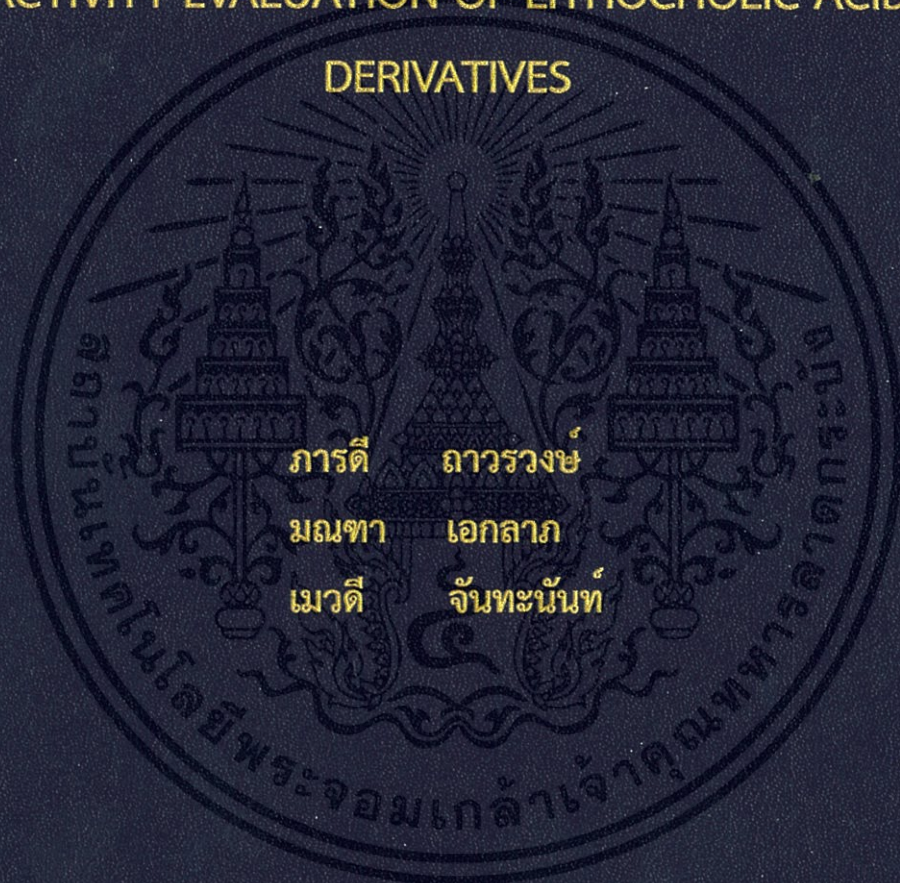


การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและการประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพ
ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

FUNCTIONAL GROUP MODIFICATION AND BIOLOGICAL
ACTIVITY EVALUATION OF LITHOCHOLIC ACID
DERIVATIVES



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและการประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพ
ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

FUNCTIONAL GROUP MODIFICATION AND BIOLOGICAL
ACTIVITY EVALUATION OF LITHOCHOLIC ACID
DERIVATIVES



เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....148988
วัน,เดือน,ปี.....1 8 S.ค. 2560

148988
b.....
f.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FUNCTIONAL GROUP MODIFICATION AND BIOLOGICAL
ACTIVITY EVALUATION OF LITHOCHOLIC ACID
DERIVATIVES



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL CHEMISTRY)
DEPARTMENT OF CHEMISTRY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและการประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของ อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก Functional Group Modification And Biological Activity Evaluation Of Lithocholic Acid Derivatives		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวภารดี ภาวรวงษ์	รหัสนักศึกษา	55050765
	นางสาวมณฑา เอกलग	รหัสนักศึกษา	55050770
	นางสาวเมวดี จันทะนันท์	รหัสนักศึกษา	55050776
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	เคมี		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. พัทณี เจริญยิ่ง		
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี
อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.การุณย์ สาดอ่อน ประธานกรรมการ	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการ	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	
ผศ.ดร. พัทณี เจริญยิ่ง กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและการประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวภารดี ถาวรวงษ์	รหัสนักศึกษา 55050765
	นางสาวมณฑา เอกลาภ	รหัสนักศึกษา 55050770
	นางสาวเมวดี จันทะนันท์	รหัสนักศึกษา 55050776
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)	
ภาควิชา	เคมี	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2558	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. พัทธนี เจริญยิ่ง	
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร. สุพิศรา โพธิ์เอี่ยม	

บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิก 1 จากนั้นทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยทำการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่คาร์บอนตำแหน่ง 24 และตำแหน่ง 3 เริ่มจากการสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันที่คาร์บอนตำแหน่ง 24 หลังจากนั้นสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์-ซัลเฟตด้วยปฏิกิริยาซัลเฟชันที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (IR, MS, ^1H NMR และ ^{13}C NMR) โดยสารอนุพันธ์ทั้งหมดที่สังเคราะห์ได้นี้ ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 6 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (HT-29) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (P388) และเซลล์ไตลิงปกติ (Vero) โดยใช้วิธี MTT assay จากการทดลองพบว่า สารอนุพันธ์ 48a แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ KB, P388 และ Vero สารอนุพันธ์ 48d แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7 และ HepG2

นอกจากนี้สารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ ยังถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 8 ชนิด ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก 5 ชนิด และแบคทีเรียแกรมลบ 3 ชนิด โดยใช้วิธี Disc diffusion method ผลการทดสอบพบว่าสารอนุพันธ์ 48h มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ในระดับปานกลาง

คำสำคัญ : กรดลิโทโคลิก, ความเป็นพิษต่อเซลล์, ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย, ฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง

Title	Functional Group Modification And Biological Activity Evaluation Of Lithocholic Acid Derivatives
Students	Miss Paradee Tawonwong Student ID 55050765 Miss Montha Eakkalap Student ID 55050770 Miss Mevadee Jantanana Student ID 55050776
Degree	Bachelor of Science (Industrial Chemistry)
Department	Chemistry
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2015
Advisor	Asst. Prof. Dr. Patchanee Charoenying
Co-advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim

Abstract

The aims of the special project were to synthesize derivatives of lithocholic acid, and to evaluate their anticancer and antibacterial activities which these derivatives were synthesized through modification at the carboxyl carbon C-24 and oxygenated carbon C-3. Initially, lithocholic acid was transformed into its ester derivatives under esterification at carbon C-24 and then these derivatives were prepared through sulfation at carbon C-3. The structures of all compounds obtained were identified on the basis of their spectral data (IR, MS, ^1H NMR and ^{13}C NMR). These compounds were investigated the cytotoxicity in six cell lines : human colon adenocarcinoma cell line (HT-29), human breast carcinoma cell line (MCF-7), human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2), oral human epidermal carcinoma cell line (KB), murine leukemia cell line (P388) and african green monkey kidney (Vero) by MTT assay method. In the result of study, the derivative **48a** exhibited the best anticancer activity against cell lines: KB, P388 and Vero. The derivative **48d** showed the best activity against cell lines: HT-29, MCF-7 and HepG2.

Furthermore, the derivatives were tested for antibacterial activity on 8 different bacteria including 5 gram-positive and 3 gram-negative using disc diffusion method. The derivative **48h** showed moderate inhibition of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Keywords: Lithocholic acid, Cytotoxicity, Antibacterial Activity, Anticancer Activity

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจากคณาจารย์ และบุคคลหลายฝ่าย ทางผู้จัดทำโครงการพิเศษจึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. พัทณี เจริญยิ่ง ที่คอยให้คำปรึกษา แนะนำ ตรวจสอบ และแก้ไข ข้อบกพร่องทุกขั้นตอนในการทำโครงการพิเศษนี้ คณะผู้จัดทำโครงการขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ ดร.การุณย์ สาดอ่อน และดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ที่ให้คำแนะนำและแก้ไข ในการจัดทำรูปเล่มโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ ตลอดจนให้คำแนะนำ และแก้ไขในการจัดทำรูปเล่มโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณ นายพัชรวรรษ หลอดเข็ม และนางสาวเกษรา คงกล้า รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ คำปรึกษา คอยช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ แบคทีเรีย

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ที่ช่วยสนับสนุนทุนวิจัยสำหรับจัดทำโครงการพิเศษนี้ และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการจัดทำโครงการ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ บิดา มารดา เพื่อนๆ ที่คอยให้กำลังใจ และช่วยเหลือจนโครงการพิเศษ นี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ภารดี ถาวรวงษ์
มณฑา เอกลาภ
เมวดี จันทะนันท์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
คำย่อ/สัญลักษณ์	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	4
2.2 ประเภทของสเตียรอยด์	4
2.3 สเตียรอยด์ที่พบในธรรมชาติ	6
2.4 กรดน้ำดี	8
2.5 ข้อดีและข้อเสียของกรดน้ำดี	10
2.5.1 ข้อดีของกรดน้ำดี	10
2.5.2 ข้อเสียของกรดน้ำดี	11
2.6 ประโยชน์จากการใช้สเตียรอยด์	11
2.7 อันตรายจากการใช้สเตียรอยด์	12
2.8 การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี (Chromatography)	13
2.8.1 ชนิดของโครมาโทกราฟี	14
2.8.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography, CC)	14
2.8.3 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)	15
2.9 ปฏิกริยาที่เกี่ยวข้อง	16
2.10 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย	18
2.11 สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น	20
2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	29
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	29
3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารสังเคราะห์และการทำโครมาโทกราฟี	29
3.1.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	29
3.1.3 สารเคมีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	30
3.2.1 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้เตรียมสารสังเคราะห์และการทำโครมาโทกราฟี	30
3.2.2 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์	31
3.2.3 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	31
3.3 การทดลองทั่วไป	32
3.4 วิธีการทดลอง	33
3.4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิกโดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	33
3.4.2 การสังเคราะห์สารประกอบซัลเฟตของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดยการทำปฏิกิริยาซัลเฟชัน	36
3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์	38
3.4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion method	40
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	42
4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิกโดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	42
4.1.1 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ Sulfuric acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	43
4.1.2 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ 1,3-Dicyclo carbodiimide (DCC) เป็นรีเอเจนต์	47
4.2 การสังเคราะห์สารประกอบซัลเฟตของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดยการทำปฏิกิริยาซัลเฟชัน	59
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก	75
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก	83
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	86
5.1 สรุปผลการวิจัย	86
5.1.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิกโดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	86
5.1.2 การสังเคราะห์สารประกอบซัลเฟตของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดยการทำปฏิกิริยาซัลเฟชัน	86
5.1.3 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก	86
5.1.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก	87
5.2 ข้อเสนอแนะ	87
เอกสารอ้างอิง	88
ภาคผนวก	93
ภาคผนวก ก	94
ภาคผนวก ข	101

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ปริมาณสารตั้งต้นและ sulphamic acid ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา	36
4.1 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Lithocholic acid 1 และอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก 47a-47h และ 48a-48h ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	79
4.2 ค่า CC_{50} ของ Lithocholic acid 1 และสารอนุพันธ์ 47a, 47c, 47d, 48a และ 48d	80
4.3 ค่า zone diameter (มิลลิเมตร) ของ Lithocholic acid 1 สาร อนุพันธ์ 48a, 48b, 48d และ 48	85



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 Entero-hepatic circulation	10
4.1 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47a	44
4.2 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47a	45
4.3 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47b	46
4.4 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47b	47
4.5 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47c	48
4.6 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47c	49
4.7 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47d	50
4.8 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47d	51
4.9 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47e	52
4.10 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47e	53
4.11 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47f	54
4.12 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47f	55
4.13 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47g	56
4.14 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47g	57
4.15 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47h	58
4.16 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47h	59
4.17 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 48a	60
4.18 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48a	61
4.19 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 48b	62
4.20 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48b	63
4.21 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 48c	64
4.22 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48c	65
4.23 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 48d	66
4.24 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48d	67
4.25 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 48e	68
4.26 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48e	69
4.27 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 48f	70
4.28 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48f	71
4.29 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 48g	72
4.30 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48g	73
4.31 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 48h	74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.32 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48h	75
4.33 ตัวอย่างผลการทดสอบของ Lithocholic acid 1 ต่อเซลล์ไลน์ HT-29 และ MCF-7 เทียบกับชุดควบคุม (Control) ที่กำลังขยาย 100 เท่า	76
4.34 กราฟ CC_{50} ของสารอนุพันธ์ 48a และ 48d ต่อเซลล์ KB	81
4.35 กราฟ CC_{50} ของสารอนุพันธ์ 47a, 47c, 47d, 48a และ 48d ต่อเซลล์ P388	81
4.36 กราฟ CC_{50} ของสารอนุพันธ์ 48a และ 48d ต่อเซลล์ MCF-7	82
4.37 กราฟ CC_{50} ของสารอนุพันธ์ 48d ต่อเซลล์ HepG2	82
4.38 กราฟ CC_{50} ของสารอนุพันธ์ 48a และ 48d ต่อเซลล์ HT-29	82
4.39 ตัวอย่างผลการทดสอบของสารอนุพันธ์ 48d ต่อเซลล์ไลน์ HepG2 และ HT-29 ที่กำลังขยาย 100 เท่า	83



คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
^{13}C NMR	^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
CC ₅₀	Cytotoxic concentration 50%
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
Conc.	Concentrated
DCM	Dichloromethane
DMAP	4-Dimethylaminopyridine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ES-MS	Electrospray Ionization Mass Spectroscopy
FBS	Fetal Bovine Serum
^1H NMR	^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
Hz	Hertz
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50%
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
m/z	Mass to charge ratio
NA	Nutrient Agar
ppm	Part per million
PBS	Phosphate buffered saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
R _f	Retention factor
TLC	Thin Layer Chromatography
cm ⁻¹	per centimeter
δ	Chemical shift
J	Coupling constant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

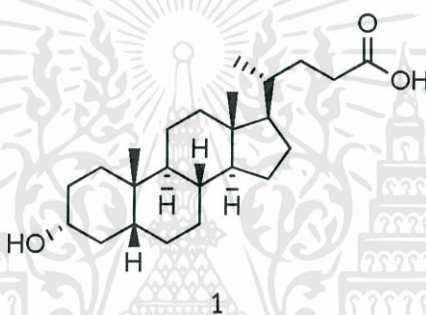
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

สเตียรอยด์ (Steroid) เป็นสารธรรมชาติที่สามารถพบได้ในพืชและสัตว์ จัดเป็นสารที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ค่อนข้างสูง จากโครงสร้างของสเตียรอยด์ที่มีความหลากหลาย ช่วยส่งผลให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันโดยเฉพาะฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา จึงนิยมมาใช้ในทางการแพทย์ สเตียรอยด์ที่ได้จากพืชที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรค เช่น 24-Methyllophenol และ Cycloartanol พบในทานาคา (*Hesperethusa crenulata* (Roxb.) Roem) ใช้เป็นยาลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวาน[1] G-strophanthin ได้จากเมล็ดของแยมปีนัง (*Strophanthus gratus* Baillon) ใช้รักษาโรคหัวใจวายเฉียบพลัน[2] นอกจากนี้สารกลุ่มสเตียรอยด์ยังเป็นฮอร์โมนของสัตว์ เช่น เทสโทสเตอโรน (Testosterone) เป็นฮอร์โมนเพศชายใช้เป็นยาสร้างกล้ามเนื้อ มีประโยชน์ต่อนักกีฬาประเภทยกน้ำหนัก[3] โพรเจสเทอโรน (Progesterone) เป็นฮอร์โมนเพศหญิง สามารถฉีดให้ผู้ป่วยที่มีภาวะขาดฮอร์โมนเพศหญิงได้[4] ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ในรูปแบบต่างๆ เพื่อที่จะนำไปใช้ศึกษาการออกฤทธิ์ในทางชีวภาพและพัฒนาเป็นยารักษาโรค

กรดน้ำดี หรือ Bile acid จัดเป็นสเตียรอยด์ที่พบในธรรมชาติ เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของ Cholesterol ที่สังเคราะห์ขึ้นในตับ เพื่อใช้ในกระบวนการดูดซึมไขมันและวิตามินที่ละลายในไขมัน หน้าที่ที่สำคัญของกรดน้ำดีภายในร่างกายมนุษย์คือ การทำหน้าที่ช่วยในการกระจายตัวของไขมันให้เป็นไขมันที่มีขนาดเล็กกลองเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสให้เอนไซม์ไลเปสเข้าไปตัดพันธะเอสเทอร์ระหว่างกลีเซอรอลและกรดไขมันได้มากขึ้น ซึ่งถ้าหากกระบวนการเมตาบอลิซึมมีความผิดปกติ ทำให้เกิดภาวะไม่สมดุลของกรดน้ำดี ส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคตับอักเสบ, โรคตับแข็ง, โรคนิ่วในถุงน้ำดี, และโรคมะเร็ง เป็นต้น[5] จะเห็นได้ว่ากรดน้ำดีมีสมบัติทางชีวภาพที่ดีสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น Cholic acid มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งได้แก่ *Enterococcus faecalis* และ *Bacillus megaterium* รวมทั้งยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งได้แก่ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* Deoxycholic acid มีฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านม MCF7-breast cancer[6] Chenodeoxycholic acid ใช้เป็นยาในการรักษาโรค Cerebrotendinous xanthomatosis โรค Hypertriglyceremia โรคตับที่มีมาแต่กำเนิด โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ และโรคท้องผูก[6] Cholic acid มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และเป็นตัวยับยั้งโปรตีนเอชเอ็ม[7] จากสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลายของกรดน้ำดีเหล่านี้ รวมทั้งมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างกันส่งผลให้ระดับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่เท่ากัน ซึ่งจากงานวิจัยพบว่า Lithocholic acid 1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเยื่อぶลาไส้ใหญ่ของมนุษย์ (Caco-2) และเซลล์มะเร็งเนื้อเยื่ออ่อนของปอด (HT1080) มากกว่า Deoxycholic acid และ Chenodeoxycholic acid [8] ภัททฤทธิ์และคณะ[9,10] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุพันธ์เอไมด์ของ Deoxycholic acid และ Chenodeoxycholic acid พบว่าอนุพันธ์เอไมด์แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกที่ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แนวคิดของงานวิจัยนี้ สนใจการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ Lithocholic acid 1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้โดยนำมาเปรียบเทียบกับ Lithocholic acid 1 ซึ่งคาดหวังว่าสารอนุพันธ์นั้นสามารถออกฤทธิ์ได้ดีกว่า Lithocholic acid 1 เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของ Lithocholic acid 1 พบหมู่ฟังก์ชันหลักได้แก่ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 24 (C-24) คือหมู่คาร์บอกซิล และที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) คือหมู่ไฮดรอกซิล โดยจะทำการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจากหมู่คาร์บอกซิลเป็นหมู่เอสเทอร์โดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Esterification reaction) และเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจากหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ซัลเฟต จากนั้นแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์ ซึ่งประกอบด้วยการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (anticancer) ในมนุษย์ และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) โดยคาดหวังว่างานวิจัยนี้สามารถผลิตสเต็มเซลล์ชนิดใหม่ได้จาก Lithocholic acid 1 และสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในระดับที่ดี



1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์จากกรดลิโทโคลิก โดยการเลือกใช้สารเคมีเฉพาะในการทำปฏิกิริยา
2. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์ซัลเฟตจากกรดลิโทโคลิก โดยการเลือกใช้สารเคมีเฉพาะในการทำปฏิกิริยา
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. สังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดลิโทโคลิก โดยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน
2. สังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์ซัลเฟตของกรดลิโทโคลิก
3. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้
4. ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์และอนุพันธ์เอสเทอร์ซัลเฟตของกรดลิโทโคลิก ซึ่งอนุพันธ์เหล่านี้อาจแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ความเป็นพิษต่อเซลล์และการต้านเชื้อแบคทีเรีย
2. สามารถทราบถึงฤทธิ์ของอนุพันธ์เอสเทอร์และอนุพันธ์เอสเทอร์ซัลเฟตของกรดลิโทโคลิกในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาใช้เป็นตัวยาสำหรับต้านแบคทีเรีย
3. สามารถทราบถึงฤทธิ์ของอนุพันธ์เอสเทอร์และอนุพันธ์เอสเทอร์ซัลเฟตของกรดลิโทโคลิกต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาทางด้านการแพทย์ได้



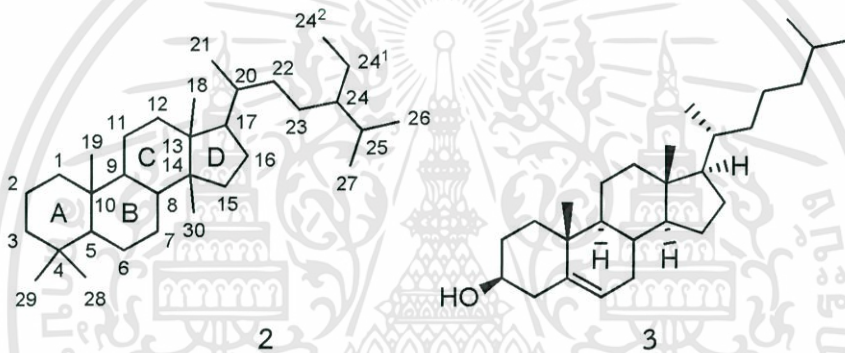
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง[11]

สเตียรอยด์ 2 เป็นลิพิดชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติพิเศษ จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ประกอบไปด้วยคาร์บอนเป็นวง 4 วงเชื่อมต่อกัน โดยที่วง A, B และ C จัดเป็นไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) ส่วนวง D เป็นไซโคลเพนเทน (cyclopentane) ความแตกต่างของชนิดสเตียรอยด์จะผันแปรไปตามหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่ติดอยู่กับวงแหวนเหล่านี้ มีสเตียรอยด์แตกต่างกันนับร้อยชนิดที่สามารถตรวจพบในพืชและสัตว์ ตัวอย่างบทบาทสำคัญของสเตียรอยด์ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่คือ การทำหน้าที่เป็นฮอร์โมน

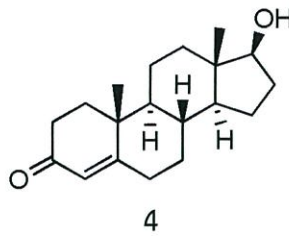


ในสรีรวิทยาและการแพทย์ของมนุษย์สเตียรอยด์ที่สำคัญคือ Cholesterol 3 ซึ่งจัดเป็นสารประกอบประเภทสเตียรอยด์แอลกอฮอล์ เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ในสัตว์ แต่อย่างไรก็ตาม ถ้ามีปริมาณของ Cholesterol 3 มากเกินไปจะทำให้เกิดโรคและภาวะผิดปกติมากมาย เช่น ภาวะผนังเส้นโลหิตแดงหนาและมีความยืดหยุ่นน้อยลง (atherosclerosis) สเตียรอยด์ชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่ถูกสังเคราะห์จาก Cholesterol 3 รวมทั้งฮอร์โมนต่างๆ เช่น ฮอร์โมนเพศของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate) ก็เป็นสเตียรอยด์ที่สร้างจาก Cholesterol 3

2.2 ประเภทของสเตียรอยด์

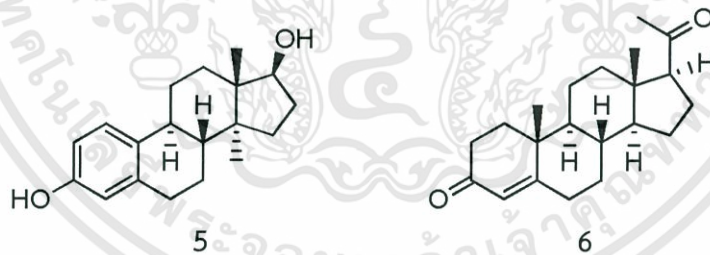
สเตียรอยด์แบ่งเป็นประเภทต่าง ๆ ดังนี้

1. แอนาบอลิกสเตียรอยด์ (Anabolic steroid) หรือ แอนาบอลิกแอนโดรเจนสเตียรอยด์ (Anabolic androgenic steroid, AAS) เป็นสารสังเคราะห์ที่ได้จากการดัดแปลงโมเลกุลของ Testosterone 4 ถูกใช้เพื่อเพิ่มสมรรถภาพของร่างกาย[12]

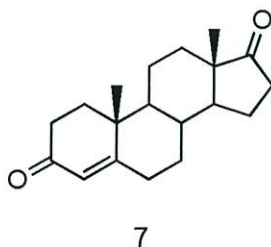


2. คอร์ติโคสเตอรอยด์ (Corticosteroid) เป็นฮอร์โมนประเภทสเตียรอยด์ชนิดหนึ่ง ฮอร์โมนตัวนี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ที่เปลือกของต่อมหมวกไตภายใต้การควบคุมจากสมองส่วนกลาง โดยสมองส่วนนี้จะสร้าง Corticotrophin Releasing Hormone เพื่อกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้าสร้าง Andrenocorticotrophin (หรือ Andrenocorticotrophic hormone, ACTH) ออกมา ACTH ก็จะไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์ที่เปลือกของต่อมหมวกไตให้สังเคราะห์คอร์ติโคสเตียรอยด์ขึ้นมาจากไขมันกลุ่มคอเลสเตอรอล คอร์ติโคสเตียรอยด์เป็นฮอร์โมนที่มีฤทธิ์หลายด้าน โดยเฉพาะในทางแพทย์ทำให้ดูเหมือนว่าฮอร์โมนตัวนี้เป็นยาครอบจักรวาล คือสามารถใช้ในการรักษาโรคได้แทบทุกชนิด เพราะมีการออกฤทธิ์ต่อระบบต่างๆ ในร่างกายหลายระบบ เช่นที่ ตับ กล้ามเนื้อ ผิวหนัง ต่อม น้ำเหลือง เนื้อเยื่อไขมัน เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน รวมทั้งมีฤทธิ์ลดการอักเสบในร่างกายด้วย[13]

3. ฮอร์โมนเพศ โดยส่วนใหญ่จะสร้างจากอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ เช่น รังไข่ (ในผู้หญิง) หรือ อัณฑะ (ในผู้ชาย) แต่ส่วนน้อยจะสร้างได้จากอวัยวะอื่นในระบบต่อมไร้ท่อ ฮอร์โมนเพศ มีหน้าที่สำคัญในการให้การเจริญเติบโตกับอวัยวะที่เป็นสัญลักษณ์บอเพศ เช่น เต้านม การมีประจำเดือนในเพศหญิง หรือ หนวด เครา น้ำอสุจิ และอสุจิในเพศชาย ซึ่งฮอร์โมนเพศ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ฮอร์โมนเพศชาย ได้แก่ Testosterone 4 และฮอร์โมนเพศหญิง ได้แก่ Estrogen 5 และ Progesterone 6[14]



4. โพรฮอร์โมน (Prohormone) เป็นสารตั้งต้นในการสร้างฮอร์โมนชนิดต่างๆ ซึ่งโพรฮอร์โมนจะไม่มีผลต่อระบบการทำงานของร่างกาย โพรฮอร์โมนที่พบได้ในคนคือ Proinsulin และ Proopiomelanocortin ตัวอย่างของโพรฮอร์โมน ได้แก่ Androstenedione 7[15]



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) เป็นสารธรรมชาติที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์พืช เช่น ผัก ผลไม้ ถั่วเปลือกแข็ง (Nuts) เมล็ดพืช (Seeds) พืชตระกูลถั่ว (Legumes) และน้ำมันพืช มีคุณสมบัติลดการดูดซึม Cholesterol 3 ในลำไส้เล็ก อาจเนื่องมาจากโครงสร้างที่คล้ายกันของ Cholesterol 3 กับไฟโตสเตอรอล ทำให้เกิดการแข่งขันกันในกระบวนการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายผ่านทางลำไส้เล็ก ไฟโตสเตอรอลจึงเข้าไปแทนที่ Cholesterol 3 ในการจับตัวกับไมเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่ขนส่งไขมันและ Cholesterol 3 ทำให้ปริมาณ Cholesterol 3 ในไมเซลล์ลดลง Cholesterol 3 จึงถูกดูดซึมได้น้อยลงและขับออกทางอุจจาระมากขึ้น[16]

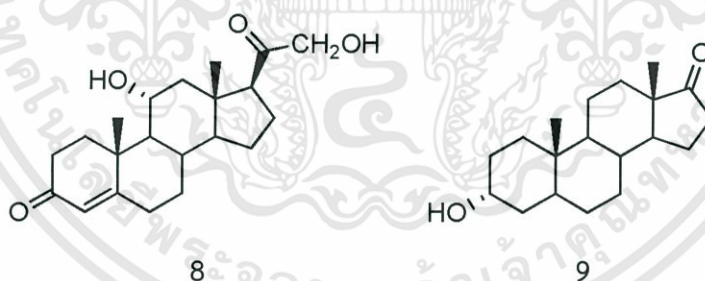
2.3 สเตียรอยด์ที่พบในธรรมชาติ

สเตียรอยด์ที่สำคัญในธรรมชาติส่วนใหญ่ คือ

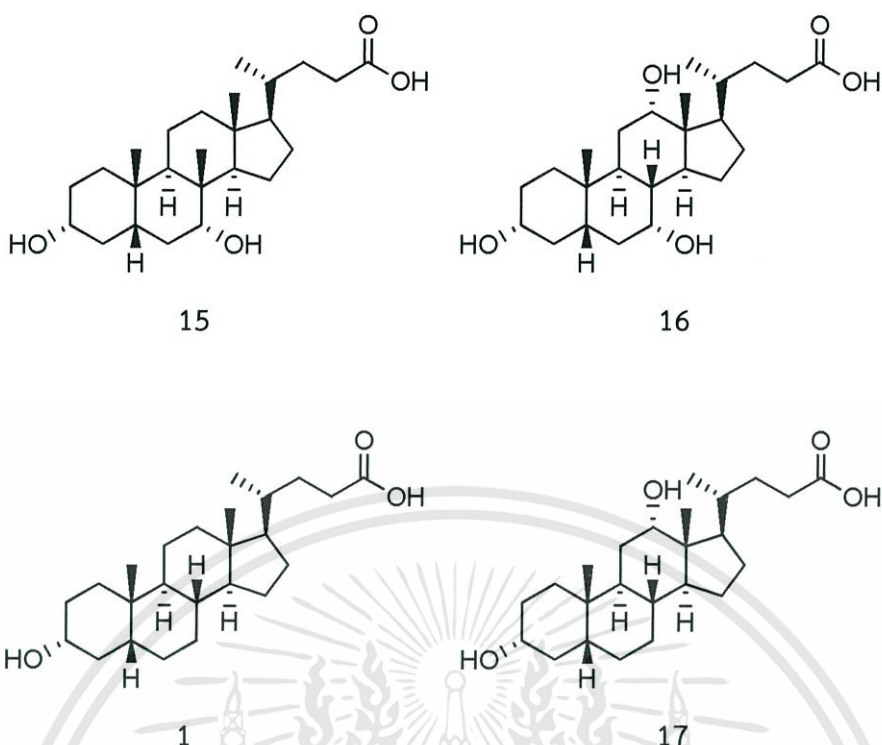
1. สเตอรอล (Sterols) หรือ สเตียรอยด์แอลกอฮอล์ (Steroid alcohols) ยกตัวอย่างเช่น Cholesterol 3 ซึ่งส่วนใหญ่ไม่ได้มาจากอาหารแต่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกาย แต่ไม่เพียงพอ กับความต้องการ จะสะสมอยู่มากในเนื้อเยื่อของอวัยวะที่สร้างมันขึ้นมาเช่น ตับ ไชสันหลัง (spinal cord) สมอง และผนังหลอดเลือดแดง (atheroma)[17]

2. สเตียรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormones) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่หนึ่งคือสเตียรอยด์ที่เป็นฮอร์โมนเพศและสามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่มฮอร์โมนเพศหญิง เช่น Estrogen 5 กลุ่ม Progestational hormone เช่น Progesterone 6 และกลุ่มที่สองคือกลุ่ม Adrenocortical hormones แบ่งออกเป็นกลุ่ม Glucocorticoids เช่น Hydrocortisone 8 และกลุ่ม Mineralocorticoids เช่น Androsterone 9[15]



3. คาร์ดิแอก โกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) ช่วยออกฤทธิ์ต่อการเพิ่มแรงบีบของหัวใจ โครงสร้างโดยทั่วไปประกอบด้วยสองส่วน คือส่วนอะไกลโคโคนที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบทั้ง 23 อะตอมที่เรียกว่า Cardenolide 10 และ 24 อะตอม เรียกว่า Bufadienolide 11 และส่วนน้ำตาลที่มีตำแหน่งพันธะและโครงสร้างแตกต่างกันไปในหลายรูปแบบ พบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยเฉพาะในวงศ์สำคัญคือวงศ์ตีนเป็ด (Apocynaceae) และวงศ์นมตำเลีย (Asclepiadaceae) ตัวอย่างพืชที่มีสารกลุ่มนี้เป็นองค์ประกอบในประเทศไทยได้แก่ หอมปิ้ง, ราเพย, ยี่ถ่อ, รักดอก เป็นต้น[18]



2.4 กรดน้ำดี (Bile Acid)[19-21]

