

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสมมาตรยูเรียนี้ เป็นการพัฒนาศึกษาต่อมาจากการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ยูรามีน ซึ่งอนุพันธ์ของยูรามีนคือ NF157 แสดงฤทธิ์ที่ดีในการเป็น antagonist ต่อ $P2Y_{11}$ receptor และใช้เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์ต่อรีเซปเตอร์นี้ นอกจากนี้ Meis, et .al ยังได้รายงานถึงอนุพันธ์สมมาตรยูเรียขนาดเล็ก NF340 ว่ามีฤทธิ์เป็น agonist ต่อ $P2Y_{11}$ receptor .ในขณะที่อนุพันธ์ phosphate NF546 แสดงฤทธิ์การเป็น selective agonist ต่อ $P2Y_{11}$ receptor

จากการที่ทั้ง NF157 และ NF340 ต่างมีฤทธิ์เป็น antagonist ซึ่งเมื่อพิจารณาโครงสร้างทั้ง 2 พบว่ามีขนาดที่แตกต่างกันมาก ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะลดขนาดของ NF157 โดยการทำเป็นอนุพันธ์สมมาตรยูเรีย เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับการออกฤทธิ์

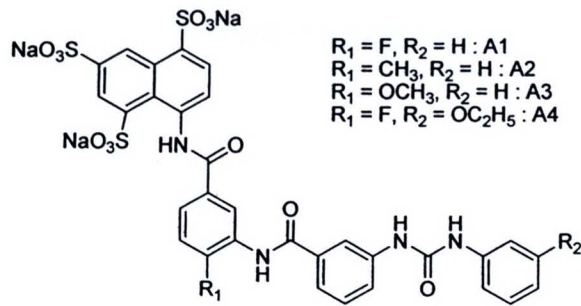
จากวิธีการสังเคราะห์พบว่า อนุพันธ์สมมาตรยูเรีย สังเคราะห์ขึ้นได้ง่ายจากปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้น amine ซึ่งแสดงวิธีการสังเคราะห์ไว้โดยละเอียดใน Ullmann et.al จากปฏิกิริยาระหว่าง สารตั้งต้น 8-amino-1,3,5-naphthalene trisulfonic acid ทำปฏิกิริยา acetylation กับ acid chloride จากนั้นจึงทำการรีดิวซ์หมู่ nitro ให้เป็น amino group เมื่อได้อนุพันธ์ตั้งต้นตามต้องการแล้วสามารถนำมาทำเป็นอนุพันธ์สมมาตรได้โดยการทำปฏิกิริยากับ isocyanate โดยการทำให้ปฏิกิริยานี้จะใช้ triethylamine เป็น catalyst เนื่องจากเป็นการทำปฏิกิริยาในน้ำ isocyanate จะทำให้เกิดสารประกอบเป็น side product ได้ง่าย การทำปฏิกิริยาบางชนิดอาจต้องใช้เวลานานเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ สารประกอบยูเรียที่เกิดขึ้นสามารถกรองออกได้ (ถ้าจำเป็น) และทำการสกัดด้วยอีเทอร์ จากนั้นต้องทำลายละลายให้เป็นกลางแล้วจึงทำการระเหยภายใต้สุญญากาศเพื่อเอาน้ำออก เกลือที่เกิดขึ้นกำจัดโดยใช้ ion exchange column chromatography

การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทำโดยใช้เทคนิค 1H และ ^{13}C -NMR Spectrophotometry นอกจากนี้ยังยืนยันผลการสังเคราะห์ที่ได้โดยการทำ MALDI-TOF MS ทั้ง positive mode และ negative mode ซึ่งช่วยยืนยันโครงสร้างในรูปที่เป็นเกลือโซเดียม จากผลการไทเทรตด้วยสารละลาย $AgCl_2$ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ด้วย ซึ่งเกิดจากการทำให้เป็นกลางภายหลังทำ column exchange chromatography ซึ่งเกลือเหล่านี้ไม่มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ ปริมาณเกลือที่มีพบว่าสอดคล้องกับค่าที่ได้ในการคำนวณ elemental analysis

ในการทดลองครั้งนี้ไม่มีการทำ IR เนื่องจากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่า IR ไม่สามารถช่วยในการพิสูจน์สูตรโครงสร้างได้เนื่องจากโมเลกุลค่อนข้างใหญ่และไม่มีลักษณะเด่นจำเพาะ และเนื่องจากเป็นเกลือโซเดียมจึงไม่สามารถหาจุดหลอมเหลวได้

จากการวิจัยนี้ได้สังเคราะห์สาร 4 ตัวได้แก่

1. 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium
2. 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium
3. 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium
4. 8-(3-(3-(N'-(3-(Ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate sodium



ตารางที่ 7 สรุปโครงสร้างแล pKi ที่ได้เมื่อทดสอบฤทธิ์ต่อ P2Y₁₁ receptor

สาร	R ₁	R ₂	pKi
A1	F	H	6.58
A2	CH ₃	H	6.17
A3	OCH ₃	H	6.39
A4	F	COOC ₂ H ₅	7.04

สารที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 4 ตัวมีฤทธิ์เป็น antagonist ต่อ P2Y₁₁ receptor เมื่อใช้ ATP เป็น standard agonist และไม่มีตัวใดมีฤทธิ์กระตุ้น receptor ได้เลย อีกทั้งยังไม่มีตัวใดแสดงฤทธิ์ต่อทั้ง P2Y₁ และ P2Y₂ receptor แสดงว่าสาร A1-A4 มีความจำเพาะต่อ P2Y₁₁ receptor สูง

เมื่อพิจารณาอนุพันธ์อสมมาตรของ NF157 คือสาร A1 และสาร A4 พบว่ามีความแรงในการเป็น antagonist ดังนี้ NF175 > A4 > A1 (pKi มีค่า 7.35, 7.04 และ 6.58 ตามลำดับ) และเมื่อเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ขนาดเล็กของ NF157 พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการกระตุ้นโดย ATP ได้เพียง 64.7% ในขณะที่ NF157 ยับยั้งได้ถึง 96.6%⁽²²⁾

เมื่อเปลี่ยนหมู่แทนที่จาก fluorine เป็น methyl group และ methoxy group จะได้สารที่มีฤทธิ์ต่ำกว่า อนุพันธ์ fluorine (pKi มีค่า 6.17 และ 6.39 เมื่อเทียบกับ 6.58) อาจเป็นเพราะทั้งหมู่ fluorine และ methoxy group มีผล negative inductive effect ต่อโครงสร้าง ซึ่งดีกว่าหมู่ positive inductive group แต่มีผลที่น่าสนใจคืออนุพันธ์ขนาดเล็กของ suramine คือ NF058 (R₁ = methyl group) แสดง % การยับยั้งได้ถึง 86.6 % และมีค่า pKi 5.12 ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีความแรงต่ำกว่า A2 ประมาณ 10 เท่า แต่ก็ยังสูงกว่า อนุพันธ์ fluorine แสดงให้เห็นว่าปัจจัยในเรื่อง electronic effect ของโครงสร้างอาจไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ ซึ่งควรต้องมีการศึกษาต่อไป

