

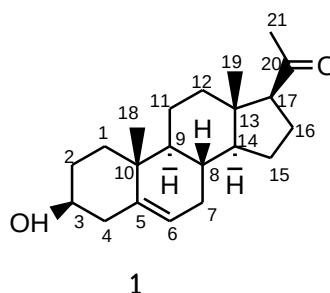
บทที่ 4

ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pregnenolone **1** และ Chenodeoxycholic acid **7** โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันหลัก เพื่อสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอะมิโนสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์ได้

4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Pregnenolone **1**

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

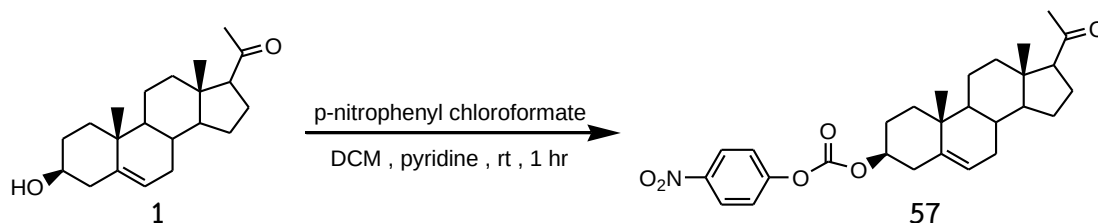


Szendieและคณะ[39]ได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างของ Pregnenolone **1** โดยเทคนิคนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่าสัญญาณ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ 1.84 และ 1.08 (2H, H-1), 1.84 และ 1.48 (2H, H-2), 3.54 (1H, H-3), 2.27 (2H, H-4), 5.34 (1H, H-6), 1.97 และ 1.57 (2H, H-7), 1.46 (1H, H-8), 0.98 (1H, H-9), 1.62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

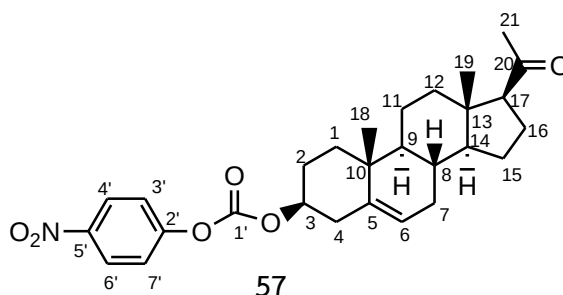
4.1.1 การสังเคราะห์ 4-Nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57

การสังเคราะห์เริ่มจากหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 ของ Pregnenolone **1** ถูกกระตุ้นให้เป็นหมู่หลุดออกที่ดีด้วยรีเอเจนต์คือ *p*-nitrophenyl chloroformate

แผนภาพที่ 4.1



ผลทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.62 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 97 : 3 ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 165-168 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 92.41 เปอร์เซ็นต์ ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **57** สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัม FT-IR (KBr) cm^{-1} : 2945 (C-H stretch ของหมู่ CH_2 และ CH_3), 1762 (C=O stretch ของหมู่คาร์บอนेट), 1702 (C=O stretch ของหมู่คีโต), 1524-1491 (C=C stretch ของแอโรมาติก) และ 1254-1216 (C-O stretch)

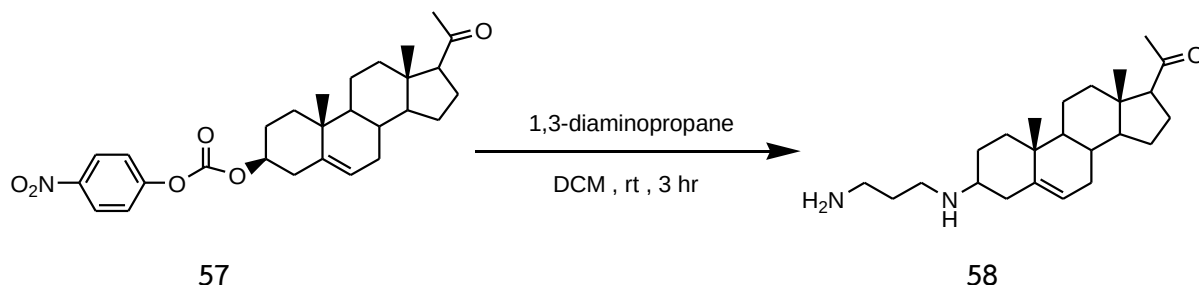


สเปกตรัมของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **57** พบสัญญาณที่ ^1H NMR δ 4.64 (1H, m, H-3), 2.19 (2H, d, H-4), 5.44 (1H, d, H-6), 2.55 (1H, t, H-17), 0.65 (3H, s, H-18), 1.06 (3H, s, H-19), 2.14 (3H, s, H-21), 7.39 (2H, d, $J_{3',4'} = 7.1$ Hz, H-3' และ H-7'), 8.29 (2H, d, $J_{4',3'} = 7.1$ Hz, H-4' และ H-6') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.09 ถึง 1.16 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัมของ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **57** พบสัญญาณที่ δ 79.5 (C-3), 138.8 (C-5), 123.2 (C-6), 49.9 (C-9), 21.0 (C-1), 56.8 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.2 (C-19), 209.4 (C-20), 155.6 (C-1'), 145.3 (C-2'), 121.7 (C-3') และ (C-7'), 125.2 (C-4' และ C-6'), 151.7 (C-5') และสัญญาณที่ปรากฏอยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

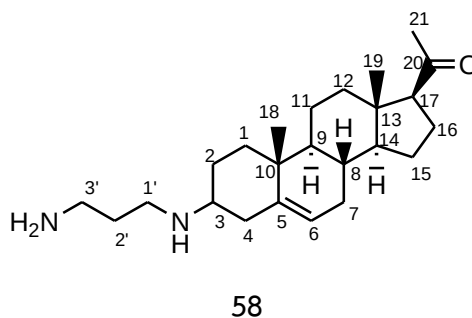
4.1.2 การสังเคราะห์ 3-(1,3-Diaminopropyl)-pregn-5-en-20-one 58

สาร 58 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diaminopropane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.2



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



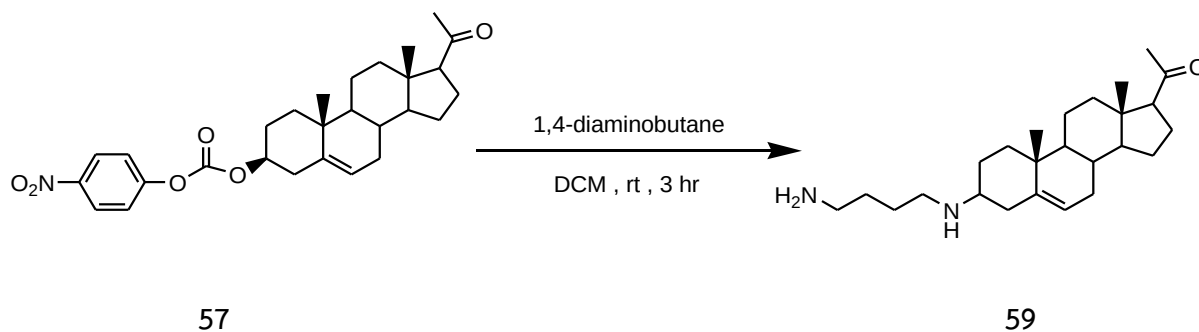
สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 58 พบสัญญาณที่ δ 3.23 (1H, br.s, H-3), 5.38 (1H, d, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.38 ถึง 1.14 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR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

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

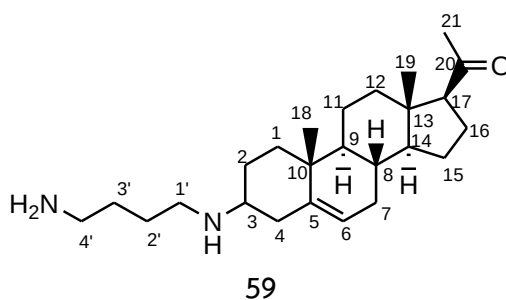
4.1.3 สารสังเคราะห์ 3-(1,4-Diaminobutyl)-pregn-5-en-20-one 59

สาร **59** เตรียมจาก 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **57** ทำปฏิกิริยากับ 1,4-diaminobutane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.3



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



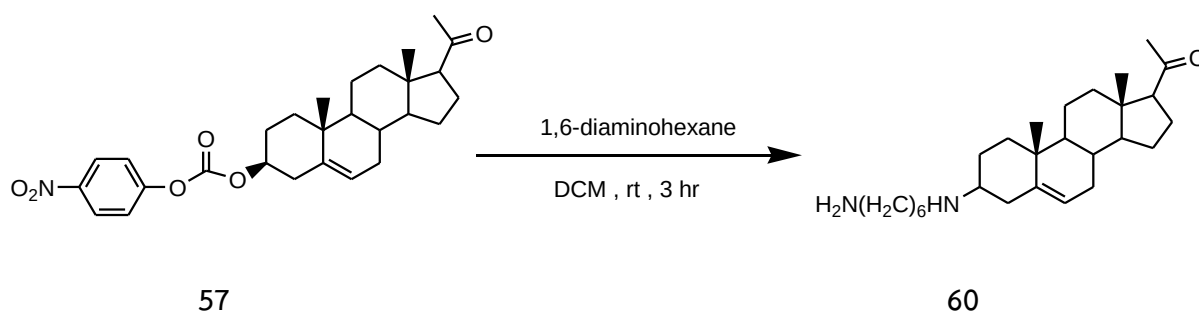
สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **59** พบสัญญาณที่ δ 3.17 (1H, br.s, H-3), 5.38 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.62 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-19), 2.12 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.35 ถึง 1.10 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C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

ES-MS : $C_{25}H_{42}N_2O$ Calcd. 386.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[M+H]^+$ (3.1%), 370.7 (2.0%) และ 314.0 (1.2%)

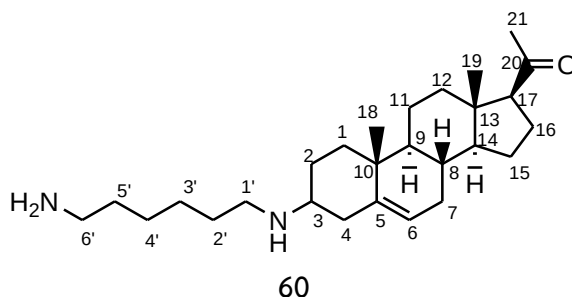
4.1.4 การสังเคราะห์ 3-(1,6-Diaminohexyl)-pregn-5-en-20-one 60

สาร 60 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 ทำปฏิกิริยากับ 1,6-diaminohexane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.4



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



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

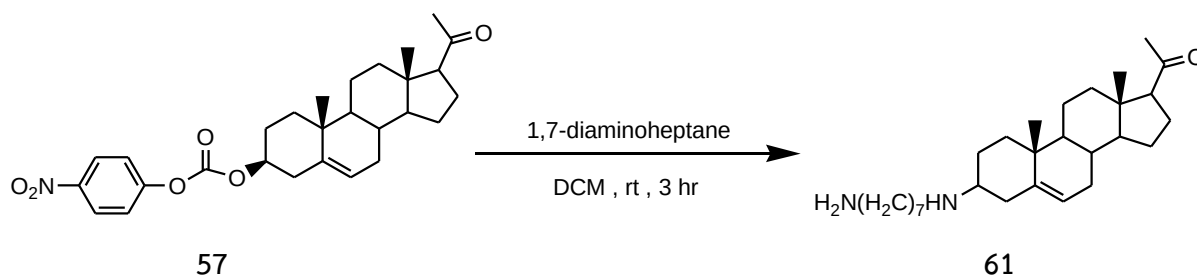
209.62 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 49.4 ถึง 22.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

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

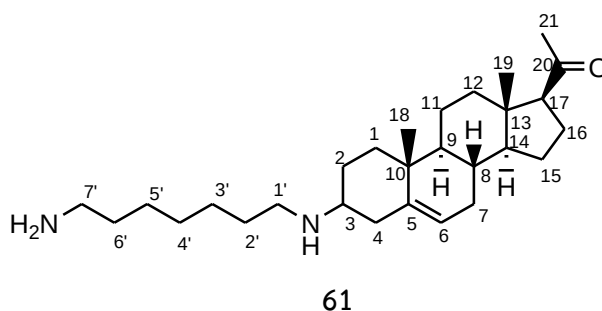
4.1.5 การสังเคราะห์ 3-(1,7-Diaminoheptyl)-pregn-5-en-20-one 61

สาร 61 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 ทำปฏิกิริยากับ 1,7-diaminoheptane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.5



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



สเปกตรัม 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) ของสาร 61 พบสัญญาณที่ δ 3.08 ppm (1H, m, H-3), 5.30 (1H, br.t, H-6), 2.47 (1H, t, H-17), 0.56 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, s, H-19), 2.06 (3H, s H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่าเท่ากับ 2.37 ถึง 1.04 ppm เป็น multiple ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 61 พบสัญญาณที่ δ 73.1 (C-3),

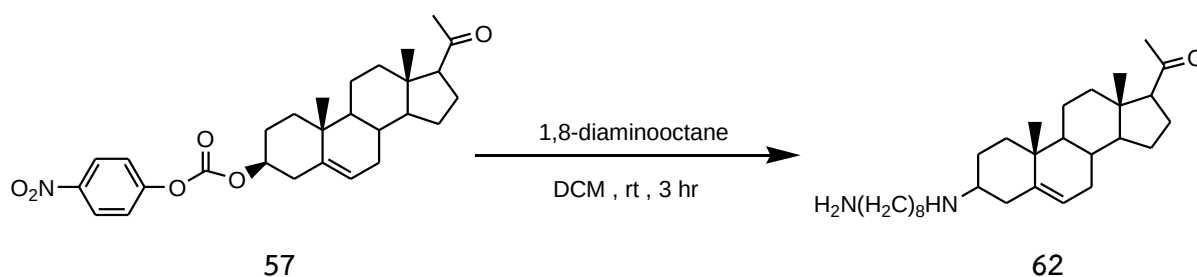
138.9 (C-5), 121.1 (C-6), 48.9 (C-9), 55.8 (C-14), 62.7 (C-17), 12.2 (C-18), 18.3 (C-19), 208.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 42.9 ถึง 20.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

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

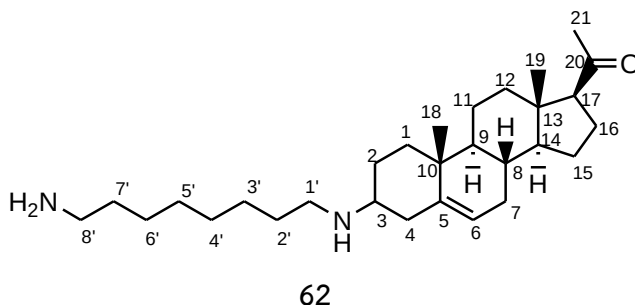
4.1.6 การสังเคราะห์ 3-(1,8-Diaminooctyl)-pregn-5-en-20-one 62

สาร 62 เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate 57 ทำปฏิกิริยากับ 1,8-diaminoheptane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.6



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



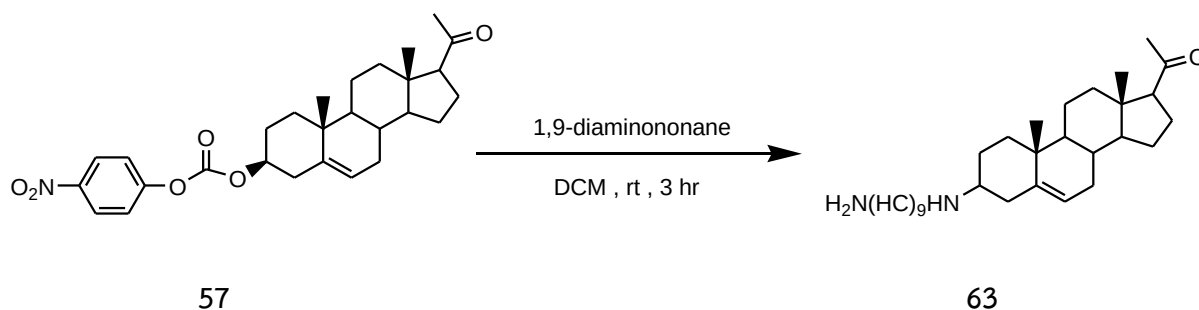
สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร 62 พบสัญญาณที่ δ 3.14 (1H, br.d, H-3), 5.38 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.38 ถึง 1.11 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ

methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **62** พบสัญญาณที่ δ 74.0 (C-3), 139.9 (C-5), 122.1 (C-6), 49.9 (C-9), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.32 (C-19), 209.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 42.9 ถึง 20.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne
 ES-MS : $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}$ Calcd. 442.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 442.0 (4.8%) และ 344.0 (7.0%)

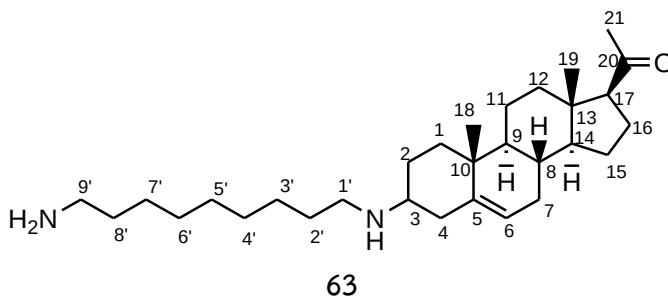
4.1.7 การสังเคราะห์ 3-(1,9-Diaminononyl)-pregn-5-en-20-one **63**

สาร **63** เตรียมจากสาร 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **57** ทำปฏิกิริยากับ 1,9-diaminononane โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.7



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



สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **63** พบสัญญาณที่ δ 3.08 (1H, m, H-3), 5.41 (1H, br.t, H-6), 2.66 (1H, t, H-17), 0.64 (3H, s, H-18), 1.05 (3H, s, H-19), 2.14 (3H, s, H-2)

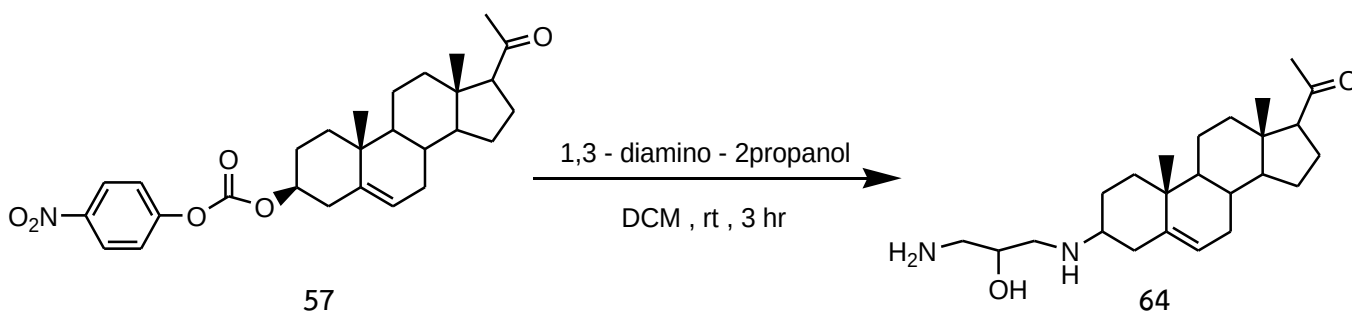
และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.34 ถึง 1.11 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **63** พบสัญญาณที่ δ 73.9 (C-3), 139.9 (C-5), 121.8 (C-6), 50.1 (C-9), 56.7 (C-14), 63.3 (C-17), 12.2 (C-18), 18.4 (C-19), 210.9 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 48.4 ถึง 20.8 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}$ Calcd. 456.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 456.0 (1.9%), 412.0 (2.0%) และ 384.6 (6.8%)

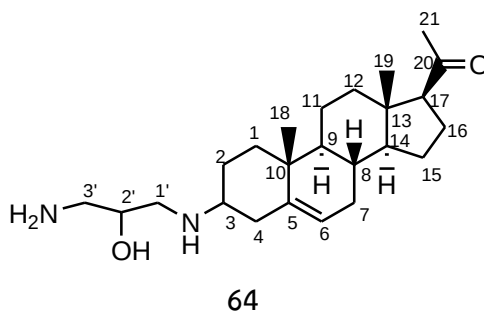
4.1.8 การสังเคราะห์ 3-(1,3-Diaminopropyl-2-ol)-pregn-5-en-20-one **64**

สาร **64** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **57** ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diamino-2-propanol โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.8



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



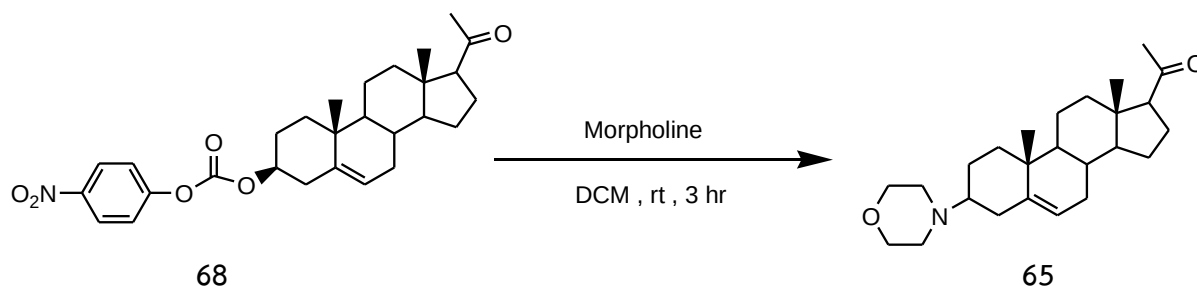
สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **64** พบสัญญาณที่ δ 3.78 (1H, br.s, H-3), 5.36 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21), 3.26 (1H, s, H-2') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.33 ถึง 1.10 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **64** พบสัญญาณที่ δ 74.7 (C-3), 139.7 (C-5), 122.3 (C-6), 49.9 (C-9), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20), 70.6 (C-2') และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 45.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

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

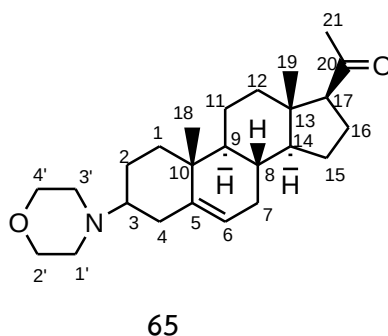
4.1.9 การสังเคราะห์ 3-Morpholinopregn-5-en-20-one **65**

สาร **65** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **57** ทำปฏิกิริยากับ morpholine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.9



จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 6 : 4 ทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.50 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 156-159 องศาเซลเซียส มีผลได้เท่ากับ 83.89 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **1**) และยืนยันสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สรุปข้อมูลได้ดังนี้



