

สารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *Fusarium equiseti* ที่แยกจากเหง้าขมิ้นชัน
Curcuma longa



นางสาวปัทมา บัวเพชร

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOACTIVE SECONDARY METABOLITES FROM ENDOPHYTIC FUNGI
(*Fusarium equiseti*) FROM *Curcuma longa* RHIZOMES



Miss Pattama Buapet

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

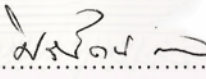
Copyright of Chulalongkorn University

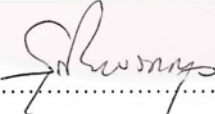
หัวข้อวิทยานิพนธ์	สารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ <i>Fusarium equiseti</i> ที่แยกจากเหง้าขมิ้นชัน <i>Curcuma longa</i>
โดย	นางสาวปัทมา บัวเพชร
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ พรภคกุล


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบริหารบัณฑิต



..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ มณะเศวต)

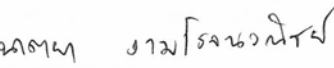
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ กักผล)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ พรภคกุล)

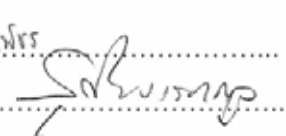

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน สีहनนท์)


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


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวณิชย์)

ปัทมา บัวเพ็ชร : สารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *Fusarium equiseti* ที่แยกจากเหง้าขมิ้นชัน *Curcuma longa*. (BIOACTIVE SECONDARY METABOLITES FROM ENDOPHYTIC FUNGI (*Fusarium equiseti*) FROM *Curcuma longa* RHIZOMES) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สุรัชย์ พรภคกุล, 173 หน้า.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อแยกสารปฏิชีวนะจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากเหง้าขมิ้นชัน *Curcuma longa* เก็บตัวอย่างเหง้าขมิ้นชันจาก 7 จังหวัด คือ เชียงใหม่ มหาสารคาม ร้อยเอ็ด อุดรธานี ชลบุรี ราชบุรี และนครศรีธรรมราช โดยเลือกเก็บตัวอย่างเหง้าจากต้นขมิ้นชันที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงไม่เป็นโรค มาคัดแยกราเอนโดไฟต์ โดยผ่านวิธีฆ่าเชื้อที่ผิวนอก สามารถแยกได้ทั้งหมด 47 ไอโซเลต ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Dual agar diffusion technique พบว่ามีราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 14 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยสายพันธุ์ NK9 มีฤทธิ์ดีที่สุด คือ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ดังนั้นจึงเลือกราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ NK9 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Malt Extract Broth (MEB) จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยาของ ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ NK9 เมื่อเทียบลำดับ DNA บริเวณ ITS1 ITS2 และ 5.8S rRNA พบว่าคล้าย *Fusarium equiseti* เมื่อนำมาสกัดและแยกสารที่สร้างขึ้นด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและการตกผลึกได้สาร 3 ชนิด ประกอบด้วย ergosterol peroxide(1), 8'-*epi*-hydroxyzearealenone(2), และ zearealenone(3) โดยสารทั้ง 3 ชนิด ได้มาจากสารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากส่วนน้ำเลี้ยงและเส้นใยรา ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี minimum inhibitory concentration method (MIC) เมื่อใช้ streptomycin, chloramphenicol เป็น positive control พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดมีสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ คือ zearealenone มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด คือสามารถยับยั้ง *B. subtilis*, *S. aureus* และ *E. coli* ได้ที่ค่า MIC 1.95 µg/ml (6.13 µM), 7.81 µg/ml (24.56 µM) และ 7.81 µg/ml (24.56 µM) ตามลำดับ สาร 8'-*epi*-hydroxyzearealenone มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis*, *S. aureus* และ *E. coli* ได้ที่ค่า MIC 7.81 µg/ml (23.28 µM), 7.81 µg/ml (23.28 µM) และ 15.62 µg/ml (46.76 µM) ตามลำดับและ ergosterol peroxide มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus*, *E. coli* และ *C. albicans* ได้ที่ค่า MIC 7.81 µg/ml (23.84 µM), 31.25 µg/ml (95.27 µM) และ 62.5 µg/ml (190.55 µM) ตามลำดับ และจากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้ พบว่าสาร สาร 8'-*epi*-hydroxyzearealenone สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ(HEP-G2) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร(KATO-III) ได้ โดยมีค่า IC₅₀ 0.05 µg/ml และ 4.94 µg/ml ตามลำดับ ส่วนสาร zearealenone สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม(BT 474) เซลล์มะเร็งตับ(HEP-G2) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร(KATO-III) เซลล์มะเร็งปอด(CHAGO) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่(SW 620)ได้ โดยมีค่า IC₅₀ 0.1 µg/ml, 0.001 µg/ml 0.02 µg/ml 5.89 µg/ml และ 4.78 µg/ml ตามลำดับ

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต..... มีทอง มีพร.....
 ปีการศึกษา.....2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

4772368623 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: ENDOPHYTIC FUNGI / *Curcuma longa* / BIOACTIVE

PATTAMA BUAPET : BIOACTIVE SECONDARY METABOLITES FROM
ENDOPHYTIC FUNGI (*Fusarium equiseti*) FROM *Curcuma longa* RHIZOMES.

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SURACHAI PORNPAKAKUL, Ph.D., 173 pp.

The purposes of this research were to isolate antibiotics produced by the endophytic fungi of *Curcuma longa* rhizomes. Plant samples were collected from 7 provinces including Chiang Mai, Maha Sarakham, Roi Et, Ayutthaya, Chon Buri, Ratcha Buri and Nakhon Si Thammarat. The endophytic fungi were isolated using surface-sterilization technique to give 47 isolates. The fungal isolates were examined for antimicrobials using dual culture agar diffusion technique. Fourteen isolates against tested microorganism but isolate NK9 have the highest exhibited activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Candida albicans* ATCC 10231. On the basis of morphology and DNA sequences from ITS1, ITS2 and 5.8S rRNA region, the fungus was identified as *Fusarium equiseti*. The fungus NK9 was cultivated on Malts Extract Broth (MEB). Extraction and isolation antibiotics using chromatographic techniques and crystallization of ethyl acetate extract of culture broth and mycelium gave three known compounds including ergosterol peroxide, 8'-epi-hydroxyzearalenone and zearalenone. Antimicrobial activity of three compounds was determined by the minimum inhibitory concentration method (MIC) and streptomycin and chloramphenicol were used as positive control. The results showed that zearalenone exhibited antimicrobial activity against *B. subtilis*, *S. aureus* and *E. coli* with the MIC value of 1.95 µg/ml (6.13 µM), 7.81 µg/ml (24.56 µM) and 7.81 µg/ml (24.56 µM), respectively and cytotoxic activity against BT 474, HEP-G2 and KATO-III with the IC₅₀ value of 0.1, 0.001 and 0.02 µg/ml. 8'-epi-Hydroxyzearalenone exhibited antimicrobial activity against *B. subtilis*, *S. aureus* and *E. coli* with the MIC value of 7.81 µg/ml (23.28 µM), 7.81 µg/ml (23.28 µM) and 15.62 µg/ml (46.76 µM), respectively and exhibited cytotoxic activity against HEP-G2 with the IC₅₀ value of 0.05 µg/ml. Ergosterol peroxide exhibited antimicrobial activity against *B. subtilis*, *S. aureus* and *E. coli* with the MIC value of 7.81 µg/ml (23.84 µM), 31.25 µg/ml (95.27 µM) and 62.5 µg/ml (190.55 µM), respectively.

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

Academic year.....2006.....

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Pattama Buapet
Surachai Pornpakakul

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ พรหมคกุล อาจารย์ที่ปรึกษาที่คอยให้คำแนะนำและสั่งสอนให้ได้รับความรู้ต่างๆ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ก๊กผล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ประทีปดีลีน สีหนนทน์ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำแก่ผู้เขียน

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ซึ่งได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. จิตรา เพ็ญเขียว และ คุณสุนัดดา โยมญาติ ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการศึกษาการพิสูจน์ทางอณูชีววิทยาของราเอนโดไฟต์

ขอขอบคุณคุณศรีนวล ตันสุวรรณ คุณจตุพล เหลียงสกุล คุณสุรศักดิ์ ปรัชญา คุณสุนิษา สุวรรณเจริญ คุณจำเรียง ธรรมธร คุณสุชน ดีจิงวิภาต ที่คอยช่วยเหลือให้คำแนะนำตลอดมา รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และที่หน่วยวิจัยไบโอออร์แกนิกเคมี (Research Centre for Bioorganic Chemistry, RCBC) ทุกคนที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดเวลาที่ทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีแก่ผู้เขียนจนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
สารบัญแผนภาพ.....	ฏ
คำย่อ.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 รายงานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 คำจำกัดความของเอนโดไฟต์.....	4
2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างราเอนโดไฟต์กับพืชในทางนิเวศวิทยา.....	5
2.3 การจัดกลุ่มราเอนโดไฟต์ในทางนิเวศวิทยา.....	7
2.4 การศึกษาสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์.....	7
2.5 ขมิ้นชัน.....	17
2.6 องค์ประกอบทางเคมีของขมิ้นชัน.....	19
2.7 การนำไปใช้.....	24
2.8 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา.....	25
บทที่ 3 วิธีการทดลอง.....	31
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	31
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	33
3.3 เทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการทดลอง.....	33
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง.....	33
3.5 การเก็บตัวอย่างเหง้าขมิ้นชัน.....	34
3.6 การแยกราเอนโดไฟต์.....	34
3.7 การคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์.....	34
3.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์.....	35
3.9 ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์ NK9.....	38

3.10	ศึกษาการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิของราเอนโดไฟต์ NK9.....	38
3.11	การเลี้ยงเชื้อและสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จาก..... ราเอนโดไฟต์ NK9	39
3.12	การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของส่วนสกัดหยาบ.....	41
3.13	การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบ ของเส้นใย..... และน้ำเลี้ยงให้บริสุทธิ์ และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบ	42
3.14	การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบที่แยกได้.....	46
3.15	การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้.....	49
3.16	การทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารที่แยกได้.....	50
3.17	การทดสอบความสามารถในการต้านการอักเสบของสารที่แยกได้.....	55
บทที่ 4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	56
4.1	ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากเหง้าขมิ้นชัน.....	56
4.2	การคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์.....	61
4.3	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์.....	66
4.4	ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการเจริญเติบโตของราของรา..... เอนโดไฟต์ NK9	69
4.5	ศึกษาการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิของราเอนโดไฟต์ NK9.....	72
4.6	การเลี้ยงเชื้อและสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จาก.....	74
4.7	การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของส่วนสกัดหยาบ.....	75
4.8	การแยกองค์ประกอบ การทำให้บริสุทธิ์ และสมบัติทางเคมีของสารประกอบ.	78
4.9	การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบ.....	110
4.10	การทดสอบฤทธิ์โดยวิธี The Minimum Inhibitory Concentration Method.	110
4.11	การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารประกอบ	112
4.12	การทดสอบความสามารถต้านออกซิเดชัน.....	115
4.13	การทดสอบความสามารถต้านการอักเสบ.....	116
บทที่ 5	สรุปผลการทดลอง.....	117
	รายการอ้างอิง.....	119
	ภาคผนวก.....	125
	ภาคผนวก ก.....	126

ภาคผนวก ข.....	132
ภาคผนวก ค.....	147
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	173



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงจำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้ามันชั้น.....	56
4.2 การจัดจำแนกราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้ามันชั้น.....	57
4.3 แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ในอาหารต่างชนิดกัน	62
4.4 แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ที่มีระยะเวลาในการเลี้ยงต่างกัน.....	73
4.5 แสดงลักษณะและปริมาณส่วนสกัดหยาบของในตัวทำลายต่างๆ.....	75
4.6 แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์	76
4.7 การแยกส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากส่วนน้ำเลี้ยงรา.....	78
4.8 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 1.....	81
4.9 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 1.....	82
4.10 ข้อมูลเปรียบเทียบ ¹³ C-NMR และ ¹ H-NMR สารประกอบ 1.....	85
กับ ergosterol peroxide	
4.11 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 2.....	91
4.12 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 2.....	92
4.13 ข้อมูล เปรียบเทียบ ¹³ C-NMR และ ¹ H-NMR ของสารประกอบ 2.....	95
กับ 8'- <i>epi</i> -hydroxyzearalenone	
4.14 การแยกส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใยราเอนโดไฟต์ NK9.....	99
4.15 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 3.....	102
4.16 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 3.....	103
4.17 ข้อมูล เปรียบเทียบ ¹³ C-NMR และ ¹ H-NMR ของสารประกอบ 3	105
กับ zearalenone	
4.18 แสดงค่าการยับยั้งจุลินทรีย์ของแต่ละลำดับส่วน.....	110
4.19 แสดงค่า MIC ของสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์.....	111
4.20 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง 1.....	112
4.21 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง 2.....	114
4.22 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชัน.....	115
4.23 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ.....	116

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างราเอนโดไฟต์กับพืช.....	6
2.2 โครงสร้างทางเคมีของ Lolicine A และ B.....	8
2.3 โครงสร้างทางเคมีของ $3\beta,5\alpha$ -dihydroxy- 6β -acetoxyergosta-7,22-diene และ $3\beta,5\alpha$ -dihydroxy- 6β -phenyl-acetoxyergosta-7,22-diene	9
2.4 โครงสร้างทางเคมีของ Cryptocandin.....	9
2.5 โครงสร้างทางเคมีของ pentaketide.....	10
2.6 โครงสร้างทางเคมีของ Artemisinin.....	10
2.7 โครงสร้างทางเคมีของ Neoplaether.....	11
2.8 โครงสร้างทางเคมีของ Taxol.....	12
2.9 โครงสร้างทางเคมีของ Torreynic acid.....	12
2.10 โครงสร้างทางเคมีของ Sequoiatones A และ Sequoiatones B.....	13
2.11 โครงสร้างทางเคมีของ Cytonic acid A และ B.....	14
2.12 โครงสร้างทางเคมีของ Subglutinol A.....	14
2.13 โครงสร้างทางเคมีของ Isopestacin.....	15
2.14 โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มของ Ergot alkaloid.....	15
2.15 แสดงลักษณะของเหง้าของขมิ้นชัน.....	18
2.16 แสดงลักษณะของใบขมิ้นชัน.....	18
2.17 แสดงลักษณะของดอกขมิ้นชัน.....	18
2.18 องค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยของขมิ้นชันในกลุ่ม ketone.....	19
2.19 องค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยของขมิ้นชันในกลุ่ม hydrocarbons.....	19
2.20 โครงสร้างทางเคมีของ Curcumin.....	20
3.1 การทำ slide culture.....	36
4.1 แสดงตัวอย่างของราเอนโดไฟต์ในกลุ่มต่างๆ ที่แยกได้.....	58
4.2 แสดงตัวอย่างวงใสในการยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์	64
4.3 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของราเอนโดไฟต์	65
4.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของราเอนโดไฟต์	65
4.5 แสดงลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราเอนโดไฟต์.....	66
4.6 แสดงลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ NK9.....	67

รูปที่	หน้า
4.7 แสดงการเจริญเติบโตในอาหารแข็งชนิดต่างๆของราเอนโดไฟต์ NK9.....	69
4.8 กราฟแสดงการเจริญเติบโต ในอาหารเหลว MEB.....	72
4.9 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ NK9 ที่เลี้ยง ในอาหารเหลว MEB.....	74
4.10 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 1.....	80
4.11 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 1.....	87
4.12 gHMBC ของสารประกอบ 1.....	87
4.13 gCOSY ของสารประกอบ 1.....	88
4.14 gNOESY ของสารประกอบ 1.....	88
4.15 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 2.....	90
4.16 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 2.....	97
4.17 gHMBC ของสารประกอบ 2.....	97
4.18 gCOSY ของสารประกอบ 2.....	98
4.19 gNOESY ของสารประกอบ 2.....	98
4.20 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 3.....	101
4.21 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 3.....	107
4.22 gHMBC ของสารประกอบ 3.....	108
4.23 gCOSY ของสารประกอบ 3.....	108
4.24 gNOESY ของสารประกอบ 3.....	109

สารบัญแนภาพ

แผนภาพที่	หน้า
3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NK9.....	40
3.2 แสดงขั้นตอนการแยกสารของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตต จากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NK9 โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี	43
3.3 แสดงขั้นตอนการแยกสารของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจาก..... เส้นใยราเอนโดไฟต์ NK9 โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี	45



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

$[\alpha]_D^{20}$	=	Specific rotation at 20 °C and Sodium D line (589 nm)
AAPH	=	2,2'-Azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (for cancer chemoprevention data)
ATCC	=	American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A
br s	=	broad singlet (for NMR spectral data)
br t	=	broad triplet (for NMR spectral data)
°C	=	degree Celsius
$^{13}\text{C-NMR}$	=	carbon-13 nuclear magnetic resonance
CDCl_3	=	deuterated chloroform
CD_3OD	=	deuterated methanol- d_4
CHCl_3	=	chloroform
CH_2Cl_2	=	dichloromethane
cm	=	centimeter
CMA	=	Corn Meal Agar
gCOSY	=	Gradient ^1H - ^1H correlation spectroscopy
CFU	=	Colony forming unit
δ	=	chemical shift
d	=	doublet (for NMR spectral data)
dd	=	doublet of doublet (for NMR spectral data)
dt	=	doublet of triplets (for NMR spectral data)
DMSO	=	Dimethylsulfoxide
DPPH	=	1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical (for cancer chemoprevention data)
ϵ	=	molar absorptivity
eq	=	equatorial
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid (for cancer chemoprevention data)
EtOAc	=	ethyl acetate

g	=	gram
G-6-P	=	Glucose-6-phosphate (for cancer chemoprevention data)
G-6-PDH	=	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (for cancer chemoprevention data)
gHMBC	=	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation
gHSQC	=	Gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence
¹ H-NMR	=	Proton Nuclear Magnetic Resonance
HBSS	=	Hank's balanced salt solution (for cancer chemoprevention data)
Hz	=	hertz
IR	=	infrared spectroscopy
L	=	liter
LOX	=	Lipoxygenase (soybean) (for cancer chemoprevention data)
λ_{\max}	=	wavelength of maximum absorption
[M+H] ⁺	=	protonated molecular ion
m	=	multiple (for NMR spectral data)
MEA	=	Malt extract agar
MgCl ₂	=	Magnesium chloride
MHB	=	Mueller-Hinton Broth
MeOH	=	methanol
MIC	=	Minimum inhibitory concentration
mg	=	milligram
MHz	=	megahertz
min	=	Minute
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
MORAC	=	Microplate oxygen radical absorbance capacity (for cancer chemoprevention data)
NA	=	Nutrient Agar

NADP	=	β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (for cancer chemoprevention data)
NaHCO ₃	=	Sodium hydrogen carbonate (for cancer chemoprevention data)
NaOH	=	Sodium hydroxide (for cancer chemoprevention data)
NDGA	=	Nordihydroguaiaretic acid (for cancer chemoprevention data)
nm	=	Nanometer
NMR	=	nuclear magnetic resonance
No.	=	Number
ORAC	=	Oxygen radical absorbance capacity (for cancer chemoprevention data)
PBS	=	Phosphate buffer saline (for cancer chemoprevention data)
PDA	=	Potato Dextrose Agar
ppm	=	part per million
q	=	quartet (for NMR spectral data)
ROO [•]	=	Peroxy radical (for cancer chemoprevention data)
rpm	=	Round per minute
s	=	singlet (for NMR spectral data)
SDA	=	Sabouraud's Dextrose Agar
SOD	=	Superoxide dismutase (for cancer chemoprevention data)
t	=	triplet (for NMR spectral data)
TLC	=	thin layer chromatography
TPA	=	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (for cancer chemoprevention data)
Trolox	=	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (for cancer chemoprevention data)
UV	=	Ultraviolet
XTT	=	(2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) (for cancer chemoprevention data)

YES	=	Yeast Extract Agar
YMA	=	Yeast-Malt Extract Agar
μg	=	microgram
μl	=	micro liter
μM	=	Micromolar
ν_{max}	=	wave number at maximum absorption



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันราเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญแหล่งหนึ่ง เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้เร็วจึงสามารถเพิ่มการผลิตได้ง่ายกว่าการแยกสารจากพืชโดยตรง จึงมีประโยชน์มากทั้งในทางการแพทย์ เกษษกรรม และเกษตรกรรม ราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมาก สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในน้ำจืด น้ำทะเล ดิน ซากพืช ซากสัตว์ มูลสัตว์ หรือในเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ที่ยังมีชีวิต โดยราที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืช และไม่ก่อให้เกิดโรคและความผิดปกติต่อพืชปรากฏให้เห็น เรียกว่า ราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์อาจจะอาศัยอยู่ในเซลล์หรือช่องว่างระหว่างเซลล์ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ใบ ก้านใบ ลำต้น หรือราก สามารถพบราเอนโดไฟต์ได้ในพืชแทบทุกชนิด และมีความเกี่ยวข้องกับพืชในลักษณะที่อยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน โดยพืชให้ที่อยู่อาศัย เป็นแหล่งอาหาร และปกป้องเชื้อราจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความร้อน ความแห้งแล้ง ส่วนราเอนโดไฟต์ก็จะตอบแทนโดยการสร้างสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิบางชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อพืช เช่น ทำให้พืชมีความสามารถในการเจริญเติบโตและอยู่รอดได้มากขึ้น โดยอาจช่วยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืช สัตว์กินพืช ภาวะที่หนาวหรือร้อนและแห้งแล้งเกินไป (Gregory, 2004) หรือทำให้พืชมีความสามารถในการต้านทานต่อภาวะขาดสารอาหารมากขึ้น (Dariusz, Malinowski และ Belesky, 2000)

โดยมีรายงานยืนยันว่า เอนโดไฟต์สามารถสร้างสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิมีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และโปรโตซัวที่เป็นสาเหตุของโรคหลายชนิด เช่น โรคมาลาเรีย วัณโรค และแอนแทรกซ์ (Palangpol Kongsaree, 2003) ทั้งยังพบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างโดยเอนโดไฟต์ จะมีฤทธิ์คล้ายคลึงหรือเหมือนกับสารที่พืชชนิดนั้นผลิตได้ (Petrini, 1991)

Schwarz และคณะ พบว่าราเอนโดไฟต์ *Phomopsis phaseoli* ซึ่งแยกได้จากพืชที่ขึ้นได้ในเขตร้อน และ *Melanconium betulunum* ซึ่งแยกได้จากกิ่งของต้น *Betula pendula* กับ *B. pubescens* สามารถสร้างสารประกอบ 3-Hydroxypropionic acid ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการทำลายสิ่งมีชีวิตพวก nematode กลุ่มที่เป็นปรสิตต่อพืช เช่นพวก *Meiloidogyne incognita* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Schwarz และ Kopcke, 2004)

Lu และคณะ รายงานว่า *Colletotrichum* sp. ซึ่งเป็นราเอนโดไฟต์ ที่แยกได้จากต้น *Artemisia annua* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรของประเทศจีนสามารถสร้างสารชนิดใหม่ ซึ่งได้แก่ 6-isoprenylindole-3-carboxylic acid, $3\beta,5\alpha$ -dihydroxy- 6β -acetoxy-ergosta-7,22-diene และ $3\beta,5\alpha$ -dihydroxy- 6β -phenylacetyloxy-ergosta-7,22-diene ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Lu และคณะ, 2000)

Palangpol และคณะ พบว่าราเอนโดไฟต์ *Geotrichum* sp. ที่พบใน *Crassocephalum crepidioides* สามารถสร้างสารตัวใหม่ 3 ชนิดที่เป็นอนุพันธ์ของ dihydroisocoumarin คือ 7-butyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pent-11-enylisochroman-1-one, 7-butyl-15-enyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pent-11-enylisochroman-1-one และ 7-butyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pentylisochroman-1-one ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย วัณโรค และเชื้อราได้ (Palangpol Kongsaree และคณะ, 2003)

Blankenship และคณะ รายงานว่าราเอนโดไฟต์ *Neotyphodium uncinatum* ซึ่งเป็นเอนโดไฟต์ที่อยู่ในพืชตระกูลหญ้าสามารถผลิตสาร alkaloids ชื่อ Lolines ซึ่งเป็น saturated 1-aminopyrrolizidines with an oxygen bridge ที่สามารถออกฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลงได้ (Blankenship และคณะ, 2001)

Thongchai Taechowisan, Peberdy และ Saisamorn Lamyong ได้ทำการแยกเชื้อเอนโดไฟต์จากพืชทั้งหมด 36 ชนิดโดยพบว่าพืชที่มีเหง้าจะสามารถแยกเชื้อจากส่วนเหง้าได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับส่วนอื่นๆ ของต้นพืช และเชื้อบางชนิดสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Thongchai และคณะ, 2003)

จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่า ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรบางชนิดสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์และสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และอาจพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรมหรือเกษตรกรรมได้ ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษา ราเอนโดไฟต์จากขมิ้นชันซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์ที่น่าสนใจ

จากการศึกษาทางเภสัชวิทยา พบว่าขมิ้นชันมีสรรพคุณในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ช่วยต้านมะเร็ง วัณโรค ทั้งยังมีสารที่ยับยั้งการหลั่งของกรดจึงใช้ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร และลำไส้ มีฤทธิ์ลดการอักเสบ ขับน้ำดี และฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบ แก้อืดท้องเฟ้อ ช่วยให้เจริญอาหาร ทั้งยังมีผลดีต่อผิวหนัง คือ ช่วยรักษาโรคผิวหนัง แก้อาการผื่นคัน รักษากลากเกลื้อน แผลสด รักษาพิษโลหิต แก้บิดเป็นมูกเลือด นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการลดไข้ บรรเทาอาการวิงเวียน ตมแก้หวัด ระวังอาการชัก รักษาฟัน ตาแดง ปวดเมื่อย และบำรุงผิว

จากการศึกษาทางพิษเคมี พบว่า ขมิ้นมีสารประกอบทางเคมีที่หลากหลายและมีประสิทธิภาพสูงในการรักษาโรค ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากขมิ้นชันจะสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ที่น่าสนใจและอาจพัฒนาไปใช้ประโยชน์ได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อแยกราเอนโดไฟต์ที่ยับยั้งจุลินทรีย์จากเหง้าขมิ้น
2. แยกองค์ประกอบทางเคมีของสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ราเอนโดไฟต์สร้างขึ้น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเป็นสิ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นปัญหาในทางการแพทย์ และการเกษตรได้ ทั้งยังมีความปลอดภัยกว่าสารที่ได้มาจากการสังเคราะห์โดยกระบวนการทางเคมี โดยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากพืชชนิดต่างๆ แต่ก็มีกรพบว่ามีจุลินทรีย์บางชนิดที่เรียกว่าเอนโดไฟต์ ซึ่งอาจเป็นเชื้อราหรือแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเซลล์ หรือช่องว่างระหว่างเซลล์พืช โดยไม่ก่อให้เกิดโรคหรือความผิดปกติต่อพืช มีความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์และพืชในลักษณะที่อยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน และสามารถพบได้ในทุกส่วนของพืช โดยมีรายงานยืนยันว่าเอนโดไฟต์สามารถสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิมีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และโปรโตซัวที่เป็นสาเหตุของโรคหลายชนิด เช่น โรคมาลาเรีย วัณโรค และแอนแทรกซ์ โดยพบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างโดยเอนโดไฟต์ จะมีฤทธิ์คล้ายคลึงหรือเหมือนกับสารที่พืชชนิดนั้นผลิตได้

2.1 คำจำกัดความของเอนโดไฟต์

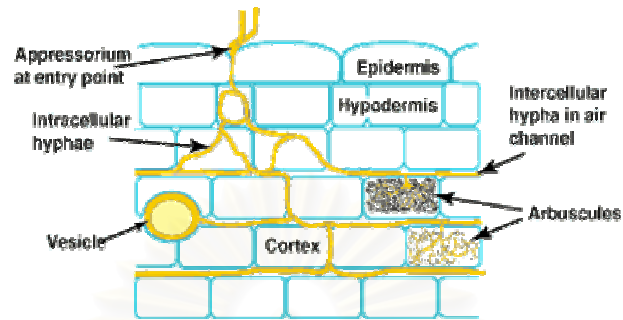
ในปี 1986 Petrini ได้ให้คำจำกัดความว่า เอนโดไฟต์ หมายถึงจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อยู่ในช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตจะสั้นหรือยาวก็ได้แต่มาอาศัยอยู่ในพืชในภาวะพึ่งพากัน (mutualism simbiotic) และก่อให้เกิดโรคด้วย (pathogen) ด้วยแต่อยู่แบบพักในพืชที่เป็นพืชให้อาศัย (Petrini, 1986) แต่ข้อมูลของเอนโดไฟต์ที่ก่อให้เกิดโรคหรือความผิดปกติของพืชนั้นยังมีน้อยส่วนใหญ่จะเป็นรูปแบบที่เอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน

ราเอนโดไฟต์เป็นกลุ่มราที่อาศัยอยู่กับพืช โดยอาจจะอาศัยอยู่ในเซลล์หรือช่องว่างระหว่างเซลล์ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ใบ ก้านใบ ลำต้น หรือราก สามารถพบราเอนโดไฟต์ได้ในพืชแทบทุกชนิด และมีความเกี่ยวข้องกับพืชในลักษณะที่อยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน โดยพืชให้ที่อยู่อาศัย เป็นแหล่งอาหาร และปกป้องเชื้อราจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความร้อน ความแห้งแล้ง ส่วนราเอนโดไฟต์ก็จะตอบแทนโดยการสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิบางชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อพืช เช่น ทำให้พืชมีความสามารถในการเจริญเติบโตและอยู่รอดได้มากขึ้น โดยอาจช่วยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืช (Hawksworth, 1991) สัตว์กินพืช

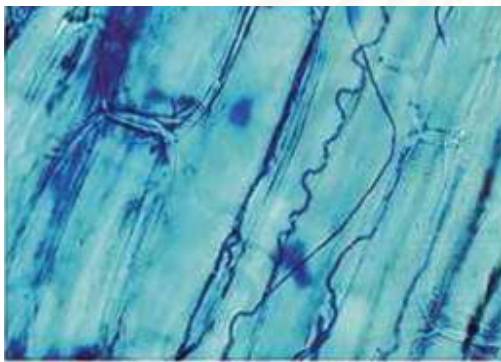
ภาวะที่หนาวหรือร้อนและแห้งแล้งเกินไป หรือทำให้พืชมีความสามารถในการต้านทานต่อภาวะขาดสารอาหารมากขึ้น (Petrini,1991) ราเอนโดไฟต์เป็นกลุ่มราที่มีความหลากหลายมากโดยจะมีความแตกต่างกันทั้งชนิดและนิเวศวิทยา ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในไฟลัม Ascomycota และ Deuteromycota วิธีการแยกเชื้อจะมีผลต่อราเอนโดไฟต์ที่มีในพืช โดยราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณแตกต่างกัน โดยความหลากหลายนี้จะขึ้นกับแต่ละส่วนของพืชที่ทำการศึกษาและแหล่งที่พืชเจริญเติบโต ทั้งนี้ยังพบว่าพืชแต่ละชนิดจะมีกลุ่มรา เอนโดไฟต์ที่จำเพาะเจาะจง ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นในการรวมกลุ่มในเนื้อเยื่อพืช

2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างราเอนโดไฟต์กับพืชในทางนิเวศวิทยา

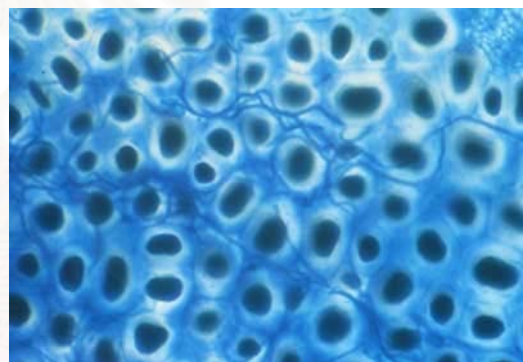
ราเอนโดไฟต์จะอาศัยอยู่ในต้นพืช โดยไม่ก่อให้เกิดโรคแก่ต้นพืชที่ราอาศัยอยู่ (Strobel และคณะ, 2001) โดยอาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular spaces) ของส่วนลำต้น (stem) เปลือกไม้ (bark) ท่อลำเลียงน้ำ (xylem) ใบ (leaves) เส้นใบ (petioles) ราก (root) และ เมล็ด (seed) ของพืชชั้นสูง (รูปที่ 2.1) ราเอนโดไฟต์จะมีความเกี่ยวข้องกับพืชในลักษณะที่เป็นภาวะพึ่งพากัน (mutualistic) ภาวะที่ต้องอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiotic) และ ภาวะที่อยู่ร่วมกันโดยฝ่ายหนึ่งได้ประโยชน์แต่อีกฝ่ายไม่ได้ประโยชน์แต่ไม่ได้รับอันตราย(commensal) แต่บางครั้งอาจจะทำให้เกิดพยาธิสภาพกับต้นพืชได้ถ้าต้นพืชมีภาวะอ่อนแอหรือมีความเครียดเกิดขึ้น (Dariusz และคณะ, 2000) โดยจะพบราเอนโดไฟต์ได้ในพืชจำพวกหญ้า ไม้ผลัดใบ ไม้ยืนต้น และไม้พุ่ม เป็นต้น (Strobel และคณะ, 2002)



ก.



ข.



ค.

รูปที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างราเอนโดไฟต์กับพืช

ก. การแทรกตัวของเส้นใยราเอนโดไฟต์ในช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular space)

ข. รูปแสดงเส้นใยของราเอนโดไฟต์ที่เจริญอยู่ระหว่างเซลล์ใบของพืช

ค. รูปแสดงเส้นใยของราเอนโดไฟต์ที่เจริญอยู่ในเนื้อเยื่อในเมล็ดพืช

2.3 การจัดกลุ่มราเอนโดไฟต์ในทางนิเวศวิทยา

เมื่อจัดกลุ่มของราเอนโดไฟต์ในทางนิเวศวิทยาแบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้ (Strobel และคณะ, 1996)

2.3.1 Clavicipitaceous grass endophyte

ราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในหญ้า ซึ่งเป็นราในตระกูล Clavicipitaceae การค้นพบราเอนโดไฟต์ในกลุ่มนี้ เริ่มต้นจากการที่ในปี 1999 Strobel (Strobel และคณะ, 1999) พบราเอนโดไฟต์ในเมล็ดของหญ้าชนิดหนึ่ง (*Lolium tumulentum* L.) ซึ่งเป็นวัชพืชที่เกิดในแปลงธัญพืช จากนั้นจึงมีรายงานการศึกษาอีกมากมายที่แสดงให้เห็นว่าราในกลุ่มนี้มีแหล่งที่อยู่อาศัยในพืชอีกหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นหญ้า ได้แก่ หญ้าตระกูล Poaceae หญ้าจำพวกหญ้าแห้วหมู (Sedge) ตระกูล Cyperaceae และหญ้าทรงสูงชนิดหนึ่ง (Rush) ตระกูล Juncaceae โดยมีหญ้ากว่า 80 สกุลและอีกหลายร้อยชนิดที่ราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่

2.3.2 Non-Clavicipitaceous grass endophyte

ราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่ม แต่รวมราเอนโดไฟต์ในหญ้าที่ไม่ใช่ตระกูล Clavicipitaceae ราเอนโดไฟต์ในกลุ่มนี้ได้แก่ราในไฟลัมย่อย Ascomycota, Deuteromycota, Zygomycota และ Basidiomycota

ราเอนโดไฟต์ของพืชตระกูลหญ้าเป็นที่รู้จักกันมานานกว่า 70 ปีแล้ว แต่การศึกษาราเอนโดไฟต์ของไม้ยืนต้นและไม้พุ่มเพิ่งเริ่มเมื่อ 15 ปีที่ผ่านมา โดยเริ่มศึกษาจากต้นสนพันธุ์ยุโรป หลังจากนั้นก็มีรายงานที่รวบรวมรายชื่อของพืชที่มีราเอนโดไฟต์เพื่อสรุปถึงการกระจายของราเอนโดไฟต์ในอาณาจักรพืชและพบว่าพืชที่มีเนื้อไม้พวกจิมโนสเปิร์มและแองจิโดสเปิร์มทั้งหมดที่ถูกตรวจสอบมีราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ และพบว่าราเอนโดไฟต์เหล่านี้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง

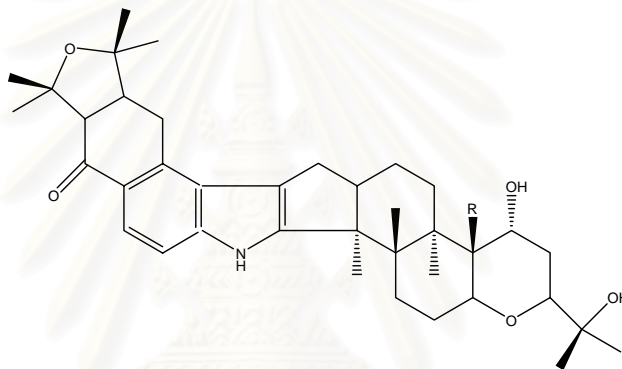
2.4 การศึกษาสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์

การศึกษาสารทุติยภูมิจากราเอนโดไฟต์ โดยมากมักศึกษาจากพืชสมุนไพรหรือพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากคาดว่าราเอนโดไฟต์ที่อาศัยร่วมกับพืชดังกล่าวอาจจะสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้เช่นเดียวกับพืชที่อาศัย

2.4.1 สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial agent)

การออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์จัดเป็นฤทธิ์เบื้องต้นที่มีการทดสอบ โดยมักทดสอบกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรคแล้ววัดความสามารถในการออกฤทธิ์จากขนาดวงใสที่เกิดขึ้น หรืออาจรายงานเป็นค่า MIC (minimum inhibitory concentration) หรือค่า IC (inhibition concentration) โดยมีรายงานการศึกษาที่น่าสนใจดังนี้

Munday และคณะ ศึกษาสารเอนโดไฟต์ *Neotyphodium lolii* จาก *Lolium perenne* ซึ่งสามารถผลิตสาร Lolicine A และ B โดยเมื่อศึกษาโครงสร้างและสมบัติของสารดังกล่าวพบว่าเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของ indole-diterpenoids ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด (Munday และคณะ, 1998)

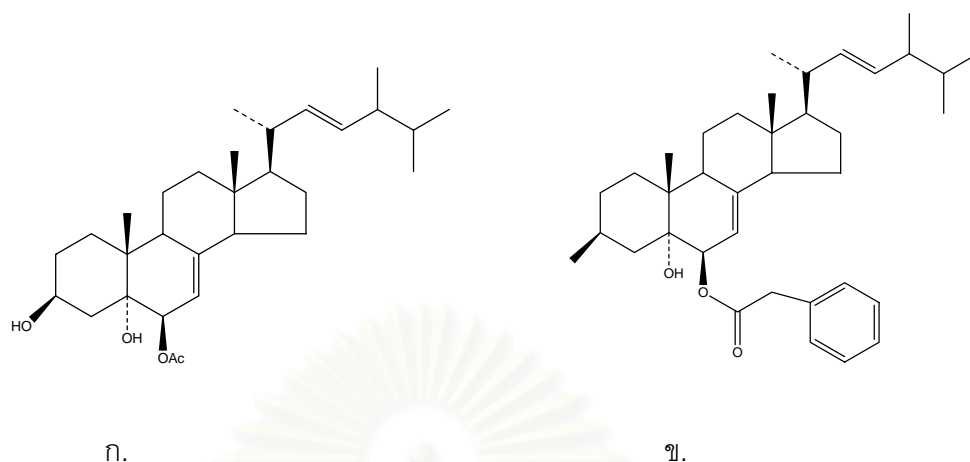


Lolicine A: R = CH₃

Lolicine B: R = CHO

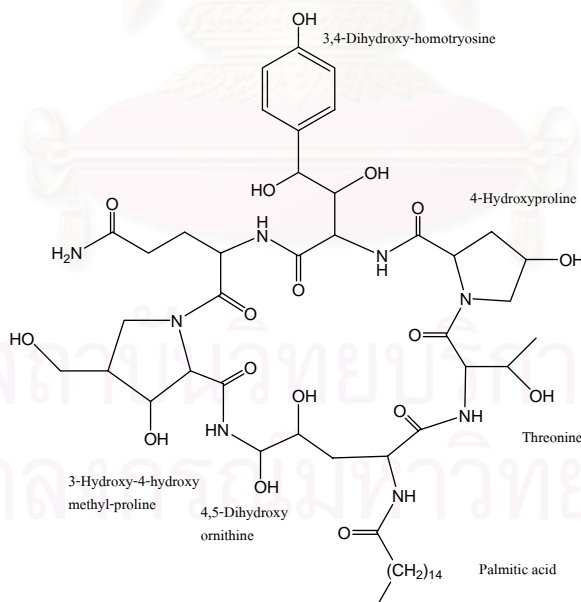
รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ Lolicine A และ B

Lu และคณะ ศึกษาสารเอนโดไฟต์ *Colletotrichum* sp. ซึ่งเป็นราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้น *Artemisia annua* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรของจีน พบว่าสามารถสร้างสารชนิดใหม่ซึ่งได้แก่ 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 -phenylacetoxy-ergosta-7,22-diene ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม steroids ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Lu และคณะ, 1999)



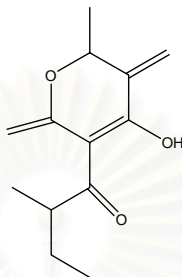
รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของ $3\beta,5\alpha$ -dihydroxy- 6β -acetoxysterol (ก.)
และ $3\beta,5\alpha$ -dihydroxy- 6β -phenylacetoxysterol (ข.)

Strobel และคณะ ศึกษาสารแอนโตไฟต์ *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* จาก *Tripterigeum wilfordii* ซึ่งสามารถผลิตสาร cryptocandin ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida albicans* โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.03-0.07 $\mu\text{g/ml}$ และสามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้หลายชนิด (Strobel และคณะ, 1999)



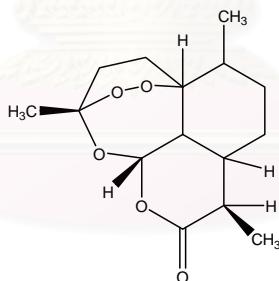
รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของ Cryptocandin

Brandy และคณะ คีซาราราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. จากต้น *Selaginella pallescens* ซึ่งสามารถผลิตสาร CR377 ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม pentaketide ชนิดใหม่ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* โดยเกิดวงไฮดรอกซิลผ่านศูนย์กลาง 19-24 มิลลิเมตร (Brandy และคณะ, 2000)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ pentaketide

Liu และคณะ คีซาราราเอนโดไฟต์หลายชนิดจากต้น *Artemisia annua* ที่เป็นแหล่งของยาต้านมาลาเรีย Artemisinin พบว่าราเอนโดไฟต์ IV403 สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้มากที่สุด (Liu และคณะ, 2001)

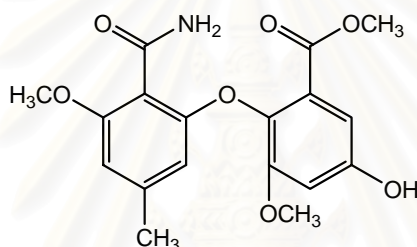


รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของ Artemisinin

Strobel คีซาราราเอนโดไฟต์ *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากต้น *Kennedia nigricans* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรของประเทศออสเตรเลีย พบว่าสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ munumbicins A, B และ D ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคแอนแทรกซ์ วัณโรค และมาลาเรียได้ (Strobel, 2003)

Strobel ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Pseudomonas viridiflora* ซึ่งสามารถพบได้ในใบหญ้าหลายชนิดสามารถสร้างสาร Ecomycin ซึ่งเป็น kir:d polypeptide มีผลกับเชื้อ *Cryptococcus neoformans* และ *Candida albicans* (Strobel, 2003)

Wang และคณะ ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Neoplaconema napellum* IFB-E016 ซึ่งแยกได้จากใบของต้น *Hopea hainanensis* พบว่าสามารถสร้างสารชนิดใหม่ 1 ชนิด คือ Neoplaether ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม diphenyl ether และสารอีก 4 ชนิดคือ monomethylsulochrin, physcion, helvolic acid, ergosterol และ ergosterol peroxide โดยสาร Neoplaether ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida albicans* โดยมีค่า MIC 6.2 µg/ml และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB cell) โดยมีค่า IC₅₀ 13.0 µg/ml (Wang และคณะ, 2006)



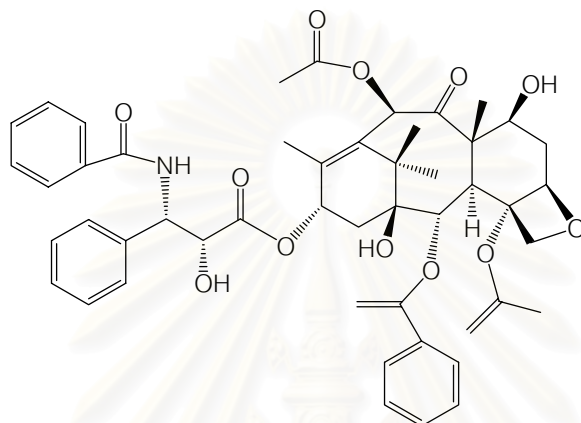
รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของ Neoplaether

2.4.2 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง (cytotoxic activity)

Srinivasa และคณะได้ศึกษาพบสาร taxol ที่เป็นสารประกอบพวก diterpenoid แยกได้จากเปลือกของต้น *Taxus* sp. มีสมบัติเป็นยาต้านมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งรังไข่ มะเร็งเต้านม และมะเร็งปอด โดยจะยับยั้งและทำลายไมเลกุลของ microtubulin ในระหว่างการแบ่งตัวแบบไมโทซิสของเซลล์มะเร็ง (Srinivasa และคณะ, 1995).

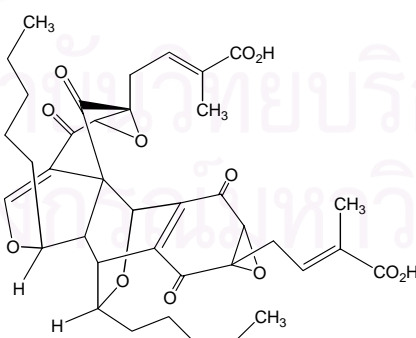
Paclitaxel (Taxol[®]) (รูปที่ 2.8) เป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่สร้างจากราเอนโดไฟต์ *Taxomyces andreanae* ที่แยกได้จากต้น Pacific yew (*Taxus brevifolia*) โดย Taxol นี้จะป้องกันการเกิดการ depolymerization ของ tubulin ในระหว่างกระบวนการแบ่งเซลล์ เมื่อทำการทดสอบพบว่า มีผลยับยั้งการเจริญและเพิ่มจำนวนของ P-388, P-1534 และ L-1210 murine leukemia นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ Walker 256 carcinosarcoma และ sarcoma 180 ได้อีกด้วย (Stierle และคณะ, 1993) นอกจากนี้แล้วยังมีราเอนโดไฟต์ชนิดอื่นๆ เช่น *Pestalotiopsis micospora* ที่แยกได้จากต้น Himayalan yew (*Taxus wallachiana*) และ

Tubercularia sp. สายพันธุ์ TF 5 จากต้น Chinese Southern yew (*Taxus mairei*) ก็สามารถสร้างสาร Taxol ได้เช่นเดียวกัน (Strobel และคณะ, 1996) ปัจจุบันนี้มีการนำ Taxol มาใช้เป็นตัวยาในการรักษาโรคมะเร็งแล้ว และ Taxol นี้เองก็เป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิสำคัญที่สร้างจากราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์เหมือนกับพืชที่ราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ได้ (Strobel และคณะ, 2004) และมีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้เหมือนกับพืช



รูปที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของ Taxol

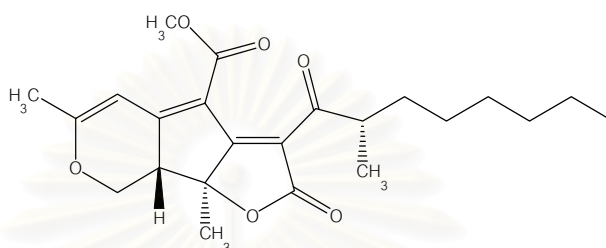
จากการศึกษาของ Lee และคณะ ที่ศึกษาราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspora* ซึ่งสามารถผลิตสาร Torreyanic acid พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งหลายชนิด โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 9.4-25 $\mu\text{g/ml}$ (Lee และคณะ, 1996)



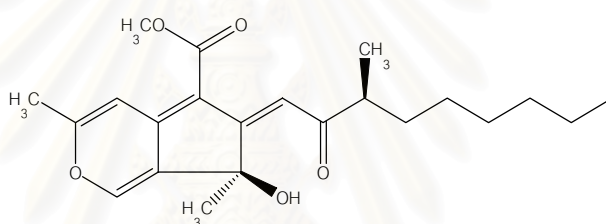
รูปที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของ Torreyanic acid

2.4.3 สารต้านเนื้องอก (Antitumor Agents)

ราเอนโดไฟต์ *Aspergillus parasiticus* ที่เจริญอยู่ในพีชจำพวกไม้เนื้อแดง (Redwood) สามารถสร้างสาร Sequoiatones A และ B (รูปที่ 2.9 ก. และ ข.) ที่จัดเป็นเอสเทอร์ชนิดหนึ่ง ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพแล้วพบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดเซลล์เนื้องอกได้ (Noble และคณะ, 1991)



ก. Sequoiatones A



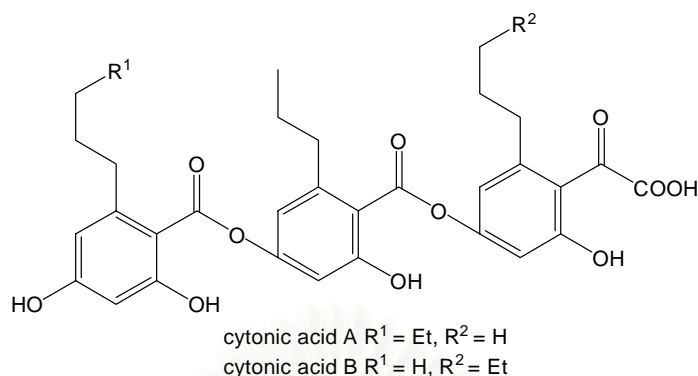
ข. Sequoiatones B

รูปที่ 2.10 โครงสร้างทางเคมีของ Sequoiatones A และ Sequoiatones B

2.4.4 สารสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (Antiviral Agents)

ราเอนโดไฟต์ *Cytonaema* sp. ซึ่งสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการต้านไวรัสที่เป็น cytomegalovirus protease inhibitors, cytonic acid A และ B (Gou และคณะ, 2000).

สารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิอีกชนิดหนึ่งที่สกัดได้มาจากการหมักแบบ Solid-State ของราเอนโดไฟต์ *Cytonaema* sp. แยกได้จากต้นโอ๊ค (*Quercus* sp.) สารที่ได้คือ Cytonic acids A และ B จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส human cytomegalovirus (hCMV) ที่เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในคนได้ (Kantorova และคณะ, 2002)

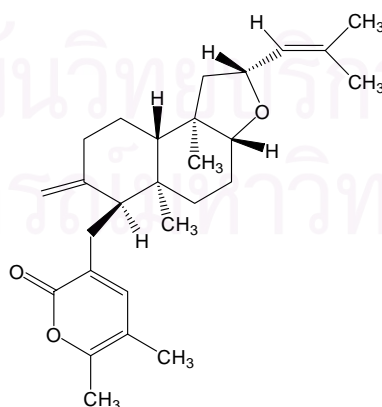


รูปที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของ Cytonic acid A และ B

ราเอนโดไฟต์ *Penicillium chrysogenum* ที่สามารถผลิตสาร Xanthoviridicatin E และ F ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัส HIV โดยทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ integrase ในไวรัส (Singh และคณะ, 2003)

2.4.5 สารที่มีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive Agents)

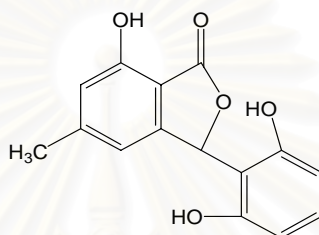
ปัจจุบันยาที่ให้แกผู้ป่วยที่มีการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยที่เป็นโรคเกี่ยวกับข้อต่อ เช่น โรคปวดข้อปวดกล้ามเนื้อ โรคไขข้ออักเสบ หรือผู้ป่วยที่ร่างกายอยู่ในภาวะที่ต้องการอินซูลิน จะเป็นยาที่มีส่วนประกอบของสาร Subglutinol A และ B ซึ่งเป็นสารที่ได้จากราเอนโดไฟต์ *Fusarium subglutinans* จากต้น *Taxus wilfordii* โดยสารตัวนี้จะมีฤทธิ์ในการทำให้เกิด Immunosuppression คือเป็นสารกดภูมิคุ้มกันที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (Lee และคณะ, 1995)



รูปที่ 2.12 โครงสร้างทางเคมีของ Subglutinol A

2.4.6 สารต้านการเกิดออกซิเดชัน (Antioxidant Agents)

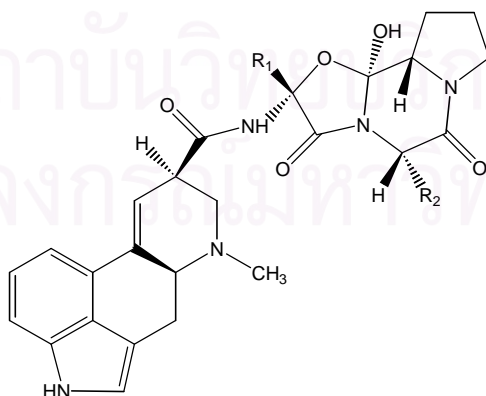
พบราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspora* ที่แยกได้จากต้น *Terminalia morobensis* ซึ่งเป็นพืชในเขตป่าฝนทางตอนเหนือของประเทศปาปัวนิวกินี (Strobel และคณะ, 2002) สามารถสร้างสารในกลุ่ม Isobenzofuranone คือ Isopestacin โดยสารนี้นอกจากจะมีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพจำพวกราและแบคทีเรียแล้ว ยังพบว่ายังมีฤทธิ์ต้านการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน โดยจะไปจับกับอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย



รูปที่ 2.13 โครงสร้างทางเคมีของ Isopestacin

2.4.7 สารที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท (Neurotoxicity Agents)

สารที่แยกได้จากราเอนโดไฟต์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นสารในกลุ่มของอัลคาลอยด์ เช่น Ergot alkaloid โดยสารชนิดนี้จะมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อประสาทของแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Bush และคณะ, 1997) ที่แยกได้จากราเอนโดไฟต์ *Neotyphodium coenophialum* และ *Claviceps purpurea* ที่อาศัยอยู่ในต้น *Festuca arundinacea* และ *Zizania aquatica* (Powell และ Petroski, 1992)



รูปที่ 2.14 โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มของ Ergot alkaloid

2.4.7 สารที่ออกฤทธิ์ไล่แมลง (Insect repellent)

Nodulisporic acid ที่สร้างจาก *Nodulisporium* sp. ที่แยกได้จาก *Bontia daphnoides* ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งตัวอ่อนของแมลงบางชนิด หรือ *Muscodor vitigenus* ที่แยกได้จาก *Paullina paullinioides* มีแนวพลาตินเป็นองค์ประกอบหลัก มีฤทธิ์ไล่แมลง (Bryn และคณะ, 2002)

2.4.8 ยารักษาโรคเบาหวาน (Antidiabetic agent)

สารเมแทบอลิต์ที่สร้างจาก *Pseudomassaria* sp. ที่ได้จากพืชในเขตป่าฝนของประเทศคองโก จะออกฤทธิ์เหมือน insulin ไม่ทำให้เกิดการแพ้ และไม่ถูกย่อยในระบบทางเดินอาหาร จึงสามารถให้ยาโดยการกินได้ (Strobel and Daisy, 2003)

2.4.9 สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (Antimalarial agent)

มีการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum* sp. ที่พบใน *Crassocephalum crepidioides* สามารถสร้างสารตัวใหม่ 3 ชนิด ที่เป็นอนุพันธ์ของ dihydroisocoumarin คือ 7-butyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pent-11-enylisochroman-1-one, 7-butyl-15-enyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pent-11-enylisochroman-1-one และ 7-butyl-6,8-dihydroxy-3(R)-pentylisochroman-1-one ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย วัณโรค และเชื้อราได้ (Palangpol และคณะ, 2003)

2.4.10 การนำมาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (Biological control)

จากการศึกษาราเอนโดไฟต์ *Phomopsis phaseoli* ที่แยกได้จากต้น *Quercus suber* ที่สามารถผลิตสาร 3-Hydroxypropionic acid ที่มีฤทธิ์ฆ่าปรสิตของพืช *Meloidogyne incognita* โดยมีค่า LD₅₀ ในช่วง 12.5-15 µg/ml (Schwarz และคณะ, 2004)

จากรายงานการพบสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่กล่าวมาแล้ว หากเราสามารถสกัดสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกับพืชที่ราเอนโดไฟต์ชนิดนั้นๆ อาศัยอยู่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชสมุนไพรไทย เช่นขมิ้นชัน ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ ก็จะมีประโยชน์อย่างมากต่อการพัฒนาทางการแพทย์และด้านอื่นๆ ที่จะนำสารที่ได้พัฒนามาใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต

2.5 ขมิ้นชัน

ขมิ้นชัน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae จำพวกเดียวกับ ขิง ข่า ไพล มีชื่อเรียกไปตามภาษาท้องถิ่น เช่น ขมิ้นแกง, ขมิ้นชัน, ขมิ้นหยอก, ขมิ้นหัว, ขี้มัน, หมิ้น(ใต้), ตายอ(กะเหรี่ยง-กำแพงเพชร), สะยอ(กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), หมิ้น ชื่อภาษาอังกฤษคือ Turmeric, Curcuma และ Yellow Root เป็นพืชสมุนไพรที่พบทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของทวีปเอเชีย ประเทศอินเดีย จีน และหมู่เกาะอินเดียตะวันออก ปัจจุบันมีการปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจอย่างแพร่หลายในเขตร้อน ขมิ้นชันเป็นพืชที่มีอายุยืนมีลำต้นใต้ดินเรียกว่าเหง้า (รูปที่ 2.15) เนื้อในของเหง้าขมิ้นชันสีเหลืองเข้มจนสีแดงจัดมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ใบมีขนาดใหญ่เรียวยาวเกิดมาจากเหง้า ออกแบบตรงข้าม (รูปที่ 2.16) ใบจะแห้งเมื่อถึงฤดูแล้ง เจริญงอกงามในฤดูฝน ดอกเป็นดอกช่อแบบช่อเชิงลด (spike) เรียงอัดติดกันแน่นบนแกนกลาง มีก้านช่อแทงจากเหง้าโดยตรง ดอกย่อยมีสีเหลืองอ่อนมีกลีบประดับสีเขียวอมชมพู (รูปที่ 2.17) ดอกบานครั้งละ 3-4 ดอก ผลรูปกลม มี 3 พู ชอบอากาศค่อนข้างร้อนและมีความชุ่มชื้น ชอบดินร่วนซุยที่ระบายน้ำได้ดี โดยมากปลูกไว้เป็นพืชสวนครัว หรือไว้ประกอบยา โดยส่วนที่ใช้คือเหง้าแห้งและสด

สามารถใช้ขมิ้นเป็นเครื่องเทศในการประกอบอาหาร สีส้มอาหารหรือสีย้อมผ้า นอกจากนี้ยังนิยมใช้เหง้าที่แก่จัดทั้งสดและแห้งเป็นยาสมุนไพร ในการรักษาโรคหรืออาการต่าง ๆ เช่น มีฤทธิ์ลดการอักเสบ ขับน้ำดี และฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบ แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ช่วยให้เจริญอาหาร ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ช่วยต้านมะเร็ง วัณโรค ทั้งยังมีสารที่ยับยั้งการหลั่งของกรดจึงใช้ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร และลำไส้ ทั้งยังมีผลดีต่อผิวหนัง คือ ช่วยรักษาโรคผิวหนัง แก้อาการผื่นคัน รักษากลากเกลื้อน แผลสด รักษาพิษโลหิต แก้บิดเป็นมูกเลือด นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการลดไข้ บรรเทาอาการวิงเวียน ตมแก้หวัด ระวังอาการชัก รักษาฟัน ตาแดง ปวดเมื่อย และบำรุงผิว เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปแสดงลักษณะของขมิ้นชัน (*Curcuma longa*)



รูปที่ 2.15 แสดงลักษณะของเหง้าขมิ้นชัน



รูปที่ 2.16 แสดงลักษณะของใบขมิ้นชัน



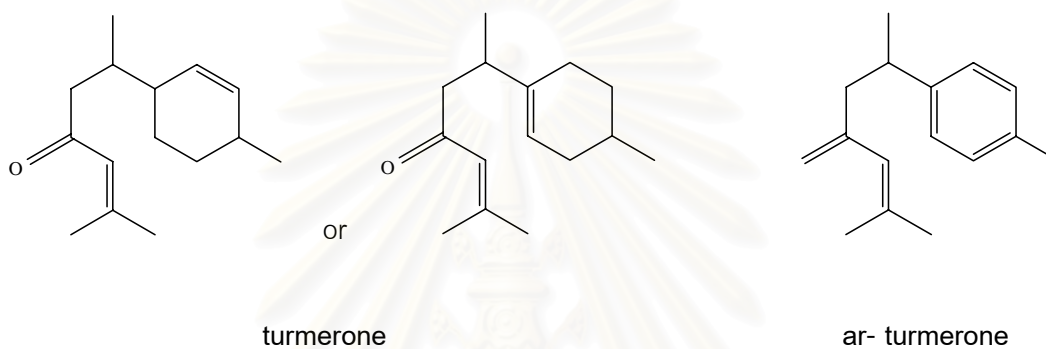
รูปที่ 2.17 แสดงลักษณะของดอกขมิ้นชัน

2.6 องค์ประกอบทางเคมีของขมิ้นชัน

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของขมิ้นชัน พบว่ามีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ

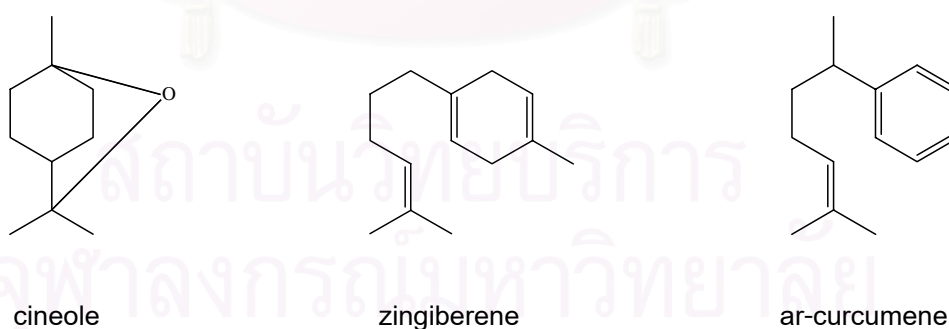
2.6.1 สารประกอบ (essential oil) หรือน้ำมันขมิ้น (turmeric oil) มีประมาณ 1.5-6.0% ซึ่งประกอบด้วย

2.6.1.1 ketone เป็นองค์ประกอบหลัก (65%) ได้แก่ turmerone และ ar-turmerone



รูปที่ 2.18 องค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยของขมิ้นชันในกลุ่ม ketone

2.6.1.2 hydrocarbons (25%) ได้แก่ zingiberene, β -sesqui-phellandrene, ar-curcumene, bisabolene และ 1,8-cineole



รูปที่ 2.19 องค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยของขมิ้นชันในกลุ่ม hydrocarbons

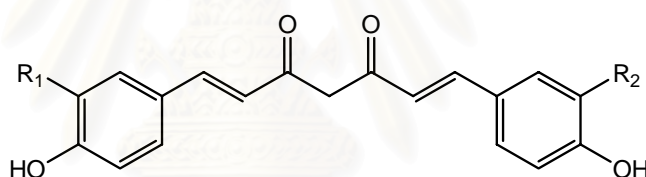
ในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จะมีกลิ่นหอมของเครื่องเทศ สีเหลืองอ่อน ลักษณะใสไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในแอลกอฮอล์ จากการทดสอบพบว่า เมื่อใช้เอทานอล 70% เป็นตัวทำละลาย จะสามารถละลายได้ในอัตราส่วน 1:10 เมื่อใช้เอทานอล 80% เป็นตัวทำละลายจะสามารถละลายได้ในอัตราส่วน 1:4 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 5.0, relative density 0.916-0.937, refractive index 1.502-1.514 และ optical rotation 0° -(-45 $^{\circ}$)

2.6.2 สาร curcuminoids เป็นสารรงสีเหลือง มีประมาณ 3-6% เป็นสารผสมของอนุพันธ์ของ feruloyl methane ประกอบด้วยสารเคมี 3 ชนิด คือ

2.10.2.1 Curcumin (diferuloylmethane) 70-75%

2.10.2.2 Desmethoxycurcumin (hydroxycinnamoyl feruloyl methane) 15-20%

1.10.2.3 Bisdesmethoxycurcumin (dihydroxydicinnamoyl methane) 3%



Curcumin $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$

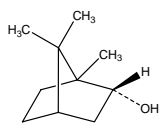
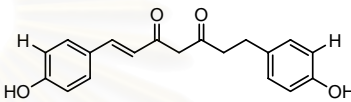
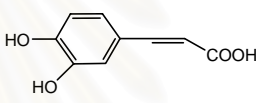
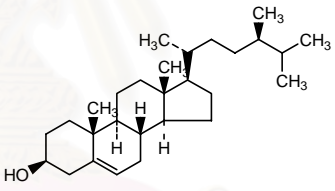
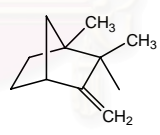
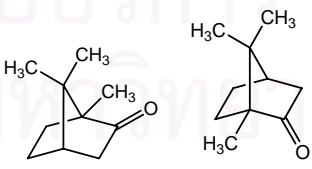
Desmethoxycurcumin $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OCH}_3$

Bisdesmethoxycurcumin $R_1 = R_2 = \text{H}$

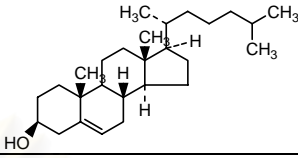
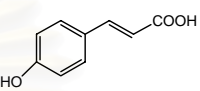
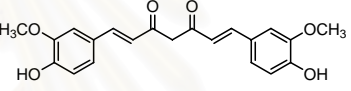
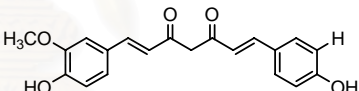
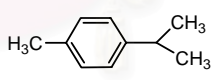
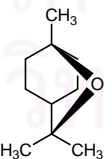
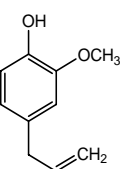
รูปที่ 2.20 โครงสร้างทางเคมีของ Curcumin

ในขมิ้นนอกจากจะมี turmeric oil และ curcumin เป็นองค์ประกอบหลักแล้ว ยังมีสารอาหารอื่น เช่น โปรตีน ไขมัน แร่ธาตุ และคาร์โบไฮเดรต

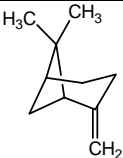
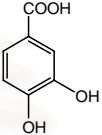
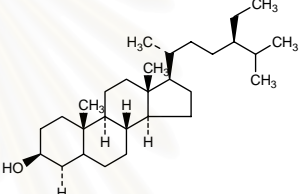
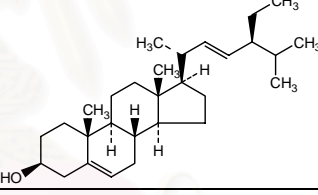
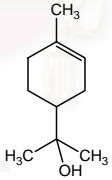
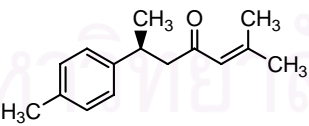
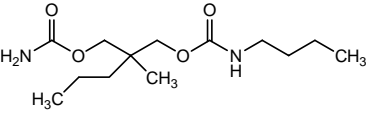
ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสารที่แยกได้จากขมิ้นชัน (อรัญญา, 2005)

ชื่อสาร	ชื่อในระบบ IUPAC	โครงสร้างทางเคมี	การนำไปใช้
1. Borneol	Endo-1,7,7-trimethylbicyclo [2.2.1] heptan-2-ol		- ใช้เป็นน้ำหอม - ใช้ทำเครื่องหอม
2. Bisdesmethoxy curcumin	Bis (p-hydroxy cinnamoyl) methane		-
3. Caffeic acid	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid		-
4. Campesterol	(3 β ,24R) –ergost-5-en-3-ol		-
5. Camphene	2,2-dimethyl-3-methylenebicycol [2.2.1] heptane		-
6. Camphor	1,7,7-trimethylbicyclo [2.2.1] heptan-2-one	 l-form d-form	- เป็นสารตั้งต้น - สารให้กลิ่น รส - ส่วนประกอบในเครื่องสำอางและสารกันเสีย

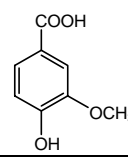
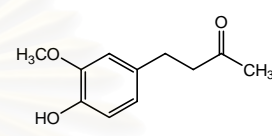
ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสารที่แยกได้จากไขมันชั้น (ต่อ)

ชื่อสาร	ชื่อในระบบ IUPAC	โครงสร้างทางเคมี	การนำไปใช้
7. Cholesterol	(3 β) -cholest-5-en-3-ol		- ใช้ในการผลิตยา(เป็นตัวช่วยผสมเนื้อยา)
8. p-coumaric acid	3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid		-
9. Curcumin	(1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione		- ต้านการอักเสบ - ต้านอนุมูลอิสระ
10. Desmethoxy curcumin	-		-
11.p, α - dimethylbenzyl alcohol	α , 4 - dimethylbenzene methanol		-
12. Eucalyptol	1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo [2.2.2] octane		- ใช้ในการผลิตยา
13. Eugenol	2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol		- ใช้เป็นน้ำหอม - แก้ปวด(ฟัน) - สารล่อแมลง

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสารที่แยกได้จากขมิ้นชัน (ต่อ)

ชื่อสาร	ชื่อในระบบ IUPAC	โครงสร้างทางเคมี	การนำไปใช้
19. β -Pinene	6,6-dimethyl-2-methylene-bicyclo-[3.1.1] heptane		-
20. Protocatechuic acid	3,4-dihydroxybenzoic acid		-
21. Stigmastanol	(3 β ,5 α) stigmastan-3-ol		-
22. Stigmasterol	(3 β ,22E)-stigmastan-5,22-diene-3-ol		-
23. α -Terpineol	α , α , 4-trimethyl-3-cyclohexane-1-methanol		- ใช้เป็นน้ำหอม
24. ar-Turmerone	(6s)-2-methyl-6-(4-methylphenyl)-2-heptane-4-one		- ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อ
25. Tybamate	butylcarbamic acid-2-[[[(aminocarbonyl)oxy]methyl]-2-methylpentyl ester		- คลายเครียด

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสารที่แยกได้จากไขมันชั้น (ต่อ)

ชื่อสาร	ชื่อในระบบ IUPAC	โครงสร้างทางเคมี	การนำไปใช้
26. Vanillic acid	4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid		-
27. Zingerone	4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone		-

2.7 การนำไปใช้ (อรัญญา, 2005)

2.7.1 ป้องกันยุงกัดและกำจัดลูกน้ำ

น้ำมันขมิ้น 2.5% ผสมในโลชั่นสามารถป้องกันยุง หรือใช้น้ำมันขมิ้นที่สกัดด้วยเอทานอล 20% ทาป้องกันยุง หรือหยदन้ำมันขมิ้นลงในแหล่งเพาะพันธุ์ยุงจะช่วยไล่อยุงและกำจัดลูกน้ำได้

2.7.2 รักษาโรคผิวหนังผื่นคัน แผลพุพอง หรืออาการแพ้จากแมลงสัตว์กัดต่อย

ใช้น้ำมันขมิ้นที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ ผงขมิ้น หรือสารสกัดจากขมิ้นที่ผสมในครีม ใช้ทาบริเวณแผลจากผื่นคัน และช่วยฆ่าแบคทีเรียและเชื้อราได้

2.7.3 รักษาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ จุกเสียดแน่น โรคกระเพาะและรักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้

นำขมิ้นมาบดผสมกับน้ำผึ้งหรือน้ำต้มสุกในอัตราส่วน 1:1 จะช่วยรักษาอาการได้ โดยจากการศึกษาของกองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ศึกษาว่า ขมิ้นชันไม่มีพิษที่รุนแรง ทั้งในการใช้ระยะสั้นและระยะยาว และน้ำมันหอมระเหย เป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์รักษาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ โดยได้ทำการศึกษา ทดลองในโรงพยาบาลชุมชน 5 แห่ง และโรงพยาบาล ทัวไป 1 แห่ง ในผู้ป่วยที่มีอาการต่าง ๆ ได้แก่ ปวดแสบท้องเวลาหิว

จุดเน้นบริเวณลิ้นปี เนื่องจากมีลมในกระเพาะอาหาร จุดเสียดท้อง เนื่องจากมีลมในกระเพาะอาหาร และลำไส้ ผลจากการศึกษาเป็นที่น่าพอใจ ผู้ป่วยที่ได้รับขมิ้นชันมีอาการดีขึ้น และไม่พบ ผลแทรกซ้อนในการใช้

2.7.4 ช่วยลดการอักเสบ

นำสารสกัดจากขมิ้นผสมในยาสีฟัน ช่วยลดการอักเสบของเนื้อเยื่อในช่องปาก และรักษาอาการเหงือกอักเสบ นอกจากนี้ น้ำมันขมิ้นผสมในยานวด จะช่วยคลายเส้น แก้เคล็ดขัดยอก และแก้ น้ำกัดเท้า

2.7.5 ใช้ในเครื่องสำอาง ได้แก่

- ผสมสารสกัดในครีมขัดผิว ช่วยขจัดเซลล์ผิวที่เสื่อมสภาพ และบำรุงผิวให้เนียนนุ่ม
- ผสมในครีมอาบน้ำ สบู่อาบน้ำ และโลชั่นทาผิวเพื่อบำรุงผิวพรรณ

2.8 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของขมิ้นชัน ได้มีการศึกษากันในวงกว้าง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ยับยั้งการสร้างหลอดเลือด(ไนเซอิลมะเว็ง) ต้านอนุมูลอิสระ รักษาบาดแผล และต้านมะเร็ง เป็นต้น โดยได้มีการศึกษาทั้งทางพยาธิวิทยา การใช้สัตว์ทดลอง กลไกในระดับเซลล์ เพื่อให้เข้าใจถึงการออกฤทธิ์ของสารสำคัญในขมิ้นชัน โดยมีการศึกษาที่น่าสนใจและอาจจะเป็นประโยชน์ในการนำไปพัฒนาต่อไป ตัวอย่างเช่น

2.8.1 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการทดสอบทางคลินิกของสารสกัดจากขมิ้น (turmeric oil และ curcuminoids)

2.8.1.1 ฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชัน

จากการศึกษาพบว่าสาร curcumin ที่พบได้ในขมิ้นชันมีความสามารถสูงในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับวิตามินซี และอี (Toda และคณะ, 1985) ทั้งยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation จากการศึกษาในโมเดลของสัตว์ชนิดต่างๆ (Roddy และ Lokesh, 1992) หรือการศึกษาความสามารถในการป้องกันเซลล์ไต(LLC-PK1) ผิดปกติ โดยการยับยั้งกระบวนการ lipid degradation, lipid peroxidation และ cytolysis (Cohly และคณะ, 1998)

2.8.1.2 ฤทธิ์ในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระ

มีคุณสมบัติในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระ โดยการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุของการลดปริมาณและการสร้างคอลลาเจน (Manikanda และคณะ, 2004)

2.8.1.3 ฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรีย

สารสกัดจากขมิ้นมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิด *Lactobacillus acidophilus* และ *L. plantarum* ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas solacearem* และ *Xanthomonas citri* และการศึกษาของ Gianni และคณะ พบว่าน้ำมันที่สกัดได้จากขมิ้นชั้นมีฤทธิ์ต่อเชื้อราและแบคทีเรียมากที่สุดเมื่อเทียบกับพืช 11 ชนิด โดยสามารถออกฤทธิ์กับเชื้อ *Candida albican* ATCC 48274, *Rhodotorula glutinis* ATCC 16740, *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 60232, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 3265 และ *Yarrowia lipolytica* ATCC 16617 (Gianni และคณะ, 2004)

2.8.1.4 ฤทธิ์ในการฆ่ารา

น้ำมันขมิ้นที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ อีเทอร์และคลอโรฟอร์ม มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยติดเชื้อเอดส์ชนิด *Candida albican*, *Cryptococcus neoformans* และ *Penicillium marneffeii* และเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคกลากเกลื้อน และมีฤทธิ์ในการฆ่า *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum*, *Chaetomium globosum* และ *Neurospora crassa* (Damrihanunt และคณะ, 1990)

2.8.1.5 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ขมิ้นชั้นลดจำนวนและขนาดของมะเร็ง เมื่อทดลองกับหนู female Swiss mice ที่เหนียวทำให้เกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร ยับยั้งเซลล์มะเร็งมดลูกหนูแฮมสเตอร์และเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง นอกจากนี้ขี้ผึ้ง curcumin ยังช่วยลดกลิ่นเน่า ลดอาการคันแผล ทำให้แผลแห้งเร็วและอาการปวดน้อยลงในแผลมะเร็งภายนอก โดยจากการศึกษาพบว่าสาร curcumin สามารถลดการเกิดมะเร็งที่เกิดในลำไส้ใหญ่ ลำไส้เล็ก กระเพาะอาหาร ทางเดินอาหาร และในช่องปาก ที่เกิดจากการชักนำของสาร benz(a) pyrene และ 7,12-dimethyl benz(a) anthracene (Singh และคณะ, 1998)

2.8.1.6 ฤทธิ์ในการลดการอักเสบ

สารสกัดจากขมิ้นช่วยรักษาถุงน้ำดีอักเสบ มีฤทธิ์ต้านสาร histamine ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบต่อ Freund's adjuvant-induced arthritis ในหนูขาว มีฤทธิ์ในการลดการบวมอักเสบ โดย curcumin สามารถลดการอักเสบได้ดีในคนไข้หลังการผ่าตัดไส้เลื่อน และ ได้มีผู้ทดลองรักษาแผลหลังผ่าตัด 40 ราย พบว่าให้ผลลดการอักเสบได้เหมือน phenylbutazone (Satoskar และ Shenoy, 1986)

2.8.1.7 ฤทธิ์ในการรักษาโรคเบาหวาน

จากการศึกษาของ Kumar และคณะ พบว่าขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเกิดโรคเบาหวานที่เกิดจากการชักนำของสาร streptozotocin ในหนู โดยพบว่าหนูที่เป็นโรคจะมีอาการน้ำหนักลด แต่เมื่อให้หนูกินขมิ้นชันก็จะมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น และมีระดับของน้ำตาลในเลือดปกติมากขึ้น (Kumar และคณะ, 2005)

2.8.1.8 ฤทธิ์ในการขับน้ำดี

สารสกัดจากขมิ้นผสมกับ camphoric acid และ diethanolamine มีฤทธิ์ในการเพิ่มการขับน้ำดีได้มากกว่าปกติถึงสองเท่า จะช่วยลดการทำลายเซลล์ตับในคนไข้เป็นโรคตับ และช่วยลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด สารสำคัญในการออกฤทธิ์นี้ คือ curcumin (Ramaprasad และ Sirsi, 1956) และ p-tolyl-methylcarbinol (Rumpel, 1954) ซึ่งสามารถขับน้ำดี และกระตุ้นการสร้างน้ำดี Sodium curcuminat เมื่อฉีดเข้าหลอดเลือดในขนาด 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีฤทธิ์เพิ่มน้ำดีเกือบ 100% โดยไม่มีผลต่อความดันโลหิต และการหายใจ (Jentzsch, Gonda และ Holler, 1959) เมื่อฉีด sodium curcuminat เข้าหลอดเลือดในขนาด 5, 10, 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่าเพิ่มปริมาณน้ำดี แต่ลดปริมาณของแข็ง เพิ่มการขับ bile salt, bilirubin และ cholesterol แต่กรดไขมันไม่เปลี่ยนแปลง (Ramaprasad และ Sirsi, 1957) นอกจากนี้ cineole ที่พบในน้ำมันหอมระเหย ยังมีฤทธิ์กระตุ้นการขับน้ำดีด้วย (Bell และคณะ, 1981) จึงทำให้การย่อยดีขึ้นเป็นผลให้อาการจุกเสียดบรรเทา

2.8.1.9 ฤทธิ์ในการต่อต้านปรสิต

สารสกัดจากขมิ้นด้วยแอลกอฮอล์และน้ำในความเข้มข้น 125 µg/ml มีผลในการฆ่าเชื้อ *Entamoeba histolytica* ที่เป็นสาเหตุของโรคบิดมีตัว และที่ความเข้มข้น 0.2% สามารถฆ่าพยาธิไส้เดือนและพยาธิตัวตืดได้

2.8.1.10 ฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกัน

ฤทธิ์ในการกดภูมิคุ้มกัน พบว่าสาร curcumin สามารถลดการสร้างภูมิคุ้มกันในหนูได้อย่างมีประสิทธิภาพในการทดลองที่ต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วัน (Xu และคณะ, 2005)

2.8.1.11 ฤทธิ์ในการฆ่าและไล่แมลง

พบว่าสารสกัดจากขมิ้นมีฤทธิ์ในการไล่มอดแป้งและด้วงงวง และมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำ ป้องกันการวางไข่ และกันยุงได้นาน 1.5-7.7 ชั่วโมง

2.8.1.12 ฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้

ในบางรายโดยเฉพาะผู้เป็นโรคกระเพาะมักมีอาการปวดเกร็งร่วมด้วย ขมิ้นชันมีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบ โดยออกฤทธิ์ต้าน acetylcholine, barium choride และ serotonin (Permpiphat และคณะ, 1990) และยังมีผู้พบการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก จึงช่วยบรรเทาอาการปวดเกร็ง (Goto และคณะ, 1957)

2.8.1.13 การไม่ก่อการกลายพันธุ์

พบว่าสารสกัดด้วยเมธานอลและน้ำร้อนในความเข้มข้น 50 mg/disc ไม่ทำให้ *Salmonella typhimurium* TA 100 กลายพันธุ์ ทั้งขมิ้นและ curcumin ไม่ก่อกลายพันธุ์เมื่อผสมในอาหารหนู 0.5 และ 0.015% ตามลำดับ (Vijayalaxmi, 1980)

2.8.1.14 ฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีสารสกัดขมิ้นเป็นส่วนประกอบหลัก

ใช้ในการทำความสะอาดผิวและกำจัดอนุมูลอิสระได้

2.8.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการทดสอบทางคลินิกของ Curcumin (curcuminoids)

2.8.2.1 ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ Curcumin มีกลไกดังนี้

- ยับยั้งการสังเคราะห์ leukotrine B4
- ยับยั้งการเกิด pellet aggregation
- ยับยั้ง fibrinolysis
- ยับยั้งการตอบสนองของ neutrophil ต่อสิ่งเร้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการอักเสบ
- ป้องกันการปลดปล่อย inflammatory mediators

สาร curcumin ลดการอักเสบได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับ phenylbutazone และ cortisone พบว่ามีฤทธิ์พอ ๆ กันในกรณีการอักเสบเฉียบพลัน ส่วนกรณีการอักเสบเรื้อรังมีฤทธิ์เพียงครึ่งเดียว แต่ฤทธิ์ทำให้เกิดแผลน้อยกว่า phenylbutazone

- ป้องกันการอักเสบของตับที่เกิดจาก carbon tetrachloride และ D-galactosamine
- ต้านการอักเสบของถุงน้ำดี
- ต้านการอักเสบของข้อมีฤทธิ์ต้าน histamine โดยยับยั้ง trypsin หรือ hyaluronidase

2.8.2.2 ฤทธิ์ในการรักษาแผล

Curcumin เป็นตัวเพิ่ม mucin ซึ่งเป็นสารเคลือบกระเพาะ จึงช่วยในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร และยับยั้งการหลั่งน้ำย่อยต่างๆ (Rafatullah และคณะ, 1999)

2.8.2.3 ฤทธิ์ต่อระบบไหลเวียนโลหิต

Curcumin ในขนาด 7.5 mg/kg ทำให้ความดันโลหิตลดลงชั่วคราวและก่อกำเนิดการทำงานของหัวใจ ในการทดลองที่ตัดแยกจากลำตัว

2.8.2.4 ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

2.8.2.5 ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

2.8.2.6 ฤทธิ์ช่วยขับลมและช่วยให้ระบบย่อยอาหารดีขึ้น

2.8.2.7 ฤทธิ์ช่วยลดปริมาณโคเลสเตอรอลในเลือด

จากรายงานการวิจัยองค์ประกอบทางเคมีของขมิ้นชัน ว่ามีความหลากหลายสูงและมี รายงานการพบราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Thongchai และคณะ, 2003) มี

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้สนใจศึกษาราคาเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส่วนเหง้าของขมิ้นชัน ซึ่งจากการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าในพืชที่มีเหง้าจะพบราเอนโดไฟต์จากส่วนเหง้า มากกว่าส่วนอื่นๆ ของต้นพืช (Thongchai, Peberdy และ Saisamorn, 2003) ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรไทยที่มีสรรพคุณในการช่วยต้านมะเร็ง ต้านวัณโรค ป้องกันโรคหัวใจ ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย รักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ รักษาโรคผิวหนัง ท้องร่วง ลดไข้ แก้หวัด ปวดเมื่อยและบำรุงผิว จึงอาจเป็นไปได้ว่า ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส่วนเหง้าของขมิ้นชันนี้จะสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องหาจุดหลอมเหลว

สำหรับการหาจุดหลอมเหลวใช้เครื่อง Fisher - John Melting Point Apparatus ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำได้โดยการนำสารตัวอย่างมาบดให้ละเอียด จากนั้นบรรจุลงในหลอดแก้วสำหรับตรวจหาจุดหลอมเหลว (capillary tube) ให้ได้ความสูงพอประมาณแล้วนำไปหาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่องวัดจุดหลอมเหลว

3.1.2 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR)

เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) ของบริษัท Nicolet Impact รุ่น 410 สำหรับวัดอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร สารตัวอย่างที่ใช้การตรวจวัดเตรียมโดยบดผสมกับโปแตสเซียมโบรไมด์ (KBr) ชัดเม็ด ชัดเป็นแผ่น (pellet) เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร

3.1.3 Mass Spectrometer (MS)

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

3.1.4 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR)

เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) รุ่น Varian Mercury 400 NMR สำหรับการหาโปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม โดยวัดค่าเคมีคอลชิฟต์เป็นพีพีเอ็ม (ppm) สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยละลายในคลอโรฟอร์ม-ดี₃ (CDCl₃), เมทานอล-ดี₄ (CD₃OD), ดิวเทอเรียมออกไซด์ (D₂O) และ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์-ดี₆ (DMSO-d₆) ¹H-NMR สเปกตรัมวิเคราะห์ที่ 400 MHz สำหรับ ¹H nuclei โดยอ้างอิงกับค่าเคมีคอลชิฟต์ของตัวทำละลายที่เหลืออยู่ ค่าเคมีคอลชิฟต์ (δ) 7.26 ppm สำหรับ

CDCl_3 , 4.87 ppm สำหรับ CD_3OD , 4.80 ppm สำหรับ D_2O และ 2.50 ppm สำหรับ DMSO-d_6 และวิเคราะห์ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่ 100 MHz สำหรับ ^{13}C nuclei มีค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ) 77.1 ppm สำหรับ CDCl_3

3.1.5 Rotary Vacuum Evaporator

เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ของบริษัท Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.6 Specific Optical Rotation

Polarimeter รุ่น 341 โดยใช้ sodium lamp ที่ความยาวคลื่น 589 นาโนเมตรของบริษัท Perkin-Elmer

3.1.7 Ultraviolet-visible Spectrophotometer (UV-VIS)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Varian Cary 50 Probe ทำได้โดยนำสารที่ต้องการวัดมาละลายตัวทำละลายอินทรีย์ที่สารนั้นละลายได้ดี แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.1.8 CombiFlash Graduate

เครื่อง Isco CombiFlash™ Graduate™ ของบริษัท Isco ใช้แยกสารตัวอย่างโดยใช้ flash chromatography โดยมีอัตราเร็วระหว่าง 10-100 มิลลิเมตร/นาที โดยใช้คอลัมน์ขนาด 30x2.5 เซนติเมตร บรรจุตัวดูดซับ Silica gel 60 No.109385.1000 หรือ Sephadex LH-20 ลงในคอลัมน์ขนาดต่างๆ ขึ้นกับปริมาณสารที่ต้องการแยก ซึ่งเครื่องนี้จะมีปั๊มช่วย ทำให้ตัวทำละลายชะสารที่ต้องการแยกลงมาได้เร็วขึ้น

3.1.9 Sunrise Microtiter Plate Reader

เครื่อง Sunrise Microtiter Plate Reader ใช้ในการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 ตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองเป็นตัวทำละลาย Commercial Grade และ Analytical Grade โดยตัวทำละลาย Commercial Grade นั้นจะต้องทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่นก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, ไดคลอโรมีเทน, เอธิลอะซิเตต, เมทานอล, แอซีโตน, บิวทานอล และเอทานอล

3.2.2 สารเคมีชนิดอื่นๆ

1. ตัวดูดซับ ใช้ Silica gel 60 No.109385.1000 (230-400 Mesh ASTM) ของบริษัท Merck, Damstadt ประเทศเยอรมนี
2. แผ่นThin Layer Chromatography (Thin Layer Chromatography) สำเร็จรูปชนิด Art. 5554 TLC Aluminium sheets Silica gel 60F₂₅₄ (1.05554.0001) ของบริษัท Merck, Damstadt ประเทศเยอรมนี
3. Sephadex LH-20 ของบริษัท Pharmacia ประเทศสวีเดน

3.3 เทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 Thin Layer Chromatography (Thin Layer Chromatography, TLC)

ใช้แผ่น TLC สำเร็จรูปแต่มีสารด้วยหลอดขนาดเล็ก (capillary tube) แล้วทำให้เกิดการแยก (develop) ในขวดแก้วปล่อยให้วัฏภาคเคลื่อนที่ไปจนถึงแนวเส้นตัวทำละลาย (solvent front) ทำให้แห้ง จากนั้นนำไปตรวจหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC โดยส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือโดยใช้รีเอเจนท์ Vanillin / H₂SO₄ (ซึ่งประกอบด้วย วานิลิน 0.50 กรัม, เอทานอล 95 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 4.5 มิลลิลิตร) หรือใช้ Ninhydrin (20% Ninhydrin ในเอทานอล) พอให้สารซึมเข้าแผ่น TLC จนทั่วจากนั้นนำแผ่น TLC ไปให้ความร้อนจนปรากฏจุดของสารขึ้นบนแผ่น TLC

3.3.2 Column Chromatography (Column Chromatography)

บรรจุตัวดูดซับ Silica gel 60 No.109385.1000 หรือ Sephadex LH-20 ลงในคอลัมน์ขนาดต่างๆ ขึ้นกับปริมาณสารที่ต้องการแยก โดยอาจใช้ปั๊มช่วย เพื่อให้ตัวทำละลายชะสารที่ต้องการแยกลงมาได้เร็วขึ้น

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง (ดูรายละเอียดสูตรในตารางที่ 3.1 ภาคผนวก ก)

3.5 การเก็บตัวอย่างเหง้าขมึนชั้น

การเก็บตัวอย่างเหง้าขมึนชั้นจาก 7 จังหวัด ในประเทศไทย คือ จังหวัดเชียงใหม่ (รหัส CM) จังหวัดมหาสารคาม (รหัส MS) จังหวัดร้อยเอ็ด (รหัส RE) จังหวัดอุยธยา (รหัส AY) จังหวัดชลบุรี (รหัส CB) จังหวัดราชบุรี (รหัส RB) จังหวัดนครศรีธรรมราช (รหัส NK) โดยเลือกเก็บตัวอย่างเหง้าจากต้นขมึนชั้นที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงไม่เป็นโรค โดยเก็บตัวอย่างในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาแยกราเอนโดไฟต์

3.6 การแยกราเอนโดไฟต์

นำส่วนเปลือกเหง้าขมึนชั้นที่เก็บตัวอย่างมาทำการแยกราเอนโดไฟต์โดยใช้เทคนิคการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Petrini (Petrini, 1986) ดังนี้

1. นำส่วนเหง้าที่ล้างน้ำทำความสะอาดแล้วมามาตัดเป็นชิ้นขนาดใหญ่โดยให้มีเนื้อติดอยู่กับเปลือก แช่ในเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์นาน 1 นาที ตามด้วยสารละลาย โซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์นาน 1 นาที และสุดท้ายแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์นาน 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง แล้วซับให้แห้งบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
2. นำส่วนเปลือกเหง้าขมึนชั้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาดประมาณ 5x5x2 มิลลิเมตร แล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °C) แล้วสังเกตการงอกของเส้นใยของเชื้อราออกมาจากเนื้อเยื่อส่วนเปลือกเหง้าขมึน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
3. เมื่อพบว่ามีเส้นใยของราเอนโดไฟต์เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อส่วนเปลือกเหง้าขมึนชั้น จึงแยกส่วนปลายเส้นใยของเชื้อราไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วเก็บรักษาราเอนโดไฟต์เป็น stock เชื้อไว้ (ข้อ 3.6 ภาคผนวก ก)

3.7 การคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

นำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Dual Culture Method โดยนำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด คือ Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Corn Meal Agar (CMA), Sabouraud' s Dextrose Agar (SDA) และ Yeast Extract Sucrose Agar (YES) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

จากนั้นใช้ sterile cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ตัดชิ้นส่วนของเชื้อราไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค สังเกตวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี

จุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ในการทดลองมี 5 ชนิด แบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 และ ราที่เจริญในรูปของยีสต์ คือ *Candida albicans* ก่อนการทดสอบนำแบคทีเรียมาเลี้ยงใน Nutrient Broth (NB) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง ขึ้นกับอัตราการเจริญเติบโต อ่านค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตรให้ได้ประมาณ 0.10 (ความเข้มข้นของแบคทีเรียประมาณ 10^7 CFU/ml) สำหรับเชื้อยีสต์วัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรให้ได้ประมาณ 0.10 (ความเข้มข้นของแบคทีเรียประมาณ 10^7 CFU/ml) นำไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในน้ำเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และนำมาทา (swab) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA จนทั่ว หมุนจานเพาะเชื้อ 60 องศา ป้ายให้ทั่ว หมุนอีก 60 องศา ป้ายซ้ำอีกครั้งให้ทั่วจานเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั่วจานเพาะเชื้อ ปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำชิ้นส่วนของเชื้อราเอนโดไฟต์มาวางทับลงบนอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง แล้ววัดวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี และเลือกกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดีที่สุด มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีอย่างคร่าวๆ โดยนำสารสกัดมาวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟี (TLC) และ NMR

3.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์

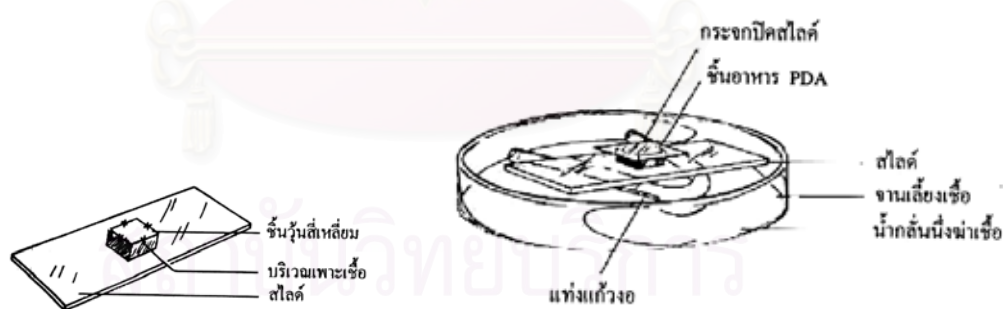
3.8.1 การศึกษาลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ NK9 โดยนำรามาเลี้ยงบนอาหารแข็งทั้ง 5 ชนิด คือ PDA MEA CMA SDA และ YES เป็นเวลา 1 เดือนที่อุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาลักษณะต่างๆ เช่นลักษณะของโคโลนีหรือสีของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำรามาย่อยด้วย แลคโตฟีนอลบลู (lactophenol blue) เพื่อดูการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.8.2 การทำ slide culture

การทำ slide culture (รูปที่ 3.1) เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยสปอร์ ก้านชูสปอร์ หรือลักษณะอื่นๆของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งมีวิธีการทำดังนี้

1. นำกระดาษกรองวางลงในจานเพาะเชื้อ แล้ววางแท่งแก้วรูปตัววีและแผ่นสไลด์บนแท่งแก้ว แล้วนำไปฆ่าเชื้อ
2. ตัดชิ้นวุ้นขนาดประมาณ $1 \times 1 \times 0.2$ เซนติเมตร วางลงบนแผ่นสไลด์ เชี่ยเชื้อราที่ต้องการศึกษามาแตะที่ด้านข้างของชิ้นวุ้นทั้ง 4 ด้าน จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟ
3. เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4-5 วัน หรือจนกว่าเชื้อราจะเจริญเต็มที่ สังเกตการเจริญของราใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน
4. ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างสปอร์ โดยการหยดสีย้อมแลคโตไฟโนลบลู ลงบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่มีเส้นใยของราเจริญอยู่ นำไปศึกษาลักษณะต่างๆภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทาขอบกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บเพื่อป้องกันสีย้อมแห้งหากต้องการเก็บไว้ศึกษาต่อไป



รูปที่ 3.1 การทำ slide culture

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ NK9 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ scanning electron microscope (SEM) ซึ่งมีวิธีการเตรียมตัวอย่างดังนี้

เลี้ยงรบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MEA เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตัดชิ้นส่วนโคโลนีและนำมาตรึงตัวอย่างใน glutaraldehyde 2% (v/v) ใน sodium cacodolate buffer 0.1 M ที่ pH 7.2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงดึงน้ำออกจากเซลล์โดยการแช่ในเอธานอลที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 70-95% ทำให้แห้งด้วยเครื่อง critical point drying machine เคลือบด้วยทองแล้วแช่ในเอธานอลบริสุทธิ์ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที จากนั้นจึงนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ SEM

3.8.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุชีววิทยา

เป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS (internal transcribe spacer) ของ ribosomal RNA ทำโดยการเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NK9 ในอาหาร MEB จากนั้นสกัด DNA จากเส้นใยด้วย cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ตามวิธีการของ Zhou et al. (1999) จากนั้นเพิ่มจำนวนลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ NK9 ในโดยในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA 100 นาโนกรัม, 1xPCR Master Mix (fermentas, California, USA) และไพรเมอร์ ITS1f (Grades and Bruns, 1993) และ ITS4 (White et al., 1990) เพิ่มปริมาณ DNA ด้วย thermocycler (TGradient; Biometra, Germany) โดยเริ่มต้นปฏิกิริยาที่ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาซ้ำ 38 รอบ โดยในแต่ละรอบประกอบด้วย ขั้นตอนการแยกคู่สาย DNA (denaturing step) ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที , การจับเข้าคู่กันใหม่ของ DNA (annealing step) ที่อุณหภูมิ 51 °C 1 นาที และการเพิ่มความยาวสาย DNA (extension step) ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที และสิ้นสุดปฏิกิริยาด้วยการเพิ่มความยาวสาย DNA ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที นำ DNA ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย NucleoSpin® (Macherey-Nagel Inc., Easton, USA) วิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ NK9 โดยส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen จำกัด กรุงโซล ประเทศเกาหลีใต้

ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ NK9 ได้มีการนำไปบันทึกไว้ใน GenBank โดยมี accession number คือ AB 277550 และลำดับเบสนี้ได้นำไปเปรียบเทียบกับความเหมือนของสาย DNA บริเวณไพรเมอร์ ITS1f และ ITS4 กับข้อมูลลำดับเบสของราสายพันธุ์ต่างๆโดยการ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) กับฐานข้อมูลใน website [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi)

3.9 ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์ NK9

โดยการเพาะเลี้ยงราบนอาหารแข็งที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ PDA, MEA, CMA, SDA และ YES บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน ศึกษาและบันทึกลักษณะการเจริญของราในแต่ละอาหาร

3.10 ศึกษาการสร้างสารเมแทบอลิซึมของราเอนโดไฟต์ NK9

3.10.1 การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอลิซึมของราเอนโดไฟต์ NK9

