



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์และการประเมินฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์
ของสเตียรอยด์ออกซิมบางชนิด

Synthesis and Evaluation Cytotoxicity of Some Steroidal Oximes

นางสาวพัชนี เจริญยิ่ง

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์และการประเมินฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสเตียรอยด์ออกซิม
บางชนิด

แหล่งเงิน ประเภทงบประมาณแผ่นดิน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปีงบประมาณ 2560 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 300,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2559 ถึง 30 กันยายน 2560

หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมชนิดใหม่จากเพรกนินโนโลน 5 โดยการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง A ของเพรกนินโนโลน 5 นำไปสู่อะมิโนสเตียรอยด์ 38-43 และปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง D เป็นอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม ด้วยปฏิกิริยาออกซิมมีเนชัน อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50 ถูกนำมาประเมินฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของมนุษย์จำนวน 4 ชนิดได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cell line), เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Hepatocellular carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line) และเซลล์ไตลิงปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero) ด้วยวิธี MTT assay จากการทดลองพบว่า อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 46-50 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มีค่า IC_{50} ในช่วง 0.22-1.91 ไมโครโมล/มิลลิลิตร โดยเฉพาะสาร 50 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.22 ไมโครโมล/มิลลิลิตร

คำสำคัญ: เพรกนินโนโลน, สารอนุพันธ์, ความเป็นพิษต่อเซลล์

Research Title: Synthesis and Evaluation Cytotoxicity of Some Steroidal Oximes
Researcher: Asst. Professor Dr. Patchanee Charoenying
Faculty: Faculty of Science **Department:** Department of Chemistry

ABSTRACT

In this research, pregnenolone **5** was used as a starting material to develop new amino steroids. Ring-A modification of pregnenolone **5** resulted in the synthesis of amino derivatives **38-43**. The latter compounds underwent oximation reaction at ring -D to give the 3-amino-20-oxime pregnenolone derivatives **45-50**. The *in vitro* cytotoxicity of the 3-amino-20-oxime pregnenolone derivatives **45-50** was evaluated by MTT assay against four cancer cell lines namely human breast carcinoma cell line (MCF-7), oral human epidermal carcinoma cell line (KB), human hepatocellular carcinoma cell line (HepG-2), Human colon adenocarcinoma cell line (HT-29) and African green monkey kidney (Vero). The results indicated that compounds **46-50** exhibited significant cytotoxicity with IC_{50} values ranging from 0.22 to 1.91 $\mu\text{mol/mL}$. Most importantly compound **50** exhibited cytotoxicity against KB cancer cell line with a IC_{50} value of 0.22 $\mu\text{mol/mL}$.

Keywords: pregnenolone, derivatives, cytotoxicity

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามความตั้งใจในระดับหนึ่งด้วยการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเภททุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2560 ที่พิจารณาเห็นคุณค่าของงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้อความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้



พัชนี เจริญยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ III กองอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	3
1.5 กรอบแนวความคิดในการทำวิจัย	3
1.6 คำสำคัญของการวิจัย	5
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	7
2.2 ประเภทของสเตียรอยด์	8
2.3 สมบัติทางเคมีของสเตียรอยด์	9
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 การทดลองทั่วไป	13
3.2 วิธีการทดลอง	13
3.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบ	19
3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pregnenolone 5	21
4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	29
4.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ออกซิมสเตียรอยด์ 44-50 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50	34
4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของ Pregnenolone oxime 44 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50	40
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 38-43 จาก Pregnenolone 5	43
5.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 38-43	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการอ้างอิงเท่านั้น ไม่ควรนำเอกสารนี้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ IV ของอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.3 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซีม 45-50	44
5.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของ Pregnenolone oxime 44 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซีม 45-50	45
บรรณานุกรม	47
ประวัติผู้วิจัย	49
ผลงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่	50



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone 5 และอะมินอสเตียรอยด์ 38-43 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	30
4.2 ค่า IC ₅₀ Pregnenolone 5, และอะมินอสเตียรอยด์ 38-43	33
4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone 5, Pregnenolone oxime 44 และอะมินอสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50 ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	41
4.4 ค่า IC ₅₀ ของ Pregnenolone 5, Pregnenolone oxime 44 และอะมินอสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50	42
5.1 ผลได้ร้อยละของอะมินอสเตียรอยด์ 38-43 (คำนวณเทียบกับ Pregnenolone 5)	43
5.2 ผลได้ร้อยละของ Pregnenolone oxime 44 และอะมินอสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50 (คำนวณเทียบกับ Pregnenolone 5)	45

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างหลักของสเตียรอยด์	3
4.1 ผลของ Pregnenolone 5 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม	30
4.2 ผลของ Pregnenolone 5 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 เป็นชุดควบคุม	31
4.3 ผลของสาร 39 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม	31
4.4 ผลของสาร 39 ต่อเซลล์ HepG-2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG-2 เป็นชุดควบคุม	31
4.5 ผลของสาร 39 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 เป็นชุดควบคุม	32
4.6 ผลของสาร 40 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 เป็นชุดควบคุม	32
4.7 ผลของสาร 41 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 เป็นชุดควบคุม	32
4.8 ผลของสาร 42 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ KB เป็นชุดควบคุม	33
4.9 ผลของสาร 43 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ KB เป็นชุดควบคุม	33

รายการคำย่อและสัญลักษณ์

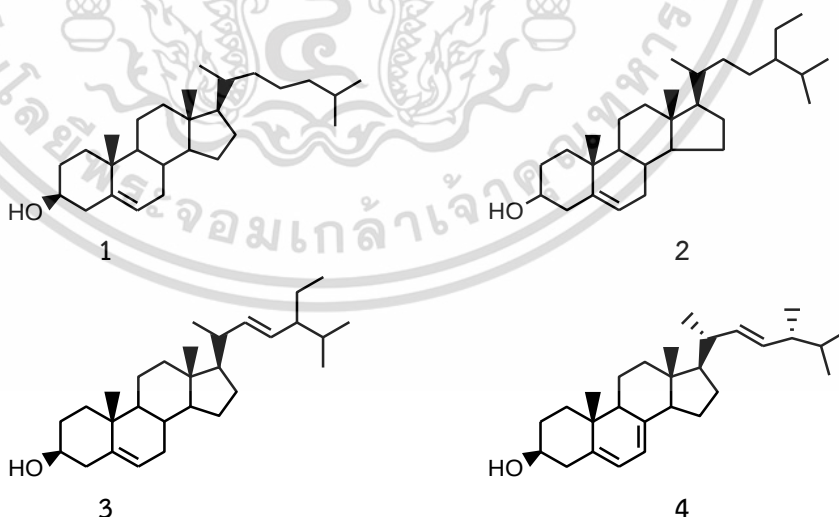
^{13}C NMR	^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
DCM	Dichloromethane
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ESMS	Electrospray Ionization Mass Spectroscopy
Hz	Hertz
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50%
IR	Infrared Spectroscopy
^1H NMR	^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
m/z	Mass to charge ratio
MIC	Minimum Inhibition Concentration
ppm	Part per million
R _f	Retardation factor
ν_{max} cm ⁻¹	Frequency maximum per centimeter
δ	Chemical shift
J	Coupling constant
$\mu\text{g/mL}$	Microgram per milliliter

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เป็นที่ยอมรับว่า สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Product) จำนวนมากที่ถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และมนุษย์ ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้านเช่น ด้านการแพทย์และด้านการเกษตร เป็นต้น เนื่องจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีสมบัติที่ดีทั้งทางเคมีและชีวภาพ และด้วยความเชื่อที่ว่าสารธรรมชาติมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมากกว่าสารสังเคราะห์ จึงทำให้เกิดการนำไปใช้อย่างกว้างขวาง ตัวอย่างของสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจได้แก่ แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ต่อมานักเคมีอินทรีย์ได้สนใจนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างและ/หรือหมู่ฟังก์ชันด้วยการทำปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์ ซึ่งการปรับเปลี่ยนในที่นี้หมายถึง การปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมี การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันด้วยรีเอเจนต์ที่เหมาะสม และความเฉพาะเจาะจงของสเตอริโอเคมีของหมู่ฟังก์ชันซึ่งจะนำไปสู่สมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารที่ดีมากยิ่งขึ้น ในปัจจุบันปรากฏรายงานการวิจัยจำนวนมากที่การศึกษาเกี่ยวกับสมบัติทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ใหม่ๆ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านั้น สเตียรอยด์ (Steroids) เป็นสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่งและจัดเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ เช่น Cholesterol 1 พบได้ในกล้ามเนื้อสมอง และเส้นประสาทไขสันหลัง Sitosterol 2 และ Stigmasterol 3 เป็น sterol ทั่วไปของพืช แยกได้จากน้ำมันข้าวโพด น้ำมันของข้าวสาลีกำลังออก น้ำมันของข้าวไรน์ที่กำลังออก น้ำมันเมล็ดฝ้าย เป็นต้น และ Ergosterol 4 พบได้ในยีสต์และเห็ด เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์และเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินดี เป็นต้น



จากงานวิจัยพบว่าสารกลุ่มสเตียรอยด์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้ในทางการแพทย์ เช่น รักษาโรคไขข้อ โรคหัวใจ บำรุงหัวใจ และเป็นส่วนผสมในยาคุมกำเนิดและถูกนำไปใช้ในการแก้ปัญหาประชากรที่เพิ่มขึ้น[1] แต่สเตียรอยด์บางชนิดเช่น Cholesterol 1 เป็นสเตียรอยด์ซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดไขมันอุดตันในเส้นเลือดซึ่งเป็นปัญหาต่อสุขภาพของมนุษย์อย่างมาก สเตียรอยด์

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ได้จากพืชธรรมชาติถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรค เช่น G-Strophanthin สกัดแยกได้จากเมล็ดของ *Strophanthus gratus* Baillon ใช้รักษาโรคหัวใจวายฉับพลัน Ruscogenin ได้จากต้น *Ruscus aculeatus* วงศ์ Liliaceae ใช้รักษาโรคจิตสัณฐานวิทยา Scillaren A ได้จากส่วนใบบนหัวใต้ดินของ *Urginea maritima* Baker วงศ์ Liliaceae ใช้เป็นยาขับเสมหะที่ออกฤทธิ์บำรุงหัวใจและมีฤทธิ์ขับปัสสาวะด้วย[2] สเตียรอยด์ยังเป็นฮอร์โมนของสัตว์เช่น โปรเจสเตอโรน (Progesterone) เป็นฮอร์โมนเพศหญิงสามารถฉีดให้ผู้ป่วยที่ขาดฮอร์โมนเพศหญิงได้ จะเห็นได้ว่าสเตียรอยด์เป็นสารที่มีสมบัติในทางชีวภาพที่ดีและเป็นสารที่มีอยู่ในธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมในระดับค่อนข้างสูง แต่เนื่องจากปริมาณของสเตียรอยด์ที่พืชหรือสัตว์สังเคราะห์ขึ้นมานั้นมีปริมาณน้อยมาก และถ้าสกัดส่วนต่างๆของพืชหรือสัตว์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อแยกสเตียรอยด์เป็นเรื่องที่ทำได้แต่อาจต้องใช้พืชหรือสัตว์ปริมาณมากและเป็นการนำไปสู่การส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมธรรมชาติและก่อปัญหาวิกฤติโลกร้อนโดยทางอ้อม

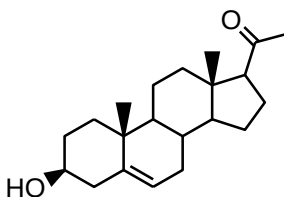
ด้วยเหตุนี้จึงปรากฏงานวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ในรูปแบบต่างๆ เพื่อที่จะนำไปใช้ศึกษาการออกฤทธิ์ในทางชีวภาพและพัฒนาเป็นยารักษาโรค จากความหลากหลายของหมู่ฟังก์ชันบนนิวเคลียสของสเตียรอยด์ ผู้วิจัยจึงมีแนวทางการคิดค้นที่จะสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสเตียรอยด์ที่มีโครงสร้างอย่างง่ายเพื่อเลียนแบบสเตียรอยด์ที่พบในธรรมชาติและนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยที่สเตียรอยด์สังเคราะห์ที่เตรียมได้จากการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันหลักๆ จะถูกนำไปศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งพบว่าสารกลุ่มนี้จึงเป็นที่สนใจอย่างมากกับนักวิจัยด้านเคมีอินทรีย์ที่นิยมการสังเคราะห์ และศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้าง (Structure-Activity Relationships, SAR) ของสเตียรอยด์สังเคราะห์กับฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ โดยการเลือกใช้สารเข้าทำปฏิกิริยาและเทคนิคในการสังเคราะห์ที่เหมาะสม
2. เพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์ออกซิมสเตียรอยด์
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์สังเคราะห์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์ออกซิมสเตียรอยด์โดยการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Pregnenolone 5 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 20 ให้เป็นหมู่ออกซิม และหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ให้เป็นหมู่อะมิโน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้เซลล์ไลน์ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cell line) เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Hepatocellular carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line) และเซลล์ไตลิงปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero) ด้วยวิธี MTT assay

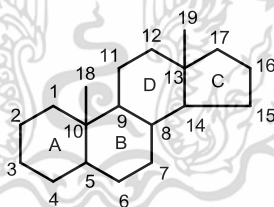
1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่โดยการดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันของ Pregnenolone 5 การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันได้แก่หมู่คีโตให้เป็นหมู่ออกซิเจน และเพิ่มหมู่อะมิโนที่สายโซ่ด้านข้างของ Pregnenolone 5

2. ทดสอบฤทธิ์ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์

1.5 กรอบแนวความคิดในการทำวิจัย

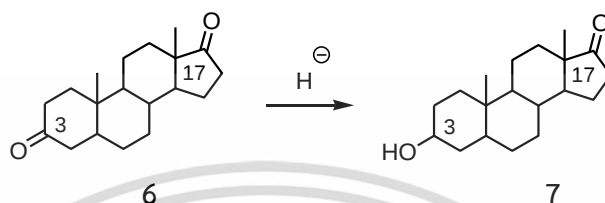
ในธรรมชาติมีสเตียรอยด์ที่ต่างกัันนับร้อยชนิดสามารถตรวจพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ การค้นพบสเตียรอยด์เริ่มจากการสกัดจากพืชหรือเนื้อเยื่อของสัตว์ด้วยอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม หรือ เบนซีน พบว่าสเตียรอยด์เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติคล้ายกับไขมันหรือเป็นของแข็ง สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์และไม่ละลายในน้ำ ความแตกต่างของสเตียรอยด์แต่ละชนิดจะแปรผันไปตามหมู่ฟังก์ชันที่ติดอยู่กับโครงสร้างหลัก สเตียรอยด์จัดเป็นอนุพันธ์ของสารที่มีโครงสร้างเป็นวงที่เรียกว่า Perhydrocyclopentanephenanthrene ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยม 3 วง คือ วง A วง B วง C และมีวงห้าเหลี่ยม 1 วง คือ วง D ที่เชื่อมต่อกัน



