

## ตอนที่ 2

### อนุพันธ์พัยโรไลควิโนลินจากแบคทีเรียไกลดิงในทะเล

#### 2.1. บทนำ

การเคลื่อนที่แบบคืบคลานหรือ gliding เป็นหนึ่งในรูปแบบของการเคลื่อนที่ที่พบในจุลินทรีย์หลายกลุ่ม ตั้งแต่กลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไปจนถึงจุลินทรีย์ชั้นสูงขึ้นไป อย่างไรก็ตาม สำหรับแบคทีเรียที่ได้รับการจัดเป็นแบคทีเรียไกลดิงนั้น เป็นแบคทีเรียใน 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ แบคทีเรียในลำดับ Myxobacterales หรือกลุ่มมิกโซแบคทีเรีย (Myxobacteria) และแบคทีเรียในสกุล *Cytophaga*, *Flavobacterium* และ *Bacteroides* (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*; CFB complex) ทั้งนี้ สำหรับแบคทีเรียไกลดิงใน CFB complex นั้น เดิมถูกจัดอยู่ในลำดับ Cytophagales แต่ในปัจจุบัน ถูกแยกออกมาเป็นไฟลัมใหม่ คือไฟลัม Bacteroides ต่างหากอีก 1 ไฟลัม (Hosoya et al, 2006; Srisukchayakul et al, 2007)

นอกเหนือไปจากความสามารถในการคืบคลานซึ่งเป็นรูปแบบการเคลื่อนที่ที่พบได้น้อยในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และทำให้แบคทีเรียไกลดิงเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะเฉพาะตัวที่น่าสนใจแล้ว ลักษณะเด่นอื่นๆ ของแบคทีเรียไกลดิงในทั้ง 2 กลุ่มที่อ้างถึงข้างต้น ซึ่งทำให้แบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มนี้ ได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างมาก ได้แก่ พฤติกรรมการล่า และพฤติกรรมการรวมกลุ่มและติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียในแต่ละโคโลนี ทั้งนี้ ทั้ง 2 กรณี เป็นพฤติกรรมที่เกิดจากการสร้างสารเคมีที่เฉพาะตัวขึ้น ในกรณีของการติดต่อสื่อสารนั้น แบคทีเรียไกลดิงใช้การสื่อสารผ่านสารเคมี เพื่อให้เกิดการคืบคลานไปในรูปแบบและทิศทางเดียวกันทั้งโคโลนี และเป็นการเคลื่อนที่แบบ chemotaxis โดยแบคทีเรียจะคืบคลานไปยังแหล่งอาหารซึ่งอาจเป็นสารอินทรีย์หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เป็นเหยื่อของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ทั้งนี้ ในกรณีหลัง กลุ่มของแบคทีเรียที่เป็นเหยื่อของแบคทีเรียไกลดิงมีทั้งกลุ่มยีสต์และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยแบคทีเรียไกลดิงสามารถดักจับและย่อยจุลินทรีย์ที่เป็นเหยื่อโดยใช้เอนไซม์และสารปฏิชีวนะที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (Gasperi et al, 2005)

การใช้สารเคมีเพื่อการสื่อสารระหว่างเซลล์ และพฤติกรรมการล่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ตามที่อ้างถึงข้างต้น เป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียไกลดิงได้รับความสนใจจากนักวิจัยในสาขาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ในฐานะของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะ และเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่

น่าสนใจ ตัวอย่างของสารจากแบคทีเรียไกลดิงที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดี และเป็นที่รู้จักในฐานะสารกลุ่มนำซึ่งอยู่ระหว่างการศึกษและพัฒนาเพื่อนำมาใช้เป็นยาได้แก่ อนุพันธ์มาโครไลด์ในกลุ่ม epothilone ตัวอย่างเช่น epothilone A และ B ซึ่งได้จากมิกโซแบคทีเรีย *Sorangium cellulosum* ทั้งนี้ สารในกลุ่ม epothilone เป็นสารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับดีมาก และมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ microtubule เช่นเดียวกับ paclitaxel (Bollag et al, 1995)

จากการศึกษาในระดับนำร่องเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในแบคทีเรียไกลดิงในทะเลไทย ผู้วิจัยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิง ทั้งที่เป็นกลุ่มที่สร้าง fruiting body ได้ (แบคทีเรียกลุ่มมิกโซแบคทีเรีย) และกลุ่มที่ไม่สร้าง fruiting body (แบคทีเรียในกลุ่ม CFB complex) ได้จากตะกอนดินและวัสดุจมน้ำจากพื้นที่สำรวจตามแนวชายฝั่งทะเล ทั้งเขตอ่าวไทย และแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้เหล่านี้มาเพาะเลี้ยงเพิ่มเติม และแยกสารสกัดหยาบจากการสกัดอาหารเพาะเลี้ยงของแบคทีเรียเหล่านี้ พบว่า สารสกัดจำนวนไม่น้อยมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ที่ใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาในระดับดี สำหรับการศึกษาในส่วนที่ 2 ของโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้คัดเลือกสารสกัดจากตัวอย่างแบคทีเรียไกลดิง 3 สายพันธุ์ ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE ในระดับดีและมีแนวโน้มที่จะมีองค์ประกอบทางเคมีที่น่าสนใจมาแยกสกัดเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ดังกล่าว ผลจากการศึกษาพบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน โดยเป็นแบคทีเรียในสกุลใหม่และชนิดใหม่ นอกจากนั้น สารที่พบในแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ยังเป็นสารชนิดใหม่ซึ่งยังไม่มีรายงานโครงสร้างทางเคมี หรือข้อมูลการศึกษาจากแหล่งที่มาในธรรมชาติมาก่อน

## 2.2. การทดลองและระเบียบวิธีวิจัย

### 2.2.1. สภาวะการทดลองทั่วไป

สภาวะการทดลองทั่วไปที่ใช้ในการศึกษาวิจัยตามโครงการส่วนนี้ ทั้งในส่วนสารเคมีและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ เป็นไปตามที่ได้ระบุมาแล้วในตอน 1 ข้างต้น

### 2.2.2. การแยกสกัดเชื้อแบคทีเรียและการเตรียมเชื้อให้บริสุทธิ์

ตัวอย่างแบคทีเรียโคลนนิ่งที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ รวมทั้งสิ้น 3 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ TISTR 1742, TISTR 1749 และ SH5.13.2 ได้จากการแยกจากเศษวัสดุที่เก็บสำรวจได้จากบริเวณแนวชายฝั่งทะเลไทยในพื้นที่ต่างๆ ดังนี้; สายพันธุ์ TISTR 1742 จากบริเวณหาดทองหลิง จ.ตรัง สายพันธุ์ TISTR 1749 จากสุสานหอย 75 ล้านปี จ.กระบี่ และสายพันธุ์ SH5.13.2 จากชายฝั่งเกาะขาม จ.ชลบุรี

ในการแยกเชื้อ ตัวอย่างเศษวัสดุที่สำรวจได้จะถูกตัดเป็นชิ้นเล็กและวางบนจานเพาะเลี้ยง (ที่อุณหภูมิห้อง) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SWG (สูตรอาหารประกอบด้วย monosodium glutamate 1 กรัม  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.01 กรัม  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.01 กรัม วุ้น 15 กรัม ในน้ำทะเล 1 ลิตร) ทั้งนี้ ในกรณีเชื้อสายพันธุ์ TISTR 1742 และ 1749 ใช้อาหารแข็งดังกล่าวโดยตรง ส่วนสายพันธุ์ SH5.13.2. ใช้อาหารสูตร SWG ซึ่งมี crystal violet (1 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร)

การตรวจสอบการเจริญของเชื้อ ใช้การติดตามด้วยตาเปล่า โดยสังเกตจากลักษณะเฉพาะตัวของโคโลนีของแบคทีเรียโคลนนิ่งซึ่งเป็นโคโลนีที่มีการกระจายตัวออกจากจุดเริ่มต้น แยกสกัดเชื้อให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยตัดตัวกลางเพาะเลี้ยงแรกเริ่มที่มีโคโลนีของเชื้อตัวอย่างเป็นแท่งสี่เหลี่ยมขอบเรียบ วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ  $\text{SAP}_2$  (ประกอบด้วย tryptone 1 กรัม yeast extract 1 กรัม วุ้น 15 กรัม ในน้ำทะเล 1 ลิตร) ตัวอย่างเชื้อสายพันธุ์ TISTR 1742 และ 1749 แยกให้บริสุทธิ์จากอาหารเพาะเลี้ยงนี้โดยใช้เทคนิค micromanipulation (Hosoya et al, 2006) ส่วนตัวอย่างสายพันธุ์ SH5.13.2. แยกให้บริสุทธิ์โดยการเพาะเลี้ยงซ้ำในอาหารเพาะเลี้ยง  $\text{SAP}_2$  ข้างต้นที่อุณหภูมิห้องจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ (สูตรการเตรียมตัวอย่างเพาะเลี้ยงทั้งหมด ดัดแปลงจาก Raichenbach 1992 และ Vobis 1992)

### 2.2.3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน

การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียไกลดิงทั้ง 3 สายพันธุ์ ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ 16S rDNA ขั้นตอนโดยย่อ ประกอบด้วย การเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ที่สกัดได้จากเชื้อแต่ละสายพันธุ์ โดยเทคนิค PCR และใช้ 16S rDNA BF1 และ BR1 เป็นไพรเมอร์ การทำให้บริสุทธิ์ใช้ชุดสกัด DNA ของ GFX PCR DNA purification kit การเรียงลำดับคู่เบสและการตัดต่อ/ประกอบคู่เบส ใช้ชุดการเรียงลำดับโดย ABRI PRISM Big Dye Terminator cycle sequencing และโปรแกรม BioEdit ตามลำดับ คู่เบสของ 16S rDNA ที่ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลจากฐานข้อมูล DNA โดยใช้ PLASTN อัลกอริทึม และเปรียบเทียบลำดับเบสที่สมบูรณ์แล้วจากฐานข้อมูลโดยโปรแกรม ClustalX เพื่อวิเคราะห์และจับคู่ 16s rDNA ระหว่างเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เป็นตัวอย่างศึกษาและข้อมูลของตัวอย่างเชื้ออ้างอิงที่มีความสัมพันธ์กันสูงสุด

### 2.2.4. การเพาะเลี้ยงปริมาณมาก

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในปริมาณมากเพื่อการแยกสกัดสารตัวอย่างจากแบคทีเรียไกลดิงแต่ละสายพันธุ์ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเลี้ยงเชื้อดังต่อไปนี้; อาหารเพาะเลี้ยงสูตร SAP2 ประกอบด้วย Tryptone 1 กรัม yeast extract 1 กรัม ในน้ำทะเล 1 ลิตร อาหารเพาะเลี้ยงสูตร CY ประกอบด้วย casitone 10 กรัม malt extract 2 กรัม yeast extract 1 กรัม ในน้ำทะเล 1 ลิตร และอาหารเพาะเลี้ยงสูตร skim milk ประกอบด้วย นมผงปราศจากมันเนย 5 กรัม yeast extract 3 กรัม ในน้ำทะเล 1 ลิตร (สูตรการเตรียมตัวอย่างเพาะเลี้ยง ดัดแปลงจาก Raichenbach 1992 และ Vobis 1992)

เตรียมตัวอย่างหัวเชื้อเพาะเลี้ยงสำหรับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ตามที่อ้างถึงข้างต้น โดยการเพาะตัวอย่างแบคทีเรียที่เตรียมให้บริสุทธิ์แล้วในตุ่มกลางเพาะเลี้ยงสูตร SAP<sub>2</sub> (25°C นาน 72 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที) ถ่ายโอนตัวอย่างหัวเชื้อเพาะเลี้ยงดังกล่าว (5 มิลลิลิตรต่อขวด) เพื่อเพาะเลี้ยงปริมาณมากในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร skim milk สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ TISTR 1742 และ 1749 และสูตร CY สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ SH5.13.2 (100 มิลลิลิตรต่อขวด จำนวน 80 ขวด) ใช้ Amberlite XAD-16 resin (2 กรัมต่อตุ่มกลางเพาะเลี้ยง 100 มิลลิลิตร) เพื่อใช้สกัดสารตัวอย่างจากอาหารเพาะเลี้ยงในทันที เพาะเลี้ยงที่ 25°C นาน 7 วัน บนเครื่องแกว่งที่ 200 รอบต่อนาที เก็บเกี่ยวเรซินจากตุ่มกลางโดยการกรองผ่านผ้าขาวบาง ล้างด้วยน้ำ และสกัดสารสกัดตัวอย่างจากเรซินด้วยเมทานอล (100 มิลลิลิตร 2 ครั้ง)

## 2.2.5. การแยกสกัดสารตัวอย่าง

การสกัดสารตัวอย่างจากสารสกัดหยาบของแมคทีเรียสายพันธุ์ TISTR 1742 ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีตามลำดับดังนี้; คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ ชะด้วยเมธานอล ตามด้วยคอลัมน์ซิลิกาเจลชะด้วยตัวทำละลายเมธานอล (5%) ในไดคลอโรมีเทน สารตัวอย่าง 3 ได้จากการตกผลึกสิ่งสกัดในตัวทำละลายเมธานอล

ในการสกัดสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของแมคทีเรียสายพันธุ์ TISTR 1749 ประกอบด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และบิวทานอล จากนั้นนำสิ่งสกัดหยาบจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมาแยกสกัดต่อโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีดังนี้; คอลัมน์ซิลิกาเจล ชะด้วยตัวทำละลายอะซีโตนในเฮกเซน (20% ถึง 50%) ตามด้วยเมธานอลในไดคลอโรมีเทน (5% ถึง 50%); HPLC ซิลิกาเจลคอลัมน์ (คอลัมน์ Econosil<sup>®</sup> ขนาด 250×7 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 10 ไมโครเมตร) ชะด้วยตัวทำละลาย ไอโซโพรพานอลในเฮกเซน (5% ถึง 35%) ติดตามผลที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สามารถแยกสารตัวอย่าง 4 (12 มิลลิกรัม) และ 5 (27 มิลลิกรัม) ที่ระยะเวลา 19 และ 13 นาทีตามลำดับ

สำหรับการแยกสารตัวอย่างจากแมคทีเรีย SH5.13.2 ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีตามลำดับดังนี้; คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ ชะด้วยเมธานอล ตามด้วยคอลัมน์ HPLC รีเวิร์สเฟส C-18 (คอลัมน์ Phenomenex<sup>®</sup> ขนาด 250×10 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 10 ไมโครเมตร) ชะด้วยตัวทำละลาย 70% น้ำในเมธานอล ติดตามผลที่ 210 นาโนเมตร และสามารถแยกสารตัวอย่าง 4 ได้ที่ 31 นาที (35 มิลลิกรัม)

**Marinoquinoline A (3).** ของแข็งสีน้ำตาล: IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3400, 2920, 1530, 1475, 1365  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz สำหรับ  $^1\text{H}$ ; 125 MHz สำหรับ  $^{13}\text{C}$ ) ดูตารางที่ 4: EIMS  $m/z$  (%relative intensity) 182 [ $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2$ ] (100), 154 (10).

**3-(2'-Aminophenyl)-pyrrole (4).** ของแข็งสีน้ำตาลส้ม UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 212 (4.07), 302 (3.34) nm; IR (thin film)  $\nu_{\max}$  3400, 2910, 1610  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$  หรือ  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz สำหรับ  $^1\text{H}$ ) ดูตารางที่ 5: EIMS  $m/z$  (%relative intensity) 158 [ $\text{M}^+$ ] (100), 130 (85), 84 (52), 66 (65); HREIMS  $m/z$  158.0853 (คำนวณสำหรับ  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2$ , 158.0842).

**2,2-Dimethyl-pyrrolo(1,2)-dihydroquinoline (5).** ของแข็งสีม่วง: UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 230 (4.41), 322 (3.67) nm; IR (thin film)  $\nu_{\max}$  3400, 2905, 1520, 1450, 1400  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ,

500 MHz สำหรับ  $^1\text{H}$ ) ตารางที่ 4: EIMS  $m/z$  (%relative intensity) 198 [ $\text{M}^+$ ] (15), 183 (100); HREIMS  $m/z$  198.1122 (คำนวณสำหรับ  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2$ , 198.1154).

#### 2.2.6. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง AChE และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเช่นเดียวกับที่ระบุในตอนที่ 1

### 2.3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาวิจัยในระดับนาร์รอง ผู้วิจัยสามารถแยกตัวอย่างแบคทีเรียไกลดิงหลายสายพันธุ์จากเศษวัสดุจมน้ำ ซึ่งเก็บสำรวจได้จากบริเวณแนวชายฝั่งทะเล สำหรับในการศึกษาวิจัยตามโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้คัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียไกลดิง 3 สายพันธุ์ โดยอาศัยการประเมินองค์ประกอบทางเคมีจากสเปกตรัม NMR ของสารสกัดหยาบที่สกัดจากตัวกลางเพาะเลี้ยงต่างๆ กัน ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานพบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน และคาดว่าเป็นแบคทีเรียในสกุลและชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ผลการศึกษาขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตสารเคมีที่มีองค์ประกอบหลักที่สัมพันธ์กันแต่ไม่ตรงกันทั้งหมด โดยองค์ประกอบหลักที่ได้เป็นอนุพันธ์ในกลุ่มพัยโรไลควิโนลิน ซึ่งเป็นโครงสร้างแกนที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน และอนุพันธ์พัยโรลชนิดใหม่ที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กันอีกจำนวนหนึ่ง นอกเหนือจากนี้ ผู้วิจัยยังสามารถแยกอนุพันธ์ในกลุ่ม diketopiperazine ได้อีกรวม 8 รายการ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสารในกลุ่ม diketopiperazine เกือบทั้งหมด เป็นสารที่สามารถพบได้ทั่วไปในสารสกัดจากจุลินทรีย์แทบทุกชนิด และสารที่ได้เป็นสารที่เคยมีการรายงานการศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพมาแล้ว ในรายงานฉบับนี้ จึงจะเว้นการรายงานการศึกษาสูตรโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในกลุ่มดังกล่าว

#### 2.3.1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน

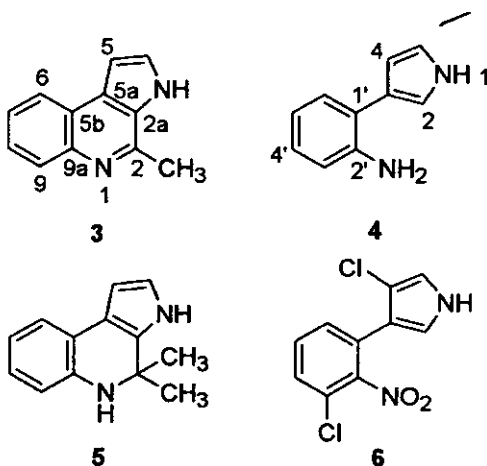
จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเป็นตัวอย่างในการศึกษาทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ 16S rDNA พบว่า ลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ตรงกันมากกว่า 98% ซึ่งทำให้สามารถสรุปได้ว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ TISTR 1742, TISTR 1749 และ SH5.13.2 เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน นอกจากนั้น เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์กับลำดับเบสของแบคทีเรียในฐานข้อมูล BLASTN พบว่า ลำดับเบสของทั้ง 3 สายพันธุ์ตรงกับลำดับเบสของแบคทีเรียไกลดิงชนิดใหม่ (*Rapidithrix thailandica*) ซึ่งผู้วิจัย (ดร.อัศววิทย์) ได้ดำเนินการวิจัยในอีกโครงการวิจัยหนึ่งต่างหากจากโครงการนี้ ผลการวิจัยอยู่ระหว่างรอการตีพิมพ์ (Srisukchayakul et al, 2007)

ตัวอย่างแมคที่เรียเพื่อการอ้างอิง สายพันธุ์ TISTR 1742 และ 1749 เก็บรักษาที่สถาบันวิจัย

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ส่วนสายพันธุ์ SH5.13.2 เก็บรักษาที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ภายใต้รหัสการสืบค้นตามรหัสสายพันธุ์ตรงกับที่อ้างถึง)

### 2.3.2. การแยกสกัดและการวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง

ในการแยกสกัดองค์ประกอบทางเคมีจากตัวอย่างแมคที่เรียสายพันธุ์ TISTR 1742 สามารถแยกสกัดตัวอย่างที่บริสุทธิ์ได้ 1 ชนิด ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีในขั้นต้น พบว่า ตัวอย่างมีแนวโน้มเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่คาร์บอนตติยภูมิมากกว่าครึ่งหนึ่งของสูตรโครงสร้าง เนื่องจากอิทธิพลของ nuclear Overhauser และจากระยะเวลาการคลายตัว (relaxation time) ของคาร์บอนกลุ่มนี้ที่นานกว่าปกติทำให้ไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณคาร์บอนได้ครบทุกสัญญาณจากสเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR จากการวิเคราะห์ในขั้นแรก อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสามารถเตรียมตัวอย่างในรูปที่เป็นผลึกเดี่ยวได้ ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างที่ได้ดำเนินการเพื่อการตีพิมพ์ในครั้งแรก จึงเป็นการวิเคราะห์โดยเทคนิคการวิเคราะห์โครงสร้างจากการหักเหรังสีเอ็กซ์ ซึ่งทำให้ได้โครงสร้างของสารตัวอย่างที่มีโครงสร้างแทนเป็น pyrrolo[2,3-c]quinoline ซึ่งเป็นโครงสร้างแทนแบบใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน โครงสร้างของสาร 3 ตามที่เสนอ มีชื่อว่า marinoquinoline A



การวิเคราะห์สเปกตรัม NMR ของสาร 3 ตามที่แสดงในตารางที่ 4 เป็นการวิเคราะห์เพื่อการรายงาน

ผลประกอบการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างซึ่งถือเป็นการรายงานครั้งแรกเช่นกัน สัญญาณจากสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR ประกอบด้วยสัญญาณหลักเพียง 3 ชุด ได้แก่ สัญญาณของโปรตอนอะโรมาติกที่  $\delta$  8.18 (dd,  $J = 7.2, 2.4$  Hz), 7.56 (m), 7.54 (m) และ 8.12 (dd,  $J = 7.2, 1.5$  Hz) ซึ่งเป็นสัญญาณของโปรตอน



ตำแหน่งที่ 6-9 ตามลำดับ สัญญาณโปรตอนของวงแหวนพิโรล (ตำแหน่ง 4 และ 5) ที่  $\delta$  7.44 (d,  $J = 3.0$  Hz) และ 7.08 (d,  $J = 3.0$  Hz) ตามลำดับ และสัญญาณหมู่เมธิลที่  $\delta$  2.93 (s) ซึ่งเป็นหมู่เมธิลที่แทนที่บนคาร์บอนตำแหน่ง 2 ทั้งนี้ การแปลสัญญาณของสเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR เป็นไปตามที่ได้แปลผลของสัญญาณโปรตอน และใช้การวิเคราะห์สเปกตรัม HMBC ประกอบการแปลผลตามที่แสดงในตารางที่ 5

สารตัวอย่าง 4 ได้จากการสกัดแยกจากสารสกัดหยาบของแบคทีเรียสายพันธุ์ TISTR 1749 และ SH5.13.2 ทั้งนี้ แม้ว่าสเปกตรัม NMR ของตัวอย่างที่ได้จากทั้ง 2 สายพันธุ์จะได้จากตัวทำละลายที่ต่างกัน ( $\text{DMSO}-d_6$  สำหรับตัวอย่างจาก TISTR 1479 และ  $\text{CDCl}_3$  สำหรับตัวอย่างจาก SH5.13.2) แต่ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างจากทั้ง 2 แหล่งเป็นสารชนิดเดียวกัน ในการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างในรายงานนี้ จะใช้ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างจากสเปกตรัมใน  $\text{DMSO}-d_6$  ส่วนข้อมูลเปรียบเทียบในตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดแสดงตามตารางที่ 6

สูตรโมเลกุลของสารตัวอย่าง 4 ตามที่วิเคราะห์ได้จากแมสสเปกตรัม (EIMS) คือ  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2$  ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์แมสสเปกตรัมความไวสูง ซึ่งให้ค่ามวลโมเลกุลที่  $m/z$  158.0853 (คำนวณสำหรับ  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2$  158.0842) ข้อมูลจากสเปกตรัม NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) แสดงให้เห็นสัญญาณโปรตอนอะโรมาติกเพียง 2 ชุด จำนวนรวม 7 โปรตอน ชุดที่ 1 คือ สัญญาณของวงแหวนเบนซีนที่มีการแทนที่ 2 ตำแหน่ง (*ortho* substitution) ที่  $\delta$  6.55 (ddd;  $J = 7.5, 7.2, 1.3$  Hz; H-5'), 6.69 (dd;  $J = 7.9, 1.3$  Hz; H-3'), 6.88 (ddd;  $J = 7.9, 7.3, 1.5$  Hz; H-4'), และ 7.10 (dd;  $J = 7.5, 1.5$  Hz; H-6') ตามลำดับ ส่วนสัญญาณชุดที่ 2 ประกอบด้วยสัญญาณที่  $\delta$  6.25 (ddd;  $J = 2.5, 2.3, <1$  Hz; H-4), 6.83 (ddd;  $J = 2.5, 2.3, 2.3$  Hz; H-5), และ 6.96 (ddd;  $J = 2.3, 2.3, <1$  Hz; H-2) ตามลำดับ ทั้งนี้ ค่าเคมีคัลชิฟต์ของสัญญาณชุดที่ 2 นี้ เป็นค่าที่เป็นลักษณะเฉพาะของวงแหวนพิโรลที่มีการแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 3

การต่อโครงสร้างส่วนวงแหวนอะโรมาติกทั้ง 2 ส่วนเข้าด้วยกัน ใช้ข้อมูลจากสเปกตรัม HMBC ซึ่งแสดงความสัมพันธ์จากคาร์บอนที่ตำแหน่ง 3 ของพิโรลไปที่โปรตอน 6' ของเบนซีน ส่วนตำแหน่งที่มีการแทนที่บนวงแหวนเบนซีนอีก 1 ตำแหน่งเป็นการแทนที่ด้วยหมู่อะมิโน จากการสังเกตพบสัญญาณของหมู่อะมิโนปฐมภูมิจากสเปกตรัม IR ที่  $3400\text{ cm}^{-1}$  และทำให้สามารถเสนอสูตรโครงสร้างของสารตัวอย่าง 4 ได้เป็น 3-(2'-aminophenyl)-pyrrole ตามที่แสดง สูตรโครงสร้างตามที่เสนอเป็นโครงสร้างของสารใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนจากแหล่งที่มาในธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม โครงสร้างของสารตัวอย่างตามที่เสนอนี้ เป็นสูตรโครงสร้างที่เคยมีการเสนอในทางทฤษฎีว่า เป็นหนึ่งในสารมัธยันตร์ในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของ

ตารางที่ 4. ค่าเคมีคัลซิฟต์ของโปรตอนและคาร์บอนของสาร 3 และ 5

Position	$3^{n, a}$		$5^{n, a}$	
	$\delta_H$ (mult.)	$\delta_C$ (mult.)	$\delta_H$ (mult.)	$\delta_C$ (mult.)
1	-	-	5.70 (br s)	-
2	-	145.3 (C)	-	52.1 (C)
2a	-	128.5 (C)	-	132.2 (C)
3	-	-	10.74 (br s)	-
4	7.44 (d, $J = 3.0$ Hz)	126.2 (CH)	6.64 (dd, $J = 2.8, 2.6$ Hz)	117.8 (CH)
5	7.08 (d, $J = 3.0$ Hz)	102.2 (CH)	6.20 (dd, $J = 2.6, 2.4$ Hz)	101.5 (CH)
5a	-	128.3 (C)	-	113.5 (C)
5b	-	122.9 (C)	-	119.1 (C)
6	8.18 (dd, $J = 7.2, 2.4$ Hz)	123.0 (CH)	7.08 (dd, $J = 7.5, 1.3$ Hz)	121.0 (CH)
7	7.56 (m)	125.5 (CH)	6.45 (ddd, $J = 7.7, 7.5, 1.0$ Hz)	116.2 (CH)
8	7.54 (m)	126.0 (CH)	6.73 (ddd, $J = 7.9, 7.7, 1.3$ Hz)	125.0 (CH)
9	8.12 (dd, $J = 7.2, 1.5$ Hz)	128.2 (CH)	6.50 (dd; $J = 7.9, 1.0$ Hz)	112.7 (CH)
9a	-	142.1 (C)	-	141.7 (C)
CH <sub>3</sub> -2	2.93 (s, 3H)	20.6 (CH <sub>3</sub> )	1.42 (s, 6H)	30.6 (CH <sub>3</sub> , 2C)

หมายเหตุ <sup>a</sup> หากไม่มีการระบุอื่นใด สัญญาณตามที่แสดงเป็นสัญญาณที่เทียบเท่ากับ 1 โปรตอนหรือ 1 คาร์บอนตามกำหนด

<sup>b</sup> ค่าเคมีคัลซิฟต์จากสเปกโตรมิเตอร์ขนาด 300 MHz สำหรับสเปกตรัมของ <sup>1</sup>H และขนาด 125 MHz สำหรับ <sup>13</sup>C โดยใช้ CDCl<sub>3</sub> เป็นตัวทำละลาย

<sup>c</sup> ค่าเคมีคัลซิฟต์จากสเปกโตรมิเตอร์ขนาด 500 MHz สำหรับสเปกตรัมของ <sup>1</sup>H และขนาด 125 MHz สำหรับ <sup>13</sup>C โดยใช้ DMSO-*d*<sub>6</sub> เป็นตัวทำละลาย

ตารางที่ 5. ค่าเคมีคัลฟิฟต์ของโปรตอนและคาร์บอนของสาร 4 (500 MHz for  $^1\text{H}$ )

Position	$\delta$ (DMSO- $d_6$ )		$\delta$ (CDCl $_3$ )	
	H (mult.) <sup>n</sup>	C (mult.)	H (mult.) <sup>n</sup>	C (mult.)
1	10.90 (br s)	-	8.39 (br s)	-
2	6.96 (ddd, $J = 2.3, 2.3, <1$ Hz)	115.8 (CH)	6.96 (ddd, $J = 2.3, 2.3, <1$ Hz)	116.1 (CH)
3	-	121.1 (C)	-	121.8 (C)
4	6.25 (ddd, $J = 2.3, 2.3, <1$ Hz)	107.3 (CH)	6.44 (ddd, $J = 2.3, 2.3, <1$ Hz)	108.6 (CH)
5	6.83 (ddd, $J = 2.3, 2.3, <1$ Hz)	118.3 (CH)	6.85 (ddd, $J = 2.3, 2.3, <1$ Hz)	118.4 (CH)
1'	-	121.6 (C)	-	122.2 (C)
2'	-	144.8 (C)	-	143.7 (C)
3'	6.69 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz)	115.2 (CH)	6.76 (dd, $J = 7.7, 1.2$ Hz)	115.5 (CH)
4'	6.88 (ddd, $J = 7.9, 7.2, 1.5$ Hz)	126.2 (CH)	7.08 (ddd, $J = 7.7, 7.5, 1.2$ Hz)	127.1 (CH)
5'	6.55 (ddd, $J = 7.5, 7.2, 1.3$ Hz)	116.9 (CH)	6.79 (ddd, $J = 7.7, 7.5, 1.2$ Hz)	118.6 (CH)
6'	7.10 (dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz)	128.9 (CH)	7.25 (dd, $J = 7.7, 1.2$ Hz)	129.8 (CH)
NH $_2$ -2'	4.70 (br s, 2H)	-	3.97 (br s, 2H)	-

หมายเหตุ <sup>n</sup> หากไม่มีการระบุอื่นใด สัญญาณตามที่ได้แสดงเป็นสัญญาณที่เทียบเท่ากับ 1 โปรตอน

psuedomonads) ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่แยกได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม

สารตัวอย่าง 5 สกัดได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ TISTR 1749 มีสูตรโมเลกุลเป็น  $C_{13}H_{14}N_2$  โดยสรุปจากผลการวิเคราะห์แมสสเปกตรัม (ทั้งในระบบความไวต่ำและสูง) ของสัญญาณที่  $m/z$  198.1122 (คำนวณสำหรับ  $C_{13}H_{14}N_2$  198.1154) ทั้งนี้ จากมวลโมเลกุลที่เพิ่มขึ้น 16 หน่วย ช่วยให้สามารถเสนอว่า โครงสร้างของสาร 5 น่าจะเป็นอนุพันธ์ dehydro ของสาร 3 โดยมีจำนวนหมู่เททริลแทนที่เพิ่มขึ้นอีก 1 หมู่ ผลจากการวิเคราะห์สเปกตรัม  $^1H$  NMR ยืนยันข้อเสนอดังกล่าว จากการสังเกตพบสัญญาณของโปรตอนอะโรมาติกทุกสัญญาณเช่นเดียวกับที่พบในสัญญาณจากสาร 3 และสัญญาณของหมู่เมทิลลักษณะเดียวกับที่พบในสาร 3 ซึ่งในที่นี้มีค่าเทียบเท่ากับ 6 โปรตอน หรือ 2 หมู่เมทิล เลื่อนไปอยู่ที่ช่วงสนามที่สูงขึ้น ( $\delta_H$  1.42, s) สามารถเสนอสูตรโครงสร้างของสาร 5 ได้เป็น 2,2-dimethyl-pyrrolo(1,2)-dihydroquinoline ในฐานของสารที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน ตามที่แสดง

### 2.3.3. ฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ของสารทั้ง 3 ชนิด สามารถวิเคราะห์ค่า  $IC_{50}$  ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ได้ตามที่แสดงในตารางที่ 6 ทั้งนี้ เห็นได้ว่า ในกลุ่มของอนุพันธ์พิไรโรลทั้ง 3 ชนิดที่ได้จากการวิจัยนี้ มีเพียงสาร 3 ชนิดเดียวเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ได้ในระดับที่น่าพอใจ ส่วนสารตัวอย่างอีก 2 ชนิดที่สกัดได้ ไม่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว ซึ่งแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ของการที่การเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างทางเคมีเพียงเล็กน้อยจะมีผลต่อความแรงในการออกฤทธิ์ และเพิ่มโอกาสในการพัฒนาอนุพันธ์พิไรโรลนี้ให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดีขึ้น

ตารางที่ 6. ฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ของสาร 3, 4 และ 5

สารตัวอย่าง	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
3	$4.9 \pm 0.9$
4	-ve <sup>n</sup>
5	-ve <sup>n</sup>
galantamine	$0.6 \pm 0.1$

หมายเหตุ <sup>n</sup> สารตัวอย่างยับยั้งเอนไซม์ได้น้อยกว่า 30% ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบพบว่า สารตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดมีค่าเสมือนไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ใช้เป็นเป้าหมายในการทดสอบ (ค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์ต่ำกว่า 50% ที่ระดับความเข้มข้น 200 mg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษา)