



การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของไบล์แอซิด
เพื่อเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพ

Structure Modification of Bile Acids for
Increasing Biological Activity

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปีงบประมาณ 2553

ผู้วิจัย

RCH

QP

752

B54

พ 5167

ค. 1

ลงหมู่.....

เลขทะเบียน 115559

ใน,เดือน,ปี 21 ส.ค. 2554

ผศ. ดร. พัชนี เจริญยิ่ง

Asst. Prof. Dr. Patchanee Charoenying

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

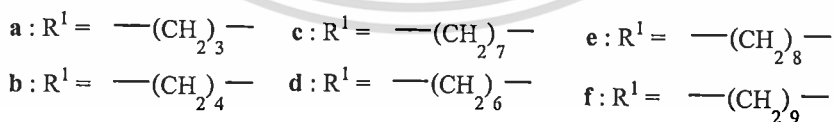
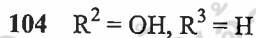
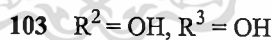
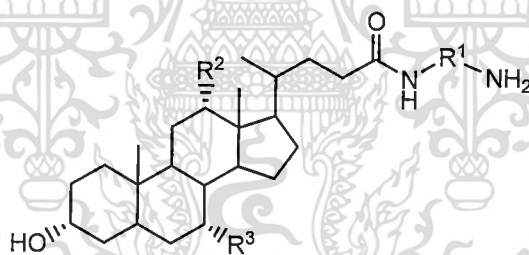
b. 12313063
i.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ได้สังเคราะห์ไบอะเซติเคอไมด์ชนิดใหม่ **103a-103f** และ **104a-104f** จากกรดโคลิค **1** และกรดดีออกซีโคลิค **1** โดยใช้เทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็ง ผลที่ได้อยู่ในเกณฑ์ระดับปานกลางถึงดี ไบล์อะเซติเคอไมด์สังเคราะห์ถูกนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย (antialgal) และฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์ (cytotoxic) จากการทดลองพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppm ไบล์อะเซติเคอไมด์ **104b** มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย *Chorella* sp. 47.69 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไบล์อะเซติเคอไมด์ **103b** ที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm มีผลในการยับยั้งเซลล์สาหร่าย *Oscillatoria* sp. 37.90 เปอร์เซ็นต์

สำหรับฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์พบว่า ไบอะเซติเคอไมด์ **103b-103f** และ **104b-104f** มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB-oral cavity cancer) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7-breast cancer) ในระดับปานกลางถึงดี โดยเฉพาะไบอะเซติเคอไมด์ **104c** จะมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB-oral cavity cancer) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7-breast cancer) ในระดับดีมีค่า IC_{50} 3.42 และ 9.70 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

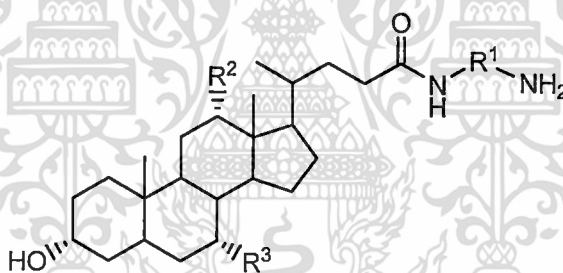


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

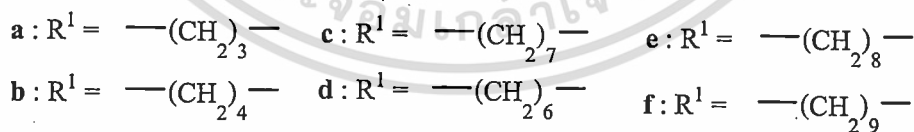
New synthetic cholic acid amides **103a-f** and deoxycholic acid amides **104a-f** were synthesized by solid phase technique in moderate to good yields. These compounds were tested for antialgal and cytotoxic activities. As for antialgal activity, the results found that at the concentration of 10 ppm deoxycholic acid amide **104b** showed inhibitory effect on cell germination of *Chorella* sp. by 47.69% while at the concentration of 20 ppm cholic acid amide **103b** exhibited inhibitory effect on cell germination of *Oscillatoria* sp. by 37.90%.

As for cytotoxic activities, the results found that cholic acid amides **103b-f** and deoxycholic acid amides **104b-104f** showed significant anticancer, KB-oral cavity cancer and MCF7-breast cancer, in moderate to good activities. Particularly, the good activity was obtained with deoxycholic amide **104c** on KB-oral cavity cancer and MCF7-breast cancer (IC_{50} 3.42 and 9.70 $\mu\text{g/mL}$)



103 $R^2 = \text{OH}, R^3 = \text{OH}$

104 $R^2 = \text{OH}, R^3 = \text{H}$



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามความตั้งใจในระดับหนึ่งด้วยการสนับสนุนเงินทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ งบประมาณปี 2553 ที่พิจารณาเห็นคุณค่าของงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณผู้ร่วมงานวิจัย รศ.ดร. นันทนา อรุณฤกษ์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำให้ความรู้ในเรื่องการทดสอบสารสังเคราะห์ต่อเชื้อจุลินทรีย์

ขอขอบคุณ รศ.ดร. สมชาย หวังวิบูลย์กิจ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำให้ความรู้ในเรื่องการทดสอบสารสังเคราะห์ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ขอขอบคุณ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้อความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้

พัชนี เจริญยิ่ง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
รายการคำย่อ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและดำเนินงาน	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 ไบเล่แอซิด (Bile acid).....	5
2.2 พอลิเอมีน	12
2.3 สาหร่ายและความเป็นพิษของสาหร่าย	15
2.4 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง	16
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	26
3.2 การทดลองทั่วไป	26
3.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของไบเล่แอซิด โดยเทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็ง.....	27
3.3.1 ปฏิกิริยาการกระตุ้น Wang resin โดยการเปลี่ยนเป็นหมู่คาร์บอนेट.....	27
3.3.2 ปฏิกิริยาการใส่เอมีนเข้าไปทำปฏิกิริยากับ Wang resin	28
3.3.3 ปฏิกิริยาการใส่ไบเล่แอซิดเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน.....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.4 ปฏิบัติการตัดสารผลิตภัณฑ์ออกจาก Wang resin.....	30
3.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย	30
3.4.1 การเตรียมอนุพันธ์เอไมด์ของไบสแอสิด	30
3.4.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย	31
3.4.3 การวิเคราะห์บันทึกผลและการวิเคราะห์ผล	31
3.5 การทดสอบฤทธิ์ด้านความเป็นพิษของเซลล์.....	32
3.5.1 ทดสอบฤทธิ์ด้านความเป็นพิษของเซลล์	32
3.5.2 ทดสอบฤทธิ์การต้านไวรัสเริม HSV-1.....	32
3.5.3 ทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก	32
3.5.4 ทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านม	33
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	
4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของไบสแอสิด โดยเทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็ง.....	34
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย 3 ชนิด	45
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านความเป็นพิษต่อเซลล์และไวรัสเริม HSV-1 ของอนุพันธ์เอไมด์ของไบสแอสิด 103b-103c และ 104b-104c	48
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง ของอนุพันธ์เอไมด์ของไบสแอสิด 103a-103f และ 104a-104f	49
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	
5.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของไบสแอสิด	53
5.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย	53
5.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์	55
5.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง	55
เอกสารอ้างอิง	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 จำนวนเซลล์สำหรับ 3 ชนิดที่ถูกยับยั้งด้วยสาร 2 (103b)	46
4.2 จำนวนเซลล์สำหรับ 3 ชนิดที่ถูกยับยั้งด้วยสาร 103b	48
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์และไวรัสเริม HSV-1 ของอนุพันธ์เอไมด์ของไบล์เอซิด 103a-103f และ 104a-104f	49
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก KB-Oral cavity cancer ของอนุพันธ์เอไมด์ของไบล์เอซิด 103a-103f และ 104a-104f	50
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านม MCF7-breast cancer ของอนุพันธ์เอไมด์ของไบล์เอซิด 103a-103f และ 104a-104f	51
5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของสาหร่าย 3 ชนิด ของอนุพันธ์เอไมด์ของไบล์เอซิด 2 (103b)	54
5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของสาหร่าย 3 ชนิด ของอนุพันธ์เอไมด์ของไบล์เอซิด 104b	54

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงกระบวนการ Enterohepatic circulation	5
2.2 แสดงความเป็น Amphipathic	9
2.3 รูปร่างของโคโลนีของ <i>Microcystis</i> sp.	17
2.4 เซลล์ของสาหร่าย <i>Oscillatoria</i> sp.	17
2.5 เซลล์ของสาหร่าย <i>Chorella</i> sp.	18
5.1 แสดงโครงสร้างของสารอนุพันธ์เอไมด์ของ ไบโกลีแอซิด 103a-103f และ 104a-104f	53



รายการคำย่อ

^{13}C NMR	^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
CI-MS	Chemical Ionization Mass Spectrometry
$\mu\text{g/mL}$	Microgram/milliliter
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMRT	Duncan's Multiple Rang Test
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EI-MS	Electron Ionization Mass Spectrometry
ES-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
^1H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
IC ₅₀	Inhibition Concentration at 50%
ppm	part per million
rt	room temperature
TMS	Tetramethylsilane

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจำนวนมากถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และมนุษย์ ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน เนื่องจากสารเหล่านี้มีสมบัติที่ดีทั้งทางเคมีและชีวภาพ ต่อมา นักวิทยาศาสตร์สนใจนำสารเหล่านี้มาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยปฏิกิริยาเคมี ซึ่งการปรับเปลี่ยนในที่นี้หมายถึง การปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีหรือหมู่ฟังก์ชันซึ่งจะนำไปสู่สมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารที่ดีมากยิ่งขึ้นและหรือน้อยลงกว่าเดิม ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับสมบัติทางชีวภาพของสารซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านั้น

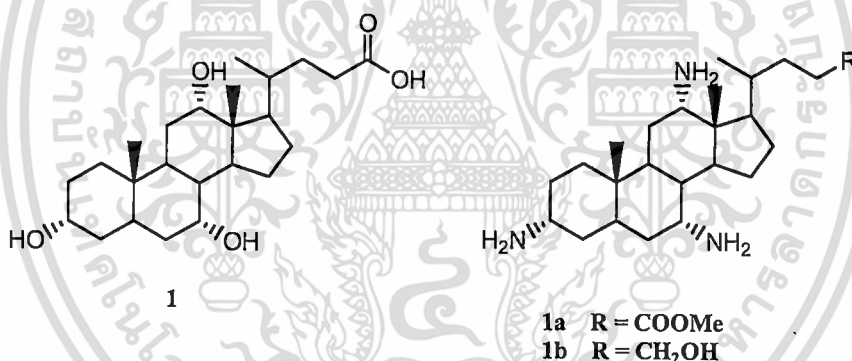
สเตียรอยด์เป็นสารธรรมชาติกลุ่มหนึ่งที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ มีความสำคัญทางชีวภาพ และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจึงนิยมนำมาใช้ในทางการแพทย์ สเตียรอยด์มีด้วยกันหลายกลุ่ม เช่น กลุ่ม Antandrogen นำมาใช้เป็นยารักษาภาวะ Hyperandrogenism กลุ่ม Cardiac steroid สามารถใช้ในการรักษาโรค Congestive heart failure เป็นต้น นอกจากนี้สเตียรอยด์บางชนิดพบได้จากพืชธรรมชาติก็ถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้ เช่น G-strophanthin ได้จากเมล็ดของ *Strophanthus gratus* Baillon ใช้รักษาโรคหัวใจวายเฉียบพลัน Ruscogenin ได้จากต้น *Ruscus aculeatus* วงศ์ Liliaceae ใช้รักษาโรคกรดสีดวงทวาร Scillaren A ได้จากส่วนใบบนหัวใต้ดินของ *Urginea maritime* Baker วงศ์ Liliaceae ใช้เป็นยาขับเสมหะที่ออกฤทธิ์บำรุงหัวใจและมีฤทธิ์ขับปัสสาวะด้วย[1] สเตียรอยด์ยังเป็นฮอร์โมนในสัตว์และพืชด้วย เช่น Progesterone เป็นฮอร์โมนเพศหญิง Testosterone เป็นฮอร์โมนเพศชาย เป็นต้น สเตียรอยด์เป็นสารที่มีสมบัติในทางชีวภาพที่ดีและเป็นสารที่มีอยู่ในธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมในระดับค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อที่จะนำไปใช้ศึกษาการออกฤทธิ์ในทางชีวภาพและพัฒนาเป็นยารักษาโรค

ไบสแอสิตเป็นสเตียรอยด์กลุ่มหนึ่งสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด แต่ในมนุษย์จะพบในน้ำดีซึ่งถูกผลิตจากคลอเลสเทอรอลภายในตับ ซึ่งการเปลี่ยนคลอเลสเทอรอลไปเป็นไบสแอสิตนั้นเป็นทางหนึ่งที่จะช่วยขับคลอเลสเทอรอลส่วนเกินออกไปได้ หน้าที่ที่สำคัญของไบสแอสิตภายในร่างกายมนุษย์คือ การทำหน้าที่ช่วยในการกระจายตัวของไขมันให้เป็นไขมันที่มีขนาดเล็กลง เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสให้อินซูลินไปจับกับไลโปโปรตีนไปตัดพันธะเอสเทอร์ระหว่างกลีเซอรอลและกรดไขมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มากขึ้น เป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันในลำไส้เล็ก นอกจากนี้ยังได้มีการนำไบลเอนซิดไปใช้ทางด้านต่าง ๆ เช่น การนำกรดคลีนดีออกซีโคลิกใช้เป็นยาในการรักษาโรค cerebrotendinous xanthomatosis โรค hypertriglyceremia โรคตับที่มีมาแต่กำเนิด โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ และโรคท้องผูก[2] การนำกรดคลีนดีออกซีโคลิกและกรดเอโซดีออกซีโคลิกซึ่งเป็นอนุพันธ์ไบลเอนซิดไปใช้เป็นยาละลายนิ่วซึ่งสามารถใช้ได้ดีในผู้ป่วยบางราย[3] การนำกรดเอโซดีออกซีโคลิกมาใช้เป็นยารักษาโรคคอลลอสตาซิส (cholestasis) ซึ่งเป็นภาวะที่ผู้ป่วยมีการอักเสบบริเวณรอบ ๆ ท่อน้ำดีส่งผลให้มีความผิดปกติในการขับน้ำดี[4] การใช้กรดเอโซดีออกซีโคลิกเป็นยาที่ส่งผลทำให้เซลล์ตับแข็งแรง ปรับปรุงระบบการขับถ่ายให้ดีขึ้น[5]

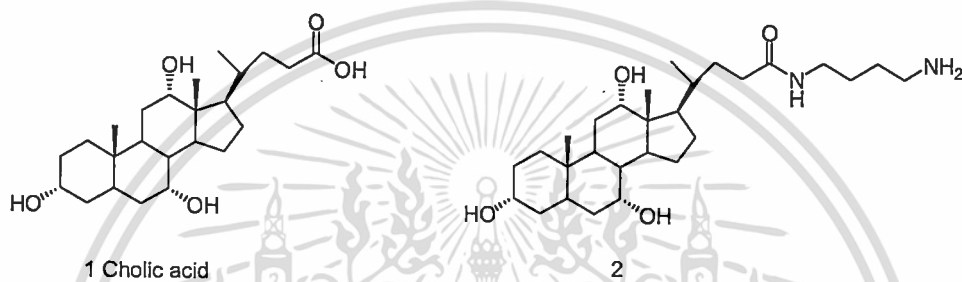
จากสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลายของไบลเอนซิดที่นำไปใช้เป็นส่วนประกอบของยาในการบำบัดรักษาโรคต่าง ๆ และจากโครงสร้างของไบลเอนซิดที่ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่สามารถปรับเปลี่ยนได้โดยการใช้ปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์อย่างง่าย รวมทั้งรายงานการวิจัยถึงผลของหมู่ฟังก์ชันบางหมู่ที่สามารถเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าไบลเอนซิดตั้งต้น เช่น Savage และคณะ[6] ได้สังเคราะห์สาร 1a และ 1b เพื่อหาตัวยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของกรดโคลิก 1 ไปเป็นหมู่อะมิโน



ผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของไบลเอนซิด โดยการนำเข้ามาเชื่อมต่อกับสารชนิดอื่น ทั้งนี้เพื่อเป็นการเสาะแสวงหาฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ ของอนุพันธ์ของไบลเอนซิด และสามารถนำไปใช้งานทางด้านยาได้หลากหลายมากขึ้น แต่เนื่องจากไบลเอนซิดเป็นสเตียรอยด์ที่มีความมีขั้วสูง การสังเคราะห์ทางเคมีอินทรีย์โดยใช้เทคนิคสารละลายนั้นทำได้ยากซึ่งจะมีข้อจำกัดในการใช้ตัวทำละลาย ในงานวิจัยนี้จึงเลือกทำการสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของไบลเอนซิดโดยใช้เทคนิควิภาคของแข็ง ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีข้อได้เปรียบกว่าเทคนิคสารละลายคือไม่จำเป็นจะต้องทำการแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี จึงทำได้ง่ายและรวดเร็วกว่า นอกจากนี้สารผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็มีความบริสุทธิ์มากกว่า รวมทั้งไม่สูญเสียสารผลิตภัณฑ์เนื่องจากถูกดูดซับอยู่บนตัวดูดซับที่มีขั้วสูง และได้สารผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิคสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากงานวิจัยเบื้องต้นผู้วิจัยได้ปรับเปรียบเทียบฟังก์ชันของสเตียรอยด์ในกลุ่ม ไบล์แอซิด เช่น กรดโคลิค 1 ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าอนุพันธ์เอไมด์ 2 ของกรดโคลิคสามารถยับยั้งการงอก และการเจริญเติบโตของพืชทดสอบได้แก่ ผักโขมสวน และหญ้าข้าวนก ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า กรดโคลิค และยังสามารถออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียดีกว่ากรดโคลิค โดยคาดว่าจะเป็ นแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ด้านเภสัชวิทยา กล่าวคือเป็นการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ ที่สามารถนำไปเป็นตัวยารักษาโรคหรือเป็นส่วนผสมในยารักษาโรคชนิดใหม่ได้ และในทำนอง เดียวกัน สเตียรอยด์สังเคราะห์นี้อาจจะนำไปเป็นส่วนผสมเพื่อเพิ่มฤทธิ์ในยาควบคุมศัตรูพืช โดยเฉพาะในด้านการยับยั้งการงอกของวัชพืชได้



1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่จากไบล์แอซิด โดยการเลือกใช้ สารเข้าทำปฏิกิริยาและเทคนิคในการสังเคราะห์ที่เหมาะสม
2. เพื่อศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์จากสารอนุพันธ์ของไบล์แอซิด โดยทดสอบการ ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย 3 ชนิด ได้แก่ *Microcystis* sp. *Osillatoria* sp. และ *Chlorella* sp.
3. เพื่อศึกษาผลของสารอนุพันธ์ของไบล์แอซิดต่อการต้านความเป็นพิษของเซลล์
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์ของไบล์ แอซิด

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์สเตียรอยด์เป้าหมายคือ อนุพันธ์ของไบแอซิด โดยการเปลี่ยนหมู่ ฟังก์ชันเป็นหลักด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีอินทรีย์
2. ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย
3. ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการต้านความเป็นพิษต่อเซลล์

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและดำเนินงาน

เอกสารนี้เป็นขั้นตอนการวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้ งานเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. สังเคราะห์อนุพันธ์ของ ไบโกลีแอซิด โดยใช้เทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็ง
 - 1.1 การใส่หมู่กระตุ้นที่ Wang resin ซึ่งทำหน้าที่เป็น solid support
 - 1.2 การใส่ไดเอมีนเข้าไปทำปฏิกิริยากับ Wang resin
 - 1.3 การใส่ไบโกลีแอซิดเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของไดเอมีน
 - 1.4 การถอดสารผลิตภัณฑ์ออกจาก Wang resin
2. ทำการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ โดยอาศัยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี
3. ทดสอบฤทธิ์ต้านฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้
4. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการต้านความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

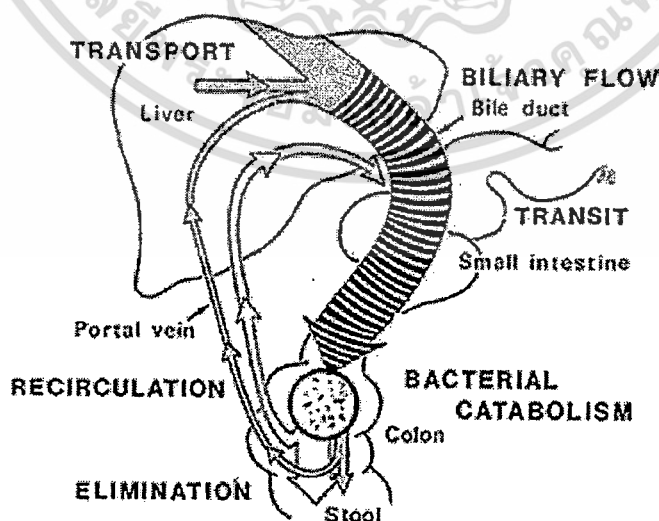
1. สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ของไบโกลีแอซิดได้ ซึ่งสารอนุพันธ์นี้อาจแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายและการต้านความเป็นพิษต่อเซลล์
2. สามารถทราบถึงฤทธิ์ของอนุพันธ์ของไบโกลีแอซิดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย
3. สามารถนำอนุพันธ์ของไบโกลีแอซิดที่ออกฤทธิ์ไปใช้ได้โดยตรงหรือเป็นส่วนผสมเพื่อใช้ในการออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย
4. สามารถทราบถึงฤทธิ์ของอนุพันธ์ของไบโกลีแอซิดต่อการต้านความเป็นพิษของเซลล์

