



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอะมิโนสเตียรอยด์
Synthesis and Bioactivities of Amino Steroids

นางสาวพชณี เจริญยิ่ง

๒๕๗
พ ๕๑๖ ก
๒๕๕๖

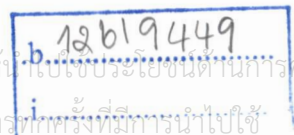
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 137301
วันเดือนปี 22 ส.ย. 2558

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ชื่อโครงการ การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอะมิโนสเตรอยด์
แหล่งเงิน ประเภททุนงบประมาณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปีงบประมาณ 2556
จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 250,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2556 ถึง 30 กันยายน 2557 ✓
หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง
สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการสังเคราะห์อะมิโนสเตรอยด์ชนิดใหม่ 58-67 จากเพรกนินโนโลน 1 โดยการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง A อะมิโนสเตรอยด์ 58-67 ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อเกิดโรคต่อมนุษย์ในสภาวะจำลอง จากการทดลองพบว่าอะมิโนสเตรอยด์ 58-67 ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้งหมด อะมิโนสเตรอยด์ 58-67 ถูกนำมาประเมินฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของมนุษย์ จากการทดลองพบว่า อะมิโนสเตรอยด์ 58, 59, 60, 61, 64, 65 และ 66 แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของมนุษย์ โดยเฉพาะในการศึกษานี้อะมิโนสเตรอยด์ 64 มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด

นอกจากนั้น อนุพันธ์อะมิโนเอไมด์ 84-90 ถูกสังเคราะห์จากกรดคีโนโคลิก 7 และถูกนำมาประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ อนุพันธ์อะมิโนเอไมด์ 84-90 ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 30 ชนิด ยีสต์ 3 ชนิด และ เชื้อรา 2 ชนิดด้วยวิธี disc diffusion จากการทดลองพบว่า อนุพันธ์อะมิโนเอไมด์ 84-90 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus milleri* group, *Streptococcus mutan*, *Staphylococcus coagulase negative*, *Corynebacterium diphtheriae* and Vancomycin Resistance *S. aureus* (VRSA) โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 1.56-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ อนุพันธ์อะมิโนเอไมด์ 84-90 ไม่มีฤทธิ์ในการต้านยีสต์และเชื้อราทดสอบทั้งหมด

คำสำคัญ: อะมิโนสเตรอยด์, ฤทธิ์ทางชีวภาพ, ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์, ความเป็นพิษต่อเซลล์

Research Title: Synthesis and Bioactivities of Amino Steroids
Researcher: Asst. Professor Dr. Patchanee Charoenying
Faculty: Faculty of Science **Department:** Department of Chemistry

ABSTRACT

In this research, pregnenolone **1** was used as a starting template to develop new amino steroids. Ring-A modification of pregnenolone **1** resulted in the synthesis of amino derivatives **58-67**. These derivatives were evaluated for their *in vitro* antimicrobial properties against human pathogens. The results found that these derivatives did not show any significant activity against human pathogens. The amino steroids derivatives **58-67** were also tested for their cytotoxicity evaluations against five human cell lines. The results of the *in vitro* study showed that amino steroids **58, 59, 60, 61, 64, 65** and **66** exhibited significant activity against all the cell lines and derivative **64** as the most active compounds in all derivatives of pregnenolone **1**.

Furthermore, a series of amino amides of chenodeoxycholic acid **84-90** were synthesized from chenodeoxycholic acid **7** and their antimicrobial activities were evaluated. The synthesized compounds were tested *in vitro* against 30 bacteria, 3 yeast and 2 fungi strains by disc diffusion method. All compounds exhibited the highest antibacterial activity against *Streptococcus milleri* group, *Streptococcus mutan*, *Staphylococcus coagulase negative*, *Corynebacterium diphthiae* and Vancomycin Resistance *S. aureus* (VRSA). The MIC values of selected bacterial strains tested ranged from 1.56-100 µg/mL. Unfortunately, no antifungal activity observed against tested strains of yeasts and fungi.

Keywords: amino steroids, biological activity, antimicrobial, cytotoxicity

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามความตั้งใจในระดับหนึ่งด้วยการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเภททุนงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2556 ที่พิจารณาเห็นคุณค่าของงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย คุณณัฐกร อ่อนแสง และ คุณพละวัฒน์ อุ่นเรือน ที่อดทนต่อการทำงานนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นันทนา อรุณฤกษ์ สาขาโชนฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ขอขอบคุณ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้อความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
รายการคำย่อและสัญลักษณ์	VII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	4
1.5 กรอบแนวความคิดในการทำวิจัย	5
1.6 คำสำคัญของการวิจัย	8
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	9
2.2 สเตียรอยด์ที่พบในธรรมชาติ	10
2.3 ประเภทของสเตียรอยด์	12
2.4 ประโยชน์และโทษของสเตียรอยด์	14
2.5 สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น	16
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 การทดลองทั่วไป	21
3.2 วิธีการทดลอง	21
3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method	27
3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	28
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pregnenolone 1	31
4.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid 7	43
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์	49
4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	55
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 จาก Pregnenolone 1	58
5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67	59

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์อะมิโนสเดียมรอยด์ 58-67	59
5.4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid 7	60
5.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของอนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid 7	61
5.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์ Chenodeoxycholic acid 7	61
บรรณานุกรม	62
ภาคผนวก	65
ประวัตินักวิจัย	83
ผลงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่	84



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Chenodeoxycholic acid 7 และอนุพันธ์เดี่ยวรอยด์ 84-90	53
4.1 (ต่อ) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Chenodeoxycholic acid 7 และอนุพันธ์เดี่ยวรอยด์ 84-90	54
4.2 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone 1 และอะมีโนสเตียรอยด์ ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	56
4.3 ค่า IC_{50} ของอะมีโนสเตียรอยด์	57



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อ VI ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อและสัญลักษณ์

^{13}C NMR	^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
DCM	Dichloromethane
DIC	<i>N,N</i> -diisopropylcarbodiimide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ESMS	Electrospray Ionization Mass Spectroscopy
Hz	Hertz
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50%
IR	Infrared Spectroscopy
^1H NMR	^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
m/z	Mass to charge ratio
MIC	Minimum Inhibition Concentration
ppm	Part per million
R _f	Retardation factor
TFA	Trifluoroacetic acid
ν_{max} cm ⁻¹	Frequency maximum per centimeter
δ	Chemical shift
J	Coupling constant

บทที่ 1 บทนำ

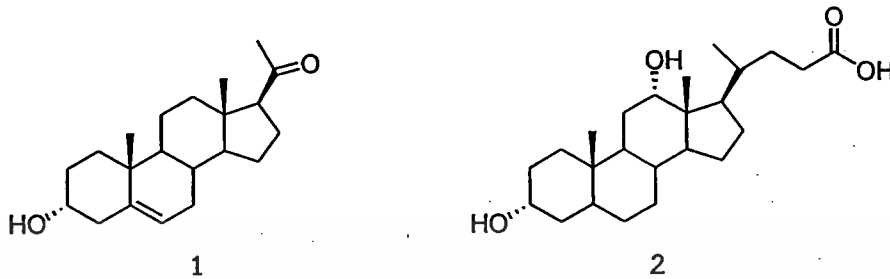
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจำนวนมากถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และมนุษย์ ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน เพราะสารเหล่านี้มีสมบัติที่ดีทั้งทางเคมีและชีวภาพ ซึ่งในยุคแรกนักวิจัยให้ความสนใจเกี่ยวกับการหาโครงสร้างของสารสำคัญในพืช ต่อมานักวิทยาศาสตร์สนใจนำสารเหล่านี้มาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยปฏิกิริยาเคมี ซึ่งการปรับเปลี่ยนในที่นี้หมายถึง การปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีซึ่งจะนำไปสู่สมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และเมื่อวิทยาศาสตร์ก้าวหน้าขึ้นทำให้นักวิจัยเล็งเห็นความสำคัญของพืชเหล่านั้นมากขึ้น และได้ประยุกต์ใช้สารสำคัญในพืชนั้นพัฒนาเป็นสารชีวภาพและพัฒนาโดยการปรับปรุงโครงสร้างเพื่อนำมาใช้ทดแทนสารเคมีที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ด้วยความเชื่อที่ว่าสารชีวภาพมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมากกว่าสารที่ได้จากธรรมชาติตัวอย่างเช่น แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นต้น ซึ่งสารในกลุ่มต่างๆ เหล่านี้ล้วนมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจทั้งสิ้น ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีรายงานวิจัยจำนวนมากที่ทำการศึกษเกี่ยวกับสมบัติทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านั้น

สเตียรอยด์ (Steroids) เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Product) กลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ จากการวิจัยพบว่าสารกลุ่มสเตียรอยด์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้สารประเภทสเตียรอยด์ในทางการแพทย์ เช่น รักษาโรคไขข้อ โรคหืด บำรุงหัวใจ และเป็นส่วนผสมในยาคุมกำเนิดและถูกนำไปใช้ในการแก้ปัญหาประชากรที่เพิ่มขึ้น [1] คอเลสเตอรอล (Cholesterol) เป็นสเตียรอยด์ชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดไขมันอุดตันในเส้นเลือดซึ่งเป็นปัญหาต่อสุขภาพของมนุษย์อย่างมาก สเตียรอยด์ที่ได้จากพืชธรรมชาติถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรค เช่น G-strophanthin ได้จากเมล็ดของ *Strophanthus gratus* Baillon ใช้รักษาโรคหัวใจ วายฉับพลัน Ruscogenin ได้จากต้น *Ruscus aculeatus* วงศ์ Liliaceae ใช้รักษาโรคจิตเสียดวงทวาร Scillaren A ได้จากส่วนใบบนหัวใต้ดินของ *Urginea maritima* Baker วงศ์ Liliaceae ใช้เป็นยาขับเสมหะที่ออกฤทธิ์บำรุงหัวใจและมีฤทธิ์ขับปัสสาวะด้วย [2] สารกลุ่มสเตียรอยด์ยังเป็นฮอร์โมนของสัตว์ เช่น โปรเจสเตอโรน (Progesterone) เป็นฮอร์โมนเพศหญิงสามารถฉีดให้ผู้ป่วยที่ขาดฮอร์โมนเพศหญิงได้ จะเห็นได้ว่าสเตียรอยด์เป็นสารที่มีสมบัติในทางชีวภาพที่ดีและเป็นสารที่มีอยู่ในธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมในระดับค่อนข้างสูงแต่เนื่องจากปริมาณสเตียรอยด์ที่พืชหรือสัตว์สังเคราะห์ขึ้นมาที่มีปริมาณน้อยมาก และถ้าสกัดส่วนต่างๆ ของพืชหรือสัตว์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อแยกสเตียรอยด์เป็นเรื่องที่ทำได้แต่อาจต้องใช้พืชหรือสัตว์ปริมาณมากและเป็นการนำไปสู่การส่งผลต่อการเสียสมดุลธรรมชาติ และก่อปัญหาวิกฤติโลกร้อนโดยทางอ้อม จึงปรากฏงานวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ในรูปแบบต่างๆ เพื่อที่จะนำไปใช้ศึกษาการออกฤทธิ์ในทางชีวภาพและพัฒนาเป็นยารักษาโรค ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีแนวทางการคิดค้นที่จะสังเคราะห์โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสเตียรอยด์ที่มีโครงสร้างอย่างง่ายเพื่อเลียนแบบสเตียรอยด์ที่พบในธรรมชาติและนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยที่สเตียรอยด์สังเคราะห์ที่เตรียมได้จากการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันหลักๆ จะถูกนำไปศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยจะเน้นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์การต้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

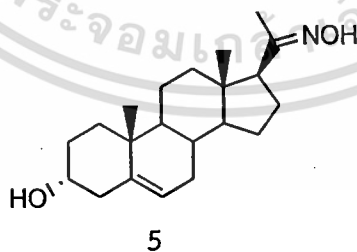
เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง ผลงานวิจัยเบื้องต้นของผู้วิจัย โดยการศึกษาผลจากการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์ 2 ชนิดได้แก่ Pregnenolone 1 และ Deoxycholic acid 2



ผลการทดลองพบว่า Pregnenolone sulfate 3 ที่สังเคราะห์ได้จากการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Pregnenolone 1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra อันเป็นสาเหตุของวัณโรค และผลการทดสอบเบื้องต้นในด้านการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์อนุพันธ์ของแอลลิลอีเทอร์ 4 ของ Pregnenolone 1 สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus subtilis* ATCC 26633, และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

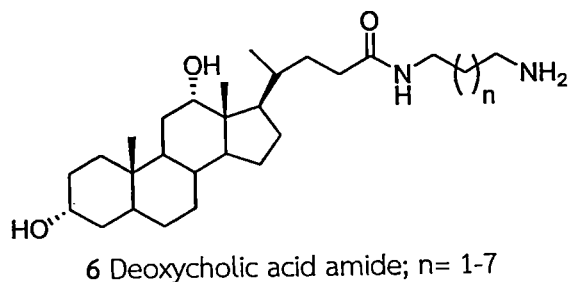


ในขณะที่อนุพันธ์แอลลิล ออกซิเม 4 ของ Pregnenolone 1 สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. diphtheriae* และ *Streptococcus mutans* ATCC 27175[3]

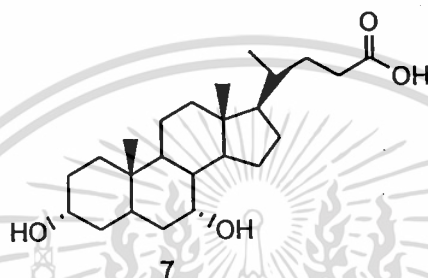


อนุพันธ์เอไมด์ของ Deoxycholic acid 6 มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของมนุษย์ (Human breast adenocarcinoma ATCC HTB-22 และ Human epidermoid carcinoma of cavity ATCC CCL-17)[4] เห็นได้ว่าเมื่อหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์เปลี่ยนไปฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์นั้นๆ เปลี่ยนไปได้โดยที่อาจจะออกฤทธิ์ยับยั้งหรือส่งเสริม และ/หรือมีฤทธิ์เท่าเดิม เมื่อเปรียบเทียบกับสเตียรอยด์ตั้งต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



จุดมุ่งหมายของโครงการวิจัยนี้คือสนใจสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่จาก Pregnenolone 1 และ Chenodeoxycholic acid 7



โดยคาดหวังว่าเมื่อใช้ Pregnenolone 1 เป็นสารตั้งต้นโดยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจากหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่อะมิโน และการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Chenodeoxycholic acid 7 จากหมู่คาร์บอกซิลเป็นอะมิโนเอไมด์นั้นจะเป็นการช่วยเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพให้แก่สเตียรอยด์สังเคราะห์ชนิดใหม่นี้ได้ สาเหตุการเลือกใช้สเตียรอยด์ตั้งต้นทั้งสองในการสังเคราะห์ เนื่องจากสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดเป็นสเตียรอยด์ที่มีโครงสร้างที่เปลี่ยนมาจากคลอเลสเทอรอล ซึ่งเป็นสเตียรอยด์ที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ ความเป็นพิษจะน้อยกว่าสเตียรอยด์ชนิดอื่น สามารถนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตได้จึงเหมาะกับการนำมาเป็นสารตั้งต้น จากข้อมูลเบื้องต้นที่กล่าวมาการวิจัยนี้จะป็นแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ด้านเภสัชวิทยา กล่าวคือ สามารถสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่สามารถนำไปเป็นตัวยารักษาโรคหรือเป็นส่วนผสมในยารักษาโรคชนิดใหม่ได้ และ/หรือสามารถใช้ทดแทนสเตียรอยด์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่จาก Pregnenolone 1 และ Chenodeoxycholic acid 7 โดยการเลือกใช้สารเข้าทำปฏิกิริยาและเทคนิคในการสังเคราะห์ที่เหมาะสม
2. เพื่อศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์จากสารโดยทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านการต้านเชื้อจุลินทรีย์
3. เพื่อศึกษาผลของอะมิโนสเตียรอยด์ต่อความเป็นพิษของเซลล์และฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของอะมิโนสเตียรอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์โดยการดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันของนิวเคลียส โดยเลือกใช้ Pregnenolone 1 และ Chenodeoxycholic acid 7 เป็นสารตั้งต้น
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และเชื้อรา (Fungi)
3. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง

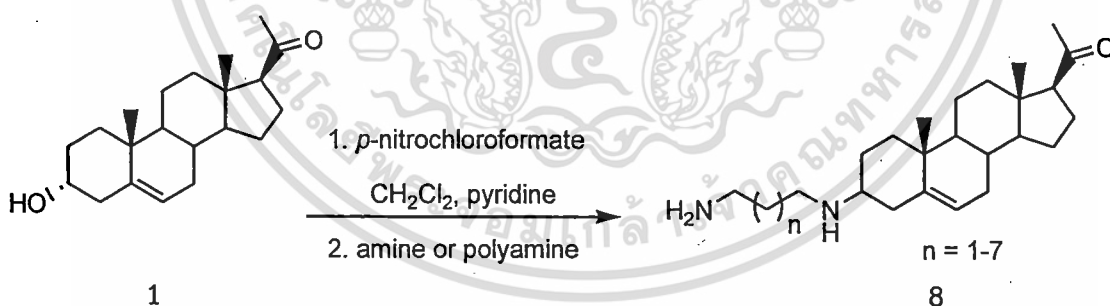
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน กล่าวโดยสรุปดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 สังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์

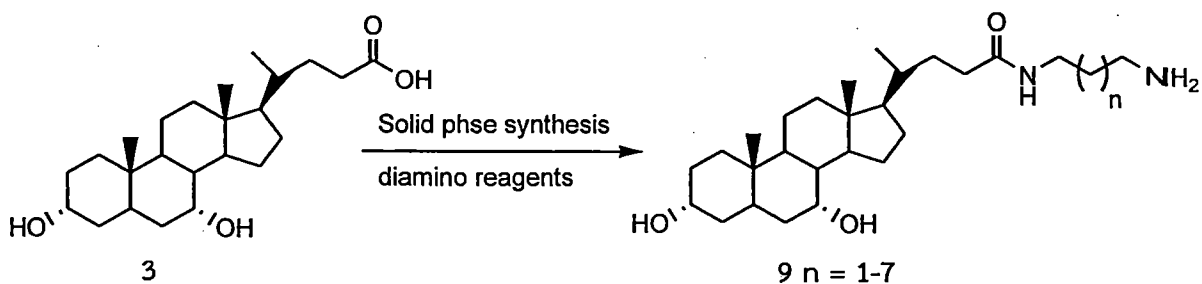
กำหนดสเตียรอยด์ตั้งต้นคือ Pregnenolone 1 และ Chenodeoxycholic acid 7 จากโครงสร้างของสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดนี้พบว่า ประกอบด้วยส่วนที่ไม่มีซ้ำซึ่งได้แก่ โครงสร้างหลักของ Pregnenolone 1 และ Chenodeoxycholic acid 7 ซึ่งแต่ละวงประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่มีซ้ำสูงคือ หมู่ไฮดรอกซิล และหมู่คาร์บอกซิล จากรายงานการวิจัยพบว่า สเตียรอยด์ที่มีหมู่อะมิโนและพอลิเอมีนประกอบอยู่เป็นสายโซ่ มักจะให้ผลทางเภสัชวิทยาที่ดี โดยเฉพาะหน่วยของ 1,4-diaminobutane ที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของสารธรรมชาติที่มีรายงานวิจัยการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ [5] แนวความคิดสำหรับการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ของ Pregnenolone 1 แสดงใน Scheme 1 คือ การทำปฏิกิริยา amination โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-3 ของ Pregnenolone 1 ให้เป็นหมู่อะมิโนโดยการเติมหมู่อะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ตรง และ/หรือพอลิเอมีน

Scheme 1



ส่วน Chenodeoxycholic acid 7 จะมีการปรับหมู่คาร์บอกซิลที่ ring D โดยการติดทำปฏิกิริยากับสารประกอบไดอะมิโนให้เป็นหมู่อะมิโนเอไมด์ โดยการทำการสังเคราะห์โดยเทคนิควิศวกรรมของแข็ง (Solid phase) แสดงดังใน Scheme 2

Scheme 2



จากนั้นนำอะมิโนสเตียรอยด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ (Crude product) มาทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ศึกษาหาโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์

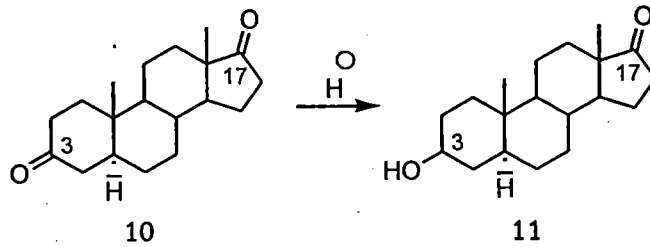
การทดสอบอะมิโนสเตียรอยด์ต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์จะนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และเชื้อรา (Fungi) โดยทำการทดสอบแบบ Disc diffusion Method ทำการบันทึกผลการทดลองโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone และคำนวณหาค่า MIC

ขั้นตอนที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และเซลล์มะเร็ง

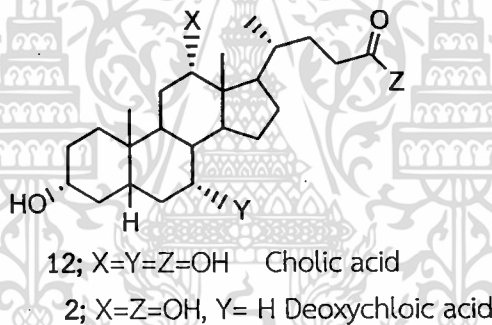
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของอะมิโนสเตียรอยด์

1.5 กรอบแนวความคิดในการทำวิจัย

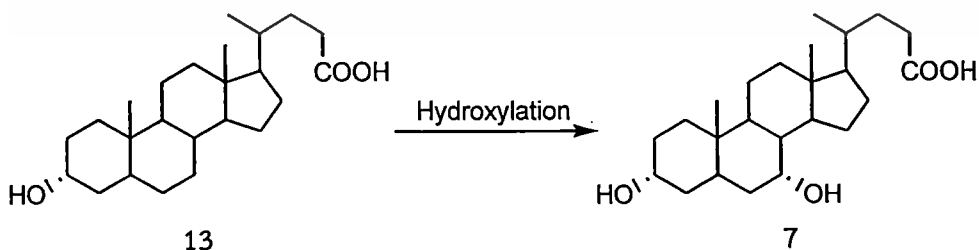
จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยวงทกเหลี่ยมมาเชื่อมต่อกัน หมู่แทนที่ต่างๆ ที่มาเกาะจะเป็นหมู่ฟังก์ชันที่คล้ายคลึงกันมีคุณสมบัติทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว จึงทำให้สเตียรอยด์มีคุณสมบัติที่หลากหลาย นักเคมีได้ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะทางเคมีอินทรีย์ในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและรวมถึงโครงสร้างเพื่อเป็นการนำไปสู่สเตียรอยด์ชนิดใหม่ และเป็นแนวทางไปสู่การสังเคราะห์สเตียรอยด์เลียนแบบธรรมชาติ โดยการเลือกใช้รีเอเจนต์หรือสารเข้าทำปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจง และควบคุมสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารผลิตภัณฑ์ที่มากพอต่อการนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จากรายงานการวิจัยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างมักมุ่งเน้นไปที่หมู่ฟังก์ชันเป็นส่วนใหญ่ ที่ ring A และ ring B หรือหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง การเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้างสเตียรอยด์จะขึ้นกับตำแหน่งบนโครงสร้าง ลำดับความสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาคือ 3 11 17 และ 20 ตัวอย่างเช่น การเข้าทำปฏิกิริยาของนิวคลีโอไฟล์ที่หมู่คาร์บอนิล การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยไฮไดรด์ไอออน การเกิดคีทาล (ketal formation) และปฏิกิริยาการเพิ่มโดยกรีนยาร์ดรีเอเจนต์ สามารถเรียงลำดับตำแหน่งที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาได้คือ $3 > 17 \geq 20 > 11$ เช่นความเฉพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ 5 α -androstane-3,17-dione **10** เป็น 3-hydroxy-5 α -androstane-17-one **11** แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งที่ 3 สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่าตำแหน่งที่ 17[6]



สารกลุ่มสเตียรอยด์ที่ได้รับความสนใจในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันโดยมีทั้งการปรับเปลี่ยนโดยใช้สารเคมี (Chemical transformation) และการปรับเปลี่ยนโดยใช้เทคนิคทางชีวภาพ (Biotransformation) ตัวอย่างเช่น ไบล์ แอซิด (Cholic acid 12 และ Deoxycholic acid 2) โครงสร้างหลักของไบล์ แอซิดประกอบด้วยส่วนที่ไม่มีขั้ว เมื่อสายโซ่ข้างแสดงควมมีขั้วจะส่งผลให้ไบล์ แอซิดเป็นสเตียรอยด์ที่มีสมบัติคล้ายสบู่และผงซักฟอก (Detergent properties) จึงเรียกได้ว่าเป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ส่งผลให้เกิดไฮโดรไลซิสโดยเอนไซม์ดีซันและช่วยในการดูดซึมในน้ำเหลือง เมื่อ Bile salt ถูกไฮโดรไลส์จะได้ไบล์แอซิดซึ่งโดยทั่วไปจะมีคาร์บอน 24 อะตอม ซึ่งวง A และวง B จะต่อกันแบบซิส (cis- ring junction) และมีสายโซ่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 เป็นกรดคาร์บอกซิลิก

