การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ อะมิโนสเตียรอยด์จากเพรกนินโนโลน

THE STUDY ON ANTIBACTERIAL OF AMINOSTEROIDS FROM PREGNENOLONE

นายพิพิธธน เหล่าคนค้า

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ อะมิโนสเตียรอยด์จากเพรกนินโนโลน

THE STUDY ON ANTIBACTERIAL OF AMINOSTEROIDS FROM PREGNENOLONE

T149479

นายพิพิธธน เหล่าคนค้า

b 12882033
i
เลขหมู่
เลขทะเบียน 149479
วัน เดือน ปี 8 มิ.ย. 2561

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE STUDY ON ANTIBACTERIAL OF AMINOSTEROIDS FROM PREGNENOLONE

PIPITTON LAOKHONKHA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL CHEMISTRY

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอะมิโนสเตียรอยด์จากเพรกนินโนโลน

ชื่อนักศึกษา นายพิพิธธน เหล่าคนค้า

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการคุมสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.ณวสิทธิ์ โชติแสง	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	
ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอะมิโนสเตียรอยด์จากเพรกนินโนโลน
ชื่อนักศึกษา	นายพิพิธธน เหล่าคนค้า
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

เพรกนินโนโลน **3** ถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่ วิธีการสังเคราะห์เริ่มจากการเปลี่ยนเพรกนินโนโลน **3** เป็นเพรกนินโนโลนคาร์บอเนต **4** และนำเพรกนินโนโลนคาร์บอเนต **4** ทำปฏิกิริยากับอะมิโนรีเอเจนต์ให้อะมิโนสเตียรอยด์ **5a-5d** ผลผลิตปานกลางถึงดี เมื่อนำอะมิโนสเตียรอยด์ **5a-5d** ทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าอะมิโนสเตียรอยด์ **5a** มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดดีที่สุดโดยมีบริเวณยับยั้งในช่วง 17.42-23.35 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	The Study on Antibacterial of Aminosteroids from Pregnenolone
Student	Mr. Pipitton Laokhonkha
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Industrial Chemistry
Academic Year	2016
Advisor	Asst. Prof. Dr. Patchanee Charoenying
Co-advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim

ABSTRACT

Pregnenolone **1** was used as a starting material to develop new steroidal amino. The synthesis involved the transformation of the starting pregnenolone **1** into pregnenolone carbonate **4** . The 3-amino pregnenolone derivatives **5a-5d** were obtained by the reaction of pregnenolone carbonate **4** with different amino reagents in moderate to good yields. The antibacterial activity of 3-amino pregnenolone derivatives **5a-5d** was tested by paper disc diffusion method, against 5 human microbial pathogens: *Bacillus subtilis* ATCC 6 6 3 3 , *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* TISTR 1466. The results found that compound **5a** exhibited more interesting antibacterial activity than other compounds and showed zone of inhibition ranging from 17.42-23.35 mm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยฉบับนี้มีจุดประสงค์เพื่อ สังเคราะห์อนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์ได้ โดยได้ความช่วยเหลือจาก ผศ.ดร. พัชนี เจริญยิ่ง อาจารย์ที่ปรึกษาควบคุมโครงงานวิจัยที่ให้คำแนะนำในการทำการทดลอง รวมไปถึงการให้คำปรึกษาและข้อมูลเพื่อใช้ในการค้นคว้าข้อมูลการทดลอง เขียนเล่มและเรียบเรียงข้อมูล ตรวจทานให้มีความถูกต้องและเกิดข้อผิดพลาดน้อยที่สุด ผู้วิจัยจึงกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำการทดลองทางชีวภาพ และให้ความรู้กับคำแนะนำ รวมทั้งให้ข้อเสนอแนะต่างๆ

ขอขอบพระคุณ ดร.ณวสิทธิ์ โชติแสง ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อชี้แนะ และตรวจสอบข้อมูลต่างๆ ในโครงงานวิจัยนี้ให้มีความถูกต้องและเกิดข้อผิดพลาดน้อยที่สุด

ขอขอบคุณ คุณพฤษวรรษ หลอดเข็ม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องอุปกรณ์ทำการทดลองทางชีววิทยา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าทุกท่านหรือผู้มีส่วนเกี่ยวข้องที่สังกัดอยู่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องอุปกรณ์ทำการทดลองที่นำไปใช้ในการทำโครงงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การอุปการะอบรมเลี้ยงดู ตลอดจนส่งเสริมการศึกษา และให้กำลังใจเป็นอย่างดี อีกทั้งกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกๆท่าน ที่ให้การศึกษา มั่นเพียรอบรมสั่งสอนและประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ที่มีค่าแก่ผู้วิจัยเสมอมา และขอขอบพระคุณเจ้าของเอกสารและงานวิจัยทุกท่าน ที่ผู้วิจัยนำมาศึกษาค้นคว้าและได้นำมาอ้างอิงในการทำโครงงานวิจัยนี้ จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พิพิธธน เหล่าคนค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญรูป ..... ช

รายการคำย่อ ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 3

1.3 ขอบเขตการศึกษา 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 สเตียรอยด์ 5

2.2 สเตียรอยด์ที่พบในธรรมชาติ 6

2.3 ความสำคัญของสเตียรอยด์กับการสังเคราะห์ทางเคมีอินทรีย์ 8

2.4 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย 9

2.4.1 เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* 10

2.4.2 เชื้อแบคทีเรีย *M. luteus* 10

2.4.3 เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* 11

2.4.4 เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* 12

2.2.4 เชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* 12

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 13

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 18

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 18

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 19

3.3 วิธีการทดลองทั่วไป 21

3.4 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 21

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Paper disc diffusion 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล 28

4.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ **5a-5d** จาก Pregnenolone **3** 28

4.1.1 การสังเคราะห์ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **4** 29

4.1.2 การสังเคราะห์ 3-(Aminobenzyl)-pregn-5-en-20-one) **5a** 29

4.1.3 การสังเคราะห์ 3-Morpholinopregn-5-en-20-one **5b** 30

4.1.4 การสังเคราะห์ 3-(1,6-Diaminohexyl)-pregn-5-en-20-one) **5c** 31

4.1.5 การสังเคราะห์ 3-(1,3-Diaminopropyl-2-ol)-pregn-5-en-20-one) **5d** ... 32

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอะมิโนสเตียรอยด์ **5a-5d** 32

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 38

เอกสารอ้างอิง 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของอะมิโน
สเตียรอยด์ 5a-5d 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 2.1 โครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ 5
รูปที่ 2.2 แสดงรูปร่างของ *B. subtilis* 10
รูปที่ 2.3 แสดงรูปร่างของ *M. luteus* 10
รูปที่ 2.4 แสดงรูปร่างของ *S. aureus* 11
รูปที่ 2.5 แสดงรูปร่างของ *E. coli* 12
รูปที่ 2.6 แสดงรูปร่างของ *P. aeruginosa* 13
รูปที่ 3.1 ตัวอย่างของวงใสหรือ Clear zone (มิลลิเมตร) 26
รูปที่ 3.2 เวอร์เนียร์ ดิจิตอล 26
รูปที่ 3.3 ตัวอย่างวงใสหรือ Clear zone ของพืชสมุนไพรในประเทศฟิลิปปินส์ 27
รูปที่ 4.1 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ pregnenolone 3 33
รูปที่ 4.2 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาร 5a 35
รูปที่ 4.3 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาร 5b 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อ

^{1}H NMR	^{1}H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
^{13}C NMR	^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
δ	Chemical shift
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DCM	Dichloromethane
EtOAc	Ethyl acetate
R_f	Rate of flow
mm	Millimetre
TLC	Thin Layer Chomatography
ppm	part per million

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

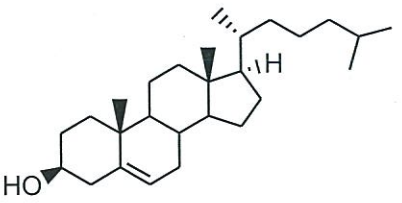
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารสังเคราะห์จำนวนมากที่นำมาใช้ในชีวิตประจำวันมาจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นต้นแบบซึ่งมีจำนวนมากถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และมนุษย์ สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย เพราะว่ามีสมบัติที่ดีทั้งทางเคมีและชีวภาพ แต่เนื่องจากสารผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเหล่านี้มีอยู่ในปริมาณจำกัดไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ ด้วยเหตุนี้นักวิจัยจึงเริ่มให้ความสนใจในการผลิตสารสังเคราะห์ขึ้นมาทดแทนสารที่มีอยู่ตามธรรมชาติและปรับปรุงโครงสร้างด้วยปฏิกิริยาเคมี ซึ่งจะนำไปสู่สมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารที่ดีมากขึ้น ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ทำการศึกษาเกี่ยวข้องกับสมบัติทางชีวภาพของสารซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านั้น

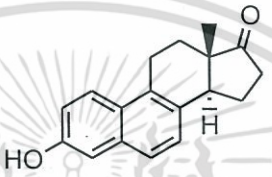
สเตียรอยด์ เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่มใหญ่ที่พบได้จากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิตอย่างกว้างขวางสารจำนวนมากในกลุ่มนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ เช่น วิตามิน D, กรดน้ำดี (Bile acid), คลอเลสเตียรอล (Cholesterol) และฮอร์โมน (Hormones) เป็นต้น โดยความสำคัญทางชีวภาพและเภสัชวิทยาจึงนิยมนำมาใช้ในทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย สเตียรอยด์มีหลากหลายประเภทที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เช่น วิตามินดี (Secosteroids) นำมาใช้รักษาโรค Rickets (โรคกระดูกพิการ) และยังพบว่าสเตียรอยด์ยังเป็นฮอร์โมนในสัตว์และพืชด้วย เช่น Testosterone เป็นฮอร์โมนเพศชายที่ช่วยส่งเสริมสร้างกล้ามเนื้อ Progesterone เป็นฮอร์โมนเพศหญิงที่ช่วยส่งเสริมการตั้งครรภ์ Digoxin ช่วยควบคุมจังหวะการเต้นของหัวใจให้ปกติ และสเตียรอยด์ที่พบในพืช เช่น Brassinosteroids เป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ที่ออกฤทธิ์ต่อการเจริญเติบโตของพืชได้หลากหลาย พบในละอองเรณูของพืชตระกูลผักกาด สเตียรอยด์จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดีและมีความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมในระดับค่อนข้างสูงพบอยู่ในธรรมชาติมากมาย ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาจำนวนมากมายเกี่ยวกับการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสเตียรอยด์ โดยอยู่ในรูปของอนุพันธ์ของสเตียรอยด์ในรูปแบบต่างๆ เพื่อที่จะนำไปใช้ศึกษาการออกฤทธิ์ในทางชีวภาพและพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป สเตียรอยด์ที่นิยมใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์คือ Cholesterol 1 ซึ่งจัดเป็นทั้งสเตียรอยด์ ลิปิด และแอลกอฮอล์ พบในเยื่อหุ้มเซลล์ของทุกเนื้อเยื่อในร่างกายและถูกขนส่งในกระแสเลือดของสัตว์ Cholesterol 1 ส่วนใหญ่ไม่ได้มากับอาหารแต่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกายจะสะสมอยู่มากในเนื้อเยื่อของอวัยวะที่สร้างมันขึ้นมาเช่น ตับ ไขสันหลัง (spinal cord) สมองและผนังหลอดเลือด (atheroma) Cholesterol 1 มีบทบาทในกระบวนการทางชีวเคมีมากมาย แต่ที่รู้จักกันดีคือ เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจ ความผิดปกติของระบบหลอดเลือด (cardiovascular disease) และภาวะคลอเลสเตอรอลในเลือดสูง (Hypercholesterolemia)[1]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



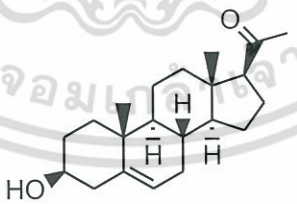
1

ในปี ค.ศ. 1930 ได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์สเตียรอยด์หลายชนิดขึ้น Equilenin 2 เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนชนิดแรกที่ได้จากการสังเคราะห์ ปัจจุบันการสังเคราะห์สารดังกล่าวในปริมาณมากอาจใช้วิธีการสังเคราะห์แบบกึ่งสังเคราะห์ (semi-synthesis) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ที่เริ่มจากสารตั้งต้นในธรรมชาติซึ่งมีขั้นตอนการสังเคราะห์และค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์น้อยกว่า



