

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะเปลี่ยนโครงสร้างส่วน Central Ring ของ Selective COX-2 Inhibitor เป็น *N*-Substituted Amide และได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีหมู่ 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 หลังจากทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ขึ้นทุกตัว โดยใช้เทคนิคทาง Spectroscopy ได้แก่ Infrared (IR), Proton-Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$), Carbon-Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy ($^{13}\text{C-NMR}$) และ High-Resolution Mass spectrometry (MS) พบว่าสารที่สังเคราะห์ขึ้นทุกตัวมีโครงสร้างดังที่ได้ออกแบบไว้ นอกจากนี้ข้อมูลของ $^1\text{H-NMR}$ ซึ่งแสดงค่า Chemical Shift ของสัญญาณ Aromatic Proton ของ *N*-Substituted Benzanilides ที่มีค่าที่แตกต่าง (Shield) กับค่าของสัญญาณ Aromatic Proton ของ *N*-H Benzanilides อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นสารละลาย สารทั้งสองกลุ่มจัดเรียงตัวใน 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 ดังนั้นการใช้ *N*-Substituted Amide แทนที่ Central Ring ในโครงสร้างของ Selective COX-2 Inhibitor นั้นควรให้สารที่มีการจัดเรียงตัวของ Lipophilic Aryl Ring และ 4-Sulfonyl-Substituted Aryl Ring คล้ายคลึงกับสาร Selective COX-2 Inhibitor กลุ่ม COXIBs

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ COX โดยอนุพันธ์ Benzanilide สังเคราะห์ขึ้น โดยห้องปฏิบัติการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ซึ่งเป็นการตรวจวัดความสามารถของสารที่ความเข้มข้น 10 mcg/ml ในการยับยั้งการทำงานของ COX-1 และ COX-2 (ใน COX-2 และ COX-2 Knockout, Mouse Lung Fibroblast Cell Line ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับ Aspirin ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 10 mcg/ml (Positive Control) และ 0.1 % DMSO (negative control) พบว่า *N*-H Benzanilide (สาร I และ II) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของทั้ง COX-1 และ COX-2 ในขณะที่ *N*-CH₃ Benzanilide (สาร III, VIII, IX, X, XV และ XVI) ที่ความเข้มข้น 10 mcg/ml สามารถยับยั้งการทำงานของ COX ได้เล็กน้อย การเพิ่มขนาดของ *N*-Substituent จาก Methyl (CH₃) ป็น 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) สาร XII ซึ่งมีหมู่ *N*-Substituent คือ Benzyl (CH₂C₆H₅) และสาร XIV ซึ่งมีหมู่ *N*-Substituent คือ Carboxymethyl (CH₂COOH) เนื่องจากสาร XII และ XIV มีความสามารถในการละลายที่

ต่ำใน Medium ที่ใช้ในการทดสอบ จึงไม่สามารถทำการเพิ่มความเข้มข้นของสารเพื่อเตรียม Dose-Response Curve ที่จะใช้ในการคำนวณหา IC-50 ได้ สารที่สามารถหาค่า IC-50 ได้จึงมีแค่สาร VI ซึ่งให้ค่า Anti-COX-1 IC-50 มากกว่า 100 mcg/ml และ Anti-COX-2 IC-50 เท่ากับ 26.7 mcg/ml แม้ว่าจะมี Potency ที่ต่ำกว่า Aspirin ในการยับยั้งการทำงานของ COX-2 แต่แสดง Selectivity ที่ดีกว่า Aspirin (Anti-COX-1 IC-50 เท่ากับ 4-5 mcg/ml และ Anti-COX-2 IC-50 เท่ากับ 9-10 mcg/ml)

N-Substituted Benzanilides เป็นสารที่สามารถสังเคราะห์ได้ง่าย จาก Reagents ที่สามารถหาได้ทั่วไป โดยมีจำนวนขั้นตอนในการสังเคราะห์น้อย และมี % Yield ในแต่ละขั้นของปฏิกิริยาที่สูง (โดยทั่วไปประมาณ 80-100 %) จึงเป็นกลุ่มสารที่มีศักยภาพในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม จากข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ แม้ว่าสารส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์ยับยั้ง COX ที่ไม่สูงมากนัก แต่ก็มีความเป็นไปได้ที่จะใช้อนุพันธ์ benzamides ที่มี 4-(methylsulfonyl)phenyl เป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างกลุ่มนี้ในการพัฒนา Selective COX-2 Inhibitor ต่อไป แต่เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ ซึ่งเป็นปัญหาในการทดสอบฤทธิ์และการออกฤทธิ์ของสาร จึงควรเพิ่มหมู่ที่มี Polarity เข้าไปในโครงสร้างของสารเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของสาร และนอกจากนี้จากข้อมูลที่ได้เบื้องต้นยังแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มส่วนของโครงสร้างที่มี Polarity เข้าเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างของสาร โดยเฉพาะในส่วนที่เป็น N-Substituent ยังสามารถจะทำให้สารมี Potency ที่สูงขึ้นได้