

## บทที่ 2

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 2.1 ผลการสกัดและแยกสารบริสุทธิ์

จากการสกัดเส้นใยแห้งของรา *Ch. cupreum* 372 กรัม ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว (PDB) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้สารสกัดหยาบเฮกเซน (crude *n*-Hexane)หนัก 38 กรัม (10.21%) สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (crude EtOAc) หนัก 30 กรัม (8.06%) และสารสกัดหยาบเมทานอล (crude MeOH) หนัก 56 กรัม (15.05%) จากการแยกสารสกัดหยาบทั้งสามโดยวิธีโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 8 สาร คือ สาร 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8

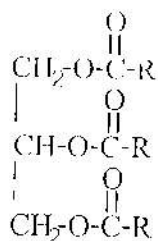
#### 2.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง

การวิเคราะห์ผลทางสเปกโตรสโกปีของสารต่าง ๆ ใช้การเปรียบเทียบค่าจากตำราทางสเปกโตรสโกปี<sup>17, 18</sup>

สาร 1 ได้จากการแยกสารสกัดทั้งสามคือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และ เมทานอล โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารเป็นของเหลวข้น หนัก 31.44 กรัม (8.45%) mp = 29-30°C  $R_f = 0.62$  (10% EtOAc:Hexane) จาก IR สเปกตรัม (ภาพที่ 2.1) แสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 2920 และ 2853  $\text{cm}^{-1}$  เป็นลักษณะของ C-H ยืด (C-H stretching) ที่ 1759 และ 1732  $\text{cm}^{-1}$  เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของ C=O ยืด ของ ester ที่ 1446  $\text{cm}^{-1}$  เป็น C-H งอ และที่ 1163  $\text{cm}^{-1}$  เป็น C-O ยืด จาก  $^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัม (ภาพที่ 2.2) แสดงค่า chemical shift ที่ 5.388-5.312 ppm เป็น multiplet จำนวน 6 โปรตอนของ olefinic โปรตอนซึ่งไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น *cis* หรือ *trans* ที่ 5.25 ppm เป็น doublet of quintet จำนวน 1 โปรตอน ของ  $\text{CH}_2\text{-O}$  ที่ 4.28 และ 4.13 ppm เป็น doublet of doublet (AB) จำนวน 4 โปรตอน ซึ่งมีค่า  $J$  เป็น 12, 4.2 Hz และ 12, 6.2 Hz คาดว่าเป็นโปรตอนของหมู่  $-\text{O-CH}_2\text{-CH(O)-CH}_2\text{-O-}$  ของหมู่ ester โดยโปรตอนของ 2-( $\text{CH}_2$ -)

สมมาตรกัน และโดยที่โปรตอนของ  $-\text{CH}_2-$  นี้เป็น geminal โปรตอนที่ไม่สมมาตรจึงเกิด coupling กันเป็น AB quartet (ชุดละ 2 โปรตอน) มีค่า  $J = 12 \text{ Hz}$  ขณะเดียวกันโปรตอนของ  $2(-\text{CH}_2-)$  แต่ละชุดเกิดการ coupling กับ  $-\text{CH}(\text{O})-$  เป็น doublet โดยมีค่า  $J$  ไม่เท่ากัน คือ 4.2 และ 6.0 Hz ที่ 2.303 ppm เป็น triplet มีค่า  $J = 7.5 \text{ Hz}$  จำนวน 2 โปรตอน คาดว่าเป็นหมู่เมทิลีนที่ต่ออยู่กับหมู่คาร์บอนิล  $\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$  และที่ 2.298 ppm มีค่า  $J = 7.5 \text{ Hz}$  จำนวน 4 โปรตอน คาดว่าเป็นหมู่เมทิลีนที่ต่ออยู่กับหมู่คาร์บอนิล  $\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$  ซึ่งเมทิลีนทั้งสองหมู่ปรากฏที่เดียวกัน ที่ 1.99 และ 1.59 ppm เป็น multiplet จำนวน 12 โปรตอน คาดว่าเป็นหมู่เมทิลีนที่ด้านหนึ่งต่ออยู่กับอัลคีนและอีกด้านต่อกับสายโซ่อัลเคน  $3(-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-)$  ที่ 1.29-1.25 ppm ปรากฏเป็น singlet broad จำนวน 72 โปรตอน จัดให้เป็น  $3(-\text{CH}_2-)_2$  ของสายโซ่อัลเคน และที่ 0.87 ppm เป็น triplet มีค่า  $J = 6.6 \text{ Hz}$  จำนวน 9 โปรตอนจัดเป็นหมู่เมทิลที่ปลายโซ่อัลเคน  $3(-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3)$

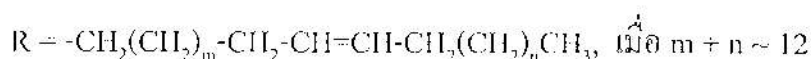
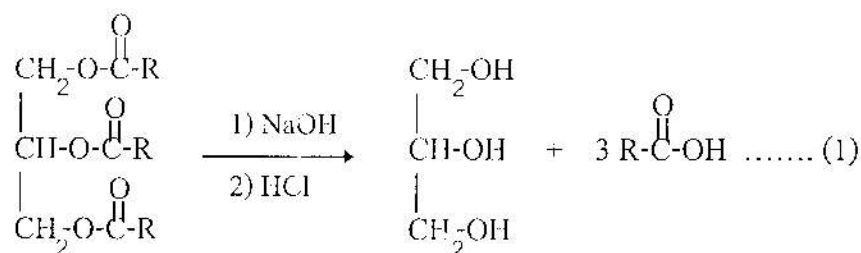
จาก  $^{13}\text{C}$ -NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 2.3) แสดงสัญญาณที่ 173.30 และ 172.82 ppm จัดเป็นหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ 3 หมู่ ( $2\text{CO}_2-\text{CH}_2$  และ  $-\text{CO}_2-\text{CH}-$ ) ที่ 129.66 และ 129.30 ppm จัดให้เป็นคาร์บอนของอัลคีน ที่ 68.86 และ 62.05 ppm จัดให้เป็นคาร์บอนที่ติดกับออกซิเจนของเอสเทอร์ ( $\text{CO}_2-\text{CH}$  และ  $2\text{CO}_2-\text{CH}_2$ ) 3 หมู่ สำหรับสัญญาณที่เหลือระหว่าง 34.14-22.63 ppm เป็นสายโซ่ของหมู่เมทิลีน ( $(-\text{CH}_2)_{m+n}-$ ) และที่ 14.03 เป็นหมู่เมทิลที่ปลายสายโซ่ เมื่อประมวลข้อมูลจาก IR และ  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR คาดว่าสารประกอบ 1 น่าจะมีสูตรโมเลกุลเป็น  $\text{C}_{6m}\text{H}_{110}\text{O}_6$  ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท glyceride ที่มีสายโซ่ (-R) ที่เหมือนกันดังโครงสร้างข้างล่างนี้



