ทำให้ระบุได้ว่าสารประกอบ **4** คือ 1-hydroxy-6,8-dimethoxy-3-methyl-9,10-anthraquinone ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีรายงานไว้ก่อนหน้าโดย Waser, และคณะ, 2005 และจากการเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H กับที่รายงานไว้พบว่าสอดคล้องกัน



4

ในระหว่างการระเหยส่วนแยก 101-125 ซึ่งได้จากการชะด้วย 30-35 % EtOAc ในเฮกเซน สารประกอบ **5** ตกตะกอนออกมา กรองตะกอนและล้างด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ทำให้ได้สารประกอบ **5** (38 mg) เป็นของแข็งสีส้ม



5

m.p. 224-225 ^{o}C;

HRESIMS *m/z* 315.0843 $[M+H]^+$, 651.1464 $[2M+Na]^+$ (calcd 315.0868 $[M+H]^+$, 651.1478 $[2M+Na]^+$);

$\lambda_{max}(CHCl_3)$: (ε) 282.96 (12984), 308 (3890), 408.97 (2685);

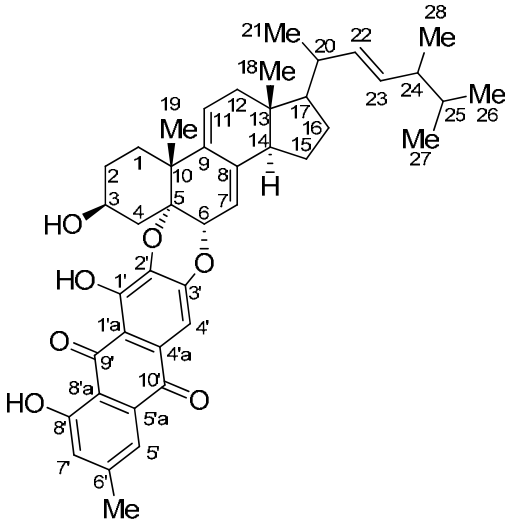
ν_{max} (KBr) 3432(brs), 3004 (w), 2921(w), 2851(w), 1732, 1632(s), 1592(m), 1552(m), 1486(w), 1420 (w), 1340(m), 1270(m), 1217(w), 1154(w),1117(s), 875(w), 795(w) nm;

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) 12.88(1H, s, OH-4), 7.69 (1H, s, H-8), 7.58 (1H, s, H-1), 7.07 (1H, s, H-3), 4.09 (3H, OCH_3-7), 4.03 (3H, OCH_3-5), 2.44 (3H,s, CH_3-2) ppm;

^{13}C-NMR ($CDCl_3$) 187.56 (s, C-10), 182.03 (s, C-9), 162.60 (s, C-4), 151.90 (s, C7), 147.65 (s, C-2 and s, C-5), 144.94 (s, C-6), 132.47 (C-9a), 127.78 (s, C-8a), 124.32(d, C-3), 120.23 (d, C-1 and s, C-10a), 114.62 (s, C4a), 106.58 (d, C-8), 61.89 (q, OCH_3-5), 56.69 (q, OCH_3-7), 29.70 (q, CH_3-2) ppm.

จากข้อมูล ^{1}H, ^{13}C, gHSQC, gHMBC, gCOSY, TOCSY และ NOESY ทำให้ระบุได้ว่าสารประกอบ **5** คือ 4,6-dihydroxy-5,7-dimethoxy-2-methylanthraquinone สารนี้รายงานไว้โดย Barba et. al., 1994 ซึ่งแยกได้จากรากและเปลือก *Chamaecrista greggii*

ส่วนแยก 143-165 ซึ่งได้จากการชะด้วย 35-45 % EtOAc ในเฮกเซน ทำการแยกต่อให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วย reverse phase HPLC โดยใช้เมธานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้ได้สารประกอบ **6** (12 mg) เป็นของแข็งอสัณฐานที่เวลาการกักเก็บ (retention time) 17 นาที



6

m.p. 229-230 ^{o}C;

$[\alpha]^{20}_{D}$ +171^{o} (c 0.1, $CHCl_3$);

HREIMS *m/z* 679.3629 $[M+H]^{+}$ (calcd 679.3635 for $C_{43}H_{51}O_7$);

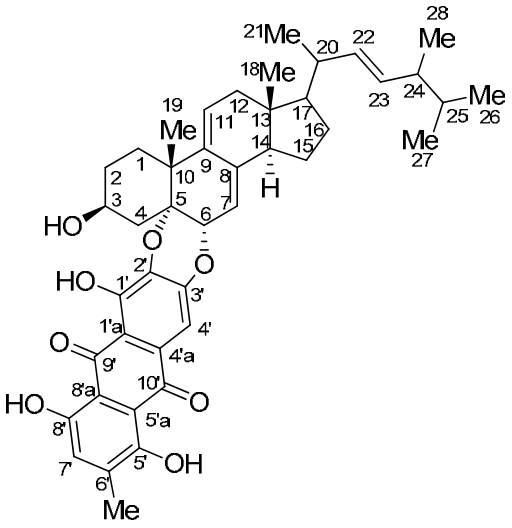
λ_{max} ($CHCl_3$) (ε) (287.98, 22971.4), (434.99, 8848.5) nm:

ν_{max} (KBr) 3549(br), 3473 (br, s), 3415(br), 3233(br), 2957(m), 2924(m), 2866(w), 1718(w), 1665(w), 1616(s), 1569(w), 1443(m), 1412(m), 1378(m), 1311(m), 1278(s), 1200(w), 1164(w), 1098 (w),1040(w) cm^{-1};

^{1}H-NMR ($CDCl_3$,400 MHz) δ_H: 12.32 (1H, s, 1'-OH), 12.01 (1H, s, 8'-OH), 7.57(1H, s, H-5'), 7.37(1H, s, H-4'), 7.03(1H, s, H-7'), 5.72(1H, d, *J* = 5.6 Hz, H-11), 5.21(1H, dd, *J* = 7.2, 15.2 Hz, H-23), 5.12(1H, dd, *J* = 8.0, 15.2 Hz, H-22), 5.03(1H, s, H-7), 4.77(1H, s, H-6), 4.00(1H, m, H-3), 2.43(3H, s, 6'-CH_3) , 2.33(2H, m, H-12), 2.26(1H, m, H-1), 2.21(1H, d, *J* = 14.8, H-14), 2.21(1H, m, H-12), 2.17(1H, dd, *J* = 1.6, 11.6 Hz, H-4), 2.08(1H, m, H-2), 2.01(1H, m, H-20), 1.90(1H, brd, *J* = 13.6 Hz, H-1), 1.82(1H, dd, *J* = 6.8, 13.2 Hz, H-24), 1.71(1H, m, H-16), 1.68(1H, m, H-2), 1.66(1H, m, H-15), 1.63(1H, dd, *J* = 11.2, 14.0 HZ, H-4), 1.45(1H, dt, *J* = 7.2, 12.8 Hz, H-25), 1.33(2H, m, H-15), 1.31(1H, m, H-16), 1.23(3H, d, J = 9.2 Hz, H-19), 1.29(1H, m, H-17), 1.00(3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-21), 0.89(3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-28), 0.81(3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-27), 0.79(3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-26), 0.55(3H, s, H-18) ppm.

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ_C : 193.42(s, C-9'), 181.19(s, C-10'), 162.38(s, C-8'), 153.54(s, H-1'), 148.57(s, C-6'), 147.41(s, C-3'), 140.99(s, C-8), 139.32(s, C-9),135.94(s, C-2'), 135.24(d, C-22), 133.40(s, C-5a'), 132.24(d, C-23), 126.03(s, C-4a'), 124.20(d, C-11), 123.98(d, C-7'), 121.09(d, C-5'), 115.09(d, C-7), 113.77(s, C-8a'), 110.89(d, C-4'), 110.89(s, C-1a') 78.05(s, C-5), 73.62(d, C-6), 66.42(d, C-3), 55.87(d, C-17), 50.87(d, C-14), 42.78(d, C-24), 42.53(s, C-13), 42.00(t, C-12), 42.00(s, C-10), 40.30(d, C-20), 35.40(t, C-4), 33.04(d, C-25), 30.51(t, C-2), 29.45(t, C-1), 28.64(t, C-16), 24.20(q, C-19), 22.88(t, C-15), 22.19(q, CH_3-C6'), 20.68(q, C-21), 19.94(q, C-27), 19.60(q, C-26), 17.62(q, C-28), 11.62(q, C-18) ppm.

