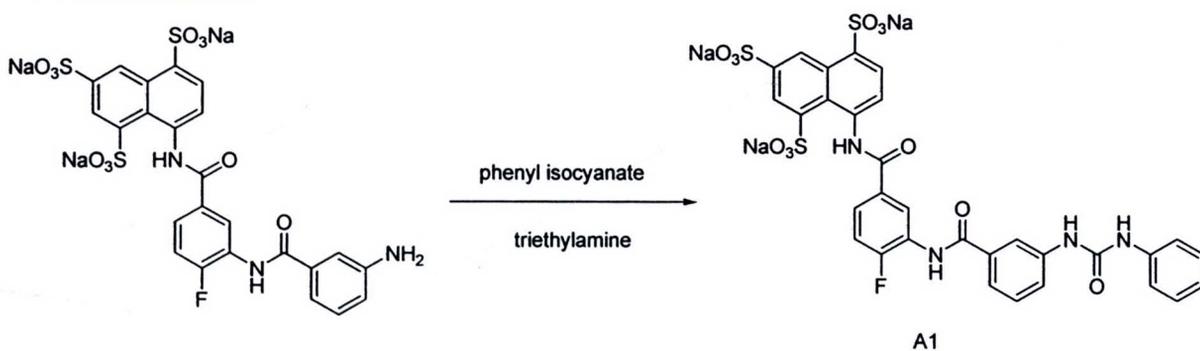


## ผลการทดลอง

### 1. การสังเคราะห์

#### 1.1 การสังเคราะห์ 8-(3-(3-((N'-(phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorbenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt (A1)

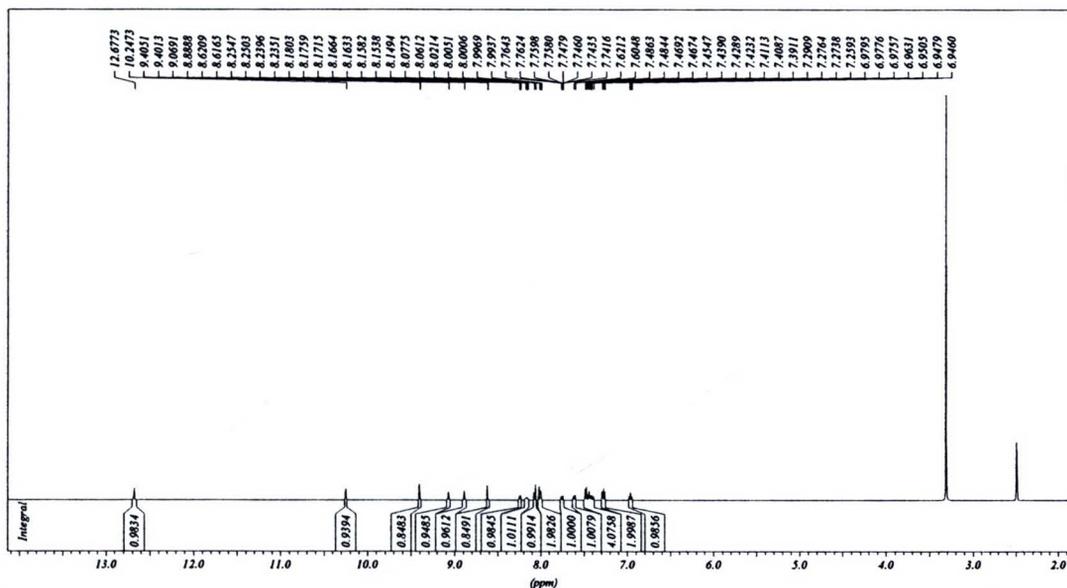


ค่อยๆหยด 1-Phenyl isocyanat 0.51 กรัม (4.28 mmol) ลงในเอมีน 188.7 mg (0.27 mmol) ที่ละลายน้ำ 5 มล. และ triethylamine 0.2 มล. หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ กรองเอาตะกอนออก เติม diethylether 50 ml และ stir นาน 2 ชั่วโมง แยกชั้นน้ำ และสกัดด้วย diethyl ether ครั้งละ 50 มล. อีก 2 ครั้ง นำชั้นน้ำไประเหยแห้ง จะได้ตะกอนสีขาวหนัก 160.4 มก. ตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ developing system เป็น Isopropanol + 25% NH<sub>3</sub> = 5+2 จะได้ค่า R<sub>f</sub> ของผลิตภัณฑ์มีค่า 0.38 และ R<sub>f</sub> ของสารตั้งต้นมีค่าเท่ากับ 0.30

วิเคราะห์หาปริมาณเกลือ NaCl ได้เท่ากับ 3.21 % Uvmax แสดงที่ 246, 314 nm เมื่อวัดในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.5

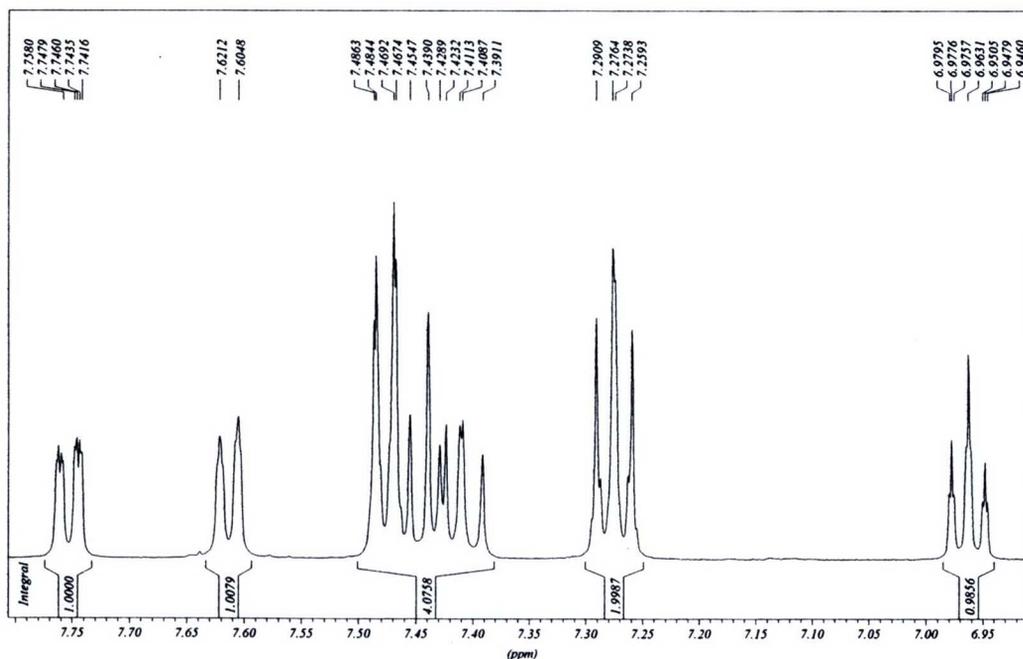
การพิสูจน์สูตรโครงสร้างโดย <sup>1</sup>H NMR 500 MHz ได้ spectrum ดังรูป 7-12

DH-T35-1 in d6-DMSO: 303K  
 1H-NMR



รูป 7  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ 2.0 - 14.0 ppm

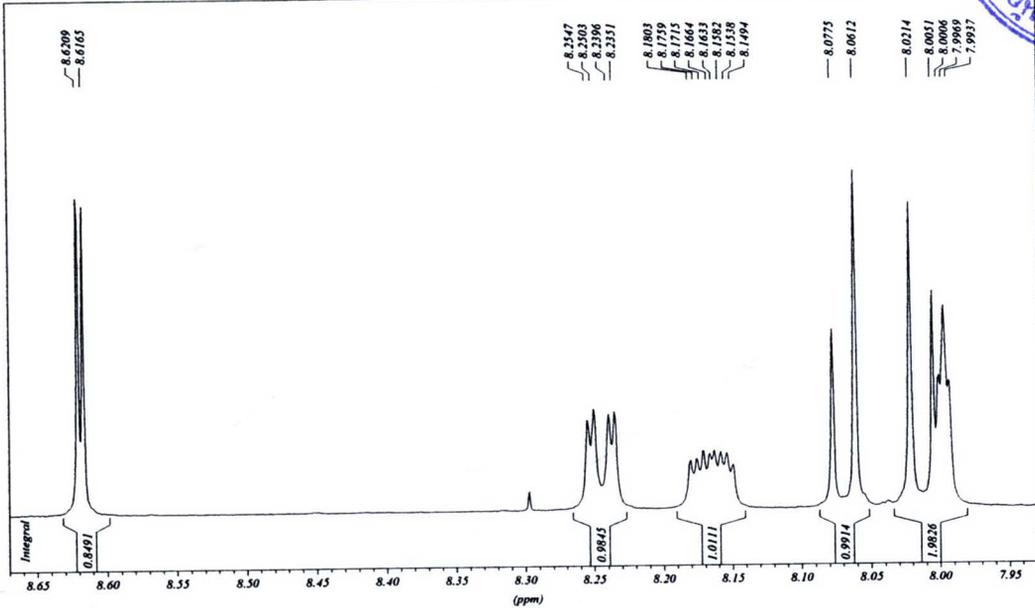
DH-T35-1 in d6-DMSO: 303K  
 1H-NMR



รูป 8  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ขยายพิคในส่วน 6.90 - 7.80 ppm

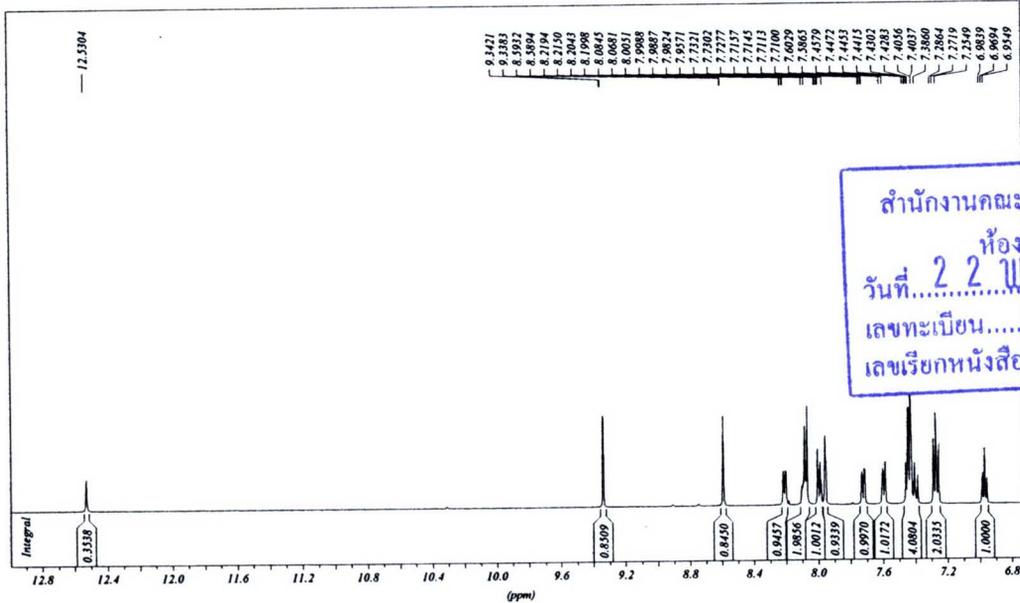


DH-T35-1 in d6-DMSO; 303K  
1H-NMR

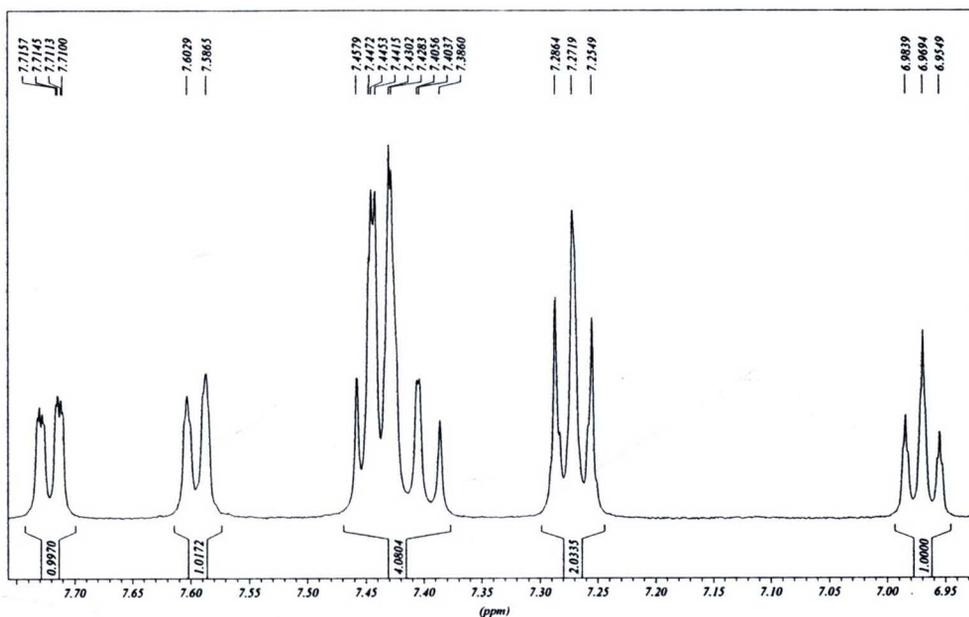


รูป 9  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ขยายพิคในส่วน 7.90 – 8.65 ppm

DH-T35-1 in d6-DMSO; 303K  
D2O Anatawach

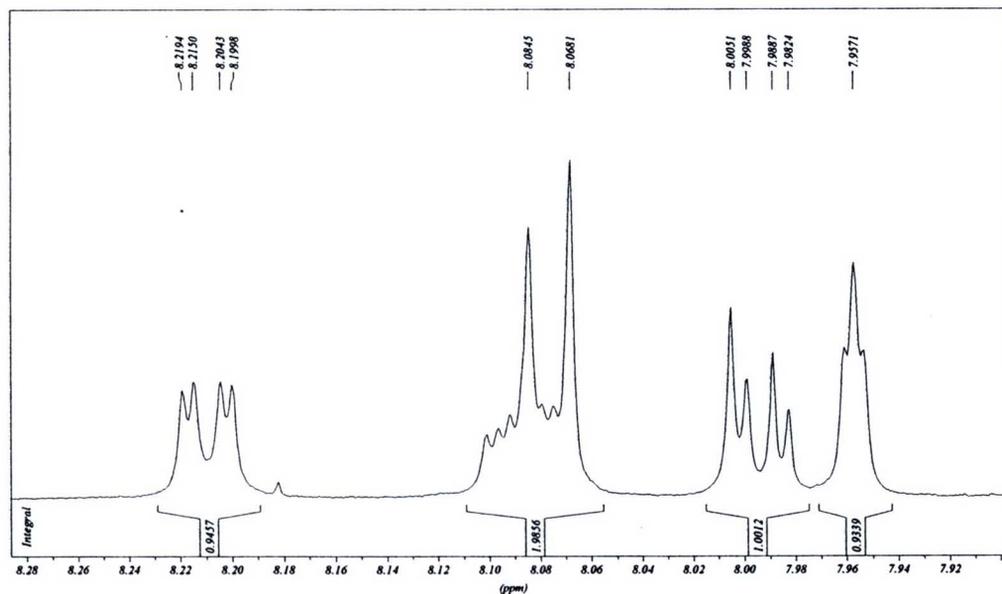


DH-T35-1 in d6-DMSO; 303K  
D20 Avanceach



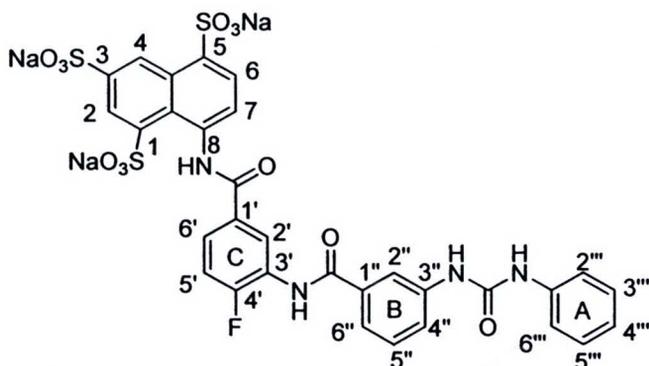
รูป 11  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ทำ  $\text{D}_2\text{O}$  exchange ขยายพิคที่ 6.90 - 7.71 ppm

DH-T35-1 in d6-DMSO; 303K  
D20 Avanceach



รูป 12  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ทำ  $\text{D}_2\text{O}$  exchange ขยายพิคที่ 7.90 - 8.28 ppm

สามารถอธิบายผลของ  $^1\text{H}$  NMR spectrum ต่อโครงสร้างได้ดังนี้



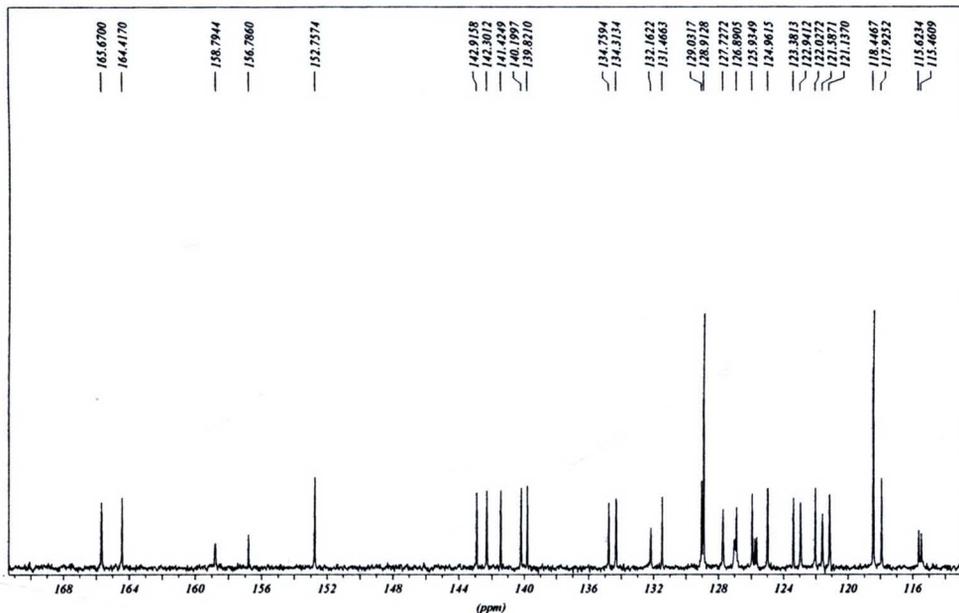
ที่ 10.25 และ 12.68 ppm เป็น singlet มีค่า integration เท่ากับ 1 และหายไปเมื่อทำ แสดงว่าเป็น peak ของ NH amide ทั้งสองตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 8.89 และ 9.07 ppm แสดง peak ลักษณะเป็น singlet และหายไปเมื่อทำ  $\text{D}_2\text{O}$  exchange เช่นกันเป็น peak ของ NH urea ทั้ง 2 ตำแหน่ง

ส่วนของ naphthalene ring proton H2 แสดง peak ที่ 9.40 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น double ที่มีค่า  $J$  เท่ากับ 1.89 Hz และค่า integration เท่ากับ 1 ซึ่งมีการ coupling H4 ที่แสดง peak เป็น double ที่ 8.62 ppm โดยมีค่า  $J$  เท่ากับ 2.20 Hz proton ในตำแหน่ง H6 และ H7 แสดงลักษณะเป็น double peak เหมือนกันที่ 8.06 และ 8.03 ppm และมีค่า  $J$  เท่ากันคือ 8.20 Hz

Ring C แสดงลักษณะของ proton ที่ชัดเจน 2 ตำแหน่งคือที่ 8.24 และ 8.00 ppm ที่มีลักษณะ peak เป็น doublet of doublet ( $J$  เท่ากับ 2.20 และ 7.56 Hz) และ เป็น doublet ที่มีค่า  $J$  เท่ากับ 1.90 Hz ซึ่งเป็น peak ของ H6' และ H2' ตามลำดับ ส่วน proton H5' แสดง peak อยู่ในช่วง 7.74 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น multiplet เนื่องจากซ้อนทับกับ peak ของ H5'', H2''' และ H6'''

Ring B แสดงลักษณะ peak ที่เห็นชัดของ H6'' ที่ 7.61 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น doublet ที่มีค่า  $J$  เท่ากับ 8.19 Hz และ integration เท่ากับ 1 ส่วน H2'' และ H4'' แสดงได้ด้วย peak ที่ 8.16 ppm ซึ่งเป็นลักษณะ multiplet และ ที่ 7.74 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น doublet of doublet และมี integration เท่ากับ 1 ทั้งสองตำแหน่ง ในส่วนของ proton H5'' อยู่ในบริเวณ 7.74 ppm ซึ่งไม่สามารถหาค่า coupling constant ได้

Ring A แสดงลักษณะ peak ที่ซับซ้อนบริเวณ 7.74 และ 6.95 ppm โดย ที่ตำแหน่ง 6.95 ppm มีลักษณะ เป็น triplet of triplet ซึ่งมีค่า  $J$  เท่ากับ 0.95 และ 7.27 Hz แต่มี integration เพียง 1 ตำแหน่งนี้จึงต้องเป็นตำแหน่งการ แสดงออกของ proton H4''' ในขณะที่ตำแหน่ง 7.74 ppm มีลักษณะเป็น multiplet ไม่สามารถหาค่า  $J$  ได้ ควรเป็น H2''' และ H6''' ในส่วนของ H3''' , H5''' แสดงออกโดย peak ที่ 7.27 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น doublet of doublet ที่มีค่า  $J$  เท่ากับ 1.26 และ 7.27 และมีค่า integration เท่ากับ 2



รูป 13 <sup>13</sup>C NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ 113 - 171 ppm

ผลจากวิเคราะห์ <sup>13</sup>C-NMR โดยใช้ d<sub>6</sub>-DMSO เป็นตัวทำละลายพบ peak ทั้งสิ้นจำนวน 29 peak ดังนี้ 165.67, 164.42, 158.79, 156.79, 152.76, 142.92, 142.30, 141.42, 140.20, 139.82, 134.76, 134.31, 132.16, 131.47, 129.03, 128.91, 127.73, 126.89, 125.93, 124.96, 123.38, 122.94, 122.03, 121.59, 121.14, 118.45, 117.93, 115.62, และที่ 115.46 ppm โดย peak ที่ 128.91 และ 118.45 มีความสูงของ peak มากกว่า peak อื่น ซึ่งสามารถแปลความได้ว่าเป็น peak ของ C ในตำแหน่ง C3''' และ 5''' (ที่ 128.91 ppm) และ ของ C ตำแหน่ง C2''' และ C6''' (ที่ 118.45 ppm) ได้ และ peak ที่ตำแหน่ง 129.03 ควรเป็น peak ของ C4''' ส่วน peak ที่ 139.82 แสดงถึง C1'''

Peak ที่ 165.67 และ 164.42 ppm แสดงถึงการมี CO amide 2 ตำแหน่ง และ peak ที่ 152.76 ppm แสดงลักษณะของ CO urea

Naphthyl sulfonate group สามารถแสดงได้โดย peak ที่ 141.42, 123.38, 142.30, 127.73, 140.20, 126.89, 117.93, และ 142.92 ppm แสดง C1-8 และ peak ของ C4a และ 8a แสดงโดย peak ที่ 131.47 และ 122.94 ppm ตามลำดับ

Fluorobenzoyl ring (C) แสดง peak 6 peaks ที่ 132.16 (C1'), 115.62 (C2'), 121.14 (C3'), 158.79 (C4'), 115.46 (C5'), และ 122.03 (C6')

Ring B แสดงได้โดย peak ที่ 134.76, 121.59, 156.79, 125.93, 134.31 และ 124.96 ppm ซึ่งแสดงถึง peak ของ C1'' - C6'' ตามลำดับ

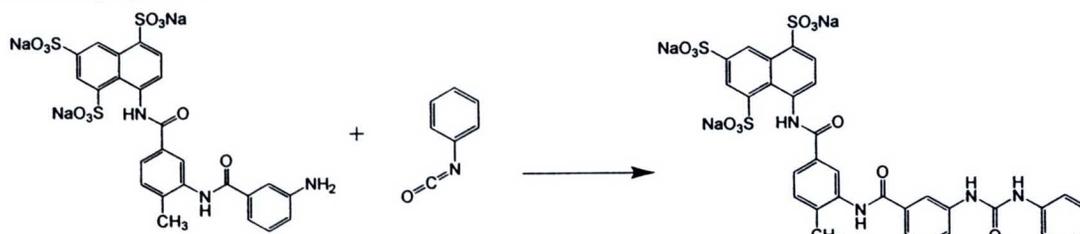
ผลจาก MALDI-TOF MS ที่ทำการทดลองในลักษณะ positive mode พบ m/z ดังตารางที่ 3 ตารางที่ 3 ผล Mass spectrometry ที่ run ใน positive mode ของสาร A1

m/z ที่พบ	m/z จากการคำนวณ	การแปลผล
825.6	825.0	$[M+H]^+$
847.8	847.0	$[M+Na]^+$
781.5	781.0	$[M-2Na+3H]^+$
759.3	759.1	$[M-3Na+4H]^+$
1649.3	1649.0	$[2M+H]^+$
1671.7	1671.0	$[2M+Na]^+$

ผล MALDI-TOF MS เมื่อทำการวัดใน negative mode พบค่า calcd/found มีค่า 801.0/801.6 ซึ่งสามารถแปลผลได้เป็น peak ของ  $[M-Na]^-$

ผลการทำ Elemental analysis พบ % C เท่ากับ 36.82 % H เท่ากับ 3.29 และ % N เท่ากับ 5.50 และเมื่อเทียบ C/N มีค่า 6.70 เมื่อเปรียบเทียบจากการคำนวณ ต้องมีค่าเป็น 45.15, 2.44, 6.79 และ 6.65 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าไม่เท่ากับทฤษฎีที่ควรจะเป็น แต่จากการวิเคราะห์พบว่าสารที่ได้มีเกลือ NaCl และน้ำอยู่ด้วย คำนวณใหม่ จึงได้เป็น 37.20, 3.62, 5.60, และ 6.65 ตามลำดับ นั่นคือสามารถใช้ผล Elemental analysis ในการยืนยันสารสังเคราะห์ที่ได้

## 1.2 การสังเคราะห์ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium (A2)



ค่อยๆหยด 1-Phenylisocyanat 40 หยด ลงในเอมีน 0.34 กรัม (0.49 mmol) ที่ละลายน้ำ 10 มล. และ triethylamine 0.2 มล. หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ กรองเอาตะกอนออก เติมนิโตรเบนซีน 50 ml และ stir นาน 2 ชั่วโมง แยกชั้นน้ำ และสกัดด้วย diethyl ether ครั้งละ 50 มล. อีก 2 ครั้ง นำชั้นน้ำไประเหยแห้ง จะได้ตะกอนสีขาวหนัก 167.9 มก.(42.17%)

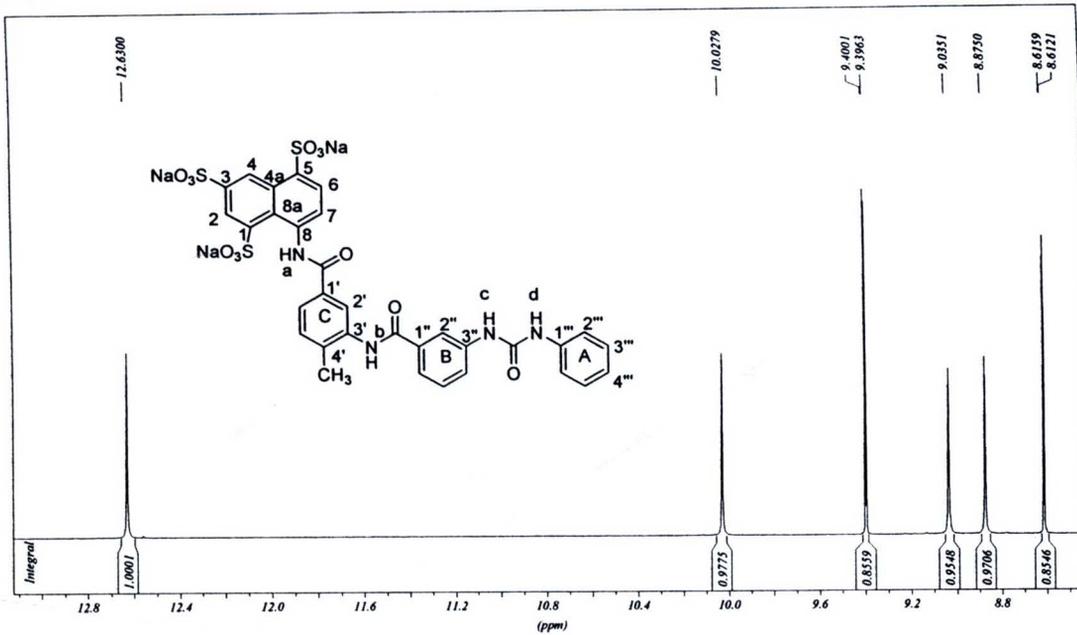
ตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ developing system เป็น Isopropanol + 25%  $NH_3$  = 5+2 จะได้ค่า Rf ของผลิตภัณฑ์มีค่า 0.38 และ Rf ของสารตั้งต้นมีค่าเท่ากับ 0.30

เมื่อนำไปวัดค่า UV spectrophotometry พบการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 246 และ 316 nm และ วิเคราะห์ NaCl ได้ 3.16 %

การพิสูจน์สูตรโครงสร้างโดย  $^1H$  NMR 500 MHz ได้ spectrum ดังรูป 14 - 19

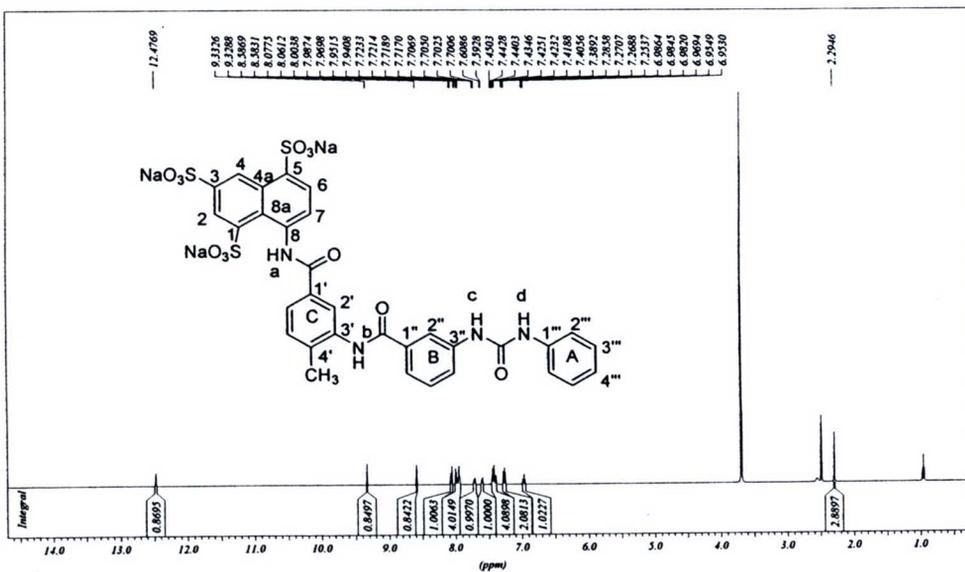


DH-T41-1 in d6-DMSO; 303K  
 1H-NMR



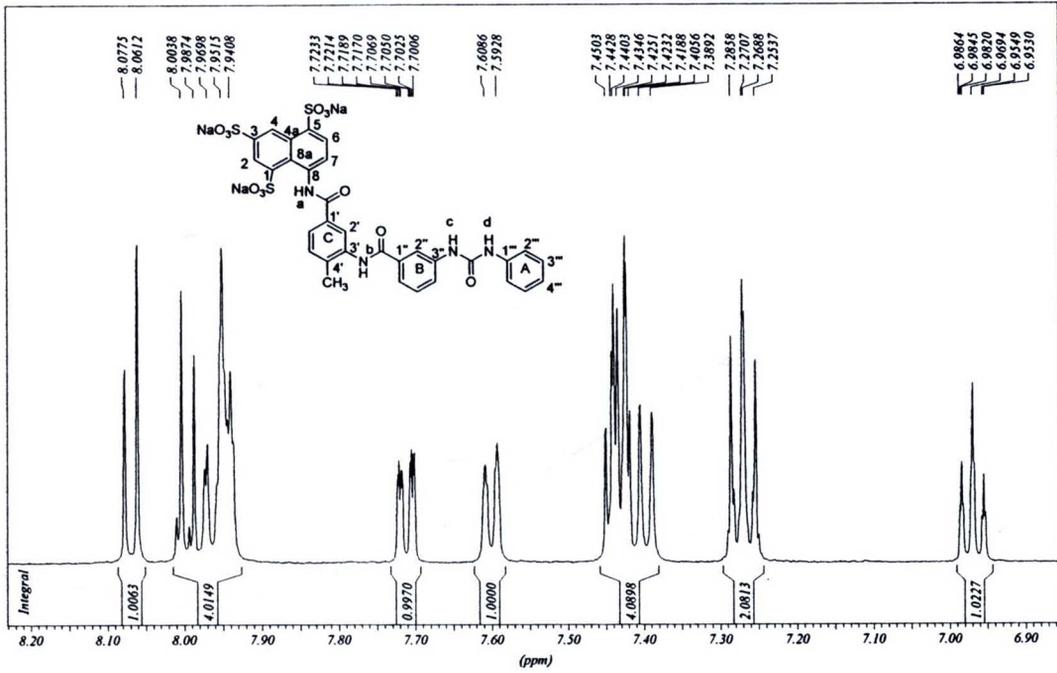
รูป 16 <sup>1</sup>H NMR spectrum ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยายพิกัดในส่วน 8.40 – 13.10 ppm

DH-T41-1 in d6-DMSO; 303K  
 D2 O Austausch



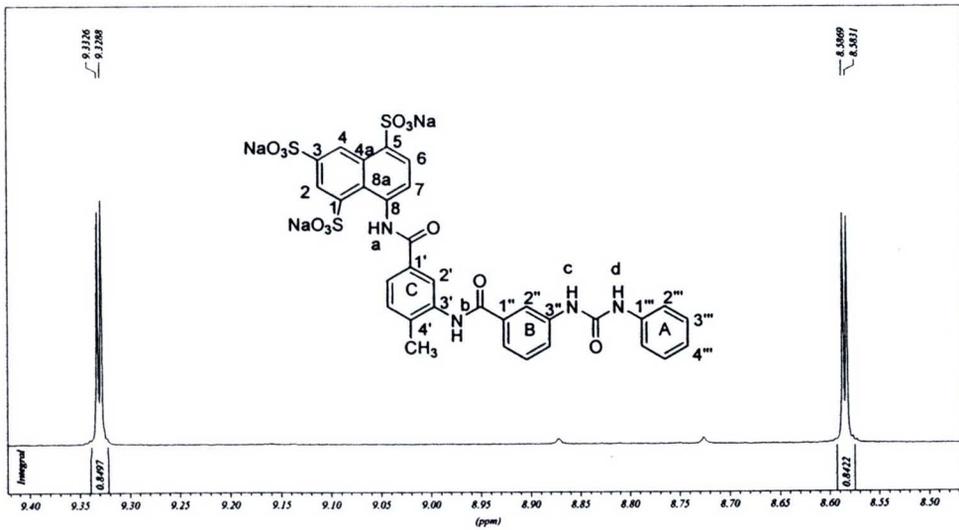
รูป 17 <sup>1</sup>H NMR spectrum ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ D<sub>2</sub>O exchange ที่ 0.0 - 15.0 ppm

DH-T41-1 in d6-DMSO: 303K  
D2 O Austausch



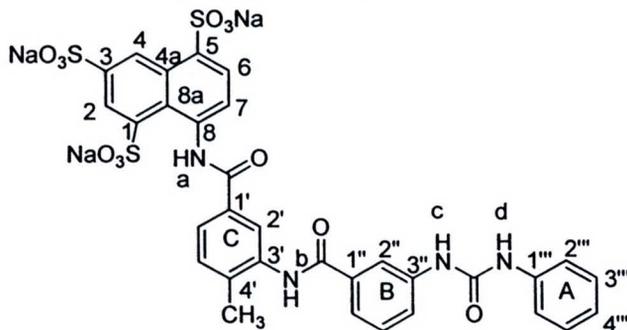
รูป 18  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ  $\text{D}_2\text{O}$  exchange ขยายพิกัดในส่วน 6.80 – 8.20 ppm

DH-T41-1 in d6-DMSO: 303K  
D2 O Austausch



รูป 19  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ  $\text{D}_2\text{O}$  exchange ที่ขยายพิกัดในส่วน 8.45 - 9.40 ppm

จากผลการวิเคราะห์ ด้วย  $^1\text{H}$  NMR Spectrophotometry สามารถยืนยันโครงสร้างที่สังเคราะห์ได้ดังนี้



ที่ 10.03 และ 12.63 ppm เป็น singlet มีค่า integration เท่ากับ 1 และหายไปเมื่อทำ แสดงว่าเป็น peak ของ NH amide ทั้งสองตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 8.87 และ 9.04 ppm แสดง peak ลักษณะเป็น singlet และหายไปเมื่อทำ  $\text{D}_2\text{O}$  exchange แสดงว่าเป็น peak ของ NH urea ทั้ง 2 ตำแหน่ง

ส่วนของ naphthalene ring proton H<sub>2</sub> แสดง peak ที่ 9.40 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น double ที่มีค่า *J* เท่ากับ 1.89 Hz และค่า integration เท่ากับ 1 ซึ่ง proton ตำแหน่งนี้ควรเกิด 4 bond coupling กับ H<sub>4</sub> ที่แสดง peak เป็น doublet ที่ 8.62 ppm และมีค่า *J* เท่ากับ 1.89 Hz เท่ากัน proton ในตำแหน่ง H<sub>6</sub> และ H<sub>7</sub> ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ควรจะแสดงลักษณะเป็น doublet peak เหมือนกัน แต่จากการทดลองพบว่า ที่ 8.01 - 8.07 ppm พบ peak ลักษณะเป็น multiplet ไม่สามารถหาค่า coupling constant ได้แน่นอน และมีความ integration เท่ากับ 3H จึงควรเป็น peak ของ H<sub>6</sub> และ H<sub>4</sub> และตำแหน่งนี้ควรมี proton อีก 1 ตัวคือ H<sub>2</sub>"

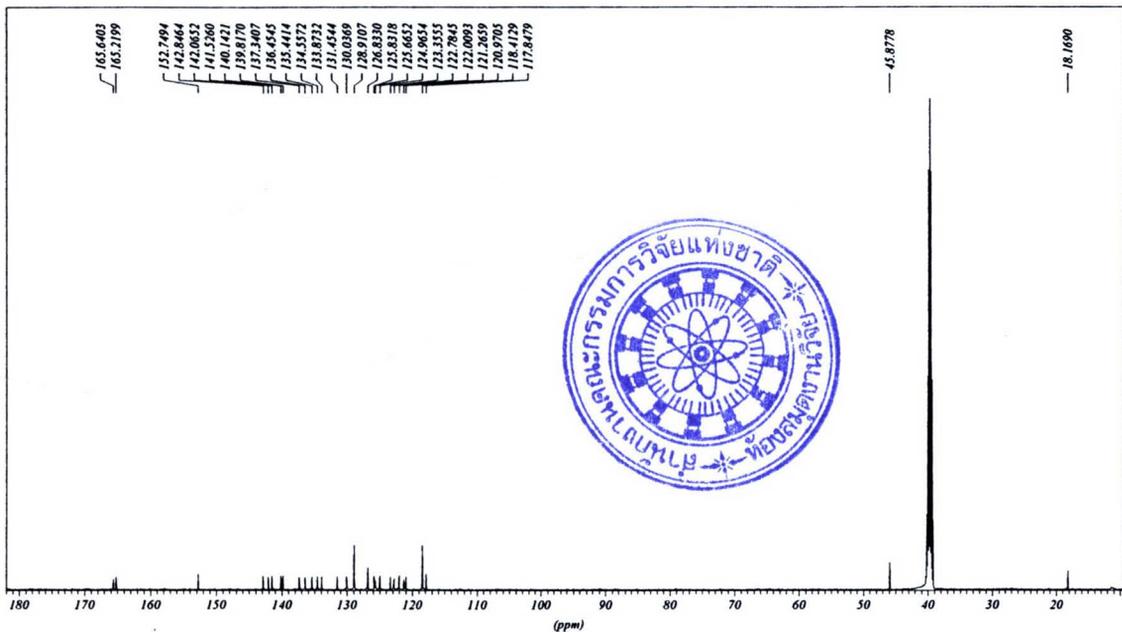
Ring C ซึ่งเป็น methyl substituted benzene พบ peak CH<sub>3</sub> ที่ 2.32 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น singlet และมีความ integration เท่ากับ 3 peak ในตำแหน่ง 7.99 - 7.98 ppm มีลักษณะเป็น multiplet และแสดงค่า integration เท่ากับ 2 เป็น peak ของ H<sub>6'</sub> และ H<sub>2'</sub> ส่วน H<sub>5'</sub> แสดง peak ลักษณะเป็น doublet ที่ 7.37 - 7.39 โดยมีความ integration เท่ากับ 1 และ มีค่า coupling constant เท่ากับ 8.2 Hz

Ring B แสดงลักษณะ peak ที่เห็นชัดของ H<sub>6''</sub> ที่ 7.61 - 7.63 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น doublet of doublet ที่มีค่า *J* เท่ากับ 8.20 และ 1.58 Hz และ integration เท่ากับ 1 แสดงถึงลักษณะการ coupling ของ H<sub>6''</sub> ต่อ H<sub>5''</sub> และ H<sub>4''</sub> ตามลำดับ สำหรับ proton H<sub>5''</sub> แสดง peak ลักษณะ doublet of doublet เช่นกัน แต่มีค่า *J* coupling เท่ากับ 8.20 และ 7.88 Hz ซึ่งเป็นการ coupling กับ C<sub>4''</sub> และ C<sub>6''</sub> ซึ่งเป็น 3-bond coupling ทั้งคู่ ในตำแหน่ง 7.42 - 7.45 ppm และ integration เท่ากับ 1 ในส่วน H<sub>4''</sub> แสดง peak ที่มี integration เท่ากับ 1 ในตำแหน่ง 7.73 - 7.76 ppm และลักษณะ peak เป็น td โดยมีความ *J* เท่ากับ 0.95, 2.2 และ 7.88 Hz ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีที่ควรเห็นลักษณะการ coupling กับ H<sub>2''</sub>, H<sub>6''</sub> และ H<sub>5''</sub> ด้วย ในส่วนของ H<sub>2''</sub> ซึ่งควรจะมิลักษณะเป็น doublet ไม่สามารถชี้เฉพาะได้เนื่องจากแสดง peak บริเวณเดียวกับ proton ใน naphthalene ring

Ring A ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium แสดงลักษณะ peak เห็นชัดเจน ดังนี้คือ ในตำแหน่ง 6.94 - 6.98 ppm แสดงลักษณะ peak เป็น triplet of triplet

ซึ่งมีค่า  $J$  เท่ากับ 0.95, 1.26, และ 7.25 Hz แสดงถึง peak ของ H4''' ซึ่งมีค่า integration เท่ากับ 1 และแสดงการ coupling กับทั้ง H2''', H3''', H5 และ H6''' ส่วน peak ในตำแหน่ง 7.46 - 7.48 ppm แสดง integration เท่ากับ 2 และมีค่า  $J$  เท่ากับ 0.95, 1.89, และ 7.56 Hz แสดงถึงลักษณะของ H2''' และ H6''' ในส่วนของ proton H3''' และ H5''' แสดง peak เป็น triplet โดยมีค่า  $J$  เท่ากับ 7.56 Hz และ integration เท่ากับ 2 แสดงถึงการ coupling กับ H2''' และ H6'''

DH-T41-1 in d6-DMSO; 303K  
13C-NMR



รูป 20  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของ 8-(4-fluoro-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt ที่ 0- 180 ppm

การวิเคราะห์ด้วย  $^{13}\text{C}$ -NMR โดยใช้ตัวทำละลายเป็น  $\text{d}_6$ -DMSO (รูป 20) พบ peak ซึ่งสามารถใช้อธิบายโครงสร้างได้ดังนี้ ลักษณะ CO ของ amide bond 2 ตำแหน่ง แสดง peak ที่ 165.64 และ 165.22 ppm ส่วน CO ของ urea แสดง peak ที่ 152.75 ppm

Sulfonyl substituted naphthalene แสดง ได้โดย peak ที่ 141.50, 123.36, 142.07, 128.91, 140.14, 126.83, 117.85 และ 142.85 ppm แสดงถึง peak ของ C1-8 ในส่วน peak ของ C4a และ 8a แสดงโดย peak ที่ 131.45 และ 122.78 ppm ตามลำดับ

Ring C ยืนยันได้โดย peak ของ CH3 ในตำแหน่ง 18.75 ppm และในส่วนของ aromatic ring แสดงได้โดย peak ในตำแหน่งดังนี้ แสดง peak 6 peaks ที่ 133.87 (C1'), 120.97 (C2'), 136.45 (C3'), 137.34 (C4'), 122.01 (C5'), และ 125.66 (C6')

Ring B แสดงได้โดย peak ที่ 139.82, 121.27, 134.56, 125.83, 130.04 และ 124.96 ppm ซึ่งแสดงถึง peak ของ C1'' - C6'' ตามลำดับ

ในส่วนของ Ring A พบ peak ที่แสดงถึง C2''' และ C6''' คือ peak ที่ตำแหน่ง 118.42 ppm ส่วน ตำแหน่ง 128.91 ppm แสดงลักษณะของ C3''' และ C5''' ส่วน C1''' และ C4''' แสดงได้โดย peaks ที่ 135.44 และ 126.83 ppm ตามลำดับ

ผลจาก ES-MS ที่ทำการทดลองในลักษณะ positive mode พบ m/z ดังตารางที่ 4

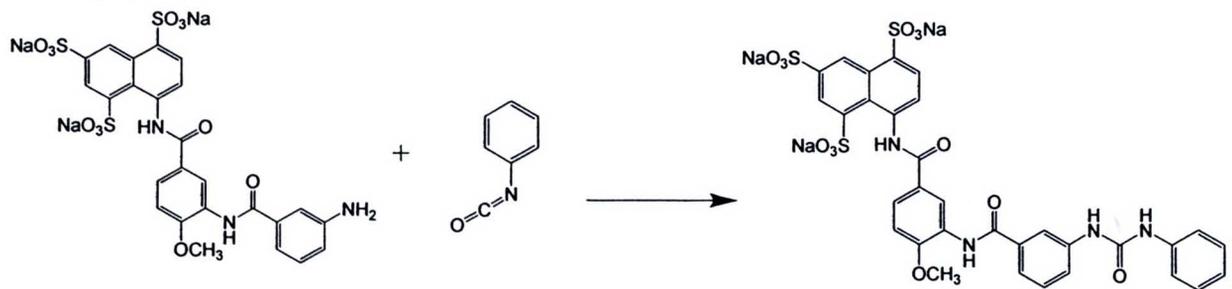
ตารางที่ 4 ผล Mass spectrometry ที่ run ใน positive mode ของสาร A2

m/z ที่พบ	m/z จากการคำนวณ	การแปลผล
843.7	843.0	$[M+Na]^+$
799.5	799.0	$[M-Na+2H]^+$
777.4	777.1	$[M-2Na+3H]^+$
755.2	755.1	$[M-3Na+4H]^+$