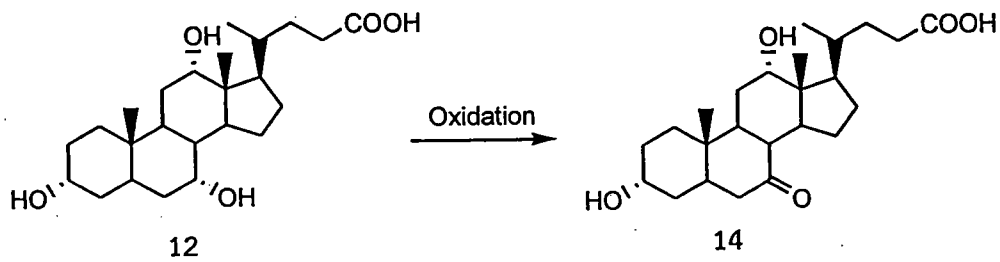


การปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยเฉพาะที่หมู่ฟังก์ชันของไบล์แอซิดมีการศึกษาโดยส่วนใหญ่ใช้เทคนิคการสังเคราะห์ทางชีวภาพโดยอาศัยเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น Bortolinui และคณะ[7] รายงานถึงปฏิกิริยา Hydroxylation (ปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล) ของไบล์แอซิด โดยใช้ *Fusarium equiseti* M41 เกิดการเพิ่มของหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 ได้ผลิตภัณฑ์คือ Chenodeoxycholic acid 7

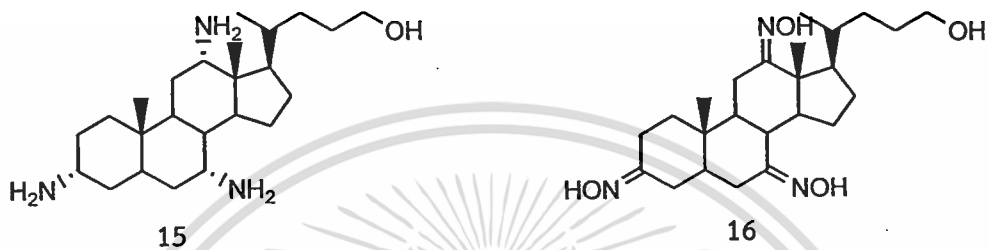


Medici และคณะ[8] ได้ทำปฏิกิริยา Regioselective Microbial Oxidation ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 ของกรดโคคลิก 12 โดยใช้ *Xanthomonas maltophilia* BS6

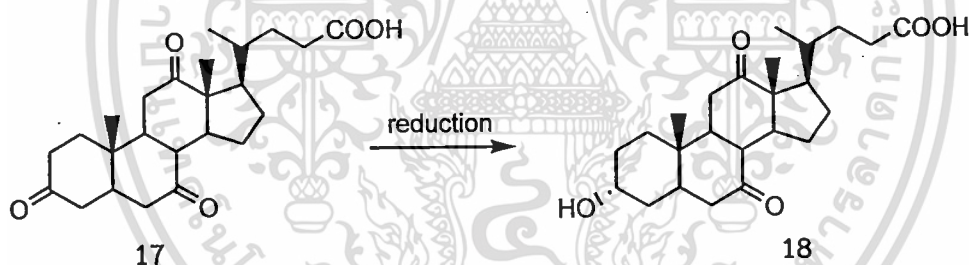
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



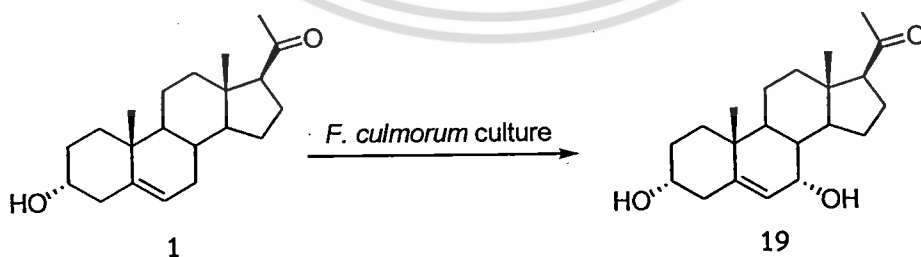
Savage และคณะ[9] ได้สังเคราะห์ triamine derivatives 15 และ 16 ของกรดโคเลอิก 12



Chimichi และคณะ[10] รายงานการทำปฏิกิริยา Regio และ stereoselective reductions ของ Dehydrocholic acid 17 ด้วยวิธี Biotransformation โดยใช้ *Trametes hirsute* และ *Collybia velutipes* เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันที่เฉพาะเจาะจง เปลี่ยนหมู่คีโตของ Dehydrocholic acid 17 ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 เป็นหมู่ไฮดรอกซิลเท่านั้น



Kolek[11] รายงานปฏิกิริยา Biotransformation ของ Pregnenolone 1 โดยใช้เชื้อ *Fusarium culmorum* culture โดยเกิดปฏิกิริยา Hydroxylation ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-7



จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างนี้จะได้อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลายมากยิ่งขึ้นและเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสเตียรอยด์เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป ดังเช่นอนุพันธ์ของโบลีแอสติดบางชนิดถูกพัฒนาขึ้นมาเป็นยาหรือเป็นตัวส่งผ่านยาเข้าสู่เซลล์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6 คำสำคัญของการวิจัย

อะมิโนสเตียรอยด์
ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity)
ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial)
ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ ซึ่งสารเหล่านี้อาจแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง
2. สามารถทราบถึงฤทธิ์ของอะมิโนสเตียรอยด์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาเพื่อผลิตส่วนผสมของยาที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเป็นการนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์



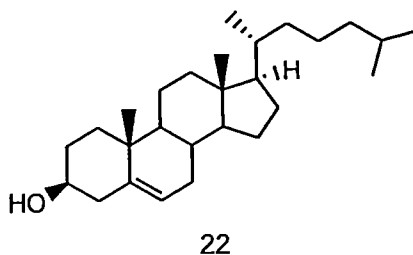
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ในธรรมชาติมีสเตียรอยด์ที่แตกต่างกันนับร้อยชนิดพบทั้งในพืชและสัตว์ การค้นพบสเตียรอยด์เริ่มจากการสกัดจากพืชหรือเนื้อเยื่อของสัตว์ด้วยอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม หรือเบนซีน พบว่าสเตียรอยด์เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติคล้ายกับไขมัน สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์และไม่ละลายในน้ำ ความแตกต่างของสเตียรอยด์แต่ละชนิดจะแปรผันไปตามหมู่ฟังก์ชันที่ติดอยู่กับโครงสร้างหลัก บทบาทสำคัญของสเตียรอยด์ในสิ่งมีชีวิตคือเป็นฮอร์โมน สเตียรอยด์ฮอร์โมนที่พบในสัตว์มีปริมาณค่อนข้างน้อยจึงไม่สามารถใช้เป็นแหล่งสำคัญของสารดังกล่าวได้ ในปลายทศวรรษของปี ค.ศ. 1930 ได้มีการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์สเตียรอยด์หลายชนิดขึ้นและ Equilenin 20 เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนตัวแรกที่ได้จากการสังเคราะห์ ในปี ค.ศ. 1953 W. E. Bachmann และ J. W. Cornforth ได้อธิบายการสังเคราะห์ Epiandrosterone 21 ปัจจุบันการสังเคราะห์สารดังกล่าวในปริมาณมากอาจใช้วิธีการสังเคราะห์แบบกึ่งสังเคราะห์ (semi-synthesis) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ที่เริ่มจากสารตั้งต้นในธรรมชาติ ซึ่งมีขั้นตอนการสังเคราะห์และค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์น้อยกว่า ปัจจุบันสเตียรอยด์ในพืชได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากมีปริมาณสารตั้งต้นค่อนข้างสูง

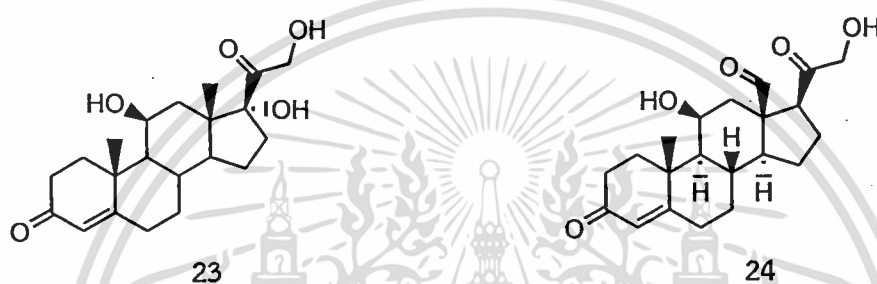


สเตียรอยด์ที่เป็นแม่แบบชนิดแรกคือ Cholesterol 22 จัดเป็นทั้งสารสเตียรอยด์ ลิพิด และแอลกอฮอล์ พบในเยื่อหุ้มเซลล์ของทุกเนื้อเยื่อในร่างกายและถูกขนส่งในกระแสเลือดของสัตว์ Cholesterol 22 ส่วนใหญ่ไม่ได้มาจากอาหารแต่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกายจะสะสมอยู่มากในเนื้อเยื่อของอวัยวะที่สร้างมันขึ้นมาเช่น ตับ ไชสันหลัง (spinal cord) สมอและผนังหลอดเลือด (atheroma) Cholesterol 22 มีบทบาทในกระบวนการทางชีวเคมีมากมาย แต่ที่รู้จักกันดีคือ เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจและระบบหลอดเลือด (cardiovascular disease) และภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (Hypercholesterolemia)[12]



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สเตียรอยด์ที่ถูกจัดเป็นฮอร์โมนส่วนใหญ่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก Cholesterol 22 โดยกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพซึ่งมีเอนไซม์ที่แตกต่างกันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ร่างกายจะผลิตสเตียรอยด์ขึ้น 20 ถึง 30 หน่วยในแต่ละวันเพื่อควบคุมฮอร์โมนต่างๆในร่างกายและกตภูมิคุ้มกันให้สมดุล รักษาความสมดุลของเกลือแร่ อิเล็กโทรไลต์และน้ำ โดยใช้ Cholesterol 22 เป็นสารตั้งต้นในการผลิต สเตียรอยด์จะถูกผลิตขึ้นทุกเช้าหลังจากการนอนหลับพักผ่อนมาจนเต็มที่แล้ว สมองจะสั่งการผลิตฮอร์โมนสเตียรอยด์โดยต่อมหมวกไตจะนำ Cholesterol 22 มาเปลี่ยนเป็นสเตียรอยด์ตัวอื่นๆ ซึ่งหลักๆอยู่ 2 ชนิดคือ Cortisol 23 มีประโยชน์ในการบรรเทาอาการอักเสบ ควบคุมสมดุลของเกลือแร่และน้ำ รวมถึงเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน อีกชนิดคือ Aldosterone 24 ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลเกลือแร่ในร่างกาย แต่ถ้ามี Aldosterone 24 หลั่งออกมามากเกินไปก็จะทำให้ร่างกายขับโพแทสเซียมออกมา กล้ามเนื้ออ่อนแรงและทำให้มีความดันโลหิตสูงได้

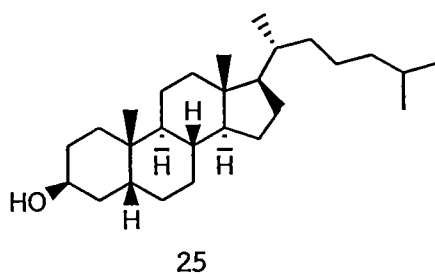


ไบโอสเตียรอยด์หรือสเตียรอยด์ธรรมชาติคือสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในพืชทั่วไปตามธรรมชาติ ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ สเตียรอยด์ที่ได้จากพืชนี้ร่างกายสามารถดูดซึมเพื่อเอาไปใช้ทดแทนฮอร์โมนสเตียรอยด์ได้ทันที เมื่อร่างกายมีอาการเจ็บป่วยจนร่างกายไม่สามารถผลิตสเตียรอยด์เองได้ เคมีของสเตียรอยด์หรือยาสเตียรอยด์ เป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นจากต้นแบบ Cortisol 23 ที่มีลักษณะคล้ายฮอร์โมนสเตียรอยด์ แพทย์แผนปัจจุบันจะใช้อยาสเตียรอยด์รักษาโรคร้ายแรงในกลุ่ม LE หรือ SLE ใช้ระงับความปวดเฉียบพลันในผู้ป่วยที่มีอาการอักเสบของกล้ามเนื้อเอ็น และมีฤทธิ์เฉพาะเจาะจงกับโรคบางชนิด

2.2 สเตียรอยด์ที่พบในธรรมชาติ[13]

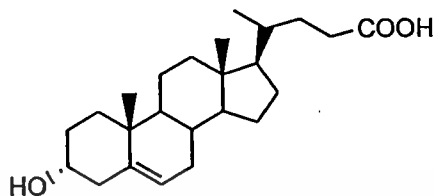
สเตียรอยด์ที่สำคัญในธรรมชาติส่วนใหญ่คือ

1. สเตอรอล (Sterol) Cholesterol 22 เป็นสเตอรอลตัวหนึ่งที่พบมากในธรรมชาติ พบได้ในสัตว์ทั้งกลุ่มมีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังและในพืชด้วยโดยพบร่วมกับสเตียรอยด์ในกลุ่มสเตอรอลตัวอื่นๆ เช่น Coprostan-3 β -ol 25



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

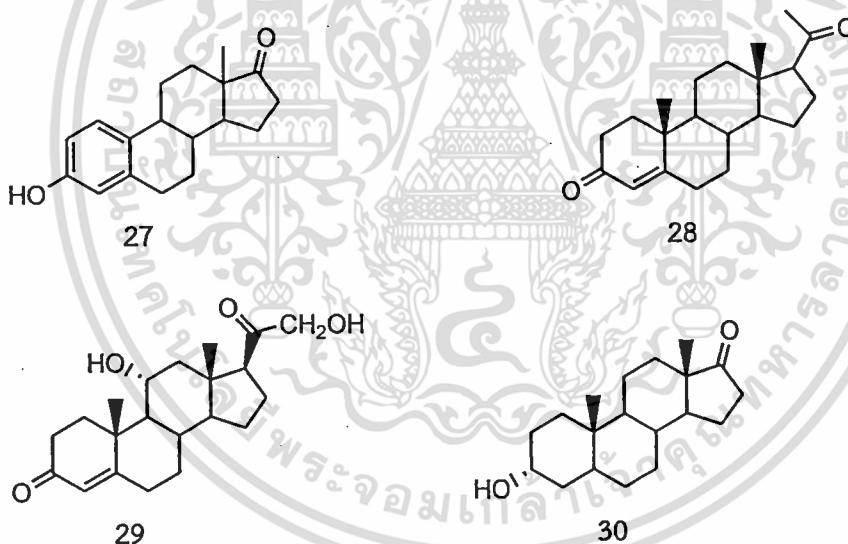
2. ไบล์ แอซิด (Bile acid) แยกได้จากน้ำดีของสัตว์ชั้นสูง อาจพบอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม โดยเป็น Peptidic conjugate กับ Taurine และ Glycine สารในกลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 2 แบบคือ C-27 และ C-28 แอซิด พบในน้ำดีของสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และอีกแบบคือ C-24 แอซิด เช่น Lithocholic acid 26



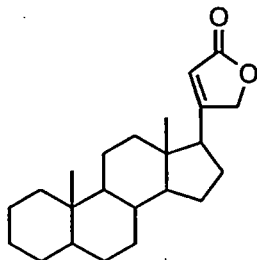
26

3. สเตียรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormones) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

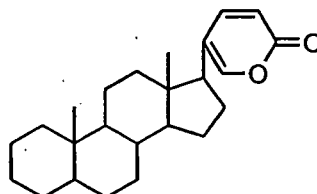
กลุ่มที่หนึ่งคือสเตียรอยด์ที่เป็นฮอร์โมนเพศและสามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่มฮอร์โมนเพศหญิง เช่น Estrogen 27 กลุ่ม Progestational hormone เช่น Progesterone 28 และกลุ่มที่สองคือกลุ่ม Adrenocortical hormones แบ่งออกเป็น กลุ่ม Glucocorticoids เช่น Hydrocortisone 29 และกลุ่ม Mineralocorticoids เช่น Andosterone 30



4. คาร์ดิแอก กลัยโคไซด์ (Cardiac glycosides) สเตียรอยด์ในกลุ่มนี้มีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่งเรียกว่า Cardiac-active (Cardiotonic) สารประกอบนี้แยกได้จากพืชที่อยู่ในเขตร้อน และสามารถพบได้ในเขตแอฟริกาและอเมริกาใต้ ชาวพื้นเมืองใช้เตรียมเป็นลูกดอกอาบยาพิษ อาจพบบางชนิดในน้ำลายคางคก สเตียรอยด์กลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กลุ่ม Cardenolides 31 เป็นสเตียรอยด์ชนิด C-23 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 เป็นชนิด 5-membered unsaturated lactone ring และกลุ่ม Bufadienolides 32 เป็นสเตียรอยด์ชนิด C-24 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 เป็นชนิด 6-membered unsaturated lactone ring

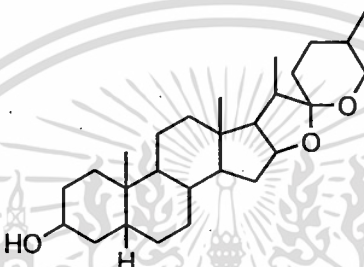


31



32

5. Saponinins อะไกลโคโคนหรือส่วนที่ปราศจากน้ำตาลของพืชที่สามารถทำให้เกิดฟองได้ในน้ำ ได้เรียกว่า Saponin ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้เช่น Smilagenin 33



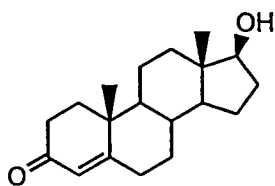
33

2.3 ประเภทของสเตียรอยด์[14-20]

ในสรีรวิทยาและการแพทย์ของมนุษย์ สเตียรอยด์ที่สำคัญส่วนใหญ่ คือ Cholesterol 22 สเตียรอยด์ฮอร์โมน และสารตั้งต้น (precursor) และเมแทบอลิต์ คลอเลสเทอรอลเป็นสารประกอบประเภท สเตอรอยด์แอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ เซลล์ เมมเบรน ในสัตว์ แต่อย่างไรก็ดี ถ้ามีปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิดโรคและภาวะผิดปกติมากมาย เช่น ภาวะผนังเส้นโลหิตแดงหนาและมีความยืดหยุ่นน้อยลง (atherosclerosis) สเตอรอยด์อื่นส่วนใหญ่ถูกสังเคราะห์จาก Cholesterol 22 ฮอร์โมนต่างๆ เช่น ฮอร์โมนเพศของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate) ก็เป็นสเตียรอยด์ที่สร้างจาก Cholesterol 22 เช่นกัน

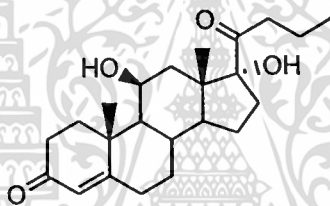
สเตียรอยด์แบ่งเป็นประเภทต่างๆ ดังนี้

1. แอนาบอลิกสเตียรอยด์ (Anabolic steroid) หรือที่รู้จักกันเป็นทางการคือ แอนาบอลิกแอนโดรเจนสเตียรอยด์ (Anabolic-androgen steroid, AAS) เป็นอนุพันธ์สังเคราะห์ของฮอร์โมนเพศชาย Testosterone 34 มีผลในการเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีน กระตุ้นให้ร่างกายสะสมโปรตีน และสร้างกล้ามเนื้อ แอนาบอลิกสเตียรอยด์ยังมีคุณสมบัติ Androgenic และ Virilizing รวมถึงการบำรุงรักษาในลักษณะที่เป็นชาย เช่นการเจริญเติบโตของร่างกาย เสี่ยง และหวัดเครา สเตียรอยด์ประเภทนี้ส่วนมากจะใช้ในกลุ่มของนักกีฬาเพราะจะช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้แก่กล้ามเนื้อ



34

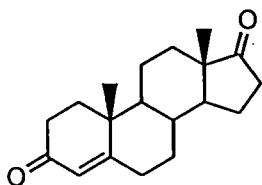
2. คอร์ติโคสเตียรอยด์ 35 (Corticosteroid) เป็นฮอร์โมนประเภทสเตียรอยด์ชนิดหนึ่ง ถูกสังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ที่เปลือกของต่อมหมวกไตภายใต้การควบคุมจากสมองส่วนกลาง โดยสมองส่วนนี้จะสร้าง Corticotrophin Releasing Hormone เพื่อกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า สร้าง Andrenocorticotrophin ออกมา ACTH จะไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์ที่เปลือกของต่อมหมวกไตให้สังเคราะห์คอร์ติโคสเตียรอยด์ 35 ขึ้นมาจากไขมันกลุ่มคอเลสเตอรอลคอร์ติโคสเตียรอยด์ เป็นฮอร์โมนที่มีฤทธิ์หลายด้านโดยเฉพาะในทางการแพทย์ ฮอร์โมนตัวนี้เปรียบเสมือนยาครอบจักรวาลคือสามารถใช้ในการรักษาโรคได้แทบทุกชนิดเพราะมีการออกฤทธิ์ต่อระบบต่างๆในร่างกายหลายระบบ เช่น ตับ กล้ามเนื้อ ผิวหนัง ต่อมไทรอยด์ เนื้อเยื่อไขมัน เนื้อเยื่อเกี่ยวพันรวมทั้งมีฤทธิ์ลดการอักเสบในร่างกายด้วย



35

3. ฮอร์โมนเพศ เกิดจากการทำงานของต่อมในสมองที่เรียกว่า พิทูอิทารีแกรนด์ (Pituitary Grand) ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างฮอร์โมนอันจะเป็นสิ่งกำหนดความแตกต่างของกระบวนการทำงานในร่างกายของทั้งชายและหญิง ฮอร์โมนที่ควบคุมการทำงานของผู้หญิงเรียกว่า Estrogen 27 ทำหน้าที่ให้ร่างกายของผู้หญิงพัฒนาจากวัยเด็กสู่วัยสาว ทำให้เต้านมมีขนาดใหญ่ขึ้น สะโพกผายขึ้น น้ำเสียงที่เคยแหบพร่าหรือดูเรียวๆก็กลับมามีลีลานุ่มนวล เสียงเสีกลอง และที่สำคัญคือการมีประจำเดือน ซึ่งเป็นสัญญาณเตือนเริ่มแรกของการเข้าสู่วัยสาวเต็มตัว ส่วนผู้ชายฮอร์โมนที่เป็นตัวกำหนดความเป็นชายเรียกว่า Testosterone 34 มีส่วนทำให้เด็กผู้ชายเริ่มเข้าสู่วัยหนุ่ม มีเสียงห้าวขึ้น อวัยวะเพศใหญ่ขึ้น มีหนวดเคราซึ่งบ่งบอกความเป็นชาย

4. โพรฮอร์โมน (Prohormone) เป็นสารตั้งต้นในการสร้างฮอร์โมนชนิดต่างๆ ซึ่งโพรฮอร์โมนจะไม่มีผลต่อระบบการทำงานของร่างกาย โพรฮอร์โมนที่พบได้ในคนคือ Proinsulin และ Pro-opiomelanocortin ตัวอย่างของโพรฮอร์โมนได้แก่ Androstenedione 36



36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) เป็นสารสเตียรอยด์ที่พบในพืช มีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกับ Cholesterol 22 มาก จึงช่วยยับยั้งการดูดซึม Cholesterol 22 ในอาหารที่เรารับประทานเข้าไปไม่ให้เข้าสู่กระแสเลือดด้วยกลไกเข้าไปแทนที่ Cholesterol 22 ซึ่งไฟโตสเตอรอลจะถูกดูดซึมได้น้อยมาก ทำให้ Cholesterol 22 จากอาหารถูกดูดซึมได้น้อยลงและถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระ ปริมาณไฟโตสเตอรอลในพืชจะพบมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์รวมทั้งตำแหน่งของพืชที่วิเคราะห์ ซึ่งในพืชชนิดหนึ่งๆมีการพบไฟโตสเตอรอลหลายชนิดในสัดส่วนที่แตกต่างกันไป

2.4 ประโยชน์และโทษของสเตียรอยด์ [21,22]

สเตียรอยด์นั้นหากนำมาใช้อย่างถูกต้องตามหลักวิชาการจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก สเตียรอยด์ที่นำมาใช้ในทางการแพทย์เพื่อประโยชน์ในการรักษาดังต่อไปนี้

1. ใช้เพื่อทดแทนการขาดฮอร์โมน โดยปกติจะใช้สเตียรอยด์เพื่อทดแทนการขาดฮอร์โมน จากต่อมหมวกไต ที่มีสาเหตุมาจาก ความบกพร่องของต่อมหมวกไต และจากความบกพร่องของต่อมใต้สมองส่วนหน้า

2. ใช้รักษาโรคต่าง ๆ สเตียรอยด์จะถูกใช้เมื่อใช้ยาอื่นไม่ได้ผล หรือโรคนั้นไม่อาจควบคุมด้วยยาอื่น เนื่องจากมีอาการข้างเคียงสูง วัตถุประสงค์ของการนำสเตียรอยด์ไปใช้ก็เพื่อบรรเทาอาการอักเสบหรือกดภูมิคุ้มกันในโรคต่างๆ นั้น เช่น