2

โครงงานพิเศษนี้ สนใจศึกษาแนวทางการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่จากสเตียรอยด์ตั้งต้นที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต โดยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันหลักๆ และนำไปศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่จะใช้วิธีการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์ ซึ่งในการศึกษานี้จะเลือกใช้ Pregnenolone 3 เป็นสารตั้งต้นและศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ Pregnenolone 3 จัดเป็น neurosteroid และเป็นสเตียรอยด์ที่มีโครงสร้างที่เปลี่ยนมาจาก Cholesterol 1 จากโครงสร้างของ Pregnenolone 3 ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่อยู่บนนิวเคลียสของ Pregnenolone 3 ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3, พันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 5 และ 6 และหมู่เมทิลคีโตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 20



3

ซึ่งในโครงงานพิเศษนี้จะทำการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์จาก Pregnenolone 3 โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ให้เป็นหมู่อะมิโนที่เป็นสายโซ่ที่มีความยาวต่างๆ หรือโครงสร้างที่เป็นวงแหวน จากนั้นจะทำการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอะมิโนสเตียรอยด์ ทั้งนี้เพื่อทราบถึงชนิดของหมู่อะมิโนที่มีผลต่อการต้านฤทธิ์แบคทีเรียและยังเป็นแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ด้านเภสัชวิทยากล่าวคือ สามารถสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่จะสามารถใช้เป็นตัวยาทดแทนสเตียรอยด์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

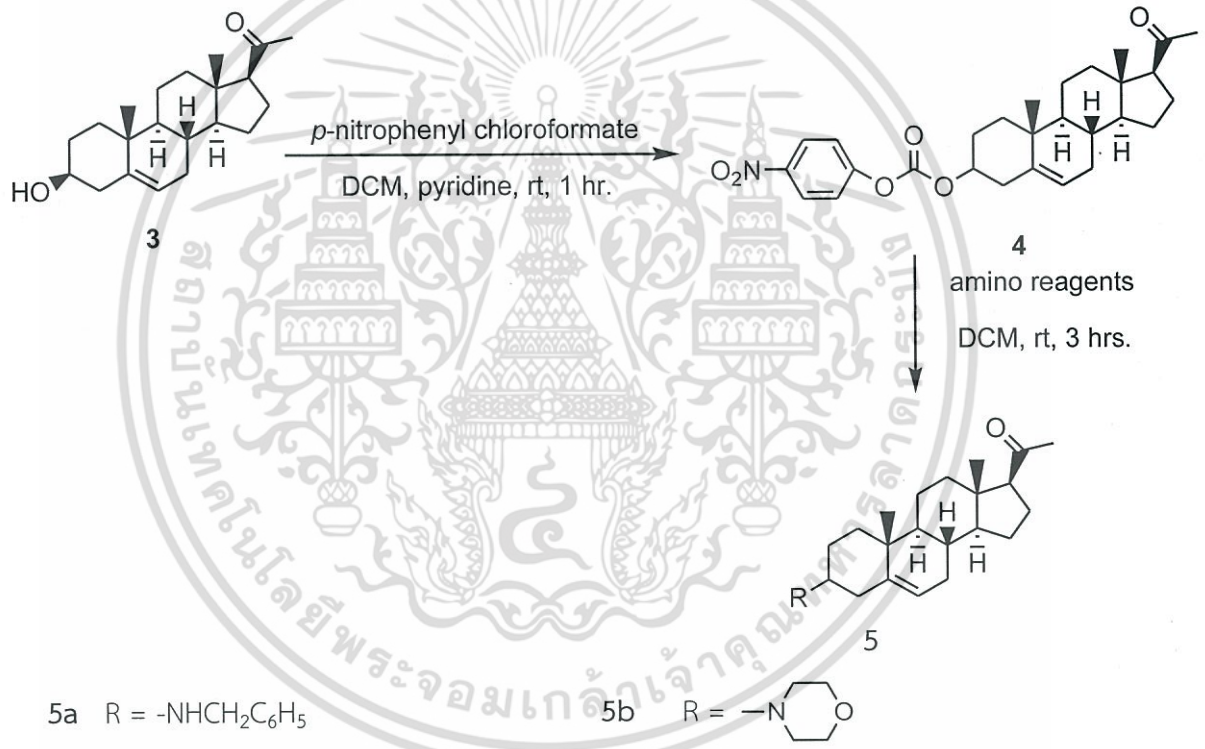
1. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์จาก Pregnenolone **3**

2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์ได้

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1. สังเคราะห์อนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์จาก Pregnenolone **3** แสดงดังแผนภาพที่ 1.1

แผนภาพที่ 1.1



5a R = $-NHCH_2C_6H_5$ **5b** R = —N O

5c R = $-NH(CH_2)_6NH_2$ **5d** R = $-NHCH_2CH(OH)CH_2NH_2$

2. แยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

3. ศึกษาโครงสร้างของอะมิโนสเตียรอยด์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

4. ศึกษาฤทธิ์ของอนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคมนุษย์ของ 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ด้วยวิธี Paper disc diffusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่จาก Pregnenolone **3** ซึ่งอนุพันธ์เหล่านี้อาจแสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

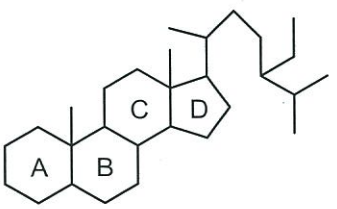
2. สามารถทราบถึงฤทธิ์ของอะมิโนสเตียรอยด์ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สเตียรอยด์ (Steroids)[2]

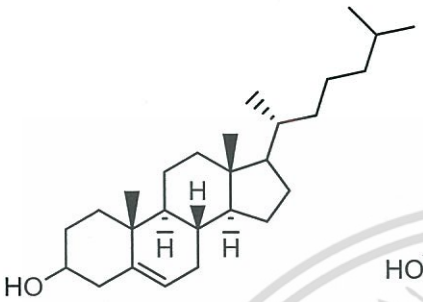
ในปัจจุบันนี้การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในวงการการแพทย์และเภสัชโดยนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับจุลชีพซึ่งโดยทั่วไปมักเป็นเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้จากการทดลองอยู่ในเกณฑ์ที่ดี และสารประกอบที่ได้รับความนิยมตลอดจนนำมาศึกษาคือ สารประกอบกลุ่มสเตียรอยด์โดยเป็นสารประกอบประเภทลิพิดที่พบได้ในทั้งพืชและสัตว์ โครงสร้างพื้นฐานของสเตียรอยด์จะมีวงไฮโดรคาร์บอนที่อิ่มตัวอยู่ 4 วง ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยม 3 วง คือ วง A B และ C และวงห้าเหลี่ยม 1 วงคือวง D ความแตกต่างของชนิดสเตียรอยด์จะผันแปรไปตามหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่ติดอยู่กับวงแหวนเหล่านี้ มีสเตียรอยด์แตกต่างกันนับร้อยชนิดที่สามารถตรวจพบในพืชและสัตว์ ตัวอย่างสารประกอบสเตียรอยด์ที่สำคัญเช่น อนุพันธ์ของวิตามินดี, กรดน้ำดี, ฮอร์โมนเพศ และฮอร์โมนต่อมหมวกไต เป็นต้น ในปัจจุบันพบว่าสเตียรอยด์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตมีฤทธิ์ทางชีวภาพไม่สูงนัก จึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพได้ดีเท่าที่ควร ดังนั้นการศึกษาสเตียรอยด์จึงมุ่งเน้นไปที่การปรับปรุงโครงสร้างของสเตียรอยด์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย หากผลที่ได้จากการทดลองอยู่ในเกณฑ์ดีและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ในร่างกาย สเตียรอยด์ชนิดนั้นก็สามารถใช้เป็นองค์ประกอบในตัวยาได้ ซึ่งยาที่สำคัญที่มีสเตียรอยด์เป็นองค์ประกอบหลักเช่น Hydrocortisone, Prednisolone, Triamcinolone, Fluocinolone, Betamethasone, Clobetasol, Desoximetasone, Prednicarbate, Mometasone, Beclomethasone, Budesonide และ Dexamethasone เป็นต้น แต่ยาในกลุ่มสเตียรอยด์ก็มีโทษเช่นเดียวกันโดยจะเกิดผลข้างเคียงได้หากใช้ในปริมาณที่มากเกินไป เช่น ความดันโลหิตสูง, คลื่นไส้ อาเจียน, เบื่ออาหาร, กล้ามเนื้ออ่อนแรง, ผิวหนังบางลีบ, ภาวะไขมันในเลือดสูง, ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง และติดเชื้อง่ายขึ้นเพราะยากดระบบภูมิคุ้มกันที่คอยต่อต้านเชื้อโรค เป็นต้น ดังนั้นในการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะ นักวิจัยจึงต้องทำการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย เพื่อที่จะไม่เป็นการสะสมปริมาณสารประกอบสเตียรอยด์ในร่างกายมากเกินไป



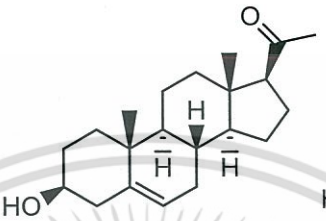
รูปที่ 2.1 โครงสร้างหลักของสเตียรอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

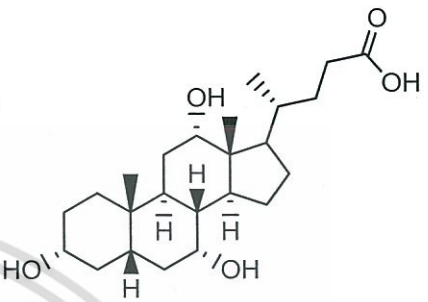
โดยส่วนใหญ่สเตียรอยด์จะมีบทบาทสำคัญอย่างมากในด้านเภสัชกรรม เนื่องจากถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆเพื่อใช้รักษาโรค หรือถูกนำไปใช้สังเคราะห์สารประกอบภายในร่างกาย เช่น วิตามินดี, กรดน้ำดี และ ฮอร์โมนเพศ เป็นต้น เพื่อนำไปใช้รักษาผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันทางร่างกายความบกพร่องเช่นเดียวกัน โดยมีตัวอย่างของสารประกอบจำพวกสเตียรอยด์ดังต่อไปนี้



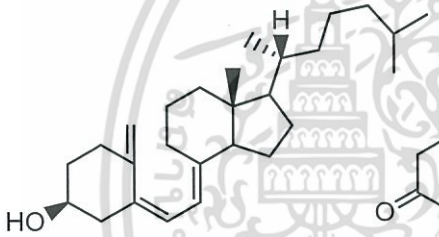
Cholesterol 1



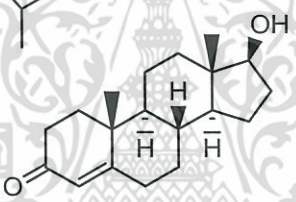
Pregnenolone 3



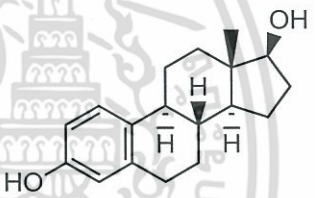
Cholic acid 6



Vitamin D 7



Testosterone 8

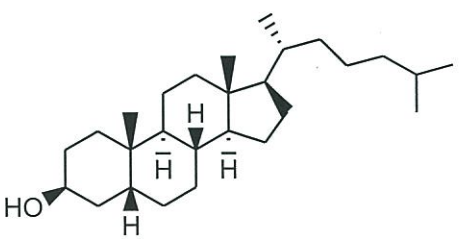


Estrogen 9

2.2 สเตียรอยด์ที่พบในธรรมชาติ[3]

สารสเตียรอยด์ที่สำคัญในธรรมชาติส่วนใหญ่คือ

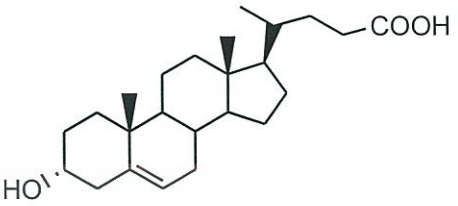
1. สเตอรอล (Sterol) Cholesterol 1 เป็นสเตอรอลตัวหนึ่งที่พบมากในธรรมชาติ พบได้ในสัตว์ทั้งกลุ่มมีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังและในพืชด้วยโดยพบร่วมกับสเตียรอยด์ในกลุ่มสเตอรอลตัวอื่นๆ เช่น Coprostan-3β-ol 10



10

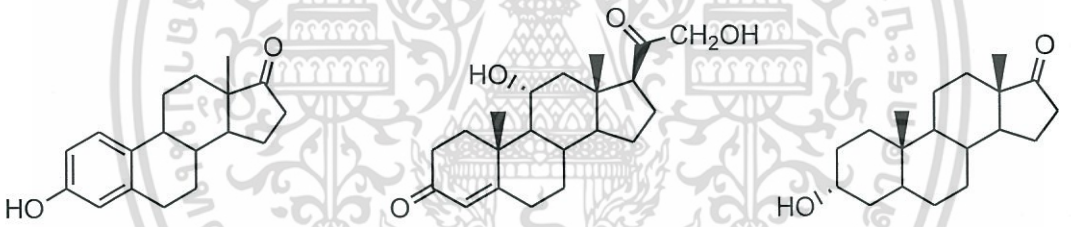
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ไบล์ แอซิด (Bile acid) แยกได้จากน้ำดีของสัตว์ชั้นสูง อาจพบอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม โดยเป็น Peptidic conjugate กับ Taurine และ Glycine สารในกลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือคาร์บอนตำแหน่ง C-27 และ C-28 แอซิด พบในน้ำดีของสัตว์เลี้อยคลานและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และอีกแบบคือคาร์บอนตำแหน่ง C-24 แอซิด เช่น Lithocholic acid **11**



11

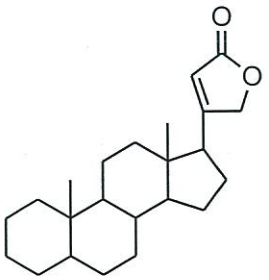
3. สเตียรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormones) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งคือ สเตียรอยด์ที่เป็นฮอร์โมนเพศและสามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่มฮอร์โมนเพศหญิง เช่น Estrogen **12** และกลุ่มฮอร์โมนเพศชาย เช่น Testosterone **8** และกลุ่มที่สองคือกลุ่ม Adrenocortical hormones แบ่งออกเป็น กลุ่ม Glucocoticoids เช่น Hydrocortisone **13** และ กลุ่ม Mineralocorticoids เช่น Andosterone **14**



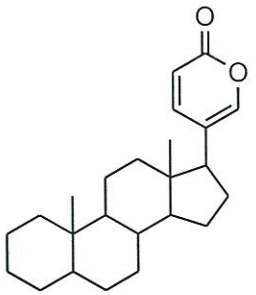
12 13 14

4. คาร์ดิแอ็ก กลัยโคไซด์ (Cardiac glycosides) สเตียรอยด์ในกลุ่มนี้มีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่งเรียกว่า Cardiac–active (Cardiotonic) สารประกอบนี้แยกได้จากพืชที่อยู่ในเขตร้อน และ สามารถพบได้ในเขตแอฟริกาและอเมริกาใต้ ชาวพื้นเมืองใช้เตรียมเป็นลูกดอกอาบยาพิษ อาจพบ บางชนิดในน้ำลายคางคก สเตียรอยด์กลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กลุ่ม Cardenolides **15** เป็นสเตียรอยด์ชนิด C-23 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 เป็นชนิด 5-membered unsaturated lactone ring และกลุ่ม Bufadienolides **16** เป็นสเตียรอยด์ชนิด C–24 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 เป็นชนิด 6-membered unsaturated lactone ring

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

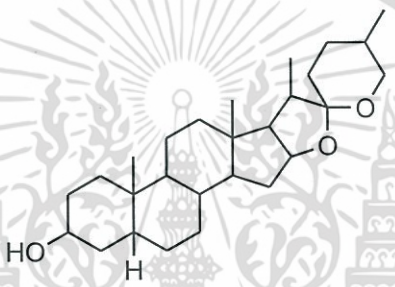


15



16

5. Sapogenins อะไกโคนหรือส่วนที่ปราศจากน้ำตาลของพืชที่สามารถทำให้เกิดฟองได้ในน้ำได้เรียกว่า Saponin ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้เช่น Smilagenin 17



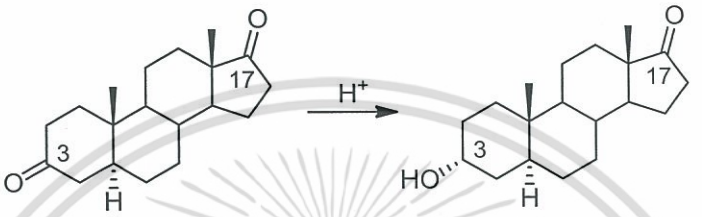
17

2.3 ความสำคัญของสเตียรอยด์กับการสังเคราะห์ทางเคมีอินทรีย์

ในปัจจุบันมีการนำสเตียรอยด์มาใช้ศึกษากันอย่างแพร่หลายเพื่อที่จะนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด การศึกษาสเตียรอยด์ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่กระบวนทางเภสัชกรรมและทางการแพทย์โดยศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลและประมวลผลการทดลอง ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะสามารถนำไปใช้คิดค้นนวัตกรรมยาชนิดใหม่ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อโรคชนิดใหม่ได้ โดยวิธีการหลักๆ ที่ใช้ในการศึกษาสเตียรอยด์คือ การสังเคราะห์ทางเคมีอินทรีย์ ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง โดยการปรับปรุงโครงสร้างสเตียรอยด์โดยใช้ปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์ จะได้ผลิตภัณฑ์ใหม่เกิดขึ้นและนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อโรคชนิดต่างๆ และนำผลที่ได้จากการทดลองมาประมวลผล จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยมและวงห้าเหลี่ยมมาเชื่อมต่อกัน หมู่แทนที่ต่างๆ ที่มาเกาะจะเป็นหมู่ฟังก์ชันที่คล้ายคลึงกันมีคุณสมบัติทั้งมีขั้วและไม่มีขั้วจึงทำให้สเตียรอยด์มีคุณสมบัติที่หลากหลาย นักเคมีใช้ปฏิกิริยาเฉพาะทางเคมีอินทรีย์ในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและรวมถึงโครงสร้างเพื่อเป็นการนำไปสู่สเตียรอยด์ชนิดใหม่ และเป็นแนวทางการสังเคราะห์สเตียรอยด์เลียนแบบธรรมชาติ โดยการเลือกใช้รีเอเจนต์หรือสารเข้าทำปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจง และควบคุมสภาวะที่เหมาะสมเพื่อจะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มากพอต่อการนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จากรายงานการวิจัยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างมักมุ่งเน้นไปที่หมู่ฟังก์ชันเป็นส่วนใหญ่ ที่ ring A และ ring B หรือหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง การเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนโครงสร้างสเตียรอยด์จะขึ้นกับตำแหน่งบนโครงสร้าง ลำดับความสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาคือ 3 11 17 และ 20 ตัวอย่างเช่น การเข้าทำปฏิกิริยาของนิวคลีโอไฟล์ที่หมู่คาร์บอนิล การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยไฮไดรด์ไอออน การเกิดคีทาล (ketal formation) และปฏิกิริยาการเพิ่มโดยกรินยาร์ดรีเอเจนต์ สามารถเรียงลำดับตำแหน่งที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาได้คือ 3 > 17 ≥ 20 > 11 เช่นความเฉพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ 5α-androstane–3,17-dione **18** เป็น 3-hydroxy-5α-androstane-17-one **19** แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งที่ 3 สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่าตำแหน่งที่ 17[4]



18 19

2.4 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเซลล์เดียว มีขนาดกว้างโดยเฉลี่ยประมาณ 1.5 ไมโครเมตร และยาวประมาณ 2 ไมโครเมตร มีผนังเซลล์ (Cell wall) ที่แข็งแรง ทำให้คงรูปอยู่ได้ ได้อาหารด้วยวิธีดูดซึม สืบพันธุ์ด้วยการแบ่งตัวแบบ Binary fission ทำให้ได้แบคทีเรียใหม่ 2 เซลล์ ขนาดเท่าๆ กัน เซลล์ของแบคทีเรียเป็นแบบ Prokaryotes คือ เป็นเซลล์ที่ไม่มี Nuclear membrane ไม่มี Nucleus เป็นขอบเขตที่ชัดเจน ส่วนสิ่งที่มีชีวิตอื่นๆ เช่น คน สัตว์ พืช สาหร่าย และ Protozoa เป็นเซลล์แบบ Eukaryotes คือ เซลล์ที่มี Nucleus จริงๆ มี Membrane ล้อมรอบ Nucleus

เชื้อแบคทีเรียถือว่าเป็น 1 ใน 5 ชนิดของเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดโรคติดต่อ นอกเหนือไปจากเชื้อไวรัส เชื้อรา ริกเกตเซีย และพยาธิ[5] ในโครงงานพิเศษนี้เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วย 5 ชนิด จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด คือ

1. *B. subtilis* ATCC 6633
2. *M. luteus* ATCC 9341
3. *S. aureus* TISTR 1466

และแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ

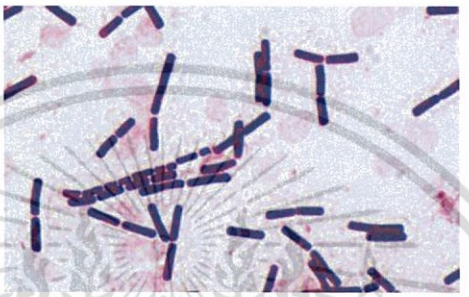
1. *E. coli* ATCC 25922
2. *P. aeruginosa* ATCC 27853

รายละเอียดโดยสังเขปของแบคทีเรียแต่ละชนิดมีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*

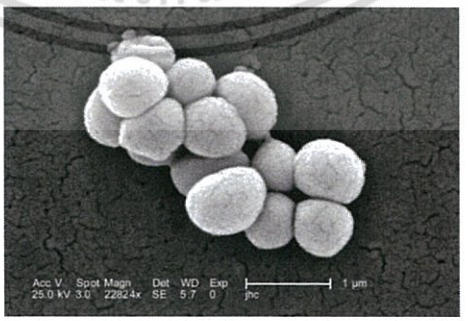
B. subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่งที่อยู่ในกลุ่ม Strict aerobe หรือ Facultative anaerobe มีขนาดประมาณ 0.5-1 x 3-10 ไมครอน พบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงตัวเป็นสาย คุณสมบัติเด่นของเชื้อคือความสามารถในการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ ซึ่งจะเกิดขึ้นเฉพาะเมื่อเซลล์เจริญอยู่ในบรรยากาศที่มีก๊าซออกซิเจนเท่านั้น จึงเรียกสปอร์ชนิดนี้ว่า Aerobic endospore[6,7] โรคที่เกิดจากเชื้อ *B. subtilis* ได้แก่ โรคปอดบวม (ชนิดรุนแรง), โรคติดเชื้อในกระแสเลือด, โรคลิ้นหัวใจอักเสบ และโรคท้องร่วง เป็นต้น



รูปที่ 2.2 แสดงรูปร่างของ *B. subtilis*

2.4.2 เชื้อแบคทีเรีย *M. luteus*

M. luteus จัดอยู่ในสกุล (genus) *Micrococcus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมเรียงตัวเป็นกลุ่ม เส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาด 0.5 – 2.0 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ซึ่งพบอาศัยเป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนังและเยื่อเมือกผิว รวมถึงพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคนน้อย แต่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (microbial spoilage) ได้หลายประเภท เช่น น้ำนม ไข่ เนื้อสัตว์ สัตว์ปีก อาหารกึ่งแห้ง อาหารทะเล ปลา หอย รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก แฮม



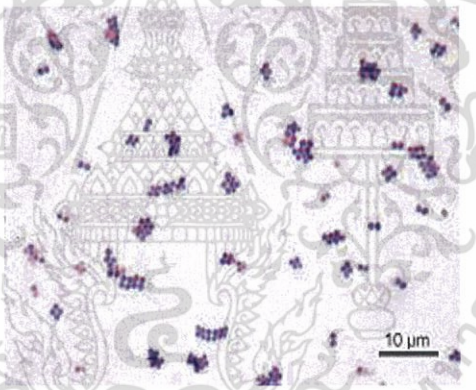
รูปที่ 2.3 แสดงรูปร่างของ *M. luteus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การก่อให้เกิดโรคของ *M. luteus* ในคนพบได้น้อย ส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องและสัมพันธ์กับการใช้อุปกรณ์ทางการแพทย์เข้าสู่ร่างกาย สามารถก่อโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ ระบบประสาท และการติดเชื้อในกระแสเลือด การวินิจฉัยเชื้อในระดับสปีชีส์ไม่นิยมทำในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากเชื้อมีความสำคัญน้อยทางคลินิกและมักเป็นเชื้อปนเปื้อน เชื้อ *Micrococcus* ไวต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ รวมไปถึงยา Penicillin[6,8]