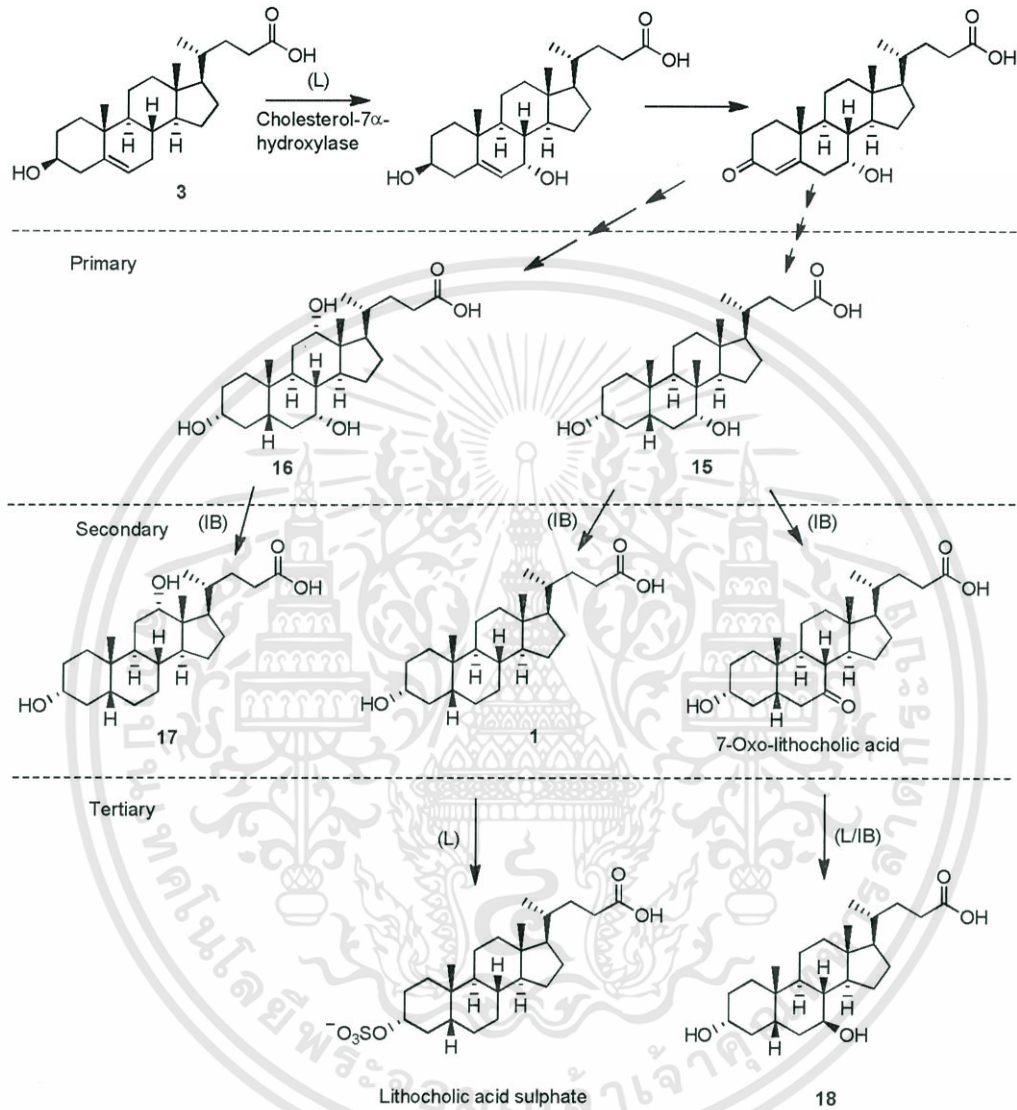
กรดน้ำดีคืออนุพันธ์ของ Cholesterol 3 ที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นที่ตับ เพื่อที่จะใช้ในกระบวนการดูดซึมไขมันและวิตามินที่ละลายในไขมัน โมเลกุลของกรดน้ำดีมีทั้งบริเวณที่มีขั้วและบริเวณที่ไม่มีขั้วในโมเลกุลเดียวกัน (Amphipathic molecules) เมื่อไขมันและวิตามินที่ละลายในไขมัน (วิตามิน A, E, D และ K) จับตัวกับกรดน้ำดีจะเกิดเป็นอนุภาคที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ในมนุษย์กรดน้ำดีที่พบมากที่สุดคือ Chenodeoxycholic acid 15 และ Cholic acid 16

กรดน้ำดีถูกสังเคราะห์ขึ้นในตับจาก Cholesterol 3 ซึ่งเป็นการสังเคราะห์กรดน้ำดีปฐมภูมิ (Primary bile acid) ได้แก่ Chenodeoxycholic acid 15 และ Cholic acid 16 จากนั้นกรดน้ำดีปฐมภูมิ (Primary bile acid) จะถูกแบคทีเรียในลำไส้เล็กเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดีทุติยภูมิ (Secondary bile acid) โดย Chenodeoxycholic acid 15 จะถูกเปลี่ยนเป็น Lithocholic acid 1 และ Cholic acid 16 จะถูกเปลี่ยนเป็น Deoxycholic acid 17 ตามลำดับ ดังแผนภาพที่ 2.1

กรดน้ำดีปฐมภูมิ (Primary bile acid) ในตับเป็น peptide conjugate อยู่กับ Glycine 13 และ Taurine 14 จากนั้นจะถูกเก็บไว้ในถุงน้ำดีและขับออกมาในลำไส้เล็กส่วนต้น ซึ่งช่วยในการย่อยสลายไขมัน จากนั้นในลำไส้เล็กส่วนปลาย กรดน้ำดีปฐมภูมิ (Primary bile acid) จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดีทุติยภูมิ (Secondary bile acid) ดังที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งกรดน้ำดีทุติยภูมิ (Secondary bile acid) นี้ก็ถูกดูดซึมกลับที่ลำไส้ใหญ่ เพื่อช่วยในการย่อยสลายในครั้งใหม่ ซึ่งเรียกขบวนการนี้ว่า Entero-hepatic circulation ดังแสดงในรูปภาพที่ 2.1 โดยปริมาณการดูดซึมกลับของกรดน้ำดีจะมีผลต่ออัตราการสังเคราะห์กรดน้ำดีในตับ ดังนั้นในอุจจาระของมนุษย์นั้นจะพบกรดน้ำดีที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ในปริมาณมากกว่าชนิดอื่นๆ นอกจากนั้นยังมีกรดน้ำดีชนิดอื่นๆ ได้แก่ Ursodeoxycholic acid 18 Tauro lithocholic acid 19 และกรดน้ำดีที่มีหมู่คีโตน (ketone group) ซึ่งมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

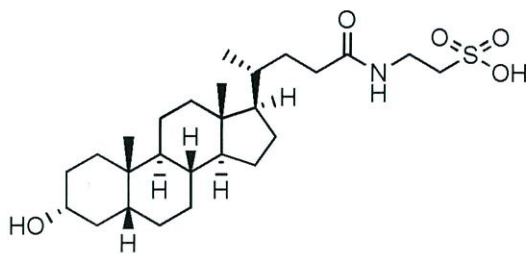
กับกรดน้ำดีทั้งสี่ชนิดที่กล่าวมาข้างต้น กรดน้ำดีบางส่วนไม่ถูกดูดซึมกลับจะถูกขับออกทางอุจจาระในปริมาณเฉลี่ย 500 มิลลิกรัมต่อวัน กรดน้ำดียังมีบทบาทในการกำจัด Cholesterol 3 ออกจากร่างกายผ่านทางอุจจาระ



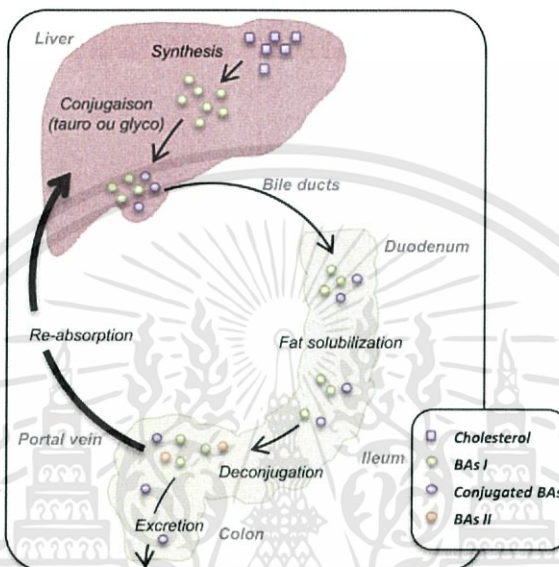
แผนภาพที่ 2.1

เมื่อ L หมายถึงกระบวนการที่เกิดขึ้นในตับ และ IB หมายถึงแบคทีเรียในลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



19



รูปที่ 2.1 Entero-hepatic circulation

2.5 ข้อดีและข้อเสียของกรดน้ำดี

2.5.1 ข้อดีของกรดน้ำดี [22,23]

1. ไบล์แอซิดซีเคสเตรนต (bile acid sequestrants) เป็นกลุ่มของยาที่ใช้จับน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract) เพื่อใช้รักษาโรคคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (hypercholesterolemia) และป้องกันอาการคันในคนไข้โรคตับ (liver disease) เรื้อรังหรือโรคท้องร่วง

2. ช่วยให้เกิดอิมัลชัน (emulsification) เกลื่อน้ำดีมีสมบัติเป็นแอมฟิพาติก (amphiphatic) คือโมเลกุลมีส่วนทั้งที่เป็นโพลาร์หรือมีขั้ว ซึ่งละลายได้ดีในน้ำ และส่วนที่ไม่มีขั้วซึ่งละลายได้ดีในไขมันและน้ำมัน จึงทำให้น้ำดีทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟอิงเอเจนต์ (emulsifying agent) ช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำมันกับน้ำให้น้อยลง และช่วยในการละลายของสบู่ (เกลือของกรดไขมัน) ที่ไม่ละลายในน้ำ น้ำดียังช่วยในการย่อยและการดูดซึมลิพิดและวิตามินต่างๆ ที่ละลายในไขมัน เช่น วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค ให้สมบูรณ์อีกด้วย หากการย่อยไขมันและน้ำมันไม่ดี จะทำให้สารอาหารอื่นถูกย่อยได้ไม่สมบูรณ์ไปด้วย เพราะไขมันจะห่อหุ้มก้อนอาหารไว้ ทำให้เอนไซม์อื่นๆ ไม่สามารถเข้าไปย่อยสลายได้ ในภาวะเช่นนี้แบคทีเรียในลำไส้เล็กจะนำสารอาหารไปใช้เป็นอาหารเพื่อการเจริญของแบคทีเรีย เกิดกระบวนการหมัก และทำให้มีแก๊สเกิดขึ้น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดอาการท้องอืดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ช่วยทำให้เป็นกลาง (neutralization of acid) น้ำดีมีสมบัติเป็นด่าง จะช่วยทำให้ไขมันที่เคลื่อนที่มาจากกระเพาะอาหาร ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรดถูกเปลี่ยนให้เป็นอย่างอื่นในลำไส้เล็กได้

4. ช่วยในการขับถ่ายสารบางชนิด น้ำดีมีหน้าที่สำคัญในการพาคอเลสเตอรอลออกจากร่างกาย และยังช่วยพาสารจำพวกยารักษาโรค สารพิษ สารสีน้ำดี และสารอินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ ทองแดง สังกะสี และปรอท ออกจากร่างกายทางน้ำดีด้วย

5. การละลายของคอเลสเตอรอลในน้ำดี คอเลสเตอรอลอิสระจะไม่ละลายในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย แต่ในน้ำดีมีเลซิทีนอยู่มาก จึงรวมกับเกลือน้ำดีเป็นไมเซลล์ของเลซิทีน-เกลือน้ำดี (lecithin-bile salt micelle) คอเลสเตอรอลจึงสามารถละลายอยู่ในไมเซลล์ (micelle) ได้โดยวิธีนี้ จึงทำให้คอเลสเตอรอลบางส่วนถูกพาไปในน้ำดีได้ แต่การละลายของคอเลสเตอรอลยังขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำในน้ำดีอีกด้วย

6. กรดน้ำดีมีหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของไทรอยด์ และสมดุลของพลังงาน นอกจากนี้ช่วยในการดูดซึมไขมันในลำไส้เล็ก ยังมีหน้าที่อื่นด้วยคือ ส่งสัญญาณกระตุ้นการสร้างไทรอยด์ในเซลล์ไขมัน โดยกรดน้ำดีมีฤทธิ์กระตุ้นไทรอยด์เฉพาะในอวัยวะที่ไทรอยด์มีฤทธิ์เพิ่มการผลิตพลังงานช่วยให้เราเข้าใจการควบคุมสมดุลพลังงานมากขึ้นและนี้อาจเป็นอีกทางในการช่วยลดความอ้วนได้

2.5.2 ข้อเสียของกรดน้ำดี [24]

อาจทำให้เกิดปัญหาในระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องผูก ท้องเสีย ท้องอืด และมีผลกระทบต่อหญิงตั้งครรภ์

2.6 ประโยชน์จากการใช้สเตียรอยด์ [25]

สเตียรอยด์หากนำมาใช้อย่างถูกต้องตามหลักวิชาการจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก สเตียรอยด์ที่นำมาใช้ทางการแพทย์ เพื่อประโยชน์ในการรักษาดังต่อไปนี้

1. ใช้เพื่อทดแทนการขาดฮอร์โมน โดยปกติจะใช้สเตียรอยด์เพื่อทดแทนการขาดฮอร์โมนจากต่อมหมวกไตที่มีสาเหตุมาจากความบกพร่องของต่อมหมวกไต และจากความบกพร่องของต่อมใต้สมองส่วนหน้า

2. ใช้รักษาโรคต่างๆ สเตียรอยด์จะถูกใช้เมื่อใช้ยาอื่นไม่ได้ผลหรือโรคนั้นไม่อาจควบคุมด้วยยาอื่น เนื่องจากมีอาการข้างเคียงสูง วัตถุประสงค์ที่นำสเตียรอยด์ไปใช้ก็เพื่อบรรเทาอาการอักเสบและ/หรือลดภูมิคุ้มกันในโรคต่างๆ นั้น อาทิ

- โรคภูมิแพ้ สเตียรอยด์ เมื่อใช้ในโรคภูมิแพ้ จะให้ผลดีและรวดเร็วในการควบคุมอาการหลายอย่างที่เกี่ยวเนื่องกับโรคภูมิแพ้ เช่น โรคหืด ไข้หวัดเรื้อรังชนิดแพ้อากาศ ไข้ละอองฟาง การแพ้ยา และโรคผื่นคันตามผิวหนังที่เกิดจากการแพ้ แต่เนื่องจากยามีอันตรายจากการใช้สูง จึงควรเก็บไว้ใช้ในกรณีจำเป็นจริง ๆ และใช้ในระยะเวลาสั้น เช่น เป็นโรคหวัดคัดจมูกเรื้อรังชนิดแพ้อากาศ ที่ใช้ยาต้านฮีสตามีนไม่ได้ผล หรือเป็นโรคหืด ไข้หวัดหายตลอดมาแล้วไม่ได้ผล

- โรคตา สเตียรอยด์ใช้ได้ผลในการรักษาโรคของตาที่เกิดจากอาการแพ้ เช่น อาการเคืองตา เนื่องจากการแพ้สารบางชนิด ที่ไม่ใช่เกิดจากการติดเชื้อ ซึ่งแพทย์มักรักษาด้วยการใช้ยาหยอดตา ดังนั้น จึงห้ามใช้ยาที่มีส่วนผสมของสเตียรอยด์ในกรณีติดเชื้อ และยานี้ไม่มีผลในการรักษาต่อกระจก นอกจากนี้หากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน อาจให้ความดันในลูกตาสูงขึ้นจนเกิดเป็นโรคต้อหินได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-โรคผิวหนัง สเตียรอยด์สามารถลดอาการทางผิวหนังที่เกิดจากการแพ้ การอักเสบและโรคผิวหนังที่ทำให้เกิดอาการคันต่าง ๆ แต่การใช้ยาสเตียรอยด์ ไม่ใช่เป็นการรักษาที่ต้นเหตุ เป็นเพียงยับยั้งอาการคันและอาการอักเสบที่เกิดจากเชื้อรา ดังนั้น เมื่อหยุดยาาก็จะกลับมาเป็นอีก และอาจมีผลทำให้การติดเชื้อลุกลามได้ เพราะสเตียรอยด์มีผลในการกดภูมิคุ้มกันของร่างกาย

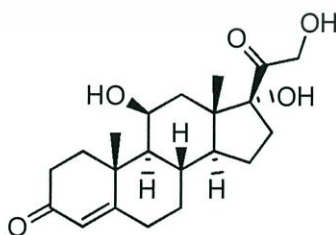
-โรคข้ออักเสบชนิดรูมาตอยด์ โรคนี้ปกติจะใช้ยาต้านการอักเสบชนิดที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ก่อน หากมีอาการอักเสบที่รุนแรงแพทย์อาจพิจารณาให้สเตียรอยด์เพื่อบรรเทาอาการเฉพาะครั้ง กรณีที่มีการอักเสบเฉพาะบางข้อนั้น การฉีดสเตียรอยด์เข้าข้อ อาจช่วยลดการอักเสบได้ในระยะแรก อย่างไรก็ตาม หากสงสัยว่ามีการติดเชื้อในข้อร่วมด้วย ห้ามฉีดยาสเตียรอยด์เข้าข้อโดยตรงอย่างเด็ดขาด เพราะจะทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงขึ้น

2.7 อันตรายจากการใช้สเตียรอยด์[25]

เนื่องจากสเตียรอยด์เป็นยาซึ่งมีผลต่อระบบต่างๆในร่างกายแทบทุกระบบ การใช้สเตียรอยด์อาจนำไปสู่อันตรายมากมายหลายประการ ที่สำคัญได้แก่

1. การติดเชื้อ ใช้สเตียรอยด์ในขนาดสูงมีผลกดภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราได้ง่าย นอกจากนี้สเตียรอยด์ยังอาจบดบังอาการแสดงของโรคติดเชื้อ ทำให้ตรวจพบโรคเมื่ออาการรุนแรงแล้ว

2. กดการทำงานของระบบที่ควบคุมการหลั่งฮอร์โมน ระบบที่ทำหน้าที่ควบคุมการหลั่งสเตียรอยด์ฮอร์โมน ประกอบด้วยอวัยวะที่สำคัญในร่างกาย 3 แห่งด้วยกันคือ ไฮโปธาลามัส (Hypothalamus) ต่อมพิทูตารี (Pituitary gland) และต่อมหมวกไต (Adrenal gland) ในภาวะที่มีระดับของ Cortisol 20 ในเลือดสูงจะมีการกระตุ้นจากไฮโปธาลามัสไปยังต่อมหมวกไตให้ลดการสร้างสเตียรอยด์ในทางตรงกันข้าม ถ้าระดับของ Cortisol 20 ต่ำจะมีผลกระตุ้นให้ต่อมหมวกไตสร้างฮอร์โมนนี้เพิ่มขึ้น การให้สเตียรอยด์ขนาดสูง จะไปกดการทำงานของระบบอวัยวะที่ทำหน้าที่สร้างและควบคุมการหลั่งฮอร์โมนชนิดนี้ ซึ่งจะมากหรือน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับขนาดของยาที่ได้รับและระยะเวลาในการใช้ยา เช่น ถ้าให้สเตียรอยด์ในขนาดที่เทียบเท่ากับเพรดนิโซโลน 5 มิลลิกรัมต่อวัน แทบจะไม่มีผลที่จะกดการทำงานของระบบนี้เลย แต่ถ้าให้ขนาดสูงเทียบเท่ากับเพรดนิโซโลน 15 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลานานกว่า 1-2 เดือน จะมีผลต่อการกดการสร้างฮอร์โมนได้มาก ทำให้เมื่อหยุดใช้ยานี้แล้ว ร่างกายไม่สามารถสร้างฮอร์โมนนี้ได้เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย โดยเฉพาะเมื่อร่างกายอยู่ในภาวะเครียด



20

3. แผลในกระเพาะอาหาร สเตียรอยด์ซึ่งมีผลทำให้เยื่อกระเพาะอาหารบางลง และยับยั้งการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ทดแทนเนื้อเยื่อเก่าที่หลุดไป นอกจากนี้ในผู้ป่วยบางรายยังพบว่า มีการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารเพิ่มขึ้นด้วย การใช้สเตียรอยด์อาจทำให้มีอาการกระเพาะอาหารทะลุ หรือเลือดออกในกระเพาะอาหารได้ โดยไม่มีอาการปวดมาก่อน ถึงแม้จะยังไม่มีหลักฐานทางวิชาการยืนยันว่า การให้ยาลดกรดร่วมกับสเตียรอยด์จะมีผลช่วยป้องกันการเกิดแผลได้ แต่ในทางปฏิบัติก็มีแพทย์จำนวนมากไม่น้อยที่นิยมให้ยาดังกล่าวร่วมกัน

4. ผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง สเตียรอยด์อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบุคลิกภาพ และอารมณ์ของผู้ป่วยได้ การใช้ยาขนาดสูงจะทำให้เกิดอารมณ์เป็นสุข จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ใช้มีอาการติดยา นอกจากนี้ยังพบอาการไม่พึงประสงค์อื่น ๆ เช่น นอนไม่หลับ เจริญอาหาร กระสับกระส่าย หงุดหงิด เป็นต้น

5. กระดูกผุ (Osteoporosis) การใช้สเตียรอยด์ติดต่อกันเป็นเวลานาน มีผลทำให้กระดูกผุได้ ดังนั้น ผู้ที่มีแนวโน้มที่จะเกิดกระดูกผุอยู่แล้ว เช่น ผู้สูงอายุ คนที่เป็นโรคไขกระดูก ควรหลีกเลี่ยงการใช้ยาดังกล่าวติดต่อกันเป็นเวลานาน

6. ยับยั้งการเจริญเติบโตของร่างกาย เนื่องจากสเตียรอยด์มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเด็ก การให้ยาขนาดสูงในเด็ก จึงไม่ให้ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน แต่จะให้ยาแบบวันเว้นวัน เพราะจะทำให้มีฤทธิ์และอาการไม่พึงประสงค์น้อยกว่า

7. ทำให้ระดับโพแทสเซียมในเลือดต่ำ ผลของสเตียรอยด์ทำให้ร่างกายสูญเสียเกลือโพแทสเซียมทางปัสสาวะมาก ซึ่งป้องกันได้โดยให้ลดการกินโซเดียม และกินอาหารที่มีโพแทสเซียมสูงแทน เช่น ส้ม กล้วย ผู้ที่มีระดับโพแทสเซียมต่ำมาก อาจมีผลทำให้เกิดอาการอ่อนเพลีย กล้ามเนื้อไม่มีแรง และหัวใจเต้นผิดจังหวะ หรือหยุดเต้นได้

8. ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรง การใช้สเตียรอยด์เป็นระยะเวลาสั้นจะทำให้มีการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กล้ามเนื้อบริเวณต้นขาและแขน ซึ่งเมื่อลดขนาดยาลงก็จะมีผลทำให้อาการดีขึ้น และต้องใช้เวลาหลายเดือนกว่าจะเป็นปกติ

9. ผลต่อตา ยาหยอดตาบางชนิด มีส่วนผสมของสเตียรอยด์ หากใช้ไปนาน ๆ อาจทำให้ความดันลูกตาสูงขึ้น และมีโอกาสติดเชื้อได้ง่าย บางรายอาจทำให้ตาบอดได้

10. ผลต่อผิวหนัง สเตียรอยด์ในรูปของยาทาภายนอก มีผลทำให้ผิวหนังบางเป็นรอยแตกและมีลักษณะเป็นมัน การใช้สเตียรอยด์ที่สูตรโครงสร้างมีฟลูออไรด์เป็นองค์ประกอบ ถ้าทาบริเวณใบหน้า อาจจะทำให้หน้ามีผื่นแดง และมีอาการอักเสบของผิวหนังรอบๆ ในบางรายอาจมีสิวเกิดขึ้นด้วย

11. ฤทธิ์และอาการไม่พึงประสงค์อื่นๆ สเตียรอยด์มีผลทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า Cushing's Syndrome ลักษณะพบในผู้ป่วยประเภทนี้ เช่น อ้วน ขนดก ระบบประจำเดือนผิดปกติ ความดันโลหิตสูง กล้ามเนื้อไม่มีแรง ปวดหลัง เป็นสิ่ว มีอาการทางจิตใจ หัวใจล้มเหลว บวม น้ำ เป็นต้น

2.8 การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี (Chromatography)[26,27]

โครมาโทกราฟี (Chromatography) มาจากภาษากรีก Chroma แปลว่าสี และ graphein แปลว่าเขียนหรือวาด เป็นวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบันสำหรับทำสารให้บริสุทธิ์ แยกสารออกจากตัวอย่างที่ซับซ้อนได้ ซึ่งการแยกในลักษณะเช่นนี้จะทำโดยวิธีอื่นๆได้ลำบาก คำว่าโครมาโทกราฟี แปลว่า การแยกออกเป็นสีๆ (The production of color scheme) ทั้งนี้เนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mikhail Tswett นักพฤกษศาสตร์ชาวรัสเซียเป็นผู้เริ่มใช้เทคนิคนี้เป็นคนแรกในปี ค.ศ. 1906 ได้แยกสารสกัดออกจากใบไม้สกัดเป็นสีต่างๆในคอลัมน์ วิธีโครมาโทกราฟียังสามารถแยกสารที่ไม่มีสีก็ได้

2.8.1 ชนิดของโครมาโทกราฟี

วิธีทางโครมาโทกราฟีเกี่ยวข้องกับการแจกแจง (distribution) ของสารระหว่างสองเฟส โดยเฟสหนึ่งอยู่กับที่เรียกว่า เฟสคงที่ (stationary phase) ส่วนอีกเฟสหนึ่งเคลื่อนที่ได้เรียกว่า เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) สามารถแบ่งโครมาโทกราฟีอย่างกว้างๆ ได้เป็น 2 ชนิดตามลักษณะของเฟสที่เกี่ยวข้อง คือ

1. โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (Adsorption Chromatography) ในกรณีนี้เฟสคงที่เป็นของแข็ง เช่น อะลูมินา หรือซิลิกาเจล ส่วนเฟสเคลื่อนที่อาจเป็นแก๊สหรือของเหลวก็ได้ ตัวอย่างได้แก่ Column Chromatography (CC) และ Thin Layer Chromatography (TLC)

2. โครมาโทกราฟีแบบแบ่งส่วน (Partition Chromatography) ในกรณีนี้เฟสคงที่เป็นของเหลว ส่วนมากมักเป็นน้ำซึ่งถูกพยุงอยู่ด้วยของแข็ง (supporter) ที่พรุน เช่น ดินเบา (kieselguhr) หรือเซลลูโลส (cellulose) ส่วนเฟสเคลื่อนที่อาจเป็นแก๊สหรือของเหลวก็ได้ ตัวอย่างได้แก่ Paper Chromatography (PC) และ Gas-Liquid Chromatography (GLC)

2.8.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography, CC)

วิธีนี้ใช้คอลัมน์แก้วบรรจุผงของตัวดูดซับ (adsorbent) ซึ่งชุ่มอยู่ด้วยตัวทำละลาย (solvent) ชนิดหนึ่ง เอาสารผสมที่ต้องการจะแยก (solute) ซึ่งละลายอยู่ในตัวทำละลายอันเดียวกันกับชนิดข้างต้นมาหยดลงบนตัวดูดซับ แล้วจึงเติมตัวทำละลายตามลงมา ตัวทำละลายจะค่อยๆชะสารที่ต้องการจะแยกให้เคลื่อนที่ลงไป (elute) ด้วยอัตราเร็วต่างกัน จนในที่สุดจะได้แถบสี (color band) ของแต่ละสารแยกออกจากกัน (ในกรณีที่สารเหล่านั้นมีสีในตัวเอง) แต่ถ้าสารเหล่านี้ไม่มีสี จำเป็นต้องใช้วิธีอื่นเพื่อหาแต่ละแถบอยู่ตรงไหนของคอลัมน์ เช่น อาจตรวจวัดด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (ในกรณีที่รังสีนี้ทำให้สารนั้นเรืองแสงได้) หรือสเปกโตรมิเตอร์บางชนิดไปบนตัวดูดซับสำหรับตรวจหาสารหรือ เคลือบตัวดูดซับด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ เมื่อสารอยู่ในตำแหน่งใดตำแหน่งนั้นจะมีมืด เพราะสารไปบดบังการเรืองแสง เป็นต้น

การที่สารในสารผสมแยกออกจากกันได้ เนื่องจากแต่ละสารถูกดูดซับ (adsorb) ไว้โดยตัวดูดซับในอัตราที่ไม่เท่ากัน สารที่ถูกดูดซับไว้มากกว่าย่อมเคลื่อนที่ลงมาช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับน้อยกว่า จากหลักการนี้ สามารถแยกสารที่มีขั้วต่างกันออกจากกันได้

ตัวดูดซับที่ใช้ส่วนมาก ได้แก่ อะลูมินา (alumina, Al_2O_3) หรือซิลิกาเจล (silica gel, SiO_2) ซิลิกาเจลใช้ได้ดีกับสารเกือบทุกชนิด โดยเฉพาะสารที่เป็นกรดเป็นกลาง หรือเป็นเบสอ่อน ส่วนอะลูมินาใช้ได้ดีกับสารที่เป็นเบส ตัวดูดซับอื่นๆที่ใช้คือ $MgCO_3$, $CaSO_4$, $CaCO_3$, Na_2CO_3 , starch และ sucrose เป็นต้น ตัวดูดซับเป็นผงละเอียดที่มีพื้นที่ผิวมาก ทำให้มีปริมาณพื้นที่ผิวที่มีขั้วมากที่จะดูดหรือยึดตัวถูกละลายที่มีจำนวนน้อยไว้ด้วยแรงดึงดูดแบบไฟฟ้าสถิต

ตัวทำละลายที่ใช้ได้ดีมาก ตัวทำละลายแต่ละชนิดจะทำให้อัตราเร็วในการแยกสารต่างๆออกจากตัวดูดซับหรืออำนาจชะ (eluting power) ไม่เท่ากัน ตัวทำละลายที่มีขั้วมากจะยิ่งพาสารต่างๆเคลื่อนที่ได้เร็วมาก ดังนั้นมักจะเลือกตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อย สำหรับการแยกสารที่ถูกดูดน้อยออกมาก่อน แล้วเลือกตัวทำละลายที่มีขั้วมากขึ้น สำหรับการแยกสารที่ถูกดูดดีขึ้นตามลำดับ ตัวทำละลายสามัญที่ใช้เรียงตามลำดับของอำนาจชะหรือสภาพมีขั้ว (polarity) จากน้อยไปมาก คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- | | |
|-----------------------------------|----------------|
| 1. petroleum ether หรือ hexane... | 2. cyclohexane |
| 3. carbon tetrachloride | 4. benzene |
| 5. chloroform | 6. ether |
| 7. acetone | 8. ethanol |
| 9. methanol | 10. water |
| 11. organic acid | |

ถ้าต้องการตัวทำละลายที่มีอำนาจการชะพอเหมาะ อาจต้องผสมตัวทำละลายสองชนิดหรือมากกว่านั้นเข้าด้วยกัน

2.8.3 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีเป็นโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ วิธีนี้เป็นการแยกสารโดยอาศัยหลักการเช่นเดียวกับกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยให้ตัวดูดซับ (เฟสคงที่) ที่เป็นของแข็งเกาะอยู่บนแผ่นกระจก แผ่นอะลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติก ในลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ หนาประมาณ 0.25-1 มิลลิเมตร โดยตัวดูดซับที่ใช้อาจเป็นซิลิกาเจล หรืออะลูมินา ซึ่งมี binding agent ผสมอยู่ด้วยเพื่อให้เกิดการยึดเกาะได้ดี แผ่น TLC มีทั้งที่เป็นแผ่นสำเร็จรูป หรืออาจเตรียมขึ้นได้เองในห้องปฏิบัติการ โดยกวนตัวดูดซับกับน้ำในปริมาณที่เหมาะสมจนเป็นสารขุ่นเหลว (slurry) แล้วเคลือบลงบนแผ่นสไลด์ให้ทั่วอย่างสม่ำเสมอ นำแผ่นสไลด์ที่เคลือบแล้วนี้ไป activate เพื่อระเหยน้ำออก (ถ้ามีน้ำอยู่ด้วยจะทำให้ความสามารถในการดูดของตัวดูดลดลง) โดยทำให้ร้อน เช่น อังด้วยหลอดไฟ 60 วัตต์ หรือนำไปใส่ในเตาอบที่อุณหภูมิ 100-120 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาทีสำหรับแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้นานๆ อาจเสีย activity ไปบ้าง ก่อนใช้ให้นำมา reactivate ใหม่โดยทำให้ร้อนด้วยวิธีดังกล่าว ในกรณีที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยง่ายในการเตรียมแผ่น TLC เช่น คลอโรฟอร์ม เมื่อเคลือบตัวดูดซับลงบนแผ่นสไลด์เรียบร้อยแล้ว ปล่อยให้คลอโรฟอร์มระเหยจนหมดก็สามารถนำแผ่นสไลด์มาใช้ได้ทันทีโดยไม่ต้องนำไปทำให้ร้อนก่อน การเตรียมแผ่น TLC นี้ไม่ควรเตรียมล่วงหน้ากว่าหนึ่งวัน

การทำทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี เริ่มด้วยการนำสารละลายที่ต้องการแยกจำนวนเล็กน้อย (5 ไมโครลิตร) แต่้มนบนตัวดูดซับทางปลายแผ่นสไลด์ด้านหนึ่ง โดยใช้หลอดแคปิลารี (capillary tube) แล้วนำแผ่นสไลด์นี้ไปใส่ในภาชนะที่มีตัวทำละลายซึ่งจะทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยให้ระดับของตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าจุดของสาร เมื่อปิดภาชนะเพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยตัวทำละลาย ตัวทำละลายจะซึมผ่านขึ้นมาข้างบนตามแนวตั้งผ่านจุดที่มีสาร สารต่าง ๆ ที่แต่้มนไว้จะเคลื่อนที่ตามตัวทำละลายขึ้นมาในอัตราเร็วที่ต่างกันขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสาร ตัวทำละลายและตัวดูดซับที่ใช้ ตัวทำละลายที่ใช้ในทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีจะคล้ายคลึงหรืออาศัยหลักการเลือกระบบตัวทำละลายเช่นเดียวกันกับที่ใช้ในวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี อาจใช้ตัวทำละลายเดี่ยวหรือตัวทำละลายผสม แต่ส่วนมากมักจะใช้ตัวทำละลายผสม และใช้ตัวทำละลายเพียงระบบเดียว

การตรวจหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารไม่มีสีบนแผ่น TLC ทำได้หลายวิธี วิธีหนึ่งที่ทำได้ง่ายและสะดวกก็คือ การนำแผ่น TLC ที่ทำการแยกสารแล้วมาปล่อยให้แห้ง จากนั้นจึงนำไปใส่ภาชนะปิดที่มีเกล็ดไอโอดีน สารอินทรีย์ส่วนใหญ่จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนอย่างอ่อนที่ผันกลับได้ (reversible weak complex) กับไอโอดีน และให้จุดสีน้ำตาลภายในเวลาเพียง 5-10 วินาที หรืออาจนานถึง 10-15 นาที ขึ้นอยู่กับความว่องไวในการดูดซับไอโอดีนของแต่ละสาร

อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการพาดำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารที่ไม่มีสีได้ก็คือ การใช้แผ่น TLC สำเร็จรูปที่มีการผสมฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ (fluorescent indicator) อยู่กับซิลิกาเจลที่ฉาบไว้บาง ๆ โดยเมื่อนำแผ่น TLC ที่ทำการแยกแล้วมาส่องกับแสงยูวี (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะเห็นจุดสารที่มีสมบัติเป็นตัวควENCHER หรือตัวเพิ่มฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent) สารอินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงยูวีได้ เนื่องจากมีโครโมฟอร์ (chromophore) เช่น ฟันธะคู จะใช้การตรวจสอบแบบนี้ได้ แผ่น TLC สำเร็จรูปดังกล่าวนี้สามารถนำมาใช้ตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี (reaction progress) รวมทั้งตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารในกระบวนการแยกได้อย่างรวดเร็ว

เนื่องจากวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีทำได้รวดเร็วและง่าย จึงใช้กันมากในการตรวจหาความบริสุทธิ์ของสาร ใช้แยกสารจำนวนน้อยออกจากกัน และใช้สำหรับระบุชนิดของสารเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยอาศัยหลักการที่ว่า ถ้าใช้ตัวดูดซับเดียวกัน ใช้ระบบตัวทำละลายเหมือนกัน ที่อุณหภูมิและสถานะเดียวกัน สารหนึ่ง ๆ จะมีค่า “Retention factor” หรือค่า R_f (R_f value) คงที่ ค่า R_f คืออัตราส่วนระหว่างระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่หรือ

