



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์สเตียรอยด์  
ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอมและกรดอะมิโน

Synthesis and Bioactivities of Steroid Derivatives  
Containing N-atom and Amino Acids

นางสาวพัชณี เจริญยิ่ง

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์สเตียรอยด์  
ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอมและกรดอะมิโน

Synthesis and Bioactivities of Steroid Derivatives  
Containing N-atom and Amino Acids

นางสาวพัชนี เจริญยิ่ง

สาขาหมู่.....  
เลขทะเบียน **149119**  
วัน เดือน ปี..... **4 ต.ค. 2561**

b. 00266524  
i. ....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559  
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ	การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์สเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอมและกรดอะมิโน
แหล่งเงิน	ประเภททุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 300,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2558 ถึง 30 กันยายน 2559
หัวหน้าโครงการวิจัย	ผศ.ดร.พีชนี เจริญยิ่ง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ไบโกล์แอซิดสองชนิดได้แก่ กรดโคลิค 44 และกรดดีออกซีโคลิค 9 ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 50a-50g และ 51a-51g กระทำโดยการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 24 ของไบโกล์แอซิดทั้งสองให้เป็นหมู่เอไมด์ โดยใช้เทคนิควิศวกรรมของแข็ง ผลที่ได้อยู่ในเกณฑ์ระดับปานกลางถึงดี สารอนุพันธ์เหล่านี้ถูกนำมาประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อเกิดโรคต่อมนุษย์ในสถานะจำลองกับแบคทีเรีย 30 ชนิด ยีสต์ 3 ชนิด และ เชื้อรา 2 ชนิด ด้วยวิธี Disc diffusion และ วิธี Broth microdilution จากการทดลองพบว่า อนุพันธ์ของกรดดีออกซี 51a-51g มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ATCC 27175, *Corynebacterium diphtheriae*, Methicillin Resistance *S. aureus* (MRSA) และ Vancomycin Resistance *S. aureus* (VRSA) โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.78-12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารอนุพันธ์ 50a-50g และ 51a-51g ไม่มีฤทธิ์ในการต้านยีสต์และเชื้อราทดสอบทั้งหมด

นอกจากนั้น สารอนุพันธ์ 50a-50f และ 51a-51f ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line) และเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney) ด้วยวิธี REMA and SRB assay จากการทดลองพบว่า สารอนุพันธ์ 50c-50f มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB และ MCF-7 ในระดับปานกลาง ในขณะที่สารอนุพันธ์ 51b-51f มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB และ MCF-7 ในระดับปานกลางถึงดี โดยเฉพาะสารอนุพันธ์ 51c มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB และ MCF-7 สูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 3.42 และ 9.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** อนุพันธ์สเตียรอยด์, ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์, ความเป็นพิษต่อเซลล์

**Research Title:** Synthesis and Bioactivities of Steroid Derivatives  
Containing N-atom and Amino Acids  
**Researcher:** Asst. Professor Dr. Patchanee Charoenying  
**Faculty:** Faculty of Science      **Department:** Department of Chemistry

## ABSTRACT

In this research, two bile acids cholic acid **44** and deoxycholic acid **9**, were used as a starting template to develop new steroid derivatives containing N-atom. The derivatives **50a-50g** and **51a-51g** were synthesized through modification at the carboxyl carbon C-24 to amide derivatives by solid phase technique in moderate to good yields. These derivatives were evaluated for their *in vitro* antimicrobial properties against human pathogens. The synthesized compounds were tested *in vitro* against 30 bacteria, 3 yeast and 2 fungi strains by disc diffusion and broth microdilution methods. The results found that the deoxycholic acid derivatives **51a-51g** exhibited the highest antibacterial activity against *Streptococcus mutans* ATCC 27175, *Corynebacterium diphtheriae*, Methicillin Resistance *S. aureus* (MRSA) and Vancomycin Resistance *S. aureus* (VRSA). The MIC values of selected bacterial strains tested ranged from 0.78-12.5  $\mu\text{g/mL}$ . Unfortunately, no antifungal activity observed against tested strains of yeasts and fungi.

Furthermore, the cytotoxicity of these compounds was investigated in three cell lines: human breast carcinoma cell line (MCF-7), oral human epidermal carcinoma cell line (KB) and African green monkey kidney (Vero) using REMA and SRB methods. The results found that the derivatives **50c-50f** showed the moderate activity against cell lines: KB and MCF-7. whereas the derivatives **51b-51f** exhibited the moderate to good activity against cell lines: KB and MCF-7. Particularly, the good activity was obtained from the derivative **51c** and found against KB and MCF-7 cell lines with  $\text{IC}_{50} = 3.42$  and  $9.70 \mu\text{g/mL}$ , respectively.

**Keywords:** steroid derivatives, antimicrobial, cytotoxicity

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามความตั้งใจในระดับหนึ่งด้วยการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเภททุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 ที่พิจารณาเห็นคุณค่าของงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นันทนา อรุณฤกษ์ สาขาโษษุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่เอื้อเพื่อความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
รายการคำย่อและสัญลักษณ์	VIII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	4
1.5 สมมุติฐานงานวิจัย	5
1.6 คำสำคัญของการวิจัย	7
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	8
2.2 สเตียรอยด์ในธรรมชาติ	9
2.3 ประเภทของสเตียรอยด์	11
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 การทดลองทั่วไป	16
3.2 วิธีการทดลอง	17
3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์	22
3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	23
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม	25
4.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน	41
4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์	44
4.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	50
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม	53
5.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน	53
5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	54
5.5 ข้อเสนอแนะ	54
บรรณานุกรม	55
ประวัตินักวิจัย	58



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Cholic acid 44 และ สารอนุพันธ์ 50a-50g เปรียบเทียบกับตัวยา Vancomycin	46
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Deoxycholic acid 9 และ สารอนุพันธ์ 51a-51g เปรียบเทียบกับตัวยา Vancomycin	49
4.3 ค่า IC <sub>50</sub> ของ Cholic acid 44 และสารอนุพันธ์ 50a-50f เปรียบเทียบกับ Ellipticine และ Doxorubicine	51
4.4 ค่า IC <sub>50</sub> ของ Deoxycholic acid 9 และสารอนุพันธ์ 51a-51f เปรียบเทียบกับ Ellipticine และ Doxorubicine	52



## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างหลักของสเต็มรอยด์	1
1.2 แสดงความเป็น Amphipathic ของโพลีแอสิต	3
3.1 ตัวอย่างการวัดวงใส (clear zone)	23
5.1 แสดงโครงสร้างของสเต็มรอยด์สังเคราะห์	53



## รายการคำย่อและสัญลักษณ์

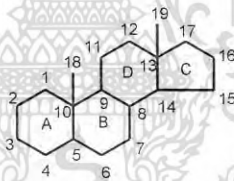
$^{13}\text{C}$ NMR	$^{13}\text{C}$ Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
DCM	Dichloromethane
DIC	<i>N,N</i> -diisopropylcarbodiimide
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ESMS	Electrospray Ionization Mass Spectroscopy
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Inhibitory concentration 50%
IR	Infrared Spectroscopy
$^1\text{H}$ NMR	$^1\text{H}$ Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
m/z	Mass to charge ratio
MIC	Minimum Inhibition Concentration
ppm	Part per million
REMA	Resazurin Microplate assay
R <sub>f</sub>	Retardation factor
SRB	Sulforhodamine B assay
TFA	Trifluoroacetic acid
TLC	Thin Layer Chromatography
$\nu_{\text{max}}$ cm <sup>-1</sup>	Frequency maximum per centimeter
$\delta$	Chemical shift
<i>J</i>	Coupling constant

## บทที่ 1

### บทนำ

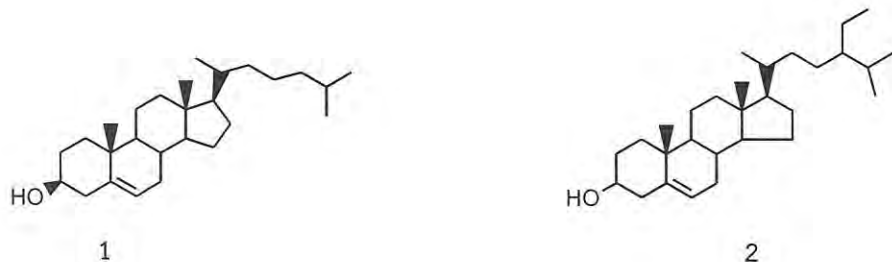
#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากการเรียนรู้ด้วยตนเองของคนในสมัยโบราณเกี่ยวกับพืชที่ใช้เป็นอาหาร ทำให้พบสิ่งสำคัญจากพืชคือการค้นพบสรรพคุณต่างๆของพืชโดยบังเอิญซึ่งเป็นจุดเริ่มในการค้นพบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Product) และมนุษย์ได้นำสารธรรมชาติเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ในหลายด้านได้แก่ ด้านการแพทย์และการเกษตร เป็นต้น เนื่องจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีสมบัติที่ดีทั้งทางเคมีและชีวภาพ และมีการตกค้างในธรรมชาติที่น้อยกว่าสารสังเคราะห์ทำให้ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ต่อมานักเคมีได้สนใจนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลและ/หรือหมู่ฟังก์ชันโดยการทำปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์กับสารเคมี (รีเอเจนต์) ที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดความเฉพาะเจาะจงของสเตอริโอเคมีของหมู่ฟังก์ชันซึ่งจะนำไปสู่สมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารผลิตภัณฑ์ที่ดีมากยิ่งขึ้น ปัจจุบันจึงปรากฏรายงานการวิจัยจำนวนมากที่ทำการศึกษเกี่ยวกับสมบัติทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ใหม่ๆซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านั้น กลุ่มสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายและเป็นกลุ่มสารที่นักเคมีให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการนำไปเป็นสารตั้งต้นในการเตรียมตัวยาชนิดใหม่ๆ คือ สเตียรอยด์ (Steroids) ซึ่งจัดเป็นสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่งมีโครงสร้างของนิวเคลียสหลักประกอบด้วย Perhydrocyclopentanophenanthrene เป็นโครงสร้างหลัก ดังแสดงในรูปที่ 1.1

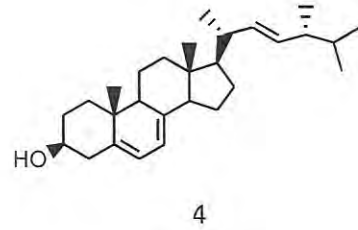
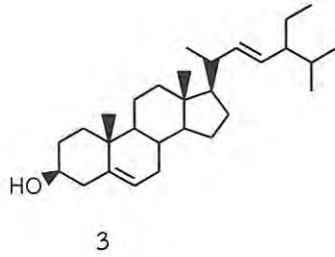


รูปที่ 1.1 โครงสร้างหลักของสเตียรอยด์

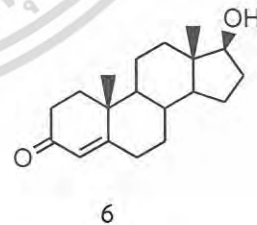
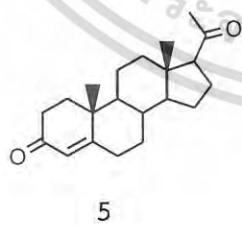
ตัวอย่างของสเตียรอยด์ที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ เช่น Cholesterol 1 พบได้ในกล้ามเนื้อสมอง เส้นประสาทไขสันหลัง และน้ำมันปลา ส่วน Sitosterol 2 และ Stigmasterol 3 เป็น sterol ทั่วๆไปของพืช แยกได้จากน้ำมันข้าวโพด น้ำมันของข้าวสาลีกำลังงอก น้ำมันของข้าวไรท์ที่กำลังงอก น้ำมันเมล็ดฝ้าย และ Ergosterol 4 พบได้ในยีสต์และเห็ด เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์และเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินดี เป็นต้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



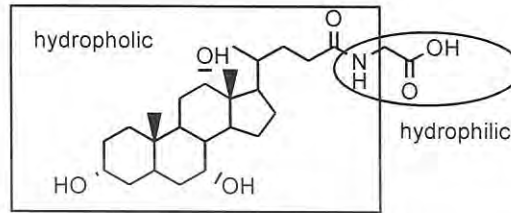
ปัจจุบันได้มีการนำสารกลุ่มสเตียรอยด์ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อย่างมากเช่น สเตียรอยด์กลุ่ม Antiandrogen นำมาใช้เป็นยารักษาภาวะ Hyperandrogenism และกลุ่ม Cardiac steroid สามารถใช้ในการรักษาโรค Congestive heart failure เป็นต้น แต่การสกัดแยกสเตียรอยด์จากพืชและสัตว์ด้วยเทคนิคทางเคมีอินทรีย์เพื่อให้ได้สเตียรอยด์ที่บริสุทธิ์นั้นมีปริมาณน้อยมาก และถ้ามีการนำไปใช้จะต้องใช้พืชและสัตว์ในปริมาณมากทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทั้งทางตรงและทางอ้อม ด้วยเหตุนี้การนำสเตียรอยด์มาใช้ในทางการแพทย์เพื่อเป็นตัวยาหรือส่วนประกอบของตัวยาจึงมักนิยมกระทำด้วยวิธีการสังเคราะห์เลียนแบบตามธรรมชาติโดยการนำสเตียรอยด์ที่หาซื้อได้มาปรับเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันและ/หรือการเพิ่มหมู่แทนที่บนส่วนของวงและ/หรือส่วนของสายโซ่ด้านข้าง (side chain) รวมถึงการสังเคราะห์โดยวิธีเฉพาะเจาะจงเพื่อควบคุมสเตอริโอเคมีเพื่อให้ได้สเตียรอยด์สังเคราะห์ชนิดใหม่ ทั้งนี้เพื่อมุ่งหวังที่จะทำให้มีคุณสมบัติและการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อสิ่งมีชีวิตในแนวทางที่ดีขึ้น ซึ่งพบว่าสเตียรอยด์นั้นหากนำมาใช้อย่างถูกต้องตามหลักวิชาการจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก สารกลุ่มนี้จึงเป็นที่สนใจอย่างมากกับนักวิจัยด้านเคมีอินทรีย์ที่นิยมการสังเคราะห์และศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้าง (Structure-Activity Relationships, SAR) ของสเตียรอยด์สังเคราะห์กับฤทธิ์ทางชีวภาพ ความแตกต่างของสเตียรอยด์แต่ละชนิดจะแปรผันไปตามชนิดของหมู่ฟังก์ชันหรือชนิดของหมู่ฟังก์ชันบนสายโซ่ที่เกาะอยู่รอบนิวเคลียสหลักของสเตียรอยด์ เช่น Progesterone 5 จะมีหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 และ C-20 หรือ Testosterone 6 จะมีหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 และหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-17 จากโครงสร้างที่แตกต่างกันนี้จึงได้ส่งผลถึงคุณสมบัติที่แตกต่างกันด้วยดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น[1,2]



สเตียรอยด์กลุ่มไบลแอซิด (Bile acid) เป็นสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์มาจาก Cholesterol 1 โครงสร้างประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic, ส่วนที่ละลายในไขมัน) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic, ส่วนที่มีขั้ว) จัดเป็นแอมฟิพาติก (amphipathic) ดังรูปที่ 1.2 จะเห็นได้ว่าโครงสร้างของไบลแอซิดที่มีหมู่ฟังก์ชัน

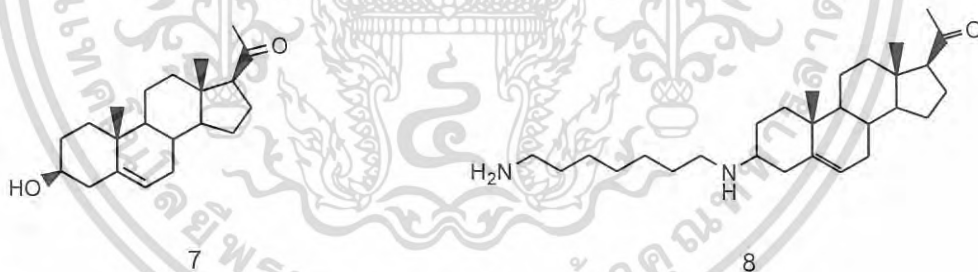
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายหมู่และมีสเตอริโอเคมีที่ต่างกันจึงทำให้โบล์แอซิดเป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่นักเคมีนิยมนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่และมีอนุพันธ์หลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าโบล์แอซิดตั้งต้น



