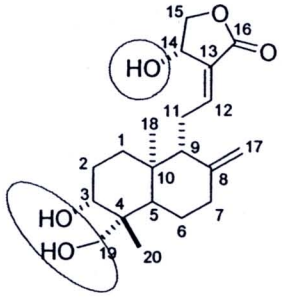
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การดำเนินการวิจัยเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ andrographolide ได้วางแผนแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ต่อไปนี้

<u>ส่วนที่</u> 1	สกัดและแยกสาร andrographolide จากต้นฟ้าทะลายโจร
สถานที่ทำการทดลอง	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
<u>ส่วนที่ 2</u>	สังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ของสาร andrographolide จำนวน 40 ชนิด
สถานที่ทำการทดลอง	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ andrographolide เพื่อให้ได้สารใหม่สำหรับศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโรคปริทันต์ จะทำการวิจัยโดยแบ่งการสังเคราะห์และดัดแปลงหรือปรับแต่งโครงสร้างในส่วนต่างๆของ andrographolide โดยออกแบบการปรับเปลี่ยนโครงสร้างออกเป็น 3 แผนการ (ส่วนที่วงกลมไว้ คือส่วนที่ทำการปรับเปลี่ยน) แผนการที่ 1 และ 2 ทำในปีแรก และแผนที่ 3 ทำในปีที่ 2

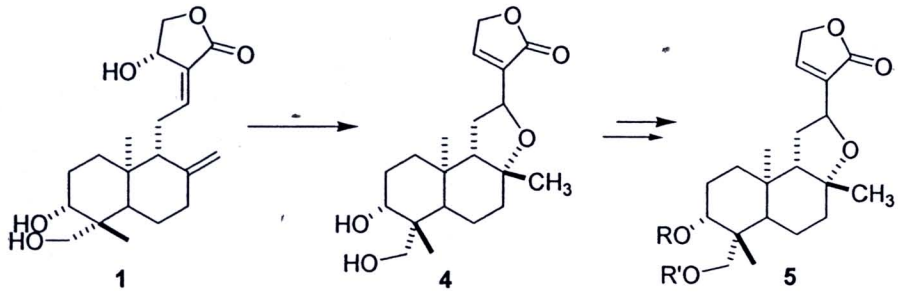


<u>แผนการที่ 1.</u> ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่ hydroxyl ของ andrographolide ในตำแหน่งที่ 3, 14 และ 19 (ส่วนที่วงกลม) ให้เป็นหมู่ต่างๆ เช่น หมู่ ether และหมู่ ester

โครงสร้างทางเคมีของสารอนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ที่ได้จากการสังเคราะห์ตามแผนการที่ 1 จะมีจำนวนประมาณ 14 ตัว

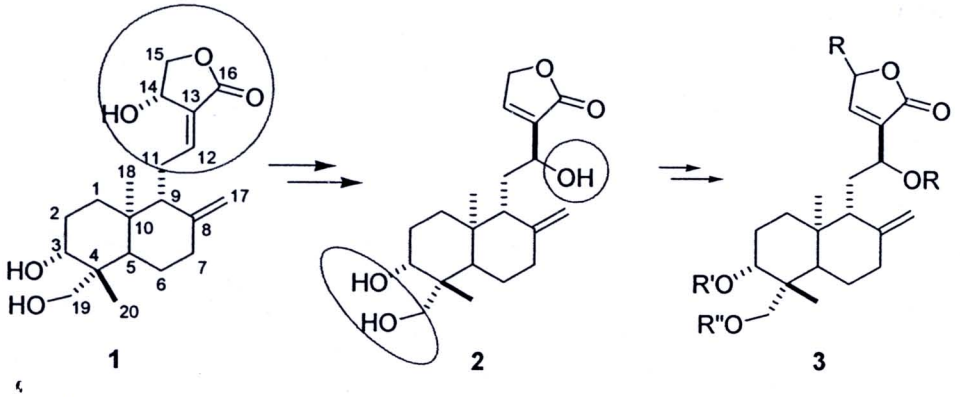
<u>แผนการที่ 2</u> ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ andrographolide ให้เป็น isoandrographolide (สาร **4**) และเปลี่ยนหมู่ hydroxyl ตำแหน่ง C-3 และ C-19