รูปที่ 1.1 โครงสร้างหลักของสเตียรอยด์

จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยมมาเชื่อมต่อกัน หมู่แทนที่ต่างๆ ที่มาเกาะจะเป็นหมู่ฟังก์ชันที่คล้ายคลึงกันมีคุณสมบัติทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว จึงทำให้สเตียรอยด์มีคุณสมบัติที่หลากหลาย นักเคมีได้ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะทางเคมีอินทรีย์ในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างเพื่อเป็นการนำไปสู่สเตียรอยด์ชนิดใหม่ และเป็นแนวทางในการสังเคราะห์สเตียรอยด์เลียนแบบธรรมชาติ โดยการเลือกใช้เอนไซม์หรือสารเข้าทำปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจง และควบคุมสภาวะที่เหมาะสมเพื่อจะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มากพอต่อการนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จากรายงานการวิจัยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างมักมุ่งเน้นไปที่หมู่ฟังก์ชันเป็นส่วนใหญ่ ที่ ring A และ ring B หรือหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง การเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้างสเตียรอยด์จะขึ้นกับตำแหน่งบนโครงสร้าง ลำดับความสำคัญในการเกิดปฏิกิริยารียงลำดับได้คือตำแหน่งคาร์บอนที่ 3, 11, 17 และ 20 ตัวอย่างเช่น ผลการทดลองจากปฏิกิริยาเพิ่มเข้าด้วยนิวคลีโอไฟล์ที่หมู่คาร์บอนิล เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

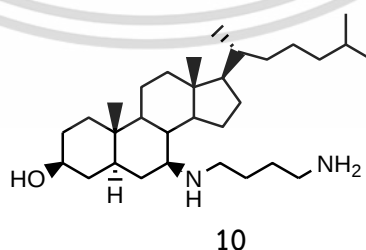
การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยไฮไดรด์ไอออน การเกิดคีทาล (ketal formation) และปฏิกิริยาการเพิ่มเข้าด้วยกรีนยาร์ตรีเอเจนต์ สามารถเรียงลำดับตำแหน่งที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาได้คือ $3 > 17 \geq 20 > 11$ เช่นความเฉพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ 5α -androstane-3,17-dione **6** เป็น 3-hydroxy- 5α -androstane-17-one **7** แสดงให้เห็นว่าคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 สามารถเกิดปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกว่าคาร์บอนตำแหน่งที่ 17[3]



สารกลุ่มสเตียรอยด์ที่ได้รับความสนใจในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันโดยใช้สารเคมี (Chemical transformation) ด้วยสารกลุ่มเอมีนและพอลิเอมีนรีเอเจนต์ที่มีความยาวของสายโซ่แตกต่างกัน แสดงตัวอย่างได้ดังนี้ จากงานวิจัยของ Savage และคณะ[4] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ triamine **8** และอนุพันธ์ออกซิมีน **9** ของกรดโคเลอิก พบว่าอนุพันธ์ทั้งสองมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์



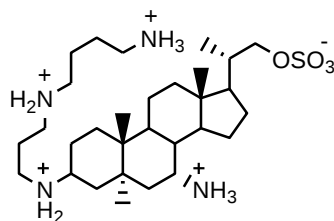
Loncle และคณะ[5] ได้ทำการสังเคราะห์ 7-amino และ polyaminosterol จาก 3β -acetoxy-7-keto- 5α -cholestane โดยทำปฏิกิริยา Reductive amination กับ $\text{Ti}(\text{OR})_4$ และ NaBH_4 ทำการกำจัดหมู่แอซิเตตด้วย K_2CO_3 ใน $\text{MeOH} : \text{CHCl}_3$ (1:1) พบว่าสาร **10** มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์และว่องไวในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ส่งผลคล้ายกับ *Staphylococcus aureus* และ *S. faecalis*



Khan และคณะ[6] ได้ทำการสังเคราะห์ 7α -Aminosteroids จาก 3-dioxolane-22-*tert*-butyldimethylsilyloxy-23,24-bisnor- 5α -cholan-7-one พบว่าสาร **11** ที่ได้มีคุณสมบัติใน

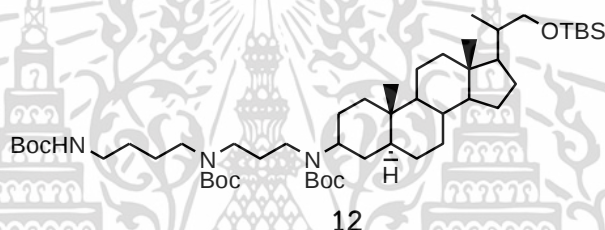
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes* 308A



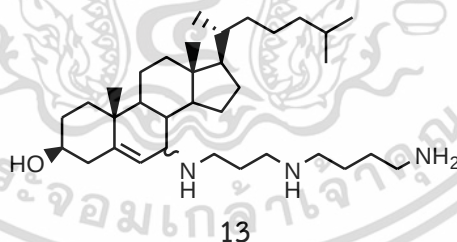
11

Kim และคณะ[7] ได้ทำการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 12 โดยการทำปฏิกิริยา amination ของ 3-ketosteroid ด้วยเอมีน ซึ่งวิธีการสังเคราะห์เป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจนำมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์ Squalamine อะมิโนสเตียรอยด์จากฉลามพันธุ์ dog fish ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ แกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา



12

Kihel และคณะ[8] ได้ทำการสังเคราะห์ spermidylcholesterol 13 และศึกษาฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์ทั้งนี้เพื่อพัฒนาต่อเป็นยาต้านเซลล์มะเร็ง



13

จากตัวอย่างการปรับเปลี่ยนโครงสร้างนี้จะได้อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลายมากยิ่งขึ้นและเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสเตียรอยด์เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนั้นยังสามารถนำสเตียรอยด์สังเคราะห์เหล่านี้ไปเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้อีกหรือพัฒนาเป็นส่วนผสมหรือตัวยาในการรักษาโรคได้

1.6 คำสำคัญของการวิจัย

เพรกนินโนโลน (Pregnenolone)

สารอนุพันธ์ (Derivatives)

ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสังเคราะห์สเต็มเซลล์ชนิดใหม่ได้ ซึ่งสเต็มเซลล์สังเคราะห์เหล่านี้อาจแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์
2. สามารถทราบถึงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสเต็มเซลล์สังเคราะห์
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาเพื่อผลิตส่วนผสมของยาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ศึกษาเพื่อเป็นการนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์



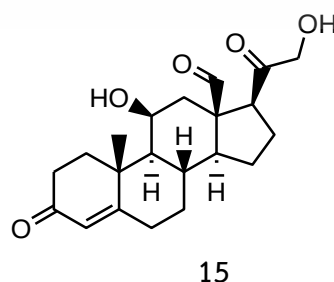
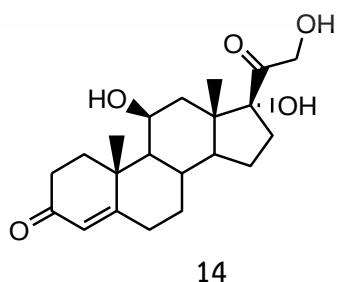
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยวงแหวนสี่เหลี่ยมและห้าเหลี่ยมมาเชื่อมต่อกัน หมู่แทนที่ต่างๆ ที่มาเกาะหรือหมู่ฟังก์ชันจะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน นักเคมีได้ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะทางเคมีอินทรีย์ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างและ/หรือหมู่ฟังก์ชันซึ่งจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะเป็นการนำไปสู่การสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ โดยการเลือกใช้สารที่เข้าทำปฏิกิริยา (reagent) และสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม รวมทั้งชนิด จำนวน ตำแหน่งและสเตอริโอเคมีของหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้างก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจในการสังเคราะห์ ซึ่งจะเป็นผลดีอย่างมากถ้าพบว่า สเตียรอยด์สังเคราะห์นั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไปด้วย สเตียรอยด์ที่เป็นต้นแบบชนิดแรกคือ Cholesterol 1 จัดเป็นได้ทั้งสเตียรอยด์ ลิพิด และแอลกอฮอล์ พบในเยื่อหุ้มเซลล์ของทุกเนื้อเยื่อในร่างกายและถูกขนส่งในกระแสเลือดของสัตว์ Cholesterol 1 ส่วนใหญ่ไม่ได้มาจากอาหารแต่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกายจะสะสมอยู่มากในเนื้อเยื่อของอวัยวะที่สร้างมันขึ้นมาเช่น ตับ ไชสันหลัง (spinal cord) สมองและผนังหลอดเลือด (atheroma) Cholesterol 1 มีบทบาทในกระบวนการทางชีวเคมีมากมาย แต่ที่รู้จักกันดีคือ เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจและระบบหลอดเลือด (cardiovascular disease) และภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (Hypercholesterolemia)[9] สเตียรอยด์ที่ถูกจัดเป็นฮอร์โมนส่วนใหญ่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก Cholesterol 1 โดยกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพซึ่งมีเอนไซม์ที่แตกต่างกันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าในแต่ละวันร่างกายจะผลิตสเตียรอยด์ขึ้น 20 ถึง 30 หน่วย เพื่อควบคุมฮอร์โมนต่างๆในร่างกายและกดภูมิคุ้มกันให้สมดุล รักษาความสมดุลของเกลือแร่ อิเล็กโทรไลต์และน้ำ โดยใช้ Cholesterol 1 เป็นสารตั้งต้นในการผลิต สเตียรอยด์จะถูกผลิตขึ้นทุกเช้าหลังจากการนอนหลับพักผ่อนมาจนเต็มที่แล้วสมองจะสั่งการผลิตฮอร์โมนสเตียรอยด์โดยต่อมหมวกไตจะนำ Cholesterol 1 มาเปลี่ยนเป็นสเตียรอยด์ตัวอื่นๆ โครงสร้างหลักมีอยู่ 2 ชนิดคือ Cortisol 14 มีประโยชน์ในการบรรเทาอาการอักเสบ ควบคุมสมดุลของเกลือแร่และน้ำ รวมถึงเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน อีกชนิดคือ Aldosterone 15 ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลเกลือแร่ในร่างกาย แต่ถ้ามี Aldosterone 15 หลังออกมามากเกินไปจะทำให้ร่างกายขับโพแทสเซียมออกมา กล้ามเนื้ออ่อนแรงและทำให้มีความดันโลหิตสูงได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ประเภทของสเตียรอยด์[10]

สเตียรอยด์แบ่งประเภทโดยอาศัยฤทธิ์ทางสรีระ (Physiological activities) และลักษณะโครงสร้างทั่วไปได้ 6 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

2.2.1 Sterols

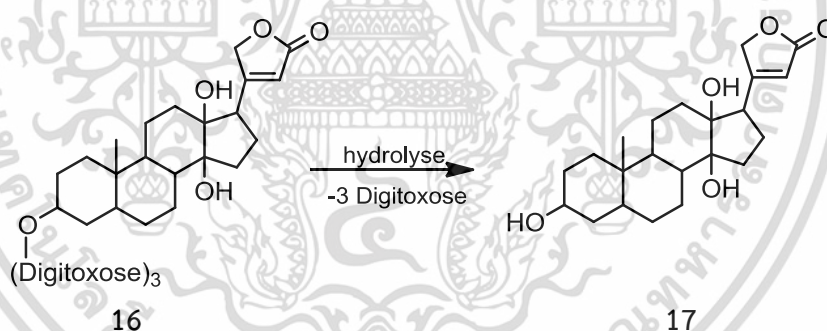
Sterols คือ สเตียรอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เช่น Cholesterol **1**

2.2.2 Vitamin D Precursors

Vitamin D Precursors คือ สเตียรอยด์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในกระดูก ถ้าร่างกายของมนุษย์ขาดสารกลุ่มนี้จะส่งผลกระทบต่อกระดูก โดยสารสเตียรอยด์กลุ่มนี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเมื่อถูกเร่งด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นส่วนใหญ่แล้วให้วิตามิน D

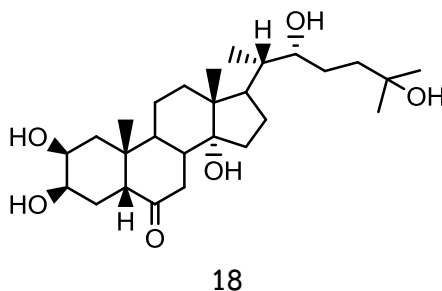
2.2.3 Glycosides ของ sterols

Glycosides ของ sterols คือ สเตียรอยด์ที่ได้จากการเชื่อมต่อบน Glycosidic linkage (Ether linkage) ระหว่างสเตียรอยด์ (Cholesterol **1** และ Phytosterol อื่นๆ) กับน้ำตาลชนิดต่างๆ จำนวนหนึ่งหรือหลายโมเลกุล ดังนั้น Steroidal glycosides จึงมีโครงสร้างตั้งแต่ง่ายไปจนถึงโครงสร้างที่ซับซ้อนโดยขึ้นกับชนิดและจำนวนน้ำตาลโมเลกุล สารกลุ่มนี้จะละลายน้ำได้ดี เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอื่น เช่น กลุ่มฟีนอลิก ดังตัวอย่างการไฮโดรไลซิส Digoxcin **16** เป็น Digoxigenin **17**



2.2.4 สารกลุ่ม Ecdysones

Ecdysone **18** เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบของตัวอ่อนแมลง (insect moulting hormone) Ecdysone สกัดแยกได้ครั้งแรกจากดักแด้ของตัวไหมชื่อ *Bombyx mori* สารกลุ่มนี้ยังพบในพืชชั้นสูงอีกด้วย Ecdysone มีโครงสร้างดังนี้

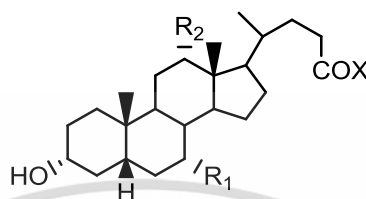


18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 Bile acids และ alcohols

สารสองกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กันแต่ที่มีผลทางชีวภาพ คือ Bile acids **19** หรือ **20** โดยมักจะอยู่ในรูปสารประกอบเอไมด์ ที่เกิดจากการเชื่อมต่อนระหว่าง Bile acids กับ Glycine ได้สารผลิตภัณฑ์คือ สาร **21** และ Bile acids กับ Taurine ได้สารผลิตภัณฑ์คือ สาร **22** ดังโครงสร้างต่อไปนี้



19, 20 ; $R_1 R_2 = \text{H or OH}$

21; $X = -\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COONa}$

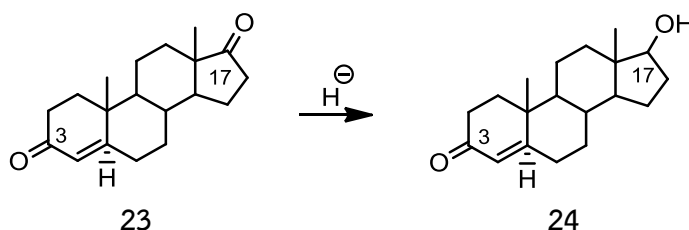
22; $X = -\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COONa}$