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

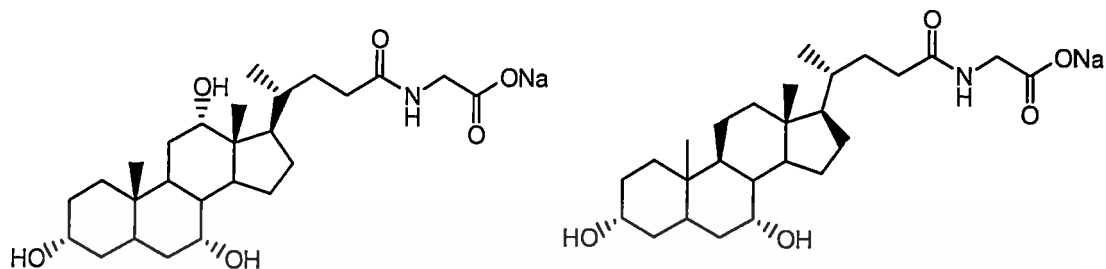
2.1 ไบล์แอซิด (Bile acid)[7]

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับไบล์แอซิด (cholanoogy) มีความสำคัญทั้งในด้านชีววิทยาและด้านการแพทย์. กลื่อน้ำดีเป็นสเตียรอยด์ที่มีสมบัติเป็นดีเทอเจนต์ซึ่งจะทำให้ทั้งไลปิด ไขมัน คลอเลสเทอรอล มีรูปร่างเป็น mixed micelle ในลำไส้ สามารถย่อยและดูดกลืนผ่านทางผนังของลำไส้เล็กได้ ไบล์แอซิดสามารถสังเคราะห์ได้จากคลอเลสเทอรอลในตับและถูกเก็บไว้ในถุงน้ำดี โดยตับจะสร้างไบล์แอซิดในรูปของไบล์แอซิดชนิดปฐมภูมิ (primary bile acid) และส่งไปเก็บที่ถุงน้ำดี เมื่อมีการกระตุ้น ถุงน้ำดีจะเกิดการบีบตัวแล้วขับน้ำดีเข้าสู่ลำไส้เล็ก แบคทีเรียในลำไส้จะทำให้ไบล์แอซิดปฐมภูมิเปลี่ยนเป็นไบล์แอซิดชนิดทุติยภูมิ (secondary bile acid) ซึ่งกลื่อน้ำดีทั้งสองรูป ตลอดจนไบล์แอซิดต่าง ๆ ก็จะถูกดูดกลับที่บริเวณไอลีอัม (Ileum) โดยอาศัยกระบวนการแอคทีฟทรานสปอร์ต (Active transport) เข้าสู่กระแสเลือด เนื่องจากไบล์แอซิดมีสมบัติไม่ชอบน้ำ จึงถูกขนส่งโดยจับกับอัลบูมิน (Albumin) เพื่อที่จะละลายอยู่ในเลือดแล้วกลับเข้าสู่ตับได้ โดยตับทำหน้าที่เปลี่ยนไบล์แอซิดทั้งในรูปปฐมภูมิและทุติยภูมิให้อยู่ในรูปของกลื่อน้ำดี ซึ่งพร้อมที่จะถูกลำเลียงเข้าสู่ถุงน้ำดีแล้วหลั่งออกไป การดูดซึมกลับที่ลำไส้เล็กเข้าสู่ตับ ของไบล์แอซิดถูกควบคุมโดยระบบขนส่งที่ขึ้นกับโซเดียมไอออน วัฏจักรการขนส่งไบล์แอซิดจากลำไส้เล็กไปยังตับและกลับเข้าสู่ลำไส้เล็กอีก เรียกว่า Enterohepatic circulation ดังรูปที่ 2.1



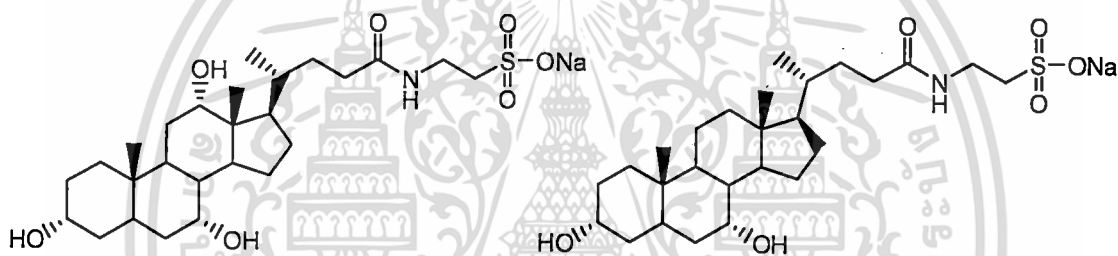
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนรูปที่ 2.1 แสดงกระบวนการ Enterohepatic circulation ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไบล์แอซิดในตับจะถูกคอนจูเกตด้วยไกลซีน (Glycine) และเทารีน (Taurine) จึงอยู่ในรูปของ Glycocholate 3 Glycochenodeoxycholate 4 Taurocholate 5 และTaurochenodeoxycholate 6 จากนั้นจึงขับออกจากตับ ไปเก็บไว้ในถุงน้ำดี



3 Glycocholate

4 Glycochenodeoxycholate



5 Taurocholate

6 Taurochenodeoxycholate

ในน้ำดีนั้นพบว่าไบล์แอซิดที่คอนจูเกตแล้วทั้ง 4 รูปแบบดังกล่าวจะอยู่ในรูปของเกลือโซเดียมหรือเกลือโพแทสเซียม เช่น ในรูปของโซเดียมไกลโคโคเลตหรือโพแทสเซียมไกลโคโคเลตหรือโซเดียมเทอโรโคเลตหรือโพแทสเซียมเทอโรโคเลต เป็นต้น และพบว่าไบล์แอซิดชนิดปฐมภูมิและเกลือน้ำดีที่คอนจูเกตแล้วจะแตกตัวเป็นไอออนได้เหมือนกันเมื่อมีอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบผ่านเข้ามาในระบบทางเดินอาหารแล้วกระตุ้นให้ถุงน้ำดีบีบตัวหลั่งน้ำดีเข้าสู่ลำไส้เล็ก จากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปของเกลือน้ำดีอีกครั้งโดยอาศัยแบคทีเรียในลำไส้เล็ก ซึ่งเริ่มแรกนั้นจะดึงเอากรดอะมิโนออกจากเกลือน้ำดีคอนจูเกต (เกลือน้ำดีชนิดปฐมภูมิ) ทำให้ได้เป็นไบล์แอซิดชนิดปฐมภูมิดังเดิม

2.1.1 องค์ประกอบของน้ำดี

น้ำดีประกอบด้วยน้ำประมาณ 85-97 เปอร์เซ็นต์ มีสารประกอบอื่นที่รวมเรียกว่าของแข็ง (solid) ประมาณ 3-14 เปอร์เซ็นต์ โดยของแข็งในน้ำดีที่สำคัญ ได้แก่ เกลือน้ำดี (51-71 เปอร์เซ็นต์)

บิลิรูบิน (10-20 เปอร์เซ็นต์) ฟอสโฟไลปิด (20-24 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่เป็นเลซิทิน) และ

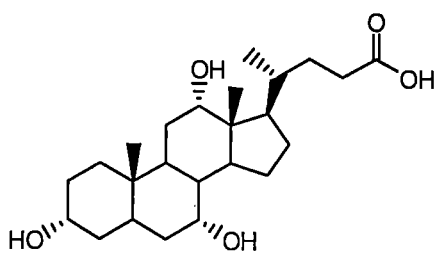
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอเลสเทอรอล (4 เพอร์เซ็นต์) น้ำดีเป็นของเหลวที่ตับสังเคราะห์ขึ้นและสะสมไว้ในถุงน้ำดี (gallbladder) ส่วนประกอบของน้ำดีที่ขับออกจากตับ มีส่วนประกอบที่ต่างจากน้ำดีที่เก็บไว้ในถุงน้ำดี เนื่องจากน้ำและอิเล็คโทรไลต์บางส่วนจะถูกดูดกลับ และมีสารบางชนิด เช่น mucin ถูกขับออกมาจากถุงน้ำดี ทำให้น้ำดีเข้มข้นและมีความหนืดมากขึ้น น้ำดีในถุงน้ำดีเป็นของเหลวข้น มีรสขม และมีกลิ่นเฉพาะ มักเป็นสีเหลืองทอง เหลืองน้ำตาลหรือเขียวมะกอก ซึ่งขึ้นอยู่กับสารสี ในวันหนึ่ง ๆ จะมีการหลั่งน้ำดีประมาณ 500-1,000 มิลลิลิตร น้ำดีที่ออกจากตับใหม่ ๆ มีพีเอชอยู่ระหว่าง 7.7-8.6 แต่พีเอชของน้ำดีที่อยู่ในถุงน้ำดีสามารถลดลงจนถึง 6.5 ได้ ส่วนความถ่วงจำเพาะนั้น น้ำดีในถุงน้ำดีนั้นอาจมีความถ่วงจำเพาะสูงถึง 1.040 เพิ่มขึ้นจากที่ออกมาจากตับใหม่ ๆ ถึง 0.030 เมื่อฟอสโฟไลปิดและคลอเลสเทอรอลรวมกับเกลือน้ำดีจะได้เป็น mixed micelle ซึ่งละลายได้ในน้ำดี ถ้าไบล์แอซิดถูกขับมาก ไลปิดก็จะถูกขับออกมามากด้วย คลอเลสเทอรอลที่ขับออกมาในน้ำดีได้มาจากเลือดและจากที่ตับสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ ตับจะสังเคราะห์คลอเลสเทอรอลขึ้นมาประมาณวันละ 1-1.5 กรัม catabolism ส่วนใหญ่ของคลอเลสเทอรอลในร่างกายคือการสลายเป็นไบล์แอซิด ตับจะขับคลอเลสเทอรอลออกทางน้ำดีประมาณวันละ 2 กรัม แต่คลอเลสเทอรอลจะมี enterohepatic circulation เช่นเดียวกับไบล์แอซิด โดยถูกดูดกลับประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือจะขับออกทางอุจจาระ ซึ่ง 30 เปอร์เซ็นต์ มาจากตับและอีก 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นคลอเลสเทอรอลของเยื่อบุลำไส้

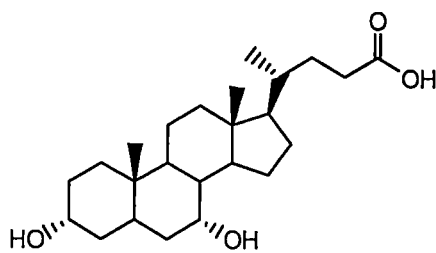
สารสีน้ำดี (bile pigment) ประกอบด้วยบิลิเวอร์ดีน และบิลิรูบิน ซึ่งได้จากการสลายของเม็ดเลือดแดง ถ้ามีในปริมาณที่มากจะทำให้เกิดนิ่วในถุงน้ำดี (gallstones) น้ำดีสังเคราะห์จากคลอเลสเทอรอลเป็น hydroxylated cholanic acids ที่พบส่วนใหญ่มี 4 ชนิด คือ

1. cholic acid (3, 7, 12-trihydroxycholanic acid)
2. deoxycholic acid (3, 12-dihydroxycholanic acid)
3. chenodeoxycholic acid (3, 7- dihydroxycholanic acid)
4. lithocholic acid (3-monohydroxycholanic acid)

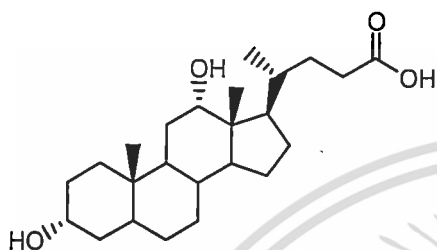
เกลือน้ำดีหรือไบล์แอซิดมี 2 ชนิดที่สำคัญ คือ ไบล์แอซิดชนิดปฐมภูมิและไบล์แอซิดชนิดทุติยภูมิ ตับจะสังเคราะห์ไบล์แอซิดชนิดปฐมภูมิซึ่งก็คือ กรดโคลิก 1 และกรดคีโนไดออกซีโคลิก 7 จากคลอเลสเทอรอล ส่วนไบล์แอซิดชนิดทุติยภูมิ ได้แก่ กรดไดออกซีโคลิก 8 และกรดลิวโทโคลิก 9 โดยแบคทีเรียจะเปลี่ยนกรดโคลิก 1 ให้กลายเป็นกรดไดออกซีโคลิก 8 และเปลี่ยนกรดคีโนไดออกซีโคลิก 7 เป็นกรดลิวโทโคลิก 9



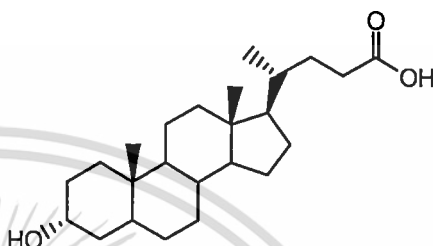
1 Cholic acid



7 Chenodeoxycholic acid



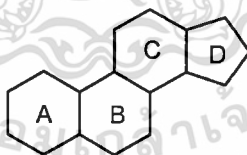
8 Deoxycholic acid



9 Lithocholic acid

2.1.2 โครงสร้างทางเคมีของไบล์แอซิด

ไบล์แอซิดประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อยที่เชื่อมต่อกัน คือ ส่วนที่เป็นนิวเคลียสสเตียรอยด์ และส่วนที่เป็นโซ่กิ่งสั้นของอะลิฟาติก นิวเคลียสสเตียรอยด์ของไบล์แอซิดนั้นมีวงไฮโดรคาร์บอนที่อิ่มตัวอยู่ 4 วง เรียกว่า perhydrocyclopentaphenanthrene 10 ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยม 3 วง คือ วง A B และ C และวงห้าเหลี่ยม 1 วงคือวง D มีหมู่เมทิลเกาะอยู่ที่ตำแหน่ง C-10 และ C-13



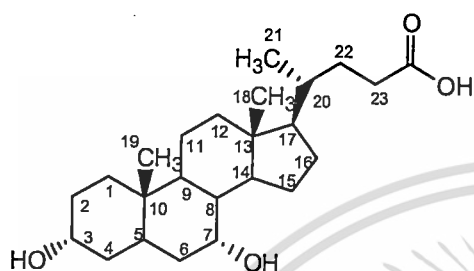
10 perhydrocyclopentaphenanthrene

การนับตำแหน่งของไบล์แอซิดแสดงดังตัวอย่าง เช่น กรดคีนโนดีออกซีโคลิก 7 ในโครงสร้างด้านบนสุดนิวเคลียสของไบล์แอซิดจะโค้งเพราะวง A และวง B อยู่ในรูปของ *cis*-fused configuration บางไบล์แอซิดนั้นในโครงสร้างหลักล่างสุด หรือที่รู้จักกันคือ แอลโล-ไบล์แอซิด จะแบนราบเนื่องจาก A/B *trans*-fusion (5 α -stereochemistry) โครงสร้างโซ่กิ่งจะกำหนดกลุ่มของสารประกอบ (ไบล์แอซิดหรือไบล์แอลกอฮอล์) มีไบล์แอลกอฮอล์ 4 ชนิดที่แตกต่างกัน (C-27, C-26, C-25 และ C-24) และมันจะเกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตที่มีรูปแบบของการวิวัฒนาการที่น้อย ไบล์แอซิดค่า

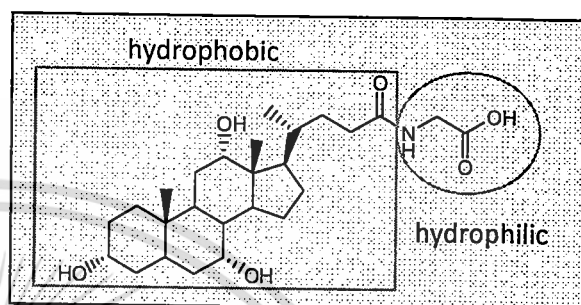
เอกลี ไม่ว่าจะเป็นกรรมใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักขึ้นอยู่กับความยาวของโซ่กิ่ง คือ ไบล์เอซิด C-27 และ C-24 ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง ไบล์เอซิด C-24 จะประกอบด้วยองค์ประกอบหลักของน้ำดี พวกมันจะถูกคอนจูเกตด้วยไกลซีนหรือเทารีน เพื่อให้ได้ผลผลิตในรูปของไบล์เอซิดที่ถูกคอนจูเกตแล้ว

ไบล์เอซิดเป็นแอมฟิพาติก (amphipathic) กล่าวคือจะประกอบไปด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (ส่วนที่ละลายในไขมัน) และส่วนที่ชอบน้ำ (ส่วนที่มีขั้ว) ดังรูปที่ 2.2



7 Chenodeoxycholic acid



รูปที่ 2.2 แสดงความเป็น Amphipathic

2.1.3 โครงสร้างทางเคมีของไบล์เอซิดและการวิวัฒนาการ

ไบล์เอซิดเป็นสิ่งที่มีความหลากหลายของโครงสร้าง ไบล์เอซิดที่ต่างชนิดกันจะมีความแตกต่างทางเคมีใน 3 ประเด็น คือ 1. โครงสร้างโซ่กิ่ง 2. สเตอริโอเคมีของวง A/B fusion และ 3. การกระจายของเลข ตำแหน่ง และสเตอริโอเคมีของหมู่ไฮดรอกซีในนิวเคลียสสเตอโรอยด์ ในหลายสิบปีที่ผ่านมา Haslewood ได้พิจารณาโครงสร้างของไบล์เอซิดเพื่อให้เข้าใจในกระบวนการวิวัฒนาการ แต่ก่อนนั้น โครงสร้างของไบล์เอซิดจะแสดงรูปแบบของการพัฒนาโมเลกุลไปตามแนวเส้นของโครงสร้างหลัก หลักฐานที่ชัดเจนของการพัฒนาของไบล์เอซิดผ่านลำดับขั้นคือ ที่ตำแหน่ง C-27 ของไบล์แอลกอฮอล์จะเปลี่ยนไปเป็นกรดคาร์บอกซิลิก และสุดท้ายจะเปลี่ยนกรดคาร์บอกซิลิกจากตำแหน่ง C-27 ไปเป็นที่ตำแหน่ง C-24 ไบล์แอลกอฮอล์ทำหน้าที่ที่เสมือนเกลือน้ำดี หลังจากเกิดคอนจูเกตกับซัลเฟต (ทำให้ค่าการละลายในน้ำเพิ่มขึ้น) เช่นเดียวกันกับ C-27 acid ที่ถูกคอนจูเกตด้วยเทารีนและ C-24 acid ในน้ำดีที่ถูกคอนจูเกตด้วยเทารีนและไกลซีน มีการเสนอว่า ไบล์เอซิดที่เกิดขึ้นจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี β -configuration กับหมู่ไฮดรอกซีที่ 3-แอลฟา 7-แอลฟา และ 12-แอลฟา

2.1.4 การส่งเกลือน้ำดีออกจากตับ

ตับส่งเกลือน้ำดีออกจากเซลล์เข้าสู่ท่อน้ำดีย่อยโดยใช้กระบวนการแอกทีฟทรานสปอร์ตซึ่งต้องใช้พลังงานจาก ATP การส่งออกเกลือน้ำดีก็จะเป็นการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี จะมีผลทำให้เกิดการขับอิเล็กโทรไลต์ กลอเลสเทอรอล และฟอสโฟไลปิดตามออกมาด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

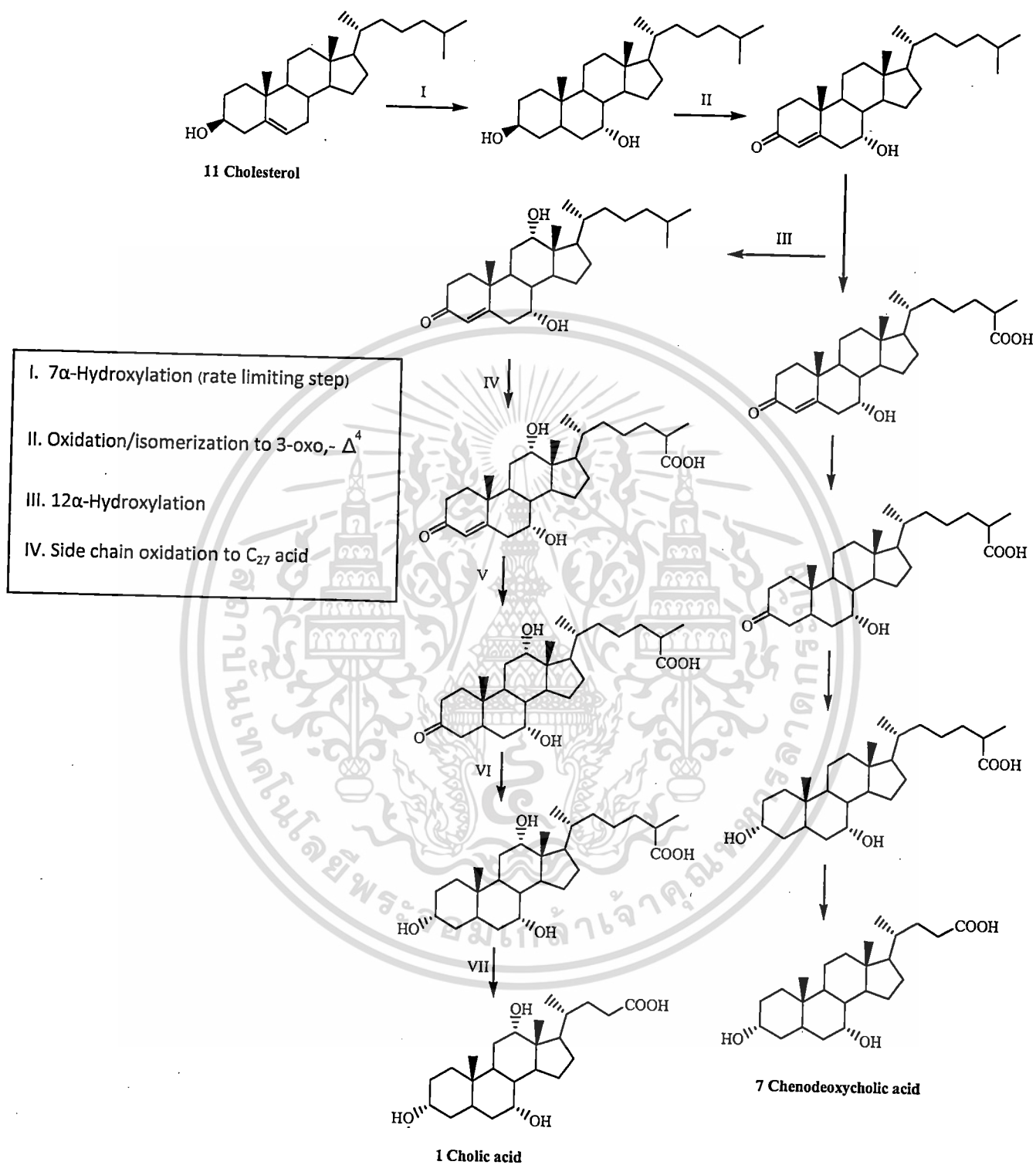
เมื่อเกลือน้ำดีถูกขับลงสู่ลำไส้เพื่อช่วยในการย่อยและดูดซึมอาหารไขมัน แบคทีเรียในลำไส้จะสลายพันธะระหว่างเกลือน้ำดีกับไกลซีน และเทารีนได้เป็นไบล์แอซิดชนิดปฐมภูมิแบบไม่คอนจูเกต (unconjugated primary bile acid) ซึ่งส่วนหนึ่งจะถูกรีดิวส์ให้เป็นไบล์แอซิดชนิดทุติยภูมิ โดยการตัดหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C-7 ออก