และได้สารประกอบ **7** (8 mg) เป็นของแข็งสีที่เวลาการกักเก็บ 26 นาที



7

m.p. 242-243 ^{o}C;

m/z 695.3594 $[M+H]^{+}$ (calcd 695.3584 for $C_{43}H_{51}O_8$);

$[\alpha]_D^{20}$ +172^{o} (c 0.1, $CHCl_3$);

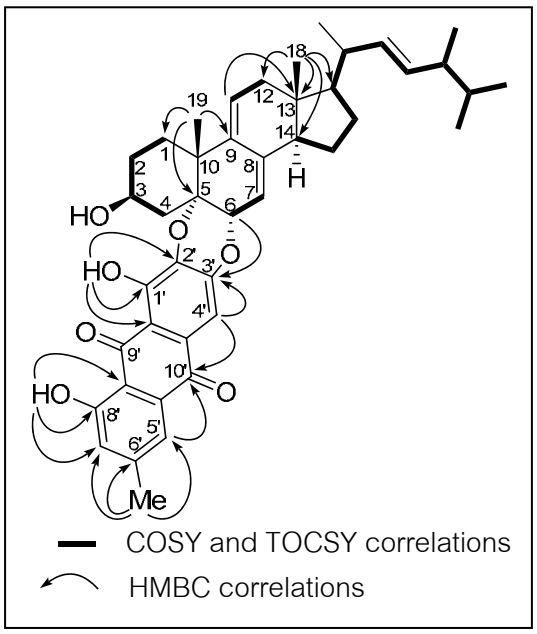
λ_{max} ($CHCl_3$): (ε) (274.95, 15975), 292.06, 18424.5), 493.06, 9443), 515.04, 8094), 529, 6837) nm;

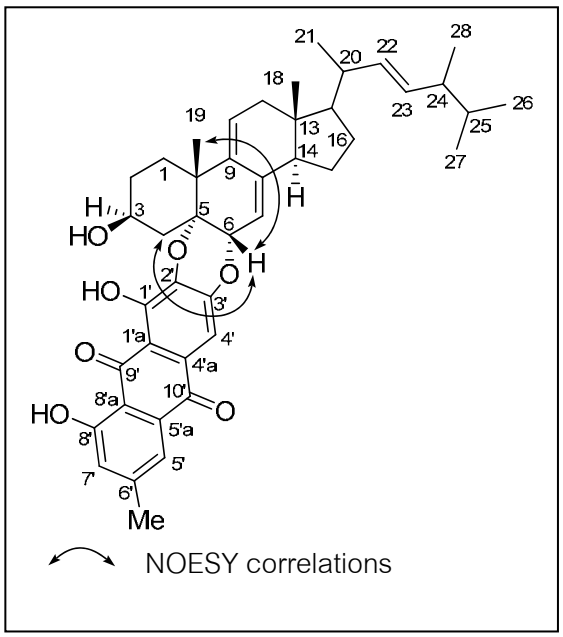
ν_{max} (KBr) 3546(br), 3476(br), 3412(br), 3236(br), 2951(s), 2924(s), 2863(m), 1723(w), 1595(s), 1415(s), 1336(s), 1308(s), 1263(s), 1194(m), 1161(m), 1122(m), 1092(m), 1034(m) cm^{-1};

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm): 13.48(s, OH-5'), 12.48(1H, s, OH-1'), 12.25(1H, s, OH-8'), 7.43(1H, s, H-4'), 7.06(1H, s, H-7'), 5.72(1H, d, *J* = 5.6 Hz, H-11), 5.17(1H, dd, *J* = 7.2, 15.2 Hz, H-23), 5.13 (1H, dd, *J* = 7.6, 15.2 Hz, H-22), 5.03 (1H, s, H-7) , 4.78(1H, s, H-6), 3.99(1H, ddd, H-3), 2.37 (3H, s, Me-6'), 2.25(1H, m H-12), 2.15 (1H, m, H-12), 2.15 (1H, m, H-14), 2.06(2H, m, H-4), 2.04(1H, m, H-2), 1.92(1H, m, H-20), 1.83 (1H, m, H-1), 1.75 (1H, m, H-24), 1.45 (1H, sept, J = 6.4 Hz, H-25), 1.36 (2H, m, H-16), 1.28 (2H, m, H-15), 1.25 (1H, m, H-1),1.24 (1H, m H-17), 1.23 (3H, s, H-19), 1.00 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-21), 0.88 (, 0.81 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-27) , 0.79 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-26), 0.55 (3H, s, H-18) ppm;

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C (ppm): 189.50 (s, C-9'), 185.85 (s, C-10'), 157.46 (s, C-5'), 157.11 (s, C-8'), 153.51 (s, C-1'), 147.28 (s, C-3'), 141.07 (s, C-8), 140.91 (s, C-6'), 139.29 (s, C-9), 136.17 (s, C-2'), 135.23 (d, C-22), 132.25 (d, C-23), 128.51 (d, C-7'), 125.76 (s, C-4a'), 124.26 (d, C-11), 115.03 (d, C-7), 111.72 (s, C-5a'), 111.32 (s, C-1a'), 110.80 (s, C-8a'), 110.24 (d, C-4'), 78.17 (s, C-5), 73.61 (d, C-6), 66.41 (d, C-3), 55.87 (d, C-17), 50.87 (d, C-14), 42.78 (d, C-24), 42.53 (s, C-13), 41.99 (t, C-12), 40.30 (s, C-10), 35.42 (t, C-4), 33.03 (d, C-25), 30.56 (t, C-2), 29.41 (t, C-1), 28.62 (t, C16), 24.20 (q, C-19), 22.87 (t, C-15), 20.67 (q, C-21), 19.92 (q, C-27), 19.59 (q, C-26), 17.61 (q, 28), 16.52 (q, Me-C-6'), 11.62 (q, C-18) ppm.

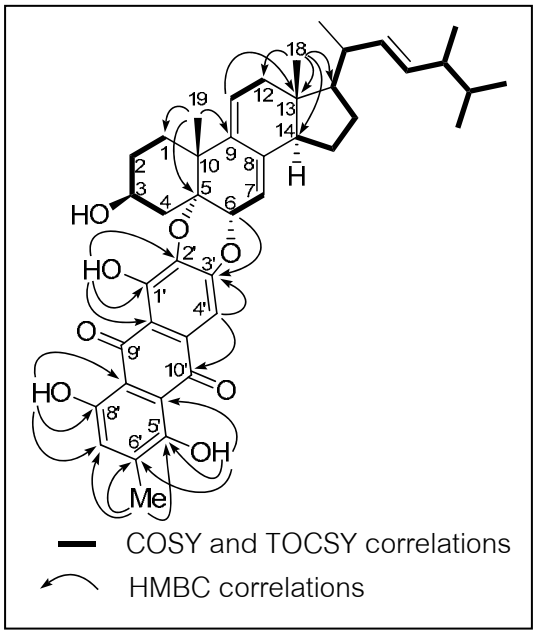
ข้อมูล ^{1}H, ^{13}C NMR ของสารประกอบ **6** บ่งชี้ว่าโครงสร้างของสารประกอบควรประกอบด้วยส่วนของโมเลกุลที่เป็นแอนธราควิโนน (anthraquinone) และที่เป็นสเตียรอยด์ ส่วนแอนธราควิโนนมีลักษณะคล้ายกับ 7-hydroxyemodin ข้อมูล ^{1}H, ^{13}C, gHSQC, gHMBC, gCOSY, TOCSY และ NOESY สามารถเชื่อมต่อโมเลกุลของสารประกอบได้ดังรูปข้างล่างนี้

