

บทที่ 1

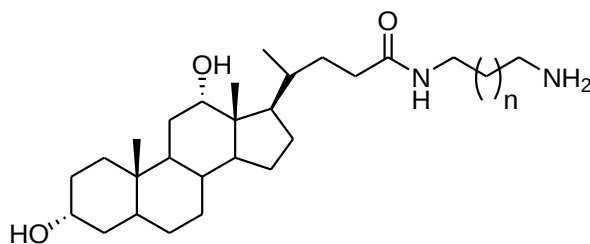
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจำนวนมากถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และมนุษย์ ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน เพราะสารเหล่านี้มีสมบัติที่ดีทั้งทางเคมีและชีวภาพ ซึ่งในยุคแรกนักวิจัยให้ความสนใจเกี่ยวกับการหาโครงสร้างของสารสำคัญในพืช ต่อมานักวิทยาศาสตร์สนใจนำสารเหล่านี้มาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยปฏิกิริยาเคมี ซึ่งการปรับเปลี่ยนในที่นี้หมายถึง การปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีซึ่งจะนำไปสู่สมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และเมื่อวิทยาศาสตร์ก้าวหน้าขึ้นทำให้นักวิจัยเล็งเห็นความสำคัญของพืชเหล่านั้นมากขึ้น และได้ประยุกต์ใช้สารสำคัญในพืชนั้นพัฒนาเป็นสารชีวภาพและพัฒนาโดยการปรับปรุงโครงสร้างเพื่อนำมาใช้ทดแทนสารเคมีที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ด้วยความเชื่อที่ว่าสารชีวภาพมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมากกว่าสารที่ได้จากธรรมชาติตัวอย่างเช่น แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นต้น ซึ่งสารในกลุ่มต่างๆ เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจทั้งสิ้น ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีรายงานวิจัยจำนวนมากที่ทำการศึกษเกี่ยวกับสมบัติทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านั้น

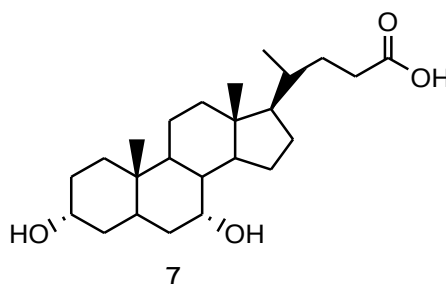
สเตียรอยด์ (Steroids) เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Product) กลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ จากการวิจัยพบว่าสารกลุ่มสเตียรอยด์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้สารประเภทสเตียรอยด์ในทางการแพทย์ เช่น รักษาโรคไขข้อ โรคหืด บำรุงหัวใจ และเป็นส่วนผสมในยาคุมกำเนิดและถูกนำไปใช้ในการแก้ปัญหาประชากรที่เพิ่มขึ้น [1] คอเลสเตอรอล (Cholesterol) เป็นสเตียรอยด์ชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดไขมันอุดตันในเส้นเลือดซึ่งเป็นปัญหาต่อสุขภาพของมนุษย์อย่างมาก สเตียรอยด์ที่ได้จากพืชธรรมชาติถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรค เช่น G-strophanthin ได้จากเมล็ดของ *Strophanthus gratus* Baillon ใช้รักษาโรคหัวใจ วายฉับพลัน Ruscogenin ได้จากต้น *Ruscus aculeatus* วงศ์ Liliaceae ใช้รักษาโรคหลอดเลือดหัวใจ Scillaren A ได้จากส่วนใบบนหัวใต้ดินของ *Urginea maritima* Baker วงศ์ Liliaceae ใช้เป็นยาขับเสมหะที่ออกฤทธิ์บำรุงหัวใจและมีฤทธิ์ขับปัสสาวะด้วย [2] สารกลุ่มสเตียรอยด์ยังเป็นฮอร์โมนของสัตว์ เช่น โปรเจสเตอโรน (Progesterone) เป็นฮอร์โมนเพศหญิงสามารถฉีดให้ผู้ป่วยที่ขาดฮอร์โมนเพศหญิงได้ จะเห็นได้ว่าสเตียรอยด์เป็นสารที่มีสมบัติในทางชีวภาพที่ดีและเป็นสารที่มีอยู่ในธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมในระดับค่อนข้างสูงแต่เนื่องจากปริมาณสเตียรอยด์ที่พืชหรือสัตว์สังเคราะห์ขึ้นมานั้นมีปริมาณน้อยมาก และถ้าสกัดส่วนต่างๆ ของพืชหรือสัตว์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อแยกสเตียรอยด์เป็นสิ่งที่ทำได้แต่อาจต้องใช้พืชหรือสัตว์ปริมาณมากและเป็นการนำไปสู่การส่งผลต่อการเสียสมดุลธรรมชาติ และก่อปัญหาวิกฤติโลกร้อนโดยทางอ้อม จึงปรากฏงานวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ในรูปแบบต่างๆ เพื่อที่จะนำไปใช้ศึกษาการออกฤทธิ์ในทางชีวภาพและพัฒนาเป็นยารักษาโรค ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีแนวทางการคิดค้นที่จะสังเคราะห์โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสเตียรอยด์ที่มีโครงสร้างอย่างง่ายเพื่อเลียนแบบสเตียรอยด์ที่พบในธรรมชาติและนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยที่สเตียรอยด์สังเคราะห์ที่เตรียมได้จากการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันหลักๆ จะถูกนำไปศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยจะเน้นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์การต้าน

อนุพันธ์เอไมด์ของ Deoxycholic acid **6** มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของมนุษย์ (Human breast adenocarcinoma ATCC HTB-22 และ Human epidermoid carcinoma of cavity ATCC CCL-17)[4] เห็นได้ว่าเมื่อหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์เปลี่ยนไปฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์นั้นๆ เปลี่ยนไป ได้โดยที่อาจจะออกฤทธิ์ยับยั้งหรือส่งเสริม และ/หรือมีฤทธิ์เท่าเดิม เมื่อเปรียบเทียบกับสเตียรอยด์ตั้งต้น



6 Deoxycholic acid amide; n= 1-7

จุดมุ่งหมายของโครงการวิจัยนี้คือสนใจสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่จาก Pregnenolone **1** และ Chenodeoxycholic acid **7**



โดยคาดหวังว่าเมื่อใช้ Pregnenolone **1** เป็นสารตั้งต้นโดยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจากหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่อะมิโน และการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Chenodeoxycholic acid **7** จากหมู่คาร์บอกซิลเป็นอะมิโนเอไมด์นั้นจะเป็นการช่วยเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพให้แก่สเตียรอยด์สังเคราะห์ชนิดใหม่นี้ได้ สาเหตุการเลือกใช้สเตียรอยด์ตั้งต้นทั้งสองในการสังเคราะห์ เนื่องจากสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดเป็นสเตียรอยด์ที่มีโครงสร้างที่เปลี่ยนมาจากคลอเลสเทอรอล ซึ่งเป็นสเตียรอยด์ที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ ความเป็นพิษจะน้อยกว่าสเตียรอยด์ชนิดอื่น สามารถนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตได้จึงเหมาะกับการนำมาเป็นสารตั้งต้น จากข้อมูลเบื้องต้นที่กล่าวมาการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ด้านเภสัชวิทยา กล่าวคือ สามารถสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่สามารถนำไปเป็นตัวยารักษาโรคหรือเป็นส่วนผสมในยารักษาโรคชนิดใหม่ได้ และ/หรือสามารถใช้ทดแทนสเตียรอยด์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่จาก Pregnenolone **1** และ Chenodeoxycholic acid **7** โดยการเลือกใช้สารเข้าทำปฏิกิริยาและเทคนิคในการสังเคราะห์ที่เหมาะสม
2. เพื่อศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์จากสารโดยทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านการต้านเชื้อจุลินทรีย์
3. เพื่อศึกษาผลของอะมิโนสเตียรอยด์ต่อความเป็นพิษของเซลล์และฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของอะมิโนสเตียรอยด์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์โดยการดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันของนิวเคลียส โดยเลือกใช้ Pregnenolone **1** และ Chenodeoxycholic acid **7** เป็นสารตั้งต้น
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และเชื้อรา (Fungi)
3. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง

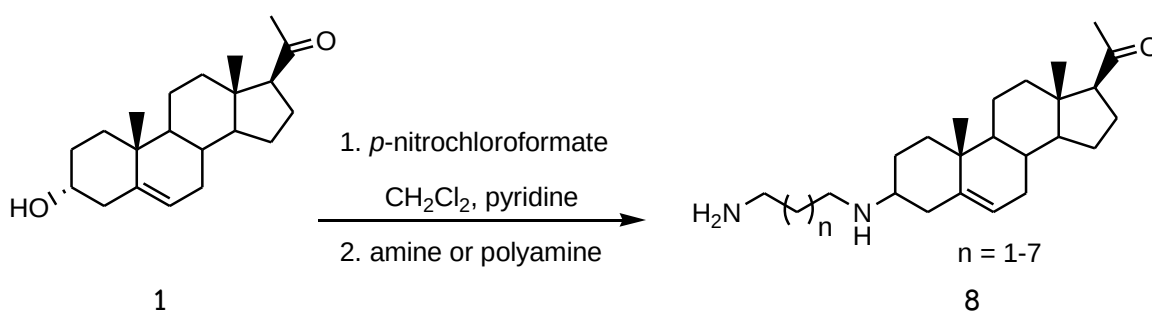
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน กล่าวโดยสรุปดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 สังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์

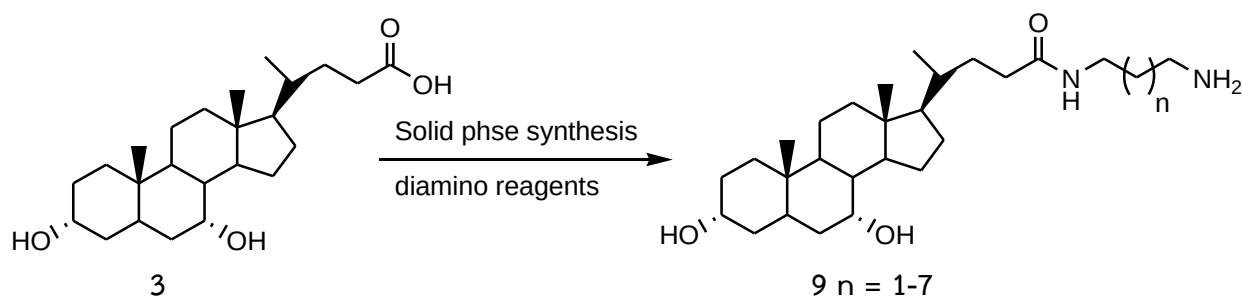
กำหนดสเตียรอยด์ตั้งต้นคือ Pregnenolone **1** และ Chenodeoxycholic acid **7** จากโครงสร้างของสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดนี้พบว่า ประกอบด้วยส่วนที่ไม่มีข้อซึ่งได้แก่ โครงสร้างหลักของ Pregnenolone **1** และ Chenodeoxycholic acid **7** ซึ่งแต่ละวงประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่มีข้อสูงคือ หมู่ไฮดรอกซิล และหมู่คาร์บอกซิล จากรายงานการวิจัยพบว่า สเตียรอยด์ที่มีหมู่อะมิโนและพอลิเอมีนประกอบอยู่เป็นสายโซ่จะทำให้ผลทางเภสัชวิทยาที่ดี โดยเฉพาะหน่วยของ 1,4-diaminobutane ที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของสารธรรมชาติที่มีรายงานวิจัยการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้[5] แนวความคิดสำหรับการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ของ Pregnenolone **1** แสดงใน **Scheme 1** คือ การทำปฏิกิริยา amination โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-3 ของ Pregnenolone **1** ให้เป็นหมู่อะมิโนโดยการเติมหมู่อะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ตรง และ/หรือพอลิเอมีน