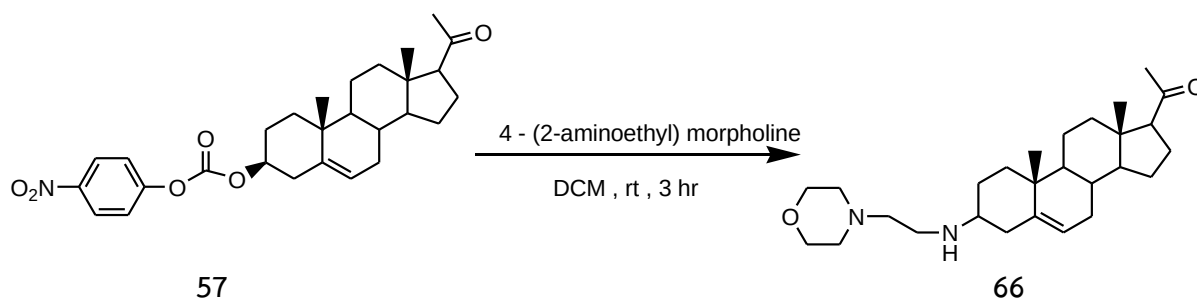
สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **65** พบสัญญาณที่ δ 3.47 (1H, br.d, H-3), 5.37 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21), 3.65 (4H, s, H-2' และ H-3') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.37 ถึง 1.12 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **65** พบสัญญาณที่ δ 74.9 (C-3), 139.8 (C-5), 122.2 (C-6), 49.8 (C-9), 56.8 (C-14), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.4 (C-20), 65.6 (C-2' และ C-3') และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 45.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{NO}_2$ Calcd. 385.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 299.0 (3.0%)

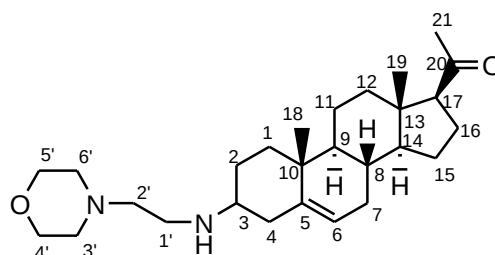
4.1.10 การสังเคราะห์ 3-(4-(2-Aminoethyl) morpholino)-pregn-5-en-20-one **66**

สาร **66** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **57** มาทำปฏิกิริยากับ 4-(2-aminoethyl) morpholine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.10



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



66

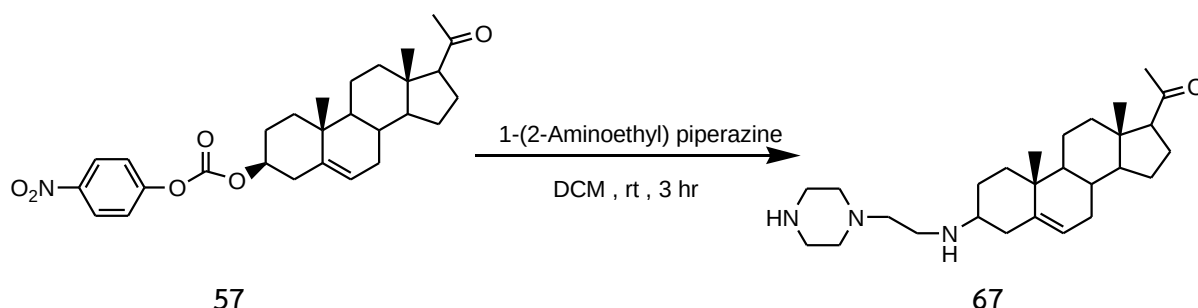
สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **66** พบสัญญาณที่ δ 3.28 (1H, br.d, H-3), 5.37 (1H, br. s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21), 2.47 (4H, t, H-3' และ H-6'), 3.71 (4H, s, H-4' และ H-5') และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.37 ถึง 1.12 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **66** พบสัญญาณที่ δ 74.2 (C-3), 139.8 (C-5), 122.2 (C-6), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20), 57.5 (C-1'), 53.4 (C-3' และ C-6'), 66.9 (C-4' และ C-5') และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 53.4 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

ES-MS : $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_2$ Calcd. 428.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 418.6 (26.3%)

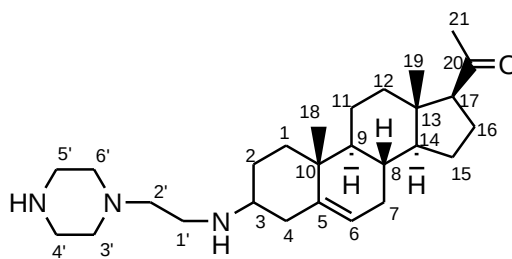
4.1.11 การสังเคราะห์ 3-(2-Piperazin-1-yl-ethyl)-pregn-5-en-20-one **67**

สาร **67** เตรียมจากการนำ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **57** ทำปฏิกิริยากับ 1-(2-Aminoethyl) piperazine โดยใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย

แผนภาพที่ 4.11



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



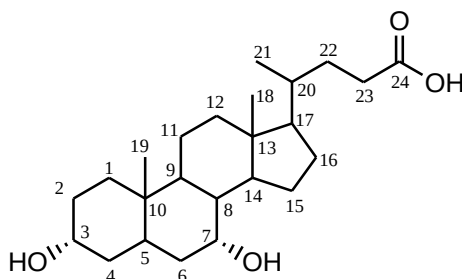
67

สเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **67** พบสัญญาณที่ δ 3.48 (1H, br. s, H-3), 5.37 (1H, br.s, H-6), 2.54 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 2.13 (3H, s, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.43 ถึง 1.16 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **67** พบสัญญาณที่ δ 74.8 (C-3), 140.0 (C-5), 122.2 (C-6), 49.9 (C-9), 56.8 (C-14), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 43.9 ถึง 21.0 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne
ES-MS : $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}$ Calcd. 427.0 g/mol ข้อมูลที่ได้คือ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 313.4 (1.0%)

4.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid 7

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

กรดคีโนไดออกซีโคลิก 7



7

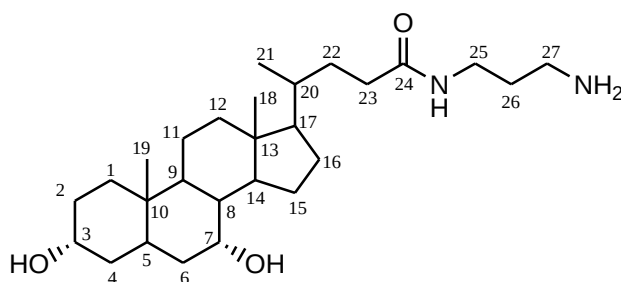
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.56 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, d, $J_{\text{H}21, \text{H}20} = 6.3$ Hz, H-21), 0.98-1.89 (m, $-\text{CH}_2$), 2.01-2.25 (m, $-\text{CH}_2$), 3.16-3.17 (1H, m, H-3 β) และ 3.66 (1H, m, H-7 β)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.3 (C-18), 18.9 (C-21), 21.8 (C-11), 23.5 (C-15), 24.6 (C-19), 29.2 (C-16), 31.4 (C-2), 32.0 (C-22), 32.3 (C-23), 34.0 (C-9), 35.9 (C-10), 36.2 (C-1), 36.6 (C-6), 36.8 (C-20), 40.5 (C-4), 40.8 (C-8), 41.1 (C-12), 43.2 (C-5), 43.7 (C-13), 51.5 (C-14), 57.3 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 178.1 (C-24)

ข้อมูลจากการวิเคราะห์โครงสร้างของ Chenodeoxycholic acid **7** ด้วยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR ที่แสดงไว้ข้างต้นนั้น สามารถนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างของอนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid **7** ที่สังเคราะห์ได้ โดยสามารถสังเกตจากการเปลี่ยนแปลง คือ ค่า chemical shift ของ ^{13}C NMR ของหมู่เอไมด์ (-CONH) จะปรากฏสัญญาณที่ δ 176.0-177.0 ppm และสามารถตรวจสอบได้อย่างชัดเจนจากมวลโมเลกุลของอนุพันธ์อะมิโนเอไมด์สังเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรสโกปี ข้อมูลของอะมิโนเอไมด์สังเคราะห์แสดงได้ดังต่อไปนี้

4.2.1 การสังเคราะห์ *N*-(3-Aminopropyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

84



84

สาร **84** สังเคราะห์จาก Chenodeoxycholic **7** ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diaminopropane สาร **84** มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 70.00 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร **84** ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : ν_{max} 1200 (C-N stretching), 1678 (C=O stretching ของ CONH), 2851, 2918 (C-H stretching) และ 3434 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

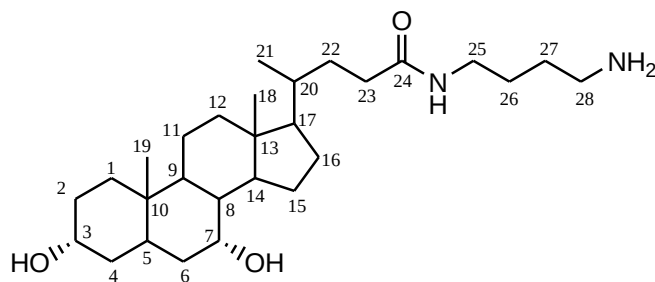
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.61 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 3.8$ Hz, H-21), 1.14-2.13 (m, $-\text{CH}_2$), 2.85 (2H, m, H-27), 2.94 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-25), 3.20-3.21 (1H, m, H-3 β), 3.71 (1H, m, H-7 β), และ 7.99 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.1 (C-18), 18.8 (C-21), 21.7 (C-11), 23.1 (C-15), 24.5 (C-19), 28.7 (C-26), 28.8 (C-16), 31.1 (C-2), 33.2 (C-22), 33.9 (C-23), 34.0 (C-9), 35.6 (C-25), 35.7 (C-10), 36.2 (C-1), 36.6 (C-6), 36.9 (C-20), 37.9 (C-27), 40.5 (C-4), 40.8 (C-8), 41.1 (C-12), 43.2 (C-5), 44.0 (C-13), 51.7 (C-14), 57.1 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 177.7 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 449.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (67%)

4.2.2 การสังเคราะห์ *N*-(4-Aminobutyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

85



85

สาร **85** สังเคราะห์จาก Chenodeoxycholic acid **7** ทำปฏิกิริยากับ 1,4-diaminobutane สาร **85** มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 75.45 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร **85** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : $\nu_{\max}$ 1202 (C-N stretching), 1634 (C=O stretching ของ CONH), 2868, 2929 (C-H stretching) และ 3417 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

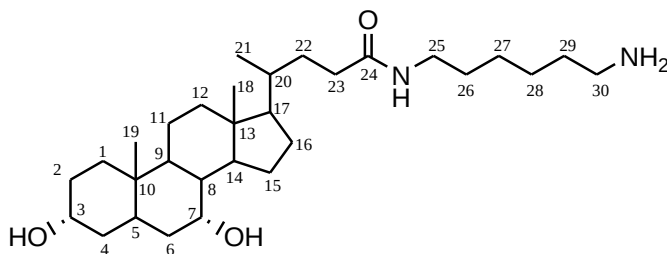
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.64 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-21), 0.99-2.15 (m, $-\text{CH}_2$), 2.87 (2H, m, H-28), 3.12 (2H, m, H-25), 3.23-3.24 (1H, m, H-3 β), 3.73 (1H, m, H-7 β), และ 7.93 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.1 (C-18), 18.8 (C-21), 21.7 (C-11), 23.1 (C-15), 24.6 (C-19), 25.9 (C-26), 27.5 (C-27), 29.0 (C-16), 31.4 (C-2), 33.2 (C-22), 34.0 (C-23), 34.0 (C-9), 35.6 (C-10), 36.2 (C-1), 36.6 (C-6), 36.8 (C-20), 39.4 (C-25), 40.3 (C-28), 40.5 (C-4), 40.8 (C-8), 41.0 (C-12), 43.3 (C-5), 43.7 (C-13), 51.8 (C-14), 57.1 (C-17), 69.0 (C-7), 72.2 (C-3) และ 177.0 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 463.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (13%)

4.2.3 การสังเคราะห์ *N*-(6-Aminohexyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

86



86

สาร **86** สังเคราะห์จาก Chenodeoxycholic acid **7** ทำปฏิกิริยากับ 1,6-diaminohexane สาร **86** มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 70.91 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร **86** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

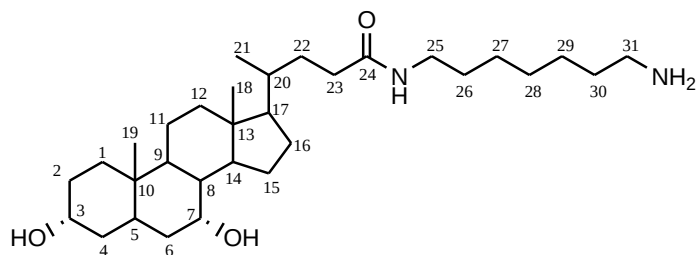
IR : $\nu_{\max}$ 1202 (C-N stretching), 1638 (C=O stretching ของ CONH), 2862, 2918 (C-H stretching) และ 3404 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.55 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, s, H-21), 1.02-2.07 (m, $-\text{CH}_2$), 2.74 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-30), 2.99 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-25), 3.26 (1H, m, H-3 β), 3.63 (1H, m, H-7 β), และ 7.86 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.1 (C-18), 18.8 (C-21), 21.7 (C-11), 23.2 (C-15), 24.5 (C-19), 27.0 (C-26), 27.4 (C-29), 29.0 (C-16), 30.2 (C-28), 31.1 (C-2), 33.3 (C-22), 34.0 (C-23), 34.1 (C-9), 35.6 (C-10), 35.8 (C-27), 36.2 (C-1), 36.6 (C-6), 36.8 (C-20), 37.0 (C-25), 40.6 (C-4), 40.7 (C-30), 40.8 (C-8), 41.1 (C-12), 43.2 (C-5), 44.0 (C-13), 51.7 (C-14), 57.1 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 176.8 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 491.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (49%)

4.2.4 การสังเคราะห์ *N*-(7-Aminoheptyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide **87**



87

สาร **87** สังเคราะห์จาก Chenodeoxycholic acid **7** ทำปฏิกิริยากับ 1,7-diaminoheptane สาร **87** มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 47.27 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร **87** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : $\nu_{\max}$ 1202 (C-N stretching), 1669 (C=O stretching ของ CONH), 2868, 2922 (C-H stretching) และ 3434 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.59 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, s, H-21), 1.05-2.10 (m, $-\text{CH}_2$), 2.78 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-31), 3.02 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-25), 3.18 (1H, m, H-3 β), 3.67 (1H, m, H-7 β), และ 7.95 (2H, s, NH_2)

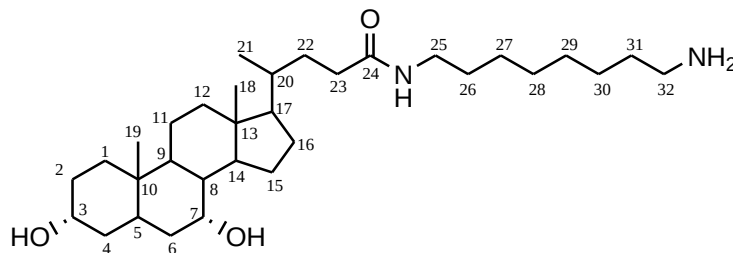
^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.1 (C-18), 18.8 (C-21), 21.7 (C-11), 23.2 (C-15), 24.5 (C-19), 27.4 (C-26), 28.5 (C-30), 29.0 (C-16), 29.8 (C-29), 31.1 (C-2), 33.3 (C-22), 33.5 (C-28), 34.0 (C-23), 34.1 (C-9), 35.6 (C-10), 35.8 (C-27), 36.2 (C-1), 36.6 (C-6), 36.8 (C-20),

37.0 (C-25), 40.2 (C-4), 40.7 (C-31), 40.8 (C-8), 41.1 (C-12), 43.2 (C-5), 44.0 (C-13), 51.7 (C-14), 57.1 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 176.7 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 505.6 $[M+H]^+$ (28%)

4.2.5 การสังเคราะห์ *N*-(8-Aminooctyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

88



88

สาร 88 สังเคราะห์จาก Chenodeoxycholic acid 7 ทำปฏิกิริยากับ 1,8-diaminooctane สาร 88 มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 56.36 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร 88 ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : $\nu_{\max}$ 1202 (C-N stretching), 1639 (C=O stretching ของ CONH), 2857, 2921 (C-H stretching) และ 3366 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

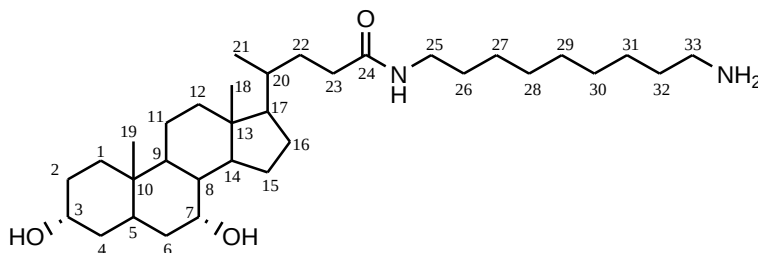
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.56 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20}$ = 4.8 Hz, H-21), 1.01-2.08 (m, $-\text{CH}_2$), 2.75 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-32), 2.99 (2H, t, J = 7.0 Hz, H-25), 3.16 (1H, m, H-3 β), 3.65 (1H, m, H-7 β), และ 7.93 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.1 (C-18), 18.8 (C-21), 21.7 (C-11), 23.2 (C-15), 24.5 (C-19), 27.4 (C-26), 27.8 (C-31), 29.0 (C-16), 30.1 (C-28), 30.1 (C-29), 30.4 (C-30), 31.1 (C-2), 33.3 (C-22), 34.0 (C-23), 34.1 (C-9), 35.5 (C-10), 35.6 (C-27), 36.2 (C-1), 36.6 (C-6), 36.8 (C-20), 39.2 (C-25), 40.3 (C-4), 40.8 (C-8), 40.8 (C-32), 41.1 (C-12), 43.2 (C-5), 44.0 (C-13), 51.7 (C-14), 57.1 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 176.7 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 519.6 $[M+H]^+$ (37%)

4.2.6 การสังเคราะห์ *N*-(9-Aminononyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide

89



89

สาร **89** สังเคราะห์จาก chenodeoxycholic acid **7** ทำปฏิกิริยากับ 1,9-diaminononane สาร **89** มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 59.46 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร **89** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

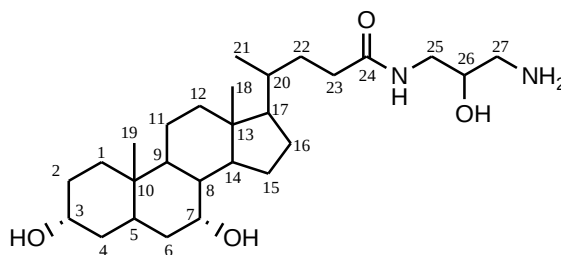
IR : $\nu_{\max}$ 1202 (C-N stretching), 1642 (C=O stretching ของ CONH), 2862, 2922 (C-H stretching) และ 3389 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.59 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 5.7$ Hz, H-21), 1.06-2.19 (m, $-\text{CH}_2$), 2.81 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-33), 3.05 (2H, m, H-25), 3.22 (1H, m, H-3 β), 3.70 (1H, m, H-7 β), และ 7.99 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.2 (C-18), 18.9 (C-21), 21.8 (C-11), 23.4 (C-15), 24.7 (C-19), 27.4 (C-26), 27.9 (C-32), 28.6 (C-16), 29.3 (C-31), 30.1 (C-28), 30.1 (C-30), 30.4 (C-29), 31.4 (C-2), 33.5 (C-22), 34.1 (C-23), 34.2 (C-9), 35.8 (C-10), 35.3 (C-27), 36.3 (C-1), 36.6 (C-6), 36.9 (C-20), 39.2 (C-25), 40.3 (C-4), 40.5 (C-8), 40.8 (C-33), 41.1 (C-12), 43.2 (C-5), 43.7 (C-13), 51.6 (C-14), 57.4 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 176.7 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 533.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100%)

4.2.7 การสังเคราะห์ *N*-(3-Amino-2-hydroxypropyl)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide **90**



90

สาร **90** สังเคราะห์จาก Chenodeoxycholic acid **7** ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diamino-2-propanol สาร **90** มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้เท่ากับ 74.55 เปอร์เซ็นต์ และยืนยันโครงสร้างสาร **90** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR : $\nu_{\max}$ 1216 (C-N stretching), 1642 (C=O stretching ของ CONH), 2868, 2927 (C-H stretching) และ 3389 (O-H stretching และ N-H stretching) cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ 0.58 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 4.6$ Hz, H-21), 1.04-2.14 (m, $-\text{CH}_2$), 2.83 (2H, m, H-27), 3.00 (2H, m, H-25), 3.17 (2H, m, H-3 β และ H-26), 3.72 (1H, m, H-7 β), และ 7.93 (2H, s, NH_2)

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) : δ 12.1 (C-18), 18.8 (C-21), 21.7 (C-11), 23.9 (C-15), 24.5 (C-19), 29.0 (C-16), 31.1 (C-2), 33.1 (C-22), 33.8 (C-23), 33.9 (C-9), 35.5 (C-10), 35.8 (C-1), 36.2 (C-6), 36.9 (C-20), 40.7 (C-4), 40.8 (C-8), 41.0 (C-12), 42.8 (C-5), 43.7 (C-25),

43.9 (C-27), 44.0 (C-13), 51.6 (C-14), 57.0 (C-17), 68.0 (C-26), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3) และ 177.8 (C-24)

ESMS (positive mode) : m/z 465.5 $[M+H]^+$ (20%)

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

Pregnenolone **1** และอะมิโนสเตียรอยด์ **58-67** ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยการพิจารณาจากบริเวณการเกิดวงใส (Clear zone) ณ หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์รวมทั้งหมด 6 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในสภาวะแวดล้อมและสามารถก่อโรคกับมนุษย์ได้ ซึ่งแต่ละชนิดมีโทษดังนี้ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบการปนเปื้อนในอาหารและเครื่องสำอาง ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษและโรคติดเชื้อที่ผิวหนังซึ่งอาจลุกลามเข้าสู่กระแสเลือดได้ *M. luteus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้อาหารเสื่อมเสีย เช่นการเสื่อมเสียของนม อาหารกระป๋อง นอกจากนั้นยังพบว่า *B. subtilis* สามารถนำมาใช้ในการหมักอาหาร *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์รวมทั้งคน พบได้ในดิน ผิวหนังและในสภาวะแวดล้อมอื่นๆ อยู่ได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมปกติและสภาพออกซิเจนต่ำ ในสัตว์จะเข้าทำลายเนื้อเยื่อที่มีภูมิคุ้มกันต่ำลง และ *C. albicans* เป็นยีสต์ชนิดหนึ่ง ซึ่งก่อให้เกิดโรคประเภทเชื้อฉวยโอกาสในคน โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเอดส์ จากผลการทดลอง พบว่าไม่ปรากฏวงใส (Clear zone) ของ Pregnenolone **1** และอะมิโนสเตียรอยด์ **58-67** ซึ่งถือว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่กล่าวมา

นอกจากนั้น Pregnenolone **1** และอะมิโนสเตียรอยด์ **58-67** ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ ณ ภาควิชาโษษุวิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ รวมทั้งหมด 12 ชนิด เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Streptococcus milleri* group, *S. coagulase negative*, *S. aureus* (MRSA) 20625 *S. aureus* (MRSA) 20626, *S. aureus* (MRSA) 20627, *S. aureus* (MRSA) 20633, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623, *S. aureus* (VRSA) 20683, *S. aureus* ATCC 25923 และแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Bordetella pertussis* โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มนี้ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อทางช่องปาก การอักเสบของผิวหนัง ปอดบวม เยื่อหู หูอักเสบและเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด พบได้ที่ผิวหนัง จมูก การกระจายเชื้อโดยการสัมผัสและผ่านทางลมหายใจ ปัจจุบันพบว่าเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* คือตัวยาล Methicillin (MRSA) และ Vancomycin (VRSA) เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไอ

กรณในมนุษย์ จากการทดลองพบว่า ผลการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ให้ผลการทดลองทำเดียวกันคือ พบวงใสมีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 5 มิลลิเมตร ซึ่งถือว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่กล่าวมา

อนุพันธ์สเตียรอยด์ของ Chenodeoxycholic acid 7 ได้แก่สเตียรอยด์ 84-90 ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ ณ ภาควิชาโอสถวิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อราและยีสต์ รวมทั้งหมด 35 ชนิด เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Streptococcus milleri* group, *S. sobrinus*, *S. pneumoniae*, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coagulase* negative, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* MRSA 20653, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20622, *S. aureus* VRSA 20623, *S. aureus* VRSA 20624, *S. aureus* VRSA 21083, *Bacillus subtilis* ATCC 26633, *Corynebacterium diphtheriae* และ *Enterococcus faecalis* 4373 (VRE) แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholera*, *V. paraheamolyticus* เชื้อราได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* และยีสต์ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231, *C. krusei* และ *C. tropicalis* โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method รายงานผลด้วยค่า MIC (Minimal Inhibition Concentration) หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา (หรือสารตัวอย่าง) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า Chenodeoxycholic acid 7 ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ยกเว้น *B. subtilis* ATCC 26633 และ *B. pertussis* มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

โดยภาพรวมเมื่อเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Chenodeoxycholic acid เลือกเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลเป็นหมู่เอไมด์ โดยการนำ Chenodeoxycholic acid 7 ทำปฏิกิริยากับไดเอมีนที่มีความยาวของสายโซ่แตกต่างกัน สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ได้สารทั้งหมด 7 ชนิด ความแตกต่างของอนุพันธ์ทั้ง 7 คือความยาวของสายโซ่ที่จะมีการเพิ่มหมู่เมทิลีนทีละ 1 หมู่ จากการทดลองพบว่า อนุพันธ์สเตียรอยด์ 84-90 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียดีกว่า Chenodeoxycholic acid 7 จากตารางที่ 4.2 สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

สเตียรอยด์ 84 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. milleri* group มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. mutans* ATCC 27175 และ *S. coagulase* negative มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *C. diphtheria* มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* VRSA 20622 และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สเตียรอยด์ 85 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. coagulase* negative, *C. diphtheria*, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20654 และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *S. sobrinus*, *S. aureus* VRSA 20622 และ *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *V. paraheamolyticus* มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *S. aureus*

ATCC 25923, *B. pertussis*, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* VRSA 20623 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *B. subtilis* ATCC 26633, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20633 และ *S. aureus* MRSA 20636 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สเตียรอยด์ **86** มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. mutans* ATCC 27175 และ *S. coag negative* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *C. diphtheria* มีค่า MIC เท่ากับ 3.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. aureus* VRSA 20622, *S. aureus* VRSA 20623 และ *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *S. aureus* MRSA 20628 และ *S. aureus* MRSA 20654 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. aureus* ATCC 25923, *V. paraheamolyticus*, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20652 และ *S. aureus* MRSA 20653 มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. sobrinus* และ *S. aureus* MRSA N1 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สเตียรอยด์ **87** มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheria* มีค่า MIC เท่ากับ 3.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coag negative*, *S. sobrinus*, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20654 และ *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. aureus* VRSA 20622 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *V. paraheamolyticus*, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* VRSA 20623 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *B. pertussis*, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 26633, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20635 และ *S. aureus* MRSA 20653 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สเตียรอยด์ **88** มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheria* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coag negative*, *S. aureus* MRSA 20627 และ *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. sobrinus*, *V. paraheamolyticus*, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20622 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *B. pertussis*, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* VRSA 20623 และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 26633, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20635 และ *S. aureus* MRSA 20653 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สแตียรอยด์ **89** มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *C. diphtheria* และ *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. coag* negative, *S. sobrinus*, *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *B. pertussis*, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20622, *S. aureus* VRSA 20623, *E. faecalis* 4737 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 26633, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* MRSA 20653 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สแตียรอยด์ **90** มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheria*, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coag* negative, *S. aureus* MRSA 20654 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *V. paraheamolyticus*, *S. aureus* MRSA 20632 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *B. pertussis*, *S. sobrinus*, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* VRSA 20623, *S. aureus* VRSA 20624, *E. faecalis* 4737 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 26633, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* MRSA 20653 มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์พบว่า อะมิโนสแตียรอยด์ **84-90** ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อราได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* และยีสต์ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231, *C. krusei* และ *C. tropicalis* โดยมีค่า MIC มากกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นอะมิโนสแตียรอยด์ **86** สามารถยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* และยีสต์ *C. tropicalis* มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และอะมิโนสแตียรอยด์ **90** สามารถยับยั้งยีสต์ *C. tropicalis* มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Chenodeoxycholic acid 7 และอนุพันธ์อะมิโนสเตียรอยด์ 84-90

แบคทีเรีย	ค่า MIC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)			
	Vancomycin	7	84	85
<i>Streptococcus milleri</i> group	4	> 100	25	12.5
<i>S. pneumoniae</i>	3	> 100	> 100	50
<i>S. mutans</i> ATCC 27175	0.016	> 100	12.5	12.5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.0	> 100	> 100	50
<i>Staphylococcus coag</i> negative	0.094	> 100	12.5	6.25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 26633	6	50	> 100	100
<i>Bordetella pertussis</i>	3	50	> 100	50
<i>Corynebacterium diptheriae</i>	1	> 100	6.25	6.25
<i>Streptococcus sobrinus</i>	1	> 100	> 100	12.5
<i>Vibrio cholerae</i>	-	> 100	> 100	> 100
<i>V. paraheamolyticus</i>	3	> 100	> 100	25
<i>S. aureus</i> MRSA N1	2	> 100	> 100	> 100
<i>S. aureus</i> MRSA 20625	-	> 100	> 100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20626	-	> 100	> 100	> 100
<i>S. aureus</i> MRSA 20627	-	> 100	> 100	6.25
<i>S. aureus</i> MRSA 20628	2	> 100	> 100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20630	1.5	> 100	> 100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20631	48	> 100	> 100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20632	3	> 100	> 100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20633	1	> 100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20635	8	> 100	> 100	> 100
<i>S. aureus</i> MRSA 20636	1.5	> 100	> 100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20652	0.25	> 100	> 100	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20653	2	> 100	> 100	> 100
<i>S. aureus</i> MRSA 20654	1.5	> 100	> 100	6.25
<i>S. aureus</i> VRSA 20622	32	> 100	100	12.5
<i>S. aureus</i> VRSA 20623	32	> 100	> 100	50
<i>S. aureus</i> VRSA 20624	-	> 100	> 100	12.5
<i>S. aureus</i> VRSA 21083	32	> 100	100	6.25
<i>Enterococcus faecalis</i> 4737 (VRE)	32	> 100	> 100	50

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Chenodeoxycholic acid 7 และอนุพันธ์อะมิโนสเต็มยรอยด์ 84-90

แบคทีเรีย	ค่า MIC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)				
	86	87	88	89	90
<i>Streptococcus milleri</i> group	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5
<i>S. pneumoniae</i>	12.5	25	50	50	50
<i>S. mutans</i> ATCC 27175	1.56	6.25	6.25	6.25	12.5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	50	100	100	100	100
<i>Staphylococcus coag</i> negative	1.56	6.25	6.25	12.5	12.5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 26633	50	100	100	100	100
<i>Bordetella pertussis</i>	12.5	50	50	50	50
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	3.125	3.125	1.56	6.25	6.25
<i>Streptococcus sobrinus</i>	100	6.25	25	12.5	50
<i>Vibrio cholerae</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Vibrio paraheamolyticus</i>	50	25	25	> 100	25
<i>S. aureus</i> MRSA N1	100	100	100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20625	50	6.25	100	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20626	50	100	100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20627	50	6.25	6.25	100	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20628	12.5	50	50	100	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20630	50	100	100	100	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20631	50	100	100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20632	25	100	100	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20633	50	50	50	50	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20635	50	100	100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20636	25	50	50	100	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20652	50	25	25	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20653	50	100	100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20654	12.5	6.25	25	50	6.25
<i>S. aureus</i> VRSA 20622	6.25	12.5	25	50	12.5
<i>S. aureus</i> VRSA 20623	6.25	25	50	50	50
<i>S. aureus</i> VRSA 20624	6.25	6.25	6.25	6.25	50
<i>S. aureus</i> VRSA 21083	25	50	50	12.5	6.25
<i>Enterococcus faecalis</i> 4737 (VRE)	> 100	25	25	50	50

4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

อะมิโนสเตียรอยด์ **58-67** ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ ประกอบด้วยเซลล์ปกติ (Vero, African green monkey kidney fibroblast), เซลล์มะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma, MCF-7), เซลล์มะเร็งช่องปาก (Human oral cavity carcinoma, KB), เซลล์มะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma, HepG2), เซลล์มะเร็งลำไส้ (Human colon adenocarcinoma, HT-29), และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (Murine leukemia, P388) ด้วยวิธี MTT assay (Primary screening) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับ Pregnenolone **1** ที่ระดับความเข้มข้นในการทดสอบเบื้องต้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone **1** และอะมิโนสเตียรอยด์ **58-67** แสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า Pregnenolone **1** มีค่าความเป็นพิษน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, KB, HepG2, HT-29 และ P388 โดยมีค่า %Cytotoxicity เท่ากับ 32.34, 43.26, 21.04 และ 22.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ Pregnenolone **1** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 60.45 เปอร์เซ็นต์

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

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

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

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

อะมิโนสเตียรอยด์ **62** มีแนวโน้มความเป็นพิษต่อเซลล์เหมือนกับอะมิโนสเตียรอยด์ **61** โดยแสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7, KB และ P388 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 54.02, 53.88 และ 57.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่มีผลต่อเซลล์ Vero, HepG2 และ HT-29 น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 44.40, 27.44 และ 22.10 เปอร์เซ็นต์

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

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

อะมิโนสเตียรอยด์ **65** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ MCF-7 และ KB มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 55.84 และ 52.95 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อย

กว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, Hep-G2, HT-29 และ P388 มีค่าเท่ากับ 36.52, 30.54, 13.27 และ 13.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

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

และอะมิโนสเตียรอยด์ **67** มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ MCF-7 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 51.70 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ Vero, KB, Hep-G2, HT-29 และ P388 มีค่าเท่ากับ 31.44, 35.88, 36.98, 18.68 และ 26.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Pregnenolone **1** และอะมิโนสเตียรอยด์ **58-67** ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สาร ตัวอย่าง	%Cytotoxicity					
	Vero	MCF-7	KB	HepG2	HT-29	P388
1	40.65	60.45	32.34	43.26	21.04	22.18
58	56.88	71.74	84.69	44.27	38.97	97.56
59	57.12	57.42	66.74	40.07	42.30	37.94
60	62.38	68.74	95.30	55.19	25.64	96.86
61	42.40	89.85	97.80	40.25	19.34	99.65
62	44.40	54.02	53.88	27.44	22.10	57.80
63	62.71	74.51	31.99	43.41	23.95	28.15
64	61.97	74.75	98.69	62.36	64.92	92.96
65	36.52	55.84	52.95	30.54	13.27	13.36
66	32.04	53.17	56.75	32.04	10.57	100.00
67	31.44	51.70	35.88	36.98	18.68	26.56

จากผลการทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ จะนำอะมิโนสเตียรอยด์ที่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง (antagonist) 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี MTT assay (IC_{50}) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับตัวยามาตรฐาน Vinblastine sulfate salt ค่า IC_{50} ของ Pregnenolone **1** และ อะมิโนสเตียรอยด์ **58-67** แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า Pregnenolone **1** ไม่มีผลในการทำลายเซลล์ปกติ (Vero), KB, HepG-2, HT-29 และ P388 โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 40 จากรูปผ. 1 แสดงให้เห็นถึงลักษณะของเซลล์ปกติ (Vero) ที่มีลักษณะเป็นรูปกลม เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ Pregnenolone **1** ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 125 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อเซลล์ Vero น้อยมาก แต่ Pregnenolone **1** มีผลในการทำลายเซลล์ MCF-2 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.29 แสดงดังรูปผ. 2 แสดงการทำลายเซลล์ MCF-2 ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 125 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Pregnenolone **1** มากขึ้นเซลล์ MCF-7 จะถูกทำลายมากขึ้น

โดยบางเซลล์มีรูปแบบของการตายแบบ apoptosis คือการเปลี่ยนแปลงจากรูปกลมกลายเป็นก้อนกลม นอกจากนี้ยังมีบางเซลล์ที่ตายแบบสลายตัวไปแล้ว

ตารางที่ 4.3 ค่า IC_{50} ของอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67

สาร ตัวอย่าง	IC50 (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)					
	Vero	MCF-7	KB	HepG2	HT-29	P388
Vinblastine sulfate salt	0.0014	0.0002	0.0016	0.0007	0.0017	0.0091
1	>40	2.29	>40	>40	>40	>40
58	1.63	1.09	0.54	>40	>40	1.41
59	2.25	2.29	1.06	>40	>40	>40
60	1.53	1.74	0.79	2.23	>40	0.36
61	>40	0.70	1.07	>40	>40	0.73
62	>40	2.04	2.13	>40	>40	1.45
63	1.77	1.30	>40	>40	>40	>40
64	1.47	0.93	0.33	2.09	0.95	0.33
65	>40	2.14	1.70	>40	>40	>40
66	>40	2.17	1.59	>40	>40	0.76
67	>40	2.17	>40	>40	>40	>40

จากตารางที่ 4.3 พบว่าสาร 61 มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ MCF-2 และ P388 ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.70 และ 0.73 ไมโครโมล/มิลลิลิตร (รูปผ. 26 และ รูปผ. 30) และที่น่าสนใจมากคือ สาร 61 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติในค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้ (42.40 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นจะมีค่าใกล้เคียงในช่วงที่ยอมรับได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า สาร 58 มีผลต่อเซลล์ KB ในระดับที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.54 ไมโครโมล/มิลลิลิตร, สาร 60 มีผลต่อเซลล์ P388 ในระดับที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.36 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และสาร 64 มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ MCF-2, KB, HepG2, HT-29 และ P388 ที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.93, 0.33, 2.09, 0.95 และ 0.33 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปผ. 44-48) แต่เป็นที่น่าเสียดายสาร 58, 60 และ 64 มีผลต่อเซลล์ปกติโดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (56.88, 62.38 และ 61.97 เปอร์เซ็นต์) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.63, 1.53 และ 1.47 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิต

นอกจากนั้น Chenodeoxycholic acid 7 และสารอนุพันธ์ 85 ถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 และเซลล์ KB ด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA) พบว่าทั้ง Chenodeoxycholic acid 7 และสารอนุพันธ์ 85 ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ MCF-7 และเซลล์ KB