2.1.5 ชีวิตสังเคราะห์ของไบล์แอซิด

ไบล์แอซิดถูกสังเคราะห์จากคลอเลสเทอรอล ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับจำนวนขั้นตอนที่ซับซ้อนทั้งในนิวเคลียสสเตียรอยด์และโซ่กิ่ง ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.1 ชีวิตสังเคราะห์นั้นจะเกี่ยวข้องอย่างน้อย 5 ลำดับขั้นในแต่ละนิวเคลียสและโซ่กิ่ง การอธิบายลำดับขั้นชีวิตสังเคราะห์ของไบล์แอซิดจะเป็นแบบทางอ้อม โดยในลำดับขั้นแรกนั้นจะเป็นลำดับขั้นกำหนดอัตรา (rate limiting step) โดยคลอเลสเทอรอลจะถูกออกซิไดซ์ด้วยคลอเลสเทอรอล 7-แอลฟา-ไฮดรอกซีเลส (CYP7A1) ได้เป็น 7-แอลฟาไฮดรอกซีคลอเลสเทอรอล แล้ว 7-แอลฟาไฮดรอกซีคลอเลสเทอรอลจะถูกเปลี่ยนไปเป็น cholest-7 α -hydroxy- Δ^4 -3-one โดยผ่านการกระทำของไอโซเมอเรส (isomerase) และรีดักเทส (reductase) อนุพันธ์ออกโซที่ไม่อิ่มตัวจะเป็นจุดต่อกิ่งของชีวิตสังเคราะห์กรดโคลิคและกรดคีโนติออกซีโคลิค

กระบวนการเติมหมู่ไฮดรอกซี (hydroxylation) ที่ตำแหน่ง C-12 ก่อให้เกิดรูปร่างของโครงแบบกรดโคลิค อนุพันธ์ออกโซเป็นสเตอริโอซีเลคทีฟ (stereoselective) ที่ลดการมีโครงแบบของ 5 เบต้า-ไบล์แอซิด ขั้นการสันดาปในลำดับขั้นที่ 2 จะเกิดปฏิกิริยา 27-ไฮดรอกซีเลชัน (27-hydroxylation) เป็นการสร้างกรดคาร์บอกซิลิกที่ตำแหน่ง C-27 ขึ้นมา ซึ่งเชื่อว่าเกิดขึ้นในตอนกลางของไมโทคอนเดรียโดยเอนไซม์ P-450 ไฮดรอกซีเลส หลังจากนั้นเอนไซม์ peroxisomal จะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดทีฟคลีเวจ (oxidative cleavage) ของโซ่กิ่งทำให้กรดคาร์บอกซิลิกจากตำแหน่ง C-27 เปลี่ยนไปอยู่ที่ตำแหน่ง C-24 แทน ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นไบล์แอซิดที่สมบูรณ์และไบล์แอซิดจะเปลี่ยนสภาพทางชีวเคมีเข้าไปคอนจูเกตกับไกลซีนและเทารีน โดยเอนไซม์เอซิลทรานเฟอร์เรส (acyltransferase) ซึ่งเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาเอมิเดชัน (amidation) ในระยะสิบปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาที่สำคัญที่ประสบความสำเร็จในพันธุศาสตร์ของการสังเคราะห์ไบล์แอซิด การสังเคราะห์องค์ประกอบที่สมบูรณ์ของไบล์แอซิดนั้นต้องการเอนไซม์ร่วมด้วย 17 เอนไซม์ การแสดงออกของเอนไซม์ที่ถูกเลือกจะต้องควบคุมเป็นอย่างดีโดยตัวรับนิวเคลียร์ฮอร์โมน (Nuclear hormone receptor) และปัจจัยกระบวนการถอดรหัส (transcription) อื่น ๆ

แผนภาพที่ 2.1



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.6 การนำไปใช้ทางด้านเภสัชวิทยาของไบล์แอซิด

ในช่วงเวลาไม่ถึงสิบปีมานี้ได้มีการพิจารณาในการศึกษาและการสังเคราะห์เรื่องสารลดแรงตึงผิวชนิด ไอออนบวกจากอนุพันธ์ของน้ำดี จากการศึกษาส่วนใหญ่จะนำไดเอมีนมาทำปฏิกิริยากับไบล์แอซิด โดยเปลี่ยนเป็นพันธะเอไมด์ และเอมีนชนิดอื่น ๆ จะเปลี่ยนเป็นเกลือของควอเทอริแอมโมเนียม Bernheim และ Lack[8] ได้ศึกษาอนุกรมของอนุพันธ์ของกรดโคลานิกและแสดงถึงเกลือน้ำดีไอออนบวกซึ่งสามารถเร่งการบวมตัวของแบคทีเรียได้ ยิ่งไปกว่านั้นการบวมตัวของแบคทีเรียจะแสดงถึงการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน สมบัติการต้านไวรัสและการต้านเชื้อราของอนุพันธ์ไบล์แอซิดบางตัวได้ถูกพิจารณา เกลือควอเทอริแอมโมเนียมจากไบล์แอซิดจะทำเป็นสารละลายคลอเลสเตอร์อล อนุพันธ์สเตียรอยด์นั้นจะไปเร่งการสลายตัวของคลอเลสเตอร์อล โมโนไฮเดรตในสารน้ำดีสังเคราะห์ (11mM NaC 32 mM lecithin) โดยมันจะเกิดขึ้นได้ที่ระดับความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ อนุพันธ์ Nor- และอนุพันธ์ไฮโมไบล์แอซิดจะถูกเติมลงไปในยาบางชนิดเพื่อปรับปรุงการดูดซึม โดย Cationic amphiphiles ได้มาจากการคอนจูเกตของไบล์แอซิดกับพอลิเอมีนจะแสดงถึงการดูดซึมและการนำเข้าไปเนื้อเยื่อเซลล์ของ DNA ความสามารถในการทรานสเฟกชัน (transfection) ของไบล์แอซิดคอนจูเกตพอลิเอมีนที่ผสมอยู่กับ dioleoyl phosphatidyl-ethanolamine (DOPE) จะอยู่ในช่วง 3-7 เท่าของความสามารถที่เหมาะสมของ lipofectin (ซึ่งเป็นสารผสมระหว่าง DOTMA (*N*-[1,2,3-dioleoyloxy]propyl)-*N,N,N*-trimethylammoniumchloride) กับ DOPE) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการตระหนักถึงความจำเพาะที่สูงและความสามารถในการบรรจุของระบบการขนส่งไบล์แอซิด ในระหว่างการเกิด Enterohaptic circulation ซึ่งอาจมาจากหลักสำคัญของงานวิจัยในปัจจุบันของยาคอนจูเกตไบล์แอซิด เพื่อใช้เป็นยาเฉพาะเป้าหมายที่ตับ และเพื่อปรับปรุงการดูดซึมของลำไส้เล็กที่มีการดูดซึมไม่ดีหรือไม่ดูดซึมยาตัวอย่างเช่นเปปไทด์

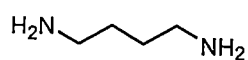
2.2 พอลิเอมีน (Polyamine)

ตามปกติค่านำหน้าว่า พอลิ (poly) ในระบบการตั้งชื่อทางเคมีจะหมายถึง สารที่มีลักษณะโครงสร้างภายในเป็นแบบทวิคูณ ในที่นี้คือพอลิเอมีนและพอลิเอมีน อัลคาลอยด์ ซึ่งจะมีหมู่อะมิโนอยู่อย่างน้อย 2 หมู่อยู่กับส่วนที่เป็นสายโซ่อะลิฟาติก หมู่อะมิโนต่าง ๆ ปกติจะถูกแบ่งออกเป็น 3 หรือ 4 หน่วยย่อยของเมทิลีน หรือมากกว่าเป็น 2 หรือ 5

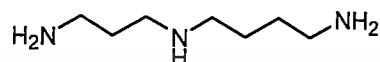
การแบ่งประเภทของพอลิเอมีนและ โมโนเอมีนนั้นตั้งอยู่บนหลักพื้นฐานที่ว่าสารทั้งสองประเภทนี้ได้แสดงออกถึงความแตกต่างกันทางลักษณะของสาร อันเนื่องมาจากความใกล้เคียงกันของไนโตรเจนอะตอมอย่างน้อย 2 ตัวในโครงสร้างเหล่านั้น ทำให้พอลิเอมีนแสดงความว่องไวทางเคมีที่แตกต่างอย่างเด่นชัดจากโมโนเอมีนทั้งหลาย นี่เป็นสิ่งที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ยกตัวอย่างไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น การปรับปรุงสภาพความเป็นเบสของพอลิเอมีน การเพิ่มความสามารถในการเกิดสารเชิงซ้อนกับโลหะไอออน หรือพฤติกรรมการแตกโครงสร้างที่เด่นชัดในแมสสเปกโทรสโกปี

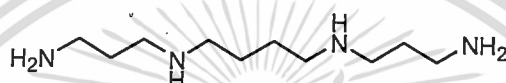
ตัวอย่างของพอลิเอมีน เช่น putrescine 12 หรือ PA4 (ใช้ในการเรียกชื่อพอลิเอมีนแบบย่อคือ PolyAmine กับหมู่ CH_2 อีก 4 หมู่ ที่อยู่ระหว่างอะตอมไนโตรเจน 2 อะตอมจึงอ่านได้เป็น PA4) spermidine (PA34) 13 spermine (PA343) 14



12 putrescine (PA4)



13 spermidine (PA34)



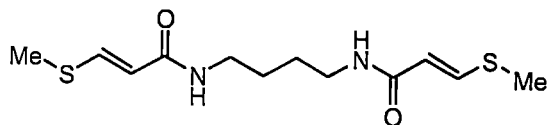
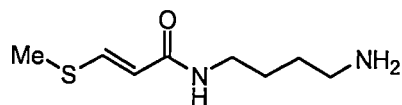
14 spermine (PA343)

2.2.1 Acylated polyamines

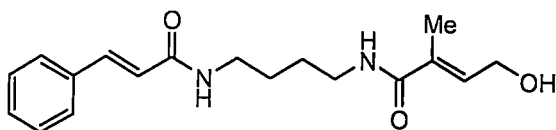
โดยส่วนใหญ่ของการค้นพบพอลิเอมีนชนิดใหม่จะเป็นแบบ *N*-acyl ชนิดสายโซ่เปิดซึ่งเป็นอนุพันธ์ของพอลิเอมีนสายโซ่ตรง พอลิเอมีนชนิดหลัก ๆ แบ่งออกได้เป็นหลายสารซึ่งส่วนมากประกอบด้วย putrescine spermidine และ spermine และส่วนน้อยคือ PA33 PA35 PA44 และ PA33433 สารใหม่ ๆ จะถูกเสนออยู่ในกลุ่มของสารหลักเหล่านั้นหรือลักษณะโครงสร้างเด่นอื่น ๆ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้อีกดังต่อไปนี้

2.2.1.1 Putrescine alkaloid

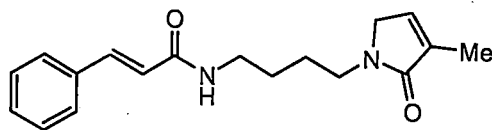
ในจำนวนทั้งหมดของ putrescine alkaloid ถูกค้นพบโดย Saifah และคณะ[9] และ Greger และคณะ[10] ในจำพวกพืชประยงค์ (*Aglaia* species) โดยสารส่วนใหญ่จะเป็น *N,N*-diacylputrescines ซึ่งประกอบไปด้วยหมู่เอซิล ในจำนวนของการเสนอ bisamides) 10 จำนวน มีจำนวน 8 โครงสร้างของ *Aglaia* alkaloids ที่ได้รับการยืนยัน และอีก 2 จำนวนที่ได้เสนอโครงสร้างอัลคาลอยด์ไปเมื่อตรวจสอบแล้วไม่ถูกต้อง hemileptagline แสดงเป็น *N,N*-bis-{3-(methylthio)propenoyl}putrescine 15 และ mono-(methylthio)propenoyl 16 และโครงสร้างของ aglaurubine ถูกปรับปรุงเป็น 4-hydroxy-2-methylbut-2-enoyl derivative 17 โครงสร้างที่เสนอแล้วพบว่าผิดคือ 3-methyl-2(5H)pyrrolone 18 การสังเคราะห์ไอแนนทีโอแบบจำเพาะของ (+)-secoodorine 19 ซึ่งถูกแสดงให้เห็นว่าแต่ก่อนยังไม่รู้ถึงโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติ

15 *N,N*-bis-{3-(methylthio)propenoyl}putrescine

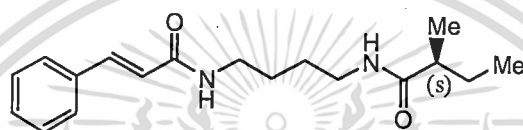
16 mono-(methylthio)propenoyl



17 4-hydroxy-2-methylbut-2-enoyl

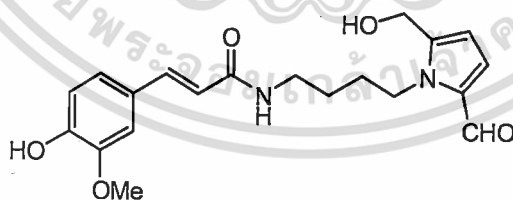


18 3-methyl-2(5-H)pyrrolone



19 (+)-Secoodorine

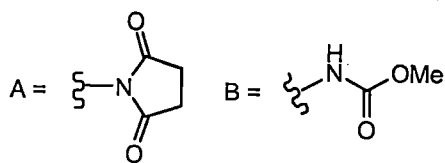
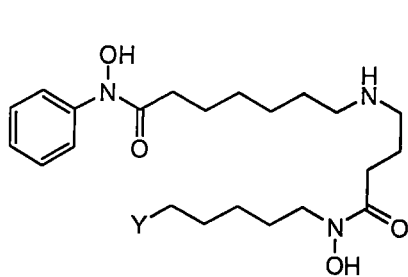
Putrescine alkaloid magnolamide ได้ถูกแยกออกมาโดย Yu และคณะ[11] จากยี่หุบ (*Magnolia coco*) ในวงศ์ Magnoliaceae สารอยู่ในอนุกรมของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้รับจากแหล่งที่แตกต่างกันนั้นจะเป็น 2-formyl-5-hydroxymethyl ซึ่งส่วนหนึ่งจะถูกแทนที่ด้วยไพโรล (pyrrole) สาเหตุมาจากการกระทำทางชีววิทยามากมายของสารประกอบ การถูกแทนที่ด้วยไพโรล จะถูกพิจารณาทางเภสัชวิทยาแขนงใหม่ นอกจากนี้ magnolamide 20 ยังถูกสังเคราะห์ขึ้นมาโดย Dong และคณะ[12]



20 Magnolamide

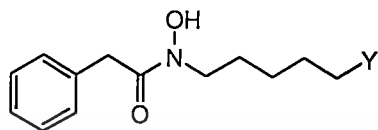
2.2.1.2 PA5 alkaloids

PA5 alkaloids ถูกแยกออกมาจาก DNA ของสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวซึ่งเกี่ยวกับ *Streptomyces lividans* โดย terragines A-E 21-25 จะแทนที่ด้วยอนุพันธ์ของกรดไฮดรอกซามิก (hydroxamic acid) และการใช้เป็นไซเดอโรฟอรัส (siderophores) ศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



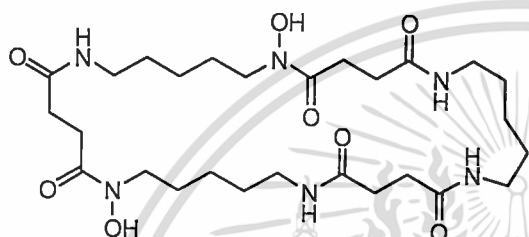
21 Terragine A Y = A

22 Terragine D Y = B



23 Terragine B Y = A

24 Terragine C Y = B



25 Terragine E

2.3 สาหร่ายและความเป็นพิษของสาหร่าย

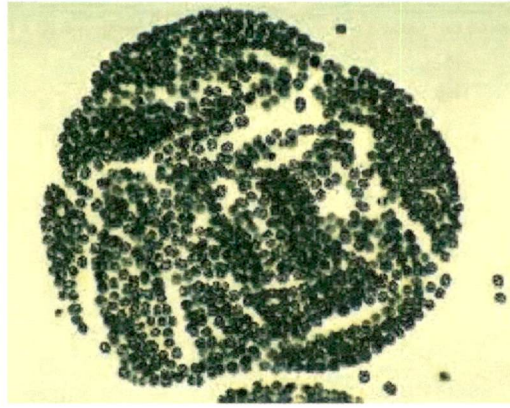
สาหร่าย หมายถึง สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่มีขนาดเล็กมาก จนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (microscopic algae : microalgae) ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ และขนาดใหญ่ที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (macroscopic algae : macroalgae) ซึ่งดูเหมือนมีราก ลำต้น และใบ ซึ่งรวมเรียกว่า ทลัสส์ (thallus) ส่วนใหญ่จะมีคลอโรฟิลล์ช่วยในการสังเคราะห์แสง[13] ปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษในแหล่งน้ำจืด ได้เกิดขึ้นทั่วโลกแล้ว และในหลายกรณีพบว่าเป็นสาเหตุการตายของปศุสัตว์ และสัตว์ปีกที่อพยพโยกย้ายถิ่น รวมทั้งเป็นสาเหตุของอาการผิดปกติและเสื่อมสุขภาพในมนุษย์ด้วย ในหลายประเทศที่ประสบปัญหานี้ได้มีการจัดทำเอกสารเพื่อเตือนประชาชนให้ระวังปัญหาสุขภาพที่จะเกิดขึ้นในช่วงที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายในแหล่งน้ำ สารพิษจากสาหร่าย คือ สารทุติยภูมิที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างและสลายของเซลล์ (secondary metabolite) เป็นสารที่ไม่เกี่ยวข้องหรือ จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายเอง แม้ว่าบางครั้งจะช่วยในการอยู่รอดในธรรมชาติก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงเหตุผลที่แท้จริงในการผลิตสารพิษของสาหร่าย แต่คาดว่าสารพิษที่สร้างขึ้นทำหน้าที่เป็นเสมือนสารป้องกันตัว (protective compound) จากศัตรูหรือคู่แข่งในธรรมชาติ[14]

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) จัดเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่ง เพราะมีโครงสร้างของนิวเคลียสคล้ายคลึงกับนิวเคลียสของแบคทีเรีย และบางชนิดยังมีคุณสมบัติสร้างเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจนในอากาศได้ เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายแบคทีเรียด้วย แต่อย่างไรก็ตามนักวิชาการด้านสาหร่ายยังจัดกลุ่มของสาหร่ายพวกนี้แยกออกมาจากแบคทีเรีย เพราะสาหร่ายชนิดนี้มีคลอโรฟิลล์เอ และมีการปล่อยออกซิเจนสู่สิ่งแวดล้อมจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งไม่พบในแบคทีเรีย[13] สาหร่ายชนิดนี้จะสร้างรงควัตถุในเซลล์มีสีเขียวน้ำเงิน พืชของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้ถูกกล่าวถึงว่ามีพิษต่อสัตว์น้ำและสัตว์เลี้ยงที่บริโภคน้ำดื่มที่ปนเปื้อนพิษจากสาหร่ายชนิดนี้เข้าไป เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีองค์ประกอบภายในเซลล์ที่เรียกว่า Gas vacuole ซึ่งช่วยในการลอยตัวอยู่บนผิวน้ำ เมื่อถูกคลื่นและลมพัดพามวลสาหร่ายมาบริเวณใกล้ชายฝั่ง เมื่อสัตว์ดื่มน้ำที่มีสารพิษที่สาหร่ายสร้างขึ้นปนเปื้อนอยู่อาจได้รับอันตรายถึงตายได้ โดยทั่วไปสาหร่ายจะปลดปล่อยสารพิษลงสู่แหล่งน้ำเมื่อเซลล์ตายหรือเซลล์แก่เกิดการรั่วของผนังเซลล์ การตายของสัตว์ที่ได้รับสารพิษเข้าไป เนื่องจากการย่อยเซลล์สาหร่ายที่กินเข้าไปนั่นเอง สาหร่ายในกลุ่มนี้มีหลายสกุลแต่สกุลที่รายงานว่าก่อให้เกิดพิษต่อสัตว์ได้แก่ สกุล *Anabena* *Aphanizomenon* *Microcystis* *Nostoc* และ *Oscillatoria* พืชจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ สารพิษที่มีผลต่อระบบประสาท และสารพิษที่มีผลต่อดับ[15] ตัวอย่างของสาหร่ายพิษเช่น *Microcystis aeruginosa* เป็นสาหร่ายที่มีความเป็นพิษขึ้นกับสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำ หากทราบสถานะที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายแล้ว จะสามารถหาแนวทางในการจัดการแหล่งน้ำให้มีคุณภาพดี ปราศจากอันตรายจากปนเปื้อนของสาหร่ายที่สร้างสารพิษได้ ส่วนเซลล์สาหร่ายที่แยกจากการเพิ่มปริมาณ สามารถนำไปใช้ประโยชน์มีการศึกษาในระดับสูงขึ้นไปเช่น การศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง การศึกษาโครงสร้างสารพิษ และการศึกษาพันธุกรรมของสาหร่ายที่สร้างสารพิษ เป็นต้น ซึ่งในประเทศไทยมีผู้ให้ความสนใจน้อยมาก โดยสวนทางกับความสำคัญของปัญหาเนื่องจากปัญหาที่เกิดขึ้นนั้นมีผลโดยตรงต่อสุขภาพของมนุษย์

2.4 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

1. *Microcystis* sp. เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่พบมากตามแหล่งน้ำและเค็มชนิดที่ก่อให้เกิดพิษมากที่สุด ซึ่งสามารถผลิตสารพิษและปล่อยออกมาจากเซลล์ได้คือ Microcystin ลักษณะของเซลล์จะมารวมกันอยู่เป็นโคโลนี รูปร่างของโคโลนีอาจกลม เบี้ยวหรือแห้วเว้า แต่ละเซลล์อาจมีรูปร่างกลม หรือรูปไข่ไม่มีเมือกหุ้ม อยู่รวมกันแน่น โดยมีเมือกหุ้มทั้งโคโลนีเอาไว้ รูปร่างของ *Microcystis* sp. แสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 รูปร่างของโคโลนีของ *Microcystis* sp.

2. *Oscillatoria* sp. พบได้ทั่วไปเช่น ในน้ำหน้าดิน มีลักษณะเป็นเซลล์รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าเรียงต่อกันเป็นเส้นไม่แตกแขนง บริเวณตอนปลายเส้นมีลักษณะเรียวลง บางเซลล์ภายในเส้นเดียวกันเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว เรียกว่า concave cell โดยตำแหน่งนี้จะเป็นบริเวณที่เกิดจากการขาดหลุดจากกันของสาหร่าย ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Fragmentation และสามารถเคลื่อนที่ได้โดยปลายเส้นจะแกว่งซ้า ๆ คล้ายกับการแกว่งของตุ้มนาฬิกา จึงเรียกการเคลื่อนที่แบบนี้ว่า Oscillation



รูปที่ 2.4 เซลล์ของสาหร่าย *Oscillatoria* sp.

3. *Chorella* sp. เป็นสาหร่ายที่มีระบบกระบวนการสังเคราะห์แสงคล้ายคลึงกับกลุ่มของพืชดอก จึงทำให้สาหร่าย *Chorella* sp. มีความสำคัญในการศึกษาวิจัยทางสรีรวิทยาในเรื่องของคลอโรฟิลล์ กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและการหายใจ เพราะสาหร่ายชนิดนี้เจริญเติบโตได้ง่ายและรวดเร็วภายใต้สภาวะที่ไม่ต้องการควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

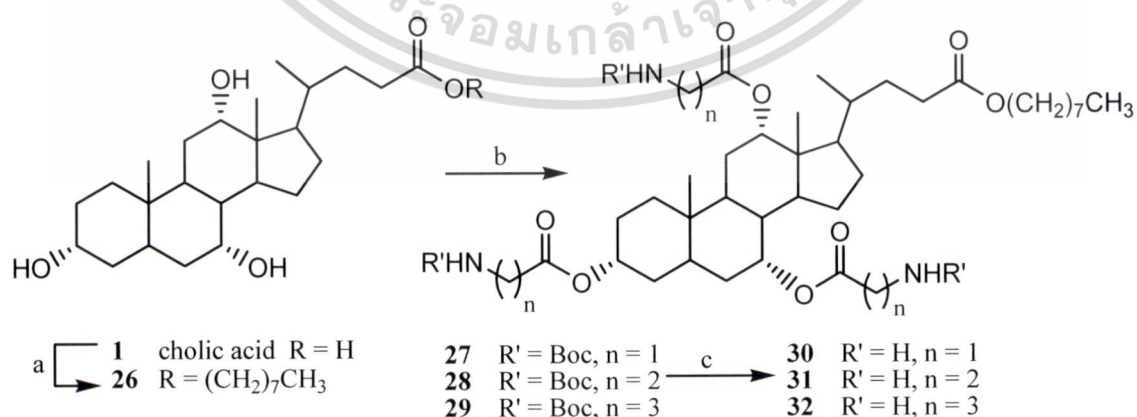


รูปที่ 2.5 เซลล์ของสาหร่าย *Chorea* sp.

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Savage และคณะ[16] ได้ทำการสังเคราะห์สาร 30-32 จากกรดโคลิค 1 ตามแผนภาพที่ 2.2 และ 2.3 แล้วนำสารที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดย สาร 30-32 มีตำแหน่งปลายสายโซ่ที่ C-24 มีความเป็นไฮโดรโฟบิกพบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดได้ดี ส่วนสารที่ 43-45 มีตำแหน่งปลายสายโซ่ที่ C-24 มีประจวบพบที่สามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย *S. aureus* ส่วนสารที่ 46 มีตำแหน่งปลายสายโซ่ที่ C-24 มีประจวบพบที่ไม่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียเลย นอกจากนี้ยังทำการทดสอบความเสถียรของหมู่เอสเตอร์ที่ตำแหน่ง C-3 C-7 และ C-12 โดยใช้สาร 47-49 พบว่าที่พีเอชต่ำหมู่อะมิโนเกิดโปรโตเนตทำให้ไม่เกิดไฮโดรไลซิสที่หมู่เอสเตอร์ แต่ที่พีเอชสูงจะไม่เกิดการโปรโตเนตที่หมู่อะมิโนจึงทำให้เกิดไฮโดรไลซิสที่หมู่เอสเตอร์ได้ดี

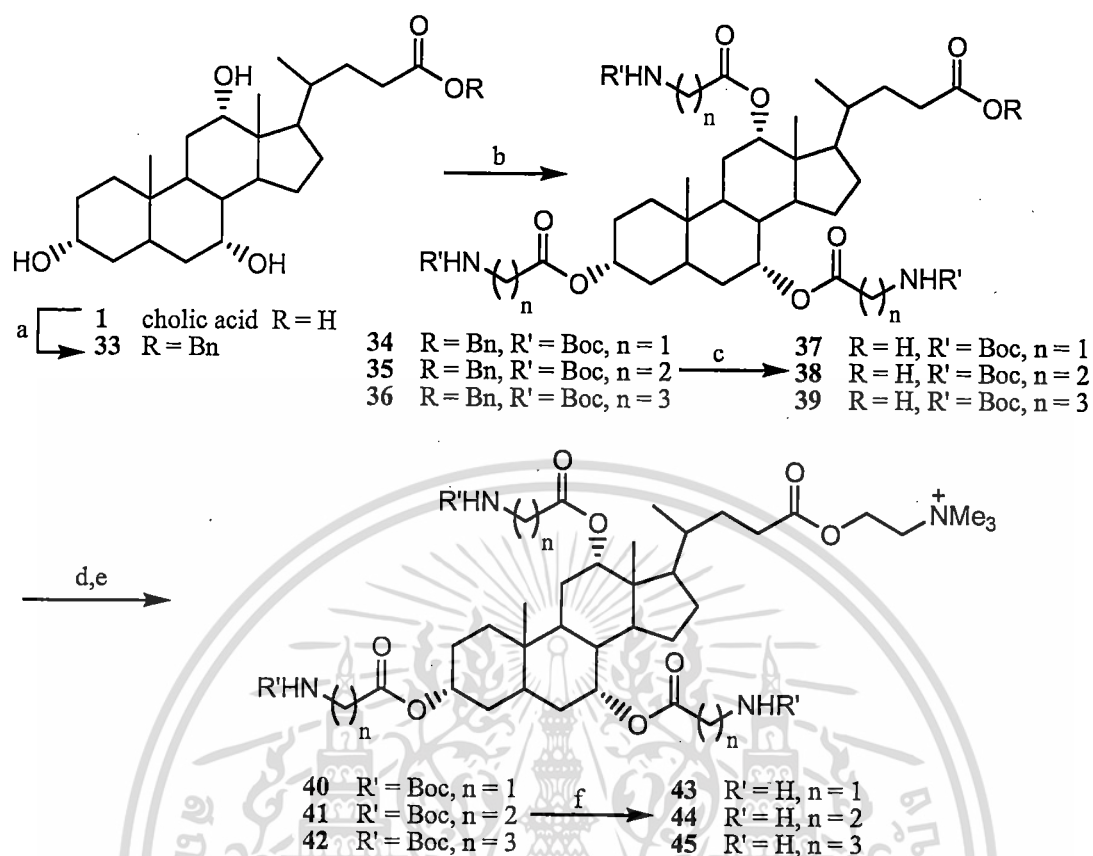
แผนภาพที่ 2.2



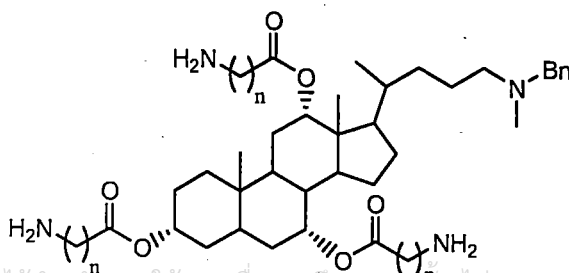
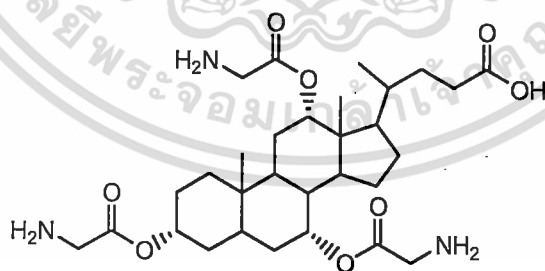
Reagents and Conditions; (a) Octanol, TsOH (73%); (b) Bocglycine, Boc- β -alanine or Boc- γ -aminobutyric acid, DCC, DMAP, DCM, (91-95%); (c) HCl, dioxane (84-99%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

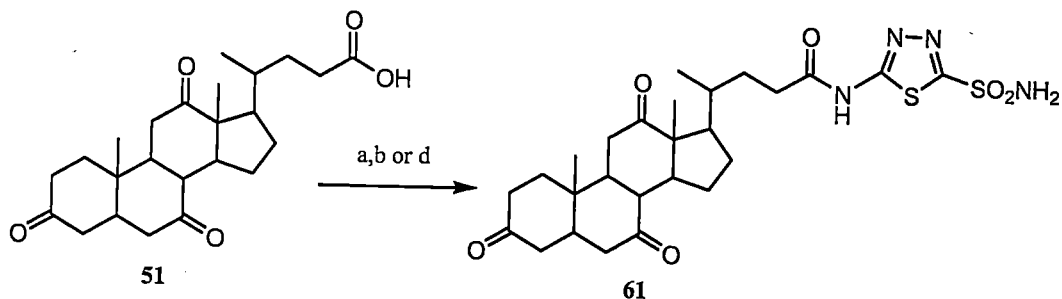
แผนภาพที่ 2.3



Reagents and Conditions; (a) Benzyl alcohol, TsOH (81%); (b) Bocglycine, Boc- β -alanine or Boc- γ -aminobutyric acid, DCC, DMAP, DCM, (68-78%); (c) H_2 , Pd/C (97-99%); (d) $(CH_3)_2N(CH_2)_2OH$, DCC, DMAP, DCM or THF (62-82%); (e) MeI, DCM; (f) HCl, dioxane (83-90% for two steps)



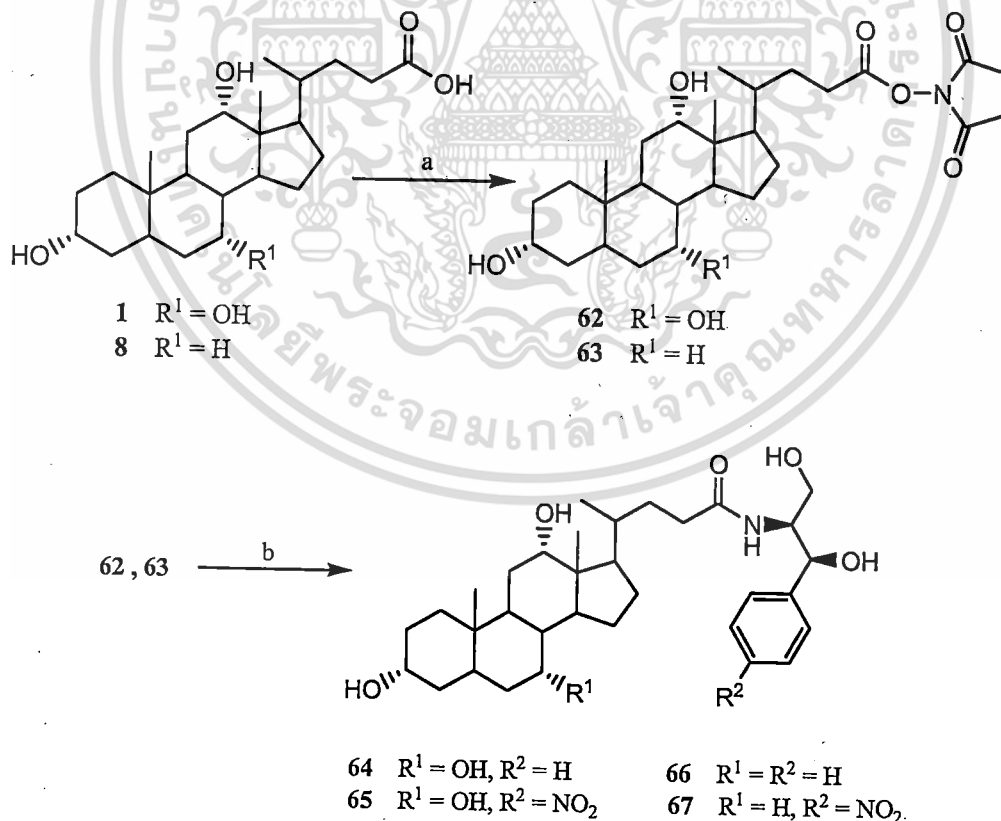
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



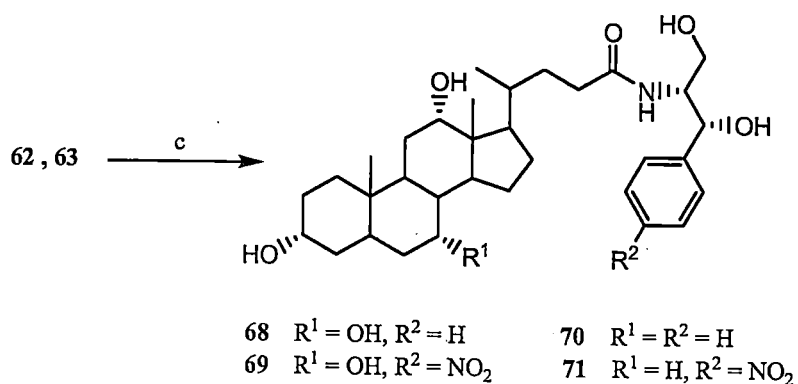
Reagents and Conditions; (a) Ethyl chloro formate, *N*-methyl morpholine, THF; (b) **50**, reflux; (c) AcCl, rt; (d) SOCl₂, **50**, THF

Hazra และคณะ[19] ได้ทำการสังเคราะห์สารเอไมด์ **64-71** จากกรดโคคลิก **1** และกรดดีออกซีโคคลิก **8** แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและสาหร่าย พบว่า สาร **64 67 68 69 70** และ **71** มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในระดับปานกลาง และสาร **66** เท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อเซลล์สมองอักเสบ *Cryptococcus neoformans* ที่ค่า IC₅₀ เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

แผนภาพที่ 2.5



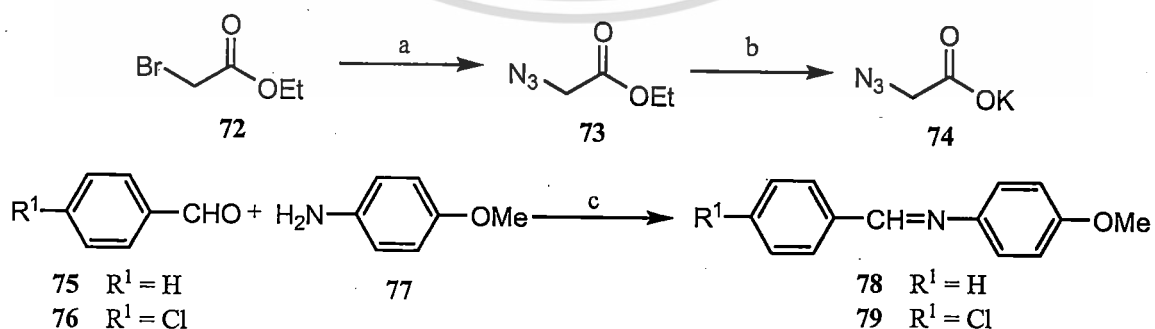
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



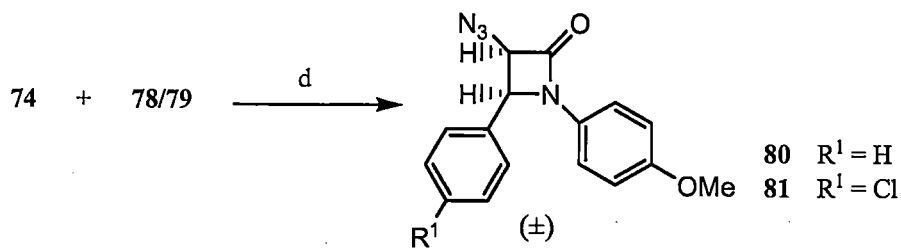
Reagents and conditions; (a) *N*-Hydroxy succinamide, DCC, THF-CH₃CN, 25°C, 18 h (62 97% yield, 63 84% yield); (b) (1*R*,2*R*)-1-phenyl-2-amino-1,3-propanediol, DMF, 25 °C, 1.5 h (64 92% yield, 66 88% yield), or (1*R*,2*R*)-1-para-nitrophenyl-2-amino-1,3-propanediol, DMF, 25 °C, 1.5 h (65 86% yield, 67 81% yield); (c) (1*S*,2*S*)-1-phenyl-2-amino-1,3-propanediol, DMF, 25 °C, 1.5 h (68 90% yield, 70 92% yield), or (1*S*,2*S*)-1-para-nitrophenyl-2-amino-1,3-propanediol, DMF, 25 °C, 1.5 h (69 79% yield, 71 81% yield)

Hazra และคณะ[20] ได้ทำการสังเคราะห์ 1,2,3-triazole-linked β -lactam-bile acid จากกรดโคลิก 1 และกรดคีออกซีโคลิก 8 แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่า สาร 93 แสดงผลที่ดีมากในการต้านสาหร่ายโดยให้ค่า MIC 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับการต้าน *Candida albicans* และ 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับการต้าน *Benjaminiella poitrasii* และสาร 87 แสดงฤทธิ์ต้านสูงสุดที่ค่า MIC 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับการต้าน *Yarrowia lipolytica* นอกจากนี้สารที่เป็นอนุพันธ์ของกรดโคลิก 86 88 90 92 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ในระดับปานกลาง

แผนภาพที่ 2.6

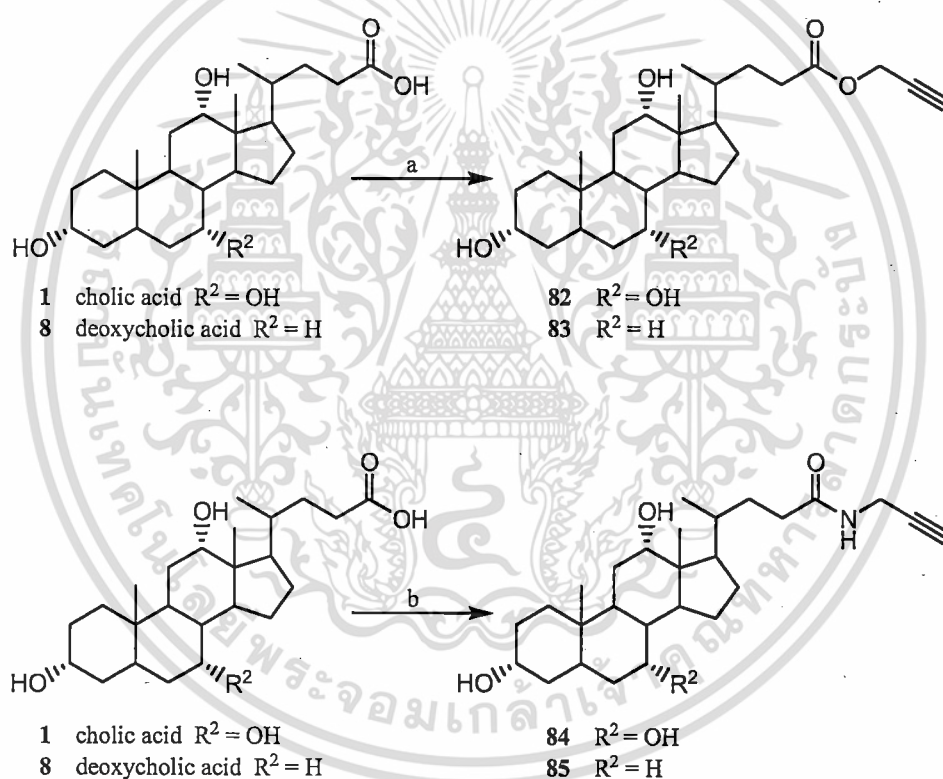


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Reagents and Conditions; (a) NaN₃, Bu₄NBr, DCM/H₂O (1:1), 25°C, 36h, 98%; (b) KOH, MeOH, 25 °C, 4h, 94%; (c) anhydrous MgSO₄, DCM, 25°C, 12h, (97% for **78** and 95% for **79**); (d) Triphosgene, Et₃N, DCM, 0-25°C, 15h, (81% for **80** and 77% for **81**);

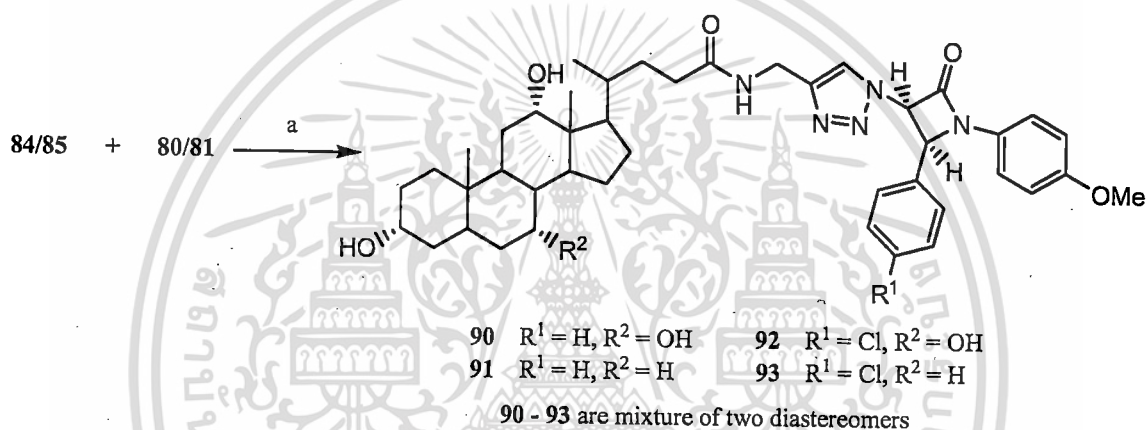
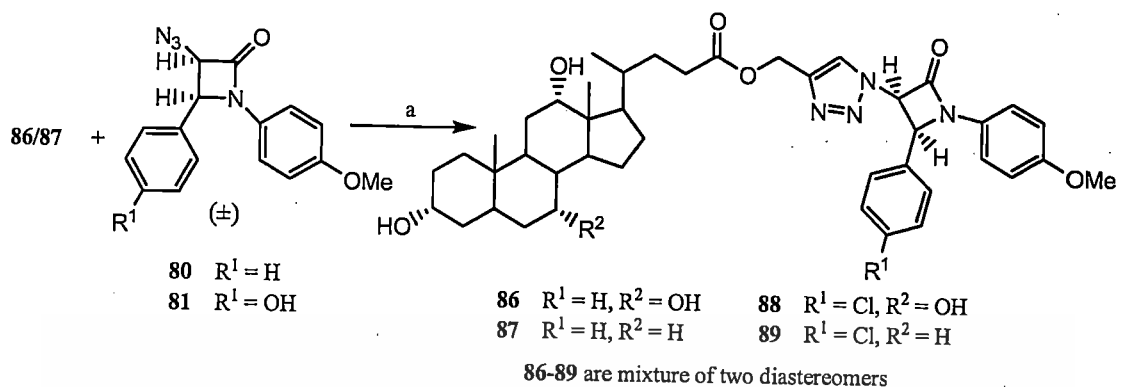
แผนภาพที่ 2.7



Reagents and Conditions; (a) EDC.HCl, HOBt, Propargyl alcohol, DMF, 0-25°C, 12h, 88% for **82** and 90% for **83**; (b) EDC.HCl, HOBt, Propargyl amine hydrochloride, DMF, 0-25°C, 11h, 89% for **84** and 92% for **85**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

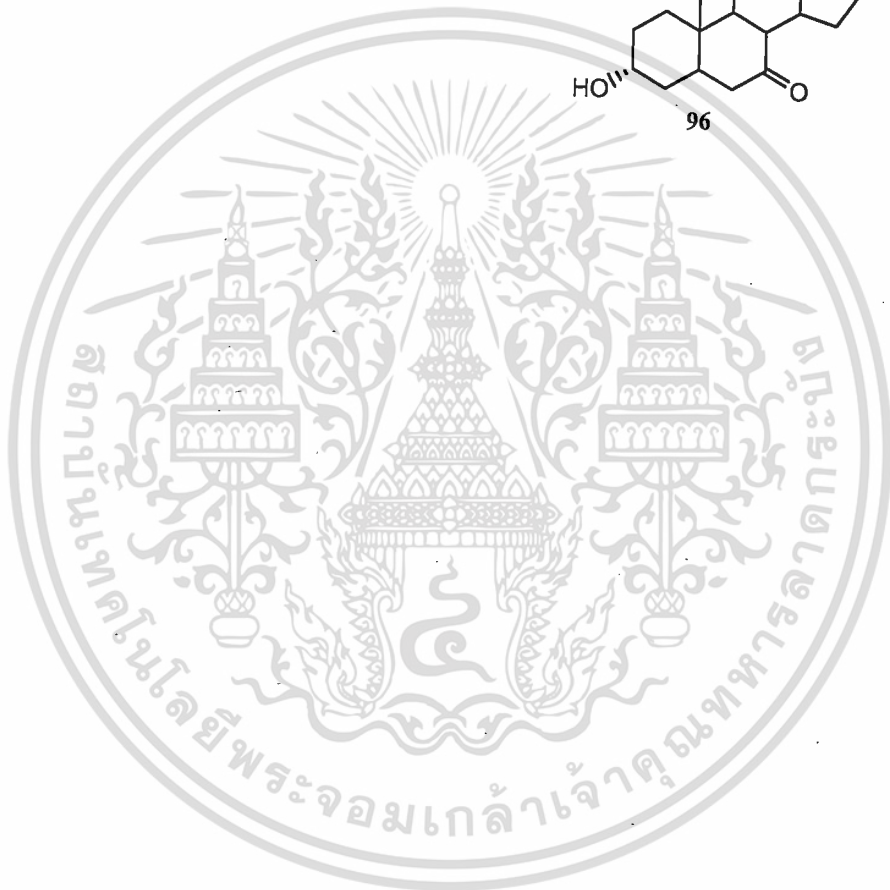
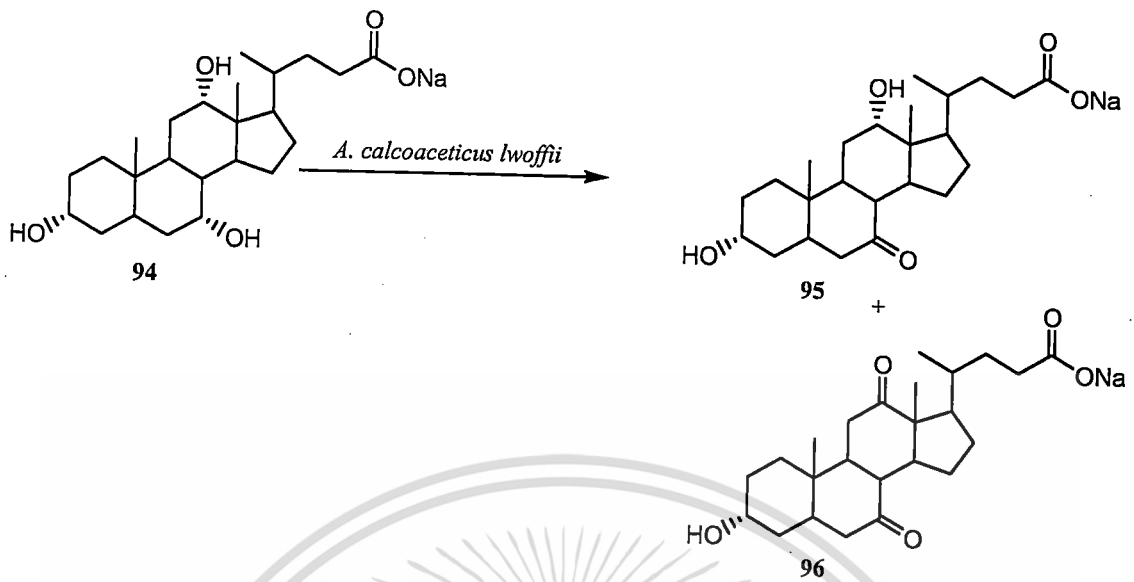
แผนภาพที่ 2.8



Reagents and Conditions; (a) Sodium ascorbate, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, DMF/ H_2O (7:3), microwave (385 W), 5 min, 95-97%

Pedrini และคณะ[21] ได้ทำการเปลี่ยนเกลือไฮเดียมของกรดโคลิก 94 โดยใช้เอ็นไซม์ *Acinetobacter calcoaceticus lwoffii* ซึ่งจะเกิดออกซิเดชันที่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-7 และ C-12 ได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ 7-คีโต และ 7,12-ไดคีโตกรดโคลานิก 95 และ 96 ตามแผนภาพที่ 2.9 มีผลได้เท่ากับ 24 และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

แผนภาพที่ 2.9



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

	เกรด	บริษัท
1. กรดโคลิก	AR grade	Fluka
2. กรดดีออกซีโคลิก	AR grade	Fluka
3. 1,3-ไดอะมิโนโพรเพน	AR grade	Fluka
4. 1,4-ไดอะมิโนบิวเทน	AR grade	Fluka
5. 1,6-ไดอะมิโนเฮกเซน	AR grade	Fluka
6. 1,7-ไดอะมิโนเฮปเทน	AR grade	Fluka
7. 1,8-ไดอะมิโนออกเทน	AR grade	Fluka
8. 1,9-ไดอะมิโนโนเนน	AR grade	Fluka
9. ไดคลอโรมีเทน	AR grade	Fisher scientific
10. เมทานอล	Commercial grade	Thai pure science
11. ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	AR grade	Lab-Scan
12. พีรีดีน	AR grade	Lab-Scan
13. Wang resin	AR grade	Fluka
14. 4-ไนโตรฟีนิลคลอโรฟอร์มेट	AR grade	Merck
15. <i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide	AR grade	Aldrich
16. กรดไตรฟลูออโรอะซิติก	AR grade	Fluka
17. รีเอเจนต์ A		
18. รีเอเจนต์ B		

3.2 การทดลองทั่วไป

ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน และเมทานอลที่ใช้เป็นเกรดทางการค้าถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง และตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ที่นำมาใช้จะแช่ไว้ใน Molecular sieve เพื่อดูดน้ำและความชื้น ส่วนสารเคมีที่ได้จากการซื้อจะนำมาใช้โดยปราศจากการทำสารให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวทำละลายพริดีนที่ใช้ในการทดลอง ถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นที่อุณหภูมิ 115 – 116 องศาเซลเซียส และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อลดน้ำ ระยะเวลาในการใช้ 30 วัน

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

อินฟราเรดสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องฟูเรียรทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX 60237 โดยใช้ KBr เป็นวัสดุในการทำหน้าต่างเซลล์ และทำการบันทึกในช่วงความถี่ $4,000 - 400 \text{ cm}^{-1}$

แมสสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ Finnigan LC – Q MS detector ด้วยเทคนิค Electrospray จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง และ Thermo Finnigan Model Polaris Q – Mass spectrometer serial No. MS 210179 จากมหาวิทยาลัยมหิดล

การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์โดยใช้ รีเอเจนต์ A และ รีเอเจนต์ B ในการทดสอบ ซึ่งเตรียมได้ดังนี้

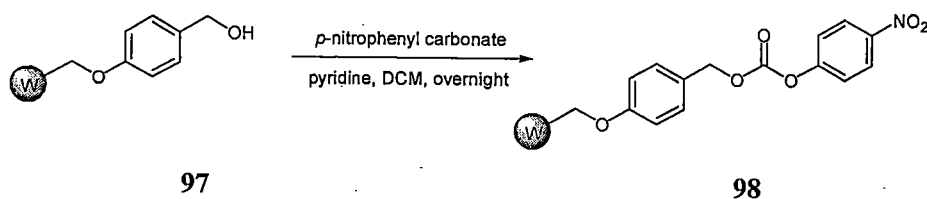
รีเอเจนต์ A : สารละลาย 1) ชั่งฟีนอล 40 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร สารละลาย 2) ชั่งโพแทสเซียมไฮยาไนด์ 65 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารละลายมา 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยพริดีน 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการผสมสารละลาย 1 และ 2 ตั้งบ่มกวนให้สารละลายผสมเข้ากัน

รีเอเจนต์ B : ชั่งนินไฮดริน 2.5 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 50 มิลลิลิตร

3.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของไบสแอสิดโดยเทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็ง[22]

3.3.1 ปฏิกิริยาการกระตุ้น Wang resin โดยการเปลี่ยนเป็นหมู่คาร์บอนेट

แผนภาพที่ 3.1



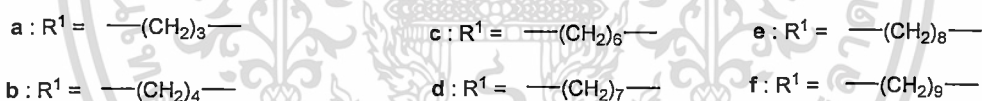
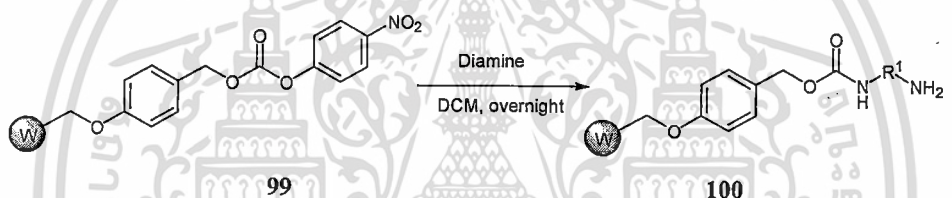
1. ชั่ง Wang resin 97 จำนวน 100.0 มิลลิกรัม (0.10 มิลลิโมล) ใส่ลงใน column cap แล้วเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่อนักศึกษาเห็นใบเซอร์ของการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- โคลลอร์โรมีเทน 10 มิลลิลิตร แช่ไว้ประมาณ 10 นาที จนกระทั่งเรซินบวมตัว
2. ไขโคลลอร์โรมีเทนออกจาก column cap เติมสารละลายของ 4-ไนโตรฟีนิลโคลลอร์โพรเมต 80.6 มิลลิกรัม (0.40 มิลลิโมล) ในโคลลอร์โรมีเทน ลงใน column cap
 3. เติมฟิริตินลงไปประมาณ 5 หยด แล้วเติมโคลลอร์โรมีเทนจนได้ปริมาตร 2/3 ของ column cap
 4. จากนั้นปิดฝา column cap ให้เรียบร้อย และระบายความดันภายใน column cap นำ column cap ไปตั้งหมუნ เปิดเครื่องตั้งหมუნทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
 5. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไขสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง จากนั้นล้างเรซินด้วยโคลลอร์โรมีเทนหลาย ๆ ครั้ง จะได้ *p*-nitrophenyl carbonate wang resin 98

3.3.2 ปฏิกิริยาการใส่ไดเอมีนเข้าไปทำปฏิกิริยากับ Wang resin

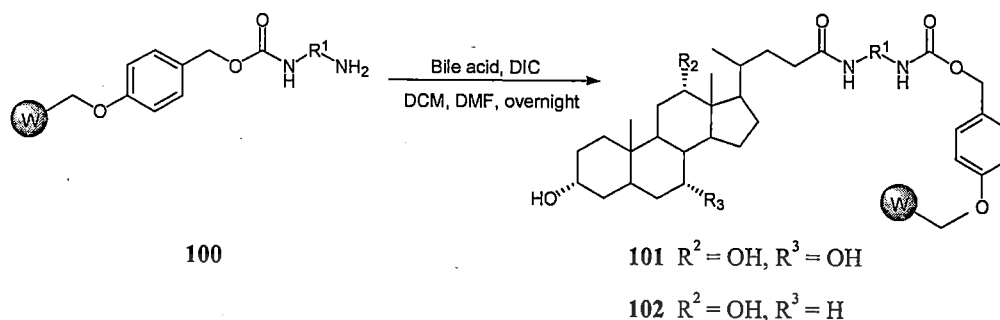
แผนภาพที่ 3.2



1. ชั่งไดเอมีนจำนวน 4 equivalent ของ Wang resin ละลายในโคลลอร์โรมีเทน จากนั้นเติมลงใน column cap ที่ได้จากปฏิกิริยา 3.3.1
2. จากนั้นเติมโคลลอร์โรมีเทนลงใน column cap จนได้ปริมาตร 2/3 ของหลอด
3. นำ column cap ไปตั้งหมუნ เปิดเครื่องตั้งหมუნทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
4. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไขสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง จากนั้นล้างเรซินด้วยโคลลอร์โรมีเทนสลับกับเมทานอลหลาย ๆ ครั้ง
5. นำเม็ดเรซิน 2-3 เม็ด ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กไปทดสอบ โดยใส่ รีเอเจนต์ A 3 หยด และ รีเอเจนต์ B 1 หยด จากนั้นนำหลอดทดลองนี้ไปให้ความร้อนประมาณ 1 นาที ถ้าเม็ดเรซินเปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่าไดเอมีนได้ทำปฏิกิริยากับ Wang resin สมบูรณ์แล้ว

3.3.3 ปฏิกิริยาการใส่ไบต์แอซิดเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน

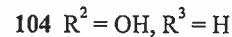
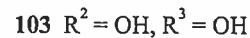
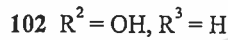
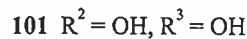
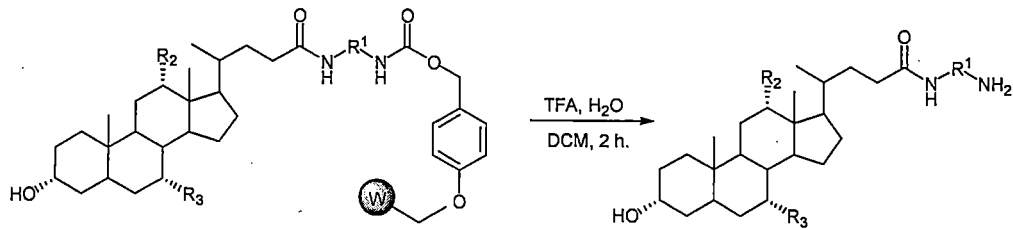
แผนภาพที่ 3.3



1. ชั่งไบต์แอซิดจำนวน 4 equivalent ของ Wang resin ใส่ลงใน vial ละลายไบต์แอซิดด้วย ไดคลอโรมีเทน และไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ทำการปั่นจนจนกระทั่งไบต์แอซิดละลายหมด
2. จากนั้นใส่ DIC ลงในไบต์แอซิดปั่นจนต่อเนื่องเป็นเวลา 10 นาที
3. นำไบต์แอซิดที่ได้จากข้อ 2 ใส่ลงใน column cap ที่มีเรซินที่ได้จากปฏิกิริยา 3.3.2
4. เติมไดคลอโรมีเทนลงใน column cap จนมีปริมาณเป็น 2/3 ของหลอด
5. นำ column cap ไปตั้งหมუნ เปิดเครื่องตั้งหมუნทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
6. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไขสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง และล้างเรซินด้วยไดคลอโรมีเทนสลับกับเมทานอล จากนั้นแช่เรซินในไดคลอโรมีเทนเป็นเวลา 30 นาที สลับกับแช่ในเมทานอลเป็นเวลา 30 นาทีเช่นกัน ประมาณ 5-6 ครั้ง
7. นำเม็ดเรซิน 2-3 เม็ด ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กไปทดสอบ โดยใส่รีเอเจนต์ A 3 หยด และรีเอเจนต์ B 1 หยด จากนั้นนำหลอดทดลองนี้ไปให้ความร้อนประมาณ 1 นาที ถ้าเม็ดเรซินไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่าไบต์แอซิดได้ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนสมบูรณ์แล้ว

3.3.4 ปฏิกิริยาการตัดสารผลิตภัณฑ์ที่ออกจาก Wang resin

แผนภาพที่ 3.4



- นำ column cap ที่มีเรซินที่ได้จากปฏิกิริยา 3.3.3 มาเติมกรดไตรฟลูออโรแอซิดกลงไปประมาณ 1/3 โดยปริมาตรของหลอด
- จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 2-3 หยด
- เติมไดคัลโรวีเทนลงใน column cap จนมีปริมาตรเป็น 2/3 ของหลอด
- นำ column cap ไปตั้งหมุน เปิดเครื่องตั้งหมุนทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
- ไขสารละลายจาก column cap ใส่ลงในขวดแก้วเล็กที่ทราบน้ำหนัก จากนั้นนำไปพ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อกำจัดตัวทำละลายออกจากสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมด
- นำขวดแก้วเล็กที่มีสารผลิตภัณฑ์ไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ได้
- นำสารผลิตภัณฑ์ไปตรวจวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

3.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายเลือกใช้สาหร่าย 3 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis* sp. *Oscillatoria* sp. และ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. มีวิธีการทดลองดังนี้

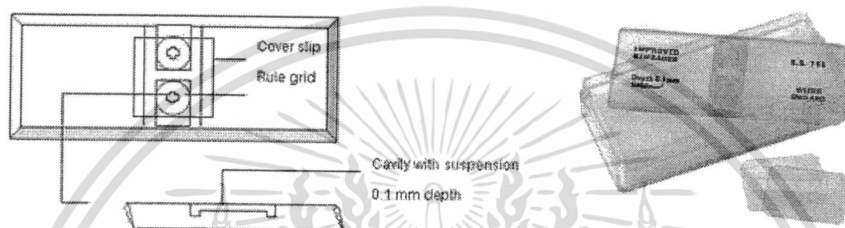
3.4.1 การเตรียมอนุพันธ์เอไมด์ของไบลต์แอซิด

ชั่งอนุพันธ์เอไมด์ของไบลต์แอซิด 20 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมีความเข้มข้นเท่ากับ 200 ppm จากนั้นเจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้สารละลายมีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 20 จนถึง 200 ppm ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16 X 160 มิลลิเมตร โดยสารตัวอย่าง 1 ชนิด จะทำการทดสอบกับสาหร่าย 3 ชนิด

3.4.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย

นำสารตัวอย่างมาทดสอบกับสาหร่าย 3 ชนิด ชนิดละ 3 ซ้ำ โดยนำสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดใส่ในสารละลายที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปวางในสภาวะแวดล้อมที่มีแสงสว่างเพียงพอในการเจริญเติบโตของสาหร่าย และทำการปั่นกวนสารละลายทุกวันเพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์สาหร่ายจับตัวกันเป็นตะกอนด้านล่าง สังเกตผล และบันทึกผล โดยการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่เริ่มต้นและสิ้นสุด ในระยะเวลา 1 สัปดาห์โดยใช้ Haemocytometer

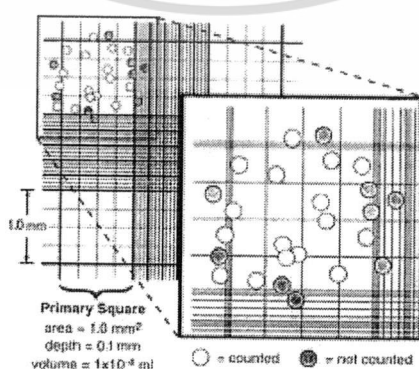


รูปที่ 3.1 สไลด์ Haemocytometer

3.4.3 การบันทึกผลและการวิเคราะห์ผล

การบันทึกผลทำโดยการนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นและสิ้นสุด ทำการนับทั้งหมด 3 กริด (1 กริด เท่ากับ 16 ช่องของแต่ละมุม) แล้วหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ผล โดยนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณเพื่อหาจำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่ถูกยับยั้งการเจริญเติบโต

$$\text{จำนวนเซลล์สาหร่าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)} = \text{จำนวนเซลล์สาหร่ายที่นับได้ต่อ 1 กริด} \times 10^4$$



เอกสารนี้เป็นเอกสารรูปที่ 3.2 ช่องกริดของสไลด์ Haemocytometer และวิธีการนับใน 1 กริด ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การทดสอบฤทธิ์ด้านความเป็นพิษของเซลล์

อนุพันธ์เอไมค์ของไบต์แอสิดจะถูกส่งไปทดสอบฤทธิ์การด้านความเป็นพิษของเซลล์ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ การทดลองแบ่งออกได้ดังต่อไปนี้

3.5.1 ทดสอบฤทธิ์ด้านความเป็นพิษของเซลล์

การทดสอบใช้วิธี Sulforhodamine B (SRB) assay เซลล์ที่ใช้ทดสอบคือ African green monkey kidney โดยมีชุดควบคุมคือ 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) และเปรียบเทียบกับตัวยา Ellipticine การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการเจริญเติบโตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างไม่มีผลต่อการด้านความเป็นพิษของเซลล์ (non cytotoxic) และถ้าเซลล์มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อการด้านความเป็นพิษของเซลล์ (cytotoxic) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

3.5.2 ทดสอบฤทธิ์การต้านไวรัสเริม (Anti-HSV-1, Herpes simplex virus type 1)

การทดสอบใช้วิธี Sulforhodamine B (SRB) assay โดยมีชุดควบคุมคือ 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) และเปรียบเทียบกับตัวยา Acyclovir การบันทึกผลการทดลองทำโดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อไวรัสเริม ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อไวรัสเริม

% การยับยั้งเชื้อไวรัสเริม	Activity
< 25%	Inactive
25-35%	Weakly active
> 35-50%	Moderately active
> 50%	Active*

* รายงานผลการทดลองเป็นค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

3.5.3 ทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก (Anti-cancer KB-Oral cavity cancer)

การทดสอบด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA)[23] ใช้เซลล์ KB (Human epidermoid carcinoma of carcinoma) โดยมีชุดควบคุมคือ 0.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) และเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบกับตัวยา Ellipticine และ Doxorubicine การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างไม่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (inactive) และถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (active) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

3.5.4 ทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (Anti-cancer BC-Breast cancer)

การทดสอบด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA)[23] ใช้เซลล์ MCF7 (Human breast adenocarcinoma) โดยมีชุดควบคุมคือ 0.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) และเปรียบเทียบกับตัวยา Ellipticine และ Doxorubicine การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างไม่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (inactive) และถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (active) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)



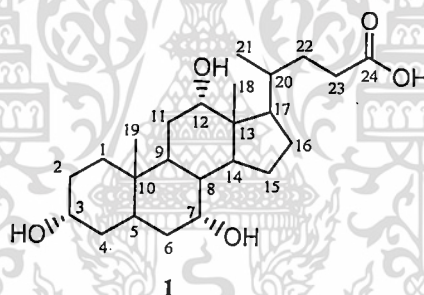
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของไบลต์แอซิดโดยเทคนิควิทยุภาคของแข็ง

จาก โมเลกุลของ ไบลต์แอซิดที่ประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว งานวิจัยนี้จึงเลือกทำการสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของไบลต์แอซิด โดยเทคนิควิทยุภาคของแข็ง ทั้งนี้เพื่อสะดวกในการทำให้สารผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์ได้ง่ายขึ้น และไม่เสียผลิตภัณฑ์ในขณะที่ทำการแยกให้บริสุทธิ์เช่นในขั้นตอนการทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ไบลต์แอซิดที่ใช้เป็นสารตั้งต้น คือ กรดโคลิค 1 และกรดคือออกซีโคลิค 8 โดยทำการพิสูจน์โครงสร้างของไบลต์แอซิดด้วยเทคนิค $^1\text{H NMR}$ และ $^{13}\text{C NMR}$ ได้ผลดังต่อไปนี้

กรดโคลิค 1

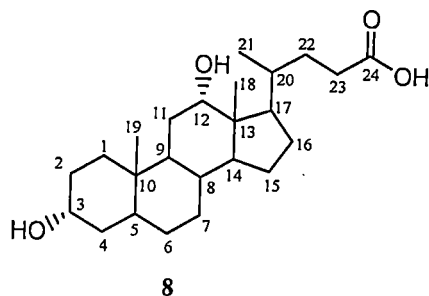


$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.61 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J_{\text{H}21, \text{H}20} = 6.2$ Hz, H-21), 1.19-1.92 (m, $-\text{CH}_2$), 2.07-2.26 (m, $-\text{CH}_2$), 3.20-3.30 (1H, m, H-3), 3.69 (1H, m, H-7) และ 3.85 (1H, m, H-12)

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 13.0 (C-18), 17.7 (C-21), 23.2 (C-19), 24.2 (C-15), 27.9 (C-9), 28.6 (C-16), 29.6 (C-11), 31.2 (C-2), 32.0 (C-22), 32.3 (C-23), 35.9 (C-6), 35.9 (C-10), 36.5 (C-1), 36.7 (C-20), 40.5 (C-4), 41.0 (C-8), 43.0 (C-14), 43.2 (C-5), 47.5 (C-13), 48.0 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3), 74.0 (C-12) และ 178.2 (C-24)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดดีออกซีโคลิค 8



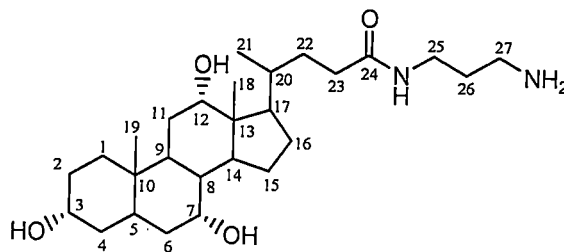
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.57 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 6.2$ Hz, H-21), 0.93-1.75 (m, $-\text{CH}_2$), 2.01-2.26 (m, $-\text{CH}_2$), 3.17 (1H, m, H-3) และ 3.82 (1H, m, H-12)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 13.0 (C-18), 17.4 (C-21), 23.5 (C-19), 24.7 (C-15), 27.3 (C-7), 28.2 (C-6), 28.4 (C-16), 29.7 (C-11), 30.9 (C-2), 31.8 (C-22), 32.1 (C-23), 34.6 (C-9), 35.1 (C-10), 36.3 (C-1), 36.5 (C-20), 37.0 (C-4), 37.2 (C-8), 43.4 (C-5), 47.4 (C-13), 47.9 (C-17), 49.1 (C-14), 72.3 (C-3), 73.8 (C-12) และ 178.0 (C-24)

ข้อมูลจากการวิเคราะห์โครงสร้างของไบต์แอซิดตั้งต้นด้วยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR ที่แสดงไว้ข้างต้นนี้ สามารถนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างของไบต์แอซิดเอไมด์สังเคราะห์ โดยสามารถสังเกตจากการเปลี่ยนแปลง คือ ค่า chemical shift ของ ^{13}C ของหมู่เอไมด์ (-CONH) จะปรากฏสัญญาณที่ δ 176.0-177.0 ppm และสามารถตรวจสอบได้อย่างชัดเจนจากมวลโมเลกุลของไบต์แอซิดเอไมด์สังเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรสโกปี ข้อมูลของไบต์แอซิดเอไมด์สังเคราะห์แสดงได้ดังต่อไปนี้

4.1.1 สารตั้งเคราะห์ *N*-(3-Aminopropyl)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-amide

103a



103a

สาร **103a** ตั้งเคราะห์จากกรดโคเลอิก 1 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-ไดอะมิโนโพรเพน สาร **103a** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 72.32 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร **103a** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{\max} 1230 (C-N stretching), 1659 (C=O stretching ของ CONH), 2850, 2920 (C-H stretching) และ 3359 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

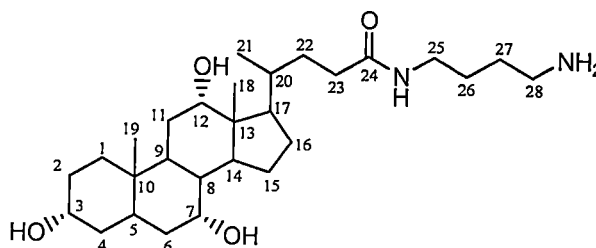
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.60 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, $J_{\text{H}_{21},\text{H}_{20}} = 5.8$ Hz, H-21), 1.17-2.22 (m, $-\text{CH}_2$), 2.81 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-27), 2.93 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-25), 3.15-3.19 (1H, m, H-3), 3.70 (1H, m, H-7), 3.85 (1H, m, H-12) และ 7.86 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 13.0 (C-18), 17.7 (C-21), 22.8 (C-19), 24.2 (C-15), 27.9 (C-9), 28.7 (C-16), 28.9 (C-26), 29.6 (C-11), 31.2 (C-2), 33.3 (C-22), 34.0 (C-23), 35.7 (C-6), 35.8 (C-25), 35.8 (C-10), 36.8 (C-1), 37.0 (C-20), 38.2 (C-27), 40.5 (C-4), 41.0 (C-8), 42.8 (C-14), 43.1 (C-5), 47.5 (C-13), 48.0 (C-17), 68.9 (C-7), 73.2 (C-3), 74.0 (C-12) และ 177.9 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 465.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (81%)

4.1.2 สารตั้งเคราะห์ *N*-(4-Aminobutyl)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-amide

2 (103b)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร 2 สังเคราะห์จากกรดโคลิก 1 ทำปฏิกิริยากับ 1,4-ไดอะมิโนบิวเทน สาร 2 (103b) มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 77.09 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 2 (103b) ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{\max} 1204 (C-N stretching), 1672 (C=O stretching ของ CONH), 2857, 2925 (C-H stretching) และ 3435 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

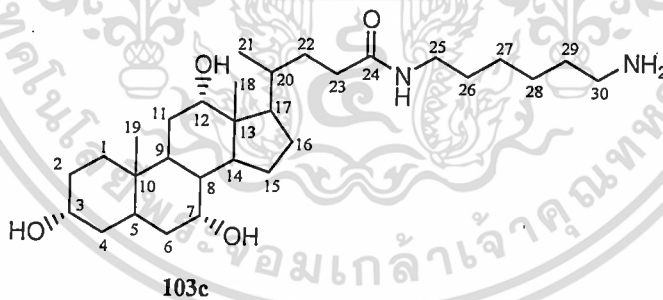
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.65 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, d, $J_{\text{H}_{21},\text{H}_{20}} = 5.0$ Hz, H-21), 1.19-2.23 (m, $-\text{CH}_2$), 2.80-2.93 (2H, m, H-28), 3.13 (2H, m, H-25), 3.24 (1H, m, H-3), 3.73 (1H, m, H-7), 3.89 (1H, m, H-12) และ 7.91 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 13.0 (C-18), 17.8 (C-21), 23.2 (C-19), 24.3 (C-15), 25.9 (C-26), 27.5 (C-27), 28.0 (C-9), 28.7 (C-16), 29.7 (C-11), 31.2 (C-2), 33.3 (C-22), 34.1 (C-23), 36.0 (C-6), 36.1 (C-10), 36.5 (C-1), 37.0 (C-20), 39.5 (C-25), 40.4 (C-28), 40.5 (C-4), 41.0 (C-8), 43.1 (C-14), 43.2 (C-5), 47.5 (C-13), 48.0 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3), 74.1 (C-12) และ 177.1 (C-24)

MS (positive mode) : m/z 477.35 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (4.5%)

4.1.3 สารสังเคราะห์ *N*-(6-Aminohexyl)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-amide

103c



สาร 103c สังเคราะห์จากกรดโคลิก 1 ทำปฏิกิริยากับ 1,6-ไดอะมิโนเฮกเซน สาร 103c มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 56.80 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 103c ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{\max} 1203 (C-N stretching), 1677 (C=O stretching ของ CONH), 2862, 2935 (C-H stretching) และ 3394 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

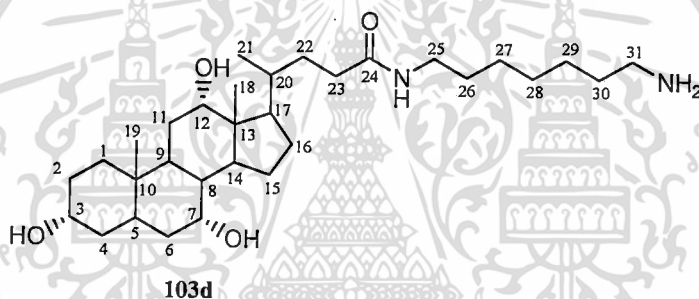
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.58 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 6.2$ Hz, H-21), 1.15-2.21 (m, $-\text{CH}_2$), 2.78 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H30), 3.03 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, H-25), 3.17-3.18 (1H, m, H-3), 3.67 (1H, m, H-7), 3.84 (1H, m, H-12) และ 7.85 (2H, s, NH_2)

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 13.0 (C-18), 17.8 (C-21), 23.2 (C-19), 24.2 (C-15), 27.0 (C-26), 27.3 (C-29), 28.0 (C-9), 28.5 (C-16), 29.6 (C-11), 30.2 (C-28), 31.2 (C-2), 33.5 (C-22), 34.3 (C-23), 35.7 (C-27), 35.9 (C-6), 36.1 (C-10), 36.5 (C-1), 36.8 (C-20), 37.0 (C-25), 40.1 (C-4), 40.7 (C-30), 41.0 (C-8), 43.1 (C-14), 43.2 (C-5), 47.6 (C-13), 48.1 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3), 74.1 (C-12) และ 176.9 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 507.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (40%)

4.1.4 สารสังเคราะห์ที่ *N*-(7-Aminoheptyl)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-amide

103d



สาร 103d สังเคราะห์จากกรดโคเลสิก 1 ทำปฏิกิริยากับ 1,7-ไดอะมิโนเฮปเทน สาร 103d มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 48.18 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 103d ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{max} 1202 (C-N stretching), 1659 (C=O stretching ของ CONH), 2851, 2922 (C-H stretching) และ 3359 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.61 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 6.2$ Hz, H-21), 1.19-2.25 (m, $-\text{CH}_2$), 2.81 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-31), 3.06 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, H-25), 3.21-3.22 (1H, m, H-3), 3.71 (1H, m, H-7), 3.86 (1H, m, H-12) และ 7.88 (2H, s, NH_2)

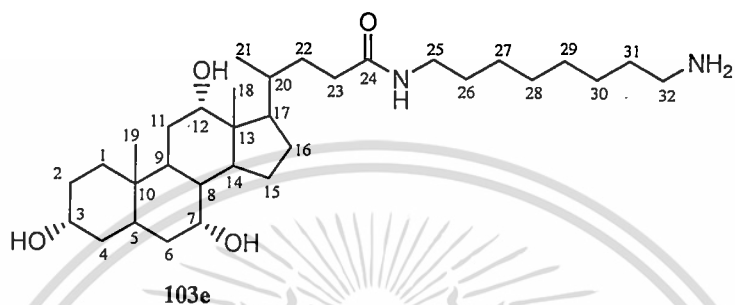
$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 13.0 (C-18), 17.8 (C-21), 23.2 (C-19), 24.3 (C-15), 27.4 (C-26), 28.0 (C-9), 28.5 (C-30), 28.7 (C-16), 29.7 (C-11), 29.8 (C-29), 31.2 (C-2), 33.4 (C-22), 33.5 (C-28), 34.1 (C-23), 35.7 (C-6), 35.9 (C-27), 36.1 (C-10), 36.5 (C-1), 36.8 (C-20), 37.0

(C-25), 40.5 (C-4), 40.8 (C-31), 41.1 (C-8), 43.1 (C-14), 43.2 (C-5), 47.6 (C-13), 47.8 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3), 74.1 (C-12) และ 176.9 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 521.6 $[M+H]^+$ (95%)

4.1.5 สารสังเคราะห์ *N*-(8-Aminoctyl)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-amide

103e



สาร 103e สังเคราะห์จากกรดโคเลสิก 1 ทำปฏิกิริยากับ 1,8-ไดอะมิโนออกเทน สาร 103e มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 43.07 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 103e ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{\max} 1253 (C-N stretching), 1619 (C=O stretching ของ CONH), 2851, 2924 (C-H stretching) และ 3432 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.59 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-21), 1.18-2.12 (m, $-\text{CH}_2$), 2.75-2.87 (2H, m, H-32), 3.05 (2H, m, H-25), 3.20 (1H, m, H-3), 3.42 (1H, m, H-7), 3.85 (1H, m, H-12) และ 7.86 (2H, s, NH_2)

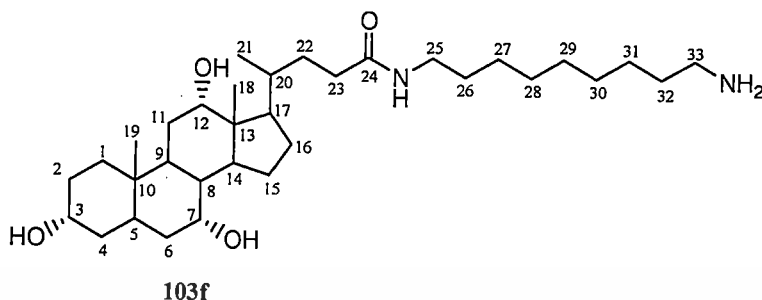
^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 13.0 (C-18), 17.8 (C-21), 22.8 (C-19), 24.2 (C-15), 27.4 (C-26), 27.8 (C-31), 27.9 (C-9), 28.5 (C-16), 29.6 (C-11), 30.0 (C-28), 30.0 (C-29), 30.5 (C-30), 31.2 (C-2), 33.5 (C-22), 34.3 (C-23), 35.7 (C-27), 35.9 (C-6), 36.1 (C-10), 36.8 (C-1), 37.0 (C-20), 38.9 (C-25), 40.3 (C-4), 40.8 (C-32), 41.0 (C-8), 42.8 (C-14), 43.1 (C-5), 47.6 (C-13), 47.8 (C-17), 68.9 (C-7), 73.2 (C-3), 74.0 (C-12) และ 176.8 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 535.5 $[M+H]^+$ (100%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.6 สารสังเคราะห์ *N*-(9-Aminononyl)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-amide

103f



สาร 103f สังเคราะห์จากกรดโคเลอิก 1 ทำปฏิกิริยากับ 1,9-ไดอะมิโนโนนีน สาร 103f มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 57.27 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 103f ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{\max} 1202 (C-N stretching), 1672 (C=O stretching ของ CONH), 2856, 2925 (C-H stretching) และ 3433 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

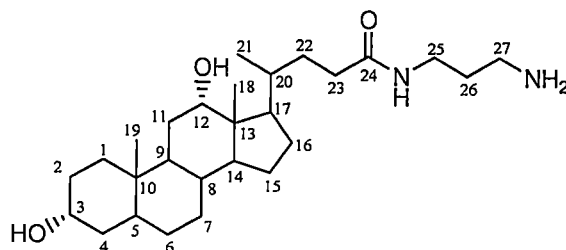
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.62 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 10.9$ Hz, H-21), 1.18-2.10 (m, $-\text{CH}_2$), 2.80 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-33), 3.03 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-25), 3.21 (1H, m, H-3), 3.73 (1H, m, H-7), 3.88 (1H, m, H-12) และ 7.91 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.3 (C-18), 18.2 (C-21), 23.7 (C-19), 24.1 (C-15), 27.4 (C-26), 27.9 (C-32), 28.0 (C-9), 28.6 (C-16), 29.7 (C-31), 29.8 (C-11), 30.1 (C-28), 30.1 (C-30), 30.4 (C-29), 31.0 (C-2), 33.1 (C-22), 33.9 (C-23), 35.4 (C-27), 35.9 (C-6), 35.9 (C-10), 36.2 (C-1), 36.8 (C-20), 39.0 (C-25), 40.4 (C-4), 40.8 (C-33), 41.5 (C-8), 43.2 (C-14), 44.3 (C-5), 47.8 (C-13), 47.8 (C-17), 68.4 (C-7), 72.1 (C-3), 73.3 (C-12) และ 176.3 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 549.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (39%)

4.1.7 สารสังเคราะห์ *N*-(3-Aminopropyl)-3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

104a



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ 104a เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร **104a** สังเคราะห์จากกรดคีออกซีโคลิก **8** ทำปฏิกิริยากับ 1,3-ไดอะมีโนโพรเพน สาร **104a** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 58.18 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร **104a** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

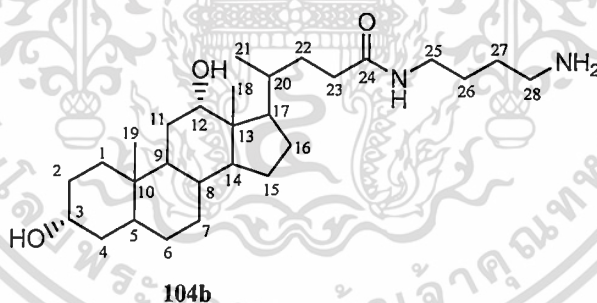
IR : ν_{\max} 1203 (C-N stretching), 1677 (C=O stretching ของ CONH), 2858, 2925 (C-H stretching) และ 3294 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.58 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 6.0$ Hz, H-21), 0.95-2.19 (m, $-\text{CH}_2$), 2.78 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-27), 3.13 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-25), 3.17 (1H, m, H-3), 3.84 (1H, m, H-12) และ 7.84 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 13.2 (C-18), 17.7 (C-21), 23.3 (C-19), 24.8 (C-15), 27.3 (C-7), 28.0 (C-6), 28.7 (C-16), 28.9 (C-26), 29.9 (C-11), 31.1 (C-2), 33.3 (C-22), 34.0 (C-23), 34.7 (C-9), 34.9 (C-10), 35.7 (C-25), 36.1 (C-1), 36.5 (C-20), 36.9 (C-4), 37.4 (C-8), 38.2 (C-27), 43.3 (C-5), 47.6 (C-13), 48.1 (C-17), 49.6 (C-14), 72.6 (C-3), 74.1 (C-12) และ 177.9 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 449.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100%)

4.1.8 สารสังเคราะห์ *N*-(4-Aminobutyl)-3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide **104b**



สาร **104b** สังเคราะห์จากกรดคีออกซีโคลิก **8** ทำปฏิกิริยากับ 1,4-ไดอะมีโนบิวเทน สาร **104b** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 47.87 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร **104b** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

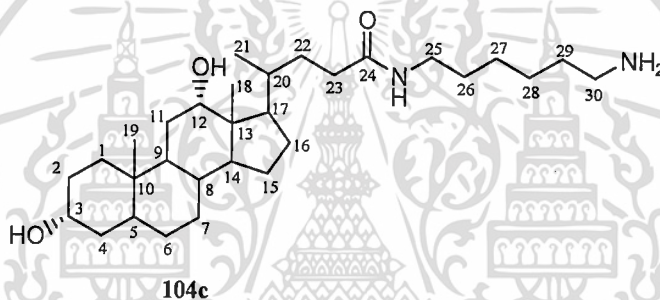
IR : ν_{\max} 1203 (C-N stretching), 1680 (C=O stretching ของ CONH), 2857, 2930 (C-H stretching) และ 3384 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.63 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 5.6$ Hz, H-21), 1.03-2.18 (m, $-\text{CH}_2$), 2.86 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-28), 3.12 (2H, m, H-25), 3.23 (1H, m, H-3), 3.88 (1H, m, H-12) และ 7.90 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 13.5 (C-18), 18.0 (C-21), 24.0 (C-19), 25.1 (C-15), 26.2 (C-26), 27.7 (C-27), 27.8 (C-7), 28.7 (C-6), 29.0 (C-16), 30.1 (C-11), 31.4 (C-2), 33.6 (C-22), 34.5 (C-23), 35.2 (C-9), 35.6 (C-10), 36.7 (C-1), 37.2 (C-20), 37.5 (C-4), 37.8 (C-8), 39.8 (C-25), 40.7 (C-28), 43.9 (C-5), 47.9 (C-13), 48.5 (C-17), 49.9 (C-14), 72.9 (C-3), 74.3 (C-12) และ 177.4 (C-24)

MS (positive mode) : m/z 462.39 [M] (7%)

4.1.9 สารสังเคราะห์ *N*-(6-Aminoethyl)-3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide 104c



สาร 104c สังเคราะห์จากกรดดีออกซีโคลิก 8 ทำปฏิกิริยากับ 1,6-ไดอะมิโนเฮกเซน สาร 104c มีลักษณะกลายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 58.93 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 104c ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{max} 1204 (C-N stretching), 1677 (C=O stretching ของ CONH), 2850, 2918 (C-H stretching) และ 3355 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

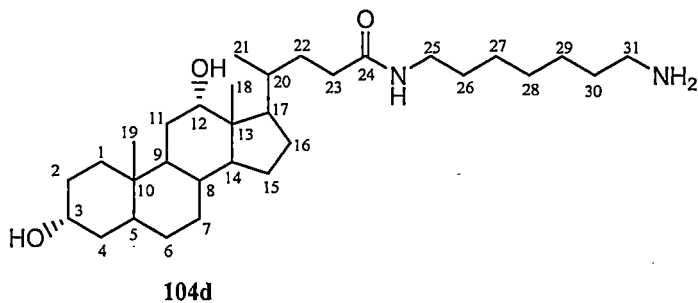
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.62 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 5.9$ Hz, H-21), 0.98-2.16 (m, $-\text{CH}_2$), 2.83 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-30), 3.08 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-25), 3.23 (1H, m, H-3), 3.87 (1H, m, H-12) และ 7.89 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 13.2 (C-18), 17.7 (C-21), 23.7 (C-19), 24.9 (C-15), 27.0 (C-26), 27.3 (C-29), 27.5 (C-7), 28.4 (C-6), 28.5 (C-16), 29.9 (C-11), 30.2 (C-28), 31.1 (C-2), 33.4 (C-22), 34.2 (C-23), 34.9 (C-9), 35.3 (C-10), 35.7 (C-27), 36.5 (C-1), 36.9 (C-20), 37.2 (C-4), 37.5 (C-8), 40.0 (C-25), 40.7 (C-30), 43.7 (C-5), 47.6 (C-13), 48.2 (C-17), 49.6 (C-14), 72.6 (C-3), 74.1 (C-12) และ 176.9 (C-24)

เอกสารนี้เป็น ESMS (positive mode) : m/z 491.5 [M+H] $^+$ (100%) นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.10 สารสังเคราะห์ที่ *N*-(7-Aminoheptyl)-3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

104d



สาร **104d** สังเคราะห์จากกรดดีออกซีโคเลอิก **8** ทำปฏิกิริยากับ 1,7-ไดอะมิโนเฮปเทน สาร **104d** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 63.64 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร **104d** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{\max} 1202 (C-N stretching), 1655 (C=O stretching ของ CONH), 2851, 2922 (C-H stretching) และ 3359 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

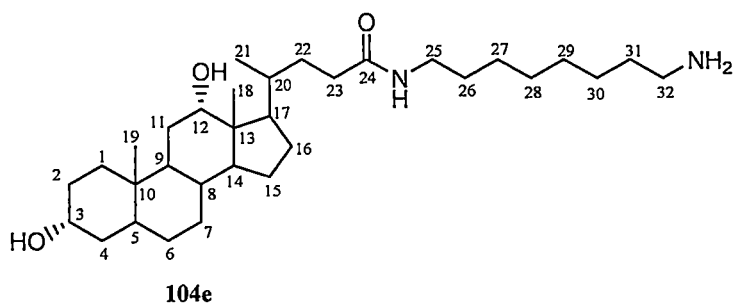
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.58 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, $J_{\text{H}_{21},\text{H}_{20}} = 5.9$ Hz, H-21), 0.94-2.12 (m, $-\text{CH}_2$), 2.79 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-31), 3.03 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-25), 3.19 (1H, m, H-3), 3.84 (1H, m, H-12) และ 7.93 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 13.7 (C-18), 18.1 (C-21), 24.2 (C-19), 25.2 (C-15), 27.4 (C-26), 28.1 (C-6), 28.1 (C-7), 28.1 (C-30), 28.4 (C-16), 29.7 (C-11), 29.7 (C-29), 31.2 (C-2), 33.1 (C-28), 33.8 (C-22), 34.1 (C-23), 34.6 (C-9), 35.2 (C-10), 35.9 (C-27), 36.3 (C-1), 37.0 (C-25), 37.4 (C-20), 37.0 (C-4), 38.0 (C-8), 40.3 (C-31), 44.1 (C-5), 47.4 (C-13), 48.0 (C-17), 49.1 (C-14), 72.8 (C-3), 74.6 (C-12) และ 176.5 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 505.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100%)

4.1.11 สารสังเคราะห์ที่ *N*-(8-Amino-octyl)-3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

104e



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร **104e** สังเคราะห์จากกรดคีออกซีโคลิก 8 ทำปฏิกิริยากับ 1,8-ไดอะมิโนออกเทน สาร **104e** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 47.84 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร **104e** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{\max} 1203 (C-N stretching), 1616 (C=O stretching ของ CONH), 2857, 2924 (C-H stretching) และ 3435 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

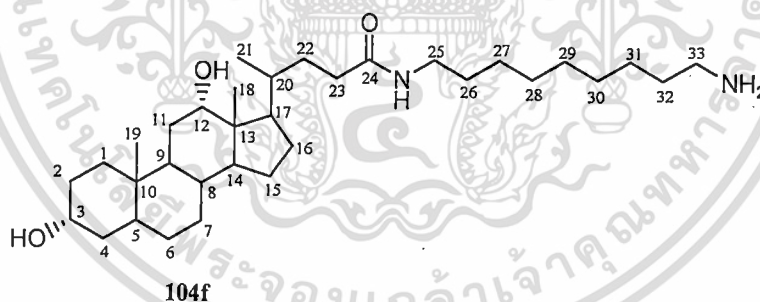
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.62 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, $J_{\text{H}_{21},\text{H}_{20}} = 6.0$ Hz, H-21), 1.02-2.20 (m, $-\text{CH}_2$), 2.82 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-32), 3.06 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-25), 3.22 (1H, m, H-3), 3.87 (1H, m, H-12) และ 7.95 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 13.2 (C-18), 17.7 (C-21), 23.7 (C-19), 24.9 (C-15), 27.4 (C-26), 27.5 (C-7), 27.8 (C-31), 28.5 (C-6), 28.7 (C-16), 30.0 (C-11), 30.1 (C-28), 30.1 (C-29), 30.4 (C-30), 31.1 (C-2), 33.5 (C-22), 34.3 (C-23), 34.9 (C-9), 35.4 (C-10), 35.7 (C-27), 36.5 (C-1), 36.9 (C-20), 37.3 (C-4), 37.5 (C-8), 38.9 (C-25), 40.8 (C-32), 43.7 (C-5), 47.6 (C-13), 48.2 (C-17), 49.6 (C-14), 72.6 (C-3), 74.1 (C-12) และ 176.9 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 519.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100%)

4.1.12 สารสังเคราะห์ที่ *N*-(9-Aminononyl)-3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

104f



สาร **104f** สังเคราะห์จากกรดคีออกซีโคลิก 8 ทำปฏิกิริยากับ 1,9-ไดอะมิโนโนนเนน สาร **104f** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 76.36 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร **104f** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{\max} 1202 (C-N stretching), 1673 (C=O stretching ของ CONH), 2857, 2925 (C-H stretching) และ 3434 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.57 (3H, s, H-18), 0.69 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, d, $J_{\text{H}_{21},\text{H}_{20}} = 12.0$ Hz, H-21), 1.03-2.06 (m, $-\text{CH}_2$), 2.76 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-33), 3.06 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-25), 3.17 (1H, m, H-3), 3.83 (1H, m, H-12) และ 7.94 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.7 (C-18), 18.1 (C-21), 23.5 (C-19), 24.3 (C-15), 27.4 (C-7), 27.4 (C-26), 27.9 (C-32), 28.2 (C-6), 28.6 (C-16), 28.6 (C-31), 30.1 (C-11), 30.1 (C-28), 30.1 (C-30), 30.2 (C-29), 30.3 (C-2), 33.2 (C-22), 34.0 (C-23), 35.1 (C-10), 35.3 (C-27), 35.8 (C-9), 36.0 (C-20), 36.1 (C-1), 37.0 (C-8), 37.1 (C-4), 38.9 (C-25), 40.8 (C-33), 43.4 (C-5), 46.5 (C-13), 48.2 (C-17), 49.6 (C-14), 72.2 (C-3), 72.2 (C-12) และ 176.4 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 533.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (33%)

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย 3 ชนิด

อนุพันธ์เอไมด์ของไบล်แอซิดถูกนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย 3 ชนิด ได้แก่ *Microcystis* sp. *Oscillatoria* sp. และ *Chlorella* sp. โดยสาหร่ายสองชนิดแรกจัดเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสามารถสร้างและปลดปล่อยสารพิษสู่สภาวะแวดล้อมได้ ส่วน *Chlorella* sp. จัดเป็นสาหร่ายสีเขียว มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็ว ผลการทดลองจะถูกแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่ถูกยับยั้งการเจริญเติบโต

4.2.1 ผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *N*-(4-Aminobutyl)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-amide 2 (103b)

จากตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของอนุพันธ์เอไมด์ของไบล်แอซิด *N*-(4-Aminobutyl)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-amide 2 (103b) ต่อสาหร่าย 3 ชนิด โดยมีชุดควบคุมคือ น้ำกลั่น จากการทดลองพบว่า สาหร่าย *Microcystis* sp. ในชุดควบคุม (น้ำกลั่น) มีการลดลงของจำนวนเซลล์สาหร่ายซึ่งมีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 0.97×10^5 เซลล์ จากจำนวนสาหร่ายเริ่มต้นเป็น 5.51×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ผลการทดลองควรจะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากคุณลักษณะของเซลล์สาหร่าย *Microcystis* sp. มีผนังเซลล์ที่บาง และไม่ชอบอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่สะอาดและคงที่ จึงไม่มีการเจริญเติบโตแต่ยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้เพียงบางส่วน ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppm มีการลดลงของจำนวนเซลล์จากจำนวนเซลล์เริ่มต้นซึ่งมีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 0.83×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจำนวนเซลล์สิ้นสุดลดลงมากขึ้น และที่ระดับความเข้มข้น 40 ppm มีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 0 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งหมายความว่าที่ระดับความเข้มข้น 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ppm สาร 2 (103b) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย *Microcystis* sp. ได้อย่างสมบูรณ์

เมื่อนำสาร 2 (103b) มาทดสอบกับเซลล์สาหร่าย *Oscillatoria* sp. พบว่าในชุดควบคุม (น้ำกลั่น) จำนวนเซลล์สาหร่ายสิ้นสุดมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นคือ 1.24×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น 2.07×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโต โดยพิจารณาจากจำนวนเซลล์สิ้นสุดเป็นจำนวนเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตตามปกติของเซลล์สาหร่าย *Oscillatoria* sp. ที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm พบว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์จากจำนวนเริ่มต้นซึ่งมีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 0.77×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm มีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 0 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งหมายความว่าที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm สาร 2 (103b) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย *Oscillatoria* sp. ได้อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 4.1 จำนวนเซลล์สาหร่าย 3 ชนิด ที่ถูกยับยั้งด้วยสาร 2 (103b)

ความเข้มข้น ของ สารละลาย (ppm)	จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร					
	<i>Microcystis</i> sp.		<i>Oscillatoria</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด
0	5.51×10^5	0.97×10^5	1.24×10^5	2.07×10^5	6.50×10^5	13.0×10^5
10	5.51×10^5	0.83×10^5	1.24×10^5	1.47×10^5	6.50×10^5	12.0×10^5
20	5.51×10^5	0.30×10^5	1.24×10^5	0.77×10^5	6.50×10^5	1.10×10^5
30	5.51×10^5	0.10×10^5	1.24×10^5	0	6.50×10^5	9.40×10^5
40	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0	6.50×10^5	8.63×10^5
50	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0	6.50×10^5	4.00×10^5
60	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0	6.50×10^5	2.10×10^5
70	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0	6.50×10^5	1.30×10^5
80	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0	6.50×10^5	1.10×10^5
90	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0	6.50×10^5	0.90×10^5
100	5.51×10^5	0	1.24×10^5		6.50×10^5	0.73×10^5

และเมื่อนำสาร 2 (103b) มาทดสอบกับเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. พบว่าในชุดควบคุม (น้ำกลั่น) จำนวนเซลล์สาหร่ายสิ้นสุดมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นคือ 6.50×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น 13.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโต โดยพิจารณาจากจำนวนเซลล์สิ้นสุดเป็นจำนวนเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตตามปกติของเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm พบว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์จากจำนวนเริ่มต้นซึ่งมีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 0.90×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm มีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 0 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งหมายความว่าที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm สาร 2 (103b) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. ได้อย่างสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น 13.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโต โดยพิจารณาจากจำนวนเซลล์สิ้นสุดเป็นจำนวนเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตตามปกติของเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm พบว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์จากจำนวนเริ่มต้นซึ่งมีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 4.00×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นพบว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์มากขึ้นตามลำดับ

4.2.2 ผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *N*-(4-Aminobutyl)-3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide 104b

จากตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของอนุพันธ์เอไมด์ของไบเล่เอซิด *N*-(4-Aminobutyl)-3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide 104b ต่อสาหร่าย 3 ชนิด โดยมีชุดควบคุมคือ น้ำกลั่น จากการทดลองพบว่า สาหร่าย *Microcystis* sp. ในชุดควบคุม (น้ำกลั่น) มีการลดลงของจำนวนเซลล์สาหร่ายซึ่งมีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 0.33×10^7 เซลล์ จากจำนวนสาหร่ายเริ่มต้นเป็น 5.51×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ผลการทดลองควรจะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น ซึ่งคาดว่ามีความสาเหตุเดียวกันดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 4.2.1 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppm มีการลดลงของจำนวนเซลล์จากจำนวนเซลล์เริ่มต้นซึ่งมีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 0.10×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm มีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 0 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งหมายความว่าที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm สาร 104b มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย *Microcystis* sp. ได้อย่างสมบูรณ์

เมื่อนำสาร 2 (103b) มาทดสอบกับเซลล์สาหร่าย *Oscillatoria* sp. พบว่าในชุดควบคุม (น้ำกลั่น) จำนวนเซลล์สาหร่ายสิ้นสุดมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นคือ 1.24×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น 2.37×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโต โดยพิจารณาจากจำนวนเซลล์สิ้นสุดเป็นจำนวนเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตตามปกติของเซลล์สาหร่าย *Oscillatoria* sp. ที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm พบว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์จากจำนวนเริ่มต้นซึ่งมีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 1.10×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นพบว่าจะมีการลดลงของจำนวนเซลล์สิ้นสุดเพิ่มขึ้น และที่ระดับความเข้มข้น 60 ppm มีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 0 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งหมายความว่าที่ระดับความเข้มข้น 60 ppm สาร 104b มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย *Oscillatoria* sp. ได้อย่างสมบูรณ์

และเมื่อนำสาร 104b มาทดสอบกับเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. พบว่าในชุดควบคุม (น้ำกลั่น) จำนวนเซลล์สาหร่ายสิ้นสุดมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นคือ 6.50×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น 8.30×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโต โดยพิจารณาจากจำนวนเซลล์สิ้นสุดเป็นจำนวนเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตตามปกติของเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppm พบว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์

จากจำนวนเริ่มต้นซึ่งมีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 3.40×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นพบว่าการลดลงของจำนวนเซลล์มากขึ้นตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้น 80 ppm มีจำนวนเซลล์สิ้นสุดเท่ากับ 0 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งหมายความว่าที่ระดับความเข้มข้น 80 ppm สาร 104b มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. ได้อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 4.2 จำนวนเซลล์สาหร่าย 3 ชนิด ที่ถูกยับยั้งด้วยสาร 104b

ความเข้มข้น ของ สารละลาย (ppm)	จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร					
	<i>Microcystis</i> sp.		<i>Oscillatoria</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด
0	5.51×10^5	0.30×10^5	1.24×10^5	2.37×10^5	6.50×10^5	8.30×10^5
10	5.51×10^5	0.10×10^5	1.24×10^5	1.77×10^5	6.50×10^5	3.40×10^5
20	5.51×10^5	0	1.24×10^5	1.10×10^5	6.50×10^5	2.37×10^5
30	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0.73×10^5	6.50×10^5	1.20×10^5
40	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0.53×10^5	6.50×10^5	0.67×10^5
50	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0.27×10^5	6.50×10^5	0.50×10^5
60	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0	6.50×10^5	0.33×10^5
70	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0	6.50×10^5	0.20×10^5
80	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0	6.50×10^5	0
90	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0	6.50×10^5	0
100	5.51×10^5	0	1.24×10^5	0	6.50×10^5	0

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านความเป็นพิษต่อเซลล์และไวรัสเริ่ม HSV-1 ของอนุพันธ์เอไมด์ของไบต์แอซิด 103b-103c และ 104b-104c

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านความเป็นพิษต่อเซลล์ African green monkey kidney และไวรัสเริ่ม HSV-1 ของอนุพันธ์เอไมด์ของไบต์แอซิด 103b-103c และ 104b-104c ทำโดยการทดสอบเปรียบเทียบกับกรดโคลิก 1 และกรดคีออกซีโคลิก 8 และเปรียบเทียบกับตัวยา ellipticine และ acyclovir พิจารณาจากค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านความเป็นพิษต่อเซลล์และไวรัสเริม HSV-1 ของอนุพันธ์เอไมด์ของไบล์แอซิด 103b-103c และ 104b-104c

สารตัวอย่าง	Cytotoxicity activity	IC ₅₀ (µg/mL)	Anti HSV-1 activity	IC ₅₀ (µg/mL)
กรดโคลิก 1	cytotoxic	44.56	moderately active	-
กรดคีอ็อกซีโคลิก 8	non cytotoxic	-	weakly active	-
2 (103b)	non cytotoxic	-	inactive	-
103c	non cytotoxic	-	inactive	-
104b	non cytotoxic	-	moderately active	-
104c	cytotoxic	-	inactive	-
ellipticine	-	-	-	-
acyclovir	-	0.649	-	1.84

จากการทดลองพบว่า กรดโคลิก 1 มีฤทธิ์ในการต้านความเป็นพิษของเซลล์ มีค่า IC₅₀ 44.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และไวรัสเริมในระดับปานกลาง แต่เมื่อเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์เอไมด์ 2 (103b) และ 103c พบว่าไม่มีฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์และฤทธิ์ต้านไวรัสเริม กล่าวได้ว่าการเปลี่ยนกรดโคลิก 1 เป็นอนุพันธ์เอไมด์โดยการเพิ่มหมู่พอลิเอมีนเข้าไปไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสาร ส่วนกรดคีอ็อกซีโคลิก 8 ไม่มีฤทธิ์ในการต้านความเป็นพิษของเซลล์ แต่สามารถออกฤทธิ์ในการต้านไวรัสเริมในระดับต่ำ และเมื่อเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์เอไมด์ 104b และ 104c พบว่า สาร 104b ไม่มีผลต่อการต้านความเป็นพิษของเซลล์แต่สามารถออกฤทธิ์ต้านไวรัสเริมในระดับปานกลาง ในขณะที่สาร 104c ออกฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์ แต่ไม่ออกฤทธิ์ในการต้านไวรัสเริม เมื่อเปรียบเทียบกับตัวยาค ellipticine และ acyclovir

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งของอนุพันธ์เอไมด์ของไบล์แอซิด 103a-103f และ 104a-104f

4.4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก

จากตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก KB (Human epidermoid carcinoma of carcinoma) โดยเปรียบเทียบกับตัวยาค ellipticine และ doxorubicine พบว่า กรดโคลิก 1 และกรดคีอ็อกซีโคลิก 8 ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก KB-Oral cavity cancer ของอนุพันธ์เอไมด์ของไบต์เอซิด 103a-103f และ 104a-104f

สารตัวอย่าง	Activity	IC ₅₀ (µg/mL)
กรด โคลิก 1	inactive	-
กรดคีออกซีโคลิก 8	inactive	-
103a	inactive	-
2 (103b)	inactive	-
103c	active	39.98
103d	active	32.12
103e	active	23.86
103f	active	25.95
104a	inactive	-
104b	active	14.49
104c	active	3.42
104d	active	14.19
104e	active	21.41
104f	active	35.01
ellipticine		0.509
doxorubicine		0.144

จากการทดลองพบว่า เมื่อทำการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของกรดโคลิก 1 และกรดคีออกซีโคลิก 8 เป็นหมู่เอไมด์ โดยเน้นให้มีหมู่อะมิโนที่ปลายสายโซ่ของพอลิเอมีน สารอนุพันธ์ของกรดโคลิก 103c-103f จะมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก สาร 103e มีค่า IC₅₀ 23.86 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าที่น้อยที่สุด เมื่อเทียบกับสารอนุพันธ์ทั้งหมด ส่วนสารอนุพันธ์เอไมด์ของกรดคีออกซีโคลิก 8 จะให้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกัน สารอนุพันธ์ 104c มีค่า IC₅₀ 3.42 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งแสดงว่าเมื่อเปลี่ยนไบต์เอซิดเป็นอนุพันธ์เอไมด์ที่ประกอบด้วยสายโซ่ยาวจะมีผลช่วยเพิ่มฤทธิ์การยับยั้งมากขึ้น

4.4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านม

จากตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านม MCF7-breast cancer (Human breast adenocarcinoma) โดยเปรียบเทียบกับตัวยา ellipticine และ doxorubicine พบว่ากรดโคลิก 1 และกรดคีออกซีโคลิก 8 ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม มีค่า IC_{50} 24.14 และ 46.04 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

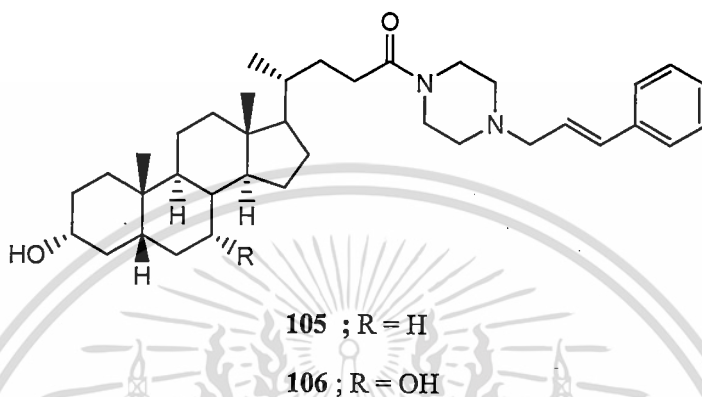
ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านม MCF7-breast cancer ของอนุพันธ์เอไมด์ของไบสแอซิด 103a-103f และ 104a-104f

สารตัวอย่าง	Activity	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
กรดโคลิก 1	active	24.14
กรดคีออกซีโคลิก 8	active	46.04
103a	inactive	-
2 (103b)	inactive	-
103c	active	35.94
103d	active	31.84
103e	active	30.73
103f	active	30.29
104a	inactive	-
104b	active	21.91
104c	active	9.70
104d	active	31.84
104e	active	17.92
104f	active	22.67
ellipticine		-
doxorubicine		0.817

จากการทดลองพบว่า สารอนุพันธ์ของกรดโคลิก 1 สาร 103f-103c มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วงระหว่าง 35.94-30.29 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่กรดโคลิกมีค่า IC_{50} 24.14 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งแสดงว่ากรดโคลิกสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้ดีกว่า ส่วนสารอนุพันธ์เอไมด์ของกรดคีออกซีโคลิก 8 พบว่าจะมีค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่ากรดคีออกซีโคลิก 8 ซึ่งให้ผลในการยับยั้งเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่หรือใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ดีกว่ากรดดีออกซีโคลิค 8 สาร 104c มีค่า IC_{50} 9.70 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งแสดงว่าเมื่อเปลี่ยนกรดดีออกซีโคลิค 8 เป็นอนุพันธ์เอไมด์ที่ประกอบด้วยสายโซ่ยาวจะมีผลช่วยเพิ่มฤทธิ์การยับยั้งมากขึ้น ซึ่งมีรายงานการวิจัยของ Kihel และคณะ[24] กล่าวถึงการสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของ lithocholic acid 9 และ chenodeoxycholic acid 7 เช่นสาร 97 และ 98 ที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษของเซลล์และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในมนุษย์ได้



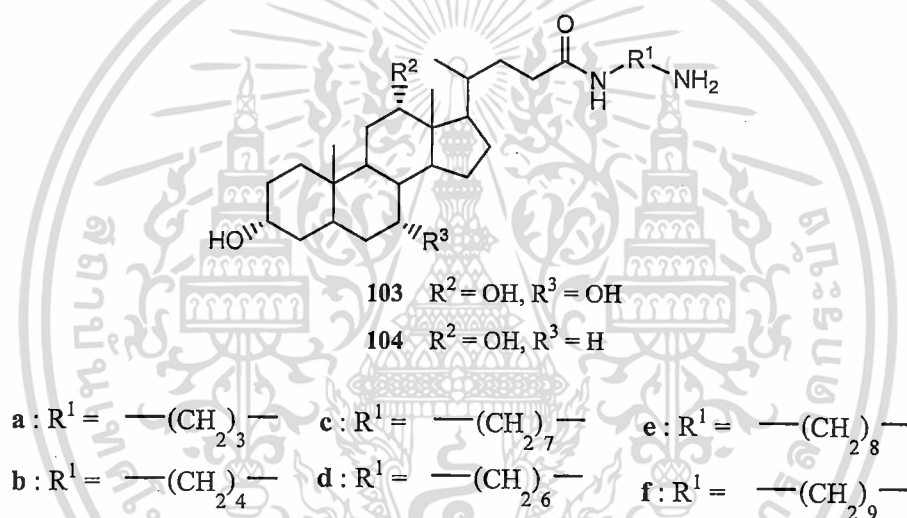
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของไบลีนเอซิด

ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของไบลีนเอซิด โดยเทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็งสามารถตรวจสอบโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่าอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้มีความถูกต้องของโครงสร้าง และมีความบริสุทธิ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ผลได้ของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 40 – 80 เปอร์เซ็นต์ สูตรโครงสร้างของไบลีนเอซิดเอไมด์สังเคราะห์แสดงในรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 แสดงโครงสร้างของสารอนุพันธ์เอไมด์ของไบลีนเอซิด 103a-f และ 104a-f

5.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของอนุพันธ์เอไมด์ของไบลีนเอซิด 2 (103b) และ 104b ต่อสาหร่าย 3 ชนิด ได้แก่ *Microcystis* sp. *Oscillatoria* sp. และ *Chlorella* sp. ได้ทำการศึกษาเป็นครั้งแรก โดยพิจารณาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ใช้ (ppm) และจำนวนเซลล์ที่ถูกยับยั้ง สรุปได้ดังตารางที่ 5.1 และตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของสาหร่าย 3 ชนิดของอนุพันธ์เอไมด์ของไบลต์แอซิด 2 (103b)

ชนิดของสาหร่าย	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ใช้ (ppm)	จำนวนเซลล์ที่ถูกยับยั้ง (%)
<i>Microcystis</i> sp.	20	94.56
<i>Oscillatoris</i> sp.	20	37.90
<i>Chlorella</i> sp.	50	38.46

ตารางที่ 5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของสาหร่าย 3 ชนิดของอนุพันธ์เอไมด์ของไบลต์แอซิด 104b

ชนิดของสาหร่าย	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ใช้ (ppm)	จำนวนเซลล์ที่ถูกยับยั้ง (%)
<i>Microcystis</i> sp.	10	98.19
<i>Oscillatoris</i> sp.	20	11.29
<i>Chlorella</i> sp.	10	47.69

ผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของกรดโคลิค 1 และกรดคือออกซีโคลิค 8 เป็นอนุพันธ์เอไมด์ สารทั้งสองมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ดี โดยอาจกล่าวได้ว่า เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ใช้ โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุด 10 ppm สาร 104b มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. 47.69 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สาร 2 (103b) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 50 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. 38.46 เปอร์เซ็นต์ สาร 2 (103b) และ 104b สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Oscillatoris* sp. ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 20 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Oscillatoris* sp. 37.90 และ 11.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในกรณีของสาหร่าย *Microcystis* sp. นั้น ไม่อาจสรุปได้ว่า สาร 2 (103b) และ 104b มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย *Microcystis* sp. ได้ เนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis* sp. ซึ่งสาหร่ายกลุ่มนี้เจริญเติบโตได้ดีในสถานะนำเสียหรือแหล่งน้ำที่ใกล้บริเวณโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งควรปรับสภาวะการทดลองให้เหมือนกับสภาวะจริง แต่ในการวิจัยนี้การเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองจะใช้ในสภาวะเดียวกันทั้งหมดเพื่อเป็นการเปรียบเทียบฤทธิ์ของสาร 2 (103b) และ 104b ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารห่วยทั้งสามชนิด

5.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์

ผลการทดลองพบว่า สารอนุพันธ์เอไมด์ของกรด โคลิก 2 (103b) และ 103c ไม่มีฤทธิ์ในการต้านความเป็นพิษของเซลล์ African green monkey kidney และไวรัสเริม HSV-1 ในขณะที่กรด โคลิก 1 สามารถออกฤทธิ์ในการต้านความเป็นพิษของเซลล์และไวรัสเริม HSV-1 ในระดับปานกลาง ส่วนกรดดีออกซีโคลิก 8 ไม่มีฤทธิ์ในการต้านความเป็นพิษของเซลล์ แต่สามารถออกฤทธิ์ในการต้านไวรัสเริมในระดับต่ำ และเมื่อเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์เอไมด์ 104b และ 104c พบว่า สาร 104b ไม่มีผลต่อการต้านความเป็นพิษของเซลล์แต่สามารถออกฤทธิ์ต้านไวรัสเริมในระดับปานกลาง ส่วนสาร 104c ออกฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์ แต่ไม่ออกฤทธิ์ในการต้านไวรัสเริม

5.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง

ผลการทดลองพบว่า กรด โคลิก 1 และกรดดีออกซีโคลิก 8 ไม่มีผลในการต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก แต่อนุพันธ์เอไมด์ของกรดทั้งสองสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการต้านเซลล์มะเร็งช่องปากได้ดีขึ้น ยกเว้น สาร 103a 2(103b) และ 104b จะเห็นได้ว่าอนุพันธ์เอไมด์ของกรดดีออกซีโคลิก จะออกฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งช่องปากดีกว่าอนุพันธ์เอไมด์ของกรด โคลิก โดยเฉพาะสาร 103c สามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปากมีค่า มีค่า IC_{50} 3.42 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สำหรับผลการทดลองกับเซลล์มะเร็งเต้านมพบว่า กรด โคลิก 1 และกรดดีออกซีโคลิก 8 ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม สารอนุพันธ์ของกรด โคลิกจะออกฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านมน้อยกว่ากรด โคลิก 1 การเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์เอไมด์ไม่มีผลในการทำให้การออกฤทธิ์ดีขึ้น ส่วนสารอนุพันธ์เอไมด์ของกรดดีออกซีโคลิกพบว่า ให้ผลในการยับยั้งเซลล์ได้ดีกว่ากรดดีออกซีโคลิก 8 โดยเฉพาะสาร 104c มีค่า IC_{50} 9.70 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงว่าเมื่อเปลี่ยนกรดดีออกซีโคลิก 8 เป็นอนุพันธ์เอไมด์ที่ประกอบด้วยสายโซ่ยาวจะมีผลช่วยเพิ่มฤทธิ์การยับยั้งมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- [1] ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. 2536. เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เล่ม 1, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- [2] G. Broughton. 1994. **Chenodeoxycholate: the Bile Acid. The Drug. A Review.**, The American Journal of the Medical Sciences, Vol. 307, pp. 54-63.
- [3] M. C. Bateson. 1997. **Bile Acid Research and Applications.**, The Lancet, Vol. 349, pp. 5-6.
- [4] U. Beuers, J. L. Boyer, G. Paumgartner. 2003. **Ursodeoxycholic Acid in Cholestasis: Potential Mechanisms of Action and Therapeutic Applications.**, Hepatology, Vol. 28, pp. 1449-1453.
- [5] M. Trauner and I. W. Graziadei. 1999. **Review Article: Mechanisms of Action and Therapeutic Applications of Ursodeoxycholic Acid in Chronic Liver Diseases.**, Alimentary Pharmacology Therapeutics, Vol. 13, pp. 979-995.
- [6] C. Li, A. Rehman, N. K. Dalley and P. B. Savage. 1999. **Short Synthesis of Triamine Derivatives of Cholic Acid.**, Tetrahedron Letter, Vol. 40, pp. 1861-1864.
- [7] S. Mukhopadhyay, U. Maitra. 2004. **Chemistry and Biology of Bile Acids.**, Current Science, Vol. 87, pp. 1666-1684.
- [8] F. Bernheim and L. Lack. 1967. **The Effects of Bile Acid Derivatives on Bacterial Permeability and Enzyme Induction.**, Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 10, pp. 1096-1100.
- [9] E. Saifah, V. Jongbunprasert and C. J. Kelly. 1988. **Piriferine, a New Pyrrolidine Alkaloid from *Aglaia-pirifera* Leaves.**, Journal of Natural Products., Vol. 51, pp. 80-82.; E. Saifah , J. Puripattanavong, K. Likhitwitayawuid, J. A. Cordell, H. Chai and J. M. Pezzuto. 1993. **Bisamides from *Aglaia* Species: Structure Analysis and Potential to Reverse Drug Resistance with Culture Cells.** Journal of Natural Products., Vol. 56, pp. 473-477.; E. Saifah, R. Suttisri, S. Shamsub, T. Pengsuparp and V. Lipipun. 1999. **Bisamides from *Aglaia edulis*.**, Phytochemistry., Vol. 52, pp. 1085-1088.
- [10] H. Greger, T. Pacher, S. Vajrodaya, M. Bacher and O. Hofer. 2000. **Intraspecific Variation of Sulfur-Containing Bisamides from *Aglaia leptantha*.**, Journal of Natural Products, Vol. 63, pp. 16-620.; H. Greger, T. Pacher, B. Brem, M. Bacher and O. Hofer.

2001. **Insecticidal Flavaglines and Other Compounds from Fijian *Aglaia* Species.**, *Phytochemistry*, Vol. 57, pp. 57-64.
- [11] H. –J. Yu, C. –C. Chen and B. –J. Shich. 1998. **Two New Constituents from the Leaves of *Magnolia coco*.**, *Journal of Natural Products*, Vol. 61, pp. 1017-1019.
- [12] Y. Dong and P. W. Le Quesne. 2002. **Total Synthesis of Magnolamide.**, *Heterocycles*, Vol. 56, pp. 221-22.
- [13] ยวดี พีรพรพิศาล. 2549. สหรัยวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- [14] ประสาท กิตตะคุปต์. 2538. สารพิษจากสหรัย. วารสารวาริชศาสตร์, หน้า 141-153.
- [15] Ramathibodi Poison Center, Bulletin (January-March 1999, Vol. 7, No. 1), Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital.
- [16] Q. Guan, C. Li, E. J. Schmidt, J. S. Boswell, J. P. Walsh, G. W. Allman and P. B. Savage. 2000. **Preparation and Characterization of Cholic Acid-Derived Antimicrobial Agents with Controlled Stabilities.**, *Organic Letter*, Vol. 2, pp. 2837-2840.
- [17] A. Scozzafava and C. T. Supuran. 2002. **Carbonic Anhydrase Inhibitors. Preparation of Potent Sulfonamides Inhibitors Incorporating Bile Acid Tails.**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 12, pp. 1551-1557.
- [18] M. Bulbul, N. Saracoglu, O. I. Kufrevioglu and M. Ciftci. 2002. **Bile Acid Derivatives of 5-Amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide as New Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis and Investigation of Inhibition Effects.**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 10, pp. 2561-2567.
- [19] B. G. Hazra, V. S. Pore; S. K. Dey, S. Datta, M. P. Darokar, D. Saikia, S. P. S. Khanuja and A. P. Thakur. 2004. **Bile Acid Amides Derived from Chiral Amino Alcohols: Novel Antimicrobials and Antifungals.**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 14, pp. 773-777.
- [20] N. S. Vatmurge, B. G. Hazra, V. S. Pore, F. Shirazi, P. S. Chavan and M. V. Deshpande. 2008. **Synthesis and Antimicrobial Activity of β -Lactam-Bile Acid Conjugates Linked *Via* Triazole.**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 18, pp. 2043-2047.

- [21] P. P. Giovannini, A. Grandini, D. Perrone, P. Pedrini, G. Fantin and M. Fogagnolo. 2008. **“7 α - and 12 α -Hydroxysteroid Dehydrogenases from *Acinetobacter calcoaceticus lwoffii*: a New Integrated Chemo-Enzymatic Route to Ursodeoxycholic Acid.**, *Steroids*, Vol. 73 pp. 1385-1390.
- [22] พันธ์กร บุญมานำสิน และ ภัททฤทธิ์ สหัสโยธิน. 2551. การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของไบต์แอซิดเอไมด์. โครงการงานพิเศษภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [23] J. O. Brien, I. Wilson, T. Orton and F. Pognan. 2000. **Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity.**, *European Journal of Biochemistry*, 267, pp. 5421-5426.
- [24] L. E. Kihel, M. Clement, M. A. Bazin and G. Descamps. 2008. **New Lithocholic and Chenodeoxycholic Piperazinylcarboxamides with Antiproliferative and Pro-Apoptotic Effects on Human Cell Lines.**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 16, pp. 8737-8744.