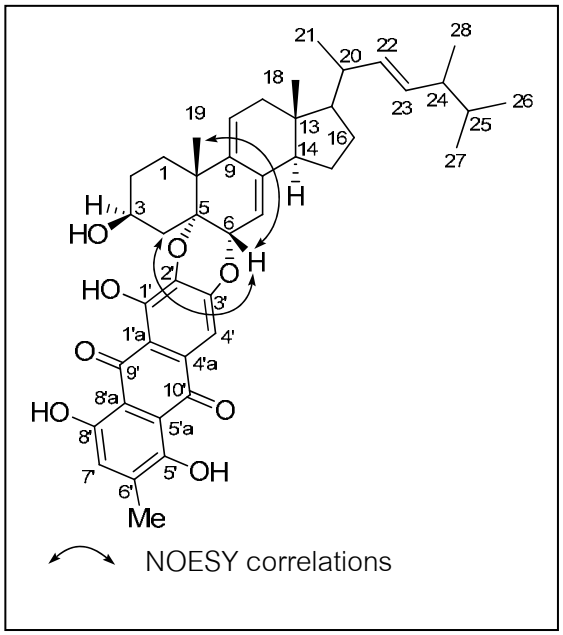


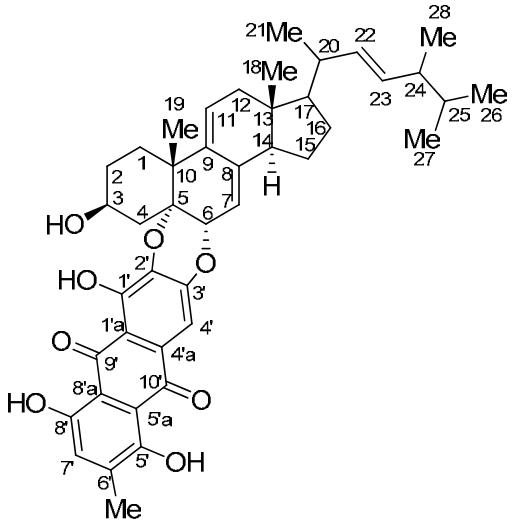


HRMS *m/z* 679.3629 $[M+H]^+$ ทำให้ทราบสูตรโมเลกุลของสารประกอบ **6** คือ $C_{43}H_{50}O_7$ ^{13}C NMR แสดงให้เห็นว่าสารประกอบ **6** มี 43 คาร์บอนประกอบด้วย 7 เมธิลคาร์บอน, 6 sp^3-เมธิลีนคาร์บอน, 7 sp^3-เมไธน์คาร์บอน, 3 sp^3-ควอเทอร์นารีคาร์บอน, 7 sp^2-เมไธน์คาร์บอน, 11 sp^2-ควอเทอร์นารีคาร์บอน, และ 2 คาร์บอนิลคาร์บอน (ที่ 193.42 and 181.19 ppm) การคำนวณจำนวนพันธะคู่จาก ^{13}C NMR ได้ 11 พันธะคู่ แต่สูตรโมเลกุลของสารประกอบ **6** บ่งชี้ว่ามี 19 จำนวนที่สมมูลพันธะคู่ ดังนั้นสรุปได้ว่าสารประกอบ **6** ประกอบด้วยวงทั้งหมด 8 วง ซึ่งประกอบด้วย 3 วงของแอนธราควิโนน, 4 วงของสเตียรอยด์ และอีกหนึ่งวงที่เกิดจากการเชื่อมกันระหว่างแอนธราควิโนนและสเตียรอยด์ ข้อมูล HMBC พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-6 ของส่วนสเตียรอยด์และ 3' ของส่วนแอนธราควิโนน ทำให้ทราบว่ากับ C-5 และ C-6 ของสเตียรอยด์เชื่อมต่อเข้ากับ C-2' และ C-3' ของแอนธราควิโนนเกิดเป็นวงโดยผ่านอะตอมออกซิเจน นอกจากนี้ ข้อมูล NOESY พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-6 และ 4-H_{ax} และ ระหว่าง H-6 และ Me บน C-10 ทำให้สามารถระบุสเตริโอเคมีของสารประกอบ **6** ได้ดังแสดงในรูปข้างบน จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ **6** เป็นสารใหม่ โดยจะตั้งชื่อว่า evanthrasterol A การเชื่อมต่อกันของส่วนแอนธราควิโนนและส่วนสเตียรอยด์นี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับ sirosterol ซึ่งแยกได้มาจากรา *Sirococcus* sp. (Ayer and Ma, 1992)

HRMS *m/z* 679.3629 $[M+H]^+$ ทำให้ทราบสูตรโมเลกุลของสารประกอบ **7** คือ $C_{43}H_{50}O_8$ ^{13}C NMR แสดงให้เห็นว่าสารประกอบ **7** มี 43 คาร์บอนประกอบด้วย 7 เมธิลคาร์บอน, 6 sp^3-เมธิลีนคาร์บอน, 7 sp^3-เมไธน์คาร์บอน, 3 sp^3-ควอเทอร์นารีคาร์บอน, 6 sp^2-เมไธน์คาร์บอน, 12 sp^2-ควอเทอร์นารีคาร์บอน, และ 2 คาร์บอนิลคาร์บอน (ที่ 193.42 and 181.19 ppm) การคำนวณจำนวนพันธะคู่จาก ^{13}C NMR ได้ 11 พันธะคู่ แต่สูตรโมเลกุลของสารประกอบ **7** บ่งชี้ว่ามี 19 จำนวนที่สมมูลพันธะคู่ ดังนั้นสรุปได้ว่าสารประกอบ **7** ประกอบด้วยวงทั้งหมด 8 วง ซึ่งประกอบด้วย 3 วงของแอนธราควิโนน, 4 วงของสเตียรอยด์ และอีกหนึ่งวงที่เกิดจากการเชื่อมกันระหว่างแอนธราควิโนนและสเตียรอยด์ ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสารประกอบ **7** มี







7

ข้อมูล HMBC พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-6 ของส่วนสเตียรอยด์และ 3’ ของส่วนแอนธราควิโนน ทำให้ทราบว่ากับ C-5 และ C-6 ของสเตียรอยด์เชื่อมต่อเข้ากับ C-2’ และ C-3’ ของแอนธราควิโนนเกิดเป็นวงโดยผ่านอะตอมออกซิเจน นอกจากนี้ ข้อมูล NOESY พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-6 และ 4-H_{ax} และ ระหว่าง H-6 และ Me บน C-10 ทำให้สามารถระบุสเตริโอเคมีของสารประกอบ **7** ได้ดังแสดงในรูปข้างบน จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ **7** เป็นสารใหม่ โดยจะตั้งชื่อว่า evanthrasterol B

ล้างของแข็งที่ได้จากส่วนแยก 181-214 ซึ่งได้จากการชะด้วย 50 % EtOAc ในเฮกเซน ด้วย เอธิล แอซิเทต เย็น ได้สารประกอบ **8** (110 mg) เป็นของแข็งสีเหลือง

m.p. 194-195 ^{o}C;

$[\alpha]^{20}_{D}$ -76^{o} (c 0.23, $CHCl_3$);

λ_{max} ($CHCl_3$): (ε) 245 (26928), 255 (33475), 270 (45646), 280 (39579), 300 (13253), and 400 (9002) nm;

ν_{max} (KBr) cm^{-1}: 3486 (OH), 3073, 2976, 2883, 1797 and 1738 (C=O), 1645, 1571, 1474, 1345, 1244, 1046 and 1026 (C-O-C), 898 and 820 cm; EI MS m/z+440 [M, 14%], 409 (14), 398 (8), 371 (44), 333 (100), 283(46), 271 (22), 255 (56), 242 (8), 225 (56), and 59 (39) nm;

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm): 1.34 (3H, s, CH_3-17), 1.39 (3H, s, CH_3-18), 1.82 (3H, s, CH_3-23), 2.28 (3H,s, CH_3-24), 2.37 (1H, s, 16-OH), 2.44 (1H, s, 15-OH), 2.63 (1H, dd, *J* = 10.8, 14.0 Hz, H-14b), 2.69 (1H, s, H-20), 3.16 (1H, dd, *J* = 1.2, 14.0 Hz, H-14a), 3.70 (1H, d, *J* =10.8 Hz, H-15), 4.31 (1H, dd, *J* = 2.8, 10.8 Hz, H-19b), 4.41 (1H, dd, J = 2.0, 10.8 Hz, H-19a), 4.53 (1H, s, H-22b), 4.77 (1H, s, H-22a), 4.98 (1H, d, *J* = 4.0 Hz, 25-OH),5.34 (1H, s, H-25), 6.72 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2), 7.19 (1H,s, H-5), 7.49 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3), 12.54 (1H, s, 1-OH) ppm;

^{13}C-NMR (100 MHz, CDCl) δ_C (ppm): 184.3 (C-13), 160.3(C-1), 153.1 (C-10), 151.9 (C-11), 149.5 (C-7), 142.5 (C-21), 138.5 (C-6), 138.3 (C-3), 120.8 (C-8), 119.1 (C-5),116.8 (C-12), 116.3 (C-9), 112.3 (C-22), 109.9 (C-2),109.2 (C-4), 77.7 (C-15), 72.9 (C-16), 64.5 (C-19), 63.2(C-25), 44.8 (C-20), 32.0 (C-14), 26.5 (C-17), 23.6 (C-18),22.6 (C-23), 17.4 (C-24) ppm.

จากข้อมูล ^{1}H, ^{13}C, gHSQC, gHMBC, gCOSY, TOCSY และ NOESY ทำให้ระบุได้ว่าสารประกอบ **8** คือ tajixanthone hydrate จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR กับที่รายงานไว้โดยคณะผู้วิจัย (Pornpakakul, S และคณะ 2005) ทำให้ยืนยันโครงสร้างสารประกอบ **8** ได้

แยกสารสกัดหยาบ เอธิล แอซิเทต ของน้ำเลี้ยง MCzB ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ 330 ลำดับส่วนแยก ล้างของแข็งที่ได้จากส่วนแยก 34-48 ซึ่งได้จากการชะด้วย 20-25 % EtOAc ในเฮกเซน ด้วยของผสม เฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ได้สารประกอบ **9** (4 mg) เป็นของแข็งสีส้ม

m.p. 239-240;

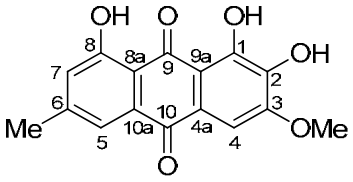
HRTOFMS *m/z* 299.0561 $[M-H]^-$ (calcd for $[M-H]^-$ 299.0557);

λ_{max} ($CHCl_3$)(ε): 278 (20085), 307 (7888), 435 (8448); ν_{max} (KBr) 3430(br), 2954 (w), 2924 (w), 2851(w), 1732 (w), 1625 (s), 1566 (m), 1486 (w), 1456(w), 1397(s), 1263(m), 1208(w), 1156(w), 1125(w), 1046(m), 970 (w), 760(m), 717(m) nm;

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) 12.43 (1H, s, OH-8), 12.05 (1H, s, OH-1), 7.52 (1H, s, H-5), 7.28 (1H, s, H-4), 7.00 (1H, s, H-7), 3.96 (3H, s, OCH_3-3), 2.37 (3H, s, CH_3-6)

^{13}C-NMR($CDCl_3$) (125 MHz) 191.06 (s, C-9), 181.96 (s, C-10), 161.99 (s, C-8), 156.75 (s, C-2), 148.37 (s, C-6), 139.68 (s, C-3), 133.08 (s, C-1, C10a), 129.50 (s, C-4a), 124.13 (d, C-7), 121.10 (d, C-5), 113.66 (s,C-8a), 110.52 (s, C-9a), 109.50 (d, C-4), 60.67 (q, OCH_3-3), 21.93 (q, CH_3-6)

จากข้อมูล ^{1}H, ^{13}C, gHSQC, gHMBC, gCOSY, TOCSY และ NOESY ทำให้ระบุได้ว่าสารประกอบ **9** คือ 1,2,8-Trihydroxy-3-methoxy-6-methylanthraquinone (หรือชื่อสามัญคือ dermoglaucin)



9

ล้างของแข็งที่ได้จากส่วนแยก 49-52 ซึ่งได้จากการชะด้วย 25-30 % EtOAc ในเฮกเซน ด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ทำให้ได้สารประกอบ **5** (4 mg) เป็นของแข็งสีส้ม

ล้างของแข็งที่ได้จากส่วนแยก 81-110 ซึ่งได้จากการชะด้วย 50 % EtOAc ในเฮกเซน ด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ทำให้ได้สารประกอบ **10** (7 mg) เป็นผลึกสีขาว

m.p. 201-202 ^{o}C (dec);

$[\alpha]_D^{20}$ -72 ($CHCl_3$, c 0.24);

HRESIMS *m/z* 427.2050 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{25}H_{31}O_6$ 427.2120);

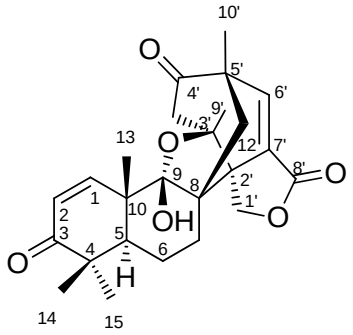
ν_{max} (KBr) 3418 (br,s), 2961 (s), 2929 (s), 2874 (m), 1711 (s), 1668 (s), 1457 (m), 1385 (m), 1376 (m), 1243 (s), 1222 (s), 1151 (s), 1108 (s), 1094 (s), 1055 (s), 964(m), 939 (m), 903 (m) nm;

^{1}H-NMR (400 MHz): 7.26 (1H, d, *J* = 10 Hz, H-1), 7.00 (1H, s, H-6') , 5.87 (1H, d, *J* = 10 Hz, H-2), 4.65 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-1'), 4.02 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-1'), 2.65 (1H, d, J = 19.2 Hz, H-11), 2.48 (1H, d, J = 19.2 Hz, H-11), 2.31 (1H, d, J = 10.4 Hz, H-5), 2.20 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-12) , 1.62 (1H, m, H-7), 1.59 (2H, m, H-6), 1.45 (1H, d, J= 15.6 Hz, H-12), 1.43 (3H, s, H-9'), 1.29 (3H, s, H-10'), 1.23 (1H, m, H-7), 1.20 (3H, s, H-13), 1.11 (3H, s, H-15), 1.06 (3H, s, H-14)

^{13}C-NMR (100 MHz): 204.52 (s, C-3), 200.54 (s, C-4'), 167.79 (s, C-8'), 155.61 (d, C-1), 147.88 (d, C-6'), 129.91 (s, C-7'), 126.37 (d, C-2), 110.00 (s, C-9), 84.20 (s, C-3'), 67.32 (t, C-1'), 55.76 (s, C-2'), 53.72 (s, C-8), 51.33 (t, C-11), 51.33 (s, C-5'), 46.59 (d, C-5), 44.50 (s, C-4), 41.71 (s, C-10), 38.27 (t, C-12), 31.00 (t, C-7), 28.40 (q, C-15), 27.80 (q, C-9'), 22.36 (q, C-10'), 21.34 (q, C-14), 19.04 (q, C-13), 18.63 (t, C-6)

HRMS *m/z* 427.2050 $[M+H]^+$ ทำให้ทราบสูตรโมเลกุลของสารประกอบ **10** คือ $C_{25}H_{28}O_6$ ^{1}H-NMR ของสารประกอบ **10** แสดงให้เห็นสัญญาณสำคัญซึ่งประกอบด้วย 3 โปรตอนโอเลฟินที่ δ_H 7.26, 7.00 และ 5.87 ppm, ห้าหมู่เมธิลที่ δ_H 1.43, 1.29, 1.20, 1.11 และ 1.06 ppm, โปรตอนของเมธิลีนที่ต่อกับออกซิเจนที่ δ_H 4.65 และ 4.02 และโปรตอนของเมธิลีนที่อยู่ใกล้ชิดกับ Csp^2 ที่ δ_H 2.65 และ 2.48 ppm

^{13}C NMR ของสารประกอบ **10** แสดงให้เห็นว่ามี 25 คาร์บอน ซึ่งประกอบด้วย 3 คาร์บอนิลคาร์บอน ที่ δ_C 204.52, 200.54 และ 167.79 ppm, 4 คาร์บอนของโอเลฟินที่ δ_C 155.61, 147.88, 129.91 และ 126.37, ppm, 4 คาร์บอนเมธิลที่ δ_C 28.40, 27.80, 22.36, 21.34 and 19.04 ppm, 5 คาร์บอนเมธิลีนที่ δ_C 67.32, 51.33, 38.27, 31.00 และ 18.63 ppm, หนึ่งคาร์บอนเมไธน์ที่ δ_C 46.59 ppm, และ 8 ควอเทอร์นารีคาร์บอนที่ δ_C 110.00 (OC-OH), 84.20, 55.76, 53.72, 2x 51.33, 44.50 และ 41.71ppm. ข้อมูล ^{1}H, ^{13}C, gHSQC, gHMBC, gCOSY, TOCSY และ NOESY สามารถเชื่อมต่อโมเลกุลของสารประกอบได้ดังรูปข้างล่างนี้



10

สารเมแทบอไลท์ของ *Emericella variecolor* ที่เพาะเลี้ยงในในอาหารเหลว Czapek-Dox (CzB)

ตัดต้นเชื้อ *Emericella variecolor* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Czapek-dox ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ให้ได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 mm จากนั้นใส่ห้าชิ้นที่ตัดไว้ลงในขวดเพาะเลี้ยง 250 ml ที่มี CzB อยู่ 100 ml (x 211) เพาะเลี้ยงราโดยตั้งอยู่กับที่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง. กรองแยกน้ำเลี้ยงและเส้นใยออกจากกันโดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1 ได้น้ำเลี้ยง (14 L) และเส้นใย (1.30 กก. ของน้ำหนักเปียก)

