



รายงานฉบับสมบูรณ์

การดัดแปลงโครงสร้างของแมงจิเฟอร์ินเพื่อใช้เป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ
"ไวรัสก่อโรคเรื้อรัง"

Structure Modification of Mangiferin for Using as Biological Active
Compounds

โดย

ผศ. ดร. ศิริรัตน์ จันทจารุณี และคณะ

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

แมงจีเฟอรินมีฤทธิ์ในการยับยั้ง herpes viruses แต่เนื่องจากแมงจีเฟอรินมีสมบัติการละลายได้น้อยในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์และ oil ทำให้เกิดความยุ่งยากในการเตรียมส่วนผสมเพื่อใช้ในด้านเครื่องสำอางและอาหาร และอาจลดความสามารถในการใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การดัดแปลงโครงสร้างของสาร เช่น การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลบนวง xanthone หรือ วงน้ำตาลให้มีหมู่แอลคิลที่ยาวขึ้น อาจช่วยให้มีคุณสมบัติการละลายที่เปลี่ยนแปลงไป และอาจนำไปสู่โครงสร้างใหม่ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง herpes viruses ที่ดีขึ้น นอกจากนี้การศึกษาผลของโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปต่อเอนไซม์ topoisomerase ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีผู้ให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการพัฒนายาต้าน herpes simplex จะช่วยให้ได้ข้อมูลแนวโน้มของโครงสร้างที่มีผลต่อคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และแนวโน้มของการยับยั้งของสารที่เป็น intercalators ดังนั้น งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาผลของการดัดแปลงส่วนโครงสร้างแมงจีเฟอรินต่อการยับยั้ง herpes viruses ให้ได้สารที่มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งที่ดีขึ้น และศึกษาคูณสมบัติการละลายที่เปลี่ยนแปลงไป โดยได้ทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอริน 3 แนวทาง คือ แบบ (A) การเปลี่ยนให้เป็นเกลือของโลหะประเภทต่างๆ แบบ (B) การเปลี่ยนหมู่แอลกอฮอล์บนวงน้ำตาล แบบ (C) การเปลี่ยนหมู่ OH บนวง xanthone ให้มีหมู่แอลคอกซี หมู่เอซิลหรืออนุพันธ์เบนซิล

สารแมงจีเฟอรินตลอดการทดลองได้จากการสกัดใบมะม่วงแห้งจำนวน 300 กรัม ด้วยสารละลาย 95% เอทานอล และทำการตกผลึกด้วยสารละลาย 50% เอทานอลในน้ำให้แมงจีเฟอริน 20.67 กรัม คิดเป็นร้อยละ 6.89 จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย NMR แสดงให้เห็นว่าสารที่ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่าสารแมงจีเฟอรินมาตรฐานที่ได้จากการซื้อ

ในการดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอริน สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือโซเดียม โพแทสเซียมและ แคลเซียมของแมงจีเฟอริน ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 53%-93% พิสูจน์เอกลักษณ์โดย ^1H NMR, ^{13}C NMR, 2DNMR, COSY, HMQC และ HMBC เกลือที่เตรียมขึ้นได้แสดงเอกลักษณ์ทาง ^1H NMR อย่างเห็นได้ชัดเจน และแตกต่างจากสารตั้งต้นอย่างชัดเจน โดยเฉพาะค่า chemical shift ของโปรตอนบนวงอะโรมาติก และพิสูจน์ชนิดของโลหะโดย ICP

การดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอริน โดยการเปลี่ยนหมู่แอลกอฮอล์บนวงน้ำตาล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันโดยอาศัย Ultrasound irradiations ได้สารผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่น้อยโดยให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตเพียง 5% และสารที่เกิดขึ้นสลายตัวอย่างรวดเร็วโดยเปลี่ยนแปลงกลับเป็นแมงจีเฟอรินเมื่อตั้งทิ้งไว้ในสารละลาย DMSO

การดัดแปลงโครงสร้างของสารแมงจีเฟอรินต่างๆ ที่หมู่ไฮดรอกซิลของ Xanthone โดยทำการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชัน -OH ของฟีนอล ซึ่งมี 2 วิธี ที่เป็นไปได้คือการทำปฏิกิริยาแอลคิลเลชัน เปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์แอลคอกซี (-OR) งานวิจัยนี้สามารถเตรียมอนุพันธ์ได้แอลคอกซี 4 ชนิด OMe, O-Hexyl O-allyl, O-benzyl ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 17%-25% และการเปลี่ยนให้เป็นหมู่เอซิลโดยอาศัยปฏิกิริยาเอซิลเลชันที่หมู่ -OH สามารถเตรียมอนุพันธ์เอซิล 7 ชนิด คือ acetyl, octanoyl, lauroyl, cinnamoyl, *p*-Cl-cinnamoyl *o*-Cl-cinnamoyl, *p*-OMe-cinnamoyl ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 17-50% อนุพันธ์ที่เตรียมได้ พิสูจน์เอกลักษณ์โดย ^1H NMR, ^{13}C NMR, 2DNMR, COSY, HMQC, HMBC และ ESI-MS

แนวโน้มการละลายของสารที่ได้ของสารที่ได้จากการจากการดัดแปลงโครงสร้างพบว่าเกลือ โซเดียม, โพแทสเซียม และแคลเซียม แมงจีเฟอริน มีความสามารถในการละลายน้ำที่ดีขึ้น โดยละลายน้ำได้ดีกว่าแมงจีเฟอริน และเกลือ

ที่เตรียมได้สามารถละลายในตัวทำละลายมีขั้วสูงได้เล็กน้อย เช่น MeOH และ DMSO นอกจากนี้เกลือที่สังเคราะห์ได้ไม่ละลายใน oil และละลายได้น้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไปยกเว้น DMSO

การดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันฟีนอลบนวงอะโรมาติกโดยอาศัยปฏิกิริยาแอลคิลเลชันให้ได้หมู่แอลคอกซี (OR) ที่เป็น benzyl ($-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$) และ allyl ให้สารอนุพันธ์ที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายใน MeOH ได้ปานกลาง และละลายใน DMSO ได้ดีมาก ในขณะที่อนุพันธ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเช่น octanoyl, lauroyl, cinnamoyl, *p*-OMe-cinnamoyl, *p*-Cl-cinnamoyl และ *o*-Cl-cinnamoyl มีแนวโน้มในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ protic solvent และตัวทำละลายที่มีขั้วได้ดีขึ้นกว่าแมงจีเฟอรินคือละลายในแอลกอฮอล์และ DMSO ซึ่งมีสาเหตุจากการที่โครงสร้างมีส่วน non polar ของสายคาร์บอนจำนวนมากขึ้น และอนุพันธ์ดังกล่าวไม่ละลายใน oil สำหรับอนุพันธ์ acetyl ซึ่งมีหมู่ $-\text{OH}$ บนวงถูกเปลี่ยนเป็นเอซิลหลายตำแหน่ง สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วคือ คลอโรฟอร์มและแอลกอฮอล์ ที่ดีกว่าแมงจีเฟอรินนอกจากนี้อนุพันธ์ cinnamoyl จะเกิดการสลายตัวเปลี่ยนกลับไปเป็นแมงจีเฟอรินอย่างช้าๆ ในแอลกอฮอล์ และสารทุกตัวจะค่อยๆ สลายตัวเป็นแมงจีเฟอรินเมื่อตั้งทิ้งไว้ในตัวทำละลายเป็นเวลานาน

จากการประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F ของอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 14 อนุพันธ์ ด้วยค่า TI พบว่าการดัดแปลงโครงสร้างให้มีอนุพันธ์เกลืออยู่ในโครงสร้างของแมงจีเฟอริน ไม่ได้เพิ่มความสามารถในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F ในขณะที่การดัดแปลงโครงสร้างของอนุพันธ์แมงจีเฟอรินให้มีหมู่เอซิลที่แตกต่างกัน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสได้สูงกว่าอนุพันธ์เกลือและอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่มีหมู่แอลคอกซี โดยเมื่อพิจารณาในส่วนของหมู่แอลคอกซี (methoxy, O-benzyl, O-allyl และ O-hexyl แมงจีเฟอริน) พบว่าการดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอรินโดยการเติมหมู่ methyl, allyl และ hexyl เข้าไป ทำให้ความสามารถในการยับยั้ง HSV-1 strain F ลดลง ยกเว้นในกรณีของอนุพันธ์ O-benzyl ที่มีการเติมหมู่ benzyl 2 หมู่เข้าไปที่โมเลกุลของแมงจีเฟอริน จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 strain F ได้ เมื่อพิจารณาการดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอรินโดยอาศัยหมู่เอซิล (acetyl, cinnamoyl, octanoyl และ lauroyl แมงจีเฟอริน) พบว่าการเพิ่มหมู่เอซิลเข้าไปที่โมเลกุลของแมงจีเฟอรินสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F ได้ ซึ่งความสามารถในการยับยั้งขึ้นอยู่กับจำนวนคาร์บอนและชนิดของหมู่เอซิลที่เพิ่มขึ้น จากผลการทดลองพบว่า การเพิ่ม cinnamoyl เข้าไปที่โมเลกุลของแมงจีเฟอริน 1 หมู่ จะเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด รองลงมา คือ octanoyl ส่วน acetyl แมงจีเฟอรินที่มีการเติมหมู่ acetyl เข้าไปถึง 8 หมู่ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F น้อยกว่า octanoyl แต่ยังคงดีกว่าแมงจีเฟอริน และเมื่อทำการดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอริน โดยทำการเพิ่ม chloro บนส่วนอะโรมาติกของ cinnamoyl แมงจีเฟอริน พบว่าการดัดแปลงโครงสร้างของอนุพันธ์แมงจีเฟอริน โดยการเติมหมู่ chloro บนส่วนอะโรมาติกของ cinnamoyl ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 strain F ได้ ถึงแม้การเติมหมู่ chloro เข้าไปที่โมเลกุลของ cinnamoyl จะช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง แต่ค่า ED_{50} ในการยับยั้ง HSV-1 ก็ลดต่ำลงด้วยเช่นกัน ส่วนการเติมหมู่ methoxy ไปบนส่วนอะโรมาติกของ cinnamoyl กลับลดความสามารถในการยับยั้ง HSV-1 ให้ต่ำกว่าของแมงจีเฟอริน และเมื่อพิจารณาผลการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F ของ lauroyl พบว่าจำนวนของคาร์บอนที่เพิ่มสูงขึ้นบนหมู่เอซิล ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสลดลง การที่ cinnamoyl แมงจีเฟอริน เป็นอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในบรรดาอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้อื่นๆ อาจจะเป็นเพราะการเพิ่มจำนวนของ carbon อยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จึงส่งผลให้อนุพันธ์ดังกล่าวน่าจะสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ที่ติดเชื้อได้ดีกว่าอนุพันธ์อื่นๆ เนื่องจากไวรัส HSV-1 มี envelope ที่เป็น

ชั้นไขมันห่อหุ้ม แต่เมื่อทำการเพิ่มจำนวนของ carbon มากขึ้นและทำการเติมหมู่อื่นๆ บนโครงสร้างอะโรมาติกพบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 จะเริ่มลดลง ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F จะขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของจำนวนของ carbon และชนิดของหมู่เอซิล

ในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase II α (topoisomerase II poisons) ของแมนจิเฟอริน และอนุพันธ์แมนจิเฟอรินซึ่ง ได้แก่ Na, K, Ca, O-hexyl, acetyl, O-allyl, O-benzyl, methoxy, cinnamoyl, octanoyl, *p*-OMe-cinnamoyl, *p*-Cl-cinnamoyl และ *o*-Cl-cinnamoyl ด้วย eukaryotic topoisomerase II drug screening kit พบว่าแมนจิเฟอริน และอนุพันธ์แมนจิเฟอรินทุกชนิด มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II α ได้ จากการตรวจสอบกลไกการยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α ของแมนจิเฟอรินและอนุพันธ์ของ แมนจิเฟอรินด้วยวิธี DNA-unwinding assay พบว่า แมนจิเฟอริน, Na, K, Ca, O-hexyl, acetyl, O-allyl, O-benzyl, cinnamoyl, octanoyl, methoxy, *p*-Cl-cinnamoyl และ *o*-Cl-cinnamoyl แมนจิเฟอริน แสดงความสามารถในการยับยั้งแบบ non-intercalator โดยอาจมีกลไกในการจับกับเอนไซม์ topoisomerase II α โดยตรง ซึ่งอาจจะทำการศึกษาการจับกันระหว่างแมนจิเฟอรินและอนุพันธ์แมนจิเฟอรินกับ topoisomerase II α ด้วย surface plasmon resonance assay เพื่อพิสูจน์กลไกการยับยั้งต่อไป อย่างไรก็ตามพบว่าอนุพันธ์ของ *p*-OMe-cinnamoyl แมนจิเฟอรินมีกลไกการยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α แบบ intercalator โดย *p*-OMe-cinnamoyl จะเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างสายของดีเอ็นเอ ซึ่งส่งผลต่อโครงสร้างของดีเอ็นเอที่บิดเบี้ยวไปและมีผลยับยั้งของการเชื่อมต่อกัน (re-ligation) ของสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้ การทดสอบการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α และ DNA-unwinding assay เป็นการทดสอบเบื้องต้นในสถานะในหลอดทดลอง เพื่อยืนยันฤทธิ์ของแมนจิเฟอริน และอนุพันธ์ของแมนจิเฟอรินที่สังเคราะห์จึงควรพิจารณาผลการยับยั้ง HSV ในเซลล์เพาะเลี้ยงต่อไปควบคู่ไปด้วย

บทคัดย่อ

แมงจีเฟอรินเป็นสารที่พบมากในใบและเปลือกของมะม่วง งานวิจัยจำนวนมากพบว่าแมงจีเฟอรินมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น ด้านการอักเสบ การต้านอนุมูลอิสระ และการต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ เป็นต้น แต่เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติด้านการละลายที่ไม่ดีทำให้เกิดข้อจำกัดในการนำไปใช้งาน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอริน เพื่อที่จะปรับปรุงคุณสมบัติของแมงจีเฟอริน โดยได้ทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอริน 3 แนวทาง คือ การเปลี่ยนให้เป็นเกลือของโลหะประเภทต่างๆ การเปลี่ยนหมู่แอลกอฮอล์บนวงน้ำตาลเป็นเอสเทอร์ และการเปลี่ยนหมู่ OH บนวง xanthone ให้เป็นอนุพันธ์แอลคอกซีและเอซิล โดยการสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือโซเดียม โปแตสเซียมและ แคลเซียมของแมงจีเฟอริน ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 53%-93% การดัดแปลงโครงสร้างของโดยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชัน -OH ของฟีนอล ให้เป็นอนุพันธ์แอลคอกซี (-OR) 4 ชนิด คือ OMe, O-Hexyl, O-allyl, O-Bn ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 17%-25% และการเปลี่ยนให้เป็นหมู่เอซิลโดยอาศัยปฏิกิริยาเอซิเลชันที่หมู่ -OH สามารถเตรียมอนุพันธ์เอซิล 7 ชนิด คือ acetyl, octanoyl, lauroyl, cinnamoyl, *p*-Cl-cinnamoyl, *o*-Cl-cinnamoyl, *p*-OMe-cinnamoyl ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 17-50% พบว่าอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้ มีความสามารถในการละลายน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ที่ดีขึ้น จากการทดสอบและหาแนวโน้มของฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน antiherpes ของอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 14 อนุพันธ์ พบว่าการเพิ่ม cinnamoyl เข้าไปที่โมเลกุลของแมงจีเฟอริน 1 หมู่ จะเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด รองลงมา คือ octanoyl และ acetyl ในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase II α ของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์แมงจีเฟอริน พบว่าแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์แมงจีเฟอรินทุกชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II α และจากการศึกษากลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้พบว่า เป็นแบบ non-intercalator ยกเว้น *p*-OMe-cinnamoyl แมงจีเฟอริน

ABSTRACT

Mangiferin, is present in leaves and peel of mango. Many research studies showed that mangiferin possess various biological activities for example anti-inflammatory, anti-oxidant, and anti-herpes properties. However, the solubility of this compound caused some limitation for its usage. This research is aimed to modify mangiferin structure to improve its properties by using three major routes which are metal salt formation, esterification of hydroxyl group on sugar ring and conversion of hydroxyl group on xanthone ring to alkoxy and acyl derivatives. Preparation of sodium potassium and calcium salt gave product between 53%-93%. Four derivatives were received in 17%-25% yield by modification of phenolic –OH to alkoxy (-OR). And seven acyl derivatives were prepared in 17-50% which are acetyl, octanoyl, lauroyl, cinnamoyl, *p*-Cl-cinnamoyl, *o*-Cl-cinnamoyl, *p*-OMe-cinnamoyl. The result showed that the new derivatives have better solubilities than mangiferin. All fourteen derivatives were then evaluated for their anti-herpes simplex activity. It was revealed that cinamoyl derivative gave the best activity followed by octanoyl and acetyl derivatives. Inhibition of topoisomerase II α of mangiferin and mangiferin derivatives were tested and revealed that all compounds showed topoisomerase II inhibitory activity. Further studies for the inhibition mechanism were also investigated. It was found that the inhibition occurred as non-intercalator except that of *p*-OMe-cinnamoyl mangiferin.

สารบัญ

	หน้า
Executive Summary	ก
บทคัดย่อไทย	ง
บทคัดย่ออังกฤษ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญภาพ	ช
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 การทดลองและผลการทดลอง	8
บทที่ 4 สรุปผลการศึกษา	65
ภาคผนวก ก ตารางเปรียบเทียบ วัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ ดำเนินการมา ผลที่ได้รับตลอดโครงการ	70
ภาคผนวก ข ดัชนีโครงสร้างและเลขตำแหน่งกำกับโครงสร้าง	74
ภาคผนวก ค ข้อมูล Mass Spectrum	78
ภาคผนวก ง NMR Spectral data	91

สารบัญตาราง

ตาราง	ชื่อตาราง	หน้า
3.1	แสดงการเปรียบเทียบค่าเคมีคัลชิฟท์ของ ^{13}C NMR ของแมงจิเฟอร์นกับไซเดียมแมงจิเฟอร์น	15
3.2	แสดงข้อมูล 2D NMR HMBC ของเกลือไซเดียมแมงจิเฟอร์น	16
3.3	แสดงค่าเปรียบเทียบ chemical shift ของ แมงจิเฟอร์น และเกลืออนุพันธ์ของ แมงจิเฟอร์น	19
3.4	เปอร์เซ็นต์ธาตุโลหะของเกลือทั้งสามชนิด	20
3.5	เปรียบเทียบค่าการดูดกลืน UV ของแมงจิเฟอร์นกับเกลือไซเดียม โบแตสเซียม แคลเซียม	22
3.6	แสดงการผลการเปลี่ยนสภาวะในการทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ไลเปส	24
3.7	แสดงข้อมูล 2D NMR HMQC, HMBC ของเมทิลแมงจิเฟอร์น	28
3.8	การละลายน้ำของอนุพันธ์ แมงจิเฟอร์น	40
3.9	การละลายของ อนุพันธ์ แมงจิเฟอร์น ใน oil และตัวทำละลายอินทรีย์	41
3.10	ช่วงความเข้มข้นของแมงจิเฟอร์นและอนุพันธ์ของแมงจิเฟอร์นที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อ HSV-1	43
3.11	แสดงความเป็นพิษและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 strain F ของ แมงจิเฟอร์น และอนุพันธ์ของ แมงจิเฟอร์น หลังไวรัสเกาะติดเซลล์	46-47
3.12	องค์ประกอบของน้ำยาสำเร็จรูป Eukaryotic Topoisomerase II Drug Screening	52
3.13	ปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II α ปริมาตรรวม 20 μl	53
3.14	สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา DNA-unwinding assay ปริมาตรรวม 20 μl	58
3.15	การศึกษากการยับยั้งการทำงานของ T4 DNA ligase ของสาร แมงจิเฟอร์น และอนุพันธ์ของแมงจิเฟอร์น ที่ สังเคราะห์ขึ้นที่ความเข้มข้น 1 mM ด้วยวิธี DNA-unwinding assay	62

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1.1	เปรียบเทียบโครงสร้างหลักสารกลุ่ม แชนโธน กับ แมนจีเฟอริน	2
2.1	โครงสร้างของสารสกัดจากเปลือกต้นมะม่วง	4
3.1	แนวทางการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง Mangiferin	8
3.2	¹ H NMR spectrum ของสาร Mangiferin ที่สกัดได้จากใบมะม่วง	10
3.3	¹³ C NMR spectrum ของสาร Mangiferin ที่สกัดได้จากใบมะม่วง	11
3.4	¹ H NMR spectrum ของสาร Mangiferin มาตรฐาน	12
3.5	¹ H NMR spectrum ของ sodium mangiferin	15
3.6	¹³ C NMR spectrum ของ sodium Mangiferin	15
3.7	¹ H NMR spectrum ของ potassium Mangiferin	18
3.8	¹³ C NMR spectrum ของ potassium Mangiferin	18
3.9	¹ H NMR spectrum ของ calcium แมนจีเฟอริน	19
3.10	¹³ C NMR spectrum ของ calcium แมนจีเฟอริน	20
3.11	แสดง UV spectrum สารละลายแมนจีเฟอรินในน้ำ	22
3.12	แสดง UV spectrum สารละลายเกลือ sodium แมนจีเฟอริน ในน้ำ	22
3.13	แสดง UV spectrum สารละลายเกลือ potassium แมนจีเฟอริน ในน้ำ	22
3.14	แสดง UV spectrum สารละลายเกลือ calcium แมนจีเฟอริน ในน้ำ	23
3.15	ค่า CD ₅₀ ของแมนจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมนจีเฟอรินที่ดัดแปลงให้มีหมู่ต่างๆ และ acyclovir ต่อ vero cells	45
3.16	ค่า ED ₅₀ ของแมนจีเฟอริน อนุพันธ์ของแมนจีเฟอรินที่ดัดแปลงให้มีหมู่ต่างๆ และ acyclovir ต่อ HSV-1 strain F	45
3.17	การยับยั้งเชื้อ HSV-1F หลังเกาะติดกับเซลล์โดยสารของ แมนจีเฟอริน	47
3.18	ค่า TI ของแมนจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมนจีเฟอรินที่ดัดแปลงให้มีหมู่ต่างๆ	49
3.19	agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pHOT1 ในปฏิบัติการการยับยั้ง เอนไซม์ topoisomerase II	55
3.20	การทำงานของ topoisomerase II ในการคลายเกลียวของพลาสมิดดีเอ็นเอจากรูปร่าง catenated เป็น decatenated DNA	55
3.21	Agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ที่ทำปฏิบัติการการยับยั้ง เอนไซม์ human topoisomerase II α	56-57
3.22	Agarose gel electrophoresis ของการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a สายตรงด้วย <i>EcoRI</i> เมื่อใช้ 入 DNA ที่ตัดด้วย <i>HindIII</i> และ <i>EcoRI</i> (lane M)	59
3.23	agarose gel electrophoresis ในการทดสอบ DNA-unwinding assay ของแมนจีเฟอริน และ อนุพันธ์ของแมนจีเฟอรินด้วย T4 DNA ligase	61

บทที่ 1

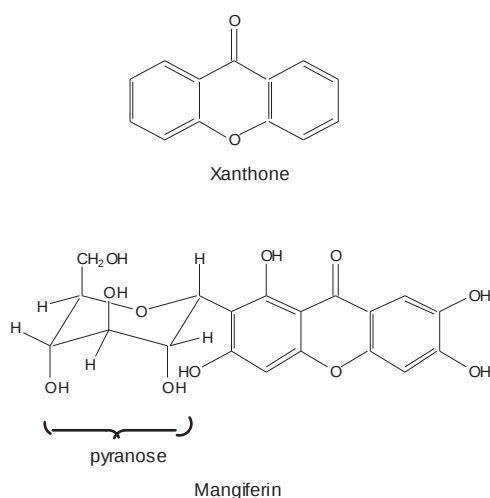
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

มะม่วงเป็นไม้ผลเขตร้อนที่เก่าแก่และสำคัญที่สุดชนิดหนึ่ง ตามหลักฐานปรากฏว่า มีคนใช้มะม่วงเป็นอาหารกว่า 4,000 ปีมาแล้ว ทั้งนี้เพราะส่วนต่าง ๆ ของมะม่วงเกือบทุกส่วนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ปัจจุบันเชื่อว่ามะม่วงมีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดียและพม่า โดยมีศูนย์กลางกระจายพันธุ์อยู่ในแถบอินโดจีน มาเลเซีย และอินโดนีเซีย การกระจายพันธุ์เป็นไปอย่างช้า ๆ ก่อนที่จะขยายไปสู่ส่วนต่าง ๆ ของโลกจนถึงปัจจุบัน

การปลูกมะม่วงในอดีตนั้นโดยมากเป็นการปลูกเพื่อใช้บริโภคภายในประเทศ แต่ในปัจจุบันมะม่วงเป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางทั้งในประเทศและต่างประเทศ จึงมีการผลิตมะม่วงเป็นการค้าเพิ่มมากขึ้น ทำให้มะม่วงกลายเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง นอกจากนี้ส่วนต่าง ๆ ของมะม่วงยังมีสรรพคุณทางยาสมุนไพรสามารถใช้เป็นยาพื้นบ้านตามส่วนที่ใช้ เช่น เปลือกแก้บิด โรคไขข้ออักเสบ ริดสีดวงทวาร ท้องร่วง แก้ไข้ตัวร้อน ใบแก้โรคลำไส้อักเสบ ดอกแก้ท้องเสีย แก้โรคหนองใน ผลดิบบำรุงกระเพาะอาหาร แก้คลื่นไส้อาเจียน ขับปัสสาวะ เปลือกผลสดแก้ตกขาว พอกแผลสด แก้หูด ยางผลแก้หิด กลากเกลื้อน เมล็ดดิบแก้โรคบิด ท้องเสีย ในประเทศฟิลิปปินส์ ใช้ใบมะม่วงขิงปั่นชาและใบใช้แก้โรคบิด เปลือกและเมล็ดใช้เป็นยาสมุนไพร ในยาแผนโบราณของอินเดียใช้ภาวะซึมเศร้ารุนแรง

แมนจิเฟอริน (Mangiferin) เป็นสารที่พบมากในใบและเปลือกของมะม่วง จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มแซนโธน (Xanthone) มีสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{18}O_{11}$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 422.345 g/mol โครงสร้างแมนจิเฟอริน (แสดงดังภาพที่ 1.1) เมื่อเปรียบเทียบกับแซนโธน โครงสร้างหลักของแมนจิเฟอรินแตกต่างกันตรงที่มีน้ำตาล pyranose เชื่อมต่อคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เรียกว่า α -D-glucopyranosyl และมี hydroxyl group (OH) เกาะอยู่ 4 แห่ง คือ ที่ตำแหน่ง 1, 3, 6 และ 7 ดังนั้นชื่อตามระบบ IUPAC ของ แมนจิเฟอริน จึงเป็น 2- α -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxy-9H-Xanthen-9-one¹ จากศึกษาการออกฤทธิ์ของการสกัด 95 % ethanol จากใบมะม่วงพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด และสารสกัด 80 % ethanol จากใบมะม่วงในเซลล์เพาะเลี้ยงมีผลฆ่าเชื้อไวรัสชนิด Virus-Coxsackie B2, Virus-Measles และ Virus-Poliiovirus นอกจากนี้พบว่าสารที่สกัดด้วย 95 % ethanol และสารที่สกัดด้วยน้ำร้อนไม่ระบุส่วนที่ใช้สามารถออกฤทธิ์อย่างอ่อนต่อไวรัสที่อยู่เหนือสละเฮว (Virus Herpes type I)²



ภาพที่ 1.1 เปรียบเทียบโครงสร้างหลักสารกลุ่มแซนโธนกับแมงจีเฟอริน

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาพบว่า แมงจีเฟอรินสามารถเพิ่มศักยภาพของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย โดยจากการทดลองหนูที่ป่วยเป็นเนื้องอก หลังจากให้แมงจีเฟอรินเข้าไปและนำเนื้อเยื่อมาตรวจสอบพบว่า เม็ดเลือดขาว (Lymphocytes) ชนิด splenocytes และ thymocytes มีปริมาณเพิ่มขึ้นในอัตรา 5-40 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่ง แมงจีเฟอริน จะไปกระตุ้นการทำงานของ DNA ให้มีการสังเคราะห์เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคต่าง ๆ ได้³

อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารนี้จะละลายน้ำและน้ำมันได้น้อยทำให้เกิดความยุ่งยากในการเตรียมส่วนผสมเพื่อใช้ในด้านเครื่องสำอางและอาหาร และทำให้ลดความสามารถในการใช้เป็นสารออกฤทธิ์⁴ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการศึกษาการดัดแปลงโครงสร้างของสารนี้ให้อยู่ในรูปที่สามารถเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถใช้ในตัวทำละลายในลักษณะต่าง ๆ เช่น น้ำ น้ำมัน เป็นต้น

โดยในงานวิจัยนี้ต้องการที่จะดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอริน เพื่อศึกษาความสามารถในการละลายของอนุพันธ์ แมงจีเฟอริน และฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน antiherpes ที่สังเคราะห์ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษาและวิจัย

1. ดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอรินให้ได้สารอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินชนิดใหม่
2. ปรับปรุงความสามารถในการละลายของอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้
3. ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน antiherpes ของอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้

1.3 แนวทางและขั้นตอนการดำเนินงาน

- 1.3.1 การศึกษาปฏิกิริยาที่สามารถเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันบนวงน้ำตาลของแมงจีเฟอริน
- 1.3.2 การศึกษาปฏิกิริยาที่สามารถเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันบนวงแซนโธนของแมงจีเฟอริน
- 1.3.3 ศึกษาผลของโครงสร้างใหม่ที่ได้ออกฤทธิ์และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
- 1.3.4 ศึกษาผลของโครงสร้างใหม่ที่ได้ออกฤทธิ์และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน antiherpes

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับเมื่อการดำเนินงานเสร็จสิ้นที่เป็นรูปธรรม และตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการ

1.4.1 กระบวนการและขั้นตอนการเตรียมสารอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่มีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่ดีขึ้น

1.4.2 กระบวนการและขั้นตอนการเตรียมสารอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น หรือเทียบเท่า

1.5 กระบวนการผลักดันผลงานดังกล่าวออกสู่การใช้ประโยชน์

ถ่ายทอดกระบวนการและขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ แมงจีเฟอรินที่มีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่ดีขึ้น และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น หรือ เทียบเท่ากับผู้ผลิตหรือเภสัชกร

1.6 เอกสารอ้างอิง

1. Francoise, R. Cosmetic or pharmaceutical compositions containing, as active ingredient, mangiferine or its derivatives, in pure form or in plant extracts. US Patent 5824320
2. Yoosook, C.; Bunyapraphatsara, N.; Boonyakiat, Y.; Kantasuk, C., Anti-herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 2000, 6 (6), 411-419.
3. สมพมิตร, ฤงเงิน วิศิษฎ์จินดา ศนิ เลื่อมใส สิตานัน สมพมิตร การศึกษาค้นคว้าด้วยตนเอง ปริญญา การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ศึกษา เคมี 2547.
4. บุญทา, ส. ปริญญานิพนธ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ 2546.

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารสกัดจากมะม่วง

จากการศึกษาสรรพคุณทางยาของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของมะม่วง และพบว่ามะม่วงมีสารหลายชนิดอยู่ในส่วนต่าง ๆ ดังนี้

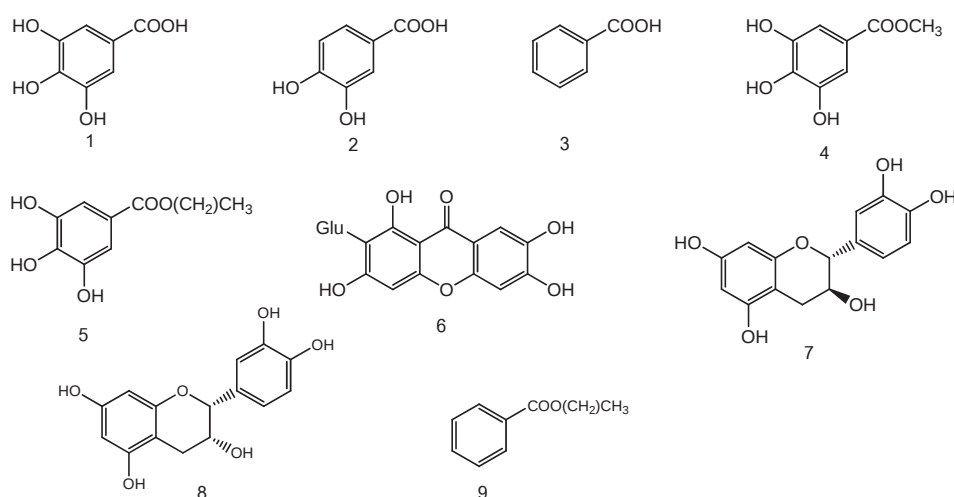
1. เปลือกของลำต้นประกอบด้วยสารกลุ่ม Gallic acid (1), 3,4-dihydroxy benzoic acid (2), benzoic acid (3), methyl gallate (4), propyl gallate (5), mangiferin (6), (+)-catechin (7), (-)-epicatechin (8) และ propyl benzoate (9) ดังปรากฏในรูปที่ 1.2 จากการศึกษาดังกล่าว พบว่า สารสกัดจากเปลือกลำต้นของมะม่วงซึ่งมี Mangiferin เป็นองค์ประกอบ 50–250 mg/kg มีความสามารถในการต่อต้านสาร TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) ซึ่งสารนี้จะไปเหนี่ยวนำให้ peritoneal macrophages สร้าง ROS (reactive oxygen species) ได้ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการทำลายซีรัม ดับ และสมองนั้นคือ Mangiferin สามารถลดปริมาณ ROS ได้นั่นเอง

2. ดอกประกอบด้วยสารกลุ่ม benzenoid threonine alanine valine ผลประกอบด้วย cycloartenol เป็นส่วนใหญ่

3. เมล็ดประกอบด้วยสารกลุ่ม riboside, alkaloids, flavonoid, xanthone, benzenoid sesquiterpenes

4. รากประกอบด้วยสาร friedelin

5. ใบประกอบด้วยสารกลุ่ม sesquiterpenes monoterpene phenylpropanoid ได้แก่ Mangiferin-6'-O-gallate กลุ่ม flavonoid ได้แก่ fisetin triterpenes benzenoid tannins และสารกลุ่ม xanthone ได้แก่ Mangiferin ซึ่งมีปริมาณสูงสุด

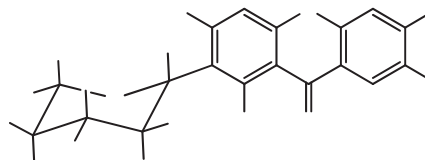


ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของสารสกัดจากเปลือกต้นมะม่วง

2.2 แมงจิเฟอริน (Mangiferin)

แมงจิเฟอริน (Mangiferin) เป็นสารสำคัญในสารสกัดจากใบมะม่วง (*Mangifera indica* Linn.) โดย Iseda Syun¹ ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารแมงจิเฟอริน ในมะม่วง โดยนำเปลือกของต้นมะม่วงไปทำการสกัด โดยใช้เอทานอลที่

ร้อนแล้วระเหยด้วยความร้อน ทำการสกัดกากที่ได้อีกครั้งด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ พบว่ามีสารตกผลึกเป็นรูปเข็มออกมาจากในชั้นของปิโตรเลียมอีเทอร์ เมื่อทำการตกผลึกซ้ำด้วย 75% เอทานอลจะได้สารที่สูตรเป็น $C_{19}H_{18}O_{11}$ ซึ่งสลายตัวได้ที่ $280-281^{\circ}C$ ส่วนสารที่เป็น dimethyl ester ของ แลงจีเฟอริน จะสลายตัวที่ $296.5-297.0^{\circ}C$ จากการวิเคราะห์พบว่า มีสูตรเป็น $C_{19}H_{16}O_9(OMe)_2$ และมีจุดหลอมเหลว $216-217^{\circ}C$



1

นอกจากนี้แลงจีเฟอริน ยังสามารถแยกออกมาจากพืชชนิดอื่นได้อีกด้วยโดย Svetlana และคณะ² ได้ทำการสกัดสารแลงจีเฟอริน จากพืชตระกูล *Hedysarum* (*Hedysarum alpinum* L., *Hedysarum flavescens*) โดยการสกัด Xanthone glycosides จากส่วนของพืช โดยใช้ของผสม acetone-water = 1 : 0.5-2 แล้วนำส่วนที่สกัดได้ไประเหยด้วยความร้อน ทำการกรองแล้วนำไปต้มในกรด H_2SO_4 ที่ pH จาก 2 ถึง 4 เป็นเวลา 0.5 – 3.0 ชั่วโมง เมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วจะแยกเป็น 2 ชั้นโดย Xanthone glycoside จะละลายในชั้น aqueous เมื่อนำออกมาเติมด้วยบิวทานอลก็จะแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนประกอบด้วยสารละลายของ Xanthone glycoside แยกออกมาทำการระเหยด้วยความร้อน ตะกอนของแลงจีเฟอรินจะถูกแยกออกมาและทำการตกผลึกซ้ำโดยวิธีนี้จะให้ % yield ประมาณ 0.1 % โดยน้ำหนักที่เปรียบเทียบกับใบไม้ที่ใช้สกัด

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของแลงจีเฟอริน

โครงสร้างของแลงจีเฟอรินจัดเป็นสารอนุพันธ์ xanthone มีส่วน C-glucosylxanthones มีชื่อทางเคมีคือ 1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone-C-2-beta-d-glucoside สารนี้พบในพืชชั้นสูงในวงศ์ Anacardiaceae และ Gentianaceae โดยเฉพาะในส่วน ใบและเปลือก สารนี้มีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้าน โดยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

Sato และคณะ³ พบว่าแลงจีเฟอริน มีฤทธิ์เป็น antioxidant สามารถทำหน้าที่เป็นต้านอนุมูลอิสระ

Rajendran และคณะ⁴ ทำการกระตุ้นให้หนูเป็นมะเร็งปอดด้วยเบนโซ(เอ)ไพรีน พบว่าหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็งดังกล่าวมีการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีอิเล็กทรอนิกส์และ TCA Cycle ลดลง ส่วนหนูที่ได้รับแลงจีเฟอรินก่อนการให้สารก่อมะเร็ง หรือได้รับแลงจีเฟอรินหลังได้รับสารมะเร็งเป็นเวลา 18 สัปดาห์ มีการทำงานของเอนไซม์เหล่านั้นที่เป็นปกติเหมือนกลุ่มสัตว์ทดลองที่ไม่เป็นมะเร็ง ทำให้เห็นว่าแลงจีเฟอรินมีฤทธิ์ป้องกันและรักษามะเร็งนอกจากนี้

Miura และคณะ⁵ ทำการทดสอบฤทธิ์การควบคุมระดับน้ำตาลในโรคเบาหวานในหนู KK-Ay โดยการให้แลงจีเฟอรินทางปาก พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดภายใน 3 สัปดาห์ ($p < 0.01$) และแลงจีเฟอรินสามารถลด hyperinsulinemia ลด insulin resistance ได้

Bunyapraphatsara และคณะ⁶ พบว่าแลงจีเฟอรินสามารถออกฤทธิ์ต่อไวรัสเฮอร์ปีส์ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเริมที่เกิดเนื้อเยื่อ

Bairy, I. และคณะ⁷ พบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากเมล็ดของมะม่วงมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ เช่น *E. coli* และ *Salmonella* spp. นอกจากประโยชน์ในทางการแพทย์แล้ว แลงจิกเฟอรินยังถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอางประเภทครีมหรือโลชั่นกันแดด ครีมลดรอยเหี่ยวย่น ตลอดจนผลิตภัณฑ์อาหารเสริมอีกมากมาย ซึ่งในหลายประเทศ เช่น จีน อินเดีย และคิวบาได้ทำการสกัดในระดับอุตสาหกรรมแล้ว

Dar, A. และคณะ⁸ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH assay เปรียบเทียบกับ rutin พบว่าแลงจิกเฟอรินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (EC_{50}) 5.8 ± 0.96 mg/ml หรือ 13.74 mM

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาพบว่า แลงจิกเฟอรินสามารถเพิ่มศักยภาพของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย⁹ โดยจากการทดลองหนูที่ป่วยเป็นเนื้องอก หลังจากให้แลงจิกเฟอรินเข้าไป และนำเนื้อเยื่อมาตรวจสอบพบว่า เม็ดเลือดขาว (Lymphocytes) ชนิด splenocytes และ thymocytes มีปริมาณเพิ่มขึ้นในอัตรา $5-40$ μ g/ml ซึ่งแลงจิกเฟอริน จะไปกระตุ้นการทำงานของ DNA ให้มีการสังเคราะห์เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคต่าง ๆ ได้

ในด้านสมบัติทางเคมี Gomez-Zaleta, B., และคณะ¹⁰ ศึกษาค่าคงที่ของกรด (pK_a) ของแลงจิกเฟอรินในสารละลาย โดยใช้ UV/vis spectroscopic study และ SQUAD program ในการคำนวณ พบว่าแบบจำลองจากการคำนวณให้ค่า pK_a สอดคล้องกับค่าจากการทดลอง $H_4 = H_3(MGF)^- + H^+$, $pK_{a1}(6-H) = 6.52 \pm 0.06$; $H_3(MGF)^- = H_2(MGF)^{2-} + H^+$, $pK_{a2}(3-H) = 7.97 \pm 0.06$; $H_2(MGF)^{2-} = (MGF)^{3-} + H^+$, $pK_{a3}(7-H) = 9.44 \pm 0.04$; $H(MGF)^{3-} = (MGF)^{4-} + H^+$, $pK_{a4}(1-H) = 12.10 \pm 0.01$

Hou, Y. และคณะ¹¹ ได้ศึกษา Pharmacokinetic ของแลงจิกเฟอรินในพลาสมาและ retina ของหนู พบว่าแลงจิกเฟอรินมีความสามารถในการละลายในไขมันต่ำและซึมผ่าน blood-retina barrier ได้น้อย

นอกจากประโยชน์ในทางการแพทย์แล้ว แลงจิกเฟอริน ยังถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอางประเภทครีมหรือโลชั่นกันแดด ครีมลดรอยเหี่ยวย่น ตลอดจนผลิตภัณฑ์อาหารเสริมอีกมากมาย² สำหรับประเทศไทยซึ่งมีพื้นที่ในการปลูกมะม่วงมาก และให้ความสนใจในคุณสมบัติของมะม่วงในด้านการนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพรมานานแล้ว ซึ่งได้มีการวิจัยที่จะนำแลงจิกเฟอริน สำเร็จรูปในการตั้งตำรับ¹² แต่พบอุปสรรคในการขึ้นตำรับยา เนื่องจากความสามารถในการละลายที่ยังไม่ดีทั้งในน้ำและน้ำมัน ทั้งนี้ในปัจจุบันมีการใช้สารประกอบประเภทเบสอ่อนเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลาย แต่ก็ทำให้ความเสถียรของยาลดลงตามเวลาที่เก็บไว้ ดังนั้นการเพิ่มความสามารถในการละลายของสารแลงจิกเฟอริน ทั้งในน้ำและน้ำมันและคงฤทธิ์ทางยาคงเดิม จะทำให้การนำไปใช้ประโยชน์ทางยาของสารนี้เป็นไปได้ง่ายขึ้น

จากการที่ประเทศไทยมีการปลูกมะม่วงจำนวนมาก และคุณสมบัติของแลงจิกเฟอรินในมะม่วงต่อการต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ การเพิ่มความสามารถในการละลายและฤทธิ์ในการต้านไวรัสเฮอร์ปีส์จึงช่วยเพิ่มมูลค่าของมะม่วงให้เกิดประโยชน์สูงสุด

2.3 เอกสารอ้างอิง

1. Iseda, S., *Bull. Chem. Soc. Japan* **1957**, *30*, 625
2. Rusakova, S. V., kv. 49, poselok Polyany, Moskovskaya oblast, SU), Glyzin, Vladimir I. (ulitsa Shipilovskaya, 29, korpus 2, kv. 255, Moscow, SU), Kocherga, Stepan I. (ulitsa Botanicheskaya, 8, kv. 7, p/o Vilar, Moskovskaya oblast, SU), Ananieva, Alla A. (Birjulevskaya ulitsa, 5, korpus 2, kv. 463, Moscow, SU),

Libizova, Larisa F. (ulitsa Botanicheskaya, 8, kv. 8, p/o Vilar, Moskovskaya oblast, SU) Process for preparing mangiferin. 1985.

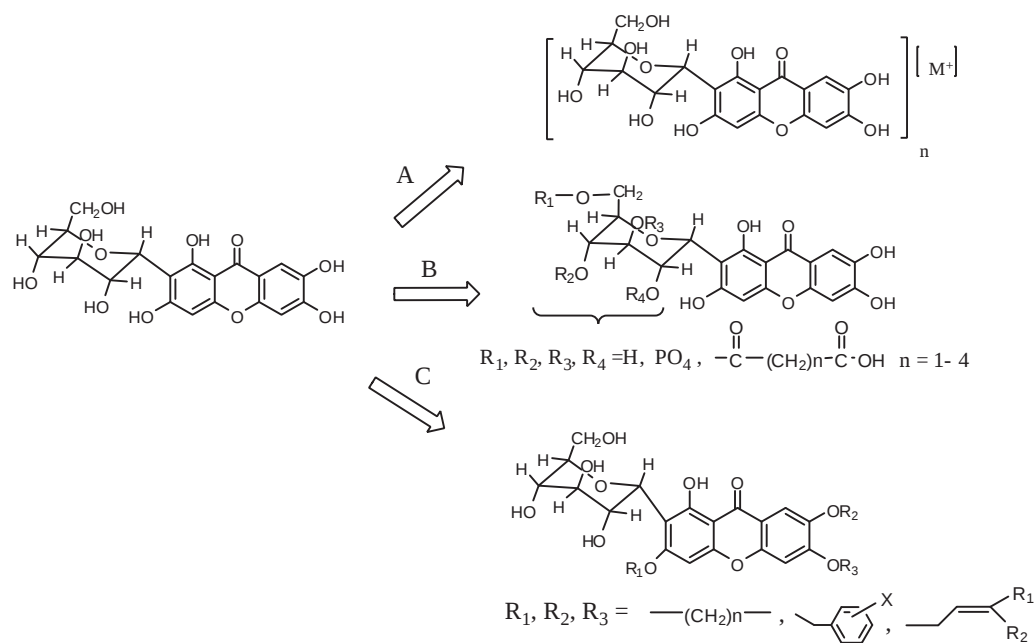
3. Sato, T.; Kawamoto, A.; Tamura, A.; Tatsumi, Y.; Fujii, T., Mechanism of antioxidant action of pueraria glycoside (PG)-1 (an isoflavonoid) and mangiferin (a xanthonoid). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1992**, *40* (3), 721-724.
4. Rajendran, P.; Ekambaram, G.; Sakthisekaran, D., Protective role of mangiferin against Benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in experimental animals. *Biol Pharm Bull* **2008**, *31* (6), 1053-8.
5. Miura, T.; Ichiki, H.; Hashimoto, I.; Iwamoto, N.; Kato, M.; Kubo, M.; Ishihara, E.; Komatsu, Y.; Okada, M.; Ishida, T.; Tanigawa, K., Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin. *Phytomedicine* **2001**, *8* (2), 85-7.
6. Yoosook, C.; Bunyaphatsara, N.; Boonyakiat, Y.; Kantasuk, C., Anti-herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2000**, *6* (6), 411-419.
7. Bairy, I.; Reeja, S.; Siddharth; Rao, P. S.; Bhat, M.; Shivananda, P. G., Evaluation of antibacterial activity of *Mangifera indica* on anaerobic dental microflora based on in vivo studies. *Indian J Pathol Microbiol* **2002**, *45* (3), 307-10.
8. Dar, A.; Faizi, S.; Naqvi, S.; Roome, T.; Zikr-ur-Rehman, S.; Ali, M.; Firdous, S.; Moin, S. T., Analgesic and antioxidant activity of mangiferin and its derivatives: the structure activity relationship. *Biol Pharm Bull* **2005**, *28* (4), 596-600.
9. Chattopadhyay, U.; Das, S.; Guha, S.; Ghosal, S., Activation of lymphocytes of normal and tumor bearing mice by mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Cancer Letters* **1987**, *37* (3), 293-299.
10. Gomez-Zaleta, B.; Ramirez-Silva, M. T.; Gutierrez, A.; Gonzalez-Vergara, E.; Guizado-Rodriguez, M.; Rojas-Hernandez, A., UV/vis, ¹H, and ¹³C NMR spectroscopic studies to determine mangiferin pKa values. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2006**, *64* (4), 1002-9.
11. Hou, Y.; Fan, S.; Zhang, H.; Gu, Y.; Yu, X.; Li, B., Pharmacokinetic study of mangiferin in rat plasma and retina using high-performance liquid chromatography. *Molecular Vision* **2010**, *16*, 1659-1668.
12. บุญทา, ส. ปริมาณนิพนธ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ 2546.

บทที่ 3

การทดลองและผลการทดลอง

แมงจิเฟอรินมีฤทธิ์ในการยับยั้ง herpes viruses แต่เนื่องจากแมงจิเฟอรินมีสมบัติการละลายได้น้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์และ oil ทำให้เกิดความยุ่งยากในการเตรียมส่วนผสมเพื่อใช้ในด้านเครื่องสำอางและอาหาร และอาจลดความสามารถในการใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การดัดแปลงโครงสร้างของแมงจิเฟอรินเช่น การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลบนวง xanthone หรือ วงน้ำตาลให้มีหมู่แอลคิลที่ยาวขึ้น อาจช่วยให้มีคุณสมบัติที่สามารถละลายในตัวทำละลายต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลงไป และอาจนำไปสู่โครงสร้างใหม่ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง herpes viruses ที่ดีขึ้น นอกจากนี้การศึกษากลไกของโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปต่อเอนไซม์ topoisomerase ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีผู้ให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการพัฒนายาต้าน herpes simplex จะช่วยให้ได้ข้อมูลแนวโน้มของโครงสร้างที่มีผลต่อคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และแนวโน้มของการยับยั้งของสารที่เป็น intercalators ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษากลไกของการดัดแปลงส่วนโครงสร้างแมงจิเฟอรินต่อการยับยั้ง herpes viruses ให้ได้สารที่มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งที่ดีขึ้น

โครงสร้างของแมงจิเฟอรินมีส่วนของหมู่ฟังก์ชันที่สามารถดัดแปลงได้โดยอาศัยปฏิกิริยาอย่างง่าย 3 แบบ คือ แบบ (A) การเปลี่ยนให้เป็นเกลือของโลหะประเภทต่างๆ แบบ (B) การเปลี่ยนหมู่แอลกอฮอล์บนวงน้ำตาล ให้เป็นหมู่ที่ละลายน้ำได้เช่น ฟอสเฟต, คาร์บอกซิเลต แบบ (C) การเปลี่ยนหมู่ OH บนวง xanthone ให้มีหมู่แอลคิล, ไวนิลดีน หรืออนุพันธ์เบนซิล (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 แนวทางการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง แมงจิเฟอริน

3.1 การสกัดและการแยกสารแมนจิเฟอรินจากเปลือกและใบมะม่วงให้ได้สารบริสุทธิ์

เนื่องจากการดัดแปลงโครงสร้างของแมนจิเฟอรินต้องใช้สารตั้งต้นในปริมาณมาก และสารดังกล่าวมีราคาสูง จึงทำการสกัดสารตั้งต้นจากใบมะม่วงและทำการแยกบริสุทธิ์ เพื่อให้ได้สารปริมาณมากและได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์รวมถึงความบริสุทธิ์ของสารที่ได้เพื่อนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสกัดสารแมนจิเฟอรินจากใบมะม่วงเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้น
2. สามารถแยกบริสุทธิ์สารแมนจิเฟอรินจากสารสกัดใบมะม่วงได้

เครื่องมือและสารเคมี

1. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Fisher Scientific, United State America
2. เครื่องชั่ง (Balance) 2 ตำแหน่ง, Sartorius, Germany
3. เครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Rotary Evaporator), Buchi B-171, Switzerland
4. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance), Bruker 400 MHz, Germany
5. 95% เอทานอล (C_2H_5OH), Commercial Grade
6. Acetic acid (CH_3COOH), Glacial Grade, Lab Scan, Thailand
7. สารมาตรฐาน Mangiferin from *Mangifera indica* bark 98% (Sigma-Aldrich)

วิธีการทดลอง

ในการสกัดและแยกบริสุทธิ์สารแมนจิเฟอรินจากใบมะม่วง มีขั้นตอนในการดำเนินการทั้งหมด 3 ขั้นตอน คือ การเตรียมตัวอย่างใบมะม่วง การสกัดสารแมนจิเฟอรินจากใบมะม่วง และการแยกบริสุทธิ์สารแมนจิเฟอริน ด้วยวิธีการตกผลึก (crystallization) ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างใบมะม่วง

นำใบมะม่วงมาล้างให้สะอาด และเช็ดให้แห้งเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน จากนั้นนำไปตากแดดให้แห้งสนิท สุดท้ายนำใบมะม่วงแห้งนั้นมาบดให้ละเอียด เพื่อทำการสกัดต่อไป

2. การสกัดสารแมนจิเฟอรินจากใบมะม่วง

นำใบมะม่วงที่บดละเอียด 300 กรัม ใส่ในถังสกัด เติมสารละลาย 95% เอทานอล ทิ้งไว้ 2 วัน (โดยกวนบ่อยๆ) รินของเหลวออกจากถังสกัด กรองเอากากทิ้งไปด้วยผ้าขาวบาง ทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นกรองสารสกัดที่ได้ด้วยชุดกรองสุญญากาศ และล้างตะกอนบนกระดาษกรองด้วยสารละลาย 95% เอทานอล จะได้ สารสกัดเป็นตะกอนสีน้ำตาล

3. การแยกบริสุทธิ์สารแมนจิเฟอริน จากใบมะม่วงด้วยวิธีการตกผลึก (crystallization)

นำสารสกัดที่ได้ ใส่ลงในปีกเกอร์ เติมสารละลาย 50% เอทานอลในน้ำ ให้ความร้อนจนกระทั่งมีอุณหภูมิ $70^{\circ}C$ ต้มต่อไปอีกเป็นเวลา 30 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ พร้อมกับคนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก จากนั้นนำของเหลวที่ได้ไปกรองขณะร้อน แล้วเก็บของเหลวที่กรองได้ไว้ในขวดรูปชมพู่ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน เพื่อให้แมนจิเฟอริน ตกผลึกออกมา ทำการกรองผลึกแมนจิเฟอริน และล้างผลึกด้วยสารละลาย 50% เอทานอล (เย็น) บนกระดาษกรองจนได้ผลึกสีเหลืองอ่อน ทิ้งไว้ให้ผลึกแห้ง และทำการตกผลึกซ้ำอีกครั้ง

ด้วยสารละลาย 50% กรดอะซิติกในน้ำ ด้วยวิธีการเดียวกับการตกผลึกด้วยสารละลาย 50% เอทานอล และซังน้ำหนักของสารแมงจีเฟอรินที่ตกผลึกได้ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร แมงจีเฟอริน ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR)

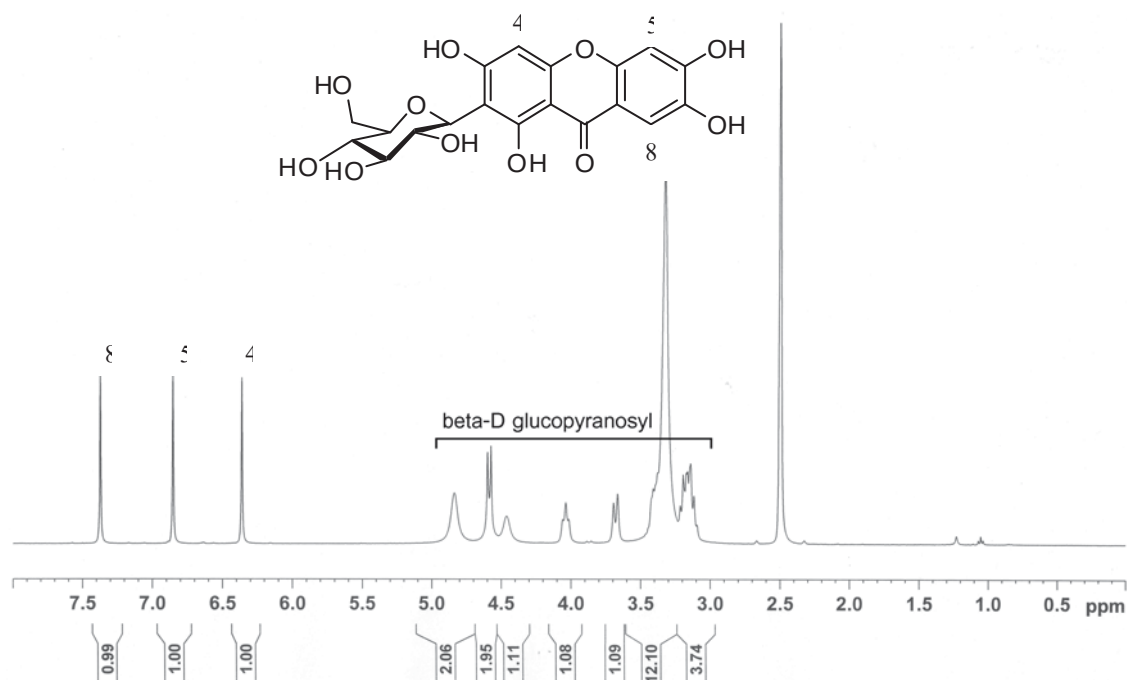
ผลการทดลอง

เมื่อทำการสกัดใบมะม่วง ด้วยสารละลาย 95 % เอทานอล จะได้ของเหลวที่มีลักษณะเป็นสีเขียวเข้ม ทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ จะได้ตะกอนเกิดขึ้น และเมื่อนำไปกรองแยกตะกอนและ ล้างคลอโรฟิลล์ออกจากตะกอนด้วยสารละลาย 95% เอทานอล จะได้ตะกอนสีน้ำตาล และเมื่อนำตะกอนสีน้ำตาลที่ได้ มาทำการตกผลึกด้วยสารละลาย 50 % เอทานอลในน้ำ จะได้ตะกอนสีเหลืองออกมา และเมื่อทำการตกผลึกซ้ำอีกครั้งด้วย 50% กรดอะซิติกในน้ำ จะได้ตะกอนสีเหลืองอ่อน จำนวน 20.67 กรัม คิดเป็นร้อยละ 7 จากใบมะม่วงแห้ง จำนวน 300 กรัม

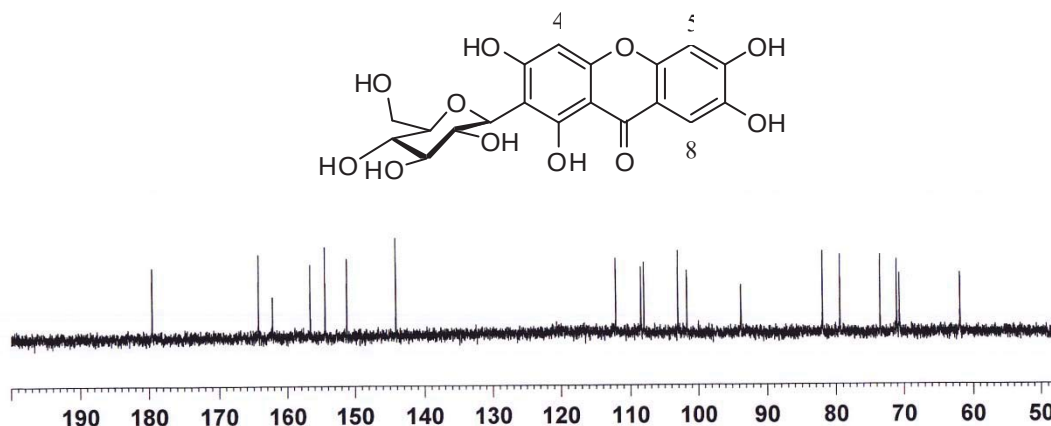
จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารแมงจีเฟอริน ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสารแมงจีเฟอรินที่เกิดขึ้น จากผลวิเคราะห์ ^1H NMR Spectrum (ภาพ 3.2) และ ^{13}C NMR Spectrum (ภาพ 3.3) สามารถระบุโครงสร้างของสารดังกล่าวดังนี้

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ตรวจพบสัญญาณที่ δ 7.37 (s, 1H, H_8), 6.85 (s, 1H, H_5), 6.36 (s, 1H, H_4) ซึ่งเป็นช่วงของอะโรมาติก และช่วง 4.84 – 3.10 ppm ซึ่งเป็นช่วงของกลุ่มน้ำตาล

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ตรวจพบสัญญาณที่ δ 179.56 (CO), 164.3 (C_3), 162.26 (C_1), 156.68 (C_{4a}), 154.48 (C_6), 151.24 (C_{4b}), 144.19 (C_7), 112.19 (C_{8a}), 108.54 (C_8), 108.09 (C_2), 103.09 (C_5), 101.77 (C_{8b}), 93.78 (C_4), 82.05, (C_5), 79.46 (C_3), 73.55 (C_1), 71.11 (C_4), 70.70 (C_2), 61.96 (C_6)



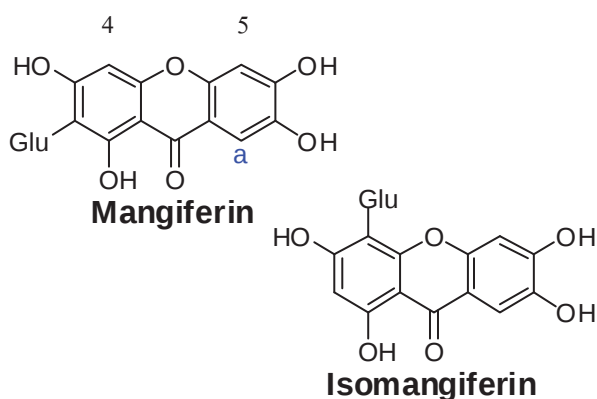
ภาพที่ 3.2 ^1H NMR spectrum ของสารแมงจีเฟอรินที่สกัดได้จากใบมะม่วง

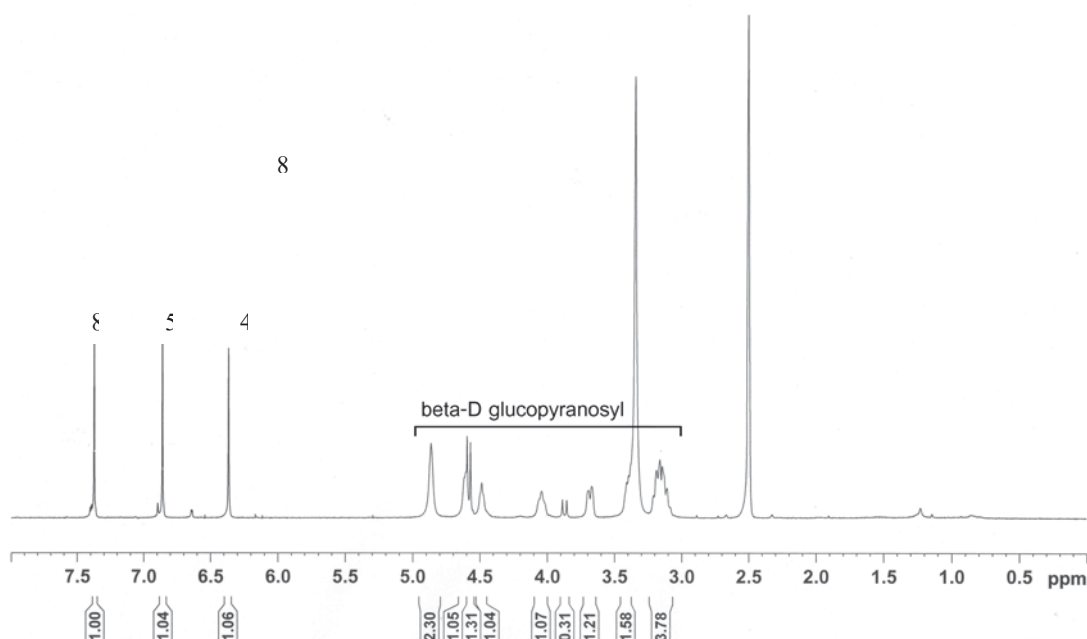


ภาพที่ 3.3 ^{13}C NMR spectrum ของสารแมงจิเฟอรินที่สกัดได้จากใบมะม่วง

สรุปผลการทดลอง

เมื่อทำการสกัดใบมะม่วง ด้วยสารละลาย 95 % เอทานอล และทำการตกผลึกด้วยสารละลาย 50% เอทานอลในน้ำ จะได้ตะกอนสีเหลืองออกมา และเมื่อทำการตกผลึกซ้ำอีกครั้งด้วย 50% กรดอะซิติกในน้ำ ซึ่งจะได้ตะกอนสีเหลืองนวล ๆ ออกมา จำนวน 21.22 กรัม คิดเป็นร้อยละ 7 และเมื่อนำสารแมงจิเฟอรินที่สามารถสกัดออกมาได้นั้น มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารสกัดที่สกัดได้นั้นเป็นสารแมงจิเฟอรินบริสุทธิ์ เนื่องจากมีค่า Retention time เท่ากับสารแมงจิเฟอรินมาตรฐาน คือ 6.8 นาที และเมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^1H NMR spectroscopy เปรียบเทียบกับสารแมงจิเฟอรินมาตรฐาน (ภาพ 3.4) พบว่าสารแมงจิเฟอรินที่สกัดได้นั้นมีความบริสุทธิ์มากกว่าสารแมงจิเฟอรินมาตรฐาน ซึ่งสามารถสังเกตได้จากในช่วงสัญญาณ 7.37 - 6.36 ppm ที่เป็นช่วงของกลุ่มอะโรมาติกที่ไม่พบสัญญาณโปรตอนจากสาร ไอโซแมงจิเฟอริน (isomangiferin) ในช่วงดังกล่าวใน ^1H NMR ของสารที่สกัดได้ ในขณะที่พบสัญญาณโปรตอนของไอโซแมงจิเฟอรินปนอยู่บางส่วนในสารมาตรฐาน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารแมงจิเฟอริน ที่แยกบริสุทธิ์ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่าสารแมงจิเฟอรินที่ซื้อจากบริษัทผู้ผลิต





ภาพ 3.4 ^1H NMR spectrum ของสาร แมงจิเฟอรินมาตรฐานที่ซื้อจากบริษัทผู้ผลิต

3.2 ดัดแปลงโครงสร้างของ แมงจิเฟอริน ให้ได้สารอนุพันธ์ของ แมงจิเฟอรินที่อยู่ในรูปเกล็ดอนุพันธ์น้ำตาลและอนุพันธ์ฟีนอล

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินที่อยู่ในรูปเกล็ด, อนุพันธ์น้ำตาลและอนุพันธ์ฟีนอล
2. เพื่อศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโคปีของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้

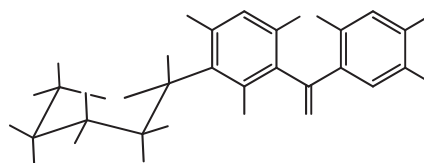
เครื่องมือและสารเคมี

1. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Fisher Scientific, United State America
2. เครื่องชั่ง (Balance) 4 ตำแหน่ง, Sartorius, Germany
3. เครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Rotary Evaporator), Buchi B-171, Switzerland
4. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance), Bruker 400 MHz, Germany
5. UV-spectrometer, Perkin-Elmer
6. Ethy acetate, Commercial Grade
7. Dicloromethane, CH_2Cl_2 , commercial grade
8. Dmethyl formamide, $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$, Labscan
9. 2-methyl-2-butanol, commercial grade
10. NaHCO_3 , 98%, Fluka
11. K_2CO_3 , 98%, Fluka
12. DMSO-d_6 , 98% Wilmard
13. DMSO , 98%, Fluka
14. 95% เอทานอล ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), Commercial Grade

15. CHCl_3 , Commercial Grade
16. แมงจิเฟอริน, จากที่สกัดแยกได้
17. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Commercial Grade
18. Acetone, commercial grade
19. Vinyl acetate, 98%, Sigma Aldrich
20. Lipase , Novozyme 435, Sigma Aldrich
21. Vinyl palmitate, เตรียมขึ้นเองตามวิธีในเอกสารอ้างอิง¹³
22. Dimethyl sulphate, 98%, Fluka
23. Methyl iodide, 98%, Sigma Aldrich
24. Cinnamoyl chloride, 98% Sigma Aldrich
25. Benzyl chloride, 98%, Sigma Aldrich
26. Acetic anhydride, commercial grade
27. Silica gel g 60, Merck, Germany
28. Lipase B acrylic resin from *Candida Antarctica*: Novozyme 435, Sigma Aldrich
29. Lipase B *Candida antarctica* immobilized on Immobead 150, recombinant from *Aspergillus oryzae*
30. Vinyl laurate, เตรียมขึ้นเองตามวิธีในเอกสารอ้างอิง
31. Methyl iodide, 98%, Sigma Aldrich
32. Allyl bromide, 98%, Sigma Aldrich
33. 1-bromohexane, 98%, Sigma Aldrich
34. Octanoyl chloride, 98% Sigma Aldrich
35. Cinnamoyl chloride, 98% Sigma Aldrich
36. Benzyl chloride, 98%, Sigma Aldrich
37. Acetic anhydride, commercial grade
38. p-methoxy-Cinnamoyl chloride เตรียมขึ้นเองตามวิธีในเอกสารอ้างอิง¹⁴
39. p-Chloro-Cinnamoyl chloride เตรียมขึ้นเองตามวิธีในเอกสารอ้างอิง¹⁴
40. o-Chloro- Cinnamoyl chloride เตรียมขึ้นเองตามวิธีในเอกสารอ้างอิง¹⁴

*ตัวทำละลาย commercial grade ทุกชนิด ทำการ dry และ กลั่นก่อนใช้งาน

3.2.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือของ แมงจิเฟอริน

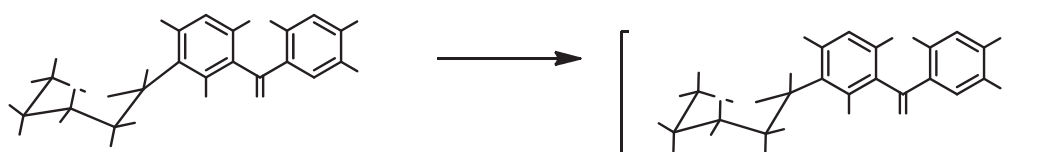


เนื่องจากแมงจิเฟอรินมีสมบัติการละลายน้ำได้น้อย การดัดแปลงโครงสร้างของสารโดยการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปเกลือของโลหะจะช่วยให้ได้อนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติที่สามารถละลายในน้ำได้ดีขึ้นและอาจเป็นประโยชน์ต่อการเตรียมส่วนผสม เพื่อใช้ในด้านเครื่องสำอางและเภสัชและอาจส่งผลต่อฤทธิ์การต้านไวรัสได้ดีขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินที่อยู่ในรูปเกลือ
2. เพื่อศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปี UV และ NMR ของเกลือที่สังเคราะห์ได้ และเพื่อเปรียบเทียบสมบัติของ UV และ NMR ของเกลือที่สังเคราะห์ได้

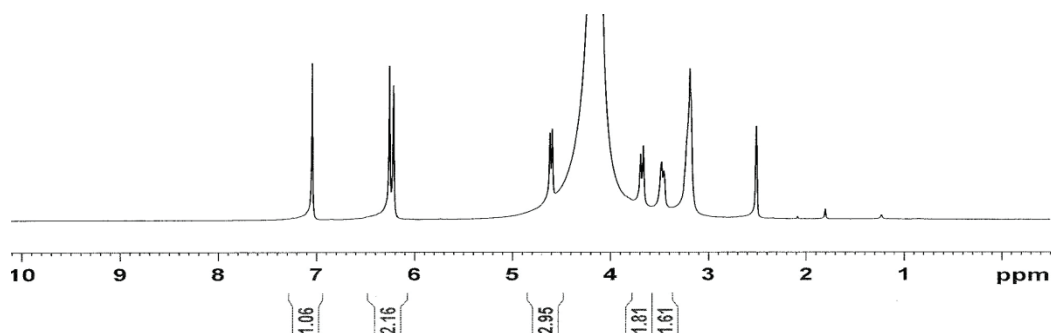
3.2.1.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือโซเดียมของ แมงจิเฟอริน



ชั่งแมงจิเฟอริน 0.132 กรัม (0.3 mmol) ละลายในของผสมของน้ำและเอทานอล อัตราส่วน 1:9 ปริมาตร 2.5 มล ค่อยๆ เติม สารละลาย NaHCO_3 0.026 กรัม (0.3 mmol) ละลายในน้ำ 2 มล อย่างช้าๆ ประมาณ 30 นาที ได้สารละลายใส และเติมสารละลายผสม เอทานอล: Ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1.5 (v/v) จนเกิดตะกอน กรองของแข็ง นำไปอบที่ 60°C ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.130 กรัม

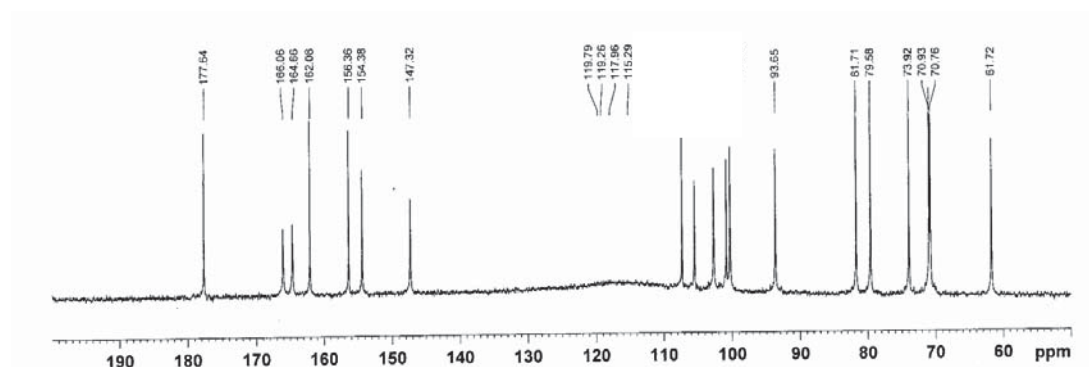
ผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจิเฟอริน 0.132 กรัม มาละลายในของผสมของน้ำและเอทานอล แล้วค่อยๆ เติมสารละลาย NaHCO_3 อย่างช้าๆ จะได้สารละลายใสสีเหลืองและเมื่อนำไปเติมสารละลายผสม เอทานอล: Ethyl acetate จะได้ตะกอนสีเหลืองเกิดขึ้น เมื่อนำไปกรองและอบที่ 60°C ได้สารผลิตภัณฑ์ของแข็งสีเหลืองอ่อนหนัก 0.130 กรัม (93% yield) จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเกลือโซเดียมแมงจิเฟอริน ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ให้ข้อมูลดังนี้ ^1H NMR (ดังแสดงในภาพที่ 3.1) ^{13}C NMR (ดังแสดงในภาพที่ 3.1) ซึ่งแสดงลักษณะที่แตกต่างจากแมงจิเฟอริน และ HMQC และ HMBC แสดงการเกิด phenoxide ของ-OH ที่ตำแหน่ง C-6



ภาพที่ 3.5 ^1H NMR spectrum ของโซเดียมแมงจีเฟอริน

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ตรวจพบสัญญาณของวงอะโรมาติกที่ δ 7.04 (s, 1H, H_8), 6.26 (s, 1H, H_5) และ 6.21 (s, 1H, H_4) และช่วง 4.61-3.2 ซึ่งเป็นช่วงของกลุ่มน้ำตาล โดยแสดงสัญญาณตำแหน่งไกลที่สุดของวงกลูโคส ที่ 4.61 (1H, d, $J = 9.8$ Hz) ซึ่งแสดงลักษณะ beta-glycoside



ภาพที่ 3.6 ^{13}C NMR spectrum ของโซเดียมแมงจีเฟอริน

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ตรวจพบสัญญาณที่ δ 177.64 (CO), 166.06 (C_6), 164.66 (C_3), 162.08 (C_1), 156.36 (C_{4a}), 154.38 (C_{4b}), 147.32 (C_7), 107.32 (C_2), 105.48 (C_{8a}), 102.69 (C_8), 100.85 (C_5), 100.30 (C_{8b}), 93.65 (C_4), 81.71 (C_5), 79.58 (C_3), 73.92 (C_1), 70.93 (C_4), 70.76 (C_2), 61.72 (C_6)

สรุปผลการทดลอง

สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือโซเดียมของแมงจีเฟอรินได้ 0.130 กรัม เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 93% โดยเกลือโซเดียมแสดงค่าเคมีคัลลิตี้ที่แตกต่างกับแมงจีเฟอรินทั้ง ^1H NMR และ ^{13}C NMR โดยเฉพาะค่าเคมีคัลลิตี้ ^{13}C NMR ของคาร์บอนในวง B ซึ่งมีค่าที่เปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 6, 4b, 7, 8a และ 8 โดยเฉพาะที่ C_6 ซึ่งมีค่าเปลี่ยนแปลงมากที่สุด ดังแสดงค่าเปรียบเทียบในตารางที่ 3.1 และตารางแสดงความเชื่อมโยงของโปรตอน-คาร์บอน 2D NMR HMQC และ HMBC ดังในตารางที่ 3.2 ทำให้สามารถยืนยันการเกิด phenoxide ของ-OH ที่ตำแหน่ง C-6 และ HMBC ดังนี้

ตารางที่ 3.1 แสดงการเปรียบเทียบค่าเคมีคัลลิตี้ของ ^{13}C NMR ของแมงจีเฟอรินกับโซเดียมแมงจีเฟอริน

C	แมงจีเฟอริน	Na แมงจีเฟอริน	$\Delta\delta$
---	-------------	----------------	----------------

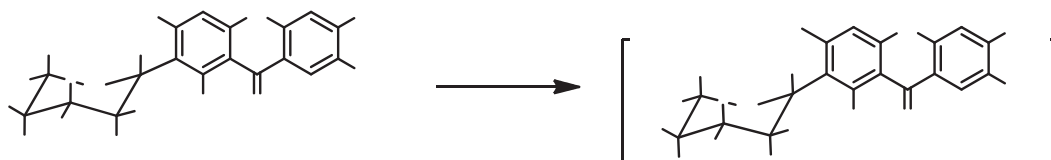
CO	179.56	177.64	-1.92
3	164.30	164.66	0.36
1	162.26	162.08	-0.18
4a	156.68	156.36	-0.32
6	154.48	166.06	11.58
4b	151.24	154.38	3.14
7	144.19	147.32	3.13
8a	112.19	105.48	-6.71
8	108.54	102.69	-5.85
2	108.09	107.32	-0.77
5	103.09	100.3	-2.79
8b	101.77	100.85	-0.92
4	93.78	93.65	-0.13

