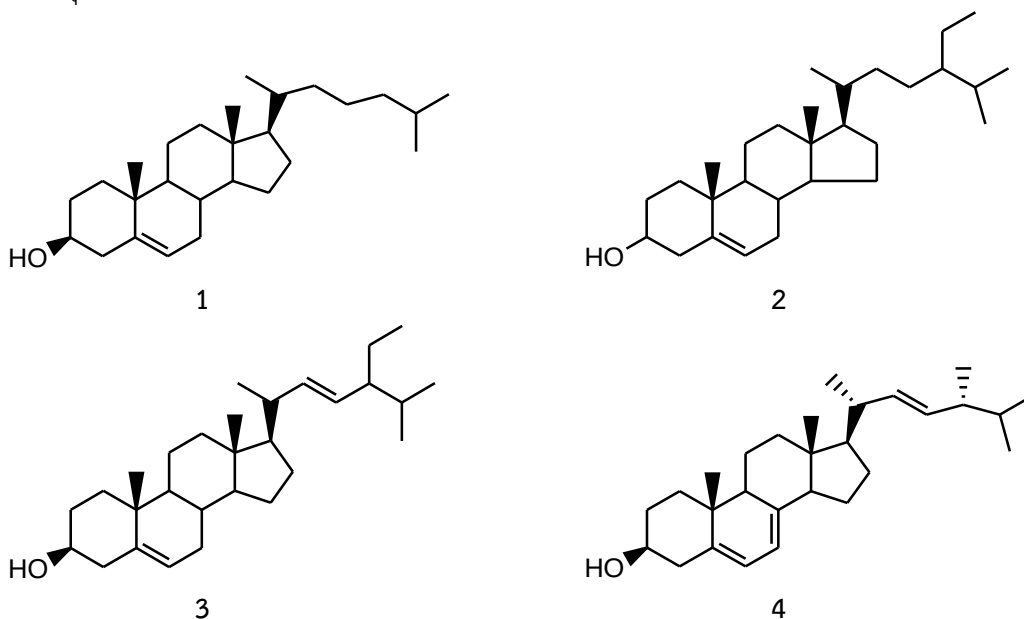


บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

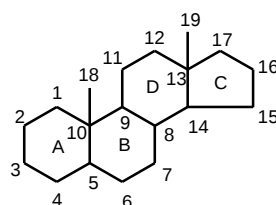
จากความเชื่อที่ว่าสารธรรมชาติมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมากกว่าสารสังเคราะห์ เช่น สารธรรมชาติในกลุ่ม เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และแอลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นต้น ซึ่งสารธรรมชาติในกลุ่มนี้ล้วนมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ตัวอย่างเช่น กลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันชะลอการแก่ก่อนวัย ด้านการเกิดอนุมูลอิสระอันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง ปัจจุบันจึงมีรายงานวิจัยจำนวนมากที่ทำการศึกษเกี่ยวกับสมบัติทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของสารธรรมชาติเหล่านี้ สเตียรอยด์ (Steroids) เป็นสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ (Natural product) กลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ เช่น Cholesterol **1** พบได้ในกล้ามเนื้อสมอง เส้นประสาทไขสันหลัง และน้ำมันปลา Sitosterol **2** และ Stigmasterol **3** เป็น sterol ทั่วไปของพืช แยกได้จากน้ำมันข้าวโพด น้ำมันของข้าวสาลีกำลังงอก น้ำมันของข้าวไรน์ที่กำลังงอก น้ำมันเมล็ดฝ้าย และ Ergosterol **4** พบได้ในยีสต์และเห็ด เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์และเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินดี เป็นต้น



เห็นได้ว่าการนำสเตียรอยด์ไปใช้ประโยชน์อย่างมากเช่น ในทางการแพทย์ใช้รักษาโรคข้ออักเสบ โรคมะเร็ง รوماتอยด์ หรือในทางการเกษตรใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชและ/หรือใช้ในการเพิ่มผลผลิตพืช เป็นต้น แต่เป็นที่ทราบกันดีว่ากลุ่มสารธรรมชาติที่มีปรากฏในธรรมชาติมีอยู่ในปริมาณที่น้อยเช่นเดียวกันกับ

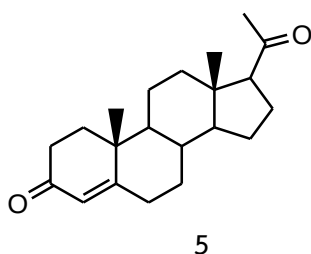
สเตียรอยด์ที่มาจากพืชและสัตว์นั้นมีปริมาณน้อยมาก ถ้านำพืชหรือสัตว์มาสกัดแยกสารด้วยเทคนิคทางเคมีอินทรีย์เพื่อให้ได้สเตียรอยด์ในรูปสารบริสุทธิ์จะต้องใช้พืชและสัตว์ในปริมาณมากส่งผลเสียต่อสมดุลทางธรรมชาติ และเป็นการก่อเกิดปัญหาวิกฤตโลกร้อนทางอ้อม จากสาเหตุเหล่านี้การนำมาใช้ในทางการแพทย์เพื่อเป็นตัวยาก็มักนิยมกระทำโดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีอินทรีย์โดยการนำสเตียรอยด์ที่มีใน

ปริมาณมากหรือหาซื้อได้ง่ายมาเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โดยเลียนแบบธรรมชาติ เช่นการนำเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันหรือการเพิ่มหมู่แทนที่บนส่วนของวงหรือสายโซ่ รวมทั้งการสังเคราะห์โดยวิธีเฉพาะเจาะจงเพื่อควบคุมสเตอริโอเคมี เพื่อให้ได้สเตียรอยด์สังเคราะห์ชนิดใหม่ ทั้งนี้เพื่อมุ่งหวังที่จะทำให้คุณสมบัติและการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนแปลง ซึ่งพบว่าสเตียรอยด์นั้นหากนำมาใช้อย่างถูกต้องหลักวิชาการจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก สารกลุ่มนี้จึงเป็นที่สนใจของนักวิจัยด้านเคมีอินทรีย์ที่นิยมการสังเคราะห์และศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างสเตียรอยด์สังเคราะห์กับฤทธิ์ทางชีวภาพจากโครงสร้างของนิวเคลียสหลักประกอบด้วย Perhydrocyclopentanophenanthrene เป็นโครงสร้างหลัก ดังแสดงในรูปที่ 1

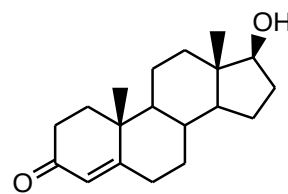


รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์

ความแตกต่างของชนิดของสเตียรอยด์แต่ละชนิดจะแปรผันไปตามชนิดของหมู่ฟังก์ชันหรือชนิดของหมู่ฟังก์ชันบนสายโซ่ที่เกาะอยู่รอบนิวเคลียสหลักของสเตียรอยด์ เช่น จากโครงสร้างของ Progesterone 5 มีหมู่ฟังก์ชันประกอบด้วยหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 และ C-20 หรือ Testosterone 6 จะมีหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 และหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-17 จากโครงสร้างที่แตกต่างกันนี้จึงได้ส่งผลถึงคุณสมบัติที่ต่างกันอย่างดั่งที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น[1,2]



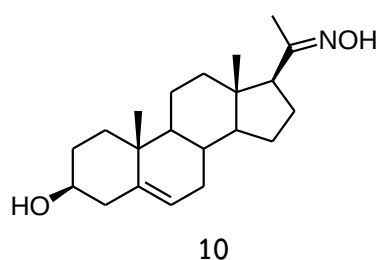
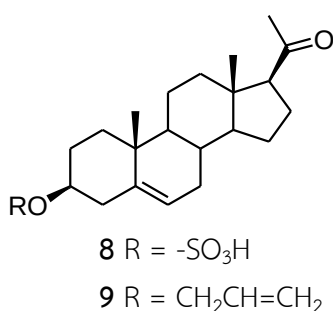
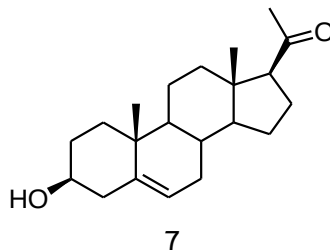
5



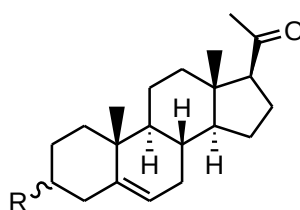
6

จากจุดที่น่าสนใจในโครงสร้างและความหลากหลายของหมู่ฟังก์ชันบนนิวเคลียสของสเตียรอยด์ กลุ่มผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาและทำงานงานวิจัยต่อเนื่องเพื่อศึกษาและหาแนวทางการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่จากสเตียรอยด์ตั้งต้นที่สามารถหาซื้อได้ในท้องตลาดและที่สำคัญคือไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต ผู้วิจัยเลือกเพรกนินโนโลน 7 เป็นสารตั้งต้น ทั้งนี้เนื่องจากเพรกนินโนโลนมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางชีวสังเคราะห์จาก Cholesterol 1 และจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าเพรกนินโนโลน 7 ไม่มีฤทธิ์ด้านเชื้อจุลินทรีย์และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษาทำโดยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันหลักๆ และนำไปศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ มีผลสรุปของงานวิจัยที่ผ่านมาของผู้วิจัยได้สังเคราะห์สเตียรอยด์ซัลเฟต 8 ด้วยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของเพรกนินโนโลน 7 จากหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 เป็นหมู่ซัลเฟต พบว่าสเตียรอยด์ซัลเฟต 8 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra อันเป็นสาเหตุของโรควัณโรค และผลการทดสอบเบื้องต้นในด้านการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์อนุพันธ์ของแอลลิซของเพรกนินโนโลน 9 สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

Staphylococcus aureus (MRSA), *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus subtilis* ATCC 26633 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ในขณะที่อนุพันธ์ออกซิมีของเพกนินโนโลน 10 สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. diphtheriae* และ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์การต้านไวรัสโรคเริมชนิด Herpes simplex virus-1[3]



นอกจากนี้กลุ่มผู้วิจัยยังได้ทำการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ซึ่งเป็นอนุพันธ์อะมิโนเพกนินโนโลนโดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ให้เป็นหมู่อะมิโนที่เป็นสายโซ่ที่มีความยาวต่างๆ กันหรือบนสายโซ่มีหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ อยู่ และทำการทดสอบเบื้องต้นโดยเน้นศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งพบว่าอนุพันธ์ 11 และ 12 สามารถออกฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง Human hepatocellular liver carcinoma cell lines (HepG2) หรือเซลล์มะเร็งตับ ชนิด HepG2 ได้ โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 2.23 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และ 2.09 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ตามลำดับ[4]



11 R = NH(CH₂)₃NH₂

12 R = NH(CH₂)₆NH₂

13 R = NHCH₂(OH)CH₂NH₂

และเพื่อเป็นการดำเนินงานวิจัยต่อเนื่อง วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้สนใจสังเคราะห์อนุพันธ์ของเพกนินโนโลน 7 เพื่อเป็นการศึกษาแนวทางการเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพให้แก่สเตียรอยด์สังเคราะห์ชนิดใหม่ โดยเฉพาะสารตั้งต้นที่เลือกใช้ในการสังเคราะห์คือ เพกนินโนโลน 7 จัดเป็น neurosteroid และเป็นสเตียรอยด์ที่มีโครงสร้างที่เปลี่ยนมาจากคลอเลสเตอรอล 1 ซึ่งเป็นสเตียรอยด์ที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ นอกจากนี้เพกนินโนโลน 7 ยังเป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมนชนิดอื่นอีกเช่น estrogen testosterone และ

progesterone เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของเพรกนินโนโลนต่อเซลล์ปกติจากไตของลิง (African green monkey kidney fibroblast, Vero) จะน้อยกว่าสเต็มเซลล์ชนิดอื่นจึงเหมาะกับการนำมาเป็นสารตั้งต้น จากนั้นจะนำสเต็มเซลล์ชนิดใหม่นี้มาทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่ามะเร็งเป็นโรคร้ายที่คร่าชีวิตในอัตราการเสียชีวิตที่สูง และผู้ป่วยโรคนี้นี้จะมีความทรมานมาก นักวิจัยจึงพยายามหาตัวยาใหม่ๆ ที่ประกอบด้วยนิวเคลียสของสเต็มเซลล์ทั้งจากสารธรรมชาติและ การสังเคราะห์สารออกฤทธิ์เลียนแบบธรรมชาติในห้องปฏิบัติการ จากข้อมูลเบื้องต้นของงานวิจัยที่กล่าวมา ผู้วิจัยคิดว่าโครงการวิจัยนี้เป็นแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ด้านเภสัชวิทยา กล่าวคือ สามารถสังเคราะห์สเต็มเซลล์ชนิดใหม่ที่สามารถนำไปเป็นตัวรักษามะเร็งหรือเป็นส่วนผสมในยารักษามะเร็งชนิดใหม่ได้ และ/หรือสามารถใช้ทดแทนสเต็มเซลล์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์สเต็มเซลล์ชนิดใหม่จากสเต็มเซลล์เพรกนินโนโลน 7 โดยการเลือกใช้สารเข้าทำปฏิกิริยาและเทคนิคในการสังเคราะห์ที่เหมาะสม
2. เพื่อศึกษาผลของสเต็มเซลล์ต่อความเป็นพิษของเซลล์และฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสเต็มเซลล์จากเพรกนินโนโลน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์สเต็มเซลล์ชนิดใหม่โดยการดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันของนิวเคลียส โดยใช้เพรกนินโนโลน 7 เป็นสารตั้งต้น
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง

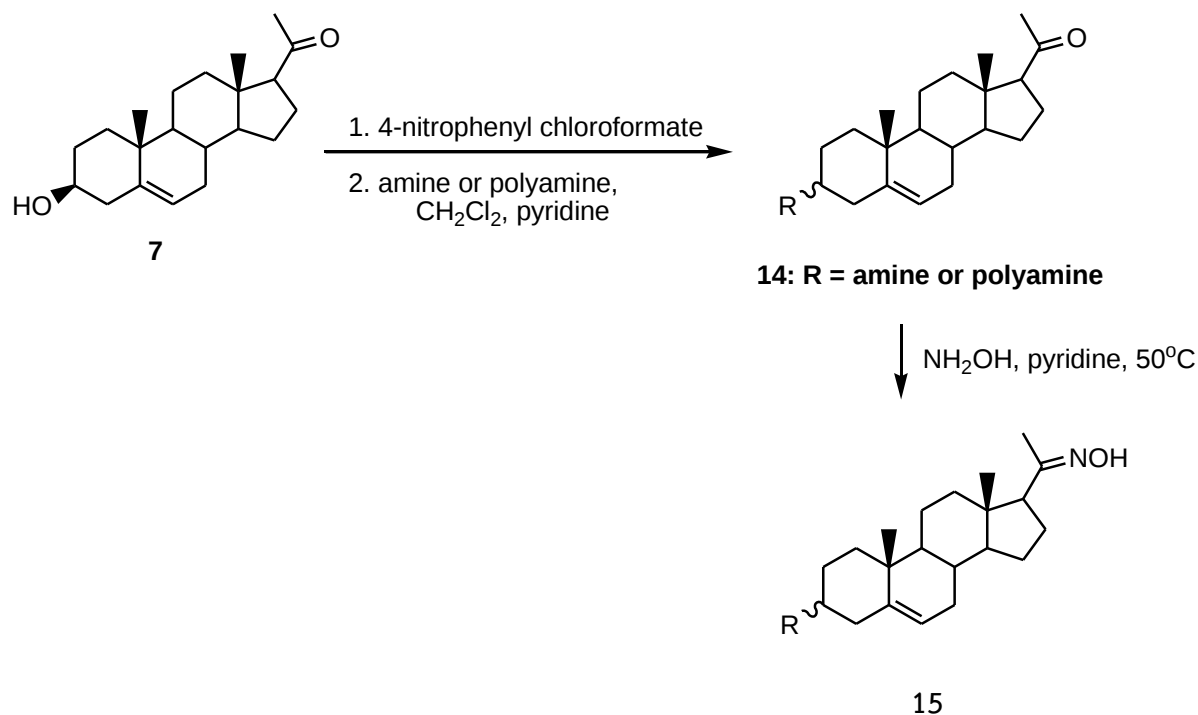
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการวิจัย : การสังเคราะห์สเต็มเซลล์เป้าหมายโดยใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีอินทรีย์กล่าวโดยสรุปดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเพรกนินโนโลน

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเพรกนินโนโลน 7 โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่วง A ให้เป็นหมู่อะมิโน โดยเริ่มจากการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-3 ให้เป็นหมู่หลุดออกที่วงไวด้วยการใช้รีเอเจนต์คือ 4-nitrochloroformate (4-NPC) จากนั้นใช้อะมิโนรีเอเจนต์เข้าทำปฏิกิริยากับเพรกนินโนโลน คาร์บอนที่ได้สารผลิตภัณฑ์คืออะมิโนสเต็มเซลล์ นำอะมิโนสเต็มเซลล์ที่สังเคราะห์ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี แล้วจึงนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ อะมิโนสเต็มเซลล์จะถูกนำมาเปลี่ยนหมู่คีโต (ตำแหน่ง C-20) ที่วง D ให้เป็นหมู่ออกซิมโดยการทำปฏิกิริยา Oximation กับ $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ ทั้งนี้เพื่อศึกษาผลของหมู่ออกซิมว่ามีผลต่อการออกฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของอะมิโนสเต็มเซลล์ที่สังเคราะห์หรือไม่ จากนั้นนำอนุพันธ์สเต็มเซลล์ที่ได้จากการสังเคราะห์ (Crude product) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ศึกษาโครงสร้างของสเต็มเซลล์สังเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปีและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ ในการทดลองนี้ได้เปลี่ยนแนวทางการสังเคราะห์

อนุพันธ์ของเพรกนินโนโลน 7 จากที่ได้เสนอไว้ในโครงการวิจัยเนื่องจากสังเคราะห์สารเป้าหมายได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แนวทางการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเพรกนินโนโลนได้สรุปดังแสดงในแผนภาพที่ 1.1



ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

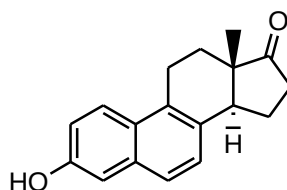
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสเตียรอยด์สังเคราะห์ หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ด้วยวิธี MTT assay เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่

1. เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line)
2. เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Human hepatocellular carcinoma cell line)
3. เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line)
4. เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line)
5. เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูชนิด P388 (Murine leukemia cell line)
6. เซลล์ปกติจากไตของลิงชนิด Vero (African green monkey kidney)

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

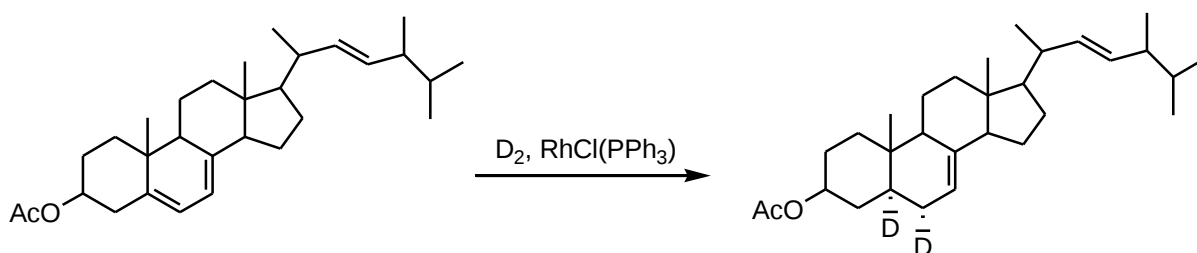
ในธรรมชาติมีสเตียรอยด์ที่แตกต่างกันนับร้อยชนิดตรวจพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ การค้นพบสเตียรอยด์เริ่มจากการสกัดจากพืชหรือเนื้อเยื่อของสัตว์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม หรือเบนซีน พบว่าสเตียรอยด์เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติคล้ายกับไขมัน สามารถละลายได้ดีในตัวทำ

ละลายอินทรีย์และไม่ละลายในน้ำ ความแตกต่างของสเตียรอยด์แต่ละชนิดจะแปรผันไปตามหมู่ฟังก์ชันที่ติดอยู่กับโครงสร้างหลัก บทบาทสำคัญของสเตียรอยด์ในสิ่งมีชีวิตคือเป็นฮอร์โมน สเตียรอยด์ฮอร์โมนที่พบในสัตว์มีปริมาณค่อนข้างน้อยจึงไม่สามารถใช้เป็นแหล่งสำคัญของสารดังกล่าวได้ ในปลายทศวรรษของปี ค.ศ. 1930 ได้มีการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์สเตียรอยด์หลายชนิดขึ้นและ Equilenin **16** เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนตัวแรกที่ได้จากการสังเคราะห์ ปัจจุบันการสังเคราะห์สารดังกล่าวในปริมาณมากอาจใช้วิธีแบบกึ่งสังเคราะห์ (semi-synthesis) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ที่เริ่มจากสารตั้งต้นในธรรมชาติซึ่งมีขั้นตอนการสังเคราะห์และค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์น้อยกว่า ซึ่งได้ให้ความสนใจกับสเตียรอยด์ที่ได้จากพืชเนื่องจากมีปริมาณสารตั้งต้นค่อนข้างสูง นอกจากนั้นยังพบว่าสเตียรอยด์จากพืชร่างกายสามารถดูดซึมเพื่อเอาไปใช้ทดแทนฮอร์โมนสเตียรอยด์ได้ทันที



16

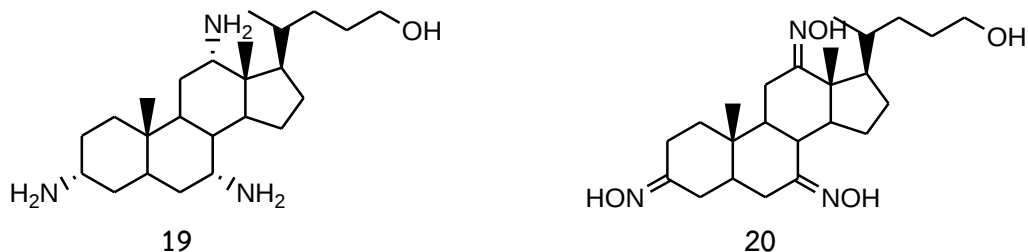
จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยมมาเชื่อมต่อกัน หมู่แทนที่ต่างๆ ที่มาเกาะจะเป็นหมู่ฟังก์ชันที่คล้ายคลึงกันมีคุณสมบัติทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว จึงทำให้สเตียรอยด์มีคุณสมบัติที่หลากหลาย นักเคมีได้ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะทางเคมีอินทรีย์ในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและรวมถึงโครงสร้างเพื่อเป็นการนำไปสู่สเตียรอยด์ชนิดใหม่ และรวมทั้งเป็นแนวทางไปสู่การสังเคราะห์สเตียรอยด์เลียนแบบธรรมชาติ โดยการเลือกใช้รีเอเจนต์หรือสารเข้าทำปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจง และควบคุมสภาวะที่เหมาะสมเพื่อจะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มากพอต่อการนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จากรายงานการวิจัยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างมักมุ่งเน้นไปที่หมู่ฟังก์ชันเป็นส่วนใหญ่ ที่ ring A และ ring B หรือหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง การเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้างสเตียรอยด์จะขึ้นกับตำแหน่งบนโครงสร้าง ความสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาคือคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 11 17 และ 20 ตัวอย่างเช่น การเข้าทำปฏิกิริยาของนิวคลีโอไฟล์ที่หมู่คาร์บอนิล การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยไฮโดรไรต์ไอออน การเกิดคีทาล (ketal formation) และปฏิกิริยาการเพิ่มโดยกรีนยาร์ตรีเอเจนต์ สามารถเรียงลำดับตำแหน่งที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาได้คือ $3 > 17 \geq 20 > 11$ นอกจากนั้นปฏิกิริยาของสเตียรอยด์ยังมีความเฉพาะเจาะจงทางสเตอริโอเคมี (Stereoselectivity in steroids) เช่น การเกิดปฏิกิริยา Catalytic hydrogenation ของ Ergosterol acetate **17** จะเกิดแบบ *cis*-addition เข้าทางด้านพันธะคู่ที่มีความเกะกะน้อย[5]



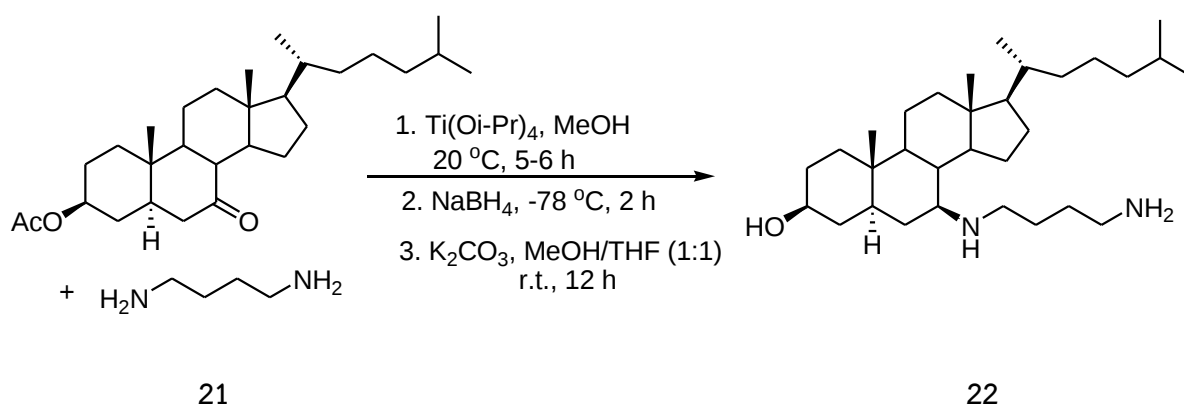
17

18

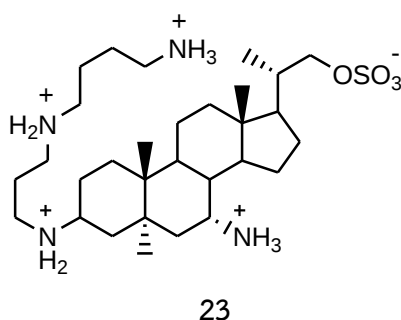
สารกลุ่มสเตียรอยด์ที่ได้รับความสนใจในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันโดยการปรับเปลี่ยนโดยใช้สารเคมี (Chemical transformation) แสดงตัวอย่างได้ดังนี้ จากงานวิจัยของ Savage และคณะ[6] ได้สังเคราะห์ triamine derivatives **19** และ **20** ของกรดโคเลอิก พบว่าอนุพันธ์ทั้งสองมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์



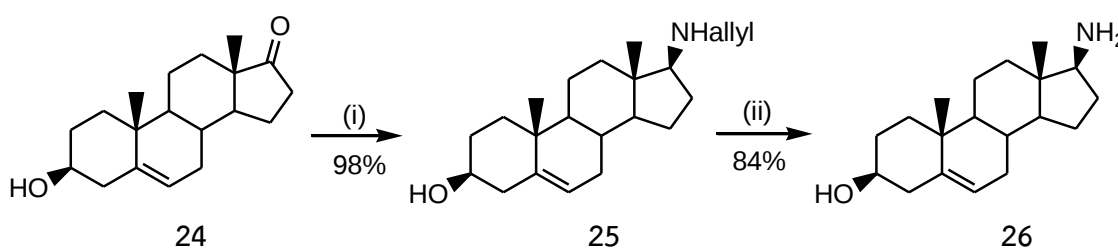
Loncle และคณะ[7] ได้ทำการสังเคราะห์ 7-amino และ polyaminosterol จาก 3 β -acetoxy-7-keto-5 α -cholestane **21** โดยทำปฏิกิริยา reductive amination กับ Ti(OR)₄ และ NaBH₄ ทำการกำจัดหมู่แอซิติลด้วย K₂CO₃ ใน MeOH : CHCl₃ (1:1) พบว่าสารผลิตภัณฑ์ **22** มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์และว่องไวในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ส่งผลคล้ายกับ *Staphylococcus aureus* และ *S. faecalis*



Khan และคณะ[8] ได้ทำการสังเคราะห์ 7 α -Aminosteroids จาก 3-dioxolane-22-tert-butyl(dimethylsilyloxy)-23,24-bisnor-5 α -cholan-7-one พบว่าสารผลิตภัณฑ์ **23** ที่ได้จะมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes* 308A

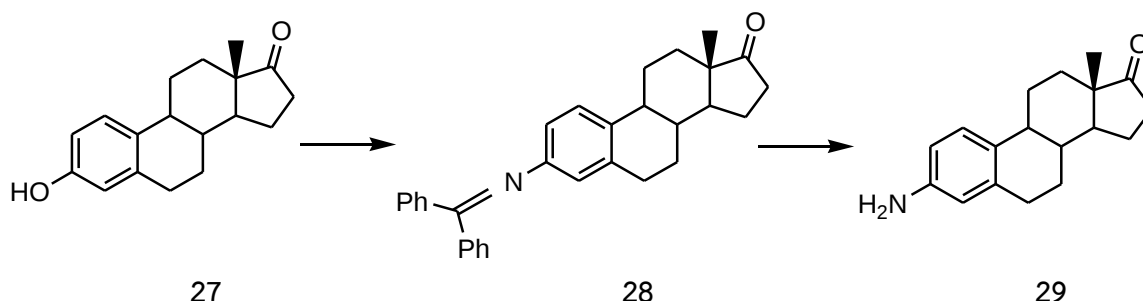


Taylor และคณะ[9] ได้สังเคราะห์ 17 β -Aminosteroids คือ 17 β -amino-3 β -hydroxyandrost-5-en 26 โดยใช้ 3- β -hydroxyandrost-5-en-17-ene-17-one 24 เป็นสารตั้งต้น เริ่มจากปฏิกิริยา Reductive amination โดยการใช้ allyl amine และ sodium triacetoxyborohydride และในขั้นตอนสุดท้ายยถอนหมู่ allyl ออกด้วย dimethylbarbituric acid โดยใช้ Pd(PPh₃) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สารผลิตภัณฑ์ทั้งสามชนิดถูกใช้เป็น key intermediate ในการเตรียมอนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

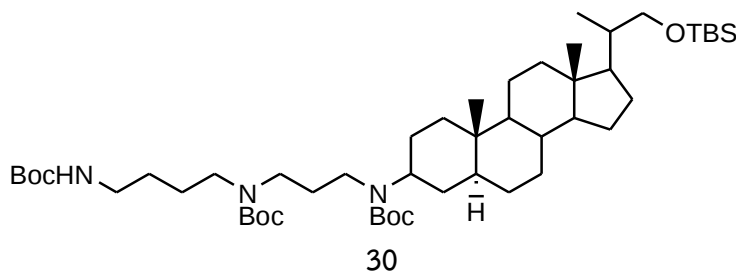


Reaction conditions: (i) allylamine, acetic acid, sodium triacetoxyborohydride, THF-ClCH₂CH₂Cl, rt, 24-48 h
(ii) 2,3-dimethylbarbituric acid, Pd(PPh₃)₄, CH₂Cl₂

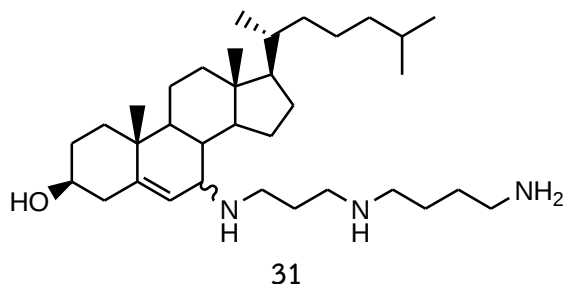
Radu และคณะ[10] ได้ทำการสังเคราะห์ 3-aminosterone 29 จาก 3-estrone 27 ซึ่งนิยมใช้ 3-aminosterone 29 เป็นสารตั้งต้นในการเตรียมสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเตรียมผ่าน diphenylketimine 28 พบว่าเป็นวิธีการที่สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของสารผลิตภัณฑ์ เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้อุณหภูมิที่สูงในการเกิดปฏิกิริยาและความบริสุทธิ์ต่ำ



Kim และคณะ[11] ได้ทำการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 30 โดยการทำปฏิกิริยา amination ของ 3-ketosteroid ด้วยเอมีน ซึ่งวิธีการสังเคราะห์เป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการสังเคราะห์ Squalamine อะมิโนสเตียรอยด์จากฉลามพันธ์ Dog fish ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา



Kihel และคณะ[12] ได้ทำการสังเคราะห์ spermidylcholesterol **31** และศึกษาฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์ทั้งนี้เพื่อพัฒนาต่อเป็นยาต้านเซลล์มะเร็ง



จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างนี้จะได้อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลายมากยิ่งขึ้น และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสเตียรอยด์เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนั้นยังสามารถนำสเตียรอยด์สังเคราะห์ไปเป็นสารตั้งต้นในการเตรียมสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้อีก

1.6 คำสำคัญของการวิจัย

เพรกนินโนโลน (Pregnenolone)
 สารอนุพันธ์ (Derivatives)
 ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)
 ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Anticancer)

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่จากเพรกนินโนโลน 7 ได้ ซึ่งอนุพันธ์เหล่านี้อาจต้านความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง
2. สามารถทราบถึงฤทธิ์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์ในการต้านความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาเพื่อผลิตส่วนผสมของยาที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อเซลล์มะเร็ง เพื่อเป็นการนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

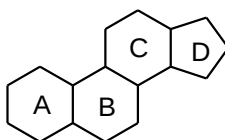
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

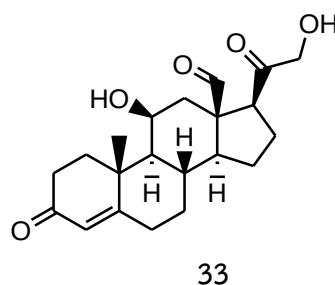
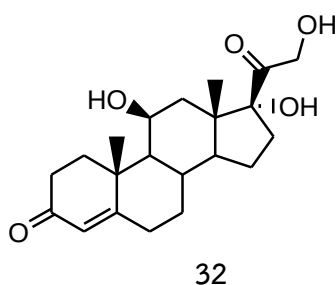
สเตียรอยด์ (Steroids) เป็นหนึ่งในสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Product) ที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ จากการวิจัยพบว่า สารกลุ่มสเตียรอยด์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ปัจจุบันจึงนิยมใช้สารประเภทสเตียรอยด์ในทางการแพทย์เช่น รักษาโรคไขข้อ โรคหืด บำรุงหัวใจ และเป็นส่วนผสมในยาคุมกำเนิดซึ่งถูกนำไปใช้ในการแก้ปัญหาประชากรที่เพิ่มขึ้น[13] แต่ตัวอย่างของสเตียรอยด์เช่น Cholesterol 1 เป็นสเตียรอยด์อีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดไขมันอุดตันในเส้นเลือดซึ่งเป็นปัญหาต่อสุขภาพของมนุษย์อย่างมาก สเตียรอยด์ที่ได้จากพืชธรรมชาติถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรค เช่น G-strophanthin ได้จากเมล็ดของ *Strophanthus gratus* Baillon ใช้รักษาโรคหัวใจวาย ฉับพลัน Ruscogenin ได้จากต้น *Ruscus aculeatus* วงศ์ Liliaceae ใช้รักษาโรคจิตเสียดวงทวาร Scillaren A[14] ได้จากส่วนใบบนหัวใต้ดินของ *Urginea maritima* Baker วงศ์ Liliaceae ใช้เป็นยาขับเสมหะที่ออกฤทธิ์บำรุงหัวใจและมีฤทธิ์ขับปัสสาวะด้วย สารกลุ่มสเตียรอยด์ยังเป็นฮอร์โมนของพืชและสัตว์ เช่น โปรเจสเตอโรน (Progesterone) เป็นฮอร์โมนเพศหญิงสามารถฉีดให้ผู้ป่วยที่ขาดฮอร์โมนเพศหญิงได้ สเตียรอยด์ยังมีฤทธิ์ที่สำคัญอื่นๆ ในร่างกายของมนุษย์อีกเช่น เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ vitamin D และ เป็น emulsifying agent[5] พืชสามารถสร้างสารกลุ่มสเตียรอยด์ขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis)

สเตียรอยด์เป็นสารประกอบที่เป็นของแข็ง จัดเป็นอนุพันธ์ของสารที่มีโครงสร้างเป็นวงที่เรียกว่า Perhydrocyclopentanephentanethrene ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยม 3 วง คือ วง A วง B วง C และมีวงห้าเหลี่ยม 1 วง คือ วง D ที่เชื่อมต่อกัน



จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยมและห้าเหลี่ยมมาเชื่อมต่อกัน หมู่แทนที่ต่างๆ ที่มาเกาะหรือหมู่ฟังก์ชันจะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน นักเคมีได้ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะทางเคมีอินทรีย์ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างและ/หรือหมู่ฟังก์ชันซึ่งจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะเป็นการนำไปสู่การสังเคราะห์สารกลุ่มสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ โดยการเลือกใช้สารที่เข้าทำปฏิกิริยา (reagent) และสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม รวมทั้งชนิด จำนวน ตำแหน่งและสเตอริโอเคมีของหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้างก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจในการสังเคราะห์ ซึ่งจะเป็นผลดีอย่างมากถ้าพบว่า สเตียรอยด์สังเคราะห์นั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไปด้วย สเตียรอยด์ที่เป็นต้นแบบชนิดแรกคือ Cholesterol 1 จัดเป็นได้ทั้งสเตียรอยด์ ลิปิด และแอลกอฮอล์ พบในเยื่อหุ้มเซลล์ของทุกเนื้อเยื่อในร่างกายและถูกขนส่งในกระแสเลือดของสัตว์ Cholesterol 1 ส่วนใหญ่ไม่ได้มากับอาหารแต่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกายจะสะสมอยู่มากในเนื้อเยื่อของอวัยวะที่สร้างมันขึ้นมาเช่น ตับ ไขสันหลัง (spinal cord) สมองและผนังหลอดเลือด (atheroma) Cholesterol 1 มีบทบาทในกระบวนการทางชีวเคมีมากมาย แต่ที่รู้จักกันดีคือ เป็นสาเหตุทำ

ให้เกิดโรคหัวใจและระบบหลอดเลือด (cardiovascular disease) และภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (Hypercholesterolemia)[15] สเตียรอยด์ที่ถูกจัดเป็นฮอร์โมนส่วนใหญ่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก Cholesterol 1 โดยกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพซึ่งมีเอนไซม์ที่แตกต่างกันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในแต่ละวันร่างกายจะผลิตสเตียรอยด์ขึ้น 20 ถึง 30 หน่วย เพื่อควบคุมฮอร์โมนต่างๆในร่างกายและกดภูมิคุ้มกันให้สมดุล รักษาความสมดุลของเกลือแร่ อิเล็กโทรไลต์และน้ำ โดยใช้ Cholesterol 1 เป็นสารตั้งต้นในการผลิต สเตียรอยด์จะถูกผลิตขึ้นทุกเช้าหลังจากการนอนหลับพักผ่อนมาจนเต็มที่แล้วสมองจะสั่งการผลิตฮอร์โมนสเตียรอยด์โดยต่อมหมวกไตจะนำ Cholesterol 1 มาเปลี่ยนเป็นสเตียรอยด์ตัวอื่นๆ ซึ่งหลักๆอยู่ 2 ชนิดคือ Cortisol 32 มีประโยชน์ในการบรรเทาอาการอักเสบ ควบคุมสมดุลของเกลือแร่ และน้ำ รวมถึงเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน อีกชนิดคือ Aldosterone 33 ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลเกลือแร่ในร่างกาย แต่ถ้ามี Aldosterone 33 หลั่งออกมามากเกินไปจะทำให้ร่างกายขับโพแทสเซียมออกมา กล้ามเนื้ออ่อนแรงและทำให้มีความดันโลหิตสูงได้