$\text{R} = -\text{CH}_2(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ , เมื่อ  $m+n \sim 12$

เพื่อเป็นการยืนยันว่าสาร 1 เป็น glyceride โดยมีสายโซ่ (-R) ที่เหมือนกัน จึงทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสใน NaOH แล้ว acidified ด้วยกรด (สมการ ที่ 1) แยกผลิตภัณฑ์ที่

ได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และตกผลึกด้วยเอทานอล ได้ สาร 1a เป็นของแข็ง สีขาว mp = 39-42°C



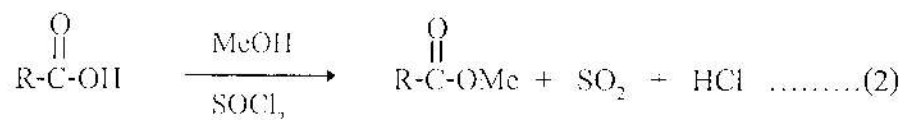
จากข้อมูล IR สเปกตรัมของสาร 1a (ภาพที่ 2.4) แสดงค่าการดูดกลืนกว้าง และอ่อน (br, weak) ของกรดคาร์บอกซีที่ 3249  $\text{cm}^{-1}$  และหมู่คาร์บอนิล (C=O) ที่ 1713  $\text{cm}^{-1}$  ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็นกรดไขมัน (fatty acid) ที่เป็นของแข็ง ดังนั้นการเกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bonding) ของหมู่คาร์บอกซี (-COOH) ระหว่างโมเลกุลค่อนข้างจะอ่อน ไม่เหมือนสารที่อยู่ในสถานะของสารละลาย

จาก  $^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัมของสาร 1a (ภาพที่ 2.5) แสดงสัญญาณคล้ายกับสาร 1 เพียงแต่โปรตอนลดลง 3 เท่า

$^{13}\text{C-NMR}$  สเปกตรัมของสาร 1a (ภาพที่ 2.6) แสดงค่า chemical shift ที่ 180.38 ppm ซึ่งเป็นคาร์บอนของหมู่คาร์บอกซี (-COOH) ที่ 130.01 และ 129.72 ppm เป็นเอกลักษณ์ของคาร์บอนที่เป็นอัลคีน (C=C) จาก  $^{13}\text{C-NMR}$  สเปกตรัมโดยเทคนิค DEPT 135 (ภาพที่ 2.7) พบว่าในโครงสร้างของสาร 1a มีหมู่ -CH<sub>3</sub> 1 หมู่, หมู่ -CH- 2 หมู่ และคาร์บอนที่ไม่มีไฮโดรเจน 1 คาร์บอน นอกนั้นเป็นหมู่ -CH<sub>2</sub>- ซึ่งซ้อนกันอยู่ จากจำนวนโปรตอนใน  $^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัมคาดว่าน่าจะมีหมู่ -CH<sub>2</sub>- ประมาณ 15 หมู่

จากข้อมูลของ IR และ NMR สเปกตรัม สามารถบอกข้อมูลว่าโครงสร้างของสาร 1a เป็นกรดไขมันสายโซ่ยาว มีสูตรโมเลกุล  $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$  (Mw = 296)

เพื่อยืนยันว่าสาร 1a เป็นกรดไขมัน จึงได้เตรียมอนุพันธ์เป็นเมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) ให้ชื่อว่าสาร 1b (สมการ ที่ 2) เป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน ( $R_f = 0.72$ , 10% EtOAc:Hexane)



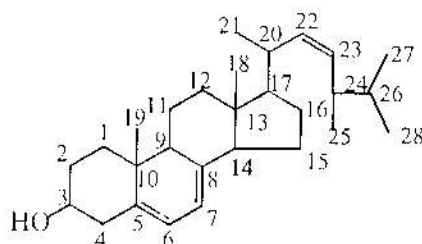
จาก IR สเปกตรัมของสาร 1b (ภาพที่ 2.8) แสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 1746  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ ซึ่งยืนยันได้ว่า สาร 1a เป็นกรดคาร์บอกซิลิก

นอกจากนี้ข้อมูลของ  $^1\text{H-NMR}$  (ภาพที่ 2.9) ปรากฏสัญญาณโปรตอนของหมู่  $-\text{OCH}_3$  ของเอสเทอร์ที่ 3.65 ppm และ  $^{13}\text{C-NMR}$  (ภาพที่ 2.10) พบสัญญาณที่ 172.23 และ 49.33 ppm ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอสเทอร์ ( $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ )

สาร 2 ได้มาจากการแยกสารสกัดหยาบทั้งสามคือเอ็น-เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตามด้วยการตกผลึกด้วย Hexane ได้ผลึก รูปเข็มสีขาวหนัก 0.3007 กรัม (0.08%) mp = 157-159°C,  $R_f = 0.52$  (40% EtOAc:Hexane)

จาก IR สเปกตรัมของสาร 2 (ภาพที่ 2.11) แสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 3419  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งกว้างเป็นเอกลักษณ์ของ  $-\text{OH}$  ยึด ที่ 3050  $\text{cm}^{-1}$  มีสัญญาณอ่อนมาก คาดว่าเป็น  $\text{C}=\text{C}$  ที่ 2957 และ 2872  $\text{cm}^{-1}$   $\text{C-H}$  ยึด ของคาร์บอนอิ่มตัว ที่ 1657-1650 เป็น  $\text{C}=\text{C}$  ยึด ที่ 1458 และ 1366  $\text{cm}^{-1}$  เป็น  $\text{C-H}$  งอ ที่ 1039 เป็น  $\text{C-O}$  ยึด

จากข้อมูลของ  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  สเปกตรัม (ภาพที่ 2.12 และ 2.13) คาดว่าสาร 2 เป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์ (steroid) และเมื่อเปรียบเทียบจุดหลอมเหลว จาก mix-mp และตรวจสอบด้วย mix- $\text{TLC}$  กับ Ergosterol ปรากฏว่าเป็นสารเดียวกัน



