

บทที่ 5

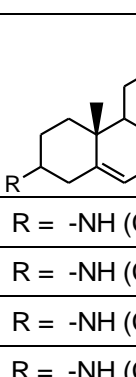


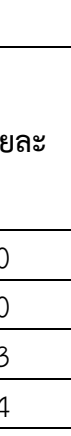
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากความสนใจของผู้วิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงโครงสร้างของ Pregnenolone **1** และ Chenodeoxycholic acid **7** จึงได้สังเคราะห์อนุพันธ์ที่ประกอบด้วยหมู่อะมิโน และนำสารสังเคราะห์ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

5.1 การสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 จาก Pregnenolone **1**

อะมิโนสเตียรอยด์ **58-67** ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ Pregnenolone **1** ให้เป็นหมู่อะมิโน การสังเคราะห์เตรียมผ่านสารตัวกลางคือ 4-nitrophenyl-pregnenolone-carbonate **57** สามารถสังเคราะห์สาร **57** มีผลได้เท่ากับได้ 92.41 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสารประกอบไดอะมิโน ผลได้ร้อยละของอะมิโนสเตียรอยด์แสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ผลได้ร้อยละของอะมิโนสเตียรอยด์ (คำนวณเทียบจาก Pregnenolone **1**)

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

จากการทดลองสามารถสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ มีผลได้ร้อยละอยู่ในช่วงต่ำถึงสูง สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก

1. จากแผนภาพที่ 4.1 ในขั้นตอนการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone 1 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ให้เป็นหมู่หลุดออก โดยใช้รีเอเจนต์คือ *p*-nitrophenyl chloroformate ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันเอซิลคลอไรด์ที่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยากับความชื้นในอากาศ ทำให้สาร 57 ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้กลับเป็นสารตั้ง Pregnenolone 1 มีผลทำให้ได้สาร 57 ลดลง

2. ขั้นตอนแยกอะมิโนสเตียรอยด์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี อะมิโนสเตียรอยด์เป็นสารที่มีช่วงค่อนข้างสูงอาจเกิด interaction กับซิลิกาเจล ที่ใช้ในเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีค่อนข้างสูง และเนื่องจากเป็นสารผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยหมู่อะมิโนซึ่งมีความเป็นเบสสามารถเกิด interaction กับซิลิกาเจลที่มีความเป็นกรดได้ ทำให้เกิดการตกค้างอยู่ในคอลัมน์ส่งผลให้ได้ปริมาณหลังการทำให้บริสุทธิ์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ลดลง

5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67

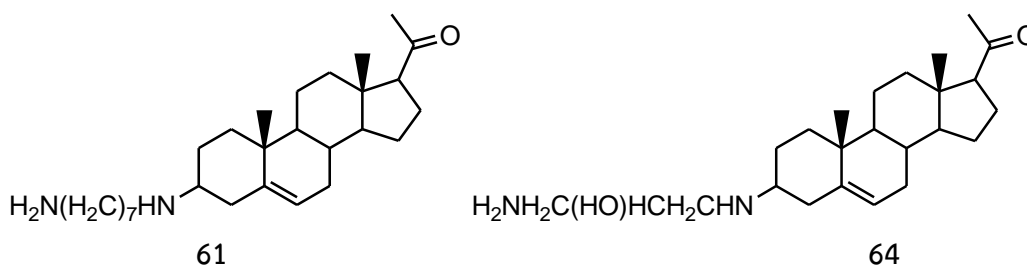
จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น ซึ่งประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 พบว่า Pregnenolone 1 อะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และเมื่อนำไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *S. 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 และ *B. pertussis* ผลการทดลองมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันคือ Pregnenolone 1 และ อะมิโนสเตียรอยด์ 58-67 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ กล่าวได้ว่าการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์ Pregnenolone 1 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของวง A เป็นหมู่อะมิโนไม่มีผลต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์

5.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอะมิโนสเตียรอยด์ 58-67

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า Pregnenolone 1 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เซลล์ปกติ (Vero, African green monkey kidney fibroblast), เซลล์มะเร็งช่องปาก (Human oral cavity carcinoma, KB), เซลล์มะเร็งลำไส้ (Human colon adenocarcinoma, HT-29), และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (Murine leukemia P388) น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ กล่าวได้ว่า Pregnenolone 1 มีความเหมาะสมในการเลือกใช้เป็นสารตั้งต้น