ตารางที่ 3.2 แสดงข้อมูล 2D NMR HMQC, HMBC ของเกล็ดหีไคเดียมแมงจิเฟอริน

	H	δ (ppm) HMQC	δ C (ppm)	HMBC
(CO)			177.64 (CO)	
C ₁			162.08	
C ₂			107.32	
C ₃			164.66	
C ₅	5	6.26 (s, 1H)	100.85	C _{8a} , C _{8b} , C7, CO
C ₆			166.06	
C ₇			147.32	
C ₈	8	7.04 (s, 1H)	102.69	C _{8a} , C _{8b} , C7, CO
C _{4a}			156.36	
C _{4b}			154.38	
C _{8a}			105.48	
C _{8b}			100.85	
C ₄	4	6.21 (s, 1H)	93.65	C ₃ , C _{4a} , C _{4b} , CO
C _{1'}	1'	4.61 (1H, d, J = 9.8 Hz)	73.92	C _{1''} , C _{3'} , C _{2'} , C _{6'}
C _{2'}	2'	4.03 (1H, d, J = 9.8 Hz)	70.76	C _{1''} , C _{3''}
C _{3'}	3'	3.16 (3H, m)	79.58	C _{5''} , C _{4''}
C _{4'}	4'	3.16 (3H, m)	70.93	C _{5''}

C _{5'}	5'	4.16 (1H, d, J = 9.8 Hz)	81.71	C _{4'} , C _{6'}
C _{6'}	6'	3.4, 3.6 (2H, dd 11.0Hz, 2.1 Hz)	61.72	C _{5'}

3.2.1.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือโปแตสเซียมของ แมนจีเฟอริน



ชั่งแมนจีเฟอริน 0.422 กรัม (1 mmol) ละลายในเอทานอล 7 มล เติมน้ำ 3 มล ค่อยๆ กวน และ เติมสารละลาย K₂CO₃ (0.055 กรัม 0.4 mmol) ละลายในน้ำ 27.6 มล) อย่างช้าๆ จนได้สารละลายใส เติมสารละลายผสม เอทานอล : CHCl₃ อัตราส่วน 7:1 (v/v) จนเกิดตะกอน กรองของแข็ง นำไปอบที่ 60°C ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.448 กรัม

ผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจิเฟอริน 0.422 กรัม ละลายในของผสมของน้ำและเอทานอล แล้วค่อยๆ เติม สารละลาย K_2CO_3 อย่างช้าๆ จะได้สารละลายใสสีเหลืองอ่อน เมื่อเติมสารละลายผสม เอทานอล: $CHCl_3$ จะได้ตะกอนสีเหลืองเกิดขึ้น เมื่อนำไปกรองและอบที่ $60^\circ C$ ได้สารผลิตภัณฑ์ของแข็งสีเหลืองอ่อนหนัก 0.448 กรัม (97% yield) จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเกลือโปแตสเซียม แมงจิเฟอริน ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ให้ข้อมูล 1H NMR (ดังแสดงในภาพที่ 3.7) ^{13}C NMR (ดังแสดงในภาพที่ 3.8) ซึ่งแสดงลักษณะที่แตกต่างจากแมงจิเฟอริน และ HMQC และ HMBC แสดงการเกิด phenoxide ของ -OH ที่ตำแหน่ง C-6

┐

ภาพที่ 3.7 1H NMR spectrum ของโปแตสเซียมแมงจิเฟอริน

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) ตรวจพบสัญญาณของวงอะโรเมติกที่ δ 7.10 (s, 1H, H_8), 6.45 (s, 1H, H_5) และ 6.26 (s, 1H, H_4) และช่วง 4.58-3.1 ซึ่งเป็นช่วงของกลุ่มน้ำตาล โดยแสดงสัญญาณตำแหน่งไกลที่สุดของวงกลูโคส ที่ 4.61 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H) ซึ่งแสดงลักษณะ beta-glycoside

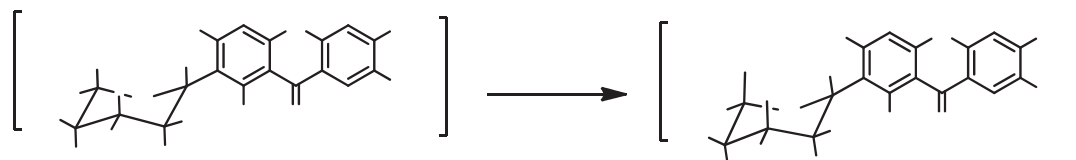
┐ ภาพที่ 3.8 ^{13}C NMR spectrum ของโปแตสเซียมแมงจิเฟอริน

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) ตรวจพบสัญญาณที่ δ 178.10 (CO), 163.90 (C_6), 163.90 (C_3), 161.54 (C_1), 156.49 (C_{4a}), 153.88 (C_{4b}), 146.39 (C_7), 107.05 (C_2), 106.89 (C_{8a}), 103.92 (C_8), 101.20 (C_5), 101.15 (C_{8b}), 93.75 (C_4), 81.41 (C_5), 79.03 (C_3), 73.61 (C_1), 70.60 (C_4), 70.60 (C_2), 61.58 (C_6)

สรุปผลการทดลอง

สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือโปแตสเซียมของแมงจิเฟอริน ได้ 0.448 กรัม เปรี่เซ็นต์ผลผลิต 97% โดยเกลือโปแตสเซียมที่สังเคราะห์ได้แสดงค่าเคมีคัลลิทที่แตกต่างกับแมงจิเฟอรินทั้ง 1H NMR และ ^{13}C NMR และมีค่าเคมีคัลลิทเปลี่ยนแปลงไปในทำนองเดียวกันกับเกลือโซเดียมแมงจิเฟอริน ซึ่งมีค่าที่เปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดที่วง B ที่คาร์บอนตำแหน่ง 6, 4b, 7, 8a และ 8 โดยเฉพาะที่ C_6 ซึ่งมีค่าเปลี่ยนแปลงมากที่สุดเช่นกัน ทำให้สามารถยืนยันการเกิด phenoxide ของ -OH ที่ตำแหน่ง C-6

3.2.1.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือแคลเซียมของ แมงจิเฟอริน



ซึ่งเกลือโปแตสเซียมแมงจิเฟอริน 0.230 กรัม (0.5 mmol) ละลายในน้ำ 25 มล ค่อยๆ กวนของผสม และเติมสารละลาย $CaCl_2$ 0.050 กรัม (0.05 mmol) ละลายในน้ำ 15 มล อย่างช้าๆ และทำให้ของผสมเย็นลงที่ $4^\circ C$ นาน 3 ชั่วโมง ได้ของแข็งตกตะกอน กรองตะกอนที่ได้นำไปอบที่ $60^\circ C$ ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.116 กรัม

ผลการทดลอง

เมื่อนำโปแตสเซียมแมงจิเฟอริน 0.230 กรัม ละลายในน้ำและค่อยๆ เติมสารละลาย CaCl_2 0.050 กรัม อย่างช้าๆ ประมาณ 30 นาที จะได้สารละลายใสสีเหลืองและเมื่อนำไป ทำให้เย็นที่ 4°C จะได้ตะกอนสีเหลืองอมเขียวเกิดขึ้น เมื่อนำไปกรองและอบที่ 60°C ได้สารผลิตภัณฑ์ของแข็งสีเขียวเกิดขึ้น มีน้ำหนัก 0.116 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 53%

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเกลือแคลเซียมแมงจิเฟอรินด้วยเทคนิค NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้นจากผลวิเคราะห์จาก ^1H NMR Spectrum ดังกล่าวดังนี้

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) ตรวจพบสัญญาณของวงอะโรมาติกที่ δ 7.18 (s, 1H, H_8), 6.51 (s, 1H, H_5) และ 6.31 (s, 1H, H_4), และช่วง 4.59-3.0 ซึ่งเป็นช่วงของกลุ่มน้ำตาล โดยแสดงสัญญาณตำแหน่งไกลที่สุดของวงกลูโคส ที่ 4.59 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H,) ซึ่งแสดงลักษณะ beta-glycoside

┐

ภาพที่ 3.9 ^1H NMR spectrum ของแคลเซียมแมงจิเฟอริน

┐

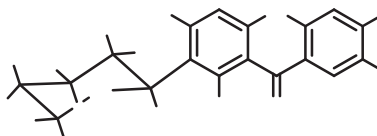
ภาพที่ 3.10 ^{13}C NMR spectrum ของแคลเซียมแมงจิเฟอริน

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) ตรวจพบสัญญาณที่ δ 178.57 (CO), 164.13 (C_6), 162.14 (C_3), 162.14 (C_1), 156.46 (C_{4a}), 153.21 (C_{4b}), 146.49 (C_7), 108.08 (C_2), 107.60 (C_{8a}), 105.08 (C_8), 102.5 (C_5), 101.71 (C_{8b}), 93.66 (C_4), 82.56 (C_5), 80.20 (C_3), 73.76 (C_1), 70.75 (C_4), 70.03 (C_2), 61.86 (C_6)

สรุปผลการทดลอง

สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือแคลเซียมของแมงจิเฟอริน ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 53% เกลือที่เตรียมขึ้นได้ แสดงเอกลักษณ์ทาง ^1H NMR อย่างเห็นได้ชัดเจน และแตกต่างจากสารตั้งต้นอย่างชัดเจน โดยเฉพาะค่า chemical shift ของโปรตอนบนวงอะโรมาติก ที่แสดงแนวโน้มของ upfield ซึ่งตำแหน่งที่ได้รับอิทธิพลสูงสุดคือ H_5 ซึ่งยืนยันตำแหน่งของประจุลบที่อยู่ใกล้คาร์บอนในตำแหน่งคาร์บอนที่ 6 ดังแสดงค่าเปรียบเทียบในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงค่าเปรียบเทียบ chemical shift ของ แมงจิเฟอริน และเกลืออนุพันธ์ของแมงจิเฟอริน



H	แมงจิเฟอริน	โซเดียมแมงจิเฟอริน	$\Delta\delta$	โปแตสเซียมแมงจิเฟอริน	$\Delta\delta$	แคลเซียมแมงจิเฟอริน	$\Delta\delta$
H_8	7.37	7.04	0.33	7.10	0.07	7.18	0.19

H ₅	6.85	6.26	0.59	6.45	0.4	6.51	0.34
H ₄	6.36	6.21	0.15	6.23	0.13	6.31	0.05

3.2.1.4 การวิเคราะห์ธาตุโลหะสารอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่อยู่ในรูปเกลือ

ในการยืนยันองค์ประกอบโลหะของเกลือที่เตรียมได้ทั้งสามชนิด ได้ทำการตรวจหาปริมาณธาตุโลหะโดยวิธี Inductively Coupled Plasma Optical Emission

วิธีทดลอง

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยละลายตัวอย่างด้วยน้ำ deionized water ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.01% (W/V) แล้วนำไปวัดด้วยเครื่องมือ Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer, Spectro CIROSCCD

ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุโลหะด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma Optical Emission ดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 เปอร์เซ็นต์ธาตุโลหะของเกลือทั้งสามชนิด

ตัวอย่าง	ปริมาณธาตุ %(w/w)			ปริมาณธาตุ %(w/w) ทางทฤษฎี
	Na	K	Ca	
Na- แมงจีเฟอริน	3.5 ± 0.05	<0.0085	<0.014	5.17
K- แมงจีเฟอริน	<0.0015	3.5 ± 0.06	<0.014	7.98
Ca- แมงจีเฟอริน	<0.0015	1.6 ± 0.02	3.3 ± 0.2	4.53

สรุปผลการทดลอง

อนุพันธ์เกลือโซเดียมและโปแตสเซียมของแมงจีเฟอรินมีองค์ประกอบธาตุโซเดียมและโปแตสเซียมตามลำดับ และปริมาณ % ของธาตุโซเดียมและโปแตสเซียมแตกต่างจากเปอร์เซ็นต์ทางทฤษฎี (คำนวณจาก Elemental Analysis) อาจเนื่องมาจากเกลือโซเดียมของ แมงจีเฟอริน และเกลือโปแตสเซียมของแมงจีเฟอรินเป็นเกลือที่มีน้ำผลึกเป็นองค์ประกอบที่อยู่ในลักษณะ hydrate เกลือแคลเซียมที่เตรียมได้ มีเปอร์เซ็นต์ของแคลเซียมน้อยกว่าปริมาณ % ทางทฤษฎี และจากการวิเคราะห์ % ของธาตุโลหะพบไอออนของโปแตสเซียมปนอยู่เล็กน้อย ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากขั้นตอนการเตรียมเกลือดังกล่าวที่ต้องผ่านการเตรียมจากเกลือโปแตสเซียมของแมงจีเฟอริน ทำปฏิกิริยากับสารละลาย CaCl₂ และทำการตกผลึก โดยปฏิกิริยามีผลึก KCl ที่เกิดขึ้นซึ่งอาจจับอยู่กับเกลือแคลเซียมที่เกิดขึ้นบางส่วน

3.2.1.4 การศึกษาสมบัติทาง UV spectroscopy

เพื่อให้ได้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีเพื่อใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และเปรียบเทียบความแตกต่างของเกลือ

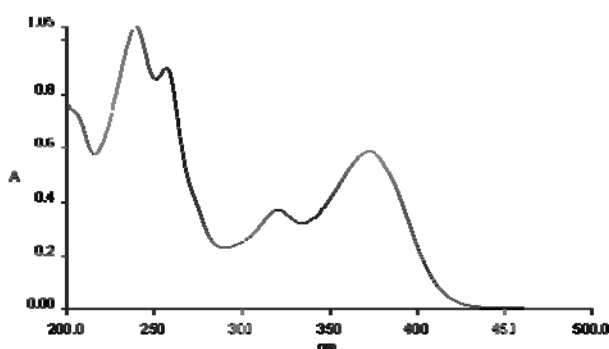
ที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 3 ชนิด จึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทาง UV ของเกลือ โซเดียม, โพแทสเซียม และ แคลเซียม เปรียบเทียบกับสารตั้งต้น

วิธีทดลอง

1. เตรียมสารละลาย แมงกานีสเพอร์มังกาตัมเข้มข้น 3.5×10^{-5} M โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 200-500 nm
2. เตรียมสารละลายโซเดียม แมงกานีสเพอร์มังกาตัมเข้มข้น 5.2×10^{-5} M โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 200-500 nm
3. เตรียมสารละลายโพแทสเซียม แมงกานีสเพอร์มังกาตัมเข้มข้น 6.3×10^{-5} M โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 200-500 nm
4. เตรียมสารละลายแคลเซียม แมงกานีสเพอร์มังกาตัมเข้มข้น 3.1×10^{-5} M โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 200-500 nm

ผลการทดลอง

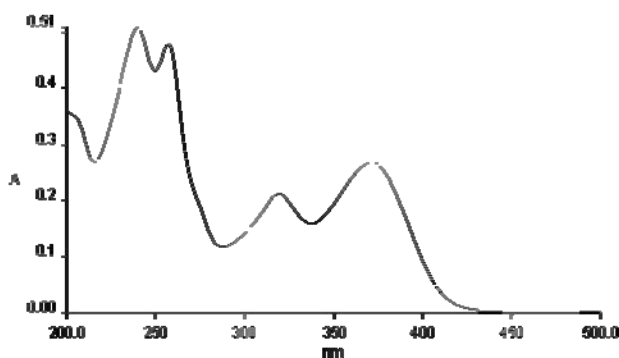
เกลือทั้งสามชนิด ซึ่งมีสมบัติละลายน้ำได้ดีมาก ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 3.11-3.14



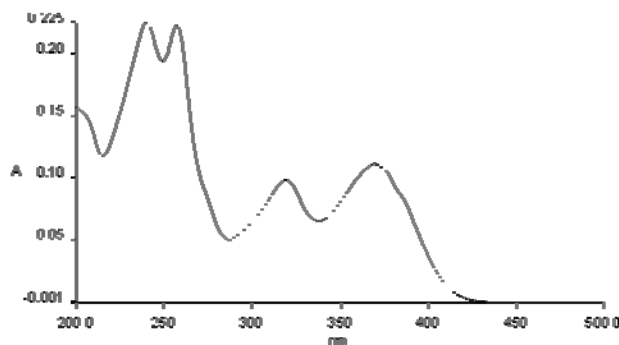
ภาพที่ 3.11 แสดง UV spectrum สารละลายแมงกานีสเพอร์มังกาตัมในน้ำ

Γ

ภาพที่ 3.12 แสดง UV spectrum สารละลายเกลือโซเดียมแมงกานีสเพอร์มังกาตัม ในน้ำ



ภาพที่ 3.13 แสดง UV spectrum สารละลายเกลือโพแทสเซียมแมงกานีสเพอร์มังกาตัม ในน้ำ



ภาพที่ 3.14 แสดง UV spectrum สารละลายเกลือแคลเซียมแมงจิเฟอริน ในน้ำ

เกลือทั้งสามชนิดที่เตรียมขึ้นได้ แสดงเอกลักษณ์ ทาง UV ที่คล้ายกัน และมีค่า ϵ ที่แตกต่างกันและต่างจากสารตั้งต้น แมงจิเฟอริน ดังแสดงในตารางที่ 3.5

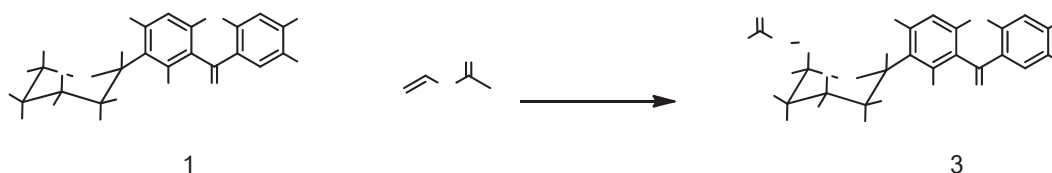
ตาราง 3.5 เปรียบเทียบค่าการดูดกลืน UV ของแมงจิเฟอรินกับเกลือโซเดียม, โพแทสเซียม และแคลเซียม

Wavelength (nm)	ค่า ϵ			
	240	257	317	365
แมงจิเฟอริน	20,269.57	17,371.98	7,132.957	11302.7
โซเดียม แมงจิเฟอริน	6,283.57	6,080.87	2,695.85	3,200.66
โพแทสเซียม แมงจิเฟอริน	8,054.76	7,582.07	3,356.41	4,246.28
แคลเซียม แมงจิเฟอริน	7,346.73	7,274.87	2,910.60	3,604.44

3.2.2 ดัดแปลงโครงสร้างของ แมงจิเฟอริน โดยการเปลี่ยนหมู่แอลกอฮอล์บนวงน้ำตาลให้ได้ สารอนุพันธ์ของ แมงจิเฟอริน ตามแนวทาง B

เนื่องจากแมงจิเฟอรินมีสมบัติการละลายได้น้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์และ oil ทำให้เกิดความยุ่งยากในการเตรียมส่วนผสมเพื่อใช้ในด้านเภสัชวิทยาและทำให้ลดความสามารถในการใช้เป็นสารออกฤทธิ์ การดัดแปลงโครงสร้างของสาร โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลบนวงน้ำตาลให้มีหมู่แอลคิลที่ยาวขึ้นอาจช่วยให้มีคุณสมบัติที่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ดีขึ้นและอาจนำไปสู่ผลการออกฤทธิ์ที่ดีขึ้น ในการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยวิธีทางชีวภาพ เนื่องจากสารตั้งต้นมีหมู่ น้ำตาลบนวงหลายตำแหน่ง การใช้วิธีทางปฏิกิริยาเคมีไม่สามารถควบคุมตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาแบบจำเพาะ (regioselective) จะทำให้เกิดของผสมของผลิตภัณฑ์ที่เกิดปฏิกิริยาหลายตำแหน่งพร้อมกัน ในการทดลองจึงเลือกศึกษาวิธีที่ทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์ไลเปสในการเกิดปฏิกิริยา transesterification เพื่อให้มีความจำเพาะกับหมู่แอลกอฮอล์ปฐมภูมิบนวงน้ำตาล