ระเหยน้ำเลี้ยงให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบเยือกแข็งได้กากของแข็งสีน้ำตาลดำ (87.45 g) สกัดกากด้วย เอธิล แอซิเทต (2L x 5) ในอ่างอัลตราโซนิก ระเหยสารสกัด เอธิล แอซิเทต ภายใต้การลดความดัน ได้ของแข็งสีน้ำตาลดำ (790 mg) การที่เหลืออยู่ (85.38 g) สกัดต่อด้วยเมธานอล (2 L x 5) ในอ่างอัลตราโซนิก หลังจากการระเหยเมธานอล) ได้กาก (56.68 g)

สกัดเส้นใย (1.30 กก. ของน้ำหนักเปียก) ด้วยเมธานอล (2 L x 5) แล้วระเหยตัวทำละลายได้ของแข็งสีน้ำตาลดำ (41.95 g) สกัดของแข็งสีน้ำตาลดำด้วย เอธิล แอซิเทต (2 L x 5) และ เมธานอล (2 L x 5), โดยลำดับ หลังจากการระเหยตัวทำละลายออกไป, ได้สารสกัดหยาบ เอธิล แอซิเทต (26.27 g) และกากสกัดหยาบเมธานอล (13.46 g)

แยกสารสกัดหยาบ เอธิล แอซิเทต ของเส้นใยราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน CzB ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ 280 ลำดับส่วนแยก การระเหยส่วนแยก 36-48 ซึ่งได้จากการชะด้วย 20-25% EtOAc ในเฮกเซน ทำให้สารประกอบ **1** ตกตะกอนออกมา หลังจากการกรองและล้างตะกอนด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ได้ สารประกอบ **1** (12 mg) เป็นของแข็งสีขาว ล้างของแข็งที่ได้จากส่วนแยก 49-56 ซึ่งได้จากการชะด้วย 25 % EtOAc ในเฮกเซน ด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ได้สารประกอบ **2** (10 mg) เป็นผลึกไม่มีสี

การแยกสารเมแทบอไลท์เห็ดเผาะ (*Astraeus odoratus*)

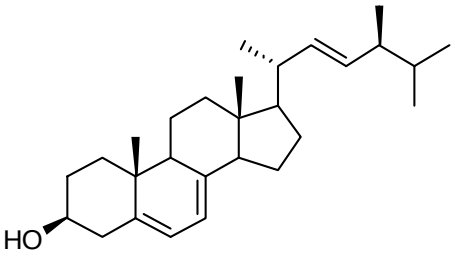
ราในกลุ่ม *Astraeus* เป็นเชื้อราตระกูลหนึ่งของ ectomycorrhizal ซึ่งอยู่ในสภาวะแวดล้อมภูมิอากาศแบบอบอุ่นและร้อนชื้น พบได้ทั่วไปทั่วโลก ในเอเชีย พบ 3 สปีชีส์และ 1 variety : *Astraeus odoratus* Phosri, Watling, M. P. Martin & Whalley (syn. *A. thailandicus*; Phosri และคณะ, 2004*); A. asiaticus* Phosri, M. P. Martin & Watling (Phosri et al. 2007*); A. hygrometricus* (Pers.) Morgan (Morgan 1889; Ito 1959) และ *A. hygrometricus* var. *koreanus* V. J. Stenek (Stenek, 1958; Kreisel, 1976; Imazeki และ Hongo, 1989). ในภูมิประเทศอื่นๆ *A. hygrometricus* (อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ ยุโรป แอฟริกา และ ออสเตรเลีย) และ *A. pteridis* (อเมริกาเหนือ และ Canary Islands) (Robert 2003; Baseia and Galvao 2001; De Roman et al, 2005; Phosri et al. 2007). โดยต้นไม้ที่อยู่อาศัยของ *Astraeus hygrometricus* และ *A. pteridis* ได้แก่ *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Alnus*, *Eucalyptus* และ *Castanea ส่วน A. odoratus* และ *A. asiaticus* รายงานว่าพบได้ในป่า *Dipterocarp* (Trappe 1967; Malajczuk และคณะ, 1982; Phosri และคณะ, 2007).

มีรายงานว่า *Astraeus* พบสารประกอบในกลุ่ม steroids (Takaishi, Y. และคณะ, 1987), triterpenoids (Takaishi, Y และคณะ, 1987; Stanikunaite, R. และคณะ, 2008), , glucans (Chakraborty, I. และคณะ, 2004; Maiti, D และคณะ, 2008; Chakraborty, I. และคณะ, 2007), และ proteins (Maiti, S. และคณะ, 2008) และ volatile compounds (Kakumyan, P และ Matsui, K. 2009)

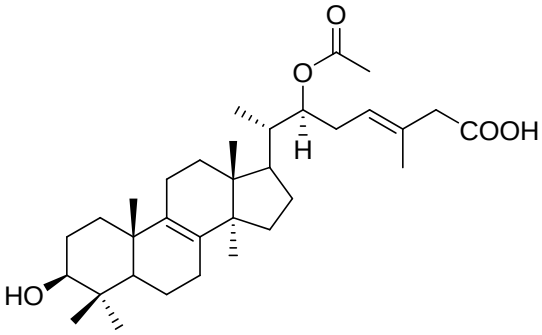
ในการวิจัย นำเห็ดเผาะจากจังหวัดน่าน 2.20 กิโลกรัม (น้ำหนักเปียก)มาบดให้ละเอียดแล้วนำไปแช่ในตัวทำละลายต่างๆ ดังนี้ ได้แก่ เฮกเซน เอธิล แอซิเทต และ เมทานอล ตามลำดับ ระเหยตัวทำละลายที่แช่เห็ดเผาะจนแห้ง ได้สารสกัดหยาบเฮกเซน 9.49 กรัม สารสกัดหยาบเอธิล แอซิเทต 16.27 กรัม และสารสกัดหยาบเมธานอล 119.46 กรัม วิเคราะห์สารประกอบโดยใช้ TLC และ ^{1}H-NMR

แยกส่วนสกัดหยาบเอธิล แอซิเทตโดยใช้ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายดังนี้ Hexane, Hexane : EtOAc, EtOAc, EtOAc: MeOH, MeOH ตามลำดับ ได้ 130 ลำดับส่วนแยก นำมาวิเคราะห์โดยใช้ TLC และ ^{1}H NMR จากนั้นลำดับส่วนแยกที่มีสารประกอบคล้ายคลึงกันนำมารวมเข้าด้วยกัน ได้ 23 ส่วนแยก ล้างของแข็งที่ได้จากส่วนแยกที่ 15-22 ซึ่งได้จากการชะด้วย 25 %EtOAc ในเฮกเซน ด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ได้ Ergosterol เป็นตะกอนสีขาว

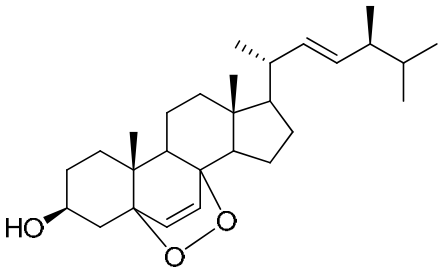
ส่วนแยก 27-30 ซึ่งได้จากการชะด้วย 30% EtOAc ในเฮกเซน นำมาแยกโดย semi-preparative reverse phase HPLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์ H_2O:MeOH (20:80) ไปจนถึง MeOH อัตราการไหล 3.0 ml/min และตรวจวัดโดยใช้ UV ที่ช่วงคลื่น 220 และ 254 nm ได้สาร Triterpene 1 ที่เวลาการกักเก็บ 21.5 นาที, ergosterol peroxide ที่เวลาการกักเก็บ 27.5 นาที และ 5,8-epidioxy-(3β,5*a*,8*a*,24*R*)-ergosta-6-en-3-ol ที่เวลาการกักเก็บ 29 นาที