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 **5**

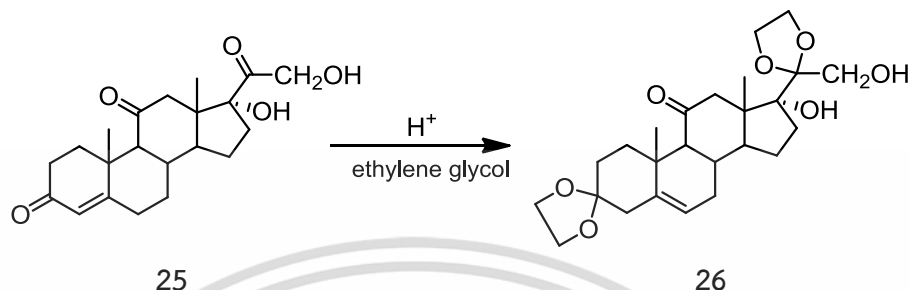
2.3 สมบัติทางเคมีของสเตียรอยด์[3]

การเกิดปฏิกิริยาเคมีที่จะทราบถึงการกำหนดทิศทางการเข้าทำปฏิกิริยา (Regioselectivity) และการเลือกทำปฏิกิริยาที่มีสเตอริโอเคมีแน่นอน (Stereoselectivity) จำเป็นต้องศึกษาจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจริงในการทดลอง การเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้างสเตียรอยด์จะขึ้นกับตำแหน่งบนโครงสร้าง ลำดับความสำคัญของตำแหน่งคาร์บอนอะตอมในการเกิดปฏิกิริยาคือ 3, 11, 17 และ 20 เช่นถ้ามีความไม่อิ่มตัวของโครงสร้างในลักษณะมีพันธะคู่อยู่ที่ตำแหน่ง α และ β (α, β -Unsaturation) จะลดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน แต่ไม่รวมถึงการเกิดคีทาล (ketal) เช่นการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ androst-4-ene-3, 17-dione **23** ที่ตำแหน่งที่ 17 ให้ Testosterone **24**

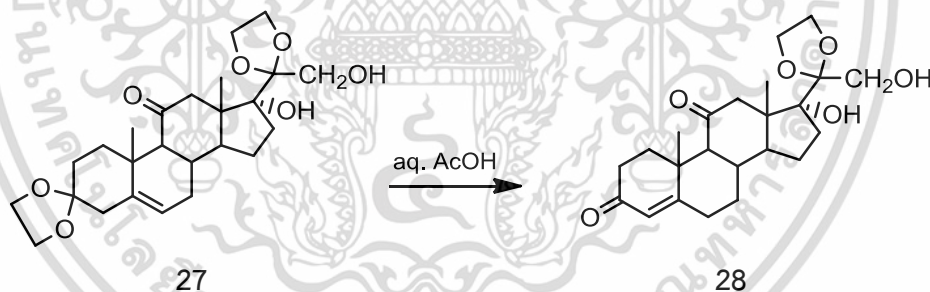


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

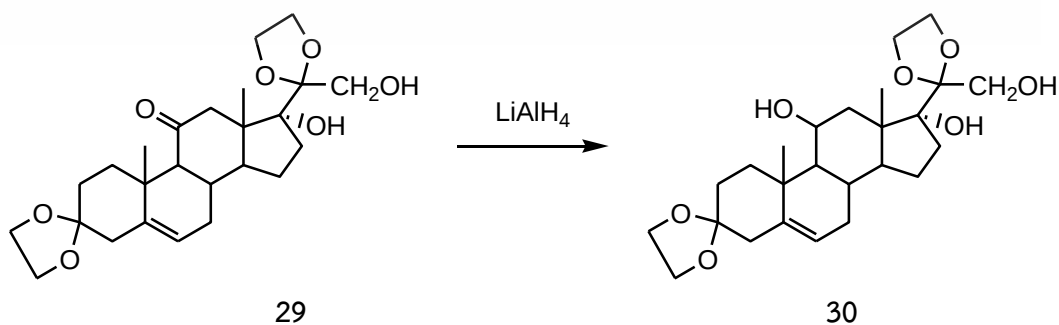
ปฏิกิริยาการเกิดคีทาล (ketal) เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการป้องกันหมู่คาร์บอนิล เช่น ปฏิกิริยาของ Cortisone 25 กับ ethylene glycol ในสภาวะกรดสามารถป้องกันหมู่คาร์บอนิลได้ 2 หมู่ คือตำแหน่งที่ 3 และ 20 ได้สาร 26 จะเห็นว่าหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 3 และ 20 สามารถเกิดปฏิกิริยาดีกว่าหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 11



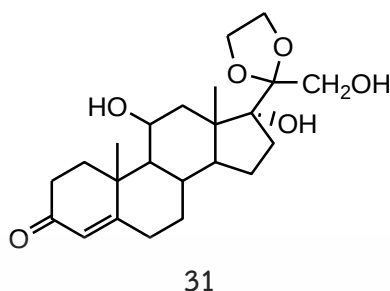
โครงสร้างของสาร 27 ประกอบด้วยหมู่คีทาล (ketal) 2 หมู่ เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสภาวะกรดได้สาร 28 ที่มีหมู่คีทาลเพียง 1 หมู่ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้มากกว่าที่ตำแหน่งที่ 20 สรุปได้ว่าคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยามากที่สุด Cortisone 28 เป็นสารที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 4 จากโครงสร้างที่คาร์บอนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะคู่สามารถเพิ่มความเสถียรโดยมีระบบคอนจูเกตกับหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 3 เมื่อหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 3 เปลี่ยนเป็นคีทาลจะทำให้ระบบคอนจูเกตเสียไป ส่งผลให้เกิดไอโซเมอร์ที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 5 และ 6 ของสาร 27 หลังจากนั้นสามารถเกิดพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 4 และ 5 ได้สาร 28



เมื่อนำ สาร 29 ทำปฏิกิริยารีดักชันกับ $LiAlH_4$ (Lithium aluminium hydride) จะเกิดปฏิกิริยาที่หมู่คาร์บอนิลตำแหน่งที่ 11 เปลี่ยนเป็นหมู่ไฮดรอกซิลได้สาร 30

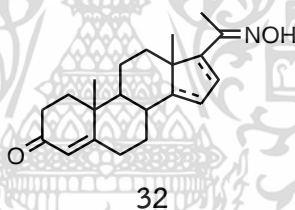


และเมื่อนำสาร 30 มาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสภาวะกรดจะเกิดการถอดหมู่แอเซตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ออก ให้สารผลิตภัณฑ์ Hydrocortisone 31

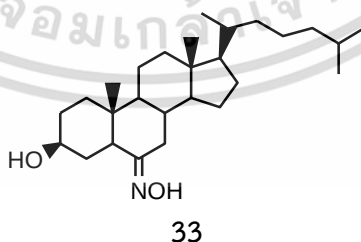


2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

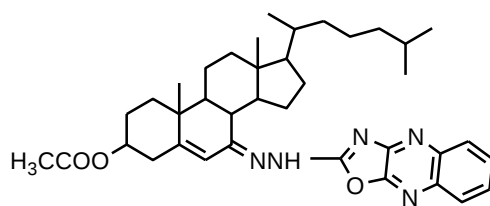
แนวทางการสังเคราะห์ออกซิมสเตียรอยด์และผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ถูกกล่าวถึงโดย Hartmann และคณะ[11] ได้สังเคราะห์ออกซิมสเตียรอยด์จากสเตียรอยด์โพเจสเตอโลน โดยการทำการเปลี่ยนหมู่คีโตที่คาร์บอนตำแหน่ง 20 เป็นหมู่ออกซิม พบว่าออกซิมสเตียรอยด์ 32 สามารถยับยั้ง P-450 17(17 α -hydroxylase/C17-20-Lyase และ 5 α -reductase types 1 และ 2 ได้



Zhou และคณะ[12] ได้สังเคราะห์ออกซิมสเตียรอยด์ 33 จากคลอเลสเทอรอล 1 พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ Sk-Hep-1 (Human liver carcinoma cell line) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 39.5 ไมโครโมล/มิลลิลิตร

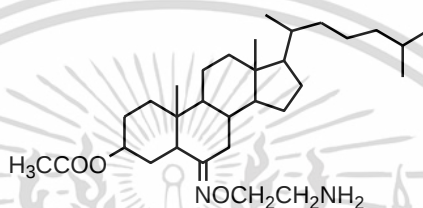


Khan และคณะ[13] ได้สังเคราะห์ steroidal oxazolo quinoxaline 34 โดยพัฒนาโครงสร้างจากออกซิมสเตียรอยด์ของคลอเลสเทอรอล 1 พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก *S. aureus* และ *S. pyogenes* และแกรมลบ *S. typhimurium* และ *E. coli* มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.78, 0.52, 0.47 และ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ



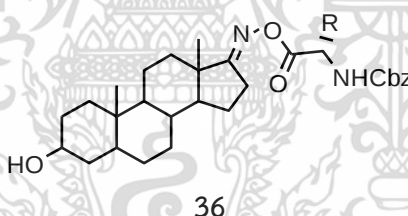
34

Khan และคณะ[14] สังเคราะห์ oxime ether **35** จากคลอเลสเทอรอล **1** พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก *S. aureus* และ *S. pyogenes* และแกรมลบ *S. typhimurium* และ *E. coli* มีค่า MIC เท่ากับ 32, 64, 64 และ 128 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ



35

Katrizky และคณะ[15] พัฒนาโครงสร้างของออกซิมสเตียรอยด์โดยการติดหมู่ *N*-protected amino acids เช่น สาร **36** ซึ่งยังไม่มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพ



36

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การทดลองทั่วไป

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

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

สารเคมีที่ใช้เป็นสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ในการสังเคราะห์เป็นเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Fluka และ Aldrich ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography ทำให้ปรากฏบนแผ่น aluminium sheet silica gel F₂₅₄ Merck ตรวจสอบจุดของสารผลิตภัณฑ์ด้วยการดูกลิ่นแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และ/หรือโดยการย้อมด้วย anisaldehyde reagent แล้วให้ความร้อนบนแผ่น TLC บนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

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

สเปกตรัม ¹H NMR และ ¹³C NMR บันทึกโดยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกะเฮิร์ต การเตรียมสารตัวอย่าง จะทำการละลายโดยใช้ตัวทำละลาย CDCl₃ และ CD₃OD จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ CHCl₃ ที่ δ 7.25 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹H NMR และที่ δ 77.5 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹³C NMR

จุดหลอมเหลวบันทึกโดยเครื่องหาจุดหลอมเหลว GALLEKAMP SANYO

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

แมสสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ Finnigan LC-Q MS detector ด้วยเทคนิค Electrospray จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 38-43

แนวทางการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ โดยใช้ Pregnenolone 5 เป็นสารตั้งต้น แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

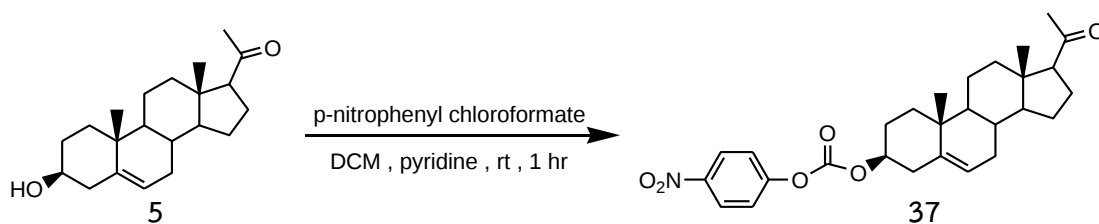
ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone 5 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3

เป็นหมู่หลุดออกโดยใช้รีเอเจนต์คือ *p*-nitrophenyl chloroformate[16]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนภาพที่ 3.1



1. ชั่ง Pregnenolone 5 300.0 มิลลิกรัม (0.95 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลมซึ่งภายในมีแม่เหล็กอยู่ ซึ่งวางอยู่บนเครื่องปั่นกววน จากนั้นเติม DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกววน จนกระทั่ง Pregnenolone 5 ละลายหมด

2. ชั่ง *p*-nitrophenyl chloroformate 248.9 มิลลิกรัม (1.23 มิลลิโมล) แล้วใส่ลงไปในขวดก้นกลมในข้อ 1 ทำการปั่นกววน จากนั้นเติม pyridine 1.5 มิลลิลิตร และทำการปั่นกววนที่อุณหภูมิห้อง

3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทึนเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ Pregnenolone 5 สังเกตการเกิดปฏิกิริยาโดยพิจารณาจุดของสารตั้งต้นเจือจางมากที่สุดแล้วไม่มีการเปลี่ยนแปลง

4. หยุดการปั่นกววน และนำสารที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะได้ของผสมเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน

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

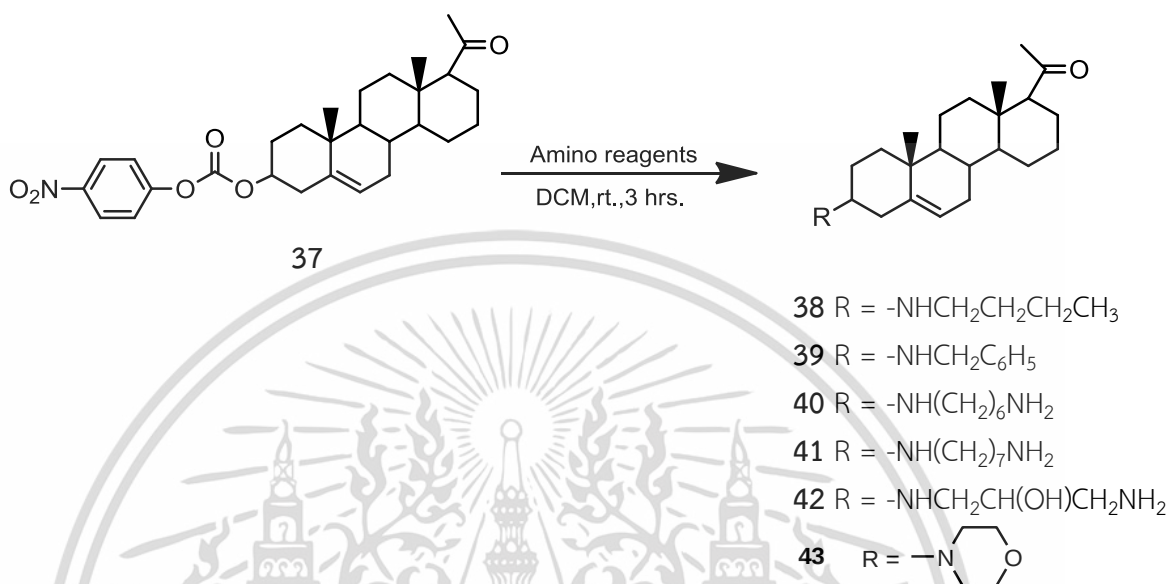
6. ตรวจสอบสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทึนเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เป็น 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารตั้งพิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R_f เดียวกัน การดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และการให้สีกับ anisaldehyde reagent สีเดียวกันให้เก็บรวมไว้ด้วยกันในขวดก้นกลม

7. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดก้นกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. นำสารผลิตภัณฑ์มาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

ขั้นตอนที่ 2 สังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **37** และอะมิโนรีเอเจนต์

แผนภาพที่ 3.2



1. ละลาย 4-nitrophenyl pregnenolonecarbonate **37** จากขั้นตอนที่ 1 ใน DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งละลายหมด
2. เติม *n*-butylamine 165.8 มิลลิลิตร (1.23 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิห้อง และทำการปั่นกวต่อที่อุณหภูมิห้อง
3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี ทุก 1 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **37** จนกระทั่งจุดของสารผลิตภัณฑ์หรือสารข้างเคียงเกิดขึ้น
4. หยุดการปั่นกว และนำของผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ
5. ละลายของผสมด้วย ethyl acetate เทใส่กรวยแยกทำการสกัดล้างด้วยน้ำ 30 x 2 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง
6. นำของผสมสกัดล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว 30 มิลลิลิตร เก็บชั้นสารละลาย ethyl acetate แล้วนำมาเติมโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำเพื่อทำการดูดน้ำ
7. กรองแยกชั้น ethyl acetate และโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำออกจากกัน และนำชั้นสารละลาย ethyl acetate ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารผลิตภัณฑ์คล้ายน้ำมันสีเหลือง
8. ทำการแยกสารผลิตภัณฑ์ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยสารละลายที่ใช้เป็นสารละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate โดยที่ผลรวมของอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 100 เริ่มต้นจากสารละลายไม่มีขั้วคือ hexane : ethyl acetate เป็น 100 : 0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วค่อยๆ เพิ่มส่วนของสารละลาย 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 acetate เป็น 7 : 3 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารตั้งต้น พิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R_f เดียวกัน การดูกลิ่นรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และการให้สีกับ anisaldehyde reagent สีเดียวกันให้เก็บรวมไว้ด้วยกันในขวดกันกลม

10. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดกันกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

11. นำของแข็งที่ได้จากระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศมาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

12. นำสารผลิตภัณฑ์ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

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

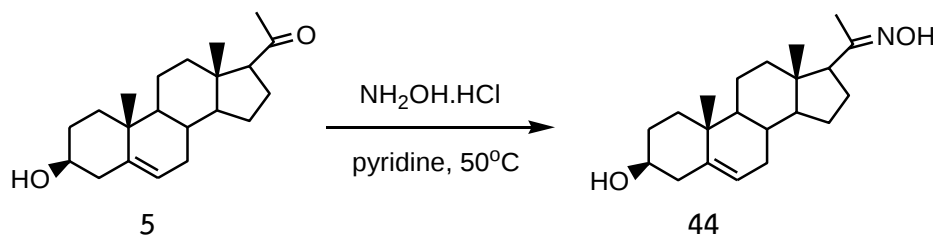
อะมิโนรีเอเจนต์	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
benzylamine	145.5
1,6-diaminohexane	143.5
1,7-diaminoheptane	160.8
1,3-diamino-2-propanol	111.3
morpholine	107.6

หมายเหตุ ในการสังเคราะห์สาร 38-43 จะไม่มีการแยก 4-nitrophenylpregnenolone carbonate 37 ในรูปสารบริสุทธิ์ การทำปฏิกิริยาจะทำแบบปฏิกิริยา one pot โดยการเติม nucleophilic reagent ซึ่งในที่นี้หมายถึงอะมิโนรีเอเจนต์ และพิจารณาการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

3.2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ออกซิมีของ Pregnenolone 5 [17]

การสังเคราะห์อนุพันธ์ออกซิมีของ Pregnenolone 5 แสดงในแผนภาพที่ 3.3

แผนภาพที่ 3.3



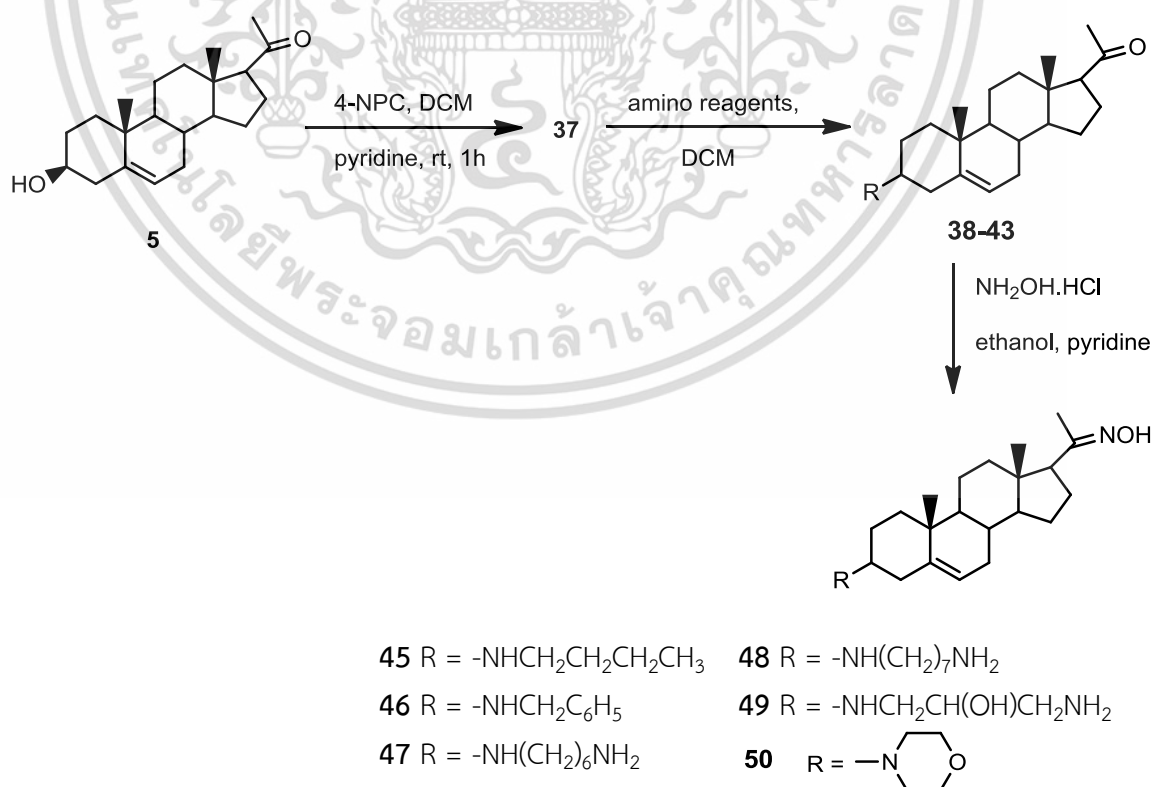
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ชั่ง Pregnenolone 5 500.0 มิลลิกรัม (1.58 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยเอทานอล 10 มิลลิลิตร และ pyridine 10 มิลลิลิตร
2. เติม hydroxylamine hydrochloride 131.7 มิลลิกรัม (1.20 มิลลิโมล) ลงในสารละลายของ Pregnenolone 5 ในข้อ 1 และทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และทำการปั่นกวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. ทดสอบการดำเนินของปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4
4. หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารผลิตภัณฑ์ 44 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว
5. นำสารผลิตภัณฑ์ 44 ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ระบบของตัวชะสารคือ hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 90 : 10

3.2.3 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50

เนื่องการเปลี่ยนอะมิโนสเตียรอยด์ให้เป็นอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม โดยการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 37 มาทำให้เป็นสารบริสุทธิ์ แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับอะมิโนรีเอเจนต์นั้น พบว่าได้เปอร์เซ็นต์สารผลิตภัณฑ์สุดท้ายในปริมาณที่น้อยมาก ในการทดลองต่อไปนี้จะทำการทดลองแบบ one pot reaction ทำโดยไม่มีการแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน

แผนภาพที่ 3.4



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ชั่ง Pregnenolone 5 300.0 มิลลิกรัม (0.95 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลมซึ่งภายในมีแท่งแม่เหล็กอยู่ ซึ่งวางอยู่บนเครื่องปั่นกวน จากนั้นเติม DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวน จนกระทั่ง Pregnenolone 5 ละลายหมด
2. ชั่ง 4-nitrophenyl chloroformate 248.9 มิลลิกรัม (1.23 มิลลิโมล) แล้วใส่ลงไปในขวดก้นกลมในข้อ 1 ทำการปั่นกวน จากนั้นเติม pyridine 1.5 มิลลิลิตร และทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้อง
3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ Pregnenolone 5 สังเกตการเกิดปฏิกิริยาโดยพิจารณาจุดของสารตั้งต้นเจือจางมากที่สุดแล้วไม่มีการเปลี่ยนแปลง
4. เติม *n*-butylamine 165.8 มิลลิกรัม (1.23 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิห้อง และทำการปั่นกวนต่อที่อุณหภูมิห้อง
5. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ทุก 1 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เป็น 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 37 จนกระทั่งจุดของ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 37 จางมากที่สุด พร้อมกับมีการเกิดจุดของสารผลิตภัณฑ์หรือสารข้างเคียงเกิดขึ้น
6. หยุดการปั่นกวน และนำของผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ
7. สภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ 45-50 ใช้ภายใต้สภาวะเดียวกับการสังเคราะห์สาร 44
8. ละลายสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 6. ด้วยเอทานอล 10 มิลลิลิตร และ pyridine 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติม hydroxylamine hydrochloride 131.7 มิลลิกรัม (1.20 มิลลิโมล) ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และทำการปั่นกวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
9. ทดสอบการดำเนินของปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4
10. หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารผลิตภัณฑ์ 45-50 มีลักษณะเป็นกึ่งของแข็งสีเหลือง
11. นำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ระบบของตัวชะสารคือ hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 90 : 10
12. เริ่มทำการสังเคราะห์ใหม่ตั้งแต่ข้อ 1 ถึง 11 โดยเปลี่ยนอะมิโนรีเอเจนต์ในข้อ 2 จาก *n*-butylamine เป็นอะมิโนรีเอเจนต์ดังต่อไปนี้

อะมิโนรีเอเจนต์	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
benzylamine	145.5
1,6-diaminohexane	143.5
1,7-diaminoheptane	160.8
1,3-diamino-2-propanol	111.3
morpholine	107.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบ

1. เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line)
2. เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Human hepatocellular carcinoma cell line)
3. เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line)
4. เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line)
5. เซลล์ปกติจากไตของลิงชนิด Vero (African green monkey kidney)

3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

อะมิโนสเตียรอยด์ 38-50 ถูกส่งไปทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay[18] 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 และใส่ขวดแก้วที่ปลอดเชื้อ หุ้มขวดแก้วด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟอยด์เพื่อป้องกันแสงและเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
3. เตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆ ที่ต้องการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 โดยเจือจางเป็นสองเท่า (two-fold dilution) ได้แก่ความเข้มข้น 1,000, 500, 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
4. ปลุกเซลล์ไลน์ MCF-7 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในงานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทดสอบ 3 ซ้ำ นำงานเพาะเลี้ยงที่ปลุกเซลล์แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. นำงานเพาะเลี้ยงเซลล์ออกจากตู้บ่ม และดูดอาหารออกจากหลุมให้หมด จากนั้นเติมสารตัวอย่างความเข้มข้นที่กำหนด (กลุ่มควบคุมเป็น 2 กลุ่ม คือ แถวที่ 1 คือความเข้มข้นของ DMSO เจือจางกับอาหาร DMEM และแถวที่ 2 คือเซลล์ปกติซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. เมื่อบ่มเซลล์ในสารตัวอย่างครบ 24 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 5 มิลลิลิตร 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. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครไทดเตอร์ เพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่นของแผ่นกรองแสงเท่ากับ 570 นาโนเมตร
9. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 38-50 เปรียบเทียบกับตัวยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vinblastine sulfate salt และ ยาปฏิชีวนะ Mitomycin C

10. คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของแต่ละความเข้มข้นดังนี้ คือ

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

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ไลน์ในสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น

หมายเหตุ

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



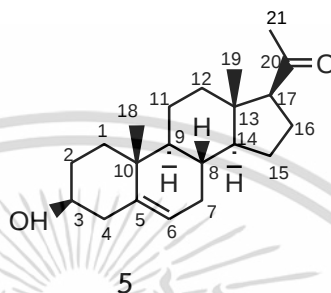
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pregnenolone 5

สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นคือ Pregnenolone 5 ทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR ได้ผลดังต่อไปนี้

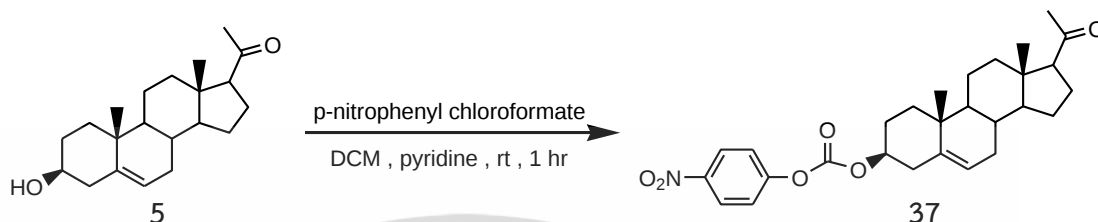


Szendil และคณะ [19] ได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างของ Pregnenolone 5 โดยเทคนิคนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่าสัญญาณ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ 1.84 และ 1.08 (2H, H-1), 1.84 และ 1.48 (2H, H-2), 3.54 (1H, H-3), 2.27 (2H, H-4), 5.34 (1H, H-6), 1.97 และ 1.57 (2H, H-7), 1.46 (1H, H-8), 0.98 (1H, H-9), 1.62 และ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

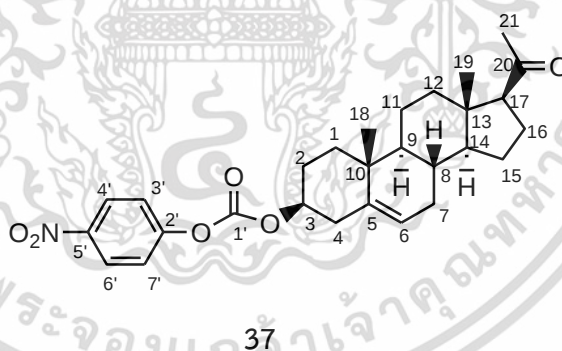
4.1.1 การสังเคราะห์ 4-Nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 37