นำราเอนโดไฟต์ NK9 ที่คัดเลือกได้ (เนื่องจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดจากการทดลองข้างต้น) นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MEA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะราเอนโดไฟต์เพื่อให้แต่ละชั้นมีขนาดเท่ากัน นำขึ้นเชื้อราจำนวน 5 ชั้น ใส่ลงในอาหารเหลว MEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เตรียมให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อ 5.1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 46 วัน เก็บตัวอย่างราทุก 2-3 วัน ทำ 3 ซ้ำ นำมากรองแยกส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อราด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำส่วนของเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วชั่งน้ำหนักแห้ง เขียนกราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์ NK9 ระหว่างน้ำหนักแห้ง (กรัม) และระยะเวลาการเจริญเติบโตของรา (วัน)

3.10.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

นำน้ำเลี้ยงเชื้อราที่กรองได้จากข้อ 3.10.1 ซึ่งแยกเก็บในขวดแก้วขนาดเล็กมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Agar-well Diffusion (Jorgensen, J.H., 1999) เพื่อศึกษาว่าช่วงเวลาใดที่ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกมามีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ซึ่งมีวิธีการดังนี้ คือ ใช้ cork borer เจาะรูอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.7.1.3 และ 3.7.1.4 (ภาคผนวก ก) ให้เข็มเปียขึ้นรู้นิ่งในน้ำยาฆ่าเชื้อ หยอดน้ำเลี้ยงราที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ลงในหลุมที่เจาะไว้ด้วย micropipette หลุมละ 10 ไมโครลิตร ทำ 3 ซ้ำ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารแพร่เข้าในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง วัดผลการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้ โดยวัดความกว้างของวงใสที่เกิดรอบรูที่เจาะไว้ หาค่าเฉลี่ยและบันทึกผล

3.11 การเลี้ยงเชื้อและสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จากราเอนโดไฟต์ NK9

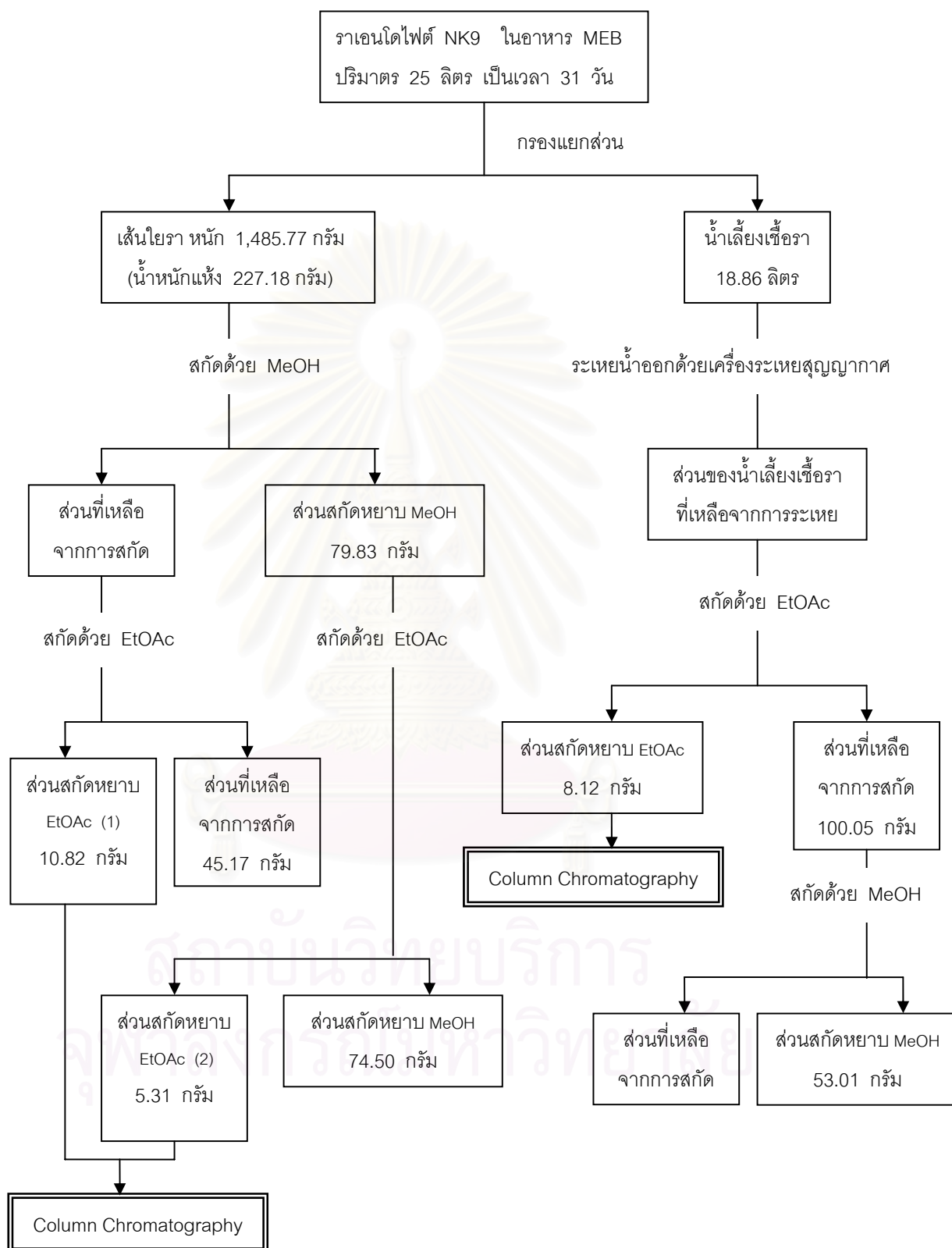
3.11.1 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NK9

ใช้ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของราเอนโดไฟต์ NK9 อายุ 14 วัน ที่เจริญบนอาหารแข็ง MEA มาเลี้ยงในอาหารเหลว MEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขันต่อ 1 ขวด เลี้ยงทั้งหมดปริมาตร 25 ลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 31 วัน

3.11.2 การสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ NK9

นำราเอนโดไฟต์ NK9 ที่เพาะเลี้ยงไว้ในข้อ 3.11.1 มากรองแยกด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น จะได้ส่วนของเส้นใยและส่วนของน้ำเลี้ยงรา ส่วนของน้ำเลี้ยงรานำมาระเหยน้ำออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ได้ของเหลวหนืดสีน้ำตาล นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต และเมธานอลสกัดซ้ำอย่างละ 7 ครั้ง(จนไม่มีสารออกมา ทดสอบโดยการทำ TLC) นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลาย จะได้สารละลายเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล (จากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต) และสีน้ำตาลเข้ม(จากตัวทำละลายเมธานอล)

ส่วนเส้นใยนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต และเมธานอลอย่างละ 7 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 รวมสารสกัดที่ได้นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ได้ของเหลวหนืดสีส้ม (จากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต) และสีน้ำตาลเข้ม(จากตัวทำละลายเมธานอล) ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3.1



แผนภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NK9

3.12 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของส่วนสกัดหยาบที่ได้จากราเอนโดไฟต์ NK9 โดยใช้วิธี Paper disk Diffusion Method (Wood,1995 และ Joseph และคณะ, 1998)

3.12.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

นำส่วนสกัดหยาบทั้ง 6 ส่วน ที่ได้จากการสกัดลำดับส่วน คือ ส่วนสกัดหยาบ เมธานอล ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตต และส่วนที่เหลือจากการสกัดของทั้งจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์ มาตัวอย่างละ 5 มิลลิกรัม ผสมกับตัวทำละลายที่สามารถละลายได้หมดคือ ส่วนสกัดหยาบเมธานอลละลายในเมธานอล สกัดหยาบเอธิลอะซิเตตละลายในเอธิลอะซิเตต และส่วนที่เหลือจากการสกัดของทั้งจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงละลายใน 10% DMSO ในน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 5 mg/ml แล้วนำไปเจือจางต่อด้วยตัวทำละลายให้ได้ระดับความเข้มข้น 1 mg/ml และ 0.5 mg/ml ตามลำดับ

3.12.2 การเตรียมสารละลายสารชุดควบคุม

ชุดควบคุมบวก (Positive Control) ได้แก่

- สารละลาย Streptomycin 0.5, 1 และ 5 mg/ml
- สารละลาย Chloramphenicol 0.5, 1 และ 5 mg/ml

ชุดควบคุมลบ (Negative Control) ได้แก่

- เมธานอล
- เอธิลอะซิเตต
- 10% DMSO ในน้ำ

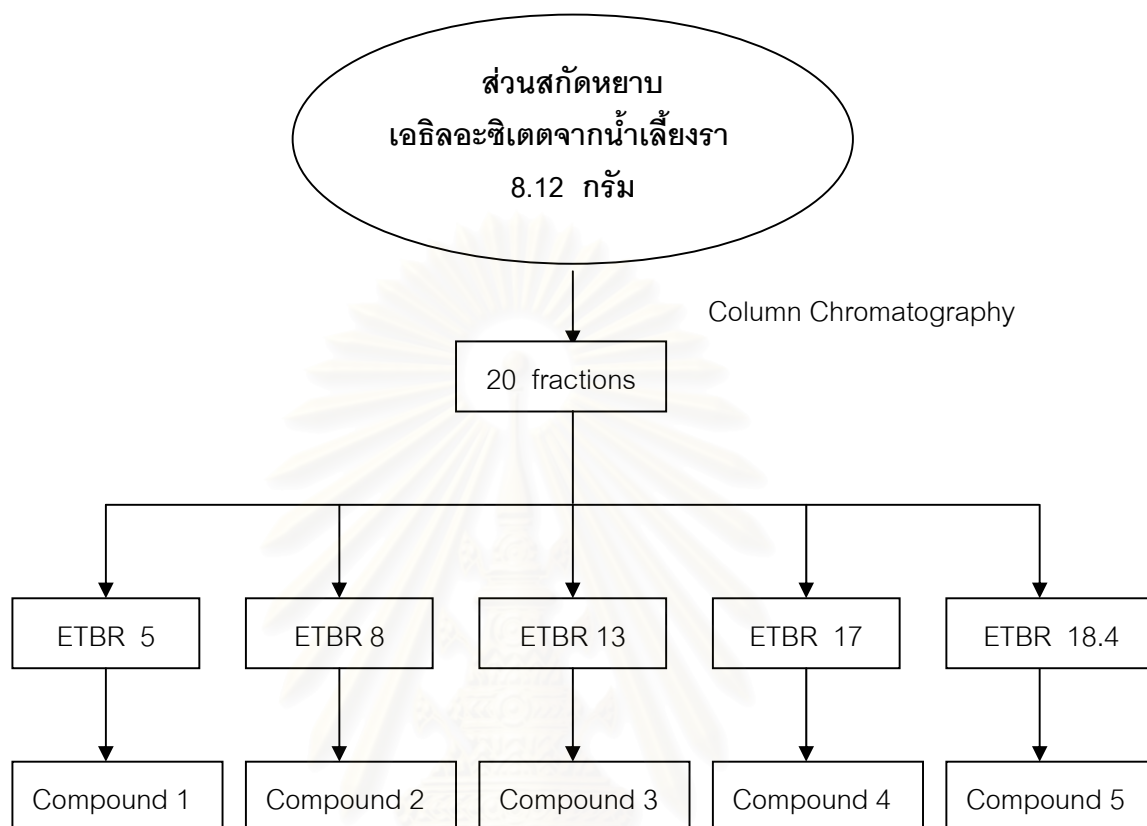
นำส่วนสกัดที่ได้ทั้ง 6 ส่วน ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ โดยหยดสารตัวอย่างลงบน Paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (ของบริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี) ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยวิธีการเตรียมจุลินทรีย์เหมือนกับข้อ 3.7.1 (ภาคผนวก ก) โดยบ่มเชื้อไว้นาน 12-18 ชั่วโมง นำ Paper disc ที่หยดสารทดสอบลงไปวางบนอาหารแข็งที่ swob เชื้อแล้ว โดยบ่มเชื้อไว้นาน 12-18 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลที่ได้

นอกจากนี้ยังทดสอบฤทธิ์การยับยั้งราก่อโรคพืช จากกรมวิชาการเกษตร 4 ชนิด คือ *Phytophthora parasitica*, *Alternaria brassicola*, *Collectitrichum gloeosporioides* และ *Fusarium oxysporum* โดยเลี้ยงเชื้อราใน PDA ให้มีอายุ 4 วัน จากนั้นนำส่วนสกัดละลายในตัวทำละลาย หยดลงบน Paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (ของบริษัท Merck,

ประเทศเยอรมนี) ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตรและความเข้มข้นของสารเหมือน 3.12.1 ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยใช้ Ketoconazole ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 5 mg/ml เป็น Positive Control นำไปบ่มสองวันที่อุณหภูมิห้องแล้วอ่านและบันทึกผลการทดลอง

3.13 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบของเส้นใยและน้ำเลี้ยงราของราเอนโดไฟต์ NK9 ให้บริสุทธิ์ และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

3.13.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงราส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงราที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล น้ำหนัก 8.12 กรัม มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 80 เซนติเมตร และใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (350 กรัม) ใช้ตัวทำละลายเป็นตัวชะ ซึ่งได้แก่ เฮกเซน, เฮกเซน-เอธิลอะซิเตต, เอธิลอะซิเตต, เอธิลอะซิเตต-เมทานอล, เมทานอล และเมทานอล-น้ำ ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.7



แผนภาพที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการแยกสารของส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต จากน้ำเลี้ยงรา เอนโดไฟต์ NK9 โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.13.1.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 65-70 (ETBR F5)

สารประกอบ 1 ได้จากลำดับส่วนที่ ETBR F5 ของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต จากน้ำเลี้ยงรา โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย 30% เอทิลอะซิเตต ในเฮกเซน เป็นตัวชะ จะได้ของเหลวสีเหลืองอ่อน นำมาล้างน้ำมันสีเหลืองออกด้วยเฮกเซน กรองแยกจะได้ผงสีขาวน้ำหนัก 35.7 มิลลิกรัม ซึ่งสามารถละลายได้ในเอทิลอะซิเตต

3.13.1.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 116-124 (ETBR F8)

สารประกอบ 2 ได้จากลำดับส่วนที่ ETBR F8 ของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตต จากน้ำเลี้ยงรา โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย 50% เอธิลอะซิเตต ในเฮกเซน เป็นตัวชะ จะได้ผงสีเหลืองอ่อน นำมาล้างน้ำมันสีเหลืองออกด้วยเฮกเซน แล้วนำไปตกผลึกซ้ำด้วย ตัวทำละลายเอธิลอะซิเตต-เฮกเซน จะได้ผลึกสีขาวน้ำหนัก 51 มิลลิกรัม ซึ่งสามารถละลายได้ใน เอธิลอะซิเตต

3.13.1.3 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 224-319 (ETBR F13)

สารประกอบ 3 ได้จากลำดับส่วนที่ ETBR F13 ของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตต จากน้ำเลี้ยงรา โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย 70-85% เอธิลอะซิเตต ใน เฮกเซนเป็นตัวชะ จะได้ผงสีเหลือง จากนั้นนำมาล้างน้ำมันสีเหลืองออกด้วยเฮกเซน แล้วกรองแยก จะได้ผงสีขาวน้ำหนัก 22.1 มิลลิกรัม ซึ่งสามารถละลายได้ในเอธิลอะซิเตต

3.13.1.4 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 404-418 (ETBR F17)

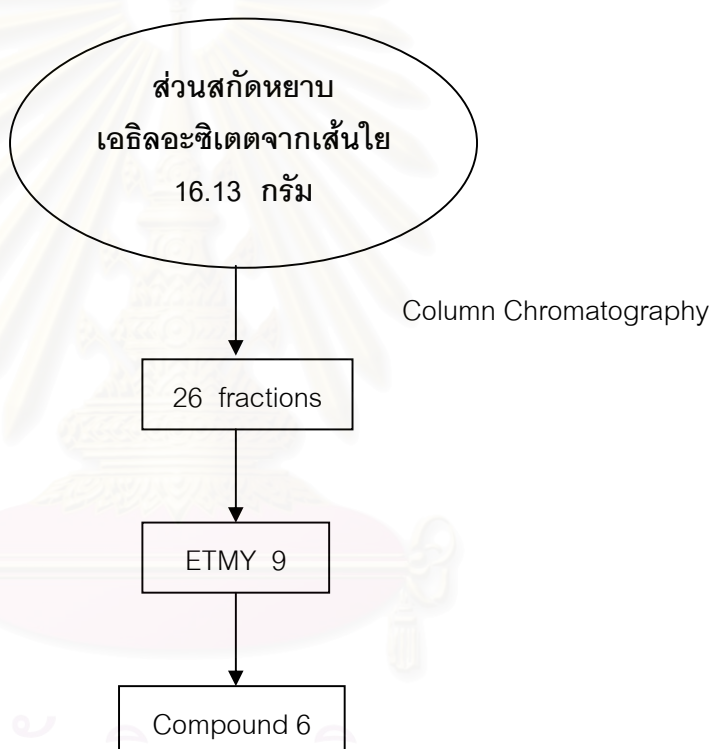
สารประกอบ 4 ได้จากลำดับส่วนที่ ETBR F17 ของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตต จากน้ำเลี้ยงรา โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย 10-15% เมทานอลใน เอธิลอะซิเตต เป็นตัวชะ จะได้ผงสีเหลืองอ่อน แล้วกรองแยกจะได้ผงสีขาวน้ำหนัก 627.4 มิลลิกรัม ซึ่งสามารถละลายได้ในเมทานอล

3.13.1.5 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 419-436 (ETBR F18)

สารประกอบ 4 ได้จากลำดับส่วนที่ ETBR F18 ของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตต จากน้ำเลี้ยงรา โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย 15-17% เมทานอลใน เอธิลอะซิเตต เป็นตัวชะ จะได้ของเหลวหนืดสีน้ำตาลน้ำหนัก 1293 มิลลิกรัม นำมาลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้งโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร สูง 60 เซนติเมตร และใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (130 กรัม) เก็บสารลำดับส่วนละ 10 ml ใช้ตัวชะคือ ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโร มีเทน-เมทานอล และ เมทานอล ได้มารจากลำดับส่วนที่ 4 ที่ชะด้วย ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล เป็น ของเหลวใส นำมาตกผลึกด้วยเมทานอลในไดคลอโรมีเทน จะได้ผลึกใสไม่มีสีน้ำหนัก 8.3 มิลลิกรัม ซึ่งสามารถละลายได้ในเอธิลอะซิเตต

3.13.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใย

นำส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใย 16.13 กรัม มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 80 เซนติเมตร และใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (370 กรัม) ใช้ตัวทำละลายเป็นตัวชะ ซึ่งได้แก่ เฮกเซน, เฮกเซน-เอธิลอะซิเตต, เอธิลอะซิเตต, เอธิลอะซิเตต-เมทานอล, และ เมทานอล ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.13



แผนภาพที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการแยกสารของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใยราเอ็นโดไฟต์ NK9 โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.13. 2.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 81-96 (ETMY 12)

สารประกอบ 1 ได้จากลำดับส่วนที่ ETMY 12 ของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตต จากเส้นใย โดยเทคนิคคอลลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย 30-35% เอธิลอะซิเตต ในเฮกเซน เป็นตัวชะ จะได้ของแข็งสีส้ม นำมาล้างน้ำมันสีเหลืองออกด้วยเฮกเซน กรองแยกจะได้ของแข็งสีขาว น้ำหนัก 1,847.7 มิลลิกรัม ซึ่งสามารถละลายได้ในเอธิลอะซิเตต

3.14 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบที่แยกได้

3.14.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารที่ได้จากแต่ละลำดับส่วน

นำสารที่ได้จากแต่ละลำดับส่วนมาทดสอบฤทธิ์โดยใช้วิธี Disk Diffusion Method โดยใช้สาร ปริมาณ 100 µg/disc ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์

3.14.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบที่แยกได้โดยใช้วิธี Disk Diffusion Method

3.14.1.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

นำสารประกอบที่แยกได้ ละลายในเอธิลอะซิเตต ได้สารละลายที่ความเข้มข้น 5 mg/ml แล้วนำไปเจือจางต่อด้วยตัวทำละลายให้ได้ระดับความเข้มข้น 1 mg/ml และ 0.5 mg/ml ตามลำดับ

3.12.2 การเตรียมสารละลายสารชุดควบคุม

ชุดควบคุมบวก (Positive Control) ได้แก่

- สารละลาย Streptomycin 0.5, 1 และ 5 mg/ml
- สารละลาย Chloramphenicol 0.5, 1 และ 5 mg/ml

ชุดควบคุมลบ (Negative Control) ได้แก่

- เอธิลอะซิเตต

นำสารประกอบที่แยกได้ ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ โดยหยดสารตัวอย่างลงบน Paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (ของบริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี) ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยวิธีการเตรียมจุลินทรีย์เหมือนกับข้อ 3.7.1 (ภาคผนวก ก) นำ Paper disc ที่หยดสารทดสอบลงไปวางบนอาหารแข็งที่ swob เชื้อแล้ว โดยบ่มเชื้อ ใวนาน 12-18 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลที่ได้

3.14.3 การทดสอบฤทธิ์โดยใช้วิธี The Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบที่แยกได้ด้วยวิธี The Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) (Jorgensen, J.H.,1999) ซึ่งเป็นการหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้โดยใช้ Microtiter Plate Broth Dilution Technique ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

3.14.3.1 การเตรียมสารละลายสารประกอบ

นำสารประกอบที่แยกได้ ละลายในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะได้สารละลายสารประกอบที่ความเข้มข้น 125 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นแรกในระดับความเข้มข้นที่เราต้องการ จากนั้นจึงเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้น 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906, 1.953, 0.977 และ 0.488 µg/ml

ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ คือ

ความเข้มข้นสุดท้าย	125	µg/ml
ความเข้มข้นสุดท้าย	62.5	µg/ml
ความเข้มข้นสุดท้าย	31.25	µg/ml
ความเข้มข้นสุดท้าย	15.625	µg/ml
ความเข้มข้นสุดท้าย	7.813	µg/ml
ความเข้มข้นสุดท้าย	3.906	µg/ml
ความเข้มข้นสุดท้าย	1.953	µg/ml
ความเข้มข้นสุดท้าย	0.977	µg/ml
ความเข้มข้นสุดท้าย	0.488	µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย คือ ความเข้มข้นสุดท้าย ของสารละลายสารประกอบที่วัดได้ใน 96 well microtiter plate หลังจากเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบลงไป

3.14.3.2 การเตรียมสารละลายสารชุดควบคุมบวก (Positive Control) ได้แก่

Streptomycin, Chloramphenicol, และ Ketoconazole เป็นสารชุดควบคุมบวก โดยเจือจางสารละลายเช่นเดียวกับการเจือจางสารละลายสารประกอบในข้อ 3.12.1

3.14.3.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 และราที่เจริญในรูปของยีสต์ 1 ชนิด คือ *Candida albican* ATCC 10231 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.2 (ภาคผนวก ก) ส่วนการเตรียมเชื้อแบคทีเรียจะเตรียมตามข้อ 3.7.1.3 และ 3.7.1.4 โดยแบคทีเรียทดสอบจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller-Hinton Broth (MHB) และราจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast-Malt Extract Broth (YMB) โดยที่ความเข้มข้นของเชื้อทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 3.3 (ภาคผนวก ก)

3.14.3.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์จะทำการทดสอบใน 96 well microtiter plate โดยก่อนการหยอดสารละลายสารประกอบและสารชุดควบคุมบวก ให้ทำแผนผังระบุชนิดและตำแหน่งของสารที่จะหยอดลงไป ใน 96 well microtiter plate เสียก่อนเพื่อความถูกต้องของการแปลผลทดสอบที่ได้ โดยสารที่จะหยอดลงใน 96 well microtiter plate มีดังนี้

<u>Blank</u>	- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว - อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบ
<u>Negative control</u>	- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบ + เกล็ดอะซิเตด
<u>Positive Control</u>	- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบ + ระดับความเข้มข้นของยา
<u>ตัวอย่างทดสอบ</u>	- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบ + ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ

ปริมาตรที่ใช้คือ จุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 50 μ l + สารละลายสารประกอบ 50 μ l ปริมาตรรวมต่อหลุมจึงเป็น 100 μ l

3.14.3.5 การแปลผล

อ่านผลการทดลองเป็นค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Sunrise Microtiter Plate Reader ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบของเชื้อก่อนการบ่มเชื้อกับ ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและสารละลายสารประกอบตามระดับความเข้มข้น โดยให้เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบ + ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ หลังจากบ่มเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมง

หากค่าการดูดกลืนแสง ของตัวอย่างทดสอบหรือ Positive Control มีค่าสูงกว่า แสดงว่า สารละลายสารประกอบหรือยาในความเข้มข้นนั้นๆ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

แต่ถ้าค่าการดูดกลืนแสง ของตัวอย่างทดสอบหรือ Positive Control มีค่าต่ำกว่า แสดงว่า สารละลายสารประกอบหรือยาในความเข้มข้นนั้นๆ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

ความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบตัวสุดท้ายที่มีค่าต่ำกว่า ค่านั้นคือค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

3.15 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้ ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งตับ(HEP-G2), เซลล์มะเร็งปอด(CHAGO), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่(SW 620), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร(KATO-III) และ เซลล์มะเร็งเต้านม(BT 474) และ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ซึ่งได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 10 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (Hucca-1), เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB), เซลล์มะเร็งปากมดลูก(HeLa), เซลล์มะเร็งเต้านม: Hormone independent(MDA-MB 231), เซลล์มะเร็งเต้านม: Hormone dependent(T47D), เซลล์มะเร็งปอด(A549), เซลล์มะเร็งปอด: Multidrug resistance (H69AR), เซลล์มะเร็งตับ: Hepatoblastoma carcinoma(HepG2) , เซลล์มะเร็งตับ: Hepatocellular carcinoma (S102), Mouse lymphoid neoplasm (P388) และ Human promyelocytic leukemia cell (HL-60)

โดยทำการทดลองในหลอดทดลองด้วยวิธี colorimetric โดยใช้สาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Carmichael และคณะ, 1987) ซึ่งมีหลักการคือ จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต/หลุม จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณการผลิตสาร formazan ที่สามารถวัดได้โดยการนำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

นำเซลล์มะเร็งมาเลี้ยง และเก็บเซลล์ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด (exponential phase) นับจำนวนเซลล์ด้วย trypan exclusion นำเซลล์มะเร็งที่ทราบจำนวนมาใส่ลงในหลุมทั้ง 96 หลุมของ microtiter plates หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเซลล์ในบรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ต้องการทดสอบอยู่ลงไปในแต่ละหลุม (ในกลุ่มควบคุม N เท่ากับ 6 และในกลุ่มทดลอง N เท่ากับ 3) ส่วนหลุมที่อยู่รอบๆ microtiter plates (lacking cells) ใช้สำหรับชุดควบคุม (N เท่ากับ 2) และกลุ่มควบคุมลบที่เติมสาร tetrazolium (N เท่ากับ 6) จากนั้นนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 4 วัน ก่อนที่จะเติมสารละลาย tetrazolium MTT stock solution มีวิธีการเตรียมดังนี้ นำ MTT 5 มิลลิกรัม มาละลายใน 1 มิลลิตรของ PBS นำไปอบแห้งแล้วกรองผ่าน 0.45- μ l filter units สำหรับ MTT working solutions เตรียมโดยนำ MTT stock solution มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 1:5 (ปริมาตร/ปริมาตร) นำ MTT working solutions ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมนลงในหลุมแต่ละหลุม จากนั้นบ่มต่อไปอีก 4-24 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับการทดลอง นำสารในหลุมไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่ำ เป็นเวลา 5 นาที ถ้าในหลุมดังกล่าวมีสารที่แขวนลอยอยู่ ดูดส่วนน้ำในในแต่ละหลุมออกปริมาณ 10-20 ไมโครลิตร แล้วเติม DMSO ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การวัดอัตราการเจริญและอัตราการยับยั้งการเจริญคำนวณจากเปอร์เซ็นต์ของการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

3.16 การทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารที่แยกได้

การทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน มีการวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น

1.) Diphenyl-pioryl-hydrazyl (DPPH) Assay

DPPH Assay เป็นการให้สารที่ต้องการทดสอบทำปฏิกิริยากับ 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) สารที่จะหยดลงใน 96 well plate มีดังนี้

Blank สารละลาย DPPH 100 μ M ปริมาตร 195 μ l + DMSO 5 μ l

Positive control สารละลาย DPPH 100 μ M ปริมาตร 195 μ l + vitamin C 10 mM 5 μ l

ตัวอย่างทดสอบ สารละลาย DPPH 100 μ M ปริมาตร 195 μ l + สารตัวอย่าง 5 μ l

ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยเครื่อง microplate reader

เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยากับ DPPH (% scavenging) คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ scavenging} = 100 - \frac{(\text{OD}_{\text{sample}})}{(\text{OD}_{\text{control}})} \times 100$$

2.) HL-60 Antioxidant by Reduction of Cytochrome C

2.1) Differentiation of HL-60

การเกิด Differentiation ของ human promyelocytic leukemia cell (HL-60) ไปเป็น granulocyte cell โดยใช้ HL-60 2.5×10^5 cells/ml กับอาหารเลี้ยง cells ที่ผสม DMSO 1.3 % แล้วบ่มในตู้ CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยสารละลาย Hank 's balance salt, pH 7.8 2 รอบ

2.2) HL-60 Antioxidant Assay

การยับยั้ง TPA ที่หน้าที่เป็นตัวชักนำให้เกิด superoxide radical ใน differentiate HL-60 จะพิจารณาจากการเกิดปฏิกิริยา reduction ของ cytochrome c โดยทดสอบใน 96 well plate ผสมสารกลุ่มแรก (A) ให้เข้ากันซึ่งประกอบด้วย

Negative control cell suspension 1×10^6 cells/ml ปริมาตร 100 μ l + 10% DMSO ปริมาตร 25 μ l

Positive control cell suspension 1×10^6 cells/ml ปริมาตร 100 μ l

ตัวอย่างทดสอบ cell suspension 1×10^6 cells/ml ปริมาตร 100 μ l + สารตัวอย่างที่เจือจาง 10 เท่า (10-fold dilution) ปริมาตร 25 μ l

บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม HBSS 25 μ l ลงในตัวอย่างทดสอบและ Negative control ส่วน Positive control เติม SOD 600 U/ml 25 μ l จากนั้นเติม cytochrome c ความเข้มข้น 4.17 mg/ml ปริมาตร 75 μ l แล้วเริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยการเติม TPA 0.55 mg/ml ปริมาตร 25 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยา จากนั้นปั่นเหวี่ยง

ที่ 2,000 rpm 10 นาที ดูดส่วน supernatant มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 550 nm ด้วย microplate reader

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง TPA ที่เป็นตัวชักนำให้เกิด superoxide radical (% Inhibition) คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \frac{(\text{OD}_{\text{sample}})}{(\text{OD}_{\text{DMSO}})} \times 100$$

2.3) Cell Viability Assay

เนื่องจากสารบางชนิดมีความเป็นพิษสูง การทดสอบ cell viability จึงเป็นการทดสอบเพื่อป้องกันความผิดพลาดของผลที่ได้ มีวิธีการคือ หลังจากที่ทำ HL-60 Antioxidant Assay นำเซลล์ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงและล้างด้วย PBS 2 รอบ แล้วเติม calcein AM ความเข้มข้น 0.25 μM ปริมาตร 50 μl วัดสัญญาณ fluorescence โดยใช้

- excitation wavelength ที่ 485 nm

- emission wavelength ที่ 520 nm โดยตัดสัญญาณที่ 515 nm ออกไป

ด้วยเครื่อง microplate fluorescence reader ค่าเปอร์เซ็นต์ของ cell viability) % cell viability) คำนวณจากค่า V_{max} ตามสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{(V_{\text{max}} \text{ of sample})}{(V_{\text{max}} \text{ of DMSO})} \times 100$$

3.) Scavenging of Superoxide Anion by Reduction of XTT (XXO)

superoxide anion radical เกิดจาก xanthine / xanthine oxidase system โดย superoxide anion สามารถทำปฏิกิริยากับ XTT เกิดเป็น formazan ที่ละลายได้ในน้ำ ปริมาณของ superoxide anion จะตรวจวัดได้โดยตรงจากการวัด formazan

3.1) Measuring of the XTT-reduction

มีวิธีการทดลองโดย การผสมสารกลุ่มแรก (A) ให้เข้ากันซึ่งประกอบด้วย

- 1) NaHCO₃ buffer, pH 9.4 ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 110µl
- 2) Hypoxanthine 0.5 mM ปริมาตร 20µl
- 3) EDTA ปริมาตร 20µl
- 4) XTT ความเข้มข้น 0.25 mM ปริมาตร 20µl

Negative control สารผสมกลุ่ม A + DMSO ปริมาตร 10 µl

Positive control สารผสมกลุ่ม A + Allopurinol 2 mM ปริมาตร 10 mM

ตัวอย่างทดสอบ สารผสมกลุ่ม A + สารตัวอย่าง ปริมาตร 10 µl

หลังจากหยดสารดังกล่าวลงใน 96 well plate แล้ว เริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยการเติม xanthine oxidase 150 mU/ml ปริมาตร 20µl แล้ววัดผลการเกิดปฏิกิริยาทันทีด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 480 nm ทุก 20 วินาทีเป็นเวลา 5 นาที

เปอร์เซ็นต์ของ Scavenging of superoxide anion (% Scavenging) คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Scavenging} = 100 - \frac{(V_{\text{max}} \text{ of sample})}{(V_{\text{max}} \text{ of DMSO})} \times 100$$

3.2) Measuring of the uric formation

xanthine oxidase activity จะสามารถตรวจวัดได้จากปริมาณของ uric acid ที่เกิดจาก xanthine ใน 96 well plate มีวิธีการทดลองโดย การผสมสารกลุ่มแรก (A) ให้เข้ากันซึ่งประกอบด้วย

- 1) NaHCO₃ buffer, pH 9.4 ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 130µl
- 2) Xanthine 0.5 mM ปริมาตร 20µl
- 3) EDTA ปริมาตร 20µl

Negative control สารผสมกลุ่ม A + DMSO ปริมาตร 10 µl

Positive control สารผสมกลุ่ม A + Allopurinol 2 mM ปริมาตร 10 mM

ตัวอย่างทดสอบ สารผสมกลุ่ม A + สารตัวอย่าง ปริมาตร 10 µl

เริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยการเติม xanthine oxidase 150 mU/ml ปริมาตร 20 μ l แล้ววัดผล การเกิดปฏิกิริยาทันทีด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 295 nm ทุก 30 วินาทีเป็นเวลา 5 นาที

เปอร์เซ็นต์ของ uric formation inhibition (% Inhibition) คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \frac{(V_{\text{max}} \text{ of sample})}{(V_{\text{max}} \text{ of DMSO})} \times 100$$

4.) Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay (ORAC)

The oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC) มีวิธีการคือ การผสมสารกลุ่ม แรก (A) ให้เข้ากันซึ่งประกอบด้วย

1) Phosphate buffer, pH 7.0 ความเข้มข้น 75 mM ปริมาตร 175 μ l

2) Fluorescein 7x10⁵ mM ปริมาตร 10 μ l

Negative control สารผสมกลุ่ม A + DMSO ปริมาตร 10 μ l

Positive control สารผสมกลุ่ม A + Trolox 2 mM ปริมาตร 10 mM

ตัวอย่างทดสอบ สารผสมกลุ่ม A + สารตัวอย่างเจือจาง 1/80 ปริมาตร 10 μ l

บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที เริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยการเติมสาร AAPH 255 mM ปริมาตร 15 μ l (เพื่อให้เกิดเป็น ROO^o) แล้ววัดผลการเกิดปฏิกิริยาทันทีด้วย microplate fluorescence reader

- excitation wavelength ที่ 485 nm

- emission wavelength ที่ 530 nm โดยตัดสัญญาณที่ 530 nm ออกไป

อ่านผล ทุก 2 นาทีเป็นเวลา 45 นาที หาพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve: AUC) โดย ผลจะเป็นค่า ORAC unit โดย 1 ORAC จะเท่ากับ ค่าการป้องกัน fluorescein ที่จะเกิดจาก Trolox 1 mM ที่จะทำหน้าที่คล้ายกับวิตามินอี

ค่า ORAC คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ORAC (unit)} = [(\text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}}) / (\text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{\text{blank}})]$$

3.17 การทดสอบความสามารถในการต้านการอักเสบของสารที่แยกได้

1.) Lipoxygenase Inhibition Assay (LOX)

Lipoxygenase คือ dioxygenase enzyme ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาของกรดไขมันไลโนเลอิก หรือไขมันไม่อิ่มตัวชนิดอื่น ที่ประกอบด้วย cis,cis-1,4-pentadiene โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถตรวจสอบได้โดยการทำปฏิกิริยาใน 96 well plate แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 nm วิธีการทดลองคือการผสมสารกลุ่มแรก (A) ให้เข้ากันซึ่งประกอบด้วย

1) PBS, pH 7.4 ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 120 μ l

2) LOX ความเข้มข้น 2500 U/ml ปริมาตร 20 μ l

Negative control สารผสมกลุ่ม A + 10% DMSO ปริมาตร 20 μ l

Positive control สารผสมกลุ่ม A + NDGA ปริมาตร 20 ml

ตัวอย่างทดสอบ สารผสมกลุ่ม A + สารตัวอย่างเจือจาง 1/10 ปริมาตร 20 μ l

เขย่าให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วเริ่มด้วยการเติม arachidonic acid 0.5 mM ปริมาตร 40 ml (เจือจางใน PBS buffer) จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิห้องอีก 10 นาที ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 nm การยับยั้ง LOX คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \frac{(\Delta OD_{\text{sample}})}{(\Delta OD_{\text{DMSO}})} \times 100$$

$$\Delta OD_{\text{sample}} = \text{OD (sample with enzyme)} - \text{OD (sample without enzyme)}$$

$$\Delta OD_{\text{DMSO}} = \text{OD (DMSO with enzyme)} - \text{OD (DMSO without enzyme)}$$

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ราเอนโดไฟต์ที่แยกจากเหง้าขมิ้นชัน

ผลการแยกราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจากทั้งหมด 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ (รหัส CM) จังหวัดมหาสารคาม (รหัส MS) จังหวัดร้อยเอ็ด (รหัส RE) จังหวัดอุรุธยา (รหัส AY) จังหวัดชลบุรี (รหัส CB) จังหวัดราชบุรี (รหัส RB) และจังหวัดนครศรีธรรมราช (รหัส NK) ได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 47 ไอโซเลต ผลแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชัน

จังหวัด	จำนวนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ (ไอโซเลต)
เชียงใหม่ (รหัส CM)	4
มหาสารคาม (รหัส MS)	3
ร้อยเอ็ด (รหัส RE)	4
อุรุธยา (รหัส AY)	3
ชลบุรี (รหัส CB)	8
ราชบุรี (รหัส RB)	9
นครศรีธรรมราช (รหัส NK)	16
รวม (ไอโซเลต)	47

นำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ 5 ชนิด คือ Corn Meal Agar (CMA), Malts Extract Agar (MEA), Sabouraud' Dextrose Agar (SDA), Potato Dextrose Agar (PDA) และ Yeast Extract Sucrose Agar (YEA) จากนั้นป้อนไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานจนกระทั่งราแต่ละชนิดเจริญเต็มจานเพาะเชื้อ (เนื่องจากราแต่ละชนิดมีอัตราการเจริญที่ต่างกัน) จากนั้นศึกษาลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ เช่น ลักษณะของรา สีของเส้นใย สีสันของสปอร์ หรือลักษณะพิเศษบางอย่าง ลักษณะต่างๆของราเอนโดไฟต์ที่แยก

ได้ทั้งหมด (ภาคผนวก ข ตารางที่ 5.1 - 5.7) และรูปตัวอย่างราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ (ภาคผนวก ข รูป 5.1-5.5)

จากการทดลองที่เลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน พบว่าอาหารจะมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ลักษณะของโคโลนี สีของเส้นใยสีรงควัตถุ การสร้างสปอร์ หรือลักษณะพิเศษบางอย่าง เนื่องจากในอาหารแต่ละชนิดมีสารอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ต่างกันด้วย

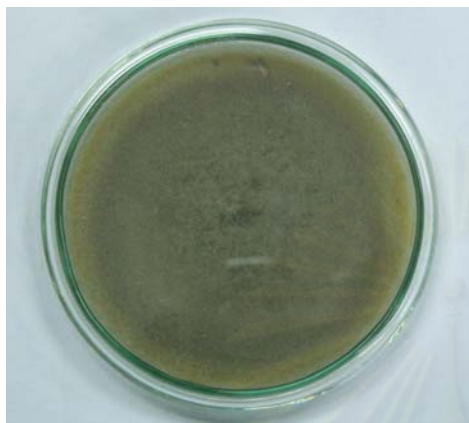
จากการจัดจำแนกราเอนโดไฟต์ที่แยกได้โดยการทำ slide culture แล้วย้อมด้วยแลคโตฟีนอลบลู (lactophenol blue) เพื่อดูการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้สามารถแบ่งได้เป็น 6 ประเภท ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และลักษณะราเอนโดไฟต์ที่แยกได้แสดงดังรูปที่ 4.1.1-4.1.6

ตารางที่ 4.2 การจัดจำแนกราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชัน

ชนิดราเอนโดไฟต์	ไอโซเลต	จำนวนที่พบ	% ที่พบ
Mycelia Sterilia	CM1, MS2, MS3, RE1, RE4, AY2, CB1, CB2, CB3, CB6, CB8, RB1, RB3, RB4, RB7, RB8, RB9, NK1, NK2, NK3, NK4, NK5, NK6, NK7, NK8, NK10, NK11, NK13, NK14	30	63.83
<i>Fusarium</i> sp.	RE3, AY1, AY3, CB5, RB5, NK9	6	12.77
<i>Xylaria</i> sp.	CM2, CM4, RB2,	3	6.38
<i>Phomopsis</i> sp.	RE2, CB7, RB6, NK15	4	8.51
<i>Alternaria</i> sp.	CM3, CB4, NK12	3	6.38
<i>Acremonium</i> sp.	MS1	1	2.13

หมายเหตุ รหัสไอโซเลตตัวอย่างเช่น NK9 มีความหมายดังนี้ รหัส 2 ตัวแรก (NK) หมายถึง รหัสจังหวัด ส่วน ตัวเลข (9) หมายถึงลำดับที่

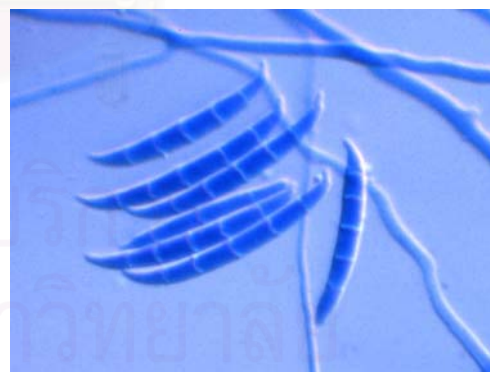
รูปที่ 4.1 แสดงตัวอย่างของราเอนโดไฟต์ในกลุ่มต่างๆ ที่สามารถแยกได้



A. ลักษณะโคโลนีของราที่เจริญบน PDA อายุ 15 วัน

B. เส้นใยรา

รูปที่ 4.1.1 ราเอนโดไฟต์ *Mycelia Sterilia* ไอโซเลต MS2



A. ลักษณะโคโลนีของราที่เจริญบน PDA อายุ 15 วัน

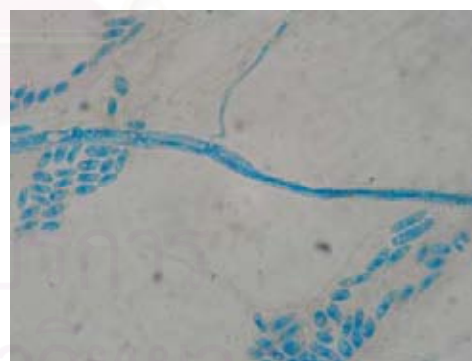
B. เส้นใยและสปอร์

รูปที่ 4.1.2 ราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. ไอโซเลต NK9



A. ลักษณะโคโลนีของราที่เจริญบน PDA อายุ 20 วัน

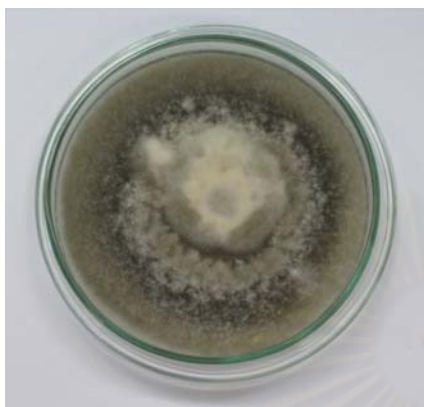
B. เส้นใยรา

รูปที่ 4.1.3 ราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. ไอโซเลต CM4

A. ลักษณะโคโลนีของราที่เจริญบน PDA อายุ 15 วัน

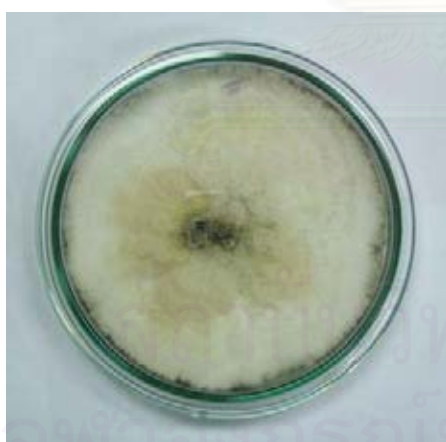
B. เส้นใยและสปอร์

รูปที่ 4.1.4 ราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. ไอโซเลต RB6



A. ลักษณะโคโลนีของราที่เจริญบน PDA อายุ 15 วัน

B. เส้นใยและสปอร์

รูปที่ 4.1.5 ราแอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ไอโซเลต NK12

A. ลักษณะโคโลนีของราที่เจริญบน PDA อายุ 15 วัน

B. เส้นใยและสปอร์

รูปที่ 4.1.6 ราแอนโดไฟต์ *Acremonium* sp. ไอโซเลต MS1

4.2 การคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์

โดยเป็นการคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด ซึ่งทำโดย การเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทั้ง 5 คือชนิด CMA, MEA, PDA, YES และ SDA จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี Dual Culture Method จากนั้นใช้ sterile cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ตัดชิ้นส่วนของเชื้อราไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคสังเกตวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี ซึ่งผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ทั้งหมดที่แยกได้แสดงในตารางที่ 4.3



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ผลแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ในอาหารต่างชนิดกัน โดยวิธี Dual Culture Method

ราเอนโดไฟต์	อาหาร เลี้ยงเชื้อ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสล้อมรอบจุลินทรีย์ทดสอบ (มิลลิเมตร)				
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>C. albican</i> ATCC 10231
NK7	CMA	14	-	-	-	-
	YES	12	-	-	-	-
NK9	PDA	14	14	-	-	15
	MEA	20	16	-	-	24
	CMA	12	10	-	-	12
	SDA	20	-	-	-	18
NK12	MEA	-	12	-	-	-
	CMA	14	-	-	-	-
	YES	12	-	-	-	-
	SDA	12	-	-	-	-
NK13	MEA	12	22	-	-	-
	YES	21	-	-	-	-
	SDA	22	-	-	-	-
NK15	CMA	16	-	11	-	-
	YES	13	-	-	-	-
CB5	PDA	9	-	11	-	-
	MEA	9	-	-	9	-
CB13	PDA	20	12	-	-	-
	YES	22	14	-	-	-
NP1	PDA	25	19	-	-	-

ตารางที่ 4.3 ผลแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ในอาหารต่างชนิดกัน โดยวิธี Dual Culture Method (ต่อ)

ราเอนโดไฟต์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสล้อมรอบจุลินทรีย์ทดสอบ (มิลลิเมตร)				
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	ATCC 9027	ATCC 10231
NP4	MEA	12	-	-	-	-
AY1	SDA	14	-	-	-	-
RB2	SDA	13	13	-	-	-
RB3	MEA	18	-	-	-	-
	YES	24	-	-	-	-
	SDA	21	10	-	-	-
CM4	PDA	25	26	-	-	-
	MEA	19	17	-	-	-
	SDA	-	-	13	-	-
CM5	PDA	10	-	-	-	-
	YES	13	-	-	-	-
	SDA	12	-	-	-	-

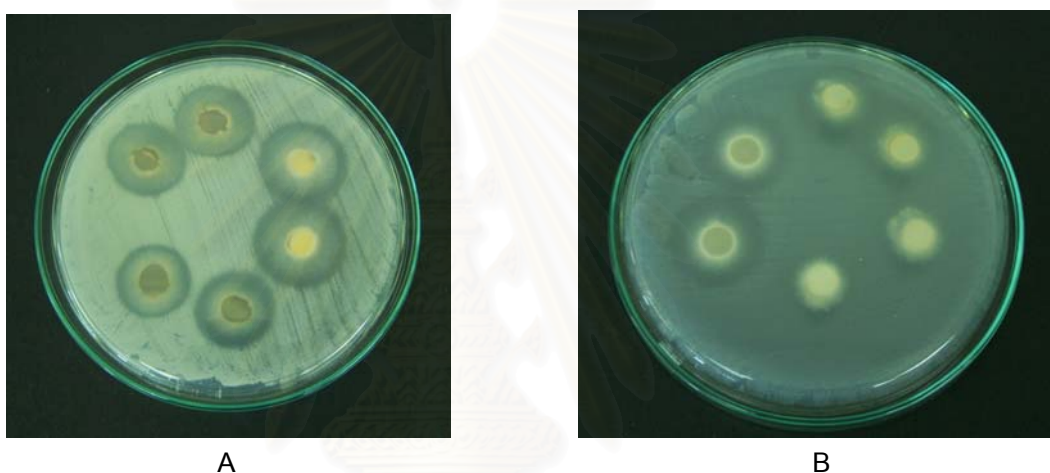
หมายเหตุ

(-) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

PDA (Potato Dextrose Agar), MEA (Malt Extract Agar), CM (Corn Meal Agar), SDA Agar (Sabouraud' s Dextrose) และ YES (Yeast Extract Sucrose Agar)

ผลการทดลองพบว่าราเอนโดไฟต์ 14 ชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ได้แก่ ราเอนโดไฟต์ ไอโซเลต NK7, NK9, NK12, NK13, NK15, CB5, CB13, NP1, NP4, AY1, RB2, RB3 CM4, และ CM5 โดยราเอนโดไฟต์ ไอโซเลต NK9 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด โดยเฉพาะในอาหาร MEA ส่วนราเอนโดไฟต์ที่เหลือไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จึงคัดเลือกราเอนโดไฟต์ NK9 มาใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิดและมีวงใสในการยับยั้งจุลินทรีย์ขนาดใหญ่ที่สุด

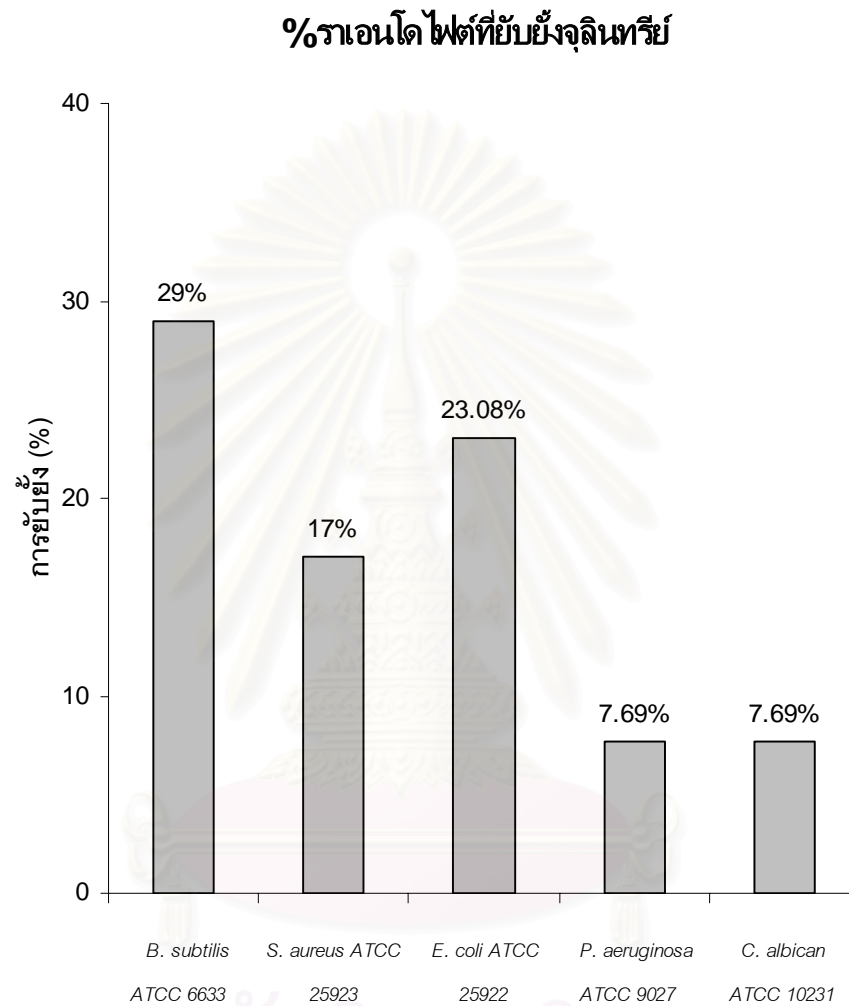
สำหรับรูปร่างใสในการยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ NK9 แสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงตัวอย่างวงใสในการยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ ในเชื้อ *Bacillus subtilis* (A) และ *Staphylococcus aureus* (B) ในอาหาร PDA, MEA และ CMA ของราเอนโดไฟต์ไอโซเลต NK9

จากผลการยับยั้งจุลินทรีย์พบว่าของราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค สามารถยับยั้งเชื้อแต่ละชนิดโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้

- *Bacillus subtilis* 29 %,
- *Staphylococcus aureus* 17 %,
- *Escherichia coli* 23.08 %,
- *Pseudomonas aeruginosa* 7.69 %, และ
- *Candida albican* 7.69 %



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุลินทรีย์ทดสอบ

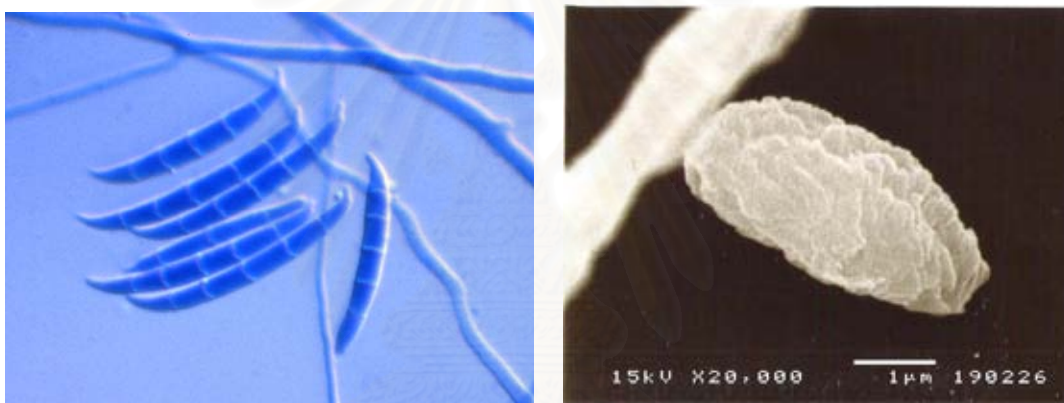
รูปที่ 4.3 แสดงผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้

4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์

4.3.1 การพิสูจน์ทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะของภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope พบว่าราเอนโดไฟต์ NK9 สร้างสปอร์ที่มีลักษณะยาวเรียว ปลายโค้งคล้ายรูปเคียว

และจากการศึกษาเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ scanning electron microscope (SEM) จะเห็นลักษณะของ microconidia อย่างชัดเจน โดย microconidia จะมีลักษณะยาวรีมีรอยหยักที่ผิวภายนอก และมีร่องตามแนวยาวดังรูป



ก.