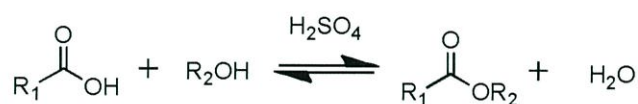
$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

นอกจากนี้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟียังเป็นวิธีที่ใช้ทดลองหาสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และยังใช้สำหรับติดตามการดำเนินไปของปฏิกิริยาว่าได้เกิดการเปลี่ยนแปลงถึงขั้นตอนใด รวมทั้งเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ตรวจสอบการทำให้สารให้บริสุทธิ์โดยวิธีอื่น ๆ ได้อีกด้วย

2.9 ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง[28-31]

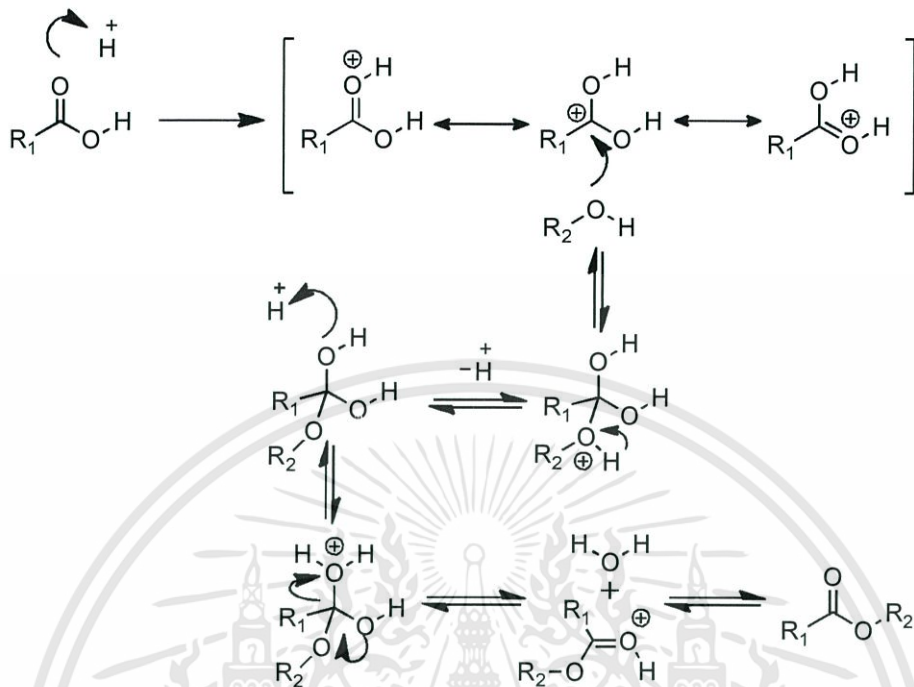
ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (Esterification) คือ การสังเคราะห์สารประกอบเอสเทอร์ ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดคาร์บอกซิลิกกับแอลกอฮอล์ โดยมีกรดแก่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น กรดซัลฟูริกเข้มข้น ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.3 ในงานวิจัยนี้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Lithocholic acid 1

แผนภาพที่ 2.3



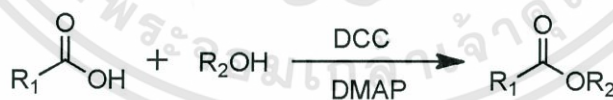
โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยา มีดังนี้

แผนภาพที่ 2.4



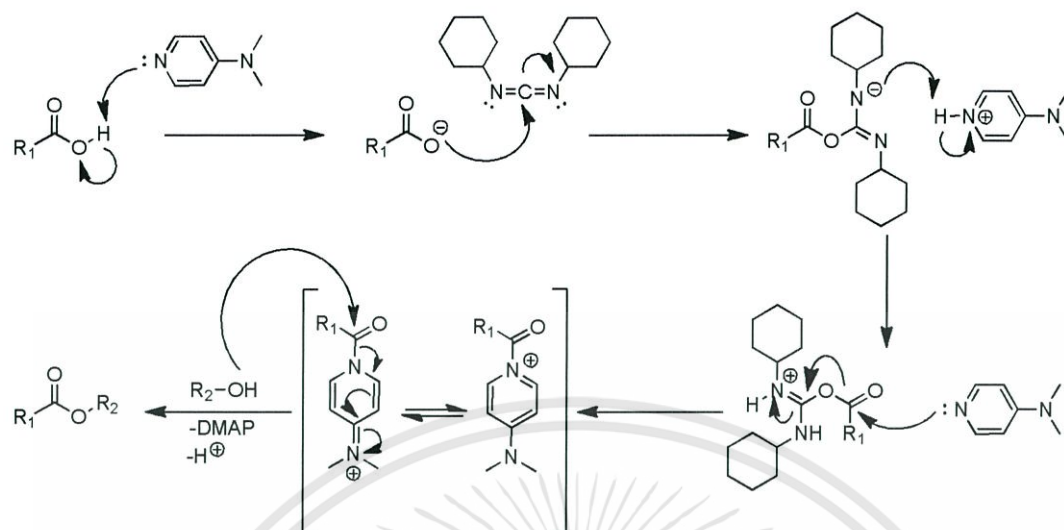
นอกจากนี้ปฏิกิริยา Steglich esterification ยังถูกนำมาใช้สังเคราะห์สารประกอบเอสเทอร์ เช่นเดียวกัน โดยเกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดคาร์บอกซิลิกกับแอลกอฮอล์ มี 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ทำหน้าที่เป็น coupling agent และมี 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) ทำหน้าที่เป็นตั้งเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ตั้งปฏิกิริยา

แผนภาพที่ 2.5



โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังแผนภาพที่ 2.6 โดยมี DCC เข้าทำปฏิกิริยากับกรดคาร์บอกซิลิกเกิด O-acylisourea intermediate จากนั้น DMAP ทำปฏิกิริยากับ O-acylisourea intermediate และแอลกอฮอล์เกิดสารประกอบเอสเทอร์ ตามลำดับ

แผนภาพที่ 2.6



นอกจากปฏิกิริยาตั้งที่กล่าวมาข้างต้น ปฏิกิริยาซัลเฟชัน (Sulfation) ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Lithocholic acid 1 ด้วย ซึ่งเกิดปฏิกิริยาที่หมู่ไฮดรอกซิลกลายเป็นหมู่ซัลเฟต โดยใช้กรดซัลฟามิก แสดงดังปฏิกิริยา

แผนภาพที่ 2.7



2.10 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

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

เชื้อแบคทีเรียถือว่าเป็น 1 ใน 5 ชนิดของเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดโรคติดต่อ นอกเหนือไปจากเชื้อไวรัส เชื้อรา ริกเกตเซีย และพยาธิ[32] ในงานวิจัยนี้เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วย 8 ชนิด จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 5 ชนิด คือ

1. *Bacillus cereus* DMST 5040
2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
3. *Micrococcus luteus* ATCC 9341

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. *Staphylococcus aureus* TISTR 1466

5. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

และแบคทีเรียแกรมลบ 3 ชนิด คือ

1. *Escherichia coli* ATCC 25922

2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3. *Salmonella typhimurium* DMST 0562

ซึ่งแต่ละชนิดก่อให้เกิดโรคต่างๆ มีลักษณะดังนี้

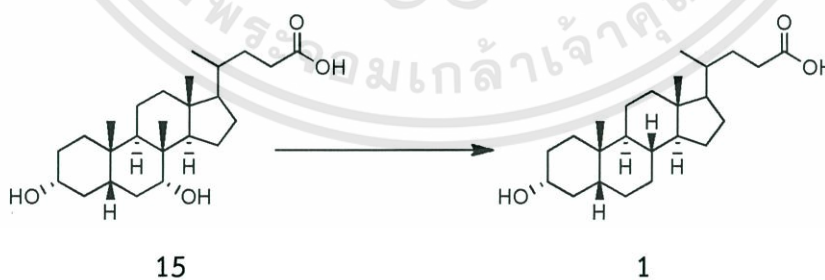
- *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค (pathogen) ชนิดหนึ่ง เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) เกิดอาการ 2 ลักษณะคืออาการอาเจียน (Emetic syndrome) เกิดจากที่ร่างกายได้รับสารพิษ (intoxication) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในอาหารก่อนที่จะบริโภคเข้าไป และอาการถ่ายเหลว (Diarrhea syndrome) เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีเซลล์ของแบคทีเรีย และเพิ่มจำนวนในลำไส้ของมนุษย์[33]
- *B. subtilis* ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilage)[34]
- *M. luteus* จัดอยู่ในสกุล (genus) Micrococcus เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (microbial spoilage) ได้หลายประเภท เช่น น้านม ไข่ เนื้อสัตว์ สัตว์ปีก อาหารกึ่งแห้ง อาหารทะเล ปลา หอย รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก แฮม[35]
- *S. aureus* เมื่อได้รับสารพิษของ *S. aureus* สารพิษนี้ทำให้กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อ่อนเพลีย ในรายที่รุนแรงมีอาการ ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ ความดันโลหิตเปลี่ยนแปลง ผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรงจะดีขึ้นภายใน 3 วัน นอกจากนี้ยังพบเป็นสาเหตุของ ฝี (abscess) การติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) การติดเชื้อที่กระดูก (osteomyelitis) ปอดบวม (pneumonia) การติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจ (endocarditis) อาหารเป็นพิษ (food poisoning) และ toxic shock syndrome (TSS)[36,37]
- *S. epidermidis* เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่พบก่อโรคบ่อยในผู้ป่วยที่คาสายสวน และเป็นสาเหตุของการอักเสบของเยื่อหุ้มหัวใจชั้นในในผู้ป่วยที่ผ่าตัดเปลี่ยนลิ้นหัวใจเทียมเนื่องจากเชื้อสามารถยึดเกาะกับสายยาง และอุปกรณ์การแพทย์ต่าง ๆ ได้[37]
- *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นทั่วไปจึงตรวจพบได้จากอุจจาระในปริมาณมาก โดยปกติ *E. coli* ประจำถิ่นเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคแต่อาจฉวยโอกาสก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องได้ ซึ่งเชื้อจะก่อโรคได้เมื่อเข้าสู่ร่างกายโดยการกินอาหาร และน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* เหล่านี้เข้าไปเป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงในคน [38]
- *P. aeruginosa* เป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสจะมีการติดเชื้อกับผู้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำหรือป่วยมากๆ ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ในหลายส่วนของร่างกาย เช่น
 - หัวใจและกระแสเลือด ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในกระแสเลือดซึ่งจะเกิดกับผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดและผู้ที่ติดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ระบบประสาทส่วนกลาง จะทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ
- ตาและหู จะก่อให้เกิดการติดเชื้อที่หูส่วนนอกที่เรียกว่า “swimmer’s ear”
- ทางเดินปัสสาวะ ติดได้จากการใช้เครื่องทางการแพทย์หรือการผ่าตัด
- ปอด โดยผู้ป่วยที่เป็นโรคปอดเรื้อรัง ภูมิคุ้มกันต่ำ ไซยาปฏิกิชีวนะ หัวใจล้มเหลวมี โอกาสเสี่ยงที่จะติดเชื้อได้
- ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน คนสุขภาพดีก็สามารถติดเชื้อได้ จากการอาบน้ำหรือเล่น น้ำในสระว่ายน้ำ hot tubs ที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ ซึ่งโรคติดเชื้อ *Pseudomonas* ที่ ผิวหนังนี้มักจะเกิดการสับสนกับโรคอีสุกอีใสและจะเกิดอาการรุนแรงได้กับผู้ที่ติดเชื้อในกระแสเลือดร่วมกับ *P. aeruginosa* เป็นสาเหตุอันดับสองในการก่อให้เกิด โรคติดเชื้อในบาดแผลไฟไหม้ในผู้ป่วยที่พักรักษาตัวที่โรงพยาบาล[39]
- *S. typhimurium* ก่อให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์หรือโรคไขกระดูกสันหลัง เป็นโรคที่ติดต่อกันได้ง่าย ผ่านทางอาหารและน้ำดื่มที่ปนเปื้อนเชื้อและการใกล้ชิดผู้ที่มีเชื้อโรค โดยผู้ป่วยจะมีอาการ เหงื่อออกมาก ไข้สูง คลื่นไส้ อาเจียน ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ ท้องร่วง ผื่นขึ้นตามตัว เลือดออกทางระบบอาหารในกรณีรุนแรง[40]

2.11 สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น

Lithocholic acid 1 (3α -Hydroxy- 5β -cholan-24-oic acid) เป็นกรดน้ำดีชนิดทุติยภูมิ โดยโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอน C- 3 และหมู่ คาร์บอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอน C-24 ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ Ursodeoxycholic acid 18 และ Sulfolithocholic acid การสังเคราะห์ Lithocholic acid 1 ได้จากกรดน้ำดีปฐมภูมิ Chenodeoxycholic acid 15 โดยตัดสังเคราะห์ Chenodeoxycholic acid 15 จาก Cholesterol 3 จากนั้นจะถูกตัดหมู่ไฮดรอกซิลออกโดยแบคทีเรียในลำไส้ (Bacterial 7α -dehydroxylation)

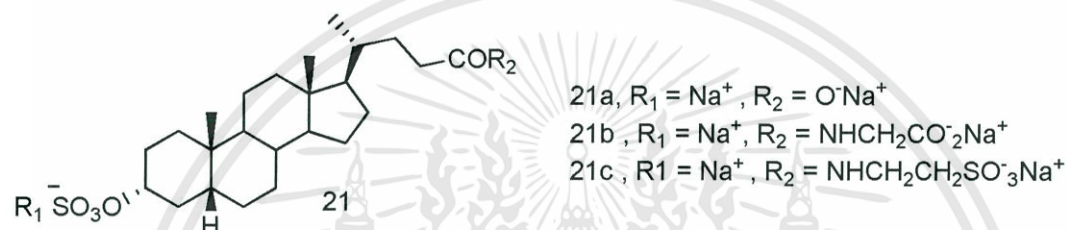


สมบัติทางชีวภาพของ Lithocholic acid 1 สามารถช่วยในการกระจายตัวของไขมันให้มีขนาดเล็กลงเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมไขมัน มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial)[41] ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (anticancer), เป็นตัวยับยั้งโปรตีโอโซม (proteasome inhibitors) และมีฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งในมนุษย์ (antiproliferative)[42]

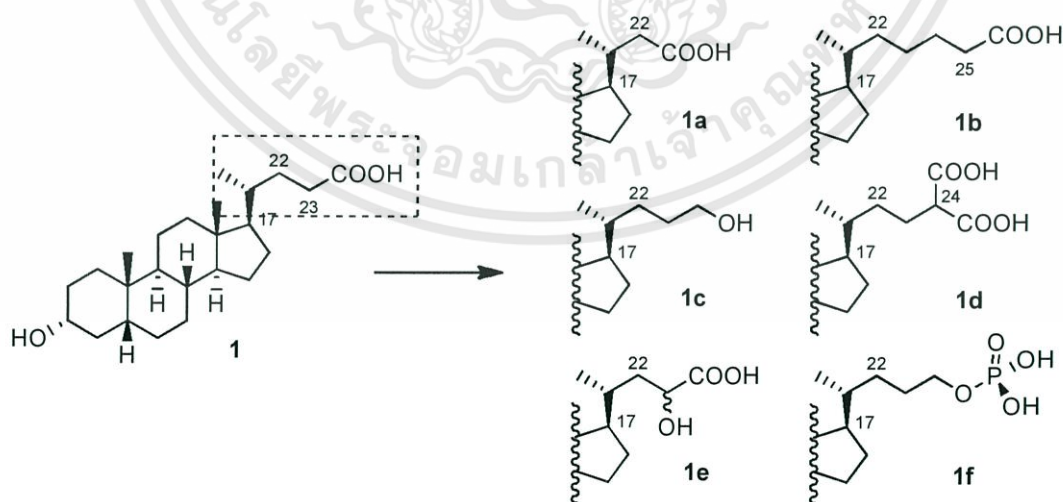
2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Palmer และ Bolt[43] ได้สังเคราะห์ sulfate esters จาก lithocholic acid, glycolithocholic acid และ tauroolithocholic acid ได้จากปฏิกิริยา sulfation โดยใช้ sulfur trioxide (SO_3) ใน pyridine และจากปฏิกิริยา esterification โดยใช้ ammonium hydroxide (NH_3OH)

Klein และคณะ[44] ทำการสังเคราะห์ sulfate ester ของ Lithocholic acid **21a** glycolithocholic acid **21b** และ tauroolithocholic acid **21c** โดย **21a** และ **21b** ได้จากปฏิกิริยา sulfation โดยใช้ sulfur trioxide-triethylamine ใน dimethylformamide (DMF) ส่วน **21c** ได้โดย conjugating lithocholic acid sulfate กับ Taurine **14** ใน DMF

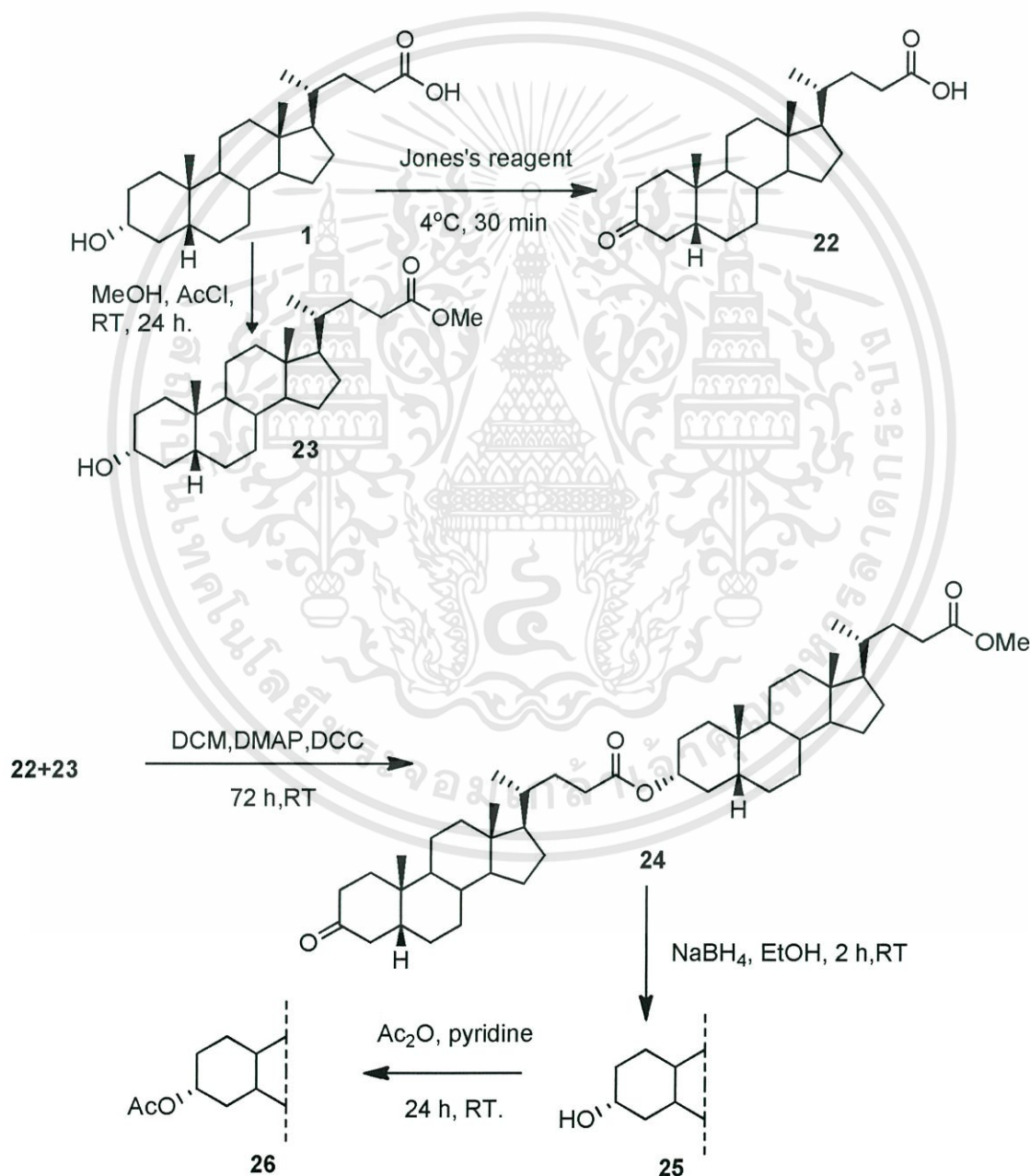


Arya และคณะ[45] ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Lithocholic acid **1a-1f** เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้ง Glucuronosyltransferase ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colon cancer cell line, HT-29) โดยสามารถเรียงลำดับฤทธิ์การยับยั้งจากน้อยไปมาก คือ $1d < 1a < 1b$ ตามลำดับ ทั้งนี้อนุพันธ์ของ Lithocholic acid **1a-1f** ที่ทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างมีฤทธิ์ในการยับยั้งลดลงจาก Lithocholic acid **1**



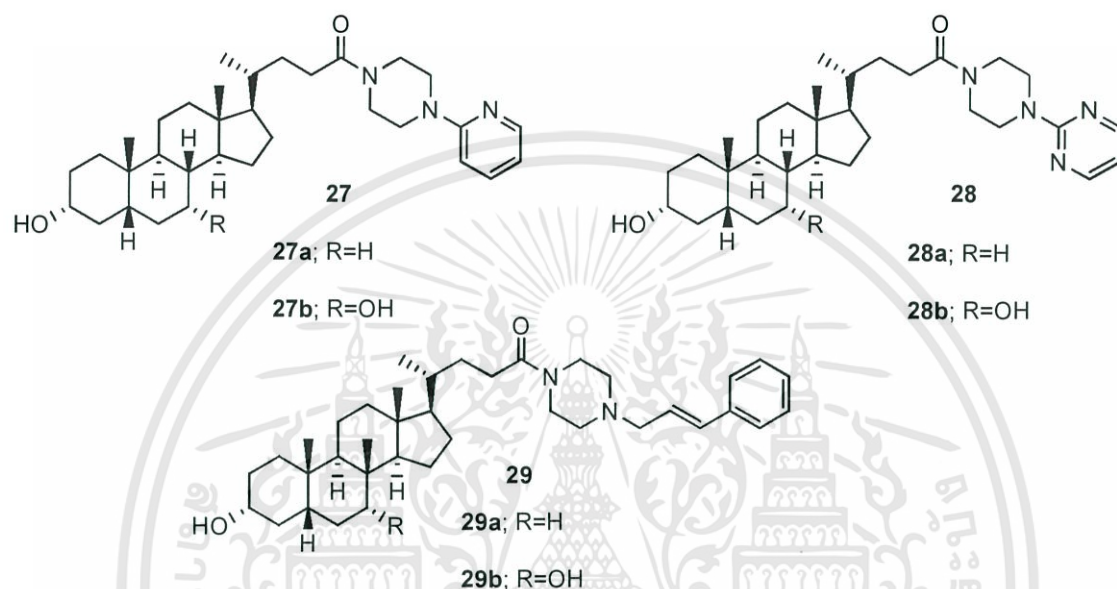
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nahar และคณะ[46] ได้ทำการสังเคราะห์ ester-linked lithocholic acid dimers โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ 3-oxo-5 β -cholan-24-oic acid **22** และ 3 α -Hydroxy-5 β -cholan-24-oic acid methyl ester **23** จาก Lithocholic acid **1** จากนั้นนำอนุพันธ์ทั้งสองมาสังเคราะห์ ester-linked dimers โดยใช้ DCC เป็น coupling agent และมี DMAP เป็น catalyst ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 3-oxo-5 β -cholan-24-oic acid (cholan-4-oic acid methyl ester)-3-yl ester, (3 α ,5 β) **24** และทำการสังเคราะห์ 3 α -Hydroxy-5 β -cholan-24-oic acid(cholan-4-oic acid methyl ester)-3-yl ester, (3 α ,5 β) **25** และ 3 α -Acetoxy-5 β -cholan-24-oic acid(cholan-4-oic acid methyl ester)-3-yl ester, (3 α ,5 β) **26** จาก **24**



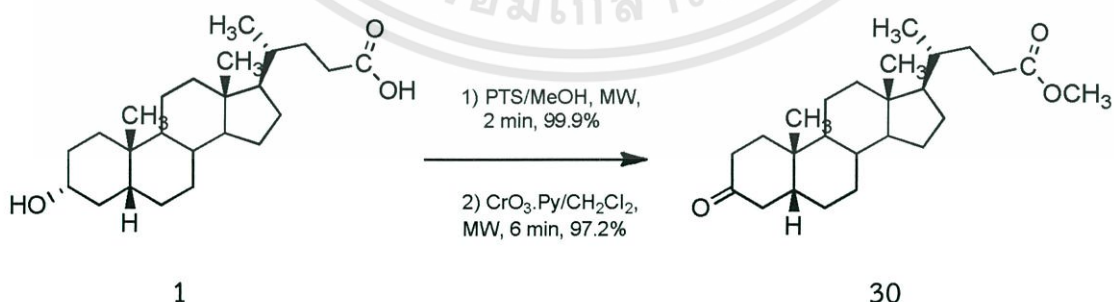
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kihel และคณะ[42] สังเคราะห์ Lithocholic piperazinylcarboxamides **27a,28a,29a** และ Chenodeoxycholic piperazinylcarboxamides **27b,28b,29b** จาก Lithocholic acid **1** และ Chenodeoxycholic acid **15** โดยใช้อนุพันธ์ของ piperazine ได้แก่ 1-(2-pyridyl) piperazine, 1-(2-pyrimidyl) piperazine, *trans*-1-cinnamyl piperazine เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสมอง (GMB), มะเร็งเม็ดเลือดขาว (KMS-11) และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT-11) ของมนุษย์ พบว่า **29b** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KMS-11>HCT-11>GMB ตามลำดับ



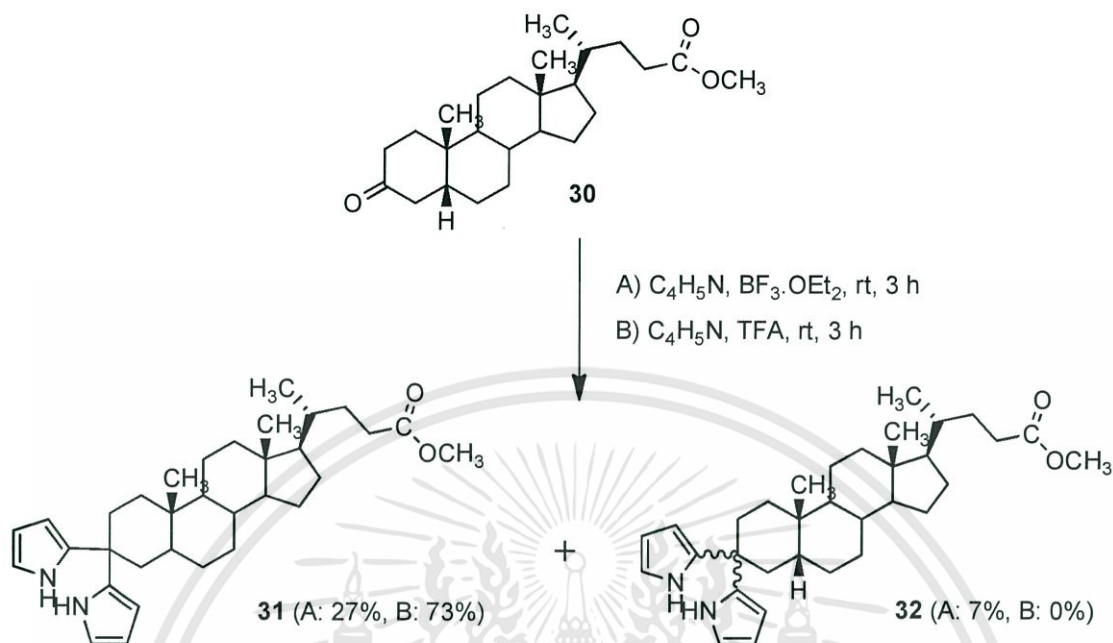
Drašar และคณะ[47] ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ spiroannulated oligopyrrole macrocycles **33, 34** จาก Lithocholic acid **1** โดยการสังเคราะห์มี 3 ขั้นตอน ดังนี้

1) Esterification ของ Lithocholic acid **1**

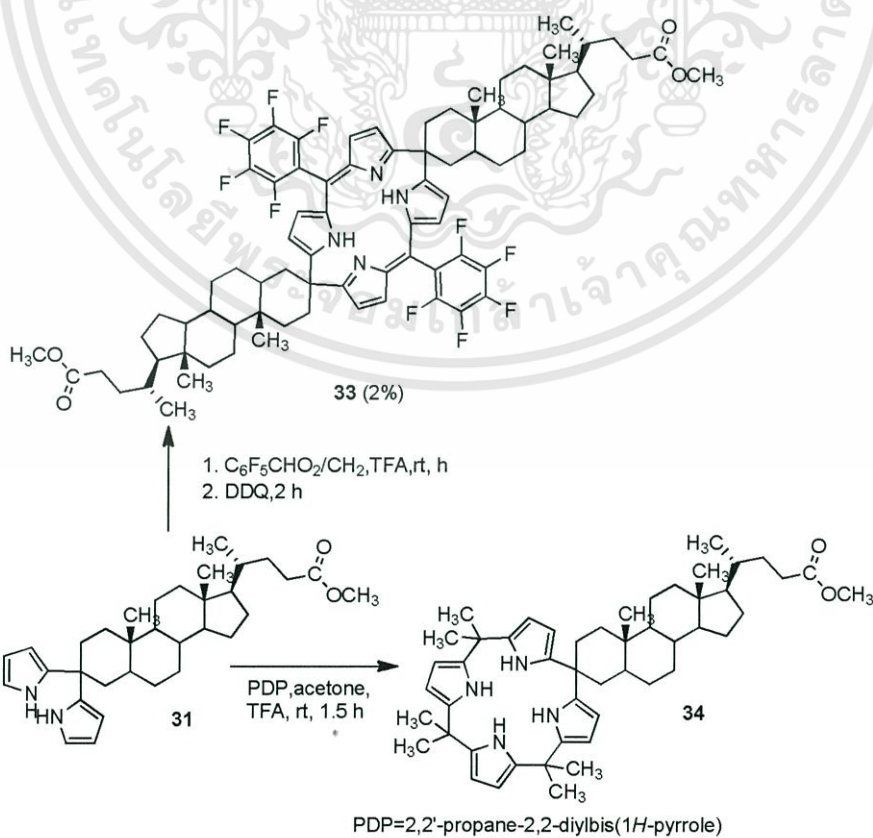


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) Condensation กับ pyrrole

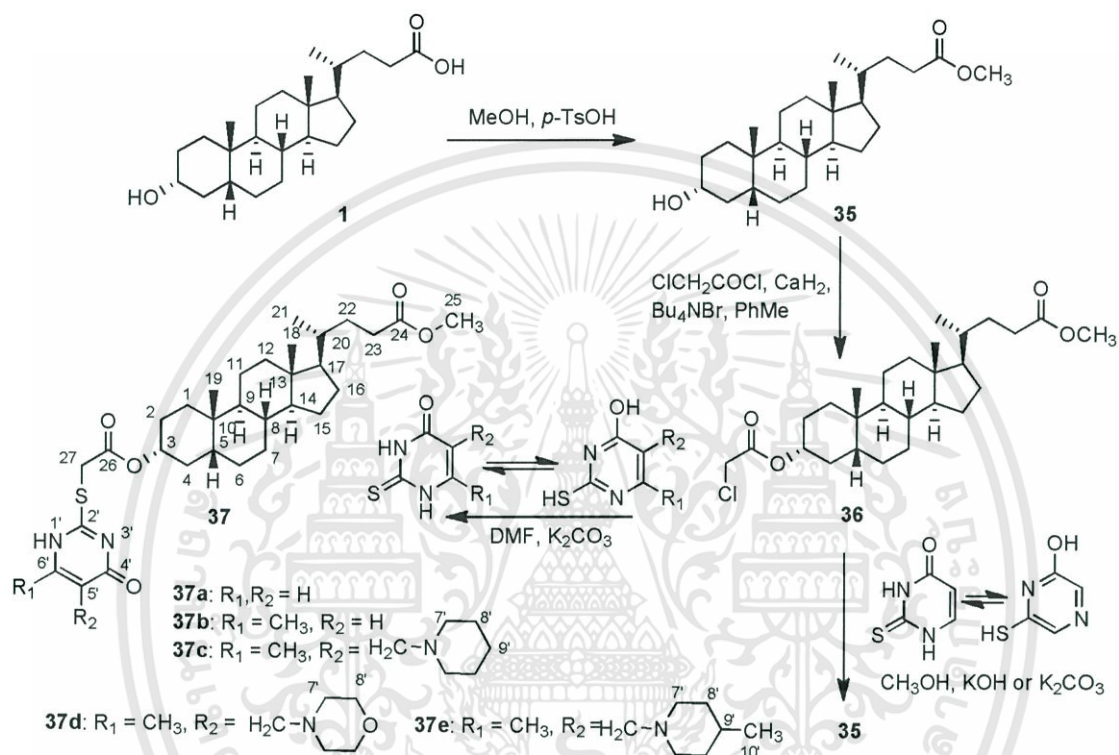


3) Condensation กับ carbonyl compounds ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Spiroannulated oligopyrrole macrocycles 33,34

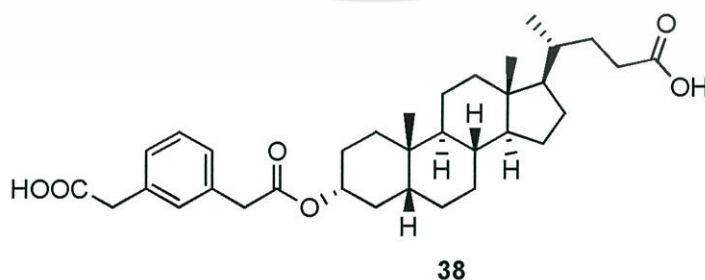


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pospieszny และคณะ[48] ได้ทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ Lithocholic acid **1** ให้เป็น methyl 3a-chloroacetoxy-5b-cholan-24-oate **36** ซึ่งเป็นหมู่แทนที่ (S-lithocholic acid-substituted derivatives) ของ 2-thiouracil **37a**, 6-methyl-2-thiouracil **37b**, 5-morpholinomethyl-6-methyl-2-thiouracil **37c**, 5-piperidinomethyl-6-methyl-2-thiouracil **37d**, และ 5-(4-methylpiperidino) methyl-6-methyl-2-thiouracil **37e** โดยสามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารประกอบ **37a-37e**

