

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล

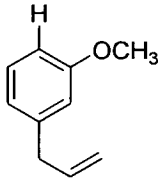
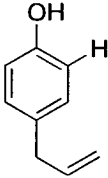
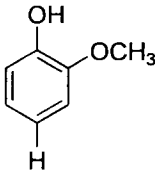
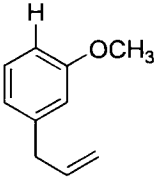
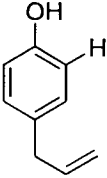
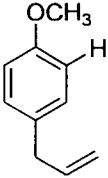
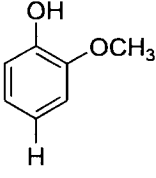
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลชนิดต่างๆ จะดำเนินการควบคู่ไปกับการศึกษาความสัมพันธ์ทางด้านโครงสร้างของสารกับฤทธิ์การเป็นยาเสพติด (SAR: Structure-Activity Relationship) ซึ่งจะได้กล่าวในหัวข้อต่อไป เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาพัฒนาและปรับปรุงเพื่อออกแบบการสังเคราะห์สารที่มีประสิทธิภาพต่อไป โดยการทดสอบในส่วนนี้ร่วมมือกับ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญรัตน์ ประทุมชาติ และ ดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อย่างไรก็ตามอ้างอิงจากรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 2 จากผลการทดลองการสลับปลาเบื่องต้น ประกอบกับความเห็นจากผู้ทรงคุณวุฒิข้อ 2 (ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการทบทวนและปรับปรุง คิดว่าไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์อนุพันธ์ที่คล้ายกัน และการทดสอบประสิทธิภาพของสารที่สังเคราะห์ในสัตว์น้ำหลายๆ ชนิด มากกว่าที่จะสังเคราะห์สารจำนวนมากชนิด)

ทางผู้วิจัยจึงขอเสนอให้มีการเปลี่ยนแปลงการออกแบบอนุพันธ์บางกลุ่มเพื่อให้สอดคล้องกับการสังเคราะห์ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยไม่ใช้เวลานานเกินไป โดยจะไม่สังเคราะห์สารบางชนิดที่มีแนวโน้มว่าจะให้ผลที่ไม่ต่างจากสารที่มีอยู่แล้ว แต่ยังคงแนวทางการออกแบบเพื่อศึกษาผลของการดัดแปรหมู่ต่างๆ ต่อฤทธิ์การสลับในสัตว์น้ำอย่างครบถ้วน โดยจะเน้นนำสารที่มีศักยภาพดีไปทดสอบในสัตว์น้ำชนิดอื่น ได้แก่ ปลากระพง และกุ้งขาวแวน โดยจะทำการดัดแปรโครงสร้างอนุพันธ์ของยูจีนอลทั้งหมด 8 กลุ่ม ดังรายละเอียดแสดงดังนี้

1. การแทนที่หมู่แทนที่ต่างๆ ในยูจีนอลด้วยไฮโดรเจน
2. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่อะมิโน หรือ ซัลไฟด์
3. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เมทอกซี คลอโรหรือโบรโม
4. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่แอลคอกซี
5. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ต่างๆ
6. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่แอลลิล
7. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการนำยูจีนอลมาทำปฏิกิริยาต่างๆ
8. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการปรับปรุงโครงสร้างหลายตำแหน่งพร้อมกัน

กลุ่มที่ 1 การแทนที่หมู่แทนที่ต่างๆ ในยูจีนอลด้วยไฮโดรเจน

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาถึงความสำคัญของหมู่แทนที่ต่างๆ ที่อาจจะเป็น active site ต่อฤทธิ์การเป็นยาสลบในสัตว์น้ำเบื้องต้น ดังแสดงโครงสร้าง

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด			
แนวทางเดิม			
			
แนวทางที่เสนอใหม่			
			

เหตุผลประกอบ : เนื่องจากการศึกษาการดัดแปรหมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่แอลคิล (P1-P13) พบว่าอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ในการสลบปลาได้ดี คือ อนุพันธ์ P5 P7 P10 และ P13 ซึ่งต่างก็เป็นหมู่แอลคิล โดย P5 และ P7 เป็นอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้ดีกว่ายูจีนอลที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีมาก ประกอบกับอนุพันธ์ที่เสนอไว้เดิมนั้น มีแนวทางการสังเคราะห์ที่ค่อนข้างยาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่าจะเสนอเปลี่ยนโครงสร้างจากหมู่ไฮดรอกซี (-OH) เป็นหมู่ เมทอกซี (-OCH₃) เพื่อให้สอดคล้องกับผลการทดสอบฤทธิ์การสลบปลา ซึ่งสารนี้เป็นสารที่มีจำหน่าย ดังนั้นผู้วิจัยสามารถนำไปทดสอบฤทธิ์ได้โดยตรง

กลุ่มที่ 2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่อะมิโน หรือ ซัลไฟด์

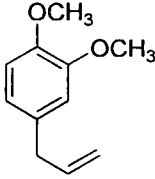
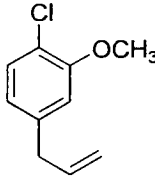
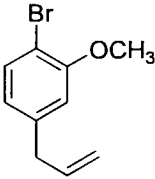
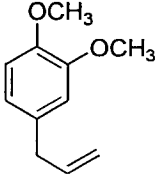
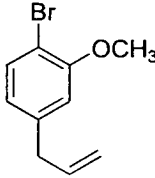
วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bond donor) ได้เช่นเดียวกับหมู่ไฮดรอกซี เช่น หมู่อะมิโน (เริ่มจากอะนิลีน) หมู่ไทออล (เริ่มจากไทโอฟีนอล) เป็นต้น โดยยังคงหมู่แอลลิลและหมู่เมทอกซีภายในโมเลกุลไว้ ดังแสดงโครงสร้าง

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด
แนวทางเดิม <chem>Nc1ccc(CC=C)cc1OC</chem><chem>S[SH]c1ccc(CC=C)cc1OC</chem>
แนวทางที่เสนอใหม่ <chem>Nc1ccc(CC=C)cc1OC</chem>

เหตุผลประกอบ : ในกลุ่มนี้จะเป็นการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่อะมิโน หรือ ซัลไฟด์ เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนแบบ H-bond donor ได้ ซึ่งผู้วิจัยเห็นว่าการเปลี่ยนจากหมู่ไฮดรอกซี เป็นหมู่อะมิโนน่าจะเพียงพอต่อการได้ข้อมูลในเชิงวิเคราะห์แล้ว จึงขอเสนอตัดการแทนที่ด้วยหมู่ซัลไฟด์ออก เพราะเป็นหมู่ฟังก์ชันในกลุ่มของ H-bond donor เช่นเดียวกับหมู่อะมิโน โดยอนุพันธ์ที่แทนที่ด้วยหมู่อะมิโนนี้สามารถสังเคราะห์ได้แล้ว

กลุ่มที่ 3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เมทอกซี คลอโรหรือโบรโม

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bond acceptor) ได้ เช่นเดียวกับหมู่ไฮดรอกซี เช่น หมู่เมทอกซี (เริ่มจากไพโรแคทีคอล) หมู่คลอโร โบรโม (เริ่มจากเฮลเบนซีน) เป็นต้น โดยยังคงหมู่แอลลิลและเมทอกซีภายในโมเลกุลไว้ ดังแสดงโครงสร้าง

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด		
แนวทางเดิม		
		
แนวทางที่เสนอใหม่		
		

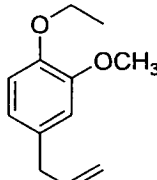
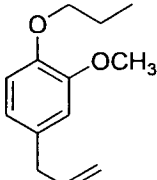
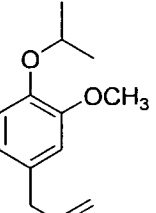
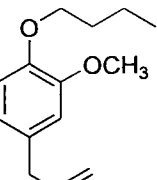
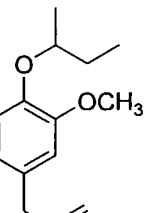
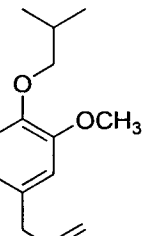
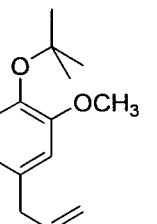
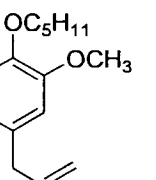
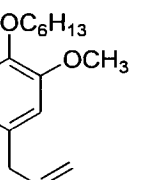
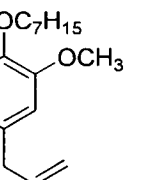
เหตุผลประกอบ : ในกลุ่มนี้จะเป็นการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยคลอโรหรือโบรโม เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนแบบ H-bond acceptor ได้ ในส่วนของการแทนที่ด้วยเมทอกซีนั้นมีสารแล้ว ส่วน คลอโรและโบรโมนั้น เป็นหมู่ฟังก์ชันในกลุ่มเดียวกัน ผู้วิจัยจึงเห็นว่าการเปลี่ยนจากหมู่ไฮดรอกซี เป็น คลอโร หรือ โบรโม ตัวใดตัวหนึ่ง น่าจะเพียงพอต่อการได้ข้อมูลในเชิงวิเคราะห์แล้ว จึงขอเสนอสังเคราะห์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น โดยในที่นี้ได้เลือกอนุพันธ์ของโบรโม เนื่องจากน่าจะสังเคราะห์ได้ง่ายกว่า

กลุ่มที่ 4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจินอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่แอลคอกซี

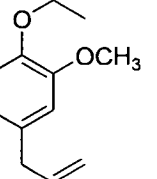
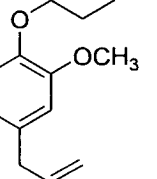
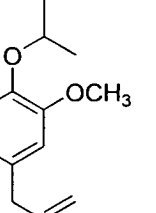
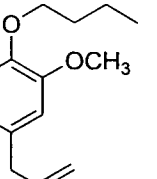
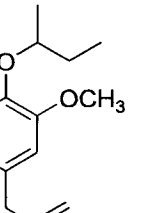
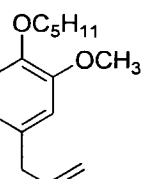
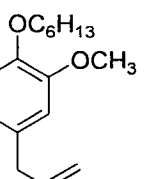
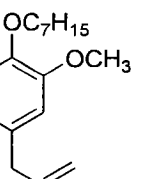
วัตถุประสงค์ : เป็นการเปลี่ยนไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซีให้เป็นหมู่ไฮโดรคาร์บอนที่มีขนาดยาวขึ้นเพื่อเพิ่มความเป็นไฮโดรโฟบิกในโมเลกุล เช่น หมู่เมทิล เอทิล โพรพิล บิวทิล จนถึงเฮปทิล เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบไฮโดรโฟบิกจะมีผลต่อฤทธิ์การสลายอย่างไร ดังแสดงโครงสร้าง

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด

แนวทางเดิม

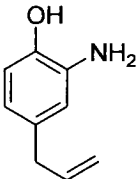
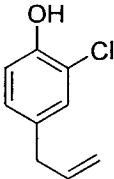
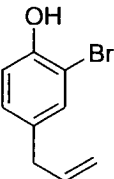
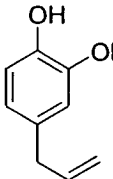
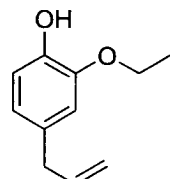
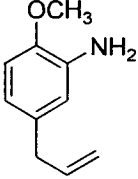
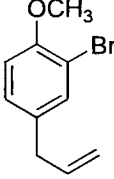
แนวทางที่เสนอใหม่

เหตุผลประกอบ : ในกลุ่มนี้จะเป็นการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่แอลคอกซี ซึ่งจากผลทดสอบการสลายปลาตุกเบื้องต้นพบว่าอนุพันธ์ P5 P7 P10 และ P13 นั้นมีศักยภาพที่ดี โดยอนุพันธ์ที่มีศักยภาพดีที่สุด คือ P5 และ P7 ซึ่งมีความยาวของหมู่แอลคิล คือ C1 และ C3 ดังนั้น อนุพันธ์ที่แทนที่ด้วย isobutyl และ tertiarybutyl จึงน่าจะให้ผลที่ไม่แตกต่างจาก sec-butyl หรือ ethyl มากนัก ผู้วิจัยจึงขอเสนอไม่สังเคราะห์สารดังกล่าว

กลุ่มที่ 5 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ต่างๆ

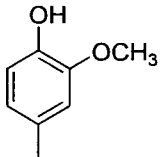
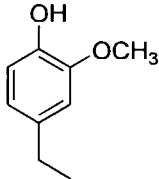
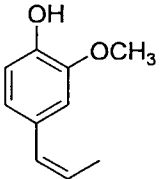
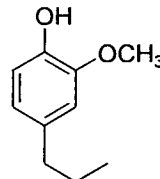
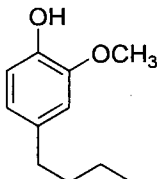
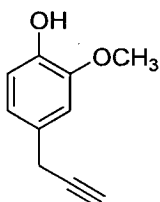
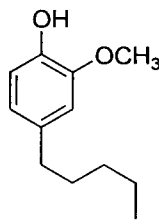
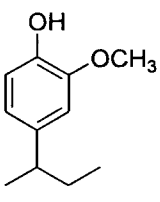
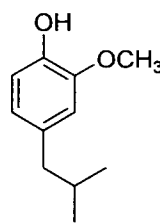
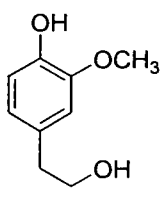
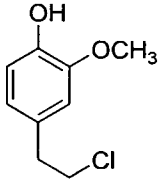
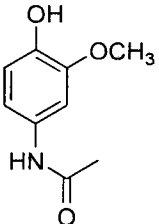
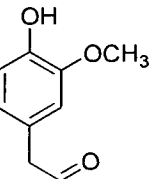
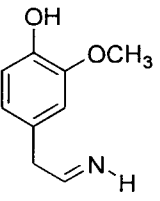
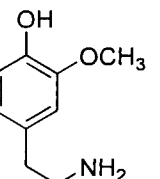
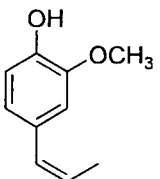
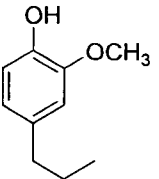
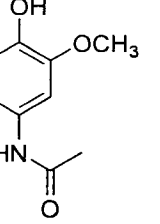
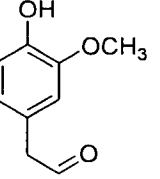
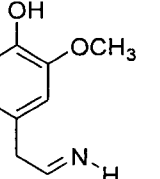
วัตถุประสงค์ : เป็นการแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ เช่น หมู่อะมิโน และ/หรือ สายโซ่คาร์บอนที่มีขนาดยาวขึ้น เช่น หมู่เอทิล เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบให้พันธะไฮโดรเจนหรือไฮโดรโฟบิกจะมีผลต่อฤทธิ์การสลับอย่างไร ดังแสดงโครงสร้าง

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด				
แนวทางเดิม				
				
แนวทางที่เสนอใหม่				
				

เหตุผลประกอบ : ในกลุ่มนี้จะเป็นการแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ต่างๆ ซึ่งจากผลทดสอบการสลับเบื้องต้นของอนุพันธ์ P20 ทำให้ทราบว่าหมู่เมทอกซีดังกล่าวไม่น่าจะมีผลต่อฤทธิ์การสลับปลา เพราะโครงสร้างของอนุพันธ์ P20 นั้นไม่มีหมู่เมทอกซี แต่ยังคงออกฤทธิ์ในการสลับ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเห็นว่าการดัดแปรโครงสร้างบริเวณนี้ ไม่น่าจะมีผลต่อฤทธิ์การสลับมากนัก อย่างไรก็ตาม จะขอเสนอโครงสร้างที่มีการแทนที่หมู่เมทอกซี ด้วยหมู่อะมิโน และ คลอโรหรือโบรมไ ไว้เพื่อให้เป็นข้อมูลเชิงวิเคราะห์ โดยจะขอเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซีเดิม เป็นหมู่เมทอกซี ตามที่ได้ชี้แจงรายละเอียดไว้ในกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 6 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่แอลลิล

วัตถุประสงค์ : เป็นการแทนที่หมู่แอลลิลให้เป็นหมู่ไฮโดรโฟบิกชนิดอื่นๆ เช่น หมู่เมทิล เอทิล โพรพิล ไอโซโพรพิล บิวทิล เซค-บิวทิล เทอร์เชียรีบิวทิล เป็นต้น รวมทั้งหมู่ที่มีโครงสร้างและความยาวพันธะคล้ายกับหมู่แอลลิล เช่น methylene carbonyl, methylene imine เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบใดจะมีผลต่อฤทธิ์การสลายอย่างไรจึงแสดงโครงสร้าง

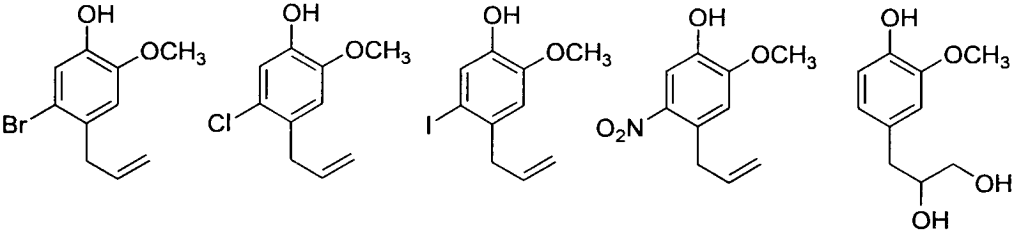
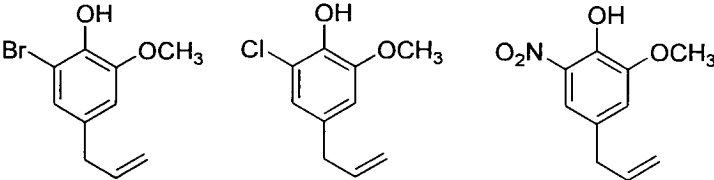
แนวทางการออกแบบ/ปรับลด				
<u>แนวทางเดิม</u>				
				
				
				
<u>แนวทางที่เสนอใหม่</u>				
				

เหตุผลประกอบ : ในกลุ่มนี้จะเป็นการแทนที่หมู่แอลลิลด้วยหมู่ต่างๆ ซึ่งจากผลทดสอบการสลายเบื้องต้นในอนุพันธ์ P3 P4 P21 P22 (P21 และ P22 จะรายงานในความก้าวหน้าครั้งที่ 3) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่ไม่มีหมู่แอลลิล จะพบว่าอนุพันธ์กลุ่มดังกล่าวไม่ออกฤทธิ์เป็นยาสลายในสัตว์น้ำ หรือออกฤทธิ์ช้ากว่ายูจีนอล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหมู่แอลลิลน่าจะมีความสำคัญมากในโครงสร้างของสารที่จะออกฤทธิ์เป็นยาสลายในสัตว์น้ำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงขอเสนอการ

ออกแบบอนุพันธ์ในกลุ่มนี้ใหม่ โดยเห็นว่าควรคงในส่วนของหมู่แอลลิลไว้ ส่วนอนุพันธ์ที่ออกแบบโดยการเปลี่ยนหมู่แอลลิลนั้นไม่น่าจะให้ผลออกฤทธิ์เป็นยาเสพติด จึงขอตัดออกเพื่อให้สอดคล้องกับผลการทดสอบในสัตว์น้ำ โดยในกลุ่มนี้จะเหลืออนุพันธ์ที่ต้องสังเคราะห์อยู่ 4 ชนิด ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายแอลลิล กล่าวคือมีพันธะอยู่ โดยจะเปลี่ยนจาก C=C เป็น C=N หรือ C=O แทน ซึ่งน่าจะช่วยให้บอกถึงความสำคัญของหมู่นี้ได้

กลุ่มที่ 7 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการนำยูจีนอลมาทำปฏิกิริยาต่างๆ

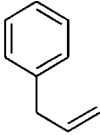
วัตถุประสงค์ : เป็นการใช้อยูจีนอลเป็นสารตั้งต้น แล้วนำมาทำปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว เช่น แอลคิเลชัน แอลคิลเลชัน หรือออกซิเดชัน เป็นต้น เพื่อให้ได้อนุพันธ์ของยูจีนอลแบบต่างๆ ดังแสดงโครงสร้าง

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด
<u>แนวทางเดิม</u> 
<u>แนวทางที่เสนอใหม่</u> 

เหตุผลประกอบ : ในกลุ่มนี้จะเป็นการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการเติมหมู่ต่างๆ เข้าไป โดยจะขอเปลี่ยนแปลงตำแหน่งในการเติมเป็นตำแหน่งออร์โท (ortho) กับหมู่ไฮดรอกซี และขอปรับลดในกรณีของคลอโร หรือ โบรโม ซึ่งจะเลือกสังเคราะห์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง เนื่องจากเป็นหมู่ฟังก์ชันในกลุ่มเดียวกัน ส่วนอนุพันธ์ชนิดสุดท้าย เสนอตัดออกเพราะเป็นการเปลี่ยนแปลงหมู่แอลลิล ดังอธิบายไว้ในกลุ่มที่ 6

กลุ่มที่ 8 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการปรับปรุงโครงสร้างหลายตำแหน่งพร้อมกัน

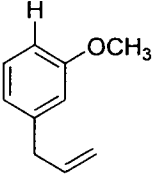
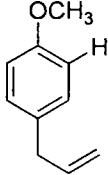
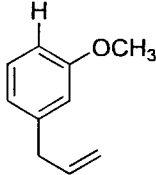
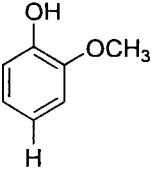
วัตถุประสงค์ : เป็นการออกแบบการปรับโครงสร้างหลายตำแหน่ง เช่น บริเวณที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี หรือ บริเวณที่เป็นหมู่แอลลิล ซึ่งการออกแบบในหัวข้อนี้ จะขึ้นอยู่กับข้อมูลผลการทดลองฤทธิ์ในการสลายของอนุพันธ์ทั้งหมด

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด
แนวทางการเดิม 

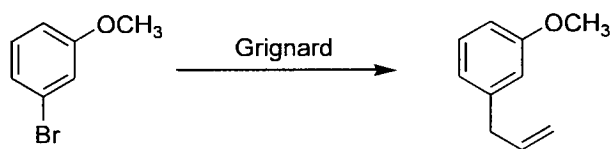
สำหรับสารอนุพันธ์ที่ทำการปรับลดออก รวมทั้งหมด 19 ชนิด ดังนั้น คาดว่าสารอนุพันธ์ที่น่าจะเตรียมได้ทั้งหมด คงเหลือ 24 ชนิด

สำหรับการสังเคราะห์สารอนุพันธ์แต่ละชนิด มีรายละเอียดดังนี้

3.1.1 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 1 การแทนที่หมู่แทนที่ต่างๆ ในยูจีนอลด้วยไฮโดรเจน

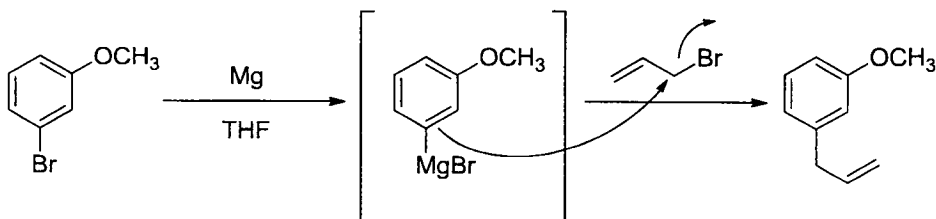
	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	P27	P20	P32
Name	3-allylanisole	4-allylanisole	4-allylphenol
โครงสร้าง			
Code	P21		
Name	Guaiacol		

สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ ได้แก่ 3-allylanisole (P27) เป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซี (-OH) 4-allylanisole (P20) เป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่ไม่มีหมู่เมทอกซี (-OCH₃) และแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เมทอกซี ส่วน Guaiacol (P21) เป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่ไม่มีหมู่แอลลิล (-CH₂CH=CH₂) เพื่อศึกษาถึงความสำคัญของหมู่แทนที่ต่างๆ ที่อาจจะเป็น active site ต่อฤทธิ์การเป็นยาสลับในสัตว์น้ำเบื้องต้น โดยที่สารอนุพันธ์ 2 ชนิดหลัง คือ 4-allylanisole เป็นสารเคมีของ Aldrich และ Guaiacol เป็นสารเคมีของ Acros Chemical จึงจัดซื้อมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์การเป็นยาสลับในสัตว์น้ำโดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ส่วน 3-allylanisole สามารถสังเคราะห์ได้โดยเริ่มจากสารตั้งต้น คือ 3-bromoanisole ซึ่งเป็นสารที่มีจำหน่าย เปลี่ยนให้เป็น 3-allylanisole โดยการทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ที่เป็นแหล่งของหมู่โบรมิ โดยใช้ตัวเข้าทำปฏิกิริยาและตัวทำละลายชนิดต่างๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยหมู่โบรมิ โดยมีแผนการสังเคราะห์แสดงดังภาพ 3.1



ภาพ 3.1 แนวทางการสังเคราะห์ 3-allylanisole (P27)

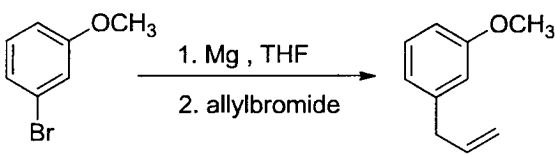
ปฏิกิริยากรีนยาสามารถทำได้โดยเตรียมจากสารตั้งต้น 3-bromoanisole เปลี่ยนให้เป็น aryl magnesium bromide (ArMgBr) โดยใช้โลหะแมกนีเซียมรีฟลักซ์ในตัวทำละลายชนิดอะโปรติก (aprotic solvent) คือ tetrahydrofuran เมื่อผ่านไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติม allyl bromide ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นอิเล็กโตรไฟล์และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง สารจะมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวขุ่น ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เปรียบเทียบระหว่างสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ ในระบบตัวทำละลาย hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 8 : 1 พบว่าบนแผ่น TLC จะเกิดสารผลิตภัณฑ์ขึ้นสองจุด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยสารละลาย KMnO₄ พบว่าจุดบนที่มีค่า R_f = 0.69 สามารถให้ผลบวกกับสารละลาย KMnO₄ คาดว่าน่าจะเป็น 3-allylanisole โดยการสังเคราะห์และกลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 3.2



ภาพ 3.2 กลไกการเกิดปฏิกิริยาแอลลิลชันผ่านกรีนยารีเอเจนต์ของ 3-bromoanisole

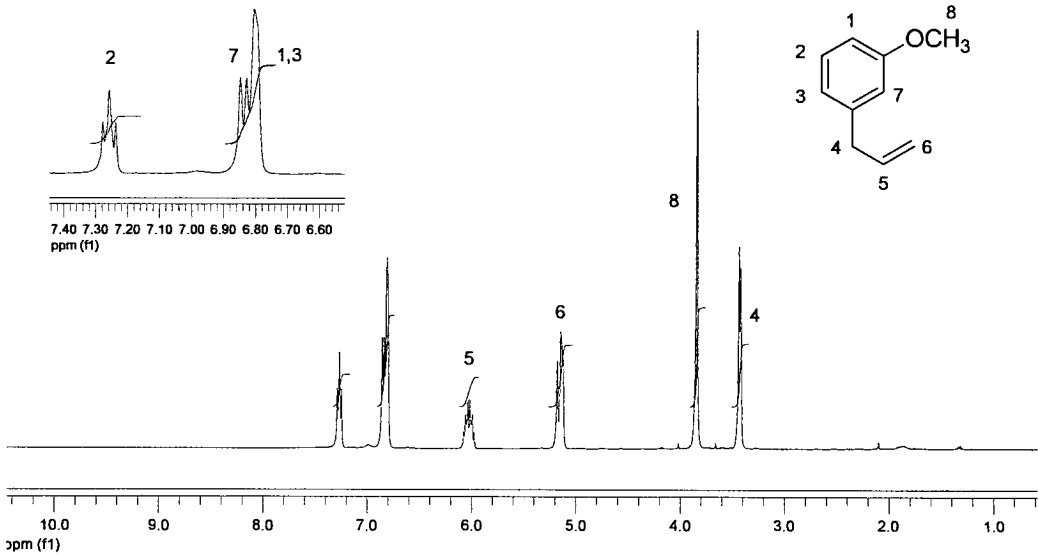
ปฏิกิริยาการเตรียม 3-allylanisole ในงานวิจัยนี้ได้ผลแสดงดังตาราง 3.1 โดยจะได้ผลผลิตประมาณร้อยละ 39.2-57.7

ตาราง 3.1 แสดงผลการเกิดปฏิกิริยากรีนยา (Grignard)



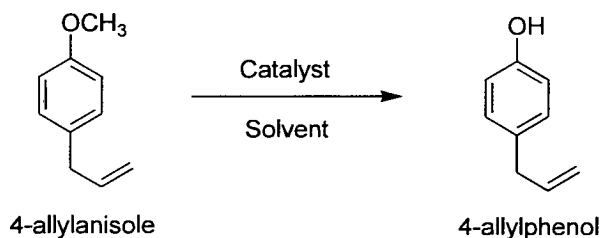
ครั้งที่	จำนวนโมล 3-bromoanisole	จำนวนโมล allylbromide	น้ำหนักผลิตภัณฑ์	ผลผลิตร้อยละ
1	15x10 ⁻³	18x10 ⁻³	1.22	55.0
2	15x10 ⁻³	18x10 ⁻³	1.13	51.2
3	15x10 ⁻³	18x10 ⁻³	1.21	54.6
4	15x10 ⁻³	18x10 ⁻³	0.93	41.8
5	15x10 ⁻³	18x10 ⁻³	0.98	44.2
6	15x10 ⁻³	18x10 ⁻³	1.28	57.7
7	15x10 ⁻³	18x10 ⁻³	1.00	45.2
8	15x10 ⁻³	18x10 ⁻³	0.87	39.2
			เฉลี่ย	48.6

หลังจากทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ จะได้สารผลิตภัณฑ์ P27 มีลักษณะเป็นของเหลวใส และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) จากผลการทดสอบพบว่ามีการแทนที่ด้วยหมู่ allyl ลงไปบนวงอะโรมาติก ดังแสดงในภาพ 3.3



ภาพ 3.3 ¹H NMR สเปกตรัมของ 3-allylanisole ใน CDCl₃

สำหรับการสังเคราะห์ 4-allylphenol (P32) นั้นสามารถสังเคราะห์ได้จาก 4-allylanisole ซึ่งเป็นสารที่มีจำหน่าย โดยนำมาทำปฏิกิริยา demethylation เพื่อกำจัดหมู่เมทิลออก แสดงดังแผนภาพ 3.4



ภาพ 3.4 ปฏิกิริยา demethylation ในการสังเคราะห์ 4-allylphenol

ในการทำปฏิกิริยา demethylation นั้นจะต้องอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาและสภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง โดยได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์วิธีต่างๆ จากเอกสารอ้างอิง ดังแสดงในตาราง 3.2 โดยปกติตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้จะเป็นกรดลิวอิส หรือเบสลิวอิส เช่น aluminum chloride (AlCl_3) หรือ sodium ethanethiolate (NaSEt) [1] โดยได้ทดลองใช้ AlCl_3 ในกรดชนิดต่างๆ (วิธีที่ 1-3) และได้ทดลองใช้เบสลิวอิส (วิธีที่ 11) ปรากฏว่าไม่สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ หรือได้สารที่มีลักษณะเป็นของผสมที่ไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ ดังนั้นจึงได้ปรับสภาวะการทดลองโดยใช้ Lithium chloride/*N,N*-dimethylformamide (LiCl -DMF) ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ค่อนข้างจำเพาะเจาะจงต่อการกำจัดหมู่เมทิลในเมทอกซี (วิธีที่ 4) [2,3] อย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยาดังกล่าวก็ไม่ประสบความสำเร็จเช่นเดียวกัน อาจจะเนื่องมาจากหม้อฟังก์ชันแอลลิโนในโครงสร้างที่รบกวนการทำปฏิกิริยา

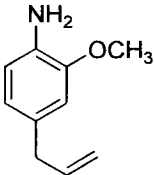
ต่อมาจึงได้ทดลองใช้ Trimethylsilyl chloride ($(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$) ใน pyridine (วิธีที่ 5) และ *tetra-n*-butylammonium bromide (TBAB) ในตัวทำละลายผสมของ 48% HBr/acetic acid (วิธีที่ 6) [4] ซึ่งยังคงไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ หรือการใช้โลหะโซเดียม ทั้งที่มีและไม่มี 1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctadecane (18-Crown-6) (วิธีที่ 7-8) [5] รวมถึงการใช้ iodocyclohexane (วิธีที่ 10) ก็ไม่ประสบความสำเร็จ และการใช้ NaSEt ก็ให้ของผสมจำนวนมากที่ไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ สุดท้ายได้ทดลองใช้ methyl magnesium iodide (MeMgI) ใน THF (วิธีที่ 9) [6] ผลปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์ 4-allylphenol ได้ผลผลิตร้อยละ 70 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า สามารถสังเคราะห์สารอนุพันธ์ P32 ได้ โดยมีรายละเอียดดังแสดงในตาราง 3.2

ตาราง 3.2 ปฏิกิริยา demethylation ในกาสังเคราะห์ 4-allylphenol

วิธี	รีเอเจนต์	ตัวทำละลาย	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (h)	Yield (%)
1	AlCl ₃	CH ₃ CN	0	24	NR
2	AlCl ₃	CH ₂ Cl ₂	0-35	24	NR
3	AlCl ₃	EtOAc	50	24	NR
4	LiCl	DMF	MW	72	NR
5	(CH ₃) ₃ SiCl	Pyridine	35	24	NR
6	TBAB	HBr/AcOH	reflux	24	NR
7	Na	THF/NH ₃	35	48	NR
8	Na/18-Crown-6	THE	35	24	NR
9	MeMgI	THF	reflux	24	70
10	Iodocyclohexane	DMF	reflux	48	NR
11	NaSEt	DMF	reflux	3	mixture

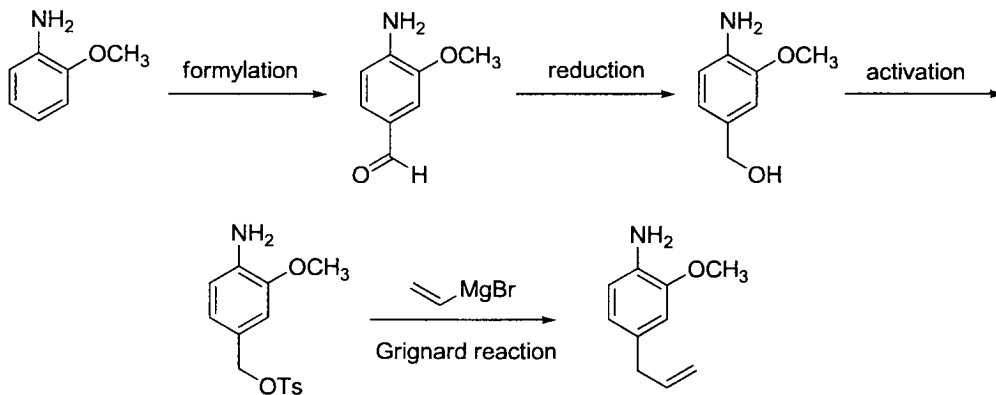
Note: NR = No reaction, MW = Microwave (100 W, 160 °C)

3.1.2 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่อะมิโน

	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	P30		
Name	4-allyl-2-methoxyaniline		

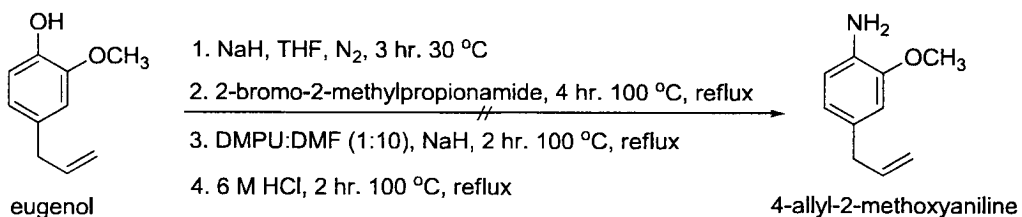
สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ ได้แก่ 4-allyl-2-methoxyaniline (P30) เป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่มีการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่อะมิโน เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bond donor) ได้ เช่นเดียวกับหมู่ไฮดรอกซี เช่น หมู่อะมิโน (อนุพันธ์ของอะนิลีน) เป็นต้น โดยยังคงหมู่แอลลิลและหมู่เมทอกซีภายในโมเลกุลไว้ และได้ทำการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยมีแนวทางในการสังเคราะห์ 2 วิธี โดยวิธีแรกจะใช้

o-anisidine เป็นสารตั้งต้น จะมีแนวทางการสังเคราะห์ดังแสดงในภาพ 3.5 โดยให้ทำปฏิกิริยา formylation เพื่อแทนที่หมู่ฟอร์มิลลงบนวงเบนซีนแล้วรีดิวซ์หมู่แอลดีไฮด์ให้เป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นเปลี่ยนหมู่แอลกอฮอล์ให้เป็น leaving group ที่ดี แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยากับ vinyl magnesium bromide เกิดการแทนที่ด้วยหมู่ไวนิลจะได้ 4-allyl-2-methoxyaniline เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย อย่างไรก็ตามแนวทางนี้ไม่ได้ดำเนินการเนื่องจากมีวิธีการหลายขั้นตอน และแนวทางที่สองที่มีขั้นตอนน้อยกว่านั้นประสบความสำเร็จด้วยดี



ภาพ 3.5 แผนการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยใช้ *o*-anisidine เป็นสารตั้งต้น

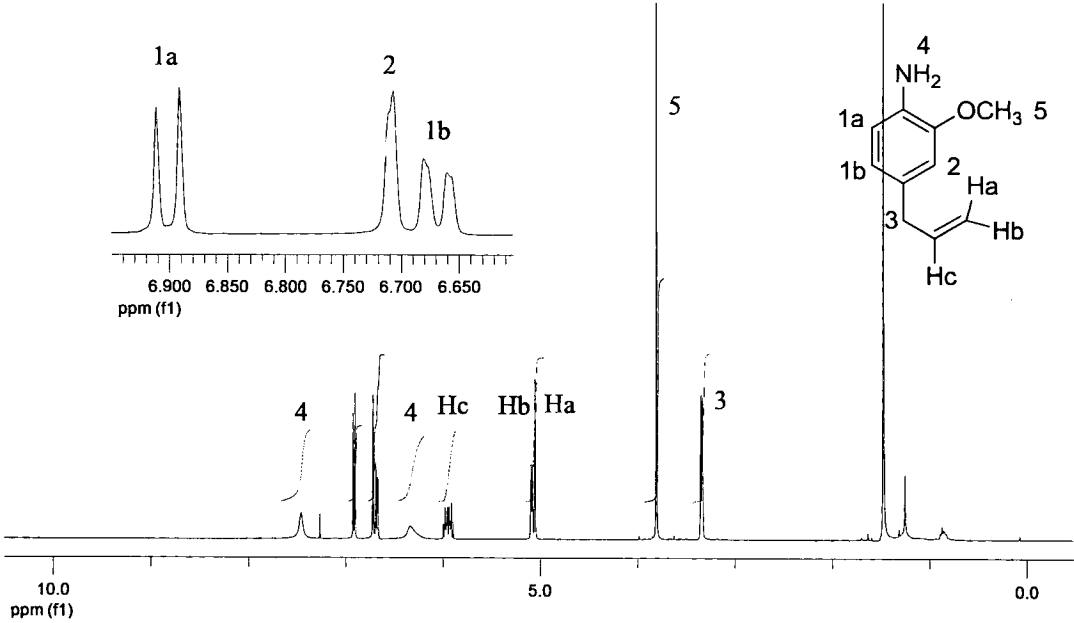
แผนการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline แนวทางที่สอง คือ การใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้น โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซีอะโรมาติกภายในวงเบนซีน โดยทำการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ให้เป็นหมู่อะมิโน (-NH₂) ซึ่งจากรายงานตามเอกสารอ้างอิงของ Carlo Bonini และคณะ [7] พบว่ามีปฏิกิริยาที่สามารถเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซีบนวงอะโรมาติกให้เป็นหมู่อะมิโนได้ในขั้นตอนเดียว นั่นคือการทำปฏิกิริยา Smiles rearrangement ดังแสดงในภาพ 3.6



ภาพ 3.6 แผนการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยปฏิกิริยา Smiles rearrangement โดยใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้น

ดังนั้นจึงได้ทำการสังเคราะห์ตามวิธีของ Carlo Bonini และคณะ โดยใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้น ซึ่งในการทดลองเบื้องต้นพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาเป็นสารผลิตภัณฑ์ตามต้องการ จากนั้นจึงได้ทำการทดลองเปลี่ยนรีเอเจนต์ที่ใช้จากเบส NaH เป็นเบส NaOH จากผลการทดลองพบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ โดยเริ่มจากการละลายยูจีนอลใน

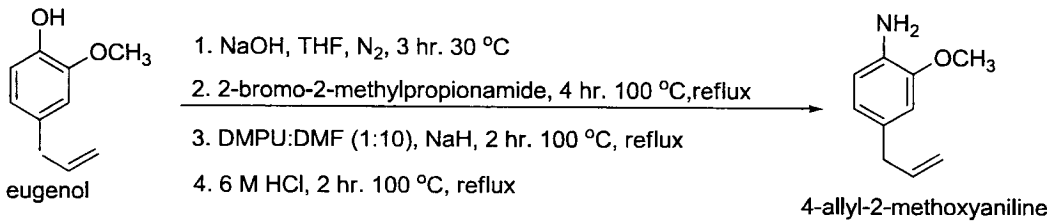
จาก ¹H NMR สเปกตรัมสามารถยืนยันโครงสร้างของ 4-allyl-2-methoxyaniline ที่ได้ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ดังแสดงในภาพ 3.8



ภาพที่ 3.8 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4-allyl-2-methoxyaniline

ผลการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยใช้ปฏิกิริยา Smiles rearrangement แสดงผลดังตาราง 3.3 โดยทำการทดลองทั้งหมด 8 ครั้ง ได้ผลผลิตร้อยละ 30.5-89.0 คิดเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ 61.2

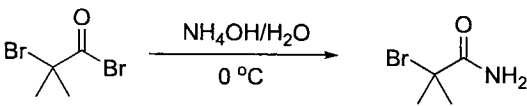
ตาราง 3.3 การสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยปฏิกิริยา Smiles rearrangement



ครั้งที่	จำนวนโมลของยูจีนอล (mmol)	ผลิตภัณฑ์ (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก
1	1.0	0.081	49.7
2	6.0	0.299	30.5
3	6.0	0.456	46.6
4	8.0	0.646	49.5
5	6.0	0.615	62.8
6	6.0	0.872	89.0

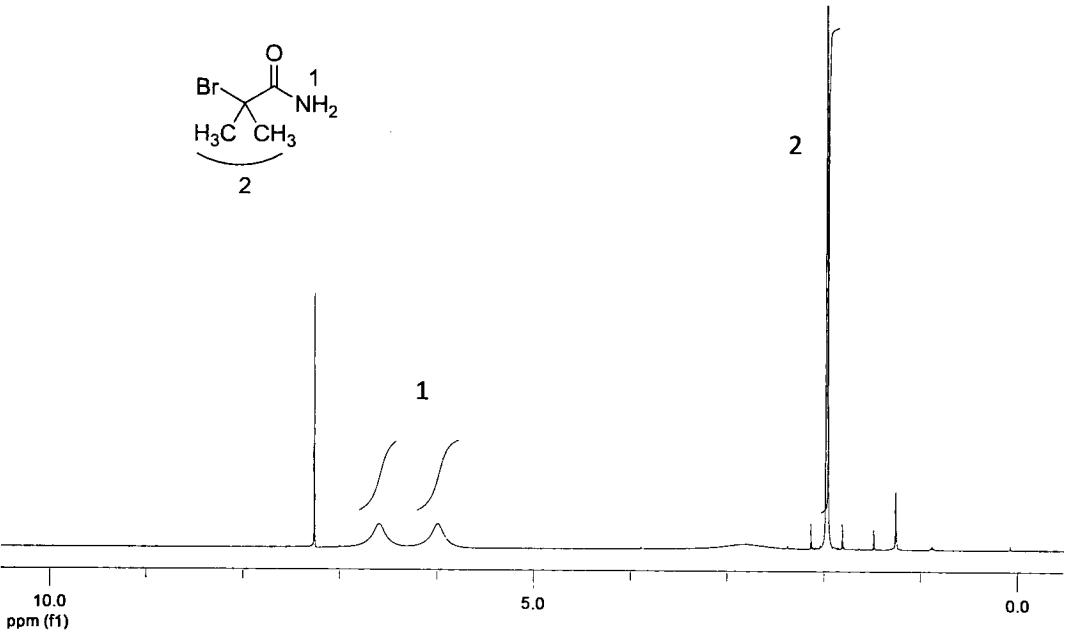
ครั้งที่	จำนวนโมลของยูจีนอล (mmol)	ผลิตภัณฑ์ (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก
7	6.0	0.795	81.2
8	6.0	0.785	80.2
		เฉลี่ย	61.2

เมื่อพิจารณาจากกลไกการเกิดปฏิกิริยา Smiles rearrangement จะเห็นว่ารีเอเจนต์ที่สำคัญตัวหนึ่งในปฏิกิริยา คือ 2-bromo-2-methylpropionamide ซึ่งเป็นสารที่มีราคาค่อนข้างแพง (4000 บาท/5 g) ดังนั้นจึงได้ทดลองเตรียม bromoacetamide และ 2-bromo-2-methyl propionamide เพื่อศึกษาว่าจะสามารถสังเคราะห์รีเอเจนต์ดังกล่าวขึ้นเองเพื่อใช้ทดแทนในปฏิกิริยาได้หรือไม่ โดยจะสังเคราะห์ 2-bromo-2-methylpropionamide ที่สามารถเตรียมได้จาก α -Bromoisobutyrylbromide (2100 บาท/100 g) ทำปฏิกิริยากับ NH_4OH ในตัวทำละลายน้ำ รายละเอียดแสดงดังภาพ 3.9 โดยได้ผลผลิตร้อยละ 70.1



ภาพที่ 3.9 การสังเคราะห์ 2-bromo-2-methylpropionamide

จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม สามารถยืนยันโครงสร้างของ 2-bromo-2-methylpropionamide ที่สังเคราะห์ได้ดังแสดงในภาพ 3.10



ภาพ 3.10 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 2-bromo-2-methylpropionamide

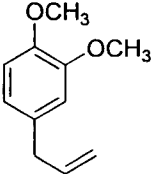
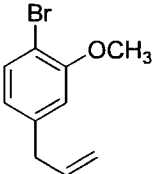
หลังจากนั้นจึงได้นำรีเอเจนต์ 2-bromo-2-methylpropionamide ที่สังเคราะห์ขึ้นเองมาใช้ในการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยวิธี Smiles rearrangement พบว่ารีเอเจนต์ที่สังเคราะห์ขึ้นเองนั้น สามารถนำมาใช้ทดแทนรีเอเจนต์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์โดยมีร้อยละของผลผลิตอยู่ระหว่าง 23.8-59.1 คิดเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ 42.3 ซึ่งได้ผลการทดลองแสดงในตาราง 3.5

ตาราง 3.5 การสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยใช้รีเอเจนต์ 2-bromo-2-methylpropionamide ที่สังเคราะห์ขึ้นมาเองในปฏิกิริยา Smiles rearrangement

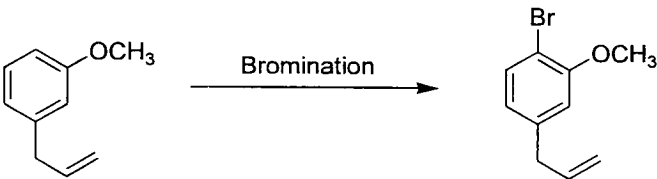
ครั้งที่	จำนวนโมลของยูจีนอล (mmol)	ผลิตภัณฑ์ (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก
1	6.0	0.229	23.4
2	10.0	0.964	59.1
3	10.0	0.724	44.4
		เฉลี่ย	42.3

เมื่อเปรียบเทียบการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยใช้รีเอเจนต์ที่สังซื้อกับรีเอเจนต์ที่สังเคราะห์ขึ้นเองพบว่า เมื่อใช้ 2-bromo-2-methylpropionamide ที่สังซื้อจากบริษัท Aldrich จะได้ผลผลิตร้อยละของผลิตภัณฑ์เฉลี่ย 61.2 และเมื่อใช้ 2-bromo-2-methylpropionamide ที่สังเคราะห์ขึ้นเอง จะได้ผลผลิตร้อยละของผลิตภัณฑ์เฉลี่ย 42.3 ดังนั้นการใช้รีเอเจนต์ที่สังเคราะห์ขึ้นเองนั้น สามารถสังเคราะห์สารเป้าหมายได้ แม้ว่าผลผลิตร้อยละที่ได้จะน้อยกว่าในกรณีเมื่อใช้รีเอเจนต์ที่สังซื้อ อาจเป็นผลเนื่องมาจากขั้นตอนการสังเคราะห์รวมทั้งการทำให้บริสุทธิ์ อาจมีสิ่งเจือปนอยู่ จึงทำให้ได้ผลผลิตร้อยละน้อยลง แต่เพื่อลดต้นทุนในการสังเคราะห์สาร การใช้รีเอเจนต์ที่สังเคราะห์ขึ้นมานั้นสามารถนำมาใช้ทดแทนในการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline ได้

3.1.3 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เมทอกซี คลอโรหรือโบรม

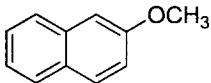
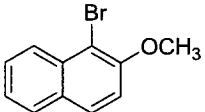
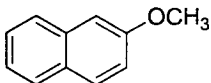
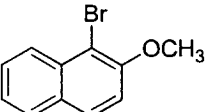
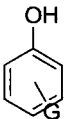
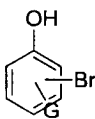
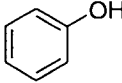
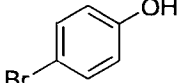
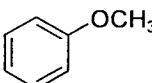
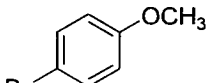
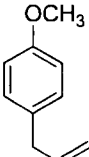
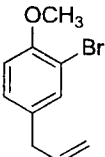
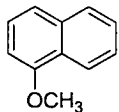
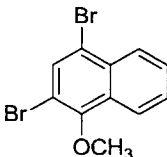
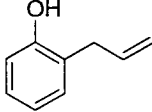
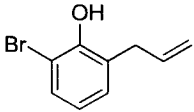
	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	P5	P28	
Name	Methyleugenol	4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene	

สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ ได้แก่ methyleugenol (P5) และ 4-allyl-2-methoxyaniline (P28) เป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่มีการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เมทอกซี และหมู่โบรม เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bond acceptor) ได้เช่นเดียวกับหมู่ไฮดรอกซี เช่น หมู่เมทอกซี หมู่โบรม เป็นต้น โดยยังคงหมู่แอลลิลและเมทอกซีภายในโมเลกุลไว้ สำหรับการสังเคราะห์ methyleugenol จะขอกล่าวรายละเอียดการสังเคราะห์ในกลุ่มที่ 4 เพราะปฏิกิริยาการสังเคราะห์มีความคล้ายคลึงกัน ส่วนการสังเคราะห์ 4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene สามารถเริ่มจาก 3-allylanisole (P27) ที่ได้กล่าวรายละเอียดไปแล้วในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 1 โดยนำมาทำปฏิกิริยาโบรมิเนชัน ซึ่งจะเป็นการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมที่ตำแหน่งออร์โทของหมู่เมทอกซีด้วยโบรมีนอะตอมด้วยปฏิกิริยาโบรมิเนชัน ซึ่งจากการสืบค้นเอกสารอ้างอิง พบว่าการแทนที่โบรมีนอะตอมลงบนวงแหวนอะโรมาติกสามารถทำได้หลายวิธี ดังแสดงในภาพ 3.11 และตาราง 3.6



ภาพ 3.11 แนวทางการสังเคราะห์ 4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene

ตาราง 3.6 ตัวอย่างปฏิกิริยาโบรมิเนชันของสารประกอบอะโรมาติกจากการสับคั่นเอกสารอ้างอิง

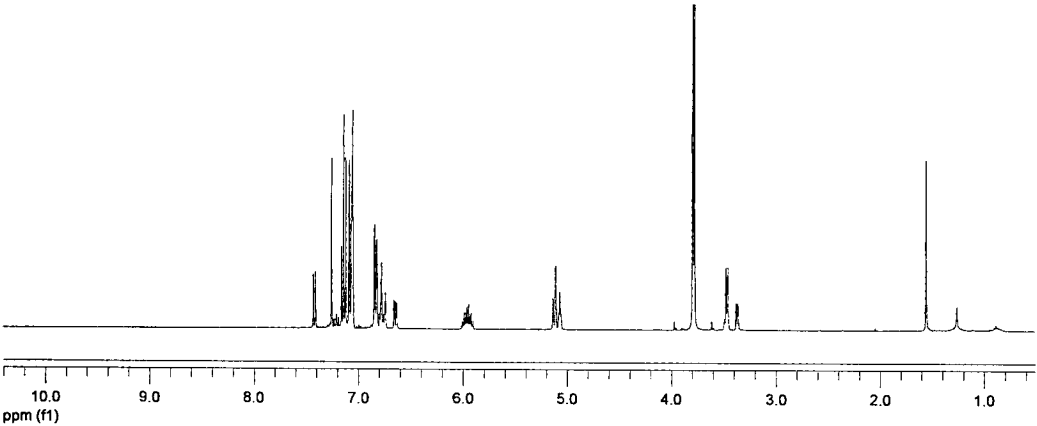
วิธี	สารตั้งต้น	สารผลิตภัณฑ์	รีเอเจนต์	% Yield	Ref
1			HBr, DMSO, RT, 2h	96	[9]
2			LiBr, CAN, MeCN, N ₂	98	[10]
3			NBS, MeCN, hv	100	[11]
4			PhCH ₂ Ph ₃ PSO ₅ , KBr, MeCN, RT	92	[12]
5			NBS, pTsOH, MeCN, RT	95	[13]
6			5 mol% Bu ₄ NBr, HNO ₃	99	[14]
7			Py ⁺ HBr ₃ , Zn	94	[15]
8			Br ₂ , NaHCO ₃ , Methanol	33	[16]
9			NBS, ⁱ Pr ₂ NH, CH ₂ Cl ₂	86	[17]

และจากการศึกษาปฏิกิริยาโบรมิเนชันต่างๆ ตามเอกสารอ้างอิง จึงได้ทดลองโดยมีการปรับสภาวะและตัวทำละลาย ดังแสดงในตาราง 3.7 นี้

ตาราง 3.7 สภาวะที่ใช้ในการทดลองปฏิกิริยาโบรมิเนชันของ 3-allylanisole

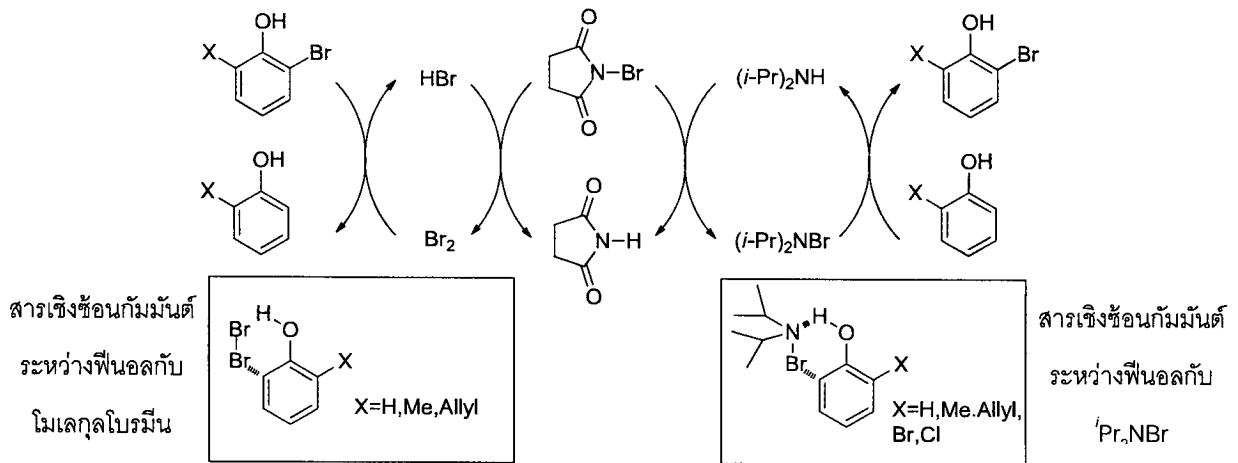
วิธี	รีเอเจนต์	สารเติมแต่ง	ตัวทำละลาย	สภาวะ	Ref	% Yield
1	NBS	-	DMF	N ₂ , 0 °C	[11]	-
2		-	MeCN	N ₂ , RT	[11]	-
3		-	THF	N ₂ , 0 °C	[11]	-
4		(<i>i</i> -Pr) ₂ NH	CH ₂ Cl ₂	0 °C	[17]	-
5		<i>p</i> -TsOH	MeCN	RT	[13]	-
6	HBr	-	DMSO	RT	[9]	-
7		CH ₃ COOH	DMSO	RT	[9]	-
8	Br ₂	FeCl ₃	MeCN	0 °C	-	-
9	Py ⁺ HBr ₃	Zn	-	RT ถึง 60 °C	[15]	54.6

จากตาราง 3.7 พบว่าวิธีที่ 1-3 จะใช้ NBS ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ dimethyl-formamide (DMF) acetonitrile (MeCN) และ tetrahydrofan (THF) จากผลการทดลองพบว่า ไม่ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ ซึ่งคาดว่าในงานวิจัยนี้ใช้สารตั้งต้นเป็น 3-allylanisole ซึ่งต่างจากเอกสารอ้างอิง ซึ่งใช้ anisole ซึ่งเป็นสารอะโรมาติกอย่างง่าย เป็นสารตั้งต้น ในขณะที่ 3-allylanisole จะมีส่วนของหมู่ allyl ที่อาจเกิดการแทนที่ที่ตำแหน่ง benzyl (Ph-CH₂-R) หรือเกิดการเติมที่พันธะคู่ของหมู่แอลลิล ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่ยากต่อการทำให้บริสุทธิ์ ดังแสดงในตัวอย่างของ ¹H NMR สเปกตรัมของของผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวใน CDCl₃ ในภาพ 3.12



ภาพ 3.12 ตัวอย่าง ¹H NMR สเปกตรัมของของผสมใน CDCl₃

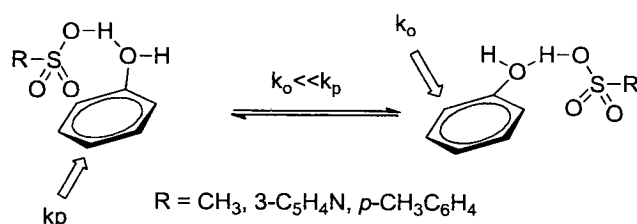
ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้สืบค้นเอกสารอ้างอิงเพิ่มเติม พบว่า Calo V. และคณะ [10] ได้ใช้ iso-propylamine เป็นสารเติมแต่ง เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแทนที่ของโบรมีนอะตอมที่ตำแหน่งออร์โทหมู่ไฮดรอกซีของอนุพันธ์ฟีนอล โดยใช้ NBS ร่วมกับ diisopropylamine จะเกิดเป็นสารมัธยันต์ *N*-bromo-*N*-isopropylpropane-2-amine ซึ่งสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างไนโตรเจนอะตอมกับหมู่ไฮดรอกซีบนวงอะโรมาติก ทำให้เกิดจีโอมเทรีที่เหมาะสมในการเกิดการแทนที่ของโบรมีนอะตอมที่ตำแหน่งออร์โท กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 3.13



ภาพ 3.13 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชันโดยใช้ diisopropylamine เป็นสารเติมแต่ง [10]

โดยตามรายงานจากเอกสารอ้างอิง สามารถสังเคราะห์ได้ผลิตภัณฑ์ได้ถึงร้อยละ 86 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ประยุกต์ใช้วิธีนี้ในการสังเคราะห์สารเป้าหมาย (วิธีที่ 4) แต่พบว่าปฏิกิริยาดังกล่าวไม่ประสบความสำเร็จ ทั้งนี้คาดว่าสารตั้งต้นที่ใช้เป็นอนุพันธ์ของอะนิโซล ซึ่งมีหมู่เมทอกซี ($-\text{OCH}_3$) แทนหมู่ไฮดรอกซี ($-\text{OH}$) ทำให้ไม่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ดังกลไกที่แสดง จึงไม่เกิดผลิตภัณฑ์ตามต้องการ

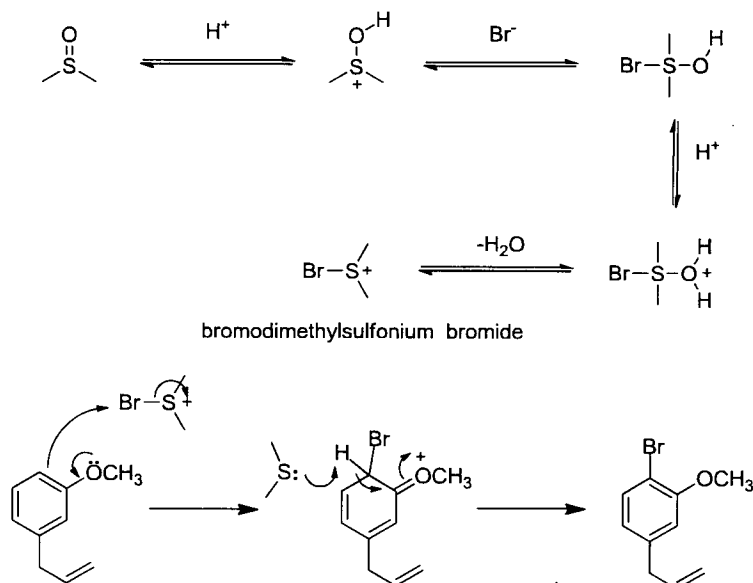
ในขณะเดียวกัน Bovonsombat P. และคณะ [18] ได้รายงานการใช้ *p*-toluenesulfonic acid ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์เป็นสารเติมแต่งเพื่อทำให้เกิด regioselectivity ของปฏิกิริยาโบรมิเนชันที่ตำแหน่งพารามากกว่าตำแหน่งออร์โทโดยอาศัยผลความเกะกะ (steric effect) แสดงดังภาพ 3.14 อย่างไรก็ตามจากการทดลองตามวิธีที่ 5 พบว่าปฏิกิริยาดังกล่าวไม่ประสบความสำเร็จ เช่นเดียวกับวิธีที่ 4



ภาพ 3.14 แสดงการเลือกเข้าของโบรมีนบนวงอะโรมาติก โดยใช้ *p*-toluenesulfonic acid เป็นสารเติมแต่ง

หลังจากไม่สามารถสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมายด้วยการใช้ NBS เป็นรีเอเจนต์ ผู้วิจัยจึงทดลองใช้กรดไฮโดรโบรมิก (HBr) และ DMSO เป็นรีเอเจนต์ (วิธีที่ 6) ตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง

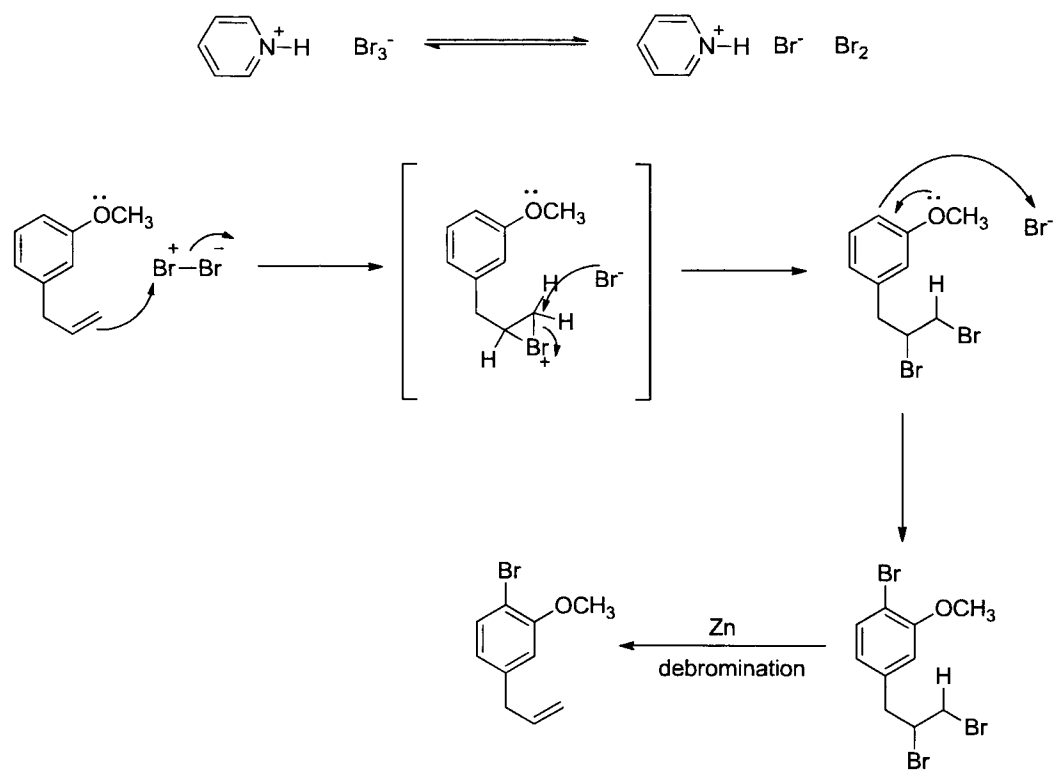
จากเอกสารอ้างอิง [11] พบว่ามีการแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชันของสารประกอบโดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดผ่านสารมัธยันต์ dimethylsulfonium bromide ดังภาพ 3.15



ภาพ 3.15 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชัน ผ่าน bromodimethylsulfonium bromide

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลอง พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาตามต้องการ ซึ่งอาจเกิดจากสภาวะที่ใช้กรดไม่เพียงพอต่อการเกิดสารมัธยันต์ดังกล่าว จึงได้ปรับสภาวะโดยการเติมกรดอะซิติก (HOAc) เพิ่ม (วิธีที่ 7) ซึ่งเอกสารอ้างอิงรายงานว่าทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้น [11] แต่พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาเช่นเดียวกับวิธีที่ 6 โดยวิธีนี้อาจจะไม่เหมาะสม เนื่องจากว่าในกรณีที่มีหมู่แอลคิลภายในโมเลกุลอาจเกิดปฏิกิริยาการเติมแข่งขันได้ ต่อมาผู้วิจัยจึงได้ทดสอบปฏิกิริยาโบรมิเนชันด้วยวิธีมาตรฐาน คือ ใช้โบรมีน (Br₂) และมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น FeBr₃ แต่ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ใช้ FeCl₃ ใน acetonitrile แทน (วิธีที่ 8)

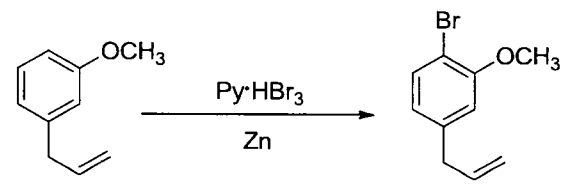
ในทำนองเดียวกับวิธีที่ 1-7 พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาตามต้องการ ต่อมาผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองโดยใช้ pyridinium hydrobromide perbromide (Py⁺HBr⁻Br₂; PHP) และกรดอะซิติกเป็นรีเอเจนต์ตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง [17] สารมัธยันต์นี้สามารถเข้าสู่สมดุลได้อย่างรวดเร็วและเป็นของแข็ง สามารถให้ผลิตภัณฑ์ได้ร้อยละ 54.6 โดยพบว่าในขั้นแรกจะได้สารมัธยันต์ที่มีการเติมโบรมีนลงไปทั้งพันธะคู่ และการแทนที่ไปที่วงอะโรมาติก ดังนั้นจึงต้องทำขั้นตอนที่ 2 ที่ทำปฏิกิริยา debromination โดยใช้ Zn เป็นรีเอเจนต์ จึงจะได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพ 3.16



ภาพ 3.16 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชัน ผ่าน pyridinium hydrobromide perbromide

ปฏิกิริยาการเตรียม 4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene จากรายงานเอกสารอ้างอิง [17] ได้ผลแสดงดังตาราง 3.8 โดยจะได้ผลผลิตเฉลี่ยร้อยละ 47.6

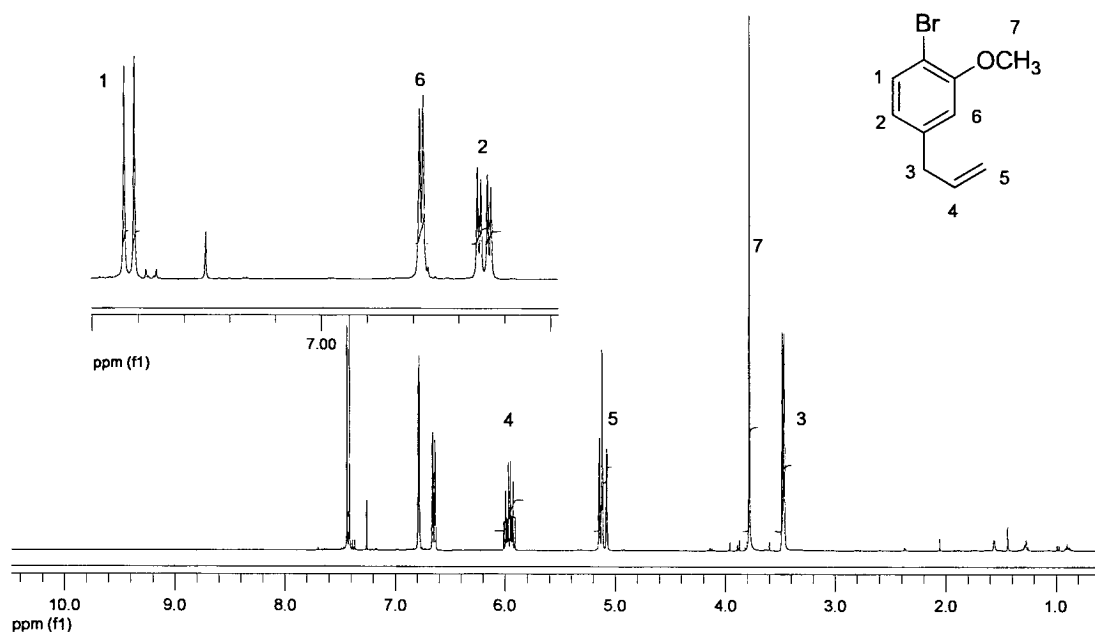
ตาราง 3.8 แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชัน (Bromination)



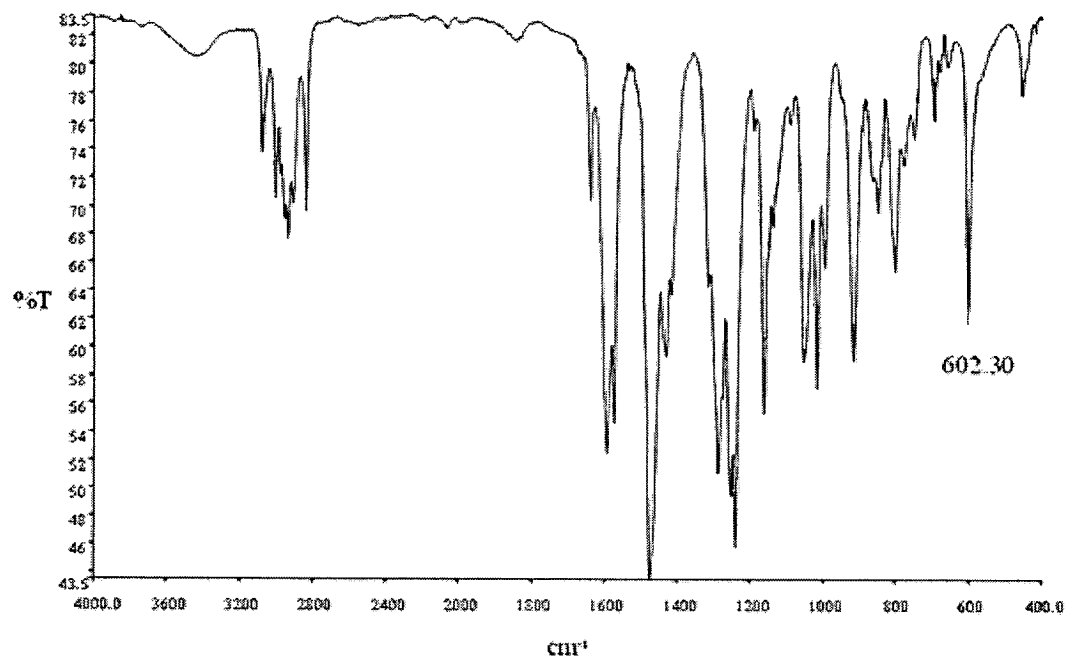
ครั้งที่	จำนวนโมล 3-allylbromide	จำนวนโมล $\text{Py}\cdot\text{HBr}_3$	จำนวนโมล Zn	น้ำหนัก ผลิตภัณฑ์	ร้อยละของ ผลิตภัณฑ์ที่ได้
1	5.9×10^{-3}	5.9×10^{-3}	6.0×10^{-3}	0.12	9.1*
2	3.5×10^{-3}	3.5×10^{-3}	3.6×10^{-3}	0.32	40.6
3	2.1×10^{-3}	2.1×10^{-3}	2.2×10^{-3}	0.26	54.6
				เฉลี่ย	47.6

*ไม่ได้นำมาคิดในร้อยละของผลิตภัณฑ์เฉลี่ยที่ได้เนื่องจากเกิดความผิดพลาดระหว่างการทดลอง

หลังจากทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ จะได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของเหลวใส และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) จากผลการทดสอบพบว่าการแทนที่ด้วยหมู่โบรมีนลงไปบนวงอะโรมาติกจริง ดังแสดงในภาพ 3.17



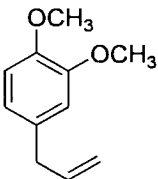
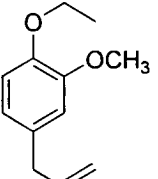
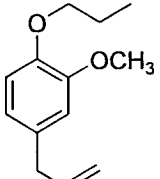
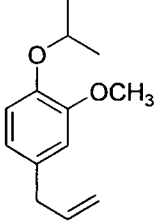
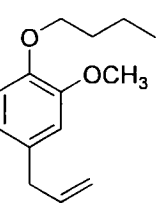
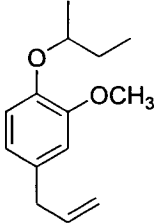
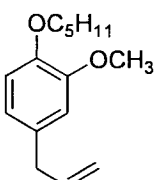
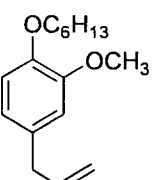
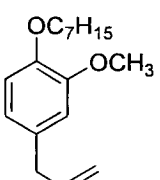
ภาพ 3.17 ^1H NMR สเปกตรัมของ 4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene ใน CDCl_3



ภาพ 3.18 IR spectrum ของ 4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene

นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันการเข้าแทนที่ของหมู่โบรมโมบนวงอะโรมาติกของ 4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene จาก IR spectroscopy ซึ่งโดยปกติพันธะ C-Br จะปรากฏสัญญาณที่เลขคลื่น 650-511 cm^{-1} (C-Br stretching) และจากสเปกตรัมพบว่าเกิดสัญญาณของ C-Br stretching ที่เลขคลื่น 602.30 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับการพิจารณาโครงสร้าง 4-allyl-1-brom-2-methoxybenzene แสดงดังภาพ 3.18

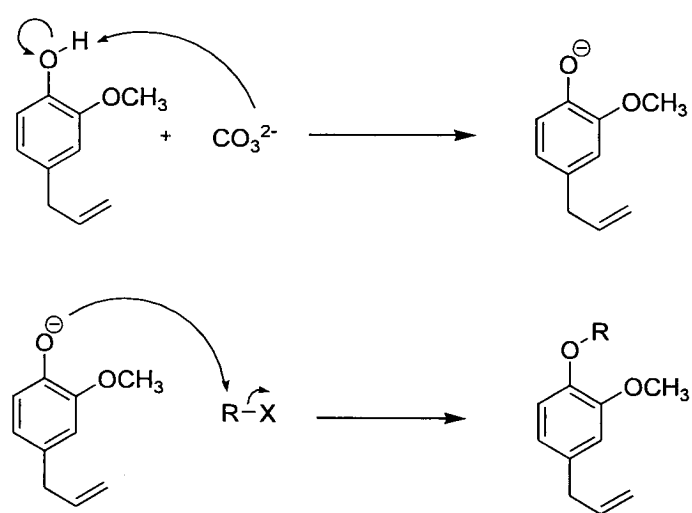
3.1.4 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่แอลคอกซี

	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	P5	P6	P7
Name	Methyleugenol	Ethyleugenol	Propyleugenol
โครงสร้าง			
Code	P8	P13	P10
Name	Isopropyleugenol	Butyleugenol	Sec-Butyleugenol
โครงสร้าง			
Code	P9	P11	P12
Name	Pentyleugenol	Hexyleugenol	Heptyleugenol

สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ ได้แก่ methyleugenol (P5) ethyleugenol (P6) propyleugenol (P7) isopropyl-eugenol (P8) butyleugenol (P13) sec-butyleugenol (P10) pentyleugenol (P9) hexyleugenol (P11) และ heptyleugenol (P12) ซึ่งเป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่มีการเปลี่ยนไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซีให้เป็นหมู่

ไฮโดรคาร์บอนที่มีขนาดยาวขึ้นเพื่อเพิ่มความเป็นไฮโดรโฟบิกในโมเลกุล เช่น หมูเมทิล เอทิล โพรพิล บิวทิล จนถึง เฮปทิล เพื่อศึกษาว่าหมูแทนที่แบบไฮโดรโฟบิกจะมีผลต่อฤทธิ์การสลับอย่างไร

โดยได้ศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลที่มีการเปลี่ยนหมูไฮดรอกซีให้เป็นหมูแอลคอกซีโดยปฏิกิริยา o-alkylation โดยให้ทำปฏิกิริยากับแอลคิลเฮไลด์ ในตัวทำละลายและชนิดของเบสที่ต่างกันเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา o-alkylation กลไกการเกิดปฏิกิริยาแอลคิลเลชันแสดงดังภาพ 3.19



ภาพ 3.19 แผนการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลโดยปฏิกิริยา o-alkylation
เมื่อ R แทนหมูแอลคิลชนิดต่างๆ ($-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, ..., $-\text{C}_7\text{H}_{15}$)

สำหรับสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจะใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้น ทำปฏิกิริยากับแอลคิลเฮไลด์ชนิดต่างๆ โดยมีเบสเป็นรีเอเจนต์ร่วมในตัวทำละลายชนิดต่างๆ และสภาวะที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตาราง 3.9

ตาราง 3.9 สภาวะในการทดลองและผลผลิตร้อยละของปฏิกิริยาแอลคิลเลชันของยูจีนอล

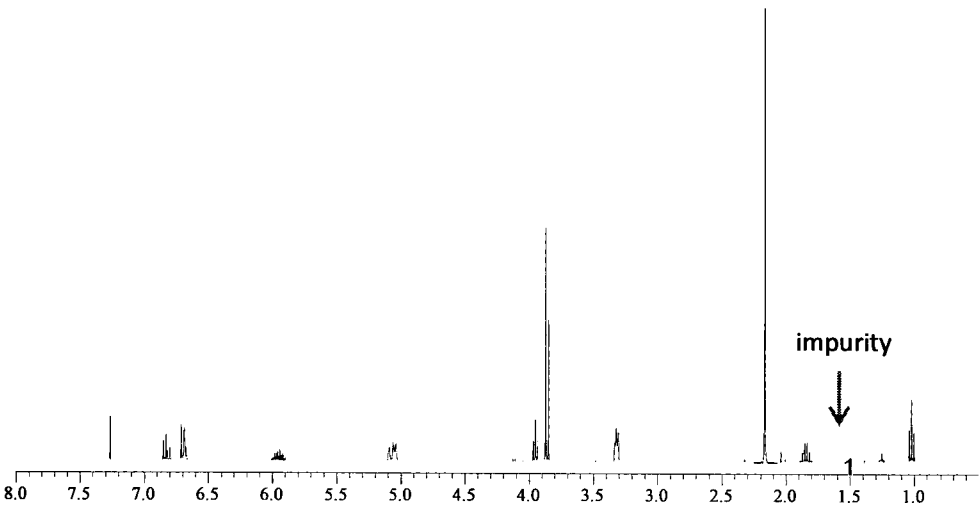
สภาวะ	ตัวเข้าทำปฏิกิริยา	เบส	ตัวทำละลาย	%yield
1	Methyl iodide	K_2CO_3	Acetone	46.0
2	Ethyl bromide	K_2CO_3	Acetone	42.4
3	Propyl bromide	K_2CO_3	Acetone	30.3
4	Propyl bromide	NaH	THF	ของผสม
5	Propyl bromide	NaOH	Methanol	ของผสม
6	Isopropyl bromide	K_2CO_3	Acetone	25.3
7	Isopropyl bromide	NaH	THF	ของผสม

สภาวะ	ตัวเข้าทำปฏิกิริยา	เบส	ตัวทำละลาย	%yield
8	Isopropyl bromide	NaOH	Methanol	ของผสม
9	Butylbromide	K ₂ CO ₃	Acetone	53.6
10	Isobutylbromide	K ₂ CO ₃	Acetone	17.8
11	Pentylbromide	K ₂ CO ₃	Acetone	56.0
12	Hexylbromide	K ₂ CO ₃	Acetone	61.2
13	Heptylbromide	K ₂ CO ₃	Acetone	62.3

สภาวะการทดลองที่แสดงในตาราง 3.9 แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่ 3-8 นั้นเป็นไปได้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาแอลคิลเลชันเพื่อให้ได้ผลผลิตร้อยละของผลิตภัณฑ์มากที่สุด ซึ่งผลที่ได้ออกมา นั้นจะพบว่าในการใช้โพแทสเซียมคาร์บอเนตเป็นเบสและใช้อะซีโตนเป็นตัวทำละลายจะให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด

การเปรียบเทียบผลที่ได้จากการทดลองที่ 3-5 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแอลคิลเลชันของ propyl bromide พบว่าการใช้เบสเป็น K₂CO₃ และตัวทำละลายเป็นอะซีโตน (การทดลองที่ 3) จะให้ผลผลิตร้อยละของผลิตภัณฑ์สูงสุด และผลิตภัณฑ์หลังผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่ามีความบริสุทธิ์สูง ไม่มีสารอื่นปน แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสภาวะการทดลองอื่น (การทดลองที่ 4 และ 5) จะให้ผลผลิตร้อยละที่ต่ำกว่า และสารผลิตภัณฑ์ไม่ค่อยบริสุทธิ์ แม้ว่าจะผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีมาแล้ว

ส่วนการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการทดลองที่ 6-8 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแอลคิลเลชันของ isopropyl bromide พบว่าการใช้เบสเป็น NaOH และตัวทำละลายเป็นเมทานอล (การทดลองที่ 8) จะให้ผลผลิตร้อยละสูงสุดแต่สารผลิตภัณฑ์ที่ได้พบว่ามีค่าความบริสุทธิ์ สังกัดได้จาก NMR spectrum ที่มีพิกที่ไม่ใช่ของสารผลิตภัณฑ์ที่ปรากฏ

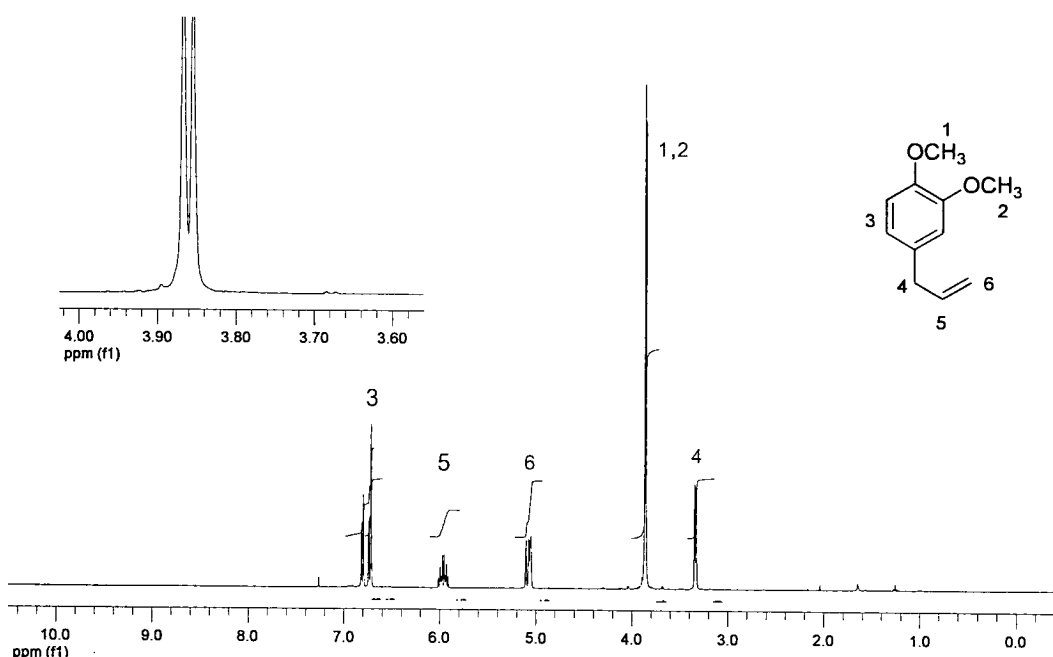


ภาพ 3.20 ¹H NMR สเปกตรัมของ propyleugenol ที่สังเคราะห์ได้โดยใช้ NaOH เป็นเบส

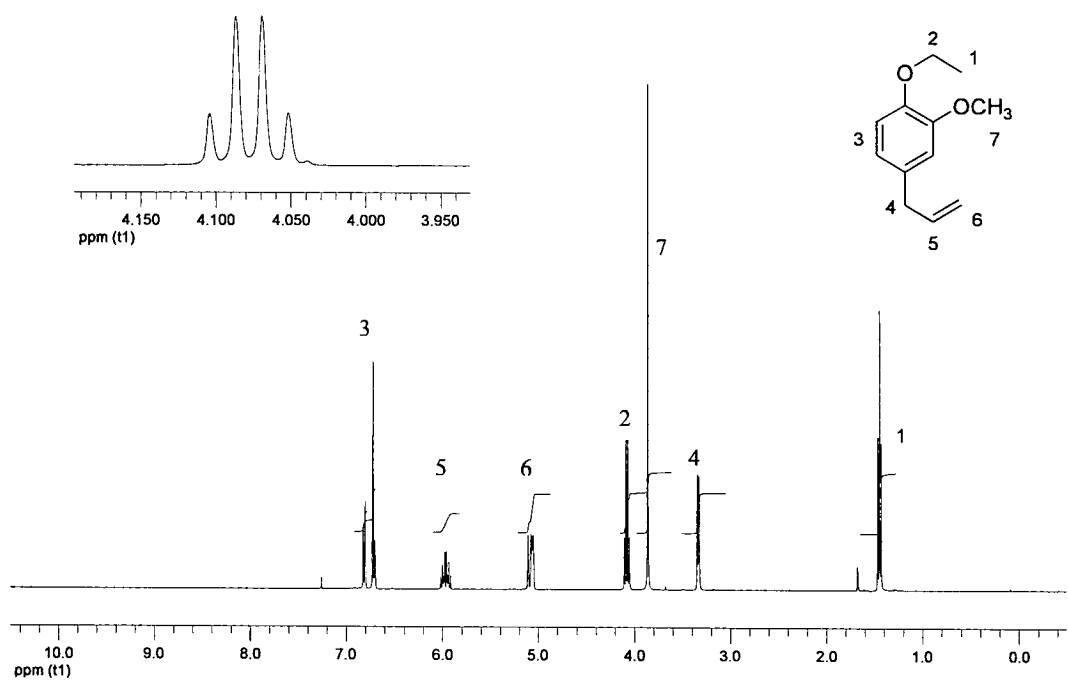
เช่นเดียวกับการใช้เบสเป็น NaH และ THF จะให้ผลผลิตร้อยละที่ต่ำกว่าและพบการปนเปื้อนของสารผลิตภัณฑ์ ส่วนสภาวะการทดลองที่ใช้เบสเป็น K_2CO_3 และอะซีโตนเป็นตัวทำละลาย แม้ว่าจะให้ผลผลิตร้อยละที่ต่ำกว่าแต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ ดังนั้นในการทดลองของปฏิกิริยาแอลคิลเลชันอื่นๆ จึงเลือกใช้สภาวะการทดลองที่มีเบสเป็น K_2CO_3 และอะซีโตนเป็นตัวทำละลาย

นอกจากนี้พบว่าปฏิกิริยาแอลคิลเลชันของหมู่แอลคิลที่เป็นโซ่ตรงจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีผลผลิตร้อยละสูงกว่าหมู่แอลคิลที่เป็นโซ่กิ่ง (เปรียบเทียบจากการทดลองที่ 3 กับ 6 และการทดลองที่ 9 กับ 10) ผลการทดลองที่ได้นี้อาจจะอธิบายได้จากผลของความเกะกะของหมู่แอลคิลที่เป็นโซ่กิ่งจึงทำให้การเข้าทำปฏิกิริยาเกิดขึ้นยากกว่า

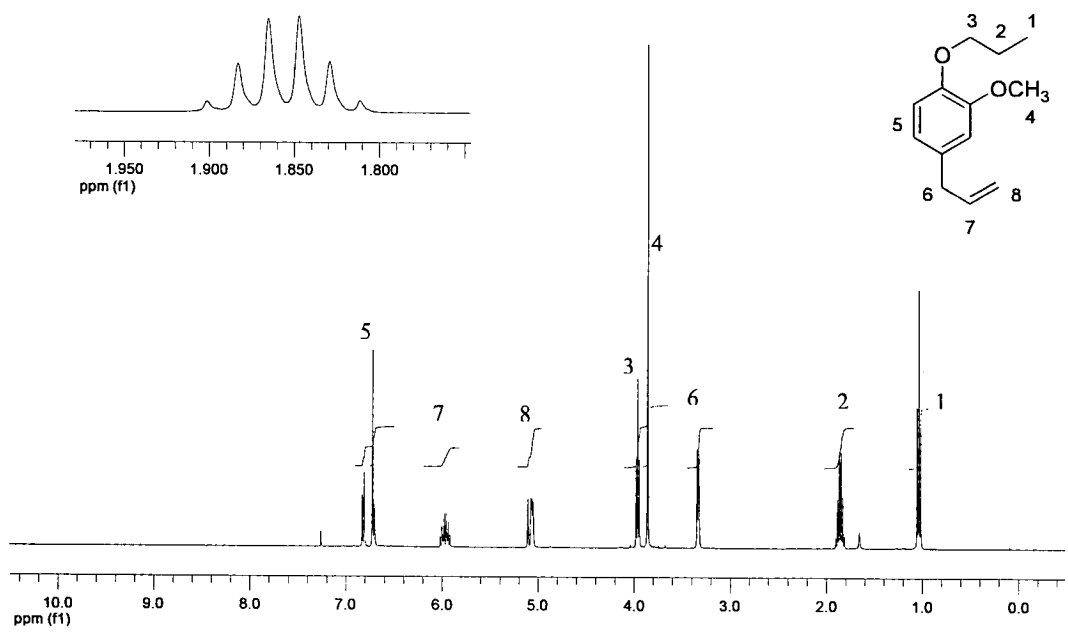
จากการศึกษาโครงสร้างของสารทั้งหมดที่ได้สังเคราะห์ด้วยวิธีเทคนิค Nuclear magnetic resonance (NMR) ออกมาจะพบว่าได้ผล 1H NMR สเปกตรัมสามารถยืนยันโครงสร้างของสารแต่ละตัวได้ดังนี้



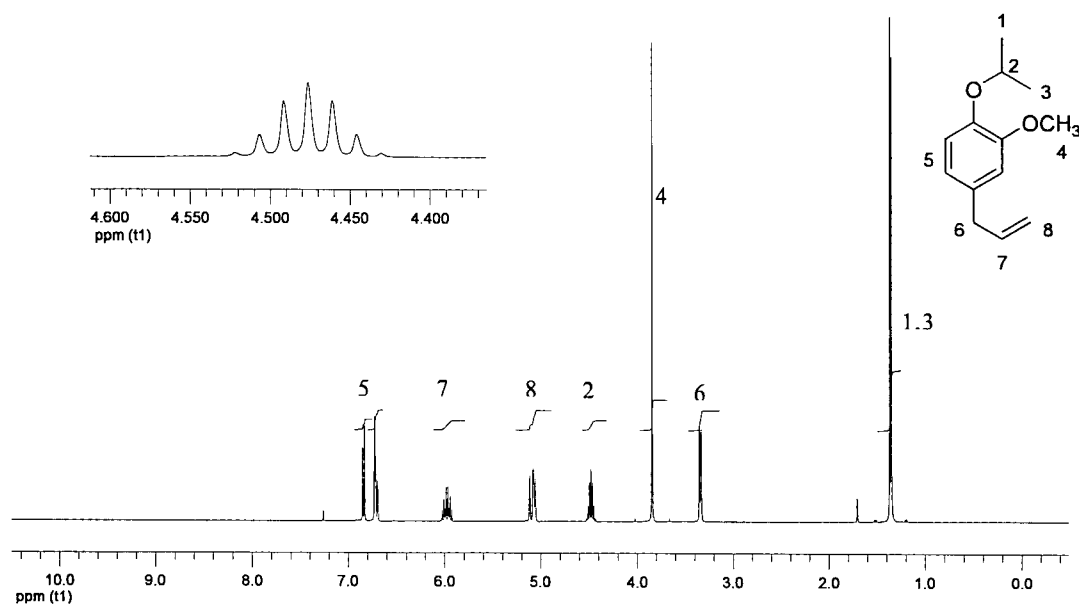
ภาพ 3.21 1H NMR สเปกตรัมของ methyl eugenol ที่สังเคราะห์ได้



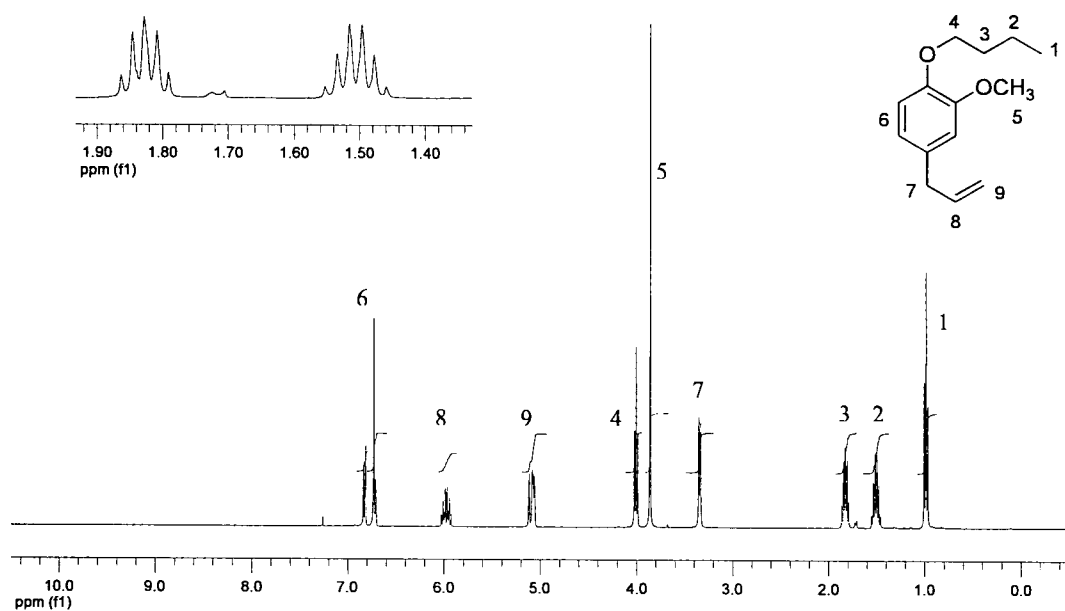
ภาพ 3.22 ^1H NMR สเปกตรัมของ ethyleugenol ที่สังเคราะห์ได้



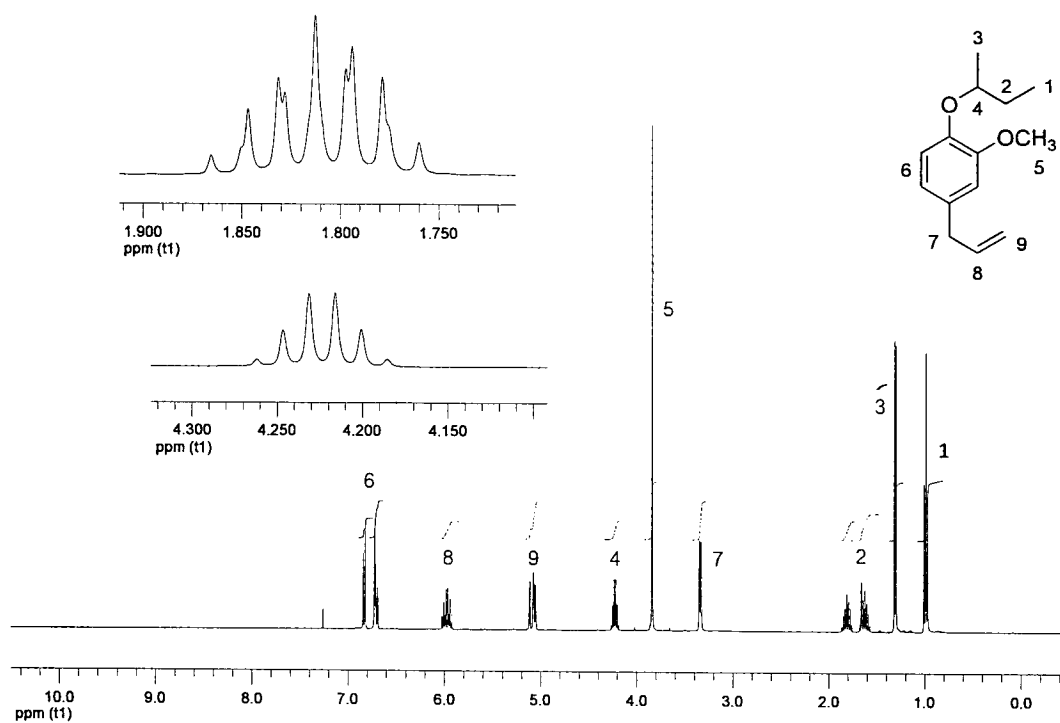
ภาพ 3.23 ^1H NMR สเปกตรัมของ propyleugenol ที่สังเคราะห์ได้



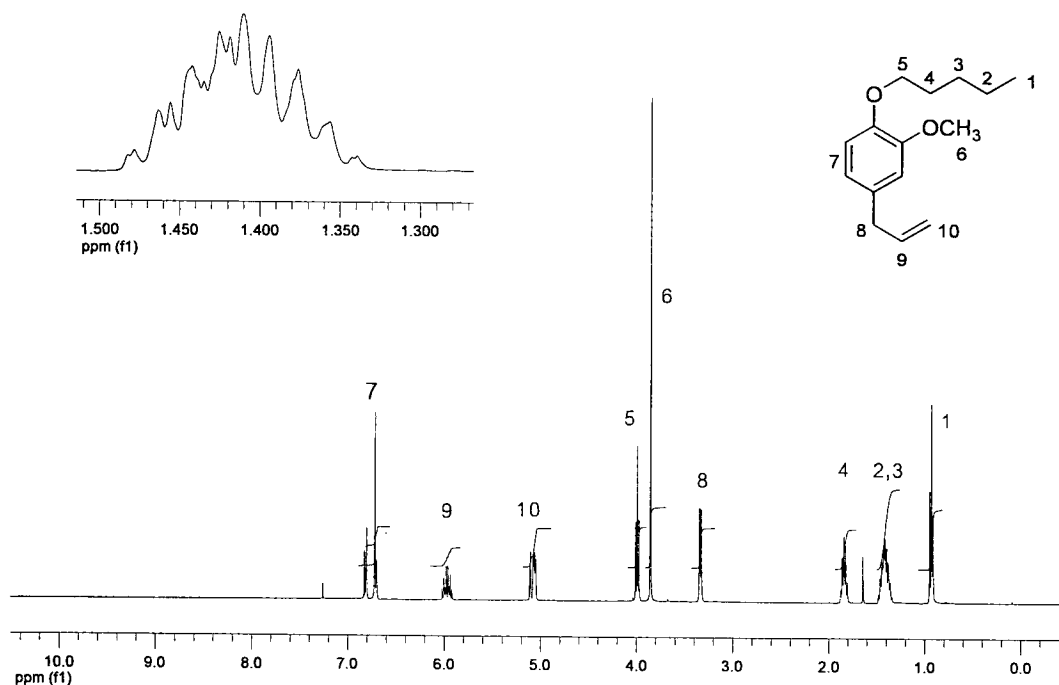
ภาพ 3.24 ^1H -NMR สเปกตรัมของ isopropyleugenol ที่สังเคราะห์ได้



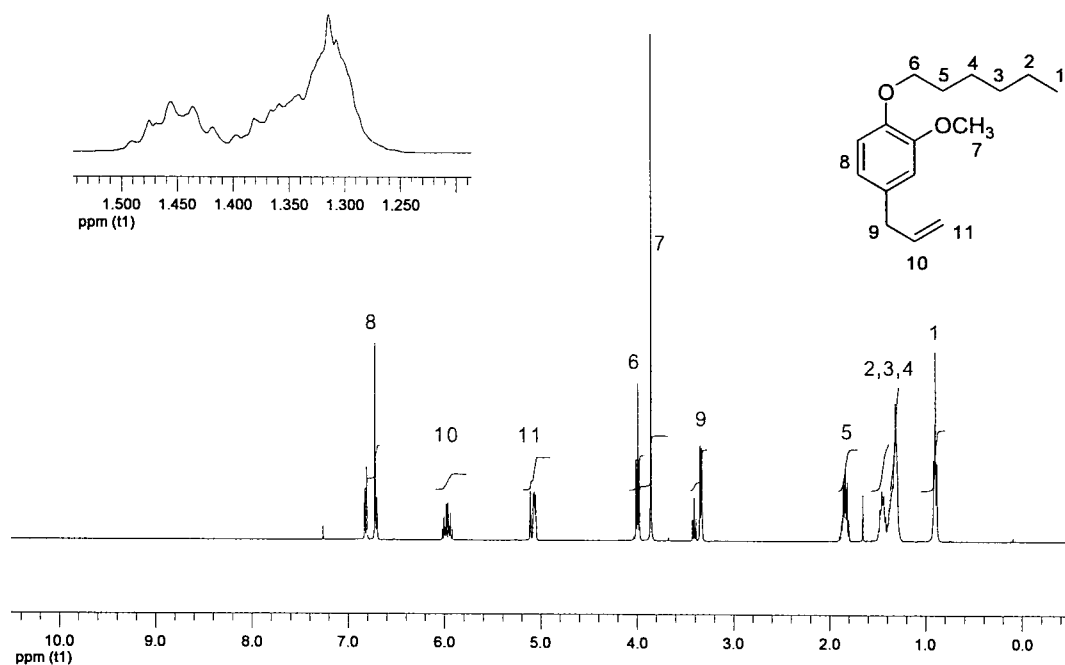
ภาพ 3.25 ^1H NMR สเปกตรัมของ butyleugenol ที่สังเคราะห์ได้



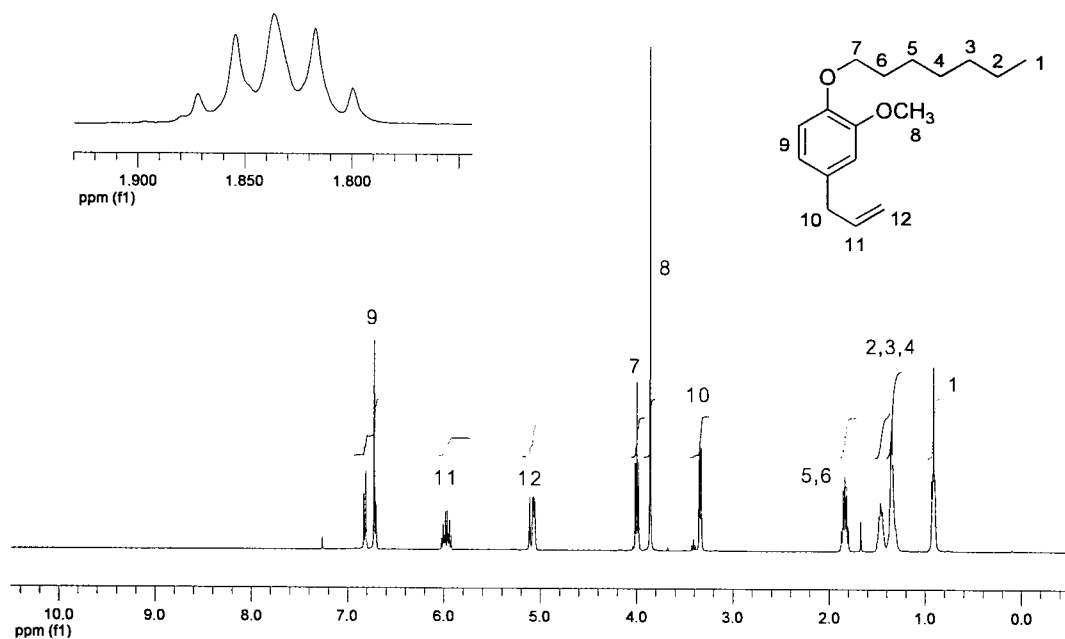
ภาพ 3.26 ^1H NMR สเปกตรัมของ sec-butyleugenol ที่สังเคราะห์ได้



ภาพ 3.27 ^1H NMR สเปกตรัมของ pentyleugenol ที่สังเคราะห์ได้

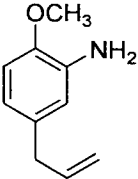
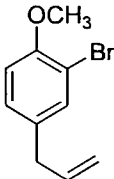


ภาพ 3.28 ^1H NMR สเปกตรัมของ hexyleugenol ที่สังเคราะห์ได้

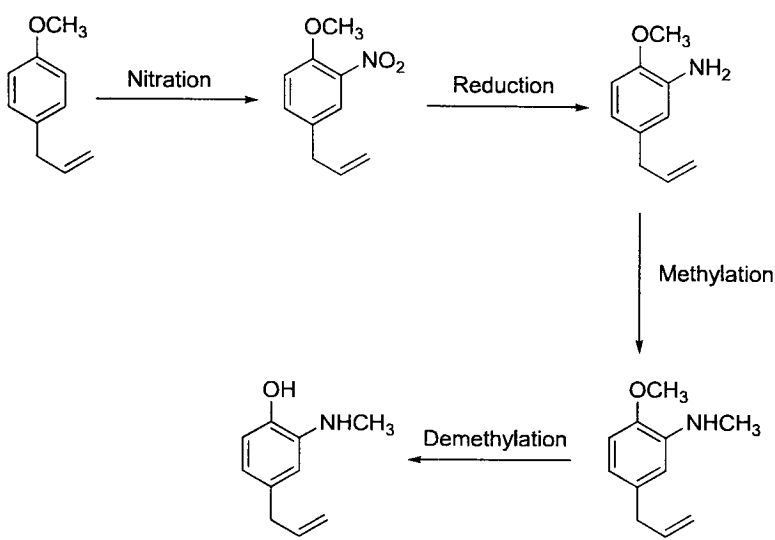


ภาพ 3.29 ^1H NMR สเปกตรัมของ heptyleugenol ที่สังเคราะห์ได้

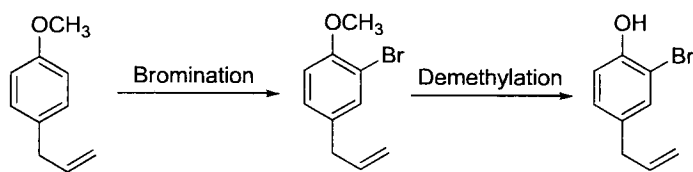
3.1.5 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 5 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ต่างๆ

	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	-	P29	
Name	5-allyl-2-hydroxy-N-methylaniline	4-allyl-2-bromophenol	

สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ ได้แก่ 5-allyl-2-hydroxy-N-methylaniline และ 4-allyl-2-bromophenol (P29) ซึ่งเป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่มีการแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ เช่น หมู่อะมิโน และหมู่โบรมิ เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบให้พันธะไฮโดรเจนหรือไฮโดรโฟบิกจะมีผลต่อฤทธิ์การสลายอย่างไร โดยได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล จากสารตั้งต้น 4-allylanisole โดย 5-allyl-2-hydroxy-N-methylaniline มีแนวทางการสังเคราะห์จากปฏิกิริยานาเตรชัน จะได้สารประกอบไนโตร แล้วจากจากนั้นทำการเปลี่ยนหมู่ไนโตรไปเป็นหมู่เอมีนด้วยปฏิกิริยารีดักชัน แล้วจึงทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันได้สารประกอบเป็น N-methylaniline และในขั้นสุดท้ายจะทำปฏิกิริยาดีเมทิลเลชันได้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น 5-allyl-2-hydroxy-N-methylaniline ส่วน 4-allyl-2-bromophenol สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาโบรมิเนชัน และปฏิกิริยาดีเมทิลเลชัน ซึ่งมีแผนการสังเคราะห์แสดงดังภาพ 3.30 และภาพ 3.31

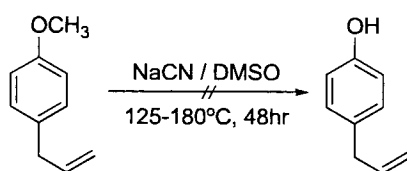


ภาพ 3.30 แผนการสังเคราะห์ 5-allyl-2-hydroxy-N-methylaniline



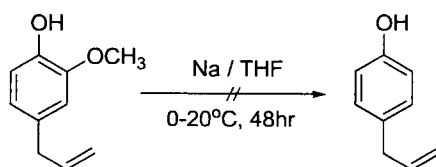
ภาพ 3.31 แผนการสังเคราะห์ 4-allyl-2-bromophenol

ในขั้นแรกนั้นได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนหมู่เมทอกซีของ 4-allylanisole ให้เป็นหมู่ไฮดรอกซีโดยใช้ปฏิกิริยาดีเมทิลเลชันตามรายงานจากเอกสารอ้างอิงของ Greene [19] ซึ่งแสดงปฏิกิริยาดังภาพ 3.32



ภาพ 3.32 ปฏิกิริยา Demethylation ของ 4-allylanisole

จากผลการทดลองปรากฏว่าปฏิกิริยาดีเมทิลเลชันของ 4-allylanisole ไม่ประสบความสำเร็จตามที่คาดหวัง แม้จะใช้สภาวะค่อนข้างรุนแรงที่อุณหภูมิประมาณ 180°C และใช้ระยะเวลาประมาณ 48 ชั่วโมงแล้วก็ตาม ในขั้นต่อมาจึงได้ลองเปลี่ยนแนวทางการสังเคราะห์โดยเริ่มจากยูจีนอล ทำปฏิกิริยากำจัดหมู่เมทอกซีอ้างอิงจากงานวิจัยของ Azzena และคณะ [20] ด้วยปฏิกิริยา demethoxylation ผ่านกลไกการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของโลหะ Na ในสารละลาย THF ปฏิกิริยาแสดงได้ดังภาพ 3.33

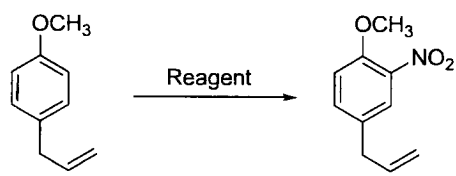


ภาพ 3.33 ปฏิกิริยา demethoxylation ของยูจีนอล

ผลปรากฏว่าปฏิกิริยาดีเมทอกซีเลชันของยูจีนอลก็ไม่ประสบความสำเร็จเช่นเดียวกับปฏิกิริยาดีเมทิลเลชัน ดังนั้นเพื่อเป็นการลดขั้นตอนในการสังเคราะห์ ผู้วิจัยจึงใช้ 4-allylanisole เป็นสารตั้งต้นโดยจะไม่มี การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ 4-allylanisole จากหมู่เมทอกซีเป็นหมู่ไฮดรอกซี ทั้งนี้เนื่องจากพิจารณาเห็นว่าฤทธิ์การสลับเบื่องต้นของ methyleugenol นั้น ไม่ต่างจากยูจีนอลมากนัก โดยคาดว่าหมู่ไฮดรอกซี หรือ หมู่เมทอกซี ในโครงสร้างดังกล่าว ไม่น่าจะมีผลกระทบมากนักต่อการออกฤทธิ์เป็นยาสลับในสัตว์น้ำ ดังนั้นจึงคงหมู่เมทอกซีไว้ดังเดิมโดยจะนำ 4-allylanisole มาศึกษาการทำปฏิกิริยาไนเตรชันและปฏิกิริยาโบรมิเนชันต่อไป