2.4.3 เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.5 ไมครอน มักอยู่รวมเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น จำนวนเซลล์ในแต่ละกลุ่มไม่แน่นอน บางครั้งอาจเห็นเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ก็ได้ เชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Non-motile) เชื้อในสกุลนี้สามารถเจริญในที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 10% และเจริญได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกันตั้งแต่ 18-40 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถทนต่อความแห้งและทนความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสได้นานถึง 30 นาที



รูปที่ 2.4 แสดงรูปร่างของ *S. aureus*

ลักษณะสำคัญของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. aureus* คือเกิดการอักเสบเป็นหนองในตำแหน่งติดเชื้อที่เรียกว่า Suppurative (หรือ pyogenic) infection หรือมักทำให้เกิดฝีหนอง (Abscess) โดยเฉพาะในบริเวณผิวหนังและชั้นเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง เอนไซม์ Coagulase กระตุ้นการจับกลุ่มของเส้นใย fibrin ทำให้เกิดการสร้างผนังขึ้นล้อมรอบรอยโรคเกิดเป็นก้อนฝี ซึ่งภายในประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่เน่าตายรวมตัวกันเป็นหนอง อย่างไรก็ตาม เชื้อจากรอยโรคอาจแพร่กระจายเข้าสู่เลือดไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ทำให้สามารถก่อโรคติดต่อตามระบบได้[6] โรคที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* ได้แก่ โรคติดเชื้อของชั้นผิวหนัง, โรคติดเชื้อระบบไหลเวียนเลือด, โรคติดเชื้อของระบบหายใจ, โรคติดเชื้อระบบทางเดินอาหาร และโรคติดเชื้อของกระดูกและข้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 เชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

E. coli เป็นเซลล์รูปท่อน แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ อาจเคลื่อนที่ได้หรือไม่เคลื่อนที่ บางสายพันธุ์แยกได้จากนอกลำไส้สร้างแคปซูลได้ ให้โคโลนีเรียบ ไม่มีสี มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตรในเวลา 18 ชั่วโมง แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารที่แสดงความแตกต่าง (Differential media) เช่น Mac Conkey Agar โคโลนีมีสีชมพู ขนาดใหญ่ หรือเลี้ยงในอาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) โคโลนีมีสีมันวาวคล้ายโลหะ เชื้อนี้เจริญได้ดีในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45 องศาเซลเซียส) บางสายพันธุ์ทนความร้อน 60 องศาเซลเซียส 15 นาที หรือ 55 องศาเซลเซียส 60 นาที เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นทั่วไปจึงตรวจพบได้จากอุจจาระในปริมาณมาก โดยปกติ *E. coli* ประจำถิ่นเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคแต่อาจฉวยโอกาสก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องได้ ซึ่งเชื้อจะก่อโรคได้เมื่อเข้าสู่ร่างกายโดยการกินอาหาร และน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* เหล่านี้เข้าไปเป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงในคน *E. coli* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรค อาจทำให้เกิดโรคดังนี้ ท้องร่วง (Gastroenteritis) ทางเดินปัสสาวะอักเสบ (Urinary tract infections) และ เยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กทารก (Neonatal meningitis)[9,10]

รูปที่ 2.5 แสดงรูปร่างของ *E. coli*

2.4.5 เชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa*

P. aeruginosa มีลักษณะเป็นรูปท่อนหรือโค้งเล็กน้อย เคลื่อนที่ด้วยโพลาร์เฟลกเจลลา มีขนาด 0.5-1.0 x 1.5-5.0 ไมโครเมตร เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ ผนังเซลล์ประกอบด้วยลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) ที่มีโครงสร้างคล้ายแบคทีเรียในตระกูลเอนเทอโรแบคทีรีเอซี (Enterobacteriaceae) แต่มีสารเคมีบางหมู่ต่างกัน ส่วนของสายโซ่พอลิแซ็กคาไรด์ไซด์ (Polysaccharide side chain) ที่ยื่นออกมาจากเมมเบรนชั้นนอก (LPS) เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับความจำเพาะทางซีโรโลยีและความไว (Susceptible) ต่อแบคทีริโอซินหรือไพโอซิน (Bacteriocin or Pyocin) *P. aeruginosa* ยังมีชั้นเมือก (Slime layer) ที่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์และมีพิไลอยู่ที่ผิวเซลล์ด้วย เป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสจะมีการติดเชื้อกับผู้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำหรือป่วยมากๆ ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ในหลายส่วนของร่างกาย การติดเชื้อที่เกิดขึ้นจากเชื้อ *P. aeruginosa* ได้แก่ การติดเชื้อในกระแสเลือด (Bacteremia) และเยื่อบุหัวใจอักเสบ (Endocarditis), การติดเชื้อที่ปอด (Pulmonary

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

infections), การติดเชื้อที่หู (Ear infections) หรือหูส่วนนอกอักเสบ (External otitis) และการติดเชื้อที่แผลไฟไหม้[9]

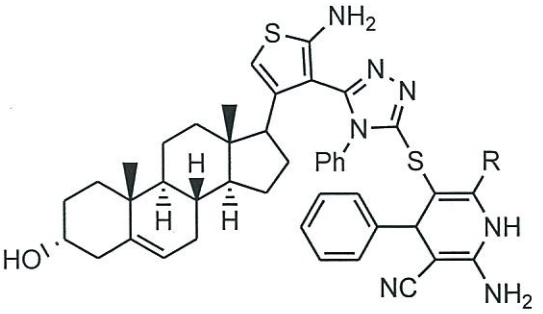
รูปที่ 2.6 แสดงรูปร่างของ *P. aeruginosa*

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

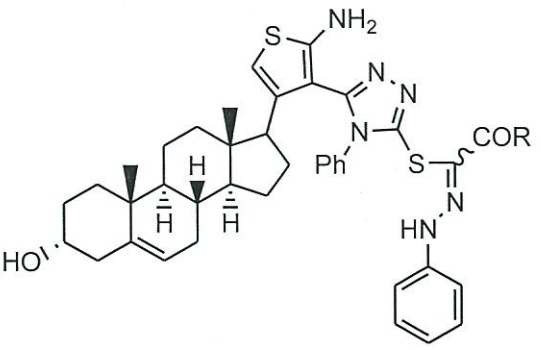
สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการศึกษานี้คือ Pregnenolone **3** ซึ่งเป็นสเตียรอยด์อีกชนิดหนึ่งที่นักเคมีอินทรีย์นิยมนำมาเป็นสารตั้งต้นในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและ/หรือปรับเปลี่ยนโครงสร้าง และเมื่อนำสเตียรอยด์สังเคราะห์ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพผลการทดลองพบว่าสเตียรอยด์สังเคราะห์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ Pregnenolone **3** และบางชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยกว่า Pregnenolone **3** จากโครงสร้างของ Pregnenolone **3** ที่ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันหลักที่คาร์บอนตำแหน่งต่างๆ กันได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3, พันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 5 และ 6 และหมู่คีโตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 20 ซึ่งนักเคมีอินทรีย์มักจะเลือกรีเอเจนต์ที่เฉพาะเจาะเข้าทำปฏิกิริยาบนคาร์บอนอะตอมตำแหน่งต่างๆ และรวมถึงการต่อสายโซ่ที่หมู่เมทิลคีโตให้เป็นสายโซ่ยาวและเพิ่มหมู่ฟังก์ชันเข้าที่สายโซ่นั้นๆ นอกจากนั้น แนวทางการทดลองใหม่ๆนี้ยังสามารถนำไปใช้พัฒนาในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้อีก ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่จาก Pregnenolone **3** และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์เหล่านั้น ได้แก่

Mohareb และคณะ[11] ทำการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่โดยการทำปฏิกิริยาที่หมู่เมทิลคีโต (คาร์บอนตำแหน่งที่ 21) ของ Pregnenolone **3** และศึกษาผลที่มียับยั้งการอักเสบจากบาดแผล พบว่าผลทดสอบความเป็นพิษกับลูกกุ้ง โดยใช้ค่า LC_{50} เป็นตัวชี้วัด สารสังเคราะห์ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้บ้าง สาร **20, 21a** และ **21b** สามารถออกฤทธิ์ได้ที่ค่า LC_{50} มากกว่า 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



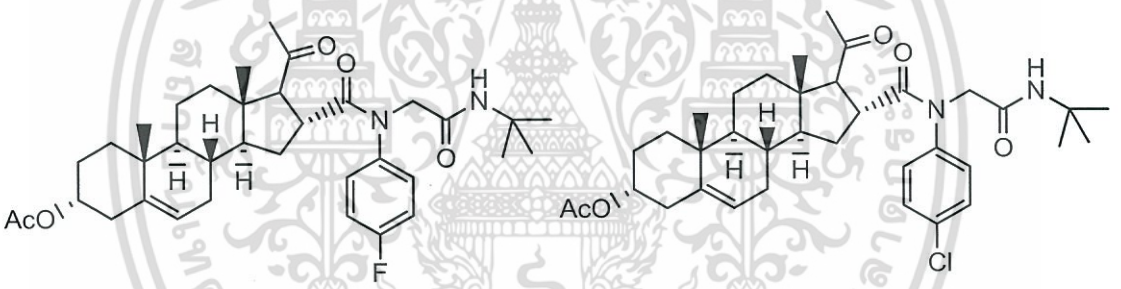
20



21a X = H, R = OEt

21b X = H, R = Ph

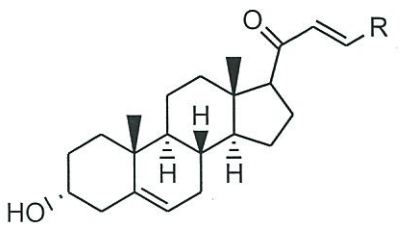
Ramírez และคณะ[12] ทำการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่โดยการทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-16 ของ Pregnenolone **3** และนำสารสังเคราะห์มาทดสอบการยับยั้งการเติบโตของเซลล์ไวรัส HSV-1 (เซลล์ไวรัสโรคเริม) ส่วนใหญ่จะติดเชื้อที่บริเวณผิวหนังริมฝีปากและอวัยวะเพศ พบว่าสาร **22** และ **23** มีค่า CC_{50} มากกว่า 200 ไมโครโมลาร์

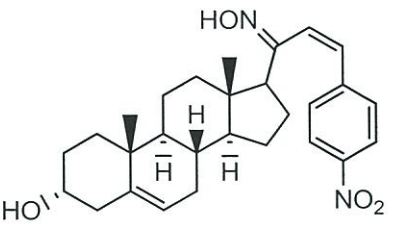


22

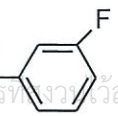
23

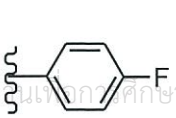
Banday และคณะ[13] ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT-15) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ของสารสังเคราะห์จากการต่อสายโซ่ของหมู่เมทิลคีโตที่คาร์บอนตำแหน่ง C-21 ของ Pregnenolone **3** พบว่าสาร **24a**, **24b** และ อนุพันธ์ออกซีม **25** ออกฤทธิ์ยับยั้งจะมีค่า IC_{50} ต่ำกว่า 1.5 ไมโครโมลาร์





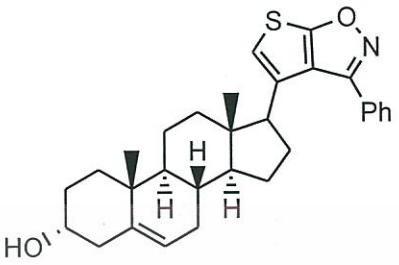
25

24a R = 

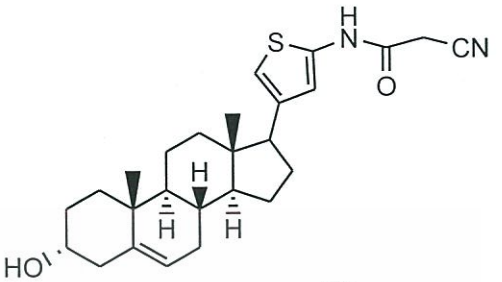
24b R = 

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

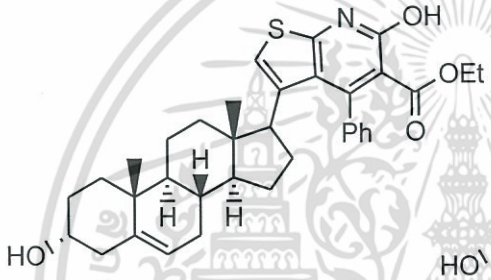
Mohareb และคณะ[14] ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และ เซลล์มะเร็งตับ (HA22T และ HepG2) โดยใช้ค่า IC_{50} เป็นตัวชี้วัด พบว่า สาร **26, 27, 28** และ **29** มีฤทธิ์ต่อเซลล์ไลน์ทั้งสามชนิดในระดับที่ดี