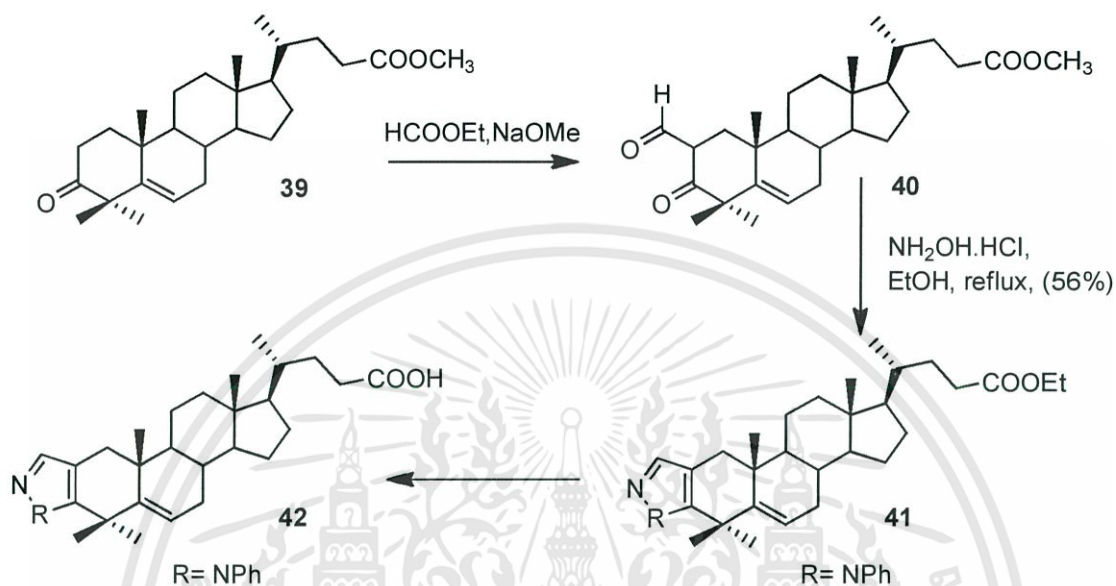


Li Huang, Chin-Ho Chenx และคณะ[7] ได้ทำการศึกษาตัวยับยั้งโปรติเอส (Protease inhibitor) จาก Lithocholic acid **1** พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งโปรติเอส และการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Lithocholic acid พบว่า สาร **38** มีฤทธิ์ในการยับยั้งโปรติเอสมากที่สุด

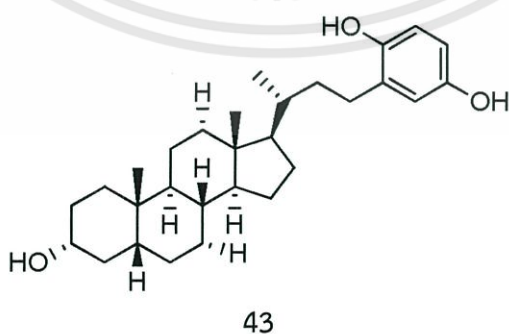


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yang และคณะ[49] ทำการสังเคราะห์และประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพอนุพันธ์ของ 4,4-dimethyl lithocholic acid **39-42** เพื่อศึกษาคุณสมบัติการยับยั้ง protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) พบว่าสารผลิตภัณฑ์ **42** มีคุณสมบัติในการยับยั้ง PTP1B ได้ดีที่สุด ทั้งนี้เพื่อพัฒนาต่อไปเป็นยาใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน

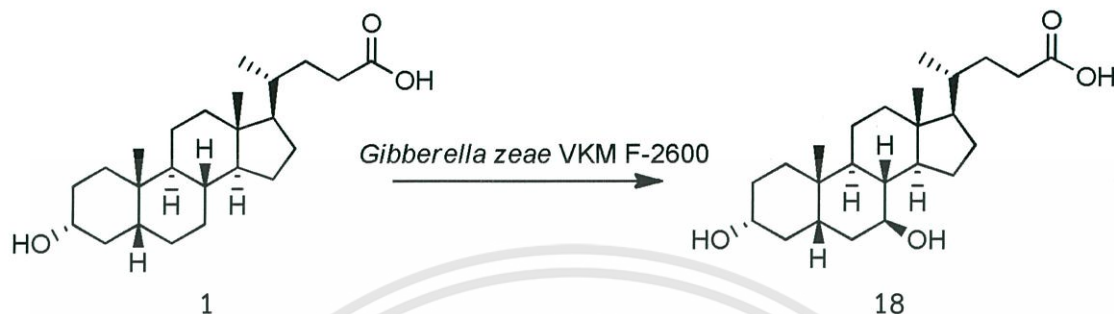


Palermo และคณะ[50] ทำการสังเคราะห์ steroidal quinones และ steroidal hydroquinones จากกรดน้ำดี Chenodeoxycholic acid **15** Lithocholic acid **1** และ Cholic acid **16** โดยวิธี Barton radical decarboxylation และ benzoquinone addition เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับอ่อน (PANC1) และการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* พบว่า 23-Hydroquinoyl-3 α -hydroxy-24-nor-5 β -cholane **43** ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Lithocholic acid **1** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ PANC1 สูงที่สุดแต่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราไม่ดี

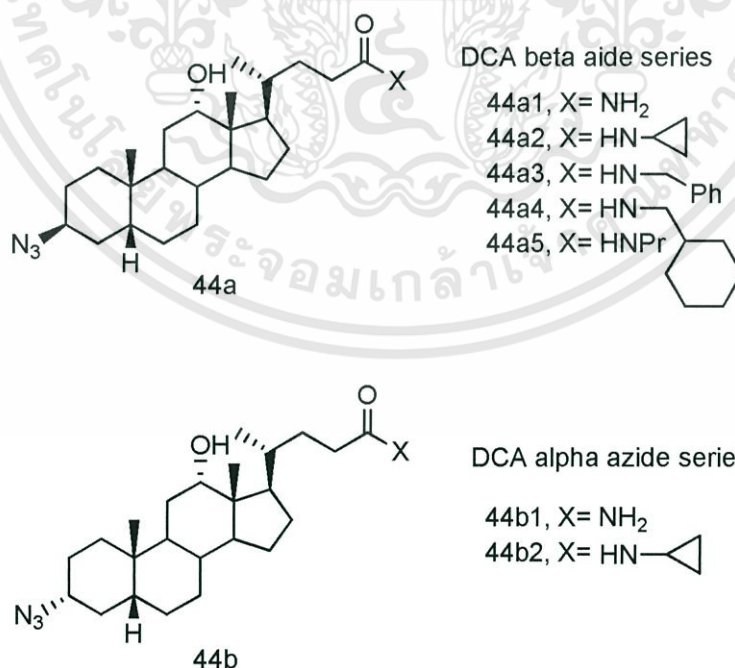


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Donova และคณะ[5] ทำการสังเคราะห์ Ursodeoxycholic acid **18** จาก Lithocholic acid **1** ด้วยปฏิกิริยา hydroxylation ซึ่งทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่ตำแหน่ง 7β โดยใช้ actinobacteria และ filamentous fungi จากนั้นทำเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยา พบว่า *Gibberella zeae* VKM F-2600 ซึ่งเป็น filamentous fungi มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด

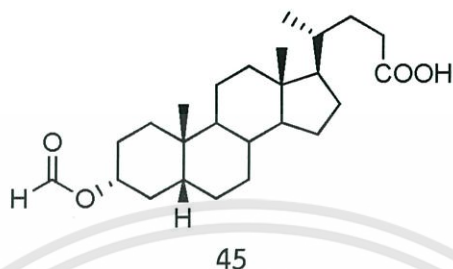


Gilmer และคณะ[8] สังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดน้ำดีที่มีความเป็นพิษสูงจาก Deoxycholic acid **17** Chenodeoxycholic acid **15** และ Lithocholic acid **1** โดยศึกษาผลของการแทนที่ด้วย 3-azido และ 24-amidation และผลของสเตอริโอเคมี ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุลำไส้ใหญ่ (Caco-2) และเซลล์มะเร็งเยื่อบุปอด (HT 1080) ของมนุษย์ พบว่า 3β - และ α -azides ของ DCA cyclopropyl amide **44a2** และ **44b2** มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงที่สุด โดยที่ **44a2** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุปอดของมนุษย์ (HT 1080) สูงสุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ **44b2** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุลำไส้ใหญ่ (Caco-2) สูงสุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

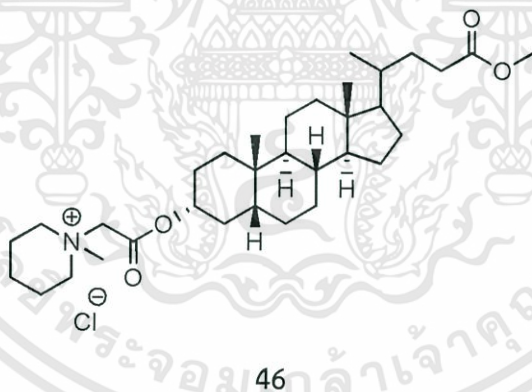


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lemos และคณะ[41] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ Lithocholic acid **1** เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยใช้อนุพันธ์ของ Lithocholic acid **1** ร่วมกับกลุ่มยาต้านแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ Amikacin, Gentamycin และ Neomycin อนุพันธ์ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีที่สุดคือ 3α -formyloxy- 5β -cholan-24-oic acid **45**



Bajaj และคณะ[51] ทำการสังเคราะห์ Lithocholic acid amphiphiles เพื่อศึกษาความแตกต่างของ amphiphiles (ester และ amide linkages) บนโครงสร้างของ Lithocholic acid **1** ที่ส่งผลต่อฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ 3 ชนิด คือ HCT-119, DLD-1 และ HCT-8 พบว่า Lithocholic acid-piperidine (LCA-PIP₁) **46** มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ดีที่สุด ลำดับการออกฤทธิ์ คือ HCT-116 > DLD-1 > HCT-8 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 11.7±3.0, 13.7±1.0, 14.7±3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารสังเคราะห์และการทำโครมาโทกราฟี

1. Anisaldehyde reagent	เกรตวิเคราะห์ PANREA SINTESIS
2. Absolute Ethanol	เกรตวิเคราะห์ CARLO ERBA reagent
3. Benzyl alcohol	เกรตวิเคราะห์ CARLO ERBA reagent
4. Butyl alcohol	เกรตวิเคราะห์ CARLO ERBA reagent
5. Concentrated Sulfuric Acid	CARLO ERBA reagent
6. Cinnamyl alcohol	เกรตวิเคราะห์ Aldrich
7. Dichloromethane (DCM)	เกรตวิเคราะห์ Lab-Scan
8. Distilled Water	
9. Ethyl acetate	เกรตการค้า Zen Point
10. Ethyl alcohol	เกรตวิเคราะห์ CARLO ERBA reagent
11. Ethylene glycol	เกรตวิเคราะห์ Aldrich
12. Hexane	เกรตการค้า Zen Point
13. Isoamyl alcohol	เกรตวิเคราะห์ Fluka
14. Lithocholic acid	เกรตวิเคราะห์ Sigma life science
15. Methyl alcohol	เกรตการค้า Zen Point
16. <i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide (DCC)	เกรตวิเคราะห์ Fluka
17. Pyridine	เกรตวิเคราะห์ Lab-Scan
18. Sea sand	เกรตวิเคราะห์ MERCK
19. Silica gel F60 0.04-0.06 millimeter	Scharlau GE0048
20. Silica gel 0.06-0.2 millimeter	CARLO ERBA reagent
21. Sodium bicarbonate	เกรตวิเคราะห์ CARLO ERBA reagent
22. Sodium chloride	ปรงทิพย์
23. Sodium hydroxide anhydrous	
24. Sodium sulphate anhydrous	เกรตวิเคราะห์ Fisher Scientific
25. 4-Dimethylaminopyridine (DMAP)	เกรตวิเคราะห์ Fluka
26. 4-Methoxybenzyl alcohol	เกรตวิเคราะห์ Aldrich
27. 4-Nitrobenzyl alcohol	เกรตวิเคราะห์ Aldrich

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

1. Dimethylsulfoxide (DMSO)	เกรตวิเคราะห์ Amresco
2. Ethyl alcohol	เกรตวิเคราะห์ VWR International
3. Gentamicin	T.P. Drug Laboratories

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Mitomycin C	Kyowa
5. Phosphate buffered saline (PBS)	Amresco
6. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 ยี่ห้อ Gibco	
7. Serum (fetal bovine serum)	Gibco
8. Sodium bicarbonate	เกอร์ดิไคราะห์ ยี่ห้อ Carlo Erba
9. Trypan blue 0.4%	Gibco
10. Trypsin/EDTA 0.25%	Gibco
11. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	

Invitrogen

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

1. Chloroform	เกอร์ดิไคราะห์ VWR International
2. Dichloromethane	เกอร์ดิไคราะห์ VWR International
3. Gentamicin	T.P. Drug Laboratories
4. Methanol	เกอร์ดิไคราะห์ VWR International
5. Muerller Hinton Agar (MHA)	HIMEDIA
6. Normal saline solution 0.85%	Klean & Kare
7. Nutrient Agar (NA)	HIMEDIA

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.1 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้เตรียมสารส่งเคราะห์และการทำโครมาโทกราฟี

1. กรวยกรอง (Funnel)
2. กรวยแยก (Separator funnel) ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. กระดาษกรอง (Filter paper) ADVANTEC เบอร์ 2
4. กระดาษชั่งสาร (Weighing papers)
5. กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร
6. ขวดก้นกลม (Round-bottomed flask) ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร
7. ขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก (Vial)
8. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
9. เครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาให้ความร้อน (Hot plate & Stirrer)
10. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance) METTLER TOLEDO
11. เครื่องดูคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร
12. เครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มมิกโรเคิลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกะเฮิร์ต
13. เครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX 60237
14. เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ Finnigan LC-Q MS detector ด้วยเทคนิค Electrospray
15. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) BüCHI รุ่น Rotavapor R-

114

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16. เครื่องหาจุดหลอมเหลว GALLEKAMP SANYO
17. คอลัมน์แก้ว (Glass column)
18. ช้อนตักสาร (Spatula)
19. แท่งแก้ว (Glass rod)
20. แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)
21. นาฬิกาจับเวลา (Stop watch)
22. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร
23. ปากคีบ (Forceps)
24. แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC aluminium sheets, silica gelF254,

MERCK)

25. ยูนิเวอร์แซลอินดิเคเตอร์ (Universal indicator)
26. สำลี (Cotton)
27. หลอดคาพิลลารี (Capillary tube)
28. หลอดหยด (Dropper)
29. หลอดทดลอง (Test tube)

3.2.2 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

1. กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)
2. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted light microscope)
3. ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (TC-flask) มีพื้นที่ผิวเท่ากับ 25 ตารางเซนติเมตร
4. เครื่องนับเซลล์ (Cell counter)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)
6. เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Micro plate reader)
7. จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plate)
8. ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (Laminar air flow)
9. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิและคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator)
10. ปิเปตแก้วปลอดเชื้อ ขนาด 5 มิลลิลิตร
11. ปิเปตดูดสารอัตโนมัติ (Automatic micro pipette)
12. ปิเปตทิป (Pipette tip) ขนาด 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
13. หลอดปั่นแยกสาร (Microcentrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
14. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) และแผ่นปิดสไลด์ (cover slip)

3.2.3 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

1. เครื่องชั่งน้ำหนัก สี่ตำแหน่ง (balance)
2. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
4. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow)
5. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator)
6. ปากคีบ (Forceps)
7. แผ่นทดสอบ (paper disc) ของ Whatman ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. ไมโครปิเปตขนาด 2-20 ไมโครลิตร (micropipette)
9. ไมโครปิเปตขนาด 100-1000 ไมโครลิตร
10. ไม้พันสำลี (sterile cotton sab)
11. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
12. เวอร์เนียร์แคลิเปอร์ (Vernier)
13. หม้อนึ่งอัตโนมัติ (autoclave)

3.3 การทดลองทั่วไป

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารได้แก่ dichloromethane (DCM) นำมาใช้โดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์ (เกรดวิเคราะห์ Lab-Scan) ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้แก่ hexane, ethyl acetate และ methanol (เกรดการค้า, Zen point) นำมาผ่านกระบวนการกลั่นเพื่อให้บริสุทธิ์ก่อนการใช้งาน สารเคมีที่ใช้เป็นสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ในการสังเคราะห์เป็นเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Fluka และ Aldrich ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น

ตัวทำละลาย pyridine (เกรดวิเคราะห์, Lab scan) ที่ใช้ในการทดลอง ถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นที่อุณหภูมิ 115 – 116 องศาเซลเซียส และเติม Sodium hydroxide anhydrous เพื่อดูดน้ำ ระยะเวลาในการใช้ 30 วัน

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

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

สเปกตรัม ¹H NMR และ ¹³C NMR บันทึกโดยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกะเฮิร์ต การเตรียมสารตัวอย่างจะทำการละลายโดยใช้ตัวทำละลาย CDCl₃ และ CD₃OD จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ CHCl₃ ที่ δ 7.25 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹H NMR และที่ δ 77.5 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹³C NMR และ CH₃OH ที่ δ 4.80 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹H NMR และที่ δ 49.0 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹³C NMR

จุดหลอมเหลวบันทึกโดยเครื่องหาจุดหลอมเหลว GALLEKAMP SANYO

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

แมสสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ Finnigan LC-Q MS detector ด้วยเทคนิค Electrospray จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง

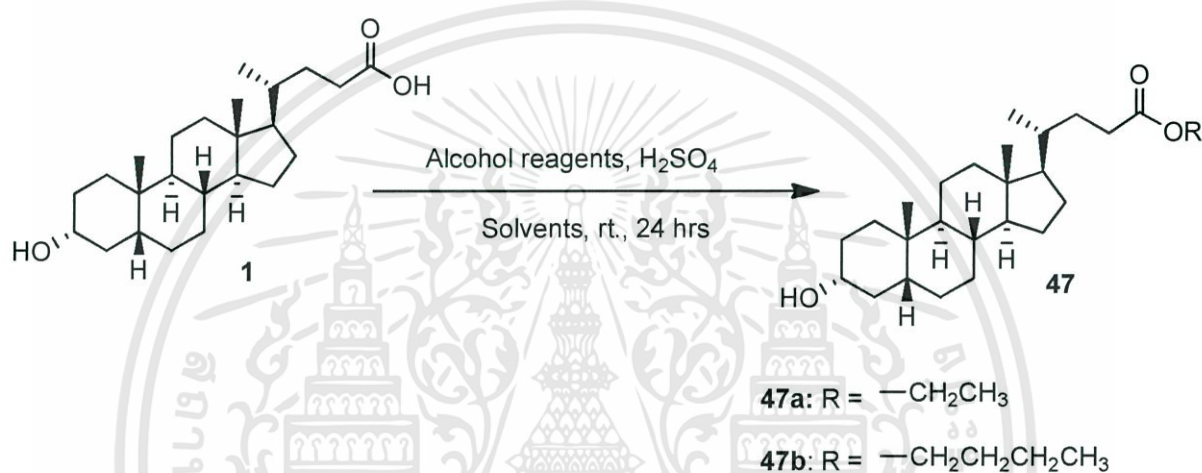
3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิกโดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

3.4.1.1 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ Sulfuric acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

Lithocholic acid 1 เป็นสารตั้งต้น โดยทำการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-24 โดยใช้สารเข้าทำปฏิกิริยาเป็นตัวทำละลาย ได้แก่ ethyl alcohol และ butyl alcohol ตามลำดับ

แผนภาพที่ 3.1



1. ชั่ง Lithocholic acid 1 200.0 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล) ละลายด้วย ethyl alcohol ในขวดก้นกลม ทำการปั่นกวนอย่างต่อเนื่องจนกระทั่ง Lithocholic acid 1 ละลายหมด
2. ค่อยๆ หยด Conc. sulfuric acid 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม ethyl alcohol ปริมาณมากเกินไป 10 เท่าของสารตั้งต้น และทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคThin layer chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ Lithocholic acid 1 โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงบนแผ่น TLC หากพบว่าจุดของผลิตภัณฑ์ไม่มีสารตั้งต้นเจือปนหรือเจือปนน้อยที่สุดแสดงว่าเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว
4. หยุดการปั่นกวนและนำสารผสมที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้ของผสมที่เป็นของเหลว จากนั้นทำการสกัดด้วยปฏิกิริยากรดเบส โดยเติม ethyl acetate เพื่อละลายสาร เเทสารลงในกรวยแยก
5. เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และเติมสารละลายอิมิตัว sodium bicarbonate 25 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก แล้วเขย่ากรวยแยกพร้อมระบายแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) จากกรวยแยก และตั้งไว้ให้เกิดการแยกชั้นของชั้น ethyl acetate และชั้นสารละลายอิมิตัว sodium bicarbonate จากนั้นไขชั้นน้ำทิ้ง ตรวจสอบชั้น ethyl acetate ด้วยยูนิเวอร์แซลอินดิเคเตอร์ ทำการสกัดแยกซ้ำด้วยสารละลายอิมิตัว sodium bicarbonate จนกว่าค่า pH เป็นกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ทำการสกัดล้างชั้น ethyl acetate โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก แล้วค่อยๆ เขย่ากรวยแยก ตั้งไว้รอให้เกิดการแยกชั้น และปล่อยให้ชั้นน้ำที่

7. เติมน้ำสารละลายอิ่มตัว sodium chloride 25 มิลลิลิตร เพื่อขจัดน้ำออก เขย่า และตั้งไว้รอให้เกิดการแยกชั้น ไซ้ชั้นสารละลายอิ่มตัว sodium chloride ที่ ส่วนชั้น ethyl acetate เก็บไว้ในขวดรูปชมพู่ที่แห้ง

8. เติมน้ำ Sodium sulphate anhydrous ลงขวดรูปชมพู่ในข้อ 7 เพื่อดูดน้ำที่เหลือออกจากชั้น ethyl acetate พร้อมกับแกว่งขวดรูปชมพู่เบาๆ จนกระทั่งชั้น ethyl acetate ใส และทำการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 ลงในขวดก้นกลม

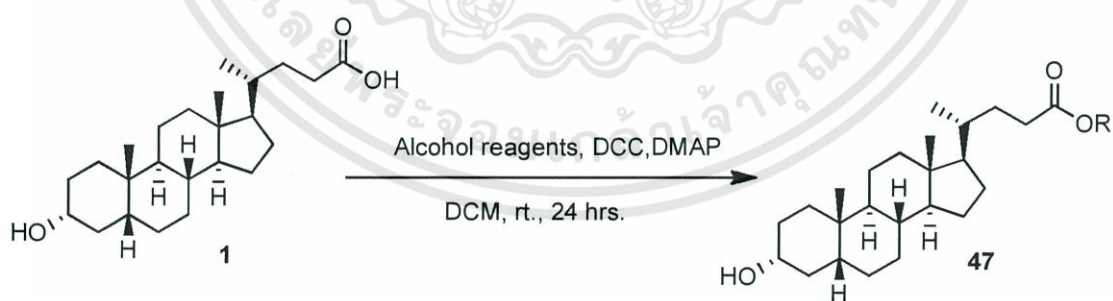
9. นำสารผสมในขวดก้นกลมไปทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้สารผลิตภัณฑ์ในรูปของเหลวคล้ายน้ำมัน เก็บตัวอย่างส่วนหนึ่ง เพียงเล็กน้อยไว้ในขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก อีกส่วนหนึ่งนำมาคลุกด้วย silica gel ขนาด 0.06-0.2 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้จนแห้งที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

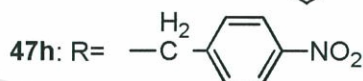
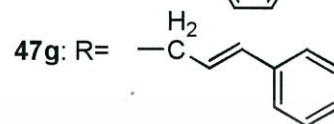
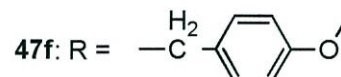
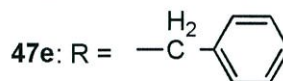
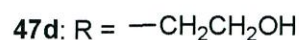
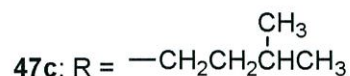
10. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1 ถึง 9 เปลี่ยนสารเข้าทำปฏิกิริยาเป็น butyl alcohol

3.4.1.2 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ 1,3-Dicyclocarbodiimide (DCC) เป็นรีเอเจนต์

Lithocholic acid **1** เป็นสารตั้งต้น โดยทำการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-24 โดยใช้ DCC เป็นรีเอเจนต์ทำหน้าที่กระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลให้ว่องไวต่อปฏิกิริยา และทำปฏิกิริยาคู่ควบ (Coupling reaction) กับ isoamyl alcohol, ethylene glycol, benzyl alcohol, 4-methoxybenzyl alcohol, cinnamyl alcohol และ 4-nitrobenzyl alcohol

แผนภาพที่ 3.2





1. ชั่ง Lithocholic acid 1 200.0 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล) ลงในขวดก้นกลม จากนั้นเติม DCM 5 มิลลิลิตร ปั่นจนจนกระทั่ง Lithocholic acid 1 ละลายหมด

2. เติม DMAP 6.8 มิลลิกรัม (0.053 มิลลิโมล) จากนั้นเติม isoamyl alcohol 46.7 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล) และลดอุณหภูมิของปฏิกิริยาลงเหลือ 4 องศาเซลเซียส

3. ชั่ง DCC 109.4 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล) ละลายใน DCM 3 มิลลิลิตร และค่อยๆ หยดลงในขวดก้นกลม ปั่นจนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที จากนั้นปั่นจนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้อง

4. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร จากนั้นเปรียบเทียบกับ Lithocholic acid 1 โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงบนแผ่น TLC หากพบว่าจุดของผลิตภัณฑ์ไม่มีสารตั้งต้นเจือปนหรือเจือปนน้อยที่สุดแสดงว่าเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว

5. หยุดการปั่นจน ทำการกรองเพื่อแยกยูเรีย จากนั้นระเหยสารผสมด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้ของผสมที่เป็นของแข็ง

6. เก็บตัวอย่างส่วนหนึ่งเพียงเล็กน้อยไว้ในขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก อีกส่วนหนึ่งนำมาคลุกด้วย silica gel ขนาด 0.06-0.2 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้จนแห้งที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

7. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1 ถึง 5 แต่เปลี่ยนสารเข้าทำปฏิกิริยาเป็น ethylene glycol 32.9 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล), benzyl alcohol 57.3 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล), 4-methoxybenzyl alcohol 73.2 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล), cinnamyl alcohol 71.1 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล) และ 4-nitrobenzyl alcohol 81.2 มิลลิกรัม (0.53 มิลลิโมล)

3.4.1.3 การทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

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

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

เตรียมไว้ในข้อ 1 มาบรรจุลงในคอลัมน์ในระดับ $\frac{1}{2}$ ของคอลัมน์ พร้อมกับใช้ตัวทำละลาย hexane ออกจากคอลัมน์

3. จากนั้นใช้ลูกลียงเคาะคอลัมน์เพื่อปรับผิวหน้า silica gel ให้เรียบ

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

5. บรรจุสารผสมที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.4.1.1 และ 3.4.1.2 ลงในคอลัมน์ ทำการแยกสารผสมให้บริสุทธิ์ โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate โดยมีอัตราส่วนของตัวทำละลายผสมเป็น 100 มิลลิลิตร ใช้ตัวทำละลายชะคอลัมน์โดยเริ่มต้นจากสารละลายไม่มีขี้ขี้คือ hexane จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายผสม โดยเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวทำละลายผสม hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5, 90 : 10, 85 : 15 โดยปริมาตร ตามลำดับ เก็บสารที่ได้จากการเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวทำละลายผสมลงในหลอดทดลอง

6. ตรวจสอบสารที่ได้จากคอลัมน์ด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 โดยปริมาตร ตรวจสอบการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เคลือบด้วย anisaldehyde reagent และให้ความร้อนเปรียบเทียบจุดของสารที่ได้กับตัวอย่างสารผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ในข้อ 3.4.1.2.6 โดยพิจารณาจากค่า R_f ซึ่งจะมีค่าเดียวกัน

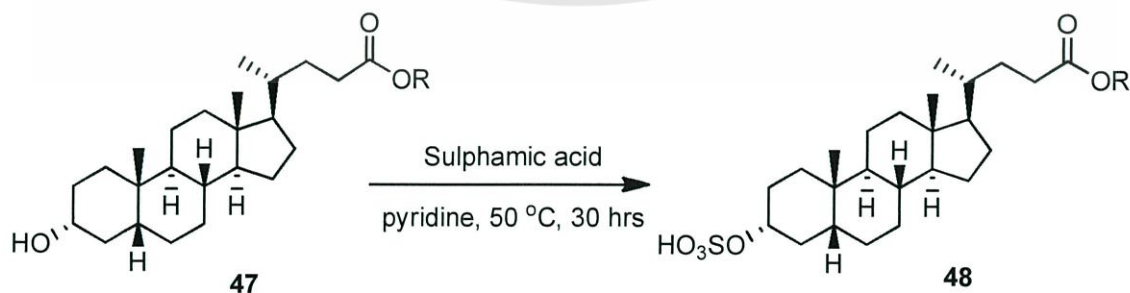
7. เก็บสารที่ตรวจพบผลิตภัณฑ์ไว้ในขวดกันกลม นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นนำสารผลิตภัณฑ์ไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3.4.2 การสังเคราะห์สารประกอบซัลเฟตของอนุพันธ์กรดลิโทโคคลิกโดยการทำปฏิกิริยาซัลเฟชัน

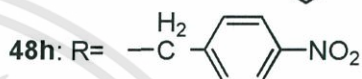
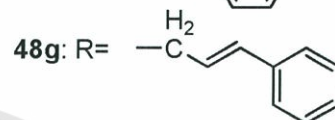
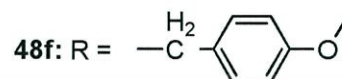
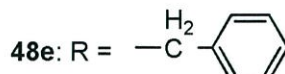
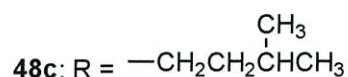
3.4.2.1 การสังเคราะห์สารประกอบซัลเฟตของอนุพันธ์กรดลิโทโคคลิก

ใช้สารประกอบเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 3.4.1 คือสาร 47 เป็นสารตั้งต้น โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 เป็นหมู่ซัลเฟต

แผนภาพที่ 3.3



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



1. ชั่ง Ethyl 3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oate 47a 150 มิลลิกรัม (0.37 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลม จากนั้น pyridine 5 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวนจนกระทั่ง 47a ละลายหมด

2. เติม sulphamic acid 181.4 มิลลิกรัม (1.85 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ในข้อ 1 และทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ 47a สังเกตการเกิดปฏิกิริยาโดยพิจารณาจุดของสารตั้งต้นเจอจากมากที่สุดและไม่มีการเปลี่ยนแปลง

4. หยุดการปั่นกวน ระบาย pyridine ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวจากนั้นนำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปละลายด้วย methanol เก็บตัวอย่างส่วนหนึ่งเพียงเล็กน้อยไว้ในขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก อีกส่วนหนึ่งนำมาคลุกด้วย silica gel ขนาด 0.06-0.2 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้จนแห้งที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

5. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1 ถึง 4 แต่เปลี่ยนสารตั้งต้น ควบคู่กับ sulphamic acid ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารตั้งต้นและ sulphamic acid ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

สารตัวอย่าง	สารตั้งต้น		Sulphamic acid	
	มิลลิกรัม (mg)	มิลลิโมล (mmol)	มิลลิกรัม (mg)	มิลลิโมล (mmol)
47b	150	0.35	171.6	1.75
47c	150	0.34	166.7	1.70
47d	150	0.37	171.6	1.75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1(ต่อ) ปริมาณสารตั้งต้นและ sulphamic acid ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

สารตัวอย่าง	สารตั้งต้น		Sulphamic acid	
	มิลลิกรัม (mg)	มิลลิโมล (mmol)	มิลลิกรัม (mg)	มิลลิโมล (mmol)
47e	150	0.32	156.9	1.60
47f	150	0.30	147.1	1.50
47g	150	0.30	147.1	1.50
47h	150	0.29	142.2	1.45

3.4.2.2 การทำให้สารอนุพันธ์ซิลเฟตบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

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

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

3. จากนั้นใช้ลูกยางเคาะคอลัมน์เพื่อปรับผิวหน้า silica gel ให้เรียบ

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

5. บรรจุสารผสมที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.4.2.1 ลงในคอลัมน์ ทำการแยกสารผสมให้บริสุทธิ์ โดยใช้ hexane : ethyl acetate : methanol โดยที่ผลรวมของอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เริ่มต้นจากชะคอลัมน์ด้วย hexane จากนั้นเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 70 : 30 และ 60 : 40 แล้วค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นโดยใช้ methanol อัตราส่วน hexane : ethyl acetate : methanol เท่ากับ 65 : 30 : 5 และ 60 : 30 : 10, 55 : 30 : 15 และ 50 : 30 : 20 ตามลำดับ

6. ตรวจสอบสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารตั้งต้นพิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R_f เดียวกัน การดูจุดคลื่นรังสีอัตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และการให้สีกับ anisaldehyde reagent โดยสีเดียวกันให้เก็บรวมไว้ด้วยกันในขวดกันกลม

7. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดกันกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. นำสารผลิตภัณฑ์มาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line)
2. เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line)
3. เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 (Human hepatocellular carcinoma cell line)
4. เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line)
5. เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูชนิด P388 (Murine leukemia cell line)
6. เซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney)

โดยขั้นตอนการทดลองดัดแปลงมาจาก Mosmann[52] ซึ่งใช้วิธี MTT assay สามารถสรุปการทดลองได้ดังนี้

1. เตรียมเซลล์ไลน์ที่ต้องการทดสอบในอาหาร RPMI 1640 เสริมด้วย 8% FBS โดยเฉพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร คำนวณปริมาตรเซลล์มีชีวิต (V_1) เพื่อใช้ทดสอบให้เพียงพอกับการทดลองแต่ละครั้ง โดยให้จำนวนเซลล์มีชีวิต (C_2) ของเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero เท่ากับ 1.6×10^5 , 1.5×10^5 , 1.6×10^5 , 1.8×10^5 , 1×10^5 และ 1.5×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากสมการ $C_1 V_1 = C_2 V_2$ เมื่อ C_1 เท่ากับจำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตรใน stock และ V_2 เท่ากับปริมาตรที่ต้องการใช้

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

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

4. เตรียมสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นในการทดสอบเบื้องต้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero เพื่อให้ทราบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารตัวอย่าง เมื่อพบว่าสารตัวอย่างมีความเป็นพิษต่อเซลล์ จากนั้นทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 1,000, 500, 250 และ 125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ หรือทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50})

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

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

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

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

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

10. คำนวณหาค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%cytotoxicity) ของแต่ละความเข้มข้น ดังนี้

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

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น

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

11. นำผลการคำนวณค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) บันทึกลงในตารางเพื่อนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (CC₅₀)