3.2.2.1 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของแมงจิเฟอรินกับ vinyl acetate



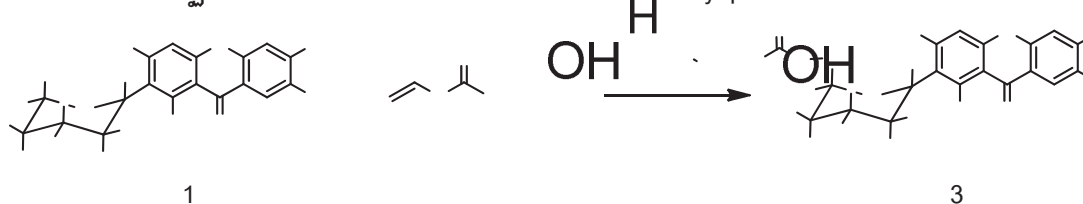
วิธีทดลอง

ละลายแมงจีเฟอริน 0.211 กรัม (1 mmol) ใน acetone ปริมาตร 5 มล และเติม vinyl acetate 92 ไมโครลิตร (1 mmol) เติมไลเปส 32 มิลลิกรัม และ 3 Å molecular sieves 25 มิลลิกรัม เขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40°C และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC

ผลการทดลอง

เมื่อเติมแมงจีเฟอริน 0.211 กรัม ใน acetone ปริมาตร 5 มล ได้ของผสมสีเหลืองมีลักษณะขุ่นและเติม vinyl acetate 92 ไมโครลิตร ไลเปส 32 มิลลิกรัม และ 3 Å molecular sieves 25 มิลลิกรัม และเขย่าโดยควบคุมอุณหภูมิ 40°C และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงจากการตรวจสอบ TLC พบเพียงจุดของสารตั้งต้นและสารผลิตภัณฑ์

5.2.2.2 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของแมงจีเฟอรินกับ vinyl palmitate



วิธีทดลอง

ละลายแมงจีเฟอริน 0.063 กรัม (0.03 mmol) ใน 2-methyl-2-butanol ปริมาตร 5 มล และเติมสารละลาย 20% dimethylsulfoxide เติม vinyl palmitate (0.15 mmol) 0.211 กรัม เติมไลเปส 125 มิลลิกรัม และ 3 Å molecular sieves 125 มิลลิกรัม เขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40°C และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC

ผลการทดลอง

เมื่อเติม 2-methyl-2-butanol ปริมาตร 5 มล ลงใน แมงจีเฟอริน 0.063 กรัม ได้สารละลายมีลักษณะขุ่นและเติมสารละลาย 20% dimethylsulfoxide สารละลายใสขึ้น แต่ยังคงมีของแข็งลอยอยู่บางส่วน เมื่อเติม vinyl palmitate (0.15 M) 0.211 กรัม ไลเปส 125 มิลลิกรัม และ 3 Å molecular sieves 125 มิลลิกรัม. เขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40°C และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ไม่พบสารผลิตภัณฑ์ TLC พบเพียงจุดของสารตั้งต้น และ palmitic acid ที่เกิดจากการสลายตัวของ vinyl palmitate

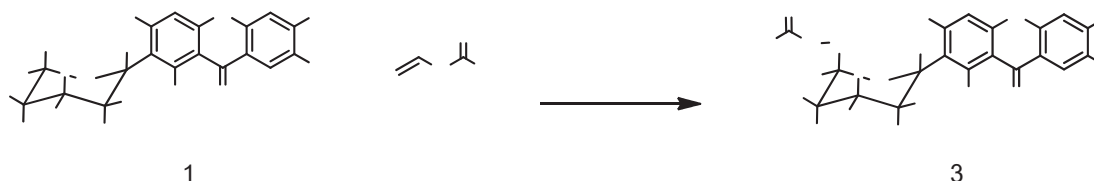
สรุปผลการทดลอง

การดัดแปลงปฏิกิริยาโครงสร้างของแมงจีเฟอริน โดยการเปลี่ยนหมู่แอลกอฮอล์บนวงน้ำตาลให้ได้สารอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน ตามแนวทาง B ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ทั้งที่ใช้ vinyl acetate และ vinyl palmitate ไม่สามารถทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดในการเลือกตัวทำละลายในการทำปฏิกิริยา เนื่องจากสารตั้งต้นมีสมบัติละลายที่ละลายได้ยากในตัวทำละลายอินทรีย์เกือบทุกชนิด ทำให้ต้องใช้ตัว

ทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูงเช่น acetone, DMSO และ 2-methyl-2-butanol ซึ่งตัวทำละลายคู่ผสมที่ใช้ อาจไม่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่มักเกิดปฏิกิริยาในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย

5.2.2.1 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของ แลงจีเฟอริน กับ acyl donor ในตัวทำละลายต่างๆ

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายคู่ผสมที่ใช้ อาจมีผลทำให้ไม่สามารถเตรียมสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ ในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันบนวงน้ำตาล และศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ acyl donor ที่เหมาะสม และตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของ แลงจีเฟอริน ที่ตำแหน่ง -OH ของวงน้ำตาล โดยอาศัยปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปส



วิธีทดลอง

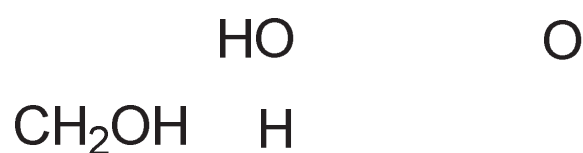
ละลายแลงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.5 mmol) ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ (acetone, DMSO, 2-methyl-2-butanol, Butylmethyl imidazolium tetrafluoroborate (BMiMBF₄) ปริมาตร 5 มล และเติม vinyl acetate 92 ไมโครลิตร (1 mmol) หรือ vinyl laurate (1 mmol) เติมไลเปส 32 มิลลิกรัม และ 3 Å molecular sieves 25 มิลลิกรัม เขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40°C และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ผลการทดลอง

เมื่อนำแลงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.5 mmol) มาเติมตัวทำละลายชนิดต่างๆ พบว่าตัวทำละลาย acetone และ 2-methyl-2-butanol สามารถละลายสารตั้งต้นได้น้อย และ DMSO และ Butylmethyl imidazolium tetrafluoroborate (BMiMBF₄) สามารถละลายสารตั้งต้นได้ดี เมื่อเติมเอนไซม์ไลเปส และเขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40°C และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 3.6 ไม่พบสารผลิตภัณฑ์ และพบเพียงสารตั้งต้นที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 3.6 แสดงผลการเปลี่ยนสภาวะในการทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส	Acyl donor	ตัวทำละลาย	ผลการติดตาม TLC
Novozyme 435	vinyl acetate	Acetone	ไม่พบสารผลิตภัณฑ์
Novozyme 435	vinyl acetate	2-methyl-2-butanol	ไม่พบสารผลิตภัณฑ์
Novozyme 435	vinyl acetate	DMSO	ไม่พบสารผลิตภัณฑ์
Novozyme 435	vinyl laurate	20% 2-methyl-2-butanol /DMSO	ไม่พบสาร



			ผลิตภัณฑ์
Novozyme 435	vinyl acetate	Butylmethyl imidazolium tetra fluoroborate (BmIMBF ₄)	ไม่พบสาร ผลิตภัณฑ์
Lipase B:Immbead	vinyl acetate	2-methyl-2-butanol	ไม่พบสาร ผลิตภัณฑ์
Lipase B:Immbead	vinyl acetate	DMSO	ไม่พบสาร ผลิตภัณฑ์

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ acyl donor และตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยา เอส-

เทอร์ฟิเคชันของแมงจีเฟอรินที่ตำแหน่ง -OH ของวงน้ำตาล โดยอาศัยปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปส โดยการเขย่าและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40°C แสดงให้เห็นว่าวิธีดังกล่าวไม่สามารถเตรียมสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ ทั้งนี้จะมีสาเหตุเนื่องมาจากข้อจำกัดของเอนไซม์ที่เอนไซม์ไลเปสที่มักเกิดปฏิกิริยาในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยที่อุณหภูมิ 40°C และ เนื่องจากสารตั้งต้นมีสมบัติที่ละลายได้ยากในตัวทำละลายอินทรีย์ acetone และ 2-methyl-2-butanol และตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูงเช่น ตัวทำละลายผสม 2-methyl-2-butanol และ DMSO และ BmIMBF₄ อาจไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

5.2.2.2 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของแมงจีเฟอรินกับ vinyl acetate โดยอาศัย Ultrasound irradiations

เนื่องจากการสังเคราะห์ตามแนวทาง B โดยอาศัยการเขย่าไม่สามารถทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ได้ เพื่อหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาตามแนวทาง B จึงได้ทำการปรับปรุงวิธีการทดลองโดยอาศัยเครื่อง Ultrasound irradiations

Γ

1

3

วิธีการทดลอง

1. Ultrasound irradiations โดยใช้ sonic probe

ละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.5 mmol) ในตัวทำละลาย DMSO 1.25 มล 60°C เติม Vinyl acetate 0.13 มล (3 mmol) lipase Novozyme 435 0.0076 กรัม ลงใน vial ขนาด 5 มล และ 3 Å molecular sieves 5 มิลลิกรัม ทำการ sonicate โดยใช้ ultrasonic probe ด้วยกำลัง 100 W เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC

2. Ultrasound irradiations โดยใช้ sonic bath

ละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.5 mmol) ในตัวทำละลาย DMSO 1.25 มล 60°C เติม Vinyl acetate 0.13 มล (3 mmol) lipase Novozyme 435 0.0076 กรัม ลงใน vial ขนาด 5 มล และ 3 Å molecular sieves 5 มิลลิกรัม ทำการ sonicate โดยใช้ ultrasonic bath ด้วยกำลัง 100 W เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ติดตาม

ปฏิกิริยาด้วย TLC กรองของแข็งออกและนำสารละลายไประเหยตัวทำละลาย นำ crude product ที่ได้แยกบริสุทธิ์ด้วย silica gel chromatography (chloroform–เอทานอล, 4:1) ได้ของเหลวหนืดสีเหลือง

ผลการทดลอง

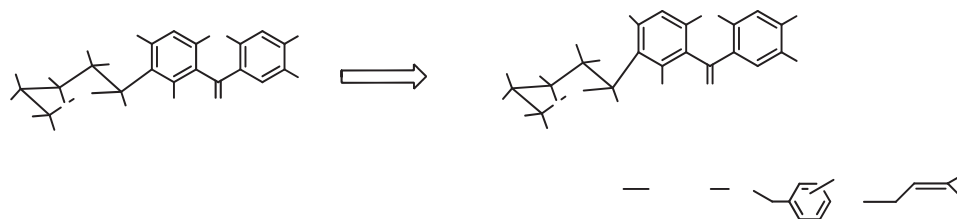
เมื่อปล่อยให้แมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.5 mmol) ที่ละลายใน DMSO 1.25 มล 60°C ทำปฏิกิริยากับ Vinyl acetate 0.13 มล (3 mmol) และ lipase Novozyme 435 0.007 กรัม โดยใช้ sonic probe ด้วยกำลัง 100 W ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่าปฏิกิริยาเริ่มเกิดขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง และจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นเล็กน้อย เมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง ผลการติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่ามีจุดสารเกิดขึ้นเล็กน้อย และเมื่อดึงของแข็งที่ทำหน้าที่ตรึงเอนไซม์เริ่มแตกจึงหยุดปฏิกิริยา

เมื่อปล่อยให้แมงจีเฟอรินทำปฏิกิริยากับ Vinyl acetate ที่ 60°C โดยใช้ปริมาณและตัวทำละลายเช่นเดียวกันกับตอนต้น โดยมี lipase Novozyme 435 0.0076 กรัม โดยใช้ ultrasonic bath ด้วยกำลัง 100W ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่าปฏิกิริยาเริ่มเกิดขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง และจุดของสารผลิตภัณฑ์เข้มขึ้นตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง ผลการติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่ามีจุดสารเกิดขึ้นหลายจุด เมื่อกรองของแข็งออกและนำสารละลายไประเหยตัวทำละลาย นำ crude product ที่ได้แยกบริสุทธิ์ด้วย silica gel chromatography (chloroform–mเอทานอล, 4:1) ได้ของเหลวหนืดสีเหลือง ได้สารผลิตภัณฑ์ 0.005 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 487.0856$ ($M+Na$)⁺ ของ $C_{20}H_{20}NaO_{11}$ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 5% พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 13.83 (1H, s, 1-OH), 10.40 (3H, bs, 3, 6, 7-OH), 7.36 (1H, s, 8-H), 6.86 (1H, s, 5-H), 6.40 (1H, s, 4-H), 5.0-4.78 (1H, m, 1'-H), 4.39 (2H, m, 6'-H), 3.85-3.5 (4H, m, 5', 4', 3', 2'-H) 2.07 (3H, s, CH₃CO₂) 2.04 (3H, s, CH₃CO₂) สารที่เกิดขึ้นสลายตัวอย่างรวดเร็วโดยเปลี่ยนแปลงกลับเป็นแมงจีเฟอริน เมื่อตั้งทิ้งไว้ในสารละลาย DMSO

สรุปผลการทดลอง

การใช้เอนไซม์ไลเปสทั้งแบบ Novozyme 435 และ Lipase B:Immobilized ในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันบนวงน้ำตาลของแมงจีเฟอรินในตัวทำละลายต่างๆ ทั้งที่ละลายได้ดี เช่น DMSO และ Butylmethylimidazolium tetra fluoroborate (BMIMBF₄) และที่ละลายได้น้อย เช่น acetone และ 2-methyl-2-butanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มักใช้สำหรับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของไลเปส ไม่สามารถให้สารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นได้ แม้จะทำการเปลี่ยน acyl donor ทั้งที่เป็นสายสั้นๆ เช่น vinyl acetate และที่เป็นสายยาว เช่น vinyl laurate โดยวิธีการเขย่าที่ อุณหภูมิ 60°C ไม่สามารถให้สารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นได้ แต่เมื่อทำปฏิกิริยาโดยอาศัย Ultrasound irradiations ทั้งแบบ ultrasonic probe และ ultrasonic bath พบว่ามีสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น โดยที่ ultrasonic probe มีสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยมากและมีการแตกของสาร supporter ปะปนมากับของผสมของสารผลิตภัณฑ์ การใช้ ultrasonic bath ด้วยกำลัง 100 W เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ให้ crude product ที่มีสารผสมของสารผลิตภัณฑ์และเมื่อนำไปแยกบริสุทธิ์ด้วย silica gel chromatography (chloroform: เอทานอล, 4:1) ได้ของเหลวหนืดสีเหลือง จาก ¹H NMR แสดงให้เห็นว่าเกิดทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งให้ผล NMR ใกล้เคียงกับรายงานที่มีมาก่อน¹⁵ วิธีการนี้ได้สารผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่น้อยโดยให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตเพียง 5% และสารที่เกิดขึ้นสลายตัวอย่างรวดเร็วโดยเปลี่ยนแปลงกลับเป็นแมงจีเฟอรินเมื่อตั้งทิ้งไว้ในสารละลาย DMSO

3.2.2 ดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอรินโดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลบนวงอะโรมาติกให้ได้สารอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินตามแนวทาง C

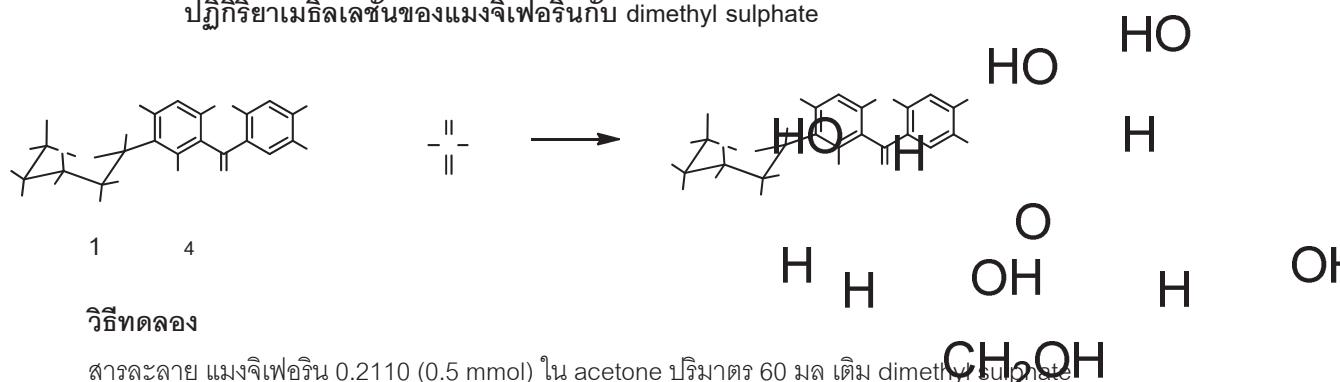


5.2.3 การดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอรินโดยการเปลี่ยนหมู่อนุพันธ์ฟีนอลได้สารอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินตามแนวทาง C

การดัดแปลงโครงสร้างของสารแมงจีเฟอรินที่หมู่ไฮดรอกซิลของ Xanthone ตามแนวทาง C อาจช่วยให้ได้สารที่มีคุณสมบัติที่สามารถละลายในตัวทำละลายต่างๆ ดีขึ้น และอาจเป็นประโยชน์ต่อการเตรียมส่วนผสมเพื่อใช้ในด้านเภสัชวิทยา โดยการเปลี่ยนแปลงที่เป็นไปได้ที่อาศัยปฏิกิริยาเคมีอย่างง่ายขั้นตอนเดียวโดยไม่รบกวนโครงสร้างหลักของแมงจีเฟอริน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สามารถยับยั้งไวรัสได้ คือการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชัน -OH ของ ฟีนอลซึ่งมี 2 วิธี ที่เป็นไปได้คือการทำปฏิกิริยาเอสเตอร์เลชัน เปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์แอลคอกไซด์ที่มีหมู่แอลคิล และการเปลี่ยนให้เป็นหมู่เอสเตอร์โดยอาศัยปฏิกิริยาเอซิดเลชันที่หมู่ -OH

5.2.3.1 ปฏิกิริยาเอซิดเลชันของแมงจีเฟอริน

ปฏิกิริยาเอซิดเลชันของแมงจีเฟอรินกับ dimethyl sulphate



วิธีทดลอง

สารละลาย แมงจีเฟอริน 0.2110 (0.5 mmol) ใน acetone ปริมาตร 60 มล เติม dimethyl sulphate 0.425 กรัม (3.3 mmol) และเติม K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC

ผลการทดลอง

เมื่อเติม acetone ลงใน แมงจีเฟอริน 0.2110 กรัม และเติม dimethyl sulphate ที่อุณหภูมิห้องและกวนของผสมเป็นเวลา 7 วันได้ของผสมสีเหลืองมีลักษณะขุ่น ผลจากการตรวจสอบปฏิกิริยา ด้วย TLC ไม่พบการเปลี่ยนแปลง พบเพียงจุดของสารตั้งต้นเพียงอย่างเดียว

ปฏิกิริยาเอซิดเลชันของแมงจีเฟอรินกับ methyl iodide



1

4a

วิธีทดลอง

ละลายแมงกานีสเพอร์นิก 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล เติมนีโตนไอดายด์ 0.25 มล (6 mmol) และ K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) ทำการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ $60^{\circ}C$ เป็นเวลา 24 ชม. และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา นำของผสมไประเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อละลายแมงกานีสเพอร์นิก 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล และเติมนีโตนไอดายด์ 6 mmol ได้สารละลายใสสีเหลืองและปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาโดยทำการรีฟลักซ์เป็นเวลา 24 ชม. ผลจากการตรวจสอบปฏิกิริยา โดยติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบจุดของสารที่คาดว่าเป็นสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และยังคงมีจุดของสารตั้งต้นเหลืออยู่บางส่วน เมื่อนำ crude ไประเหยภายใต้สุญญากาศ และแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ 4a ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 38 (0.080 กรัม) พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 459.0906 (M+Na)^+$ ของ $C_{20}H_{20}NaO_{11}$

IR (KBr, cm^{-1}): 3452 (b), 3023, 2980, 1627, 1586, 1492, 1419, 1375, 1363, 1263, 1178, 1027, 818, 792, 500

NMR spectroscopy 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$, δ , ppm): 13.83 (1H, s, OH), 9.89 (2H, bs, OH), 7.39 (1H, s, H₈), 7.15 (1H, s, H₅), 6.45 (1H, s, H₄), 4.88 (2H, br, OH), 4.58 (1H, d, J = 8 Hz H₁), 4.45 (2H, br, OH) 4.06 (1H, m, H₂), 3.93 (3H, s, OCH₃), 3.67, 3.4 (d, J = 8 Hz, H₆), 3.15 (m, 3H, H₃, H₄, H₅)

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$, δ , ppm): 179.58 (CO), 164.79 (C₃), 162.22 (C₁) 156.75 (C_{4a}), 155.50 (C₆), 151.13 (C_{4b}), 144.77 (C₇), 112.98 (C_{8a}), 108.27, (C₈), 108.05 (C₂), 101.80 (C₅), 100.63 (C_{8b}), 93.85 (C₄), 82.05 (C₅), 79.49 (C₃), 73.52 (C₁), 71.11 (C₄), 70.66 (C₂), 61.96 (C₆), 56.82, OCH₃

ตารางที่ 3.7 แสดงข้อมูล 2D NMR HMQC, HMBC ของเมธิลแมงกานีสเพอร์นิก

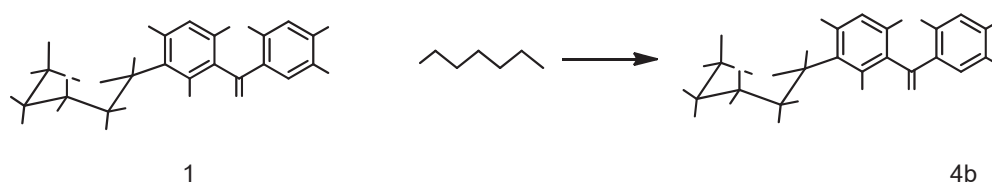
atom	C	HMQC		HMBC
CO	179.58			
C ₃	164.79			
C ₁	162.22			
C _{4a}	156.75			
C ₆	155.50			
C _{4b}	151.13			
C ₇	144.77			
C _{8a}	112.98			
C ₈	108.27	7.39	(s, 1H, H ₈),	CO, C ₆ , C ₇ , C _{8a} , C _{8b}
C ₂	108.05			
C ₅	101.80	7.15	(s, 1H, H ₅),	CO, C ₆ , C ₇ , C _{8a} , C _{8b}
C _{8b}	100.63			
C ₄	93.85	6.45	(s, 1H, H ₄),	CO, C ₅ , C ₈ , C ₃ , C _{4a}
C _{5'}	82.05	3.15	(m, 3H, H _{3'} , H _{4'} , H _{5'})	
C _{3'}	79.49	3.15	(m, 3H, H _{3'} , H _{4'} , H _{5'})	
C _{1'}	73.52	4.58	(1H, d, J = 8 Hz H _{1'}),	C ₂ , C _{2'} , C ₁ , C ₃
C _{4'}	71.11	3.15	(m, 3H, H _{3'} , H _{4'} , H _{5'})	
C _{2'}	70.66	4.06	(1H, m, H _{2'})	
C _{6'}	61.96	3.67, 3.4	(d, J = 8 Hz, 2H, H _{6''})	
OCH ₃	56.82	3.93	(3H, s, OCH ₃),	C ₆

สรุปผลการทดลอง

เมื่อให้แมงจีเฟอรินในทำปฏิกิริยาเมทิลชันโดยใช้ไดเมทิลซัลเฟตใน acetone พบว่าไม่เกิดสารผลิตภัณฑ์ น่าจะมีสาเหตุมาจากความสามารถในการละลายของแมงจีเฟอรินที่ละลายได้น้อยใน acetone แต่เมื่อละลายแมงจีเฟอรินใน dry DMF และเติม methyl iodide และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาโดยทำการรีฟลักซ์ที่ 60°C เป็นเวลา 12 ชม. ผลจากการตรวจสอบปฏิกิริยาโดยติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบจุดของสารที่คาดว่าเป็น

สารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นและยังมีสารตั้งต้นเหลืออยู่บางส่วน ซึ่งโดยทั่วไปหากต้องการทำให้สารตั้งต้นลดลง อาจทำการเติมเมธิลไอโอไดด์เพิ่มได้ แต่เนื่องจากบนวงแมงจีเฟอรินมีตำแหน่ง -OH ที่เกิดปฏิกิริยาได้หลายหมู่ การเติมเมธิลไอโอไดด์ลงไปจำนวนมากอาจทำให้ได้สารหลายไอโซเมอร์ ทำให้ยุ่งยากในการแยกจึงได้หยุดปฏิกิริยาเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชม. เมื่อนำ crude ไประเหยภายใต้สุญญากาศ และแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารหนัก 0.080 กรัม (38% yield) จากการพิสูจน์โครงสร้างทั้ง ^1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC (ดังแสดงในตารางที่ 3.6) แสดงให้เห็นว่าสารมีโครงสร้างเป็น monomethoxy-แมงจีเฟอริน ในตำแหน่งคาร์บอนที่ 6

5.2.3.2 ปฏิกิริยาแอลคิลเลชันของแมงจีเฟอรินกับ 1-bromohexane



ละลายแมงจีเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล เติม 1-bromohexane 0.28 มล (2 mmol) และ K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) รีฟลักซ์ที่ 60°C ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา 20 ชม. นำของผสมไประเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS, NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

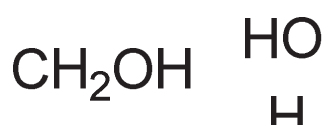
เมื่อละลาย แมงจีเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล และเติม 1-bromohexane 0.28 มล (2 mmol) และ K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 60°C ได้สารละลายลักษณะสีส้มเข้ม และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา 24 ชม. นำของผสมไประเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์สีเหลืองหนัก 0.080 กรัม (33% yield) พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 507.1868$ ($\text{M}+\text{H}^+$) ตรงกับค่าคำนวณของ $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{O}_{11}$ และ NMR spectroscopy ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดโมโนแอลคิลเลชัน

IR (CH_3OH , cm^{-1}): 3437(b), 2962, 1634 (b), 1469, 1277, 1224, 1196, 1080, 1020, 620

NMR spectroscopy ^1H NMR Spectrum (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ , ppm): 13.68 (br, 1H, OH),

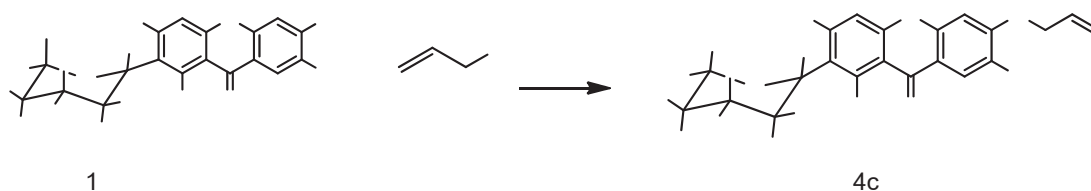
3.8 (br, 2H, OH), 8.46 (br, 5H, OH) 7.39 (s, 1H, H_8), 7.13 (s, 1H, H_5), 6.45 (s, 1H, H_4), 4.9-4.5 (br, 4H, -OH), 4.59 (m, 1H, H_1), 3.67, 3.33 (m, 2H, H_{6a} , H_{6b}), 4.02 (m, 2H, $\text{H}_{1'}$), 3.74-3.15 (m, H_2 , H_3 , H_4 , H_5) 1.78 (2H, m, $\text{H}_{2'}$), 1.31 (m, 6H, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{4'}$, $\text{H}_{5'}$), 0.89 (3H, m, $\text{H}_{6'}$) ^{13}C NMR Spectrum (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ , ppm), 179.6, (CO), 168.13, (C_3), 164.57, (C_1), 162.22, (C_{4a}), 156.72, (C_6), 154.92, (C_{4b}), 151.16, (C_7), 115.39, (C_{8a}), 108.21, (C_8), 108.06, (C_2), 101.8, (C_5), 99.13, (C_{8b}), 93.81, (C_4), 82.04, (C_5), 79.47, (C_3), 73.5, ($\text{C}_{1'}$), 71.09, (C_4), 70.66, (C_2), 69.4, ($\text{C}_{6'}$), 61.94, (C_6), 34.7, ($\text{C}_{2'}$), 28.78, (C_3), 25.55, ($\text{C}_{4'}$), 22.54, (C_5), 14.40, ($\text{C}_{6'}$)

สรุปผลการทดลอง



แมงจีเฟอรินสามารถเกิดปฏิกิริยาแอลคิลเลชันโดยใช้ 1-bromohexane โดยมี K_2CO_3 ใน dry DMF ที่อุณหภูมิ $60^\circ C$ โดยเมื่อนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสม MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 4b เป็นของแข็งหนืดสีเหลือง หนัก 0.080 กรัม (33% yield) พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 507.1868 (M+H)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $C_{25}H_{31}O_{11}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดโมโนแอลคิลเลชัน จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค 1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้น มีลักษณะเป็น mono alkylation ที่ตำแหน่งคาร์บอน 6

5.2.3.3 วิธีการสังเคราะห์ ปฏิกิริยาแอลคิลเลชันของแมงจีเฟอรินกับแอลลิลโบรไมด์



ละลาย แมงจีเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล เติม Allyl bromide 0.049 กรัม (6 mmol) และ K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) รีฟลักซ์ที่ $60^\circ C$ ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา 22 ชม. ระเหยภายใต้สูญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 0.057 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อละลาย แมงจีเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล เติม allyl bromide 0.049 กรัม (6 mmol) และ K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) รีฟลักซ์ที่ $60^\circ C$ ได้สารละลายสีส้มแดง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา 22 ชม. ระเหยภายใต้สูญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งหนืดสีเหลือง หนัก 0.057 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 463.1244 (M+H)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $C_{22}H_{23}O_{11}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากโมโนแอลคิลเลชัน

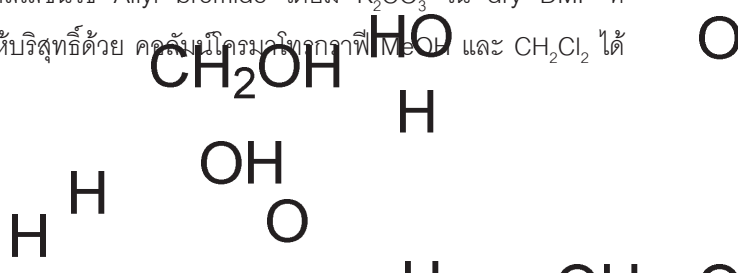
IR (CH_3OH , cm^{-1}): 3418 (b), 1651, 1645, 1047, 1025, 997, 837, 765, 631

NMR spectroscopy 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$, δ , ppm) 13.66 (bs, 1H, OH), 7.43 (s, 1H, H_8), 7.15 (s, 1H, H_5), 6.49 (s, 1H, H_4), 6.06 (m, 1H, $H_{2''}$), 5.45 (d, $J = 17$ Hz, $H_{3'a}$), 5.32 (d, $J = 11$ Hz, $H_{3''b}$), 4.89-4.5 (5H, OH), 4.68 (d, $J = 5$ Hz, 2H, $H_{1''}$), 4.57 (d, $J = 10$ Hz, 1H, $H_{1''}$), 4.02 (t, 9Hz, H_2), 3.6-3.5 (m, 2H, $H_{6a}, 6b$) (3.5-3.3 (m, H_3, H_4, H_5)

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$, δ , ppm) 179.59 (CO), 164.57, (C_3), 162.15 (C_1), 156.67 (C_{4a}), 154.26 (C_6), 150.95 (C_{4b}), 144.88 (C_7), 133.25 ($C_{2''}$) 118.80 ($C_{3''}$) 113.02 (C_{8a}), 108.31 (C_8), 108.15 (C_2), 101.83 (C_5), 101.66 (C_{8b}), 93.86 (C_4), 81.95, (C_5), 79.41 (C_3), 73.43 ($C_{1''}$), 71.01 (C_4), 70.60 ($C_{2''}$), 69.85 ($C_{1''}$), 61.85(C_6)

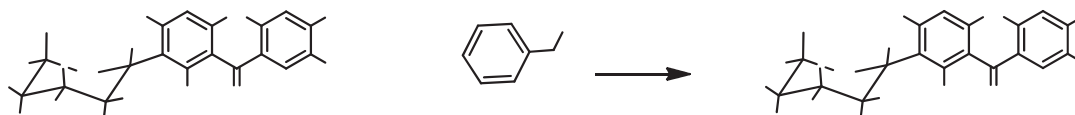
สรุปผลการทดลอง

แมงจีเฟอรินสามารถเกิดปฏิกิริยาแอลคิลเลชันใช้ Allyl bromide โดยมี K_2CO_3 ใน dry DMF ที่อุณหภูมิ $60^\circ C$ โดยเมื่อนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้



สารผลิตภัณฑ์ 4c เป็นของแข็งสีเหลือง น้ำหนัก 0.057 กรัม พิกเก็ตของไอออนหลักที่ $m/z = 463.1244$ ($M+H$)⁺ ตรงกับค่าคำนวณของ $C_{22}H_{23}O_{11}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากโมโนแอลคิลเลชัน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 25% จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค ¹H NMR, ¹³C NMR, HMQC และ HMBC spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น monoallylate ที่ -OH ตำแหน่ง 6

5.2.3.4 ปฏิกิริยา benzylation ของแมนจีเฟอรินกับ benzyl chloride



วิธีทดลอง

ละลายแมนจีเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล เติม benzyl chloride 0.252 กรัม (2 mmol) และ K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 60°C ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา 24 ชม. ระเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสม MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 0.078 กรัม พิกเก็ตของไอออนหลักด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อละลายแมนจีเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล เติม benzyl chloride 0.252 (2 mmol) และ K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 60°C ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา 24 ชม. ระเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสม MeOH และ CH_2Cl_2 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ benzyl mangiferin ของแข็งสีเหลือง จุดหลอมเหลว 130–133°C มีน้ำหนัก 0.078 กรัม พิกเก็ตของไอออนหลักด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 603.19$ ($M+H$)⁺ ตรงกับค่าคำนวณของ $C_{33}H_{31}O_{11}$ และ NMR spectroscopy ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดไดเบนซิลเลชัน

IR (CH₃OH, cm⁻¹) 3358 (b), 2923, 1606 (sh), 1467, 1250, 1180, 1000, 950

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ดังนี้ ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

13.48 (1H, s), 7.63~7.29 (10H, m, 2H_{3a}, 2H_{4a}, H_{5a}, 2H_{3b}, 2H_{4b}, H_{5b}), 7.49 (s, 1H, H₈), 7.23 (s, 1H, H₅) 6.74 (1H, s, H₄), 5.29 (1H, bs, OH), 5.22~5.14 (4H, m, 2H_{1a}, 2H_{1b}), 4.89 (bs 2H, OH) 4.68 (1H, d, J = 8 Hz, H₂), 4.48 (m, 1H, H₂), 4.0-3.0 (2H, m, OH), 3.8, 3.7 (m, 2H, H_{6a}, H_{6b}), 3.4 - 3.15 (m, 3H, H₃, H₄, H₅)

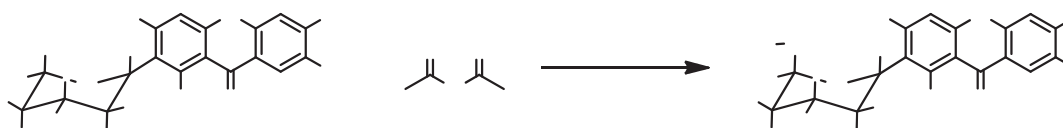
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆, δ, ppm): 179.69 (CO), 164.72 (C₃), 160.97 (C₁), 157.30 (C_{4a}), 154.69 (C₆), 151.07 (C_{4b}), 145.45 (C₇), 136.98 (C_{2a}), 136.55 (C_{2b}), 129.03 (C_{3a}, C_{7a}),

128.74 ($C_{4a''}$, $C_{6a''}$), 128.65 ($C_{3b''}$, $C_{7b''}$), 128.40 ($C_{4b''}$, $C_{6b''}$), 128.12 ($C_{5a''}$),
 127.40 ($C_{5b''}$), 113.32 (C_{8a}), 109.44 (C_2), 108.24 (C_8), 102.45 (C_{8b}),
 101.80 (C_5), 91.96 (C_4), 82.31 (C_5), 71.16 ($C_{1a''}$), 70.84 ($C_{1b''}$),
 79.44 (C_3), 73.97 ($C_{1'}$), 71.2 (C_4), 70.39 (C_2), 62.29 (C_6)

สรุปผลการทดลอง

แมงจีเฟอรินสามารถเกิดปฏิกิริยาเบนซิลเลชันโดยใช้ benzyl chloride โดยมี K_2CO_3 ใน dry DMF ที่อุณหภูมิ $60^\circ C$ โดยเมื่อนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 4d เป็นของแข็งสีเหลืองหนัก 0.078 กรัม จุดหลอมเหลว $130-133^\circ C$ พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 603.19 (M+H)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $C_{33}H_{31}O_{11}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดไดเบนซิลเลชัน เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 26% จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค 1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC, HMBC และ Mass spectrometry สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น dibenzylation ที่ -OH ตำแหน่ง 6, 7 ทั้งนี้ไม่พบสารที่เกิดจาก monobenzylation ซึ่งแตกต่างจากกรณีของเมธิลไฮโดรไอไดด์และ 1-bromohexane ซึ่งน่าจะเกิดมาจากการที่ benzyl bromide เป็น alkylating agent ที่มีขนาดใหญ่ ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้อย่างช้าๆ ในขณะที่บนวง xanthone มีหมู่ hydroxyl หลายหมู่ จึงทำให้เกิด alkylation ได้หลายตำแหน่งกัน โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดไดเบนซิลเลชันน่าจะมาจากการเกิด alkylation ต่อเนื่องจากผลิตภัณฑ์ monobenzyl และสาเหตุที่ปฏิกิริยาหยุดที่ dibenzyl น่าจะมีสาเหตุจากอัตราส่วน mol ratio อุณหภูมิที่ใช้ และความเกะกะของ หมู่ benzyl ที่ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาต่อเนื่อง และการที่เกิดปฏิกิริยา alkylation ที่ตำแหน่ง 6 และ 7 และไม่เกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง 1 และ 3 น่าจะมีสาเหตุมาจากที่ -OH ตำแหน่ง 1 และ 3 ที่อยู่ใกล้กับหมู่ glycoside ซึ่งมีความเกะกะมากกว่า ตำแหน่ง 6 และ 7

5.2.3.5 ปฏิกิริยาอะเซทิลเลชันของแมงจีเฟอรินกับ Acetic anhydride



ละลายแมงจีเฟอริน 0.050 กรัม (0.12 mmol) ใน pyridine 4 มล เติม acetic anhydride 0.3 มล (0.3 mmol) กวนของผสมที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ระเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ของผสม Ethyl acetate/ hexane ได้สารผลิตภัณฑ์สีขาวปนน้ำตาล หนัก 0.091 กรัม ได้สารผลิตภัณฑ์ หนัก 0.016 กรัม (17%) พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจีเฟอริน 0.050 กรัม ละลายใน pyridine 4 มล และเติม acetic anhydride และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น 2 จุด ไม่พบว่า มีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีขาว crude ที่ได้ละลายได้ดีใน $CHCl_3$ เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม Ethyl acetate/ hexane จะได้ของแข็งสีเหลือง