ข.

รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราเอนโดไฟต์ NK9

ก. ลักษณะของ macroconidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope

ข. ลักษณะของ microconidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ SEM

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.2 การพิสูจน์ทางอณูชีววิทยา

ลำดับเบสบริเวณ ITS (internal transcribe spacer) ของ ribosomal RNA ที่ประกอบด้วยส่วนของ 18S, ITS1, 5.8S และ 28S มีความยาว 542 คู่เบส แสดงดังรูปที่ 4.4

จากการพิสูจน์ทางอณูชีววิทยา พบว่าราเอนโดไฟต์ NK9 มีความคล้ายคลึงกับรา *Fusarium equiseti* 99% โดยลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ NK9 ได้นำไปบันทึกไว้ใน GenBank โดยมี accession number คือ AB 277550 โดยผลสอดคล้องกับผลทางสัณฐานวิทยา

10	20	30	40	50
AAGTCGTAAC	AAGGTCTCCG	TTGGTGAACC	AGCGGAGGGA	TCATTACCGA
GTTTACAAC	CCCAAACCCC	TGTGAACATA	CCTATACGTT	GCCTCGGCGG
ATCAGCCCGC	GCCCCGTAAA	ACGGGACGGC	CCGCCCGAGG	ACCCCTAAAC
TCTGTTTTTA	GTGGAACTTC	TGAGTAAAC	AAACAAATAA	ATCAAACTT
TCAACAACGG	ATCTCTTGGT	TCTGGCATCG	ATGAAGAACG	CAGCAAAATG
CGATAAGTAA	TGTGAATTGC	AGAATTGAGT	GAATCATCGA	ATCTTTGAAC
GCACATTGCG	CCCGCCAGTA	TTCTGGCGGG	CATGCCTGTT	CGAGCGTCAT
TTCAACCCTC	AAGCTCAGCT	TGGTGTGGG	ACTCGCGGTA	ACCCGCGTTC
CCCAAATCGA	TTGGCGGTCA	CGTCGAGCTT	CCATAGCGTA	GTAATCATAC
ACCTCGTTAC	TGGTAATCGT	CGCGGCCACG	CCGTAAAACC	CCAACCTTCTG
AATGTTGACC	TCGGATCAGG	TAGGAATACC	CGCTGAACTT	AA

รูปที่ 4.6 แสดงลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟต์ NK9

ลำดับเบสของราเอนโดไฟต์ NK9 บริเวณ ITS (internal transcribe spacer) ของ ribosomal RNA ประกอบด้วยส่วนของ rRNA (18S rRNA) ลำดับเบสที่ 1-47 , misc RNA (ITS1) ลำดับเบสที่ 48-196, rRNA (5.8S rRNA) ลำดับเบสที่ 197-404, misc RNA (ITS2) ลำดับเบสที่ 405-508 และ rRNA (28S rRNA) ลำดับเบสที่ 509-542

จากลักษณะที่แสดงขึ้นต้นนั้นแสดงว่าราเอนโดไฟต์ NK9 คือรา *Fusarium* sp. และเมื่อได้ทำการวิเคราะห์ผลทางเทคนิคทางพันธุกรรม เพื่อตรวจสอบผลอีกครั้งพบว่าราชนิดนี้คือ *Fusarium equiseti* ซึ่งจัดอยู่ในคิงดอม Mycetozoa ติวิชั่น Deuteromycota (Fungi Imperfecti) อันดับ Melanconia (conidia)

สำหรับเชื้อราชนิดนี้ก่อนหน้านี้ได้มีผู้ศึกษาพอสมควร โดยเป็นราที่สามารถพบได้ในดินทั่วโลก และเคยมีรายงานพบในพืชที่เก็บเกี่ยวแล้ว

มีการศึกษาแยกสารสำคัญต่างๆที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสารชนิดใหม่จากราชนิดนี้นั้น มาเป็นเวลานาน โดยมีการศึกษาทั้งราที่ได้จากดิน และราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชดังนี้

การศึกษารา *Fusarium equiseti* ที่แยกได้จาก tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) ได้สาร equisetin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus* และ *Neisseria perflava* ได้ (Burmeister และคณะ, 1974)

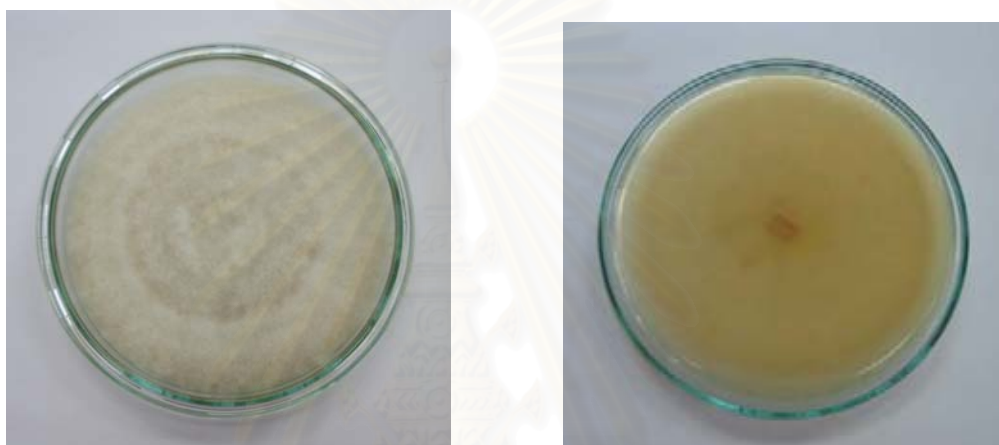
มีการศึกษาพบว่ามีรา *Fusarium* sp. ในข้าวโพดที่ใช้บริโภคที่มาจากรัฐในแถบตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศไนจีเรีย โดยพบว่ามีสาร trichothecenes, diacetoxyscirpenol (DAS), MAS-monoacetoxyscirpenol (MAS) และ fusarenone-X จึงทำให้ทราบว่าในประเทศไนจีเรียมีการบริโภคสารพิษเหล่านี้เข้าไปโดยตรง (Adejumo, Hettwer Karlovsky, 2007)

มีการศึกษาพบว่ารา *Fusarium equiseti* และ *F. acuminatum* สามารถผลิตสาร pyruvate โดยจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่การผลิตเอทานอล และ alcohol dehydrogenase จากราชนิดนี้จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของความเข้มข้นของ yeast extract ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Kayali, Tarhan และ Soran, 2005)

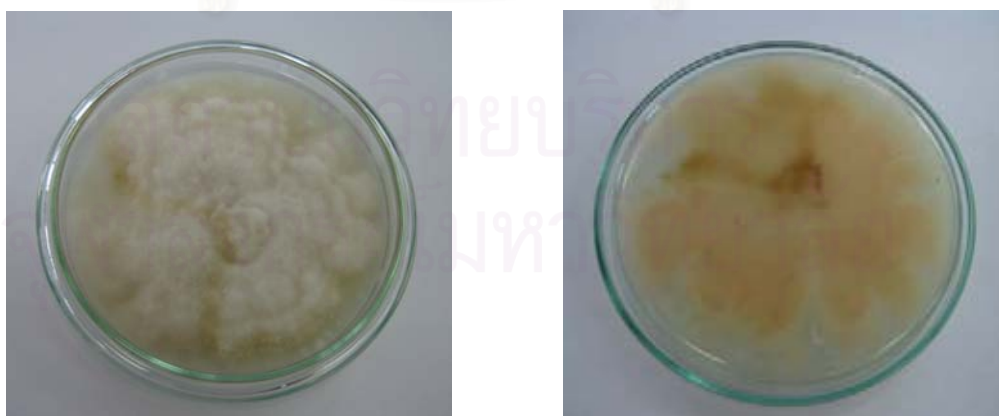
4.4 ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการเจริญเติบโตของราของราเอนโดไฟต์ NK9

โดยการเพาะเลี้ยงราบนอาหารแข็งที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ PDA, MEA, CMA, SDA และ YES ป่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน พบว่าราเอนโดไฟต์ NK9 เจริญเติบโตในอาหารแข็ง MEA ได้ดีที่สุดคือ เจริญได้เร็วและมีความหนาแน่นมากกว่าในอาหารชนิดอื่น ดังรูปที่ 4.5

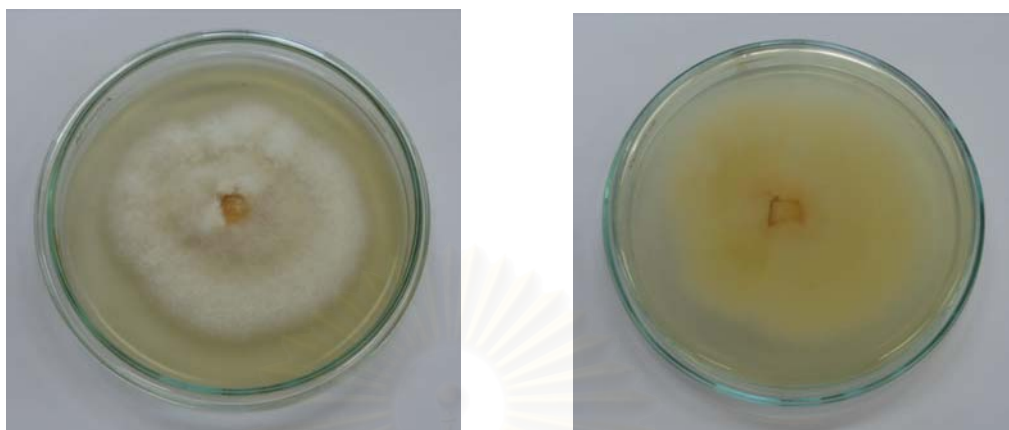
รูปที่ 4.7 แสดงการเจริญเติบโตในอาหารแข็งชนิดต่างๆของราเอนโดไฟต์ NK9



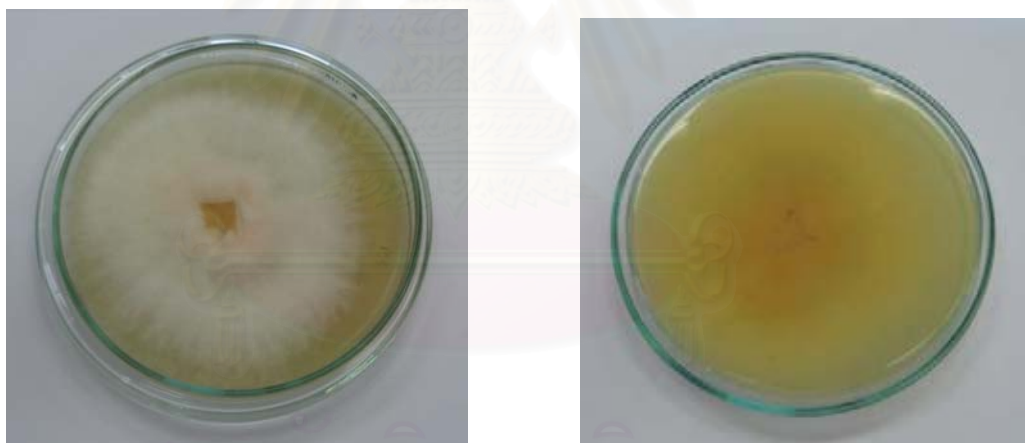
รูปที่ 4.7.1 การเจริญในอาหารPDA



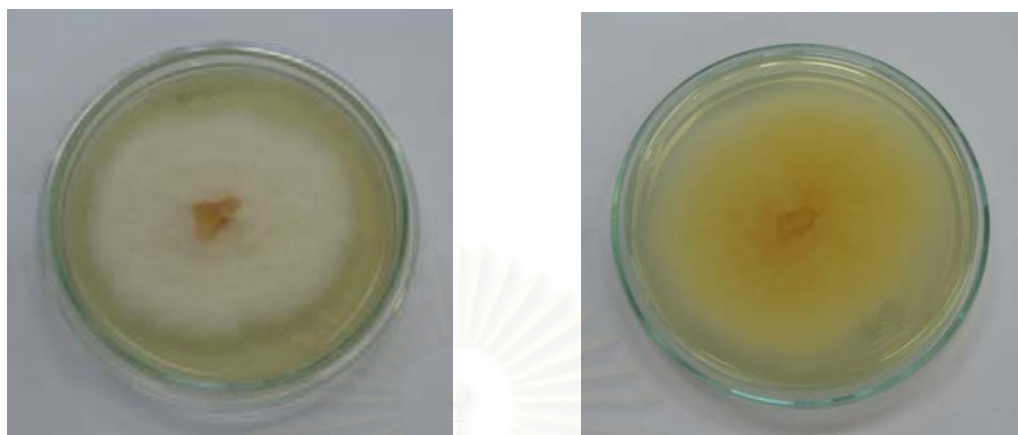
รูปที่ 4.7.2 การเจริญในอาหาร MEA



รูปที่ 4.7.3 การเจริญในอาหาร CMA



รูปที่ 4.7.4 การเจริญในอาหาร SDA



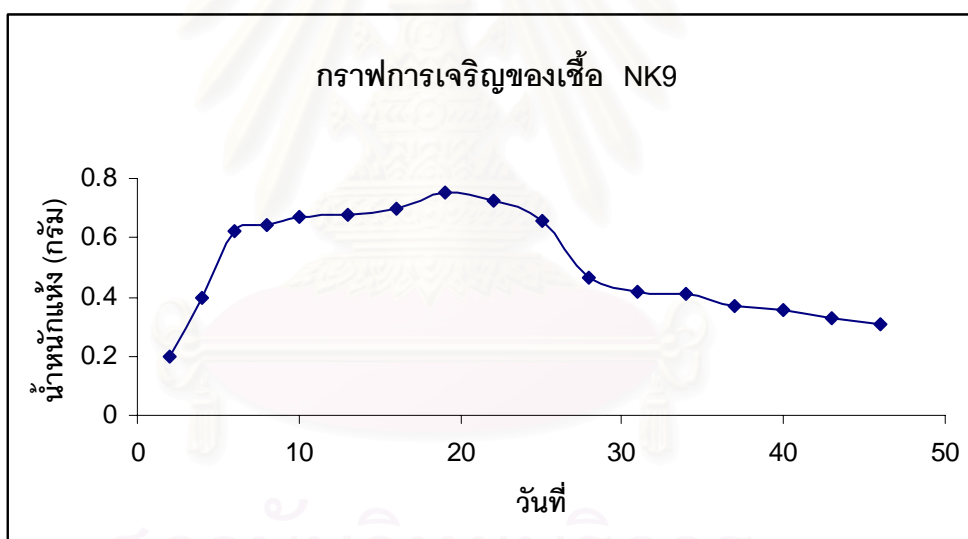
รูปที่ 4.7.5 การเจริญในอาหาร YES

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ศึกษาการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิของราเอนโดไฟต์ NK9

4.5.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์ NK9

นำราเอนโดไฟต์ NK9 ที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลว MEB เนื่องจากเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้เราสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุดโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะราเอนโดไฟต์เพื่อให้แต่ละชิ้นมีขนาดเท่ากัน นำชิ้นเชื้อราจำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเหลว MEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เตรียมให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อ 5.1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 46 วัน เก็บตัวอย่างราทุก 2-3 วัน ทำ 3 ซ้ำ นำมากรองแยกส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อราด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำส่วนของเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วชั่งน้ำหนักแห้ง ซึ่งสามารถเขียนกราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์ NK9 ระหว่างน้ำหนักแห้ง (กรัม) และระยะเวลาการเจริญเติบโตของรา (วัน) ได้ดังนี้



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงการเจริญเติบโต ในอาหารเหลว MEB

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีอย่างคร่าวๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB ของราเอนโดไฟต์ NK9 ที่อายุแตกต่างกัน คือ 6 วัน 10 วัน 16 วัน 25 วัน 31 วัน และ 40 วัน โดยเทคนิค NMR พบว่าราเอนโดไฟต์ NK9 เริ่มสร้างสารในวันที่ 10 และเริ่มมีสารที่น่าสนใจในช่วงวันที่ 16 และมีปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ แต่จะลดลงในช่วงวันที่ 40

4.5.2 การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิของราเอนโดไฟต์ NK9

และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Agar-well Diffusion เพื่อศึกษาว่าช่วงเวลาใด ที่ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกมามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด พบว่าในวันที่ 31 ราเอนโดไฟต์ NK9 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้มากที่สุด

ตารางที่ 4.4 ผลแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของราเอนโดไฟต์ที่มีระยะเวลาในการเลี้ยงต่างกัน โดยวิธี Agar-well Diffusion

วันที่	วงใส (มม.) ที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
13	14	12
16	18	20
19	18	26
22	14	26
25	16	28
28	18	32
31	22	32
34	22	30
37	22	30
40	20	30
43	18	24
46	18	24

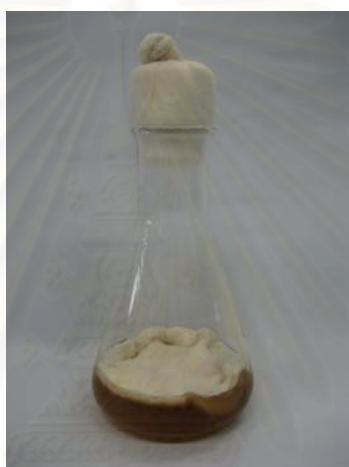
หมายเหตุ ก่อนวันที่ 13 ไม่มีวงใสเกิดขึ้น

จากการทดลองพบว่า ราเอนโดไฟต์สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ตั้งแต่วันที่ 13 โดยขนาดของวงใสที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* มีขนาดกว้างขึ้นเรื่อยๆ จนกว้างที่สุดในวันที่ 31 และจากนั้นขนาดของวงใสก็จะเล็กลงเรื่อยๆ ดังนั้นจึงเลือกเลี้ยงราเอนโดไฟต์ ที่อายุ 31 วันในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB

4.6 การเลี้ยงเชื้อและสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จาก

4.6.1 การเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ NK9

ใช้ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นที่มีเส้นใยของราเอนโดไฟต์ NK9 อายุ 14 วัน ที่เจริญบนอาหารแข็ง MEA มาเลี้ยงในอาหารเหลว MEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขันต่อ 1 ขวด เลี้ยงทั้งหมด ปริมาตร 25 ลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 31 วัน โดยสีของน้ำเลี้ยงราจะเป็นสีน้ำตาล และมีเส้นใยราสีส้มอ่อนลอยอยู่บนผิวอาหารเหลว



รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ NK9 ที่เลี้ยง ในอาหารเหลว MEB

4.6.2 การสกัดสารชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ NK9

กรองแยกราเอนโดไฟต์ NK9 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MEB ด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น จะได้ส่วนของเส้นใยราและส่วนของน้ำเลี้ยงรา ส่วนของน้ำเลี้ยงรานำมา ระเหยน้ำออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ได้ของเหลวเหน็ดสีน้ำตาล นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย เอธิลอะซิเตต และเมทานอลสกัดซ้ำอย่างละ 7 ครั้ง (จนไม่มีสารออกมา ทดสอบโดยการทำ TLC) นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลาย จะได้สารละลายเป็นของเหลวเหน็ดสีน้ำตาล (จากตัวทำละลาย เอธิลอะซิเตต) น้ำหนัก 8.12 กรัม และของเหลวเหน็ดสีน้ำตาลเข้ม (จากตัวทำละลายเมทานอล) น้ำหนัก 53.01 กรัม

ส่วนเส้นใยนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ สกัดด้วยตัวทำละลายเอธิลอะซิเตต และเมทานอลอย่างละ 7 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 รวมสารสกัดที่ได้นำไประเหยตัวทำละลายด้วย

เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ได้ของเหลวหนืดสีส้ม (จากตัวทำละลาย เอธิลอะซิเตต) น้ำหนัก 16.13 กรัม และของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม(จากตัวทำละลายเมธานอล) น้ำหนัก 74.50 กรัม ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงลักษณะและปริมาณส่วนสกัดหยาบของจากราเอนโดไฟต์ NK9 ในตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	เส้นใย			น้ำเลี้ยงเชื้อ		
	ลักษณะส่วนสกัดหยาบ	น้ำหนัก (กรัม)	% yield (w/w)	ลักษณะส่วนสกัดหยาบ	น้ำหนัก (กรัม)	% yield (w/v)
เอธิลอะซิเตต	ของเหลวหนืดสีส้ม	16.13	7.10	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	8.12	0.04
เมธานอล	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	74.50	32.79	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	53.01	0.28
ส่วนที่เหลือ	ของเหลวหนืดสีดำ	45.17	19.82	ของเหลวหนืดสีดำ	100.05	0.53

4.7 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของส่วนสกัดหยาบที่ได้จากราเอนโดไฟต์ NK9 โดยใช้วิธี Paper disk Diffusion Method

นำส่วนสกัดหยาบทั้ง 6 ส่วน ที่ได้จากการสกัดลำดับส่วน คือ ส่วนสกัดหยาบเมธานอล ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตต และส่วนที่เหลือจากการสกัดของทั้งจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์ มาตัวอย่างละ 5 มิลลิกรัม ผสมกับตัวทำละลายที่สามารถละลายได้หมดคือ ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตต ละลายในเอธิลอะซิเตต ส่วนสกัดหยาบเมธานอล ละลายในเมธานอล และส่วนที่เหลือจากการสกัดทั้งจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงละลายใน 10% DMSO ในน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 5 mg/ml แล้วนำไปเจือจางต่อด้วยตัวทำละลายให้ได้ระดับความเข้มข้น 1 mg/ml และ 0.5 mg/ml ตามลำดับ โดยชุดควบคุมบวก (Positive Control) ได้แก่ สารละลาย Chloramphenicol (C1) และ Streptomycin (C2) ชุดควบคุมลบ (Negative Control) ได้แก่ 10% DMSO ในน้ำ ซึ่งผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่าสารสกัดหยาบบางชนิดทำให้เกิดวงใสได้กว้างกว่าตัวควบคุม ได้แสดงใน ตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.6 ผลแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ โดยวิธี Agar-well Diffusion

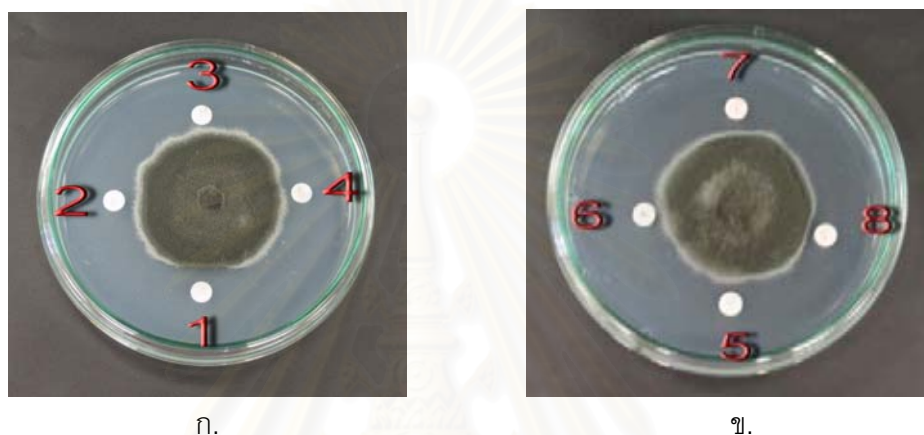
ปริมาณ สาร (mg/ml)	วงใส (มม.) ที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ									
	<i>Bacillus subtilis</i>					<i>Escherichia coli</i>				
	C1	C2	Broth EtOAc	Mycelium MeOH	Broth MeOH	C1	C2	Broth EtOAc	Mycelium MeOH	Broth MeOH
0.5	25	22	17	10	11	13	12	16	20	17
1	25	24	25	18	17	15	16	21	30	23
5	31	27	31	19	17	20	23	28	33	30

หมายเหตุ สารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากเส้นใยและส่วนที่เหลือจากการสกัดของทั้งจากเส้นใยและน้ำเลี้ยง ไม่มีวงใสเกิดขึ้น

C1 = Chloramphenicol และ C2 = Streptomycin

จากการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากเส้นใยและส่วนที่เหลือจากการสกัดของทั้งจากเส้นใยและน้ำเลี้ยง ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ แต่สารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากน้ำเลี้ยงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ *Bacillus subtilis* ได้ดีเท่ากับสารที่ใช้เป็นตัวควบคุมได้แก่ Chloramphenicol และ Streptomycin ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 mg/ml และพบว่าสารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากน้ำเลี้ยง และสารสกัดหยาบเมธานอลของทั้งจากเส้นใยและน้ำเลี้ยง มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ *Escherichia coli* ได้ดีกว่าสารที่ใช้เป็นตัวควบคุมได้แก่ Chloramphenicol และ Streptomycin ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 5 mg/ml

นอกจากนี้ยังทดสอบฤทธิ์การยับยั้งรากล่อโรคพืช 4 ชนิด คือ *Phytophthora parasitica*, *Alternaria brassicola*, *Collectitrichum gloeosporioides* และ *Fusarium oxysporum* โดยใช้ Ketoconazole ความเข้มข้น 100 mg เป็น ตัวควบคุมบวก และใช้ เอธิลอะซิเตต เมธานอล และ 10% DMSO ในน้ำเป็นตัวควบคุมลบ พบว่าสารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงรา ที่ ความเข้มข้น 100 μ g มีฤทธิ์ยับยั้งรากล่อโรคพืช *Collectitrichum gloeosporioides* ได้



รูปที่ 4.10 แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งรากล่อโรคพืชของส่วนสกัดหยาบของ ราเอนโดไฟต์ NK9 ความเข้มข้น 100 μ g (รูป ข) เทียบกับ ketokonazole 100 μ g (รูป ก) (positive control)

- หมายเหตุ
- 1: ketokonazole 100 μ g
 - 2: 10% DMSO
 - 3: เมธานอล
 - 4: เอธิลอะซิเตต
 - 5: สารสกัดหยาบเมธานอลจากเส้นใย
 - 6: สารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใย
 - 7: สารสกัดหยาบเมธานอลจากน้ำเลี้ยง
 - 8: สารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยง

จากผลการทดลองได้ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากส่วนน้ำเลี้ยง และเส้นใยราเอนโดไฟต์ NK9 มาลงคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยคาดว่าจะมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ โดยมีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ตัวชะที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน, เฮกเซน-เอธิลอะซีเตต, เอธิลอะซีเตต, เอธิลอะซีเตต-เมธานอล, เมธานอล และเมธานอล-น้ำ ตามลำดับ ได้สารประกอบจากลำดับส่วนทั้งหมด คือ ETBR F5, ETBR F8, ETBR F13, ETBR F17, ETBR F18.4 (ได้จากการลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ) และ ETMY 9 แต่จากการศึกษาในภายหลังทราบว่า สาร ETBR F13, ETBR F17, ETBR F18.4 และ ETMY 9 เป็นสารเดียวกัน ดังนั้นจึงได้สารประกอบทั้งหมด 3 ชนิด คือ ETBR F5, ETBR F8, และ ETMY 9 (ปริมาณมากที่สุด)

4.8 ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากส่วนน้ำเลี้ยงและเส้นใยรา การทำให้บริสุทธิ์ และสมบัติทางเคมีของสารประกอบที่ได้จากราเอนโดไฟต์ NK9

4.8.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากส่วนน้ำเลี้ยง

นำส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากส่วนน้ำเลี้ยงรา น้ำหนัก 8.12 กรัม มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (350 กรัม) โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 เซนติเมตร สูง 80.0 เซนติเมตร และเก็บลำดับส่วนครั้งละ 50 ml ตัวชะที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน, เฮกเซน-เอธิลอะซีเตต, เอธิลอะซีเตต, เอธิลอะซีเตต-เมธานอล, เมธานอล และเมธานอล-น้ำ ตามลำดับ ได้สารผ่านคอลัมน์ทั้งหมด 58.055 %

ตารางที่ 4.7 การแยกส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากส่วนน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NK9

ลำดับส่วนที่ (ก่อน)	ลำดับส่วนที่ (หลัง)	ตัวชะ	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1-16	ETBR 1	100% เฮกเซน	สารใสไม่มีสี	54.6
17-40	ETBR 2	5% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	สารใสไม่มีสี	33.9
41-52	ETBR 3	15% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวสีเหลืองส้ม	768
53-64	ETBR 4	20-25% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวสีเหลือง	49.6
65-70	ETBR 5	30% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ตะกอนขาวในของเหลวสีเหลือง	72.9
71-82	ETBR 6	32-35% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน	18
83-115	ETBR 7	35-50% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวหนืดสีส้ม	273.8

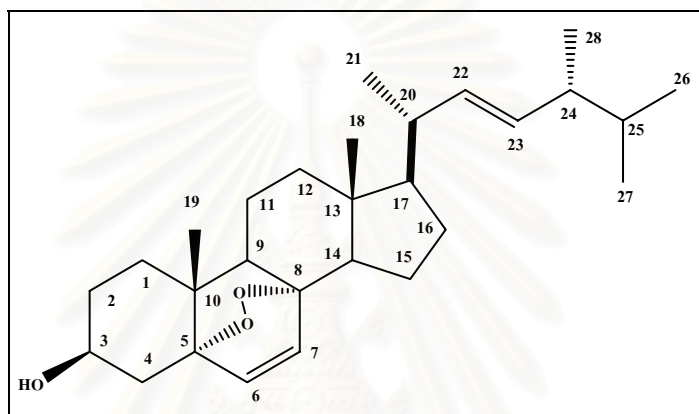
ตารางที่ 4.7 การแยกส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากส่วนน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ NK9 (ต่อ)

ลำดับส่วนที่ (ก่อน)	ลำดับส่วนที่ (หลัง)	ตัวชะ	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
116-124	ETBR 8	50% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ผลึกสีส้มอ่อน	59
125-135	ETBR 9	50% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ตะกอนขาวในของเหลวสี น้ำตาล	91.1
136-151	ETBR 10	55% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวสีน้ำตาล	77.2
152-178	ETBR 11	60% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวสีเหลือง	207.6
179-223	ETBR 12	65% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ตะกอนเหลืองในของเหลวสี เหลือง	234.7
224-319	ETBR 13	70-85% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ตะกอนเหลืองในของเหลวสี เหลือง	105.3
320-325	ETBR 14	85% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ตะกอนเหลืองในของเหลวสี น้ำตาลเข้ม	318.1
326-376	ETBR 15	90-100%เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวสีน้ำตาลแดง	28.3
377-403	ETBR 16	2-7% เมธานอลในเอธิลอะซิเตต	ของเหลวสีน้ำตาล	751.8
404-418	ETBR 17	10-15% เมธานอลในเอธิล อะซิเตต	ตะกอนขาวในของเหลวสี เหลืองอ่อน	345.6
419-436	ETBR 18	15-17% เมธานอลในเอธิล อะซิเตต	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล	627.4
437-477	ETBR 19	17-50% เมธานอลในเอธิล อะซิเตต	ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม	253.9
478-516	ETBR 20	50-100% เมธานอลในเอธิล อะซิเตต	ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม	349.3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8.1.1 การทำสารให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารประกอบ 1

สารประกอบ 1 เป็นผงสีขาวแยกได้จากลำดับส่วนที่ ETBR 5 ของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากส่วนน้ำเลี้ยงรา ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 30% เอธิลอะซิเตตใน เฮกเซน เป็นตัวชะจะได้สารสกัดหยาบมีลักษณะเป็นตะกอนขาวในของเหลวสีเหลือง นำมาล้างน้ำมันสีเหลืองออกด้วยเฮกเซน จะได้ผงสีขาวหนัก 46 มิลลิกรัม (0.975 % yield) (สารประกอบ 1)



รูปที่ 4.10 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 1

$R_f = 0.65$ (50% Hexane ใน CH_2Cl_2)

mp = 182 -183 °C

$V_{\text{max}}(\text{KBR})$: 3424 (br), 2953 (s), 2863 (s), 1703 (m), 1633 (m), 1555 (m), 1450 (m), 1365 (m), 1267 (w), 1225 (w), 1155(w), 1038 (m) และ 960 (m) cm^{-1} ดังตารางที่ 4.7 (รูปที่ 1 ภาคผนวก ค)

ตารางที่ 4.8 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 1

แถบการดูดกลืนแสง	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3424	กว้าง	O-H สั่นแบบยืดของ alcohol
2953, 2863	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ alkane
1633, 1555	ปานกลาง	C=C สั่นแบบยืดของ double bond
1450, 1365	ปานกลาง	C-H สั่นแบบยืดของ alkane
1267, 1225, 1155	ต่ำ	C-O สั่นแบบยืดของ ketone
1038	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืดของ ketone
960	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอนอกระนาบ

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 1 (รูปที่ 2 ภาคผนวก ค) พบว่าสารประกอบนี้มีมวลโมเลกุล $[M+Na]^+$ m/z : 433.1627; cal 433.1627 ทำให้รู้สูตรโมเลกุลของสารประกอบ 1 คือ $C_{28}H_{44}O_3$

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

ที่ตำแหน่งของโปรตอน 6.53, 6.27, 5.25 และ 5.18 ppm แสดงโปรตอนของคาร์บอนที่มีพันธะคู่

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

ที่ตำแหน่งของโปรตอน 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)

ที่ตำแหน่งของโปรตอน 1.03, 1.95, 0.91, 0.87, 0.85 และ 0.84 ppm แสดงโปรตอนของเมทิลคาร์บอน (-CH₃)

จากข้อมูล ¹³C-NMR ของสารประกอบ 1 (รูปที่ 4 ภาคผนวก ค) พบตำแหน่งของคาร์บอนที่สัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_c) 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 (CH-13), 42.79 (CH-24), 39.77 (CH-20), 39.35 (CH-12), 36.98 (CH-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 แสดงถึงคาร์บอนที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งคาร์บอน 82.20, 79.46, 44.58 และ 36.98 ppm แสดงถึงควอเตอร์นารีคาร์บอนที่ตำแหน่งคาร์บอน 56.19, 51.69, 51.08, 42.79, 39.77 และ 33.08 ppm แสดงถึงเทอร์เชียรีคาร์บอน

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

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 20.90, 19.98, 19.67, 18.21, 17.59 และ 12.89 ppm แสดงถึง เมทิลคาร์บอน

ผลการวิเคราะห์ 2D-NMR ของสารประกอบ 1 ประกอบด้วย **g**H₂QC, **g**H₂MBC, **g**COSY, และ **g**NOESY (รูปที่ 5-8 ภาคผนวก ค)

รวมทั้งแสดงผลข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 1 ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.9 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 1

ตำแหน่ง	¹³ C-NMR (δ_c)	¹ H-NMR (δ_H)	g H ₂ MBC	g COSY	g NOESY
1	36.92	2.14 (1H, m), 1.95 (1H, m)	C-2, C-3, C-8, C10 C-3	H-19 -	H-19 -
2	30.10	1.87 (1H, m), 1.58 (1H, m)	C-4 -	- H-3	H-9 -

ตารางที่ 4.9 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 1 (ต่อ)

ตำแหน่ง	¹³ C-NMR (δ_C)	¹ H-NMR (δ_H)	g HMBC	g COSY	g NOESY
3	66.46	4.00 (1H, m)	-	H-2	-
4	34.70	1.98 (1H, m), 1.74 (1H, m)	- -	-	- -
5	79.46	-	-	-	-
6	130.75	6.53 (1H,d, $J=4.8$)	C-5, C-8, C-9	H-7	H-7
7	135.44	6.27 (1H,d, $J=8.4$)	C-5, C-8	H-6	H-6
8	82.20	-	-	-	-
9	51.08	1.53 (1H, m)	C-5, C-7, C-14	-	H-2, H-19
10	36.98	-	-	-	-
11	20.65	1.64 (1H, m), 1.42 (1H, m)	C-9 C-14	- -	- H-14
12	39.35	2.04 (1H, m), 1.28 (1H, m)	C-17 C-9	- -	- -
13	44.58	-	-	-	-
14	51.69	1.60 (1H, m)	C-11, C-13, C15	-	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, C15	H-17 -	H-21, H-18
17	56.19	1.26 (1H, m)	C-13, C15	H-16	H-16
18	12.89	0.85 (3H, s)	C-14, C-17	-	

ตารางที่ 4.9 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 1 (ต่อ)

ตำแหน่ง	¹³ C-NMR (δ_C)	¹ H-NMR (δ_H)	g HMBC	g COSY	g NOESY
19	18.21	0.93 (3H, s)	C-1, C-4, C-8, C-9, C-10	-	H-1, H-9
20	39.77	2.07 (1H, m)	C-17	-	-
21	19.67	0.84 (3H, d, $J=6.0$)	C-13, C-14, C-17, C-20, C-24, C-25, C-26	-	H-16
22	132.3113	5.25 (1H, dd, $J_1=7.6$ และ $J_2=14.8$)	C-20, C-24, C-26	H-23	H-23
23	135.22	5.18 (1H, dd, $J_1=7.6$ และ $J_2=14.8$)	C-20, C-24	H-22, H-24	H-22
24	42.79	1.89 (1H, m)	C-22, C-23	H-23, H-28	H-28
25	33.08	1.52 (1H, m)	C-22, C-24, C-26, C-28	H-26	-
26	19.98	0.87 (3H, d, $J=6.0$)	C-24, C-27	H-25	-
27	20.90	1.03 (3H, d, $J=6.0$)	C-23	-	-
28	17.59	0.95 (3H, d, $J=6.8$)	C-22, C-24, C-25	H-24	H-24

จากการค้นหาข้อมูลงานวิจัยของสารชนิดนี้พบว่าเคยมีรายงานแล้ว จึงได้นำข้อมูลของที่เคยรายงานมาเปรียบเทียบกันดังตาราง ตารางที่ 4.9 ดังนี้

ตารางที่ 4.10 แสดงข้อมูล เปรียบเทียบ $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ 1 กับ Ergosterol Peroxide

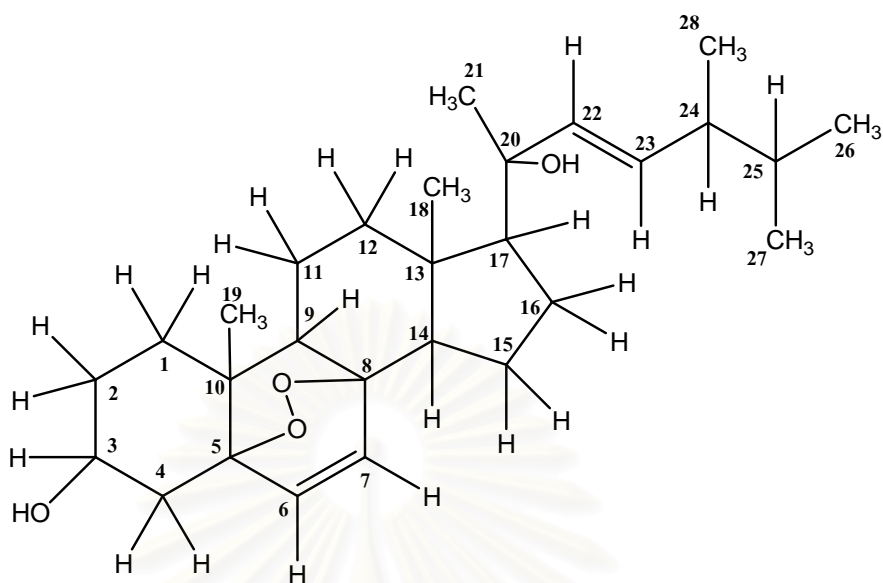
ตำแหน่ง	สารประกอบ 1		Ergosterol Peroxide (Box, 1999)	
	δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (400 MHz)	δ_{C} (50 MHz)	δ_{H} (500 MHz)
1	36.92 (t)	2.14 (m), 1.95 (m)	39.4 (t)	ไม่รายงาน
2	30.10 (t)	1.87 (m), 1.58 (m)	30.1 (t)	ไม่รายงาน
3	66.46 (d)	4.00 (m)	66.3 (d)	3.92 (m)
4	34.70 (t)	1.98 (m), 1.74 (m)	51.2 (t)	ไม่รายงาน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

ตารางที่ 4.10 แสดงข้อมูล เปรียบเทียบ $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ 1 กับ Ergosterol peroxide (ต่อ)

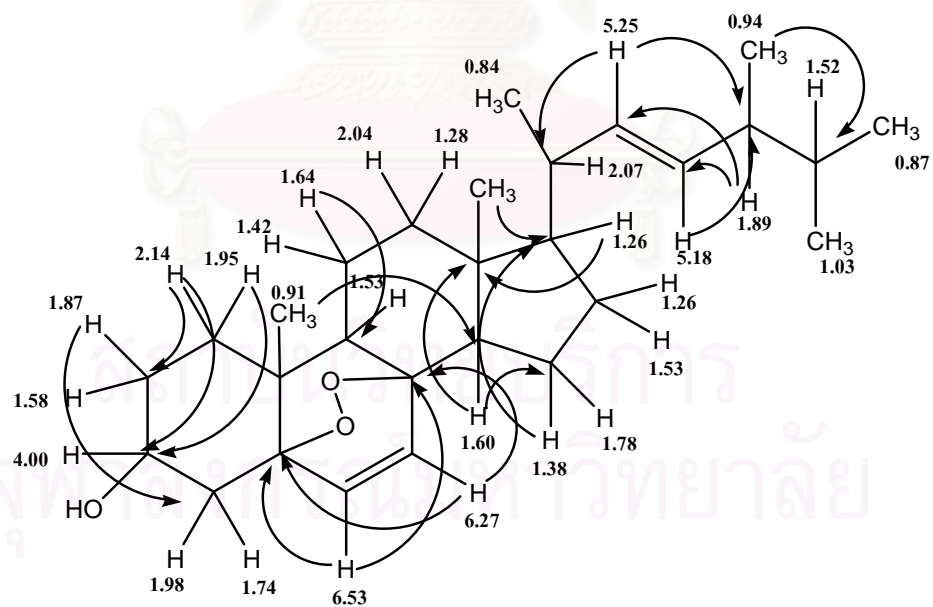
ตำแหน่ง	สารประกอบ 1		Ergosterol peroxide (Box, 1999)	
	δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (400 MHz)	δ_{C} (50 MHz)	δ_{H} (500 MHz)
21	19.67 (q)	0.84 (d, $J=6.0$)	19.6 (q)	1.00 (d, $J=6.49$)
22	132.31 (d)	5.25 (dd, $J_1=7.6$ และ $J_2=14.8$)	132.3 (d)	5.25 (dd, $J_1=7.6$ และ $J_2=15.3$)
23	135.22 (d)	5.18 (dd, $J_1=7.6$ และ $J_2=14.8$)	135.2 (d)	5.14 (dd, $J_1=7.6$ และ $J_2=14.8$)
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)	-

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี และการเปรียบเทียบค่าเคมีคอลชิฟท์ของคาร์บอน-13 และโปรตอนของสารประกอบ 1 กับ Ergosterol peroxide (Box, 1999) พบว่า สารทั้งสองมีค่าเคมีคอลชิฟท์ที่ใกล้เคียงกัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ 1 คือ Ergosterol peroxide ($5\alpha,8\alpha$ -epidioxy-24(R)-methyl-cholesta-6,22-diene-3 β -ol) ซึ่งสารชนิดนี้มีรายงานเคยพบในราและเห็ดหลายชนิด มีโครงสร้างดังรูปที่ รูปที่ 4.10 - 4.14

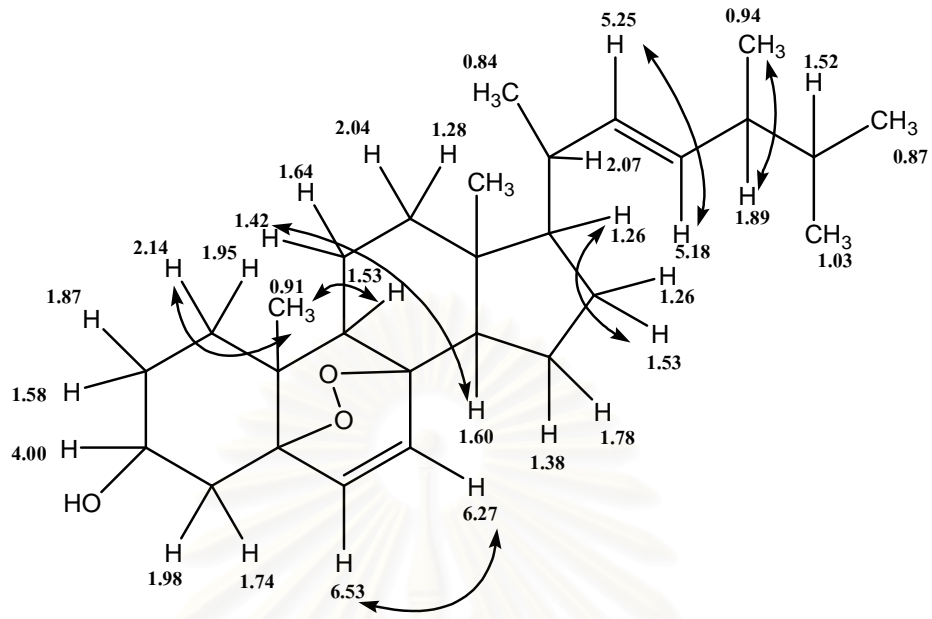
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