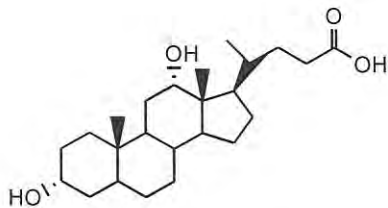
รูปที่ 1.2 แสดงความเป็น Amphipathic ของโบล์แอซิด

จากความหลากหลายของหมู่ฟังก์ชันบนนิวเคลียสของสเตียรอยด์ งานวิจัยนี้จึงสนใจในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่โดยเตรียมได้จากการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันหลักๆ โดยการเพิ่มหมู่อะตอมเข้าที่นิวเคลียสหลักของสเตียรอยด์ และสเตียรอยด์สังเคราะห์เหล่านี้จะถูกนำไปศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยจะเน้นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ และความเป็นพิษต่อเซลล์ จากงานวิจัยต่อเนื่องของผู้วิจัยพบว่า อะมิโนสเตียรอยด์ 8 ที่สังเคราะห์ได้จากการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone 7 มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.70 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และยังพบว่าอะมิโนสเตียรอยด์ 8 ไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ปกติ (Vero) โดยมีเปอร์เซ็นต์ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero) น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์[3]

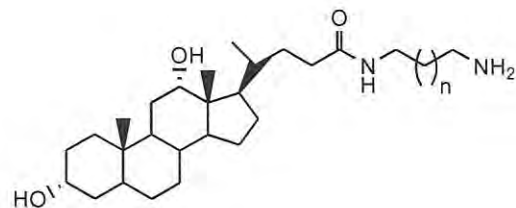


และอนุพันธ์เอไมด์ของ Deoxycholic acid 10 ที่สังเคราะห์ได้จาก Deoxycholic acid 9 โดยการเติมหมู่ไดเอมีนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 24 มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma ATCC HTB-22) และเซลล์มะเร็งช่องปาก KB (Human epidermoid carcinoma of cavity ATCC CCL-17) และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์พบว่า อนุพันธ์เอไมด์ที่มีความยาวของสายโซ่ของไดอะมิโนที่แตกต่างกันและเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ *Corynebacterium diphtheriae* เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคคอตีบพบว่าอนุพันธ์เอไมด์ของ Deoxycholic acid 10 ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.78 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร[4] จะเห็นได้ว่าเมื่อหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์เปลี่ยนไปฤทธิ์ทางชีวภาพของมันเปลี่ยนไปได้โดยที่อาจจะออกฤทธิ์ยับยั้งหรือส่งเสริม และ/หรือมีฤทธิ์เท่าเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



9 Deoxycholic acid



10 Deoxycholic acid amide n= 7

จากผลการทดลองของงานวิจัยทั้งสองพบว่าการเพิ่มอะตอมของไนโตรเจนเข้าไปที่นิวเคลียสของสเตียรอยด์ (หมายถึงที่วงหรือสายโซ่ด้านข้าง) มีส่วนทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์สังเคราะห์เปลี่ยนไปเมื่อเปรียบเทียบกับสเตียรอยด์ดั้งเดิม โดยแนวความคิดในการสังเคราะห์บวกกับข้อมูลเบื้องต้นที่กล่าวมา งานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ด้านเภสัชวิทยา กล่าวคือ สามารถสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่อาจจะนำไปเป็นตัวยารักษาโรคหรือเป็นส่วนผสมในยารักษาโรคชนิดใหม่ได้ และ/หรือสามารถใช้ทดแทนสเตียรอยด์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ และเป็นแนวทางเบื้องต้นนำไปสู่การสังเคราะห์เอซาสเตียรอยด์ (azasteroid หมายถึงสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอมที่วงหลักหรือสายโซ่ด้านข้าง) ได้[5] ซึ่งจากรายงานการวิจัยพบว่าเอซาสเตียรอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ โดยการเลือกใช้สารเข้าทำปฏิกิริยาและเทคนิคในการสังเคราะห์ที่เหมาะสม
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์สังเคราะห์
3. เพื่อเป็นแนวทางเบื้องต้นในการสังเคราะห์เอซาสเตียรอยด์

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่โดยการเพิ่มอะตอมของไนโตรเจนและกรดอะมิโนของนิวเคลียสของสเตียรอยด์
2. ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์
3. ทดสอบฤทธิ์ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์

## 1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

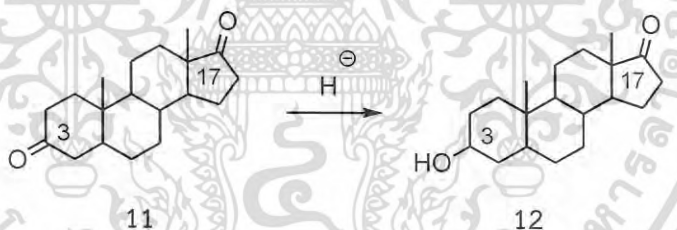
1. สังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่โดยใช้เทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็งและเทคนิคสารละลาย
2. ทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี
3. ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

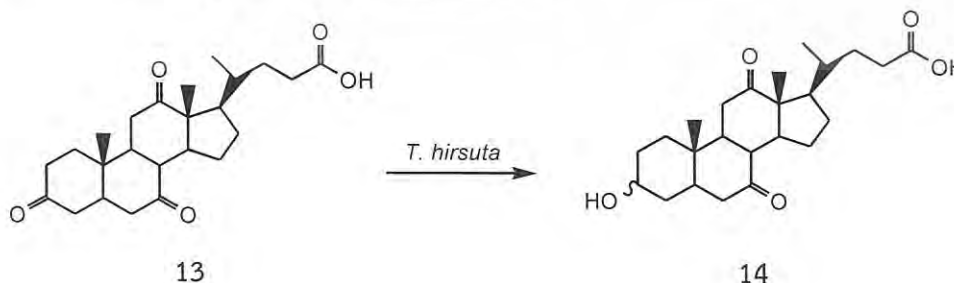
#### 4. ทดสอบฤทธิ์ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์

##### 1.5 สมมุติฐานงานวิจัย

จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยวงแหวนสี่เหลี่ยม 3 วง คือ วง A วง B วง C และมีวงห้าเหลี่ยม 1 วง คือ วง D ที่เชื่อมต่อกัน (รูปที่ 1.1) หมู่แทนที่ต่างๆ ที่มาเกาะเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีคุณสมบัติทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว จึงทำให้สเตียรอยด์มีคุณสมบัติที่หลากหลาย นักเคมีอินทรีย์ได้ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะทางเคมีอินทรีย์ในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างเพื่อเป็นการนำไปสู่สเตียรอยด์ชนิดใหม่ โดยถูกประยุกต์เพื่อเป็นแนวทางไปสู่การสังเคราะห์สเตียรอยด์เลียนแบบธรรมชาติ โดยการเลือกใช้รีเอเจนต์หรือสารเข้าทำปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจง และควบคุมสภาวะที่เหมาะสมเพื่อจะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มากพอต่อการนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จากรายงานการวิจัยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างมักมุ่งเน้นไปที่หมู่ฟังก์ชัน ที่ วง A และ วง B หรือ หมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชันบนนิวเคลียสของสเตียรอยด์จะขึ้นกับตำแหน่งบนโครงสร้าง ปฏิกิริยาที่สำคัญของสเตียรอยด์เช่น ปฏิกิริยาเพิ่มเข้าด้วยนิวคลีโอไฟล์ที่หมู่คาร์บอนิล, การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยไฮไดรด์ไอออน, การเกิดคีทาล (ketal formation) และปฏิกิริยาการเพิ่มเข้าด้วยกรีนยาร์ตรีเอเจนต์ จากการทดลองพบว่าลำดับตำแหน่งของคาร์บอนอะตอมที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาได้คือ  $3 > 17 \geq 20 > 11$  ตัวอย่างเช่นการแสดงความเฉพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ  $5\alpha$ -androstane-3,17-dione **11** เป็น 3-hydroxy- $5\alpha$ -androstane-17-one **12** แสดงให้เห็นว่าที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 สามารถเกิดปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกว่าที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17[6]

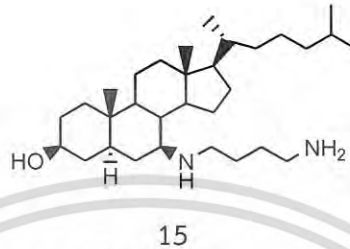


รวมทั้งการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันโดยใช้วิธีทางชีวภาพ (Biotransformation) ของกรดดีไฮโดรโคคลิก **13** ด้วยเชื้อ *Trametes hirsute* พบว่าเอนไซม์รีดักเตสจาก *T. hirsute* จะรีดิวส์หมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เท่านั้น[7] แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยารีดักชันที่เฉพาะเจาะจง

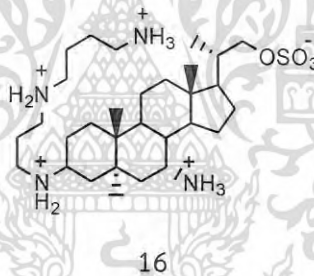


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

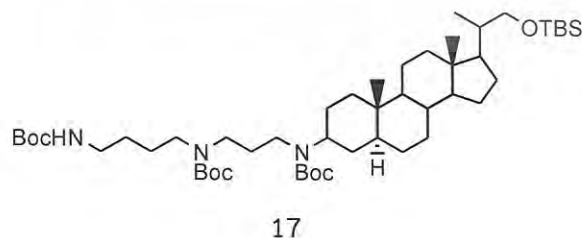
และตัวอย่างของการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์โดยใช้สารเคมี (Chemical transformation) เช่น Loncle และคณะ[8] ได้ทำการสังเคราะห์ 7-amino และ polyaminosterol จาก 3 $\beta$ -acetoxy-7-keto-5 $\alpha$ -cholestane 15 พบว่าสาร 15 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ และต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ส่งผลคล้ายกับ *Staphylococcus aureus* และ *S. faecalis*



Khan และคณะ[9] ได้ทำการสังเคราะห์ 7 $\alpha$ -Aminosteroids 16 พบว่าสาร 16 มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes* 308A

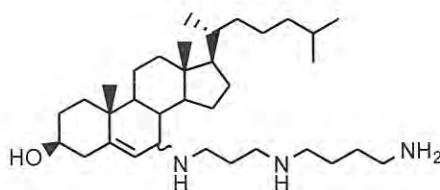


Kim และคณะ[10] ได้ทำการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 17 โดยการทำปฏิกิริยา amination ของ 3-ketosteroid ด้วยพอลิเอมีน วิธีการสังเคราะห์ที่เป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจนำมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์ Squalamine สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอะมิโนสเตียรอยด์ซึ่งสกัดแยกจากฉลามพันธ์ dog fish ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kihel และคณะ[11] ได้ทำการสังเคราะห์ spermidinylcholesterol 18 และศึกษาฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์ทั้งนี้เพื่อพัฒนาต่อเป็นยาต้านเซลล์มะเร็ง



18

จากตัวอย่างการปรับเปลี่ยนโครงสร้างนี้จะได้อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลายมากยิ่งขึ้นและเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสเตียรอยด์เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้ยังสามารถนำสเตียรอยด์สังเคราะห์ไปเป็นสารตั้งต้นในการเตรียมสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้อีก

### 1.6 คำสำคัญของการวิจัย

อนุพันธ์สเตียรอยด์      ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์      ความเป็นพิษต่อเซลล์

### 1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ ซึ่งสเตียรอยด์สังเคราะห์เหล่านี้อาจแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และความเป็นพิษต่อเซลล์
2. สามารถทราบถึงฤทธิ์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์ในด้านฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และความเป็นพิษต่อเซลล์
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาเพื่อผลิตส่วนผสมของยาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ศึกษาเพื่อเป็นการนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

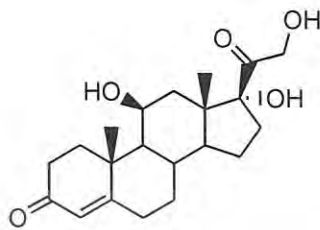
ในธรรมชาติมีสเตียรอยด์ที่แตกต่างกันนับร้อยชนิดพบทั้งในพืชและสัตว์ การค้นพบสเตียรอยด์เริ่มจากการสกัดจากพืชหรือเนื้อเยื่อของสัตว์ด้วยอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม หรือเบนซีน พบว่าสเตียรอยด์เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติคล้ายกับไขมัน สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์และไม่ละลายในน้ำ ความแตกต่างของสเตียรอยด์แต่ละชนิดจะแปรผันไปตามหมู่ฟังก์ชันที่ติดอยู่กับโครงสร้างหลัก บทบาทสำคัญของสเตียรอยด์ในสิ่งมีชีวิตคือเป็นฮอร์โมน สเตียรอยด์ฮอร์โมนที่พบในสัตว์มีปริมาณค่อนข้างน้อยจึงไม่สามารถใช้เป็นแหล่งสำคัญของสารดังกล่าวได้ ในปลายทศวรรษของปี ค.ศ. 1930 ได้มีการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์สเตียรอยด์หลายชนิดขึ้นและ Equilenin 19 เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนตัวแรกที่ได้จากการสังเคราะห์ ในปี ค.ศ. 1953 W. E. Bachmann และ J. W. Cornforth ได้อธิบายการสังเคราะห์ Epiandrosterone 20 ปัจจุบันการสังเคราะห์สารดังกล่าวในปริมาณมากอาจใช้วิธีการสังเคราะห์แบบกึ่งสังเคราะห์ (semi-synthesis) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ที่เริ่มจากสารตั้งต้นในธรรมชาติซึ่งมีขั้นตอนการสังเคราะห์และค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์น้อยกว่า ปัจจุบันสเตียรอยด์ในพืชได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากมีปริมาณสารตั้งต้นค่อนข้างสูง



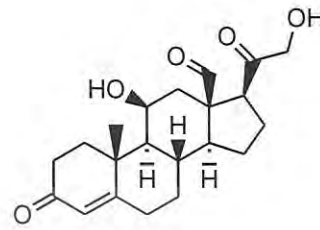
สเตียรอยด์ที่เป็นแม่แบบชนิดแรกคือ Cholesterol 1 จัดเป็นทั้งสเตียรอยด์ ลิพิด และแอลกอฮอล์ พบในเยื่อหุ้มเซลล์ของทุกเนื้อเยื่อในร่างกายและถูกขนส่งในกระแสเลือดของสัตว์ Cholesterol 1 ส่วนใหญ่ไม่ได้มากับอาหารแต่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกายจะสะสมอยู่มากในเนื้อเยื่อของอวัยวะที่สร้างมันขึ้นมาเช่นตับ ไชสันหลัง (spinal cord) สมองและผนังหลอดเลือด (atheroma) Cholesterol 1 มีบทบาทในกระบวนการทางชีวเคมีมากมาย แต่ที่รู้จักกันดีคือ เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจและระบบหลอดเลือด (cardiovascular disease) และภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (Hypercholesterolemia)[12] สเตียรอยด์ที่ถูกจัดเป็นฮอร์โมนส่วนใหญ่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก Cholesterol 1 โดยกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพซึ่งมีเอนไซม์ที่แตกต่างกันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ร่างกายจะผลิตสเตียรอยด์ขึ้น 20 ถึง 30 หน่วยในแต่ละวันเพื่อควบคุมฮอร์โมนต่างๆในร่างกายและกตภูมิคุ้มกันให้สมดุล รักษาความสมดุลของเกลือแร่ อิเล็กโทรไลต์และน้ำ โดยใช้ Cholesterol 1 เป็นสารตั้งต้นในการผลิต สเตียรอยด์จะถูกผลิตขึ้นทุกเช้าหลังจากการนอนหลับพักผ่อนมาจนเต็มที่แล้วสมองจะสั่งการผลิตฮอร์โมนสเตียรอยด์โดยต่อมหมวกไตจะนำ Cholesterol 1 มาเปลี่ยนเป็นสเตียรอยด์ตัวอื่นๆ ซึ่งหลักๆอยู่ 2 ชนิดคือ Cortisol 21 มีประโยชน์ในการบรรเทาอาการอักเสบ ควบคุมสมดุลของเกลือแร่และน้ำ รวมถึงเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน อีกชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ Aldosterone 22 ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลเกลือแร่ในร่างกาย แต่ถ้ามี Aldosterone 22 หลั่งออกมามากเกินไปก็จะทำให้ร่างกายขับโพแทสเซียมออกมา กล้ามเนื้ออ่อนแรงและทำให้มีความดันโลหิตสูงได้



21

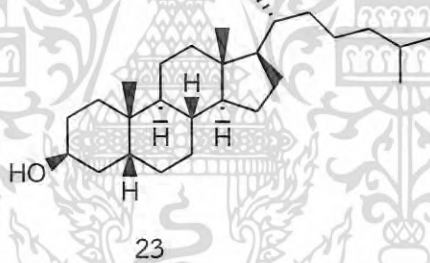


22

## 2.2 สเตียรอยด์ในธรรมชาติ[13]

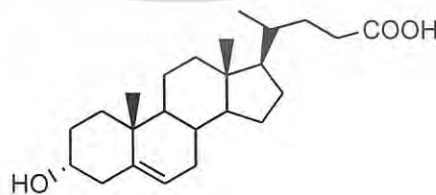
สเตียรอยด์ที่สำคัญในธรรมชาติส่วนใหญ่คือ

1. สเตอรอล (Sterol) Cholesterol 1 เป็นสเตอรอลตัวหนึ่งที่พบมากในธรรมชาติ พบได้ในสัตว์ทั้งกลุ่มมีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังและในพืชด้วยโดยพบร่วมกับสเตียรอยด์ในกลุ่มสเตอรอลตัวอื่นๆ เช่น Coprostan-3 $\beta$ -ol 23



23

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

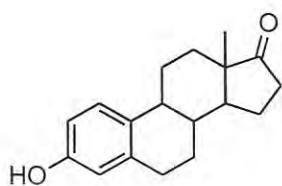


24

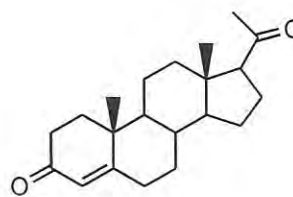
3. สเตียรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormones) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่หนึ่งคือสเตียรอยด์ที่เป็นฮอร์โมนเพศและสามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่มฮอร์โมนเพศหญิง เช่น Estrogen 25 กลุ่ม Progestational hormone เช่น Progesterone 5 และกลุ่มที่สองคือกลุ่มเอกซอร์เจนเป็นเอกซอร์เจนที่สังวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

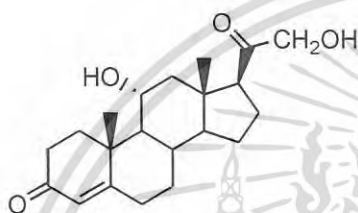
Adrenocortical hormones แบ่งออกเป็น กลุ่ม Glucocorticoids เช่น Hydrocortisone 26 และกลุ่ม Mineralocorticoids เช่น Andosterone 27



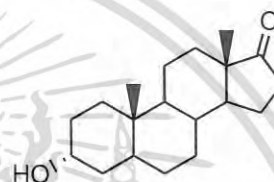
25



5

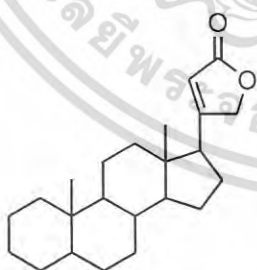


26

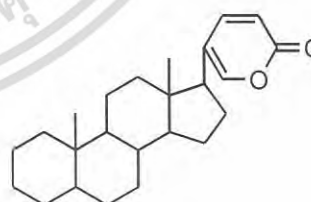


27

4. คาร์ดิแอกไกลัยโคไซด์ (Cardiac glycosides) สเตียรอยด์ในกลุ่มนี้มีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจซึ่งเรียกว่า Cardiac-active (Cardiotonic) สารประกอบนี้แยกได้จากพืชที่อยู่ในเขตร้อน และสามารถพบได้ในเขตแอฟริกาและอเมริกาใต้ ชาวพื้นเมืองใช้เตรียมเป็นลูกดอกอาบยาพิษ สเตียรอยด์กลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กลุ่ม Cardenolides 28 เป็นสเตียรอยด์ชนิด C-23 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 เป็นชนิด 5-membered unsaturated lactone ring และกลุ่ม Bufadienolides 29 เป็นสเตียรอยด์ชนิด C-24 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 เป็นชนิด 6-membered unsaturated lactone ring



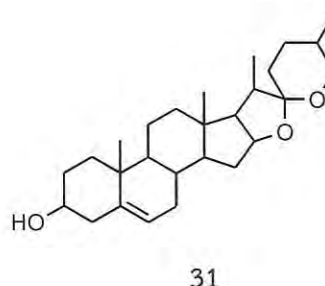
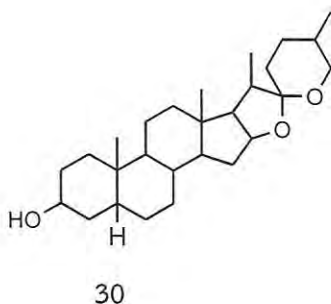
28



29

5. Saponins อะโกโคโนหรือส่วนที่ปราศจากน้ำตาลของพืชที่สามารถทำให้เกิดฟองได้ในน้ำได้ เรียกว่า Saponin ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้เช่น Smilagenin 30 และ Diosgenin 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

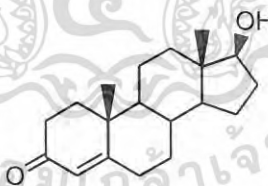


### 2.3 ประเภทของสเตียรอยด์[14-20]

ในสรีรวิทยาและการแพทย์ของมนุษย์ สเตียรอยด์ที่สำคัญคือ Cholesterol 1 เป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์แอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์ เมมเบรน ในสัตว์ แต่อย่างไรก็ดี ถ้ามีปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิดโรคและภาวะผิดปกติมากมาย เช่น ภาวะผนังเส้นโลหิตแดงหนาและมีความยืดหยุ่นน้อยลง (atherosclerosis) สเตอรอยด์อื่นส่วนใหญ่ถูกสังเคราะห์จาก Cholesterol 1 ฮอร์โมนต่างๆ เช่น ฮอร์โมนเพศของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate) ก็เป็นสเตียรอยด์ที่สร้างจาก Cholesterol 1 เช่นกัน

สเตียรอยด์แบ่งเป็นประเภทต่างๆ ดังนี้

1. แอนแนบอลิกสเตียรอยด์ (Anabolic steroid) หรือที่รู้จักกันเป็นทางการคือ แอนแนบอลิกแอนโดรเจนสเตียรอยด์ (Anabolic-androgen steroid, AAS) เป็นอนุพันธ์สังเคราะห์ของฮอร์โมนเพศชาย Testosterone 32 มีผลในการเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีน กระตุ้นให้ร่างกายสะสมโปรตีนและสร้างกล้ามเนื้อ แอนแนบอลิกสเตียรอยด์ยังมีคุณสมบัติ Androgenic และ Virilizing รวมถึงการบำรุงรักษาในลักษณะที่เป็นชาย เช่นการเจริญเติบโตของร่างกาย เสี่ยง และหนวดเครา สเตียรอยด์ประเภทนี้ส่วนมากจะใช้ในกลุ่มของนักกีฬาเพราะจะช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้แก่กล้ามเนื้อ



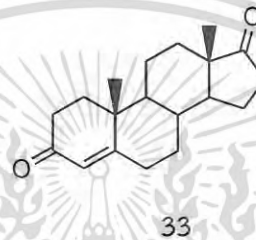
2. คอร์ติโคสเตียรอยด์ (Corticosteroid) เป็นฮอร์โมนประเภทสเตียรอยด์ชนิดหนึ่ง ถูกสังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ที่เปลือกของต่อมหมวกไตภายใต้การควบคุมจากสมองส่วนกลาง จัดเป็นฮอร์โมนที่มีฤทธิ์หลายด้าน โดยเฉพาะในทางการแพทย์ ฮอร์โมนตัวนี้เปรียบเสมือนยาครอบจักรวาลคือสามารถใช้ในการรักษาโรคได้แทบทุกชนิดเพราะมีการออกฤทธิ์ต่อระบบต่างๆ ในร่างกายหลายระบบเช่น ตับ กล้ามเนื้อ ผิวหนัง ต่อมน้ำเหลือง เนื้อเยื่อไขมัน เนื้อเยื่อเกี่ยวพันรวมทั้งมีฤทธิ์ลดการอักเสบในร่างกายด้วย

3. ฮอร์โมนเพศ เกิดจากการทำงานของต่อมในสมองที่เรียกว่า พิทูอิทารีแกรนด์ (Pituitary Grand) ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างฮอร์โมนอันจะเป็นสิ่งกำหนดความแตกต่างของกระบวนการทำงานในร่างกายของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งชายและหญิง ฮอโมนที่ควบคุมการทำงานของผู้หญิงเรียกว่า Estrogen 25 ทำหน้าที่ให้ร่างกายของผู้หญิงพัฒนาจากวัยเด็กสู่วัยสาว ทำให้เต้านมมีขนาดใหญ่ขึ้น สะโพกผายขึ้น น้ำเสียงที่เคยแหบพร่าหรือดูเรียบๆ ก็กลับมามีลีลานุ่มนวล เสียงเล็กลง และที่สำคัญคือการมีประจำเดือน ซึ่งเป็นสัญญาณเตือนเริ่มแรกของการเข้าสู่วัยสาวเต็มตัว ส่วนผู้ชายฮอโมนที่เป็นตัวกำหนดความเป็นชายเรียกว่า Testosterone 6 มีส่วนทำให้เด็กผู้ชายเริ่มเข้าสู่วัยหนุ่ม มีเสียงห้าวขึ้น อวัยวะเพศใหญ่ขึ้น มีหนวดเคราซึ่งบ่งบอกความเป็นชาย

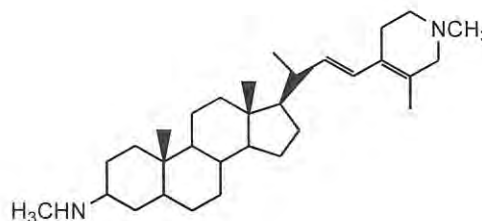
4. โพรฮอโมน (Prohormone) เป็นสารตั้งต้นในการสร้างฮอโมนชนิดต่างๆ ซึ่งโพรฮอโมนจะไม่มีผลต่อระบบการทำงานของร่างกาย โพรฮอโมนที่พบได้ในคนคือ Proinsulin และ Pro-opiomelanocortin ตัวอย่างของโพรฮอโมนได้แก่ Androstenedione 33



5. ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) เป็นสารสเตียรอยด์ที่พบในพืช มีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกับ Cholesterol 1 มาก จึงช่วยยับยั้งการดูดซึม Cholesterol 1 ในอาหารที่เรารับประทานเข้าไปไม่ให้เข้าสู่กระแสเลือดด้วยกลไกเข้าไปแทนที่ Cholesterol 1 ซึ่งไฟโตสเตอรอลจะถูกดูดซึมได้น้อยมาก ทำให้ Cholesterol 1 จากอาหารถูกดูดซึมได้น้อยลงและถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระ ปริมาณไฟโตสเตอรอลในพืชจะพบมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์รวมทั้งตำแหน่งของพืชที่วิเคราะห์ ซึ่งในพืชชนิดหนึ่งๆมีการพบไฟโตสเตอรอลหลายชนิดในสัดส่วนที่แตกต่างกันไป

#### 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

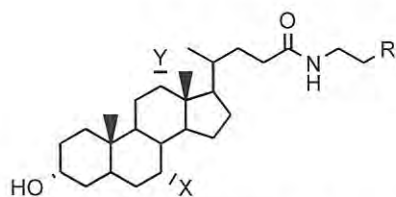
แนวทางการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอมที่วงหลักและ/หรือสายโซ่ด้านข้าง (side chain) และผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ถูกกล่าวถึงโดย Gans และ Bracher[5] ได้ทำสังเคราะห์เลียนแบบธรรมชาติ Plakinnamine B 34 ซึ่งเป็นสเตียรอยด์ที่ประกอบอะตอมของไนโตรเจนจัดเป็นสารกลุ่ม azasteroid หรือ steroid alkaloid ในธรรมชาติสกัดแยกได้จากฟองน้ำ *Plakina* sp. จากการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นพบว่า Plakinnamine B 34 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา



34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

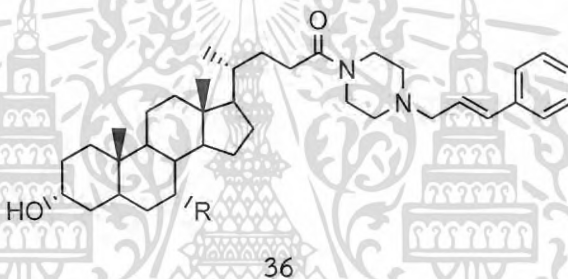
Banday และคณะ[21] สังเคราะห์ bile acid amidoalcohol 35a และ 35b โดยการทำปฏิกิริยาที่หมู่คาร์บอกซิลของโบล์แอซิดให้เป็นหมู่เอมีโดแอลกอฮอล์ และศึกษาโครงสร้างของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค X-ray



35a X, Y = H, R = OH

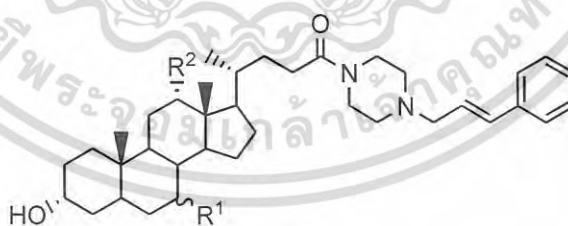
35b X, Y = H, R = CH<sub>2</sub>OH

Kihel และคณะ[22] สังเคราะห์สาร 36 จาก Lithocholic acids 24 พบว่าสาร 36 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้



36

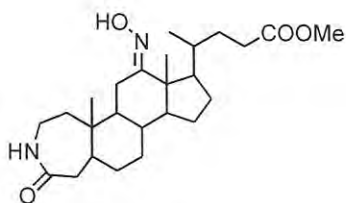
Kihel และคณะ[23] สังเคราะห์อนุพันธ์ของโบล์แอซิด 37 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ในระดับที่ดี



37

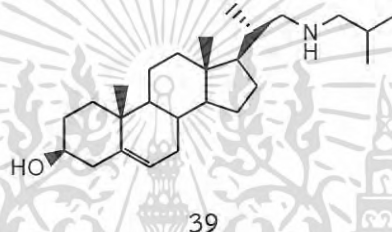
Song และคณะ[24] สังเคราะห์อนุพันธ์ของ Deoxycholic acid 9 โดยเปลี่ยนวง A เป็น homo-lactam และหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 12 เป็นหมู่ออกซิม จากนั้นนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก พบว่า สาร 38 มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 20.6 ไมโครโมล/ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



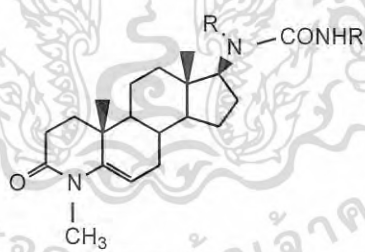
38

Bracher และคณะ[25] สังเคราะห์ azasteroids 23-azacholesterol 39 โดยการเติมไนโตรเจนอะตอมเข้าไปที่สายโซ่ด้านข้าง พบว่าสาร 39 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ sterol methyltransferase ในกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ ergosterol



39

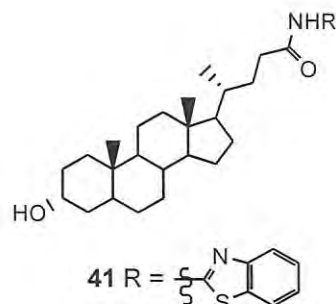
Singh และคณะ[26] สังเคราะห์ azasteroid 40 พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้ง human type I isozyme มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $1.3 \pm 0.64$  นาโนโมล



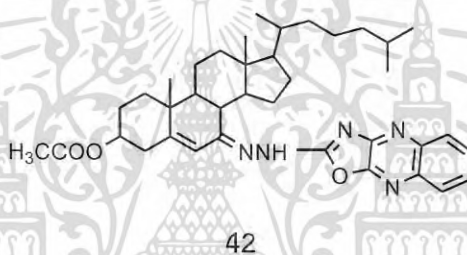
40 R = cyclopropyl, R' = phenyl

Qiu และคณะ[27] สังเคราะห์อนุพันธ์ของ Lithocholic acid 41 โดยทำการเพิ่มไนโตรเจนอะตอมเข้าไปในโมเลกุลของ Lithocholic acid 24 เปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจากคาร์บอกซิลเป็นหมู่เอไมด์ และนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสาร 41 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 7.8 ไมโครโมลาร์

