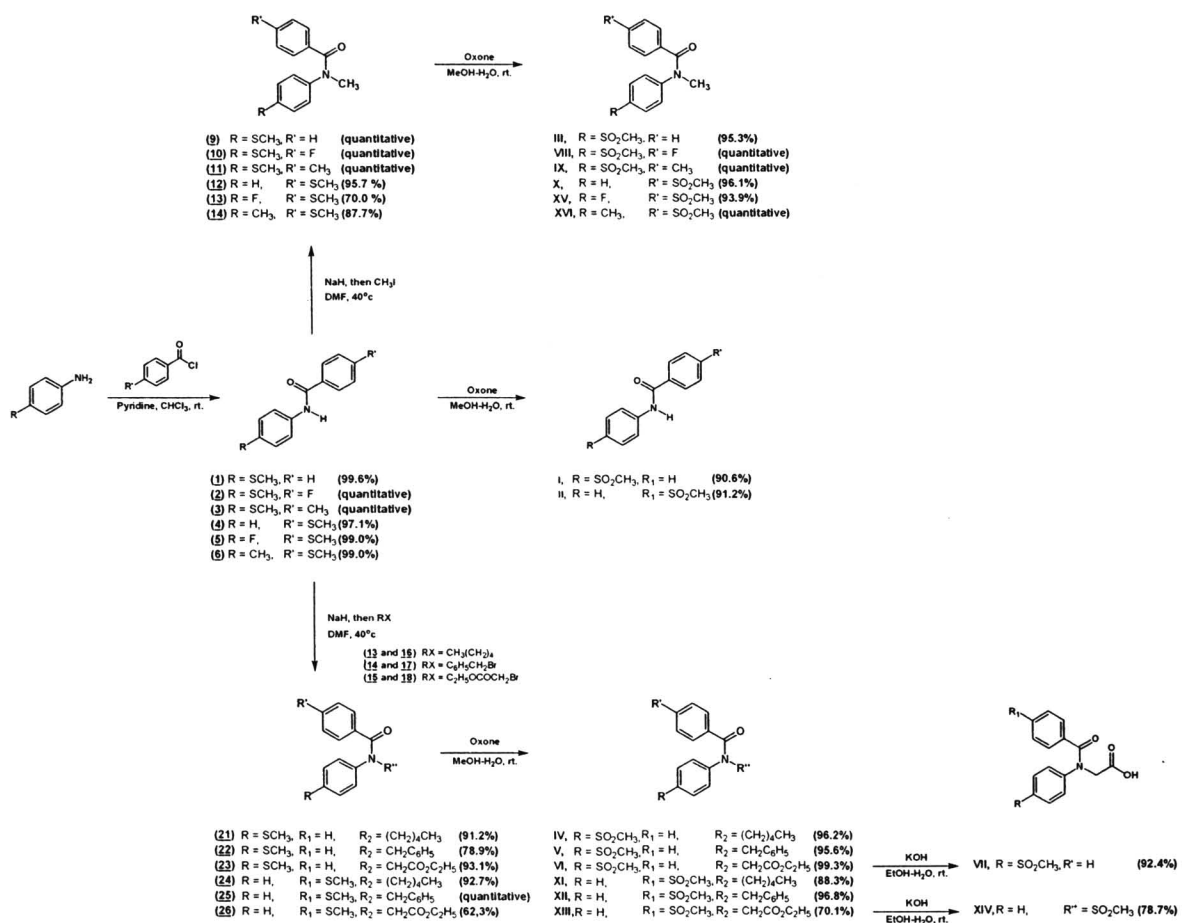


บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสังเคราะห์ และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ขึ้น

ผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะเปลี่ยนโครงสร้างส่วน Central Ring ของ Selective COX-2 Inhibitor จากเดิมให้เป็น *N*-Substituted Amide เนื่องจากการศึกษาและพบว่า *N*-Substituted Benzanilide ชอบที่จะจัดตัวอยู่ใน *cis*-Conformation ทั้งในสภาวะที่เป็นสารละลายและสภาวะที่เป็นของแข็ง ดังนั้น การใช้ *N*-Substituted Amide แทนที่ Central Ring ในโครงสร้างของ Selective COX-2 Inhibitor นั้น ควรให้สารที่มีการจัดเรียงตัวของ Lipophilic Aryl Ring และ 4-Sulfonyl-Substituted Aryl Ring คล้ายคลึงกับสาร Selective COX-2 Inhibitor กลุ่ม COXIBs และสามารถออกฤทธิ์เป็น Selective COX-2 Inhibitor ได้เช่นเดียวกัน ในระหว่างการทำเนิงานวิจัยตลอด 2 ปี ผู้วิจัยทำการสังเคราะห์ อนุพันธ์ที่มีหมู่ 4-(Methylsulfonyl)phenyl อยู่ในโครงสร้างรวมทั้งสิ้น 16 สาร ซึ่งแบ่งเป็น *N*-H Benzanilide จำนวน 2 สาร (สาร I-II) และ *N*-Substituted Benzanilide ที่มีหมู่แทนที่บน Nitrogen เป็น Alkyl หรือ Aalkyl จำนวน 14 ตัว (สาร III-XVI) ตลอดจนสาร Intermediate ในกระบวนการสังเคราะห์อีก 18 สาร รวมทั้งสิ้น 34 สาร ดังลำดับขั้นตอน และ % yield ซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 13



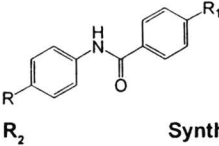
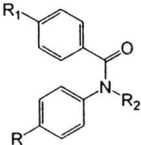
รูปที่ 13 Synthetic scheme แสดงการสังเคราะห์ Benzamides ทั้งหมดในงานวิจัยนี้

