บทความวิจัย

การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี และการคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารคล้ายโปรดิจิโอซินที่ผลิตโดยแอคติโนแบคทีเรีย B7 (*Streptomyces spectabilis*)

นฤมล เถื่อนกูล
สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
อรุณ จันทร์คำ
สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี
กาญจนา วงศ์กระจ่าง*
สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 06 3459 4289 อีเมล: kanjana_w@psru.ac.th
DOI: 10.14416/j.kmutnb.2023.07.002
รับเมื่อ 7 มิถุนายน 2564 แก้ไขเมื่อ 2 สิงหาคม 2564 ตอบรับเมื่อ 21 กันยายน 2564 เผยแพร่ออนไลน์ 6 กรกฎาคม 2566
© 2023 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

บทคัดย่อ

แอคติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกสามารถสร้างสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการสกัด การแยก และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารสีชมพูที่แยกได้จากแอคติโนแบคทีเรีย B7 (*Streptomyces spectabilis*) ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากดินรังมด จังหวัดเพชรบูรณ์ ในเชื้อชนิดนี้มีรายงานสารกลุ่มโปรดิจินิน ซึ่งสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จุลชีพ และเชื้อรา จึงมีการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต เช่น ส่วนประกอบในเครื่องสำอาง ผลการทดลองพบว่า เมทานอลเป็นตัวทำละลายสำหรับการสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดได้รับการตรวจสอบปริมาณสารจากน้ำหนักและโดยใช้เทคนิค HPLC สารสีชมพูบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี มีการพิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยใช้สเปกโทรสโกปีและเทียบกับข้อมูลที่ได้มีการรายงานพบว่า สารบริสุทธิ์สีชมพูที่แยกได้มีข้อมูลตรงกับโครงสร้างของสาร 4'-Methoxy-5'-[(1"-nonyl-5"-propyl-4"-cycle-1-penten-3"-imino)-methyl]-2,2'-bi-1H-pyrrole ซึ่งจากการตรวจสอบในฐานข้อมูลพบว่า สารชนิดนี้ยังไม่มีการรายงานในเชื้อ *S. spectabilis* สำหรับผลการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารเบื้องต้นด้วยเทคนิค DPPH Radical Scavenging พบว่า สารกลุ่มที่มีสีชมพู แสดงผลการยับยั้งที่ร้อยละ 127.80 ± 0.02 (สารสกัดหยาบมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 87.85 ± 0.01%, 1.0 มก./ มล.)

คำสำคัญ: แอคติโนแบคทีเรีย การแยก สารสีโปรดิจิโอซิน สารต้านอนุมูลอิสระ

การอ้างอิงบทความ: นฤมล เถื่อนกูล, อรุณ จันทร์คำ และ กาญจนา วงศ์กระจ่าง, "การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี และการคัดกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารคล้ายโปรดิจิโอซินที่ผลิตโดยแอคติโนแบคทีเรีย B7 (*Streptomyces spectabilis*)," *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, ปีที่ 33, ฉบับที่ 3, หน้า 1–13, เลขที่บทความ 233-135127, ก.ค.–ก.ย. 2566.

Research Article

Structure Elucidation and Antioxidant Activity Screening of Prodigiosin-like Pigment Produced from Actinobacteria B7 (*Streptomyces spectabilis*)

Naruemol Thurnkul
Department of Microbiology, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand
Aroon Jankam
Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Rachathani Rajabhat University, Ubon Rachathani, Thailand
Kanjana Wongkrajang
Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand

* Corresponding Author, Tel. 06 3459 4289, E–mail: kanjana_w@psru.ac.th
DOI: 10.14416/j.kmutnb.2023.07.002
Received 7 June 2021; Revised 2 August 2021; Accepted 21 September 2021; Published online: 6 July 2023
© 2023 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

Abstract

Actinobacteria is a gram-positive bacteria that can produce various biological active secondary metabolites. This research aims to study the appropriate extraction methods, isolation and chemical structure of the pink compound isolated from the actinobacteria B7 (*Streptomyces spectabilis*), which was isolated from the ant nest soil in Phetchabun Province. *S. spectabilis* has been reported of prodiginines substances acting as antioxidant, antimicrobial and antifungal agents. In addition, the preliminary antioxidant efficacy has been conducted for the future use such as in cosmetic ingredients. According to our results, methanol was found to be the most effective extraction solvent determined by extract weight and using the HPLC technique. A pure pink compound was isolated from column chromatography and evaluated the structure using spectroscopytechnique as well as compared with the previously reported data. It was found that the primary pink compound was consistent with the structure of the compound, 4'-Methoxy-5'-[(1"-nonyl-5"-propyl-4"-cycle-1-penten-3"-imino)-methyl]-2,2'-bi-1H-pyrrole. According to the database examination, the compound has not been reported in *S. spectabilis*. The preliminary demonstration of antioxidant activity by the DPPH radical scavenging assay revealed that the pink compound provided an inhibitory effect at 127.80 ± 0.02% (the crude extract had an inhibition percentage of 87.85 ± 0.01%, 1.0 mg/ml).

Keywords: Actinobacteria, Isolation, Prodigiosin Pigment, Antioxidant Agent

Please cite this article as: N, Thurnkul, A, Jankam, and K. Wongkrajang, "Structure elucidation and antioxidant activity screening of prodigiosin-like pigment produced from actinobacteria B7 (*Streptomyces spectabilis*)," *The Journal of KMUTNB*, vol. 33, no. 3, pp. 1–13, ID. 233-135127, Jul.–Sep. 2023 (in Thai).

1. บทนำ

แอคติโนแบคทีเรียพบมากในดินเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นเส้นสาย จัดอยู่ใน Order Actinomycetals จำแนกตามสมบัติการสร้างสารปฏิชีวนะ ได้ 3 กลุ่มหลักคือ *Streptomycete Actinoplanete* และ *Nocardioform* โดยเป็นแหล่งผลิตสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary Metabolite) *Streptomyces* เป็นสกุลที่พบมากที่สุดและสามารถผลิตสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิที่มีสี [1], [2] แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท B7 คัดแยกได้จากดินรังมด มีการสร้างสารสีส้มเข้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ระบุชนิดของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท B7 พบว่า แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท B7 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces spectabilis* (99.35%) และมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีใน *S. spectabilis* น้อยมาก พบสาร Metacycloprodigosin เป็นสารที่จัดอยู่ในสารกลุ่มโปรดิจินิน [3]

โปรดิจินิน (Prodiginines) เป็นสารประกอบสีแดงเข้ม ถูกผลิตขึ้นในแบคทีเรียหลายชนิดเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ [4] เช่น *Serratia* [5] *Streptomyces* [6], [7], *Hahella* [8] และ *Vibrio* [9] เป็นต้น สารกลุ่มนี้ได้มีการทดสอบทางคลีนิก [10] และแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ยับยั้งเซลล์มะเร็ง [11] ต้านอนุมูลอิสระและต้านจุลชีพ [12], [13] ต้านเชื้อรา [14], [15] และต้านมาลาเรีย [16]

ปัจจุบันการผลิตเม็ดสีของจุลินทรีย์เป็นหนึ่งในสาขาการวิจัยที่เกิดขึ้นใหม่เพื่อแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการใช้งานในอุตสาหกรรมต่างๆ มีข้อดีสามารถผลิตเม็ดสีได้ง่ายและรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก สีมีความจำเพาะ และมีเฉดสีที่หลากหลายและแตกต่างกัน [17] ความน่าสนใจของแอคติโนแบคทีเรีย B7 (*S. spectabilis*) มีสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิสีชมพูเข้มและมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อชนิดนี้น้อย [18-19] ซึ่งการรู้ชนิดและโครงสร้างทางเคมีของสารทำให้นำไปสู่การศึกษาเชิงลึกเพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสีชมพู และทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีการศึกษาประสิทธิภาพของการสกัด ตรวจสอบจากการแยกด้วยเทคนิค HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) แยกสารสีให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิคสเปคโตรสโคปีของแอคติโนแบคทีเรีย B7 (*S. spectabilis*) นอกจากนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดหยาบและกลุ่มสารที่แยกได้เพื่อใช้ประเมินในการนำไปประยุกต์เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางในอนาคต

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich), Silica gel (Merck), TLC Silica gel 60 Aluminium sheet (Sigma-Aldrich), Gallic acid (Sigma-Aldrich) Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Loba Chemie), $CDCl_3$ (Merck), Methanol (HPLC grade, Merck), Acetonitrile (HPLC grade, Merck), Nylon membrane filtered (Merck), column C-18, 150 × 4.6 mm (Merck), เครื่อง Rotary Evaporator (Rotavapor R-300 system, Büchi), เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC, รุ่น Flexar, Perkin Elmer), เครื่อง Microplate reader (รุ่น Spectrostar Nano, BMG LABTECH), เครื่อง UV-visible Spectrophotometer (รุ่น LAMBDA25, Perkin Elmer), เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR, Nicolet iS5, Thermo Fisher Scientific), เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR, รุ่น AVANCE 400 spectrometer, Bruker), เครื่อง high resolution mass spectra (HRMS, รุ่น micrOTOF-II mass spectrometer, Bruker)

2.2 การเตรียมผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7

การเตรียมผงสีเริ่มจากการคัดแยกเชื้อแอคติโนแบคทีเรียจากดินรังมด จากอำเภอหนองไผ่ จังหวัดเพชรบูรณ์ บนอาหาร Sodium Caseinate Agar (SCA) ด้วยวิธี spread plate และได้นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากนั้นระบุชนิดของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท B7 ด้วยวิธีหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *16S ribosomal RNA* โดย

สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (Nation Center for Biotechnology Information)

ดัดแปลงจากวิธีการของ [20] ชั่งปลายข้าวเพื่อใช้เป็นซับสเตรต จำนวน 30 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร แช่ข้าวด้วยน้ำประปาประมาณ 1 ชั่วโมง เทน้ำออกให้หมด นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียลงในอาหาร Sodium Caseinate Ager (SCA slant) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5–7 วัน ปิเปตน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารที่เพาะเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) ขูดสปอร์ของแอคติโนแบคทีเรียให้ละลายในรูปของสารแขวนลอยสปอร์ (Spore Suspension) นำสารแขวนลอยสปอร์มานับจำนวนสปอร์ให้ได้จำนวนสปอร์เริ่มต้นประมาณ 106 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารแขวนลอยสปอร์ 1.0 มิลลิลิตร ลงในซับสเตรตที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5–7 วัน นำซับสเตรตที่หมักด้วยแอคติโนแบคทีเรียไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บดด้วยเครื่องบด และเก็บผงสีในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3 การศึกษาการสกัดผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7

2.3.1 ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

ผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7 จากหัวข้อ 2.2 เพื่อศึกษาการสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันจำนวน 10 ชนิด ดังนี้ ตัวทำละลายเดี่ยว 7 ชนิด ดังนี้ น้ำ (H_2O), เมทานอล (Me), เอทานอล (Et), เอททิลอะซิเตท (EA), อะซีโตน (AC), ไดคลอโรมีเทน (C), เฮกเซน (H), และตัวทำละลายผสม 3 ชนิด ดังนี้ เฮกเซน + เอททิลอะซิเตท (H + EA), ไดคลอโรมีเทน + อะซีโตน (H + AC) และเฮกเซน + ไดคลอโรมีเทน (H + C) ในการสกัดใช้อัตราส่วนของผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7 ต่อ ตัวทำละลาย (1 กรัม ต่อ 5 มิลลิลิตร) วิธีการสกัดใช้วิธีแช่หมัก 7 วัน ทำ 3 ซ้ำ ที่อุณหภูมิห้อง และนำสารสกัดที่ได้ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบสุญญากาศ (Vacuum Rotary Evaporator) ได้สารสกัดหยาบ ชั่งน้ำหนักและเก็บตัวอย่างในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส รอการนำไปแยกด้วยเทคนิค HPLC

2.3.2 การสกัดผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7 เพื่อใช้สำหรับแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี

จากผลการทดลองที่ 2.3.1 ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด และผลการทดลอง 2.4 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด จึงได้ทำการเลือกมาเป็นตัวทำละลายในการสกัดเพื่อนำสารสกัดไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป โดยนำผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7 จำนวน 600 กรัม สกัดแบบแช่หมักด้วยเมทานอล ในอัตราส่วน 600 กรัม ต่อ 1,200 มิลลิลิตร สกัด 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้องโดยสกัดครั้งที่ 1 เป็นเวลา 3 วัน กรองเอากากออก แล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบสุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบส่วนกากที่เหลือนำไปสกัดต่อครั้งที่ 2 เป็นเวลา 5 วัน และสกัดครั้งที่ 3 เป็นเวลา 7 วัน ตามลำดับ และทำขั้นตอนต่อไปเหมือนการสกัดครั้งที่ 1 หลังจากนั้นนำสารสกัดทั้ง 3 ครั้ง มารวมกันนำไปชั่งน้ำหนัก หาร้อยละสารสกัดที่ได้เทียบกับผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7 เก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค HPLC ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน

เลือกสารสกัดที่ดีที่สุดจากหัวข้อ 2.3.1 จำนวน 5 ตัวอย่างสารสกัดเมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน นำมาวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค HPLC โดยเทียบกับสารสกัดปลายข้าวที่ไม่มีผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7 ด้วยตัวทำละลายเดียวกัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของสารที่ตัวทำละลายต่างกันโดยไม่มีสารจากปลายข้าวผสม เพื่อคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้ในการสกัดสารในปริมาณมากเพื่อนำไปแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี

การเตรียมสารละลายสำหรับเทคนิค HPLC นำสารสกัด 5 ตัวอย่างที่เลือก เตรียมความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มก./มล.) ด้วยเมทานอล กรองสารละลายตัวอย่าง

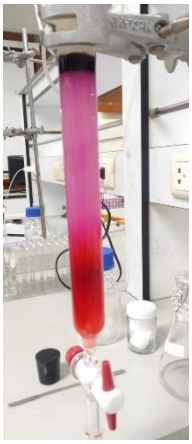
ผ่านกระดาษกรอง Nylon Membrane Filtered ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปแยกด้วยเครื่อง HPLC ยี่ห้อ Perkin Elmer โดยใช้คอลัมน์ C18 ขนาด 150 × 4.6 มิลลิเมตร ทำการแยกด้วยระบบ Gradient Elution โดยใช้ Injection Value Loop 20 ไมโครลิตร และตรวจวัดสัญญาณด้วย PDA Plus detector ความยาวคลื่น 260 และ 360 นาโนเมตร กำหนดจากการตรวจเช็คเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC ตัวชะที่ใช้ในการแยกสารประกอบด้วย 2 ชนิด คือ Mobile Phase A (Acetonitrile) และ Mobile Phase B (2% Formic Acid ในน้ำกลั่นมีค่า Resistivity 18.2 เมกะโอห์ม การกำหนดตัวชะที่นิยมในการแยกสารกลุ่มฟีนอลิกได้ทดลองหลายระบบพบว่า ในอัตราส่วนที่ทำให้แยกได้แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารด้วยเทคนิค HPLC

Time (min)	Mobile phase A	Mobile phase B	Flow rate (ml/min)
0.0	25%	75%	0.7
2.0	25%	75%	0.7
2.0	80%	20%	0.7
2.0	0%	100%	0.7

2.5 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบเมทานอลด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

การแยกสารแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้ ขั้นตอนแรกทำเพื่อแยกกลุ่มสารที่มีความมีขั้วต่างกัน เริ่มจากนำสารสกัดหยาบเมทานอล น้ำหนัก 6.08 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ผสมด้วยซิลิกาเจล เพื่อจับสารและระเหยตัวทำละลายออกให้หมดได้สารตัวอย่างผง และเตรียมคอลัมน์ขนาด กว้าง 3 เซนติเมตร ความสูงของซิลิกา เจล 5 เซนติเมตร แยกสารด้วยระบบตัวชะแบบเกรเดียน (Gradient Elution) โดยเฟสเคลื่อนที่เริ่มต้น 10% Acetone/Hexane เพิ่มความมีขั้วจนถึง Acetone และขั้วสูงสุด คือ 20% MeOH/Acetone หลังจากนั้นตรวจสอบสารด้วยเทคนิคTLC (Thin Layer Chromatography) และรวมสารที่เหมือนกันอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ทำการระเหยตัวทำละลาย เก็บสารที่ได้ใส่ในขวดที่



รูปที่ 1 การแยกสารบริสุทธ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสารสกัดหยาบเมทานอล

เหมาะสมเพื่อทำในขั้นตอนที่ 2 ต่อไป การแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีแสดงดังรูปที่ 1

ขั้นตอนที่ 2 การเลือกกลุ่มสารที่มีสารสีชมพูเป็นส่วนประกอบหลัก น้ำหนัก 174.5 มิลลิกรัม เตรียมคอลัมน์ขนาดกว้าง 2 เซนติเมตรความสูงของซิลิกาเจล 15 เซนติเมตร ด้วยระบบ Isocratic และเฟสเคลื่อนที่คือ 10% Acetone/Hexane ตรวจสอบสารด้วยเทคนิค TLCตรวจสอบสารที่ปรากฏในแผ่น TLC ที่มีจุดเดียวคาดว่าเป็นสารบริสุทธิ์ และรวมสารที่มีลักษณะจุดบนแผ่น TLC เหมือนกันเป็นกลุ่มย่อยเดียวกัน แล้วก็นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เก็บสารที่ได้ และเตรียมนำไปตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีต่อไป ด้วยเทคนิค UV NMR FTIR และ MS

2.6 การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคสเปคโตรสโคปีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

2.6.1 การพิสูจน์โครงสร้างเคมีของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค UV-Vis (UV-Visible spectrophotometry)

เตรียมสารละลายของตัวอย่างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร วัดด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น LAMBDA25 เพื่อสแกนหาค่ายาวคลื่น

ที่มีการดูดกลืนแสงได้มากที่สุดเพื่อใช้เทียบกับกลุ่มสารเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี

2.6.2 การพิสูจน์โครงสร้างเคมีของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค NMR (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)

เตรียมสารละลายของตัวอย่างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยตัวทำละลาย $CDCl_3$ ใส่ในหลอด NMR (NMR tube) และ วัดด้วยเครื่อง NMR ยี่ห้อ Bruker รุ่น AVANCE 400 Spectrometer Operation, 400 เมกะเฮิรตซ์

2.6.3 การตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของโครงสร้างเคมีของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค FTIR (Fourier transform Infrared Spectroscopy)

เตรียมสารตัวอย่างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ใส่ในโถดูดความชื้น 1 วันเพื่อให้สารไม่มีความชื้นและวัดด้วยเครื่อง FTIR รุ่น Nicolet iS5 ยี่ห้อThermo Fisher Scientific

2.6.4 การยืนยันโครงสร้างเคมีของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HRMS (High resolution mass spectrometry)

เตรียมสารตัวอย่างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ละลายด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ใส่ในขวดสำหรับใส่สาร และวัดด้วยเครื่อง HRMS ยี่ห้อ Bruker รุ่น micrOTOF-II Mass Spectrometer

2.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดและกลุ่มสารที่แยกได้ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging ใช้วิธีดัดแปลง [21] โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานเชิงบวก (positive control) หลักการคือสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นสารละลายสีม่วงเป็นตัวแทนของอนุมูลอิสระและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Agent) ได้จะทำให้สารละลายสีม่วงของ DPPH จางลงจนเป็นสารละลายสีเหลืองและไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ในการทดลองเตรียมสารละลาย 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH) (ความเข้มข้น 0.18 มก./มล.) สารละลายมาตรฐานมีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบประกอบด้วย 4 ส่วน 1) control (A) ประกอบด้วยเอทานอล 100 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร 2) control blank (B) ประกอบด้วยเอทานอล 200 ไมโครลิตร 3) Sample (C) ประกอบด้วย เอทานอล 80 ไมโครลิตร ตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร และ 4) sample blank (D) ประกอบด้วยเอทานอล 180 ไมโครลิตร และตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็น เวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ จากสูตร % DPPH Radical Inhibition = $[(A–B) – (C–D)/(A–B)] \times 100$ เมื่อ A–B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ C–D คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

2.8 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

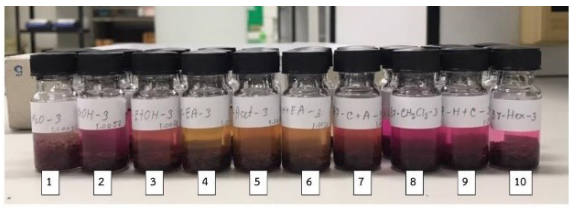
วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One Way ANOVA) ค่าถูกแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จำนวน 3 ซ้ำ ของการทดลอง และได้รับการพิจารณาอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3. ผลการทดลอง

3.1 ผลการเตรียมตัวอย่างผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7

การเตรียมตัวอย่างผงสี ได้จากการคัดแยกเชื้อแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท B7 จากดินรังมด จากอำเภอหนองไผ่ จังหวัดเพชรบูรณ์ เชื้อมีการสร้างสารสีส้มเข้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเชื้อชนิดนี้ และพบว่า แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท B7 ย้อมติดสีแกรมบวก สร้างมัยซีเลียม 2 ชนิด คือ มัยซีเลียมที่ยึดเกาะกับซับสเตรต (Substrate Mycelium) และมัยซีเลียมชนิดที่ยื่นไปในอากาศ (Aerial Mycelium) ผลการระบุชนิดของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท B7 และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท B7 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces spectabilis* (99.35%)

รูปที่ 2 ผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7



รูปที่ 3 สารสกัดผงสีแอคติโนแบคทีเรียB7 ด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 10 ชนิด

S. aureoverticillatus (98.76%) *S. lasiicapitis* (98.76%) *S. thermotolerans* (98.62%) *S. parvulus* (98.55%) และ *S. muensis* (98.55%) ตามลำดับ ในการเตรียมตัวอย่างแอคติโนแบคทีเรีย B7 เพื่อใช้ศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ปลายข้าวเป็นตัวจับสารสีจากเชื้อได้เป็นผงสีชมพูที่มีส่วนผสมปลายข้าวแสดงดังรูปที่ 2

3.2 ผลการศึกษาการสกัดผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7

ผลการศึกษาการสกัดผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7 ด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน การเลือกตัวทำละลายในการทดลองเลือกจากความขั้วต่างกันจากมากไปน้อย โดยชนิดของตัวทำละลาย (1–10) แสดงตามลำดับในตารางที่ 2 ผลการทดลองพบว่า สารสกัดที่มีตัวทำละลายแสดงสีที่แตกต่างกัน ดังนี้ เมทานอล เอทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน แสดงสีของสารสกัดเป็นสีชมพู ในขณะที่เอทิลอะซิเตท และอะซิโตน แสดงสีของสารสกัดเป็นสีเหลืองส้ม ผลการสกัดแสดงดังรูปที่ 3 สีที่ต่างกันเป็นผลมาจากตัวทำละลายมีค่า pH ต่างกัน เมื่อระเหยตัวทำละลายออกสารสกัดหยาบที่ได้มีสีชมพูเหมือนกัน แต่ได้ร้อยละสารสกัดที่ไม่เท่ากัน แสดงผลดังตารางที่ 2 ซึ่งสารสกัดเมทานอลมีปริมาณมากที่สุด ส่วนสารสกัดน้ำไม่มีสารสีชมพู

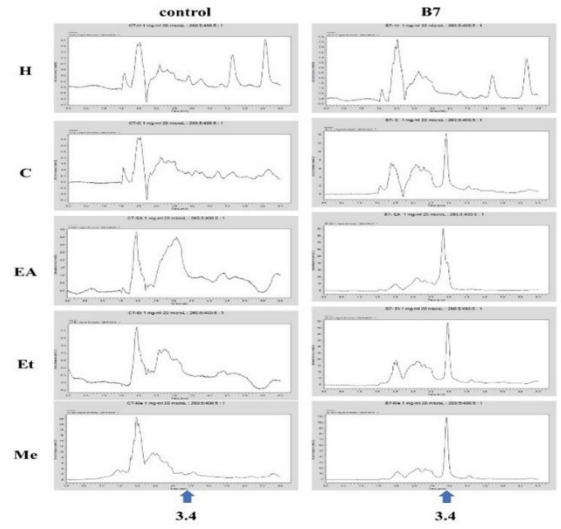
ตารางที่ 2 ผลการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน 10 ชนิด ของตัวอย่างผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7

ลำดับ	ชนิดตัวทำละลาย	ร้อยละสารสกัด*
1	Water	-
2	Methanol	0.54 ± 0.25
3	Ethanol	0.21 ± 0.15
4	Ethyl acetate	0.20 ± 0.30
5	Hexane + Ethyl acetate	0.23 ± 0.33
6	Acetone	0.17 ± 0.32
7	Dichloromethane + Acetone	0.18 ± 0.28
8	Dichloromethane	0.33 ± 0.25
9	Hexane+ Dichloromethane	0.18 ± 0.31
10	Hexane	0.35 ± 0.10

*การทดลอง 3 ซ้ำ

3.3 การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค HPLC ของสารสกัดที่ต่างกัน

การเปรียบเทียบตัวทำละลายเดี่ยวกับตัวทำละลายผสมในการสกัด ข้อ 3.2 พบว่า ปริมาณสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายเดี่ยวดีกว่าตัวทำละลายผสม แสดงในตารางที่ 2 ดังนั้นจึงเลือกตัวอย่างสารสกัดจากตัวทำละลายเดี่ยว 5 ตัวอย่าง ดังนี้ สารสกัดเฮกเซน สารสกัดไดคลอโรมีเทน สารสกัดเอทิลอะซิเตท สารสกัดเอทานอล และสารสกัดเมทานอล ในการเปรียบเทียบปริมาณและชนิดของสารเพิ่มเติมด้วยเทคนิค HPLC เพื่อใช้เป็นตัวช่วยในการเลือกตัวทำละลาย 1 ชนิดในการสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดที่ดีที่สุดเพื่อนำไปแยกสารบริสุทธิ์ต่อไป ในการแยกด้วยเทคนิค HPLC กำหนดความยาวคลื่น 260 และ 360 นาโนเมตร (ความเข้มข้น 1.0 มก./มล.) และมีสารสกัดของปลายข้าว เนื่องจากตัวอย่างแอคติโนแบคทีเรีย B7 มีปลายข้าวเป็นส่วนผสม จึงกำหนดให้สารสกัดปลายข้าวเป็นตัวควบคุมที่ตัวทำละลายเดียวกัน การกำหนดความยาวคลื่นของเทคนิค HPLC กำหนดจากการ

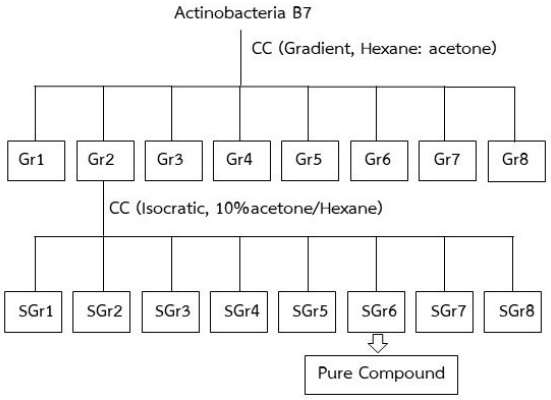


รูปที่ 4 ผลการแยกสารสกัดผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7 ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เทียบกับสารสกัดปลายข้าว (Control) H (สารสกัดเฮกเซน) C (สารสกัดไดคลอโรมีเทน) EA (สารสกัดเอทิลอะซิเตท) Et (สารสกัดเอทานอล) และ Me (สารสกัดเมทานอล)

ตรวจสอบสารเบื้องต้นด้วยเทคนิคTLC ด้วยแสง UV ผลการทดลองด้วยเทคนิค HPLC แสดงผลดังรูปที่ 4 ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร มีค่าการดูดกลืนแสง (OD, mAU) มีชนิดของสารสำคัญตรงกันของสารสกัดทุกตัวอย่าง ยกเว้นสารสกัดเฮกเซน ที่ Retention Time = 3.4 (นาทีที่ 3.4) มีค่า OD ดังนี้ สารสกัดไดคลอโรมีเทน (14 mAU) สารสกัดเอทิลอะซีเตท (90 mAU) สารสกัดเอทานอล (49 mAU) และสารสกัดเมทานอล (110 mAU) ส่วนที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร มีค่าการดูดกลืนแสงของสารน้อย จากค่า OD ที่ 260 นาโนเมตร สารสกัดเมทานอลมีค่ามากที่สุด ดังนั้นสารเมทานอลจึงมีปริมาณสารมากที่สุดด้วย

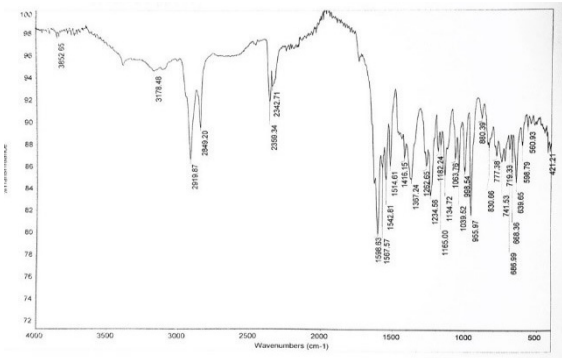
3.4 ผลการแยกสารสกัดเมทานอลด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

กระบวนการแยกเพื่อให้สารบริสุทธิ์เป็นขั้นตอนสำคัญ สารสกัดสำหรับใช้ในการแยกได้มีการศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยวิเคราะห์ผลจากน้ำหนักสารสกัดที่ได้ และผลการแยกด้วยเทคนิค HPLC จากผลการทดลองพบว่าเมทานอล เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด ดังนั้นจึงนำมาสกัดสารเพื่อใช้สำหรับแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโต กราฟี ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยม (น้ำหนักสารสกัดเมทานอล 6.08 กรัม ร้อยละ 1.01) ในการแยกได้แบ่งการแยกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนที่ 1 แยกเพื่อแบ่งกลุ่มโดยอาศัยการตรวจสอบสารด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography; TLC) พิจารณาจากจุดสารในแผ่น TLC มีสารเหมือนกันนำมารวมเป็นกลุ่มเดียวกัน การแยกขั้นตอนแรกจัดกลุ่ม ได้สาร 8 กลุ่ม (Gr. 1–8) แยกด้วยระบบ Gradient Elution โดยเรียงตามความมีขั้ว (แบ่งสารส่วนหนึ่งนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ขั้นที่ 2 เป็นการแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ ได้เลือกสาร Gr. 2 เป็นกลุ่มที่มีสารสีชมพูรวมเป็นกลุ่มเดียว มีน้ำหนัก 174.5 มิลลิกรัม นำไปแยกต่อจำนวน 2 ครั้ง ด้วยระบบ Isocratic Elution โดยอาศัยการตรวจสอบสารด้วยเทคนิค TLC ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ ได้สารทั้งหมด 8 กลุ่มย่อย (SGr1-8) โดยกลุ่มย่อยที่ 6 (SGr 6) คาดว่าเป็นสารบริสุทธิ์เนื่องจากมีจุดสารจุดเดียวในแผ่น TLC มีน้ำหนัก 24.2 มิลลิกรัม ได้แสดงกระบวนการแยกสารบริสุทธิ์ดังแผนผังที่ 1



แผนผังที่ 1 การแยกสารสกัดผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7

สรุปการแยกสารสกัดแอคติโนแบคทีเรีย B7 ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด เมื่อเทียบจากน้ำหนักผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7 จำนวน 100 กรัม (สารสกัด 1.01 กรัม) ได้สารกลุ่ม 2



รูปที่ 5 IR spectrum ของสารที่แยกได้จากสารสกัดผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7

(Gr.2, สีชมพู) 29.08 มิลลิกรัม และได้สารบริสุทธิ์ 4.03 มิลลิกรัม

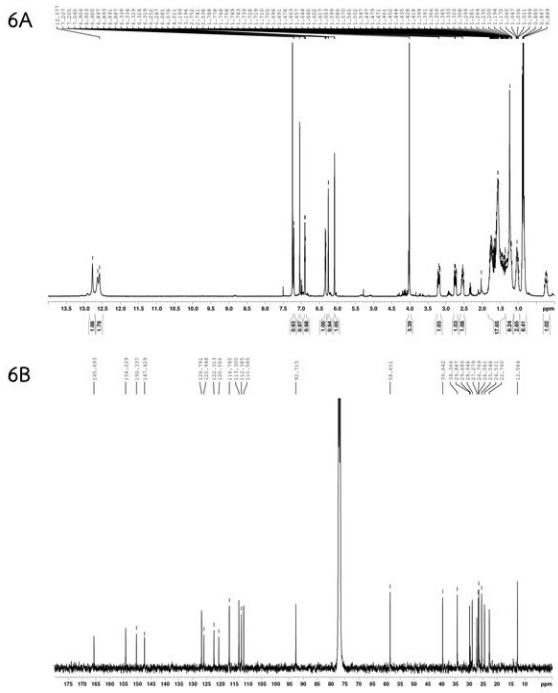
3.5 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิคสเปคโตรสโคปี

การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดเมทานอลของผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7 การตรวจสอบด้วยเทคนิคสเปคโตรสโคปีประกอบด้วย 4 เทคนิค แสดงผล ดังนี้

UV; แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุด (λmax) 530 นาโนเมตร แสดงว่ามีระบบคอนจุเกตในโครงสร้างสารประกอบโดยมีพันธะคู่สลับพันธะเดี่ยวต่อเนื่องกัน

IR; แถบการสั่นแบบยืดของ N-H ที่ 3178 cm^{-1}, C-H ที่ 2849, 2919 cm^{-1}, aromatic-H ที่ 1514, 1598 cm^{-1} และ IR Spectrum แสดงดังรูปที่ 5

NMR; ^{1}H-NMR Spectrum โดยตำแหน่งโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 7 ผลแสดงดังรูปที่ 6A แสดงค่าเคมิคัลชิฟท์ที่ 12.5–12.8 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนของ -NH, ค่าเคมิคัลชิฟที่ 6.2–7.8 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนของอะโรมาติก, ค่าเคมิคัลชิฟท์ที่ 4.0 เป็นสัญญาณโปรตอนของ Methoxy, ค่าเคมิคัลชิฟท์ที่ 3.3–2.5 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนของ Methine ที่ใกล้เฮทเทอโรอะตอม, ค่าเคมิคัลชิฟท์ที่ 0.8–2.0 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนของ Methine, Methylene และ Methyl เมื่อเทียบ ^{1}H-NMR Spectrum พบว่า ข้อมูลตรงกับสารคล้ายโปรดิจิโอซิน [22]



รูปที่ 6 6A) ^{1}H-NMR และ 6B) ^{13}C-NMR Spectrum ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดแอคติโนแบคทีเรีย B7

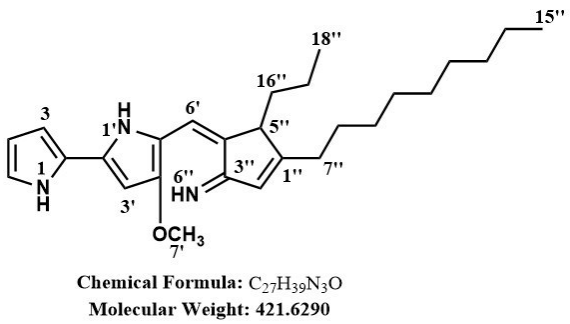
NMR: ^{13}C-NMR Spectrum โดยตำแหน่งโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 7 ผลแสดงดังรูปที่ 6B แสดงค่าเคมิคัลชิฟท์เป็นช่วงๆ ดังนี้

ค่าเคมิคัลชิฟท์ที่ 165.6 ppm เป็นสัญญาณของคาร์บอนตำแหน่ง 4′, ค่าเคมิคัลชิฟท์ที่ 154.2, 150.2, 147.4 ppm เป็นสัญญาณของคาร์บอนตำแหน่ง 1″, 3″ และ 2′ ตามลำดับ

ค่าเคมิคัลชิฟท์ที่ 126.7, 125.9, 122.3, 120.5, 116.7, 113.3, 112.3 และ 111.5 ppm เป็นสัญญาณของคาร์บอนตำแหน่ง 5, 4″, 2, 5′, 4, 6′, 2″ และ 3 ตามลำดับ

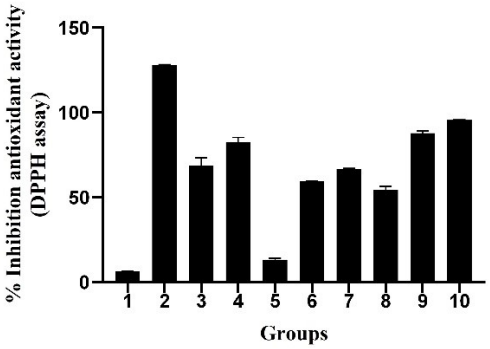
ค่าเคมิคัลชิฟท์ที่ 92.7, 58.6 และ 39.6 ppm เป็นสัญญาณของคาร์บอนตำแหน่ง 3′, OCH_3 และ 5″ ตามลำดับ

ค่าเคมิคัลชิฟท์ที่ 34.3, 29.8, 29.6, 28.9, 27.2, 26.7, 26.5, 25.5, 24.5 และ 22.7 ppm เป็นสัญญาณของคาร์บอนตำแหน่ง -CH_2 ทั้งหมด 10 ตำแหน่ง 16″, 17″, 13″, 7″, 9″, 8″, 14″, 10″, 12″ และ 11″ ตามลำดับ



Chemical Formula: $C_{27}H_{39}N_3O$
Molecular Weight: 421.6290

รูปที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์จากสารสกัดแอคติโนแบคทีเรีย B7 [22]



รูปที่ 8 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารสกัดแอคติโนแบคทีเรีย B7 (1-8 = กลุ่มย่อยจากการแยก 1-8, 9 = สารสกัดหยาบความเข้มข้น 1 มก./มล., 10 = Trolox 0.1 มก./มล.)

ค่าเคมิคัลชิฟท์ที่ 12.5 ppm เป็นสัญญาณของคาร์บอนตำแหน่ง -CH_3 ทั้งหมด 2 ตำแหน่ง คือ 15″ และ 18″

จากสเปคตรัมในรูปที่ 6 พบว่าลักษณะพีค และค่าเคมิคัลชิฟท์ทุกตำแหน่งตรงกับสาร 4'-Methoxy-5'-[(1"-nonyl-5"-propyl-4"-cycle-1-penten-3"-imino)-methyl]-2,2'-bi-1H-pyrrole [22]

MS: MS Spectrum มีค่า m/z 392.2665 [M+H-CH2O]+ วัดด้วยเทคนิค ESI-MSHR, positive) ซึ่งพบว่าตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{27}H_{39}N_{3O}$ แสดงค่ามวลโมเลกุล 421

นำข้อมูลทุกเทคนิคที่ได้มาวิเคราะห์ร่วมกันและเทียบจากข้อมูลที่เคยมีรายงานพบว่า ตรงกับโครงสร้างทางเคมีของสาร 4'-Methoxy-5'-[(1"-nonyl-5"-propyl-4"-cycle-1-penten-3"-imino)-methyl]-2,2'-bi-1H-pyrrole [22] แสดงโครงสร้างดังรูปที่ 7

3.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยเทคนิค DPPH Radical Scavenging

สารสกัดสีชมพูจากแอคติโนแบคทีเรีย B7 เป็นสารที่น่าสนใจในแง่ของการนำไปประยุกต์ใช้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปต่อยอดในแง่ของการศึกษาเชิงลึกเพื่อจะได้นำไปประยุกต์ใช้ต่อไป ซึ่งผลการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค DPPH Radical Scavenging ของสารสกัดหยาบ และส่วนที่แยกเป็นกลุ่มได้ 8 กลุ่ม พบว่ากลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีสีชมพูแสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุดสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 127.8 ± 0.01 ส่วนสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 87.84 ± 0.01 (1 มก./มล.) โดยสารมาตรฐานเชิงบวกคือ Trolox สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 95.60 ± 0.01 (0.1 มก./มล.) ผลการทดสอบฤทธิ์แสดงดังรูปที่ 8

4. อภิปรายผลและสรุป

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารที่แยกได้จากผงสีชมพูแอคติโนแบคทีเรีย B7 ซึ่งได้จากการนำเชื้อแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท B7 คัดแยกได้จากดินรังมด จังหวัดเพชรบูรณ์ ได้ระบุชนิดด้วยวิธีหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *16S ribosomal* พบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท B7 มีความใกล้เคียงกับ *S. spectabilis* (99.35%) [23] และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นเพื่อจะได้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ต่อไป การศึกษาเริ่มโดยการศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อสกัดให้ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุดโดยประเมินผลจากปริมาณของสารสกัดและจากการแยกด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งจากการศึกษาพบว่าตัวทำละลายที่ดีที่สุดคือ เมทานอล จึงเลือกเมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณสารสกัดที่มากที่สุดใช้สำหรับแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ ผลการสกัดพบว่า เมื่อเทียบจากน้ำหนักผงสีแอคติโน

แบคทีเรีย B7 จำนวน 100 กรัม ได้สารสกัดหยาบ 1.01 กรัม หลังจากได้สารสกัดเมทานอลจึงนำไปแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารกลุ่มสีชมพู Gr.2 จากแผนผังที่ 1 น้ำหนัก 29.08 มิลลิกรัม และได้สารบริสุทธิ์ SGr6 จากแผนผังที่ 1 น้ำหนัก 4.03 มิลลิกรัม (ผงสีแอคติโนแบคทีเรีย B7 จำนวน 100 กรัม) และนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคสเปคโตรสโคปี (UV, NMR, FTIR และ MS) ผลการตรวจสอบด้วยเครื่อง UV-Vis พบค่า การดูดกลืนแสงของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มีความยาวคลื่นสูงสุด 530 นาโนเมตร ซึ่งค่าตรงกับสารกลุ่มเดียวกับโปรดิจินิน (Prodiginines) หรือสารที่คล้ายโปรดิจิโอซิน (Prodigiosin-like) [24], [25] และได้ตรวจสอบข้อมูลที่มีรายงานของสารกลุ่มนี้ในสปีชี่ *S. spectabilis* พบว่า มีรายงานการศึกษาสารสีกลุ่มโปรดิจินินของแอคติโนแบคทีเรียน้อยมาก [4] และได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR เพิ่ม (1H-NMR, 13C-NMR และ 2D เทคนิคอื่น) พบว่า ตรงกับสารชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างคล้ายโปรดิโอซิน มีชื่อว่า 4'-Methoxy-5'-[(1"-nonyl-5"-propyl-4" -cycle-1-penten-3"-imino)-methyl]-2,2'-bi-1H-pyrrole และได้ยืนยันหมู่ฟังก์ชันซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในโครงสร้างทางเคมีด้วยด้วยเทคนิค FTIR ได้ผลสอดคล้องกับงานวิจัย Valente และคณะ [22] และได้ยืนยันโครงสร้างทางเคมีมวลโมเลกุลด้วยเทคนิค ESI-MSHR มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 421 ตรงกับสูตรโมเลกุลดังนี้ $C_{27}H_{39}N_{3O}$ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Valente และคณะเช่นกัน [22] และได้ตรวจสอบโครงสร้างจากฐานข้อมูล ScienceFinder พบว่า ในสปีชี่ *S. spectabilis* ยังไม่มีการพบสารชนิดนี้มาก่อน ดังนั้นสารที่แยกได้จากแอคติโนแบคทีเรีย B7 จึงเป็นเป็นสารชนิดใหม่ใน *S. spectabilis* นอกจากนี้ได้นำกลุ่มย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยเทคนิค DPPH Assay ในการเลือกเทคนิคนี้เนื่องจากสารสกัดสามารถละลายเอทานอลได้ดีและเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยม มีความน่าเชื่อถือ ทดสอบง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูง ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (รูปที่ 8) พบว่า กลุ่ม 2 ซึ่งเป็นกลุ่มสารสีชมพู แสดงฤทธิ์ดีที่สุดมีค่าผลการยับยั้งที่ร้อยละ 127.80 ± 0.02 และสารสกัดหยาบ แสดงฤทธิ์ดีมีค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 87.85 ± 0.01 ที่ความเข้มข้น 1.0 มก./ มล. โดยที่ Trolox ซึ่งเป็น Positive Control มีค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 95.65 ± 0.01 ที่ความเข้มข้น 0.10 มก./มล. ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีมาก สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปศึกษาเชิงลึกในการต่อยอดเพื่อประยุกต์สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสีชมพูเป็นจุดเด่นต่อไป เช่น ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่เน้นมีฤทธิ์ชีวภาพ

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณบูรณาการการวิจัยและนวัตกรรมสนับสนุน จากมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 (สัญญารับทุนเลขที่ RDI-1-63-3)

เอกสารอ้างอิง

[1] A. Lazzarini, L. Cavaletti, G. Toppo and F. Marinelli, “Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 78, pp. 399–405, 2000.

[2] N. R. Williamson, P. C. Fineran, T. Gristwood, F. J. Leeper, and G. P. Salmond, “The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 4, no. 12, pp. 887–899, 2006.

[3] L. I. Meng xi, H. B. Huang, J. Y. Long, C. A. O. Jing Xiao, and Z. W. Zhang, “Antibacterial performance of a *Streptomyces spectabilis* strain producing metacycloprodigiosin,” *Current Microbiology*, vol. 78, pp. 2569–2576, 2021.

[4] N. R. Williamson, P. C. Fineran, T. Gristwood, F. J. Leeper, and G. P. Salmond, “The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 4, no. 12, pp. 887–899, 2006.

[5] A. H. Faraag, A. I. El-Batal, and H. H. El-Hendawy, "Characterization of prodigiosin produced by Serratia marcescens strain isolated from irrigation water in Egypt," *Nature and Science*, vol. 15, no. 5, pp. 55–68, 2017.

[6] M. Assia, A. Hasnaa, M. Sara, M. Jamal, and M. Mohammed, "Physico-chemical characterization of a pink red-like pigments produced by five new bacterial soil strains identified as Streptomyces coelicoflavus," *American Journal of Microbiological Research*, vol. 6, no. 3, pp. 67–72, 2018.

[7] T. Kawasaki, F. Sakurai, and Y. Hayakawa, "A Prodigiosin from the Roseophilin Producer Streptomyces griseoviridis," *Journal of Natural Products*, vol. 71, pp. 1265–1267, 2008.

[8] D. Kim, J. S. Lee, Y. K. Park, J. F. Kim, H. Jeong, T. K. Oh, B. S. Kim, and C. H. Lee, "Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium Hahella chejuensis KCTC 2396", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 102, pp. 937–944, 2007.

[9] N. Starič, T. Danevčič, and D. Stopar, "Vibrio sp. DSM 14379 pigment production-a competitive advantage in the environment," *Microbial Ecology*, vol. 60, pp. 592–598, 2010.

[10] V. L. Yu, "Serratia marcescens - historical perspective and clinical Review," *New England Journal of Medicine*, vol. 300, no. 16, pp. 887 893, 1979.

[11] N. R. Williamson, P. C. Fineran, T. Gristwood, S. R. Chawrai, F. J. Leeper, and G. P. Salmond, "Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines," *Future Microbiol*, vol. 2, no. 6, pp. 605–618, 2007.

[12] K. V. Arivizhivendhan, M. Mahesh, R. Boopathy, S. Swarnalatha, R. Regina Mary, and G. Sekaran, "Antioxidant and antimicrobial activity of bioactive prodigiosin produces from Serratia marcescens using agricultural waste as a substrate," *The Journal of Food Science and Technology*, vol. 55, no.7, pp. 2661–2670, 2018.

[13] E. Hacene, "Effect of prodigiosin from Serratia marcesccens BR1 strain as an antioxidant, antimicrobial, and in vivo wound healing," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 13, no. 10, pp. 175–179, 2020.

[14] G. Berg, "Diversity of antifungal and plant-associated Serratia plymuthica strains," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 88, pp. 952–960, 2000.

[15] S. S. Habash, H. U. C. Brass, A. S. Klein, D. P. Klebl, T. M. Weber, T. Classen, J. Pietruszka, F. M. W. Grundler, and A. S. S. Schleker, "Novel prodiginine derivatives demonstrate bioactivities on plants, nematodes, and fungi," *Frontiers in Plant Science*, vol. 11, pp. 1–11, 2020.

[16] A. J. Castro, "Antimalarial activity of prodigiosin," *Nature*, vol. 213, no. 5079, pp. 903–904, 1967.

[17] C. K. Venil and P. Lakshmanaperumalsamy, "An insight overview on microbial pigment, prodigiosin," *Electronic Journal of Biology*, vol. 5, no. 3, pp. 49–61, 2009.

[18] A. L. Staley and K. L. Rinehart, "Ectomycins, new antibacterial compounds produced by *Streptomyces spectabilis*: Isolation, structures, and biosynthesis," *The Journal of Antibiotics*, vol. 47, no. 12, pp. 1425–1433, 1994.

[19] Z. K. Guoa, R. Wang, F. X. Chen, T. M. Liu, M. Q. Yang, "Bioactive aromatic metabolites from the sea urchin-derived actinomycete *Streptomyces spectabilis* Strain HDa1," *Phytochemistry Letters*, vol. 25, pp. 132–135, 2018.

[20] N. Thurnkul and N. Huanratuek, "Isolation of actinomycetes from termite mound in srisatchanalai district sukhothai province for sillk fiber dyeing," *PSRU Journal of Science and Technology*, vol, 2, no. 3, pp. 1–8, 2017 (in Thai).

[21] A. Braca, C. Sortino, M. Politi, I. Morelli, and J. Mendez, "Antioxidant activity of flavonoids from licania licaniaeflora," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 79, no. 3, pp. 379–381, 2002.

[22] A. M. M. P. Valente, E. F. Boffo, and A. G. Ferreira. "Complete NMR assignments of a new prodigiosin isolated from Streptomyces violaccusniger violaccusniger," *Annals of Magnetic Resonance*, vol. 7, no. 2/3, pp. 44–54, 2008.

[23] S .K. Holkar, D. N. Begde, N. A. Nashikkar, T. A. Kadam, and A. A. Upadhyay, "Optimization of some culture conditions for improved biomass and antibiotic production by *Streptomyces Spectabilis* Isolated from soil," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 4, no. 8, pp. 2980–2987, 2013.

[24] N. N. Gerber, "Prodigiosin-like pigments from *Actinomadura (Nocardia) pelletieri* and *Actinomadura Madurae*," *Applied Microbiology*, vol. 18, no. 1, pp. 1–3, 1969.

[25] J. C. L. Lapenda, V. P. Alves, M. L. Adam, M. D. Rodrigues, and S. C. Nascimento, "Cytotoxic effect of prodigiosin, natural red pigment, isolated from Serratia marcescens UFPEDA 398," *Indian J Microbiol*, vol. 60, no. 2, pp. 182–195, 2020.