ส่วนการวิเคราะห์ ES-MS ใน negative mode พบ peak ที่ m/z 753.5 ซึ่งแสดงถึงลักษณะของ peak  $[M-3Na+2H]^-$

ผลการวิเคราะห์ด้วย elemental analysis พบลักษณะที่ยืนยันโครงสร้างได้โดยมี C, H, N และ C/N เท่ากับ 41.72, 4.18, 6.12 และ 6.82 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ ค่า C, H, N และ C/N 41.38, 3.80, 6.03 และ 6.86 ที่คำนวณได้ตามทฤษฎี และได้ปริมาณน้ำ เท่ากับ 6 mol/mol

### 1.3 การสังเคราะห์ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium (A3)



ค่อยๆหยด 40 หยด 1-Phenylisocyanat ลงในเอมีน (7) 0.35 กรัม (0.49 mmol) ที่ละลายน้ำ 10 มล. และ triethylamine 0.2 มล. หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ กกรองเอาตะกอนออก เติมน Diethylether 50 ml และ stir นาน 2 ชั่วโมง แยกชั้นน้ำ และสกัดด้วย diethylether ครั้งละ 50 มล. อีก 2 ครั้ง นำชั้นน้ำไประเหยแห้ง จะได้ตะกอนสีขาว หนัก 195 มก.(47.26 %)

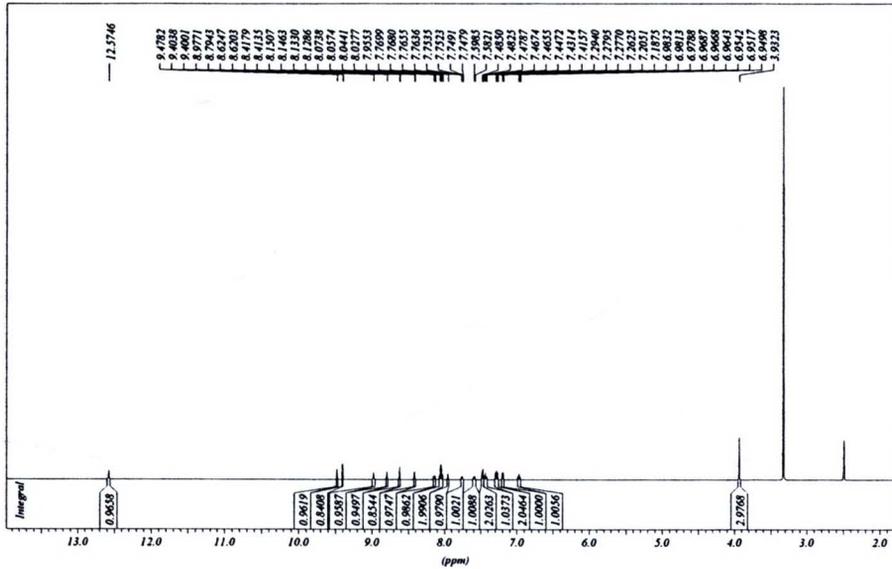
ตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ developing system เป็น Isopropanol + 25% NH<sub>3</sub> = 5+2 จะได้ค่า R<sub>f</sub> ของผลิตภัณฑ์มีค่า 0.40 และ R<sub>f</sub> ของสารตั้งต้นมีค่าเท่ากับ 0.31

เมื่อตรวจดูการดูดกลืนแสง UV สูงสุดพบที่ 250 และ 314 nm และวิเคราะห์หาปริมาณเกลือเซเดียมคลอไรด์ได้

1.47 %

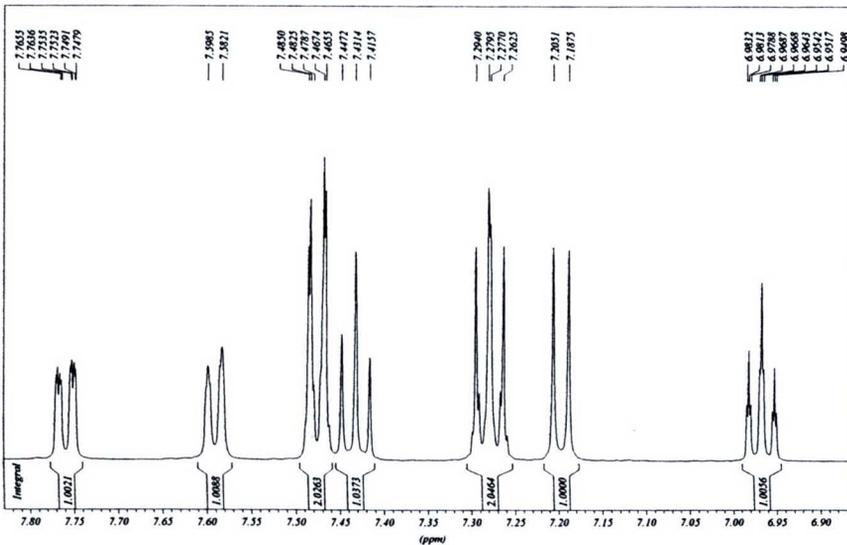
การพิสูจน์สูตรโครงสร้างโดย  $^1\text{H}$  NMR 500 MHz ได้ spectrum ดังรูป 21-26

DH-T42-1 in d6-DMSO; 303K  
1H-NMR



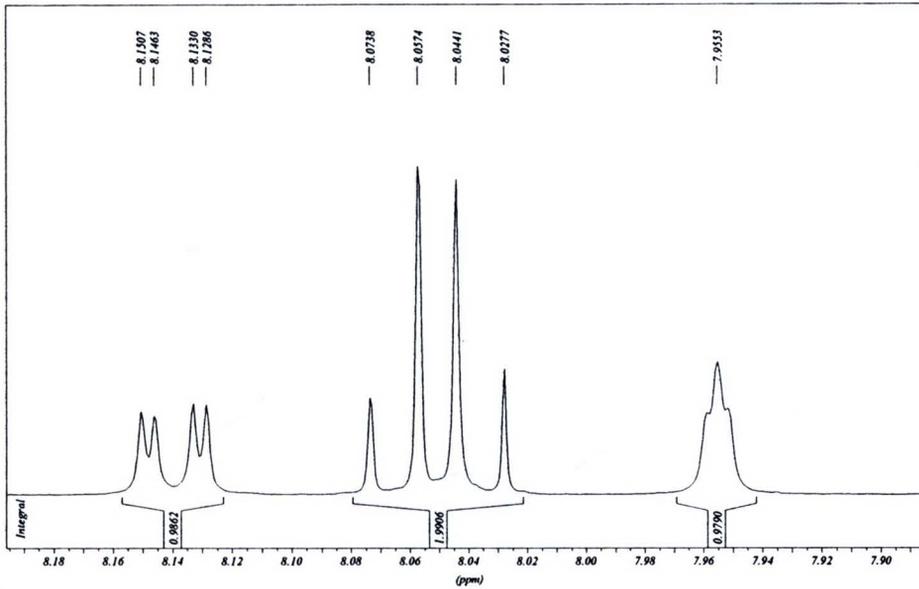
รูป 21  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ 2.0 - 15.0 ppm

DH-T42-1 in d6-DMSO; 303K  
1H-NMR



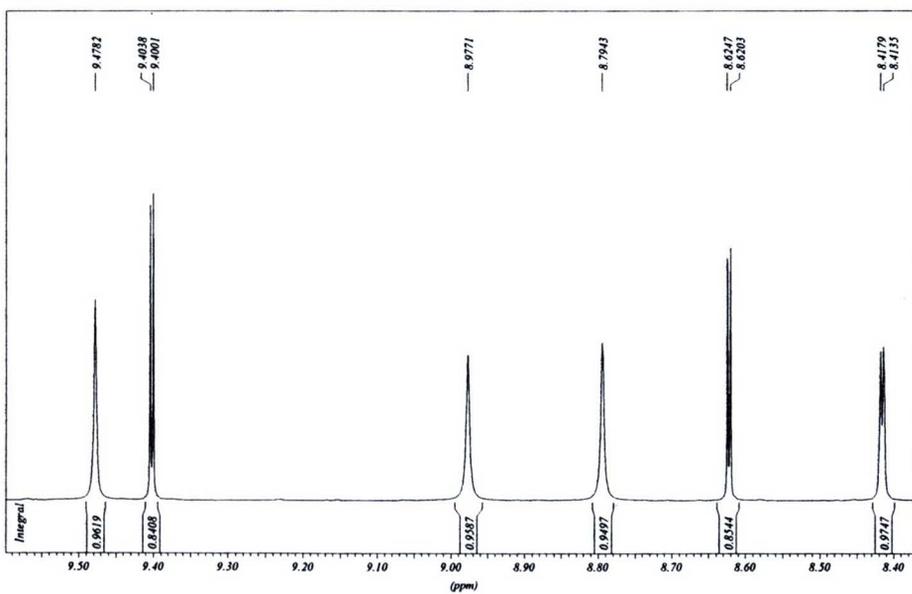
รูป 22  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยายพิศในส่วน 6.80 - 7.90 ppm

DH-T42-1 in d6-DMSO: 303K  
1H-NMR



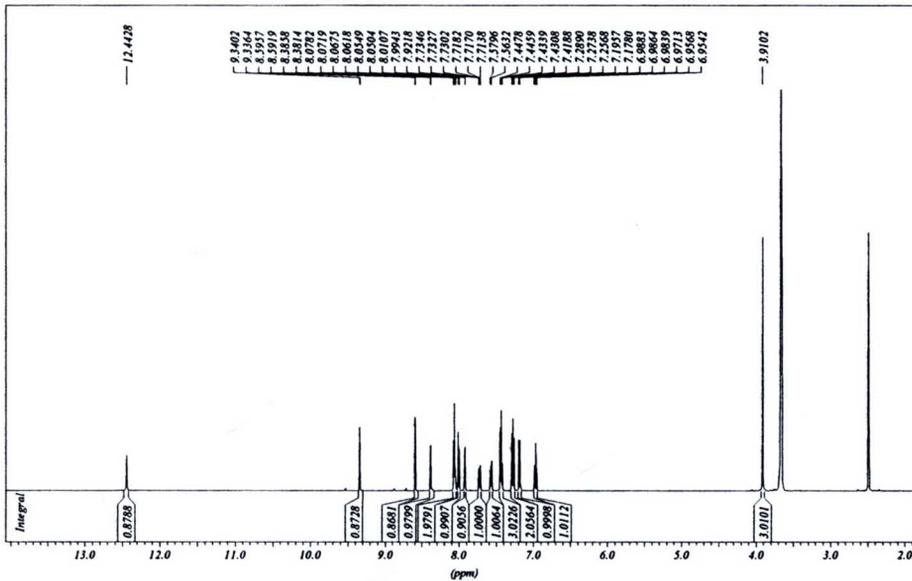
รูป 23  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยายพิกัดในส่วน 7.90 – 8.20 ppm

DH-T42-1 in d6-DMSO: 303K  
1H-NMR



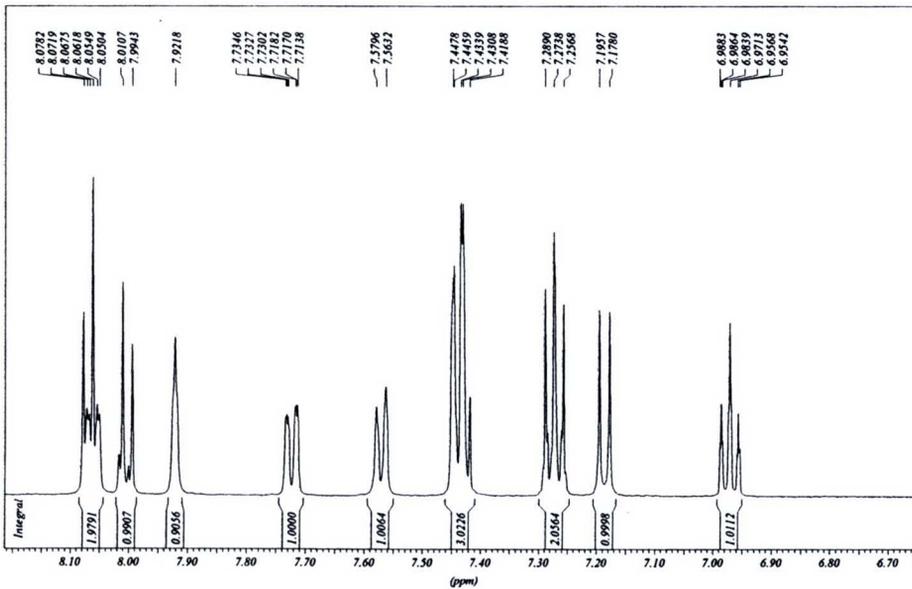
รูป 24  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยายพิกัดในส่วน 8.30 – 9.70 ppm

DH-T42-1 in d6-DMSO: 303K  
D20 Autotouch



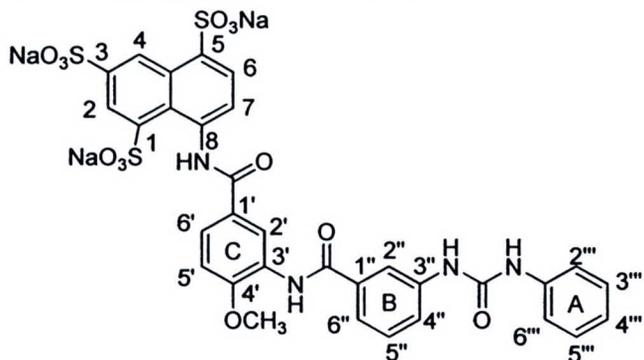
รูป 25  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ proton exchange ที่ 2.0 – 15.0 ppm

DH-T42-1 in d6-DMSO: 303K  
D20 Autotouch



รูป 26  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ proton exchange ที่ขยายพิคในส่วน 6.70 – 8.20 ppm

จากลักษณะ  $^1\text{H}$  NMR Spectrum ที่ได้ สามารถยืนยันโครงสร้างว่าเป็น ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ได้ดังนี้



ที่ 9.48 และ 12.57 ppm เป็น singlet มีค่า integration เท่ากับ 1 และหายไปเมื่อทำ แสดงว่าเป็น peak ของ NH amide ทั้งสองตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 8.79 และ 8.98 ppm แสดง peak ลักษณะเป็น singlet และหายไปเมื่อทำ  $\text{D}_2\text{O}$  exchange แสดงว่าเป็น peak ของ NH urea ทั้ง 2 ตำแหน่ง

ส่วนของ naphthalene ring proton H2 แสดง peak ที่ 9.40 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น double ที่มีค่า  $J$  เท่ากับ 1.89 Hz และค่า integration เท่ากับ 1 ซึ่งมีการ coupling H4 ที่แสดง peak เป็น doublet ที่ 8.62 ppm โดยมีค่า  $J$  เท่ากับ 2.20 Hz proton ในตำแหน่ง H6 และ H7 แสดงลักษณะเป็น doublet peak เหมือนกันที่ 8.05 - 8.07 และ 8.03 - 8.04 ppm และมีค่า  $J$  ใกล้เคียงกัน คือ 8.19 และ 8.20 Hz ตามลำดับ

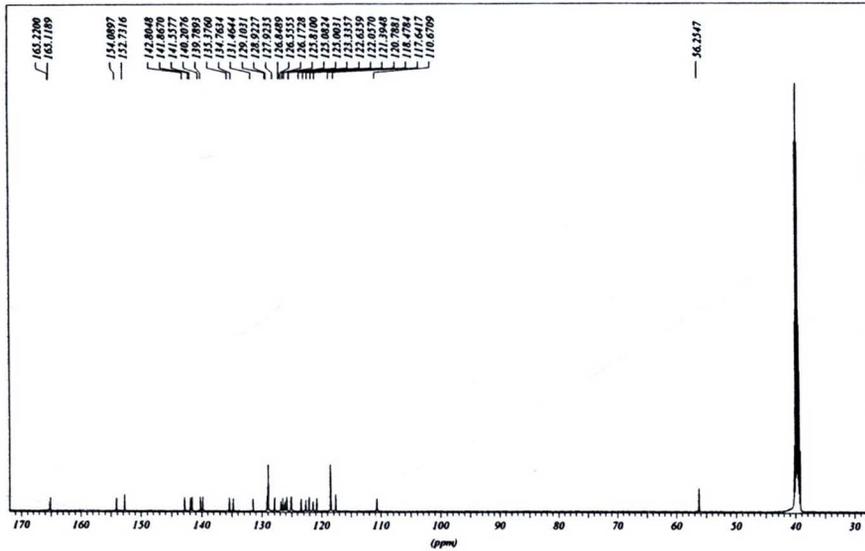
Ring C ซึ่งเป็น methoxy substituted benzene พบ peak ของ  $\text{OCH}_3$  ที่ 3.93 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น singlet และมีค่า integration เท่ากับ 3 ในส่วน aromatic ring พบ peak ที่ 8.41, 8.13-8.15 และ 7.19 - 7.20 ppm ซึ่งมี integration เป็น 1 ทั้ง 3 peaks โดยในตำแหน่ง 8.41 ppm มีลักษณะเป็น doublet ที่มีค่า  $J$  coupling เพียง 2.21 Hz จึงแสดงถึงลักษณะของ H2' ที่สามารถเกิด coupling กับ C6' ได้ซึ่งมีค่า  $J$  coupling ที่เท่ากันในตำแหน่ง 8.13 - 8.15 ppm ค่า  $J$  coupling เท่ากับ 8.82 Hz อีกค่าหนึ่งแสดงถึงการ coupling กับ C5' ในตำแหน่ง 7.19 - 7.20 ppm (ค่า  $J$  ในตำแหน่งนี้มีค่า 8.83 Hz และลักษณะ peak เป็น doublet)

เนื่องจากการ coupling ของ H2'' ต่อ H4'' และ H6'' ใน ring B ไม่สามารถเห็นลักษณะ coupling constant ได้ชัดเจน peak ที่ตำแหน่ง 7.95 ppm แสดงลักษณะเหมือน singlet ซึ่งสอดคล้องกับ H6'' ซึ่งเห็นลักษณะเพียงการเกิด doublet ในตำแหน่ง 7.58 - 7.60 ppm ( $J$  coupling มีค่า 8.19 Hz และมี integration เท่ากับ 1) ในตำแหน่ง H4'' แสดงลักษณะ doublet of doublet โดยมีค่า  $J$  เท่ากับ 2.80 และ 6.60 Hz ในส่วนของ H5'' แสดงลักษณะเป็น triplet ที่มี  $J$  coupling เท่ากับ 7.88 Hz และ integration เท่ากับ 1

Ring A ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium แสดงลักษณะ peak เห็นชัดเจน ดังนี้คือ ในตำแหน่ง 6.95 - 6.98 ppm แสดงลักษณะ peak เป็น triplet of triplet ซึ่งมีค่า  $J$  เท่ากับ 0.94, 1.26 และ 7.57 Hz แสดงถึง peak ของ H4''' ซึ่งมีค่า integration เท่ากับ 1 และแสดงการ coupling กับทั้ง H2''', H3''', H5 และ H6''' ส่วน peak ในตำแหน่ง 7.47 - 7.48 ppm แสดง integration เท่ากับ 2 ลักษณะเป็น doublet of doublet และมีค่า  $J$  เท่ากับ 6.95 และ 1.55 Hz แสดงถึงลักษณะของ H2''' และ H6''' สำหรับ proton H3'''

และ H5''' แสดง peak เป็น triplet ในตำแหน่ง 7.26 - 7.29 ppm และมีค่า J coupling เท่ากับ 8.05 Hz ซึ่งแสดงถึงการ coupling กับ H2''' และ H6''' และมีค่า integration เท่ากับ 2

DH-T42-1 in d6-DMSO; 303K  
13C-NMR



รูป 27  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido)benzamido)naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ 30 - 170 ppm

การวิเคราะห์โครงสร้างด้วย  $^{13}\text{C}$ -NMR โดยใช้ตัวทำละลายเป็น  $\text{d}_6$ -DMSO พบ peak ซึ่งสามารถใช้อธิบายโครงสร้างได้ดังนี้ ลักษณะ CO ของ amide bond 2 ตำแหน่ง แสดง peak ที่ 165.12 และ 165.22 ppm ส่วน CO ของ urea แสดง peak ที่ 152.73 ppm

การอธิบายตำแหน่งของ  $^{13}\text{C}$ -NMR ใน Sulfonyl substituted naphthalene สามารถเปรียบเทียบได้ในลักษณะเดียวกับสาร 1 และ สาร 2 ที่สังเคราะห์ได้ ซึ่ง แสดงได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบตำแหน่งที่พบใน  $^{13}\text{C}$ -NMR เฉพาะบริเวณ naphthalene ring ของสาร A1-A3

ตำแหน่งใน Naphthalene ring	ตำแหน่งที่แสดงใน $^{13}\text{C}$ -NMR (ppm)		
	A3	A2	A1
C1	141.66	141.50	141.42
C2	123.34	123.36	123.38
C3	141.87	142.07	142.30
C4	127.92	128.91	127.73
C4a	131.46	131.45	131.47
C5	140.21	140.14	140.20

C6	126.85	126.83	126.89
C7	117.64	117.85	117.93
C8	142.80	142.85	142.92
C8a	122.64	122.78	122.94

จะเห็นได้ว่า ค่าที่ได้จากการทดลองของสารทั้ง 3 ตัวมีความสอดคล้องกัน

Ring C ยืนยันได้โดย peak ของ  $\text{OCH}_3$  ในตำแหน่ง 56.25 ppm และในส่วนของ aromatic ring แสดงได้โดย peak ในตำแหน่งดังนี้ แสดง peak 6 peaks ที่ 126.56 (C1'), 120.79 (C2'), 125.08 (C3'), 154.13 (C4'), 110.67 (C5'), และ 122.06 (C6')

Ring B แสดงได้โดย peak ที่ 135.38, 121.39, 134.76, 125.81, 126.17 และ 125.00 ppm ซึ่งแสดงถึง peak ของ C1'' – C6'' ตามลำดับ

ในส่วนของ Ring A พบ peak ที่แสดงถึง C2''' และ C6''' คือ peak ที่ตำแหน่ง 118.48 ppm ส่วน ตำแหน่ง 128.92 ppm แสดงลักษณะของ C3''' และ C5''' ส่วน C1''' และ C4''' แสดงได้โดย peaks ที่ 139.79 และ 129.10 ppm ตามลำดับ

ผลจาก ES-MS ที่ทำการทดลองในลักษณะ positive mode พบ m/z ดังนี้

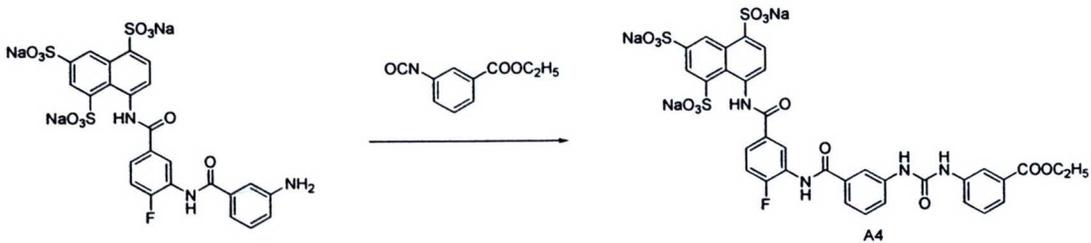
ตารางที่ 6 ผล Mass spectrometry ที่ run ใน positive mode ของสาร A3

m/z ที่พบ	m/z จากการคำนวณ	การแปลผล
859.4	859.0	$[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,
793.3	793.1	$[\text{M}-2\text{Na}+3\text{H}]^+$
771.2	771.1	$[\text{M}-3\text{Na}+4\text{H}]^+$

ส่วนการวิเคราะห์ Maldi-Tof-MS ใน negative mode พบ peak ที่ m/z 813.5 7 ซึ่งแสดงถึงลักษณะของ peak  $[\text{M}-[\text{M}-\text{Na}]$  และ 769.5  $[\text{M}-3\text{Na}+2\text{H}]$  ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการคำนวณคือ m/z 813.0 และ 769.0 ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ด้วย elemental analysis พบลักษณะที่ยืนยันโครงสร้างได้โดยมี C, H, N และ C/N เท่ากับ 40.51, 3.92, 5.86 และ 6.91 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ ค่า C, H, N และ C/N ที่คำนวณได้ตามทฤษฎีซึ่งควรมีค่า 40.47, 3.61, 5.90 และ 6.86 เมื่อบริการว่ามีน้ำอยู่ในโมเลกุล 5.5 โมล

1.4 การสังเคราะห์ 8-(3-(3-(N'-(3-(Ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene- 1,3,5-trisulfonate Sodium ( A4)

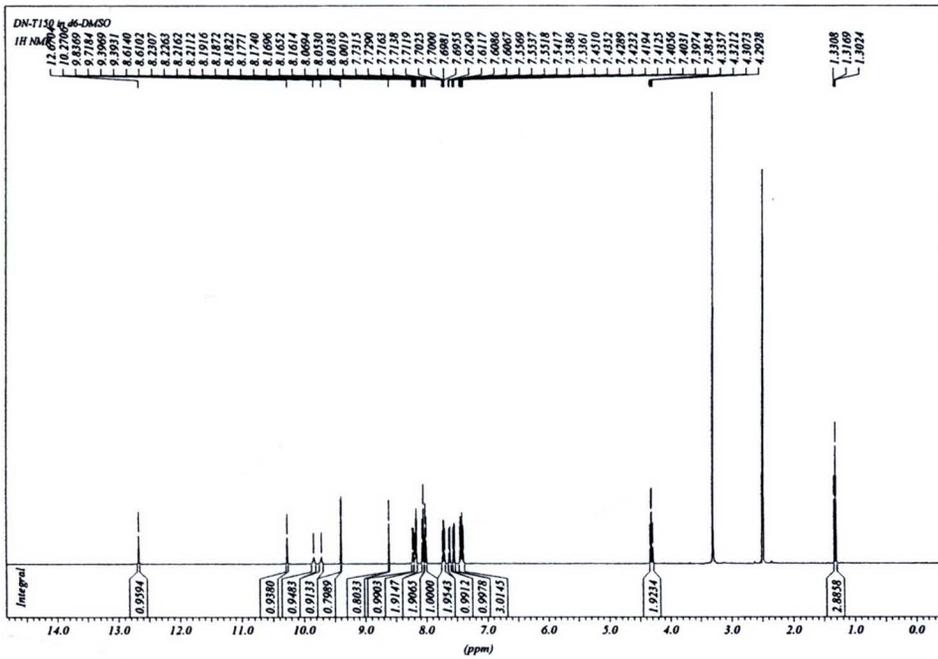


เติม ethyl-3-aminobenzoate 0.66 กรัม (4 mmol) ที่ละลายใน dichloroethane 10 ml และ 0.6 ml (4.3 mmol) triethylamine ลงใน 0.43 กรัม (1.47 mmol) triphosgene ที่ละลายใน 10 ml dichloroethane ที่อุณหภูมิ 0°C และ stir นาน 5 ชั่วโมง กรอง triethylamine HCl ออกและนำ isocyanate ที่ได้เติมลงในสารตั้งต้นเอมีน 216 มิลลิกรัม (0.30 mmol) ที่ละลายน้ำ 50 มล. และ triethylamine 0.2 มล. หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ กรองเอาตะกอนออก เติม Diethylether 50 ml และ stir นาน 2 ชั่วโมง แยกชั้นน้ำ และสกัดด้วย diethylether ครั้งละ 50 มล. อีก 2 ครั้ง นำชั้นน้ำไประเหยแห้ง นำไปผ่าน ion exchange column chromatography จากนั้นปรับ pH ให้เป็นกลาง นำไประเหยแห้ง จะได้ ตะกอนสีขาวหนัก 215 มิลลิกรัม (0.24 mmol, 78.72% yield)

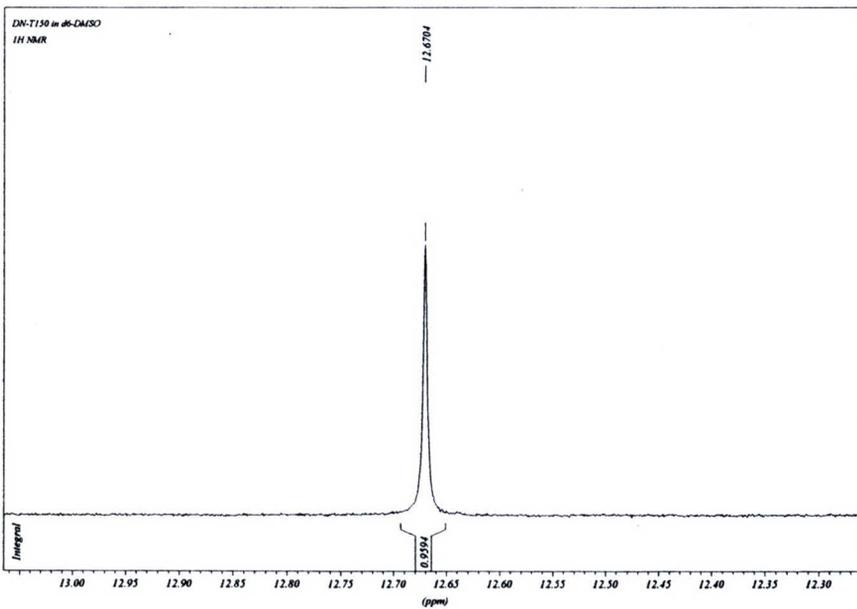
ตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ developing system เป็น Isopropanol + 25% NH<sub>3</sub> = 5+2 จะได้ค่า R<sub>f</sub> ของผลิตภัณฑ์มีค่า 0.40 และ R<sub>f</sub> ของสารตั้งต้นมีค่าเท่ากับ 0.43

เมื่อนำไปวัดการดูดกลืนแสง UV พบค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 237 และ 310 nm เมื่อใช้ตัวทำละลายเป็น บัฟเฟอร์ pH 6.5 และ โทเทรตหาปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ 66.18%

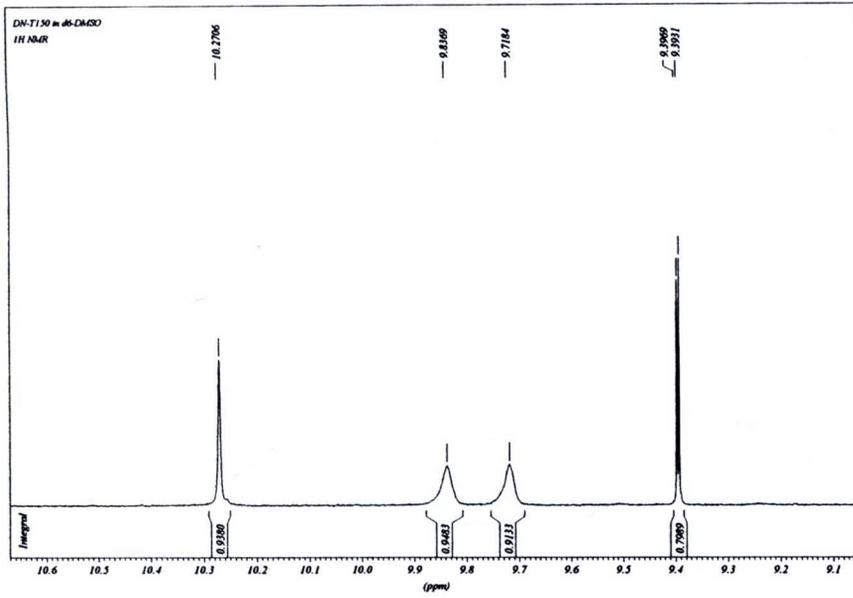
การพิสูจน์สูตรโครงสร้างโดย H NMR 500 MHz ได้ spectrum ดังรูป 28 – 39



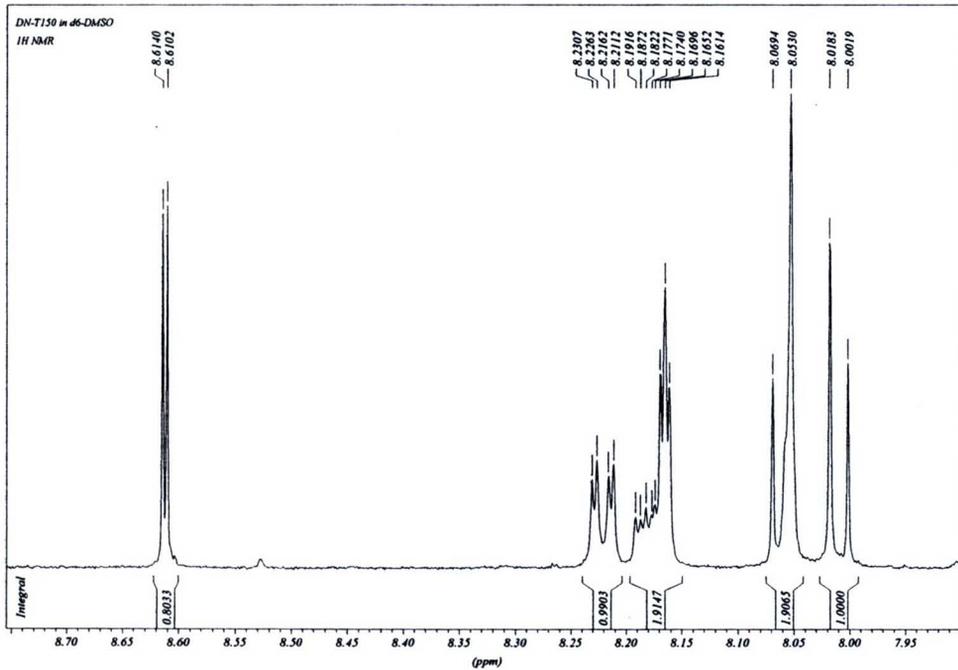
รูป 28  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonate Sodium ที่ 0 – 14 ppm



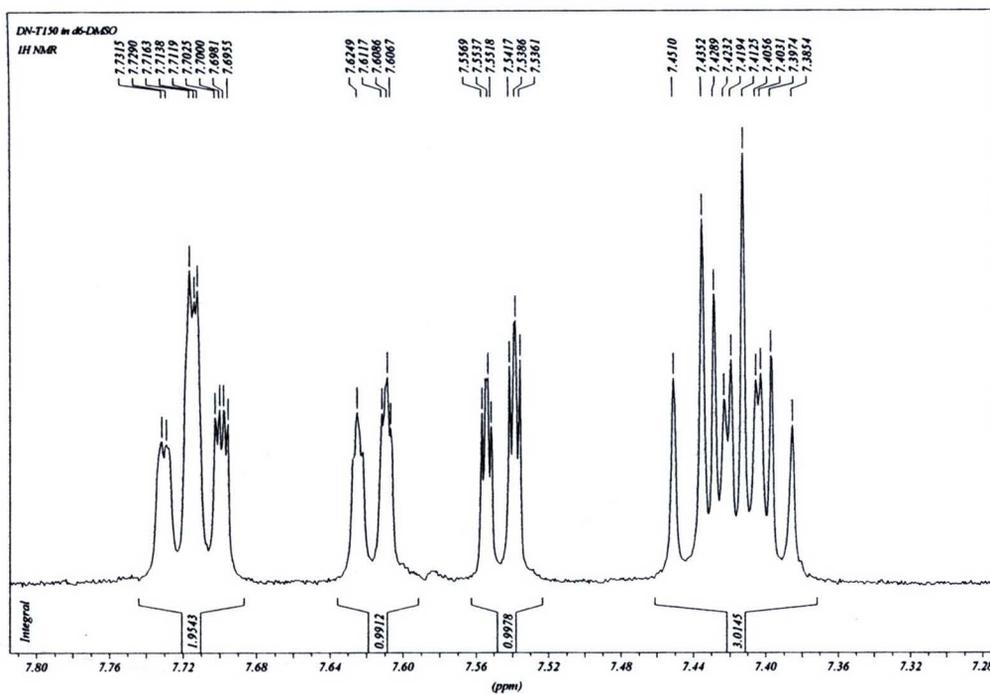
รูป 29  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยาย peak ในบริเวณ 12.3 – 13.0 ppm



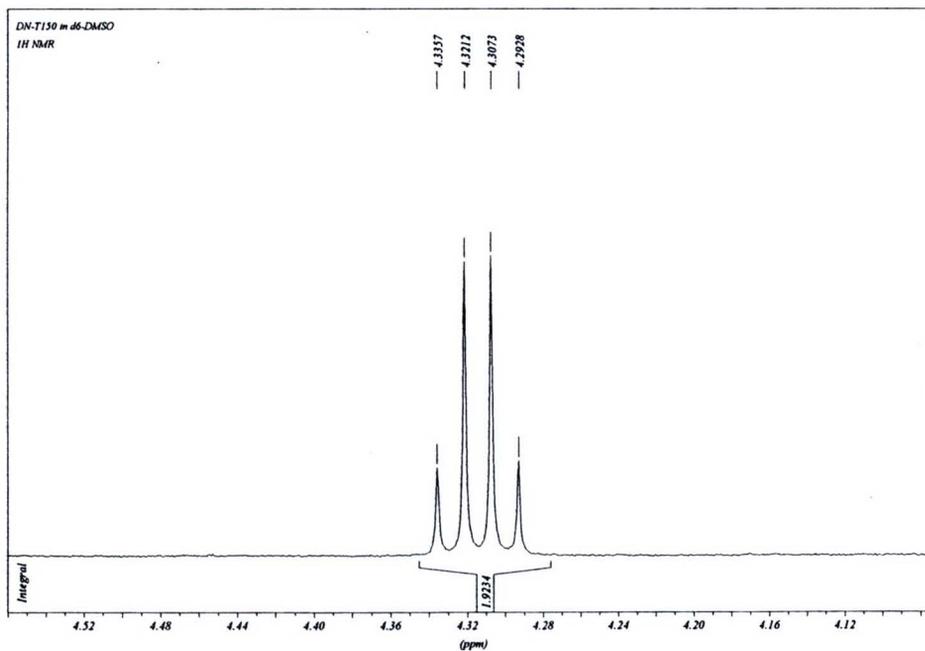
รูป 30  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยาย peak ในบริเวณ 9.1 – 10.6 ppm



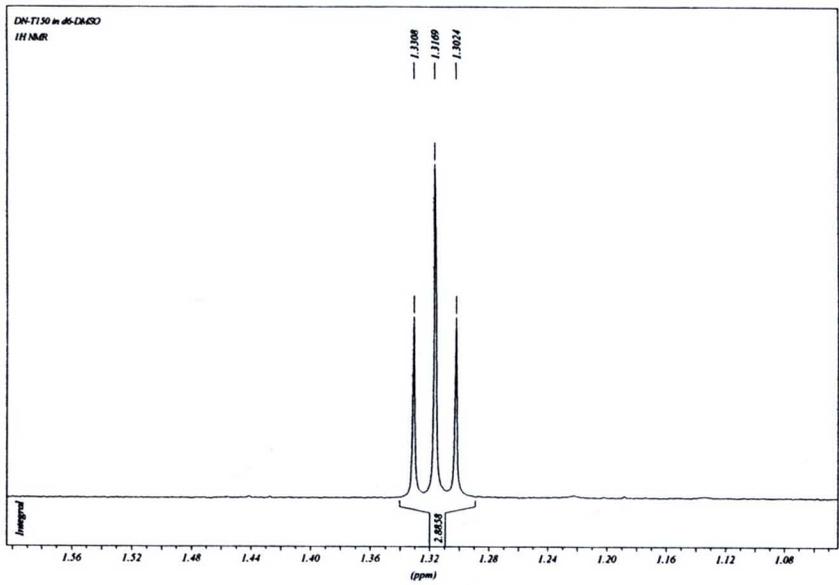
รูป 31  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยาย peak ในบริเวณ 7.9 – 8.7 ppm



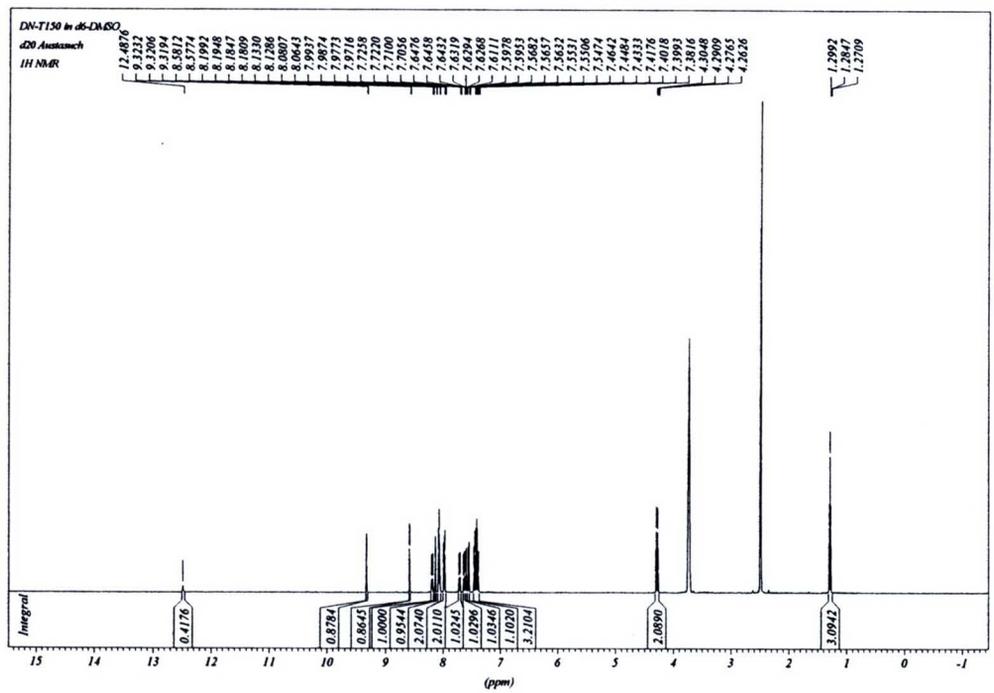
รูป 32  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยาย peak ในบริเวณ 7.28 – 7.80 ppm



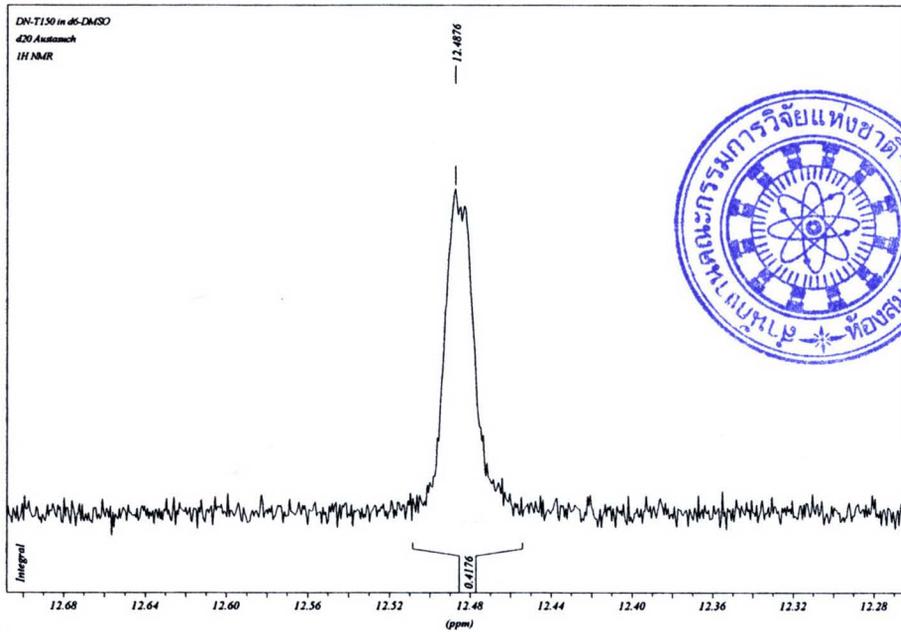
รูป 33  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยาย peak ในบริเวณ 4.2 – 4.4 ppm



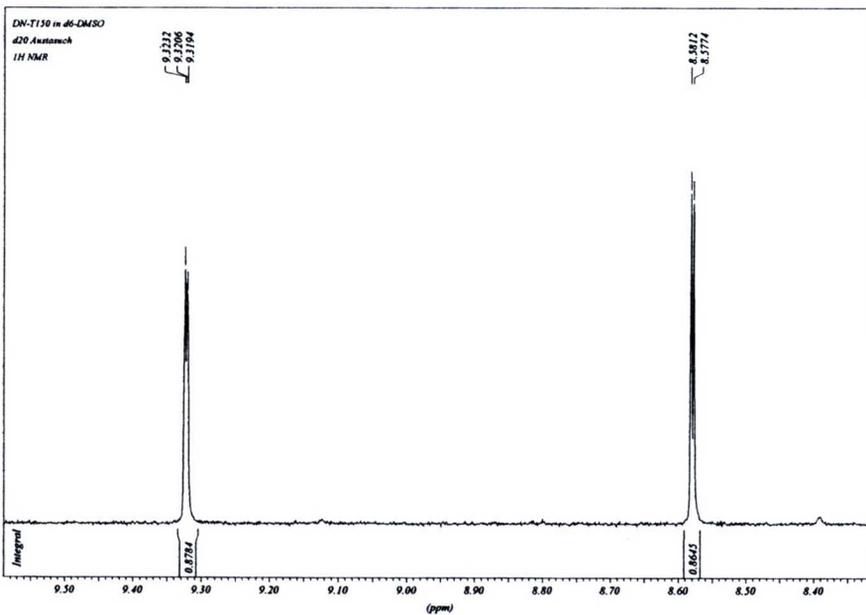
รูป 34  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ขยาย peak ในบริเวณ 1.1 – 1.5 ppm



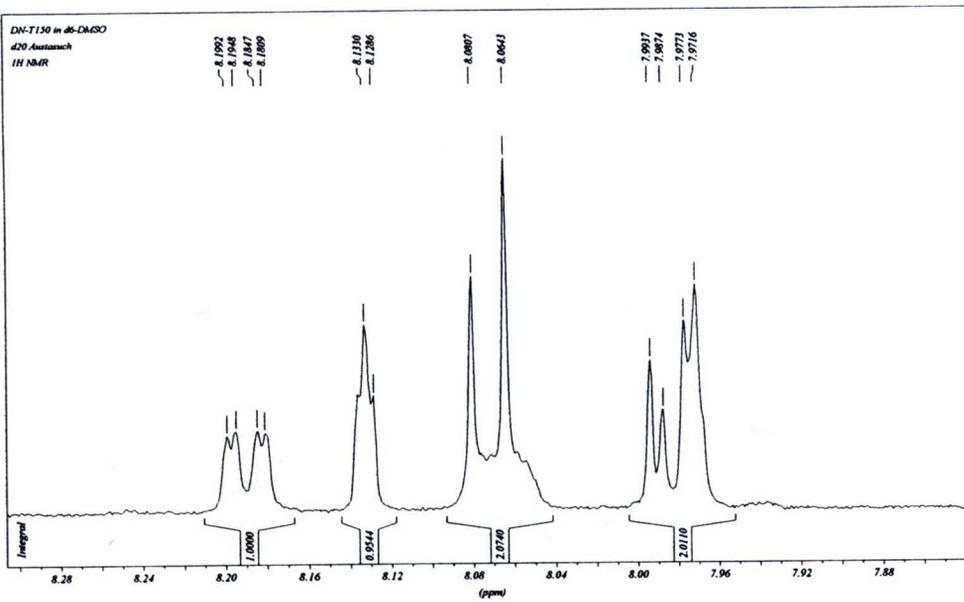
รูป 35  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ  $\text{D}_2\text{O}$  exchange ที่ 0.0 - 15.0 ppm



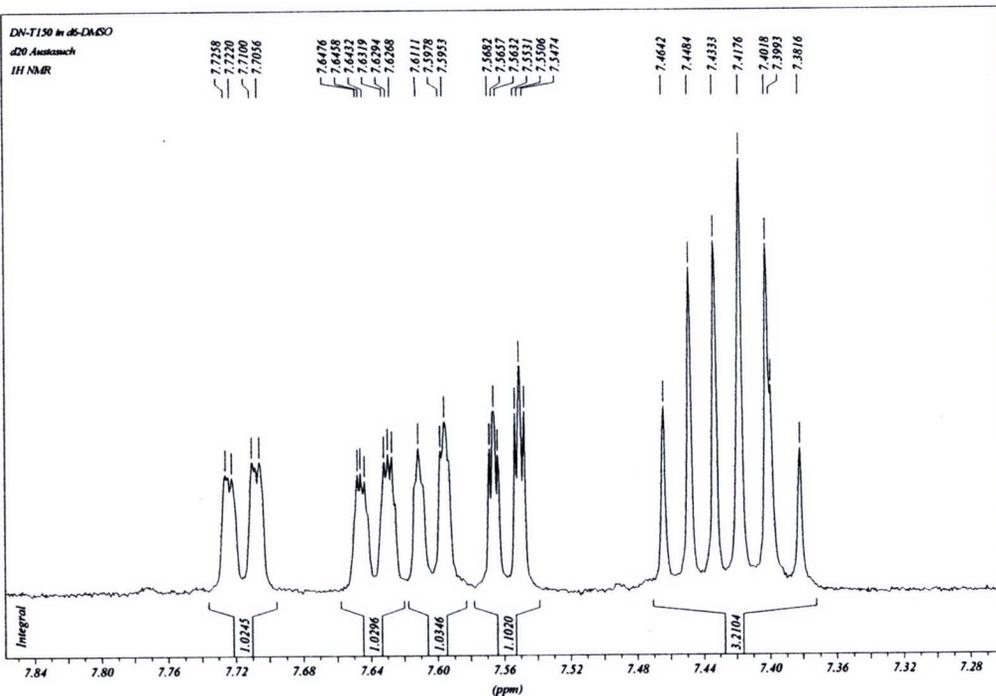
รูป 36  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ  $\text{D}_2\text{O}$  exchange ขยาย peak ที่ 12.28 – 12.68 ppm



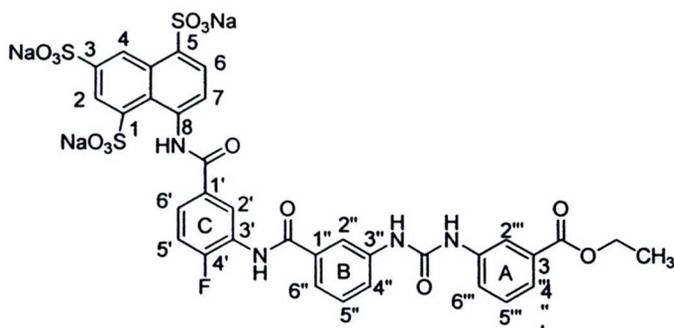
รูป 37  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ  $\text{D}_2\text{O}$  exchange ขยาย peak ที่ 8.40 – 9.50 ppm



รูป 38  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ  $\text{D}_2\text{O}$  exchange ขยาย peak ที่ 7.88 – 8.28 ppm



รูป 39  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonate sodium ที่ทำ  $\text{D}_2\text{O}$  exchange ขยาย peak ที่ 7.28 – 7.84 ppm



อภิปรายผลของ  $^1\text{H}$  NMR spectrum ต่อโครงสร้าง A4 ได้ดังนี้

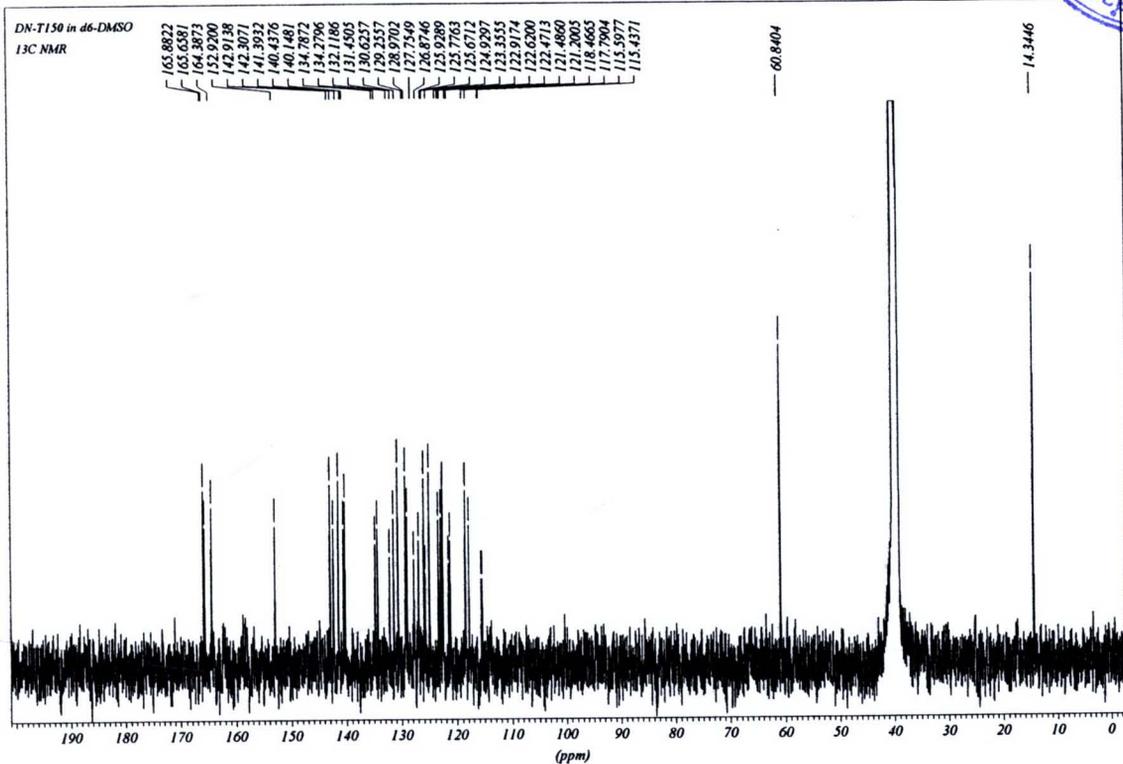
ที่ 9.84 และ 12.67 ppm เป็น singlet มีค่า integration เท่ากับ 1 และหายไปเมื่อทำ แสดงว่าเป็น peak ของ NH amide ทั้งสองตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 10.27 และ 9.72 ppm แสดง peak ลักษณะเป็น singlet และหายไปเมื่อทำ  $\text{D}_2\text{O}$  exchange แสดงว่าเป็น peak ของ NH urea ทั้ง 2 ตำแหน่ง

ส่วนของ naphthalene ring proton H2 แสดง peak ที่ 8.61 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น double ที่มีค่า  $J$  เท่ากับ 1.89 Hz และค่า integration เท่ากับ 1 ซึ่งมีการ coupling H4 โดยมีค่า  $J$  เท่ากันคือ 1.89 Hz และแสดง peak เป็น doublet ที่ 9.39 ppm proton ในตำแหน่ง H6 และ H7 แสดงลักษณะเป็น doublet peak เหมือนกันที่ 8.01 - 8.02 และ 8.05 - 8.07 ppm และมีค่า  $J$  เท่ากันคือ 8.20 Hz

Ring C ซึ่งเป็น fluorinated substituted benzene พบ peak ที่ 8.20 - 8.24 ppm มีลักษณะเป็น doublet of doublet ที่มีค่า  $J$  เท่ากับ 2.20 และ 7.25 ppm และมี integration เท่ากับ 1 ซึ่งเป็น peak ของ H2' ที่เกิด coupling กับทั้ง H6' และ fluorine atom โดยลักษณะการแตก peak ของ H6' เกิดที่ บริเวณ 8.17 - 8.20 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น multiplet ไม่สามารถหาค่า coupling constant ได้ ส่วน H5' แสดง peak ที่ 7.38 - 7.44 ppm ซึ่งซ้อนอยู่กับ peak ของ H5'' แต่ยังสามารถควมค่า  $J$  ได้เท่ากับ 8.83 และ 10.09 Hz เนื่องจากการ coupling กับ H6'' และ fluorine

เนื่องจากการ coupling ของ H2'' ต่อ H4'' และ H6'' ใน ring B ไม่สามารถเห็นลักษณะ coupling constant ได้ชัดเจน peak ที่ตำแหน่ง 8.05 ppm แสดงลักษณะเป็น singlet ในส่วนอื่นของ ring B และ ring A มีสภาวะแวดล้อมคล้ายคลึงกัน จึงเกิด peak ในบริเวณที่ซ้อนกันอยู่เป็นส่วนมาและหาค่า coupling constant ได้ค่อนข้างยาก แต่อาจจะวิเคราะห์ได้ดังนี้ ในบริเวณ 7.72 - 7.74 ppm มีลักษณะเป็น multiplet ที่มีค่า integration เท่ากับสอง ควรเป็นตำแหน่งของ H4'' และ H4''' ในตำแหน่ง 7.60 - 7.60 ppm มีลักษณะ peak เป็น triplet of doublet จึงควรเป็นของ H6''' และที่ 7.52 - 7.56 ppm มีลักษณะ triplet of doublet เช่นกันน่าจะเป็นของ H6'' ใน peak multiplet ที่ 7.38 - 7.46 ppm มี integration เท่ากับ 3 ควรเป็นของ H5''', H5'' และ H5' (ดังกล่าวมาแล้วด้านบน) การ coupling ของ H2''' ต่อ H4''' และ H6''' เห็นได้ค่อนข้างชัดเจนด้วยค่า  $J$  เท่ากับ 1.90 และ 2.20 Hz ของ peak ที่ 8.16 Hz

Ethoxy group ที่ต่ออยู่แสดง peak ของ  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$  ชัดเจนที่ 4.31 (quartet,  $J$  เท่ากับ 6.93 และ 7.26 Hz, integration เท่ากับ 2) และที่ 1.31 ppm (triplet,  $J$  เท่ากับ 6.93 และ 7.26 Hz, integration เท่ากับ 3)



รูป 40  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum ของ 8-(3-(3-(N'-(3-(Ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonate Sodium (A4)

การวิเคราะห์ด้วย  $^{13}\text{C}$ -NMR โดยใช้ตัวทำละลายเป็น  $\text{d}_6$ -DMSO พบ peak ซึ่งสามารถใช้อธิบายโครงสร้างได้ดังนี้ ลักษณะ CO ของ amide bond 2 ตำแหน่ง แสดง peak ที่ 165.88 และ 165.66 ppm ส่วน CO ของ urea แสดง peak ที่ 152.92 ppm

Sulfonyl substituted naphthalene แสดง ได้โดย peak ที่ 141.39 (C1), 123.36 (C2), 142.31 (C3), 127.75 (C4), 140.15 (C5), 126.87 (C6), 117.79 (C7), 142.91 (C8), 131.45 (C4a) และ 122.92 (C8a) ppm ซึ่งสอดคล้องกับ ผลจาก A1-A3 ด้วย

Fluorinated substituted benzene ring C สามารถยืนยันด้วย peak ในตำแหน่ง 130.63 (C1'), 115.60 (C2'), 121.20 (C3'), 164.39 (C4'), 115.44 (C5') และ 122.47 (C6')

Ring B แสดงได้โดย peak ที่ 134.28, 121.49, 132.12, 125.67, 125.77 และ 122.62 ppm ซึ่งแสดงถึง peak ของ C1'' - C6'' ตามลำดับ

ส่วนคาร์บอนใน ring A เห็น peak จำนวน 6 peaks ในตำแหน่ง 134.79 (C1'''), 118.47 (C2'''), 129.26 (C3'''), 124.93 (C4'''), 128.97 (C5''') และ 125.93 (C6''') ppm และส่วนหมู่แทนที่ ester ในตำแหน่ง meta แสดงด้วย peak 140.44 (CO ester), 60.84 ( $-\text{OCH}_2-$ ) และ 14.34 ( $-\text{CH}_3$ ) ppm

ผลจาก ES-MS ที่ทำการทดลองในลักษณะ positive mode พบ peak เด่นที่ m/z 919.5 ซึ่งสามารถบ่งชี้ว่าเป็น peak ของ  $[M+Na]^+$  และสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการคำนวณคือ 919.0

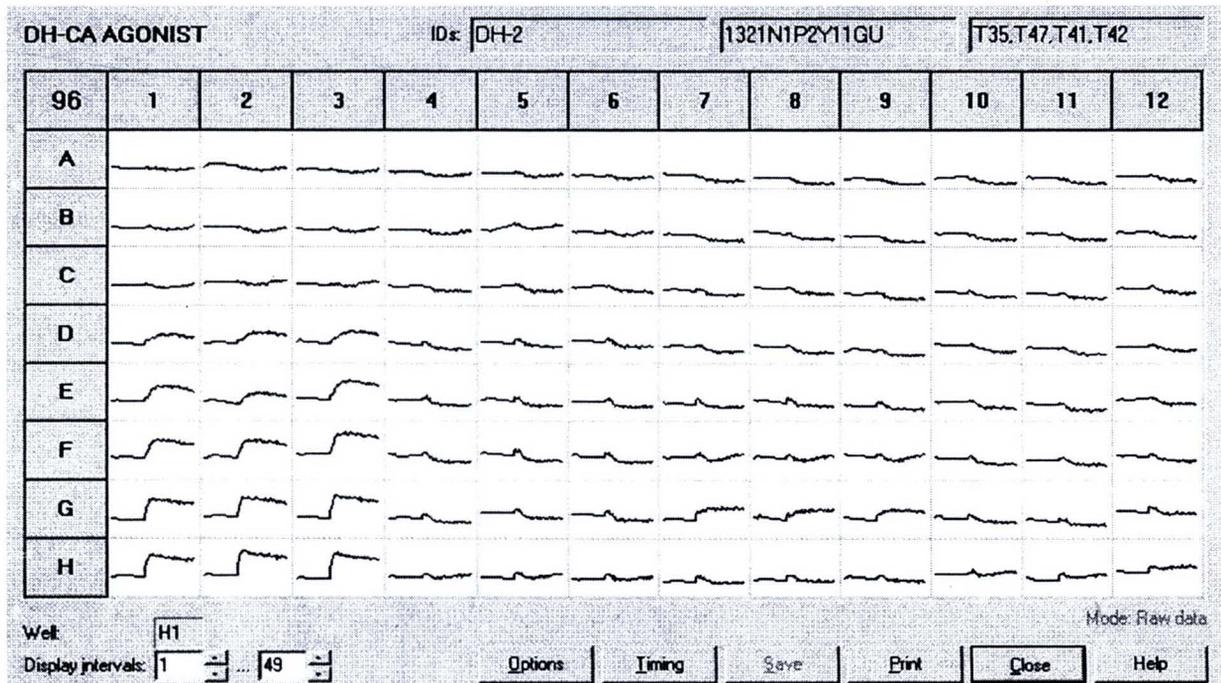
ผลการวิเคราะห์ด้วย elemental analysis พบลักษณะที่ยืนยันโครงสร้างได้โดยมี C, H, N และ C/N เท่ากับ 14.34, 1.51, 2.05, และ 7.00 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ ค่า C, H, N และ C/N ที่คำนวณได้ตามทฤษฎีซึ่งควรมีค่า 14.26, 1.13, 1.96 และ 7.29 เมื่อกำหนดว่ามีน้ำอยู่ในโมเลกุล 4 โมล

## 2. ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต่อ P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>2</sub> และ P2Y<sub>11</sub> ในเซลล์

### 2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต่อ P2Y<sub>11</sub> receptor

#### 2.1.1 ผล Agonist ของสารสังเคราะห์ต่อ P2Y<sub>11</sub> receptor

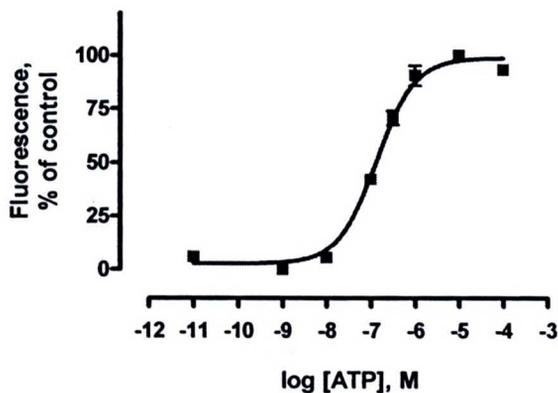
เมื่อนำสารสังเคราะห์ทั้ง 3 ตัวมาทดสอบฤทธิ์การกระตุ้น P2Y<sub>11</sub> receptor และวัดระดับการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์แสดงได้ดังรูป 41



รูป 41 ผลการกระตุ้นเซลล์สารทดสอบ เพื่อดูฤทธิ์ Agonist ต่อ P2Y<sub>11</sub> receptor

จากรูป คอลัมน์ที่ 1-3 แสดงผลการกระตุ้นด้วยสารมาตรฐาน ATP ในความเข้มข้น  $10^{-11}$  -  $10^{-4}$  ตามลำดับ ส่วนคอลัมน์ 4-12 แสดงผลการกระตุ้นด้วยสารสังเคราะห์ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไม่มีสารสกัดตัวใดมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ P2Y<sub>11</sub> receptor เลย

จากผลการกระตุ้นด้วย ATP ความเข้มข้น  $10^{-11}$  -  $10^{-4}$   $\mu\text{M}$  สามารถนำมา plot graph ได้ดังรูป



รูป 42 Dose- response curve ของการกระตุ้น 1321N1P2Y<sub>11</sub> receptor ด้วย ATP

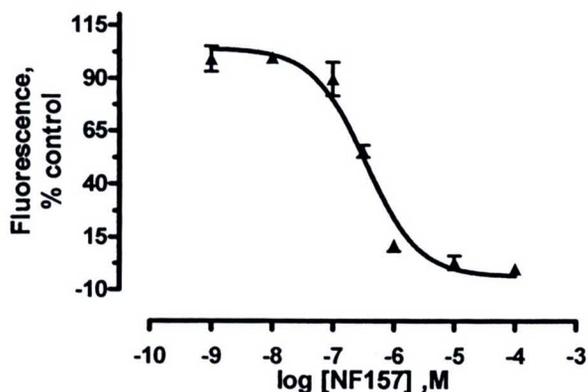
จากผลการทดลองได้ค่า EC<sub>50</sub> ได้ range ที่ค่อนข้างกว้าง ตั้งแต่ 124.7 – 425.5 nm ซึ่งได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 216 nM ซึ่งค่าที่ได้สอดคล้องกับที่รายงานโดย Meis et.al (214 nM) อนึ่งเนื่องจากค่า EC<sub>50</sub> ที่ได้อาจมีค่าแตกต่างกัน การรายงานผล antagonist จึงรายงานเป็น pKi ไม่ใช่ค่า IC<sub>50</sub>

### 2.1.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ Antagonist ของสารสังเคราะห์

เมื่อนำสารที่สังเคราะห์ได้มาตรวจหาฤทธิ์ antagonist โดยการใช้ 1 μM ATP เป็น agonist ได้ผลการทดลองดังนี้  
**สารมาตรฐาน NF157**

ในการทดลองนี้จะใช้สาร antagonist มาตรฐาน NF157 เป็นมาตรฐานในการเทียบฤทธิ์ที่ได้ เมื่อทดสอบฤทธิ์ antagonist ของ NF157 สามารถสร้างกราฟของการเรืองแสงที่เกิดขึ้นได้ดังรูป 43

### NF157, 1321N1P1Y11PU

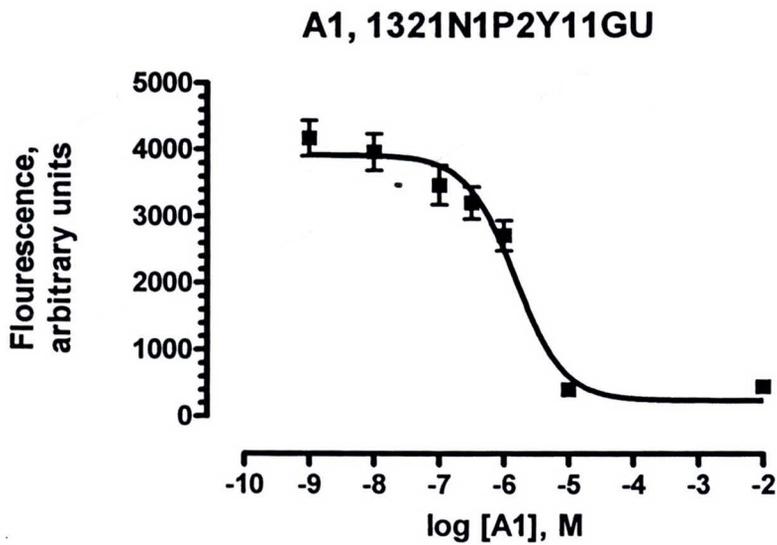


รูป 43 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการเรืองแสงซึ่งแสดงได้ถึงความสามารถในการยับยั้งฤทธิ์ของ NF157 ต่อ P2Y<sub>11</sub> receptor เมื่อใช้ 1 μM ATP เป็น agonist

พบว่า ค่า IC50 ที่ได้มีค่า 7.43, 7.20 และ 7.34 ซึ่งได้ค่าเฉลี่ยเป็น 7.32 ซึ่ง ใกล้เคียงกับในรายงานของ Ullmann et.al. ซึ่งมีค่า 7.35

8-(3-(3-((N'-(phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorbenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt (A1)

ผลของการยับยั้งการออกฤทธิ์ของ ATP โดย 8-(3-(3-((N'-(phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorbenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt แสดงได้ดังรูป 44



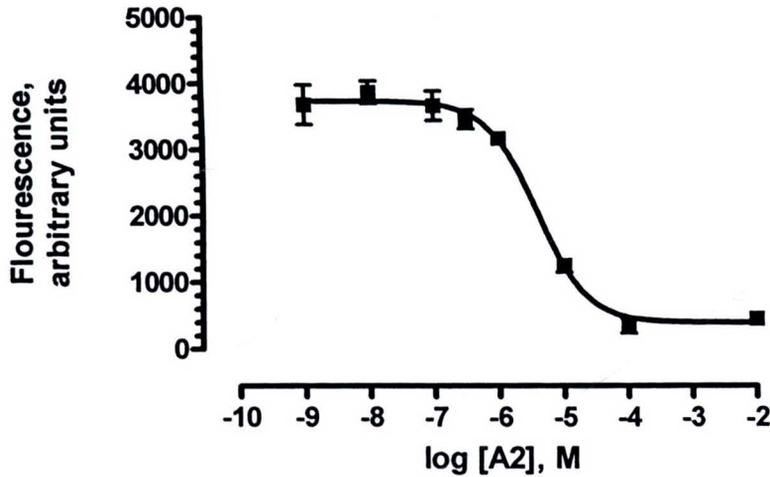
รูป 44 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการเรืองแสงซึ่งแสดงได้ถึงความสามารถในการยับยั้งฤทธิ์ของ 8-(3-(3-((N'-(phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorbenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt (A1) ต่อ P2Y<sub>11</sub> receptor เมื่อใช้ 1  $\mu$ M ATP เป็น agonist

ค่า pKi ที่ได้มีค่า  $6.58 \pm 0.12$  ซึ่งต่ำกว่า NF157

8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt (A2)

ผลของการยับยั้งการออกฤทธิ์ของ ATP โดย 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt (A2) แสดงได้ดังรูป

## A2, 1321N1P2Y11GU



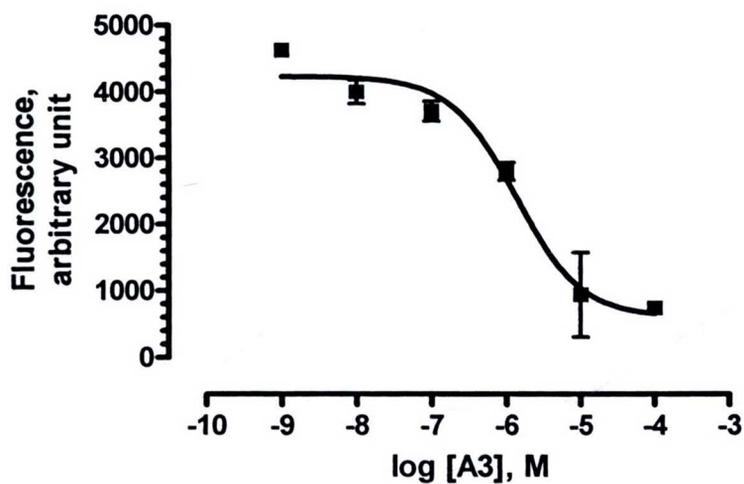
รูป 45 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการเรืองแสงซึ่งแสดงได้ถึงความสามารถในการยับยั้งฤทธิ์ของ 8-(4-methyl-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt (A2) ต่อ P2Y<sub>11</sub> receptor เมื่อใช้ 1  $\mu$ M ATP เป็น agonist

ค่า pKi ที่ได้มีค่า  $6.17 \pm 0.10$

8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt (A2)

ผลของการยับยั้งการออกฤทธิ์ของ ATP โดย 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt (A3) แสดงได้ดังรูป 46

### A3, 1321N1P2Y11GU



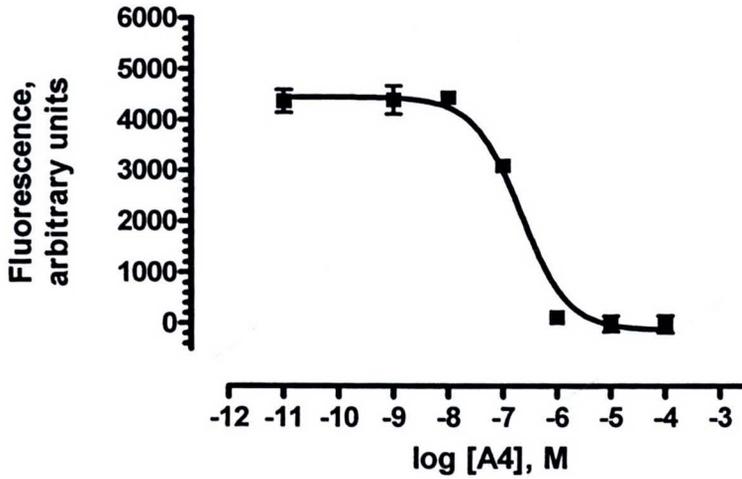
รูป 46 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการเรืองแสงซึ่งแสดงได้ถึงความสามารถในการยับยั้งฤทธิ์ 8-(4-methoxy-3-(3-(3-phenylureido)benzamido) benzamido) naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt (A3) ต่ P2Y<sub>11</sub> receptor เมื่อใช้ 1  $\mu$ M ATP เป็น agonist

ค่า pKi ที่ได้มีค่า  $6.39 \pm 0.30$

8-(3-(3-((N'-(phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorbenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt (A4)

ผลของการยับยั้งการออกฤทธิ์ของ ATP โดย 8-(3-(3-((N'-(phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorbenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt แสดงได้ดังรูป 47

### A4, 1321N1P2Y11GU



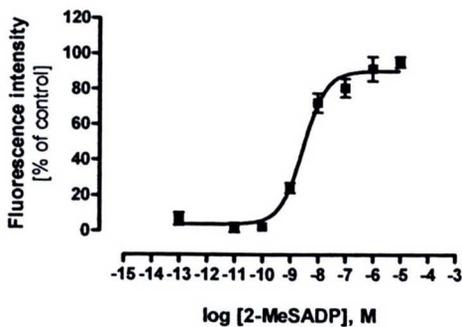
รูป 47 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการเรืองแสงซึ่งแสดงได้ถึงความสามารถในการยับยั้งฤทธิ์ 8-(3-(3-(N'-(3-(Ethoxycarbonyl)-phenyl)-ureido)-benzamido)-4-fluorobenzamido)- naphthalene- 1,3,5-trisulfonate Sodium ( A4) ต่อ P2Y<sub>11</sub> receptor เมื่อใช้ 1  $\mu$ M ATP เป็น agonist

ค่า pKi ที่ได้มีค่า  $7.04 \pm 0.33$

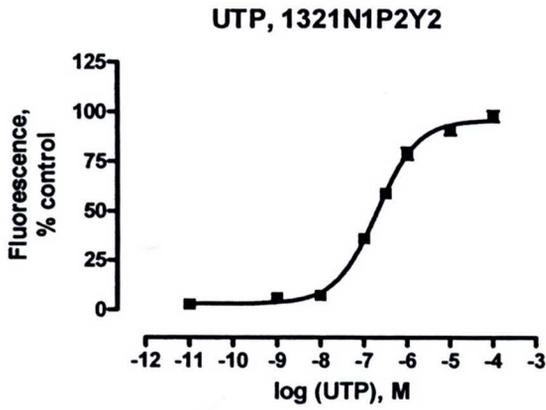
### 2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต่อ P2Y<sub>1</sub> และ P2Y<sub>2</sub> receptors

เมื่อทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพ ของ P2Y<sub>1</sub> และ P2Y<sub>2</sub> receptors โดยใน P2Y<sub>1</sub> receptors จะใช้ 2-MeSADP เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบ ได้ค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 2.82 nM ซึ่งสูงกว่าที่รายงานโดย Niebauer ประมาณ 1.7 เท่า กราฟของdose- response curve ของการกระตุ้น 1321N1P2Y<sub>1</sub> receptor ด้วย 2-MeSADP แสดงได้ดังรูป 48

#### 2- MeSADP, 1321N1P2Y1



รูป 48 Dose- response curve ของการกระตุ้น 1321N1P2Y<sub>1</sub> receptor ด้วย 2-MeSADP



รูป 49 Dose- response curve ของการกระตุ้น 1321N1P2Y<sub>2</sub> receptor ด้วย UTP

เมื่อทดสอบการตอบสนองของ P2Y<sub>2</sub> receptors เมื่อกระตุ้นด้วย UTP ได้กราฟดังรูป 49 ซึ่งพบค่า EC<sub>50</sub> ประมาณ 200 nM

สารสังเคราะห์ทั้ง 4 ตัวไม่มีฤทธิ์ต่อ P2Y<sub>1</sub> และ P2Y<sub>2</sub> receptors ทั้งแบบ agonist และ antagonist