

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



246174

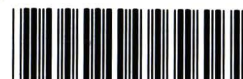


รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ต่อเอนไซม์ Cyclooxygenase ของอนุพันธ์ N-Substituted benzanilides
(Synthesis and cyclooxygenase inhibitory activity of N-substituted benzanilides)

โดย ผศ. ดร. เฉลิมเกียรติ สงคราม และคณะ

กรกฎาคม 2553



246174

สัญญาเลขที่ MRG4980016

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ต่อเอนไซม์ Cyclooxygenase ของอนุพันธ์ N-Substituted
benzanilides
(Synthesis and cyclooxygenase inhibitory activity of N-substituted benzanilides)



คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ผศ. ดร. เฉลิมเกียรติ สงคราม

2. Professor Dr. Hiroyuki Kagechika

3. ผศ. ดร. ภูธร แคนยุกต์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Tokyo Medical and Dental University

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานฉบับนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ต่อเอนไซม์ Cyclooxygenase ของอนุพันธ์ *N*-Substituted benzanilides สำเร็จตามวัตถุประสงค์ได้ โดยได้รับการสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินการจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ Professor Dr Hiroyuki Kagechika และ Dr. Shinya Fujii (Tokyo Medical and Dental University) Associate Professor Dr. Aya Tanatani (Ochanomizu University) คุณอังศุมา วงษ์มะยุรา คุณคมกริช เดชพิชัย คุณวัชรินทร์ ดิลกนวกฤทธิ และบุคลากรคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

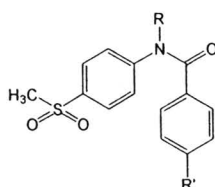
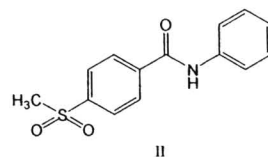
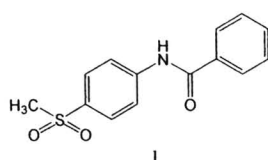
ผู้วิจัย

ผศ. ดร. เฉลิมเกียรติ สงคราม

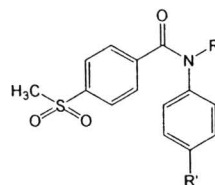
บทคัดย่อ

246174

ผู้วิจัยทำการออกแบบ สังเคราะห์ และประเมินความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้ง cyclooxygenase ของอนุพันธ์ benzamides ที่มี 4-(methylsulfonyl)phenyl เป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้าง สารทำการออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นจำนวน 16 สาร จะเป็น secondary benzanilides (I และ II) จำนวน 2 สาร ส่วนสารที่เหลืออีก 14 สาร (III - XVI) จะเป็น tertiary benzanilides ซึ่งมีหมู่แทนที่บน Nitrogen เป็น หมู่ alkyl หรือ aralkyl



III	R = CH ₃	R' = H
IV	R = C ₅ H ₁₁	R' = H
V	R = CH ₂ C ₆ H ₅	R' = H
VI	R = CH ₂ COOC ₂ H ₅	R' = H
VII	R = CH ₂ COOH	R' = H
VIII	R = CH ₃	R = F
IX	R = CH ₃	R = CH ₃



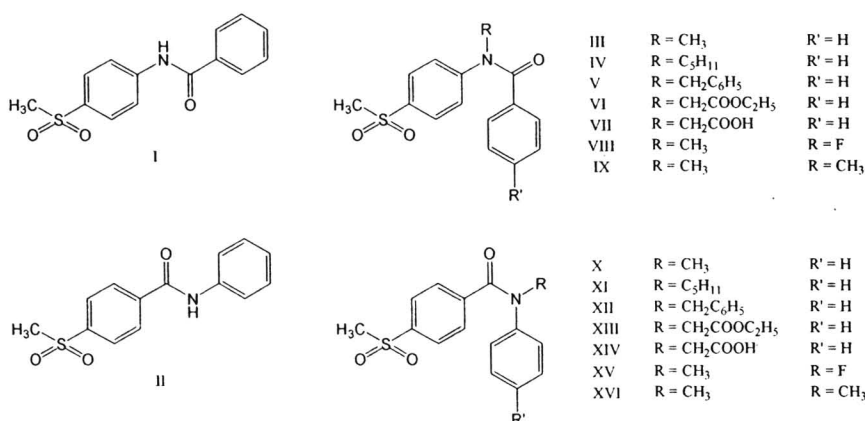
X	R = CH ₃	R' = H
XI	R = C ₅ H ₁₁	R' = H
XII	R = CH ₂ C ₆ H ₅	R' = H
XIII	R = CH ₂ COOC ₂ H ₅	R' = H
XIV	R = CH ₂ COOH	R' = H
XV	R = CH ₃	R = F
XVI	R = CH ₃	R = CH ₃

ขั้นตอนการสังเคราะห์เริ่มจากการสังเคราะห์ *N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamides และ 4-(methylthio)-*N*-phenylbenzamides จากปฏิกิริยา acylation ระหว่าง anilines และ benzoyl chlorides ที่มีหมู่แทนที่บน benzene ring ที่สอดคล้องกับสารที่ถูกออกแบบขึ้น จากนั้นจึงทำปฏิกิริยา *N*-alkylation เพื่อเพิ่มหมู่ alkyl หรือ aralkyl บนโครงสร้างของ benzamides สองชนิดข้างต้น หลังจากนั้นจึงทำการ oxidation สารได้ด้วย Oxone[®] เพื่อเตรียมเป็น benzamides ที่มีส่วนของหมู่ 4-(methylsulfonyl)phenyl อยู่ในโครงสร้าง สารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นทุกตัว ถูกยืนยันโครงสร้างด้วย IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR และ HR-MS Spectroscopy ก่อนจะถูกนำไปประเมินความสามารถในการยับยั้ง cyclooxygenases ทั้ง COX-1 และ COX-2 ซึ่งผลจาก *In vitro* whole cell assay ซึ่งทำการทดลองใน murine COX-1 หรือ COX-2 null fibroblast cell line แสดงว่าสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้ง COX ก่อนข้างต่ำ แต่แสดง selectivity ต่อ COX-2

Abstract

246174

We designed, synthesized, and evaluated a series of benzamides, processing 4-(methylsulfonyl)phenyl pharmacophore as cyclooxygenase inhibitors. Sixteen designed compounds were two secondary benzanilides (I and II) and fourteen tertiary benzanilides (III-XVI) containing different alkyl or aralkyl substituents.



The synthetic scheme started from the synthesis of *N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamides and 4-(methylthio)-*N*-phenylbenzamides by the acylation of the corresponding anilines with the corresponding benzoyl chlorides. The alkyl or aralkyl substituents were introduced by subsequent *N*-alkylation of the obtained benzanilide. Finally, target benzamides, processing 4-(methylsulfonyl)phenyl pharmacophore were then synthesized by oxidation with Oxone[®]. Their structures were confirmed by, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and HR-MS Spectroscopy. The designed compounds will be subjected to evaluate for their ability to inhibit the cyclooxygenases, COX-1 and COX-2. *In vitro* whole cell assay in murine COX-1 or COX-2 null fibroblast cell line suggested that these compounds showed low potency against COX but processed selectivity with COX-2 in some extent.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ต่อเอนไซม์ Cyclooxygenase ของอนุพันธ์
N-Substituted benzanilides

(ภาษาอังกฤษ) Synthesis and cyclooxygenase inhibitory activity of *N*-substituted benzanilides

Keywords synthesis, benzanilide, cyclooxygenase, inhibitor

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ชื่อหัวหน้าโครงการ	ผศ. ดร. เฉลิมเกียรติ สงคราม
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
โทรศัพท์	074-288860
โทรสาร	074-428239
Email	chalermkiat.s@psu.ac.th

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช

4. งบประมาณทั้งโครงการ 480,000 บาท

5. ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี

6. ได้เสนอโครงการนี้ หรือโครงการที่มีส่วนเหมือนกับเรื่องนี้บางส่วนเพื่อขอทุนต่อแหล่งทุนอื่นที่ใดบ้าง

☐ ไม่ได้เสนอต่อแหล่งทุนอื่น

☒ เสนอต่อ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2548

ชื่อโครงการที่เสนอ การสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ต่อเอนไซม์ Cyclooxygenase ของอนุพันธ์
N-Substituted benzanilides

กำหนดทราบผล อนุมัติเมื่อ พฤศจิกายน 2548

7. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

Cyclooxygenases (COX) เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของ Prostaglandin (PGs) จาก Arachidonic Acid จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ Cyclooxygenase ที่พบอยู่ในร่างกายมีอยู่ 2 Isoforms คือ Cyclooxygenase-1 (COX-1) และ Cyclooxygenase-2 (COX-2)

COX-1 เป็นเอนไซม์ที่พบมากในไตและระบบทางเดินอาหาร มีหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์ Prostaglandins ที่มีบทบาทในกลไกการป้องกันผนังกระเพาะอาหารและลำไส้ และยังมีผลต่อการทำงานของเกร็ดเลือด ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของ COX-1 จึงก่อให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ และรบกวนการเกาะกลุ่มแข็งตัวของเกร็ดเลือดทำให้ระยะเวลาการไหลออกของเลือดจากบาดแผลนานขึ้น

ส่วน COX-2 เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นเป็นจำนวนมากในเนื้อเยื่อได้รับบาดเจ็บและกำลังเข้าสู่ภาวะอักเสบ มีหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์ Prostaglandins ที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบ

ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่ Steroid หรือ NSAIDs ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่ เช่น Aspirin, Ibuprofen, Diclofenac, Indomethacin และ Mefenamic Acid ยับยั้งการทำงานของทั้ง COX-1 และ COX-2 ซึ่งจะส่งผลยับยั้งการสังเคราะห์ Prostaglandins ใน Cell และเนื้อเยื่อแทบทุกชนิด จึงก่อให้เกิดทั้งฤทธิ์ด้านการอักเสบตลอดจนอาการข้างเคียงต่าง ๆ ทางระบบทางเดินอาหารและระบบเลือด ในขณะที่ Selective COX-2 Inhibitor เช่น Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Etericoxib และ Parecoxib Sodium ซึ่งถูกค้นพบและพัฒนาขึ้นมาในภายหลัง มีข้อดีกว่าคือเป็นยาต้านการอักเสบที่มีอาการข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหารและระบบเลือดน้อย

แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการใช้ Selective COX-2 Inhibitor ทำให้ผู้ใช้ยาเกิดภาวะเสี่ยงต่อการเกิด Myocardial Infarction ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการพัฒนายาใหม่ที่มีประสิทธิภาพ และความปลอดภัยมากกว่า Selective COX-2 Inhibitor ที่มีอยู่ในปัจจุบัน

8. วัตถุประสงค์

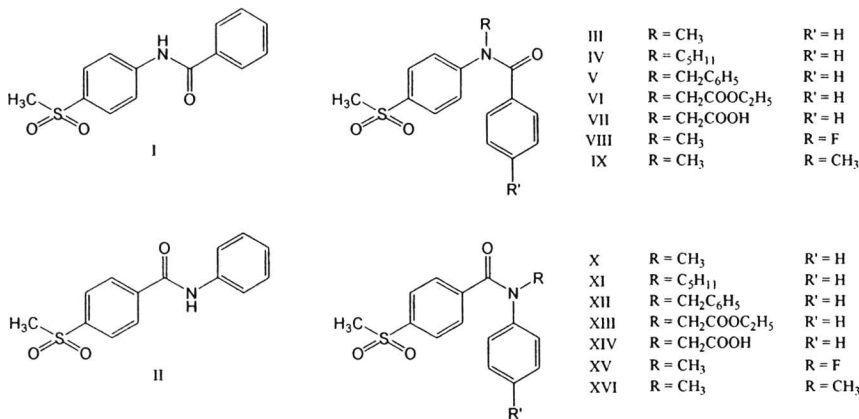
1. สังเคราะห์ *N*-Substituted Benzanilides ซึ่งมี *N*-Substituent เป็น Alkyl หรือ Aralkyl ตลอดจน Intermediate ที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์
2. ศึกษาวิธีการและสภาวะในการสังเคราะห์ *N*-Substituted Benzanilides เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงทางเคมีสังเคราะห์สำหรับการสังเคราะห์สารกลุ่มนี้
3. ศึกษาข้อมูลคุณสมบัติทางกายภาพและข้อมูลทาง Spectroscopy ของสารกลุ่ม *N*-Substituted Benzanilides เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงของสารกลุ่มนี้
4. ศึกษาถึง Structure-Activity Relationship ต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase ของสารกลุ่ม *N*-Substituted Benzanilides และนำข้อมูลที่ได้มาใช้ประโยชน์ในการพัฒนา Selective COX-2 Inhibitor ต่อไป