3.4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion method

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุพันธ์ของกรดิลโทโคลิก ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วย 8 ชนิด จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 5 ชนิด คือ *B. cereus* DMST 5040, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, *S. aureus* TISTR 1466 และ *S. epidermidis* ATCC 12228 แบคทีเรียแกรมลบ 3 ชนิด คือ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. typhimurium* DMST 0562 ซึ่งวิธีการทดสอบดัดแปลงมาจาก Clinical and Laboratory Standards Institute[53] สรุปได้ดังนี้

3.4.4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

1. นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *B. cereus* DMST 5040, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, *S. aureus* TISTR 1466, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. typhimurium* DMST 0562 ที่เก็บใน Stock culture มาเชื้อให้เป็นโคลนเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. ใช้ห่วงเย็บเชื้อ (loop) 3-5 โคลน เชื้อลงบนอาหาร NA อีกครั้ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3. นำแบคทีเรียที่บ่มไว้มาเจือจางด้วยสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4. ปรับค่าความขุ่นของเชื้อให้มีค่าเท่ากับค่ามาตรฐาน McFarland 0.5 (มีจำนวนเซลล์ 1.5×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร)

3.4.4.2 การเตรียมสารละลายของสารอนุพันธ์

เตรียมสารละลายของสารอนุพันธ์ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลายอนุพันธ์เอสเทอร์และใช้ chloroform-methanol เป็นตัวทำละลายอนุพันธ์เอสเทอร์ซัลเฟต

3.4.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารอนุพันธ์

ใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์

1. ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการการฆ่าเชื้อแล้ว (sterile cotton sab) ชุบสารละลายของแบคทีเรียที่ได้ทำการเจือจางไว้
2. นำมาป้าย (swab) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar (MHA) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง
3. บีบสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรต่อดิสก์ โดยจะมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ หยดลงบนกระดาษกรอง (paper disc) ที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง
4. นำแผ่นดิสก์ที่เตรียมไว้วางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 5 ตำแหน่งต่อหนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ DCM และ chloroform-methanol เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin ปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)
5. นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
6. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้น

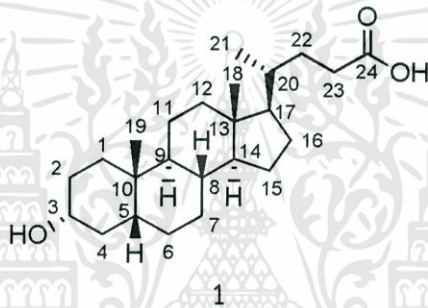
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

งานวิจัยนี้ศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Lithocholic acid 1 โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันหลักที่คาร์บอนตำแหน่ง 24 (C-24) จากหมู่คาร์บอกซิลเป็นหมู่เอสเทอร์ และคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) จากหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ซัลเฟต และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้

4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิกโดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นคือ Lithocholic acid 1 ทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR ได้ผลดังนี้



Barnes และคณะ[54] ได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างของ Lithocholic acid 1 โดยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่า สัญญาณ ^1H NMR (300.1 MHz, CDCl_3 -dimethylsulfoxide- d_6 4:1 (v/v)) : δ 1.75 และ 0.94 (2H, H-1), 1.60 และ 1.29 (2H, H-2), 3.51 (1H, H-3), 1.71 และ 1.45 (2H, H-4), 1.35 (1H, H-5), 1.83 และ 1.23 (2H, H-6), 1.39 และ 1.09 (2H, H-7), 1.38 (1H, H-8), 1.41 (1H, H-9), 1.38 และ 1.23 (2H, H-11), 1.96 และ 1.14 (2H, H-12), 1.05 (1H-14), 1.56 และ 1.04 (2H, H-15), 1.85 และ 1.27 (2H, H-16), 1.10 (1H, H-17), 0.64 (3H, H-18), 0.91 (3H, H-19), 1.41 (1H, H-20), 0.92 (3H, H-21), 1.75 และ 1.29 (2H, H-22), 2.32 และ 2.12 (2H, H-23) ; ^{13}C NMR (15000 Hz) : δ 35.3 (C-1), 30.3 (C-2), 70.5 (C-3), 36.3 (C-4), 41.9 (C-5), 27.1 (C-6), 26.3 (C-7), 35.6 (C-8), 40.2 (C-9), 34.2 (C-10), 20.6 (C-11), 40.0 (C-12), 42.4 (C-13), 56.3 (C-14), 24.0 (C-15), 28.0 (C-16), 55.8 (C-17), 11.9 (C-18), 23.3 (C-19), 35.1 (C-20), 18.2 (C-21), 30.9 (C-22), 30.9 (C-23) และ 178.1 (C-24) เมื่อนำข้อมูลเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ ^1H NMR และ ^{13}C NMR กับ Lithocholic acid 1 มาตรฐานจากบริษัท Sigma life science ได้ผล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับข้อมูลของ Barnes และคณะ [45] ดังนี้ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ 1.80 และ 0.93 (2H, H-1), 1.66 และ 1.29 (2H, H-2), 3.65 (1H, H-3), 1.72 และ 1.50 (2H, H-4), 1.40 (1H, H-5), 1.83 และ 1.29 (2H, H-6), 1.40 และ 1.09 (2H, H-7), 1.40 (1H, H-8), 1.40 (1H, H-9), 1.40 และ 1.19 (2H, H-11), 1.95 และ 1.16 (2H, H-12), 1.09 (1H-14), 1.55 และ 0.97 (2H, H-15), 1.83 และ 1.32 (2H, H-16), 1.12 (1H, H-17), 0.66 (3H, H-18),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.95 (3H, H-19), 1.40 (1H, H-20), 0.95 (3H, H-21), 1.80 และ 1.32 (2H, H-22), 2.42 และ 2.27 (2H, H-23) และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) : δ 35.3 (C-1), 30.5 (C-2), 71.9 (C-3), 36.4 (C-4), 42.1 (C-5), 27.2 (C-6), 26.4 (C-7), 35.9 (C-8), 40.5 (C-9), 34.9 (C-10), 20.8 (C-11), 40.2 (C-12), 42.8 (C-13), 56.5 (C-14), 24.2 (C-15), 28.2 (C-16), 56.0 (C-17), 12.1 (C-18), 23.4 (C-19), 35.3 (C-20), 18.2 (C-21), 30.8 (C-22), 30.7 (C-23) และ 178.4 (C-24)

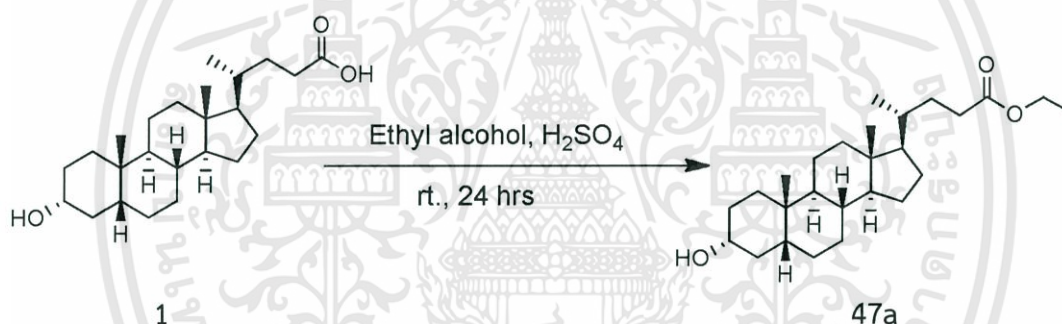
ดังนั้นการรายงานโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 47a-47h และ 48a-48h ด้วยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR จึงถูกนำมาเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ Lithocholic acid 1 จากนั้นรายงานผล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์เฉพาะตำแหน่งของสัญญาณเรโซแนนซ์ที่เปลี่ยนแปลง

4.1.1 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ Sulfuric acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

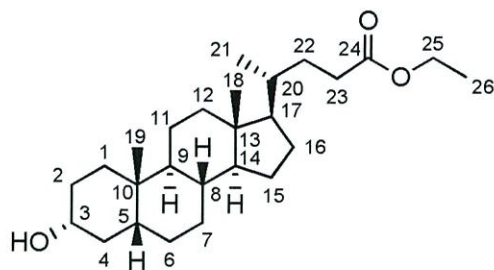
4.1.1.1 การสังเคราะห์ Ethyl 3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oate 47a

สาร 47a เตรียมจากการนำ Lithocholic acid 1 ทำปฏิกิริยากับ ethyl alcohol โดยใช้ sulfuric acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

แผนภาพที่ 4.1



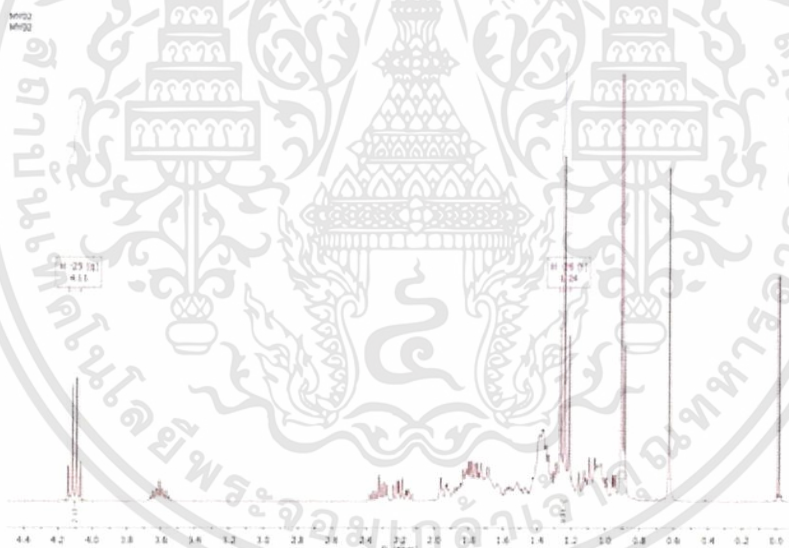
ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.43 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 94-97 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 58.34 (คำนวณเทียบจาก Lithocholic acid 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3353 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 2934 (C-H stretching ของ CH_2), 2865 (C-H stretching ของ CH_3), 1737 (C=O stretching), 1448 (C-H bending ของ CH_2, CH_3), 1375 (C-H bending ของ CH_3) และ 1174 (C-O stretching ของ ester)



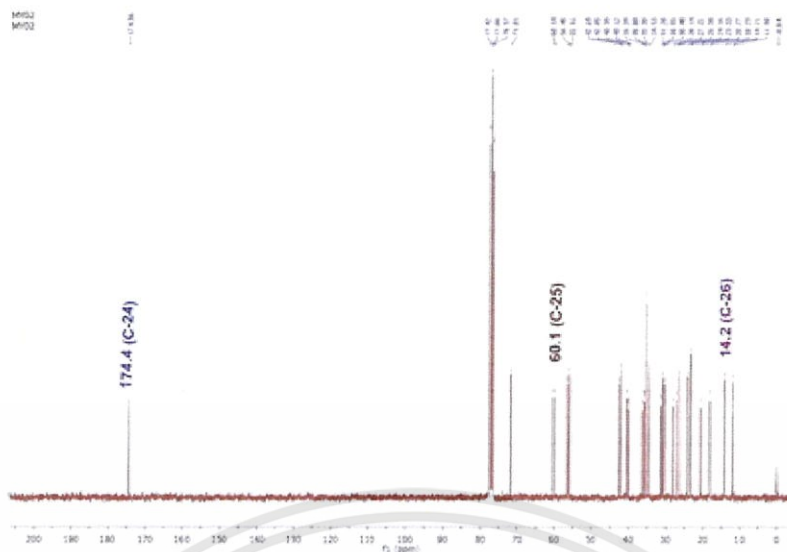
47a

สเปกตรัม ^1H NMR (300.1 MHz, CDCl_3) ของสาร 47a พบสัญญาณที่ δ 4.11 (2H, q, $J_{25,26} = 7.0$ Hz, OCH_2) และ 1.24 (3H, t, $J_{26,25} = 7.1$ Hz, CH_3) และโปรตอนที่อยู่ ในช่วง δ เท่ากับ 1.96 ถึง 0.95 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูป ที่ 4.1 และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 47a พบสัญญาณที่ δ 174.4 (C-24), 60.1 (OCH_2) และ 14.2 (CH_3) ดังรูปที่ 4.2

ES-MS : $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_3$ Calcd. 404.33 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 373.2 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$)

รูปที่ 4.1 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

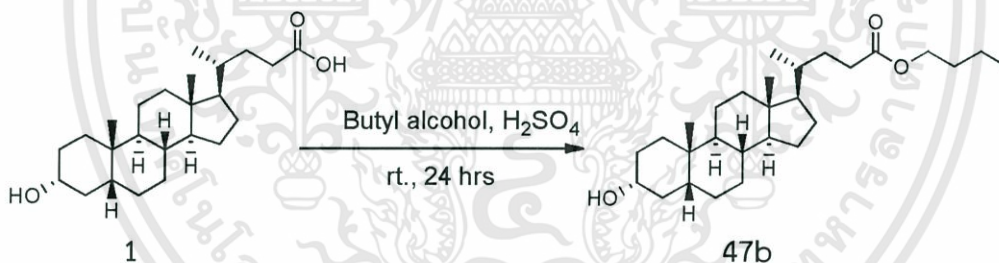


รูปที่ 4.2 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47a

4.1.1.2 การสังเคราะห์ Butyl 3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oate 47b

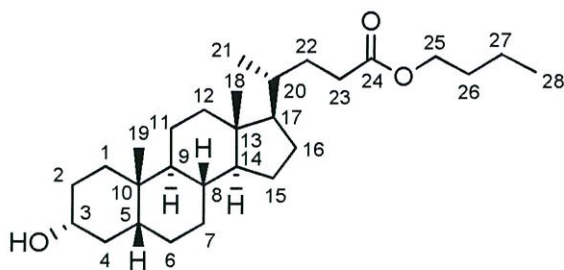
สาร 47b เตรียมจากการนำ Lithocholic acid 1 ทำปฏิกิริยากับ butyl alcohol โดยใช้ sulfuric acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

แผนภาพที่ 4.2



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.57 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 82-85 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 65.60 (คำนวณเทียบจาก Lithocholic acid 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3353 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 2934 (C-H stretching ของ CH_2), 2865 (C-H stretching ของ CH_3), 1738 (C=O stretching), 1449 (C-H bending ของ CH_2, CH_3), 1377 (C-H bending ของ CH_3) และ 1170 (C-O stretching ของ ester)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



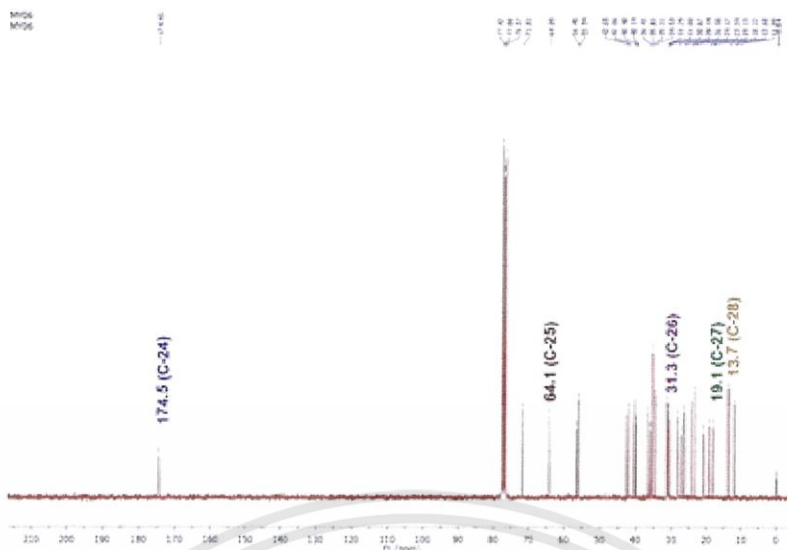
47b

สเปกตรัม ^1H NMR (300.1 MHz, CDCl_3) ของสาร 47b พบสัญญาณที่ δ 4.05 (2H, t, $J_{25,26} = 6.7$ Hz, OCH_2), 1.62-1.56 (2H, m, H-26), 1.30-1.24 (2H, m, H-27) และ 0.90 (2H, t, $J = 6.3$ Hz, H-28) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.97 ถึง 1.00 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.3 และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 47b พบสัญญาณที่ δ 174.5 (C-24), 64.1 (C-25), 31.3 (C-26), 19.1 (C-27) และ 13.7 (C-28) ดังรูปที่ 4.4

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

รูปที่ 4.3 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



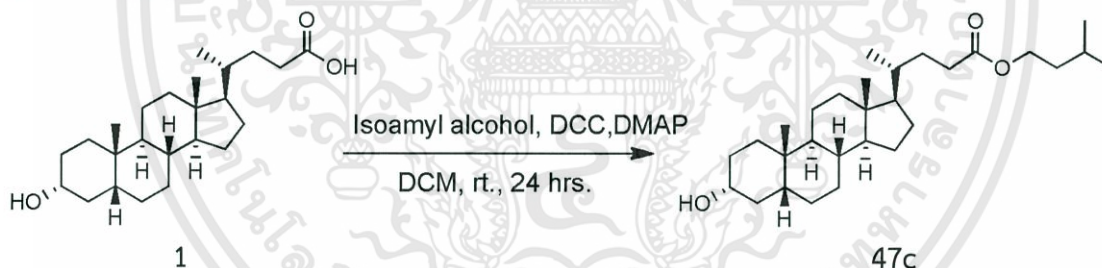
รูปที่ 4.4 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47b

4.1.2 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ 1,3-Dicyclocarbodiimide (DCC) เป็นรีเอเจนต์

4.1.2.1 การสังเคราะห์ Isoamyl 3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oate 47c

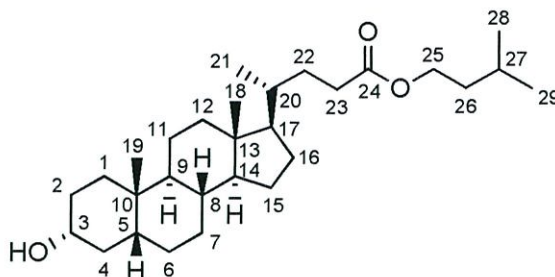
สาร 47c เตรียมจากการนำ Lithocholic acid 1 ทำปฏิกิริยากับ isoamyl alcohol โดยใช้ DCC เป็นรีเอเจนต์

แผนภาพที่ 4.3



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.40 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 70-73 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 32.76 (คำนวณเทียบจาก Lithocholic acid 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3351 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 2933 (C-H stretching ของ CH_2), 2866 (C-H stretching ของ CH_3), 1738 (C=O stretching), 1449 (C-H bending ของ CH_2, CH_3), 1368 (C-H bending ของ CH_3) และ 1167 (C-O stretching ของ ester)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



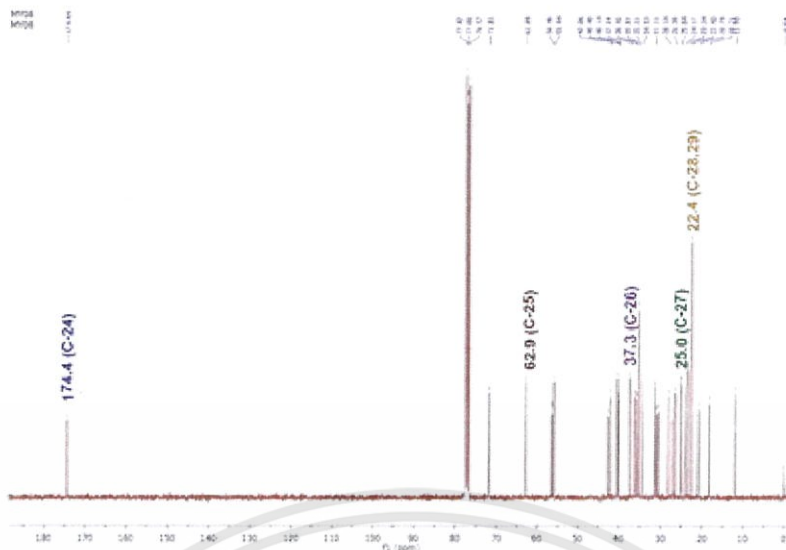
47c

สเปกตรัม ^1H NMR (300.1 MHz, CDCl_3) ของสาร 47c พบสัญญาณที่ δ 4.08 (2H, t, $J_{25,26} = 6.8$ Hz, OCH_2), 1.50 (2H, q, $J_{26,25} = 6.8$ Hz, H-26), 1.98-1.90 (1H, m, H-27) และ 1.07 (6H, d, $J_{28,29} = 6.9$ Hz, H-28,29) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.90 ถึง 1.00 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.5 และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 47c พบสัญญาณที่ δ 174.4 (C-24), 62.9 (C-25), 37.3 (C-26), 25.0 (C-27), 22.4 (C-28) และ 22.4 (C-29) ดังรูปที่ 4.6

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

รูปที่ 4.5 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47c

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

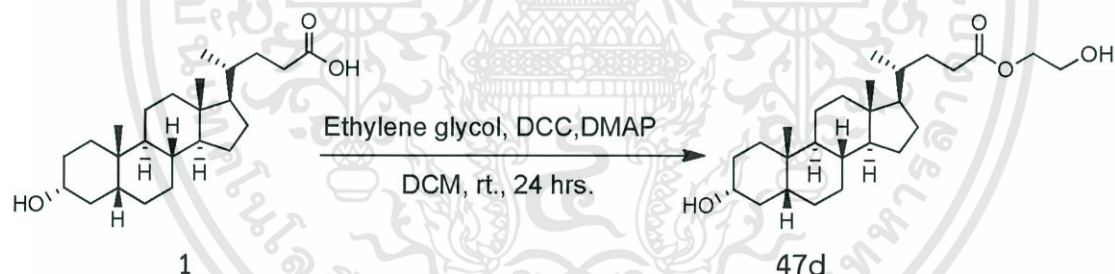


รูปที่ 4.6 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47c

4.1.2.2 การสังเคราะห์ Hydroxyethyl 3α -hydroxy- 5β -cholan-24-oate 47d

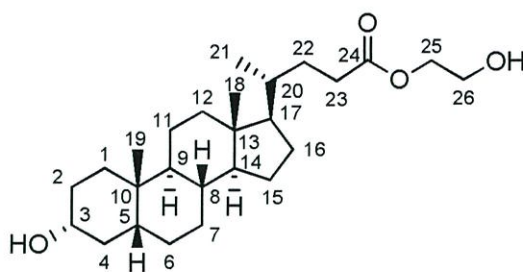
สาร 47d เตรียมจากการนำ Lithocholic acid **1** ทำปฏิกิริยากับ ethylene glycol โดยใช้ DCC เป็นรีเอเจนต์

แผนภาพที่ 4.4



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดเขี้ยวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.34 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 85 : 15 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 143-146 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 15.88 (คำนวณเทียบจาก Lithocholic acid **1**) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3440 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 2931 (C-H stretching ของ CH_2), 2856 (C-H stretching ของ CH_3), 1687 ($\text{C}=\text{O}$ stretching), 1450 (C-H bending ของ CH_2, CH_3), 1384 (C-H bending ของ CH_3), 1232 (C-O stretching ของ ester) และ 1034 (C-O stretching)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



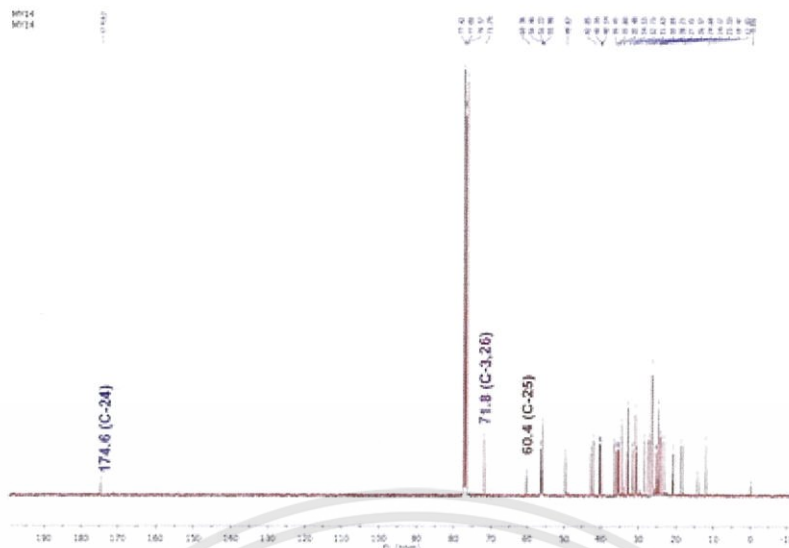
47d

สเปกตรัม ^1H NMR (300.1 MHz, CDCl_3) ของสาร 47d พบสัญญาณที่ δ 4.10 (2H, t, $J_{25,26} = 7.1$ Hz, OCH_2) และ 3.87 (2H, t, $J_{26,25} = 9.8$ Hz, H-26), และโปรตอนที่อยู่ในช่วง δ เท่ากับ 1.97 ถึง 0.95 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.7 และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 47d พบสัญญาณที่ δ 174.6 (C-24), 60.4 (C-25) และ 71.8 (C-26) ดังรูปที่ 4.8

ES-MS : $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_4$ Calcd. 420.32 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 353.9 ($-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$) และ 325.8 ($-\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$)

รูปที่ 4.7 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47d

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

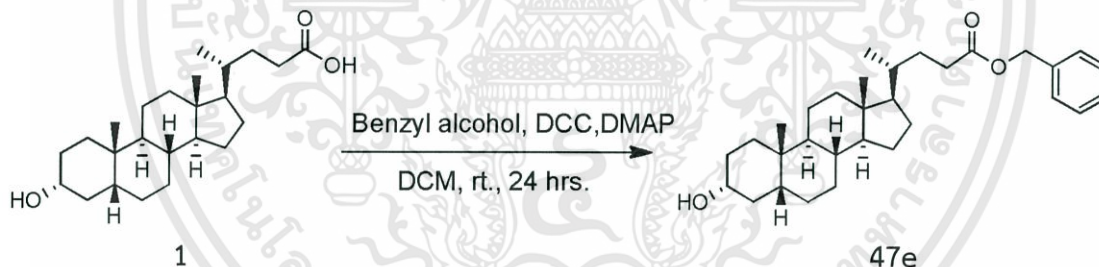


รูปที่ 4.8 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47d

4.1.2.3 การสังเคราะห์ Benzyl 3α -hydroxy- 5β -cholan-24-oate 47e

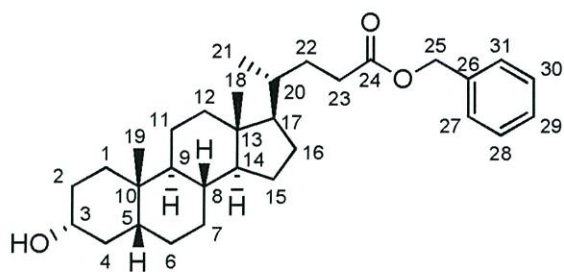
สาร 47e เตรียมจากการนำ Lithocholic acid 1 ทำปฏิกิริยากับ benzyl alcohol โดยใช้ DCC เป็นรีเอเจนต์

แผนภาพที่ 4.5



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin layer chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.43 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 120-123 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 64.50 (คำนวณเทียบจาก Lithocholic acid 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3359 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 3033 (C-H stretching ของ aromatic), 2934 (C-H stretching ของ CH_2), 2864 (C-H stretching ของ CH_3), 1736 (C=O stretching), 1656 และ 1558 (C=C stretching ของ aromatic), 1450 (C-H bending ของ CH_2, CH_3), 1377 (C-H bending ของ CH_3), 1162 (C-O stretching ของ ester) และ 697 (C-H bending ของ aromatic)

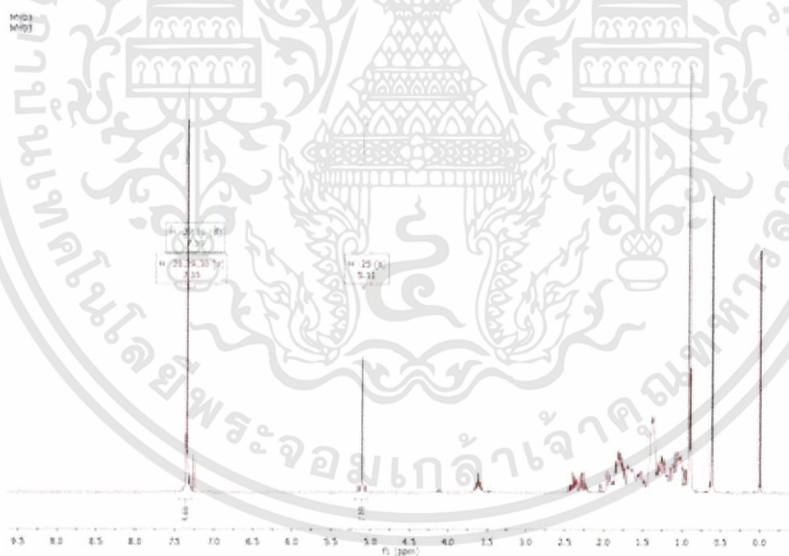
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



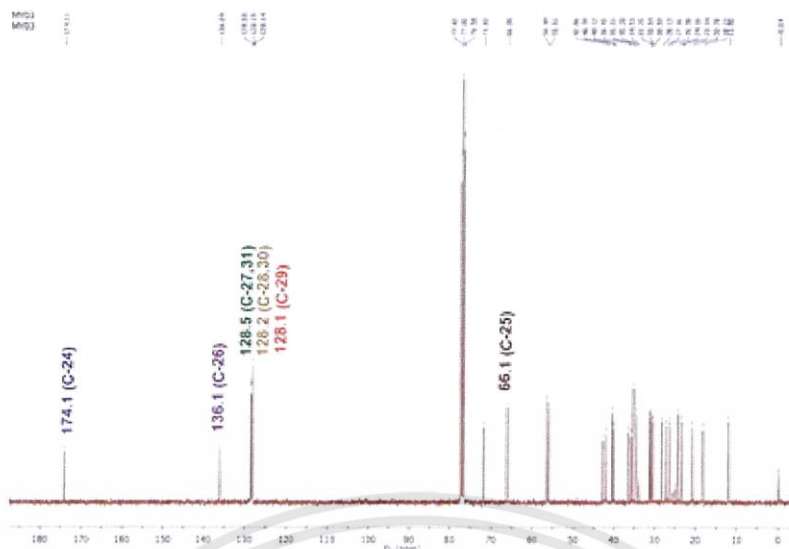
47e

สเปกตรัม ^1H NMR (300.1 MHz, CDCl_3) ของสาร 47e พบสัญญาณที่ δ 5.11 (2H, s, OCH_2), 7.35 (3H, s, H-28,29,30) และ 7.30 (2H, d, $J_{27,31} = 26.7$ Hz, H-27,31) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.96 ถึง 0.95 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.9 และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 47e พบสัญญาณที่ δ 174.1 (C-24), 66.1 (C-25), 136.1 (C-26), 128.5 (C-27), 128.2 (C-28), 128.1 (C-29), 128.2 (C-30) และ 128.5 (C-31) ดังรูปที่ 4.10

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

รูปที่ 4.9 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47e

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



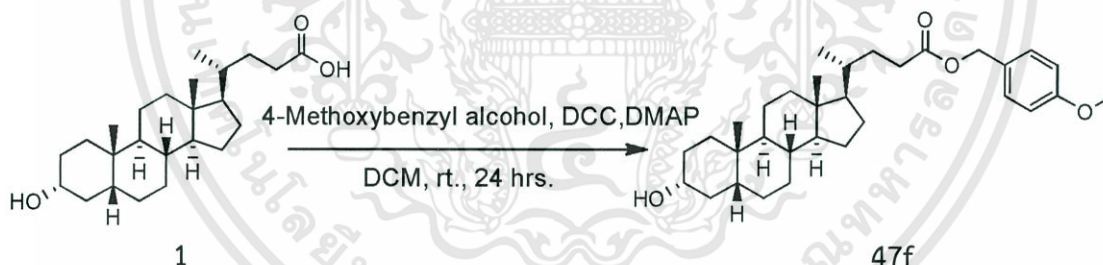
รูปที่ 4.10 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47e

4.1.2.4 การสังเคราะห์ 4-Methoxybenzyl 3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oate

47f

สาร 47f เตรียมจากการนำ Lithocholic acid 1 ทำปฏิกิริยากับ 4-methoxybenzyl alcohol โดยใช้ DCC เป็นรีเอเจนต์

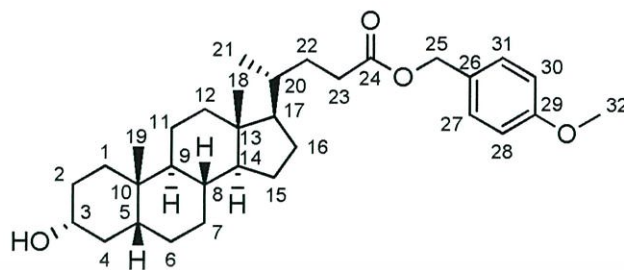
แผนภาพที่ 4.6



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.31 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 104-107 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 55.17 (คำนวณเทียบจาก Lithocholic acid 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3391 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 3037 (C-H stretching ของ aromatic), 2934 (C-H stretching ของ CH_2), 2864 (C-H stretching ของ CH_3), 1733 (C=O stretching), 1614 และ 1587 (C=C stretching ของ aromatic), 1449 (C-H bending ของ CH_2, CH_3), 1377

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

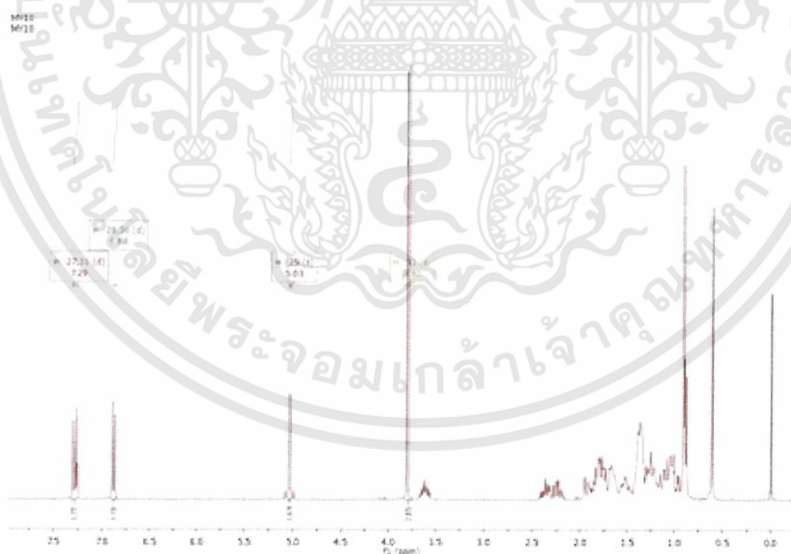
(C-H bending ของ CH_3), 1248 (C-O stretching ของ phenolic), 1163 (C-O stretching ของ ester), 823 (C-H bending ของ para subst.) และ 704 (C-H bending ของ aromatic)