การสังเคราะห์เริ่มจากหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ Pregnenolone 5 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 37 สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 2945 (C-H stretch ของหมู่ CH_2 และ CH_3), 1762 (C=O stretch ของหมู่คาร์บอนेट), 1702 (C=O stretch ของหมู่คีโต), 1524-1491 (C=C stretch ของแอโรมาติก) และ 1254-1216 (C-O stretch)



สเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 37 พบสัญญาณที่ ^1H NMR δ 4.64 (1H, m, H-3), 2.19 (2H, d, H-4), 5.44 (1H, d, H-6), 2.55 (1H, t, H-17), 0.65 (3H, s, H-18), 1.06 (3H, s, H-19), 2.14 (3H, s, H-21), 7.39 (2H, d, $J_{3',4'} = 7.1$ Hz, H-3' และ H-7'), 8.29 (2H, d, $J_{4',3'} = 7.1$ Hz, H-4' และ H-6') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.09 ถึง 1.16 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัมของ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 37 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

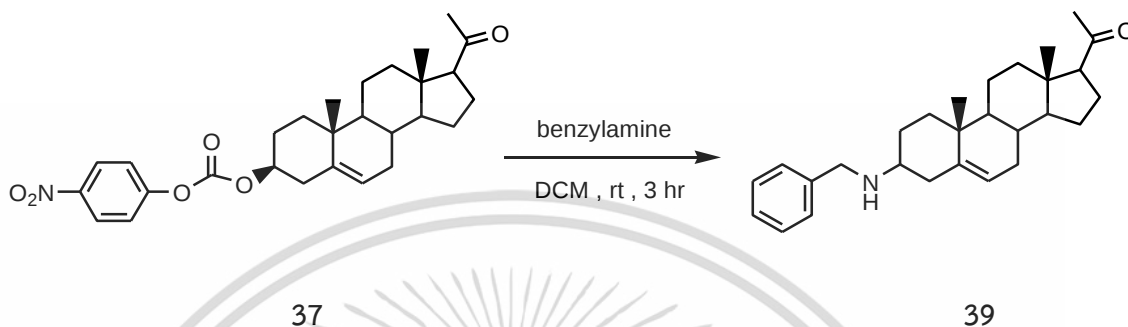
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

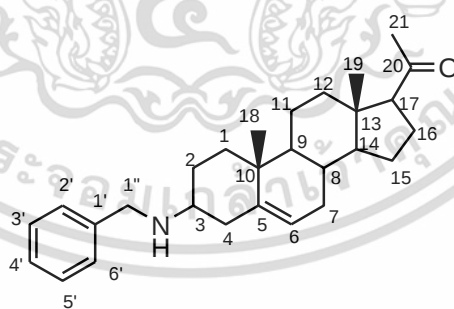
4.1.3 สารสังเคราะห์ 3-(1-aminobenzyl)-pregn-5-en-20-one 39

สาร 39 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 37 ทำปฏิกิริยากับ benzylamine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.3



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 มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 43.50 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 5) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3363 (N-H stretch ของเอมีน), 2936 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1453 (CH_2 bend) และ 1357 (CH_3 bend)



39

สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 39 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 multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 39 พบสัญญาณที่ δ 74.1 (C-3), 139.8 (C-5), 122.1 (C-6), 49.8 (C-9), 21.0 (C-

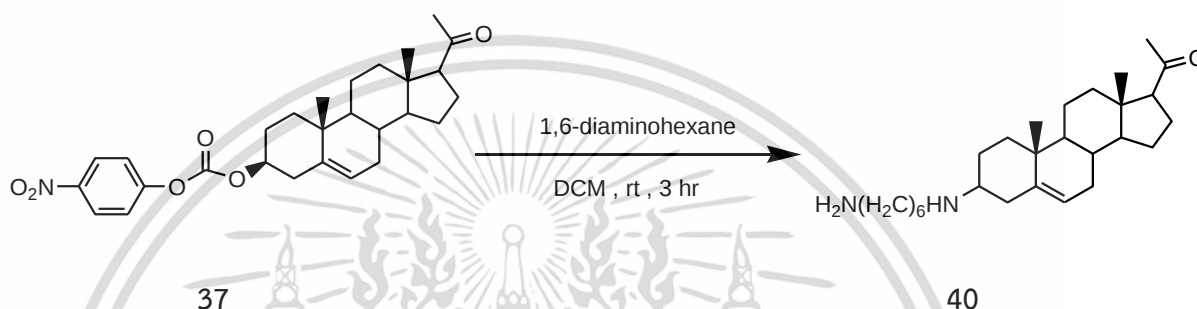
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

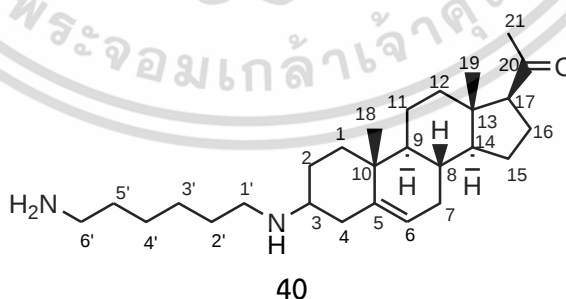
4.1.4 การสังเคราะห์ 3-(1,6-Diaminohexyl)-pregn-5-en-20-one 40

สาร 40 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 37 ทำปฏิกิริยากับ 1,6-diaminohexane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.4



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.38 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 84 : 16 ได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 92-95 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 12.13 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 5) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3362 (N-H stretch ของ เอมีน), 2936 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1453 (CH_2 bend) และ 1357 (CH_3 bend)



สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 40 พบสัญญาณที่ δ 3.15 (1H, m, H-3), 5.36 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.34 ถึง 1.11 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 40 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานภายในเท่านั้น เมื่อเผยแพร่ให้คนอื่นใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

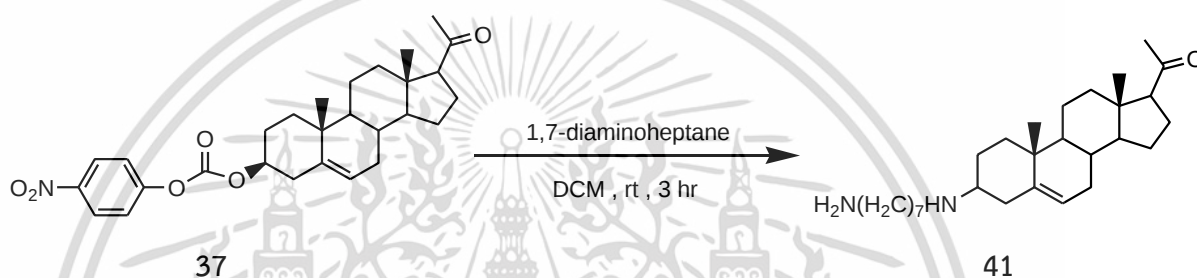
(C-19), 209.62 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 49.4 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

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

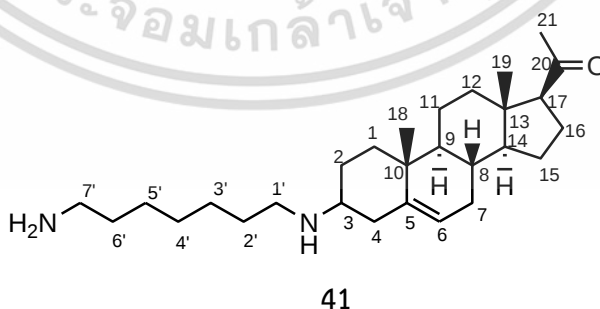
4.1.5 การสังเคราะห์ 3-(1,7-Diaminoheptyl)-pregn-5-en-20-one 41

สาร 41 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 37 ทำปฏิกิริยากับ 1,7-diaminoheptane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.5



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.36 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 87 : 13 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 175-178 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 18.74 (คำนวณเทียบกับ Pregnenolone 5) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3359 (N-H stretch ของ เอมีน), 2927 (C-H stretch ของ CH_2), 2852 (C-H stretch ของ CH_3), 1698 (C=O stretch), 1455 (CH_3 bend) และ 1357 (CH_2 bend)



สเปกตรัม 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร 41 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 41 พบสัญญาณที่ δ 73.1 (C-3),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

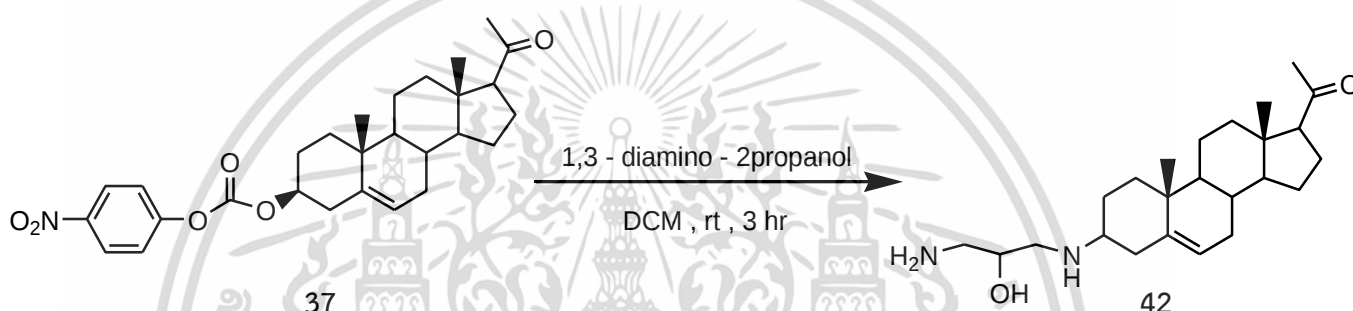
138.9 (C-5), 121.1 (C-6), 48.9 (C-9), 55.8 (C-14), 62.7 (C-17), 12.2 (C-18), 18.3 (C-19), 208.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 42.9 ถึง 20.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

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

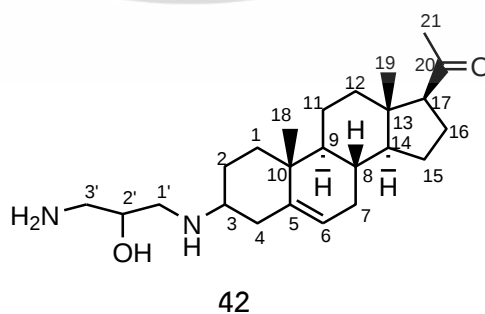
4.1.6 การสังเคราะห์ 3-(1,3-Diaminopropyl-2-ol)-pregn-5-en-20-one 42

สาร 42 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 37 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diamino-2-propanol โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.6



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.07 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 70 : 30 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 103-106 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 29.57 (คำนวณเทียบกับ Pregnenolone 5) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปข้อมูลได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3379 (N-H และ O-H stretch ของ เอมีน และ แอลกอฮอล์), 2918 (C-H stretch ของ CH_2), 2845 (C-H stretch ของ CH_3), 1698 (C=O stretch) และ 1384 (CH_3 bend)



สเปกตรัม 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร 42 พบสัญญาณที่ δ 3.78 (1H, br.s, H-3), 5.36 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21),

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

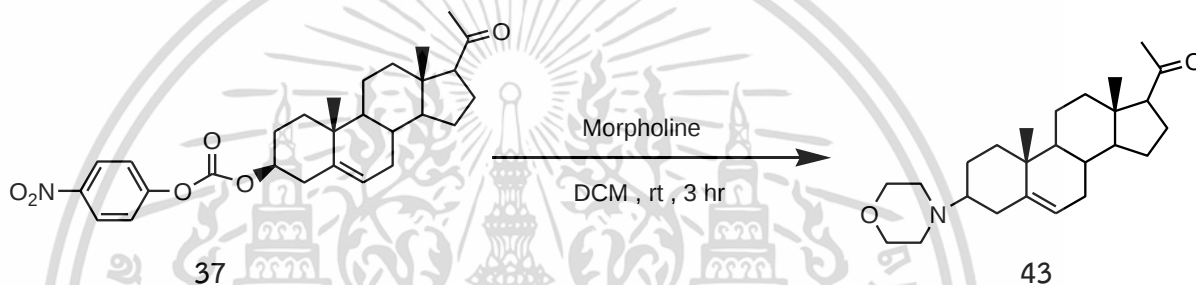
3.26 (1H, s, H-2') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.33 ถึง 1.10 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **42** พบสัญญาณที่ δ 74.7 (C-3), 139.7 (C-5), 122.3 (C-6), 49.9 (C-9), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20), 70.6 (C-2') และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 45.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

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

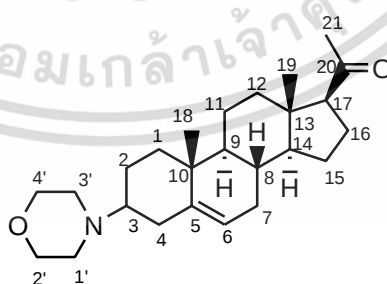
4.1.7 การสังเคราะห์ 3-Morpholinopregn-5-en-20-one **43**

สาร **43** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **37** ทำปฏิกิริยากับ morpholine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.7



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 มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 83.89 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **5**) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปข้อมูลได้ดังนี้



43

สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **43** พบสัญญาณที่ δ 3.47 (1H, br.d, H-3), 5.37 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21), 3.65 (4H, s, H-2' และ H-3') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.37 ถึง 1.12 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **43**

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 : $C_{25}H_{38}NO_2$ Calcd. 385.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 299.0 (3.0%)

4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

Prenenolone 5 และอะมิโนสเตียรอยด์ 38-43 ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ประกอบด้วยเซลล์ไลน์ดังต่อไปนี้:

1. เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cell line)
2. เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Hepatocellular carcinoma cell line)
3. เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line)
4. เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line)

5. เซลล์ไตลิงปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero)

ด้วยวิธี MTT assay โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับ Pregnenolone 5 ที่ระดับความเข้มข้นในการทดสอบเบื้องต้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone 5 และอะมิโนสเตียรอยด์ 38-43 แสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า Pregnenolone 5 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, KB, HT-29 และ HepG-2 โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 32.34, 43.26, 21.04, 11.90 และ 22.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ Pregnenolone 5 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 60.45 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ 38 แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB HT-29 และ HepG-2 โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 34.07, 43.61, 27.21, 47.73 และ 30.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ 39 แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB HT-29 และ HepG-2 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 98.32, 93.61, 65.85, 95.33 และ 91.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ 40 แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB และ HepG-2 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 62.38, 68.74, 95.30 และ 55.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อเซลล์ HT-29 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 25.64

อะมิโนสเตียรอยด์ 41 แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 และ KB มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 89.85 และ 97.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่มีผลต่อเซลล์ Vero, HepG-2 และ HT-29 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 42.40, 40.25 และ 19.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

