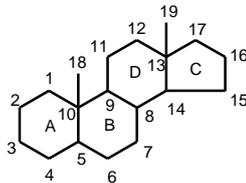


## บทที่ 1

### บทนำ

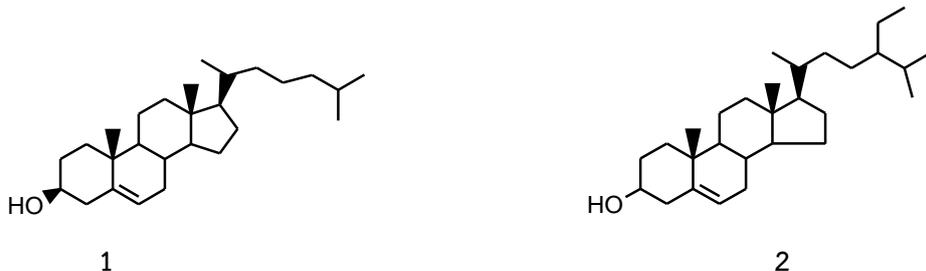
#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

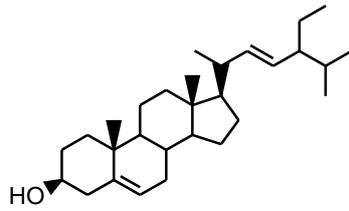
จากการเรียนรู้ด้วยตนเองของคนในสมัยโบราณเกี่ยวกับพืชที่ใช้เป็นอาหาร ทำให้พบสิ่งสำคัญจากพืช คือการค้นพบสรรพคุณต่างๆของพืชโดยบังเอิญซึ่งเป็นจุดเริ่มในการค้นพบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Product) และมนุษย์ได้นำสารธรรมชาติเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ในหลายด้านได้แก่ ด้านการแพทย์และการเกษตร เป็นต้น เนื่องจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติดีมีสมบัติที่ดีทั้งทางเคมีและชีวภาพ และมีการตกค้างในธรรมชาติที่น้อยกว่าสารสังเคราะห์ทำให้ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ต่อมานักเคมีได้สนใจนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลและ/หรือหมู่ฟังก์ชันโดยการทำปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์กับสารเคมี (รีเอเจนต์) ที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดความเฉพาะเจาะจงของสเตอริโอเคมีของหมู่ฟังก์ชันซึ่งจะนำไปสู่สมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารผลิตภัณฑ์ที่ดีมากยิ่งขึ้น ปัจจุบันจึงปรากฏรายงานการวิจัยจำนวนมากที่ทำการศึกษเกี่ยวกับสมบัติทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ใหม่ๆซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านั้น กลุ่มสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายและเป็นกลุ่มสารที่นักเคมีให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการนำไปเป็นสารตั้งต้นในการเตรียมตัวยาชนิดใหม่ๆ คือ สเตียรอยด์ (Steroids) ซึ่งจัดเป็นสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่งมีโครงสร้างของนิวเคลียสหลักประกอบด้วย Perhydrocyclopentanophenanthrene เป็นโครงสร้างหลัก ดังแสดงในรูปที่ 1.1



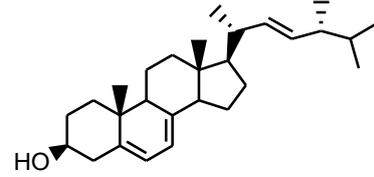
รูปที่ 1.1 โครงสร้างหลักของสเตียรอยด์

ตัวอย่างของสเตียรอยด์ที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ เช่น Cholesterol **1** พบได้ในกล้ามเนื้อสมอง เส้นประสาทไขสันหลัง และน้ำมันปลา ส่วน Sitosterol **2** และ Stigmasterol **3** เป็น sterol ทั่วไปของพืช แยกได้จากน้ำมันข้าวโพด น้ำมันของข้าวสาลีกำลังอก น้ำมันของข้าวไรน์ที่กำลังอก น้ำมันเมล็ดฝ้าย และ Ergosterol **4** พบได้ในยีสต์และเห็ด เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์และเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินดี เป็นต้น



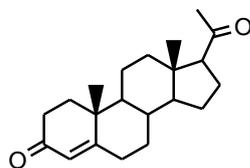


3

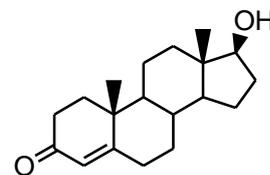


4

ปัจจุบันได้มีการนำสารกลุ่มสเตียรอยด์ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อย่างมากเช่น สเตียรอยด์กลุ่ม Antiandrogen นำมาใช้เป็นยารักษาภาวะ Hyperandrogenism และกลุ่ม Cardiac steroid สามารถใช้ในการรักษาโรค Congestive heart failure เป็นต้น แต่การสกัดแยกสเตียรอยด์จากพืชและสัตว์ด้วยเทคนิคทางเคมีอินทรีย์เพื่อให้ได้สเตียรอยด์ที่บริสุทธิ์นั้นมีปริมาณน้อยมาก และถ้ามีการนำไปใช้จะต้องใช้พืชและสัตว์ในปริมาณมากทำให้เกิดผลกระทบต่อสมดุลทางธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาวิกฤตโลกร้อนทั้งทางตรงและทางอ้อม ด้วยเหตุนี้การนำสเตียรอยด์มาใช้ในทางการแพทย์เพื่อเป็นตัวยารหรือส่วนประกอบของตัวยาก็มักนิยมกระทำด้วยวิธีการสังเคราะห์เลียนแบบตามธรรมชาติโดยการนำสเตียรอยด์ที่หาซื้อได้มาปรับเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันและ/หรือการเพิ่มหมู่แทนที่บนส่วนของวงและ/หรือส่วนของสายโซ่ด้านข้าง (side chain) รวมถึงการสังเคราะห์โดยวิธีเฉพาะเจาะจงเพื่อควบคุมสเตอริโอเคมีเพื่อให้ได้สเตียรอยด์สังเคราะห์ชนิดใหม่ ทั้งนี้เพื่อมุ่งหวังที่จะทำให้มีคุณสมบัติและการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อสิ่งมีชีวิตในแนวทางที่ดีขึ้น ซึ่งพบว่าสเตียรอยด์นั้นหากนำมาใช้อย่างถูกต้องตามหลักวิชาการจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก สารกลุ่มนี้จึงเป็นที่สนใจอย่างมากกับนักวิจัยด้านเคมีอินทรีย์ที่นิยมการสังเคราะห์และศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้าง (Structure-Activity Relationships, SAR) ของสเตียรอยด์สังเคราะห์กับฤทธิ์ทางชีวภาพ ความแตกต่างของสเตียรอยด์แต่ละชนิดจะแปรผันไปตามชนิดของหมู่ฟังก์ชันหรือชนิดของหมู่ฟังก์ชันบนสายโซ่ที่เกาะอยู่รอบนิวเคลียสหลักของสเตียรอยด์ เช่น Progesterone 5 จะมีหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 และ C-20 หรือ Testosterone 6 จะมีหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 และหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-17 จากโครงสร้างที่แตกต่างกันนี้จึงได้ส่งผลถึงคุณสมบัติที่แตกต่างกันด้วยดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น[1,2]



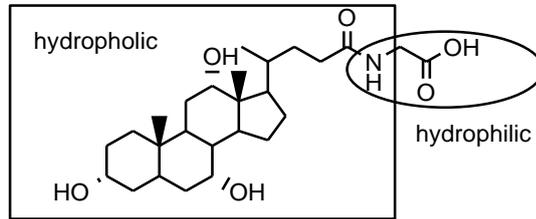
5



6

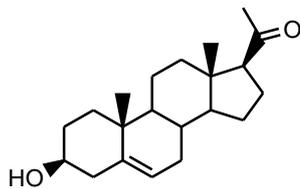
สเตียรอยด์กลุ่มไบลแอซิด (Bile acid) เป็นสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์มาจาก Cholesterol 1 โครงสร้างประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic, ส่วนที่ละลายในไขมัน) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic, ส่วนที่มีขั้ว) จัดเป็นแอมฟิพาติก (amphipathic) ดังรูปที่ 1.2 จะเห็นได้ว่าโครงสร้างของไบลแอซิดที่มีหมู่ฟังก์ชัน

หลายหมู่และมีสเตอริโอเคมีที่ต่างกันอย่างสิ้นเชิงทำให้โพลีแอซิดเป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่นักเคมีนิยมนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่และมีอนุพันธ์หลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าโพลีแอซิดตั้งต้น

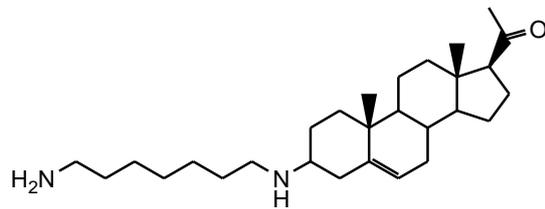


รูปที่ 1.2 แสดงความเป็น Amphipathic ของโพลีแอซิด

จากความหลากหลายของหมู่ฟังก์ชันบนนิวเคลียสของสเตียรอยด์ งานวิจัยนี้จึงสนใจในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่โดยเตรียมได้จากการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันหลักๆ โดยการเพิ่มหมู่อะตอมเข้าที่นิวเคลียสหลักของสเตียรอยด์ และสเตียรอยด์สังเคราะห์เหล่านี้จะถูกนำไปศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยจะเน้นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ และความเป็นพิษต่อเซลล์ จากงานวิจัยต่อเนื่องของผู้วิจัยพบว่า อะมิโนสเตียรอยด์ **8** ที่สังเคราะห์ได้จากการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ Pregnenolone **7** มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.70 ไมโครโมล/มิลลิลิตร และยังพบว่าอะมิโนสเตียรอยด์ **8** ไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ปกติ (Vero) โดยมีเปอร์เซ็นต์ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero) น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์[3]

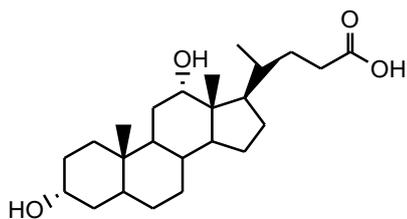


7

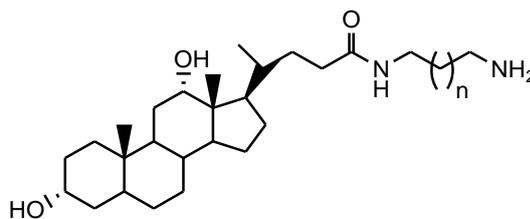


8

และอนุพันธ์เอไมด์ของ Deoxycholic acid **10** ที่สังเคราะห์ได้จาก Deoxycholic acid **9** โดยการเติมหมู่ไดเอมีนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 24 มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma ATCC HTB-22) และเซลล์มะเร็งช่องปาก KB (Human epidermoid carcinoma of cavity ATCC CCL-17) และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์พบว่า อนุพันธ์เอไมด์ที่มีความยาวของสายโซ่ของไดอะมีนที่แตกต่างกันและเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ *Corynebacterium diphtheriae* เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคคอตีบพบว่าอนุพันธ์เอไมด์ของ Deoxycholic acid **10** ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.78 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร[4] จะเห็นได้ว่าเมื่อหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์เปลี่ยนไปฤทธิ์ทางชีวภาพของมันเปลี่ยนไปได้โดยที่อาจจะออกฤทธิ์ยับยั้งหรือส่งเสริม และ/หรือมีฤทธิ์เท่าเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น



9 Deoxycholic acid



10 Deoxycholic acid amide n = 7

จากผลการทดลองของงานวิจัยทั้งสองพบว่าการเพิ่มอะตอมของไนโตรเจนเข้าไปที่นิวเคลียสของสเตียรอยด์ (หมายถึงที่วงหรือสายโซ่ด้านข้าง) มีส่วนทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์สังเคราะห์เปลี่ยนไปเมื่อเปรียบเทียบกับสเตียรอยด์ดั้งเดิม โดยแนวความคิดในการสังเคราะห์บวกกับข้อมูลเบื้องต้นที่กล่าวมา งานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ด้านเภสัชวิทยา กล่าวคือ สามารถสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่อาจจะนำไปเป็นตัวยารักษาโรคหรือเป็นส่วนผสมในยารักษาโรคชนิดใหม่ได้ และ/หรือสามารถใช้ทดแทนสเตียรอยด์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ และเป็นแนวทางเบื้องต้นนำไปสู่การสังเคราะห์เอซาสเตียรอยด์ (azasteroid หมายถึงสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอมที่วงหลักหรือสายโซ่ด้านข้าง) ได้ [5] ซึ่งจากรายงานการวิจัยพบว่าเอซาสเตียรอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ โดยการเลือกใช้สารเข้าทำปฏิกิริยาและเทคนิคในการสังเคราะห์ที่เหมาะสม
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์สังเคราะห์
3. เพื่อเป็นแนวทางเบื้องต้นในการสังเคราะห์เอซาสเตียรอยด์

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่โดยการเพิ่มอะตอมของไนโตรเจนและกรดอะมิโนของนิวเคลียสของสเตียรอยด์
2. ทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อจุลินทรีย์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์
3. ทดสอบฤทธิ์ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์

## 1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

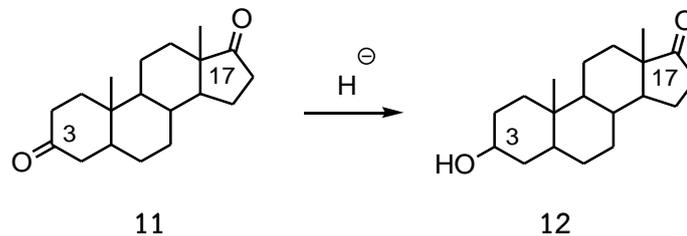
ขั้นตอนการวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. สังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่โดยใช้เทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็งและเทคนิคสารละลาย
2. ทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี
3. ทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อจุลินทรีย์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์

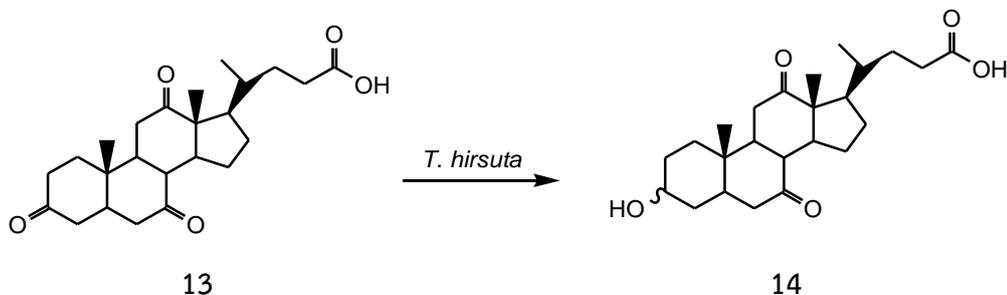
#### 4. ทดสอบฤทธิ์ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์

### 1.5 สมมุติฐานงานวิจัย

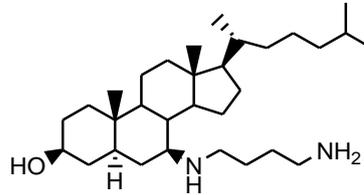
จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยวงแหวนเหลี่ยม 3 วง คือ วง A วง B วง C และมีวงห้าเหลี่ยม 1 วง คือ วง D ที่เชื่อมต่อกัน (รูปที่ 1.1) หมู่แทนที่ต่างๆ ที่มาเกาะเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีคุณสมบัติทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว จึงทำให้สเตียรอยด์มีคุณสมบัติที่หลากหลาย นักเคมีอินทรีย์ได้ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะทางเคมีอินทรีย์ในการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างเพื่อเป็นการนำไปสู่สเตียรอยด์ชนิดใหม่ โดยถูกประยุกต์เพื่อเป็นแนวทางไปสู่การสังเคราะห์สเตียรอยด์เลียนแบบธรรมชาติ โดยการเลือกใช้รีเอเจนต์หรือสารเข้าทำปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจง และควบคุมสภาวะที่เหมาะสมเพื่อจะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มากพอต่อการนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จากรายงานการวิจัยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างมักมุ่งเน้นไปที่หมู่ฟังก์ชัน ที่ วง A และ วง B หรือ หมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชันบนนิวเคลียสของสเตียรอยด์จะขึ้นกับตำแหน่งบนโครงสร้าง ปฏิกิริยาที่สำคัญของสเตียรอยด์เช่น ปฏิกิริยาเพิ่มเข้าด้วยนิวคลีโอไฟล์ที่หมู่คาร์บอนิล, การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยไฮไดรด์ไอออน, การเกิดคีทาล (ketal formation) และปฏิกิริยาการเพิ่มเข้าด้วยกรีนยาร์ตรีเอเจนต์ จากการทดลองพบว่าลำดับตำแหน่งของคาร์บอนอะตอมที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาได้คือ  $3 > 17 \geq 20 > 11$  ตัวอย่างเช่นการแสดงเฉพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ  $5\alpha$ -androsterone-3,17-dione **11** เป็น 3-hydroxy- $5\alpha$ -androsterone-17-one **12** แสดงให้เห็นว่าที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 สามารถเกิดปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกว่าที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17[6]



รวมทั้งการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันโดยใช้วิธีทางชีวภาพ (Biotransformation) ของกรดดีไฮโดรโคคลิก **13** ด้วยเชื้อ *Trametes hirsute* พบว่าเอนไซม์รีดักเตสจาก *T. hirsute* จะรีดิวส์หมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เท่านั้น[7] แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยารีดักชันที่เฉพาะเจาะจง

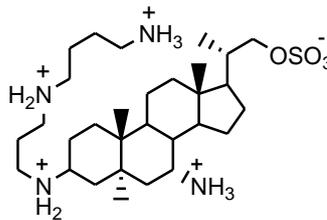


และตัวอย่างของการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์โดยใช้สารเคมี (Chemical transformation) เช่น Loncle และคณะ[8] ได้ทำการสังเคราะห์ 7-amino และ polyaminosterol จาก 3 $\beta$ -acetoxy-7-keto-5 $\alpha$ -cholestane **15** พบว่าสาร **15** มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ และต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ส่งผลคล้ายกับ *Staphylococcus aureus* และ *S. faecalis*



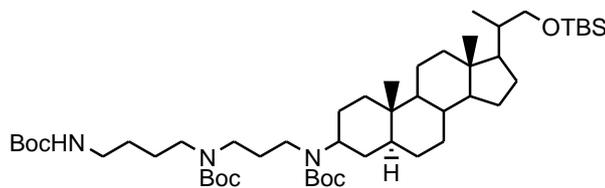
15

Khan และคณะ[9] ได้ทำการสังเคราะห์ 7 $\alpha$ -Aminosteroids **16** พบว่าสาร **16** มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes* 308A



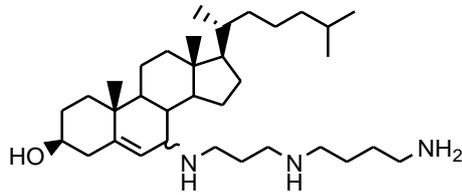
16

Kim และคณะ[10] ได้ทำการสังเคราะห์อะมิโนสเตียรอยด์ **17** โดยการทำปฏิกิริยา amination ของ 3-ketosteroid ด้วยพอลิเอมีน วิธีการสังเคราะห์เป็นแนวทางหนึ่งที่น่ามาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์ Squalamine สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอะมิโนสเตียรอยด์ซึ่งสกัดแยกจากฉลามพันธุ์ dog fish ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา



17

Kihel และคณะ[11] ได้ทำการสังเคราะห์ spermidylcholesterol 18 และศึกษาฤทธิ์การต้านความเป็นพิษของเซลล์ทั้งนี้เพื่อพัฒนาต่อเป็นยาต้านเซลล์มะเร็ง



18

จากตัวอย่างการปรับเปลี่ยนโครงสร้างนี้จะได้อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลายมากยิ่งขึ้นและเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสเตียรอยด์เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้ยังสามารถนำสเตียรอยด์สังเคราะห์ไปเป็นสารตั้งต้นในการเตรียมสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้อีก

### 1.6 คำสำคัญของการวิจัย

อนุพันธ์สเตียรอยด์

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ความเป็นพิษต่อเซลล์

### 1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ ซึ่งสเตียรอยด์สังเคราะห์เหล่านี้อาจแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และความเป็นพิษต่อเซลล์
2. สามารถทราบถึงฤทธิ์ของสเตียรอยด์สังเคราะห์ในด้านฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และความเป็นพิษต่อเซลล์
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาเพื่อผลิตส่วนผสมของยาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ศึกษาเพื่อเป็นการนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

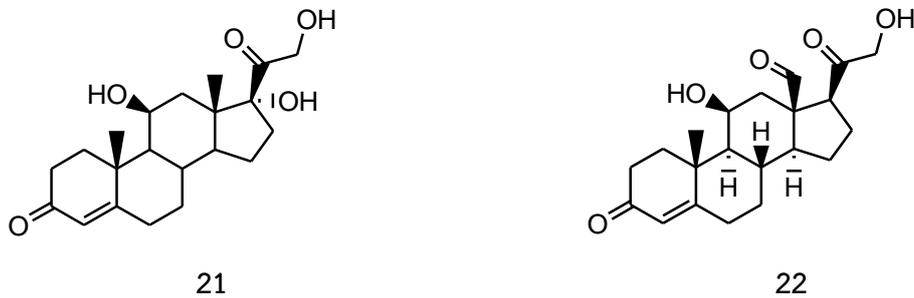
#### 2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ในธรรมชาติมีสเตียรอยด์ที่แตกต่างกันนับร้อยชนิดพบทั้งในพืชและสัตว์ การค้นพบสเตียรอยด์เริ่มจากการสกัดจากพืชหรือเนื้อเยื่อของสัตว์ด้วยอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม หรือเบนซีน พบว่าสเตียรอยด์เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติคล้ายกับไขมัน สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์และไม่ละลายในน้ำ ความแตกต่างของสเตียรอยด์แต่ละชนิดจะแปรผันไปตามหมู่ฟังก์ชันที่ติดอยู่กับโครงสร้างหลัก บทบาทสำคัญของสเตียรอยด์ในสิ่งมีชีวิตคือเป็นฮอร์โมน สเตียรอยด์ฮอร์โมนที่พบในสัตว์มีปริมาณค่อนข้างน้อยจึงไม่สามารถใช้เป็นแหล่งสำคัญของสารดังกล่าวได้ ในปลายทศวรรษของปี ค.ศ. 1930 ได้มีการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์สเตียรอยด์หลายชนิดขึ้นและ Equilenin **19** เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนตัวแรกที่ได้จากการสังเคราะห์ ในปี ค.ศ. 1953 W. E. Bachmann และ J. W. Cornforth ได้อธิบายการสังเคราะห์ Epiandrosterone **20** ปัจจุบันการสังเคราะห์สารดังกล่าวในปริมาณมากอาจใช้วิธีการสังเคราะห์แบบกึ่งสังเคราะห์ (semi-synthesis) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ที่เริ่มจากสารตั้งต้นในธรรมชาติซึ่งมีขั้นตอนการสังเคราะห์และค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์น้อยกว่า ปัจจุบันสเตียรอยด์ในพืชได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากมีปริมาณสารตั้งต้นค่อนข้างสูง



สเตียรอยด์ที่เป็นแม่แบบชนิดแรกคือ Cholesterol **1** จัดเป็นทั้งสเตียรอยด์ ลิพิด และแอลกอฮอล์ พบในเยื่อหุ้มเซลล์ของทุกเนื้อเยื่อในร่างกายและถูกขนส่งในกระแสเลือดของสัตว์ Cholesterol **1** ส่วนใหญ่ไม่ได้มากับอาหารแต่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกายจะสะสมอยู่มากในเนื้อเยื่อของอวัยวะที่สร้างมันขึ้นมาเช่น ตับ ไชสันหลัง (spinal cord) สมอและผนังหลอดเลือด (atheroma) Cholesterol **1** มีบทบาทในกระบวนการทางชีวเคมีมากมาย แต่ที่รู้จักกันดีคือ เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจและระบบหลอดเลือด (cardiovascular disease) และภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (Hypercholesterolemia)[12] สเตียรอยด์ที่ถูกจัดเป็นฮอร์โมนส่วนใหญ่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก Cholesterol **1** โดยกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพซึ่งมีเอนไซม์ที่แตกต่างกันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ร่างกายจะผลิตสเตียรอยด์ขึ้น 20 ถึง 30 หน่วยในแต่ละวันเพื่อควบคุมฮอร์โมนต่างๆในร่างกายและกตภูมิคุ้มกันให้สมดุล รักษาความสมดุลของเกลือแร่ อิเล็กโทรไลต์และน้ำ โดยใช้ Cholesterol **1** เป็นสารตั้งต้นในการผลิต สเตียรอยด์จะถูกผลิตขึ้นทุกเช้าหลังจากการนอนหลับพักผ่อนมาจนเต็มที่แล้วสมองจะสั่งการผลิตฮอร์โมนสเตียรอยด์โดยต่อมหมวกไตจะนำ Cholesterol **1** มาเปลี่ยนเป็นสเตียรอยด์ตัวอื่นๆ ซึ่งหลักๆอยู่ 2 ชนิดคือ Cortisol **21** มีประโยชน์ในการบรรเทาอาการอักเสบ ควบคุมสมดุลของเกลือแร่และน้ำ รวมถึงเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน อีกชนิด

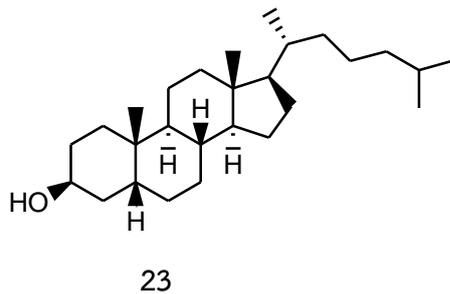
คือ Aldosterone 22 ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลเกลือแร่ในร่างกาย แต่ถ้ามี Aldosterone 22 หลั่งออกมามากเกินไปจะทำให้ร่างกายขับโพแทสเซียมออกมา กล้ามเนื้ออ่อนแรงและทำให้มีความดันโลหิตสูงได้



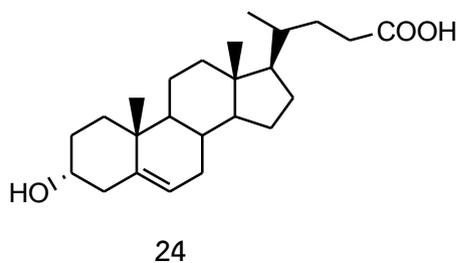
## 2.2 สเตียรอยด์ในธรรมชาติ[13]

สเตียรอยด์ที่สำคัญในธรรมชาติส่วนใหญ่คือ

1. สเตอรอล (Sterol) Cholesterol 1 เป็นสเตอรอลตัวหนึ่งที่พบมากในธรรมชาติ พบได้ในสัตว์ทั้งกลุ่มมีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังและในพืชด้วยโดยพบร่วมกับสเตียรอยด์ในกลุ่มสเตอรอลตัวอื่นๆ เช่น Coprostan-3 $\beta$ -ol 23



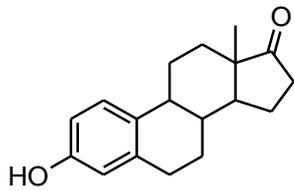
2. ไบล์ แอซิด (Bile acid) แยกได้จากน้ำดีของสัตว์ชั้นสูง อาจพบอยู่ในรูปของเกลือโซเดียมโดยเป็น Peptidic conjugate กับ Taurine และ Glycine สารในกลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 2 แบบคือ C-27 และ C-28 แอซิด พบในน้ำดีของสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และอีกแบบคือ C-24 แอซิด เช่น Lithocholic acid 24



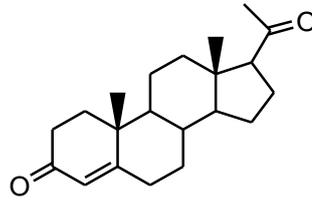
3. สเตียรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormones) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่หนึ่งคือสเตียรอยด์ที่เป็นฮอร์โมนเพศและสามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่มฮอร์โมนเพศหญิง เช่น Estrogen 25 กลุ่ม Progestational hormone เช่น Progesterone 5 และกลุ่มที่สองคือกลุ่ม

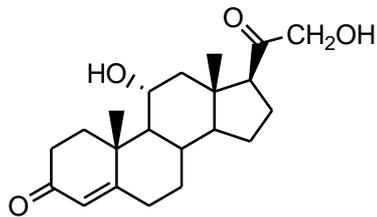
Adrenocortical hormones แบ่งออกเป็น กลุ่ม Glucocorticoids เช่น Hydrocortisone **26** และกลุ่ม Mineralocorticoids เช่น Andosterone **27**



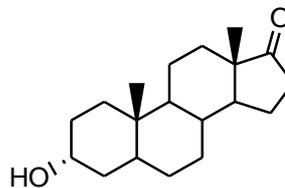
25



5

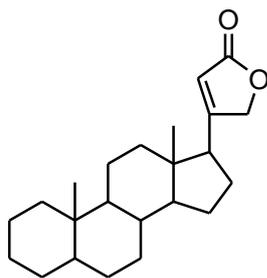


26

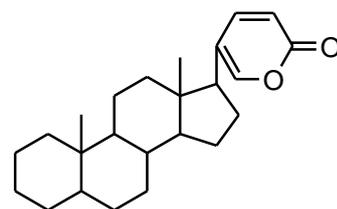


27

4. คาร์ดิแอกิก กลัยโคไซด์ (Cardiac glycosides) สเตียรอยด์ในกลุ่มนี้มีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจซึ่งเรียกว่า Cardiac-active (Cardiotonic) สารประกอบนี้แยกได้จากพืชที่อยู่ในเขตร้อน และสามารถพบได้ในเขตแอฟริกาและอเมริกาใต้ ชาวพื้นเมืองใช้เตรียมเป็นลูกดอกอาบยาพิษ สเตียรอยด์กลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กลุ่ม Cardenolides **28** เป็นสเตียรอยด์ชนิด C-23 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 เป็นชนิด 5-membered unsaturated lactone ring และกลุ่ม Bufadienolides **29** เป็นสเตียรอยด์ชนิด C-24 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 เป็นชนิด 6-membered unsaturated lactone ring

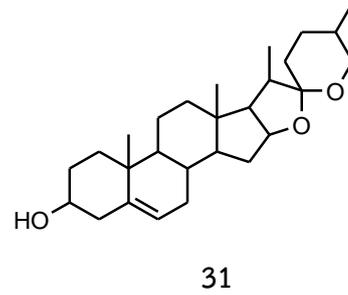
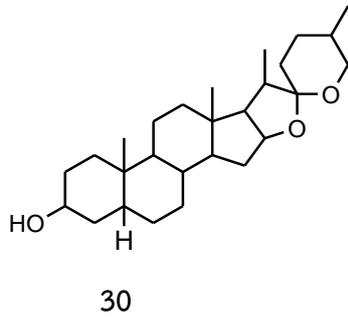


28



29

5. Saponins อะไกลโคโคนหรือส่วนที่ปราศจากน้ำตาลของพืชที่สามารถทำให้เกิดฟองได้ในน้ำได้ เรียกว่า Saponin ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้เช่น Smilagenin **30** และ Diosgenin **31**

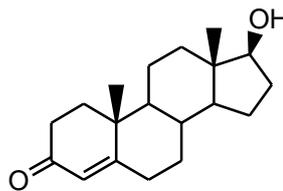


### 2.3 ประเภทของสเตียรอยด์[14-20]

ในสรีรวิทยาและการแพทย์ของมนุษย์ สเตียรอยด์ที่สำคัญคือ Cholesterol 1 เป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์แอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์ เมมเบรน ในสัตว์ แต่อย่างไรก็ดี ถ้ามีปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิดโรคและภาวะผิดปกติมากมาย เช่น ภาวะผนังเส้นโลหิตแดงหนาและความยืดหยุ่นน้อยลง (atherosclerosis) สเตอรอยด์อื่นส่วนใหญ่ถูกสังเคราะห์จาก Cholesterol 1 ฮอร์โมนต่างๆ เช่น ฮอร์โมนเพศของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate) ก็เป็นสเตียรอยด์ที่สร้างจาก Cholesterol 1 เช่นกัน

สเตียรอยด์แบ่งเป็นประเภทต่างๆ ดังนี้

1. แอนแนบอลิกสเตียรอยด์ (Anabolic steroid) หรือที่รู้จักกันเป็นทางการคือ แอนแนบอลิกแอนโดรเจนสเตียรอยด์ (Anabolic-androgen steroid, AAS) เป็นอนุพันธ์สังเคราะห์ของฮอร์โมนเพศชาย Testosterone 32 มีผลในการเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีน กระตุ้นให้ร่างกายสะสมโปรตีนและสร้างกล้ามเนื้อ แอนแนบอลิกสเตียรอยด์ยังมีคุณสมบัติ Androgenic และ Virilizing รวมถึงการบำรุงรักษาในลักษณะที่เป็นชาย เช่นการเจริญเติบโตของร่างกาย เสียง และหนวดเครา สเตียรอยด์ประเภทนี้ส่วนมากจะใช้ในกลุ่มของนักกีฬาเพราะจะช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้แก่กล้ามเนื้อ

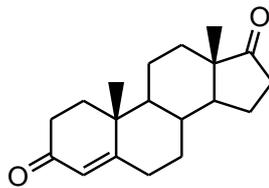


2. คอร์ติโคสเตียรอยด์ (Corticosteroid) เป็นฮอร์โมนประเภทสเตียรอยด์ชนิดหนึ่ง ถูกสังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ที่เปลือกของต่อมหมวกไตภายใต้การควบคุมจากสมองส่วนกลาง จัดเป็นฮอร์โมนที่มีฤทธิ์หลายด้าน โดยเฉพาะในทางการแพทย์ ฮอร์โมนตัวนี้เปรียบเสมือนยาครอบจักรวาลคือสามารถใช้ในการรักษาโรคได้แทบทุกชนิดเพราะมีการออกฤทธิ์ต่อระบบต่างๆ ในร่างกายหลายระบบเช่น ตับ กล้ามเนื้อ ผิวหนัง ต่อมน้ำเหลือง เนื้อเยื่อไขมัน เนื้อเยื่อเกี่ยวพันรวมทั้งมีฤทธิ์ลดการอักเสบในร่างกายด้วย

3. ฮอร์โมนเพศ เกิดจากการทำงานของต่อมในสมองที่เรียกว่า พิทูอิทารีแกรน (Pituitary Grand) ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างฮอร์โมนอันจะเป็นสิ่งกำหนดความแตกต่างของกระบวนการทำงานในร่างกายของ

ทั้งชายและหญิง ฮอริโมนที่ควบคุมการทำงานของผู้หญิงเรียกว่า Estrogen 25 ทำหน้าที่ให้ร่างกายของผู้หญิงพัฒนาจากวัยเด็กสู่วัยสาว ทำให้เต้านมมีขนาดใหญ่ขึ้น สะโพกผายขึ้น น้ำเสียงที่เคยแหบพร่าหรือดูเรียบๆ ก็กลับมามีสีลานุ่มนวล เสียงเล็กกลง และที่สำคัญคือการมีประจำเดือน ซึ่งเป็นสัญญาณเตือนเริ่มแรกของการเข้าสู่วัยสาวเต็มตัว ส่วนผู้ชายฮอริโมนที่เป็นตัวกำหนดความเป็นชายเรียกว่า Testosterone 6 มีส่วนทำให้เด็กผู้ชายเริ่มเข้าสู่วัยหนุ่ม มีเสียงห้าวขึ้น อวัยวะเพศใหญ่ขึ้น มีหนวดเคราซึ่งบ่งบอกความเป็นชาย

4. โพรฮอริโมน (Prohormone) เป็นสารตั้งต้นในการสร้างฮอริโมนชนิดต่างๆ ซึ่งโพรฮอริโมนจะไม่มีผลต่อระบบการทำงานของร่างกาย โพรฮอริโมนที่พบได้ในคนคือ Proinsulin และ Pro-opiomelanocortin ตัวอย่างของโพรฮอริโมนได้แก่ Androstenedione 33

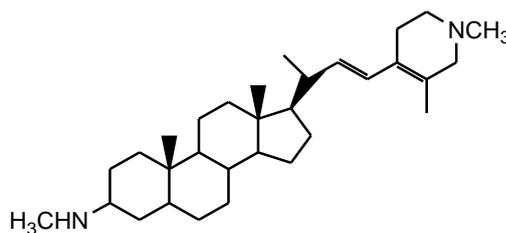


33

5. ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) เป็นสารสเตียรอยด์ที่พบในพืช มีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกับ Cholesterol 1 มาก จึงช่วยยับยั้งการดูดซึม Cholesterol 1 ในอาหารที่เรารับประทานเข้าไปไม่ให้เข้าสู่กระแสเลือดด้วยกลไกเข้าไปแทนที่ Cholesterol 1 ซึ่งไฟโตสเตอรอลจะถูกดูดซึมได้น้อยมาก ทำให้ Cholesterol 1 จากอาหารถูกดูดซึมได้น้อยลงและถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระ ปริมาณไฟโตสเตอรอลในพืชจะพบมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์รวมทั้งตำแหน่งของพืชที่วิเคราะห์ ซึ่งในพืชชนิดหนึ่งๆมีการพบไฟโตสเตอรอลหลายชนิดในสัดส่วนที่แตกต่างกันไป

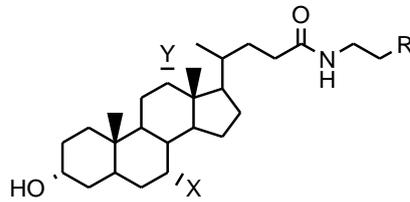
## 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวทางการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอมที่วงหลักและ/หรือสายโซ่ด้านข้าง (side chain) และผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ถูกกล่าวถึงโดย Gans และ Bracher[5] ได้ทำสังเคราะห์เลียนแบบธรรมชาติ Plakinnamine B 34 ซึ่งเป็นสเตียรอยด์ที่ประกอบอะตอมของไนโตรเจนจัดเป็นสารกลุ่ม azasteroid หรือ steroid alkaloid ในธรรมชาติสกัดแยกได้จากฟองน้ำ *Plakina* sp. จากการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นพบว่า Plakinnamine B 34 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา



34

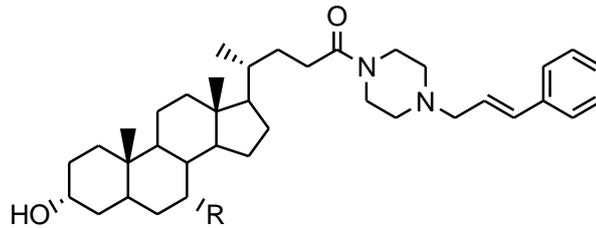
Banday และคณะ[21] สังเคราะห์ bile acid amidoalcohol **35a** และ **35b** โดยการทำปฏิกิริยาที่หมู่คาร์บอกซิลของโบล์แอซิดให้เป็นหมู่อะมิโดแอลกอฮอล์ และศึกษาโครงสร้างของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค X-ray



35a X, Y = H, R = OH

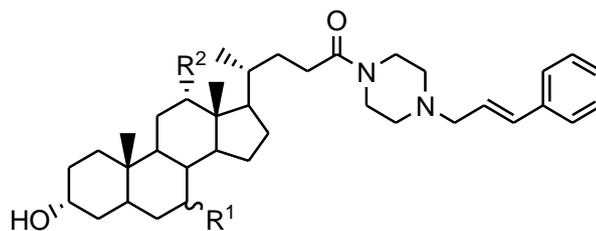
35b X, Y = H, R = CH<sub>2</sub>OH

Kihel และคณะ[22] สังเคราะห์สาร **36** จาก Lithocholic acids **24** พบว่าสาร **36** สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้



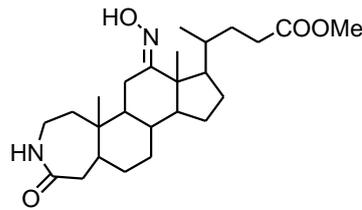
36

Kihel และคณะ[23] สังเคราะห์อนุพันธ์ของโบล์แอซิด **37** พบว่ามีฤทธิ์ในยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ในระดับที่ดี



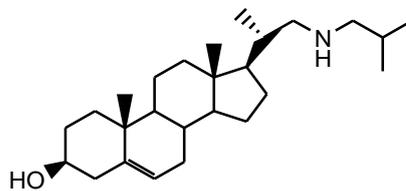
37

Song และคณะ[24] สังเคราะห์อนุพันธ์ของ Deoxycholic acid **9** โดยเปลี่ยนวง A เป็น homo-lactam และหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 12 เป็นหมู่ออกซิม จากนั้นนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก พบว่า สาร **38** มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 20.6 ไมโครโมล/ลิตร



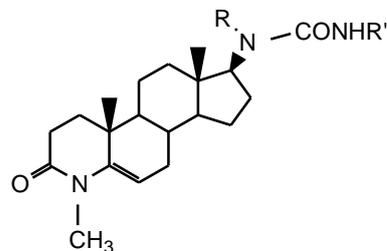
38

Bracher และคณะ[25] สังเคราะห์ azasteroids 23-azacholesterol 39 โดยการเติมไนโตรเจนอะตอมเข้าไปที่สายโซ่ด้านข้าง พบว่าสาร 39 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ sterol methyltransferase ในกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ ergosterol



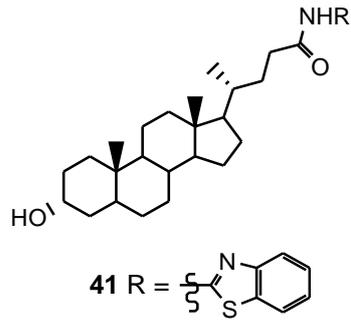
39

Singh และคณะ[26] สังเคราะห์ azasteroid 40 พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้ง human type I isozyme มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $1.3 \pm 0.64$  นาโนโมล

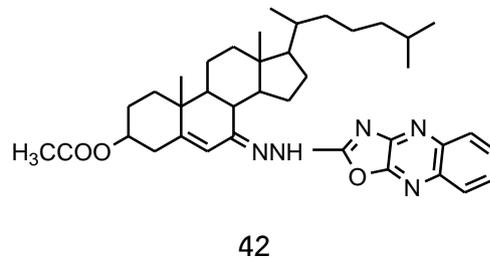


40 R = cyclopropyl, R' = phenyl

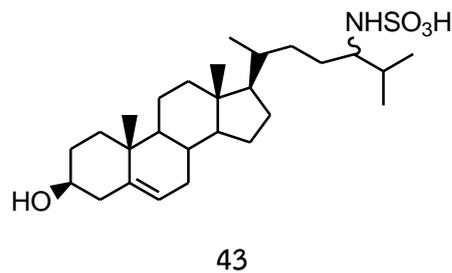
Qiu และคณะ[27] สังเคราะห์อนุพันธ์ของ Lithocholic acid 41 โดยทำการเพิ่มไนโตรเจนอะตอมเข้าไปในโมเลกุลของ Lithocholic acid 24 เปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจากคาร์บอกซิลเป็นหมู่เอไมด์ และนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสาร 41 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 7.8 ไมโครโมลาร์



Khan และคณะ[28] ได้สังเคราะห์ steroidal oxazolo quinoxaline **42** ที่ประกอบด้วยอะตอมของไนโตรเจนโดยพัฒนาโครงสร้างจากออกซิมสเตียรอยด์ของคลอเลสเตอรอล พบว่าสาร **42** มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก *S. aureus* และ *S. pyogenes* และแกรมลบ *S. typhimurium* และ *Escherichia coli* มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.78, 0.52, 0.47 และ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ



Chung และคณะ[29] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ Cholesterol **1** โดยการเพิ่มหมู่  $-NHSO_3H$  ที่สายโซ่ด้านข้างของ Cholesterol **1** พบว่าสาร **43** มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม *Cryptococcus neoformans* และ *Candida albicans* ที่ดี มีค่า MIC ช่วงระหว่าง 0.10-6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การทดลองทั่วไป

ตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ hexane, dichloromethane (DCM), ethyl acetate และ methanol (เกรดการค้า, Zen point) ที่ใช้สำหรับการล้างเรซินและการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง ส่วนสารเคมีที่ได้จากการซื้อจะนำมาใช้โดยปราศจากการทำสารให้บริสุทธิ์

ตัวทำละลาย pyridine (เกรดวิเคราะห์, Lab scan) ที่ใช้ในการทดลอง ถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นที่อุณหภูมิ 115 – 116 องศาเซลเซียส และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อดูดน้ำ ระยะเวลาในการใช้ 30 วัน

สารเคมีที่ใช้เป็นสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ในการสังเคราะห์เป็นเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Fluka และ Aldrich ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีทำให้ปรากฏบนแผ่น aluminium sheet silica gel F<sub>254</sub> Merck ตรวจสอบจุดของสารผลิตภัณฑ์ด้วยการดูคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และ/หรือโดยการย้อมด้วย anisaldehyde reagent แล้วให้ความร้อนแผ่น TLC บนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

รีเอเจนต์ใช้ทดสอบเรซิน:

รีเอเจนต์ A : สารละลาย (1) ซังฟีนอล 40 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร สารละลาย (2) ซังโพแทสเซียมไฮยาไนด์ 65 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งมา 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วย pyridine 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลาย (1) และ (2) ทำการปั่นกววนให้สารละลายผสมเข้ากัน

รีเอเจนต์ B : ซัง Ninhydrin 2.5 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 50 มิลลิลิตร

การแยกสารสังเคราะห์ให้บริสุทธิ์ทำโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้เฟสคงที่คือ Silica gel 60 0.04-0.06 mm (Scharlau GE0048) ใช้เฟสเคลื่อนที่คือ ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane : ethyl acetate

สเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR และ <sup>13</sup>C NMR บันทึกโดยเครื่องฟูเรียรทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกกะเฮิร์ต การเตรียมสารตัวอย่างจะทำการละลายโดยใช้ตัวทำละลาย CDCl<sub>3</sub> และ CD<sub>3</sub>OD จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ CHCl<sub>3</sub> ที่ δ 7.25 ppm สำหรับสเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR และที่ δ 77.5 ppm สำหรับสเปกตรัม <sup>13</sup>C NMR และ CD<sub>3</sub>OH ที่ δ 4.80 ppm สำหรับสเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR และที่ δ 49.0 ppm สำหรับสเปกตรัม <sup>13</sup>C NMR

จุดหลอมเหลวบันทึกโดยเครื่องหาจุดหลอมเหลว GALLEKAMP SANYO

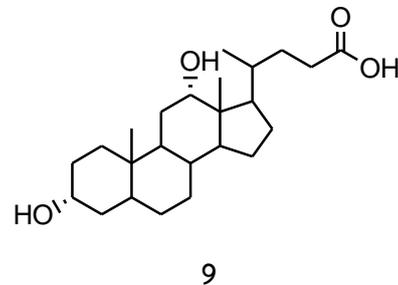
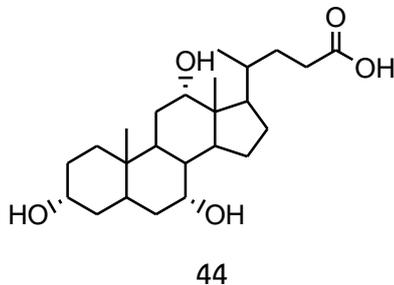
อินฟราเรดสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องฟูเรียรทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX 60237 โดยใช้ KBr เป็นวัสดุในการทำหน้าต่างเซลล์ และทำการบันทึกในช่วงความถี่ 4,000-400 cm<sup>-1</sup>

แมสสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ Finnigan LC-Q MS detector ด้วยเทคนิค Electrospray จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง

### 3.2 วิธีการทดลอง

#### 3.2.1 การสังเคราะห์สเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม

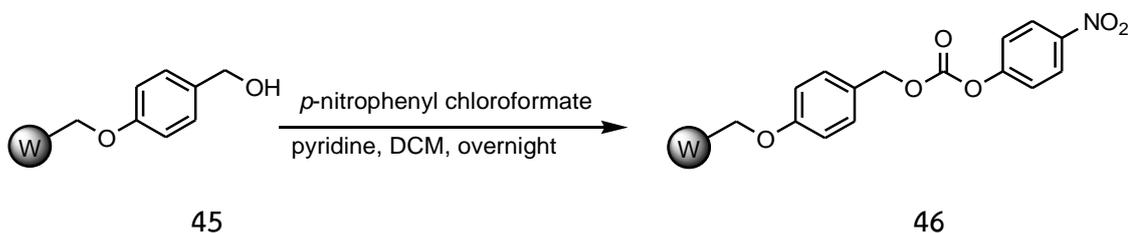
เลือกใช้ Cholic acid **44** และ Deoxycholic acid **9** เป็นสารตั้งต้น



การเพิ่มอะตอมของไนโตรเจนเข้าไปในโมเลกุลของไบสแอสิตทั้งสองจะทำได้โดยการนำไบสแอสิตทำปฏิกิริยากับสารประกอบเอมีนซึ่งเลือกใช้กลุ่มไดเอมีน ในการสังเคราะห์จะเลือกการสังเคราะห์ด้วยเทคนิควิศวกรรมของแข็ง แนวทางการสังเคราะห์แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน[30] ดังนี้

#### 1. ปฏิกิริยาการกระตุ้น Wang resin โดยการเปลี่ยนเป็นหมู่คาร์บอเนต

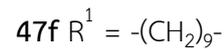
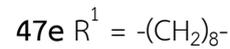
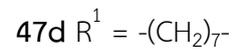
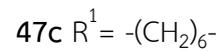
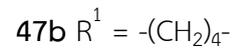
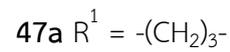
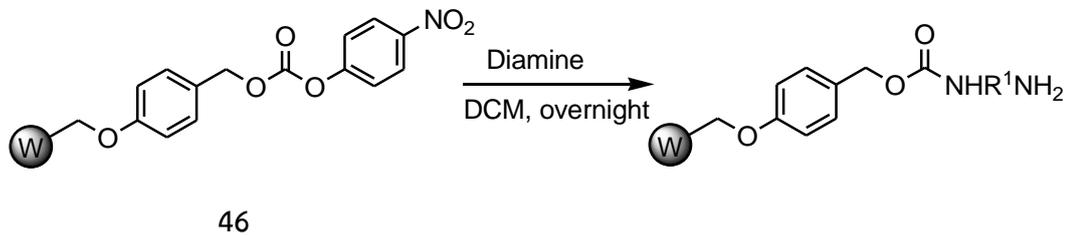
แผนภาพที่ 3.1



1. ชั่ง Wang resin **45** จำนวน 100.0 มิลลิกรัม (0.10 มิลลิโมล) ใส่ลงใน column cap แล้วเติม DCM 10 มิลลิลิตร แช่ไว้ประมาณ 10 นาที จนกระทั่งเรซินบวมตัว
2. ไข DCM ออกจาก column cap เติมสารละลายของ *p*-nitrophenyl chloroformate 80.6 มิลลิกรัม (0.40 มิลลิโมล) ใน DCM ลงใน column cap
3. เติม pyridine ลงไปประมาณ 5 หยด แล้วเติม DCM จนได้ปริมาตร 2/3 ของ column cap จากนั้นปิดฝา column cap ให้เรียบร้อย และระบายความดันภายใน column cap นำ column cap ไปตั้งหมุน เปิดเครื่องตั้งหมุนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
4. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไขสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง จากนั้นล้างเรซินด้วย DCM หลายๆ ครั้ง จะได้ *p*-nitrophenyl carbonate wang resin **46**

## 2. ปฏิกิริยาการใส่ไดเอมีนเข้าไปทำปฏิกิริยากับ Wang resin 46

แผนภาพที่ 3.2



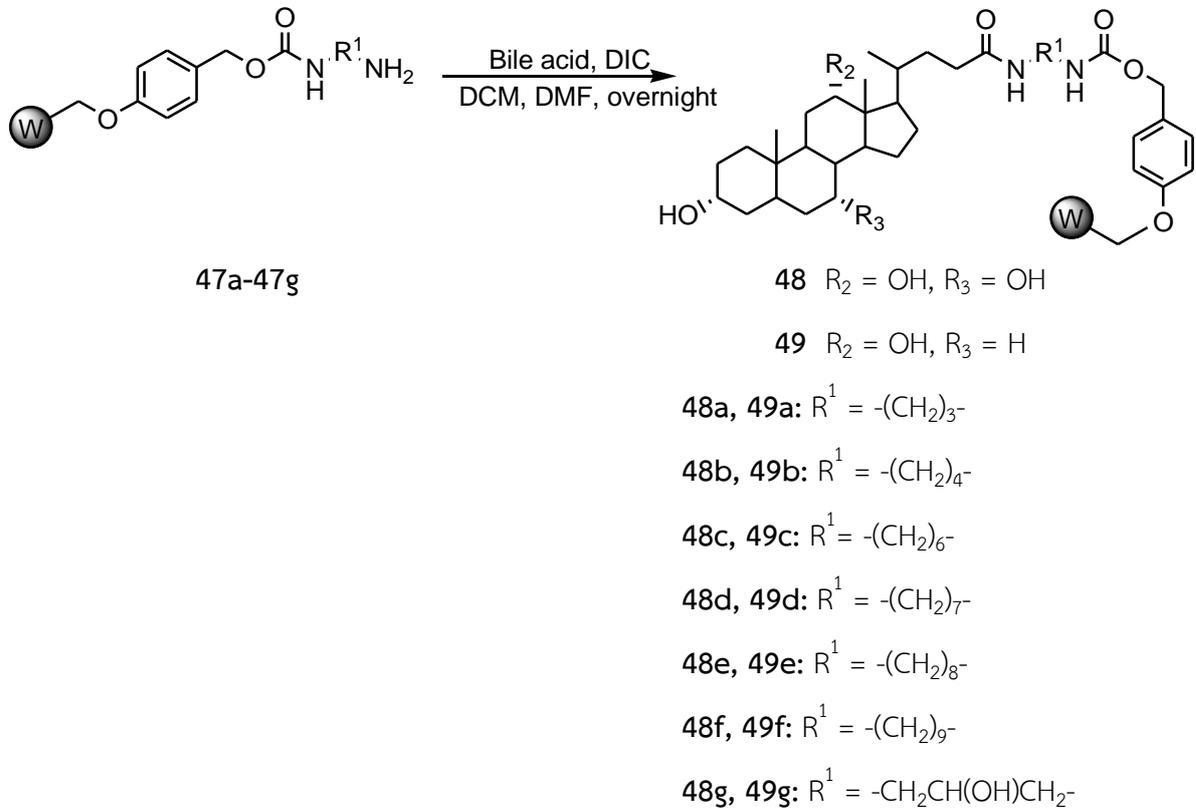
1. ซั่งไดเอมีนจำนวน 4 equivalent ของ Wang resin 46 ละลายใน DCM จากนั้นเติมลงใน column cap ที่ได้จากปฏิกิริยาตอนที่ 1

2. จากนั้นเติม DCM ลงใน column cap จนได้ปริมาตร 2/3 ของหลอด นำ column cap ไปตั้งหมุน เปิดเครื่องตั้งหมุนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา

3. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไซสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้ง จากนั้นล้างเรซินด้วย DCM สลับกับ methanol หลายๆ ครั้งนำเม็ดเรซิน 2-3 เม็ด ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กไปทดสอบโดยใส่รีเอเจนต์ A 3 หยด และรีเอเจนต์ B 1 หยด จากนั้นนำหลอดทดลองนี้ไปให้ความร้อนประมาณ 1 นาที ถ้าเม็ดเรซินเปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่าไดเอมีนได้ทำปฏิกิริยากับ Wang resin สมบูรณ์แล้ว

### 3. ปฏิกิริยาการใส่โบล์แอซิดเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน

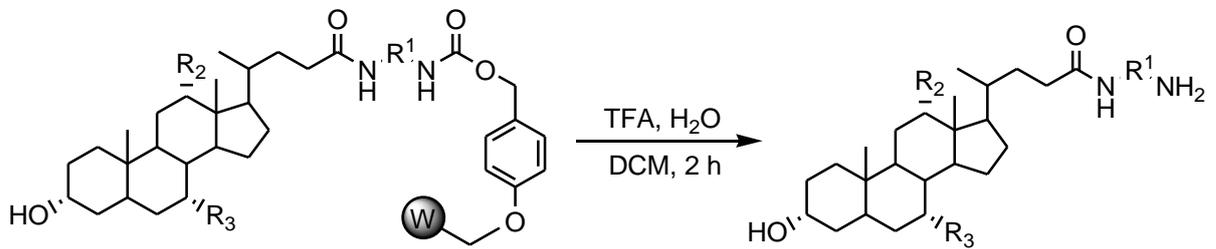
#### แผนภาพที่ 3.3



1. ซิ่งโบล์แอซิดจำนวน 4 equivalent ของ Wang resin ใส่ลงใน vial ละลายโบล์แอซิดด้วย DCM และ DMF ทำการปั่นจนจนกระทั่งโบล์แอซิดละลายหมด
2. จากนั้นใส่ DIC ลงในโบล์แอซิดปั่นจนต่อเป็นเวลา 10 นาที
3. นำโบล์แอซิดที่ได้จากข้อ 2 ใส่ลงใน column cap ที่มีเรซินที่ได้จากปฏิกิริยา 2
4. เติม DCM ลงใน column cap จนมีปริมาณเป็น 2/3 ของหลอด
5. นำ column cap ไปตั้งหมุน เปิดเครื่องตั้งหมุนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
6. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดไขสารละลายที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาทิ้งและล้างเรซินด้วย DCM สลับกับ methanol จากนั้นแช่เรซินใน DCM เป็นเวลา 30 นาที สลับกับแช่ใน methanol เป็นเวลา 30 นาทีเช่นกัน ประมาณ 5-6 ครั้ง
7. นำเม็ดเรซิน 2-3 เม็ด ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กไปทดสอบ โดยใส่รีเอเจนต์ A 3 หยด และรีเอเจนต์ B 1 หยด จากนั้นนำหลอดทดลองนี้ไปให้ความร้อนประมาณ 1 นาที ถ้าเม็ดเรซินไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่าโบล์แอซิดได้ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนสมบูรณ์แล้ว

## 4. ปฏิกิริยาการตัดสารผลิตภัณฑ์ออกจาก Wang resin

แผนภาพที่ 3.4



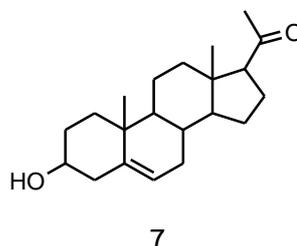
48a-48g, 49a-49g

50  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{OH}$ 51  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{H}$ 50a, 51a:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_3-$ 50b, 51b:  $R^1 = -(\text{CH}_2)_4-$ 50c, 51c  $R^1 = -(\text{CH}_2)_6-$ 50d, 51d  $R^1 = -(\text{CH}_2)_7-$ 50e, 51e  $R^1 = -(\text{CH}_2)_8-$ 50f, 51f  $R^1 = -(\text{CH}_2)_9-$ 50g, 51g:  $R^1 = -\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 

- นำ column cap ที่มีเรซินที่ได้จากปฏิกิริยาตอนที่ 3 มาเติม TFA ลงไปประมาณ 1/3 โดยปริมาตรของหลอด จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 2-3 หยด
- เติม DCM ลงใน column cap จนมีปริมาตรเป็น 2/3 ของหลอด จากนั้นนำ column cap ไปตั้งหมุน เปิดเครื่องตั้งหมุนทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
- ไขสารละลายจาก column cap ใส่ลงในขวดแก้วเล็กที่ทราบน้ำหนัก จากนั้นนำไปพ่นด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อกำจัดตัวทำละลายออกจากสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมด
- นำขวดแก้วเล็กที่มีสารผลิตภัณฑ์ไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ได้
- นำสารผลิตภัณฑ์ไปตรวจวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

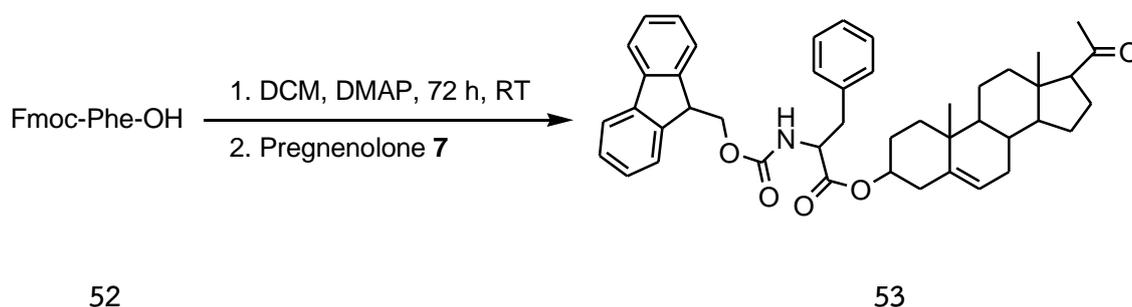
### 3.2.2 การสังเคราะห์สเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน

เลือกใช้ Pregnenolone 7 เป็นสารตั้งต้น



การเพิ่มกรดอะมิโนเข้าไปในโมเลกุลของ Pregnenolone 7 เลือกทำปฏิกิริยาที่หมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) วิธีการสังเคราะห์จะเลือกเทคนิควิทยาศาสตร์ละลายโดยการนำ Pregnenolone 7 ปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่ติดหมู่ป้องกัน (Protecting group) Pregnenolone 7 จะเข้าทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่หมู่คาร์บอกซิลถูกกระตุ้นด้วย DCC ซึ่งวิธีการทดลองจะทำการทดลองเสร็จสิ้นภายในขั้นตอนเดียว โดยจะไม่ทำการแยกสารตัวกลางที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยาในรูปสารบริสุทธิ์[31] และจะทำปฏิกิริยาต่อเนื่องจนกระทั่งได้สารผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือสารประกอบเอสเทอร์ของ Pregnenolone 53

#### แผนภาพที่ 3.5



1. ชั่ง Fmoc phenylalanine 52 จำนวน 182.4 มิลลิกรัม (0.47 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม DCM 10 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวานจนกระทั่ง Fmoc phenylalanine 52 ละลายหมด
2. จากนั้นเติม DMAP 3-4 เกร็ด ลงในสารละลายในข้อ 1 ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นกวานจนกระทั่ง DMAP ละลายหมด
3. เติมสารละลายของ Pregnenolone 7 จำนวน 100.0 มิลลิกรัม (0.31 มิลลิโมล) ใน DCM 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ทำการปั่นกวานจนกระทั่ง Pregnenolone 7 ละลายหมด
4. นำสารละลายผสมจากข้อ 3 ทำการปั่นกวานที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลาย DCC จำนวน 97.1 มิลลิกรัม ใน DCM 5 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวานที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และทำการปั่นกวานต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะเกิดตะกอนสีขาวของ dicyclohexylurea

5. ทำการกรองแยกตะกอนสีขาวและสารละลายผสม จากนั้นนำสารละลายผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง
6. นำของเหลวหนืดจากข้อ 5 มาละลายด้วย DCM 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาสกัดล้างด้วย 0.5 N ของกรดไฮโดรคลอริก 10 x 2 ครั้ง, สารละลายอิมัลชันโซเดียมไบคาร์บอเนต 10 x 2 ครั้ง และสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิมัลชัน 10 มิลลิลิตร
7. ทำการดูดน้ำออกจากสารละลายด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ปราศจากน้ำ กรองแยกสารละลายและแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต และนำของผสมไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ
8. ทำการแยกสารผสมให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี
9. เริ่มทำการทดลองใหม่ตั้งแต่ข้อ 1-8 โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนในข้อ 1 จาก Fmoc phenylalanine เป็น Fmoc isoleucine 91.5 มิลลิกรัม (0.26 มิลลิโมล)

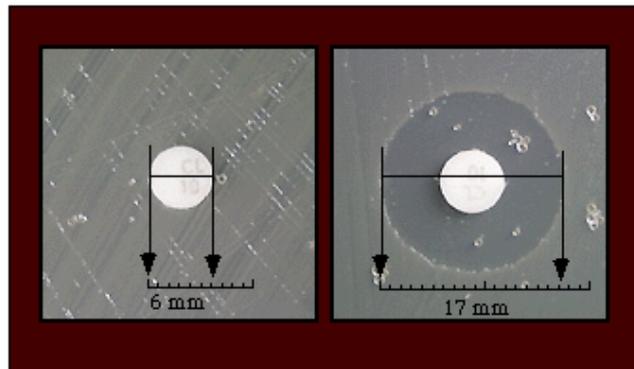
### 3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ จะทำการทดสอบ ณ ห้องปฏิบัติการสาขาโอบุสวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ด้วยวิธี Disc diffusion method ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauer และคณะ[32] ซึ่งวิธีการทดสอบสรุปได้ดังนี้

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เก็บไว้บน Trypticase Soy Agar (TSA) เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นทำการเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูก activated แล้วลงมาใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mcfarland
3. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมได้มาเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Ager อยู่ โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่วจำนวน 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ อยู่บนหน้าวุ้น
4. หลังจากนั้นนำแผ่นดิสก์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มีสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งละลายด้วย DCM วางบนผิววุ้นที่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากนั้นทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. อาหารสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ใช้เป็นชนิด Sabouraud Agar และทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอุณหภูมิและเวลาขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด
6. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone ที่เกิดขึ้น

กรณีทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียใช้ Vancomycin เป็นตัวยาเปรียบเทียบ และกรณีทดสอบกับยีสต์ใช้ Amphotericin B เป็นตัวยาเปรียบเทียบ ในแต่ละชุดการทดลองจะใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม

การวิเคราะห์ผลการทดลองพิจารณา ดังนี้: ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่าน้อยกว่า 11 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับอ่อน (weak) ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 11 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 14 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับปานกลาง (moderate) และถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 14 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับดี (good)



รูปที่ 3.1 ตัวอย่างแสดงการวัดวงใส (clear zone)

### 3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จะทำการทดสอบ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ วิธีการทดลองแบ่งออกได้ดังต่อไปนี้

#### 3.4.1 ทดสอบฤทธิ์ด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติชนิด Vero (African green monkey kidney)

การทดสอบใช้วิธี Sulforhodamine B (SRB) assay เซลล์ที่ใช้ทดสอบคือ เซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney) ที่ความเข้มข้นของสารทดสอบเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 0.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และเปรียบเทียบกับตัวยา Ellipticine เป็นชุดควบคุมเชิงบวก การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการเจริญเติบโตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ (non cytotoxic) และถ้าเซลล์มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ (cytotoxic) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า  $IC_{50}$  (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

#### 3.4.2 ทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก (Anti-cancer KB-Oral cavity cancer)

การทดสอบใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA)[33] ใช้เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากชนิด KB (Human epidermoid carcinoma of carcinoma, ATCC CCL-17) ที่ความเข้มข้นของสารทดสอบเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 0.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และเปรียบเทียบกับตัวยา Ellipticine เป็นชุดควบคุมเชิงบวก การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสาร

ตัวอย่างไม่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (inactive) และถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (active) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า  $IC_{50}$  (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

### 3.4.3 ทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (Anti-cancer BC-Breast cancer)

การทดสอบด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA)[33] ใช้เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast adenocarcinoma, ATCC HTB-22) ที่ความเข้มข้นของสารทดสอบเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 0.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และเปรียบเทียบกับตัวยา Doxorubicine เป็นชุดควบคุมเชิงบวก การบันทึกผลการทดลองพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างไม่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (inactive) และถ้าเซลล์มีการยับยั้งการเจริญเติบโตมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารตัวอย่างมีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (active) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่า  $IC_{50}$  (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

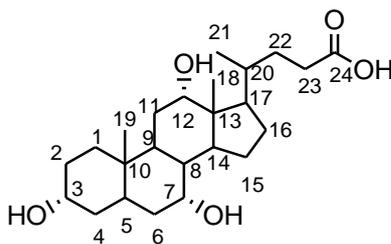
## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผล

#### 4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม

สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คือ ไบล์แอซิด Cholic acid **44** และ Deoxycholic acid **9** ทำการเพิ่มไนโตรเจนอะตอมด้วยการทำปฏิกิริยากับสารประกอบไดเอมีนที่มีความยาวของสายโซ่แตกต่างกัน ซึ่งมีความยาวของสายโซ่ที่แตกต่างกันโดยมีการเพิ่มหมู่เมทิลีนทีละ 1 หมู่ พิจารณาจากโมเลกุลของสเตียรอยด์กลุ่มไบล์แอซิดที่ประกอบส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว และสารอนุพันธ์ที่จะทำการสังเคราะห์เป็นโมเลกุลที่มีความมีขั้วสูง วิธีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์จากไบล์แอซิดทั้งสองจึงเลือกทำการสังเคราะห์โดยเทคนิควิทยุภาคของแข็ง ทั้งนี้เพื่อสะดวกในการทำให้สารผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์ได้ง่ายขึ้นและไม่เสียผลิตภัณฑ์ ในขณะที่ทำการแยกให้บริสุทธิ์เช่นในขั้นตอนการทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี เมื่อทำการพิสูจน์โครงสร้างของไบล์แอซิดด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ได้ผลดังต่อไปนี้