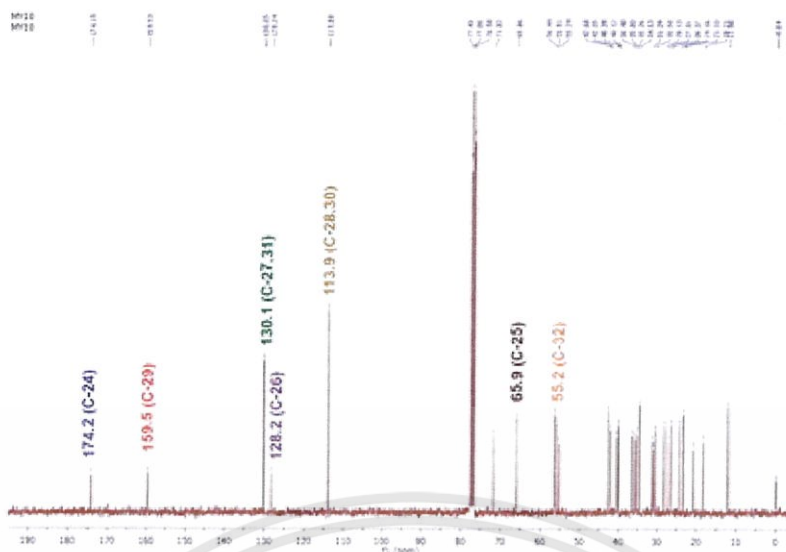
47f

สเปกตรัม ^1H NMR (300.1 MHz, CDCl_3) ของสาร 47f พบสัญญาณที่ δ 5.03 (2H, s, OCH_2), 7.29 (2H, d, $J_{27,31} = 8.6$ Hz, H-27,31) และ 6.88 (2H, d, $J_{28,30} = 8.7$ Hz, H-28,30) และ 3.80 (3H, s, H-32) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.95 ถึง 0.95 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.11 และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 47f พบสัญญาณที่ δ 174.2 (C-24), 65.9 (C-25), 128.2 (C-26), 130.1 (C-27), 113.9 (C-28), 159.5 (C-29), 113.9 (C-30), 130.1 (C-31) และ 55.2 (C-32) ดังรูปที่ 4.12

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

รูปที่ 4.11 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47f

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

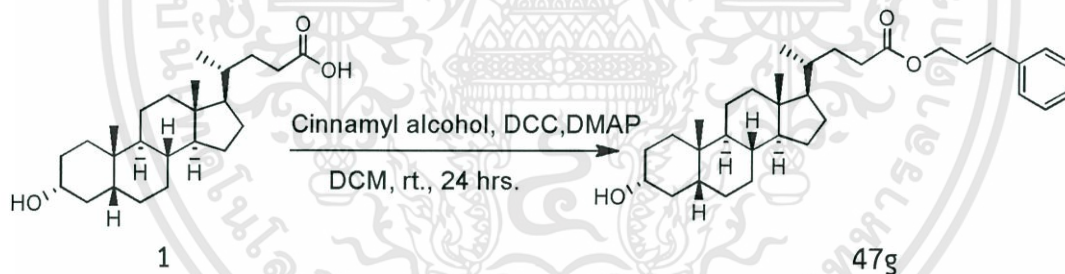


รูปที่ 4.12 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47f

4.1.2.5 การสังเคราะห์ Cinnamyl 3α -hydroxy- 5β -cholan-24-oate 47g

สาร 47g เตรียมจากการนำ Lithocholic acid 1 ทำปฏิกิริยากับ cinnamyl alcohol โดยใช้ DCC เป็นรีเอเจนต์

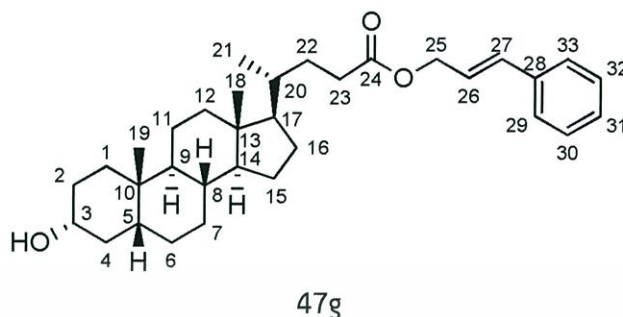
แผนภาพที่ 4.7



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.43 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 130-133 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 42.61 (คำนวณเทียบจาก Lithocholic acid 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3361 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 3083 (C-H stretching ของ aromatic), 3027 (C-H stretching ของ olefinic), 2938 (C-H stretching ของ CH_2), 2863 (C-H stretching ของ CH_3), 1732 (C=O stretching), 1659 (C=C stretching ของ olefinic), 1599 และ 1578 (C=C stretching ของ aromatic), 1448.50 (C-H bending ของ CH_2, CH_3), 1377.28 (C-H

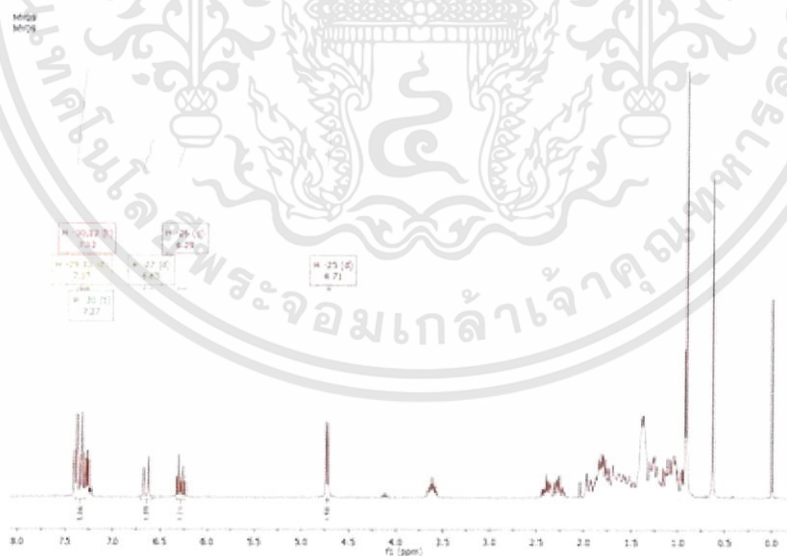
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bending ของ CH₃), 1163 (C-O stretching ของ ester) และ 692.47 (C-H bending ของ aromatic)



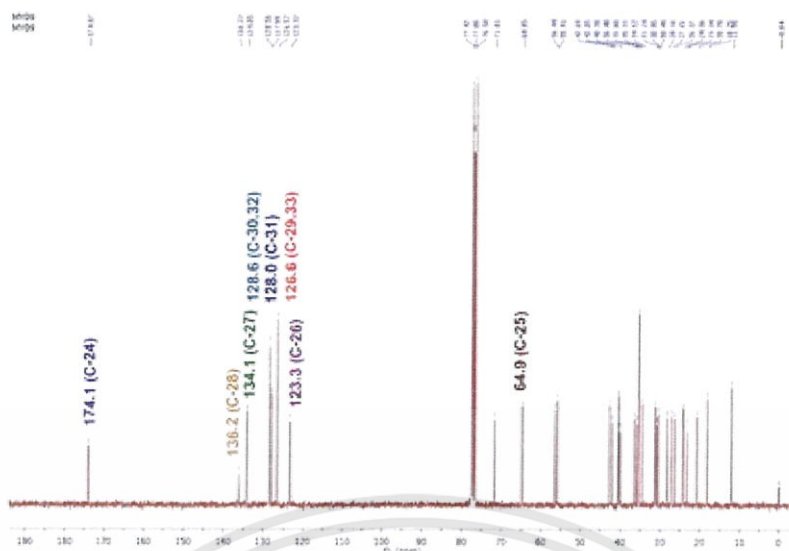
สเปกตรัม ¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃) ของสาร 47g พบสัญญาณที่ δ 4.71 (2H, d, *J*_{25,26} = 1.0 Hz, OCH₂), 6.29 (1H, q, H-26), 6.65 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-27), 7.37 (2H, d, *J*_{29,33} = 1.0 Hz, H-29,33), 7.32 (2H, t, *J*_{30,32} = 3.3 Hz, H-30,32) และ 7.27 (1H, t, *J* = 1.6 Hz, H-31) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.87 ถึง 0.95 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.13 และสเปกตรัม ¹³C NMR (75.5 MHz) ของสาร 47g พบสัญญาณที่ δ 174.1 (C-24), 64.9 (C-25), 123.3 (C-26), 134.1 (C-27), 136.2 (C-28), 126.6 (C-29), 128.6 (C-30), 128.0 (C-31), 128.6 (C-32) และ 126.6 (C-33) ดังรูปที่ 4.14

ES-MS : C₃₃H₄₈O₃ Calcd. 492.36 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z [M+H]⁺ 318.9 (-CH₂COOCH₂(CH)₂C₆H₅) และ 304.8 (-(CH₂)₂COOCH₂(CH)₂C₆H₅)



รูปที่ 4.13 สเปกตรัม ¹H NMR ของสารอนุพันธ์ 47g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

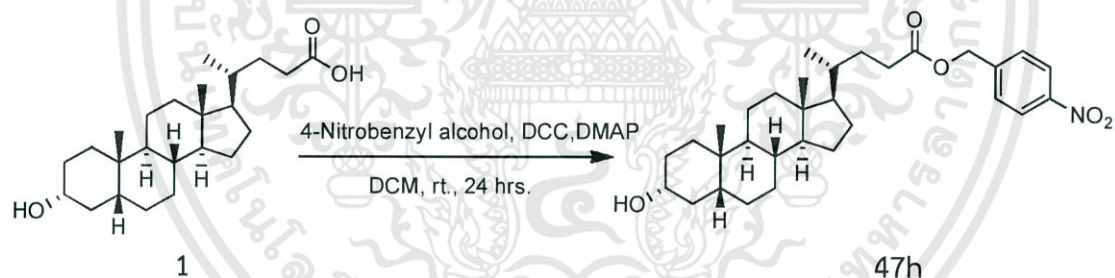


รูปที่ 4.14 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47g

4.1.2.6 การสังเคราะห์ 4-Nitrobenzyl 3α -hydroxy- 5β -cholan-24-oate 47h

สาร 47h เตรียมจากการนำ Lithocholic acid 1 ทำปฏิกิริยากับ 4-nitrobenzyl alcohol โดยใช้ DCC เป็นรีเอเจนต์

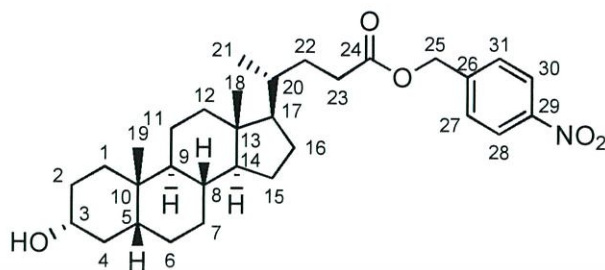
แผนภาพที่ 4.8



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.26 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 156-159 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 64.52 (คำนวณเทียบจาก Lithocholic acid 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3323 (O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล), 3083 (C-H stretching ของ aromatic), 2927 (C-H stretching ของ CH_2), 2862 (C-H stretching ของ CH_3), 1741 (C=O stretching), 1608 และ 1496 (C=C stretching ของ aromatic), 1524 (N=O asymmetric stretching), 1449 (C-H bending ของ CH_2, CH_3), 1378 (C-H bending ของ CH_3), 1346 (N=O symmetric

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

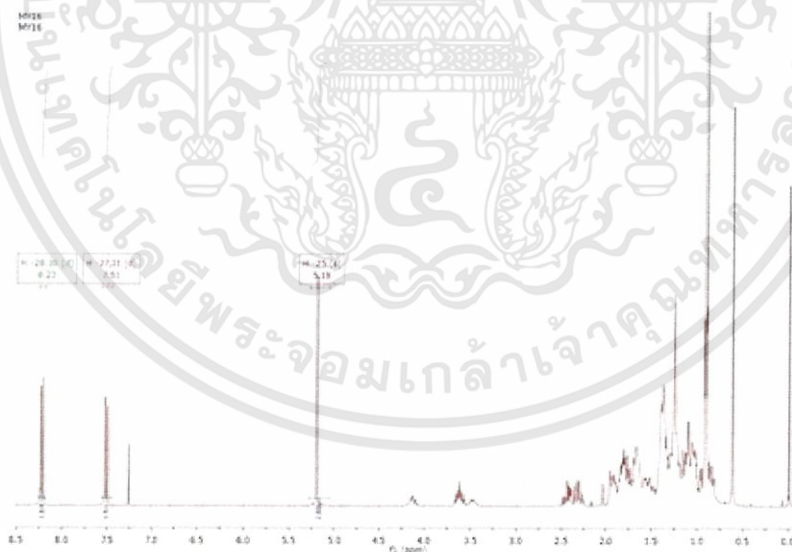
stretching), 1244 (C-N stretching), 1159 (C-O stretching ของ ester), 858 (C-H bending ของ para subst.) และ 738 (C-H bending ของ aromatic)



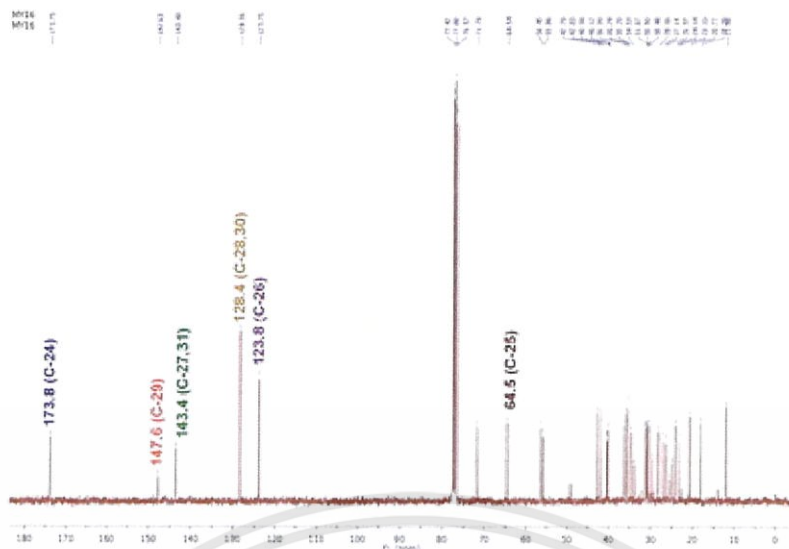
47h

สเปกตรัม ^1H NMR (300.1 MHz, CDCl_3) ของสาร 47h พบสัญญาณที่ δ 5.19 (2H, s, OCH_2), 7.51 (2H, d, $J_{27,31} = 8.8$ Hz, H-27,31) และ 8.22 (2H, d, $J_{28,30} = 8.8$ Hz, H-28,30) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.96-0.95 ถึง ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.15 และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 47h พบสัญญาณที่ δ 173.8 (C-24), 64.5 (C-25), 123.8 (C-26), 143.4 (C-27), 128.4 (C-28), 147.6 (C-29), 128.4 (C-30), 143.4 (C-31) ดังรูปที่ 4.16

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

รูปที่ 4.15 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 47h

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



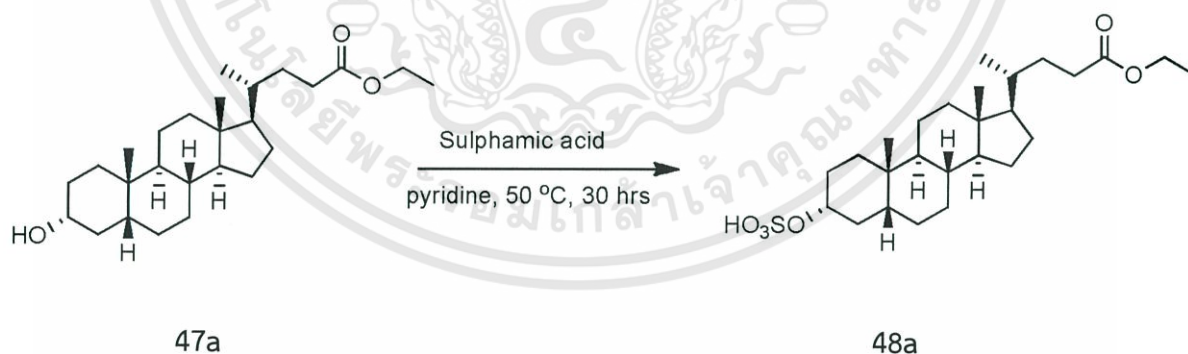
รูปที่ 4.16 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 47h

4.2 การสังเคราะห์สารประกอบซัลเฟตของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิคโดยการทำปฏิกิริยาซัลเฟชัน

4.2.1 การสังเคราะห์ Ethyl 3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oate-3-sulphate 48a

สาร 48a เตรียมจากการนำสาร 47a ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

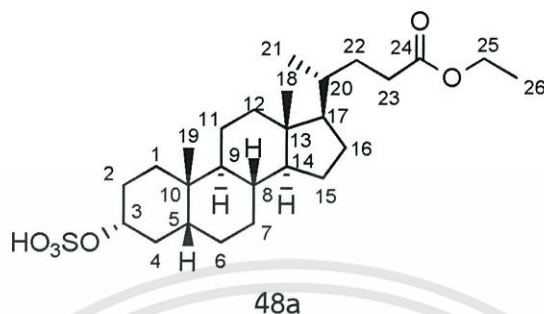
แผนภาพที่ 4.9



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.34 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 30 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 180-183 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 85.59 (คำนวณเทียบจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

47a) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3446 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 2929 (C-H stretching ของ CH_2), 2859 (C-H stretching ของ CH_3), 1733 (C=O stretching), 1445 (C-H bending ของ CH_2, CH_3), 1376 (C-H bending ของ CH_3), 1208 (O=S=O stretching) และ 1059 (S=O stretching)



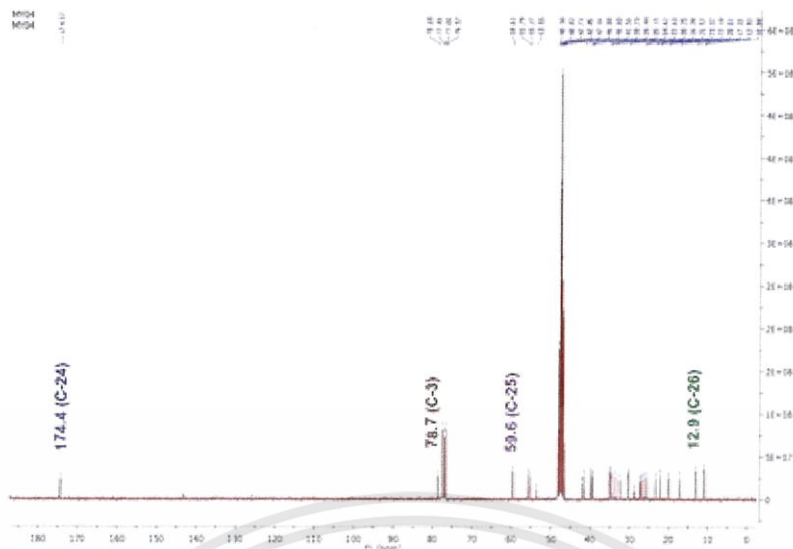
สเปกตรัม ^1H NMR (300.1 MHz, CDCl_3) ของสาร 48a พบสัญญาณที่ δ 3.93-3.82 (1H, m, H-3), 3.68 (2H, q, $J_{25,26} = 7.1$ Hz, OCH_2) และ 0.83 (3H, t, $J_{26,25} = 9.2$ Hz, CH_3), และโปรตอนที่อยู่ในช่วง δ เท่ากับ 1.58 ถึง 0.59 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.17 และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 48a พบสัญญาณที่ δ 78.7 (C-3), 174.4 (C-24), 59.6 (C-25) และ 12.9 (C-26) ดังรูปที่ 4.18

ES-MS : $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_6\text{S}$ Calcd. 484.29 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 483.9



รูปที่ 4.17 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 48a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

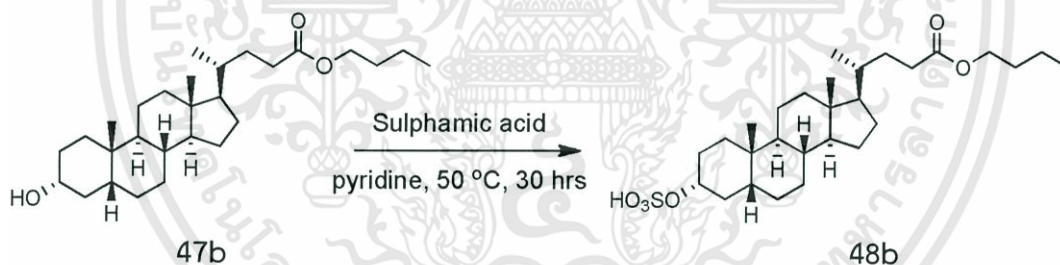


รูปที่ 4.18 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48a

4.2.2 การสังเคราะห์ Butyl 3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oate-3-sulphate 48b

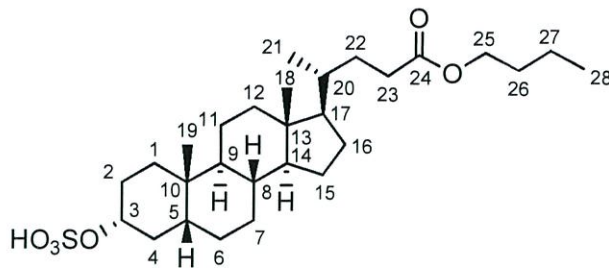
สาร 48b เตรียมจากการนำสาร 47b ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.10



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.29 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 30 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 181-184 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 62.50 (คำนวณเทียบจาก 47b) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3458 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 2939 (C-H stretching ของ CH_2), 2867 (C-H stretching ของ CH_3), 1734 (C=O stretching), 1447 (C-H bending ของ CH_2, CH_3), 1376 (C-H bending ของ CH_3), 1224 (O=S=O stretching) และ 1061 (S=O stretching)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



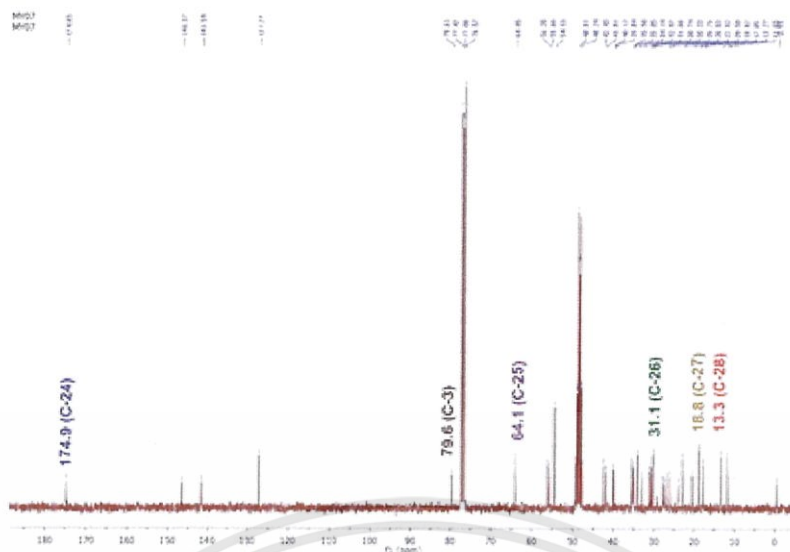
48b

สเปกตรัม ^1H NMR (300.1 MHz, CDCl_3) ของสาร **48b** พบสัญญาณที่ δ 4.24-4.13 (1H, m, H-3), 3.92 (2H, t, $J_{25,26} = 6.6$ Hz, OCH_2), 1.31-1.21 (2H, m, H-26), 1.02-0.86 (2H, m, H-27) และ 0.77 (3H, t, $J = 2.4$ Hz, H-28) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.97 ถึง 1.00 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.19 และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **48b** พบสัญญาณที่ δ 79.6 (C-3), 174.9 (C-24), 64.1 (C-25), 31.1(C-26), 18.8 (C-27) และ 13.3 (C-28) ดังรูปที่ 4.20

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

รูปที่ 4.19 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ **48b**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

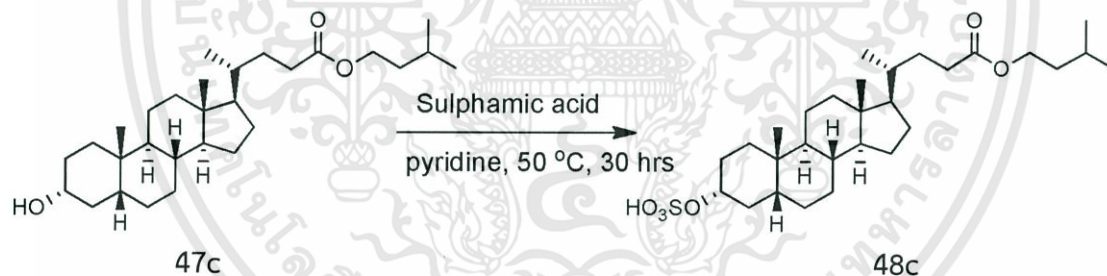


รูปที่ 4.20 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48b

4.2.3 การสังเคราะห์ Isoamyl 3α -hydroxy- 5β -cholan-24-oate-3-sulphate 48c

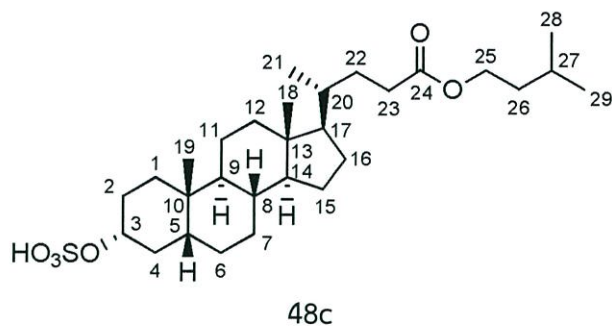
สาร 48c เตรียมจากการนำสาร 47c ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.11



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.37 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 30 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 153-156 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 47.19 (คำนวณเทียบจาก 47c) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3450 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 2931 (C-H stretching ของ CH_2), 2870 (C-H stretching ของ CH_3), 1730 (C=O stretching), 1447 (C-H bending ของ CH_2, CH_3), 1371 (C-H bending ของ CH_3), 1308 (O=C-O stretching), 1207 (O=S=O stretching) และ 1061 (S=O stretching)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



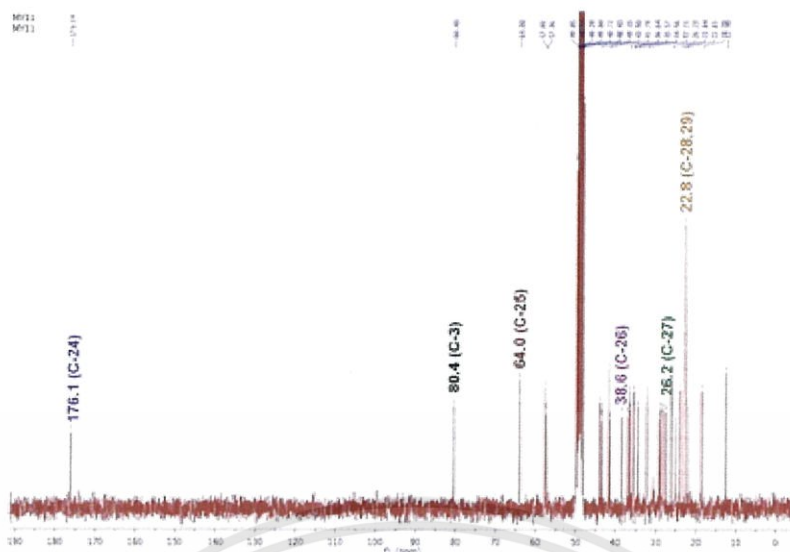
สเปกตรัม ^1H NMR (300.1 MHz, CDCl_3) ของสาร 48c พบสัญญาณที่ δ 4.33-4.22 (1H, m, H-3), 4.09 (2H, t, $J_{25,26} = 6.7$ Hz, OCH_2), 1.52 (2H, q, $J_{26,25} = 6.7$ Hz, H-26), 1.76-1.60 (1H, m, H-27) และ 1.30 (6H, d, $J_{28,29} = 10.8$ Hz, H-28,29) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.76 ถึง 1.01 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.21 และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 48c พบสัญญาณที่ δ 80.4 (C-3), 176.1 (C-24), 64.0 (C-25), 38.6 (C-26), 26.2 (C-27), 22.8 (C-28), 22.8 (C-29) ดังรูปที่ 4.22

ES-MS : $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_6\text{S}$ Calcd. 526.33 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 526.0



รูปที่ 4.21 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ 48c

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



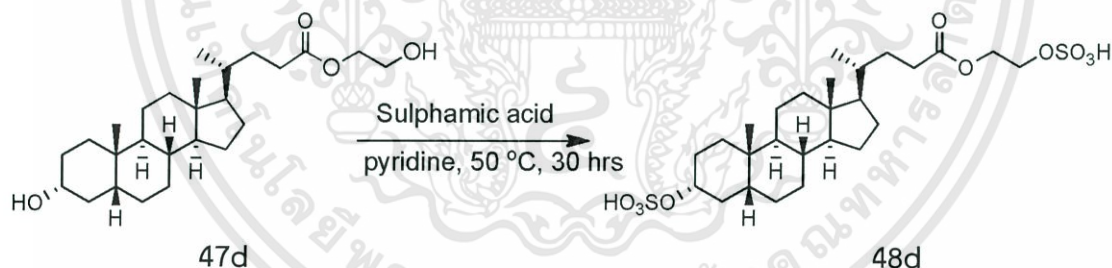
รูปที่ 4.22 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48c

4.2.4 การสังเคราะห์ Hydroxyethyl 3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oate-3-sulphate

48d

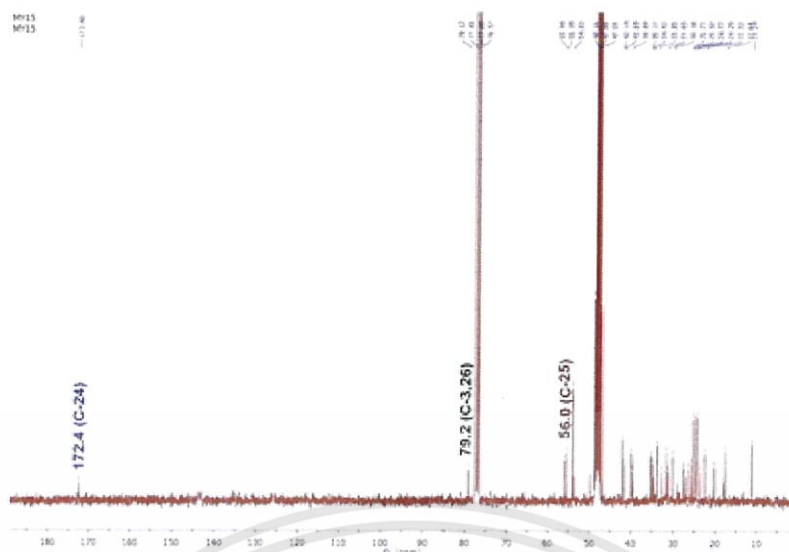
สาร 48d เตรียมจากการนำสาร 47d ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.12



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.37 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 50 : 30 : 20 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 160-163 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 75.60 (คำนวณเทียบกับ 47d) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3438 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 2926 (C-H stretching ของ CH_2), 2855 (C-H stretching ของ CH_3), 1646 (C=O stretching), 1449 (C-H bending ของ CH_2, CH_3),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

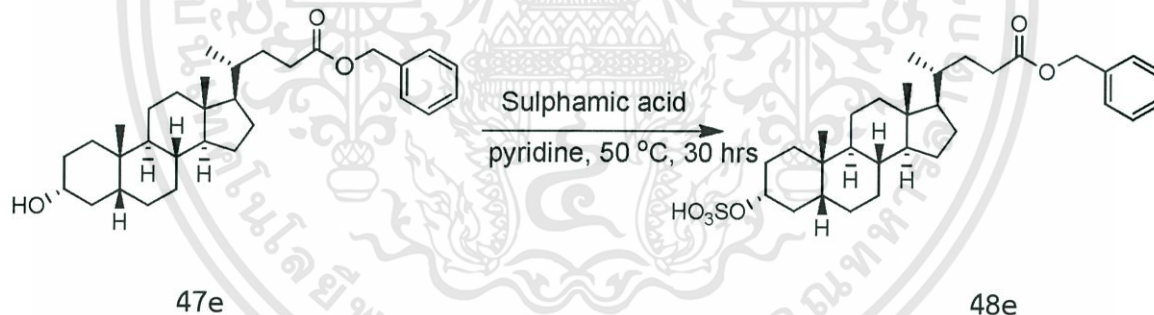


รูปที่ 4.24 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48d

4.2.5 การสังเคราะห์ Benzyl 3α -hydroxy- 5β -cholan-24-oate-3-sulphate 48e

สาร 48e เตรียมจากการนำสาร 47e ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

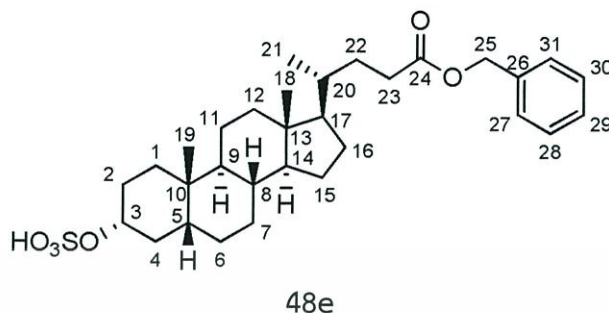
แผนภาพที่ 4.13



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin layer chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.51 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : metanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 30 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 170-173 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 55.02 (คำนวณเทียบจาก Lithocholic acid 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3442 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 3075 (C-H stretching ของ aromatic), 2933 (C-H stretching ของ CH_2), 2863 (C-H stretching ของ CH_3), 1736 (C=O stretching), 1638 และ 1542 (C=C stretching ของ aromatic), 1456 (C-H bending ของ