-โรคภูมิแพ้ สเตียรอยด์ใช้ในโรคภูมิแพ้ จะให้ผลดีและรวดเร็วในการควบคุมอาการหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับโรคภูมิแพ้ เช่น โรคหืด ไข้หวัดเรื้อรังชนิดแพ้ากาศ ไข้ละอองฟาง การแพ้ยาและโรคผื่นคันตามผิวหนังที่เกิดจากการแพ้ แต่เนื่องจากยาอื่นอันตรายจากการใช้สูง จึงควรเก็บไว้ใช้ในกรณีที่เป็นจริงๆ และใช้ในระยะเวลาสั้นเช่น เป็นโรคหัดคัดจมูกเรื้อรังชนิดแพ้อากาศ ที่ใช้ยาต้านฮีสตามีนไม่ได้ผล หรือเป็นโรคหืด แล้วใช้ยาขยายหลอดลมแล้วไม่ได้ผล

-โรคผิวหนัง สเตียรอยด์สามารถลดอาการทางผิวหนังที่เกิดจากการแพ้ การอักเสบและโรคผิวหนังที่ทำให้เกิดอาการคันต่างๆ การใช้ยาสเตียรอยด์ ไม่ใช่เป็นการรักษาที่ต้นเหตุ แต่เป็นเพียงยับยั้งอาการคันและอาการอักเสบที่เกิดจากเชื้อรา ดังนั้นเมื่อหยุดยาาก็จะกลับมาเป็นอีก

-โรคตา สเตียรอยด์ใช้ได้ผลในการรักษาโรคของตาที่เกิดจากการแพ้ เช่น อาการเคืองตา เนื่องจากการแพ้สารบางชนิด ที่ไม่ใช่เกิดจากการติดเชื้อ ซึ่งแพทย์มักรักษาด้วยการใช้ยาหยอดตาตา ดังนั้น จึงห้ามใช้ยาที่มีส่วนผสมของสเตียรอยด์ ในกรณีที่ติดเชื้อและยานี้ไม่มีผลในการรักษาต่อกระจก นอกจากนี้หากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน อาจให้ความดันในลูกตาสูงขึ้นจนเกิดเป็นโรคต้อหินได้

เนื่องจากสเตียรอยด์เป็นยาซึ่งมีผลต่อระบบต่างๆ ในร่างกายแทบทุกระบบ การใช้สเตียรอยด์ไม่ถูกวิธี ใช้ในปริมาณมากเกินไป และใช้ติดต่อกันนานเกินไปอาจนำไปสู่อันตรายมากมายหลายประการ ที่สำคัญได้แก่

1. การติดเชื้อ การใช้สเตียรอยด์ในขนาดสูงมีผลกดภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราได้ง่าย นอกจากนี้ สเตียรอยด์ยังอาจบดบังอาการแสดงของโรคติดเชื้อ ทำให้ตรวจพบโรคเมื่ออาการ รุนแรงแล้ว

2. กัดการทำงานของระบบที่ควบคุมการหลั่งฮอร์โมน ระบบที่ทำหน้าที่ควบคุมการหลั่งสเตียรอยด์ฮอร์โมน ประกอบด้วยอวัยวะที่สำคัญในร่างกาย 3 แห่ง ด้วยกันคือ ไฮโปทาลามัส (Hypothalamus) ต่อมพิทูอิทารี (Pituitary gland) และต่อมหมวกไต (Adrenal gland) ในภาวะที่มีระดับของ Cortisol 23 ในเลือดสูงจะมีการกระตุ้นจากไฮโปทาลามัสไปยังต่อมหมวกไตให้หลั่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสร้างสเตียรอยด์ ในทางตรงกันข้ามถ้าระดับของ Cortisol 23 ต่ำ จะมีผลกระทบทำให้ต่อมหมวกไต สร้างฮอร์โมนนี้เพิ่มขึ้น การให้สเตียรอยด์ขนาดสูง จะไปกดการทำงานของระบบอวัยวะที่ทำหน้าที่สร้างและควบคุมการหลั่งฮอร์โมนชนิดนี้ ซึ่งจะมากหรือน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับขนาดของยาที่ได้รับ และระยะเวลาในการใช้ยา เช่น ถ้าให้สเตียรอยด์ในขนาดที่เทียบ เท่ากันเพรดนิโซโลน 5 มิลลิกรัมต่อวัน แทบจะไม่มีผลที่จะกดการทำงานของระบบ นี้เลย แต่ถ้าให้ขนาดสูงเทียบเท่ากับเพรดนิโซโลน 15 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลานานกว่า 1 - 2 เดือน จะมีผลต่อการกดการสร้างฮอร์โมนได้มาก ทำให้ เมื่อหยุดใช้ยาแล้ว ร่างกายไม่สามารถสร้างฮอร์โมนนี้ได้เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย โดยเฉพาะเมื่อร่างกายอยู่ในภาวะเครียด

3. ผลในกระเพาะอาหาร สเตียรอยด์มีผลทำให้เยื่อกระเพาะอาหารบางลงและยับยั้งการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ทดแทนเนื้อเยื่อเก่าที่หลุดไป นอกจากนี้ในผู้ป่วยบางรายยังพบว่า มีการหลั่ง กรดในกระเพาะอาหารเพิ่มขึ้นด้วย การใช้สเตียรอยด์อาจทำให้มีอาการกระเพาะอาหารทะลุ หรือเลือดออกในกระเพาะอาหารได้ โดยไม่มีอาการปวดมาก่อน

4. ผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง สเตียรอยด์อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบุคลิกภาพ และอารมณ์ของผู้ใช้ยา ได้ การใช้ยาขนาดสูงจะทำให้เกิดอารมณ์เป็นสุข จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ ผู้ใช้มีอาการติดยา นอกจากนี้ยังพบอาการไม่พึงประสงค์อื่นๆ เช่นนอนไม่หลับ เจริญอาหาร กระสับกระส่ายและหงุดหงิด เป็นต้น

5. กระดูกผุ (Osteoporosis) การใช้สเตียรอยด์ติดต่อกันเป็นเวลานาน มีผลทำให้กระดูกผุได้ ดังนั้น ผู้ที่มีแนวโน้มที่จะเกิดกระดูกผุอยู่แล้ว เช่น ผู้สูงอายุ คนที่เป็นโรคไขกระดูก ควรหลีกเลี่ยงการใช้ยาชนิดติดต่อกันเป็นเวลานาน

6. ยับยั้งการเจริญเติบโตของร่างกาย เนื่องจากสเตียรอยด์มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเด็ก การให้ยาขนาดสูงในเด็ก จึงไม่ให้ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน แต่จะให้ยาแบบวันเว้นวันเพราะจะทำให้มีฤทธิ์และอาการไม่พึงประสงค์น้อยกว่า

7. สเตียรอยด์ทำให้ร่างกายสูญเสียเกลือโพแทสเซียมทางปัสสาวะมาก ทำให้ระดับโพแทสเซียมในเลือดต่ำซึ่งป้องกันได้โดยให้ลดการกินโซเดียม และกินอาหารที่มีโพแทสเซียมสูง เช่น ส้ม กล้วย ผู้ที่มีระดับโพแทสเซียมต่ำมาก อาจมีผลทำให้เกิดอาการอ่อนเพลีย กล้ามเนื้อไม่มีแรง และหัวใจเต้นผิดจังหวะหรือหยุดเต้นได้

8. ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรง การใช้สเตียรอยด์เป็นระยะเวลาเวลานาน จะทำให้มีการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กล้ามเนื้อบริเวณต้นขาและแขน ซึ่งเมื่อลดขนาดยาลงก็จะมีผลทำให้อาการดีขึ้น และต้องใช้เวลาหลายเดือนกว่าจะเป็นปกติ

9. ผลต่อตา ยาหยอดตาบางชนิดมีส่วนผสมของสเตียรอยด์ หากใช้ไปนานๆ อาจทำให้ความดันลูกตาสูงขึ้น และมีโอกาสติดเชื้อได้ง่าย บางรายอาจทำให้ตาบอดได้

10. ผลต่อผิวหนัง สเตียรอยด์ในรูปของยาทาภายนอก มีผลทำให้ผิวหนังบางเป็นรอยแตกและมีลักษณะเป็นมัน การใช้สเตียรอยด์ที่สูตรโครงสร้างมีฟลูออไรด์เป็นองค์ประกอบ ถ้าทาบริเวณ ใบหน้า อาจจะทำให้หน้ามีผื่นแดง และมีอาการอักเสบของผิวหนังรอบๆ ในบางรายอาจมีสิว เกิดขึ้นด้วย

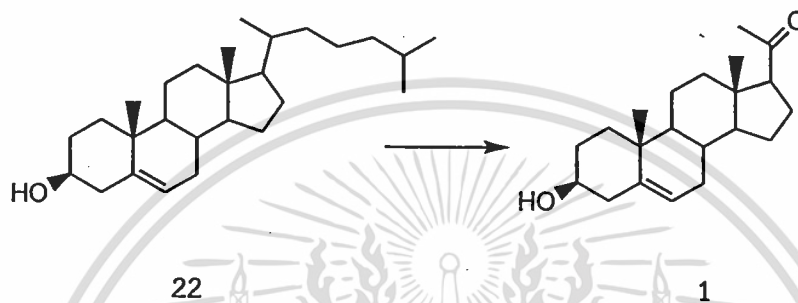
11. ฤทธิ์และอาการไม่พึงประสงค์อื่นๆ สเตียรอยด์มีผลทำให้เกิดลักษณะ เรียกว่า Cushing's Syndrome ลักษณะพบในผู้ป่วยประเภทนี้ เช่น อ้วน ขนดก ระบบประจำเดือนผิดปกติ ความดันโลหิต สูง กล้ามเนื้อไม่มีแรง ปวดหลัง เป็นสิว มีอาการทางจิตใจ หัวใจล้มเหลว เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น

งานวิจัยนี้เลือกใช้สเตียรอยด์ 2 ชนิด เป็นสารตั้งต้นได้แก่

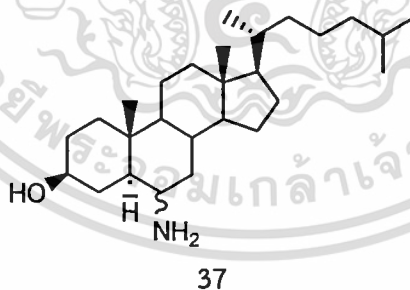
1. Pregnenolone 1 เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนประเภทโปรฮอร์โมน ประกอบด้วยหมู่คีโต หมู่ไฮดรอกซิล และพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และ 6 Pregnenolone 1 เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ Progesterone Mineralocorticoid Glucocorticoid Androgen และ Estrogen 19 Pregnenolone 1 สามารถสังเคราะห์ได้จาก Cholesterol 22 โดยเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Hydroxylation) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 20 และตำแหน่งที่ 22



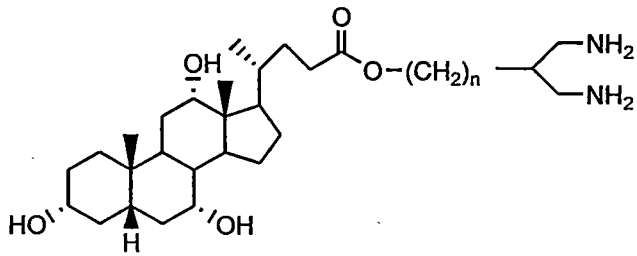
2. Chenodeoxycholic acid 7 เป็นเกลือน้ำดีหรือไบสแอซิดชนิดปฐมภูมิ ตับจะสังเคราะห์ Chenodeoxycholic acid 7 จาก Cholesterol 22[23]

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของอะมิโนสเตียรอยด์ได้ถูกกล่าวถึงโดย Burbiel และ Bracher[24] พบว่า 6-amino-5 α -cholestan-3 α -ol 37 มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราที่ดี

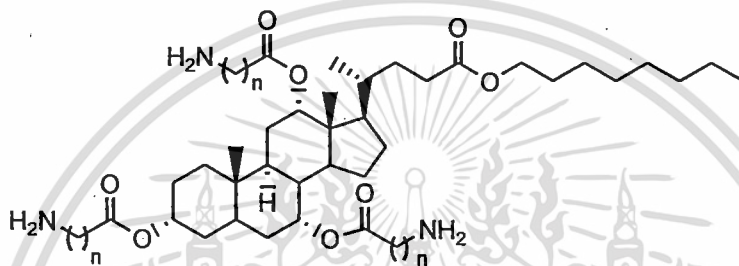


Paschke และคณะ[25] ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Cholic acid 12 ที่ประกอบด้วย 3 ส่วน คือส่วนของ Cholic acid 12 เป็น transport fragment และมีอนุพันธ์ของ 1,3-diaminopropane เชื่อมกับ alkyl spacer พบว่าสารประกอบ diamino 38 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง



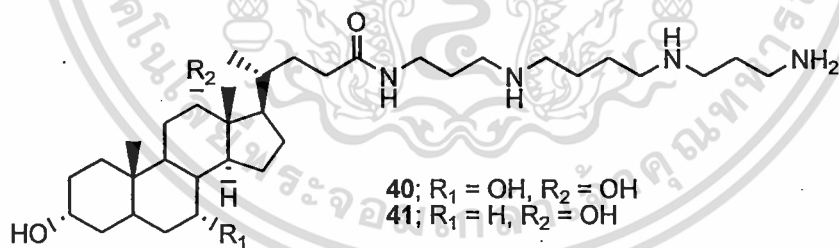
38

Savage และคณะ[26] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ Cholic acid 39 ที่มีสายโซ่ประกอบด้วยหมู่อะมิโนและมีความเสถียรสูง พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์



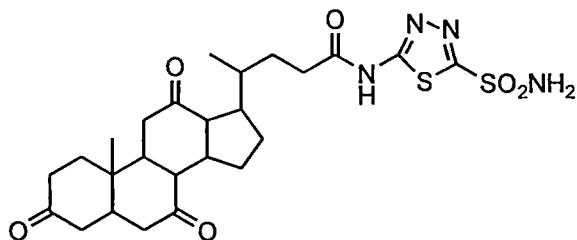
39 n = 1, 2 or 3

Blagbrough และคณะ[27] ได้สังเคราะห์ Cholic acid spermine conjugated 40 และ Deoxycholic acid spermine conjugated 41 โดยนำ Cholic acid และ Deoxycholic acid ทำปฏิกิริยากับพอลิเอมีน spermine สาร 40 และ 41 ทำหน้าที่เป็น binding affinities สำหรับ Calf Thymus DNA



40; R₁ = OH, R₂ = OH
41; R₁ = H, R₂ = OH

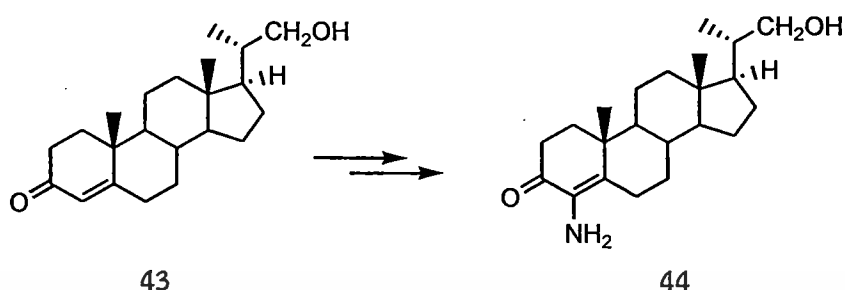
Saracoglu และคณะ[28] สังเคราะห์อนุพันธ์ของ bile acid 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide 42 ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง carbonic anhydrase



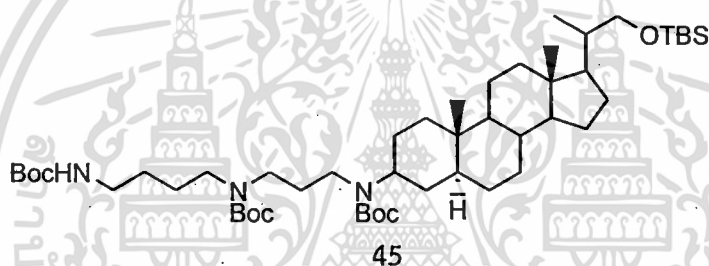
42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

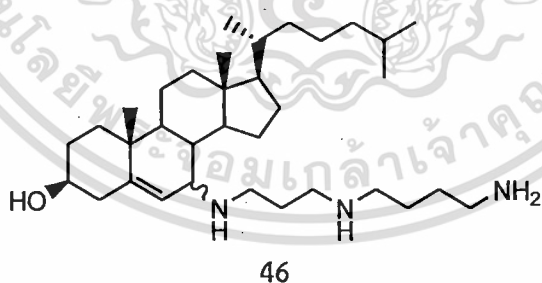
Curran และคณะ[29] ได้ทำการสังเคราะห์ 4-amino steroid MDL 19687 44 โดยการทำให้ปฏิกิริยารีดักชันของสาร 43



Kim และคณะ[30] ได้ทำการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 45 โดยการทำให้ปฏิกิริยา amination ของ 3-ketosteroid ด้วยเอมีน ซึ่งวิธีการสังเคราะห์เป็นแนวทางหนึ่งที่น่ามาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์ Squalamine อะมิโนสเตียรอยด์จากฉลามพันธ์ dog fish ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา

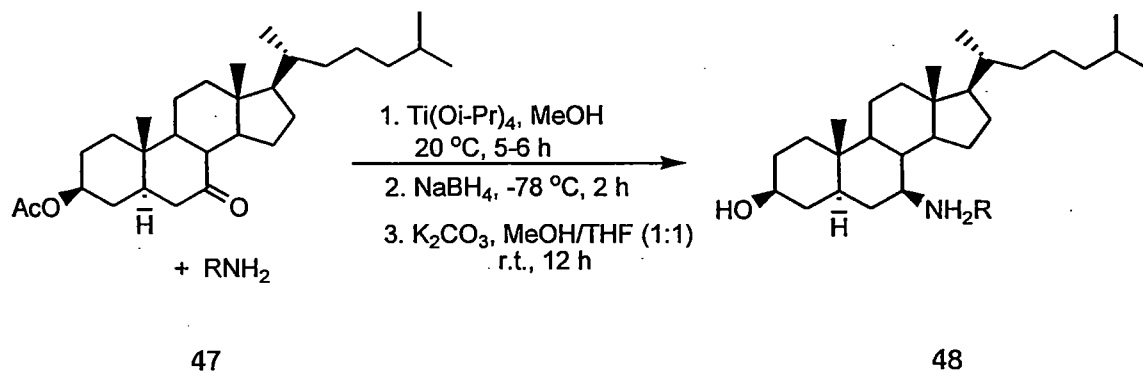


Kihel และคณะ[31] ได้ทำการสังเคราะห์ spermidinylcholesterol 46 และศึกษาฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์ทั้งนี้เพื่อพัฒนาต่อเป็นยาต้านเซลล์มะเร็ง

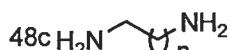


Loncle และคณะ[32] ได้ทำการสังเคราะห์ 7-amino และ polyaminosterol จาก 3 β -acetoxy-7-keto-5 α -cholestane 47 โดยทำให้ปฏิกิริยา reductive amination กับ Ti(OR)₄ และ NaBH₄ ทำการกำจัดหมู่แอซิเตตด้วย K₂CO₃ ใน MeOH : CHCl₃ (1:1) พบว่าสารผลิตภัณฑ์ 48 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์และว่องไวในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ส่งผลคล้ายกับ *Staphylococcus aureus* และ *S. faecalis*

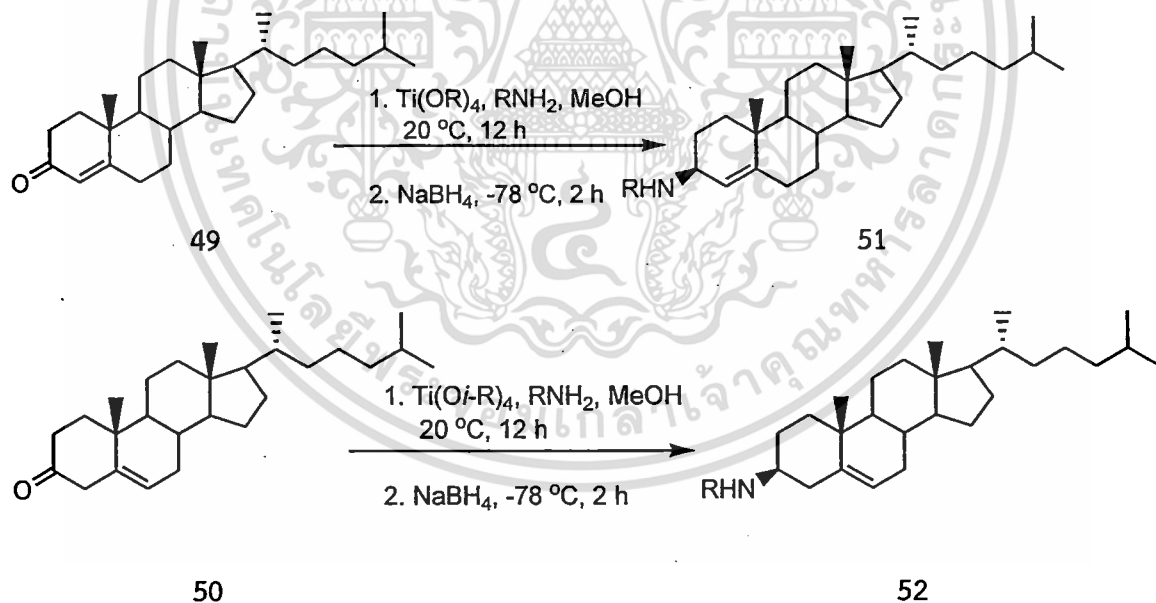
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



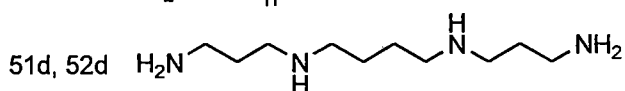
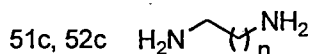
$\text{RNH}_2 = 48\text{a } \text{R} = \text{H}, 48\text{b } \text{R} = \text{CH}_3$



Salami และคณะ[33] ได้ทำการสังเคราะห์ 3-amino- และ polyaminosterol จาก 4-cholesten-3-one 49 และ 5-cholesten-3-one 50 โดยทำปฏิกิริยา Reductive amination กับ $\text{Ti}(\text{OR})_4$ และ NaBH_4 พบว่าสารผลิตภัณฑ์ 51 และ 52 มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ ยีสต์ และเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

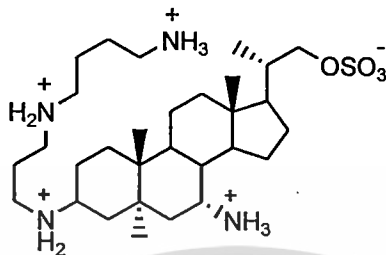


$\text{RNH}_2 = 51\text{a}, 52\text{a } \text{R} = \text{H}, 52\text{b}, 53\text{b } \text{R} = \text{Me}$



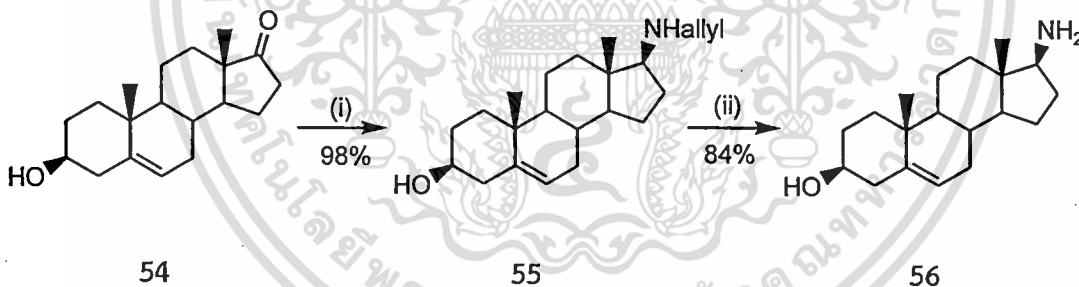
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khan และคณะ[34] ได้ทำการสังเคราะห์ 7 α -Aminosteroids จาก 3-dioxolane-22-*tert*-butyldimethylsilyloxy-23,24-bisnor-5 α -cholan-7-one ผลิตภัณฑ์ 53 ที่ได้จะมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes* 308A



53

Taylor และคณะ[35] ได้สังเคราะห์ 17 β -Aminosteroids คือ 17 β -amino-3 β -hydroxyandrost-5-en 56 โดยใช้ 3- β -hydroxyandrost-5-en-17-ene-17-one 54 เป็นสารตั้งต้น เริ่มจากปฏิกิริยา Reductive amination โดยการใช้ allyl amine และ sodium triacetoxyborohydride และในขั้นตอนสุดท้ายลดอนุหมู allyl ออกด้วย dimethylbarbituric acid โดยใช้ Pd(PPh₃) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สารผลิตภัณฑ์ทั้งสามชนิดถูกใช้เป็น key intermediate ในการเตรียมอนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ



Reaction conditions: (i) allylamine, acetic acid, sodium triacetoxyborohydride, THF-ClCH₂CH₂Cl, rt, 24-48 h
(ii) 2,3-dimethylbarbituric acid, Pd(PPh₃)₄, CH₂Cl₂

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การทดลองทั่วไป

ตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ hexane, dichloromethane (DCM), ethyl acetate และ methanol (เกรดการค้า, Zen point) ที่ใช้สำหรับการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง ส่วนสารเคมีที่ได้จากการซื้อจะนำมาใช้โดยปราศจากการทำสารให้บริสุทธิ์

ตัวทำละลายฟิรดิน (เกรดวิเคราะห์, Lab scan) ที่ใช้ในการทดลอง ถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นที่อุณหภูมิ 115 – 116 องศาเซลเซียส และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อดูดน้ำ ระยะเวลาในการใช้ 30 วัน

