รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์และฤทธิ์ชีวภาพของอะมิโนสเตียรอยด์จากเพรกนินโนโลน
Synthesis and Biological Activity of Amino Steroids from Pregnenolone

นางสาวพัชนี เจริญยิ่ง

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2560
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์และฤทธิ์ชีวภาพของอะมิโนสเตียรอยด์จากเพรกนินโนโลน
แหล่งเงิน ประเภททุนรายได้ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2560
จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2559 ถึง 30 กันยายน 2560
หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เพรกนินโนโลน **4** ถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่ โดยการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง A ของเพรกนินโนโลน **4** นำไปสู่อะมิโนสเตียรอยด์ **49**-**57** และ **59**-**60** อะมิโนสเตียรอยด์ **49**-**57** ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อเกิดโรคต่อมนุษย์ในสภาวะจำลองด้วยวิธี disc diffusion จากการทดลองพบว่าอะมิโนสเตียรอยด์ **49**-**57** ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้งหมด นอกจากนั้น อะมิโนสเตียรอยด์ **49**-**57** และ **59**-**60** ถูกนำมาประเมินฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มะเร็ง 3 ชนิดได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (human breast carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (oral human epidermal carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (human hepatocellular carcinoma cell line) และเซลล์ปกติจากไตของลิงชนิด Vero (African green monkey kidney) จากการทดลองพบว่า อะมิโนสเตียรอยด์ **53** แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 มากที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.70 ไมโครโมล/มิลลิลิตร

คำสำคัญ: เพรกนินโนโลน, สารอนุพันธ์, ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์, ความเป็นพิษต่อเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ABSTRACT

In this research, pregnenolone **4** was used as a starting material to develop new amino steroids. Ring-A modification of pregnenolone **4** resulted in the synthesis of amino derivatives **49-57** and **59-60**. The amino steroid derivatives **49-57** were evaluated for their *in vitro* antimicrobial properties against human pathogens using disc diffusion method. The results found that these derivatives did not show any significant activity against human pathogens. The amino steroids **49-57** and **59-60** were also tested for their cytotoxicity evaluations against 3 cancer cell lines: human breast carcinoma cell line (MCF-7), oral human epidermal carcinoma cell line (KB), human hepatocellular carcinoma cell line (HepG-2) and African green monkey kidney (Vero) using MTT assay. The results of the *in vitro* study showed that amino steroid **53** exhibited significant activity against MCF-7 cell line (IC_{50} = 0.70 μmol/mL).

Keywords: pregnenolone, derivatives, antimicrobial, cytotoxicity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามความตั้งใจในระดับหนึ่งด้วยการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเภททุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2560 ที่พิจารณาเห็นคุณค่าของงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้อความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้

พัชนี เจริญยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
รายการคำย่อและสัญลักษณ์	VIII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	3
1.5 กรอบแนวความคิดในการทำวิจัย	4
1.6 คำสำคัญของการวิจัย	7
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	8
2.2 ประเภทของสเตียรอยด์	9
2.3 สมบัติทางเคมีของสเตียรอยด์	11
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 การทดลองทั่วไป	15
3.2 วิธีการทดลอง	16
3.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบ	21
3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	22
3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method	23
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pregnenolone **4**	24
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์	37
4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	37
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ **49-56** จาก Pregnenolone **4**	43
5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของอะมิโนสเตียรอยด์ **49-56**	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.3 การสังเคราะห์อะมิโนอีพอกไซด์สเตียรอยด์ **57** และ **59-60**	44
5.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอะมิโนสเตียรอยด์ **49-60**	44
บรรณานุกรม	45
ประวัติผู้วิจัย	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone **4** และอะมิโนสเตียรอยด์ **49**-**57** และ **59**-**60** ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 39

4.2 ค่า IC_{50} ของอะมิโนสเตียรอยด์ **4, 49**-**57** และ **59**-**60** 42

5.1 ผลได้ร้อยละของอะมิโนสเตียรอยด์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **4**) 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างหลักของสเตียรอยด์	1
4.1 ผลของ Pregnenolone **4** ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม	39
4.2 ผลของ Pregnenolone **4** ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม	40
4.3 ผลของสาร **50** ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม	40
4.4 ผลของสาร **50** ต่อเซลล์ HepG-2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG-2 ปกติ เป็นชุดควบคุม	40
4.5 ผลของสาร **52** ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุม	41
4.6 ผลของสาร **53** ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อและสัญลักษณ์

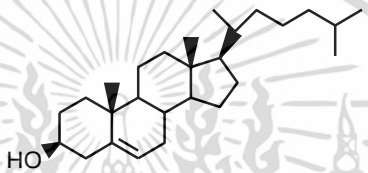
^{13}C NMR	^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
DCM	Dichloromethane
DIC	*N*,*N*'-diisopropylcarbodiimide
DMF	*N*,*N*-dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ESMS	Electrospray Ionization Mass Spectroscopy
Hz	Hertz
IC_{50}	Inhibitory concentration 50%
IR	Infrared Spectroscopy
^{1}H NMR	^{1}H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
m/z	Mass to charge ratio
MIC	Minimum Inhibition Concentration
ppm	Part per million
R_f	Retardation factor
ν_{max}	Frequency maximum
cm^{-1}	per centimeter
δ	Chemical shift
J	Coupling constant
μg/mL	Microgram per milliliter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

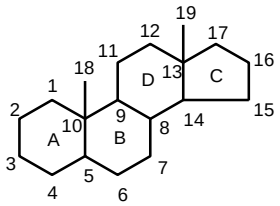
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในธรรมชาติมีสเตียรอยด์ที่แตกต่างกันนับร้อยชนิดสามารถตรวจพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ การค้นพบสเตียรอยด์เริ่มจากการสกัดจากพืชหรือเนื้อเยื่อของสัตว์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม หรือเบนซีน เป็นต้น สเตียรอยด์เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติคล้ายกับไขมัน สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์และไม่ละลายในน้ำ บทบาทสำคัญของสเตียรอยด์ในสิ่งมีชีวิตคือเป็นฮอร์โมน สเตียรอยด์ที่ถูกจัดว่าเป็นฮอร์โมนส่วนใหญ่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก Cholesterol **1** สเตียรอยด์ฮอร์โมนที่พบในสัตว์มีปริมาณค่อนข้างน้อยจึงไม่สามารถใช้เป็นแหล่งสำคัญของสารดังกล่าวได้



1

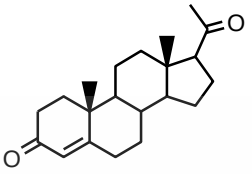
สเตียรอยด์ (Steroids) เป็นสารธรรมชาติกลุ่มหนึ่งที่ปัจจุบันได้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างมากเช่น ในทางการแพทย์ใช้รักษาโรคข้ออักเสบ รูมาตอยด์ โรคมะเร็ง หรือในทางการเกษตรใช้ในการควบคุมแมลงและเพิ่มผลผลิตพืช เป็นต้น แต่เนื่องจากในธรรมชาติสเตียรอยด์ที่มาจากพืชและสัตว์นั้นมีปริมาณน้อยมาก ถ้านำพืชหรือสัตว์มาสกัดแยกสารด้วยเทคนิคทางเคมีอินทรีย์เพื่อให้ได้สเตียรอยด์ในรูปสารบริสุทธิ์จะต้องใช้พืชและสัตว์ในปริมาณมากส่งผลเสียต่อสมดุลทางธรรมชาติ และก่อปัญหาวิกฤตโลกร้อนทางอ้อม ด้วยเหตุนี้การนำมาใช้ในทางการแพทย์เพื่อเป็นตัวยาจึงมักนิยมกระทำโดยวิธีการสังเคราะห์โดยการนำสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์มาจากการเลียนแบบตามธรรมชาติมาเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันหรือการเพิ่มหมู่แทนที่บนส่วนของวงหรือสายโซ่ รวมทั้งการสังเคราะห์โดยวิธีเฉพาะเจาะจงเพื่อควบคุมสเตอริโอเคมีเพื่อให้ได้สเตียรอยด์สังเคราะห์ชนิดใหม่ ทั้งนี้เพื่อมุ่งหวังที่จะทำให้คุณสมบัติและการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนแปลง ซึ่งพบว่าสเตียรอยด์นั้นหากนำมาใช้อย่างถูกตามหลักวิชาการจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก สารกลุ่มนี้จึงเป็นที่สนใจอย่างมากกับนักวิจัยด้านเคมีอินทรีย์ที่นิยมการสังเคราะห์และศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างสเตียรอยด์สังเคราะห์กับฤทธิ์ทางชีวภาพ จากโครงสร้างของนิวเคลียสหลักประกอบด้วย Perhydrocyclopentanophenanthrene เป็นโครงสร้างหลัก ดังแสดงในรูปที่ 1.1



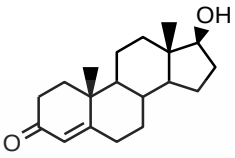
รูปที่ 1.1 โครงสร้างหลักของสเตียรอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความแตกต่างของชนิดของสเตียรอยด์แต่ละชนิดจะแปรผันไปตามชนิดของหมู่ฟังก์ชันหรือชนิดของหมู่ฟังก์ชันบนสายโซ่ที่เกาะอยู่รอบนิวเคลียสหลักของสเตียรอยด์ เช่น Progesterone **2** จะมีหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 และ C-20 หรือ Testosterone **3** จะมีหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 และหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-17 จากโครงสร้างที่แตกต่างกันนี้จึงได้ส่งผลถึงคุณสมบัติที่แตกต่างกันด้วยดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น[1,2]

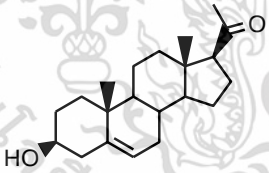


2

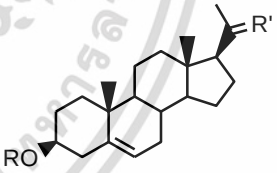


3

ด้วยความน่าสนใจของโครงสร้างสเตียรอยด์นี้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาแนวทางการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่จากสเตียรอยด์ตั้งต้นที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต โดยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันหลักๆ และศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากงานวิจัยที่ผ่านมาของผู้วิจัยได้สังเคราะห์สเตียรอยด์ซัลเฟต **5** โดยเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Pregnenolone **4** จากหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 เป็นหมู่ซัลเฟตพบว่า สาร **5** มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra อันเป็นสาเหตุของโรควัณโรค และผลการทดสอบเบื้องต้นในด้านการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์อนุพันธ์ของแอลลิลของเพกนินโนโลน **6** สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococus aureus* (MRSA), *Corynebacterium diphtheria*, *Bacillus subtilis* ATCC 26633 และ *Pseudomonos aeruginosa* ATCC 27853 ในขณะที่อนุพันธ์แอลลิล ออกซีม **7** ของ Prenenolone **4** สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. diphtheriae* และ *Streptococcus mutans* ATCC 27175[3]



4



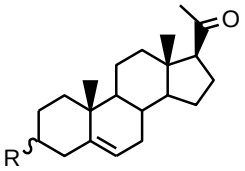
5 R = $-SO_3H$, R′= O

6 R = $CH_2CH{=}CH_2$

7 R = $CH_2CH{=}CH_2$, R′= -NOH

จากงานวิจัยต่อเนื่องของกลุ่มผู้วิจัยยังได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์อะมิโนเพรกนินโนโลนโดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ให้เป็นหมู่อะมิโนที่เป็นสายโซ่ที่มีความยาวต่างๆ กันหรือบนสายโซ่มีหมู่ฟังก์ชันอื่นเกาะอยู่ และทำการทดสอบเบื้องต้นโดยเน้นศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งพบว่าอนุพันธ์ **8** และ **9** สามารถออกฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง human hepatocellular liver carcinoma cell lines (HepG-2) หรือเซลล์มะเร็งตับได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.23 ไมโครโมลาร์/มิลลิลิตร และ 2.09 ไมโครโมลาร์/มิลลิลิตร ตามลำดับ[4]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



8 R = $NH(CH_2)_6NH_2$

9 R = $NHCH_2(OH)CH_2NH_2$

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้คือสนใจสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pregnenolone **4** โดยจะทำการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันบนวงหลัก เพื่อศึกษาแนวทางการเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพให้แก่สเตียรอยด์สังเคราะห์ชนิดใหม่นี้ โดยเฉพาะสารตั้งต้นที่เลือกใช้ในการสังเคราะห์คือ Pregnenolone **4** จัดเป็น neurosteroid และเป็นสเตียรอยด์ที่มีโครงสร้างที่เปลี่ยนมาจาก Cholesterol **1** ซึ่งเป็นสเตียรอยด์ที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ สำหรับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ Pregnenolone **4** นั้นเช่นความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า Pregnenolone **4** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero) น้อยกว่าสเตียรอยด์ชนิดอื่นจึงเหมาะสมกับการนำมาเป็นสารตั้งต้น อนุพันธ์ของ Pregnenolone **4** จะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยเฉพาะการต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่ามะเร็งเป็นโรคร้ายที่คร่าชีวิตในอัตราการเสียชีวิตที่สูง และผู้ป่วยโรคนี้จะมีความทรมานมาก นักวิจัยจึงพยายามหาตัวยาใหม่ๆที่ประกอบด้วยนิวเคลียสของสเตียรอยด์ทั้งจากสารธรรมชาติและการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์เลียนแบบธรรมชาติในห้องปฏิบัติการ จากข้อมูลเบื้องต้นของงานวิจัยที่กล่าวมาผู้วิจัยคิดว่าโครงการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ด้านเภสัชวิทยากล่าวคือ สามารถสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่สามารถนำไปเป็นตัวยารักษามะเร็งหรือเป็นส่วนผสมในยารักษามะเร็งชนิดใหม่ได้ สามารถใช้ทดแทนสเตียรอยด์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ และรวมถึงสเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่จาก Pregnenolone **4** โดยการเลือกใช้สารเข้าทำปฏิกิริยาและเทคนิคในการสังเคราะห์ที่เหมาะสม
2. เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่จาก Pregnenolone **4**
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์ได้

1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

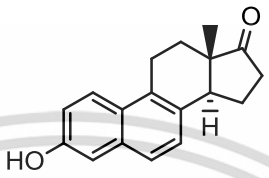
1. ทำการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่โดยการดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันของ Pregnenolone **4**
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์สังเคราะห์ได้แก่ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disk Diffusion
3. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้เซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cell line) เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Hepatocellular carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cell line) และเซลล์ไตลิงปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero) ด้วยวิธี MTT assay

1.5 กรอบแนวความคิดในการทำวิจัย

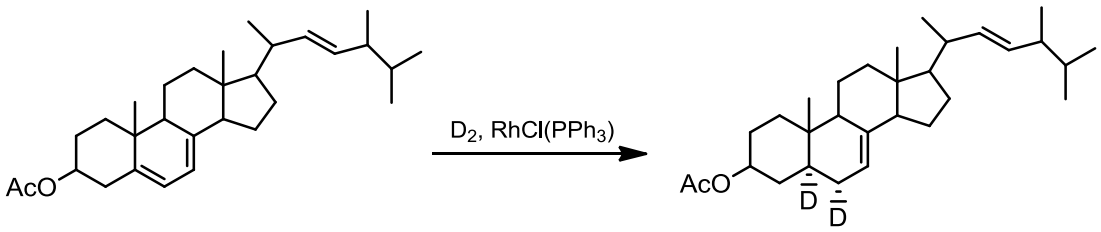
ปลายทศวรรษของปี ค.ศ. 1930 ได้มีการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์สเตียรอยด์หลายชนิดขึ้นและ Equilenin **10** เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนตัวแรกที่ได้จากการสังเคราะห์



10

ปัจจุบันการสังเคราะห์สารดังกล่าวในปริมาณมากอาจใช้วิธีแบบกึ่งสังเคราะห์ (semi-synthesis) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ที่เริ่มจากสารตั้งต้นในธรรมชาติซึ่งมีขั้นตอนการสังเคราะห์และค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์น้อยกว่า ซึ่งได้ให้ความสนใจกับสเตียรอยด์ที่ได้จากพืชเนื่องจากมีปริมาณสารตั้งต้นค่อนข้างสูง นอกจากนั้นยังพบว่าสเตียรอยด์จากพืชร่างกายสามารถดูดซึมเพื่อเอาไปใช้ทดแทนฮอร์โมนสเตียรอยด์ได้ทันที จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยมมาเชื่อมต่อกัน หมู่แทนที่ต่างๆ ที่มาเกาะจะเป็นหมู่ฟังก์ชันที่คล้ายคลึงกันมีคุณสมบัติทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว จึงทำให้สเตียรอยด์มีคุณสมบัติที่หลากหลาย นักเคมีได้ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะทางเคมีอินทรีย์ในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและรวมถึงโครงสร้างเพื่อเป็นการนำไปสู่สเตียรอยด์ชนิดใหม่ และรวมทั้งเป็นแนวทางไปสู่การสังเคราะห์สเตียรอยด์เลียนแบบธรรมชาติ โดยการเลือกใช้รีเอเจนต์หรือสารเข้าทำปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจง และควบคุมสภาวะที่เหมาะสมเพื่อจะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มากพอต่อการนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จากรายงานการวิจัยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างมักมุ่งเน้นไปที่หมู่ฟังก์ชันเป็นส่วนใหญ่ ที่ ring A และ ring B หรือหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง การเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้างสเตียรอยด์จะขึ้นกับตำแหน่งบนโครงสร้าง ความสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาคือคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 11 17 และ 20 ตัวอย่างเช่น การเข้าทำปฏิกิริยาของนิวคลีโอไฟล์ที่หมู่คาร์บอนิล การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยไฮไดรด์ไอออน การเกิดคีทาล (ketal formation) และปฏิกิริยาการเพิ่มโดยกรินยาร์ดรีเอเจนต์ สามารถเรียงลำดับตำแหน่งที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาได้คือ 3 $>$ 17 $\geq$ 20 $>$ 11 นอกจากนั้นปฏิกิริยาของสเตียรอยด์ยังมีความเฉพาะเจาะจงทางสเตอริโอเคมี (Stereoselectivity in steroids) เช่น การเกิดปฏิกิริยา Catalytic hydrogenation ของ Ergosterol acetate **11** จะเกิดปฏิกิริยาที่พันธะคู่แบบ *cis*-addition ทางด้านพันธะคู่ที่มีความเกะกะน้อย[5]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

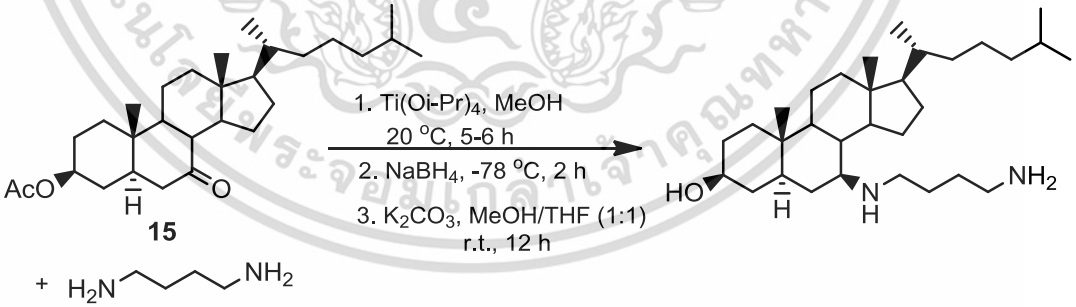


11 **12**

สารกลุ่มสเตียรอยด์ที่ได้รับความสนใจในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันโดยการปรับเปลี่ยนโดยใช้สารเคมี (Chemical transformation) แสดงตัวอย่างได้ดังนี้ จากงานวิจัยของ Savage และคณะ[6] ได้สังเคราะห์ triamine derivatives **13** และ **14** ของกรดโคลิก พบว่าอนุพันธ์ทั้งสองมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

13 **14**

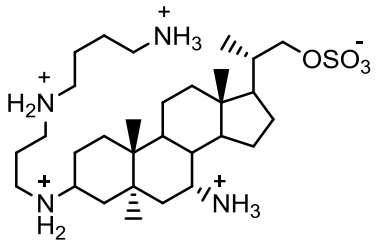
Loncle และคณะ[7] ได้ทำการสังเคราะห์ 7-amino และ polyaminosterol จาก 3β-acetoxy-7-keto-5α-cholestane **15** โดยทำปฏิกิริยา reductive amination กับ $Ti(OR)_4$ และ $NaBH_4$ ทำการกำจัดหมู่แอซิเตตด้วย K_2CO_3 ใน MeOH : $CHCl_3$ (1:1) พบว่าสารผลิตภัณฑ์ **16** มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์และมีความว่องไวในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ส่งผลคล้ายกับ *Staphylococcus aureus* และ *S. faecalis*



15 **16**

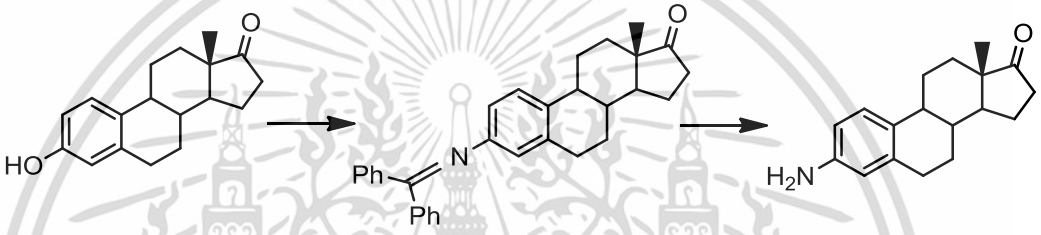
Khan และคณะ[8] ได้ทำการสังเคราะห์ 7α-Aminosteroids จาก 3-dioxolane-22-*tert*–butyldimethylsilyloxy-23,24-bisnor-5α-cholan-7-one พบว่าสาร **17** มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes* 308A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



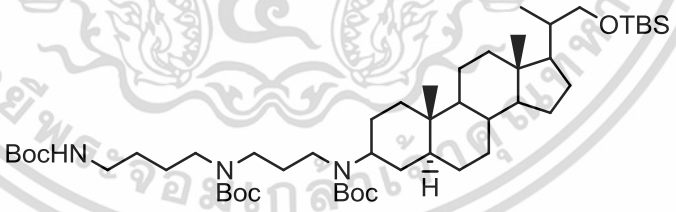
17

Radu และคณะ[9] ได้ทำการสังเคราะห์ 3-aminosterone **20** จาก 3-estrone **18** ซึ่งนิยมใช้ 3-aminosterone **20** เป็นสารตั้งต้นในการเตรียมสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเตรียมผ่าน diphenylketimine **19** พบว่าเป็นวิธีการที่สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของสารผลิตภัณฑ์ เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้อุณหภูมิที่สูงในการเกิดปฏิกิริยาและความบริสุทธิ์ต่ำ



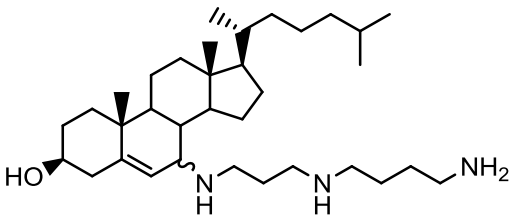
18 19 20

Kim และคณะ[10] ได้ทำการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ **21** โดยการทำปฏิกิริยา amination ของ 3-ketosteroid ด้วยเอมีน ซึ่งวิธีการสังเคราะห์เป็นแนวทางหนึ่งที่นำมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์ Squalamine อะมิโนสเตียรอยด์จากฉลามพันธุ์ Dog fish ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา



21

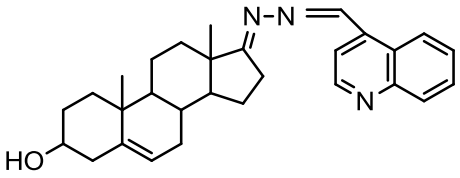
Kihel และคณะ[11] ได้ทำการสังเคราะห์ spermidinylcholesterol **22** และศึกษาฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์ทั้งนี้เพื่อพัฒนาต่อเป็นยาต้านเซลล์มะเร็ง



22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Huang และคณะ[12] ได้ทำการสังเคราะห์ dehydroepiandrosterane quinolone-4-methanylidenehydrazone **23** และศึกษาฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์พบว่าสาร **23** มีฤทธิ์ต้านชื้อมะเร็ง Hela และ HT-29 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.6 และ 5.9 ไมโครโมล/ลิตร ตามลำดับ



23

จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างนี้จะได้อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลายมากยิ่งขึ้น และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสเตียรอยด์เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนั้นยังสามารถนำสเตียรอยด์สังเคราะห์ไปเป็นสารต้นแบบในการเตรียมสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้อีก

1.6 คำสำคัญของการวิจัย

เพรกนินโนโลน (Pregnenolone)
สารอนุพันธ์ (Derivatives)
ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial)
ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่จาก Pregnenolone **4**
2. ทราบถึงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์
3. ทราบถึงฤทธิ์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์ในการต้านความเป็นพิษต่อเซลล์
4. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาเพื่อผลิตส่วนผสมของยาที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และความเป็นพิษต่อเซลล์เพื่อเป็นการนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

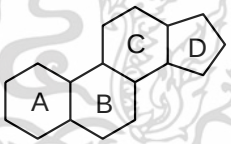
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

สเตียรอยด์ (Steroids) เป็นหนึ่งในสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Product) ที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ จากการวิจัยพบว่า สารกลุ่มสเตียรอยด์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ปัจจุบันจึงนิยมใช้สารประเภทสเตียรอยด์ในทางการแพทย์เช่น รักษาโรคไขข้อ โรคหืด บำรุงหัวใจ และเป็นส่วนผสมในยาคุมกำเนิดซึ่งถูกนำไปใช้ในการแก้ปัญหาประชากรที่เพิ่มขึ้น[13] แต่สเตียรอยด์เช่น Cholesterol **1** เป็นสเตียรอยด์อีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดไขมันอุดตันในเส้นเลือดซึ่งเป็นปัญหาต่อสุขภาพของมนุษย์อย่างมาก สเตียรอยด์ที่ได้จากพืชธรรมชาติถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรค เช่น G-strophanthin ได้จากเมล็ดของ *Strophanthus qratus* Baillon ใช้รักษาโรคหัวใจวายฉับพลัน Ruscogenin ได้จากต้น *Ruscus aculeatus* วงศ์ Liliaceae ใช้รักษาโรคริดสีดวงทวาร Scillaren A[14] ได้จากส่วนใบบนหัวใต้ดินของ *Urginea maritima* Baker วงศ์ Liliaceae ใช้เป็นยาขับเสมหะที่ออกฤทธิ์บำรุงหัวใจและมีฤทธิ์ขับปัสสาวะด้วย สารกลุ่มสเตียรอยด์ยังเป็นฮอร์โมนของพืชและสัตว์เช่น โปรเจสเทอโรน (Progesterone) เป็นฮอร์โมนเพศหญิงสามารถฉีดให้ผู้ป่วยที่ขาดฮอร์โมนเพศหญิงได้ สเตียรอยด์ยังมีฤทธิ์ที่สำคัญอื่นๆ ในร่างกายของมนุษย์อีกเช่น เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ vitamin D และ เป็น emulsifying agent[15] พืชสามารถสร้างสารกลุ่มสเตียรอยด์ขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis)

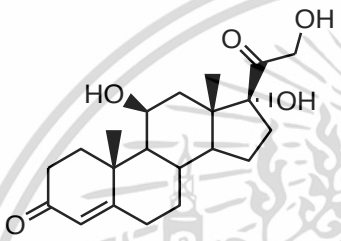
สเตียรอยด์เป็นสารประกอบที่เป็นของแข็ง จัดเป็นอนุพันธ์ของสารที่มีโครงสร้างเป็นวงที่เรียกว่า Perhydrocyclopentanephenanthrene ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยม 3 วง คือ วง A วง B วง C และมีวงห้าเหลี่ยม 1 วง คือ วง D ที่เชื่อมต่อกัน



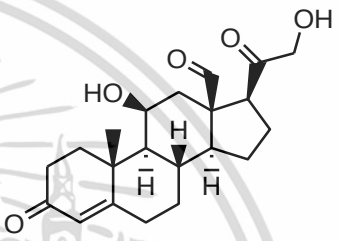
จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยมและห้าเหลี่ยมมาเชื่อมต่อกัน หมู่แทนที่ต่างๆ ที่มาเกาะหรือหมู่ฟังก์ชันจะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน นักเคมีได้ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะทางเคมีอินทรีย์ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างและ/หรือหมู่ฟังก์ชันซึ่งจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะเป็นการนำไปสู่การสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ โดยการเลือกใช้สารที่เข้าทำปฏิกิริยา (reagent) และสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม รวมทั้งชนิด จำนวน ตำแหน่งและสเตอริโอเคมีของหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้างก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจในการสังเคราะห์ ซึ่งจะเป็นผลดีอย่างมากถ้าพบว่า สเตียรอยด์สังเคราะห์นั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไปด้วย สเตียรอยด์ที่เป็นต้นแบบชนิดแรกคือ Cholesterol **1** จัดเป็นได้ทั้งลิปิดสเตียรอยด์ และแอลกอฮอล์ พบในเยื่อหุ้มเซลล์ของทุกเนื้อเยื่อในร่างกายและถูกขนส่งในกระแสเลือดของสัตว์ Cholesterol **1** ส่วนใหญ่ไม่ได้มากับอาหารแต่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกายจะสะสมอยู่มากในเนื้อเยื่อของอวัยวะที่สร้างมันขึ้นมาเช่น ตับ ไขสันหลัง (spinal cord) สมองและผนังหลอดเลือด (atheroma) Cholesterol **1** มีบทบาทในกระบวนการทางชีวเคมีมากมาย แต่ที่รู้จักกันดีคือ เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจและระบบหลอดเลือด (cardiovascular disease) และภาวะ**คอเลสเตอรอลในเลือด**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูง (Hypercholesterolemia)[15] สเตียรอยด์ที่ถูกจัดเป็นฮอร์โมนส่วนใหญ่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก Cholesterol **1** โดยกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพซึ่งมีเอนไซม์ที่แตกต่างกันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในแต่ละวันร่างกายจะผลิตสเตียรอยด์ขึ้น 20 ถึง 30 หน่วย เพื่อควบคุมฮอร์โมนต่างๆในร่างกายและกดภูมิคุ้มกันให้สมดุล รักษาความสมดุลของเกลือแร่ อิเล็กโทรไลต์และน้ำ โดยใช้ Cholesterol **1**เป็นสารตั้งต้นในการผลิต สเตียรอยด์จะถูกผลิตขึ้นทุกเช้าหลังจากการนอนหลับพักผ่อนมาจนเต็มที่แล้วสมองจะสั่งการผลิตฮอร์โมนสเตียรอยด์โดยต่อมหมวกไตจะนำ Cholesterol **1** มาเปลี่ยนเป็นสเตียรอยด์ตัวอื่นๆ โครงสร้างหลักมีอยู่ 2 ชนิดคือ Cortisol **24** มีประโยชน์ในการบรรเทาอาการอักเสบ ควบคุมสมดุลของเกลือแร่และน้ำ รวมถึงเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน อีกชนิดคือ Aldosterone **25** ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลเกลือแร่ในร่างกาย แต่ถ้ามี Aldosterone **25** หลั่งออกมามากเกินไปก็จะทำให้ร่างกายขับโพแทสเซียมออกมา กล้ามเนื้ออ่อนแรงและทำให้มีความดันโลหิตสูงได้



24



25

2.2 ประเภทของสเตียรอยด์[16]

สเตียรอยด์แบ่งประเภทโดยอาศัยฤทธิ์ทางสรีระ (Physiological activities) และลักษณะโครงสร้างทั่วไปได้ 6 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

2.2.1 Sterols

Sterols คือ สเตียรอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เช่น Cholesterol **1**

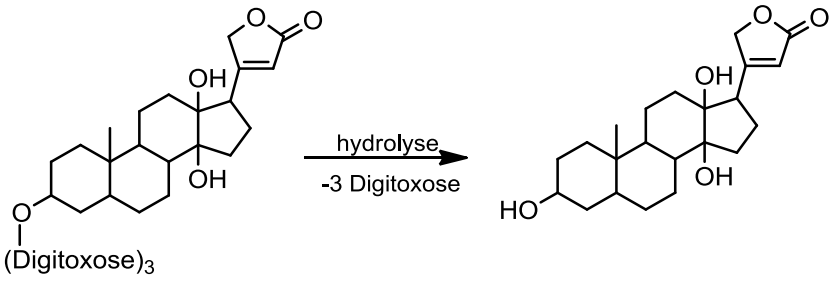
2.2.2 Vitamin D Precursors

Vitamin D Precursors คือ สเตียรอยด์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมทาบอลิซึมของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในกระดูก ถ้าร่างกายขาดสารกลุ่มนี้จะส่งผลกระทบต่อกระดูกสเตียรอยด์กลุ่มนี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเมื่อถูกเร่งด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเป็นส่วนใหญ่แล้วให้วิตามิน D

2.2.3 Glycosides ของ sterols

Glycosides ของ sterols คือ สเตียรอยด์ที่ได้จากการเชื่อมต่อแบบ Glycosidic linkage (Ether linkage) ระหว่างสเตียรอยด์ (Cholesterol **1** และ Phytosterol อื่นๆ) กับน้ำตาลชนิดต่างๆ จำนวนหนึ่งหรือหลายโมเลกุล ดังนั้น Steroidal glycosides จึงมีโครงสร้างตั้งแต่ง่ายไปจนถึงโครงสร้างที่ซับซ้อนโดยขึ้นกับชนิดและจำนวนน้ำตาลในโมเลกุล สารกลุ่มนี้ละลายน้ำได้ดีเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอื่น เช่น กลุ่มฟีนอลิก ดังตัวอย่างการไฮโดรไลซิส Digoxcin **26** เป็น Digoxigenin **27**

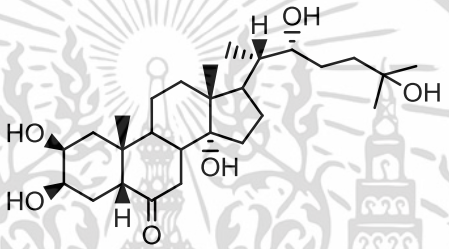
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



26 **27**

2.2.4 สารกลุ่ม Ecdysones

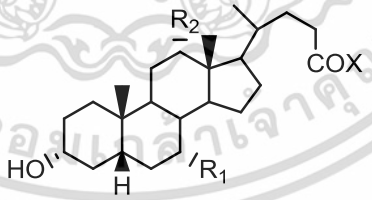
Ecdysone **28** เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบของตัวอ่อนแมลง (insect moulting hormone) Ecdysone สกัดแยกได้ครั้งแรกจากดักแด้ของตัวไหมชื่อ *Bombyx mori* สารกลุ่มนี้ยังพบในพืชชั้นสูงอีกด้วย Ecdysone มีโครงสร้างดังนี้



28

2.2.5 Bile acids และ alcohols

สารสองกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กันแต่ที่มีผลทางชีวภาพ คือ Bile acids **29** หรือ **30** โดยมักจะอยู่ในรูปสารประกอบเอไมด์ ที่เกิดจากการเชื่อมต่อระหว่าง Bile acids กับ Glycine ได้สารผลิตภัณฑ์คือ สาร **31** และ Bile acids กับ Taurine ได้สารผลิตภัณฑ์คือ สาร **32** ดังโครงสร้างต่อไปนี้



29, 30 ; R_1R_2 = H or OH

31; X = -NH-CH_2-COONa

32; X = -NH-CH_2CH_2-COONa

2.2.6 Steroid hormones

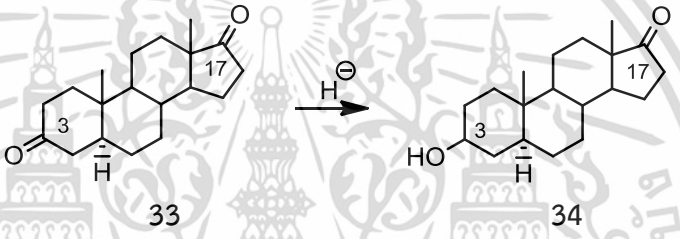
Steroid hormones คือ สเตียรอยด์ที่เป็นฮอร์โมนแต่แตกต่างไปจากกลุ่ม Ecdysone ทั้งโครงสร้างและแหล่งกำเนิด แบ่งเป็น 4 ประเภท คือ Corticosteroids Gestogens Androgens และ Estrogens โดยสเตียรอยด์ทั้ง 4 ประเภทพบในมนุษย์และสัตว์ ซึ่งเกิดจากสเตียรอยด์ที่จัดเป็นสารมัธยันตร์ที่สำคัญ คือ Pregnenolone **4**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 สมบัติทางเคมีของสเตียรอยด์[5]

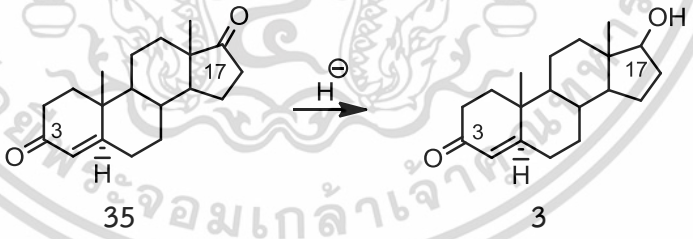
ในการเกิดปฏิกิริยาเคมี การที่จะทราบถึงการกำหนดทิศทางการเข้าทำปฏิกิริยา (Regioselectivity) และการเลือกทำปฏิกิริยาที่มีสเตอริโอเคมีแน่นอน (Stereoselectivity) ในการเกิดปฏิกิริยาได้นั้น จำเป็นต้องศึกษาจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจริงในการทดลอง ซึ่งในที่นี้จะขอกล่าวเฉพาะการกำหนดทิศทางการเข้าทำปฏิกิริยา (Regioselectivity) เท่านั้น

การเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้างสเตียรอยด์จะขึ้นกับตำแหน่งบนโครงสร้าง ลำดับความสำคัญของตำแหน่งคาร์บอนอะตอมในการเกิดปฏิกิริยาคือ 3 11 17 และ 20 เช่น การเข้าทำปฏิกิริยาของนิวคลีโอไฟล์ที่หมู่คาร์บอนิล การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยไฮดรายด์ไอออน การเกิดคีทาล (ketal formation) และปฏิกิริยาการเพิ่มเข้าโดยกรินยาร์ดรีเอเจนต์ สามารถเรียงลำดับตำแหน่งที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาได้คือ $3 > 17 \geq 20 > 11$ ตัวอย่างความเฉพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ 5α-androstane–3,17-dione **33** เป็น 3-hydroxy-5α-androstane-17-one **34** แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งที่ 3 สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ว่องไวกว่าตำแหน่งที่ 17



33 **34**

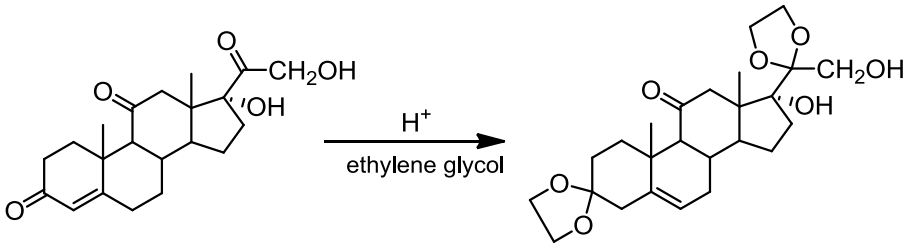
ถ้ามีความไม่อิ่มตัวของโครงสร้างในลักษณะมีพันธะคู่อยู่ที่ตำแหน่ง α และ β (α,β-Unsaturation) จะลดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน แต่ไม่รวมถึงการเกิดคีทาล (ketal) เช่นการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ androst-4-ene-3, 17-dione **35** ที่ตำแหน่งที่ 17 ให้ Testosterone **3**



35 **3**

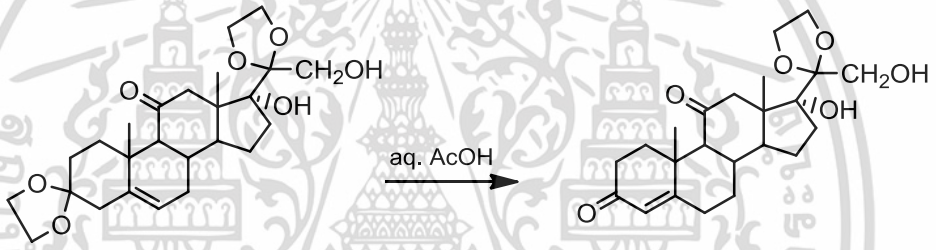
ปฏิกิริยาในการเกิดคีทาล (ketal) เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการป้องกันหมู่คาร์บอนิล เช่น ปฏิกิริยาของ Cortisone **36** กับ ethylene glycol ในกรดสามารถป้องกันหมู่คาร์บอนิลได้ 2 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 3 และ 20 ได้สาร **37** จะเห็นว่าหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 3 และ 20 สามารถเกิดปฏิกิริยาดีกว่าหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



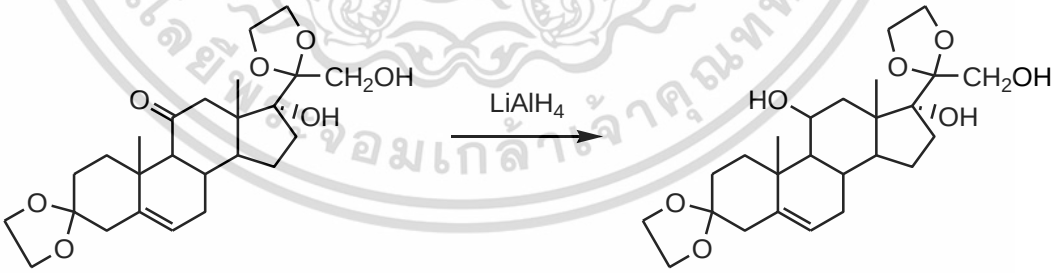
36 **37**

โครงสร้างของสาร **38** ประกอบด้วยหมู่คีทาล (ketal) 2 หมู่ เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสภาวะกรดได้สารผลิตภัณฑ์ **39** ที่มีหมู่คีทาลเพียง 1 หมู่ เฉพาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากกว่าที่ตำแหน่งที่ 20 สรุปได้ว่าตำแหน่งที่ 3 มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยามากที่สุด Cortisone **39** เป็นสารที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 4 จากโครงสร้างที่คาร์บอนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะคู่สามารถเพิ่มความเสถียรโดยมีระบบคอนจุเกตกับหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 3 เมื่อหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 3 เกิดเป็นคีทาล ทำให้ระบบคอนจุเกตเสียไป ส่งผลให้เกิดไอโซเมอร์ที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 5 และ 6 **38** หลังจากนั้นสามารถเกิดพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 4 และ 5 ได้สาร **39**



38 **39**

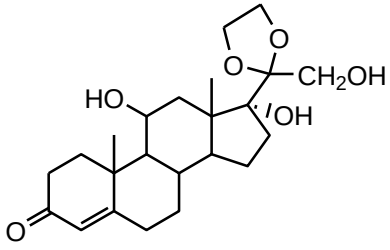
สาร **40** เมื่อทำปฏิกิริยากับ $LiAlH_4$ (Lithium aluminium hydride) จะทำปฏิกิริยารีดักชันหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 11 ให้หมู่ไฮดรอกซิล เป็นสาร **41**



40 **41**

จากนั้นเมื่อนำสาร **41** ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟูริกเกิดการถอดหมู่คีทัลออก ให้สารผลิตภัณฑ์ Hydrocortisone **42**

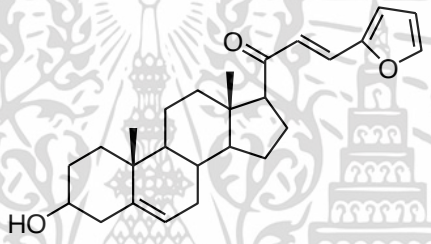
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



42

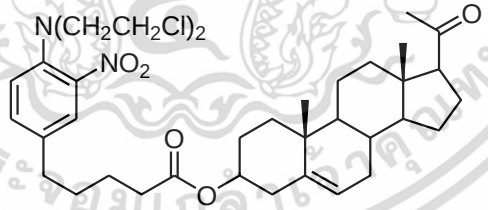
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวทางการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเพรกนินโนโลนและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ถูกกล่าวถึงโดย Banday และคณะ[17] สังเคราะห์ chalconyl pregnenolones โดยการทำปฏิกิริยาที่หมู่เมทิลคีโตของ C-20 พบว่า chalconyl pregnenolone **43** มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *B. subtills* มี zone of inhibition เท่ากับ 20 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับตัวยา Kenamycin



43

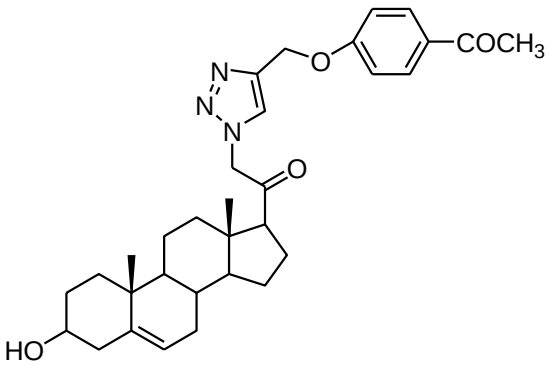
Shervington และคณะ[18] สังเคราะห์อนุพันธ์ไนโตรของเพรกนินโนโลน **44** พบว่ามีฤทธิ์ต้านเซลล์ lung large cell carcinoma (H460) cell lines ได้ดีมาก



44

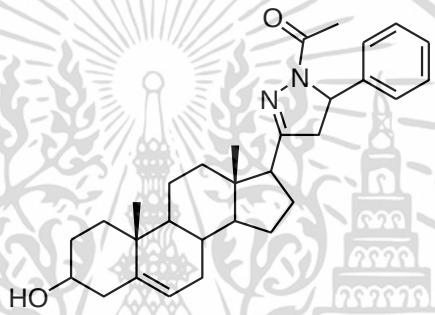
Banday และคณะ[19] สังเคราะห์ 1,2,3-triazolyl 20-keto pregnenanes **45** โดยเลือกทำปฏิกิริยาที่วง D และศึกษาความสัมพันธ์ของหมู่แทนที่ต่อโครงสร้างในการออกฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งตับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



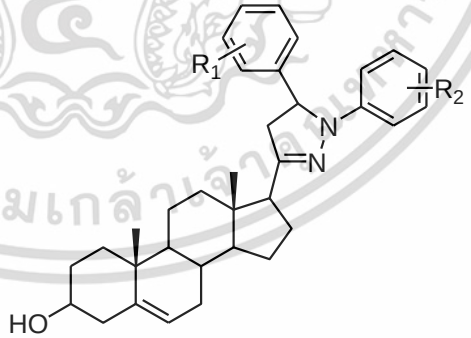
45

Bandy และคณะ[20] สังเคราะห์อนุพันธ์ 17-pyrazolinyl **46** จากเพรกนินโนโลน พบว่าสาร **46** สามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับที่ดี



46

Choudhary และคณะ[21] สังเคราะห์อนุพันธ์เพรกนินโนโลน **47** ที่ออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ (HepG-2) ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 11.03 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับ Doxoribicin



47 R_1 = 2-furyl; R_2 = 2,4-dichlorophenyl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การทดลองทั่วไป

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

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

สารเคมีที่ใช้เป็นสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ในการสังเคราะห์เป็นเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Fluka และ Aldrich ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีทำให้ปรากฏบนแผ่น aluminium sheet silica gel F_{254} Merck ตรวจสอบจุดของสารผลิตภัณฑ์ด้วยการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และ/หรือโดยการย้อมด้วย anisaldehyde reagent แล้วให้ความร้อนแผ่น TLC บนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

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

สเปกตรัม ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR บันทึกโดยเครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกกะเฮิร์ท การเตรียมสารตัวอย่างจะทำการละลายโดยใช้ตัวทำละลาย $CDCl_3$ จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ $CHCl_3$ ที่ δ 7.25 ppm สำหรับสเปกตรัม ^{1}H NMR และที่ δ 77.5 ppm

จุดหลอมเหลวบันทึกโดยเครื่องหาจุดหลอมเหลว GALLEKAMP SANYO

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

แมสสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ Finnigan LC–Q MS detector ด้วยเทคนิค Electrospray จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง

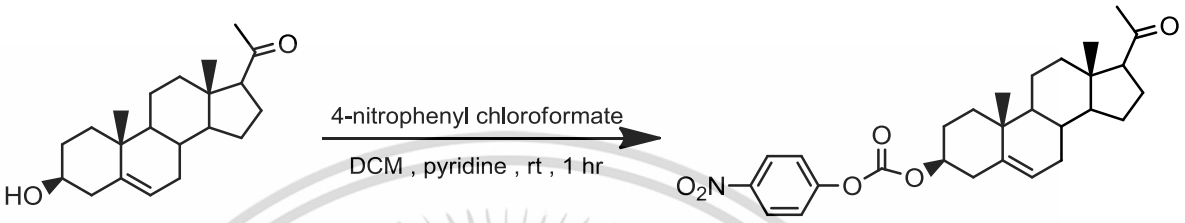
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ของ Pregnenolone **4** แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone **4** ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 เป็นหมู่หลุดออกโดยใช้รีเอเจนต์คือ 4-nitrophenyl chloroformate

แผนภาพที่ 3.1



4 48

1. ชั่ง Pregnenolone **4** 300 มิลลิกรัม (0.95 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลมซึ่งภายในมีแท่งแม่เหล็กอยู่ ซึ่งวางอยู่บนเครื่องปั่นกวน จากนั้นเติม DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวน จนกระทั่ง Pregnenolone **4** ละลายหมด

2. ชั่ง 4-nitrophenyl chloroformate 248.9 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล) แล้วใส่ลงไปในขวดก้นกลมในข้อ 1 ทำการปั่นกวน จากนั้นเติม pyridine 1.5 มิลลิลิตร และทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้อง

3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ Pregnenolone **4** สังเกตการเกิดปฏิกิริยาโดยพิจารณาจุดของสารตั้งต้นเจือจางมากที่สุดแล้วไม่มีการเปลี่ยนแปลง

4. หยุดการปั่นกวน และนำสารที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้ของผสมเป็นของแข็งสีขาว

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

6. ตรวจสอบสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารตั้งพิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R_f เดียวกัน การดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และการให้สีกับ anisaldehyde reagent สีเดียวกันให้เก็บรวมไว้ด้วยกันในขวดก้นกลม

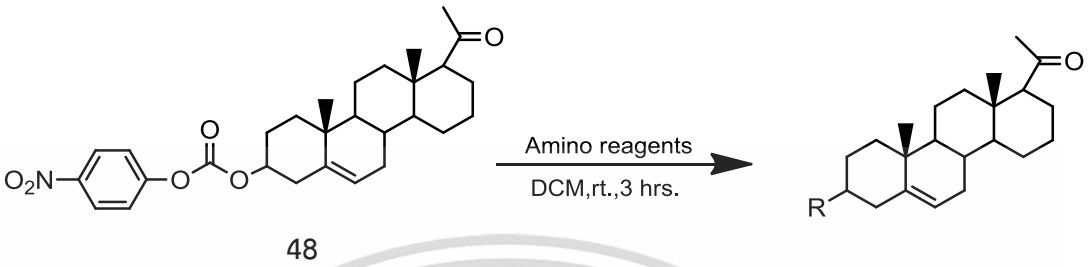
7. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดก้นกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. นำสารผลิตภัณฑ์มาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

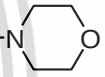
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 2 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง 3-(4-nitrophenyl) pregnenolone carbonate **48** และอะมิโนรีเอเจนต์

แผนภาพที่ 3.2



48

49 R = -$NHCH_2CH_2CH_2CH_3$
50 R = -$NHCH_2C_6H_5$
51 R = -$NH(CH_2)_4NH_2$
52 R = -$NH(CH_2)_6NH_2$
53 R = -$NH(CH_2)_7NH_2$
54 R = -$NH(CH_2)_8NH_2$
55 R = -$NH(CH_2)_9NH_2$
56 R = 

1. ละลายสาร **48** ใน DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งละลายหมด

2. เติม *n*-butylamine 165.8 ไมโครลิตร (1.23 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิห้อง และทำการปั่นกวนต่อที่อุณหภูมิห้อง

3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ทุก 1 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสาร **48** จนกระทั่งจุดของสาร **48** จางมากที่สุด พร้อมกับมีการเกิดจุดของสารผลิตภัณฑ์หรือสารข้างเคียงเกิดขึ้น

4. หยุดการปั่นกวน และนำของผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

5. ละลายของผสมด้วย ethyl acetate เทใส่กรวยแยกทำการสกัดล้างด้วยน้ำ 30 มิลลิลิตร (2 ครั้ง)

6. นำของผสมสกัดล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว 30 มิลลิลิตร เก็บชั้นสารอินทรีย์แล้วนำมาเติมโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำเพื่อทำการดูดน้ำ

7. กรองแยกชั้นสารอินทรีย์และโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำออกจากกัน และนำชั้นสารอินทรีย์ (สารผลิตภัณฑ์) ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. ทำการแยกสารที่สังเคราะห์ได้ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยที่สารละลายที่ใช้เป็นสารละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate โดยที่ผลรวมของอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 100 เริ่มต้นจากสารละลายไม่มีขั้วคือ hexane : ethyl acetate เป็น 100 : 0 แล้วค่อยๆ เพิ่มขั้วของสารละลาย โดยเพิ่มปริมาตรของ ethyl acetate จาก 0 เป็น 2, 5, 7, 10, 12, 15, ... และลดปริมาตรของ hexane จาก 100 เป็น 98, 95, 93, 90, 88, 85, ... ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. ตรวจสอบสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetae อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสาร **48** พิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R_f เดียวกัน การดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และการให้สีกับ anisaldehyde reagent สีเดียวกันให้เก็บรวมไว้ด้วยกันในขวดก้นกลม

10. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดก้นกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

11. นำของแข็งที่ได้จากระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศมาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

12. นำสารผลิตภัณฑ์ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

13. เริ่มทำการสังเคราะห์ใหม่ตั้งแต่ข้อ 1 ถึง 12 โดยเปลี่ยนอะมิโนรีเอเจนต์ในข้อ 2 จาก *n*-butylamine เป็นอะมิโนรีเอเจนต์ดังต่อไปนี้

- benzylamine	ปริมาตร 145.5 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 1,4-diaminobutane	ปริมาตร 123.6 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 1,6-diaminohexane	ปริมาตร 143.5 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 1,7-diaminoheptane	ปริมาณ 160.8 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- 1,8-diaminooctane	ปริมาณ 178.2 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- 1,9-diaminononane	ปริมาณ 195.5 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- morpholine	ปริมาตร 107.6 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)

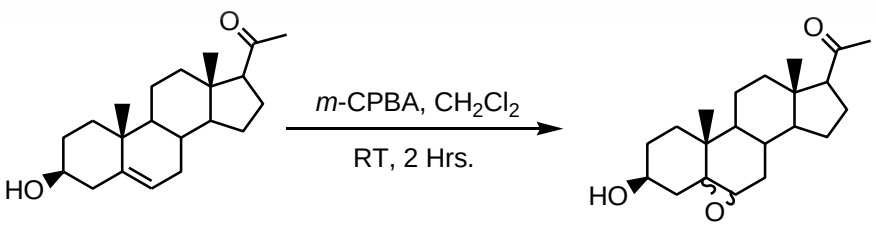
หมายเหตุ

ในการสังเคราะห์สาร **50-56** จะไม่มีการแยกสาร **48** ในรูปสารบริสุทธิ์ การทำปฏิกิริยาจะทำแบบปฏิกิริยา one pot โดยการเติม nuclephilic reagent ซึ่งในที่นี้หมายถึงอะมิโน รีเอเจนต์ และพิจารณาการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี

3.2.3 การสังเคราะห์อะมิโนอีพอกไซด์ของ Pregnenolone **4** แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสังเคราะห์ Pregnenolone-5,6-epoxide **57** โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง Pregnenolone **4** กับ *m*-chloroperbenzoic acid (*m*-CPBA)

แผนภาพที่ 3.3



4 **57**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ละลาย Pregnenolone 254.8 มิลลิกรัม (0.80 มิลลิโมล) ใน DCM 20 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งละลายหมด

2. เติม *m*-CPBA 189.2 มิลลิกรัม (1.20 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิห้อง และทำการปั่นกวนต่อที่อุณหภูมิห้อง

3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ทุก 1 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ Pregnenolone **4** จนกระทั่งจุดของ Pregnenolone **4** จางมากที่สุดหรือไม่ปรากฏบนแผ่น TLC พร้อมกับมีการเกิดจุดของสารผลิตภัณฑ์หรือสารข้างเคียงเกิดขึ้น

4. หยุดการปั่นกวน และนำของผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

5. ละลายของผสมด้วย ethyl acetate เทใส่กรวยแยกทำการสกัดล้างด้วยสารละลายอิ่มตัวโซเดียมไบคาร์บอเนต 30 มิลลิลิตร (2 ครั้ง) และสกัดล้างด้วยน้ำ 30 มิลลิลิตร (1 ครั้ง)

6. นำของผสมสกัดล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว 30 มิลลิลิตร เก็บชั้นสารอินทรีย์แล้วนำมาเติมโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำเพื่อทำการดูดน้ำ

7. กรองแยกชั้นสารอินทรีย์และโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำออกจากกัน และนำชั้นสารอินทรีย์ (สารผลิตภัณฑ์) ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. ทำการแยกสารที่สังเคราะห์ได้ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยที่สารละลายที่ใช้เป็นสารละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate โดยที่ผลรวมของอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 100 เริ่มต้นจากสารละลายไม่มีขั้วคือ hexane : ethyl acetate เป็น 100 : 0 แล้วค่อยๆ เพิ่มขั้วของสารละลาย โดยเพิ่มปริมาตรของ ethyl acetate จาก 0 เป็น 2, 5, 7, 10, 12, 15, ... และลดปริมาตรของ hexane จาก 100 เป็น 98, 95, 93, 90, 88, 85, ... ตามลำดับ

9. ตรวจสอบสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetae อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารตั้งพิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R_f เดียวกัน และการให้สีกับ anisaldehyde reagent สีเดียวกันให้เก็บรวมไว้ด้วยกันในขวดก้นกลม

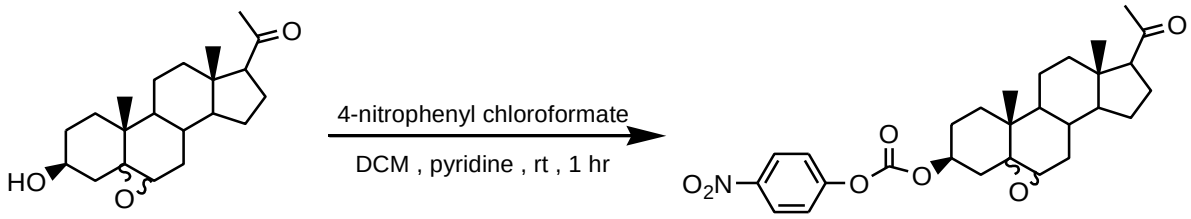
10. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดก้นกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

11. นำของแข็งที่ได้จากระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศมาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

ขั้นตอนที่ 2 การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ 5,6-epoxide pregnenolone **57** ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 เป็นหมู่หลุดออกโดยซีรีเอเจนต์คือ 4-nitrophenyl chloroformate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนภาพที่ 3.4

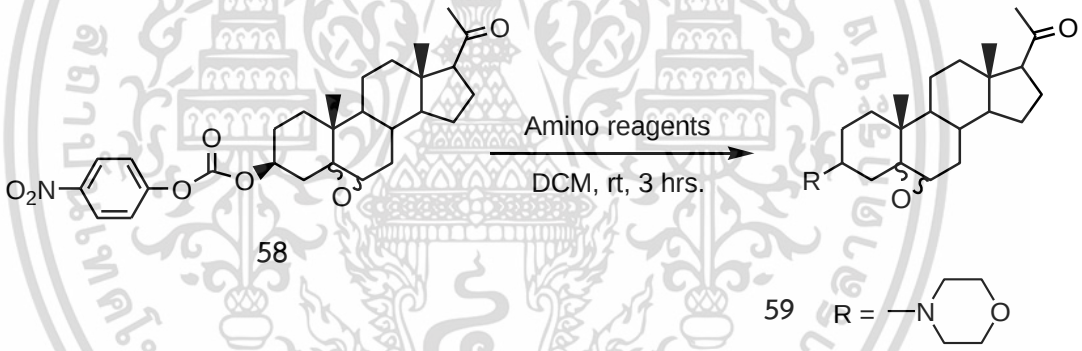


57 **58**

การสังเคราะห์ 3-(4-nitrophenyl)-5,6-epoxidepregnenolone carbonate **58** พิจารณาการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี โดยเปรียบเทียบระหว่างสาร **57** และสาร **58**

ขั้นตอนที่ 3 การสังเคราะห์ 3-amino-5,6-epoxide pregnenolone โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง 3-(4-nitrophenyl)-5,6-epoxide-pregnenolone carbonate **58** และอะมิโน รีเอเจนต์

แผนภาพที่ 3.5



58

59 R = —N O

60 R = -NHCH$_2$C$_6$H$_5$

1. ชั่ง 3β-hydroxy-5,6-epoxide pregnenolone **57** 159.1 มิลลิกรัม (0.47 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลมภายในมีแท่งแม่เหล็กอยู่ ซึ่งวางอยู่บนเครื่องปั่นกวน จากนั้นเติม DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวน จนกระทั่ง 3β-hydroxy-5,6-epoxide pregnenolone **57** ละลายหมด

2. ชั่ง *p*-nitrophenyl chloroformate 142.1 มิลลิกรัม (0.70 มิลลิโมล) แล้วใส่ลงไปในขวดก้นกลมในข้อ 1 ทำการปั่นกวน จากนั้นเติม pyridine 1.5 มิลลิลิตร และทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้อง

3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ 3β-hydroxy-5,6-epoxide pregnenolone **57** สังเกตการเกิดปฏิกิริยาโดยพิจารณาจุดของสารตั้งต้นเจือจางมากที่สุดแล้วไม่มีการเปลี่ยนแปลง

4. เติม benzylamine 145.5 ไมโครลิตร (1.23 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิห้อง และทำการปั่นกวนต่อที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ทุก 1 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เท่ากับ 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสาร **58** จนกระทั่งจุดของสาร **58** จางมากที่สุด พร้อมกับมีการเกิดจุดของสารผลิตภัณฑ์หรือสารข้างเคียงเกิดขึ้น

6. หยุดการปั่นกวน และนำของผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

7. ละลายของผสมด้วย ethyl acetate เทใส่กรวยแยกทำการสกัดล้างด้วยน้ำ 30 มิลลิลิตร (2 ครั้ง)

8. นำของผสมสกัดล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว 30 มิลลิลิตร เก็บชั้นสารอินทรีย์ แล้วนำมาเติมโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำเพื่อทำการดูดน้ำ

9. กรองแยกชั้นสารอินทรีย์และโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำออกจากกัน และนำชั้นสารอินทรีย์ (สารผลิตภัณฑ์) ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

10. ทำการแยกสารที่สังเคราะห์ได้ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยที่สารละลายที่ใช้เป็นสารละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate โดยที่ผลรวมของอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 100 เริ่มต้นจากสารละลายไม่มีขั้วคือ hexane : ethyl acetate เป็น 100 : 0 แล้วค่อยๆ เพิ่มขั้วของสารละลาย โดยเพิ่มปริมาตรของ ethyl acetate จาก 0 เป็น 2, 5, 7, 10, 12, 15, ... และลดปริมาตรของ hexane จาก 100 เป็น 98, 95, 93, 90, 88, 85, ... ตามลำดับ

11. ตรวจสอบสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetae อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารตั้งพิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R_f เดียวกัน การดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และการให้สีกับ anisaldehyde reagent สีเดียวกันให้เก็บรวมไว้ด้วยกันในขวดก้นกลม

12. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดก้นกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

13. นำของแข็งที่ได้จากระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศมาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

14. นำสารผลิตภัณฑ์ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

15. เริ่มทำการสังเคราะห์ใหม่ตั้งแต่ข้อ 1 ถึง 13 โดยเปลี่ยนอะมิโนรีเอเจนต์ในข้อ 2 จาก morpholine เป็นอะมิโนรีเอเจนต์

หมายเหตุ

ในการสังเคราะห์อะมิโนอีพอกไซด์ของ Pregnenolone **4** จะไม่มีการแยกสาร **58** ในรูปสารบริสุทธิ์ การทำปฏิกิริยาจะทำแบบปฏิกิริยา one pot โดยการเติม nucleophilic reagent ซึ่งในที่นี้หมายถึงอะมิโน รีเอเจนต์ และพิจารณาการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี

3.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

อะมิโนสเตียรอยด์ **49** ถึง **59** ถูกส่งไปทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay[22] มีวิธีการทดสอบดังนี้

1. เตรียมเซลล์ไลน์ในอาหาร Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) เสริมด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ FBS โดยเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร

2. เตรียม Stock สารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร ทำการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีช่องผ่านขนาด 0.2 ไมโครเมตร และใส่ขวดแก้วที่ปลอดเชื้อหุ้มขวดแก้วด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์เพื่อป้องกันแสง และเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

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

4. ปลูกเซลล์ไลน์ MCF-7 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 98 หลุม (96-well plate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทดสอบ 3 ซ้ำ นำจานเพาะเลี้ยงที่ปลูกเซลล์แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

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

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

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

8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครไตเตอร์ เพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่นของแผ่นกรองแสงเท่ากับ 570 นาโนเมตร

9. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอะมิโนสเตียรอยด์ **49-59** เปรียบเทียบกับตัวยา Vinblastine sulfate salt

10. คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของแต่ละความเข้มข้นดังนี้ คือ

ค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ = $[(A-B)/A] \times 100$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ไลน์ในสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น

หมายเหตุ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method

การทดสอบอนุพันธ์ของ Pregnenolone **4** จะทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method จากหน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauer และคณะ[23] สรุปได้ดังนี้

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

2. หลังจากนั้นทำการเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูก activated แล้วลงมาใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mcfarland

3. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมได้มาเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Ager อยู่ โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่วจำนวน 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ อยู่บนหน้าวุ้น

4. หลังจากนั้นนำแผ่นดิสก์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มีสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งละลายด้วย DCM วางบนผิววุ้นที่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากนั้นทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. อาหารสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ใช้เป็นชนิด Sabouraud Agar และทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอุณหภูมิและเวลาขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

6. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone ที่เกิดขึ้น

การทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียใช้ Penicillin Ampicillin Gentamicin Caftazidime และ Clavulanic acid เป็นตัวยาเปรียบเทียบ และกรณีทดสอบกับยีสต์ใช้ Nystatin เป็นตัวยาเปรียบเทียบ ในแต่ละชุดการทดลองจะใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม จะใช้ทดสอบกับอะมิโนสเตียรอยด์ **58** ถึง **67**

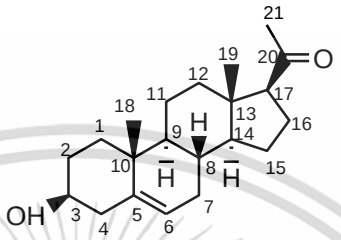
การอ่านผลการทดลองพิจารณาดังนี้: ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 2 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 5 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับอ่อน (weak) ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับปานกลาง (moderate) และถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับดี (good)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pregnenolone 4

สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นคือ Pregnenolone **4** ทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR ได้ผลดังต่อไปนี้



4

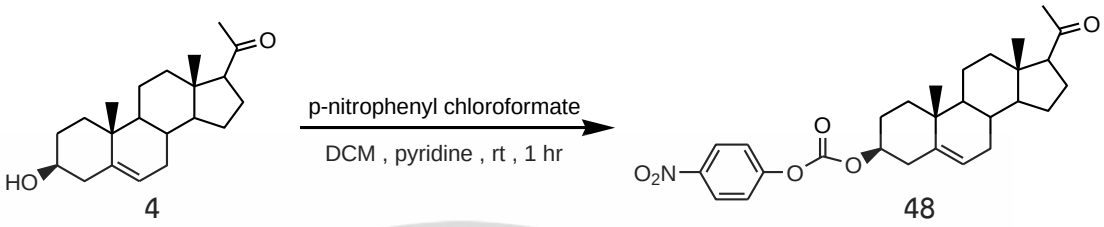
Szendiและคณะ[24]ได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างของ Pregnenolone **4** โดยเทคนิคนิวเคลียแมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่าสัญญาณ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 1.84 และ 1.08 (2H, H-1), 1.84 และ 1.48 (2H, H-2), 3.54 (1H, H-3), 2.27 (2H, H-4), 5.34 (1H, H-6), 1.97 และ 1.57 (2H, H-7), 1.46 (1H, H-8), 0.98 (1H, H-9), 1.62 และ 1.47 (2H, H-11), 2.04 และ 1.43 (2H, H-12), 1.17 (1H, H-14), 1.68 และ 1.23 (2H, H-15), 2.19 และ 1.66 (2H, H-16), 2.55 (1H, H-17), 0.63 (3H, H-18), 1.00 (2H, H-19) และ 2.11 (3H, H-21); ^{13}C NMR (75.5 MHz) : δ 37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.3 (C-4), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 31.8 (C-7), 31.9 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 21.1 (C-11), 38.9 (C-12), 44.0 (C-13), 56.9 (C-14), 24.5 (C-15), 22.9 (C-16), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.4 (C-19), 209.4 (C-20) และ 31.5 (C-21) เมื่อนำข้อมูลเปรียบเทียบกับสเปกตราของ ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR กับ Pregnenolone **4** ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ของบริษัท Fluka ได้ผล ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับข้อมูลของ Szendiและคณะ[24] ได้เสนอไว้ดังนี้ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ; δ 1.20 และ1.14 (2H, t , H-1), 1.84 และ 1.81 (2H, m , H-2), 3.52 (1H, m , H-3), 2.29 (2H, d, H-4) , 5.35 (1H, d, H-6) , 1.85 (2H, m, H-7), 1.49 (1H, d, H-8), 1.19-1.10 (1H, m, H-9), 1.66-1.58 (2H, m, H-11), 1.69 (2H, t, H-12), 1.24-1.14 (1H, m, H-14), 1.53-1.44 (2H, m, H-15), 2.05 (2H, m, H-16), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19) และ 2.13 (3H, s, H-21) และ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ; δ 37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-3), 140.8 (C-5), 121.3 (C-6), 31.7 (C-7), 31.8 (C-8), 49.9 (C-9), 36.5 (C-10), 21.0 (C-11), 38.8 (C-12), 44.0 (C-13), 56.9 (C-14), 24.4 (C-15), 22.8 (C-16), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20) และ 31.5 (C-21)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

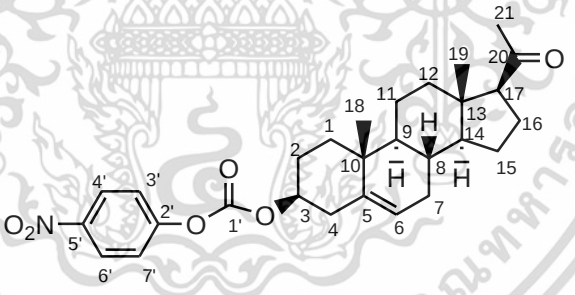
4.1.1 การสังเคราะห์ 4-Nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 48

การสังเคราะห์เริ่มจากหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 ของ Pregnenolone **4** ถูกกระตุ้นให้เป็นหมู่หลุดออกที่ดีด้วยรีเอเจนต์คือ 4-nitrophenyl chloroformate

แผนภาพที่ 4.1



ผลทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.62 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 97 : 3 ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 165-168 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 92.41 เปอร์เซ็นต์ ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **48** สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1}: 2945 (C-H stretch ของหมู่ CH_2 และ CH_3), 1762 (C=O stretch ของหมู่คาร์บอเนต), 1702 (C=O stretch ของหมู่คีโต), 1524-1491 (C=C stretch ของแอโรมาติก) และ 1254-1216 (C-O stretch)



48

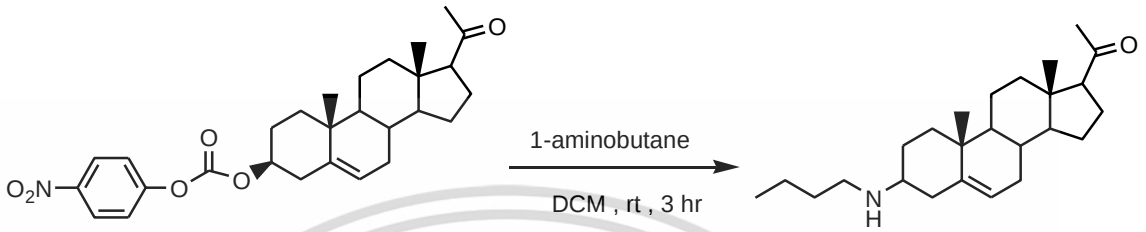
สเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **48** พบสัญญาณที่ ^1H NMR δ 4.64 (1H, m, H-3), 2.19 (2H, d, H-4), 5.44 (1H, d, H-6), 2.55 (1H, t, H-17), 0.65 (3H, s, H-18), 1.06 (3H, s, H-19), 2.14 (3H, s, H-21), 7.39 (2H, d,$J_{3',4'}$= 7.1 Hz, H-3'และ H-7'), 8.29 (2H, d,$J_{4',3'}$ = 7.1 Hz, H-4' และ H-6') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.09 ถึง 1.16 ppm เป็น mutiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัมของ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **48** พบสัญญาณที่ δ 79.5 (C-3), 138.8 (C-5), 123.2 (C-6), 49.9 (C-9), 21.0 (C-1), 56.8 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.2 (C-19), 209.4 (C-20), 155.6 (C-1′), 145.3 (C-2′), 121.7 (C-3′) และ (C-7′), 125.2 (C-4′ และ C-6′), 151.7 (C-5′) และสัญญาณที่ปรากฏอยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 สารสังเคราะห์ 3-(1-aminobutyl)-pregn-5-en-20-one 49

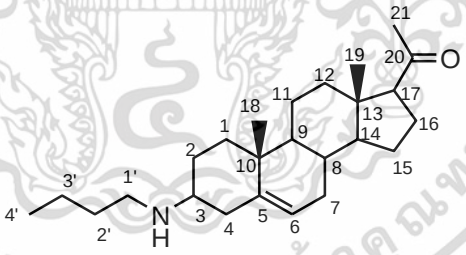
สาร **49** เตรียมจาก 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **48** ทำปฏิกิริยากับ 1-aminobutane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.2



48 49

ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 70 : 30 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.45 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 90 : 10 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้เท่ากับ 45.80 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **4**) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1}: 3363 (N-H stretch ของเอมีน), 2936 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1453 (CH_2 bend) และ1357 (CH_3 bend)



49

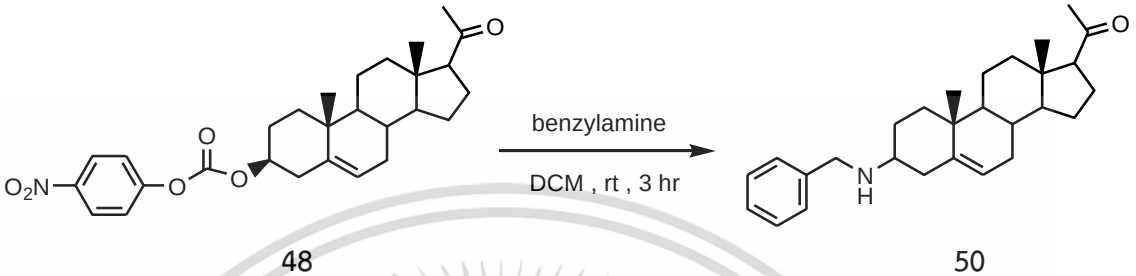
สเปกตรัม ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **49** พบสัญญาณที่ δ 3.17 (1H, br.s, H-3), 5.38 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.62 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.12 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.35 ถึง 1.10 ppm เป็น mutiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **49** พบสัญญาณที่ δ 74.1 (C-3), 139.8 (C-5), 122.1 (C-6), 49.8 (C-9), 21.0 (C-11), 56.9 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), และ 209.5 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 สารสังเคราะห์ 3-(1-aminobenzyl)-pregn-5-en-20-one 50

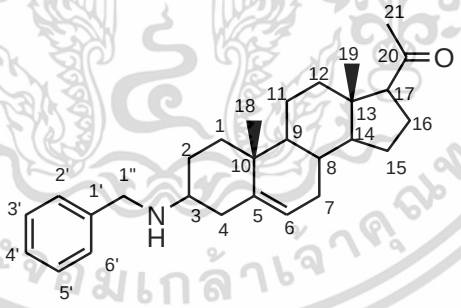
สาร **50** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **55** ทำปฏิกิริยากับ benzylamine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.3