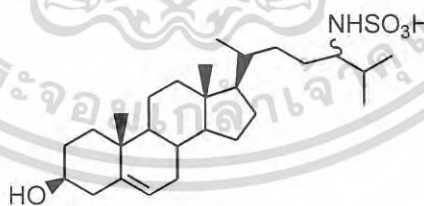
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Khan และคณะ[28] ได้สังเคราะห์ steroidal oxazolo quinoxaline **42** ที่ประกอบด้วยอะตอมของไนโตรเจนโดยพัฒนาโครงสร้างจากออกซีสเตียรอยด์ของคลอเลสเทอรอล พบว่าสาร **42** มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก *S. aureus* และ *S. pyogenes* และแกรมลบ *S. typhimurium* และ *Escherichia coli* มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.78, 0.52, 0.47 และ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ



Chung และคณะ[29] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ Cholesterol **1** โดยการเพิ่มหมู่  $-NHSO_3H$  ที่สายโซ่ด้านข้างของ Cholesterol **1** พบว่าสาร **43** มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรากลุ่ม *Cryptococcus neoformans* และ *Candida albicans* ที่ดี มีค่า MIC ช่วงระหว่าง 0.10-6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การทดลองทั่วไป

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ได้แก่ hexane, dichloromethane (DCM), ethyl acetate และ methanol (เกรดการค้า, Zen point) ที่ใช้สำหรับการล้างเรซินและการทำคลอสมน์โครมาโทกราฟีถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง ส่วนสารเคมีที่ได้จากการซื้อจะนำมาใช้โดยปราศจากการทำสารให้บริสุทธิ์

ตัวทำละลาย pyridine (เกรดวิเคราะห์, Lab scan) ที่ใช้ในการทดลอง ถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นที่อุณหภูมิ 115 – 116 องศาเซลเซียส และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อลดน้ำ ระยะเวลาในการใช้ 30 วัน

สารเคมีที่ใช้เป็นสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ในการสังเคราะห์เป็นเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Fluka และ Aldrich ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography ทำให้ปรากฏบนแผ่น aluminium sheet silica gel F<sub>254</sub> Merck ตรวจสอบจุดของสารผลิตภัณฑ์ด้วยการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และ/หรือโดยการย้อมด้วย anisaldehyde reagent แล้วให้ความร้อนบนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

รีเอเจนต์ใช้ทดสอบเรซิน:

รีเอเจนต์ A : สารละลาย (1) ชั่งพีนอล 40 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร สารละลาย (2) ชั่งโพแทสเซียมไฮโปไนต์ 65 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งมา 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วย pyridine 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลาย (1) และ (2) ทำการปั่นจนให้สารละลายผสมเข้ากัน

รีเอเจนต์ B : ชั่ง Ninhydrin 2.5 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 50 มิลลิลิตร

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

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

จุดหลอมเหลวบันทึกโดยเครื่องหาจุดหลอมเหลว GALLEKAMP SANYO

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

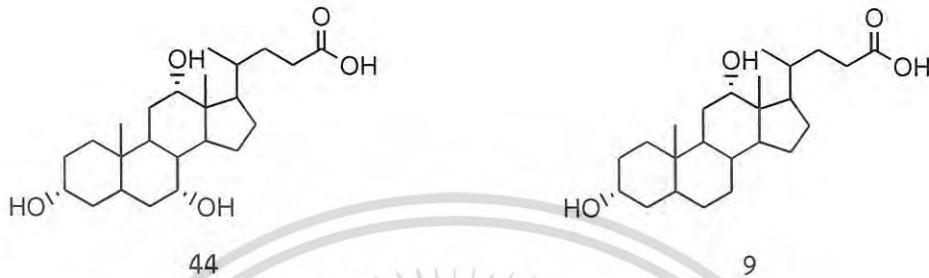
แมสสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ Finnigan LC-Q MS detector ด้วยเทคนิค Electrospray จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2 วิธีการทดลอง

#### 3.2.1 การสังเคราะห์สเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม

เลือกใช้ Cholic acid 44 และ Deoxycholic acid 9 เป็นสารตั้งต้น



การเพิ่มอะตอมของไนโตรเจนเข้าไปในโมเลกุลของโพลีแอซิดทั้งสองจะทำได้โดยการนำโพลีแอซิดทำปฏิกิริยากับสารประกอบเอมีนซึ่งเลือกใช้กลุ่มไดเอมีน ในการสังเคราะห์จะเลือกการสังเคราะห์ด้วยเทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็ง แนวทางการสังเคราะห์แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน[30] ดังนี้

#### 1. ปฏิกิริยาการกระตุ้น Wang resin โดยการเปลี่ยนเป็นหมู่คาร์บอเนต

แผนภาพที่ 3.1

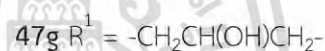
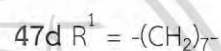
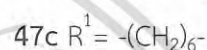
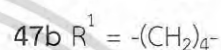
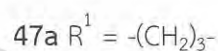
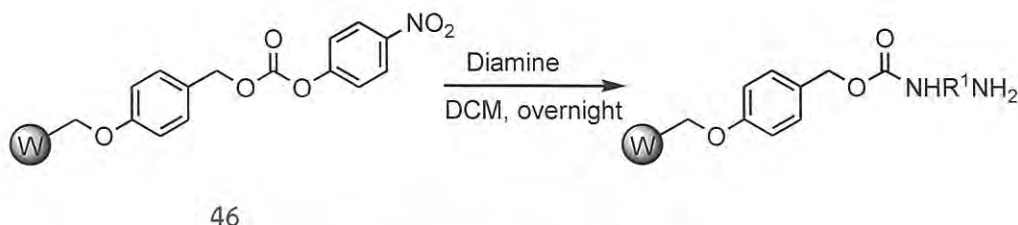


1. ชั่ง Wang resin 45 จำนวน 100.0 มิลลิกรัม (0.10 มิลลิโมล) ใส่ลงใน column cap แล้วเติม DCM 10 มิลลิลิตร แช่ไว้ประมาณ 10 นาที จนกระทั่งเรซินบวมตัว
2. ไข DCM ออกจาก column cap เติมสารละลายของ *p*-nitrophenyl chloroformate 80.6 มิลลิกรัม (0.40 มิลลิโมล) ใน DCM ลงใน column cap
3. เติม pyridine ลงไปประมาณ 5 หยด แล้วเติม DCM จนได้ปริมาตร 2/3 ของ column cap จากนั้นปิดฝา column cap ให้เรียบร้อย และระบายความดันภายใน column cap นำ column cap ไปตั้งหมუნ เปิดเครื่องตั้งหมუნทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
4. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไขสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง จากนั้นล้างเรซินด้วย DCM หลายๆ ครั้ง จะได้ *p*-nitrophenyl carbonate wang resin 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. ปฏิกิริยาการใส่ไดเอมีนเข้าไปทำปฏิกิริยากับ Wang resin 46

แผนภาพที่ 3.2

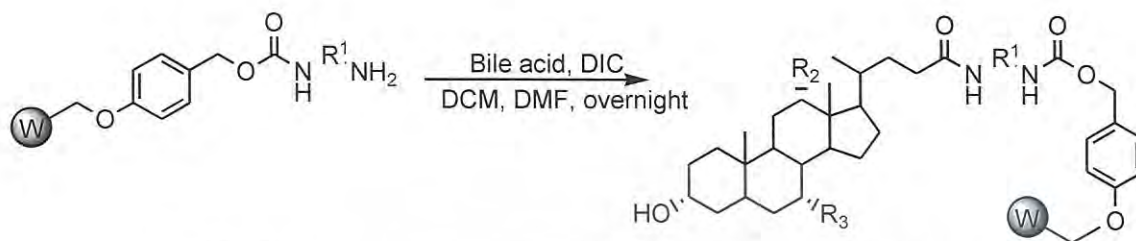


1. ซิงไดเอมีนจำนวน 4 equivalent ของ Wang resin 46 ละลายใน DCM จากนั้นเติมลงใน column cap ที่ได้จากปฏิกิริยาตอนที่ 1
2. จากนั้นเติม DCM ลงใน column cap จนได้ปริมาตร 2/3 ของหลอด นำ column cap ไปตั้งหมუნ เปิดเครื่องตั้งหมუნทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
3. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไซสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง จากนั้นล้างเรซินด้วย DCM สลับกับ methanol หลายๆ ครั้งนำเม็ดเรซิน 2-3 เม็ด ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กไปทดสอบโดยใส่รีเอเจนต์ A 3 หยด และรีเอเจนต์ B 1 หยด จากนั้นนำหลอดทดลองนี้ไปให้ความร้อนประมาณ 1 นาที ถ้าเม็ดเรซินเปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่าไดเอมีนได้ทำปฏิกิริยากับ Wang resin สมบูรณ์แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. ปฏิกิริยาการใส่โบล์แอซิดเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน

#### แผนภาพที่ 3.3



47a-47g

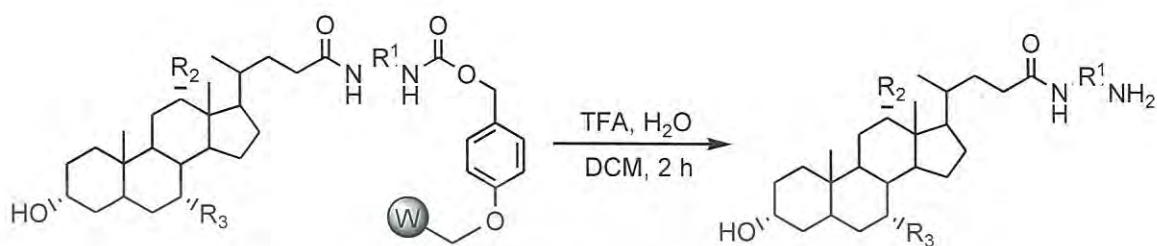
48  $R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{OH}$ 49  $R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$ 48a, 49a:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_3-$ 48b, 49b:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_4-$ 48c, 49c:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_6-$ 48d, 49d:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_7-$ 48e, 49e:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_8-$ 48f, 49f:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_9-$ 48g, 49g:  $R^1 = -\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 

1. ชั่งโบล์แอซิดจำนวน 4 equivalent ของ Wang resin ใส่ลงใน vial ละลายโบล์แอซิดด้วย DCM และ DMF ทำการปั่นจนจนกระทั่งโบล์แอซิดละลายหมด
2. จากนั้นใส่ DIC ลงในโบล์แอซิดปั่นจนต่อเป็นเวลา 10 นาที
3. นำโบล์แอซิดที่ได้จากข้อ 2 ใส่ลงใน column cap ที่มีเรซินที่ได้จากปฏิกิริยา 2
4. เติม DCM ลงใน column cap จนมีปริมาณเป็น 2/3 ของหลอด
5. นำ column cap ไปตั้งหมุน เปิดเครื่องตั้งหมุนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
6. เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดไขสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้งและล้างเรซินด้วย DCM สลับกับ methanol จากนั้นแช่เรซินใน DCM เป็นเวลา 30 นาที สลับกับแช่ใน methanol เป็นเวลา 30 นาทีเช่นกัน ประมาณ 5-6 ครั้ง
7. นำเม็ดเรซิน 2-3 เม็ด ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กไปทดสอบ โดยใส่รีเอเจนต์ A 3 หยด และรีเอเจนต์ B 1 หยด จากนั้นนำหลอดทดลองนี้ไปให้ความร้อนประมาณ 1 นาที ถ้าเม็ดเรซินไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่าโบล์แอซิดได้ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนสมบูรณ์แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4. ปฏิกิริยาการตัดสารผลิตภัณฑ์ออกจาก Wang resin

แผนภาพที่ 3.4



48a-48g, 49a-49g

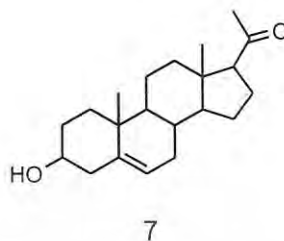
50  $R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{OH}$ 51  $R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$ 50a, 51a:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_3-$ 50b, 51b:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_4-$ 50c, 51c:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_6-$ 50d, 51d:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_7-$ 50e, 51e:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_8-$ 50f, 51f:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_9-$ 50g, 51g:  $R^1 = -\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 

1. นำ column cap ที่มีเรซินที่ได้จากปฏิกิริยาตอนที่ 3 มาเติม TFA ลงไปประมาณ 1/3 โดยปริมาตรของหลอด จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 2-3 หยด
2. เติม DCM ลงใน column cap จนมีปริมาตรเป็น 2/3 ของหลอด จากนั้นนำ column cap ไปตั้งหมุน เปิดเครื่องตั้งหมุนทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
3. ไซสารละลายจาก column cap ใส่ลงในขวดแก้วเล็กที่ทราบน้ำหนัก จากนั้นนำไปฟั่นด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อกำจัดตัวทำละลายออกจากสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมด
4. นำขวดแก้วเล็กที่มีสารผลิตภัณฑ์ไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ได้
5. นำสารผลิตภัณฑ์ไปตรวจวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

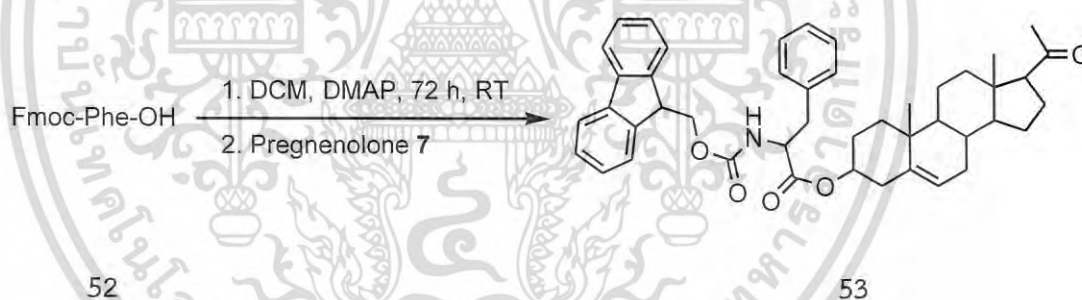
### 3.2.2 การสังเคราะห์สเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน

เลือกใช้ Pregnenolone 7 เป็นสารตั้งต้น



การเพิ่มกรดอะมิโนเข้าไปในโมเลกุลของ Pregnenolone 7 เลือกทำปฏิกิริยาที่หมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) วิธีการสังเคราะห์จะเลือกเทคนิควิทยาศาสตร์ละลายโดยการนำ Pregnenolone 7 ปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่ติดหมู่ป้องกัน (Protecting group) Pregnenolone 7 จะเข้าทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่หมู่คาร์บอกซิลถูกกระตุ้นด้วย DCC ซึ่งวิธีการทดลองจะทำการทดลองเสร็จสิ้นภายในขั้นตอนเดียว โดยจะไม่ทำการแยกสารตัวกลางที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยาในรูปสารบริสุทธิ์[31] และจะทำปฏิกิริยาต่อเนื่องจากกระทั่งได้สารผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือสารประกอบเอสเทอร์ของ Pregnenolone 53

แผนภาพที่ 3.5



1. ชั่ง Fmoc phenylalanine 52 จำนวน 182.4 มิลลิกรัม (0.47 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม DCM 10 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวานจนกระทั่ง Fmoc phenylalanine 52 ละลายหมด
2. จากนั้นเติม DMAP 3-4 เกร็ด ลงในสารละลายในข้อ 1 ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นกวานจนกระทั่ง DMAP ละลายหมด
3. เติมสารละลายของ Pregnenolone 7 จำนวน 100.0 มิลลิกรัม (0.31 มิลลิโมล) ใน DCM 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ทำการปั่นกวานจนกระทั่ง Pregnenolone 7 ละลายหมด
4. นำสารละลายผสมจากข้อ 3 ทำการปั่นกวานที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลาย DCC จำนวน 97.1 มิลลิกรัม ใน DCM 5 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวานที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และทำการปั่นกวานต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะเกิดตะกอนสีขาวของ dicyclohexylurea

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ทำการกรองแยกตะกอนสีขาวและสารละลายผสม จากนั้นนำสารละลายผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง
6. นำของเหลวหนืดจากข้อ 5 มาละลายด้วย DCM 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาสกัดล้างด้วย 0.5 N ของกรดไฮโดรคลอริก 10 x 2 ครั้ง, สารละลายอิมัลชันโซเดียมโบคาร์บอเนต 10 x 2 ครั้ง และสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิมัลชัน 10 มิลลิลิตร
7. ทำการดูดน้ำออกจากสารละลายด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ปรอทจากน้ำ กรองแยกสารละลายและแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต และนำของผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ
8. ทำการแยกสารผสมให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี
9. เริ่มทำการทดลองใหม่ตั้งแต่ข้อ 1-8 โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนในข้อ 1 จาก Fmoc phenylalanine เป็น Fmoc isoleucine 91.5 มิลลิกรัม (0.26 มิลลิโมล)