สาร 2, Ergosterol

สาร 3 แยกได้จากสารสกัดหาบทั้งสามคือ เอ็น-เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล โดยวิธีโครมาโทกราฟี และตกผลึกซ้ำด้วย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :Hexane ได้ผลึกรูปเข็มละเอียดสีแดง 0.5997 กรัม (0.16%) จุดหลอมเหลว  $134-137^\circ\text{C}$ ,  $R_f = 0.58$  (60% EtOAc:Hexane)

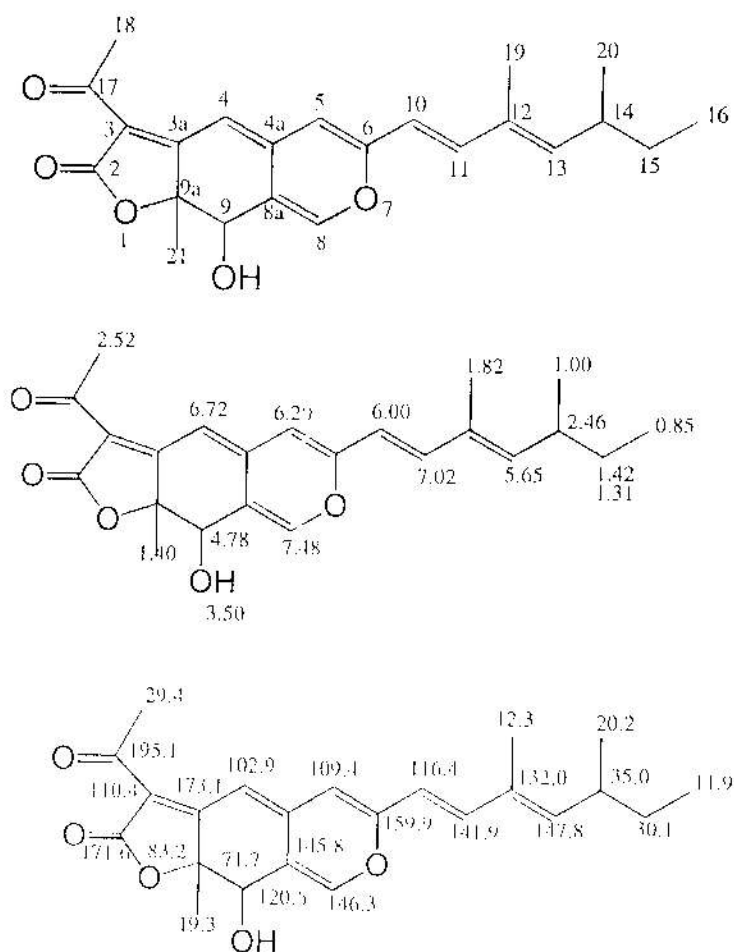
จากข้อมูลของ IR สเปกตรัม (ภาพที่ 2.14) แสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่  $3393\text{ cm}^{-1}$  เป็นเอกลักษณ์ของ -OH ยืด ที่  $2924$  และ  $2855$  เป็นเอกลักษณ์ของ C-H ยืด ที่  $1732\text{ cm}^{-1}$  เป็นเอกลักษณ์ของหมู่คาร์บอนิล (C=O) ของคีโตน ที่  $1651\text{ cm}^{-1}$  เป็นค่าดูดกลืนคลื่นแสงของหมู่คาร์บอนิลซึ่ง conjugate กับ C=C ที่เป็นวงแหวน ที่  $1539\text{ cm}^{-1}$  เป็น C=C ยืด และที่  $1200\text{ cm}^{-1}$  เป็น C-O ยืด

จากข้อมูลของ Mass spectrum (ภาพที่ 2.15) แสดงค่ามวลโมเลกุล (m/z) ที่ 382 เมื่อนำมาพิจารณาร่วมกับ  $^{13}\text{C}$  NMR (ภาพที่ 2.16) จากเทคนิค DEPT และ HMQC (ภาพที่ 2.17) พบว่ามีจำนวนคาร์บอนชนิดไม่มี H (quaternary C) อยู่จำนวน 9 แห่ง ชนิด CH จำนวน 8 แห่ง ชนิด  $\text{CH}_2$  จำนวน 1 แห่ง และ  $\text{CH}_3$  จำนวน 5 แห่ง เมื่อรวมแล้วมีจำนวนคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็น  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}$  และเมื่อประมวลค่ามวลโมเลกุล และ ข้อมูลจากวิเคราะห์ธาตุคือ C (71.62%) และ H (6.86%) พบว่าสาร 3 น่าจะมีสูตรโมเลกุลเป็น  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_5$  และมีค่า double bond equivalence เท่ากับ 11

จาก  $^1\text{H}$ -NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 2.18) และ H-H COSY สเปกตรัม (ภาพที่ 2.19) ซึ่งแสดงค่า chemical shift ของโปรตรอนหลักและโปรตรอนข้างเคียง พบว่าโปรตรอนที่  $7.48\text{ ppm}$  ซึ่งเป็น doublet จำนวน 1 โปรตรอนจะ coupling กับ 1 โปรตรอนที่  $4.78\text{ ppm}$  doublet โดยมีค่า  $J = 2.0\text{ Hz}$  ที่  $7.02$  และ  $6.00\text{ ppm}$  ต่างเป็น doublet 1 โปรตรอน โดยมีค่า  $J = 15.7\text{ Hz}$  ซึ่งจัดให้เป็น olefinic โปรตรอนที่อยู่ในตำแหน่ง เป็น *trans* กัน ค่า chemical shift ที่  $1.42$  และ  $1.31\text{ ppm}$  ซึ่งเป็น multiplet และ doublet of quintet ( $J = 13.4$  และ  $7.5\text{ Hz}$ ) แห่งละ 1 โปรตรอน กำหนดให้เป็น geminal โปรตรอนของ  $-\text{CH}_2-$  ซึ่งเกิดจากแต่ละโปรตรอนจัดตัวต่างกัน มีค่า  $J = 7.5\text{ Hz}$  ซึ่งมีค่า เท่ากับ ค่า  $J$  ของ triplet ที่  $0.85\text{ ppm}$  ของหมู่  $-\text{CH}_3$  แสดงถึงการเชื่อมต่อกันเป็น  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$  ค่า Chemical shift ที่  $2.52\text{ singlet}$  กำหนดให้เป็นหมู่  $\text{CH}_2$  ที่ต่ออยู่กับคาร์บอนิล ที่  $1.82$  เป็นหมู่  $\text{CH}_3$  ที่ต่ออยู่กับ C=C และที่  $1.40\text{ ppm}$  เป็นหมู่  $\text{CH}_2$  ที่ต่ออยู่กับ quaternary คาร์บอน ส่วนที่  $1.00$

ppm จำนวน 3 โปรตอนซึ่งเป็น doublet เป็นของหมู่  $\text{CH}_3$  ซึ่งต่ออยู่กับคาร์บอนที่มี 1 โปรตอน

