บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การทดลองทั่วไป

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

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

สารเคมีที่ใช้เป็รสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ในการสังเคราะห์เป็นเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Fluka และ Aldrich ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีทำให้ปรากฏบนแผ่น aluminium sheet silica gel F_{254} Merck ตรวจสอบจุดของสารผลิตภัณฑ์ด้วยการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และ/หรือโดยการย้อมด้วย anisaldehyde reagent แล้วให้ความร้อนแผ่น TLC บนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

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

สเปกตรัม ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR บันทึกโดยเครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกกะเฮิร์ท การเตรียมสารตัวอย่างจะทำการละลายโดยใช้ตัวทำละลาย $CDCl_3$ และ CD_3OD จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ $CHCl_3$ที่ δ 7.25 ppm สำหรับสเปกตรัม ^{1}H NMR และที่ δ 77.5 ppm สำหรับสเปกตรัม ^{13}C NMR และ CD_3OH ที่ δ 4.80 ppm สำหรับสเปกตรัม ^{1}H NMR และที่ δ 49.0 ppm สำหรับสเปกตรัม ^{13}C NMR

จุดหลอมเหลวบันทึกโดยเครื่องหาจุดหลอมเหลว GALLEKAMP SANYO

อินฟราเรดสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX 60237 โดยใช้ KBr เป็นวัสดุในการทำหน้าต่างเซลล์ และทำการบันทึกในช่วงความถี่ 4,000-400 cm^{-1}

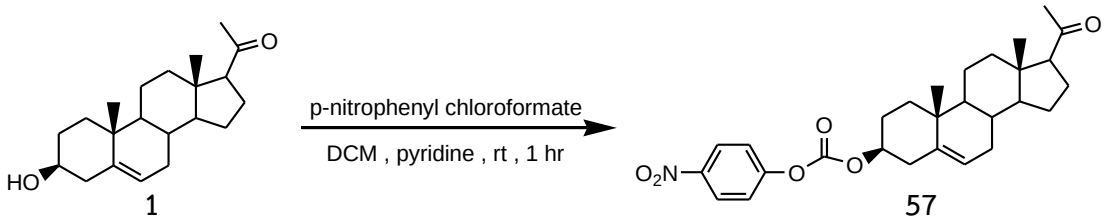
แมสสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ Finnigan LC–Q MS detector ด้วยเทคนิค Electrospray จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์จะใช้ Pregnenolone **1** เป็นสารตั้งต้น แนวทางการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone **1** ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 เป็นหมู่หลุดออกโดยใช้รีเอเจนต์คือ *p*-nitrophenyl chloroformate

แผนภาพที่ 3.1



1. ชั่ง Pregnenolone **1** 300 มิลลิกรัม (0.95 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลมซึ่งภายในมีแท่งแม่เหล็กอยู่ ซึ่งวางอยู่บนเครื่องปั่นกวน จากนั้นเติม DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวน จนกระทั่ง Pregnenolone **1** ละลายหมด

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

3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ Pregnenolone **1** สังเกตการเกิดปฏิกิริยาโดยพิจารณาจุดของสารตั้งต้นเจือจางมากที่สุดแล้วไม่มีการเปลี่ยนแปลง

4. หยุดการปั่นกวน และนำสารที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะได้ของผสมเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน

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

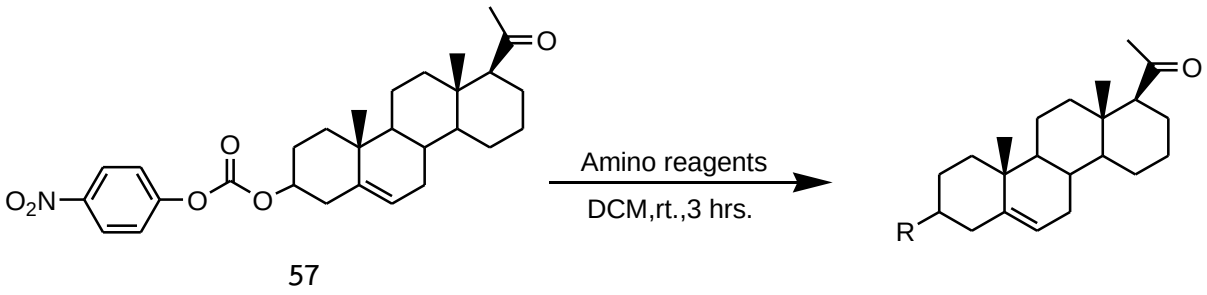
6. ตรวจสอบสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เป็น 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารตั้งพิจารณาจากจุดของสารที่เกิดขึ้นจากหลอดของสารละลายที่เก็บได้ที่ค่า R_f เดียวกัน การดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และการให้สีกับ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

7. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดก้นกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. นำสารผลิตภัณฑ์มาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

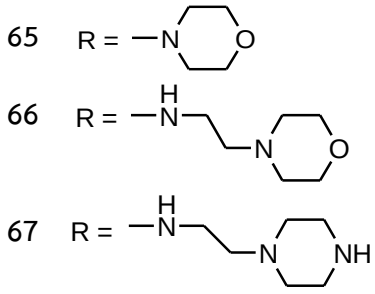
ขั้นตอนที่ 2 สังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **57** และอะมิโนรีเอเจนต์

แผนภาพที่ 3.2



57

58 R = $-NH(CH_2)_3NH_2$
59 R = $-NH(CH_2)_4NH_2$
60 R = $-NH(CH_2)_6NH_2$
61 R = $-NH(CH_2)_7NH_2$
62 R = $-NH(CH_2)_8NH_2$
63 R = $-NH(CH_2)_9NH_2$
64 R = $-NHCH_2CH(OH)CH_2NH_2$



1. ละลาย 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **57** ใน DCM 15 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งละลายหมด

2. เติม 1,3-diaminopropane 103.3 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล) ที่อุณหภูมิห้อง และทำการปั่นกวนต่อที่อุณหภูมิห้อง

3. ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ทุก 1 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate เป็น 6 : 4 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **57** จนกระทั่งจุดของ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **57** จางมากที่สุด พร้อมกับมีการเกิดจุดของสารผลิตภัณฑ์หรือสารข้างเคียงเกิดขึ้น

4. หยุดการปั่นกวน และนำของผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

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

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

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

7. นำสารละลายที่เก็บรวมไว้ในขวดก้นกลมมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. นำของแข็งที่ได้จากระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศมาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

9. นำสารผลิตภัณฑ์ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

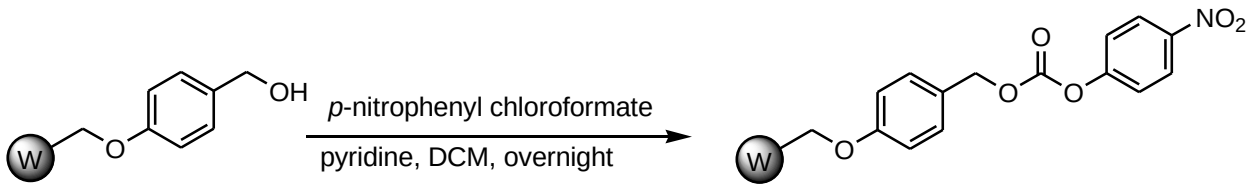
10. เริ่มทำการสังเคราะห์ใหม่ตั้งแต่ข้อ 1 ถึง 9 โดยเปลี่ยนอะมิโนรีเอเจนต์ในข้อ 2 จาก 1,3-diaminopropane เป็นอะมิโนรีเอเจนต์ดังต่อไปนี้

- 1,4-diaminobutane ปริมาตร 123.6 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 1,6-diaminohexane ปริมาณ 143.5 มิลลิลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 1,7-diaminoheptane ปริมาณ 160.8 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- 1,8-diaminooctane ปริมาณ 178.2 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- 1,9-diaminononane ปริมาณ 195.5 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- 1,3-diamino-2-propanol ปริมาณ 111.3 มิลลิกรัม (1.235 มิลลิโมล)
- morpholine ปริมาตร 107.6 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 4-(2-aminoethyl) morpholine ปริมาตร 160.8 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)
- 1-(2-Aminoethyl) piperazine ปริมาตร 162.0 ไมโครลิตร (1.235 มิลลิโมล)

3.2.2 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์จะใช้ Chenodeoxycholic acid **7** เป็นสารตั้งต้น แนวทางการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน[23] ดังนี้