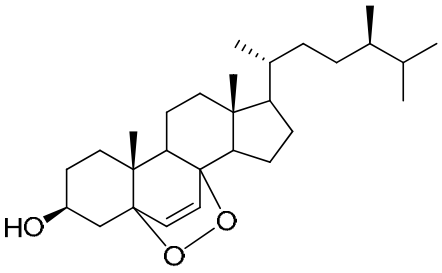
Ergosterol



Triterpene **1**

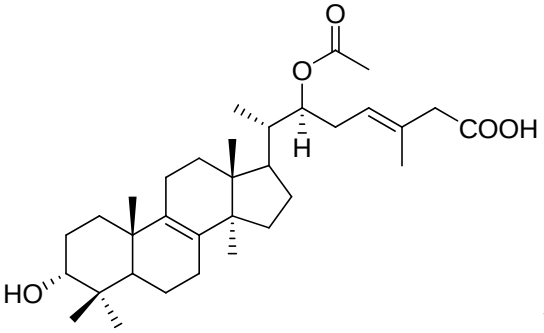


Ergosterol peroxide



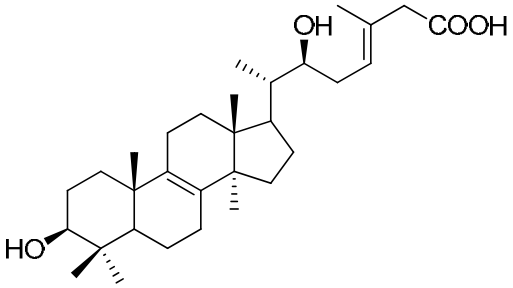
5,8-Epidioxy-(3β,5*a*,8*a*,24*R*)-ergosta-6en-3-ol

ส่วนแยก 31-34 ซึ่งได้จากการชะด้วย 40% EtOAc ในเฮกเซน นำมาแยกโดย semi-preparative reverse phase HPLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์ H_2O:MeOH (30:70) ไปจนถึง MeOH อัตราการไหล 3.0 ml/min และตรวจวัดโดยใช้ UV ที่ช่วงคลื่น 220 และ 254 nm ได้สาร Triterpene 2 ที่เวลาการกักเก็บ 19.5 นาที และ Triterpene 1 ที่เวลาการกักเก็บ 23 นาที

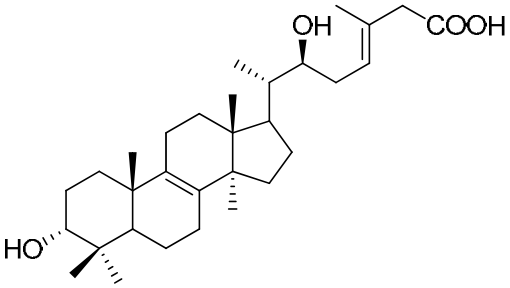


Triterpene **2**

ส่วนแยก 43-46 ซึ่งได้จากการชะด้วย 50% EtOAc ในเฮกเซน นำมาแยกโดย semi-preparative reverse phase HPLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์ H_2O:MeOH (30:70) ไปจนถึง MeOH อัตราการไหล 3.0 ml/min และตรวจวัดโดยใช้ UV ที่ช่วงคลื่น 220 และ 254 nm ได้สาร Triterpene 3 ที่เวลาการกักเก็บ 25.0 นาที และ Triterpene 4 ที่เวลาการกักเก็บ 30 นาที



Triterpene **3**



Triterpene**4**

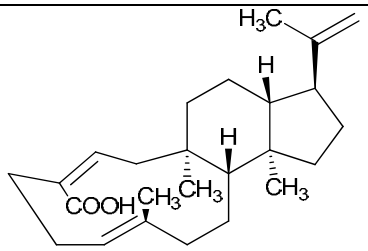
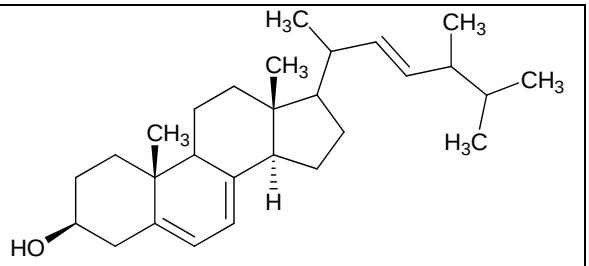
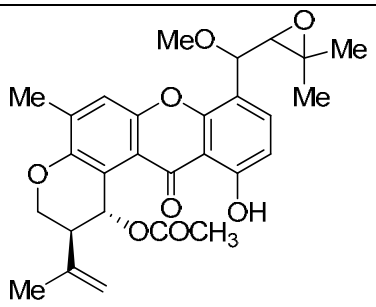
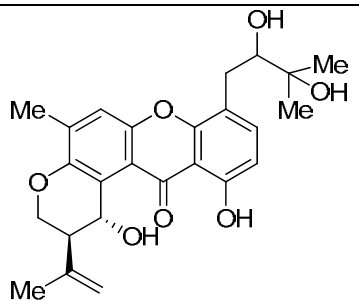
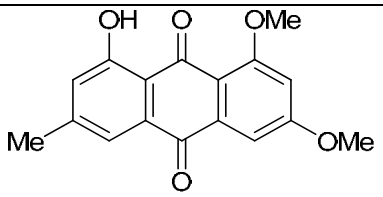
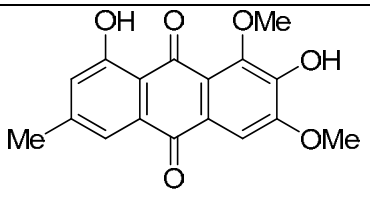
ด้วยเหตุที่ระยะเวลาของโครงการได้สิ้นสุดลงก่อนที่จะทำการแยกสารเมแทบอไลท์ของเห็ดเผาะให้เสร็จสมบูรณ์ จึงยังคงมีงานที่ต้องทำต่อไปอีกอีกมากเพื่อจะได้ข้อมูลครบถ้วนสมบูรณ์ ดังนั้นผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะได้รับการสนับสนุนเงินทุนต่อไปเพื่อให้สามารถศึกษาสารที่เห็ดเผาะสร้างขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ รวมทั้งจะได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้เหล่านั้นด้วย

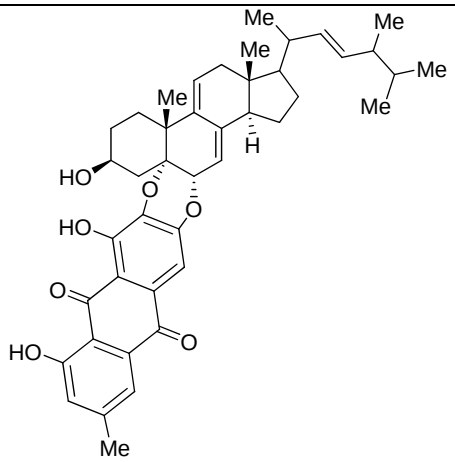
สรุปผลการวิจัย

การวิจัยภายใต้โครงการนี้ ได้ทำการศึกษาสารเมแทบอไลท์ของราเอ็นโดไฟท์ *Emericella variecolor* ในอาหารเพาะเลี้ยง Malt Czapek-Dox broth (MCzB) และ Czapek-Dox broth (CzB) และสารเมแทบอไลท์ของเห็ดเผาะ *Astraeus odoratus*

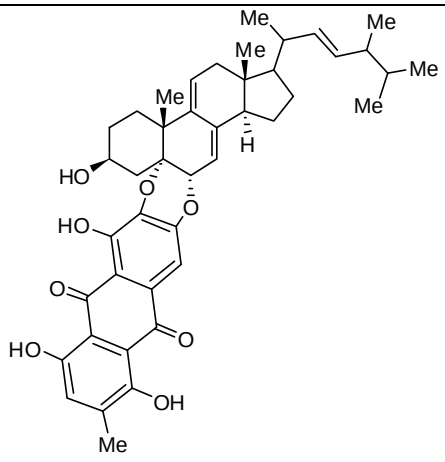
ส่วนสกัดเอธิล แอซิเทตของส่วนน้ำเลี้ยงและเส้นใยราเอ็นโดไฟท์ *E. variecolor* นำไปแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน, เฮกเซน-เอธิล แอซิเทต, เอธิล แอซิเทต, เอธิล แอซิเทต-เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ นำส่วนแยกมาทำให้บริสุทธิ์ สารที่แยกได้จากส่วนสกัดเอธิล แอซิเทตจากเส้นใย ได้แก่ stellatic acid (**1**), ergosterol (**2**), สารกลุ่ม xanthones 2 ชนิด [14-methoxy tajixanthone 25-acetate (**3**) และ tajixanthone hydrate (**8**), สารกลุ่ม anthraquinone 2 ชนิด [1-hydroxy-6,8-dimethoxy-3-methylanthraquinone (**4**) และ 4,6-dihydroxy-5,7-dimethoxy-2-methylanthraquinone (**5**)] และสารชนิดใหม่ 2 ชนิด [สารประกอบ (**6**) และ (**7**)] ส่วนการแยกสารจากส่วนสกัดเอธิล แอซิเทตจากน้ำเลี้ยงได้ 4,6-dihydroxy-5,7-dimethoxy-2-methyl anthraquinone (**5**) และ dermoglaucin (**9**) และ และสารใหม่หนึ่งชนิด [สารประกอบ (**10**)] ซึ่งโครงสร้างสารแสดงไว้ดังข้างล่างนี้