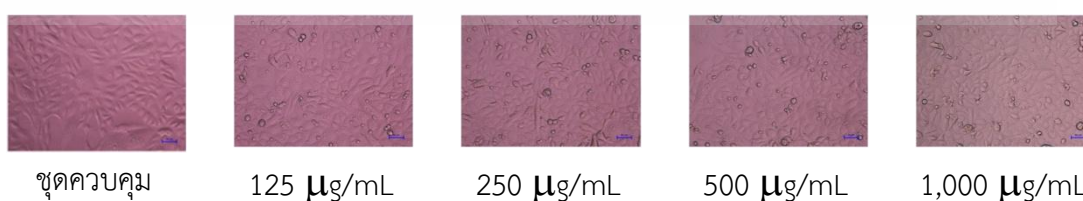
อะมิโนสเตียรอยด์ 42 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ทดสอบทุกชนิด โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB, HT-29 และ HepG2 เท่ากับ 61.97, 74.75, 98.69, 64.92 และ 62.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ 43 แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ MCF-7 และ KB โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 55.84 และ 52.95 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, HT-29 และ HepG-2 โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 36.52, 13.27 และ 30.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone 5 และอะมิโนสเตียรอยด์ 38-43 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

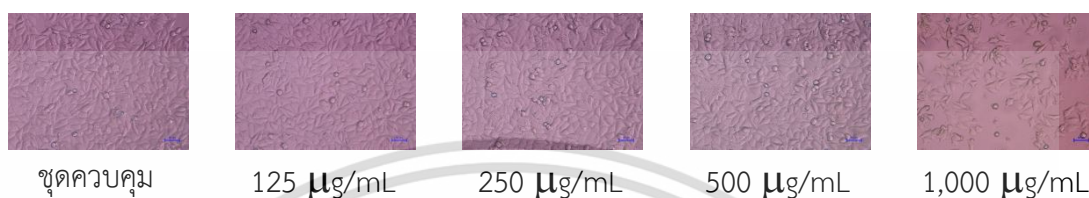
สารตัวอย่าง	ความเป็นพิษต่อเซลล์ (%)				
	Vero	MCF-7	KB	HepG-2	HT-29
5	40.65	60.45	32.34	43.26	21.04
38	34.07	43.61	27.21	30.63	47.73
39	98.32	93.61	65.85	91.52	95.33
40	62.38	68.74	95.30	55.19	25.64
41	42.40	89.85	97.80	40.25	19.34
42	61.97	74.75	98.69	62.36	64.92
43	36.52	55.84	52.95	30.54	13.27

จากผลการทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ จะนำอะมิโนสเตียรอยด์ที่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง (antagonist) 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี MTT assay (IC_{50}) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับตัวยามาตรฐาน Vinblastine sulfate salt ค่า IC_{50} ของ Pregnenolone 5 และ อะมิโนสเตียรอยด์ 38-43 แสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า Pregnenolone 5 ไม่มีผลในการทำละลายเซลล์ Vero, KB และ HepG-2 โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 40 ไมโครโมล/มิลลิลิตร จากรูปที่ 4.1 แสดงให้เห็นถึงลักษณะของเซลล์ปกติ (Vero) ที่มีลักษณะเป็นรูปกลม เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ Pregnenolone 5 ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 125 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อเซลล์ Vero น้อยมาก



รูปที่ 4.1 ผลของ Pregnenolone 5 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม

แต่ Pregnenolone 5 มีผลในการทำลายเซลล์ MCF-2 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.29 แสดงดังรูปที่ 4.2 แสดงการทำลายเซลล์ MCF-2 ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 125 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Pregnenolone 5 มากขึ้นเซลล์ MCF-7 จะถูกทำลายมากขึ้น โดยบางเซลล์มีรูปแบบของการตายแบบ apoptosis คือการเปลี่ยนแปลงจากรูปกลมกลายเป็นก้อนกลม นอกจากนี้ยังมีบางเซลล์ที่ตายแบบสลายตัวไปแล้ว



รูปที่ 4.2 ผลของ Pregnenolone 5 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ
เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 เป็นชุดควบคุม

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสาร 39 มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ Vero, MCF-7, KB, HT-29 และ HepG-2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.68, 1.09, 1.69, 0.67 และ 0.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สาร 39 มีผลในการทำลายเซลล์ HT-29 และเซลล์ HepG-2 ที่ดี (รูปที่ 4.4 และ 4.5) แต่ในทำนองเดียวกัน สาร 39 สามารถทำลายเซลล์ Vero ได้ในระดับที่ดีกว่า (รูปที่ 4.3) ซึ่งถ้านำไปพัฒนาเป็นตัวยาอาจจะใช้ในการทำลายเซลล์ HepG-2 และทำลายเซลล์ Vero ได้ในเวลาเดียวกัน

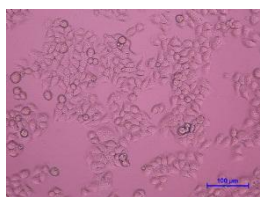


รูปที่ 4.3 ผลของสาร 39 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุม

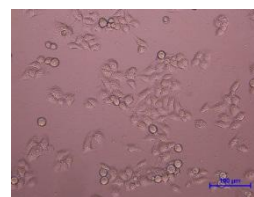


รูปที่ 4.4 ผลของสาร 39 ต่อเซลล์ HepG-2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG-2 เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อผู้เผยแพร่ได้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



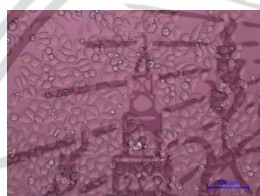
ชุดควบคุม



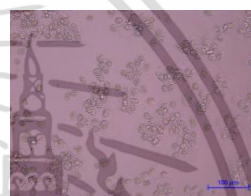
1,000 µg/mL

รูปที่ 4.5 ผลของสาร 39 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 เป็นชุดควบคุม

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสาร 40 มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ KB ดีที่ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.79 ไมโครโมล/มิลลิลิตร (รูปที่ 4.6) แต่ในทำนองเดียวกันสาร 40 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero เท่ากับ 62.38 เปอร์เซ็นต์



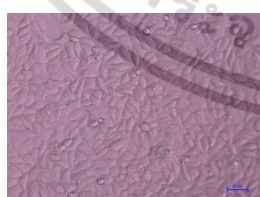
ชุดควบคุม



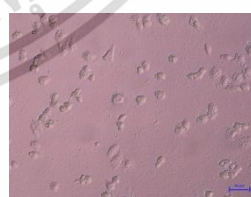
1,000 µg/mL

รูปที่ 4.6 ผลของสาร 40 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ KB เป็นชุดควบคุม

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสาร 41 มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ MCF-2 ดีที่ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.70 ไมโครโมล/มิลลิลิตร (รูปที่ 4.7) และที่น่าสนใจมากคือ สาร 41 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ในค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้ (42.40 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นจะมีค่าใกล้เคียงในช่วงที่ยอมรับได้เช่นกัน



ชุดควบคุม

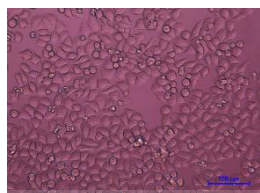


1,000 µg/mL

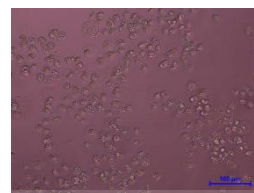
รูปที่ 4.7 ผลของสาร 41 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 เป็นชุดควบคุม

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสาร 42 มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ Vero, MCF-7, KB, HT-29 และ HepG-2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.47, 0.93, 0.33, 2.09 และ 0.95 ไมโครโมล/มิลลิลิตร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร 42 มีผลในการทำลายเซลล์ MCF-2, KB (รูปที่ 4.8) และ HT-29 ที่ดี แต่ในทำนองเดียวกัน สาร 42 สามารถทำลายเซลล์ Vero ได้ในระดับที่น้อยกว่า ซึ่งถ้านำไปพัฒนาเป็นตัวยาอาจจะใช้ได้ในการทำลายเซลล์ MCF-2, KB และ HT-29 และทำลายเซลล์ Vero ได้บ้างในเวลาเดียวกัน



ชุดควบคุม



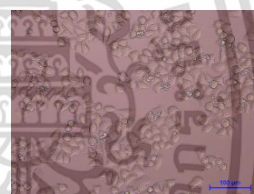
1,000 µg/mL

รูปที่ 4.8 ผลของสาร 42 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ KB เป็นชุดควบคุม

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสาร 43 มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ MCF-2 และ KB ดีที่ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.14 และ 1.70 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และ สาร 43 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ในค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้ (36.52 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นจะมีค่าใกล้เคียงในช่วงที่ยอมรับได้เช่นกัน



ชุดควบคุม



1,000 µg/mL

รูปที่ 4.9 ผลของสาร 43 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ KB เป็นชุดควบคุม

ตารางที่ 4.2 ค่า IC_{50} Pregnenolone 5, และอะมินอสเตียรอยด์ 38-43

สารตัวอย่าง	IC_{50} (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)				
	Vero	MCF-7	KB	HepG-2	HT-29
Vinblastine sulfate salt	0.0014	0.0002	0.0016	0.0007	0.0017
5	>40	2.29	>40	>40	>40
38	>40	>40	>40	>40	>40
39	0.68	1.09	1.69	0.90	0.67
40	1.53	1.74	0.79	2.23	>40
41	>40	0.70	1.07	>40	>40
42	1.47	0.93	0.33	2.09	0.95
43	>40	2.14	1.70	>40	>40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสาร **41** มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ MCF-2 ดีที่ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.70 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ในค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้ (42.40 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนั้น พบว่าสาร **43** มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ KB ที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ ใจ ไมโครโมล/มิลลิลิตร และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ในค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้ (36.52 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับ Pregnenolone 5 จะมีค่าใกล้เคียงในช่วงที่ยอมรับได้เช่นกัน

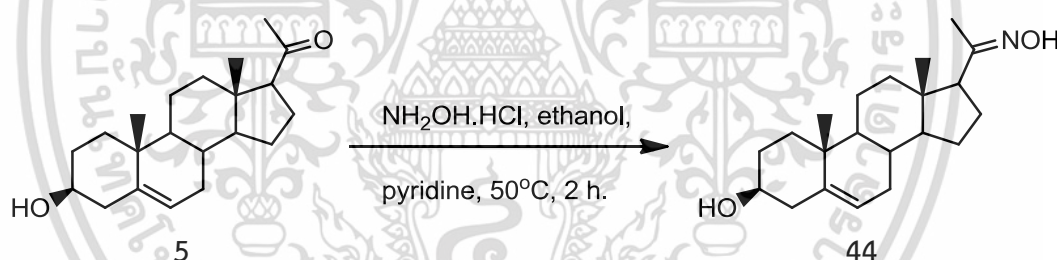
4.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ออกซิมสเตียรอยด์ **44** และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **45-50**

จากผลการทดลองพบว่าการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เป็นหมู่อะมิโนมีแนวโน้มทำให้ Pregnenolone 5 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในภาพรวมมีผลที่ดีขึ้น ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดจากงานวิจัยของวนาวรรณ[17] จากการเปลี่ยนหมู่คีโตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 20 ให้เป็นหมู่ออกซิม และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ Pregnenolone oxime **44** พบว่าสารสังเคราะห์แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และไวรัสเริม (Herpes simplex type I, HSV-I)

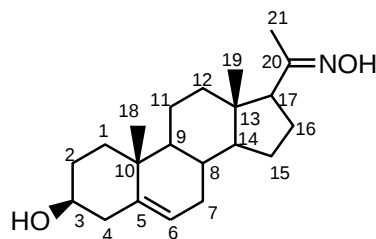
4.3.1 การสังเคราะห์ 3 β -Hydroxy-5-pregnenone-20-oxime **44**

สังเคราะห์สาร **44** จากการทำระหว่าง Pregnenolone 5 กับ hydroxylamine hydrochloride โดยใช้ ethanol และ pyridine เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.8



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.35 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 90 : 10 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 214-216 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 93.07 และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3280 (O-H stretch ของหมู่ไฮดรอกซิล), 2825 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1656 (C=N stretch), 1439 (CH_2 bend) และ 1366 (CH_3 bend)



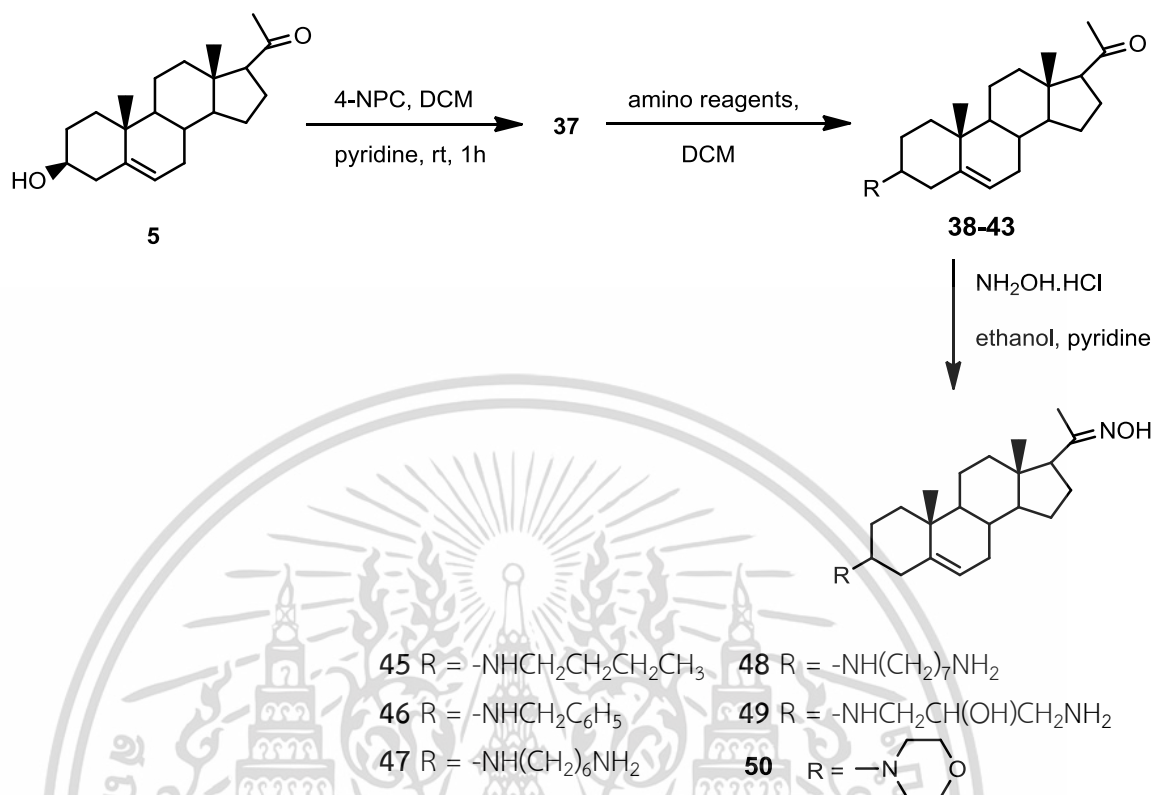
44

สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **44** พบสัญญาณที่ δ 3.52 (1H, br. s, H-3), 5.32 (1H, br. d, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.66 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 1.98 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.00 ถึง 2.50 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **44** พบสัญญาณที่ δ 71.7 (C-3), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 50.1 (C-9), 56.1 (C-14), 56.2 (C-17), 13.3 (C-18), 19.4 (C-19), 160.3 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}$ Calcd. 331.49 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 332.14 (39.4%), 314.24 (100.0%), 273.26 (5.0%) และ 255.28 (28.1%)