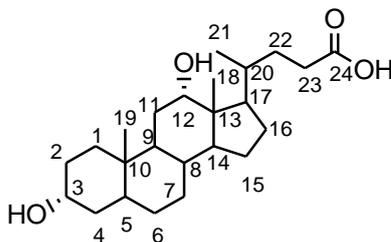
Cholic acid **44**



**44**

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.61 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 6.2 Hz, H-21), 1.19-1.92 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.07-2.26 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 3.20-3.30 (1H, m, H-3), 3.69 (1H, m, H-7) และ 3.85 (1H, m, H-12)

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.7 (C-21), 23.2 (C-19), 24.2 (C-15), 27.9 (C-9), 28.6 (C-16), 29.6 (C-11), 31.2 (C-2), 32.0 (C-22), 32.3 (C-23), 35.9 (C-6), 35.9 (C-10), 36.5 (C-1), 36.7 (C-20), 40.5 (C-4), 41.0 (C-8), 43.0 (C-14), 43.2 (C-5), 47.5 (C-13), 48.0 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3), 74.0 (C-12) และ 178.2 (C-24)

Deoxycholic acid **9****9**

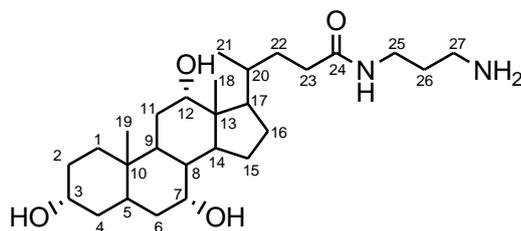
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.57 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 6.2 Hz, H-21), 0.93-1.75 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.01-2.26 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 3.17 (1H, m, H-3) และ 3.82 (1H, m, H-12)

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.4 (C-21), 23.5 (C-19), 24.7 (C-15), 27.3 (C-7), 28.2 (C-6), 28.4 (C-16), 29.7 (C-11), 30.9 (C-2), 31.8 (C-22), 32.1 (C-23), 34.6 (C-9), 35.1 (C-10), 36.3 (C-1), 36.5 (C-20), 37.0 (C-4), 37.2 (C-8), 43.4 (C-5), 47.4 (C-13), 47.9 (C-17), 49.1 (C-14), 72.3 (C-3), 73.8 (C-12) และ 178.0 (C-24)

ข้อมูลจากการวิเคราะห์โครงสร้างของโพลีแอซิดตั้งต้นด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ที่แสดงไว้ข้างต้นนี้ จะนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างของโพลีแอซิดเอไมด์สังเคราะห์ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของ ค่า chemical shift ของ  $^{13}\text{C}$  ของหมู่เอไมด์ (-CONH) จะปรากฏสัญญาณที่  $\delta$  176.0-177.0 ppm และสามารถตรวจสอบได้อย่างชัดเจนจากมวลโมเลกุลของสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรสโกปี ข้อมูลของโพลีแอซิดเอไมด์สังเคราะห์แสดงได้ดังต่อไปนี้

4.1.1 สารสังเคราะห์ *N*-(3-Aminopropyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide

50a



50a

สาร **50a** สังเคราะห์จาก Cholic acid **44** ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diaminopropane สาร **50a** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 72.32 และพิสูจน์โครงสร้างสาร **50a** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

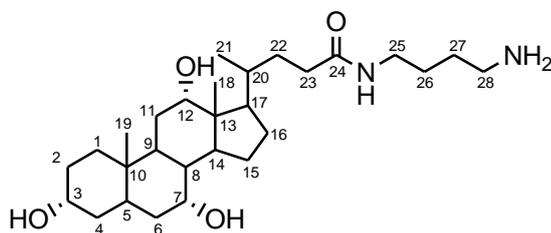
IR :  $\nu_{\max}$  1230 (C-N stretching), 1659 (C=O stretching ของ CONH), 2850, 2920 (C-H stretching) และ 3359 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.60 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 5.8 Hz, H-21), 1.17-2.22 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.81 (2H, t,  $J$  = 6.8 Hz, H-27), 2.93 (2H, t,  $J$  = 7.4 Hz, H-25), 3.15-3.19 (1H, m, H-3), 3.70 (1H, m, H-7), 3.85 (1H, m, H-12) และ 7.86 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.7 (C-21), 22.8 (C-19), 24.2 (C-15), 27.9 (C-9), 28.7 (C-16), 28.9 (C-26), 29.6 (C-11), 31.2 (C-2), 33.3 (C-22), 34.0 (C-23), 35.7 (C-6), 35.8 (C-25), 35.8 (C-10), 36.8 (C-1), 37.0 (C-20), 38.2 (C-27), 40.5 (C-4), 41.0 (C-8), 42.8 (C-14), 43.1 (C-5), 47.5 (C-13), 48.0 (C-17), 68.9 (C-7), 73.2 (C-3), 74.0 (C-12) และ 177.9 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  465.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (81%)

4.1.2 สารสังเคราะห์ *N*-(4-Aminobutyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide  
50b



50b

สาร **50b** สังเคราะห์จาก Cholic acid **44** ทำปฏิกิริยากับ 1,4-diaminobutane สาร **50b** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 77.09 และพิสูจน์โครงสร้างสาร **50b** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

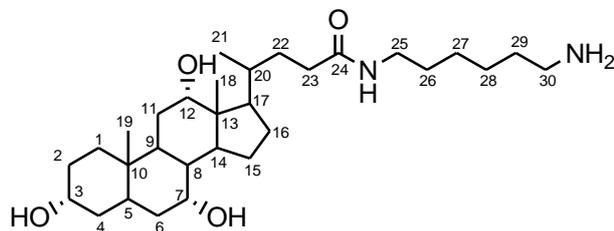
IR :  $\nu_{\max}$  1204 (C-N stretching), 1672 (C=O stretching ของ CONH), 2857, 2925 (C-H stretching) และ 3435 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.65 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 5.0 Hz, H-21), 1.19-2.23 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.80-2.93 (2H, m, H-28), 3.13 (2H, m, H-25), 3.24 (1H, m, H-3), 3.73 (1H, m, H-7), 3.89 (1H, m, H-12) และ 7.91 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.8 (C-21), 23.2 (C-19), 24.3 (C-15), 25.9 (C-26), 27.5 (C-27), 28.0 (C-9), 28.7 (C-16), 29.7 (C-11), 31.2 (C-2), 33.3 (C-22), 34.1 (C-23), 36.0 (C-6), 36.1 (C-10), 36.5 (C-1), 37.0 (C-20), 39.5 (C-25), 40.4 (C-28), 40.5 (C-4), 41.0 (C-8), 43.1 (C-14), 43.2 (C-5), 47.5 (C-13), 48.0 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3), 74.1 (C-12) และ 177.1 (C-24)

MS (positive mode) :  $m/z$  477.35  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (4.5%)

4.1.3 สารสังเคราะห์ *N*-(6-Aminohexyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide  
50c



50c

สาร 50c สังเคราะห์จาก Cholic acid 44 ทำปฏิกิริยากับ 1,6-diaminohexane สาร 50c มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 56.80 และพิสูจน์โครงสร้างสาร 50c ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1203 (C-N stretching), 1677 (C=O stretching ของ CONH), 2862, 2935 (C-H stretching) และ 3394 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

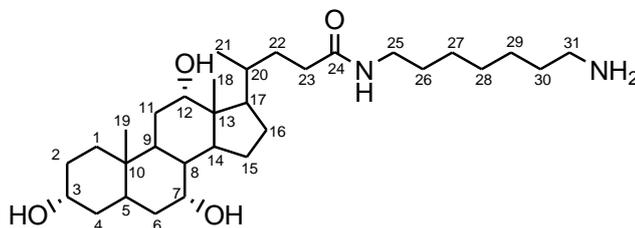
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.58 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 6.2 Hz, H-21), 1.15-2.21 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.78 (2H, t,  $J$  = 7.1 Hz, H-30), 3.03 (2H, t,  $J$  = 6.6 Hz, H-25), 3.17-3.18 (1H, m, H-3), 3.67 (1H, m, H-7), 3.84 (1H, m, H-12) และ 7.85 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.8 (C-21), 23.2 (C-19), 24.2 (C-15), 27.0 (C-26), 27.3 (C-29), 28.0 (C-9), 28.5 (C-16), 29.6 (C-11), 30.2 (C-28), 31.2 (C-2), 33.5 (C-22), 34.3 (C-23), 35.7 (C-27), 35.9 (C-6), 36.1 (C-10), 36.5 (C-1), 36.8 (C-20), 37.0 (C-25), 40.1 (C-4), 40.7 (C-30), 41.0 (C-8), 43.1 (C-14), 43.2 (C-5), 47.6 (C-13), 48.1 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3), 74.1 (C-12) และ 176.9 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  507.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (40%)

4.1.4 สารสังเคราะห์ *N*-(7-Aminoheptyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide

50d



50d

สาร 50d สังเคราะห์จาก Cholic acid 44 ทำปฏิกิริยากับ 1,7-diaminoheptane สาร 50d มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 48.18 และพิสูจน์โครงสร้างสาร 50d ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1202 (C-N stretching), 1659 (C=O stretching ของ CONH), 2851, 2922 (C-H stretching) และ 3359 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

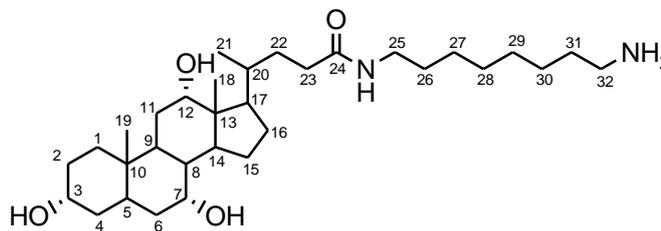
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.61 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 6.2$  Hz, H-21), 1.19-2.25 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.81 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-31), 3.06 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz, H-25), 3.21-3.22 (1H, m, H-3), 3.71 (1H, m, H-7), 3.86 (1H, m, H-12) และ 7.88 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.8 (C-21), 23.2 (C-19), 24.3 (C-15), 27.4 (C-26), 28.0 (C-9), 28.5 (C-30), 28.7 (C-16), 29.7 (C-11), 29.8 (C-29), 31.2 (C-2), 33.4 (C-22), 33.5 (C-28), 34.1 (C-23), 35.7 (C-6), 35.9 (C-27), 36.1 (C-10), 36.5 (C-1), 36.8 (C-20), 37.0 (C-25), 40.5 (C-4), 40.8 (C-31), 41.1 (C-8), 43.1 (C-14), 43.2 (C-5), 47.6 (C-13), 47.8 (C-17), 69.1 (C-7), 72.9 (C-3), 74.1 (C-12) และ 176.9 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  521.6  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (95%)

4.1.5 สารสังเคราะห์ *N*-(8-Aminoethyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide

50e



50e

สาร **50e** สังเคราะห์จาก Cholic acid **44** ทำปฏิกิริยากับ 1,8-diaminooctane สาร **50e** มีลักษณะเป็นออยล์สีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 43.07 และพิสูจน์โครงสร้างสาร **50e** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีได้ผลดังนี้

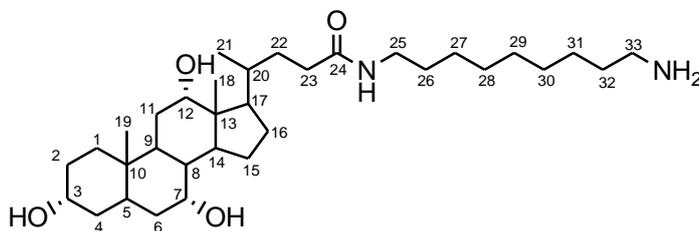
IR :  $\nu_{\max}$  1253 (C-N stretching), 1619 (C=O stretching ของ CONH), 2851, 2924 (C-H stretching) และ 3432 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.59 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-21), 1.18-2.12 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.75-2.87 (2H, m, H-32), 3.05 (2H, m, H-25), 3.20 (1H, m, H-3), 3.42 (1H, m, H-7), 3.85 (1H, m, H-12) และ 7.86 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.8 (C-21), 22.8 (C-19), 24.2 (C-15), 27.4 (C-26), 27.8 (C-31), 27.9 (C-9), 28.5 (C-16), 29.6 (C-11), 30.0 (C-28), 30.0 (C-29), 30.5 (C-30), 31.2 (C-2), 33.5 (C-22), 34.3 (C-23), 35.7 (C-27), 35.9 (C-6), 36.1 (C-10), 36.8 (C-1), 37.0 (C-20), 38.9 (C-25), 40.3 (C-4), 40.8 (C-32), 41.0 (C-8), 42.8 (C-14), 43.1 (C-5), 47.6 (C-13), 47.8 (C-17), 68.9 (C-7), 73.2 (C-3), 74.0 (C-12) และ 176.8 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  535.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%)

4.1.6 สารสังเคราะห์ *N*-(9-Aminononyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide  
50f



50f

สาร **50f** สังเคราะห์จาก Cholic acid **44** ทำปฏิกิริยากับ 1,9-diaminononane สาร **50f** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 57.27 และพิสูจน์โครงสร้างสาร **50f** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีได้ผลดังนี้

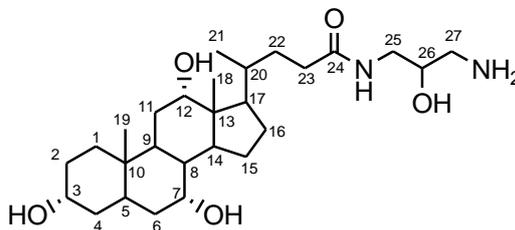
IR :  $\nu_{\max}$  1202 (C-N stretching), 1672 (C=O stretching ของ CONH), 2856, 2925 (C-H stretching) และ 3433 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.62 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 10.9$  Hz, H-21), 1.18-2.10 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.80 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-33), 3.03 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-25), 3.21 (1H, m, H-3), 3.73 (1H, m, H-7), 3.88 (1H, m, H-12) และ 7.91 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  12.3 (C-18), 18.2 (C-21), 23.7 (C-19), 24.1 (C-15), 27.4 (C-26), 27.9 (C-32), 28.0 (C-9), 28.6 (C-16), 29.7 (C-31), 29.8 (C-11), 30.1 (C-28), 30.1 (C-30), 30.4 (C-29), 31.0 (C-2), 33.1 (C-22), 33.9 (C-23), 35.4 (C-27), 35.9 (C-6), 35.9 (C-10), 36.2 (C-1), 36.8 (C-20), 39.0 (C-25), 40.4 (C-4), 40.8 (C-33), 41.5 (C-8), 43.2 (C-14), 44.3 (C-5), 47.8 (C-13), 47.8 (C-17), 68.4 (C-7), 72.1 (C-3), 73.3 (C-12) และ 176.3 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  549.6  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (39%)

4.1.7 สารสังเคราะห์ *N*-(3-Amino-2-hydroxypropyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 50g



50g

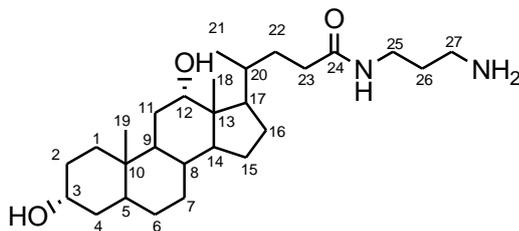
สาร 50g สังเคราะห์จาก Cholic acid 44 ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diamino-2-propanol สาร 50g มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 67.27 และพิสูจน์โครงสร้างสาร 50g ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1203 (C-N stretching), 1673 (C=O stretching ของ CONH), 2862, 2924 (C-H stretching) และ 3428 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.54 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.98 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 11.3 Hz, H-21), 0.96-2.09 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.80 (2H, t, H-27), 3.09 (2H, m, H-25), 3.13-3.14 (2H, m, H-3 $\beta$  และ H-26), 3.67 (1H, m, H-7 $\beta$ ), 3.79 (1H, m, H-12 $\beta$ ) และ 7.89 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.0 (C-18), 17.6 (C-21), 22.7 (C-19), 24.2 (C-15), 27.9 (C-9), 28.7 (C-16), 29.6 (C-11), 31.2 (C-2), 33.2 (C-22), 33.8 (C-23), 35.9 (C-6), 35.9 (C-10), 36.5 (C-1), 37.0 (C-20), 40.5 (C-4), 41.0 (C-8), 43.1 (C-14), 43.2 (C-5), 43.7 (C-25), 43.9 (C-27), 47.5 (C-13), 48.0 (C-17), 68.0 (C-26), 68.9 (C-7), 73.2 (C-3), 74.0 (C-12) และ 177.9 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  481.6  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (61%)

4.1.8 สารสังเคราะห์ *N*-(3-Aminopropyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 51a

51a

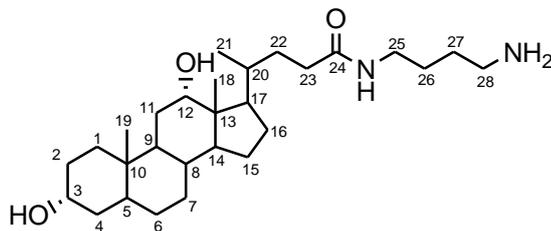
สาร **51a** สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid **9** ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diaminopropane สาร **51a** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 58.18 และพิสูจน์โครงสร้างสาร **51a** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1203 (C-N stretching), 1677 (C=O stretching ของ CONH), 2858, 2925 (C-H stretching) และ 3294 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.58 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 6.0 Hz, H-21), 0.95-2.19 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.78 (2H, t,  $J$  = 7.1 Hz, H-27), 3.13 (2H, t,  $J$  = 6.7 Hz, H-25), 3.17 (1H, m, H-3), 3.84 (1H, m, H-12) และ 7.84 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.2 (C-18), 17.7 (C-21), 23.3 (C-19), 24.8 (C-15), 27.3 (C-7), 28.0 (C-6), 28.7 (C-16), 28.9 (C-26), 29.9 (C-11), 31.1 (C-2), 33.3 (C-22), 34.0 (C-23), 34.7 (C-9), 34.9 (C-10), 35.7 (C-25), 36.1 (C-1), 36.5 (C-20), 36.9 (C-4), 37.4 (C-8), 38.2 (C-27), 43.3 (C-5), 47.6 (C-13), 48.1 (C-17), 49.6 (C-14), 72.6 (C-3), 74.1 (C-12) และ 177.9 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  449.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%)

4.1.9 สารสังเคราะห์ *N*-(4-Aminobutyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 51b

51b

สาร **51b** สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid **9** ทำปฏิกิริยากับ 1,4-diaminobutane สาร **51b** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 47.87 และยืนยันโครงสร้างสาร **51b** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1203 (C-N stretching), 1680 (C=O stretching ของ CONH), 2857, 2930 (C-H stretching) และ 3384 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

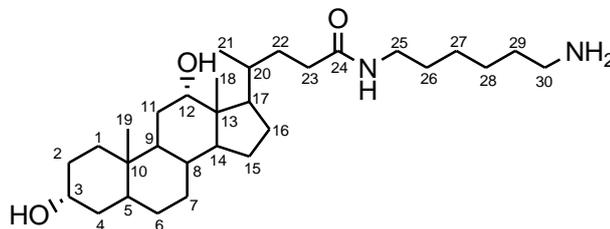
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.63 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 5.6 Hz, H-21), 1.03-2.18 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.86 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-28), 3.12 (2H, m, H-25), 3.23 (1H, m, H-3), 3.88 (1H, m, H-12) และ 7.90 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.5 (C-18), 18.0 (C-21), 24.0 (C-19), 25.1 (C-15), 26.2 (C-26), 27.7 (C-27), 27.8 (C-7), 28.7 (C-6), 29.0 (C-16), 30.1 (C-11), 31.4 (C-2), 33.6 (C-22), 34.5 (C-23), 35.2 (C-9), 35.6 (C-10), 36.7 (C-1), 37.2 (C-20), 37.5 (C-4), 37.8 (C-8), 39.8 (C-25), 40.7 (C-28), 43.9 (C-5), 47.9 (C-13), 48.5 (C-17), 49.9 (C-14), 72.9 (C-3), 74.3 (C-12) และ 177.4 (C-24)

MS (positive mode) :  $m/z$  462.39 [M] (7%)

4.1.10 สารสังเคราะห์ *N*-(6-Aminohexyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide

51c



51c

สาร **51c** สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid **9** ทำปฏิกิริยากับ 1,6-diaminohexane สาร **51c** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 58.93 และยืนยันโครงสร้างสาร **51c** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1204 (C-N stretching), 1677 (C=O stretching ของ CONH), 2850, 2918 (C-H stretching) และ 3355 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

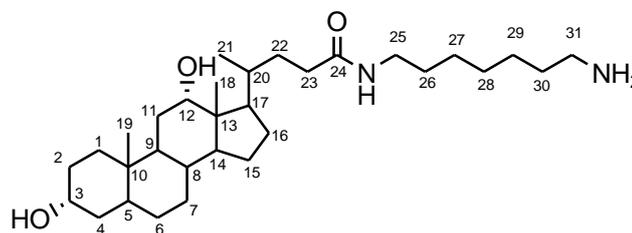
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.62 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 5.9$  Hz, H-21), 0.98-2.16 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.83 (2H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-30), 3.08 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-25), 3.23 (1H, m, H-3), 3.87 (1H, m, H-12) และ 7.89 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.2 (C-18), 17.7 (C-21), 23.7 (C-19), 24.9 (C-15), 27.0 (C-26), 27.3 (C-29), 27.5 (C-7), 28.4 (C-6), 28.5 (C-16), 29.9 (C-11), 30.2 (C-28), 31.1 (C-2), 33.4 (C-22), 34.2 (C-23), 34.9 (C-9), 35.3 (C-10), 35.7 (C-27), 36.5 (C-1), 36.9 (C-20), 37.2 (C-4), 37.5 (C-8), 40.0 (C-25), 40.7 (C-30), 43.7 (C-5), 47.6 (C-13), 48.2 (C-17), 49.6 (C-14), 72.6 (C-3), 74.1 (C-12) และ 176.9 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  491.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%)

4.1.11 สารสังเคราะห์ *N*-(7-Aminoheptyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide

51d



51d

สาร **51d** สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid **9** ทำปฏิกิริยากับ 1,7-diaminoheptane สาร **51d** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 63.64 และยืนยันโครงสร้างสาร **51d** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1202 (C-N stretching), 1655 (C=O stretching ของ CONH), 2851, 2922 (C-H stretching) และ 3359 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

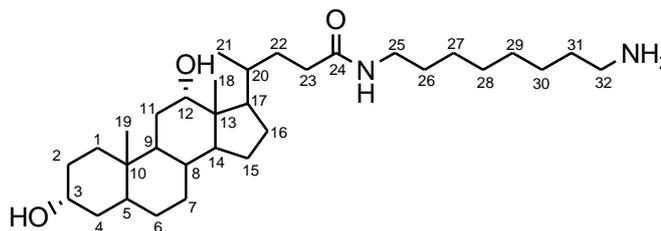
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.58 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 5.9 Hz, H-21), 0.94-2.12 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.79 (2H, t,  $J$  = 7.0 Hz, H-31), 3.03 (2H, t,  $J$  = 6.8 Hz, H-25), 3.19 (1H, m, H-3), 3.84 (1H, m, H-12) และ 7.93 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.7 (C-18), 18.1 (C-21), 24.2 (C-19), 25.2 (C-15), 27.4 (C-26), 28.1 (C-6), 28.1 (C-7), 28.1 (C-30), 28.4 (C-16), 29.7 (C-11), 29.7 (C-29), 31.2 (C-2), 33.1 (C-28), 33.8 (C-22), 34.1 (C-23), 34.6 (C-9), 35.2 (C-10), 35.9 (C-27), 36.3 (C-1), 37.0 (C-25), 37.4 (C-20), 37.0 (C-4), 38.0 (C-8), 40.3 (C-31), 44.1 (C-5), 47.4 (C-13), 48.0 (C-17), 49.1 (C-14), 72.8 (C-3), 74.6 (C-12) และ 176.5 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  505.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%)

4.1.12 สารสังเคราะห์ *N*-(8-Aminoethyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide

51e



51e

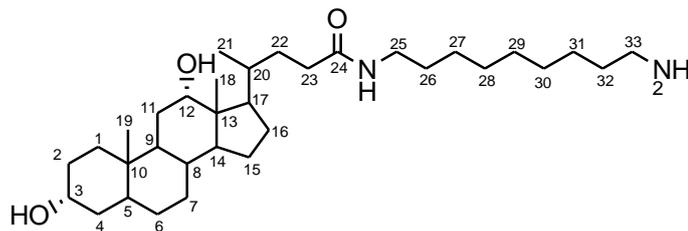
สาร **51e** สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid **9** ทำปฏิกิริยากับ 1,8-diaminooctane สาร **51e** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 47.84 และยืนยันโครงสร้างสาร **51e** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1203 (C-N stretching), 1616 (C=O stretching ของ CONH), 2857, 2924 (C-H stretching) และ 3435 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.62 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 6.0 Hz, H-21), 1.02-2.20 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.82 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-32), 3.06 (2H, t,  $J$  = 6.9 Hz, H-25), 3.22 (1H, m, H-3), 3.87 (1H, m, H-12) และ 7.95 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  13.2 (C-18), 17.7 (C-21), 23.7 (C-19), 24.9 (C-15), 27.4 (C-26), 27.5 (C-7), 27.8 (C-31), 28.5 (C-6), 28.7 (C-16), 30.0 (C-11), 30.1 (C-28), 30.1 (C-29), 30.4 (C-30), 31.1 (C-2), 33.5 (C-22), 34.3 (C-23), 34.9 (C-9), 35.4 (C-10), 35.7 (C-27), 36.5 (C-1), 36.9 (C-20), 37.3 (C-4), 37.5 (C-8), 38.9 (C-25), 40.8 (C-32), 43.7 (C-5), 47.6 (C-13), 48.2 (C-17), 49.6 (C-14), 72.6 (C-3), 74.1 (C-12) และ 176.9 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  519.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%)

4.1.13 สารสังเคราะห์ *N*-(9-Aminononyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide 51f

51f

สาร **51f** สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid **9** ทำปฏิกิริยากับ 1,9-diaminononane สาร **51f** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 76.36 และยืนยันโครงสร้างสาร **51f** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

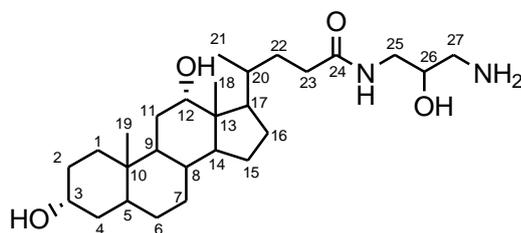
IR :  $\nu_{\max}$  1202 (C-N stretching), 1673 (C=O stretching ของ CONH), 2857, 2925 (C-H stretching) และ 3434 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.57 (3H, s, H-18), 0.69 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20} = 12.0$  Hz, H-21), 1.03-2.06 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.76 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-33), 3.06 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-25), 3.17 (1H, m, H-3), 3.83 (1H, m, H-12) และ 7.94 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  12.7 (C-18), 18.1 (C-21), 23.5 (C-19), 24.3 (C-15), 27.4 (C-7), 27.4 (C-26), 27.9 (C-32), 28.2 (C-6), 28.6 (C-16), 28.6 (C-31), 30.1 (C-11), 30.1 (C-28), 30.1 (C-30), 30.2 (C-29), 30.3 (C-2), 33.2 (C-22), 34.0 (C-23), 35.1 (C-10), 35.3 (C-27), 35.8 (C-9), 36.0 (C-20), 36.1 (C-1), 37.0 (C-8), 37.1 (C-4), 38.9 (C-25), 40.8 (C-33), 43.4 (C-5), 46.5 (C-13), 48.2 (C-17), 49.6 (C-14), 72.2 (C-3), 72.2 (C-12) และ 176.4 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  533.6  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (33%)

4.1.14 สารสังเคราะห์ที่ *N*-(3-Amino-2-hydroxypropyl)-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amide **51g**



**51g**

สาร **51g** สังเคราะห์จาก Deoxycholic acid **9** ทำปฏิกิริยากับ 1,3-diamino-2-propanol สาร **51g** มีลักษณะคล้ายน้ำมันสีเหลือง มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 70.00 และพิสูจน์โครงสร้างสาร **51g** ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ผลดังนี้

IR :  $\nu_{\max}$  1213 (C-N stretching), 1616 (C=O stretching ของ CONH), 2868, 2925 (C-H stretching) และ 3417 (O-H stretching และ N-H stretching)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.60 (3H, s, H-18), 0.73 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, d,  $J_{\text{H}21,\text{H}20}$  = 11.9 Hz, H-21), 1.06-2.16 (m,  $-\text{CH}_2$ ), 2.86 (2H, m, H-27), 3.00 (2H, m, H-25), 3.20 (2H, m, H-3 $\beta$  และ H-26), 3.99 (1H, m, H-12 $\beta$ ) และ 7.97 (2H, s,  $\text{NH}_2$ )

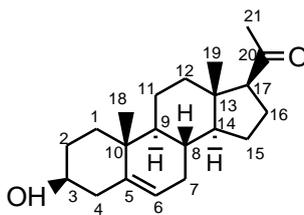
$^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  12.6 (C-18), 18.1 (C-21), 23.6 (C-19), 24.3 (C-15), 27.1 (C-9), 28.7 (C-6), 28.2 (C-16), 30.0 (C-11), 31.1 (C-2), 33.0 (C-22), 33.8 (C-23), 35.0 (C-9), 35.1 (C-10), 36.1 (C-1), 36.8 (C-20), 37.0 (C-8), 37.1 (C-4), 43.4 (C-5), 43.6 (C-25), 43.9 (C-27), 47.6 (C-13), 48.2 (C-17), 49.1 (C-14), 68.0 (C-26), 72.2 (C-3), 74.1 (C-12) และ 177.5 (C-24)

ESMS (positive mode) :  $m/z$  465.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (51%)

#### 4.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน

สเตียรอยด์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คือ Pregnenolone 7 เนื่องจากสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น แสดงความมีขั้วไม่สูงมากนัก วิธีการสังเคราะห์จึงเลือกใช้เทคนิคสารละลายและสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วย เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี การพิสูจน์โครงสร้างของ Pregnenolone 7 ด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ได้ผลดังต่อไปนี้

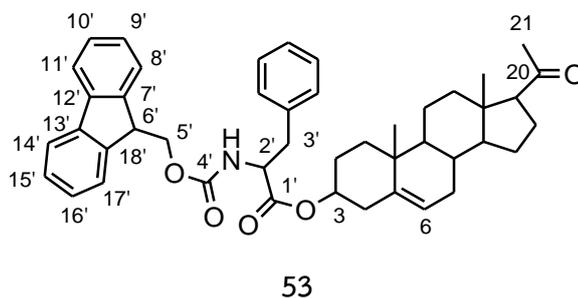
Pregnenolone 7



7

Szendli และคณะ [34] ได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างของ Pregnenolone 1 โดยเทคนิคนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่าสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  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);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz) :  $\delta$  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  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR กับ Pregnenolone 1 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ของบริษัท Fluka ได้ผล  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ;  $\delta$  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  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz) ;  $\delta$  37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-3), 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)

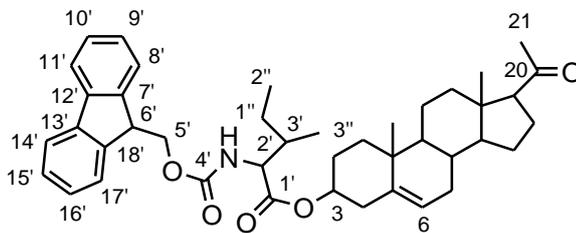
## 4.2.1 การสังเคราะห์ 3-Fmoc phenylalanine-pregnenolone ester 53



ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 และย้อมแผ่น TLC ด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.45 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 175-178 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 45.32 การพิสูจน์โครงสร้างด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสาร **53** จะกล่าวถึงเฉพาะข้อมูลที่ได้จากเทคนิคนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์ ( $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR) และบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณและมีสัญญาณเกิดขึ้นใหม่ สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัมของ  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร **53** พบสัญญาณที่  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  3.11 (2H, d, H-3'), 4.20 (1H, d, H-3) 4.60-4.66 (4H, m, H-2', H-5' และ H-6'), 5.37 (1H, d, H-6) และ 7.12-7.33, 7.37-7.42, 7.55-7.58 และ 7.75-7.78 ppm เป็นสัญญาณของแอรอมาติกโปรตอน และสเปกตรัมของ  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz) ของสาร **53** พบสัญญาณที่  $\delta$  75.2 (C-3), 63.6 (C-5'), 155.5 (C-4'), 170.8 (C-1'), 119.94-143.83 แอรอมาติกและโอลิฟินิกคาร์บอน และ 209.6 (C-20) ppm จาก  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมพบว่า H-3 มีการเคลื่อนของสัญญาณไปบริเวณที่มีค่า  $\delta$  สูงกว่าเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับค่า  $\delta$  ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ Pregnenolone **7** เนื่องจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) มีหมู่แทนที่ที่สามารถดึงอิเล็กตรอนเกาะอยู่ทำให้สัญญาณเคลื่อนที่ไปบริเวณที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนน้อยกว่า นอกจากนี้  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมยังปรากฏสัญญาณของกลุ่มคาร์บอนใหม่ได้แก่ คาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ (C-1'), คาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของคาร์บาเมต (C-4')

ESMS (positive mode) :  $m/z$  686.45  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (51%)

## 4.2.2 การสังเคราะห์ 3-Fmoc isoleucine-pregnenolone ester 54



54

ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 และย้อมแผ่น TLC ด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีเขียวของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.48 เมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : ethyl acetate อัตราส่วนเท่ากับ 95 : 5 ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 174-177 องศาเซลเซียส มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 40.45 การพิสูจน์โครงสร้างด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสาร **54** จะกล่าวถึงเฉพาะข้อมูลที่ได้จากเทคนิคนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์ ( $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR) และบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณและมีสัญญาณเกิดขึ้นใหม่ สรุปได้ดังนี้ สรุปได้ดังนี้ สเปกตรัมของ  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร **54** พบสัญญาณที่  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  4.22 (1H, d, H-3) 4.39 (1H, d, H-2'), 4.63-4.70 (3H, m, H-5' และ H-6'), 5.02 (1H, d, H-6) และ 7.28-7.33, 7.37-7.46, 7.58-7.68 และ 7.75-7.77 ppm เป็นสัญญาณของแอมโรมาติกโปรตอน และสเปกตรัมของ  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz) ของสาร **54** พบสัญญาณที่  $\delta$  36.57 (C-3'), 74.95 (C-3), 63.64 (C-5'), 156.08 (C-4'), 171.41 (C-1'), 119.96-143.91 แอมโรมาติกและโอลิฟินิกคาร์บอน และ 209.61 (C-20) ppm จาก  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมพบว่า H-3 มีการเคลื่อนของสัญญาณไปบริเวณที่มีค่า  $\delta$  สูงกว่าเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับค่า  $\delta$  ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ Pregnenolone **7** เนื่องจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) มีหมู่แทนที่ที่สามารถดึงอิเล็กตรอนเกาะอยู่ทำให้สัญญาณเคลื่อนที่ไปบริเวณที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนน้อยกว่า นอกจากนั้น  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมยังปรากฏสัญญาณของกลุ่มคาร์บอนใหม่ได้แก่ คาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ (C-1'), คาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของคาร์บาเมต (C-4')

ESMS (positive mode) :  $m/z$  666.45  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (45%)

### 4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

Cholic acid **44**, Deoxycholic acid **9**, สารอนุพันธ์ **50a-50g** และสารอนุพันธ์ **51a-51g** ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อราและยีสต์รวมทั้งหมด 35 ชนิด เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Streptococcus milleri* group, *S. sobrinus*, *S. pneumoniae*, *S. mutans* ATCC 27175, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. coagulase* negative, *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, *C. diphtheriae* และ *Enterococcus faecalis* 4373 (VRE) แบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholera*, *V. parahaemolyticus* เชื้อราได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* และยีสต์ได้แก่ *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* และ *C. tropicalis* โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method เปรียบเทียบกับตัวยา Vancomycin และรายงานผลด้วยค่า MIC (Minimal Inhibition Concentration) หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา (หรือสารตัวอย่าง) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธี Broth microdilution เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ในการทดสอบเป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อทางช่องปาก การอักเสบของผิวหนัง ปอดบวม เยื่อหูหัวใจอักเสบและเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด พบได้ที่ผิวหนัง จมูก การกระจายเชื้อโดยการสัมผัสและผ่านทางลมหายใจ ซึ่งในปัจจุบันพบว่าเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* ตื้อต่อยา Methicillin (MRSA) และ Vancomycin (VRSA), เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไอกรนในมนุษย์ และเชื้อรา *T. mentagrophytes* และ *T. rubrum* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคผิวหนัง (โรคกลาก) และยีสต์ *C. albicans* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดติดเชื้อในที่อับชื้นเช่นการติดเชื้อในช่องคลอด

#### 4.3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของ Cholic acid 44 และสารอนุพันธ์ 50a-50g

จากตารางที่ 4.1 พบว่า Cholic acid **44** ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด ยกเว้น *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุพันธ์ **50a-50g** ในที่นี้จะรายงานเฉพาะค่า MIC ของสารอนุพันธ์ที่มีค่า MIC ต่ำกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถสรุปได้ดังนี้

สารอนุพันธ์ **50a** มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. mutans* ATCC 27175 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในทางตรงกันข้ามการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ **50a** ลดลงต่อเชื้อ *C. diphtheriae* เมื่อเปรียบเทียบกับ Cholic acid **44**

สารอนุพันธ์ **50b** มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. mutans* ATCC 27175, *S. sobrinus* และ *V. parahaemolyticus* มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ **50c** มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175 และ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 50d มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. milleri* group และ *S. mutans* ATCC 27175 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 50e ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทุกชนิด

สารอนุพันธ์ 50f มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. mutans* ATCC 27175 มีค่า MIC เท่ากับ 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *S. aureus* MRSA 20652 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 50g มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20636 และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. coagulase* negative, *S. aureus* MRSA N1 และ *S. aureus* MRSA 20625 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์พบว่า สารอนุพันธ์ 50a-50g ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อราได้แก่ *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* และยีสต์ได้แก่ *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* และ *C. tropicalis* โดยมีค่า MIC มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Cholic acid 44 และ สารอนุพันธ์ 50a-50g  
เปรียบเทียบกับตัวยา Vancomycin

แบคทีเรีย	ค่า MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)								
	Vancomycin	44	50a	50b	50c	50d	50e	50f	50g
<i>Streptococcus milleri</i> group	4.0	>100	25	12.5	12.5	12.5	>100	12.5	6.25
<i>S. pneumoniae</i>	3.0	>100	>100	50	100	>100	>100	100	>100
<i>S. mutans</i> ATCC 27175	0.016	>100	6.25	25	12.5	12.5	>100	3.125	100
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.0	>100	>100	50	50	50	>100	100	100
<i>Staphylococcus coagulase</i> negative	0.094	>100	>100	50	100	100	>100	25	25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 26633	6.0	>100	>100	100	50	50	>100	100	100
<i>Bordetella pertussis</i>	3.0	>100	>100	50	100	100	>100	100	50
<i>C. diphtheriae</i>	1.0	50	>100	6.25	12.5	1.56	>100	6.25	1.56
<i>Streptococcus sobrinus</i>	1.0	>100	>100	25	100	50	>100	100	>100
<i>Vibrio cholerae</i>	-	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>V. parahaemolyticus</i>	3.0	>100	>100	25	100	100	>100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA N1	2.0	>100	100	50	100	100	>100	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20625	-	>100	>100	50	100	100	>100	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20626	-	>100	>100	50	100	50	>100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20627	-	>100	>100	50	50	>100	>100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20628	2.0	>100	>100	50	>100	>100	>100	100	>100
<i>S. aureus</i> MRSA 20630	1.5	>100	>100	100	>100	>100	>100	100	>100
<i>S. aureus</i> MRSA 20631	48.0	>100	>100	100	>100	>100	>100	100	>100
<i>S. aureus</i> MRSA 20632	3.0	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>S. aureus</i> MRSA 20633	1.0	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	12.5
<i>S. aureus</i> MRSA 20635	8.0	>100	>100	100	100	>100	>100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA 20636	1.5	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	12.5
<i>S. aureus</i> MRSA 20652	0.25	>100	100	50	100	100	>100	12.5	>100
<i>S. aureus</i> MRSA 20653	2.0	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>S. aureus</i> MRSA 20654	1.5	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	100
<i>S. aureus</i> VRSA 20622	32.0	>100	100	100	>100	100	>100	>100	100
<i>S. aureus</i> VRSA 20623	32.0	>100	>100	100	>100	100	>100	>100	>100
<i>S. aureus</i> VRSA 20624	-	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>S. aureus</i> VRSA 21083	32.0	>100	>100	100	>100	100	>100	>100	12.5
<i>E. faecalis</i> 4737 (VRE)	32.0	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100

#### 4.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของ Deoxycholic acid 9 และ สารอนุพันธ์ 51a-51g

จากตารางที่ 4.2 พบว่า Deoxycholic acid 9 ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ยกเว้น *S. milleri* group และ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 100 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารอนุพันธ์ 51a-51g พบว่าสารอนุพันธ์ส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีกว่า Deoxycholic acid 9 ในที่นี้จะรายงานเฉพาะค่า MIC ของสารอนุพันธ์ที่มีค่า MIC ต่ำกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

สารอนุพันธ์ 51a มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. mutans* ATCC 27175 และ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. aureus* MRSA 20628 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. aureus* MRSA 20636 มีค่า MIC เท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *S. coagulase negative*, *B. pertussis* และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20624 และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 51b มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. pneumoniae*, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coagulase negative*, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20633 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *B. pertussis*, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. aureus* ATCC 25923, *S. sobrinus*, *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20653, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20622, *S. aureus* VRSA 20623 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 51c มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *C. diphtheriae*, *S. aureus* MRSA 20653, *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *S. coagulase negative*, *V. cholera*, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. aureus* ATCC 25923, *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20623, *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ 51d มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. milleri* group, *S. mutans* ATCC 27175, *C. diphtheriae*, *S. aureus* MRSA 20653, *S. aureus* VRSA 20622, *S. aureus* VRSA 21083 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *S. coagulase negative*, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* VRSA 20623 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 26633, *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20630, *S.*

*aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20624 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ **51e** มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. aureus* MRSA 20627 มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *B. subtilis* ATCC 26633 และ *S. sobrinus* มีค่า MIC เท่ากับ 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. pneumoniae*, *B. pertussis*, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* VRSA 20622 มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coagulase* negative, *C. diphtheriae*, *S. aureus* MRSA 20625, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* MRSA 20636, *S. aureus* MRSA 20652, *S. aureus* VRSA 20623 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *V. cholera*, *S. aureus* MRSA N1, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20654, *S. aureus* VRSA 20624, *S. aureus* VRSA 21083 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ **51f** มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *S. mutans* ATCC 27175 และ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *S. coagulase* negative, *S. aureus* MRSA 20652 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารอนุพันธ์ **51g** มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. milleri* group, *S. aureus* MRSA 20631, *S. aureus* MRSA 20633, *S. aureus* MRSA 20635, *S. aureus* MRSA 20653 และ *E. faecalis* 4373 (VRE) มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. mutans* ATCC 27175, *S. coagulase* negative, *B. subtilis* ATCC 26633, *S. aureus* MRSA 20654 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, *S. pneumoniae*, *S. aureus* ATCC 25923, *B. pertussis*, *S. sobrinus*, *S. aureus* MRSA 20626, *S. aureus* MRSA 20627, *S. aureus* MRSA 20628, *S. aureus* MRSA 20630, *S. aureus* MRSA 20632, *S. aureus* VRSA 20622, *S. aureus* VRSA 20623 และ *S. aureus* VRSA 21083 มีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์พบว่า สารอนุพันธ์ **51a-51g** ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อราได้แก่ *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* และยีสต์ได้แก่ *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* และ *C. tropicalis* โดยมีค่า MIC มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ Deoxycholic acid 9 และ สารอนุพันธ์ 51a-51g  
เปรียบเทียบกับตัวยา Vancomycin

แบคทีเรีย	ค่า MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)								
	Vancomycin	9	51a	51b	51c	51d	51e	51f	51g
<i>Streptococcus milleri</i> group	4.0	100	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
<i>S. pneumoniae</i>	3.0	>100	12.5	6.25	12.5	12.5	6.25	100	25
<i>S. mutans</i> ATCC 27175	0.016	>100	3.125	6.25	6.25	6.25	12.5	0.78	12.5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.0	>100	25	25	25	25	3.125	100	25
<i>Staphylococcus coagulase</i> negative	0.094	>100	12.5	6.25	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 26633	6.0	>100	50	50	100	25	3.125	100	12.5
<i>Bordetella pertussis</i>	3.0	>100	12.5	12.5	50	50	6.25	100	25
<i>C. diphtheriae</i>	1.0	50	3.125	3.125	6.25	6.25	12.5	0.78	1.56
<i>Streptococcus sobrinus</i>	1.0	>100	50	25	50	50	3.125	100	25
<i>Vibrio cholerae</i>	-	>100	>100	>100	12.5	100	25	>100	100
<i>V. parahaemolyticus</i>	3.0	>100	25	25	25	25	>100	100	100
<i>S. aureus</i> MRSA N1	2.0	>100	25	6.25	25	50	25	100	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20625	-	>100	50	6.25	50	50	12.5	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20626	-	>100	50	50	25	25	12.5	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20627	-	>100	25	6.25	25	25	6.25	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20628	2.0	>100	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20630	1.5	>100	25	50	25	25	6.25	100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20631	48.0	>100	25	12.5	25	25	6.25	100	6.25
<i>S. aureus</i> MRSA 20632	3.0	>100	10	25	50	50	12.5	>100	25
<i>S. aureus</i> MRSA 20633	1.0	>100	>100	6.25	100	50	50	100	6.25
<i>S. aureus</i> MRSA 20635	8.0	>100	50	12.5	50	50	25	100	6.25
<i>S. aureus</i> MRSA 20636	1.5	>100	>100	12.5	50	50	12.5	100	12.5
<i>S. aureus</i> MRSA 20652	0.25	>100	25	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	50
<i>S. aureus</i> MRSA 20653	2.0	>100	50	25	6.25	6.25	1.56	100	6.25
<i>S. aureus</i> MRSA 20654	1.5	>100	25	25	25	25	25	>100	12.5
<i>S. aureus</i> VRSA 20622	32.0	>100	50	25	50	6.25	6.25	>100	25
<i>S. aureus</i> VRSA 20623	32.0	>100	25	25	25	12.5	12.5	>100	25
<i>S. aureus</i> VRSA 20624	-	>100	25	12.5	25	25	25	>100	100
<i>S. aureus</i> VRSA 21083	32.0	>100	12.5	50	12.5	6.25	25	>100	25
<i>E. faecalis</i> 4737 (VRE)	32.0	>100	6.25	6.25	6.25	6.25	25	>100	6.25

จากผลการทดลองโดยภาพรวมการเพิ่มไนโตรเจนอะตอมเข้าที่โมเลกุลของไบล်แอซิดทั้งสองมีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเมื่อเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Cholic acid **44** และ Deoxycholic acid **9** จากหมู่คาร์บอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 24 (C-24) เป็นหมู่เอไมด์โดยการนำไบล်แอซิดทั้งสองทำปฏิกิริยากับสารประกอบไดเอมีน ถึงแม้สารอนุพันธ์ของไบล်แอซิดทั้งสองจะออกฤทธิ์ได้ไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับตัวยา Vancomycin แต่จากการทดลองพบว่าสารอนุพันธ์ของ Deoxycholic acid **9** มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีมากกว่าสารอนุพันธ์ของ Cholic acid **44** สารอนุพันธ์ของ Cholic acid **44** ได้แก่ สาร **50a-50d** และ **50f-50g** สามารถออกฤทธิ์ที่ดีกับเชื้อแบคทีเรียบางชนิด มีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 1.56-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารอนุพันธ์ของ Deoxycholic acid **9** ได้แก่ สาร **51a-51g** สามารถออกฤทธิ์ที่ดีกับเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์มากกว่า มีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.78-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้การออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์อาจมีความยาวของสายโซ่ไดเอมีนเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย

#### 4.3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสาร **53** และ สาร **54**

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์พบว่า สารอนุพันธ์ **53** และ **54** ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบทุกชนิด

#### 4.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

นำ Cholic acid **44**, Deoxycholic acid **9**, สารอนุพันธ์ **50a-50f** และสารอนุพันธ์ **51a-51f** มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero, เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากชนิด KB และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ยา Ellipticine (สำหรับเซลล์ Vero และเซลล์ KB) และ Doxorubicine (สำหรับเซลล์ MCF-7) เป็นตัวควบคุมเชิงบวกและใช้สารละลาย DMSO 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุมเชิงลบ

##### 4.4.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Cholic acid **44** และสารอนุพันธ์ **50a-50f**

จากการทดลองความเป็นพิษของ Cholic acid **44** ต่อเซลล์ไลน์ Vero, KB และ MCF-7 จากตารางที่ 4.3 เมื่อพิจารณาจากค่า  $IC_{50}$  พบว่า Cholic acid **44** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero และเซลล์ MCF-7 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 44.56 และ 24.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Cholic acid **44** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB ส่วนความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารอนุพันธ์ **50a-50f** ต่อเซลล์ไลน์ Vero, KB และ MCF-7 สรุปได้ดังนี้

สารอนุพันธ์ **50a** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7

สารอนุพันธ์ **50b** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, เซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7

สารอนุพันธ์ **50c** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero แต่จะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7

สารอนุพันธ์ **50d** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 32.12 และ 31.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ **50e** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 23.86 และ 30.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ **50f** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 25.95 และ 30.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.3** ค่า  $IC_{50}$  ของ Cholic acid **44** และสารอนุพันธ์ **50a-50f** เปรียบเทียบกับ Ellipticine และ Doxorubicine

สารตัวอย่าง	$IC_{50}$ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	Vero	KB	MCF-7
Cholic acid <b>44</b>	44.56	inactive	24.14
<b>50a</b>	Non cytotoxic	inactive	inactive
<b>50b</b>	Non cytotoxic	inactive	inactive
<b>50c</b>	Non cytotoxic	39.38	35.94
<b>50d</b>	-	32.12	31.84
<b>50e</b>	-	23.86	30.73
<b>50f</b>	-	25.95	30.29
Ellipticine	0.617	0.371	-
Doxorubicine	-	0.052	0.290

#### 4.4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Deoxycholic acid **9** และสารอนุพันธ์ **51a-51f**

จากการทดลองความเป็นพิษของ Deoxycholic acid **9** ต่อเซลล์ไลน์ Vero, KB และ MCF-7 จากตารางที่ 4.4 เมื่อพิจารณาจากค่า  $IC_{50}$  พบว่า Deoxycholic acid **9** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero และเซลล์ KB แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 46.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารอนุพันธ์ **51a-51f** ต่อเซลล์ไลน์ Vero, KB และ MCF-7 สรุปได้ดังนี้

สารอนุพันธ์ **51a** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7

สารอนุพันธ์ **51b** ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero จะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 14.49 และ 21.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ **51c** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero, เซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 46.34, 3.928 และ 9.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ **51d** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 14.19 และ 39.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ **51e** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 21.41 และ 17.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารอนุพันธ์ **51f** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ เซลล์ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 35.01 และ 22.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ค่า  $IC_{50}$  ของ Deoxycholic acid **9** และสารอนุพันธ์ **51a-51f** เปรียบเทียบกับ Ellipticine และ Doxorubicine

สารตัวอย่าง	$IC_{50}$ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	Vero	KB	MCF-7
Deoxycholic acid <b>9</b>	Non cytotoxic	inactive	46.04
<b>51a</b>	Non cytotoxic	inactive	inactive
<b>51b</b>	Non cytotoxic	14.49	21.91
<b>51c</b>	46.34	3.42	9.70
<b>51d</b>	-	14.19	39.97
<b>51e</b>	-	21.41	17.92
<b>51f</b>	-	35.01	22.67
Ellipticine	0.617	0.371	-
Doxorubicine	-	0.052	0.290

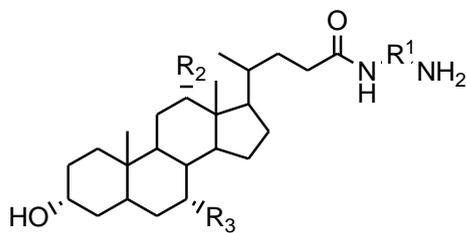
จากผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Cholic acid **44**, Deoxycholic acid **9** และสารอนุพันธ์ สรุปได้ว่าการเพิ่มไนโตรเจนอะตอมเข้าที่โมลกุลของ Cholic acid **44** และ Deoxycholic acid **9** มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ กล่าวคือสารอนุพันธ์ของโบลแอซิดส่วนใหญ่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบทั้งหมดอาจจะไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ดีเทียบเท่ากับ Ellipticine และ Doxorubicine แต่ก็สามารถออกฤทธิ์ได้ดีระดับหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น ยกเว้นสารอนุพันธ์ของ Cholic acid **44** มีผลต่อเซลล์ MCF-7 น้อยกว่า Cholic acid **44** ในขณะที่สารอนุพันธ์ **50c-50f** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB มากกว่า Cholic acid **44** ส่วน Deoxycholic acid **9** มีผลต่อเซลล์ MCF-7 น้อยกว่า Cholic acid **44** แต่สารอนุพันธ์ของ Deoxycholic acid **9** ได้แก่สาร **51b**, **51c**, **51e** และ **51f** มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 ที่ดีกว่า Cholic acid **44** และสารอนุพันธ์ **50c-50f** ส่วนความเป็นพิษต่อเซลล์ KB พบว่าสารอนุพันธ์ **51b-51f** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB ที่ดีโดยเฉพาะสาร **51c** มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 3.428 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หรือเท่ากับ 0.0069 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) และสาร **51c** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 9.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หรือเท่ากับ 0.0069 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) แต่สาร **51c** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ซึ่งถ้ามีโอกาสการนำไปใช้จริงอาจจะต้องคำนึงถึงเรื่องการเป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วย ทั้งนี้ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารอนุพันธ์ที่มีความยาวของสายโซ่เอมีนที่ต่างกันอาจจะเป็นส่วนหนึ่งของการเข้าทำลายเซลล์

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม

ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอะตอม ทำการเพิ่มไนโตรเจนอะตอมโดยเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลของ Cholic acid **44** และ Deoxycholic acid **9** ให้เป็นหมู่อะไมด์มีการเพิ่มไนโตรเจนอะตอม 2 อะตอม สารอนุพันธ์ **50a-50g** และ **51a-51g** โดยเทคนิควิศวกรรมของแข็ง พิสูจน์โครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่าอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้มีความถูกต้องของโครงสร้าง และมีความบริสุทธิ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ผลได้ร้อยละของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 40-80 สูตรโครงสร้างของสารอนุพันธ์ แสดงในรูปที่ 5.1



**50**  $R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{OH}$

**51**  $R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$

**50a, 51a:**  $R^1 = -(\text{CH}_2)_3-$

**50b, 51b:**  $R^1 = -(\text{CH}_2)_4-$

**50c, 51c**  $R^1 = -(\text{CH}_2)_6-$

**50d, 51d**  $R^1 = -(\text{CH}_2)_7-$

**50e, 51e**  $R^1 = -(\text{CH}_2)_8-$

**50f, 51f**  $R^1 = -(\text{CH}_2)_9-$

**50g, 51g:**  $R^1 = -\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$

รูปที่ 5.1 แสดงโครงสร้างของสเตียรอยด์สังเคราะห์

#### 5.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน

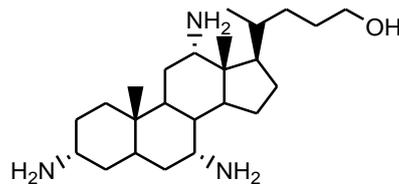
ได้สังเคราะห์อนุพันธ์สเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนโดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง Pregnenolone **7** กับกรดอะมิโนได้แก่ Fmoc phenylalanine และ Fmoc isoleucine ได้ผลิตภัณฑ์อะมิโนเอสเทอร์ของ Pregnenolone **53** และ **54** มีผลได้ร้อยละเท่ากับ 40

#### 5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

การเพิ่มไนโตรเจนอะตอมเข้าที่โมเลกุลของไบล์แอซิดทั้งสองมีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเมื่อเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ Cholic acid **44** และ Deoxycholic acid **9** จากหมู่คาร์บอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 24 (C-24) เป็นหมู่อะไมด์ โดยการนำไบล์แอซิดทั้งสองทำปฏิกิริยากับสารประกอบไดเอมีนที่มีความยาวของสายโซ่แตกต่างกัน พบว่าสารอนุพันธ์ของ Deoxycholic acid **9** มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีมากกว่าสารอนุพันธ์ของ Cholic acid **44**

สารอนุพันธ์ของ Cholic acid **44** ได้แก่ สาร **50a-50d** และ **50f-50g** สามารถออกฤทธิ์ที่ดีกับแบคทีเรีย *S. mutans* ATCC 27175 มีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 3.125-6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารอนุพันธ์ สาร **50b-50d** และ **50f-50g** สามารถออกฤทธิ์ที่ดีกับแบคทีเรีย *C. diphtheriae* มีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 1.56-12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารอนุพันธ์ของ Deoxycholic acid **9** ได้แก่ สาร **51a-51g** สามารถออกฤทธิ์ที่ดีกับเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์มากกว่า มีค่า MIC อยู่ในช่วง

ระหว่าง 0.78-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเฉพาะสาร **51f** สามารถออกฤทธิ์ที่ต่ำกว่าแบคทีเรีย *S. mutans* ATCC 27175 และ *C. diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร **51e** สามารถออกฤทธิ์ที่ต่ำกว่าเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* ต่อด้อยยา Methicillin (MRSA) และ Vancomycin (VRSA) ได้แก่ *S. aureus* MRSA 20653 และ *S. aureus* VRSA 20623 มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แนวความคิดของงานวิจัยนี้สอดคล้องกับจากงานวิจัยของ Savage และคณะ[35] ได้สังเคราะห์ triamine derivatives **55** จาก Cholic acid **44** พบว่าสารอนุพันธ์ **55** มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์



55

สำหรับสารอนุพันธ์อะมิโนเอสเทอร์ของ Pregnenolone **53** และ **54** ไม่มีฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด

#### 5.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

จากผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Cholic acid **44**, Deoxycholic acid **9** และสารอนุพันธ์ พบว่าการเพิ่มไนโตรเจนอะตอมเข้าที่โมเลกุลของ Cholic acid **44** และ Deoxycholic acid **9** มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ จะเห็นได้ว่าสารอนุพันธ์ของโบล์แอซิดส่วนใหญ่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น โดยที่สารอนุพันธ์ของ Deoxycholic acid **9** ได้แก่สาร **51b-51f** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าสารอนุพันธ์ของ Cholic acid **44** ซึ่งในที่นี้ขอกกล่าวเฉพาะที่ให้ผลการทดลองที่น่าสนใจคือ สาร **51c** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB และ MCF-7 ในระดับที่ดี มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 3.42 และ 9.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ในขณะที่เดียวกันสารอนุพันธ์ **51c** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero (มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 46.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งถ้ามีการนำไปพัฒนาเป็นตัวยานั้นอาจจะทำได้แต่เซลล์ปกติจะได้รับผลกระทบจากสารอนุพันธ์ **51c** ที่ใช้ด้วย ทั้งนี้จะต้องมีแนวทางการทดลองในขั้นที่สูงกว่าในระดับห้องปฏิบัติการหรือต้องมีการทดลองทางคลินิกเพิ่มขึ้นอีกทางหนึ่ง นอกจากนั้นแล้วยังทำให้ทราบว่าการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลของโบล์แอซิดเป็นหมู่เอไมด์ประกอบด้วยสายโซ่ยาวจะมีผลช่วยเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kihel และคณะ[22,23]

#### 5.5 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมกับสเตียรอยด์ชนิดอื่น พร้อมศึกษาถึงตำแหน่งการแทนที่ของหมู่อะมิโนบนวงของสเตียรอยด์ว่ามีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือไม่
2. เปลี่ยนรีเอเจนต์ที่ใช้ในปฏิกิริยา โดยให้มีหมู่อะมิโนเพิ่มขึ้นมากขึ้นเช่น กลุ่มพอลิเอมีน หรือสารกลุ่มเอซาเฮกเทอร์โรไซคลิก เป็นต้น นอกจากจะศึกษาในแง่ผลของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพแล้ว ยังคาดว่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายขณะทำการทดสอบได้ดีขึ้น

## บรรณานุกรม

- [1] ThaiBiz Center.com. 2011. บทความน่ารู้เรื่องสเตียรอยด์. [Online]. Available: <http://www.thaibizcenter.com/knowledgecenter.asp?kid=1184>.
- [2] สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2011. บราสลิโนสเตอรอยด์. [Online]. Available: <http://th.wikipedia.org/wiki/บราสลิโนสเตอรอยด์>.
- [3] P. Charoenying, N. Onsaeng, P. Unruean and W. Changin. 2013. Synthesis and Anticancer Activity of 3-Aminopregnenolone., 14<sup>th</sup> Tetrahedron Symposium: Challenges in Organic & Bioorganic Chemistry, 25-28 June 2013, Vienna, Austria.
- [4] P. Charoenying, P. Boonmanumsin, P. Sahasyodhin, C. Laosinwattana and Nuntana Aroonrerk. 2009. Modified Bile Acid: Preparation of Deoxycholic acid Amides and Their Biological Activities, 10<sup>th</sup> Tetrahedron Symposium: Challenges in Organic and Bioorganic Chemistry, 23-26 June 2009, Paris, France.
- [5] M. Gans and F. Bracher. 2014. First Total Synthesis of the Marine Steroid Alkaloid Plakinamine B., **Tetrahedron**. Vol. 70, pp. 1084-1090.
- [6] R. J. Simmonds, 1997. **Chemistry of Biomolecules: An Introduction**, Billing & Sons Ltd., Worcester.
- [7] G. Cravotto, A. Binello, L. Boffa, O. Rosati, M. Boccalini and S. Chimichi. 2006. Regio- and Stereoselective Reductions of Dehydrocholic acid., **Steroids**, Vol. 71, pp. 469-475.
- [8] C. Loncle, C. Salmi, Y. Letourneux and J. M. Brunel. 2007. Synthesis of New 7-Aminosterol Squalamine Analogues with High Antimicrobial Activities Through a Stereoselective Titanium Reductive Amination Reaction. **Tetrahedron**. Vol. 63, pp. 12968-12974.
- [9] S. N. Khan, Y. M. Jung, B. J. Kim, H. Cho, J. Lee and H. Kim. 2008. Synthesis and Activity of 7 $\alpha$ -Amino-23,24-Bisnor-5 $\alpha$ -Cholan-22-ol Derivatives., **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. Vol. 18, pp. 2558-2561.
- [10] S. N. Khan, S-Y. Bae and H-S. Kim. 2005. A Highly Stereoselective Reductive Amination of 3-Ketosteroid with Amines: an Improved Synthesis of 3 $\alpha$ -aminosteroid., **Tetrahedron Letters**, 46, pp. 7675-7678.
- [11] B. Choucair, M. Dherbomez, C. Roussakis and L. El kihel. 2004. Synthesis of Spermidinylcholestanol and Spermidinylcholesterol Squalamine Analogues., **Tetrahedron**, Vol. 60, pp. 11477-11486.
- [12] G. P. Moss. Steroid. [Online] Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Steroid>. 2011.
- [13] บุญรอด วงษ์สวาท. สเตอรอยด์ฮอร์โมน. [Online]. Available:

- [http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd\\_site/hormone.htm](http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd_site/hormone.htm). 2011.
- [14] M. Powers. **Anabolic steroid**. [Online]. Available:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Anabolic\\_steroid](http://en.wikipedia.org/wiki/Anabolic_steroid). 2011
- [15] วนาวรรณ ปราบพยัคฆ์. 2549. **การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์สเตียรอยด์เพอร์กินินโนโลน**. วิทยานิพนธ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [16] Anagrammer.com. Images for Corticosteroids. [Online]. Available:  
<http://www.anagrammer.com/scrabble/corticosteroids>. 2011
- [17] Health Education Division. **มารู้จักฮอร์โมนเพศกันเถอะ**. [Online]. Available:  
[http://thaihed.com/healthy\\_talk/talk\\_detail.php?sub\\_id=69](http://thaihed.com/healthy_talk/talk_detail.php?sub_id=69). 2011
- [18] D. Lommer. **Prohormone**. [Online]. Available:  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Prohormone>. 2011
- [19] T. Akhisa. **Phytosterol**.  
[Online]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Phytosterol>. 2011
- [20] Giffarine. **เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับ ไฟโตสเตอรอล กับคอเลสเตอรอล**. [Online]. Available:  
[http://www.giffarinethailand.com/th/interesting\\_info.php?nid=69](http://www.giffarinethailand.com/th/interesting_info.php?nid=69). 2011
- [21] A. Valkonen, M. Lahtinen and E. Kolehmainen. 2008. Syntheses and Structural Study of Bile Amidoalcohols., **Steroids**, 73, pp.1228-1241.
- [22] L. E. Kihel, M. Clement, M. A. Bazin, G, Descamps. 2008. New Lithiocholic and Chenodeoxycholic piperazinylcarboxamides with Antiproliferative and Pro-apoptotic Effects on Human Cancer Cell Lines., **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16, pp. 8737-8744.
- [23] D. Brossard, L. E. Kihel, M. Clement, W. Sebbahi, M. Khalid, C. Roussakis and S. Rault. 2010. Synthesis of Bile Acid Derivatives and in vitro Cytotoxic Activity with Pro-apoptotic Process on Multiple Myeloma (KMS-11), Glioblastoma Multiforme (GBM), and Colonic Carcinoma (HCT-116) Human Cell Lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 45, pp. 2912-2918.
- [24] Y. Huang, S. Chen, J. Cui, C. Gan, Z. Liu, Y. Wei and H. Song. 2011. Synthesis and Cytotoxicity of A-Homo-Lactam Derivatives of Cholic Acid and 7-Deoxycholic acid., **Steroids**, 76, pp. 690- 694.

- [25] D. Renard, J. Perruchon, M. Giera, J. Müller, and F. Bracher. 2009. Side Chain Azasteroids and Thiasteroids as Sterol Methyltransferase Inhibitors in Ergosterol Biosynthesis., **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Vol. 17, pp. 8123-8137.
- [26] M. Lourdasamy, J. Cote, S. Laplante, F. Labrie and S. M. Singh. 1997. Synthesis and *in vitro* of 17 $\beta$ -[N-Ureylene-N,N'-Disubstituted]-4-methyl-4-aza-5 $\alpha$ -Androstan-3-ones as Selective Inhibitors of Type I 5 $\alpha$ -Reductase, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Vol. 5, pp. 305-310.
- [27] X-L. He, Y. Xing, X-Z. Gu, J-X Xiao, Y-Y Wang, Z. Yi and WW Qiu. 2017., The Synthesis and Antitumor activity of Lithocholic Acid and Its Derivatives., **Steroids**, Vol. 125, pp. 54-60.
- [28] S. A. Khan and A. M. Asiri. 2011. Synthesis of Novel **Steroid Oxazolo Quinoxaline** as Antibacterial agents., **Arabian Journal of Chemistry**, Vol. 4 pp. 349-354.
- [29] S.K. Chung, C.H. Ryoo, H.W. Yang, J.Y. Shim, M.G. Kang, K.W. Lee and H.I. Kang. 1998. Synthesis and Bioactivities of Steroids Derivatives as Antifungal Agents, **Tetrahedron**, Vol. 54, pp. 15899-15914.
- [30] พันัชกร บุญมานำสิง และ ภัททฤทธิ สหัสโยธิน. 2551. การสังเคราะห์และฤทธิ์ชีวภาพของไบล์แอซิด เอไมด์. โครงการพิเศษสาขาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- [31] L. Nahar and A.B. Turner. 2003. Synthesis of Ester-Linked Lithocholic Acid Dimer., **Steroids**, Vol. 68, pp. 1157-1161.
- [32] A.W. Bauer, W.M.M. Kirby, J.C. Sherris and M. Turck. 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method, **American Journal of Clinical Pathology**, Vol. 45, pp. 493-496.
- [33] J.O. Brien, I. Wilson, T. Orton and F. Pognan. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity, **European Journal of Biochemistry**, Vol. 267, pp. 5421-5426.
- [34] Z. Szendi, P. Forgo and F. Sweet. 1995. Complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectra of Pregnenolone., **Steroids**, 60, pp. 442-446.
- [35] C. Li, A-un Rehman, N. K. Dalley and P. B. Savage. 1999. Short Syntheses of Triamine Derivatives of Cholic Acid, **Tetrahedron Letters**, 40, pp. 1861-1864.

## ประวัติผู้วิจัย

### หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวพัชณี เจริญยิ่ง
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สังกัด	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สาขา	สถานศึกษา
ปริญญาตรี	เคมี	มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ปริญญาโท	เคมีอินทรีย์	มหาวิทยาลัยมหิดล
ปริญญาเอก	เคมี (เคมีอินทรีย์)	University of York

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ	เคมีอินทรีย์สังเคราะห์ และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
Honors and Awards	Cerebos Award year 2003