สารเมแทบอไลท์ที่แยกได้จากเส้นใยราที่เพาะเลี้ยงใน MCzB

<table>
<tr>
<td> 
stellatic acid (1)</td>
<td> 
ergosterol (2)</td>
</tr>
<tr>
<td> 
14-methoxy tajixanthone 25-acetate (3)</td>
<td> 
Tajixanthone hydrate (8)</td>
</tr>
<tr>
<td> 
1-hydroxy-6,8-dimethoxy-3-methylanthraquinone (4)</td>
<td> 
4,6-dihydroxy-5,7-dimethoxy-2 – methylanthraquinone (5)</td>
</tr>
</table>

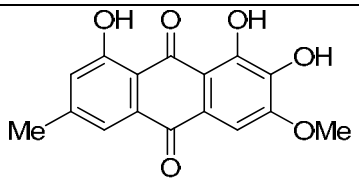


สารประกอบ (6)

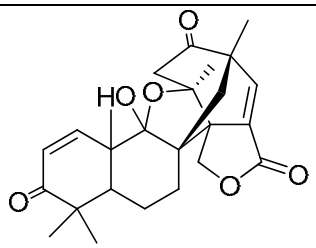


สารประกอบ (7)

สารเมแทบอไลท์ที่แยกได้จากน้ำเลี้ยง



Dermoglaucin (9)

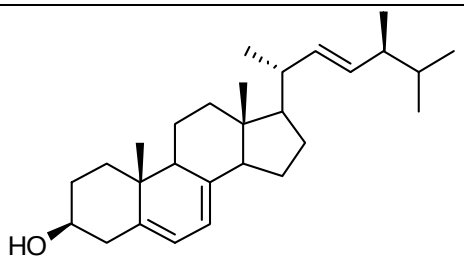


สารประกอบ (10)

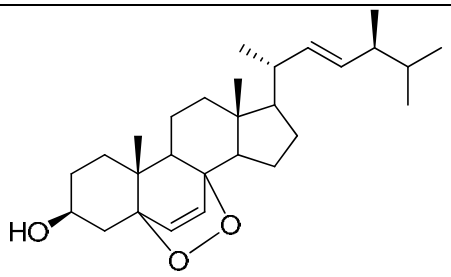
ขณะที่ การแยกสารเมแทบอไลท์ของราเอ็นโดไฟท์ *E. variecolor* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเหลว Czapek-Dox ได้ stellatic acid (**1**) และ ergosterol (**2**) จากสารสกัดเส้นใยเท่านั้น

การแยกสารเมแทบอไลท์จากเห็ดเผาะที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดน่านสามารถแยกสารได้สารประกอบไตรเทอร์พีนชนิดใหม่ 4 ชนิด และสารประกอบสเตียรอยด์ที่มีรายงานแล้ว 3 ชนิด ดังนี้

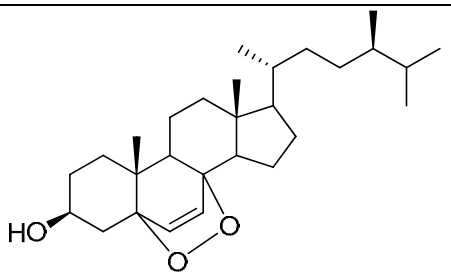
สารเมแทบอไลท์ที่แยกได้จากเห็ดเผาะ



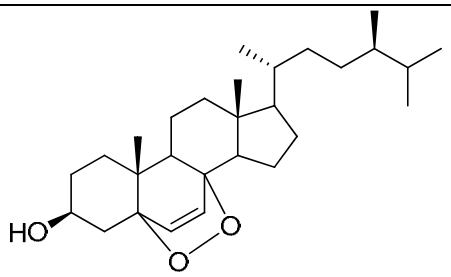
ergosterol (2)



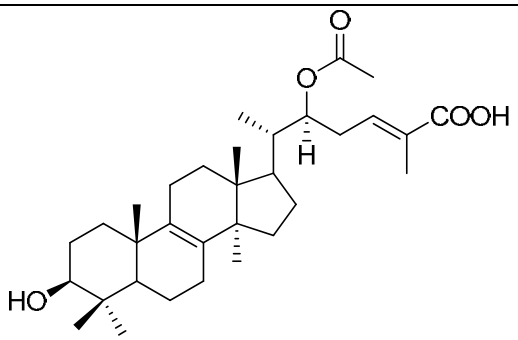
Ergosterol peroxide



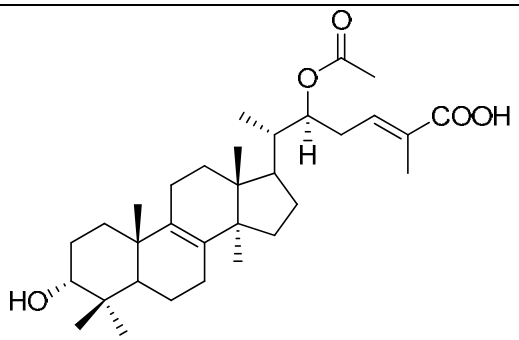
5,8-Epidioxy-(3β,5*a*,8*a*,24*R*)-ergosta-6en-3-ol



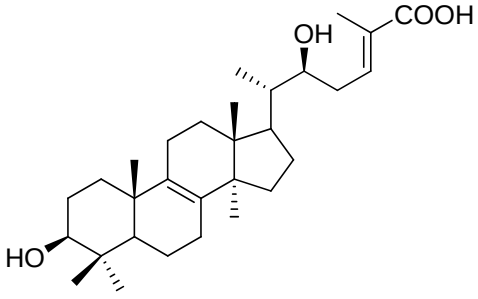
5,8-Epidioxy-(3β,5*a*,8*a*,24*R*)-ergosta-6en-3-ol



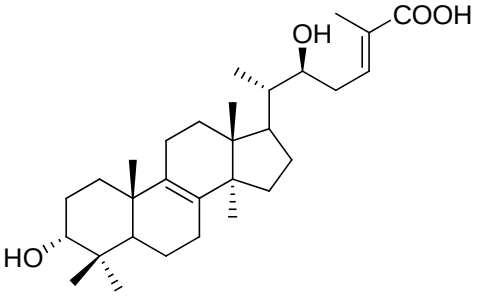
Triterpene 1



Triterpene 2



Triterpene 3



Triterpene 4

สารทั้งหมดที่แยกได้จากเห็ดเผาะที่ได้รายงานไว้นี้ ได้เพียงบางส่วนของการศึกษาเท่านั้น ด้วยเหตุที่ระยะเวลาของโครงการได้สิ้นสุดลงก่อนที่จะทำการแยกสารเมแทบอไลท์ของเห็ดเผาะให้เสร็จสมบูรณ์ จึงยังคงมีงานที่ต้องทำต่อไปอีกมากเพื่อจะได้ข้อมูลครบถ้วนสมบูรณ์ รวมทั้งจะได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้เหล่านั้นด้วย

บรรณานุกรม

Abraham, R. J. and Monasterios, J. R. 1974. 13C Nuclear magnetic resonance spectra of some ergosta-dienes and –trienes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans II*. 662-665.

Ayer, W. A. and Ma, Y. T. 1992. Sirosterol and dehydroazasirosterol, unusual steroidal adducts from a *Sirococcus* species. *Can. J. Chem.* 70: 1905-1913.

Barba, B., Diaz, J. G., and Herz, W. 1994. Cassanes and anthraquinones from *Chamaecrista greggii*. *Phytochemistry*. 37, 3: 837-845.

Pornpakakul, S., Liangsakul, J., Ngamrojanavanich, N., Roengsumran, S, Sihanonth, P., Piapukiew, J., Sangvichien, E., and Petsom, A. 2005. Cytotoxic activity of four xanthones from *Emericella variecolor*, an endophytic fungus isolated from *Croton oblongifolius*. *Arch Pharm Res*. *29*, 140-144.

Pruess, L. M., Peterson, W. H., and Fred E. B. 1932. Isolation and identification of ergosterol and mannitol from Aspergillus fischeri. *J. Biol. Chem*. *97*, 483-489.

Qureshi, I. H., Husain, S. A., Noorani, R., Murtaza, N., Iitaka, Y., Iwasaki, S., and Okuda, S. 1980. Stellatic acid: a new class of sesterterpenoid; X-ray crystal structure. *Tetrahedron Lett*. 21: 1961-1962.

Waser, M., Lackner, B., Zuschrader, J., Müller, N., and Falk, H. 2005. An efficient regioselective synthesis of endocrocin and structural related natural anthraquinones starting from emodin *Tetrahedron Lett. 46* (14), pp. 2377-2380

Phosri, C., Watling, R., Martin, M. P., and Whalley, A. J. S. 2004. The genus *Astraeus* in Thailand. *Mycotaxon*, 89(2), 453-463.

Morgan AP, 1889. North American fungi: the gasteromycetes. Journal of the Cincinnati Society of Natural History 12: 8–22.

Phosri, C, Martin, M. P., Sihanonth, P., Whalley, A. J. S., and Watling, R. 2007. Molecular study of the genus Astraeus. Molecular Research III. 275-286.

Takaishi, Y., Murakami, Y., Ohashi, T., Nakano, K., Murakami, K., and Tomimatsu, T. 1987. Three Triterpenes from Astraeus hygrometricus. *Phytochemistry*. 26(8), 2341-2344.

Stanikunaite, R., Radwan, M. M., Trappe, J. M., Fronczek, F., and Ross, S. A. 2008. Lanostane-Type Triterpenes from the Mushroom Astraeus pteridis with Antituberculosis Activity. *J. Nat. Prod*. 71, 2077-2079.

Chakraborty, I., Mondal, S., Pramanik, M., Rout, D. and Islam, S. S. 2004. Structural investigation of a water-soluble glucan from an edible mushroom, Astraeus hygrometricus. *Carbohydrate Research*. 339, 2249-2254.

Maiti, S., Bhutia, S. K., Mallick, S. K., Kumar, A., Khadgi, N., and Maiti, T. K. 2008. Antiproliferative and immunostimulatory protein fraction from edible mushrooms. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 26, 187-191.

Maiti, D., Chandra, K., Mondal, S., Ojha, A. K.,Das, D., Roy, S. K., Ghosh, K., Chakraborty, I., and Islam, S. S. 2008. Isolation and characterization of a heteroglycan from the fruits of Astraeus hygrometricus. *Carbohydrate Research*. 343. 817-824.

Chakraborty, I., Mondal, S., Rout, D., Chandra, K., and Islam, S. S. 2007. Structural investigation of a heteroglycan isolated from the fruit bodies of an ectomycorrhizal fungus Astraeus hygrometricus. *Carbohydrate Research*. 342, 982-987.

Ito, S. 1959 Mycological flora of Japan, vol II. Basidiomycetes no. 5:Agaricales, Gasteromycetales (in Japanese).

Kaneko, R., and Kakishima, M. 2001. Mycosphaerella buna sp. nov. with a Pseudocercospora anamorph isolated from the leaves of Japanese beech. *Mycoscience* 42:59–66

Stanek., V. J. 1958. 1. rod Astraeus Morg.–Hvezdak. In: Pilat A (ed) Flora CSR B-1, Gasteromycetes. *Ceskoslovenske Akademie, Praha*, pp 626–632.

Kreisel, H. 1976. Gasteromyzeten aus Nepal II. *Feddes Repert* 87:83–107

Imazeki, R., and Hongo, T. 1989. Colored illustrations of mushrooms of Japan, vol II (in Japanese). Hoikusha, Osaka.

Robert, R. 2003. Trial field key to the species of Sclerodermataceae in the Pacific Northwest. Pacific Northwest Key Council, Portland, OR.

De Roman, M., Claveria, V., De Miguel, A. M. 2005, A revision of the descriptions of ectomycorrhizas published since 1961. *Mycol Res* 109:1063–1104.

Trappe, J. M. 1967. Pure culture synthesis of Douglas-fir mycorrhizae with species of Hebeloma, Suillus, Rhizopogon, and Astraeus. *For Sci* 13:121–130.

Malajczuk, N., Molina, R., Trappe, J. M. 1982. Ectomycorrhizal formation in Eucalyptus. I. Pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. *New Phytol*. 91:467–482.

Kakumyan, P. and Matsui, K. 2009. Characterization of volatile compounds in *Astraeus* spp. *Biosci. Biotechnol. Biochem. 73*(12), 2742-2745.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย สุรชัย พรภคกุล
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Surachai Pornpakakul
2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ระดับ 8
3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท
   เขตปทุมวัน กทม. 10330 โทรศัพท์ 02-2187637, 081-5620555 โทรสาร 02-6120968
   E-mail: psuracha@chula.ac.th
4. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2535 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปิโตรเคมี)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2543 Doctor of Philosophy (Chemistry)	University of Manchester Institute of Science and Technology (UMIST), UK

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
   เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, เคมีอินทรีย์
6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอก
   6.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ย้อนหลัง 5 ปี)
   1. Tansuwan, S., Chanaprat, P., Teerawatananond, T., Muangsin, N., Pornpakakul, S. (4S,5S,6S)-4-Hydroxy-3-methoxy-5-methyl-5,6-epoxycyclohex-2-en-1-one. Acta Crystallographica Section E, 2010, E66, o 2263.
   2. Pechwang, J., Sihanonth, P., Pornpakakul, S., Muangsin, N., Piapukiew, J., Vangnai, A., Chaichit, N., Chuchawankul, S., Petsom, A. Biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by Psilocybe cubensis. Natural product research 2010; 24(10):905-14.
   3. Suwancharoen, S., Tommeurd, W., Phurat, C., Muangsin, N., Chaichit, N. and Pornpakakul, S. Acanthoic acid. *Acta Crystallographica Section E*, 2010, E66, o1531.
   4. Roengsumran, S., Pata, P., Ruengraweewat, N., Tummatorn, J., Pornpakakul, S., Sangvanich, P., Puthong, S., Petsom, A. New cleistanthane diterpenoids and 3,4-seco-cleistanthane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Chemistry of Natural Compounds* 2009, **45** (5), 641-646.
   5. Liangsakul, J., Srisurichan, S., Muangsin, N., Chaichit, N., Pornpakakul, S. 8-[(3,3-Dimethyloxiran-2-yl)methoxymethyl]-11-hydroxy-2-isopropenyl-5-methyl-12-oxo-1,2,3,12-tetrahydropyrano[3,2-a]xanthen-1-yl acetate. *Acta Crystallographica*, 2009, **E65**, 2558-2559.

6. Sudto, K., Pornpakakul, S., Wanichwecharungruang, S. An efficient method for the large scale isolation of naringin from pomelo (*Citrus grandis*) peel. 2009, *International Journal of Food Science and Technology* **44** (9), 1737-1742.
7. Pornpakakul, S., Suwancharoen, S., Petsom, A., Roengsumran, S., Muangsin, N., Chaichit, N., Piapukiew, J., Sihanonth, P., Allen, J. W. A new sesquiterpenoid metabolite from *Psilocybe samuiensis*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2009, **11**(1), 12-7.
8. Peungjitton, P., Sangvanich, P., Pornpakakul, S., Petsom, A., Roengsumran, S. Sodium Cardanol Sulfonate Surfactant from Cashew Nut Shell Liquid. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2009, 12, 85-89.
9. Tansuwan, S., Pornpakakul, S., Roengsumran, S., Petsom, A., Muangsin, N., Sihanonta, P. Chaichit, N. Antimalarial Benzoquinones from an Endophytic Fungus, *Xylaria* sp. *Journal of Natural Products,* 2007, **70**(10), 1620-1623.
10. Pornpakakul, S., Roengsumran, S., Deechangvipart, S., Petsom, A., Muangsin, N., Ngamrojnavanich, N., Sriubolmas, N., Chaichit, N., Ohta, T. Diaporthichalasin, a novel CYP3A4 inhibitor from an endophytic *Diaporthe* sp. *Tetrahedron Letters* 2007, **48** (4), 651-655.
11. Ngamrojanavanich, N., Loontaisong, A., Pengpreecha, S., Cherdshewasart, W., Pornpakakul, S., Pudhom, K., Roengsumran, S., Petsom, A. Cytotoxic constituents from *Butea superba* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology* 2007, **109**(2), 354-358.
12. Ngamrojanavanich, N., Manakit, S., Pornpakakul, S., Petsom, A. Inhibitory effects of selected Thai medicinal plants on Na^+,K^+-ATPase *Fitoterapia* 2006, **77**(6), 481-483.
13. Pornpakakul, S., Liangsakul, J., Ngamrojanavanich, N., Roengsumran, S., Sihanonth, P., Piapukiew, J., Sangvichien, E., Puthong, S., Petsom, A. Cytotoxic activity of four xanthones from *Emericella variecolor*, an endophytic fungus isolated from *Croton oblongifolius*. *Archives of Pharmacal Research* 2006, **29**(2), 140-144.