9. ระเบียบวิธีวิจัย

สังเคราะห์อนุพันธ์ *N*-substituted Benzanilide ประมาณ 15 ตัว พิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อยืนยันโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้วิธีการทาง Spectroscopy และ Elemental Analysis และนำสารที่สังเคราะห์ขึ้นไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Cyclooxygenase-1 และเอนไซม์ Cyclooxygenase -2 เพื่อนำผลการวิจัยมาสรุปถึงความน่าจะเป็นในการนำอนุพันธ์ *N*-substituted Benzanilide มาพัฒนาเป็น Selective Cyclooxygenase Inhibitor และสรุปถึง Structure-Activity Relationship เบื้องต้นของสารกลุ่มนี้ต่อฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ Cyclooxygenase

10. ผลการศึกษาวิจัย

ผู้วิจัยทำการออกแบบ สังเคราะห์ และประเมินความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้ง cyclooxygenase ของอนุพันธ์ benzamides ที่มี 4-(methylsulfonyl)phenyl เป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้าง สารทำการออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นจำนวน 16 สาร จะเป็น secondary benzanilides (I และ II) จำนวน 2 สาร ส่วนสารที่เหลืออีก 14 สาร (III - XVI) จะเป็น tertiary benzanilides ซึ่งมีหมู่แทนที่บน Nitrogen เป็น หมู่ alkyl หรือ aralkyl



สารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นทุกตัว ถูกยืนยันโครงสร้างด้วย IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR และ HR-MS Spectroscopy ก่อนจะถูกนำไปประเมินความสามารถในการยับยั้ง cyclooxygenases ทั้ง COX-1 และ COX-2 ซึ่งผลจาก *In vitro* whole cell assay ซึ่งทำการทดลองใน murine COX-1 หรือ COX-2 null fibroblast cell line แสดงว่าสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้ง COX ค่อนข้างต่ำ แต่แสดง selectivity ต่อ COX-2

11. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับในเชิงความรู้พื้นฐานและการใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ เช่น เชิงนโยบาย เชิงสาธารณะ และการพัฒนาสู่เชิงพาณิชย์

งานวิจัยนี้อาศัยความรู้และเทคนิคทางเคมีสังเคราะห์ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของกระบวนการวิจัยยาใหม่ ซึ่งยังไม่ได้ดำเนินการอย่างเป็นรูปธรรมมากนักในประเทศไทย ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะมีส่วนส่งเสริมทางด้านวิชาการที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนายาในกลุ่ม selective COX-2 inhibitor และรวมไปถึงการส่งเสริมองค์ความรู้ในเชิงการพัฒนายาในยากลุ่มอื่นๆ ต่อไปในอนาคตอีกด้วย การเริ่มต้นในการดำเนินงานวิจัยด้านนี้จึงน่าจะช่วยเพิ่มศักยภาพของงานวิจัยยา เพื่อให้สามารถเกิดการแข่งขันกับนานาชาติได้นอกจากนี้หากประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์สารในกลุ่มนี้จะทำให้ได้ยาในกลุ่ม selective COX-2 Inhibitor ตัวใหม่ ซึ่งคาดว่าจะสามารถลดผลข้างเคียงที่เกิดจากยาในกลุ่มนี้ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันและเพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้ใช้งานได้มากขึ้น

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	iii
หน้าสรุปโครงการ	iv
สารบัญ	vii
สารบัญตาราง	Viii
สารบัญรูป	ix
คำอธิบายคำย่อ	x
บทที่ 1	
บทนำ	
หลักการและเหตุผล	1
โครงการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วัตถุประสงค์	5
ประโยชน์	5
บทที่ 2	
วิธีการทดลอง	
สารเคมีและอุปกรณ์	6
การสังเคราะห์สาร	8
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ COX	35
บทที่ 3	
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
การสังเคราะห์ และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ขึ้น	37
การพิสูจน์ Conformation ของสารด้วย $^1\text{H-NMR}$	41
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ COX	43
บทที่ 4	
สรุปผลการทดลอง	48
เอกสารอ้างอิง	50
การนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์	53
ภาคผนวก	54

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	Total Yield ในการสังเคราะห์ Benzamides I- XVI 38
ตารางที่ 2	ผล HR-MS ของสารที่สังเคราะห์ทั้งหมด 39-40
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) 41
ตารางที่ 4	ค่า Chemical Shift ของ Final Product ที่เป็น N-Substituted Benzanilide (สาร III - XIV) เปรียบเทียบกับค่าของ N-H Benzanilide (สาร I และ II) 42
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 43
ตารางที่ 6	% Inhibition ต่อ COX ของ Benzanilide ที่สังเคราะห์ขึ้น (สาร I, II, VI และ X) เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ที่ความเข้มข้น 10 mcg/ml ใน Mouse Lung Fibroblast Cell Line 45
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 46
ตารางที่ 8	IC-50 ของสาร VI ในการยับยั้งการทำงานของ COX เปรียบเทียบกับ Aspirin 47

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1	1
รูปที่ 2	2
รูปที่ 3	2
รูปที่ 4	3
รูปที่ 5	3
รูปที่ 6	4
รูปที่ 7	4
รูปที่ 8	5
รูปที่ 9	8
รูปที่ 10	8
รูปที่ 11	8
รูปที่ 12	9
รูปที่ 13	37
รูปที่ 14	44
รูปที่ 15	45
รูปที่ 16	46
รูปที่ 17	47

คำอธิบายคำย่อ

AA	ย่อมาจาก	Arachidonic Acid
ASA	ย่อมาจาก	Aspirin
<i>br</i>	ย่อมาจาก	broad
°c	ย่อมาจาก	Degree Celcius
calcd	ย่อมาจาก	Calculated
CDCl ₃	ย่อมาจาก	Deuterated Chloroform
¹³ C-NMR	ย่อมาจาก	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
COX	ย่อมาจาก	Cyclooxygenase
COX-1	ย่อมาจาก	Cyclooxygenase-2
COX-2	ย่อมาจาก	Cyclooxygenase-2
<i>d</i>	ย่อมาจาก	Doublet
DMEM	ย่อมาจาก	Dubelcco' s Modified Eagle Meduim
DMSO	ย่อมาจาก	Dimethylsulfoxide
DMSO- <i>d</i> ₆	ย่อมาจาก	Deuterated Dimethylsulfoxide
FCS	ย่อมาจาก	Fetal Calf Serum
¹ H-NMR	ย่อมาจาก	Proton Nuclear Magnetic Resonance
³ H	ย่อมาจาก	Tritrium
HR-MS	ย่อมาจาก	High Resolution Mass Spectrometry
<i>Hz</i>	ย่อมาจาก	Hertz
IC-50	ย่อมาจาก	50% inhibitory concentration
IR	ย่อมาจาก	Infrared Spectrophotometry
L	ย่อมาจาก	Liter
<i>m</i>	ย่อมาจาก	Multiplet
mcg	ย่อมาจาก	Microgram
mcM	ย่อมาจาก	Micromolar
mg	ย่อมาจาก	Miligram
ml	ย่อมาจาก	Milliliter
mM	ย่อมาจาก	Milimolar
mmol	ย่อมาจาก	Milimole
MO	ย่อมาจาก	Molecular Orbital
NMR	ย่อมาจาก	Nuclear Magnetic Resonance

คำอธิบายคำย่อ

PGs	ย่อมาจาก	Prostaglandins
ppm	ย่อมาจาก	Part Per Million
q	ย่อมาจาก	Quartet
RIA	ย่อมาจาก	Radioimmunoassay
rpm	ย่อมาจาก	Round Per Minute
rt	ย่อมาจาก	Room Temperature
s	ย่อมาจาก	Singlet
t	ย่อมาจาก	Triplet
TX	ย่อมาจาก	Thromboxane