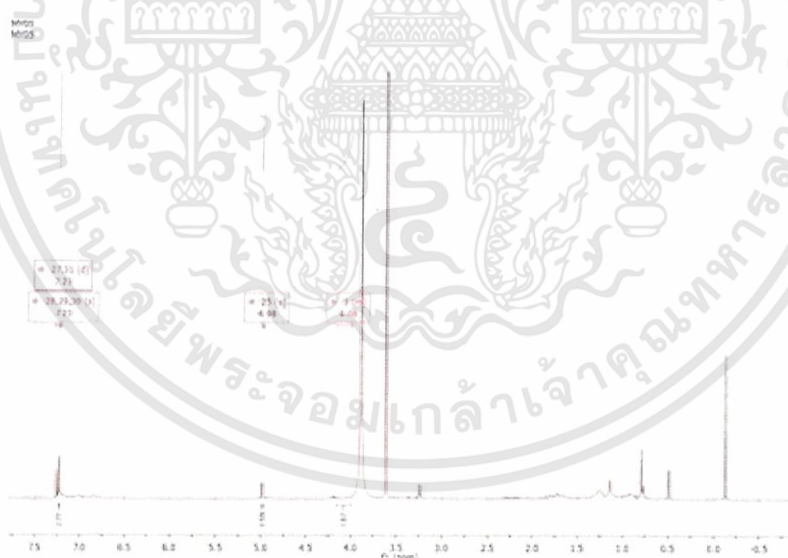
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CH₂,CH₃), 1384 (C-H bending ของ CH₃), 1241 (O=S=O stretching), 1061 (S=O stretching) และ 695 (C-H bending ของ aromatic)



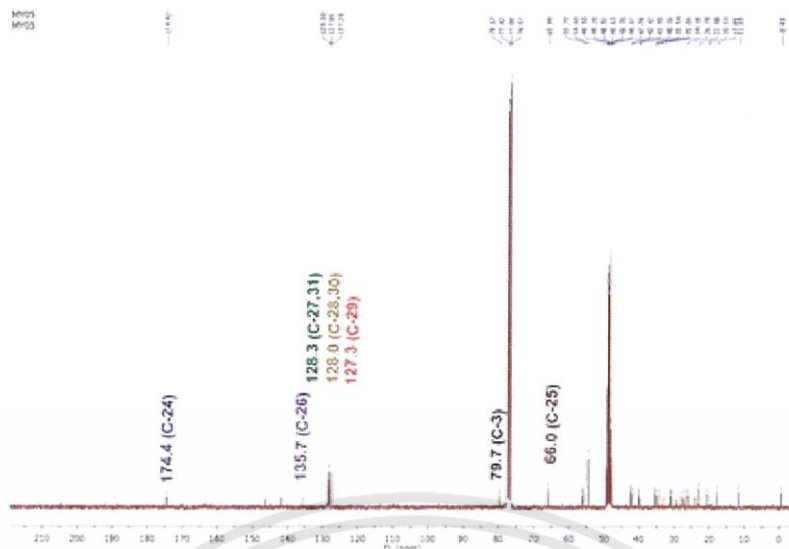
สเปกตรัม ¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃) ของสาร 48e พบสัญญาณที่ δ 4.16-3.99 (1H, m, H-3), 4.98 (2H, s, OCH₂), 7.23 (3H, s, H-28,29,30) และ 7.24 (2H, d, J_{27,31} = 9.0 Hz, H-27,31) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.91 ถึง 0.82 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.25 และสเปกตรัม ¹³C NMR (75.5 MHz) ของสาร 48e พบสัญญาณที่ δ 79.7 (C-3), 174.4 (C-24), 66.0 (C-25), 135.7 (C-26), 128.3 (C-27), 128.0 (C-28), 127.3 (C-29), 128.0 (C-30) และ 128.3 (C-31) ดังรูปที่ 4.26

ES-MS : C₃₁H₄₆O₆S Calcd. 546.30 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z [M+H]⁺ 545.9



รูปที่ 4.25 สเปกตรัม ¹H NMR ของสารอนุพันธ์ 48e

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

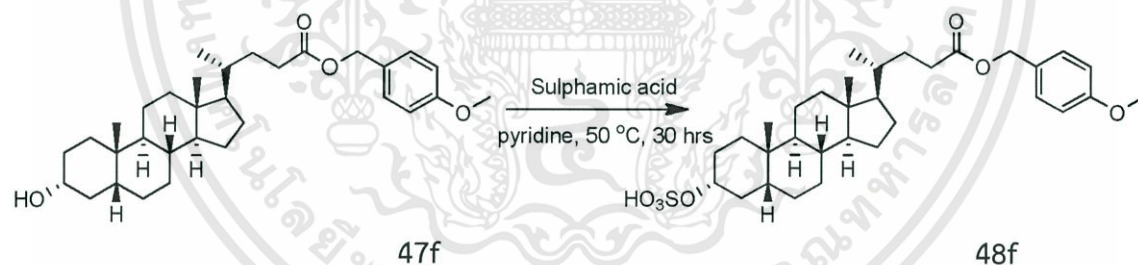


รูปที่ 4.26 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48e

4.2.6 การสังเคราะห์ 4-Methoxybenzyl 3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oate-3-sulphate 48f

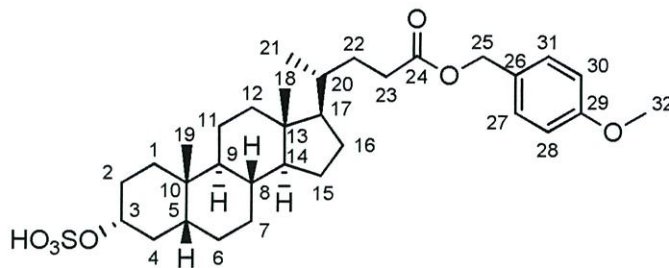
สาร 48f เตรียมจากการนำสาร 47f ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.14



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.29 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 10 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 190-193 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 51.59 (คำนวณเทียบจาก 47f) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3454 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 2937 (C-H stretching ของ CH_2), 2867 (C-H stretching ของ CH_3), 1733 (C=O stretching), 1615 และ 1517 (C=C stretching ของ aromatic), 1453 (C-H bending ของ CH_2, CH_3), 1376 (C-H bending ของ CH_3), 1224 (O=S=O stretching) และ 1067 (S=O stretching)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



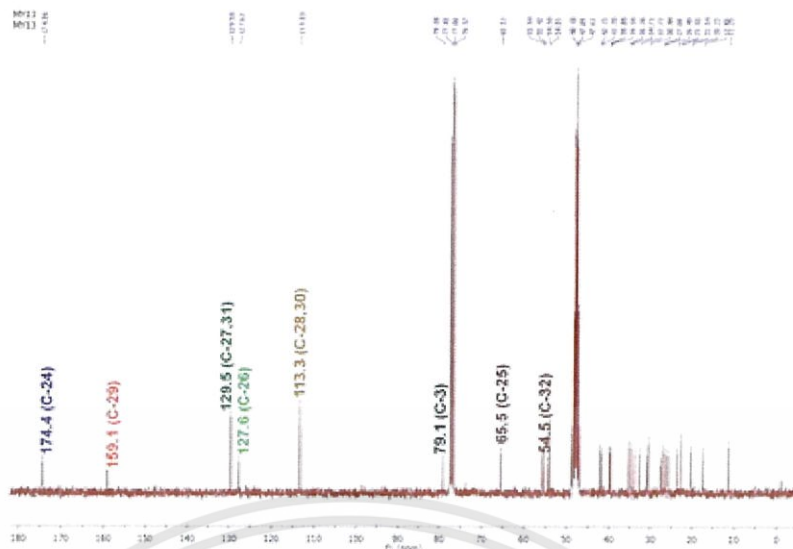
48f

สเปกตรัม ^1H NMR (300.1 MHz, CDCl_3) ของสาร **48f** พบสัญญาณที่ δ 4.13-4.03 (1H, m, H-3), 4.80 (2H, s, OCH_2), 7.06 (2H, d, $J_{27,31} = 8.7$ Hz, H-27,31) และ 6.66 (2H, d, $J_{28,30} = 8.7$ Hz, H-28,30) และ) และ 3.53 (3H, s, H-32) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.95 ถึง 0.95 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.27 และ สเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **48f** พบสัญญาณที่ δ 79.1 (C-3), 174.4 (C-24), 65.5 (C-25), 127.6 (C-26), 129.5 (C-27), 113.3 (C-28), 159.1 (C-29), 113.3 (C-30), 129.5 (C-31) และ 54.5 (C-32) ดังรูปที่ 4.28

ES-MS : $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_7\text{S}$ Calcd. 576.31 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 575.9 และ 469.9 ($-\text{C}_5\text{H}_4\text{OCH}_3$)

รูปที่ 4.27 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอนุพันธ์ **48f**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

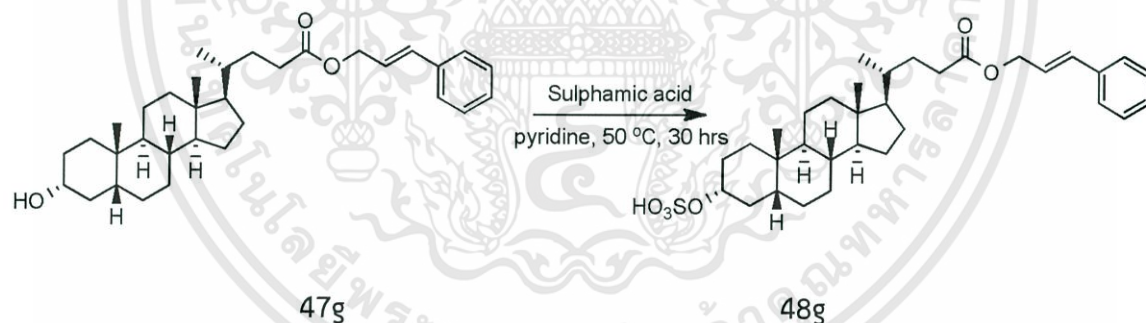


รูปที่ 4.28 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48f

4.2.7 การสังเคราะห์ Cinnamyl 3α -hydroxy- 5β -cholan-24-oate-3-sulphate 48g

สาร 48g เตรียมจากการนำสาร 47g ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

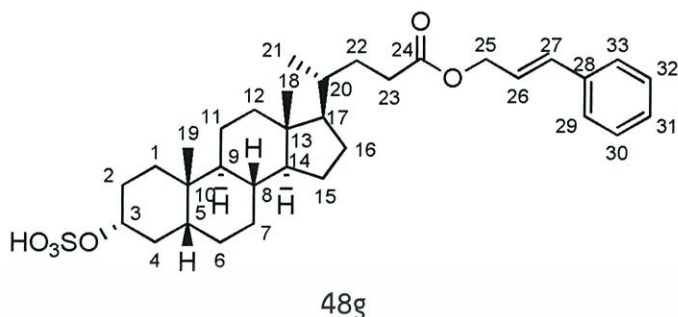
แผนภาพที่ 4.15



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.37 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 30 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 151-154 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 67.85 (คำนวณเทียบจาก 47g) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3461 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 3029 (C-H stretching ของ aromatic), 3029 (C-H stretching ของ olefinic), 2935 (C-H stretching ของ CH_2), 2867 (C-H stretching ของ CH_3), 1733 (C=O stretching), 1654 (C=C stretching ของ olefinic), 1619

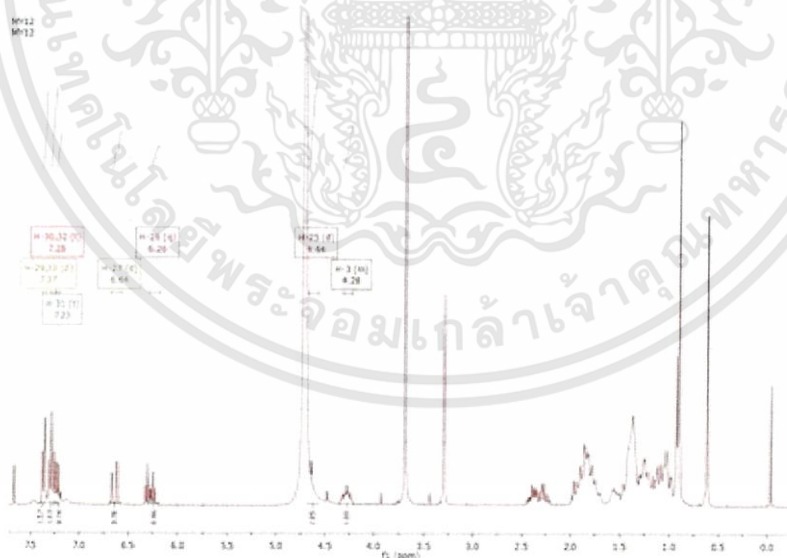
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ 1509 (C=C stretching ของ aromatic), 1449 (C-H bending ของ CH₂,CH₃), 1374 (C-H bending ของ CH₃), 1225 (O=S=O stretching) และ 1072 (S=O stretching)



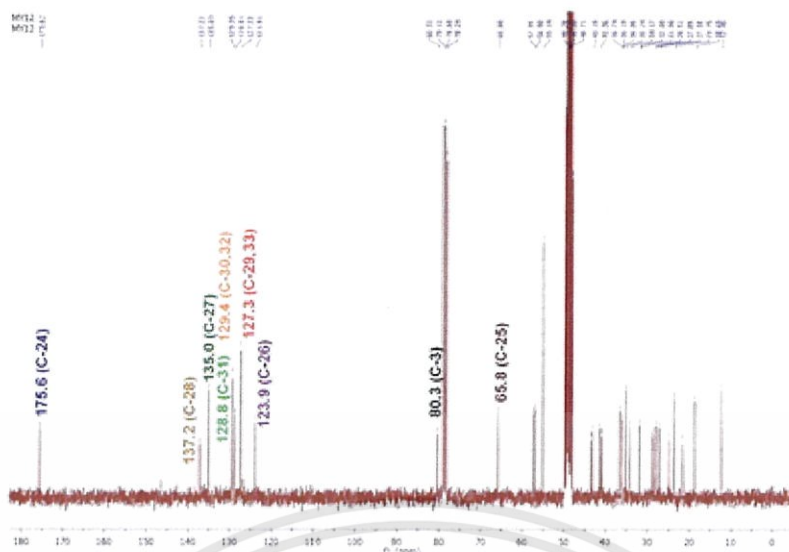
สเปกตรัม ¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃) ของสาร 48g พบสัญญาณที่ δ 4.33-4.23 (1H, m, H-3), 4.64 (2H, d, *J*_{25,26} = 3.0 Hz, OCH₂), 6.26 (1H, q, H-26), 6.64 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-27), 7.37 (2H, d, *J*_{29,33} = 1.2 Hz, H-29,33), 7.28 (2H, t, *J*_{30,32} = 6.3 Hz, H-30,32) และ 7.23 (1H, t, *J* = 2.0 Hz, H-31) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.56 ถึง 0.98 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne ดังรูปที่ 4.29 และสเปกตรัม ¹³C NMR (75.5 MHz) ของสาร 48g พบสัญญาณที่ δ 80.3 (C-3), 175.6 (C-24), 65.8 (C-25), 123.9 (C-26), 135.0 (C-27), 137.2 (C-28), 127.3 (C-29), 129.4 (C-30), 128.8 (C-31), 129.4 (C-32) และ 127.3 (C-33) ดังรูปที่ 4.30

ES-MS : C₃₃H₄₈O₆S Calcd. 572.32 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z [M+H]⁺ 571.6



รูปที่ 4.29 สเปกตรัม ¹H NMR ของสารอนุพันธ์ 48g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



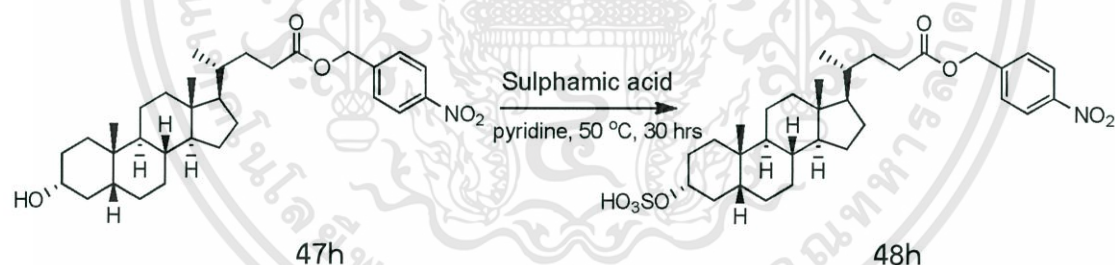
รูปที่ 4.30 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48g

4.2.8 การสังเคราะห์ 4-Nitrobenzyl 3α -hydroxy- 5β -cholan-24-oate-3-sulphate

48h

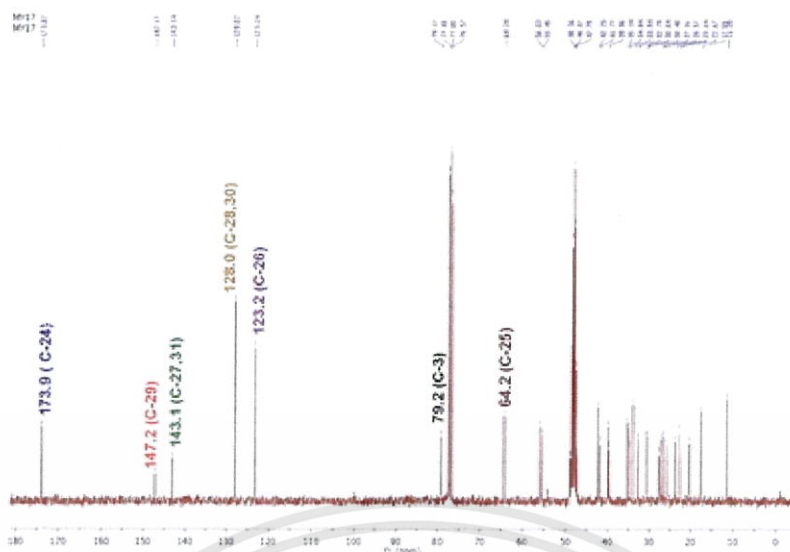
สาร 48h เตรียมจากการนำสาร 47h ทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.16



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 4 : 4.5 : 1.5 โดยปริมาตร ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.14 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 10 : 5 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 162-165 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 56.35 (คำนวณเทียบกับ 47h) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3416 (O-H stretching ของหมู่ซัลเฟต), 3033 (C-H stretching ของ aromatic), 2925 (C-H stretching ของ CH_2), 2859 (C-H stretching ของ CH_3), 1736 (C=O stretching), 1654 และ 1525 (C=C stretching ของ aromatic), 1561 (N=O asymmetric stretching), 1459 (C-H bending ของ CH_2, CH_3), 1374 (C-H bending ของ CH_3), 1345 (N=O

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



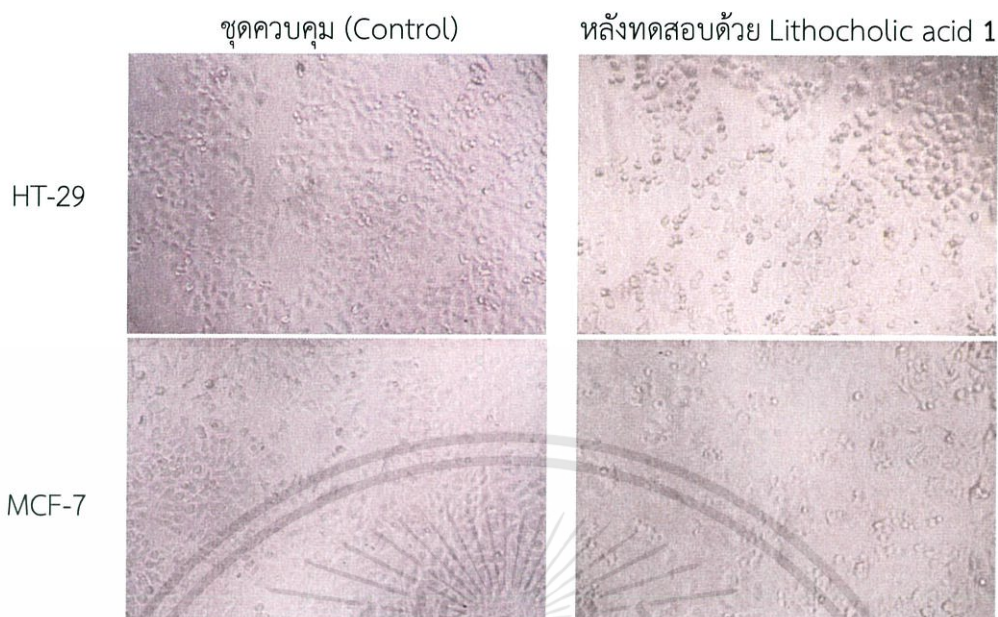
รูปที่ 4.32 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารอนุพันธ์ 48h

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

Lithocholic acid 1, สารอนุพันธ์ 47a-47h และ 48a-48h ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ประกอบด้วยเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line), เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 (Human hepatocellular carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูชนิด P388 (Murine leukemia cell line) และเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney) ด้วยวิธี MTT assay และในการทำ Primary screening โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับ Lithocholic acid 1 ที่ระดับความเข้มข้นในการทดสอบเบื้องต้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ (%Cytotoxicity) แล้วนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ หรือทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) โดยพิจารณาจากค่า CC_{50} ในการศึกษานี้จะใช้ตัวทำละลาย 2 เปอร์เซ็นต์ของ DMSO และใช้ Mitomycin C ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวยาปฏิชีวนะเพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบ

ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Lithocholic acid 1 และสารอนุพันธ์ 47a-47h และ 48a-48h แสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า Lithocholic acid 1 มีความเป็นพิษน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero โดยมีค่า %Cytotoxicity เท่ากับ 16.24, 12.27, 13.38, 13.52, 14.41 และ 13.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับผลการทดสอบของ Lithocholic acid 1 ต่อเซลล์ไลน์ HT-29 และ MCF-7 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control) ซึ่งชุดควบคุมประกอบด้วยเซลล์ไลน์และอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าลักษณะของเซลล์ไลน์ไม่มีความผิดปกติ ซึ่งสอดคล้องกับค่า %Cytotoxicity คือ Lithocholic acid 1 ไม่มีผลต่อเซลล์ไลน์ แสดงดังรูปที่ 4.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.33 ตัวอย่างผลการทดสอบของ Lithocholic acid 1 ต่อเซลล์ไลน์ HT-29 และ MCF-7 เทียบกับชุดควบคุม (Control) ที่กำลังขยาย 100 เท่า

สารอนุพันธ์ 47a แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 51.23 ± 1.58 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปผ. 7 ในภาคผนวก ก และมีค่าความเป็นพิษน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, และ Vero เท่ากับ 20.02 ± 1.51 , 17.14 ± 0.61 , 16.72 ± 0.15 , 16.07 ± 6.24 และ 11.16 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 47b แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 26.10 ± 2.39 , 40.48 ± 1.53 , 29.96 ± 0.92 , 26.40 ± 0.15 , 10.33 ± 0.88 และ 12.17 ± 2.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 47c แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 58.10 ± 3.93 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปผ. 13 ในภาคผนวก ก และมีค่าความเป็นพิษน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, และ Vero เท่ากับ 16.84 ± 5.66 , 27.58 ± 1.69 , 19.79 ± 0.00 , 13.90 ± 0.00 และ 39.09 ± 2.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 47d แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 73.62 ± 4.71 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปผ. 14 ในภาคผนวก ก และมีค่าความเป็นพิษน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, และ Vero เท่ากับ 27.31 ± 0.31 , 44.67 ± 0.38 , 22.10 ± 1.38 , 18.17 ± 3.57 และ 22.16 ± 4.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 47e แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 25.56 ± 1.38 , 22.49 ± 2.45 , 16.33 ± 1.53 , 2.02 ± 0.74 , 16.08 ± 4.38 และ 16.15 ± 1.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 47f แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 31.70 ± 1.50 , 40.04 ± 1.77 , 20.65 ± 15.61 , 9.90 ± 0.89 , 38.45 ± 1.31 และ 24.30 ± 4.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 47g แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 22.75 ± 1.96 , 34.63 ± 9.50 , 32.66 ± 5.05 , 15.89 ± 0.15 , 37.27 ± 0.64 และ 23.74 ± 1.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 47h แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 27.43 ± 0.76 , 43.29 ± 0.92 , 32.01 ± 1.38 , 17.57 ± 0.45 , 33.66 ± 0.00 และ 20.13 ± 5.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 48a แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, KB, P388 และ Vero มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 75.44 ± 1.41 , 62.51 ± 3.22 , 92.22 ± 1.00 , 91.26 ± 1.64 และ 88.99 ± 4.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดัง รูปผ. 8 ถึง รูปผ. 12 ในภาคผนวก ก ตามลำดับ และมีความเป็นพิษน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ HepG2 มีค่าเท่ากับ 4.87 ± 2.15 เปอร์เซ็นต์

สารอนุพันธ์ 48b แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 14.50 ± 0.00 , 29.93 ± 0.00 , 19.64 ± 1.84 , 15.12 ± 3.42 , 25.37 ± 1.00 และ 21.97 ± 0.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 48c แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 36.27 ± 3.27 , 37.80 ± 3.06 , 20.85 ± 1.10 , 15.30 ± 0.00 , 36.65 ± 1.67 และ 26.64 ± 2.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 48d แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 97.64 ± 0.87 , 98.13 ± 0.40 , 98.41 ± 0.65 , 99.96 ± 0.00 , 97.96 ± 0.72 และ 70.79 ± 4.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังรูปผ. 15 ถึง รูปผ. 20 ในภาคผนวก ก ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 48e แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 21.35 ± 0.38 , 33.39 ± 2.76 , 11.75 ± 0.77 , -5.79 ± 0.59 , 39.46 ± 6.58 และ 7.94 ± 0.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 48f แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 25.18 ± 1.01 , 13.90 ± 10.11 , 5.40 ± 0.46 , 11.13 ± 0.45 , 42.82 ± 0.81 และ 35.52 ± 5.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 48g แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB, P388 และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 27.11 ± 1.89 , 27.94 ± 1.07 , 0.53 ± 0.64 , 18.75 ± 0.52 , 31.11 ± 0.32 และ 28.29 ± 2.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ 48h แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7, HepG2, KB และ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 4.62 ± 4.41 , 9.67 ± 4.14 , 13.80 ± 0.00 , -3.90 ± 0.59 และ -6.47 ± 3.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์ จะนำสารอนุพันธ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ หรือทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ด้วยวิธี MTT assay ที่ระดับความเข้มข้น 125, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะ Mitomycin C ค่า CC_{50} ของสารอนุพันธ์ 47a-48h แสดงในตารางที่ 4.2

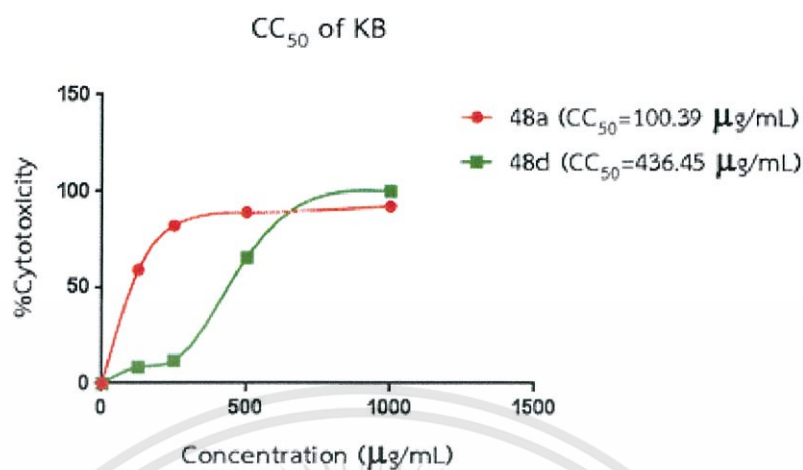
จากตารางที่ 4.2 พบว่าสารอนุพันธ์ 47a, 47c และ 47d มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ P388 มีค่า CC_{50} เท่ากับ 982.84, 865.13 และ 437.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารอนุพันธ์ 48a มีผลต่อเซลล์ไลน์ KB มากที่สุด รองลงมาคือ P388, Vero, HT-29 และ MCF-7 มีค่า CC_{50} เท่ากับ 100.39, 209.41, 401.79, 458.03 และ 704.01 ตามลำดับ ส่วนสารอนุพันธ์ 48d มีผลต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด รองลงมาคือ MCF-7, HepG2, HT-29, KB และ Vero มีค่า CC_{50} เท่ากับ 326.04, 335.26, 371.53, 436.45 และ 505.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่า CC_{50} ของสารอนุพันธ์ 47a, 47c, 47d, 48a และ 48d ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 6 ชนิด พบว่า สารอนุพันธ์ 48a มีผลต่อเซลล์ไลน์ KB และ P388 ได้ดีที่สุดในเรื่องที่มีค่า CC_{50} น้อยที่สุด ดังรูปที่ 4.34 และ 4.35 ตามลำดับ ส่วนสารอนุพันธ์ 48d มีผลต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, HepG2 และ HT-29 ได้ดีที่สุด เนื่องจากมีค่า CC_{50} น้อยที่สุด ดังรูปที่ 4.36, 4.37 และ 4.38 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Lithocholic acid 1 และอนุพันธ์กรดดีโทโคลิก 47a-47h และ 48a-48h ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

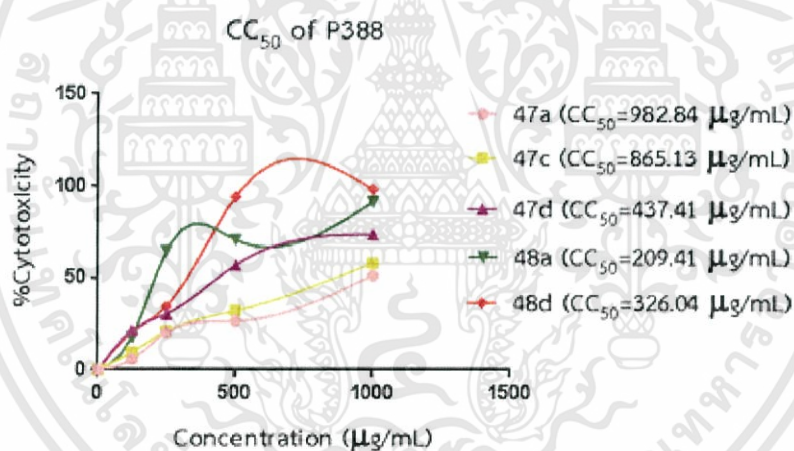
สารตัวอย่าง	% Cytotoxicity					
	HT-29	MCF-7	HepG2	KB	P388	Vero
1	16.24	12.27	13.38	13.52	14.41	13.12
47a	20.02±1.51	17.14±0.61	16.72±0.15	16.07±6.24	51.23±1.58	11.16±0.00
47b	26.10±2.39	40.48±1.53	29.96±0.92	26.40±0.15	10.33±0.88	12.17±2.68
47c	16.84±5.66	27.58±1.69	19.79±0.00	13.90±0.00	58.10±3.93	39.09±2.14
47d	27.31±0.31	44.67±0.38	22.10±1.38	18.17±3.57	73.62±4.71	22.16±4.83
47e	25.56±1.38	22.49±2.45	16.33±1.53	2.02±0.74	16.08±4.38	16.15±1.34
47f	31.70±1.50	40.04±1.77	20.65±15.61	9.90±0.89	38.45±1.31	24.30±4.29
47g	22.75±1.96	34.63±9.50	32.66±5.05	15.89±0.15	37.27±0.64	23.74±1.88
47h	27.43±0.76	43.29±0.92	32.01±1.38	17.57±0.45	33.66±0.00	20.13±5.36
48a	75.44±1.41	62.51±3.22	4.87±2.15	92.22±1.00	91.26±1.64	88.99±4.97
48b	14.50±0.00	29.93±0.00	19.64±1.84	15.12±3.42	25.37±1.00	21.97±0.27
48c	36.27±3.27	37.80±3.06	20.85±1.10	15.30±0.00	36.65±1.67	26.64±2.41
48d	97.64±0.87	98.13±0.40	98.41±0.65	99.96±0.00	97.96±0.72	70.79±4.76
48e	21.35±0.38	33.39±2.76	11.75±0.77	-5.79±0.59	39.46±6.58	7.94±0.80
48f	25.18±1.01	13.90±10.11	5.40±0.46	11.13±0.45	42.82±0.81	35.52±5.96
48g	27.11±1.89	27.94±1.07	0.53±0.64	18.75±0.52	31.11±0.32	28.29±2.21
48h	4.62±4.41	9.67±4.14	13.80±0.00	-3.90±0.59	-	-6.47±3.48
Mitomycin C	31.89±2.64	68.89±2.26	68.07±2.01	23.54±1.16	77.65±2.31	79.73±1.32

ตารางที่ 4.2 ค่า CC_{50} ของ Lithocholic acid 1 และสารอนุพันธ์ 47a, 47c, 47d, 48a และ 48d

สารตัวอย่าง	CC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)					
	HT-29	MCF-7	HepG2	KB	P388	Vero
47a	>1000	>1000	>1000	>1000	982.84	>1000
47c	>1000	>1000	>1000	>1000	865.13	>1000
47d	>1000	>1000	>1000	>1000	437.41	>1000
48a	458.03	704.01	>1000	100.39	209.41	401.79
48d	402.68	335.26	371.53	436.45	326.04	505.33

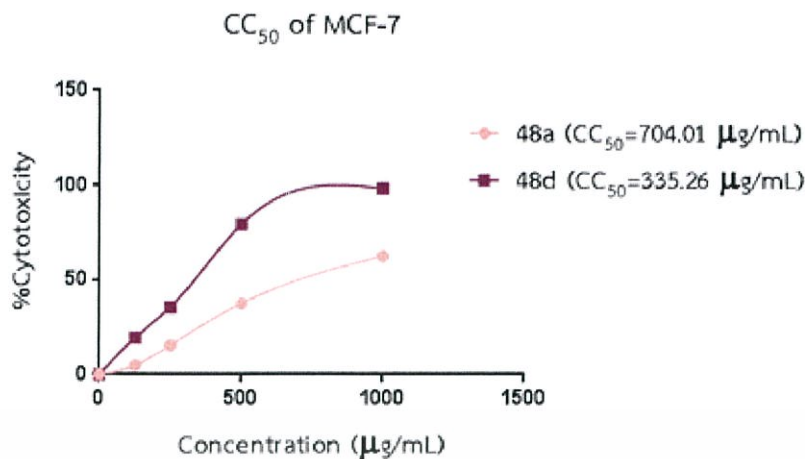


รูปที่ 4.34 กราฟ CC₅₀ ของสารอนุพันธ์ 48a และ 48d ต่อเซลล์ KB

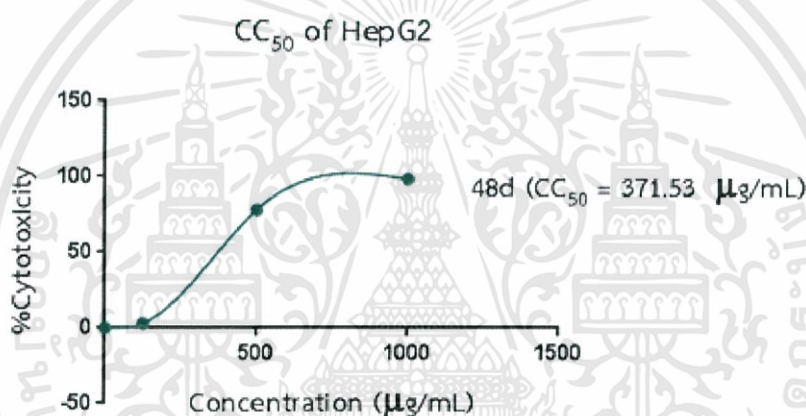


รูปที่ 4.35 กราฟ CC₅₀ ของสารอนุพันธ์ 47a, 47c, 47d, 48a และ 48d ต่อเซลล์ P388

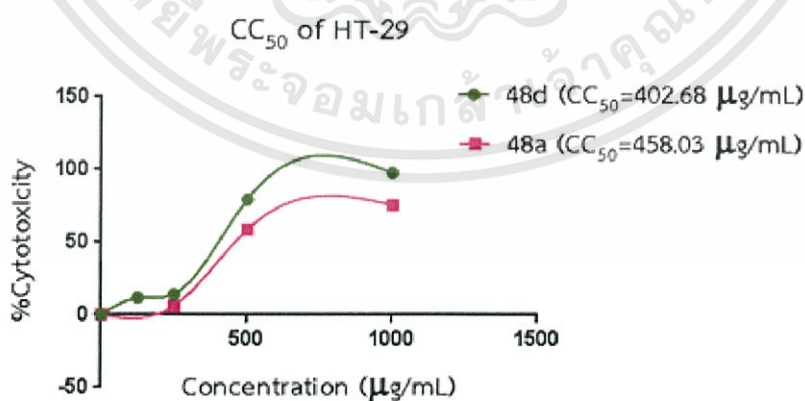
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.36 กราฟ CC₅₀ ของสารอนุพันธ์ 48a และ 48d ต่อเซลล์ MCF-7