48 **50**

ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 70 : 30 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.50 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 85 : 15 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้เท่ากับ 43.50 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **4**) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1}: 3363 (N-H stretch ของเอมีน), 2936 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1453 (CH_2 bend) และ1357 (CH_3 bend)



50

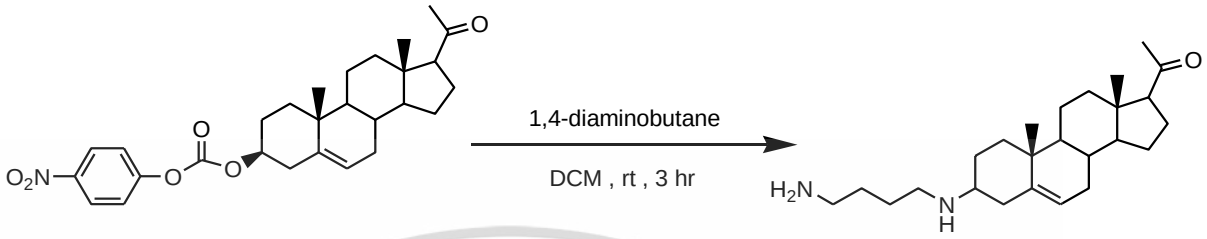
สเปกตรัม ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **50** พบสัญญาณที่ δ 7.29-7.32 (5H, m, H-2′, H-3′, H-4′, H-5′, H-6′), 4.34 (1H, br.s, H-3), 5.38 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.62 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.12 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.35 ถึง 1.10 ppm เป็น mutiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **50** พบสัญญาณที่ δ 74.1 (C-3), 139.8 (C-5), 122.1 (C-6), 49.8 (C-9), 21.0 (C-11), 56.9 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), และ 209.5 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 สารสังเคราะห์ 3-(1,4-Diaminobutyl)-pregn-5-en-20-one 51

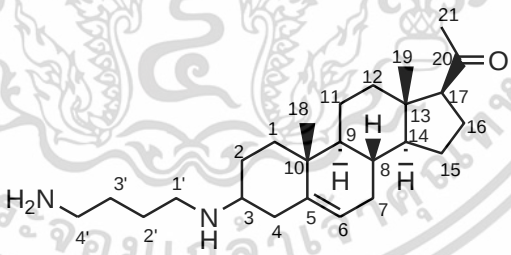
สาร **51** เตรียมจาก 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **48** ทำปฏิกิริยากับ 1,4-diaminobutane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.4



48 **51**

ผลการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.39 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 77 : 23 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 128-131 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 28.80 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **4**) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3363 (N-H stretch ของเอมีน), 2936 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1453 (CH_2 bend) และ1357 (CH_3 bend)



51

สเปกตรัม ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **51** พบสัญญาณที่ δ 3.17 (1H, br.s, H-3), 5.38 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.62 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.12 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.35 ถึง 1.10 ppm เป็น mutiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **51** พบสัญญาณที่ δ 74.1 (C-3), 139.8 (C-5), 122.1 (C-6), 49.8 (C-9), 21.0 (C-11), 56.9 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), และ 209.5 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

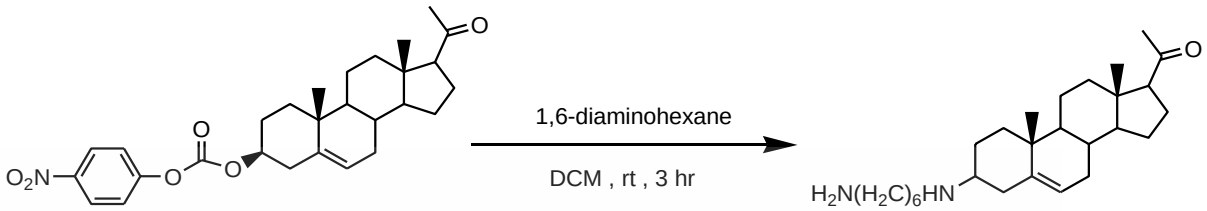
ES-MS : $C_{25}H_{42}N_2O$ Caled. 386.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ (3.1%), 370.7 (2.0%) และ 314.0 (1.2%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5 การสังเคราะห์ 3-(1,6-Diaminohexyl)-pregn-5-en-20-one 52

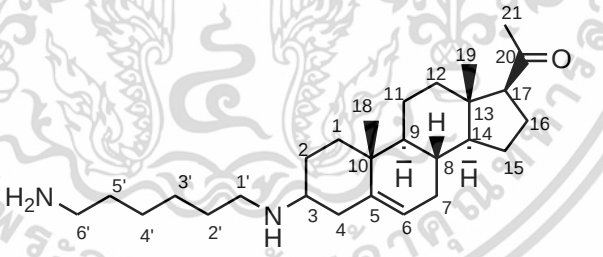
สาร **52** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **48** ทำปฏิกิริยากับ 1,6-diaminohexane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.5



48 **52**

จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.38 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 84 : 16 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 92-95 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 12.13 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **4**) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1}: 3362 (N-H stretch ของ เอมีน), 2936 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=0 stretch), 1453 (CH_2 bend) และ 1357 (CH_3 bend)



52

สเปกตรัม ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **52** พบสัญญาณที่ δ 3.15 (1H, m, H-3), 5.36 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.34 ถึง 1.11 ppm เป็น mutiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **52** พบสัญญาณที่ δ 74.1 (C-3), 139.9 (C-5), 122.1 (C-6), 49.9 (C-9), 21.1 (C-11), 56.9 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.62 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 49.4 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

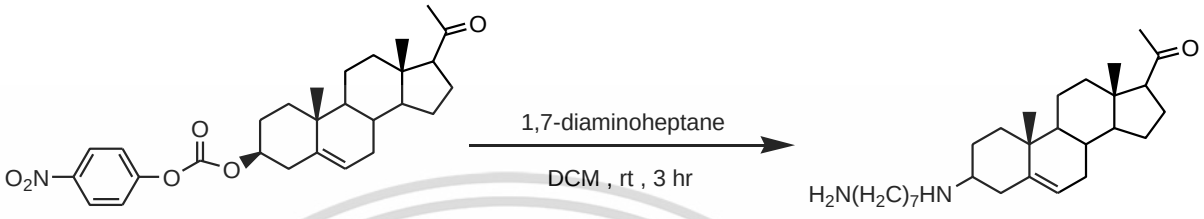
ES-MS : $C_{27}H_{46}N_2O$ Caled. 414.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 414.0 (2.0%), 369.7 (1.2 %) และ 342.0 (1.4%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.6 การสังเคราะห์ 3-(1,7-Diaminoheptyl)-pregn-5-en-20-one 53

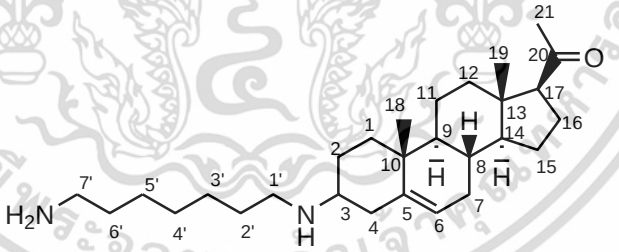
สาร **53** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **48** ทำปฏิกิริยากับ 1,7-diaminoheptane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.6



48 **53**

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



53

สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **53** พบสัญญาณที่ δ 3.08 ppm (1H, m, H-3), 5.30 (1H, br.t, H-6) , 2.47 (1H, t, H-17), 0.56 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, s, H-19) , 2.06 (3H, s H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่าเท่ากับ 2.37 ถึง 1.04 ppm เป็น multiple ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **53** พบสัญญาณที่ δ 73.1 (C-3), 138.9 (C-5), 121.1 (C-6), 48.9 (C-9), 55.8 (C-14), 62.7 (C-17), 12.2 (C-18), 18.3 (C-19), 208.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 42.9 ถึง 20.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และmethyne

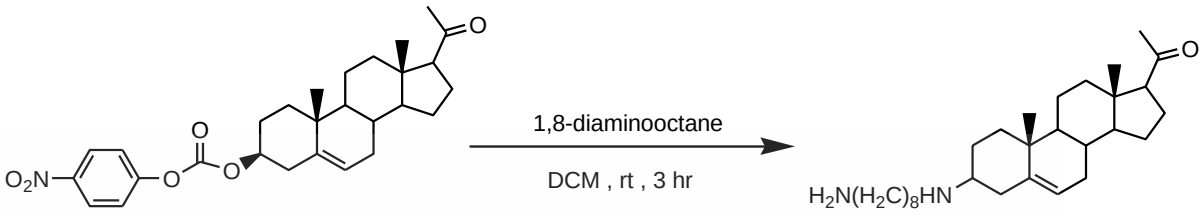
ES-MS : $C_{28}H_{48}N_2O$ Caled. 428 g/molข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 428.0 (5.4%) และ 413.1 (22.9%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.7 การสังเคราะห์ 3-(1,8-Diaminooctyl)-pregn-5-en-20-one 54

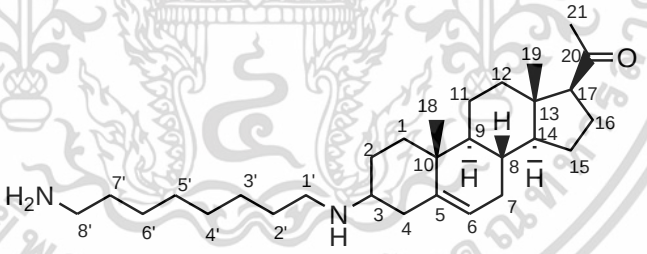
สาร **54** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **48** ทำปฏิกิริยากับ 1,8-diaminoheptane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.7



48 54

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



54

สเปกตรัม ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **54** พบสัญญาณที่ δ 3.14 (1H, br.d, H-3), 5.38 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.38 ถึง 1.11 ppm เป็น mutiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **54** พบสัญญาณที่ δ 74.0 (C-3), 139.9 (C-5), 122.1 (C-6), 49.9 (C-9), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.32 (C-19), 209.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 42.9 ถึง 20.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

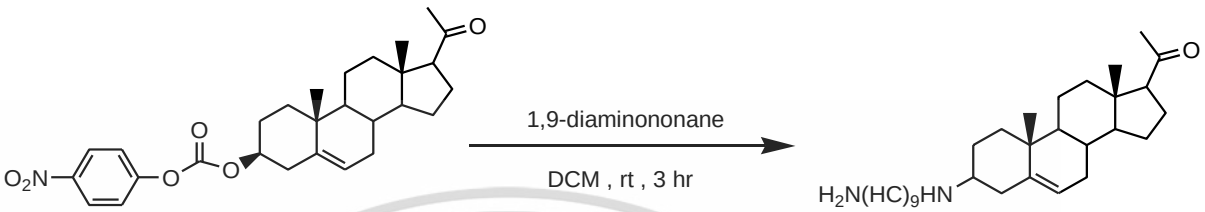
ES-MS : $C_{29}H_{50}N_2O$ Caled. 442.0 g/molข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 442.0 (4.8%) และ 344.0 (7.0%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.8 การสังเคราะห์ 3-(1,9-Diaminononyl)-pregn-5-en-20-one 55

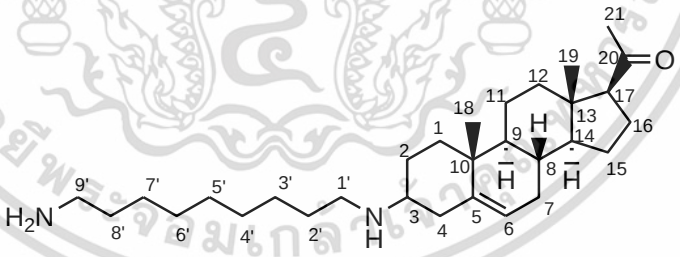
สาร **55** เตรียมจากสาร 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **48** ทำปฏิกิริยากับ 1,9-diaminononaneโดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.8



48 **55**

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



55

สเปกตรัม ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **55** พบสัญญาณที่ δ 3.08 (1H, m , H-3), 5.41 (1H, br.t, H-6), 2.66 (1H, t, H-17), 0.64 (3H, s, H-18), 1.05 (3H, s, H-19), 2.14 (3H, s, H-2)และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.34 ถึง 1.11 ppm เป็น mutiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **55** พบสัญญาณที่ δ 73.9 (C-3), 139.9 (C-5), 121.8 (C-6), 50.1 (C-9), 56.7 (C-14), 63.3 (C-17), 12.2 (C-18), 18.4 (C-19), 210.9 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 48.4 ถึง 20.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และmethyne

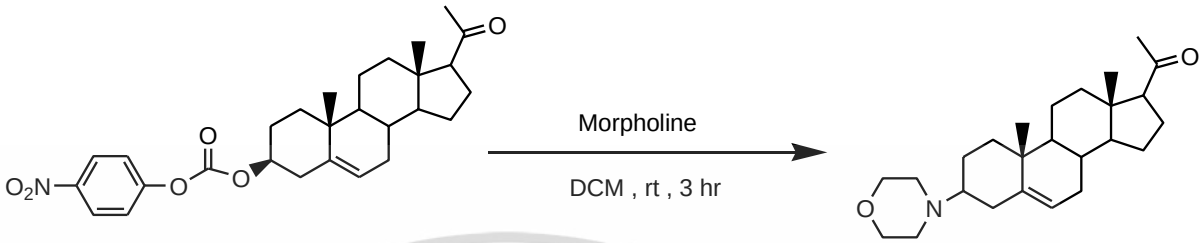
ES-MS : $C_{30}H_{52}N_2O$ Caled. 456.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 456.0 (1.9%), 412.0 (2.0%) และ 384.6 (6.8%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.9 การสังเคราะห์ 3-Morpholinopregn-5-en-20-one 56

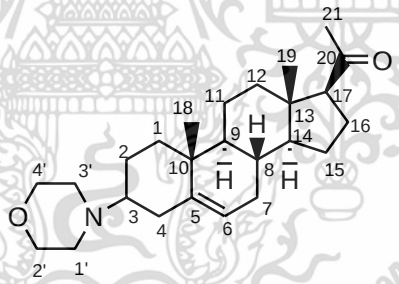
สาร **56** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **48** ทำปฏิกิริยากับ morpholine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.9



48 **56**

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



56

สเปกตรัม ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **56** พบสัญญาณที่ δ 3.47 (1H, br.d, H-3), 5.37 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21), 3.65 (4H, s, H-2′ และ H-3′) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.37 ถึง 1.12 ppm เป็น mutiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **56** พบสัญญาณที่ δ 74.9 (C-3), 139.8 (C-5), 122.2 (C-6), 49.8 (C-9), 56.8 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.4 (C-20), 65.6 (C-2′ และ C-3′) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 45.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

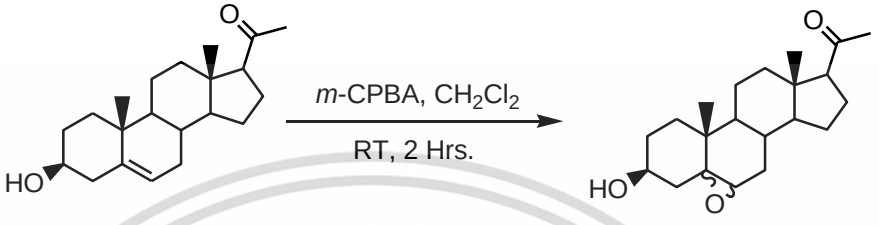
ES-MS : $C_{25}H_{38}NO_2$Caled. 385.0 g/molข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 299.0 (3.0%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.10 การสังเคราะห์ 3β-Hydroxy-5,6-epoxy-pregn-20-one 57

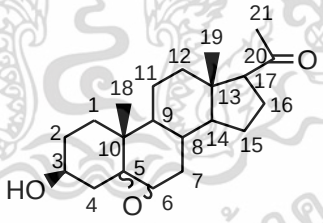
สาร **57** เตรียมจากการนำ Pregnenolone **4** ทำปฏิกิริยากับ *m*-CPBA โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.10



4 **57**

จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 1 : 1 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีน้ำตาลของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.31 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 70 : 30 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 176-179 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 94.06 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **4**) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปข้อมูลได้ดังนี้



57

สเปกตรัม ^{1}H-NMR พบว่าการสังเคราะห์สาร **57** ผลิตภัณฑ์เกิดเป็นสารผสมสองชนิดโดยมีวงอีพอกไซด์อยู่เหนือระนาบและใต้ระนาบใน ซึ่งในที่นี้ไม่ได้แยกสารผสมนี้อยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ สเปกตรัม ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **57** สอดคล้องกับงานวิจัยของMelo และคณะ[25] พบสัญญาณที่ δ 3.84-3.94 (1H, m, αH-3), 3.63-3.73 1H, m, αH-3), 3.06 (1H, d, αH-6), 2.90 (1H, d, βH-6) 2.45-2.51 (2H, m, H-17), 0.54 (3H, s, H-18), 0.59 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 1.04 (3H, s, H-19) และ 2.08 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.37 ถึง 1.12 ppm เป็น mutiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **57** พบสัญญาณที่ δ 209.4 (C-20),68.5, 65.6, 56.99, 43.9, 42.5, 39.7, 38.4, 34.8, 32.4, 31.4, 29.8,

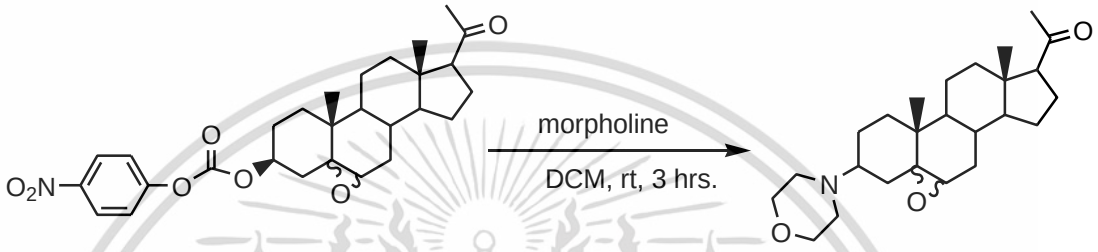
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

24.2, 22.6, 20.6, 15.8 และ 13.2 และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 45.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

4.1.11 การสังเคราะห์ 3-Morpholino-5,6-epoxy-pregn-20-one 59

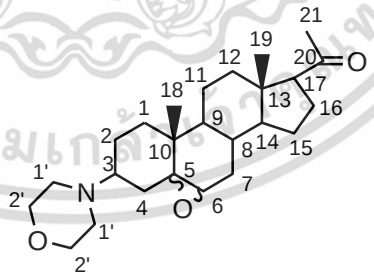
สาร **59** เตรียมจากการนำสาร **58** ที่ไม่มีการทำให้อยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ทำปฏิกิริยากับ morpholine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.10



58 **59**

จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีน้ำตาลของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.47 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 75 : 25 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 173-176 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 53.27 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจากสาร **57**) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปข้อมูลได้ดังนี้



59

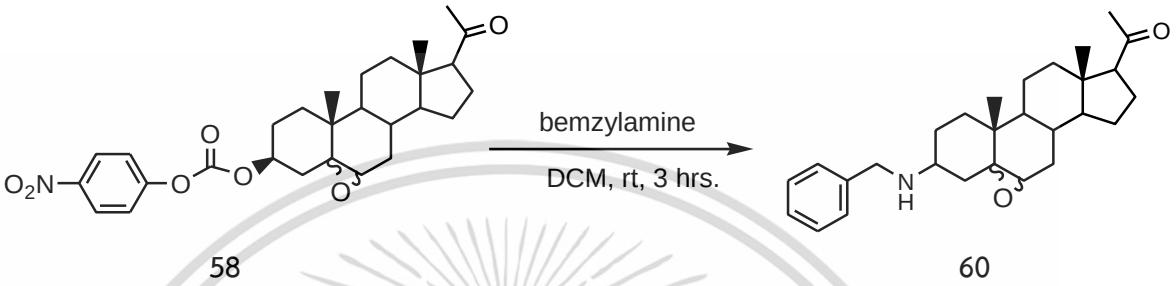
สเปกตรัม ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **59** พบสัญญาณที่ δ 4.81-4.88 (1H, m, αH-3), 4.65-4.73 (1H, m, αH-3), 3.07 (1H, d, αH-6), 2.88 (1H, d, βH-6), 0.54 (3H, s, H-18), 0.59 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 1.04 (3H, s, H-19) และ 2.08 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.37 ถึง 1.12 ppm เป็น mutiplet ของหมู่ methylene และ methyne

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.12 การสังเคราะห์ 3-Aminobenzyl-5,6-epoxy-pregn-20-one 60

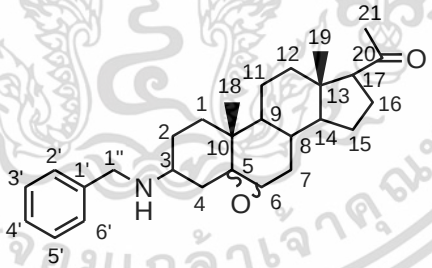
สาร **60** เตรียมจากการนำสาร **58** ที่ไม่มีการทำให้อยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ทำปฏิกิริยากับ benzylamine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.11



58 60

จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีน้ำตาลของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.40 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 75 : 25 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 219-221 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 66.78 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจากสาร **57**) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปข้อมูลได้ดังนี้



60

สเปกตรัม ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **59** พบสัญญาณที่ δ 7.24-7.33 (5H, m, H-2′, H-3′, H-4′, H-5′ และ H-6′) 4.84-4.92 (1H, m, αH-3), 4.33 (2H, d, H-1′′), 2.88 (1H, d, βH-6), 0.54 (3H, s, H-18), 0.59 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 1.04 (3H, s, H-19) และ 2.08 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.37 ถึง 1.12 ppm เป็น mutiplet ของหมู่ methylene และ methyne

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

Pregnenolone **4** และอะมิโนสเตียรอยด์ **49-56** ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยการพิจารณาจากบริเวณการเกิดวงใส (Clear zone) ณ หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์รวมทั้งหมด 6 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในสภาวะแวดล้อมและสามารถก่อเกิดโรคกับมนุษย์ได้ ซึ่งแต่ละชนิดมีโทษดังนี้ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบการปนเปื้อนในอาหารและเครื่องสำอาง ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษและโรคติดเชื้อที่ผิวหนังซึ่งอาจลุกลามเข้าสู่กระแสเลือดได้ *M. luteus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้อาหารเสื่อมเสีย เช่นการเสื่อมเสียของนม อาหารกระป๋อง นอกจากนั้นยังพบว่า *B. subtilis* สามารถนำมาใช้ในการหมักอาหาร *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์รวมทั้งคน พบได้ในดิน ผิวหนังและในสภาวะแวดล้อมอื่นๆ อยู่ได้ทั่วในสภาพแวดล้อมปกติและสภาพออกซิเจนต่ำ ในสัตว์จะเข้าทำลายเนื้อเยื่อที่มีภูมิคุ้มกันต่ำลง และ *C. albicans* เป็นยีสต์ชนิดหนึ่ง ซึ่งก่อให้เกิดโรคประเภทเชื้อฉวยโอกาสในคนโดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเอดส์ จากผลการทดลอง พบว่าไม่ปรากฏวงใส (Clear zone) ของ Pregnenolone **4** และอะมิโนสเตียรอยด์ **49-56** ซึ่งถือว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่กล่าวมา

4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

Prenenolone **4** และอะมิโนสเตียรอยด์ **49-57 และ 59-60** ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ประกอบด้วยซลล์ไลน์ของดังต่อไปนี้:

1. เซลล์มะร็งเต้านมชนิด MCF-7 Human breast adenocarcinoma cell line)
2. เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Hepatocellular carcinoma cell line)
3. เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line)
4. เซลล์ไตลิงปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero)

ด้วยวิธี MTT assay โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับ Pregnenolone **4** ที่ระดับความเข้มข้นในการทดสอบเบื้องต้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone **4** และอะมิโนสเตียรอยด์ **49-57 และ 59-60** แสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า Pregnenolone **4** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, KB และHepG-2 โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 32.34, 43.26, 21.04 และ 22.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ Pregnenolone **1** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 60.45 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะมิโนสตียรอยด์ **49** แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB และ HepG-2 โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 34.07, 43.61, 27.21 และ 30.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ **50** แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB และ HepG-2 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 98.32, 93.61, 65.85 และ 91.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ **51** แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7 และ KB มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 57.12, 57.42, และ 66.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อเซลล์ HepG-2 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 37.94 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ **52** แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB และ HepG-2 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 62.38, 68.74, 95.30 และ 55.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ **53** แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 และ KB มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 89.85 และ 97.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่มีผลต่อเซลล์ Vero และ HepG-2 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 42.40 และ 40.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ **54** มีแนวโน้มความเป็นพิษต่อเซลล์เหมือนกับอะมิโนสเตียรอยด์ **53** โดยแสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 และ KB มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 54.02 และ 53.88เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่มีผลต่อเซลล์ Vero และ HepG-2 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 44.40 และ 27.44 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ **55** แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero และ MCF-7 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 62.71 และ 74.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อเซลล์ KB และ HepG2 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 31.99 และ 43.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ **56** แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ MCF-7 และ KB โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 55.84 และ 52.95 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero และ HepG-2 โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 36.52 และ 30.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสตียรอยด์ **57** แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB และ HepG-2 โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 44.69, 1.25, 20.27 และ 3.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ **59** แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB และ HepG-2 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 85.37, 93.26, 91.74 และ 81.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

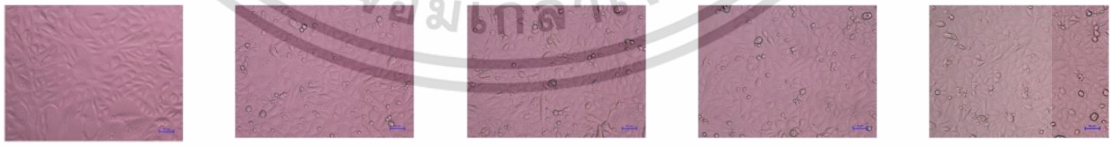
อะมิโนสตียรอยด์ **60** แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB และ HepG-2 โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 11.94, 13.55, 2.53 และ 18.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone **4** และอะมิโนสเตียรอยด์ **49-57** และ **59-60** ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารตัวอย่าง	ความเป็นพิษต่อเซลล์ (%)			
	Vero	MCF-7	KB	HepG-2
4	40.65	60.45	32.34	43.26
49	34.07	43.61	27.21	30.63
50	98.32	93.61	65.85	91.52
51	57.12	57.42	66.74	40.07
52	62.38	68.74	95.30	55.19
53	42.40	89.85	97.80	40.25
54	44.40	54.02	53.88	27.44
55	62.71	74.51	31.99	43.41
56	36.52	55.84	52.95	30.54
57	44.69	1.25	20.27	3.42
59	85.37	93.26	91.74	81.78
60	11.94	2.53	21.02	18.80

จากผลการทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ จะนำอะมิโนสเตียรอยด์ที่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง (antagonist) 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี MTT assay (IC_{50}) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับตัวยามาตราฐาน Vinblastine sulfate salt ค่า IC_{50} ของ Pregnenolone **4** และ อะมิโนสเตียรอยด์ **49-59** แสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า Pregnenolone **4** ไม่มีผลในการทำลายเซลล์ Vero, KB และ HepG-2 โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 40 ไมโครโมล/มิลลิลิตร จากรูปที่ 4.1 แสดงให้เห็นถึงลักษณะของเซลล์ปกติ (Vero) ที่มีลักษณะเป็นรูปลิ่ม เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ Pregnenolone **4** ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 125 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อเซลล์ Vero น้อยมาก



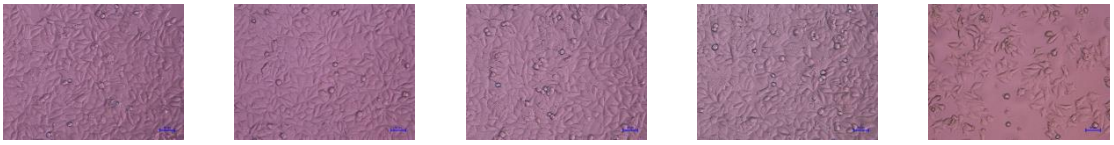
ชุดควบคุม 125 μg/mL 250 μg/mL 500 μg/mL 1,000 μg/mL

รูปที่ 4.1 ผลของ Pregnenolone **4** ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม

แต่ Pregnenolone **4** มีผลในการทำลายเซลล์ MCF-2 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.29 แสดงดังรูปที่ 4.2 แสดงการทำลายเซลล์ MCF-2 ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 125 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Pregnenolne **4** มากขึ้นเซลล์ MCF-7 จะถูกทำลายมากขึ้น โดยบางเซลล์มีรูปแบบของการตายแบบ apoptosis คือการเปลี่ยนแปลงจากรูปลิ่มกลายเป็นก้อนกลม นอกจากนี้ยังมีบางเซลล์ที่ตายแบบสลายตัวไปแล้ว



ชุดควบคุม 125 μg/mL 250 μg/mL 500 μg/mL 1,000 μg/mL

รูปที่ 4.2 ผลของ Pregnenolone **4** ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสาร **50** มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ Vero, MCF-7, KB และ HepG-2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.68, 1.09, 1.69 และ 0.90 ไมโครโมล/มิลลิลิตร สาร **50** มีผลในการทำลายเซลล์ HepG-2 ที่ดี (รูปที่ 4.3) แต่ในทำนองเดียวกัน สาร **50** สามารถทำลายเซลล์ Vero ได้ในระดับที่ดีกว่า (รูปที่ 4.4) ซึ่งถ้านำไปพัฒนาเป็นตัวยาอาจจะใช้ได้ในการทำลายเซลล์ HepG-2 และทำลายเซลล์ Vero ได้ในเวลาเดียวกัน

ชุดควบคุม 1,000 μg/mL

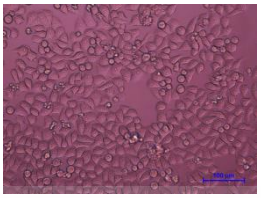
รูปที่ 4.3 ผลของสาร **50** ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม

ชุดควบคุม 1,000 μg/mL

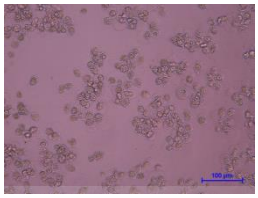
รูปที่ 4.4 ผลของสาร **50** ต่อเซลล์ HepG-2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG-2 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสาร **52** มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ KB ดีที่ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.79 ไมโครโมล/มิลลิลิตร (รูปที่ 4.6) แต่ในทำนองเดียวกันสาร **52** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero เท่ากับ 62.38 เปอร์เซ็นต์



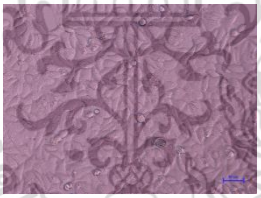
ชุดควบคุม



1,000 μg/mL

รูปที่ 4.5 ผลของสาร **52** ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุม

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสาร **53** มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ MCF-2 ดีที่ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.70 ไมโครโมล/มิลลิลิตร (รูปที่ 4.6) และที่น่าสนใจมากคือ สาร **53** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ในค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้ (42.40 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นจะมีค่าใกล้เคียงในช่วงที่ยอมรับได้เช่นกัน



ชุดควบคุม

1,000 μg/mL

รูปที่ 4.6 ผลของสาร **53** ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุม

เมื่อนำ Pregnenolone **4** เปลี่ยนเป็นอีพอกไซด์สเตียรอยด์พบว่าสาร **57** ไม่มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่เมื่อเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เป็นหมู่อะมิโนพบว่า สาร **59** มีผลต่อเซลล์ KB ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.31 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และมีผลต่อเซลล์ Vero, MCF-7 และ HepG-2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.04, 1.74 และ 1.91 ไมโครโมล/มิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าสาร **59** มีผลต่อเซลล์ไลน์ทดสอบทุกชนิด ในทำนองเดียวกันก็มีผลต่อเซลล์ Vero ซึ่งไม่เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิต ส่วนสาร **60** ไม่มีผลต่อเซลล์ไลน์ทดสอบทุกชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่า IC_{50} ของอะมิโนสเตียรอยด์ **4, 49-57** และ **59-60**

สารตัวอย่าง	IC_{50} (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)			
	Vero	**MCF-7**	**KB**	**HepG-2**
Vinblastine sulfate salt	0.0014	0.0002	0.0016	0.0007
4	>40	2.29	>40	>40
49	>40	>40	>40	>40
50	**0.68**	1.09	1.69	**0.90**
51	2.25	2.29	1.06	>40
52	1.53	1.74	**0.79**	2.23
53	>40	**0.70**	1.07	>40
54	>40	2.04	2.13	>40
55	1.77	1.30	>40	>40
56	>40	2.14	1.70	>40
57	>40	>40	>40	>40
59	2.04	1.74	1.31	1.91
60	>40	>40	>40	>40

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสาร **53** มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ MCF-2 ดีที่ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.70 ไมโครโมล/มิลลิลิตร (รูปที่ 4.6) และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ในค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้ (42.40 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นจะมีค่าใกล้เคียงในช่วงที่ยอมรับได้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

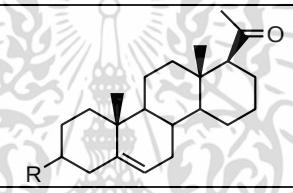
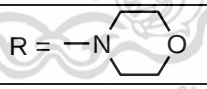
บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากความสนใจของผู้วิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงโครงสร้างของ Pregnenolone **4** ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ที่ประกอบด้วยหมู่อะมิโนและนำสารสังเคราะห์ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

5.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 49-56 จาก Pregnenolone 4

อะมิโนสเตียรอยด์ **49-56** ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ Pregnenolone **4** ให้เป็นหมู่อะมิโน การสังเคราะห์เตรียมผ่านสารตัวกลางคือ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **48** สามารถสังเคราะห์สาร **48** มีผลได้เท่ากับได้ 92.41 เปอร์เซ็นต์จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสารประกอบอะมิโน ผลได้ร้อยละของอะมิโนสเตียรอยด์แสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ผลได้ร้อยละของอะมิโนสเตียรอยด์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **4**)

สารอนุพันธ์		ผลได้ร้อยละ
49	R = $-NHCH_2CH_2CH_2CH_3$	45.80
50	R = $-NHCH_2C_6H_5$	43.50
51	R = $-NH(CH_2)_4NH2$	28.80
52	R = $-NH(CH_2)_6NH2$	12.13
53	R = $-NH(CH_2)_7NH2$	18.74
54	R = $-NH(CH_2)_8NH2$	19.54
55	R = $-NH(CH_2)_9NH2$	15.31
56		83.89

จากการทดลองสามารถสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ มีผลได้ร้อยละอยู่ในช่วงต่ำถึงสูง สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก

1. จากแผนภาพที่ 4.1 ในขั้นตอนการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone **4** ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ให้เป็นหมู่หลุดออก โดยใช้รีเอเจนต์คือ 4-nitrophenyl chloroformate ซึ่งมีหมู่ฟังชันก์เอซิลคลอไรด์ที่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยากับความชื้นในอากาศ ทำให้สาร **48** ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้กลับเป็นสารตั้ง Pregnenolone **4** มีผลทำให้ได้สาร **48** ลดลง

2. ขั้นตอนแยกอะมิโนสเตียรอยด์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี อะมิโนสเตียรอยด์เป็นสารที่มีขั้วค่อนข้างสูงอาจจะเกิด interaction กับซิลิกาเจล ที่ใช้ในเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีค่อนข้างสูง และเนื่องจากเป็นสารผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยหมู่อะมิโนซึ่งมีความเป็นเบสสามารถเกิด interaction กับซิลิกาเจลที่มีความเป็นกรดได้ ทำให้เกิดการตกค้างอยู่ในคอลัมน์ส่งผลให้ได้ปริมาณหลังการทำให้บริสุทธิ์ของอะมิโนสเตียรอยด์ **49-55** ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 49-56

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น ซึ่งประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้งสิ้น 8 ชนิด คือ *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 พบว่า Pregnenolone **4** อะมิโนสเตียรอยด์ **49-56** ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และเมื่อนำไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *S. milleri* group, *S. coagulase* negative, *S. aureus* (MRSA) 20625 *S. aureus* (MRSA) 20626, *S. aureus* (MRSA) 20627, *S. aureus* (MRSA) 20633, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623, *S. aureus* (VRSA) 20683, *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. pertussis* ผลการทดลองมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันคือ Pregnenolone **4** และ อะมิโนสเตียรอยด์ **49-56** ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ กล่าวได้ว่าการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์ Pregnenolone **4** ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของวง A เป็นหมู่อะมิโนไม่มีผลต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์

5.3 การสังเคราะห์อะมิโนอีพอกไซด์สเตียรอยด์ 57 และ 59-60

อะมิโนอีพอกไซด์สเตียรอยด์ **59** และ **60** ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ Pregnenolone **4** ให้เป็นหมู่อะมิโน และที่คาร์บอนพันธะคู่ตำแหน่งที่ 5 และ 6 ให้เป็นวงอีพอกไซด์ พบว่าสามารถสังเคราะห์สังเคราะห์อะมิโนอีพอกไซด์สเตียรอยด์สาร **59** และสาร **60** ได้ผลผลิตร้อยละ 53.27 และ 66.78 ตามลำดับ

5.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 49-60

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า Pregnenolone **4** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่ เซลล์ปกติ (Vero, African green monkey kidney fibroblast) เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line) และ เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Hepatocellular carcinoma cell line) น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ กล่าวได้ว่า Pregnenolone **4** มีความเหมาะสมในการเลือกใช้เป็นสารตั้งต้น

ในที่นี้ขอกล่าวสรุปเฉพาะอะมิโนสเตียรอยด์ที่ให้ผลการทดลองที่ดีคือ 2 พบว่าสาร **53** มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ MCF-2 ดีที่ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.70 ไมโครโมล/มิลลิลิตร (รูปที่ 4.6) และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ในค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้ (42.40 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นจะมีค่าใกล้เคียงในช่วงที่ยอมรับได้เช่นกัน

นอกจากนี้ยังพบว่า สาร **59** มีผลต่อเซลล์ KB ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.31 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และมีผลต่อเซลล์ Vero, MCF-7 และ HepG-2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.04, 1.74 และ 1.91 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสาร **59** มีผลต่อเซลล์ไลน์ทดสอบทุกชนิด ในทำนองเดียวกันก็มีผลต่อเซลล์ Vero ซึ่งไม่เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิต จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Pregnenolone **4** ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 ของวง A จากหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่อะมิโนมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพด้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ยังพบว่าการออกฤทธิ์ขึ้นกับชนิดและโครงสร้างของหมู่อะมิโนด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

[1] ThaiBiz Center.com. **2011. บทความน่ารู้เรื่องสเตียรอยด์. Online Available:** http://www.thaibizcenter.com/knowledgecenter.asp?kid=1184.

[2] สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2011. **บราสสิโนสเตอรอยด์. Online Available:** http://th.wikipedia.org/wiki/บราสสิโนสเตอรอยด์.

[3] W. Prabpayak, P. Charoenying, C. Laosinwattana and Nuntana Aroonrerk. 2006. Antibacterial of Pregnenolone Derivatives., **KMITL Sci.**, Vol. 6, No 2b: pp. 466-470.

[4] N. Onsaeng, P. Unruean, W. Changin and P. Charoenying,. 2012. Synthesis and Anticancer Evaluations of C-3 Aminopregnenolone , การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 วันที่ 17-19 ตุลาคม 2555 ณ The Empress Convention Centre, เชียงใหม่.

[5] R. J. Simmonds, 1997. **Chemistry of Biomolecules**: An Introduction, Billing & Sons Ltd., Worcester.

[6] 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.

[7] 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.

[8] S. N. Khan, Y. M. Jung, B. J. Kim, H. Cho, J. Lee and H. Kim. 2008. Synthesis and Antimicrobial Activity of 7α-Amino-23,24-Bisnor-5α-Cholan-22-ol Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. Vol. 18, pp. 2558-2561.

[9] I. Radu, D. Poirier and L. Provencher. New Efficient Pathway for the Synthesis of 3-Aminoestrone. 2002. **Tetrahedron Letters**. Vol. 43, pp. 7617-7619.

[10] 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 3α-aminosteroid., Tetrahedron Letters, 46, pp. 7675-7678.

[11] B. Choucair, M. Dherbomez, C. Roussakis and L. El Kihel. 2004. Synthesis of Spermidinylcholestanol and Spermidinylcholesterol Squalamine Analogues., Tetrahedron, 60, pp. 11477-11486.

[12] J. Cui, L. liu, D. Zhao, C. Gan, X. Huang, Q. Xiao, B. Qi, L. Yang and Y. Huang. 2015. Synthesis, Characterization and Antitumor Activities of Some Steroidal Derivatives with Side Chain of 17-Hydrazone Aromatic Heterocycle, Steroids, 95, pp. 32-38.

[13] วีรศักดิ์ เชื้อมโนชาญ. 2525. **สเตียรอยด์จากพืช**, ภาควิชาเภสัชเวท, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

[14] ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. 2536. **เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม1**. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[15] G. P. Moss. **Steroid. Online Available:** http://en.wikipedia.org/wiki/Steroid. 2011.

[16] วิชชุ โลจนาภิวัฒน์. 2532. **ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชีวสังเคราะห์**, ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

[17] A. H. Banday, M. I. Zargar and B. A. Ganaie. 2011. Synthesis and Antimicrobial Studies of Chalconyl Pregnenolones., **Steroids**, 76, pp. 1358-1362.

[18] L. A. Shervington, N. Smith, E. Norman, T. Ward, R. Phillips and A. Shervington. 2009. To Determine the Cytotoxicity of Chlorambucil and One of its Nitro-Derivatives, Conjugated to Prasterone and Pregnenolone, towards Eight Human Cancer., **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44, pp. 2944-2951.

[19] A. H. Banday, S. A. Shameem, B. D. Gupta and H. M. S. Kumar. 2010. D-Ring Substituted 1,2,3-Triazolyl 20-Keto Pregnenolones as Potential Anticancer Agents: Synthesis and Biological Evaluation., **Steroids**, 75, pp. 801-804.

[20] A. H. Banday, B. P. Mir, I. H. Lone, K. A. Suri and H. M. S. Kumar. 2010. Studies on Novel D-Ring Substituted Steroidal Pyrazolines as Potential Anticancer Agents., Steroids, 75, pp. 805-809.

[21] M. I. Choudhary, M. S. Alam, A. Rahman, S. Yousuf, Y. C. Wu, A. S. Lin and F. Shaheen. 2011. Pregnenolone Derivatives as Potential Anticancer Agents., Steroids, 76, pp. 1554-1559.

[22] International Standard. 2nd ed. ISO 10—3-5: Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for *in vitro* Cytotoxicity.

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

[24] Z. Szendi, P. Forgo and F. Sweet. 1995. Complete ^{1}H and ^{13}C NMR Spectra of Pregnenolone., **Steroids**, 60, pp. 442-446.

[25] J.F.S. Carvalho, M.C. Silva, M.L.S. Melo. 2009. Highly Efficient Epoxidation of Unsaturated Steroids Using Magnesium bis(monoperoxyphthalate)hexahydrate, **Tetrahedron**, 65, pp. 2773-2781.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่

P. Charoenying, N. Onsaeng, P. Unruean and W. Changin. 2013. Synthesis and Anticancer Activity of 3-Aminopregnenolone., 14th Tetrahedron Symposium: Challenges in Organic & Bioorganic Chemistry, 25-28 June 2013, Vienna, Austria.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บันทึกรายการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลขที่ 2560 01 05 042 ตั้งแต่วันที่1 ตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2560

แหล่งทุน: เงินอุดหนุนทั่วไป เงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

ชื่อโครงการ : การสังเคราะห์และฤทธิ์ชีวภาพของอะมิโนสเตียรอยด์จากเพรกนินโนโลน

ชื่อหัวหน้าโครงการ: ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้างถึง	รายการรับ - จ่าย			รายรับ	รายจ่าย						รวม
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	ดอกเบี้ยรับ	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน				งบลงทุน	รายจ่าย
							ค่าจ้างชั่วคราว	าตอบแท	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ	ค่าสาธารณูปโภค	ค่าครุภัณฑ์	
	งบประมาณที่ได้รับการอนุมัติ (ตามแผน)								29000.00	21,000.00			50,000.00
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 1 = 85%)	13/1/2017	42,500.00										
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 2 = 15%)	27/6/2017	7,500.00										
	หัก ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 1)			33,009.50			-	-		33,009.50	-	-	33,009.50
	ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 2)			19,210.00			-	-	19210.00	-	-	-	19,210.00
	งบประมาณคงเหลือ				-2,219.50	0.00							**52,219.50**
	รายละเอียดค่าใช้จ่าย												
ครั้งที่ 1													
ว/ด/ป													
	ค่าสารเคมี	JVA57-61		33,009.50						33,009.50			33,009.50
													-
													-
													-
													-
	รวมครั้งที่ 1		-	33,009.50	9,490.50	-	-	-	0.00	33,009.50	-	-	**33,009.50**

บันทึกรายการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลขที่ 2560 01 05 042 ตั้งแต่วันที่1 ตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2560

แหล่งทุน: เงินอุดหนุนทั่วไป เงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

ชื่อโครงการ : การสังเคราะห์และฤทธิ์ชีวภาพของอะมิโนสเตียรอยด์จากเพรกนินโนโลน

ชื่อหัวหน้าโครงการ: ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้างถึง	รายการรับ - จ่าย			รายรับ	รายจ่าย						รวม
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	ดอกเบี้ยรับ	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน				งบลงทุน	รายจ่าย
ครั้งที่ 2													
ว/ด/ป	ค่าจ้างเตรียมสารและทดสอบเชื้อ	4201-5		19,210.00					19210.00				19,210.00
													-
													-
													-
													-
													-
													-
													-
													-
	รวมครั้งที่ 2		-	19,210.00	- 19,210.00	-	-	-	19210.00	-	-	-	**19210.00**

ลงชื่อหัวหน้าโครงการ ..... วันที่ 30 กันยายน 2561