วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการทั่วไป

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

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

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

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

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

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

ของแข็งที่ได้จากส่วนแยก 71-75 ซึ่งได้จากการชะด้วย 25-30 % EtOAc ในเฮกเซน ล้างด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ทำให้ได้สารประกอบ **4** (10 mg) เป็นของแข็งสีส้ม ในระหว่างการระเหยส่วนแยก 101-125 ซึ่งได้จากการชะด้วย 30-35 % EtOAc ในเฮกเซน สารประกอบ **5** ตกตะกอนออกมา กรองตะกอนและล้างด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ทำให้ได้สารประกอบ **5** (38 mg) เป็นของแข็งสีส้ม ส่วนแยก 143-165 ซึ่งได้จากการชะด้วย 35-45 % EtOAc ในเฮกเซน ทำการแยกต่อให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วย reverse phase HPLC โดยใช้เมธานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้ได้สารประกอบ **6** (12 mg) เป็นของแข็งอสัณฐานที่เวลาการกักเก็บ (retention time) 17 นาที และได้สารประกอบ **7** (8 mg) เป็นของแข็งสีที่เวลาการกักเก็บ 26 นาที ล้างของแข็งที่ได้จากส่วนแยก 181-214 ซึ่งได้จากการชะด้วย 50 % EtOAc ในเฮกเซน ด้วย เอธิล แอซิเทต เย็น ได้สารประกอบ **8** (110 mg) เป็นของแข็งสีเหลือง

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

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

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

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

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

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

แอซิเทต ได้ สารประกอบ 1 (12 mg) เป็นของแข็งสีขาว ล้างของแข็งที่ได้จากส่วนแยก 49-56 ซึ่งได้จากการชะด้วย 25 % EtOAc ในเฮกเซน ด้วยของผสมเฮกเซน-เอธิล แอซิเทต ได้สารประกอบ 2 (10 mg) เป็นผลึกไม่มีสี

การแยกสารเมแทบอไลท์เห็ดเผาะ (*Astraeus odoratus*)

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

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

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

การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

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

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

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