วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยได้แบ่งออกเป็นกิจกรรม 4 ส่วน ดังรายละเอียดดังนี้

กิจกรรมส่วนที่ 1 การหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ไดเอริล เมธิลเอมีนโดยผ่านปฏิกิริยา catalytic aminoalkylation ในเปอร์เซ็นต์ที่ดีที่สุดโดยวิธีการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

ศึกษาและทดลองปฏิกิริยา catalytic aminoalkylation โดยใช้สารตั้งต้นคือ benzyl carbamate benzaldehyde และ anisole มาทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะต่างๆ ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งอิทธิพลที่จะศึกษาได้แก่

1. ผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยา
2. ผลของตัวทำละลายต่อปฏิกิริยา
3. ผลของปริมาณการใช้ iodine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
4. ผลของเวลาต่อปฏิกิริยา

วิธีการทดลองทั่วไปเป็นดังนี้

ชั่ง 1,3,5-trimethoxybenzene 0.1682 g (1.0 mmol) และ benzyl carbamate 0.1512 g (1.0 mmol) ใส่ในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลาย toluene (1 mL) เติม benzaldehyde 1.1 mL (1.1 mmol) และเติมไอโอดีน 0.0279 g (10 mol %) ปิดหลอดทดลองด้วย septum คนตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยเปรียบเทียบกับ 1,3,5-trimethoxybenzene และ benzyl carbamate ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดเติมสารละลายอิ่มตัวของ $Na_2S_2O_3$ เพื่อกำจัดไอโอดีน ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (2×20 mL) ตามด้วยสารละลายอิ่มตัวของ $NaHCO_3$ (10 mL) น้ำ (10 mL) และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น CH_2Cl_2 มาทำให้แห้งด้วย $MgSO_4$ anhydrous นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product

นำ crude product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค radial chromatography (ภาคผนวก 2) โดยใช้ตัวทำละลาย hexane (50 mL) ตามด้วย 5%, 10%, 20%, และ 30% EtOAc ใน hexane (ตัวทำละลายละ 50 mL) ตามลำดับ เพื่อแยกสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมา นำ fraction ของผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump

กิจกรรมส่วนที่ 2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของไดเอริล เมธิลเอมีนชนิดต่างๆ ด้วยปฏิกิริยา catalytic aminoalkylation

ทำการศึกษาและทดลองปฏิกิริยา catalytic aminoalkylation ของสารตั้งต้น aromatic compounds และ aldehydes ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากกิจกรรมส่วนที่ 1

กิจกรรมส่วนที่ 2 นี้จะได้สารประกอบของ benzylamine ประมาณ 15-20 ตัว ซึ่งโครงสร้างของสารบางตัวมีลักษณะใกล้เคียงกับสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้งจากธรรมชาติและที่สังเคราะห์ขึ้น

กิจกรรมส่วนที่ 3 การพิสูจน์หาเอกลักษณ์ของสาร

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร ให้ทราบถึงโครงสร้างที่แท้จริงสารบริสุทธิ์ที่สังเคราะห์ได้ โดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโคปี ได้แก่ NMR spectroscopy IR spectroscopy Mass spectroscopy และ อื่นๆ

<u>กิจกรรมส่วนที่ 4</u> การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สังเคราะห์ได้

1. การเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจสายพันธ์ RAW 264.7

เลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจสายพันธ์ RAW 264.7 ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งมี 100 U/ml penicillin,100 μg/ml streptomycin, 4 mM L-glutamine, 25 mM D-glucose, 1 mM sodium pyruvate และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์นั้นทดสอบโดยใช้วิธี MTT assay ซึ่งเอนไซม์ dehydrogenase ในไมโตรคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสาร tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ให้เป็นสาร formazan ซึ่งปริมาณสาร formazan ที่เกิดขึ้นนี้มีสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ นำสารบริสุทธิ์ที่สังเคราะห์ได้มาละลายใน DMSO แล้วผสมสารลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (10% FBS ใน DMEM) ให้มีความเข้มข้นต่างๆ พร้อมทั้งใส่ LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดใส่สารละลาย MTT แล้วนำกลับไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นละลายสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (Srisook และ Cha, 2004) แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ/ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ) X 100

3. การวิเคราะห์แอคทีวิตีของเอนไซม์ iNOS

ไนไตรท์ (nitrite) เกิดจากการออกซิเดชั่นไนตริกออกไซด์ ที่ผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (10% FBS ใน DMEM) เป็นดัชนีที่บ่งชี้แอคทีวิตีของเอนไซม์ iNOS ปริมาณไนไตรท์ทดสอบได้โดยปฏิกิริยา Griess โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ นำสารบริสุทธิ์ที่สังเคราะห์ได้มาละลายใน DMSO แล้วผสมสารลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ พร้อมทั้งใส่ LPS และเลี้ยงเซลล์ ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml และนำอาหารเลี้ยงเซลล์นี้จำนวน 100 μl ผสมกับสารละลาย Griess [0.1% *N*-(1-naphtyl)-ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5 % phosphoric acid] จำนวน 100 μl จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตราฐานที่สร้างจาก sodium nitrite (Srisook และ Cha, 2005)