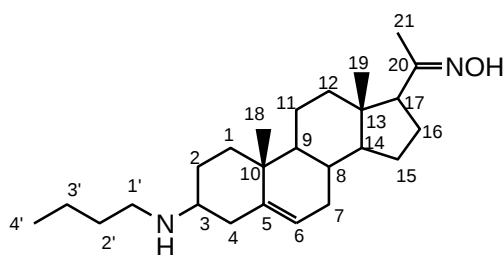
การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **45-50** ทำโดยการเปลี่ยนสาร **38-43** เป็นสารประกอบออกซิมโดยการทำปฏิกิริยา Oximation กับ $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ การทดลองจะทำปฏิกิริยาแบบ one pot reaction โดยการเปลี่ยน Pregnenolone **5** เป็นอนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม เริ่มจากการทำปฏิกิริยาผ่าน 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **37** ซึ่งในที่นี้จะไม่การแยกสาร **37** ในรูปสารบริสุทธิ์ เนื่องจากถ้าใช้สาร **37** ในรูปสารบริสุทธิ์จะเกิดการสลายตัวของสาร **37** โดยการทำปฏิกิริยากับความชื้นในอากาศ เมื่อหมู่หลุดออกหลุดออกไปได้สารผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่คือ Pregnenolone **5** เพราะฉะนั้นเมื่อนำมาทำปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไปพบว่าจะได้ผลิตภัณฑ์อะมิโนสเตียรอยด์ในปริมาณที่น้อยมาก และเมื่อทำปฏิกิริยา Oximation จะมีผลทำให้ได้อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมในปริมาณที่น้อย การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมสรุปได้ในแผนภาพที่ 4.9

แผนภาพที่ 4.9



4.3.1 การสังเคราะห์ 3-(Aminobutyl)-pregn-5-en-20-oxime 45

นำสาร 37 มาทำปฏิกิริยากับ *n*-butylamine จะได้สาร 38 จากนั้นนำสาร 38 ทำปฏิกิริยา Oximation กับ hydroxylamine hydrochloride จะได้สาร 45 จากการทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 70 : 30 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวบนน้ำเงินของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.43 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 85 : 15 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 45.50 และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3280 (O-H stretch ของหมู่ไฮดรอกซิล), 2830 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1650 (C=N stretch), 1439 (CH_2 bend) และ 1366 (CH_3 bend)



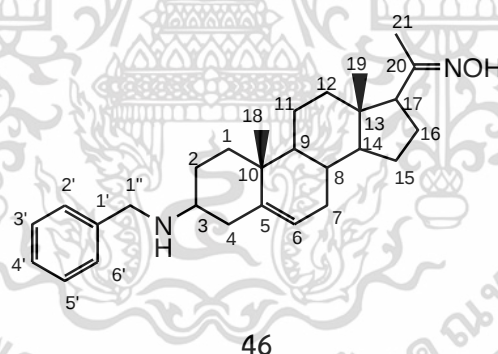
45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **45** 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), 1.96 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.35 ถึง 1.10 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **45** 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 162.3 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

4.3.2 การสังเคราะห์ 3-(Aminobenzyl)-pregn-5-en-20-oxime **46**

การสังเคราะห์สาร **46** ทำการทดลองภายใต้สภาวะกับการเตรียมสาร **45** โดยใช้สารตั้งต้นคือ Pregnenolone **5** ทำปฏิกิริยาโดยไม่มีการแยกสารผลิตภัณฑ์ **37** และ สาร **39** ในรูปสารบริสุทธิ์ จากนั้นนำสาร **39** ทำปฏิกิริยากับ $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 70 : 30 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.45 และเมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 85 : 15 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 45.55 (คำนวณเทียบกับ Pregnenolone **5**)



และยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร **46** (เปรียบเทียบกับสาร **39**) โดยพิจารณาจากสเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่เมทิล (C-21) จาก 2.12 ppm เป็น 1.91 ppm และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล (C-20) จาก 208.9 ppm เป็น 164.5 ppm

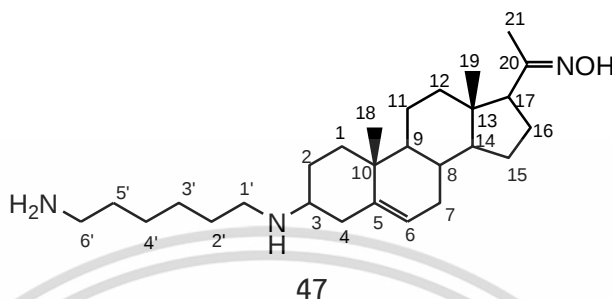
4.3.3 การสังเคราะห์ 3-(1,6-Diaminohexyl)-pregn-5-en-20-oxime **47**

การสังเคราะห์สาร **47** ทำการทดลองภายใต้สภาวะกับการเตรียมสาร **45** โดยใช้สารตั้งต้นคือ Pregnenolone **5** ทำปฏิกิริยาโดยไม่มีการแยกสารผลิตภัณฑ์ **37** และ สาร **40** ในรูปสารบริสุทธิ์ จากนั้นนำสาร **40** ทำปฏิกิริยากับ $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น

hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 1 : 1 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อได้รู้เนื้อหาแล้วให้รีบแจ้งคืนให้เจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

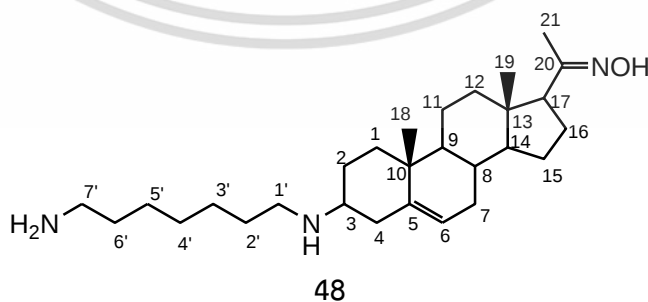
สีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.68 และเมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 60 : 40 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 38.67 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 5)



และยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร 47 (เปรียบเทียบกับสาร 40) โดยพิจารณาจากสเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่เมทิล (C-21) จาก 2.13 ppm เป็น 1.92 ppm และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล (C-20) จาก 209.6 ppm เป็น 163.5 ppm

4.3.4 การสังเคราะห์ 3-(1,7-Diaminohexyl)-pregn-5-en-20-oxime 48

การสังเคราะห์สาร 48 ทำการทดลองภายใต้สภาวะกับการเตรียมสาร 41 โดยใช้สารตั้งต้นคือ Pregnenolone 5 ทำปฏิกิริยาโดยไม่มีการแยกสารผลิตภัณฑ์ 37 และ สาร 41 ในรูปสารบริสุทธิ์ จากนั้นนำสาร 41 ทำปฏิกิริยากับ $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 60 : 40 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.31 และเมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 60 : 40 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 40.10 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 5)



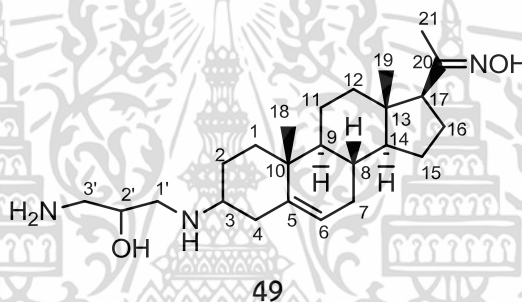
และยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร 48 (เปรียบเทียบกับสาร 41) โดยพิจารณาจากสเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่เมทิล (C-21) จาก 2.06 ppm เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.91 ppm และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล (C-20) จาก 208.6 ppm เป็น 161.5 ppm

4.3.5 การสังเคราะห์ 3-(1,3-Diaminopropyl-2-ol)-pregn-5-en-20-oxime 49

การสังเคราะห์สาร 49 ทำการทดลองภายใต้สภาวะกับการเตรียมสาร 42 โดยใช้สารตั้งต้นคือ Pregnenolone 5 ทำปฏิกิริยาโดยไม่มีการแยกสารผลิตภัณฑ์ 37 และ สาร 42 ในรูปสารบริสุทธิ์ จากนั้นนำสาร 42 ทำปฏิกิริยากับ $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 60 : 40 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.10 และเมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 60 : 40 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 35.10 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 5)

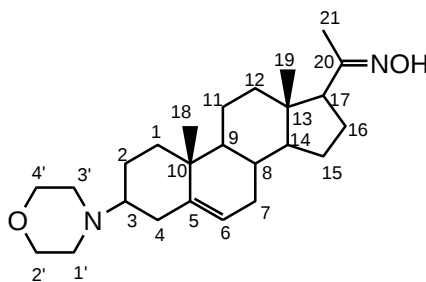


และยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร 49 (เปรียบเทียบกับสาร 42) โดยพิจารณาจากสเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่เมทิล (C-21) จาก 2.06 ppm เป็น 1.95 ppm และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล (C-20) จาก 208.6 ppm เป็น 162.5 ppm

4.3.6 การสังเคราะห์ 3-Morpholinopregn-5-en-20-oxime 50

การสังเคราะห์สาร 50 ทำการทดลองภายใต้สภาวะกับการเตรียมสาร 43 โดยใช้สารตั้งต้นคือ Pregnenolone 5 ทำปฏิกิริยาโดยไม่มีการแยกสารผลิตภัณฑ์ 37 และ สาร 43 ในรูปสารบริสุทธิ์ จากนั้นนำสาร 43 ทำปฏิกิริยากับ $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 85 : 15 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.41 และเมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 90 : 10 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 43.68 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



50

และยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร 50 (เปรียบเทียบกับสาร 43) โดยพิจารณาจากสเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่เมทิล (C-21) จาก 2.06 ppm เป็น 1.91 ppm และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล (C-20) จาก 208.6 ppm เป็น 161.5 ppm

4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของ Pregnenolone oxime 44 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50

Pregnenolone oxime 44 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50 ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ ประกอบด้วยเซลล์ปกติชนิด Vero (African green monkey kidney fibroblast), เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB (Human oral cavity carcinoma), เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Hepatocellular carcinoma) และเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma) ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay (Primary screening) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับ Pregnenolone 5, อะมิโนสเตียรอยด์ 38-43 และ Pregnenolone oxime 44 ที่ระดับความเข้มข้นในการทดสอบเบื้องต้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดลองนี้จะใช้ตัวมาตรฐานในการเปรียบเทียบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมคือ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ผลเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของ Pregnenolone 5, Pregnenolone oxime 44 และอะมิโนสเตียรอยด์ 45-50 แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า Pregnenolone 5 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero, KB, HepG-2 และ HT-29 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 40.65, 32.34, 43.26 และ 21.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ Pregnenolone 5 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 60.75 เปอร์เซ็นต์

Pregnenolone oxime 44 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero, MCF-7, KB, HepG-2 และ HT-29 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 14.48, 17.10, 7.34, 12.66 และ 4.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero, MCF-7, KB, HepG-2 และ HT-29 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 25.77, 34.83, 32.61 และ 28.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี **46** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 34.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, HepG-2 และ HT-29 เท่ากับ 85.11, 93.46, 87.59 และ 95.33 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี **47** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero และ HT-29 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 12.95 และ 12.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ KB และ HepG-2 เท่ากับ 86.42 และ 78.19 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี **48** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero, Hep2 และ HT-29 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 34.43, 31.18 และ 12.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ KB เท่ากับ 86.17 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี **49** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero, MCF-7, KB, Hep2 และ HT-29 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 12.24, 16.69, 21.02, 18.80 และ 17.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี **50** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero, Hep2 และ HT-29 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 17.65, 37.45 และ 12.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ KB เท่ากับ 100.36 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone 5, Pregnenolone oxime 4 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี **45-50** ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารตัวอย่าง	ความเป็นพิษต่อเซลล์ (%)				
	Vero	MCF-7	KB	HepG-2	HT-29
Mitomycin C	63.32	64.88	83.63	77.28	59.54
5	40.65	60.75	32.34	43.26	21.04
44	14.48	17.10	7.34	12.66	4.12
45	25.17	39.43	34.83	32.61	28.70
46	34.87	85.11	93.46	87.59	95.33
47	12.95	-	86.42	78.19	12.95
48	34.43	-	86.17	31.18	12.95
49	12.24	16.69	21.02	18.80	17.60
50	17.65	-	100.30	37.45	12.95

จากเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าสาร **46** ให้เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ดีกว่าตัวยาปฏิชีวนะ Mitomycin C และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero น้อยกว่าตัวปฏิชีวนะ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mitomycin C จากผลการทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ เมื่อนำอะมิโนสเตียรอยด์ที่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง (antagonist) 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี MTT assay (IC_{50}) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับตัวยามาตรฐาน Mitomycin C ค่า IC_{50} ของ Pregnenolone 5, Pregnenolone oxime 44 และ อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50 แสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า Pregnenolone 5 และ Pregnenolone oxime 44 ไม่มีผลในการทำลายเซลล์ไลน์ปกติ Vero, KB, HepG-2, HT-29 โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 40 ไมโครโมล/มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.4 ค่า IC_{50} ของ Pregnenolone 5, Pregnenolone oxime 44 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50

สารตัวอย่าง	IC_{50} (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)				
	Vero	MCF-7	KB	HepG-2	HT-29
5	>40	2.29	>40	>40	>40
44	>40	>40	>40	>40	>40
45	>40	>40	>40	>40	>40
46	>40	0.92	0.94	1.91	0.79
47	>40	-	0.63	1.74	>40
48	>40	-	1.29	>40	>40
49	>40	>40	>40	>40	>40
50	>40	-	0.22	>40	>40

จากตารางที่ 4.4 เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} พบว่าสาร 46 มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, HepG-2 และ HT-29 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.92, 0.94, 1.91 และ 0.79 ไมโครโมล/มิลลิลิตร นอกจากนั้นยังพบว่าสาร 47 มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ไลน์ KB และ HepG-2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.63 และ 1.74 ไมโครโมล/มิลลิลิตร โดยที่สาร 46 และสาร 47 ไม่มีผลต่อเซลล์ไลน์ปกติมีค่า IC_{50} มากกว่า 40 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ซึ่งเหมาะต่อการนำไปใช้จริงเนื่องจากสามารถทำลายเซลล์ไลน์ปกติ Vero ได้ดีแต่ทั้งนี้ควรมีการทดลองอื่นที่พิสูจน์กลไกการเข้าทำลายและผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นเมื่อนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิต

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 48 ไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ Vero, HepG-2 และ HT29 แต่มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.29 ไมโครโมล/มิลลิลิตร

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 49 ไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ Vero, MCF-7, KB HepG2 และ HT29

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 50 ไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ Vero, HepG-2 และ HT29 แต่มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.22 ไมโครโมล/มิลลิลิตร

บทที่ 5

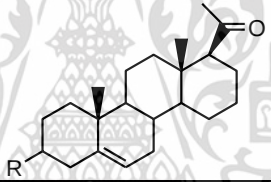
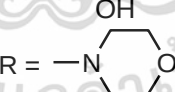
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากความสนใจของผู้วิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงโครงสร้างของ Pregnenolone 5 ได้สังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ Pregnenolone 5 ที่ประกอบด้วยหมู่อะมิโนและหมู่ออกซิเม จากนั้นนำสารสังเคราะห์ไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 5 ชนิด ผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

5.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 38-43 จาก Pregnenolone 5

อะมิโนสเตียรอยด์ 38-43 ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ Pregnenolone 5 ให้เป็นหมู่อะมิโน การสังเคราะห์เตรียมผ่านสารตัวกลางคือ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 37 สามารถสังเคราะห์สาร 37 มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 92.41 จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสารประกอบอะมิโนและสารประกอบโคอะมิโน ตารางที่ 5.1 แสดงผลได้ร้อยละของอะมิโนสเตียรอยด์ 38-43

ตารางที่ 5.1 ผลได้ร้อยละของอะมิโนสเตียรอยด์ 38-43 (คำนวณเทียบกับ Pregnenolone 5)

สารอนุพันธ์		ผลได้ร้อยละ
38	R = -NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	45.83
39	R = -NHCH ₂ C ₆ H ₅	43.50
40	R = -NH (CH ₂) ₆ NH ₂	12.13
41	R = -NH (CH ₂) ₇ NH ₂	18.74
42	R = -NH CH ₂ CH(OH)CH ₂ NH ₂	29.57
43	R = 	83.39

จากการทดลองสามารถสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ มีผลได้ร้อยละอยู่ในช่วงต่ำถึงสูงสาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก

1. จากแผนภาพที่ 4.1 ในขั้นตอนการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone 5 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ให้เป็นหมู่หลุดออก โดยใช้รีเอเจนต์คือ *p*-nitrophenyl chloroformate ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันแกเอซิลคลอไรด์ที่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยากับความชื้นในอากาศ ทำให้สาร 37 ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้กลับเป็นสารตั้ง Pregnenolone 5 มีผลทำให้ได้สาร 37 ลดลง

2. ขั้นตอนแยกอะมิโนสเตียรอยด์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี อะมิโนสเตียรอยด์เป็นสารที่มีขั้วค่อนข้างสูงอาจจะเกิด interaction กับซิลิกาเจล ที่ใช้ในเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีค่อนข้างสูง และเนื่องจากเป็นสารผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยหมู่อะมิโนซึ่งมีความเป็นเบสสามารถเกิดเอกซอร์เป็นเอกซอร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

interaction กับซิลิกาเจลที่มีความเป็นกรดได้ ทำให้เกิดการตกค้างอยู่ในคอลัมน์ส่งผลให้ได้ปริมาณหลังการทำให้บริสุทธิ์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 40-42 ลดลง

5.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 38-43

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า Pregnenolone 5 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 5 ชนิดได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cell line), เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Hepatocellular carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Human oral cavity carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line) และเซลล์ปกติ (Vero, African green monkey kidney fibroblast) น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ กล่าวได้ว่า Pregnenolone 5 มีความเหมาะสมในการเลือกใช้เป็นสารตั้งต้น

ในที่นี้ขอกล่าวสรุปเฉพาะอะมิโนสเตียรอยด์ที่ให้ผลการทดลองที่ดีคือ อะมิโนสเตียรอยด์ 39 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero, MCF-7, KB, HepG-2 และ HT-29 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.68, 1.09, 1.69, 0.90 และ 0.67 ไมโครโมล/มิลลิลิตร แต่เป็นที่น่าเสียดายอะมิโนสเตียรอยด์ 39 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในแนวโน้มที่ดี และรวมทั้งมีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero ที่ดีมากด้วยเช่นกัน (IC₅₀ เท่ากับ 0.68 ไมโครโมล/มิลลิลิตร) ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิต

อะมิโนสเตียรอยด์ 41 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 ดีที่สุดคือมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.70 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีโอกาสเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ในสิ่งมีชีวิตได้ ในกรณีที่ต้องการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7

นอกจากนั้นอะมิโนสเตียรอยด์ 42 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-2, KB, HepG-2 และ HT-29 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.93, 0.33, 2.09 และ 0.95 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ดี แต่อะมิโนสเตียรอยด์ 42 มีข้อเสียคือจะมีผลการทำลายต่อเซลล์ Vero โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.47 ไมโครโมล/มิลลิลิตร จึงยังไม่เหมาะกับการนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิต

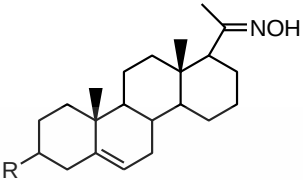
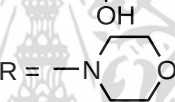
จะเห็นได้ว่าอะมิโนสเตียรอยด์ 41 ที่สังเคราะห์ได้นี้ จัดอยู่ในกลุ่ม Alkylating agent มีหมู่แอลคิลเป็นสายโซ่ยาวซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ในการทำลายสารพันธุกรรมเพื่อป้องกันการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง โดยออกฤทธิ์ได้ทุกระยะของการแบ่งเซลล์ และจากลักษณะการตายของเซลล์พบว่า เซลล์มีการหดตัวและจับตัวกันแน่นจนกลายเป็นก้อนกลม ซึ่งเป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำของสารที่สังเคราะห์ได้ โดยการเปลี่ยนแปลงในลักษณะดังกล่าวเป็นรูปแบบของการตายแบบ apoptosis นอกจากนี้ยังมีบางเซลล์ที่ตายและสลายตัวไปแล้ว จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Pregnenolone 5 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของวง A จากหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่อะมิโนมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพด้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

5.3 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50

การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50 ทำโดยการเปลี่ยนสาร 38-43 เป็นสารประกอบออกซิมโดยการทำปฏิกิริยา Oximation กับ NH₂OH.HCl การทดลองจะทำปฏิกิริยาแบบ one pot reaction เป็นการเปลี่ยน Pregnenolone 5 เป็นสารอนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม โดยจะทำปฏิกิริยาผ่าน 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 37 ซึ่งในที่นี้จะไม่การแยก

สาร 37 ในรูปสารบริสุทธิ์ ตารางที่ 5.2 แสดงผลได้ร้อยละของ Pregnenolone oxime 44 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50

ตารางที่ 5.2 ผลได้ร้อยละของ Pregnenolone oxime 44 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 5)

สารอนุพันธ์		ผลได้ร้อยละ
44	R = -OH	93.07
45	R = -NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	45.50
46	R = -NHCH ₂ C ₆ H ₅	45.58
47	R = -NH(CH ₂) ₆ NH ₂	38.67
48	R = -NH(CH ₂) ₇ NH ₂	40.10
49	R = -NHCH ₂ CH(OH)CH ₂ NH ₂	35.10
50	R = 	43.68

5.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของ Pregnenolone oxime 44 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 45-50

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า Pregnenolone 5 และ Pregnenolone oxime 44 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 5 ชนิดได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cell line) เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Hepatocellular carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์ไตลิงปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero) ด้วยวิธี MTT assay น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ กล่าวได้ว่า การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Pregnenolone 5 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 20 เป็นหมู่ออกซิม ไม่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อนำอะมิโนสเตียรอยด์ 38-43 มาทำปฏิกิริยา Oximation โดยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 20 เป็นหมู่ออกซิม พบว่าหมู่ออกซิมมีผลที่ทำให้สมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์เปลี่ยนไป กล่าวคือเป็นที่น่าสนใจสำหรับอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 46 ที่เตรียมได้จากอะมิโนสเตียรอยด์ 39 ซึ่งแต่เดิมมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทดสอบทุกชนิดในแนวโน้มที่ดี พบว่าอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 46 ไม่มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ปกติ Vero แต่มีผลต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, KB, HepG2 และ HT-29 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.92, 0.94, 1.91, 0.79 ไมโครโมล/มิลลิลิตร แต่ดูเหมือนว่าหมู่ออกซิมจะลดการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ไลน์ KB, HepG-2 และ HT-29 แต่กลับเพิ่มฤทธิ์การยับยั้งเซลล์ไลน์ MCF-7 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.92 ไมโครโมล/มิลลิลิตร นอกจากนั้นอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 47 ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกันกับอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 46 คือไม่มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ปกติ Vero แต่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KB และ HepG-2 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.63, 1.74 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์ไลน์ KB และ HepG-2 ได้ดีกว่าอะ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิโนสเตียรอยด์ 40 จากงานวิจัยเบื้องต้นนี้อาจกล่าวได้ว่า อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี 46 และ 47 เหมาะสมกับการนำไปใช้จริงกับสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะถ้านำไปพัฒนาใช้กับการออกฤทธิ์ต้านเซลล์ไลน์ มะเร็งตับชนิด HepG-2 หรือเซลล์ไลน์มะเร็งตับชนิดอื่นๆ อีก ซึ่งเป็นที่ทราบว่าโรคมะเร็งตับเป็นโรคที่คร่าชีวิตคนไทยเป็นอันดับหนึ่ง แต่ควรมีการทดสอบแนวทางอื่นเพิ่มเติมถึงแนวทางการออกฤทธิ์ ระยะเวลาการสลายตัวของสารในสิ่งมีชีวิต และผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นเมื่อมีการใช้จริง นอกจากนั้นอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี 50 ให้ผลการทดลองที่มีแนวโน้มเดียวกันคือมีผลความเป็นพิษ ต่อเซลล์ไลน์ KB ในทางดีขึ้น เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับอะมิโน สเตียรอยด์ 43 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.22 ไมโครโมล/มิลลิลิตร จากงานวิจัยนี้สามารถสรุปในเบื้องต้นคือหมู่ออกซิมีมีผลต่อความเป็นพิษของ เซลล์ไลน์ จึงสมควรเป็นอีกหมู่ฟังก์ชันหนึ่งที่เหมาะสมกับการนำไปปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ สเตียรอยด์สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cui และคณะ[20] ที่ได้ศึกษาถึงตำแหน่งของหมู่ออกซิมีใน โมเลกุลของ Cholesterol 1 ซึ่งในที่นี้คณะผู้วิจัยยังคงต้องค้นคว้าหาแนวทางการสังเคราะห์และวิธี ทดสอบฤทธิ์แบบใหม่เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองที่ได้



บรรณานุกรม

- [1] วีรศักดิ์ เชื้อมนโนชาญ. 2525. สเตียรอยด์จากพืช, ภาควิชาเภสัชเวท, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- [2] ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. 2536. เกล็ดขมิ้นชัน ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม1. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- [3] R.J. Simmonds, 1997. **Chemistry of Biomolecules: An Introduction**, Billing & Sons Ltd., Worcester.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] S. N. Khan, Y. M. Jung, B. J. Kim, H. Cho, J. Lee and H. Kim. 2008. Synthesis and Antimicrobial Activity of 7 α -Amino-23,24-Bisnor-5 α -Cholan-22-ol Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. Vol. 18, pp. 2558-2561.
- [7] S. N. Khan, S-Y. Bae and H-S. Kim. 2005. A Highly Stereoselective Reductive Amination of 3-Ketosteroid with Amines: an Improved Synthesis of 3 α -aminosteroid., **Tetrahedron Letters**, 46, pp. 7675-7678.
- [8] B. Choucair, M. Dherbomez, C. Roussakis and L. El Kihel. 2004. Synthesis of Spermidinylcholestanol and Spermidinylcholesterol Squalamine Analogues., **Tetrahedron**, 60, pp. 11477-11486.
- [9] G. P. Moss. **Steroid**. Online Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Steroid>. 2011.
- [10] วิษณุ โลจนาภิวัฒน์. 2532. ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชีวสังเคราะห์, ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- [11] R. B. Hartmann, M. Hector, S. Haidar, P. B. Ehmer, W. Reichert and J. Jose. 2000. Synthesis and Evaluation of Novel Steroidal Oxime Inhibitors of P450 17(17 α -Hydroxylase/C17-20-Lyase and 5 α -Reductase Types 1 and 2., **Journal of Medicinal Chemistry**, Vol. 43, pp. 4266-4277.
- [12] J. Cui, L. Fan, V. Huang, W. Nin and A. Zhou. 2009. Synthesis and Evaluation of Some Steroidal Oxime as Cytotoxic agents Structure/Activity studies (II)., **Steroids**, Vol. 74, pp. 989-995.
- [13] S. A. Khan and A. M. Asiri. 2011. Synthesis of Novel Steroidal Oxazolo Quinoxaline as Antibacterial Agents., **Arabian Journal of Chemistry**, Vol. 4 pp. 349-354.
- [14] S. A. Khan, A. M. Asiri and K. Saleem. 2012. Synthesis and Biological Evaluation

เอกสารนี้เป็นเอกสารทบทวนเนื้อหาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- of New Oxime-ether derivatives of Steroid as anti-bacterial agents., **Journal of Saudi Society**, Vol. 16, pp. 7-11.
- [15] N. N. Barbakadze, R. A. Jones, N. R. Rosanio, N. Sh Nadaraia, M. L. Kakhabrishvili, C. D. Hall and A. R. Ratritzky. 2014. Chemical Modification of Oximes with *N*-protected Amino Acids., **Tetrahedron**, Vol. 70, pp. 7181-7184.
- [16] 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.
- [17] วณารรณ ปราปพย์ค์. 2549. การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์สเตียรอยด์เพรกนินโนโลน. วิทยานิพนธ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [18] International Standard. 2nd ed. ISO 10-3-5: Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for *in vitro* Cytotoxicity.
- [19] Z. Szendi, P. Forgo and F. Sweet. 1995. Complete ¹H and ¹³C NMR Spectra of Pregnenolone., **Steroids**, 60, pp. 442-446.
- [20] J. Cui, L. Fan, V. Huang, W. Nin and A. Zhou. 2009. Synthesis and Evaluation of Some Steroidal Oxime as Cytotoxic agents Structure/Activity studies (II)., **Steroids**, Vol. 74, pp. 989-995.

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวพัชนี เจริญยิ่ง
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สังกัด	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประวัติการศึกษา

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่

P. Charoenying. 2017. Synthesis and Cytotoxic Activity of 3-Amino-20-oxime Pregnenolone Derivatives., 18th Tetrahedron Symposium Asia Edition: New Developments in Organic Chemistry, 24-26 July 2017, Melbourne, Australia.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้