

ชื่อโครงการ	การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์สเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอมและกรดอะมิโน
แหล่งเงิน	ประเภททุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 300,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2558 ถึง 30 กันยายน 2559
หัวหน้าโครงการวิจัย	ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ไบโกลแอสติคสองชนิดได้แก่ กรดโคลิก 44 และกรดดีออกซีโคลิก 9 ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 50a-50g และ 51a-51g กระทำโดยการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 24 ของไบโกลแอสติคทั้งสองให้เป็นหมู่อะไมด์โดยใช้เทคนิควิฤภาคของแข็ง ผลที่ได้อยู่ในเกณฑ์ระดับปานกลางถึงดี สารอนุพันธ์เหล่านี้ถูกนำมาประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อเกิดโรคต่อมนุษย์ในสภาวะจำลองกับแบคทีเรีย 30 ชนิด ยีสต์ 3 ชนิด และ เชื้อรา 2 ชนิด ด้วยวิธี Disc diffusion และ วิธี Broth microdilution จากการทดลองพบว่า อนุพันธ์ของกรดดีออกซี 51a-51g มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ATCC 27175, *Corynebacterium diphtheriae*, Methicillin Resistance *S. aureus* (MRSA) และ Vancomycin Resistance *S. aureus* (VRSA) โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.78-12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารอนุพันธ์ 50a-50g และ 51a-51g ไม่มีฤทธิ์ในการต้านยีสต์และเชื้อราทดสอบทั้งหมด

นอกจากนั้น สารอนุพันธ์ 50a-50f และ 51a-51f ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line), เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line) และเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney) ด้วยวิธี REMA and SRB assay จากการทดลองพบว่า สารอนุพันธ์ 50c-50f มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB และ MCF-7 ในระดับปานกลาง ในขณะที่สารอนุพันธ์ 51b-51f มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB และ MCF-7 ในระดับปานกลางถึงดี โดยเฉพาะสารอนุพันธ์ 51c มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB และ MCF-7 สูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 3.42 และ 9.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: อนุพันธ์สเตียรอยด์, ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์, ความเป็นพิษต่อเซลล์

Research Title: Synthesis and Bioactivities of Steroid Derivatives
Containing N-atom and Amino Acids
Researcher: Asst. Professor Dr. Patchanee Charoenying
Faculty: Faculty of Science **Department:** Department of Chemistry

ABSTRACT

In this research, two bile acids cholic acid **44** and deoxycholic acid **9**, were used as a starting template to develop new steroid derivatives containing N-atom. The derivatives **50a-50g** and **51a-51g** were synthesized through modification at the carboxyl carbon C-24 to amide derivatives by solid phase technique in moderate to good yields. These derivatives were evaluated for their *in vitro* antimicrobial properties against human pathogens. The synthesized compounds were tested *in vitro* against 30 bacteria, 3 yeast and 2 fungi strains by disc diffusion and broth microdilution methods. The results found that the deoxycholic acid derivatives **51a-51g** exhibited the highest antibacterial activity against *Streptococcus mutans* ATCC 27175, *Corynebacterium diphtheriae*, Methicillin Resistance *S. aureus* (MRSA) and Vancomycin Resistance *S. aureus* (VRSA). The MIC values of selected bacterial strains tested ranged from 0.78-12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Unfortunately, no antifungal activity observed against tested strains of yeasts and fungi.

Furthermore, the cytotoxicity of these compounds was investigated in three cell lines: human breast carcinoma cell line (MCF-7), oral human epidermal carcinoma cell line (KB) and African green monkey kidney (Vero) using REMA and SRB methods. The results found that the derivatives **50c-50f** showed the moderate activity against cell lines: KB and MCF-7. whereas the derivatives **51b-51f** exhibited the moderate to good activity against cell lines: KB and MCF-7. Particularly, the good activity was obtained from the derivative **51c** and found against KB and MCF-7 cell lines with $\text{IC}_{50} = 3.42$ and $9.70 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

Keywords: steroid derivatives, antimicrobial, cytotoxicity

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามความตั้งใจในระดับหนึ่งด้วยการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเภททุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 ที่พิจารณาเห็นคุณค่าของงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นันทนา อรุณฤกษ์ สาขาโชนฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่เอื้อเพื่อความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้

พัชนี เจริญยิ่ง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
รายการคำย่อและสัญลักษณ์	VIII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	4
1.5 สมมุติฐานงานวิจัย	5
1.6 คำสำคัญของการวิจัย	7
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	8
2.2 สเตียรอยด์ในธรรมชาติ	9
2.3 ประเภทของสเตียรอยด์	11
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 การทดลองทั่วไป	16
3.2 วิธีการทดลอง	17
3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์	22
3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	23
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม	25
4.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน	41
4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์	44
4.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	50
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม	53
5.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน	53
5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์	53

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	54
5.5 ข้อเสนอแนะ	54
บรรณานุกรม	55
ประวัตินักวิจัย	58

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Cholic acid 44 และ สารอนุพันธ์ 50a-50g เปรียบเทียบกับตัวยา Vancomycin	46
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Deoxycholic acid 9 และ สารอนุพันธ์ 51a-51g เปรียบเทียบกับตัวยา Vancomycin	49
4.3 ค่า IC_{50} ของ Cholic acid 44 และสารอนุพันธ์ 50a-50f เปรียบเทียบกับ Ellipticine และ Doxorubicine	51
4.4 ค่า IC_{50} ของ Deoxycholic acid 9 และสารอนุพันธ์ 51a-51f เปรียบเทียบกับ Ellipticine และ Doxorubicine	52

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างหลักของสเตียรอยด์	1
1.2 แสดงความเป็น Amphipathic ของไบล์แอซิด	3
3.1 ตัวอย่างการวัดวงใส (clear zone)	23
5.1 แสดงโครงสร้างของสเตียรอยด์สังเคราะห์	53

รายการคำย่อและสัญลักษณ์

^{13}C NMR	^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
DCM	Dichloromethane
DIC	<i>N,N</i> -diisopropylcarbodiimide
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ESMS	Electrospray Ionization Mass Spectroscopy
Hz	Hertz
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50%
IR	Infrared Spectroscopy
^1H NMR	^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
m/z	Mass to charge ratio
MIC	Minimum Inhibition Concentration
ppm	Part per million
REMA	Resazurin Microplate assay
R _f	Retardation factor
SRB	Sulforhodamine B assay
TFA	Trifluoroacetic acid
TLC	Thin Layer Chromatography
ν_{max}	Frequency maximum
cm ⁻¹	per centimeter
δ	Chemical shift
<i>J</i>	Coupling constant