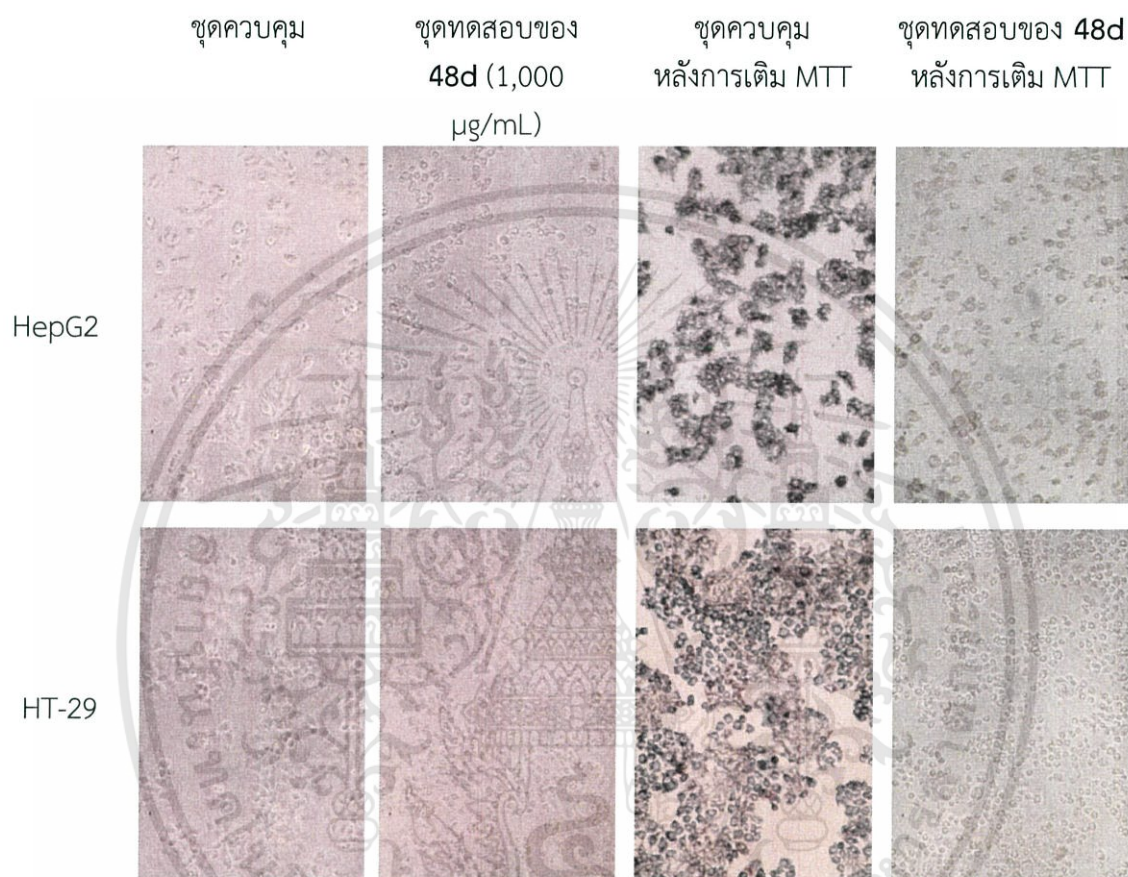
รูปที่ 4.37 กราฟ CC₅₀ ของสารอนุพันธ์ 48d ต่อเซลล์ HepG2



รูปที่ 4.38 กราฟ CC₅₀ ของสารอนุพันธ์ 48a และ 48d ต่อเซลล์ HT-29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.39 แสดงตัวอย่างผลการทดสอบของสารอนุพันธ์ 48d ต่อ HepG2 และ HT-29 เซลล์ไลน์ที่ถูกทำลายหลังการทดสอบ มีลักษณะผิดปกติไปจากชุดควบคุม และสังเกตได้ชัดเจนจากชุดควบคุมหลังการเติม MTT พบฟลิกฟอร์มมาชานปริมาณมาก แต่จากภาพหลังการเติม MTT ของชุดทดสอบ พบฟลิกฟอร์มมาชานในปริมาณที่น้อยแสดงว่า สารอนุพันธ์ 48d มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์ไลน์ได้ดี



รูปที่ 4.39 ตัวอย่างผลการทดสอบของสารอนุพันธ์ 48d ต่อเซลล์ไลน์ HepG2 และ HT-29 ที่กำลังขยาย 100 เท่า

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

Lithocholic acid 1, สารอนุพันธ์ 47a-47h และ 48a-48h ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 8 ชนิด จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 5 ชนิด คือ *B. cereus* DMST 5040, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, *S. aureus* TISTR 1466 และ *S. epidermidis* ATCC 12228 แบคทีเรียแกรมลบ 3 ชนิด คือ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. typhimurium* DMST 0562 โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางจากบริเวณไฮโซของการยับยั้ง (Clear zone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

inhibition) เพื่อบอกผลในเชิงคุณภาพว่าเชื่อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ โดยมี Gentamicin ที่ ปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวยาปฏิชีวนะเพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบ และมีชุดควบคุม เชิงลบ 2 ชุด คือ ไคโคลโรมีเทน และคลอโรฟอร์ม-เมทานอล

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของ Lithocholic acid 1 รวมทั้งอนุพันธ์ 47a-47h และ 48a-48h ปรากฏว่าพบ zone diameter ของสารอนุพันธ์ 48a, 48b, 48d และ 48h แสดงดัง ตารางที่ 4.3

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของ Lithocholic acid 1 สารอนุพันธ์ 47a-47h และ 48a-48h แสดงในตาราง 4.3 ค่า zone diameter (มิลลิเมตร) โดยแผ่นดิสก์มีขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ผลการทดสอบมีดังนี้ Lithocholic acid 1 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ทั้งหมดที่กล่าวมา และสารอนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิกที่ปรากฏวงใสบนเชื้อแบคทีเรีย มีทั้งหมด 4 สาร อนุพันธ์ ประกอบด้วยสารอนุพันธ์ 48a, 48b, 48d และ 48h โดยมีผลการทดสอบดังนี้

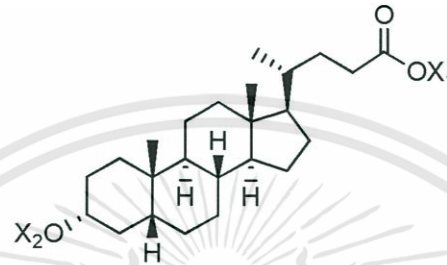
สารอนุพันธ์ 48a ผลการทดสอบพบว่าปรากฏวงใส (Clear zone) ต่อแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด มีค่าเท่ากับ 7.75 ± 0.64 มิลลิเมตรต่อ *B. subtilis*, 9.92 ± 0.20 มิลลิเมตรต่อ *M. luteus* และ 7.81 ± 0.48 มิลลิเมตรต่อ *S. epidermidis* พบว่า สารอนุพันธ์ 48a มีผลต่อ *M. luteus* ในระดับ อ่อน ดังรูปผ. 1 ในภาคผนวก ข แต่ไม่มีผลต่อ *B. subtilis* และ *S. epidermidis* เนื่องจากวงใสมีค่าน้อย

สารอนุพันธ์ 48b ผลการทดสอบพบว่าปรากฏวงใส (Clear zone) ต่อแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *S. epidermidis* มีค่าเท่ากับ 6.86 ± 0.13 มิลลิเมตร แต่วงใสมีค่าน้อย ดังนั้นสารอนุพันธ์ 48b ไม่มี ผลต่อ *S. epidermidis*

สารอนุพันธ์ 48d ผลการทดสอบพบว่าปรากฏวงใส (Clear zone) ต่อแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *B. subtilis* มีค่าเท่ากับ 6.44 ± 0.10 มิลลิเมตร แต่วงใสมีค่าน้อย ดังนั้นสารอนุพันธ์ 48d ไม่มีผลต่อ *B. subtilis*

สารอนุพันธ์ 48h ผลการทดสอบพบว่าปรากฏวงใส (Clear zone) ต่อแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *S. epidermidis* มีค่าเท่ากับ 13.33 ± 0.95 มิลลิเมตร ดังรูปผ. 2 ในภาคผนวก ข พบว่า สารอนุพันธ์ 48h มีผลต่อ *S. epidermidis* ในระดับปานกลาง

ตารางที่ 4.3 ค่า zone diameter (มิลลิเมตร) ของ Lithocholic acid 1 สารอนุพันธ์ 48a, 48b, 48d และ 48h



สาร	X ₁	X ₂	ค่า zone diameter (มิลลิเมตร)							
			แบคทีเรียแกรมบวก					แบคทีเรียแกรมลบ		
			<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	H	H	-	-	-	-	-	-	-	-
48a	-CH ₂ CH ₃	SO ₃ H	-	7.75±0.64	9.92±0.20	-	7.81±0.48	-	-	-
48b	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	SO ₃ H	-	-	-	-	6.86±0.13	-	-	-
48d	-CH ₂ CH ₂ OSO ₃ H	SO ₃ H	-	6.44±0.10	-	-	-	-	-	-
48h	-C ₆ H ₄ (NO ₂)	SO ₃ H	-	-	-	-	13.33±0.95	-	-	-
Gentamicin 10	ไมโครกรัมต่อดิสก์		31.71±1.27	25.31±0.52	27.55±1.96	24.02±0.73	28.32±2.17	25.80±0.38	28.70±0.28	17.41±0.86

(-) หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบ, หมายถึง ค่า zone diameter ดังกล่าวรวมค่าเส้นผ่านศูนย์กลางแผ่นดิสก์ 6 มิลลิเมตร

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ได้ทำการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Lithocholic acid 1 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 24 (C-24) จากหมู่คาร์บอกซิลเป็นหมู่เอสเทอร์ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน และที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) จากหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ซัลเฟตด้วยปฏิกิริยาซัลเฟชัน จากนั้นนำสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ผลการวิจัยสรุปได้ดังนี้

5.1.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิกโดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน แบ่งออกเป็น 2 วิธี ดังนี้

5.1.1.1 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ Sulfuric acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

อนุพันธ์เอสเทอร์ 47a และ 47b ถูกสังเคราะห์จาก Lithocholic acid 1 ทำปฏิกิริยากับ ethyl alcohol และ butyl alcohol ตามลำดับ โดยมีผลได้ร้อยละของสารอนุพันธ์ 47a และ 47b เท่ากับ 58.34 และ 65.60 ตามลำดับ (คำนวณเทียบจาก Lithocholic acid 1)

5.1.1.2 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ 1,3-Dicyclocarbodiimide (DCC) เป็นรีเอเจนต์

อนุพันธ์เอสเทอร์ 47c ถึง 47h ถูกสังเคราะห์จาก Lithocholic acid 1 โดยมี DCC เป็นรีเอเจนต์ในการกระตุ้นให้หมู่คาร์บอกซิลมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์กับแอลกอฮอล์รีเอเจนต์ (Alcohol reagents) ซึ่งสารอนุพันธ์ 47c ถึง 47h มีผลได้ร้อยละอยู่ในช่วง 15.88 ถึง 64.52 (คำนวณเทียบจาก Lithocholic acid 1)

5.1.2 การสังเคราะห์สารประกอบซัลเฟตของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดยการทำปฏิกิริยาซัลเฟชัน

อนุพันธ์ซัลเฟตเอสเทอร์ 48a ถึง 48h ถูกสังเคราะห์จากสารอนุพันธ์ 47a ถึง 47h โดยทำปฏิกิริยากับ sulphamic acid มีผลได้ร้อยละของสารอนุพันธ์อยู่ในช่วง 47.19 ถึง 85.59 (คำนวณเทียบจาก 47a-47h)

5.1.3 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

Lithocholic acid 1 และสารอนุพันธ์ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 6 ชนิด ประกอบด้วย เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29, เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7, เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2, เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากชนิด KB, เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูชนิด P388 และเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารอนุพันธ์ 47a, 47c และ 47d มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ P388 สารอนุพันธ์ 48a มีผลต่อเซลล์ไลน์ KB มากที่สุด รองลงมาคือ P388, Vero, HT-29 และ MCF-7 ตามลำดับ ส่วนสารอนุพันธ์ 48d มีผลต่อเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด รองลงมาคือ MCF-7, HepG2, HT-29, KB และ Vero ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ พบว่า สารอนุพันธ์ 48a มีผลต่อเซลล์ไลน์ KB และ

เอกสารอ้างอิง

- [1] Goutam Brahmachari. 2012. **BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry**. Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- [2] พัทณี เจริญยิ่ง. 2549. “การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์สังเคราะห์.” รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [3] สมพล เพิ่มพงศ์โกศล. รักษาภาวะฮอร์โมนเพศชายบกพร่อง. [online]. Available : <http://academic.ra.mahidol.ac.th/pdffile/health/health001.pdf>.
- [4] พัทณี เจริญยิ่ง. 2551. “การปรับปรุงโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์สังเคราะห์.” รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [5] V.V. Kollerov, D. Monti, N.O. Deshcherevskaya, T.G. Lobastova, E.E. Ferrandi, A. Larovere b, S.A. Gulevskaya, S. Riva and M.V. Donova. 2013. Hydroxylation of lithocholic acid by selected actinobacteria and filamentous fungi, **Steroids**, 78, pp. 370–378.
- [6] พัทณี เจริญยิ่ง. 2553. “การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของไบล์แอซิดเพื่อเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพ.” รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [7] Z. Dang, A. Lin, P. Ho, D. Soroka, K.-H. Lee, L. Huang and C.-H. Chen. 2011. Synthesis and proteasome inhibition of lithocholic acid derivatives, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 21, pp. 1926–1928.
- [8] F. Májer, R. Sharma, C. Mullins, L. Keogh, S. Phipps, S. Duggan, D. Kelleher, S. Keely, A. Long, G. Radics, J. Wang, and JF. Gilmer. 2014. New highly toxic bile acid derived from deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid and lithocholic acid, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 22, pp. 256-268.
- [9] P. Sahasyodhin, P. Boonmanumsin, N. Aroonrek and P. Charoenying. 2008. Synthesis and Antibacterial Activity of Deoxycholic Acid Amides, การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34 วันที่ 31 ตุลาคม – 2 พฤศจิกายน 2551 ณ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์กรุงเทพมหานคร.
- [10] P. Charoenying, P. Boonmanumsin, P. Sahasyodhin, C. Laosinwattana and N. Aroonrek. 2009. Modified Bile Acid: Preparation of Deoxycholic acid Amides and Their Biological Activities, **Tenth Tetrahedron Symposium: Challenges in Organic and Bioorganic Chemistry**, 23-26 June 2009, Paris, France.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [11] wikipedia.org. 2556. **สเตอรอยด์**. [online]. Available : <https://th.wikipedia.org/wiki/สเตอรอยด์>.
- [12] จักรกริช กล้าผจญ. **Anabolic steroids: The Truth**. [online]. Available : <http://www.med.cmu.ac.th/dept/rehab/2010/images/sports/steroid.pdf>.
- [13] ศูนย์ตรวจสอบสารต้องห้ามในนักกีฬา มหาวิทยาลัยมหิดล. 2546. **อันตรายของ“คอร์ติโคสเตียรอยด์”**. [Online]. Available : <http://www.dc.mahidol.ac.th/th/index.php/,/2013-04-01-04-20-50/2013-04-02-04-10-50/56-34>.
- [14] พวงทอง ไกรพิบูลย์. **ฮอร์โมนเพศ (Sex hormone หรือ Sex steroid หรือ Gonadal steroid)**. [Online]. Available: <http://haamor.com/th/ฮอร์โมนเพศ/>.
- [15] พัทธนี เจริญยิ่ง. 2557. “การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอะมิโนสเตียรอยด์”. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [16] HMEPLEASE D. 2557. **ไฟโตสเตอรอล (phytosterols) คืออะไร และมีอยู่ในอาหารใดบ้าง?**. [Online]. Available: <http://healthmeplease.com/phytosterols.html>.
- [17] Hanukoglu I. 2559. **คอเลสเตอรอล**. [Online]. Available: <https://th.wikipedia.org/wiki/คอเลสเตอรอล>.
- [18] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2556. **คาร์ดิแอกไกลโคไซด์**. [Online]. Available: <https://th.wikipedia.org/wiki/คาร์ดิแอกไกลโคไซด์>.
- [19] A. Enhsen, W. Kramer and G. Wess.1998. Bile acids in drug discovery., *Drug Discoveries & Therapeutics.*, 3, pp.409-418.
- [20] ชัยสิทธิ์ สิทธิเวช. 2553. **การสื่อสัญญาณเซลล์ของกรดน้ำดี**. [Online]. Available: <http://digitalcollect.lib.buu.ac.th/journal/Science/v15n2/107-115.pdf>.
- [21] M. Baptissart, A. Vega, S. Maqdasy, F. Caira, S. Baron, Jean-Marc A. Lobaccaro, and D.H. 2013. Bile acids: From digestion to cancers., *Biochimie.*, 95, pp. 504-517.
- [22] wikipedia.org. 2015. **ไบล์แอซิดซีเควสเตรนต์**. [Online]. Available : <https://th.wikipedia.org/wiki/ไบล์แอซิดซีเควสเตรนต์>.
- [23] นิธิยา รัตนาปนนท์. **หน้าที่ของน้ำดี**. [Online]. Available : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/6979/หน้าที่ของน้ำดี>.
- [24] Hashim SA and Vanitallie TB. 2016. **Bile acid sequestrant**. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Bile_acid_sequestrant.
- [25] กองพัฒนาศักยภาพผู้บริโภค สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. 2545. **รู้จักสเตียรอยด์ดีหรือยัง?**. [Online]. Available: <http://webnotes.fda.moph.go.th/consumer/csmb/csmb2546.nsf/723dc9fee41b850847256e5c00332fb4/0aedb8b0fe960133c7256cbb0025d1a9?OpenDocument>.
- [26] วิจิตร เอื้อประเสริฐและคณาจารย์ภาควิชาเคมี. 2547. **คู่มือปฏิบัติการเคมีอินทรีย์**. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ : บริษัท แอคทีฟ พรินท์ จำกัด.

- [27] สุภาพ บุญยะรัตเวช และเกษร วีระชาโต. 2536. **ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์**. พิมพ์ครั้งที่ 5 กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [28] B. Neises, W. Steglich. 1978. **Steglich esterification**. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Steglich_esterification.
- [29] Wiley Online Library. 2010. **Steglich Catalyst (Steglich Esterification)**. [Online]. Available: <http://onlinelibrary.wiley.com/>.
- [30] ปิยาณี ลีมีโสภารธรรม. 2550. “การเตรียม 5 β -cyclodextrin ที่เชื่อมกับผ้าฝ้ายสำหรับใช้ใน งานด้านสิ่งทอ.” วิทยานิพนธ์ สาขาวิชาวิทยาการและวิศวกรรมพอลิเมอร์ ภาควิชาวิทยาการ และวิศวกรรมวัสดุ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- [31] Norman C. Foster. 1997. Sulfonation and Sulfation Processes, **Chemithon**, pp. 1-36.
- [32] ThaiNurseClub. 2010. **Bacteria**. [Online]. Available: <http://thainurseclub.blogspot.com/2014/08/bacteria.html>.
- [33] พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. **Bacillus cereus/บาซิลลัส ซีเรียส**. [Online]. Available: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1116/bacillus-cereus-บาซิลลัส-ซีเรียส>.
- [34] พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. **Bacillus/บาซิลลัส**. [Online]. Available: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1226/bacillus-บลาซิลลัส>.
- [35] พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. **Micrococcus/ไมโครคอกคัส**. [Online]. Available : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1982/micrococcus>
- [36] พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. **โรคและอาการของโรคที่เกิดจาก Staphylococcus aureus**. [Online]. Available: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3919/โรคและอาการของโรคที่เกิดจากstaphylococcus-aureus>.
- [37] คมสันต์ วรรณไสย. 2558. **พยาธิวิทยาของโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อย**. [Online]. Available : <http://www.med.cmu.ac.th/secret/edserv/curriculum/file/2558/อ.คมสันต์/เอกสารประกอบการบรรยาย%20Pathology%20of%20bacterial%20Infections.pdf>.
- [38] จันทรเพ็ญ วิวัฒน์. 2554. **โรคอุจจาระร่วงจากเชื้ออีโคไล (E. coli)**. [Online]. Available : [http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/52/โรคอุจจาระร่วงจากเชื้ออีโคไล\(Ecoli\)/](http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/52/โรคอุจจาระร่วงจากเชื้ออีโคไล(Ecoli)/).
- [39] **เชื้อแบคทีเรีย Pseudomonas aeruginosa**. [Online]. Available : <http://www.vcharkarn.com/varticle/42381>.
- [40] **ใช้ไทพอยด์**. [Online]. Available : <http://www.medicthai.com/โรคต่างๆ/item/94-ใช้ไทพอยด์>.
- [41] P. G.G. do Nascimento, T. L.G. Lemos, M. C.S. Almeida, J. M.O. de Souza, A. M.C. Bizerra, G. M.P. Santiago, J. G.M. da Costa, and H. D.M. Coutinho. 2015. Lithocholic acid and derivatives: Antibacterial activity., **Steroids**, in press.

- [42] L. Kihel, M. Clément, M. A. Bazin, G. Descamps, M. Khalid and S. Rault. 2008. New lithocholic and chenodeoxycholic piperazinylcarboxamides with antiproliferative and pro-apoptotic effects on human cancer cell lines, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16, pp. 8737–8744.
- [43] R. H. PALMER and M. G. BOLT. 1971. Bile acid sulfates I Synthesis of lithocholic acid and their identification in human bile, **Lipid Research**, 12, pp. 671-679.
- [44] K.-Y. Tserng and P. D. Klein. 1971. Synthesis of sulfate esters of lithocholic acid, glycolithocholic acid, and tauroolithocholic acid with sulfur trioxide-triethylamine, **Lipid Research**, 12, pp. 671-679.
- [45] H Schneider, H. Fiander, K. A. Harrison, M. Watson, G. W. Burton and Arya. 1996. Inhibitory Potency of Lithocholic Acid Analogs and Other Bile Acids on Glucuronosyltransferase Activity in a Colon Cancer Cell Line, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 6, pp. 637-642.
- [46] L. Nahar and A. B. Turner. 2003. Synthesis of ester-linked lithocholic acid dimers, **Steroids**, 68, pp. 1157–1161.
- [47] N. T. T. Huonga, P. Klímková, A. Sorrenti, G. Mancini, and P. Drašar. 2009. Synthesis of spiroannulated oligopyrrole macrocycles derived from lithocholic acid, **Steroids**, 74, pp. 715–720.
- [48] T. Pospieszny, I. Małecka and Z. Paryzek. 2010. A practical synthesis and spectroscopic study of new potentially biologically active S-lithocholic acid-substituted derivatives of 2-thiouracil, **Tetrahedron Letters**, 51, pp. 4166–4169.
- [49] H.-B. He, L.-X. Gao, Q.-F. Deng, W.-P. Ma, C.-L. Tang, W.-W. Qiu, J. Tang, J.-Y. Li and F. Yang. 2012. Synthesis and biological evaluation of 4,4-dimethyl lithocholic acid derivatives as novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 22, pp. 7237-7242.
- [50] G. E. Siless, M. E. Knott, M. G. Derita, S. A. Zacchino, L. Puricelli and J. A. Palermo. 2012. Synthesis of steroidal quinones and hydroquinones from bile acids by Barton radical decarboxylation and benzoquinone addition. Studies on their cytotoxic and antifungal activities, **Steroids**, 77, pp. 45–51.
- [51] M. Singh, S. Bansal, S. Kundu, P. Bhargava, A. Singh, R. K. Motiani, R. Shyam, V. Sreekanth, S. Sengupta and A. Bajaj. 2015. Synthesis, structure–activity relationship, and mechanistic investigation of lithocholic acid amphiphiles for colon cancer therapy, **Medicinal Chemical Communications**, 6, pp. 192–201.

- [52] Mosmann, T. 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of Immunological*. 65 : 55-63.
- [53] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Eleventh Edition**. Wayne : Clinical and Laboratory standards institute.
- [54] D. V. Waterhous, S. Barnes and D. D. Muccio. 1985. "Nuclear magnetic resonance spectroscopy of bile acids. Development of two-dimensional NMR methods for the elucidation of proton resonance assignments for five common hydroxylated bile acids, and their parent bile acid, 5 β -cholanoic acid." *Lipid research*. 26. pp. 1068-1078.



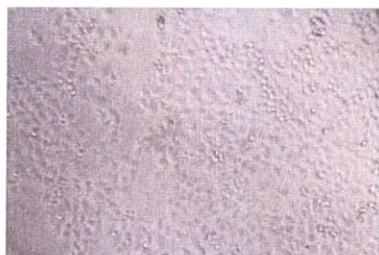
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



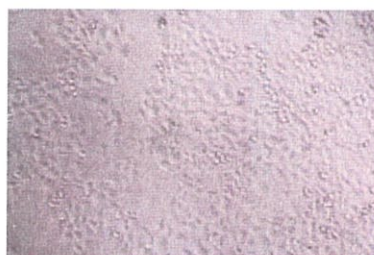
ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 1 ผลของ Lithocholic acid 1 ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า

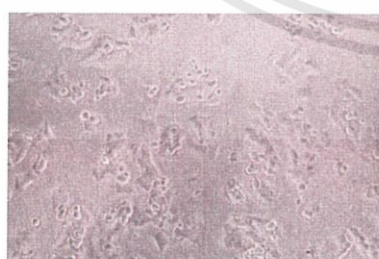


Control

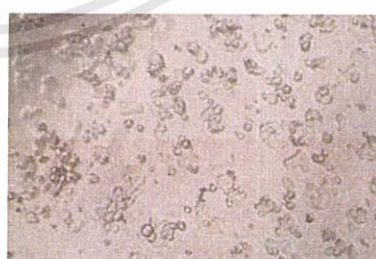


1,000 µg/mL

รูปผ. 2 ผลของ Lithocholic acid 1 ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า



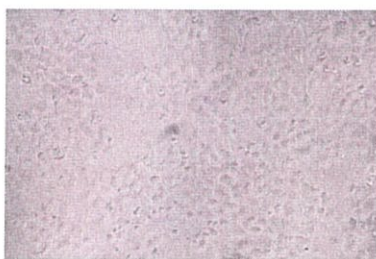
Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 3 ผลของ Lithocholic acid 1 ต่อเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG2 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Control

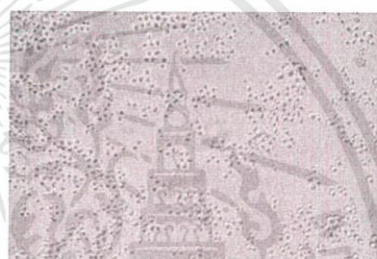


1,000 µg/mL

รูปผ. 4 ผลของ Lithocholic acid 1 ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 5 ผลของ Lithocholic acid 1 ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า

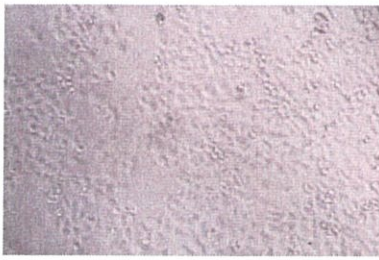


Control

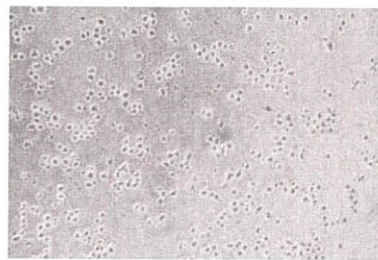


1,000 µg/mL

รูปผ. 6 ผลของ Lithocholic acid 1 ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 7 ผลของ 47a ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า



Control

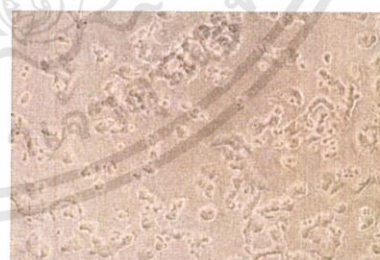


1,000 µg/mL

รูปผ. 8 ผลของ 48a ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า

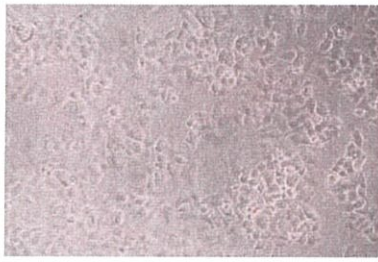


Control

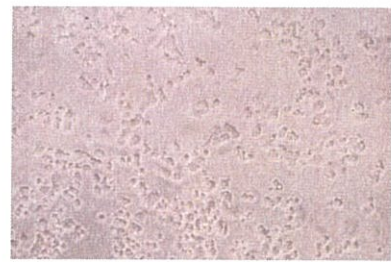


1,000 µg/mL

รูปผ. 9 ผลของ 48a ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 10 ผลของ 48a ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า

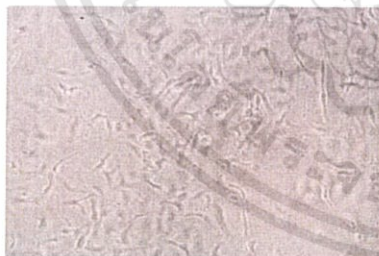


Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 11 ผลของ 48a ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า

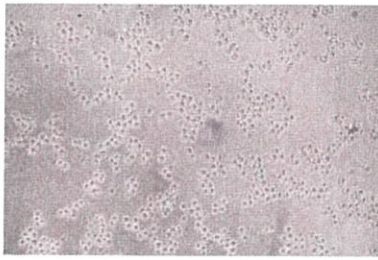


Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 12 ผลของ 48a ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 13 ผลของ 47c ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า

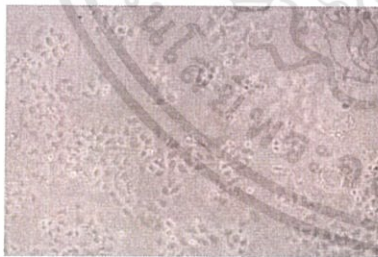


Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 14 ผลของ 47d ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า

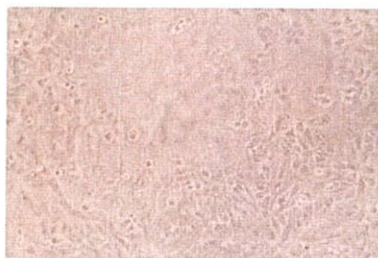


Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 15 ผลของ 48d ต่อเซลล์ HT-29 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ HT-29 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 16 ผลของ 48d ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ MCF-7 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า

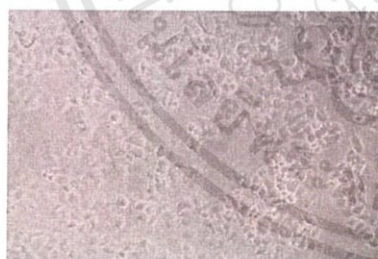


Control

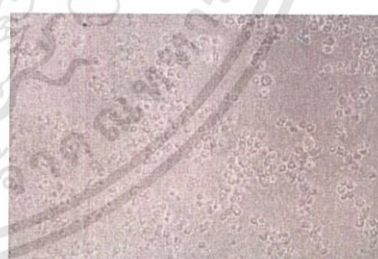


1,000 µg/mL

รูปผ. 17 ผลของ 48d ต่อเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ HepG2 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า

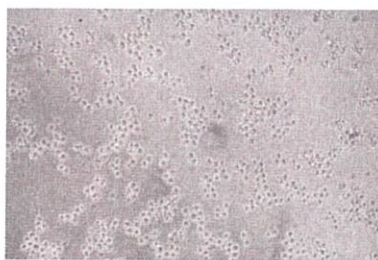


Control

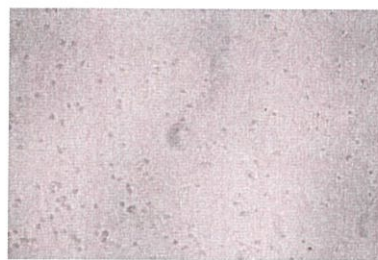


1,000 µg/mL

รูปผ. 18 ผลของ 48d ต่อเซลล์ KB ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ KB ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า



Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 19 ผลของ 48d ต่อเซลล์ P388 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ P388 ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า



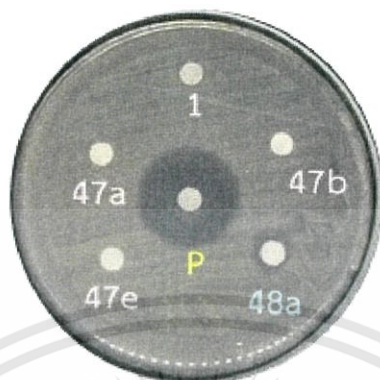
Control



1,000 µg/mL

รูปผ. 20 ผลของ 48d ต่อเซลล์ Vero ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero ปกติ เป็นชุดควบคุมที่กำลังขยาย 100 เท่า

ภาคผนวก ข



รูปผ. 1 Clear zone ของ Lithocholic acid 1 สารอนุพันธ์ 47a, 47b, 47e และ 48a ต่อเชื้อ *M. luteus* เมื่อ P คือ ยาปฏิชีวนะ Gentamicin ที่ปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)



รูปผ. 2 Clear zone ของสารอนุพันธ์ 47d, 47h, 48d, 48g และ 48h ต่อเชื้อ *S. epidermidis* เมื่อ P คือ ยาปฏิชีวนะ Gentamicin ที่ปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)