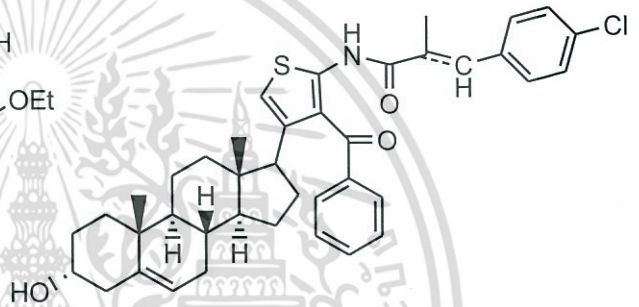
26



27

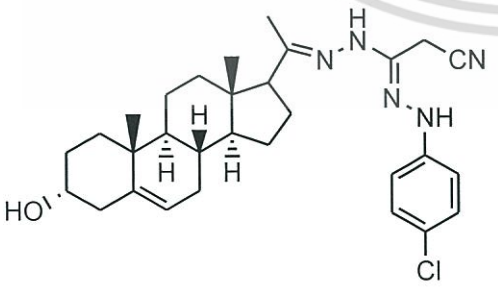


28

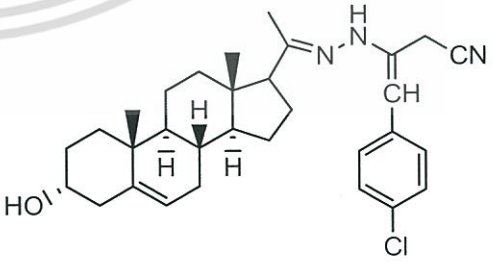


29

Mohareb และคณะ[15] ศึกษาความเข้มข้นของสารสังเคราะห์จากอนุพันธ์ออกซีมของ Pregnenolone **3** ที่ยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H460) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยใช้ค่า GI_{50} เป็นตัวชี้วัด พบว่าสาร **30, 31, 32a, 32b, 33a, 33b, 34** และ **35** ออกฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีที่ค่า GI_{50} ต่ำกว่า 1 ไมโครโมล/ลิตร

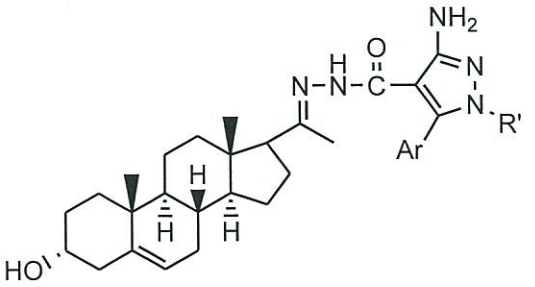


30



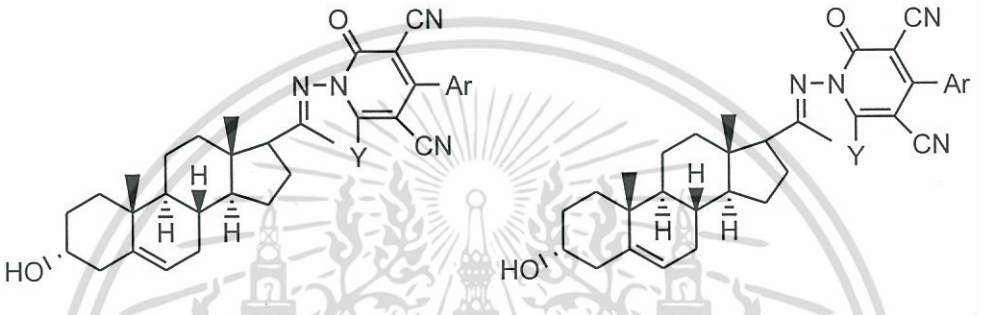
31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



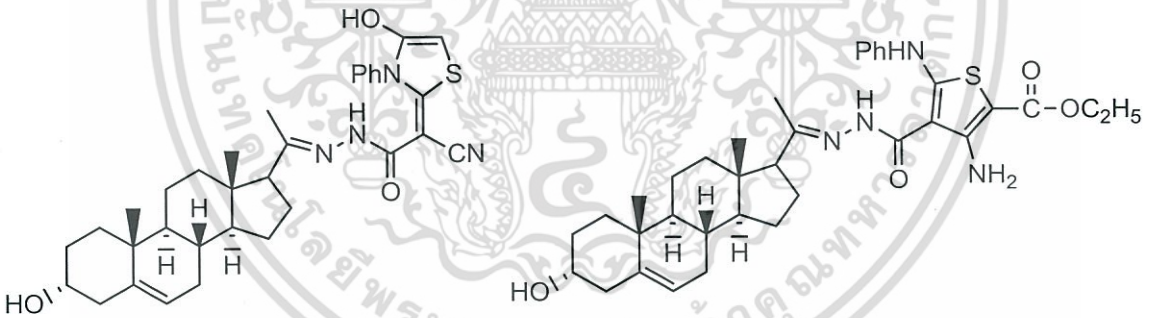
32a Ar = 4-Cl-C_6H_4, R"= H

32b Ar = 4-Cl-C_6H_4, R" = Ph



33a Y = NH, Ar = 4-OCH_3-C_6H_4

33b Y = OH, Ar = C_6H_5

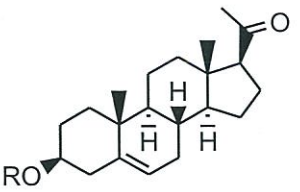


34

35

วณาวรรณ[16] ได้สังเคราะห์เพรกนินโนโลนซัลเฟต **36** โดยเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Pregnenolone **3** จากหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 เป็นหมู่ซัลเฟตพบว่า เพรกนินโนโลนซัลเฟต **36** มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra อันเป็นสาเหตุของโรควัณโรค และผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของอนุพันธ์ของแอลลิลของเพกนินโนโลน **37** สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (MRSA), *Corynebacterium diphtheriae*, *B. subtilis* ATCC 6633 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853

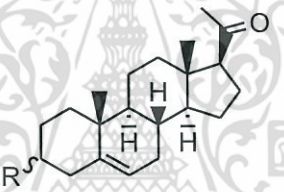
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



36 R = $-SO_3H$

37 R = $CH_2CH{=}CH_2$

ณฐกรและคณะ[17] พบว่าอนุพันธ์อะมิโนเพรกนินโนโลนที่ทำการสังเคราะห์โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ให้เป็นหมู่อะมิโนที่เป็นสายโซ่ที่มีความยาวต่างๆ กันหรือบนสายโซ่มีหมู่ฟังก์ชันอื่นเกาะอยู่ และทำการทดสอบเบื้องต้นโดยเน้นศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าอนุพันธ์อะมิโนเพรกนินโนโลน **38** และ **39** สามารถออกฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง human hepatocellular liver carcinoma cell lines (HepG2) หรือเซลล์มะเร็งตับได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.23 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และ 2.09 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ตามลำดับ



38 R = $NH(CH_2)_6NH_2$

39 R = $NHCH_2(OH)CH_2NH_2$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารสังเคราะห์และการทำโครมาโทรกราฟี

	เกรด	บริษัท
1. Pregnenolone	วิเคราะห์	Sigma-Aldrich
2. 1,6-Hexamethylenediamine	วิเคราะห์	Sigma-Aldrich
3. 1,3-Diamino-2-propanol	วิเคราะห์	Sigma-Aldrich
4. Morpholine	วิเคราะห์	Sigma-Aldrich
5. Benzylamine	วิเคราะห์	Sigma-Aldrich
6. *p*-Nitrophenyl chloroformate	วิเคราะห์	Merck
7. Hexane	การค้า	Zen point
8. Dichloromethane	วิเคราะห์	Lab scan
9. Ethyl acetate	การค้า	Zen point
10. Methanol	การค้า	Zen point
11. Ethanol	การค้า	Zen point
12. Acetone	การค้า	Zen point
13. Pyridine	วิเคราะห์	Lab scan
14. Anhydrous sodium sulfate	วิเคราะห์	Fisher scientific
15. Anisaldehyde	วิเคราะห์	Fluka
16. Silica gel 60 0.04-0.06 mm		Scharlau GE0048
17. Silica gel 0.06-0.2 millimeter		Carlo erba
18. Sea sand		Merck

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

1. Dichloromethane
2. Ethyl acetate
3. Dimethyl sulfoxide
4. Methanol
5. Gentamicin
6. Mueller Hinton Agar (MHA)
7. Normal saline Solution 0.85%
8. Nutrient Agar (NA)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.1 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้เตรียมสารสังเคราะห์และการทำโครมาโทรกราฟี

1. กรวยกรอง (Funnel)
2. กรวยแยก (Separator funnel) ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. กระดาษกรอง (Filter paper) ADVANTEC เบอร์ 2
4. กระดาษชั่งสาร (Weighing papers)
5. กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร
6. ขวดก้นกลม (Round-bottomed flask) ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร
7. ขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก (Vial)
8. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
9. เครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาให้ความร้อน (Hot plate & Stirrer)
10. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance) METTLER TOLEDO
11. คอลัมน์แก้ว (Glass colum)
12. ช้อนตักสาร (Spatula)
13. แท่งแก้ว (Glass rod)
14. แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. นาฬิกาจับเวลา (Stop watch)

16. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

17. ปากคีบ (Forceps)

18. แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี (TLC aluminium sheets, silica gel F_{254}, MERCK)

19. สำลี (Cotton)

20. หลอดคาปิลลารี (Capillary tube)

21. หลอดหยด (Dropper)

22. หลอดทดลอง (Test tube)

23. เครื่องดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร

24. เครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER
    รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกกะเฮิร์ท

25. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) Büchi
    รุ่น Rotavapor R-114

3.2.2 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ทดลองฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

1. เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance)

2. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

3. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

4. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow)

5. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)

6. ปากคีบ (Forceps)

7. กระดาษกรอง (Filter paper) Whatman เบอร์ 1

8. ไมโครปิเปตขนาด 2-20 ไมโครลิตร (Micropipetted)

9. ไมโครปิเปตขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร

10. ไม้พันสำลี (Sterile cotton sat)

11. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

12. หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการทดลองทั่วไป

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้การสังเคราะห์สารได้แก่ Dichloromethane (DCM) นำมาใช้โดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์ (เกรดวิเคราะห์ Lab Scan), pyridine (เกรดวิเคราะห์ Lab Scan) นำมากลั่นเพื่อทำให้บริสุทธิ์และเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนการใช้งาน

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สำหรับการทำโครมาโทรกราฟี ได้แก่ Hexane, Ethyl acetate และ Methanol (เกรดการค้า Zen point) นำมาผ่านกระบวนการกลั่นเพื่อทำให้บริสุทธิ์ก่อนการใช้งาน

สารเคมีที่ใช้เป็นสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ในการสังเคราะห์เป็นเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Fluka และ Sigma-Aldrich โดยไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟีทำให้ปรากฏบนแผ่น Aluminium sheet Silica gel F_{254} Merck ตรวจสอบจุดของสารผลิตภัณฑ์ด้วยการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และโดยการย้อมด้วย anisaldehyde reagent แล้วให้ความร้อนแผ่น TLC บนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

การแยกสารสังเคราะห์ให้บริสุทธิ์ทำได้โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี ใช้เฟสคงที่คือ Silica gel 60 0.04-0.06 mm (Scharlau GE0048) และใช้เฟสเคลื่อนที่คือ ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate และคลุกสารที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Silica gel 0.06-0.2 millimeter (Carlo erba)

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

3.4 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์

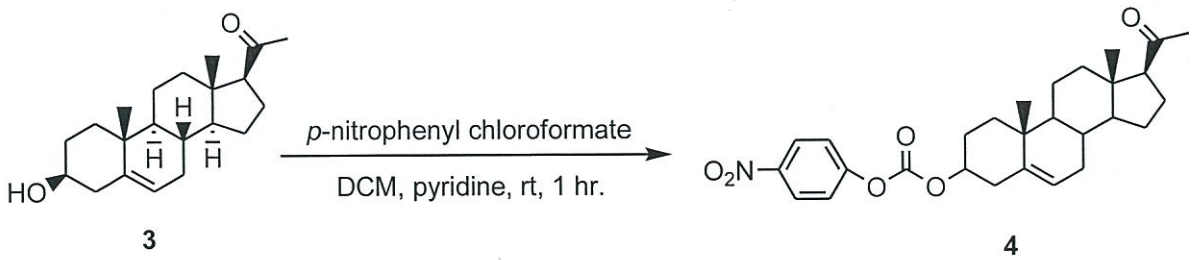
3.4.1 วิธีการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์

แนวทางการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์จาก Pregnenolone **3** จะดำเนินการสังเคราะห์ด้วยวิธีของณฐกรและคณะ[17] โดยแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone **3** ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 ให้เป็นหมู่หลุดออกที่ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนภาพที่ 3.1



3 4

1. ชั่ง Pregnenolone 3 300 มิลลิกรัม (0.95 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลมซึ่งภายในมีแท่งแม่เหล็กอยู่ ซึ่งวางอยู่บนเครื่องปั่นกวน จากนั้นเติม DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวน จนกระทั่ง Pregnenolone 3 ละลายหมด

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

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

4. หยุดการปั่นกวน และนำสารที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะได้ของผสมเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน

5. ทำการแยกสารผสมให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate โดยที่ผลรวมของอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 100 เริ่มต้นจากสารละลายไม่มีขั้วคือ hexane : ethyl acetate เป็น 100 : 0 แล้วค่อยๆเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย โดยเพิ่มปริมาตรของ ethyl acetate จาก 0 เป็น 2 , 5 , 7 , 10 , 12 , 15 , ... และลดปริมาตรของ hexane จาก 100 เป็น 98 , 95 , 93 , 90 , 88 , 85 , ... ตามลำดับ

6. ตรวจสอบสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เป็น 7 : 3 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารตั้งพิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R_f เดียวกัน การดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และการให้สีกับ anisaldehyde reagent สีเดียวกัน ให้เก็บรวมไว้ด้วยกันในขวดก้นกลม

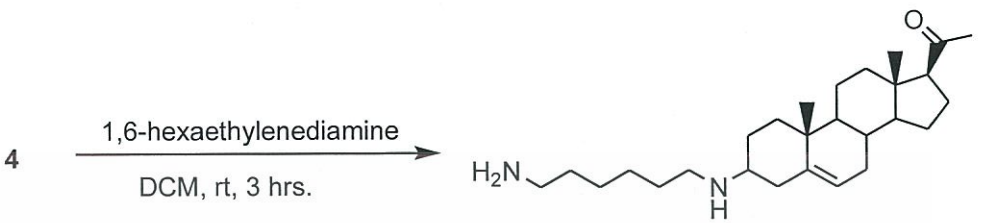
7. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดก้นกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. นำสารผลิตภัณฑ์มาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 2 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **4** และอะมิโนรีเอเจนต์

แผนภาพที่ 3.2



5c

1. ละลาย 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **4** ใน DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งละลายหมด

2. เติม 1,6-hexamethylenediamine ปริมาตร 139.4 มิลลิกรัม (1.20 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิห้อง และทำการปั่นกวนต่อที่อุณหภูมิห้อง

3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ทุก 1 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เป็น 7 : 3 โดยปริมาตรเทียบกับ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **4** จนกระทั่งจุดของ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **4** จางมากที่สุดหรือไม่ปรากฏบนแผ่น TLC พร้อมกับมีการเกิดจุดของสารผลิตภัณฑ์หรือสารข้างเคียงเกิดขึ้น

4. หยุดการปั่นกวน และนำของผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

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

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

7. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดก้นกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. นำของแข็งที่ได้จากระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศมาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

9. นำสารผลิตภัณฑ์ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

10. เริ่มทำการสังเคราะห์ใหม่ตั้งแต่ข้อ 1 ถึง 9 โดยเปลี่ยนอะมิโนรีเอเจนต์ในข้อ 2 จาก 1,6-hexamethylenediamine เป็นดังต่อไปนี้

- 1,3-diamino-2-propanol ปริมาตร 108.1 มิลลิกรัม (1.2 มิลลิโมล)
- morpholine ปริมาตร 104.5 มิลลิกรัม (1.2 มิลลิโมล)
- benzylamine ปริมาตร 128.6 มิลลิกรัม (1.2 มิลลิโมล)

3.4.2 การทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี

1. เตรียมคอลัมน์แบบ Slurry โดยเท Silica gel F60 ขนาด 0.04-0.06 มิลลิเมตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี hexane ให้มีลักษณะเป็นของเหลวข้น

2. ตั้งคอลัมน์แก้วขนาด 1.8x30 เซนติเมตรให้ตรง เติม hexane ลงในคอลัมน์ให้สูงประมาณ 1/3 ของคอลัมน์ ใส่สำลีโดยใช้แท่งแก้วกดสำลีลงไป จากนั้นนำ Silica gel ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาบรรจุลงในคอลัมน์ระดับ ½ ของคอลัมน์ พร้อมกับไขตัวทำละลาย hexane ออกจากคอลัมน์

3. จากนั้นใช้ลูกยางเคาะคอลัมน์เพื่อปรับผิวหน้า Silica gel ให้เรียบ

4. บรรจุทรายละเอียดประมาณ 2 ช้อนลงคอลัมน์ เพื่อป้องกันผิวหน้าของ Silica gel จากนั้นผ่าน Silica gel ด้วย hexane ประมาณ 200 มิลลิลิตร เพื่อช่วยในการเรียงตัวของ Silica gel ให้แน่น

5. บรรจุสารผสมที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.4.1 ลงในคอลัมน์ทำการแยกสารผสมให้บริสุทธิ์ โดยใช้ตัวทำละลายผสมเป็น 100 มิลลิลิตร ใช้ตัวทำละลายชะคอลัมน์โดยเริ่มต้นจากสารละลายไม่มีขั้วคือ hexane จากนั้นเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5, 90 : 10, 85 : 15 โดยปริมาตร ตามลำดับ เก็บสารที่ได้จากการเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวทำละลายผสมลงในหลอดทดลอง

6. การตรวจสอบที่ได้จากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร ตรวจสอบการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากนั้นเคลือบด้วย anisaldehyde reagent และให้ความร้อนเปรียบเทียบจุดของสารที่ได้กับตัวอย่างสารผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ในข้อ 3.4.1 โดยพิจารณาจากค่า R_f ซึ่งจะมีค่าเดียวกัน

7. เก็บสารที่ตรวจพบสารผลิตภัณฑ์ไว้ในขวดก้นกลมและนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ตั้งขวดก้นกลมทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยในตู้ควัน จากนั้นนำสารผลิตภัณฑ์ไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Paper Disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอะมิโนสเตียรอยด์ **5a-5d** ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย 5 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *M. luteus* ATCC 9341, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* TISTR 1466 ซึ่งวิธีการทดสอบดัดแปลงมาจาก Clinical and Laboratory Standards Institute[18] สรุปได้ดังนี้

3.5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

1. นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *M. luteus* ATCC 9341, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* TISTR 1466 ที่เก็บใน Stock culture มาเขี่ยให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) 3-5 โคโลนี เขี่ยลงบนอาหาร NA อีกครั้ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3. นำแบคทีเรียที่บ่มไว้มาเจือจางด้วยสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4. ปรับค่าความขุ่นของเชื้อให้มีค่าเท่ากับค่ามาตรฐาน McFarLand 0.5 หรือวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08-0.13 (มีจำนวนเซลล์เท่ากับ $1.5x10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร)

3.5.2 การเตรียมแผ่นดิสก์

เตรียมสารละลายของอะมิโนสเตียรอยด์ **5a-5d** ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DCM, ethyl acetate, methanol และ DMSO เป็นตัวทำละลาย ปิเปตสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร หยดลงในแผ่นดิสก์ที่ปราศจากเชื้อ (กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เจาะให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้ง โดยจะมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัม/ดิสก์

3.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอะมิโนสเตียรอยด์

ใช้วิธีทดสอบแบบ paper disc diffusion ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ดิสก์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Sterile cotton sab) ชุบสารละลายของแบคทีเรียที่ได้ทำการเจือจางไว้

2. จากนั้นนำมาป้าย (Swab) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar (MHA) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

3. นำแผ่นดิสก์ที่เตรียมไว้วางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ DCM, ethyl acetate, methanol และ DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin ปริมาณ 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control)

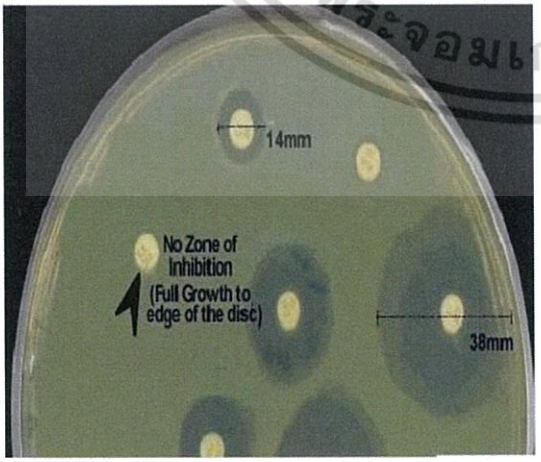
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้น

3.5.4 วิธีการวัดขนาดของวงใสหรือ Clear zone

ขนาดความกว้างของวงใสหรือ Clear zone (มิลลิเมตร) แสดงถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ดังนั้นสามารถแปลผลได้ว่าขนาดความกว้างของวงใสหรือ Clear zone (มิลลิเมตร) มีขนาดของความกว้างมาก แสดงว่า สารอนุพันธ์ที่นำมาทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียมากโดยใช้ เวอร์เนียร์ ดิจิตอลในการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสหรือ Clear zone (มิลลิเมตร)

1. กดปุ่ม Set zero ที่ เวอร์เนียร์ ดิจิตอล ให้เป็นศูนย์
2. นำปลาย เวอร์เนียร์ ดิจิตอล แตะขอบวงกลมของวงใสหรือ Clear zone (มิลลิเมตร) ด้านใดด้านหนึ่ง
3. ทำการเลื่อน เวอร์เนียร์ ดิจิตอล ไปยังอีกฝั่งของขอบวงกลม
4. อ่านค่าที่ได้จากการเลื่อน เวอร์เนียร์ ดิจิตอล



รูปที่ 3.1 ตัวอย่างของวงใสหรือ Clear zone (มิลลิเมตร)

รูปที่ 3.2 เวอร์เนียร์ ดิจิตอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5 วิเคราะห์และแปรผลข้อมูล

การวิเคราะห์และแปรผลข้อมูลนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีค่าการควบคุมคุณภาพ (Quality control) แตกต่างกัน เช่น เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทำการทดสอบกับ ตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) ในที่นี้ใช้ ยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน (Gentamicin) ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ จะมีขนาดของวงใสหรือ Clear zone กว้างประมาณ 19-26 มิลลิเมตร[18] ดังนั้นเมื่อนำสารตัวอย่างมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ระดับความเข้ม 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ ขนาดของวงใสหรือ Clear zone ที่ได้จากผลการทดลองควรมีค่า > 19-26 มิลลิเมตร หากพบว่าสารตัวอย่าง มีขนาดของวงใสหรือ Clear zone > 19-26 มิลลิเมตร แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ดีกว่ายาฆ่าเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน (Gentamicin) ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ หากพบว่าสารตัวอย่าง มีขนาดของวงใสหรือ Clear zone ≤ 19-26 มิลลิเมตร แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* น้อยกว่าหรือเท่ากับยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน (Gentamicin) ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ จากรูปที่ 3.3 แสดงตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* MRSA ของพืชสมุนไพรในประเทศฟิลิปปินส์ โดยเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ Cefoxitin ที่ระดับความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/ดิสก์[19]

รูปที่ 3.3 ตัวอย่างวงใสหรือ Clear zone ของพืชสมุนไพรในประเทศฟิลิปปินส์ที่มีฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* MRSA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

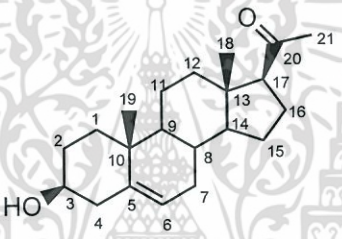
บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

โครงงานพิเศษนี้เป็นการสังเคราะห์อนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์จาก Pregnenolone 3 โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone 3 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-3 จากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบของอนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี paper disc diffusion

4.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 5a-5d จาก Pregnenolone 3

สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นคือ Pregnenolone 3 ทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR ได้ผลดังต่อไปนี้



3

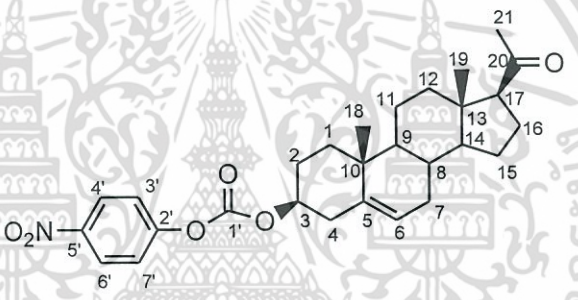
Szendiและคณะ[20]ได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างของ Pregnenolone 3 โดยเทคนิคนิวเคลียแมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่า ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 1.84 และ 1.08 (2H, H-1), 1.84 และ 1.48 (2H, H-2), 3.54 (1H, H-3), 2.27 (2H, H-4), 5.34 (1H, H-6), 1.97 และ 1.57 (2H, H-7), 1.46 (1H, H-8), 0.98 (1H, H-9), 1.62 และ 1.47 (2H, H-11), 2.04 และ 1.43 (2H, H-12), 1.17 (1H, H-14), 1.68 และ 1.23 (2H, H-15), 2.19 และ1.66 (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), 31.5 (C-21) เมื่อตรวจสอบเปรียบเทียบกับ ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR กับ Pregnenolone 3 จากบริษัท Sigma-Aldrich ได้ผล ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับข้อมูลของ Szendiและคณะ[20]ได้เสนอไว้ดังนี้ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 3.52 (1H, m, H-3), 5.35 (1H, d, H-6), 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) และโปรตอนที่อยู่ในช่วง δ เท่ากับ 1.08 ถึง 2.55 ppm เป็ น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne; ^{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), 31.6 (C-7), 31.8 (C-9), 49.9 (C-9), 36.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(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 4

การสังเคราะห์เริ่มจากกระตุ้นหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-3 ของ Pregnenolone **3** ให้เป็นหมู่หลุดออกที่ดีด้วยรีเอเจนต์คือ 4-nitrophenyl chloroformate จากการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f 0.62 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 97 : 3 ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 165-168 องศาเซลเซียส คิดเป็นร้อยละสารผลิตภัณฑ์เท่ากับ 92.41 เปอร์เซ็นต์



4

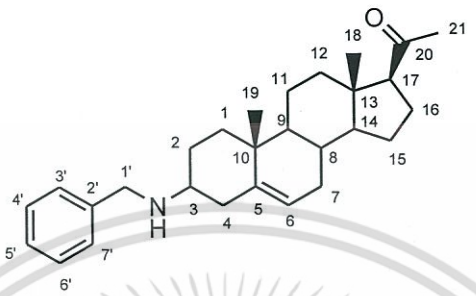
ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **4** สอดคล้องกับงานวิจัยของณฐกรและคณะ[17] สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัมของ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร 4 ^{1}H NMR พบสัญญาณที่ δ 4.64 (1H, m, H-3), 2.19 (2H, d, H-4), 5.44 (1H, d, H-6), 2.55 (1H, t, H-17), 0.65 (3H, s, H-18), 1.06 (3H, s, H-19), 2.14 (3H, s, H-21), 7.39 (2H, d, $J_{3'4'}$= 7.1 Hz, H-3′และ H-7′), 8.29 (2H, d, $J_{4'3'}$ = 7.1 Hz, H-4′ และ H-6′) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.09 ถึง 1.16 ppm เป็น mutiplet ของหมู่ methylene และ methyne; ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **4** 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

4.1.2 การสังเคราะห์ 3-(Aminobenzyl)-pregn-5-en-20-one) 5a

สาร **5a** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **4** ทำปฏิกิริยากับ benzylamine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่าสารผลิตภัณฑ์มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 43.53 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **3**) ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นกึ่งของแข็งสีขาว เมื่อใช้

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 และทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.50 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้



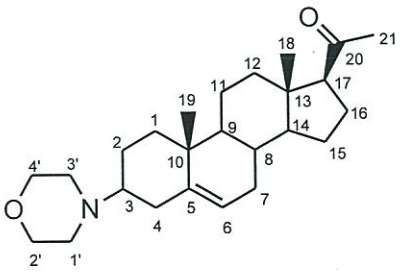
5a

สเปกตรัมของ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **5a** พบสัญญาณ ^{1}H NMR δ 7.19-7.38 (5H, m, H-2′, H-3′, H-4′, H-5′, H-6′), 4.32 (2H, d, H-1′) 5.13 (1H, t, N-H), 4.50 (1H, m, H-3), 5.32 (1H, br.d, H-6), 2.50 (1H, t, H-17), 0.61 (3H, s, H-18), 1.10 (3H, s, H-19), 2.10 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ ถึง ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัมของ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **5a** 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), 209.5 (C-20), 45.3 (C-1′), 139.6 (C-2′), 127.2 (C-5′), 128.4 (C-4′และC-6′), 127.3 (C-3′และC-7′), และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

4.1.3 การสังเคราะห์ 3-Morpholinopregn-5-en-20-one 5b

สาร **5b** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **4** ทำปฏิกิริยากับ mopholine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่า สารผลิตภัณฑ์มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 72.37 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **3**) ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว และเมื่อใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 และทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.31 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

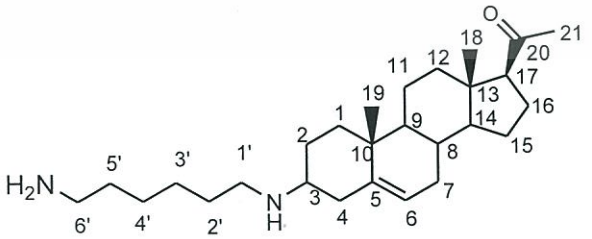


5b

สเปกตรัมของ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **5b** พบสัญญาณ ^{1}H NMR δ 4.53 (1H, m, H-3), 5.38 (1H, br.d, H-6), 2.50 (1H, t, H-17), 0.59 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.10 (3H, s, H-21), 3.64 (4H, t, H-2′ และ H-4′), 3.45 (4H, t, H-1′ และ H-3′) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.40 ถึง 1.11 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัมของ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **5b** พบสัญญาณที่ δ 75.0 (C-3), 139.7 (C-5), 122.1 (C-6), 49.8 (C-9), 56.6 (C-14), 63.5 (C-17), 13.1 (C-18), 19.1 (C-19), 210.0 (C-20), 66.1 (C-2′และC-4′), 43.7 (C-1′และC-3′) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 46.1 ถึง 21.1 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

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

สาร **7** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **4** ทำปฏิกิริยากับ 1,6-hexamethylenediamine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่า สารผลิตภัณฑ์มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 20.76 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **3**) ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นกึ่งของแข็งสีขาวและเมื่อใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 และทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.68 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้



5c

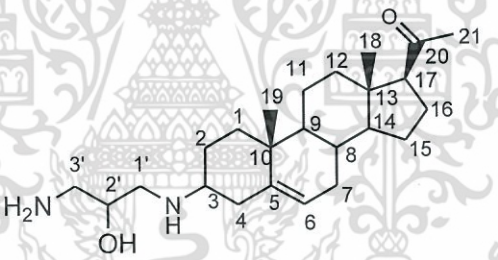
สเปกตรัมของ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **5c** พบสัญญาณ ^{1}H NMR δ 3.15 (1H, m, H-3), 5.36 (1H, br.d, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.34 ถึง 1.11 ppm เป็น multiplet ของหมู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

methylene และ methyne และสเปกตรัมของ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **5c** พบสัญญาณที่ δ 74.1 (C-3), 139.8 (C-5), 122.1 (C-6), 49.9 (C-9), 21.1 (C-11), 56.9 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), และ 209.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 49.4 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

4.1.5 การสังเคราะห์ 3-(1,3-Diaminopropyl-2-ol)-pregn-5-en-20-one) 5d

สาร **5d** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **4** ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diamino-2-propanol โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่า สารผลิตภัณฑ์มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 36.15 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **3**) ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว และเมื่อใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 และทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.70 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้



5d

สเปกตรัมของ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร **5d** พบสัญญาณ ^{1}H NMR δ 3.77 (1H, m, H-3), 5.37 (1H, br.d, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21), 4.47 (1H, s, H-2′) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.33 ถึง 1.10 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัมของ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **5d** 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), 77.6 (C-2′) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 45.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอะมิโนสเตียรอยด์ 5a-5d

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของอะมิโนสเตียรอยด์ **5a-5d** ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ดิสก์ ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *B. subtilis* ATCC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6633, *E. coli* ATCC 25922, *M. luteus* ATCC 9341, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* TISTR 1466 ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่เป็นสาเหตุของโรคที่เกิดในมนุษย์ โดยใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ เป็นชุดควบคุมเชิงบวก และเนื่องจากความมีขั้วที่แตกต่างกันของอะมิโนสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์ได้ DCM, ethyl acetate, methanol และ DMSO ถูกใช้เป็นตัวทำละลายของอะมิโนสเตียรอยด์ที่ใช้ในการทดสอบจึงถูกเป็นชุดควบคุมเชิงลบ และทำการทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion จากนั้นทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้งหรือวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น ซึ่งผลการทดลองเป็นดังนี้

4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของ Pregnenolone 3

จากผลการทดลองฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ของ Pregnenolone **3** ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ดิสก์ ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่า Pregnenolone **3** ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด (รูปที่ 4.1)

รูปที่ 4.1 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ Pregnenolone **3** ต่อเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 P) positive control และ N1) negative control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของอะมิโนสเตียรอยด์ 5a-5d