โครงสร้างทางเคมีของสารอนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ที่ได้จากการสังเคราะห์ตามแผนการที่ 2 จะมีจำนวนประมาณ 5 ตัว เช่น หมู่ ether และหมู่ ester



แผนการที่ 3. ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของวง α-alkylidene χ-butyrolactone ของ andrographolide (ส่วนที่วงกลมของ 1)และเพิ่มจำนวนสายโซ่คาร์บอนที่ตำแหน่ง C-15 ให้มีจำนวนต่างกัน ดังรูปข้างล่าง จากนั้นปรับเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่ hydroxyl ในตำแหน่งที่ 3, 12 และ 19 ให้เป็นหมู่ต่างๆ เช่น หมู่ ether หมู่ ester หรือหมู่ amide

โครงสร้างทางเคมีของสารอนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ที่ได้จากการสังเคราะห์ตามแผนการที่ 3 จะมีจำนวนประมาณ 20 ตัว



ในระหว่างการสังเคราะห์จะทำการศึกษาพัฒนาวิธีการที่มีประสิทธิภาพ ใช้เคมีสะอาดและหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารที่มีโครงสร้างสามมิติตรงกับสารเป้าหมายและ %การผลิตของผลิตภัณฑ์สูง พร้อมทั้งวิเคราะห์ ตรวจสอบและศึกษาโครงสร้างสามมิติของสารโดยวิธีทาง spectroscopy .

หลังจากนั้นนำสารอนุพันธ์ใหม่ที่ได้ทั้งหมดส่งไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

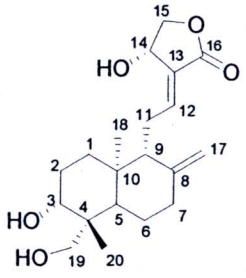
ส่วนที่ 3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis* ซึ่งทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) และแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* (แบคทีเรียในช่องปากที่เปลี่ยนน้ำตาลบนเคลือบฟันให้เป็นกรด

ส่วนการสกัดและแยกสาร andrographolide จากต้นฟ้าทะลายโจร

ได้สกัดและแยกสาร andrographolide จากต้นฟ้าทะลายโจรจากแหล่งที่มาคือ บ้านดงบัง จ. ปราจีนบุรี ที่มีการเก็บเกี่ยวประมาณเดือน มีนาคม พ.ศ. 2553 (เก็บผลผลิตเมื่อมีดอก) และตากแดดและอบแห้งที่อุณหภูมิ 75-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

การสกัดและแยกสาร andrographolide จากต้นฟ้าทะลายโจร ทำโดยฟ้าทะลายโจรอบแห้ง ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ทำการสกัดโดยแช่ในถังที่บรรจุ Ethanol ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน แล้วระเหยตัวทำละลายออก จะได้ crude ฟ้าทะลายโจร และนำ crude ฟ้าทะลายโจรที่มาแยกให้บริสุทธิ์โดย column chromatrography จะได้สาร Andrographolide

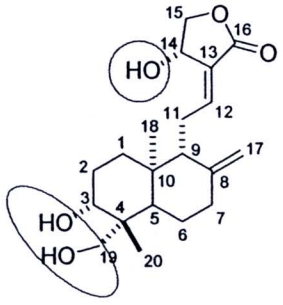
ตรวจสอบโครงสร้างโดย ^{1}H และ $^{13}CNMR$ spectroscopy ยืนยันโครงสร้างโดยเทคนิค 2D NMR (COSY, HMQC, HMBC และ NOESY)



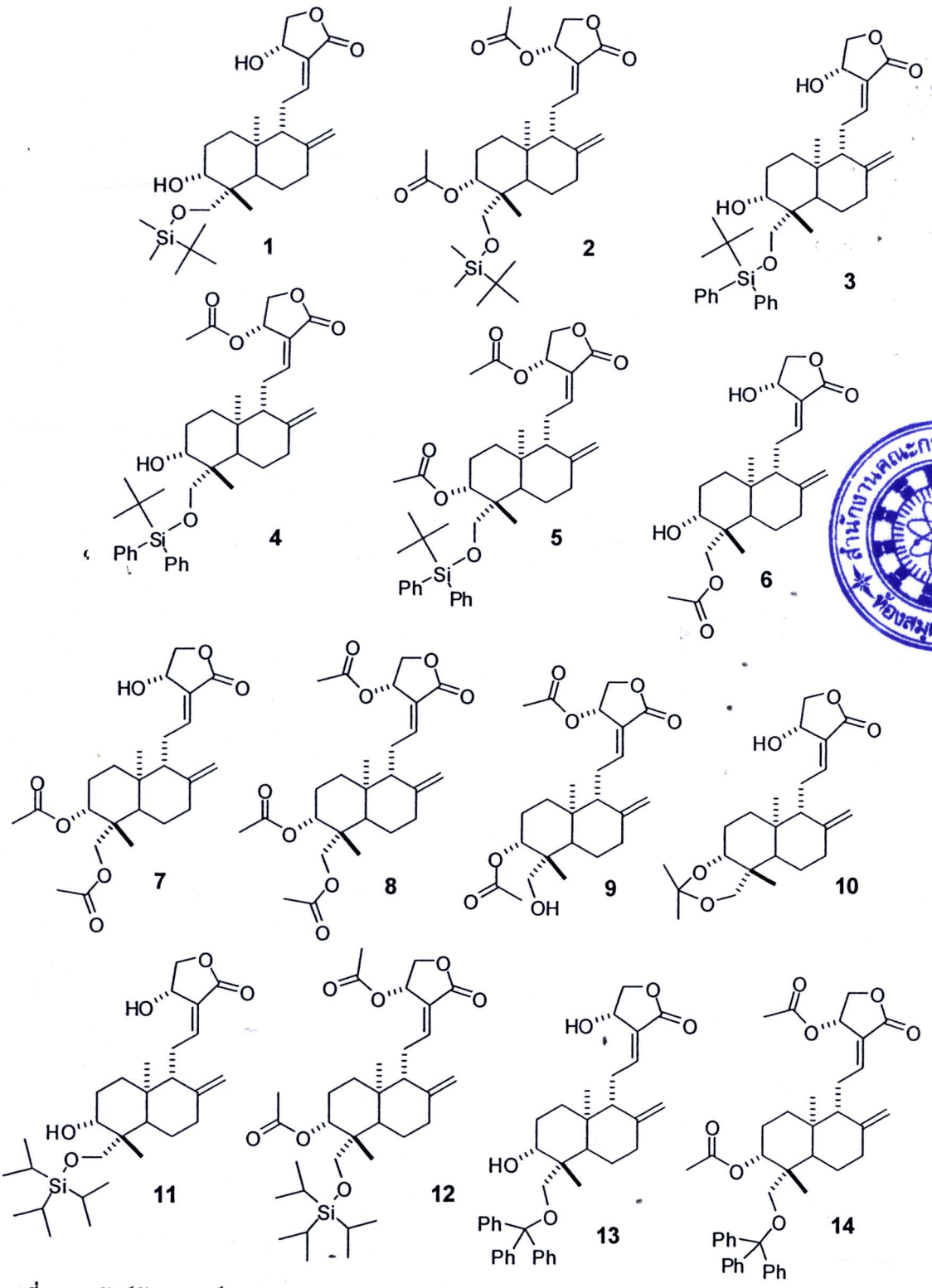
Andrographolide

2. สังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ตามแผนการที่ 1 พร้อมทั้งตรวจสอบโครงสร้าง

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ andrographolide ตามแผนการที่ 1 เพื่อให้ได้สารใหม่สำหรับศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโรคปริทันต์ จะทำการวิจัยโดยแบ่งการสังเคราะห์และดัดแปลงหรือปรับแต่งโครงสร้างในส่วนต่างๆของ andrographolide โดยออกแบบการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่ hydroxyl ของ andrographolide ในตำแหน่งที่ 3, 14 และ 19 (ส่วนที่วงกลม) ให้เป็นหมู่ต่างๆ