ขั้นตอนของกระบวนการสังเคราะห์เริ่มจากการเตรียม *N*-H benzanilides จำนวน 6 ชนิด (สาร 1-6) จากปฏิกิริยา Acylation ระหว่าง Benzoyl Chloride กับ Aniline ที่มีหมู่แทนที่บน Benzene Ring ที่เหมาะสม แล้วนำ *N*-H Benzanilides ที่เตรียมขึ้นทั้งหมดมาทำปฏิกิริยา *N*-Methylation ด้วย Methyl Iodide เกิดเป็นอนุพันธ์ *N*-Methylated Benzanilides จำนวน 6 ชนิด (สาร 9-14)

สำหรับ *N*-(4-(Methylthio)phenyl)benzamide (สาร 1) และ 4-(Methylthio)-*N*-phenylbenzamide (สาร 2) นั้นนอกจากจะถูก *N*-Methylation แล้ว สารทั้งสองชนิดยังถูกนำมาทำปฏิกิริยา *N*-Alkylation ด้วย Alkyl Halide อีก 3 ชนิด คือ Iodopentane, Benzyl Bromide และ Ethyl Bromoacetate เพื่อเตรียมเป็น *N*-Alkylated Benzanilides จำนวน 6 ชนิด (สาร 21-26)

จากนั้นเมื่อนำสารที่ได้จากปฏิกิริยาข้างต้นทั้ง 8 ตัวมาทำปฏิกิริยา Oxidation ด้วย Oxone® ก็จะได้สาร III-VI สาร VIII-XII และสาร XV-XVI ส่วนสาร VII และสาร XIV ได้มาจากการทำปฏิกิริยา Hydrolysis สาร VI และ XIII

ตารางที่ 1 Total Yield ในการสังเคราะห์ Benzamides I- XVI

					
Compound	R	R ₁	R ₂	Synthesis Pathway	Total Yield
I	-SO ₂ CH ₃	-H		Two-step Synthesis	90.1
II	-H	-SO ₂ CH ₃		Two-step Synthesis	91.2
					
III	-SO ₂ CH ₃	-H	-CH ₃	Three-step Synthesis	94.9
IV	-SO ₂ CH ₃	-H	-(CH ₂) ₄ CH ₃	Three-step Synthesis	87.4
V	-SO ₂ CH ₃	-H	-CH ₂ C ₆ H ₅	Three-step Synthesis	75.1
VI	-SO ₂ CH ₃	-H	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	Three-step Synthesis	92.1
VII	-SO ₂ CH ₃	-H	-CH ₂ COOH	Four-step Synthesis	85.1
VIII	-SO ₂ CH ₃	-F	-CH ₃	Three-step Synthesis	Quantitative
IX	-SO ₂ CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	Three-step Synthesis	Quantitative
X	-H	-SO ₂ CH ₃	-CH ₃	Three-step Synthesis	89.3
XI	-H	-SO ₂ CH ₃	-(CH ₂) ₄ CH ₃	Three-step Synthesis	81.9
XII	-H	-SO ₂ CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅	Three-step Synthesis	96.8
XIII	-H	-SO ₂ CH ₃	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	Three-step Synthesis	43.7
XIV	-H	-SO ₂ CH ₃	-CH ₂ COOH	Four-step Synthesis	34.4
XV	-F	-SO ₂ CH ₃	-CH ₃	Three-step Synthesis	65.1
XVI	-CH ₃	-SO ₂ CH ₃	-CH ₃	Three-step Synthesis	86.8

* Started from Methylthioaniline

สารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาถูกนำมาพิสูจน์โครงสร้างโดยใช้เทคนิคทาง Spectroscopy ได้แก่ Infrared (IR), Proton-Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$), Carbon-Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy ($^{13}\text{C-NMR}$) และ Mass spectrometry (MS) โดยมีผลการวิเคราะห์ดังสรุปและแสดงไว้ในบทที่ 2 ซึ่งพอสรุปได้คร่าว ๆ ดังนี้

IR Spectra ของสารทุกตัวแสดง Characteristic Signal ของ Functional group ที่สำคัญ เช่น N-H Benzanilide (สาร 1-6) ปรากฏสัญญาณของ N-H Streching อยู่ในช่วง $3335\text{-}3355\text{ cm}^{-1}$ และ C=O Streching ในช่วง $1645\text{-}1655\text{ cm}^{-1}$ ในขณะที่สัญญาณของ N-H Streching จะหายไปเมื่อสารถูกเปลี่ยนไปเป็น N-Methylated Benzanilides (สาร 7-14, 21-26, III-XVI)

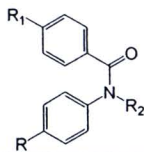
$^1\text{H-NMR}$ Spectra ให้สัญญาณของ Aromatic Proton และ Proton ในส่วนของ Side Chain ที่มีจำนวนของสัญญาณ และ Multiplicity สอดคล้องกับโครงสร้างของสารแต่ละตัว และจำนวนสัญญาณของ Carbon ที่ปรากฏใน $^{13}\text{C-NMR}$ Spectra แบ่งออกเป็น 3 ชุด ได้แก่ Carbonyl Carbon, Aromatic Carbon และ Aliphatic Carbon ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของสารแต่ละตัว ในกรณีของอนุพันธ์ที่มี Fluorine อยู่ในโครงสร้าง (สาร 2, 5, 10, 13, VIII และ XV) ก็ให้ Spectra ที่แสดงสัญญาณที่เกิดการ Coupling ของ Proton หรือ Carbon กับ Fluorine โดยมีค่า Coupling Constant ที่สอดคล้องกับค่าที่เคยมีการรายงานของสารกลุ่ม Aromatic ที่มี Fluorine ในโครงสร้างสารอื่น ๆ

นอกจากนี้เพื่อยืนยันสัดส่วนของธาตุที่ประกอบกันเป็นโมเลกุลสารแต่ละตัว ผู้วิจัยยังทำการตรวจวัดน้ำหนักที่แท้จริง (Exact Mass) ของสารแต่ละตัวด้วยเทคนิค High-Resolution Mass Spectrometry (HR-MS) ซึ่งให้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผล HR-MS ของสารที่สังเคราะห์ทั้งหมด

Compound	R	R ₁	R ₂	Formula	Exact Mass		
					Calc for M+H ⁺	Found	Δ (ppm)
(1)	-SCH ₃	-H	-	C ₁₄ H ₁₃ NOS	244.0796	244.0798	0.8
(2)	-SCH ₃	-F	-	C ₁₄ H ₁₂ FNOS	262.0702	262.0703	0.4
(3)	-SCH ₃	-CH ₃	-	C ₁₅ H ₁₅ NOS	258.0953	258.0953	0.0
(4)	-H	-SCH ₃	-	C ₁₄ H ₁₃ NOS	244.0796	244.0798	0.8
(5)	-F	-SCH ₃	-	C ₁₄ H ₁₂ FNOS	262.0702	262.0697	1.9
(6)	-CH ₃	-SCH ₃	-	C ₁₅ H ₁₅ NOS	258.0953	258.0949	1.6
(7) or I	-SO ₂ CH ₃	-H	-	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃ S	276.0694	276.0689	1.8
(8) or II	-H	-SO ₂ CH ₃	-	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃ S	276.0694	276.0692	0.7

ตารางที่ 2 (ต่อ) ผล HR-MS ของสารที่สังเคราะห์ทั้งหมด



Compound	R	R ₁	R ₂	Formula	Exact Mass		
					Calc for M+H ⁺	Found	Δ (ppm)
(9)	-SCH ₃	-H	-CH ₃	C ₁₅ H ₁₅ NOS	258.0953	258.0945	3.1
(10)	-SCH ₃	-F	-CH ₃	C ₁₅ H ₁₄ FNOS	276.0858	276.0850	2.9
(11)	-SCH ₃	-CH ₃	-CH ₃	C ₁₆ H ₁₇ NOS	272.1109	272.1111	0.7
(12)	-H	-SCH ₃	-CH ₃	C ₁₅ H ₁₅ NOS	258.0953	258.0956	1.2
(13)	-F	-SCH ₃	-CH ₃	C ₁₅ H ₁₄ FNOS	276.0858	276.0864	2.2
(14)	-CH ₃	-SCH ₃	-CH ₃	C ₁₆ H ₁₇ NOS	272.1109	272.1107	0.7
(15) or III	-SO ₂ CH ₃	-H	-CH ₃	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃ S	290.0851	290.0844	2.4
(16) or VIII	-SO ₂ CH ₃	-F	-CH ₃	C ₁₅ H ₁₄ FNOS	308.0757	308.0768	3.6
(17) or IX	-SO ₂ CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃ S	304.1007	304.1006	0.3
(18) or X	-H	-SO ₂ CH ₃	-CH ₃	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃ S	290.0851	290.0847	1.4
(19) or XV	-F	-SO ₂ CH ₃	-CH ₃	C ₁₅ H ₁₄ FNOS	308.0757	308.0764	2.7
(20) or XVI	-CH ₃	-SO ₂ CH ₃	-CH ₃	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃ S	304.1007	304.1008	0.3
(21)	-SCH ₃	-H	-(CH ₂) ₄ CH ₃	C ₁₉ H ₂₃ NOS	314.1579	314.1576	0.9
(22)	-SCH ₃	-H	-CH ₂ C ₆ H ₅	C ₂₁ H ₁₉ NOS	334.1266	334.1266	0.0
(23)	-SCH ₃	-H	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃ S	330.1164	330.1165	0.3
(24)	-H	-SCH ₃	-(CH ₂) ₄ CH ₃	C ₁₉ H ₂₃ NOS	314.1579	314.1579	0.0
(25)	-H	-SCH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅	C ₂₁ H ₁₉ NOS	334.1266	334.1263	0.9
(26)	-H	-SCH ₃	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃ S	330.1164	330.1169	1.5
(27) or IV	-SO ₂ CH ₃	-H	-(CH ₂) ₄ CH ₃	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃ S	346.1477	346.1487	2.9
(28) or V	-SO ₂ CH ₃	-H	-CH ₂ C ₆ H ₅	C ₂₁ H ₁₉ NO ₃ S	366.1164	366.1168	1.1
(29) or VI	-SO ₂ CH ₃	-H	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃ S	362.1062	362.1047	4.1
(30) or XI	-H	-SO ₂ CH ₃	-(CH ₂) ₄ CH ₃	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃ S	346.1477	346.1476	0.3
(31) or XII	-H	-SO ₂ CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅	C ₂₁ H ₁₉ NO ₃ S	366.1164	366.1172	2.2
(32) or XIII	-H	-SO ₂ CH ₃	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃ S	362.1062	362.1071	2.5
(33) or VII	-SO ₂ CH ₃	-H	-CH ₂ COOH	C ₁₆ H ₁₅ NO ₃ S	334.0749	334.0751	0.6
(34) or XIV	-H	-SO ₂ CH ₃	-CH ₂ COOH	C ₁₆ H ₁₅ NO ₃ S	334.0749	334.0747	0.6

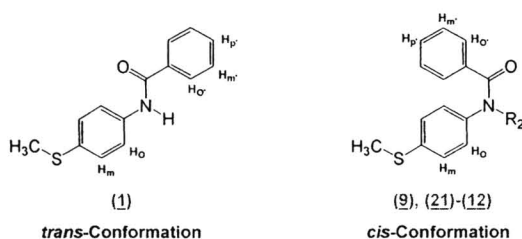
จะเห็นว่าค่าความแตกต่างระหว่างน้ำหนักที่แท้จริงเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการคำนวณของสารแต่ละตัวมีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (น้อยกว่า 5 ppm) ซึ่งแสดงว่าผลจาก HR-MS สอดคล้องกับสัดส่วนของธาตุที่ประกอบขึ้นเป็นโครงสร้างของสารแต่ละตัว

จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงสรุปได้ว่าสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นทุกตัวสามารถยืนยันโครงสร้างด้วย IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR และ HR-MS Spectroscopy

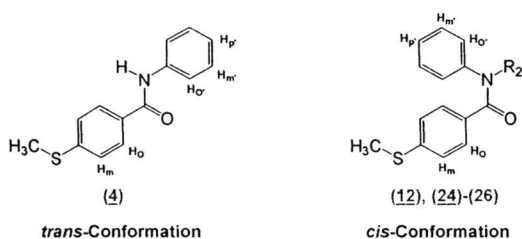
2. การพิสูจน์ Conformation ของสารด้วย $^1\text{H-NMR}$

เพื่อทำการยืนยันว่า *N*-Substituted Benzanilide ที่สังเคราะห์ขึ้น จัดตัวอยู่ใน *cis*-Conformation เช่นเดียวกับ *N*-Substituted Benzanilide อื่นที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้หรือไม่ ผู้วิจัยจึงทำการเปรียบเทียบค่า Chemical shift ของสารทั้งที่เป็น Intermediate (ตารางที่ 3) และ Final Products (ตารางที่ 4) ที่มีโครงสร้างเป็น *N*-Substituted Benzanilide กับค่า Chemical shift ของสารที่เป็น *N*-H Benzanilide และพบว่าสารทั้งสองชุดแสดงค่า Chemical Shift ของ Aromatic Proton ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 3 ค่า Chemical Shift ของ Intermediate ที่เป็น *N*-Substituted Benzanilide (สาร 9, 12 และ 21-26) เปรียบเทียบกับค่าของ *N*-H Benzanilide (สาร 1 และ 4)

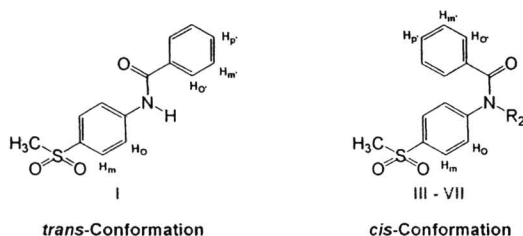


Compound, Solvent	R ₂	Chemical shift of aromatic protons (ppm)					Different (ppm) from those of NH-benzamide				
		H _o	H _m	H _{o'}	H _{m'}	H _{p'}	H _o	H _m	H _{o'}	H _{m'}	H _{p'}
NH-Benzanilide											
(1), CDCl ₃	-	7.59	7.29	7.56	7.50	7.84	-	-	-	-	-
N-Substituted benzanilide											
(9), CDCl ₃	-CH ₃	7.08	6.95	7.30	7.18	7.25	0.51	0.34	0.26	0.32	0.59
(21), CDCl ₃	-(CH ₂) ₄ CH ₃	7.08	6.93	7.28	7.16	7.22	0.51	0.36	0.28	0.34	0.62
(22), CDCl ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅	6.99	6.81	7.16-7.38			0.60	0.48	0.34-0.46		
(23), CDCl ₃	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	7.08	7.05	7.35	7.19	7.27	0.51	0.24	0.21	0.31	0.57

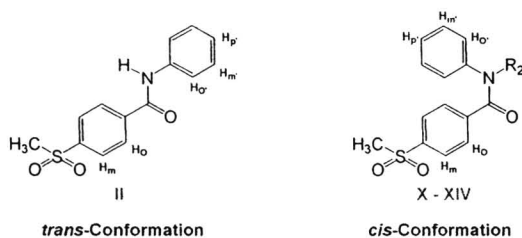


N-Substituted benzanilide, solvent	R ₂	Chemical shift of aromatic protons (ppm)					Different (ppm) from those of NH-benzamide				
		H _o	H _m	H _{o'}	H _{m'}	H _{p'}	H _o	H _m	H _{o'}	H _{m'}	H _{p'}
NH-Benzanilide											
(4), CDCl ₃	-	7.79	7.30	7.63	7.37	7.15	-	-	-	-	-
N-Substituted benzanilide											
(12), CDCl ₃	-CH ₃	7.22	7.00	7.04	7.24	7.15	0.57	0.30	0.59	0.13	0.00
(24), CDCl ₃	-(CH ₂) ₄ CH ₃	7.20	6.98	7.02	7.23	7.15	0.59	0.32	0.61	0.14	0.00
(25), CDCl ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅	7.26	6.99	7.09-7.31			0.53	0.31	0.06-0.32		
(26), CDCl ₃	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	7.26	7.00	7.18	7.24	7.14	0.53	0.30	0.45	0.13	0.01

ตารางที่ 4 ค่า Chemical Shift ของ Final Product ที่เป็น *N*-Substituted Benzanilide (สาร III - XIV) เปรียบเทียบกับค่าของ *N*-H Benzanilide (สาร I และ II)



Compound, Solvent	R ₂	Chemical shift of aromatic protons					Different (ppm) from those of				
		(ppm)					NH-benzamide				
		H _o	H _m	H _{o'}	H _{m'}	H _{p'}	H _o	H _m	H _{o'}	H _{m'}	H _{p'}
NH-Benzanilide											
I, DMSO- <i>d</i> ₆	-	8.05	7.91	7.98	7.56	7.63					
N-Substituted benzanilide											
III, DMSO- <i>d</i> ₆	-CH ₃	7.80	7.43	7.25-7.35			0.25	0.48	0.31-0.63		
IV, DMSO- <i>d</i> ₆	-(CH ₂) ₄ CH ₃	7.79	7.40	7.23-7.32			0.26	0.51	0.33-0.66		
V, DMSO- <i>d</i> ₆	-CH ₂ C ₆ H ₅	7.72	7.35	7.21-7.37			0.33	0.56	0.35-0.61		
VI, DMSO- <i>d</i> ₆	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	7.80	7.38	7.28-7.30			0.25	0.53	0.28-0.68		
VII, DMSO- <i>d</i> ₆	-CH ₂ COOH	7.79	7.37	7.33-7.35			0.26	0.54	0.23-0.63		



Compound, Solvent	R ₂	Chemical shift of aromatic protons					Different (ppm) from those of				
		(ppm)					NH-benzamide				
		H _o	H _m	H _{o'}	H _{m'}	H _{p'}	H _o	H _m	H _{o'}	H _{m'}	H _{p'}
NH-Benzanilide											
II, DMSO- <i>d</i> ₆	-	8.17	8.08	7.78	7.37	7.13					
N-Substituted benzanilide											
X, DMSO- <i>d</i> ₆	-CH ₃	7.77	7.50	7.21	7.29	7.18	0.40	0.58	0.57	0.08	(-0.05)
XI, DMSO- <i>d</i> ₆	-(CH ₂) ₄ CH ₃	7.75	7.48	7.18	7.28	7.18	0.42	0.60	0.60	0.09	(-0.05)
XII, DMSO- <i>d</i> ₆	-CH ₂ C ₆ H ₅	7.77	7.57	7.08-7.35			0.40	0.51	(-0.05)-0.43		
XIII, DMSO- <i>d</i> ₆	-CH ₂ COOC ₂ H ₅	7.79	7.50	7.20	7.27	7.19	0.38	0.58	0.58	0.10	(-0.06)
XIV, DMSO- <i>d</i> ₆	-CH ₂ COOH	7.79	7.50	7.19	7.27	7.18	0.38	0.58	0.59	0.10	(-0.05)

จากการที่ค่า Chemical Shift ของสัญญาณ Aromatic Proton ของ *N*-Substituted Benzanilides มีค่าแตกต่าง (Shield) กับค่าของสัญญาณ Aromatic Proton ของ *N*-H Benzanilides อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า สารทั้งสองกลุ่มจัดเรียงตัว (เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นสารละลาย) ใน Conformation ที่แตกต่างกัน ซึ่งการ Shield ของสัญญาณ Aromatic Proton ของ *N*-Substituted Benzanilides น่าจะเกิดจาก Ring Current Effect ของ Benzene Ring เมื่อ Ring ทั้งสองจัดเรียงตัว โดยหันเอามาอยู่ในด้านเดียวกันของพันธะ Amide หรือที่เรียกกันว่า *cis*-Conformation ดังเช่นที่ได้ คาดการณ์เอาไว้

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ COX

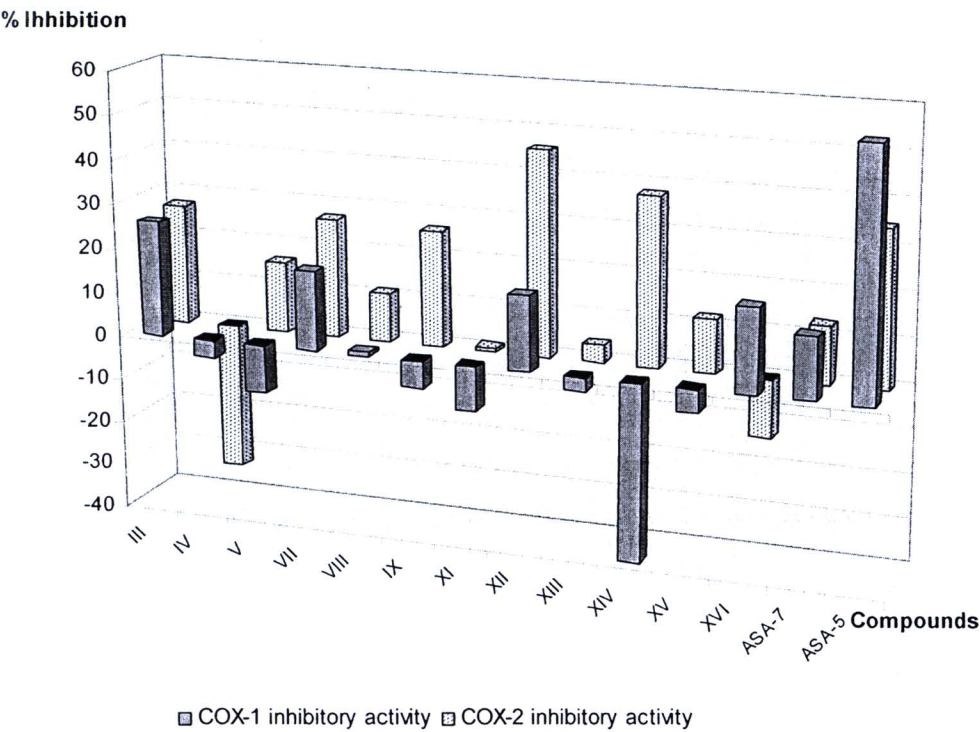
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ COX โดยอนุพันธ์ Benzanilide สังเคราะห์ขึ้น ได้ขอใช้ บริการวิเคราะห์ ซึ่งให้บริการโดยห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหน่วยปฏิบัติการ เทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ซึ่งอาศัยหลักการ ของ *in vitro* Whole Cell Assay System เพื่อตรวจวัดความสามารถของสารในการยับยั้งการทำงานของ COX-1 (ใน COX-2 Knockout, Mouse Lung Fibroblast Cell Line) และ COX-2 (ใน COX-1 Knockout, Mouse Lung Fibroblast Cell Line) เปรียบเทียบกับ Aspirin (Positive Control) และ 0.1 % DMSO (negative control) ซึ่งทำการทดสอบ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 จะเป็นการทดสอบสาร III – V, VII – IX และ XI – XVI (ตารางที่ 4 และ รูปที่ 14) ครั้งที่ 2 จะเป็นการทดสอบสาร I, II, VI และ X (ตารางที่ 5 และ รูปที่ 15)

ตารางที่ 5 % Inhibition ต่อ COX ของ Benzanilide ที่สังเคราะห์ขึ้น (สาร III – V, VII – IX และ XI – XVI) เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ที่ความเข้มข้น 10 mcg/ml ใน Mouse Lung Fibroblast Cell Line

Compound	Test Concentration (mcg/ml)	Anti COX-1 ^a		Anti COX-2 ^a		Selectivity**
		%PGE ₂	% inhibition	%PGE ₂	% inhibition	
III	10	74 ± 22	26	73 ± 11	27	1.04
IV	10	104 ± 30	-4	133 ± 13	-33	Inactive ^c
V	10	111 ± 14	-11	84 ± 30	16	COX-2 preference ^d
VII	10	82 ± 4	18	73 ± 4	27	1.50
VIII	10	99 ± 22	1	89 ± 8	11	11.0
IX	10	106 ± 3	-6	74 ± 12	26	COX-2 preference ^d
XI	10	110 ± 23	-10	99 ± 8	1	Inactive ^c
XII	10	83 ± 10	17	54 ± 9	46	2.71
XIII	10	103 ± 7	-3	96 ± 21	4	Inactive ^c
XIV	10	140 ± 34	-40	62 ± 1	38	COX-2 preference ^d
XV	10	105 ± 7	-5	88 ± 25	12	COX-2 preference ^d
XVI	10	81 ± 22	19	113 ± 5	-13	COX-1 preference ^e
ASA	0.1	86 ± 15	14	87 ± 19	13	0.93
ASA	10	45 ± 20	55	65 ± 9	35	0.64
0.1 % DMSO		100 ± 6	0	100 ± 22	0	-

a ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง
b อัตราส่วนระหว่าง % Inhibition ต่อ COX-2 ต่อ % Inhibition ต่อ COX-2
c สารไม่มีฤทธิ์ต่อ COX ทั้งสอง Isoform
d สารมียับยั้งการทำงานเฉพาะ COX-2
e สารมียับยั้งการทำงานเฉพาะ COX-1



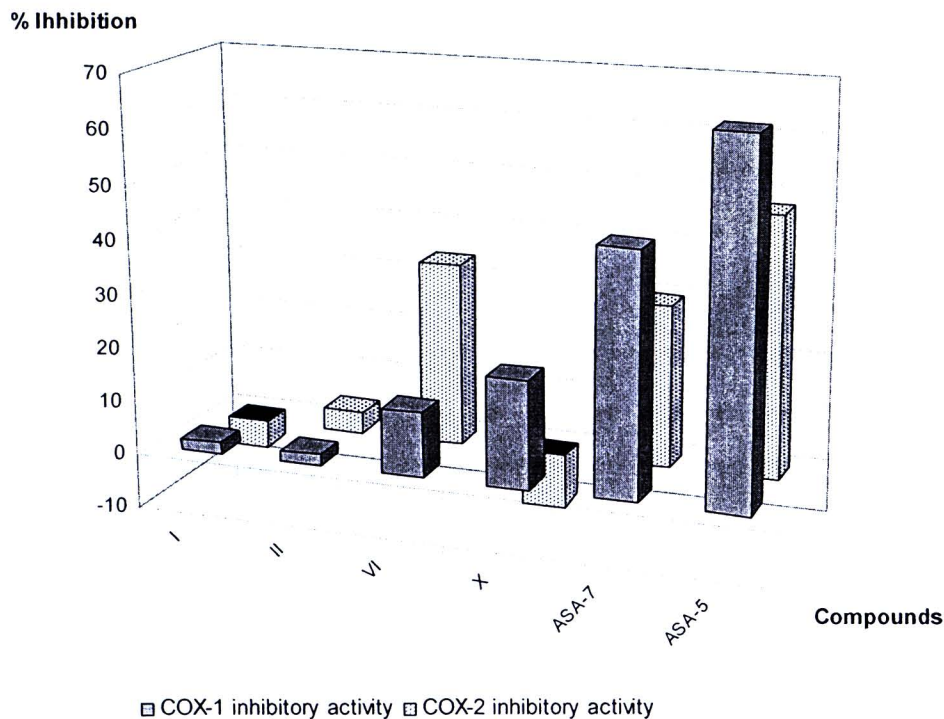


รูปที่ 14 % Inhibition ต่อ COX ของ Benzanilide III - V, VII – IX และ XI – XVI เปรียบเทียบกับ Aspirin

ตารางที่ 6 % Inhibition ต่อ COX ของ Benzanilide ที่สังเคราะห์ขึ้น (สาร I, II, VI และ X) เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ที่ความเข้มข้น 10 mcg/ml ใน Mouse Lung Fibroblast Cell Line

Compound	Test Concentration (mcg/ml)	Anti COX-1 ^a		Anti COX-2 ^a		Selectivity ^b
		%PGE ₂	% inhibition	%PGE ₂	% inhibition	
I	10	98 ± 6	2	105 ± 3	-5	Inactive ^c
II	10	98 ± 1	2	96 ± 8	4	Inactive ^c
VI	10	88 ± 13	12	66 ± 14	34	2.83
X	10	80 ± 9	20	110 ± 7	-10	COX-1 preference ^d
ASA	0.1	55 ± 16	45	70 ± 12	30	0.67
ASA	10	34 ± 13	66	52 ± 17	48	0.73
0.1 % DMSO		100 ± 22	0	100 ± 28	0	-

a ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง
b อัตราส่วนระหว่าง % Inhibition ต่อ COX-2 ต่อ % Inhibition ต่อ COX-2
c สารไม่มีฤทธิ์ต่อ COX ทั้งสอง Isoform
d สารมียับยั้งการทำงานเฉพาะ COX-2
e สารมียับยั้งการทำงานเฉพาะ COX-1



รูปที่ 15 % Inhibition ต่อ COX ของ Benzanilide I, II, VI และ X เปรียบเทียบกับ Aspirin

จากผลการทดสอบเบื้องต้นในตรวจวัดความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ COX โดยสารที่ความเข้มข้น 10 mcg/ml เปรียบเทียบกับ Aspirin ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 10 mcg/ml จะเห็นได้ว่า *N*-H Benzanilides (สาร I และ II) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของทั้ง COX-1 และ COX-2 ในขณะที่ *N*-CH₃ Benzanilides (สาร III, VIII, IX, X, XV และ XVI) ที่ความเข้มข้น 10 mcg/ml สามารถยับยั้งการทำงานของ COX ได้เล็กน้อย โดยมี % Inhibition ต่อ COX-1 และ/หรือ COX-2 อยู่ในช่วง 11-27 % การเพิ่มขนาดของ *N*-Substituent จาก Methyl (-CH₃) เป็น Pentyl (-C₅H₁₁) (สาร IV และ XI) ทำให้สารสูญเสียความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ COX ส่วนสารที่มีหมู่ *N*-Substituent ที่มี Hetroatom หรือ Aromatic Ring เป็นส่วนประกอบจะเริ่มแสดงถึง Potency และ Selectivity ที่ดีขึ้น เช่น สาร VI ซึ่งมีหมู่ *N*-Substituent คือ 2-Ethoxy-2-oxoethyl (-CH₂COOC₂H₅) สามารถยับยั้ง COX-1 และ COX-2 ได้ 12 และ 34 % ตามลำดับ สาร XII ซึ่งมีหมู่ *N*-Substituent คือ Benzyl (-CH₂C₆H₅) สามารถยับยั้ง COX-1 และ COX-2 ได้ 17 และ 46 % ตามลำดับและสาร XIV ซึ่งมีหมู่ *N*-Substituent คือ Carboxymethyl (-CH₂COOH) สามารถยับยั้ง COX-1 และ COX-2 ได้ (-40) และ 38 % ตามลำดับ

ผู้วิจัยจึงทำการส่งสาร VI, XII และ XIV ไปทำการทดสอบเพื่อหาค่า IC₅₀ ต่อ แต่เนื่องจากสาร XII และ XIV มีความสามารถในการละลายที่ต่ำใน Medium ที่ใช้ในการทดสอบ จึงไม่สามารถทำการเพิ่มความ

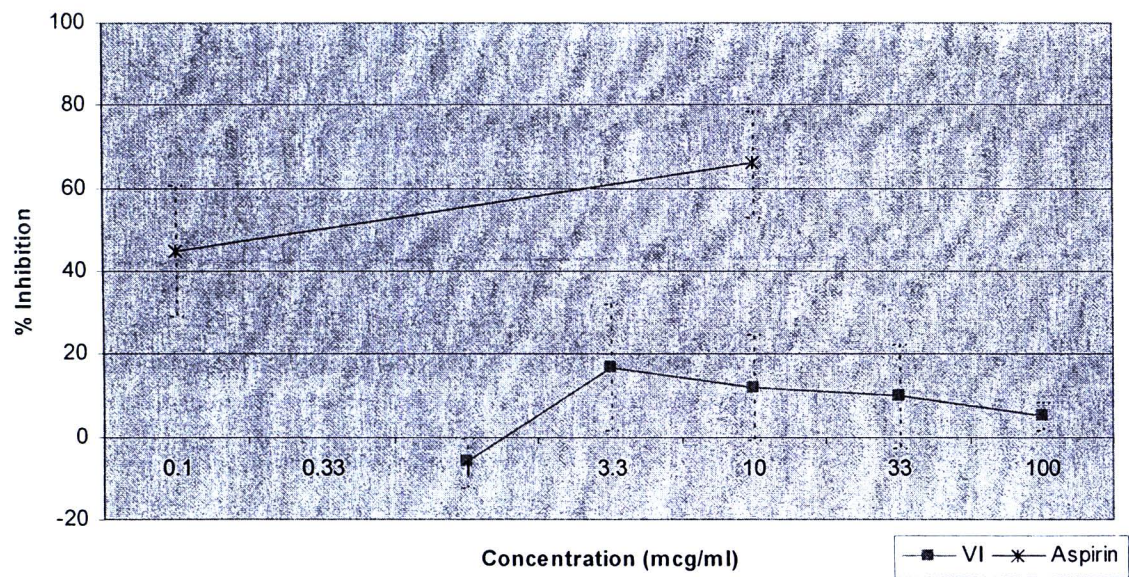
เข้มข้นของสารเพื่อเตรียม Dose-Response Curve ที่จะใช้ในการคำนวณหา IC-50 ได้ สารที่สามารถหาค่า IC-50 ได้จึงมีแต่สาร VI เท่านั้น ซึ่งให้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 7-8 และรูปที่ 16-17

ตารางที่ 7 % Inhibition ต่อ COX ของ สาร VI เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ที่ความเข้มข้น 1, 3.3, 10, 33.3 และ 100 mcg/ml ใน Mouse Lung Fibroblast Cell Line

Compound	Test	Anti COX-1 ^a		Anti COX-2 ^a		IC-50
	Concentration					
	(mcg/ml)	%PGE ₂	% inhibition	%PGE ₂	% inhibition	
VI	1	106 ± 6	-6	94 ± 3	6	COX-1 > 100 mcg/ml
VI	3.3	83 ± 15	17	61 ± 15	39	COX-2 : 26.7 mcg/ml
VI	10	88 ± 13	12	66 ± 14	34	
VI	33.3	90 ± 13	10	64 ± 11	36	
VI	100	95 ± 5	5	49 ± 11	51	
ASA	0.1	55 ± 16	45	70 ± 12	30	
ASA	10	34 ± 13	66	52 ± 17	48	
0.1 % DMSO		100 ± 22	0	100 ± 28	0	

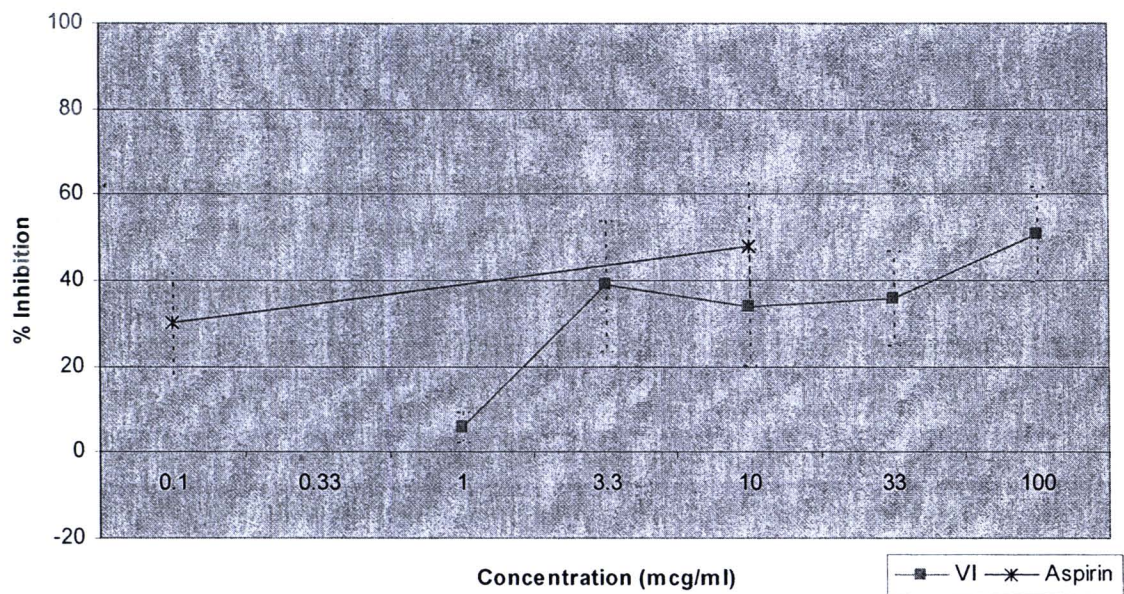
a ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง

% Cyclooxygenase-1 Inhibition of Compound VI



รูปที่ 16 % Inhibition ต่อ COX-1 ของ สาร VI ที่มีความเข้มข้นในช่วง 1-100 mcg/ml เปรียบเทียบกับ Aspirin

% Cyclooxygenase-2 Inhibition of Compound VI



รูปที่ 17 % Inhibition ต่อ COX-2 ของ สาร VI ที่มีความเข้มข้นในช่วง 1-100 mcg/ml เปรียบเทียบกับ Aspirin

ตารางที่ 8 IC-50 ของสาร VI ในการยับยั้งการทำงานของ COX เปรียบเทียบกับ Aspirin

Compound	Anti-COX-1, IC-50 (mcg/ml)*	Anti-COX-2, IC-50 (mcg/ml)*
VI	> 100	26.7
Aspirin	0.4-0.5	9-10

* Data from Bioassay Laboratory, BIOTEC, Thailand

จากผลการทดสอบในตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่า แม้สาร VI จะมี Potency ที่ต่ำกว่า Aspirin ในการยับยั้งการทำงานของ COX-2 แต่แสดง Selectivity ที่ดีกว่า Aspirin ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้สารในกลุ่มนี้ในการพัฒนา Selective COX-2 Inhibitor ต่อไป