จากข้อมูลที่ได้เมื่อนำมาพิจารณาร่วมกับเทคนิค HMBC (ภาพที่ 2.20) ซึ่งอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างไฮโดรเจน กับ คาร์บอน ที่อยู่ใกล้เคียง และยืนยันด้วยความสัมพันธ์ระหว่างไฮโดรเจนกับไฮโดรเจนจากเทคนิค NOESY (ภาพที่ 2.21) และ HMQC (ภาพที่ 2.22) สามารถสรุปโครงสร้างของสาร 3 ได้ โดยมีค่า chemical shift ของโปรตอนและคาร์บอนในแต่ละตำแหน่งของสาร 3 แสดงดังรูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างและค่า chemical shift ของโปรตอนและคาร์บอนของสาร 3

บน : แสดงโครงสร้างพร้อมตำแหน่งของสาร 3

กลาง : แสดงค่า chemical shift ของโปรตอนของสาร 3

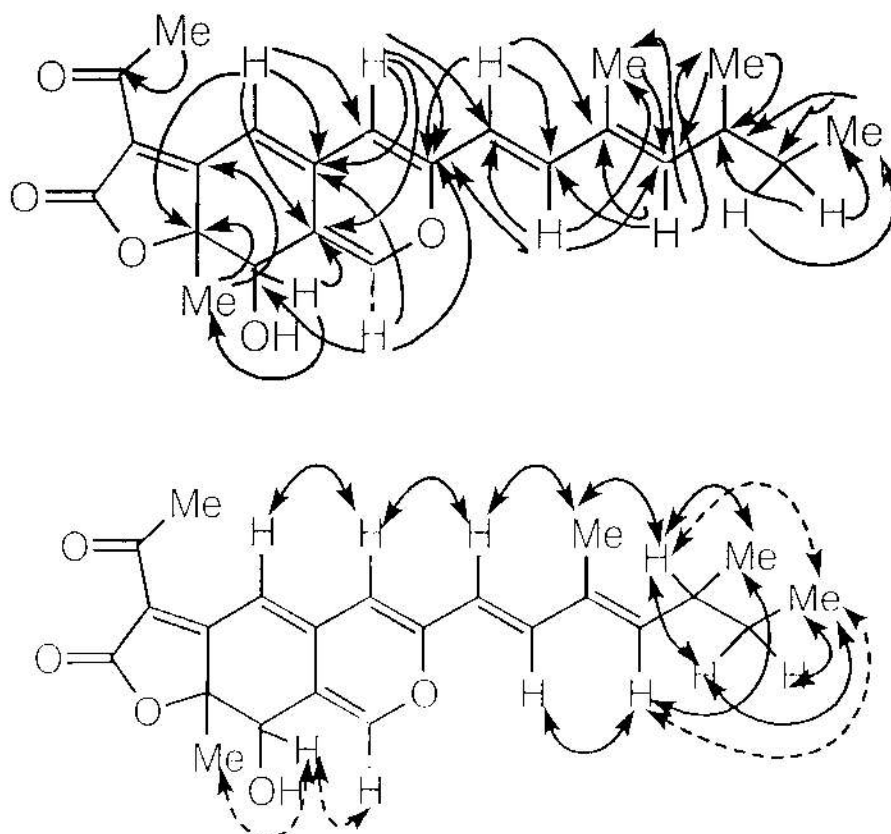
ล่าง : แสดงค่า chemical shift ของคาร์บอนของสาร 3

ตารางที่ 2.1 ค่า chemical shift ของโปรตอนและคาร์บอน  
ในแต่ละตำแหน่งของสาร 3

| No | $\delta H^a$                                         | $\delta C^b$ |
|----|------------------------------------------------------|--------------|
| 2  | -                                                    | 171.6        |
| 3  | -                                                    | 110.4        |
| 3a | -                                                    | 173.1        |
| 4  | 6.72 <i>s</i>                                        | 102.9        |
| 4a | -                                                    | 145.8        |
| 5  | 6.20 <i>s</i>                                        | 109.4        |
| 6  | -                                                    | 159.9        |
| 8  | 7.28 <i>d</i> , 2.0                                  | 146.3        |
| 8a | -                                                    | 120.6        |
| 9  | 4.78 <i>d</i> , 2.0                                  | 71.7         |
| 9a | -                                                    | 83.2         |
| 10 | 6.0 <i>d</i> , 15.7                                  | 116.4        |
| 11 | 7.02 <i>d</i> , 15.7                                 | 141.9        |
| 12 | -                                                    | 132.0        |
| 13 | 5.65 <i>d</i> , 9.7                                  | 147.8        |
| 14 | 2.46 <i>m</i>                                        | 35.0         |
| 15 | 1.42 <i>m</i> , 1.31 <i>d</i> , <i>quint</i> , 13.4, | 30.1         |
| 16 | 0.85 <i>t</i> , 7.5                                  | 11.9         |
| 17 | -                                                    | 195.1        |
| 18 | 2.52 <i>s</i>                                        | 29.4         |
| 19 | 1.82 <i>s</i>                                        | 12.3         |
| 20 | 1.00 <i>d</i> , 6.6                                  | 20.2         |
| 21 | 1.40 <i>s</i>                                        | 19.3         |
| OH | 3.50 <i>br</i>                                       | -            |

<sup>a</sup> 600 MHz (CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm), <sup>b</sup> 150 MHz (CDCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm)

นอกจากนี้รูปความสัมพันธ์ระหว่างไฮโดรเจนกับคาร์บอน ที่อยู่ใกล้เคียงจากเทคนิค HMBC และรูปความสัมพันธ์ระหว่างไฮโดรเจนกับไฮโดรเจนจากเทคนิค NOESY ของสาร 3 แสดงได้ดังรูปที่ 2.2