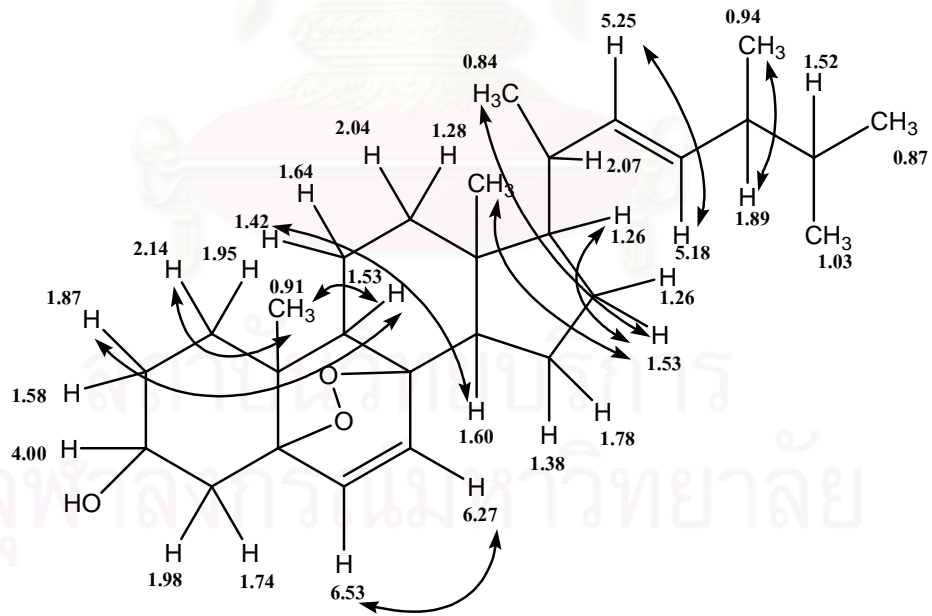
รูปที่ 4.11 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 1



รูปที่ 4.12 gHMBC ของสารประกอบ 1



รูปที่ 4.13 gCOSY ของสารประกอบ 1



รูปที่ 4.14 gNOESY ของสารประกอบ 1

Ergosterol peroxide เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถพบได้ในราและเห็ดหลายชนิด มีการรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารดังกล่าวโดยสกัด และทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ได้แก่

Noelia และคณะสกัดและแยก Ergosterol peroxide จากสารสกัดหยาบเมธานอลของ *Euphorbia lagascae* และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Mycobacterium tuberculosis* ได้ (Noelia และคณะ, 2006)

Box และคณะ สกัดและแยก Ergosterol peroxide จากเชื้อรา *Cordyceps sinensis* และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (K526, Jarkat, HL-60 และ RPMI-8226), เซลล์มะเร็งผิวหนัง (WM-1341) โดยมีค่า IC_{50} 65, 48, 60, 63 และ 49 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (Box และคณะ, 1999)

Nam และคณะ สกัดและแยก Ergosterol peroxide จากเชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (SNU-1), เซลล์มะเร็งตับ (SNU-354) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SNU-C4) โดยมีค่า IC_{50} 1.2, 2.2 4.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (Nam และคณะ, 2001)

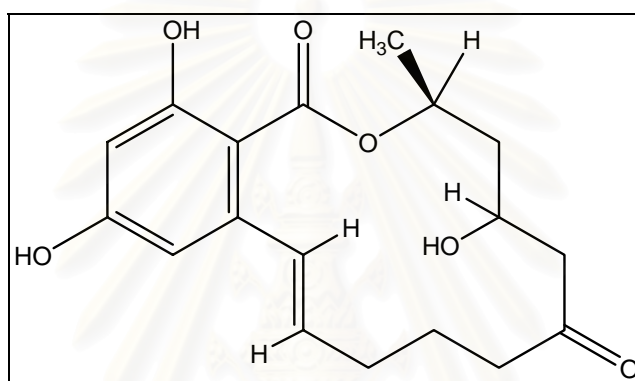
Takei และคณะ สกัดและแยก Ergosterol peroxide จากเห็ด *Sarcodon asparatus* และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60) โดยมีค่า IC_{50} 25 $\mu\text{g/ml}$ (Takei และคณะ, 2005)

Kim และคณะ สกัดและแยก Ergosterol peroxide จากเห็ด *Armillariella mellea* และทดสอบฤทธิ์ต้านการเกิด oxidation พบว่าสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ใน microsome ในตับของหนูได้ดี และยับยั้งการเกิด oxidation ได้ดีกว่าสารที่ใช้ในการต้านการเกิด oxidation คือ α -tocopherol และ thiourea (Kim และคณะ, 1999)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8.1.2 การทำสารให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารประกอบ 2

สารประกอบ 2 เป็นผลึกสีขาวแยกได้จากลำดับส่วนที่ ETBR 8 ของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากส่วนน้ำเลี้ยงรา ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย 50% เอธิลอะซิเตตใน เฮกเซนเป็นตัวชะจะได้สารสกัดหยาบมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง นำมาล้างน้ำมันสีเหลืองออกด้วยเฮกเซน แล้วนำไปตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายเอธิลอะซิเตต-เฮกเซน จะได้ผลึกสีขาวน้ำหนัก 51 มิลลิกรัม (1.082 % yield) ซึ่งสามารถละลายได้ในเอธิลอะซิเตต (สารประกอบ 2)



รูปที่ 4.15 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 2

$$R_f = 0.275 \quad (10\% \text{ EtOAc in Hexane})$$

$$\text{mp} = 176 - 177 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$\text{mp} = 172 - 174 \text{ } ^\circ\text{C} \quad (\text{Bolliger and Tamm, 1972})$$

$$\text{MW} = 334$$

$$[\alpha]_D^{20} = -9 \quad (c = 0.1, \text{Methanol}), -11 \quad (c = 0.1, \text{Chloroform}) \text{ และ } -16 \quad (c = 0.1, \text{Acetone})$$

$$[\alpha]_D^{24} = -53.1 \quad (c = 1,000, \text{Acetone}) \quad (\text{Bolliger and Tamm, 1972})$$

$$\text{Vmax(KBR): } 3361(\text{br}), 2990 (\text{s}), 2925 (\text{s}), 1707 (\text{m}), 1637 (\text{m}), 1252 (\text{m})$$

และ 1018 (m) cm^{-1} ดังตารางที่ 4.10 (รูปที่ 10 ภาคผนวก ค)

ตารางที่ 4.11 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 2

แถบการดูดกลืนแสง	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3361	กว้าง	O-H สั่นแบบยืดของ alcohol
2990	ต่ำ	C-H สั่นแบบยืดของ aromatics
2925	ปานกลาง	C-H สั่นแบบยืดของ alkane
1707	ปานกลาง	C=O สั่นแบบยืดของ ketone
1637	สูง	C=C สั่นแบบยืดของ alkene
1252	สูง	C-C สั่นแบบยืดของ ketone
1018	สูง	C-O สั่นแบบยืดของ alcohol

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 2 (รูปที่ 11 ภาคผนวก ค) พบว่าสารประกอบมีมวลโมเลกุล $[M+Na]^+$ m/z : 357.15 ทำให้รู้สูตรโมเลกุลของสารประกอบ 2 คือ $C_{18}H_{22}O_6$

จากข้อมูล 1H -NMR ของสารประกอบ 2 (รูปที่ 12 ภาคผนวก ค) พบตำแหน่งของโปรตอนที่สำคัญณที่ค่าเคมีคอลลีพท์ (δ_H) (DMSO, 400 MHz): 11.40 (br, s, -OH), 6.73 (1H, d, $J = 15.2$, H-1'), 6.34 (1H, d, $J = 2.4$, H-5), 6.19 (1H, d, $J = 2.4$, H-3), 5.69 (1H, ddd, $J_1 = 14.4$, $J_2 = 8.8$ และ $J_3 = 5.2$, H-2'), 5.15 (1H, dq, $J_1 = 12.4$ และ $J_2 = 6$, H-10'), 4.95 (br, s, -OH), 3.97 (1H, br, s, $J = 10$, -OH), 2.63 (1H, dd, $J_1 = 10.8$, และ $J_2 = 9.2$ H-7'), 2.46 (1H, m, H-5'), 2.39 (1H, m, H-5'), 2.20-2.14 (1H, m, H-3'), 2.17 (1H, dd, $J_1 = 10.8$, และ $J_2 = 4.8$, H-7'), 2.03 (1H, m, H-3'), 1.79 (1H, m, H-4'), 1.63 (1H, dd, $J_1 = 13.2$, และ $J_2 = 12$, H-9'), 1.53 (1H, m, H-4'), 1.48 (1H, dd, $J_1 = 13.6$, และ $J_2 = 10.4$, H-9'), 1.28 (3H, d, $J = 6$, H-12') ppm

ที่ตำแหน่งของโปรตอน 6.73, 6.34, 6.19 และ 5.69 ppm แสดงโปรตอนของคาร์บอนที่มีพันธะคู่

ที่ตำแหน่งของโปรตอน 5.15 และ 3.97 ppm แสดงโปรตอนของเทอร์เชียรีคาร์บอน (-CH)

ที่ตำแหน่งของโปรตอน 2.63, 2.46, 2.39, 2.20-2.14, 2.17, 2.03, 1.79, 1.63, 1.53 และ 1.48 ppm แสดงโปรตอนของเมทิลีนคาร์บอน (-CH₂)

ที่ตำแหน่งของโปรตอน 1.28 ppm แสดงโปรตอนของเมทิลคาร์บอน (-CH₃)

จากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ 2 (รูปที่ 13 ภาคผนวก ค) พบตำแหน่งของคาร์บอนที่สัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_{C}) (DMSO, 100 MHz): 208.87 (C-6'), 170.45 (C-11'), 162.94, (C-2), 162.34, (C-4'), 141.92 (C-6), 132.41 (CH-2'), 132.32 (CH-1'), 107.51 (CH-5), 105.03 (C-1), 102.13 (CH-3), 69.62 (CH-10'), 63.98 (CH-8'), 53.72 (CH₂-7'), 43.21 (CH₂-9'), 39.27 (CH₂-5'), 31.00 (CH₂-3'), 21.30 (CH₂-4') และ 20.85 (CH₃-12') ppm

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 208.87 และ 170.45 ppm แสดงถึงคาร์บอนที่มีพันธะคู่

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 162.94, 162.34, 141.92, 132.41, 132.32, 107.51, 105.03 และ 102.13 ppm แสดงถึงควอเทอร์นารีคาร์บอน (C)

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 69.62 และ 63.98 ppm แสดงถึงเทอร์เชียรีคาร์บอน (-CH)

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 53.72, 43.21, 39.27, 31.00, และ 21.30 ppm แสดงถึง เมทิลีนคาร์บอน (-CH₂)

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 20.85 ppm แสดงถึง เมทิลคาร์บอน (-CH₃)

ผลการวิเคราะห์ 2D-NMR ของสารประกอบ 2 ประกอบด้วย **g**HMQC, **g**HMBC, **g**COSY, และ **g**NOESY (รูปที่ 14-17 ภาคผนวก ค)

รวมทั้งแสดงผลข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 2 ดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 2

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C})	$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H})	g HMBC	g COSY	g NOESY
1	105.03	-	-	-	-
2	162.94	11.4 (br, s)	-	-	-
3	102.13	6.19 (1H, d, $J=2.4$)	C-1, C-2, C-4, C-5	H-5	-
4-OH	162.34	4.95 (br, s)	-	-	-
5	107.51	6.34 (1H, d, $J=2.4$)	C-1, C-3, C-4, C-6	H-3	-
6	141.92	-	-	-	-

ตารางที่ 4.12 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 2 (ต่อ)

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C})	$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H})	g HMBC	g COSY	g NOESY
1'	132.32	6.73 (1H, d, $J=15.2$)	C-1, C-5, C-6, C-3'	-	-
2'	132.41	5.69 (1H,ddd, $J_1=14.2, J_2 =$ 8.8 และ $J_3= 5.2$)	C-6, C-3', C-4'	H-3'	-
3'	31.00	2.03 (1H, m)	C-1', C-2'	H-2'	-
		2.20-2.14 (1H, m)			
4'	21.30	1.53 (1H, m)	-	H-5'	-
		1.79 (1H, m)			
5'	39.27	2.46 (1H, m)	C-3', C-4', C-6'	H-4'	-
		2.39 (1H, m)			
6'	208.87	-	-	-	-
7'	53.72	2.17 (1H,dd, $J_1=10.8$ และ $J_2= 4.8$)	C-5', C-6', C-8',C-9'	H-8'	
		2.63 (1H,dd, $J_1=10.8$ และ $J_2= 9.2$)			
8'-OH	63.98	3.97(1H, br, s, $J=10$)	-	H-7', H-9'	H-12'

ตารางที่ 4.12 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 2 (ต่อ)

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C})	$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H})	$^{\text{g}}\text{HMBC}$	$^{\text{g}}\text{COSY}$	$^{\text{g}}\text{NOESY}$
9'	43.21	1.63 (1H,dd, $J_1=13.2$ และ $J_2= 12$)	C-8',C-10'	H-8', H-10'	H-12'
		1.48 (1H,dd, $J_1=13.6$ และ $J_2= 10.4$)			
10'	69.92	5.15(1H,dq, $J_1=12.4$ และ $J_2= 6$)	C-8',C-11'	H-9'	-
11'	170.45	-	-	-	-
12'	20.85	1.28 (3H, d, $J=6$)	C-9',C-10'	-	H-8', H-9'

จากการค้นหาข้อมูลงานวิจัยของสารชนิดนี้พบว่าเคยมีรายงานแล้ว จึงได้นำข้อมูลของที่เคยรายงานมาเปรียบเทียบกันดังตารางที่ 4.13 ดังนี้

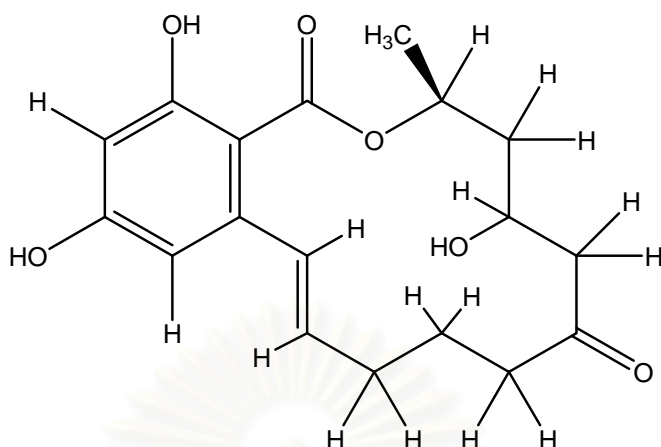
ตารางที่ 4.13 แสดงข้อมูล เปรียบเทียบ $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ 2 กับ 8'-*epi*-hydroxyzearalenone

ตำแหน่ง	สารประกอบ 2		(Bolliger and Tamm, 1972)	
	δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (400 MHz)	δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (100 MHz)
1	105.03	-	ไม่รายงาน	ไม่รายงาน
2-OH	162.94	11.4 (br, s)	ไม่รายงาน	11.90 (s)
3	102.13	6.19 (1H, d, $J=2.4$)	ไม่รายงาน	6.51 (s, $J=2.5$)
4-OH	162.34	4.95 (br, s)	ไม่รายงาน	9.11 (s)
5	107.51	6.34 (1H, d, $J=2.4$)	ไม่รายงาน	6.32 (s, $J=2.5$)
6	141.92	-	ไม่รายงาน	ไม่รายงาน
1'	132.32	6.73 (1H, d, $J=15.2$)	ไม่รายงาน	7.08 (d)
2'	132.41	5.69 (1H, ddd, $J_1=14.2, J_2=8.8$ และ $J_3=5.2$)	ไม่รายงาน	5.86 (m)
3'	31.00	2.03 (1H, m) 2.20-2.14 (1H, m)	ไม่รายงาน	ไม่รายงาน
4'	21.30	1.53 (1H, m) 1.79 (1H, m)	ไม่รายงาน	ไม่รายงาน
5'	39.27	2.46 (1H, m) 2.39 (1H, m)	ไม่รายงาน	ไม่รายงาน
6'	208.87	-	ไม่รายงาน	ไม่รายงาน

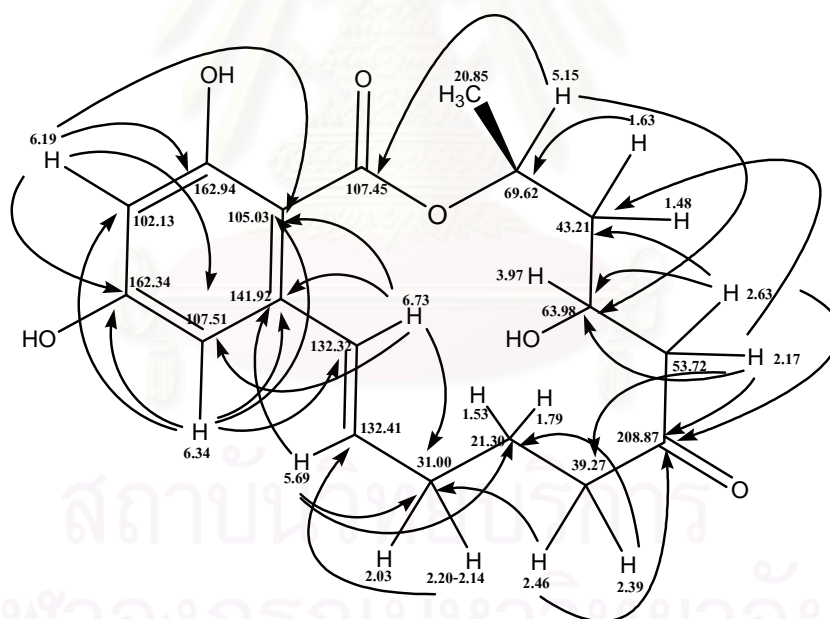
ตารางที่ 4.13 แสดงข้อมูล เปรียบเทียบ $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ 2 กับ 8'-*epi*-hydroxyzearalenone (ต่อ)

ตำแหน่ง	สารประกอบ 2		(Bolliger and Tamm,1972)	
	δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (400 MHz)	δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (100 MHz)
7'	53.72	2.17 (1H,dd, $J_1=10.8$ และ $J_2=$ 4.8)	ไม่รายงาน	3.2 - 2.8 (d)
		2.63 (1H,dd, $J_1=10.8$ และ $J_2=$ 9.2)		
8'-OH	63.98	3.97(1H, br, s, $J=10$)	ไม่รายงาน	3.84 (d, $J=4$)
9'	43.21	1.63 (1H,dd, $J_1=13.2$ และ $J_2= 12$)	ไม่รายงาน	ไม่รายงาน
		1.48 (1H,dd, $J_1=13.6$ และ $J_2=$ 10.4)		
10'	69.92	5.15(1H,dq, $J_1=12.4$ และ $J_2= 6$)		5.60
11'	170.45	-	ไม่รายงาน	ไม่รายงาน
12'	20.85	1.28 (3H, d, $J=6$)	ไม่รายงาน	ไม่รายงาน

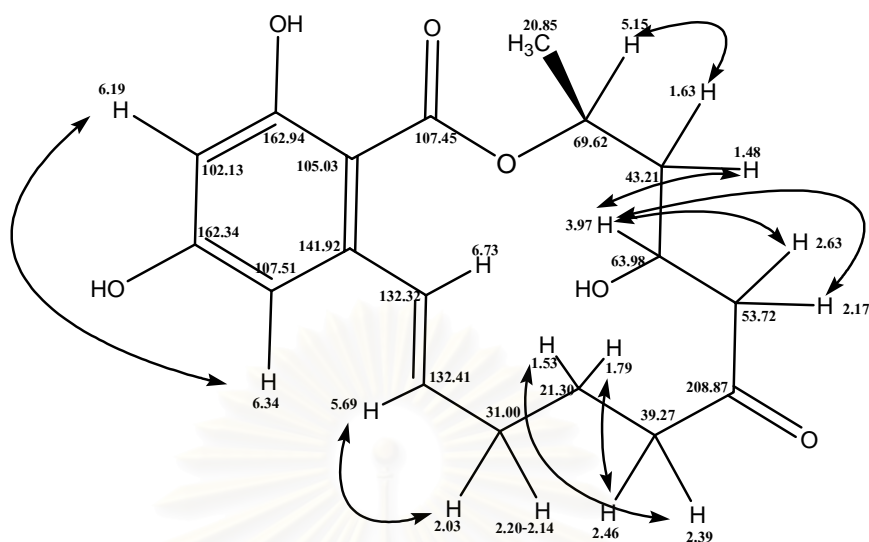
จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี การเปรียบเทียบ ค่าเคมีคอลชิฟท์ของโปรตอนของสารประกอบ 2 กับ 8'-*epi*-hydroxyzearalenone (Bolliger and Tamm,1972) พบว่าสารทั้งสองมีค่าเคมีคอลชิฟท์ใกล้เคียงกัน และจากลักษณะโครงสร้าง และสมบัติทางเคมี ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ 2 คือ 8'-*epi*-hydroxyzearalenone ซึ่งสารชนิดนี้มีรายงานเคยพบในรา *Giberella zeae* มีโครงสร้าง ดังรูปที่ รูปที่ 4.15



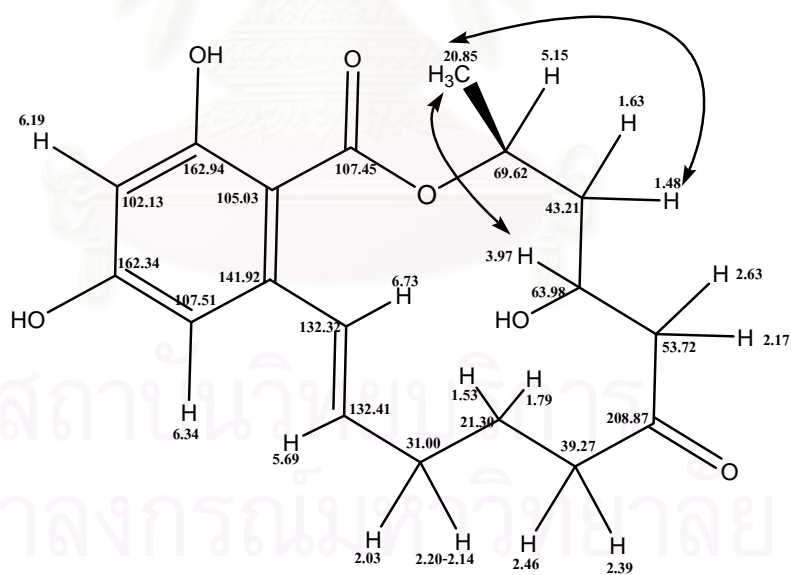
รูปที่ 4.16 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 2



รูปที่ 4.17 gHMBC ของสารประกอบ 2



รูปที่ 4.18 gCOSY ของสารประกอบ 2



รูปที่ 4.19 gNOESY ของสารประกอบ 2

สาร 8'-*epi*-hydroxyzearalenone เป็นสารเมแทบอลิท์ของสาร zearalenone โดยสารชนิดนี้มีรายงานเคยพบในรา *Giberella zeae* (Bolliger and Tamm,1972) ซึ่งพบว่ามึลักษณะและสมบัติทางเคมีคล้ายกันมากกับสาร 8'-hydroxyzearalenone ต่างกันเพียงจุดหลอมเหลว (mp) คือ สาร 8'-*epi*-hydroxyzearalenone มีจุดหลอมเหลว 172-174 °C ขณะที่ สาร 8'-hydroxyzearalenone มีจุดหลอมเหลว 210-212 °C (Bolliger and Tamm,1972) และจากการทดลองพบว่า สาร 8'-*epi*-hydroxyzearalenone เมื่อหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 176-177 °C แล้วทิ้งไว้จนเย็นจะได้สารที่มีผลึกคล้ายเดิม แต่จะมีจุดหลอมเหลวที่สูงขึ้น คือ 203-204 °C จึงมีความเป็นไปได้ที่ความร้อนจะทำให้มีการเปลี่ยนรูปของสารจาก 8'-*epi*-hydroxyzearalenone ไปเป็นสาร 8'-hydroxyzearalenone

4.8.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากเส้นใย

นำส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากเส้นใย 16.13 กรัม มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (370 กรัม) โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 เซนติเมตร สูง 80.0 เซนติเมตร และเก็บสารลำดับส่วนละ 50 ml ตัวชะที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน, เฮกเซน-เอธิลอะซีเตต, เอธิลอะซีเตต, เอธิลอะซีเตต-เมธานอล, เมธานอล และเมธานอล-น้ำ ตามลำดับ ได้สารผ่านคอลัมน์ทั้งหมด 10.646 %

ตารางที่ 4.14 การแยกส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากเส้นใยราเอนโดไฟต์ NK9

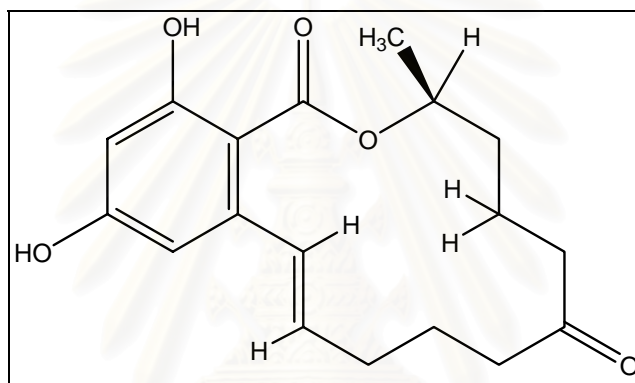
ลำดับส่วนที่ (ก่อน)	ลำดับส่วนที่ (หลัง)	ตัวชะ	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1-31	ETMY 1	100% เฮกเซน - 5% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสไม่มีสี	774.8
32-36	ETMY 2	10% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสไม่มีสี	5,495.8
37-42	ETMY 3	15-20% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีส้มอ่อน	3,901.7
43-46	ETMY 4	20% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีส้มแดง	203.1
47-61	ETMY 5	20-25% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ตะกอนขาวในของเหลวสีเหลืองส้ม	625.8
62-70	ETMY 6	25-30% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ผงสีขาว	501.1
71-78	ETMY 7	30% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวสีเหลืองขุ่น	248.2

ตารางที่ 4.14 การแยกส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากเส้นใยราเอนโดไฟต์ NK9 (ต่อ)

ลำดับส่วนที่ (ก่อน)	ลำดับส่วนที่ (หลัง)	ตัวชะ	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
79-80	ETMY 8	30% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ตะกอนขาว ในของเหลวสีส้ม	13.3
81-96	ETMY 9	30-35% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ของแข็งสีส้มอ่อน	1,892.4
97-115	ETMY 10	35-40% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	สารหนืดสีส้มใส	58.9
116-126	ETMY 11	40-45% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	สารหนืดสีน้ำตาลใส	54.2
127-150	ETMY 12	45-55% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวสีเหลือง	236
151-163	ETMY 13	60-65% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	สารหนืดสีเหลือง	2.2
164-174	ETMY 14	65-70% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ผลึกใสในสารหนืดสีเหลือง	40.1
175-189	ETMY 15	70-75% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ตะกอนขาวในของเหลว สีเหลือง	55.4
190-220	ETMY 16	75-90% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน	ตะกอนขาวในของเหลว สีน้ำตาล	110.6
221-259	ETMY 17	90% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน - 10% เมธานอลในเอธิลอะซีเตต	ผลึกใสในของเหลวสีเหลือง	17.3
260-270	ETMY 18	10-20% เมธานอลใน เอธิลอะซีเตต	สารหนืดสีน้ำตาลอ่อน	171.7
271-286	ETMY 19	20-60% เมธานอลใน เอธิลอะซีเตต	สารหนืดสีน้ำตาล	1,222.9
287-310	ETMY 20	80% เมธานอลใน เอธิลอะซีเตต -100% เมธานอล	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม	1,577.4

4.8.1.3 การทำสารให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารประกอบ 3

สารประกอบ 3 เป็นผลึกสีขาวแยกได้จากลำดับส่วนที่ ETMY 9 ของส่วนสกัดหยาบ เอธิลอะซิเตตจากจากเส้นใยรา ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย 30-35% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซนเป็นตัวชะ จะได้สารสกัดหยาบมีลักษณะเป็นของแข็งสีส้ม นำมาล้างด้วยเฮกเซนแล้วนำไปตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายเอธิลอะซิเตต-เฮกเซน จะได้ผลึกสีขาวหนัก 1,834.4 มิลลิกรัม (11.02 % yield) ซึ่งสามารถละลายได้ในเอธิลอะซิเตต (สารประกอบ 3)



รูปที่ 4.20 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 3

$$R_f = 0.525 \quad (10\% \text{ EtOAc in Hehane})$$

$$\text{mp} = 160-161 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$\text{mp} = 163-164 \text{ } ^\circ\text{C} \quad (\text{Bolliger and Tamm, 1972})$$

$$\text{MW} = 318$$

$$[\alpha]_D^{20} = -141 \quad (c = 0.1, \text{Methanol})$$

$$= -30 \quad (c = 0.1, \text{Chloroform})$$

$$= -11 \quad (c = 0.1, \text{Acetone})$$

$$[\alpha]_{546}^{24} = -173.8 \quad (c = 1,000, \text{MeOH}), \quad (\text{Bolliger and Tamm, 1972})$$

$$\text{Vmax(KBR): } 3353 \text{ (br)}, 2972 \text{ (s)}, 2918 \text{ (s)}, 1692 \text{ (m)}, 1645 \text{ (m)}, 1256 \text{ (m)}$$

และ 839 (m) cm^{-1} ดังตารางที่ 4.7 (รูปที่ 19 ภาคผนวก ค)

ตารางที่ 4.15 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 3

แถบการดูดกลืนแสง	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3353	กว้าง	O-H สั่นแบบยืดของ alcohol
2972	ต่ำ	C-H สั่นแบบยืดของ aromatics
2918	ปานกลาง	C-H สั่นแบบยืดของ alkane
1692	ปานกลาง	C=O สั่นแบบยืดของ ketone
1645	สูง	C=C สั่นแบบยืดของ alkene
1256	สูง	C-C สั่นแบบยืดของ ketone
839	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืดของ alcohol

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 3 (รูปที่ 20 ภาคผนวก ค) พบว่าสารประกอบนี้มีมวลโมเลกุล $[M+Na]^+$ m/z : 341.136 ทำให้รู้สูตรโมเลกุลของสารประกอบ 2 คือ $C_{18}H_{22}O_5$

จากข้อมูล 1H -NMR ของสารประกอบ 3 (รูปที่ 21 ภาคผนวก ค) พบตำแหน่งของโปรตอน ที่ สัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_H) (DMSO, 400 MHz): 12.1 (br, s, -OH), 7.00 (1H, dd, $J_1 = 15.2$ และ $J_2 = 0.8$, H-1'), 6.89 (br, s, -OH), 6.43 (1H, d, $J = 2.4$, H-5), 6.37 (1H, d, $J = 2.4$, H-3), 5.66 (1H, ddd, $J_1 = 14.8$, $J_2 = 10.4$ และ $J_3 = 3.2$, H-2'), 4.98 (1H, dq, $J_1 = 11.6$ และ $J_2 = 6.4$, H-10'), 2.88 (1H, m, H-5'), 2.62 (1H, m, H-7'), 2.35 (1H, m, H-3'), 2.23 (1H, m, H-5'), 2.18 (1H, m, H-3'), 2.14 (1H, m, H-7'), 2.13 (1H, m, H-4'), 1.72-1.80 (2H, m, H-8'), 1.59-1.65 (2H, m, H-9'), 1.49 (1H, m, H-4'), 1.35 (3H, d, $J = 6.4$, H-12') ppm

ที่ตำแหน่งของโปรตอน 7.00, 6.43, 6.37 และ 5.66 ppm แสดงโปรตอนของคาร์บอนที่มีพันธะคู่

ที่ตำแหน่งของโปรตอน 4.89 ppm แสดงโปรตอนของเทอร์เชียรีคาร์บอน (-CH)

ที่ตำแหน่งของโปรตอน 2.88, 2.62, 2.35, 2.23, 2.18, 2.14, 2.13, 1.72-1.80, 1.59-1.65 และ 1.49 ppm แสดงโปรตอนของเมทิลีนคาร์บอน (-CH₂)

ที่ตำแหน่งของโปรตอน 1.35 ppm แสดงโปรตอนของเมทิลคาร์บอน (-CH₃)

จากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ 3 (รูปที่ 22 ภาคผนวก ค) พบตำแหน่งของคาร์บอนที่สัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_{C}) (DMSO, 100 MHz): 212.547 (C-6'), 171.39 (C-11'), 165.30, (C-2), 160.99, (C-4), 143.91 (C-6), 133.24 (CH-1'), 132.32 (CH-2'), 108.65 (CH-5), 103.59 (C-1), 102.45 (CH-3), 73.43 (CH-10'), 42.98 (CH-7'), 36.75 (CH₂-5'), 34.71 (CH₂-9'), 30.99 (CH₂-3'), 20.98 (CH₂-4'), 22.31 (CH₂-8') และ 20.82 (CH₃-12') ppm

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 212.547 และ 171.39 ppm แสดงถึงคาร์บอนที่มีพันธะคู่

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 165.30, 160.99, 143.91 และ 103.59 ppm แสดงถึงควอเทอร์นารีคาร์บอน (C)

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 133.24, 132.32, 108.65, 102.45, 73.43 และ 42.98 ppm แสดงถึงเทอร์เชียรีคาร์บอน (-CH)

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 36.75, 34.71, 30.99, 20.98 และ 22.31 ppm แสดงถึง เมทิลีนคาร์บอน (-CH₂)

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 20.82 ppm แสดงถึง เมทิลคาร์บอน (-CH₃)

ผลการวิเคราะห์ 2D-NMR ของสารประกอบ 3 ประกอบด้วย **g**HMQC, **g**HMBC, **g**COSY, และ **g**NOESY (รูปที่ 23-26 ภาคผนวก ค)

รวมทั้งแสดงผลข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 3 ดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 3

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C})	$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H})	g HMBC	g COSY	g NOESY
1	103.59	-	-	-	-
2-OH	165.30	12.1 (br, s)	C-1, C-3, C-4	-	-
3	102.45	6.37 (1H, d, $J=2.4$)	C-1, C-2, C-5	H-5	-
4-OH	160.99	6.89 (br, s)	C-3, C-5	-	H-5
5	108.65	6.43 (1H, d, $J=2.4$)	C-1, C-3, C-4, C-1'	H-3	H-4- H-1', H-2'
6	143.91	-	-	-	-

ตารางที่ 4.16 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 3 (ต่อ)

ตำแหน่ง	¹³ C-NMR (δ_C)	¹ H-NMR (δ_H)	g HMBC	g COSY	g NOESY
1'	133.24	7.00 (1H,dd, $J_1=15.2$ และ $J_2 = 0.8$)	C-1, C-5, C-6, C-3'	H-2'	H-5, H-2'
2'	132.32	5.66 (1H,ddd, $J_1=14.8, J_2 = 10.4$ และ $J_3= 3.2$)	C-6, C-3', C-4'	H-1'	H-5, H-1'
3'	30.99	2.35 (1H, m) 2.18 (1H, m)	C-2' C-4', C-5'	H-4',H-5'	H-7'
4'	20.98	2.13 (1H, m) 1.49 (1H, m)	C-3', C-6'	H-3',H-5'	H-5
5'	36.75	2.88 (1H, m) 2.23 (1H, m)	C-3', C-4', C-6'	H-3',H-4'	H-4', H-7', H-8'
6'	212.54	-	-	-	-
7'	42.98	2.62 (1H, m) 2.14 (1H, m)	C-6', C-8', C-9'	H-8'	H-3', H-5', H-8'
8'	22.31	1.72-1.80 (2H, m)	C-6',C-7'	H-7',H-9'	H-7'
9'	34.71	1.59-1.65 (2H, m)	C-7' C-8', C-10' C-12'	H-8', H-10' , H-12'	H-12'
10'	73.43	4.98(1H,dq, $J_1=11.6$ และ $J_2 = 6.4$)	C-8', C-9' C-11'	H-9', H-12'	-
11'	171.39	-	-	-	-

ตารางที่ 4.16 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 3 (ต่อ)

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C})	$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H})	g HMBC	g COSY	g NOESY
12'	20.82	1.35 (3H, d, $J=6.4$)	C-9'	H-9', H-10'	H-9'

จากการค้นหาข้อมูลงานวิจัยของสารชนิดนี้พบว่าเคยมีรายงานแล้ว จึงได้นำข้อมูลของที่เคยรายงานมาเปรียบเทียบกันดังตารางที่ 4.1 ดังนี้

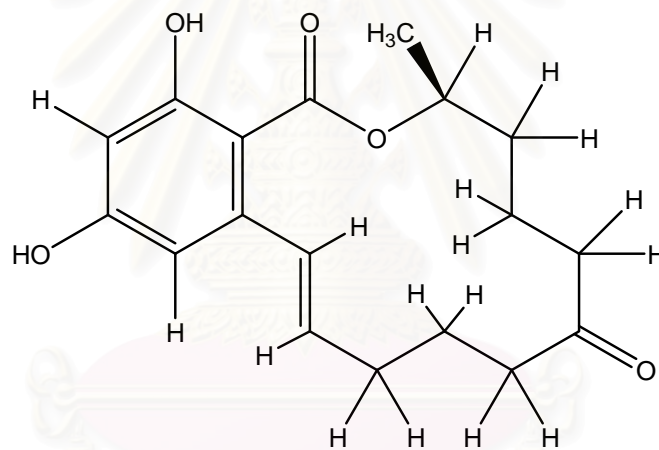
ตารางที่ 4.17 แสดงข้อมูล เปรียบเทียบ $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ 3 กับ zearalenone

ตำแหน่ง	สารประกอบ 3		(S.H. El-Sharkawy,1987)	
	δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (400 MHz)	δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (300 MHz)
1	103.59	-	103.90	ไม่รายงาน
2-OH	165.30	12.1 (br, s)	165.46	ไม่รายงาน
3	102.45	6.37 (1H, d, $J=2.4$)	102.96	6.44 (1H, d, $J=2.5$)
4-OH	160.99	6.89 (br, s)	160.05	5.01
5	108.65	6.43 (1H, d, $J=2.4$)	108.96	6.40 (1H, d, $J=2.5$)
6	143.91	-	144.05	ไม่รายงาน
1'	133.24	7.00 (1H,dd, $J_1=15.2$ และ $J_2 =$ 0.8)	133.10	7.01 (1H, d, $J=14$)
2'	132.32	5.66 (1H,ddd, $J_1=14.8$, $J_2 = 10.4$ และ $J_3= 3.2$)	132.54	5.88(1H, m, $J=15.5$)

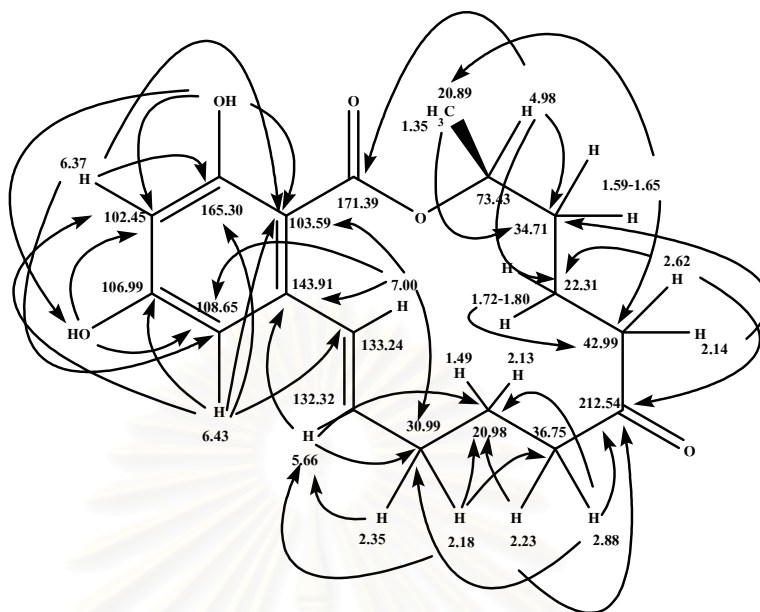
ตารางที่ 4.17 แสดงข้อมูล เปรียบเทียบ $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ 3 กับ zearalenone (ต่อ)

ตำแหน่ง	สารประกอบ 3		(S.H. El-Sharkawy,1987)	
	δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (400 MHz)	δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (300 MHz)
3'	30.99	2.35 (1H, m)	31.08	2.10 (2H, m)
		2.18 (1H, m)		
4'	20.98	2.13 (1H, m)	22.39	1.81(2H, m)
		1.49 (1H, m)		
5'	36.75	2.88 (1H, m)	36.76	2.50 (2H, m)
		2.23 (1H, m)		
6'	212.54	-	211.82	ไม่รายงาน
7'	42.98	2.62 (1H, m)	43.03	2.60 (2H, m)
		2.14 (1H, m)		
8'	22.31	1.72-1.80 (2H, m)	21.09	1.67 (2H, m)
9'	34.71	1.59-1.65 (2H, m)	34.79	ไม่รายงาน
10'	73.43	4.98(1H,dq, $J_1=11.6$ และ $J_2 = 6.4$)	74.55	5.01 (1H, m)
11'	171.39	-	171.37	ไม่รายงาน
12'	20.82	1.35 (3H, d, $J=6.4$)	21.07	1.36 (3H, d)

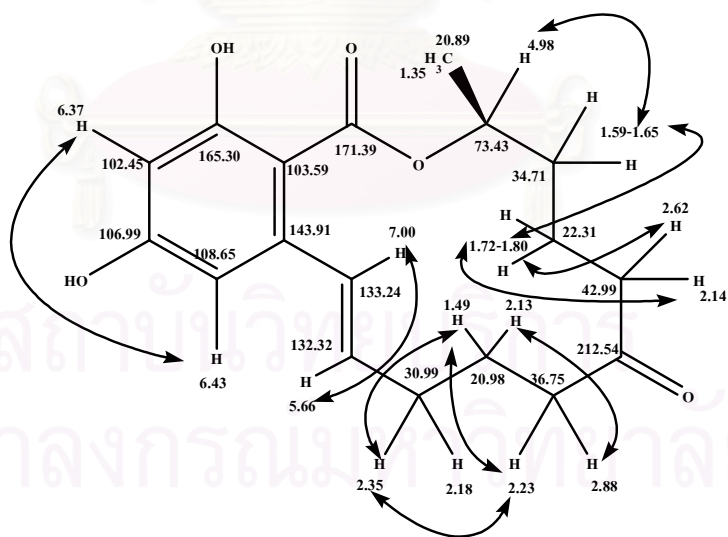
จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี การเปรียบเทียบ ค่าเคมีคอลชิฟท์ของโปรตอนของสารประกอบ 3 กับ zearalenone (S.H. El-Sharkawy, 1987) พบว่า สารทั้งสองมีค่า เคมีคอลชิฟท์ใกล้เคียงกัน และจากลักษณะโครงสร้าง และสมบัติทางเคมี ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ 3 คือ zearalenone ซึ่งสารชนิดนี้มีรายงานเคยพบในรา *Fusarium equiseti*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. semitectum*, *F. moniliforme*, (Bresler, 1994), *Giberella zeae* (Bolliger and Tamm, 1972) มีโครงสร้างดังรูปที่ รูปที่ 4.20



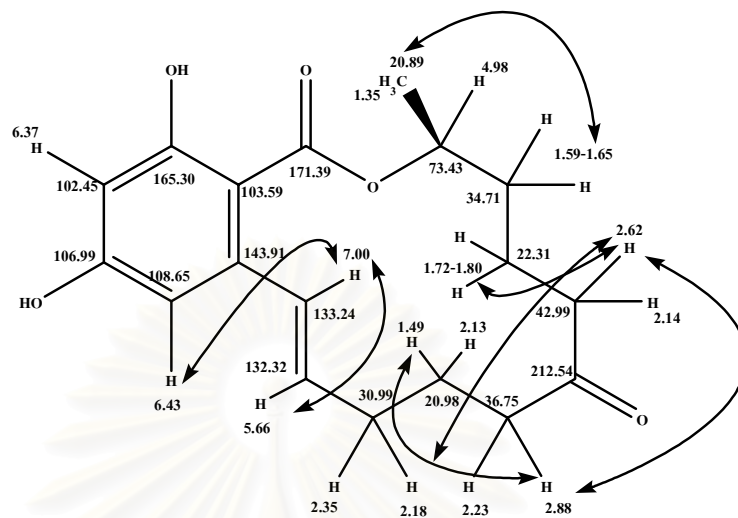
รูปที่ 4.21 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 3



รูปที่ 4.22 gHMBC ของสารประกอบ 3



รูปที่ 4.23 gCOSY ของสารประกอบ 3



รูปที่ 4.24 gNOESY ของสารประกอบ 3

สาร zearalenone เป็นสารที่สร้างขึ้นโดยราหลายชนิดในกลุ่ม *Fusarium* เช่น *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. semitectum*, *F. moniliforme*, (G. Bresler, 1994), หรือ *Giberella zeae* (Bolliger and Tamm, 1972) zearalenone เป็นสารที่ทนความร้อนและมักพบในธัญพืชต่างๆ ที่มีการปนเปื้อนจากรากลุ่มนี้ เช่นข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต (Kuiper-Goodman et al., 1987; Tanaka et al., 1988) และสามารถพบในน้ำนมได้ถ้าโคได้รับสารเข้าไปในปริมาณมาก (ให้โดยการกิน zearalenone 6000 mg ซึ่งเทียบเท่ากับ 12 mg/kg ของโค) หรือพบได้ในเป็ยร์ที่มีขั้นตอนการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า zearalenone เป็นสารที่ออกฤทธิ์ทำให้เกิดความผิดปกติของระบบฮอร์โมนในร่างกาย เพราะเป็นสารพิษที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (hyperestrogenism) โดยพบว่าสามารถชักนำให้เซลล์สืบพันธุ์ของหนูเพศผู้ตายได้ (Kim, 2002) หรือเกิดการบวมโตของอวัยวะสืบพันธุ์และมีความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ เช่น สูกรรที่ผสมพบว่ากลับสัดมากขึ้น, ขนาดครอกลดลง, แท้ง เป็นต้น (Friend et al, 1990) แต่เมื่อให้โดยการกินทั้งในหนู กระต่าย และ คนพบว่าไม่สามารถวัดการดูดซึมได้โดยตรง เนื่องจากร่างกายจะมีการขับออกมาโดยระบบต่างๆ (Kuiper-Goodman et al., 1987).

