ผลของ Pseudoceratidine และอนุพันธ์ต่อการเกาะติดของเพรียง และฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

Effects of Pseudoceratidine and Its Derivatives on Setting of Barnacle and Antimicrobial Activity

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปีงบประมาณ 2551

ผู้วิจัย

รศ. ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์

Assoc. Prof. Dr. Theerawat Mongkolaussavaratana

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

RCH
QL
A44
.C58
ธ๗๖ผ

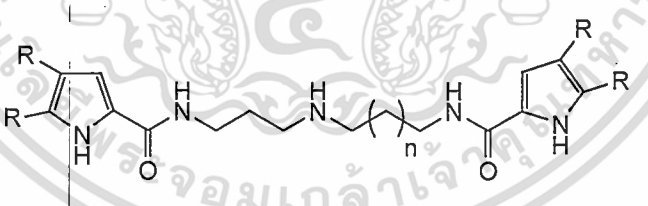
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....120316 ฉ.1
วัน, เดือน, ปี.....15 ก.พ. 2555

b.12324115
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

สารป้องกันการเกาะติดของเพรียงได้ถูกใช้ผสมในสีสำหรับทาเคลือบผิวเรือ อุปกรณ์ของระบบที่ติดตั้ง และส่วนต่าง ๆ ของเรือ จากรายงานพบว่า สารป้องกันการเกาะติดของเพรียงมีส่วนผสมของสารออร์กาโนสแตนเนนซึ่งเป็นสารที่มีผลกระทบและเป็นสาเหตุการตายของสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง และรวมทั้งสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ในปัจจุบันมีความพยายามหลีกเลี่ยงอันตรายที่เป็นผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากส่วนผสมของสารป้องกันการเกาะติดของเพรียง Pseudoceratidine **1** สามารถแยกได้จากฟองน้ำทะเล *Pseudoceratina Purpurea* และแสดงฤทธิ์การยับยั้งการเกาะติดของตัวอ่อนเพรียงทะเล (*Balanus Amphitrite*) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้เป็นสารผสมในสีแทนดีบุก งานวิจัยนี้ได้นำเสนอการสังเคราะห์ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง ซึ่งสามารถสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ได้ 65, 68 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับวิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเกาะติดของเพรียงได้ทำการทดสอบกับเพรียงหิน (*Balanus* sp.) โดยทำการแช่ตัวอ่อนของเพรียงหินลงในสารละลายของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** ยับยั้งการเกาะติดของตัวอ่อนเพรียงหินมีโดยมีค่า LC_{50} 17, 24 และ 19 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* พบว่าสาร Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อระดับต่ำ



1: n = 2, R = Br

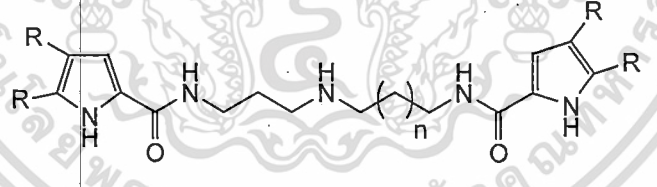
69: n = 2, R = H

82: n = 1, R = Br

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Antifouling agents are widely used as paint additives for ship hulls, power plant cooling systems, and other marine facilities. It has been reported that most antifouling paint is based on organostannanes, which apart from being lethal towards invertebrate marine organisms as intended, are also suspected to be poisonous to higher vertebrates. Therefore, at present much effort is being put into alternative antifouling agents devoid of such side effects. Pseudoceratidine **1** was isolated from the marine sponge *Pseudoceratina Purpurea* and exhibits a significant antifouling activity against *Balanus amphitrite* larvae and might be a useful alternative to stannanes. Here we describe our syntheses of pseudoceratidine **1** and its derivatives **68** and **82** using a solid-phase technique that achieved 65, 68 and 70% yields. As for an antifouling assay, the synthetic products were prepared as aqueous solutions and then were utilized in an antifouling assay by soaking rock barnacles (*Balanus* sp.) in the solutions for 48 h. The data indicated that compounds **1, 69** and **82** inhibited larval settlement of the rock barnacles with LC_{50} values 17, 24 and 19 mg/L, respectively. Furthermore, the compounds **1**, **69**, and **82** were also tested on antimicrobial against *Staphylococcus aureus* and the results showed that these compounds had low activity.



1: n = 2, R = Br

69: n = 2, R = H

82: n = 1, R = Br

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามความตั้งใจในระดับหนึ่งด้วยการสนับสนุนเงินทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ งบประมาณปี 2551 ที่พิจารณาเห็นคุณค่าของงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณผู้ร่วมงานวิจัย รศ.ดร. สมชาย หวังวิบูลย์กิจ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำให้ความรู้และความอนุเคราะห์การทดสอบสารสังเคราะห์ต่อการเกาะติดของเพรียงทะเล

ขอขอบคุณผู้ร่วมงานวิจัย รศ.ดร. นันทนา อรุณฤกษ์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำให้ความรู้และความอนุเคราะห์การทดสอบสารสังเคราะห์ต่อเชื้อจุลินทรีย์

ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย ดร. บดินทร์ ชิตกุล และ ผศ.ดร. พัชนี เจริญยิ่ง กับการทำงานนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้อความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้

ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
รายการคำย่อ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 เพรียง	4
2.2 ผลของสารธรรมชาติกับการเกาะติดของเพรียง	5
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	19
3.1 สารเคมี	19
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	20
3.3 การทดลองทั่วไป	21
3.4 การสังเคราะห์ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง	22
3.5 การใส่หมู่ป้องกันของสารต้นแบบ **67**	25
3.6 การใส่หมู่ป้องกันของสารต้นแบบ **68**	26
3.7 การสังเคราะห์ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง	27
3.8 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pseudoceratidine **82** โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง	36
3.9 วิธีการดำเนินการทดสอบฤทธิ์ของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** กับเพรียงหิน	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.10 การทดสอบความเข้มข้นของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** ต่อการเกาะติดของเพรียงหิน	44
3.11 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย	46
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	48
4.1 การสังเคราะห์ Pseudoceratidine **1** โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง	48
4.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ N^1,N^8-di(2-pyrroyl)amide spermidine **69**	49
4.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ N^1,N^8-di(4,5-dibromo-2-pyrrolyl)amide Norspermidine **82**	51
4.4 ความเป็นพิษของสาร **82** ต่อเพรียงหินที่ 48 ชั่วโมง	52
4.5 ความเป็นพิษของสาร **1** ต่อเพรียงหินที่ 48 ชั่วโมง	53
4.6 ความเป็นพิษของสาร **69** ต่อเพรียงหินที่ 48 ชั่วโมง	54
4.7 การทดสอบความเข้มข้นของสาร **82** **1** และ **69** ต่อการเกาะติดของเพรียงหิน	55
4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์	60
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	62
5.1 การสังเคราะห์ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **82** และ **69**	62
5.2 ความเป็นพิษต่อการตายของเพรียงหิน	62
5.3 ฤทธิ์ต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์	62
เอกสารอ้างอิง	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกาะติดของเพรียง	6
2.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารต่อการต้านแบคทีเรีย 5 ชนิด ที่ความเข้มต่ำ (MIC)	13
2.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่แยกได้จากฟองน้ำ *P. purpurea*	13
2.4 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารพอลิเอมีน (μg/mL) ที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์	15
4.1 แสดงค่า δ ^{1}H และ ^{13}C NMR ของ Pseudoceratidine **1**	49
4.2 แสดงค่า δ ^{1}H และ ^{13}C NMR ของอนุพันธ์ N^{1},N^{9}-di(2-pyrroyl)amide spermidine **69**	50
4.3 แสดงค่า δ ^{1}H และ ^{13}C NMR ของอนุพันธ์ N^{1},N^{9}-di(4,5-dibromo-2-pyrrolyl)amide norspermidine **82**	52
4.4 เปอร์เซ็นต์การตายของเพรียงหินในสาร **82** ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	52
4.5 เปอร์เซ็นต์การตายของเพรียงหินในสาร **1** ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	53
4.6 เปอร์เซ็นต์การตายของเพรียงหินในสาร **69** ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	54
4.7 เปอร์เซ็นต์การเกาะของเพรียงหินที่ใช้วิธีการแช่สารละลายสาร **82 1** และ **69**	56
4.8 เปอร์เซ็นต์การเกาะของเพรียงหินที่ใช้วิธีสเปรย์สารละลาย **82 1** และ **69**	58
4.9 ปัจจัยคุณภาพน้ำในการทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย **82** ต่อเพรียงหินด้วยวิธีการแช่และสเปรย์สารละลาย	58
4.10 ปัจจัยคุณภาพน้ำในการทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย **1** ต่อเพรียงหินด้วยวิธีการแช่และสเปรย์สารละลาย	59
4.11 ปัจจัยคุณภาพน้ำในการทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย **69** ต่อเพรียงหินด้วยวิธีการแช่และสเปรย์สารละลาย	59
4.12 แสดงค่า MIC ของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82**	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 เพรียงหินที่เกาะอยู่ตามธรรมชาติ	4
2.2 การเกาะของเพรียงหินบริเวณผิวหน้าของเรือ	5
2.3 โครงสร้างของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกาะติด	9
3.1 เพรียงหินที่รวบรวมได้จากธรรมชาติเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง	42
3.2 การเลี้ยงดีโตซีรอส (*Chaetoceros* sp.) สำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเพรียงหิน	43
3.3 เพรียงหินที่ได้จากการเพาะเลี้ยง	43
3.4 สารละลายตั้งต้นของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **82** และ **69**	44
3.5 การเตรียมแผ่นพลาสติกใสสำหรับให้เพรียงหินยึดเกาะ	45
3.6 แผ่นพลาสติกใสทำความสะอาดหลังการทดลองเพื่อตรวจนับ	45
3.7 ตรวจนับจำนวนเพรียงหินหลังจากการทดลอง	45
4.1 เปอร์เซ็นต์การตายของเพรียงหินในสาร **82** ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	53
4.2 เปอร์เซ็นต์การตายของเพรียงหินในสาร **1** ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	54
4.3 เปอร์เซ็นต์การตายของเพรียงหินในสาร **69** ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	55
4.4 การเกาะของเพรียงหินที่ความเข้มข้นของสารละลาย ที่ความเข้มข้น 0 ppm	56
4.5 การเกาะของเพรียงหินที่ความเข้มข้นของสารละลาย ที่ความเข้มข้น 10 ppm	56
4.6 การเกาะของเพรียงหินที่ความเข้มข้นของสารละลาย ที่ความเข้มข้น 20 ppm	57
4.7 การเกาะของเพรียงหินที่ความเข้มข้นของสารละลาย ที่ความเข้มข้น 30 ppm	57
4.8 การเกาะของเพรียงหินที่ความเข้มข้นของสารละลาย ที่ความเข้มข้น 40 ppm	57
4.9 การเกาะของเพรียงหินที่ความเข้มข้นของสารละลาย ที่ความเข้มข้น 50 ppm	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อ

^{13}C NMR	Carbon Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
^{1}H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
LC_{50}	Lethal concentration 50
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
ppm	part per million
R_f	Retention factor
rt	room temperature
TLC	Thin Layer Chromatography
TMS	Tetramethylsilane

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของงานวิจัย

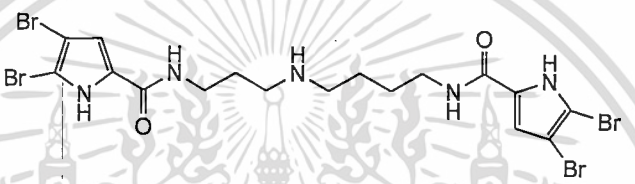
เพรียง (Barnacle) มีโครงสร้างภายนอกเป็นแผ่นหินปูนคลุมลำตัว เช่น เพรียงหิน (acorn barnacle) มีลักษณะลำตัวอ่อนนุ่มอยู่ในเปลือกแข็ง เป็นแผ่นประกบรูปกรวยคว่ำ เกาะติดอยู่บนหิน เปลือกหอย หรือวัตถุอื่นๆ ที่จมน้ำ เช่น ก้อนหิน บริเวณเรือ ท่าเทียบเรือ ตลอดจนสิ่งมีชีวิตที่ยึดเกาะอยู่กับที่ เพรียงคอห่าน (stalked barnacle) จะมีก้าน (stalk) เป็นเนื้อนุ่มสีน้ำตาลเกาะติดอยู่บนพื้น ลำตัวจะประกอบด้วยส่วนหัวที่หุ้มด้วยเปลือกแข็งสีเทาปนขาว มักพบอยู่รวมกันเป็นกลุ่มหนาแน่นบริเวณหาดหิน ปัจจุบันพบว่าเพรียงเป็นต้นเหตุในการก่อปัญหาให้กับอุตสาหกรรมการเดินเรือและชาวประมงเป็นอย่างมาก เนื่องจากการเกาะติดของเพรียงที่บริเวณผิวท้องเรือหรือส่วนต่าง ๆ ของเรือจะทำให้บริเวณนั้นเกิดการผุกร่อนขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าปกติ เมื่อเพรียงตายเศษเปลือกของเพรียงจะยังคงเกาะติดอยู่มีลักษณะเป็นก้อนแข็ง ชาวประมงต้องกำจัดเศษเปลือกออกก่อนทาสีเรือใหม่ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองงบประมาณและแรงงานมาก หนทางแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นนี้ในอดีตจนถึงปัจจุบันคือ การใช้สีทาเคลือบผิวเรือ แต่พบว่าสีที่นิยมใช้กันนั้นมีส่วนผสมของ ไตรบิวทิลทิน ซึ่งมีโลหะหนักคือ ดีบุก เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ จากรายงานพบว่าการใช้สีที่มีส่วนผสมของไตรบิวทิลทินนั้นส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทางทะเลเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากการชะของน้ำทะเลเป็นเวลานานต่อเนื่องก่อให้เกิดมลพิษขึ้น และส่งผลกระทบต่อวงจรชีวิตของสัตว์ทะเลชนิดอื่นและมนุษย์ ในปี 1990 The International Maritime Organization (IMO) ได้พิจารณาเห็นถึงมลพิษที่เกิดขึ้นจึงได้ออกข้อกำหนดในการใช้ไตรบิวทิลทิน ผสมในสี และในปี 2001 จึงเริ่มออกคำสั่งในการห้ามใช้อย่างเด็ดขาด

ด้วยตระหนักถึงพิษภัยและอันตรายที่เกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีที่มีส่วนประกอบของไตรบิวทิวทิน เป็นส่วนผมในสีดังกล่าว นักวิจัยจากนานาประเทศจึงได้พยายามค้นคว้าและพัฒนาสารเคมีเพื่อนำมาใช้ทดแทนไตรบิวทิลทิน ในปี 1987 จึงได้เริ่มมีการศึกษาอย่างจริงจังในเรื่องของการเลือกสารเคมีที่จะนำมาใช้เป็นส่วนผสมและให้ฤทธิ์ที่ใกล้เคียงหรือดีกว่าเดิม วิธีในการสังเคราะห์ การพัฒนาสูตรและการนำมาทดสอบกับสิ่งแวดล้อมจริง สารทดแทนไตรบิวทิลทิน มีชื่อว่า NB17 จากผลการทดลองโดยการนับจำนวนตัวอ่อนของเพรียงทะเลที่มาเกาะที่ผิวของพื้นที่ทดสอบที่เคลือบด้วยสีที่ผสมด้วย NB17 พบว่าตัวอ่อนของเพียงทะเลมาเกาะลดลง เมื่อใช้ความเข้มข้นของ NB17 เพิ่มมากขึ้น (โดยเฉลี่ยจะใช้ NB17 0.1 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักของสี 1 กรัม) นอกจากนั้นจากการทดลองนี้ยังพบว่า สีชนิดนี้จะมีผลลดการเกาะติดของตัวอ่อนของเพรียงทะเลแต่ไม่ได้ส่งผลให้เพรียงทะเลนั้นตายลง และในปี 1998 จึงเริ่มมีการใช้ NB 17 เป็นสารทดแทนไตรบิวทิลทินผสมลงในสีและเริ่มมีการใช้กันอย่างกว้างขวาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนั้นยังมีการวิจัยสารเคมีที่มีโครงสร้างและฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะติดของเพรียงทะเลใกล้เคียงกับ NB17

จากแนวความคิด Copping ที่ว่าสารชีวภาพเป็นสารที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมากกว่า [1] นักวิจัยจึงหาแนวทางที่จะหาสารชีวภาพมาใช้ทดแทนสารสังเคราะห์ Fusetani ได้ทำการสกัดแยกสารในชั้นเมทานอลที่มีชื่อว่า Pseudoceratidine **1** จากฟองน้ำทะเล *Pseudoceratina purpurea*[2] ซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วยสายโซ่พอลิเอมีน จากผลการทดสอบพบว่า Pseudoceratidine **1** สามารถยับยั้งการเกาะติดของเพรียงทะเล (*Balanus amphitrite*) โดยมีค่า ED_{50} ที่ดีที่สุดเมื่อใช้ Pseudoceratidine 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าเมื่อใช้ Pseudoceratidine **1** เพิ่มมากขึ้นถึง 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะสามารถฆ่าเพรียงทะเลได้



1 Pseudoceratidine

จากงานวิจัยที่จะทำต่อยอดในที่นี้คือ คณะผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์โดยเทคนิควัฏภาคของแข็งพบว่าได้เปอร์เซ็นต์สารผลิตภัณฑ์ที่ดีกว่าการสังเคราะห์โดยเทคนิควัฏภาคสารละลาย กรรมวิธีในการสังเคราะห์สะดวกกว่าโดยเฉพาะสามารถลดขั้นตอนและเวลาในการแยกสารผลิตภัณฑ์ในแต่ละขั้นตอนให้บริสุทธิ์ได้ง่าย จากเหตุผลนี้จึงมีแนวความคิดที่จะนำสารสังเคราะห์นี้มาทำการทดสอบกับเพรียงหินโดยจะทำการทดสอบความเป็นพิษของ Pseudoceratidine **1** ต่อเพรียงหินโดยวิธีการเติมสารลงในน้ำ วิธีการสเปรย์ และตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำตามวิธีของ APHA[3,4] นอกจากนั้นจะนำสารสังเคราะห์ทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ ว่าเมื่อมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างแล้วนั้นจะทำให้มีฤทธิ์ที่ดีกว่ากันหรือไม่

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อเป็นการทดสอบฤทธิ์ของ Pseudoceratidine และอนุพันธ์ต่อการเกาะติดของเพรียงหิน
2. เพื่อเป็นการทดสอบฤทธิ์ของ Pseudoceratidine และอนุพันธ์ต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์
3. เพื่อเป็นการเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของ Pseudoceratidine และอนุพันธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์ Pseudoceratidine และอนุพันธ์ โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง
2. ทำการทดสอบฤทธิ์ของ Pseudoceratidine และอนุพันธ์ ต่อการเกาะติดของเพรียงหิน
   -ศึกษาระดับความเป็นพิษของ Pseudoceratidine และอนุพันธ์ ต่อการตายของเพรียงหินที่ 48 ชั่วโมง
   - ศึกษาระดับความเข้มข้นของ Pseudoceratidine และอนุพันธ์ ต่อการเกาะติดของเพรียงหิน
3. ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของ Pseudoceratidine และอนุพันธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เพรียง

เพรียง (barnacle) มีโครงสร้างภายนอกเป็นแผ่นหินปูนคลุมลำตัว เช่น เพรียงหิน (acorn barnacle) มีลักษณะลำตัวอ่อนนุ่มอยู่ในเปลือกแข็ง เป็นแผ่นประกบรูปกรวยคว่ำ เกาะติดอยู่บนหิน เปลือกหอย หรือวัตถุอื่นๆ ที่จมน้ำ เช่น ก้อนหิน บริเวณเรือ ท่าเทียบเรือ ตลอดจนสิ่งมีชีวิตที่ยึดเกาะอยู่กับที่ เพรียงคอห่าน (stalked barnacle) จะมีก้าน (stalk) เป็นเนื้อนุ่มสีน้ำตาลเกาะติดอยู่บนพื้น ลำตัวจะประกอบด้วยส่วนหัวที่หุ้มด้วยเปลือกแข็งสีเทาปนขาว มักพบอยู่รวมกันเป็นกลุ่มหนาแน่นบริเวณหาดหิน ตัวอ่อนของเพรียงจะมีการพัฒนาระยะนอเพลียส (nauplius stage) 6 ระยะ และระยะไซปรีส (cypris stage) 1 ระยะ ก่อนลงเกาะกับวัสดุและเติบโตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งอัตรารอดของเพรียงขึ้นอยู่กับปัจจัยสภาพแวดล้อม เช่น วัสดุที่ลงเกาะ[5] ชนิดอาหาร อุณหภูมิ[6,7] และความเค็ม โดย Tindle และคณะ[8] พบว่า ความเค็มที่ต่ำกว่า 20 ส่วนในพัน หรือสูงกว่า 50 ส่วนในพัน จะมีผลทำให้เพรียงระยะวัยอ่อนตาย 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สารบางชนิดก็ยังมีผลต่ออัตรารอดของเพรียง[9]ได้ประเมินผลของคอปเปอร์ (Cu) ต่อการพัฒนาตัวอ่อนของเพรียง พบว่า ความเข้มข้นของคอปเปอร์ 32 และ 128 ไมโครกรัมต่อลิตร จะมีผลต่อการลอกคราบของตัวอ่อนนอเพลียสระยะ 1 และ 2 ตามลำดับ เมื่อทดสอบ LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมง พบว่า LC_{50} ของนอเพลียสระยะ 1 มีความเข้มข้นของคอปเปอร์ 145 ไมโครกรัมต่อลิตร และ LC_{50} ของนอเพลียสระยะ 6 ที่ความเข้มข้นของคอปเปอร์ 213 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเพรียงมีความทนทานต่อคอปเปอร์มากขึ้นเมื่อระยะการพัฒนาตัวอ่อนเพิ่มขึ้น

รูปที่ 2.1 เพรียงหินที่เกาะอยู่ตามธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเพรียงตายเศษของเพรียงหินยังจะเกาะอยู่มีลักษณะแข็งชาวประมงจะต้องหาวิธีทางที่จะต้องกำจัดเศษเหล่านี้ออก ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองงบประมาณและแรงงานมาก วิธีการที่มีใช้กันอยู่ในปัจจุบันนี้ก็คือ การใช้สีเคลือบผิวเรือเพื่อป้องกันการเกาะของเพรียงหิน แต่สีที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมมาก เพราะมีส่วนผสมของโลหะหนัก เช่น ดีบุกซึ่งเป็นอันตรายอย่างมาก จากรายงานพบว่าบริเวณที่มีการชะของดีบุกออกจากตัวเรืออย่างต่อเนื่อง ประชากรของปลาดาวจะลดลง และมีการกลายพันธุ์ของสัตว์ทะเล และบางทีได้มีการผสมทองแดง สารกำจัดชีวภาพอินทรีย์ (Organic Booster Biocides) ผสมพอลิเมอร์ (Copolymer) และผสมสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Product) ลงไปในสีเคลือบเรือด้วย[10]

รูปที่ 2.2 การเกาะของเพรียงหินบริเวณผิวหน้าของเรือ

2.2 ผลของสารธรรมชาติกับการเกาะติดของเพรียง

จากแนวความคิดของ Copping[1] ที่กล่าวว่าสารชีวภาพเป็นสารที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม นักวิจัยจึงหาแนวทางที่จะหาสารชีวภาพมาใช้ทดแทนสารสังเคราะห์ จึงได้มีการนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Product) มาผสมลงในสีเคลือบเรือซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะติดของเพรียงทะเลได้ดีและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมในทะเลด้วยซึ่งสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะติดของของเพรียงทะเลเรียกว่า Natural Product Antifoulant ส่วนใหญ่สารประเภทนี้ได้จากสัตว์ทะเล เชื้อจุลินทรีย์ (Microorganism) พืชทะเล และใบพืช เช่น ใบชาเขียว ใบต้นวาซาบิ และใบต้นโอ๊ค เป็นต้น[11] จากการศึกษาได้มีการแบ่งสาร Natural Product Antifoulant ออกเป็น 10 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกาะติดของเพรียง[11]

ชนิดของสารธรรมชาติและแหล่งที่มาจากสิ่งมีชีวิต	
	1.Terpenes
Monoterpenes	1,4-dibromo-2,3,6-trichloro-3,7-dimethyl-7-octene **2**
	temperate red alga
Susquiterpenes	3-acetoxy-*E*-γ-bisabolene **3**
	marine red alga
	isocyanosesquiterepene alcohol (1*S**,4*S**,7*R**,10*S**) 10-isocyano-5-cadinen-4-ol **4**
	nudibranch
	2-hydroxy-9,11-dimethyl-10-methylene-3-oxatricyclo[7.3.10]tridec-5-en-4-one **5**
	palauan marine sponge
Diterpenes	*epi*-agelasine C **6**
	marine sponge
	eleganolone **7**
	common brown alga
	renillafoulins **8**
	Atlantic sea pansy
	Kalihinenes **9** (Kalihinol A)
	Marine sponge
Sesterterpene	22-acetoxy-16β-hydroxy-24-methyl-24-oxoscalarano-25,12β-lactone **10**
	palauan marine sponge

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกาะติดของเพรียง[11]

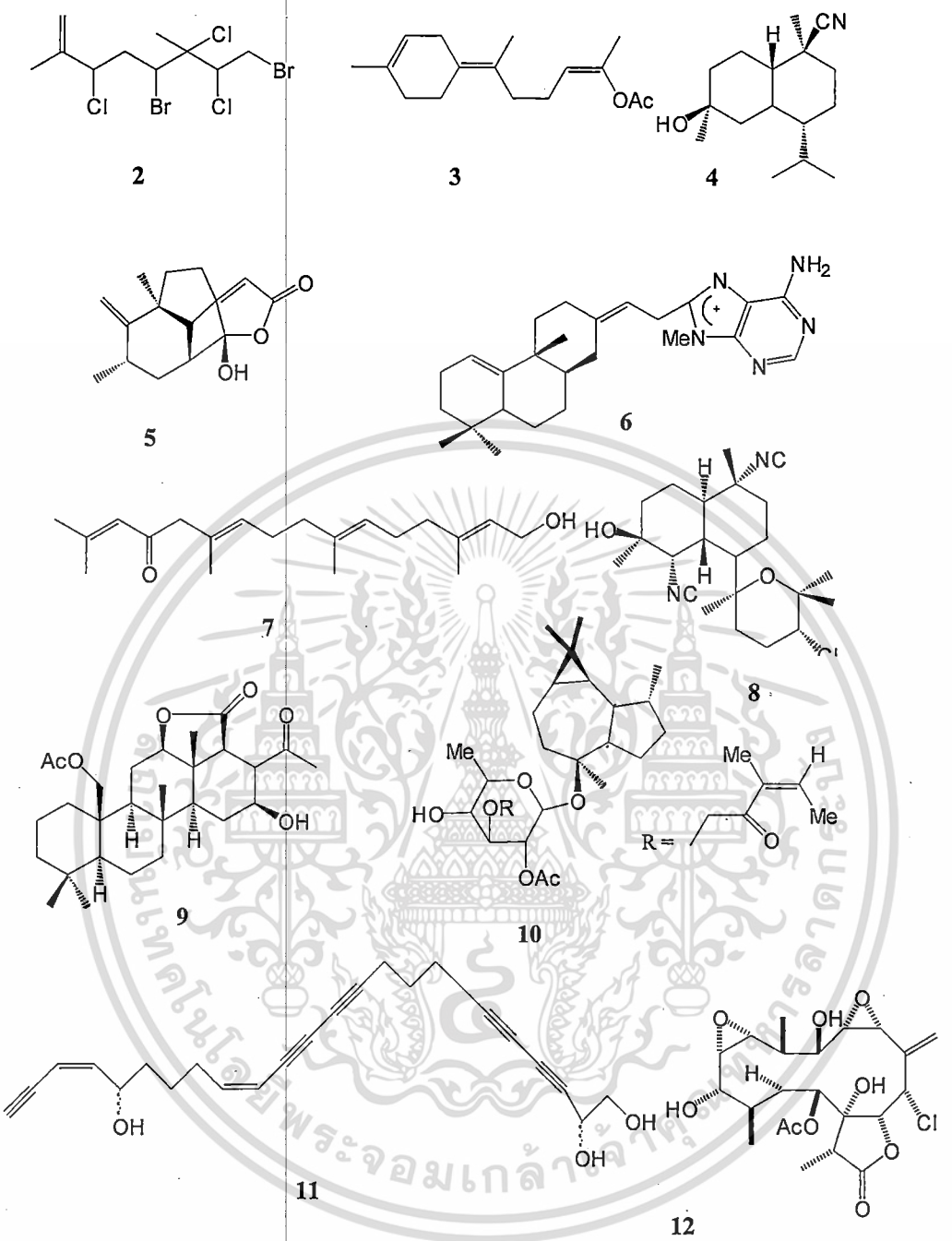
ชนิดของสารธรรมชาติและแหล่งที่มาจากสิ่งมีชีวิต	
	2. Acetylenes
Polyacetylenes	callytetraynetriol **11**
	Marine sponge
	3. Polycyclic Compounds
Selenoide	bis(deacetyl)solenoide D **12**
	marine sponge
	4. Steroids
Epidioxy sterol	5α,8α-epidioxycholest-6-en-3-β-ol **13**
	palauan marine sponge
Seco-steroids	12α-acetoxy-13,17-seco-chlolesta-1,4-diene-3-ones **14**
	octocoral
	3-methoxy-19-norpregna-1,3,5(10),20-tetraene **15**
	octocoral
Steroid lycosides	Δ3β,6α-diydroxysteroidal aglycon **16**
	starfish
	5. Phenols
Tannins	epigallocatechingallate **17**
	green tea
Phloroglucinols	3,5-diformyl phloroglucinols **18**
	blue mussel
Kaempferol Glucopyranoside	kaempferol coumaroylglucopyranoside **19**
	leaves of oak tree
Stilben glucoside	polydatin coumarate **20**
	eucalyptus
Monophenol	capsaicin **21**
	pepper

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกาะติดของเพรียง[11]

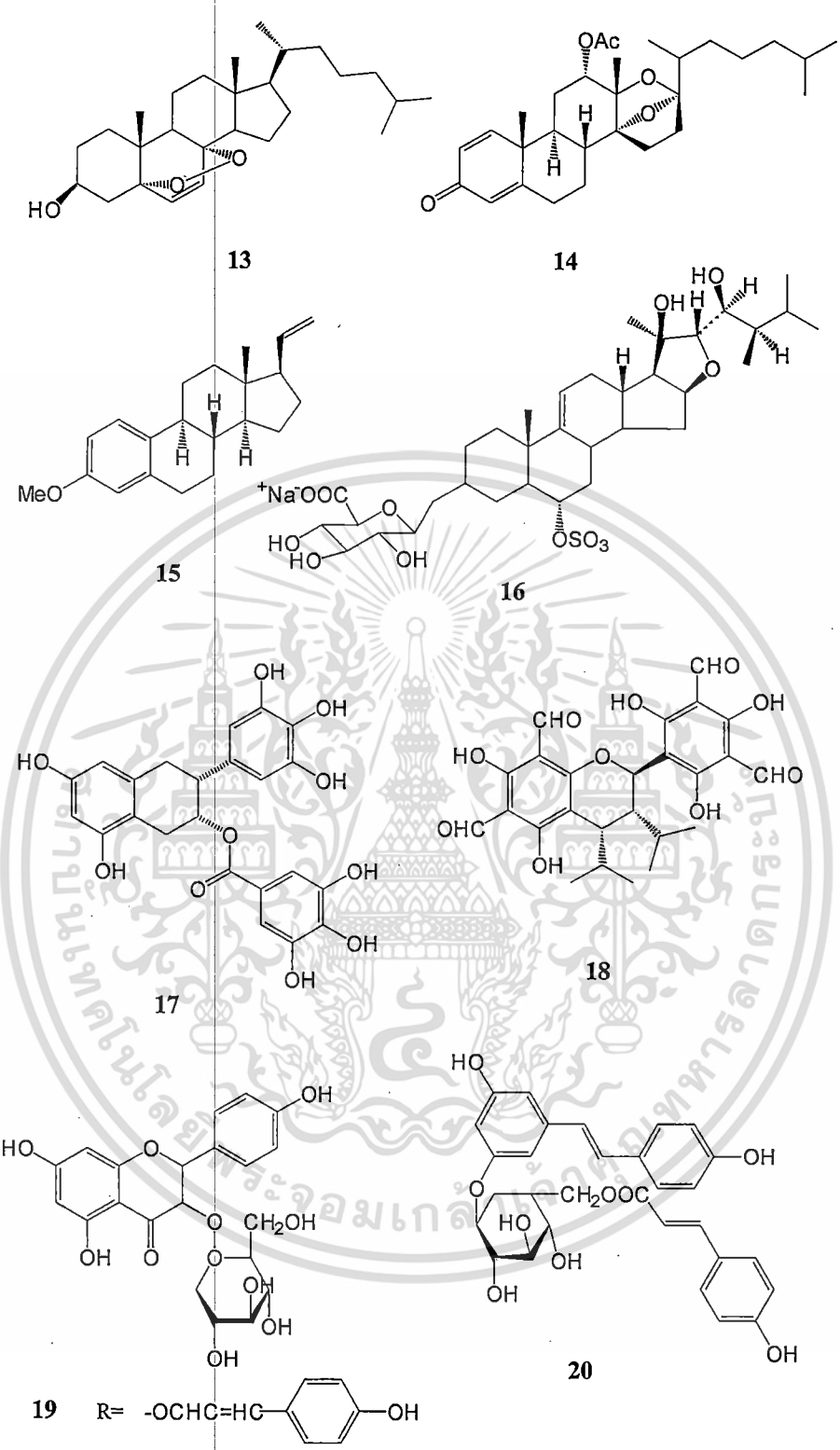
ชนิดของสารธรรมชาติและแหล่งที่มาจากสิ่งมีชีวิต	
	6. Isothiocyanates
Alkyl isothiocyanates	phenylethylisothiocyanate **22**
	wasabi
	7. Nitrogen – Containing Compounds
Pyrroles	pseudoceratidine **1**
	marine sponge
	mauritiamine **23**
	marine sponge
Indoles	2,5,6-tribromo-1-methylgramine **24**
	zoobotryon
Amides	*N*-docosanoyl-D-erthro-(2*R*,3*R*)-16-methyl-
	heptadecasphing-4(*E*)-enine **25**
	Marine sponge
	Nicotinamide **26**
	Mallotus
Carbamates	Ethyl *N*-(2-phenylethyl)carbamate **27**
	Marine bacteria
Primary amines	Ceratinamine **28**
	Marine sponge
	8.Glycerol Derivatives
Glycoylglycerolipids	digalactosyl diacylglycerol **29**
	wakame (sea weed)
	9. Higher Fatty Acids
	Arachidonic acid **30** palamitoleic acid **31**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



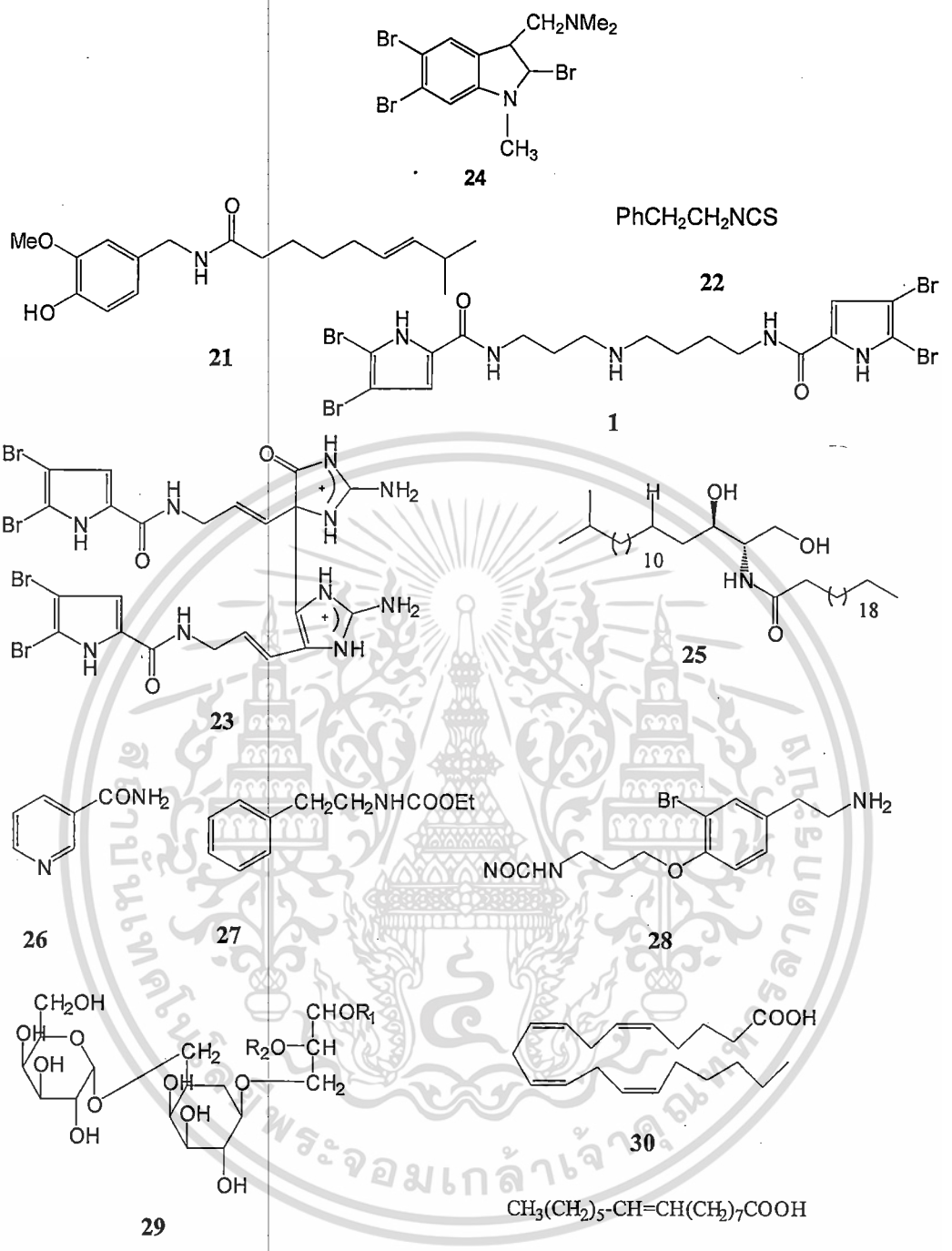
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกาะติด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 (ต่อ) โครงสร้างของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกาะติด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 (ต่อ) โครงสร้างของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกาะติด

จากการศึกษาพบว่าสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกาะติด ออกฤทธิ์หลายทางเช่น ทำให้เกิดการชาหรือทำให้สลบ ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช ยับยั้งการเกาะติดของเพรียงทะเล ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสัตว์และขับไล่สัตว์ที่เป็นศัตรูของพืช และข้อดีอีกอย่างหนึ่งของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกาะติด จะไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมในทะเล ดังนั้นสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

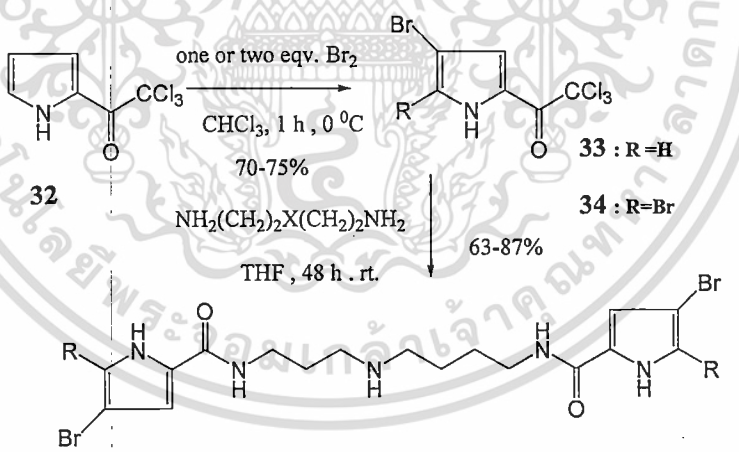
ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกาะติด จึงได้รับความสนใจที่จะทำการศึกษาค้นคว้าและวิจัยต่อไปอีก ซึ่งปัจจุบันนี้วิธีการแก้ไขการเกาะติดของเพรียงทะเลในอุตสาหกรรมการเดินเรือคือจะใช้สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกาะติด ผสมลงในสีเคลือบผิวเรือ ซึ่งเป็นการช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อม ลดต้นทุนในการซ่อมบำรุงเรือ และที่สำคัญปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตในทะเลด้วย

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Fusetani และคณะ[2] ได้ค้นพบ Pseudoceratidine ซึ่งสามารถสกัดได้จากฟองน้ำทะเล *Pseudoceratina purpurea* พบว่า Pseudoceratidine สามารถยับยั้งการเกาะตัวของตัวอ่อนเพรียง *Balanus amphitrite* บริเวณผิวหน้าของเรือ โดยมีค่า ED_{50} 8 μg/ml (ความเข้มข้นของ Pseudoceratidine **1**) ซึ่งหมายความว่า Pseudoceratidine **1** ปริมาณ 8 μg/ml สามารถยับยั้งการเกาะของเพรียงทะเลได้ 50 เปอร์เซ็นต์

Behren และคณะ[12] ได้ทำการสังเคราะห์ Pseudoceratidine จาก 2-trichloroacetylpyrrole โดยทำปฏิกิริยาโบรมิเนชัน หลังจากนั้นทำปฏิกิริยากับสเปอร์มิดีนและยังได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pseudoceratidine ดังแผนภาพที่ 1 พบว่า Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย

แผนภาพที่ 1



1 : R = Br, X= -$CH_2NHCH_2CH_2$ – (Pseudoceratidine)

35 : R = H, X = -$CH_2NHCH_2CH_2$- (5,5'-didebromo pseudoceratidine)

36 : R = Br , X = -CH_2NHCH_2-

37 : R = Br , X = -$NHCH_2CH_2NH$-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารต่อการต้านแบคทีเรีย 5 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่ำ (MIC)

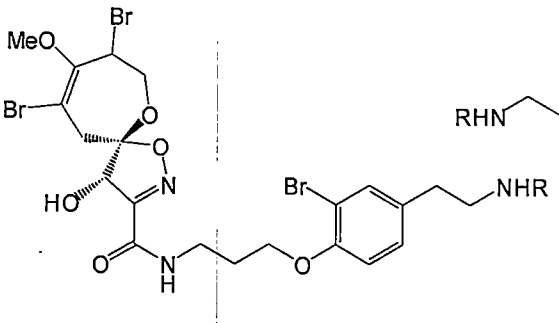
Bacterial species	Temperature, ^{0}C	Media	MIC (μg/mL) ของสาร			
			1	**35**	**36**	**37**
Staphylococcus aureus	37	TSB	5	100	10	50
Listeria monocytogenes	37	TSB	5	250	10	50
Pseudomonas aeruginosa	37	TSB	250	>500	100	>500
Escherichia coli	37	TSB	50	250	50	100
Serratia liquefaciens	25	LB	>500	>500	>500	>500

Fusetani และคณะ[13] ได้ค้นพบ Ceratinamides A และB และอนุพันธ์ Bromotyrosine คือ Psammaplysin A และ B Ceratinamine Moloka'iamine Pseudoceratidine และ 4,5-dibromipyrrole-2-carbamide จากฟองน้ำ *P. purpurea* พบว่าสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการเกาะติดของตัวอ่อนเพรียงทะเล *B. amphitrite* โดยมีค่า ED_{50} ที่ความเข้มข้น 0.10- 8.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถต่อต้าน P388 ที่เป็นเซลล์ murine leulemia โดยมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 3.4-2.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และยังสามารถต่อต้านแบคทีเรีย *Flavobacterium marinotypicum*

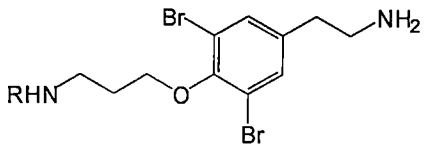
ตารางที่ 2.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่แยกได้จากฟองน้ำ *P. purpurea*

Compounds	Metamorphosis inducing activity on ascidian *Halocynthia roretzi*, ED_{100} (μg/mL)	Antifouling activity against barnacle *B. amphitrite* ED_{50} (μg/mL)	Antibacterial activity against *F. marinotypicum*, halo (mm)	Cytotoxic activity against P388 cell, IC_{50} (μg/mL)
Ceratinamide A	-	0.10	-	>10
Ceratinamide B	-	2.4	-	>10
Psammaplysin A	1.2	0.27	10	>10
Psammaplysin E	-	4.8	-	2.1
Ceratinamine	-	5.0	-	3.4
Moloka'iamine	-	4.3	-	2.1
Pseudoceratidine	-	8.0	15	>10
4,5-Dibromo pyrrole-2-carbamide	25	>30	-	>10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



R



R

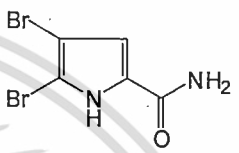
42 : Ceratinamine COCN

43 : Molaka'iamine H

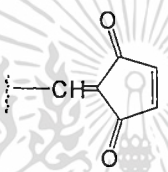
38 : Ceratinamide A CHO

39 : Ceratinamide B $CO(CH_2)_{11}CHMe_2$

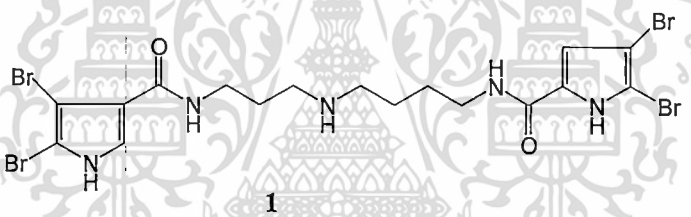
40 : Psammaplysin A H



41: Psammaplysin



44 : 4,5-Dibromopyrrole-2-carbamine

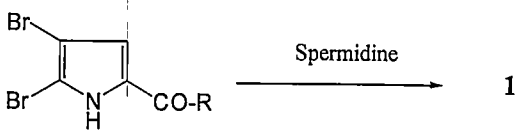


1

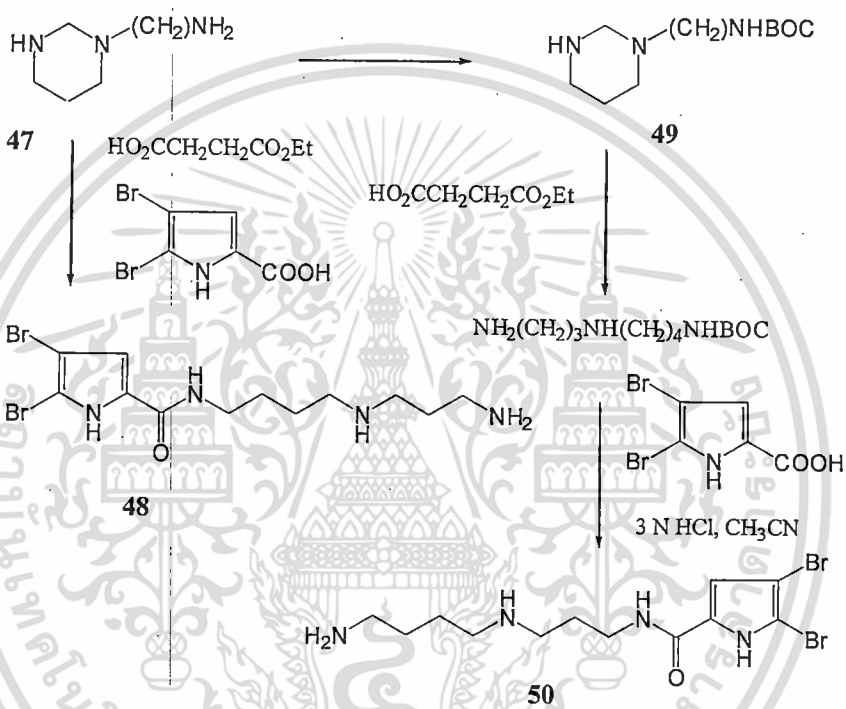
Ganem และคณะ[14] ได้สังเคราะห์ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ของพอลิเอมีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะติดของเพรี่ยงทะเลและยังมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้โดยสังเคราะห์จากปฏิกิริยาระหว่าง 4,5-Dibromopyrrole-2-carboxylic acid ทำปฏิกิริยากับสเปอร์มิดีนได้ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์อีกหลายชนิด ดังแผนภาพที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนภาพที่ 2



45 : R= OH, **46 :** R =

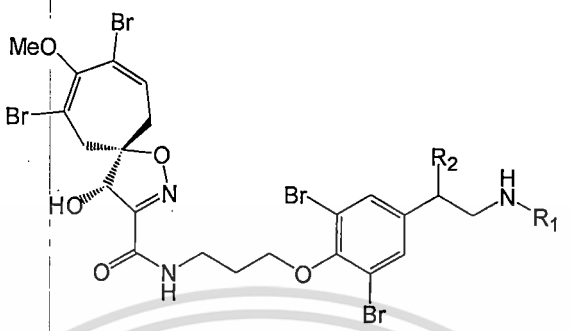


ตารางที่ 2.4 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารพอลิเอมีน (μg/mL) ที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์

Compounds	*S.aureus*	*E.coli*	*P.aeruginosa.*	*C.albicans*
Pseudoceratidine **1**	4	32	128	32
48	64	128	256	128
50	>256	256	>256	>256

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

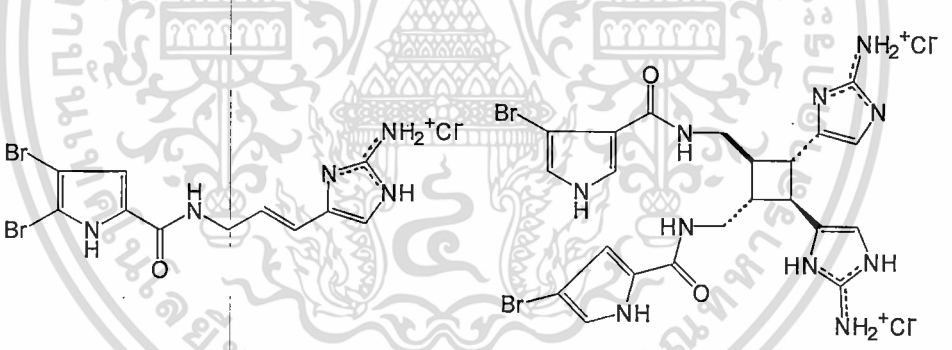
Clardy และคณะ [15] ได้ค้นพบ Psammaplysin A และ B จากฟองน้ำ *Psammaplysilla purpurea* พบว่ามีสารที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านแบคทีเรีย



51 : Psammaplysin – A : R_1 =H, R_2 = H

52 : Psammaplysin – B : R_1 =H, R_2 = OH

Faulkner และคณะ[16] ได้ค้นพบ Oroidin **53** และ Septrin **54** จากฟองน้ำ Caribbean ที่อยู่ในจีนัส *Agelas* โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้



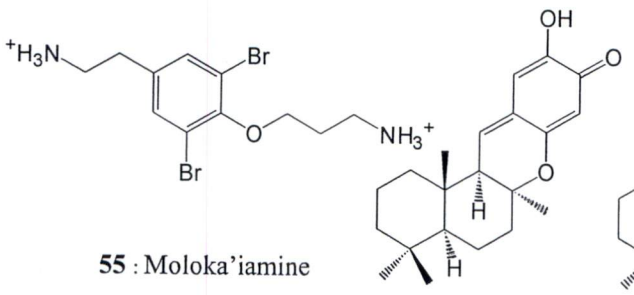
53 : Oroidin

54 : Septrin

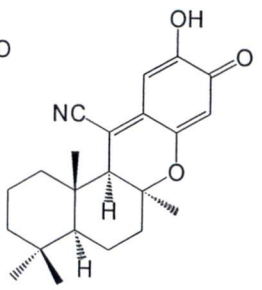
Scheuer และคณะ[17] ได้ค้นพบอนุพันธ์ bromotyramine คือ Molaka'iamine **55** Puupehenone และ อนุพันธ์ของ Puupehenone **56** และ **57** จากฟองน้ำ *Verongid* ตระกูล Aplysinellidae พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านไวรัสและสามารถต้านการเกาะติดของเพรียงทะเลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



55 : Moloka'iamine

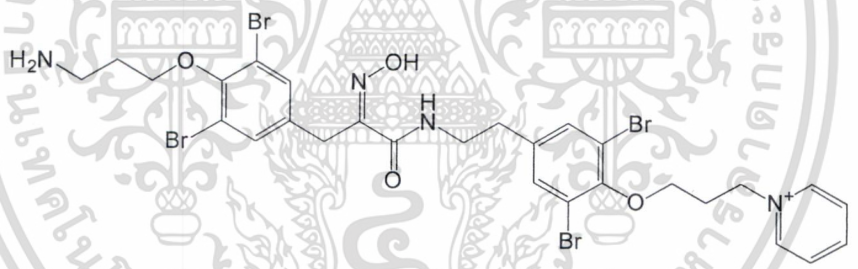


56 : Puupehenol

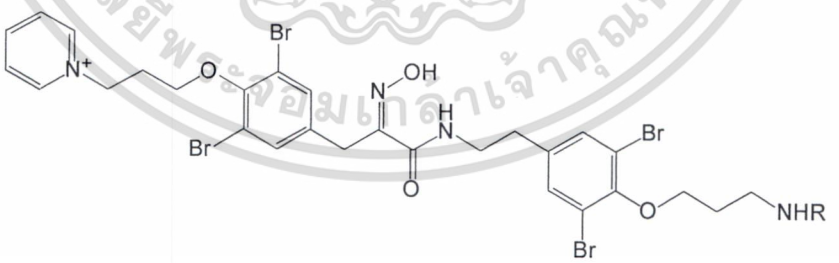
57 : Cyanopuupehenone

Gribble และคณะ[18] ได้ทำการสกัดแยกสาร Pseudoceratidine **1** จากฟองน้ำ *P. purpurea* ซึ่งสามารถยับยั้งการเกาะติดของตัวอ่อนเพรียงได้ดี

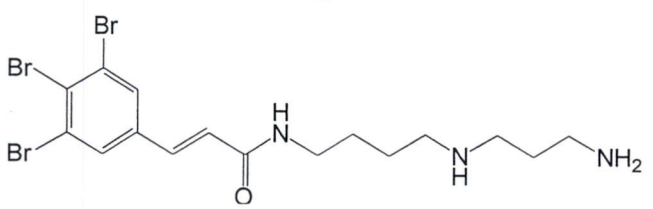
Fusetani และคณะ[2] ได้ทำการแยกฟองน้ำ *P. purpurea* และพบอนุพันธ์ของ Bromotyrosine คือ Tokaradines A **58** B **59** และ C **60** ที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียและยังสามารถยับยั้งการเกาะติดของเพรียงได้ด้วย



58



59

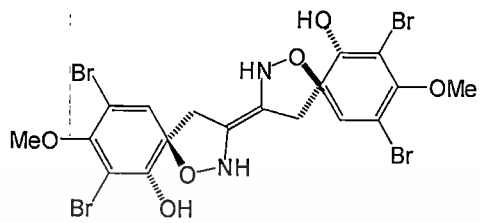


60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

120316

Uermura และคณะ[19] ได้ทำการแยกฟองน้ำ *P. purpurea* ได้ค้นพบอนุพันธ์ Bromotyrosine คือ Zamamistatin **61** พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่อยู่ในทะเล *Rhodospirillum salexigens* SCRC และสามารถยับยั้งการเกาะติดของเพรียงทะเลได้ด้วย



61 : Zamamistatin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

	เกรด	บริษัท
1. สเปอร์มีดีน	AR	Fluka
2. นอร์สเปอร์มิดีน	AR	Fluka
3. 4-ไฮดรอกซีเบนซาลดีไฮด์	AR	Fluka
4. แอลลิลคลอโรอะซิเตต	AR	Fluka
5. 4-ไนโตรฟีนิลคลอโรฟอร์เมต	AR	ACORS
6. โซเดียมไซยาโนโบโรไฮดรายด์	AR	Fluka
7. โซเดียมโบโรไฮดรายด์	AR	ACORS
8. โพแทสเซียมไอโอดรายด์	AR	Riedel-dehaen
9. โบรมีน	AR	CARLO ERBA
10. พิริดีน	AR	Lab SCAN
11. ไฮดราซีน	AR	Lab SCAN
12. อะมิโนเมทิลเรซิน	AR	Fluka
13. *N*-ethoxycarbonyl phthalimide	AR	Fluka
14. *N,N*-diisopropylcarbodiimide (DIC)	AR	Sigma
15. 1-hydroxybenzotriazole (HOBt)	AR	ACORS
16. 4-*N,N*-dimethylaminopyridine (DMAP)	AR	ACORS
17. ไตรฟลูออโรอะซิติกเอซิด (TFA)	AR	Fluka
18. นินไฮดริน	AR	Fluka
19. ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	AR	Lab SCAN
20. โพแทสเซียมคาร์บอเนต	AR	CARLO ERBA
21. แอซิโตไนไทล์	AR	Lab SCAN
22. เอทิลคลอโรแอซิเตต	AR	Fluka
23. เตตระไฮโดรฟิวแรน	AR	Lab SCAN
24. โซเดียมซัลเฟต	AR	CARLO ERBA
25. โซเดียมไฮดรอกไซด์	AR	Lab SCAN
26. กรดไฮโดรคลอริก	AR	Fluka

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	เกรด	บริษัท
27. ไดคลอโรมีเทน	Commercial	Zen point
28. เอทิลแอซิเตต	Commercial	Zen point
29. เฮกเซน	Commercial	Zen point
30. เอทานอล	AR	CARLO ERBA
31. เมทานอล	AR	CARLO ERBA
32. น้ำมันพาราฟิน	-	LABCHEM
33. ผงถ่าน	-	Fluka
34. พาลาเดียมคลอไรด์	AR	ACORS
35. กรดไพโรล-2-คาร์บอกซิลลิก	AR	Fluka
36. ไทโออะนิซอล	AR	Fluka
37. ไตรเอทิลลามีน	AR	Fluka
38. ไตรฟีนิลฟอสฟีน	AR	Fluka
39. โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต	AR	Fluka
40. กรดไทโอซาลิไซลิก	AR	Fluka

41. ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.02-0.06 มิลลิเมตร 230-400 mesh ASTM (Scharlau GE0048)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องปั่นกวนแม่เหล็ก
2. แท่งแม่เหล็ก
3. หลอดฉีดยาพลาสติก
4. เครื่องเขย่า
5. เครื่องกรองลดความดัน
6. เตาอบ
7. คอลัมน์
8. กรวยแยก
9. เครื่องระเหยสุญญากาศ Rotavapor R-114 BÜCHI
10. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC -254 Denver Instrument Company
11. แผ่นทิลเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี (TLC aluminium sheets, silica gel F_{254} MERCK)
12. แผ่นให้ความร้อน
13. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300
    ความถี่ 300 เมกกะเฮิร์ท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. เครื่องเขย่า (Shaker)

3.3 การทดลองทั่วไป

ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตต และเมทานอลที่ใช้สำหรับการทำคลอลัมน์โครมาโทกราฟีเป็นเกรดทางการค้าถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง และตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ที่นำมาใช้จะแช่ไว้ใน Molecular sieve เพื่อดูดน้ำและความชื้น ส่วนสารเคมีที่ได้จากการซื้อจะนำมาใช้โดยปราศจากการทำสารให้บริสุทธิ์

ตัวทำละลายพิริดีนที่ใช้ในการทดลอง ถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นที่อุณหภูมิ 115 – 116 องศาเซลเซียส และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อดูดน้ำ ระยะเวลาในการใช้ 30 วัน

สเปกตรัม ^{1}H และ ^{13}C NMR ถูกบันทึกโดยเครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกกะเฮิร์ท การละลายสารตัวอย่างจะทำการละลายโดยใช้ตัวทำละลาย $CDCl_3$ และ CD_3OD จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ $CHCl_3$ ที่ δ 7.25 ppm สำหรับสเปกตรัม ^{1}H NMR และที่ δ 77.5 ppm และสเปกตรัม ^{13}C NMR และ CD_3OH ที่ δ 4.80 ppm สำหรับสเปกตรัม ^{1}H NMR และที่ δ 49.0 ppm สำหรับสเปกตรัม ^{13}C NMR ตามลำดับ

การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์โดยใช้รีเอเจนต์ A และรีเอเจนต์ B ในการทดสอบ ซึ่งเตรียมได้ดังนี้

รีเอเจนต์ A : สารละลาย 1) ชั่งฟีนอล 40 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร สารละลาย 2) ชั่งโพแทสเซียมไซยาไนด์ 65 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารละลายมา 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยพิริดีน 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการผสมสารละลาย 1 และ 2 ตั้งปั่นกวนให้สารละลายผสมเข้ากัน

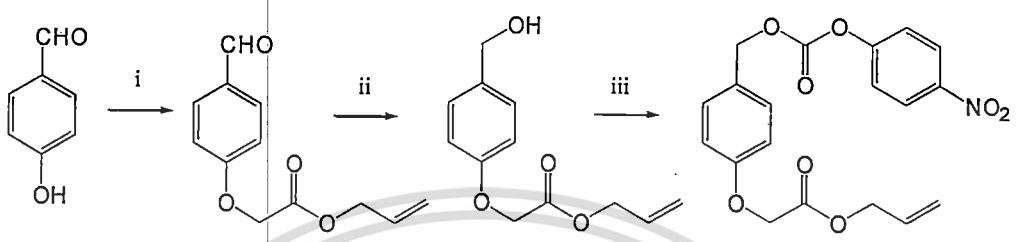
รีเอเจนต์ B : ชั่งนินไฮดริน 2.5 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การสังเคราะห์ Pseudoceratidine 1 และอนุพันธ์ โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง[20]

3.4.1 การสังเคราะห์ตัวเชื่อมโยง 4-nitrocabonyl carbonate 62

แผนภาพที่ 3

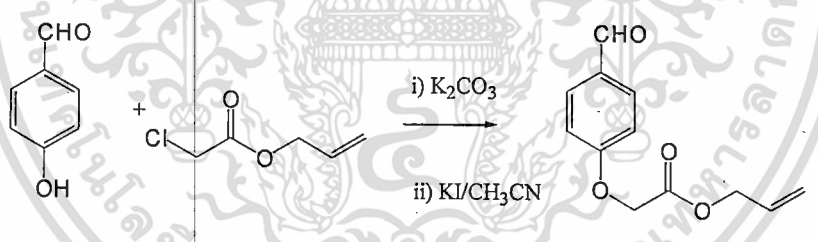


62 **63** **64** **65**

Reagents and conditions : i) ally chloroacetate, K_2CO_3,KI,CH_3CN , reflux 24 h. 97% ; ii) $NaCNBH_3$, THF : H_2O (1:1) , 32% ; iii) *p*-nitrophenylchloroformate , DCM : Pyr (1:4) , 0 ^{0}C – RT , 90%

3.4.2 การสังเคราะห์ตัวเชื่อม allyl-(4-formyl-1-phenoxy)-ethanoate 63

แผนภาพที่ 4



62 allyl chloroacetate **63**

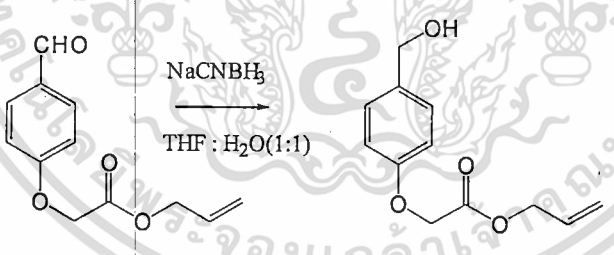
1. อบเครื่องแก้วที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วทำให้เย็นในเดสิเคเตอร์
2. ชั่ง 4-ไฮดรอกซีเบนซาลดีไฮด์ **62** 6.02 กรัม (49.2 มิลลิโมล) แอลลิลคลอโรแอซิเตต 7.95 กรัม (59.1 มิลลิโมล) โพแทสเซียมคาร์บอเนต 10 กรัม และโพแทสเซียมไอโอดรายด์ 0.83 กรัม (4.9 มิลลิโมล) เทลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตรพร้อมใส่เศษกระเบื้อง 2-3 ชิ้น เติมแอซิโตไนไตร์ 250 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมทำการปั่นกวนและรีฟลักซ์ 24 ชั่วโมง
3. ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี ในระบบตัวทำละลายผสมของเฮกเซนและเอทิลแอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. หลังจากที่เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วนำไปกรองตะกอนด้วยการกรองสุญญากาศและล้างสารผลิตภัณฑ์ **63** ที่ต้องการออกจากตะกอนด้วยเอทิลแอซิเตต 50 x 2 มิลลิลิตร
5. นำสารละลายที่ได้จากการกรองไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนได้สารที่มีลักษณะหนืดสีส้ม
6. สกัดล้างสารโดยใช้ตัวทำละลายผสมของน้ำและไดคลอโรมีเทน อัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1 จำนวน 100 x 2 มิลลิลิตร สารผลิตภัณฑ์ **63** จะละลายอยู่ในชั้นอินทรีย์ทำการสกัดด้วยน้ำ จำนวน 50 x 2 มิลลิลิตร ทิ้งชั้นน้ำ และเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงในชั้นไดคลอโรมีเทนเพื่อดูดน้ำ
7. นำสารที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกจะได้สารมีลักษณะหนืดสีน้ำตาลอ่อนและทดสอบการเกิดสารผลิตภัณฑ์ **63** ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี
8. นำสารหนืดสีน้ำตาลอ่อนไปทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผลิตภัณฑ์ **63** ออกจากผลิตภัณฑ์ข้างเคียงโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ระบบตัวชะที่ใช้ คือ เฮกเซนและเอทิลแอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1 ได้สารผลิตภัณฑ์ **63** 10.21 กรัม (97 %) มีค่า R_f = 0.39 (เฮกเซน : เอทิลแอซิเตต 1:1) ทำการตรวจสอบโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนท์

3.4.3 การเตรียมสาร allyl-(4-hydroxy-1-phenoxy)-ethanoate 64

แผนภาพที่ 5



63 **64**

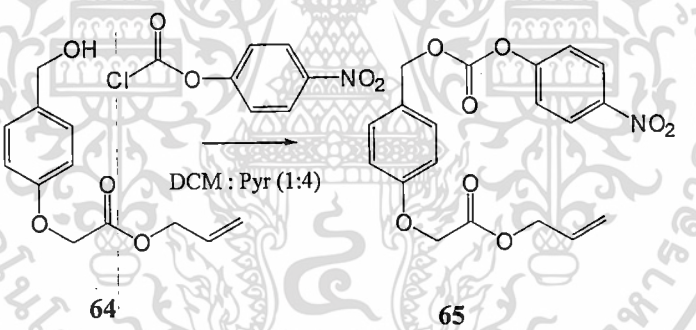
1. ชั่งสารผลิตภัณฑ์ **63** 10.21 กรัม (47.8 มิลลิโมล) มาทำปฏิกิริยารีดักชันในตัวทำละลายผสมของเตตตระไฮโดรฟูแรนและน้ำ อัตราส่วนเท่ากับ 1 : 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติม bromocresolegreen 2-3 หยด ซึ่งใช้เป็นอินดิเคเตอร์ และ 10 % กรดไฮโดรคลอริก 20 หยด สังเกตดูสีสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเขียวอมเหลืองแสดงว่าสภาวะปฏิกิริยาเป็นกรดแล้ว จากนั้นเติมโซเดียมไซยาโนโบรโรไฮดรายด์ 3.61 กรัม (62.80 กรัม/โมล 57.4 มิลลิโมล) ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ทดสอบการเกิดของสารผลิตภัณฑ์ **64** โดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมของเฮกเซนและเอทิลแอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1 ได้สารประกอบ **64** เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ทำการหยุดปฏิกิริยา และทำการสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต 30 x 2 มิลลิลิตร
3. นำชั้นอินทรีย์ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารหนืดสีเหลืองอ่อน
4. นำสารหนืดสีเหลืองอ่อนไปทำให้บริสุทธิ์โดยแยกผลิตภัณฑ์ **64** ออกจากผลิตภัณฑ์ข้างเคียงโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีระบบตัวชะที่ใช้ คือ เฮกเซนและเอทิลแอซิเตตอัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1 ได้สารผลิตภัณฑ์ **64** 10.09 กรัม (95%) มีค่า R_f = 0.38 (เฮกเซน : เอทิลแอซิเตต 2:1) ทำการตรวจสอบโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนท์

3.4.4 การสังเคราะห์ 4-nitrocabonyl carbonate 65 โดยการทำปฏิกิริยาคู่ควบระหว่างสาร 64 กับ 4-ไนโตรฟีนิลคลอโรฟอร์เมต

แผนภาพที่ 6



1. นำสาร **64** กรัม (15.3 มิลลิโมล) ละลายในตัวทำละลายผสมของไดคลอโรมีเทนและพิริดีน อัตราส่วนเท่ากับ 1 ต่อ 4 จำนวน 40 มิลลิลิตร เติม 4-ไนโตรฟีนิลคลอโรฟอร์เมต 3.72 กรัม ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และตั้งปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมของเฮกเซนและเอทิลแอซิเตตในอัตราส่วนเท่ากับ 4 : 1 ซึ่งสังเกตได้ว่ามีจุดใหม่เกิดขึ้นระยะทางสูงกว่าสารตั้งต้นแสดงว่าความเป็นขั้วลดลง
3. เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำ 50 มิลลิลิตร และสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต 20 x 4 มิลลิลิตร

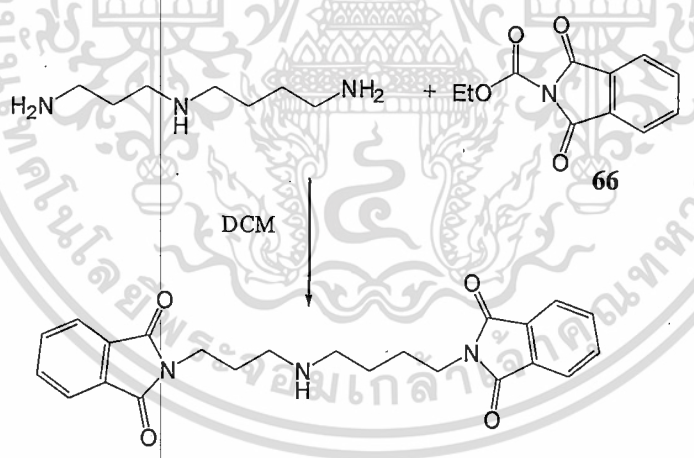
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. นำชั้นเอทิลแอซิเตตมาเติม 10 % กรดไฮโดรคลอริก 100 มิลลิลิตร และนำชั้นเอทิลแอซิเตตมาล้างด้วยน้ำกลั่น 50 x 4 มิลลิลิตร
5. นำชั้นเอทิลแอซิเตตมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำและกรองแยกสารละลายออก
6. นำชั้นเอทิลแอซิเตตไประเหยตัวทำละลายออกและเติมไดคลอโรมีเทนลงไป 20 มิลลิลิตร และทำให้แห้งจะได้ผลึกสีเหลืองทำการแยกผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ระบบตัวชะที่ใช้ คือ เฮกเซนและเอทิลแอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 4 : 1 จะได้สารผลิตภัณฑ์ **65** เป็นผลึกสีเหลือง 4.91 กรัม (90%) มีค่า R_f= 0.31 (เฮกเซน : เอทิลแอซิเตต 4 : 1) ทำการตรวจสอบสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนท์ (ขั้นตอนนี้ไม่ควรนำมาแยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีเพราะว่าสารผลิตภัณฑ์ไม่เสถียร สารผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงสามารถนำไปทำปฏิกิริยาขั้นต่อไปได้)

3.5 การใส่หมู่ป้องกันของสารต้นแบบ 67

การใส่หมู่ป้องกันสารต้นแบบเพื่อป้องกันไม่ให้ตำแหน่ง 1^0 เอมีนทำปฏิกิริยากับสาร **67**

แผนภาพที่ 7



67

1. ชั่งสเปอร์มีดีน 2.43 กรัม (16.78 มิลลิโมล) ละลายในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 10 มิลลิลิตร เติม *N*-Ethoxycarbonylphthalimide **66** 7.35 กรัม (33.5 มิลลิโมล) ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมของเอทิลแอซิเตตและเมทานอล อัตราส่วนเท่ากับ 4 : 1

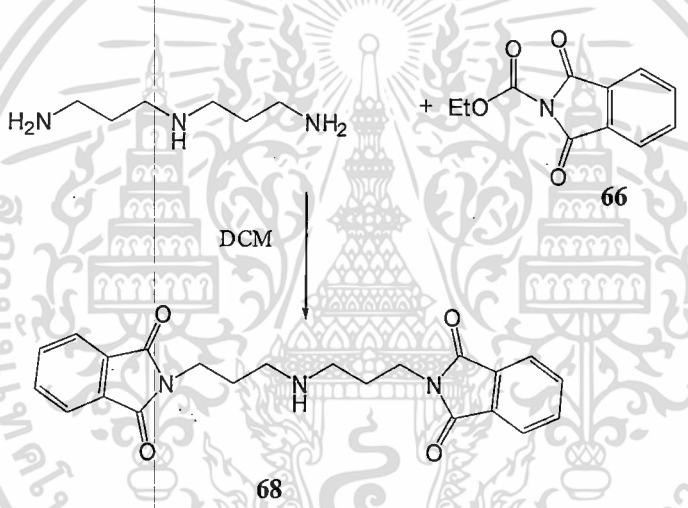
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ทำการระเหยตัวทำละลายออกและเติมไดคลอโรมีเทน 2 มิลลิลิตร เพื่อให้สารละลาย หลังจากนั้นทำการตกผลึกด้วยเมทานอลทำการแยกผลึกโดยกรองออกจากเมทานอลและทำให้ผลึกแห้งโดยการระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศหรือตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารผลิตภัณฑ์ **67** เป็นตะกอนสีขาว 6.36 กรัม (93 %) มีค่า R_f= 0.33 (เอทิลแอซิเตต : เมทานอล (4 : 1)) ทำการตรวจสอบโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

3.6 การใส่หมู่ป้องกันของสารต้นแบบ 68

การใส่หมู่ป้องกันสารต้นแบบเพื่อป้องกันไม่ให้ตำแหน่ง 1^0 เอมีนทำปฏิกิริยากับสาร **68**

แผนภาพที่ 8

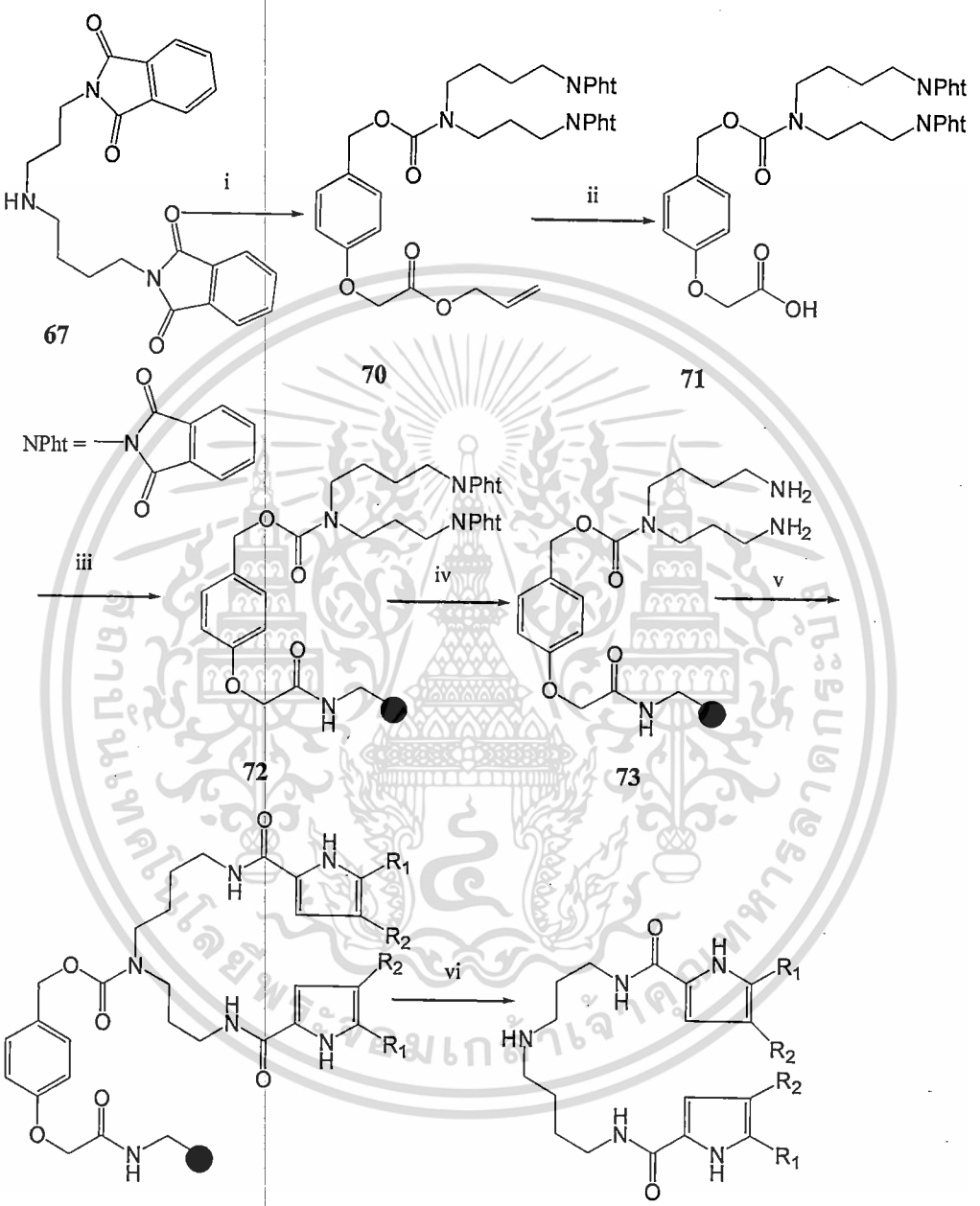


1. ชั่งนอร์สเปอร์มีดีน 2.37 กรัม (18.1 มิลลิโมล) ละลายในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 10 มิลลิลิตร เติม *N*-Ethoxycarbonylphthalimide **66** 4.76 กรัม (21.7 มิลลิโมล) ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมของเอทิลแอซิเตตและเมทานอลในอัตราส่วน 4 : 1
3. เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ระเหยตัวทำละลายออกและทำการแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ระบบตัวชะที่ใช้คือ เอทิลแอซิเตตและเมทานอล อัตราส่วนเท่ากับ 4 : 1 จะได้ผลิตภัณฑ์สารประกอบ **68** เป็นของแข็งสีขาว 5.68 กรัม (95%) มีค่า R_f= 0.44 (เอทิลแอซิเตต : เมทานอล 4 : 1) ทำการตรวจสอบโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การสังเคราะห์ Pseudoceratidine 1 และอนุพันธ์ 69 โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง

แผนภาพที่ 9



74 : $R_1 = R_2 = H$

75 : $R_1 = R_2 = Br$

69 : $R_1 = R_2 = H$

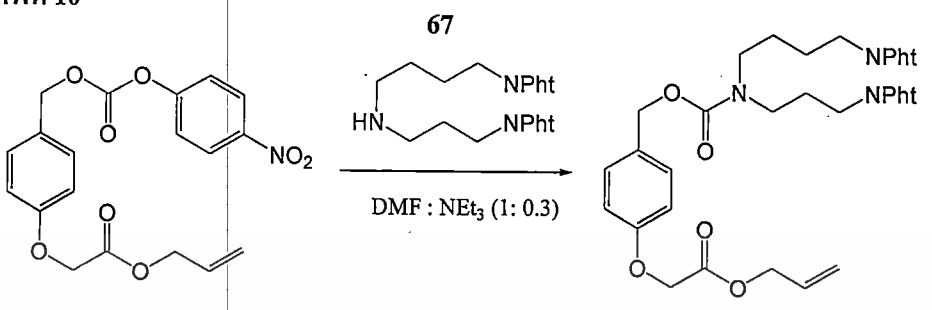
1 : $R_1 = R_2 = Br$

Reagents and conditions : i) 4-nitrocarbonyl carbonate (**212**) , DMF:NEt_3 (1:1) ,40% ; ii) $Ph(PPh_3)_4$, Thiosalicylic acid, THF : CH_2Cl_2 (1:1), 73%; iii) aminomethyl resin, DIC, HOBt, DMAP, DMF; iv) N_2H_4 , EtOH , reflux ; v) R_1R_2-pyrrole –2- carboxylic acid ,DIC, HOBt, DMAP, DMF ; vi) TFA : CH_2Cl_2 : H_2O : Thioanisole (95:5:1:1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.1 การทำปฏิกิริยาคู่ควบระหว่างสารต้นแบบ 67 กับตัวเชื่อมโยง 65

แผนภาพที่ 10



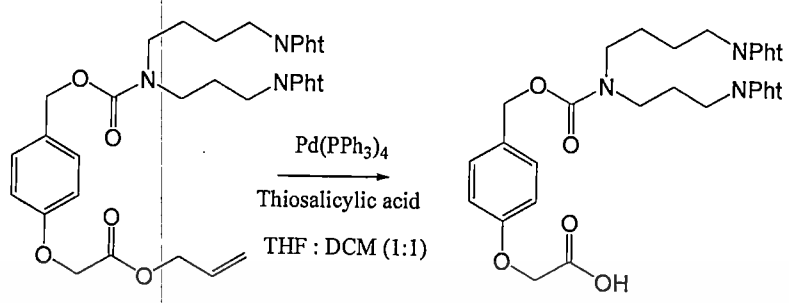
65 **70**

1. ชั่งสารประกอบไดพาทาลิไมด์สเปอร์มิดีน **67** 0.51 กรัม ละลายในตัวทำละลาย DMF 10 มิลลิลิตร เติมไตรเอทิลลามีน 0.3 มิลลิลิตร และชั่งสารประกอบ **65** 0.40 กรัม (1.3 มิลลิโมล) ละลายใน DMF 5 มิลลิลิตร และหยดลงไปในปฏิกิริยาอย่างช้า ๆ ประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. เมื่อครบ 2 ชั่งโมง ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ระบบตัวทำละลายผสมของเฮกเซนและเอทิลแอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1 หรือสังเกตได้ว่าปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วจะเห็นสารละลายเป็นสีเหลืองเข้ม
3. เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์เติมเอทิลแอซิเตต 100 มิลลิลิตร และทำการสกัดด้วยน้ำกลั่น 50 x 4 มิลลิลิตร ลงไปและเติมสารละลาย 10 % ของกรดไฮโดรคลอริก 20 x 2 มิลลิลิตร
4. นำชั้นอินทรีย์มาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำ แล้วกรองแยกสารละลายออก
5. นำสารละลายมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศและทำการแยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ระบบตัวชะที่ใช้ คือ เฮกเซนและเอทิลแอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1 จะได้สารผลิตภัณฑ์ **70** เป็นตะกอนสีเหลือง 0.27 กรัม (40%) มีค่า R_f= 0.38 (เฮกเซน : เอทิลแอซิเตต 4 : 1) ทำการตรวจสอบโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

3.7.2 การเตรียมสารประกอบ 70 โดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนภาพที่ 11

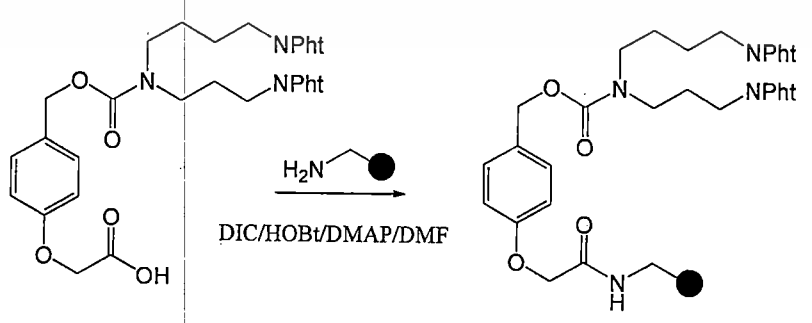


70 **71**

1. ชั่งสารประกอบ **70** 0.83 กรัม (1.3 มิลลิโมล) ละลายในตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเตตระไฮโดรฟูแรนในอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม Palladium tetrakistriphenylphosphine ($Pd(PPh_3)_4$ 85.6 มิลลิกรัม ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไนโตรเจน
2. ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ระบบตัวทำละลายผสมของเอทิลแอซิเตตและเมทานอลในอัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1
3. เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ทำการระเหยตัวทำละลายออก หลังจากนั้นทำการแยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โคมาโตกราฟีระบบตัวชะที่ใช้ คือ เอทิลแอซิเตตและเมทานอล อัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1 และสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการจะถูกชะด้วย 10 % เมทานอล ได้ผลิตภัณฑ์ **71** ที่มีลักษณะหนืดสีเหลืองอ่อน 0.57 กรัม (73%) มีค่า R_f= 0.39 (เอทิลแอซิเตต : เมทานอล 2 :1) ทำการตรวจสอบโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

3.7.3 การทำปฏิกิริยาคู่ควบระหว่างสารประกอบ 71 กับ amino methyl resin

แผนภาพที่ 12



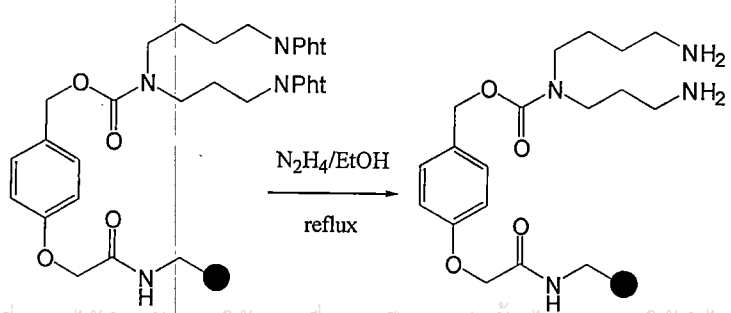
71 **72**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ชั่ง amino methyl resin (% loading 1.1 มิลลิโมล/กรัม) 200 มิลลิกรัม (0.2 มิลลิโมล) ใส่ในหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร แช่ amino methyl resin ด้วยไดคลอโรมีเทน 3 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที
2. หลังจากนั้นทำการดูดไดคลอโรมีเทนออกจากหลอดฉีดยาให้หมดด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ
3. ชั่งสารประกอบ **71** 264.4 มิลลิกรัม (0.4 มิลลิโมล) ละลายในDMF จำนวน 1 มิลลิลิตร เติม DIC 55.5 มิลลิกรัม ลงไปทำการปั่นกวน 5 นาที จะเกิดตะกอน และหลังจากนั้นเติม HOBt 59.4 มิลลิกรัม และ DMAP 53.7 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายผสมของ DMF และไดคลอโรมีเทน อัตราส่วนเท่ากับ 3 : 1 ประมาณ 2 มิลลิลิตร (ใช้ตัวทำละลายให้น้อยที่สุด)
4. เทสารละลายในข้อ 3 ลงไปในหลอดฉีดยาในข้อ 2 ทำการปิดหลอดฉีดยาให้สนิทแล้วทำการเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำหลอดฉีดยาในข้อ 4 มาดูดสารละลายออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ
6. เมื่อดูดสารละลายออกหมด ทำการล้างหลอดฉีดยาด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมี 5x3 มิลลิลิตร กับเมทานอล 5x3 มิลลิลิตร แต่ละครั้งแช่นาน 10 นาที ล้างสลับกัน ทำให้เรซินแห้งโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศดูดตัวทำละลายออกให้หมด แล้วนำมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย Reagent A และ Reagent B
7. ขั้นตอนการทดสอบทำได้โดยนำเรซิน **72** ที่แห้งมา 5 มิลลิกรัม (หลอด ก) และ amino methyl resin (หลอด ข เป็นหลอดเปรียบเทียบ) มา 5 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร 2 หลอด แล้วทำการหยด Reagent A 6 หยด และ Reagent B 3 หยด ลงในหลอดทดลองทั้ง 2 หลอด และนำหลอดทดลองทั้ง 2 หลอดมาให้ความร้อนบนแผ่นให้ความร้อนจนสารละลายเกิดการเปลี่ยนสีคือ หลอด ข. จะให้สีม่วงเพราะว่าในหลอดนี้จะมี amino methyl resin ที่มีหมู่ 1^{0} เอมีนอยู่ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ Reagent A และ Reagent B ได้ โดยจะใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ ถ้าหลอด ก. ไม่ให้สีม่วงแสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ได้สารผลิตภัณฑ์ **72**

3.7.4 การถอดหมู่ป้องกันออกจากสารต้นแบบ

แผนภาพที่ 13



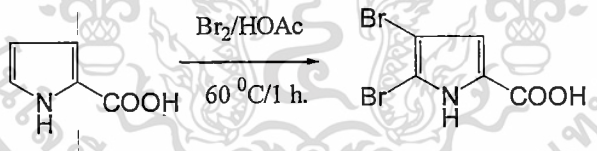
72 **73**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ชั่งเรซิน **72** 200.0 มิลลิกรัม (0.2 มิลลิโมล) เทลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร เติมไฮดราซีน 12.8 มิลลิกรัม (0.4 มิลลิโมล) และเติมเอทานอล 50 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส
2. นำปฏิกิริยามากรองสารละลายออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ ล้างเรซินด้วย เอทานอล เอทานอล : น้ำ อัตราส่วนเท่ากับ 1 : 1 และ เมทานอล จำนวน 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วทำให้แห้งโดยให้เครื่องกรองสุญญากาศดูดตัวทำละลายออกให้หมด นำไปทดสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย Reagent A และ Reagent B
3. ขั้นตอนการทดสอบทำได้โดยนำเรซิน **73** ที่แห้งมาทดสอบปฏิกิริยาโดยการนำเรซิน 5 มิลลิกรัม (หลอด ก) และ สารประกอบ **72** (หลอด ข) ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กแล้วทำการหยด Reagent A 6 หยดและ Reagent B 3 หยด ลงในหลอดทดลองทั้ง 2 หลอด
4. นำหลอดทดลองทั้ง 2 หลอดมาให้ความร้อนบนแผ่นให้ความร้อนจนสารละลายเกิดการเปลี่ยนสีคือ หลอด ข จะไม่ให้สีม่วงซึ่งใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ ถ้าหลอด ก ให้สีม่วงแสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ได้สารประกอบ **73** ที่เป็น template ซึ่งจะใช้ในการสังเคราะห์ Pseudoceratidine และอนุพันธ์ของ Pseudoceratidine ต่อไป

3.7.5 การสังเคราะห์ 4,5-dibromopyrrole-2- carboxylic acid

แผนภาพที่ 14



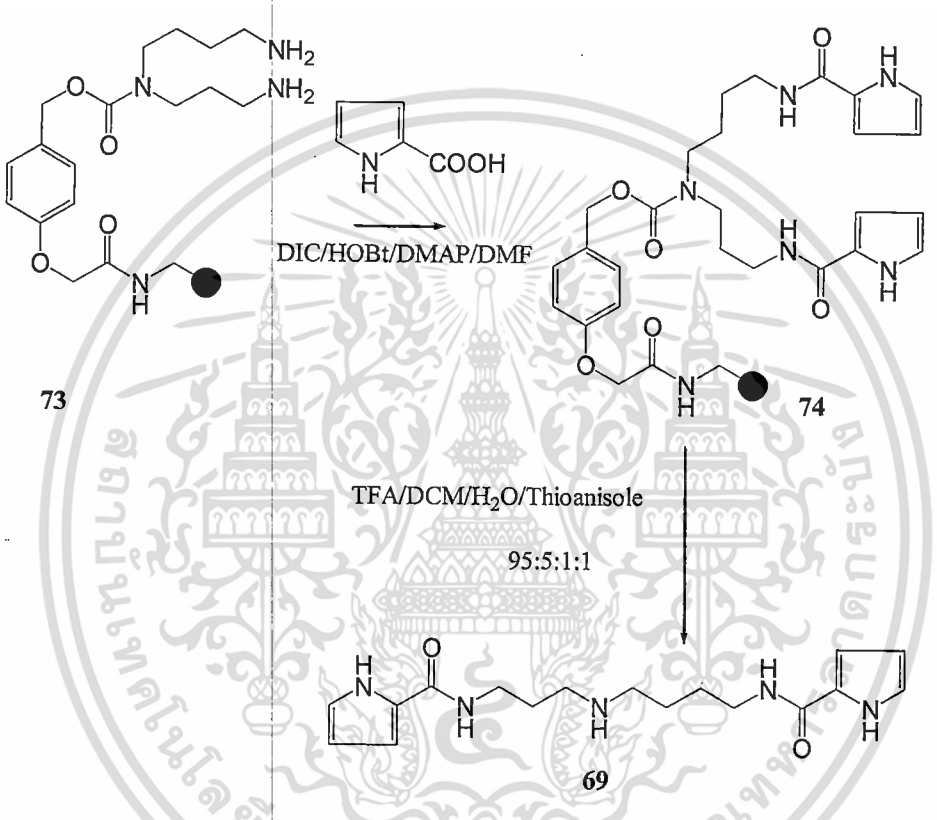
1. ชั่ง pyrrole-2-carboxylic acid 0.51 กรัม (4.6 มิลลิโมล) ละลายในกรดแอซิติก 25 มิลลิลิตร
2. ชั่งโบรมีน 1.47 กรัม (9.2 มิลลิโมล) ละลายในกรดแอซิติก 6.2 มิลลิลิตร และหยดโบรมีนในกรดแอซิติกลงไปในสารละลายปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. เมื่อครบ 1 ชั่วโมงทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ระบบตัวทำละลายผสมของเฮกเซนและเอทิลแอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1
4. เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์นำปฏิกิริยาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วทำการฟอกสีโบรมีนโดยใช้ผงถ่านหลังจากนั้นทำการกรองผ่านซีไลท์หลังจากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศและสุดท้ายทำการตกผลึกสารผลิตภัณฑ์ด้วยน้ำและเอทานอลในอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 1 จะได้ผลึกสีส้มของ 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid 1.1 มิลลิกรัม (94 %)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีค่า R_f = 0.37 (เฮกเซน : เอทิลแอซิเตต 2 :1) ทำการตรวจสอบโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนท์

3.7.6 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pseudoceratidine 69 โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง

แผนภาพที่ 15



1. ชั่งเรซิน 73 100 มิลลิกรัม (0.1 มิลลิโมล) เทใส่ลงในหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร แช่ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 3 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นดูดไดคลอโรมีเทนออกโดยเครื่องกรองสุญญากาศ
2. ชั่ง pyrrole-2-carboxylic acid 48.8 มิลลิกรัม (0.4 มิลลิโมล) ละลายใน DMF จำนวน 1 มิลลิลิตร เติม DIC 55.5 มิลลิกรัม ลงไปทำการปั่นกวน 5 นาที จะเกิดตะกอน และหลังจากนั้นเติม HOBt 59.4 มิลลิกรัม และ DMAP 53.7 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายผสมของ DMF และไดคลอโรมีเทน อัตราส่วนเท่ากับ 3 : 1 ประมาณ 2 มิลลิลิตร (ใช้ตัวทำละลายให้น้อยที่สุด)
3. เทสารละลายในข้อ 2 ลงในหลอดฉีดยา ข้อ 1 ปิดหลอดฉีดยาให้สนิท ทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

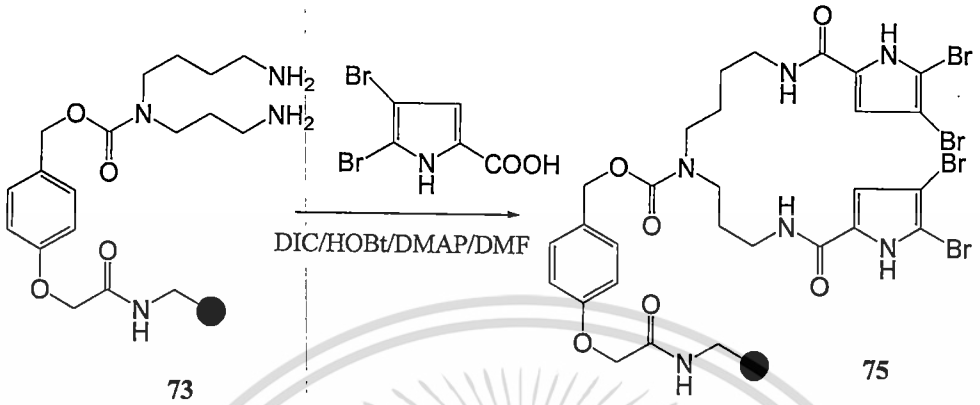
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำของผสมมากรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศโดยใช้ไดคลอโรมีเทน 5 x 3 มิลลิลิตร และเมทานอลจำนวน 5 x 3 มิลลิลิตร แต่ละครั้งแช่นาน 10 นาที ล้างสลับกัน แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องกรองสุญญากาศดูดตัวทำละลายออกให้หมด
5. นำเรซิน **74** ที่แห้งมาทดสอบปฏิกิริยาโดยการนำเรซิน 5 มิลลิกรัม (หลอด ก) และสารประกอบ **73** (หลอด ข ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการหยด Reagent A 6 หยด และ Reagent B 3 หยด ลงในหลอดทดลองทั้ง 2 หลอด
6. นำหลอดทดลองทั้ง 2 หลอดมาให้ความร้อนบนแผ่นให้ความร้อนจนสารละลายเกิดการเปลี่ยนสีคือ หลอด ข. จะให้สีม่วงซึ่งใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ ถ้าหลอด ก. ไม่ให้สีม่วงแสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ได้เรซิน **74**
7. นำเรซิน **74** ที่อยู่ในหลอดฉีดยา มาแช่ไดคลอโรมีเทน 30 นาที หลังจากนั้นทำการกรองไดคลอโรมีเทนออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ
8. เติมสารละลายผสม TFA : DCM : H_2O : Thioanisole (95 : 5 : 1 : 1) จำนวน 2 มิลลิลิตรลงไปในหลอดฉีดยา ข้อ 6 ทำการปิดหลอดฉีดยา ให้สนิทและทำการเขย่า 2 ชั่วโมง
9. เมื่อครบ 2 ชั่วโมง นำปฏิกิริยามากรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศล้างเรซินโดยใช้ไดคลอโรมีเทน 5 x 3 มิลลิลิตร และเมทานอล 5 x 3 มิลลิลิตร
10. นำสารละลายที่ล้างออกมาไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารประกอบ **69** มีสีน้ำตาลเข้ม 53.15 มิลลิกรัม (73%) ทำการตรวจยืนยันผลด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

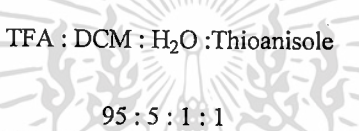
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

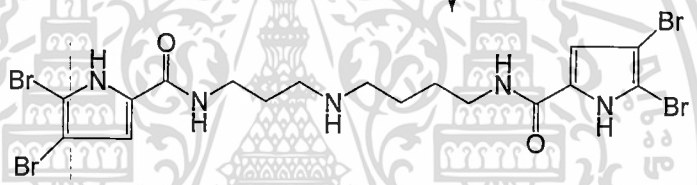
3.7.7 การสังเคราะห์ Pseudoceratidine 1 โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง

แผนภาพที่ 16



73 **75**





1

1. ชั่งเรซิน **73** 100 มิลลิกรัม (0.1 มิลลิโมล) เทใส่ลงในหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร แช่ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 3 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นดูดไดคลอโรมีเทนออกโดยเครื่องกรองสุญญากาศ
2. ชั่ง 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid 118.3 มิลลิกรัม (0.4 มิลลิโมล) ละลายใน DMF ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม DIC 55.5 มิลลิกรัม ลงไปทำการปั่นควน 5 นาที จะเกิดตะกอน และหลังจากนั้นเติม HOBt 59.4 มิลลิกรัม และ DMAP 53.7 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายผสมของ DMF และไดคลอโรมีเทน อัตราส่วนเท่ากับ 3 : 1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ควรใช้ตัวทำละลายให้น้อยที่สุด)
3. เทสารละลายในข้อ 2 ลงในหลอดฉีดยา ข้อ 1 ปิดหลอดฉีดยาให้สนิท ทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำปฏิกิริยามากรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศโดยใช้ไดคลอโรมีเทน 5 x 3 มิลลิลิตร และ เมทานอล 3 x 5 มิลลิลิตร แต่ละครั้งแช่นาน 10 นาที ล้างสลับกัน แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องกรองสุญญากาศดูดตัวทำละลายออกให้หมด

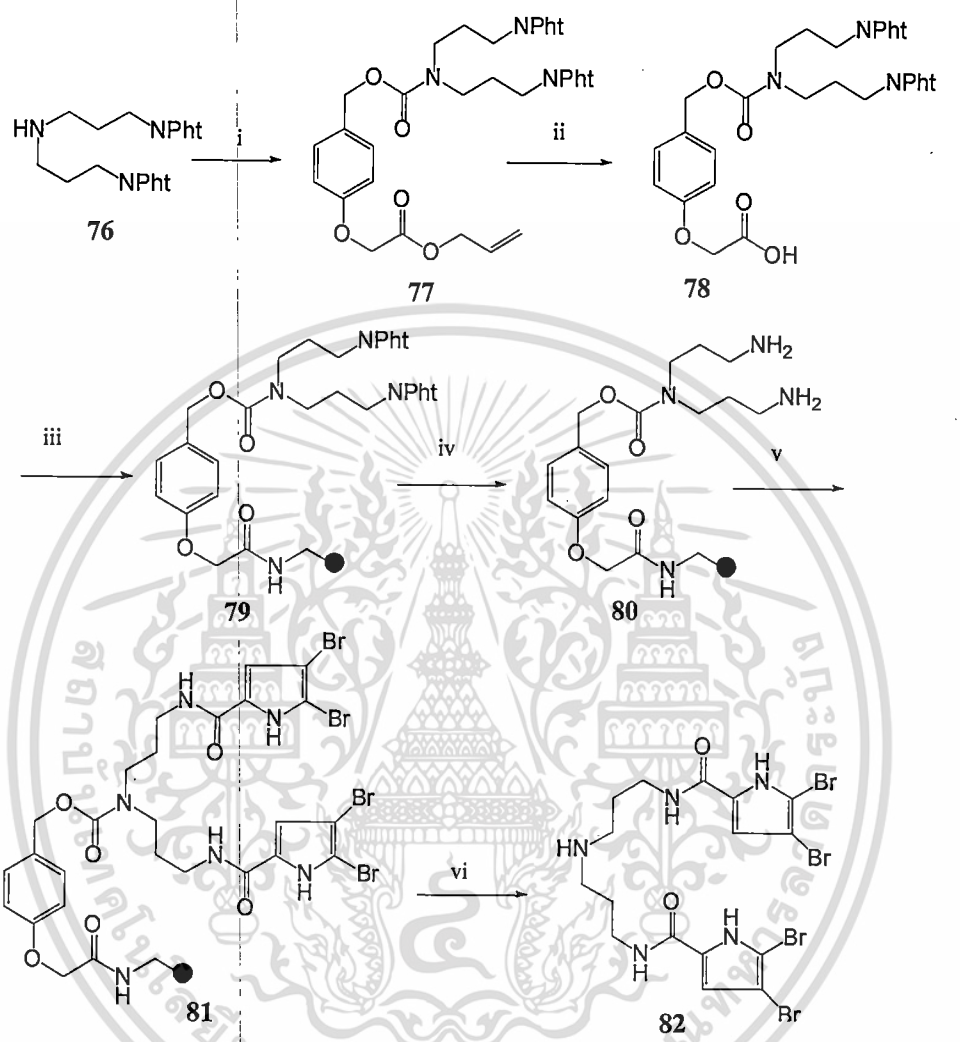
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำเรซิน **75** ที่แห้งมาทดสอบปฏิกิริยาโดยการนำเรซิน 5 มิลลิกรัม (หลอด ก) และเรซิน **73** (หลอด ข เป็นตัวเปรียบเทียบ) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการหยด Reagent A 6 หยด และ Reagent B 3 หยด ลงในหลอดทดลองทั้ง 2 หลอด
6. นำหลอดทดลองทั้ง 2 หลอดมาให้ความร้อนบนแผ่นให้ความร้อนจนสารละลายเกิดการเปลี่ยนสีคือ หลอด ข. จะให้สีม่วงซึ่งใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ ถ้าหลอด ก. ไม่ให้สีม่วงแสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ได้สารประกอบ **75**
7. นำเรซิน **75** ที่อยู่ในหลอดฉีดยา มาแช่ไดคลอโรมีเทน 30 นาที หลังจากนั้นทำการกรองไดคลอโรมีเทนออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ
8. เติมสารละลายผสม TFA : DCM : H_2O : Thioanisole (95 : 5 : 1 : 1) จำนวน 2 มิลลิลิตรลงไปในหลอดฉีดยา ข้อ 7 ทำการปิดหลอดฉีดยา ให้สนิทและทำการเขย่า 2 ชั่วโมง
9. เมื่อครบ 2 ชั่วโมง นำมาปฏิกิริยากรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศโดยใช้ไดคลอโรมีเทน 3 x 5 มิลลิลิตร และเมทานอล 5 x 5 มิลลิลตร
10. นำสารละลายที่ล้างออกมาไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารประกอบ **1** มีสีน้ำตาลเข้ม 102.4 มิลลิกรัม (72%) ทำการตรวจยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pseudoceratidine 82 โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง

แผนภาพที่ 17

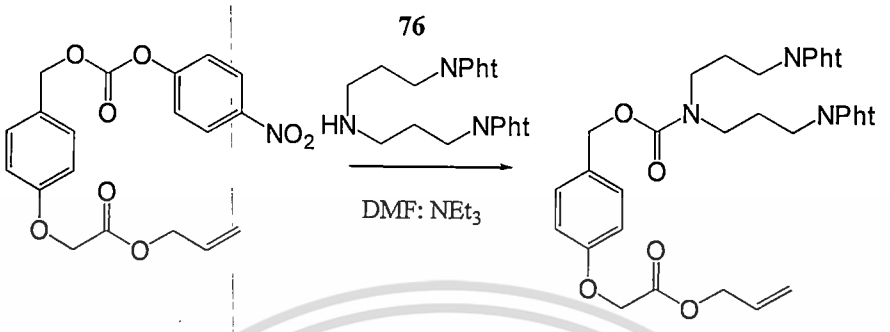


Reagents and conditions : i) 4-nitrocarbonyl carbonate (**212**) , DMF:NEt_3 (1:1) ,40% ; ii) $Ph(PPh_3)_4$, Thiosalicylic acid , THF : CH_2Cl_2 (1:1), 73% ; iii) aminomethyl resin, DIC, HOBt, DMAP, DMF; iv) N_2H_4, EtOH , reflux ; v) R_1R_2-pyrrole –2- carboxylic acid , DIC , HOBt , DMAP, DMF ; vi) TFA : CH_2Cl_2 : H_2O : Thioanisole (95:5:1:1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.1 การทำปฏิกิริยาคู่ควบระหว่างสารต้นแบบ 76 กับตัวเชื่อมโยง 65

แผนภาพที่ 18



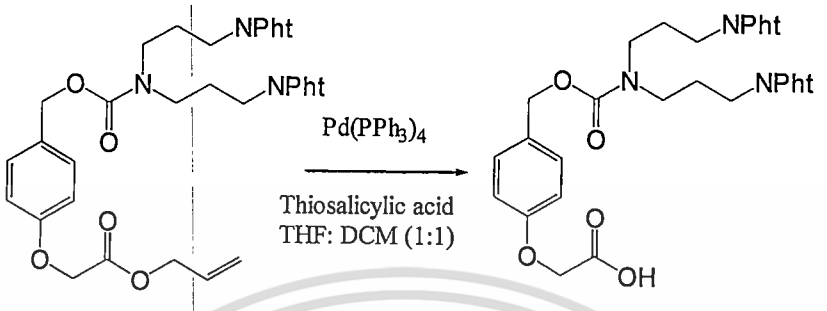
65 **77**

1. ชั่งสารประกอบไดพาทาลิไมด์นอร์สเปอร์มีดีน **76** 0.51 กรัม (1.30 มิลลิโมล) ละลายในตัวทำละลาย DMF 10 มิลลิลิตรและเติมไตรเอทิลลามีน 0.3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นชั่งสาร **65** 0.23 กรัม (0.59 มิลลิโมล) ละลายใน DMF 5 มิลลิลิตร และหยดลงไปในปฏิกิริยาอย่างช้า ๆ ประมาณ 30 นาที แล้วทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. เมื่อครบ 2 ชั่งโมง ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีระบบตัวทำละลายผสมของเฮกเซนและเอทิลแอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1 หรือสังเกตได้ว่าปฏิกิริยาสมบูรณ์จะปรากฏสารละลายเป็นสีเหลืองเข้ม
3. เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์เติมเอทิลแอซิเตต 100 มิลลิลิตร และทำการสกัดด้วยน้ำกลั่น 50 x 4 มิลลิลิตร และสกัดด้วย 10 % กรดไฮโดรคลอริก 20 x 2 มิลลิลิตร
4. นำชั้นอินทรีย์มาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำและกรองแยกสารละลายออก
5. นำสารละลายมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศและทำการแยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ระบบตัวชะที่ใช้ คือ เฮกเซนและเอทิลแอซิเตต ในอัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1 จะได้ผลิตภัณฑ์ **77** ที่มีลักษณะหนืดสีน้ำตาลอ่อน 227.3 มิลลิกรัม (60 %) มีค่า R_f= 0.33 (เฮกเซน : เอทิลแอซิเตต 2 : 1) ทำการตรวจสอบสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.2 การเตรียมสารประกอบ 77 โดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส

แผนภาพที่ 19



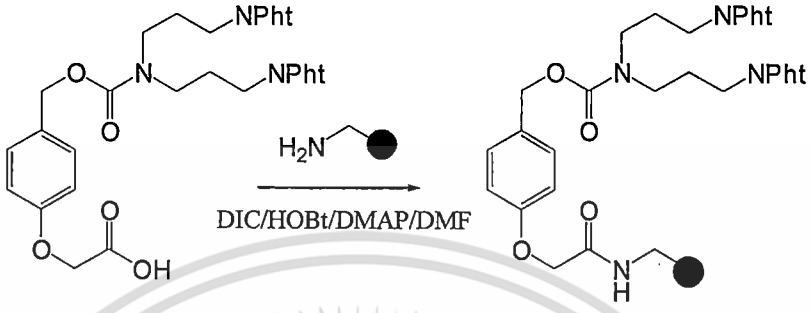
77 78

1. ชั่งสารประกอบ 77 230.3 มิลลิกรัม (0.36 มิลลิโมล) ละลายในตัวทำละลายผสมของไดคลอโรมีเทนและเตตระไฮโดรฟูแรนในอัตราส่วนเท่ากับ 1 ต่อ 1 จำนวน 10 มิลลิลิตร เติม Palladium tetrakistriphenylphosphine ($Pd(PPh_3)_4$) 85.60 มิลลิกรัม ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไนโตรเจน
2. ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ระบบตัวทำละลายผสมของเอทิลแอซิเตตและเมทานอลในอัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1
3. เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ทำการระเหยตัวทำละลาย หลังจากนั้นทำการแยกผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โคมาโทกราฟีระบบตัวชะที่ใช้ คือ เอทิลแอซิเตตและเมทานอล อัตราส่วนเท่ากับ 2 : 1 และผลิตภัณฑ์ที่ต้องการจะถูกชะออกที่ 10 % เมทานอล ได้สารผลิตภัณฑ์ 78 ที่มีลักษณะหนืดสีเหลืองอ่อน 186.8 กรัม (86%) มีค่า R_f = 0.25 (เอทิลแอซิเตต : เมทานอล 2 : 1) ทำการตรวจสอบโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.3 การทำปฏิกิริยาคู่ควบระหว่างสารประกอบ 78 กับ aminomethyl resin 79

แผนภาพที่ 20



78 **79**

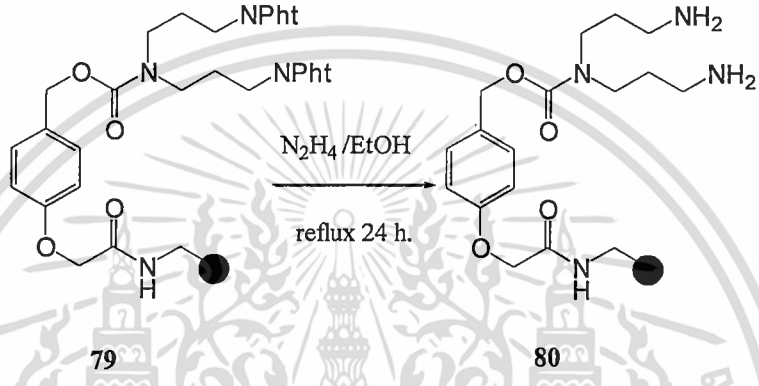
1. นำ aminomethyl resin (% loading 1.1 มิลลิโมล/กรัม) 200 มิลลิกรัม (0.22 มิลลิโมล) ใส่ในหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร แช่ amino methyl resin ด้วยไดคลอโรมีเทน 3 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที
2. หลังจากนั้นทำการดูดไดคลอโรมีเทนออกจากหลอดฉีดยาให้หมดด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ
3. ชั่งสารประกอบ **78** 263.1 มิลลิกรัม (0.44 มิลลิโมล) ละลายในDMF จำนวน 1 มิลลิลิตร เติม DIC 55.5 มิลลิกรัม ลงไปทำการปั่นกวน 5 นาที จะเกิดตะกอน และหลังจากนั้นเติม HOBt 59.4 มิลลิกรัม และ DMAP 53.7 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายผสมของ DMF และไดคลอโรมีเทน อัตราส่วนเท่ากับ 3 : 1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ใช้ตัวทำละลายให้น้อยที่สุด)
4. เทสารละลายในข้อ 3 ลงไปในหลอดฉีดยาในข้อ 2 ทำการปิดหลอดฉีดยาให้สนิทแล้วทำการเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำหลอดฉีดยาในข้อ 4 มาดูดสารละลายออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ
6. เมื่อดูดสารละลายออกหมด ทำการล้างหลอดฉีดยาด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 5 x 3 มิลลิลิตร และ เมทานอล 5 x 3 มิลลิลิตร แต่ละครั้งแช่นาน 10 นาที ล้างสลับกัน ทำให้เรซินแห้งโดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศดูดตัวทำละลายออกให้หมด แล้วนำมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย Reagent A และ Reagent B
7. ขั้นตอนการทดสอบทำได้โดยนำเรซิน **79** ที่แห้งมา 5 มิลลิกรัม (หลอด ก.) และ amino methyl resin (หลอด ข. เป็นหลอดเปรียบเทียบ) มา 5 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร 2 หลอด แล้วทำการหยด Reagent A 6 หยด และ Reagent B 3 หยด ลงในหลอดทดลองทั้ง 2 หลอด และนำหลอดทดลองทั้ง 2 หลอดมาให้ความร้อนบนแผ่นให้ความร้อนจนสารละลายเกิดการเปลี่ยนสีคือ หลอด ข. จะให้สีม่วง เนื่องจากในหลอดนี้มี amino methyl resin ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วยหมู่ 1^0 เอมีน สามารถเกิดปฏิกิริยากับ Reagent A และ Reagent B ได้ โดยจะใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ ถ้าหลอด ก. ไม่ให้สีม่วงแสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ได้สารประกอบ **79** เป็นผลิตภัณฑ์

3.8.4 การถอดหมู่ป้องกันออกจากสารต้นแบบ 80

แผนภาพที่ 21



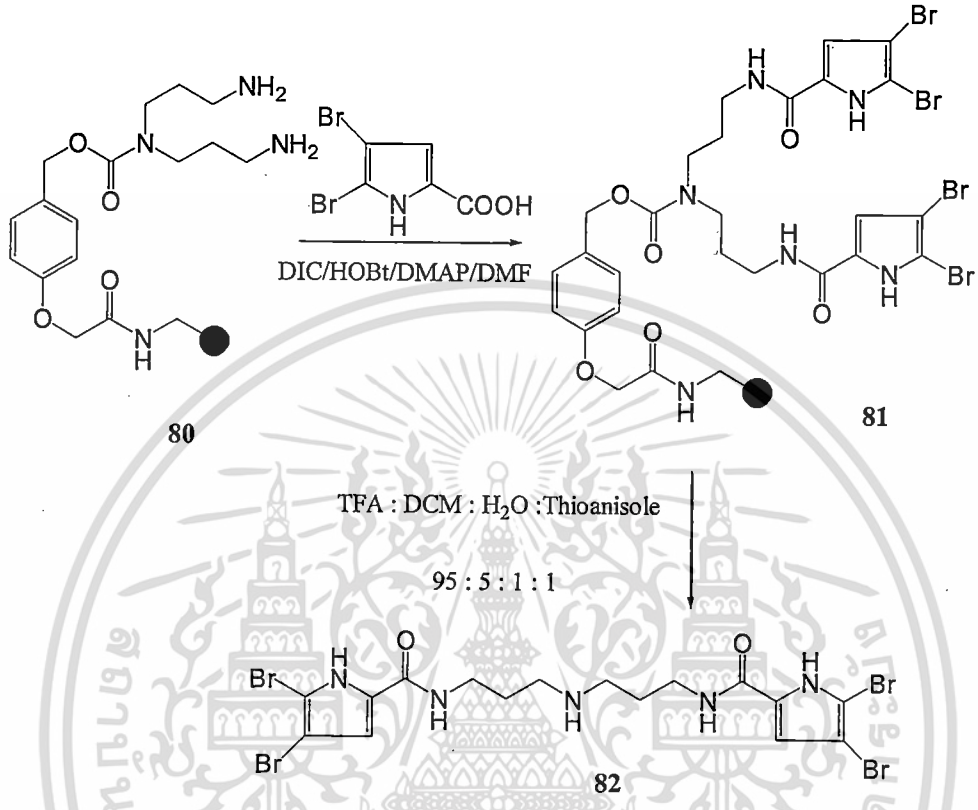
79 **80**

1. ชั่งสารประกอบ **79** 200 มิลลิกรัม (0.22 มิลลิโมล) เทลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร เติมไฮดราซีน 12.85 มิลลิกรัม (0.44 มิลลิโมล) และเติมเอทานอล 50 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส
2. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำปฏิกิริยามากรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ ล้างด้วย EtOH EtOH : H_2O (1 : 1) และ MeOH จำนวน 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วทำให้แห้งโดยให้เครื่องกรองสุญญากาศดูดตัวทำละลายออกให้หมด นำไปทดสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย Reagent A และ Reagent B
3. ขั้นตอนการทดสอบทำได้โดยนำเรซิน **80** ที่แห้งมาทดสอบปฏิกิริยาโดยการนำเรซิน 5 มิลลิกรัม (หลอด ก.) และ สารประกอบ **79** (หลอด ข.) ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กแล้วทำการหยด Reagent A 6 หยดและ Reagent B 3 หยด ลงในหลอดทดลองทั้ง 2 หลอด
4. นำหลอดทดลองทั้ง 2 หลอดมาให้ความร้อนบนแผ่นให้ความร้อนจนสารละลายเกิดการเปลี่ยนสีคือ หลอด ข. จะไม่ให้สีม่วงซึ่งใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ ถ้าหลอด ก. ให้สีม่วงแสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ได้สารประกอบ **80** เป็น template ซึ่งจะใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pseudoceratidine ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.5 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pseudoceratidine 82 โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง

แผนภาพที่ 22



1. ชั่งสารประกอบ **80** 100 มิลลิกรัม (0.11 มิลลิโมล) เทใส่ลงในหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร แช่ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 3 มิลลิลิตรเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นดูดไดคลอโรมีเทนออกโดยเครื่องกรองสุญญากาศ
2. ชั่ง 2,3-dibromo-2-pyrrole carboxylic acid 118.3 มิลลิกรัม (0.44 มิลลิโมล) ละลายในDMF จำนวน 1 มิลลิลิตร เติม DIC 55.5 มิลลิกรัม ลงไปทำการปั่นกวน 5 นาที จะเกิดตะกอน และหลังจากนั้นเติม HOBt 59.4 มิลลิกรัม และ DMAP 53.7 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายผสมของ DMF และไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วนเท่ากับ 3 ต่อ 1 ประมาณ 2 มิลลิลิตร (ใช้ตัวทำละลายให้น้อยที่สุด)
3. เทสารละลายในข้อ 2 ลงในหลอดฉีดยา ข้อ 1 ปิดหลอดฉีดยาให้สนิท ทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำปฏิกิริยามากรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศโดยใช้ไดคลอโรมีเทน 5 x 5 มิลลิลิตร และเมทานอล 5 x 5 มิลลิลิตร แต่ละครั้งแช่นาน 10 นาที ล้างสลับกัน แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องกรองสุญญากาศดูดตัวทำละลายออกให้หมด

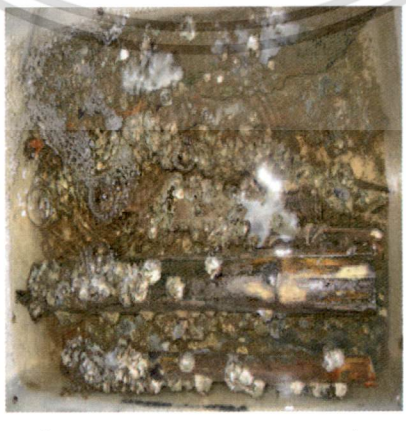
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำเรซิน **81** ที่แห้งมาทดสอบปฏิกิริยาโดยการนำเรซิน 5 มิลลิกรัม (หลอด ก.) และสารประกอบ **80** (หลอด ข. ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการหยด Reagent A 6 หยด และ Reagent B 3 หยด ลงในหลอดทดลองทั้ง 2 หลอด
6. นำหลอดทดลองทั้ง 2 หลอดมาให้ความร้อนบนแผ่นให้ความร้อนจนสารละลายเกิดการเปลี่ยนสีคือ หลอด ข. จะให้สีม่วงซึ่งใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ ถ้าหลอด ก. ไม่ให้สีม่วงแสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ได้สารประกอบ **81**
7. นำสารประกอบ **81** ที่อยู่ในหลอดฉีดยา มาแช่ไดคลอโรมีเทน 30 นาที หลังจากนั้นทำการกรองไดคลอโรมีเทนออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ
8. เติมสารละลายผสม TFA : DCM : H_2O : Thioanisole (95 : 5 : 1 : 1) จำนวน 2 มิลลิลิตรลงไปในหลอดฉีดยา ข้อ 7 ทำการปิดหลอดฉีดยา ให้สนิทและทำการเขย่า 2 ชั่วโมง
9. เมื่อครบ 2 ชั่วโมง นำมาปฏิกิริยากรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศโดยใช้ไดคลอโรมีเทน 5 x 3 มิลลิลิตร และเมทานอล 5 x 3 มิลลิลิตร
10. นำสารละลายที่ล้างออกมาไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารประกอบ **82** ที่มีสีน้ำตาลเข้ม 100.2 มิลลิกรัม (72%) ทำการตรวจยืนยันโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

3.9 วิธีการดำเนินการทดสอบฤทธิ์ของ Pseudoceratidine 1 และอนุพันธ์ 69 และ 82 กับเพรียงหิน

ขั้นตอนในการทดสอบฤทธิ์ของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** มีดังนี้

3.9.1 สำรวจและรวบรวมตัวอย่างเพรียงหินจากแหล่งธรรมชาติ และนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (รูปที่ 3.1)

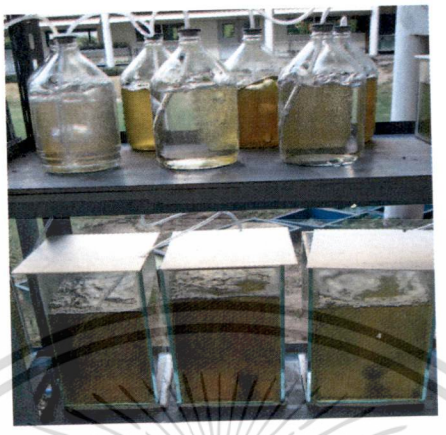


รูปที่ 3.1 เพรียงหินที่รวบรวมได้จากธรรมชาติเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

3.9.2.1 เตรียมคีโตซีรอส (*Chaetoceros* sp.) สำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเพรียงหิน แสดงดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 การเลี้ยงคีโตซีรอส (*Chaetoceros* sp.) สำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเพรียงหิน

3.9.2.2 นำเพรียงหินที่รวบรวมได้จากธรรมชาติมาเลี้ยง ในระบบหมุนเวียนน้ำ เพื่อปรับสภาพเพรียง และเลี้ยงจนกระทั่งได้เพรียงหินรุ่นใหม่ที่มีขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.3) ก่อนนำไปทดลอง โดยระหว่างการทดลองจะไม่ให้อาหาร

รูปที่ 3.3 เพรียงหินที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

3.9.3 การทดสอบความเป็นพิษของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** (รูปที่ 3.4) ต่อเพรียงหิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.4 สารละลายตั้งต้น ของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82**

3.9.3.1 การทดสอบความเป็นพิษของของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** เบื้องต้นที่ 48 ชั่วโมง

นำเพรียงหินที่ได้จากการเลี้ยงขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร จำนวน 20 ตัว มาทดสอบโดยแช่ในน้ำที่มีความเข้มข้นของสารสกัด 3 ระดับ คือ 25 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัด แต่ระดับความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจเช็คและบันทึกการตายของเพรียงหินทุกวัน เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดน้อยสุด ที่ทำให้เพรียงหินตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง

3.9.3.2 การทดสอบความเป็นพิษของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** ที่ 48 ชั่วโมง

เตรียมความเข้มข้นของของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** จากการทดลองที่ 3.9.3.1 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดน้อยสุด ที่ทำให้เพรียงหินตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยเตรียมสารสกัด 6 ระดับความเข้มข้น คือ 10 20 30 40 และ50 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัด นำเพรียงหินจำนวน 20 ตัว มาแช่ในสารสกัดที่เตรียม โดยแต่ละระดับความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจเช็คและบันทึกการตายของเพรียงหินทุกวัน เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

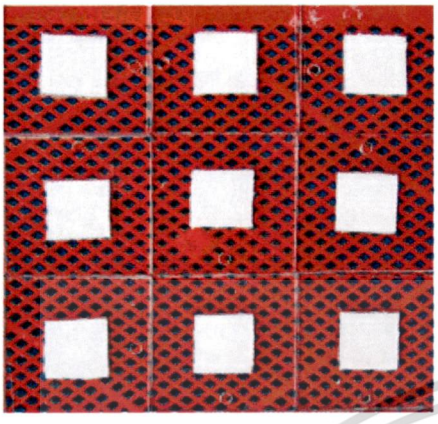
นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าความเป็นความเป็นพิษของของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** ที่ 48 ชั่วโมง เพื่อหาระดับที่เหมาะสมในการกำจัด

3.10 การทดสอบความเข้มข้นของ Pseudoceratidine 1 และอนุพันธ์ 69 และ 82 ต่อการเกาะติดของเพรียงหิน

3.10.1 เตรียมแผ่นพลาสติกใสขนาด 8 x 8 เซนติเมตร ตรงกลางมีผ้าสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4 x 4 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 และ 3.6) สำหรับให้เพรียงหินยึดเกาะ



รูปที่ 3.5 เตรียมแผ่นพลาสติกใสสำหรับให้เพรียงหินยึดเกาะ

รูปที่ 3.6 แผ่นพลาสติกใสทำความสะอาดหลังการทดลองเพื่อตรวจนับ

3.10.2 ทดสอบความความเข้มข้นของของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** ต่อการเกาะเพรียงหิน โดยวิธีการแช่ในน้ำที่มีสารสกัด

เตรียมความเข้มข้นของของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** โดยเตรียมสารสกัด 6 ระดับความเข้มข้น คือ 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดปล่อยเพรียงเต็มวัย และนำแผ่นพลาสติกใสมาแช่ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แต่ละระดับความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ เลี้ยงเพรียงหินเป็นระยะเวลา 1 เดือน ตรวจนับ (รูปที่ 3.7) และบันทึกการเกาะติดของเพรียง เพื่อหาความเข้มข้นของของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** ที่ทำให้เพรียงหินไม่ยึดเกาะ

รูปที่ 3.7 ตรวจนับจำนวนเพรียงหินหลังจากการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10.3 การทดสอบความเข้มข้นของของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** ต่อการเกาะของเพรียงหิน โดยวิธีการสเปรย์สารสกัด

เตรียมความเข้มข้นของของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** โดยเตรียมสารสกัด 6 ระดับคือ 10, 20, 30, 40, 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัด นำสารสกัดที่เตรียมได้ในแต่ละความเข้มข้นไปสเปรย์แผ่นพลาสติกใส (ตามข้อ 3.10.1) หลังจากสเปรย์สารสกัดแล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแผ่นพลาสติกใสมาแช่ในน้ำที่เลี้ยงเพรียงหิน โดยแต่ระดับความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ เลี้ยงเพรียงเป็นระยะเวลา 1 เดือน ตรวจนับและบันทึกการเกาะติดของเพรียงหินเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.10.2 เพื่อหาความเข้มข้นของของ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **69** และ **82** ที่ใช้วิธีการสเปรย์และทำให้เพรียงหินไม่ยึดเกาะ

3.10.4 ตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ ตามวิธีของ APHA (1995) ดังปัจจัยต่อไปนี้

1. ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (ammonia-nitrogen)
2. ปริมาณไนไตรท์-ไนโตรเจน (nitrite-nitrogen)
3. ปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจน (nitrate-nitrogen)
4. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)
5. ปริมาณออร์โธฟอสเฟต (orthophosphate)
6. ปริมาณฟอสเฟตทั้งหมด (total phosphate)
7. อุณหภูมิ (temperature)
8. ความเค็ม (salinity)
9. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)
10. ความเป็นด่าง (alkalinity)

3.11 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในงานวิจัยนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauer และคณะ[21] โดยมีวิธีการทดสอบดังนี้ คือ นำจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เก็บไว้บน Trypticase Soy Agar เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion Broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำจุลินทรีย์ที่บ่มเพาะได้มาปรับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับความขุ่นของ McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งเทียบเท่ากับจำนวนแบคทีเรีย 10^5-10^6 เซลล์ต่อมิลลิเมตร แล้วจึงนำจุลินทรีย์ที่เตรียมได้ไปเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar อยู่โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่ว 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ บนหน้าวุ้น หลังจากนั้นนำแผ่นดิสก์ขนาด 0.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิเมตร ที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งละลายด้วย DMSO (dimethyl sulfoxide) เจือจางลง 2 เท่า ตามลำดับ วางบนผิววุ้นที่มีจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ บ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ในกรณีทดสอบกับแบคทีเรียใช้ Vancomycin และ Oxacilin เป็นตัวยาเปรียบเทียบ และในกรณีทดสอบกับยีสต์ใช้ Amphotericin B เป็นตัวยาเปรียบเทียบ ในแต่ละชุดการทดลองจะใช้ DMSO เป็นวิธีการเปรียบเทียบ

การอ่านผล ถ้าพบ clear zone รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 2 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 5 มิลลิเมตร แสดงว่า สารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับอ่อน (weak) ถ้าพบ clear zone รอบแผ่นดิสก์มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับปานกลาง (moderate) และถ้า clear zone รอบแผ่นดิสก์มากกว่าหรือเท่ากับ 8 มิลลิเมตร แสดงว่า สารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับดี (good)

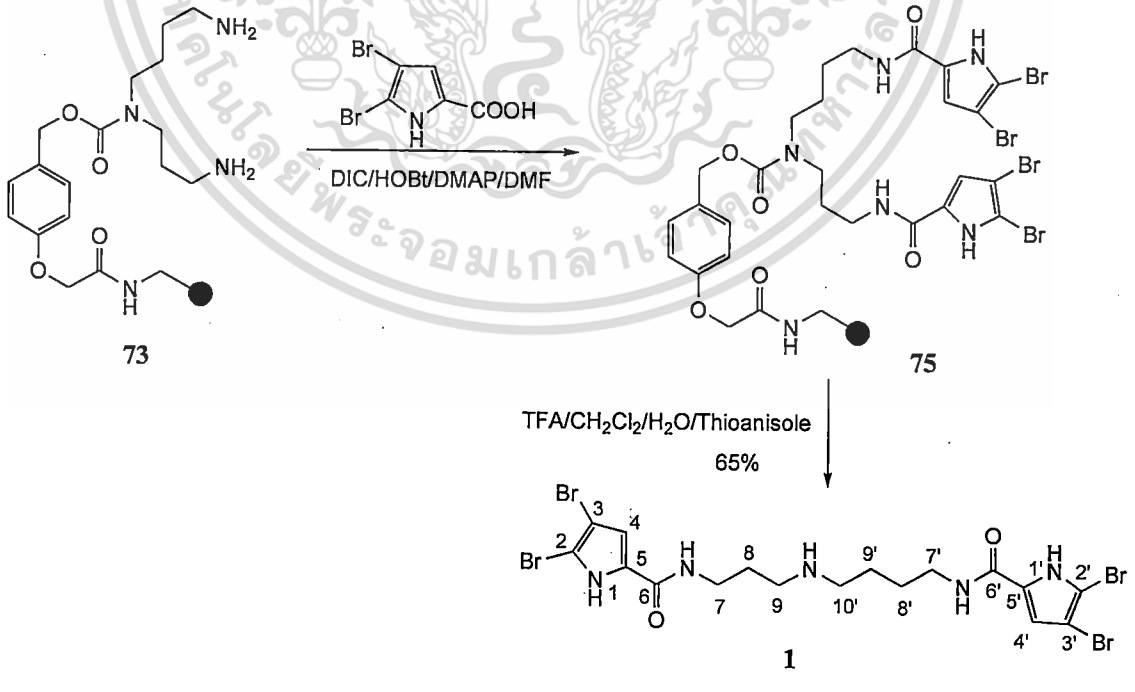
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การสังเคราะห์ Pseudoceratidine 1 โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง

การสังเคราะห์เริ่มจากนำสาร **73** แช่ในไดคลอโรมีเทนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดตัวทำละลายออก นำกรด 4,5-ไดโบรโมไพโรล-2-คาร์บอกซิลิกละลายใน DMF เติม DIC ลงไปปั่นกวน 5 นาที จากนั้นเติม HOBt ในขั้นตอนนี้สารละลายจะขุ่น และติม DMAP ใน DMF ลงไป ทำการปั่นกวน 5 นาที นำของผสมที่ได้เติมลงใน column cap และนำไปหมุนด้วยเครื่องหมุนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเรซินไปล้างด้วย DMF DCM และเมทานอล อย่างละ 20 มิลลิลิตร ตามลำดับ ตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วย reagent A และ Reagent B ถ้าเรซินไม่เปลี่ยนสีเป็นสีม่วง แสดงว่าสาร **73** ได้เปลี่ยนเป็นสาร **75** จากนั้นนำสาร **75** ไปทำการตัดออกจากตัวเชื่อมโยงโดยใช้ตัวทำละลายผสมของ TFA : DCM : น้ำ : Thioanisole ในอัตราส่วน 95 : 5 :1 :1 นำไปหมุนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเรซินด้วย DCM ได้สารผลิตภัณฑ์ **1** 65 เปอร์เซ็นต์ นำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ข้อมูลแสดงดังตารางที่ 4.1

แผนภาพที่ 23



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า δ ^{1}H และ ^{13}C NMR ของ Pseudoceratidine **1** โดยใช้ CD_3OD เป็นตัวทำละลาย

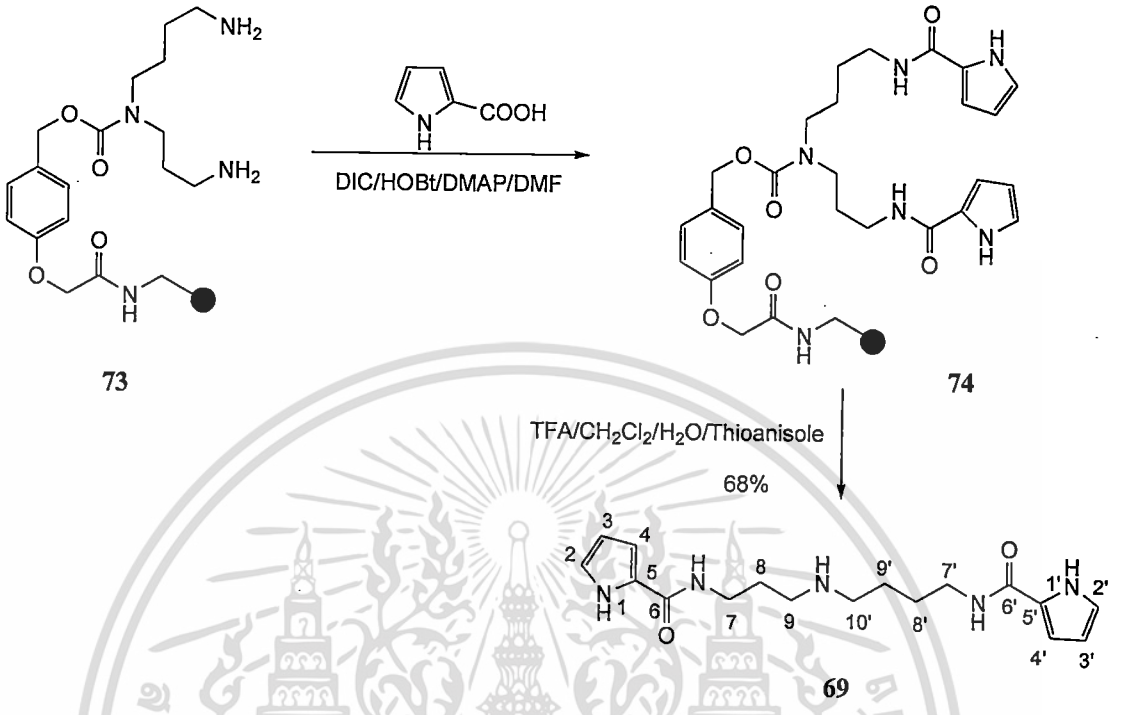
δ (ppm)	ตำแหน่งของโปรตอน	δ (ppm)	ตำแหน่งของคาร์บอน
1.55	m, 6H, H-8, H-8′ และ H-9′	22.1	C-8′
2.65	t, 4H, H-9 และ H-10′	24.6	C-8
3.25	t, 4H, H-7 และ H-7′	30.6	C-7
6.75	s, 1H, H-4	38.9	C-7′
6.85	s, 1H, H-4′	48.7	C-9
		49.4	C-10
		110	C-3 และ C-3′
		112	C-4 และ C-4′
		114	C-2 และ C-2′
		115	C-5 และ C-5′
		163	C-6 และ C-6′

4.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ *N*^{1},*N*^{8}-di(2-pyrroyl)amide spermidine 69

นำสาร **73** ไปทำปฏิกิริยาคู่ควบกับกรดไพโรล-2-คาร์บอกซิลิก เริ่มจากนำสาร **73** แช่ใน DCM เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูด DCM ออกเติมกรดไพโรล-2-คาร์บอกซิลิกที่ละลายด้วย DMF ตามด้วย DIC ทำการปั่นกวน 5 นาที และเติม HOBt สารละลายจะขุ่น จากนั้นเติม DMAP ที่ละลายใน DMF ลงไป นำของผสมที่ได้ใส่ใน column cap ที่มีสาร **73** แสดงดังแผนภาพที่ **24** นำ column cap ไปหมุนด้วยเครื่องหมุนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปล้างด้วย DMF DCM และเมทานอล อย่างละ 20 มิลลิลิตร ตามลำดับ ตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วย reagent A และ reagent B ปรากฏว่าถ้าเรซินไม่เปลี่ยนสีเป็นสีม่วงแสดงว่า สาร **73** ได้เปลี่ยนเป็นสาร **74** จากนั้นนำสาร **74** ไปทำการตัดออกจากตัวเชื่อมโยงโดยใช้ตัวทำละลายผสมของ TFA : DCM : น้ำ : Thioanisole ในอัตราส่วน 95 : 5 : 1 : 1 ทำการหมุนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาล้างเรซินด้วย DCM ได้สารผลิตภัณฑ์ **69** 68 เปอร์เซ็นต์ นำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ข้อมูลแสดงดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนภาพที่ 24



73 **74** **69**

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า δ ^{1}H และ ^{13}C NMR ของอนุพันธ์ N^{1},N^{8}-di(2-pyrroyl)amide spermidine **69** โดยใช้ CD_3OD เป็นตัวทำละลาย

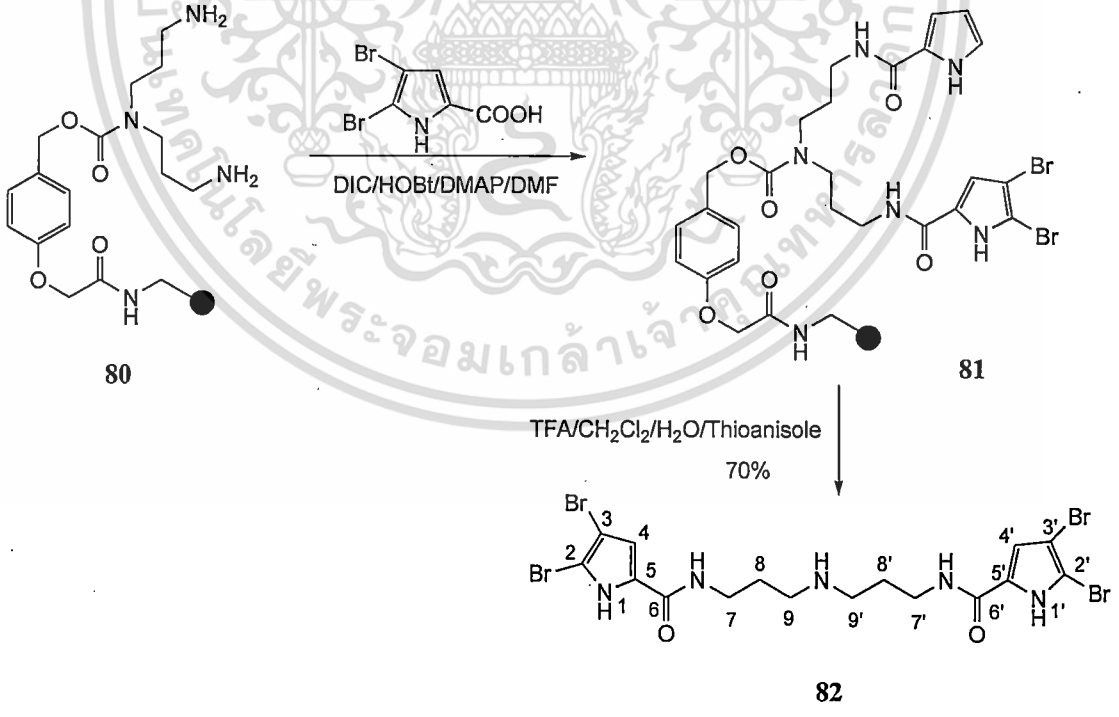
δ (ppm)	ตำแหน่งของโปรตอน	δ (ppm)	ตำแหน่งของคาร์บอน
1.59	m, 6H, H-8, H-8′ และ H-9′	29.1	C-8′และ C-9′
2.65	t, 4H, H-9 และ H-10′	33.6	C-8
3.25	t, 4H, H-7 และ H-7′	40.6	C-7
6.00	t,2H, H-3 และ H-3′	42.9	C-7′
6.65	d, 2H, H-4 และ H-4′	46.6	C-9
6.80	t, 2H, H-2 และ H-2′	49.2	C-10
		110	C-3 และ C-3′
		112	C-4 และ C-4′
		114	C-2 และ C-2′
		115	C-5 และ C-5′
		164	C-6 และ C-6′

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ N^1,N^7-di(4,5-dibromo-2-pyrrolyl)amide norspermidine 82

นำสาร **80** ไปทำปฏิกิริยาคู่ควบกับกรด 4, 5-ไดโบรโมไพโรล-2-คาร์บอกซิลิก เริ่มจากนำสาร **80** แช่ใน DCM เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูด DCM ออกเติมกรด 4, 5-ไดโบรโมไพโรล-2-คาร์บอกซิลิกที่ละลายด้วย DMF ตามด้วย DIC ทำการปั่นกวน 5 นาที และเติม HOBt สารละลายจะขุ่น จากนั้นเติม DMAP ที่ละลายใน DMF ลงไป นำของผสมที่ได้ใส่ใน column cap ที่มีสาร **80** แสดงดังแผนภาพที่ **25** นำ column cap ไปหมุนด้วยเครื่องหมุนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปล้างด้วย DMF DCM และเมทานอล อย่างละ 20 มิลลิลิตร ตามลำดับ ตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วย reagent A และ reagent B ปรากฏว่าถ้าเรซินไม่เปลี่ยนสีเป็นสีม่วงแสดงว่า สาร **80** ได้เปลี่ยนเป็นสาร **81** จากนั้นนำสาร **81** ไปทำการตัดออกจากตัวเชื่อมโยงโดยใช้ตัวทำละลายผสมของ TFA : DCM : น้ำ : Thioanisole ในอัตราส่วน 95 : 5 : 1 : 1 ทำการหมุนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาล้างเรซินด้วย DCM ได้สารผลิตภัณฑ์ **82** 70 เปอร์เซ็นต์ นำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ข้อมูลแสดงดังตารางที่ 4.3

แผนภาพที่ 25



80 **81** **82**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า δ ^{1}H และ ^{13}C NMR ของอนุพันธ์ N^{1},N^{7}-di(4,5-dibromo-2-pyrrolyl)amide norspermidine **82** โดยใช้ CD_3OD เป็นตัวทำละลาย

δ (ppm)	ตำแหน่งของโปรตอน	δ (ppm)	ตำแหน่งของคาร์บอน
1.99	m, 6H, H-8, H-8′ และ H-9′	34	C-8′และ C-8′
3.40	t, 4H, H-9 และ H-10′	43	C-7 และ C-7′
3.65	t, 4H, H-7 และ H-7′	45	C-9 และ C-9′
7.00	t,2H, H-3 และ H-3′	116	C-3 และ C-3′
	d, 2H, H-4 และ H-4′	118	C-4 และ C-4′
	t, 2H, H-2 และ H-2′	120	C-2 และ C-2′
		128	C-5 และ C-5′
		129	C-6 และ C-6′

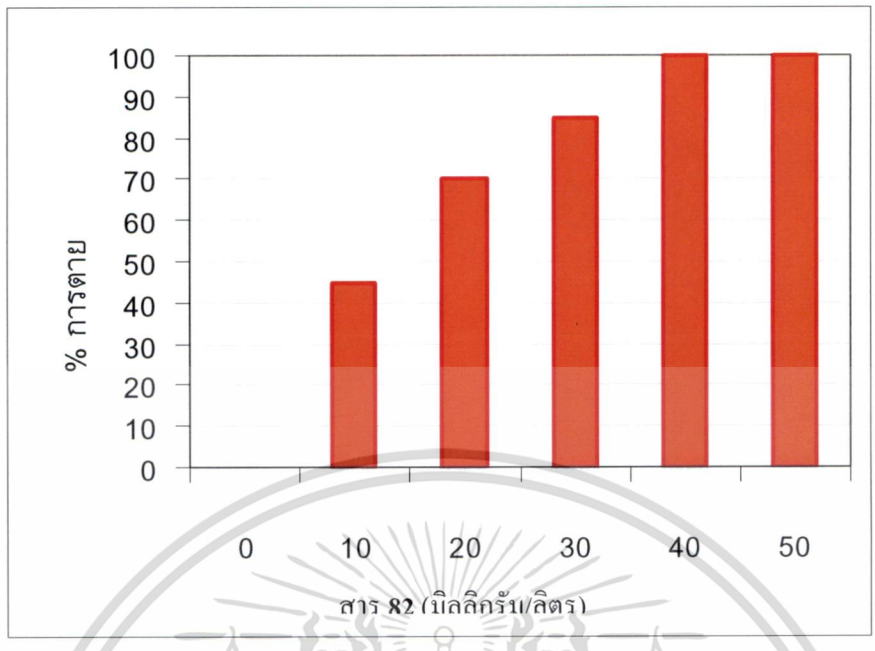
4.4 ความเป็นพิษของสาร 82 ต่อเพรียงหิน ที่ 48 ชั่วโมง

จากการทดลองความเป็นพิษของสาร **82** ต่อเพรียงหิน พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสาร **82** 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ที่ทำให้เพรียงหินตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.1) และค่า LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมงมีค่า 19 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การตายของเพรียงหินในสาร **82** ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสาร **82** (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเพรียงหิน (ตัว)		เปอร์เซ็นต์การตาย
	เริ่มต้น	ตาย	
0	20	0	0
10	20	0	0
20	20	14	70
30	20	17	85
40	20	20	100
50	20	20	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การตายของเพรียงหินในสาร **82** ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

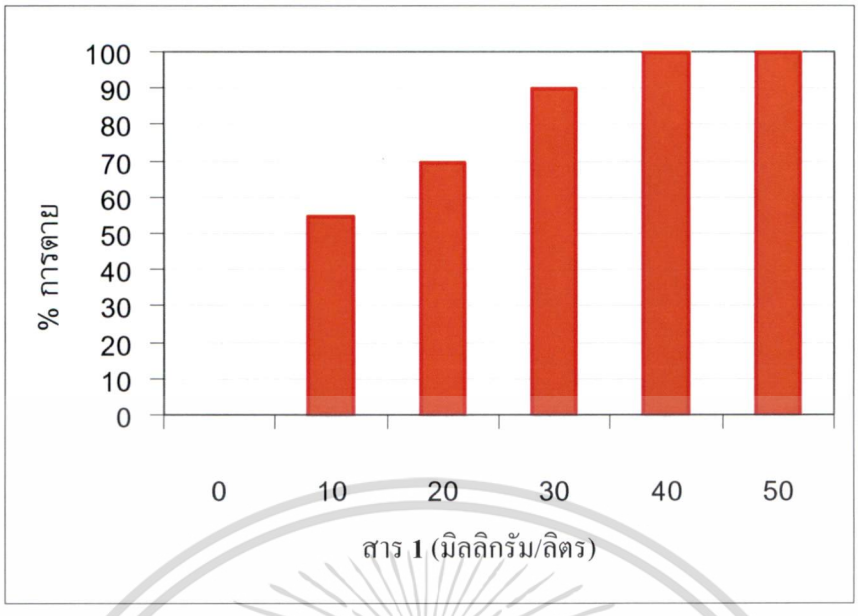
4.5 ความเป็นพิษของสาร 1 ต่อเพรียงหิน ที่ 48 ชั่วโมง

ความเป็นพิษของสาร **1** ต่อเพรียงหิน พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสาร **1** 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ที่ทำให้เพรียงหินตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.2) และค่า LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมงมีค่า 17 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การตายของเพรียงหินในสาร **1** ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสาร **1** (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเพรียงหิน (ตัว)		เปอร์เซ็นต์การตาย
	เริ่มต้น	ตาย	
0	20	0	0
10	20	11	55
20	20	14	70
30	20	18	90
40	20	20	100
50	20	20	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การตายของเพรียงหินในสาร **1** ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

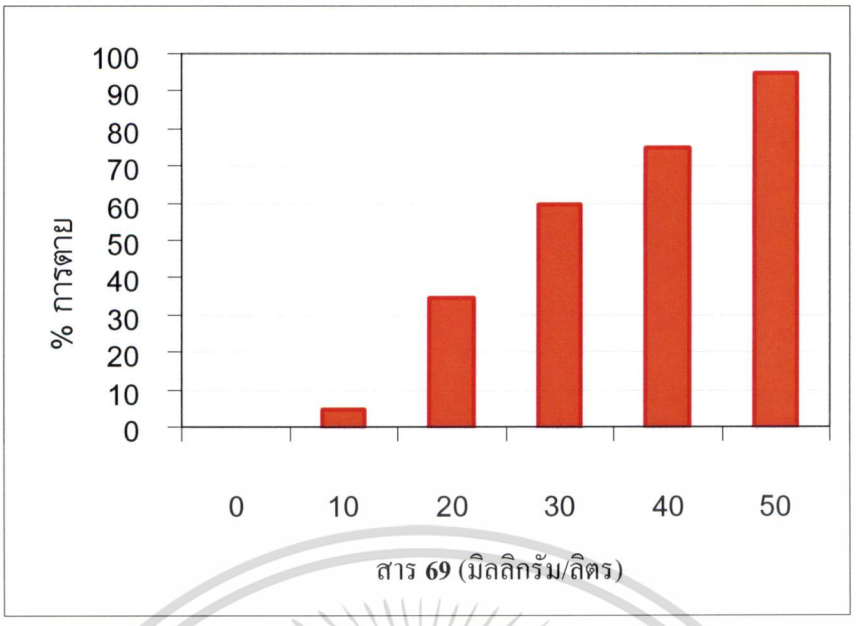
4.6 ความเป็นพิษของสาร 69 ต่อเพรียงหิน ที่ 48 ชั่วโมง

ความเป็นพิษของสาร **69** ต่อเพรียงหิน พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสาร **69** 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ที่ทำให้เพรียงหินตาย 95 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.3) และค่า LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมงมีค่า 24 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งความเป็นพิษจะน้อยกว่า สาร **82** และ สาร **1**

ตารางที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การตายของเพรียงหินในสาร **69** ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสาร **69** (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเพรียงหิน (ตัว)		เปอร์เซ็นต์การตาย (มิลลิกรัมต่อลิตร)
	เริ่มต้น	ตาย	
0	20	0	0
10	20	1	5
20	20	7	35
30	20	12	60
40	20	15	75
50	20	19	95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การตายของเพรียงหินในสาร **69** ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

4.7 การทดสอบความเข้มข้นของสาร 82 1 และ 69 ต่อการเกาะติดของเพรียงหิน

4.7.1 โดยวิธีการแช่ในสารละลาย

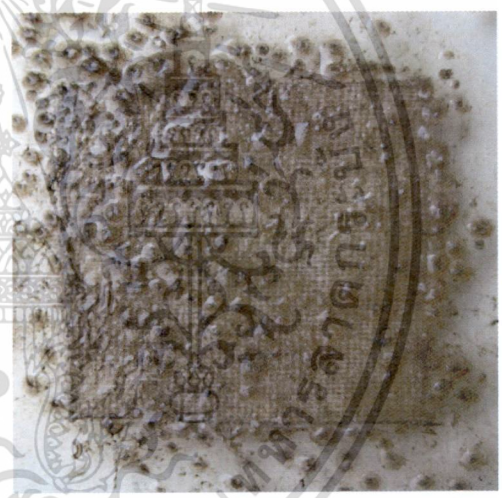
ความเข้มข้นของสารละลาย **82 1** และ **69** มีผลต่อการเกาะติดของเพรียงหินเมื่อใช้วิธีการแช่ในสารละลาย (ตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.5-4.9) โดยพบว่า การยึดเกาะของเพรียงหินจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และไม่พบการเกาะติดของเพรียงหินที่แช่ในสารละลายของสาร **82** และ **1** ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการใช้สารละลายของสาร **69** จะต้องใช้สารละลายมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับค่าการทดสอบความเป็นพิษซึ่งมีค่า LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมง สูงกว่าสารละลายของสาร **82** และ **1**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การเกาะของเพรียงหินที่ใช้วิธีการแช่สารละลายสาร **82 1** และ **69**

ความเข้มข้นของสารละลาย	จำนวนการเกาะของเพรียงหิน (ตัว)		
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	**82**	**1**	**69**
0	25	27	28
10	14	12	19
20	7	5	12
30	4	3	9
40	1	2	6
50	0	0	4

รูปที่ 4.4 การเกาะของเพรียงหินที่ความเข้มข้นของสารละลายที่ความเข้มข้น 0 ppm



รูปที่ 4.5 การเกาะของเพรียงหินที่ความเข้มข้นของสารละลายที่ความเข้มข้น 10 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.6 การเกาะของเพรียงหินที่ความเข้มข้นของสารละลายที่ความเข้มข้น 20 ppm

รูปที่ 4.7 การเกาะของเพรียงหินที่ความเข้มข้นของสารละลายที่ความเข้มข้น 30 ppm

รูปที่ 4.8 การเกาะของเพรียงหินที่ความเข้มข้นของสารละลายที่ความเข้มข้น 40 ppm

รูปที่ 4.9 การเกาะของเพรียงหินที่ความเข้มข้นของสารละลายที่ความเข้มข้น 50 ppm

ความเข้มข้นของสารละลาย **82 1** และ **69** มีผลต่อการเกาะติดของเพรียงหินเมื่อใช้วิธีการสเปรย์สารสกัด (ตารางที่ 4.8) โดยพบว่า การยึดเกาะของเพรียงหินจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสาร **82 1** และ **69** เพิ่มขึ้น แต่การเกาะติดของเพรียงหินจะพบมากกว่าวิธีการแช่ในสารละลายของสาร **82 1** และ **69** ซึ่งที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพรียงหินยังสามารถยึดเกาะได้ ต่างจากวิธีการแช่ในสารสารละลายซึ่งไม่พบการยึดเกาะของเพรียงหิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การเกาะของเพรียงหินที่ใช้วิธีสเปรย์สารละลาย **82 1** และ **69**

ความเข้มข้นของสารละลาย	จำนวนการเกาะของเพรียงหิน		
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	**82**	**1**	**69**
0	28	27	29
10	20	22	25
20	17	19	21
30	13	14	18
40	9	8	11
50	4	5	9

จากการศึกษาคุณภาพน้ำซึ่งเป็นปัจจัยสภาพแวดล้อมระหว่างการทดลองใช้สารละลาย **82 1** และ **69** เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเพรียงหิน พบว่า คุณภาพน้ำอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อเพรียง (ตารางที่ 4.9, 4.10 และ 4.11) และไม่ได้เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการตายของเพรียงหิน

ตารางที่ 4.9 ปัจจัยคุณภาพน้ำในการทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย **82** ต่อเพรียงหิน ด้วยวิธีการแช่และสเปรย์สารละลาย

ปัจจัยคุณภาพน้ำ	วิธีการแช่สารละลาย		วิธีการสเปรย์สารละลาย	
	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง
NH_3-N (mg/L)	0.006	0.007	0.006	0.006
NO^-_2-N (mg/L)	0.011	0.013	0.011	0.012
NO^-_3-N (mg/L)	0.001	0.001	0.001	0.001
TN (mg/L)	0.013	0.014	0.013	0.013
PO^-_4 (mg/L)	0.004	0.004	0.004	0.004
TP (mg/L)	0.006	0.007	0.006	0.006
Temperature (^oC)	28	28	28	28
Salinity (ppt)	25	25	25	25
pH	7.28	7.27	7.28	7.26
Alkalinity ($mgCaCO_3/L$)	95	97	95	96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ปัจจัยคุณภาพน้ำในการทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย 1 ต่อเพรียงหิน ด้วยวิธีการแช่และสเปรย์สารละลาย

ปัจจัยคุณภาพน้ำ	วิธีการแช่สารละลาย		วิธีการสเปรย์สารละลาย	
	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง
NH_3-N (mg/L)	0.004	0.012	0.004	0.010
NO^-_2-N (mg/L)	0.021	0.023	0.021	0.022
NO^-_3-N (mg/L)	0.002	0.002	0.002	0.002
TN (mg/L)	0.029	0.030	0.029	0.029
PO^-_4 (mg/L)	0.003	0.003	0.003	0.003
TP (mg/L)	0.005	0.006	0.005	0.006
Temperature (^oC)	28	28	28	28
Salinity (ppt)	25	25	25	25
pH	7.24	7.25	7.26	7.27
Alkalinity ($mgCaCO_3/L$)	89	91	89	90

ตารางที่ 4.11 ปัจจัยคุณภาพน้ำในการทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย **69** ต่อเพรียงหิน ด้วยวิธีการแช่และสเปรย์สารละลาย

ปัจจัยคุณภาพน้ำ	วิธีการแช่สารละลาย		วิธีการสเปรย์สารละลาย	
	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง
NH_3-N (mg/L)	0.004	0.01	0.004	0.010
NO^-_2-N (mg/L)	0.021	0.02	0.021	0.021
NO^-_3-N (mg/L)	0.002	0.002	0.002	0.002
TN (mg/L)	0.029	0.028	0.029	0.029
PO^-_4 (mg/L)	0.003	0.003	0.003	0.003
TP (mg/L)	0.005	0.007	0.005	0.006
Temperature (^oC)	28	28	28	28
Salinity (ppt)	25	25	25	25
pH	7.24	7.26	7.25	7.26
Alkalinity ($mgCaCO_3/L$)	89	92	89	91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Staphylococcus food poisoning) มีลักษณะเป็นรูปร่างทรงกลมติดสีกรัมบวก มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นกลุ่มๆทำให้ดูเหมือนพวงองุ่น แต่จะพบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ และเป็นสายสั้นๆ (โดยมากไม่เกิน 4 เซลล์) อยู่ปะปนด้วยเสมอ เชื้อนี้ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนไหว ส่วนใหญ่ไม่มีแคพซูล ให้ผลบวกในการทดสอบ catalase และในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะสลายน้ำตาลกลูโคสให้กรด เมื่อได้รับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้จะเกิดอาการอย่างเฉียบพลัน มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดินอย่างแรงจนอ่อนเพลียมาก ปวดท้องและเป็นตะคริวได้ ส่วนมากไม่มีไข้ ในรายรุนแรงอาจช็อคได้ แต่ส่วนใหญ่อาการจะดีขึ้นใน 8-24 ชั่วโมง โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจาก *Staphylococcus aureus* เกิดจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อน สารพิษ enterotoxin ของเชื้อ *S. aureus* เข้าไปประมาณร้อยละ 30-50 ของ *S. aureus* สร้างสารพิษชนิดนี้ ซึ่งแบ่งออกเป็น 8 ชนิด ได้แก่ ชนิด A , B , C1 , C2 , C3 , D , E, และ H สารพิษนี้มีคุณสมบัติพิเศษ คือ ทนต่อความร้อนได้ดีมาก ต้มเดือดนานครึ่งชั่วโมงก็ยังไม่ถูกทำลาย อาหารที่มีเชื้อและสารพิษปนเปื้อนอยู่จะไม่มีกลิ่น สี หรือ รสผิดปกติไป ผู้ป่วยจะเกิดอาการของอาหารเป็นพิษขึ้น หลังจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไปประมาณ 1-6 ชั่วโมง เนื่องจากสารพิษไปออกฤทธิ์ที่เยื่อบุลำไส้เล็ก ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดท้อง และ ท้องเดิน ส่วนมากไม่มีไข้ ในรายรุนแรงอาจช็อคได้ แต่ส่วนใหญ่อาการจะดีขึ้นใน 8-24 ชั่วโมง โรคนี้มีลักษณะพิเศษซึ่งอาจใช้เป็นแนวทางในการวินิจฉัยได้คือ มีประวัติเป็นพร้อมๆกันหลายคน และมีระยะฟักตัวสั้น อาการรุนแรงของโรคขึ้นกับจำนวนสารพิษในอาหารที่รับประทานเข้าไป เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ เมื่อนำ Pseudoceratidine **1** และ อนุพันธ์ **69** และ **82** มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ *S. aureus* จากผลการทดลองพบว่า Pseudoceratidine **1** และ อนุพันธ์ **69** และ **82** มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อต่ำ ที่ระดับความเข้มข้นของสารมากกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่า MIC มากกว่า 100 (ที่ระดับความเข้มข้นของสารมากกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 แสดงค่า MIC ของ Pseudoceratidine **1** และ อนุพันธ์ **69** และ **82**

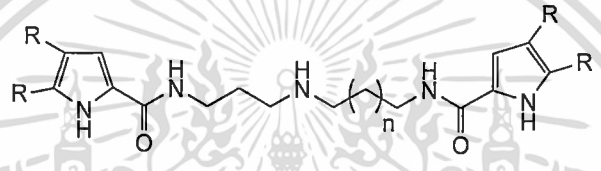
เชื้อจุลินทรีย์	ค่า MIC ของ Pseudoceratidine **1** และ อนุพันธ์ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
	1	**69**	**82**
Staphylococcus aureus MRSA 20625	>100	>100	>100
S. aureus MRSA 20626	>100	>100	>100
S. aureus MRSA 20627	>100	>100	>100
S. aureus MRSA 20628	>100	>100	>100
S. aureus MRSA 20630	>100	>100	>100
S. aureus MRSA 20631	>100	>100	>100
S. aureus MRSA 20632	>100	>100	>100
S. aureus MRSA 20633	>100	>100	>100
S. aureus MRSA 20635	>100	>100	>100
S. aureus MRSA 20636	>100	>100	>100
S. aureus MRSA 20652	>100	>100	>100
S. aureus MRSA 20653	>100	>100	>100
S. aureus MRSA 20654	>100	>100	>100
S. aureus VRSA 20622	>100	>100	>100
S. aureus VRSA 20623	>100	>100	>100
S. aureus VRSA 20624	>100	>100	>100
S. aureus VRSA 20626	>100	>100	>100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 การสังเคราะห์สาร Pseudoceratidine 1 และอนุพันธ์ 82 และ 69

จากการสังเคราะห์ Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **82** และ **69** โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง สามารถสังเคราะห์ได้ Pseudoceratidine **1** เท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ อนุพันธ์ N^1,N^7-di(4,5-dibromo-2-pyrrolyl)amide norspermidine **82** และ อนุพันธ์ N^1,N^8-di(2-pyrroyl)amide spermidine **69** สามารถสังเคราะห์ได้เท่ากับ 70 และ 68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



1: n = 2, R = Br

69: n = 2, R = H

82: n = 1, R = Br

5.2 ความเป็นพิษต่อการตายของเพรียงหิน

สารละลาย Pseudoceratidine **1** และอนุพันธ์ **82** และ **69** มีความเป็นพิษต่อการตายของเพรียงหิน โดยมีค่า LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมง 17, 19 และ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำให้เพรียงหินตาย 100 % ที่ระดับความเข้มข้น 40 และมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสารละลาย **82** **1** และ **69** มีผลต่อการเกาะติดของเพรียงหิน โดยใช้วิธีการแช่ในสารละลาย **82** และ **1** ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการใช้สารละลาย **69** จะต้องใช้สารสกัดมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งระหว่างการทดสอบ ปัจจัยคุณภาพน้ำอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อเพรียงหิน และไม่ได้เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการตายของเพรียงหิน ดังนั้น การตายและการเกาะติดของเพรียงหินจึงมีผลมาจากความเข้มข้นของสารละลาย **82** **1** และ **69**

5.3 ฤทธิ์ต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดสอบเชื้อ *S. aureus* พบว่า Pseudoceratidine **1** และ อนุพันธ์ **82** และ **69** มีค่า MIC มากกว่า 100 หมายถึง สารทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อต่ำ ที่ระดับความเข้มข้นของสารมากกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] L. G. Copping. 1996. Crop Production Agents from Nature : Natural Products and Analogues. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K.

[2] N. Fusetani, Y. Masuda, Y. Nakao, S. Matsunaga and R. W. M. Van Soest. 2001. Three new bromotyrosine derivatives lethal to crab from the marine sponge, *Pseudoceratina purpurea*., **Tetrahedron**, vol. 57, pp. 7507-7511.

[3] APHA. 1995. Standard Methods. 19th Edition, American Public Health Association, Washington, DC.

[4] H. S. Swingle. 1969. Method of Analysis for Waters, Organic Matter and Pond Bottom Soils Used in Fisheries Research, Auburn University : 199 p.

[5] R. J. H.Herbert, and S. J. Hawkins. 2006. Effect of rock type on the recruitment and early mortality of the barnacle *Chthamalus montagui*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 334:96-108.

[6] D. V. Desai, and A. C. Anil.2004. The impact of food type, temperature and starvation on larval development of *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia: Thoracica)., **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 306:113-137.

[7] M. S. Berger, A. J. Darrah, and R. B. Emlet. 2006. Spatial and temporal variability of early post-settlement survivorship and growth in the barnacle *Balanus glandula* along an estuarine gradient., **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 336:74-87.

[8] S. Tindle, E. Boone, J. O. Brien, and A. Boettcher. 2004. Effects of salinity on larval stages of the rhizocephalan barnacle *Loxothylacus texanus*: survival and metamorphosis in response to the host, *Callinectes sapidus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 302:165-176.

[9] J. Qui, V. Thiyagarajan, S. Cheung, and P. Qian. 2005. Toxic effects of copper on larval development of the barnacle *Balanus amphitrite*. **Marine Pollution Bulletin**, 51:688-693.

[10] E. Armstrong, K. G. Boyd, A. Pisacane, C. J. Peppiatt and J. G. Burgess. 2000. Marine microbial natural products in antifouling coatings., **Biofouling**, vol. 16, pp. 215-224.

[11] T. V. Raveendran and V. P. Limna Mol. 2009. Natural Product Antifoulants., **Current Science**, vol. 97, pp. 508-520.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[12] C. Behrens, M. W. Christoffersen, L. Gram and P. H. Nielsen. 1997. A convenient synthesis of Pseudoceratidine and three analogs of biological evaluation., **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 7, pp. 321-326.

[13] S. Tsukamoto, H. Kato, H. Hirota and N. Fusetami. 1996. Ceratinamides A and B: New antifouling dibromotyrosine derivatives from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*., **Tetrahedron**, vol. 52, pp. 8181-8186.

[14] J. A. Ponasik, D. J. Kassab and B. Ganem. 1996. Synthesis of the antifouling polyamine Pseudoceratidine and its analogs: factors influencing biocidal activity., **Tetrahedron Letters**., vol. 37, pp. 6041-6044.

[15] D. M. Roll, C. W. J. Chang, P. J. Scheuer, G. A. Gray, J. N. Shoolery, G. K. Matsumoto, G. D. Van Duyne and J. Clardy. 1985. Structure of the psammaplysins., **Journal of America Chemical Society**, vol. 107, pp. 2916-2920.

[16] R. P. Walker, D. J. Faulkner, D. V. Engen and J. Clardy. 1981. Septrin, an antimicrobial agent from the sponge agelas spectrum., **Journal of America Chemical Society**, vol. 103, pp. 6772-6773.

[17] M. T. Hamann, P. J. Schener and M. Kelly-Borges. 1993. Biogenetically diverse, bioactive constituents of a sponge, order Verongida: bromotyramines and sesquiterpene-shikimate derived metabolites., **Journal of Organic Chemistry**, vol. 58, pp. 6565-6569.

[18] G. W. Gribble. 1996., **Natural Chloride Updates**., vol. 30, pp. 1-26.

[19] N. Takada, R. Watanabe, K. Suenaga, K. Yamada, K. Ueda, M. Kita and D. Uemura. 2001. Zamamistatin, a significant antibacterial bromotyrosine derivative, from the Okinawa sponge *Pseudoceratidine purpurea*., **Tetrahedron Letters.**, vol. 43, pp. 5265-5267.

[20] B. Chitkul and M. Bradley. 2000. Optimising inhibitors of trypanothione reductase using solid-phase chemistry., **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 10, pp. 2367-2369.

[21] A. W. Bauer, W. M. M. Kirby, J. C. Sherris and M. Truck. 1966. Antibiotic Sueptibility Testing by a Standardized Single Disk Method., **American Journal Clinical Pathology,** Vol. 45, pp. 493-496.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้