ในที่นี้ขอกล่าวสรุปเฉพาะอะมิโนสเตียรอยด์ที่ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดคือ อะมิโนสเตียรอยด์ 61 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma, MCF-7) ดีที่สุดคือมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.70 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero) น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีโอกาสเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ในสิ่งมีชีวิตได้ ส่วนอะมิโนสเตียรอยด์ 64 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-2, KB, HT-29 และ P388 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.93, 0.33, 0.95 และ 0.33 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ดี แต่อะมิโนสเตียรอยด์ 64

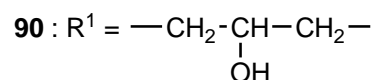
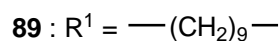
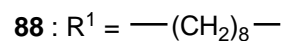
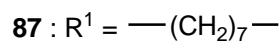
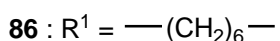
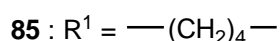
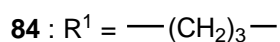
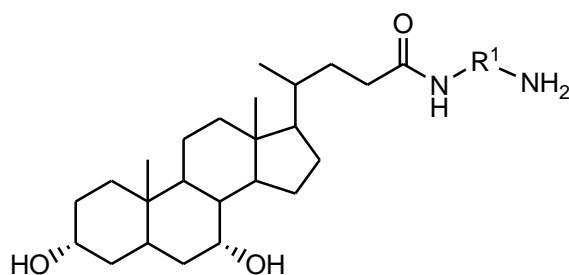
มีข้อเสียคือจะมีผลการทำลายต่อเซลล์ Vero โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.47 ไมโครโมล/มิลลิลิตร จึงยังไม่เหมาะกับการนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิต



จะเห็นได้ว่าอะมิโนสเตียรอยด์ 58-63 ที่สังเคราะห์ได้นี้ จัดอยู่ในกลุ่ม Alkylating agent ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ในการทำลายสารพันธุกรรมเพื่อป้องกันการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง โดยออกฤทธิ์ได้ทุกระยะของการแบ่งเซลล์ และจากลักษณะการตายของเซลล์พบว่า เซลล์มีการหดตัวและจับตัวกันแน่นจนกลายเป็นก้อนกลม ซึ่งเป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำของสารที่สังเคราะห์ได้ โดยการเปลี่ยนแปลงในลักษณะดังกล่าวเป็นรูปแบบของการตายแบบ apoptosis นอกจากนี้ยังมีบางเซลล์ที่ตายและสลายตัวไปแล้ว จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Pregnenolone ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 ของวง A จากหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่อะมิโนมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพด้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

5.4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid 7

ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของ Chenodeoxycholic acid 7 ที่สามารถตรวจสอบโครงสร้างสารด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่าอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้มีความถูกต้อง ผลได้ของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 40 - 80 เปอร์เซ็นต์ สูตรโครงสร้างของโบล์แอดิดเอไมด์สังเคราะห์แสดงดังนี้



5.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของอนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid 7

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Chenodeoxycholic acid 7 เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่าส่วนใหญ่มีค่า MIC มากกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นมีฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 26633 และ *B. pertussis* มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอนุพันธ์ของ Chenodeoxycholic acid 84-90 พบว่าสารส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียเกือบทุกชนิด ยกเว้นสาร 84 ที่ส่วนใหญ่ไม่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ นอกจากนี้พบว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ดีที่สุดในกลุ่มนี้มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ได้แก่สาร 86 สำหรับการต้าน *S. mutans* ATCC 27175 และ *Staphylococcus coag negative* และสาร 88 สำหรับการต้าน *C. diphtheriae* ส่วนแบคทีเรียที่สารอนุพันธ์ทุกชนิดออกฤทธิ์ต้านดีที่สุดคือ *C. diphtheriae*

จากผลการทดลอง พบว่าการปรับปรุงโครงสร้างของ Chenodeoxycholic acid 7 เป็นสารประกอบเอไมด์จะทำให้สารมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดีมากยิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hazra และคณะ[40] ที่ศึกษาพบว่าอนุพันธ์เอไมด์ของกรดโคเลสิก และกรดดีออกซีโคเลสิก มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก Hazra และคณะ[41] ศึกษาพบว่าอนุพันธ์เอไมด์ และเอสเทอร์ของกรดโคเลสิกมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *S. aureus* นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ ยังพบว่าการใช้ไดเอมีนในการปรับปรุงโครงสร้างสารมีส่วนในการช่วยเพิ่มฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารได้ดีมากยิ่งขึ้น

5.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์ Chenodeoxycholic acid 7

Chenodeoxycholic acid 7 และสารอนุพันธ์ 85 ถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 และเซลล์ KB พบว่าทั้ง Chenodeoxycholic acid 7 และสารอนุพันธ์ 85 ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ MCF-7 และเซลล์ KB