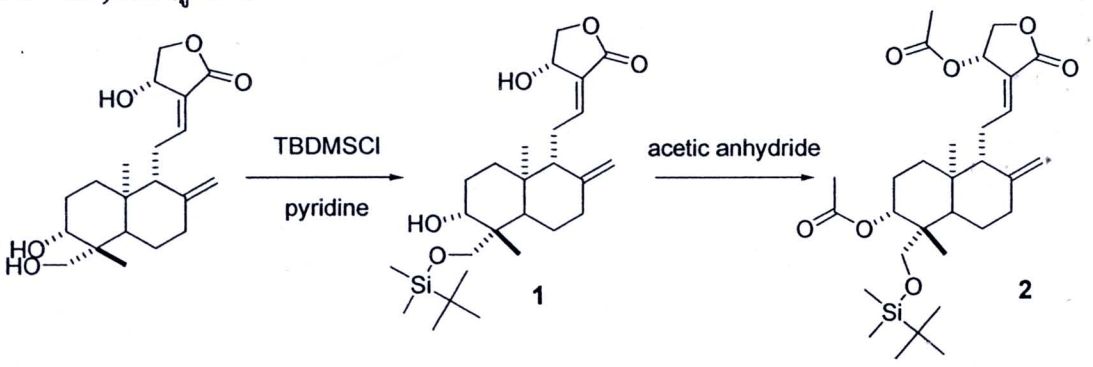
สำหรับการสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ตามแผนการที่ 1 คือ ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่ hydroxyl ของ andrographolide ในตำแหน่งที่ 3, 14 และ 19 ให้เป็นหมู่ต่างๆ ที่ได้ดำเนินการเสร็จไปแล้วนั้นได้สารอนุพันธ์ 14 ชนิดดังรูปต่อไปนี้



รูปที่ 1 อนุพันธ์สังเคราะห์ andrographolide

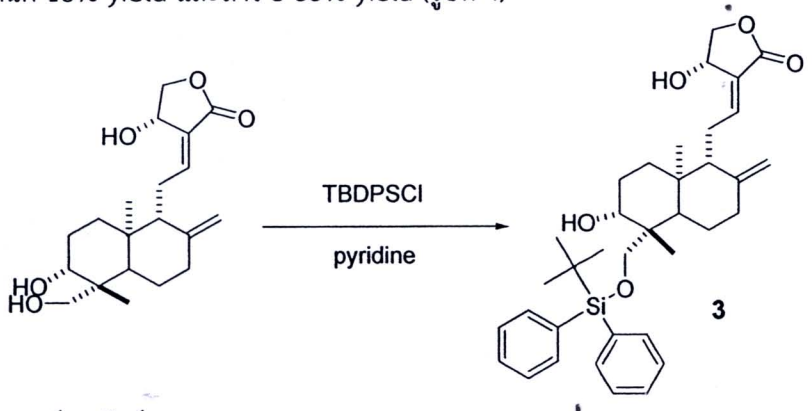
การสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ตามแผนการที่ 1 ด้วยการเปลี่ยนแปลงหมู่ hydroxyl ตำแหน่ง C-3, C-14 หรือ C-19 เป็นหมู่ *tert*-butyldimethylsilylether โดยปฏิกิริยาของ Andrographolide และ *tert*-butyldimethylsilylchloride เริ่มด้วยการนำ Andrographolide ทำปฏิกิริยาโดยการเติม pyridine และ *tert*-butyldimethylsilylchloride คนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้สารอนุพันธ์ TBS-

andrographolide **1** 92% yield จากนั้นทำปฏิกิริยาของสาร **1** และ acetic anhydride และให้ความร้อนกับปฏิกิริยา นำ crude product ที่ได้จากปฏิกิริยามาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography ได้สาร **2** 44% yield (รูปที่ 2)

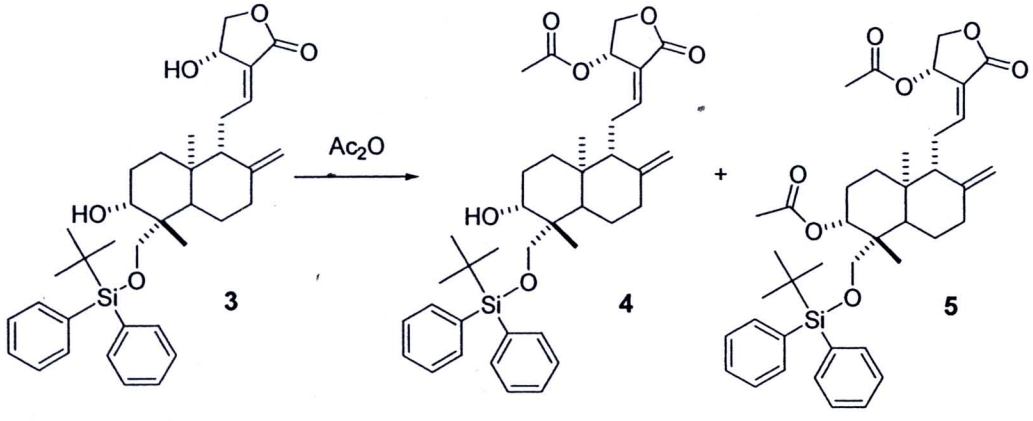


รูปที่ 2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ TBS-andrographolide

ทำการเปลี่ยนแปลงหมู่ hydroxyl ตำแหน่ง C-3, C-14 หรือ C-19 เป็นหมู่ *tert*-butyl diphenylsilylether โดยนำ Andrographolide ทำปฏิกิริยากับ pyridine และ *tert*-butyl diphenylsilylchloride เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้สาร **3** น้ำหนัก 100% yield (รูปที่ 3) เมื่อนำสารอนุพันธ์ TBDPS-andrographolide **3** ทำปฏิกิริยาต่อกับ acetic anhydride และให้ความร้อนปฏิกิริยา 70°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อเสร็จปฏิกิริยานำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography จะได้สาร **4** น้ำหนัก 18% yield และสาร **5** 33% yield (รูปที่ 4)

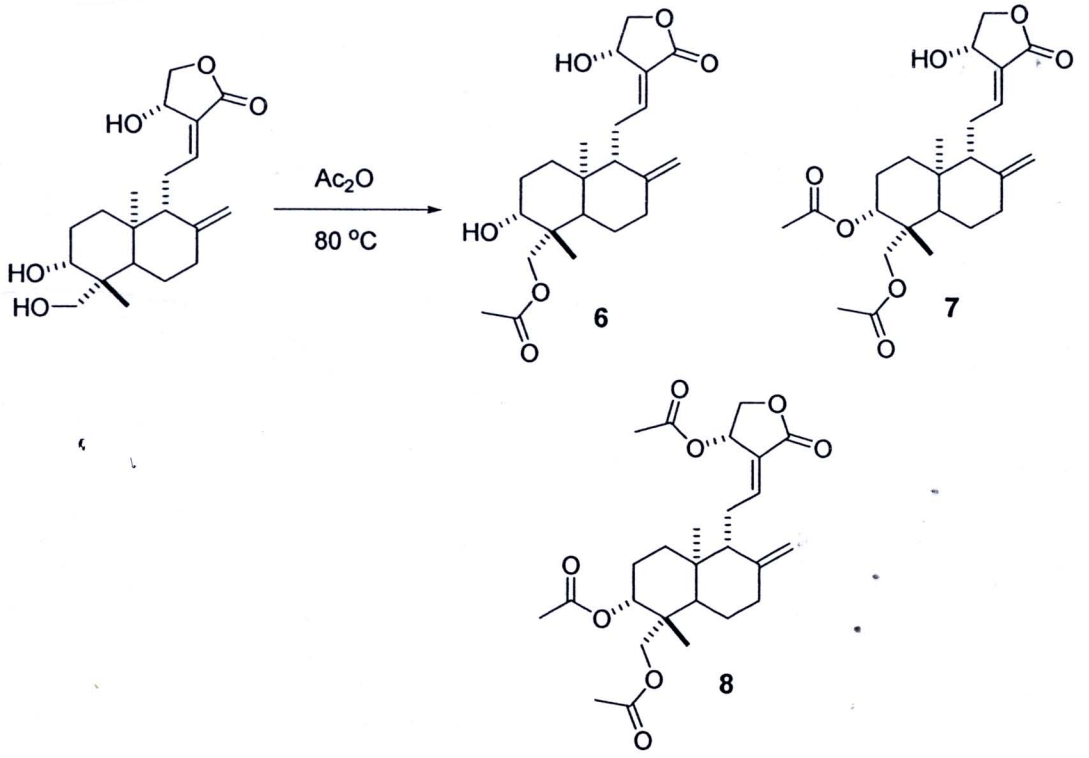


รูปที่ 3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ TBDPS-andrographolide



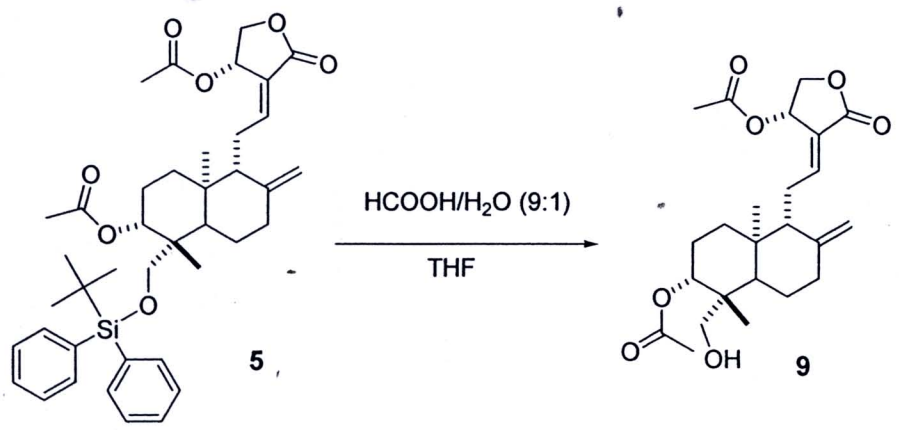
รูปที่ 4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ TBDPS-acetyl-andrographolide

สำหรับการเตรียมอนุพันธ์ acetyl ของ andrographolide สามารถทำได้โดยนำสาร Andrographolide ทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride 1 mL และให้ความร้อนแก่ปฏิกิริยา 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane จะได้สาร **6** 36% yield สาร **7** 42% yield และสาร **8** 14 % yield (รูปที่ 5)



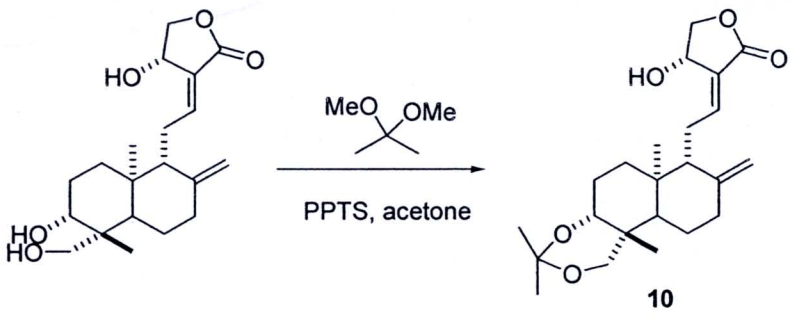
รูปที่ 5 การสังเคราะห์อนุพันธ์ acetyl-andrographolide

นอกจากนี้การเตรียมอนุพันธ์ acetyl ของ andrographolide **9** สามารถเตรียมจากปฏิกิริยาการ deprotection ของหมู่ TBS ของสารอนุพันธ์ TBS-acetate-andrographolide **5** ใน THF และ $HCOOH/H_2O$ (9:1) ที่ 0 °C เป็นเวลา 30 นาที ได้สาร **9** 43% yield ซึ่งมีหมู่ acetyl เฉพาะที่ตำแหน่ง C-3 และ C-14 (รูปที่ 6)

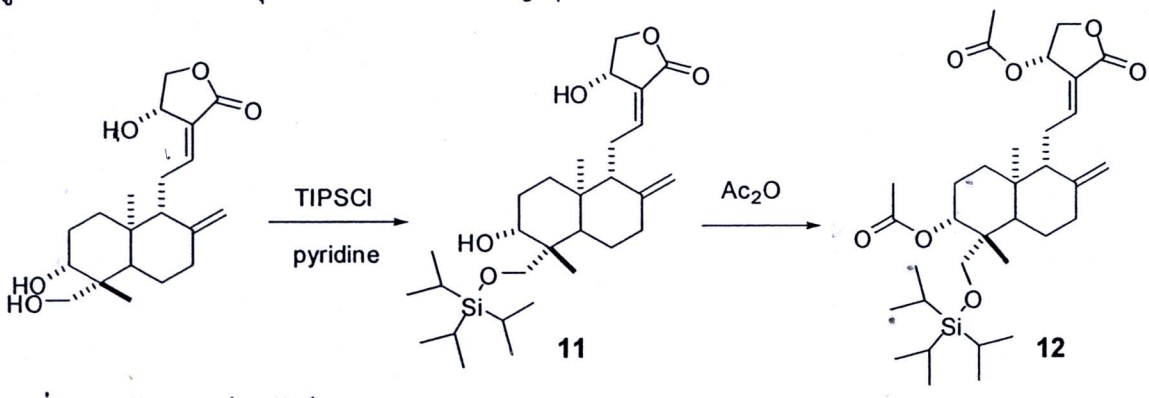


รูปที่ 6 การสังเคราะห์อนุพันธ์ diacetyl-andrographolide

การเตรียมอนุพันธ์ acetonide ของ andrographolide **10** เตรียมโดยปฏิกิริยาของ Andrographolide และ 2,2-dimethoxypropane ใน acetone โดยเติม PPTS เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้สาร **10** ซึ่งเกิดปฏิกิริยาที่หมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง C-3 และ C-19 (รูปที่ 7)

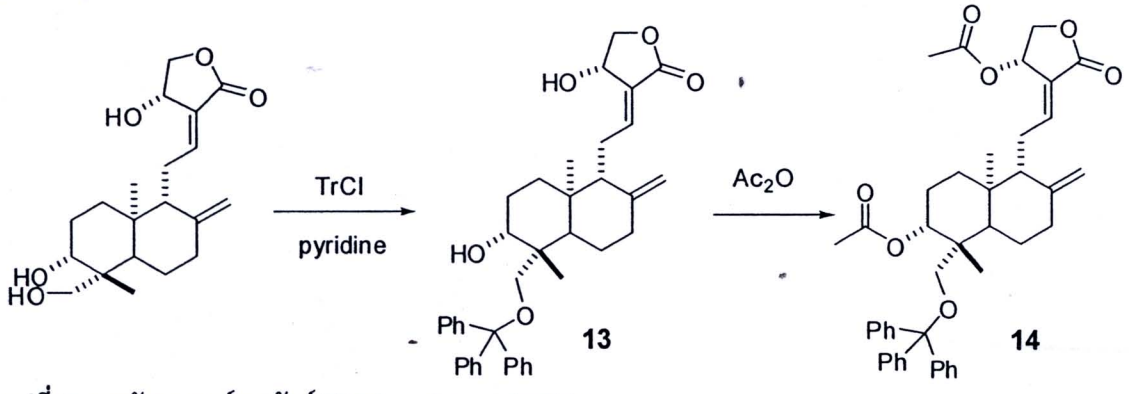


รูปที่ 7 การสังเคราะห์อนุพันธ์ acetonide-andrographolide



รูปที่ 8 การสังเคราะห์อนุพันธ์ TIPS-andrographolide

สำหรับการเตรียมอนุพันธ์ TIPS-andrographolide สามารถทำได้โดยนำสาร Andrographolide ทำปฏิกิริยากับ triisopropylsilylchloride คนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะได้สาร **11** 65% yield ทำปฏิกิริยาต่อกับ acetic anhydride และให้ความร้อนปฏิกิริยา 140°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้สาร **12** 80% yield (รูปที่ 8)

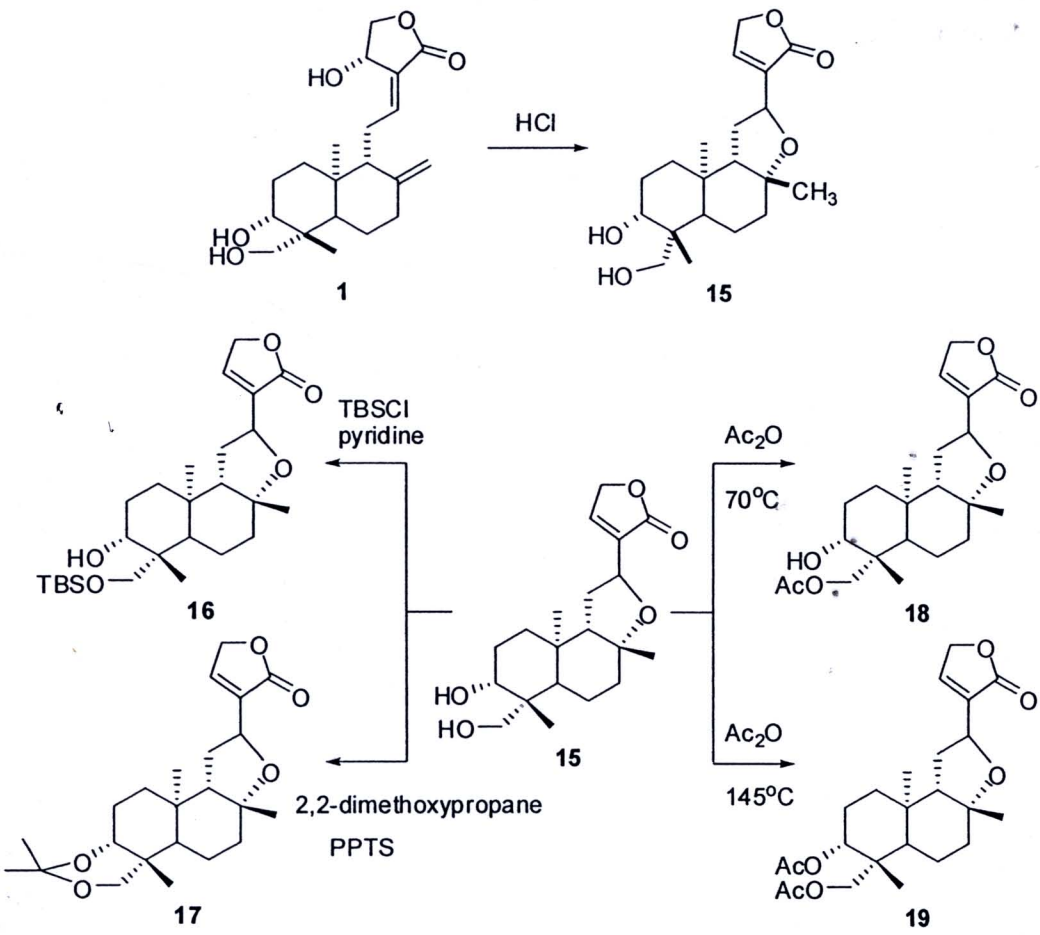


รูปที่ 9 การสังเคราะห์อนุพันธ์ Trityl-andrographolide

การสังเคราะห์อนุพันธ์ Trityl-andrographolide ทำโดยการเปลี่ยนแปลงหมู่ hydroxyl ตำแหน่ง C-3 เป็นหมู่ tritylether โดยนำ Andrographolide ทำปฏิกิริยากับ pyridine และ tritylchloride และให้ความร้อนปฏิกิริยา 70°C เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง ได้สาร **13** น้ำหนัก 99% yield เมื่อนำสารอนุพันธ์ **13** ทำปฏิกิริยาต่อกับ acetic anhydride และให้ความร้อนปฏิกิริยา 140°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเสร็จปฏิกิริยานำ

crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography จะได้สาร **14** น้ำหนัก 33% yield (รูปที่ 9)

สำหรับการสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ตามแผนการที่ 2 ได้ทำการปรับปรุงโครงสร้างสาร andrographolide ได้อนุพันธ์ใหม่คือ isoandrographolide จำนวน 5 ชนิด ดังแสดงต่อไปนี้



รูปที่ 10 การสังเคราะห์อนุพันธ์ isoandrographolide

การสังเคราะห์สาร **15-19** ทำโดยการทำปฏิกิริยาของ Andrographolide และ HCl เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ได้สารอนุพันธ์ **15** 80% yield จากนั้นทำปฏิกิริยาของสาร **15** และ TBDMSCl ใน pyridine เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ได้สาร **16** 60 % yield เมื่อนำสาร **15** ทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride และให้ความร้อนกับปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้สาร **18** 81% yield แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride และให้ความร้อนกับปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 145 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้สาร **19** 81% yield เมื่อนำสาร **15** ทำปฏิกิริยากับ 2,2-dimethoxypropane ใน acetone โดยเติม PPTS เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 40 นาที ได้สารอนุพันธ์ andrographolide **17** 83% yield **(รูปที่ 10)**

การสังเคราะห์สารตามแผนการที่ 1 และ 2 สามารถประสบผลสำเร็จ โดยสามารถสังเคราะห์สารได้ 19 ตัว ด้วยวิธีที่ง่ายและให้ร้อยละของการผลิตที่ดี สารทั้ง 19 ตัวถูกนำไปตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis* ซึ่งทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) และแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* (แบคทีเรียในช่องปากที่เปลี่ยนน้ำตาลบนเคลือบฟันให้เป็นกรด และกำลังอยู่ระหว่างรอผลทดสอบ