สารเคมีที่ใช้เป็รสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ในการสังเคราะห์เป็นเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Fluka และ Aldrich ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคThin layer chromatography ทำให้ปรากฏบนแผ่น aluminium sheet silica gel F₂₅₄ Merck ตรวจสอบจุดของสารผลิตภัณฑ์ด้วยการดูคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และ/หรือโดยการย้อมด้วย anisaldehyde reagent แล้วให้ความร้อนแผ่น TLC บนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

การแยกสารสังเคราะห์ให้บริสุทธิ์ทำโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้เฟสคงที่คือ Silica gel 60 0.04-0.06 mm (Scharlau GE0048) ใช้เฟสเคลื่อนที่คือ ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate

สเปกตรัม ¹H NMR และ ¹³C NMR บันทึกโดยเครื่องฟูเรียรทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกะเฮิร์ต การเตรียมสารตัวอย่างจะทำการละลายโดยใช้ตัวทำละลาย CDCl₃ และ CD₃OD จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ CHCl₃ ที่ δ 7.25 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹H NMR และที่ δ 77.5 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹³C NMR และ CD₃OH ที่ δ 4.80 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹H NMR และที่ δ 49.0 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹³C NMR

จุดหลอมเหลวบันทึกโดยเครื่องหาจุดหลอมเหลว GALLEKAMP SANYO

อินฟราเรดสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องฟูเรียรทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX 60237 โดยใช้ KBr เป็นวัสดุในการทำหน้าต่างเซลล์ และทำการบันทึกในช่วงความถี่ 4,000-400 cm⁻¹

แมสสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ Finnigan LC-Q MS detector ด้วยเทคนิค Electrospray จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง

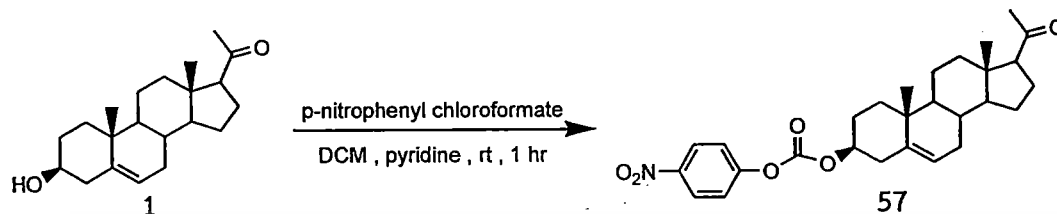
3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์จะใช้ Pregnenolone 1 เป็นสารตั้งต้น แนวทางการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone 1 ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 เป็นหมู่หลุดออกโดยใช้รีเอเจนต์คือ *p*-nitrophenyl chloroformate

แผนภาพที่ 3.1



1. ชั่ง Pregnenolone 1 300 มิลลิกรัม (0.95 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลมซึ่งภายในมีแท่งแม่เหล็กอยู่ ซึ่งวางอยู่บนเครื่องปั่นกวน จากนั้นเติม DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวน จนกระทั่ง Pregnenolone 1 ละลายหมด

2. ชั่ง *p*-nitrophenyl chloroformate 248.9 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล) แล้วใส่ลงไปในขวดก้นกลมในข้อ 1 ทำการปั่นกวน จากนั้นเติม pyridine 1.5 มิลลิลิตร และทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้อง

3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ Pregnenolone 1 สังเกตการเกิดปฏิกิริยาโดยพิจารณาจุดของสารตั้งต้นเจือจางมากที่สุดแล้วไม่มีการเปลี่ยนแปลง

4. หยุดการปั่นกวน และนำสารที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้ของผสมเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน

5. ทำการแยกสารผสมให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate โดยที่ผลรวมของอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เริ่มต้นจากสารละลายไม่มีขั้วคือ hexane : ethyl acetate เป็น 100 : 0 แล้วค่อยๆ เพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย โดยการเพิ่มปริมาตรของ ethyl acetate จาก 0 เป็น 2, 5, 10, 12, 15, ... และลดปริมาตรของ hexane จาก 100 เป็น 98, 95, 90, 85, ... ตามลำดับ

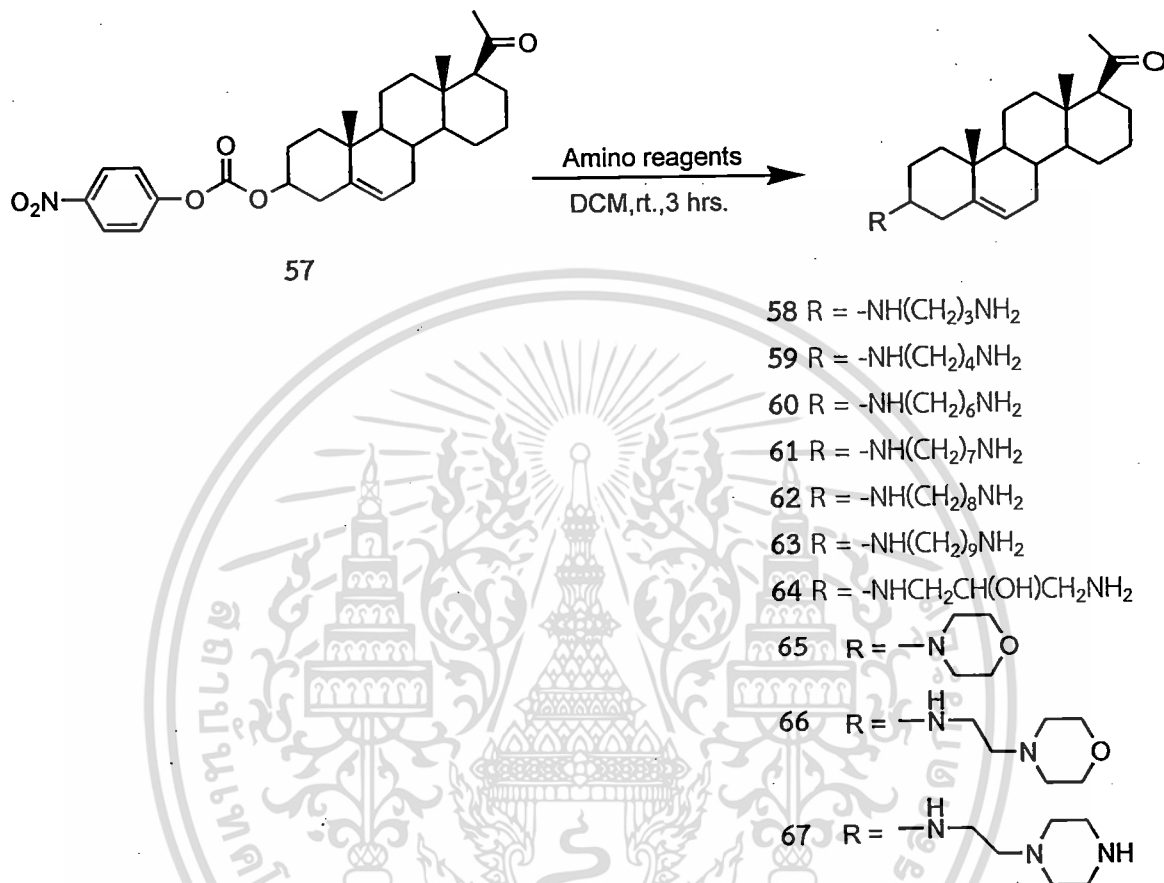
6. ตรวจสอบสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เป็น 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารตั้งต้นพิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R_f เดียวกัน การดูกลิ่นรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และการให้สีกับ anisaldehyde reagent สีเดียวกันให้เก็บรวมไว้ด้วยกันในขวดก้นกลม

7. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดก้นกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. นำสารผลิตภัณฑ์มาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

ขั้นตอนที่ 2 สังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 และอะมิโนรีเอเจนต์

แผนภาพที่ 3.2



1. ละลาย 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 ใน DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งละลายหมด
2. เติม 1,3-diaminopropane 103.3 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิห้อง และทำการปั่นกวนต่อที่อุณหภูมิห้อง
3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ทุก 1 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เป็น 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 จนกระทั่งจุดของสารผลิตภัณฑ์หรือสารข้างเคียงเกิดขึ้น
4. หยุดการปั่นกวน และนำของผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ
5. ทำการแยกสารที่สังเคราะห์ได้ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยที่สารละลายที่ใช้เป็นสารละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate โดยที่ผลรวมของอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 100 เริ่มต้นจากสารละลายไม่มีขี้ขี้คือ hexane : ethyl acetate เป็น 100 : 0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วค่อยๆเพิ่มขั้วของสารละลาย โดยเพิ่มปริมาตรของ ethyl acetate จาก 0 เป็น 2, 5, 7, 10, 12, 15, ... และลดปริมาตรของ hexane จาก 100 เป็น 98, 95, 93, 90, 88, 85, ... ตามลำดับ

6. ตรวจสอบสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เป็น 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารตั้งพิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R_f เดียวกัน การดูกลิ่นรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และการให้สีกับ anisaldehyde reagent สีเดียวกันให้เก็บรวมไว้ด้วยกันในขวดกันกลม

7. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดกันกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. นำของแข็งที่ได้จากระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศมาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

9. นำสารผลิตภัณฑ์ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

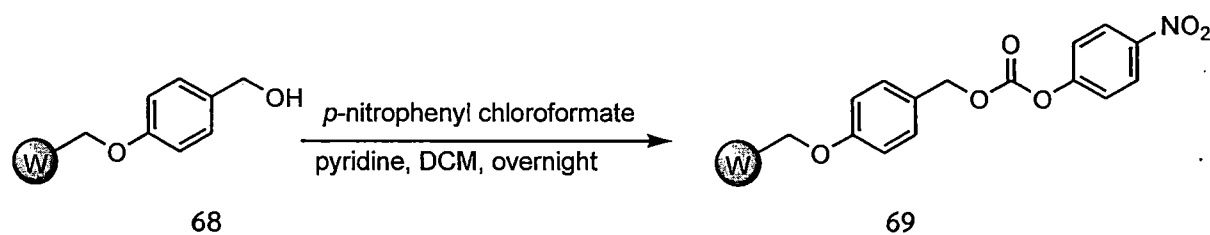
10. เริ่มทำการสังเคราะห์ใหม่ตั้งแต่ข้อ 1 ถึง 9 โดยเปลี่ยนอะมิโนรีเอเจนต์ในข้อ 2 จาก 1,3-diaminopropane เป็นอะมิโนรีเอเจนต์ดังต่อไปนี้

- 1,4-diaminobutane ปริมาตร 123.6 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 1,6-diaminohexane ปริมาณ 143.5 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- 1,7-diaminoheptane ปริมาณ 160.8 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- 1,8-diaminooctane ปริมาณ 178.2 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- 1,9-diaminononane ปริมาณ 195.5 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- 1,3-diamino-2-propanol ปริมาณ 111.3 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- morpholine ปริมาตร 107.6 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 4-(2-aminoethyl) morpholine ปริมาตร 160.8 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 1-(2-Aminoethyl) piperazine ปริมาตร 162.0 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)

3.2.2 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์จะใช้ Chenodeoxycholic acid 7 เป็นสารตั้งต้น แนวทางการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน[23] ดังนี้

1. ปฏิกริยาการกระตุ้น Wang resin โดยการเปลี่ยนเป็นหมู่คาร์บอเนต

แผนภาพที่ 3.3

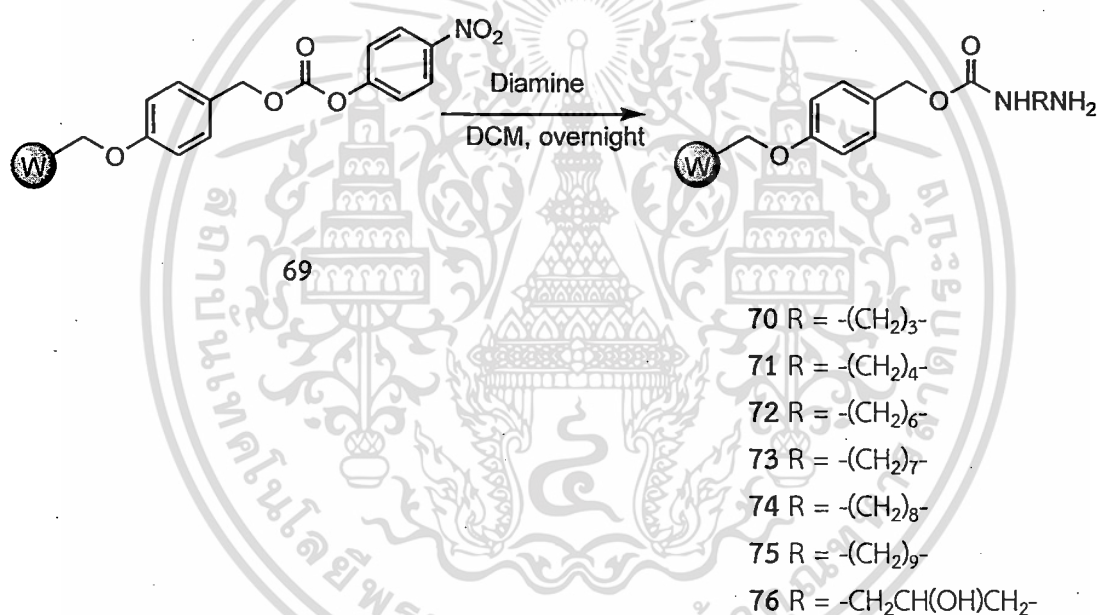


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ชั่ง Wang resin 68 จำนวน 100.0 มิลลิกรัม (0.10 มิลลิโมล) ใส่ลงใน column cap แล้วเติม DCM 10 มิลลิลิตร แช่ไว้ประมาณ 10 นาที จนกระทั่งเรซินบวมตัว
2. โข DCM ออกจาก column cap เติมสารละลายของ *p*-nitrophenyl chloroformate 80.6 มิลลิกรัม (0.40 มิลลิโมล) ในไดคลอโรมีเทน ลงใน column cap
3. เติมฟิรดินลงไปประมาณ 5 หยด แล้วเติมไดคลอโรมีเทนจนได้ปริมาตร 2/3 ของ column cap จากนั้นปิดฝา column cap ให้เรียบร้อย และระบายความดันภายใน column cap นำ column cap ไปตั้งหมუნ เปิดเครื่องตั้งหมუნทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
4. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไซสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง จากนั้นล้างเรซินด้วย DCM หลายๆ ครั้ง จะได้ *p*-nitrophenyl carbonate wang resin 69

2. ปฏิกิริยาการใส่ไดเอมีนเข้าไปทำปฏิกิริยากับ Wang resin 68

แผนภาพที่ 3.4



1. ชั่งไดเอมีนจำนวน 4 equivalent ของ Wang resin 68 ละลายในไดคลอโรมีเทน จากนั้นเติมลงใน column cap ที่ได้จากปฏิกิริยาตอนที่ 1
2. จากนั้นเติมไดคลอโรมีเทนลงใน column cap จนได้ปริมาตร 2/3 ของหลอด นำ column cap ไปตั้งหมუნ เปิดเครื่องตั้งหมუნทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
3. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไซสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง จากนั้นล้างเรซินด้วย DCM สลับกับเมทานอลหลายๆ ครั้ง นำเม็ตรезิน 2-3 เม็ด ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กไปทดสอบโดยใส่ รีเอเจนต์ A 3 หยด และรีเอเจนต์ B 1 หยด จากนั้นนำหลอดทดลองนี้ไปให้ความร้อนประมาณ 1 นาที ถ้าเม็ตรезินเปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่าไดเอมีนได้ทำปฏิกิริยากับ Wang resin สมบูรณ์แล้ว

หมายเหตุ รีเอเจนต์ A : สารละลาย (1) ชั่งฟีนอล 40 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร สารละลาย (2) ชั่งโพแทสเซียมไฮยาไนด์ 65 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้น

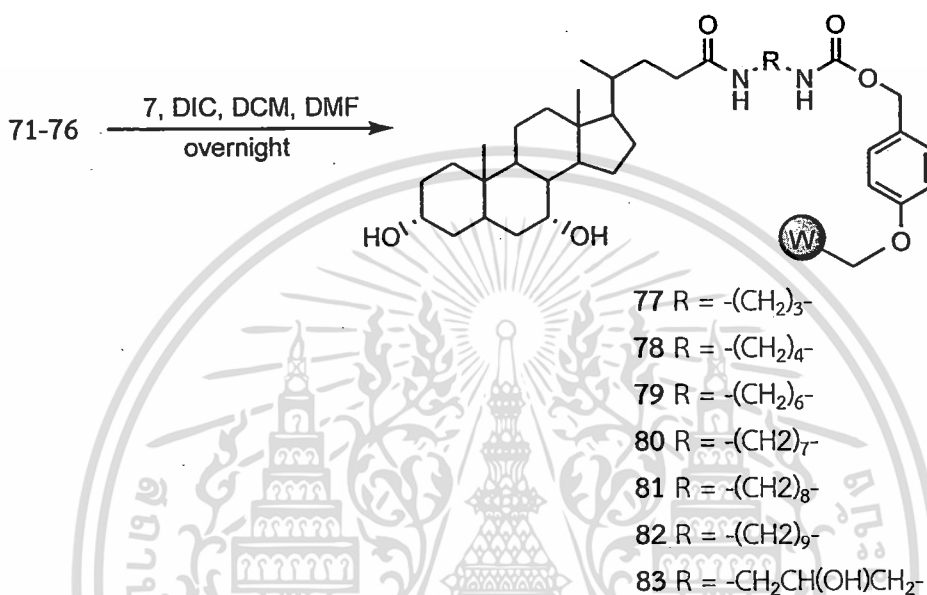
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งมา 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วย pyridine 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลาย (1) และ (2) ทำการปั่นกวนให้สารละลายผสมเข้ากัน

รีเอเจนต์ B : ชั่ง Ninhydrin 2.5 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 50 มิลลิลิตร

3. ปฏิบัติการใส่ Chenodeoxycholic acid 7 เข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน

แผนภาพที่ 3.5



1. ชั่ง Chenodeoxycholic acid 7 จำนวน 4 equivalent ของ Wang resin 68 ใส่ลงใน vial แล้วละลายด้วย DCM และ DMF ทำการปั่นกวนจนกระทั่ง Chenodeoxycholic acid 7 ละลายหมด จากนั้นใส่ DIC ลงใน Chenodeoxycholic acid 7 ปั่นกวนต่อเป็นเวลา 10 นาที

2. นำไบลต์แอซิดที่ได้จากตอนที่ 1 ใส่ลงใน column cap ที่มีเรซินที่ได้จากปฏิกิริยา 2 เติม DCM ลงใน column cap จนมีปริมาณเป็น 2/3 ของหลอด

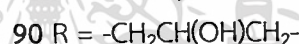
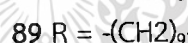
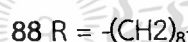
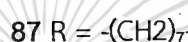
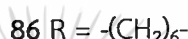
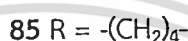
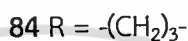
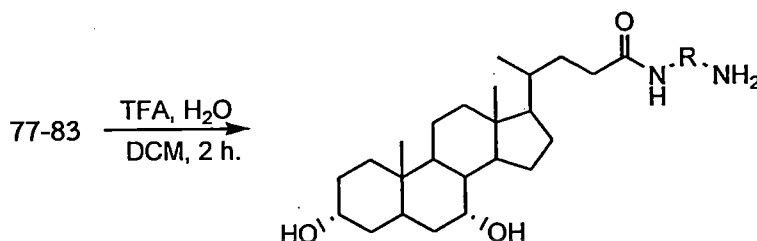
3. นำ column cap ไปตั้งหมუნ เปิดเครื่องตั้งหมუნทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา

4. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไขสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง และล้างเรซินด้วย DCM สลับกับ methanol จากนั้นแช่เรซินใน DCM เป็นเวลา 30 นาที สลับกับแช่ใน methanol เป็นเวลา 30 นาทีเช่นกัน ประมาณ 5-6 ครั้ง

5. นำเม็ดเรซิน 2-3 เม็ด ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กไปทดสอบ โดยใส่รีเอเจนต์ A 3 หยด และรีเอเจนต์ B 1 หยด จากนั้นนำหลอดทดลองนี้ไปให้ความร้อนประมาณ 1 นาที ถ้าเม็ดเรซินไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่าไบลต์แอซิดได้ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนสมบูรณ์แล้ว

4. ปฏิบัติการตัดสารผลิตภัณฑ์ออกจาก Wang resin 68

แผนภาพที่ 3.6



1. นำ column cap ที่มีเรซินที่ได้จากปฏิกิริยา 3 มาเติม trifluoroacetic acid ลงไปประมาณ 1/3 โดยปริมาตรของหลอด จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 2-3 หยด
2. เติม DCM ลงใน column cap จนมีปริมาตรเป็น 2/3 ของหลอด นำ column cap ไปตั้งหมุน เปิดเครื่องตั้งหมุนทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
3. ไขสารละลายจาก column cap ใส่ลงใน vial ที่ทราบน้ำหนัก จากนั้นนำไปปั่นด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อระเหยตัวทำละลายออกจากสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมด
4. นำขวดแก้วเล็กที่มีสารผลิตภัณฑ์ไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ได้
5. นำสารผลิตภัณฑ์ไปตรวจวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method

การทดสอบอนุพันธ์ของ Pregnenolone 1 จะทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method จากหน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสาขาโอบุสวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauer และคณะ[36] ซึ่งวิธีการทดสอบจะคล้ายคลึงกันสรุปได้ดังนี้

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เก็บไว้บน Trypticase Soy Agar (TSA) เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. หลังจากนั้นทำการเชื้อเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูก activated แล้วลงมาใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mcfarland
3. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมได้มาเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Ager อยู่ โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่วจำนวน 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ อยู่บนหน้าวุ้น
4. หลังจากนั้นนำแผ่นดิสก์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มีสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งละลายด้วย DCM วางบนผิววุ้นที่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากนั้นทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. อาหารสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ใช้เป็นชนิด Sabouraud Agar และทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอุณหภูมิและเวลาขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด
6. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone ที่เกิดขึ้น

กรณีทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียใช้ Vancomycin เป็นตัวยาเปรียบเทียบกับ ยีสต์ใช้ Amphotericin B เป็นตัวยาเปรียบเทียบกับ ในแต่ละชุดการทดลองจะใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม จะใช้ทดสอบกับอะมิโนสเตรปโตมัยซิน 58 ถึง 67 และ 84 ถึง 90

ส่วนกรณีทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียใช้ Penicillin Ampicillin Gentamicin Ceftazidime และ Clavulanic acid เป็นตัวยาเปรียบเทียบกับ และกรณีทดสอบกับยีสต์ใช้ Nystatin เป็นตัวยาเปรียบเทียบกับ ในแต่ละชุดการทดลองจะใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม จะใช้ทดสอบกับอะมิโนสเตรปโตมัยซิน 58 ถึง 67

การอ่านผลการทดลองพิจารณา ดังนี้: ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่า หรือเท่ากับ 2 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 5 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับอ่อน (weak) ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับปานกลาง (moderate) และถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับดี (good)

3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์

อะมิโนสเตรปโตมัยซิน 58 ถึง 67 ถูกส่งไปทดสอบที่หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์โดยวิธี MTT assay [37] มีวิธีการทดสอบดังนี้

1. เตรียมเซลล์ไลน์ในอาหาร Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) เสริมด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ FBS โดยเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร
2. เตรียม Stock สารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร ทำการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีช่องผ่านขนาด 0.2 ไมโครเมตร และใส่ขวดแก้วที่ปลอดเชื้อหุ้มขวดแก้วด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสง และเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. เตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆที่ต้องการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 โดยเจือจางเป็นสองเท่า (two-fold dilution) ได้แก่ความเข้มข้น 1,000, 500, 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4. ปลูกเซลล์ไลน์ MCF-7 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในงานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทดสอบ 3 ซ้ำ นำงานเพาะเลี้ยงที่ปลูกเซลล์แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. นำงานเพาะเลี้ยงเซลล์ออกจากตู้บ่ม และดูดอาหารออกจากหลุมให้หมด จากนั้นเติมสารตัวอย่างความเข้มข้นที่กำหนด (กลุ่มควบคุมเป็น 2 กลุ่ม คือ แถวที่ 1 คือความเข้มข้นของ DMSO เจือจางกับอาหาร DMEM และแถวที่ 2 คือเซลล์ปกติซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. เมื่อบ่มเซลล์ในสารตัวอย่างครบ 24 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมที่ทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

7. จากนั้นดูดสารละลาย MTT ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย DMSO : 10 % SDS อัตราส่วน 9 : 1 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อละลายผลึกฟออร์มาซานจะได้สารละลายสีม่วง

8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครโอดอเมตริกเพลทริคเตอร์ ที่ความยาวคลื่นของแผ่นกรองแสงเท่ากับ 570 นาโนเมตร

9. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 เปรียบเทียบกับตัวยาคือ Vinblastine sulfate salt

10. คำนวณหาค่า % Cytotoxicity ของแต่ละความเข้มข้นดังนี้ คือ

$$\% \text{ Cytotoxicity} = [(A-B)/A] \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ไลน์ในสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น

หมายเหตุ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero) ปลูกเซลล์ปริมาตร 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร DMEM

Chenodeoxycholic acid 7 และอนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid 85 ถูกส่งไปทดสอบฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ การทดลองแบ่งออกได้ดังต่อไปนี้

3.4.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านความเป็นพิษของเซลล์

การทดสอบใช้วิธี Sulforhodamine B (SRB) assay เซลล์ที่ใช้ทดสอบคือ เซลล์ปกติ (Vero, African green monkey kidney fibroblast) โดยมีชุดควบคุมคือ 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) และเปรียบเทียบกับตัวยาคือ Ellipticine การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการเจริญเติบโตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างไม่มีผลต่อการต้านความเป็นพิษของเซลล์ (non cytotoxic) และถ้าเซลล์มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อการต้านความเป็นพิษของเซลล์ (cytotoxic) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

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

การทดสอบใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA)[38] ใช้เซลล์ KB (Human epidermoid carcinoma of carcinoma) 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)

3.4.3 ทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (Anti-cancer BC-Breast cancer)

การทดสอบด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA)[38] 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)

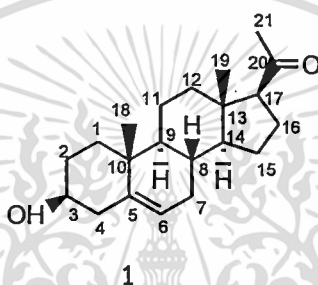
บทที่ 4

ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pregnenolone 1 และ Chenodeoxycholic acid 7 โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันหลัก เพื่อสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอะมิโนสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์ได้

4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pregnenolone 1

สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นคือ Pregnenolone 1 ทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR ได้ผลดังต่อไปนี้



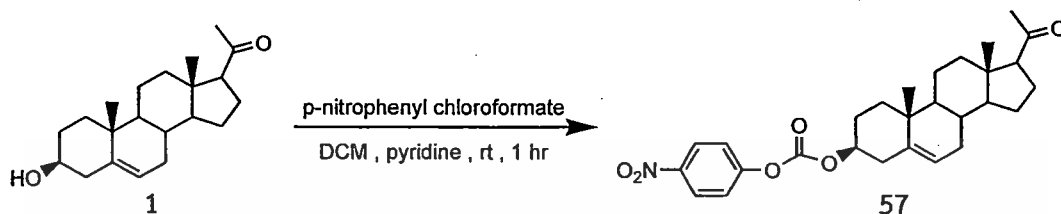
Szendliและคณะ[39]ได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างของ Pregnenolone 1 โดยเทคนิคนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่าสัญญาณ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ 1.84 และ 1.08 (2H, H-1), 1.84 และ 1.48 (2H, H-2), 3.54 (1H, H-3), 2.27 (2H, H-4), 5.34 (1H, H-6), 1.97 และ 1.57 (2H, H-7), 1.46 (1H, H-8), 0.98 (1H, H-9), 1.62 และ 1.47 (2H, H-11), 2.04 และ 1.43 (2H, H-12), 1.17 (1H, H-14), 1.68 และ 1.23 (2H, H-15), 2.19 และ 1.66 (2H, H-16), 2.55 (1H, H-17), 0.63 (3H, H-18), 1.00 (2H, H-19) และ 2.11 (3H, H-21); ^{13}C NMR (75.5 MHz) : δ 37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.3 (C-4), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 31.8 (C-7), 31.9 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 21.1 (C-11), 38.9 (C-12), 44.0 (C-13), 56.9 (C-14), 24.5 (C-15), 22.9 (C-16), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.4 (C-19), 209.4 (C-20) และ 31.5 (C-21) เมื่อนำข้อมูลเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ ^1H NMR และ ^{13}C NMR กับ Pregnenolone 1 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ของบริษัท Fluka ได้ผล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับข้อมูลของ Szendliและคณะ[39] ได้เสนอไว้ดังนี้ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ; δ 1.20 และ 1.14 (2H, t, H-1), 1.84 และ 1.81 (2H, m, H-2), 3.52 (1H, m, H-3), 2.29 (2H, d, H-4), 5.35 (1H, d, H-6), 1.85 (2H, m, H-7), 1.49 (1H, d, H-8), 1.19-1.10 (1H, m, H-9), 1.66-1.58 (2H, m, H-11), 1.69 (2H, t, H-12), 1.24-1.14 (1H, m, H-14), 1.53-1.44 (2H, m, H-15), 2.05 (2H, m, H-16), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19) และ 2.13 (3H, s, H-21) และ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ; δ 37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 140.8 (C-5), 121.3 (C-6), 31.7 (C-7), 31.8 (C-8), 49.9 (C-9), 36.5 (C-10), 21.0 (C-11), 38.8 (C-12), 44.0 (C-13), 56.9 (C-14), 24.4 (C-15), 22.8 (C-16), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20) และ 31.5 (C-21)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

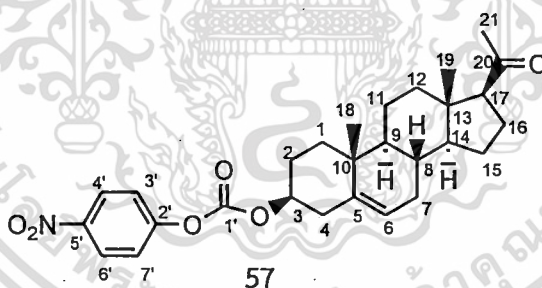
4.1.1 การสังเคราะห์ 4-Nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57

การสังเคราะห์เริ่มจากหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 ของ Pregnenolone 1 ถูกกระตุ้นให้เป็นหมู่หลุดออกที่ติดด้วยรีเอเจนต์คือ *p*-nitrophenyl chloroformate

แผนภาพที่ 4.1



ผลทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย เป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.62 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 97 : 3 ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 165-168 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 92.41 เปอร์เซ็นต์ ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 2945 (C-H stretch ของหมู่ CH_2 และ CH_3), 1762 (C=O stretch ของหมู่คาร์บอนเนต), 1702 (C=O stretch ของหมู่คีโต), 1524-1491 (C=C stretch ของแอรอมาติก) และ 1254-1216 (C-O stretch)



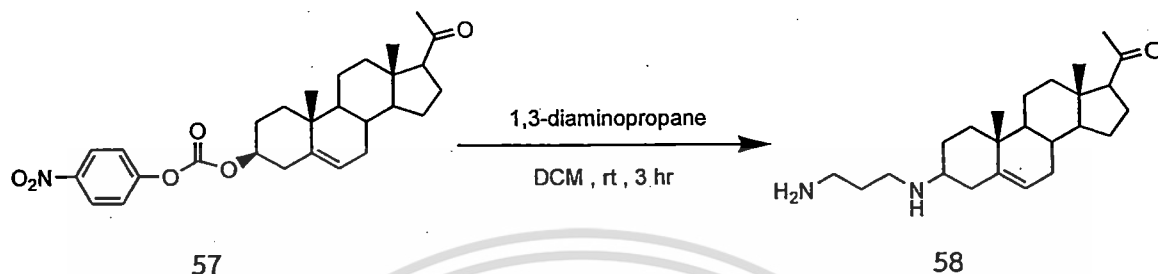
สเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 57 พบสัญญาณที่ ^1H NMR δ 4.64 (1H, m, H-3), 2.19 (2H, d, H-4), 5.44 (1H, d, H-6), 2.55 (1H, t, H-17), 0.65 (3H, s, H-18), 1.06 (3H, s, H-19), 2.14 (3H, s, H-21), 7.39 (2H, d, $J_{3',4'} = 7.1$ Hz, H-3' และ H-7'), 8.29 (2H, d, $J_{4',3'} = 7.1$ Hz, H-4' และ H-6') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.09 ถึง 1.16 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัมของ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 57 พบสัญญาณที่ δ 79.5 (C-3), 138.8 (C-5), 123.2 (C-6), 49.9 (C-9), 21.0 (C-1), 56.8 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.2 (C-19), 209.4 (C-20), 155.6 (C-1'), 145.3 (C-2'), 121.7 (C-3') และ (C-7'), 125.2 (C-4' และ C-6'), 151.7 (C-5') และสัญญาณที่ปรากฏอยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

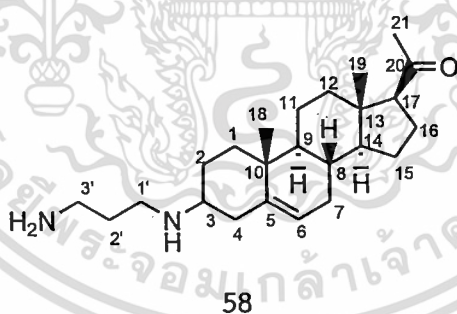
4.1.2 การสังเคราะห์ 3-(1,3-Diaminopropyl)-pregn-5-en-20-one 58

สาร 58 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diaminopropane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.2



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin layer chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.26 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 76 : 24 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 109-112 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 10.90 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBR) cm^{-1} : 3355 (N-H stretch ของเอมีน), 2940 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1438 (C-H bend) และ 1357 (C-H bend)



สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 58 พบสัญญาณที่ δ 3.23 (1H, br.s, H-3), 5.38 (1H, d, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.38 ถึง 1.14 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 58 พบสัญญาณที่ δ 74.3 (C-3), 139.8 (C-5), 122.2 (C-6), 49.9 (C-9), 56.9 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 44.0 ถึง 21.1 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

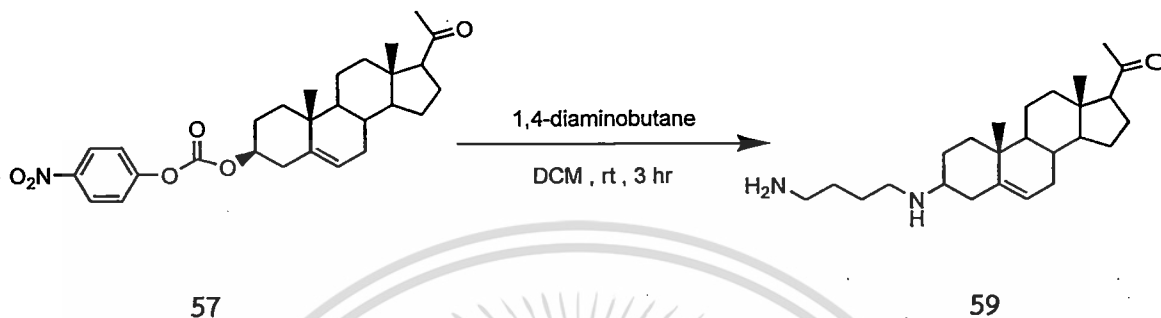
ES-MS : $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}$ Calcd. 372.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 371.6 (23%) และ 341.8 (24.2%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

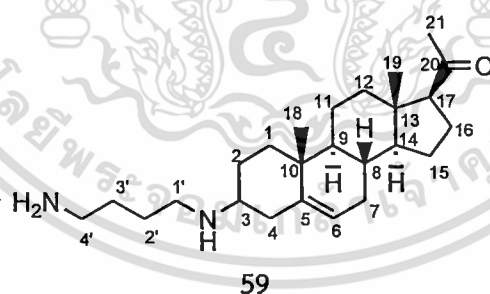
4.1.3 สารสังเคราะห์ 3-(1,4-Diaminobutyl)-pregn-5-en-20-one 59

สาร 59 เตรียมจาก 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 ทำปฏิกิริยากับ 1,4-diaminobutane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.3



ผลการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.39 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 77 : 23 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 128-131 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 28.80 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3363 (N-H stretch ของเอมีน), 2936 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1453 (CH_2 bend) และ 1357 (CH_3 bend)



สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 59 พบสัญญาณที่ δ 3.17 (1H, br.s, H-3), 5.38 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.62 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.12 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.35 ถึง 1.10 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 59 พบสัญญาณที่ δ 74.1 (C-3), 139.8 (C-5), 122.1 (C-6), 49.8 (C-9), 21.0 (C-11), 56.9 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

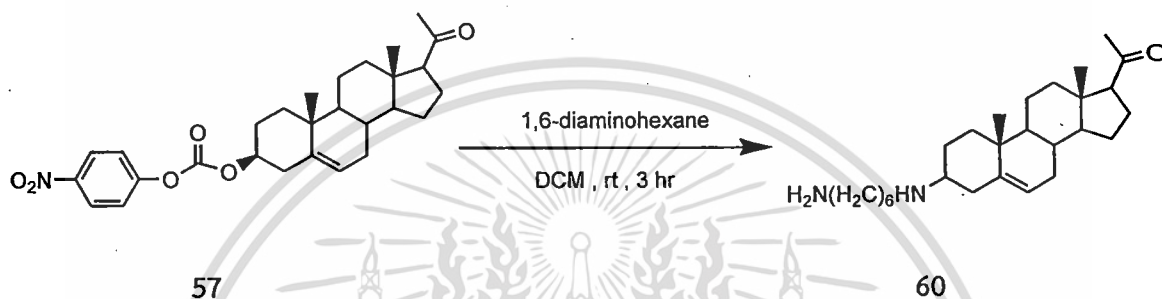
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ES-MS : $C_{25}H_{42}N_2O$ Calcd. 386.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ (3.1%), 370.7 (2.0%) และ 314.0 (1.2%)

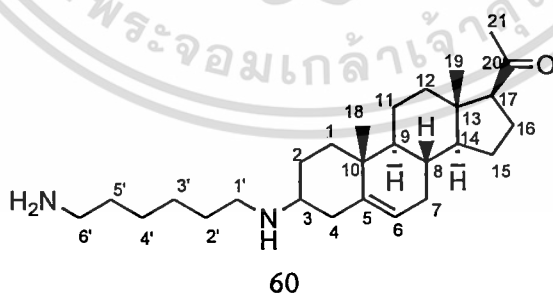
4.1.4 การสังเคราะห์ 3-(1,6-Diaminohexyl)-pregn-5-en-20-one 60

สาร 60 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 ทำปฏิกิริยากับ 1,6-diaminohexane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.4



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.38 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 84 : 16 ได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 92-95 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 12.13 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3362 (N-H stretch ของ เอมีน), 2936 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1453 (CH_2 bend) และ 1357 (CH_3 bend)



สเปกตรัม 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร 60 พบสัญญาณที่ δ 3.15 (1H, m, H-3), 5.36 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.34 ถึง 1.11 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 60 พบสัญญาณที่ δ 74.1 (C-3), 139.9 (C-5), 122.1 (C-6), 49.9 (C-9), 21.1 (C-11), 56.9 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

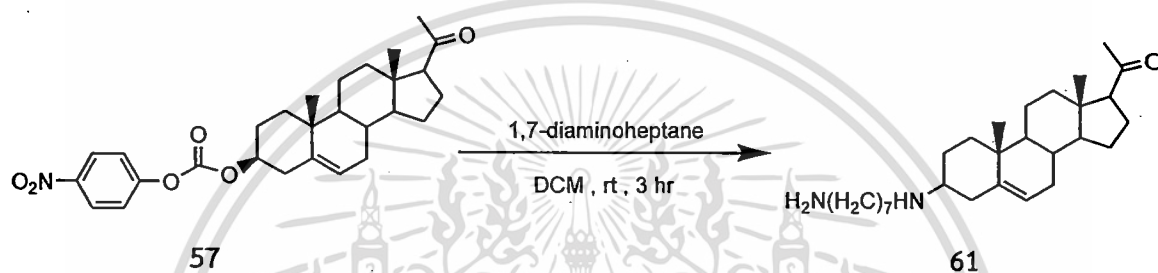
209.62 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 49.4 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $C_{27}H_{46}N_2O$ Calcd. 414.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 414.0 (2.0%), 369.7 (1.2 %) และ 342.0 (1.4%)

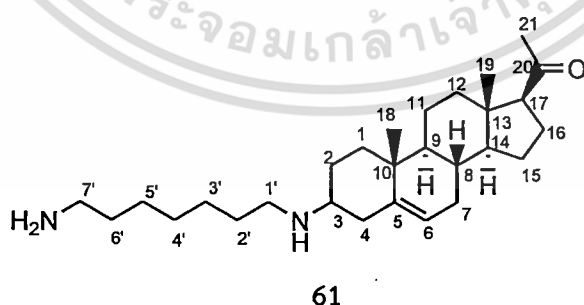
4.1.5 การสังเคราะห์ 3-(1,7-Diaminoheptyl)-pregn-5-en-20-one 61

สาร 61 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 ทำปฏิกิริยากับ 1,7-diaminoheptane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.5



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.36 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 87 : 13 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 175-178 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับเท่ากับ 18.74 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3359 (N-H stretch ของ เอมีน), 2927 (C-H stretch ของ CH_2), 2852 (C-H stretch ของ CH_3), 1698 (C=O stretch), 1455 (CH_3 bend) และ 1357 (CH_2 bend)



สเปกตรัม 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร 61 พบสัญญาณที่ δ 3.08 ppm (1H, m, H-3), 5.30 (1H, br.t, H-6) , 2.47 (1H, t, H-17), 0.56 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, s, H-19) , 2.06 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่าเท่ากับ 2.37 ถึง 1.04 ppm เป็น multiple ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 61 พบสัญญาณที่ δ 73.1 (C-3),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

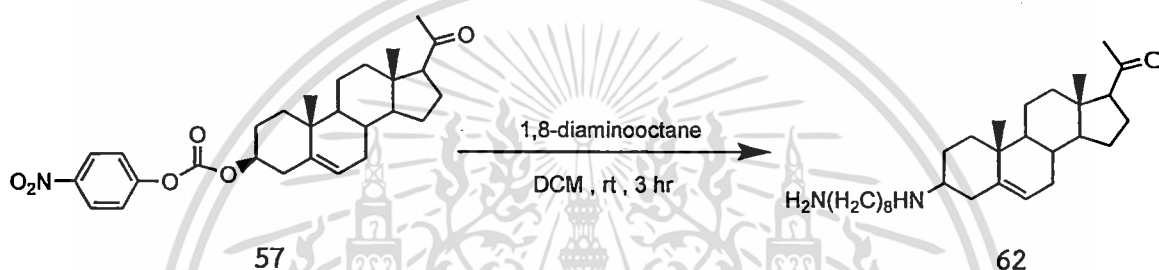
138.9 (C-5), 121.1 (C-6), 48.9 (C-9), 55.8 (C-14), 62.7 (C-17), 12.2 (C-18), 18.3 (C-19), 208.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 42.9 ถึง 20.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $C_{28}H_{48}N_2O$ Calcd. 428 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 428.0 (5.4%) และ 413.1 (22.9%)

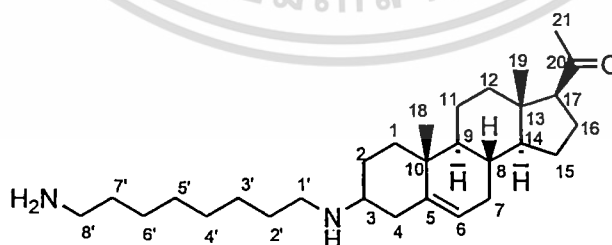
4.1.6 การสังเคราะห์ 3-(1,8-Diaminooctyl)-pregn-5-en-20-one 62

สาร 62 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 ทำปฏิกิริยากับ 1,8-diaminoheptane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.6



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.38 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 89 : 11 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวใส มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 156-159 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 19.54 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3353 (N-H stretch ของ เอมีน), 2933 (C-H stretch ของ CH_2), 2852 (C-H stretch ของ CH_3), 1703 (C=O stretch), 1455 (CH_2 bend) และ 1381 (CH_3 bend)



62

สเปกตรัม 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร 62 พบสัญญาณที่ δ 3.14 (1H, br.d, H-3), 5.38 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.38 ถึง 1.11 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ

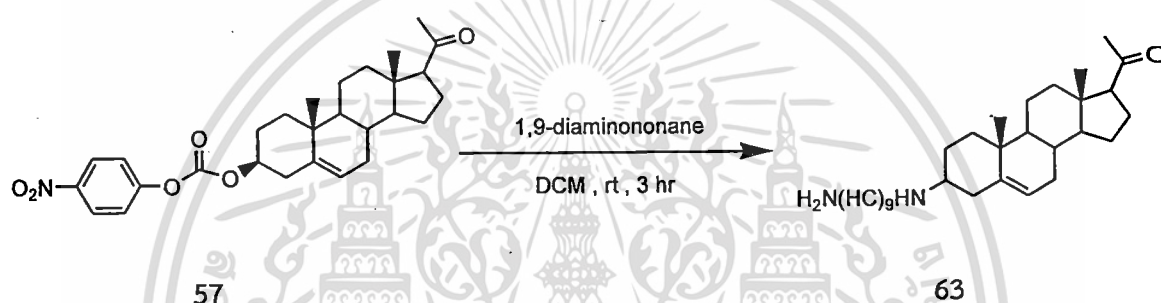
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

methylene และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 62 พบสัญญาณที่ δ 74.0 (C-3), 139.9 (C-5), 122.1 (C-6), 49.9 (C-9), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.32 (C-19), 209.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 42.9 ถึง 20.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne
 ES-MS : $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}$ Calcd. 442.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 442.0 (4.8%) และ 344.0 (7.0%)

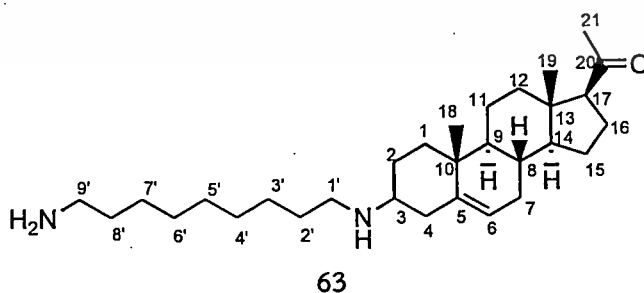
4.1.7 การสังเคราะห์ 3-(1,9-Diaminononyl)-pregn-5-en-20-one 63

สาร 63 เตรียมจากสาร 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 ทำปฏิกิริยากับ 1,9-diaminononane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.7



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.38 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 88 : 12 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 82-85 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 15.31 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบกับ Pregnenolone 1) และยืนยันโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ 63 ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีสรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBR) cm^{-1} : 3357 (N-H stretch ของหมู่เอมีน), 2926 (C-H stretch ของหมู่ CH_2), 2852 (C-H stretch ของหมู่ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1466 (CH_2 bend) และ 1380 (CH_3 bend)



สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 63 พบสัญญาณที่ δ 3.08 (1H, m, H-3), 5.41 (1H, br.t, H-6), 2.66 (1H, t, H-17), 0.64 (3H, s, H-18), 1.05 (3H, s, H-19), 2.14 (3H, s, H-2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

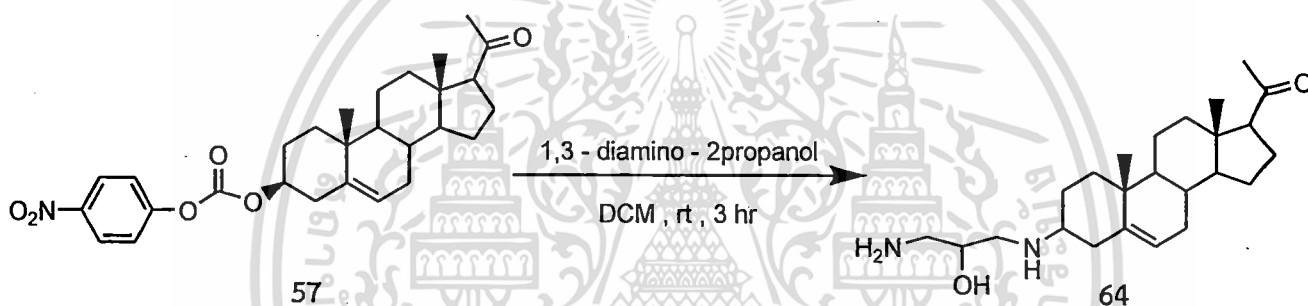
และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.34 ถึง 1.11 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 63 พบสัญญาณที่ δ 73.9 (C-3), 139.9 (C-5), 121.8 (C-6), 50.1 (C-9), 56.7 (C-14), 63.3 (C-17), 12.2 (C-18), 18.4 (C-19), 210.9 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 48.4 ถึง 20.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}$ Calcd. 456.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 456.0 (1.9%), 412.0 (2.0%) และ 384.6 (6.8%)

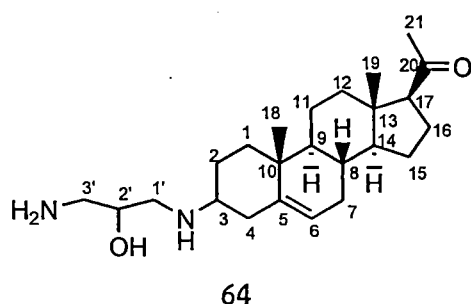
4.1.8 การสังเคราะห์ 3-(1,3-Diaminopropyl-2-ol)-pregn-5-en-20-one 64

สาร 64 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diamino-2-propanol โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.8



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.07 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 70 : 30 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 103-106 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 29.57 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปข้อมูลได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3379 (N-H และ O-H stretch ของ เอมีน และ แอลกอฮอล์), 2918 (C-H stretch ของ CH_2), 2845 (C-H stretch ของ CH_3), 1698 (C=O stretch) และ 1384 (CH_3 bend)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

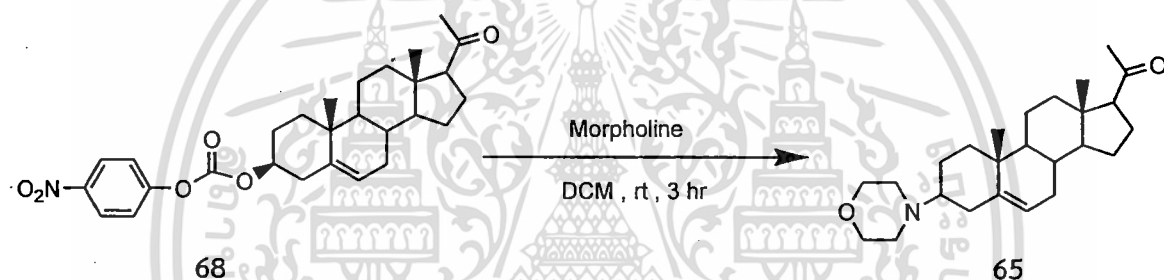
สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **64** พบสัญญาณที่ δ 3.78 (1H, br.s, H-3), 5.36 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21), 3.26 (1H, s, H-2') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.33 ถึง 1.10 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **64** พบสัญญาณที่ δ 74.7 (C-3), 139.7 (C-5), 122.3 (C-6), 49.9 (C-9), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20), 70.6 (C-2') และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 45.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_2$ Calcd. 388.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 314.0 (14.0%)

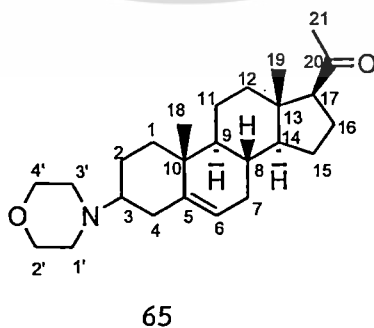
4.1.9 การสังเคราะห์ 3-Morpholinopregn-5-en-20-one **65**

สาร **65** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **57** ทำปฏิกิริยากับ morpholine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.9



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.50 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 156-159 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 83.89 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **1**) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปข้อมูลได้ดังนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

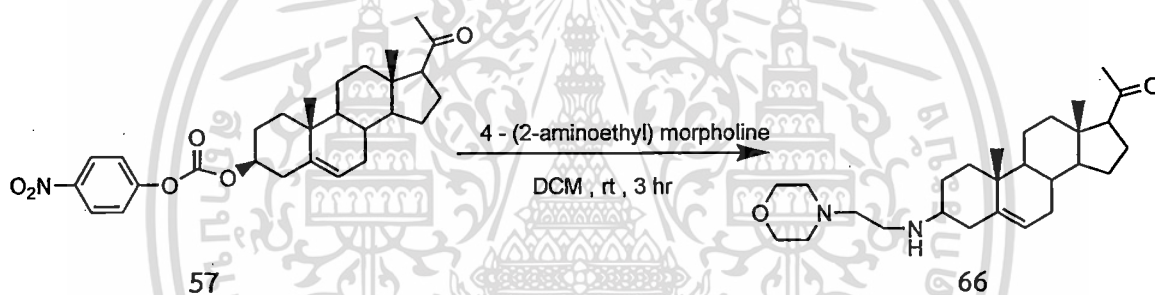
สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 65 พบสัญญาณที่ δ 3.47 (1H, br.d, H-3), 5.37 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21), 3.65 (4H, s, H-2' และ H-3') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.37 ถึง 1.12 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 65 พบสัญญาณที่ δ 74.9 (C-3), 139.8 (C-5), 122.2 (C-6), 49.8 (C-9), 56.8 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.4 (C-20), 65.6 (C-2' และ C-3') และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 45.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{NO}_2$ Calcd. 385.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 299.0 (3.0%)

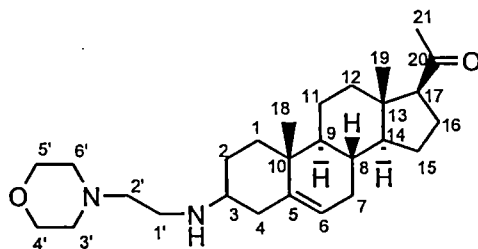
4.1.10 การสังเคราะห์ 3-(4-(2-Aminoethyl) morpholino)-pregn-5-en-20-one 66

สาร 66 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 มาทำปฏิกิริยากับ 4-(2-aminoethyl) morpholine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.10



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.05 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 35 ได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 95-98 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 37.44 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3357 (N-H stretch ของเอมีน), 2943 (C-H stretch ของ CH_2), 1702 (C=O stretch), 1455 (CH_2 bend) และ 1357 (CH_3 bend)



66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

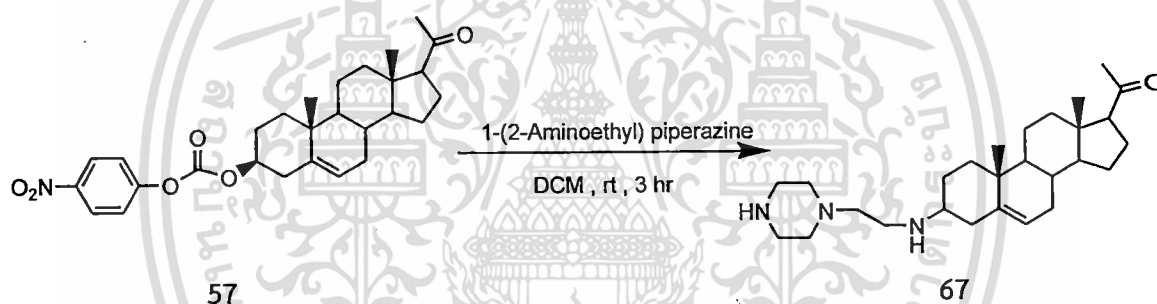
สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 66 พบสัญญาณที่ δ 3.28 (1H, br.d, H-3), 5.37 (1H, br. s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21), 2.47 (4H, t, H-3' และ H-6'), 3.71 (4H, s, H-4' และ H-5') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.37 ถึง 1.12 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 66 พบสัญญาณที่ δ 74.2 (C-3), 139.8 (C-5), 122.2 (C-6), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20), 57.5 (C-1'), 53.4 (C-3' และ C-6'), 66.9 (C-4' และ C-5') และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 53.4 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_2$ Calcd. 428.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 418.6 (26.3%)

4.1.11 การสังเคราะห์ 3-(2-Piperazin-1-yl-ethyl)-pregn-5-en-20-one 67

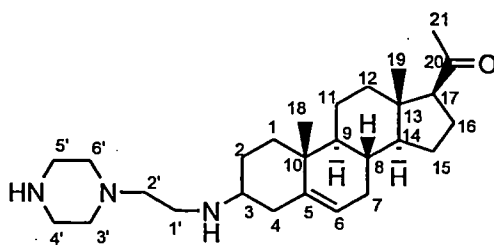
สาร 67 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 ทำปฏิกิริยากับ 1-(2-Aminoethyl) piperazine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.11



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.16 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 60 : 40 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 141-144 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 16.24 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3378 (N-H stretch ของ เอมีน), 2925 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1704 (C=O stretch) และ 1433 (CH_2 bend)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



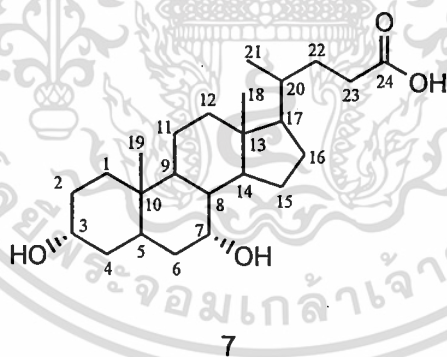
67

สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 67 พบสัญญาณที่ δ 3.48 (1H, br. s, H-3), 5.37 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.43 ถึง 1.16 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 67 พบสัญญาณที่ δ 74.8 (C-3), 140.0 (C-5), 122.2 (C-6), 49.9 (C-9), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne
ES-MS : $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}$ Calcd. 427.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 313.4 (1.0%)

4.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid 7

สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นคือ Chenodeoxycholic acid 7 ทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR ได้ผลดังต่อไปนี้

กรดคีโนไดออกซีโคลิก 7



7

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.56 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 6.3$ Hz, H-21), 0.98-1.89 (m, $-\text{CH}_2$), 2.01-2.25 (m, $-\text{CH}_2$), 3.16-3.17 (1H, m, H-3 β) และ 3.66 (1H, m, H-7 β)

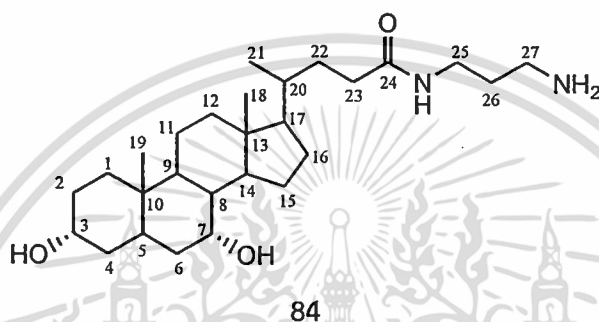
^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.3 (C-18), 18.9 (C-21), 21.8 (C-11), 23.5 (C-15), 24.6 (C-19), 29.2 (C-16), 31.4 (C-2), 32.0 (C-22), 32.3 (C-23), 34.0 (C-9), 35.9 (C-10), 36.2 (C-1), 36.6 (C-6), 36.8 (C-20), 40.5 (C-4), 40.8 (C-8), 41.1 (C-12), 43.2 (C-5), 43.7 (C-13), 51.5 (C-14), 57.3 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 178.1 (C-24)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลจากการวิเคราะห์โครงสร้างของ Chenodeoxycholic acid 7 ด้วยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR ที่แสดงไว้ข้างต้นนั้น สามารถนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างของอนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid 7 ที่สังเคราะห์ได้ โดยสามารถสังเกตจากการเปลี่ยนแปลง คือ ค่า chemical shift ของ ^{13}C NMR ของหมู่เอไมด์ (-CONH) จะปรากฏสัญญาณที่ δ 176.0-177.0 ppm และสามารถตรวจสอบได้อย่างชัดเจนจากมวลโมเลกุลของอนุพันธ์อะมิโนเอไมด์สังเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรสโกปี ข้อมูลของอะมิโนเอไมด์สังเคราะห์แสดงได้ดังต่อไปนี้

4.2.1 การสังเคราะห์ *N*-(3-Aminopropyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

84



สาร 84 สังเคราะห์จาก Chenodeoxycholic 7 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diaminopropane สาร 84 มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 70.00 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 84 ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{max} 1200 (C-N stretching), 1678 (C=O stretching ของ CONH), 2851, 2918 (C-H stretching) และ 3434 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

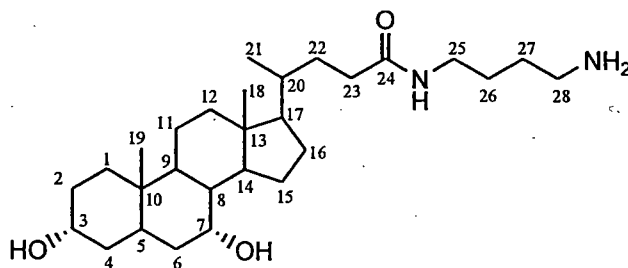
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.61 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 3.8$ Hz, H-21), 1.14-2.13 (m, $-\text{CH}_2$), 2.85 (2H, m, H-27), 2.94 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-25), 3.20-3.21 (1H, m, H-3 β), 3.71 (1H, m, H-7 β), และ 7.99 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.1 (C-18), 18.8 (C-21), 21.7 (C-11), 23.1 (C-15), 24.5 (C-19), 28.7 (C-26), 28.8 (C-16), 31.1 (C-2), 33.2 (C-22), 33.9 (C-23), 34.0 (C-9), 35.6 (C-25), 35.7 (C-10), 36.2 (C-1), 36.6 (C-6), 36.9 (C-20), 37.9 (C-27), 40.5 (C-4), 40.8 (C-8), 41.1 (C-12), 43.2 (C-5), 44.0 (C-13), 51.7 (C-14), 57.1 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 177.7 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 449.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (67%)

4.2.2 การสังเคราะห์ *N*-(4-Aminobutyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

85



85

สาร 85 สังเคราะห์จาก Chenodeoxycholic acid 7 ทำปฏิกิริยากับ 1,4-diaminobutane สาร 85 มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 75.45 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 85 ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{\max} 1202 (C-N stretching), 1634 (C=O stretching ของ CONH), 2868, 2929 (C-H stretching) และ 3417 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

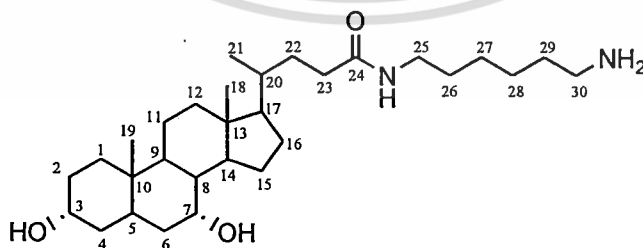
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.64 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-21), 0.99-2.15 (m, $-\text{CH}_2$), 2.87 (2H, m, H-28), 3.12 (2H, m, H-25), 3.23-3.24 (1H, m, H-3 β), 3.73 (1H, m, H-7 β), และ 7.93 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.1 (C-18), 18.8 (C-21), 21.7 (C-11), 23.1 (C-15), 24.6 (C-19), 25.9 (C-26), 27.5 (C-27), 29.0 (C-16), 31.4 (C-2), 33.2 (C-22), 34.0 (C-23), 34.0 (C-9), 35.6 (C-10), 36.2 (C-1), 36.6 (C-6), 36.8 (C-20), 39.4 (C-25), 40.3 (C-28), 40.5 (C-4), 40.8 (C-8), 41.0 (C-12), 43.3 (C-5), 43.7 (C-13), 51.8 (C-14), 57.1 (C-17), 69.0 (C-7), 72.2 (C-3) และ 177.0 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 463.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (13%)

4.2.3 การสังเคราะห์ *N*-(6-Aminoethyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

86



86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร 86 สังเคราะห์จาก Chenodeoxycholic acid 7 ทำปฏิกิริยากับ 1,6-diaminohexane สาร 86 มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 70.91 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 86 ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

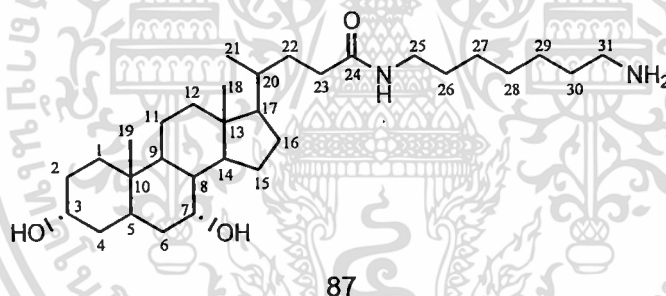
IR : ν_{\max} 1202 (C-N stretching), 1638 (C=O stretching ของ CONH), 2862, 2918 (C-H stretching) และ 3404 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.55 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, s, H-21), 1.02-2.07 (m, $-\text{CH}_2$), 2.74 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-30), 2.99 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-25), 3.26 (1H, m, H-3 β), 3.63 (1H, m, H-7 β), และ 7.86 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.1 (C-18), 18.8 (C-21), 21.7 (C-11), 23.2 (C-15), 24.5 (C-19), 27.0 (C-26), 27.4 (C-29), 29.0 (C-16), 30.2 (C-28), 31.1 (C-2), 33.3 (C-22), 34.0 (C-23), 34.1 (C-9), 35.6 (C-10), 35.8 (C-27), 36.2 (C-1), 36.6 (C-6), 36.8 (C-20), 37.0 (C-25), 40.6 (C-4), 40.7 (C-30), 40.8 (C-8), 41.1 (C-12), 43.2 (C-5), 44.0 (C-13), 51.7 (C-14), 57.1 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 176.8 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 491.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (49%)

4.2.4 การสังเคราะห์ *N*-(7-Aminoheptyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide 87



87

สาร 87 สังเคราะห์จาก Chenodeoxycholic acid 7 ทำปฏิกิริยากับ 1,7-diaminoheptane สาร 87 มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 47.27 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 87 ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{\max} 1202 (C-N stretching), 1669 (C=O stretching ของ CONH), 2868, 2922 (C-H stretching) และ 3434 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.59 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, s, H-21), 1.05-2.10 (m, $-\text{CH}_2$), 2.78 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-31), 3.02 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-25), 3.18 (1H, m, H-3 β), 3.67 (1H, m, H-7 β), และ 7.95 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.1 (C-18), 18.8 (C-21), 21.7 (C-11), 23.2 (C-15), 24.5 (C-19), 27.4 (C-26), 28.5 (C-30), 29.0 (C-16), 29.8 (C-29), 31.1 (C-2), 33.3 (C-22), 33.5 (C-28), 34.0 (C-23), 34.1 (C-9), 35.6 (C-10), 35.8 (C-27), 36.2 (C-1), 36.6 (C-6), 36.8 (C-20),

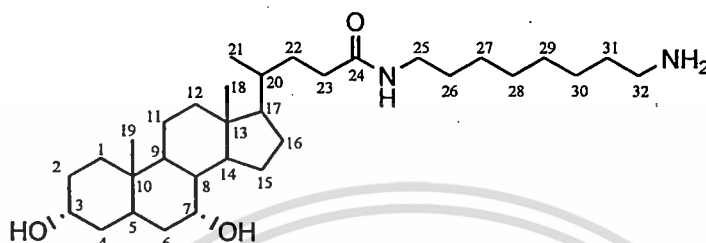
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

37.0 (C-25), 40.2 (C-4), 40.7 (C-31), 40.8 (C-8), 41.1 (C-12), 43.2 (C-5), 44.0 (C-13), 51.7 (C-14), 57.1 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 176.7 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 505.6 $[M+H]^+$ (28%)

4.2.5 การสังเคราะห์ *N*-(8-Aminooctyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

88



88

สาร 88 สังเคราะห์จาก Chenodeoxycholic acid 7 ทำปฏิกิริยากับ 1,8-diaminooctane สาร 88 มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 56.36 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 88 ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : V_{max} 1202 (C-N stretching), 1639 (C=O stretching ของ CONH), 2857, 2921 (C-H stretching) และ 3366 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

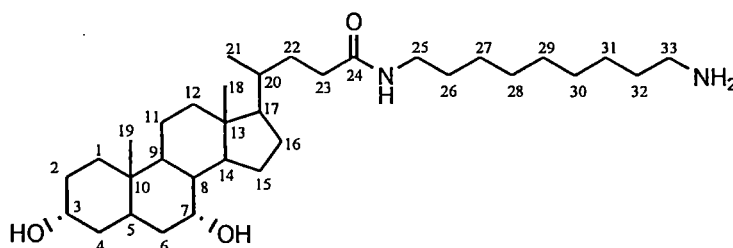
1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.56 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J_{H_{21},H_{20}} = 4.8$ Hz, H-21), 1.01-2.08 (m, $-CH_2$), 2.75 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-32), 2.99 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-25), 3.16 (1H, m, H-3 β), 3.65 (1H, m, H-7 β), และ 7.93 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.1 (C-18), 18.8 (C-21), 21.7 (C-11), 23.2 (C-15), 24.5 (C-19), 27.4 (C-26), 27.8 (C-31), 29.0 (C-16), 30.1 (C-28), 30.1 (C-29), 30.4 (C-30), 31.1 (C-2), 33.3 (C-22), 34.0 (C-23), 34.1 (C-9), 35.5 (C-10), 35.6 (C-27), 36.2 (C-1), 36.6 (C-6), 36.8 (C-20), 39.2 (C-25), 40.3 (C-4), 40.8 (C-8), 40.8 (C-32), 41.1 (C-12), 43.2 (C-5), 44.0 (C-13), 51.7 (C-14), 57.1 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 176.7 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 519.6 $[M+H]^+$ (37%)

4.2.6 การสังเคราะห์ *N*-(9-Aminononyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

89



89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร 89 สังเคราะห์จาก chenodeoxycholic acid 7 ทำปฏิกิริยากับ 1,9-diaminononane สาร 89 มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 59.46 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 89 ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

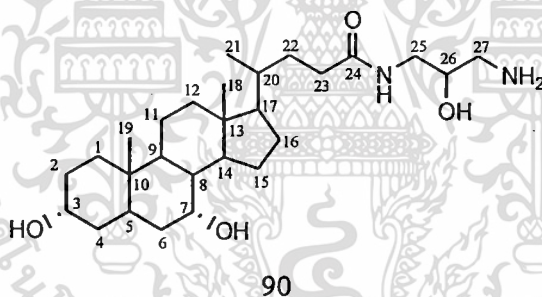
IR : ν_{\max} 1202 (C-N stretching), 1642 (C=O stretching ของ CONH), 2862, 2922 (C-H stretching) และ 3389 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.59 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 5.7$ Hz, H-21), 1.06-2.19 (m, $-\text{CH}_2$), 2.81 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-33), 3.05 (2H, m, H-25), 3.22 (1H, m, H-3 β), 3.70 (1H, m, H-7 β), และ 7.99 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.2 (C-18), 18.9 (C-21), 21.8 (C-11), 23.4 (C-15), 24.7 (C-19), 27.4 (C-26), 27.9 (C-32), 28.6 (C-16), 29.3 (C-31), 30.1 (C-28), 30.1 (C-30), 30.4 (C-29), 31.4 (C-2), 33.5 (C-22), 34.1 (C-23), 34.2 (C-9), 35.8 (C-10), 35.3 (C-27), 36.3 (C-1), 36.6 (C-6), 36.9 (C-20), 39.2 (C-25), 40.3 (C-4), 40.5 (C-8), 40.8 (C-33), 41.1 (C-12), 43.2 (C-5), 43.7 (C-13), 51.6 (C-14), 57.4 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 176.7 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 533.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100%)

4.2.7 การสังเคราะห์ *N*-(3-Amino-2-hydroxypropyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide 90



สาร 90 สังเคราะห์จาก Chenodeoxycholic acid 7 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diamino-2-propanol สาร 90 มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 74.55 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 90 ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{\max} 1216 (C-N stretching), 1642 (C=O stretching ของ CONH), 2868, 2927 (C-H stretching) และ 3389 (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), 0.92 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 4.6$ Hz, H-21), 1.04-2.14 (m, $-\text{CH}_2$), 2.83 (2H, m, H-27), 3.00 (2H, m, H-25), 3.17 (2H, m, H-3 β และ H-26), 3.72 (1H, m, H-7 β), และ 7.93 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.1 (C-18), 18.8 (C-21), 21.7 (C-11), 23.9 (C-15), 24.5 (C-19), 29.0 (C-16), 31.1 (C-2), 33.1 (C-22), 33.8 (C-23), 33.9 (C-9), 35.5 (C-10), 35.8 (C-1), 36.2 (C-6), 36.9 (C-20), 40.7 (C-4), 40.8 (C-8), 41.0 (C-12), 42.8 (C-5), 43.7 (C-25),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43.9 (C-27), 44.0 (C-13), 51.6 (C-14), 57.0 (C-17), 68.0 (C-26), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 177.8 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 465.5 $[M+H]^+$ (20%)

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

Pregnenolone 1 และอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยการพิจารณาจากบริเวณการเกิดวงใส (Clear zone) ณ หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์รวมทั้งหมด 6 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในสภาวะแวดล้อมและสามารถก่อเกิดโรคกับมนุษย์ได้ ซึ่งแต่ละชนิดมีโทษดังนี้ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบการปนเปื้อนในอาหารและเครื่องสำอาง ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษและโรคติดเชื้อที่ผิวหนังซึ่งอาจลุกลามเข้าสู่กระแสเลือดได้ *M. luteus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้อาหารเสื่อมเสีย เช่นการเสื่อมเสียของนม อาหารกระป๋อง นอกจากนั้นยังพบว่า *B. subtilis* สามารถนำมาใช้ในการหมักอาหาร *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์รวมทั้งคน พบได้ในดิน ผิวหนังและในสภาวะแวดล้อมอื่นๆ อยู่ได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมปกติและสภาพออกซิเจนต่ำ ในสัตว์จะเข้าทำลายเนื้อเยื่อที่มีภูมิคุ้มกันต่ำลง และ *C. albicans* เป็นยีสต์ชนิดหนึ่ง ซึ่งก่อให้เกิดโรคประเภทเชื้อฉวยโอกาสในคน โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเอดส์ จากผลการทดลอง พบว่าไม่ปรากฏวงใส (Clear zone) ของ Pregnenolone 1 และอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ซึ่งถือว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่กล่าวมา

นอกจากนั้น Pregnenolone 1 และอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ ณ ภาควิชาโอสถวิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ รวมทั้งหมด 12 ชนิด เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Streptococcus milleri* group, *S. coagulase* negative, *S. aureus* (MRSA) 20625 *S. aureus* (MRSA) 20626, *S. aureus* (MRSA) 20627, *S. aureus* (MRSA) 20633, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623, *S. aureus* (VRSA) 20683, *S. aureus* ATCC 25923 และแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Bordetella pertussis* โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มนี้ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อทางช่องปาก การอักเสบของผิวหนัง ปอดบวม เยื่อหู หัวใจอักเสบและเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด พบได้ที่ผิวหนัง จมูก การกระจายเชื้อโดยการสัมผัสและผ่านทางลมหายใจ ปัจจุบันพบว่าเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* ตี้อต่อยา Methicillin (MRSA) และ Vancomycin (VRSA) เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรณในมนุษย์ จากการทดลองพบว่า ผลการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ให้ผลการทดลองทำเดียวกันคือ พบวงใสมีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 5 มิลลิเมตร ซึ่งถือว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่กล่าวมา

อนุพันธ์สเตียรอยด์ของ Chenodeoxycholic acid 7 ได้แก่สเตียรอยด์ 84-90 ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ ณ ภาควิชาโษษุรวิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อราและยีสต์ รวมทั้งหมด 35 ชนิด เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Streptococcus milleri* group, *S. sobrinus*, *S. pneumoniae*, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coagulase* negative, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* MRSA 20653, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20622, *S. aureus* VRSA 20623, *S. aureus* VRSA 20624, *S. aureus* VRSA 21083, *Bacillus subtilis* ATCC 26633, *Corynebacterium diphtheriae* และ *Enterococcus faecalis* 4373 (VRE) แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholera*, *V. paraheamolyticus* เชื้อราได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* และยีสต์ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231, *C. krusei* และ *C. tropicalis* โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method รายงานผลด้วยค่า MIC (Minimal Inhibition Concentration) หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา (หรือสารตัวอย่าง) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า Chenodeoxycholic acid 7 ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ยกเว้น *B. subtilis* ATCC 26633 และ *B. pertussis* มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

โดยภาพรวมเมื่อเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Chenodeoxycholic acid เลือกลงเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลเป็นหมู่เอไมด์ โดยการนำ Chenodeoxycholic acid 7 ทำปฏิกิริยากับไดเอมีนที่มีความยาวของสายโซ่แตกต่างกัน สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ได้สารทั้งหมด 7 ชนิด ความแตกต่างของอนุพันธ์ทั้ง 7 คือความยาวของสายโซ่ที่จะมีการเพิ่มหมู่เมทิลีนทีละ 1 หมู่ จากการทดลองพบว่า อนุพันธ์สเตียรอยด์ 84-90 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียดีมากกว่า Chenodeoxycholic acid 7 จากตารางที่ 4.2 สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

สเตียรอยด์ 84 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. milleri* group มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. mutans* ATCC 27175 และ *S. coagulase* negative มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *C. diphtheria* มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* VRSA 20622 และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สเตียรอยด์ 85 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. coagulase* negative, *C. diphtheria*, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20654 และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *S. sobrinus*, *S. aureus* VRSA 20622 และ *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *V. paraheamolyticus* มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *S. aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ATCC 25923, *B. pertussis*, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* VRSA 20623 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *B. subtilis* ATCC 26633, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20633 และ *S. aureus* MRSA 20636 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สเตียรอยด์ 86 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. mutans* ATCC 27175 และ *S. coag negative* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *C. diphtheria* มีค่า MIC เท่ากับ 3.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. aureus* VRSA 20622, *S. aureus* VRSA 20623 และ *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *S. aureus* MRSA 20628 และ *S. aureus* MRSA 20654 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. aureus* ATCC 25923, *V. paraheamolyticus*, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20652 และ *S. aureus* MRSA 20653 มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. sobrinus* และ *S. aureus* MRSA N1 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สเตียรอยด์ 87 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheria* มีค่า MIC เท่ากับ 3.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coag negative*, *S. sobrinus*, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20654 และ *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. aureus* VRSA 20622 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *V. paraheamolyticus*, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* VRSA 20623 และ *E. faecalis* 4737 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *B. pertussis*, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 26633, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20635 และ *S. aureus* MRSA 20653 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สเตียรอยด์ 88 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheria* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coag negative*, *S. aureus* MRSA 20627 และ *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. sobrinus*, *V. paraheamolyticus*, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20622 และ *E. faecalis* 4737 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *B. pertussis*, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* VRSA 20623 และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 26633, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20635 และ *S. aureus* MRSA 20653 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สเตียรอยด์ 89 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *C. diphtheria* และ *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. coag* negative, *S. sobrinus*, *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *B. pertussis*, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20622, *S. aureus* VRSA 20623, *E. faecalis* 4737 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 26633, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* MRSA 20653 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สเตียรอยด์ 90 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheria*, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coag* negative, *S. aureus* MRSA 20654 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *V. paraheamolyticus*, *S. aureus* MRSA 20632 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *B. pertussis*, *S. sobrinus*, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* VRSA 20623, *S. aureus* VRSA 20624, *E. faecalis* 4737 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 26633, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* MRSA 20653 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์พบว่า อะมิโนสเตียรอยด์ 84-90 ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อราได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* และยีสต์ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231, *C. krusei* และ *C. tropicalis* โดยมีค่า MIC มากกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นอะมิโนสเตียรอยด์ 86 สามารถยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* และยีสต์ *C. tropicalis* มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และอะมิโนสเตียรอยด์ 90 สามารถยับยั้งยีสต์ *C. tropicalis* มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Chenodeoxycholic acid 7 และอนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์ 84-90

แบคทีเรีย	ค่า MIC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)			
	Vancomycin	7	84	85
<i>Streptococcus milleri</i> group	4	> 100	25	12.5
<i>S. pneumoniae</i>	3	> 100	> 100	50
<i>S. mutans</i> ATCC 27175	0.016	> 100	12.5	12.5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.0	> 100	> 100	50
<i>Staphylococcus coag</i> negative	0.094	> 100	12.5	6.25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 26633	6	50	> 100	100
<i>Bordetella pertussis</i>	3	50	> 100	50
<i>Corynebacterium diptheriae</i>	1	> 100	6.25	6.25
<i>Streptococcus sobrinus</i>	1	> 100	> 100	12.5
<i>Vibrio cholerae</i>	-	> 100	> 100	> 100
<i>V. paraheamolyticus</i>	3	> 100	> 100	25
<i>S. aureus</i> MRSA N1	2	> 100	> 100	> 100
<i>S. aureus</i> MRSA 20625	-	> 100	> 100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20626	-	> 100	> 100	> 100
<i>S. aureus</i> MRSA 20627	4	> 100	> 100	6.25
<i>S. aureus</i> MRSA 20628	2	> 100	> 100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20630	1.5	> 100	> 100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20631	48	> 100	> 100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20632	3	> 100	> 100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20633	1	> 100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20635	8	> 100	> 100	> 100
<i>S. aureus</i> MRSA 20636	1.5	> 100	> 100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20652	0.25	> 100	> 100	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20653	2	> 100	> 100	> 100
<i>S. aureus</i> MRSA 20654	1.5	> 100	> 100	6.25
<i>S. aureus</i> VRSA 20622	32	> 100	100	12.5
<i>S. aureus</i> VRSA 20623	32	> 100	> 100	50
<i>S. aureus</i> VRSA 20624	-	> 100	> 100	12.5
<i>S. aureus</i> VRSA 21083	32	> 100	100	6.25
<i>Enterococcus faecalis</i> 4737 (VRE)	32	> 100	> 100	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Chenodeoxycholic acid 7 และอนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์ 84-90

แบคทีเรีย	ค่า MIC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)				
	86	87	88	89	90
<i>Streptococcus milleri</i> group	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5
<i>S. pneumoniae</i>	12.5	25	50	50	50
<i>S. mutans</i> ATCC 27175	1.56	6.25	6.25	6.25	12.5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	50	100	100	100	100
<i>Staphylococcus</i> coag negative	1.56	6.25	6.25	12.5	12.5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 26633	50	100	100	100	100
<i>Bordetella pertussis</i>	12.5	50	50	50	50
<i>Corynebacterium diptheriae</i>	3.125	3.125	1.56	6.25	6.25
<i>Streptococcus sobrinus</i>	100	6.25	25	12.5	50
<i>Vibrio cholerae</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Vibrio paraheamolyticus</i>	50	25	25	> 100	25
<i>S. aureus</i> MRSA N1	100	100	100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20625	50	6.25	100	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20626	50	100	100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20627	50	6.25	6.25	100	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20628	12.5	50	50	100	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20630	50	100	100	100	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20631	50	100	100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20632	25	100	100	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20633	50	50	50	50	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20635	50	100	100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20636	25	50	50	100	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20652	50	25	25	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20653	50	100	100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20654	12.5	6.25	25	50	6.25
<i>S. aureus</i> VRSA 20622	6.25	12.5	25	50	12.5
<i>S. aureus</i> VRSA 20623	6.25	25	50	50	50
<i>S. aureus</i> VRSA 20624	6.25	6.25	6.25	6.25	50
<i>S. aureus</i> VRSA 21083	25	50	50	12.5	6.25
<i>Enterococcus faecalis</i> 4737 (VRE)	> 100	25	25	50	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

อะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ ประกอบด้วยเซลล์ปกติ (Vero, African green monkey kidney fibroblast), เซลล์มะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma, MCF-7), เซลล์มะเร็งช่องปาก (Human oral cavity carcinoma, KB), เซลล์มะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma, HepG2), เซลล์มะเร็งลำไส้ (Human colon adenocarcinoma, HT-29), และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (Murine leukemia, P388) ด้วยวิธี MTT assay (Primary screening) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับ Pregnenolone 1 ที่ระดับความเข้มข้นในการทดสอบเบื้องต้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone 1 และอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 แสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า Pregnenolone 1 มีค่าความเป็นพิษน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, KB, HepG2, HT-29 และ P388 โดยมีค่า %Cytotoxicity เท่ากับ 32.34, 43.26, 21.04 และ 22.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ Pregnenolone 1 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 60.45 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ 58 มีผลต่อเซลล์ HepG2 และ HT-29 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 44.27 และ 38.97 เปอร์เซ็นต์ แต่แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB และ P388 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 56.88, 71.74, 84.69 และ 97.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ 59 แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7 และ KB มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 57.12, 57.42, และ 66.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อเซลล์ HepG2, HT-29 และ P388 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 40.07, 42.30 และ 37.94 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ 60 แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB, HepG2 และ P388 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 62.38, 68.74, 95.30, 55.19 และ 96.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่มีผลต่อเซลล์ HT-29 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 25.64 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ 61 แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7, KB และ P388 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 89.85, 97.80 และ 99.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่มีผลต่อเซลล์ Vero, HepG2 และ HT-29 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 42.40, 40.25 และ 19.34 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ 62 มีแนวโน้มความเป็นพิษต่อเซลล์เหมือนกับอะมิโนสเตียรอยด์ 61 โดยแสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7, KB และ P388 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 54.02, 53.88 และ 57.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่มีผลต่อเซลล์ Vero, HepG2 และ HT-29 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 44.40, 27.44 และ 22.10 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ 63 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero และ MCF-7 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 62.71 และ 74.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อเซลล์ KB, HepG2, HT-29 และ P388 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 31.99, 43.41, 23.95 และ 28.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ 64 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ทดสอบทุกชนิด โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB, HepG2, HT-29 และ P388 เท่ากับ 61.97, 74.75, 98.69, 62.36, 64.92 และ 92.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ 65 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ MCF-7 และ KB มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 55.84 และ 52.95 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อย

กว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, Hep-G2, HT-29 และ P388 มีค่าเท่ากับ 36.52, 30.54, 13.27 และ 13.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ 66 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ MCF-7, KB และ P388 เท่ากับ 53.17, 56.75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, Hep-G2 และ HT-29 มีค่าเท่ากับ 32.04, 32.04 และ 10.57 เปอร์เซ็นต์

และอะมิโนสเตียรอยด์ 67 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ MCF-7 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 51.70 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, KB, Hep-G2, HT-29 และ P388 มีค่าเท่ากับ 31.44, 35.88, 36.98, 18.68 และ 26.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone 1 และอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารตัวอย่าง	%Cytotoxicity					
	Vero	MCF-7	KB	HepG2	HT-29	P388
1	40.65	60.45	32.34	43.26	21.04	22.18
58	56.88	71.74	84.69	44.27	38.97	97.56
59	57.12	57.42	66.74	40.07	42.30	37.94
60	62.38	68.74	95.30	55.19	25.64	96.86
61	42.40	89.85	97.80	40.25	19.34	99.65
62	44.40	54.02	53.88	27.44	22.10	57.80
63	62.71	74.51	31.99	43.41	23.95	28.15
64	61.97	74.75	98.69	62.36	64.92	92.96
65	36.52	55.84	52.95	30.54	13.27	13.36
66	32.04	53.17	56.75	32.04	10.57	100.00
67	31.44	51.70	35.88	36.98	18.68	26.56

จากผลการทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ จะนำอะมิโนสเตียรอยด์ที่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง (antagonist) 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี MTT assay (IC_{50}) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับตัวยามาตรฐาน Vinblastine sulfate salt ค่า IC_{50} ของ Pregnenolone 1 และ อะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า Pregnenolone 1 ไม่มีผลในการทำลายเซลล์ปกติ (Vero), KB, HepG-2, HT-29 และ P388 โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 40 จากรูปผ. 1 แสดงให้เห็นถึงลักษณะของเซลล์ปกติ (Vero) ที่มีลักษณะเป็นรูปลิ่ม เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ Pregnenolone 1 ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 125 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อเซลล์ Vero น้อยมาก แต่ Pregnenolone 1 มีผลในการทำลายเซลล์ MCF-2 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.29 แสดงดังรูปผ. 2 แสดงการทำลายเซลล์ MCF-2 ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 125 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Pregnenolone 1 มากขึ้นเซลล์ MCF-7 จะถูกทำลายมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยบางเซลล์มีรูปแบบของการตายแบบ apoptosis คือการเปลี่ยนแปลงจากรูปกลมกลายเป็นก้อนกลม นอกจากนี้ยังมีบางเซลล์ที่ตายแบบสลายตัวไปแล้ว

ตารางที่ 4.3 ค่า IC₅₀ ของอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67

สาร ตัวอย่าง	IC ₅₀ (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)					
	Vero	MCF-7	KB	HepG2	HT-29	P388
Vinblastine sulfate salt	0.0014	0.0002	0.0016	0.0007	0.0017	0.0091
1	>40	2.29	>40	>40	>40	>40
58	1.63	1.09	0.54	>40	>40	1.41
59	2.25	2.29	1.06	>40	>40	>40
60	1.53	1.74	0.79	2.23	>40	0.36
61	>40	0.70	1.07	>40	>40	0.73
62	>40	2.04	2.13	>40	>40	1.45
63	1.77	1.30	>40	>40	>40	>40
64	1.47	0.93	0.33	2.09	0.95	0.33
65	>40	2.14	1.70	>40	>40	>40
66	>40	2.17	1.59	>40	>40	0.76
67	>40	2.17	>40	>40	>40	>40

จากตารางที่ 4.3 พบว่าสาร 61 มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ MCF-2 และ P388 ดีที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.70 และ 0.73 ไมโครโมล/มิลลิลิตร (รูปพ. 26 และ รูปพ. 30) และที่น่าสนใจมากคือ สาร 61 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติในค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้ (42.40 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นจะมีค่าใกล้เคียงในช่วงที่ยอมรับได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า สาร 58 มีผลต่อเซลล์ KB ในระดับที่ดี โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.54 ไมโครโมล/มิลลิลิตร, สาร 60 มีผลต่อเซลล์ P388 ในระดับที่ดี โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.36 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และสาร 64 มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ MCF-2, KB, HepG2, HT-29 และ P388 ที่ดี โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.93, 0.33, 2.09, 0.95 และ 0.33 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปพ. 44-48) แต่เป็นที่น่าเสียดายสาร 58, 60 และ 64 มีผลต่อเซลล์ปกติโดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (56.88, 62.38 และ 61.97 เปอร์เซ็นต์) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.63, 1.53 และ 1.47 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิต

นอกจากนั้น Chenodeoxycholic acid 7 และสารอนุพันธ์ 85 ถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 และเซลล์ KB ด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA) พบว่าทั้ง Chenodeoxycholic acid 7 และสารอนุพันธ์ 85 ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ MCF-7 และเซลล์ KB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

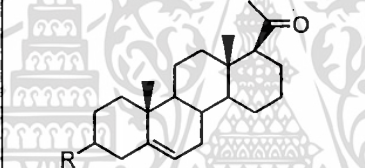

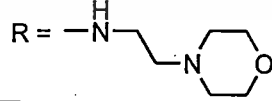
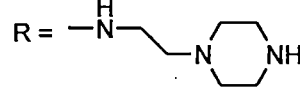
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากความสนใจของผู้วิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงโครงสร้างของ Pregnenolone 1 และ Chenodeoxycholic acid 7 จึงได้สังเคราะห์อนุพันธ์ที่ประกอบด้วยหมู่อะมิโน และนำสารสังเคราะห์ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

5.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 จาก Pregnenolone 1

อะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ Pregnenolone 1 ให้เป็นหมู่อะมิโน การสังเคราะห์เตรียมผ่านสารตัวกลางคือ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 สามารถสังเคราะห์สาร 57 มีผลได้เท่ากับได้ 92.41 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสารประกอบไดอะมิโน ผลได้ร้อยละของอะมิโนสเตียรอยด์แสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ผลได้ร้อยละของอะมิโนสเตียรอยด์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 1)

สารอนุพันธ์		ผลได้ร้อยละ
58	R = -NH (CH ₂) ₃ NH ₂	10.90
59	R = -NH (CH ₂) ₄ NH ₂	28.80
60	R = -NH (CH ₂) ₆ NH ₂	12.13
61	R = -NH (CH ₂) ₇ NH ₂	18.74
62	R = -NH (CH ₂) ₈ NH ₂	19.54
63	R = -NH (CH ₂) ₉ NH ₂	15.31
64	R = -NH CH ₂ CH(OH)CH ₂ NH ₂	29.57
65	R = 	83.39
66	R = 	37.44
67	R = 	16.24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองสามารถสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ มีผลได้ร้อยละอยู่ในช่วงต่ำถึงสูง สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก

1. จากแผนภาพที่ 4.1 ในขั้นตอนการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone 1 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ให้เป็นหมู่หลุดออก โดยใช้รีเอเจนต์คือ *p*-nitrophenyl chloroformate ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันกเฮซิลคลอไรด์ที่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยากับความชื้นในอากาศ ทำให้สาร 57 ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้กลับเป็นสารตั้ง Pregnenolone 1 มีผลทำให้ได้สาร 57 ลดลง

2. ขั้นตอนแยกอะมิโนสเตียรอยด์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี อะมิโนสเตียรอยด์เป็นสารที่มีขั้วค่อนข้างสูงอาจจะเกิด interaction กับซิลิกาเจล ที่ใช้ในเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีค่อนข้างสูง และเนื่องจากเป็นสารผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยหมู่อะมิโนซึ่งมีความเป็นเบสสามารถเกิด interaction กับซิลิกาเจลที่มีความเป็นกรดได้ ทำให้เกิดการตกค้างอยู่ในคอลัมน์ส่งผลให้ได้ปริมาณหลังการทำให้บริสุทธิ์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ลดลง

5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น ซึ่งประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 พบว่า Pregnenolone 1 อะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และเมื่อนำไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *S. milleri* group, *S. coagulase* negative, *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20626, *S. aureus* (MRSA) 20627, *S. aureus* (MRSA) 20633, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623, *S. aureus* (VRSA) 20683, *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. pertussis* ผลการทดลองมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันคือ Pregnenolone 1 และ อะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ กล่าวได้ว่าการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์ Pregnenolone 1 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของวง A เป็นหมู่อะมิโนไม่มีผลต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์

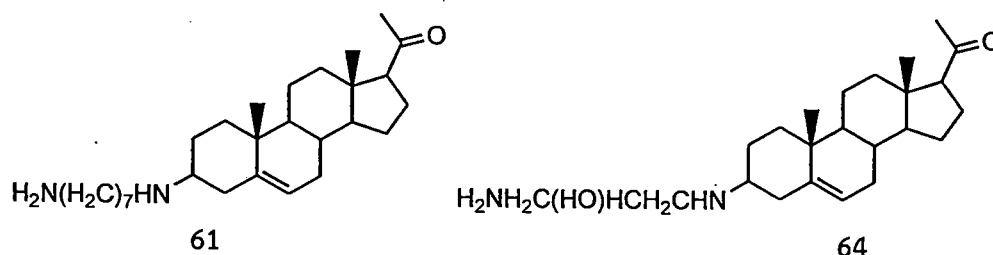
5.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า Pregnenolone 1 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เซลล์ปกติ (Vero, African green monkey kidney fibroblast), เซลล์มะเร็งช่องปาก (Human oral cavity carcinoma, KB), เซลล์มะเร็งลำไส้ (Human colon adenocarcinoma, HT-29), และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (Murine leukemia P388) น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ กล่าวได้ว่า Pregnenolone 1 มีความเหมาะสมในการเลือกใช้เป็นสารตั้งต้น

ในที่นี้ขอกล่าวสรุปเฉพาะอะมิโนสเตียรอยด์ที่ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดคือ อะมิโนสเตียรอยด์ 61 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma, MCF-7) ดีที่สุดคือมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.70 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero) น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีการสเปกโตรสโกปีได้ที่จะนำไปใช้ในสิ่งมีชีวิตได้ ส่วนอะมิโนสเตียรอยด์ 64 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-2, KB, HT-29 และ P388 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.93, 0.33, 0.95 และ 0.33 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ดี แต่อะมิโนสเตียรอยด์ 64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

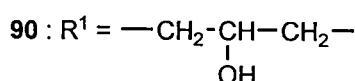
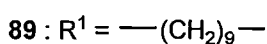
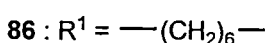
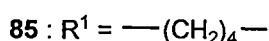
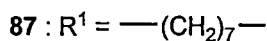
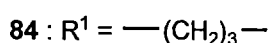
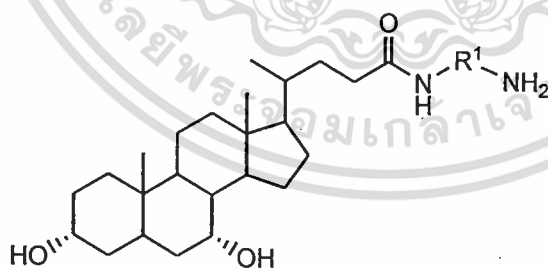
มีข้อเสียคือจะมีผลการทำลายต่อเซลล์ Vero โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.47 ไมโครโมล/มิลลิลิตร จึงยังไม่เหมาะกับการนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิต



จะเห็นได้ว่าอะมิโนสเตียรอยด์ 58-63 ที่สังเคราะห์ได้นี้ จัดอยู่ในกลุ่ม Alkylating agent ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ในการทำลายสารพันธุกรรมเพื่อป้องกันการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง โดยออกฤทธิ์ได้ทุกระยะของการแบ่งเซลล์ และจากลักษณะการตายของเซลล์พบว่า เซลล์มีการหดตัวและจับตัวกันแน่นจนกลายเป็นก้อนกลม ซึ่งเป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำของสารที่สังเคราะห์ได้ โดยการเปลี่ยนแปลงในลักษณะดังกล่าวเป็นรูปแบบของการตายแบบ apoptosis นอกจากนี้ยังมีบางเซลล์ที่ตายและสลายตัวไปแล้ว จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Pregnenolone ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 ของวง A จากหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่อะมิโนมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพด้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

5.4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid 7

ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของ Chenodeoxycholic acid 7 ที่สามารถตรวจสอบโครงสร้างสารด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่าอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้มีความถูกต้อง ผลได้ของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 40 - 80 เปอร์เซ็นต์ สูตรโครงสร้างของโบล์แอดิดเอไมด์สังเคราะห์แสดงดังนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของอนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid 7

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Chenodeoxycholic acid 7 เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่าส่วนใหญ่มีค่า MIC มากกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นมีฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 26633 และ *B. pertussis* มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid 84-90 พบว่าสารส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียเกือบทุกชนิด ยกเว้นสาร 84 ที่ส่วนใหญ่ไม่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ นอกจากนี้พบว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ดีที่สุดในกลุ่มนี้มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ได้แก่สาร 86 สำหรับการต้าน *S. mutans* ATCC 27175 และ *Staphylococcus coag negative* และสาร 88 สำหรับการต้าน *C. diphtheriae* ส่วนแบคทีเรียที่สารอนุพันธ์ทุกชนิดออกฤทธิ์ต้านดีที่สุดคือ *C. diphtheriae*

จากผลการทดลอง พบว่าการปรับปรุงโครงสร้างของ Chenodeoxycholic acid 7 เป็นสารประกอบเอไมด์จะทำให้สารมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดียิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hazra และคณะ[40] ที่ศึกษาพบว่าอนุพันธ์เอไมด์ของกรดโคเลอิก และกรดดีออกซีโคเลอิก มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก Hazra และคณะ[41] ศึกษาพบว่าอนุพันธ์เอไมด์ และเอสเทอร์ของกรดโคเลอิกมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *S. aureus* นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ ยังพบว่าการใช้ไดเอมีนในการปรับปรุงโครงสร้างสารมีส่วนในการช่วยเพิ่มฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารได้ดีมากยิ่งขึ้น

5.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์ Chenodeoxycholic acid 7

Chenodeoxycholic acid 7 และสารอนุพันธ์ 85 ถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 และเซลล์ KB พบว่าทั้ง Chenodeoxycholic acid 7 และสารอนุพันธ์ 85 ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ MCF-7 และเซลล์ KB

บรรณานุกรม

- [1] วีรศักดิ์ เชื้อมโนชาญ. 2525. สเตียรอยด์จากพืช, ภาควิชาเภสัชเวท, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- [2] ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. 2536. เกล็ดวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม1. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- [3] W. Prabpayak, P. Charoenying, C. Laosinwattana and Nuntana Aroonrerk. 2006. Antibacterial of Pregnenolone Derivatives., *KMITL Science.*, Vol. 6, No 2b: pp. 466-470.
- [4] P. Charoenying, P. Boonmanumsin, P. Sahasyodhin, C. Laosinwattana and Nuntana Aroonrerk. 2009. Modified Bile Acid: Preparation of Deoxycholic acid Amides and Their Biological Activities, Tenth Tetrahedron Symposium: Challenges in Organic and Bioorganic Chemistry, 23-26 June 2009, Paris, France.
- [5] R. Detterbeck and M. Hesse. 2002. Synthesis and Structure Elucidation of Open-chained Putrescine-Bisamides from *Aglaia species*. *Tetrahedron.* 58, pp. 6887-6893.
- [6] R.J. Simmonds, 1997. *Chemistry of Biomolecules: An Introduction*, Billing & Sons Ltd., Worcester.
- [7] O. Bortolini, A. Medici, and S. Poli. 1997. Biotransformations on Steroid nucleus of Bile Acids., *Steroid*, 2, pp. 564-577.
- [8] G. Fantin, S. Ferrarini, A. Medici, P. Pedrini ana S. Poli. 1998. Regioselective Microbial Oxidation of Bile Acids., *Tetrahedron*, 54, pp. 1937-1942.
- [9] C. Li, A-un Rehman, N. K. Dalley and P. B. Savage. 1999. Short Syntheses of Triamine Derivatives of Cholic Acid, *Tetrahedron Letters*, 40, pp. 1861-1864.
- [10] G. Cravotto, A. Binello, L. Boffa, O. Rosati, M. Boccalini and S. Chimichi. 2008. Regio- and Stereoselective Reductions of Dehydrocholic Acid., *Steroids*, 71, pp. 469-475.
- [11] T. Kolek. 1999. Biotransformation XLVII: transformations of 5-ene steroids in *Fusarium culmorum* culture., *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 71, pp. 83-90.
- [12] G. P. Moss. *Steroid*. Online Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Steroid>. 2011.
- [13] บุญรอด วงษ์สวาท. สเตียรอยด์ฮอร์โมน. Online Available: http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd_site/hormone.htm. 2011.
- [14] M. Powers. *Anabolic steroid*. Online Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Anabolic_steroid. 2011
- [15] วนาวรรณ ปราบพยัคฆ์. 2549. การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์สเตียรอยด์เพรกนินโนโลน. วิทยานิพนธ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [16] Anagrammer.com. Images for Corticosteroids. Online Available: <http://www.anagrammer.com/scrabble/corticosteroids>. 2011
- [17] Health Education Division. มารู้จักฮอร์โมนเพศกันเถอะ. Online Available: http://thaihed.com/healthy_talk/talk_detail.php?sub_id=69. 2011
- [18] D. Lommer. Prohormone. Online Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Prohormone>. 2011
- [19] T. Akhisa. Phytosterol. Online Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Phytosterol>. 2011
- [20] Giffarine. เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับ ไฟโตสเตอรอล กับคอเลสเตอรอล. Online Available: http://www.giffarinethailand.com/th/interesting_info.php?nid=69. 2011
- [21] Health Today. สเตียรอยด์ คืออะไร. Online Available: <http://www.vcharkarn.com/varticle/41934>. 2011.
- [22] ชูชาติ กมลวิศิษฐ์ และ วิสิทธิ์ จิรไชยสิงห์. 2521. สเตียรอยด์ที่ใช้ภายนอก. โครงการงานพิเศษปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 1-33.
- [23] พันซกร บุญมานำสิง และ ภัททฤทธิ สหไสยอิน. 2551. การสังเคราะห์และฤทธิ์ชีวภาพของโบลีเอซิดเอไมด์. โครงการงานพิเศษสาขาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [24] J. Burbiel and F. Bracher. 2003. Azasteroids as antifungals., *Steroids*, 68, pp. 587-594.
- [25] R. Paschke, J. Kalbitz and C. Paetz. 2000. Novel Spacer Link Bile Acid-Cisplatin Compounds as a Model for Specific Drug Delivery, Synthesis and Characterization., *Inorganica Chimica Acta*, 304, pp. 241-249.
- [26] Q. Guan, C. Li, E. J. Schmidt, 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 Letters*, 2 (18), pp. 2837-2840.
- [27] I. S. Blagbrough, D. A. Hadithi and A. J. Geall. 2000. Cheno-, Urso- and Deoxycholic Acid Spermine Conjugates; Relative Binding Affinities for Calf Thymus DNA., *Tetrahedron*, 56, pp. 3439-3447.
- [28] 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*, 10, pp. 2561-2567.
- [29] T. T. Curran, G. A. Flynn, D. E. Rudisill and P. M. Weintraub. 1995. A Novel Route to a 4-amino steroid: MDL 19687., *Tetrahedron Letters*, 36, 27, pp. 4761-4764.
- [30] S. N. Khan, S-Y. Bae and H-S. Kim. 2005. A Highly Stereoselective Reductive Amination of 3-Ketosteroid with amines: an Improved Synthesis of 3 α -aminosteroid., *Tetrahedron Letters*, 46, pp. 7675-7678.

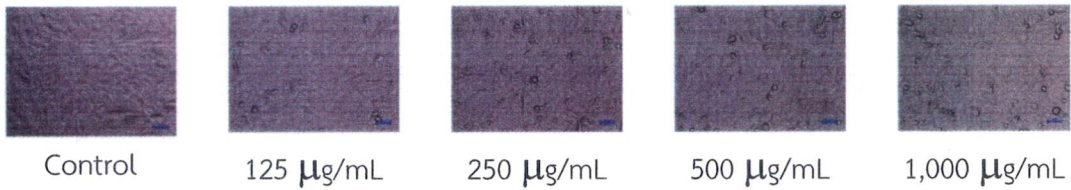
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [31] B. Choucair, M. Dherbomez, C. Roussakis and L. El Kihel. 2004. Synthesis of Spermidinylcholestanol and Spermidinylcholesterol Squalamine Analogues., **Tetrahedron**, 60, pp. 11477-11486.
- [32] C. Loncle, C. Salmi, Y. Letourneux and J. M. Brunel. 2007. Synthesis of New 7-Aminosterol Squalamine Analogues with High Antimicrobial Activities Through a Stereoselective Titanium Reductive Amination Reaction., **Tetrahedron**. 63, pp. 12968-12974.
- [33] C. Salmi, C. Loncle, N. Vidal, Y. Letourneux and J. M. Brunel. 2008. New Stereoselective Titanium Reductive Amination Synthesis of 3-Amino and Polyaminosterol Derivatives Possessing Antimicrobial Activities., **European Journal of Medicinal Chemistry**., 43, pp. 540-547.
- [34] S. N. Khan, Y. M. Jung, B. J. Kim, H. Cho, J. Lee and H. Kim. 2008. Synthesis and Antimicrobial Activity of 7 α -Amino-23,24-Bisnor-5 α -Cholan-22-ol Derivatives., **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**., 18, pp. 2558-2561.
- [35] S. D. Taylor and J. Harris. 2011. Efficient Syntheses of 17- β -Amino Steroids. **Steroids**., 76, pp. 1098-1102.
- [36] A.W. Bauer, W.M.M. Kirby, J.C. Sherris and M. Truck. 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standdized Single Disk Method., **American Journal Clinical Pathology**., 45, pp. 493-496.
- [37] International Standard. 2nd ed. ISO 10—3-5: Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for *in vitro* Cytotoxicity
- [38] 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.
- [39] Z. Szendi, P. Forgo and F. Sweet. 1995. Complete ¹H and ¹³C NMR Spectra of Pregnenolone., **Steroids**, 60, pp. 442-446.
- [40] 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**, 14, pp. 773-777.
- [41] 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**, 18, pp. 2043-2047.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone 1 และอนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์ 58-67



รูปผ. 1 ผลของ Pregnenolone 1 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 2 ผลของ Pregnenolone 1 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 3 ผลของ Pregnenolone 1 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผ. 4 ผลของ Pregnenolone 1 ต่อเซลล์ HepG-2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG-2 ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 5 ผลของ Pregnenolone 1 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 6 ผลของ Pregnenolone 1 ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผ. 7 ผลของสาร 58 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 8 ผลของสาร 58 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม

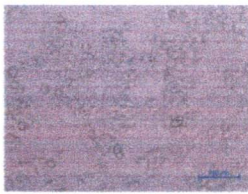


รูปผ. 9 ผลของสาร 58 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุม

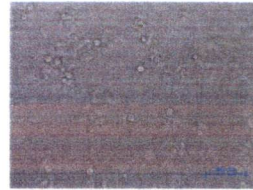


รูปผ. 10 ผลของสาร 58 ต่อเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG2 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 11 ผลของสาร 58 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control

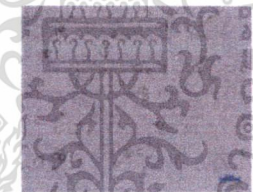


1,000 µg/mL

รูปผ. 12 ผลของสาร 58 ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 13 ผลของสาร 59 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 14 ผลของสาร 59 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผ. 15 ผลของสาร 59 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 16 ผลของสาร 59 ต่อเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG2 ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 17 ผลของสาร 59 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 18 ผลของสาร 59 ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 19 ผลของสาร 60 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม

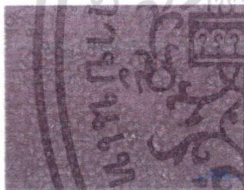


Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 20 ผลของสาร 60 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 21 ผลของสาร 60 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



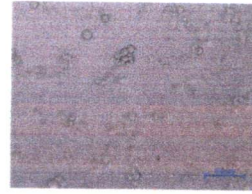
1,000 µg/mL

รูปผ. 22 ผลของสาร 60 ต่อเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG2 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 23 ผลของสาร 60 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 24 ผลของสาร 60 ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 25 ผลของสาร 61 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 26 ผลของสาร 61 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผ. 27 ผลของสาร 61 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 28 ผลของสาร 61 ต่อเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG2 ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 29 ผลของสาร 61 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 30 ผลของสาร 61 ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผ. 31 ผลของสาร 62 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 32 ผลของสาร 62 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม

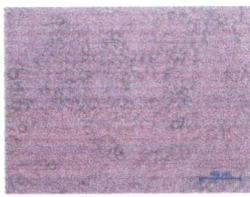


รูปผ. 33 ผลของสาร 62 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 34 ผลของสาร 62 ต่อเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG2 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Control

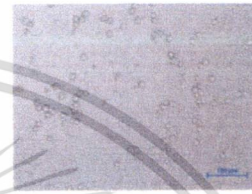


1,000 µg/mL

รูปผ. 35 ผลของสาร 62 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control

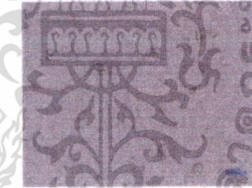


1,000 µg/mL

รูปผ. 36 ผลของสาร 62 ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control

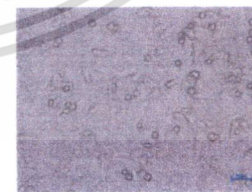


1,000 µg/mL

รูปผ. 37 ผลของสาร 63 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 38 ผลของสาร 63 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผ. 39 ผลของสาร 63 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 40 ผลของสาร 63 ต่อเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG2 ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 41 ผลของสาร 63 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุม



รูปผ. 42 ผลของสาร 63 ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 43 ผลของสาร 64 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 44 ผลของสาร 64 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 45 ผลของสาร 64 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุม



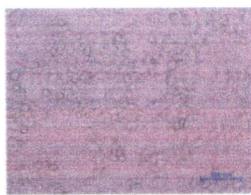
Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 46 ผลของสาร 64 ต่อเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG2 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

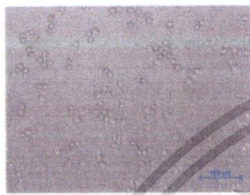


Control

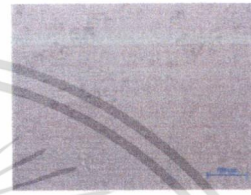


1,000 µg/mL

รูปผ. 47 ผลของสาร 64 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control

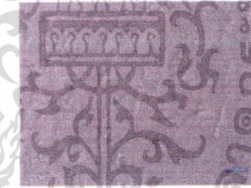


1,000 µg/mL

รูปผ. 48 ผลของสาร 64 ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 49 ผลของสาร 65 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 50 ผลของสาร 65 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 51 ผลของสาร 65 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุม

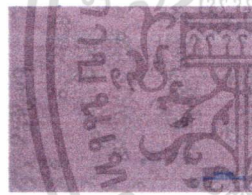


Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 52 ผลของสาร 65 ต่อเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG2 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 53 ผลของสาร 65 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 54 ผลของสาร 65 ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 55 ผลของสาร 66 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม

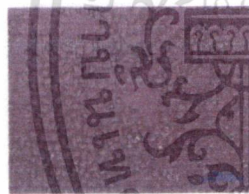


Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 56 ผลของสาร 66 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม

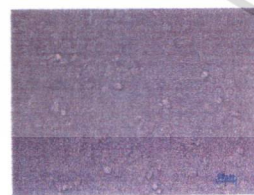


Control

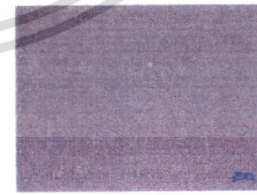


1,000 µg/mL

รูปผ. 57 ผลของสาร 66 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุม



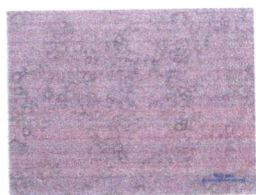
Control



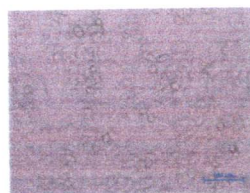
1,000 µg/mL

รูปผ. 58 ผลของสาร 66 ต่อเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG2 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Control

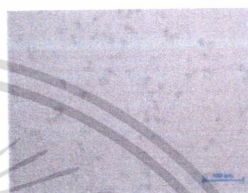


1,000 µg/mL

รูปผ. 59 ผลของสาร 66 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 60 ผลของสาร 66 ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 61 ผลของสาร 67 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 62 ผลของสาร 67 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Control

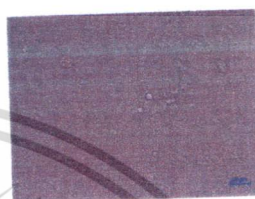


1,000 µg/mL

รูปผ. 63 ผลของสาร 67 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 64 ผลของสาร 67 ต่อเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG2 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 65 ผลของสาร 67 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุม



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 66 ผลของสาร 67 ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวพัชนี เจริญยิ่ง
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สังกัด	สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สาขา	สถานศึกษา
ปริญญาตรี	เคมี	มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ปริญญาโท	เคมีอินทรีย์	มหาวิทยาลัยมหิดล
ปริญญาเอก	เคมี (เคมีอินทรีย์)	University of York
สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ	เคมีอินทรีย์สังเคราะห์ และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	
Honors and Awards	Cerebos Award year 2003	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่

1. P. Charoenying, N. Onsaeng, P. Unruean and W. Changin. 38th Congress on science and technology of Thailand (STT 38), Science for the future of mankind, October 17-19, 2012, Empress Convention Centre, Chiang Mai, Thailand, p. 124-125.
2. P. Charoenying, N. Onsaeng, P. Unruean and W. Changin. 2013. Synthesis and Anticancer Activity of 3-Aminopregnenolone., 14th Tetrahedron Symposium: Challenges in Organic & Bioorganic Chemistry, 25-28 June 2013, Vienna, Austria.
3. P. Charoenying, P. Boonmanumsin and P. Sahasyodhin. 2014. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Chenodeoxycholic Acid Amides, 15th Tetrahedron Symposium: Challenges in Bioorganic and Organic Medicinal Chemistry, 24-27 June 2014, London, England.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

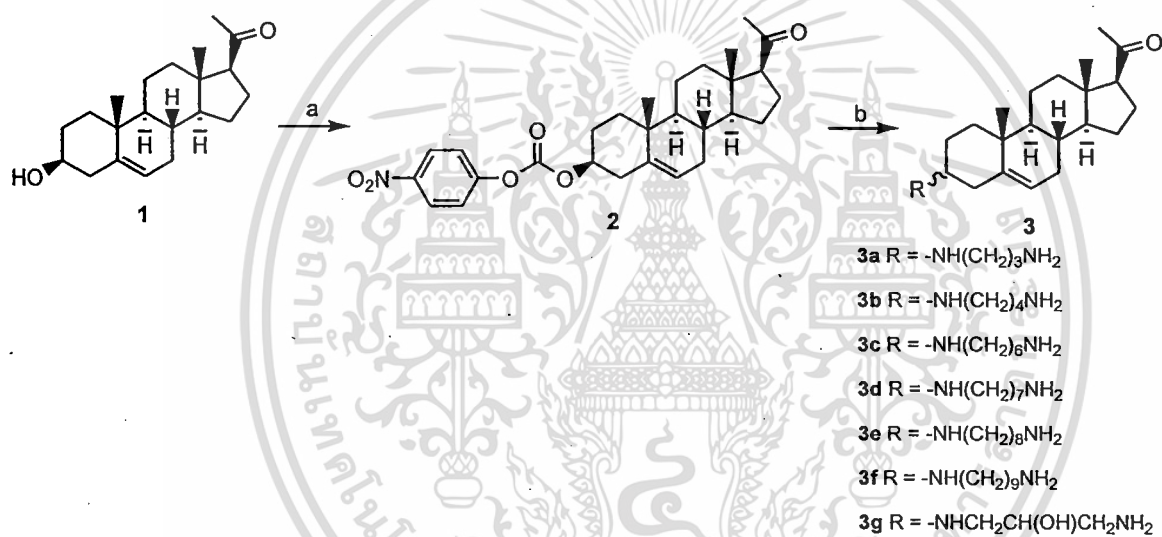


SYNTHESIS AND ANTICANCER EVALUATIONS OF C-3 AMINOPREGNENOLONE

Natakon Onsaeng, Palawat Unruean, Wiriyapong Changin, Patchanee Charoenying*
Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology
Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

*e-mail: kcpatcha@kmitl.ac.th

Abstract: Pregnenolone **1** was used as a starting template to develop new amino steroids. Ring-A modification of **1** resulted in the synthesis of amino derivatives **3a-3g**. As shown in Scheme 1, the synthesis involved the transformation of the starting pregnenolone **1** into pregnenolone carbonate **2** and conversion of pregnenolone carbonate **2** to the corresponding amino derivatives **3a-3g**. The structures of these compounds were elucidated based on NMR and mass spectroscopic analyzes. These compounds were evaluated for their anticancer activity against the human hepatocellular liver carcinoma cell lines (HepG2) using the MTT assay. The results of the *in vitro* study showed that amino steroids **3c** and **3g** exhibited high activity with IC_{50} values 2.23 $\mu\text{M/mL}$ and 2.09 $\mu\text{M/mL}$, respectively.



Scheme 1. Synthesis of pregnenolone derivatives. Reagents and conditions:
(a) *p*-nitrophenyl chloroformate, DCM, pyridine, 1 hr., rt. (b) diamino reagents, DCM, 3 hr. rt.

References:

1. Choudhary MI, Shahab Alam M, Atta-ur-Rahman A, Yousuf S, Wu YC: Steroids 2011;76:1554-1559.
2. Salmi C, Loncle C, Vidal N, Letourneux Y, Brunel JM: Eur. J. Med. Chem 2008;43:540-547.
3. Banday AH, Zargar MI, Ganaie BA: Steroids 2011; 76:1358-1362.

Acknowledgements: The author would like to thank the Nation Research Council of Thailand for financial support.

Keywords: pregnenolone, amino steroid, anticancer activity, hepatocellular liver carcinoma cell lines, IC_{50}

13th Tetrahedron

CHALLENGES IN ORGANIC & BIOORGANIC CHEMISTRY

28 June 2013 Vienna, Austria



Organised by



ELSEVIER

Supporting Journal



Conference Chair

Professor Eric J Thomas,
The School of Chemistry,
The University of Manchester, UK

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารแหล่งที่มาของเอกสาร

www.tetrahedron-symposium.elsevier.com

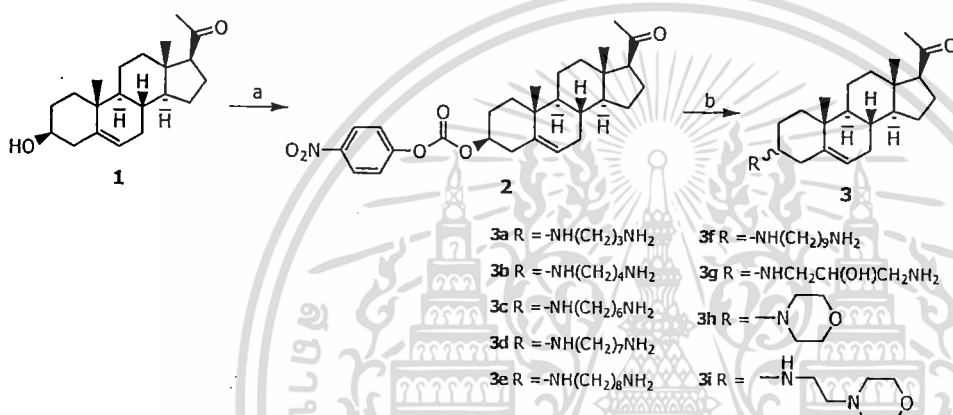
[P3.43]

Synthesis and anticancer activity of C-3 aminopregnenolone

P. Charoenying*, N. Onsaeng, P. Unruean, W. Changin

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand

Pregnenolone **1** is known as a precursor to other hormones, including cortisone, estrogen, testosterone, and progesterone. In our research, pregnenolone **1** was used as a starting template to develop new amino steroids. Ring-A modification of pregnenolone **1** resulted in the synthesis of amino derivatives **3a-3i**. As shown in Scheme 1, the synthesis involved the transformation of the starting pregnenolone **1** into pregnenolone carbonate **2** and conversion of pregnenolone carbonate **2** to the corresponding amino derivatives **3a-3i**. The structures of these compounds were elucidated based on NMR and mass spectroscopic analyzes. These compounds were screened for their anticancer activity against human oral cavity carcinoma (KB) and human breast adenocarcinoma (MCF-7) cell lines. The results of the *in vitro* study showed that amino steroids **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3g**, **3h** and **3i** exhibited significant anticancer activity with compound **3g** as the most active in this study.



Scheme 1 Synthesis of pregnenolone derivatives. Reagents and conditions: (a) *p*-nitrophenyl chloroformate, DCM, pyridine, 1 hr., rt. (b) amino reagents, DCM, 3 hr. rt.

References:

1. Choudhary MI, Shahab Alam M, Atta-ur-Rahman A, Yousuf S, Wu YC: Steroids 2011;76:1554-1559.
2. Salmi C, Loncle C, Vidal N, Letourneux Y, Brunel JM: Eur. J. Med. Chem 2008;43:540-547.
3. Banday AH, Zargar MI, Ganaie BA: Steroids 2011; 76:1358-1362.

Keywords: pregnenolone, amino steroid, anticancer activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title:

Synthesis and antimicrobial evaluation of chenodeoxycholic acid amides

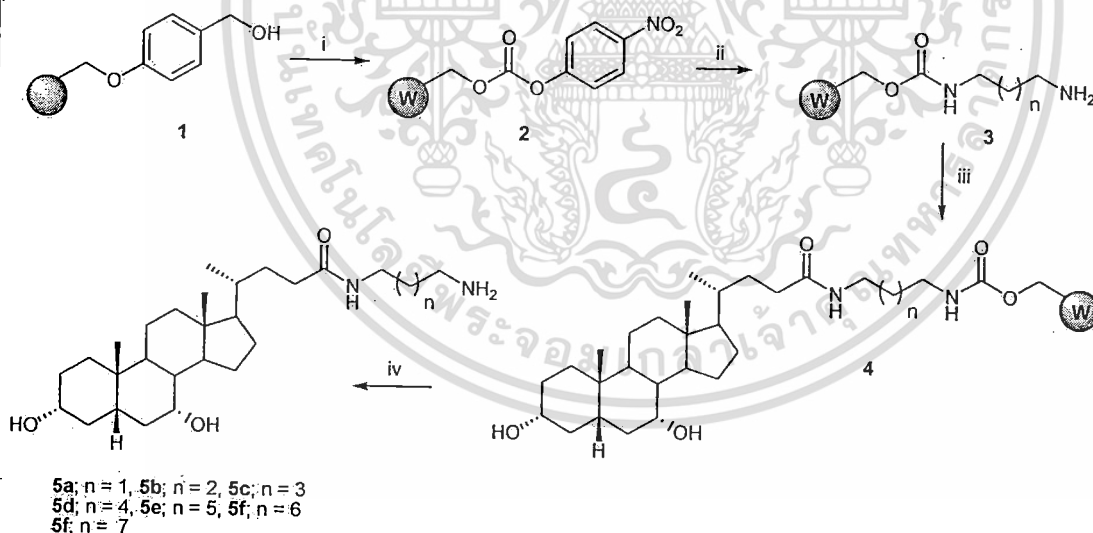
Authors & affiliations:

P. Charoenying, P. Sahasyodhin, P. Boonmanumsin

Department of Chemistry, Faculty of Science,

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

A series of amino amides of chenodeoxycholic acid were synthesized by solid phase synthesis and their antimicrobial activities were evaluated. The procedure was straightforward and the desired products were obtained in moderate to good overall yield. Reaction of Wang resin **1** with *p*-nitrophenyl chloroformate in the presence of pyridine provided the activated resin **2** which was reacted with diamines to afford the resin **3**. Chenodeoxycholic acid was coupled to the resin-bound diamines **3** to yield the resin **4** using DIC as a coupling agent in DCM/DMF. The desired chenodeoxycholic acid amide was cleaved from the resin using a solution of 20% TFA/DCM. The synthesized compounds were tested *in vitro* against 20 bacteria, 3 yeast and 2 fungi strains by disc diffusion method. The inhibition zone of different standard antibiotic discs was also evaluated for comparison. All compounds exhibited the highest antibacterial activity against *Streptococcus milleri* group, *Streptococcus mutan*, *Staphylococcus coagulase negative*, *Corynebacterium diphthiae* and Vancomycin Resistance *S. aureus* (VRSA). The MIC values of selected bacterial strains tested ranged from 3:125-100 µg/mL. Unfortunately, no antifungal activity observed against tested strains of yeasts and fungi.



Scheme 1. Preparation of target compounds (**5a-5g**). Reaction conditions: (i) *p*-nitrophenyl chloroformate, pyridine, DCM, rt, 6 h; (ii) diamine, DCM, rt, 3 h; (iii) chenodeoxycholic acid, DIC/DMF, overnight; (iv) 20%TFA, DCM, rt, 3 h.

References:

1. Löfman M., Koivukorpi J., Nojonen V., Salo H., Sievänen E.: J.Colloid and Interface Science. 2011; 360: 633-644.
2. Ye W., Li Z., Zhou Z., Wang X., Yao J., Liu J., Wang C. Loncle C.: Bioorg Chem. 2013; 51: 1-7.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่วารณี่ใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้