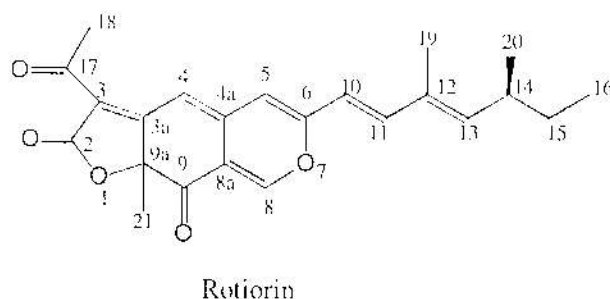
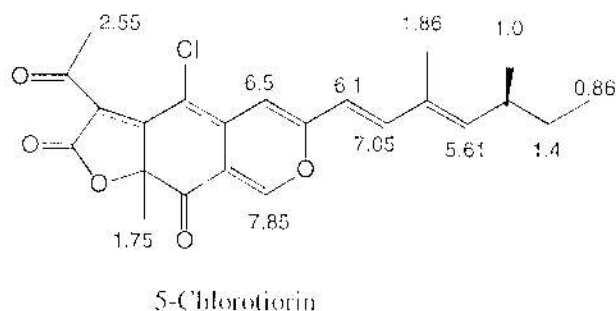


รูปที่ 2.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ไฮโดรเจนกับคาร์บอนและ  
ไฮโดรเจนกับไฮโดรเจน ของสาร 3

บน : ลูกศรแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $H \rightarrow C$  จาก HMBC

ล่าง : ลูกศรแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $H \leftrightarrow H$  จาก NOESY

จากการสืบค้นข้อมูลในขณะนี้พบว่าสาร 3 เป็นสารใหม่ มีโครงสร้างหลักเหมือนกับ Rotiorin<sup>19</sup> ต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 โดยสาร 3 เป็นหมู่-OH แต่ Rotiorin เป็นหมู่ C=O ดังนั้นจึงตั้งชื่อสาร 3 ว่า Rotiorinol และเมื่อเปรียบเทียบค่า chemical shift ของ  $^1H$  NMR สเปกตรัมระหว่างสาร 3 กับ 5-chlororotiorin<sup>20</sup> ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Rotiorin พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ 5-chlorotiorin และ Rotiorin

บน : โครงสร้างและ chemical shift ของโปรตอน ของ 5-Chlorotiorin  
 ล่าง : โครงสร้างของ Rotiorin

จากโครงสร้างของสาร 3 มีการบอเห็นในไครัลอยู่ 2 ตำแหน่งคือ C-9 และ C-14 จากรายงานพบว่า C-14 ของ Rotiorin<sup>20</sup> ซึ่งมีค่า specific rotation เป็น (+) มี configuration เป็น (S) เมื่อเปรียบกับ C-14 ของสาร 3 แล้วจึงน่าจะเหมือนกัน ซึ่งจาก NOESY สเปกตรัมพบความสัมพันธ์ของ H-14 ↔ H-19, H-10 ↔ H-19, H-1 ↔ H-13 แต่ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง H-19 ↔ H-20 แสดงถึงสเตอริโอเคมีที่ C-14 เป็น (S) configuration สำหรับ absolute configuration ของ C-9 นั้นจะต้องพิสูจน์โดยวิธีของ Ohlani และคณะ<sup>31</sup> ซึ่งพัฒนามาจากวิธีของ Mosher<sup>22</sup> โดยการเตรียมเอสเทอร์กับ (R) และ (S) methoxy-(trifluoromethyl)-phenylacetic acid chloride (MTPA-Cl) เพื่อให้ได้ (S) และ (R)-MTPA ester จากนั้นวัดความแตกต่างของค่า Chemical shift ระหว่างโปรตอน H-9 ใน (S) และ (R)-MTPA ester ซึ่งผลจะบอกได้ว่า Chiral center ที่จุด C-9 เป็น (S) หรือ (R) configuration ซึ่งการทดลองนี้ยังต้องดำเนินต่อไป

สาร 4 ได้จากการแยกส่วน filtrate จากการตกผลึก สาร 3 ของสารสกัดหยาบ เอ็น-เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล โดยวิธีโครมาโทกราฟี ได้ของแข็งสีเหลืองหนัก 0.0710 กรัม (0.02%)  $R_f=0.48$  (60% EtOAc:Hexane)

จากข้อมูล IR สเปกตรัม (ภาพที่ 2.23) แสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่  $3309\text{ cm}^{-1}$  เป็นลักษณะของ O-H ยืด ที่  $2924, 2881\text{ cm}^{-1}$  เป็น C-H ยืดของหมู่  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  และ  $\text{CH}_3$  ที่  $1636\text{ cm}^{-1}$  เป็น C=C ยืด ที่  $1463\text{ cm}^{-1}$  เป็น C-H งอ ที่  $1380$  เป็น C-O ยืด

$^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัม (ภาพที่ 2.24) แสดงค่า chemical shift ของ olefinic โปรตอน ที่เป็น trans กันที่ 6.5 และ 6.2 ppm ซึ่งเป็นลักษณะของ AB quartet มีค่า  $J=9.0\text{ Hz}$  และที่ 5.19 ppm ซึ่งคาดว่าเป็น olefinic โปรตอนที่เป็น cis กัน สำหรับโปรตอนกลุ่มอื่นซึ่งปรากฏอยู่ในช่วง 2.4-0.75 ppm จัดให้เป็นหมู่  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  และ  $\text{CH}_3$  ข้อมูลของ  $^{13}\text{C-NMR}$  สเปกตรัม (ภาพที่ 2.25) แสดงจำนวนคาร์บอนประมาณ 28 คาร์บอนและยืนยันว่ามีหมู่ C=C 2 หมู่ ที่ 135.4, 135.2, 132.4 และ 130.8 จากข้อมูลของ DEPT สเปกตรัม (ภาพที่ 2.26) บอกได้ว่าโครงสร้างมีหมู่  $\text{CH}_3$  6 หมู่  $\text{CH}_2$  7 หมู่  $\text{CH}$  7 หมู่ ที่เหลือเป็นคาร์บอนที่เป็น quaternary 4 หมู่ รวมทั้งหมดมีจำนวนคาร์บอนอย่างน้อย 28 คาร์บอน

จากข้อมูลที่มีอยู่ไม่เพียงพอสำหรับยืนยันโครงสร้างของสาร 4 แต่จาก  $^1\text{H}$ -และ  $^{13}\text{C-NMR}$  สเปกตรัมคาดว่าเป็นสารประกอบประเภทไตรเทอร์ปีโนอยด์

สาร 5 และสาร 6 ได้จากการแยกส่วน filtrate ของการตกผลึกสาร 3 ด้วย Preparative Layer Chromatography เป็นสองแถบติดกัน เป็นของแข็งสีส้มทั้งสองสาร แต่เนื่องจากสารที่ 1 ได้มีจำนวนน้อยและแยกให้บริสุทธิ์ได้ยาก จึงเป็นข้อจำกัดสำหรับการพิสูจน์โครงสร้าง จาก IR สเปกตรัม ของสาร 5 และ 6 (ภาพที่ 2.27) มีลักษณะเหมือนกันคือแสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 2961, 2931 และ  $2874\text{ cm}^{-1}$  เป็น C-H ยืด ของหมู่  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  และ  $\text{CH}_3$  ที่ 1732 และ  $1664\text{ cm}^{-1}$  เป็นลักษณะของ C=O ยืด

สำหรับ  $^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัม (ภาพที่ 2.28 และ 2.29) ของสารทั้งสองมีส่วนคล้ายกับสาร 3 โดยเฉพาะในช่วง 7.5-5.0 ppm ซึ่งเป็นกลุ่มของวงแหวน การวิเคราะห์โครงสร้างที่สมบูรณ์ของสาร 5 และ 6 ยังต้องดำเนินต่อไป

สาร 7 และ สาร 8 เป็นของแข็งสีม่วงได้จากการแยกสารสกัดหยาดเอ็น-เฮกเซน และเอทิลอะซิเตต โดยวิธีโครมาโทกราฟี เมื่อแยกด้วย Preparative Layer Chromatography จะได้แถบสีม่วง 2 แถบติดกัน แถบบน  $R_f=0.38$  (60% EtOAc:Hexane) เป็นสาร 7 หนัก 0.0557 กรัม (0.014%) ส่วนแถบล่าง  $R_f=0.34$  (60% EtOAc:Hexane) เป็นสาร 8 หนัก 0.0502 กรัม (0.013%)

จาก IR สเปกตรัม ของสาร 7 และ 8 (ภาพที่ 2.30 และ 2.31) มีลักษณะเหมือนกัน คือแสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่  $3399\text{ cm}^{-1}$  ซึ่ง broad และ weak เป็นลักษณะของ O-H ยืด ที่  $2924, 2881\text{ cm}^{-1}$  คาดว่าเป็น C-H ยืด ที่  $1731\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็น broad band คาดว่าเป็น C=O ยืดของอัลโดนมากกว่าหนึ่งหมู่ซึ่งมันซ้อนกันอยู่ที่  $1636, 1607$  และ  $1541\text{ cm}^{-1}$  จัดให้เป็นช่วงการดูดกลืนของหมู่ C=C หรือ C=N ที่  $1208$  และ  $1157$  คาดว่าเป็น C-O ยืด

จาก  $^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัม ของสาร 7 (ภาพที่ 2.32) แสดงค่า Chemical shift ที่ 7.73, 6.81-6.66 ppm จัดให้เป็นอะโรมาติกโปรตอน ที่ 6.26, 5.86 ppm เป็น olefinic โปรตอน ในช่วง 2.6-2.5 ppm ซึ่งมีสัญญาณซ้อนกันเป็นกลุ่ม อาจเป็นโปรตอนของคาร์บอนที่ต่ออยู่กับ N หรือหมู่คาร์บอนิล หรือ อะโรมาติก ที่ 2.0 ppm เป็น singlet คาดว่าเป็นหมู่  $\text{CH}_3\text{CO}$  , ที่ 1.85 ppm singlet คาดว่าเป็น  $\text{CH}_3\text{-C}=\text{C}$  สำหรับ Chemical shift ซึ่งซ้อนกันในช่วง 1.8-0.8 ppm นั้นประกอบด้วยหมู่ CH สายโซ่  $\text{CH}_2$  และ  $\text{CH}_3$  ซึ่งไม่สามารถแจกแจงรายละเอียดได้

จาก  $^{13}\text{C-NMR}$  สเปกตรัม ของสาร 7 (ภาพที่ 2.33) แสดง Chemical shift ของหมู่ C=O ประมาณ 5-6 หมู่ เป็นการยืนยันผลจาก IR สเปกตรัม นอกจากนี้ยังมี Chemical shift ของอะโรมาติกและโอเลฟินิกคาร์บอน ในช่วง 150-110 ppm

ในความพยายามพิสูจน์โครงสร้างของสาร 7 ด้วย NMR เทคนิคต่าง ๆ เช่น DEPT  $^1\text{H-H-COSY}$  (ภาพที่ 2.34)  $^1\text{H-MQC}$   $^1\text{H-MBC}$  NOESY และ HOHAHA ยังไม่สามารถสรุปโครงสร้างของสาร 7 ได้

$^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัมของสาร 8 (ภาพที่ 2.35) คล้ายกับ สาร 7 โดยเฉพาะช่วง 7.73-6.66 ppm ซึ่งเป็นช่วงของอะโรมาติก และ โอเลฟินิก โปรตอน ที่ 3.9-3.4 ppm เป็นกลุ่มสัญญาณโปรตอนของคาร์บอนซึ่งต่ออยู่กับออกซิเจน ( $-\text{OCH}_2-$ ) ค่า Chemical shift ที่ 2.51 และ 2.52 ppm เป็น doublet ที่ 2.50, 2.42 เป็น sextet ที่ 2.45 เป็น quartet และ

2.39 เป็น triplet คาดว่าเป็นโปรตอนของคาร์บอนที่ต่ออยู่กับไนโตรเจน หรือ คาร์บอนิล หรือ อะโรมาติก ที่ 1.8-0.80 ppm เป็นโปรตอนของ CH, CH<sub>2</sub> ซึ่งเป็นสายโซ่และหมู่ CH<sub>3</sub>, <sup>13</sup>C-NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 2.36) แสดงค่า Chemical shift ที่ 204.2, 204.0, 194.6, 194.2, 193.7 และ 173.26 ppm ซึ่งจัดให้เป็น C=O, ช่วง 148-114 ppm จัดให้เป็น คาร์บอนของอะโรมาติก และ โอลิฟีนิก นอกจากนี้ที่ 70-49 ppm คาดว่าเป็น C-O หรือ C-N สำหรับกลุ่ม -CH<sub>2</sub> กับ -CH<sub>3</sub> ปรากฏในช่วง 30-11 ppm

เช่นเดียวกันกับสาร 7 โครงสร้างของสาร 8 ยังไม่สามารถสรุปได้ อย่างไรก็ตาม การใช้เทคนิค DEPT ใน <sup>13</sup>C-NMR และ 2D NMR คือ H-H COSY (ภาพที่ 2.37) HMQC, HMBC, NOESY และ HCHAHHA ของทั้งสองสารพอสรุปได้ว่ามีโครงสร้างหลักเหมือนกัน แตกกันที่หมู่ย่อย

## 2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช

ในการทดลองนี้ใช้สารสกัดเห็ดเอ็น-เฮกเซน สารสกัดเห็ดอะทิลอะซิเตด และ สารสกัดเห็ดบเมทานอล ทั้งในส่วนที่เป็นตะกอน(ppi) และส่วนที่เป็น filtrate ไปทดสอบกับเชื้อ *Colletotrichum glaucosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง โดยทำการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 4 ซ้ำ ต่อสารสกัดที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ได้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนี และผลการยับยั้งการสร้างสปอร์ ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชดังต่อไปนี้

### 2.3.1 สารสกัดเห็ดเอ็น-เฮกเซน

จากการทดลองใช้สารสกัดเห็ดเอ็น-เฮกเซนในส่วนที่เป็นตะกอน ในระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนี ได้ 1.00, 8.00, 21.60, 32.60 และ 47.60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ให้ค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 1006 ppm (1.0 x 10<sup>-3</sup> g/ml) และยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 1.48, 11.85, 35.92, 41.49 และ 63.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ให้ค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 642 ppm (6.42 x 10<sup>-4</sup> g/ml) (ตารางที่ 2.2 และ รูปที่ 2.4)

สำหรับสารสกัดหยาบเอ็น-เฮกเซน ส่วนที่เป็น filtrate ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 100, 500 และ 1000 ppm พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีได้ 5.60, 15.60, 36.00 และ 44.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ให้ค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 1014 ppm ( $1.01 \times 10^{-3}$  g/ml) และสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 11.66, 40.50, 79.60 และ 80.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ให้ค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 199 ppm ( $1.99 \times 10^{-4}$  g/ml) (ตารางที่ 2.2 และ รูปที่ 2.4)

### 2.3.2 สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต

จากการทดลองใช้สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต ในส่วนที่เป็นตะกอน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 300, 500 และ 1000 ppm พบว่าสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์เท่ากับ 17.68, 56.76 และ 74.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ให้ค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 400 ppm ( $4.0 \times 10^{-4}$  g/ml) (ตารางที่ 2.2 และ รูปที่ 2.5)

สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตส่วนที่เป็น filtrate ที่ระดับความเข้มข้น 0, 300, 500 และ 1000 ppm พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีได้ 2.61, 37.55 และ 66.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ให้ค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 840 ppm ( $8.4 \times 10^{-4}$  g/ml) และสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์เท่ากับ 39.45, 45.99 และ 69.55 ตามลำดับ ให้ค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 820 ppm ( $8.20 \times 10^{-4}$  g/ml) (ตารางที่ 2.2 และ รูปที่ 2.5)

### 2.3.3 สารสกัดหยาบเมทานอล

จากการทดลองใช้สารสกัดหยาบเมทานอลในส่วนที่เป็นตะกอน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีได้ 2, 20.6, 28, 32 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ให้ค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 1277 ppm ( $1.27 \times 10^{-3}$  g/ml) และสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 12.36, 20.08, 35.55, 46.35 และ 83 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 466 ppm ( $4.66 \times 10^{-4}$  g/ml) (ตารางที่ 2.2 และ รูปที่ 2.6)

สำหรับสารสกัดหยาบเมทานอลในส่วนที่เป็น filtrate ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีได้ 0, 10, 19, 30 และ 40.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ให้ค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 1019 ppm ( $1.01 \times 10^{-3}$  ) และสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 6.01, 19.12, 43.24, 60.27 และ 79.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ให้ค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 266 ppm ( $2.66 \times 10^{-4}$  g/ml) (ตารางที่ 2.2 และ รูปที่ 2.6)

ตารางที่ 2.2 แสดงค่า  $ED_{50}$  ของสารสกัดจากรา *Chaetomium cupreum* ในการทดสอบกับเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

| สารสกัดหยาบ                  | $ED_{50}$ (g/ml)      |                       |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                              | การยับยั้งโคโลนี      | การยับยั้งสปอร์       |
| เอ็น-เฮกเซน (ตะกอน)          | $1.00 \times 10^{-3}$ | $6.42 \times 10^{-4}$ |
| เอ็น-เฮกเซน (filtrate) เอทิล | $1.01 \times 10^{-3}$ | $1.99 \times 10^{-4}$ |
| อะซิเตด (ตะกอน)              | -                     | $4.00 \times 10^{-4}$ |
| เอทิลอะซิเตด (filtrate)      | $8.40 \times 10^{-4}$ | $8.20 \times 10^{-4}$ |
| เมทานอล (ตะกอน)              | $1.27 \times 10^{-3}$ | $4.66 \times 10^{-4}$ |
| เมทานอล (filtrate)           | $1.00 \times 10^{-3}$ | $2.66 \times 10^{-4}$ |

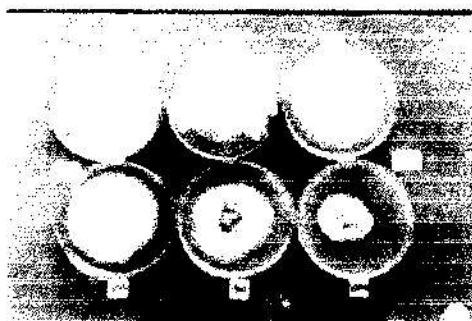
### 2.3.4 สาร 3, Rotiorinol

2.3.4.1 การทดสอบกับเชื้อ *C. gloeosporioides* พบว่าที่ความเข้มข้น 0, 50, 100 และ 300 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีได้ 17.60, 24.00 และ 31.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ให้ค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 1128 ppm ( $1.12 \times 10^{-3}$  g/ml) และสามารถยับยั้งสปอร์ได้ 20.25, 29.11 และ 51.12 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 230 ppm ( $2.30 \times 10^{-4}$  g/ml) (ตารางที่ 2.3 และ รูปที่ 2.6)

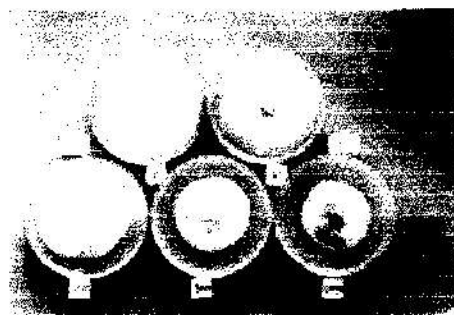
2.3.4.2 การทดสอบกับเชื้อ *Phytophthora palmivora* นอกจากนี้ยังนำสาร 3, Rotiorinol ไปทดสอบกับเชื้อรา *P. palmivora* ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่า โคนเน่าในทุเรียนและพริกไทย พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีเท่ากับ 69.60, 73.40, 86.40, 91.00 และ 93.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ให้ค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 2.79 ppm ( $2.79 \times 10^{-6}$  g/ml) (ตารางที่ 2.3 และ รูปที่ 2.7)

ตารางที่ 2.3 แสดงค่า ED<sub>50</sub> ของสาร 3, Rotiorinol ในการทดสอบกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช

| เชื้อที่ทดสอบ             | ค่า ED <sub>50</sub> (g/ml) |                       |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------|
|                           | ยีสต์โคโคนี                 | ยีสต์สาลอร์           |
| <i>C. gloeosporioides</i> | $1.12 \times 10^{-3}$       | $2.30 \times 10^{-4}$ |
| <i>P. palmivora</i>       | $2.79 \times 10^{-6}$       | -                     |



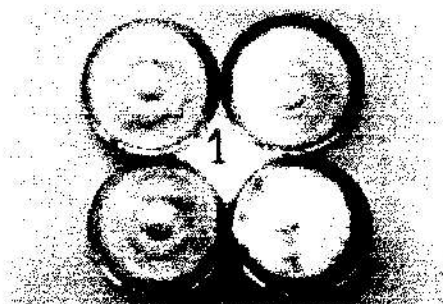
A (ส่วนที่เป็นตะกอน)



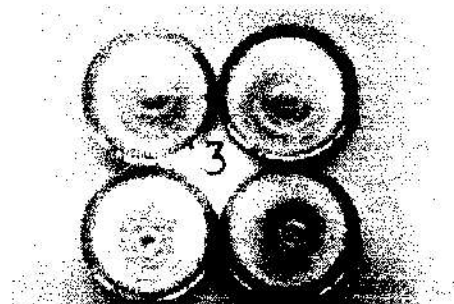
B (ส่วนที่เป็น filtrate)

รูปที่ 2.4 สารสกัดหยาบเอ็น-เฮกเซนของ *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

A : ซ้ายบน = 0 ppm, กลางบน = 10 ppm, ขวาบน = 50 ppm  
 ซ้ายล่าง = 100 ppm, กลางล่าง = 500 ppm, ขวาล่าง = 1,000 ppm  
 B : ซ้ายบน = 0 ppm, ขวาบน = 10 ppm  
 ซ้ายล่าง = 100 ppm, กลางล่าง = 500 ppm, ขวาล่าง = 1,000 ppm



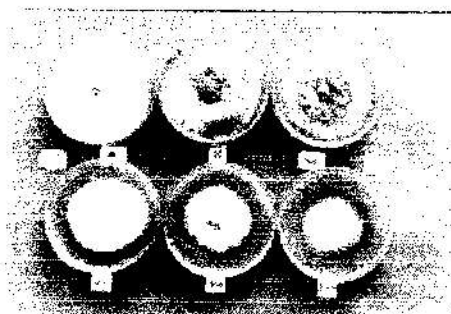
A (ส่วนที่เป็นตะกอน)



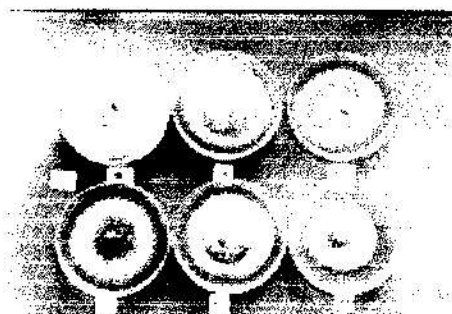
B (ส่วนที่เป็น filtrate)

รูปที่ 2.5 สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต ของ *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

A และ B ซ้ายบน = 0 ppm, ขวาบน = 300 ppm  
 ซ้ายล่าง = 500 ppm, ขวาล่าง = 1,000 ppm



A (ส่วนที่เป็นตะกอน)

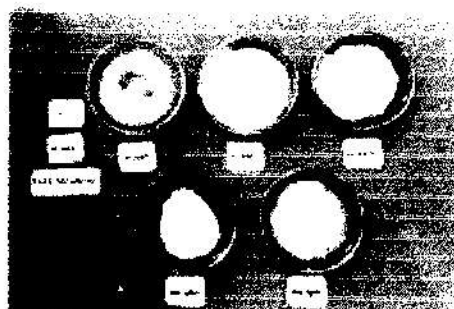


B (ส่วนที่เป็น filtrate)

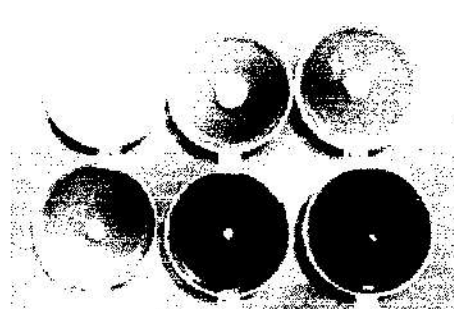
รูปที่ 2.6 สารสกัดหยาบเมทานอลของ *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

A และ B : ซ้ายบน = 0 ppm, กลางบน = 10 ppm, ขวาบน = 50 ppm

ซ้ายล่าง = 100 ppm, กลางล่าง = 500 ppm, ขวาล่าง = 1,000 ppm



A



B

รูปที่ 2.7 แสดงผลของสาร 3, Rotiorinol ในการทดสอบกับเชื้อรา

*Colletotrichum gloeosporioides* (A) และ *Phytophthora palmivora* (B)

A : ซ้ายบน = 0 ppm, กลางบน = 10 ppm, ขวาบน = 50 ppm

ซ้ายล่าง = 100 ppm, ขวาล่าง = 300 ppm

B : ซ้ายบน = 0 ppm, กลางบน = 10 ppm, ขวาบน = 50 ppm

ซ้ายล่าง = 100 ppm, กลางล่าง = 500 ppm, ขวาล่าง = 1,000 ppm