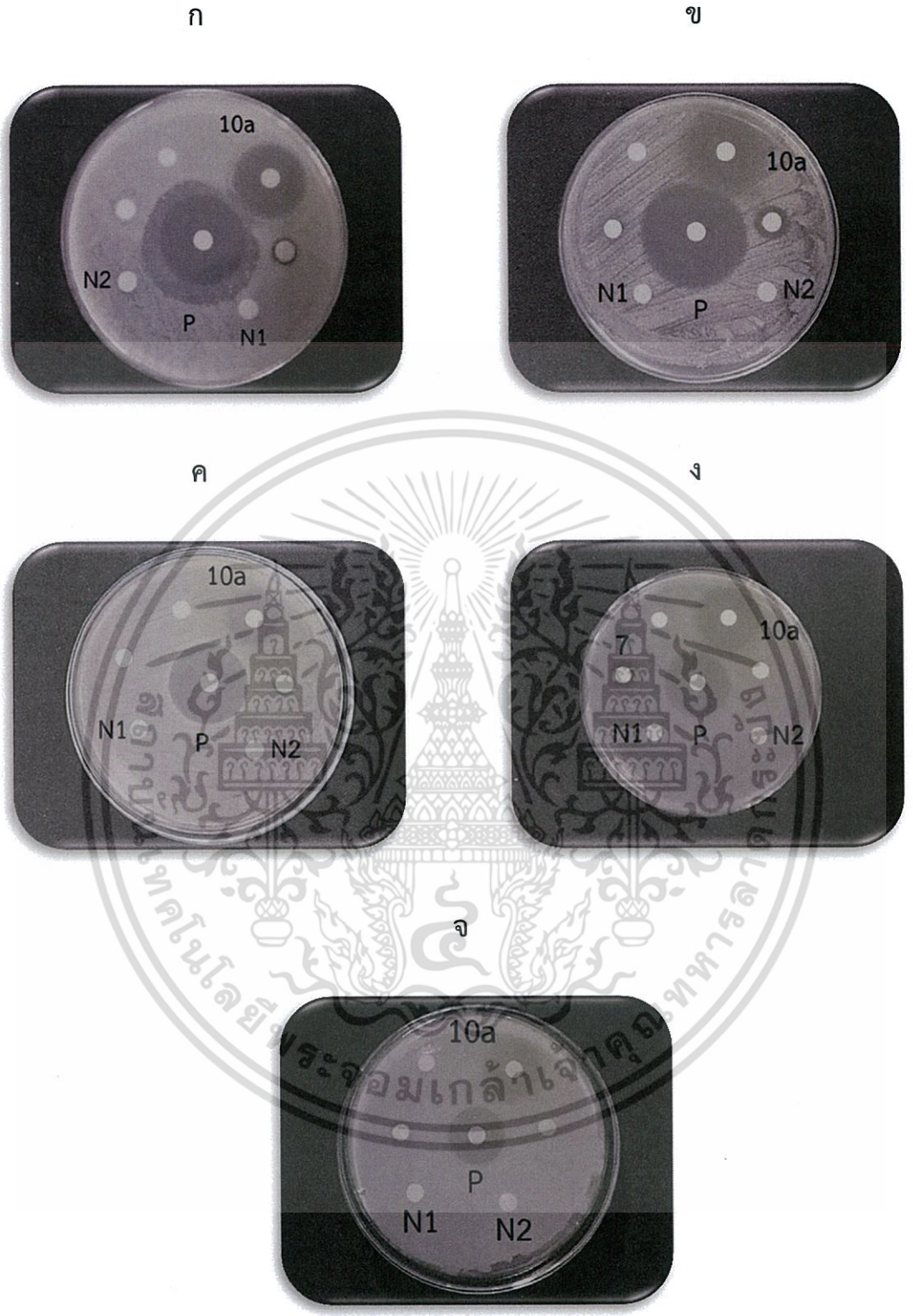
จากผลการทดลองฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของของอะมิโนสเตียรอยด์ **5a-5d** ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ดิสก์ ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าอะมิโนสเตียรอยด์ **5a, 5b** และ **5c** มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ โดยอะมิโนสเตียรอยด์ **5a** สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, *S. aureus* TISTR 1466, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 มีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 22.73±0.24, 23.35±0.87, 19.97±0.81, 22.86±1.62 และ 17.42±0.85 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.2) อะมิโนสเตียรอยด์ **5b** สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* TISTR 1466, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 มีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.03±0.38, 10.02±0.48, 20.24±0.69, และ 12.75±0.87 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.3) แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *M. luteus* ATCC 9341 อะมิโนสเตียรอยด์ **5c** สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 ได้เพียงเล็กน้อย มีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 8.42±1.36 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.2ง) ส่วนอะมิโนสเตียรอยด์ **5d** ไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 5 ชนิด ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่าอะมิโนสเตียรอยด์ **5a** แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดีที่สุด โดยเฉพาะกับเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ดิสก์ มีฤทธิ์ยับยั้งใกล้เคียงกับตัวยาปฏิชีวนะ gentamicim มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ ส่วนอะมิโนสเตียรอยด์ **5b** แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งต่อเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของอะมิโนสเตียรอยด์ 5a-5d

เชื้อแบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน				
	P	5a	5b	5c	5d
B. subtilis ATCC 6633	26.35±1.08	22.73±0.24	10.03±0.38	-	-
M. luteus ATCC 9341	25.58±0.27	23.35±0.87	-	-	-
S. aureus TISTR 1466	26.12±1.23	19.97±0.81	10.02±0.48	-	-
E. coli ATCC 25922	24.81±1.36	22.86±1.62	20.24±0.69	8.42±1.36	-
P. aeruginosa ATCC 27853	19.98±1.09	17.42±0.85	12.75±0.87	-	-

P = Positive control (Gentamicin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาร **5a** ต่อเชื้อ ก) *B. subtilis* ATCC 6633 ข) *M. luteus* ATCC 9341 ค) *S. aureus* TISTR 1466 ง) *E. coli ATCC* 25922 และ จ) *P. aeruginosa* ATCC 27853; 10a) สาร **5a**; 7) สาร **5c**; P) positive control, N1) และ N2) negative control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก ข

รูปที่ 4.3 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาร **5b** ต่อเชื้อ ก) *S. aureus* TISTR 1466 ข) *B. subtilis* ATCC 6633 ค) *E. coli* ATCC 25922; 3) Pregnenolone **3**, 10b) สาร **5b** P) positive control และ N1) negative control

จากการทดลองทั้งหมดจะเห็นได้ว่าการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-3 ของ Pregnenolone **3** จากหมู่ไฮดรอกซิลให้เป็นหมู่อะมิโนที่มีขนาดและโครงสร้างที่แตกต่างกันนั้นมีผลในการช่วยเพิ่มฤทธิ์ให้แก่ Pregnenolone **3** ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Loncle และคณะ[21] ได้ทำการสังเคราะห์ 7-amino และ polyaminosterol จาก 3β- acetoxy-7-keto-5α-cholestane โดยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-7 จากหมู่คีโตเป็นหมู่อะมิโนและหมู่พอลิเอมีน พบว่าสารอนุพันธ์มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์และว่องไวในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ทดสอบได้แก่ *S. aureus* และ *Streptococcus faecalis* และงานวิจัยของ Salami และคณะ[22] ได้ทำการสังเคราะห์ 3-amino-และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

polyaminosterol จาก 4-cholesten-3-one และ 5-cholesten-3-one โดยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-3 จากหมู่คีโตเป็นหมู่อะมิโนและหมู่พอลิเอมีน พบว่าสารอนุพันธ์มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ ยีสต์ และเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ

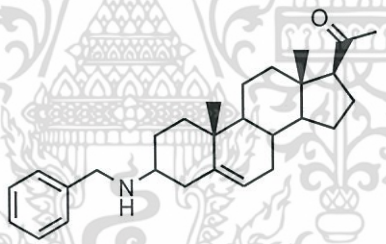
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

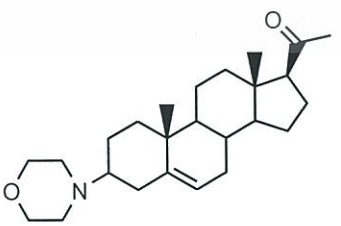
สามารถสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่จาก Pregnenolone **3** โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-3 ของ Pregnenolone **3** ให้เป็นหมู่อะมิโน โดยการสังเคราะห์จะทำการสังเคราะห์ผ่านสารตัวกลางคือ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **4** จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับอะมิโนรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ ได้อะมิโนสเตียรอยด์ **5a-5d** มีผลได้ร้อยละตั้งแต่ 20.76-73.37

อะมิโนสเตียรอยด์ **5a-5d** ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ 5 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, *S. aureus* TISTR 1466, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 โดยเปรียบเทียบกับ Pregnenolone **3** และยาปฏิชีวนะ Gentamicin พบว่า อะมิโนสเตียรอยด์ **5a** ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด โดยเฉพาะออกฤทธิ์ได้ดีกับเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *E. coli* ATCC 25922 และออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตได้ปานกลางต่อเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853



5a

อะมิโนสเตียรอยด์ **5b** ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ดีที่สุด แต่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* TISTR 1466 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้น้อย



5b

อะมิโนสเตียรอยด์ **5c** ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ได้น้อย ส่วนอะมิโนสเตียรอยด์ **5d** ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของอะมิโนสเตียรอยด์ **5a-5d** พบว่าการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสมเช่น หมู่อะมิโนในโครงสร้างของ Pregnenolone **3** สามารถช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ข้อเสนอแนะจากโครงงานพิเศษนี้คือ 1. ควรปรับเปลี่ยนอะมิโนรีเอเจนต์ให้มีโครงสร้างที่หลากหลายมากยิ่งขึ้น 2. ศึกษาวิธีการสังเคราะห์ใหม่ๆ ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการติดหมู่แทนที่บนคาร์บอนตำแหน่งต่างๆ ของ Pregnenolone **3** หรือปฏิกิริยาที่สามารถเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันเดิมที่มีอยู่ให้เป็นหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ เช่น การทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่ง C-20 หรือ C-21 เป็นต้น 3. ควรเพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ในการทดสอบให้หลากหลายมากยิ่งขึ้น เช่นพวกเชื้อรา หรือเชื้อแบคทีเรียดื้อยา เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

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

[2] วีรศักดิ์ เชื้อมโนชาญ. 2529. **สเตียรอยด์จากพืช.,** ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

[3] บุญรอด วงษ์สวาท. **สเตรอยด์ฮอร์โมน**. [Online]. Available: http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd_site/hormone.htm. 2011.

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

[5] ThaiNurseClub. 2010. **Bacteria**. [Online]. Available: http://thainurseclub.blogspo t.com/2014/08/bacteria.html.

[6] ภัทรชัย กีรติสิน. 2549. **ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์.,** โครงการตำรา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล.

[7] พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. *Bacillus*/**บาซิลลัส**. [Online]. Available: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1226/bacillus-บลาซิลลัส.

[8] พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. *Micrococcus*/**ไมโครคอกคัส**. [Online]. Available : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1982/micrococcus

[9] นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547. **แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค** โครงการตำรา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[10] จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์. 2554. **โรคอุจจาระร่วงจากเชื้ออีโคไล** (*E. coli*). [Online]. Available: http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/52/โรคอุจจาระร่วงจากเชื้ออีโคไล (*E. coli*)/.

[11] N.N. El-Sayed, M.A. Abdelaziz, W.W. Wardakhan and R.M. Mohareb. 2016. **Steroids.**, The Knoevenagel reaction of cyanoacetylhydrazine with pregnenolone: Synthesis of thiophene, thieno[2,3-d]pyrimidine, 1,2,4-triazole, pyran and pyridine derivatives with anti-inflammatory and anti-ulcer activities. vol. 107, pp. 98-111.

[12] M.E. Dávola, G.I. Mazaira, M.D. Galigniana, L.E. Alché, J.A. Ramírez and A.A. Barquero. 2015. **Antiviral Research.**, Synthetic pregnenolone derivatives as antiviral agents againstacyclovir-resistant isolates of Herpes Simplex Virus Type 1. vol. 122. pp. 55-63.

[13] A.H. Banday, S.M. Akram and S.A. Shameem. 2014. **Steroids.**, Benzylidine pregnenolones and their oximes as potential anticancer agents: Synthesis and biological evaluation. vol. 84. pp. 64-69.

[14] R.M. Mohareb, N.N.E. El-Sayed and M.A. Abdelaziz. 2013. **Steroids.**, The Knoevenagel reactions of pregnenolone with cyanomethylene reagents: Synthesis of thiophene, thieno[2,3-b]pyridine, thieno[3,2-d]isoxazole derivatives of pregnenolone and their in vitro cytotoxicity towards tumor and normal cell lines. vol. 78. pp. 1209-1219.

[15] R.M. Mohareb and F. Al-Omran. 2012. **Steroids.**, Reaction of pregnenolone with

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cyanoacetylhydrazine: Novel synthesis of hydrazide–hydrazone, pyrazole, pyridine, thiazole, thiophene derivatives and their cytotoxicity evaluations. vol. 77. pp. 1551-1559.

[16] วนาวรรณ ปราบพยัคฆ์. 2549. **การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์สเตียรอยด์เพรกนินโนโลน.** วิทยานิพนธ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

[17] ณฐกร อ่อนแสง, พละวัฒน์ อุ่นเรือน และวิริยะพงศ์ ช้างอินทร์. 2554. **การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเพรกนินโนโลนและกรดดีไฮโดรโคลิกด้วยวิธีทางเคมีและชีวภาพ.** โครงงานพิเศษ สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

[18] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Eleventh Edition.** Wayne : Clinical and Laboratory standards institute.

[19] D.L. Valle Jr., J.I. Andrade, J.J.M. Puzon, E.C. Cabrera and W.L. Rivera. 2015. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.**, Antibactirail activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. Vol. 5, Issue 7, pp. 532-540.

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

[21] C. Loncle, C. Salmi, Y. Letourneux and J. M. Brunel. 2007. **Tetrahedron.**,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Synthesis of new 7-aminosterol squalamine analogues with high antimicrobial activities through a stereoselective titanium reductive amination reaction., Vol. 63, pp. 12968-12974.

[22] C. Salmi, C. Loncle, N. Vidal, Y. Letourneux and J. M. Brunel. 2008. **European Journal of Medicinal Chemistry.**, New stereoselective titanium reductive amination synthesis of 3-amino and polyaminosterol derivatives possessing antimicrobial activities. Vol. 43, pp. 540-547.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง