



**ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558**  
**คณะวิทยาศาสตร์**  
**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์และการตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของอนุพันธ์ไบล์แอซิด  
Synthesis and Investigation of the Anticancer Activity  
of Bile Acid Derivatives

นางสาวพัชนี เจริญยิ่ง

๖๐๐๒๖๙๘๙

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558  
คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัด

ษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ชื่อโครงการ** การสังเคราะห์และการตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของอนุพันธ์โพลีเอซิด  
**แหล่งเงิน** ประเภททุนงบประมาณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ประจำปีงบประมาณ 2558  
จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 294,800 บาท  
**ระยะเวลาทำการวิจัย** 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558  
**หัวหน้าโครงการวิจัย** ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ได้สังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ 13a-13f ของกรดต็อกซีโคลิก 11 โดยใช้เทคนิควิศวกรรมของแข็ง ผลที่ได้อยู่ในเกณฑ์ระดับปานกลางถึงดี จากนั้นนำสารอนุพันธ์มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line) และเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney) ด้วยวิธี MTT assay จากการทดลองพบว่า สารอนุพันธ์ 13b-13f ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB และ Vero ในระดับปานกลางถึงดี โดยเฉพาะสารอนุพันธ์ 13c จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 และ KB สูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 9.70 และ 3.42 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

นอกจากนั้น ได้ทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิก 14a-14h และ 15b-15h โดยทำการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของกรดลิโทโคลิก 12 ที่คาร์บอนตำแหน่ง 24 และตำแหน่ง 3 ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 24 และปฏิกิริยาซัลเฟชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 จากนั้นสารอนุพันธ์เอสเทอร์ซัลเฟตถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line) และเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney) ด้วยวิธี MTT assay จากการทดลองพบว่า สารอนุพันธ์ 14a แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ KB ในระดับที่ดี และสารอนุพันธ์ 15b แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7, KB และ Vero ในระดับปานกลางถึงดี

**คำสำคัญ:** โพลีเอซิด กรดต็อกซีโคลิก กรดลิโทโคลิก ความเป็นพิษต่อเซลล์

**Research Title:** Synthesis and Investigation of the Anticancer Activity of Bile Acid Derivatives  
**Researcher:** Asst. Professor Dr. Patchanee Charoenying  
**Faculty:** Faculty of Science      **Department:** Department of Chemistry

#### ABSTRACT

In this research, the amide derivatives of deoxycholic acid **13a-13f** were synthesized by solid phase technique in moderate to good yields. The cytotoxicity of these compounds was investigated in three cell lines: human breast carcinoma cell line (MCF-7), oral human epidermal carcinoma cell line (KB) and African green monkey kidney (Vero) using MTT method. The results found that the derivatives **13b-13f** showed the moderate to good activity against cell lines: MCF-7, KB and Vero. Particularly, the good activity was obtained from the derivative **13c** and found against MCF-7 and KB cell lines with  $IC_{50} = 9.70$  and  $3.42 \mu\text{g/mL}$  respectively.

Furthermore, the derivatives of lithocholic acid **14a-14h** and **15b-15h** were synthesized through modification at the carboxyl carbon C-24 and oxygenated carbon C-3. Initially, lithocholic acid was transformed into its ester derivatives under esterification at carbon C-24 and then these derivatives were prepared through sulfation at carbon C-3. These compounds were investigated the cytotoxicity in three cell lines : human breast carcinoma cell line (MCF-7), oral human epidermal carcinoma cell line (KB) and African green monkey kidney (Vero) by MTT assay method. In the result of study, the derivative **14a** exhibited the best anticancer activity against cell line KB. The derivative **15b** showed moderate to good activity against cell lines: MCF-7, KB and Vero.

**Keywords:** Bile acid      Deoxycholic acid      Lithocholic acid      Cytotoxicity

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามความตั้งใจในระดับหนึ่งด้วยการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเภททุนงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2558 ที่พิจารณาเห็นคุณค่าของงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เบื้องต้น ตลอดจนให้คำแนะนำ

ขอขอบคุณ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่อื้อเพื่อความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้



พจนินา เจริญยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	หน้า I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
รายการคำย่อและสัญลักษณ์	IX
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	4
1.5 กรอบแนวความคิดในการทำวิจัย	5
1.6 คำสำคัญของงานวิจัย	8
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	9
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การทดลองทั่วไป	17
3.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมท์ของกรดต้ออกซีโคลิก 13a-13f โดยเทคนิควิภาคของแข็ง	18
3.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮสเทอร์ของกรดลิโทโคลิก 14a-14h	20
3.4 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์	25
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 13a-13f ของกรดต้ออกซีโคลิก 11 โดยเทคนิควิภาคของแข็ง	28
4.2 ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิก 12 โดยการทำให้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	32
4.3 ผลการสังเคราะห์สารประกอบซัลเฟตของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก 15b-15h ด้วยปฏิกิริยาซัลเฟชัน	48
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารอนุพันธ์กรดต้ออกซีโคลิก 13a-13f	61
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก 14a-14h และ 15b-15h	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 5</b> สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของกรดตือออกซีโคลิก 13a-13f	66
5.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารอนุพันธ์ 13a-13f	66
5.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิกโดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	66
5.4 การสังเคราะห์สารประกอบซัลเฟตของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก 15b-15h โดยการทำปฏิกิริยาซัลเฟชัน	67
5.5 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก	67
5.6 ข้อเสนอแนะ	68
<b>บรรณานุกรม</b>	69
<b>ประวัตินักวิจัย</b>	71



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ปริมาณสารตั้งต้นและ sulphamic acid ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา	24
4.1 แสดงระดับความเข้มข้นของอนุพันธ์ 13a-13f ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์	62
4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของกรดลิโทโคลิก 12 และสารอนุพันธ์ 14a-14h และ 15b-15h ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	64
4.3 แสดงระดับความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ 14a และ 15b ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์	65



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างหลักของสเตียรอยด์	1
2.1 แสดงกระบวนการ Enterohepatic circulation	9
2.2 แสดงความเป็น Amphipathic ของไบล์แอซิด	12
4.1 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14b	35
4.2 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14b	35
4.3 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14c	37
4.4 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14c	37
4.5 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14d	39
4.6 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14d	39
4.7 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14e	41
4.8 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14e	41
4.9 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14f	43
4.10 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14f	43
4.11 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14g	45
4.12 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14g	45
4.13 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14h	47
4.14 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 14h	47
4.15 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15b	49
4.16 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15b	49
4.17 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15c	51
4.18 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15c	51
4.19 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15d	53
4.20 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15d	53
4.21 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15e	55
4.22 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15e	55
4.23 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15f	57
4.24 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15f	57
4.25 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15g	59
4.26 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15g	59
4.27 สเปกตรัม $^1\text{H}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15h	61
4.28 สเปกตรัม $^{13}\text{C}$ NMR ของสารอนุพันธ์ 15h	61
4.29 ตัวอย่างผลการทดสอบของกรดลิโทโคลิก 12 ต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control) ที่กำลังขยาย 100 เท่า	63
4.30 ตัวอย่างผลการทดสอบของสารอนุพันธ์ 15b ต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 และเซลล์ไลน์ KB เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control) ที่กำลังขยาย 100 เท่า	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่

5.1 แสดงโครงสร้างหลักของสารอนุพันธ์เอไมด์ของกรดตียอกซีโคลิก 13a-13f

หน้า

66



## รายการคำย่อและสัญลักษณ์

$^{13}\text{C}$ NMR	$^{13}\text{C}$ Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
CC <sub>50</sub>	50% Cytotoxicity Concentration
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 <sub>50</sub>	50% Inhibitory Concentration
IR	Infrared Spectroscopy
$^1\text{H}$ NMR	$^1\text{H}$ Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
m/z	Mass to charge ratio
MIC	Minimum Inhibition Concentration
ppm	Part per million
R <sub>f</sub>	Retardation factor
TFA	Trifluoroacetic acid
$\nu_{\text{max}}$ cm <sup>-1</sup>	Frequency maximum per centimeter
$\delta$	Chemical shift
<i>J</i>	Coupling constant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 1 บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Product) จำนวนมากที่ถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้านได้แก่ ด้านการแพทย์และการเกษตร เป็นต้น เพราะสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีสมบัติที่ดีทั้งทางเคมีและชีวภาพ ต่อมานักเคมีได้สนใจนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างและ/หรือหมู่ฟังก์ชันด้วยการทำปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์ ซึ่งการปรับเปลี่ยนโครงสร้างในที่นี้หมายถึง การปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมี การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันด้วยรีเอเจนต์ที่เหมาะสม และการสังเคราะห์โดยพิจารณาจากความเฉพาะเจาะจงของสเตอริโอเคมีของหมู่ฟังก์ชันซึ่งนำไปสู่สมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารที่ดีมากยิ่งขึ้น ในปัจจุบันจึงปรากฏรายงานการวิจัยจำนวนมากที่ทำการศึกษเกี่ยวกับสมบัติทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ใหม่ๆ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านั้น สเตียรอยด์ (Steroids) จัดเป็นสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่ง มีโครงสร้างของนิวเคลียสหลักประกอบด้วย Perhydrocyclopentanophenanthrene เป็นโครงสร้างหลัก ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 โครงสร้างหลักของสเตียรอยด์

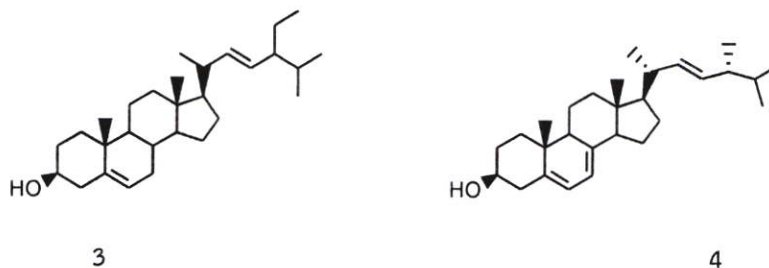
และสเตียรอยด์ยังจัดเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ เช่น Cholesterol 1 พบได้ในกล้ามเนื้อสมอง เส้นประสาทไขสันหลัง และน้ำมันปลา Stitosterol 2 และ Stigmasterol 3 เป็น sterol ทั่วไปของพืช แยกได้จากน้ำมันข้าวโพด น้ำมันของข้าวสาลีกำลังออก น้ำมันของข้าวไรน์ที่กำลังออก น้ำมันเมล็ดฝ้าย และ Ergosterol 4 พบได้ในยีสต์และเห็ด เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์และเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินดี เป็นต้น



1

2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



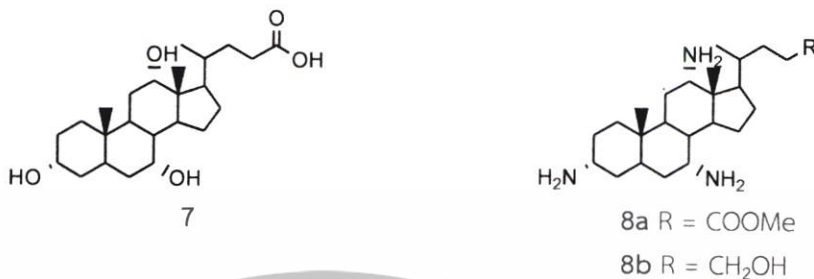
สเตียรอยด์ เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่นักเคมีนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของนิวเคลียสหลักเพื่อให้เป็นสารอนุพันธ์ชนิดใหม่ ปัจจุบันพบว่ามีการนำสารกลุ่มสเตียรอยด์ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อย่างมากเช่นกลุ่ม Antiandrogen นำมาใช้เป็นยารักษาภาวะ Hyperandrogenism กลุ่ม Cardiac steroid สามารถใช้ในการรักษาโรค Congestive heart failure เป็นต้น เนื่องจากในธรรมชาติสเตียรอยด์ที่มาจากพืชและสัตว์นั้นมีปริมาณน้อยมาก ถ้านักเคมีมุ่งแต่จะนำพืชหรือสัตว์มาสกัดและแยกสารด้วยเทคนิคทางเคมีอินทรีย์เพื่อให้ได้สเตียรอยด์ในรูปสารบริสุทธิ์แล้วนำไปใช้จะต้องใช้พืชและสัตว์ในปริมาณมาก ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมคือ ส่งผลเสียต่อสมดุลทางธรรมชาติและก่อปัญหาวิกฤตโลกร้อนทั้งทางตรงและทางอ้อม ด้วยเหตุนี้การนำสเตียรอยด์มาใช้ในทางการแพทย์เพื่อเป็นตัวยาหรือส่วนประกอบของตัวยามีแนวโน้มกระทำโดยวิธีการสังเคราะห์โดยการนำสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์มาจากการเลียนแบบตามธรรมชาติมาเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันหรือการเพิ่มหมู่แทนที่บนส่วนของวงหรือสายโซ่ รวมทั้งการสังเคราะห์โดยวิธีเฉพาะเจาะจงเพื่อควบคุมสเตอริโอเคมี เพื่อให้ได้สเตียรอยด์สังเคราะห์ชนิดใหม่ ทั้งนี้เพื่อมุ่งหวังที่จะทำให้มีคุณสมบัติและการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อสิ่งมีชีวิตในแนวทางที่ดีขึ้น ซึ่งพบว่าสเตียรอยด์นั้นหากนำมาใช้อย่างถูกต้องตามหลักวิชาการจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก สารกลุ่มนี้จึงเป็นที่สนใจอย่างมากกับนักวิจัยด้านเคมีอินทรีย์ที่นิยมการสังเคราะห์และศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างสเตียรอยด์สังเคราะห์กับฤทธิ์ทางชีวภาพ ความแตกต่างของชนิดของสเตียรอยด์แต่ละชนิดจะแปรผันไปตามชนิดของหมู่ฟังก์ชันหรือชนิดของหมู่ฟังก์ชันบนสายโซ่ที่เกาะอยู่รอบนิวเคลียสหลักของสเตียรอยด์ เช่น Progesterone 5 จะมีหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 และ C-20 หรือ Testosterone 6 จะมีหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 และหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-17 จากโครงสร้างที่แตกต่างกันนี้จึงได้ส่งผลถึงคุณสมบัติที่แตกต่างกันด้วยดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น[1,2]



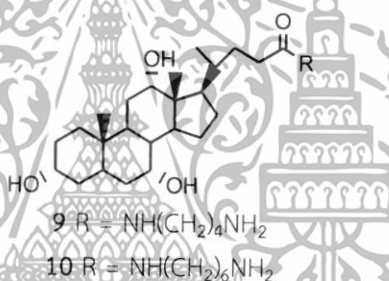
ไบล์แอซิด (Bile acid) หรือกรดน้ำดี เป็นสเตียรอยด์ที่ถูกสังเคราะห์มาจากคลอเลสเทอรอล จัดเป็นแอมฟิพาติก (amphipathic) ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic, ส่วนที่ละลายในไขมัน) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic, ส่วนที่มีขั้ว) จากโครงสร้างที่มีหมู่ฟังก์ชันหลายหมู่และมีสเตอริโอเคมีที่แตกต่างกัน จึงทำให้ไบล์แอซิดเป็นสเตียรอยด์อีกกลุ่มหนึ่งที่นักเคมีนิยมนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่และมีอนุพันธ์หลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าไบล์แอซิดตั้งต้น จากสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลายของไบล์แอซิดที่นำไปใช้เป็นส่วนประกอบของยาในการบำบัดรักษาโรคต่างๆ และโครงสร้างของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปลีแอซิดที่ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่สามารถปรับเปลี่ยนได้โดยการใช้ปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์ ซึ่งปรากฏในรายงานการวิจัยถึงผลของการเปลี่ยนหมู่แทนที่เพื่อเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าโปลีแอซิดตั้งต้น Savage และคณะ[3] สังเคราะห์อนุพันธ์อะมิโนของกรดโคคลิก 8a และ 8b โดยการปรับเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของกรดโคคลิก 7 ทั้งสามหมู่เป็นหมู่อะมิโน เพื่อศึกษาหาตัวยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

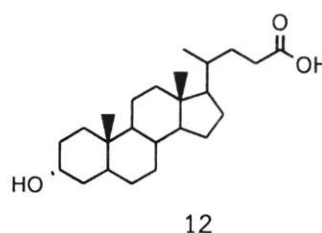
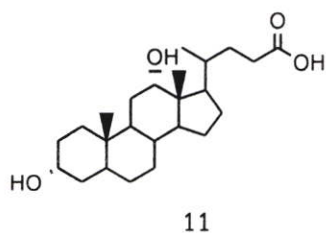


จากงานวิจัยต่อเนื่องของผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของกรดโคคลิก 7 โดยการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-24 ของกรดโคคลิก 7 ให้เป็นหมู่เอไมด์ โดยทำปฏิกิริยากับสารไดอะมิโนเบนซีนประเภทของแข็ง[4] พบว่าอนุพันธ์เอไมด์ของกรดโคคลิก 9 และ 10 มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (BC-Breast cancer) และเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) ที่ดีกว่ากรดโคคลิก 7



นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ใช้กรดไดออกซีโคคลิก 11 เป็นสารตั้งต้นในการเตรียมอนุพันธ์เอไมด์ที่มีความยาวของสายโซ่ไดอะมิโนที่แตกต่างกันและนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ *Corynebacterium diphtheriae* เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคคอตีบพบว่าอนุพันธ์เอไมด์ของกรดไดออกซีโคคลิก 11 ให้ค่า MIC ในช่วงระหว่าง 0.78-6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเพื่อเป็นการดำเนินงานที่ต่อเนื่องและต่อยอดแนวความคิด จากโครงสร้างโปลีแอซิดทั้งสองจะประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันหลายหมู่ที่มีสเตอริโอเคมีที่หลากหลาย ผู้วิจัยจึงเกิดแนวความคิดและสนใจสังเคราะห์อนุพันธ์อะมิโนของโปลีแอซิด โดยเลือกใช้กรดไดออกซีโคคลิก 11 และกรดลิโทโคคลิก 12 เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยากับบรีโอเจนต์ได้แก่สารประกอบเอมีน พอลิเอมีน และสารประกอบแอลกอฮอล์ วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้เพื่อศึกษาแนวทางการเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพให้แก่สเตียรอยด์สังเคราะห์ชนิดใหม่ นี้ โดยเฉพาะศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของอนุพันธ์โปลีแอซิดที่สังเคราะห์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



และจากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าโบล์แอซิดทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิงปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero) น้อยกว่าสเตียรอยด์ชนิดอื่นจึงเหมาะสำหรับการนำมาเป็นสารตั้งต้น การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจะเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลให้เป็นหมู่เอมีโนที่มีความยาวของสายโซ่แตกต่างกัน ซึ่งผู้วิจัยมีข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกใช้เอมีโนรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ จากการสังเคราะห์เอมีโนสเตียรอยด์มาบ้างแล้ว โดยจะเน้นการเกิดปฏิกิริยาเฉพาะที่ของหมู่คาร์บอกซิล (คาร์บอนตำแหน่ง C-24) จากนั้นจะนำสารอนุพันธ์โบล์แอซิดทั้งสองมาทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่ามะเร็งเป็นโรคร้ายที่คร่าชีวิตในอัตราการเสียชีวิตที่สูง และผู้ป่วยโรคนั้นทรมานกับความเจ็บปวดมาก นักวิจัยจึงพยายามหาตัวยาใหม่ๆ ที่ประกอบด้วยนิวเคลียสของสเตียรอยด์ทั้งจากสารธรรมชาติและสามารถสังเคราะห์สารออกฤทธิ์เลียนแบบธรรมชาติในห้องปฏิบัติการ จากข้อมูลเบื้องต้นของงานวิจัยที่กล่าวมาผู้วิจัยคิดว่าโครงการวิจัยนี้จะ เป็นแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ด้านเภสัชวิทยาล่วงคือ สามารถสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่สามารถนำไปเป็นตัวยารักษา มะเร็งหรือเป็นส่วนผสมในยารักษา มะเร็งชนิดใหม่ได้ และ/หรือใช้ทดแทนสเตียรอยด์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่จากโบล์แอซิด โดยการเลือกใช้สารเข้าทำปฏิกิริยาและเทคนิคในการสังเคราะห์ที่เหมาะสม
2. เพื่อศึกษาผลของสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์ได้ต่อความเป็นพิษของเซลล์
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์จากโบล์แอซิด

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่โดยการดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันของนิวเคลียส โดยใช้กรดดีออกซีโคลิก 11 และกรดลิโทโคลิก 12 เป็นสารตั้งต้น
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ เซลล์มะเร็ง 2 ชนิดได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line) และเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney) ด้วยวิธี MTT assay

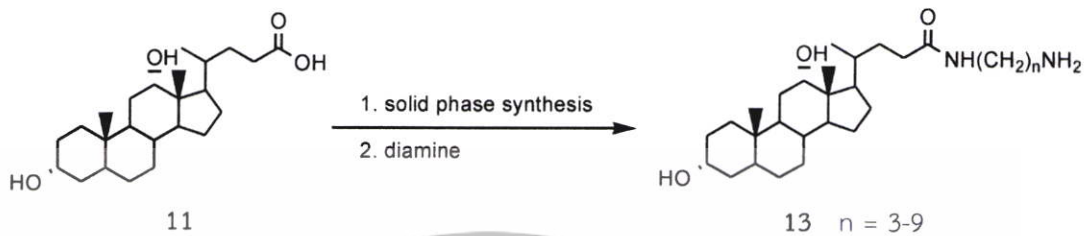
## 1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

**ขั้นตอนที่ 1** การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของโบล์แอซิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

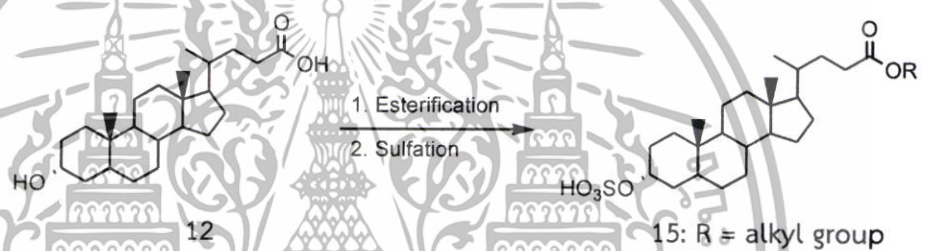
แนวทางการวิจัยได้เปลี่ยนไปจากข้อเสนอโครงการวิจัย โดยมีการเปลี่ยนใช้สารตั้งต้นเป็นกรดตืออกซีโคลิก 11 และกรดตือโทโคลิก 12 สำหรับแนวทางที่ 1 ใช้กรดตืออกซีโคลิก 11 เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์สรุปได้ในแผนภาพที่ 1.1

แผนภาพที่ 1.1



แนวทางที่ 2 ใช้กรดตือโทโคลิก 12 เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์สรุปได้ในแผนภาพที่ 1.2

แผนภาพที่ 1.2



จากนั้นนำอนุพันธ์สเตรอยด์ที่ได้จากการสังเคราะห์มาทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ศึกษาโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

### ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

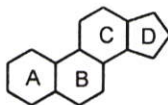
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสเตรอยด์สังเคราะห์ ทดสอบ ณ หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ด้วยวิธี MTT assay โดยใช้เซลล์ไลน์มะเร็งที่เกิดกับมนุษย์ได้แก่ เซลล์มะเร็ง 2 ชนิดได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line) และเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney)

### 1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

ในธรรมชาติมีสเตรอยด์ที่แตกต่างกันนับร้อยชนิดสามารถตรวจพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ การค้นพบสเตรอยด์เริ่มจากการสกัดจากพืชหรือเนื้อเยื่อของสัตว์ด้วยตัวทำละลายไม่มีขั้วเช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม หรือ เบนซีน ซึ่งพบว่าสเตรอยด์เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติคล้ายกับไขมันหรือเป็นของแข็ง สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์และไม่ละลายในน้ำ ความแตกต่างของสเตรอยด์แต่ละชนิดจะแปรผันไปตามหมู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

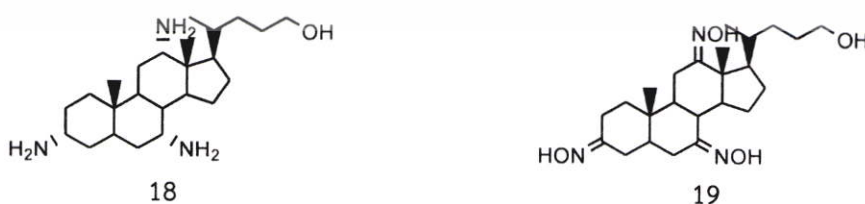
ฟังก์ชันที่ติดอยู่กับโครงสร้างหลัก สเตียรอยด์จัดเป็นอนุพันธ์ของสารที่มีโครงสร้างเป็นวงที่เรียกว่า Perhydrocyclopentanephenanthrene ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยม 3 วง คือ วง A วง B วง C และมีวงห้าเหลี่ยม 1 วง คือ วง D ที่เชื่อมต่อกัน



จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยมมาเชื่อมต่อกัน หมู่แทนที่ต่างๆ ที่มาเกาะจะเป็นหมู่ฟังก์ชันที่คล้ายคลึงกันมีคุณสมบัติทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว จึงทำให้สเตียรอยด์มีคุณสมบัติที่หลากหลาย นักเคมีได้ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะทางเคมีอินทรีย์ในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและรวมถึงโครงสร้างเพื่อเป็นการนำไปสู่สเตียรอยด์ชนิดใหม่ และรวมทั้งเป็นแนวทางไปสู่การสังเคราะห์สเตียรอยด์เลียนแบบธรรมชาติ โดยการเลือกใช้เอนไซม์หรือสารเข้าทำปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจง และควบคุมสภาวะที่เหมาะสมเพื่อจะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มากพอต่อการนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จากรายงานการวิจัยการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง มักมุ่งเน้นไปที่หมู่ฟังก์ชันเป็นส่วนใหญ่ ที่ ring A และ ring B หรือหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง การเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้างสเตียรอยด์จะขึ้นกับตำแหน่งบนโครงสร้าง ลำดับความสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาเรียงลำดับได้คือตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 11 17 และ 20 ตัวอย่างเช่น ผลการทดลองปฏิกิริยาเพิ่มเข้าด้วยนิวคลีโอไฟล์ที่หมู่คาร์บอนิล การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยไฮโดรไดโอออน การเกิดคีทาล (ketal formation) และปฏิกิริยาการเพิ่มเข้าด้วยกรีนยาร์ตรีเอนไซม์ สามารถเรียงลำดับตำแหน่งที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาได้คือ  $3 > 17 \geq 20 > 11$  เช่นความเฉพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ 5 $\alpha$ -androstane-3,17-dione 16 เป็น 3-hydroxy-5 $\alpha$ -androstane-17-one 17 แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งที่ 3 สามารถเกิดปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกว่าตำแหน่งที่ 17[5]

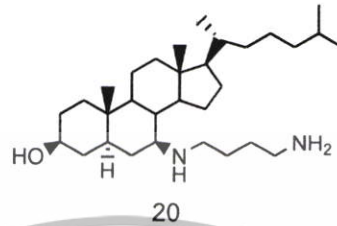


สารกลุ่มสเตียรอยด์ที่ได้รับความสนใจในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันโดยใช้สารเคมี (Chemical transformation) ด้วยสารกลุ่มเอมีนและพอลิเอมีนรีเอนไซม์ที่มีความยาวของสายโซ่แตกต่างกัน แสดงตัวอย่างได้ดังนี้ จากงานวิจัยของ Savage และคณะ[3] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ triamine 18 และอนุพันธ์ออกซิม 19 ของกรดโคเลอิก 7 พบว่าอนุพันธ์ทั้งสองมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

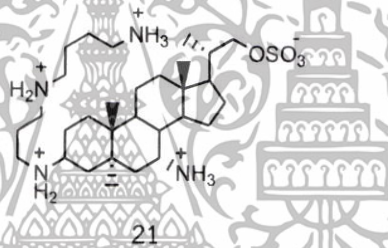


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

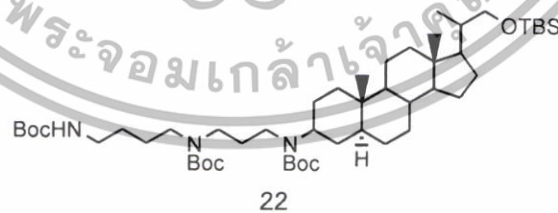
Loncle และคณะ[6] ได้ทำการสังเคราะห์ 7-amino และ polyaminosterol จาก 3 $\beta$ -acetoxy-7-keto-5 $\alpha$ -cholestane โดยทำปฏิกิริยา Reductive amination กับ Ti(OR)<sub>4</sub> และ NaBH<sub>4</sub> ทำการกำจัดหมู่แอซิเตตด้วย K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ใน MeOH : CHCl<sub>3</sub> (1:1) พบว่าสารผลิตภัณฑ์ 20 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์และว่องไวในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ส่งผลคล้ายกับ *Staphylococcus aureus* และ *S. faecalis*



Khan และคณะ[7] ได้ทำการสังเคราะห์ 7 $\alpha$ -Aminosteroids จาก 3-dioxolane-22-*tert*-butyldimethylsilyloxy-23,24-bisnor-5 $\alpha$ -cholan-7-one พบว่าสารผลิตภัณฑ์ 21 ที่ได้จะมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes* 308A

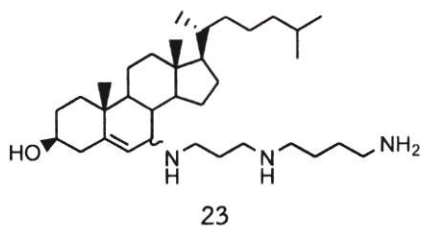


Kim และคณะ[8] ได้ทำการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 22 โดยการทำให้ปฏิกิริยา Amination ของ 3-ketosteroid ด้วยเอมีน ซึ่งวิธีการสังเคราะห์เป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์ Squalamine อะมิโนสเตียรอยด์จากฉลามพันธุ์ Dog fish ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบ และเชื้อรา



Kihel และคณะ[9] ได้ทำการสังเคราะห์ spermidinylcholesterol 23 และศึกษาฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์ทั้งนี้เพื่อพัฒนาต่อเป็นยาด้านเซลล์มะเร็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



จากตัวอย่างการปรับเปลี่ยนโครงสร้างนี้จะได้อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลายมากยิ่งขึ้นและเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสเตียรอยด์เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้ยังสามารถนำสเตียรอยด์สังเคราะห์ไปเป็นสารตั้งต้นในการเตรียมสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้อีก

## 1.6 คำสำคัญของการวิจัย

ไบล์แอซิด	กรดดีออกซีโคลิก	กรดลิโทโคลิก	ความเป็นพิษต่อเซลล์
Bile acid	Deoxycholic acid	Lithocholic acid	Cytotoxicity

## 1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่จากไบล์แอซิดได้ ซึ่งอนุพันธ์เหล่านี้อาจแสดงฤทธิ์ในการฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง
2. สามารถทราบถึงฤทธิ์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์ในการต้านความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาเพื่อผลิตส่วนผสมของยาที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อเซลล์มะเร็งเพื่อเป็นการนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

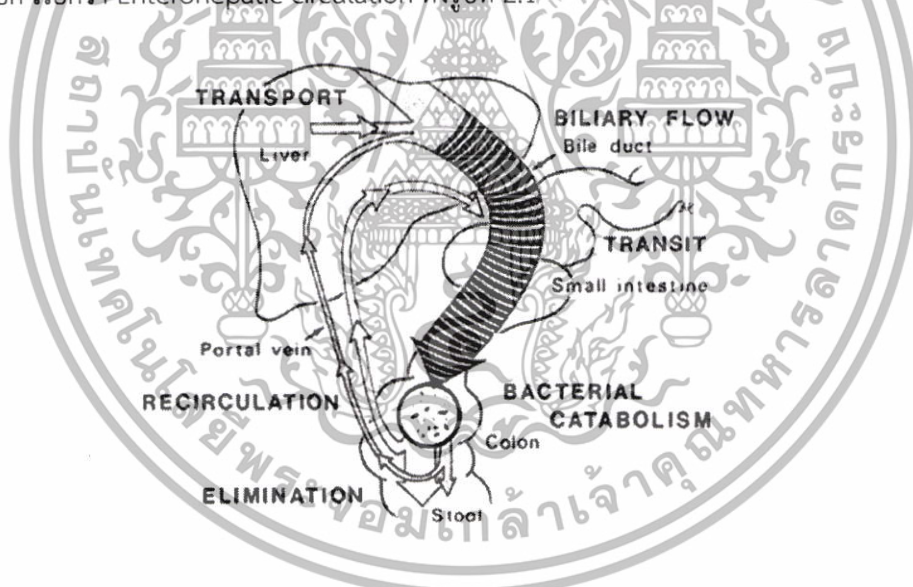
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

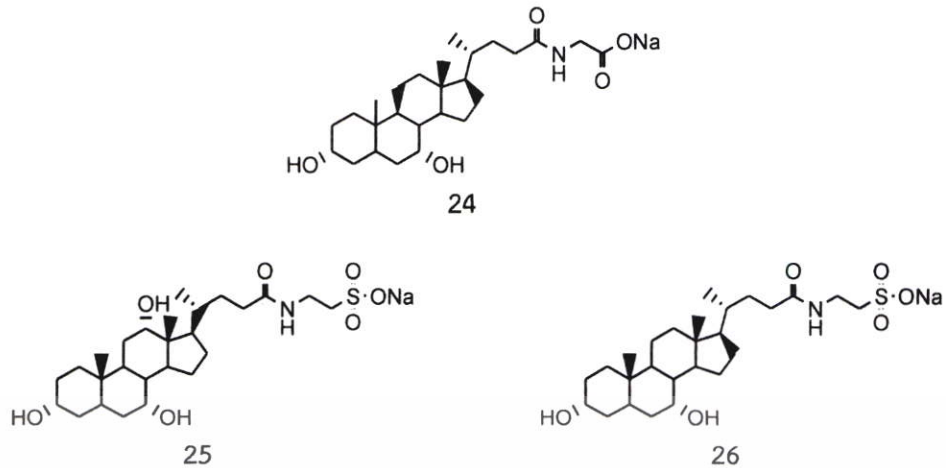
#### 2.1 แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับกรดน้ำดีหรือไบลแอซิด (cholanology) มีความสำคัญทั้งในด้านชีววิทยาและด้านการแพทย์ เกลื่อน้ำดีเป็นสเตียรอยด์ที่มีสมบัติเป็นติเทอเจนต์ซึ่งจะทำให้ทั้งไลปิดไขมัน คลอเลสเทอรอล มีรูปร่างเป็น mixed micelle ในลำไส้ สามารถย่อยและดูดกลืนผ่านทางผนังของลำไส้เล็กได้ ไบลแอซิดสามารถสังเคราะห์ได้จากคลอเลสเทอรอลในตับและถูกเก็บไว้ในถุงน้ำดี โดยตับจะสร้างไบลแอซิดในรูปของไบลแอซิดชนิดปฐมภูมิ (primary bile acid) และส่งไปเก็บที่ถุงน้ำดี เมื่อมีการกระตุ้น ถุงน้ำดีจะเกิดการบีบตัวแล้วขับน้ำดีเข้าสู่ลำไส้เล็ก แบคทีเรียในลำไส้จะทำให้ไบลแอซิดปฐมภูมิเปลี่ยนเป็นไบลแอซิดชนิดทุติยภูมิ (secondary bile acid) ซึ่งเกลื่อน้ำดีทั้งสองรูป ตลอดจนไบลแอซิดต่าง ๆ ก็จะถูกดูดกลับที่บริเวณไอเลียม (Ileum) โดยอาศัยกระบวนการแอกทีฟทรานสปอร์ต (Active transport) เข้าสู่กระแสเลือด เนื่องจากไบลแอซิดมีสมบัติไม่ชอบน้ำ จึงถูกขนส่งโดยจับกับอัลบูมิน (Albumin) เพื่อที่จะละลายอยู่ในเลือด แล้วกลับเข้าสู่ตับได้ โดยตับทำหน้าที่เปลี่ยนไบลแอซิดทั้งในรูปปฐมภูมิและทุติยภูมิให้อยู่ในรูปของเกลื่อน้ำดี ซึ่งพร้อมที่จะถูกลำเลียงเข้าสู่ถุงน้ำดีแล้วหลั่งออกไป การดูดซึมกลับที่ลำไส้เล็กเข้าสู่ตับของไบลแอซิดถูกควบคุมโดยระบบขนส่งที่ขึ้นกับโซเดียมไอออน วัฏจักรการขนส่งไบลแอซิดจากลำไส้เล็กไปยังตับและกลับเข้าสู่ลำไส้เล็กอีก เรียกว่า Enterohepatic circulation ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงกระบวนการ Enterohepatic circulation

ไบลแอซิดในตับจะถูกคอนจูเกตด้วยไกลซีน (Glycine) และเทารีน (Taurine) จึงอยู่ในรูปของ Glycochenodeoxycholate 24, Taurocholate 25 และ Taurochenodeoxycholate 26 จากนั้นจึงขับออกจากตับไปเก็บไว้ในถุงน้ำดี



ในน้ำดีนั้นพบว่าโบล์แอซิดที่คอนจูเกตแล้วทั้ง 4 รูปแบบดังกล่าวจะอยู่ในรูปของเกลือโซเดียมหรือเกลือโพแทสเซียม เช่น ในรูปของโซเดียมไกลโคโคเลตหรือโพแทสเซียมเทารโคเลต เป็นต้น และพบว่าโบล์แอซิดชนิดปฐมภูมิและเกลือน้ำดีที่คอนจูเกตแล้วจะแตกตัวเป็นไอออนได้เหมือนกันเมื่อมีอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบผ่านเข้ามาในระบบทางเดินอาหารแล้วกระตุ้นให้ถุงน้ำดีบีบตัวหลังน้ำดีเข้าสู่ลำไส้เล็ก จากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปของเกลือน้ำดีอีกครั้งโดยอาศัยแบคทีเรียในลำไส้เล็ก ซึ่งเริ่มแรกนั้นจะดึงเอากรดอะมิโนออกจากเกลือน้ำดีคอนจูเกต (เกลือน้ำดีชนิดปฐมภูมิ) ทำให้ได้เป็นโบล์แอซิดชนิดปฐมภูมิดังเดิม

### 2.1.1 องค์ประกอบของน้ำดี

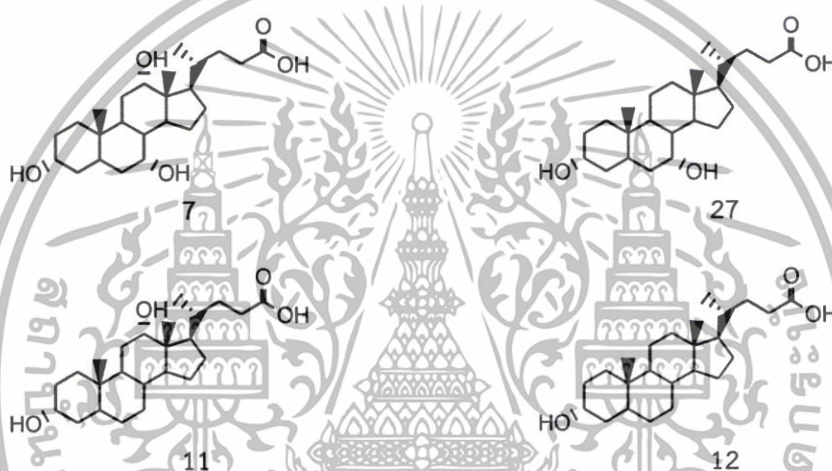
น้ำดีประกอบด้วยน้ำประมาณ 85-97 เปอร์เซ็นต์ มีสารประกอบอื่นที่รวมเรียกว่าของแข็ง(solid) ประมาณ 3-14 เปอร์เซ็นต์ โดยของแข็งในน้ำดีที่สำคัญ ได้แก่ เกลือน้ำดี (51-71 เปอร์เซ็นต์) บิลิรูบิน (10-20 เปอร์เซ็นต์) ฟอสโฟไลปิด (20-24 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่เป็นเลซิติน) และคลอเลสเทอรอล (4 เปอร์เซ็นต์) น้ำดีเป็นส่วนหนึ่งของเหลวที่ตับสังเคราะห์ขึ้นและสะสมไว้ในถุงน้ำดี (gallbladder) ส่วนประกอบของน้ำดีที่ขับออกจากตับมีส่วนประกอบที่ต่างจากน้ำดีที่เก็บไว้ในถุงน้ำดี เนื่องจากน้ำและอิเล็กโทรไลต์บางส่วนจะถูกดูดกลับ และมีสารบางชนิด เช่น mucin ถูกขับออกมาจากถุงน้ำดี ทำให้น้ำดีเข้มข้นและมีความหนืดมากขึ้น น้ำดีในถุงน้ำดีเป็นของเหลวขุ่น มีรสขม และมีกลิ่นเฉพาะ มักเป็นสีเหลืองทอง เหลืองน้ำตาลหรือเขียวมะกอก ซึ่งขึ้นอยู่กับสารสี ในวันหนึ่งๆ จะมีการหลั่งน้ำดีประมาณ 500-1,000 มิลลิลิตร น้ำดีที่ออกจากตับใหม่ ๆ มีพีเอชอยู่ระหว่าง 7.7-8.6 แต่พีเอชของน้ำดีที่อยู่ในถุงน้ำดีสามารถลดลงจนถึง 6.5 ได้ ส่วนความถ่วงจำเพาะนั้น น้ำดีในถุงน้ำดีนั้นอาจมีความถ่วงจำเพาะสูงถึง 1.040 เพิ่มขึ้นจากที่ออกมาจากตับใหม่ ๆ ถึง 0.030 เมื่อฟอสโฟไลปิดและคลอเลสเทอรอลรวมกับเกลือน้ำดีจะได้เป็น mixed micelle ซึ่งละลายได้ในน้ำดี ถ้าโบล์แอซิดถูกขับมากไลปิดก็จะถูกขับออกมามากด้วยคลอเลสเทอรอลที่ขับออกมาในน้ำดีได้มาจากเลือดและจากที่ตับสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ ตับจะสังเคราะห์คลอเลสเทอรอลขึ้นมาประมาณวันละ 1-1.5 กรัม catabolism ส่วนใหญ่ของคลอเลสเทอรอลในร่างกายคือการสลายเป็นโบล์แอซิด ตับจะขับคลอเลสเทอรอลออกจากน้ำดีประมาณวันละ 2 กรัม แต่คลอเลสเทอรอลจะมี enterohepatic circulation เช่นเดียวกับโบล์แอซิดโดยถูกดูดกลับประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือจะขับออกทางอุจจาระ ซึ่ง 30 เปอร์เซ็นต์ มาจากตับและอีก 70 เปอร์เซ็นต์เป็นคลอเลสเทอรอลของเยื่อลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

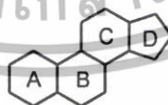
1. cholic acid (3, 7, 12-trihydroxycholanic acid)
2. deoxycholic acid (3, 12-dihydroxycholanic acid)
3. chenodeoxycholic acid (3, 7- dihydroxycholanic acid)
4. lithocholic acid (3-monohydroxycholanic acid)

เกลือน้ำดีหรือไบล์แอซิดมี 2 ชนิดที่สำคัญ คือ ไบล์แอซิดชนิดปฐมภูมิและไบล์แอซิดชนิดทุติยภูมิ ตับจะสังเคราะห์ไบล์แอซิดชนิดปฐมภูมิซึ่งก็คือ กรดโคเลลิค 7 และกรดคิโนต็อกซีโคเลลิค 27 จากคลอเลสเทอรอล ส่วนไบล์แอซิดชนิดทุติยภูมิ ได้แก่ กรดต็อกซีโคเลลิค 11 และกรดลิโทโคเลลิค 12 โดยแบคทีเรียจะเปลี่ยนกรดโคเลลิค 7 ให้กลายเป็นกรดต็อกซีโคเลลิค 11 และเปลี่ยนกรดคิโนต็อกซีโคเลลิค 27 เป็นกรดลิโทโคเลลิค 12



### 2.1.2 โครงสร้างทางเคมีของไบล์แอซิด

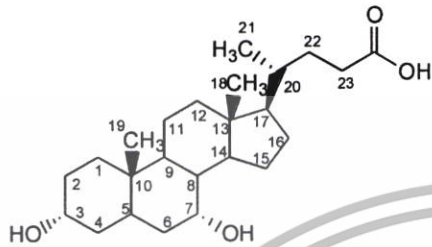
ไบล์แอซิดประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อยที่เชื่อมต่อกัน คือ ส่วนที่เป็นนิวเคลียสสเตียรอยด์และส่วนที่เป็นโซ่กิ่งสั้นของอะลิฟาติก นิวเคลียสสเตียรอยด์ของไบล์แอซิดนั้นมีวงไฮโดรคาร์บอนที่อัดตัวอยู่ 4 วง เรียกว่า perhydrocyclopentaphenanthrene ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยม 3 วง คือ วง A B และ C และวงห้าเหลี่ยม 1 วงคือวง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



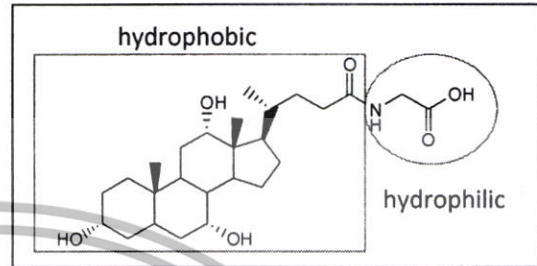
การนับตำแหน่งของไบล์แอซิดแสดงดังตัวอย่าง เช่น กรดคิโนต็อกซีโคเลลิค 27 ในโครงสร้างด้านบนสุด นิวเคลียสของไบล์แอซิดจะโค้งเพราะวง A และวง B อยู่ในรูปของ *cis*-fused configuration บางไบล์แอซิดนั้นในโครงสร้างหลักข้างสุด หรือที่รู้จักกันคือ แอลโล-ไบล์แอซิด จะแบนราบเนื่องจาก *A/B trans*-fusion (5 $\alpha$ -stereochemistry) โครงสร้างโซ่กิ่งจะกำหนดกลุ่มของสารประกอบ (ไบล์แอซิดหรือไบล์แอลกอฮอล์) มีไบล์แอลกอฮอล์ 4 ชนิดที่แตกต่างกัน (C-27, C-26, C-25 และ C-24) และมันจะเกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตที่มีรูปแบบของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิวัฒนาการที่น้อย ไบส์แอซิดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักขึ้นอยู่กับความยาวของโซ่กิ่ง คือไบส์แอซิด C-27 และ C-24 ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง ไบส์แอซิด C-24 จะประกอบด้วยองค์ประกอบหลักของน้ำดี พวกมันจะถูกคอนจูเกตด้วยไกลซีนหรือเทารีน เพื่อให้ได้ผลผลิตในรูปของไบส์แอซิดที่ถูกคอนจูเกตแล้ว ไบส์แอซิดเป็นแอมฟิพาติก (amphipathic) กล่าวคือจะประกอบไปด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (ส่วนที่ละลายในไขมัน) และส่วนที่ชอบน้ำ (ส่วนที่มีขั้ว) ดังรูปที่ 2.2



27 Chenodeoxycholic acid



รูปที่ 2.2 แสดงความเป็น Amphipathic ของไบส์แอซิด

### 2.1.3 โครงสร้างทางเคมีของไบส์แอซิดและการวิวัฒนาการ

ไบส์แอซิดเป็นสิ่งที่มีความหลากหลายของโครงสร้าง ไบส์แอซิดที่ต่างชนิดกันจะมีความแตกต่างทางเคมีใน 3 ประเด็น คือ 1. โครงสร้างโซ่กิ่ง 2. สเตอริโอเคมีของวง A/B fusion และ 3. การกระจายของเลขตำแหน่ง และสเตอริโอเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลในนิวเคลียสสเตียรอยด์ ในหลายสปีชีส์ที่ผ่านมา Haslewood ได้พิจารณาโครงสร้างของไบส์แอซิดเพื่อให้เข้าใจในกระบวนการวิวัฒนาการ แต่ก่อนนั้นโครงสร้างของไบส์แอซิดจะแสดงรูปแบบของการพัฒนาไม่เลกัลไปตามแนวเส้นของโครงสร้างหลัก หลักฐานที่ชัดเจนของการพัฒนาของไบส์แอซิดผ่านลำดับขั้นคือ ที่ตำแหน่ง C-27 ของไบส์แอลกอฮอล์จะเปลี่ยนไปเป็นกรดคาร์บอกซิลิก และสุดท้ายจะเปลี่ยนกรดคาร์บอกซิลิกจากตำแหน่ง C-27 ไปเป็นตำแหน่ง C-24 ไบส์แอลกอฮอล์ทำหน้าที่เสมือนเกลือน้ำดีหลังจากเกิดคอนจูเกตกับซัลเฟต (ทำให้ค่าการละลายในน้ำเพิ่มขึ้น) เช่นเดียวกับกับ C-27 acid ที่ถูกคอนจูเกตด้วยเทารีนและ C-24 acid ในน้ำดีที่ถูกคอนจูเกตด้วยเทารีนและไกลซีน มีการเสนอว่าไบส์แอซิดที่เกิดขึ้นจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี 5 $\beta$ -configuration กับหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3-แอลฟา, 7-แอลฟา และ 12-แอลฟา

### 2.1.4 การส่งเกลื่อน้ำดีออกจากตับ

ตับส่งเกลื่อน้ำดีออกจากเซลล์เข้าสู่ท่อน้ำดีย่อยโดยใช้กระบวนการแอกทีฟทรานสปอร์ตซึ่งต้องใช้พลังงานจาก ATP การส่งออกเกลื่อน้ำดีก็จะเป็นการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี จะมีผลทำให้เกิดการขับอิเล็กโทรไลต์ คลอเลสเตอรอล และฟอสโฟไลปิดตามออกมาด้วย เมื่อเกลื่อน้ำดีถูกขับลงสู่ลำไส้เพื่อช่วยในการย่อยและดูดซึมอาหารไขมัน แบคทีเรียในลำไส้จะสลายพันธะระหว่างเกลื่อน้ำดีกับไกลซีน และเทารีนได้เป็นไบส์แอซิดชนิดปฐมภูมิแบบไม่คอนจูเกต (unconjugated primary bile acid) ซึ่งส่วนหนึ่งจะถูกรีดิวส์ให้เป็นไบส์แอซิดชนิดทุติยภูมิ โดยการตัดหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-7 ออก

### 2.1.5 ชีวิตสังเคราะห์ของไบส์แอซิด

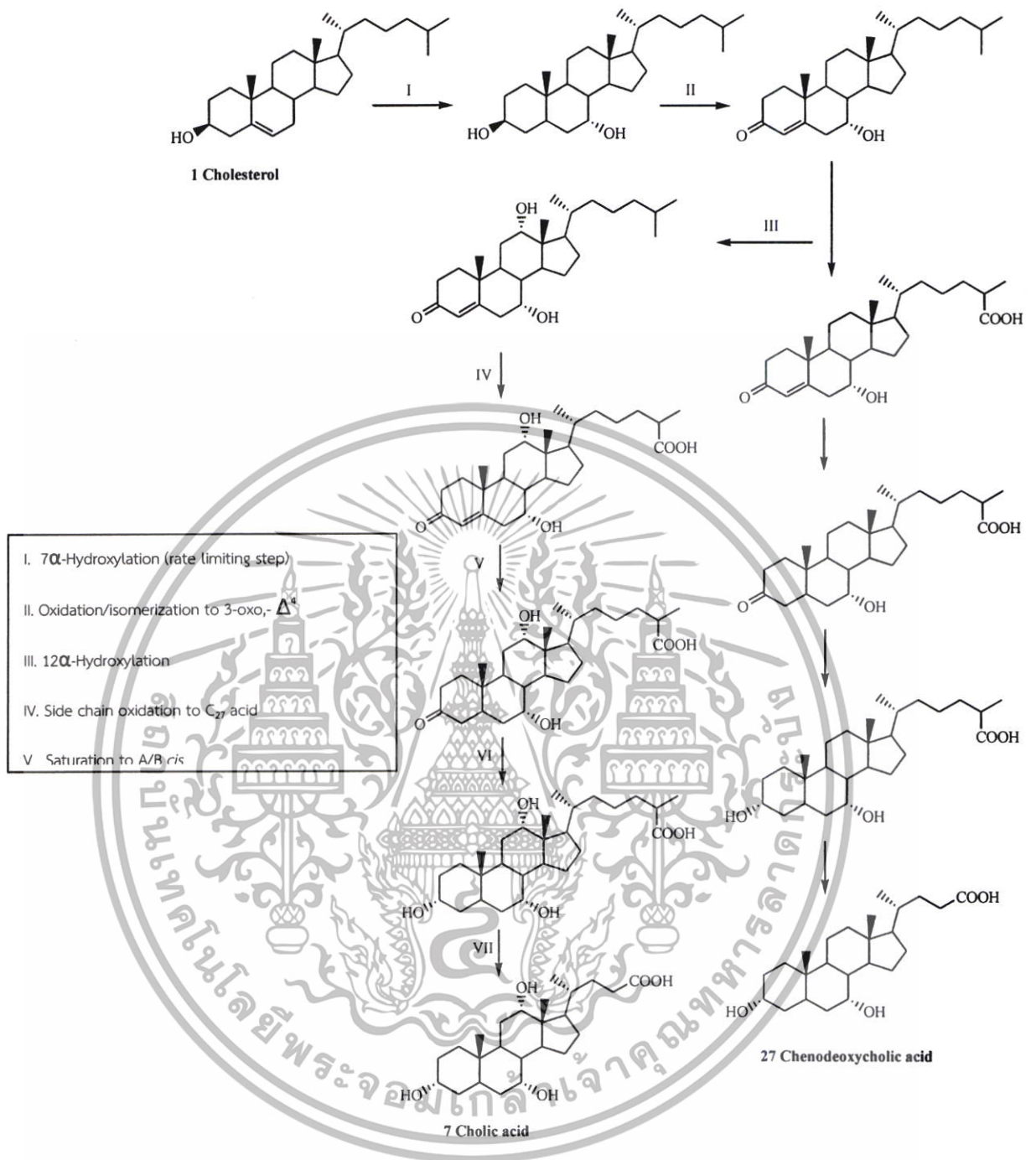
ไบส์แอซิดถูกสังเคราะห์จากคลอเลสเตอรอล ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับจำนวนขั้นตอนที่ซับซ้อนทั้งในนิวเคลียสสเตียรอยด์และโซ่กิ่ง ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.1 ชีวิตสังเคราะห์นั้นจะเกี่ยวข้องอย่างน้อย 5 ลำดับขั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในแต่ละนิวเคลียสและโซ่กิ่ง การอธิบายลำดับขั้นชีวสังเคราะห์ของโพลีแอซิดจะเป็นแบบทางอ้อม โดยในลำดับขั้นแรกนั้นจะเป็นลำดับขั้นกำหนดอัตรา (rate limiting step) โดยคลอเลสเทอรอลจะถูกออกซิไดซ์ด้วยคลอเลสเทอรอล 7-แอลฟา-ไฮดรอกซีเลส (CYP7A1) ได้เป็น 7-แอลฟาไฮดรอกซีคลอเลสเทอรอล แล้ว 7-แอลฟาไฮดรอกซีคลอเลสเทอรอลจะถูกเปลี่ยนไปเป็น cholest-7 $\alpha$ -hydroxy- $\Delta^4$ -3-one โดยผ่านการกระทำของไอโซเมอเรส (isomerase) และรีดักเทส (reductase) อนุพันธ์ออกโซที่ไม่อิ่มตัวจะเป็นจุดต่อกิ่งของชีวสังเคราะห์กรดโคเลอิก 7 และกรดคีโนต็อกซีโคเลอิก 27

กระบวนการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ที่ตำแหน่ง C-12 ก่อให้เกิดรูปร่างของโครงสร้างกรดโคเลอิก อนุพันธ์ออกโซเป็นสเตอริโอซีเลคทีฟ (stereoselective) ที่ลดการมีโครงสร้างของ 5 เบต้า-โพลีแอซิด ขั้นการสันดาปในลำดับขั้นที่ 2 จะเกิดปฏิกิริยา 27-ไฮดรอกซีเลชัน (27-hydroxylation) เป็นการสร้างกรดคาร์บอกซิลิกที่ตำแหน่ง C-27 ขึ้นมา ซึ่งเชื่อว่าเกิดขึ้นในตอนกลางของไมโทคอนเดรียโดยเอนไซม์ P-450 ไฮดรอกซีเลส หลังจากนั้นเอนไซม์ peroxisomal จะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดทีฟคลีเวจ (oxidative cleavage) ของโซ่กิ่งทำให้กรดคาร์บอกซิลิกจากตำแหน่ง C-27 เปลี่ยนไปอยู่ที่ตำแหน่ง C-24 แทน ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นโพลีแอซิดที่สมบูรณ์และโพลีแอซิดจะเปลี่ยนสภาพทางชีวเคมีโดยเข้าไปคอนจูเกตกับไกลซีนและเทารีน โดยเอนไซม์เอซิลทรานเฟอเรส (acyltransferase) ซึ่งเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาเอมิเดชัน (amidation) ในระยะสิบปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาที่สำคัญที่ประสบความสำเร็จในพันธุศาสตร์ของการสังเคราะห์โพลีแอซิด การสังเคราะห์องค์ประกอบที่สมบูรณ์ของโพลีแอซิดนั้นต้องการเอนไซม์ร่วมด้วย 17 เอนไซม์ การแสดงออกของเอนไซม์ที่ถูกเลือกจะต้องควบคุมเป็นอย่างดีโดยตัวรับนิวเคลียร์ฮอร์โมน (Nuclear hormone receptor) และปัจจัยกระบวนการถอดรหัส (transcription) อื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



แผนภาพที่ 2.1 การสังเคราะห์โบลีแอซิดจากคลอเลสเตอรอล

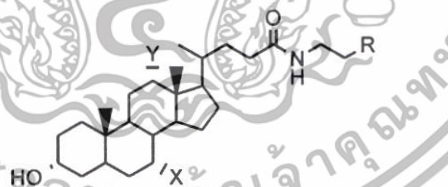
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.6 การนำไปใช้ทางด้านเภสัชวิทยาของโพลีเอซิด

ในช่วงเวลาไม่ถึงสิบปีมานี้ได้มีการพิจารณาในการศึกษาและการสังเคราะห์เรื่องสารลดแรงตึงผิวชนิดไอออนบวกจากอนุพันธ์ของน้ำดี จากการศึกษาส่วนใหญ่จะนำโพลีเอซิดมาทำปฏิกิริยากับโพลีเอซิดโดยเปลี่ยนเป็นพันธะเอไมด์ และเอมีนชนิดอื่น ๆ จะเปลี่ยนเป็นเกลือของควอเทอร์นารีแอมโมเนียม Bernheim และ Lack[10] ได้ศึกษาอนุกรมของอนุพันธ์ของกรดโคลานิกและแสดงถึงเกลือน้ำดีไอออนบวกซึ่งสามารถเร่งการบวมตัวของแบคทีเรียได้ ยิ่งไปกว่านั้นการบวมตัวของแบคทีเรียจะแสดงถึงการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน สมบัติการต้านไวรัสและการต้านเชื้อราของอนุพันธ์โพลีเอซิดบางตัวได้ถูกพิจารณา เกลือควอเทอร์นารีแอมโมเนียมจากโพลีเอซิดจะทำเป็นสารละลายคลอเลสเตอร์รอล อนุพันธ์สเตียรอยด์นั้นจะไปเร่งการสลายตัวของคลอเลสเตอร์รอลโมโนไฮเดรตในสารน้ำดีสังเคราะห์ (11mM NaC 32 mM lecithin) โดยมีนจะเกิดขึ้นได้ที่ระดับความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ อนุพันธ์ Nor- และอนุพันธ์ไฮโมโบลีเอซิดจะถูกเติมลงไปเ็นยาบางชนิดเพื่อปรับปรุงการดูดซึม โดย Cationic amphiphiles ได้มาจากการคอนจูเกตของโพลีเอซิดกับพอลิเอมีนจะแสดงถึงการดูดซึมและการนำเข้าไปเยื่อเซลล์ของ DNA ความสามารถในการทรานสเฟกชัน (transfection) ของโพลีเอซิดคอนจูเกตพอลิเอมีนที่ผสมอยู่กับ dioleoyl phosphatidyl-ethanolamine (DOPE) จะอยู่ในช่วง 3-7 เท่าของความสามารถที่เหมาะสมของ lipofectin (ซึ่งเป็นสารผสมระหว่าง DOTMA (*N*-[1,2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammoniumchloride) กับ DOPE) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการตระหนักถึงความจำเพาะที่สูงและความสามารถในการบรรจุของระบบการขนส่งโพลีเอซิด ในระหว่างการเกิด Enterohepatic circulation ซึ่งอาจมาจากหลักฐานสำคัญของงานวิจัยในปัจจุบันของยาคอนจูเกตโพลีเอซิด เพื่อใช้เป็นยาเฉพาะเป้าหมายที่ตับ และเพื่อปรับปรุงการดูดซึมของลิแกนด์เล็กที่มีการดูดซึมไม่ดีหรือไม่ดูดซึมยา ตัวอย่างเช่นเปปไทด์

### 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวทางการสังเคราะห์อนุพันธ์ของโพลีเอซิดและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ถูกกล่าวถึงโดย Valkonen และคณะ[11] สังเคราะห์ bile acid-amidoalcohol โดยการทำให้หมู่คาร์บอกซิลของโพลีเอซิดให้เป็นหมู่เอมีโดแอลกอฮอล์ และศึกษาโครงสร้างของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค X-ray



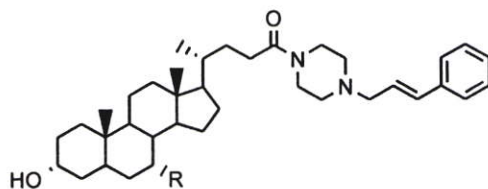
28a X, Y = H, R = OH

28b X, Y = H, R = CH<sub>2</sub>OH

Ju และคณะ[12] สังเคราะห์สารอนุพันธ์ของกรดดีออกซีโคลิก 11 โดยมีโครงสร้างหลักที่มีการสร้างพันธะเชื่อมต่อระหว่างกรดดีออกซีโคลิก-พอลิเอมีน-นิวคลีโอไซด์ และนำอนุพันธ์มาทดสอบฤทธิ์ต้านเนื้องอกพบว่าให้ฤทธิ์ในการต้านเนื้องอกในระดับที่ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

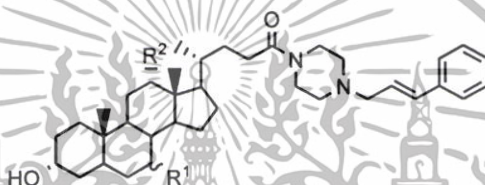
Kihel และคณะ[13] สังเคราะห์สาร 29a และ 29b จาก lithocholic acid 12 และ chenodeoxycholic acids 27 พบว่าอนุพันธ์ทั้งสองสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้



29a R= H

29b R = OH

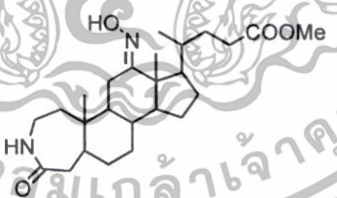
Kihel และคณะ[14] สังเคราะห์อนุพันธ์ของโบลัสแซด 30a และ 30b พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ในระดับที่ดี



30a R<sup>1</sup> =  $\beta$ -OH, R<sup>2</sup> = H

30b R<sup>1</sup> =  $\alpha$ -OH, R<sup>2</sup> = H

Song และคณะ[15] สังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดโคเลอิก 7 และ 7-deoxycholic acid โดยเปลี่ยนวง A เป็น homo-lactam และนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 20.6 ไมโครโมล/ลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การทดลองทั่วไป

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารได้แก่ dichloromethane (DCM, เกรตวิเคราะห์, Lab-Scan) นำมาใช้โดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์ dimethylformamide (DMF, เกรตวิเคราะห์, Lab scan) ที่นำมาใช้จะแช่ไว้ใน Molecular sieve เพื่อดูดน้ำและความชื้น pyridine (เกรตวิเคราะห์, Lab scan) ที่ใช้ในการทดลอง ถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นที่อุณหภูมิ 115-116 องศาเซลเซียส และเติม sodium hydroxide anhydrous เพื่อดูดน้ำ ระยะเวลาในการใช้ 30 วัน ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้แก่ hexane, ethyl acetate และ methanol (เกรตการค้า, Zen point) นำมาผ่านกระบวนการกลั่นเพื่อทำให้บริสุทธิ์ก่อนการใช้งาน และสารเคมีที่ใช้เป็นสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ในการสังเคราะห์เป็นเกรตวิเคราะห์ของบริษัท Sigma และ Aldrich ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีทำให้ปรากฏบนแผ่น aluminium sheet silica gel F<sub>254</sub> Merck ตรวจสอบจุดของสารผลิตภัณฑ์ด้วยการดูคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และ/หรือโดยการย้อมด้วย anisaldehyde reagent แล้วให้ความร้อนบน TLC บนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

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

สเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR และ <sup>13</sup>C NMR บันทึกโดยเครื่องฟูเรียรทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกะเฮิรตซ์ การเตรียมสารตัวอย่างจะทำการละลายโดยใช้ตัวทำละลาย CDCl<sub>3</sub> และ CD<sub>3</sub>OD จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ CHCl<sub>3</sub> ที่ δ 7.25 ppm สำหรับสเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR และที่ δ 77.5 ppm สำหรับสเปกตรัม <sup>13</sup>C NMR และ CH<sub>3</sub>OH ที่ δ 4.80 ppm สำหรับสเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR และที่ δ 49.0 ppm สำหรับสเปกตรัม <sup>13</sup>C NMR

จุดหลอมเหลวบันทึกโดยเครื่องหาจุดหลอมเหลว GALLEKAMP SANYO

อินฟราเรดสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องฟูเรียรทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX 60237 โดยใช้ KBr เป็นวัสดุในการทำหน้าต่างเซลล์ และทำการบันทึกในช่วงความถี่ 4,000-400 cm<sup>-1</sup>

แมสสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ Finnigan LC-Q MS detector ด้วยเทคนิค Electrospray จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง และ Thermo Finnigan Model Palaris Q-Mass Spectrometer serial No. MS 210179 จากมหาวิทยาลัยมหิดล

การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์โดยเทคนิควิภาคของแข็งใช้ รีเอเจนต์ A และ รีเอเจนต์ B ในการทดสอบ ซึ่งเตรียมได้ดังนี้

รีเอเจนต์ A : สารละลาย 1) ซังฟีนอล 40 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร สารละลาย 2) ซังโพแทสเซียมไฮยาไนด์ 65 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารละลายมา 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยพิริดีน 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการผสมสารละลาย 1 และ 2 ตั้งบ่มจนให้สารละลายผสมเข้ากัน

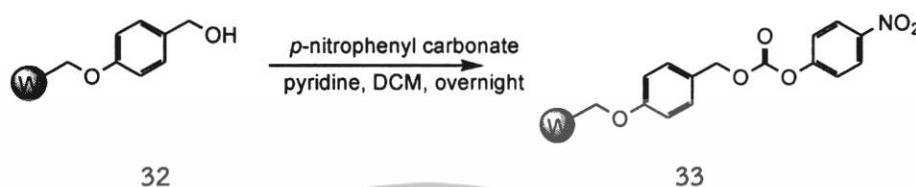
รีเอเจนต์ B : ซังนินไฮดริน 2.5 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของกรดตียอกซีโคลิก 13a-13f โดยเทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็ง [16]

### 3.2.1 ปฏิกิริยาการกระตุ้น Wang resin โดยการเปลี่ยนเป็นหมู่คาร์บอเนต

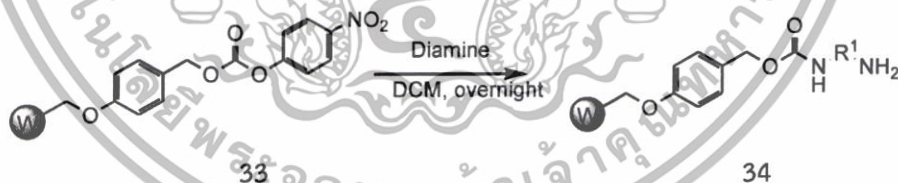
แผนภาพที่ 3.1



1. ชั่ง Wang resin 32 จำนวน 100.0 มิลลิกรัม (0.10 มิลลิโมล) ใส่ลงใน column cap แล้วเติม DCM 10 มิลลิลิตร แช่ไว้ประมาณ 10 นาที จนกระทั่งเรซินบวมตัว
2. ไข DCM ออกจาก column cap เติมสารละลายของ 4-nitrophenylchloroformate 80.6 มิลลิกรัม (0.40 มิลลิโมล) ใน DCM ลงใน column cap
3. เติม pyridine ลงไปประมาณ 5 หยด แล้วเติม DCM จนได้ปริมาตร 2/3 ของ column cap จากนั้นปิดฝา column cap ให้เรียบร้อย และระบายความดันภายใน column cap นำ column cap ไปตั้งหมุน เปิดเครื่องตั้งหมุนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
4. เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดไขสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง ล้างเรซินด้วย DCM หลายๆ ครั้ง จะได้ p-nitrophenyl carbonate wang resin 33

### 3.2.2 ปฏิกิริยาการใส่ไดเอมีนเข้าไปทำปฏิกิริยากับ Wang resin

แผนภาพที่ 3.2



34a: R<sup>1</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-

34b: R<sup>1</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-

34c: R<sup>1</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-

34d: R<sup>1</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-

34e: R<sup>1</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-

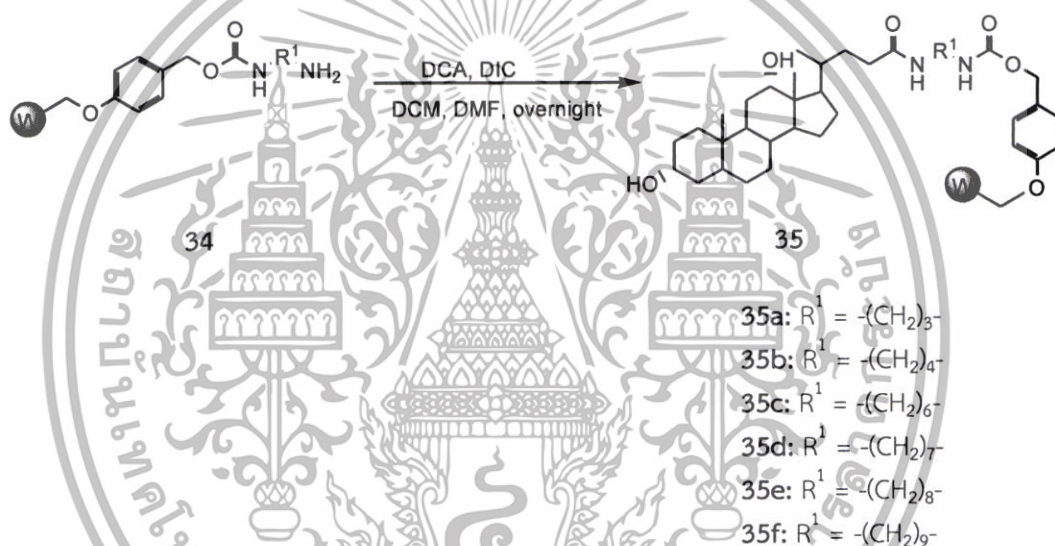
34f: R<sup>1</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ชั่งไตเอมีนจำนวน 4 equivalent ของ Wang resin ละลายในไดคลอโรมีเทน จากนั้นเติมลงใน column cap ที่ได้จากปฏิกิริยา 3.2.1
2. จากนั้นเติม DCM ลงใน column cap จนได้ปริมาตร 2/3 ของหลอด
3. นำ column cap ไปตั้งหมუნ เปิดเครื่องตั้งหมუნทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
4. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไซสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง ล้างเรซินด้วย DCM สลับกับ methanol หลายๆ ครั้ง
5. นำเม็ตรезิน 2-3 เม็ด ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กไปทดสอบ โดยใส่ รีเอเจนต์ A 3 หยด และรีเอเจนต์ B 1 หยด จากนั้นนำหลอดทดลองนี้ไปให้ความร้อนประมาณ 1 นาที ถ้าเม็ตรезินเปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่าไตเอมีนได้ทำปฏิกิริยากับ Wang resin สมบูรณ์แล้ว

### 3.2.3 ปฏิกิริยาการใส่กรดคีออกซีโคลิก (DCA) 11 เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน

แผนภาพที่ 3.3



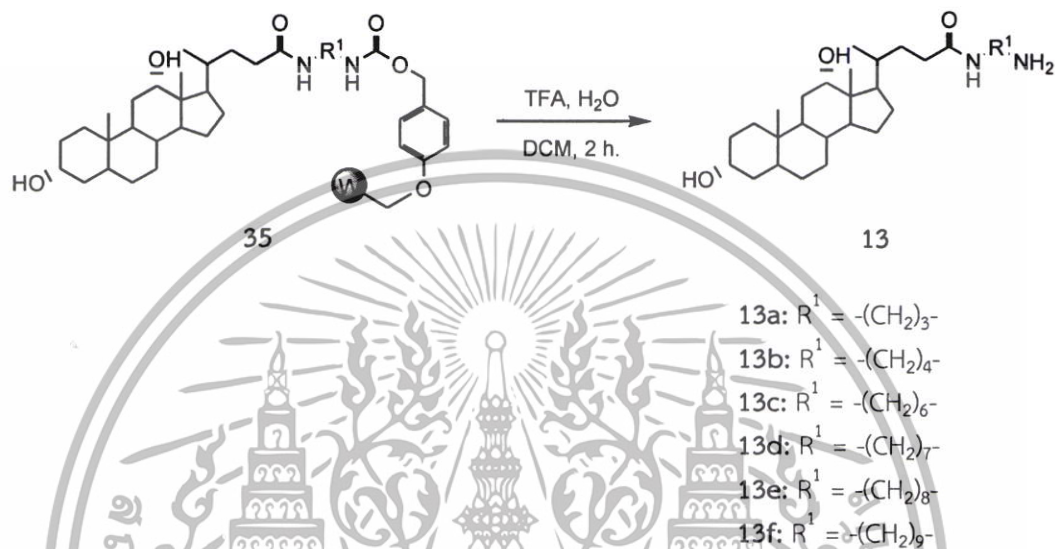
1. ชั่งกรดคีออกซีโคลิก (DCA) 11 จำนวน 4 equivalent ของ Wang resin ใส่ลงใน vial ละลายด้วย DCM และ DMF ทำการปั่นกววนจนกระทั่งโบล์แอซิดละลายหมด
2. จากนั้นใส่ *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) ลงในโบล์แอซิดปั่นกววนต่อเป็นเวลา 10 นาที
3. นำโบล์แอซิดที่ได้จากข้อ 2 ใส่ลงใน column cap ที่มีเรซินที่ได้จากปฏิกิริยา 3.2.2
4. เติม DCM ลงใน column cap จนมีปริมาณเป็น 2/3 ของหลอด
4. นำ column cap ไปตั้งหมუნ เปิดเครื่องตั้งหมუნทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
5. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไซสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง และล้างเรซินด้วย DCM สลับกับ methanol จากนั้นแช่เรซินใน DCM เป็นเวลา 30 นาที สลับกับแช่ใน methanol เป็นเวลา 30 นาทีเช่นกัน ประมาณ 5-6 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. นำเม็ดเรซิน 2-3 เม็ด ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กไปทดสอบ โดยใส่รีเอเจนต์ A 3 หยด และรีเอเจนต์ B 1 หยด จากนั้นนำหลอดทดลองนี้ไปให้ความร้อนประมาณ 1 นาที ถ้าเม็ดเรซินไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่าไบลแอซิดได้ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนสมบูรณ์แล้ว

### 3.2.4 ปฏิกิริยาการตัดสารผลิตภัณฑ์ออกจาก Wang resin

แผนภาพที่ 3.4



1. นำ column cap ที่มีเรซินที่ได้จากปฏิกิริยา 3.2.3 มาเติม TFA ลงไปประมาณ 1/3 โดยปริมาตรของหลอด จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 2-3 หยด
2. เติม DCM ลงใน column cap จนมีปริมาตรเป็น 2/3 ของหลอด
3. นำ column cap ไปตั้งหมน เปิดเครื่องตั้งหมนทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
4. โขสารละลายจาก column cap ใส่ลงในขวดแก้วเล็กที่ทราบน้ำหนัก จากนั้นนำไปพ่นด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อกำจัดตัวทำละลายออกจากสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมด
5. นำขวดแก้วเล็กที่มีสารผลิตภัณฑ์ไปชั่งน้ำหนักเพื่อกำหนดหาปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ได้
6. นำสารผลิตภัณฑ์ไปตรวจวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

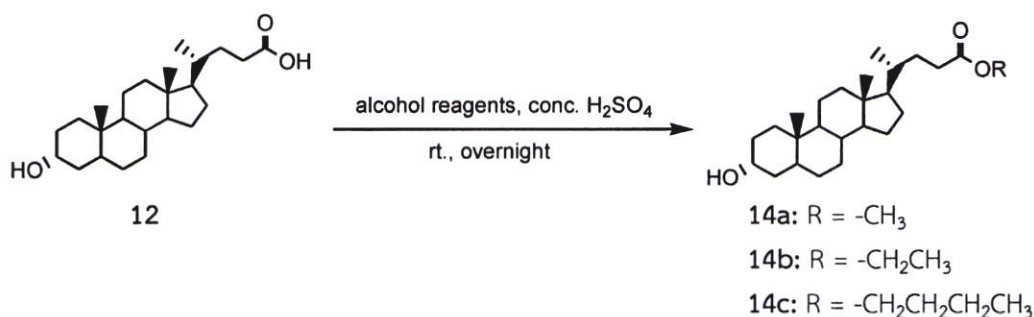
### 3.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดลิโทโคลิก 14a-14f

#### 3.3.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิกโดยการทำให้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

##### 3.3.1.1 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ Sulfuric acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ใช้กรดลิโทโคลิก 12 เป็นสารตั้งต้น โดยทำการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-24 โดยใช้สารเข้าทำปฏิกิริยาเป็นตัวทำละลาย ได้แก่ methyl alcohol, ethyl alcohol และ butyl alcohol ตามลำดับ

## แผนภาพที่ 3.5

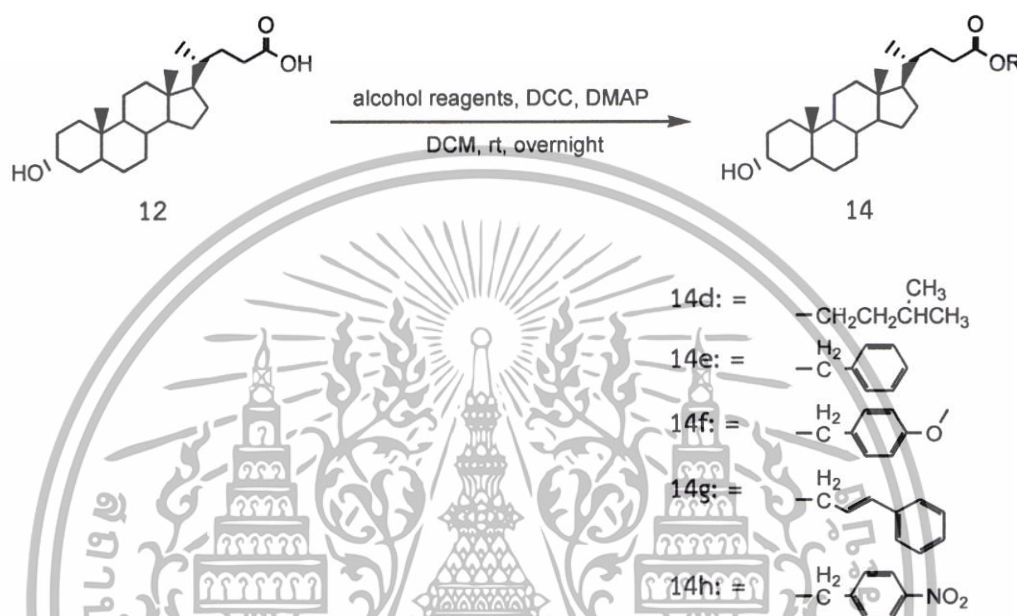


1. ชั่งกรดลิโทโคลิก 12 200.0 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล) ละลายด้วย ethyl alcohol ในขวดกันกลม ทำการปั่นกวอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งกรดลิโทโคลิก 12 ละลายหมด
2. ค่อยๆ หยด conc. sulfuric acid 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม ethyl alcohol ปริมาตรมากเกินพอ 10 เท่าของสารตั้งต้น และทำการปั่นกวที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับกรดลิโทโคลิก 12 โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงบนแผ่น TLC หากพบว่าจุดของผลิตภัณฑ์ไม่มีสารตั้งต้นเจือปนหรือเจือปนน้อยที่สุด แสดงว่าเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว
4. หยุดการปั่นกวและนำสารผสมที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้ของผสมที่เป็นของเหลว จากนั้นทำการสกัดด้วยปฏิกิริยากรดเบส โดยเติม ethyl acetate เพื่อละลายสาร เทสารลงในกรวยแยก
5. เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และเติมสารละลายอิมัลชันโซเดียมไบคาร์บอเนต 25 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก แล้วเขย่ากรวยแยกพร้อมระบายแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) จากกรวยแยก และตั้งไว้ให้เกิดการแยกชั้นของชั้น ethyl acetate และชั้นสารละลายอิมัลชันโซเดียมไบคาร์บอเนต จากนั้นไซ้ชั้นน้ำที่ตรวจสอบชั้น ethyl acetate ด้วยยูนิเวอร์แซลอินดิเคเตอร์ ทำการสกัดแยกซ้ำด้วยสารละลายอิมัลชันโซเดียมไบคาร์บอเนต จนกระทั่งค่า pH ของสารละลายเป็นกลาง
6. ทำการสกัดล้างชั้น ethyl acetate โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก แล้วค่อยๆ เขย่ากรวยแยก ตั้งไว้รอให้เกิดการแยกชั้น และปล่อยชั้นน้ำที่
7. เติมสารละลายอิมัลชันโซเดียมคลอไรด์ 25 มิลลิลิตร เพื่อขจัดน้ำออก เขย่า และตั้งไว้รอให้เกิดการแยกชั้น ไซ้ชั้นสารละลายอิมัลชันโซเดียมคลอไรด์ทั้ง ส่วนชั้น ethyl acetate เก็บไว้ในขวดรูปชมพู่ที่แห้ง
8. เติม Sodium sulphate anhydrous ลงขวดรูปชมพู่ในข้อ 7 เพื่อดูดน้ำที่เหลือออกจากชั้น ethyl acetate พร้อมกับแก้วขวดรูปชมพู่เบาๆ จนกระทั่งชั้น ethyl acetate ใส และทำการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 ลงในขวดกันกลม
9. นำสารผสมในขวดกันกลมไปทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้สารผลิตภัณฑ์ในรูปของเหลวคล้ายน้ำมัน เก็บตัวอย่างส่วนหนึ่งเพียงเล็กน้อยไว้ในขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก อีกส่วนหนึ่งนำมาคลุกด้วย silica gel ขนาด 0.06-0.2 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้จนแห้งที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป
10. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1 ถึง 9 เปลี่ยนสารเข้าทำปฏิกิริยาเป็น methyl alcohol และ butyl alcohol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.2 ปฏิกิริยาเอสเตอร์ฟิเคชันโดยใช้ 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) เป็นรีเอเจนต์ ใช้กรดลโทโคลิก 12 เป็นสารตั้งต้น โดยทำการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-24 โดยใช้ DCC เป็นรีเอเจนต์ทำหน้าที่กระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลให้ว่องไวต่อปฏิกิริยา และทำปฏิกิริยาคู่ควบ (Coupling reaction) กับ isoamyl alcohol, benzyl alcohol, 4-methoxybenzyl alcohol, cinnamyl alcohol และ 4-nitrobenzyl alcohol

แผนภาพที่ 3.6



1. ชั่งกรดลโทโคลิก 12 200.0 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล) ลงในขวดกั่นกลม จากนั้นเติม DCM 5 มิลลิลิตร ปั่นกวนจนกระทั่งละลายหมด
2. เติม 4-dimethylaminopyridine (DMAP) 6.8 มิลลิกรัม (0.053 มิลลิโมล) จากนั้นเติม isoamyl alcohol 46.7 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล) และลดอุณหภูมิของปฏิกิริยาลงเหลือ 4 องศาเซลเซียส
3. ชั่ง DCC 109.4 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล) ละลายใน DCM 3 มิลลิลิตร และค่อยๆ หยดลงในขวดกั่นกลม ปั่นกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที จากนั้นปั่นกวนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้อง
4. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร จากนั้นเปรียบเทียบกับกรดลโทโคลิก 12 โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงบนแผ่น TLC หากพบว่าจุดของผลิตภัณฑ์ไม่มีสารตั้งต้นเจือปนหรือเจือปนน้อยที่สุดแสดงว่าเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว
5. หยุดการปั่นกวน ทำการกรองเพื่อแยกยูเรีย จากนั้นระเหยสารผสมด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้ของผสมที่เป็นของแข็ง
6. เก็บตัวอย่างส่วนหนึ่งเพียงเล็กน้อยไว้ในขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก อีกส่วนหนึ่งนำมาคลุกด้วย silica gel ขนาด 0.06-0.2 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้จนแห้งที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1 ถึง 5 แต่เปลี่ยนสารเข้าทำปฏิกิริยาเป็น benzyl alcohol 57.3 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล), 4-methoxybenzyl alcohol 73.2 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล), cinnamyl alcohol 71.1 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล) และ 4-nitrobenzyl alcohol 81.2 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล)

### 3.3.1.3 การทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1. เตรียมคอลัมน์แบบ Slurry โดยเท silica gel F60 ขนาด 0.04-0.06 มิลลิเมตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี hexane ให้มีลักษณะเป็นของเหลวชั้น

2. ตั้งคอลัมน์แก้วขนาด 1.8x30 เซนติเมตรให้ตรง เติม hexane ลงในคอลัมน์ให้สูงประมาณ 1/3 ของคอลัมน์ ใส่สำลีโดยใช้แท่งแก้วยาวกดสำลีลงไป จากนั้นนำ silica gel ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาบรรจุลงในคอลัมน์ในระดับ 1/2 ของคอลัมน์ พร้อมกับใช้ตัวทำละลาย hexane ออกจากคอลัมน์

3. จากนั้นใช้ลูกยางเคาะคอลัมน์เพื่อปรับผิวหน้า silica gel ให้เรียบ

4. บรรจุทรายละเอียดประมาณ 2 ซ้อนลงคอลัมน์ เพื่อป้องกันผิวหน้าของ silica gel จากนั้นผ่าน silica gel ด้วย hexane ประมาณ 200 มิลลิลิตร เพื่อช่วยในการแพคตัวของ silica gel ให้แน่น

5. บรรจุสารผสมที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.3.1.1 และ 3.3.1.2 ลงในคอลัมน์ ทำการแยกสารผสมให้บริสุทธิ์ โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate โดยมีอัตราส่วนของตัวทำละลายผสมเป็น 100 มิลลิลิตร ใช้ตัวทำละลายชะคอลัมน์โดยเริ่มต้นจากสารละลายไม่มีขั้วคือ hexane จากนั้นเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายผสม โดยเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวทำละลายผสม hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5, 90 : 10, 85 : 15 โดยปริมาตร ตามลำดับ เก็บสารที่ได้จากการเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวทำละลายผสมลงในหลอดทดลอง

6. ตรวจสอบสารที่ได้จากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร ตรวจสอบการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เคลือบด้วย anisaldehyde reagent และให้ความร้อนเปรียบเทียบจุดของสารที่ได้กับตัวอย่างสารผลิตภัณฑ์ โดยพิจารณาจากค่า  $R_f$  ซึ่งจะมีค่าเดียวกัน

7. เก็บสารที่ตรวจพบผลิตภัณฑ์ไว้ในขวดกันกลม นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นนำสารผลิตภัณฑ์ไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

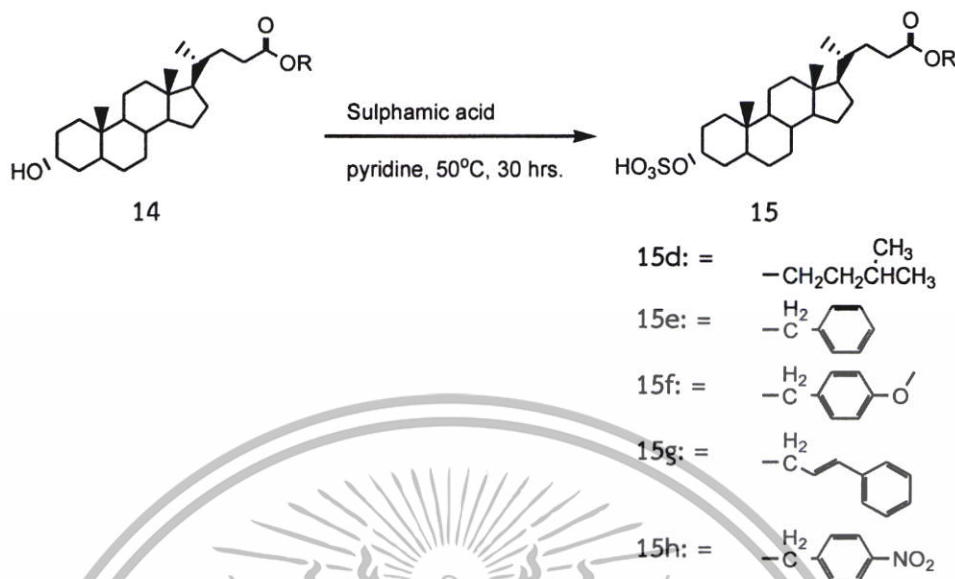
### 3.3.2 การสังเคราะห์สารประกอบอัลเฟตของอนุพันธ์กรติโทโคลิกโดยการทำปฏิกิริยาอัลเฟชัน

#### 3.3.2.1 การสังเคราะห์สารประกอบอัลเฟตของอนุพันธ์กรติโทโคลิก

ใช้สารประกอบเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 3.3.1 คือสาร 14b-14h เป็นสารตั้งต้น โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 เป็นหมู่อัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## แผนภาพที่ 3.7



1. ชั่ง Ethyl 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholestan-24-oate 14b 150 มิลลิกรัม (0.37 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลม ละลายด้วย pyridine 5 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวนจนกระทั่ง 14b ละลายหมด
2. เติม sulphamic acid 181.4 มิลลิกรัม (1.85 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมในข้อ 1 และทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง
3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ 14b สังเกตการเกิดปฏิกิริยาโดยพิจารณาจุดของสารตั้งต้นเจือจางมากที่สุดและไม่มีการเปลี่ยนแปลง
4. หยุดการปั่นกวน ระบาย pyridine ด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ จะได้สารผลิตภัณฑ์ เป็นของแข็งสีขาวจากนั้นนำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปละลายด้วย methanol เก็บตัวอย่างส่วนหนึ่งเพียงเล็กน้อยไว้ในขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก อีกส่วนหนึ่งนำมาคลุกด้วย silica gel ขนาด 0.06-0.2 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้จนแห้งที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป
5. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1 ถึง 4 แต่เปลี่ยนสารตั้งต้น ควบคู่กับ sulphamic acid ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารตั้งต้นและ sulphamic acid ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

สารตัวอย่าง	สารตั้งต้น		Sulphamic acid	
	มิลลิกรัม (mg)	มิลลิโมล (mmol)	มิลลิกรัม (mg)	มิลลิโมล (mmol)
14c	150	0.35	171.6	1.75
14d	150	0.34	166.7	1.70
14e	150	0.32	156.9	1.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1(ต่อ) ปริมาณสารตั้งต้นและ sulphamic acid ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

สารตัวอย่าง	สารตั้งต้น		Sulphamic acid	
	มิลลิกรัม (mg)	มิลลิโมล (mmol)	มิลลิกรัม (mg)	มิลลิโมล (mmol)
14f	150	0.30	147.1	1.50
14g	150	0.30	147.1	1.50
14h	150	0.29	142.2	1.45

3.3.2.2 การทำให้สารอนุพันธ์ซัลเฟตบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1. เตรียมคอลัมน์แบบ Slurry โดยเติม silica gel F60 ขนาด 0.004-0.0063 มิลลิเมตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี hexane ให้มีลักษณะเป็นของเหลวข้น

2. ตั้งคอลัมน์แก้วขนาด 1.8×30 เซนติเมตรให้ตรง เติม hexane ลงในคอลัมน์ให้สูงประมาณ 1/3 ของคอลัมน์ ใส่สำลีโดยใช้แท่งแก้วยาวกดสำลีลงไป จากนั้นนำ silica gel ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาบรรจุลงในคอลัมน์ในระดับ 1/2 ของคอลัมน์ พร้อมกับใช้ตัวทำละลายออกจากคอลัมน์

3. จากนั้นใช้ลูกยางเคาะคอลัมน์เพื่อปรับผิวหน้า silica gel ให้เรียบ

4. บรรจุทรายละเอียดประมาณ 2 ซ้อนลงในคอลัมน์ เพื่อป้องกันผิวหน้าของ silica gel จากนั้นผ่าน silica gel ด้วย hexane ประมาณ 200 มิลลิลิตร เพื่อช่วยในการแพคตัวของ silica gel ให้แน่น

5. บรรจุสารผสมที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.3.2.1 ลงในคอลัมน์ ทำการแยกสารผสมให้บริสุทธิ์ โดยใช้ hexane : ethyl acetate : methanol โดยที่ผลรวมของอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เริ่มต้นจากคอลัมน์ด้วย hexane จากนั้นเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 70 : 30 และ 60 : 40 แล้วค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นโดยใช้ methanol อัตราส่วน hexane : ethyl acetate : methanol เท่ากับ 65 : 30 : 5 และ 60 : 30 : 10, 55 : 30 : 15 และ 50 : 30 : 20 ตามลำดับ

6. ตรวจสอบสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารตั้งต้นที่พิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R<sub>f</sub> เดียวกัน การดูกลิ่นรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และการให้สีกับ anisaldehyde reagent โดยสีเดียวกันให้เก็บรวมไว้ด้วยกันในขวดกันกลม

7. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดกันกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. นำสารผลิตภัณฑ์มาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

3.4 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

3.4.1 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารอนุพันธ์ 13a-13f

อนุพันธ์เอไมด์ของโบล์แอซิดจะถูกส่งไปทดสอบฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ การทดลองแบ่งออกได้ดังต่อไปนี้

การทดสอบใช้วิธี Sulforhodamine B (SRB) assay เซลล์ที่ใช้ทดสอบคือเซลล์ไตลิงปกติ African green monkey kidney โดยมีชุดควบคุมคือ 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) และเปรียบเทียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับตัวยา Ellipticine การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการเจริญเติบโตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างไม่มีผลต่อการต้านความเป็นพิษของเซลล์ (non cytotoxic) และถ้าเซลล์มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อการต้านความเป็นพิษของเซลล์ (cytotoxic) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า  $IC_{50}$  (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (Anti-cancer KB-Oral cavity cancer) การทดสอบใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA) 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) ซึ่งรายงานผลเป็นค่า  $IC_{50}$  (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (Anti-cancer BC-Breast cancer) การทดสอบใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA) 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) ซึ่งรายงานผลเป็นค่า  $IC_{50}$  (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

#### 3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารอนุพันธ์ 14a-14h และ 15a-15h

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. สุพิศรา โพธิ์เยี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่

1. เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line)
2. เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line)
3. เซลล์ไตลิงปอกชนิด Vero (African green monkey kidney)

ขั้นตอนการทดลองดัดแปลงมาจาก Mosmann[17] ซึ่งใช้วิธี MTT assay สามารถสรุปการทดลองได้ดังนี้

1. เตรียมเซลล์ไลน์ที่ต้องการทดสอบในอาหาร RPMI 1640 เสริมด้วย 8% FBS โดยเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร คำนวณปริมาตรเซลล์มีชีวิต ( $V_1$ ) เพื่อใช้ทดสอบให้เพียงพอกับการทดลองแต่ละครั้ง โดยให้จำนวนเซลล์มีชีวิต ( $C_2$ ) ของเซลล์ MCF-7, KB และ Vero เท่ากับ  $1.5 \times 10^5$ ,  $1.8 \times 10^5$  และ  $1.5 \times 10^5$  เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากสมการ  $C_1 V_1 = C_2 V_2$  เมื่อ  $C_1$  เท่ากับจำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตรใน stock และ  $V_2$  เท่ากับปริมาตรที่ต้องการใช้

2. เมื่อทราบปริมาตรเซลล์มีชีวิต ( $V_1$ ) จากนั้นนำมาเจือจางกับอาหาร RPMI 1640 เสริมด้วย 5% FBS ให้ได้เท่ากับปริมาตรที่ต้องการใช้ ( $V_2$ ) แล้วนำมาหยอดลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plate) โดยหยอดหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ นำจานเพาะเลี้ยงที่ปลูกเซลล์เรียบร้อยแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%  $CO_2$  เป็นเวลา 1 คืน หรือ 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เตรียม Stock solution ของสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ 100% DMSO และ PBS เป็นตัวทำละลาย ทำการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีช่องผ่านขนาด 0.2 ไมโครเมตร และใส่ขวดแก้วที่ปลอดเชื้อ พันขวดแก้วด้วยพาราฟิล์ม (Parafilm) จากนั้นเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. เตรียมสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นในการทดสอบเบื้องต้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, และ Vero เพื่อให้ทราบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารตัวอย่าง เมื่อพบว่าสารตัวอย่างมีความเป็นพิษต่อเซลล์ จากนั้นทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 1,000, 500, 250 และ 125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ หรือทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ( $CC_{50}$ )

5. นำสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้มาหยอดลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ปลูกเซลล์และบ่มครบ 24 ชั่วโมง ใช้ Mitomycin C 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) และใช้ 2% DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) โดยหยอดหุลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

6. ละลาย MTT 20 มิลลิกรัม ใน PBS 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของ MTT เท่ากับ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) สารละลายที่ได้มีสีเหลือง เก็บสารละลายในขวดที่ปราศจากเชื้อ นอหุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. เมื่อบ่มเซลล์ในสารตัวอย่างครบ 20 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใส่ลงไปในแต่ละหลุมที่ทดสอบ หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

8. เมื่อบ่มครบ 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย MTT ทิ้ง แล้วเติม 100% DMSO : 99.7% EtOH (1:1) หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกฟอร์มazan จะได้สารละลายสีม่วง

9. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Micro plate reader) ที่ความยาวคลื่นของแผ่นกรองแสงเท่ากับ 570 นาโนเมตร ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสง ต้องตั้งโปรแกรมการเขย่า นาน 5 นาที เพื่อให้ผลึกฟอร์มazanละลายทั้งหมด และความเข้มข้นของสีกระจายทั่วหลุม บันทึกค่าการดูดกลืนแสง

10. คำนวณหาค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%cytotoxicity) ของแต่ละความเข้มข้น ดังนี้

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{A - B}{B} \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น

โดยค่า A และ B จะต้องนำค่าการดูดกลืนแสงของ Blank (ในที่นี้ คือ หลุมที่เติมอาหาร RPMI 1640 เสริมด้วย 5% FBS) มาหักออกก่อน จากนั้นจึงนำไปคำนวณจากสูตรข้างต้น

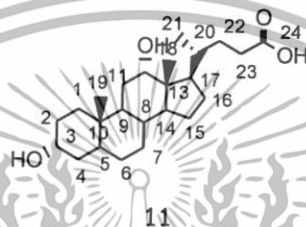
11. นำผลการคำนวณค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) บันทึกลงในตารางเพื่อนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ( $CC_{50}$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 ผลการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 13a-13f ของกรดต็อกซีโคลิค 11 โดยเทคนิควิทยุภาคของแข็ง

งานวิจัยนี้จึงเลือกทำการสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของโบล์แอซิด, กรดต็อกซีโคลิค 11, โดยเทคนิควิทยุภาคของแข็ง ทั้งนี้เพื่อสะดวกในการทำสารผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์ได้ง่ายขึ้น และไม่เสียผลิตภัณฑ์ในขณะทำการแยกให้บริสุทธิ์เช่นในขั้นตอนการทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยทำการพิสูจน์โครงสร้างของโบล์แอซิดด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ได้ผลดังต่อไปนี้

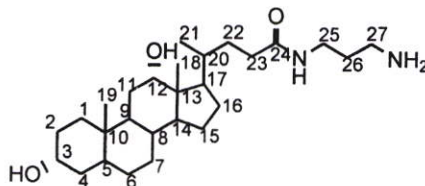


$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.57 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 6.2 Hz, H-21), 0.93-1.75 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.01-2.26 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 3.17 (1H, m, H-3) และ 3.82 (1H, m, H-12)

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.4 (C-21), 23.5 (C-19), 24.7 (C-15), 27.3 (C-7), 28.2 (C-6), 28.4 (C-16), 29.7 (C-11), 30.9 (C-2), 31.8 (C-22), 32.1 (C-23), 34.6 (C-9), 35.1 (C-10), 36.3 (C-1), 36.5 (C-20), 37.0 (C-4), 37.2 (C-8), 43.4 (C-5), 47.4 (C-13), 47.9 (C-17), 49.1 (C-14), 72.3 (C-3), 73.8 (C-12) และ 178.0 (C-24)

ข้อมูลจากการวิเคราะห์โครงสร้างของกรดต็อกซีโคลิค 11 ด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ที่แสดงไว้ข้างต้นนี้ สามารถนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างของอนุพันธ์เอไมด์สังเคราะห์ โดยสามารถสังเกตจากการเปลี่ยนแปลง คือ ค่า chemical shift ของ  $^{13}\text{C}$  ของหมู่เอไมด์ ( $-\text{CONH}$ ) จะปรากฏสัญญาณที่  $\delta$  176.0-177.0 ppm และสามารถตรวจสอบได้อย่างชัดเจนจากมวลโมเลกุลของอนุพันธ์เอไมด์สังเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรสโกปี ข้อมูลของโบล์แอซิดเอไมด์สังเคราะห์แสดงดังต่อไปนี้

#### 4.1.1 สารสังเคราะห์ *N*-(3-Aminopropyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 13a



13a

สาร 13a สังเคราะห์จากกรดตือออกซีโคลิก 11 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-ไดอะมิโนโพรเพน สาร 13a มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 58.18 และยืนยันโครงสร้างสาร 13a ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

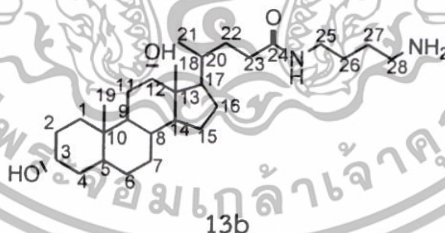
IR :  $\nu_{\max}$  1203 (C-N stretching), 1677 (C=O stretching ของ CONH), 2858, 2925 (C-H stretching) และ 3294 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.58 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 6.0 Hz, H-21), 0.95-2.19 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.78 (2H, t,  $J$  = 7.1 Hz, H-27), 3.13 (2H, t,  $J$  = 6.7 Hz, H-25), 3.17 (1H, m, H-3), 3.84 (1H, m, H-12) และ 7.84 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.2 (C-18), 17.7 (C-21), 23.3 (C-19), 24.8 (C-15), 27.3 (C-7), 28.0 (C-6), 28.7 (C-16), 28.9 (C-26), 29.9 (C-11), 31.1 (C-2), 33.3 (C-22), 34.0 (C-23), 34.7 (C-9), 34.9 (C-10), 35.7 (C-25), 36.1 (C-1), 36.5 (C-20), 36.9 (C-4), 37.4 (C-8), 38.2 (C-27), 43.3 (C-5), 47.6 (C-13), 48.1 (C-17), 49.6 (C-14), 72.6 (C-3), 74.1 (C-12) และ 177.9 (C-24)

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

#### 4.1.2 สารสังเคราะห์ *N*-(4-Aminobutyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 13b



13b

สาร 13b สังเคราะห์จากกรดตือออกซีโคลิก 11 ทำปฏิกิริยากับ 1,4-ไดอะมิโนบิวเทน สาร 13b มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 47.87 และยืนยันโครงสร้างสาร 13b ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

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

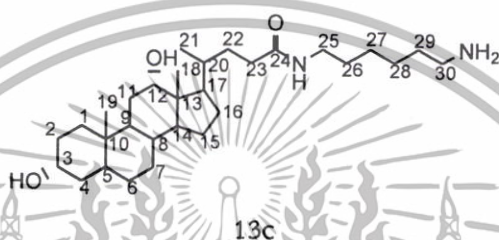
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.63 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 5.6 Hz, H-21), 1.03-2.18 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.86 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-28), 3.12 (2H, m, H-25), 3.23 (1H, m, H-3), 3.88 (1H, m, H-12) และ 7.90 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.5 (C-18), 18.0 (C-21), 24.0 (C-19), 25.1 (C-15), 26.2 (C-26), 27.7 (C-27), 27.8 (C-7), 28.7 (C-6), 29.0 (C-16), 30.1 (C-11), 31.4 (C-2), 33.6 (C-22), 34.5 (C-23), 35.2 (C-9), 35.6 (C-10), 36.7 (C-1), 37.2 (C-20), 37.5 (C-4), 37.8 (C-8), 39.8 (C-25), 40.7 (C-28), 43.9 (C-5), 47.9 (C-13), 48.5 (C-17), 49.9 (C-14), 72.9 (C-3), 74.3 (C-12) และ 177.4 (C-24)

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

#### 4.1.3 สารสังเคราะห์ *N*-(6-Aminohexyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 13c



สาร 13c สังเคราะห์จากกรดตือออกซีโคลิก 11 ทำปฏิกิริยากับ 1,6-ไดอะมิโนเฮกเซน สาร 13c มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 58.93 และยืนยันโครงสร้างสาร 13c ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

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

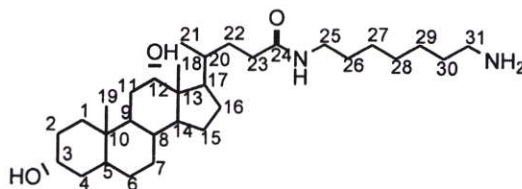
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.62 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 5.9 Hz, H-21), 0.98-2.16 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.83 (2H, t,  $J$  = 7.1 Hz, H-30), 3.08 (2H, t,  $J$  = 6.8 Hz, H-25), 3.23 (1H, m, H-3), 3.87 (1H, m, H-12) และ 7.89 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.2 (C-18), 17.7 (C-21), 23.7 (C-19), 24.9 (C-15), 27.0 (C-26), 27.3 (C-29), 27.5 (C-7), 28.4 (C-6), 28.5 (C-16), 29.9 (C-11), 30.2 (C-28), 31.1 (C-2), 33.4 (C-22), 34.2 (C-23), 34.9 (C-9), 35.3 (C-10), 35.7 (C-27), 36.5 (C-1), 36.9 (C-20), 37.2 (C-4), 37.5 (C-8), 40.0 (C-25), 40.7 (C-30), 43.7 (C-5), 47.6 (C-13), 48.2 (C-17), 49.6 (C-14), 72.6 (C-3), 74.1 (C-12) และ 176.9 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 491.5 [M+H] $^+$  (100%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิพนธ์ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.4 สารสังเคราะห์ *N*-(7-Aminoheptyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 13d



13d

สาร 13d สังเคราะห์จากกรดตือออกซีโคคลิก 11 ทำปฏิกิริยากับ 1,7-ไดอะมิโนเฮปเทน สาร 13d มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 63.64 และยืนยันโครงสร้างสาร 13d ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

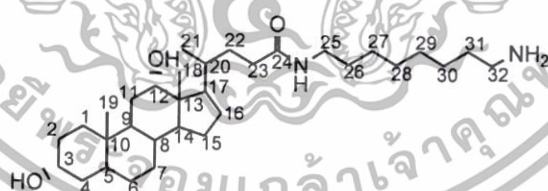
IR :  $\nu_{\max}$  1202 (C-N stretching), 1655 (C=O stretching ของ CONH), 2851, 2922 (C-H stretching) และ 3359 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.58 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 5.9$  Hz, H-21), 0.94-2.12 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.79 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-31), 3.03 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-25), 3.19 (1H, m, H-3), 3.84 (1H, m, H-12) และ 7.93 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.7 (C-18), 18.1 (C-21), 24.2 (C-19), 25.2 (C-15), 27.4 (C-26), 28.1 (C-6), 28.1 (C-7), 28.1 (C-30), 28.4 (C-16), 29.7 (C-11), 29.7 (C-29), 31.2 (C-2), 33.1 (C-28), 33.8 (C-22), 34.1 (C-23), 34.6 (C-9), 35.2 (C-10), 35.9 (C-27), 36.3 (C-1), 37.0 (C-25), 37.4 (C-20), 37.0 (C-4), 38.0 (C-8), 40.3 (C-31), 44.1 (C-5), 47.4 (C-13), 48.0 (C-17), 49.1 (C-14), 72.8 (C-3), 74.6 (C-12) และ 176.5 (C-24)

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

#### 4.1.5 สารสังเคราะห์ *N*-(8-Amino-octyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 13e



13e

สาร 13e สังเคราะห์จากกรดตือออกซีโคคลิก 11 ทำปฏิกิริยากับ 1,8-ไดอะมิโนออกเทน สาร 13e มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 47.84 และยืนยันโครงสร้างสาร 13e ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

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

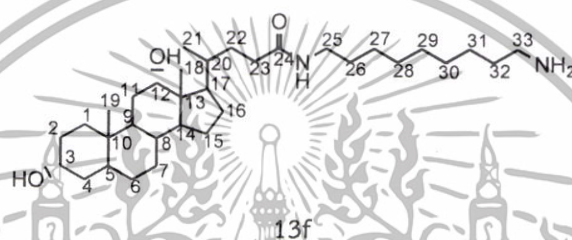
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.62 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d,  $J_{\text{H}_{21},\text{H}_{20}}$  = 6.0 Hz, H-21), 1.02-2.20 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.82 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-32), 3.06 (2H, t,  $J$  = 6.9 Hz, H-25), 3.22 (1H, m, H-3), 3.87 (1H, m, H-12) และ 7.95 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.2 (C-18), 17.7 (C-21), 23.7 (C-19), 24.9 (C-15), 27.4 (C-26), 27.5 (C-7), 27.8 (C-31), 28.5 (C-6), 28.7 (C-16), 30.0 (C-11), 30.1 (C-28), 30.1 (C-29), 30.4 (C-30), 31.1 (C-2), 33.5 (C-22), 34.3 (C-23), 34.9 (C-9), 35.4 (C-10), 35.7 (C-27), 36.5 (C-1), 36.9 (C-20), 37.3 (C-4), 37.5 (C-8), 38.9 (C-25), 40.8 (C-32), 43.7 (C-5), 47.6 (C-13), 48.2 (C-17), 49.6 (C-14), 72.6 (C-3), 74.1 (C-12) และ 176.9 (C-24)

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

#### 4.1.6 สารสังเคราะห์ *N*-(9-Aminononyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 13f



สาร 13f สังเคราะห์จากกรดดีออกซีโคลิก 11 ทำปฏิกิริยากับ 1,9-ไดอะมิโนโนเนน สาร 13f มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 76.36 และยืนยันโครงสร้างสาร 13f ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

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

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.57 (3H, s, H-18), 0.69 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, d,  $J_{\text{H}_{21},\text{H}_{20}}$  = 12.0 Hz, H-21), 1.03-2.06 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.76 (2H, t,  $J$  = 7.0 Hz, H-33), 3.06 (2H, t,  $J$  = 7.6 Hz, H-25), 3.17 (1H, m, H-3), 3.83 (1H, m, H-12) และ 7.94 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

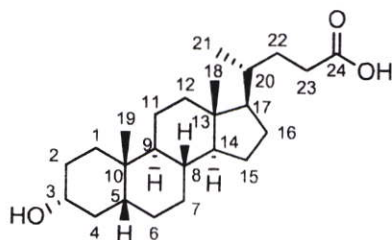
$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  12.7 (C-18), 18.1 (C-21), 23.5 (C-19), 24.3 (C-15), 27.4 (C-7), 27.4 (C-26), 27.9 (C-32), 28.2 (C-6), 28.6 (C-16), 28.6 (C-31), 30.1 (C-11), 30.1 (C-28), 30.1 (C-30), 30.2 (C-29), 30.3 (C-2), 33.2 (C-22), 34.0 (C-23), 35.1 (C-10), 35.3 (C-27), 35.8 (C-9), 36.0 (C-20), 36.1 (C-1), 37.0 (C-8), 37.1 (C-4), 38.9 (C-25), 40.8 (C-33), 43.4 (C-5), 46.5 (C-13), 48.2 (C-17), 49.6 (C-14), 72.2 (C-3), 72.2 (C-12) และ 176.4 (C-24)

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

#### 4.2 ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิก 12 โดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นคือ กรดลิโทโคลิก 12 ทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ได้ผลดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## 12

Barnes และคณะ[18] ได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างของกรดลิโทโคลิก 12 โดยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่า สัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR (300.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ -dimethylsulfoxide- $d_6$  4:1 (v/v)) :  $\delta$  1.75 และ 0.94 (2H, H-1), 1.60 และ 1.29 (2H, H-2), 3.51 (1H, H-3), 1.71 และ 1.45 (2H, H-4), 1.35 (1H, H-5), 1.83 และ 1.23 (2H, H-6), 1.39 และ 1.09 (2H, H-7), 1.38 (1H, H-8), 1.41 (1H, H-9), 1.38 และ 1.23 (2H, H-11), 1.96 และ 1.14 (2H, H-12), 1.05 (1H, H-14), 1.56 และ 1.04 (2H, H-15), 1.85 และ 1.27 (2H, H-16), 1.10 (1H, H-17), 0.64 (3H, H-18), 0.91 (3H, H-19), 1.41 (1H, H-20), 0.92 (3H, H-21), 1.75 และ 1.29 (2H, H-22), 2.32 และ 2.12 (2H, H-23) ;  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz) :  $\delta$  35.3 (C-1), 30.3 (C-2), 70.5 (C-3), 36.3 (C-4), 41.9 (C-5), 27.1 (C-6), 26.3 (C-7), 35.6 (C-8), 40.2 (C-9), 34.2 (C-10), 20.6 (C-11), 40.0 (C-12), 42.4 (C-13), 56.3 (C-14), 24.0 (C-15), 28.0 (C-16), 55.8 (C-17), 11.9 (C-18), 23.3 (C-19), 35.1 (C-20), 18.2 (C-21), 30.9 (C-22), 30.9 (C-23) และ 178.1 (C-24) เมื่อนำข้อมูลเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR กับกรดลิโทโคลิก 12 มาตรฐานจากบริษัท Sigma life science ได้ผล  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR สอดคล้องกับข้อมูลของ Barnes และคณะ[18] ดังนี้  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  1.80 และ 0.93 (2H, H-1), 1.66 และ 1.29 (2H, H-2), 3.65 (1H, H-3), 1.72 และ 1.50 (2H, H-4), 1.40 (1H, H-5), 1.83 และ 1.29 (2H, H-6), 1.40 และ 1.09 (2H, H-7), 1.40 (1H, H-8), 1.40 (1H, H-9), 1.40 และ 1.19 (2H, H-11), 1.95 และ 1.16 (2H, H-12), 1.09 (1H, H-14), 1.55 และ 0.97 (2H, H-15), 1.83 และ 1.32 (2H, H-16), 1.12 (1H, H-17), 0.66 (3H, H-18), 0.95 (3H, H-19), 1.40 (1H, H-20), 0.95 (3H, H-21), 1.80 และ 1.32 (2H, H-22), 2.42 และ 2.27 (2H, H-23) และสเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz) :  $\delta$  35.3 (C-1), 30.5 (C-2), 71.9 (C-3), 36.4 (C-4), 42.1 (C-5), 27.2 (C-6), 26.4 (C-7), 35.9 (C-8), 40.5 (C-9), 34.9 (C-10), 20.8 (C-11), 40.2 (C-12), 42.8 (C-13), 56.5 (C-14), 24.2 (C-15), 28.2 (C-16), 56.0 (C-17), 12.1 (C-18), 23.4 (C-19), 35.3 (C-20), 18.2 (C-21), 30.8 (C-22), 30.7 (C-23) และ 178.4 (C-24)

การรายงานโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 14b-14h และ 15b-15h ด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR จึงถูกนำมาเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของกรดลิโทโคลิก 12 จากนั้นรายงานผล  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารอนุพันธ์เฉพาะตำแหน่งของสัญญาณเรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนแปลง

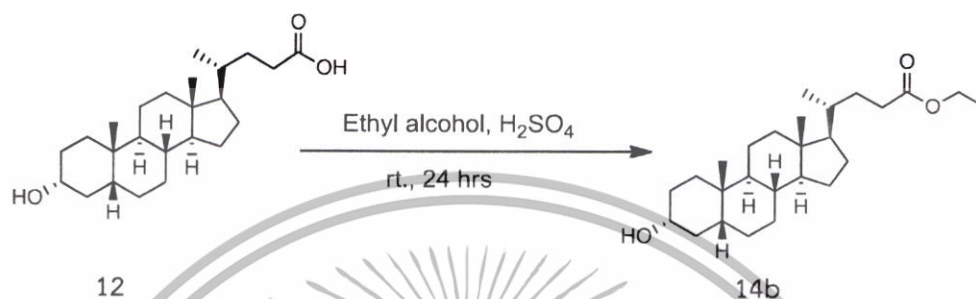
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.1 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ Sulfuric acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

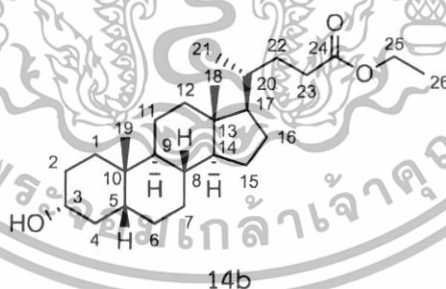
##### 4.2.1.1 การสังเคราะห์ Ethyl 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oate 14b

สาร 14b เตรียมจากการนำกรดลิโทโคลิก 12 ทำปฏิกิริยากับ ethyl alcohol โดยใช้ sulfuric acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

แผนภาพที่ 4.1



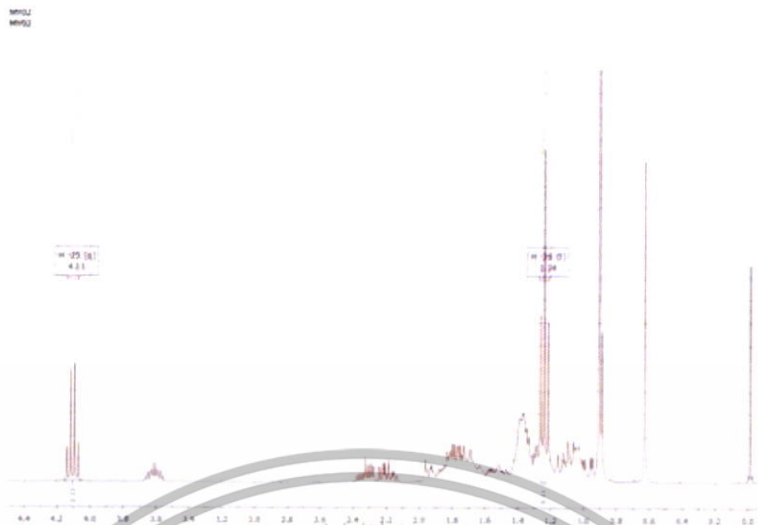
ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin layer chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.43 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 94-97 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 58.34 (คำนวณเทียบจากกรดลิโทโคลิก 12) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm<sup>-1</sup> : 3353 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 2934 (C-H stretching ของ CH<sub>2</sub>), 2865 (C-H stretching ของ CH<sub>3</sub>), 1737 (C=O stretching), 1448 (C-H bending ของ CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1375 (C-H bending ของ CH<sub>3</sub>) และ 1174 (C-O stretching ของ ester)



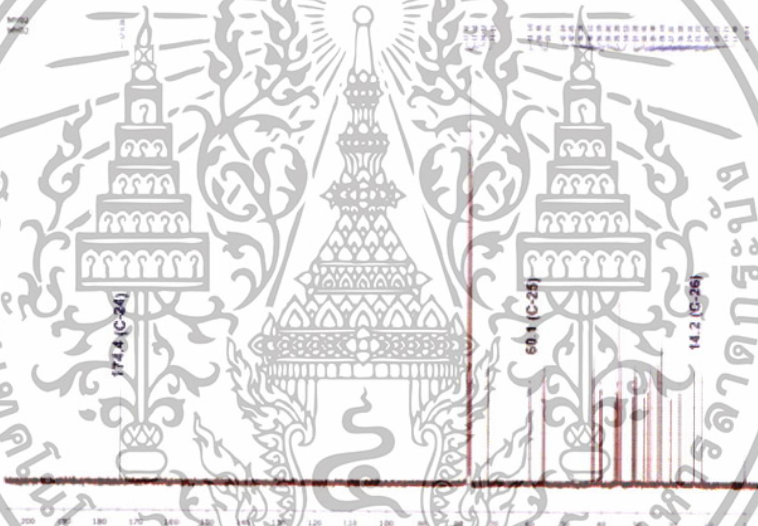
สเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR (300.1 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ของสาร 14b พบสัญญาณที่ δ 4.11 (2H, q, J<sub>25,26</sub> = 7.0 Hz, OCH<sub>2</sub>) และ 1.24 (3H, t, J<sub>26,25</sub> = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>) และโปรตอนที่อยู่ในช่วง δ เท่ากับ 1.96 ถึง 0.95 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.1 และสเปกตรัม <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz) ของสาร 14b พบสัญญาณที่ δ 174.4 (C-24), 60.1 (OCH<sub>2</sub>) และ 14.2 (CH<sub>3</sub>) ดังรูปที่ 4.2

ES-MS : C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub> Calcd. 404.33 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z [M+H]<sup>+</sup> 373.2 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 สเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14b



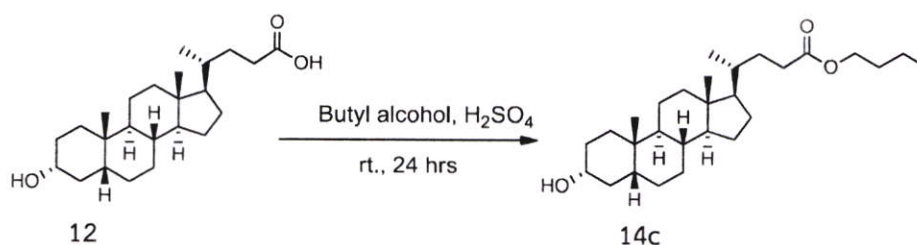
รูปที่ 4.2 สเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14b

#### 4.2.1.2 การสังเคราะห์ Butyl $3\alpha$ -hydroxy- $5\beta$ -cholan-24-oate 14c

สาร 14c เตรียมจากการนำกรดลิโทโคลิก 12 ทำปฏิกิริยากับ butyl alcohol โดยใช้ sulfuric acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## แผนภาพที่ 4.2



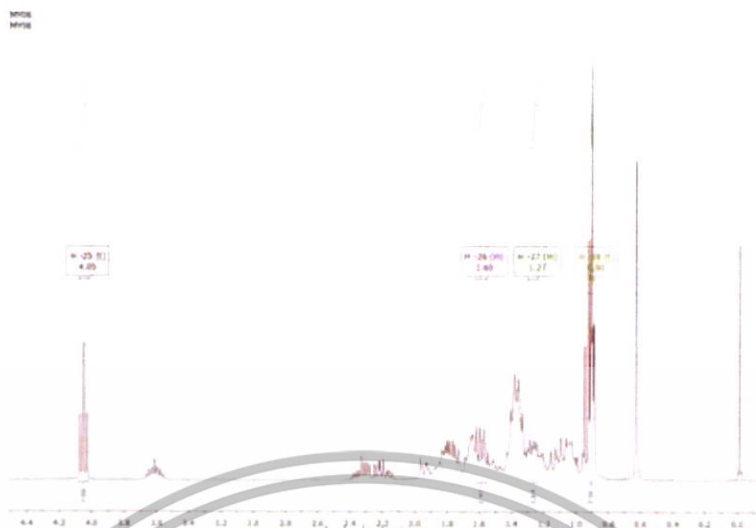
ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.57 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 82-85 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 65.60 (คำนวณเทียบจากกรณีโทโคลิค 12) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  = 3353 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 2934 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_2$ ), 2865 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_3$ ), 1738 (C=O stretching), 1449 (C-H bending ของ  $\text{CH}_2, \text{CH}_3$ ), 1377 (C-H bending ของ  $\text{CH}_3$ ) และ 1170 (C-O stretching ของ ester)



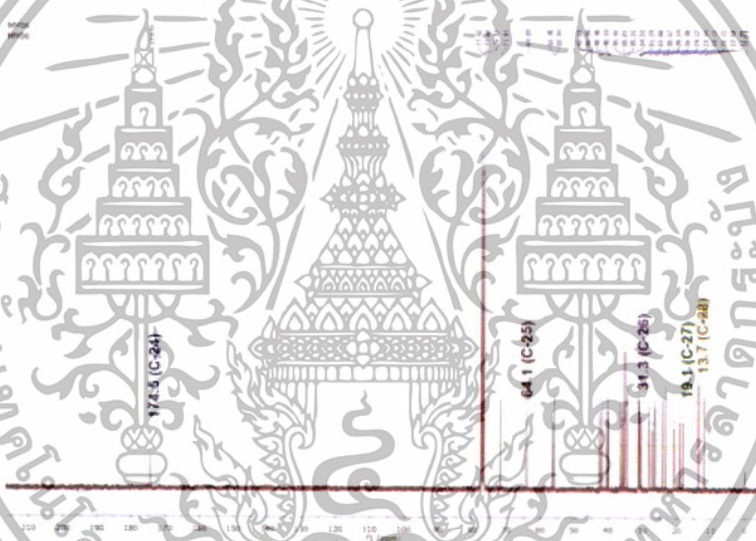
สเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (300.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร 14c พบสัญญาณที่  $\delta$  4.05 (2H, t,  $J_{25,26} = 6.7$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 1.62-1.56 (2H, m, H-26), 1.30-1.24 (2H, m, H-27) และ 0.90 (2H, t,  $J = 6.3$  Hz, H-28) และโปรตอนที่อยู่ในช่วง  $\delta$  เท่ากับ 1.97 ถึง 1.00 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.3 และสเปกตรัม  $^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz) ของสาร 14c พบสัญญาณที่  $\delta$  174.5 (C-24), 64.1 (C-25), 31.3 (C-26), 19.1 (C-27) และ 13.7 (C-28) ดังรูปที่ 4.4

ES-MS :  $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_3$  Calcd. 432.36 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  318.9 ( $-\text{CH}_2\text{COO}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ) และ 304.8 ( $-(\text{CH}_2)_2\text{COO}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 สเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14c



รูปที่ 4.4 สเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14c

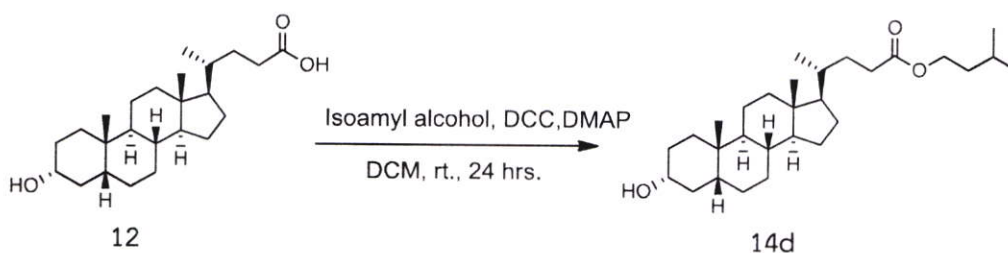
#### 4.2.2 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ 1,3-Dicyclocarbodiimide (DCC) เป็นรีเอเจนต์

##### 4.2.2.1 การสังเคราะห์ Isoamyl 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oate 14d

สาร 14d เตรียมจากการนำกรดลิโทโคลิก 12 ทำปฏิกิริยากับ isoamyl alcohol โดยใช้ DCC เป็นรีเอเจนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนภาพที่ 4.3



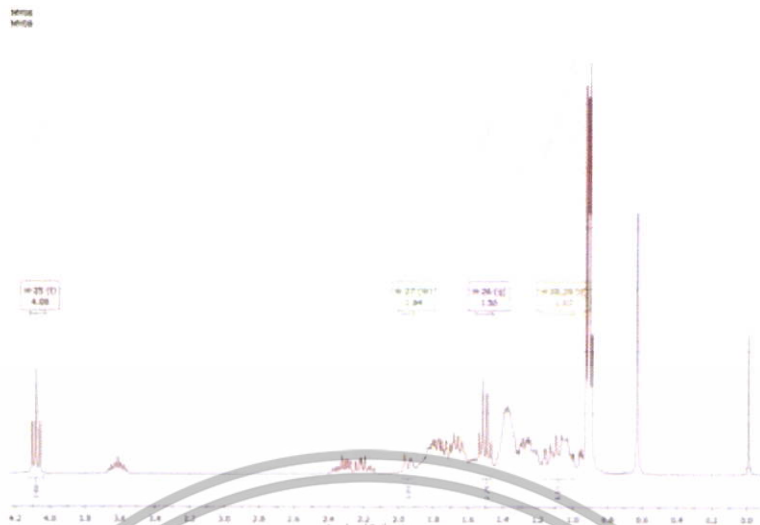
ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.40 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 70-73 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 32.76 (คำนวณเทียบจากกรณีโทโคลิค 12) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  = 3351 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 2933 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_2$ ), 2866 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_3$ ), 1738 (C=O stretching), 1449 (C-H bending ของ  $\text{CH}_2, \text{CH}_3$ ), 1368 (C-H bending ของ  $\text{CH}_3$ ) และ 1167 (C-O stretching ของ ester)



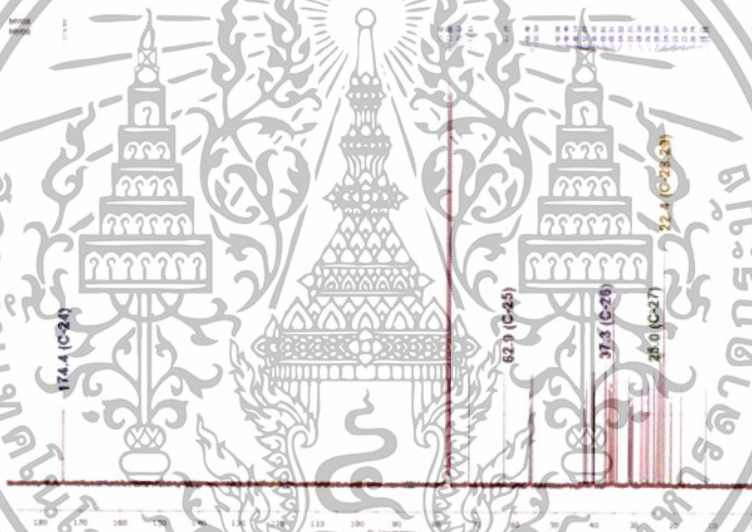
สเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (300.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร 14d พบสัญญาณที่  $\delta$  4.08 (2H, t,  $J_{25,26} = 6.8$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 1.50 (2H, q,  $J_{26,25} = 6.8$  Hz, H-26), 1.98-1.90 (1H, m, H-27) และ 1.07 (6H, d,  $J_{28,29} = 6.9$  Hz, H-28,29) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า  $\delta$  เท่ากับ 1.90 ถึง 1.00 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.5 และสเปกตรัม  $^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz) ของสาร 14d พบสัญญาณที่  $\delta$  174.4 (C-24), 62.9 (C-25), 37.3 (C-26), 25.0 (C-27), 22.4 (C-28) และ 22.4 (C-29) ดังรูปที่ 4.6

ES-MS :  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_3$  Calcd. 446.38 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  318.9 ( $-\text{CH}_2\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ) และ 304.9 ( $-(\text{CH}_2)_2\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 สเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14d



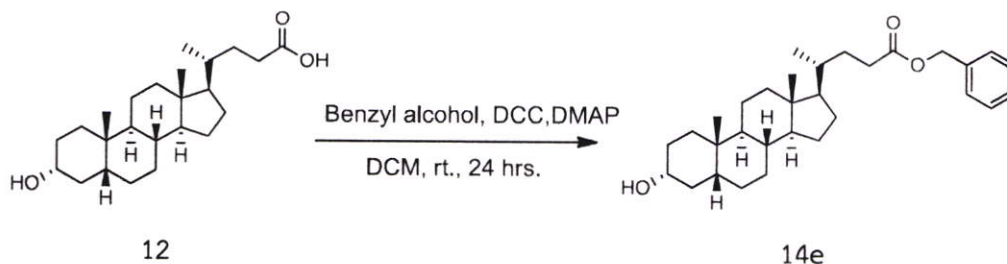
รูปที่ 4.6 สเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14d

#### 4.2.2.2 การสังเคราะห์ Benzyl 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oate 14e

สาร 14e เตรียมจากการนำกรดลิโทโคลิก 12 ทำปฏิกิริยากับ benzyl alcohol โดยใช้ DCC เป็นรีเอเจนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## แผนภาพที่ 4.5



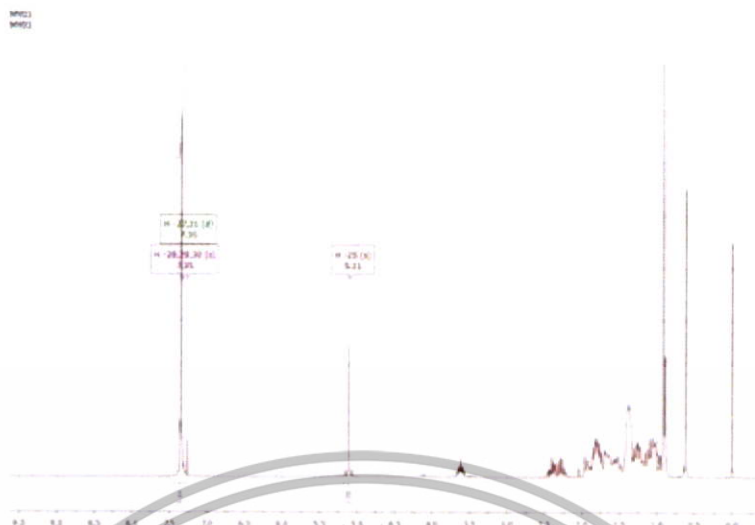
ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.43 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 120-123 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 64.50 (คำนวณเทียบจากกรดติโทโคลิก 12) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3359 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 3033 (C-H stretching ของ aromatic), 2934 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_2$ ), 2864 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_3$ ), 1736 (C=O stretching), 1656 และ 1558 (C=C stretching ของ aromatic), 1450 (C-H bending ของ  $\text{CH}_2, \text{CH}_3$ ), 1377 (C-H bending ของ  $\text{CH}_3$ ), 1162 (C-O stretching ของ ester) และ 697 (C-H bending ของ aromatic)



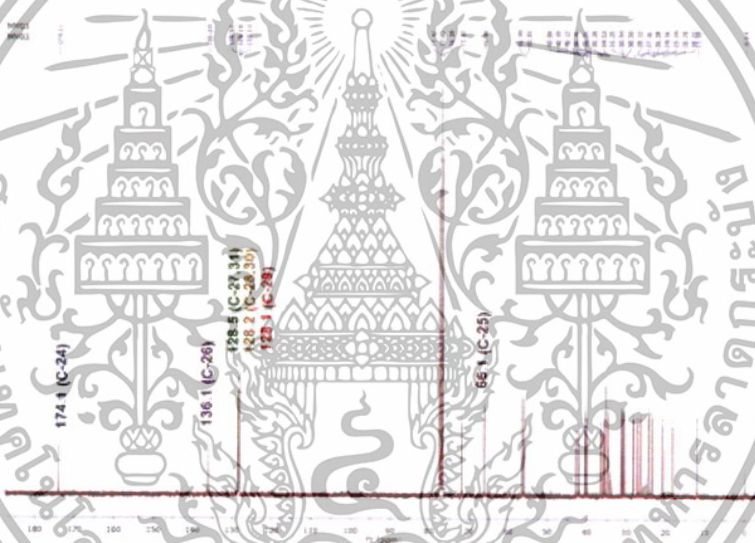
สเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (300.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร 14e พบสัญญาณที่  $\delta$  5.11 (2H, s,  $\text{OCH}_2$ ), 7.35 (3H, s, H-28,29,30) และ 7.30 (2H, d,  $J_{27,31} = 26.7$  Hz, H-27,31) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า  $\delta$  เท่ากับ 1.96 ถึง 0.95 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.7 และสเปกตรัม  $^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz) ของสาร 14e พบสัญญาณที่  $\delta$  174.1 (C-24), 66.1 (C-25), 136.1 (C-26), 128.5 (C-27), 128.2 (C-28), 128.1 (C-29), 128.2 (C-30) และ 128.5 (C-31) ดังรูปที่ 4.8

ES-MS :  $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_3$  Calcd. 466.34 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ  $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$   
 357.3 ( $-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ), 320.9 ( $-\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ) และ 304.8 ( $-(\text{CH}_2)_2\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 สเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14e



รูปที่ 4.8 สเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14e

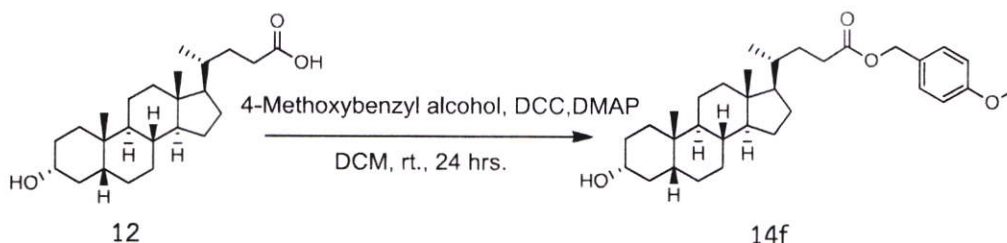
#### 4.2.2.3 การสังเคราะห์ 4-Methoxybenzyl $3\alpha$ -hydroxy- $5\beta$ -cholan-24-oate

14f

สาร 14f เตรียมจากการนำกรดลิโทดคลิก 12 ทำปฏิกิริยากับ 4-methoxybenzyl alcohol โดยใช้ DCC เป็นรีเอเจนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนภาพที่ 4.6



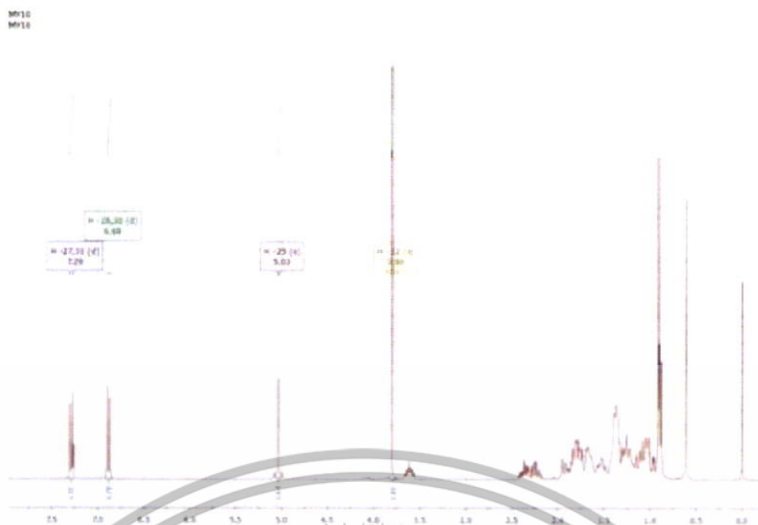
ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.31 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 104-107 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 55.17 (คำนวณเทียบจากกรณีโทโคลิค 12) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  = 3391 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 3037 (C-H stretching ของ aromatic), 2934 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_2$ ), 2864 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_3$ ), 1733 (C=O stretching), 1614 และ 1587 (C=C stretching ของ aromatic), 1449 (C-H bending ของ  $\text{CH}_2, \text{CH}_3$ ), 1377 (C-H bending ของ  $\text{CH}_3$ ), 1248 (C-O stretching ของ phenolic), 1163 (C-O stretching ของ ester), 823 (C-H bending ของ para subst.) และ 704 (C-H bending ของ aromatic)



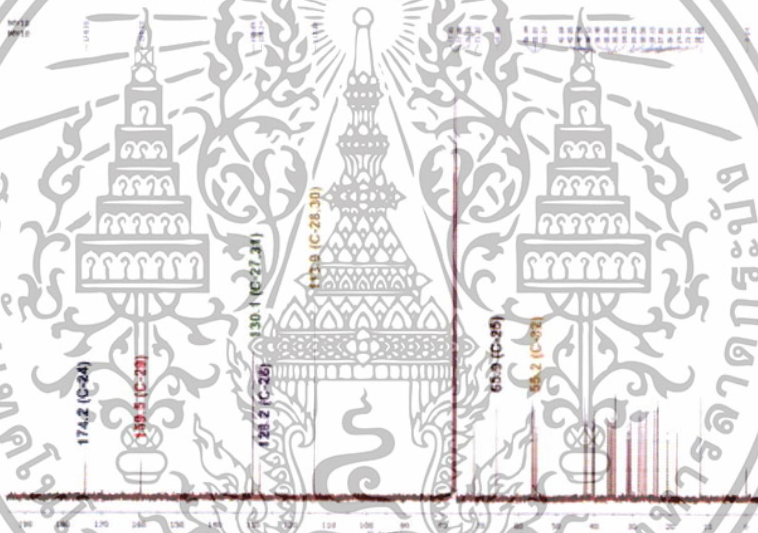
สเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (300.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร 14f พบสัญญาณที่  $\delta$  5.03 (2H, s,  $\text{OCH}_2$ ), 7.29 (2H, d,  $J_{27,31} = 8.6$  Hz, H-27,31) และ 6.88 (2H, d,  $J_{28,30} = 8.7$  Hz, H-28,30) และ 3.80 (3H, s, H-32) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า  $\delta$  เท่ากับ 1.95 ถึง 0.95 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.9 และสเปกตรัม  $^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz) ของสาร 14f พบสัญญาณที่  $\delta$  174.2 (C-24), 65.9 (C-25), 128.2 (C-26), 130.1 (C-27), 113.9 (C-28), 159.5 (C-29), 113.9 (C-30), 130.1 (C-31) และ 55.2 (C-32) ดังรูปที่ 4.10

ES-MS :  $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_4$  Calcd. 496.36 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  319.0 ( $-\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ ) และ 304.8 ( $-\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 สเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14f



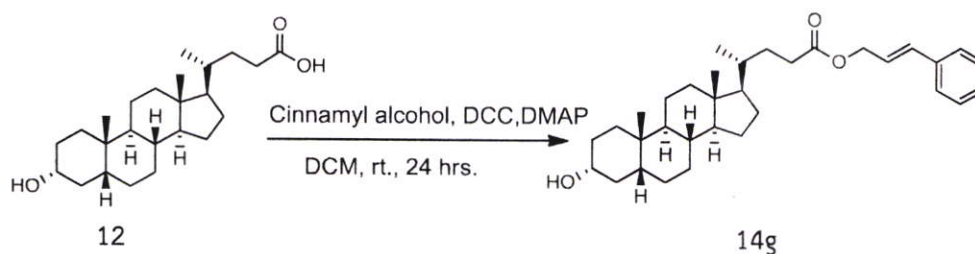
รูปที่ 4.10 สเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14f

#### 4.2.2.4 การสังเคราะห์ Cinnamyl $3\alpha$ -hydroxy- $5\beta$ -cholan-24-oate 14g

สาร 14g เตรียมจากการนำกรดลิโทโคลิก 12 ทำปฏิกิริยากับ cinnamyl alcohol โดยใช้ DCC เป็นรีเอเจนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## แผนภาพที่ 4.7



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.43 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 130-133 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 42.61 (คำนวณเทียบจากกรดลโทโคลิก 12) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  = 3361 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 3083 (C-H stretching ของ aromatic), 3027 (C-H stretching ของ olefinic), 2938 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_2$ ), 2863 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_3$ ), 1732 (C=O stretching), 1659 (C=C stretching ของ olefinic), 1599 และ 1578 (C=C stretching ของ aromatic), 1448.50 (C-H bending ของ  $\text{CH}_2, \text{CH}_3$ ), 1377.28 (C-H bending ของ  $\text{CH}_3$ ), 1163 (C-O stretching ของ ester) และ 692.47 (C-H bending ของ aromatic)



สเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (300.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร 14g พบสัญญาณที่  $\delta$  4.71 (2H, d,  $J_{25,26} = 1.0$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 6.29 (1H, q, H-26), 6.65 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-27), 7.37 (2H, d,  $J_{29,33} = 1.0$  Hz, H-29,33), 7.32 (2H, t,  $J_{30,32} = 3.3$  Hz, H-30,32) และ 7.27 (1H, t,  $J = 1.6$  Hz, H-31) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า  $\delta$  เท่ากับ 1.87 ถึง 0.95 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.11 และสเปกตรัม  $^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz) ของสาร 14g พบสัญญาณที่  $\delta$  174.1 (C-24), 64.9 (C-25), 123.3 (C-26), 134.1 (C-27), 136.2 (C-28), 126.6 (C-29), 128.6 (C-30), 128.0 (C-31), 128.6 (C-32) และ 126.6 (C-33) ดังรูปที่ 4.12

ES-MS :  $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_3$  Calcd. 492.36 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  318.9 ( $-\text{CH}_2\text{COOCH}_2(\text{CH})_2\text{C}_6\text{H}_5$ ) และ 304.8 ( $-(\text{CH}_2)_2\text{COOCH}_2(\text{CH})_2\text{C}_6\text{H}_5$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 สเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14g



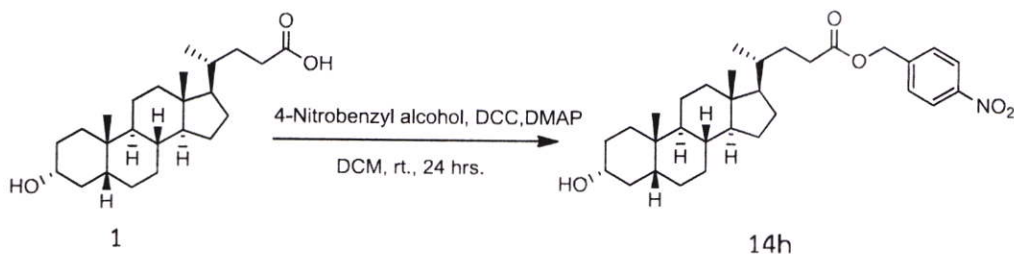
รูปที่ 4.12 สเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14g

#### 4.2.2.5 การสังเคราะห์ 4-Nitrobenzyl $3\alpha$ -hydroxy- $5\beta$ -cholan-24-oate 14h

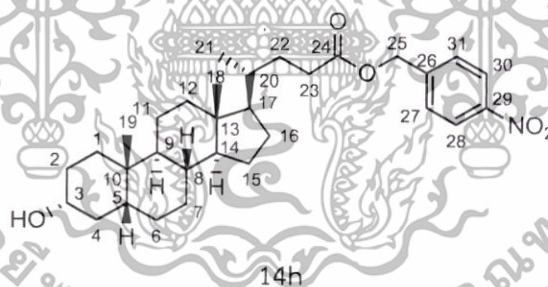
สาร 14h เตรียมจากการนำกรดลิโทโคลิก 12 ทำปฏิกิริยากับ 4-nitrobenzyl alcohol โดยใช้ DCC เป็นรีเอเจนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## แผนภาพที่ 4.8



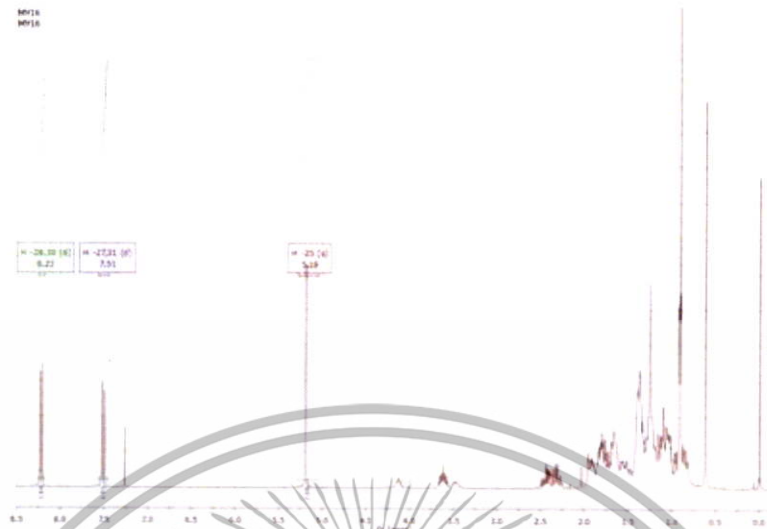
ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.26 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 156-159 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 64.52 (คำนวณเทียบจากกรณีโทโคลิค 12) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  = 3323 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 3083 (C-H stretching ของ aromatic), 2927 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_2$ ), 2862 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_3$ ), 1741 (C=O stretching), 1608 และ 1496 (C=C stretching ของ aromatic), 1524 (N=O asymmetric stretching), 1449 (C-H bending ของ  $\text{CH}_2, \text{CH}_3$ ), 1378 (C-H bending ของ  $\text{CH}_3$ ), 1346 (N=O symmetric stretching), 1244 (C-N stretching), 1159 (C-O stretching ของ ester), 858 (C-H bending ของ para subst.) และ 738 (C-H bending ของ aromatic)



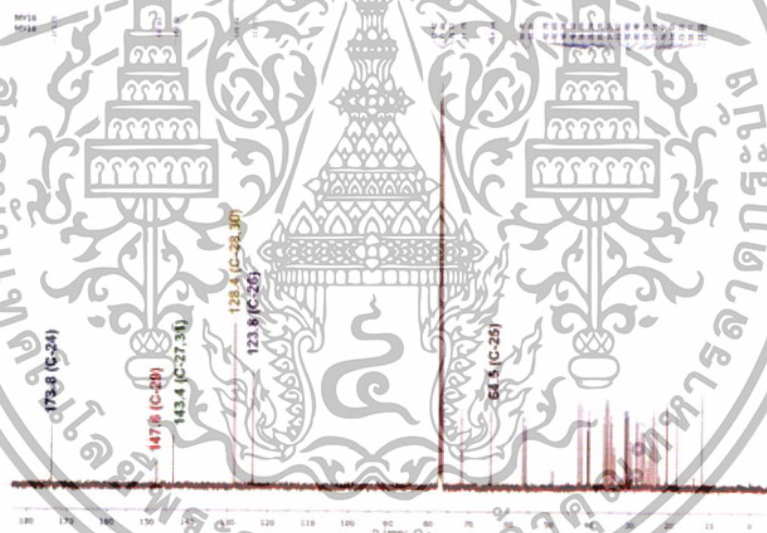
สเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (300.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร 14h พบสัญญาณที่  $\delta$  5.19 (2H, s,  $\text{OCH}_2$ ), 7.51 (2H, d,  $J_{27,31} = 8.8$  Hz, H-27,31) และ 8.22 (2H, d,  $J_{28,30} = 8.8$  Hz, H-28,30) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า  $\delta$  เท่ากับ 1.96-0.95 ถึง ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.13 และสเปกตรัม  $^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz) ของสาร 14h พบสัญญาณที่  $\delta$  173.8 (C-24), 64.5 (C-25), 123.8 (C-26), 143.4 (C-27), 128.4 (C-28), 147.6 (C-29), 128.4 (C-30), 143.4 (C-31) ดังรูปที่ 4.14

ES-MS :  $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{NO}_5$  Calcd. 511.33 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  479.3 ( $-\text{O}_2$ ), 465.5 ( $-\text{NO}_2$ ) และ 329.6 ( $-\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 สเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14h



รูปที่ 4.14 สเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 14h

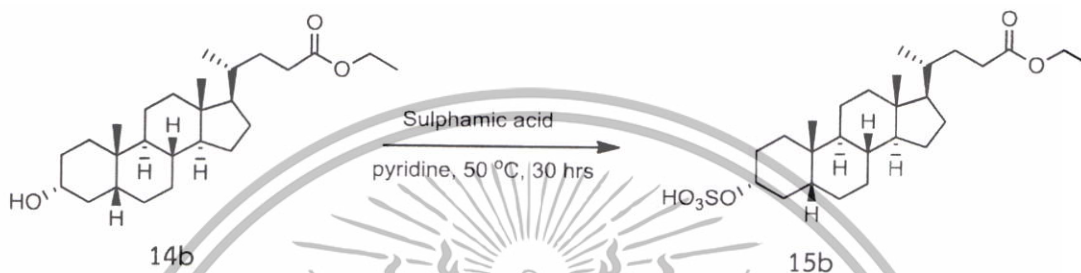
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3 ผลการสังเคราะห์สารประกอบซัลเฟตของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก 15b-15h ด้วยปฏิกิริยาซัลเฟชัน

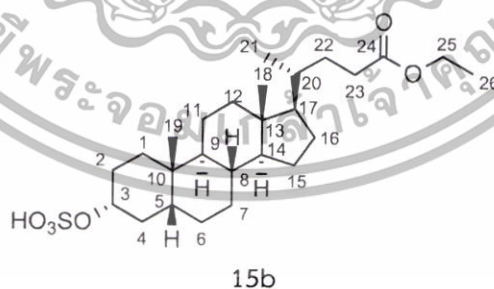
#### 4.3.1 การสังเคราะห์ Ethyl 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oate-3-sulphate 15b

สาร 14b เตรียมจากการนำสาร 15b ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.9



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.34 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 30 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 180-183 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 85.59 (คำนวณเทียบจากสาร 14b) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm<sup>-1</sup> : 3446 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 2929 (C-H stretching ของ CH<sub>2</sub>), 2859 (C-H stretching ของ CH<sub>3</sub>), 1733 (C=O stretching), 1445 (C-H bending ของ CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1376 (C-H bending ของ CH<sub>3</sub>), 1208 (O=S=O stretching) และ 1059 (S=O stretching)

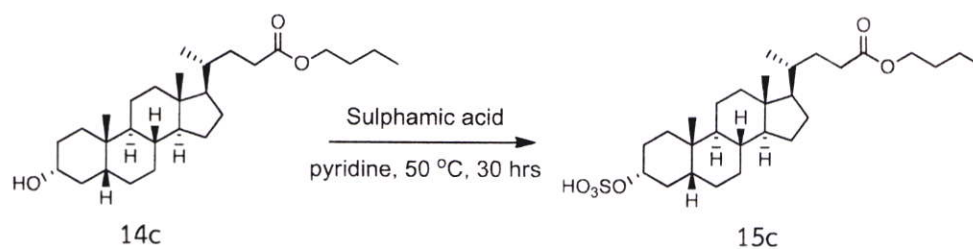


สเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR (300.1 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ของสาร 15b พบสัญญาณที่  $\delta$  3.93-3.82 (1H, m, H-3), 3.68 (2H, q,  $J_{25,26} = 7.1$  Hz, OCH<sub>2</sub>) และ 0.83 (3H, t,  $J_{26,25} = 9.2$  Hz, CH<sub>3</sub>), และโปรตอนที่อยู่ในช่วง  $\delta$  เท่ากับ 1.58 ถึง 0.59 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



แผนภาพที่ 4.10



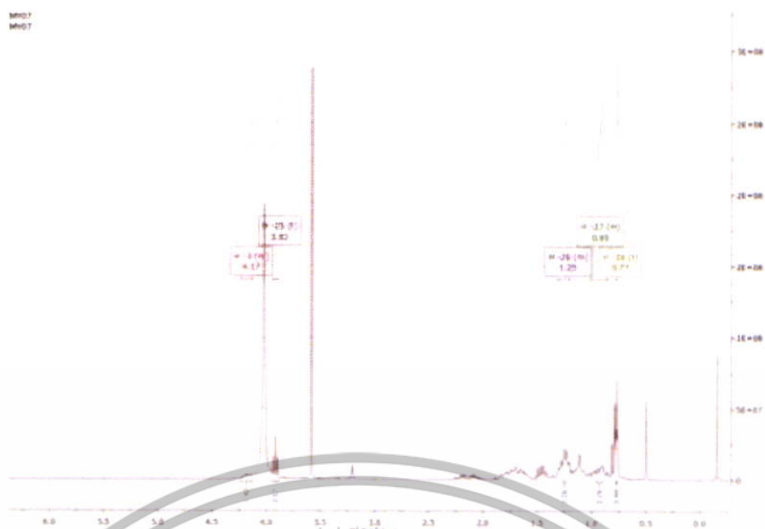
ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.29 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 30 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 181-184 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 62.50 (คำนวณเทียบจากสาร 14c) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3458 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 2939 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_2$ ), 2867 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_3$ ), 1734 (C=O stretching), 1447 (C-H bending ของ  $\text{CH}_2, \text{CH}_3$ ), 1376 (C-H bending ของ  $\text{CH}_3$ ), 1224 (O=S=O stretching) และ 1061 (S=O stretching).



สเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (300.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร 15c พบสัญญาณที่  $\delta$  4.24-4.13 (1H, m, H-3), 3.92 (2H, t,  $J_{25,26} = 6.6$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 1.31-1.21 (2H, m, H-26), 1.02-0.86 (2H, m, H-27) และ 0.77 (3H, t,  $J = 2.4$  Hz, H-28) และโปรตอนที่อยู่ในวงแหวน  $\delta$  เท่ากับ 1.97 ถึง 1.00 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.17 และสเปกตรัม  $^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz) ของสาร 15c พบสัญญาณที่  $\delta$  79.6 (C-3), 174.9 (C-24), 64.1 (C-25), 31.1 (C-26), 18.8 (C-27) และ 13.3 (C-28) ดังรูปที่ 4.18

ES-MS :  $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_6\text{S}$  Calcd. 512.32 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  512.0 และ 513.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 สเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 15c



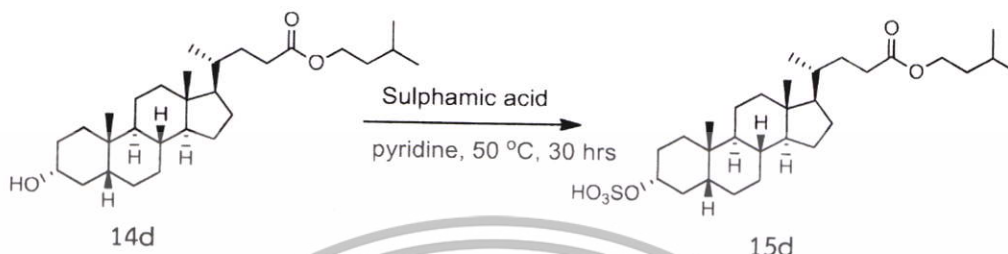
รูปที่ 4.18 สเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 15c

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

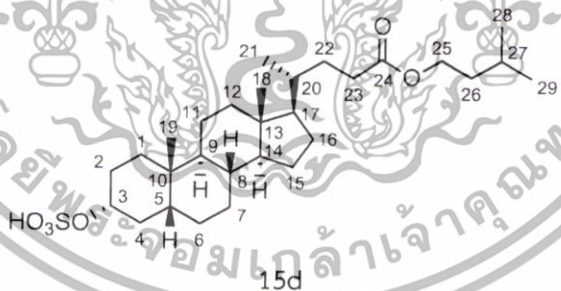
### 4.3.3 การสังเคราะห์ Isoamyl 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oate-3-sulphate 15d

สาร 15d เตรียมจากการนำสาร 14d ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.11



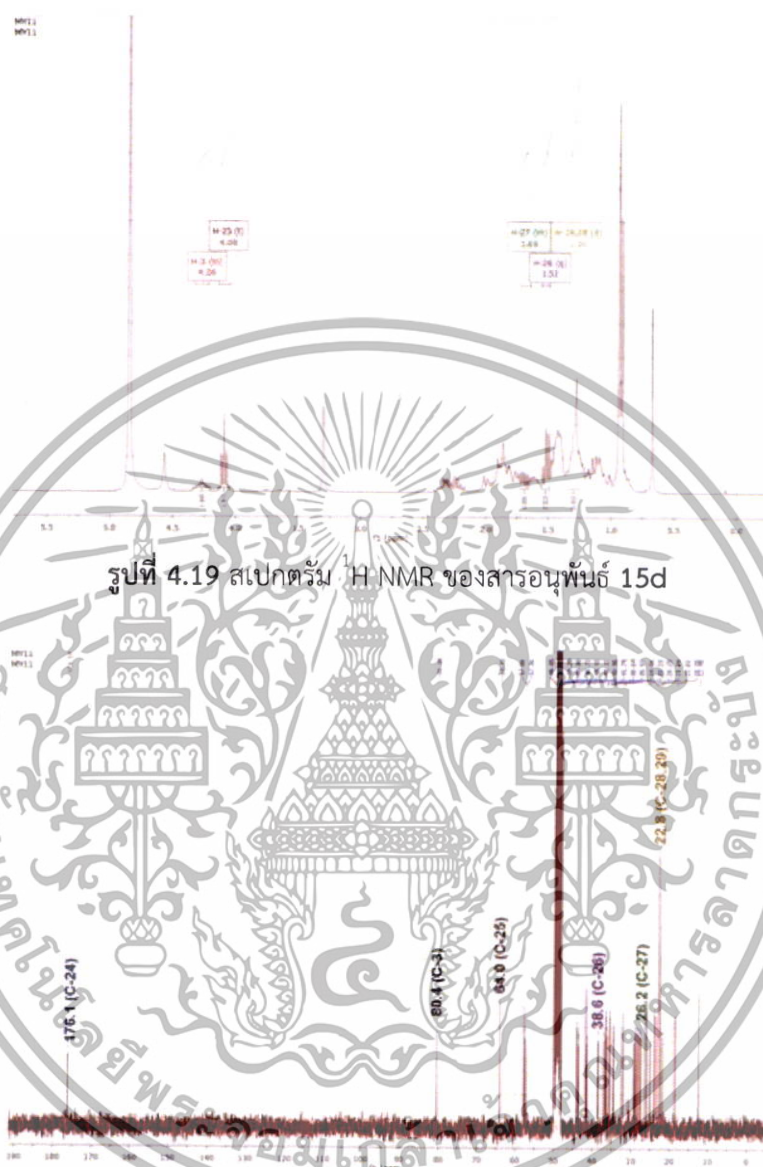
ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin layer chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.37 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 30 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 153-156 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 47.19 (คำนวณเทียบจากสาร 14d) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3450 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 2931 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_2$ ), 2870 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_3$ ), 1730 (C=O stretching), 1447 (C-H bending ของ  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ ), 1371 (C-H bending ของ  $\text{CH}_3$ ), 1308 (O=C-O stretching), 1207 (O=S=O stretching) และ 1061 (S=O stretching)



สเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (300.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร 15d พบสัญญาณที่  $\delta$  4.33-4.22 (1H, m, H-3), 4.09 (2H, t,  $J_{25,26} = 6.7$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 1.52 (2H, q,  $J_{26,25} = 6.7$  Hz, H-26), 1.76-1.60 (1H, m, H-27) และ 1.30 (6H, d,  $J_{28,29} = 10.8$  Hz, H-28 และ H-29) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า  $\delta$  เท่ากับ 1.76 ถึง 1.01 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.19 และสเปกตรัม  $^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz) ของสาร 15d พบสัญญาณที่  $\delta$  80.4 (C-3), 176.1 (C-24), 64.0 (C-25), 38.6 (C-26), 26.2 (C-27), 22.8 (C-28), 22.8 (C-29) ดังรูปที่ 4.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ES-MS :  $C_{29}H_{50}O_6S$  Calcd. 526.33 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ  $m/z$   $[M+H]^+$  526.0



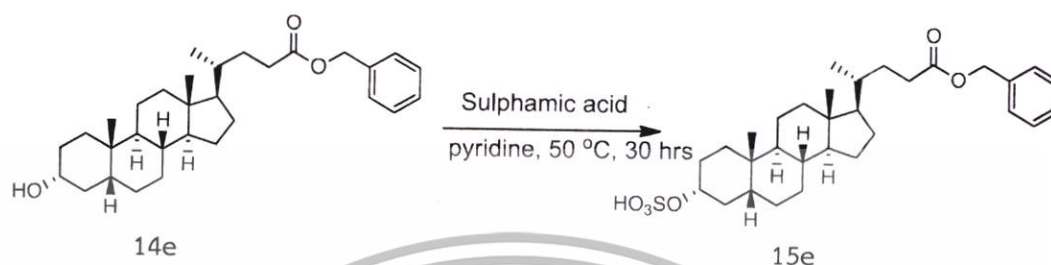
รูปที่ 4.20 สเปกตรัม  $^{13}C$  NMR ของสารอนุพันธ์ 15d

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

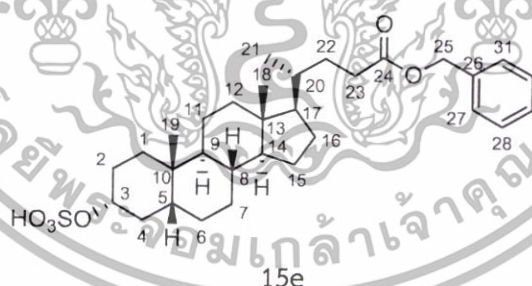
#### 4.3.4 การสังเคราะห์ Benzyl 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oate-3-sulphate 15e

สาร 15e เตรียมจากการนำสาร 14e ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.12



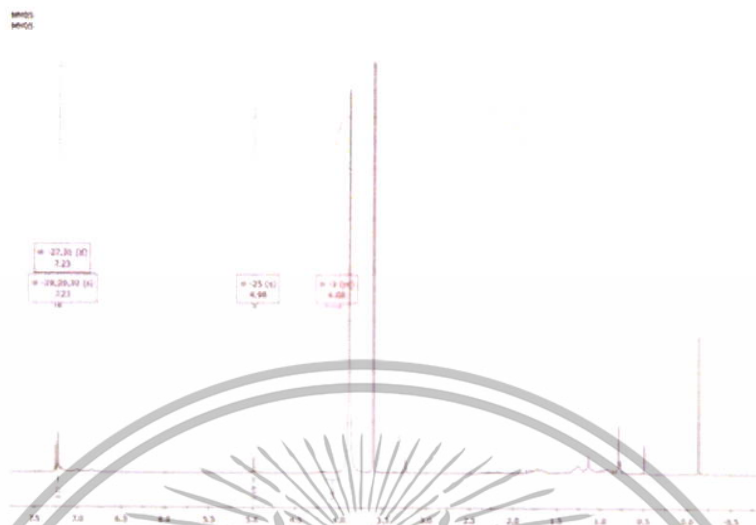
ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.51 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 30 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 170-173 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 55.02 (คำนวณเทียบจากสาร 14e) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3442 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 3075 (C-H stretching ของ aromatic), 2933 (C-H stretching ของ CH<sub>2</sub>), 2863 (C-H stretching ของ CH<sub>3</sub>), 1736 (C=O stretching), 1638 และ 1542 (C=C stretching ของ aromatic), 1456 (C-H bending ของ CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1384 (C-H bending ของ CH<sub>3</sub>), 1241 (O=S=O stretching), 1061 (S=O stretching) และ 695 (C-H bending ของ aromatic)



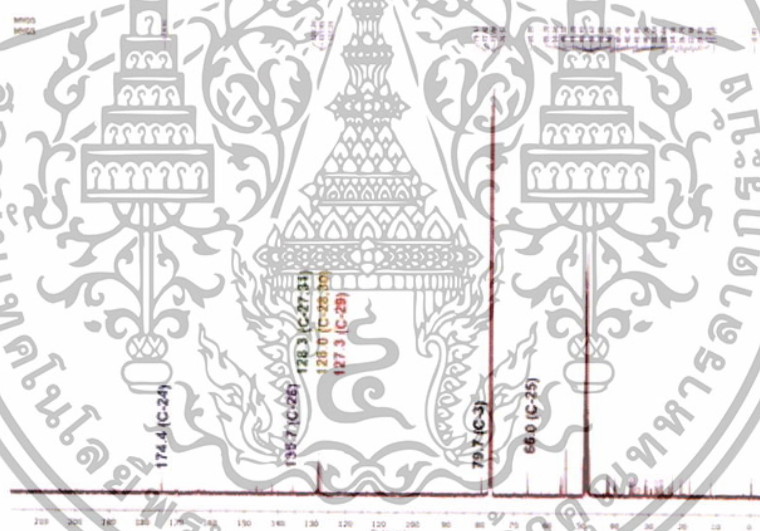
สเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR (300.1 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ของสาร 15e พบสัญญาณที่  $\delta$  4.16-3.99 (1H, m, H-3), 4.98 (2H, s, OCH<sub>2</sub>), 7.23 (3H, s, H-28,29,30) และ 7.24 (2H, d,  $J_{27,31} = 9.0$  Hz, H-27,31) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า  $\delta$  เท่ากับ 1.91 ถึง 0.82 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.21 และสเปกตรัม <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz) ของสาร 15e พบสัญญาณที่  $\delta$  79.7 (C-3), 174.4 (C-24), 66.0 (C-25), 135.7 (C-26), 128.3 (C-27), 128.0 (C-28), 127.3 (C-29), 128.0 (C-30) และ 128.3 (C-31) ดังรูปที่ 4.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ES-MS :  $C_{31}H_{46}O_6S$  Calcd. 546.30 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ  $m/z$   $[M+H]^+$  545.9



รูปที่ 4.21 สเปกตรัม  $^1H$  NMR ของสารอนุพันธ์ 15e



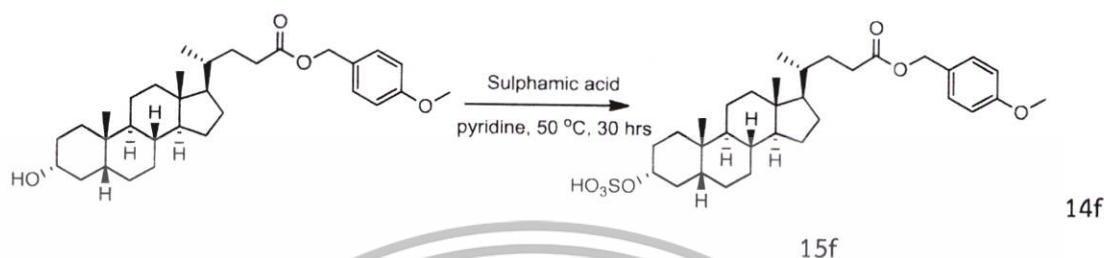
รูปที่ 4.22 สเปกตรัม  $^{13}C$  NMR ของสารอนุพันธ์ 15e

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

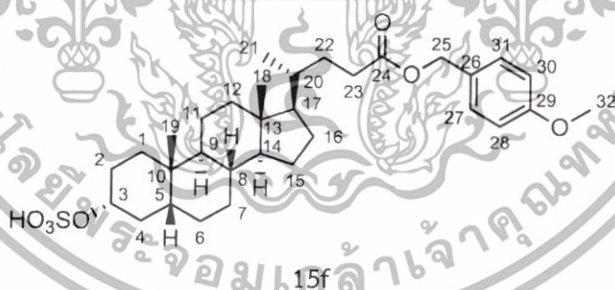
#### 4.3.5 การสังเคราะห์ 4-Methoxybenzyl 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oate-3-sulphate 15f

สาร 15f เตรียมจากการนำสาร 14f ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.13



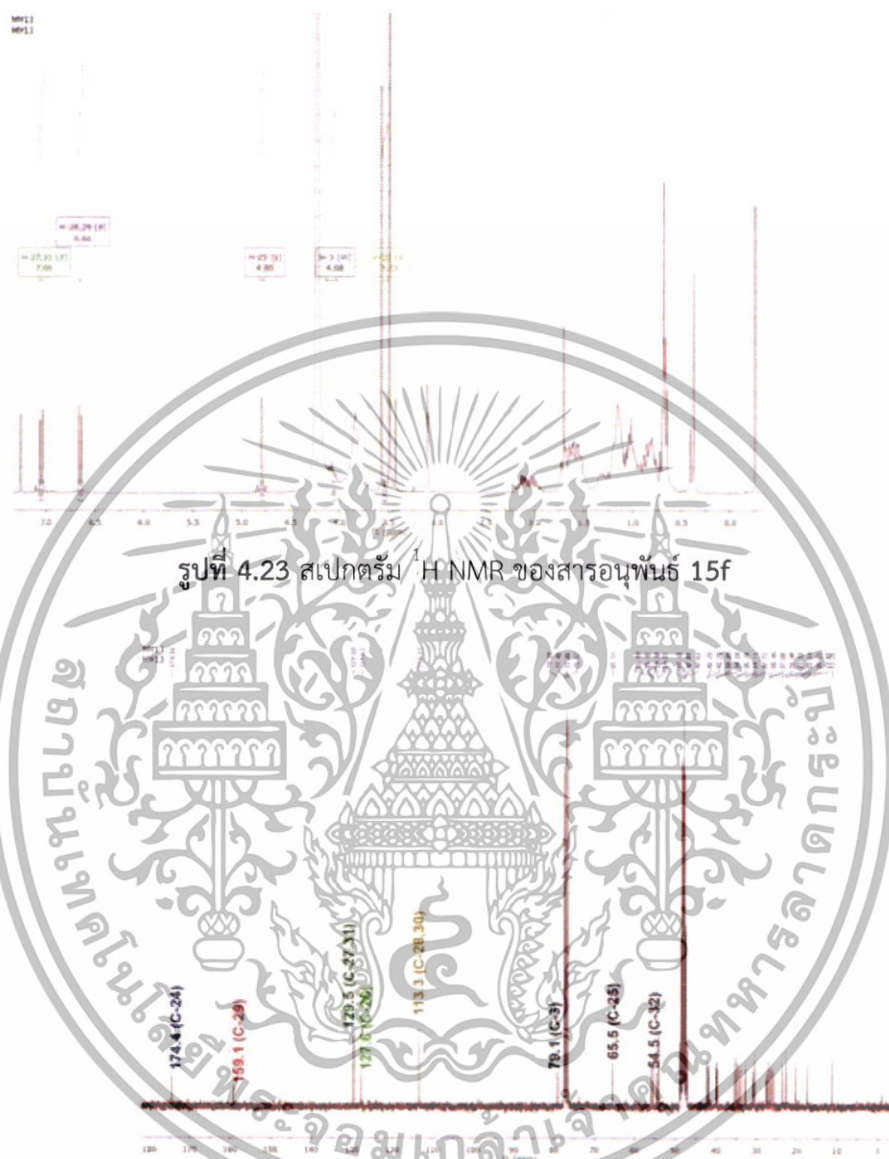
ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin layer chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.29 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 10 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 190-193 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 51.59 (คำนวณเทียบจากสาร 14f) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3454 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 2937 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_2$ ), 2867 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_3$ ), 1733 (C=O stretching), 1615 และ 1517 (C=C stretching ของ aromatic), 1453 (C-H bending ของ  $\text{CH}_2, \text{CH}_3$ ), 1376 (C-H bending ของ  $\text{CH}_3$ ), 1224 (O=S=O stretching) และ 1067 (S=O stretching)



สเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR (300.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร 15f พบสัญญาณที่  $\delta$  4.13-4.03 (1H, m, H-3), 4.80 (2H, s,  $\text{OCH}_2$ ), 7.06 (2H, d,  $J_{27,31} = 8.7$  Hz, H-27 และ H-31) และ 6.66 (2H, d,  $J_{28,30} = 8.7$  Hz, H-28 และ H-30) และ ) และ 3.53 (3H, s, H-32) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า  $\delta$  เท่ากับ 1.95 ถึง 0.95 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.23 และสเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz) ของสาร 15f พบสัญญาณที่  $\delta$  79.1 (C-3), 174.4 (C-24), 65.5 (C-25), 127.6 (C-26), 129.5 (C-27), 113.3 (C-28), 159.1 (C-29), 113.3 (C-30), 129.5 (C-31) และ 54.5 (C-32) ดังรูปที่ 4.24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ES-MS :  $C_{32}H_{48}O_7S$  Calcd. 576.31 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ  $m/z$   $[M+H]^+$  575.9 และ 469.9 ( $-C_5H_4OCH_3$ )



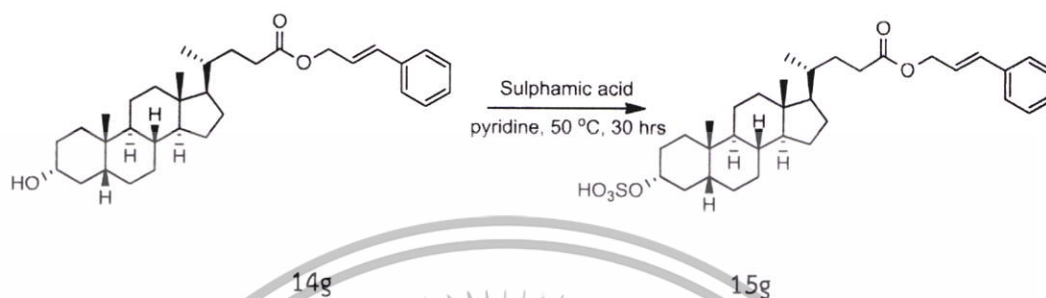
รูปที่ 4.23 สเปกตรัม  $^1H$  NMR ของสารอนุพันธ์ 15f

รูปที่ 4.24 สเปกตรัม  $^{13}C$  NMR ของสารอนุพันธ์ 15f

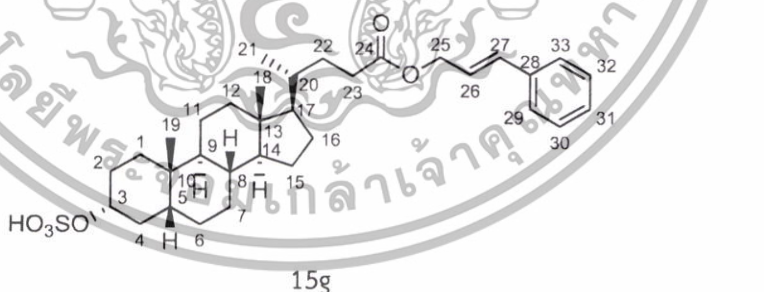
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.6 การสังเคราะห์ Cinnamyl 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oate-3-sulphate 15g  
 สาร 15g เตรียมจากการนำสาร 14g ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine  
 เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.14



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin layer chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.37 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 30 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 151-154 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 67.85 (คำนวณเทียบจากสาร 14g) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm<sup>-1</sup> : 3461 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 3029 (C-H stretching ของ aromatic), 3029 (C-H stretching ของ olefinic), 2935 (C-H stretching ของ CH<sub>2</sub>), 2867 (C-H stretching ของ CH<sub>3</sub>), 1733 (C=O stretching), 1654 (C=C stretching ของ olefinic), 1619 และ 1509 (C=C stretching ของ aromatic), 1449 (C-H bending ของ CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1374 (C-H bending ของ CH<sub>3</sub>), 1225 (O=S+O stretching) และ 1072 (S=O stretching)

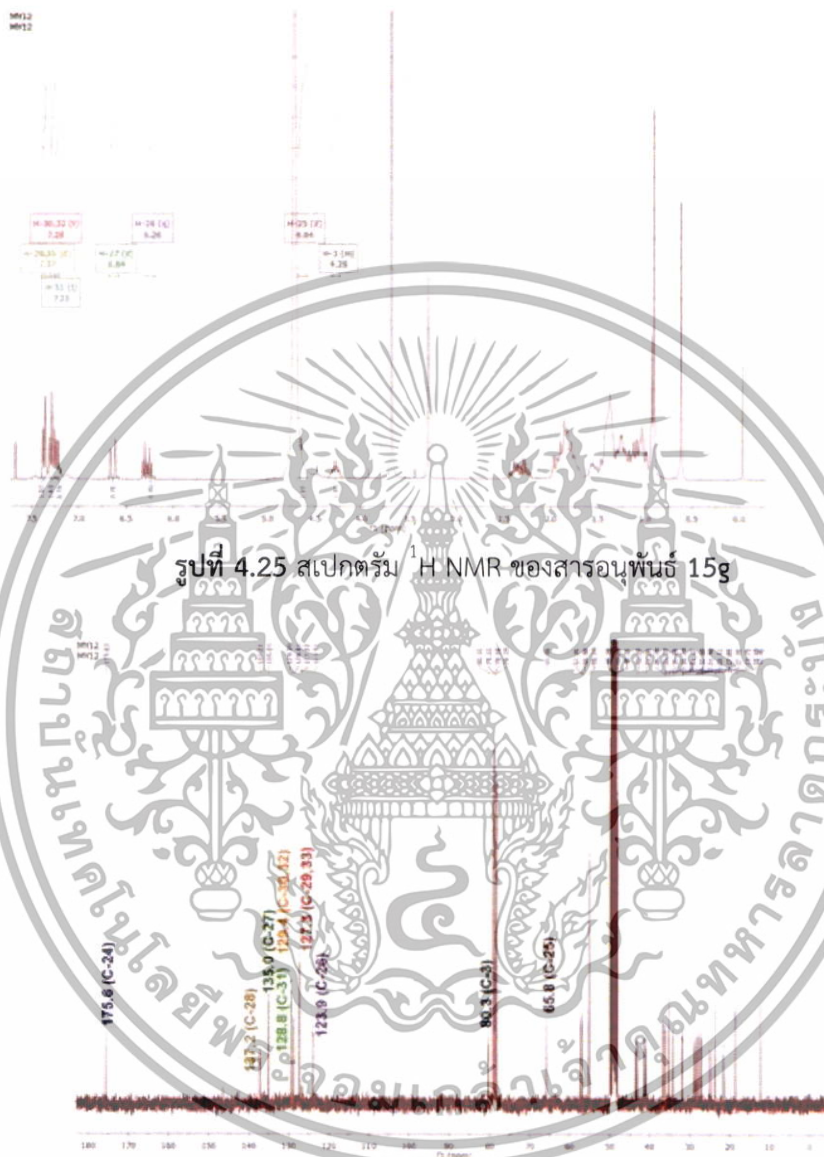


สเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR (300.1 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ของสาร 15g พบสัญญาณที่ δ 4.33-4.23 (1H, m, H-3), 4.64 (2H, d, J<sub>25,26</sub> = 3.0 Hz, OCH<sub>2</sub>), 6.26 (1H, q, H-26), 6.64 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-27), 7.37 (2H, d, J<sub>29,33</sub> = 1.2 Hz, H-29,33), 7.28 (2H, t, J<sub>30,32</sub> = 6.3 Hz, H-30,32) และ 7.23 (1H, t, J = 2.0 Hz, H-31) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.56 ถึง 0.98 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.25 และสเปกตรัม <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz) ของสาร 15g พบสัญญาณที่ δ 80.3 (C-3),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

175.6 (C-24), 65.8 (C-25), 123.9 (C-26), 135.0 (C-27), 137.2 (C-28), 127.3 (C-29), 129.4 (C-30), 128.8 (C-31), 129.4 (C-32) และ 127.3 (C-33) ดังรูปที่ 4.26

ES-MS :  $C_{33}H_{48}O_6S$  Calcd. 572.32 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ  $m/z$   $[M+H]^+$  571.6



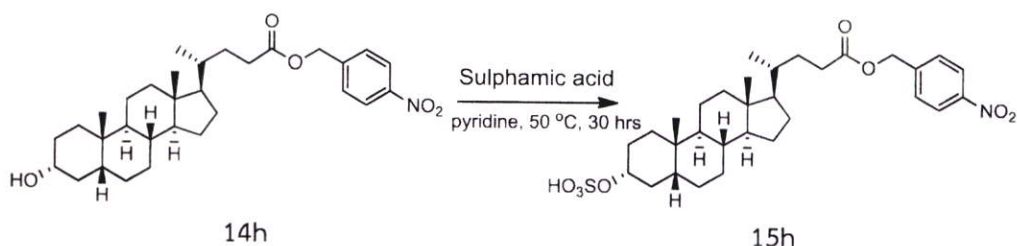
รูปที่ 4.25 สเปกตรัม  $^1H$  NMR ของสารอนุพันธ์ 15g

รูปที่ 4.26 สเปกตรัม  $^{13}C$  NMR ของสารอนุพันธ์ 15g

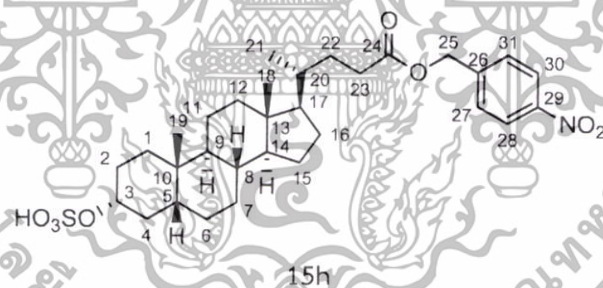
**4.3.7 การสังเคราะห์ 4-Nitrobenzyl 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oate-3-sulphate 15h**  
 สาร 15h เตรียมจากการนำสาร 14h ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนภาพที่ 4.15



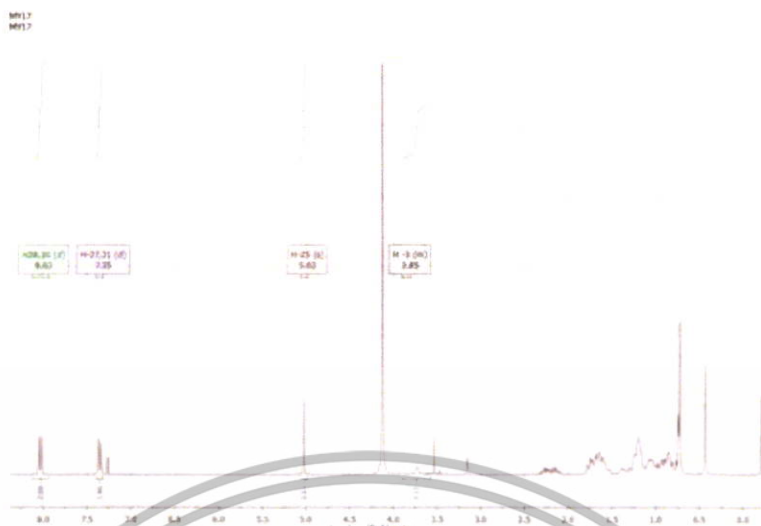
ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.14 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 10 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 162-165 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 56.35 (คำนวณเทียบจากสาร 14h) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3416 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 3033 (C-H stretching ของ aromatic), 2925 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_2$ ), 2859 (C-H stretching ของ  $\text{CH}_3$ ), 1736 (C=O stretching), 1654 และ 1525 (C=C stretching ของ aromatic), 1561 (N=O asymmetric stretching), 1459 (C-H bending ของ  $\text{CH}_2, \text{CH}_3$ ), 1374 (C-H bending ของ  $\text{CH}_3$ ), 1345 (N=O symmetric stretching), 1217 (O=S=O stretching), 1157 (C-N stretching), 1051 (S=O stretching), 841 (C-H bending ของ para subst.), และ 765 (C-H bending ของ aromatic)



สเปกตรัม  $^1\text{H NMR}$  (300.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร 15h พบสัญญาณที่  $\delta$  3.90-3.80 (1H, m, H-3), 5.02 (2H, s,  $\text{OCH}_2$ ), 7.35 (2H, d,  $J_{27,31} = 8.7$  Hz, H-27,31) และ 8.03 (2H, d,  $J_{28,30} = 8.7$  Hz, H-28,30) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า  $\delta$  เท่ากับ 1.78-0.76 ถึง ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.27 และสเปกตรัม  $^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz) ของสาร 15h พบสัญญาณที่  $\delta$  79.2 (C-3) 173.9 (C-24), 64.2 (C-25), 123.2 (C-26), 143.1 (C-27), 128.0 (C-28), 147.2 (C-29), 128.0 (C-30), 143.1 (C-31) ดังรูปที่ 4.28

ES-MS :  $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{NO}_8\text{S}$  Calcd. 591.29 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  591.1 และ 469.7 ( $-\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 สเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 15h



รูปที่ 4.28 สเปกตรัม  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารอนุพันธ์ 15h

#### 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารอนุพันธ์กรดดีออกซีโคคลิก 13a-13h

จากตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของกรดดีออกซีโคคลิก 11 และสารอนุพันธ์ 13a-13h พบว่ากรดดีออกซีโคคลิก 11 มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 46.04 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB และ Vero เมื่อเปรียบเทียบกับตัวยามาตรฐาน doxorubicine มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 0.290 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทำการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลที่ตำแหน่ง C-24 ของกรดดีออกซีโคคลิก 11 เป็นหมู่เอไมด์ โดยเน้นให้มีหมู่อะมิโนที่ปลายสายโซ่ของพอลิเอมีน พบว่าสารอนุพันธ์ 13a ไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 ในขณะที่อนุพันธ์ 13b-13f มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 21.91, 9.70, 39.97, 17.92 และ 22.67 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB พบว่าสารอนุพันธ์ 13a ไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB ในขณะที่อนุพันธ์ 13b-13f มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 14.49, 3.42, 14.19, 21.41 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35.01 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เฉพาะสารอนุพันธ์ 13c ที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 46.84 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.1 แสดงระดับความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ 13a-13f ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์

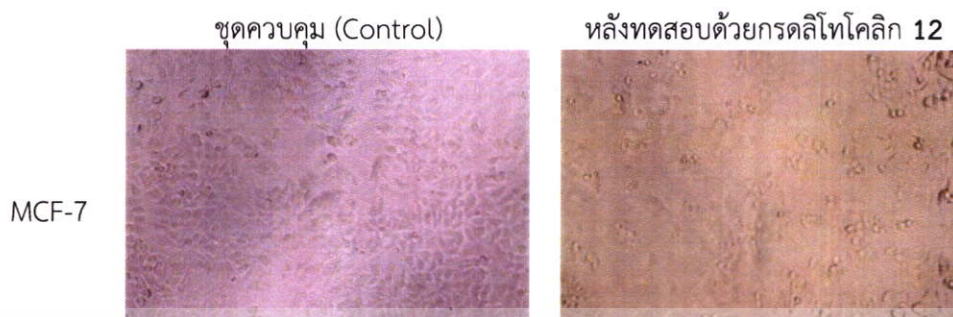
เซลล์ไลน์	ความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ 13a-13f ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)						
	กรดดีออกซีโคเลอิก 11	13a	13b	13c	13d	13e	13f
MCF-7	46.04	-	21.91	9.70	39.97	17.92	22.67
KB	-	-	14.49	3.42	14.19	21.41	35.01
Vero	-	-	-	46.84	-	-	-

#### 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารอนุพันธ์กรดดีออกซีโคเลอิก 14a-14h และ 15b-15h

กรดดีออกซีโคเลอิก 12, สารอนุพันธ์ 14a-14h และ 15b-15h ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ ประกอบด้วยเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปากชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line) และเซลล์ไตลิงปดชนิด Vero (African green monkey kidney) ด้วยวิธี MTT assay และในการทำ Primary screening โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับกรดดีออกซีโคเลอิก 12 ที่ระดับความเข้มข้นในการทดสอบเบื้องต้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) แล้วนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ หรือทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ( $CC_{50}$ ) โดยพิจารณาจากค่า  $CC_{50}$  ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ตัวทำละลาย 2 เปอร์เซ็นต์ของ DMSO และ ใช้ Mitomycin C ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวยาปฏิชีวนะเพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบ (ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสาร 14a, lithocholic acid methyl ester, จะใช้สารมาตรฐานจากบริษัท Sigma-Aldrich ทำการทดสอบคู่ขนานกับสาร 14a ที่สังเคราะห์ได้)

ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ของกรดดีออกซีโคเลอิก 12 และสารอนุพันธ์ 14a-14h และ 15b-15h แสดงในตารางที่ 4.2 พบว่ากรดดีออกซีโคเลอิก 12 มีความเป็นพิษน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB และ Vero โดยมีค่า %Cytotoxicity เท่ากับ 12.27, 13.52, และ 13.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับผลการทดสอบของกรดดีออกซีโคเลอิก 12 ต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control) ซึ่งชุดควบคุมประกอบด้วยเซลล์ไลน์และอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าลักษณะของเซลล์ไลน์ไม่มีความผิดปกติ ซึ่งสอดคล้องกับค่า %Cytotoxicity คือกรดดีออกซีโคเลอิก 12 ไม่มีผลต่อเซลล์ไลน์ แสดงดังรูปที่ 4.29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.29** ตัวอย่างผลการทดสอบของกรดลิโทโคลิก 12 ต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control) ที่กำลังขยาย 100 เท่า

สารอนุพันธ์ 14a แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $17.14 \pm 0.61$ ,  $16.07 \pm 6.24$  และ  $11.16 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 14b แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $17.14 \pm 0.61$ ,  $16.07 \pm 6.24$  และ  $11.16 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 14c แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $40.48 \pm 1.53$ ,  $26.40 \pm 0.15$ , และ  $12.17 \pm 2.68$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 14d แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $27.58 \pm 1.69$ ,  $13.90 \pm 0.00$  และ  $39.09 \pm 2.14$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 14e แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $22.49 \pm 2.45$ ,  $2.02 \pm 0.74$  และ  $16.15 \pm 1.34$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 14f แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $40.04 \pm 1.77$ ,  $9.90 \pm 0.89$  และ  $24.30 \pm 4.29$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 14g แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $34.63 \pm 9.50$ ,  $15.89 \pm 0.15$  และ  $23.74 \pm 1.88$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 14h แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $43.29 \pm 0.92$ ,  $17.57 \pm 0.45$  และ  $20.13 \pm 5.36$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 15b แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB และ Vero มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $62.51 \pm 3.22$ ,  $92.22 \pm 1.00$  และ  $88.99 \pm 4.97$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 15c แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $29.93 \pm 0.00$ ,  $15.12 \pm 3.42$  และ  $21.97 \pm 0.27$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 15d แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $37.80 \pm 3.06$ ,  $15.30 \pm 0.00$  และ  $26.64 \pm 2.41$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 15e แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $33.39 \pm 2.76$ ,  $-5.79 \pm 0.59$  และ  $7.94 \pm 0.80$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารอนุพันธ์ 15f แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $13.90 \pm 10.11$ ,  $11.13 \pm 0.45$ , และ  $35.52 \pm 5.96$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 15g แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $27.94 \pm 1.07$ ,  $18.75 \pm 0.52$  และ  $28.29 \pm 2.21$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 15h แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ  $9.67 \pm 4.14$ ,  $-3.90 \pm 0.59$  และ  $-6.47 \pm 3.48$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.2** ผลการทดสอบความเป็นพิษของกรดลิโทโคลิก 12 และสารอนุพันธ์ 14a-14h และ 15b-15h ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารตัวอย่าง	% Cytotoxicity		
	MCF-7	KB	Vero
12	12.27	13.52	13.12
14a	38.45	98.16	33.43
14b	$17.14 \pm 0.61$	$16.07 \pm 6.24$	$11.16 \pm 0.00$
14c	$40.48 \pm 1.53$	$26.40 \pm 0.15$	$12.17 \pm 2.68$
14d	$27.58 \pm 1.69$	$13.90 \pm 0.00$	$39.09 \pm 2.14$
14e	$22.49 \pm 2.45$	$2.02 \pm 0.74$	$16.15 \pm 1.34$
14f	$40.04 \pm 1.77$	$9.90 \pm 0.89$	$24.30 \pm 4.29$
14g	$34.63 \pm 9.50$	$15.89 \pm 0.15$	$23.74 \pm 1.88$
14h	$43.29 \pm 0.92$	$17.57 \pm 0.45$	$20.13 \pm 5.36$
15b	$62.51 \pm 3.22$	$92.22 \pm 1.00$	$88.99 \pm 4.97$
15c	$29.93 \pm 0.00$	$15.12 \pm 3.42$	$21.97 \pm 0.27$
15d	$37.80 \pm 3.06$	$15.30 \pm 0.00$	$26.64 \pm 2.41$
15e	$33.39 \pm 2.76$	$-5.79 \pm 0.59$	$7.94 \pm 0.80$
15f	$13.90 \pm 10.11$	$11.13 \pm 0.45$	$35.52 \pm 5.96$
15g	$27.94 \pm 1.07$	$18.75 \pm 0.52$	$28.29 \pm 2.21$
15h	$9.67 \pm 4.14$	$-3.90 \pm 0.59$	$-6.47 \pm 3.48$
Mitomycin C	$68.89 \pm 2.26$	$23.54 \pm 1.16$	$79.73 \pm 1.32$

จากผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์ จะนำสารอนุพันธ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ หรือทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ( $CC_{50}$ ) ด้วยวิธี MTT assay ที่ระดับความเข้มข้น 125, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะ Mitomycin C ค่า  $CC_{50}$  ของสารอนุพันธ์ 14a และ 15b แสดงในตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงระดับความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ 14a และ 15b ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซนต์

เซลล์ไลน์	ความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ 14a และ 15b ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซนต์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	14a	15b
MCF-7	>1,000	704.01
KB	371.07	100.39
Vero	>1,000	401.79

จากตารางที่ 4.3 พบว่าสารอนุพันธ์ 14a มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB มีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ 704.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เท่ากับ 1.80 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่สารอนุพันธ์ 15b มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ MCF-7, KB และ Vero มีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ 704.01, 100.39 และ 401.79 (เท่ากับ 1.45, 0.20 และ 0.82 ไมโครโมล/มิลลิลิตร) ตามลำดับ



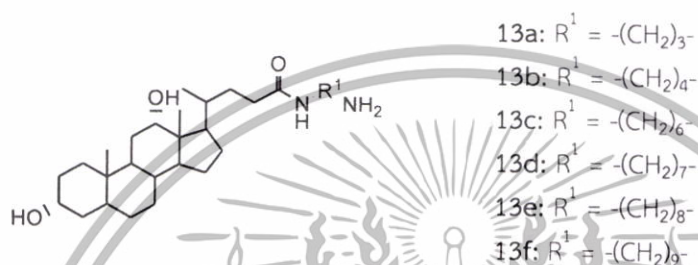
รูปที่ 4.30 ตัวอย่างผลการทดสอบของสารอนุพันธ์ 15b ต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 และเซลล์ไลน์ KB เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control) ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของกรดตือออกซีโคลิก 13a-13f

ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของกรดตือออกซีโคลิก 13a-13f โดยเทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็งสามารถตรวจสอบโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่าอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้มีความถูกต้องของโครงสร้าง และมีความบริสุทธิ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ผลได้ของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 40–80 เปอร์เซ็นต์ สูตรโครงสร้างของโบล์แอสิตเอไมด์สังเคราะห์แสดงในรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 แสดงโครงสร้างของสารอนุพันธ์เอไมด์ของกรดตือออกซีโคลิก 13a-13f

### 5.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารอนุพันธ์ 13a-13f

ผลการทดลองพบว่า กรดตือออกซีโคลิก 11 ไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB และ Vero แต่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 สารอนุพันธ์ 13a ไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB ในขณะที่สารอนุพันธ์ 13b, 13d, 13e และ 13f มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 และ KB ในระดับปานกลาง ส่วนสารอนุพันธ์ 13c มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 และ KB ในระดับที่ดี แต่ในขณะเดียวกันสารอนุพันธ์ 13c มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ซึ่งถ้ามีการนำไปพัฒนาเป็นตัวยานั้นอาจจะทำได้แต่เซลล์ปกติจะได้รับผลกระทบจากสารอนุพันธ์ 13c ที่ใช้ด้วย ทั้งนี้อาจจะต้องมีแนวทางการทดลองในขั้นที่สูงกว่าในระดับห้องทดลอง จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า การเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลของกรดตือออกซีโคลิก 11 เป็นหมู่เอไมด์ประกอบด้วยสายโซ่ยาวจะมีผลช่วยเพิ่มฤทธิ์การยับยั้งมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kihel และคณะ [13,14]

### 5.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิกโดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

ได้ทำการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของกรดลิโทโคลิก 12 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 24 (C-24) จากหมู่คาร์บอกซิลเป็นหมู่เอสเทอร์ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน และที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) จากหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ซัลเฟตด้วยปฏิกิริยาซัลเฟชัน แบ่งออกเป็น 2 วิธี ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 5.3.1 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ Sulfuric acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

อนุพันธ์เอสเทอร์ 14b และ 14c ถูกสังเคราะห์จากกรดลิโทโคลิค 12 ทำปฏิกิริยากับ ethyl alcohol และ butyl alcohol ตามลำดับ โดยมีผลได้ร้อยละของสารอนุพันธ์ 14b และ 14c เท่ากับ 58.34 และ 65.60 ตามลำดับ (คำนวณเทียบจากกรดลิโทโคลิค 12)

### 5.3.2 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) เป็นรีเอเจนต์

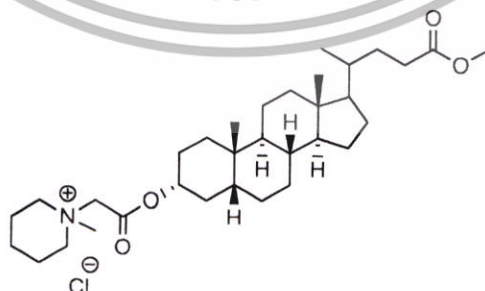
อนุพันธ์เอสเทอร์ 14d-14h ถูกสังเคราะห์จากกรดลิโทโคลิค 12 โดยมี DCC เป็นรีเอเจนต์ ในการกระตุ้นให้หมู่คาร์บอกซิลมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์กับแอลกอฮอล์รีเอเจนต์ (Alcohol reagents) ซึ่งสารอนุพันธ์ 14d-14h มีผลได้ร้อยละอยู่ในช่วง 15.88 ถึง 64.52 (คำนวณเทียบจากกรดลิโทโคลิค 12)

### 5.4 การสังเคราะห์สารประกอบซัลเฟตของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิค 15b-15h โดยการทำให้ปฏิกิริยาซัลเฟชัน

อนุพันธ์ซัลเฟตเอสเทอร์ 15b ถึง 15h ถูกสังเคราะห์จากสารอนุพันธ์ 14b ถึง 14h โดยทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid มีผลได้ร้อยละของสารอนุพันธ์อยู่ในช่วง 47.19 ถึง 85.59 (คำนวณเทียบจาก 14b-14h)

### 5.5 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารอนุพันธ์กรดลิโทโคลิค

กรดลิโทโคลิค 12 และสารอนุพันธ์ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 3 ชนิด ประกอบด้วย เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7, เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากชนิด KB และเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารอนุพันธ์ 14a มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB มากที่สุด และเมื่อเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของสารอนุพันธ์ 14b ให้เป็นหมู่ซัลเฟตได้สารอนุพันธ์ 15b ผลการทดสอบพบว่า สารอนุพันธ์ 14b ไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ MCF-7, KB และ Vero ในขณะที่สารอนุพันธ์ 15b ออกฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB และ Vero ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bajaj และคณะ[19] ซึ่งได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารอนุพันธ์กรดลิโทโคลิค 36 ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ 3 ชนิด คือ HCT-119, DLD-1 และ HCT-8 พบว่าสารอนุพันธ์มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT-116 ดีที่สุด ดังนั้นจากงานวิจัย พบว่าการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลายของกรดลิโทโคลิค 12 ส่งผลให้การออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีประสิทธิภาพดีขึ้น และฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นต่างกันขึ้นอยู่กับหมู่ฟังก์ชันของสารอนุพันธ์



36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.6 ข้อเสนอแนะ

1. สารอนุพันธ์ซัลเฟตเอสเทอร์ของกรดลิโทโคลิก มีฤทธิ์ทดสอบต่อเซลล์ไลน์ ซึ่งโครงสร้างของสารอนุพันธ์สามารถนำมาปรับเปลี่ยนที่คาร์บอนตำแหน่ง 24 เป็นสารอนุพันธ์ของเอสเทอร์อื่นๆ เช่น เอไมด์ ซึ่งคาดว่าจะช่วยเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีขึ้น
2. เปลี่ยนแอลกอฮอล์รีเอเจนต์ที่ใช้ในปฏิกิริยา ให้มีหมู่ไฮดรอกซิลหลายหมู่ เช่น พอลิเมทิลีน ไกลคอล ซึ่งคาดว่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายและเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- [1] ThaiBiz Center.com. 2011. บทความน่ารู้เรื่องสเตียรอยด์. Online Available: <http://www.thaibizcenter.com/knowledgecenter.asp?kid=1184>.
- [2] สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2011. บราสลิโนสเตอรอยด์. Online Available: <http://th.wikipedia.org/wiki/บราสลิโนสเตอรอยด์>.
- [3] 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.
- [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. J. Simmonds, 1997. *Chemistry of Biomolecules: An Introduction*, Billing & Sons Ltd., Worcester.
- [6] 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*. Vol. 63, pp. 12968-12974.
- [7] S. N. Khan, Y. M. Jung, B. J. Kim, H. Cho, J. Lee and H. Kim. 2008. Synthesis and Antimicrobial Activity of 7 $\alpha$ -Amino-23,24-Bisnor-5 $\alpha$ -Cholan-22-ol Derivatives., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Vol. 18, pp. 2558-2561.
- [8] 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 $\alpha$ -aminosteroid., *Tetrahedron Letters*, 46, pp. 7675-7678.
- [9] B. Choucair, M. Dherbomez, C. Roussakis and L. El Kihel. 2004. Synthesis of Spermidinylcholestanol and Spermidinylcholesterol Squalamine analogues., *Tetrahedron*, 60, pp. 11477-11486.
- [10] F. Bernheim and L. Lack. 1967. The Effect of Bile Acid Derivative on Bacterial Permeability and Enzyme Induction, *Journal of Medicinal Chemistry*, 100, pp. 1096-1100.
- [11] A. Valkonen, M. Lahtinen and E. Kolehmainen. 2008. Syntheses and Structural Study of Bile Amidoalcohols., *Steroids*, 73, pp.1228-1241.
- [12] D. Wu, S. Ji, Y. Wu, Y. Ju and Y. Zhao. 2007. Design, Synthesis, and Antitumor Activity of Bile Acid-Polyamine-Nucleoside Conjugates., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, pp. 2983- 2986.
- [13] L. E. Kihel, M. Clement, M. A. Bazin, G. Descamps. 2008. New Lithiocholic and Chenodeoxycholic Piperazinylcarboxamides with Antiproliferative and Pro-apoptotic Effects on Human Cancer Cell Lines., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, pp. 8737-8744.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [14] D. Brossard, L. E. Kihel, M. Clement, W. Sebbahi, M. Khalid, C. Roussakis and S. Rault. 2010. Synthesis of Bile Acid Derivatives and in vitro Cytotoxic Activity with Pro-apoptotic Process on Multiple Myeloma (KMS-11), Glioblastoma Multiforme (GBM), and Colonic Carcinoma (HCT-116) Human Cell Lines., **European Journal of Medicinal Chemistry**, 45, pp. 2912-2918.
- [15] Y. Huang, S. Chen, J. Cui, C. Gan, Z. Liu, Y. Wei and H. Song. 2011. Synthesis and Cytotoxicity of A-Homo-Lactam Derivatives of Cholic Acid and 7-Deoxycholic acid., **Steroids**, 76, pp. 690- 694.
- [16] พันิชกร บุญมานำสิน และ ภัททฤทธิ์ สหัสโยธิน. 2551. การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของโบลีแอซิดเอไมด์. โครงการงานพิเศษภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [17] T. Mosmann. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." **Journal of Immunological**. 65: 55-63.
- [18] D. V. Waterhous, S. Barnes and D. D. Muccio. 1985. "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Bile Acids. Development of Two-Dimensional NMR Methods for the Elucidation of Proton Resonance Assignments for Five Common Hydroxylated Bile Acids, and Their Parent Bile Acid, 5 $\beta$ -cholanoic acid." **Lipid research**. 26. pp. 1068-1078.
- [19] M. Singh, S. Bansal, S. Kundu, P. Bhargava, A. Singh, R. K. Motiani, R. Shyam, V. Sreekanth, S. Sengupta and A. Bajaj. 2015. Synthesis, Structure-activity Relationship, and Mechanistic Investigation of Lithocholic Acid Amphiphiles for Colon Cancer Therapy, **Medicinal Chemical Communications**., 6, pp. 192-201.

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