ในการศึกษาปฏิกิริยา nitration ของ 4-allylanisole โดยได้ทดลองรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ ในสภาวะต่างๆ ตามที่ได้ศึกษาจากเอกสารอ้างอิง โดยมีรายละเอียดการทดลองแสดงดังตาราง 3.10

ตาราง 3.10 ปฏิกิริยาไนเตรชัน ที่ใช้ในการสังเคราะห์ในครั้งนี้ เมื่อใช้ 4-allylanisole เป็นสารตั้งต้น



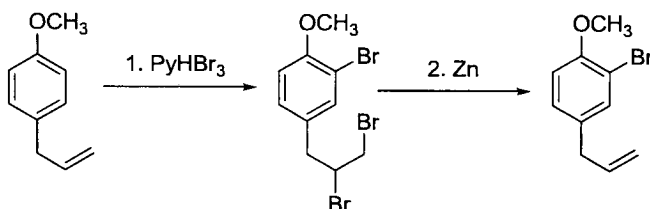
ลำดับ	รีเอเจนต์ / สภาวะ	ร้อยละผลผลิต	เอกสารอ้างอิง
1	Urea nitrate, AcOH / 60 °C, 24 h	NR	[15]
2	Ac ₂ O, HNO ₃ / 0 °C, 4 h	NR	[16]
3	H ₂ SO ₄ , HNO ₃ , Ac ₂ O / RT, 4 h	NR	[16]
4	TBAB, HNO ₃ / 20 °C, 4-6 h	NR	[16]
5	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O, CH ₂ Cl ₂ / 40 °C, 8 h (silica gel)	NR	[17]
6	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O, Al ₂ O ₃ , Toluene / 100 °C, 8 h	NR	[17]
7	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O, Toluene / 100 °C, 8 h	NR	[17]
8	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O, CH ₂ Cl ₂ / 40 °C, 8 h (MS4A)	NR	[17]

NR = No reaction

จากตาราง 3.10 พบว่าปฏิกิริยาไนเตรชันที่ใช้ urea nitrate เป็นรีเอเจนต์ โดยมีกรดอะซิติกเป็นตัวทำละลายนั้น อ้างอิงจากงานวิจัยของ Nitin และคณะ [21] ไม่ประสบผลสำเร็จตามที่คาดหวังจึงได้ศึกษาการทำปฏิกิริยาไนเตรชันด้วยวิธีใหม่ คือ วิธีที่ 2 3 และ 4 ซึ่งวิธีดังกล่าวจะใช้กรดไนตริกเป็นรีเอเจนต์ทั้งหมดร่วมกับสารชนิดอื่น ได้แก่ acetic anhydride, sulfuric acid, หรือ TBAB ตามลำดับ โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Joshi และคณะ [22] พบว่าไม่ประสบความสำเร็จตามที่คาดหวัง จึงได้ลองเปลี่ยนวิธีการทดลองใหม่โดยศึกษาปฏิกิริยาไนเตรชันอีกกลุ่มคือการใช้ Bi(NO₃)₃·5H₂O เป็นแหล่งให้หมู่ไนโตร โดยวิธีที่ 5 ใช้ CH₂Cl₂ เป็นตัวทำละลาย ที่อุณหภูมิ 40 °C ส่วนวิธีที่ 6 และ 7 จะใช้ toluene เป็นตัวทำละลาย โดยวิธีที่ 6 มีการใช้ Al₂O₃ เป็นรีเอเจนต์ร่วมด้วย โดยทั้งหมดอ้างอิงจากงานวิจัยของ Canales และคณะ [23] อย่างไรก็ตามก็พบว่ายังไม่สามารถเกิดผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ ทั้งนี้่าจะเนื่องมาจากสภาวะต่างๆ ดังกล่าวตามที่อ้างอิงจะกระทำกับสารตั้งต้นที่เป็นอนุพันธ์อย่างง่ายของฟีนอล ในขณะที่งานวิจัยนี้เริ่มต้นจาก 4-allylanisole ซึ่งคาดว่าส่วนของหมู่แอลลิล ซึ่งเป็น electron-rich region น่าจะมี

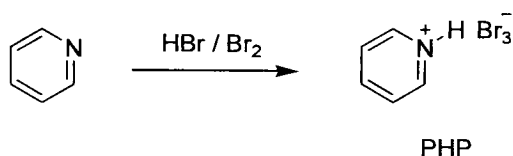
ผลกระทบทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาตามที่ต้องการ หรืออาจจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่นๆ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาวิธีการสังเคราะห์ 4-Allyl-2-bromoanisole ด้วยปฏิกิริยาโบรมิเนชันแทน

ปฏิกิริยาโบรมิเนชัน ซึ่งใช้ในการสังเคราะห์ 4-Allyl-2-bromoanisole นั้นอ้างอิงการทดลองของ Chuen [24] โดยมีรูปแบบและขั้นตอนการเตรียมแสดงดังภาพ 3.34

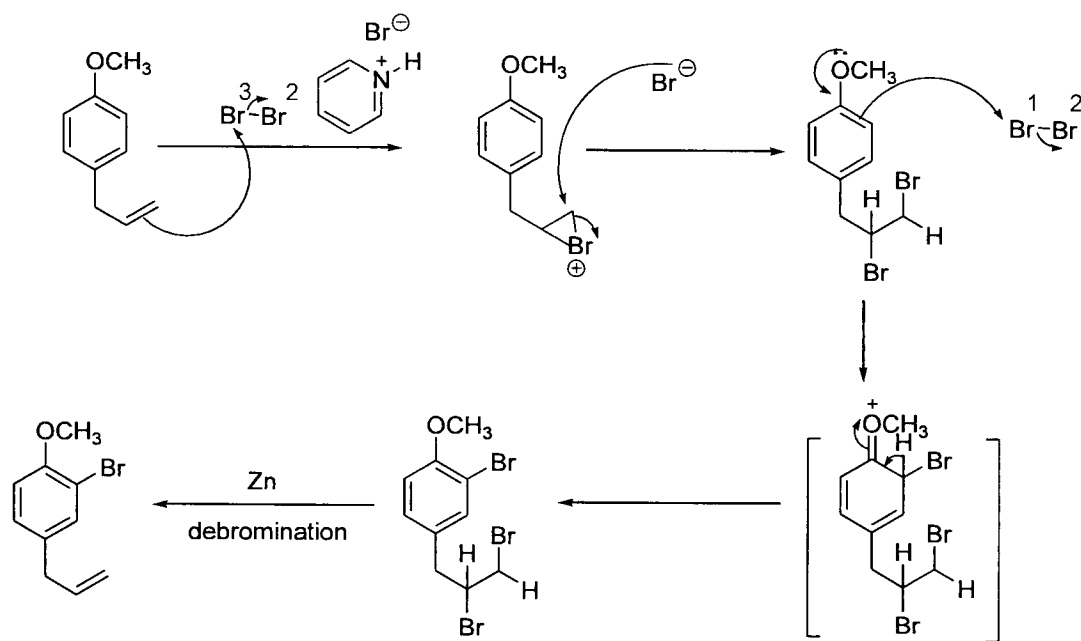


ภาพ 3.34 ปฏิกิริยาโบรมิเนชันของ 4-allylanisole

ในปฏิกิริยานี้จะใช้ pyridinium hydrobromide perbromide (PHP) เป็นแหล่งให้โบรมีน โดยสามารถเตรียมได้จากการนำกรดไฮโดรโบรมิกเติมลงในสารละลายไพริดีนที่สภาวะ 0 °C จากนั้นเติมโบรมีนลงไปจะได้ของแข็งสีเหลืองอมส้ม แล้วนำออกมาทำให้แห้ง ซึ่งการเตรียม Pyridinium hydrobromide perbromide แสดงดังสมการ

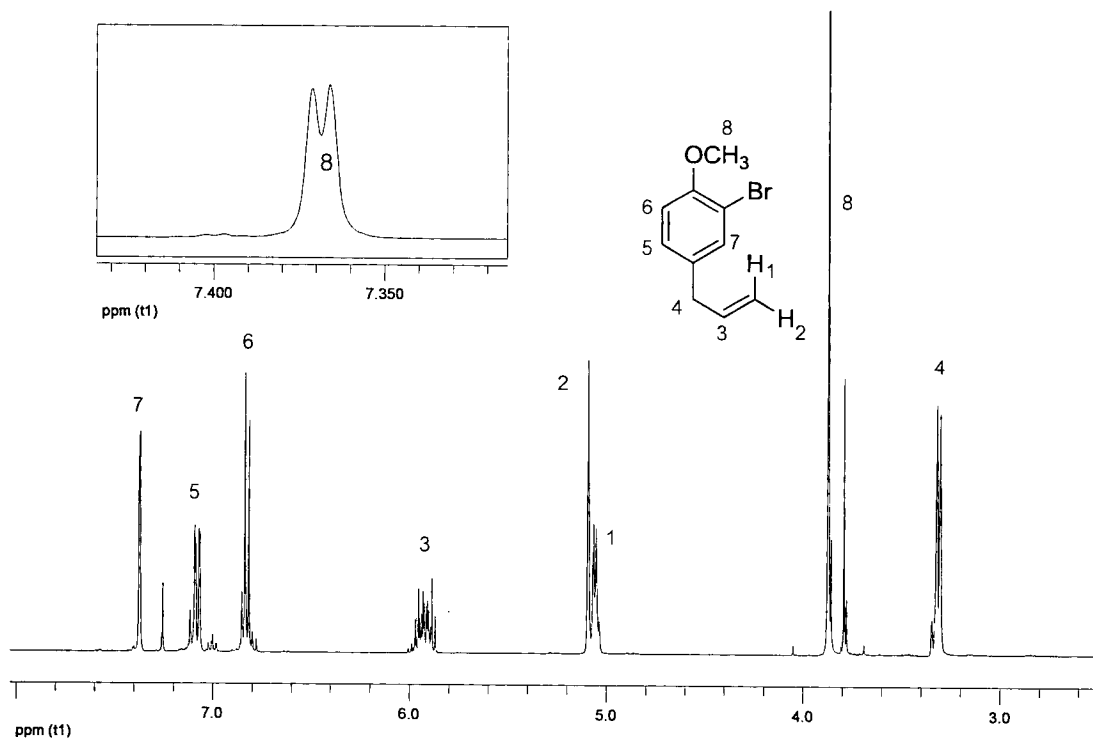


กลไกการเกิดปฏิกิริยาขั้นแรกจะเกิดการเติมโบรมีนที่ตำแหน่งพันธะคู่ แล้วจึงเกิดการแทนที่ด้วยโบรมีนบนวงแหวนเบนซีน ได้สารมัธยันต์ที่มีการเติมและการแทนที่ขึ้นก่อน ในขั้นตอนต่อมาจึงทำปฏิกิริยาด้วยโลหะสังกะสีในสารละลายไดเอทิลอีเทอร์ที่สภาวะรีฟลักซ์ที่ 35-40 °C ซึ่งจะเกิดการกำจัดโบรมีนที่ตำแหน่งพันธะคู่เดิม (debromination) ทำให้ได้พันธะคู่กลับมาได้ผลิตภัณฑ์เป็น 4-allyl-2-bromoanisole ตามที่ต้องการ โดยการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 3.35



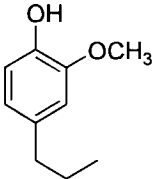
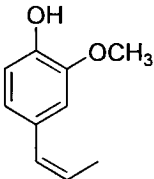
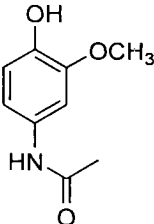
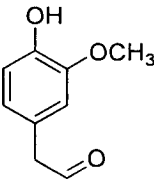
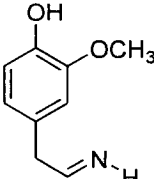
ภาพ 3.35 กลไกการเกิดปฏิกิริยาโบรมีนชันด้วย PyHBr_3 ของ 4-allylanisole

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถยืนยันโครงสร้างด้วย ^1H NMR ดังภาพ 3.36



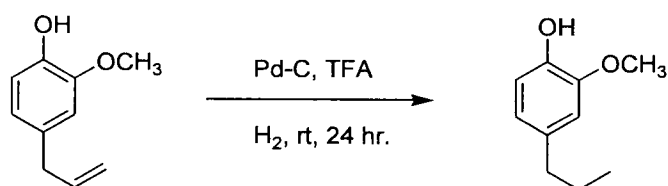
ภาพ 3.36 ^1H NMR spectrum ของสาร 4-Allyl-2-bromoanisole ใน CDCl_3

3.1.6 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 6 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่แอลลิล

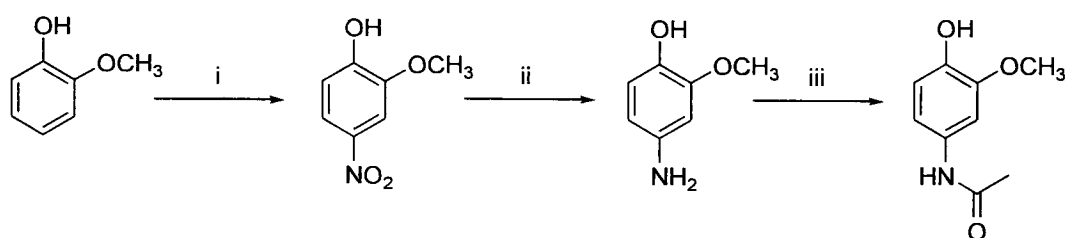
	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	P4	P26	
Name	2-methoxy-4-propylphenol	Isoeugenol	
โครงสร้าง			
Code	-	-	-
Name	N-acetyl-4-amino guaiacol	2-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl)acetaldehyde	4-(2-iminoethyl)-2-ethoxyphenol

สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ ได้แก่ 2-methoxy-4-propylphenol (P4), Isoeugenol (P26), N-acetyl-4-amino guaiacol, 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetaldehyde และ 4-(2-iminoethyl)-2-ethoxyphenol ซึ่งเป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่มีการแทนที่หมู่แอลลิลให้เป็นหมู่ไฮโดรโฟบิกชนิดอื่นๆ เช่น โพรพิล เป็นต้น รวมทั้งหมู่ที่มีโครงสร้างและความยาวพันธะคล้ายกับหมู่แอลลิล เช่น methylene carbonyl, methylene imine เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบใดจะมีผลต่อฤทธิ์การสลับอย่างไร โดย Isoeugenol (P26) นั้นเป็นสารที่มีจำหน่ายของบริษัท Acros Chemical และนำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์การเป็นยาสลับโดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ส่วน 2-methoxy-4-propylphenol (P4) นั้นสามารถสังเคราะห์ได้โดยใช้ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันของยูจีนอล โดยใช้โลหะพาลลาเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาใน trifluoroacetic acid (TFA) ภายใต้สภาวะแก๊สไฮโดรเจน [25] โดยจะเกิดการเติมไฮโดรเจนเข้าที่หมู่แอลลิลเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ 2-methoxy-4-propylphenol (PMP) (P4) ผลผลิตร้อยละ 82 แสดงดังภาพ 3.37

ส่วนการสังเคราะห์ N-acetyl-4-amino guaiacol นั้นมีแนวทางการสังเคราะห์แสดงดังภาพ 3.38 โดยเริ่มจากสารตั้งต้น guaiacol ทำปฏิกิริยาไนเตรชันเพื่อแทนที่หมู่ไนโตรลงในวงเบนซีนและจากนั้นทำการรีดิวซ์หมู่ไนโตรให้กลายเป็นหมู่อะมิโน และในขั้นสุดท้ายทำปฏิกิริยาอะเซทิลเลชัน ก็จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น N-acetyl-4-amino guaiacol ที่แทนที่หมู่แอลลิลในยูจีนอลด้วยหมู่ N-acetyl ที่มีลักษณะคล้ายหมู่แอลลิล



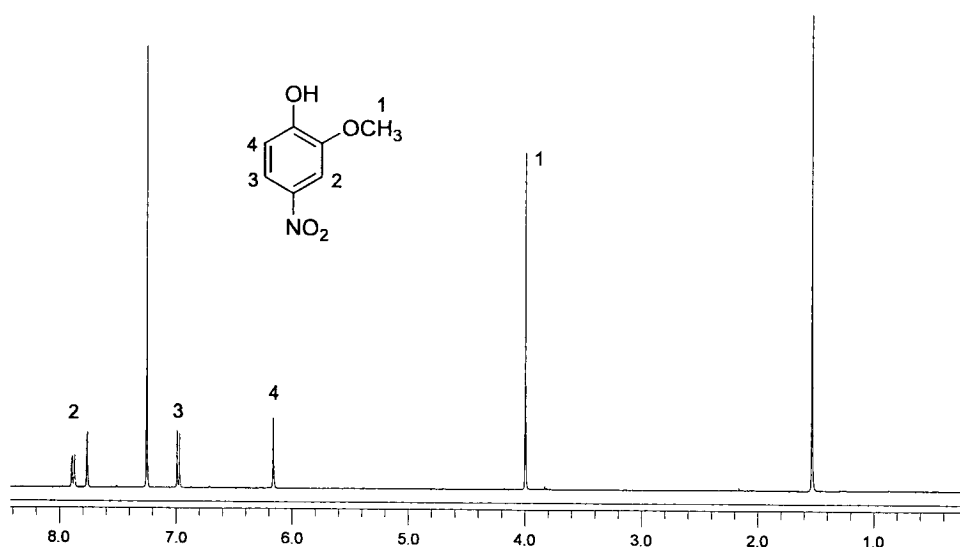
ภาพ 3.37 การสังเคราะห์ 2-methoxy-4-propylphenol ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน



Reagents and conditions: i. $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, CH_2Cl_2 , 0°C or $\text{NaNO}_3/\text{KHSO}_4$, $\text{SiO}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1:1), CH_2Cl_2 , rt [26];
ii. Zn/HCl , 0°C , iii. AcCl , DMF

ภาพ 3.38 แนวทางการสังเคราะห์ *N*-acetyl-4-aminoguaiacol

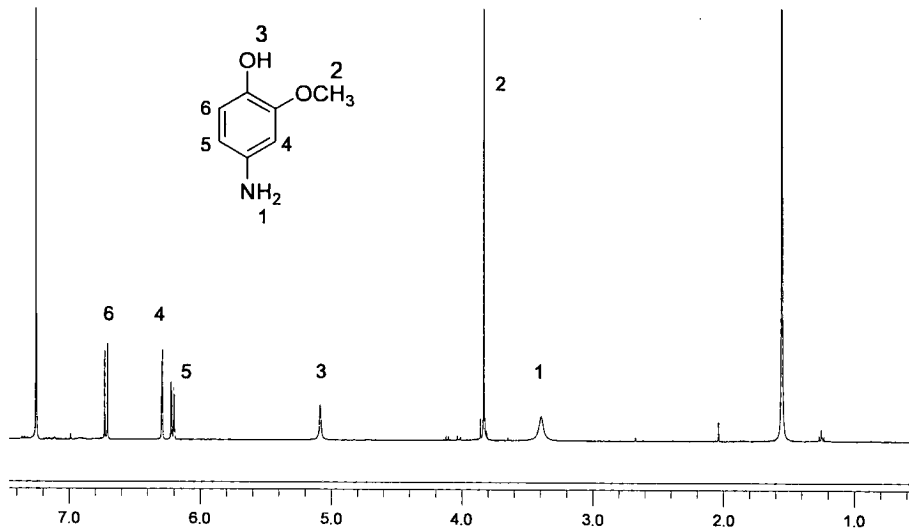
ปฏิกิริยาการแทนที่หมู่ไนโตรลงบนวงเบนซีน โดยใช้ Guaiacol เติม Urea nitrate และ CH_3COOH เป็นรีเอเจนต์ที่อุณหภูมิ 60°C ได้สารผลิตภัณฑ์เป็น 4-nitroguaiacol ได้ผลผลิตร้อยละ 13.5 ผลจาก NMR สเปกตรัมของสารที่ได้จากปฏิกิริยาในเตรนซ์แสดงดังภาพ 3.39



ภาพ 3.39 ^1H NMR สเปกตรัมของ 4-nitroguaiacol ใน CDCl_3 ที่สังเคราะห์ได้จาก

Condition: Urea nitrate, CH_3COOH , 60°C

จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation) โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น 10%mol Pd/C และใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ภายใต้สภาวะแก๊สไฮโดรเจน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 4-aminoguaiacol ได้ผลผลิตร้อยละ 29.4 ดังแสดงในภาพ 3.40 ผลจาก NMR สเปกตรัมของสารที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน

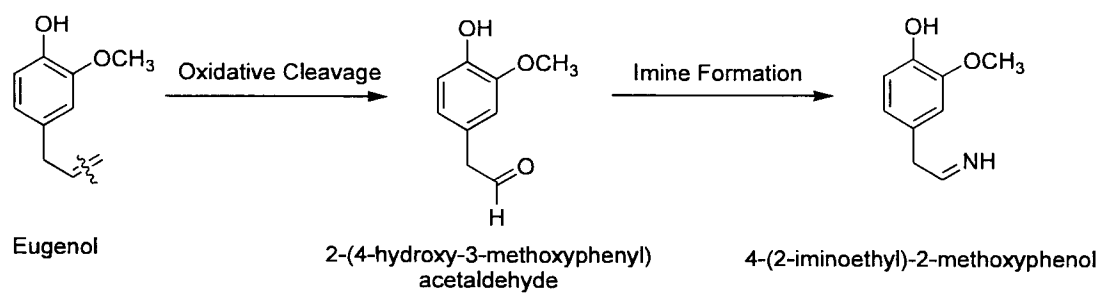


ภาพ 3.40 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4-aminoguaiacol ใน CDCl₃ ที่สังเคราะห์ได้จาก

Condition: 10%mol Pd/C, H₂

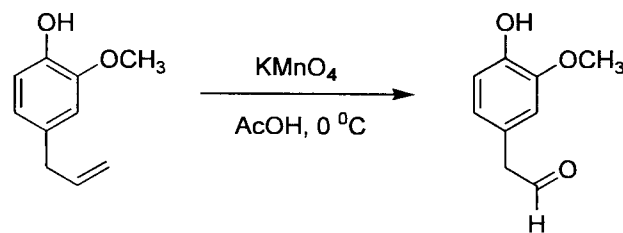
อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาอะเซทิลเลชันของ 4-aminoguaiacol นั้นยังไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสังเคราะห์ *N*-acetyl-4-aminoguaiacol ได้ตามที่วางแผนไว้

เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetaldehyde และ 4-(2-iminoethyl)-2-ethoxyphenol ซึ่งมีแผนการสังเคราะห์โดยใช้สารตั้งต้นประเภทอนุพันธ์ของยูจีนอลและใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างๆ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแบบ Oxidative Cleavage เพื่อให้เกิดการสลายพันธะคู่ในตำแหน่งคาร์บอนส่วนปลายของยูจีนอล เพื่อให้เกิดการแทนที่ของหมู่แอลดีไฮด์ที่ตำแหน่งคาร์บอนส่วนปลายของยูจีนอล จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetaldehyde ในขั้นตอนแรกมาทำการสังเคราะห์ต่อด้วยปฏิกิริยา Imine Formation ด้วยแอมโมเนียเพื่อเปลี่ยนหมู่แอลดีไฮด์ให้เป็นหมู่อิมีนตรงตำแหน่งแอลดีไฮด์เป็นไปตามแผนการสังเคราะห์ทั่วไป ดังภาพ 3.41



ภาพ 3.41 แผนการสังเคราะห์ 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetaldehyde และ 4-(2-iminoethyl)-2-ethoxyphenol

จากรายงานในเอกสารอ้างอิง พบว่ามีการสังเคราะห์ 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acetaldehyde โดยใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้นและใช้โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและใช้กรดอะซิติกมีตัวทำละลายเป็นน้ำ [27] ทำการทดลองที่ 0°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แต่พบว่าไม่เกิดผลิตภัณฑ์เนื่องจากเวลาหรือสภาวะในการทำทดลองไม่เหมาะสม



ภาพที่ 3.42 ปฏิกิริยา Oxidative Cleavage ในการสังเคราะห์ 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acetaldehyde

จึงได้ทดลองเปลี่ยนสภาวะการทำปฏิกิริยาและรีเอเจนต์ต่างๆ ดังแสดงในตาราง

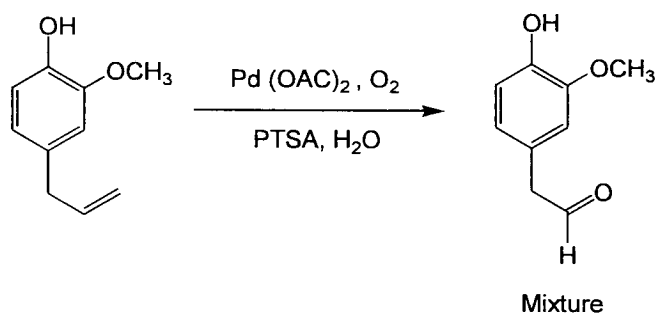
ตาราง 3.11 แสดงผลการทดลองปฏิกิริยา Oxidative Cleavage ในสภาวะต่างๆ

วิธี	สภาวะ	ตัวทำละลาย	อุณหภูมิ	%Yield
1	KMnO ₄ / AcOH	H ₂ O	0°C	-
2	Na ₂ Cr ₂ O ₇ / AcOH	H ₂ O	-	-
3	K ₂ Cr ₂ O ₇ / AcOH	H ₂ O	-	-
4	3%mol Pd(OAc) ₂ / PTSA, O ₂	H ₂ O	-	ของผสม
5	KMnO ₄	THF	40°C	-
6	10%mol PdCl ₂ / CuCl, O ₂	DMF:H ₂ O(7:1)	80°C	ของผสม
7	CoCl ₂ / O ₂	CH ₃ CN	75°C	-

จากการทดลองในตาราง พบว่าปฏิกิริยาส่วนใหญ่ยังมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ ส่วนปฏิกิริยาที่คาดว่าจะเกิดผลิตภัณฑ์ มี 2 วิธี คือ วิธีที่ 4 และ วิธีที่ 6 โดยพบว่าเกิดผลิตภัณฑ์แต่ยังคงมีสารผสมอื่นๆ โดยมีรายละเอียดดังนี้

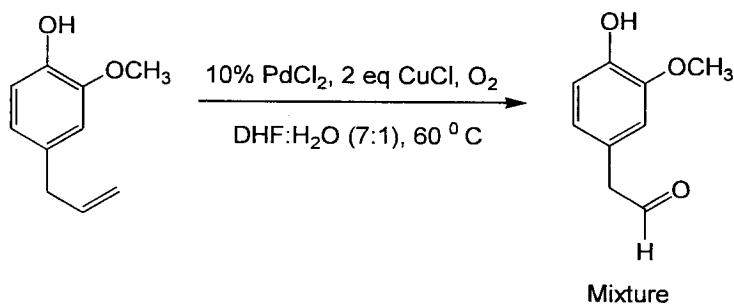
จากวิธีที่ 1 และ 5 ที่ใช้โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายที่สภาวะแตกต่างกัน โดยคาดหวังว่าให้โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์โดยเติม O_2 เข้าไปแล้วเกิดเป็นแอลดีไฮด์ตรงตำแหน่ง $C=C$ ตรงส่วนปลายของยูจีนอล แต่ทั้งนี้ในสองวิธีนี้ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ อาจเนื่องมาจากโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ค่อนข้าง sensitive กับความชื้น ซึ่งความชื้นนี้อาจจะมีผลทำให้รีเอเจนต์เสื่อมสภาพได้ เพราะเก็บไว้เป็นเวลานานและอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้ นอกจากนี้ ยังอาจจะเกิด over-oxidation โดยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตจะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่แอลดีไฮด์ของผลิตภัณฑ์ และเปลี่ยนหมู่แอลดีไฮด์ไปเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก ทำให้ไม่ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ

จากนั้นผู้ทำการทดลองจึงเปลี่ยนวิธี โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยามาเป็นแพลลาเดียมอะซิเตต ในวิธีที่ 4 นั้นคาดว่าจะเกิดผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่า เพื่อเปลี่ยนแอลคีนไปเป็นแอลดีไฮด์ อย่างไรก็ตามพบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารผสม แสดงดังภาพ 3.43



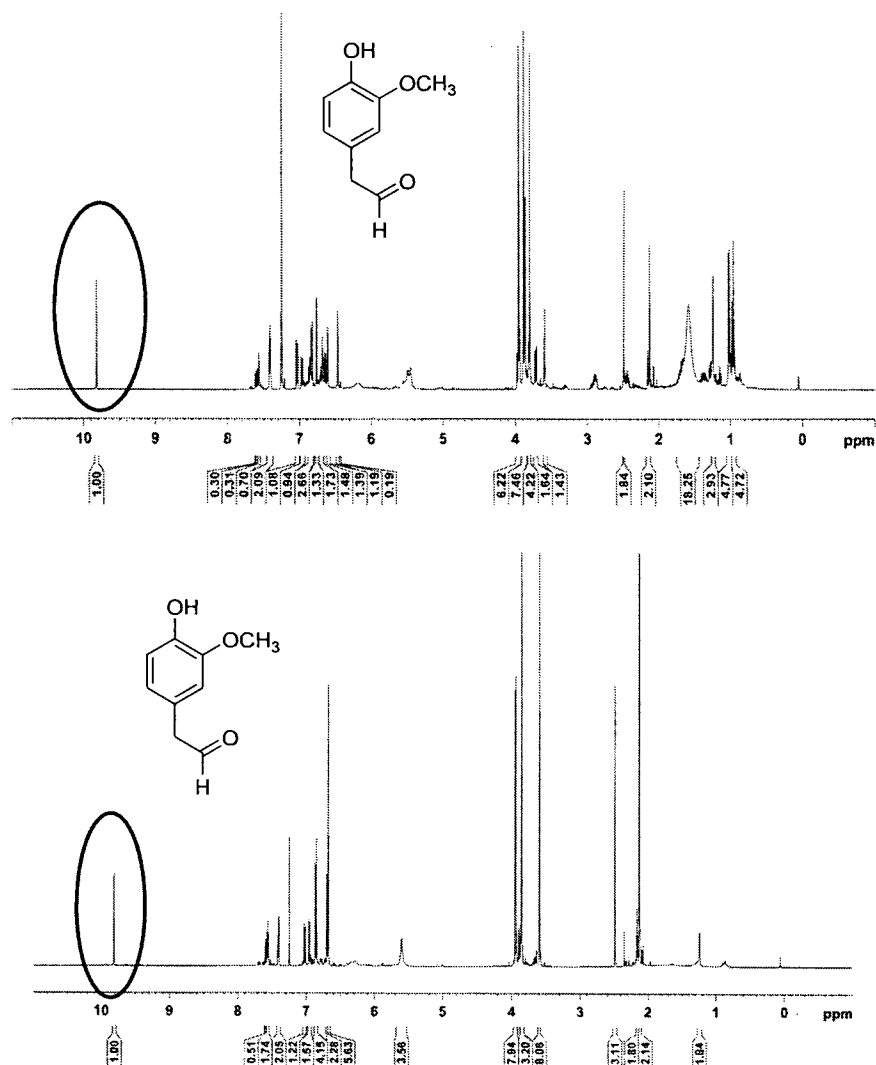
ภาพ 3.43 การเกิดปฏิกิริยา Oxidative cleavage โดยใช้แพลลาเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ส่วนปฏิกิริยาที่ใช้ แพลลาเดียมคลอไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในวิธีที่ 6 นั้นคาดว่าจะสามารถเปลี่ยนแอลคีนไปเป็นหมู่แอลดีไฮด์ได้ โดยพบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารผสม แสดงดังภาพ 3.44 โดยนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย NMR



ภาพ 3.44 กลไกการเกิดปฏิกิริยา Oxidative cleavage โดยใช้แพลลาเดียมคลอไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมสามารถยืนยันโครงสร้างของหมู่ที่เกิดเป็นแอลดีไฮด์โดยมีค่า chemical shift ปรากฏพีคที่ 9.80 ppm ของ CHO ของหมู่แอลดีไฮด์ดังแสดงในภาพ 3.45

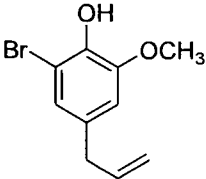
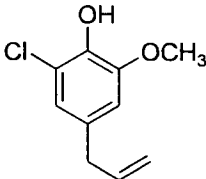
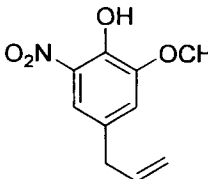
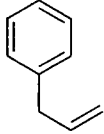


ภาพ 3.45 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acetaldehyde

ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีที่ 4 และวิธีที่ 6

จากผลการทดลอง $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้แพลลาเดียมอะซิเตตและออกซิเจนเป็นรีเอเจนต์ (วิธีที่ 4) และจากการสังเคราะห์โดยใช้แพลลาเดียมคลอไรด์เป็นรีเอเจนต์ (วิธีที่ 6) ซึ่งเกิดสเปกตรัมของแอลดีไฮด์ที่ 9.80 ppm และผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นสารผสมเช่นเดียวกัน จากการวิเคราะห์ที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$ ที่ได้จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลที่ใช้ปฏิกิริยาของ Oxidative cleavage จะเกิดพีคของแอลดีไฮด์เกิดขึ้นแล้วเกิดพีคของสารผสมที่มีสิ่งปนเปื้อนอยู่ ซึ่งยังไม่สามารถแยกสารผสมออกจากกันได้ โดยจะนำไปหาวิธีในการแยกต่อไป

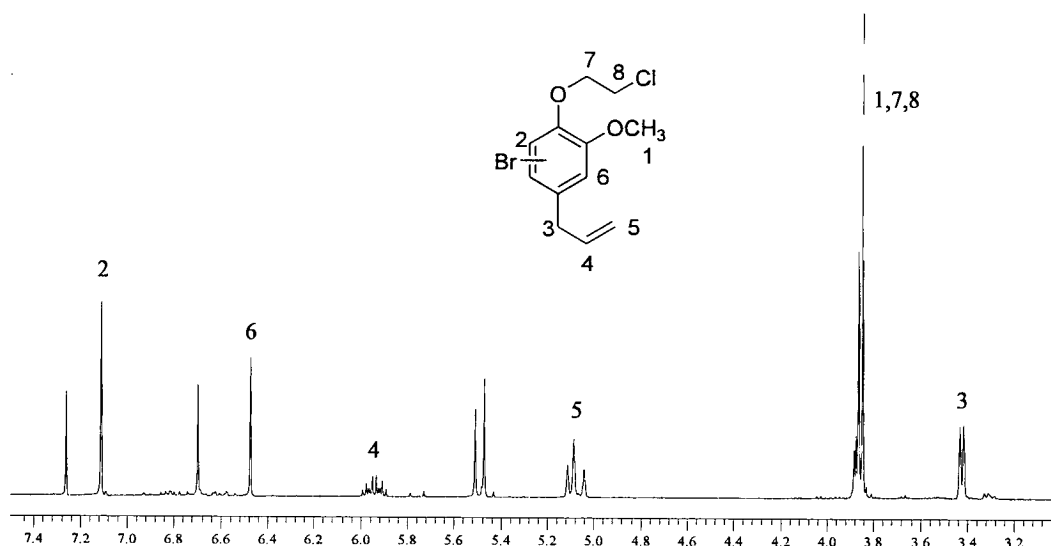
3.1.7 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ กลุ่มที่ 7 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการนำยูจีนอลมาทำปฏิกิริยาต่าง ๆ และกลุ่มที่ 8 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการปรับปรุงโครงสร้างหลายตำแหน่งพร้อมกัน

	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	P24	-	P25
Name	Bromoeugenol	Chloroeugenol	Nitro Eugenol
โครงสร้าง			
Code	P2		
Name	Allylbenzene		

สารอนุพันธ์ในกลุ่มที่ 7 และกลุ่มที่ 8 ได้แก่ Bromoeugenol (P24), Chloroeugenol, Nitro Eugenol (P25) และ Allylbenzene (P2) ซึ่งเป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่นำมาทำปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว เช่น แอลคิเลชัน แอลคิลเลชัน หรือออกซิเดชัน เป็นต้น เพื่อให้ได้อนุพันธ์ของยูจีนอลแบบต่างๆ เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบใดจะมีผลต่อฤทธิ์การสลายอย่างไร หรือเป็นการออกแบบการปรับโครงสร้างหลายตำแหน่ง เช่น บริเวณที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี หรือบริเวณที่เป็นหมู่เมทอกซี ซึ่งการออกแบบในหัวข้อนี้ จะขึ้นอยู่กับข้อมูลผลการทดสอบฤทธิ์ในการสลายของอนุพันธ์ทั้งหมด โดย Allylbenzene (P2) นั้นเป็นสารที่มีจำหน่ายของบริษัท Fluka และนำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์การเป็นยาสลายโดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ส่วน Bromoeugenol (P24) และ Nitro Eugenol (P25) นั้นสามารถสังเคราะห์ได้โดยใช้ปฏิกิริยาโบรมิเนชัน และไนเตรชันของยูจีนอล ตามลำดับ

ผู้ทดลองได้ทดลองทำปฏิกิริยาโบรมิเนชันโดยใช้สารตั้งต้นเป็นยูจีนอลทำปฏิกิริยากับ Br₂ ในตัวทำละลายเป็น 1,2-dichloroethane ปรับอุณหภูมิไปที่ 0°C ในขั้นตอนนี้สารผสมมีลักษณะเป็นของเหลวใสสีส้ม หลังคนทิ้งไว้นาน 3 ชั่วโมง ทำการติดตามการเกิดปฏิกิริยากับ TLC ในระบบตัวทำละลายเป็นสารผสมระหว่าง ethyl acetate และ hexane ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 พบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งต่ำกว่าตำแหน่งของยูจีนอล จากนั้นทำการเติมน้ำเพื่อหยุดปฏิกิริยาและเติม sodium metabisulfite (Na₂S₂O₅) เพื่อทำการกำจัดโบรมีนที่เหลือออก ให้เกิดเป็น NaBr เมื่อโบรมีนที่เหลือถูกกำจัดออกหมดสารละลายมีลักษณะสีขาวขุ่น จากนั้นทำการสกัดด้วย dichloromethane (CH₂Cl₂) และทำการตรวจสอบอีกครั้งด้วย TLC เพื่อให้แน่ใจว่าสารที่สกัดออกมานั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

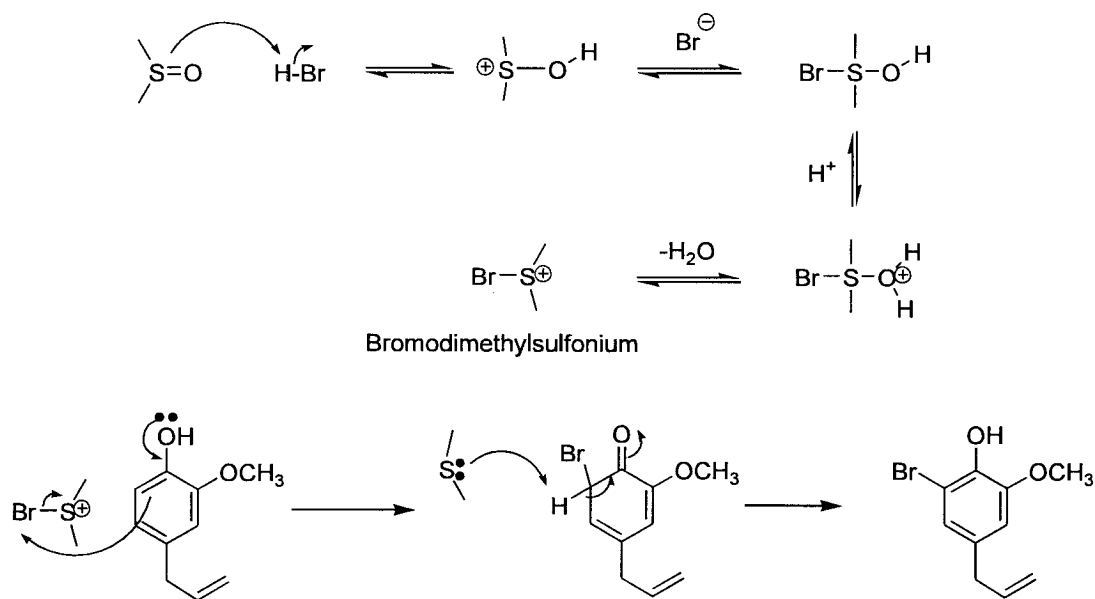
จากนั้นทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้วละลายด้วย ethanol ทำการเติม Zn powder เพื่อเป็นตัว reduce Br ในปฏิกิริยาที่อาจจะมี Br เข้าไปแทนที่ในหลายตำแหน่ง โดยเฉพาะตำแหน่งของหมู่ allyl ให้กลับมาเป็น alkene เหมือนเดิม ในขั้นตอนนี้สารละลายมีลักษณะเป็นสีเทาขุ่น จากนั้นทำการเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 60°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้วทำการกรองเอาผงสังกะสีออกและระเหยตัวทำละลาย สุดท้ายสกัดด้วยน้ำจะได้สารละลายที่มีลักษณะใสไม่มีสี นำมาทำให้สารมีความบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ในระบบตัวทำละลายเป็นสารผสมระหว่าง ethyl acetate และ hexane ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อน จากนั้นส่งทดสอบเพื่อหาเอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ผลจากการทดสอบหาเอกลักษณ์ของสารพบว่านอกจากจะมีหมู่ Br แทนที่เข้าไปบนวงอะโรมาติกของยูจีนอลแล้ว คาดว่าน่าจะมีการแทนที่ของ 1,2-dichloroethane ตรงตำแหน่ง -OH ของยูจีนอล ซึ่งไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการโดย NMR spectrum แสดงดังภาพ 3.46 จึงทำการปรับเปลี่ยนสภาวะการทดลอง



ภาพ 3.46 ^1H NMR สเปกตรัมของ bromoeugenol ใน CDCl_3 ที่สังเคราะห์ได้

จาก condition : Br_2 , 1,2-dichloroethane, 0°C, 3 h.

จากรายงานในเอกสารอ้างอิง [11] พบว่าปฏิกิริยาโบรมิเนชันของสารประกอบอะโรมาติกที่เกิดผ่าน bromodimethylsulfonium bromide ในตัวทำละลายเป็น DMSO ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะให้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงถึง 96% yield ผู้ทดลองจึงได้ทดลองทำปฏิกิริยาโบรมิเนชัน (bromination) โดยใช้สารตั้งต้นเป็นยูจีนอลทำปฏิกิริยากับ hydrobromic acid (HBr) ในตัวทำละลายเป็น DMSO โดยคาดหวังว่า HBr จะเข้าทำปฏิกิริยากับ DMSO แล้วเกิดเป็น bromodimethylsulfonium และ bromodimethyl sulfonium ion เข้าถึงโปรตอนจากยูจีนอล เกิดเป็น bromoeugenol แผนภาพการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 3.47

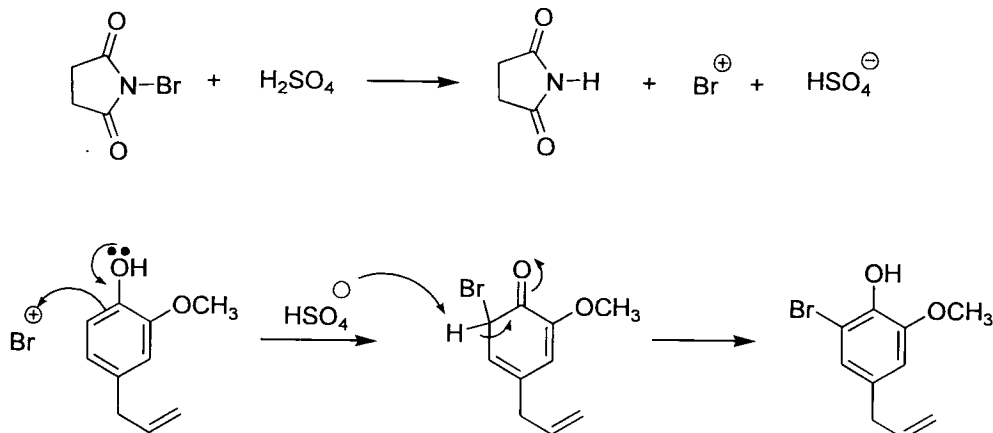


ภาพ 3.47 กลไกการเกิดปฏิกิริยา bromoeugenol โดยใช้ HBr เป็นตัวเข้าทำปฏิกิริยาในตัวทำละลาย DMSO

ปฏิกิริยาเริ่มต้นจากละลายยูจีนอลใน dimethyl sulfoxide 3 mL แล้วค่อยๆ เติม 48% HBr ลงไป ขั้นตอนนี้สารละลายมีลักษณะใสสีเหลืองอ่อน ทำการคนทิ้งนาน 3 วัน เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อครบ 3 วัน สารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม จากนั้นติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วย TLC และเติมน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา ทำการปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้ได้ pH ประมาณ 7-8 เพื่อให้สารละลายอยู่ในรูปที่เป็นกลาง และทำให้สารบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลือง จากนั้นส่งทดสอบเพื่อหาเอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ผลจากการทดสอบหาเอกลักษณ์ของสารพบว่ามีความสอดคล้องกันจำนวนมาก ทั้งนี้คาดว่าสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะเป็นของผสมที่ไม่สามารถแยกออกได้ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

จากรายงานในเอกสารอ้างอิง [28] พบว่าได้มีการศึกษาปฏิกิริยาโบรมิเนชันของ deactivated aromatics ที่ใช้ *N*-bromosuccinimide (NBS) ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้นทำปฏิกิริยากับ 3-nitrobenzaldehyde ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 3-bromo-5-nitrobenzaldehyde ถึง 92% yield

ผู้ทดลองจึงได้ทดลองทำปฏิกิริยาโบรมิเนชัน (bromination) โดยใช้สารตั้งต้นเป็นยูจีนอลทำปฏิกิริยากับ *N*-bromosuccinimide (NBS) ในตัวทำละลายเป็น sulfuric acid และให้ปฏิกิริยาเกิดที่ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยคาดหวังว่า *N*-bromosuccinimide (NBS) จะเข้าทำปฏิกิริยากับ sulfuric acid แล้วหลุดโบรมิเนียมไอออนออกมา จากนั้นโบรมิเนียมไอออนจะเข้าทำปฏิกิริยากับยูจีนอลโดยมี sulfuric anion เข้าดึงโปรตอนจากยูจีนอลเกิดเป็น bromoeugenol กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดง ดังภาพ 3.48



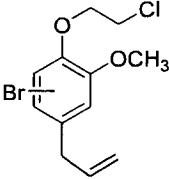
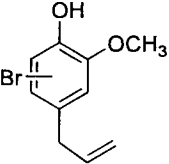
ภาพ 3.48 กลไกการเกิด bromoeugenol โดยใช้ NBS เป็นตัวเข้าทำปฏิกิริยาในตัวทำละลาย H_2SO_4

ปฏิกิริยาเริ่มต้นจากผสมยูจีนอลลงใน sulfuric acid โดยค่อยๆ หยดยูจีนอลลงไป และวางบนอ่างน้ำแข็ง และละลาย *N*-bromosuccinimide ด้วย sulfuric acid จากนั้นค่อยๆ เติมลงไป แต่เนื่องจาก sulfuric acid เป็นกรดที่แรงจึงทำให้ควบคุมปฏิกิริยาได้ยาก เมื่อทำการเติมสารผสมเข้าด้วยกันสารผสมที่ได้มีลักษณะเป็นสีดำ และเมื่อทำให้สารบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์แล้วจะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นส่งทดสอบเพื่อหาเอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ผลจากการทดสอบหาเอกลักษณ์ของสารพบว่ามีสัญญาณขึ้นจำนวนมากซึ่งคาดว่าสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะเป็นของผสมที่ไม่สามารถแยกออกได้ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ทั้งนี้ปฏิกิริยาที่ไม่เกิดตามที่ต้องการคาดว่าน่าจะมาจากสภาวะที่ใช้ไม่เหมาะสมคืออุณหภูมิอาจจะสูงเกินไป อีกทั้ง sulfuric acid ยังเป็นกรดที่แรงจึงเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงกับยูจีนอลทำให้เมื่อทดสอบหาเอกลักษณ์ของสารพบ peak ขึ้นจำนวนมาก ผู้ทดลองจึงได้ทดลองทำปฏิกิริยาต่อไปโดยเปลี่ยนตัวทำละลายและเปลี่ยนสภาวะใหม่เพื่อให้มีความเหมาะสมมากขึ้นในการเกิดปฏิกิริยา

หลังจากนั้นผู้วิจัยได้ใช้สารตั้งต้นเป็นยูจีนอลทำปฏิกิริยากับ *N*-bromosuccinimide (NBS) แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น DMF และเปลี่ยนสภาวะในการเกิดปฏิกิริยาเป็นที่ 0°C นาน 1 ชั่วโมง โดยคาดหวังว่า DMF จะเข้าดึงโปรตอนจากยูจีนอลจากนั้น NBS จะเข้าทำปฏิกิริยากับยูจีนอลเกิดเป็น bromoeugenol กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 3.49

ปฏิกิริยาเริ่มต้นจากผสมยูจีนอลใน DMF 5 mL โดยค่อยๆ หยดยูจีนอลลงไป และวางบนอ่างน้ำแข็ง จากนั้นละลาย NBS ด้วย DMF จากนั้นค่อยๆ เติมลงในยูจีนอล ขั้นตอนนี้สารละลายผสมมีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองและเมื่อคนทิ้งไว้ครบ 1 ชั่วโมง สารละลายผสมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม และเมื่อนำมาทำให้สารบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อนๆ จากนั้นส่งทดสอบเพื่อหา

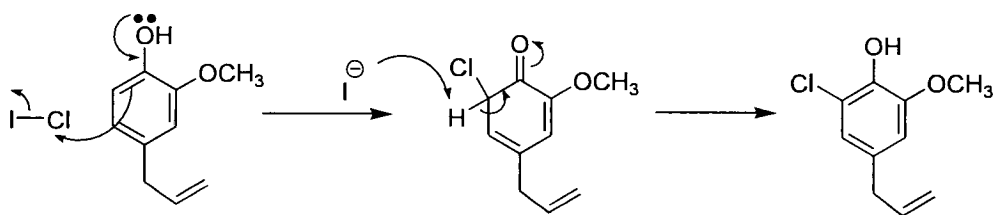
ตาราง 3.12 สภาวะการทดลองและ % yield ของปฏิกิริยาโบรมิเนชัน

วิธี	รีเอเจนต์	ตัวทำละลาย	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น	% yield
1	Bromine	1,2-dichloroethane		82.6
2	HBr	DMSO	ผลิตภัณฑ์เกิดเป็นของผสม	-
3	HBr, DMSO	Ethyl acetate	ผลิตภัณฑ์เกิดเป็นของผสม	-
4	NBS	Sulfuric acid	ผลิตภัณฑ์เกิดเป็นของผสม	-
5	NBS	DMF		47.7

สำหรับปฏิกิริยาคลอรีเนชัน (chlorination) เป็นปฏิกิริยาของหมู่ฮาโลเจนที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารอะโรมาติก จากรายงานในเอกสารอ้างอิง [29] พบว่าปฏิกิริยา oxychlorination ของยูจีนอล ทำปฏิกิริยากับ sodium chloride โดยมี copper(II)chloride เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเกิดเป็น monochlorination ที่ให้ผลิตภัณฑ์ที่สูงถึง 99% yield

ผู้วิจัยจึงได้ทดลองทำปฏิกิริยาคลอรีเนชัน (chlorination) โดยใช้สารตั้งต้นเป็นยูจีนอลทำปฏิกิริยากับ NaCl โดยมี copper(II)chloride เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในตัวทำละลายเป็น acetic acid ปฏิกิริยานี้เริ่มจากการเตรียมสารละลายผสม NaCl และ copper(II)chloride จากนั้นเติมลงในยูจีนอลที่ละลายในกรดอะซิติก (CH₃COOH) ทำการคนทิ้งไว้ (open air) พบว่าปฏิกิริยาไม่เกิด ไม่พบสารใหม่เกิดขึ้น และสารในปฏิกิริยายังคงเป็นยูจีนอลตัวเดิมเมื่อทำการติดตามการเกิดปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น ทั้งนี้การที่ปฏิกิริยาไม่เกิดนี้คาดว่าน่าจะมาจากสภาวะที่ใช้ อาจจะยังไม่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยา โดยอาจจะใช้อุณหภูมิที่ยังไม่เหมาะสมทำให้ยูจีนอลไอออนไปจับกับโปรตอนแล้วเกิดเป็นสารตั้งต้นตัวเดิม โดยไม่ทำปฏิกิริยากับคลอโรเนียมไอออน

หลังจากนั้นจึงได้ทดลองใช้สารตั้งต้นเป็นยูจีนอลทำปฏิกิริยากับ iodine monochloride (ICI) และใช้ตัวทำละลายเป็น acetonitrile สภาวะในการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 8 ชั่วโมง โดยคาดหวังว่า ICI จะเข้าทำปฏิกิริยากับยูจีนอลเกิดเป็น chloroeugenol กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 3.51



ภาพ 3.51 กลไกการเกิด chloroeugenol โดยใช้ ICl เป็นตัวเข้าทำปฏิกิริยาในตัวทำละลาย CH₃CN

ปฏิกิริยานี้เริ่มจากละลายยูจีนอลใน CH₃CN โดยค่อยๆ หยดยูจีนอลลงไป จากนั้นละลาย ICl ด้วย CH₃CN และค่อยๆ เติมนลงในยูจีนอล ขั้นแรกนี้สารผสมมีลักษณะใสสีน้ำตาลอ่อน ทำการคนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย Na₂S₂O₅ และสกัดด้วย CH₂Cl₂ ทำให้สารบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ตัวทำละลายเป็นสารผสมระหว่างเอทิลอะซิเตตและเฮกเซน (EtOAc : Hexane) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลือง จากนั้นส่งทดสอบเพื่อหาเอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ผลจากการทดสอบหาเอกลักษณ์ของสารพบว่าจากสเปกตรัม ¹H NMR ของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับสัญญาณ ¹H NMR ของสารตั้งต้นยูจีนอลยังคงพบสัญญาณของ aromatic โปรตอน แต่ไม่พบสัญญาณของ allyl โปรตอน แสดงให้เห็นว่ามีหมู่แทนที่เข้าไปแทนที่บนตำแหน่งของหมู่ allyl ของสารตั้งต้นแทนการเข้าที่ตำแหน่งบนวงอะโรมาติกของสารตั้งต้นยูจีนอล

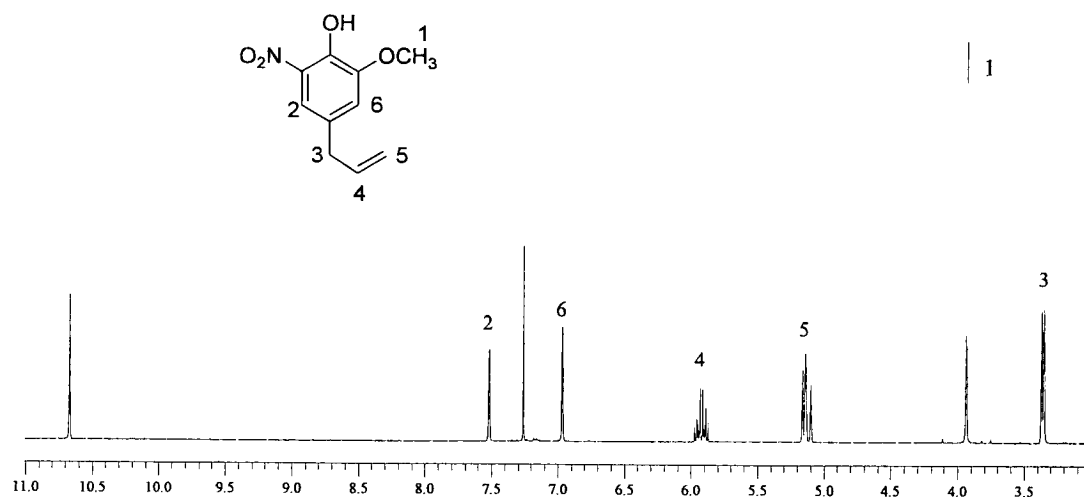
ตาราง 3.13 สภาวะการทดลองและ % yield ของปฏิกิริยาคลอรีเนชัน

วิธี	ตัวเข้าทำปฏิกิริยา	ตัวทำละลาย	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น	% yield
1	Sodium chloride	Acetic acid	ไม่เกิดผลิตภัณฑ์	-
2	Iodine monochloride	Acetonitrile		24.7

ดังนั้นจึงไม่สามารถสังเคราะห์ Chloroeugenol ได้ตามแผนที่วางไว้

สำหรับปฏิกิริยาไนเตรชัน (nitration) โดยทั่วไปของสารอะโรมาติกเป็นปฏิกิริยาของเบนซีนกับกรดไนตริก (HNO₃) โดยมีกรดซัลฟูริก (H₂SO₄) เข้มข้น เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผู้วิจัยจึงได้ทดลองทำปฏิกิริยาไนเตรชัน (nitration) โดยใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับ urea nitrate ในตัวทำละลายเป็น acetic acid โดยจะใช้ไอออนของไนโตรเนียมจาก urea nitrate เป็นตัวเข้าทำปฏิกิริยากับยูจีนอล โดยขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มจากละลายยูเรียไนเตรตในกรดอะซิติกเพื่อให้ยูเรียไนเตรตอยู่ในรูปของอินเทอร์มีเดียตที่พร้อมที่จะเข้าทำปฏิกิริยา จากนั้นเติมยูจีนอล

แล้วเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ยูจีนอลและยูเรียในเตาที่มีพลังงานมากพอที่จะเกิดการแตกพันธะเดิมและมีการสร้างพันธะใหม่ได้ ในขั้นแรกนี้สารผสมมีลักษณะใสไม่มีสีและเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง สารผสมเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นทำการติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วย TLC เปรียบเทียบสารผลิตภัณฑ์กับสารตั้งต้นในระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมคือสารผสมระหว่าง ethyl acetate และ hexane ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 โดยผลจาก TLC พบ spot ของสารเพียง spot เดียวบน TLC ซึ่งอยู่ในตำแหน่งที่ต่ำกว่าตำแหน่งของสารตั้งต้น จากนั้นจึงทำการเติมน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยาและทำการปรับ pH ของสารผสมให้ได้ pH ประมาณ 7-8 ด้วยเบสอ่อนคือ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) เพื่อให้สารผสมมีสภาพที่เป็นกลาง จากนั้นจึงทำการสกัดด้วย dichloromethane (CH_2Cl_2) สารที่ทำการสกัดออกมาได้มีลักษณะใสสีเหลืองส้ม หลังจากนั้นทำการตรวจสอบอีกครั้งด้วย TLC เพื่อให้แน่ใจว่าสารที่สกัดออกมานั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ทำการกำจัดน้ำออกโดยการเติม sodium sulfate ทำให้สารมีความบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อน จากนั้นส่งทดสอบเพื่อหาเอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ผลจากการทดสอบหาเอกลักษณ์ของสารพบว่ามีความเหมือนที่เข้าไปแทนที่บนวงอะโรมาติกของสารตั้งต้น เมื่อเปรียบเทียบกับ NMR spectrum ของสารตั้งต้นยูจีนอล ดังแสดงในภาพ 3.52



ภาพ 3.52 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ nitro Eugenol ใน CDCl_3 ที่สังเคราะห์ได้

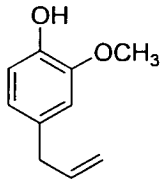
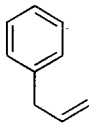
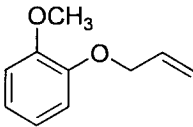
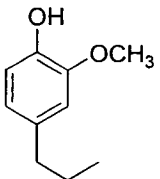
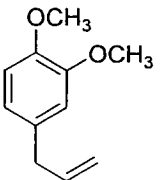
จาก condition : urea nitrate, CH_3COOH , 60°C , 24 h

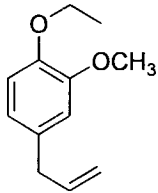
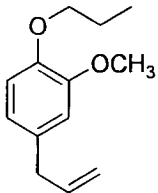
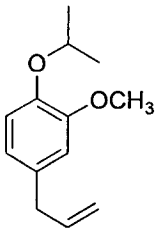
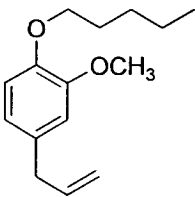
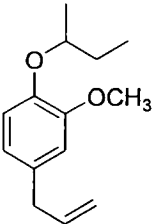
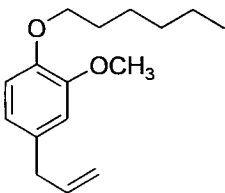
จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมสามารถยืนยันโครงสร้างของ nitro Eugenol ที่ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาในปี ค.ศ. 2009 ของ Sudarma I. M. และคณะ [30] ที่พบว่ามีความเหมือน $-\text{NO}_2$ เข้าแทนที่บนวงอะโรมาติกของยูจีนอลในตำแหน่ง ortho กับหมู่ $-\text{OH}$ จากการศึกษาด้วยปฏิกิริยาไนเตรชันโดยใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับ potassium hydrogen sulfate (KHSO_4), sodium nitrate (NaNO_3) ในสภาวะที่มีการใช้ wet silica และตัวทำ

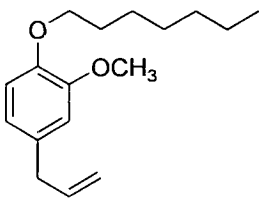
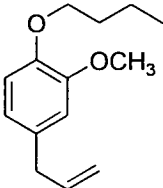
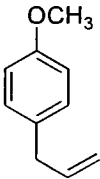
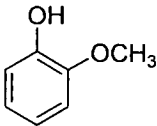
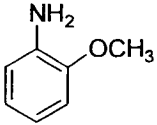
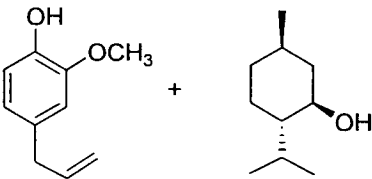
ละลายเป็น dichloromethane (CH₂Cl₂) ได้ผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 75% yield [30] ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ผู้วิจัยสามารถสังเคราะห์ได้คือ 47.9% yield

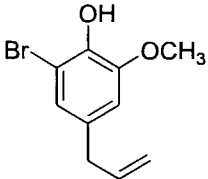
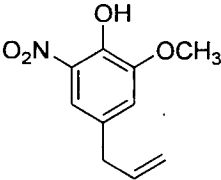
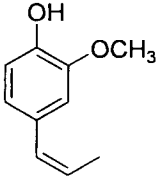
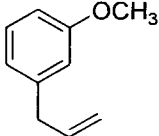
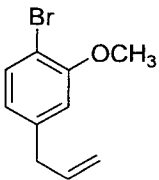
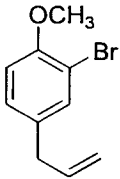
ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสามารถสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของยูจีนอลกลุ่มที่ 1 ถึงกลุ่มที่ 8 ได้ทั้งหมด 17 อนุพันธ์ รวมกับอนุพันธ์ที่มีจำหน่ายอยู่แล้ว 9 อนุพันธ์ รวมเป็นสารอนุพันธ์ที่มีการดัดแปรโครงสร้างที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์การเป็นยาสลับในสัตว์น้ำทั้งหมด 26 อนุพันธ์ ดังแสดงรายละเอียดในตาราง 3.14

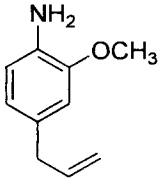
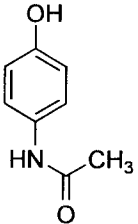
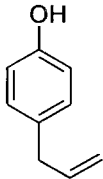
ตาราง 3.14 รหัส โครงสร้าง และน้ำหนักของสารอนุพันธ์ที่สามารถเตรียมได้จากงานวิจัยครั้งนี้

รหัส	อนุพันธ์	Yield (%)	น้ำหนักที่ได้ (g)	หมายเหตุ
P1		-	-	เป็นสารที่มีจำหน่าย (Eugenol)
P2		-	-	เป็นสารที่มีจำหน่าย (Allyl benzene)
P3		-	-	เป็นสารที่มีจำหน่าย (O-allyl guaiacol))
P4		82.1	2.72	
P5		89.7	3.19	

รหัส	อนุพันธ์	Yield (%)	น้ำหนักที่ได้ (g)	หมายเหตุ
P6		54.7	4.20	
P7		86.3	7.12	
P8		67.6	5.57	
P9		81.0	5.70	
P10		56.6	3.73	สารใหม่
P11		98.0	7.30	

รหัส	อนุพันธ์	Yield (%)	น้ำหนักที่ได้ (g)	หมายเหตุ
P12		75.1	5.91	
P13		90.5	6.60	
P14	-			Placebo Solution
P20		-	-	เป็นสารที่มี จำหน่าย (4-Allyl anisole)
P21		-	-	เป็นสารที่มี จำหน่าย (Guaiacol)
P22		-	-	เป็นสารที่มี จำหน่าย (O-Anisidine)
P23*		-	-	เป็นสารที่มี จำหน่าย (Eugenol + Menthol)

รหัส	อนุพันธ์	Yield (%)	น้ำหนักที่ได้ (g)	หมายเหตุ
P24		47.7	5.48	
P25		47.9	3.31	
P26		-	4.00	เป็นสารที่มี จำหน่าย (isoeugenol)
P27		64.1	2.43	
P28		17.0	0.50	
P29		6.9	0.50	

รหัส	อนุพันธ์	Yield (%)	น้ำหนักที่ได้ (g)	หมายเหตุ
P30		45.3	2.00	สารใหม่
P31		-	4.00	เป็นสารที่มี จำหน่าย (paracetamol)
P32		60.0	2.00	
รวมสารอนุพันธ์ทั้งหมด 26 ชนิด				

*หมายเหตุ : อนุพันธ์ P23 เป็นสารผสมระหว่างยูจีนอลและเมนทอลในอัตราส่วน 1.1 : 0.9 ซึ่งอยู่นอกเหนือ
วัตถุประสงค์ของโครงการ อย่างไรก็ตามมีรายงานจากเอกสารอ้างอิง (Aquaculture, 2009, 298, 162–167) ว่าสาร
ชนิดนี้ สามารถใช้ในการสลบกุ้งก้ามกรามได้ ผู้วิจัยจึงได้เตรียมเป็นอนุพันธ์เพื่อทดสอบการสลบในสัตว์น้ำในครั้งนี้
ด้วย

3.2 การตั้งตำรับอิมัลชันของสารอนุพันธ์ยูจีนอลที่สังเคราะห์ได้

การตั้งตำรับอิมัลชันของสารอนุพันธ์ยูจีนอลที่สังเคราะห์ได้ เพื่อศึกษาหาสัดส่วนและชนิดของคู่ของสารก่ออิมัลชันที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตำรับยูจีนอลอิมัลชันที่มีความคงตัวดี โดยงานในส่วนนี้ดำเนินการโดย รศ.ดร. ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล ณ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชกรรม มหาวิทยาลัยนเรศวร ตามที่ได้กล่าวรายละเอียดในบทที่ 2 โดยจะแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

- 1. การศึกษาอิทธิพลของค่า Hydrophilic-Lipophilic-Balance (HLB) ต่อความคงตัวของยูจีนอลอิมัลชัน
- 2. การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันต่อความคงตัวของยูจีนอลอิมัลชัน
- 3. การศึกษาอิทธิพลของคู่สารก่ออิมัลชันชนิดต่างๆ ต่อความคงตัวของยูจีนอลอิมัลชัน
- 4. การประเมินผลความคงตัวของยูจีนอลอิมัลชัน เช่น Creamin, Cracking, Apparent Viscosity และ Physical Appearance โดยได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

ตาราง 3.15 การประเมินผลของค่า HLB ต่อความคงตัวของอิมัลชัน

HLB	การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที			การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์		
	% Creaming	Cracking	App-η (s)	% Creaming	Cracking	App-η (s)
5	-	-	9.67 (SD 1.15)	-	++	3.67 (SD 1.15)
8	-	-	9.33 (SD 2.52)	-	+	5.00 (SD 2.00)
10	-	-	9.33 (SD 2.52)	-	-	3.67 (SD 1.53)
12	-	-	11.00 (SD 3.61)	3.37 (SD 1.14)	++++	3.00 (SD1.00)

หมายเหตุ

- 1. ลักษณะของอิมัลชันเริ่มต้นเป็นลักษณะขาวขุ่นเหมือนน้ำมันมทุกหลอด
- 2. เมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานาน 7 วัน พบว่ามีการรวมตัวของหยดน้ำมันเกิดขึ้นบางส่วนโดยที่ส่วนที่เป็นน้ำมันยูจีนอลจะไปรวมตัวนอนอยู่ที่ก้นหลอด ซึ่งต่างไปจากน้ำมันทั่วไปที่จะลอยอยู่บนผิวหน้า
- 3. ลักษณะการแยกชั้นแบ่งได้เป็น

- ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่น ไม่มีการแยกของหยदन้ำมัน
- + ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยदनน้ำมันที่ก้นหลอดเล็กน้อย
- ++ ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยदनน้ำมันใหญ่ที่ก้นหลอด
- +++ ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยदनน้ำมันแยกได้เป็นชั้นที่ก้นหลอด
- ++++ อิมัลชันแยกชั้นชัดเจน

ตาราง 3.16 ค่า HLB โดยประมาณของสารลดแรงตึงผิว

ชื่อสาร	HLB
Tween 20	16.7
Tween 60	14.9
Tween 80	15.0
Span 20	8.6
Span 60	4.7
Span 80	4.3

ตาราง 3.17 การประเมินผลของความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันต่อความคงตัวของอิมัลชัน (HLB = 10)

ความเข้มข้น (% w/w)	การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที			การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์		
	% Creaming	Cracking	App-η (s)	% Creaming	Cracking	App-η (s)
1	-	-	7.67 (SD 0.58)	2.94 (SD 0.64)	+++	2.67 (SD 0.58)
3	-	-	10.00 (SD 1.00)	-	+	2.67 (SD 0.58)
5	-	-	8.00 (SD 2.65)	-	-	2.67 (SD 0.58)
10	-	-	8.00 (SD 3.46)	-	-	3.33 (SD 0.58)
15	-	-	10.67 (SD 1.15)	-	-	12.67 (SD 2.52)

หมายเหตุ

1. ลักษณะของอิมัลชันเริ่มต้นเป็นลักษณะขาวขุ่นเหมือนน้ำมันมทุกหลอด
2. เมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานาน 7 วัน พบว่ามีการรวมตัวของหยดน้ำมันเกิดขึ้นบางส่วนโดยที่ส่วนที่เป็นน้ำมันยู
จีนอลจะไปรวมตัวนอนอยู่ที่ก้นหลอด ซึ่งต่างไปจากน้ำมันทั่วไปที่จะลอยอยู่บนผิวน้ำ
3. ลักษณะการแยกชั้นแบ่งได้เป็น
 - ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่น ไม่มีการแยกของหยดน้ำมัน
 - + ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยดน้ำมันที่ก้นหลอดเล็กน้อย
 - ++ ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยดน้ำมันใหญ่ที่ก้นหลอด
 - +++ ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยดน้ำมันแยกได้เป็นชั้นที่ก้นหลอด
 - ++++ อิมัลชันแยกชั้นชัดเจน

ตาราง 3.18 การประเมินผลของค่าของสารก่ออิมัลชันต่อความคงตัวของอิมัลชัน (HLB = 10)

ความเข้มข้น (% w/w)	การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที			การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์		
	% Creaming	Cracking	App-η (s)	% Creaming	Cracking	App-η (s)
T20S20	2.56	-	5.00 (SD 1.00)	3.27 (SD 2.95)	+++	3.00 (SD 0.00)
T20S60	-	+	5.33 (SD 0.58)	-	++	ไม่ไหล
T20S80	-	-	5.00 (SD 0.00)	2.52 (SD 1.66)	++	3.33 (SD 0.58)
T60S20	2.59	-	5.33 (SD 0.58)	-	++	3.67 (SD 0.58)
T60S60	-	-	4.67 (SD 0.58)	-	+	5.67 (SD 4.04)
T60S80	3.41	+	5.33 (SD 2.31)	-	+	3.67 (SD 0.58)
T80S20	1.08	-	5.00 (SD 1.00)	2.11	++	3.33 (SD 1.53)

ความเข้มข้น (% w/w)	การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที			การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์		
	% Creaming	Cracking	App-η (s)	% Creaming	Cracking	App-η (s)
T80S60	1.00	-	5.00 (SD 1.73)	2.06	+	3.33 (SD 0.58)
T80S80	-	-	5.00 (SD 1.00)	-	-	3.00 (SD 1.73)

หมายเหตุ

- 1. ลักษณะของอิมัลชันเริ่มต้นเป็นลักษณะขาวขุ่นเหมือนน้ำมันมทุกหลอด
- 2. ลักษณะการแยกชั้นแบ่งได้เป็น
 - ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่น ไม่มีการแยกของหยदन้ำมัน
 - + ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยदन้ำมันที่ก้นหลอดเล็กน้อย
 - ++ ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยदन้ำมันใหญ่ที่ก้นหลอด
 - +++ ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยदन้ำมันแยกได้เป็นชั้นที่ก้นหลอด
 - ++++ อิมัลชันแยกชั้นชัดเจน

วิจารณ์ผลการทดลอง

- 1. การประเมินผลดำรับภายหลังการเตรียม พบว่าอิมัลชันมีลักษณะเป็นอิมัลชันสีขาวขุ่น คล้ายน้ำมัน ซึ่งแม้ว่าการทดลองนี้จะไม่สามารถทดสอบชนิดของอิมัลชันที่ประเมินจากความสามารถในการละลายของสีระหว่างใน วัตถุภาคน้ำและน้ำมันได้ เนื่องจากสีที่ใช้ทดสอบ methylene blue สามารถละลายได้ทั้งในน้ำมันยูจินอลและใน น้ำ อย่างไรก็ตามจากการประเมินสัดส่วนของปริมาณของวัตถุภาคน้ำและน้ำมันแล้ว ดำรับนี้น่าจะเป็นประเภท น้ำในน้ำมัน เนื่องจากปริมาณของน้ำในดำรับค่อนข้างสูงถึงร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก
- 2. เนื่องจากน้ำมันที่ใช้เป็นน้ำมันยูจินอลที่มีลักษณะเป็นของเหลว อมเหลือง ความถ่วงจำเพาะไม่มากนัก (specific gravity: 1.064- 1.070) ความเข้มข้นที่ใช้เพียงร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก และองค์ประกอบส่วนใหญ่ของ ดำรับเป็นน้ำ ดังนั้นดำรับที่เตรียมได้ จึงได้มีความหนืดน้อย ไหลได้ง่าย และระยะเวลาในการไหลจึงไม่แตกต่างกันมากนัก ยกเว้นในกรณีที่ใช้ความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันในปริมาณที่สูงเช่น ร้อยละ 15 โดยน้ำหนักดำรับ จะไหลยากขึ้น แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้นานพบว่าดำรับอิมัลชันที่ได้ไม่มีความคงตัว ถึงแม้จะมีความหนืดสูง
- 3. ความไม่คงตัวของดำรับส่วนใหญ่เกิดจากการเกิด creaming ซึ่งจะพบหยदन้ำมันยูจินอลแยกชั้นออกมาอยู่ ด้านล่าง เป็นเพราะน้ำมันยูจินอลนั้นหนักรกว่าน้ำ ส่วนการเกิด cracking พบว่าดำรับที่เตรียมได้ส่วนใหญ่ไม่เกิด

cracking ยกเว้นในกรณีที่ใช้สารก่ออิมัลชันเป็น Tween 20 และ Span 60 ซึ่งพบว่ามีการเกิด cracking ทั้ง 3 ครั้งที่มีการทำการทดลอง

4. สำหรับการหาค่า HLB ที่มีเหมาะสมเมื่อใช้ Tween 80 และ Span 80 เป็นสารก่ออิมัลชันที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก พบว่า HLB 8 และ HLB 10 ทำให้ตำรับมีความคงตัวยังคงเป็นอิมัลชันดี แม้จะตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลานาน ดังแสดงในตารางที่ 4 และเมื่อกำหนดให้ HLB ของตำรับเท่ากับ 10 โดยน้ำหนัก โดยใช้ Tween 80 และ Span 80 เป็นสารก่ออิมัลชัน พบว่า ความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันร้อยละ 5 และ 10 เป็นความเข้มข้นที่ทำให้ตำรับอิมัลชัน ยูจีนอลมีความคงตัวเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 5
5. อิทธิพลของคู่สารทำอิมัลชันชนิดต่างๆ ต่อความคงตัวของอิมัลชันซึ่งกำหนดให้ HLB เท่ากับ 10 และความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันเท่ากับร้อยละ 5 พบว่าคู่สารก่ออิมัลชัน Tween 20 และ Span 80 กับ Tween 80 และ Span 80 ให้อิมัลชันที่มีความคงตัวดีเมื่อตั้งทิ้งไว้ ดังแสดงผลในตารางที่ 6
6. เมื่อพิจารณาผลของการทดลองในภาพรวมพบว่าการใช้สารก่ออิมัลชันเป็น Tween 80 และ Span 80 โดยกำหนดให้ Total required HLB ของตำรับเท่ากับ 10 และความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันเท่ากับร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก น่าจะเหมาะสมในการนำมาเตรียมตำรับยูจีนอลอิมัลชัน

สรุปผลการทดลองการเตรียมตำรับสารอนุพันธ์ของยูจีนอลที่สังเคราะห์ได้

จากผลการทดลองพบว่าตำรับที่เหมาะสมในการเตรียมยูจีนอลอิมัลชันให้มีความคงตัวคือ ตำรับที่มีสารก่ออิมัลชันเป็น Tween 80 และ Span 80 โดยกำหนดให้ Total required HLB ของตำรับเท่ากับ 10 และความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันเท่ากับร้อยละ 5 และตำรับอนุพันธ์ของยูจีนอลที่เตรียมได้ทั้งหมดจะถูกส่งไปทดสอบฤทธิ์ที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาต่อไป

3.3 การทดสอบฤทธิ์การสลบในสัตว์น้ำ

การทดสอบฤทธิ์ในสัตว์น้ำเป็นงานทางด้านวาริชศาสตร์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยเน้นเฉพาะฤทธิ์การเป็นยาสลบในสัตว์น้ำประเภทปลา กุ้ง และปูเป็นหลัก โดยงานในส่วนนี้ดำเนินการโดย ผศ.ดร.บุญรัตน์ ประทุมชาติ และดร.ณอมศักดิ์ บุญภักดี ณ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยทำการทดลองภายในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี โดยสัตว์ทดลองทั้งหมดเป็นสัตว์เศรษฐกิจ ต้องการการสลบเพื่อการขนส่ง และมีผลกระทบทางธุรกิจของประเทศไทยสูง แบ่งเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ครัสเตเชียน (Crustacean)

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ปูม้า (*Portunus pelagicus*)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มปลามีเกล็ด

ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

กลุ่มที่ 3 ปลาไม่มีเกล็ด

ปลาดุกบิ๊กอุย (male *Clarias gariepinus* x female *Clarias macrocephalus*)

สัตว์ทดลองทั้งหมดจะพักไว้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มีแสงนปิดบ่อเพื่อลดแสงประมาณ 60% ให้ออกซิเจนที่ 6.5 ppm ความเค็มน้ำ 10 ppt (กรณีน้ำทะเล) อุณหภูมิ 27-29 °C pH 7.8-8.5 และงดให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง โดยน้ำทะเลที่ใช้ได้มาจากแหล่งตำบลแสมสาร จังหวัดชลบุรี

ในการทดลองทั้งหมดนี้ จะใช้ความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ที่ 25 และ 50 ppm โดยพิจารณาจากรายงานในเอกสารอ้างอิงหลายฉบับ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ความเข้มข้นในการทดสอบการสลบปลาอยู่ในช่วง 15-80 ppm ขึ้นอยู่กับชนิดของปลาหรือสัตว์น้ำที่ใช้ และขนาดน้ำหนักตัวของสัตว์น้ำ ประกอบกับผลการทดลองเบื้องต้นที่มีมาก่อนหน้านี้ว่าความเข้มข้นในช่วง 20-50 ppm เป็นความเข้มข้นที่สามารถสลบปลาได้ถึงระยะที่ 2 โดยมีอัตราการรอดสูง

การทดสอบจะทดสอบในสัตว์น้ำ 4 ชนิด ได้แก่ 1. ปลาดุกบิ๊กอุย 2. ปลากะพงขาว 3. กุ้งขาว และ 4. ปูม้า และในสัตว์น้ำแต่ละชนิดจะทำการทดลอง 3 ขั้นตอน คือ

1. ระยะเวลาในการสลบ (Anesthetic time)
ระยะเวลาในการสลบ หมายถึง ระยะเวลาที่ทำให้สัตว์น้ำเริ่มสลบในระดับที่ 3 (ตาราง 3.19) หลังจากนำสัตว์น้ำลงสู่ภาชนะที่มีสารอนุพันธ์อยู่ โดยสารอนุพันธ์ที่มีระยะเวลาในการสลบที่เร็ว หมายความว่า การออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ที่รวดเร็ว โดยจะเปรียบเทียบกับยูจีนอลเป็นหลัก
2. ระยะเวลาในการฟื้นสลบ (Recovery time)
ระยะเวลาในการฟื้นสลบ หมายถึง ระยะเวลาที่ทำให้สัตว์น้ำเริ่มฟื้นจากการสลบเข้าสู่ภาวะปกติ หลังจากนำสัตว์น้ำลงสู่ภาชนะพักฟื้น โดยสารอนุพันธ์ที่มีระยะเวลาในการฟื้นสลบที่ช้า หมายความว่า การออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ที่ยาวนาน โดยจะเปรียบเทียบกับยูจีนอลเป็นหลัก
3. อัตราการรอดตาย (Survival rate)
อัตราการรอดตาย หมายถึง จำนวนของสัตว์น้ำที่นำมาทำการทดลอง หลังจากที่ผ่านมาการทดลองแล้ว 24 ชั่วโมง สารอนุพันธ์ที่มีอัตราการรอดตายสูง หมายความว่า ความปลอดภัยในการนำมาใช้กับสัตว์น้ำชนิดนั้น โดยจะเปรียบเทียบกับยูจีนอลเป็นหลัก โดยอัตราการรอดตายของสัตว์น้ำที่ยอมรับได้ คือ มากกว่าร้อยละ 80

สรุปหลักเกณฑ์ในการพิจารณาสารอนุพันธ์ที่มีศักยภาพในการเป็นยาสลบสัตว์น้ำ

1. ใช้ระยะเวลาในการสลบสัตว์น้ำได้เร็ว (สลบได้เร็ว) โกล้เคียงหรือดีกว่ายูจีนอล
2. ใช้ระยะเวลาในการฟื้นสลบสัตว์น้ำนาน (สลบได้นาน) โกล้เคียงหรือนานกว่ายูจีนอล
3. มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 80
4. มีวิธีการสังเคราะห์ง่าย ไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน

ตาราง 3.19 ระดับของการสลบของสัตว์น้ำ

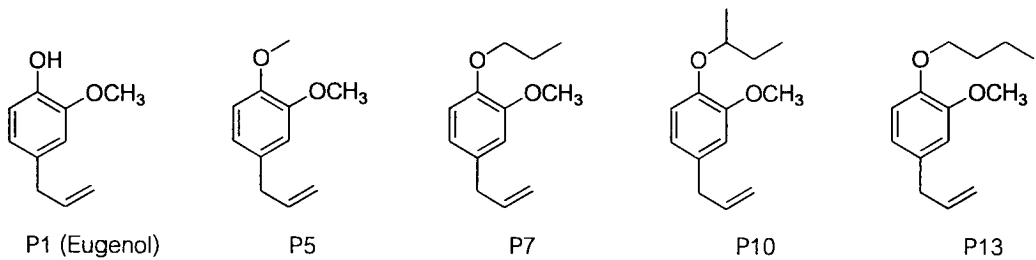
ระดับ	ลักษณะ	พฤติกรรมหรือการตอบสนอง
1	Sedation	การเคลื่อนไหวและการหายใจลดลง
2	Anesthesia	เสียสมดุลบางส่วน และมีการตอบสนองต่อการจับหรือสัมผัส
3	Surgical anesthesia	เสียสมดุลทั้งหมด และไม่ตอบสนองต่อการจับหรือการสัมผัส
4	Death	หยุดหายใจและหัวใจหยุดทำงาน

ที่มา : Coyle, S. D.; Durborow, R. M.; Tidwell, J. H., *Anaesthetics in aquaculture*. Kentucky State University Aquaculture Research Center. 2004.

3.3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การสลบในปลาดุกบิ๊กอุย

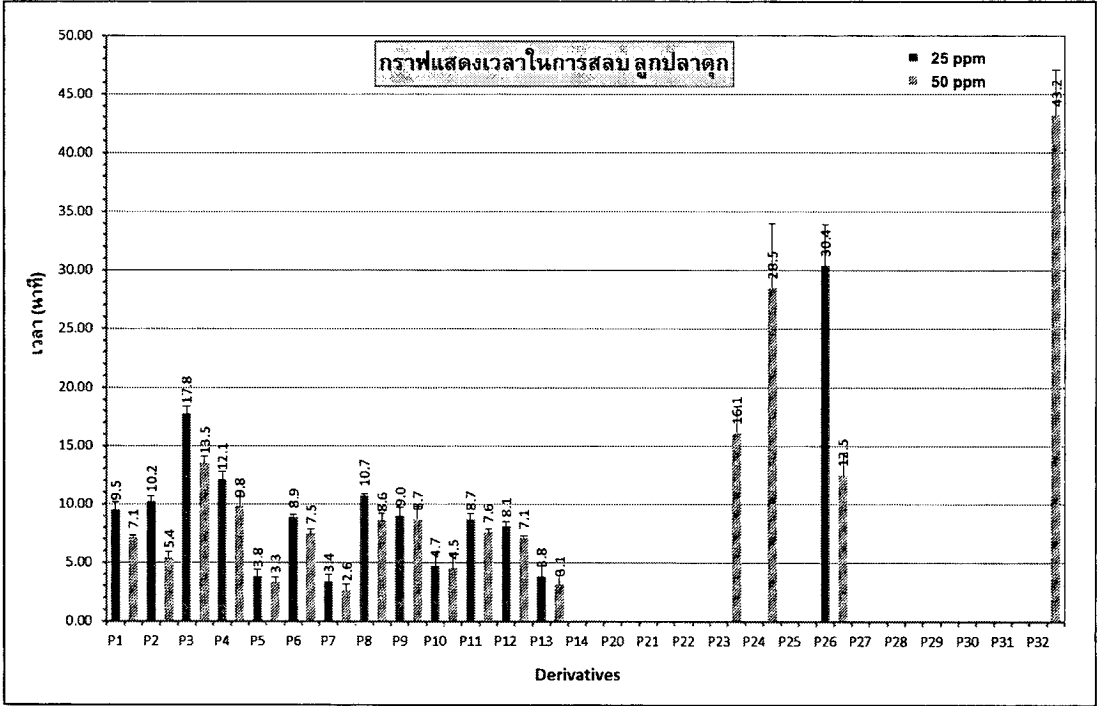
ปลาดุกที่ใช้ในการทดลองมี 2 ขนาด ได้แก่ วัยอ่อน (ความยาวเฉลี่ย 2.8 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 4.2 กรัม) และวัยรุ่น (ความยาวเฉลี่ย 18.3 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 80.5 กรัม) ก่อนการทดลองจะพักไว้ภายในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มีแสงนิตบดบ่อเพื่อลดแสงประมาณ 60% ให้ออกซิเจนที่ 6.5 ppm อุณหภูมิน้ำ 27-29 °C pH 7.8-8.2 แล่งดให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง

ในการทดลองทั้งหมดนี้ จะใช้ความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ที่ 25 และ 50 ppm หลังจากทดสอบใช้ความเข้มข้นทั้งสองความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ยูนอลที่เตรียมได้ทั้งสิ้น 25 ชนิด (P2-13 และ P20-P32) และชุดควบคุม P14 (control) ที่ไม่มีสารอนุพันธ์ของยูนอล เปรียบเทียบกับยูนอล (P1) พบว่า การออกฤทธิ์ต่อปลาดุกวัยอ่อนและปลาดุกวัยรุ่นมีลักษณะใกล้เคียงกันโดยสามารถพิจารณาได้จากกราฟการสลบ การฟื้นสลบ และอัตราการรอดตายที่มีลักษณะเหมือนกัน โดยสารอนุพันธ์ที่ให้ประสิทธิภาพดีในการสลบปลาทั้ง 2 กลุ่ม คือ P5 P7 P10 และ P13 โดยพิจารณาจากระยะเวลาที่สั้นที่สุดที่สามารถทำให้ปลาสลบได้ เมื่อเทียบกับยูนอล (P1) (กราฟ 3.1a-b)

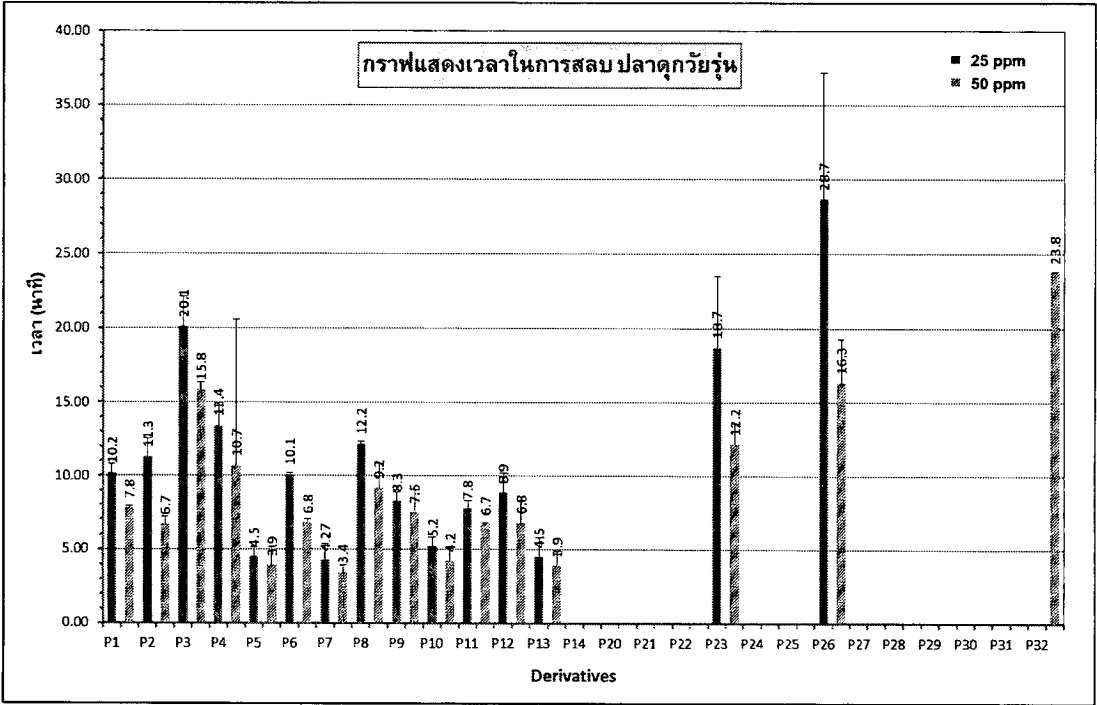


เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างแล้ว จะเห็นว่าอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้ดี ส่วนใหญ่จะเป็นอนุพันธ์ที่ทำการดัดแปรหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซี (-OH) ของยูนอลให้เป็นหมู่แอลคิลชนิดต่างๆ (methyl ถึง heptyl) P5-P13 ซึ่งจะให้ฤทธิ์ในการสลบเทียบเท่าหรือดีกว่ายูนอล โดยอนุพันธ์ที่ให้ฤทธิ์การสลบที่ดี จะมีโครงสร้างที่มีความยาวของสายโซ่คาร์บอนประมาณ 1-4 อะตอม (methyl ใน P5, propyl ใน P7, sec-butyl ใน P10 และ butyl ใน P13) ยกเว้น ethyl ที่จะให้ผลในทำนองเดียวกับ pentyl hexyl และ heptyl คือออกฤทธิ์ไม่ต่างจากยูนอลมากนัก

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของสายคาร์บอนที่หมู่ไฮดรอกซีและเวลาในการสลบของทั้งปลาดุกวัยอ่อนและปลาดุกวัยรุ่น แสดงดังกราฟ 3.2a-b จะพบว่าอนุพันธ์ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 (C1) 3 (C3 และ C4B) และ 4 (C4) อะตอม จะให้ฤทธิ์การสลบที่ดี แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มหมู่แอลคิลที่มีความยาวและขนาดที่เหมาะสม โดยไม่ยาวเกินไป หรือสั้นเกินไปที่ตำแหน่งของไฮดรอกซี จะเพิ่มประสิทธิภาพในการสลบปลาดุกทั้งปลาดุกวัยอ่อนและปลาดุกวัยรุ่นได้

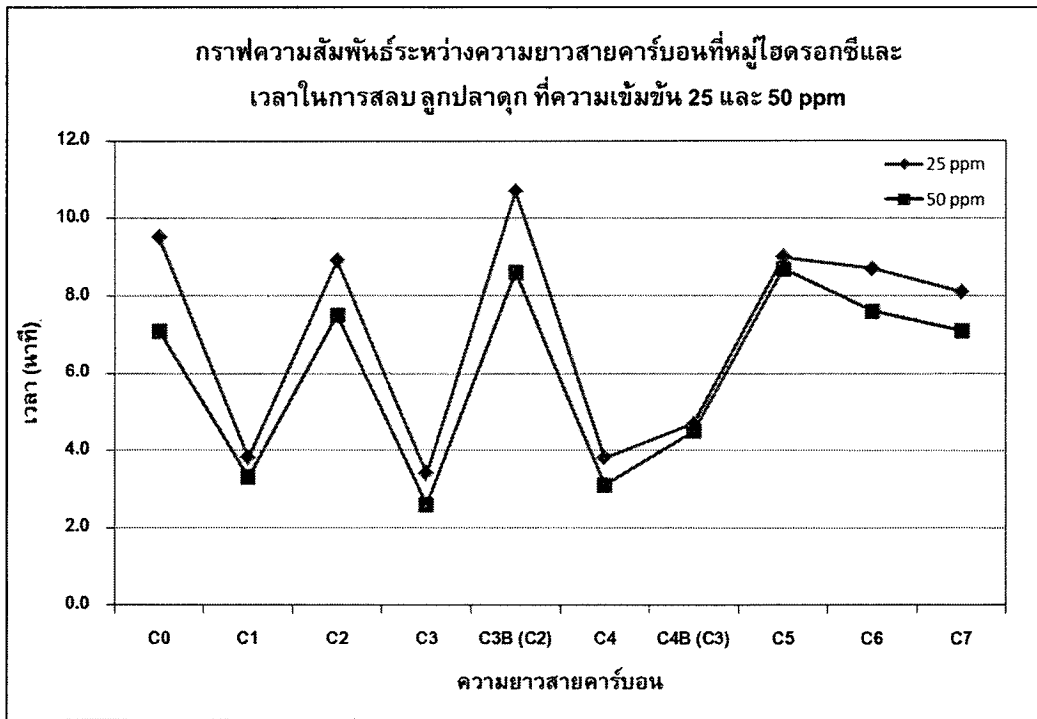


a)

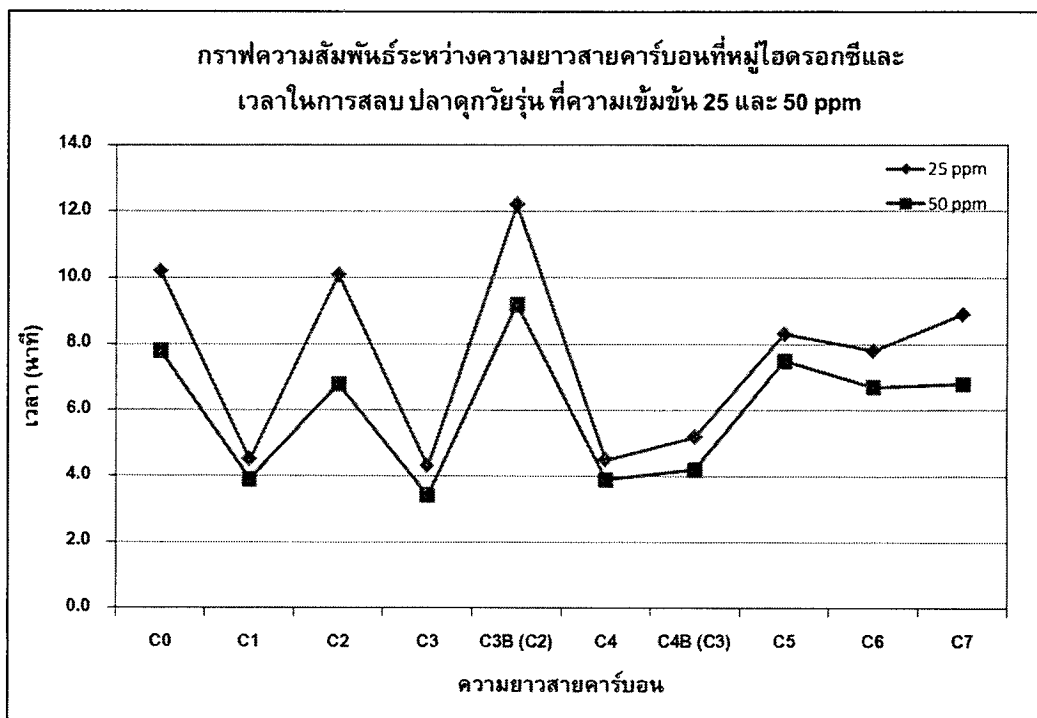


b)

กราฟ 3.1 เวลาที่ใช้ในการสลับปลาตุกกลุ่มผสม a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น ด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm



a)



b)

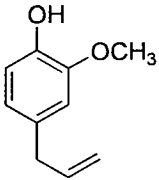
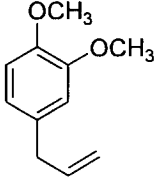
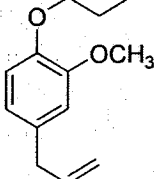
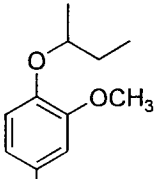
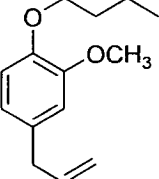
กราฟ 3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวสายคาร์บอนกับเวลาในการสลบลูกปลาตุกกลุ่ม a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น ด้วยอนุพันธ์ P1 (C0) P5 (C1) P6 (C2) P7 (C3) P8 (C3B) P13 (C4) P10 (C4B) P9 (C5) P11 (C6) P12 (C7) ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

โดยในกลุ่มปลาตุกวัยอ่อนและปลาตุกวัยรุ่น สารอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ที่ดีที่สุด คือ P7 เมื่อเทียบกับยูจินอล (P1) กล่าวคือ ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm จะสามารถสลบได้ภายในเวลา 3.4 และ 2.6 นาที สำหรับปลาตุกวัยอ่อนและ 4.3 และ 3.4 นาที สำหรับปลาตุกวัยรุ่น ซึ่งออกฤทธิ์เร็วกว่ายูจินอลทั้ง 2 กรณี (9.5 และ 7.1 นาที และ 10.2 และ 7.8 นาที ตามลำดับ) ระยะเวลาฟื้นนาน 36.7 และ 43.5 นาที สำหรับลูกปลาตุก และ 30.6 และ 40.5 นาที สำหรับปลาตุกวัยรุ่น ซึ่งช้ากว่ายูจินอลทั้ง 2 กรณี (14.5 และ 16.7 นาที และ 10.3 และ 12.4 นาที ตามลำดับ) และอัตราการรอดตายอยู่ที่ 100% เมื่อเทียบกับยูจินอลที่มีอัตราการรอดตายอยู่ที่ 86% และ 75% และ 81% และ 70% ตามลำดับ โดยสารที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน คือ P5 P10 และ P13 คือ มีระยะเวลาที่ใช้ในการสลบที่ช้ากว่า และมีระยะเวลาในการฟื้นสลบเร็วกว่า และอัตราการรอดตายสูง มากกว่า 80% ซึ่งทั้งสามอนุพันธ์ก็ให้ผลที่ดีกว่ายูจินอล และสามารถสรุปได้ว่าอนุพันธ์ P7 นั้นออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดแสดงดังตาราง 3.20

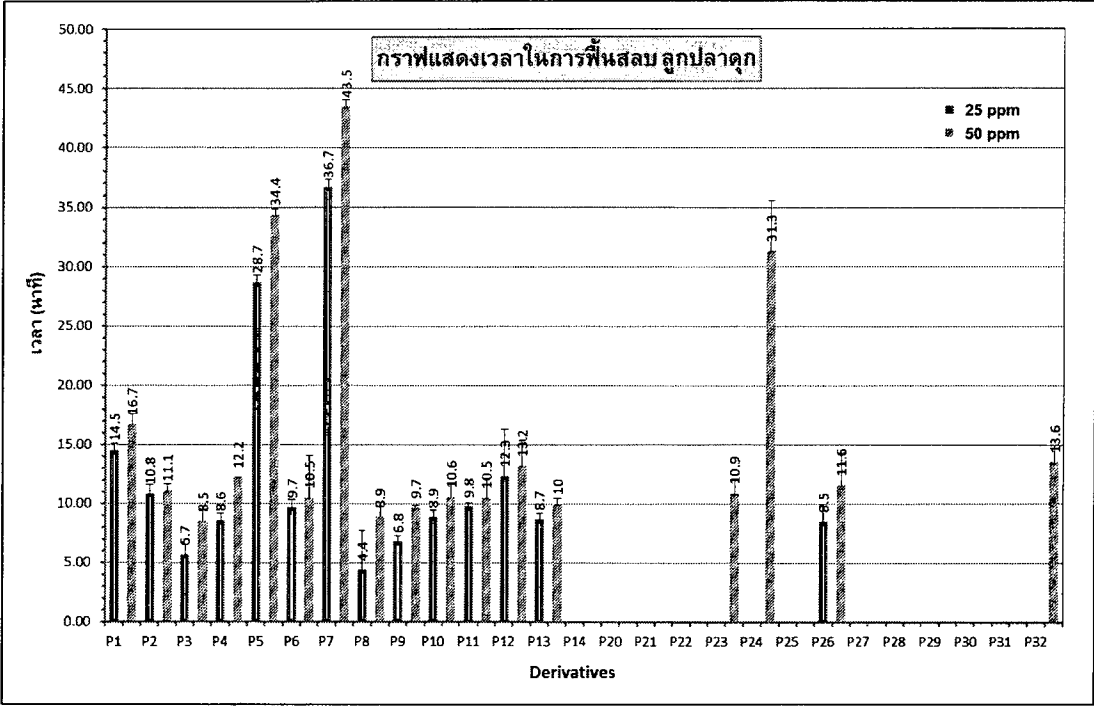
สำหรับการทดลองการฟื้นการสลบ จะให้ผลสอดคล้องกับผลการสลบ คือ อนุพันธ์ที่มีระยะเวลาในการออกฤทธิ์สั้น จะใช้ระยะเวลาในการฟื้นสลบนาน ดังจะเห็นได้จากกราฟที่ 3.3a-b อนุพันธ์ P5 และ P7 ซึ่งใช้เวลาในการสลบได้รวดเร็ว จะใช้เวลาในการฟื้นสลบค่อนข้างนาน ประมาณ 30-40 นาที กล่าวคือสารอนุพันธ์ยังออกฤทธิ์ได้ดี แม้จะมีการเคลื่อนย้ายปลาจากอ่างสลบมายังอ่างพักฟื้นแล้วก็ตาม ซึ่งในขณะที่อนุพันธ์ชนิดอื่นๆ จะใช้เวลาในการฟื้นสลบได้เร็วกว่า โดยจะใช้ระยะเวลาในการฟื้นสลบประมาณ 5-15 นาที

เมื่อพิจารณาผลการทดลองทั้งหมด จะพบว่าอนุพันธ์ที่มีศักยภาพที่ดีที่จะใช้ในการสลบปลาตุก คือ อนุพันธ์ P5 และ P7 เนื่องจากสามารถสลบปลาตุกได้รวดเร็วกว่ายูจินอล ถึงแม้ว่าจะใช้ระยะเวลาในการฟื้นสลบค่อนข้างนาน แต่ถ้าพิจารณาในทางปฏิบัติ การฟื้นสลบที่ช้าจะทำให้มีระยะเวลาในการเคลื่อนย้ายหรือทำกิจกรรมอื่นๆ ได้มากกว่า และนอกจากนี้ อนุพันธ์ P5 และ P7 ยังมีอัตราการรอดที่สูงกว่า P10 P13 และยูจินอลอีกด้วย

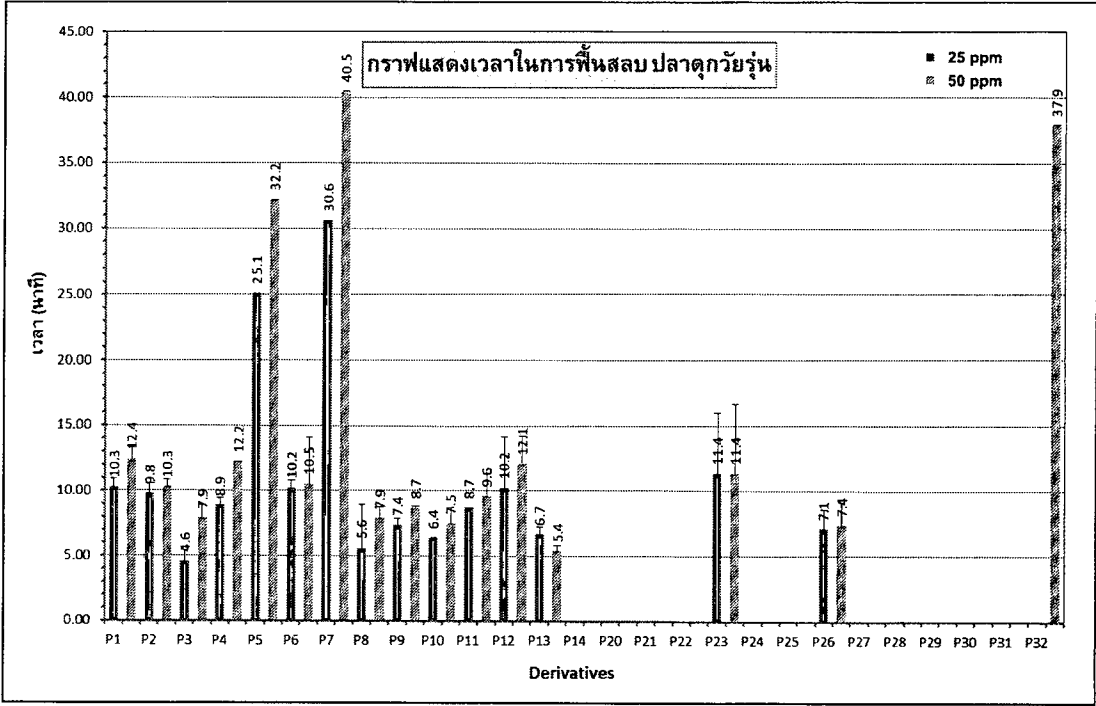
ตาราง 3.20 สารอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการสลบปลาดุกลูกผสม ระยะวัยอ่อนและวัยรุ่น ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

อนุพันธ์	โครงสร้าง	conc	เวลาในการสลบ (นาที)		เวลาในการฟื้นสลบ (นาที)		อัตราการรอดตาย (%)	
			ลูก	วัยรุ่น	ลูก	วัยรุ่น	ลูก	วัยรุ่น
P1 (Eugenol)		25	9.5±0.7	10.2±0.6	14.5±0.6	10.3±0.6	86±4	81±4
		50	7.1±0.2	7.8±0.1	16.7±0.9	12.4±0.9	75±7	70±7
P5		25	3.8±0.6	4.5±0.6	28.7±0.6	25.1±0.0	100±2	100±2
		50	3.3±0.4	3.9±1.2	34.4±0.4	32.2±0.0	94±3	100±3
P7		25	3.4±0.6	4.3±1.1	36.7±0.6	30.6±0.0	100±2	100±2
		50	2.6±0.5	3.4±0.5	43.5±0.6	40.5±0.0	100±2	100±2
P10		25	4.7±1.2	6.2±0.6	8.9±0.6	6.4±0.0	100±1	100±1
		50	4.5±1.3	4.2±0.9	10.6±1.2	7.5±1.2	86±2	90±2
P13		25	4.8±0.9	4.5±1.3	8.7±0.6	6.7±0.6	92±5	92±5
		50	3.1±0.8	3.9±0.8	10.0±0.5	5.4±0.5	94±5	88±5
P14 (Placebo)	-	25	NA	NA	NA	NA	100±0	100±0
		50	NA	NA	NA	NA	100±0	100±0

*NA = No Anesthetic (ไม่แสดงฤทธิ์การสลบ)

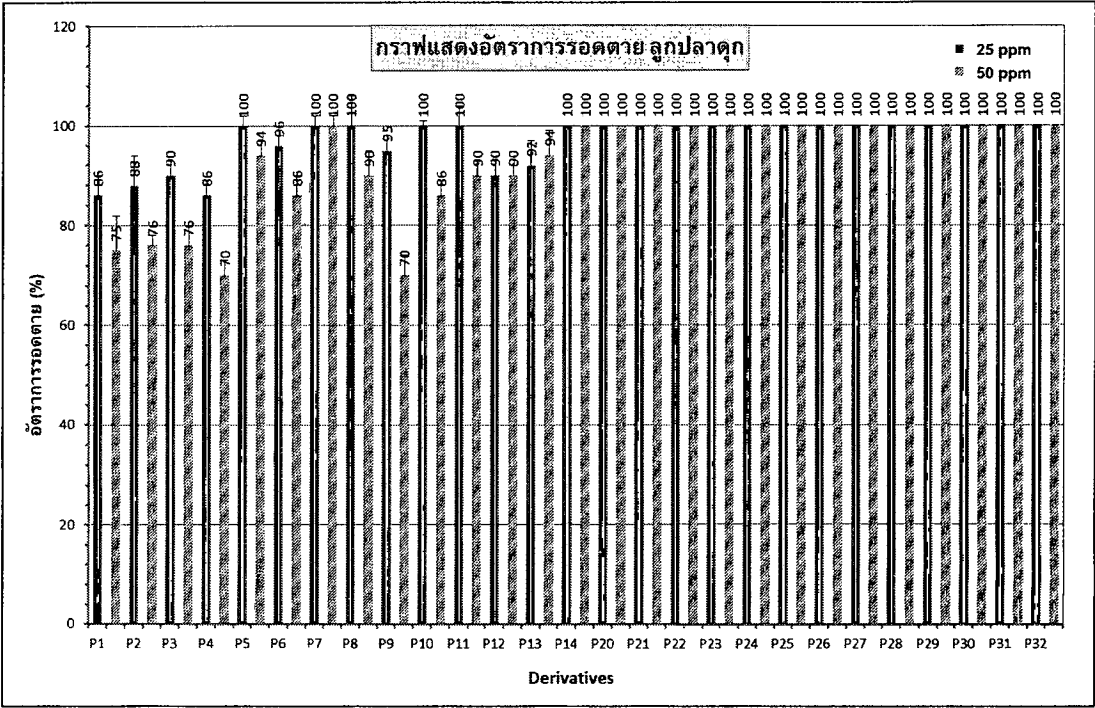


a)

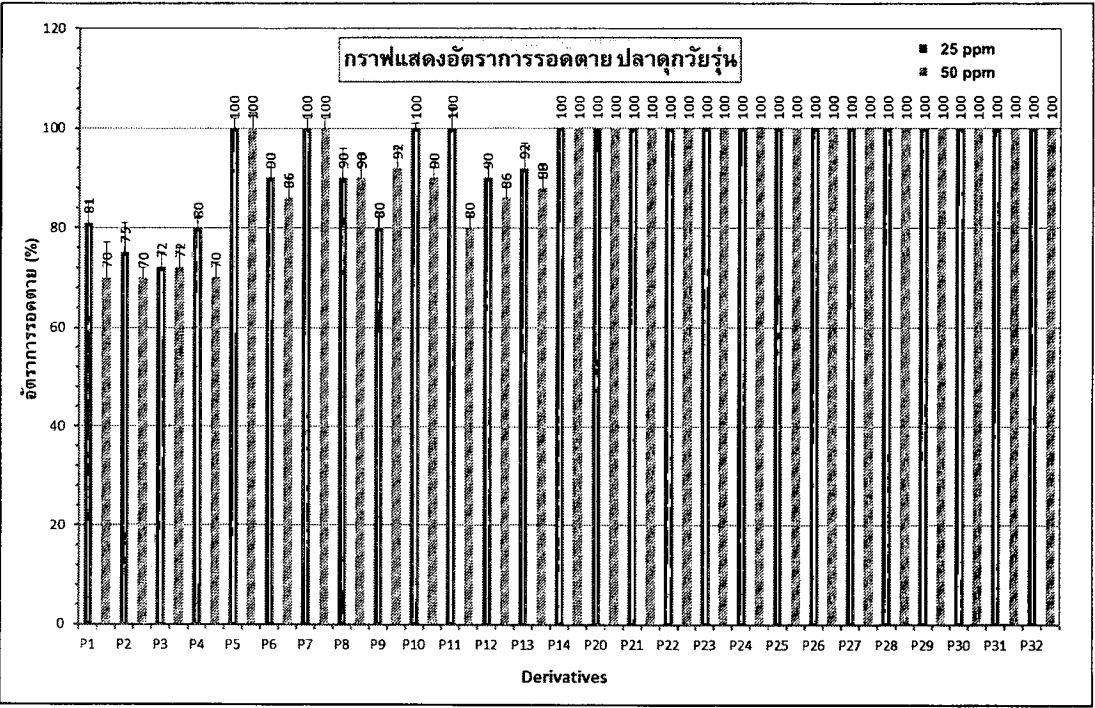


b)

กราฟ 3.3 ระยะเวลาที่ใช้ในการฟื้นของปลาตุกลูกผสม a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น ด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm



a)



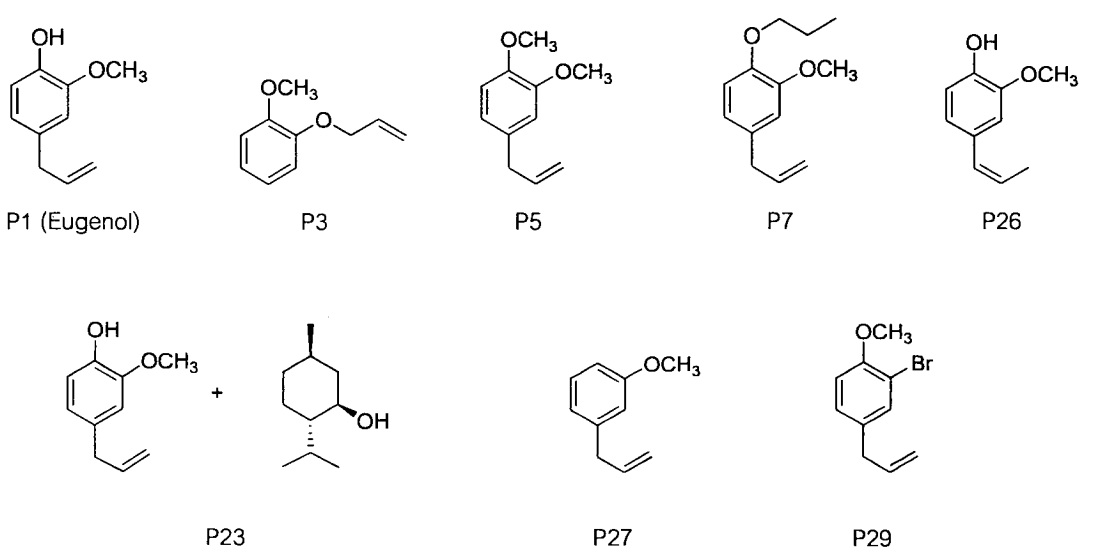
b)

กราฟ 3.4 อัตราการรอดตายของปลาดุกกลุ่มสม a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น เมื่อทำการสลับด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

3.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การสลายในปลากระพงขาว

ปลากระพงขาวที่ใช้ในการทดลองมี 2 ขนาด ได้แก่ ปลากระพงขาววัยอ่อน (ความยาวเฉลี่ย 1.1 เซนติเมตร) ปลากระพงขาววัยรุ่น (ความยาวเฉลี่ย 9.7 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 15.3 กรัม) ก่อนการทดลองจะพักไว้ภายในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มีแสงนปิดบ่อเพื่อลดแสงประมาณ 60% ให้ออกซิเจนที่ 6.5 ppm อุณหภูมิ 27-29 °C pH 7.8-8.2 และงดให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง

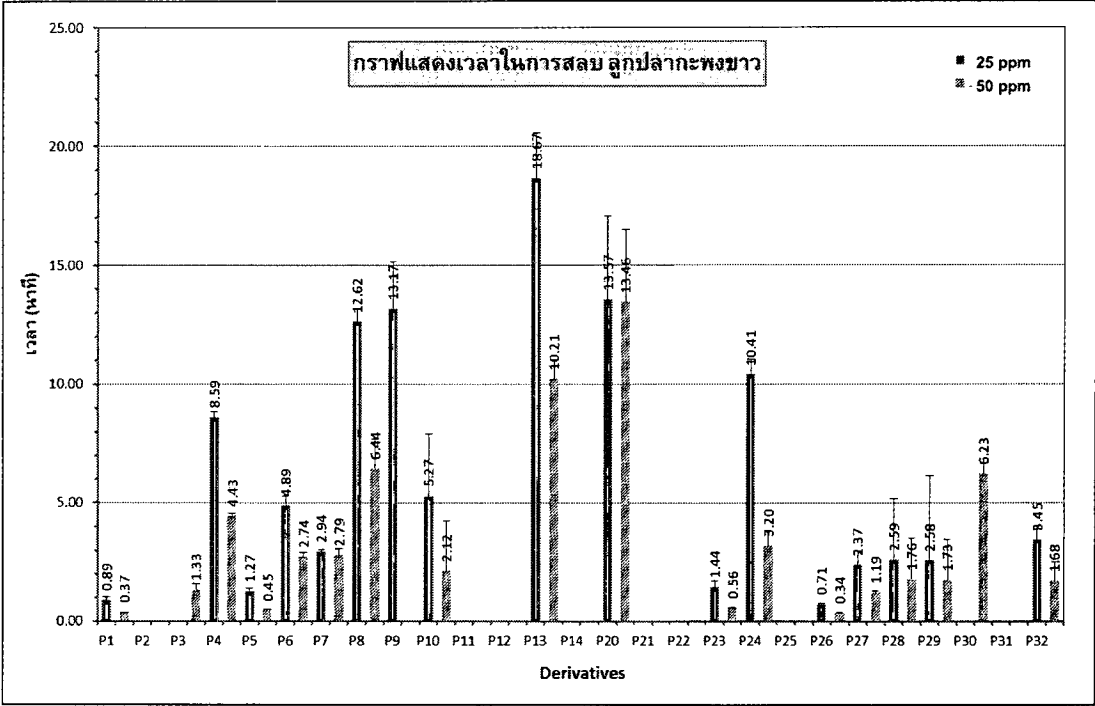
ในการทดลองทั้งหมดนี้ จะใช้ความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ที่ 25 และ 50 ppm หลังจากทดสอบใช้ความเข้มข้นทั้งสองความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ยูจินอลที่เตรียมได้ทั้งสิ้น 25 ชนิด (P2-13 และ P20-P32) และชุดควบคุม P14 (control) ที่ไม่มีสารอนุพันธ์ของยูจินอล เปรียบเทียบกับยูจินอล (P1) พบว่า การออกฤทธิ์ต่อลูกปลากระพงและปลากระพงขาววัยรุ่นมีผลแตกต่างกันเล็กน้อย โดยสามารถพิจารณาได้จากกราฟการสลายเป็นหลัก (กราฟ 3.5a-b) โดยสารอนุพันธ์ที่ให้ประสิทธิภาพดีในการสลายปลาทั้ง 2 กลุ่ม คือ อนุพันธ์ที่สามารถสลายปลากระพงขาววัยอ่อน และปลากระพงขาววัยรุ่น ได้ภายในเวลา 5 นาที ได้แก่ P3 P4 P5 P6 P7 P8 P23 P24 P26 P27 P28 P29 และ P32 รวม 13 ชนิด โดยพิจารณาจากระยะเวลาที่สั้นที่สุด เมื่อเทียบกับยูจินอล (P1) ดังแสดงในตาราง 3.21 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบอนุพันธ์ที่มีศักยภาพในการสลายปลากระพงขาววัยอ่อน และปลากระพงขาววัยรุ่น โดยอนุพันธ์ P4 P6 P8 P24 จะออกฤทธิ์ได้เร็วในปลากระพงขาววัยรุ่น ส่วน P28 และ P32 จะออกฤทธิ์ได้เร็วในปลากระพงขาววัยอ่อน ดังนั้นเมื่อพิจารณาโดยรวมแล้วจะพบว่าอนุพันธ์ที่มีศักยภาพในการสลายปลากระพงขาววัยอ่อน และปลากระพงขาววัยรุ่น ได้แก่ P3 P5 P7 P23 P26 P27 และ P29 รวม 7 ชนิด



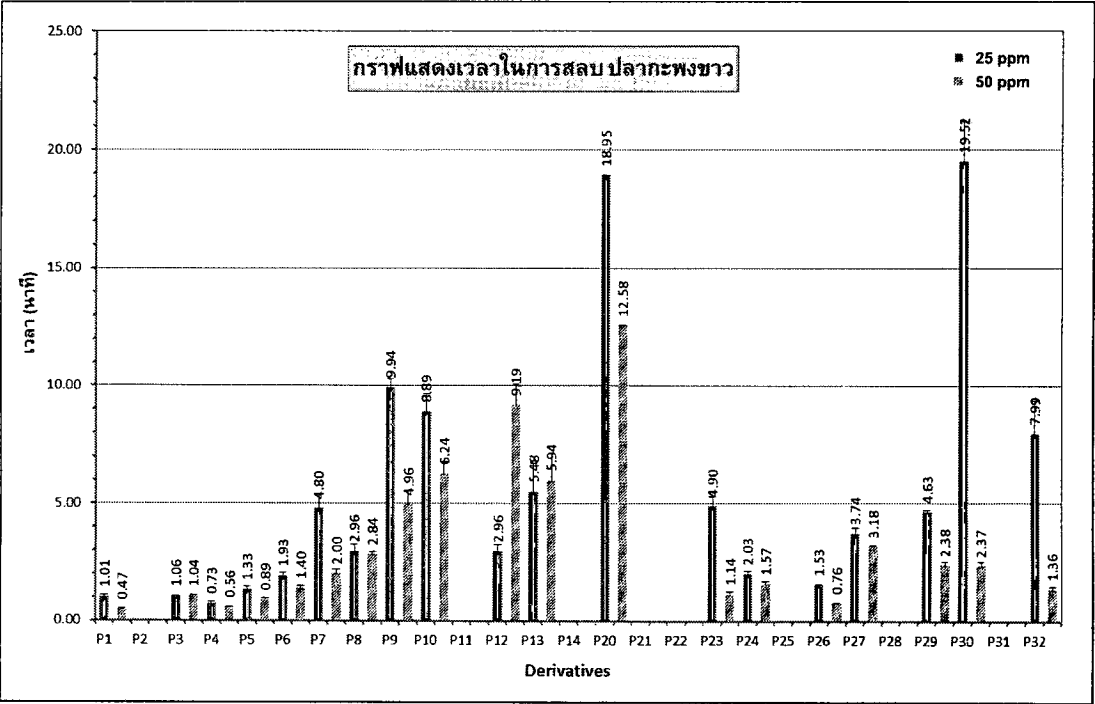
เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างแล้ว จะเห็นว่าอนุพันธ์ที่สามารถออกฤทธิ์การสลายปลาในกลุ่มปลากระพงขาวได้นั้นจะโครงสร้างที่หลากหลาย แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าอนุพันธ์ส่วนใหญ่จะเป็นอนุพันธ์ที่มีส่วนของแอลิลอยู่ภายในโมเลกุล ในขณะที่หมู่ไฮดรอกซีและหมู่เมทอกซีนั้น จะต้องมีความเหมาะสม (เช่นเดียวกับกรณีของปลาตุ๊ก)

ตาราง 3.21 สารอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการสลายปลากะพงขาววัยอ่อนและปลากะพงขาววัยรุ่น ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

อนุพันธ์ (ความเข้มข้น/ppm)		เวลาที่ใช้ในการสลาย (นาที)	
		ลูกปลากะพงขาว	ปลากะพงขาววัยรุ่น
P1 Eugenol	25	0.89±0.12	1.01+0.09
	50	0.37±0.01	0.47+0.05
P3	25	NA	1.06+0.01
	50	1.33±0.26	1.04+0.04
P4	25	8.59±0.22	0.73+0.09
	50	4.43±0.11	0.56+0.01
P5	25	1.27±0.14	1.33+0.13
	50	0.45±0.04	0.89+0.07
P6	25	4.89±0.37	1.93+0.12
	50	2.74±0.15	1.40+0.11
P7	25	2.94±0.08	4.80+0.54
	50	2.79±0.26	2.00+0.19
P8	25	11.62±0.55	2.96+0.28
	50	6.44±1.25	2.84+0.11
P23	25	1.44±0.27	4.90+0.39
	50	0.56±0.03	1.14+0.09
P24	25	10.41±0.63	2.03+0.10
	50	3.20±0.65	1.57+0.12
P26	25	0.71±0.06	1.53+0.04
	50	0.34±0.03	0.76+0.02
P27	25	2.37±0.58	3.74+0.22
	50	1.19±0.06	3.18+0.04
P28	25	2.59±2.59	NA
	50	1.76±1.76	NA
P29	25	2.58±3.58	4.63+0.08
	50	1.73±1.73	2.38+0.16
P32	25	3.45±0.44	7.99+1.39
	50	1.68±0.85	1.36+0.13



a)



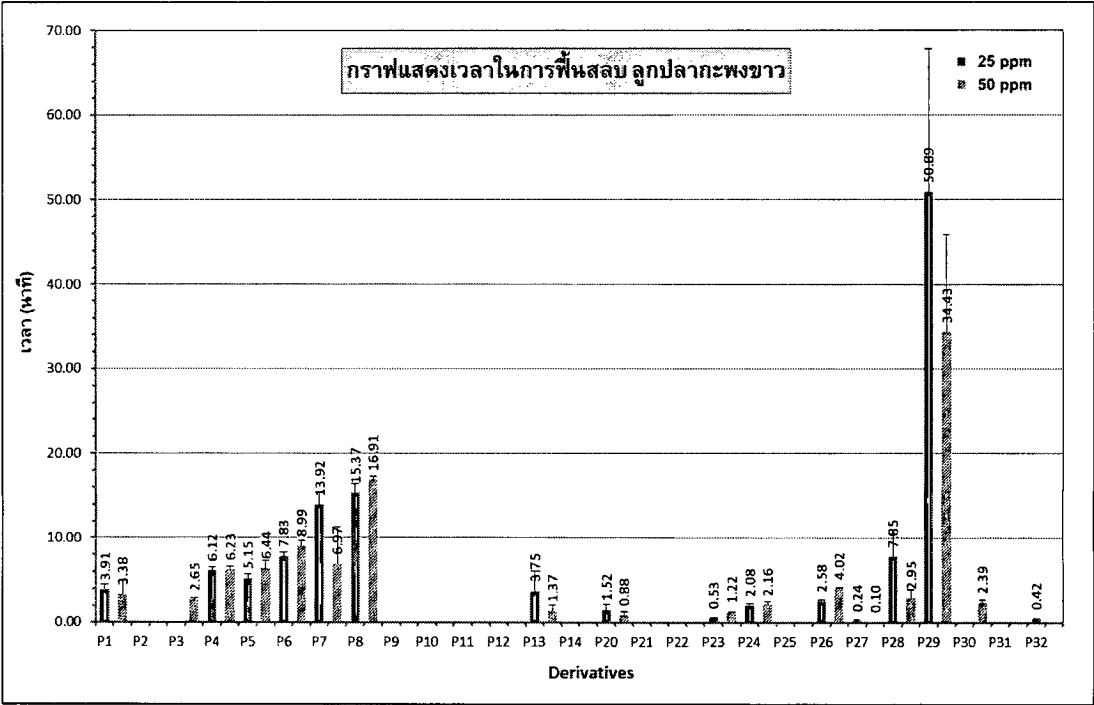
b)

กราฟ 3.5 เวลาที่ใช้ในการสลับปลากะพงขาว a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น เมื่อทำการสลับด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

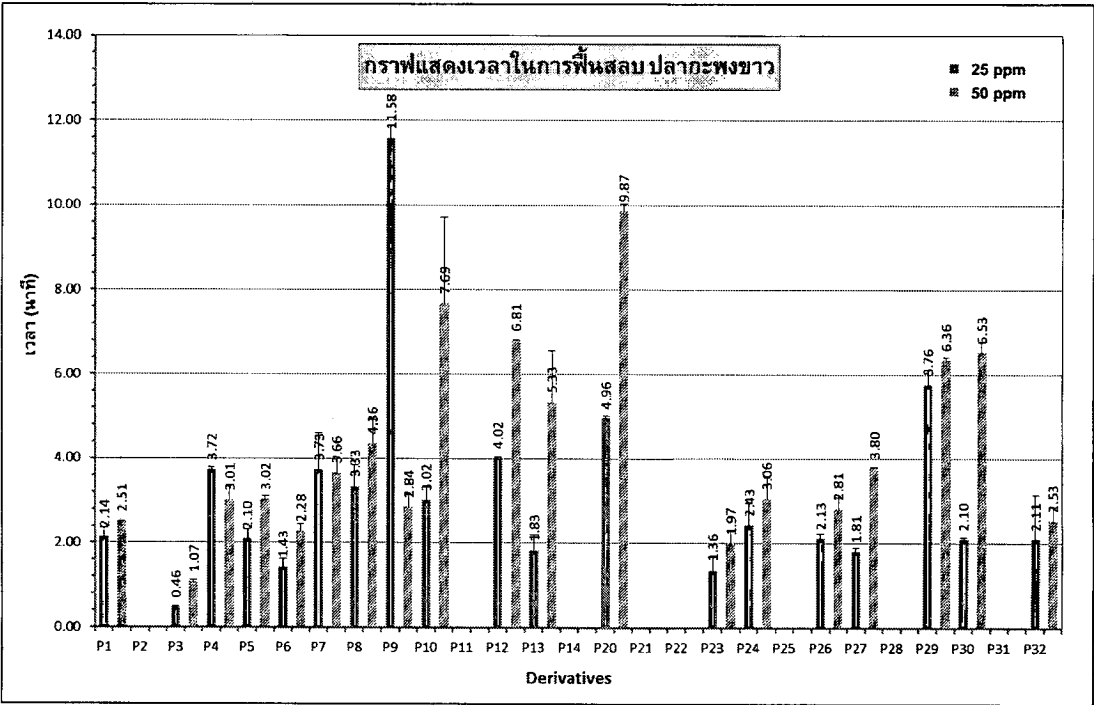
อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับยูจีนอลแล้วจะพบว่า สารอ้างอิงยูจีนอลยังคงให้ผลการสลบที่ดีที่สุด โดยอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพใกล้เคียงที่สุด คือ อนุพันธ์ P26 (Isoeugenol)

สำหรับการทดลองการฟั่นการสลบ จะพบว่าในกรณีของปลากะพงนั้น จะมีอัตราในการฟั่นสลบได้ค่อนข้างเร็วเมื่อเทียบกับปลาตุก โดยปลากะพงทั้งปลากะพงขาววัยอ่อนและวัยรุ่น จะสามารถฟั่นสลบได้ภายในระยะเวลา 5 นาที ดังจะเห็นได้จากกราฟที่ 3.6a-b อนุพันธ์ที่ทำให้ฟั่นสลบช้าที่สุด คือ อนุพันธ์ P29 ที่จะใช้เวลาในช่วง 30-50 นาที ในปลากะพงขาววัยอ่อน และ 5-6 นาที ในปลากะพงขาววัยรุ่น แต่เมื่อพิจารณาพร้อมกับอัตราการรอดตาย พบว่าในปลากะพงขาววัยอ่อน อนุพันธ์ที่มีศักยภาพ จะมีอัตราการรอดตายอยู่ในเกณฑ์ดี ยกเว้น P7 และ P29 ที่มีอัตราการรอดตายที่ค่อนข้างต่ำ (ร้อยละ 50-97 สำหรับ P7 และร้อยละ 60-80 สำหรับ P29) ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากปลากะพงขาววัยอ่อนนั้นจะมีความทนทานที่ต่ำ และตอบสนองต่อปัจจัยแวดล้อมภายนอกได้ง่ายกว่า ส่วนในปลากะพงวัยรุ่นนั้น อนุพันธ์ที่มีศักยภาพทั้งหมดจะมีอัตราการรอดตายที่ร้อยละ 100

เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองโดยรวมทั้งหมด ทั้งเวลาที่ใช้ในการสลบ ฟั่นสลบ และอัตราการรอดตาย ความสะดวกในการเตรียมและการสังเคราะห์ จะพบว่าอนุพันธ์ที่มีศักยภาพที่ดีที่จะใช้ในการสลบปลาในกลุ่มปลากะพงขาว ทั้งปลากะพงขาววัยอ่อนและปลาวัยรุ่น คือ อนุพันธ์ P5 และ P26 เนื่องจากสามารถสลบและฟั่นสลบได้มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับยูจีนอล และมีอัตราการรอดตายที่สูงมากกว่าร้อยละ 97

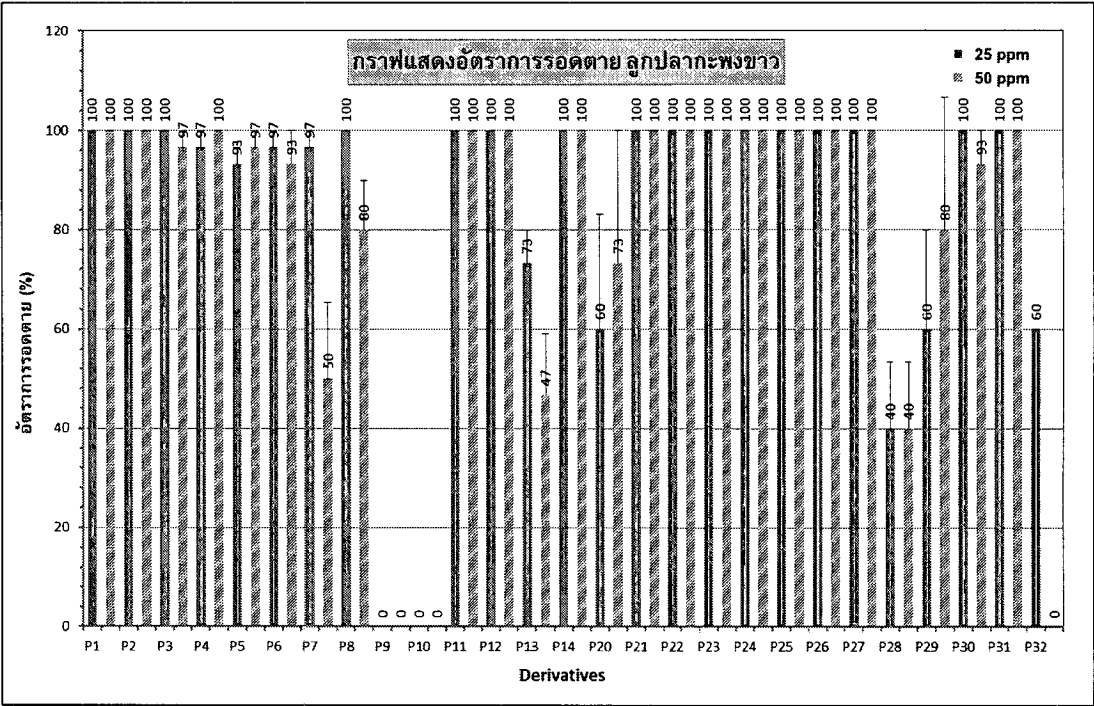


a)

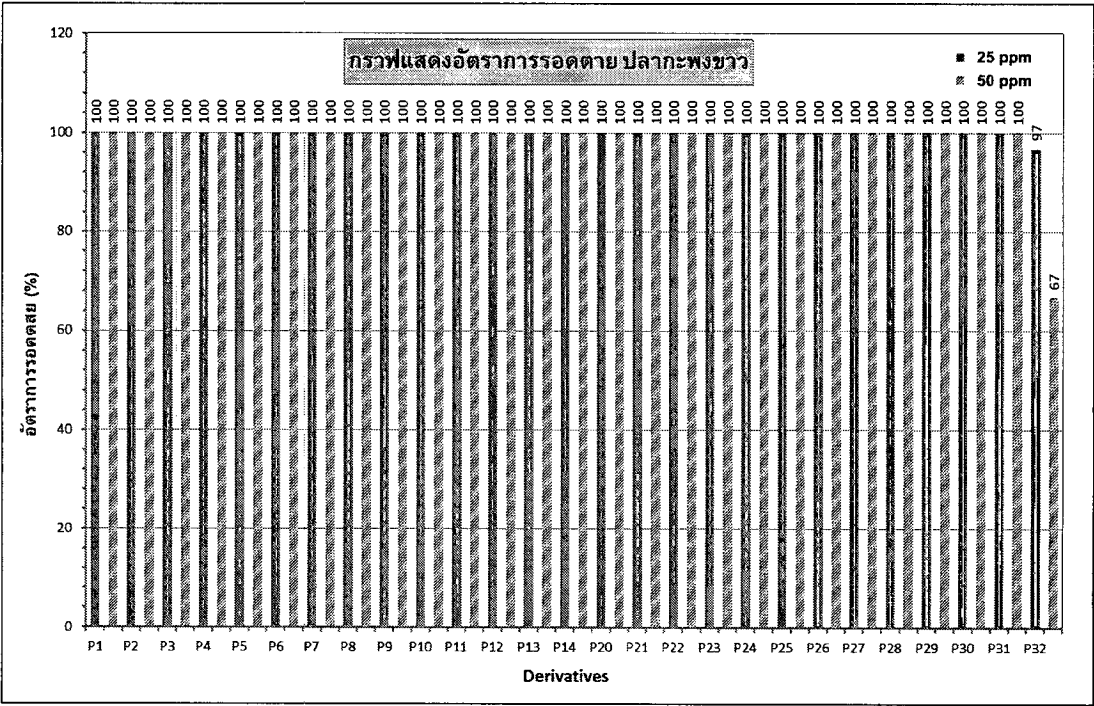


b)

กราฟ 3.6 เวลาที่ใช้ในการฟิ้นสลับ ในปลาพะงขาว a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น ด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm



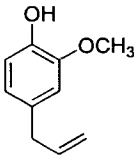
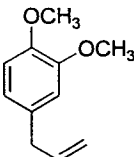
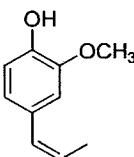
a)



b)

กราฟ 3.7 อัตราการรอดตายของปลากะพงขาว a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น เมื่อทำการสลับด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

ตาราง 3.22 สารอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการสลบ ปลากะพงขาววัยอ่อน และ ปลากะพงขาววัยรุ่น ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

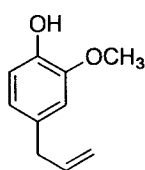
อนุพันธ์	โครงสร้าง	conc	เวลาในการสลบ (นาท)		เวลาในการฟื้น สลบ (นาท)		อัตราการรอดตาย (%)	
			ลูก	วัยรุ่น	ลูก	วัยรุ่น	ลูก	วัยรุ่น
P1 (Eugenol)		25	0.89±0.12	1.01±0.09	3.91±0.62	2.14±0.23	100±0	100±0
		50	0.37±0.01	0.47±0.05	3.38±1.61	2.51±0.01	100±0	100±0
P5		25	1.27±0.14	1.33±0.13	5.15±0.62	2.10±0.23	93±3	100±0
		50	0.45±0.04	0.89±0.07	6.44±0.86	3.02±0.08	97±3	100±0
P26		25	0.71±0.06	1.53±0.04	2.58±0.08	2.13±0.11	100±0	100±0
		50	0.34±0.03	0.76±0.02	4.02±0.16	2.81±0.28	100±0	100±0
P14 (Placebo)	-	25	NA	NA	NA	NA	100±0	100±0
		50	NA	NA	NA	NA	100±0	100±0

*NA = No Anesthetic (ไม่แสดงฤทธิ์การสลบ)

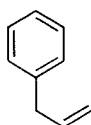
3.3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การสลบในกุ้งขาว

กุ้งขาวที่ใช้ในการทดลองมี 2 ขนาด ได้แก่ กุ้งขาววัยอ่อน (ความยาวเฉลี่ย 1.0 เซนติเมตร) และกุ้งขาววัยรุ่น (ความยาวเฉลี่ย 11.13 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 10.64 กรัม) ก่อนการทดลองจะพักไว้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มีแสงนบปิดบ่อเพื่อลดแสงประมาณ 60% ให้ ออกซิเจนที่ 6.5 ppm อุณหภูมิ น้ำ 27-29 °C pH 7.8-8.2 และงดให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง

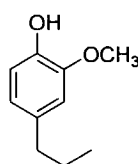
ในการทดลองนี้ จะใช้ความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ที่ 25 และ 50 ppm หลังจากทดสอบใช้ความเข้มข้นทั้งสองความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ยูจีนอลที่เตรียมได้ทั้งสิ้น 25 ชนิด (P2-13 และ P20-P32) และชุดควบคุม P14 (control) ที่ไม่มีสารอนุพันธ์ของยูจีนอล เปรียบเทียบกับยูจีนอล (P1) พบว่า ในกรณีกุ้งขาววัยอ่อน อนุพันธ์ของยูจีนอลที่ทำการสังเคราะห์ในงานวิจัยยังให้ผลการสลบไม่ด้นักเมื่อเทียบกับสารอ้างอิงยูจีนอล โดยอนุพันธ์ที่ให้ประสิทธิภาพพอประมาณในการสลบกุ้งขาววัยอ่อน ได้แก่ P4 P7 P28 และ P29 โดยสามารถสลบได้ภายในระยะเวลาไม่เกิน 10 นาที เมื่อเทียบกับยูจีนอลที่ใช้เวลา 3-4 นาที (กราฟ 3.1a-b) ในทางตรงกันข้าม อนุพันธ์ที่ให้ประสิทธิภาพดีในการสลบกุ้งขาววัยรุ่น โดยออกฤทธิ์ได้ดีกว่ายูจีนอล มีทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ P2 P6 P7 P9 P10 P11 P13 P20 P27 และ P28



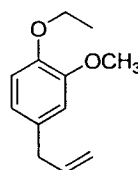
P1 (Eugenol)



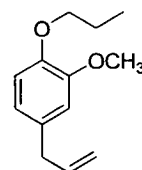
P2



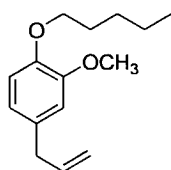
P4



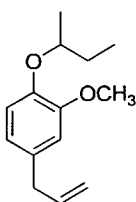
P6



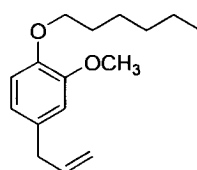
P7



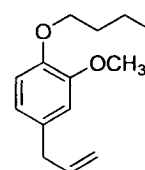
P9



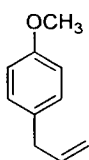
P10



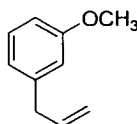
P11



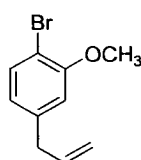
P13



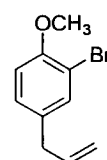
P20



P27



P28

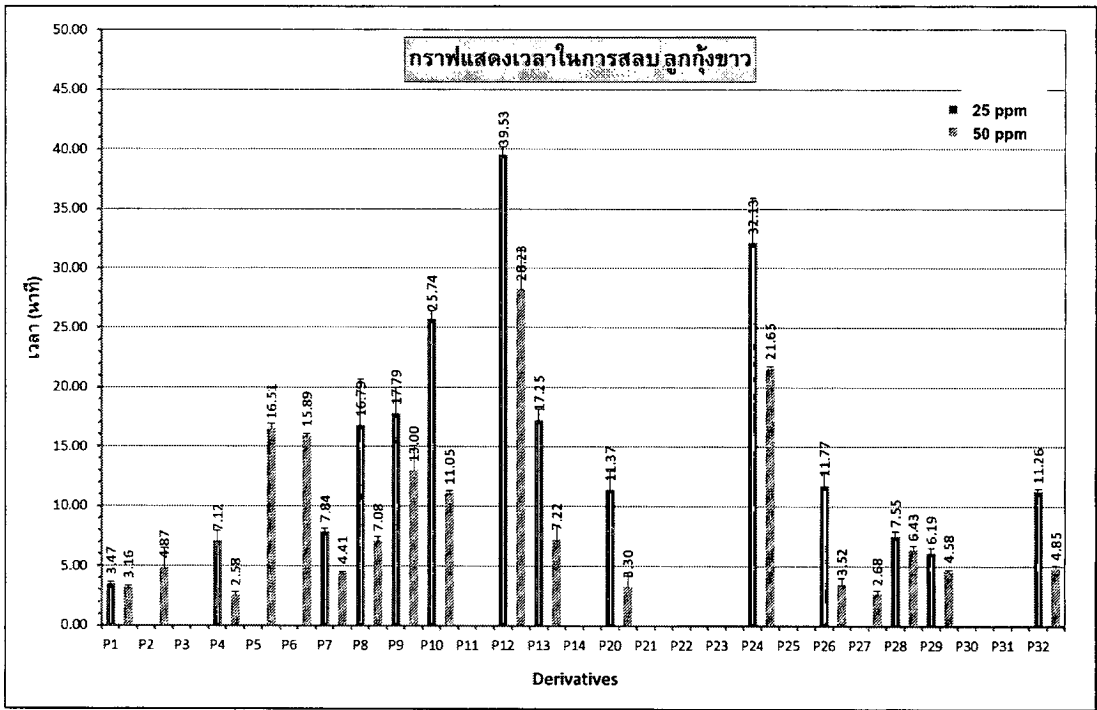


P29

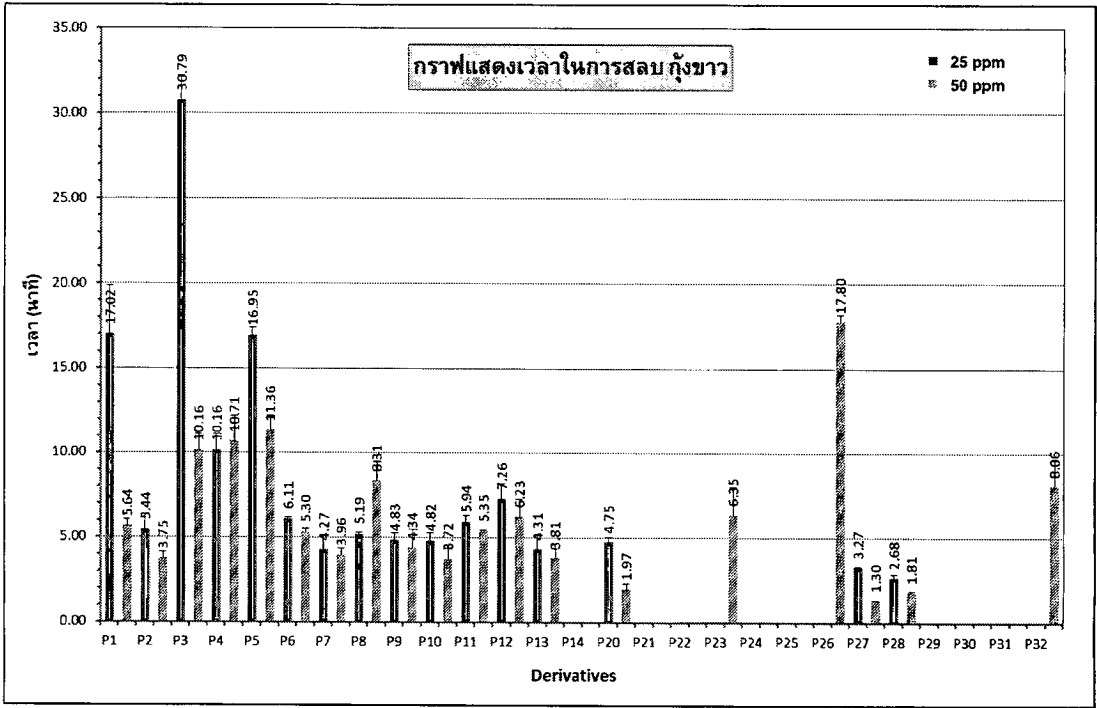
ตาราง 3.23 สารอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการสลบ กุ้งขาววัยอ่อน และกุ้งขาววัยรุ่น ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

อนุพันธ์ (ความเข้มข้น/ppm)		เวลาที่ใช้ในการสลบ (นาที)	
		ลูกกุ้งขาว	กุ้งขาวขนาดกลาง
P1 Eugenol	25	3.47±0.16	17.02±2.86
	50	3.16±0.19	5.64±0.41
P2	25	NA	5.44±0.91
	50	4.87±1.63	3.75±0.36
P4	25	7.12±0.85	10.16±0.97
	50	2.58±0.28	10.71±1.50
P6	25	NA	6.11±0.08
	50	15.89±0.17	5.30±0.20
P7	25	7.84±0.30	4.27±0.80
	50	4.41±0.13	3.96±0.38
P9	25	17.79±2.19	4.83±0.43
	50	13.00±2.08	4.34±1.13
P10	25	25.74±0.70	4.82±0.44
	50	11.05±0.22	3.72±0.63
P11	25	NA	5.94±0.36
	50	NA	5.35±0.07
P13	25	17.25±0.94	4.31±0.89
	50	7.22±1.21	3.81±0.56
P20	25	11.37±1.63	4.75±0.29
	50	8.30±0.89	1.97±0.30
P27	25	NA	3.27±0.01
	50	2.68±0.27	1.30±0.03
P28	25	7.55±0.42	2.68±0.20
	50	6.43±0.32	1.81±0.07
P29	25	6.19±0.41	d
	50	4.58±0.11	d

*NA = No Anesthetic (ไม่แสดงฤทธิ์การสลบ) และ d = สัตว์น้ำตายร้อยละ 100



a)



b)

กราฟ 3.8 เวลาที่ใช้ในการสลับลูกกังขา a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น เมื่อทำการสลับด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

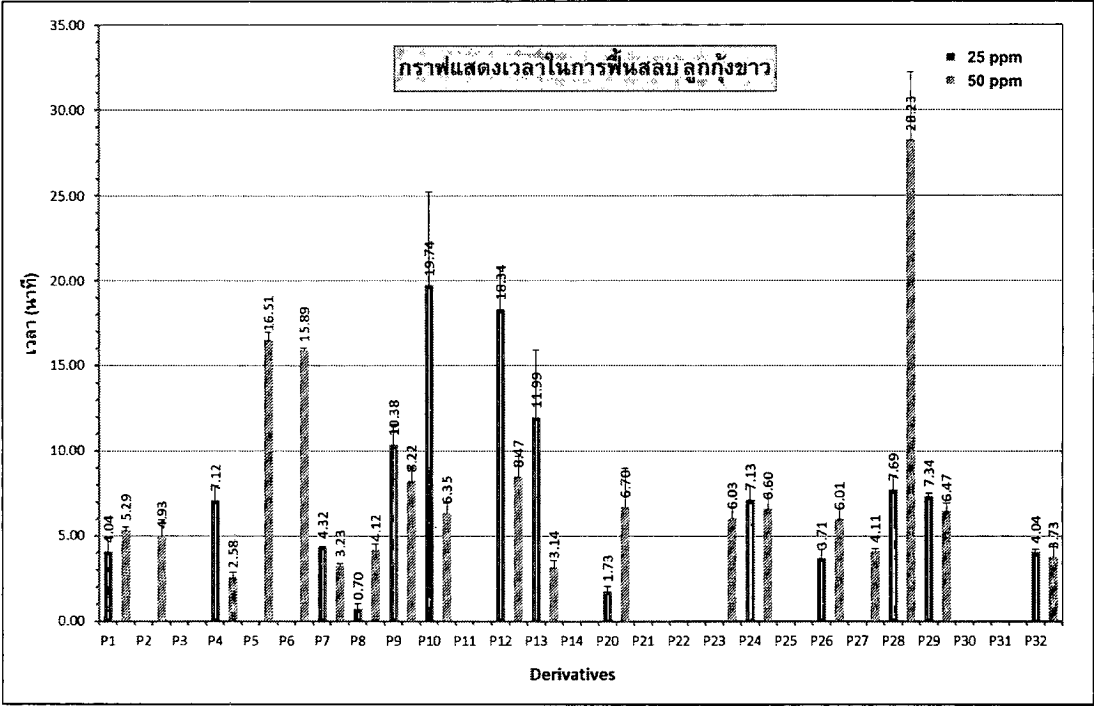
เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้ดีในกึ่งขาวแล้ว จะเห็นว่าสามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการดัดแปรโครงสร้างบริเวณหมู่ไฮดรอกซี ได้แก่ อนุพันธ์ P6 P7 P9 P10 P11 และ P13 ซึ่งจะออกฤทธิ์ได้ดีโดยเฉพาะในกึ่งขาววัยรุ่น และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน โดยจะมีความยาวของสายโซ่ตั้งแต่ 2 อะตอม จนถึง 6 อะตอม อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาอนุพันธ์ที่มีคาร์บอน 1 อะตอม และ 7 อะตอม รวมถึงสายโซ่ที่เป็นกิ่งก็พบว่าแสดงฤทธิ์การเป็นยาเสพติดเช่นกัน แต่ไม่ดีเทียบเท่ากับอนุพันธ์ที่กล่าวมา แสดงว่าการดัดแปรหมู่ไฮดรอกซีด้วยการแทนที่ด้วยสายโซ่คาร์บอนด้วยความยาวที่เหมาะสม จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์เป็นยาเสพติดยิ่งขึ้น ส่วนอนุพันธ์อีกกลุ่มหนึ่งเป็นกลุ่มที่มีการดัดแปรโครงสร้างบริเวณอื่นๆ ได้แก่ อนุพันธ์ P2 P4 P20 P27 P28 และ P28 เช่น P2 ที่มีการกำจัดหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซีและเมทอกซีออก หรือ P4 ที่เปลี่ยนหมู่แอลลิลเป็นแอลคิล หรือ P20 ที่กำจัดหมู่เมทอกซีออกและดัดแปรหมู่ไฮดรอกซีเป็นเมทอกซี หรือ P27 ที่มีการกำจัดหมู่ไฮดรอกซีออก หรือ P28 ที่มีการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยโบรมีนอะตอม หรือ P29 ที่มีการแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยโบรมีนอะตอมและดัดแปรหมู่ไฮดรอกซีเป็นเมทอกซี โดยสามารถพิจารณาแยกเป็นสองส่วน คือ การสลับกึ่งขาววัยอ่อน และการสลับกึ่งขาววัยรุ่น ในส่วนของกึ่งขาววัยอ่อน นั้นจะเห็นได้ว่าอนุพันธ์ดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์ในการสลับกึ่งขาววัยอ่อนได้ แต่จะให้ผลได้ไม่ดีเทียบเท่ากับสารอ้างอิงยูจีนอล โดยจะใช้ระยะเวลาในการสลับนานกว่า ส่วนในกึ่งขาววัยรุ่น อนุพันธ์ดังกล่าวจะออกฤทธิ์ได้เร็วกว่ายูจีนอลทั้งหมด ยกเว้น P4 ที่ออกฤทธิ์ได้ช้ากว่า และอนุพันธ์ P2 P9 P10 P11 P13 P28 และ P29 ที่มีอัตราการตายของสัตว์น้ำสูงจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการสลับกึ่งขาว แสดงรายละเอียดดังกราฟ

3.8a-b

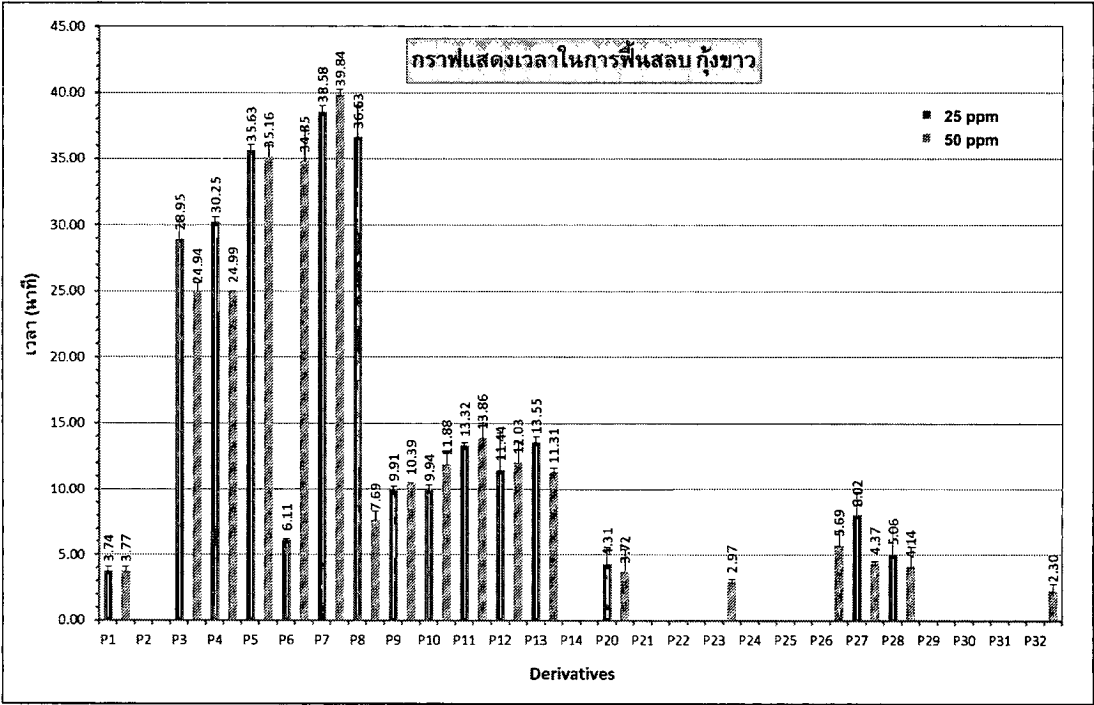
เมื่อพิจารณาในส่วนของการฟื้นฟูสภาพ สสารอนุพันธ์ทั้งหมด มีระยะเวลาของการฟื้นฟูสภาพในเกณฑ์ดี โดยจะใช้เวลาในการฟื้นฟูสภาพอยู่ในช่วงประมาณ 4-40 นาที เมื่อเทียบกับยูจีนอลที่ใช้เวลาประมาณ 3 นาที และมีอัตราการรอดตายภายหลังการทดสอบที่ดี ประมาณร้อยละ 90-100 (ยกเว้นอนุพันธ์ P2 P9 P10 P11 P13 P28 และ P29 ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว) เมื่อเทียบกับยูจีนอลที่มีอัตราการรอดตายประมาณร้อยละ 87-100 แสดงรายละเอียดดังกราฟ 3.9a-b และกราฟ 3.10a-b

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าอนุพันธ์ที่มีศักยภาพในการสลับกึ่งขาวนั้น ได้แก่ P6 P7 P20 และ P27 โดย P6 จะออกฤทธิ์ได้ดีในกึ่งขาววัยรุ่น ส่วน P20 และ P27 จะมีอัตราการฟื้นฟูสภาพค่อนข้างเร็ว โดยที่ P7 น่าจะมีศักยภาพดีที่สุด เนื่องจากสามารถออกฤทธิ์ได้ดีทั้งในกึ่งขาววัยอ่อน กึ่งขาววัยรุ่น อัตราการฟื้นฟูสภาพในช่วงประมาณ 30-40 นาที และมีอัตราการรอดตายสูง แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ที่สามารถแสดงฤทธิ์การสลับกึ่งขาวได้นั้นจะมีโครงสร้างที่มีการดัดแปรหมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เอทอกซี ($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$) หรือ หมู่โพรพอกซี ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) หรือในโครงสร้างอาจจะไม่มีหมู่ไฮดรอกซี หรือหมู่เมทอกซีก็ได้ แต่จะต้องมีส่วนของวงอะโรมาติกที่มีหมู่แอลลิลเป็นส่วนประกอบหลัก แสดงดังตาราง

3.24

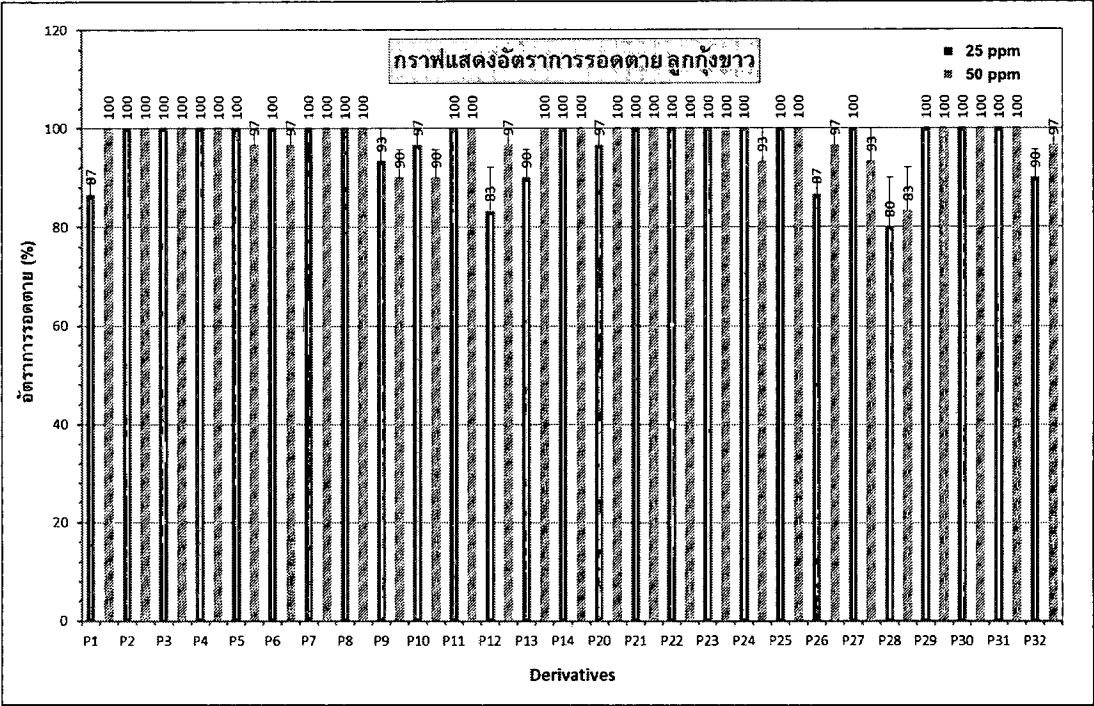


a)

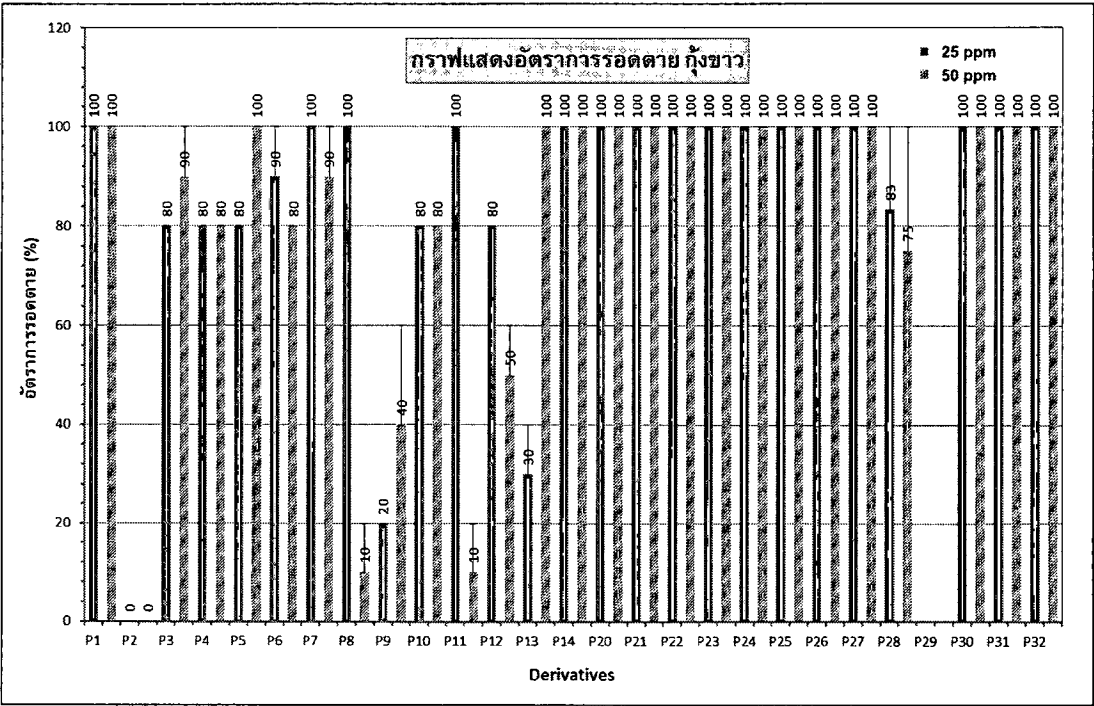


b)

กราฟ 3.9 เวลาที่ใช้ในการฟอสลบกุ้งขาว a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น ด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm



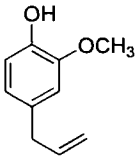
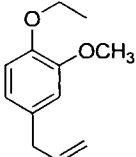
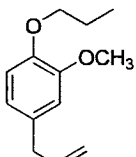
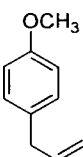
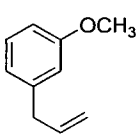
a)



b)

กราฟ 3.10 อัตราการรอดตายของกุ้งขาว a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น เมื่อทำการสลับด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

ตาราง 3.24 สารอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการสลบ กุ้งขาววัยอ่อน และ กุ้งขาววัยรุ่น ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

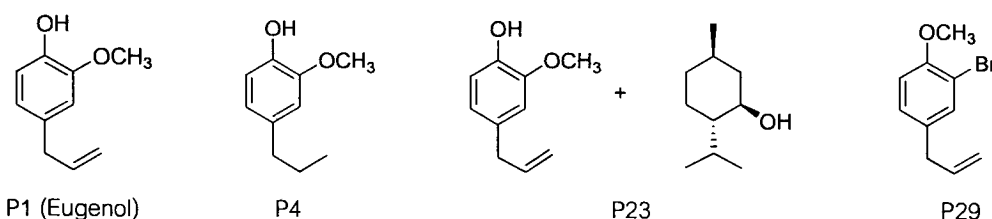
อนุพันธ์	โครงสร้าง	conc	เวลาในการสลบ (นาท)		เวลาในการฟื้น สลบ (นาท)		อัตราการรอดตาย (%)	
			ลูก	วัยรุ่น	ลูก	วัยรุ่น	ลูก	วัยรุ่น
P1 (Eugenol)		25	3.47±0.16	17.02±2.86	4.04±0.82	3.74±0.36	87±3	100±0
		50	3.16±0.19	5.64±0.41	5.29±0.23	3.77±0.36	100±0	100±0
P6		25	NA	6.11±0.08	NA	6.11±0.08	100±0	90±10
		50	15.89±0.17	5.30±0.20	15.89±0.17	34.85±2.55	97±3	80±0
P7		25	7.84±0.30	4.27±0.80	4.32±0.07	38.58±0.45	100±0	100±0
		50	4.41±0.13	3.96±0.38	3.23±0.17	39.84±0.40	100±0	90±10
P20		25	11.37±1.63	4.75±0.29	1.73±0.29	4.31±1.25	97±3	100±0
		50	8.30±0.89	1.97±0.30	6.70±2.30	3.92±1.67	100±0	100±0
P27		25	NA	3.27±0.01	NA	8.02±1.74	100±0	100±0
		50	2.68±0.27	1.30±0.03	4.11±0.14	4.37±0.15	93±7	100±0
P14 (Placebo)	-	25	NA	NA	NA	NA	100±0	100±0
		50	NA	NA	NA	NA	100±0	100±0

*NA = No Anesthetic (ไม่แสดงฤทธิ์การสลบ)

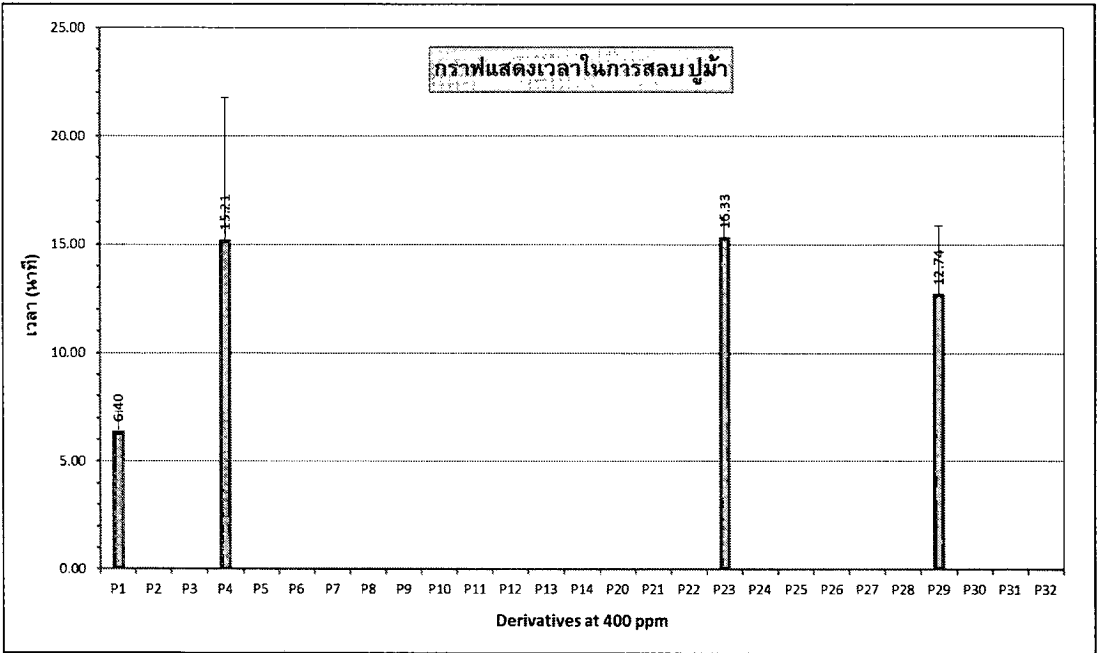
3.3.4 ผลการทดสอบฤทธิ์การสลบในปูม้า

ปูม้าที่ใช้ในการทดลองมีขนาดเดียว (ความยาวเฉลี่ย 11.0 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 94.4 กรัม) ก่อนการทดลองจะพักไว้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยมีแสงนิตบ่อเพื่อลดแสงประมาณ 60% ให้ออกซิเจนที่ 6.5 ppm อุณหภูมิ 28-29 °C pH 7.9-8.1 และงดให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง

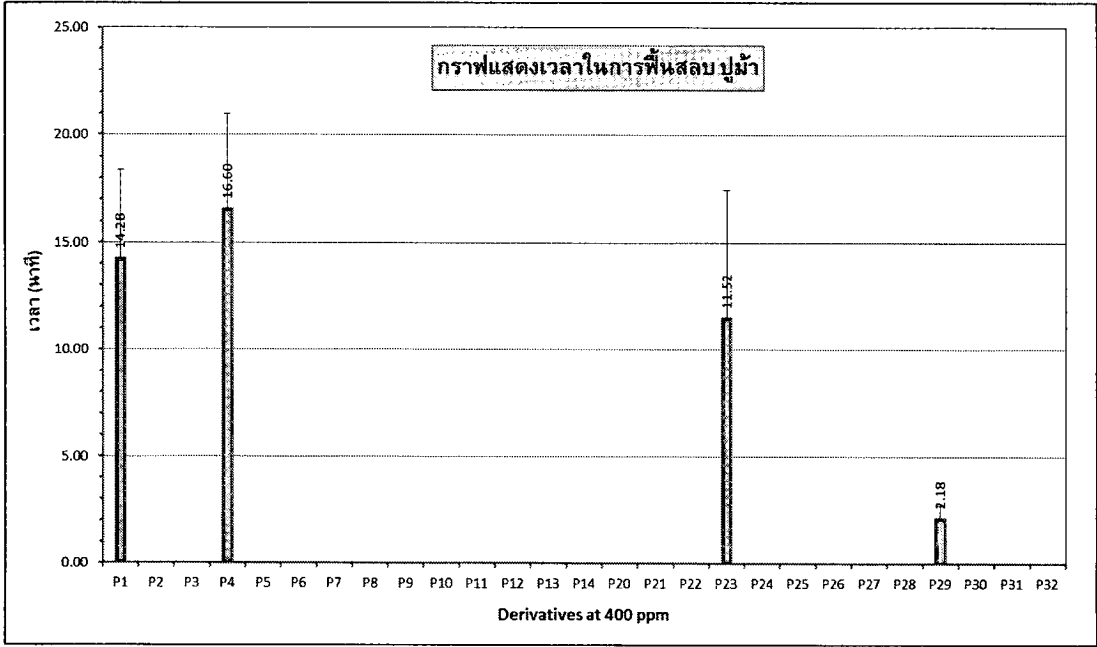
ในการทดลองในปูม้าจะมีการเปลี่ยนแปลงการใช้ความเข้มข้นของสารอนุพันธ์จากเดิมที่ใช้ความเข้มข้นที่ 25 และ 50 ppm ซึ่งไม่สามารถทำให้ปูสลบได้ จึงได้ทดลองเพิ่มความเข้มข้นขึ้น จนถึงความเข้มข้น 400 ppm และได้ใช้ความเข้มข้นนี้ของสารอนุพันธ์ยูจีนอลที่เตรียมได้ทั้งสิ้น 25 ชนิด (P2-13 และ P20-P32) และชุดควบคุม P14 (control) ที่ไม่มีสารอนุพันธ์ของยูจีนอล เปรียบเทียบกับยูจีนอล (P1) พบว่าอนุพันธ์ส่วนใหญ่ยังคงไม่สามารถสลบปูม้าได้ โดยอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้บ้าง ได้แก่ อนุพันธ์ P4 P23 และ P29 โดยใช้เวลาประมาณ 15.21 16.33 และ 12.74 นาที ตามลำดับเมื่อเทียบกับยูจีนอล (P1) ที่ใช้เวลาในการสลบเพียง 6.40 นาที (กราฟ 3.11)



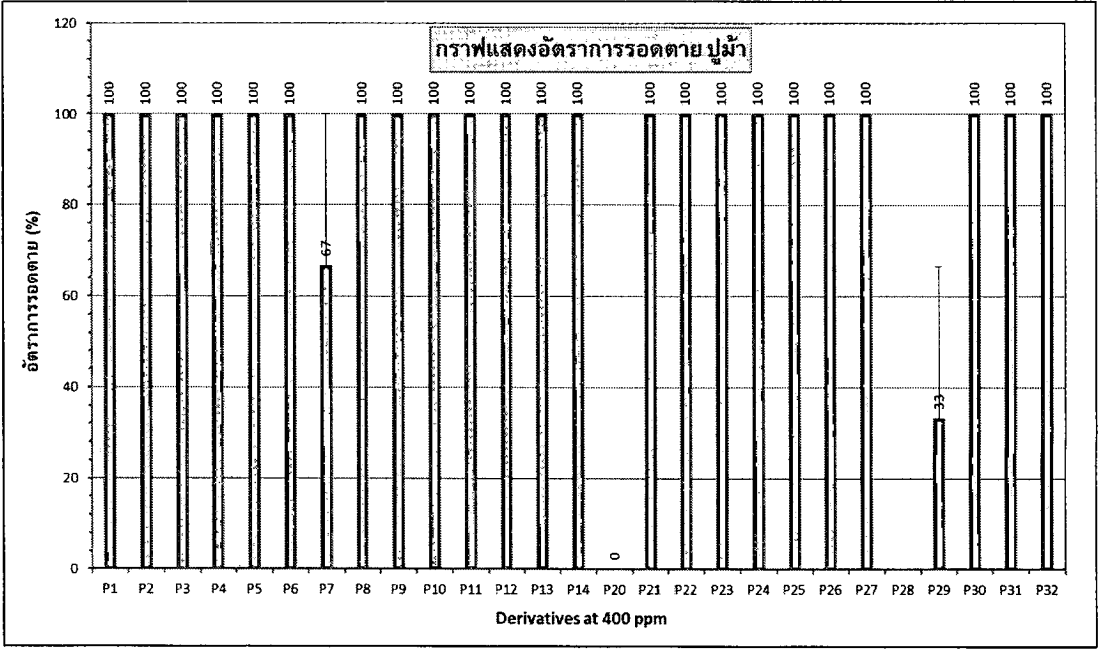
ในส่วนของการขึ้นสลบ อนุพันธ์ P4 P23 และ P29 จะใช้เวลาในการขึ้นสลบประมาณ 16.60 11.52 และ 2.18 นาที ตามลำดับเมื่อเทียบกับยูจีนอล (P1) ที่ใช้เวลาในการขึ้นสลบ 14.28 นาที (กราฟ 3.12) และมีอัตราการรอดตาย 100% ยกเว้นอนุพันธ์ P29 ที่มีอัตราการรอดตายต่ำ (33%) แสดงว่ามีความเป็นพิษสูง เมื่อเทียบกับยูจีนอลที่มีอัตราการรอดตายร้อยละ 100 แสดงรายละเอียดดังกราฟ 3.13 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าปูม้ามีความทนทานต่อการสลบสูง อาจจะเนื่องมาจากปูม้ามีโครงสร้างของเหงือกที่แตกต่างไปจากสัตว์น้ำชนิดอื่น ซึ่งอาจจะมีการดูดซึมหรือการแพร่ผ่านของสารอนุพันธ์ได้ไม่ดีพอ หรือปูม้าอาจจะมีระบบประสาทที่ตอบสนองต่อสารสลบต่ำ หรืออนุพันธ์ที่ใช้ยังไม่สอดคล้องกับการรับรู้ของระบบประสาท แม้กระทั่งสารอ้างอิงยูจีนอลที่สามารถสลบปลาตก ปลากระพง และกุ้งขาวได้ดี ยังต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 400 ppm โดยสารอนุพันธ์ที่พอจะมีศักยภาพในการใช้เป็นยาสลบในปูม้าได้ คือ อนุพันธ์ P4 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่มีการดัดแปรหมู่แอลลิลให้กลายเป็นแอลเคน และอนุพันธ์ P23 ซึ่งเป็นของผสมระหว่างยูจีนอลกับเมนทอล เป็นที่น่าสังเกตว่าผลการทดลองนี้จะต่างจากในปลาตก ปลากระพง และกุ้งขาว ที่อนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ส่วนใหญ่จะเป็นการดัดแปรหมู่ฟังก์ชันบริเวณอื่น โดยจะต้องคงหมู่แอลลิลไว้ในโครงสร้างโมเลกุล ในขณะที่ปูม้าที่อนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้จะเป็นอนุพันธ์ที่มีการดัดแปรโครงสร้างบริเวณหมู่แอลลิล ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ได้สังเคราะห์ขึ้นเพียงชนิดเดียวเท่านั้น (เนื่องจากพิจารณาจากผลของการสลบในปลาตก ปลากระพง และกุ้งขาวเป็นหลัก) ผู้วิจัยมีความเห็นว่าถ้าต้องการพัฒนายาสลบในปูม้าต่อไปในอนาคตนั้น จะต้องเน้นการสังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีการดัดแปรบริเวณหมู่แอลลิลเป็นหลัก



กราฟ 3.11 เวลาที่ใช้ในการสลบปุ๋ย เมื่อทำการสลบด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

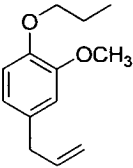
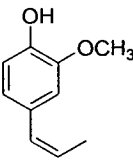
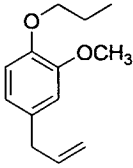
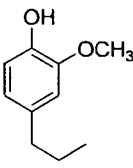


กราฟ 3.12 เวลาที่ใช้ในการฟั่นสลบปุ๋ย ด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm



กราฟ 3.13 อัตราการรอดตายของปูม้า เมื่อทำการสลับด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

ตาราง 3.25 สารอนุพันธ์ที่มีศักยภาพที่ดีที่สุดในการสลาย ปลาตก ปลากระพง กุ้งขาว และปูม้า เมื่อเทียบกับสารอ้างอิงจีนอล (เลขในวงเล็บ)

ประเภท	อนุพันธ์	โครงสร้าง	ppm	ผลการทดสอบ* (นาทีก/%)		
				เวลาสลาย**	เวลาฟื้นสลาย**	อัตราการรอด**
ปลาตก	P7		25	4.3 (10.2)	30.6 (10.3)	100 (81)
			50	3.4 (7.8)	40.5 (12.4)	100 (70)
ปลากระพง	P26		25	1.53 (1.01)	2.13 (2.14)	100 (100)
			50	0.76 (0.47)	2.81 (2.51)	100 (100)
กุ้งขาว	P7		25	4.27 (17.02)	38.58 (3.74)	100 (100)
			50	3.96 (5.64)	39.84 (3.77)	90 (100)
ปูม้า	P4		400	15.21 (6.40)	16.60 (14.28)	100 (100)

* แสดงผลเฉพาะในปลาตกวัยรุ่น ปลากระพงขาว กุ้งขาวขนาดกลางและปูม้า

** ผลการทดลองด้วยสารอ้างอิงจีนอลแสดงในวงเล็บ

เอกสารอ้างอิงบทที่ 3

- [1] Wilhelm, H., Wessjohann, L. A. An efficient synthesis of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin from xanthohumol by a novel demethylation process. *Tetrahedron*, **2006**, 62, 6961-6966.
- [2] Bernini, R., Barontini, M., Mosesso, P., Pepe, G., Willfor, S. M., Sjöholm, R. E., Eklundb, P. C., Saladino, R. A selective de-O-methylation of guaiacyl lignans to corresponding catechol derivatives by 2-iodoxybenzoic acid (IBX). The role of the catechol moiety on the toxicity of lignans. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2009**, 7, 2367-2377.
- [3] Augusto, J., Rodrigues, R., Pedro de Oliveira Filho, A., Paulo Moran, J. S. Regioselectivity of the nitration of phenol by acetyl nitrate adsorbed on silica gel. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 6733-6738.
- [4] Jin-mei, Z., Yue-qing, L., Wei-jie, Z. Demethylating Reaction of Methyl Ethers. *The Proceedings of the 3rd International Conference on Functional Molecules*. China: State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116012.
- [5] Zuo, L., Yao, S., Wang, W., Duan, W. An efficient method for demethylation of aryl methyl ethers. *Tetrahedron letters*, **2008**, 49, 4054-4056.
- [6] Kwak, J. H., Cho, Y. A., Jang, J. Y., Seo, S. Y., Lee, H., Hong, J. T., Han, S. B., Lee, K., Kwak, Y. S. and Jung, J. K. Expedient synthesis of 4-O-methylhonokiol via Suzuki-Miyaura cross-coupling. *Tetrahedron*, **2011**, 67(48), 1-4.
- [7] Bonin, C., Funicello, M., Scialpi, R., Spagnolo, P. Smiles rearrangement for the synthesis of 5-amino-substituted[1]benzothieno[2,3-b]pyridine. *Tetrahedron*, **2003**, 59, 7515-7520.
- [8] Mizuno, M., Yamano, M. A New Practical One-Pot Conversion of Phenols to Anilines. *Organic Letters*, **2005**, 7, 3629-3631.
- [9] Banno, T., Hayakawa, Y., Umeno, M. Some applications of the Grignard cross-coupling reaction in the industrial field. *Journal of Organometallic Chemistry*, **2008**, 653, 288-291.
- [10] Fujisaki, S., Eguchi, H., Omura, A., Regioselective bromination of phenol. *Journal of Organic Chemistry*, **1993**, 66, 6-16.
- [11] Majetich, G., Hicks, R., Reister, S. Electrophilic Aromatic Bromination Using Bromodimethyl sulfonium Bromide Generated in Situ. *Journal of Organic Chemistry*, **1997**, 62, 4321-4326.
- [12] Roy, S. C., Guin, C., Rana, K. K., Maitib, G. An efficient chemo and regioselective oxidative nuclear bromination of activated aromatic compounds using lithium bromide and ceric ammonium nitrate. *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 6941-6942.

- [13] Joshi, A. V., Baidossi, M., Mukhopadhyay, S., Sasson, Y. Oxidative Bromination of Activated Aromatic Compounds Using Aqueous Nitric Acid as an Oxidant. *Organic Process Research & Development*, **2004**, *8*, 568-570.
- [14] Choi, H. Y., Srisook, E., Jang, K. S., Chi, D. Y. Electrophilic Aromatic Addition Reaction: Electrophilic Attack at an Aromatic H Substituent Position. *Journal of Organic Chemistry*, **2005**, *70*, 1222-1226.
- [15] Prakash, K. C., Ramaswamy, A. V., Suresh, B. W. Regioselective, photochemical bromination of aromatic compounds using *N*-bromosuccinimide. *Tetrahedron Letters*, **2008**, *49*, 189-194.
- [16] Adibi, H., Abdol, R. H., Hashemi, M. A convenient and regioselective oxidative bromination of electron-rich aromatic rings using potassium bromide and benzyltriphenylphosphonium peroxymonosulfate under nearly neutral reaction conditions. *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48*, 1255-1259.
- [17] Chen, C. M., Liu, Y. C. A concise synthesis of honokiol. *Tetrahedron Letters*, **2009**, *50*, 1151-1152.
- [18] Bovonsombat, P., Ali, R., Khan, C. Facile *p*-toluenesulfonic acid-promoted para-selective monobromination and chlorination of phenol and analogues. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 6928-6935.
- [19] Greene, T. W., Wuts, P. G. M. Protective groups in organic synthesis, *A Wiley-Interscience Publication USA* ., **1999**, 251.
- [20] Azzena, U., Dettori, G., Idini, M. V., Pisano, L., Sechi, G. Regioselective reductive demethoxylation of 3,4,5-trimethoxystilbenes. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 7961-7966.
- [21] Nitin, S., Nandurkar, M. J., Bhanushali, S. R., Bhalchandra, J., Bhanage, M. Ultrasound promoted regioselective nitration of phenols using dilute nitric acid in the presence of phase transfer catalyst, *Ultrasonics Sonochemistry*, **2007**, *14*, 41-45.
- [22] Joshi, A. V., Baidoosi, M., Mukhopadhyay, S., Sasson, Y. Nitration of Phenol and Substituted Phenols with Dilute Nitric Acid Using Phase-Transfer Catalysts. *Organic Process Research and Department*. **2003**, *7*(1), 95-97.
- [23] Canales, L., Bandyopadhyay, D., Banik, B. K. Bismuth nitrate pentahydrate-induced novel nitration of eugenol. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 1-9.
- [24] Chen, C. M., Liu, Y. C. A concise synthesis of honokiol, *Tetrahedron Letters*, **2009**, *50*, 1151-1152.
- [25] Bolton, J. L., Comeau, E. and Vukonmanovic, V. The influence of 4-alkyl substituents on the formation and reactivity of 2-methoxy-quinone methides: evidence that extended conjugation dramatically stabilizes the quinone methide formed from eugenol. *Chemico-Biological Interactions*, **1995**, *95*, 279-290.

- [26] Carrasco, A. H., Espinosa, C. L., Cardile, V., Gallardo, C., Cardona, W., Lombardo, L., Catalan, M. K., Cuellar, F. M., Russo, A., Eugenol and its synthetic analogue inhibit cell growth of human cancer cells (part I). *Journal of Brazilian Chemical Society*, **2008**, 19, 3, 543-548.
- [27] Wang, A., Jiang, H. Palladium-Catalyzed Direct Oxidation of Alkenes with Molecular Oxygen: General and Practical Methods for the Preparation of 1,2-Diols, Aldehydes, and Ketones, *Journal of Organic Chemistry*, **2010**, 75, 7, 2321-2326.
- [28] Rajesh, K., Somasundaram, M., Saiganesh, R., Balasubramanian, K. K. Bromination of Deactivated Aromatic. A simple and Efficient Method, *Journal of Organic Chemistry*, **2007**, 5867-5869.
- [29] Menini, L., Elena V. G. Novel highly selective catalytic oxychlorination of phenols, *Chemistry Communication*, **2006**, 209-211.
- [30] Sudarma, I. M., Ulfa, M., Sarkono. Chemical Transformation of Eugenol Isolated from Clove Oil to 4-allyl-2-methoxy-6-sulfonicphenol and 4-allyl-2-methoxy-6-aminophenol, *Indonesia Journal of Chemistry*, **2009**, 9(2), 267-270.