2.2 ประเภทของสเตียรอยด์[16]

สเตียรอยด์แบ่งประเภทโดยอาศัยฤทธิ์ทางสรีระ (Physiological activities) และลักษณะโครงสร้างทั่วไปได้ 6 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

2.2.1 Sterols

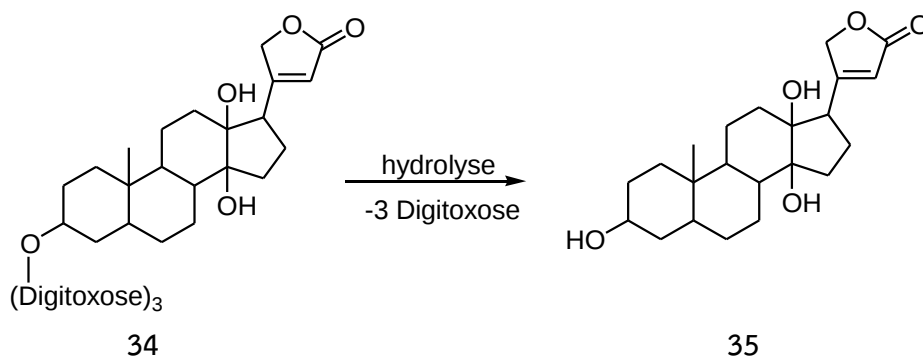
Sterols คือ สเตียรอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เช่น Cholesterol 1

2.2.2 Vitamin D Precursors

Vitamin D Precursors คือ สเตียรอยด์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในกระดูก ถ้าร่างกายขาดสารกลุ่มนี้จะส่งผลกระทบต่อกระดูกโดยสารสเตียรอยด์กลุ่มนี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเมื่อถูกเร่งด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นส่วนใหญ่แล้วให้วิตามิน D

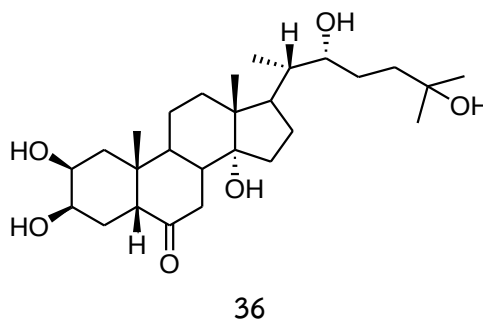
2.2.3 Glycosides ของ sterols

Glycosides ของ sterols คือ สเตียรอยด์ที่ได้จากการเชื่อมต่อบน Glycosidic linkage (Ether linkage) ระหว่างสเตียรอยด์ (Cholesterol 1 และ Phytosterol อื่นๆ) กับน้ำตาลชนิดต่างๆ จำนวนหนึ่งหรือหลายโมเลกุล ดังนั้น Steroidal glycosides จึงมีโครงสร้างตั้งแต่ง่ายไปจนถึงโครงสร้างที่ซับซ้อนโดยขึ้นกับชนิดและจำนวนน้ำตาลในโมเลกุล สารกลุ่มนี้จะละลายน้ำได้ดีเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอื่น เช่น กลุ่มฟีนอลิก ดังตัวอย่างการไฮโดรไลซิส Digoxcin 34 เป็น Digoxigenin 35



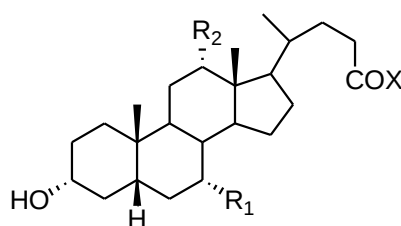
2.2.4 สารกลุ่ม Ecdysones

Ecdysone **36** เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบของตัวอ่อนแมลง (insect moulting hormone) Ecdysone สกัดแยกได้ครั้งแรกจากตักแด้ของตัวไหมชื่อ *Bombyx mori* สารกลุ่มนี้ยังพบในพืชชั้นสูงอีกด้วย Ecdysone มีโครงสร้างดังนี้



2.2.5 Bile acids และ alcohols

สารสองกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กันแต่ที่มีผลทางชีวภาพ คือ Bile acids **37** หรือ **38** โดยมักจะอยู่ในรูปสารประกอบเอไมด์ ที่เกิดจากการเชื่อมต่อนระหว่าง Bile acids กับ Glycine ได้สารผลิตภัณฑ์คือ สาร **39** และ Bile acids กับ Taurine ได้สารผลิตภัณฑ์คือ สาร **40** ดังโครงสร้างต่อไปนี้



37, 38 ; $R_1R_2 = \text{H or OH}$

39; $X = -\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COONa}$

40; $X = -\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COONa}$

2.2.6 Steroid hormones

Steroid hormones คือ สเตียรอยด์ที่เป็นฮอร์โมนแต่แตกต่างไปจากกลุ่ม Ecdysone ทั้งโครงสร้างและแหล่งกำเนิด แบ่งเป็น 4 ประเภท คือ Corticosteroids Gestogens Androgens และ

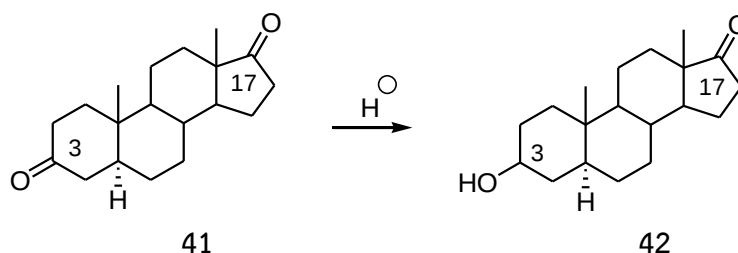
Estrogens โดยสเตียรอยด์ทั้ง 4 ประเภทพบในมนุษย์และสัตว์ ซึ่งเกิดจากสเตียรอยด์ที่จัดเป็นสารมัธยันตร์ที่สำคัญ คือ Pregnenolone 7

2.3 สมบัติทางเคมีของสเตียรอยด์[5]

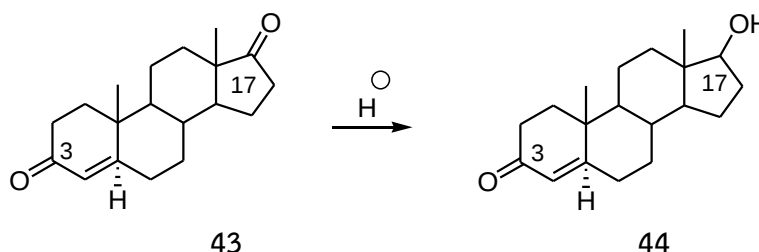
สเตียรอยด์เป็นกลุ่มสารที่สามารถเกิดเป็นผลึกได้ มีสมบัติเฉพาะตัวคือความจำเพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยาเคมี การที่จะทราบถึงการกำหนดทิศทางการเข้าทำปฏิกิริยา (Regioselectivity) และการเลือกทำปฏิกิริยาที่มีสเตอริโอเคมีแน่นอน (Stereoselectivity) ในการเกิดปฏิกิริยาได้นั้น จำเป็นต้องศึกษาจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจริงในการทดลอง

2.3.1 การกำหนดทิศทางการเข้าทำปฏิกิริยา (Regioselectivity)

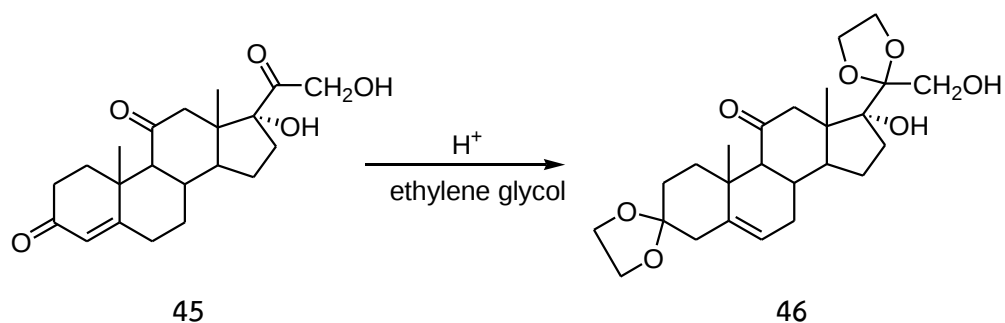
การเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้างสเตียรอยด์จะขึ้นกับตำแหน่งบนโครงสร้าง ลำดับความสำคัญของตำแหน่งคาร์บอนอะตอมในการเกิดปฏิกิริยาก็คือ 3 11 17 และ 20 เช่น การเข้าทำปฏิกิริยาของนิวคลีโอไฟล์ที่หมู่คาร์บอนิล การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยไฮดรายด์ไอออน การเกิดคีทาล (ketal formation) และปฏิกิริยาการเพิ่มโดยกรีนยาร์ดรีเอเจนต์ สามารถเรียงลำดับตำแหน่งที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาได้คือ $3 > 17 \geq 20 > 11$ ตัวอย่างความเฉพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ 5α -androstane-3,17-dione **41** เป็น 3-hydroxy- 5α -androstane-17-one **42** แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งที่ 3 สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่าตำแหน่งที่ 17



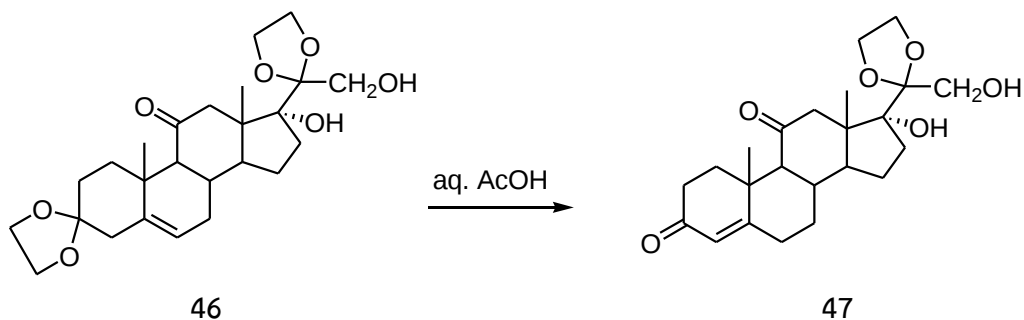
ถ้ามีความไม่อิ่มตัวของโครงสร้างในลักษณะมีพันธะคู่อยู่ที่ตำแหน่ง α และ β (α,β -Unsaturation) จะลดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน แต่ไม่รวมถึงการเกิดคีทาล (ketal) เช่นการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ androst-4-ene-3, 17-dione **43** ที่ตำแหน่งที่ 17 ให้ Testosterone **44**



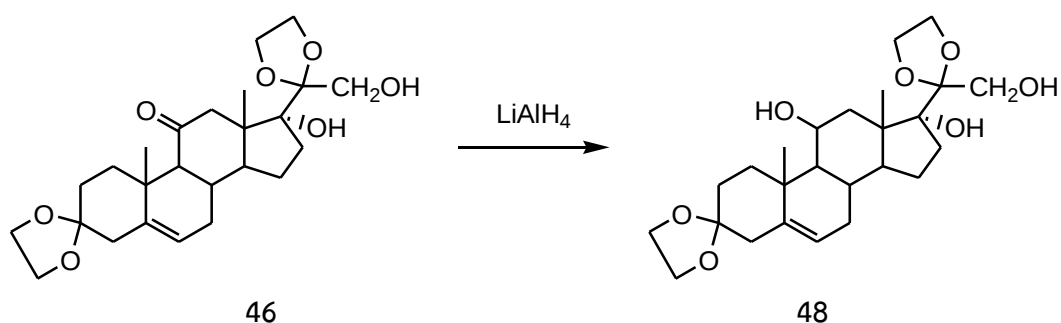
ปฏิกิริยาในการเกิดคีทาล (ketal) เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการป้องกันหมู่คาร์บอนิล เช่น ปฏิกิริยาของ Cortisone **45** กับ ethylene glycol ในกรดสามารถป้องกันหมู่คาร์บอนิลได้ 2 หมู่ ที่ตำแหน่งที่ 3 และ 20 ได้สาร **46** จะเห็นว่าหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 3 และ 20 สามารถเกิดปฏิกิริยาดีกว่าหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 11



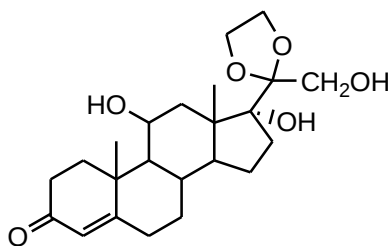
เมื่อเติมกรดแอซิดิก จากเดิมสาร **46** ซึ่งมีหมู่คีทาล (ketal) 2 หมู่ จะได้สารผลิตภัณฑ์ **47** เหลือหมู่คีทาลเพียง 1 หมู่ที่ตำแหน่งที่ 20 จึงบอกได้ว่าตำแหน่งที่ 3 มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยามากที่สุด Cortisone **45** เป็นสารที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 4 จากโครงสร้างที่คาร์บอนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะคู่สามารถเพิ่มความเสถียรโดยมีระบบคอนจูเกตกับหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 3 เมื่อหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 3 เกิดเป็นคีทาล ทำให้ระบบคอนจูเกตเสียไป ส่งผลให้เกิดไอโซเมอร์ที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 5 และ 6 **46** หลังจากนั้นสามารถเกิดพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 4 และ 5 ได้สาร **47** เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในกรดแอซิดิก



สาร **46** เมื่อทำปฏิกิริยากับ LiAlH_4 (Lithium tri-*t*-butoxyaluminium hydride) จะทำปฏิกิริยารีดักชันหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 11 ให้หมู่ไฮดรอกซิล เป็นสาร **48**



จากนั้น เมื่อนำสาร **48** ทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริกให้ Hydrocortisone **49**



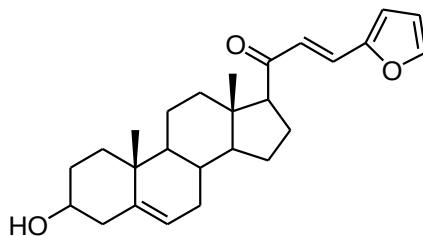
49

2.3.2 การเลือกทำปฏิกิริยาที่มีสเตอริโอเคมีแน่นอน (Stereoselectivity)

ปฏิกิริยาเคมีของสเตียรอยด์สามารถเกิดผลิตภัณฑ์มากกว่า 1 ชนิดได้ โดยจะแตกต่างกันในทิศทางการเข้าทำปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถเกิดไอโซเมอร์ต่างๆ ขึ้นกับสถานะในการเกิดปฏิกิริยา ถ้าปฏิกิริยาสามารถผันกลับได้สิ่งสำคัญในการควบคุมทิศทางการเกิดปฏิกิริยา คือ ค่าทางเทอร์โมไดนามิกส์ที่ดีกว่า แต่ในปฏิกิริยาที่ผันกลับไม่ได้สิ่งที่จำเป็นในการเกิดปฏิกิริยา คือ การเปลี่ยนโครงสร้างได้ไปอย่างรวดเร็วและค่าพลังงานที่ต่ำในสถานะทรานสิชัน

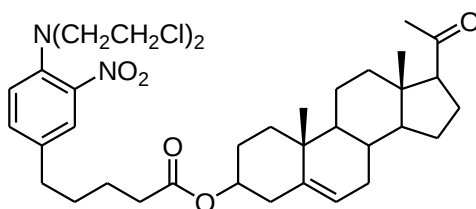
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวทางการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเพรกนินโนโลนและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ถูกกล่าวถึงโดย Banday และคณะ[17] สังเคราะห์ chalconyl pregnenolones โดยการทำปฏิกิริยาที่หมู่เมทิลคีโตของ C-20 พบว่า chalconyl pregnenolone **50** มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* มี zone of inhibition เท่ากับ 20 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับตัวยาค Kenamycin



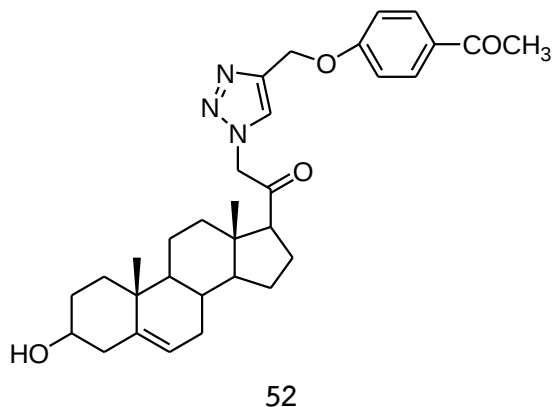
50

Shervington และคณะ[18] สังเคราะห์อนุพันธ์ไนโตรของเพรกนินโนโลน **51** พบว่ามีฤทธิ์ต้านเซลล์ lung large cell carcinoma (H460) cell lines ได้ดีมาก

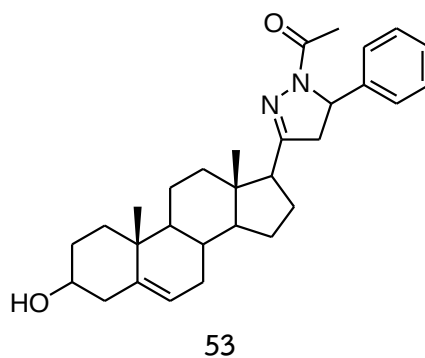


51

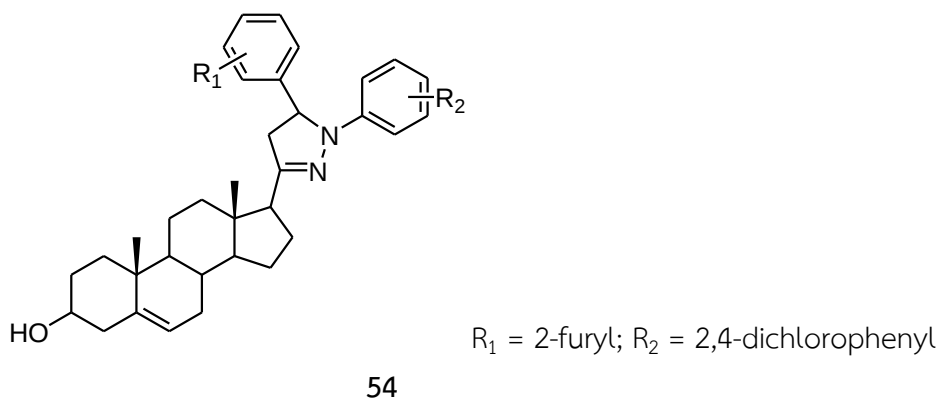
Banday และคณะ[19] สังเคราะห์ 1,2,3-triazolyl 20-keto pregnenanes **52** โดยเลือกทำปฏิกิริยาที่วง D และศึกษาความสัมพันธ์ของหมู่แทนที่ต่อโครงสร้างในการออกฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งตับ



Bandy และคณะ[20] สังเคราะห์อนุพันธ์ 17-pyrazoliny **53** จากเพรกนินโนโลน **7** พบว่าสาร **53** สามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับที่ดี



Choudhary และคณะ[21] สังเคราะห์อนุพันธ์เพรกนินโนโลน **54** ที่ออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ให้ค่า IC_{50} (μM) เท่ากับ 11.03 เมื่อเปรียบเทียบกับ Doxoribicin



บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การทดลองทั่วไป

ตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ hexane, dichloromethane (DCM), ethyl acetate และ methanol (เกรดการค้า, Zen point) ที่ใช้สำหรับการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง ส่วนสารเคมีที่ได้จากการซื้อจะนำมาใช้โดยปราศจากการทำสารให้บริสุทธิ์

ตัวทำละลายฟิรดิน (เกรดวิเคราะห์, Lab scan) ที่ใช้ในการทดลอง ถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นที่อุณหภูมิ 115 – 116 องศาเซลเซียส และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อดูดน้ำ ระยะเวลาในการใช้ 30 วัน

สารเคมีที่ใช้เป็นสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ในการสังเคราะห์เป็นเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Fluka และ Aldrich ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography ทำให้ปรากฏบนแผ่น aluminium sheet silica gel F₂₅₄ Merck ตรวจสอบจุดของสารผลิตภัณฑ์ด้วยการดูคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และ/หรือโดยการย้อมด้วย anisaldehyde reagent แล้วให้ความร้อนแผ่น TLC บนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

การแยกสารสังเคราะห์ให้บริสุทธิ์ทำโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้เฟสคงที่คือ Silica gel 60 0.04-0.06 mm (Scharlau GE0048) ใช้เฟสเคลื่อนที่คือ ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate

สเปกตรัม ¹H NMR และ ¹³C NMR บันทึกโดยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกกะเฮิร์ต การเตรียมสารตัวอย่างจะทำการละลายโดยใช้ตัวทำละลาย CDCl₃ จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ CHCl₃ ที่ δ 7.25 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹H NMR และที่ δ 77.5 ppm

จุดหลอมเหลวบันทึกโดยเครื่องหาจุดหลอมเหลว GALLEKAMP SANYO

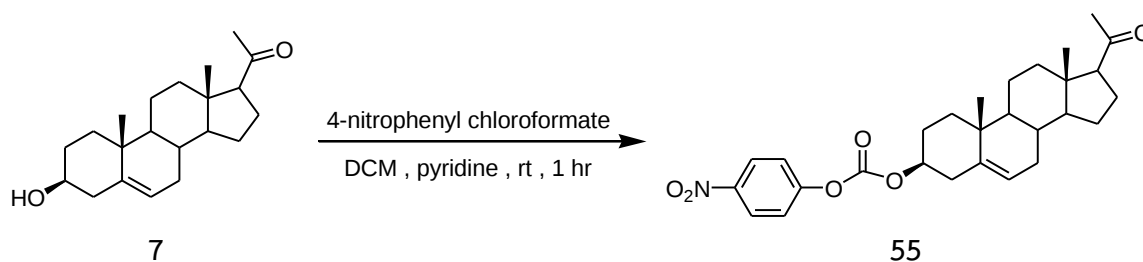
อินฟราเรดสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX 60237 โดยใช้ KBr เป็นวัสดุในการทำหน้าต่างเซลล์ และทำการบันทึกในช่วงความถี่ 4,000-400 cm⁻¹

3.2 วิธีการทดลอง

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pregnenolone 7 มีแนวทางการสังเคราะห์แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone 7 ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 เป็นหมู่หลุดออกโดยใช้รีเอเจนต์คือ 4-nitrophenyl chloroformate

แผนภาพที่ 3.1



1. ชั่ง Pregnenolone 7 300 มิลลิกรัม (0.95 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลมซึ่งภายในมีแท่งแม่เหล็กอยู่ ซึ่งวางอยู่บนเครื่องปั่นกววน จากนั้นเติม DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกววน จนกระทั่ง Pregnenolone 7 ละลายหมด

2. ชั่ง *p*-nitrophenyl chloroformate 248.9 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล) แล้วใส่ลงไปในขวดก้นกลมในข้อ 1 ทำการปั่นกววน จากนั้นเติม pyridine 1.5 มิลลิลิตร และทำการปั่นกววนที่อุณหภูมิห้อง

3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ Pregnenolone 7 สังเกตการเกิดปฏิกิริยาโดยพิจารณาจุดของสารตั้งต้นเจือจางมากที่สุดแล้วไม่มีการเปลี่ยนแปลง

4. หยุดการปั่นกววน และนำสารที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะได้ของผสมเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน

5. ทำการแยกสารผสมให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate โดยที่ผลรวมของอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เริ่มต้นจากสารละลายไม่มีขั้วคือ hexane : ethyl acetate เป็น 100 : 0 แล้วค่อยๆ เพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย โดยการเพิ่มปริมาตรของ ethyl acetate จาก 0 เป็น 2, 5, 10, 12, 15, ... และลดปริมาตรของ hexane จาก 100 เป็น 98, 95, 90, 85, ... ตามลำดับ

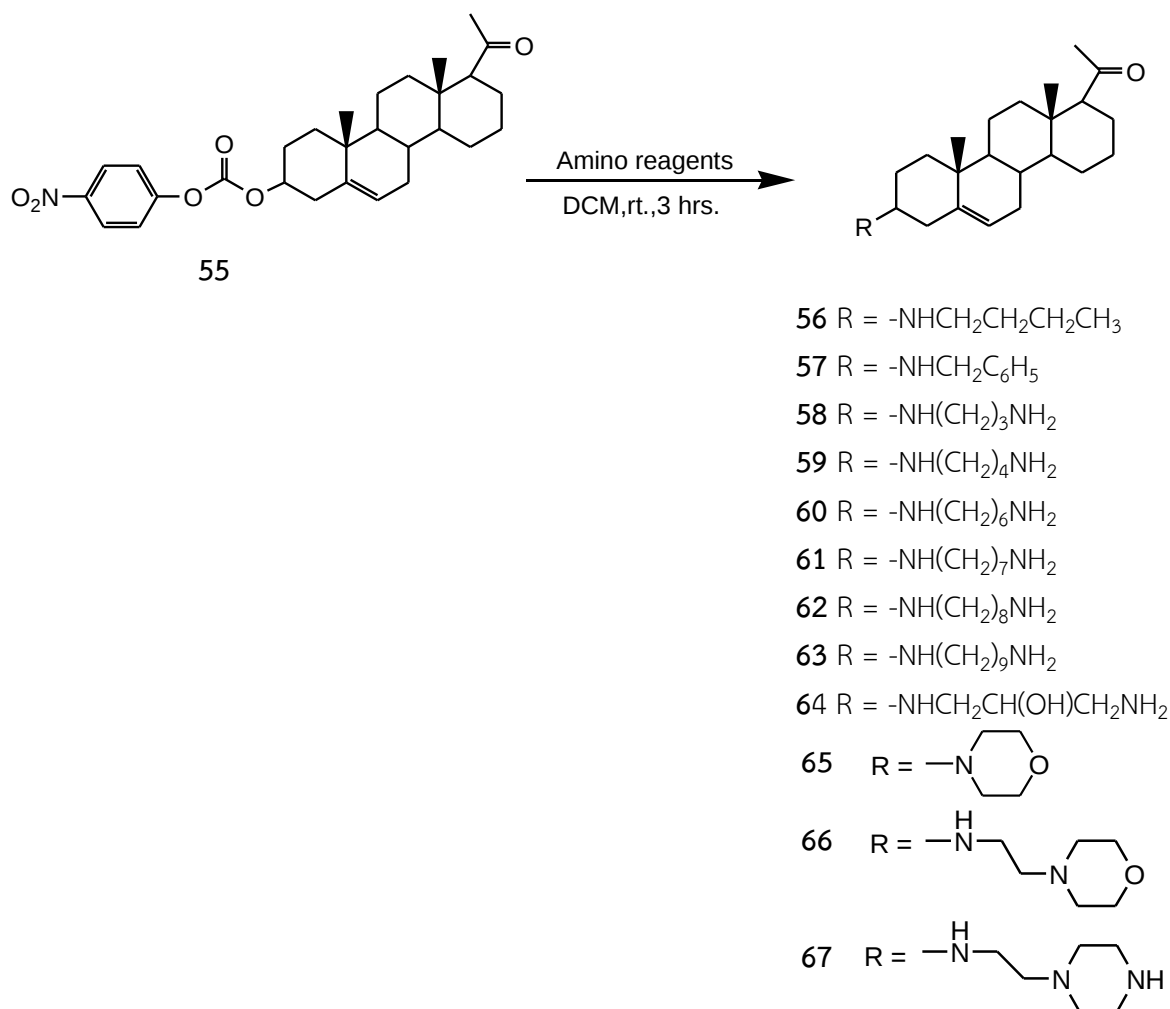
6. ตรวจสอบสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารตั้งพิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R_f เดียวกัน การดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และการให้สีกับ anisaldehyde reagent สีเดียวกันให้เก็บรวมไว้ด้วยกันในขวดก้นกลม

7. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดก้นกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. นำสารผลิตภัณฑ์มาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

ขั้นตอนที่ 2 สังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **55** และอะมิโนรีเอเจนต์

แผนภาพที่ 3.2



1. ละลาย 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **55** ใน DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งละลายหมด

2. เติม *n*-butylamine 125.3 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิห้อง และทำการปั่นกวนต่อที่อุณหภูมิห้อง

3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี ทุก 1 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เท่ากับ 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **55** จนกระทั่งจุดของ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **55** จางมากที่สุด พร้อมกับมีการเกิดจุดของสารผลิตภัณฑ์หรือสารข้างเคียงเกิดขึ้น

4. หยุดการปั่นกวน และนำของผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

5. ทำการแยกสารที่สังเคราะห์ได้ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยที่สารละลายที่ใช้เป็นสารละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate โดยที่ผลรวมของอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 100 เริ่มต้นจากสารละลายไม่มีขั้วคือ hexane : ethyl acetate เป็น 100 : 0 แล้ว

ค่อยๆ เพิ่มชั่วของสารละลาย โดยเพิ่มปริมาตรของ ethyl acetate จาก 0 เป็น 2, 5, 7, 10, 12, 15, ... และลดปริมาตรของ hexane จาก 100 เป็น 98, 95, 93, 90, 88, 85, ... ตามลำดับ

6. ตรวจสอบสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เป็น 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารตั้งพิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R_f เดียวกัน การดูกลิ่นรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และการให้สีกับ anisaldehyde reagent สีเดียวกันให้เก็บรวมไว้ด้วยกันในขวดกันกลม

7. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดกันกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. นำของแข็งที่ได้จากระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศมาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

9. นำสารผลิตภัณฑ์ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

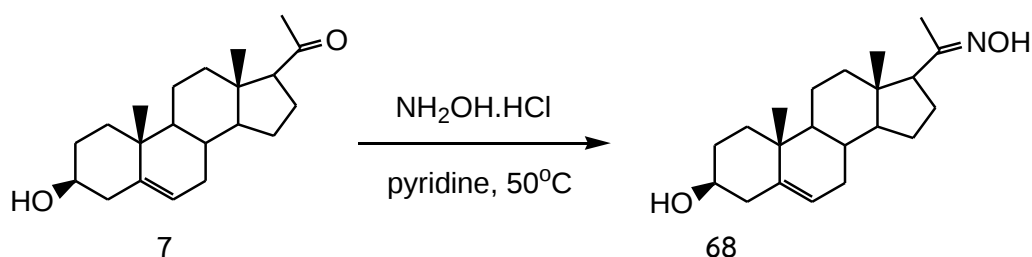
10. เริ่มทำการสังเคราะห์ใหม่ตั้งแต่ข้อ 1 ถึง 9 โดยเปลี่ยนอะมิโนรีเอเจนต์ในข้อ 2 จาก 1,3-diaminopropane เป็นอะมิโนรีเอเจนต์ดังต่อไปนี้

- <i>n</i> -butylamine	ปริมาตร 165.8 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- benzylamine	ปริมาตร 145.5 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 1,3-diaminopropane	ปริมาตร 103.6 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 1,4-diaminobutane	ปริมาตร 123.6 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 1,6-diaminohexane	ปริมาตร 143.5 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 1,7-diaminoheptane	ปริมาณ 160.8 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- 1,8-diaminooctane	ปริมาณ 178.2 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- 1,9-diaminononane	ปริมาณ 195.5 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- 1,3-diamino-2-propanol	ปริมาณ 111.3 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- morpholine	ปริมาตร 107.6 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 4-(2-aminoethyl) morpholine	ปริมาตร 160.8 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 1-(2-Aminoethyl) piperazine	ปริมาตร 162.0 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)

ขั้นตอนที่ 3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ออกซิมีของ Pregnenolone 7

การสังเคราะห์อนุพันธ์ออกซิมีของ Pregnenolone 7 แสดงในแผนภาพที่ 3

แผนภาพที่ 3.3



1. ชั่ง Pregnenolone **7** 500.0 มิลลิกรัม (1.58 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย pyridine 10 มิลลิลิตร

2. เติม hydroxylamine hydrochloride 131.7 มิลลิกรัม (1.20 มิลลิโมล) ลงในสารละลายของ Pregnenolone ในข้อ 1 และทำการปั่นกวานที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และทำการปั่นกวานเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3. ทดสอบการดำเนินของปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4

4. หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารผลิตภัณฑ์ **68** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว

5. นำสารผลิตภัณฑ์ **68** ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ระบบของตัวชะสารคือ hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 90 : 10

ขั้นตอนที่ 4 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี

เนื่องการเปลี่ยนอะมิโนสเตียรอยด์ให้เป็นอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี โดยการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **55** มาทำให้เป็นสารบริสุทธิ์ แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับอะมิโนรีเอเจนต์นั้นพบว่าได้เปอร์เซ็นต์สารผลิตภัณฑ์สุดท้ายในปริมาณที่น้อยมาก ในการทดลองต่อไปนี้จะทำการทดลองแบบ one pot reaction ทำโดยไม่มีการแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน

แผนภาพที่ 3.4



69 $\text{R} = -\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$

70 $\text{R} = -\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

71 $\text{R} = -\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$

72 $\text{R} = -\text{NH}(\text{CH}_2)_7\text{NH}_2$

73 $\text{R} = -\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array}$

1. ชั่ง Pregnenolone 7 300 มิลลิกรัม (0.95 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลมซึ่งภายในมีแท่งแม่เหล็กอยู่ ซึ่งวางอยู่บนเครื่องปั่นกวน จากนั้นเติม DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวน จนกระทั่ง Pregnenolone 7 ละลายหมด
2. ชั่ง 4-nitrophenyl chloroformate 248.9 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล) แล้วใส่ลงไปในขวดก้นกลมในข้อ 1 ทำการปั่นกวน จากนั้นเติม pyridine 1.5 มิลลิลิตร และทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้อง
3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ Pregnenolone 7 สังเกตการเกิดปฏิกิริยาโดยพิจารณาจุดของสารตั้งต้นเจือจางมากที่สุดแล้วไม่มีการเปลี่ยนแปลง
4. เติม *n*-butylamine 103.3 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิห้อง และทำการปั่นกวนต่อที่อุณหภูมิห้อง
5. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ทุก 1 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เป็น 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55 จนกระทั่งจุดของ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 จางมากที่สุด พร้อมกับการเกิดจุดของสารผลิตภัณฑ์หรือสารข้างเคียงเกิดขึ้น
6. หยุดการปั่นกวน และนำของผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ
7. สภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ 69-73 ใช้ภายใต้สภาวะเดียวกับการสังเคราะห์สาร 68
8. ละลายสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 6. ด้วย pyridine 10 มิลลิลิตร เติม hydroxylamine hydrochloride 131.7 มิลลิกรัม (1.20 มิลลิโมล) และทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และทำการปั่นกวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
9. ทดสอบการดำเนินของปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4
10. หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารผลิตภัณฑ์ 69-73 มีลักษณะเป็นกึ่งของแข็งสีเหลือง
11. นำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ระบบของตัวชะสารคือ hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 90 : 10

3.3 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบ

1. เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line)
2. เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Human hepatocellular carcinoma cell line)
3. เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line)
4. เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line)
5. เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูชนิด P388 (Murine leukemia cell line)
6. เซลล์ปกติจากไตของลิงชนิด Vero (African green monkey kidney)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 69-73 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

อะมิโนสเตียรอยด์ 56 ถึง 67 ถูกส่งไปทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay[22] มีวิธีการทดสอบดังนี้

1. เตรียมเซลล์ไลน์ในอาหาร Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) เสริมด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ FBS โดยเฉพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร

2. เตรียม Stock สารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร ทำการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีช่องผ่านขนาด 0.2 ไมโครเมตร และใส่ขวดแก้วที่ปลอดเชื้อหุ้มขวดแก้วด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์เพื่อป้องกันแสง และเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. เตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆ ที่ต้องการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 โดยเจือจางเป็นสองเท่า (two-fold dilution) ได้แก่ความเข้มข้น 1,000, 500, 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4. ปลูกเซลล์ไลน์ MCF-7 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในงานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทดสอบ 3 ซ้ำ นำงานเพาะเลี้ยงที่ปลูกเซลล์แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. นำงานเพาะเลี้ยงเซลล์ออกจากตู้บ่ม และดูดอาหารออกจากหลุมให้หมด จากนั้นเติมสารตัวอย่างความเข้มข้นที่กำหนด (กลุ่มควบคุมเป็น 2 กลุ่ม คือ แฉกที่ 1 คือความเข้มข้นของ DMSO เจือจางกับอาหาร DMEM และแฉกที่ 2 คือเซลล์ปกติซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. เมื่อบ่มเซลล์ในสารตัวอย่างครบ 24 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในแต่ละหลุมที่ทดสอบ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

7. จากนั้นดูดสารละลาย MTT ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย DMSO : 10 % SDS อัตราส่วน 9 : 1 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซานจะได้สารละลายสีม่วง

8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครไทดเตอร์ เพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่นของแผ่นกรองแสงเท่ากับ 570 นาโนเมตร

9. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 56-67 เปรียบเทียบกับตัวยา Vinblastine sulfate salt

10. คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของแต่ละความเข้มข้นดังนี้ คือ

$$\text{ค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์} = [(A-B)/A] \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ไลน์ในสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น

หมายเหตุ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero)
ปลูกเซลล์ปริมาตร 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร DMEM

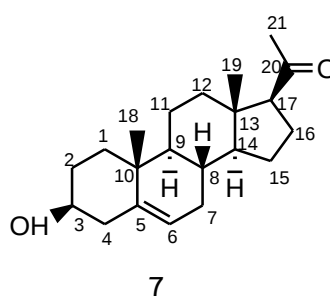
บทที่ 4

ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pregnenolone 7 โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันหลักของ Pregnenolone 7 ได้แก่หมู่ไฮดรอกซิล ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 และหมู่คีโต ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 20 จากนั้นจะทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์ได้

4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pregnenolone 7

สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นคือ Pregnenolone 7 ทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR ได้ผลดังต่อไปนี้

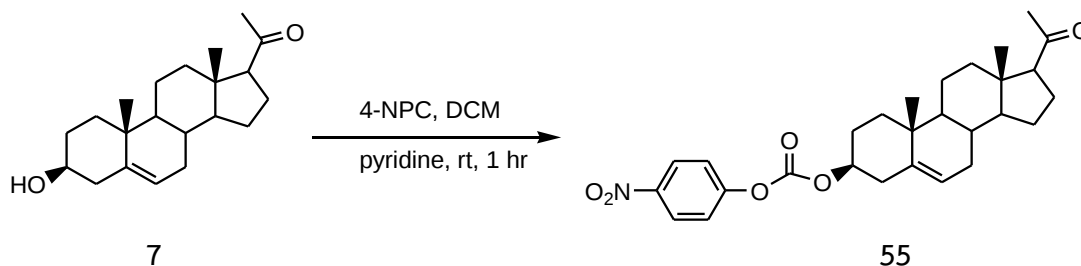


Szendi และคณะ[39]ได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างของ Pregnenolone 7 โดยเทคนิคนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์ พบสัญญาณ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ 1.84 และ 1.08 (2H, H-1), 1.84 และ 1.48 (2H, H-2), 3.54 (1H, H-3), 2.27 (2H, H-4), 5.34 (1H, H-6), 1.97 และ 1.57 (2H, H-7), 1.46 (1H, H-8), 0.98 (1H, H-9), 1.62 และ 1.47 (2H, H-11), 2.04 และ 1.43 (2H, H-12), 1.17 (1H, H-14), 1.68 และ 1.23 (2H, H-15), 2.19 และ 1.66 (2H, H-16), 2.55 (1H, H-17), 0.63 (3H, H-18), 1.00 (2H, H-19) และ 2.11 (3H, H-21); ^{13}C NMR (75.5 MHz) : δ 37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.3 (C-4), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 31.8 (C-7), 31.9 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 21.1 (C-11), 38.9 (C-12), 44.0 (C-13), 56.9 (C-14), 24.5 (C-15), 22.9 (C-16), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.4 (C-19), 209.4 (C-20) และ 31.5 (C-21) เมื่อนำข้อมูลเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ ^1H NMR และ ^{13}C NMR กับ Pregnenolone 7 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ของบริษัท Fluka ได้ผล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับข้อมูลของ Szendiและคณะ[23] ได้เสนอไว้ดังนี้ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ; δ 1.20 และ 1.14 (2H, t, H-1), 1.84 และ 1.81 (2H, m, H-2), 3.52 (1H, m, H-3), 2.29 (2H, d, H-4), 5.35 (1H, d, H-6), 1.85 (2H, m, H-7), 1.49 (1H, d, H-8), 1.19-1.10 (1H, m, H-9), 1.66-1.58 (2H, m, H-11), 1.69 (2H, t, H-12), 1.24-1.14 (1H, m, H-14), 1.53-1.44 (2H, m, H-15), 2.05 (2H, m, H-16), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19) และ 2.13 (3H, s, H-21) และ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ; δ 37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 140.8 (C-5), 121.3 (C-6), 31.7 (C-7), 31.8 (C-8), 49.9 (C-9), 36.5 (C-10), 21.0 (C-11), 38.8 (C-12), 44.0 (C-13), 56.9 (C-14), 24.4 (C-15), 22.8 (C-16), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20) และ 31.5 (C-21)

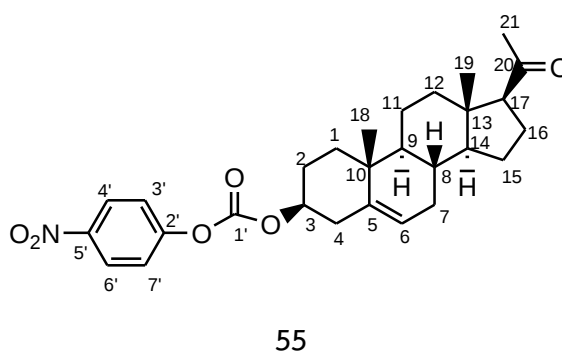
4.1.1 การสังเคราะห์ 4-Nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55

การสังเคราะห์เริ่มจากหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 ของ Pregnenolone **7** ถูกกระตุ้นให้เป็นหมู่หลุดออกที่ดีด้วยรีเอเจนต์คือ 4-nitrophenyl chloroformate (4-NPC)

แผนภาพที่ 4.1



ผลทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.62 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 97 : 3 ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 165-168 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 92.41 เปอร์เซ็นต์ ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **55** สรุปได้ดังนี้
 สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 2945 (C-H stretch ของหมู่ CH_2 และ CH_3), 1762 (C=O stretch ของหมู่คาร์บอนेट), 1702 (C=O stretch ของหมู่คีโตน), 1524-1491 (C=C stretch ของเอโรมาติก) และ 1254-1216 (C-O stretch)



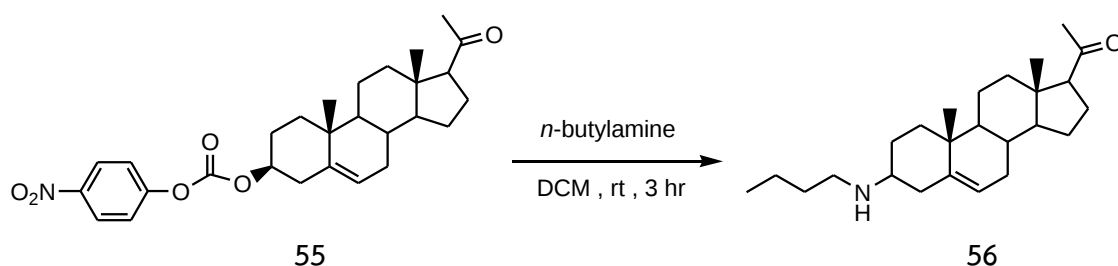
สเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **55** พบสัญญาณ ^1H NMR δ 4.64 (1H, m, H-3), 2.19 (2H, d, H-4), 5.44 (1H, d, H-6), 2.55 (1H, t, H-17), 0.65 (3H, s, H-18), 1.06 (3H, s, H-19), 2.14 (3H, s, H-21), 7.39 (2H, $d, J_{3',4'} = 7.1$ Hz, H-3' และ H-7'), 8.29 (2H, $d, J_{4',3'} = 7.1$ Hz, H-4' และ H-6') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.09 ถึง 1.16 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัมของ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **55** พบสัญญาณที่ δ 79.5 (C-3), 138.8 (C-5), 123.2 (C-6), 49.9 (C-9), 21.0 (C-1), 56.8 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.2 (C-19), 209.4 (C-20), 155.6 (C-1'), 145.3 (C-2'), 121.7 (C-3') และ (C-7'), 125.2 (C-4' และ

C-6'), 151.7 (C-5') และสัญญาณที่ปรากฏอยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

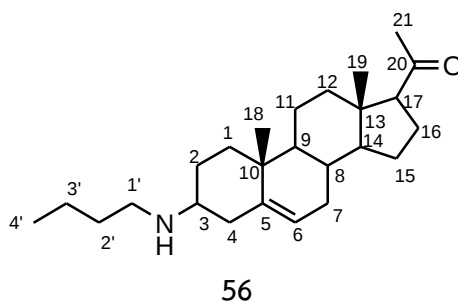
4.1.2 การสังเคราะห์ 3-(Aminobutyl)-pregn-5-en-20-one 56

สาร 56 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55 ทำปฏิกิริยากับ *n*-butylamine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.2



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 70 : 30 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.45 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 90 : 10 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้เท่ากับ 45.8 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 7) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3363 (N-H stretch ของเอมีน), 2936 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1453 (CH_2 bend) และ 1357 (CH_3 bend)

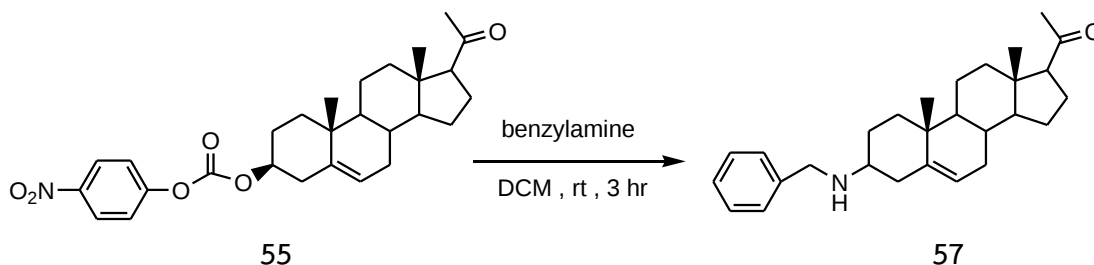


สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 56 พบสัญญาณที่ δ 3.17 (1H, br.s, H-3), 5.38 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.62 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.12 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.35 ถึง 1.10 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 56 พบสัญญาณที่ δ 74.1 (C-3), 139.8 (C-5), 122.1 (C-6), 49.8 (C-9), 21.0 (C-11), 56.9 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), และ 209.5 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

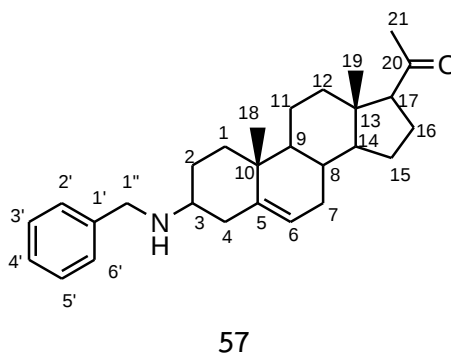
4.1.3 การสังเคราะห์ 3-(Aminobenzyl)-pregn-5-en-20-one 57

สาร 57 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55 ทำปฏิกิริยากับ benzylamine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.3



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 70 : 30 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.50 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 85 : 15 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้เท่ากับ 43.5 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบกับ Pregnenolone 7) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3363 (N-H stretch ของเอมีน), 2936 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1453 (CH_2 bend) และ 1357 (CH_3 bend)

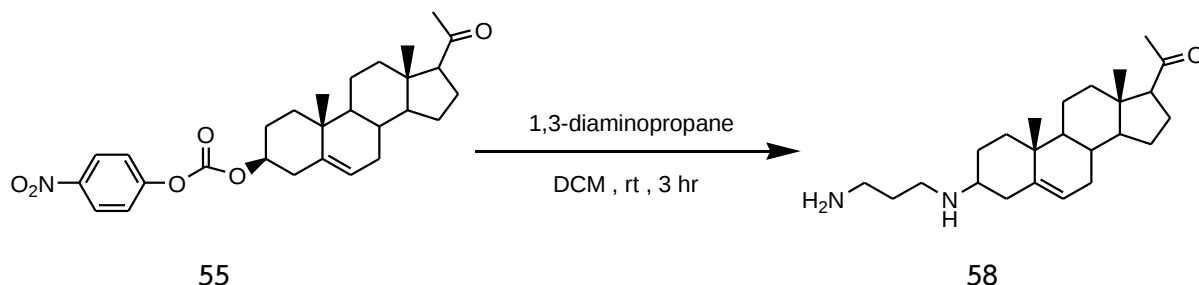


สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 57 พบสัญญาณที่ δ 7.29-7.32 (5H, m, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 4.34 (1H, br.s, H-3), 5.38 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.62 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.12 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.35 ถึง 1.10 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 57 พบสัญญาณที่ δ 74.1 (C-3), 139.8 (C-5), 122.1 (C-6), 49.8 (C-9), 21.0 (C-11), 56.9 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), และ 209.5 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

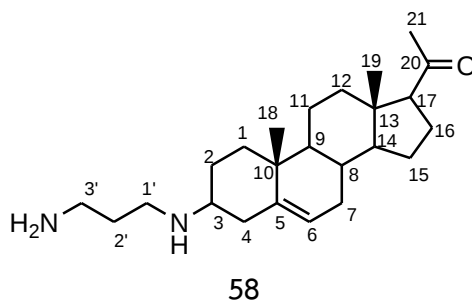
4.1.4 การสังเคราะห์ 3-(1,3-Diaminopropyl)-pregn-5-en-20-one 58

สาร 58 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diaminopropane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.4



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.26 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 76 : 24 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 109-112 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 10.90 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบกับ Pregnenolone 7) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBR) cm^{-1} : 3355 (N-H stretch ของเอมีน), 2940 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1438 (C-H bend) และ 1357 (C-H bend)



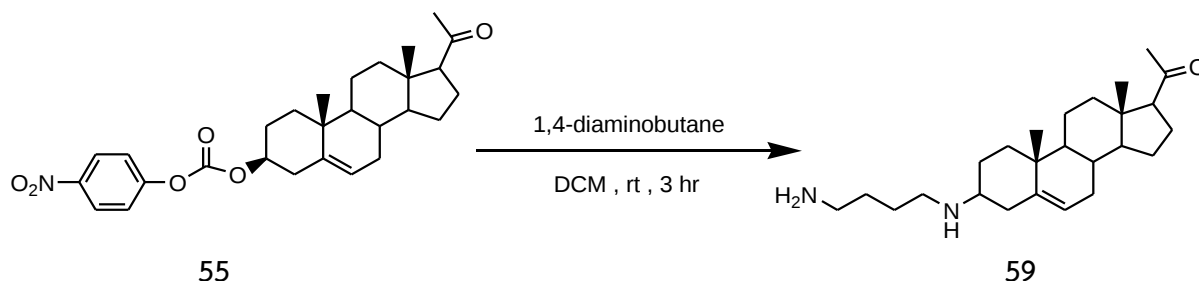
สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 58 พบสัญญาณที่ δ 3.23 (1H, br.s, H-3), 5.38 (1H, d, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.38 ถึง 1.14 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 58 พบสัญญาณที่ δ 74.3 (C-3), 139.8 (C-5), 122.2 (C-6), 49.9 (C-9), 56.9 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 44.0 ถึง 21.1 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}$ Calcd. 372.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 371.6 (23%) และ 341.8 (24.2%)

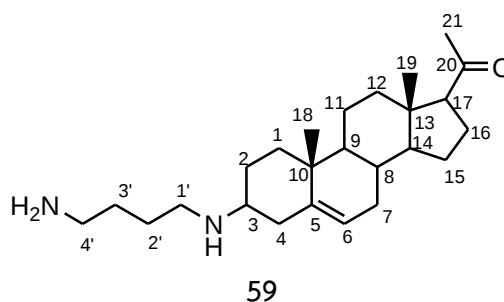
4.1.5 สารสังเคราะห์ 3-(1,4-Diaminobutyl)-pregn-5-en-20-one 59

สาร 59 เตรียมจาก 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55 ทำปฏิกิริยากับ 1,4-diaminobutane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.5



ผลการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.39 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 77 : 23 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 128-131 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 28.80 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 7) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3363 (N-H stretch ของเอมีน), 2936 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1453 (CH_2 bend) และ 1357 (CH_3 bend)



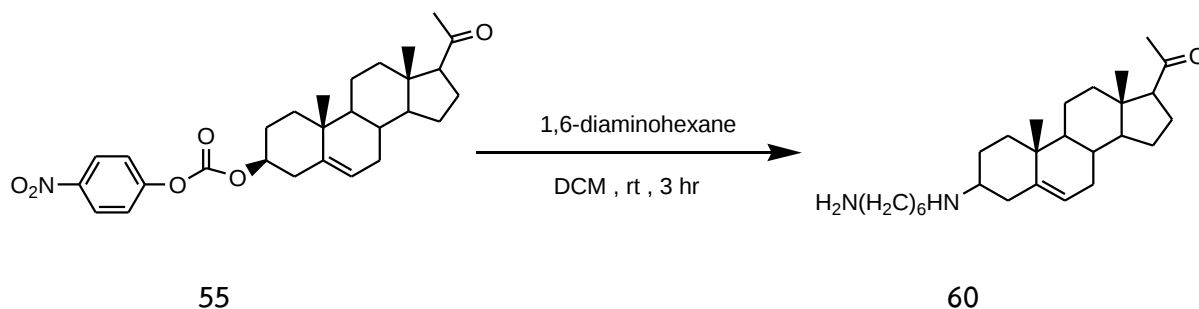
สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 59 พบสัญญาณที่ δ 3.17 (1H, br.s, H-3), 5.38 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.62 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.12 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.35 ถึง 1.10 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 59 พบสัญญาณที่ δ 74.1 (C-3), 139.8 (C-5), 122.1 (C-6), 49.8 (C-9), 21.0 (C-11), 56.9 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), และ 209.5 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}$ Calcd. 386.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (3.1%), 370.7 (2.0%) และ 314.0 (1.2%)

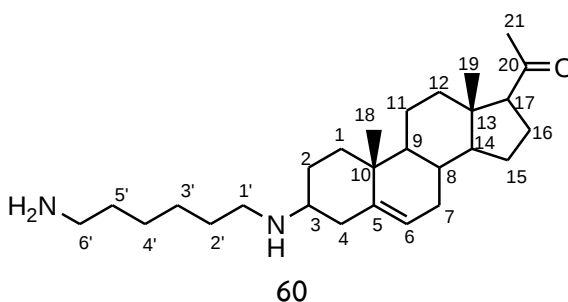
4.1.6 การสังเคราะห์ 3-(1,6-Diaminohexyl)-pregn-5-en-20-one 60

สาร **60** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **55** ทำปฏิกิริยากับ 1,6-diaminohexane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.6



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.38 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 84 : 16 ได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 92-95 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 12.13 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **7**) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3362 (N-H stretch ของ เอมีน), 2936 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1453 (CH_2 bend) และ 1357 (CH_3 bend)



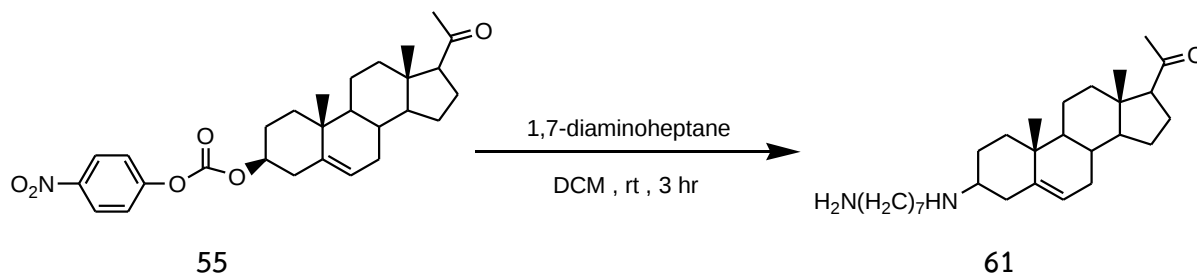
สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **60** พบสัญญาณที่ δ 3.15 (1H, m, H-3), 5.36 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.34 ถึง 1.11 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **60** พบสัญญาณที่ δ 74.1 (C-3), 139.9 (C-5), 122.1 (C-6), 49.9 (C-9), 21.1 (C-11), 56.9 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 49.4 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $C_{27}H_{46}N_2O$ Calcd. 414.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 414.0 (2.0%), 369.7 (1.2 %) และ 342.0 (1.4%)

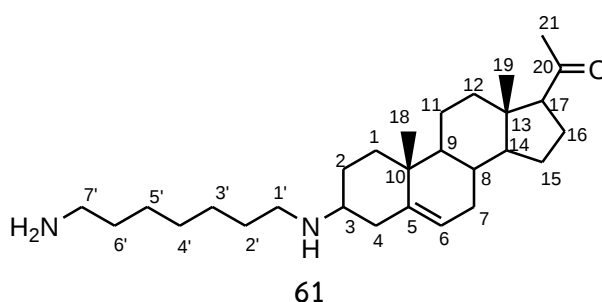
4.1.7 การสังเคราะห์ 3-(1,7-Diaminoheptyl)-pregn-5-en-20-one 61

สาร 61 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55 ทำปฏิกิริยากับ 1,7-diaminoheptane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.7



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.36 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 87 : 13 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 175-178 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 18.74 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 7) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3359 (N-H stretch ของ เอมีน), 2927 (C-H stretch ของ CH_2), 2852 (C-H stretch ของ CH_3), 1698 (C=O stretch), 1455 (CH_3 bend) และ 1357 (CH_2 bend)



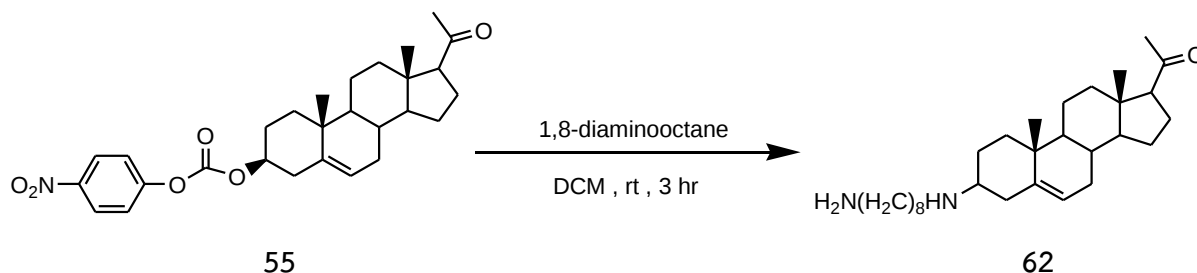
สเปกตรัม 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร 61 พบสัญญาณที่ δ 3.08 ppm (1H, m, H-3), 5.30 (1H, br.t, H-6), 2.47 (1H, t, H-17), 0.56 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, s, H-19), 2.06 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่าเท่ากับ 2.37 ถึง 1.04 ppm เป็น multiple ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 61 พบสัญญาณที่ δ 73.1 (C-3), 138.9 (C-5), 121.1 (C-6), 48.9 (C-9), 55.8 (C-14), 62.7 (C-17), 12.2 (C-18), 18.3 (C-19), 208.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 42.9 ถึง 20.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $C_{28}H_{48}N_2O$ Calcd. 428 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 428.0 (5.4%) และ 413.1 (22.9%)

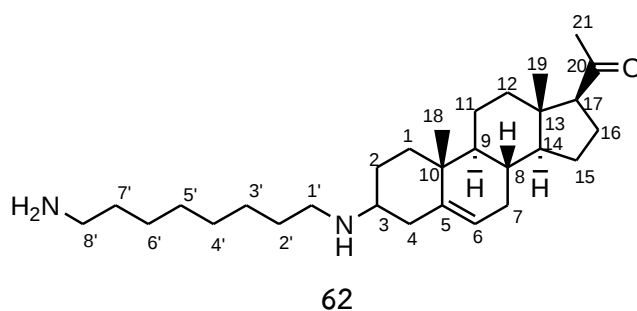
4.1.8 การสังเคราะห์ 3-(1,8-Diaminooctyl)-pregn-5-en-20-one 62

สาร 62 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55 ทำปฏิกิริยากับ 1,8-diaminoheptane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.8



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.38 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 89 : 11 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวใส มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 156-159 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 19.54 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 7) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3353 (N-H stretch ของ เอมีน), 2933 (C-H stretch ของ CH_2), 2852 (C-H stretch ของ CH_3), 1703 (C=O stretch), 1455 (CH_2 bend) และ 1381 (CH_3 bend)



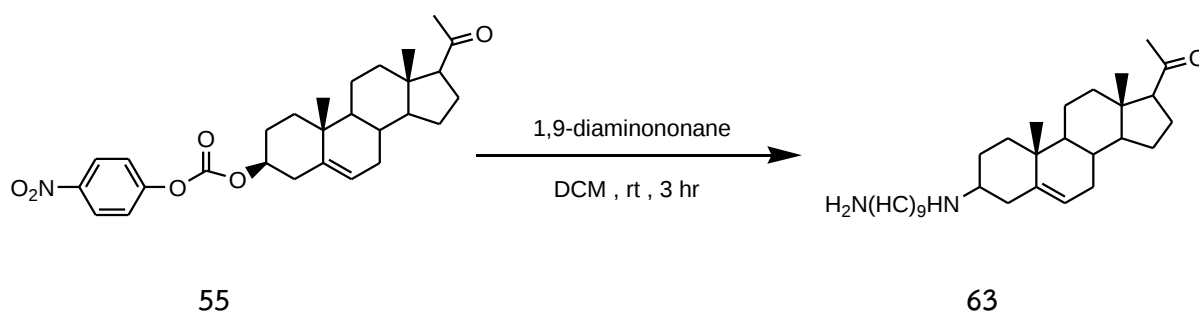
สเปกตรัม 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร 62 พบสัญญาณที่ δ 3.14 (1H, br.d, H-3), 5.38 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.38 ถึง 1.11 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 62 พบสัญญาณที่ δ 74.0 (C-3), 139.9 (C-5), 122.1 (C-6), 49.9 (C-9), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.32 (C-19), 209.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 42.9 ถึง 20.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $C_{29}H_{50}N_2O$ Calcd. 442.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 442.0 (4.8%) และ 344.0 (7.0%)

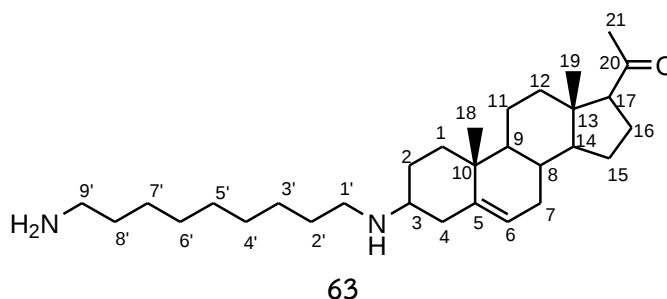
4.1.9 การสังเคราะห์ 3-(1,9-Diaminononyl)-pregn-5-en-20-one 63

สาร 63 เตรียมจากสาร 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55 ทำปฏิกิริยากับ 1,9-diaminononane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.9



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.38 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 88 : 12 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 82-85 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 15.31 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 7) และยืนยันโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ 63 ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีสรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBR) cm^{-1} : 3357 (N-H stretch ของหมู่เอมีน), 2926 (C-H stretch ของหมู่ CH_2), 2852 (C-H stretch ของหมู่ CH_3), 1702 (C=O stretch), 1466 (CH_2 bend) และ 1380 (CH_3 bend)



สเปกตรัม 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร 63 พบสัญญาณที่ δ 3.08 (1H, m, H-3), 5.41 (1H, br.t, H-6), 2.66 (1H, t, H-17), 0.64 (3H, s, H-18), 1.05 (3H, s, H-19), 2.14 (3H, s, H-2) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.34 ถึง 1.11 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 63 พบสัญญาณที่ δ 73.9 (C-3), 139.9 (C-5),

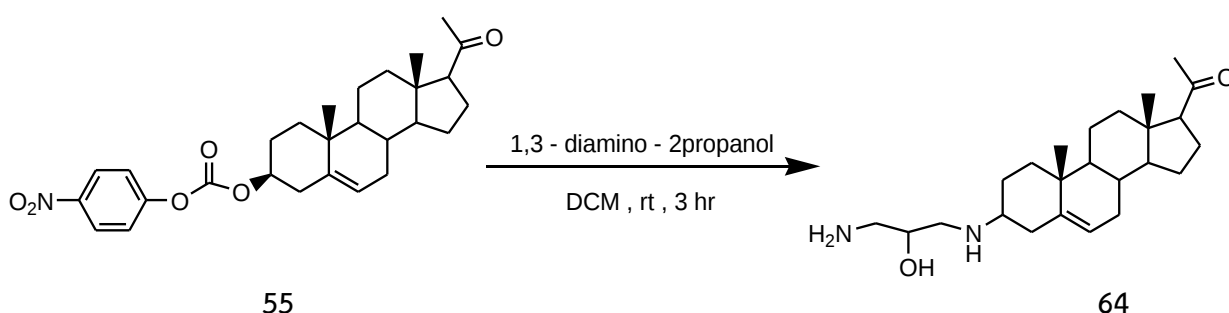
121.8 (C-6), 50.1 (C-9), 56.7 (C-14), 63.3 (C-17), 12.2 (C-18), 18.4 (C-19), 210.9 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 48.4 ถึง 20.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $C_{30}H_{52}N_2O$ Calcd. 456.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 456.0 (1.9%), 412.0 (2.0%) และ 384.6 (6.8%)

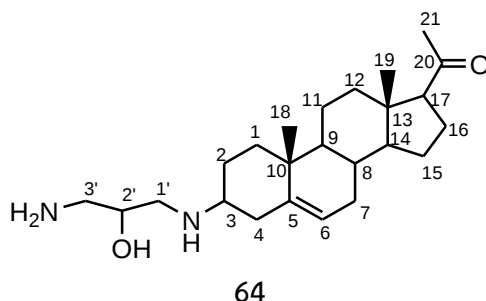
4.1.10 การสังเคราะห์ 3-(1,3-Diaminopropyl-2-ol)-pregn-5-en-20-one 64

สาร 64 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diamino-2-propanol โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.10



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.07 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 70 : 30 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 103-106 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 29.57 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 7) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปข้อมูลได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3379 (N-H และ O-H stretch ของ เอมีน และ แอลกอฮอล์), 2918 (C-H stretch ของ CH_2), 2845 (C-H stretch ของ CH_3), 1698 (C=O stretch) และ 1384 (CH_3 bend)



สเปกตรัม 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร 64 พบสัญญาณที่ δ 3.78 (1H, br.s, H-3), 5.36 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21), 3.26 (1H, s, H-2') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.33 ถึง 1.10 ppm เป็น multiplet ของหมู่

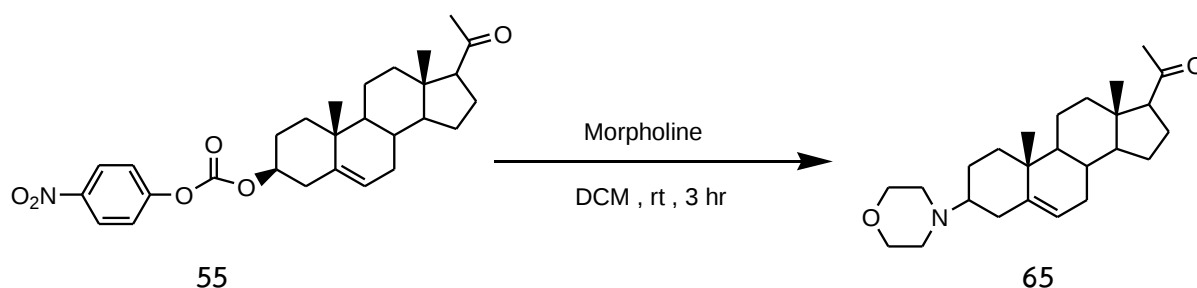
methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **64** พบสัญญาณที่ δ 74.7 (C-3), 139.7 (C-5), 122.3 (C-6), 49.9 (C-9), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20), 70.6 (C-2') และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 45.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_2$ Calcd. 388.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 314.0 (14.0%)

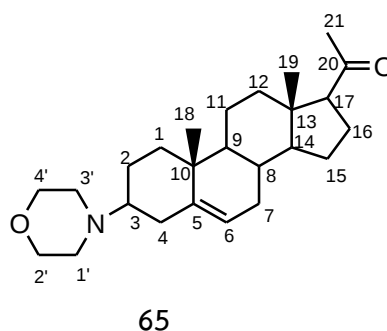
4.1.11 การสังเคราะห์ 3-Morpholinopregn-5-en-20-one **65**

สาร **65** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **55** ทำปฏิกิริยากับ morpholine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.11



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.50 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 156-159 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 83.89 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **7**) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปข้อมูลได้ดังนี้



สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **65** พบสัญญาณที่ δ 3.47 (1H, br.d, H-3), 5.37 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21), 3.65 (4H, s, H-2' และ H-3') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.37 ถึง 1.12 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **65** พบสัญญาณที่ δ 74.9 (C-3), 139.8 (C-5), 122.2 (C-6), 49.8 (C-9), 56.8 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19),

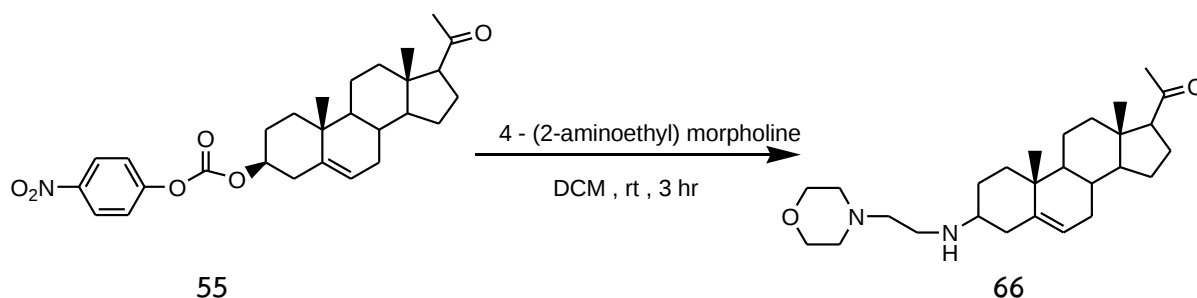
209.4 (C-20), 65.6 (C-2' และ C-3') และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 45.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $C_{25}H_{38}NO_2$ Calcd. 385.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 299.0 (3.0%)

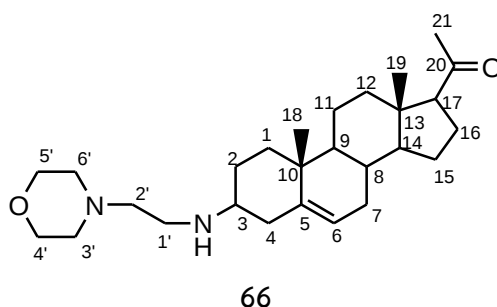
4.1.12 การสังเคราะห์ 3-(4-(2-Aminoethyl) morpholino)-pregn-5-en-20-one 66

สาร 66 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55 มาทำปฏิกิริยากับ 4-(2-aminoethyl) morpholine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.12



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.05 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 65 : 35 ได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 95-98 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 37.44 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 1) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3357 (N-H stretch ของเอมีน), 2943 (C-H stretch ของ CH_2), 1702 (C=O stretch), 1455 (CH_2 bend) และ 1357 (CH_3 bend)



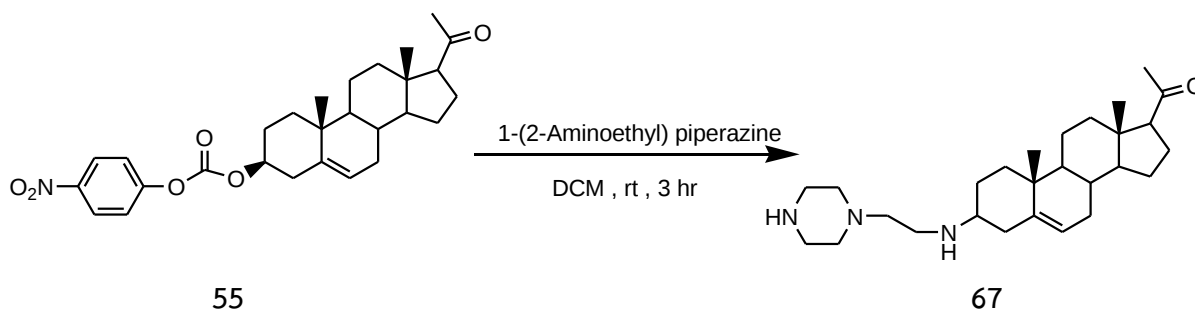
สเปกตรัม 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร 66 พบสัญญาณที่ δ 3.28 (1H, br.d, H-3), 5.37 (1H, br. S, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21), 2.47 (4H, t, H-3' และ H-6'), 3.71 (4H, s, H-4' และ H-5') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.37 ถึง 1.12 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 66 พบสัญญาณที่ δ 74.2 (C-3), 139.8 (C-5), 122.2 (C-6), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2

(C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20), 57.5 (C-1'), 53.4 (C-3' และ C-6'), 66.9 (C-4' และ C-5') และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 53.4 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne
 ES-MS : $C_{27}H_{44}N_2O_2$ Calcd. 428.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 418.6 (26.3%)

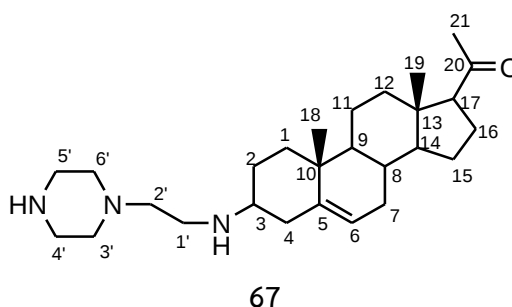
4.1.13 การสังเคราะห์ 3-(2-Piperazin-1-yl-ethyl)-pregn-5-en-20-one 67

สาร 67 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55 ทำปฏิกิริยากับ 1-(2-Aminoethyl) piperazine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.13



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.16 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 60 : 40 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 141-144 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 16.24 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปได้ดังนี้
 สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3378 (N-H stretch ของ เอมีน), 2925 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1704 (C=O stretch) และ 1433 (CH_2 bend)



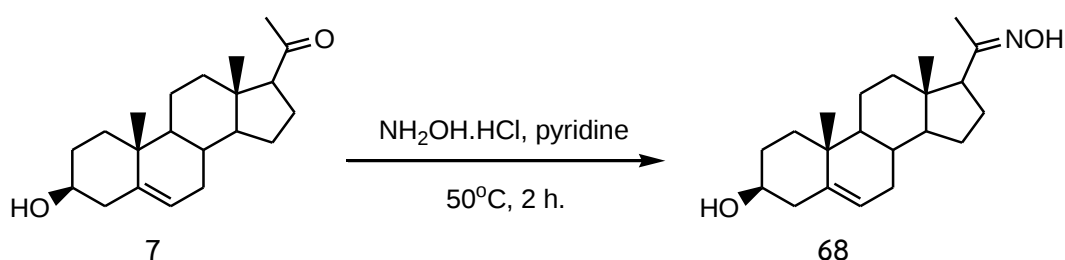
สเปกตรัม 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร 67 พบสัญญาณที่ δ 3.48 (1H, br. s, H-3), 5.37 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.43 ถึง 1.16 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 67 พบสัญญาณที่ δ 74.8 (C-3), 140.0 (C-5),

122.2 (C-6), 49.9 (C-9), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne
 ES-MS : $C_{27}H_{45}N_3O$ Calcd. 427.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 313.4 (1.0%)

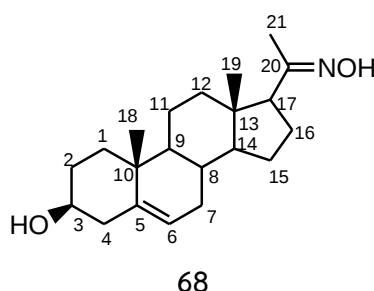
4.1.14 การสังเคราะห์ 3 β -Hydroxy-5-pregnenone-20-oxime 68

สังเคราะห์สาร 68 จากการทำระหว่าง Pregnenolone 7 กับ hydroxylamine hydrochloride โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.14



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.35 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 90 : 10 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 214-216 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 93.07 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปได้ดังนี้
 สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3280 (O-H stretch ของหมู่ไฮดรอกซิล), 2825 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1656 (C=N stretch), 1439 (CH_2 bend) และ 1366 (CH_3 bend)



สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 68 พบสัญญาณที่ δ 3.52 (1H, br. s, H-3), 5.32 (1H, br. d, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.66 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 1.98 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 1.00 ถึง 2.50 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 68 พบสัญญาณที่ δ 71.7 (C-3), 140.8 (C-5),

121.4 (C-6), 50.1 (C-9), 56.1 (C-14), 56.2 (C-17), 13.3 (C-18), 19.4 (C-19), 160.3 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $C_{27}H_{45}N_3O$ Calcd. 331.49 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ 332.14 (39.4%), 314.24 (100.0%), 273.26 (5.0%) และ 255.28 (28.1%)

4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของอะมินอสเตียรอยด์ 56-67

อะมินอสเตียรอยด์ 56-67 ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ ประกอบด้วยเซลล์ปกติชนิด Vero (African green monkey kidney fibroblast), เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast adenocarcinoma), เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB (Human oral cavity carcinoma), เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 (Hepatocellular carcinoma), เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma), และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูชนิด P388 (Murine leukemia) ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay (Primary screening) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับ Pregnenolone 7 ที่ระดับความเข้มข้นในการทดสอบเบื้องต้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของ Pregnenolone 7 และอะมินอสเตียรอยด์ 56-67 แสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า Pregnenolone 7 มีค่าความเป็นพิษน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero, KB, HepG2, HT-29 และ P388 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 32.34, 43.26, 21.04 และ 22.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ Pregnenolone 7 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 เท่ากับ 60.45 เปอร์เซ็นต์

อะมินอสเตียรอยด์ 56 มีผลต่อเซลล์ไลน์ Vero, MCF-7, KB, HepG2, HT-29 และ P388 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 34.07, 43.61, 27.21, 30.63, 47.73 และ 32.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมินอสเตียรอยด์ 57 มีผลต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB, HepG2, HT-29 และ P388 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 98.32, 93.61, 65.85, 91.52, 95.33 และ 95.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมินอสเตียรอยด์ 58 มีผลต่อเซลล์ HepG2 และ HT-29 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 44.27 และ 38.97 เปอร์เซ็นต์ แต่แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB และ P388 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 56.88, 71.74, 84.69 และ 97.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมินอสเตียรอยด์ 59 แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7 และ KB มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 57.12, 57.42, และ 66.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อเซลล์ HepG2, HT-29 และ P388 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 40.07, 42.30 และ 37.94 เปอร์เซ็นต์

อะมินอสเตียรอยด์ 60 แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB, HepG2 และ P388 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 62.38, 68.74, 95.30, 55.19 และ 96.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่มีผลต่อเซลล์ HT-29 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 25.64 เปอร์เซ็นต์

อะมินอสเตียรอยด์ 61 แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7, KB และ P388 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 89.85, 97.80 และ 99.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่มีผลต่อเซลล์ Vero, HepG2 และ HT-29 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 42.40, 40.25 และ 19.34 เปอร์เซ็นต์

อะมินอสเตียรอยด์ 62 มีแนวโน้มความเป็นพิษต่อเซลล์เหมือนกับอะมินอสเตียรอยด์ 61 โดยแสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7, KB และ P388 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 54.02, 53.88 และ

57.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่มีผลต่อเซลล์ Vero, HepG2 และ HT-29 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 44.40, 27.44 และ 22.10 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ **63** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero และ MCF-7 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 62.71 และ 74.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อเซลล์ KB, HepG2, HT-29 และ P388 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 31.99, 43.41, 23.95 และ 28.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ **64** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ทดสอบทุกชนิด โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, MCF-7, KB, HepG2, HT-29 และ P388 เท่ากับ 61.97, 74.75, 98.69, 62.36, 64.92 และ 92.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ **65** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ MCF-7 และ KB มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 55.84 และ 52.95 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, Hep-G2, HT-29 และ P388 มีค่าเท่ากับ 36.52, 30.54, 13.27 และ 13.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ **66** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ MCF-7, KB และ P388 เท่ากับ 53.17, 56.75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, Hep-G2 และ HT-29 มีค่าเท่ากับ 32.04, 32.04 และ 10.57 เปอร์เซ็นต์

และอะมิโนสเตียรอยด์ **67** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ MCF-7 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 51.70 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, KB, Hep-G2, HT-29 และ P388 มีค่าเท่ากับ 31.44, 35.88, 36.98, 18.68 และ 26.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ Pregnenolone **7** และอะมิโนสเตียรอยด์ **56-67** ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สาร ตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ (เปอร์เซ็นต์)					
	Vero	MCF-7	KB	HepG2	HT-29	P388
7	40.65	60.45	32.34	43.26	21.04	22.18
56	34.07	43.61	27.21	30.63	47.73	32.16
57	98.32	93.61	65.85	91.52	95.33	95.77
58	56.88	71.74	84.69	44.27	38.97	97.56
59	57.12	57.42	66.74	40.07	42.30	37.94
60	62.38	68.74	95.30	55.19	25.64	96.86
61	42.40	89.85	97.80	40.25	19.34	99.65
62	44.40	54.02	53.88	27.44	22.10	57.80
63	62.71	74.51	31.99	43.41	23.95	28.15
64	61.97	74.75	98.69	62.36	64.92	92.96
65	36.52	55.84	52.95	30.54	13.27	13.36
66	32.04	53.17	56.75	32.04	10.57	100.00
67	31.44	51.70	35.88	36.98	18.68	26.56

จากผลการทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ จะนำอะมิโนสเตียรอยด์ที่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง (antagonist) 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี MTT assay (IC_{50}) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับตัวยามาตรฐาน Vinblastine sulfate salt ค่า IC_{50} ของ Pregnenolone **7** และ อะมิโนสเตียรอยด์ **56-67** แสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า Pregnenolone **7** ไม่มีผลในการทำลายเซลล์ปกติ (Vero), KB, HepG-2, HT-29 และ P388 โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 40 ไมโครโมล/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นถึงลักษณะของเซลล์ปกติ (Vero) ที่มีลักษณะเป็นรูปลิ่ม เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ Pregnenolone **7** ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 125 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อเซลล์ Vero น้อยมาก แต่ Pregnenolone **7** มีผลในการทำลายเซลล์ MCF-2 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.29 ไมโครโมล/มิลลิลิตร แสดงการทำลายเซลล์ MCF-2 ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 125 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Pregnenolone **7** มากขึ้นเซลล์ MCF-7 จะถูกทำลายมากขึ้น โดยบางเซลล์มีรูปแบบของการตายแบบ apoptosis คือการเปลี่ยนแปลงจากรูปลิ่มกลายเป็นก้อนกลม นอกจากนี้ยังมีบางเซลล์ที่ตายแบบสลายตัวไปแล้ว

ตารางที่ 4.2 ค่า IC_{50} ของ Pregnenolone **7** และอะมิโนสเตียรอยด์ **56-67**

สาร ตัวอย่าง	IC_{50} (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)					
	Vero	MCF-7	KB	HepG2	HT-29	P388
Vinblastine sulfate salt	0.0014	0.0002	0.0016	0.0007	0.0017	0.0091
7	>40	2.29	>40	>40	>40	>40
56	>40	>40	>40	>40	>40	>40
57	0.68	1.09	1.69	0.90	0.66	0.56
58	1.63	1.09	0.54	>40	>40	1.41
59	2.25	2.29	1.06	>40	>40	>40
60	1.53	1.74	0.79	2.23	>40	0.36
61	>40	0.70	1.07	>40	>40	0.73
62	>40	2.04	2.13	>40	>40	1.45
63	1.77	1.30	>40	>40	>40	>40
64	1.47	0.93	0.33	2.09	0.95	0.33
65	>40	2.14	1.70	>40	>40	>40
66	>40	2.17	1.59	>40	>40	0.76
67	>40	2.17	>40	>40	>40	>40

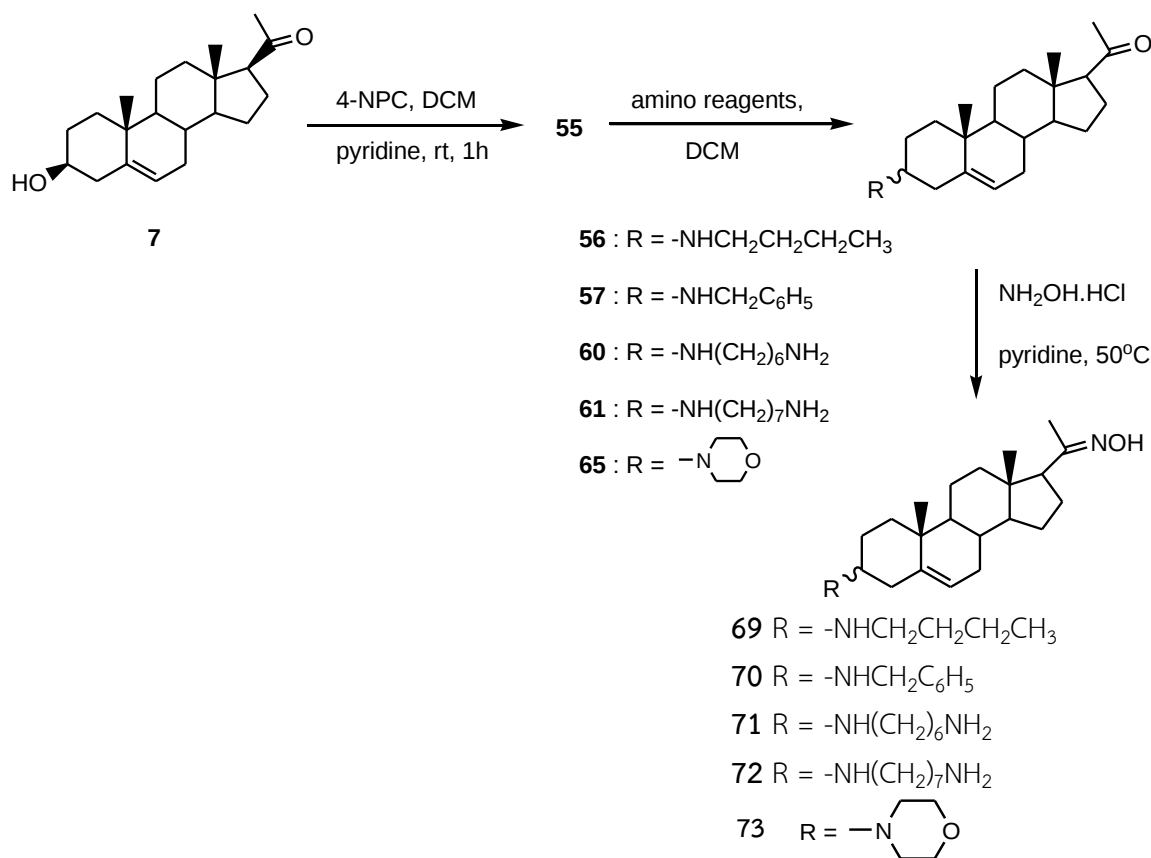
จากตารางที่ 4.2 เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} พบว่าสาร **57** มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบทุกชนิด โดยมีผลต่อเซลล์ไลน์เรียงตามลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ P388, HT-29, Vero, HepG2, MCF-7 และ KB โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.56, 0.66, 0.68, 0.90, 1.09 และ 1.69 ไมโครโมล/มิลลิลิตร แต่ไม่เหมาะต่อการนำไปใช้จริงเนื่องจากสามารถทำลายเซลล์ไลน์ปกติ Vero ได้ดี สาร **61** มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ไลน์ MCF-2 และ P388 ดีที่ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.70 และ 0.73 ไมโคร

โมล/มิลลิลิตร และที่น่าสนใจมากคือ สาร **61** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ปกติในค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้ (42.40 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นจะมีค่าใกล้เคียงในช่วงที่ยอมรับได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า สาร **58** มีผลต่อเซลล์ไลน์ KB ในระดับที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.54 ไมโครโมล/มิลลิลิตร, สาร **60** มีผลต่อเซลล์ P388 ในระดับที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.36 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และสาร **64** มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ไลน์ MCF-2, KB, HepG2, HT-29 และ P388 ที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.93, 0.33, 2.09, 0.95 และ 0.33 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เป็นที่น่าเสียดายสาร **58**, **60** และ **64** มีผลต่อเซลล์ปกติโดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (56.88, 62.38 และ 61.97 เปอร์เซ็นต์) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.63, 1.53 และ 1.47 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิต

4.3 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 69-73

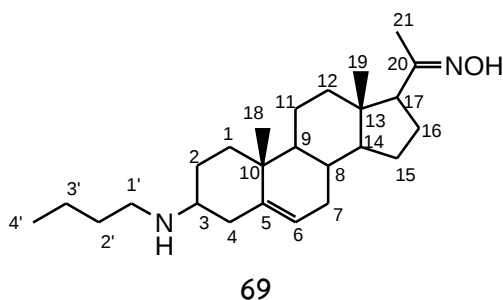
การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **69-73** ทำโดยการเปลี่ยนสาร **56-57**, **60**, **61** และ **65** เป็นสารประกอบออกซิมโดยการทำปฏิกิริยา Oximation กับ $NH_2OH.HCl$ การทดลองจะทำปฏิกิริยาแบบ one pot reaction เป็นการทำปฏิกิริยาการเปลี่ยน Pregnenolone **7** เป็นสารอนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม โดยจะทำปฏิกิริยาผ่าน 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **55** ซึ่งในที่นี้จะไม่มีการแยกสาร **55** ในรูปสารบริสุทธิ์ เนื่องจากถ้าใช้สาร **55** ในรูปสารบริสุทธิ์ขณะทำการทดลองเช่น ขณะซึ่งสาร เป็นต้น จะเกิดการสลายตัวของสาร **55** โดยการทำปฏิกิริยากับความชื้นในอากาศ เมื่อหมู่หลุดออกหลุดออกไปได้สารผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่คือ Pregnenolone **7** เพราะฉะนั้นเมื่อนำมาทำปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไปพบว่าจะได้อะมิโนสเตียรอยด์ในปริมาณที่น้อยมากและเมื่อนำไปทำปฏิกิริยา Oximation จะได้อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมในปริมาณที่น้อย การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมสรุปได้ในแผนภาพที่ 4.15

แผนภาพที่ 4.15



4.3.1 การสังเคราะห์ 3-(Aminobutyl)-pregn-5-en-20-oxime 69

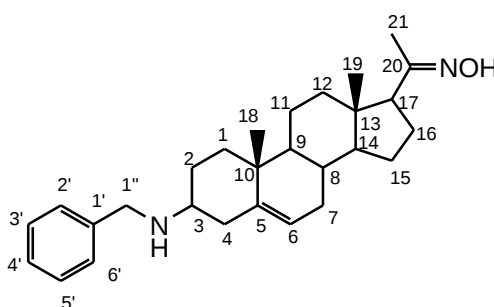
เมื่อนำสาร 55 มาทำปฏิกิริยากับ *n*-butylamine จะได้สาร 56 จากนั้นนำสาร 56 ทำปฏิกิริยา Oximation กับ hydroxylamine hydrochloride จะได้สาร 69 จากการทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 70 : 30 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวบนน้ำเงินของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.43 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 85 : 15 ได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้เท่ากับ 45.5 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3280 (O-H stretch ของหมู่ไฮดรอกซิล), 2830 (C-H stretch ของ CH_2), 2851 (C-H stretch ของ CH_3), 1650 (C=N stretch), 1439 (CH_2 bend) และ 1366 (CH_3 bend)



สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **69** พบสัญญาณที่ δ 3.17 (1H, br.s, H-3), 5.38 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.62 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 1.96 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.35 ถึง 1.10 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **56** พบสัญญาณที่ δ 74.1 (C-3), 139.8 (C-5), 122.1 (C-6), 49.8 (C-9), 21.0 (C-11), 56.9 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), และ 162.3 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

4.3.2 การสังเคราะห์ 3-(Aminobenzyl)-pregn-5-en-20-oxime **70**

การสังเคราะห์สาร **70** ทำการทดลองภายใต้สภาวะกับการเตรียมสาร **69** โดยใช้สารตั้งต้นคือ Pregnenolone **7** ทำปฏิกิริยาโดยไม่มีการแยกสารผลิตภัณฑ์ **55** และ สาร **57** ในรูปสารบริสุทธิ์ จากนั้นนำสาร **57** ทำปฏิกิริยากับ $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 70 : 30 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.45 และเมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 85 : 15 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้เท่ากับ 45.5 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **7**)



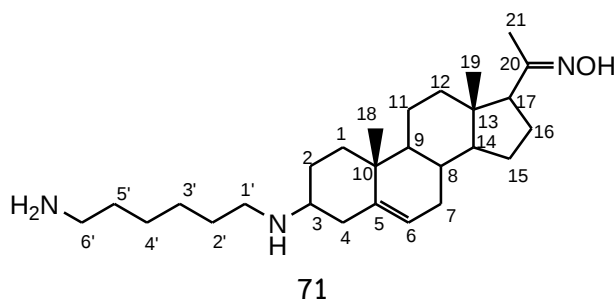
70

และยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร **70** (เปรียบเทียบกับสาร **57**) โดยพิจารณาจากสเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่เมทิล (C-21) จาก 2.12 ppm เป็น 1.91 ppm และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล (C-20) จาก 208.9 ppm เป็น 164.5 ppm

4.2.3 การสังเคราะห์ 3-(1,6-Diaminohexyl)-pregn-5-en-20-oxime **71**

การสังเคราะห์สาร **71** ทำการทดลองภายใต้สภาวะกับการเตรียมสาร **69** โดยใช้สารตั้งต้นคือ Pregnenolone **7** ทำปฏิกิริยาโดยไม่มีการแยกสารผลิตภัณฑ์ **55** และ สาร **60** ในรูปสารบริสุทธิ์ จากนั้นนำสาร **60** ทำปฏิกิริยากับ $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 1 : 1 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f

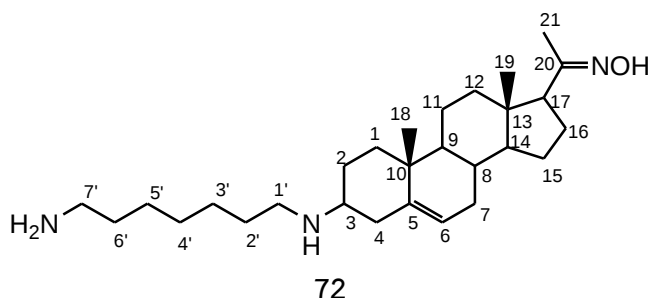
เท่ากับ 0.68 และเมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 60 : 40 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้เท่ากับ 38.6 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 7)



และยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร 71 (เปรียบเทียบกับสาร 60) โดยพิจารณาจากสเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่เมทิล (C-21) จาก 2.13 ppm เป็น 1.92 ppm และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล (C-20) จาก 209.6 ppm เป็น 163.5 ppm

4.3.4 การสังเคราะห์ 3-(1,7-Diaminohexyl)-pregn-5-en-20-oxime 72

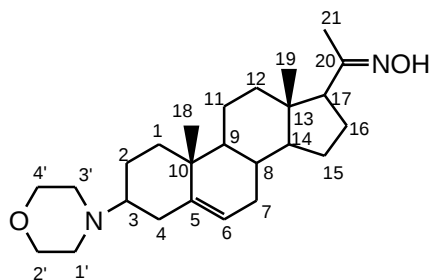
การสังเคราะห์สาร 72 ทำการทดลองภายใต้สภาวะกับการเตรียมสาร 69 โดยใช้สารตั้งต้นคือ Pregnenolone 7 ทำปฏิกิริยาโดยไม่มีการแยกสารผลิตภัณฑ์ 55 และ สาร 61 ในรูปสารบริสุทธิ์ จากนั้นนำสาร 61 ทำปฏิกิริยากับ $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 60 : 40 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.31 และเมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 60 : 40 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้เท่ากับ 40.1 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 7)



และยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร 72 (เปรียบเทียบกับสาร 61) โดยพิจารณาจากสเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่เมทิล (C-21) จาก 2.06 ppm เป็น 1.91 ppm และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล (C-20) จาก 208.6 ppm เป็น 161.5 ppm

4.2.5 การสังเคราะห์ 3-Morpholinopregn-5-en-20-oxime 73

การสังเคราะห์สาร 73 ทำการทดลองภายใต้สภาวะกับการเตรียมสาร 69 โดยใช้สารตั้งต้นคือ Pregnenolone 7 ทำปฏิกิริยาโดยไม่มีการแยกสารผลิตภัณฑ์ 55 และ สาร 65 ในรูปสารบริสุทธิ์ จากนั้นนำสาร 65 ทำปฏิกิริยากับ $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 60 : 40 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.41 และเมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 90 : 10 สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีผลได้เท่ากับ 43.6 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 7)



73

และยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร 72 (เปรียบเทียบกับสาร 65) โดยพิจารณาจากสเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่เมทิล (C-21) จาก 2.06 ppm เป็น 1.91 ppm และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) จากการเคลื่อนของสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล (C-20) จาก 208.6 ppm เป็น 161.5 ppm

4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของ Pregnenolone oxime 68 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 69-73

Pregnenolone oxime 68 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม 69-73 ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ ประกอบด้วยเซลล์ปกติชนิด Vero (African green monkey kidney fibroblast), เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB (Human oral cavity carcinoma), เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 (Hepatocellular carcinoma), เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma), และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูชนิด P388 (Murine leukemia) ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay (Primary screening) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับ Pregnenolone 7 ที่ระดับความเข้มข้นในการทดสอบเบื้องต้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดลองนี้ จะใช้ตัวยามาตรฐานในการเปรียบเทียบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมคือ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การทดลองนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

จากตารางที่ 4.3 ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของ Pregnenolone **7**, Pregnenolone oxime **68** และอะมิโนสเตียรอยด์ **56-67** พบว่า Pregnenolone **7** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero, KB, HepG2, HT-29 และ P388 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 40.65, 32.34, 43.26 และ 22.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Pregnenolone oxime **68** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero, KB, HepG2, HT-29 และ P388 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 14.48, 7.34, 12.66, 4.12 และ 31.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **69** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero, KB, HepG2 และ HT-29 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 25.77, 34.83, 32.61 และ 28.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ P388 เท่ากับ 90.16 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **70** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero และ HT-29 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 34.87 และ 0.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ KB, HepG2 และ P388 เท่ากับ 93.46, 87.59 และ 97.31 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **71** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero และ HT-29 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 30.25 และ 28.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ KB, HepG2 และ P388 เท่ากับ 86.42, 78.19 และ 94.70 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **72** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero, Hep2 และ HT-29 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 34.43, 31.18 และ 16.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ KB และ P388 เท่ากับ 86.17 และ 94.73 เปอร์เซ็นต์

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **73** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ไลน์ Vero, Hep2 และ HT-29 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 17.65, 37.45 และ 12.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ KB และ P388 เท่ากับ 93.12 และ 104.86 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone 7, Pregnenolone oxime 68 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซีม 69-73 ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ (เปอร์เซ็นต์)				
	Vero	KB	HepG2	HT-29	P388
7	40.65	32.34	43.26	21.04	22.18
68	14.48	7.34	12.66	4.12	31.01
69	25.77	34.83	32.61	28.70	90.16
70	34.87	93.46	87.59	0.79	97.31
71	30.25	86.42	78.19	28.88	94.70
72	34.43	86.17	31.18	16.01	94.37
73	17.65	93.12	37.45	12.95	104.86

จากผลการทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ จะนำอะมิโนสเตียรอยด์ที่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง (antagonist) 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี MTT assay (IC_{50}) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับตัวยามาตรฐาน Mitomycin C ค่า CC_{50} ของ Pregnenolone 7, Pregnenolone oxime 68 และ อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซีม 69-73 แสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า Pregnenolone 7 และ Pregnenolone oxime 68 ไม่มีผลในการทำละลายเซลล์ไลน์ปกติ Vero, KB, HepG-2, HT-29 และ P388 โดยมีค่า CC_{50} มากกว่า 40 ไมโครโมล/มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.4 ค่า CC_{50} ของ Pregnenolone 7, Pregnenolone oxime 68 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซีม 69-73

สารตัวอย่าง	CC_{50} (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)				
	Vero	KB	HepG2	HT-29	P388
7	>40	>40	>40	>40	>40
68	>40	>40	>40	>40	>40
69	>40	>40	>40	>40	1.17
70	>40	0.97	1.98	>40	0.25
71	>40	0.83	1.74	>40	0.17
72	>40	1.25	>40	>40	0.25
73	>40	1.13	>40	>40	0.28

จากตารางที่ 4.4 เมื่อพิจารณาค่า CC_{50} พบว่าสาร **70** มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ไลน์ KB, HepG2 และ P388 โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 0.97, 1.98 และ 0.25 ไมโครโมล/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าสาร **71** มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ไลน์ KB, HepG2 และ P388 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.83, 1.74 และ 0.17 ไมโครโมล/มิลลิลิตร โดยที่สาร **70** และสาร **71** ไม่มีผลต่อเซลล์ไลน์ปกติมีค่า CC_{50} มากกว่า 40 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ซึ่งเหมาะต่อการนำไปใช้จริงเนื่องจากสามารถทำลายเซลล์ไลน์ปกติ Vero ได้ดีแต่ทั้งนี้ควรมีการทดลองอื่นที่พิสูจน์กลไกการเข้าทำลายและผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นเมื่อนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิต

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **72** ไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ Vero, HepG2 และ HT29 แต่มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB และ P388 โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 1.25 และ 0.25 ไมโครโมล/มิลลิลิตร

อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **73** ไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ Vero, HepG2 และ HT29 แต่มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB และ P388 โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 1.13 และ 0.28 ไมโครโมล/มิลลิลิตร

บทที่ 5

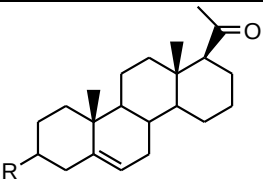
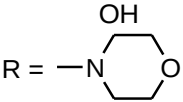
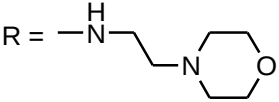
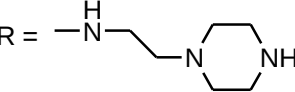
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากความสนใจของผู้วิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงโครงสร้างของ Pregnenolone 7 ได้สังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ Pregnenolone 7 ที่ประกอบด้วยหมู่อะมิโนและหมู่ออกซิมี จากนั้นนำสารสังเคราะห์ไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 6 ชนิด ผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

5.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 56-67 จาก Pregnenolone 7

อะมิโนสเตียรอยด์ 56-67 ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ Pregnenolone 7 ให้เป็นหมู่อะมิโน การสังเคราะห์เตรียมผ่านสารตัวกลางคือ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55 สามารถสังเคราะห์สาร 55 มีผลได้เท่ากับได้ 92.41 เปอร์เซ็นต์จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสารประกอบอะมิโนและสารประกอบไดอะมิโน ตารางที่ 5.1 แสดงผลได้ร้อยละของอะมิโนสเตียรอยด์ 56-67

ตารางที่ 5.1 แสดงผลได้ร้อยละของอะมิโนสเตียรอยด์ 56-67 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 7)

สารอนุพันธ์		ผลได้ร้อยละ
56	R = -NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	45.83
57	R = -NHCH ₂ C ₆ H ₅	43.50
58	R = -NH (CH ₂) ₃ NH ₂	10.90
59	R = -NH (CH ₂) ₄ NH ₂	28.80
60	R = -NH (CH ₂) ₆ NH ₂	12.13
61	R = -NH (CH ₂) ₇ NH ₂	18.74
62	R = -NH (CH ₂) ₈ NH ₂	19.54
63	R = -NH (CH ₂) ₉ NH ₂	15.31
64	R = -NH CH ₂ CH(OH)CH ₂ NH ₂	29.57
65	R = 	83.39
66	R = 	37.44
67	R = 	16.24

จากการทดลองสามารถสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ มีผลได้ร้อยละอยู่ในช่วงต่ำถึงสูง สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก

1. จากแผนภาพที่ 4.1 ในขั้นตอนการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone 7 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ให้เป็นหมู่หลุดออก โดยใช้รีเอเจนต์คือ *p*-nitrophenyl chloroformate ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันอะมิโนคลอไรด์ที่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยากับความชื้นในอากาศ ทำให้สาร 55 ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้กลับเป็นสารตั้ง Pregnenolone 7 มีผลทำให้ได้สาร 55 ลดลง

2. ขั้นตอนแยกอะมิโนสเตียรอยด์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี อะมิโนสเตียรอยด์เป็นสารที่มีขั้วค่อนข้างสูงอาจจะเกิด interaction กับซิลิกาเจล ที่ใช้ในเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีค่อนข้างสูง และเนื่องจากเป็นสารผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยหมู่อะมิโนซึ่งมีความเป็นเบสสามารถเกิด interaction กับซิลิกาเจลที่มีความเป็นกรดได้ ทำให้เกิดการตกค้างอยู่ในคอลัมน์ส่งผลให้ได้ปริมาณหลังการทำให้บริสุทธิ์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 56-67 ลดลง

5.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 56-67

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า Pregnenolone 7 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 6 ชนิดได้แก่ เซลล์ปกติ (Vero, African green monkey kidney fibroblast), เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Human oral cavity carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line), และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูชนิด P388 (Murine leukemia cell line) น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ กล่าวได้ว่า Pregnenolone 7 มีความเหมาะสมในการเลือกใช้เป็นสารตั้งต้น

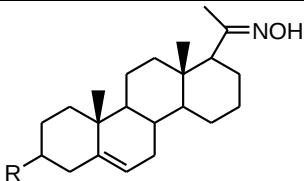
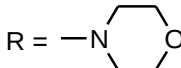
ในที่นี้ขอกล่าวสรุปเฉพาะอะมิโนสเตียรอยด์ที่ให้ผลการทดลองที่ดีคือ อะมิโนสเตียรอยด์ 57 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero, MCF-7, KB, HepG2, HT-29 และ P388 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.68, 1.09, 1.69, 0.90, 0.66 และ 0.56 ไมโครโมล/มิลลิลิตร เป็นที่น่าเสียดายอะมิโนสเตียรอยด์ 57 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในแนวทางที่ดี รวมทั้งมีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero ที่ดีมากด้วยเหมือนกัน ซึ่งไม่เหมาะต่อการนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิต ส่วนอะมิโนสเตียรอยด์ 61 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 ดีที่สุดคือมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.70 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีโอกาสเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ในสิ่งมีชีวิตได้ ในกรณีที่ต้องการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 นอกจากนั้นอะมิโนสเตียรอยด์ 64 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-2, KB, HT-29 และ P388 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.93, 0.33, 0.95 และ 0.33 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ดี แต่อะมิโนสเตียรอยด์ 64 มีข้อเสียคือจะมีผลการทำลายต่อเซลล์ Vero โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.47 ไมโครโมล/มิลลิลิตร จึงยังไม่เหมาะกับการนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิต

จะเห็นได้ว่าอะมิโนสเตียรอยด์ 61 ที่สังเคราะห์ได้นี้ จัดอยู่ในกลุ่ม Alkylating agent มีหมู่แอลคิลเป็นสายโซ่ยาวซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ในการทำลายสารพันธุกรรมเพื่อป้องกันการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง โดยออกฤทธิ์ได้ทุกระยะของการแบ่งเซลล์ และจากลักษณะการตายของเซลล์พบว่า เซลล์มีการหดตัวและจับตัวกันแน่นจนกลายเป็นก้อนกลม ซึ่งเป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำของสารที่สังเคราะห์ได้ โดยการเปลี่ยนแปลงในลักษณะดังกล่าวเป็นรูปแบบของการตายแบบ apoptosis นอกจากนี้ยังมีบางเซลล์ที่ตายและสลายตัวไปแล้ว จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Pregnenolone 7 ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 ของวง A จากหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่อะมิโนมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพด้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

5.3 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี จาก Pregnenolone 7

การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี 69-73 ทำโดยการเปลี่ยนสาร 56-57, 60, 61 และ 65 เป็นสารประกอบออกซิมีโดยการทำปฏิกิริยา Oximation กับ $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ การทดลองจะทำปฏิกิริยาแบบ one pot reaction เป็นการทำปฏิกิริยาการเปลี่ยน Pregnenolone 7 เป็นสารอนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี โดยจะทำปฏิกิริยาผ่าน 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 55 ซึ่งในที่นี้จะไม่การแยกสาร 55 ในรูปสารบริสุทธิ์ ตารางที่ 5.2 แสดงผลได้ร้อยละ Pregnenolone oxime 8 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี 69-73

ตารางที่ 5.2 แสดงผลได้ร้อยละของ Pregnenolone oxime 8 และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี 69-73 (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone 7)

สารอนุพันธ์		ผลได้ร้อยละ
68	R = -OH	93.07
69	R = -NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	45.5
70	R = -NHCH ₂ C ₆ H ₅	45.5
71	R = -NH (CH ₂) ₆ NH ₂	38.6
72	R = -NH (CH ₂) ₇ NH ₂	40.1
73	R = 	43.6

5.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของ Pregnenolone oxime 68 อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี 69-73

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า Pregnenolone 7 และ Pregnenolone oxime 68 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 5 ชนิดได้แก่ เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Human oral cavity carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line), เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 (Human hepatocellular carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูชนิด P388 (Murine leukemia cell line) และเซลล์ปกติจากไตของลิงชนิด Vero (African green monkey kidney fibroblast) น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ กล่าวได้ว่า การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Pregnenolone 7 ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-20 เป็นหมู่ ออกซิมี ไม่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อเลือกอะมิโนสเตียรอยด์ 56, 57, 60-61 และ 65 มาทำปฏิกิริยา Oximation โดยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่คาร์บอนตำแหน่ง C-20 เป็นหมู่ ออกซิมี พบว่าหมู่ ออกซิมี มีผลที่ทำให้สมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์เปลี่ยนไป กล่าวคืออะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี 69 (เตรียมจากอะมิโนสเตียรอยด์ 56 ซึ่งแต่เดิมไม่มีฤทธิ์) มีผลต่อเซลล์ไลน์ P388 โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 1.17 ไมโครโมล/มิลลิลิตร เป็นที่น่าสนใจสำหรับอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี 70 (เตรียมจากอะมิโนสเตียรอยด์ 56 ซึ่งแต่เดิมมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทดสอบทุกชนิดในแนวโน้มที่ดี) พบว่าอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิมี 70

ไม่มีผลความเป็นต่อเซลล์ไลน์ปกติ Vero แต่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KB, HepG2 และ P388 มีค่า CC_{50} เท่ากับ 0.79, 1.98 และ 0.25 ไมโครโมล/มิลลิลิตร แต่ดูเหมือนว่าหมีออกซิมจะลดการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ไลน์ HT-29 และในทำนองเดียวกัน อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **71** ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกันกับอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **70** คือไม่มีผลความเป็นต่อเซลล์ไลน์ปกติ Vero แต่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KB, HepG2 และ P388 มีค่า CC_{50} เท่ากับ 0.83, 1.74 และ 0.17 ไมโครโมล/มิลลิลิตร จากงานวิจัยเบื้องต้นนี้อาจกล่าวได้ว่า อะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **70** และ **71** เหมาะสมกับการนำไปใช้จริงกับสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะถ้านำไปพัฒนาใช้กับการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 หรือเซลล์ไลน์มะเร็งระดับชนิดอื่นๆ อีก ซึ่งเป็นที่ทราบว่าโรคมะเร็งตับเป็นโรคที่คร่าชีวิตคนไทยเป็นอันดับต้นๆ แต่ควรมีการทดสอบแนวทางอื่นเพิ่มเติมถึงแนวทางการออกฤทธิ์ ระยะเวลาการสลายตัวของสารในสิ่งมีชีวิต และผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นเมื่อมีการใช้จริง นอกจากนั้นอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **72** ให้ผลการทดลองแนวโน้มเดียวกันคือมีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB และ P388 ในทางดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอะมิโนสเตียรอยด์ **61** มีค่า CC_{50} เท่ากับ 1.25 และ 0.25 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และอะมิโนสเตียรอยด์ ออกซิม **73** ให้ผลการทดลองแนวโน้มเดียวกันกับอะมิโน สเตียรอยด์ ออกซิม **72** คือมีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB และ P388 ในทางดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอะมิโนสเตียรอยด์ **61** มีค่า CC_{50} เท่ากับ 1.13 และ 0.28 ไมโครโมล/มิลลิลิตร จากการทดลองนี้สามารถสรุปในเบื้องต้นคือหมีออกซิมมีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ จึงสมควรเป็นอีกหมู่ฟังก์ชันหนึ่งที่เหมาะสมกับการนำไปปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสเตียรอยด์สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cui และคณะ[24] ที่ได้ศึกษาถึงตำแหน่งของหมีออกซิมในโมเลกุลของ Cholesterol **1** ซึ่งในที่นี้คณะผู้วิจัยยังคงต้องค้นคว้าหาแนวทางการสังเคราะห์และวิธีทดสอบฤทธิ์แบบใหม่เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองที่ได้

บรรณานุกรม

- [1] ThaiBiz Center.com. 2011. บทความน่ารู้เรื่องสเตียรอยด์. Online Available:
<http://www.thaibizcenter.com/knowledgecenter.asp?kid=1184>.
- [2] สัมฤทธิ์ เพื่องจันทร์. 2011. บราสลิโนสเตอรอยด์. Online Available:
<http://th.wikipedia.org/wiki/บราสลิโนสเตอรอยด์>.
- [3] W. Prabpayak, P. Charoenying, C. Laosinwattana and Nuntana Aroonrerk. 2006. Antibacterial of Pregnenolone Derivatives., **KMITL Sci.**, Vol. 6, No 2b: pp. 466-470.
- [4] N. Onsaeng, P. Unruean, W. Changin and P. Charoenying. 2012. Synthesis and Anticancer Evaluations of C-3 Aminopregnenolone , การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 วันที่ 17-19 ตุลาคม 2555 ณ The Empress Convention Centre, เชียงใหม่.
- [5] R. J. Simmonds, 1997. **Chemistry of Biomolecules: An Introduction**, Billing & Sons Ltd., Worcester.
- [6] C. Li, A-un Rehman, N. K. Dalley and P. B. Savage. 1999. Short Syntheses of Triamine Derivatives of Cholic Acid, **Tetrahedron Letters**, 40, pp. 1861-1864.
- [7] C. Loncle, C. Salmi, Y. Letourneux and J. M. Brunel. 2007. Synthesis of New 7-Aminosterol Squalamine Analogues with High Antimicrobial Activities Through a Stereoselective Titanium Reductive Amination Reaction. **Tetrahedron**. Vol. 63, pp. 12968-12974.
- [8] S. N. Khan, Y. M. Jung, B. J. Kim, H. Cho, J. Lee and H. Kim. 2008. Synthesis and Antimicrobial Activity of 7 α -Amino-23,24-Bisnor-5 α -Cholan-22-ol Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. Vol. 18, pp. 2558-2561.
- [9] S. D. Taylor and J. Harris. Efficient Syntheses of 17- β -Amino Steroids. 2011. **Steroids**. Vol. 76, pp. 1098-1102.
- [10] I. Radu, D. Poirier and L. Provencher. New Efficient Pathway for the Synthesis of 3-Aminoestrone. 2002. **Tetrahedron Letters**. Vol. 43, pp. 7617-7619.
- [11] S. N. Khan, S-Y. Bae and H-S. Kim. 2005. A Highly Stereoselective Reductive Amination of 3-Ketosteroid with Amines: an Improved Synthesis of 3 α -aminosteroid., **Tetrahedron Letters**, 46, pp. 7675-7678.
- [12] B. Choucair, M. Dherbomez, C. Roussakis and L. El Kihel. 2004. Synthesis of Spermidinylcholestanol and Spermidinylcholesterol Squalamine analogues., **Tetrahedron**, 60, pp. 11477-11486.
- [13] วีรศักดิ์ เชื้อมโนชาญ. 2525. สเตียรอยด์จากพืช, ภาควิชาเภสัชเวท, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- [14] ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. 2536. เกล็ดขี้ผึ้ง ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม1. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

- [15] G. P. Moss. **Steroid**. Online Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Steroid>. 2011.
- [16] วิชชุ โลจนากิวัฒน์. 2532. **ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชีวสังเคราะห์**, ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- [17] A. H. Banday, M. I. Zargar and B. A. Ganaie. 2011. Synthesis and Antimicrobial Studies of Chalconyl Pregnenolones., **Steroids**, 76, pp. 1358-1362.
- [18] L. A. Shervington, N. Smith, E. Norman, T. Ward, R. Phillips and A. Shervington. 2009. To Determine the Cytotoxicity of Chlorambucil and One of its Nitro-Derivatives, Conjugated to Prasterone and Pregnenolone, towards Eight Human Cancer., **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44, pp. 2944-2951.
- [19] A. H. Banday, S. A. Shameem, B. D. Gupta and H. M. S. Kumar. 2010. D-Ring Substituted 1,2,3-Triazolyl 20-Keto Pregnenolones as Potential Anticancer Agents: Synthesis and Biological Evaluation., **Steroids**, 75, pp. 801-804.
- [20] A. H. Banday, B. P. Mir, I. H. Lone, K. A. Suri and H. M. S. Kumar. 2010. Studies on Novel D-Ring Substituted Steroidal Pyrazolines as Potential Anticancer Agents., **Steroids**, 75, pp. 805-809.
- [21] M. I. Choudhary, M. S. Alam, A. Rahman, S. Yousuf, Y. C. Wu, A. S. Lin and F. Shaheen. 2011. Pregnenolone Derivatives as Potential Anticancer Agents., **Steroids**, 76, pp. 1554-1559.
- [22] International Standard. 2nd ed. ISO 10—3-5: Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for *in vitro* Cytotoxicity.
- [23] Z. Szendi, P. Forgo and F. Sweet. 1995. Complete ¹H and ¹³C NMR Spectra of Pregnenolone., **Steroids**, 60, pp. 442-446.
- [24] J. Cui, L. Fan, V. Huang, W. Nin and A. Zhou. 2009. Synthesis and Evaluation of Some Steroidal Oxime as Cytotoxic agents Structure/Activity studies (II)., **Steroids**, Vol. 74, pp. 989-995.

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวพัชนี เจริญยิ่ง
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สังกัด	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สาขา	สถานศึกษา
ปริญญาตรี	เคมี	มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ปริญญาโท	เคมีอินทรีย์	มหาวิทยาลัยมหิดล
ปริญญาเอก	เคมี (เคมีอินทรีย์)	University of York

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ	เคมีอินทรีย์สังเคราะห์ และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
Honors and Awards	Cerebos Award year 2003