สาร zearalenone สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลง (Biotransform) ไปเป็นสารเมแทบอลิท์ ซึ่งได้แก่ alpha- และ beta-zearalenol โดยจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Aspergillus niger* ATCC 11394Y, *Streptomyces griseus* ATCC 13273, *Streptomyces rutgersensis* NRRL B1256 (El-Sharkawy,1987)

4.9 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารที่ได้จากแต่ละลำดับส่วน

นำสารที่ได้จากแต่ละลำดับส่วนมาทดสอบฤทธิ์โดยใช้วิธี Disk Diffusion Method โดยใช้สารปริมาณ 100 µg/disc ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ ได้ผลดังนี้คือ

ตาราง 4.18 แสดงค่าการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารที่ได้จากแต่ละลำดับส่วน

ลำดับส่วนที่	วงใส (มม.) ที่มีต่อเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i>
ETBR 13	12
ETBR 15	12
ETBR 16	13
ETBR 17	11
ETBR 18	10

หมายเหตุ ที่ลำดับส่วนอื่นๆไม่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบ

จากการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากแต่ละลำดับส่วนของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากน้ำเลี้ยงมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์เพียงบาง ลำดับส่วน คือ ETBR 13, ETBR 15, ETBR 16, ETBR 17 และ ETBR 18 ส่วนลำดับส่วนของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากเส้นใยไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์

4.10 การทดสอบฤทธิ์โดยใช้วิธี The Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบที่แยกได้ด้วยวิธี The Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) (Jorgensen, J.H.,1999) ซึ่งเป็นการหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้โดยใช้ Microtiter Plate Broth Dilution

Technique โดยใช้ streptomycin และ chloramphenicol เป็นสารชุดควบคุมบวกสำหรับแบคทีเรีย และ ketoconazole สำหรับยีสต์ ได้ผลการทดสอบดังตาราง 4.19

ตาราง 4.19 แสดงค่า MIC ของสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

สาร	ค่า MIC ของสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ [(µg/ml) / (µM)]				
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>C. albican</i> ATCC 10231
ergosterol Peroxide (1)	7.81(23.84)	-	31.25(95.27)	-	62.5(190.55)
8'- <i>epi</i> - hydroxyzearalenone (2)	7.81(23.28)	7.81(23.28)	15.62(46.76)	-	-
zearalenone (3)	1.95(6.13)	7.81(24.56)	7.81(24.56)	-	-
streptomycin	0.48(0.83)	0.48(0.83)	0.48(0.83)	0.48(0.83)	-
chloramphenicol	0.48(1.49)	0.48(1.49)	0.48(1.49)	0.48(1.49)	-
ketoconazole	-	-	-	-	50(18.82)

หมายเหตุ (-) หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 125 µg/ml

จากตารางที่ 4.19 จะเห็นว่าสาร zearalenone (3) มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด คือสามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ที่ค่า MIC 1.95 µg/ml (6.13 µM) , 7.81 µg/ml (24.56 µM) และ 7.81 µg/ml(24.56 µM) ตามลำดับ สาร 8'-*epi*-hydroxyzearalenone (2) มีฤทธิ์ยับยั้งรองลงมา คือสามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ที่ค่า MIC 7.81 µg/ml (23.28 µM) , 7.81 µg/ml(23.28 µM) และ 15.62 µg/ml(46.76) ตามลำดับและ ergosterol Peroxide (1) มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 และ *C. albican* ATCC 10231 ได้ที่ค่า MIC 7.81 µg/ml (23.84 µM) , 31.25 µg/ml(95.27 µM) และ 62.5 µg/ml (190.55 µM) ตามลำดับ

4.11 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้ ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งตับ(HEP-G2), เซลล์มะเร็งปอด(CHAGO), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่(SW 620), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร(KATO-III) และ เซลล์มะเร็งเต้านม(BT 474) ได้ผลดังตาราง 4.20

ตารางที่ 4.20 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง 1

สาร	IC ₅₀ (µg/ml)				
	BT 474	Chaco	Hep-G2	KATO-III	SW 620
8'-epi-hydroxyzearalenone (2)	>10	>10	0.05	4.94	>10
zearalenone (3)	0.1	5.89	0.001	0.01	4.74
doxorubicine	0.93	0.62	0.49	0.72	0.86

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งพบว่าสาร 8'-epi-hydroxyzearalenone (2) สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ(HEP-G2) ได้ดีกว่า doxorubicine ที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวก 9.8 เท่า โดยมีค่า IC₅₀ 0.05 µg/ml และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร(KATO-III) โดยมีค่า IC₅₀ 4.94 µg/ml ส่วนสาร zearalenone (3) สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม(BT 474) ,เซลล์มะเร็งตับ(HEP-G2) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร(KATO-III) ได้ดีกว่า doxorubicine 9.3, 490 และ 72 เท่า ตามลำดับ โดยมีค่า IC₅₀ 0.1 µg/ml , 0.001 µg/ml และ 0.02 µg/ml ตามลำดับ และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด(CHAGO) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่(SW 620) ได้

และจากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง จากสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ซึ่งได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 10 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี(Hucca-1), เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก(KB), เซลล์มะเร็งปากมดลูก(HeLa), เซลล์มะเร็งเต้านม: Hormone independent(MDA-MB 231), เซลล์มะเร็งเต้านม: Hormone dependent(T47D), เซลล์มะเร็งปอด(A549), เซลล์มะเร็งปอด: Multidrug resistance (H69AR), เซลล์มะเร็งตับ: Hepatoblastoma carcinoma(HepG2) ,

เซลล์มะเร็งตับ: Hepatocellular carcinoma (S102), Mouse lymphoid neoplasm (P388) และ Human promyelocytic leukemia cell (HL-60) ได้ผลดังตาราง 4.21



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.21 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง 2

สาร	IC ₅₀ (µg/ml)										
	HuCCA-1	KB	HeLA	MDA-MB 231	T47D	H69AR	HepG2	A549	S102	HL-60	P388
8'- <i>epi</i> -hydroxyzearalenone (2)	20.0	3.5	4.0	8.0	3.2	14.0	15.0	33.0	28.5	14.78	4.81
zearalenone (3)	23.0	3.5	3.7	16.0	4.0	18.0	14.5	30.5	30.0	13.76	4.45
etoposide	5.0	0.5	0.4	0.2	0.05	35.0	12.0	32.0	>50	0.99	0.10

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง จากสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ซึ่งได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 10 ชนิด พบว่าทั้ง สาร 8'-*epi*-hydroxyzearalenone (2) และ zearalenone (3) สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด: Multidrug resistance (H69AR), และ เซลล์มะเร็งตับ: Hepatocellular carcinoma (S102) ได้ และสาร zearalenone สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด(A549) ได้ดีกว่า etoposide ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม

4.12 การทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

การทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน มีการวิเคราะห์หลายวิธี คือ Diphenyl-pioryl-hydrazyl (DPPH) Assay, HL-60 Antioxidant by Reduction of Cytochrome C, Scavenging of Superoxide Anion by Reduction of XTT และ Microplate-Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay (MORAC) โดยผลการทดสอบแสดงดังตาราง

ตารางที่ 4.22 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

สาร	Assay / IC ₅₀ (µM)				
	DPPH	HL-60 Antiox	XXO	IXO	ORAC (unit)**
8'- <i>epi</i> - hydroxyzearalenone (2)	>250 (3%)	toxic	>500 (7%)	116.6 µM	6.9
zearalenone (3)	>250 (2%)	toxic	>500 (6%)	109.0 µM	6.2

**ORAC unit เป็นค่าคำนวณของสารตัวอย่าง 1µM, final conc.เทียบกับ 1 µM Trolox (water soluble analog of vitamin E).

จากการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันพบว่า สาร 8'-*epi*-hydroxyzearalenone และ zearalenone ไม่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบด้วยวิธี Diphenyl-pioryl-hydrazyl (DPPH) Assay, HL-60 Antioxidant by Reduction of Cytochrome C, Scavenging of Superoxide Anion by Reduction of XTT (XXO) และสามารถต้านออกซิเดชันได้เพียงเล็กน้อยเมื่อทดสอบด้วยวิธี Inhibition of Xanthine Oxidase (IXO) และ Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay (ORAC)

4.13 การทดสอบความสามารถในการต้านการอักเสบ

การทดสอบความสามารถในการต้านการอักเสบ คือ Lipoxygenase Inhibition Assay (LOX) โดยผลการทดสอบแสดงดังตาราง

ตารางที่ 4.23 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ

สาร	Assay / IC ₅₀ (μM)
	LOX
8'- <i>epi</i> -hydroxyzearalenone (2)	>100 (0%)
zearalenone (3)	>100 (3%)

จากการทดสอบความสามารถในการต้านการอักเสบพบว่า สาร 8'-*epi*-hydroxyzearalenone และ zearalenone ไม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเมื่อทดสอบด้วยวิธี Lipoxygenase Inhibition Assay (LOX)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาหาสารปฏิชีวนะจากราเอนโดไฟต์ที่แยกจากเหง้าขมิ้นชัน สามารถแยกราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจากทั้งหมด 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ มหาสารคาม ร้อยเอ็ด อุดรธานี ชลบุรี ราชบุรี และนครศรีธรรมราช ได้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 47 ไอโซเลต ในจำนวนนี้ราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 14 ไอโซเลต ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ 5 ชนิด คือ Corn Meal Agar (CMA), Malts Extract Agar (MEA), Sabouraud' Dextrose Agar (SDA), Potato Dextrose Agar (PDA) และ Yeast Extract Sucrose Agar (YEA) มีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยราเอนโดไฟต์ไอโซเลต NK9 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดโดยเฉพาะในอาหาร MEA คือ สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923 และ *C. albican* ATCC 10231 โดยมีขนาดวงใส 20, 16 และ 24 มิลลิเมตร ตามลำดับ

เมื่อนำราเอนโดไฟต์ NK9 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน 5 ชนิด พบว่ามีลักษณะการเจริญแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหาร เช่น ลักษณะโคโลนี สีและความหนาของเส้นใย การสร้างสปอร์ รังควัตถุที่ราสร้างขึ้น และอัตราการเจริญเติบโต จากนั้นนำราเอนโดไฟต์ NK9 มาทำ slide culture เทคนิค พบสปอร์ของรามีลักษณะยาวเรียวปลายโค้งคล้ายรูปเคียว และจากการพิสูจน์ทางอนุชีววิทยา บริเวณ ITS1 ITS2 และ 5.8S rRNA พบว่าราเอนโดไฟต์ NK9 มีความคล้ายคลึงกับรา *Fusarium equiseti* 99% โดยผลสอดคล้องกับผลทางสัณฐานวิทยา

จากนั้นจึงนำราเอนโดไฟต์ NK9 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB ซึ่งพบว่าในวันที่ 31 ราเอนโดไฟต์ NK9 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้มากที่สุด นำมาแยกสารที่มีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และตกผลึกได้สาร 3 ชนิด คือ 8'-*epi*-hydroxyzearalenone, zearalenone และ ergosterol peroxide โดยสารทั้ง 3 ชนิด ได้มาจากสารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากส่วนน้ำเลี้ยงและเส้นใยรา

นำสารประกอบที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบที่แยกได้ด้วยวิธี The Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ คือ zearalenone มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด คือสามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ที่ค่า MIC 1.95 µg/ml,

7.81 $\mu\text{g/ml}$ และ 7.81 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สาร 8'-*epi*-hydroxyzearalenone มีฤทธิ์ยับยั้งร่งลงมา คือสามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 S., *aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ที่ค่า MIC 7.81 $\mu\text{g/ml}$, 7.81 $\mu\text{g/ml}$ และ 15.62 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับและ ergosterol peroxide มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 และ *C. albican* ATCC 10231 ได้ที่ค่า MIC 7.81 $\mu\text{g/m}$, 31.25 $\mu\text{g/m}$ และ 62.5 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

และจากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้ พบว่าสาร 8'-*epi*-hydroxyzearalenone สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ(HEP-G2) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) ได้โดยมีค่า IC_{50} 0.05 $\mu\text{g/ml}$ และ 4.94 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วนสาร zearalenone สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม(BT 474) เซลล์มะเร็งตับ(HEP-G2) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) เซลล์มะเร็งปอด(CHAGO) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่(SW 620)ได้โดยมีค่า IC_{50} 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.001 $\mu\text{g/ml}$ 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 5.89 $\mu\text{g/ml}$ และ 4.78 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ของสาร zearalenone และ สาร 8'-*epi*-hydroxyzearalenone พบว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ xanthine oxidase (IXO) ได้โดยมีค่า IC_{50} 109.0 μM สำหรับสาร zearalenone และ 116.6 μM สำหรับสาร 8'-*epi*-hydroxyzearalenone และมีความสามารถในการต้าน $\text{ROO}\cdot$ (Oxygen radical absorbance capacity: ORAC) 6.2 unit สำหรับสาร zearalenone และ 6.9 unit สำหรับสาร 8'-*epi*-hydroxyzearalenone

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

อรัญญา มโนสร้อย และจิรเดช มโนสร้อย. น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากสมุนไพรวไทย การ
ใช้ทางยาและเครื่องสำอาง. จำนวน 100 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่:
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2548.

รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล. สมุนไพรวไทย : ยาไทยที่ควรรู้. กรุงเทพฯ. 2544.

นิรนาม. สถาบันการแพทย์แผนไทย[online]. จาก:

http://ittm.dtam.moph.go.th/product_champion/herb7.htm [20 พ.ค. 2548]

นิรนาม. ขมิ้น[online]. จาก: <http://medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/curcuma.html> [11
มิ.ย. 2548]

ภาษาอังกฤษ

Bell, G. D., et al. Terpene therapy for gallstone Effects of individual terpenes on bile
flow, bile composition and hepatic cholesterogenesis in the rat. Brit J.
Pharmacol. 1981 : 104-106.

Blankenship, J. D., Spiering, M. J., Wilkinson, H. H., Fannin, F. F., Bush, L. P., and
Schardl, C. L. Production of loline alkaloids by the grass endophyte,
Neotyphodium uncinatum, in defined media. Phytochemistry. 2001 : 395-401.

Bolliger, G. and Tamm, Ch. Vier neue metabolite von *Gibberella zeae* : 5-Formyl-
zearalenon, 7'-Dehydro zearalenon, 8'-Hydroxy- and 8'-epi-Hydroxyzearalenon.
Helv. Chem. Act. 1972 : 3030-3048.

Box, J. W., Lermer, L., Chinton, J., Hans. G. K. and Ower, G. H. Antitumor sterols from
the mycelia of *Codyceps sinensis*. Phytochemistry. 1999 : 591-598.

Brady, S. F., and Clardy, J. CR377, a new pentaketyde antifungal agent isolated from an
endophytic fungus. J. Nat. Prod. 2000 : 1447-1448.

Bush, L. P., Wilkiinson, H. H. and Schardl, C. L. Bioprospective alkaloids of grass-fungal
endophytes symbiosis. Plant Physiol. 1997 : 1-7.

- Cohly, H. H., Taylor, A., Angel, M. F. and Salahudeen, A. K. Effect of tumeric, tumerin and curcumin on H₂O₂-induced renal epithelial (LLC-PK1) cell injury. Free Radical Biology and Medicine 1998 : 49-54.
- Conkova, E., Laciakova, A., Kovac, G. and Seidel, H. Fusarial toxins and their role in animal diseases. The Veterinary Journal. 2003 : 214-220.
- Dariusz, P., Malinowski, and David P. Adaptations of Endophyte-Infected Cool-Season Grasses to Environmental Stresses : Mechanisms of Drought and Mineral Stress Tolerance. Crop Sci. 2000: 923-940.
- Daisy, H., Strobel, G. A., Castillo, U., Ezra, D., Sears, J., Weaver, D., and Runyon, J. B. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. Microbiol. 2000 : 3737-3741.
- Damrihanunt, K., Poonsupaya, M., Pithyanukul, P., Wuthiudomlert, M. and Krisanabhun W. Curcuma cream. Special Project for the degree of B. Sc. Faculty of Pharmacy Mahidol University, 1990.
- El-Sharkawy, S. H. and Abul-Hajj, Y. J. Microbial transformation of zearalenone. Reduction, Hydroxylation, and Methylation products. J. Org. Chem. 1987 : 515-519.
- Goto, M., Noguchi, T., Watanaba, T., Ishikawa, I., Komatsu, M. and Aramaki, Y. Studies on uterus contracting ingredients on plants. Takeda Kenksusho Nempo 1957 : 21-27.
- Gou, B., Dai, J., Ng, S., Huang, Y., Leong, D. C., Ong, W., and Carte, B. K. Cytonic acid A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. J. Nat. Prod. 2000 : 602-604.
- Hawksworth, D. L. The fungal dimension of diversity : magnitude, significance and conservation. Myco. Res. 1991 : 641-655.
- Jentzsch K, Gonda T, Holler H. Paper chromatography and pharmacological action of the pigments of *Curcuma*. Pharm. Acta. Helv. 1959 : 195-199.
- Kim, I. H., Son, H. Y., Cho, S. W., Ha, C. S. and Kang, B. H. zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. Toxicol. Lett. 2003 : 185-192.

- Kim, S. W., Park, S. S., Min, J. and Yu, K. H. Antioxidant activities of ergosterol peroxide (5,8-epidioxy -5 α ,8 α - ergosta-6, 22E-diene-3 β -ol) in *Armillariella mellea*. Bull. Korean Chem. Soc. 1999 : 819-823.
- Kobori, M., Yochida, M., Kameyama, M. O. and Takei, T. and Shinmoto, H. 5 α ,8 α - epidioxy-22E-ergosta-6,9(11),22-trien-3 β -ol from an edible mushroom suppresses Growth of HL60 Leukemia and HT29 Colon Adenocarcinoma cells. Biol Pharm. Bull. 2006 : 755-759.
- Kumar, G. S., Shetty, A. K., Sambaiah, K. and Salimath, P. V. Antidiabetic property of fenugreek seed mucilage and spent tumeric in streptozotocin - induced diabetic rats. Nu. Res. 2005 : 1021-1028.
- Lee, J., Lobkovsky, E., Pliam, N. B., Strobel, G. A., and Clardy, J. Subglutinol A and B: Immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. J. Org. Chem. 1995 : 7076-7077.
- Lee, J., Strobel, G. A., Lobkovsky, E., and Clardy, J. Torreyanic acid : A selective cytotoxic quinine dimmer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* J. Org. Chem. 1996 : 3232-3233.
- Lui, C. H., Zou, W. X., Lu, H. and Tan, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. J. Biotech. 2001 : 277-282.
- Lu, H., Zou, W. X., Meng, J. C., Hu, J. and Tan, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. Plant science. 2000 : 67-73.
- Munday-Finch, S. C., Wilkins, A. L., and Miles, C. O. Isolation of Lolicine A, Lolicine B, Lolitriol and Lolitrem N from *Lolium perenne* infected in *Neotyphodium lolii* and evidence for the natural occurrence of 31-Epilolitremin N and 31-Epilolitremin F. J. Agric. Food Chem. 1998 : 590.
- 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.
- Noble, H. M., Langley, D., Sidebottom, P. J., Lane, S. J. and Fisher, P. J. Anechinocandin from an endophytic *Cryptosporiopsis* sp. And *Pezicula* sp. In *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. Mycol. Res. 1991 :1439-1440.

- Palangpol Kongsaree., Samran Prabpai., nongluksna Sriubolmas., Chanika Vongvein., and Suthep Wiyakrutta. Antimalarial Dihydroisocoumarins Produced by *Geotrichum* sp., an Endophytic Fungus of *Crassocephalum crepidioides*. J. Nat. Prod. 2003 : 709-711.
- Permpiphat, U., Kieatyingsulee, N., Anulakanapakorn, K., Jirajariyavech, W., Kittisiripornkul, S. and Juthaputhi U. Pharmacological study of *Curcuma longa*. Symposium of the Department of Medicinal Science, Bangkok Thailand. 1990.
- Petrini, O., Andrews, J. H., and Hirano, S. S. Fungal endophyte of tree leaves. Microbiol Ecol. of leaves. 1991 : 179-187.
- Petrini, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissue. In Fokkema, N. J., Van den Huvel, J. Microbiology of the phyllosphere. Cambridge: Cambridge Unipress, 1986.
- Rafatullah, S., Tariq, M., Al-Yahya, M. A., Mossa, J. S. and Ageel, A. M. Evaluation of turmeric (*Curcuma Longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. J Ethnopharmacol 1999 : 25-34.
- Ramaprasad, C. and Sirsi, M. Indian medicinal plants *Curcuma longa*- Effect of curcumin and the essential oil of *C. longa* on bile secretion. J. Sci. Ind. Res. 1956 : 262-5.
- Ramaprasad, C., Sirsi, M. *Curcuma longa* and bile secretion ; quantitative changes in the bile constituents induced by sodium curcumin. Ibid. 1957 : 108-110.
- Reddy, A. C. and Lokesh, B. R. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. Molec. and Cell. Biochem. 1992 : 117-124.
- Rumpel W. Zur pharmakologie des divanillal cyclohexanon (DVC). Arch. Pharm. 1954: 350-352.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. and Bruni, R. Comparative evaluation of 11 essential oils different origin as functional antioxidants, antiradical and antimicrobial in food. Food Chem. 2005 : 621-632.

- Satoskar R. R, Shah S. G. Evaluation of antiinflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patient with postoperative inflammation. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther Toxicol. 1986 : 651-654.
- Schwarz, M., Barbel, K., Roland, W. S., Weber, Sterner, O., and Heidrun, A. 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi Phytochem. 2004 : 2239-2245.
- Sgarbi, D. B., Silva, A. J., Carlos, I. Z., Silva, C. L., Angluster, J. and Alviano, C. S. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. Mycopathol. 1997 : 9-14.
- Singh, S. V., Hu, X., Srivastava, S. K., Singh, M., Xia, H., Orchard, J. L. and Zaren, H. A. Mechanism of inhibition of benzo[a]pyrene-induced forestomach cancer in mice by dietary curcumin. Carcinogenesis. 1998 : 1357-1360.
- Strobel, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. Microbes and infection. 2003 : 535-544.
- Strobel, G. A., Yang, X., Sears, J., Klammer, R, Sidhu, R.S., and Hess, W. M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. Microbiology. 1996 : 435-440.
- Takei, T., Yochida, M., Ohnishi-kameyama, M. and Kobori, M. Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from *Sarcodon asparatus* (Berk.) Biosci. Biotechnol. Biochem. 2005 : 212-215.
- Thongchai Taechowisan, John F., and Saisamorn Lamyong. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. J. Microbiol. and Biotechnol. 2003 :381-385.
- Toda, S., Miyase, T., Arichi, H., Tanizawa, H. and Takino, Y. Natural antioxidants III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. Chem. Pharm. Bull. 1985 : 1725-1728.
- Vijayalaxmi. Genetic effects of turmeric and curcumin in mice and rat. Mutat. Res. 1980 : 125-32.
- Wang, F. W., Ye, Y. H., Chen, J. R., Wang, X. T., Zhu, H. L., Song, Y. C. and Tan, R. X. Neoplaether, a new cytotoxic and antifungal endophyte metabolite from *Neoplaconema napellum* IFB-E016. FEMS Microbiol. Lett. 2006 : 218-223.

Woods, G. L. and Washington, J. A. Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion method. In Marry, P. R. (ed): Manual of clinical microbiology. Washington DC: ASM Press. 1995.

Xu, Y., Ku, B. S., Yao, H. Y., Lin, Y. H., Ma, X., Zhang, Y. H. and Li, X. J. Antidepressant effects of curmin in the forced swim test and olfactory bulbectomy models of depression in rats. Pharmacol. Biochem. and Behav. 2005 : 200-206.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1. Corn Meal Agar (CMA)

Glucose	20.0	กรัม
Yeast Extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

2. Malts Extract Agar (MEA)

Malts Extract	20.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3. Nutrient Agar (NA)

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

4. Sabouraud' Dextrose Agar (SDA)

Dextrose	40.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

5. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่งปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ 200 กรัม ต้มในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จนเดือด จากนั้นกรองและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เติม Dextrose และ Agar เทใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Yeast Extract Sucrose Agar (YES)

Yeast Extract	20.0	กรัม
Sucrose	150.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

7. Yeast-Malt Extract Agar (YMA)

Yeast Extract	3.0	กรัม
Malts Extract	3.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

1. Nutrient Broth (NB)

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

2. Yeast-Malt Extract Broth (YMB)

Yeast Extract	3.0	กรัม
Malts Extract	3.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3. Mueller-Hinton Broth (MHB)

Mueller-Hinton	34	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เมื่อต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้นำส่วนผสมต่างๆ มาผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

อาหารแข็ง	อาหารเหลว
1. Corn Meal Agar (CMA)	1. Nutrient Broth (NB)
2. Malts Extract Agar (MEA)	2. Yeast-Malt Extract Broth (YMB)
3. Nutrient Agar (NA)	3. Mueller-Hinton Broth (MHB)
4. Sabouraud' Dextrose Agar (SDA)	4. Malts Extract Broth (MEB)
5. Potato Dextrose Agar (PDA)	
6. Yeast Extract Sucrose Agar (YES)	
7. Yeast-Malt Extract Agar (YMA)	

3.6 การแยกและเก็บรักษาราเอนโดไฟต์

ในการวิจัยได้เก็บรักษา ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ 2 วิธี คือ

1. ตัดราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หรือ MEA ขนาดประมาณ 0.3x0.3 เซนติเมตร จำนวน 8-10 ชิ้น เขี่ยใส่ลงในขวดบรรจุน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. เพาะราเอนโดไฟต์ลงในขวดเก็บเชื้อ (Vial) ซึ่งมีอาหารแข็ง PDA หรือ MEA ที่เตรียมแบบวางเอียง (Slant) แล้วปั่นที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร ภาดทับด้วยพาราฟินเหลว (liquid paraffin) สูงจากผิวหน้าอาหารประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นพันขวดด้วยพาราฟิน แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.7.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์

3.7.1.1 การเตรียมวัสดุอุปกรณ์

- เครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง ทำให้ปราศจากเชื้อโดยความร้อนด้วย Hot Air Oven โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
- อุปกรณ์อื่นๆที่ไม่ใช่เครื่องแก้ว ทำให้ปราศจากเชื้อโดยความร้อน โดยนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

3.7.1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตารางที่ 3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ		สายพันธุ์
แบคทีเรีย	แบคทีเรียแกรมบวก	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	แบคทีเรียแกรมลบ	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
ยีสต์	ราที่เจริญในรูปของยีสต์	<i>Candida albican</i> ATCC 10231

เชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ที่นำมาใช้ในการทดสอบ ต้องวัดความขุ่นของเชื้อก่อนนำมาทดสอบ โดยปรับความขุ่นของเชื้อเทียบกับ 0.5 McFarland standard และอ่านค่าจากเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง(spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงระหว่าง 0.05-0.10 จะมีเชื้อประมาณ $10^6 - 10^7$ CFU/ml ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานสำหรับใช้เปรียบเทียบกับราเอนโดไฟต์ที่นำมาทดสอบฤทธิ์ และจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ทดสอบที่อ่านค่าได้จะมีหน่วยเป็น CFU/ml ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 จำนวนจุลินทรีย์ทดสอบ (CFU/ml) ความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland standard

จุลินทรีย์ทดสอบ	จำนวนจุลินทรีย์ทดสอบ (CFU/ml)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	4.7×10^6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3.1×10^6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2.8×10^7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	2.3×10^7
<i>Candida albican</i> ATCC 10231	3.4×10^6

หมายเหตุ 0.5 McFarland standard คือ ค่าความขุ่นมาตรฐานของจุลินทรีย์ทดสอบ ที่มีจำนวนเชื้ออยู่ประมาณ 1×10^6 CFU/ml

3.7.1.3 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA (Nutrient Agar) ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่บ่มไว้มาใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland standard แล้วทำการอ่านค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงให้ได้ประมาณ 0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^7 CFU/ml เมื่อทำการทดสอบใช้สำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ กดสำลีพันปลายไม้กับด้านข้างของหลอดเพื่อไม่ให้เชื้อมีปริมาณมากเกินไป แล้วป้ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA จนทั่ว หมุนจานเพาะเชื้อ 60 องศา ป้ายให้ทั่ว หมุนอีก 60 องศา ป้ายซ้ำอีกครั้งให้ทั่วจานเพาะเชื้อแล้วปล่อยให้แห้ง นำไปใช้เพื่อการทดสอบต่อไป

3.7.1.4 การเตรียมยีสต์ทดสอบ

ปฏิบัติเช่นเดียวกับการเตรียมแบคทีเรียทดสอบในข้อ 3.7.1.3 แต่เปลี่ยนชนิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA และอาหารเหลว NB มาทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็ง YMA และอาหารเหลว YMBตามลำดับ

ภาคผนวก ข

ลักษณะและการจัดจำแนกราเอนโดไฟต์

ตารางที่ 5.1 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจาก จ.เชียงใหม่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

Isolates	ชนิดรา เอนโดไฟต์	ชนิด อาหาร เลี้ยงเชื้อ	อัตรา การเจริญ (ชม./วัน)	ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์		
				ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี	สีรงค วัตถุ ที่สร้าง ขึ้น
CM1	Mycelia sterilia	PDA	0.67	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	สีขาว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	สีขาว	-
		CM		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยักเล็กน้อย	สีขาว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	สีขาว	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	สีขาว	-
CM2	<i>Xylaria</i> sp.	PDA	0.4	เส้นใยละลายแหลมขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		MEA		เส้นใยละลายแหลมขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	เหลือง
		CM		เส้นใยละลายแหลมขึ้นเหนืออาหาร	ขาว	-
		YES		เส้นใยละลายแหลมขึ้นเหนืออาหาร	ขาว	-
		SDA		เส้นใยละลายแหลมขึ้นเหนืออาหาร	ขาว	-
CM3	Mycelia sterilia	PDA	0.67	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	สีขาว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	สีขาว	-
		CM		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	สีขาว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบหยัก	สีขาว	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	สีขาว	-
CM4	<i>Xylaria</i> sp.	PDA	0.35	เส้นใยละลายแหลมขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		MEA		เส้นใยละลายแหลมขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	เทา
		CM		เส้นใยละลายแหลมขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		YES		เส้นใยละลายแหลมขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	เทา
		SDA		เส้นใยละลายแหลมขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-

ตารางที่ 5.2 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจาก จ. มหาสารคาม ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

Isolates	ชนิดรา เอนโดไฟต์	ชนิด อาหาร เลี้ยงเชื้อ	อัตรา การเจริญ (ชม./วัน)	ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์		
				ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี	สีรงควัตถุ ที่สร้างขึ้น
MS1	<i>Acremonium</i> sp.	PDA	0.6	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลม ตรงกลาง สีน้ำตาลเข้มกว่าขอบ	น้ำตาล	-
		MEA		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมตรงกลางสี น้ำตาลเข้มกว่าขอบ	น้ำตาล	-
		CMA		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมตรงกลางสี น้ำตาลเข้มกว่าขอบ	น้ำตาล	-
		YES		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมตรงกลางสี น้ำตาลเข้มกว่าขอบ	น้ำตาล	-
		SDA		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมตรงกลางสี น้ำตาลเข้มกว่าขอบ	น้ำตาล	-
MS2	<i>Mycelia</i> <i>sterilia</i>	PDA	0.55	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
MS3	<i>Mycelia</i> <i>sterilia</i>	PDA	0.7	เส้นใยฟู โคโลนีกลมด้านหลังเป็น สีเหลืองอ่อน	เหลือง	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมด้านหลังเป็น สีเหลือง	เหลือง	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีกลม	เหลือง	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีกลมด้านหลังเป็น สีเหลือง	เหลือง	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีกลม	เหลือง	-

ตารางที่ 5.3 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจาก จ. ร้อยเอ็ด ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

Isolates	ชนิดรา เอนโดไฟต์	ชนิด อาหาร เลี้ยงเชื้อ	อัตรา การเจริญ (ชม./วัน)	ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์		
				ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี	สีรงควัตถุ ที่สร้างขึ้น
RE1	Mycelia sterilia	PDA	0.55	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	สีขาว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	สีขาว	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	สีขาว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	สีขาว	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	สีขาว	-
RE2	<i>Phomopsis</i> sp.	PDA	0.6	เส้นใยจับเป็นก้อน ขอบโคโลนีเป็น ชั้นๆ	ครีม	-
		MEA		เส้นใยจับเป็นก้อน ขอบโคโลนี เป็นชั้นๆ	ครีม	-
		CMA		เส้นใยเรียบ ขอบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	ครีม	-
		YES		เส้นใยเรียบ ขอบโคโลนีเป็นชั้นๆ	แดงอ่อน	-
		SDA		เส้นใยจับเป็นก้อน ขอบโคโลนีเป็น ชั้นๆ	ครีม	-
RE3	<i>Fusarium</i> sp.	PDA	0.72	เส้นใยฟู กลมตรงกลางสีขาว	ม่วง	ม่วง
		MEA		เส้นใยฟู กลมตรงกลางสีขาว	ม่วง	ม่วง
		CMA		เส้นใยฟู กลมตรงกลางสีขาว	ม่วง	ม่วง
		YES		เส้นใยฟู กลมตรงกลางสีขาว	ม่วง	ม่วง
		SDA		เส้นใยฟู กลมตรงกลางสีขาว	ม่วง	ม่วง
RE4	Mycelia sterilia	PDA	0.4	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	สีขาว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เหลือง	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยักเล็กน้อย	สีขาว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยักเล็กน้อย	สีขาว	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	สีขาว	-

ตารางที่ 5.4 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจาก จ.อยุธยา ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

Isolates	ชนิดรา เอนโดไฟต์	ชนิด อาหาร เลี้ยงเชื้อ	อัตรา การเจริญ (ชม./วัน)	ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์		
				ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี	สีของ วัตถุ ที่สร้าง ขึ้น
AY1	<i>Fusarium</i> sp.	PDA	0.67	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เหลือง	เหลือง
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	น้ำตาล	เหลือง
		CM		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	น้ำตาล	เหลือง
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	น้ำตาล	เหลือง
		SDA		เส้นใยฟู ตรงกลางโคโลนี	น้ำตาล	เหลือง
AY2	<i>Mycelia</i> <i>sterilia</i>	PDA	0.4	เส้นใยเรียบตรงกลางสีน้ำตาลเข้ม	น้ำตาล	-
		MEA		เส้นใยเรียบตรงกลางสีน้ำตาลเข้ม	น้ำตาล	เหลือง
		CM		เส้นใยเรียบตรงกลางสีน้ำตาลเข้ม	น้ำตาล	-
		YES		เส้นใยเรียบตรงกลางสีน้ำตาลเข้ม	น้ำตาล	-
		SDA		เส้นใยเรียบตรงกลางสีน้ำตาลเข้ม	น้ำตาล	-
AY3	<i>Fusarium</i> sp.	PDA	0.8	เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	เหลือง	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนี ขอบหยัก	เหลือง	-
		CM		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	เหลือง	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	เหลือง	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	เหลือง	-

ตารางที่ 5.5 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจาก จ. ชลบุรี ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

Isolates	ชนิดรา เอนโดไฟต์	ชนิด อาหาร เลี้ยงเชื้อ	อัตรา การเจริญ (ชม./วัน)	ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์		
				ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี	สิ่งควัดดู ที่สร้างขึ้น
CB1	Mycelia sterilia	PDA	0.55	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ขาว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ขาว	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
CB 2	Mycelia sterilia	PDA	0.62	เส้นใยเรียบโคโลนีกลมขอบหยัก	ดำ	-
		MEA		เส้นใยเรียบโคโลนีกลมขอบหยัก	ดำ	-
		CMA		เส้นใยเรียบโคโลนีกลมขอบหยัก	ดำ	-
		YES		เส้นใยเรียบโคโลนีกลมขอบหยัก	ดำ	-
		SDA		เส้นใยเรียบโคโลนีกลมขอบหยัก	ดำ	-
CB 3	Mycelia sterilia	PDA	0.74	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เขียว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เขียว	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เขียว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เขียว	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เขียว	-
CB 4	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	0.45	เส้นใยฟูตรงกลาง บางส่วนฟอร์ม เป็นก้อนกลม	เขียวเข้ม	-
		MEA		เส้นใยฟูตรงกลาง บางส่วนฟอร์ม เป็นก้อนกลม	เขียว	-
		CMA		เส้นใยเรียบโคโลนีขอบเป็นชั้นๆ	น้ำตาล	-
		YES		เส้นใยเรียบโคโลนีขอบเป็นชั้นๆ	น้ำตาล	-
		SDA		เส้นใยเรียบโคโลนีขอบเป็นชั้นๆ	น้ำตาล	-

ตารางที่ 5.5 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจาก จ. ชลบุรี ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ (ต่อ)

Isolates	ชนิดรา เอนโดไฟต์	ชนิด อาหาร เลี้ยงเชื้อ	อัตรา การเจริญ (ชม./วัน)	ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์		
				ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี	สีรงควัตถุ ที่สร้างขึ้น
CB5	<i>Fusarium</i> sp.	PDA	0.42	เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ชมพู	ชมพู
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ชมพู	ชมพู
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ชมพู	ชมพู
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ชมพู	ชมพู
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ชมพู	ชมพู
CB 6	Mycelia sterilia	PDA	0.6	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ดำ	ดำ
		MEA		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ดำ	ดำ
		CMA		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ดำ	ดำ
		YES		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ดำ	ดำ
		SDA		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ดำ	ดำ
CB7	<i>Phomopsis</i> sp	PDA	0.72	เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	ขาว	-
		MEA		เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	ขาว	-
		CMA		เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	ขาว	-
		YES		เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	ขาว	-
		SDA		เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	ขาว	-
CB8	Mycelia sterilia	PDA	0.4	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	สีขาว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เหลือง	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	สีขาว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	สีขาว	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	สีขาว	-

ตารางที่ 5.6 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจาก จ. ราชบุรี ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

Isolates	ชนิดรา เอนโดไฟต์	ชนิด อาหาร เลี้ยงเชื้อ	อัตรา การเจริญ (ชม./วัน)	ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์		
				ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี	สีรงควัตถุ ที่สร้างขึ้น
RB1	Mycelia sterilia	PDA	0.67	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	น้ำตาล	เหลือง
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	น้ำตาล	เหลือง
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	น้ำตาล	เหลือง
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	น้ำตาล	เหลือง
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	น้ำตาล	เหลือง
RB2	<i>Xylaria</i> sp.	PDA	0.35	เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		MEA		เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		CMA		เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		YES		เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		SDA		เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
RB3	Mycelia sterilia	PDA	0.64	เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
RB4	Mycelia sterilia	PDA	0.4	เส้นใยฟูตรงกลางโคโลนีขอบเรียบ	ขาว	-
		MEA		เส้นใยฟูตรงกลางโคโลนีขอบเรียบ	ขาว	-
		CMA		เส้นใยฟูตรงกลางโคโลนีขอบเรียบ	ขาว	-
		YES		เส้นใยฟูตรงกลางโคโลนีขอบเรียบ	ขาว	-
		SDA		เส้นใยฟูตรงกลางโคโลนีขอบเรียบ	ขาว	-

ตารางที่ 5.6 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจาก จ. ราชบุรี ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ (ต่อ)

Isolates	ชนิดรา เอนโดไฟต์	ชนิด อาหาร เลี้ยงเชื้อ	อัตรา การเจริญ (ชม./วัน)	ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์		
				ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี	สีรงควัตถุ ที่สร้างขึ้น
RB5	<i>Fusarium</i> sp.	PDA	0.84	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ม่วง	-
		MEA		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ม่วง	-
		CMA		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ม่วง	-
		YES		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ม่วง	-
		SDA		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ม่วง	-
RB6	<i>Phomopsis</i> sp	PDA	0.6	เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	ขาว	-
		MEA		เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	ขาว	-
		CMA		เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	ขาว	-
		YES		เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	ขาว	-
		SDA		เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	ขาว	-
RB7	<i>Mycelia</i> <i>sterilia</i>	PDA	0.7	เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	เหลือง	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	เหลือง	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	เหลือง	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	เหลือง	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	เหลือง	-
RB8	<i>Mycelia</i> <i>sterilia</i>	PDA	0.45	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ดำ	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ดำ	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ดำ	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ดำ	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ดำ	-
RB9	<i>Mycelia</i> <i>sterilia</i>	PDA	0.62	เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	สีขาว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	เหลือง	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	สีขาว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	สีขาว	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	สีขาว	-

ตารางที่ 5.7 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจาก จ. นครศรีธรรมราช ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

Isolates	ชนิดรา เอนโดไฟต์	ชนิด อาหาร เลี้ยงเชื้อ	อัตรา การเจริญ (ชม./วัน)	ลักษณะโคโคนีของราเอนโดไฟต์		
				ลักษณะโคโคนีที่ปรากฏ	สีของ โคโคนี	สีรงควัตถุ ที่สร้างขึ้น
NK1	Mycelia sterilia	PDA	0.67	เส้นใยเรียบ โคโคนีกลมขอบเรียบ	เหลือง	เหลือง
		MEA		เส้นใยเรียบ โคโคนีกลมขอบเรียบ	เหลือง	เหลือง
		CMA		เส้นใยเรียบ โคโคนีกลมขอบเรียบ	เหลือง	เหลือง
		YES		เส้นใยเรียบ โคโคนีกลมขอบเรียบ	เหลือง	เหลือง
		SDA		เส้นใยเรียบ โคโคนีกลมขอบเรียบ	เหลือง	เหลือง
NK2	Mycelia sterilia	PDA	0.78	เส้นใยฟู โคโคนีขอบหยัก	ขาว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโคนีขอบหยัก	ขาว	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโคนีขอบหยัก	ขาว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโคนีขอบหยัก	ขาว	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโคนีขอบหยัก	ขาว	-
NK3	Mycelia sterilia	PDA	0.52	เส้นใยฟู โคโคนีไม่กลม	ดำ	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโคนีไม่กลม	ดำ	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโคนีไม่กลม	ดำ	-
		YES		เส้นใยฟู โคโคนีไม่กลม	ดำ	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโคนีไม่กลม	ดำ	-
NK4	Mycelia sterilia	PDA	0.65	เส้นใยฟู โคโคนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโคนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโคนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโคนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโคนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-

ตารางที่ 5.7 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจาก จ. นครศรีธรรมราช ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ (ต่อ)

Isolates	ชนิดรา เอนโดไฟต์	ชนิด อาหาร เลี้ยงเชื้อ	อัตรา การเจริญ (ชม./วัน)	ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์		
				ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี	สี รังควัน ที่สร้างขึ้น
NK5	Mycelia sterilia	PDA	0.67	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	น้ำตาล	เหลือง
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	น้ำตาล	เหลือง
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	น้ำตาล	เหลือง
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	น้ำตาล	เหลือง
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	น้ำตาล	เหลือง
NK6	<i>Xylaria</i> sp.	PDA	0.35	เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		MEA		เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		CMA		เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		YES		เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		SDA		เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
NK7	Mycelia sterilia	PDA	0.64	เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
NK8	Mycelia sterilia	PDA	0.4	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	ขาว	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ขาว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ขาว	-
		SDA		เส้นใยฟู ตรงกลางโคโลนี	ขาว	-

ตารางที่ 5.7 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจาก จ. นครศรีธรรมราช ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ (ต่อ)

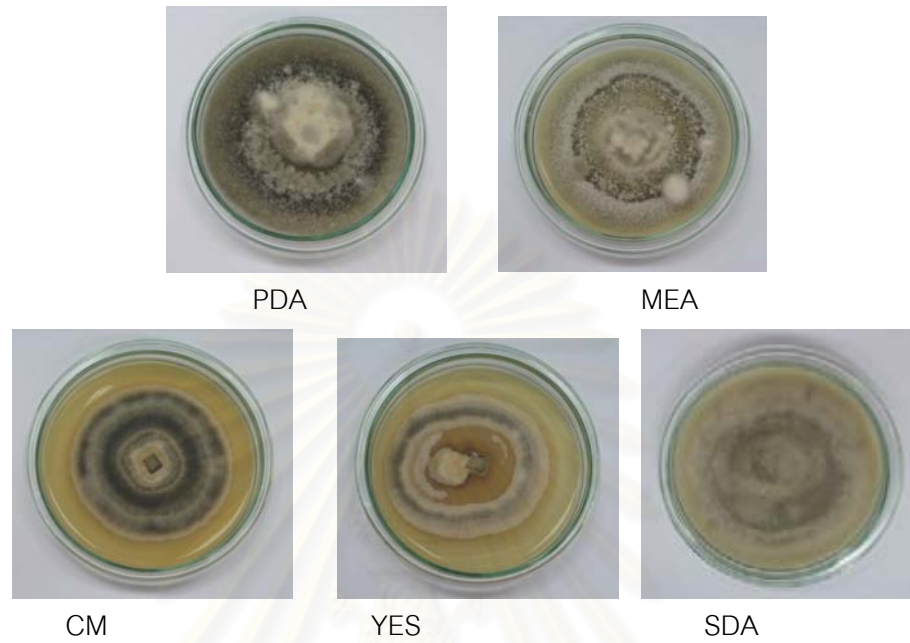
Isolates	ชนิดรา เอนโดไฟต์	ชนิด อาหาร เลี้ยงเชื้อ	อัตรา การเจริญ (ชม./วัน)	ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์		
				ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี	สีรงควัตถุ ที่สร้างขึ้น
NK9	Mycelia sterilia	PDA	0.67	เส้นใยฟู โคโลนีกลม	ส้มอ่อน	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลมขอบหยัก	ส้มอ่อน	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ส้มอ่อน	-
		YES		เส้นใยฟูสีส้มตรงกลาง โคโลนีหยัก	ส้มอ่อน	เหลือง
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ส้มอ่อน	เหลือง
NK10	Mycelia sterilia	PDA	0.72	เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		MEA		เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		CMA		เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		YES		เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
		SDA		เส้นใยแหลมชี้ขึ้นเหนืออาหาร	ขาว-ดำ	-
NK11	Mycelia sterilia	PDA	0.53	เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีไม่กลม	ดำ	-
NK12	<i>Alternaria</i> sp.	PDA	0.43	เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เขียว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เขียว	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เขียว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เขียว	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีกลมขอบเรียบ	เขียว	-

ตารางที่ 5.7 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นชันจาก จ. นครศรีธรรมราช ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ (ต่อ)

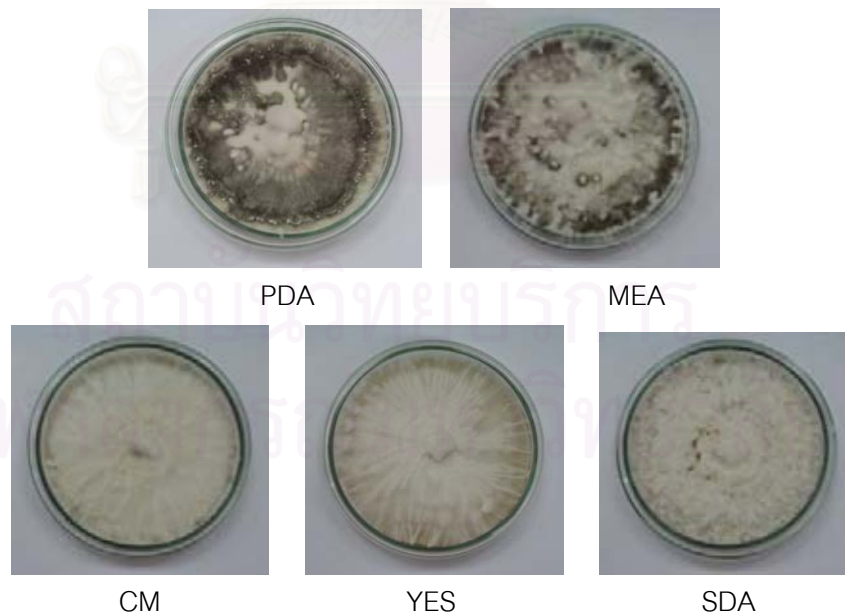
Isolates	ชนิดรา เอนโดไฟต์	ชนิด อาหาร เลี้ยงเชื้อ	อัตรา การเจริญ (ชม./วัน)	ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์		
				ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ	สีของ โคโลนี	สีรงควัตถุ ที่สร้างขึ้น
NK13	Mycelia sterilia	PDA	0.67	เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เหลือง	-
		MEA		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	ส้ม	-
		CMA		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เหลือง	-
		YES		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เหลือง	-
		SDA		เส้นใยเรียบ โคโลนีกลมขอบเรียบ	เหลือง	-
NK14	Mycelia sterilia.	PDA	0.35	เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ดำ	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ดำ	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ดำ	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ดำ	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ดำ	-
NK15		PDA	0.64	เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	เหลือง	-
		MEA		เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	เหลือง	เหลืองอ่อน
		CMA		เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	เหลือง	-
		YES		เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	เหลือง	-
		SDA		เส้นใยเรียบ โคโลนีเป็นชั้นๆ	เหลือง	-
NK16	Mycelia sterilia	PDA	0.4	เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ขาว	-
		MEA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ขาว	-
		CMA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ขาว	-
		YES		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ขาว	-
		SDA		เส้นใยฟู โคโลนีขอบหยัก	ขาว	-

หมายเหตุ PDA (Potato Dextrose Agar), MEA (Malt Extract Agar), CM (Corn Meal Agar), SDA Agar (Sabouraud' s Dextrose) และ YES (Yeast Extract Sucrose Agar)

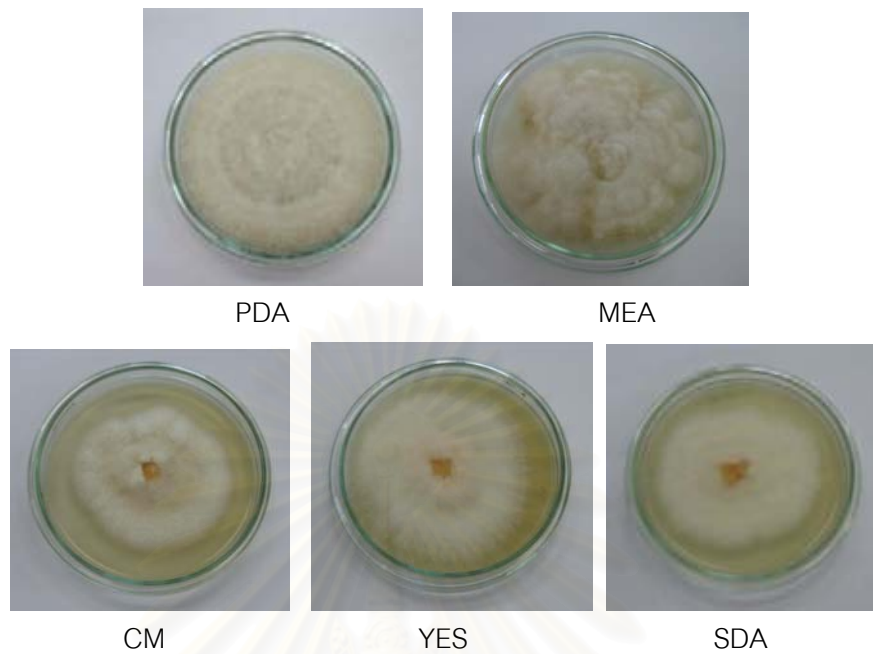
ตัวอย่างราเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ ที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างชนิดกัน



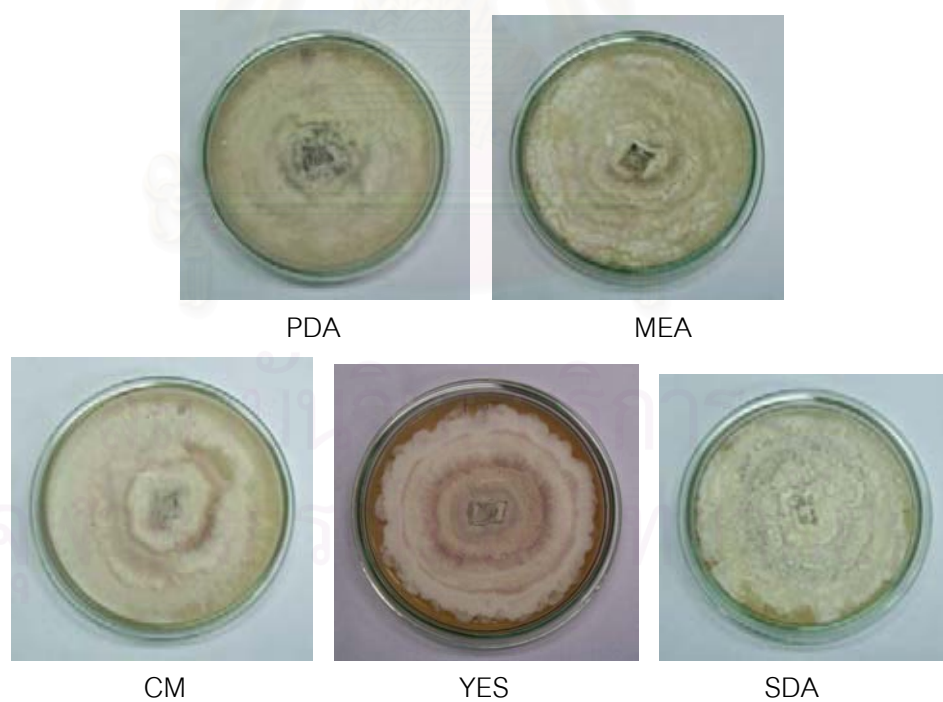
รูปที่ 5.1 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ไอโซเลต CB4



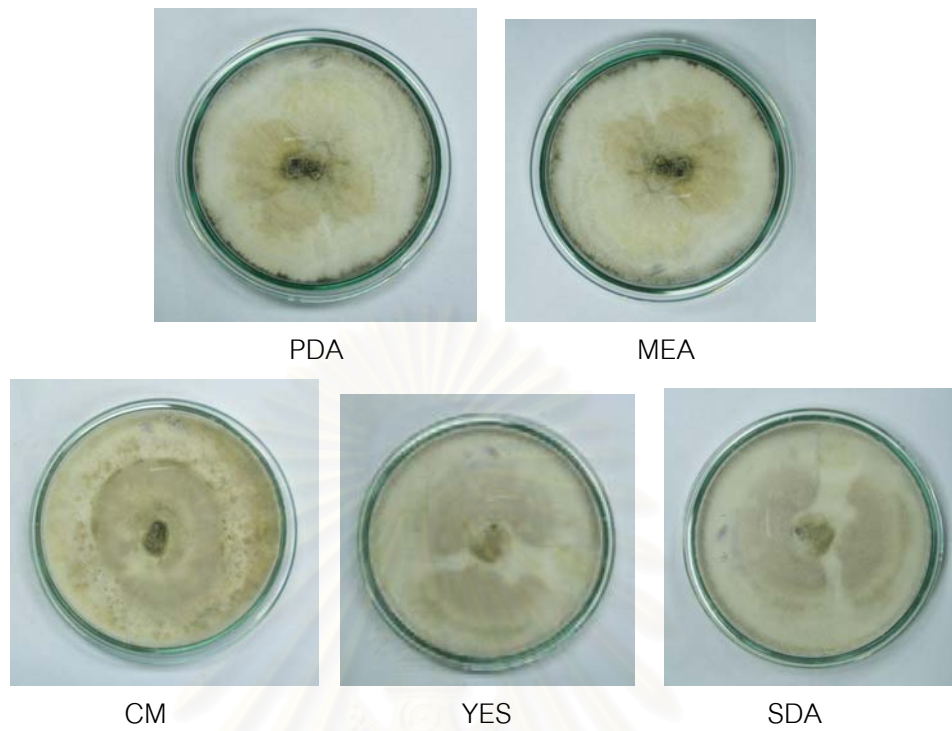
รูปที่ 5.2 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. ไอโซเลต CM2



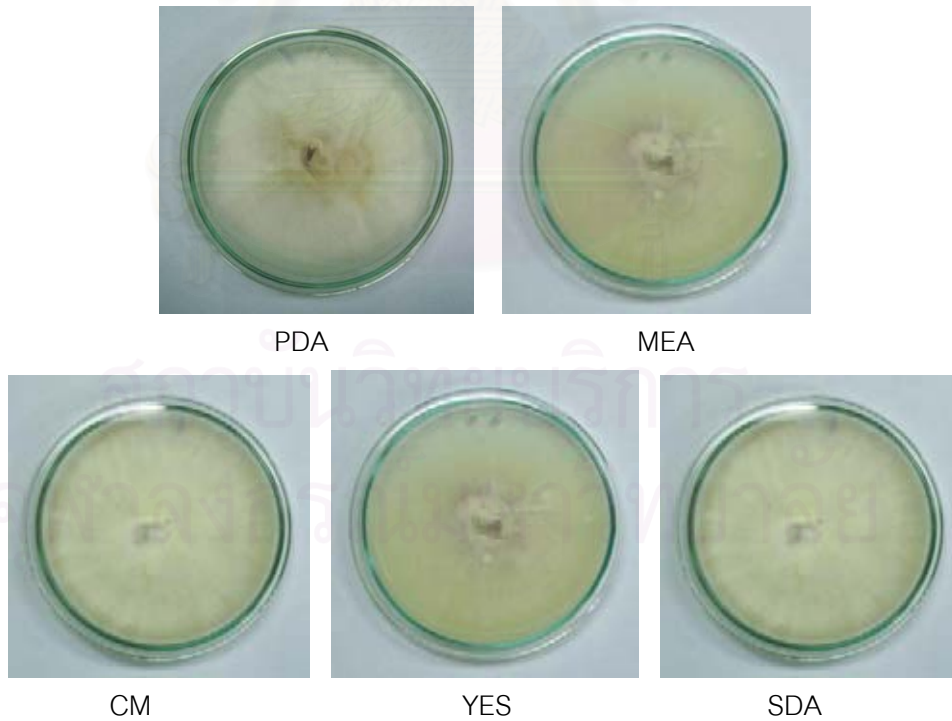
รูปที่ 5.2 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. ไอโซเลต NK9



รูปที่ 5.3 แสดงลักษณะของราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. ไอโซเลต RE2

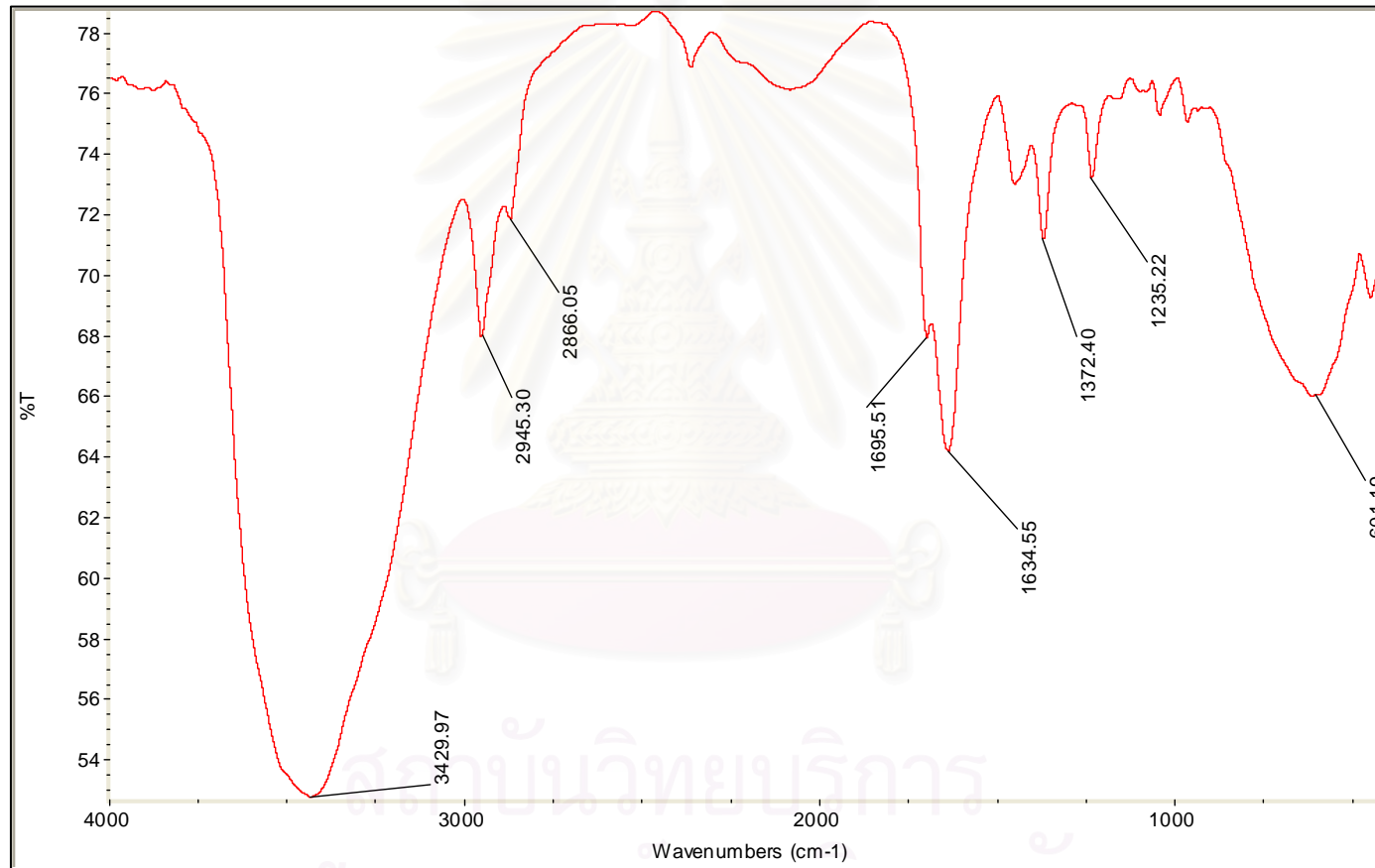


รูปที่ 5.4 แสดงลักษณะของราแอนด์ไฟต์ *Acremonium* sp. ไอโซเลต MS1

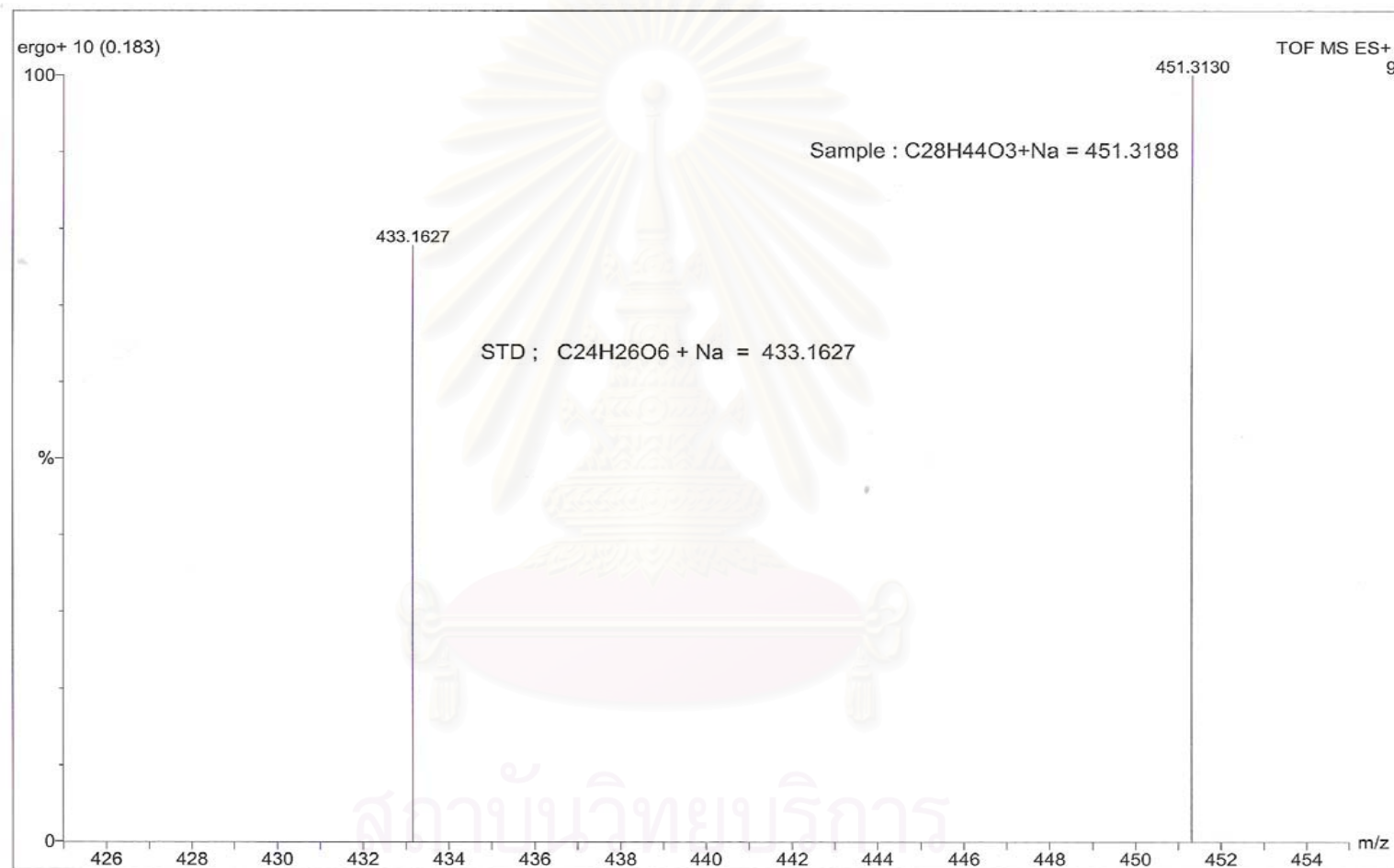


รูปที่ 5.5 แสดงลักษณะของราแอนด์ไฟต์ *Mycelia Sterilia* ไอโซเลต AY2

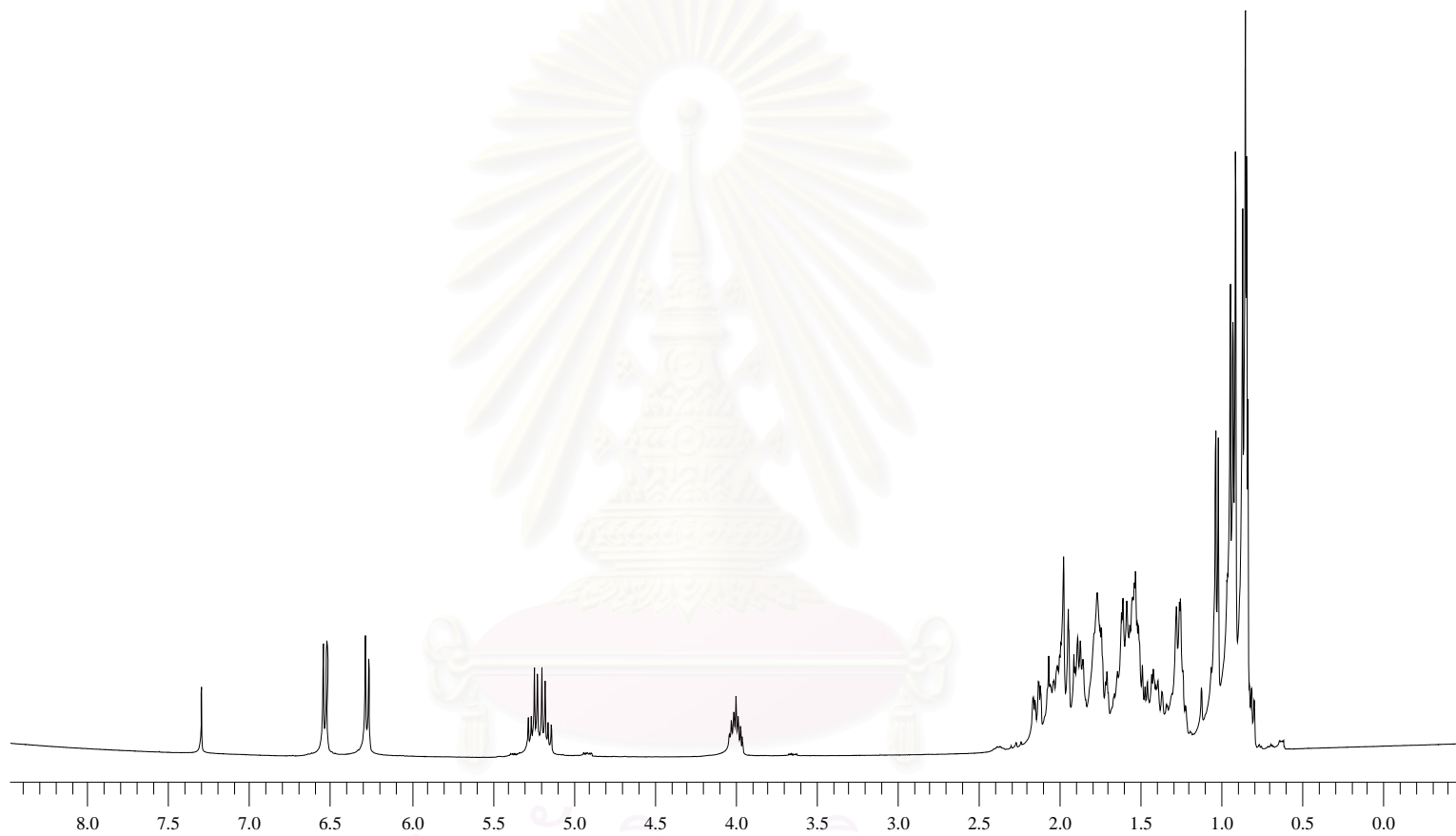
ภาคผนวก ค



รูปที่ 1 อินฟราเรดสเปกตรัม (IR spectrum) ของสารประกอบ 1

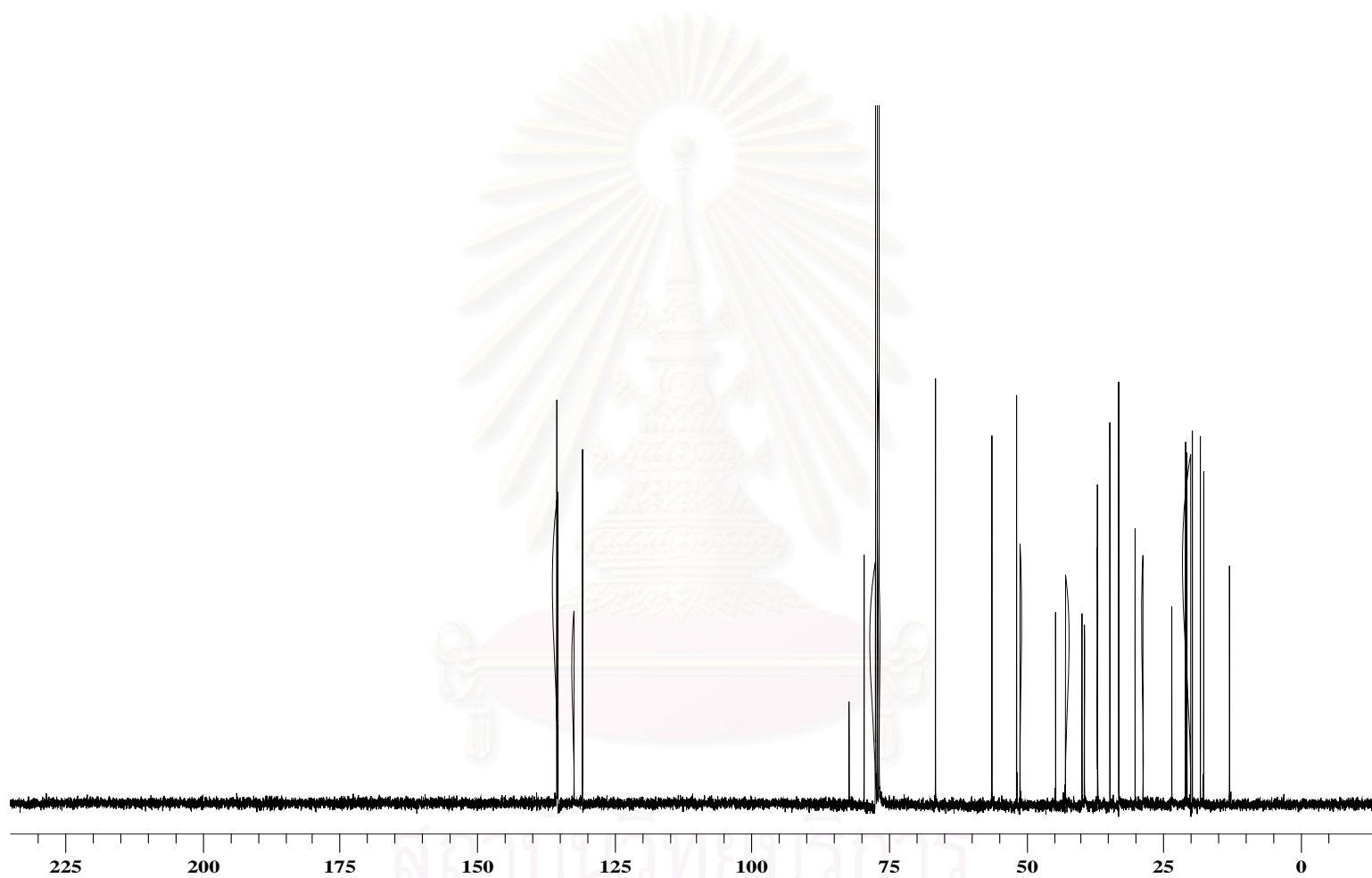


รูปที่ 2 แมสสเปกตรัม (MS spectrum) ของสารประกอบ 1

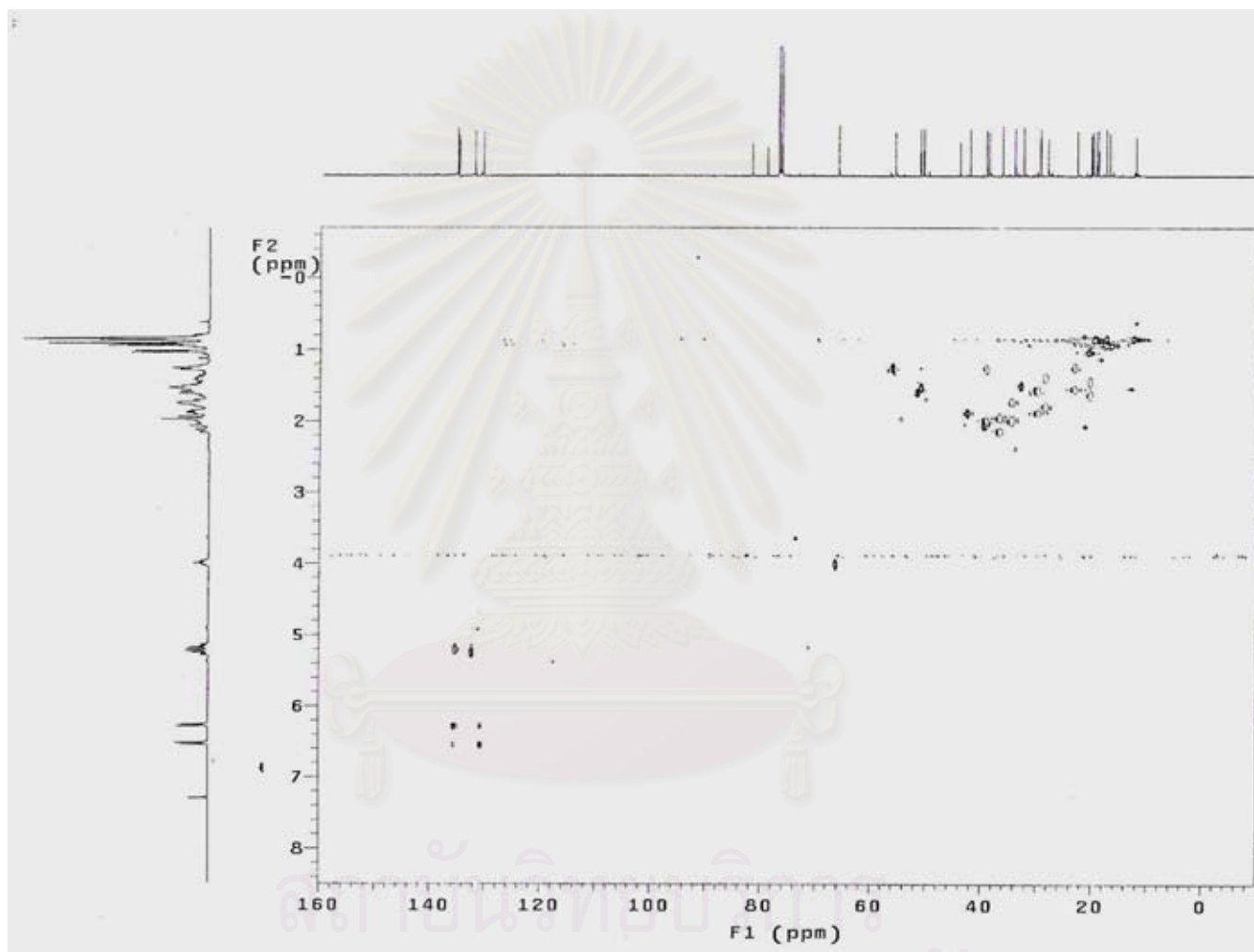


รูปที่ 3 โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^1\text{H-NMR}$ spectrum) ของสารประกอบ 1

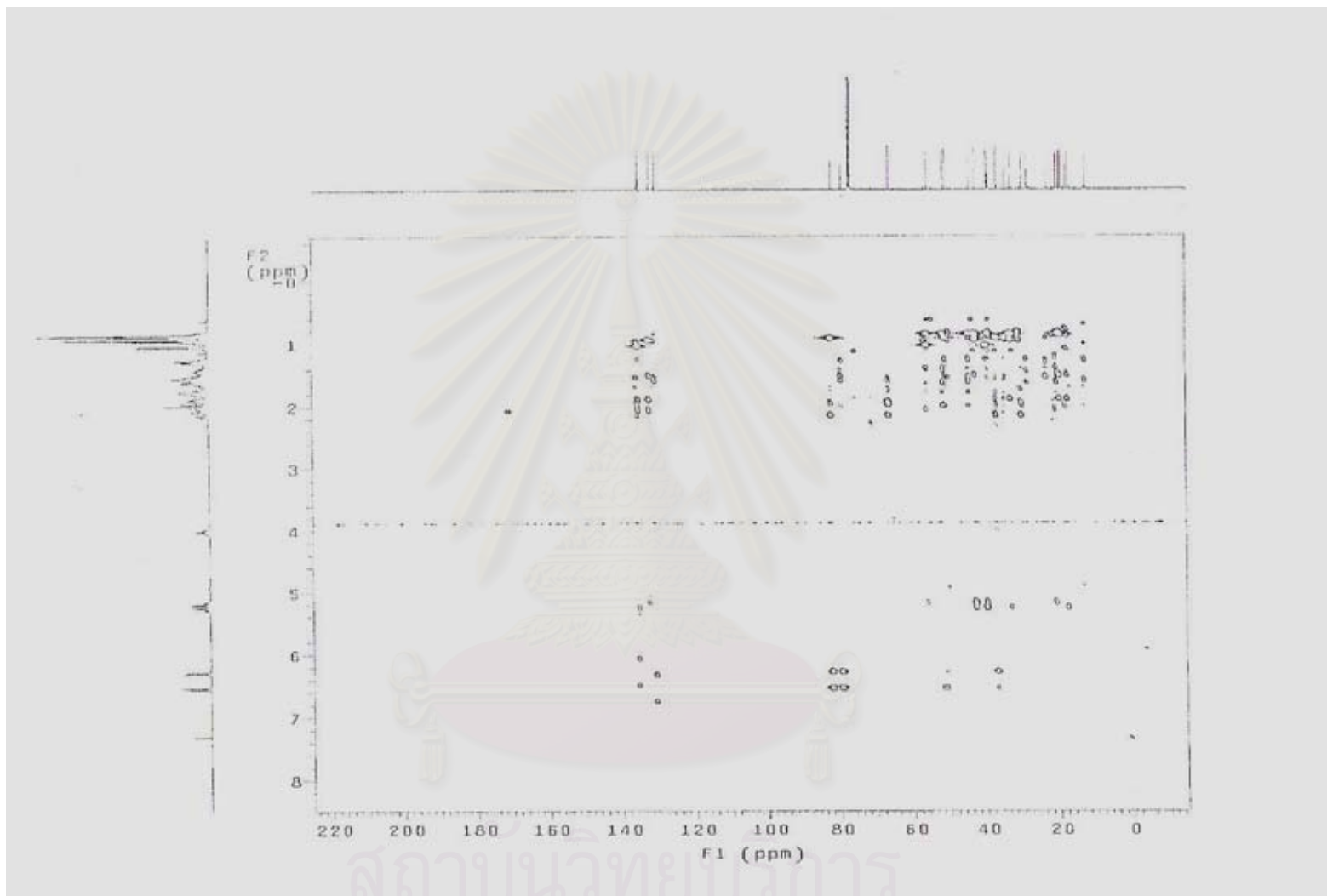
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



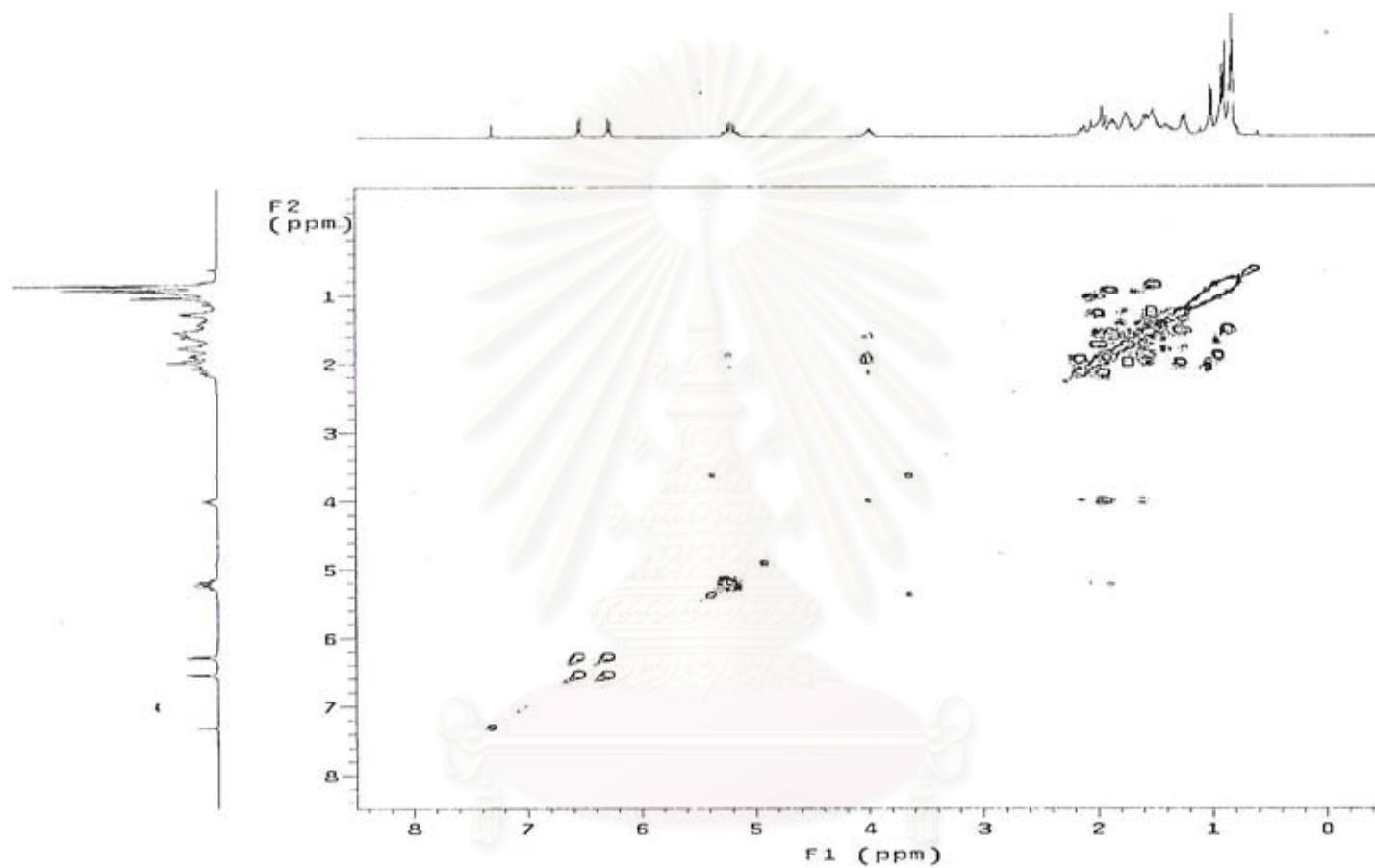
รูปที่ 4 คาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^{13}\text{C-NMR}$ spectrum) ของสารประกอบ 1



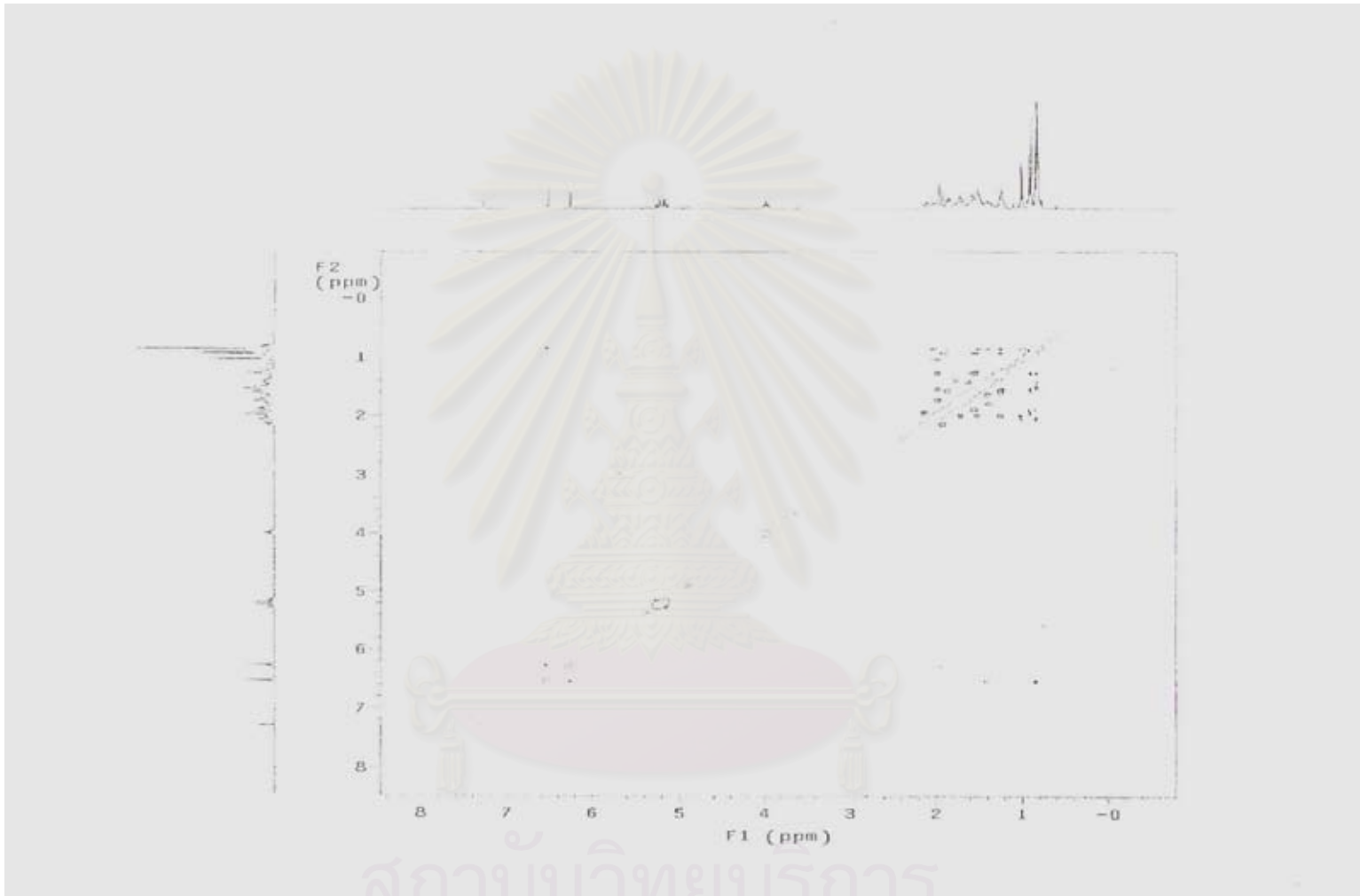
รูปที่ 5 gHSQC สเปกตรัมของสารประกอบ 1



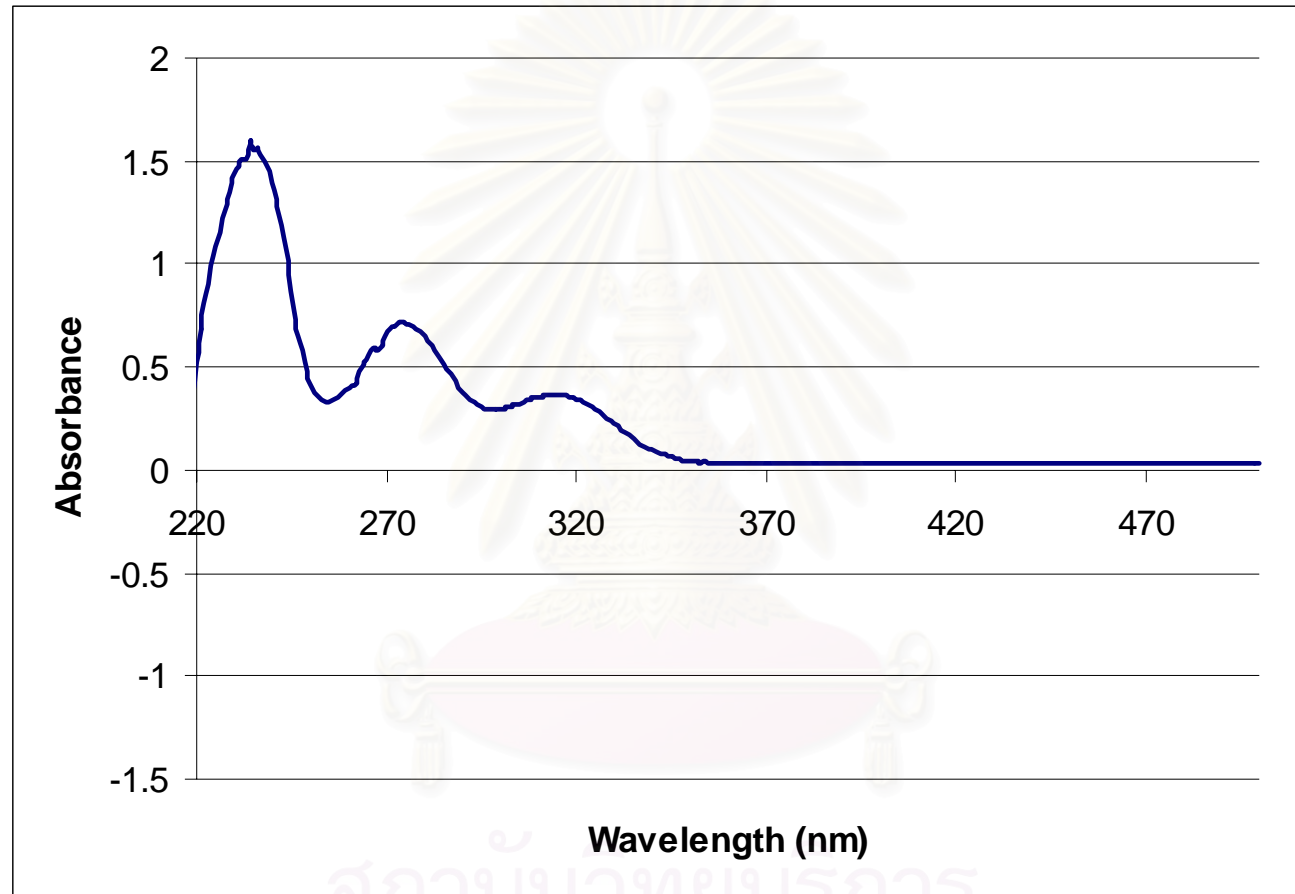
รูปที่ 6 gHMBC สเปกตรัมของสารประกอบ 1



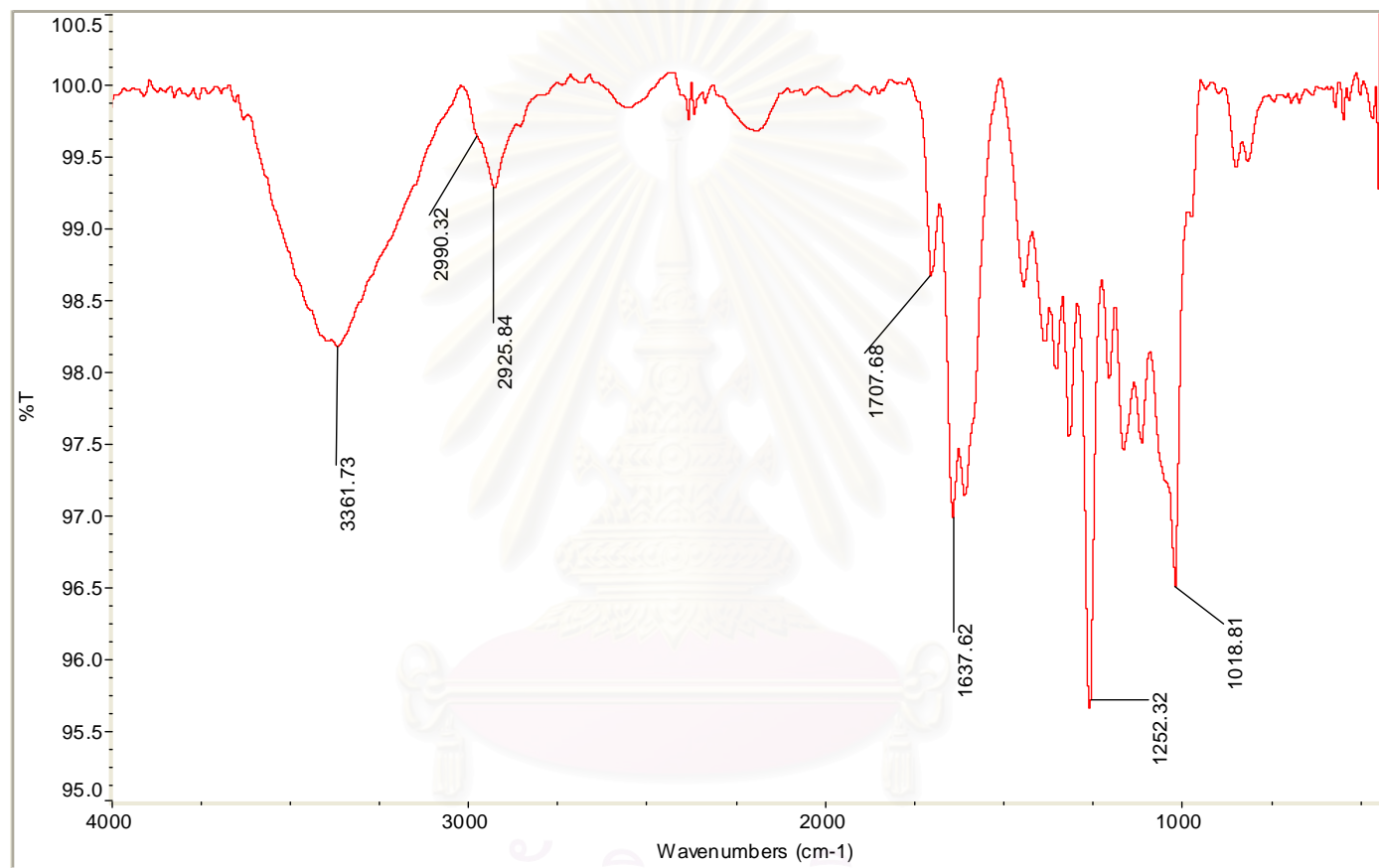
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รูปที่ 7 gCOSY สเปกตรัมของสารประกอบ 1



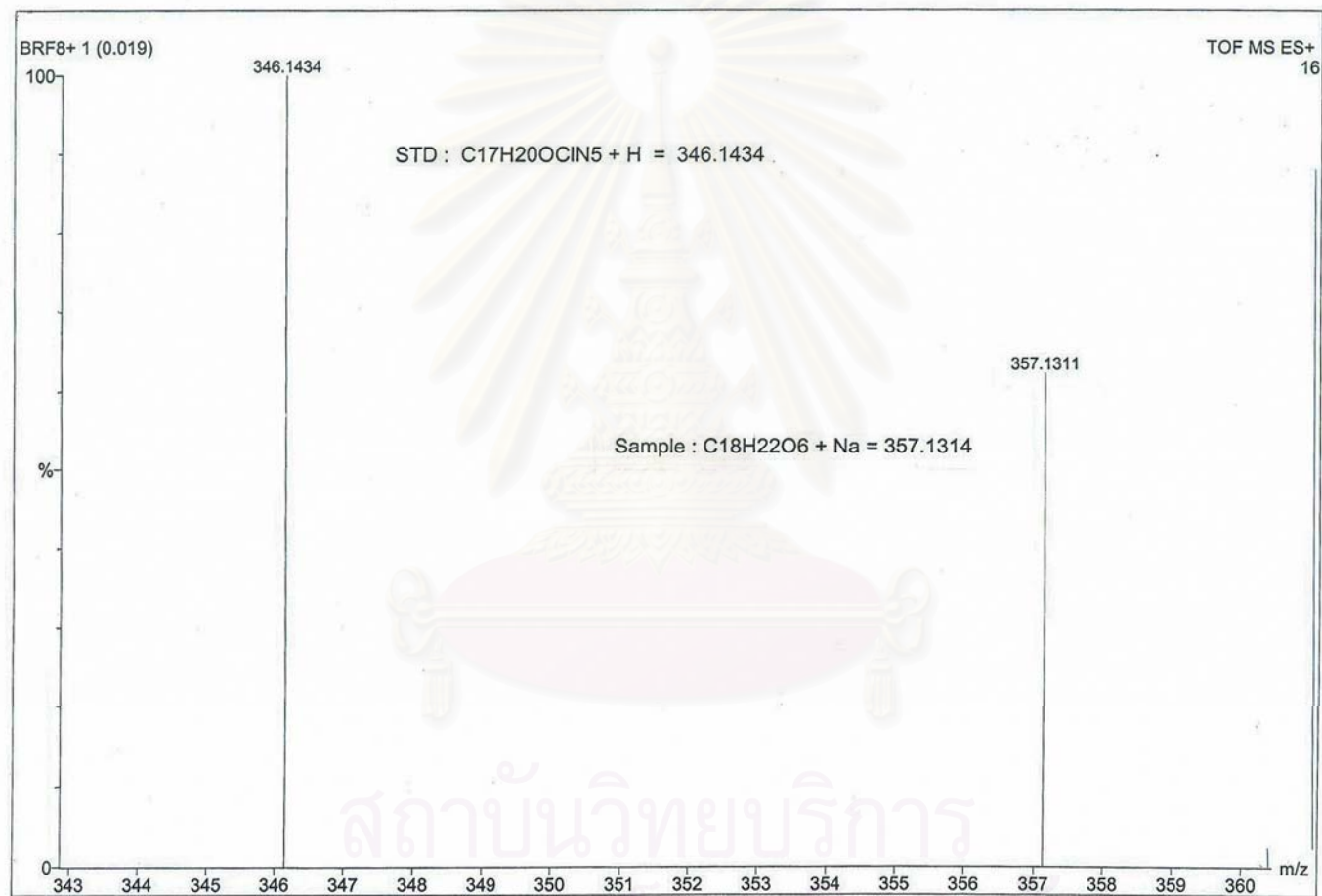
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รูปที่ 8 gNOESY สเปกตรัมของสารประกอบ 1



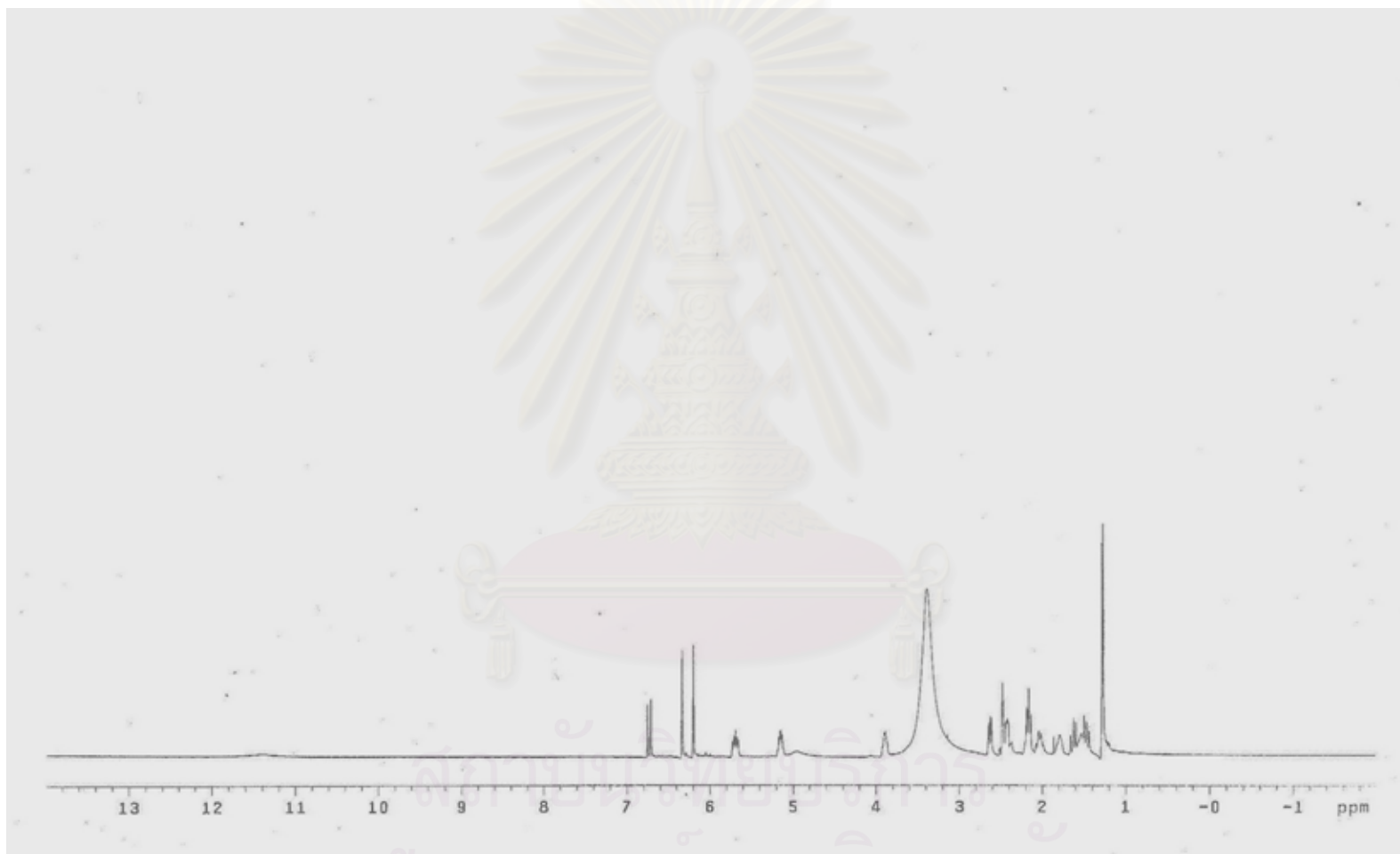
รูปที่ 9 อัลตราไวโอเล็ตสเปกตรัม (UV spectrum) ของสารประกอบ 2



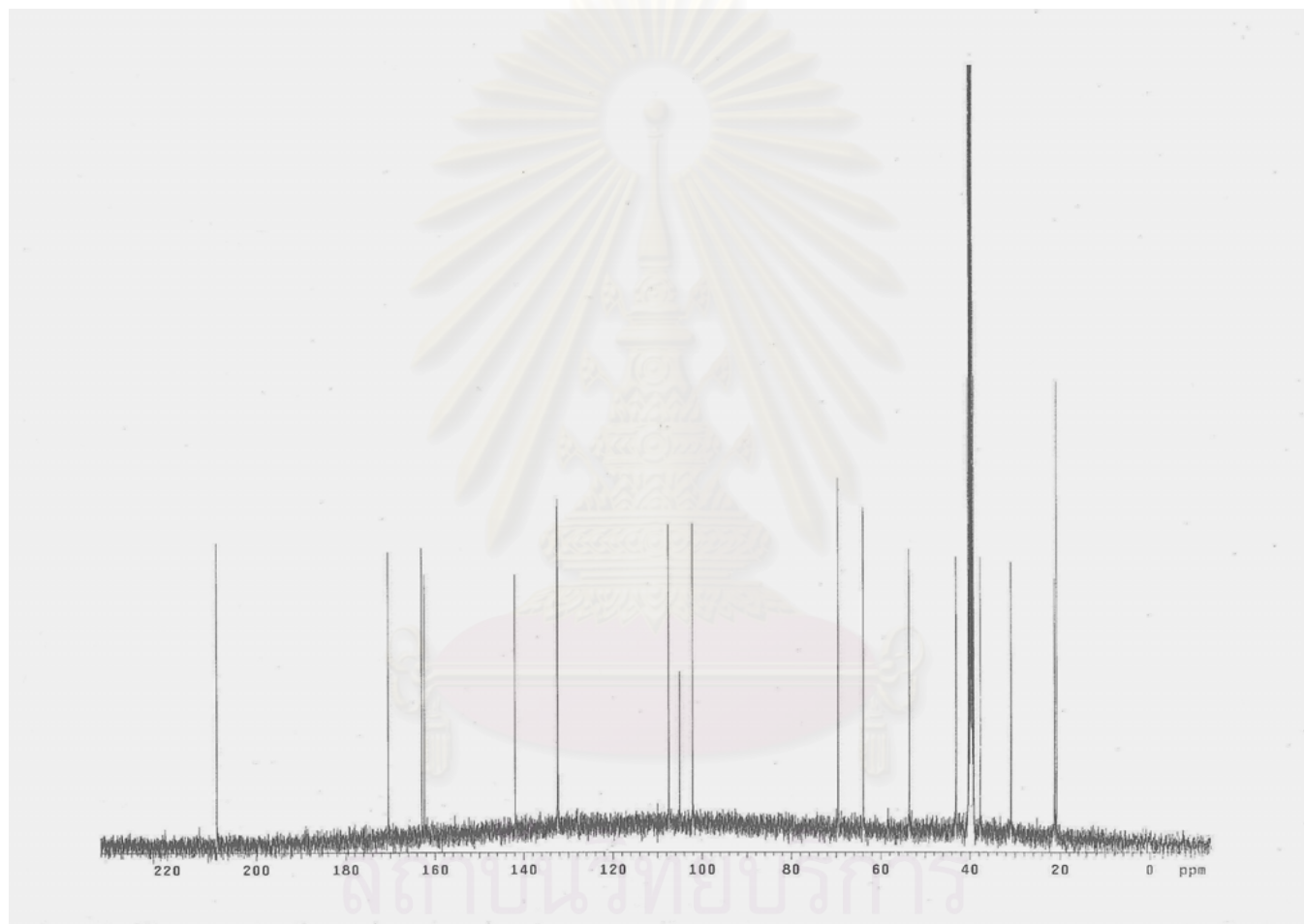
รูปที่ 10 อินฟราเรดสเปกตรัม (IR spectrum) ของสารประกอบ 2



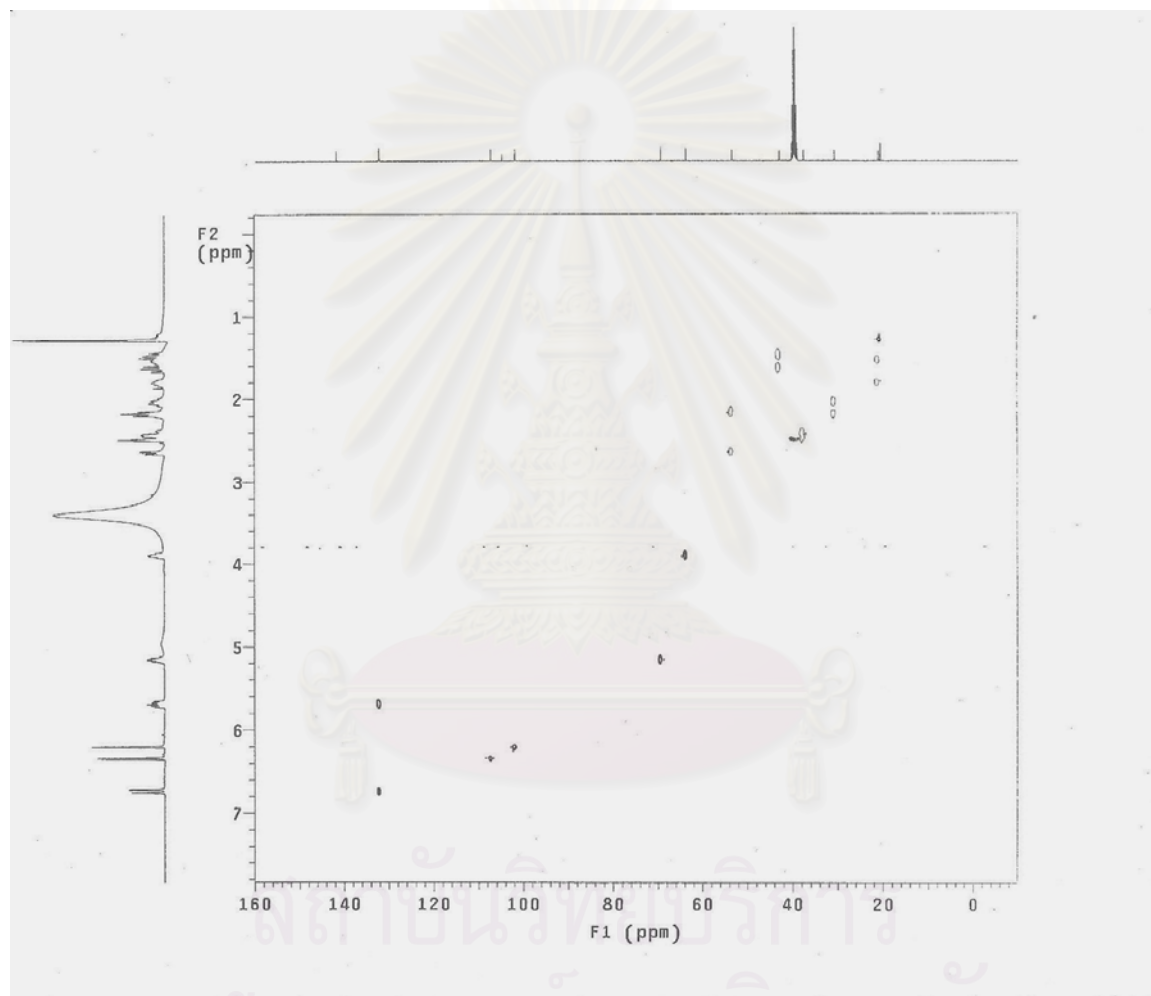
รูปที่ 11 แมสสเปกตรัม (MS spectrum) ของสารประกอบ 2



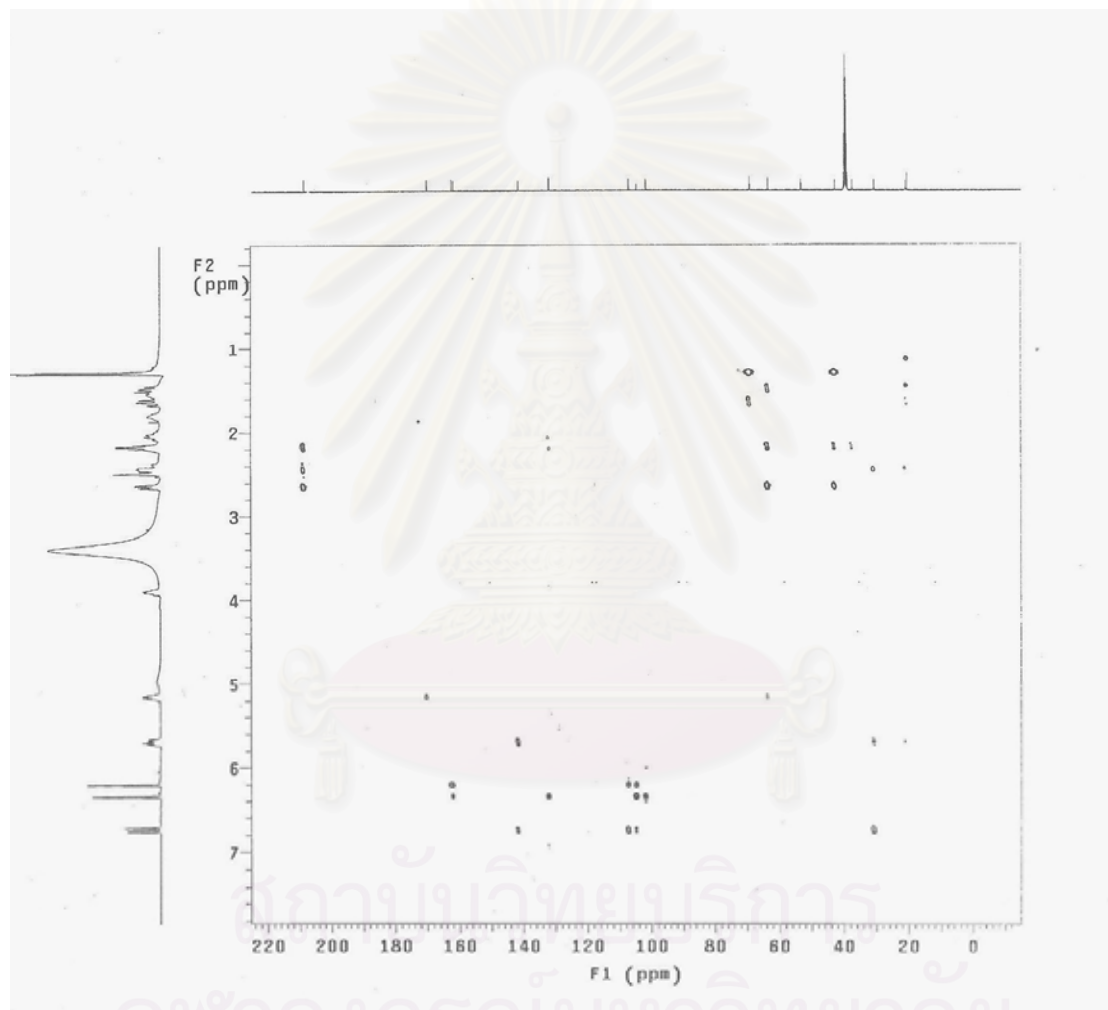
รูปที่ 12 โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^1\text{H-NMR}$ spectrum) ของสารประกอบ 2



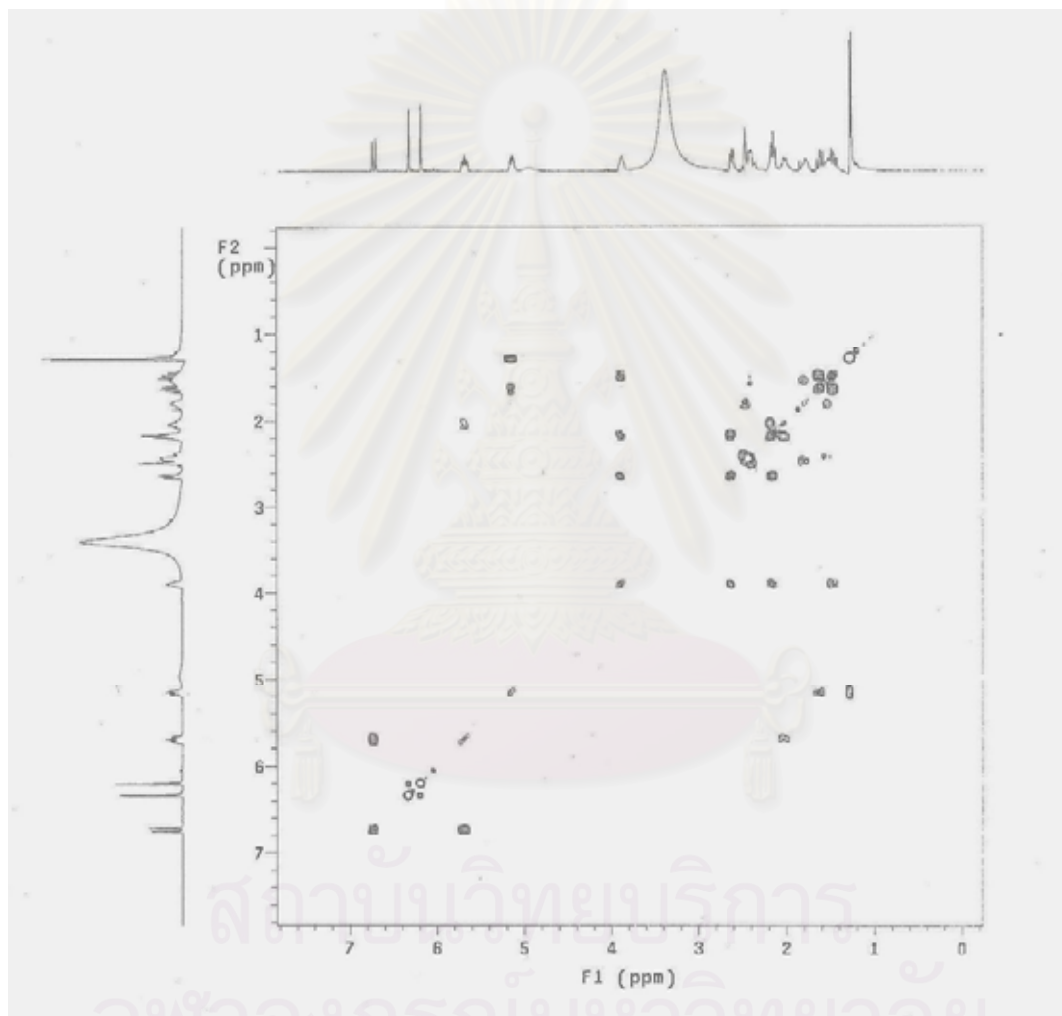
รูปที่ 13 คาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (^{13}C -NMR spectrum) ของสารประกอบ 2



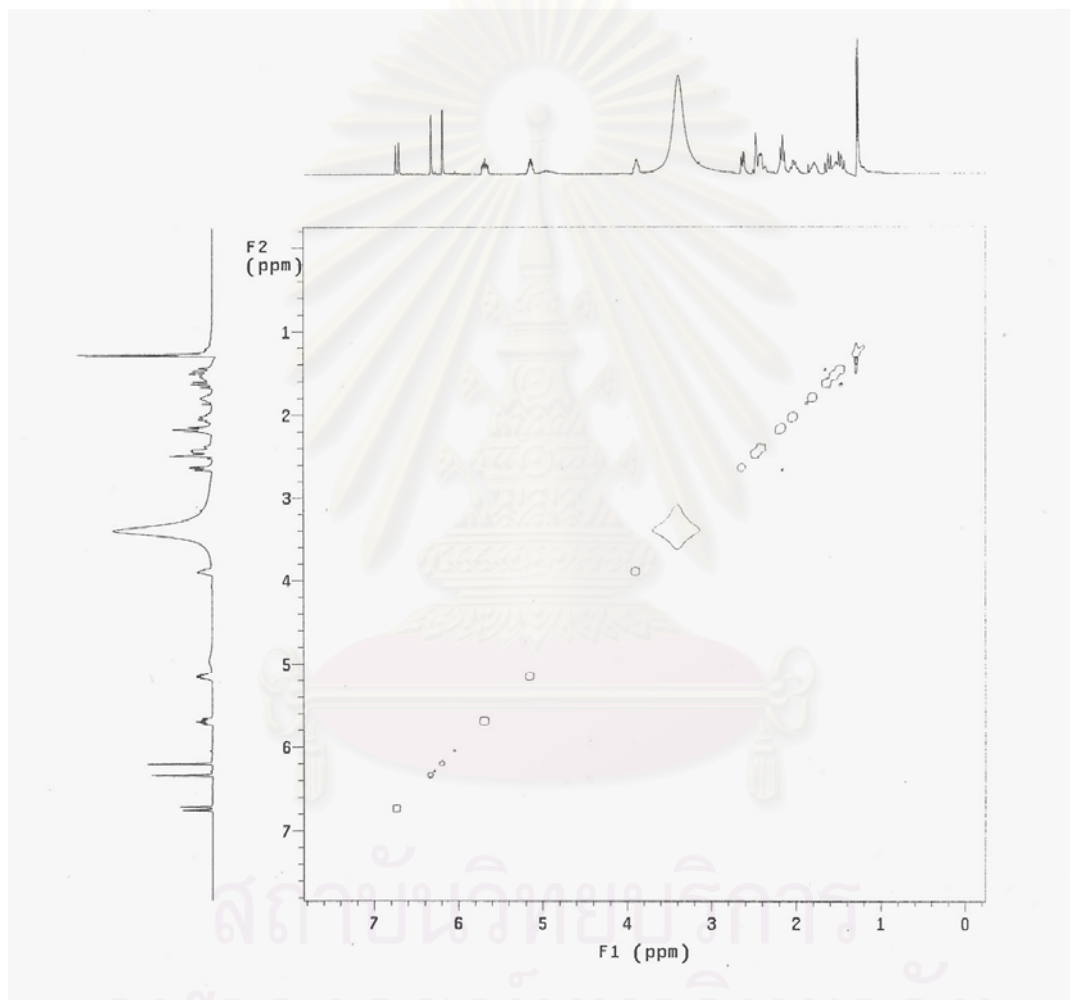
รูปที่ 14 gHSQC สเปกตรัมของสารประกอบ 2



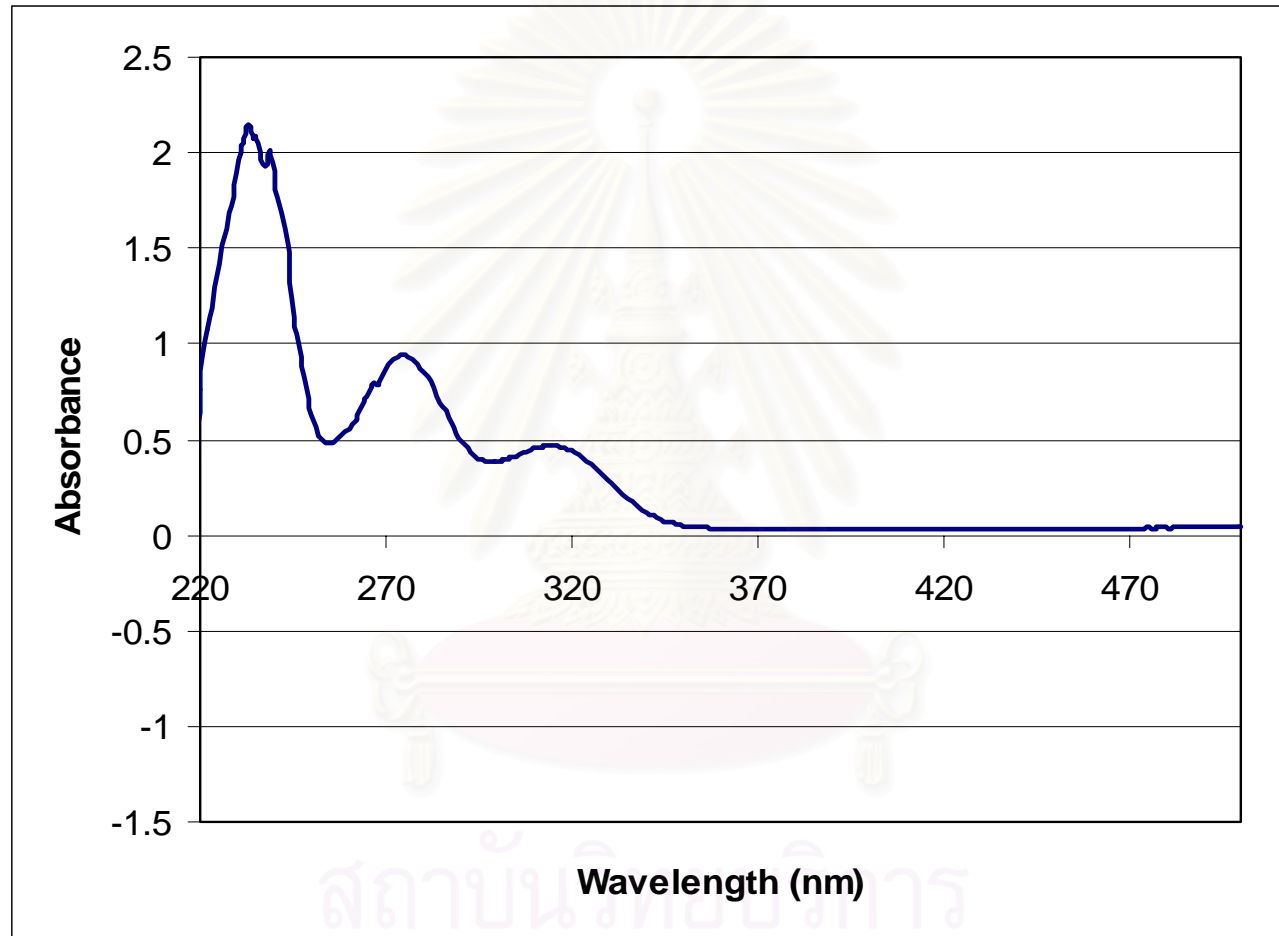
รูปที่ 15 gHMBC สเปกตรัมของสารประกอบ 2



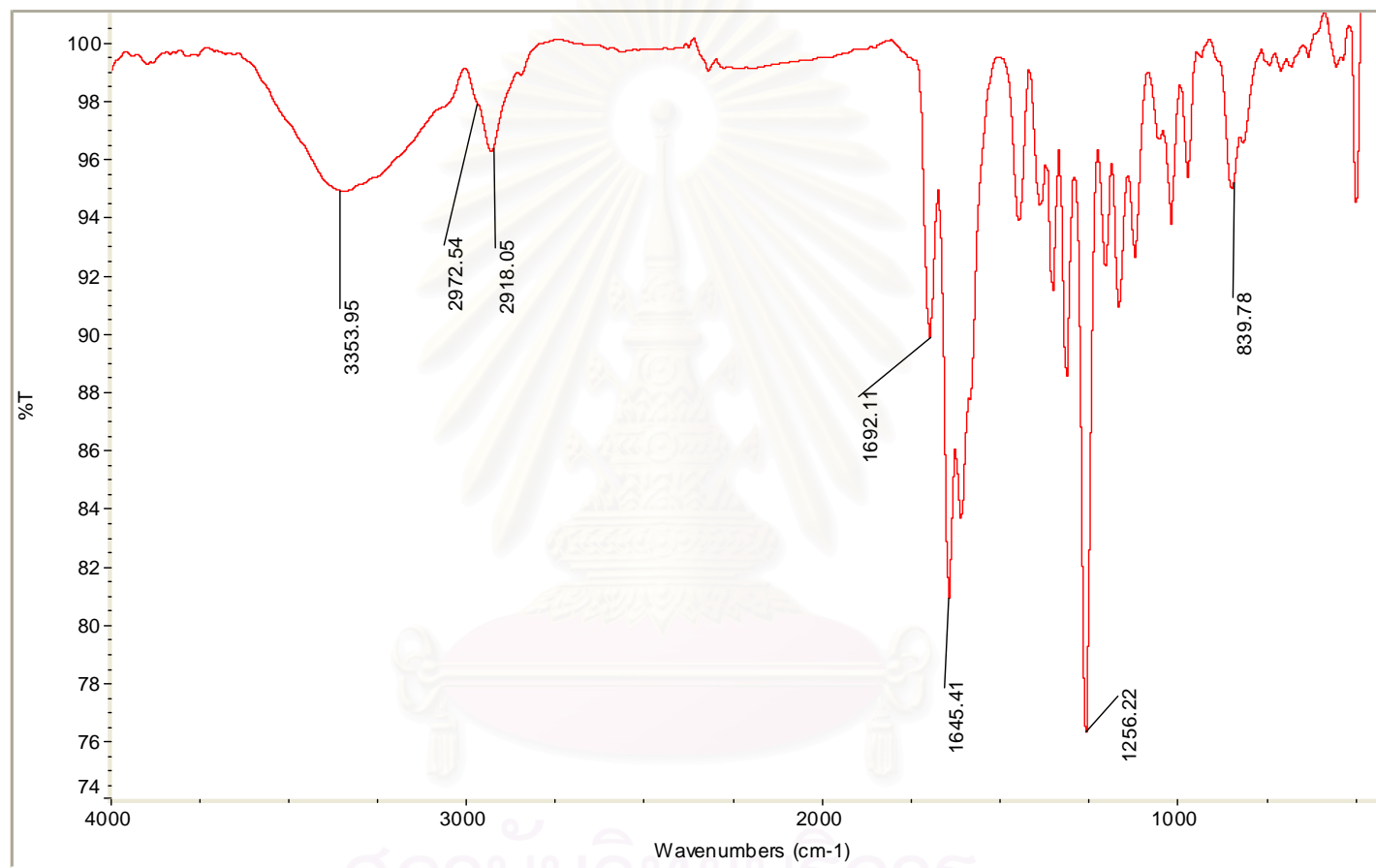
รูปที่ 16 gCOSY สเปกตรัมของสารประกอบ 2



รูปที่ 17 gNOESY สเปกตรัมของสารประกอบ 2

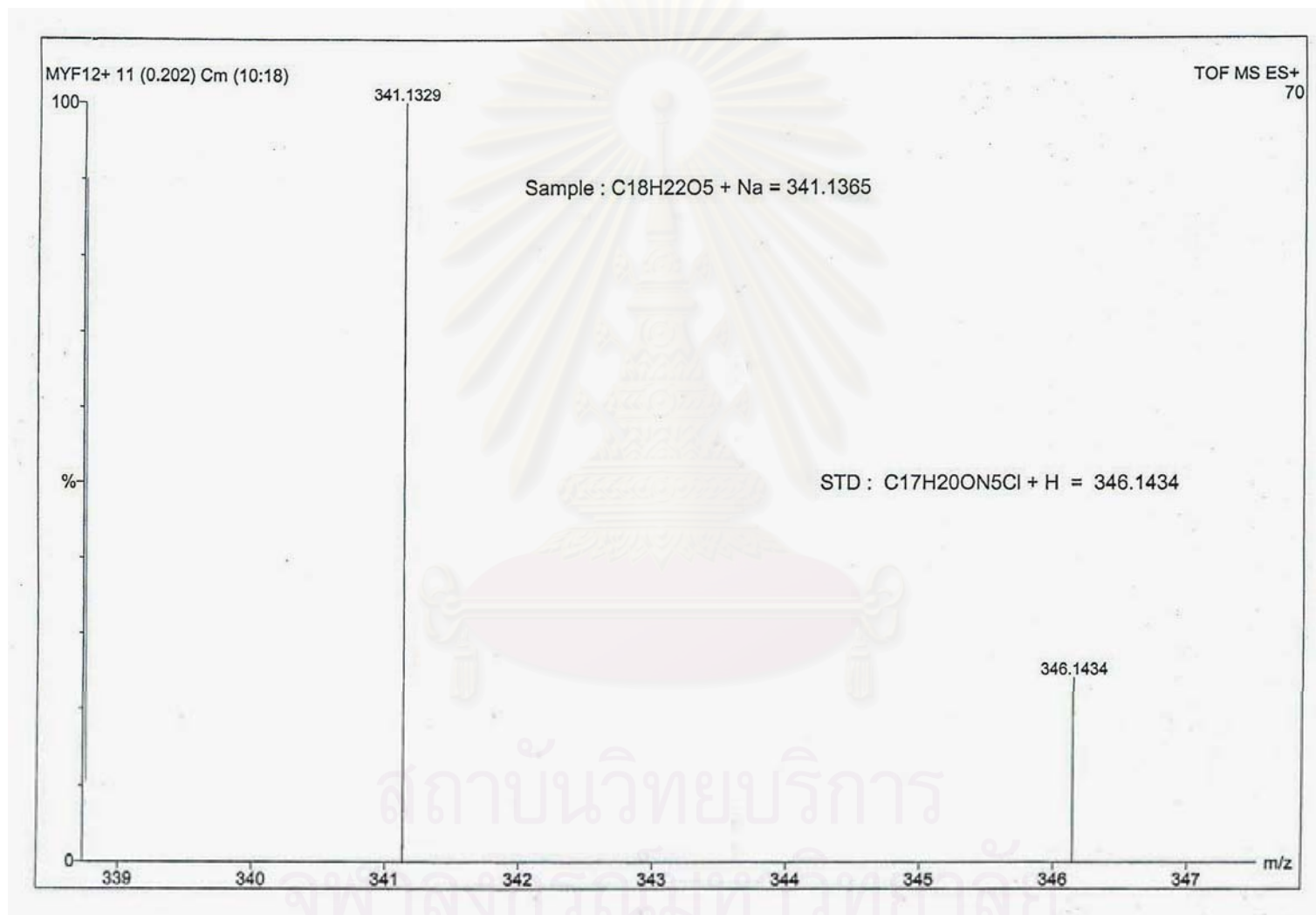


รูปที่ 18 อัลตราไวโอเลตสเปกตรัม (UV spectrum) ของสารประกอบ 3

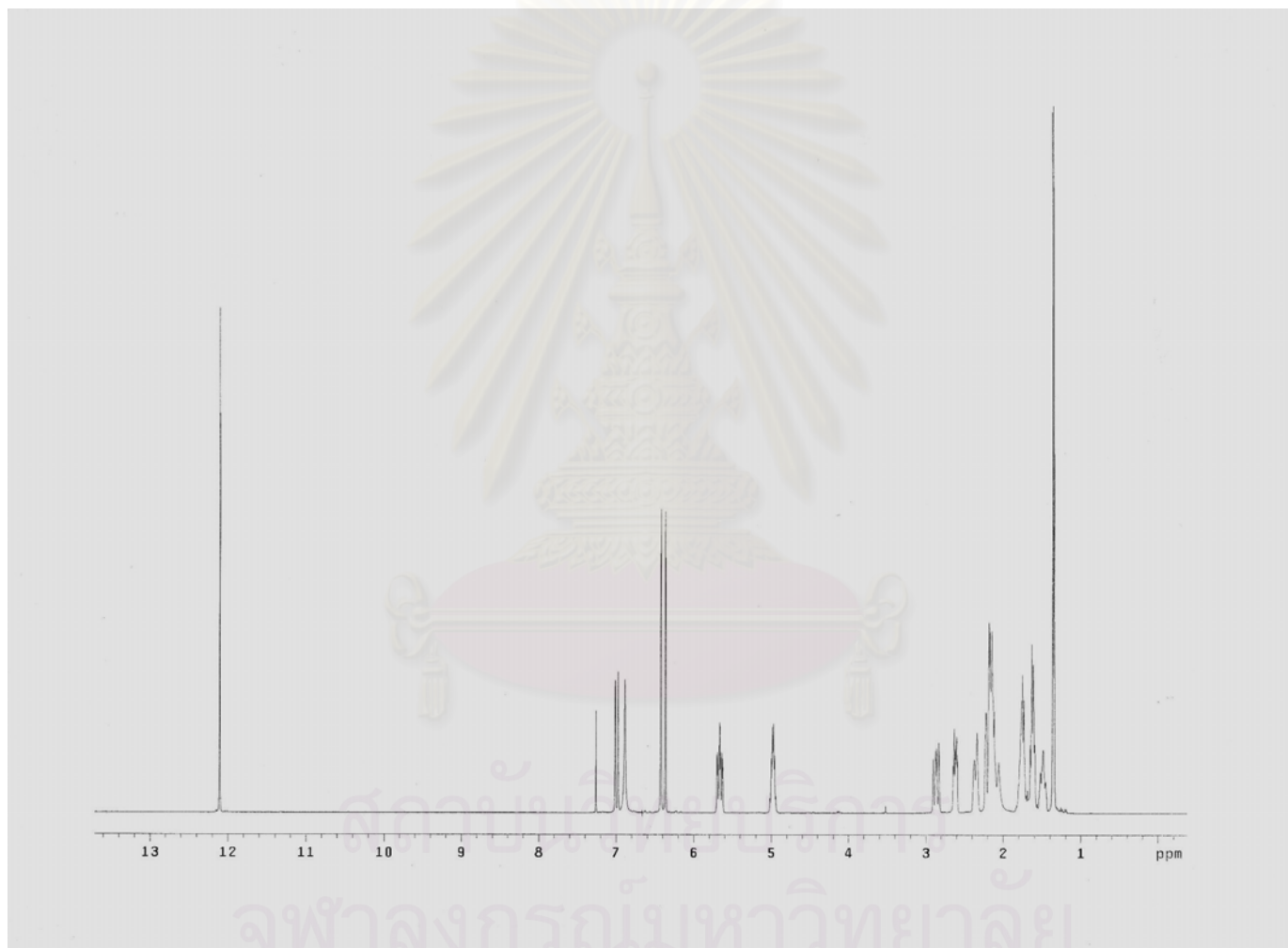


รูปที่ 19 อินฟราเรดสเปกตรัม (IR spectrum) ของสารประกอบ 3

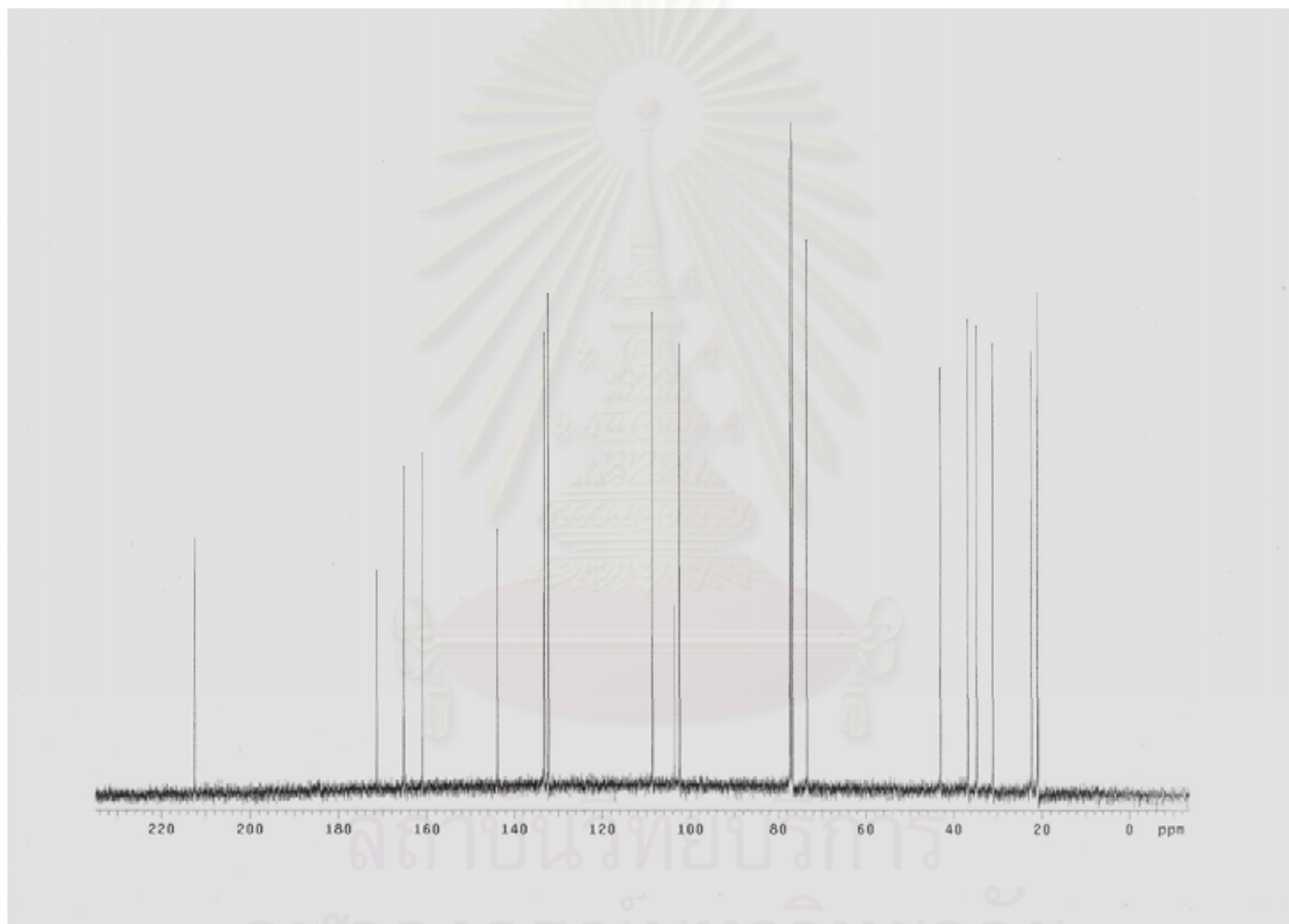
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



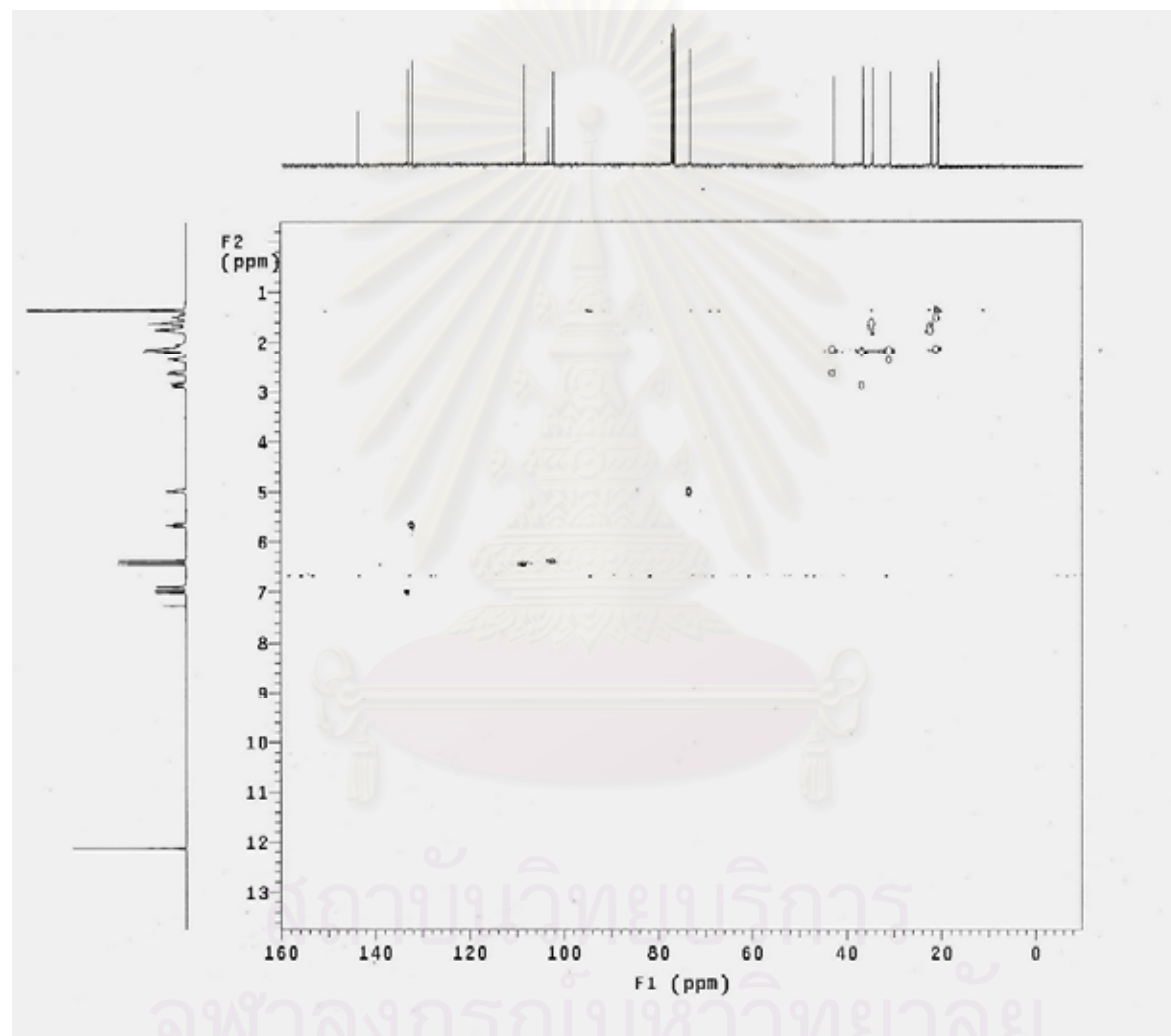
รูปที่ 20 แมสสเปกตรัม (MS spectrum) ของสารประกอบ 3



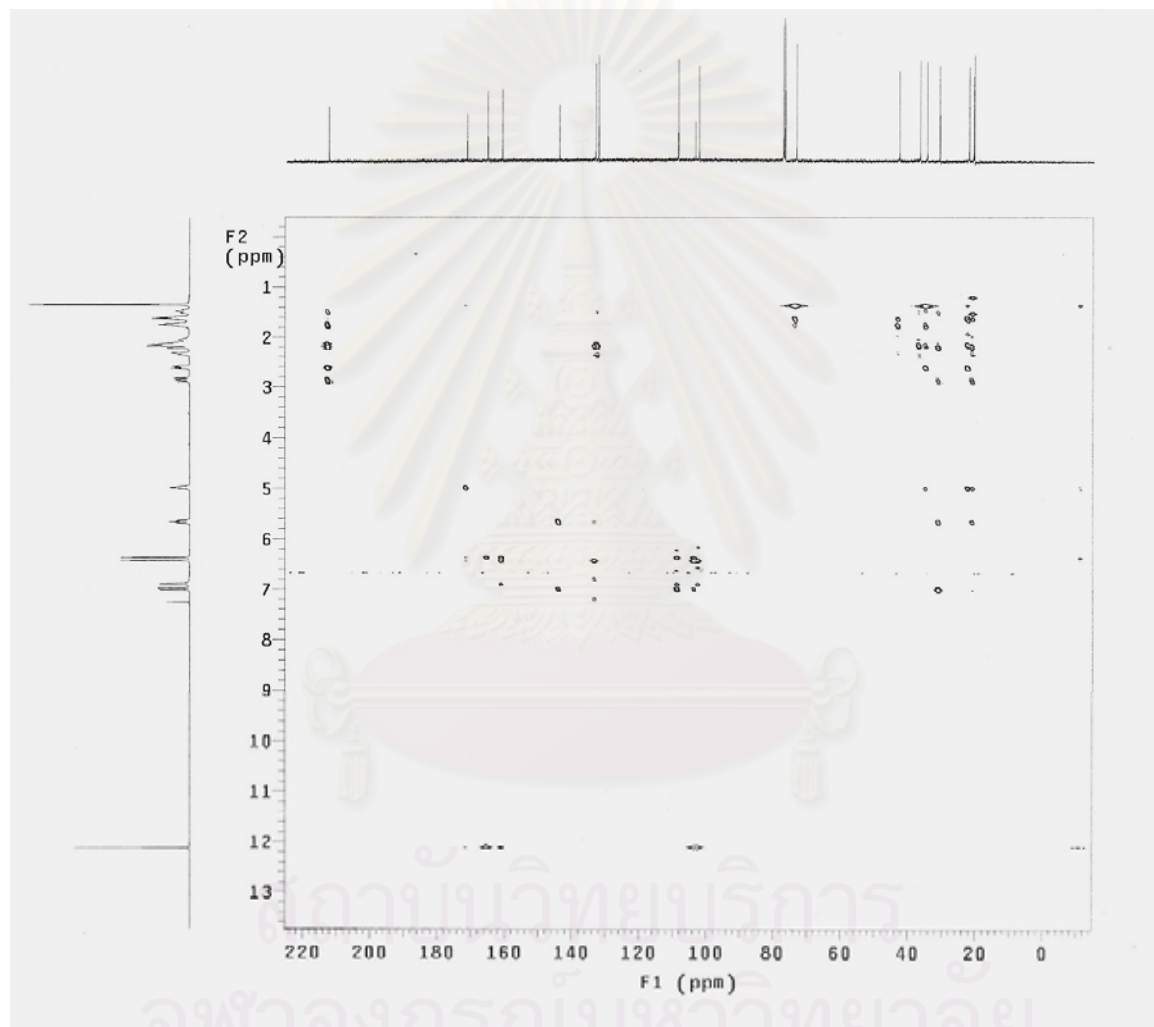
รูปที่ 21 โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^1\text{H-NMR}$ spectrum) ของสารประกอบ 3



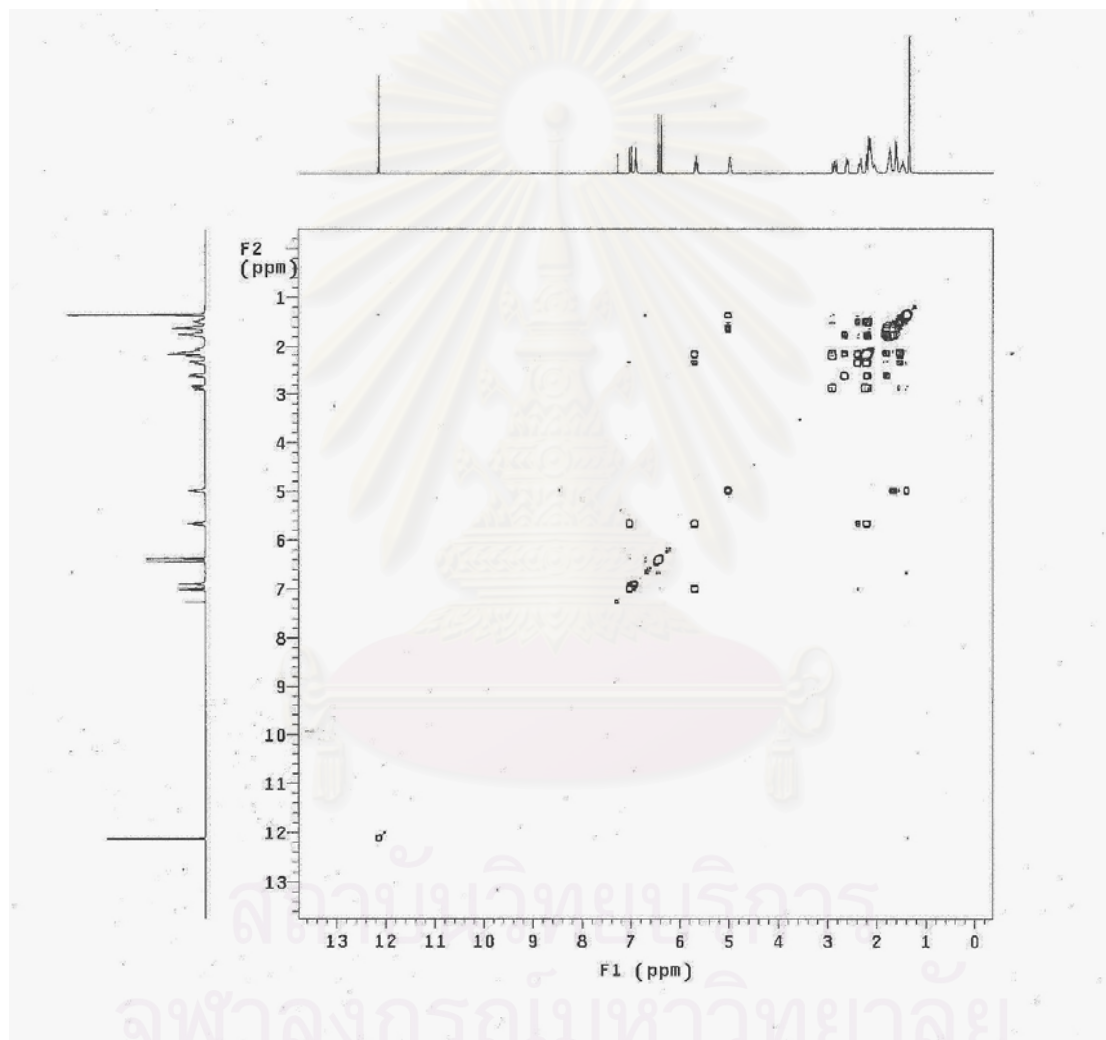
รูปที่ 22 คาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (^{13}C -NMR spectrum) ของสารประกอบ 3



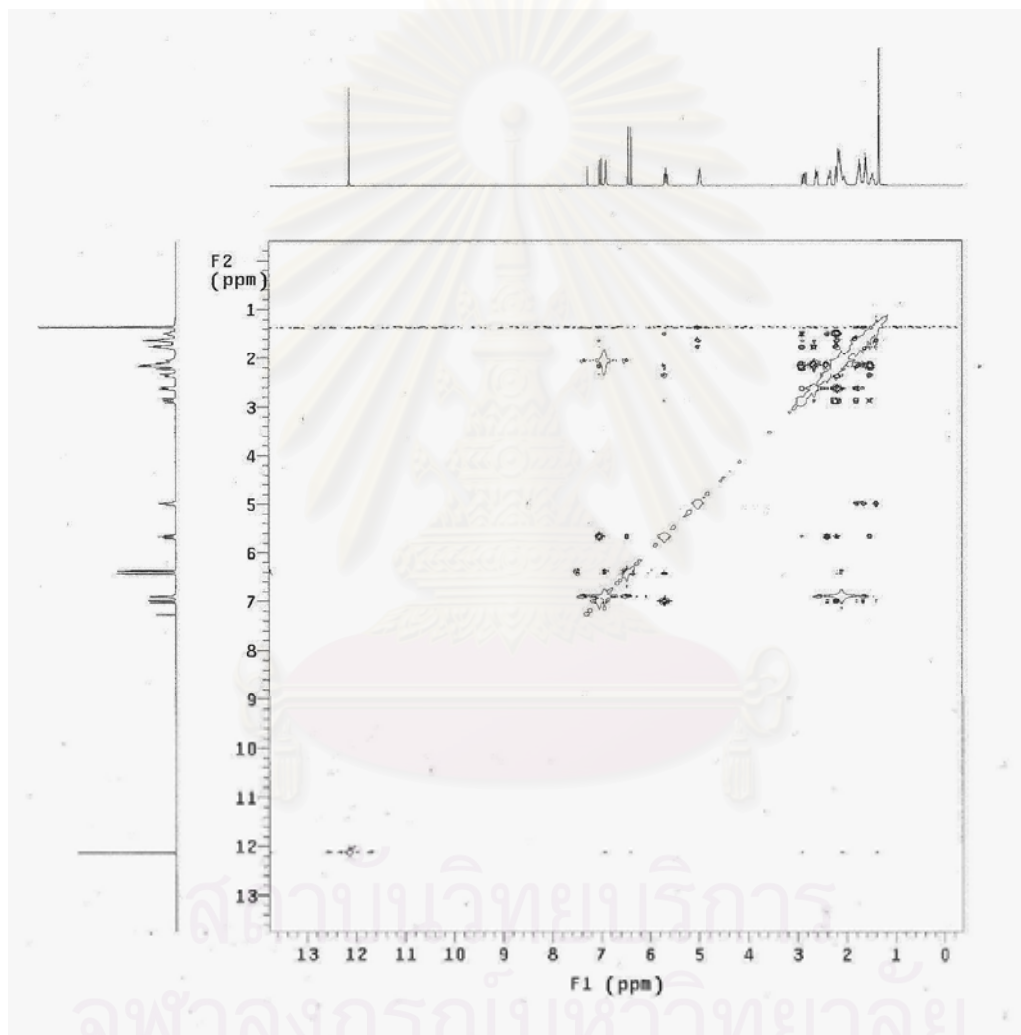
รูปที่ 23 gHSQC สเปกตรัมของสารประกอบ 3



รูปที่ 24 gHMBC สเปกตรัมของสารประกอบ 3



รูปที่ 25 gCOSY สเปกตรัมของสารประกอบ 3



รูปที่ 26 gNOESY สเปกตรัมของสารประกอบ 3

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปัทมา บัวเพชร เกิดเมื่อวันที่ 12 ธันวาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนกัลยาณีศรีธรรมราช จังหวัดนครศรีธรรมราช และได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในปีการศึกษา 2549



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย