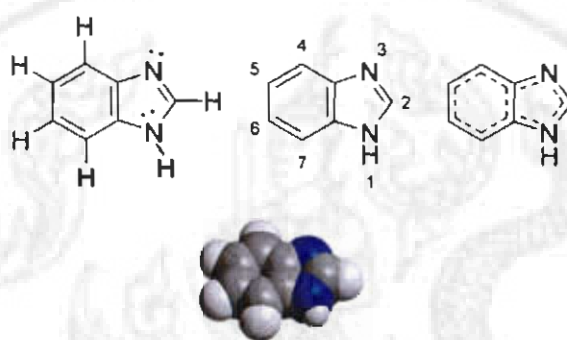


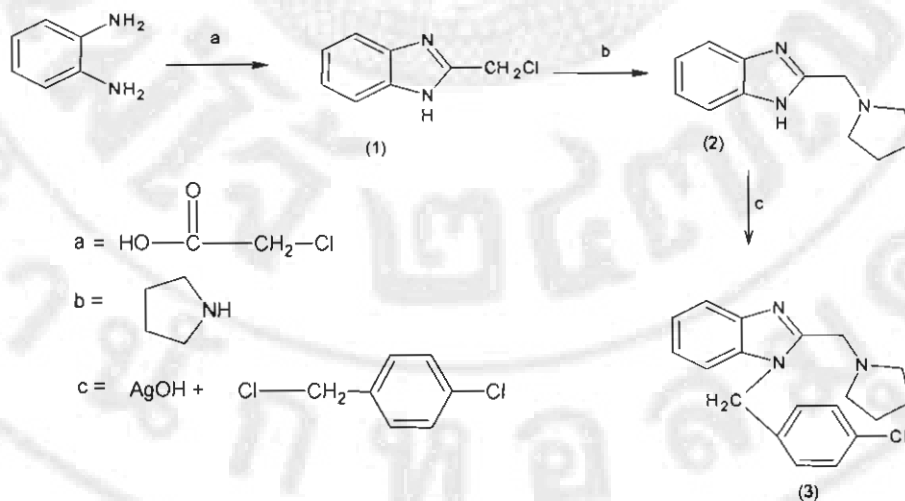
คำนำ

เบนซิมิดาโซลเป็นสารประกอบอินทรีย์เฮเทอโรไซคลิกอะโรมาติก (heterocyclic aromatic) แสดงดังภาพที่ 1 เป็นสารเคมีที่ใช้ทำยากำจัดพยาธิ ด้านเชื้อราและด้านเชื้อแบคทีเรีย อนุพันธ์ในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ เคลมิโซล (clemizole) และคลอมิคาโซล (chlormidazole) เป็นต้น



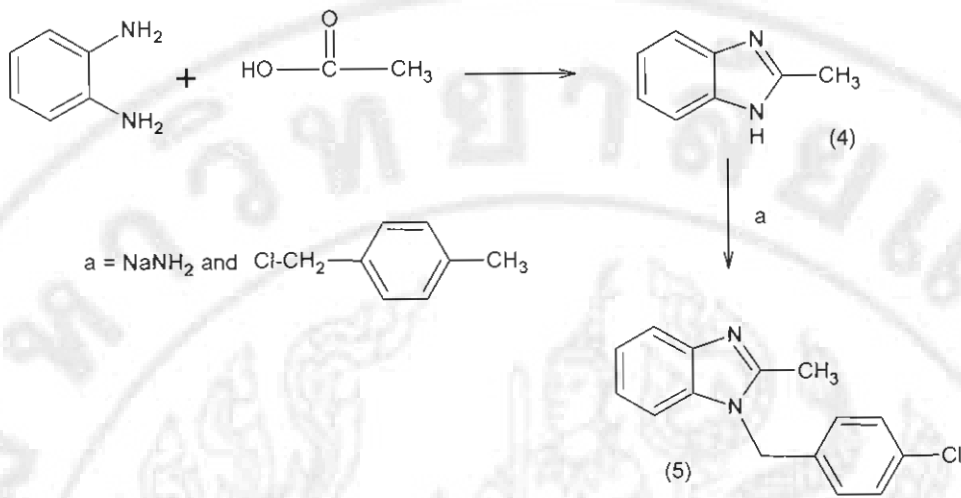
ภาพที่ 1 โครงสร้างเบนซิมิดาโซล

สารเคลมิโซล (3) มีขั้นตอนในการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 2 โดยสารกลุ่มนี้ใช้เป็นยา antihistamine สามารถเตรียมได้โดยนำสาร 1,2-phenylenediamine ทำปฏิกิริยากับกรดคลอโรแอซิดิก (a) และตามด้วยไพโรริดีน (b) และพาราคลอโรเบนซิลคลอไรด์ (c)



ภาพที่ 2 การสังเคราะห์เคลมิโซล

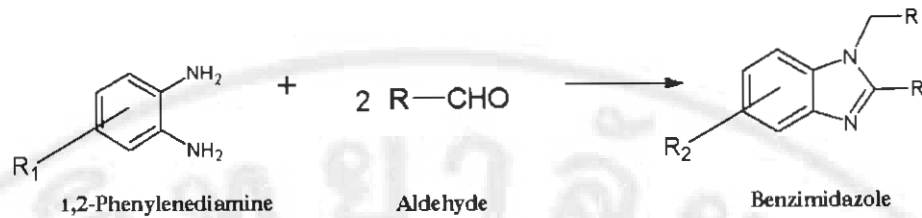
สารคลอมิคาโซล (5) มีสูตรคล้ายเคลมิโซล แต่ใช้เป็นยาคลายกล้ามเนื้อ และเป็นยาด้านเชื้อรา โดยมีขั้นตอนการสังเคราะห์ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การสังเคราะห์สารคลอมีดาโซล

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการค้นคว้าเกี่ยวกับการสังเคราะห์สารกลุ่มนี้อย่างกว้างขวาง โดยการใช้หลายกระบวนการในการผลิตไม่ว่าจะเป็นการใช้สารประกอบประเภท อัลดีไฮด์ แอซิด คลอไรด์ ไดไนโตรเบนซีน โกลด์ รีเอเจนต์ และ สารกลุ่มไนโตรอะนิลีนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ หรือนอกจากนี้การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นตัวช่วยในการสังเคราะห์ เช่น การใช้แพลเลเดียมก็เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาประยุกต์ใช้เช่นเดียวกัน

แต่ด้วยวิธีการที่กล่าวมาข้างต้นมักมีข้อเสียคือ ใช้ขั้นตอนในการสังเคราะห์หลายขั้นตอน ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่ยาวนาน ใช้อุณหภูมิสูง หรือเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้มีน้อย ทำให้ต้องใช้วิธีการสังเคราะห์โดยใช้ไมโครเวฟเข้าช่วย ซึ่งยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง นอกจากนี้บางวิธีใช้สารอันตราย และก่อให้เกิดของเสียที่มีพิษเป็นจำนวนมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้น วิธีการสังเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็ว ใช้สารปริมาณน้อย แต่ได้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก โดยการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิรีฟลักซ์ และใช้ สารตั้งต้น คือ 1,2-phenylenediamine และอนุพันธ์ของ อัลดีไฮด์ในการทำปฏิกิริยาเคมีดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์สารประกอบเบนซิมิดาโซล

เชื้อรา *Fusarium sp.*

เป็นเชื้อราใน Class Deuteromycetes, Subclass Hyphomycetidae, order Moniliales คือพวกที่สร้าง conidia รูปร่างต่าง ๆ โดยลักษณะของเชื้อราชนิดนี้แสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ลักษณะของ เชื้อรา *Fusarium sp.*

โดยโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจาก *Fusarium sp.* เชื้อราจะสร้างสารพิษ เช่น Fusaric acid ออกมาทำลายผนัง xylem ทำให้ต้นพืชสูญเสียความสามารถในการดูดน้ำ ในระยะแรกปรากฏอาการบนพืชเพียงด้านเดียวก่อน โดยใบจะเหลืองและเหี่ยวเฉพาะตอนกลางวันเมื่ออากาศร้อน และกลับเป็นปกติในเวลากลางคืน แต่ต่อมาก็จะเหี่ยวอย่างถาวรทั้งต้น รากถูกทำลายเป็นแผลสีน้ำตาล เปลือกหลุดล่อน เมื่อผ่าต้นจะเห็นส่วนท่อน้ำที่อาหารถูกทำลายเกิดเป็นแผลเน่าสีน้ำตาล ดังภาพที่ 6 ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงสังเคราะห์สารจำพวก เบนซิมิดาโซลเพื่อกำจัดเชื้อราชนิดนี้



ภาพที่ 6 ลักษณะของต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคเหี่ยวจากเชื้อรา *Fusarium sp.*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

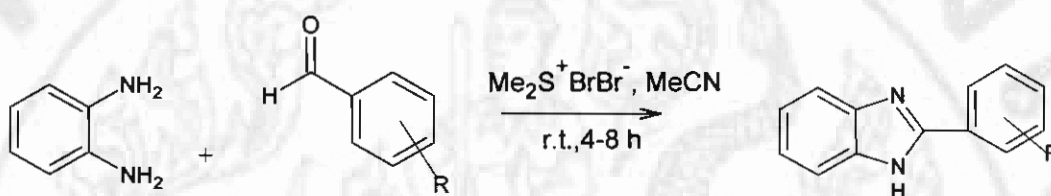
1. เพื่อศึกษาและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารประกอบเบนซิมิดาโซล โดยใช้สารตั้งต้น คือ 1,2-phenylenediamine และอนุพันธ์ของอัลดีไฮด์ โดยหาชนิด และปริมาณตัวทำละลาย และอุณหภูมิที่เหมาะสม
2. เพื่อวิเคราะห์สูตร โครงสร้างและคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของอนุพันธ์ของสารประกอบเบนซิมิดาโซล ด้วยเทคนิค furrier transform infrared spectroscopy และ เทคนิค ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy
3. เพื่อประยุกต์ใช้อนุพันธ์ของสารประกอบเบนซิมิดาโซล ในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราในมะเขือเทศ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีสังเคราะห์การผลิตอนุพันธ์ของเบนซิมิดาโซลโดย ใช้สารตั้งต้น คือ 1,2-phenylenediamine และอนุพันธ์ของอัลดีไฮด์ โดยหาชนิด และปริมาณตัวทำละลาย และอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่สูง
2. เพื่อประยุกต์ใช้อนุพันธ์ของสารประกอบเบนซิมิดาโซล ในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราในมะเขือเทศ
3. ถ่ายทอดความรู้โดยการเผยแพร่ผลงานวิชาการ เพื่อปรับใช้ในการต้านเชื้อราในมะเขือเทศ

การตรวจเอกสาร

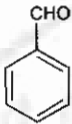
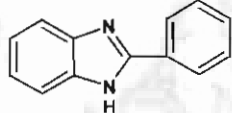
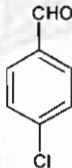
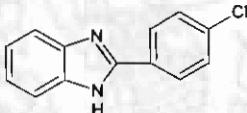
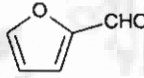
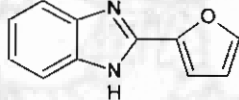
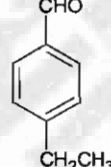
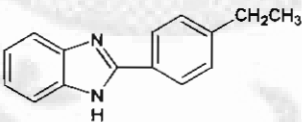
B. Das, H. Holla และ Y. Srinivas (2007: 61) รายงานว่า การสังเคราะห์เบนซิมิดาโซลโดยใช้สารตั้งต้นคือ 1,2-Phenylenediamine ทำปฏิกิริยากับอนุพันธ์ของสารประกอบอัลดีไฮด์ และมี (bromodimethyl)sulfonium bromide เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิห้อง โดยมี acetonitrile เป็นตัวทำละลาย ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนจะให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่สูงดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 การสังเคราะห์เบนซิมิดาโซล โดยวิธีของ Biswanath Das และคณะ

จากการทดลองโดยใช้สารตั้งต้นข้างต้น โดยใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์แตกต่างกันในแต่ละสารตั้งต้น จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ค่อนข้างสูงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การสังเคราะห์เบนซิมิดาโซลโดยใช้ 1,2-phenylenediamine กับอนุพันธ์ของสารประกอบอัลดีไฮด์ชนิดต่างๆและมี (bromodimethyl) sulfonium bromide เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

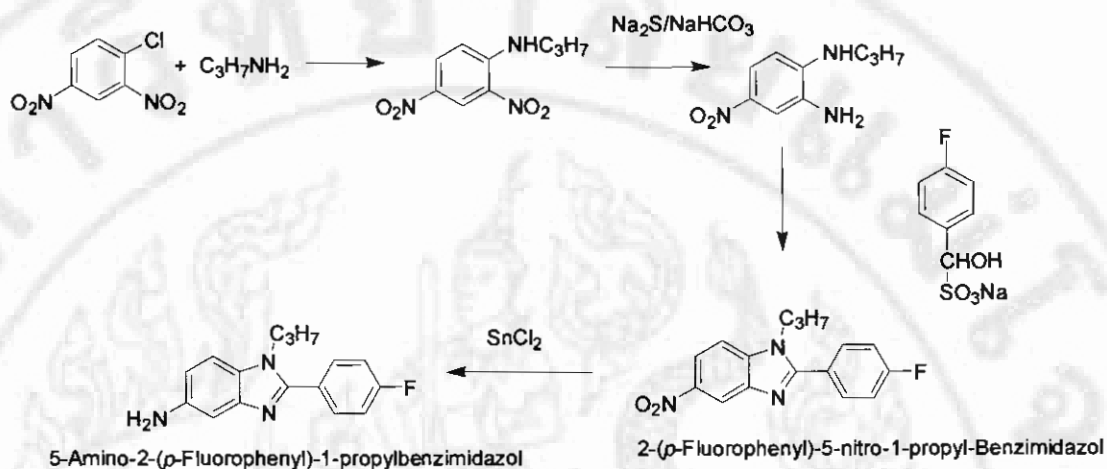
Entry	aldehyde	Product	Time(h)	Yield(%) ^a
1			5	85
2			5	82
3			8	72
4			6	74

^a = ผลิตภัณฑ์ที่พิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้ข้อมูลจาก ¹H NMR, IR and MS

จากตารางที่ 1 สรุปได้ว่าสถานะที่ใช้ในการสังเคราะห์ benzimidazoles ไม่รุนแรง และการใช้ (bromodimethyl)sulfonium bromide ถูกใช้เป็นตัวเร่งครั้งแรก และสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์กับอัลดีไฮด์ได้หลายชนิดและให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูง แต่อย่างไรก็ตามโดยวิธีการนี้ต้องใช้ตัวทำละลายที่เป็นอันตราย และต้องทำภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน

G. Kilcigil และคณะ (2006: 223) ทำการศึกษาการสังเคราะห์และคุณสมบัติของอนุพันธ์เบนซิมิดาโซล เพื่อการต้านเชื้อรา ผลการทดลองเมื่อทำการทดสอบการต้านเชื้อยีสต์ *Candida albicans*, *Candida glabrata* และ *Candida krusei*. พบว่าสารประกอบ 2-(p-Fluorophenyl)-5-nitro-1-propyl-Benzimidazol ($C_{16}H_{14}FN_3O_2$) และ 5-Amino-2-(p-Fluorophenyl)-1-propylbenzimidazol

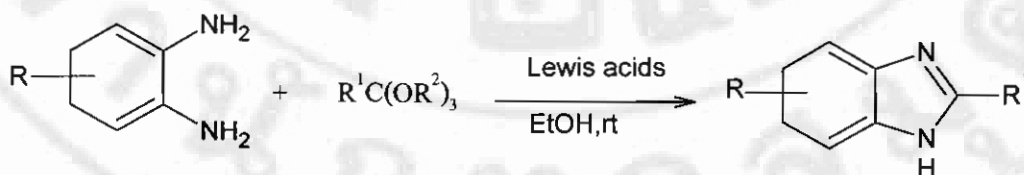
(C₁₆H₁₆FN₃) ที่ความเข้มข้นขั้นต่ำ 12.5 µg/ml สามารถต้านเชื้อ *C. albicans* ได้ โดยสมการการสังเคราะห์สารทั้งสอง เป็นดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 การสังเคราะห์เบนซิมิดาโซลโดยวิธีของ G. Kilcigil และคณะ

อย่างไรก็ตาม โดยวิธีการนี้มีการสังเคราะห์ที่ยุ่งยากและซับซ้อนแม้ว่าจะให้ผลการต้านเชื้อยีสต์ที่ดีก็ตาม

Z. H. Zhang, L. Yin และ Y. M. Wang (2007: 1126) ทำการสังเคราะห์เบนซิมิดาโซลที่ได้ผลรวดเร็วโดยใช้สารตั้งต้นคือ *o*-phenylenediamines ทำปฏิกิริยากับ *o*-esters ภายใต้ Lewis acids เช่น ZrCl₄, SnCl₄ · 5H₂O, TiCl₄, BF₃ · Et₂O, ZrOCl₂ · 8H₂O และ HfCl₄ ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ดี ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 การสังเคราะห์เบนซิมิดาโซลโดยวิธีของ Zhan-Hui Zhang และคณะ

Zhang และคณะทำการทดลองเพื่อคูทธิพลของตัวเร่งปฏิกิริยาจำพวก Lewis acids ที่ส่งผลต่อระยะเวลาและเปอร์เซ็นต์ผลผลิตในการเกิดปฏิกิริยาดังตารางที่ 2

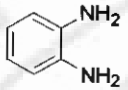
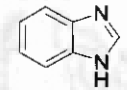
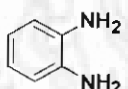
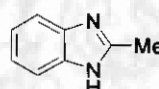
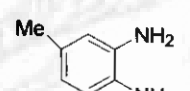
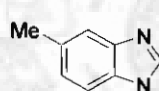
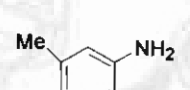
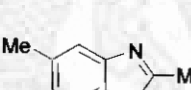
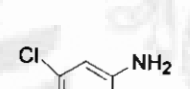
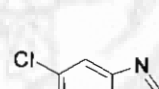
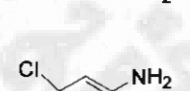
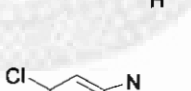
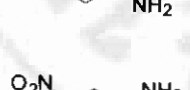
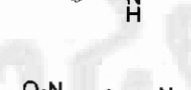
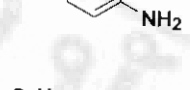
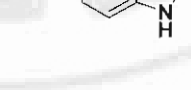
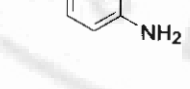
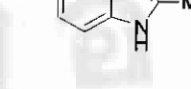
ตารางที่ 2 ผลการทดลองการสังเคราะห์เบนซิมิดาโซลโดยใช้ *o*-phenylenediamines กับ triethyl orthoformate

Entry	Catalyst	Time(h)	Yield(%) ^a
1	None	24	0
2	HfCl ₄	1	92
3	SnCl ₄ · 5H ₂ O	2	91
4	ZrCl ₄	2	95
5	TiCl ₄	2	90
6	BF ₃ · Et ₂ O	2	88
7	ZrOCl ₂ · 8H ₂ O	3	92

^a = Isolated yields

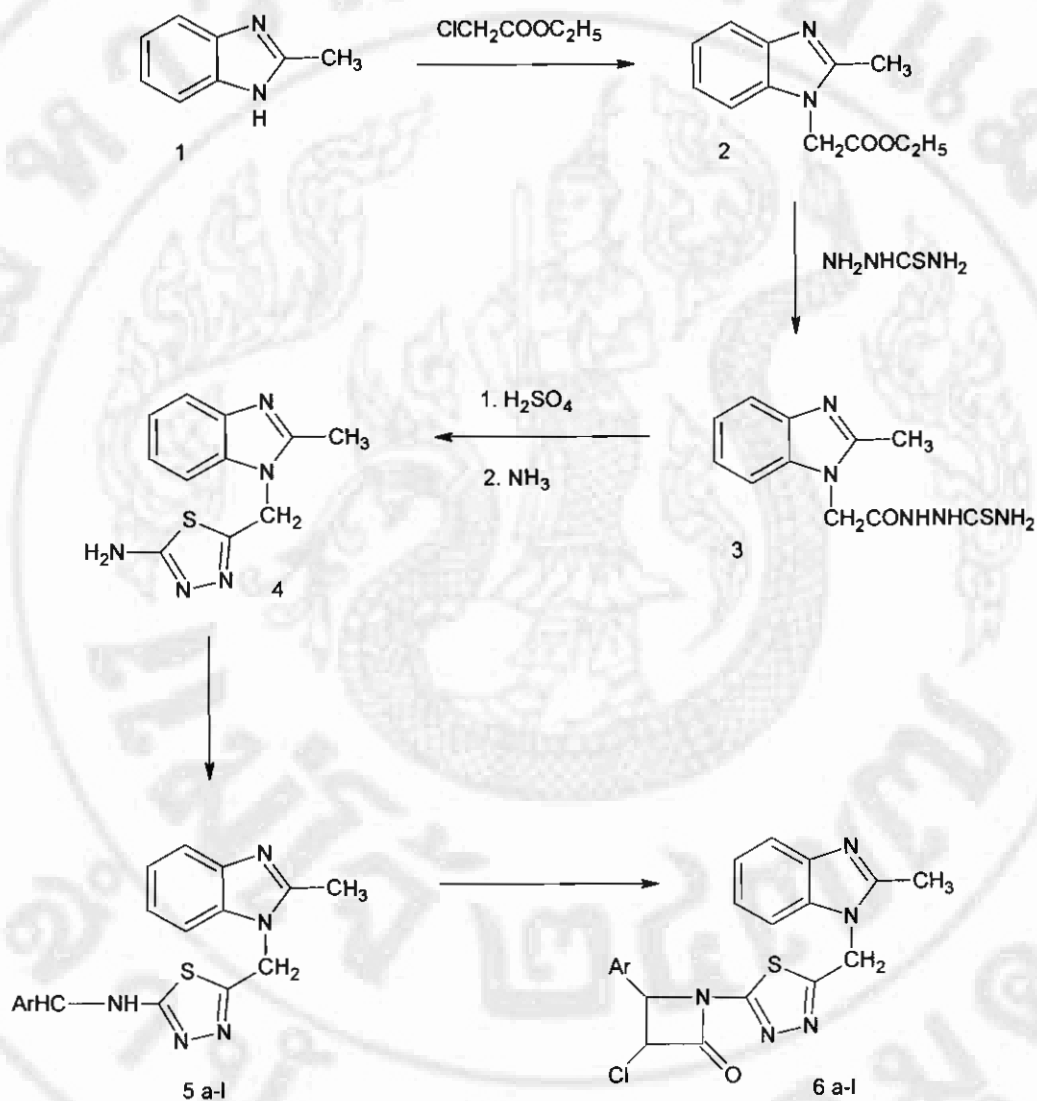
จากตารางที่ 2 สรุปผลการทดลองที่ได้ เมื่อใส่ตัวเร่งปฏิกิริยาลงไปจะทำให้ลดเวลาในการทำปฏิกิริยาลงและยังทำให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตเพิ่มขึ้นดังตารางแสดงผลการทดลองข้างต้น นอกจากนี้สถานะที่ใช้ในการทดลองสามารถเตรียม benzimidazoles ได้ง่ายและไม่รุนแรง เมื่อทำการทดลองหาสถานะที่เหมาะสม โดยการหาตัวทำละลายพบว่าเมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ ZrCl₄ ตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการทดลอง คือ เอทธานอล และเมื่อใช้สถานะนี้ทดลองโดยการเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ของ *o*-phenylenediamines และ orthoesters หลายชนิด พบว่าถ้าบนวงเบนซีนใน *o*-phenylenediamines มีหมู่ที่ดึงอิเล็กตรอนอยู่ต้องใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่นานขึ้น โดยปฏิกิริยาจะไม่ขึ้นกับชนิดของเอสเตอร์ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดลองการสังเคราะห์เบนซิมิดาโซลโดยใช้ *o*-phenylenediamines derivatives กับ orthoesters โดยมี $ZrCl_4$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

Entry	Diamines	Ortho-esters	Product	Time(h)	Yield(%) ^a
1		HC(OEt) ₃		2.0	93
2		CH ₃ C(OMe) ₃		1.0	93
3		HC(OEt) ₃		2.5	93
4		CH ₃ C(OMe) ₃		0.8	90
5		HC(OEt) ₃		5.0	83
6		CH ₃ C(OMe) ₃		2.0	53
7		HC(OEt) ₃		6.0	90
8		CH ₃ C(OMe) ₃		3.0	89
					

K. F. Ansari และ C. Lal (2008: 1-6) ทำการสังเคราะห์สารประกอบ azetidin-2-ones โดยวิธีใหม่ และทำการวิเคราะห์โครงสร้างที่สังเคราะห์จากข้อมูล สเปกตรัมของ IR, ¹H-NMR และ mass spectra จะได้โครงสร้าง (6) โดยสมการที่ใช้สังเคราะห์เป็นไปตามภาพที่ 10 จากนั้นนำสารที่

ได้ไปทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (Grampositive) และ *Escherichia coli* (Gram-negative) ปรากฏว่าสามารถต้านเชื้อทั้งสองชนิดได้โดยใช้ความเข้มข้นเพียง 500 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้ถึง 100%



ภาพที่ 10 การสังเคราะห์ azetidion-2-ones

จากผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าสารประกอบประเภท เบนซิมิดาโซลซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา หรือแบคทีเรีย เป็นที่น่าสนใจในการศึกษาสารสังเคราะห์เพื่อให้ได้เปปต์เซนต์ผลผลิตสูงโดยใช้สภาวะที่ไม่รุนแรง รวดเร็ว และก่อให้เกิดของเสียที่เป็นพิษน้อยที่สุดใน

งานวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิพลักซ์ และใช้สารตั้งต้น คือ อนุพันธ์ของ 1,2-phenylenediamine และอนุพันธ์ของอัลดีไฮด์ในการทำปฏิกิริยาเคมี และใช้ตัวทำละลายที่เป็นพิษน้อย เช่น เอทานอลมาใช้ในการทำปฏิกิริยาเคมี หลังจากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราในทะเลือเทศโดยใช้ *Fusarium sp.*



อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมี

ชื่อสารเคมี	Grade/ความบริสุทธิ์	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. 1,2-Phenylenediamine	99%	Fluka	Switzerland
2. Thiophene-2-carboxaldehyde	AR	Fluka	Switzerland
3. 2-Bromo-benzaldehyde	AR	Fluka	Switzerland
4. Benzaldehyde	AR	Fluka	Switzerland
5. 3-Nitrobenzaldehyde	AR	Fluka	Switzerland
6. <i>tert</i> -Butylbenzaldehyde	AR	Fluka	Switzerland
7. Pyridine-2-carboxaldehyde	AR	Fluka	Switzerland
8. Fural-2-carboxaldehyde	AR	Fluka	Switzerland
9. Ethanol	commercial	Shell	Thailand
10. Silica gel	AR	Merk	Germany
11. DMSO	AR	Fluka	Switzerland
12. CDCl_3	AR	Fluka	Switzerland
13. Potato dextrose agar	-	Himedia	India

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือ-อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิตและรุ่น	ประเทศ
1. เครื่องชั่งชนิด 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)	Mettler Toledo รุ่น AB304-S	Switzerland
2. ชุดรีฟลักซ์ (Reflux)	-	-
3. เครื่องกวนสารละลายและให้ความร้อน (Magnetic stirrer and heater)	Fisher Scientific รุ่น SL 2400	England
4. เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum Filtration)	BUCHI	Switzerland
5. TLC plate (Aluminium sheet)	silica gel F250	Germany
6. UV-lamp	CA91786	USA
7. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)	Bruker AMX 400 MHz AVANCE	Australia
8. Fourier Transform Infrared Spectrometer	Perkin Elmer	USA

วิธีการทดลอง

การสังเคราะห์เบนซิมิดาโซล

1. อนุพันธ์ของอัลดีไฮด์ที่ต้องการทดสอบ (0.05 mol) และ 1,2-Phenylenediamine (0.025 mol) ใส่ลงในขวดกั่นกลมขนาด 250 ml
2. จากนั้นเติม Ethanol 30 ml เป็นตัวทำละลาย
3. ตั้งชุดรีฟลักซ์พร้อมให้ความร้อนประมาณ 70-75°C ทำการรีฟลักซ์จนกว่าสารละลายจะเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ประมาณ 2-6 ชั่วโมง
4. นำสารละลายที่ผ่านการรีฟลักซ์แล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืนเพื่อให้สารละลายตกตะกอนอย่างสมบูรณ์
5. กรองตะกอนที่ได้ซึ่งจะมีลักษณะเป็นของแข็ง ชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต
6. แบ่งตะกอนที่ได้มาประมาณ 0.003x mg เพื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง ¹H-NMR

อนุพันธ์ของอัลดีไฮด์ที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

- | | |
|-------------------------------|------------------------------------|
| 1. Thiophene-2-carboxaldehyde | 5. <i>tert</i> -Butyl-benzaldehyde |
| 2. 2-Bromo-benzaldehyde | 6. Pyridine-2-carboxaldehyde |
| 3. Benzaldehyde | 7. Fural-2-carboxaldehyde |
| 4. 3-Nitro-benzaldehyde | |

การวิเคราะห์โดยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy

- นำตัวอย่างที่สังเคราะห์ได้ปริมาณเล็กน้อย (30 mg) ใส่หลอด NMR ที่สะอาดและแห้งสนิท
- เลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น DMSO, CDCl_3 ใส่ลงในหลอดทดลอง NMR สูงประมาณ 2 cm ระวังอย่าให้ปลายหลอดหยดสัมผัสกับหลอด NMR
- เขย่าเบาๆ เพื่อให้สารตัวอย่างละลายในตัวทำละลาย นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy วิเคราะห์ผลที่ได้ต่อไป

การวิเคราะห์โดยเทคนิค FT-IR Spectroscopy

- นำสารตัวอย่างที่สังเคราะห์ได้ปริมาณเล็กน้อย บดรวมกับ KBr
- นำไปวิเคราะห์ด้วย FT-IR Spectroscopy และวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันของสารตัวอย่าง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา (Potato dextrose agar)

- นำมันฝรั่งปอกเปลือกล้างให้สะอาดหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ลักษณะคล้ายลูกเต๋า 200 g จากนั้นนำมันฝรั่งที่หั่นแล้วใส่ลงในภาชนะที่มีน้ำอยู่ 500 ml
- ให้ความร้อนจนมันฝรั่งสุกจากนั้นกรองเอาแต่น้ำมันฝรั่ง
- ใส่ผงวุ้น 15 g ลงในน้ำ 500 ml ต้มจนผงวุ้นละลาย แล้วใส่ glucose 20 g คนให้เข้ากันจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำน้ำมันฝรั่งที่ต้มไว้ตอนแรกมาผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่ภาชนะเพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที
- เมื่อทำการ autoclave แล้วนำสารละลายออกจากเครื่องมาพักไว้รอจนกว่าจะนำมาทำการทดลองต่อไป

วิธีการทดสอบการต้านเชื้อรา

วิธีที่ 1 อาหารพิษ (poison food technique)

1. อุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ด้วยไมโครเวฟก่อนให้วันละลาย
2. เตรียมสารเบนซิมิดาโซลที่สังเคราะห์ได้ ให้เป็น stock solution ที่ความเข้มข้น 15000 ppm โดยการคำนวณปริมาณที่ใช้ในการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สูตร $c_1v_1 = c_2v_2$
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุ่นแล้วมาผสมกับสารเบนซิมิดาโซลที่สังเคราะห์ได้ให้ได้ปริมาณ 75 ml โดยใช้อัตราส่วนระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อต่อสารเคมี 70:5, 67.5:7.5 และ 65:10 ml ที่ความเข้มข้น 1000, 1500 และ 2000 ppm คำนวณแล้วแล้วขยำให้เข้ากัน
4. สำหรับชุดควบคุม (control) ประกอบด้วยชุดควบคุมที่ใช้ acetone และชุดควบคุมที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งทำเหมือนกับข้อ 3
5. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อประมาณจานละ 15 ml ทิ้งไว้หนึ่งคืน
6. นำเชื้อ *Fusarium sp.* ที่เตรียมไว้ใช้ทำการทดสอบอายุประมาณ 1-2 สัปดาห์ โดยใช้อุปกรณ์สำหรับเจาะเชื้อรา (cork boror) เป็นรูวงกลมและใช้เข็มเขี่ยขึ้นเชื้อราขึ้นมาเอาด้านที่เป็นเส้นใยของเชื้อราคว่ำลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ
7. เก็บจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องรอการเจริญเติบโตประมาณ 1-2 สัปดาห์ โดยจะทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราทุกๆ 2, 4, 6 และ 8 วัน หรือทุกๆ สองวันจนเชื้อราที่ control plate จะเจริญเต็ม plate

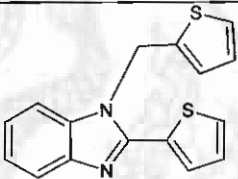
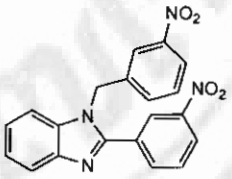
วิธีที่ 2 การแช่ขึ้นเนื้อในสารละลายสารเคมี (soaking techning)

1. อุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เตรียมไว้ด้วยไมโครเวฟก่อนให้วันละลาย จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อราลงในจานสำหรับเลี้ยงเชื้อราจานละ 15 ml ทิ้งไว้ประมาณหนึ่งคืน
2. เตรียมสารเบนซิมิดาโซลที่จะทดสอบที่ความเข้มข้น 125, 250, 500, 1000, 1500 และ 2000 ppm โดยการเตรียมสารที่จะใช้ทดสอบที่ความเข้มข้น 15000 ppm แล้วเปิดสารมา 0.40, 0.80, 1.60, 3.30, 5.00 และ 6.60 ml คำนวณแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 50 ml ขยำให้เข้ากัน
3. ใช้ cork boror เจาะที่ขอบโคโลนีของเชื้อราเป็นรูวงกลมและใช้เข็มเขี่ยขึ้นเชื้อราขึ้นมาแล้วจุ่มขึ้นเชื้อราลงในสารที่จะทำการทดสอบเป็นเวลา 10 นาที
4. ย้ายขึ้นเชื้อราขึ้นมาแล้วคว่ำด้านที่เป็นเส้นใยลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นแล้วให้อยู่ตรงกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อรา
5. เก็บจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วรอการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับวิธีที่ 1

ผลการวิจัย และวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการสังเคราะห์โดยใช้อนุพันธ์ของสารประกอบอัลดีไฮด์

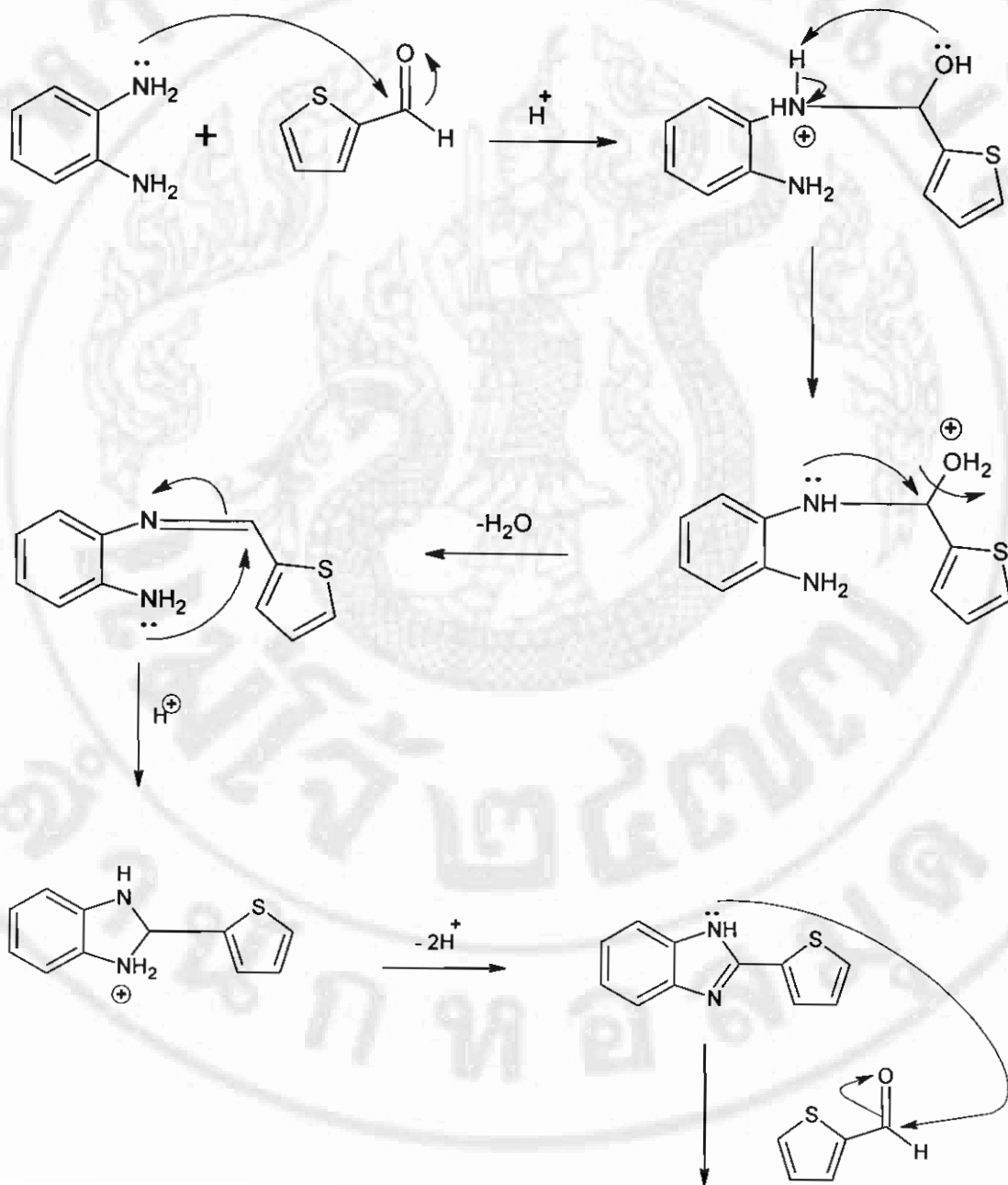
ทำการสังเคราะห์เบนซิมิดาโซลโดยใช้อนุพันธ์ของสารประกอบอัลดีไฮด์ได้ผลดังตารางที่ 4
 ตารางที่ 4 การสังเคราะห์เบนซิมิดาโซลโดยใช้อนุพันธ์ของสารประกอบอัลดีไฮด์ชนิดต่างๆ

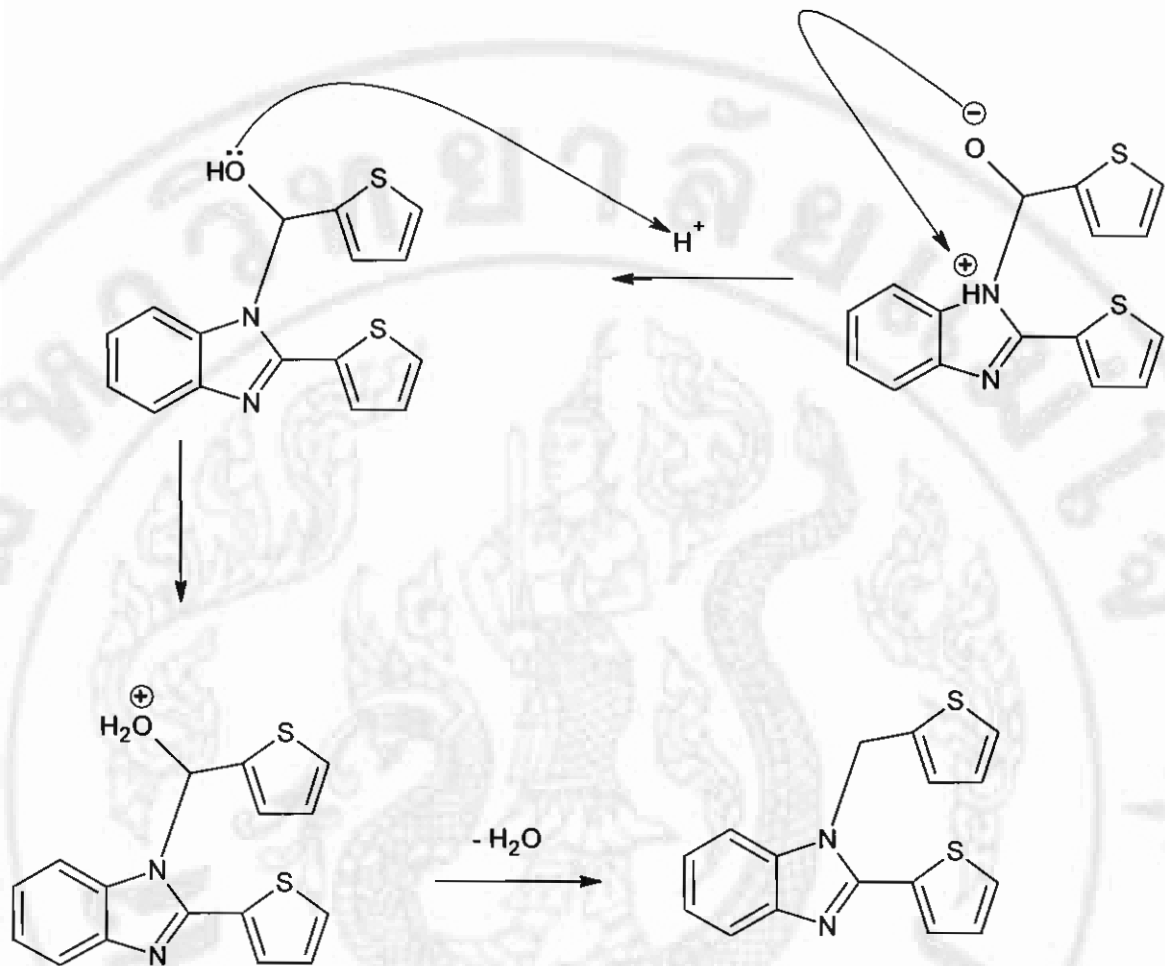
อนุพันธ์ของสารประกอบอัลดีไฮด์	ร้อยละผลได้ ^a	ผลิตภัณฑ์
1. Thiophene-2- carboxaldehyde	46.40	 Thiophene benzimidazole
2. 2-Bromo-benzaldehyde	-	-
3. Benzaldehyde	-	-
4. <i>tert</i> -Butyl benzaldehyde	-	-
5. 3-Nitro- benzaldehyde	98.01	 3-Nitro benzimidazole
6. Pyridine-2-carboxaldehyde	-	-
7. Fural-2-carboxaldehyde	-	-

^a = Isolated yield

- = ไม่เกิดปฏิกิริยา

การสังเคราะห์อนุพันธ์เบนซิมิดาโซลทำได้โดยการนำเอาอนุพันธ์ของอัลดีไฮด์มาทำปฏิกิริยากับ 1,2-phenylenediamine มีตัวทำละลายคือ เอทานอล ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 70-75 °C ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 2-6 ชั่วโมงได้ผลดังตารางที่ 4 จะเห็นว่า สารที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเคมี มีเพียงอนุพันธ์ของอัลดีไฮด์ 2 ชนิด คือ Thiophene-2- carboxaldehyde และ 3-Nitrobenzaldehyde เนื่องจากกลไกของปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังภาพที่ 11

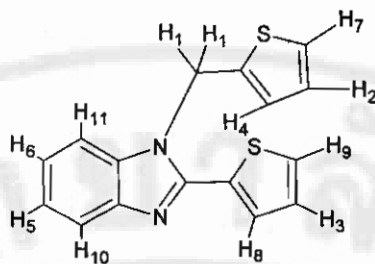




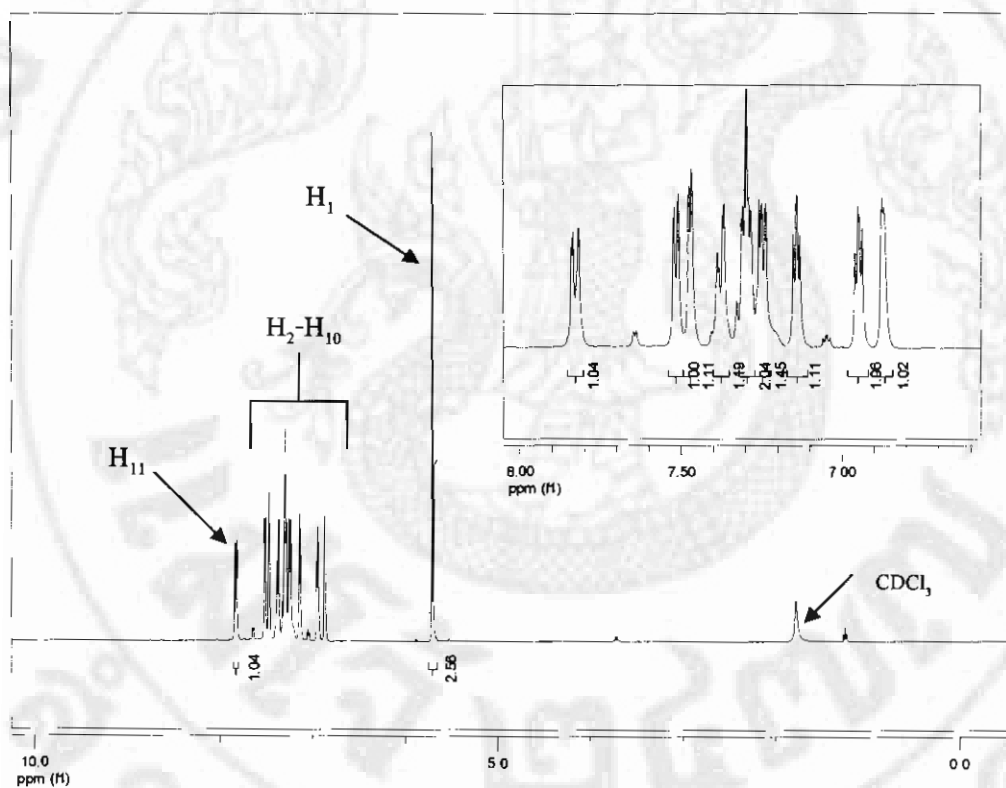
ภาพที่ 11 กลไกการเกิดปฏิกิริยา thiophenebenzimidazole

การเข้าทำปฏิกิริยานั้น NH_2 ซึ่งมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวอยู่จะวิ่งชนตรงตำแหน่ง carbonyl group ทำให้เกิดเป็น Imine และมีน้ำหลุดออกมา เกิดไซโคลเซชัน จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีโครงสร้างเป็น Benzimidazole โดยเมื่อใช้ 3-nitro benzaldehyde เป็นสารตั้งต้นก็สามารถเกิดกลไกได้ในทำนองเดียวกัน ดังนั้นถ้าใช้อัลดีไฮด์ที่มีหมู่ตั้งปฏิกิริยาอยู่ในวง อะโรมาติกจะสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่า

ทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วย ^1H-NMR และ FT-IR ที่ได้จาก thiophene-2-carboxaldehyde ทำปฏิกิริยากับ 1,2-phenylenediamine จะได้สารประกอบที่มีโครงสร้างดังภาพที่ 12 ได้จากการวิเคราะห์สเปกตรัมของ ^1H-NMR ภาพที่ 13 ซึ่งค่า chemical shift และ ตำแหน่งของโปรตอนต่างๆ แสดงดังตารางที่ 5 และผลการวิเคราะห์ด้วย FT-IR แสดงดังภาพที่ 14 ซึ่งมีค่าความยาวคลื่นที่สำคัญที่สามารถบอก functional group ต่างๆ แสดงในตารางที่ 6



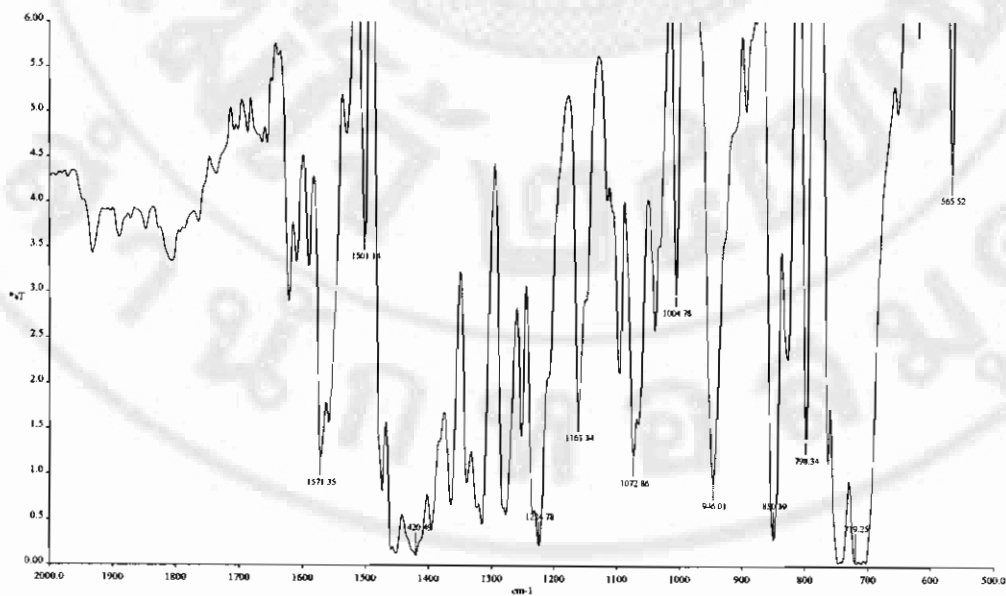
ภาพที่ 12 โครงสร้าง thiophenebenzimidazole



ภาพที่ 13 โปรตอนนิวเคลียร์ แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมของ thiophenebenzimidazole

ตารางที่ 5 ข้อมูลโปรตรอน นิวเคลียร์ แมกเนติก เรโซแนนซ์สเปกตรัมของอนุพันธ์
thiophenebenzimidazole

H	Chemical shift (ppm)	Assignment
1	6.87	s,2H
2	6.95	t,1H
3	7.05	t,1H
4	7.15	t,1H
5	7.25	t,1H
6	7.30	t,1H
7	7.39	d,1H
8	7.49	d,1H
9	7.52	d,1H
10	7.65	d,1H
11	7.82	d,1H

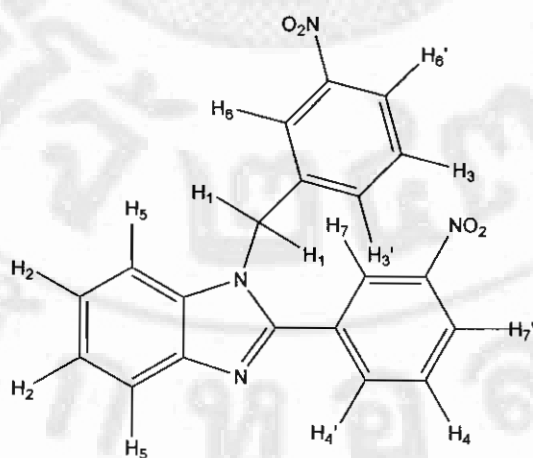


ภาพที่ 14 อินฟราเรดสเปกตรัมของ thiophenebenzimidazole

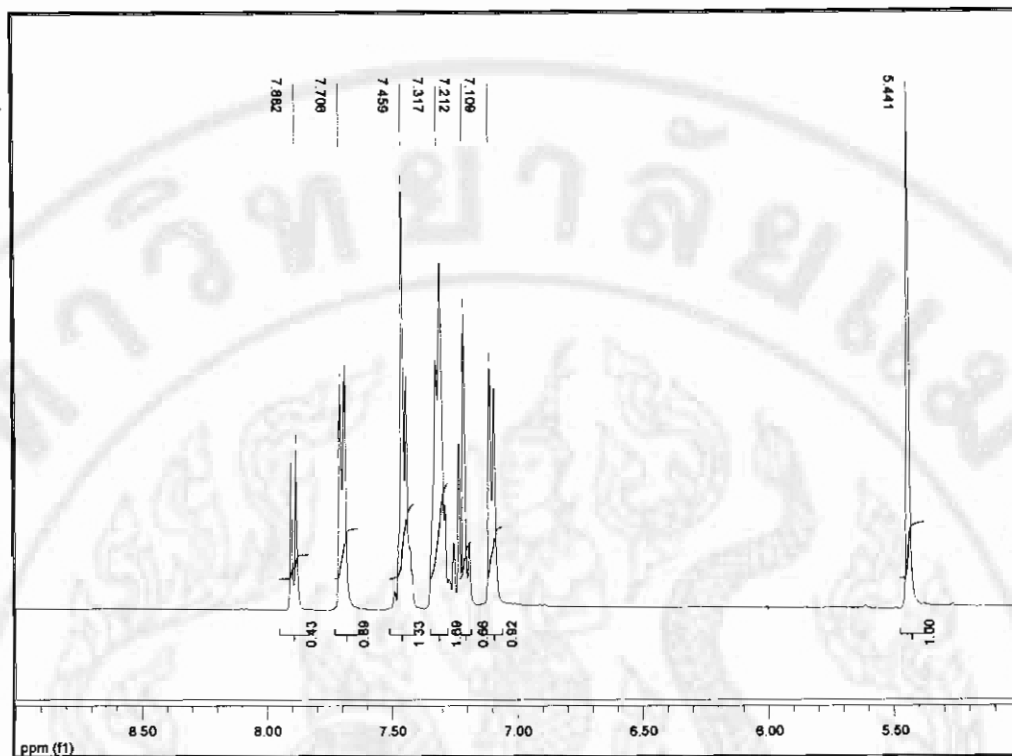
ตารางที่ 6 ข้อมูลความถี่และชนิดของการสั่นจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ thiophene-benzimidazole

Wavenumber (cm) ⁻¹	Functional group
798	CH=C (out-of-plane)
946	CH=C
1005-1073	C-CH
1162	-C=S
1224	C-N
1278-1316	C-N (aromatic)
1420-1501	CH ₂

ทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วย ¹H-NMR และ FT-IR ที่ได้จาก 3-nitrobenzaldehyde ทำปฏิกิริยากับ 1,2-phenylenediamine จะได้สารประกอบที่มีโครงสร้างดังภาพที่ 15 ซึ่งได้จากการวิเคราะห์สเปกตรัมของ ¹H-NMR ภาพที่ 16 ซึ่งค่า chemical shift และ ตำแหน่งของโปรตอนต่างๆ แสดงดังตารางที่ 7 และผลการวิเคราะห์ด้วย FT-IR แสดงดังภาพที่ 17 ซึ่งมีค่าความยาวคลื่นที่สำคัญที่สามารถบอก functional group ต่างๆ ได้แสดงในตารางที่ 8



ภาพที่ 15 โครงสร้าง 3-nitrobenzimidazole

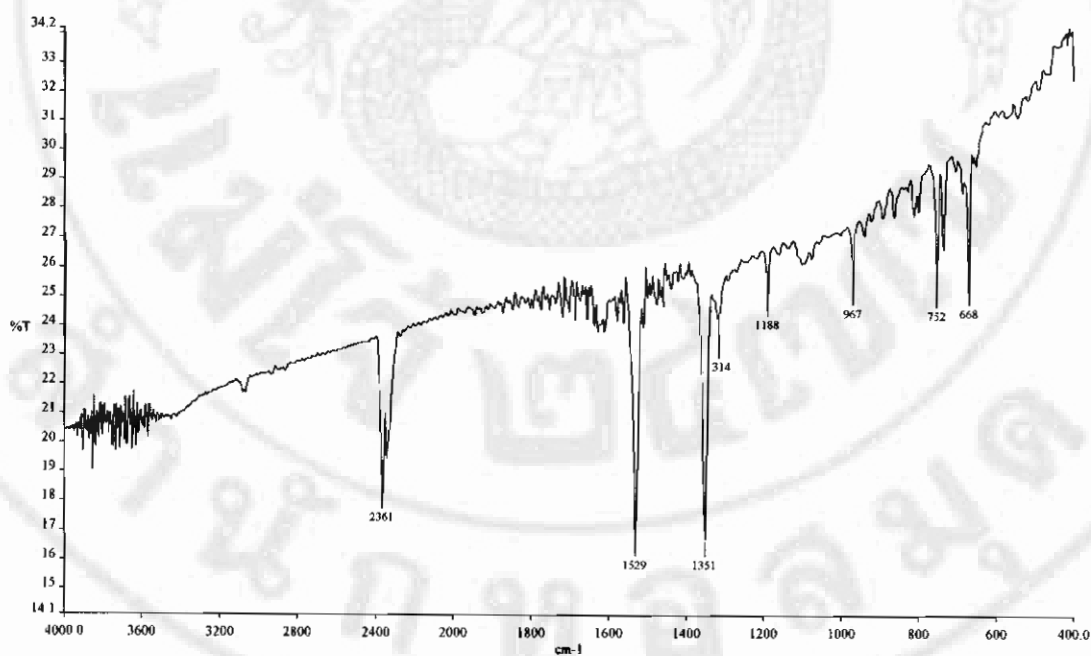


ภาพที่ 16 โปรตอน นิวเคลียร์ แมกเนติก เรโซแนนซ์สเปกตรัมของ 3-nitrobenzimidazole

จากภาพที่ 16 สเปกตรัมของ 3-nitrobenzimidazole จะพบว่าเกิดสเปกตรัม NMR ที่ประมาณ 5.44 ppm ซึ่งจะเป็นสเปกตรัมของ H_1 และ ที่ประมาณ 7.11-7.88 ppm จะเป็นสเปกตรัมของ H_2-H_7 ตามลำดับซึ่งจะแสดงข้อมูลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ข้อมูลโปรตอน นิวเคลียร์ แมกเนติก เรโซแนนซ์สเปกตรัมของอนุพันธ์ 3-nitrobenzimidazole

H	Chemical shift (ppm)	Assignment
1	5.44	s,2H
2	7.11	d,2H
3,3/	7.20-7.21	t,1H and d,1H
4,4/	7.30-7.32	t,1H and d,1H
5	7.46	d,2H
6,6/	7.60-7.70	s,1H and d,1H
7,7/	7.80-7.88	s,1H and d,1H



ภาพที่ 17 อินฟราเรดสเปกตรัมของ 3-nitrobenzimidazole

จากภาพที่ 17 อินฟราเรดสเปกตรัมของ 3-nitrobenzimidazole พบว่าจะเกิดสเปกตรัม ของหมู่ C-NO₂ ที่ประมาณ 1353,1529 (cm)⁻¹ และ C-N(aromatic) ที่ประมาณ 1186 (cm)⁻¹ และหมู่อื่นๆซึ่งแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ข้อมูลความถี่และชนิดของการสั่นจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ 3-nitrobenzimidazole

Wavenumber (cm) ⁻¹	Functional group
671-755	CH=C (out-of-plane)
756-861	aromatic ring
892-967	CH=C
968-1099	CH-CH ₂
1186	C-N (aromatic)
1353,1529	C-NO ₂
1457	CH ₂ , CH ₃
1610-1679	C=N

ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา

เบนซิมิดาโซลเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย เมื่อทำการสังเคราะห์และได้โครงสร้างที่เป็นสารบริสุทธิ์จึงทำการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารโดยใช้เชื้อราในมะเขือเทศ คือ *Fusarium sp.* แล้วทำการทดสอบการต้านเชื้อรา และวัดผลการทดสอบทุกๆ 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน หลังจากการปลูกเชื้อ ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้ จากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในทุกๆ 2 วันพบว่าเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มงานเลี้ยงเชื้อภายในระยะเวลา 10 วัน ส่วนในสารที่ใช้ทดสอบคือ 3-nitrobenzimidazole และ thiophenebenzimidazole ที่ความเข้มข้น 1000 ppm ซึ่งการทดสอบที่ใช้ 3-nitrobenzimidazole ต้องใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายเนื่องจากไม่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 9 (ภาพที่ 18)

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Fusarium sp.* ของ 3-nitrobenzimidazole และ thiophenebenzimidazole โดยทดสอบด้วยวิธีที่ 1 (poison food technique) ที่ความเข้มข้น 1000ppm

สารที่ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้น ppm	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ เชื้อรา ^a (cm)				
		2 วัน	4 วัน	6 วัน	8 วัน	10 วัน
3-nitrobenzimidazole ^b	1000	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
thiophenebenzimidazole ^c	1000	1.9	3.0	3.9	7.9	8.1
control (acetone)	1000	0.8	1.1	1.8	3.7	4.8
control (เชื้อรา)	-	2.0	3.3	4.8	8.2	9.0

a = ค่าเฉลี่ยจากการทำการทดสอบ 5 ซ้ำ b = อะซิโตนเป็นตัวทำลาย c=ไม่ใช้ตัวทำลาย



control

control acetone

test plate

test plate

thiophenebenzimidazole

3-nitrobenzimidazole

ภาพที่ 18 ผลการต้านเชื้อ *Fusarium sp.* ของ 3-nitrobenzimidazole และ thiophenebenzimidazole ที่ความเข้มข้น 1000 ppm

สืบเนื่องจากการใช้วิธี poison food technique พบว่า thiophene benzimidazole ไม่มีผลต่อการต้านเชื้อรา ส่วน 3-nitrobenzimidazole มีความสามารถในการต้านเชื้อราได้ดี แต่เนื่องจากไม่สามารถละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้จึงใช้ อะซิโตนเป็นตัวทำลาย แต่เมื่อมาพิจารณาในส่วน control acetone พบว่าตัวทำลายมีผลต่อการเจริญของเชื้อราที่ทดสอบ ดังนั้นจึงเปลี่ยนวิธีการทดสอบเป็นการแช่ชิ้นเชื้อราใน stock ของ 3-nitrobenzimidazole ที่นำมาละลายในน้ำจากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในทุกๆ 2 วันพบว่าเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อภายในระยะเวลา 8 วัน ที่ความเข้มข้น 1000, 1500 และ 2000 ppm ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อราเลย ผลที่วัดได้แสดงดังตารางที่ 10 และภาพที่ 19

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Fusarium sp.* ของ 3-nitrobenzimidazole โดยทดสอบด้วยวิธีที่ 2 (soak technique) ที่ความเข้มข้น 1000, 1500 และ 2000 ppm

สารที่ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้น ppm	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ เชื้อรา ^b (cm)			
		2 วัน	4 วัน	6 วัน	8 วัน
3-nitrobenzimidazole	1000	0.5	0.5	0.5	0.5
	1500	0.5	0.5	0.5	0.5
	2000	0.5	0.5	0.5	0.5
control (เชื้อรา)	1000	2.3	5.3	7.5	9.0
	1500	2.1	4.5	7.0	9.0
	2000	2.1	5.0	7.2	9.0

b = ค่าเฉลี่ยจากการทำการทดสอบ 4 ซ้ำ



ความเข้มข้น 1000 ppm

a

b



ความเข้มข้น 1500 ppm

a

b



ความเข้มข้น 2000 ppm

a

b

ภาพที่ 19 ผลการต้านเชื้อ *Fusarium sp.* ของ 3-nitrobenzimidazole ที่ความเข้มข้น 1000 1500 และ 2000 ppm

a = control plate ของเชื้อ *Fusarium sp.*

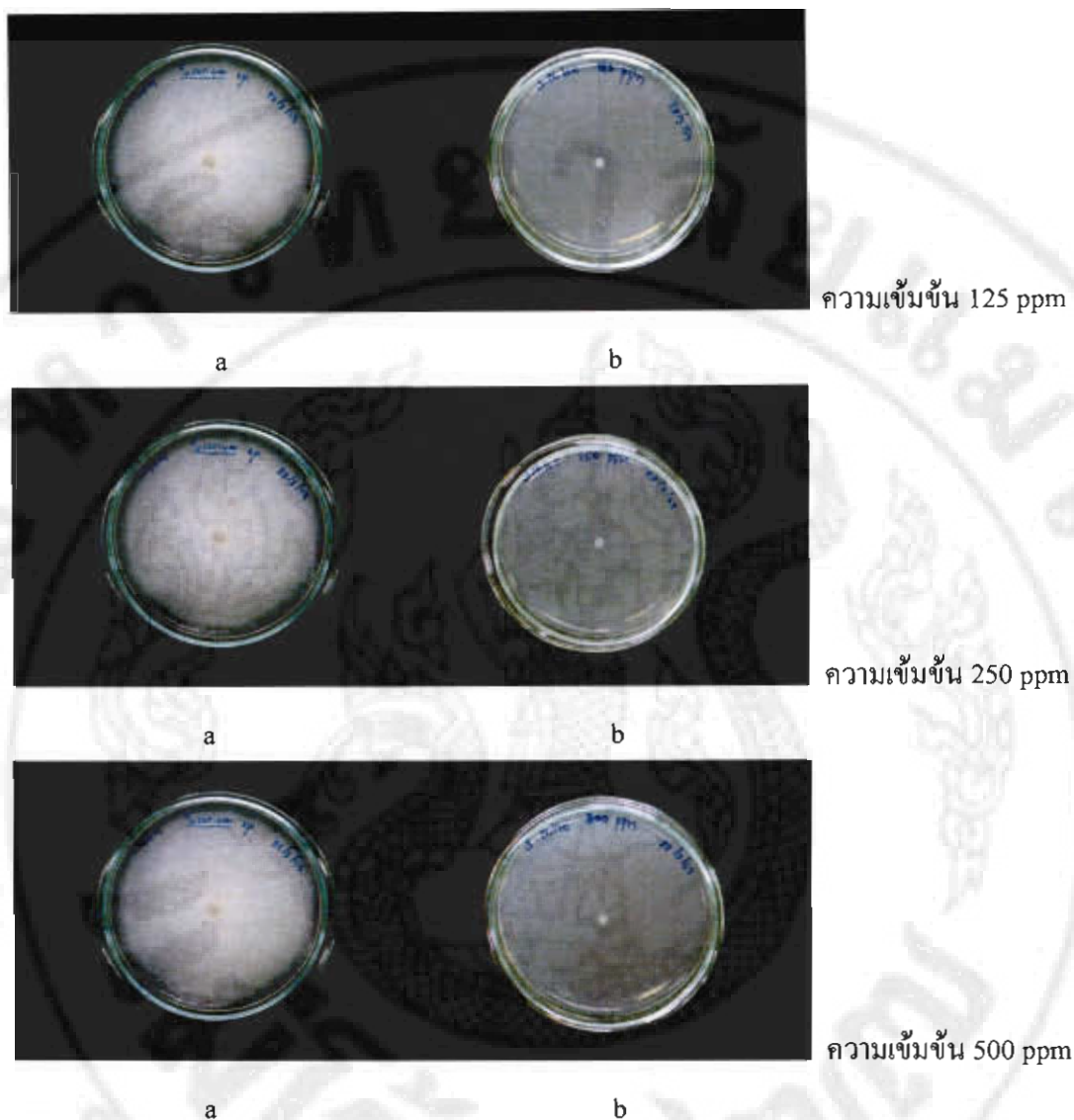
b = test plate ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Fusarium sp.*

จากการทดสอบความเข้มข้นเบื้องต้นที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm พบว่าสารเคมีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 100% จึงทดสอบว่าถ้าลดความเข้มข้นลงต่ำที่สุดเท่าใด ก็ยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ดังนั้นได้กำหนดระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบเพิ่มเติมอีก 3 ระดับคือ 500, 250 และ 125 ppm ผลที่วัดได้แสดงดังตารางที่ 11 ภาพที่ 20

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Fusarium sp.* ของ 3-nitrobenzimidazole โดยทดสอบด้วยวิธีที่ 2 (soaking technique) ที่ความเข้มข้น 125, 250 และ 500 ppm

สารที่ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้น ppm	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ เชื้อรา ^c (cm)			
		2 วัน	4 วัน	6 วัน	8 วัน
3-nitrobenzimidazole	125	0.5	0.5	0.5	0.5
	250	0.5	0.5	0.5	0.5
	500	0.5	0.5	0.5	0.5
control (เชื้อรา)	125	2.5	4.5	7.5	9.0
	250	2.2	4.2	7.4	9.0
	500	2.0	4.0	7.0	9.0

c = ค่าเฉลี่ยจากการทำการทดสอบ 4 ซ้ำ



ภาพที่ 20 ผลการต้านเชื้อ *Fusarium sp.* ของ 3-nitrobenzimidazole ที่ความเข้มข้น 125 250 และ

500 ppm

a = control plate ของเชื้อ *Fusarium sp.*

b = test plate ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Fusarium sp.*

จากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในทุกๆ 2 วัน พบว่าเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มงานเลี้ยงเชื้อภายในระยะเวลา 8 วัน ส่วนในสารที่ใช้ทดสอบคือ 3-nitrobenzimidazole ที่ความเข้มข้น 125, 250 และ 500 ppm ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อราเลย

สรุปผลการวิจัย

จากผลการสังเคราะห์เบนซิมิดาโซล พบว่าเมื่อใช้อนุพันธ์ของสารประกอบอัลดีไฮด์ ดังต่อไปนี้ thiophene-2-carboxaldehyde, 2-bromo-benzaldehyde, benzaldehyde, tert-butyl-benzaldehyde, 3-nitrobenzaldehyde, fural-2-carboxaldehyde, pyridine-2-carboxaldehyde ทำปฏิกิริยากับ 1,2-phenylene diamine ด้วยวิธีรีฟลักซ์ โดยใช้อัตราส่วน aldehyde:amine คือ 2 : 1 mol ทำปฏิกิริยาจนกระทั่งเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ โดยอนุพันธ์ของอัลดีไฮด์แต่ละชนิดจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาแตกต่างกันพบว่ามีเพียง thiophene-2-carboxaldehyde และ 3-nitrobenzaldehyde ที่สามารถทำปฏิกิริยาและเกิดเป็นสารประกอบเบนซิมิดาโซล ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างโดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโคปี จากนั้นทำการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราที่สามารถทำให้เกิดโรคพืชในมะเขือเทศได้ คือเชื้อ *Fusarium sp.* ซึ่งผลการทดสอบการต้านเชื้อราของวิธีที่ 1 (การผสมสารทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ) ที่ความเข้มข้น 1000 ppm พบว่า thiophene benzimidazole ไม่มีผลต่อการต้านเชื้อรา ส่วน 3-nitrobenzimidazole มีความสามารถในการต้านเชื้อราได้ดี แต่เนื่องจากไม่สามารถละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้จึงใช้ อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย แต่เมื่อมาพิจารณาในส่วน control acetone พบว่าตัวทำละลายมีผลต่อการเจริญของเชื้อราที่ทดสอบ ดังนั้นจึงเปลี่ยนวิธีการทดสอบเป็นการแช่ชิ้นเชื้อราใน stock ของ 3-nitrobenzimidazole ที่นำมาละลายในน้ำ (วิธีที่ 2) จากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในทุกๆ 2 วันพบว่าเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อภายในระยะเวลา 8 วัน ที่ความเข้มข้น 125 ppm ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อราเลย