### 3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

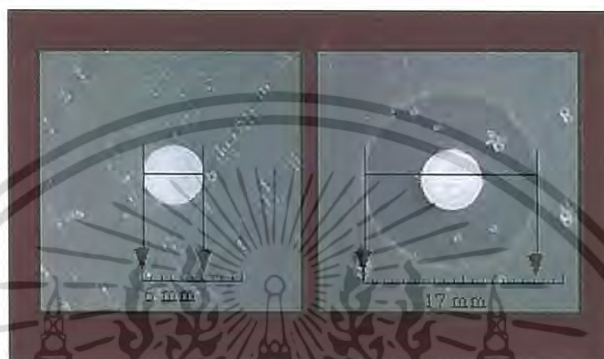
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ จะทำการทดสอบ ณ ห้องปฏิบัติการสาขาโษษุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ด้วยวิธี Disc diffusion method ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauer และคณะ[32] ซึ่งวิธีการทดสอบสรุปได้ดังนี้

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เก็บไว้บน Trypticase Soy Agar (TSA) เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นทำการเชยเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูก activated แล้วลงมาใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mcfarland
3. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมได้มาเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Ager อยู่ โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่วจำนวน 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ อยู่บนหน้าวุ้น
4. หลังจากนั้นนำแผ่นดิสก์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มีสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งละลายด้วย DCM วางบนผิววุ้นที่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากนั้นทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. อาหารสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ใช้เป็นชนิด Sabouraud Agar และทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอุณหภูมิและเวลาขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด
6. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone ที่เกิดขึ้น

กรณีทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียใช้ Vancomycin เป็นตัวยาเปรียบเทียบ และกรณีทดสอบกับยีสต์ใช้ Amphotericin B เป็นตัวยาเปรียบเทียบ ในแต่ละชุดการทดลองจะใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ผลการทดลองพิจารณา ดังนี้: ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่าน้อยกว่า 11 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับอ่อน (weak) ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 11 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 14 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับปานกลาง (moderate) และถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 14 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับดี (good)



รูปที่ 3.1 ตัวอย่างแสดงการวัดวงใส (clear zone)

### 3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จะทำการทดสอบ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ วิธีการทดลองแบ่งออกได้ดังต่อไปนี้

#### 3.4.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติชนิด Vero (African green monkey kidney)

การทดสอบใช้วิธี Sulforhodamine B (SRB) assay เซลล์ที่ใช้ทดสอบคือ เซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney) ที่ความเข้มข้นของสารทดสอบเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 0.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และเปรียบเทียบกับตัวยาค Ellipticine เป็นชุดควบคุมเชิงบวก การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการเจริญเติบโตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ (non cytotoxic) และถ้าเซลล์มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ (cytotoxic) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า  $IC_{50}$  (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

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

การทดสอบใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA)[33] ใช้เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากชนิด KB (Human epidermoid carcinoma of carcinoma, ATCC CCL-17) ที่ความเข้มข้นของสารทดสอบเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 0.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และเปรียบเทียบกับตัวยาค Ellipticine เป็นชุดควบคุมเชิงบวก การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สว่นไวสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างไม่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (inactive) และถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (active) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า IC<sub>50</sub> (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

### 3.4.3 ทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (Anti-cancer BC-Breast cancer)

การทดสอบด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA)[33] ใช้เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast adenocarcinoma, ATCC HTB-22) ที่ความเข้มข้นของสารทดสอบเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 0.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และเปรียบเทียบกับตัวยา Doxorubicine เป็นชุดควบคุมเชิงบวก การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างไม่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (inactive) และถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (active) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า IC<sub>50</sub> (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

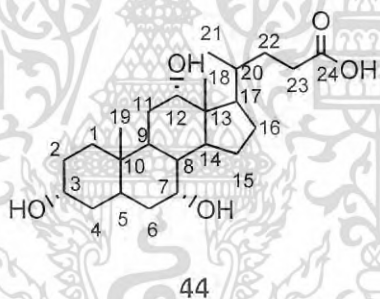
## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผล

#### 4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม

สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คือ โปล์แอซิด Cholic acid **44** และ Deoxycholic acid **9** ทำการเพิ่มไนโตรเจนอะตอมด้วยการทำปฏิกิริยากับสารประกอบไดเอมีนที่มีความยาวของสายโซ่แตกต่างกัน ซึ่งมีความยาวของสายโซ่ที่แตกต่างกันโดยมีการเพิ่มหมู่เมทิลที่ละ 1 หมู่ พิจารณาจากโมเลกุลของสเตียรอยด์กลุ่มโพลีแอซิดที่ประกอบส่วนที่มีซิวและไม่มีซิว และสารอนุพันธ์ที่จะทำการสังเคราะห์เป็นโมเลกุลที่มีความซับซ้อนสูง วิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์จากโพลีแอซิดทั้งสองจึงเลือกทำการสังเคราะห์โดยเทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็ง ทั้งนี้เพื่อสะดวกในการทำให้สารผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์ได้ง่ายขึ้นและไม่เสียผลิตภัณฑ์ ในขณะที่ทำการแยกให้บริสุทธิ์เช่นในขั้นตอนการทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี เมื่อทำการพิสูจน์โครงสร้างของโพลีแอซิดด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ได้ผลดังต่อไปนี้

Cholic acid **44**

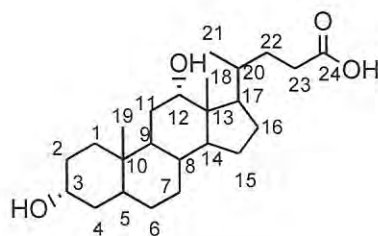


$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.61 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 6.2 Hz, H-21), 1.19-1.92 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.07-2.26 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 3.20-3.30 (1H, m, H-3), 3.69 (1H, m, H-7) และ 3.85 (1H, m, H-12)

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.7 (C-21), 23.2 (C-19), 24.2 (C-15), 27.9 (C-9), 28.6 (C-16), 29.6 (C-11), 31.2 (C-2), 32.0 (C-22), 32.3 (C-23), 35.9 (C-6), 35.9 (C-10), 36.5 (C-1), 36.7 (C-20), 40.5 (C-4), 41.0 (C-8), 43.0 (C-14), 43.2 (C-5), 47.5 (C-13), 48.0 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3), 74.0 (C-12) และ 178.2 (C-24)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Deoxycholic acid 9



9

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

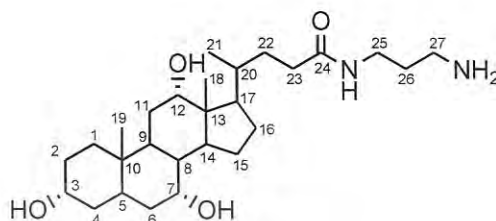
$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.4 (C-21), 23.5 (C-19), 24.7 (C-15), 27.3 (C-7), 28.2 (C-6), 28.4 (C-16), 29.7 (C-11), 30.9 (C-2), 31.8 (C-22), 32.1 (C-23), 34.6 (C-9), 35.1 (C-10), 36.3 (C-1), 36.5 (C-20), 37.0 (C-4), 37.2 (C-8), 43.4 (C-5), 47.4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

ข้อมูลจากการวิเคราะห์โครงสร้างของโพลีแอสิติตตั้งต้นด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ที่แสดงไว้ข้างต้นนี้ จะนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างของโพลีแอสิติตเอไมด์สังเคราะห์ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของ ค่า chemical shift ของ  $^{13}\text{C}$  ของหมู่เอไมด์ ( $-\text{CONH}$ ) จะปรากฏสัญญาณที่  $\delta$  176.0-177.0 ppm และสามารถตรวจสอบได้อย่างชัดเจนจากมวลโมเลกุลของสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรสโกปี ข้อมูลของโพลีแอสิติตเอไมด์สังเคราะห์แสดงได้ดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1 สารสังเคราะห์ *N*-(3-Aminopropyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide

50a



50a

สาร 50a สังเคราะห์จาก Cholic acid 44 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diaminopropane สาร 50a มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 72.32 และพิสูจน์โครงสร้างสาร 50a ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1230 (C-N stretching), 1659 (C=O stretching ของ CONH), 2850, 2920 (C-H stretching) และ 3359 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.60 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 5.8$  Hz, H-21), 1.17-2.22 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.81 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-27), 2.93 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-25), 3.15-3.19 (1H, m, H-3), 3.70 (1H, m, H-7), 3.85 (1H, m, H-12) และ 7.86 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

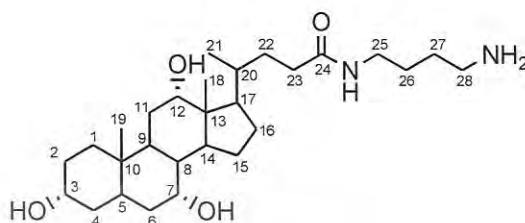
$^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.7 (C-21), 22.8 (C-19), 24.2 (C-15), 27.9 (C-9), 28.7 (C-16), 28.9 (C-26), 29.6 (C-11), 31.2 (C-2), 33.3 (C-22), 34.0 (C-23), 35.7 (C-6), 35.8 (C-25), 35.8 (C-10), 36.8 (C-1), 37.0 (C-20), 38.2 (C-27), 40.5 (C-4), 41.0 (C-8), 42.8 (C-14), 43.1 (C-5), 47.5 (C-13), 48.0 (C-17), 68.9 (C-7), 73.2 (C-3), 74.0 (C-12) และ 177.9 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  465.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (81%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 สารสังเคราะห์ *N*-(4-Aminobutyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide

50b



50b

สาร 50b สังเคราะห์จาก Cholic acid 44 ทำปฏิกิริยากับ 1,4-diaminobutane สาร 50b มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 77.09 และพิสูจน์โครงสร้างสาร 50b ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1204 (C-N stretching), 1672 (C=O stretching ของ CONH), 2857, 2925 (C-H stretching) และ 3435 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.65 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, d,  $J_{\text{H}_{21},\text{H}_{20}} = 5.0$  Hz, H-21), 1.19-2.23 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.80-2.93 (2H, m, H-28), 3.13 (2H, m, H-25), 3.24 (1H, m, H-3), 3.73 (1H, m, H-7), 3.89 (1H, m, H-12) และ 7.91 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

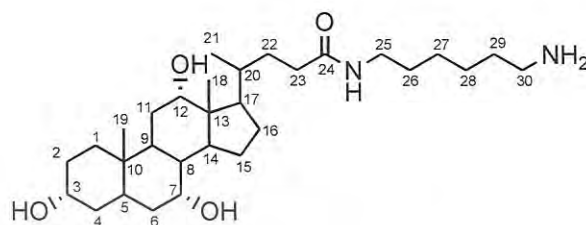
$^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.8 (C-21), 23.2 (C-19), 24.3 (C-15), 25.9 (C-26), 27.5 (C-27), 28.0 (C-9), 28.7 (C-16), 29.7 (C-11), 31.2 (C-2), 33.3 (C-22), 34.1 (C-23), 36.0 (C-6), 36.1 (C-10), 36.5 (C-1), 37.0 (C-20), 39.5 (C-25), 40.4 (C-28), 40.5 (C-4), 41.0 (C-8), 43.1 (C-14), 43.2 (C-5), 47.5 (C-13), 48.0 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3), 74.1 (C-12) และ 177.1 (C-24)

MS (positive mode) :  $m/z$  477.35  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (4.5%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 สารสังเคราะห์ *N*-(6-Aminoethyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide

50c



50c

สาร 50c สังเคราะห์จาก Cholic acid 44 ทำปฏิกิริยากับ 1,6-diaminohexane สาร 50c มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 56.80 และพิสูจน์โครงสร้างสาร 50c ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1203 (C-N stretching), 1677 (C=O stretching ของ CONH), 2862, 2935 (C-H stretching) และ 3394 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

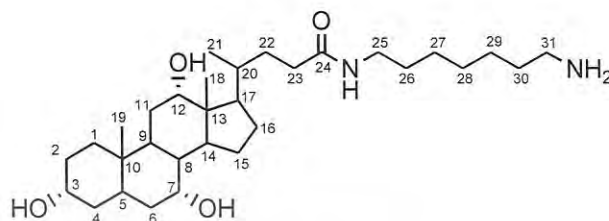
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.58 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 6.2$  Hz, H-21), 1.15-2.21 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.78 (2H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-30), 3.03 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz, H-25), 3.17-3.18 (1H, m, H-3), 3.67 (1H, m, H-7), 3.84 (1H, m, H-12) และ 7.85 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.8 (C-21), 23.2 (C-19), 24.2 (C-15), 27.0 (C-26), 27.3 (C-29), 28.0 (C-9), 28.5 (C-16), 29.6 (C-11), 30.2 (C-28), 31.2 (C-2), 33.5 (C-22), 34.3 (C-23), 35.7 (C-27), 35.9 (C-6), 36.1 (C-10), 36.5 (C-1), 36.8 (C-20), 37.0 (C-25), 40.1 (C-4), 40.7 (C-30), 41.0 (C-8), 43.1 (C-14), 43.2 (C-5), 47.6 (C-13), 48.1 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3), 74.1 (C-12) และ 176.9 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  507.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (40%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.4 สารสังเคราะห์ *N*-(7-Aminoheptyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 50d



50d

สาร 50d สังเคราะห์จาก Cholic acid 44 ทำปฏิกิริยากับ 1,7-diaminoheptane สาร 50d มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 48.18 และพิสูจน์โครงสร้างสาร 50d ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1202 (C-N stretching), 1659 (C=O stretching ของ CONH), 2851, 2922 (C-H stretching) และ 3359 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.61 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 6.2$  Hz, H-21), 1.19-2.25 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.81 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-31), 3.06 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz, H-25), 3.21-3.22 (1H, m, H-3), 3.71 (1H, m, H-7), 3.86 (1H, m, H-12) และ 7.88 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

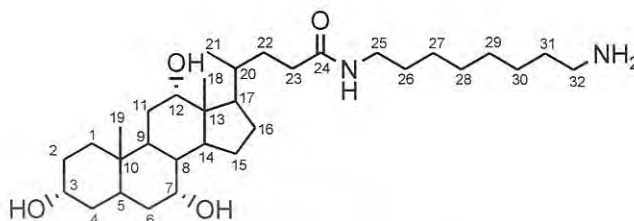
$^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.8 (C-21), 23.2 (C-19), 24.3 (C-15), 27.4 (C-26), 28.0 (C-9), 28.5 (C-30), 28.7 (C-16), 29.7 (C-11), 29.8 (C-29), 31.2 (C-2), 33.4 (C-22), 33.5 (C-28), 34.1 (C-23), 35.7 (C-6), 35.9 (C-27), 36.1 (C-10), 36.5 (C-1), 36.8 (C-20), 37.0 (C-25), 40.5 (C-4), 40.8 (C-31), 41.1 (C-8), 43.1 (C-14), 43.2 (C-5), 47.6 (C-13), 47.8 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3), 74.1 (C-12) และ 176.9 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  521.6  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (95%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5 สารสังเคราะห์ *N*-(8-Aminoocetyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide

50e



50e

สาร 50e สังเคราะห์จาก Cholic acid 44 ทำปฏิกิริยากับ 1,8-diaminooctane สาร 50e มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 43.07 และพิสูจน์โครงสร้างสาร 50e ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1253 (C-N stretching), 1619 (C=O stretching ของ CONH), 2851, 2924 (C-H stretching) และ 3432 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.59 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-21), 1.18-2.12 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.75-2.87 (2H, m, H-32), 3.05 (2H, m, H-25), 3.20 (1H, m, H-3), 3.42 (1H, m, H-7), 3.85 (1H, m, H-12) และ 7.86 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

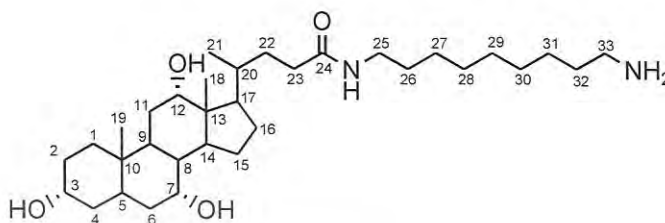
$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.8 (C-21), 22.8 (C-19), 24.2 (C-15), 27.4 (C-26), 27.8 (C-31), 27.9 (C-9), 28.5 (C-16), 29.6 (C-11), 30.0 (C-28), 30.0 (C-29), 30.5 (C-30), 31.2 (C-2), 33.5 (C-22), 34.3 (C-23), 35.7 (C-27), 35.9 (C-6), 36.1 (C-10), 36.8 (C-1), 37.0 (C-20), 38.9 (C-25), 40.3 (C-4), 40.8 (C-32), 41.0 (C-8), 42.8 (C-14), 43.1 (C-5), 47.6 (C-13), 47.8 (C-17), 68.9 (C-7), 73.2 (C-3), 74.0 (C-12) และ 176.8 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  535.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.6 สารสังเคราะห์ที่ *N*-(9-Aminononyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide

50f



50f

สาร 50f สังเคราะห์จาก Cholic acid 44 ทำปฏิกิริยากับ 1,9-diaminononane สาร 50f มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 57.27 และพิสูจน์โครงสร้างสาร 50f ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1202 (C-N stretching), 1672 (C=O stretching ของ CONH), 2856, 2925 (C-H stretching) และ 3433 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

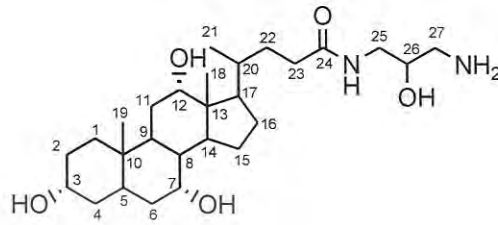
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.62 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 10.9$  Hz, H-21), 1.18-2.10 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.80 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-33), 3.03 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-25), 3.21 (1H, m, H-3), 3.73 (1H, m, H-7), 3.88 (1H, m, H-12) และ 7.91 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  12.3 (C-18), 18.2 (C-21), 23.7 (C-19), 24.1 (C-15), 27.4 (C-26), 27.9 (C-32), 28.0 (C-9), 28.6 (C-16), 29.7 (C-31), 29.8 (C-11), 30.1 (C-28), 30.1 (C-30), 30.4 (C-29), 31.0 (C-2), 33.1 (C-22), 33.9 (C-23), 35.4 (C-27), 35.9 (C-6), 35.9 (C-10), 36.2 (C-1), 36.8 (C-20), 39.0 (C-25), 40.4 (C-4), 40.8 (C-33), 41.5 (C-8), 43.2 (C-14), 44.3 (C-5), 47.8 (C-13), 47.8 (C-17), 68.4 (C-7), 72.1 (C-3), 73.3 (C-12) และ 176.3 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  549.6  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (39%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.7 สารสังเคราะห์ *N*-(3-Amino-2-hydroxypropyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 50g



50g

สาร 50g สังเคราะห์จาก Cholic acid 44 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diamino-2-propanol สาร 50g มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 67.27 และพิสูจน์โครงสร้างสาร 50g ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

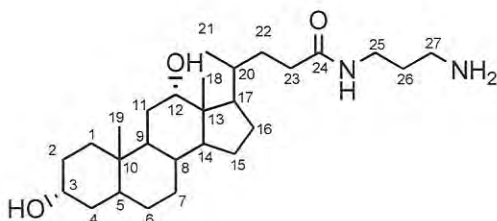
IR :  $\nu_{\max}$  1203 (C-N stretching), 1673 (C=O stretching ของ CONH), 2862, 2924 (C-H stretching) และ 3428 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.54 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.98 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 11.3$  Hz, H-21), 0.96-2.09 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.80 (2H, t, H-27), 3.09 (2H, m, H-25), 3.13-3.14 (2H, m, H-3 $\beta$  และ H-26), 3.67 (1H, m, H-7 $\beta$ ), 3.79 (1H, m, H-12 $\beta$ ) และ 7.89 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.6 (C-21), 22.7 (C-19), 24.2 (C-15), 27.9 (C-9), 28.7 (C-16), 29.6 (C-11), 31.2 (C-2), 33.2 (C-22), 33.8 (C-23), 35.9 (C-6), 35.9 (C-10), 36.5 (C-1), 37.0 (C-20), 40.5 (C-4), 41.0 (C-8), 43.1 (C-14), 43.2 (C-5), 43.7 (C-25), 43.9 (C-27), 47.5 (C-13), 48.0 (C-17), 68.0 (C-26), 68.9 (C-7), 73.2 (C-3), 74.0 (C-12) และ 177.9 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  481.6  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (61%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.8 สารสังเคราะห์ *N*-(3-Aminopropyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 51a

51a

สาร 51a สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid 9 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diaminopropane สาร 51a มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 58.18 และพิสูจน์โครงสร้างสาร 51a ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

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

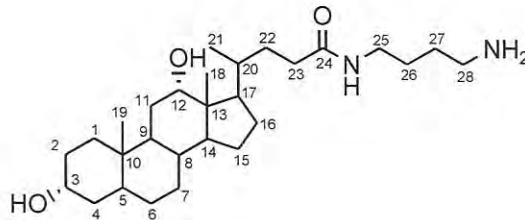
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.58 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 6.0$  Hz, H-21), 0.95-2.19 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.78 (2H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-27), 3.13 (2H, t,  $J = 6.7$  Hz, H-25), 3.17 (1H, m, H-3), 3.84 (1H,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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.9 สารสังเคราะห์ *N*-(4-Aminobutyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 51b



51b

สาร 51b สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid 9 ทำปฏิกิริยากับ 1,4-diaminobutane สาร 51b มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 47.87 และยืนยันโครงสร้างสาร 51b ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

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

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

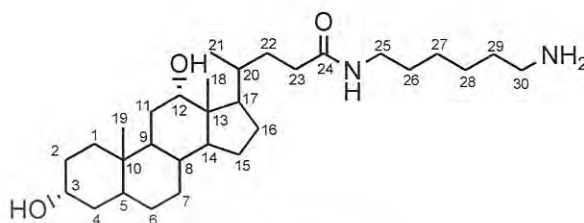
$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.5 (C-18), 18.0 (C-21), 24.0 (C-19), 25.1 (C-15), 26.2 (C-26), 27.7 (C-27), 27.8 (C-7), 28.7 (C-6), 29.0 (C-16), 30.1 (C-11), 31.4 (C-2), 33.6 (C-22), 34.5 (C-23), 35.2 (C-9), 35.6 (C-10), 36.7 (C-1), 37.2 (C-20), 37.5 (C-4), 37.8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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

51c



51c

สาร 51c สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid 9 ทำปฏิกิริยากับ 1,6-diaminohexane สาร 51c มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 58.93 และยืนยันโครงสร้างสาร 51c ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

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

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

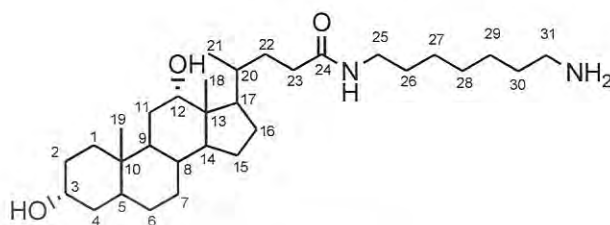
$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.2 (C-18), 17.7 (C-21), 23.7 (C-19), 24.9 (C-15), 27.0 (C-26), 27.3 (C-29), 27.5 (C-7), 28.4 (C-6), 28.5 (C-16), 29.9 (C-11), 30.2 (C-28), 31.1 (C-2), 33.4 (C-22), 34.2 (C-23), 34.9 (C-9), 35.3 (C-10), 35.7 (C-27), 36.5 (C-1), 36.9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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

51d



51d

สาร 51d สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid 9 ทำปฏิกิริยากับ 1,7-diaminoheptane สาร 51d มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 63.64 และยืนยันโครงสร้างสาร 51d ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

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

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

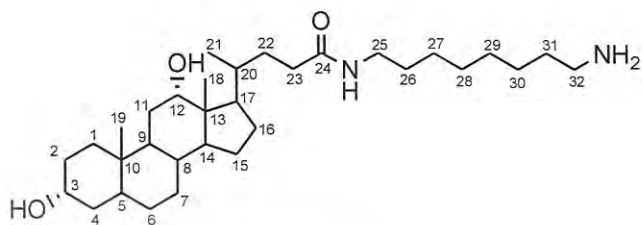
$^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.7 (C-18), 18.1 (C-21), 24.2 (C-19), 25.2 (C-15), 27.4 (C-26), 28.1 (C-6), 28.1 (C-7), 28.1 (C-30), 28.4 (C-16), 29.7 (C-11), 29.7 (C-29), 31.2 (C-2), 33.1 (C-28), 33.8 (C-22), 34.1 (C-23), 34.6 (C-9), 35.2 (C-10), 35.9 (C-27),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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.12 สารสังเคราะห์ *N*-(8-Aminoctyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide

51e



51e

สาร 51e สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid 9 ทำปฏิกิริยากับ 1,8-diaminooctane สาร 51e มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 47.84 และยืนยันโครงสร้างสาร 51e ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

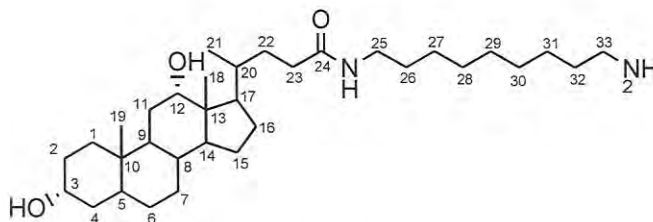
IR :  $\nu_{\max}$  1203 (C-N stretching), 1616 (C=O stretching ของ CONH), 2857, 2924 (C-H stretching) และ 3435 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.13 สารสังเคราะห์ *N*-(9-Aminononyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 51f

51f

สาร 51f สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid 9 ทำปฏิกิริยากับ 1,9-diaminononane สาร 51f มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 76.36 และยืนยันโครงสร้างสาร 51f ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

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

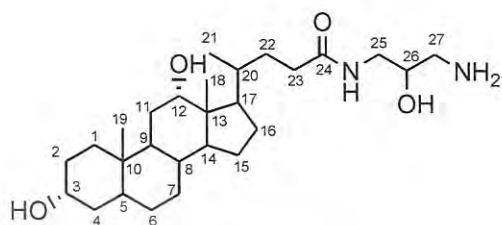
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.57 (3H, s, H-18), 0.69 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 12.0$  Hz, H-21), 1.03-2.06 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.76 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-33), 3.06 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-25), 3.17 (1H, m, H-3), 3.83 (1H,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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.14 สารสังเคราะห์ *N*-(3-Amino-2-hydroxypropyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 51g



51g

สาร 51g สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid 9 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diamino-2-propanol สาร 51g มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 70.00 และพิสูจน์โครงสร้างสาร 51g ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1213 (C-N stretching), 1616 (C=O stretching ของ CONH), 2868, 2925 (C-H stretching) และ 3417 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.60 (3H, s, H-18), 0.73 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 11.9$  Hz, H-21), 1.06-2.16 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.86 (2H, m, H-27), 3.00 (2H, m, H-25), 3.20 (2H, m, H-3 $\beta$  และ H-26), 3.99 (1H, m, H-12 $\beta$ ) และ 7.97 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  12.6 (C-18), 18.1 (C-21), 23.6 (C-19), 24.3 (C-15), 27.1 (C-9), 28.7 (C-6), 28.2 (C-16), 30.0 (C-11), 31.1 (C-2), 33.0 (C-22), 33.8 (C-23), 35.0 (C-9), 35.1 (C-10), 36.1 (C-1), 36.8 (C-20), 37.0 (C-8), 37.1 (C-4), 43.4 (C-5), 43.6 (C-25), 43.9 (C-27), 47.6 (C-13), 48.2 (C-17), 49.1 (C-14), 68.0 (C-26), 72.2 (C-3), 74.1 (C-12) และ 177.5 (C-24)

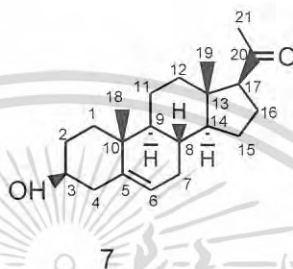
ESMS (positive mode) :  $m/z$  465.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (51%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน

สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คือ Pregnenolone 7 เนื่องจากสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น แสดงความมีขั้วไม่สูงมากนัก วิธีการสังเคราะห์จึงเลือกใช้เทคนิคสารละลายและสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วย เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี การพิสูจน์โครงสร้างของ Pregnenolone 7 ด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ได้ผลดังต่อไปนี้

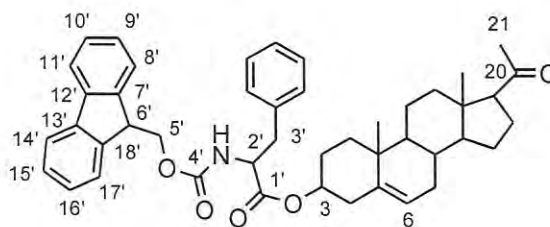
Pregnenolone 7



Szendzi และคณะ [34] ได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างของ Pregnenolone 1 โดยเทคนิคนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่าสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  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);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz) :  $\delta$  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  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR กับ Pregnenolone 1 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ของบริษัท Fluka ได้ผล  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR สอดคล้องกับข้อมูลของ Szendzi และคณะ [34] ได้เสนอไว้ดังนี้  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ;  $\delta$  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  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz) ;  $\delta$  37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 140.8 (C-5), 121.3 (C-6), 31.7 (C-7), 31.8 (C-8), 49.9 (C-9), 36.5 (C-10), 21.0 (C-11), 38.8 (C-12), 44.0 (C-13), 56.9 (C-14), 24.4 (C-15), 22.8 (C-16), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20) และ 31.5 (C-21)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2.1 การสังเคราะห์ 3-Fmoc phenylalanine-pregnenolone ester 53



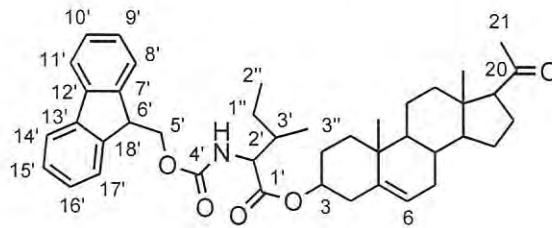
53

ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 และย้อมแผ่น TLC ด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.45 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 175-178 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 45.32 การพิสูจน์โครงสร้างด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสาร 53 จะกล่าวถึงเฉพาะข้อมูลที่ได้จากเทคนิคนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์ ( $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR) และบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณและมีสัญญาณเกิดขึ้นใหม่ สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัมของ  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร 53 พบสัญญาณที่  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  3.11 (2H, d, H-3'), 4.20 (1H, d, H-3) 4.60-4.66 (4H, m, H-2', H-5' และ H-6'), 5.37 (1H, d, H-6) และ 7.12-7.33, 7.37-7.42, 7.55-7.58 และ 7.75-7.78 ppm เป็นสัญญาณของแอรอมาติกโปรตอน และสเปกตรัมของ  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz) ของสาร 53 พบสัญญาณที่  $\delta$  75.2 (C-3), 63.6 (C-5'), 155.5 (C-4'), 170.8 (C-1'), 119.94-143.83 แอรอมาติกและโอลิฟินิกคาร์บอน และ 209.6 (C-20) ppm จาก  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมพบว่า H-3 มีการเคลื่อนของสัญญาณไปบริเวณที่มีค่า  $\delta$  สูงกว่าเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับค่า  $\delta$  ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ Pregnenolone 7 เนื่องจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) มีหมู่แทนที่ที่สามารถดึงอิเล็กตรอนเกาะอยู่ทำให้สัญญาณเคลื่อนที่ไปบริเวณที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนน้อยกว่า นอกจากนี้  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมยังปรากฏสัญญาณของกลุ่มคาร์บอนใหม่ได้แก่ คาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ (C-1'), คาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของคาร์บาเมต (C-4')

ESMS (positive mode) :  $m/z$  686.45  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (51%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2.2 การสังเคราะห์ 3-Fmoc isoleucine-pregnenolone ester 54



54

ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 และย้อมแผ่น TLC ด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.48 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 174-177 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 40.45 การพิสูจน์โครงสร้างด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสาร 54 จะกล่าวถึงเฉพาะข้อมูลที่ได้จากเทคนิคนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์ ( $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR) และบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณและมีสัญญาณเกิดขึ้นใหม่ สรุปได้ดังนี้ สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัมของ  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร 54 พบสัญญาณที่  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  4.22 (1H, d, H-3) 4.39 (1H, d, H-2'), 4.63-4.70 (3H, m, H-5' และ H-6'), 5.02 (1H, d, H-6) และ 7.28-7.33, 7.37-7.46, 7.58-7.68 และ 7.75-7.77 ppm เป็นสัญญาณของแอรโมาติกโปรตอน และสเปกตรัมของ  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz) ของสาร 54 พบสัญญาณที่  $\delta$  36.57 (C-3'), 74.95 (C-3), 63.64 (C-5'), 156.08 (C-4'), 171.41 (C-1'), 119.96-143.91 แอรโมาติกและโอเลฟินิกคาร์บอน และ 209.61 (C-20) ppm จาก  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมพบว่า H-3 มีการเคลื่อนของสัญญาณไปบริเวณที่มีค่า  $\delta$  สูงกว่าเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับค่า  $\delta$  ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ Pregnenolone 7 เนื่องจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) มีหมู่แทนที่ที่สามารถดึงอิเล็กตรอนเกาะอยู่ทำให้สัญญาณเคลื่อนที่ไปบริเวณที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนน้อยกว่า นอกจากนั้น  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมยังปรากฏสัญญาณของกลุ่มคาร์บอนใหม่ได้แก่ คาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ (C-1'), คาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของคาร์บาเมต (C-4')

ESMS (positive mode) :  $m/z$  666.45  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (45%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

Cholic acid 44, Deoxycholic acid 9, สารอนุพันธ์ 50a-50g และสารอนุพันธ์ 51a-51g ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อราและยีสต์รวมทั้งหมด 35 ชนิด เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Streptococcus milleri* group, *S. sobrinus*, *S. pneumoniae*, *S. mutans* ATCC 27175, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. coagulase* negative, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* MRSA 20653, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20622, *S. aureus* VRSA 20623, *S. aureus* VRSA 20624, *S. aureus* VRSA 21083, *Bacillus subtilis* ATCC 26633, *C. diphtheriae* และ *Enterococcus faecalis* 4373 (VRE) แบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholera*, *V. parahaemolyticus* เชื้อราได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* และยีสต์ได้แก่ *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* และ *C. tropicalis* โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method เปรียบเทียบกับตัวยา Vancomycin และรายงานผลด้วยค่า MIC (Minimal Inhibition Concentration) หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา (หรือสารตัวอย่าง) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธี Broth microdilution เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ในการทดสอบเป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อทางช่องปาก การอักเสบของผิวหนัง ปอดบวม เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบและเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด พบได้ที่ผิวหนัง จมูก การกระจายเชื้อโดยการสัมผัสและผ่านทางลมหายใจ ซึ่งในปัจจุบันพบว่าเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* ตื้อต่อยา Methicillin (MRSA) และ Vancomycin (VRSA), เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไอกรนในมนุษย์ และเชื้อรา *T. mentagrophytes* และ *T. rubrum* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคผิวหนัง (โรคกลาก) และยีสต์ *C. albicans* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดติดเชื้อในที่อับชื้นเช่นการติดเชื้อในช่องคลอด

#### 4.3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของ Cholic acid 44 และสารอนุพันธ์ 50a-50g

จากตารางที่ 4.1 พบว่า Cholic acid 44 ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด ยกเว้น *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุพันธ์ 50a-50g ในที่นี้จะรายงานเฉพาะค่า MIC ของสารอนุพันธ์ที่มีค่า MIC ต่ำกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถสรุปได้ดังนี้

สารอนุพันธ์ 50a มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. mutans* ATCC 27175 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในทางตรงกันข้ามการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ 50a ลดลงต่อเชื้อ *C. diphtheriae* เมื่อเปรียบเทียบกับ Cholic acid 44

สารอนุพันธ์ 50b มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. mutans* ATCC 27175, *S. sobrinus* และ *V. parahaemolyticus* มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 50c มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175 และ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารอนุพันธ์ 50d มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. milleri* group และ *S. mutans* ATCC 27175 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 50e ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทุกชนิด

สารอนุพันธ์ 50f มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. mutans* ATCC 27175 มีค่า MIC เท่ากับ 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *S. aureus* MRSA 20652 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 50g มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20636 และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. coagulase* negative, *S. aureus* MRSA N1 และ *S. aureus* MRSA 20625 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์พบว่า สารอนุพันธ์ 50a-50g ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อราได้แก่ *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* และยีสต์ได้แก่ *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* และ *C. tropicalis* โดยมีค่า MIC มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Cholic acid 44 และ สารอนุพันธ์ 50a-50g เปรียบเทียบกับตัวยา Vancomycin

แบคทีเรีย	ค่า MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)								
	Vancomycin	44	50a	50b	50c	50d	50e	50f	50g
<i>Streptococcus milleri</i> group	4.0	>100	25	12.5	12.5	12.5	>100	12.5	6.25
<i>S. pneumoniae</i>	3.0	>100	>100	50	100	>100	>100	100	>100
<i>S. mutans</i> ATCC 27175	0.016	>100	6.25	25	12.5	12.5	>100	3.125	100
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.0	>100	>100	50	50	50	>100	100	100
<i>Staphylococcus coagulase</i> negative	0.094	>100	>100	50	100	100	>100	25	25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 26633	6.0	>100	>100	100	50	50	>100	100	100
<i>Bordetella pertussis</i>	3.0	>100	>100	50	100	100	>100	100	50
<i>C. diphtheriae</i>	1.0	50	>100	6.25	12.5	1.56	>100	6.25	1.56
<i>Streptococcus sobrinus</i>	1.0	>100	>100	25	100	50	>100	100	>100
<i>Vibrio cholerae</i>	-	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>V. parahaemolyticus</i>	3.0	>100	>100	25	100	100	>100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA N1	2.0	>100	100	50	100	100	>100	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20625	-	>100	>100	50	100	100	>100	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20626	-	>100	>100	50	100	50	>100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20627	-	>100	>100	50	50	>100	>100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20628	2.0	>100	>100	50	>100	>100	>100	100	>100
<i>S. aureus</i> MRSA 20630	1.5	>100	>100	100	>100	>100	>100	100	>100
<i>S. aureus</i> MRSA 20631	48.0	>100	>100	100	>100	>100	>100	100	>100
<i>S. aureus</i> MRSA 20632	3.0	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>S. aureus</i> MRSA 20633	1.0	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	12.5
<i>S. aureus</i> MRSA 20635	8.0	>100	>100	100	100	>100	>100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20636	1.5	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	12.5
<i>S. aureus</i> MRSA 20652	0.25	>100	100	50	100	100	>100	12.5	>100
<i>S. aureus</i> MRSA 20653	2.0	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>S. aureus</i> MRSA 20654	1.5	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	100
<i>S. aureus</i> VRSA 20622	32.0	>100	100	100	>100	100	>100	>100	100
<i>S. aureus</i> VRSA 20623	32.0	>100	>100	100	>100	100	>100	>100	>100
<i>S. aureus</i> VRSA 20624	-	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>S. aureus</i> VRSA 21083	32.0	>100	>100	100	>100	100	>100	>100	12.5
<i>E. faecalis</i> 4737 (VRE)	32.0	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของ Deoxycholic acid 9 และ สารอนุพันธ์ 51a-51g

จากตารางที่ 4.2 พบว่า Deoxycholic acid 9 ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ยกเว้น *S. milleri* group และ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 100 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารอนุพันธ์ 51a-51g พบว่าสารอนุพันธ์ส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีกว่า Deoxycholic acid 9 ในที่นี้จะรายงานเฉพาะค่า MIC ของสารอนุพันธ์ที่มีค่า MIC ต่ำกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

สารอนุพันธ์ 51a มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. mutans* ATCC 27175 และ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. aureus* MRSA 20628 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. aureus* MRSA 20636 มีค่า MIC เท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *S. coagulase negative*, *B. pertussis* และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20624 และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 51b มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. pneumoniae*, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coagulase negative*, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20633 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *B. pertussis*, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. aureus* ATCC 25923, *S. sobrinus*, *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20653, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20622, *S. aureus* VRSA 20623 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 51c มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *C. diphtheriae*, *S. aureus* MRSA 20653, *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *S. coagulase negative*, *V. cholera*, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. aureus* ATCC 25923, *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20623, *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 51d มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *C. diphtheriae*, *S. aureus* MRSA 20653, *S. aureus* VRSA 20622, *S. aureus* VRSA 21083 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *S. coagulase negative*, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* VRSA 20623 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 26633, *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20630, *S.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 51e มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. aureus* MRSA 20627 มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *B. subtilis* ATCC 26633 และ *S. sobrinus* มีค่า MIC เท่ากับ 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. pneumoniae*, *B. pertussis*, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* VRSA 20622 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coagulase* negative, *C. diphtheriae*, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* VRSA 20623 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *V. cholera*, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20624, *S. aureus* VRSA 21083 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 51f มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. mutans* ATCC 27175 และ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *S. coagulase* negative, *S. aureus* MRSA 20652 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 51g มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20653 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coagulase* negative, *B. subtilis* ATCC 26633, *S. aureus* MRSA 20654 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *S. aureus* ATCC 25923, *B. pertussis*, *S. sobrinus*, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* VRSA 20622, *S. aureus* VRSA 20623 และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์พบว่า สารอนุพันธ์ 51a-51g ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อราได้แก่ *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* และยีสต์ได้แก่ *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* และ *C. tropicalis* โดยมีค่า MIC มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Deoxycholic acid 9 และ สารอนุพันธ์ 51a-51g  
เปรียบเทียบกับตัวยา Vancomycin

แบคทีเรีย	ค่า MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)								
	Vancomycin	9	51a	51b	51c	51d	51e	51f	51g
<i>Streptococcus milleri</i> group	4.0	100	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
<i>S. pneumoniae</i>	3.0	>100	12.5	6.25	12.5	12.5	6.25	100	25
<i>S. mutans</i> ATCC 27175	0.016	>100	3.125	6.25	6.25	6.25	12.5	0.78	12.5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.0	>100	25	25	25	25	3.125	100	25
<i>Staphylococcus coagulase negative</i>	0.094	>100	12.5	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 26633	6.0	>100	50	50	100	25	3.125	100	12.5
<i>Bordetella pertussis</i>	3.0	>100	12.5	12.5	50	50	6.25	100	25
<i>C. diphtheriae</i>	1.0	50	3.125	3.125	6.25	6.25	12.5	0.78	1.56
<i>Streptococcus sobrinus</i>	1.0	>100	50	25	50	50	3.125	100	25
<i>Vibrio cholerae</i>	-	>100	>100	>100	12.5	100	25	>100	100
<i>V. parahaemolyticus</i>	3.0	>100	25	25	25	25	>100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA N1	2.0	>100	25	6.25	25	50	25	100	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20625	-	>100	50	6.25	50	50	12.5	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20626	-	>100	50	50	25	25	12.5	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20627	-	>100	25	6.25	25	25	6.25	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20628	2.0	>100	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20630	1.5	>100	25	50	25	25	6.25	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20631	48.0	>100	25	12.5	25	25	6.25	100	6.25
<i>S. aureus</i> MRSA 20632	3.0	>100	10	25	50	50	12.5	>100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20633	1.0	>100	>100	6.25	100	50	50	100	6.25
<i>S. aureus</i> MRSA 20635	8.0	>100	50	12.5	50	50	25	100	6.25
<i>S. aureus</i> MRSA 20636	1.5	>100	>100	12.5	50	50	12.5	100	12.5
<i>S. aureus</i> MRSA 20652	0.25	>100	25	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20653	2.0	>100	50	25	6.25	6.25	1.56	100	6.25
<i>S. aureus</i> MRSA 20654	1.5	>100	25	25	25	25	25	>100	12.5
<i>S. aureus</i> VRSA 20622	32.0	>100	50	25	50	6.25	6.25	>100	25
<i>S. aureus</i> VRSA 20623	32.0	>100	25	25	25	12.5	12.5	>100	25
<i>S. aureus</i> VRSA 20624	-	>100	25	12.5	25	25	25	>100	100
<i>S. aureus</i> VRSA 21083	32.0	>100	12.5	50	12.5	6.25	25	>100	25
<i>E. faecalis</i> 4737 (VRE)	32.0	>100	6.25	6.25	6.25	6.25	25	>100	6.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองโดยภาพรวมการเพิ่มไนโตรเจนอะตอมเข้าที่โมเลกุลของโบล์แอซิดทั้งสองมีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเมื่อเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Cholic acid 44 และ Deoxycholic acid 9 จากหมู่คาร์บอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 24 (C-24) เป็นหมู่เอไมด์โดยการนำโบล์แอซิดทั้งสองทำปฏิกิริยากับสารประกอบไดเอมีน ถึงแม้ว่าสารอนุพันธ์ของโบล์แอซิดทั้งสองจะออกฤทธิ์ได้ไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับตัวยา Vancomycin แต่จากการทดลองพบว่าสารอนุพันธ์ของ Deoxycholic acid 9 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีมากกว่าสารอนุพันธ์ของ Cholic acid 44 สารอนุพันธ์ของ Cholic acid 44 ได้แก่ สาร 50a-50d และ 50f-50g สามารถออกฤทธิ์ที่ดีกับเชื้อแบคทีเรียบางชนิด มีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 1.56-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารอนุพันธ์ของ Deoxycholic acid 9 ได้แก่ สาร 51a-51g สามารถออกฤทธิ์ที่ดีกับเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์มากกว่า มีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.78-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้การออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์อาจมีความยาวของสายโซ่ไดเอมีนเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย

#### 4.3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสาร 53 และ สาร 54

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์พบว่า สารอนุพันธ์ 53 และ 54 ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบทุกชนิด

#### 4.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

นำ Cholic acid 44, Deoxycholic acid 9, สารอนุพันธ์ 50a-50f และสารอนุพันธ์ 51a-51f มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero, เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากชนิด KB และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ยา Ellipticine (สำหรับเซลล์ Vero และเซลล์ KB) และ Doxorubicine (สำหรับเซลล์ MCF-7) เป็นตัวควบคุมเชิงบวกและใช้สารละลาย DMSO 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุมเชิงลบ

##### 4.4.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Cholic acid 44 และสารอนุพันธ์ 50a-50f

จากการทดลองความเป็นพิษของ Cholic acid 44 ต่อเซลล์ไลน์ Vero, KB และ MCF-7 จากตารางที่ 4.3 เมื่อพิจารณาจากค่า  $IC_{50}$  พบว่า Cholic acid 44 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero และเซลล์ MCF-7 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 44.56 และ 24.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Cholic acid 44 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB ส่วนความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารอนุพันธ์ 50a-50f ต่อเซลล์ไลน์ Vero, KB และ MCF-7 สรุปได้ดังนี้

สารอนุพันธ์ 50a ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7

สารอนุพันธ์ 50b ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, เซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7

สารอนุพันธ์ 50c ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero แต่จะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7

สารอนุพันธ์ 50d มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 32.12 และ 31.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 50e มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 23.86 และ 30.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารอนุพันธ์ 50f มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 25.95 และ 30.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ค่า  $IC_{50}$  ของ Cholic acid 44 และสารอนุพันธ์ 50a-50f เปรียบเทียบกับ Ellipticine และ Doxorubicine

สารตัวอย่าง	$IC_{50}$ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	Vero	KB	MCF-7
Cholic acid 44	44.56	inactive	24.14
50a	Non cytotoxic	inactive	inactive
50b	Non cytotoxic	inactive	inactive
50c	Non cytotoxic	39.38	35.94
50d	-	32.12	31.84
50e	-	23.86	30.73
50f	-	25.95	30.29
Ellipticine	0.617	0.371	-
Doxorubicine	-	0.052	0.290

#### 4.4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Deoxycholic acid 9 และสารอนุพันธ์ 51a-51f

จากการทดลองความเป็นพิษของ Deoxycholic acid 9 ต่อเซลล์ไลน์ Vero, KB และ MCF-7 จากตารางที่ 4.4 เมื่อพิจารณาจากค่า  $IC_{50}$  พบว่า Deoxycholic acid 9 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero และเซลล์ KB แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 46.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารอนุพันธ์ 51a-51f ต่อเซลล์ไลน์ Vero, KB และ MCF-7 สรุปได้ดังนี้

สารอนุพันธ์ 51a ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7

สารอนุพันธ์ 51b ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero จะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 14.49 และ 21.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 51c มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, เซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 46.34, 3.928 และ 9.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 51d มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 14.19 และ 39.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 51e มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 21.41 และ 17.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 51f มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 35.01 และ 22.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่า IC<sub>50</sub> ของ Deoxycholic acid 9 และสารอนุพันธ์ 51a-51f เปรียบเทียบกับ Ellipticine และ Doxorubicine

สารตัวอย่าง	IC <sub>50</sub> (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	Vero	KB	MCF-7
Deoxycholic acid 9	Non cytotoxic	inactive	46.04
51a	Non cytotoxic	inactive	inactive
51b	Non cytotoxic	14.49	21.91
51c	46.34	3.42	9.70
51d	-	14.19	39.97
51e	-	21.41	17.92
51f	-	35.01	22.67
Ellipticine	0.617	0.371	-
Doxorubicine	-	0.052	0.290

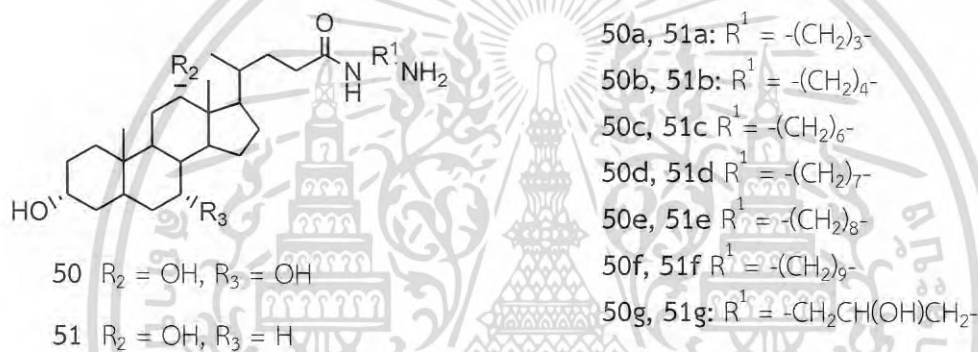
จากผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Cholic acid 44, Deoxycholic acid 9 และสารอนุพันธ์ สรุปได้ว่าการเพิ่มไนโตรเจนอะตอมเข้าที่โมเลกุลของ Cholic acid 44 และ Deoxycholic acid 9 มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ กล่าวคือสารอนุพันธ์ของโบล์แอซิดส่วนใหญ่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบทั้งหมดอาจจะไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ดีเทียบเท่ากับ Ellipticine และ Doxorubicine แต่ก็สามารถออกฤทธิ์ได้ระดับหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น ยกเว้นสารอนุพันธ์ของ Cholic acid 44 มีผลต่อเซลล์ MCF-7 น้อยกว่า Cholic acid 44 ในขณะที่สารอนุพันธ์ 50c-50f มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB มากกว่า Cholic acid 44 ส่วน Deoxycholic acid 9 มีผลต่อเซลล์ MCF-7 น้อยกว่า Cholic acid 44 แต่สารอนุพันธ์ของ Deoxycholic acid 9 ได้แก่สาร 51b, 51c, 51e และ 51f มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 ที่ดีกว่า Cholic acid 44 และสารอนุพันธ์ 50c-50f ส่วนความเป็นพิษต่อเซลล์ KB พบว่าสารอนุพันธ์ 51b-51f มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB ที่ดีโดยเฉพาะสาร 51c มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 3.428 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หรือเท่ากับ 0.0069 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) และสาร 51c มีความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 9.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หรือเท่ากับ 0.0069 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) แต่สาร 51c มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ซึ่งถ้ามีโอกาสการนำไปใช้จริงอาจจะต้องคำนึงถึงเรื่องการเป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วย ทั้งนี้ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารอนุพันธ์ที่มีความยาวของสายโซ่เอมีนที่ต่างกันอาจจะเป็นส่วนหนึ่งของการเข้าทำลายเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม

ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม ทำการเพิ่มไนโตรเจนอะตอมโดยเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลของ Cholic acid 44 และ Deoxycholic acid 9 ให้เป็นหมู่อะไมด์มีการเพิ่มไนโตรเจนอะตอม 2 อะตอม สารอนุพันธ์ 50a-50g และ 51a-51g โดยเทคนิควิฤภาคของแข็ง พิสูจน์โครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่าอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้มีความถูกต้องของโครงสร้าง และมีความบริสุทธิ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ผลได้ร้อยละของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 40-80 สูตรโครงสร้างของสารอนุพันธ์ แสดงในรูปที่ 5.1



### 5.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน

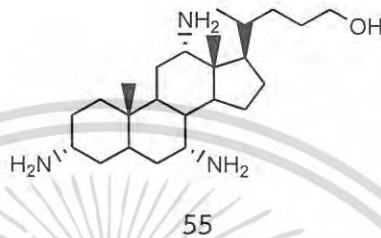
ได้สังเคราะห์อนุพันธ์สเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนโดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง Pregnenolone 7 กับกรดอะมิโนได้แก่ Fmoc phenylalanine และ Fmoc isoleucine ได้ผลิตภัณฑ์อะมิโนเอสเทอร์ของ Pregnenolone 53 และ 54 มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 40

### 5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

การเพิ่มไนโตรเจนอะตอมเข้าที่โมเลกุลของโบล์แอซิดทั้งสองมีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเมื่อเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Cholic acid 44 และ Deoxycholic acid 9 จากหมู่คาร์บอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 24 (C-24) เป็นหมู่อะไมด์ โดยการนำโบล์แอซิดทั้งสองทำปฏิกิริยากับสารประกอบไดเอมีนที่มีความยาวของสายโซ่แตกต่างกัน พบว่าสารอนุพันธ์ของ Deoxycholic acid 9 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีกว่าสารอนุพันธ์ของ Cholic acid 44

สารอนุพันธ์ของ Cholic acid 44 ได้แก่ สาร 50a-50d และ 50f-50g สามารถออกฤทธิ์ที่ดีกับแบคทีเรีย *S. mutans* ATCC 27175 มีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 3.125-6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารอนุพันธ์ สาร 50b-50d และ 50f-50g สามารถออกฤทธิ์ที่ดีกับแบคทีเรีย *C. diphtheriae* มีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 1.56-12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารอนุพันธ์ของ Deoxycholic acid 9 ได้แก่ สาร 51a-51g สามารถออกฤทธิ์ที่ดีกับเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์มากกว่า มีค่า MIC อยู่ในช่วงเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่าง 0.78-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเฉพาะสาร 51f สามารถออกฤทธิ์ที่ต่ำกว่ากับแบคทีเรีย *S. mutans* ATCC 27175 และ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร 51e สามารถออกฤทธิ์ที่ต่ำกว่าเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* คือตัวยา Methicillin (MRSA) และ Vancomycin (VRSA) ได้แก่ *S. aureus* MRSA 20653 และ *S. aureus* VRSA 20623 มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แนวความคิดของงานวิจัยนี้สอดคล้องกับจากงานวิจัยของ Savage และคณะ[35] ได้สังเคราะห์ triamine derivatives 55 จาก Cholic acid 44 พบว่าสารอนุพันธ์ 55 มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์



สำหรับสารอนุพันธ์อะมิโนเอสเทอร์ของ Pregnenolone 53 และ 54 ไม่มีฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด

#### 5.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

จากผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Cholic acid 44, Deoxycholic acid 9 และสารอนุพันธ์ พบว่าการเพิ่มไนโตรเจนอะตอมเข้าที่โมเลกุลของ Cholic acid 44 และ Deoxycholic acid 9 มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ จะเห็นได้ว่าสารอนุพันธ์ของโบลีแอซิดส่วนใหญ่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น โดยที่สารอนุพันธ์ของ Deoxycholic acid 9 ได้แก่สาร 51b-51f มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าสารอนุพันธ์ของ Cholic acid 44 ซึ่งในที่นี้ขอกล่าวเฉพาะที่ให้ผลการทดลองที่น่าสนใจคือ สาร 51c มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ MCF-7 ในระดับที่ดี มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 3.42 และ 9.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ในขณะเดียวกันสารอนุพันธ์ 51c มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero (มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 46.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งถ้ามีการนำไปพัฒนาเป็นตัวยานั้นอาจจะทำได้แต่เซลล์ปกติจะได้รับผลกระทบจากสารอนุพันธ์ 51c ที่ใช้ด้วย ทั้งนี้อาจจะต้องมีแนวทางการทดลองในขั้นที่สูงกว่าในระดับห้องปฏิบัติการหรือต้องมีการทดลองทางคลินิกเพิ่มขึ้นอีกทางหนึ่ง นอกจากนั้นแล้วยังทำให้ทราบว่า การเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลของโบลีแอซิดเป็นหมู่เอไมด์ประกอบด้วยสายโซ่ยาวจะมีผลช่วยเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kihel และคณะ[22,23]

#### 5.5 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมกับสเตียรอยด์ชนิดอื่น พร้อมศึกษาถึงตำแหน่งการแทนที่ของหมู่อะมิโนบนวงของสเตียรอยด์ว่ามีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือไม่
2. เปลี่ยนรีเอเจนต์ที่ใช้ในปฏิกิริยา โดยให้มีหมู่อะมิโนเพิ่มขึ้นมากขึ้นเช่น กลุ่มพอลิเอมีน หรือสารกลุ่มเอซาเฮกเทอร์โรไซคลิก เป็นต้น นอกจากจะศึกษาในแง่ผลของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพแล้ว ยังคาดว่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายขณะทำการทดสอบได้ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- [1] ThaiBiz Center.com. 2011. บทความน่ารู้เรื่องสเตียรอยด์. [Online]. Available: <http://www.thaibizcenter.com/knowledgecenter.asp?kid=1184>.
- [2] สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2011. บราสสิโนสเตอรอยด์. [Online]. Available: <http://th.wikipedia.org/wiki/บราสสิโนสเตอรอยด์>.
- [3] P. Charoenying, N. Onsaeng, P. Unruean and W. Changin. 2013. Synthesis and Anticancer Activity of 3-Aminopregnenolone., 14<sup>th</sup> Tetrahedron Symposium: Challenges in Organic & Bioorganic Chemistry, 25-28 June 2013, Vienna, Austria.
- [4] P. Charoenying, P. Boonmanumsin, P. Sahasyodhin, C. Laosinwattana and Nuntana Aroonrerk. 2009. Modified Bile Acid: Preparation of Deoxycholic acid Amides and Their Biological Activities, 10<sup>th</sup> Tetrahedron Symposium: Challenges in Organic and Bioorganic Chemistry, 23-26 June 2009, Paris, France.
- [5] M. Gans and F. Bracher. 2014. First Total Synthesis of the Marine Steroid Alkaloid Plakinamine B., *Tetrahedron*. Vol. 70, pp. 1084-1090.
- [6] R. J. Simmonds, 1997. *Chemistry of Biomolecules: An Introduction*, Billing & Sons Ltd., Worcester.
- [7] G. Cravotto, A. Binello, L. Boffa, O. Rosati, M. Bocalini and S. Chimichi. 2006. Regio- and Stereoselective Reductions of Dehydrocholic acid., *Steroids*, Vol. 71, pp. 469-475.
- [8] 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.
- [9] S. N. Khan, Y. M. Jung, B. J. Kim, H. Cho, J. Lee and H. Kim. 2008. Synthesis and Activity of 7 $\alpha$ -Amino-23,24-Bisnor-5 $\alpha$ -Cholan-22-ol Derivatives., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Vol. 18, pp. 2558-2561.
- [10] S. N. Khan, S-Y. Bae and H-S. Kim. 2005. A Highly Stereoselective Reductive Amination of 3-Ketosteroid with Amines: an Improved Synthesis of 3 $\alpha$ -aminosteroid., *Tetrahedron Letters*, 46, pp. 7675-7678.
- [11] B. Choucair, M. Dherbomez, C. Roussakis and L. El kihel. 2004. Synthesis of Spermidinylcholestanol and Spermidinylcholesterol Squalamine Analogues., *Tetrahedron*, Vol. 60, pp. 11477-11486.
- [12] G. P. Moss. Steroid. [Online] Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Steroid>. 2011.
- [13] บุญรอด วงษ์สวาท. สเตียรอยด์ฮอร์โมน. [Online]. Available:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd\\_site/hormone.htm](http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd_site/hormone.htm). 2011.
- [14] M. Powers. **Anabolic steroid**. [Online]. Available: [http://en.wikipedia.org/wiki/Anabolic\\_steroid](http://en.wikipedia.org/wiki/Anabolic_steroid). 2011
- [15] วนาวรรณ ปราบพยัคฆ์. 2549. การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์สเตียรอยด์เพรกนินโนโลน. วิทยานิพนธ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [16] Anagrammer.com. Images for Corticosteroids. [Online]. Available: <http://www.anagrammer.com/scrabble/corticosteroids>. 2011
- [17] Health Education Division. **มารู้จักฮอร์โมนเพศกันเถอะ**. [Online]. Available: [http://thaihed.com/healthy\\_talk/talk\\_detail.php?sub\\_id=69](http://thaihed.com/healthy_talk/talk_detail.php?sub_id=69). 2011
- [18] D. Lommer. **Prohormone**. [Online]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Prohormone>. 2011
- [19] T. Akhisa. **Phytosterol**. [Online]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Phytosterol>. 2011
- [20] Giffarine. **เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับ ไฟโตสเตอรอล กับคอเลสเตอรอล**. [Online]. Available: [http://www.giffarinethailand.com/th/interesting\\_info.php?id=69](http://www.giffarinethailand.com/th/interesting_info.php?id=69). 2011
- [21] A. Valkonen, M. Lahtinen and E. Kolehmainen. 2008. Syntheses and Structural Study of Bile Amidoalcohols., *Steroids*, 73, pp.1228-1241.
- [22] L. E. Kihel, M. Clement, M. A. Bazin, G. Descamps. 2008. New Lithiocholic and Chenodeoxycholic piperazinylcarboxamides with Antiproliferative and Pro-apoptotic Effects on Human Cancer Cell Lines., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, pp. 8737-8744.
- [23] D. Brossard, L. E. Kihel, M. Clement, W. Sebbahi, M. Khalid, C. Roussakis and S. Rault. 2010. Synthesis of Bile Acid Derivatives and in vitro Cytotoxic Activity with Pro-apoptotic Process on Multiple Myeloma (KMS-11), Glioblastoma Multiforme (GBM), and Colonic Carcinoma (HCT-116) Human Cell Lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, pp. 2912-2918.
- [24] Y. Huang, S. Chen, J. Cui, C. Gan, Z. Liu, Y. Wei and H. Song. 2011. Synthesis and Cytotoxicity of A-Homo-Lactam Derivatives of Cholic Acid and 7-Deoxycholic acid., *Steroids*, 76, pp. 690- 694.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [25] D. Renard, J. Perruchon, M. Giera, J. Müller, and F. Bracher. 2009. Side Chain Azasteroids and Thiasteroids as Sterol Methyltransferase Inhibitors in Ergosterol Biosynthesis., **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Vol. 17, pp. 8123-8137.
- [26] M. Lourdasamy, J. Cote, S. Laplante, F. Labrie and S. M. Singh. 1997. Synthesis and *in vitro* of 17 $\beta$ -[N-Ureylene-N,N'-Disubstituted]-4-methyl-4-aza-5 $\alpha$ -Androstan-3-ones as Selective Inhibitors of Type I 5 $\alpha$ -Reductase, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Vol. 5, pp. 305-310.
- [27] X-L. He, Y. Xing, X-Z. Gu, J-X Xiao, Y-Y Wang, Z. Yi and WW Qiu. 2017., The Synthesis and Antitumor activity of Lithocholic Acid and Its Derivatives., **Steroids**, Vol. 125, pp. 54-60.
- [28] 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.
- [29] S.K. Chung, C.H. Ryoo, H.W. Yang, J.Y. Shim, M.G. Kang, K.W. Lee and H.I. Kang. 1998. Synthesis and Bioactivities of Steroids Derivatives as Antifungal Agents, **Tetrahedron**, Vol. 54, pp. 15899-15914.
- [30] พันิชกร บุญมานำสิง และ ภัทฤทธิ สหัสโยธิน. 2551. การสังเคราะห์และฤทธิ์ชีวภาพของโปลีแอซิดเอไมด์. โครงการพิเศษสาขาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- [31] L. Nahar and A.B. Turner. 2003. Synthesis of Ester-Linked Lithocholic Acid Dimer., **Steroids**, Vol. 68, pp. 1157-1161.
- [32] A.W. Bauer, W.M.M. Kirby, J.C. Sherris and M. Turck. 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method, **American Journal of Clinical Pathology**, Vol. 45, pp. 493-496.
- [33] J.O. Brien, I. Wilson, T. Orton and F. Pognan. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity, **European Journal of Biochemistry**, Vol. 267, pp. 5421-5426.
- [34] Z. Szendi, P. Forgo and F. Sweet. 1995. Complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectra of Pregnenolone., **Steroids**, 60, pp. 442-446.
- [35] 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.

## 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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้