



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM11
จากต้นระเวียง *Catunaregam tomentosa* และไฮโซเลต SMUL
จากต้นชันทองพญาบาท *Suregada multiflora*

โดย

ดร. พรเทพ ชมชื่น

ธันวาคม พ.ศ. 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM11

จากต้นกระดังงา *Catunaregam tomentosa* และไฮโซเลต SMUL

จากต้นชันทองพญาบาท *Suregada multiflora*

ผู้วิจัย

สังกัด

อาจารย์ ดร. พรเทพ ชมชื่น มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และมหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ: MRG5580251

ชื่อโครงการ: สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM11 จากต้นระเวียง *Catunaregam tomentosa* และไอโซเลต SMUL2 จากต้นชันทองพญาบาท *Suregada multiflora*

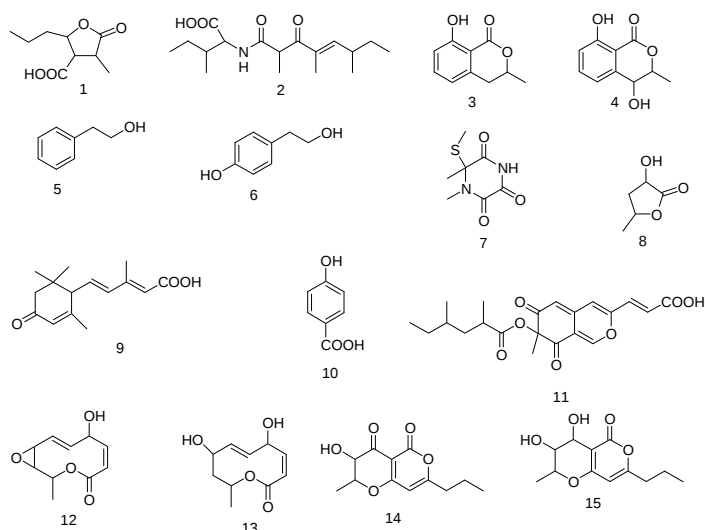
ชื่อนักวิจัย: อาจารย์ ดร. พรเทพ ชมชื่น

อีเมลล์: porntep.c@chandra.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: วันที่ 10 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2555 ถึงวันที่ 9 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2557

บทคัดย่อ:

งานวิจัยนี้ทำการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 และราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM11 โดยนำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 มาทำการแยกสารบริสุทธิ์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีได้สารใหม่ 2 ชนิด คือ สาร A (1) และสาร B (2) และผลิตสารที่มีรายงานแล้ว 5 ชนิด ได้แก่ สาร lasiodipline (3) สาร mellenin (4) สาร 4-hydroxy mellein (5) สาร phenethyl alcohol (6) และ สาร 4-hydroxyphenethyl alcohol (7) ในส่วนน้ำหมักเชื้อจากราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM11 พบสารใหม่ทางผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ 1 ชนิด คือ สาร α -hydroxybutyrolactone (8) และสารที่มีรายงานแล้ว 7 ชนิด ได้แก่ สาร abscisic acid (9) สาร 4-hydroxy benzoic acid (10) สาร lumatoic acid (11) สาร modiolind (12) สาร pyrenolind A (13) สาร radicin (14) และ สาร radicinol (15) การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารเหล่านี้ใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปี เมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากราไอโซเลต SMUL2 ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สาร A (1) สาร B (2) สาร α -hydroxybutyrolactone และสาร lasiodipline (3) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง MOLT-3 อย่างอ่อน และมีฤทธิ์ในการยับยั้งของเซลล์มะเร็ง HepG2 ก่อนข้างดีที่ระดับ 0.26 – 7.53 $\mu\text{g/ml}$ โดยเฉพาะสาร lasiodipline (3) มีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง HepG2 เท่ากับ 0.26 $\mu\text{g/ml}$ การศึกษาทางฐานพันธุศาสตร์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA พบว่าราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 จัดอยู่ในสกุล *Lasiodiplodia* sp. (100% sequence homology)



คำหลัก: สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ราเอนโดไฟต์ ต้นระเวียง ต้นชันทองพญาบาท

Abstract

Project Code: MRG5580251

Project Title: Bioactive compounds from endophytic fungi, *Curvularia geniculata* CTOM11 from *Catunaregam tomentosa* and isolate SMUL2 from *Suregada multiflora*

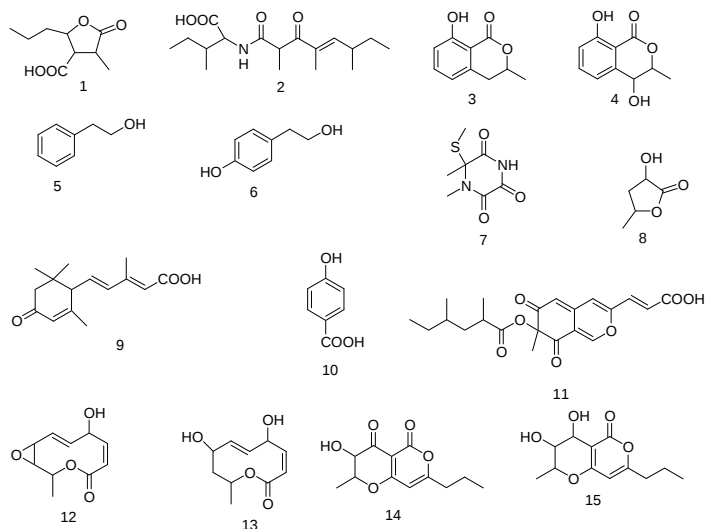
Investigator: Dr. Porntep Chomcheon

E-mail Address: porntep.c@chandra.ac.th

Project Period: 10 August 2012 to 9 August 2014

Abstract:

The purpose of this research was to characterize bioactive compounds from endophytic fungi isolate SMUL2 and *Curvularia geniculata* CTOM11. An organic extract from cultures of the isolate SMUL2 was purified by chromatographic techniques to afford two new compounds, metabotite A (**1**) and metabolite B (**2**), along with five known compounds, lasiodipline (**3**), mellenin (**4**), 4-hydroxy mellein (**5**) phenethyl alcohol (**6**) and 4-hydroxyphenethyl alcohol (**7**). The fermentation broth of the strain *Curvularia geniculata* CTOM11 afforded a new natural compound (synthesis known), α -hydroxybutyrolactone (**8**), together with seven known compounds such as abscisic acid (**9**), 4-hydroxy benzoic acid (**10**), lumatoic acid (**11**), modiolind (**12**), pyrenolind A (**13**), radicnin (**14**) and radicninol (**15**). Their structures were elucidated by analysis of spectroscopic data. Compound A (**1**), Compound B (**2**), α -hydroxybutyrolactone and lasiodipline (**3**) exhibited moderate anti-MOLT-3 activity ranging 0.26 – 7.53 μ g/ml, while, lasiodipline (**3**) had strongly activity with IC_{50} at 0.26 μ g/ml. On the basis of morphology and nucleotide sequences of ITS1-5.8S-ITS2 regions of rDNA, the fungus SMUL2 was identified as *Lasiodiplodia* sp. (100% sequence homology).



Keywords: Bioactive compounds endophytic fungi *Catunaregam tomentosa* *Suregada multiflora*

บทสรุปผู้บริหาร

โรคติดเชื้อ รวมทั้งเชื้อรา เชื้อวัณโรค เชื้อไวรัส Herpes simplex และเชื้อมาลาเรีย ยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย และแนวโน้มของปัญหาที่ทวีความรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากการเกิดเชื้อดื้อต่อยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน และการเพิ่มจำนวนของผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ นอกจากนี้โรคมะเร็งก็เป็นปัญหาสำคัญในวงการแพทย์ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ดังนั้น การค้นคว้าสารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านมะเร็งจึงเป็นสิ่งจำเป็นมากสำหรับวงการแพทย์และสาธารณสุข

ในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM12 จากต้นกระเวียง (*Catunaregam tomentosa*) และราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 จากต้นชันทองพญาบาท (*Suregada multiflora*) เนื่องจากก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้แยกสารใหม่ 5 ชนิด คือ สาร curvularides A-E จากราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM12 โดยเฉพาะสาร curvularides B มีฤทธิ์ต้านรา *Candida albicans* และสารนี้ยังช่วยเสริมฤทธิ์ยา fluconazole ด้วย (Chomcheon และคณะ, 2010) และจากการศึกษาของ Wiyakrutta และคณะ (2004) รายงานว่าราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อต่างชนิดกันจะสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันด้วย ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงนำราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM12 มาศึกษาต่อยอด โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตรต่างๆ เพื่อแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนของราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 สารสกัดหยาบที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร yeast extract sucrose (YES) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และรา *C. albican* ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11.0 มิลลิเมตร และ 11.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ด้วยวิธี disk diffusion (Ditpan, 2007) จากฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ผู้วิจัยจึงสนใจนำรามาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร YES แล้วนำสารสกัดหยาบมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อแยกและหาสูตรโครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM12 และราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบทางชีวภาพฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 ในระดับสกุลและ/หรือชนิด

ในการวิจัยนี้ได้นำราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM12 จากต้นกระเวียง (*Catunaregam tomentosa*) และราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 จากต้นชันทองพญาบาท (*Suregada multiflora*) โดยนำราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM12 จากต้นกระเวียง ซึ่งได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Chomcheon และคณะ (2010) และ Ditpan (2007), ตามลำดับ โดยเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM12 ในอาหารเหลวสูตรต่างๆ คือ อาหาร Czapek yeast autolysate อาหาร malt extract broth อาหาร MID broth อาหาร potato dextrose broth (PDB) อาหาร Sabouraud's dextrose broth และอาหาร yeast extract sucrose (YES) ที่บ่มทิ้งไว้ที่วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง (stationary condition) นาน 21 วัน แล้วนำสารสกัดหยาบมาตรวจสอบด้วย ^1H NMR จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM12 ใน

อาหารที่เหมาะสมในปริมาณมากเพียงพอแล้วทำการแยกสารให้ได้สารบริสุทธิ์เพื่อหาสูตรโครงสร้างทางเคมี และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย และฤทธิ์ต้านมะเร็ง ส่วนของราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว yeast extract sucrose (YES) ปริมาตร 10 ลิตร บ่มทิ้งไว้ที่วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง (stationary condition) นาน 21 วัน แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้างทางเคมีแล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย และฤทธิ์ต้านมะเร็ง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย และฤทธิ์ต้านมะเร็ง จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 ในระดับสกุลและ/หรือชนิด โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางโมเลกุล

ผลการทดลองการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM11 และราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 โดยนำสารสกัดหยาบจากจากราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM11 มาทำการแยกสารบริสุทธิ์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟี การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารเหล่านี้ใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลอัลตราไวโอเลต-วิชิเบล (UV) สเปกโทรสโกปี อินฟราเรด (IR) สเปกโทรสโกปี แมสสเปกโทรเมทรี (MS) และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) ได้สาร 8 ชนิด คือ สาร radicinin สาร radicinol สาร modiolide A สาร curvulide B สาร α -hydroxybutyrolactone สาร lunatoic acid A สาร abscisic acid และสาร α -hydroxybutyrolactone ซึ่งสาร α -hydroxybutyrolactone จะใช้เป็นตั้งต้น ในการสังเคราะห์ตัวยา ปัจจุบันได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี (Kagayama และคณะ, 2005) ในงานวิจัยนี้เป็นการค้นพบครั้งแรกว่าผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต (new natural products) โดยราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM11 ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพแบบสะอาด (white-biotechnology) ในการลดการใช้สารเคมีเดิมที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม โดยอาจนำมาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม (optimum) เพื่อให้ผลิตสารนี้ให้ได้ในปริมาณมากพอ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 แยกได้เป็นสารใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ สาร A และสาร B โดยสาร A และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีรายงานมาแล้ว 5 ชนิด ได้แก่ สาร mellein สาร 4-hydroxy mellein สาร phenethyl alcohol สาร 4-hydroxyphenethyl alcohol และสาร lasiodipline การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง 4 cell lines ได้แก่ เซลล์ HepG2 (hepatocarcinoma) เซลล์ MOLT-3 (acute lymphoblastic leukemia) เซลล์ A549 (lung carcinoma) และเซลล์ HuCCA-1 (cholangiocarcinoma) พบว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ สาร α -hydroxybutyrolactone lasiodipline สาร A และสาร B ไม่มีฤทธิ์ต้านเซลล์ HuCCA-1 และ A549 อย่างไรก็ตามก็มีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งเซลล์ MOLT-3 ส่วนเซลล์ HepG2 มีฤทธิ์ค่อนข้างดีโดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.26 – 7.53 $\mu\text{g/ml}$ โดยเฉพาะสาร lasiodipline มีฤทธิ์ยับยั้งเทียบเท่ายาต้านมะเร็ง Doxorubicin ซึ่งน่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปรกติต่อไป การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อวิเคราะห์ ORAC (oxygen radical absorbance capacity) มีฤทธิ์ไม่สูงมากนักต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีค่าอยู่ในช่วง 0.1 – 0.4 unit เมื่อเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Chomcheon และคณะ (2009) ของสารในกลุ่ม depsidones ที่มีค่าสูงถึง 4.3-5.9 unit และการศึกษาทาง

สัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 คาดว่าร่าเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 น่าจะเป็นราในสกุล *Lasiodiplodia* sp.

การวิจัยนี้ได้ไปนำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ในการประชุมระดับนานาชาติที่การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 14 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จังหวัดชลบุรี ในหัวข้อเรื่อง “New Metabolites From Endophytic Fungi, *Curvularia geniculata* CTOM11 And *Lasiodiplodia* sp. SMUL2” กำลังเตรียม manuscript โดยนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ สาร A (สารใหม่) สาร α -hydroxy-butyrolactone (สารใหม่ทางผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ) และสาร lasiodipline ตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Asian Natural Products Research ที่อยู่ในฐานข้อมูล ISI

จากโครงสร้างทางเคมีของสาร A (สารใหม่) จะมี chiral center 4 ตำแหน่งและมี โมเลกุลแบบ long chain จึงไม่สามารถหา relative configuration และ absolute configuration ได้ ดังนั้น จึงต้องตกผลึกสาร A ให้ได้ เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้าง แต่อย่างไรก็ตามสารนี้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดตกผลึกได้ยาก ซึ่งการแก้ไขอาจนำมาทำปฏิกิริยากับสาร 3,5-dinitrobenzoic acid เพื่อเพิ่มโอกาสการตกผลึกเช่นงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Chomcheon และคณะ (2010)

เนื้อหาทางวิจัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคติดเชื้อ รวมทั้งเชื้อรา เชื้อวัณโรค เชื้อไวรัส Herpes simplex และเชื้อมาลาเรีย ยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย และแนวโน้มของปัญหาที่ทวีความรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากการเกิดเชื้อดื้อยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน และการเพิ่มจำนวนของผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ นอกจากนี้โรคเริมก็เป็นปัญหาสำคัญในวงการแพทย์ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้โรคเริมมีอัตราตายสูงเช่นนี้เนื่องจากยาที่ใช้รักษาโรคเริมส่วนมากจะใช้ได้ผลเฉพาะเริมในระยะแรกเท่านั้นและยังมีความเป็นพิษสูงต่อผู้ป่วย นอกจากนี้ยังมีปัญหาการดื้อยาของเซลล์เริมอีกด้วย ดังนั้น การค้นคว้าสารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านเริมจึงเป็นสิ่งจำเป็นมากสำหรับวงการแพทย์และสาธารณสุข เราเป็นแหล่งสำคัญแหล่งหนึ่งที่สร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและนำมาใช้เป็นยารักษาโรค เช่น รา *Penicillium chrysogenum* ผลิตยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน (penicillin) รา *Penicillium griseofulvum* ผลิตยาด้านรากริซีโอฟูลิวัน (griseofulvin) รา *Monascus ruber* และ *Aspergillus terreus* ผลิตโลวาสตาติน (lovastatin) ซึ่งมีคุณสมบัติลดระดับคอเลสเตอรอล (cholesterol) ในเลือด และรา *Trichoderma polysporum* ผลิตไซโคลสปอริน เอ (cyclosporin A) ซึ่งมีคุณสมบัติกดภูมิคุ้มกัน เราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมาก โดยคาดว่าจำนวนสายพันธุ์ราทั้งหมดที่มีในโลกมีประมาณ 1.6 ล้านสายพันธุ์ จำนวนสายพันธุ์ราที่ถูกค้นพบในระยะเวลาที่ผ่านมาประมาณ 70,000 สายพันธุ์ ดังนั้นจำนวนสายพันธุ์ราที่ถูกค้นพบแล้วจนถึงปัจจุบันจึงมีเพียงประมาณ 7 - 8 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากแหล่งที่มีการศึกษาแยกรามิเพียงไม่กี่แหล่งเท่านั้น เช่น ราที่อยู่ในดิน นอกจากนี้เป็นที่เชื่อกันว่าราที่เจริญในแหล่งพิเศษมักสร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ดังนั้น การศึกษาแยกราจากแหล่งใหม่ เช่น ราที่อาศัยอยู่ในต้นไม้หรือที่เรียกว่า ราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) ราที่อาศัยอยู่ในแมลง (insect fungi) และราที่ได้จากทะเล (marine derived fungi) จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะแยกได้สายพันธุ์ใหม่ และ/หรือ ราที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ (Charlie และ Watkinson, 2001) ราเอนโดไฟต์เป็นราประเภทหนึ่งซึ่งเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดโรค จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าราเอนโดไฟต์สามารถสร้างสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Tan และ Zou, 2001) นอกจากนี้ราเอนโดไฟต์บางชนิดยังสามารถสร้างสารชนิดเดียวกับพืชที่ราอาศัยอยู่ ได้แก่ *Texomyces andreanae* เป็นราที่แยกได้จากเปลือกด้านในของต้น Pacific yew (*Taxus brevifolia*) สามารถสร้างสาร paclitaxel ได้เช่นเดียวกับพืชที่อาศัยอยู่ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาไปเป็นยา (Taxol[®]) ใช้เป็นยารักษามะเร็งเต้านม และมะเร็งปากมดลูก (Stierle และคณะ, 1993) จากการที่ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น ต้นไม้ในประเทศไทยจึงมีความหลากหลายทางชีวภาพมาก นอกจากนี้ ต้นไม้จำนวนมากก็มีสรรพคุณในการรักษาโรค จึงน่าจะมีโอกาสมากที่จะพบราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์

ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านรา ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย และฤทธิ์ต้านมะเร็ง ในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษารวบรวมเชื้อราจากราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM12 จากต้นกระเวียง (*Catunaregam tomentosa*) และราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 จากต้นขันทองพยาบาท (*Suregada multiflora*) เนื่องจากก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้แยกสารใหม่ 5 ชนิด คือ สาร curvularides A-E จากราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM12 โดยเฉพาะสาร curvularides B มีฤทธิ์ต้านรา *Candida albicans* และสารนี้ยังช่วยเสริมฤทธิ์ยา fluconazole ด้วย (Chomcheon และคณะ, 2010) และจากการศึกษาของ Wiyakrutta และคณะ (2004) รายงานว่าราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อต่างชนิดกันจะสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันด้วย ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงนำราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM12 มาศึกษาต่อยอด โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อสูตรต่างๆ เพื่อแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนของราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 สารสกัดหยาบที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร yeast extract sucrose (YES) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และรา *C. albican* ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11.0 มิลลิเมตร และ 11.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ด้วยวิธี disk diffusion (Ditpan, 2007) จากฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ผู้วิจัยจึงสนใจนำรานี้มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร YES แล้วนำสารสกัดหยาบมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกและหาสูตรโครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM12 และราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย รา ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย และฤทธิ์ต้านมะเร็ง
3. เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 ในระดับสกุลและ/หรือชนิด

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมของราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM11 เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM11 ในอาหารเหลวสูตรต่างๆ คือ อาหาร Czapek yeast autolysate อาหาร malt extract broth อาหาร MID broth อาหาร potato dextrose broth (PDB) อาหาร Sabouraud's dextrose broth และอาหาร yeast extract sucrose (YES) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง (stationary condition) นาน 21 วัน ปริมาตร 200 มล. ที่อุณหภูมิห้อง นาน 21 วัน จากนั้นนำมารองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกเส้นใยออกจากน้ำหมักเชื้อ สกัดน้ำหมักเชื้อ (culture broth) ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์จำนวน 3 ครั้ง แล้วระเหยแห้งโดยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (rotary evaporator) แล้วนำไปวิเคราะห์ ^1H NMR spectrum ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยดูรูปแบบการผลิตสารจากจำนวนและชนิดของโปรตอน

2. การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM11 และไอโซเลต SMUL2

เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM11 ในอาหารเหลวที่เหมาะสมจากการคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมปริมาตร 10 ลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง (stationary condition) นาน 21 วัน ในส่วนของราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว yeast extract sucrose (YES) ปริมาตร 10 ลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง นาน 21 วัน

3. การสกัดสารสกัดหยาบ

นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านผ้าขาวบาง เพื่อแยกเส้นใยออกจากน้ำหมักเชื้อ สกัดน้ำหมักเชื้อ ด้วยเอทิล แอซิเตทจำนวน 3 ครั้ง แล้วระเหยแห้งโดยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (rotary evaporator) ได้เป็นสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อ ส่วนของเส้นใยนำไปแช่ (maceration) ในเมทานอล นาน 2 วัน และไดคลอโรมีเทน นาน 2 วัน ตามลำดับ ได้เป็นสารสกัดหยาบจากเส้นใย

4. การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสารสกัดหยาบมาทำแยกสารบริสุทธิ์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟี ได้แก่

4.1 เทคนิค Preparative thin-layer chromatography (PTLC)

4.2 เทคนิค Column chromatography

4.2.1 Gel filtration chromatography (Sephadex LH-20)

4.2.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

5. การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลโดยเทคนิค สเปกโทรสโกปี ได้แก่

5.1 เทคนิค Ultraviolet (UV) spectroscopy

5.2 เทคนิค Infrared (IR) spectroscopy

5.3 เทคนิค Mass spectroscopy (MS)

5.4 เทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy, particularly 2D NMR

techniques

5.5 เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานมาแล้วก่อนหน้านี้

6. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์

6.1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ

แบคทีเรียทดสอบที่ใช้ คือ

Staphylococcus aureus ATCC29213

Bacillus subtilis ATCC6633

Escherichia coli ATCC25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC27853

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารบริสุทธิ์ โดยวิธี broth microdilution assay และใช้ Indonitrotetrazolium (INT) เป็น indicator บ่งบอกการมีชีวิตของแบคทีเรีย

1. เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบใน tryptic soy broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งมีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland turbidity standard

2. เจือจางแบคทีเรียทดสอบใน Mueller Hinton broth ให้มีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 2×10^3 cfu ต่อ มิลลิลิตร

3. ละลายสารสกัดใน dimethylsulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้น 0.08 - 1.0 กรัมต่อ มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับการละลายของสารบริสุทธิ์ และเจือจางต่ออีก 100 เท่า ใน Mueller Hinton broth (MHB) ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 0.8 - 1.0 กรัมต่อ มิลลิลิตร แล้วดูดสารละลายปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของ microtitre plate (96-well flat shape) ในแต่ละ plate มีหลุมควบคุม 2 หลุม คือ หลุมที่ใส่ MHB ซึ่งมี DMSO 1% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และหลุมที่เป็น sterility control ซึ่งใส่ MHB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

4. เตรียมแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ (2) ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร ยกเว้นหลุม sterility control แล้วนำ microtitre plate เข้าป้อนในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

5. เติมสารละลาย INT ความเข้มข้น 2 mM หลุมละ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

6. ดูผลจากสีที่เกิดขึ้น หลุมใดที่มีสีม่วงแสดงว่ามีเชื้อ หลุมใดไม่เปลี่ยนสีแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

6.2 ฤทธิ์ต้านรา

ราทดสอบที่ใช้ คือ *Candida albicans* ATCC10231 ทดสอบฤทธิ์ต้านราของสารบริสุทธิ์ โดยวิธี broth microdilution assay และใช้ Indonitrotetrazolium (INT) เป็น indicator บ่งบอกการมีชีวิตของ *C. albicans*

1. เพาะเลี้ยงราทดสอบใน Sabouraud' s dextrose agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งมีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland turbidity standard

2. เตรียม cell suspension ของ *C. albicans* ใน sterile normal saline solution ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland turbidity standard

3. เจือจางราทดสอบใน Sabouraud' s dextrose broth (SDB) ให้มีจำนวนราเท่ากับ 2×10^3 cfu ต่อ มิลลิลิตร

4. ละลายสารสกัดใน dimethylsulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้น 0.08 - 1.0 กรัมต่อ มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับการละลายของสารบริสุทธิ์ และเจือจางต่ออีก 100 เท่า ใน SDB ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 0.8 - 1.0 กรัมต่อ มิลลิลิตร แล้วดูดสารละลายปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของ microtitre plate (96-well flat shape) ในแต่ละ plate มีหลุมควบคุม 2 หลุม คือ หลุมที่ใส่ SDB ซึ่งมี DMSO 1% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และหลุมที่เป็น sterility control ซึ่งใส่ MHB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

5. เตรียมบราทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ (3) ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร ยกเว้นหลุม sterility control แล้วนำ microtitre plate เข้าป้อนในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

6. เติมสารละลาย INT ความเข้มข้น 2 mM หลุมละ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

7. ดูผลจากสีที่เกิดขึ้น หลุมใดที่มีสีม่วงแสดงว่ามีเชื้อ หลุมใดไม่เปลี่ยนสีแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านรา

6.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี microplate Alamar blue assay และใช้ *Mycobacterium tuberculosis* เป็นแบคทีเรียทดสอบ โดยห้องปฏิบัติการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค หน่วยปฏิบัติการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

6.4 ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียของสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี lactate dehydrogenase assay และ microdilution radioisotope technique และใช้ *Plasmodium falciparum* K1 strain เป็นเชื้อทดสอบ โดยห้องปฏิบัติการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย หน่วยปฏิบัติการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

6.5 ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ทดสอบความสามารถสารบริสุทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง KB cell line (oral human epidermoid carcinoma) และ BC (breast cancer) ด้วยวิธี colorimetric cytotoxicity assay โดยห้องปฏิบัติการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง หน่วยปฏิบัติการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

6.6 ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

ทดสอบความเป็นพิษของสารบริสุทธิ์ต่อเซลล์ปกติ (Vero cell) ด้วยวิธี colorimetric cytotoxicity assay โดยห้องปฏิบัติการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง หน่วยปฏิบัติการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

7. การจัดจำแนกราเณโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2

7.1 บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาของราเณโดไฟต์

เพาะเลี้ยงราเณโดไฟต์บนอาหารเพาะเชื้อ 5 ชนิด ได้แก่ corn meal agar (CMA), malt extract agar (MEA), potato dextrose agar (PDA), Sabouraud's dextrose agar (SDA) และ yeast extract sucrose agar (YES) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน แล้วถ่ายรูบบันทึกรูปร่างทั้งด้านบนและด้านล่างของโคโลนี

7.2 จัดจำแนกราเณโดไฟต์โดยเทคนิค slide culture

เพื่อตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของเส้นใยและสปอร์ เช่น การจัดเรียงตัวของสปอร์

จำนวนสปอร์ ลักษณะผิวสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อจัดจำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์ในระดับจีแนส (genus)

7.3 วิธีทางโมเลกุล

7.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 ในอาหารเหลว potato dextrose broth ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นนำส่วนเซลล์ของเชื้อรามาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการของ Lee และ Taylor (1990)

7.3.2 การเพิ่มปริมาณด้วยพีซีอาร์ (PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8-ITS2 ของ ribosomal RNA gene (rDNA) ด้วย PCR โดยใช้ forward primer ITS5 และ reverse primer ITS4 ตามวิธีการของ White และคณะ (1990)

7.3.3 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ

หาลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8-ITS2 ของ ribosomal RNA gene (rDNA) ด้วยเครื่อง automate sequencer ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

7.3.4 การวิเคราะห์ด้วยชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics)

นำลำดับเบสที่ได้จากข้อ (7.3.4) ไปสืบค้นลำดับเบสที่เหมือนกันในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN 2.2.18⁺ (Zhang และคณะ, 2000) จัดเรียงลำดับเบสของราเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Clustal W 1.82 (Thompson และคณะ, 1994) หาความสัมพันธ์และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการของราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 กับราในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003)

8. การเก็บรักษาราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM11 และไอโซเลต SMUL2

เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 ถึง 10 วัน แล้วใช้เครื่องเจาะจุลคอร์ก ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร เจาะเส้นใย และเก็บในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ผลการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้มีผลการวิจัยดังต่อไปนี้

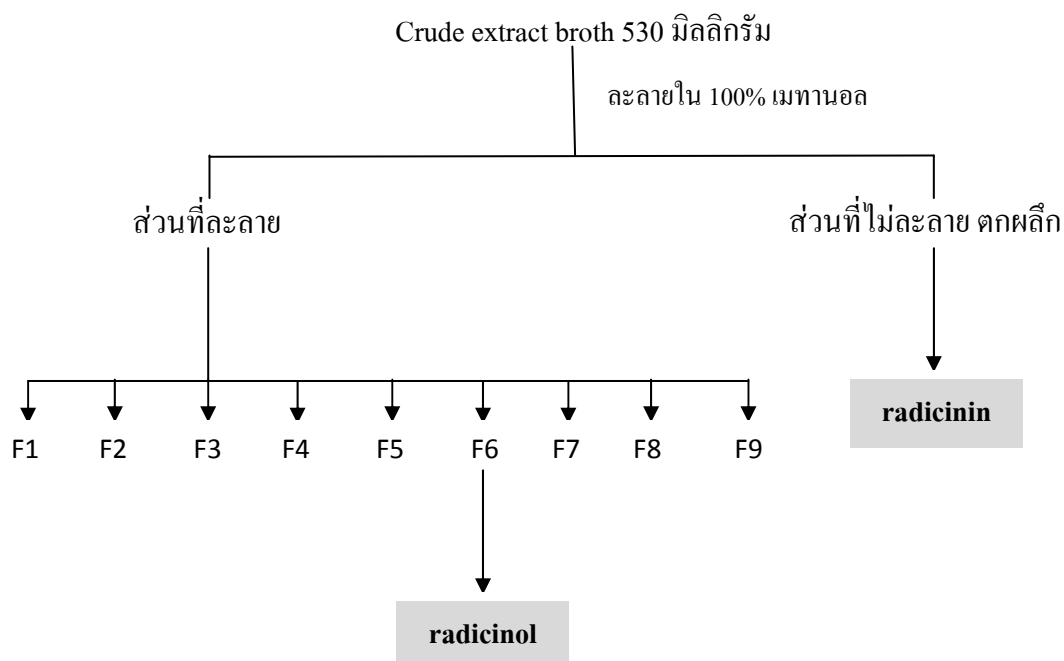
1. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM11
2. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2
3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM11

จากการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM11 ในอาหารเหลวสูตรต่างๆ คือ อาหาร Czapek yeast autolysate อาหาร malt extract broth อาหาร MID broth อาหาร potato dextrose broth (PDB) อาหาร Sabouraud's dextrose broth และอาหาร yeast extract sucrose (YES) เมื่อนำไปวิเคราะห์ ^1H NMR spectrum ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี และคัดเลือกสูตรอาหารที่น่าสนใจ เพื่อนำไปแยกสารบริสุทธิ์ คือ อาหาร MID broth อาหาร potato dextrose broth (PDB) และอาหาร Sabouraud's dextrose broth

1. สารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM11 ในอาหาร MID broth

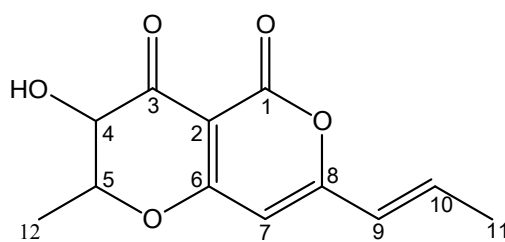
นำส่วนสารสกัดหยาบ 530 มิลลิกรัม เป็นของหนืดสีน้ำตาลเข้ม มาทำการละลาย ด้วย 100% เมทานอลแยกเป็นส่วนใหญ่ละลายนำไปตกผลึกได้เป็นสาร radicinin 130 มิลลิกรัม ส่วนที่ละลายนำไปแยกสารบริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH20 ได้ fraction ที่ 6 เป็นสาร radicinol แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 Fraction ต่างๆ ที่ได้จากสารสกัดหยาบในอาหาร MID

การวิเคราะห์โครงสร้างสาร Radicinin

เมื่อหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค ^1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY พบว่าได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ตรงกับ Mass spectrum คือ $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_5$ $m/z = 237.0757$ (charge 1 ของ H^+) ดังนั้น MW สารเท่ากับ 236.0757 เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสาร radicinin ที่พบมาแล้วก่อนหน้านี้ (known compound) จากงานวิจัยของ Robeson และ Strobel (1982) และ Nakajima และคณะ (1997) ซึ่งมีค่า δH และลักษณะของ peak สารเหมือนกันจึงคาดว่าเป็นสารเดียวกัน (ตารางที่ 1)



Radicinin

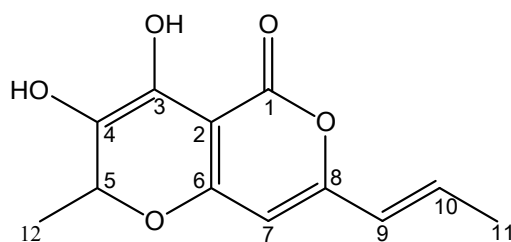
ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบค่า δH ของสาร radicinin กับสารเดียวกันที่มีรายงานก่อนหน้านี้

ตำแหน่ง คาร์บอน	δH (ppm), <i>mult</i> ของ radicinin	δH (ppm), <i>mult</i> ของ radicinin (Robeson และ Strobel, 1982)	δH (ppm), <i>mult</i> ของ radicinin (Nakajima และคณะ, 1997)
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	3.95, <i>d</i>	3.99, <i>d</i>	3.98, <i>d</i>
5	4.30, <i>dq</i>	4.36, <i>dq</i>	4.36, <i>dq</i>
6	-	-	-
7	5.80, <i>s</i>	5.86, <i>s</i>	5.84, <i>s</i>
8	-	-	-
9	6.0, <i>dq</i>	6.05, <i>d</i>	6.03, <i>dq</i>
10	6.90, <i>dq</i>	6.97, <i>dq</i>	6.95, <i>dq</i>
11	1.95, <i>dq</i>	1.97, <i>dq</i>	1.95, <i>dq</i>
12	1.60, <i>d</i>	1.66, <i>d</i>	1.64, <i>d</i>

การวิเคราะห์โครงสร้างสาร Radicinol

เมื่อหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค 1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135

เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY พบว่าได้สูตรโมเลกุล $C_{12}H_{14}O_5$ ตรงกับ Mass spectrum คือ $C_{12}H_{14}NaO_5$ $m/z = 261.0733$ (charge 1 ของ Na^+) ดังนั้น MW สารเท่ากับ 238.0733 เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสาร radicinol ที่พบมาแล้วก่อนหน้านี้ (know compound) จากงานวิจัยของ Nakajima และคณะ (1997) ซึ่งมีค่า δH และลักษณะของ peak สารเหมือนกันจึงคาดว่า เป็นสารเดียวกัน (ตารางที่ 2)



Radicinol

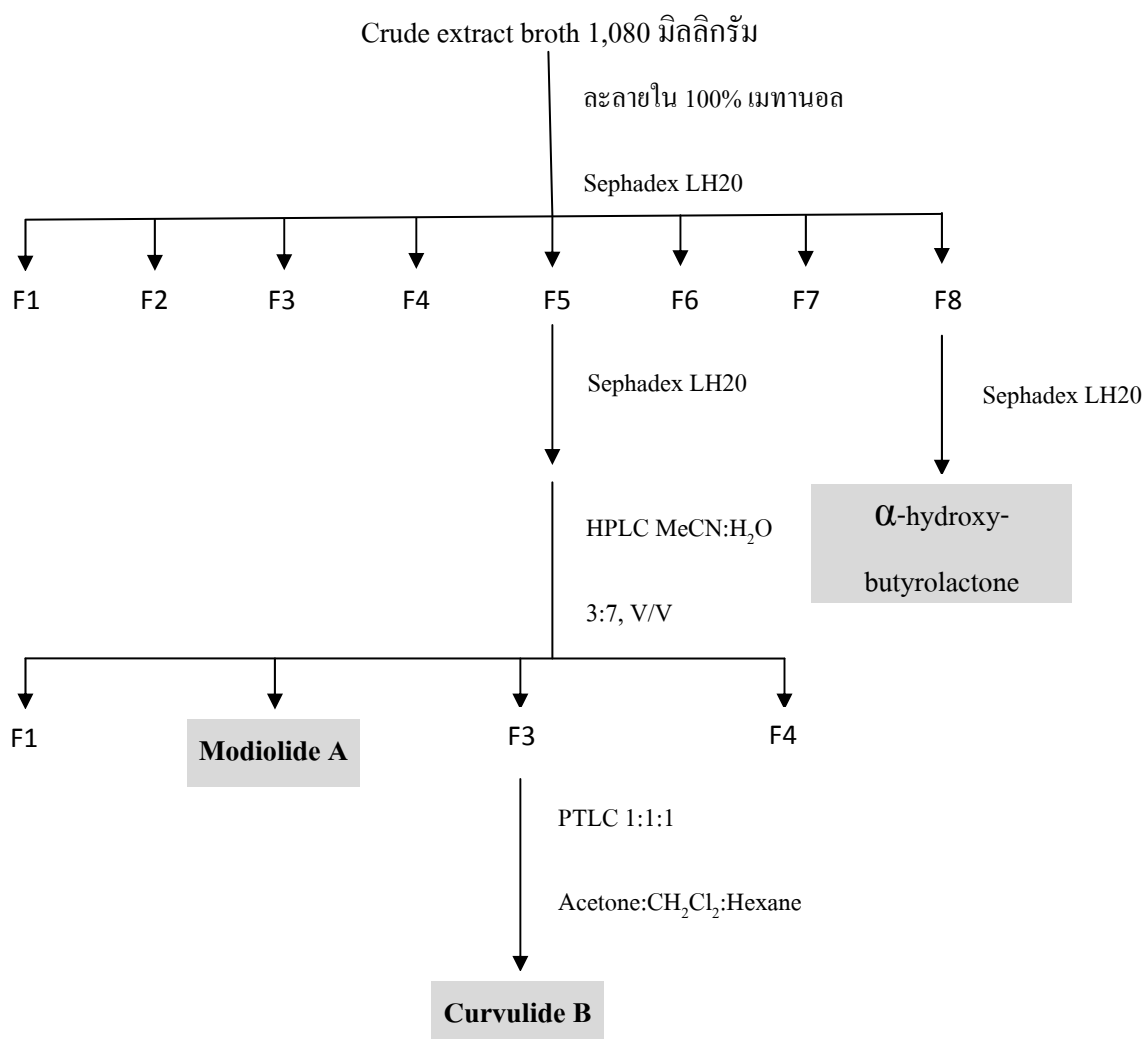
ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบค่า δH ของสาร radicinol กับสารเดียวกันที่มีรายงานก่อนหน้านี้

ตำแหน่ง คาร์บอน	δH (ppm), <i>mult</i> ของ radicinol	δH (ppm), <i>mult</i> ของ radicinol (Nakajima และคณะ, 1997)
1	-	-
2	-	-
3	4.65, <i>d</i>	4.60, <i>d</i>
4	3.66, <i>d</i>	3.88, <i>d</i>
5	4.15, <i>dq</i>	4.37, <i>dq</i>
6	-	-
7	5.78, <i>s</i>	5.79, <i>s</i>
8	-	-
9	6.0, <i>dq</i>	5.97, <i>dq</i>
10	6.70, <i>dq</i>	6.72, <i>dq</i>
11	1.92, <i>dq</i>	1.91, <i>dq</i>
12	1.50, <i>d</i>	1.50, <i>d</i>

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ radicinin และradicinol ของ Li และคณะ (2004) พบว่าเป็น phytotoxic มีผลต่อการงอกของรากพืชพวก carrot ที่ความเข้มข้น 10-20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้เป็น biocontrol ทางการเกษตรได้

2. สารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM11 ในอาหาร potato dextrose broth

นำส่วนสารสกัดหยาบ 1,080 มิลลิกรัม เป็นของหนืดสีเหลืองเข้ม มาทำการแยกด้วย Sephadex LH20 HPLC และPTLC ได้เป็นสาร modiolide A 24 มิลลิกรัม สาร curvulide B 18 มิลลิกรัม และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ (new natural product) α -hydroxybutyrolactone 120 มิลลิกรัม แสดงดังภาพที่ 2

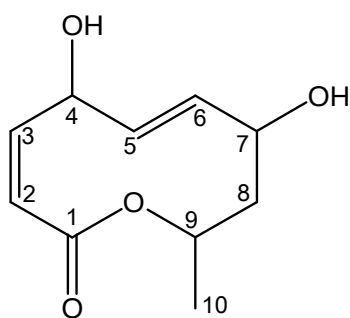


ภาพที่ 2 Fraction ต่างๆ ที่ได้จากราสกัดหยาบในอาหาร potato dextrose broth

การวิเคราะห์โครงสร้างสาร modiolide A

เมื่อหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค ^1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY พบว่าได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ตรงกับ Mass spectrum คือ $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NaO}_4$ $m/z = 221.0891$ (charge 1 ของ Na^+) ดังนั้น MW สารเท่ากับ 198.0891 เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสาร modiolide A ที่พบมาแล้วก่อนหน้านี้ (known compound) จากงานวิจัยของ Evidente และคณะ (2008) ซึ่งมีค่า δH และลักษณะของ peak สารเหมือนกันจึงคาดว่า เป็นสารเดียวกัน (ตารางที่ 3)

modiolide A มีฤทธิ์ที่น่าสนใจในการเป็นสารกำจัดวัชพืช (mycoherbicide) ต่อ *Cirsium arvense* (Evidente และคณะ, 2008)



Modiolide A

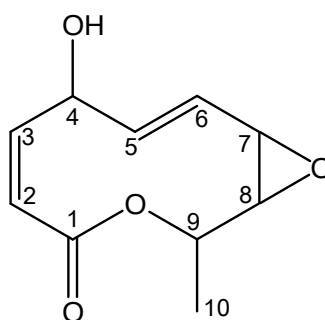
ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบค่า δH ของสาร modiolide A กับสารที่มีรายงานก่อนหน้านี้

ตำแหน่ง คาร์บอน	δH (ppm), <i>mult</i> ของ modiolide	δH (ppm), <i>mult</i> ของ modiolide (Evidente และคณะ, 2008)
1	-	-
2	5.85, <i>d</i>	5.89, <i>d</i>
3	5.89, <i>d</i>	5.91, <i>d</i>
4	4.75, <i>br d</i>	4.79, <i>br d</i>
5	5.75, <i>dd</i>	5.74, <i>dd</i>
6	5.61, <i>dd</i>	5.63, <i>dd</i>
7	4.22, <i>br d</i>	4.26, <i>br d</i>
8	1.78, <i>ddd</i>	1.81, <i>ddd</i>
9	5.33, <i>ddq</i>	5.31, <i>ddq</i>
10	1.26, <i>d</i>	1.28, <i>d</i>

การวิเคราะห์โครงสร้างสาร curvulide B

เมื่อหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค 1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY พบว่าได้สูตรโมเลกุล $C_{10}H_{12}O_4$ ตรงกับ

Mass spectrum คือ $C_{10}H_{13}O_4$ $m/z = 197.0753$ (charge 1 ของ H^+) ดังนั้น MW สารเท่ากับ 196.0753 เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสาร curvulide B ที่พบมาแล้วก่อนหน้านี้ (know compound) จากงานวิจัยของ Greve และคณะ (2008) ซึ่งมีค่า δH และลักษณะของ peak สารเหมือนกันจึงคาดว่า เป็นสารเดียวกัน (ตารางที่ 4)



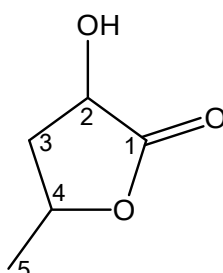
Curvulide B

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบค่า δH ของสาร curvulide B ที่มีรายงานก่อนหน้านี้

ตำแหน่ง คาร์บอน	δH (ppm), <i>mult</i> ของ curvulide B	δH (ppm), <i>mult</i> ของ curvulide B (Greve และคณะ, 2008)
1	-	-
2	5.99, <i>d</i>	5.87, <i>d</i>
3	6.13, <i>dd</i>	6.01, <i>dd</i>
4	4.77, <i>m</i>	4.71, <i>m</i>
5	5.96, <i>dd</i>	5.95, <i>dd</i>
6	5.84, <i>dd</i>	5.86, <i>dd</i>
7	3.65, <i>m</i>	3.57, <i>m</i>
8	2.95, <i>d</i>	2.98, <i>dd</i>
9	5.29, <i>dq</i>	5.38, <i>dq</i>
10	1.42, <i>d</i>	1.42, <i>d</i>

การวิเคราะห์โครงสร้างสาร α -hydroxybutyrolactone

เมื่อหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค ^1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY พบว่าได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3$ ตรงกับ Mass spectrum คือ $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3$ $m/z = 117.0546$ (charge 1 ของ H^+) ดังนั้น MW สารเท่ากับ 116.0546 เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสาร α -hydroxybutyrolactone ซึ่งข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสารนี้ แสดงดังตารางที่ 5



ตารางที่ 5 ข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสาร α -hydroxybutyrolactone

ตำแหน่ง	^{13}C NMR (δ ppm)	ชนิด	^1H NMR (δ ppm) Mult	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	177.96	C	-	-
2	67.50	CH	4.55, <i>q</i>	C-3, C-4 และ C-1
3	37.10	CH_2	2.28, <i>q</i> 2.40, <i>q</i>	C-5, C-2 และ C-1 C-5, C-2, C-4 และ C-1
4	75.17	CH	4.82, <i>m</i>	C-2 และ C-1
5	21.30	CH_3	1.41, <i>d</i>	C-4 และ C-3

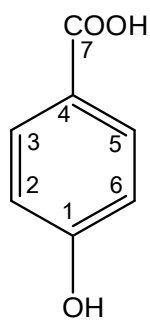
α -hydroxybutyrolactone เป็นสารสำคัญเป็นตั้งต้น (starting materials) ในการสังเคราะห์ตัวยา (pharmaceutical synthesis) ปัจจุบันได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี (Kagayama และคณะ, 2005) ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการค้นพบครั้งแรกว่าผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต (new natural products) โดยราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM11 ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพแบบสะอาด (white-biotechnology)

3. สารบริสุทธิ์จากราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM11 ในอาหาร Sabouraud's dextrose broth

นำส่วนสารสกัดหยาบ 900 มิลลิกรัม เป็นของหนืดสีน้ำตาลเข้มมาทำการแยกด้วย Sephadex LH20 silica gel และ PTLC ได้เป็นสาร 4-hydroxybenzoic acid 16 มิลลิกรัม สาร lunateic acid A 32 มิลลิกรัม และสาร abscisic acid 70 มิลลิกรัม แสดงดังภาพที่ 3

การวิเคราะห์โครงสร้างสาร 4-hydroxybenzoic acid

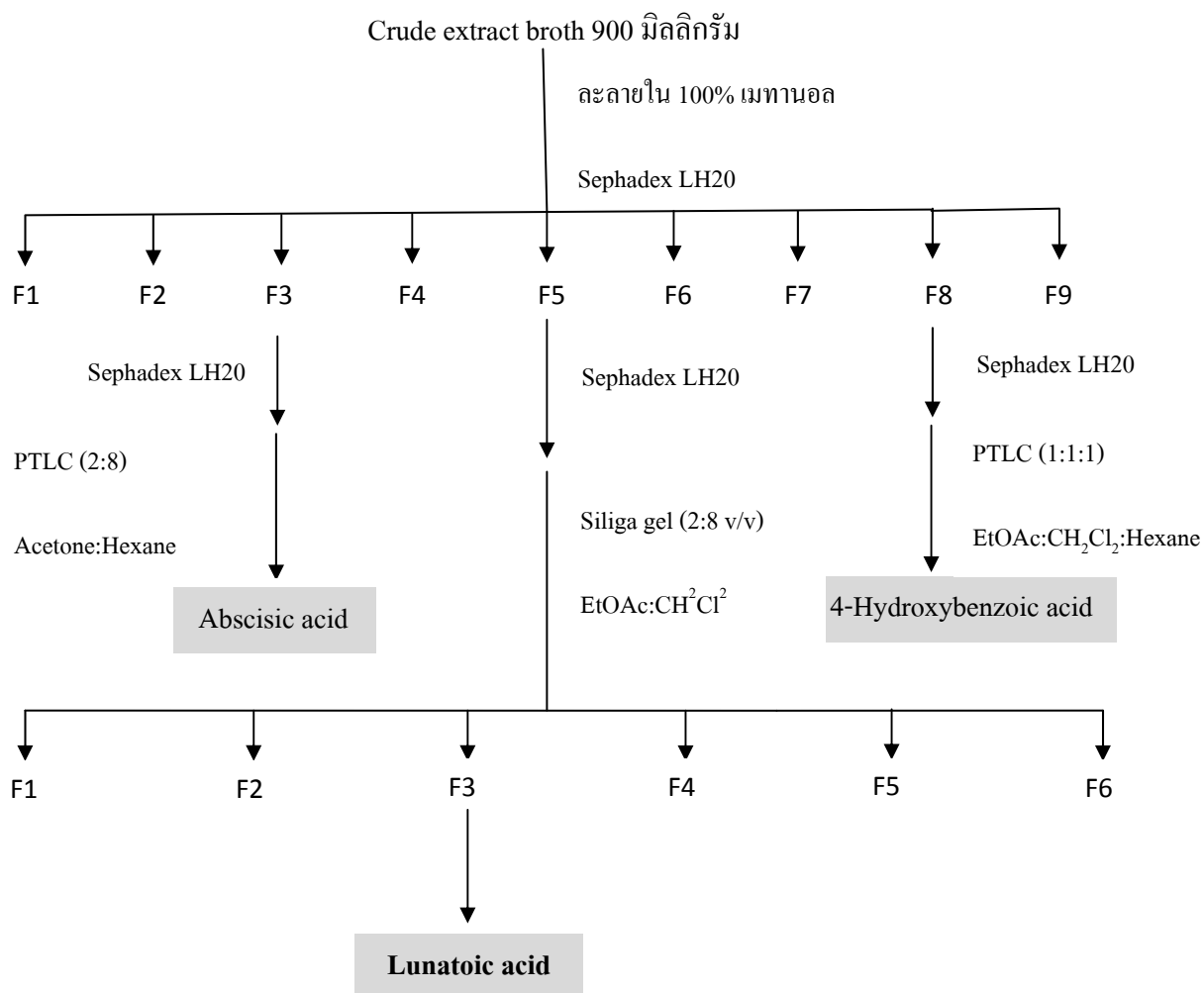
เมื่อหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค ^1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY พบว่าได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ ตรงกับ Mass spectrum คือ $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_3$ $m/z = 139.0384$ (charge 1 ของ H^+) ดังนั้น MW สารเท่ากับ 138.0384 เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสาร 4-hydroxybenzoic acid ซึ่งข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสารนี้ แสดงดังตารางที่ 6



4-hydroxybenzoic acid

ตารางที่ 6 ข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสาร 4-hydroxybenzoic acid

ตำแหน่ง	^{13}C NMR (δ ppm)	ชนิด	^1H NMR (δ ppm) Mult และ ค่า J	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	162.0	C	-	-
2	115.53	CH	6.81, <i>d</i> , 8 Hz	C-3, C-4, C-7 และ C-1
3	131.94	CH	7.78, <i>d</i> , 8 Hz	C-2, C-4, C-7 และ C-1
4	121.77	C	-	-
5	131.94	CH	7.78, <i>d</i> , 8 Hz	C-6, C-4, C-7 และ C-1
6	115.53	CH	6.81, <i>d</i> , 8 Hz	C-5, C-4, C-1 และ C-7
7	167.58	C	-	-

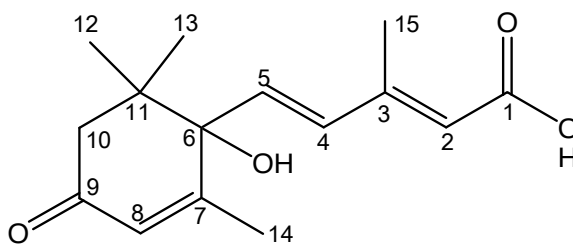


ภาพที่ 3 Fraction ต่างๆ ที่ได้จากสารสกัดหยาบในอาหาร Sabouraud's dextrose broth

การวิเคราะห์โครงสร้างสาร absciscic acid

เมื่อหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค ^1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY พบว่าได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ ตรงกับ Mass spectrum คือ $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{NaO}_4$ $m/z = 287.0267$ (charge 1 ของ Na^+) ดังนั้น MW สารเท่ากับ 264.0267 เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสาร absciscic acid ที่พบมาแล้วก่อนหน้านี้

(known compound) จากงานวิจัยของ Ferreres และคณะ (1996) ซึ่งมีค่า δ_H และลักษณะของ peak สารเหมือนกันจึงคาดว่า เป็นสารเดียวกัน (ตารางที่ 7)



abscisic acid

ตารางที่ 7 ข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสาร abscisic acid

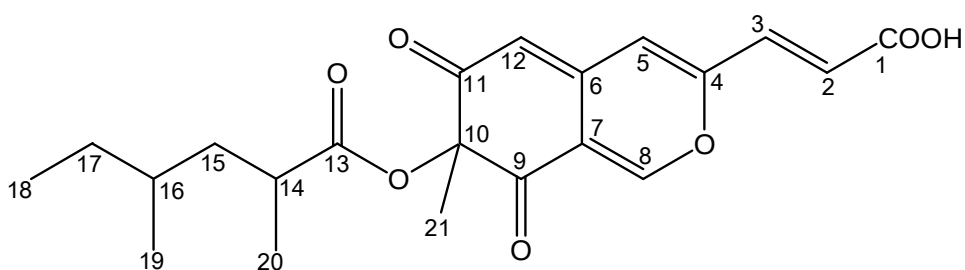
ตำแหน่ง	¹ H NMR, Mult abscisic acid	¹³ C NMR abscisic acid	¹ H NMR, Mult Ferrerres และคณะ (1996)	¹³ C NMR, Mult Ferrerres และ คณะ (1996)
1	-	170.45	-	171.51
2	5.77, <i>s</i>	118.23	5.87, <i>s</i>	119.94
3	-	160.05	-	161.95
4	6.56, <i>d</i>	128.38	6.47, <i>d</i>	134.18
5	6.25, <i>d</i>	136.46	6.47, <i>d</i>	135.66
6	-	79.89	-	79.69
7	-	151.80	-	153.04
8	5.98, <i>s</i>	127.23	5.95, <i>s</i>	127.31
9	-	196.40	-	197.70
10	2.50, <i>d</i> ; 2.30, <i>d</i>	49.20	2.49, <i>d</i> ; 2.31, <i>d</i>	49.75
11	-	42.15	-	41.63
12	1.12, <i>s</i>	16.67	1.11, <i>s</i>	14.38
13	1.04, <i>s</i>	22.07	1.02, <i>s</i>	23.08
14	1.95, <i>s</i>	23.76	1.90, <i>s</i>	24.36
15	2.23, <i>s</i>	28.97	2.29, <i>s</i>	27.56

กรดแอบไซซิก (abscisic acid) เป็นฮอร์โมนพืช กระตุ้นการหลุดร่วงของใบและผลที่แก่จัด หรือการยืตัวของเซลล์ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร สำหรับใช้เร่งรากของกิ่งตอน หรือกิ่งปักชำ ช่วยในการเปลี่ยนเพศดอกบางชนิด ช่วยให้ผลติดมากขึ้น และป้องกันการร่วงของผล

การวิเคราะห์โครงสร้างสาร lunatoic acid

เมื่อหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค ^1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY (ตารางที่ 4.8) พบว่าได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7$ ตรงกับ Mass spectrum คือ $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_7$ $m/z = 389.0421$ (charge 1 ของ Na^+) ดังนั้น MW สารเท่ากับ 388.0421 เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสาร lunatoic acid ที่พบมาแล้วก่อนหน้านี้ (know compound) จากงานวิจัยของ Marumo และคณะ (1982) และงานวิจัยของ Natsume และคณะ (1988)

Lunatoic acid เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านการงอกของเส้นใยราหลายชนิดที่ความเข้มข้น 3-12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านการเจริญของราหลายชนิด เช่น รา *Pyricularia oryzae* รา *Glomerella cingulata* และรา *Fulvia fulva* (Marumo และคณะ, 1982)



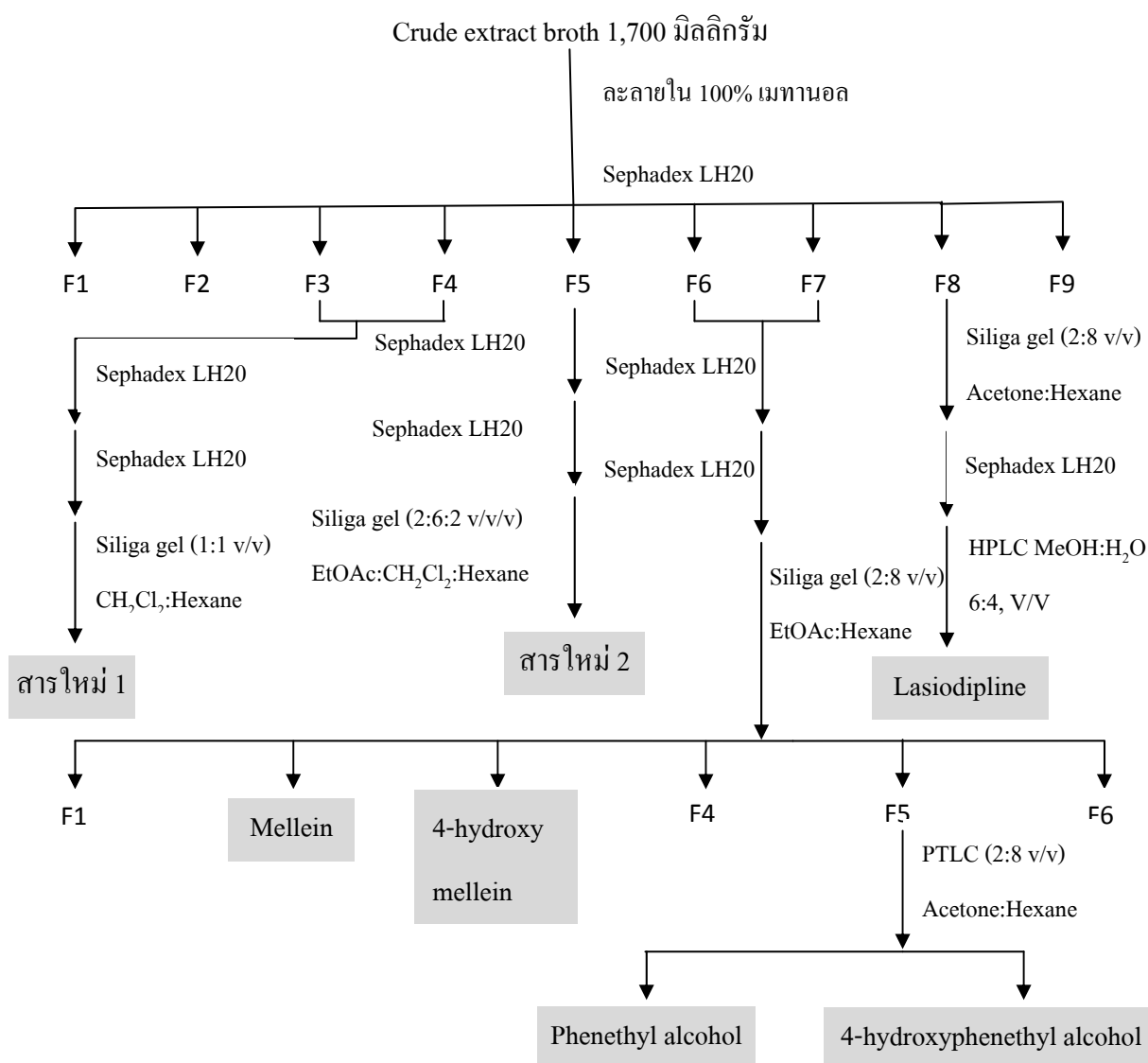
Lunatoic acid

ตารางที่ 8 ข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสาร lunatic acid

ตำแหน่ง	^{13}C NMR (δ ppm)	ชนิด	^1H NMR (δ ppm) Mult	HMBC
1	169.3	C	-	-
2	123.5	CH	6.53, <i>d</i>	C-1, C-3, C-4
3	135.1	CH	7.20, <i>d</i>	C-1, C-2, C-4, C-5
4	152.4	C	-	-
5	116.5	CH	6.51, <i>s</i>	C-3, C-4, C-6, C-12
6	114.9	C	-	-
7	140.7	C	-	-
8	153.2	CH	7.90, <i>s</i>	C-4, C-6, C-7, C-9
9	193.1	C	-	-
10	89.8	C	-	-
11	192.4	C	-	-
12	110.7	CH	5.73, <i>s</i>	C-6, C-10, C-11
13	176.4	C	-	-
14	36.2	CH	2.70, <i>m</i>	C-13, C-15, C-16
15	40.7	CH ₂	1.77, <i>t</i> : 1.13, <i>t</i>	C-13, C-14, C-16
16	31.8	CH	1.49, <i>m</i>	C-17, C-18, C-19
17	29.4	CH ₂	1.33, <i>m</i> : 1.13, <i>m</i>	C-16, C-18, C-19
18	11.1	CH ₃	0.89, <i>t</i>	C-16, C-17
19	19.0	CH ₃	0.92, <i>d</i>	C-15, C-16, C-17
20	17.6	CH ₃	1.19, <i>d</i>	C-13, C-14, C-15
21	21.9	CH ₃	1.54, <i>s</i>	C-10, C-11

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2

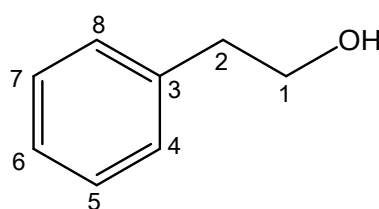
จากการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 ในอาหาร yeast extract sucrose (YES) ปริมาตร 5 ลิตร ได้สารสกัดหยาบ 1,700 มิลลิกรัม เป็นของหนืดสีเหลืองเข้มมาทำการแยกด้วยวิธี โครมาโทกราฟี ได้แก่ แบบ Sephadex LH20 แบบ silica gel แบบ HPLC และแบบ preparative TLC (PTLC) ได้เป็นสารใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ สารใหม่ 1 120 มิลลิกรัม และ สารใหม่ 2 50 มิลลิกรัม และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีรายงานมาแล้ว 5 ชนิด ได้แก่ สาร mellein 30 มิลลิกรัม สาร 4-hydroxy mellein 18 มิลลิกรัม สาร phenethyl alcohol 8.4 มิลลิกรัม สาร 4-hydroxyphenethyl alcohol 8.1 มิลลิกรัม และสาร lasiodipline 22 มิลลิกรัม ซึ่งขั้นตอนการแยกแสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 Fraction ต่างๆ ที่ได้จากสารสกัดหยาบในอาหาร YES

การวิเคราะห์โครงสร้างสาร phenethyl alcohol

เมื่อหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค ^1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY พบว่าได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$ ตรงกับ Mass spectrum คือ $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NaO}$ $m/z = 145.0367$ (charge 1 ของ Na^+) ดังนั้น MW สารเท่ากับ 122.0367 เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสาร phenethyl alcohol ที่พบมาแล้วก่อนหน้านี้ (know compound) ซึ่งข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสารนี้ แสดงดังตารางที่ 9



phenethyl alcohol

ตารางที่ 9 ข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสาร phenethyl alcohol

ตำแหน่ง	^{13}C NMR (δ ppm)	ชนิด	^1H NMR (δ ppm) Mult และค่า J in Hz	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	63.60	CH_2	3.82, <i>t</i> , 6.64	-
2	39.15	CH_2	2.84, <i>t</i> , 6.62	C-1, C-3, C-4, C-8
3	138.51	C	-	-
4	128.54	CH	7.32-7.28, <i>m</i>	C-2, C-3, C-5, C-6, C-8
5	129.02	CH	7.32-7.28, <i>m</i>	C-3, C-4, C-6, C-7
6	126.43	CH	7.22, <i>m</i>	C-4, C-5, C-7, C-8
7	129.02	CH	7.32-7.28, <i>m</i>	C-3, C-5, C-6, C-8
8	128.54	CH	7.32-7.28, <i>m</i>	C-2, C-3, C-4, C-6, C-7

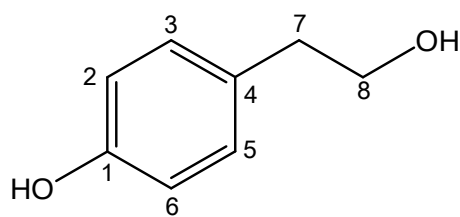
สาร phenethyl alcohol หรือ 2-phenylethanol เป็นสารอยู่ในกลุ่มของ phenethyl ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2$) ที่มีหมู่ hydroxyl ($-\text{OH}$) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติในรูปของน้ำมันหอมระเหย

(essential oils) แยกได้จากพืชที่มีกลิ่นหอม เช่น กุหลาบ และคาร์เนชั่น นอกจากนี้ยังผลิตได้จากรา *Candida albicans* ประโยชน์นำไปใช้ผสมในน้ำหอม เป็นสาร preservative ในสบู่ และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Eshkol และคณะ, 2009)

การวิเคราะห์โครงสร้างสาร 4-hydroxyphenethyl alcohol

เมื่อหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค ^1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY พบว่าได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$ ตรงกับ Mass spectrum คือ $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_2$ $m/z = 139.0538$ (charge 1 ของ Na^+) ดังนั้น MW สารเท่ากับ 138.0538 เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสาร 4-hydroxyphenethyl alcohol ที่พบมาแล้วก่อนหน้านี้ (know compound) ซึ่งข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสารนี้ แสดงดังตารางที่ 10

สาร 4-hydroxyphenethyl alcohol เป็นสารที่มีประโยชน์ในกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเป็นสารตั้งต้น (precursor) ในการสังเคราะห์สารในกลุ่ม alkaloids เช่น สาร securinine และสาร phenyl aminoalkyl ที่เป็นองค์ประกอบของยารักษาโรคประสาทเสื่อม (Parry, 1978)



4-hydroxyphenethyl alcohol

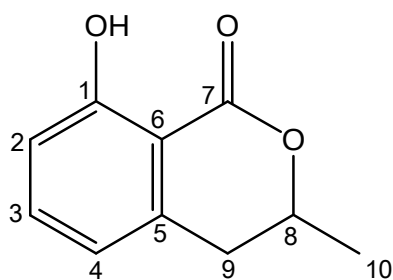
ตารางที่ 10 ข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสาร 4-hydroxyphenethyl alcohol

ตำแหน่ง	^{13}C NMR (δ ppm)	ชนิด	^1H NMR (δ ppm) Mult และค่า J in Hz	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	155.6	C	-	-
2	114.9	CH	6.74, <i>t</i> , 7.86	C-1, C-3
3	129.8	CH	7.05, <i>t</i> , 7.84	C-1, C-2, C-4, C-7
4	108.7	C	-	-
5	129.8	CH	7.05, <i>t</i> , 7.84	C-1, C-4, C-6, C-7
6	114.9	CH	6.74, <i>t</i> , 7.86	C-1, C-5
7	38.6	CH ₂	2.71, <i>t</i> , 6.46	C-5, C-8
8	63.3	CH ₂	3.69, <i>t</i> , 6.42	C-3, C-7
OH	-	OH	3.60	C-7, C-8
OH	-	OH	8.10	C-1, C-2, C-6

การวิเคราะห์โครงสร้างสาร mellein

เมื่อหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค ^1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY พบว่าได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ ตรงกับ Mass spectrum คือ $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3$ $m/z = 179.0912$ (charge 1 ของ H^+) ดังนั้น MW สารเท่ากับ 178.0912 เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสาร mellein ที่พบมาแล้วก่อนหน้านี้ (known compound) ซึ่งข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสารนี้ แสดงดังตารางที่ 11

สาร mullein และสาร 4-hydroxymellein เป็นสารในกลุ่มของ dihydroisocoumarin มีรายงานว่าเป็นสารที่สร้างจากรา *Aspergillus ochraceus* นำไปใช้ intraperitoneally (IP) ในสัตว์ เป็นของเหลวทดแทนเลือดที่มีความจำเป็นหรือเมื่อความดันโลหิตต่ำหรือปัญหาอื่นๆ (MOORE และคณะ, 1972)



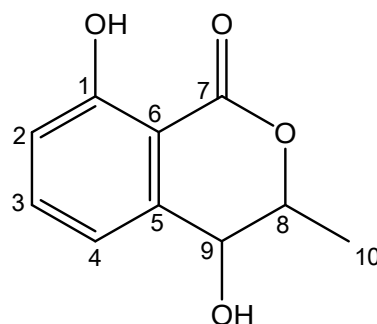
mellein

ตารางที่ 11 ข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสาร mellein

ตำแหน่ง	^{13}C NMR (δ ppm)	ชนิด	^1H NMR (δ ppm) Mult	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	162.1	C	-	-
2	116.2	CH	6.89, <i>d</i>	C-1, C-4, C-6, C-7
3	136.1	CH	7.41, <i>t</i> ,	C-1, C-2, C-5, C-6
4	117.9	CH	6.70, <i>q</i>	C-5, C-6, C-9
5	139.4	C	-	-
6	108.2	C	-	-
7	169.9	C	-	-
8	76.1	CH	4.73, <i>m</i>	C-5, C-10
9	34.5	CH ₂	2.93, <i>d</i>	C-4, C-5, C-6, C-8, C-10
10	20.7	CH ₃	1.53, <i>d</i>	C-8, C-9
OH	-	OH	11.03	C-1, C-2, C-6

การวิเคราะห์โครงสร้างสาร 4-hydroxymellein

เมื่อหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค ^1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY พบว่าได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ ตรงกับ Mass spectrum คือ $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4$ $m/z = 195.0653$ (charge 1 ของ H^+) ดังนั้น MW สารเท่ากับ 194.0653 เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสาร 4-hydroxymellein ที่พบมาแล้วก่อนหน้านี้ (know compound) ซึ่งข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสารนี้ แสดงดังตารางที่ 12



4-hydroxymellein

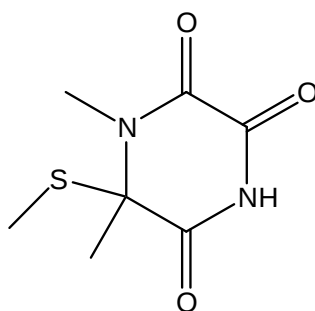
ตารางที่ 12 ข้อมูล NMR สเปกโตรสโกปีของสาร 4-hydroxymellein

ตำแหน่ง	^{13}C NMR (δ ppm)	ชนิด	^1H NMR (δ ppm) Mult	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	162.0	C	-	-
2	117.8	CH	7.01, <i>d</i>	C-1, C-3, C-4, C-6
3	136.9	CH	7.55, <i>t</i>	C-1, C-4, C-5, C-6
4	116.2	CH	7.04, <i>d</i>	C-2, C-3, C-5, C-6, C-9
5	141.1	C	-	-
6	105.0	C	-	-
7	169.0	C	-	-
8	79.9	CH	4.62, <i>m</i>	C-5, C-7, C-9, C-10
9	69.1	CH	4.62, <i>m</i>	C-4, C-5, C-6, C-8, C-10
10	17.9	CH_3	1.55, <i>d</i>	C-8, C-9
OH	-	OH	10.98, <i>s</i>	C-1, C-2, C-3, C-6

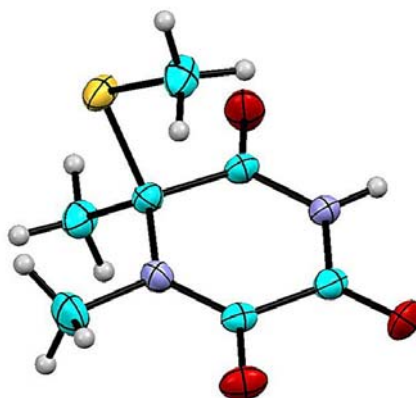
การวิเคราะห์โครงสร้างสาร lasiodipline

เมื่อหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค ^1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC และเทคนิค HMBC พบว่าได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ตรงกับ Mass spectrum

คือ $C_7H_9N_2O_3S$ $m/z = 201.0339$ (charge 1 ของ H^+) ดังนั้น MW สารเท่ากับ 202.0339 การยืนยันสูตรโครงสร้างของสารนี้ด้วยเทคนิค X-ray crystallographic structure แสดงดังภาพที่ 5 นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสาร lasiodipline ที่เพิ่งพบมาแล้วก่อนหน้านี้ (know compound) ของ Wei และคณะ (2014) การเปรียบเทียบข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปี แสดงดังตารางที่ 13



(ก)



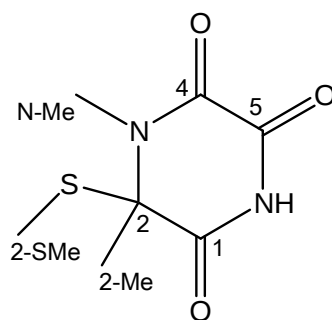
(ข)

ภาพที่ 5 เปรียบเทียบโครงสร้างของ lasiodipline

(ก) โครงสร้างของ lasiodipline ที่หาได้

(ข) X-ray crystallographic ของ lasiodipline

ตารางที่ 13 ข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสาร lasiodipline

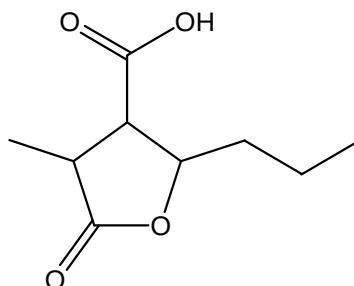


lasiodipline

ตำแหน่ง	¹ H NMR, Mult lasiodipline	¹³ C NMR lasiodipline	¹ H NMR, Mult Wei และคณะ (2014)	¹³ C NMR Wei และคณะ (2014)
1	-	167.4	-	167.0
2	-	70.2	-	70.1
N	-	-	-	-
4	-	153.6	-	153.5
5	-	154.7	-	154.3
2-Me	1.93, <i>s</i>	23.6	1.94, <i>s</i>	23.6
2-SMe	2.08, <i>s</i>	13.6	2.08, <i>s</i>	13.7
N-Me	3.24, <i>s</i>	29.2	3.42, <i>s</i>	29.2

สาร lasiodipline เป็นสารในกลุ่ม cyclolopeptide ที่ไม่ค่อยพบในธรรมชาติ ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้แยกได้จากรา *Lasiodiplodia pseudotheobromae* เป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งอนุพันธ์ของสารนี้สามารถมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหรือดีดื้อยา เช่น แบคทีเรีย *Streptococcus* sp. แบคทีเรีย *Bacteroides vulgates* แบคทีเรีย *Peptostreptococcus* sp. และแบคทีเรีย *Veillonella parvula* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) อยู่ในช่วง 0.12 – 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Wei และคณะ, 2014)

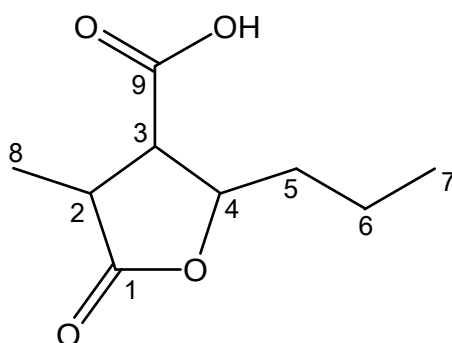
การวิเคราะห์โครงสร้างสาร A (novel compound)



สาร A มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน เมื่อนำมาวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันจากด้วยอินฟราเรด (IR) สเปกโทรสโกปีจะพบการดูดกลืนแสงที่ค่า 3525.32 cm^{-1} (carboxylic acid) ค่า 2934.78 cm^{-1} (C-H stretching) ค่า 1182.44 cm^{-1} (C-H stretching) และค่า 702.94 (C-H stretching) ส่วนค่าจากอัลตราไวโอเลต-วิชิเบิล (UV) สเปกโทรสโกปีในตัวทำละลายเมทานอลมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) ที่ 223.50 นาโนเมตร ($\log \epsilon$ 6.34) และเมื่อนำมาหาสูตรโมเลกุลด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีแบบ APCI-TOF mass spectrum แสดง $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion peak ที่ m/z 187.0959 $[\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_4+\text{H}]^+$

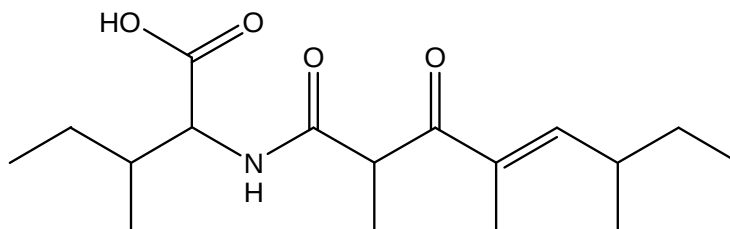
จากการหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค ^1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY พบว่าได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_4$ มีมวลโมเลกุล 186 ตรงกับ Mass spectrum เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสารนี้ยังไม่มีรายงานมาก่อนจึงน่าที่จะเป็นสารตัวใหม่ (novel compound) ซึ่งข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสารนี้ แสดงดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสาร A ใน CDCl_3



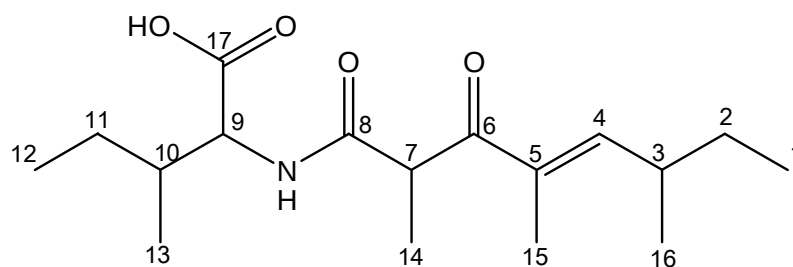
ตำแหน่ง	^{13}C NMR (δ ppm)	^1H NMR (δ ppm) Mult	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	COSY
1	176.8	-	-	-
2	39.9	2.96, <i>m</i>	C-1, C-3, C-8, C-9	H-2 และ H-8
3	54.2	2.66, <i>dd</i>	C-2, C-4, C-5, C-8, C-9	H-3 และ H-2
4	79.3	4.45, <i>q</i>	C-5, C-9	H-4 และ H-3
5	36.9	1.72, <i>m</i>	C-3, C-4, C-6, C-7	H-5 และ H-4
6	18.2	1.42, <i>m</i>	C-4, C-5, C-7	H-6 และ H-5
		1.57, <i>m</i>	C-4, C-5, C-7	
7	13.7	0.96, <i>t</i>	C-5, C-6	H-7 และ H-6
8	14.4	1.33, <i>d</i>	C-1, C-2, C-3	-
9	171.2	-	-	-

การวิเคราะห์โครงสร้างสาร B (novel compound)



สาร B มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน จากการหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ได้แก่ เทคนิค ^1H NMR เทคนิค ^{13}C NMR เทคนิค DEPT90 เทคนิค DEPT135 เทคนิค HMQC เทคนิค HMBC และเทคนิค COSY พบว่าได้สูตรโมเลกุล $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{NO}_4$ มีมวลโมเลกุล 311 ตรงกับ Mass spectrum เมื่อไปหาข้อมูลใน Sci-Finder พบว่าเป็นสารนี้ยังไม่มีรายงานมาก่อนจึงน่าที่จะเป็นสารตัวใหม่ (novel compound) ซึ่งข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสารนี้ แสดงดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ข้อมูล NMR สเปกโทรสโกปีของสาร B (novel compound) ใน CDCl_3



ตำแหน่ง	^{13}C NMR (δ ppm)	ชนิด	^1H NMR (δ ppm)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	11.9	CH_3	0.84	C-2, C-3
2	29.5	CH_2	1.37, 1.48	C-3, C-4
3	35.6	CH	2.50	C-2, C-4, C-5, C-16
4	151.3	CH	6.56	C-2, C-3, C-5, C-6, C-16
5	135.0	C	-	-
6	201.3	C	-	-
7	47.2	CH	4.23	C-6, C-8, C-9, C-14
8	171.1	C	-	-
9	56.5	CH	4.54	C-8, C-10, C-11, C-13, C-17
10	37.4	CH	1.96	C-9, C-11, C-17
11	24.8	CH_2	1.15	C-9, C-10, C-12
12	11.5	CH_3	0.94	-
13	15.5	CH_3	0.88	-
14	17.5	CH_3	1.43	C-6, C-7, C-8
15	11.7	CH_3	1.80	C-4, C-5, C-6
16	19.4	CH_3	1.02	-
17	175.6	C	-	-
N-H	-	-	7.13	C-8, C-9, C-10, C-17

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การคัดสรรบริสุทธิ์เลือกมาทดสอบจะพิจารณาจาก เป็นสารใหม่ (new compounds) หรือเป็นสารใหม่ทางผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ (new natural products) และสารที่เพิ่งพบเมื่อไม่นานมานี้ ดังนั้น นำสาร 4 ชนิดมาทดสอบ คือ สาร A สาร B สาร α -hydroxybutyrolactone และสาร lasiodipline ซึ่งฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแสดงในตารางที่ 16 และตารางที่ 17 ตามลำดับ

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

สารทดสอบ	ค่า IC ₅₀ ในแต่ละ cell lines (µg/ml)			
	HuCCA-1	A549	MOLT-3	HepG2
สาร A	≥50	≥50	22	6.56
สาร B	≥50	≥50	35	3.46
α -Hydroxybutyrolactone	≥50	≥50	23	7.53
Lasiodipline	≥50	≥50	18	0.26
ตัวควบคุม				
Doxorubicin (µg/ml)	0.45±0.09	0.18±0.05		0.26±0.59
Etoposide (µg/ml)			0.03±0.002	20.97±0.59

จากตารางที่ 16 การทดสอบความเป็นพิษจะใช้เซลล์มะเร็ง 4 cell lines ได้แก่ เซลล์ HepG2 (hepatocarcinoma) เซลล์ MOLT-3 (acute lymphoblastic leukemia) เซลล์ A549 (lung carcinoma) และเซลล์ HuCCA-1 (cholangiocarcinoma) พบว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 4 ชนิดไม่มีฤทธิ์ต้านเซลล์ HuCCA-1 และ A549 อย่างไรก็ตามก็มีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งเซลล์ MOLT-3 ส่วนเซลล์ HepG2 มีฤทธิ์ค่อนข้างดีโดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.26 – 7.53 µg/ml โดยเฉพาะสาร lasiodipline มีฤทธิ์ยับยั้งเทียบเท่ายาต้านมะเร็ง Doxorubicin ซึ่งน่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติต่อไป

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

สาร	ค่า IC ₅₀						
	DPPH	HL-60	XXO	IXO	ORAC (unit)	LOX	AIA
สาร A	I	I	I	I	0.1±0.01	I	I
สาร B	I	I	I	I	0.1±0.02	I	I
α-hydroxybutyrolactone	I	I	I	I	0.1±0.01	I	I
Lasiodipline	I	I	I	I	0.4±0.01	I	I
ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ (μM)	250	100	500	500	1	100	12.5

หมายเหตุ I = inactive (activity < 50%)

Unit คือ เป็นค่าจำนวนเท่าของความสามารถในการจับ peroxy radical ของสารทดสอบปริมาณ 1 μM เมื่อเทียบกับ 1 μM ของสาร Trolox

จากตารางที่ 17 สารบริสุทธิ์ไม่มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระโดยพิจารณาจากค่า DPPH (การทำลายอนุมูลอิสระ diphenyl picrylhydrazyl radicals, DPPH) เช่นเดียวกันกับฤทธิ์ต้าน lipoxygenase (LOX) และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ aromatase (AIA) ส่วนคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระพบว่าไม่ฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระที่รุนแรงปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ xanthine oxidase (XXO) และยับยั้งเอนไซม์ xanthine oxidase (IXO) นอกจากนี้สารบริสุทธิ์ทั้ง 4 ชนิด ไม่พบการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดในเซลล์มะเร็ง HL-60 เมื่อวิเคราะห์ ORAC (oxygen radical absorbance capacity) มีฤทธิ์ไม่สูงมากนักต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีค่าอยู่ในช่วง 0.1 – 0.4 unit เมื่อเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Chomcheon และคณะ (2009) ของสารในกลุ่ม depsidones ที่มีค่าสูงถึง 4.3-5.9 unit

การพิสูจน์เอกลักษณ์ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 จะใช้การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA

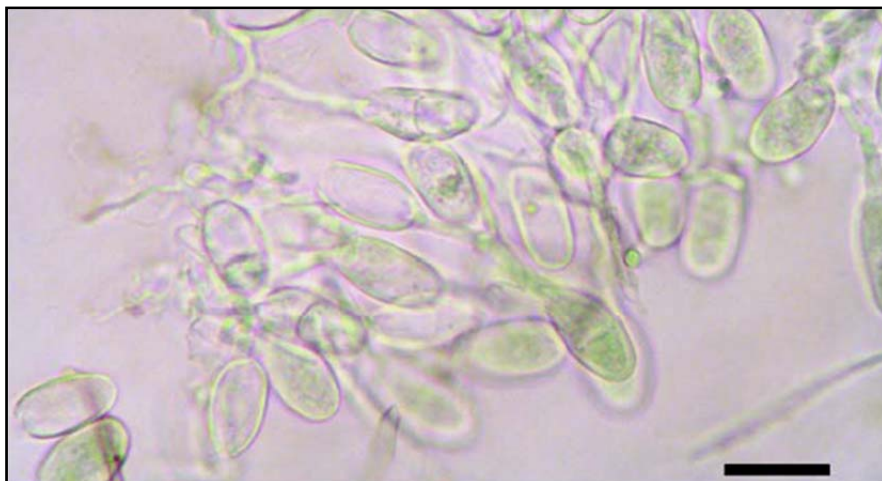
การศึกษาทางสัณฐานวิทยาราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2

เมื่อนำราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA พบว่ารานี้จะสร้างเส้นใยแบบมีผนังกัน (septate hypha) มีลักษณะเป็นสีขาวและเมื่อดูที่ด้านหลังจานเพาะเชื้อจะสังเกตเห็นเป็นสีดำ ไม่สร้างสปอร์ ดังนั้น การจัดจำแนกต้องมีการกระตุ้นราให้สร้างสปอร์ จึงนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร water agar ที่ใส่ชิ้นใบตอง (Chomcheon และคณะ, 2009) ราก็จะ

สร้างโครงสร้างห่อหุ้มสปอร์แบบไม่อาศัยเพศหรือ pycnidia แสดงดังภาพที่ 6 ซึ่งด้านในมีสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนเดี่ยวมีสีใส (hyaline conidia) ที่เป็นลักษณะเฉพาะของรา แสดงดังภาพที่ 7



ภาพที่ 6 โครงสร้างห่อหุ้มสปอร์แบบ pycnidia (ปกคลุมด้วยไมซีเลียม) ที่สร้างบนใบตองในอาหาร water agar (Bar size = 1 mm)



ภาพที่ 7 สปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบ conidia (Bar size = 20 μ m)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA ความยาว 456 bp (ภาพที่ 8) ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกันกับรา *Botryosphaeria rhodina* (teleomorph) ของ *Lasiodiplodia theobromae* และ *L. pseudotheobromae* ที่ 100% และ 99.8% ตามลำดับ

จากลักษณะโครงสร้างห่อหุ้มสปอร์ ลักษณะสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ และการวิเคราะห์ทางโมเลกุลคาดว่าราเอนโดไฟต์ไอโบลิต SMUL2 น่าจะเป็นราในสกุล *Lasiodiplodia* sp.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
          18S
TAGGTGAACC TGCGGAAGGA TCATTACCGA GTTTCGGGC TTCGGCTCGA
          ITS1
CTCTCCCAACC CTTTGTGAAC GTACCTCTGT TGCTTTGGCG GCTCCGGCCG
          ITS1
CCAAAGGACC TCCAAACTCC AGTCAGTAAA CGCAGACGTC TGATAAACAA
          ITS1
GTTAATAAAC TAAAACTTTC AACAAACGGAT CTCTTG GTTC TGGCATCGAT
          5.8S
GAAGAACGCA GCGAAATGCG ATAAGTAATG TGAATTGCAG AATTCAGTGA
          5.8S
ATCATCGAAT CTTTGAACGC ACATTGCGCC CCTTGGTATT CCGGGGGGCA
          5.8S
TGCTGTTCG AGCGTCATTA CAACCCTCAA GCTCTGCTTG GAATTGGGCA
          ITS2
CCGTCCCTCAC TGCGGACGCG CCTCAAAGAC CTCGGCGGTG GCTGTTTCAGC
          ITS2
CCTCAAGCGT AGTAGAATAC ACCTCGCTTT GGAGCGGTTG GCGTCGCCCG
          ITS2
CCGGACGAAC CTTCTGAACT TTTCTCAAGG TTGACCTCGG ATCAGG
          28S

```

ภาพที่ 8 ลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ราเอนโดไฟต์ไอโบลิต SMUL2

สรุปผลการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้มีการสรุปผลการวิจัยดังต่อไปนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. ผลผลิต (output) ที่ได้จากโครงการ
3. ข้อเสนอแนะโครงการ

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM11 และราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 โดยนำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ *Curvularia geniculata* CTOM11 มาทำการแยกสารบริสุทธิ์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟี การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารเหล่านี้ใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลอัลตราไวโอเลต-วิชิเบิล (UV) สเปกโทรสโกปี อินฟราเรด (IR) สเปกโทรสโกปี แมสสเปกโตรเมทรี (MS) และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) ได้สาร 8 ชนิด คือ สาร radicinin สาร radicinol สาร modiolide A สาร curvulide B สาร α -hydroxybutyrolactone สาร lunatoic acid A สาร abscisic acid และสาร α -hydroxybutyrolactone ซึ่งสาร α -hydroxybutyrolactone จะใช้เป็นตั้งต้น ในการสังเคราะห์ตัวยา ปัจจุบันได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี (Kagayama และคณะ, 2005) ในงานวิจัยนี้เป็นการค้นพบครั้งแรกว่าผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต (new natural products) โดยราเอนโดไฟต์ *C. geniculata* CTOM11 ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพแบบสะอาด (white-biotechnology) ในการลดการใช้สารเคมีเดิมที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม โดยอาจนำมาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม (optimum) เพื่อให้ผลิตสารนี้ให้ได้ในปริมาณมากพอ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SMUL2 แยกได้เป็นสารใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ สาร A และสาร B โดยสาร A และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีรายงานมาแล้ว 5 ชนิด ได้แก่ สาร mellein สาร 4-hydroxy mellein สาร phenethyl alcohol สาร 4-hydroxyphenethyl alcohol และสาร lasiodiplane

การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง 4 cell lines ได้แก่ เซลล์ HepG2 (hepatocarcinoma) เซลล์ MOLT-3 (acute lymphoblastic leukemia) เซลล์ A549 (lung carcinoma) และเซลล์ HuCCA-1 (cholangiocarcinoma) พบว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ สาร α -hydroxybutyrolactone lasiodiplane สาร A และสาร B ไม่มีฤทธิ์ต้านเซลล์ HuCCA-1 และ A549 อย่างไรก็ตามก็มีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งเซลล์ MOLT-3 ส่วนเซลล์ HepG2 มีฤทธิ์ค่อนข้างดี

โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.26 – 7.53 $\mu\text{g/ml}$ โดยเฉพาะสาร lasiodipline มีฤทธิ์ยับยั้งเทียบเท่ายาต้านมะเร็ง Doxorubicin ซึ่งน่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปรกติต่อไป การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อวิเคราะห์ ORAC (oxygen radical absorbance capacity) มีฤทธิ์ไม่สูงมากนักต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีค่าอยู่ในช่วง 0.1 – 0.4 unit เมื่อเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Chomcheon และคณะ (2009) ของสารในกลุ่ม depsidones ที่มีค่าสูงถึง 4.3-5.9 unit

การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 คาดว่าราเอนโดไฟต์ไอโกลเลต SMUL2 น่าจะเป็นราในสกุล *Lasiodiplodia* sp.

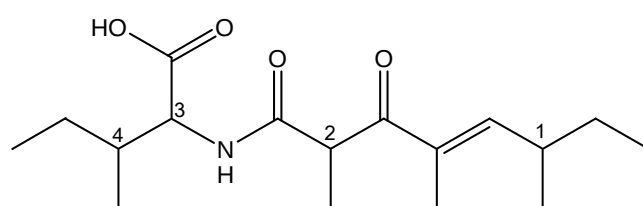
ผลผลิต (output) ที่ได้จากโครงการ

การวิจัยนี้ได้ไปนำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ในการประชุมระดับนานาชาติที่การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 14 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จังหวัดชลบุรี ในหัวข้อเรื่อง “New Metabolites From Endophytic Fungi, *Curvularia geniculata* CTOM11 And *Lasiodiplodia* sp. SMUL2”

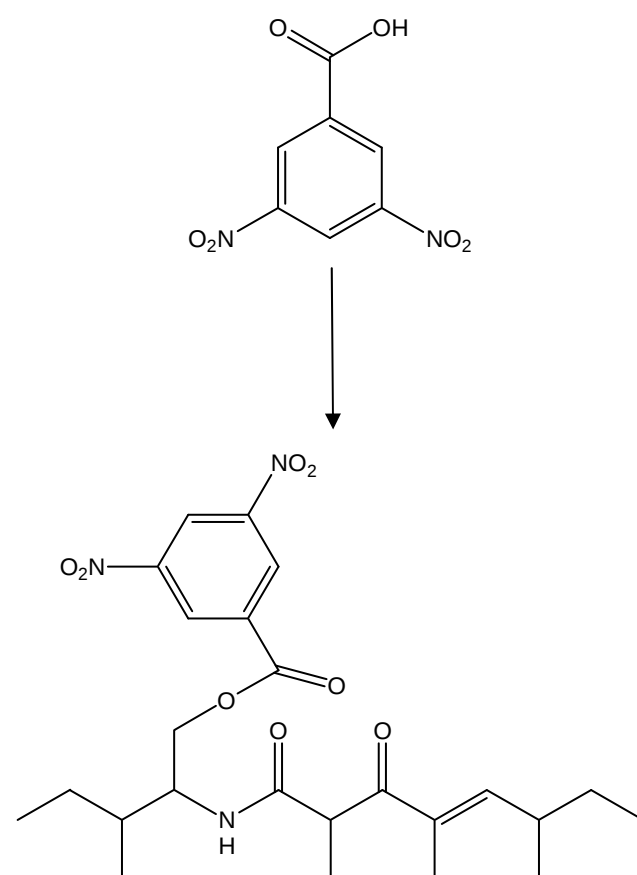
กำลังเตรียม manuscript โดยนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ สาร A (สารใหม่) สาร α -hydroxy-butyrolactone (สารใหม่ทางผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ) และสาร lasiodipline ตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Asian Natural Products Research ที่อยู่ในฐานข้อมูล ISI

ข้อเสนอแนะโครงการ

จากโครงสร้างทางเคมีของสาร A (สารใหม่) จะมี chiral center 4 ตำแหน่งและมี โมเลกุลแบบ long chain จึงไม่สามารถหา relative configuration และ absolute configuration ได้ ดังนั้นจึงต้องตกผลึกสาร A ให้ได้ เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้าง แต่อย่างไรก็ตามสารนี้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดตกผลึกได้ยาก ซึ่งการแก้ไขอาจนำมาทำปฏิกิริยากับสาร 3,5-dinitrobenzoic acid เพื่อเพิ่มโอกาสการตกผลึกเช่นงานวิจัยก่อนหน้าของ Chomcheon และคณะ (2010)



+



X-ray crystallographic

ผลผลิต (output) ที่ได้จากโครงการ

การวิจัยนี้ได้ไปนำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ในการประชุมระดับนานาชาติที่การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 14 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จังหวัดชลบุรี ในหัวข้อเรื่อง “New Metabolites From Endophytic Fungi, *Curvularia geniculata* CTOM11 And *Lasiodiplodia* sp. SMUL2”

กำลังเตรียม manuscript โดยนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ สาร A (สารใหม่) สาร α -hydroxy-butyrolactone (สารใหม่ทางผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ) และสาร lasiodipline ตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Asian Natural Products Research ที่อยู่ในฐานข้อมูล ISI