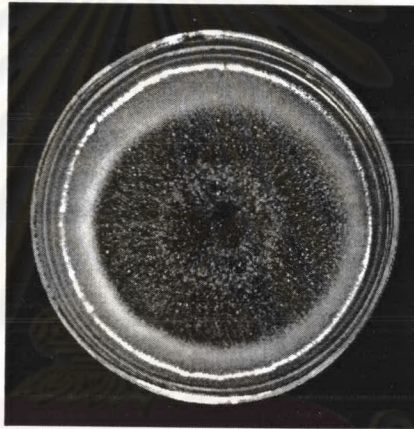


## บทที่ 4

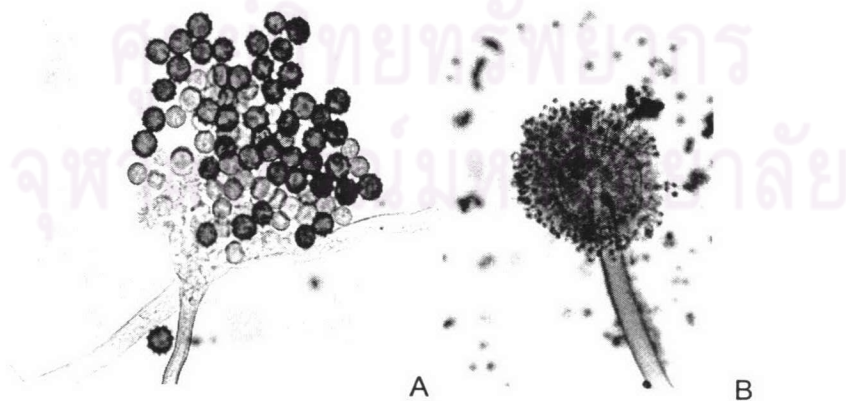
### ผลการทดลอง

#### 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ *Aspergillus niger*

จากการเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 5 วันลักษณะของโคโลนีแสดงในรูปที่ 16 และเมื่อส่องดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ประกอบด้วยหลายเซลล์เรียงเป็นเส้นใย (hypha) ที่มีการแตกแขนงออกไปเรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) เส้นใยมีผนังกันมีนิวเคลียสในแต่ละเซลล์ สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ แสดงในรูปที่ 17



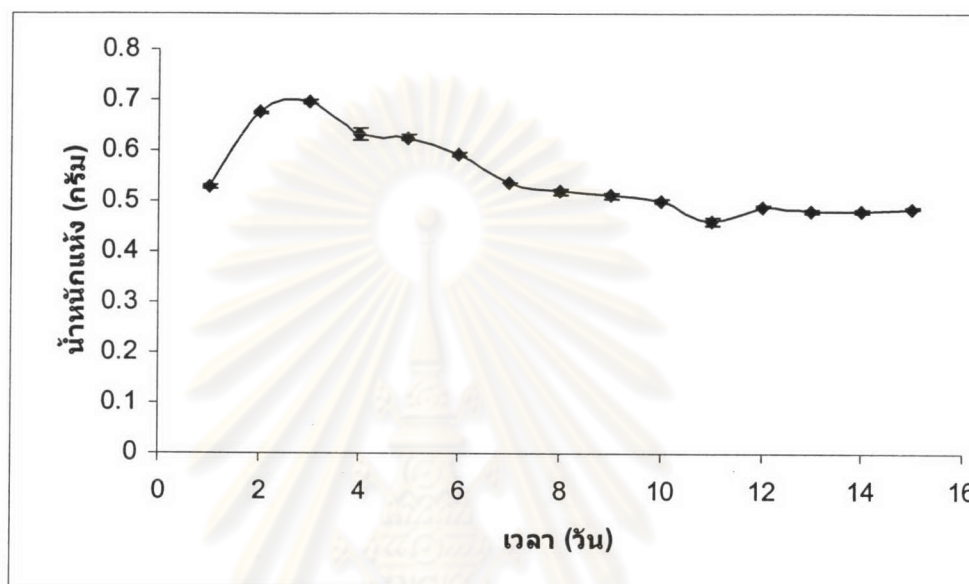
รูปที่ 16 ลักษณะของโคโลนีของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงบน Potato Dextrose Agar เป็นเวลา 5 วัน



รูปที่ 17 ลักษณะสปอร์ กำลังขยาย 4,000 เท่า (A) และส่วนสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ กำลังขยาย 1,600 เท่า (B) ของ *A. niger*

#### 4.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *A. niger*

จากการเลี้ยง *A. niger* บนอาหารเหลวสูตร SMG เป็นเวลา 15 วัน โดยทำการหาน้ำหนักแห้งของเชื้อทุกวัน แล้วหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งกับเวลา ดังแสดงในรูปที่ 18

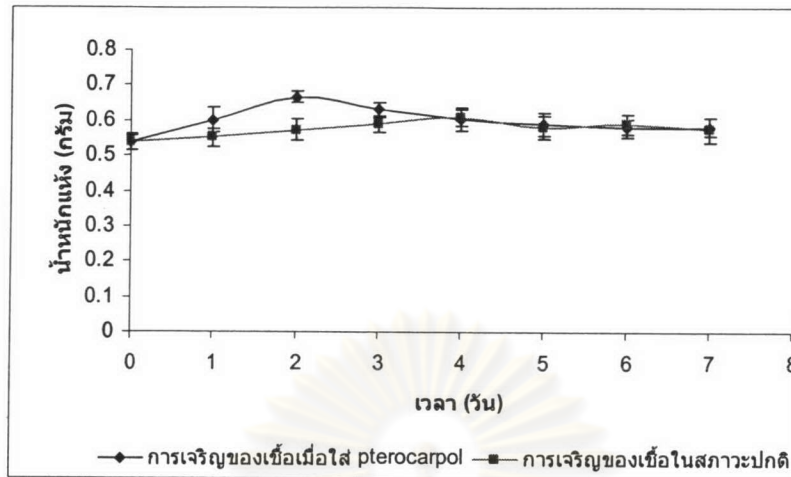


#### รูปที่ 18 การเจริญเติบโตของของ *A. niger*

จากกราฟจะเห็นว่า *A. niger* มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 4 หลังจากนั้นก็ลดลงเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 8 ถึงวันที่ 15

#### 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะปกติ กับเมื่อใส่สารตั้งต้น

4.3.1 หาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของ *A. niger* ในสภาวะปกติ กับเมื่อใส่ pterocarpol โดยเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลล์ในทั้งสองสภาวะ ภายหลังจากการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยหาน้ำหนักแห้งทุกวันเป็นเวลา 7 วันผลแสดงดังรูปที่

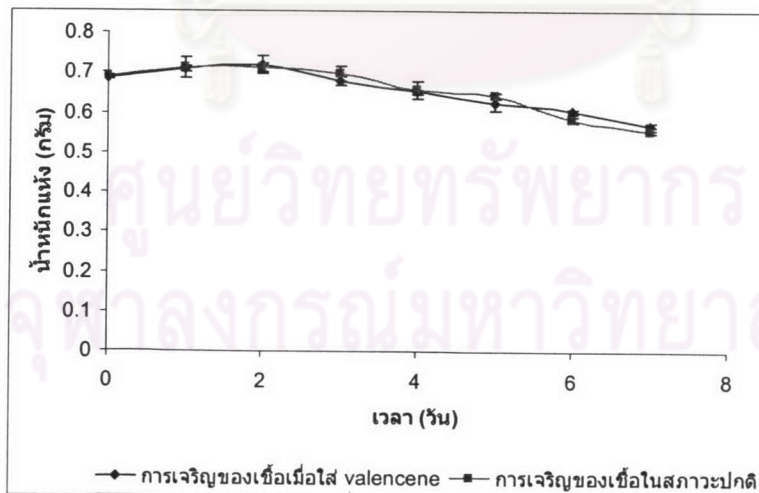


รูปที่ 19 การเจริญเติบโตของ *A. niger* ในสภาวะปกติ กับเมื่อใส่ pterocarpol

จากกราฟจะเห็นว่า การเจริญเติบโตของ *A. niger* ภายหลังจากได้รับ pterocarpol จะมีการเจริญเพิ่มมากขึ้นกว่าการเจริญปกติ โดยในวันที่ 2 จะมีการเจริญเติบโตมากที่สุด และลดลงจนเท่ากับการเจริญปกติในวันที่ 4

4.3.2 หาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของ *A. niger* ในสภาวะปกติ กับเมื่อใส่ valencene โดยเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลล์ในทั้งสองสภาวะ ภายหลังจากการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยห่าน้ำหนักแห้งทุกวันเป็นเวลา 7 วัน ผลแสดงดังรูปที่

20

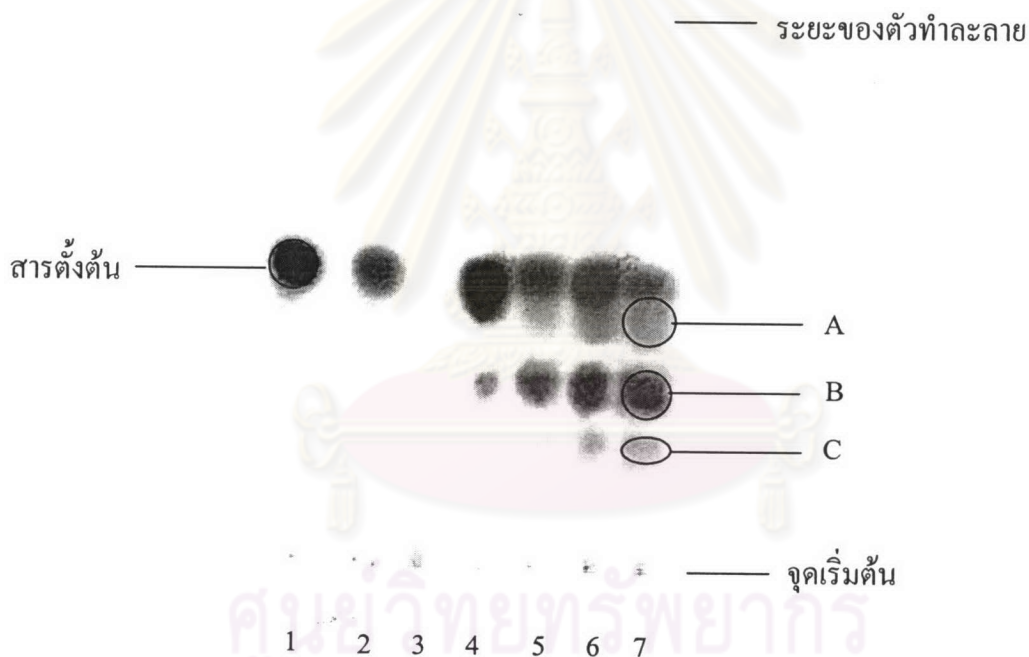


รูปที่ 20 การเจริญเติบโตของ *A. niger* ในสภาวะปกติ กับเมื่อใส่ valencene

จากกราฟจะเห็นว่า การเจริญเติบโตของ *A. niger* ในสภาวะปกติกับภายหลังจากได้รับ valencene มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน

#### 4.4 การตรวจหาผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

4.4.1 นำสารที่สกัดได้จากส่วนไดเอซิลีเทอร์จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol มาทำการทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี (TLC) ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 7 โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือเอธิลอะซิเตต ผลการทดลองพบว่าปรากฏตำแหน่งของสารที่คาดว่าน่าจะเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มชัน ซึ่งมีระยะทางการเคลื่อนที่ ต่ำกว่าสารตั้งต้น 3 จุด โดยสารตั้งต้นมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.69 และสารที่คาดว่าน่าจะเป็นสารผลิตภัณฑ์ตัวแรก (A) มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.62 ตัวที่สอง (B) มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.45 และตัวที่สาม (C) มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.31 โดยผลการตรวจสอบแสดงในรูปที่ 21 โดยใช้ชุดควบคุมสองชุดคือ ชุดการเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่สารตั้งต้น และชุดของอาหารที่ใส่สารตั้งต้น



รูปที่ 21 โครมาโทแกรมแสดงผลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Pterocarpol ด้วย *A.niger* โดยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต

1. สารตั้งต้น
2. ส่วนของไดเอซิลีเทอร์ที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อและที่ใส่สารตั้งต้น
3. ส่วนของไดเอซิลีเทอร์ที่สกัดจากการเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่สารตั้งต้น
4. ส่วนของไดเอซิลีเทอร์ที่สกัดจากชุดทดลองวันที่ 1
5. ส่วนของไดเอซิลีเทอร์ที่สกัดจากชุดทดลองวันที่ 3
6. ส่วนของไดเอซิลีเทอร์ที่สกัดจากชุดทดลองวันที่ 5
7. ส่วนของไดเอซิลีเทอร์ที่สกัดจากชุดทดลองวันที่ 7

จากโครมาโทแกรมในรูปที่ 21 จะสังเกตเห็นว่าผลิตภัณฑ์ B สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันแรกของการบ่มและมีจุดเข้มมากกว่าจุดอื่น จึงคาดว่าผลิตภัณฑ์ตัวนี้จะเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้น ส่วนผลิตภัณฑ์ A ตรวจพบครั้งแรกในวันที่ 3 ของการบ่ม และผลิตภัณฑ์ C ตรวจพบครั้งแรกในวันที่ 5 ของการบ่ม และในส่วนของชุดควบคุมที่ได้จากการสกัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่สารตั้งต้นปรากฏจุดเพียงจุดเดียวคือของสารตั้งต้นแสดงว่าอาหารหรือสิ่งแวดล้อมไม่สามารถทำให้สารตั้งต้นเปลี่ยนแปลงได้ และในส่วนของชุดควบคุมที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไม่ปรากฏจุดเกิดขึ้นแสดงว่าส่วนสกัดจากการเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการทดสอบด้วยเทคนิค TLC

4.4.2 นำสารที่สกัดได้จากส่วนไดเอธิลอีเทอร์จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ valencene มาทำการทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี (TLC) ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 7 โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซนกับเอธิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 8 ต่อ 2 ผลการทดลองพบว่าไม่ปรากฏตำแหน่งของสารที่คาดว่าน่าจะเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชัน โดยในทุกชุดทดลองพบเพียงจุดของ สารตั้งต้นคือ valencene เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 22

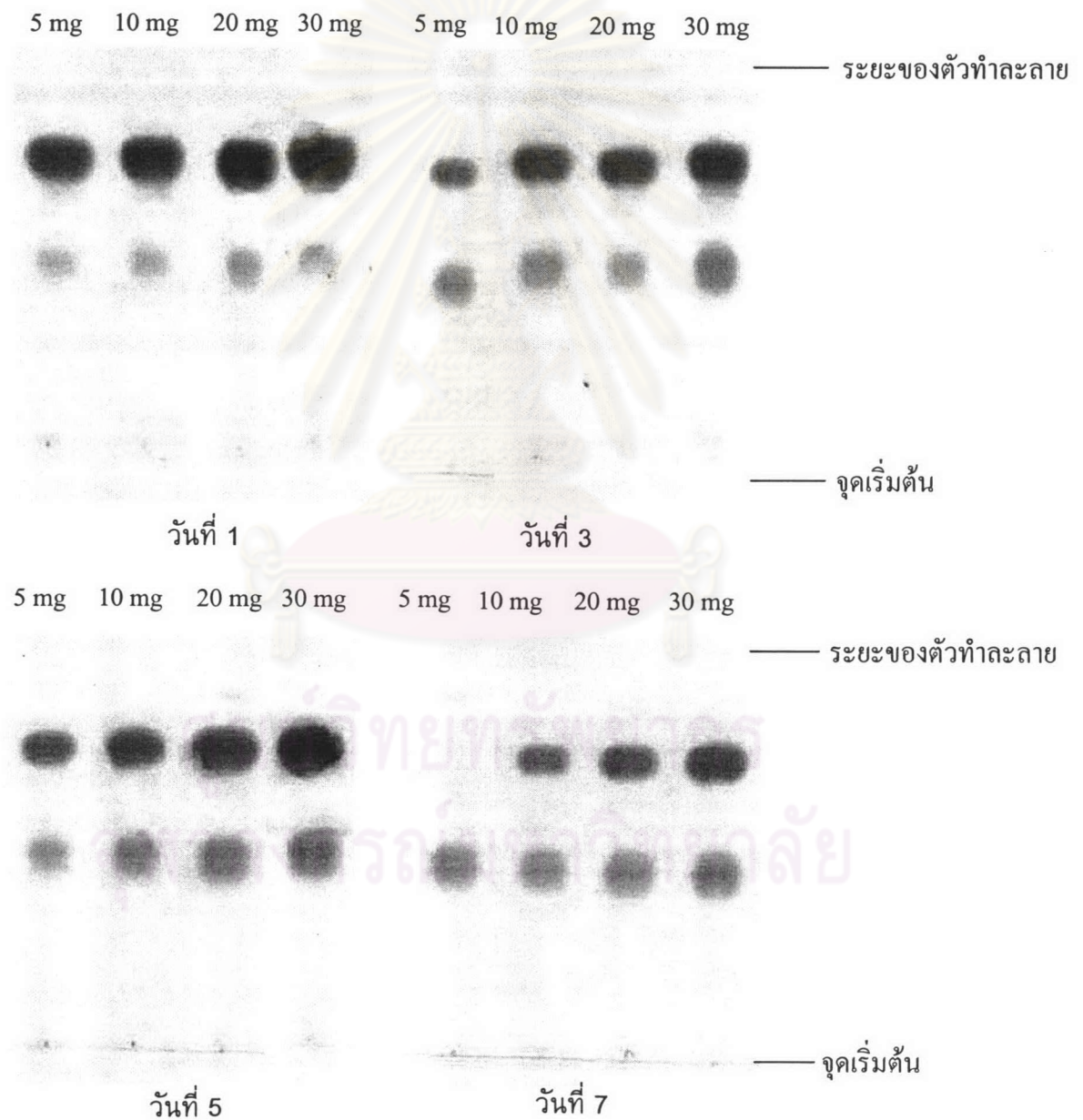


รูปที่ 22 โครมาโทแกรมแสดงผลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ valencene ด้วย *A.niger* โดยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซนกับเอธิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 8 : 2

1. สารตั้งต้น
2. ส่วนของไดเอธิลอีเทอร์ที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อและที่ใส่สารตั้งต้น
3. ส่วนของไดเอธิลอีเทอร์ที่สกัดจากการเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่สารตั้งต้น
4. ส่วนของไดเอธิลอีเทอร์ที่สกัดจากชุดทดลอง

#### 4.5 ถึงภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนสารตั้งต้น

โดยภาวะที่ศึกษาคือความเข้มข้นของสารตั้งต้น โดยเลือกศึกษาที่ความเข้มข้นของ pterocarpol ที่ 5 10 20 และ 30 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร กับระยะเวลาในการสร้างผลิตภัณฑ์ โดยเลือกศึกษาในวันที่ 1 3 5 และ 7 ภายหลังจากการเติม Pterocarpol ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทำการเก็บตัวอย่างมาทดสอบหาสารผลิตภัณฑ์โดยการสกัดด้วยไดเอธิลอีเทอร์ในอัตราส่วน 1: 1 นำส่วนของไดเอธิลอีเทอร์มาทดสอบด้วยเทคนิค TLC ผลการทดลองดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 โครมาโทแกรมแสดงผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Pterocarpol ด้วย *A. niger* โดยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต

จากโครมาโทแกรม จะเห็นว่ายิ่งความเข้มข้นของสารตั้งต้นมากก็จะมีสารตั้งต้นเหลือมาก แสดงว่ามีสารตั้งต้นมากเกินพอเกินกว่าจะเกิดปฏิกิริยาไปไอทรานส์ฟอร์มเมชันในส่วนของระยะเวลา พบว่าในวันที่ 3 5 และ 7 ไม่มีความต่างกันของความเข้มข้นของสารที่คาดว่าน่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้นน้อยสุดคือ 5 มิลลิกรัมในการศึกษาต่อไป

#### 4.6 การสกัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol

สกัดสารผลิตภัณฑ์โดยใช้ ไดเอธิลอีเทอร์ต่อน้ำเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 1:1 ทั้งหมด 3 ครั้ง จากน้ำเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 1.5 ลิตร ปริมาณสารตั้งต้น 150 มิลลิกรัม เมื่อทำการระเหยเอาไดเอธิลอีเทอร์ออก จะได้สารที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองส้มหนัก 180 มิลลิกรัม

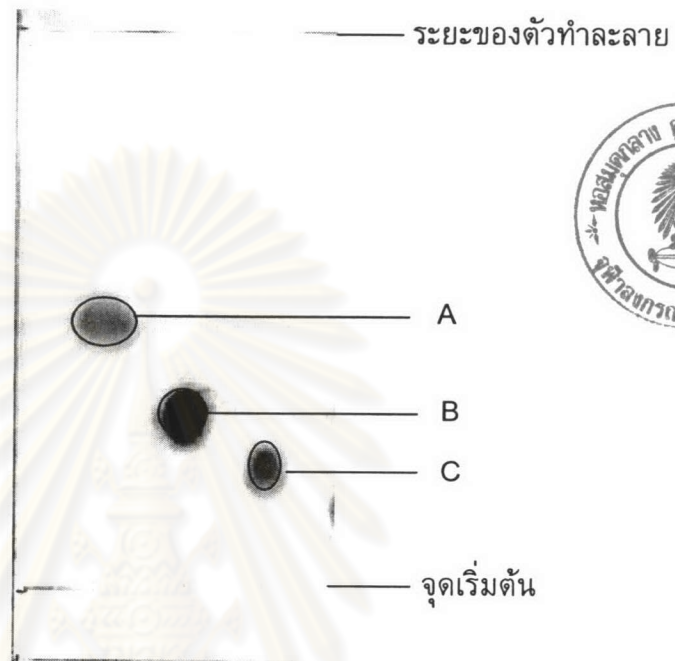
#### 4.7 การทำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol ให้บริสุทธิ์

นำสารที่ได้จากการสกัดสารผลิตภัณฑ์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซนและเอทิลอะซิเตต โดยปรับปริมาณตัวทำละลายแต่ละชนิดโดยให้สภาพขั้วเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทดสอบลำดับส่วนที่เก็บได้ด้วยเทคนิคซินเซอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอทิลอะซิเตต เก็บสารที่มีระยะทางการเคลื่อนที่ตรงกันเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค TLC เข้าไว้ด้วยกัน ทำการเก็บตามลำดับส่วนจนกระทั่งไม่มีจุดของสารปรากฏอีกเมื่อทดสอบเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค TLC จากวิธีนี้ได้สารที่คาดว่าป็นสารผลิตภัณฑ์แยกอยู่ในลำดับส่วน 3 ส่วนด้วยกัน นำลำดับส่วนที่มีสารผลิตภัณฑ์ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุน ซึ่งน้ำหนักลำดับส่วนที่ได้ โดยผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 โดยผลิตภัณฑ์ตัวแรกที่แยกได้เรียกว่า PA ตัวที่ 2 และ 3 เรียก PB และ PC ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ผลการแยกผลิตภัณฑ์จากส่วนสกัดไดเอธิลอีเทอร์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวชะ	ผลิตภัณฑ์ที่แยกได้	ร้อยละโดยน้ำหนักของผลิตภัณฑ์เทียบกับสารตั้งต้น	ลักษณะสาร
20% เฮกเซน ในเอทิลอะซิเตต	ผลิตภัณฑ์ PA	1.12	ของแข็งสีขาวขุ่น
30% เฮกเซน ในเอทิลอะซิเตต	ผลิตภัณฑ์ PB	30.53	ของเหลวหนืดสีเหลือง
40% เฮกเซน ในเอทิลอะซิเตต	ผลิตภัณฑ์ PC	5.334	ของเหลวหนืดสีเหลือง

นำสารที่ได้ในแต่ละลำดับส่วนมาทดสอบด้วยทดสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตตได้ผลแสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 24 โครมาโทแกรมของลำดับส่วนที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ทดสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือเอธิลอะซิเตต

A คือ ผลิตภัณฑ์ PA

B คือ ผลิตภัณฑ์ PB

C คือ ผลิตภัณฑ์ PC

พบว่าในแต่ละลำดับส่วนปรากฏจุดของผลิตภัณฑ์ PA มีระยะทางการเคลื่อนที่  $R_f = 0.62$  รองลงมาคือผลิตภัณฑ์ PB มีระยะทางการเคลื่อนที่  $R_f = 0.45$  และผลิตภัณฑ์ PC มีระยะทางการเคลื่อนที่  $R_f = 0.31$  เมื่อเทียบกับโครมาโทแกรมในรูปที่ 21 พบว่ามีตำแหน่งของสารที่คาดว่าเป็นผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดเหมือนกัน

พบว่า PB เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้น เมื่อทำการแยกผลิตภัณฑ์ออกมาโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี แล้วทำการคำนวณหาร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและสารตั้งต้นที่หายไปวิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ข เมื่อใส่สารตั้งต้นที่ 5 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตรเมื่อบ่มเป็นเวลา 1 3 5 และ 7 วัน ผลปรากฏดังแสดงในตารางที่ 4

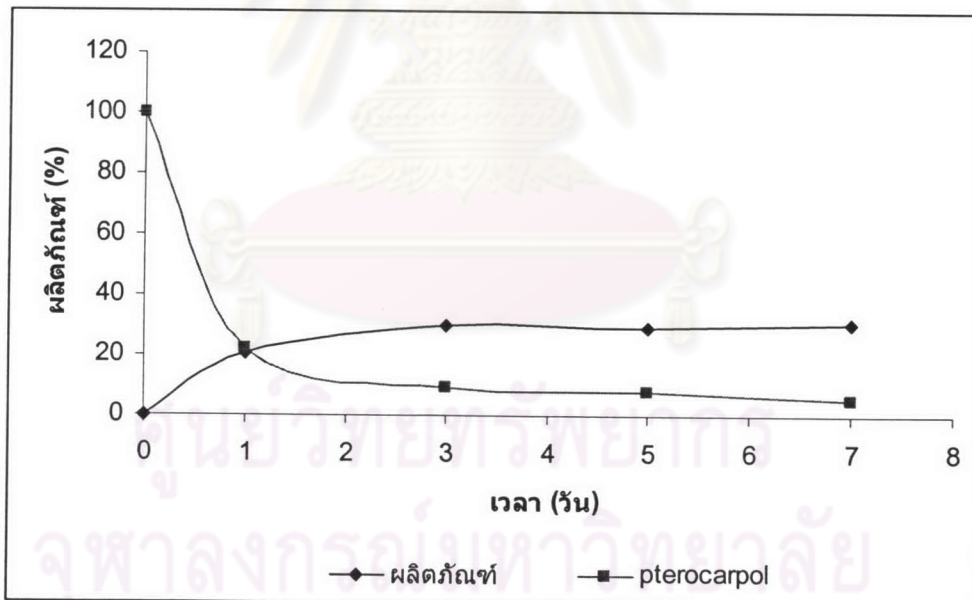


ตารางที่ 4 แสดงร้อยละของผลิตภัณฑ์ PB ที่เกิดขึ้นและ pterocarpol ที่หายไป

วันที่	% yield	% disappear
1	20.73	78.07
3	30.21	90.53
5	29.51	91.90
7	30.53	94.63

จากตารางที่ 4 ปริมาณผลิตภัณฑ์ PB ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการบ่มในวันที่ 3 5 และ 7 ไม่แตกต่างกัน ซึ่งเมื่อเทียบกับสารตั้งต้นที่เปลี่ยนไปก็เริ่มคงที่ในวันที่ 3 5 และ 7 เช่นเดียวกัน

หรือแสดงเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของผลิตภัณฑ์ PB ที่เกิดขึ้นกับร้อยละของสารตั้งต้นที่ลดลง แสดงในรูปที่ 25

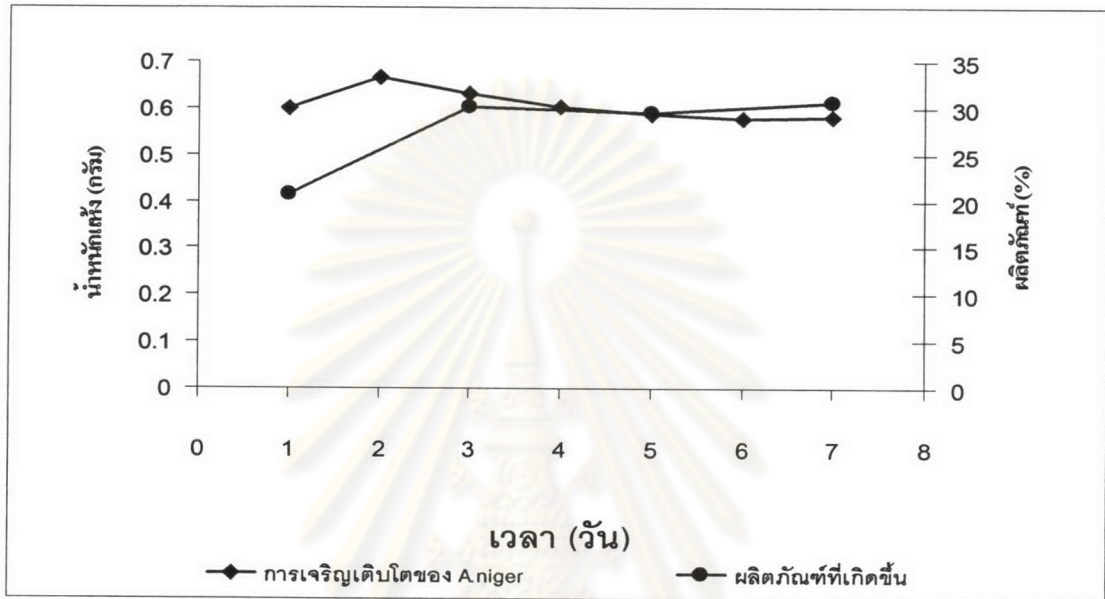


รูปที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของผลิตภัณฑ์ PB ที่เกิดขึ้นกับของ pterocarpol ที่ลดลง

จากกราฟจะเห็นว่าปริมาณสารตั้งต้นลดลงอย่างมากในวันที่ 1 และเริ่มคงที่ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ก็จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนคงที่ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 เช่นกัน

#### 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญของเชื้อกับผลิตภัณฑ์ PB ที่เกิดขึ้น

ทำการเปรียบเทียบระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อใส่ผลิตภัณฑ์โดยคิดเป็นน้ำหนักแห้ง เทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ของการบ่ม โดยผลที่เกิดขึ้นแสดงในรูปที่ 26



#### รูปที่ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อกับผลิตภัณฑ์ PB ที่เกิดขึ้น

จากกราฟจะเห็นว่าอัตราการเจริญของเชื้อกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันคือ เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นการเจริญเติบโตของเชื้อกับผลิตภัณฑ์ก็เพิ่มขึ้นด้วยแต่เมื่อถึงจุดหนึ่งคือเมื่อการเจริญเติบโตลดลงการสร้างผลิตภัณฑ์ก็เริ่มคงที่

#### 4.9 การวิเคราะห์สารที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อของ valencene ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography)

ทำการวิเคราะห์สารที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี โดยนำสารตัวอย่างมาละลายในไดเอทิลอีเทอร์ฉีดเข้าสู่ เครื่อง GC พบว่า valencene ออกมาที่เวลา (retention time) ประมาณ 7.2 นาทีซึ่งเป็นเวลาเดียวกันกับที่ในชุดควบคุมที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและ valencene มีพีคปรากฏ ส่วนในชุดควบคุมที่ประกอบด้วยส่วนผสมจากการเลี้ยงเชื้อ ปรากฏว่ามีพีคขึ้นที่เวลา ประมาณ 8.2 นาทีในส่วนของชุดทดลองทุกชุด คือตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ไม่ปรากฏพีคอื่นนอกเหนือจากพีคในชุดควบคุมทั้งสอง แสดงว่าไม่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นในทุกชุดทดลอง

#### 4.10 การทำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างของ pterocarpol ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

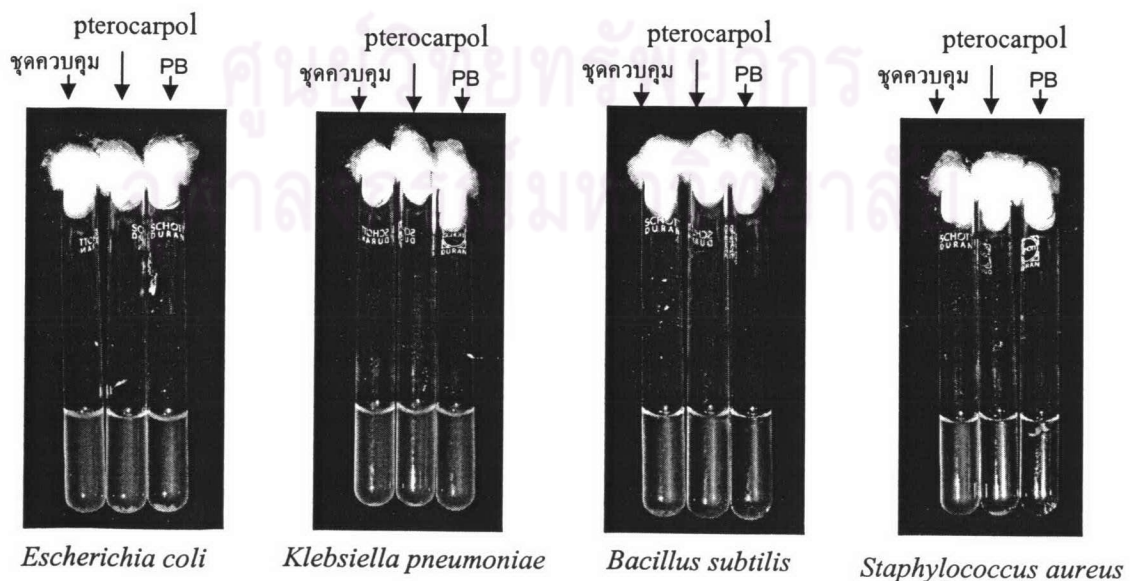
ภายหลังจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำบริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี และทำการแยกให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยเทคนิค HPLC พบว่าผลิตภัณฑ์ PA ออกมาที่เวลา (retention time) ประมาณ 10.2 นาที ผลิตภัณฑ์ PB ออกมาที่เวลา 7.4 นาที และผลิตภัณฑ์ PC ออกมาที่เวลา 6.2 นาที

#### 4.11 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์

4.11.1 ตรวจสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของ pterocarpol และผลิตภัณฑ์ PB กับแบคทีเรียชนิดต่างๆชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 3.5 มิลลิโมลาร์ แสดงผลดังตารางที่ 5 และรูปที่ 27

ตารางที่ 5 แสดงฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของ pterocarpol และ PB

แบคทีเรีย	% การยับยั้งการเจริญเติบโต	
	pterocarpol	PB
<i>Escherichia coli</i>	37.50	50.00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20.31	37.50
<i>Bacillus subtilis</i>	21.66	42.32
<i>Staphylococcus aureus</i>	50.88	96.80



รูปที่ 27 ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของ pterocarpol และ PB

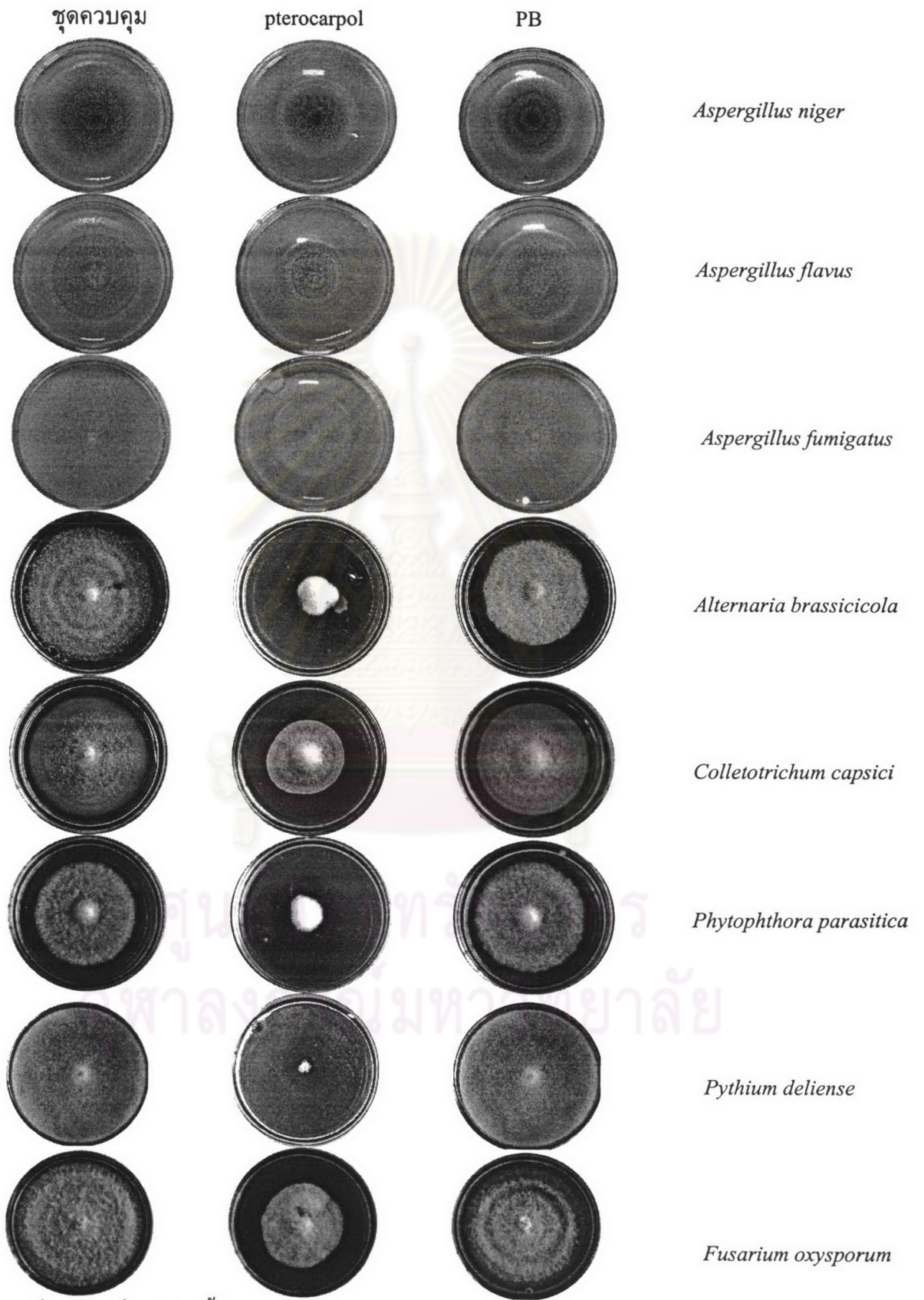
จากผลการต้านแบคทีเรียของ pterocarpol เทียบกับ PB พบว่า PB มีฤทธิ์การต้านแบคทีเรียมากกว่า pterocarpol ในทุกเชื้อทดสอบ โดยแสดงฤทธิ์ยับยั้งได้มากที่สุด ในเชื้อ *Staphylococcus aureus*

4.11.2 ตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราของ pterocarpol และผลิตภัณฑ์ PB กับเชื้อราชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 3.5 มิลลิโมลาร์ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต ปรากฏผลดังตารางที่ 6 และรูปที่ 28

ตารางที่ 6 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อราของ pterocarpol และ PB

เชื้อรา	% การยับยั้งการเจริญเติบโต	
	สารตั้งต้น	ผลิตภัณฑ์
<i>Aspergillus niger</i>	30	12.5
<i>Aspergillus flavus</i>	30	12.5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	25	0
<i>Alternaria brassicicola</i>	76	20
<i>Colletotrichum capsici</i>	38	12
<i>Phytophthora parasitica</i>	70	8
<i>Pythium deliense</i>	100	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	40	20

จากผลการต้านเชื้อราของ pterocarpol เทียบกับ PB พบว่า PB ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol มีฤทธิ์การต้านเชื้อราลดลงเมื่อเทียบกับ pterocarpol ในทุกเชื้อทดสอบ

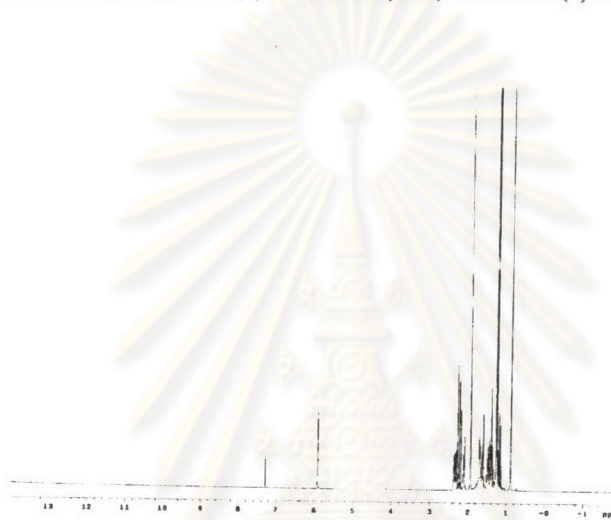


รูปที่ 28 ฤทธิ์การต้านเชื้อราของ pterocarpol และ PB

#### 4.12 การวิเคราะห์โครงสร้างผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคสเปกโทสโกปี

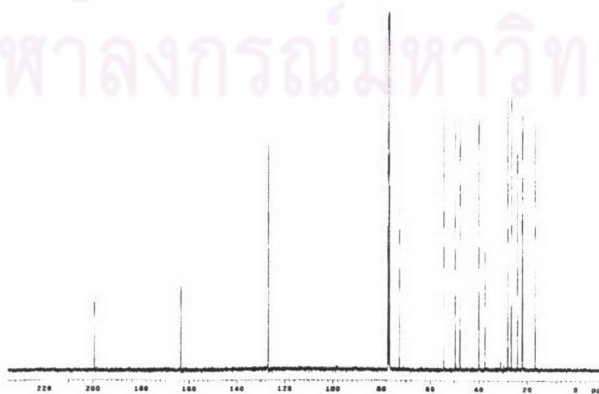
ผลิตภัณฑ์ A มีค่าการบิดระนาบแสงดังนี้  $[\alpha]_D^{26.5} + 96.0^\circ$  (c=0.485; chloroform)

โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( $\text{CDCl}_3$ ) (รูปที่ 29) ปะกฏสัญญาณที่ค่า Chemical shift ( $\delta$ , ppm) ดังนี้ 0.89(s, 3H), 1.18(m,1H), 1.25(s, 3H), 1.27(s, 3H), 1.40(m, 1H), 1.47(m, 1H), 1.62(m,1H), 1.72(d,  $J=11.98$  Hz, 1H) 1.95(s, 3H), 2.11(d,  $J=14.06$  Hz, 1H), 2.21(d,  $J=16.13$  Hz, 1H), 2.30(d,  $J=14.27$  Hz, 1H), 2.36(d,  $J=13.6$  Hz, 1H) และ 5.90(s, 1H)



รูปที่ 29 โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PA

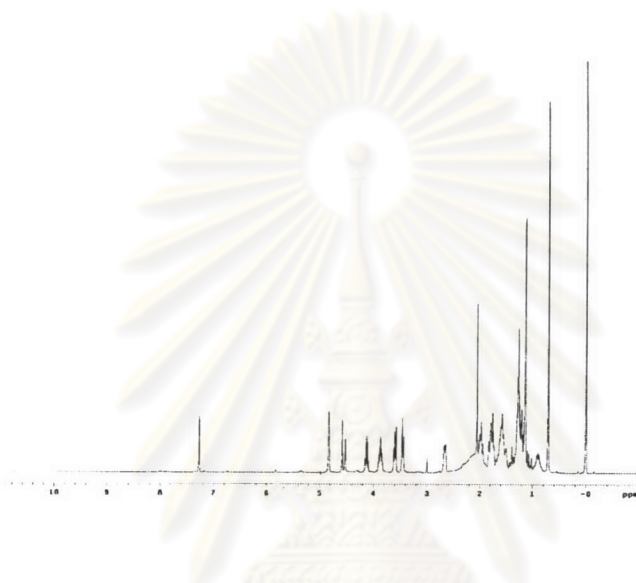
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( $\text{CDCl}_3$ ) (รูปที่ 30) ปะกฏสัญญาณที่ค่า Chemical shift ( $\delta$ , ppm) ดังนี้ 16.8(1C), 21.9(1C), 22.0(1C), 24.0(1C), 26.6(1C), 28.0(1C), 37.6(-C-), 40.0(1C), 47.8(C) 49.6(1C), 54.4(1C), 72.7(C-OH), 126.8(-C=), 163.5(C=) และ 199.4(C=O)



รูปที่ 30 คาร์บอน-13เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PA

ผลิตภัณฑ์ B มีค่าการบิดระนาบแสงดังนี้  $[\alpha]_D^{26.5} + 19.7^\circ$  (c=1; chloroform)

โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( $\text{CDCl}_3$ ) (รูปที่ 31) ปะกฏสัญญาณที่ค่า Chemical shift ( $\delta$ , ppm) ดังนี้ 0.37(s, 3H), 1.16(s, 3H), 1.19(m, 1H), 1.23(m, 1H), 1.28(m, 1H), 1.30(m, 1H), 1.52(m, 1H), 1.60(m, 2H), 1.78(m, 1H), 1.79(m, 1H), 1.82(m, 1H), 2.00(m, 1H), 2.68(m, 1H), 3.62(dd,  $J=10.88$ , 7.58 Hz, 1H), 3.47(dd,  $J=10.94$ , 4.62 Hz, 1H), 3.90(m, 1H) และ 4.86(s, 1H)

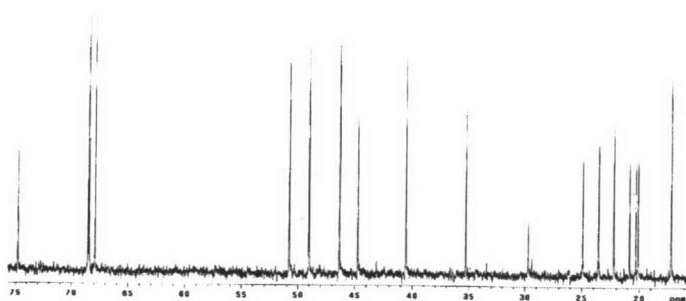


รูปที่ 31 โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PB

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( $\text{CDCl}_3$ ) (รูปที่ 32) ปะกฏสัญญาณที่ค่า Chemical shift ( $\delta$ , ppm) ดังนี้ 17.2(1C), 20.1(1C), 22.25(1C), 23.6(1C), 35.3(-C-), 40.6(1C), 44.7(1C), 46.4(1C), 50.8(1C), 49.0(1C), 67.9(C-OH), 68.6(-C-OH), 74.8(C-OH), 108.2(1C) และ 147.7(C=)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

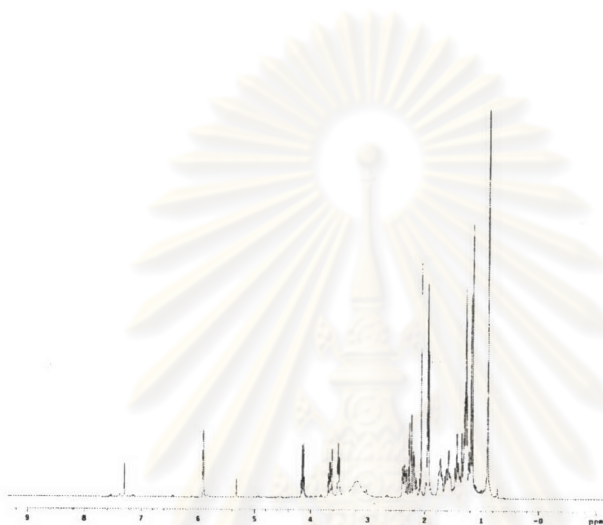
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 32 คาร์บอน-13เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PB

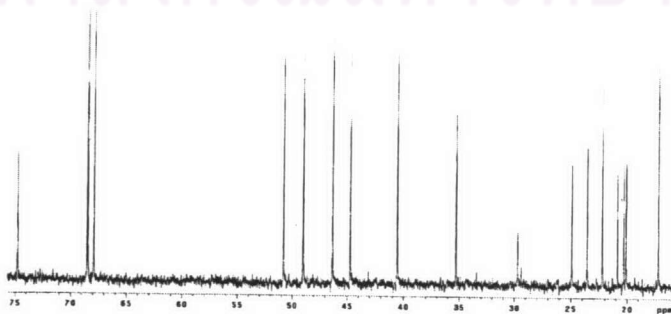
ผลิตภัณฑ์ C มีค่าการบิดระนาบแสงดังนี้  $[\alpha]_D^{26.5} + 56.8^\circ$  (c=0.145; chloroform)

โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( $\text{CDCl}_3$ ) (รูปที่ 33) ปรากฏสัญญาณที่ค่า Chemical shift ( $\delta$ , ppm) ดังนี้ 0.89(s, 3H), 1.16(s, 3H), 1.19(s, 1H), 1.26(m, 1H), 1.35(m, 1H), 1.43(m, 1H), 1.57(m, 1H), 1.74(m, 1H), 1.95(d,  $J=8.54$  Hz, 1H), 2.19(m, 1H), 2.27(d,  $J=16.23$  Hz, 1H), 2.37(d,  $J=12.49$  Hz, 1H), 3.65(dd,  $J=16.31, 11.00$  Hz, 1H) และ 5.91(s, 1H)



รูปที่ 33 โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PC

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( $\text{CDCl}_3$ ) (รูปที่ 34) ปรากฏสัญญาณที่ค่า Chemical shift ( $\delta$ , ppm) ดังนี้ 16.8(1C), 19.7(1C), 20.8(1C), 22.1(1C), 23.0(1C), 37.6(-C-), 39.9(1C), 44.9(1C), 47.8(1C), 54.3(1C), 68.5 (-C-OH), 74.7(-C-OH), 126.7(-C=), 164.1(C=) และ 199.7(C=O)



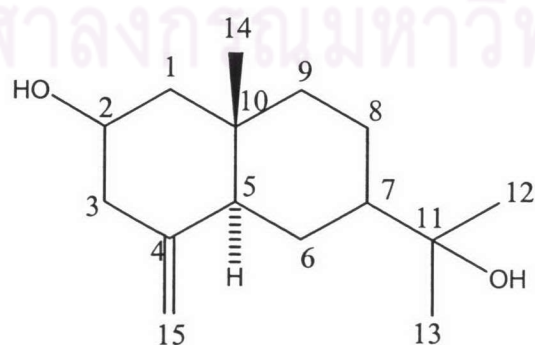
รูปที่ 34 คาร์บอน-13เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PC



ทำการเปรียบเทียบสัญญาณของคาร์บอน ( $\delta$ , ppm) ของสารตั้งต้นกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น  
แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบสัญญาณของคาร์บอน ( $\delta$ , ppm) ของสารตั้งต้นกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

ตำแหน่งของ คาร์บอน	Chemical shift ( $\delta$ , ppm)			
	pterocarpol	ผลิตภัณฑ์ PA	ผลิตภัณฑ์ PB	ผลิตภัณฑ์ PC
1	50.8	54.4	50.8	54.3
2	67.9	199.4	67.9	199.7
3	46.4	126.8	46.4	126.7
4	147.8	163.5	147.7	164.1
5	49.0	47.8	49.0	47.8
6	21.9	24.0	22.25	22.1
7	49.0	49.6	44.7	44.9
8	24.6	21.9	23.6	23.0
9	40.6	40.0	40.6	39.9
10	35.2	37.6	35.3	37.6
11	72.7	72.7	74.8	74.7
12	27.3	28.0	68.6	68.5
13	27.1	26.6	20.1	19.7
14	17.2	16.8	17.2	16.8
15	108.0	22.0	108.2	20.8



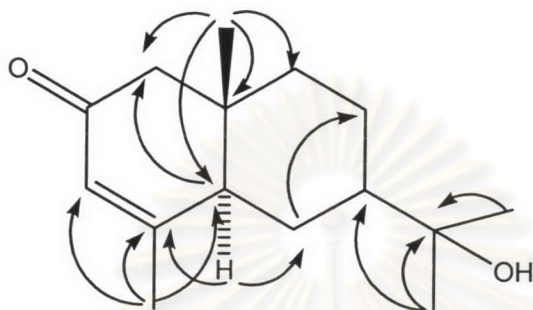
รูปที่ 35 การเรียกตำแหน่งของคาร์บอนในโมเลกุลของ pterocarpol

เพื่อที่จะยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนของผลิตภัณฑ์จึงได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้ 2D-NMR ได้แก่ HSQC เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน ( $\delta$ , ppm) ที่ตรงกับสัญญาณของโปรตอน ( $\delta$ , ppm) แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงค่า chemical shift ของผลิตภัณฑ์ ด้วยการวิเคราะห์โดย HSQC เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม

ตำแหน่ง คาร์บอน	Chemical shift ( $\delta$ , ppm)					
	ผลิตภัณฑ์ PA		ผลิตภัณฑ์ PB		ผลิตภัณฑ์ PC	
	คาร์บอน-13	โปรตอน	คาร์บอน-13	โปรตอน	คาร์บอน-13	โปรตอน
1	54.4	2.21,2.30	50.8	1.82,1.23	54.3	2.27
2	199.4		67.9	3.90	199.7	
3	126.8	5.9	46.4	2.68,2.00	126.7	5.91
4	163.5		147.7		164.1	
5	47.8	2.36	49.0	1.78	47.8	2.37
6	24.0	1.18,2.11	22.25	1.52,1.28	22.1	1.35,1.95
7	49.6	1.47	44.7	1.60	44.9	1.74
8	21.9	1.72	23.6	1.19,1.79	23.0	1.26,2.19
9	40.0	1.4,1.62	40.6	1.60,1.30	39.9	1.57,1.4
10	37.6		35.3		37.6	
11	72.7		74.8		74.7	
12	28.0	1.25	68.6	3.62,3.47	68.5	3.65,3.50
13	26.6	1.27	20.1	1.16	19.7	1.16
14	16.8	0.89	17.2	0.37	16.8	0.89
15	22.0	1.95	108.2	4.86,4.60	20.8	1.19

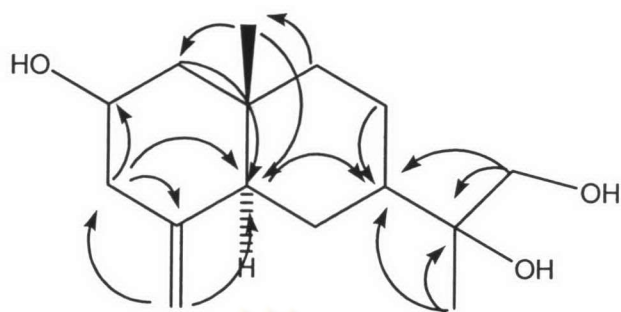
เพื่อที่จะยืนยันตำแหน่งของคาร์บอนของผลิตภัณฑ์จึงได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้ 2D-NMR ได้แก่ HMBC Inverse Probe เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ทำให้ทราบสัญญาณของของโปรตอน ( $\delta$ , ppm) ที่ coupling กับ สัญญาณของคาร์บอน ( $\delta$ , ppm) แสดงดังตารางที่ 9 10 และ 11



รูปที่ 36 ตำแหน่งโปรตอนและ คาร์บอนที่ coupling กันของผลิตภัณฑ์ PA

ตารางที่ 9 แสดง HMBC Inverse Probe เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PA

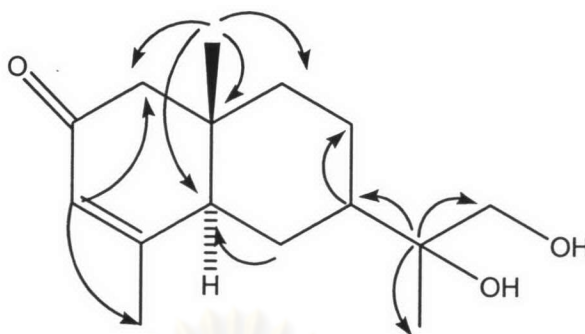
ตำแหน่งโปรตอนและ คาร์บอนที่ coupling กัน			
โปรตอน		คาร์บอน	
ตำแหน่งโปรตอน	Chemical shift ( $\delta$ , ppm)	ตำแหน่งคาร์บอน	Chemical shift ( $\delta$ , ppm)
H-1	2.30	C-6, C-9, C-10, C-14	47.8, 40.0, 37.6, 16.4
H-4	0.89	C-1, C-6, C-9, C-10	54.4, 47.8, 40.0, 37.6
H-5	2.36	C-7, C-9, C-10, C-14	49.6, 40.0, 37.6, 16.8
H-6	1.18	C-10	37.6
H-7	1.47	C-8	21.9
H-8	1.72	C-10	37.6
H-9	1.62	C-7, C-8, C-10	49.6, 21.9, 37.6
H-12	1.25	C-7, C-11, C-13	49.6, 72.7, 26.6
H-13	1.27	C-7, C-11, C-12	49.6, 72.7, 28.0
H-15	1.95	C-3, C-4, C-6	126.8, 136.5, 47.8



รูปที่ 37 ตำแหน่งโปรตอนและ คาร์บอนที่ coupling กันของผลิตภัณฑ์ PB

ตารางที่ 10 แสดง HMBC Inverse Probe เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PB

ตำแหน่งโปรตอนและ คาร์บอนที่ coupling กัน			
โปรตอน		คาร์บอน	
ตำแหน่งโปรตอน	Chemical shift ( $\delta$ , ppm)	ตำแหน่งคาร์บอน	Chemical shift ( $\delta$ , ppm)
H-1	1.82	C-3	46.4
H-2	3.90	C-3	46.4
H-3	2.00	C-2, C-4, C-5, C-15	67.9, 147.7, 49.0, 108.2
H-5	1.78	C-4, C-7, C-10	147.7, 44.7, 35.3
H-7	1.60	C-5, C-8, C-9	49.0, 23.6, 40.6
H-8	1.79	C-7, C-10	44.7, 35.3
H-9	1.30	C-5, C-7, C-14	49.0, 44.7, 17.2
H-12	3.62	C-7, C-11, C-13	44.7, 74.8, 20.1
H-13	1.16	C-7, C-11, C-12	44.7, 74.8, 68.6
H-14	0.7	C-1, C-5, C-9, C-10	50.8, 49.0, 40.6, 35.3
H-15	4.86	C-3	46.4

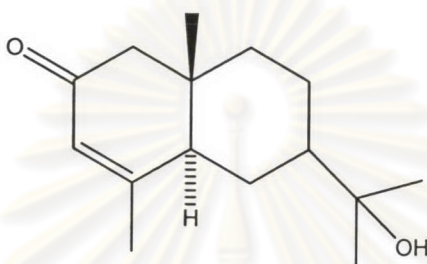


รูปที่ 38 ตำแหน่งโปรตอนและ คาร์บอนที่ coupling กันของผลิตภัณฑ์ PC

ตารางที่ 11 แสดง HMBC Inverse Probe เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ PC

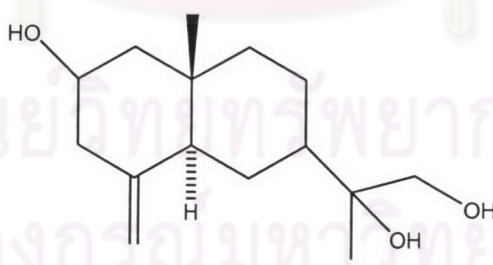
ตำแหน่งโปรตอนและ คาร์บอนที่ coupling กัน			
โปรตอน		คาร์บอน	
ตำแหน่งโปรตอน	Chemical shift ( $\delta$ , ppm)	ตำแหน่งคาร์บอน	Chemical shift ( $\delta$ , ppm)
H-1	2.27	C-5, C-9, C-10, C-14,	47.8, 39.9, 37.6, 16.8
H-3	5.91	C-1, C-5, C-15	54.3, 47.8, 20.8
H-5	2.37	C-1	54.3
H-6	1.35	C-10	37.6
H-7	1.74	C-8, C-9, C-11	23.0, 39.9, 74.7
H-8	1.26	C-11	74.7
H-9	1.43	C-5, C-10	47.8, 37.6
H-12	3.5	C-11, C-13	74.7, 19.7
H-13	1.16	C-11, C-12	74.7, 6.5
H-14	0.89	C-1, C-5, C-6, C-9, C-10	54.3, 47.8, 22.1, 39.9, 37.6
H-15	1.19	C-3	126.7

จากการเปรียบเทียบค่า Chemical shift ของผลิตภัณฑ์ PA เทียบกับ pterocarpol พบว่า ค่า Chemical shift ของผลิตภัณฑ์ PA ต่างกับ pterocarpol ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของผลิตภัณฑ์ซึ่งปรากฏเป็นสัญญาณเฉพาะของหมู่คาร์บอนิลชนิดคีโตน และที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 ปรากฏสัญญาณเฉพาะของการมีพันธะคู่ จากข้อมูลทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์ PA ควรจะมีสูตรโครงสร้างตามแสดงดังรูปที่ 39 และมีสูตรโมเลกุลคือ  $C_{15}H_{24}O_2$



รูปที่ 39 โครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ PA

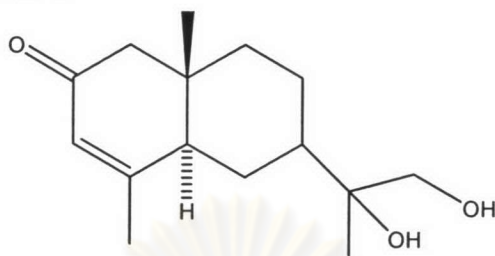
จากการเปรียบเทียบค่า Chemical shift ของผลิตภัณฑ์ PB เทียบกับสารตั้งต้น พบว่า ค่า Chemical shift มีค่าใกล้เคียงกัน ยกเว้น Chemical shift ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 12 ซึ่งปรากฏเป็นสัญญาณเฉพาะของหมู่ไฮดรอกซิล จากข้อมูลทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์ PB ควรจะมีสูตรโครงสร้างตามแสดงดังรูปที่ 40 และมีสูตรโมเลกุลคือ  $C_{15}H_{26}O_3$



รูปที่ 40 โครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ PB

จากการเปรียบเทียบค่า Chemical shift ของผลิตภัณฑ์ PC เทียบกับสารตั้งต้น พบว่า ค่า Chemical shift ของผลิตภัณฑ์ PC ต่างกับสารตั้งต้นตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของผลิตภัณฑ์ซึ่งปรากฏเป็นสัญญาณเฉพาะของหมู่คาร์บอนิลชนิดคีโตน คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 ปรากฏสัญญาณเฉพาะของพันธะคู่ และคาร์บอนตำแหน่งที่ 12 ปรากฏเป็นสัญญาณเฉพาะของหมู่ไฮดรอก

ซิด จากข้อมูลทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์ PC ควรมีส่วนประกอบโครงสร้างตามแสดงดังรูปที่ 41 และมีสูตร โมเลกุลคือ  $C_{15}H_{24}O_3$



รูปที่ 41 โครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ PC

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย