สารต้านจุลินทรีย์จากราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp. ของจอกหูหนู

Antimicrobial Agents Produced by *Fusarium* sp., an Endophytic Fungus of *Salvinia cuculata* Roxb & Bory

วรรณฤดี หิรัญรัตน์[1*] อัษฎาวุธ หิรัญรัตน์[2] พฤทธิภร ศุภพล[3] และฮิบรอเฮง บาหะ[4]

Wanrudee Hiranrat[1*], Asadhawut Hiranrat[2], Preuttiporn Supaphon[3] and Hiproheng Baha[4]

บทคัดย่อ

การแยกส่วนประกอบทางเคมีจากราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp. ที่ได้จากใบจอกหูหนู สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 4 สาร คือ “Sydoxanthone A (1)”, “13-O-Acetylsydowinin B (2)”, “Secalonic Acid A (3)” และ “Emodin (4)” เมื่อนำสารบริสุทธิ์มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (*SA*), Methicillin - resistant *S. aureus* (*MRSA SK1*), *P. aeruginosa* ATCC27853 (*PA*) และ *E. coli* (*EC*) และยับยั้งเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 (*CA90028*) และ *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 Flucytosine – resistant (*CN91112*) พบว่า สาร 3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *SA*, *MRSA SK1*, *PA* และ *EC* และยับยั้งเชื้อยีสต์ *CA90028* และ *CN91112* อยู่ในระดับดีด้วยค่า MIC เท่ากับ 25.1 25.1 25.1 50.2 50.2 และ 50.2 μM ตามลำดับ สาร 1 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *SA, MRSA SK1* และ *PA* ในระดับปานกลางด้วยค่า MIC เท่ากับ 82.2 μM ส่วนสาร 2 และ 4 แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ที่ทดสอบในระดับต่ำ

คำสำคัญ: ราเอนโดไฟท์ จอกหูหนู ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

[1] ผศ., สาขาวิชาเคมี หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

[2] อ.ดร., สาขาวิชาเคมี หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

[3] อ.ดร., สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

[4] นิสิตระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

[1] Asst. Prof., Natural Products Research Laboratory, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210, Thailand

[2] Lecturer, Dr., Natural Products Research Laboratory, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210, Thailand

[3] Lecturer, Dr., Microbiology Department, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210, Thailand

[4] Undergraduate Student, Chemistry Department, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210, Thailand

[*] Corresponding author: E-mail address: wanrudee17@yahoo.com. Tel.: 098-1595162

(Received: August 7, 2018; Revised: November 12, 2018; Accepted: December 12, 2018)

Abstract

Isolation of the chemical constituents from an endophytic fungus *Fusarium* sp. , isolated from *Salvinia cucullata* Roxb. & Bory, yielded four compounds: “Sydoxanthone A (1)”, “13-O-acetylsydowinin B (2)”, “Secalonic Acid A (3)” and “Emodin (4)”. Antimicrobial activity of isolated compounds against four bacteria, *S. aureus* (*SA*), Methicillin - resistant *S. aureus*, *P. aeruginosa* ATCC27853 (*MRSA SK1*) and *E. coli* (*EC*) and against two yeast, *Candida albicans* ATCC90028 (*CA90028*) and *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 Flucytosine – resistant (*CN90112*) was determined. The results were found that compound 3 had good antibacterial activity against *SA*, *MRSA SK1*, *PA* and *EC* and antiyeast activity against *CA90028* and *CN90112* with the MIC 25.1, 25.1, 25.1, 50.2, 50.2 and 50.2 μ M, respectively. Compound 1 exhibited moderate activities against bacteria *SA*, *MRSA SK1* and *PA* at 82.2 μM. However compound 2 and 4 showed weak activities to inhibit the growth of bacteria and yeast.

Keywords: Endophytic Fungus, *Salvinia cucullata* Roxb, Antimicrobial

บทนำ

ราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งหนึ่งที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง [1] ต้านจุลินทรีย์ [2] ต้านไวรัส [3] ต้านอนุมูลอิสระ [4] ต้านการอักเสบ [5] และฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ [6] ราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp. ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆมีรายงานวิจัยว่ามีองค์ประกอบทางเคมีที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น สารประเภทอนุพันธ์ของแนฟทาควิโนน และ เอซา-แอนทราควิโนน ซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ และฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ [7] อนุพันธ์ของไพโรน และ แนฟทาควิโนน [8] อนุพันธ์ของไอโซโครมาโนน [9] เททระไซคลิกไตรเทอร์พีนอยด์ และ อินเทกราไซด์ [10-11] รายงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาสารองค์ประกอบจากราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp. ที่แยกได้จากจอกหูหนู (*Salvinia cucullata* Roxb. & Bory.) พบว่าสามารถแยกสารได้ 4 สาร คือ Sydoxanthone A (1) 13-O-acetylsydowinin B (2) Secalonic acid A (3) และ Emodin (4) โครงสร้างของสารเหล่านี้ยืนยันโดยใช้เทคนิคทาง สเปกโทรสโกปี และการเปรียบเทียบกับสารที่เคยมีรายงานแล้ว และพบว่า สาร (3) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, Methicillin - resistant *S. aureus*, *P. aeruginosa* ATCC27853 และ *E. coli* และยับยั้งเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 และ *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 Flucytosine – resistant อยู่ในระดับดีด้วย ค่า MIC เท่ากับ 16 16 32 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ

1. การแยกราเอนโดไฟท์

เก็บใบจอกหูหนู (*Salvinia cucullata* Roxb. & Bory) จากทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง แยกราเอนโดไฟท์โดยล้างใบจอกหูหนูด้วยสบู่และน้ำประปา ตามด้วยแช่ใน 95 % เอทานอลเป็นเวลา 30 นาที และตามด้วยสารละลาย 5 % โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 5 นาที หลังจากนั้นชะด้วยน้ำกลั่น 5 นาที นำใบมาตัดเป็นชิ้นวางในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เมื่อเชื้อเจริญเติบโต คัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และนำไปใส่ในจานเพาะเชื้ออีกใบ

2. การเพาะเลี้ยงและการจัดจำแนกราเอนโดไฟท์โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำราเอนโดไฟท์ที่แยกได้เพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Macroscopic Morphological Characteristics และ Microscopic Morphological Characteristics) โดยการสังเกตด้วยตาเปล่าและเขี่ยเส้นใยมาย้อมด้วยสี Lactophenol Cotton Blue บันทึกลักษณะของโคโลนี ขนาด รูปร่าง สีของเส้นใย การมีผนังกั้น และโครงสร้างสืบพันธุ์ พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ ไอโซเลท sal3 เจริญได้เร็วบนอาหาร PDA โคโลนีมีสีขาว และแบนเรียบ พบลักษณะของโคนิเดียมีขนาดใหญ่ โค้งงอ คล้ายพระจันทร์เสี้ยว ปลายมน เส้นใยไม่มีสี สามารถจัดจำแนกได้ในระดับจีนัสเป็น *Fusarium* sp.

3. การหมักและการสกัดเชื้อ

นำราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp. ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Potato Dextrose Broth (PDB) และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 21 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อที่อยู่ในขวดรูปชมพู่มากรองเพื่อแยกเส้นใยเชื้อราออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ นำส่วนเส้นใยเชื้อรามาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตด ตามด้วยเมทานอล นำสารสกัดเอทิลอะซิเตดและ เมทานอลมาระเหย ตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้สารสกัดเอทิลอะซิเตดของเส้นใยเชื้อรา และสารสกัดเมทานอลของเส้นใยเชื้อรา ให้รหัสเป็น CE และ CM ตามลำดับ

4. การแยกสารบริสุทธิ์

นำสารสกัด CE ลักษณะของหนืดสีน้ำตาลเข้ม น้ำหนัก 0.73 กรัม มาแยกด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ใช้คอลัมน์ชนิดรีเฟิร์สเฟส (RP 18) ใช้ตัวทำละลายระบบ Gradient ระหว่างน้ำและเมทานอลใช้อัตราการไหล 4.50 mL/min แยกสารได้ทั้งหมด 6 ส่วน (CE1-CE6) นำส่วน CE3 มาแยกต่อด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ใช้ตัวทำละลาย 2 % เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ได้สาร 1 (20.5 มิลลิกรัม) นำส่วน CE6 มาแยกด้วยเทคนิค HPLC ใช้คอลัมน์ชนิดรีเฟิร์สเฟส (RP 18) ใช้ตัวทำละลายระบบ Gradient ระหว่างน้ำ เมทานอล และไดคลอโรมีเทน ใช้อัตราการไหล 4.50 mL/min ตามด้วยแยกด้วยเทคนิค TLC สามารถแยกสาร 2 (32.0 มิลลิกรัม)

นำสารสกัด CM ลักษณะของแข็งสีดำ น้ำหนัก 0.69 กรัม มาแยกด้วยเทคนิค HPLC ใช้คอลัมน์ชนิดรีเฟิร์สเฟส (RP 18) ใช้ตัวทำละลายระบบ Gradient ระหว่างน้ำและเมทานอลใช้อัตราการไหล เท่ากับ

4.50 mL/min แยกสารได้ทั้งหมด 8 ส่วน ให้รหัส CE1-CE8 นำส่วน CM 5 และ CM6 มาแยกด้วยเทคนิค TLC สามารถแยกสาร 3 (34.4 มิลลิกรัม) และ 4 (17 มิลลิกรัม) ได้ตามลำดับ

5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

แบคทีเรียแกรมบวก ทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 2 เชื้อ คือ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1 แบคทีเรียแกรมลบ ทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 2 เชื้อ คือ *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

ยีสต์ ทดสอบการยับยั้งเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC90028 และ *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 โดยเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการรา วิทยาภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

5.1 การเตรียมสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

นำสารบริสุทธิ์มาละลายด้วย Dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ เจือจางต่อด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อทดสอบต่อไป

5.2 การเตรียมยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

ละลายยา Vancomycin และ Gentamicin ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนยา Amphotericin B เตรียมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยาปฏิชีวนะมาตรฐานทั้งหมดถูกเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ยา Vancomycin และ Gentamicin ใช้เป็นยามาตรฐานกับแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ตามลำดับ และยา Amphotericin B ใช้เป็นยามาตรฐานกับยีสต์

5.3 การเตรียมเชื้อทดสอบ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย เขี่ยแบคทีเรีย 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร Nutrient Broth (NB) และเขย่าที่ตู้บ่มเชื้อความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.85 % ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 0.5 McFarland Standard (เชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml) และเจือจางต่อที่อัตราส่วน 1 : 200 ด้วยอาหาร Mueller-Hinton Broth (MHB) การเตรียมเชื้อยีสต์ เขี่ยยีสต์ 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร Sabouraud's Dextrose Broth (SDB) และเขย่าที่ตู้บ่มเชื้อ ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง สำหรับ *Candida albicans* และที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับ *Cryptococcus neoformans* จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อด้วย น้ำเกลือ 0.85 % ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 2 McFarland Standard และเจือจางต่อที่อัตราส่วน 1 : 20 ด้วยอาหาร SDB

5.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี Colorimetric Broth Microdilution Tests

5.4.1 ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี Colorimetric Broth Microdilution นำสารบริสุทธิ์ที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาเจือจางด้วยอาหาร MHB และ SDB เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ ให้ได้ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หยดสารตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate จำนวน 3 หลุม และหยดเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สำหรับ *S. aureus,* MRSA, *E. coli, P. aeruginosa* และ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง สำหรับ *C. neoformans* หยดสี Resazurin ที่เจือจาง (1:10) ลงในหลุมทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และยีสต์ (*C. albicans*) ส่วน *C. neoformans* นำไปบ่มต่อเป็นเวลา 1 วัน อ่านผลการทดสอบโดยสังเกตสีของ Resazurin หากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งเชื้อได้จะยังคงเห็นสีของ Resazurin เป็นสีน้ำเงิน หากสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้สีของ Resazurin จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู หรือไม่มีสี

5.4.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (The Minimum Inhibitory Concentrations; MICs) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ (The Minimum Bactericidal Concentration; MBCs)

สารตัวอย่างที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะนำมาทดสอบและหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (MICs) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารตัวอย่างที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ (MBCs) ด้วยวิธี Colorimetric Broth Microdilution Tests เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารตัวอย่าง โดยเตรียมสารตัวอย่างใน Microtiter Plates ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.025-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ จะบันทึกเป็นค่า MIC จากนั้น Streak เชื้อจากหลุมทดสอบที่ให้ผลการยับยั้งทุกหลุมจาก Microtiter Plate ลงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) สำหรับแบคทีเรีย และ Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) สำหรับยีสต์ โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้จะถูกบันทึกเป็นค่า MBC

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาการสกัดเส้นใยเชื้อราด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตและเมทานอล พบว่าได้ร้อยละสารสกัดหยาบ CE และสารสกัดหยาบ CM เท่ากับ 10.52 และ 29.43 ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดหยาบ CE น้ำหนัก 0.73 กรัม ทำให้เป็นส่วนย่อยโดยใช้เทคนิค HPLC ได้ส่วนสกัดย่อยจำนวน 6 ส่วน (CE1-CE6) นำส่วนย่อยที่สนใจมาทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางและการตกผลึก ได้สารบริสุทธิ์จำนวน 2 สาร คือ 1 และ 2 เมื่อนำสารสกัดหยาบ CM น้ำหนัก 0.47 กรัม ทำให้เป็นส่วนย่อยโดยใช้เทคนิค HPLC ได้ส่วนสกัดย่อยจำนวน 8 ส่วน (CM1-CM8) นำส่วนย่อยที่สนใจมาทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง ได้สารบริสุทธิ์จำนวน 2 สาร คือ 3 และ 4 เมื่อนำสารบริสุทธิ์ทั้ง 4 สารมาวิเคราะห์โครงสร้างโดยพิจารณาจากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

สาร 1 : UV(CH_3OH) : λ_{max}(logε) 389 (2.15), 275 (2.12), 165 (1.52) nm; FT-IR (ATR) λ_{max} 3400, 1713, 1682, 1154 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.12 (1H, s, 8-OH), 7.85 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-3), 7.49 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-4), 6.88 (1H, s, H-5); 6.75 (1H, s, H-7), 5.17 (2H, s, H-13), 4.18 (3H, s, H-11), 2.45 (3H, s, H-12), 2.15 (3H, s, H-15); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 182.5 (C-9), 172.4 (C-14), 167.5 (C-10),

164.2 (C-8), 154.9 (C-4b), 154.1(C-4a), 145.6 (C-6), 134.5 (C-1), 136.4 (C-3), 130.5 (C-2), 120.9 (C-4), 119.3 (C-9a), 109.3 (C-8a), 108.5 (C-7), 104.8 (C-5), 64.8 (C-13), 51.2 (C-11), 20.9 (C-15), 20.1 (C-12) (**สาร 1 คือ sydoxanthone A**)

สาร 2 : m.p. 186-187°C; UV(CH_3OH) λ_{max}(logε) 372 (2.15), 268 (2.12), 268 (2.12), 1.72 (1.52) nm; FT-IR (ATR) λ_{max} 3361, 1711, 1673, 1161, 1161 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.18 (1H, s, 8-OH), 7.50 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3), 7.58 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-4), 6.92 (1H, s, H-5), 6.71 (1H, s, H-7), 5.12 (2H, s, H-13); 2.11 (3H, s, H-15); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 183.6 (C-9), 174.2 (C-13), 162.3 (C-8), 155.1(C-4b), 152.7(C-4a), 145.6 (C-6), 133.2 (C-1), 135.8 (C-3), 131.9 (C-2), 121.8 (C-4), 117.3 (C-9a), 107.8 (C-8a), 107.5 (C-7), 103.6 (C-5), 65.4 (C-10), 63.2 (C-12), 49.2 (C-11), 23.8 (C-14) (**สาร 2 คือ 13-O-acetylsydowinin B**)

สาร 3 : m.p. 244-245°C; UV (CH_3OH) λ_{max} (logε) 375 (2.15), 262 (2.12), 267 (2.12), 1.78 (1.52) nm; FT-IR (ATR) λ_{max} 3368, 1716, 1678, 1167 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.78 (2H, s, 8,8'-OH), 11.75 (2H, s, 1,1'-OH), 7.46 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3,3'), 6.63 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-4,4'), 3.92 (2H, dd, *J* = 10.5, 2.1 Hz, H-5,5'), 3.73 (6H, s, OCH3), 2.85 (2H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5,5'), 2.74 (2H, dd, *J* = 18.6, 5.7 Hz, H-7,7'), 2.42 (2H, m, H-6,6'), 2.31 (2H, dd, *J* = 18.6, 10.5 Hz, H-7,7'), 1.17 3H, d, *J* = 5.7 Hz, H-11,11'); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 187.2 (C-9,9'), 177.5 (C-8,8'), 170.2 (C-12,12'), 159.4 (C-4a,4a'), 158.3 (C-1,1'), 140.2 (C-3,3'), 118.3 (C-2,2'), 107.5 (C-4,4'), 106.9 (C-9a,9a'), 101.6 (C-8a,8a'), 84.8 (C-10a, 10a'), 77.1 (C-5,5'), 53.0 (OCH_3), 36.3 (C-7,7'), 29.3 (C-6,6'), 17.9 (CH_3, 11, 11') (**สาร 3 คือ secalonic acid A**)

สาร 4 : m.p. 261-262°C; UV (CH_3OH) λ_{max} (logε) 378 (2.15), 288 (2.12), 258 (2.12), 1.92 (1.52) nm; FT-IR (ATR) λ_{max} 3371, 1706, 1673, 1162, 1151 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.16 (1H, s, 5-OH), 12.04 (1H, s, 4-OH), 7.53 (1H, s, H-1), 7.22 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 7.12 (1H, s, H-3), 6.64 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 2.45 (3H, s, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): 192.5 (C-10), 182.9 (C-9), 167.2 (C-7), 167.0 (C-5), 164.0 (C-4), 150.3 (C-2), 133.2 (C-1), 137.4 (C-12), 135.0 (C-13), 125.7 (C-3), 122.2 (C-1), 115.2 (C-14), 111.2 (C-11), 110.4 (C-8), 109.6 (C-6), 22.7 (CH_3) (**สาร 4 คือ emodin**)

ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (SA), Methicillin - resistant *S. aureus* (MRSA), P. *aeruginosa* (PA) และ *E. coli* (EC) ของสารบริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับ Vancomycin และ Gentamicin แสดงดังตารางที่ 1 พบว่า สาร 2 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่ทดสอบในระดับต่ำมาก ด้วยค่า MIC มากกว่า 557 M ในขณะที่สาร 3 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย SA MRSA และ PA ในระดับค่อนข้างดี ด้วยค่า MIC เท่ากัน 25.1 M และ สาร 1 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย SA MRSA และ PA ในระดับปานกลาง ด้วยค่า MIC เท่ากัน 82.2 M และยับยั้งเชื้อ EC ในระดับต่ำ ด้วยค่า MIC 329 M ส่วนสาร 4 ยับยั้งเชื้อ SA และ MRSA ในระดับต่ำ ด้วยค่า MIC 473.7 M และยับยั้งเชื้อ PA และ EC ได้ในระดับต่ำเช่นเดียวกันที่ค่า MIC 740.1 M

ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อยีสต์ *Candidi albicans* ATCC 90028 (CA 90028) และ *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 Flucytosine-resistant (CN 90112) ของสารบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Amphotericin B แสดงดังตารางที่ 1 พบว่า สาร 3 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ CA 90028 และ CN 90112 ในระดับปานกลาง ด้วยค่า MIC เท่ากับ 50.1 M ส่วนสาร 1 2 และ 4 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ CA 90028 และ CN 90112 ในระดับต่ำ ด้วยค่า MIC เท่ากับ 329 356.5 และ 473.7 M

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยีสต์ของสารบริสุทธิ์ 1-4

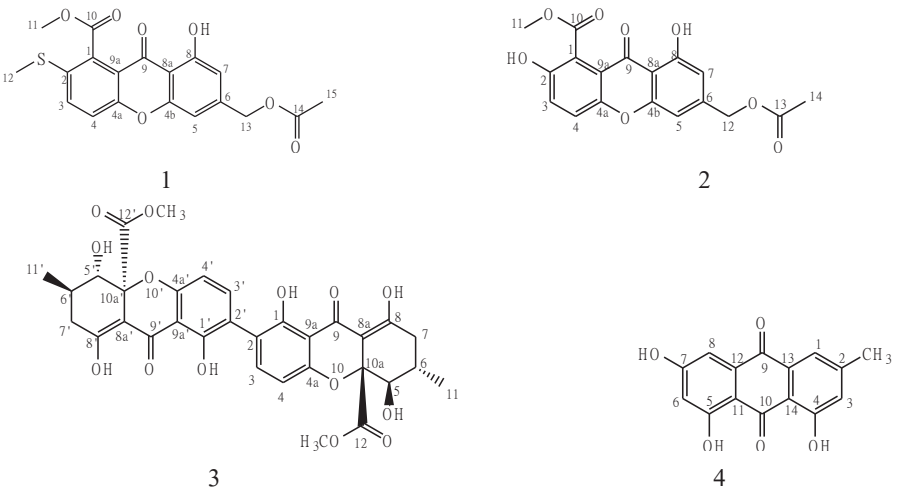
สารบริสุทธิ์	แบคทีเรีย								ยีสต์			
	SA		*MRSA SK1*		*PA*		*EC*		*CA 90028*		*CN 91112*	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	82.2	>514.1	82.2	>514.1	82.2	>514.1	329	>514.1	329	329	329	329
2	>557	>557	>557	>557	557	>557	557	>557	356.5	356.5	356.5	356.5
3	25.1	313.2	25.1	200.4	25.1	>313.2	50.2	>313.2	50.2	50.2	50.2	200.4
4	473.7	>740.1	473.7	>740.1	740.1	>740.1	740.1	>740.1	473.7	473.7	473.7	>740.1
Vancomycin	0.69	1.38	0.69	0.69								
Gentamicin					4.19	8.38	4.19	8.38				
Amphotericin B									0.54	1.08	0.54	1.08

MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (μM) MBC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (μM)

การอภิปรายผล และสรุปผลการวิจัย

เมื่อนำสารสกัดเอทิลอะซิเตตและสารสกัดหยาบเมทานอลของเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp. มาทำบริสุทธิ์ สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ เมื่อนำสารทั้ง 4 สาร ไปหาจุดหลอมเหลวและวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิค UV, IR และ NMR เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและจุดหลอมเหลวกับข้อมูลที่เคยรายงานในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสาร 1 คือ Sydoxanthon A [12] สาร 2 คือ 13-O-acetylsydownin B [13] สาร 3 คือ Secalonic acid A [14] และ สาร 4 คือ Emodin [15] แสดงดังภาพที่ 1

เมื่อนำสาร 1-4 มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* Methicillin - resistant *S. aureus* P. *aeruginosa* และ *E. coli* ของสารบริสุทธิ์ และฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 และ *C. neoformans* ATCC90112 Flucytosine-resistant พบว่า สาร 3 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย SA MRSA และ PA ในระดับดี ด้วยค่า MIC เท่ากัน 25.1 M เท่ากัน และยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* และเชื้อยีสต์ CA 90028 และ CN 90112 ในระดับปานกลาง ด้วยค่า MIC เท่ากับ 50.2 M สาร 1 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย SA MRSA SK1 และ PA ในระดับปานกลางด้วยค่า MIC เท่ากับ 82.2 M ส่วนสาร 2 และ 4 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่ทดสอบทุกชนิดในระดับต่ำ



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสาร 1-4

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

เอกสารอ้างอิง

[1] Shou-Jie, L., Xuan, Z., Xiang-Hua, W., & Chang-Qi, Z. (2018). Novel Natural Compounds from Endophytic Fungi with Anticancer Activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 156, 316-343.

[2] Hussain, H., Kliche-Spory, C., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Abbas, G., Robert, I., Schulz, B., Krohn, K., & Shah, A. (2014). Antimicrobial Constituents from Three Endophytic Fungi. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7, 224-227.

[3] Zhang, G., Sun, S., Zhu, T., Lin, Z., Gu, J., Li, D., & Gu, Q. (2011). Antiviral Isoindolone Derivertives from an Endophytic Fungus *Emericella* sp. Associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry*, 72, 1436-1442.

[4] Uma Anitha, K. P. G. & Mythili, S. (2017). Antioxidant and Hepatoprotective Potentials of Novel Endophytic Fungus *Achaetomium* sp., from *Euphorbia hirta*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *10*(6), 588-593.

[5] Guangfeng, L., Ping, W., Jinghua, X., Lan, L., Hanxiang, L. & Xiaoyi, W. (2018). Asperimides A–D, Anti-Inflammatory Aromatic Butenolides from a Tropical Endophytic Fungus. *Aspergillus terreus*. *Fitoterapia*, 131, 50-54.

[6] Na, G., Zhi-Chun, S., Pei, Y., Jie, L., Kai-Li, J., Ling-Yi, K., & Ming-Hua, Y. (2017). Alkaloids from the Endophytic Fungus *Penicillium brefeldianum* & Their Cytotoxic Activities. *Chinese Chemical Letters*, 28, 1194-1199.

[7] Nasima, K., Farhana, Afrozb, M., Nadira, B., Satyajit, R., Ronyb, S., Sharminb, F., Monib, C., Mahmood, H., Koushik, S., & Hossain, S. (2018). Endophytic *Fusarium solani*: A Rich Source of Cytotoxic and Antimicrobial Napthaquinone and Aza-anthraquinone Derivatives. *Toxicology Reports*, 5, 970-976.

[8] Wen-Jie, X., Hui-Qin, C., Hao, W., Cai-Hong, C., Wen-Li, M., & Hao-Fu, D. (2018). New Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus *Fusarium* sp. HP-2 Isolated from "Qi-Nan" Agarwood. *Fitoterapia*, 130, 180-183.

[9] Boonyaketgoson, S., Trisuwan, K., Bussaban, B., Rukachaisirikul, V., & Phongpaichit, S. (2015). Isochromanone Derivatives from the Endophytic Fungus *Fusarium* sp. PDB51F5. *Tetrahedron Letters*, 56, 5076-5078.

[10] Sabrin, R. M. I., Hossam M. A., Gamal A. M., & Samir A. R. (2016). Integracides H-J: New Tetracyclic Triterpenoids from the Endophytic Fungus *Fusarium* sp. *Fitoterapia*, 112, 161-167.

[11] Sabrin R. M. I., Gamal A. M., & Samir A. R. (2016). Integracides F and G: New Tetracyclic Triterpenoids from the Endophytic Fungus *Fusarium* sp. *Phytochemistry Letters*, 15, 125-130.

[12] Song, X. Q., Zhang, X., Han, Q. J., Li, X.B., Li, G., Li, R. J., Jiao, Y., Zhou, J. C., Lou, H. X. (2015). Xanthone derivatives from *Aspergillus sydowii*, an endophytic fungus from the liverwort *Scapania ciliata* S. Lac and their immunosuppressive activities. *Phytochemistry Letters*, 6 (3), 318-321.

[13] Elnaggar, M. S., Ebada, S. S., Ashour, M. L., Ebrahim, W., Muller, E. G., Mandi, A., Kurtan, T., Singab, A., Lin,W., Liu, Z. & Proksch, P. (2016). Xanthones and Sesquiterpene Derivatives from a Marine-Derived Fungus *Scopulariopsis* sp. *Tetrahedron*, 72, 2411-2419.

[14] Zhai, A., Zhang, Y., Zhu, X., Liang, J., Wang, X., Lin, Y., & Chen, R. (2011). Secalonic Acid a Reduced Colchicines Cytotoxicity through Suppression of JNK, p38 MAPKs and Calcium influx. *Neurochemistry International*, 58, 85-91.

[15] Kim, M. O., Park, Y. S., Nho, Y. H., Yun, S. K., Kim, Y., Jung, E., Paik, J. K., Kim, M., Cho, H., & Lee, J. (2016). Emodin Isolation from *Polygoni Multiflori Ramulus* Inhibits Melanogenesis Through the Liver X Receptor-Mediated Pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 250, 78-84.