Scheme 1



ส่วน Chenodeoxycholic acid **7** จะมีการปรับหมู่คาร์บอกซิลที่ ring D โดยการติดทำปฏิกิริยากับสารประกอบไดอะมิโนให้เป็นหมู่อะมิโนเอไมด์ โดยการทำการสังเคราะห์โดยเทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็ง (Solid phase) แสดงดังใน Scheme 2

Scheme 2



จากนั้นนำอะมิโนสเตียรอยด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ (Crude product) มาทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ศึกษาหาโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์

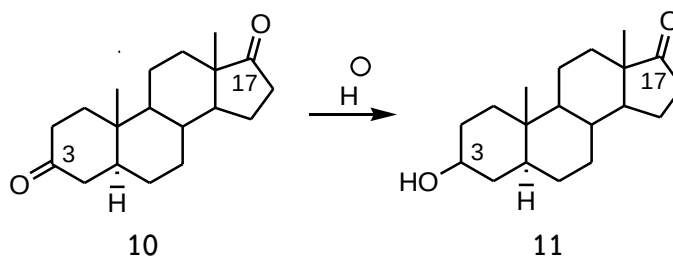
การทดสอบอะมิโนสเตียรอยด์ต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์จะนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และเชื้อรา (Fungi) โดยทำการทดสอบแบบ Disc diffusion Method ทำการบันทึกผลการทดลองโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone และคำนวณหาค่า MIC

ขั้นตอนที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และเซลล์มะเร็ง

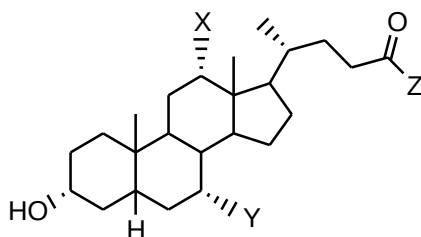
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของอะมิโนสเตียรอยด์

1.5 กรอบแนวความคิดในการทำวิจัย

จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยวงแหวนเชื่อมต่อกัน หมู่มงที่ต่างๆ ที่มาเกาะจะเป็นหมู่มงฟังก์ชันที่คล้ายคลึงกันมีคุณสมบัติทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว จึงทำให้สเตียรอยด์มีคุณสมบัติที่หลากหลาย นักเคมีได้ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะทางเคมีอินทรีย์ในการปรับเปลี่ยนหมู่มงฟังก์ชันและรวมถึงโครงสร้างเพื่อเป็นการนำไปสู่สเตียรอยด์ชนิดใหม่ และเป็นแนวทางไปสู่การสังเคราะห์สเตียรอยด์เลียนแบบธรรมชาติ โดยการเลือกใช้รีเอเจนต์หรือสารเข้าทำปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจง และควบคุมสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารผลิตภัณฑ์ที่มากพอต่อการนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จากรายงานการวิจัยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างมักมุ่งเน้นไปที่หมู่มงฟังก์ชันเป็นส่วนใหญ่ ที่ ring A และ ring B หรือหมู่มงฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง การเกิดปฏิกิริยาของหมู่มงฟังก์ชันบนโครงสร้างสเตียรอยด์จะขึ้นกับตำแหน่งบนโครงสร้าง ลำดับความสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาคือ 3 11 17 และ 20 ตัวอย่างเช่น การเข้าทำปฏิกิริยาของนิวคลีโอไฟล์ที่หมู่มงคาร์บอนิล การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยไฮโดรไดโอออน การเกิดคีทาล (ketal formation) และปฏิกิริยาการเพิ่มโดยกรีนยาร์ดรีเอเจนต์ สามารถเรียงลำดับตำแหน่งที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาได้คือ $3 > 17 \geq 20 > 11$ เช่นความเฉพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ 5α -androstane-3,17-dione **10** เป็น 3-hydroxy- 5α -androstane-17-one **11** แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งที่ 3 สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่าตำแหน่งที่ 17[6]



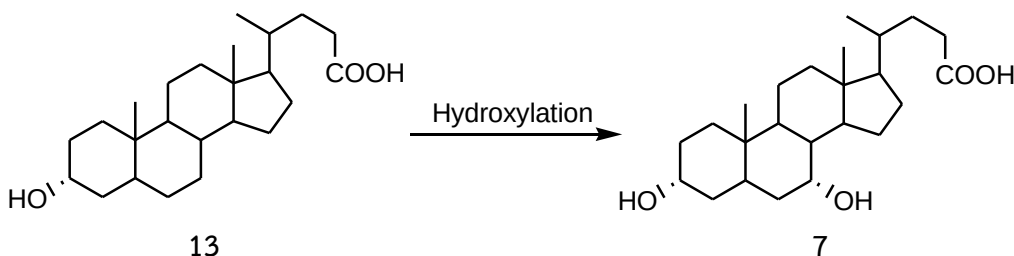
สารกลุ่มสเตียรอยด์ที่ได้รับความสนใจในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันโดยมีทั้งการปรับเปลี่ยนโดยใช้สารเคมี (Chemical transformation) และการปรับเปลี่ยนโดยใช้เทคนิคทางชีวภาพ (Biotransformation) ตัวอย่างเช่น ไบล์ แอซิด (Cholic acid 12 และ Deoxycholic acid 2) โครงสร้างหลักของไบล์ แอซิดประกอบด้วยส่วนที่ไม่มีขั้ว เมื่อสายโซ่ข้างแสดงควมมีขั้วจะส่งผลให้ไบล์ แอซิดเป็นสเตียรอยด์มีสมบัติคล้ายสบู่และผงซักฟอก (Detergent properties) จึงเรียกได้ว่าเป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ส่งผลให้เกิดไฮโดรไลซิสโดยเอนไซม์ดีซันและช่วยในการดูดซึมในน้ำเหลือง เมื่อ Bile salt ถูกไฮโดรไลส์จะได้ไบล์แอซิดซึ่งโดยทั่วไปจะมีคาร์บอน 24 อะตอม ซึ่งวง A และวง B จะต่อกันแบบซิส (*cis*- ring junction) และมีสายโซ่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 เป็นกรดคาร์บอกซิลิก



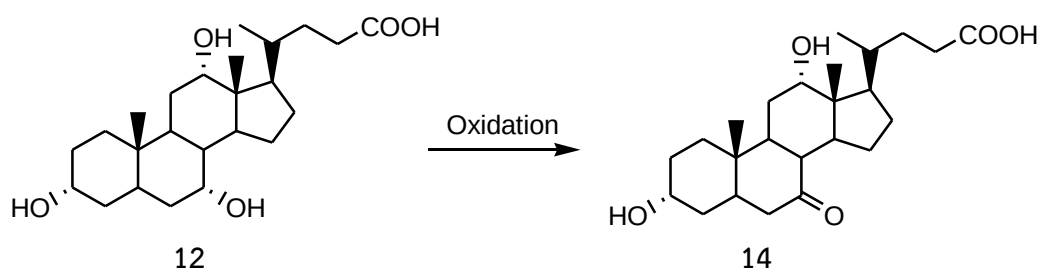
12; X=Y=Z=OH Cholic acid

2; X=Z=OH, Y= H Deoxycholic acid

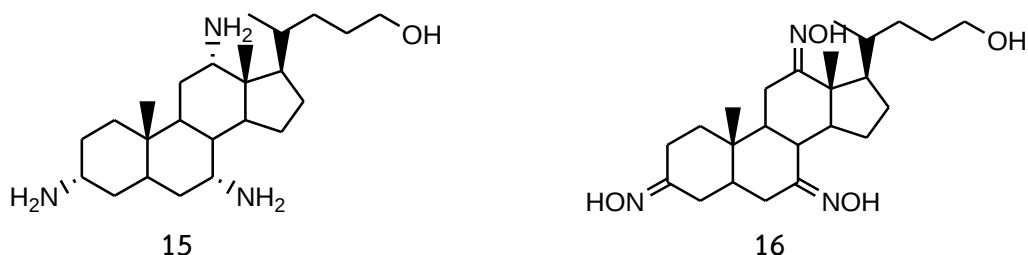
การปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยเฉพาะที่หมู่ฟังก์ชันของไบล์แอซิดมีการศึกษาโดยส่วนใหญ่ใช้เทคนิคการสังเคราะห์ทางชีวภาพโดยอาศัยเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น Bortolinui และคณะ[7] รายงานถึงปฏิกิริยา Hydroxylation (ปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล) ของไบล์แอซิด โดยใช้ *Fusarium equiseti* M41 เกิดการเพิ่มของหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 ได้ผลิตภัณฑ์คือ Chenodeoxycholic acid 7



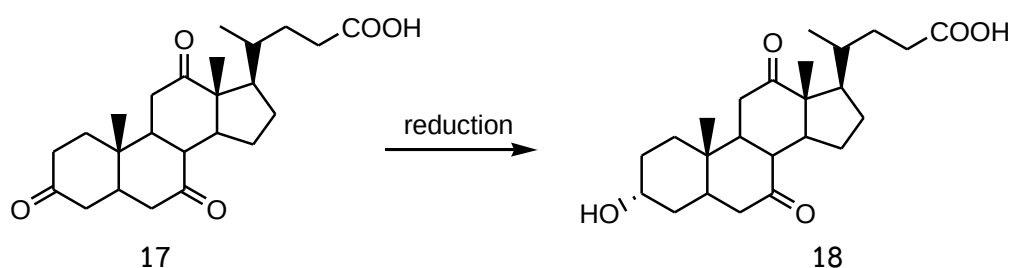
Medici และคณะ[8] ได้ทำปฏิกิริยา Regioselective Microbial Oxidation ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 ของกรดโคเลอิก 12 โดยใช้ *Xanthomonas maltophilia* BS6



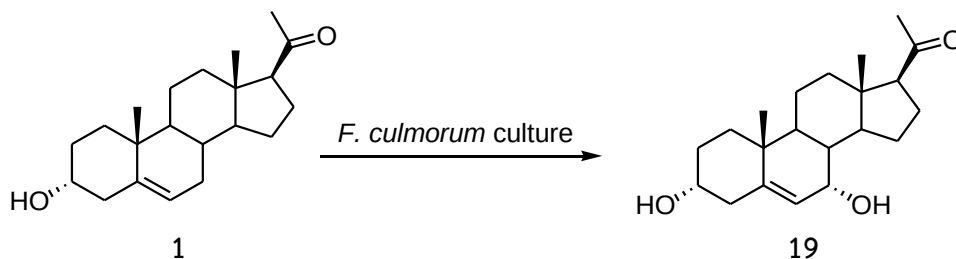
Savage และคณะ[9] ได้สังเคราะห์ triamine derivatives **15** และ **16** ของกรดโคเลอิก **12**



Chimichi และคณะ[10] รายงานการทำปฏิกิริยา Regio และ stereoselective reductions ของ Dehydrocholic acid **17** ด้วยวิธี Biotransformation โดยใช้ *Trametes hirsute* และ *Collybia velutipes* เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันที่เฉพาะเจาะจง เปลี่ยนหมู่คีโตของ Dehydrocholic acid **17** ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 เป็นหมู่ไฮดรอกซิลเท่านั้น



Kolek[11] รายงานปฏิกิริยา Biotransformation ของ Pregnenolone **1** โดยใช้เชื้อ *Fusarium culmorum* culture โดยเกิดปฏิกิริยา Hydroxylation ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-7



จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างนี้จะได้อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลายมากยิ่งขึ้นและเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสเตียรอยด์เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป ดังเช่นอนุพันธ์ของโบลีแอซิดบางชนิดถูกพัฒนาขึ้นมาเป็นยาหรือเป็นตัวส่งผ่านยาเข้าสู่เซลล์ได้

1.6 คำสำคัญของการวิจัย

อะมิโนสเตียรอยด์

ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity)

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial)

ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ ซึ่งสารเหล่านี้อาจแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง
2. สามารถทราบถึงฤทธิ์ของอะมิโนสเตียรอยด์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาเพื่อผลิตส่วนผสมของยาที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเป็นการนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์