1. ปฏิกิริยาการกระตุ้น Wang resin โดยการเปลี่ยนเป็นหมู่คาร์บอเนต

แผนภาพที่ 3.3



68 **69**

1. ชั่ง Wang resin **68** จำนวน 100.0 มิลลิกรัม (0.10 มิลลิโมล) ใส่ลงใน column cap แล้วเติม DCM 10 มิลลิลิตร แช่ไว้ประมาณ 10 นาที จนกระทั่งเรซินบวมตัว

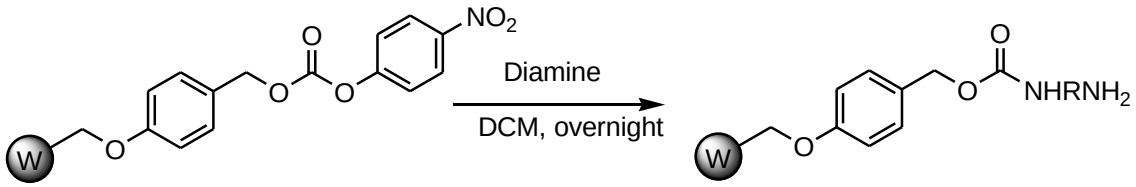
2. ไข DCM ออกจาก column cap เติมสารละลายของ *p*-nitrophenyl chloroformate 80.6 มิลลิกรัม (0.40 มิลลิโมล) ในไดคลอโรมีเทน ลงใน column cap

3. เติมพิริดีนลงไปประมาณ 5 หยด แล้วเติมไดคลอโรมีเทนจนได้ปริมาตร 2/3 ของ column cap จากนั้นปิดฝา column cap ให้เรียบร้อย และระบายความดันภายใน column cap นำ column cap ไปตั้งหมุน เปิดเครื่องตั้งหมุนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา

4. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไขสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง จากนั้นล้างเรซินด้วย DCM หลายๆ ครั้ง จะได้ *p*-nitrophenyl carbonate wang resin **69**

2. ปฏิกิริยาการใส่ไดเอมีนเข้าไปทำปฏิกิริยากับ Wang resin 68

แผนภาพที่ 3.4



69

70 R = -$(CH_2)_3$-
71 R = -$(CH_2)_4$-
72 R = -$(CH_2)_6$-
73 R = -$(CH_2)_7$-
74 R = -$(CH_2)_8$-
75 R = -$(CH_2)_9$-
76 R = -$CH_2CH(OH)CH_2$-

1. ชั่งไดเอมีนจำนวน 4 equivalent ของ Wang resin **68** ละลายในไดคลอโรมีเทน จากนั้นเติมลงใน column cap ที่ได้จากปฏิกิริยาตอนที่ 1

2. จากนั้นเติมไดคลอโรมีเทนลงใน column cap จนได้ปริมาตร 2/3 ของหลอด นำ column cap ไปตั้งหมุน เปิดเครื่องตั้งหมุนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา

3. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไขสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง จากนั้นล้างเรซินด้วย DCM สลับกับเมทานอลหลายๆ ครั้งนำเม็ดเรซิน 2-3 เม็ด ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กไปทดสอบโดยใส่รีเอเจนต์ A 3 หยด และรีเอเจนต์ B 1 หยด จากนั้นนำหลอดทดลองนี้ไปให้ความร้อนประมาณ 1 นาที ถ้าเม็ดเรซินเปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่าไดเอมีนได้ทำปฏิกิริยากับ Wang resin สมบูรณ์แล้ว

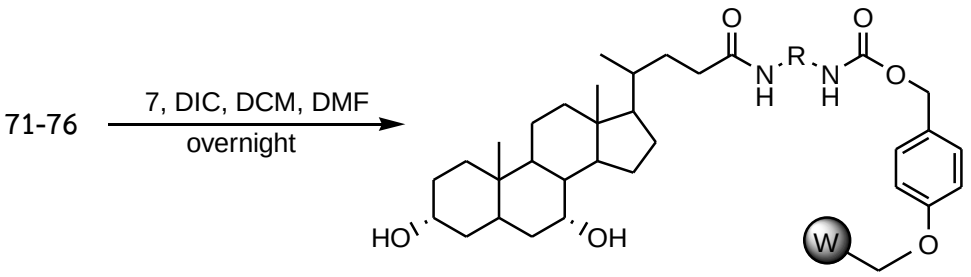
หมายเหตุ รีเอเจนต์ A : สารละลาย (1) ชั่งฟีนอล 40 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร สารละลาย (2) ชั่งโพแทสเซียมไซยาไนด์ 65 มิลลิกัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้น

แบ่งมา 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วย pyridine 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลาย (1) และ (2) ทำการปั่นกวนให้สารละลายผสมเข้ากัน

รีเอเจนต์ B : ชั่ง Ninhydrin 2.5 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 50 มิลลิลิตร

3. ปฏิกิริยาการใส่ Chenodeoxycholic acid 7 เข้าไปทำปฏิกิริยาที่หมู่อะมิโน

แผนภาพที่ 3.5



77 R = $-(CH_2)_3-$
78 R = $-(CH_2)_4-$
79 R = $-(CH_2)_6-$
80 R = $-(CH2)_7-$
81 R = $-(CH2)_8-$
82 R = $-(CH2)_9-$
83 R = $-CH_2CH(OH)CH_2-$

1. ชั่ง Chenodeoxycholic acid **7** จำนวน 4 equivalent ของ Wang resin **68** ใส่ลงใน vial แล้วละลายด้วย DCM และ DMF ทำการปั่นกวนจนกระทั่ง Chenodeoxycholic acid **7** ละลายหมด จากนั้นใส่ DIC ลงใน Chenodeoxycholic acid **7** ปั่นกวนต่อเป็นเวลา 10 นาที

2. นำไบล์แอซิดที่ได้จากตอนที่ 1 ใส่ลงใน column cap ที่มีเรซินที่ได้จากปฏิกิริยา 2 เติม DCM ลงใน column cap จนมีปริมาณเป็น 2/3 ของหลอด

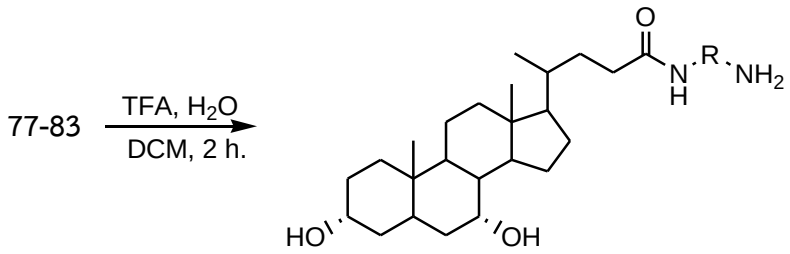
3. นำ column cap ไปตั้งหมุน เปิดเครื่องตั้งหมุนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา

4. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไขสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง และล้างเรซินด้วย DCM สลับกับ methanol จากนั้นแช่เรซินใน DCM เป็นเวลา 30 นาที สลับกับแช่ใน methanol เป็นเวลา 30 นาทีเช่นกัน ประมาณ 5-6 ครั้ง

5. นำเม็ดเรซิน 2-3 เม็ด ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กไปทดสอบ โดยใส่รีเอเจนต์ A 3 หยด และรีเอเจนต์ B 1 หยด จากนั้นนำหลอดทดลองนี้ไปให้ความร้อนประมาณ 1 นาที ถ้าเม็ดเรซินไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่าไบล์แอซิดได้ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนสมบูรณ์แล้ว

4. ปฏิกิริยาการตัดสารผลิตภัณฑ์ออกจาก Wang resin 68

แผนภาพที่ 3.6



84 R = -$(CH_2)_3$-
85 R = -$(CH_2)_4$-
86 R = -$(CH_2)_6$-
87 R = -$(CH2)_7$-
88 R = -$(CH2)_8$-
89 R = -$(CH2)_9$-
90 R = -$CH_2CH(OH)CH_2$-

1. นำ column cap ที่มีเรซินที่ได้จากปฏิกิริยา 3 มาเติม trifluoroacetic acid ลงไปประมาณ 1/3 โดยปริมาตรของหลอด จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 2-3 หยด

2. เติม DCM ลงใน column cap จนมีปริมาตรเป็น 2/3 ของหลอด นำ column cap ไปตั้งหมุน เปิดเครื่องตั้งหมุนทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา

3. ไขสารละลายจาก column cap ใส่ลงใน vial ที่ทราบน้ำหนัก จากนั้นนำไปพ่นด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อระเหยตัวทำละลายออกจากสารผลิตภัณฑ์จนหมด

4. นำขวดแก้วเล็กที่มีสารผลิตภัณฑ์ไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ได้

5. นำสารผลิตภัณฑ์ไปตรวจวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method

การทดสอบอนุพันธ์ของ Pregnenolone **1** จะทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method จากหน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสาขาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauer และคณะ[36] ซึ่งวิธีการทดสอบจะคล้ายคลึงกันสรุปได้ดังนี้

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เก็บไว้บน Tryticase Soy Agar (TSA) เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Meuller Hinton Agar (MHA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. หลังจากนั้นทำการเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูก activated แล้วลงมาใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mcfarland

3. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมได้มาเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Ager อยู่ โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่วจำนวน 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ อยู่บนหน้าวุ้น

4. หลังจากนั้นนำแผ่นดิสก์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มีสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งละลายด้วย DCM วางบนผิววุ้นที่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากนั้นทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. อาหารสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ใช้เป็นชนิด Sabouraud Agar และทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอุณหภูมิและเวลาขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

6. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone ที่เกิดขึ้น

กรณีทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียใช้ Vancomycin เป็นตัวยาเปรียบเทียบ และกรณีทดสอบกับยีสต์ใช้ Amphotericin B เป็นตัวยาเปรียบเทียบ ในแต่ละชุดการทดลองจะใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม จะใช้ทดสอบกับอะมิโนสเตียรอยด์ **58** ถึง **67** และ **84** ถึง **90**

ส่วนกรณีทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียใช้ Penicillin Ampicillin Gentamicin Caftazidime และ Clavulanic acid เป็นตัวยาเปรียบเทียบ และกรณีทดสอบกับยีสต์ใช้ Nystatin เป็นตัวยาเปรียบเทียบ ในแต่ละชุดการทดลองจะใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม จะใช้ทดสอบกับอะมิโนสเตียรอยด์ **58** ถึง **67**

การอ่านผลการทดลองพิจารณาดังนี้: ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 2 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 5 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับอ่อน (weak) ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับปานกลาง (moderate) และถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับดี (good)

3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์

อะมิโนสเตียรอยด์ **58** ถึง **67** ถูกส่งไปทดสอบที่หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์โดยวิธี MTT assay [37] มีวิธีการทดสอบดังนี้

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

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

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

4. ปลูกเซลล์ไลน์ MCF-7 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 98 หลุม (96-well plate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทดสอบ 3 ซ้ำ นำจานเพาะเลี้ยงที่ปลูกเซลล์แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

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

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

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

8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครไตเตอร์ เพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่นของแผ่นกรองแสงเท่ากับ 570 นาโนเมตร

9. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอะมิโนสเตียรอยด์ **58-67** เปรียบเทียบกับตัวยา Vinblastine sulfate salt

10. คำนวณหาค่า % Cytotoxicity ของแต่ละความเข้มข้นดังนี้ คือ

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

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ไลน์ในสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น

หมายเหตุ

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

Chenodeoxycholic acid **7** และอนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid **85** ถูกส่งไปทดสอบฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ การทดลองแบ่งออกได้ดังต่อไปนี้

3.4.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านความเป็นพิษของเซลล์

การทดสอบใช้วิธี Sulforhodamine B (SRB) assay เซลล์ที่ใช้ทดสอบคือ เซลล์ปกติ (Vero, African green monkey kidney fibroblast) โดยมีชุดควบคุมคือ 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) และเปรียบเทียบกับตัวยา Ellipticine การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการเจริญเติบโตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสาร

ตัวอย่างไม่มีผลต่อการต้านความเป็นพิษของเซลล์ (non cytotoxic) และถ้าเซลล์มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อการต้านความเป็นพิษของเซลล์ (cytotoxic) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

3.4.2 ทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก (Anti-cancer KB-Oral cavity cancer)

การทดสอบใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA)[38] ใช้เซลล์ KB (Human epidermoid carcinoma of carcinoma) โดยมีชุดควบคุมคือ 0.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) และเปรียบเทียบกับตัวยา Ellipticine และ Doxorubicine การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างไม่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (inactive) และถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (active) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

3.4.3 ทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (Anti-cancer BC-Breast cancer)

การทดสอบด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA)[38] ใช้เซลล์ MCF7 (Human breast adenocarcinoma)โดยมีชุดควบคุมคือ 0.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) และเปรียบเทียบกับตัวยา Ellipticine และ Doxorubicine การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างไม่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (inactive) และถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (active) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)