อ่อนหนัก 0.016 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 781.1597 (M+Na)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $C_{35}H_{34}NaO_{19}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชันที่หมู่ -OH ที่ตำแหน่ง C₁, C₃, C₆, C₇ และ -OH ตำแหน่ง C₂, C₃, C₄, และ C₆ ตามลำดับคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 17% พิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

IR (KBr, cm⁻¹) 3010, 2939, 1760, 1756, 1655, 1620, 1450, 1371, 1176, 1050, 919, 597

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 8.07 (s, 1H, H₈), 7.43 (s, 1H, H₅), 7.26 (1H, s, H₄), 5.74 (1H, m, H₁), 5.34 (m, 1H, H₄), 5.32 (m, 1H, H₃), 4.86 (1H, d, J = 8 Hz, H₂), 4.45, 4.03 (m, 2H, H_{6a}, H_{6b}), 3.85 (m, 1 H, H₅), 2.44 (s, CH₃), 2.42 (s, CH₃), 2.24 (s, CH₃), 2.23 (s, CH₃), 2.00 (s, CH₃), 1.98 (s, CH₃), 1.96 (s, CH₃), 1.95 (s, CH₃)

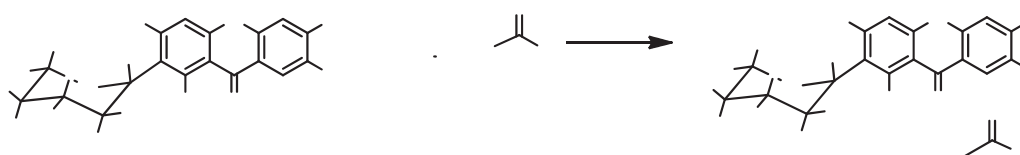
¹³CNMR (100 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 173.58 (CO), 170.46 (CO), 170.27 (CO), 169.59 (CO), 168.46 (CO), 167.98 (CO), 167.63 (CO), 157.42 (C₃), 154.37 (C₁), 152.91 (C_{4a}), 149.59 (C₆), 147.65 (C_{4b}), 139.36 (C₇), 122.45 (C_{8a}), 120.80 (C₈), 118.26 (C₂), 114.54 (C_{4b}), 112.64 (C_{8b}), 111.70 (C₅), 109.92 (C₄), 77.23 (C₅), 76.56, (C₄), 74.35 (C₂), 72.43 (C₁), 68.14 (C₃), 61.90 (C₆), 21.38, 20.76, 20.48 (C₂)

สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจีเฟอริน 0.0500 กรัม ทำปฏิกิริยา acetylation โดยละลายสารใน pyridine และเติม acetic anhydride และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น 2 จุด ไม่พบว่ามีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีขาว crude ที่ได้ละลายได้ดีใน CHCl₃ เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม Ethyl acetate/ Hexane จะได้ของแข็งสีเหลืองอ่อน น้หนัก 0.0160 กรัม (17% yield) จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 781.1597 (M+Na)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $C_{35}H_{34}NaO_{19}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชันที่หมู่ -OH ที่ตำแหน่ง C₁, C₃, C₆, C₇ และ -OH ตำแหน่ง C₂, C₃, C₄, และ C₆ ตามลำดับการพิสูจน์เอกลักษณ์เทคนิค NMR spectroscopy ¹HNMR, ¹³CNMR, HMQC, HMBC สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้น

การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวทำให้การละลายของสารเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด โดยที่สารอนุพันธ์ acylation ที่ได้สามารถละลายในคลอโรฟอร์ม ในขณะที่อนุพันธ์อื่นๆ ที่เตรียมขึ้นส่วนใหญ่ละลายได้ใน DMSO

5.2.3.6 ปฏิกิริยาอะเซทิลเลชันของ แมงจีเฟอริน กับ Octanoyl chloride



ละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.24 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม octanoyl chloride 0.05 กรัม (0.28 mmol) กวนของผสมที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ระเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาทำการแยก

ให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl_3 ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.041 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.25 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม octanoyl chloride 0.05 มล (0.3 mmol) ได้สารละลายสีเหลืองอ่อน กวนของผสมที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ระเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl_3 ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.041 กรัม จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 549.1964$ $(M+H)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{O}_{12}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชัน 1 หมู่ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 32 % yield

พิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค

IR (CH_3OH , cm^{-1}): 3428 (b), 2951, 1634, 1468, 1451, 1016, 748

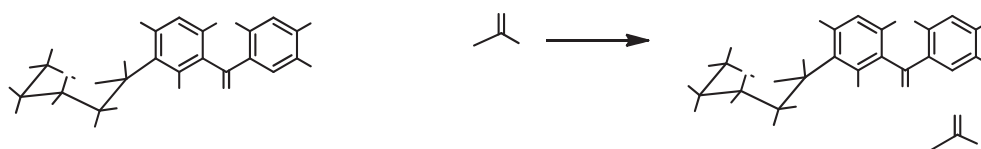
^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm): 13.40 (bs, 1H, OH), 11.3-10.5 (bs, 1H, OH), 7.44 (s, 1H, H_8), 6.82 (s, 1H, H_5), 6.36 (s, 1H, H_4), 4.8-4.61 (brs, 5H, -OH), 4.20 (m, 1H, H_1), 3.90, 3.88 (m, 1H, $\text{H}_{6a}, \text{H}_{6b}$), 3.77 (m, 1H, H_2), 3.76-3.48 (m, 3H, $\text{H}_3, \text{H}_4, \text{H}_5$), 2.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{H}_{2'}$), 1.63 (m, 2H, $\text{H}_{3'}$), 1.62 (m, 8H, $\text{H}_4, \text{H}_5, \text{H}_6, \text{H}_7$), 0.95 (q, 3H, $\text{H}_{8'}$)

^{13}C NMR (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm) 179.93 (CO), 174.85 (C_1O), 163.82 (C_3), 162.50 (C_1), 158.15 (C_{4a}), 151.78 (C_6), 150.12 (C_{4b}), 144.41 (C_7), 115.74 (C_{8a}), 107.72 (C_8), 106.31 (C_2), 102.05 (C_5), 101.89 (C_{6b}), 93.47 (C_4), 81.21 (C_5), 78.78 (C_3), 73.96 (C_1), 71.22 (C_4), 70.40 (C_2), 61.48 (C_6), 33.40 ($\text{C}_{2'}$), 31.43 ($\text{C}_{3'}$), 29.34 ($\text{C}_{4'}$), 28.74, (C_5') 24.63, ($\text{C}_{6'}$) 22.23 ($\text{C}_{7'}$), 12.97 ($\text{C}_{8'}$)

สรุปผลการทดลอง

แมงจีเฟอริน สามารถเกิดปฏิกิริยาเอซิลเลชันโดยใช้ octanoyl chloride โดยใช้ Pyridine เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 6a ลักษณะของแข็งหนืดสีเหลืองหนัก 0.041 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 32 % yield จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค ESI-MS $^1\text{HNMR}$, $^{13}\text{CNMR}$, HMQC และ HMBC spectroscopy ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชัน 1 หมู่

5.2.3.7 ปฏิกิริยาอะเซทิลเลชันของ แมงจีเฟอริน กับ Iuaroyl chloride



ละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.25 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม Iuaroyl chloride 0.06 มล (0.28 mmol) กวนของผสมที่อุณหภูมิห้อง 20 ชั่วโมง ระเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาทำการแยกโดยวิธี column chromatography ด้วย นำส่วนที่เป็นชั้นสารละลายอินทรีย์ dry ด้วย Na_2SO_4 และแยกให้บริสุทธิ์

ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี isopropanol และ Dichloromethane ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.061 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.23 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม luaroyl chloride 0.06 มล (0.28 mmol) ได้สารละลายสีเหลืองอ่อน กวนของผสมที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศได้ crude มีลักษณะเหนียวสีน้ำตาลเข้ม และเมื่อนำ crude ที่ได้มาทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl_3 ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.061 กรัม

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 605.2589 (M+H)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{O}_{12}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชัน 1 หมู่ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 42%

IR (CH_3OH , cm^{-1}): 3394 (b), 2922, 1738, 1620, 1466, 1277, 1109, 1081, 750

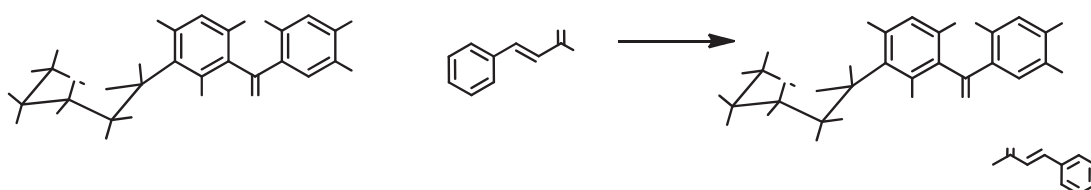
^1H NMR Spectrum (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm): 13.53 (s, 1H, OH), 11.51 (s, 1H, OH) 10.81 (s, 1H, OH), 8.00 (s, 1H, H_8), 7.01 (s, 1H, H_5), 6.42 (s, 1H, H_4), 4.89 (m, 2H, -OH), 4.62 (m, 1H, -OH), 4.6 (d, $J = 10$ Hz, 1H, H_{11}), 4.0 (m, 1H, -OH) 4.12 (m, 1H, H_2) 3.70 (m, 1H, H_{6b}), 3.41 (m, 1H, H_{6a}), 3.2-3.0 (m, 3H, H_3 , H_4 , H_5), 2.62 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{H}_{2''}$), 1.63 (m, 2H, $\text{H}_{3''}$), 1.5-1.0 (m, 16H, $\text{H}_{4''}$, $\text{H}_{5''}$, $\text{H}_{6''}$, $\text{H}_{7''}$, $\text{H}_{8''}$, $\text{H}_{9''}$, $\text{H}_{10''}$, $\text{H}_{11''}$), 0.82 (q, 3H, $\text{H}_{12''}$)

^{13}C NMR (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm) 179.93 (CO), 171.85 ($\text{C}_{1''}\text{O}$), 165 (C_3), 162.2 (C_1), 157.01 (C_{4a}), 156.71 (C_6), 155.04 (C_{4b}), 137.01 (C_7), 119.3 (C_8), 112.5 (C_{8a}), 108.59 (C_2), 104.04 (C_5), 101.98 (C_{8b}), 99.05 (C_4), 82.11 (C_5), 79.446 (C_3), 73.47 ($\text{C}_{1''}$), 70.67 (C_2), 73.47 (C_4), 62.04 (C_6), 33.62 ($\text{C}_{2''}$), 31.77 ($\text{C}_{3''}$), 29.47 ($\text{C}_{4''}$, $\text{C}_{5''}$), 29.37 ($\text{C}_{6''}$), 29.18 ($\text{C}_{7''}$), 29.16 ($\text{C}_{8''}$), 28.79 ($\text{C}_{9''}$), 24.81 ($\text{C}_{10''}$), 22.56 ($\text{C}_{11''}$), 14.42 ($\text{C}_{12''}$)

สรุปผลการทดลอง

แมงจีเฟอรินสามารถเกิดปฏิกิริยาเอซิลเลชันโดยใช้ luaroyl chloride โดยใช้ Pyridine เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 6b เป็นของแข็งสีเหลืองหนัก 0.061 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 42 % yield จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค ESI-MS $^1\text{HNMR}$, $^{13}\text{CNMR}$, HMQC และ HMBC spectroscopy ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชัน 1 หมู่

5.2.3.8 ปฏิกิริยาเอซิลเลชันของแมงจีเฟอรินของแมงจีเฟอรินกับ cinnamoyl chloride



วิธีทดลอง

ละลายแมงจีเฟอริน 0.200 กรัม (0.47 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม cinnamoyl chloride 100 มิลลิกรัม (0.6 mmol) และกวนที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ระเหยภายใต้สุญญากาศ นำ crude ที่ได้มาทำการแยก

ให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl_3 ได้สารผลิตภัณฑ์ หนัก 0.086 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจีเฟอริน 0.200 กรัม (0.5 mmol) ละลายใน pyridine 6 มล และเติม cinnamoyl chloride 10 มิลลิกรัม (0.06 mmol) และปล่อยให้ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทุก 3 ชั่วโมง พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม MeOH/ CH_2Cl_2 ได้ของแข็งสีเหลืองอ่อน ได้สารบริสุทธิ์หนัก 0.086 กรัม จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 553.1338$ ($M+H$)⁺ ตรงกับค่าคำนวณของ $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{O}_{12}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชัน 1 หมู่ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 33 % yield พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้นจากผลวิเคราะห์

IR (CH_3OH , cm^{-1}): 3413 (b), 2924, 1714, 1621, 1473, 1296, 1195, 1153, 1079, 822, 766, 572

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 7.90 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, $\text{H}_{3''}$), 7.82 (s, 1H, H_8), 7.68 (m, 2H, $\text{H}_{5''}$, $\text{H}_{9''}$), 7.44 (m, 3H, $\text{H}_{6''}$, $\text{H}_{7''}$, $\text{H}_{8''}$), 6.90 (s, 1H, H_5), 6.79 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, $\text{H}_{2''}$), 6.36 (s, 1H, H_4), 4.75 (m, 1H, H_1), 4.15 (m, 1H, H_2), 3.87 (dd, $J = 1.8, 12.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{6'a}$), 3.78 (m, 1H, $\text{H}_{6'b}$), $\square$ 3.42 (m, 1H, H_4), 3.47 (m, 3H, H_3 , H_4 , H_5)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) 179.62 (CO), 165.2 ($\text{C}_{1''}\text{O}$), 163.1 (C_3), 161.2 (C_1), 161.97 (C_6), 156.66 (C_{4a}), 155.34 (C_{4b}), 146.98 ($\text{C}_{3''}$), 136.93 (C_7), 131.03 ($\text{C}_{7''}$), 128.73 ($\text{C}_{5''}$, $\text{C}_{9''}$), 128.16 ($\text{C}_{6''}$, $\text{C}_{8''}$), 144.91 ($\text{C}_{4''}$), 118.75 (C_8), 115.56 (C_{8a}), 117.22 ($\text{C}_{2''}$), 108.46 (C_2), 107.78 (C_5), 101.55 (C_{8b}), 93.82 (C_4), 82.2 (C_5), 78.77 (C_3), 73.97 ($\text{C}_{1'}$), 71.2 ($\text{C}_{4'}$), 70.39 ($\text{C}_{2''}$), 61.45 (C_6)

สรุปผลการทดลอง

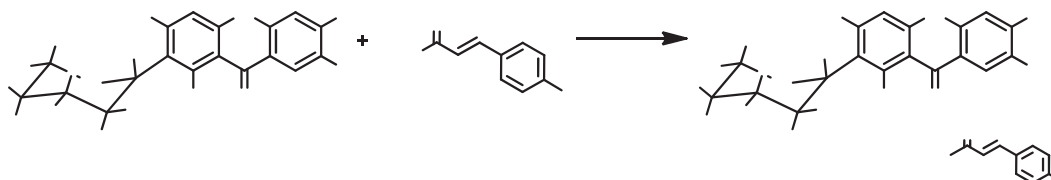
แมงจีเฟอรินเกิดปฏิกิริยากับ cinnamoyl chloride โดยใช้ Pyridine เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง โดยที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นและมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ และพบว่าหากทำการเติม cinnamoyl chloride เพิ่ม และปล่อยให้ปฏิกิริยาจะเกิดปฏิกิริยาที่ควบคุมไม่ได้โดยสังเกตจาก TLC จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหลายจุด ยากต่อการแยกบริสุทธิ์ จึงเลือกใช้สภาวะที่ยังคงเหลือสารตั้งต้น เมื่อนำ crude ที่ได้ไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม MeOH/ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 6c เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน หนัก 0.086 กรัม จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 553.1338$ ($M+H$)⁺ ตรงกับค่าคำนวณของ $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{O}_{12}$ ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 33% จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ^1H NMR ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้น เป็น monoacylation

5.2.3.9 ปฏิกิริยาเอซิลเลชันของแมงจีเฟอรินกับ substituted cinnamoyl chloride

จากการประเมินค่า TI แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชัน -OH เป็นกลุ่ม cinnamoyl มีแนวโน้มที่ให้การต้านไวรัสได้ดี และแต่มีผลต่อความเป็นพิษ เนื่องจากหมู่ cinnamoyl มีวงอะโรมาติกอยู่บน

โครงสร้างดังนั้น การเพิ่มหมู่แทนที่ ทั้งหมู่ที่ให้อิเล็กทรอนิกส์ตรอน (electron donating group) และหมู่ที่ดึงอิเล็กทรอนิกส์ตรอน (electron withdrawing group) บนวง รวมถึงตำแหน่งของหมู่ดังกล่าวบนวง น่าจะมีผลต่อความเป็นพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการทดลองนี้จึงได้ทำการปรับปรุงหมู่แทนที่บนวงอะโรมาติกของ cinnamoyl เพื่อดูแนวโน้มของหมู่ฟังก์ชัน

1. การสังเคราะห์อนุพันธ์แมงจีเฟอรินกับ p-Cl cinnamoyl chloride



วิธีทดลอง

ละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.23 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม p-Chlorocinnamoyl chloride 0.06 g มิลลิกรัม (0.28 mmol) และกวนที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม ระเหยภายใต้สูญญากาศ นำ crude ที่ได้มาทำการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl_3 ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.062 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจีเฟอริน 0.1000 กรัม (0.23 mmol) ละลายใน pyridine 6 มล และเติม p-Chlorocinnamoyl chloride 0.06 มิลลิกรัม (0.28 mmol) และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC โดยปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สูญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง ทำการแยก crude ที่ได้ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl_3 ได้ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.062 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ 609.1976 (M-H) ของ $\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{ClNaO}_{12}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอเทอร์ฟิเคชันเคชัน 1 หมู่ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 45 % และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสาร ที่เกิดขึ้นจากผลวิเคราะห์จาก

IR (CH_3OH , cm^{-1}): 3437 (b), 1634 (b), 1455, 1216, 1032, 1015, 748, 687

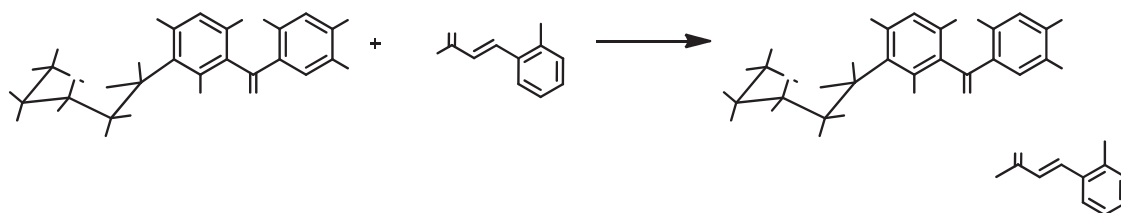
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 13.66 (s, 1H, OH_1), 11.3-10.9 (bs, 2H, OH) 7.88 (d, J = 8Hz, 2H, $\text{H}_{5''}$, $\text{H}_{9''}$), 7.86 (d, J = 16 Hz, 1H, $\text{H}_{3''}$), 7.7 (s, 1H, H_8), 7.54 (d, J = 8 Hz, 2H, $\text{H}_{6''}$, $\text{H}_{8''}$), 6.90 (s, 1H, H_5), 6.94 (d, J = 16 Hz, 1H, $\text{H}_{2''}$), 6.47 (s, 1H, H_4), 4.90 (bs, 2H, OH), 4.6-4.5 (m, 2H OH), 4.59 (2, J = 9.5 Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 4.12 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$), 3.78 (m, 1H, $\text{H}_{6'a}$), 3.45 (m, 1H, $\text{H}_{6'b}$), 3.5 - 3.0 (m, 3H, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{4'}$, $\text{H}_{5'}$)

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 179.25 (CO), 165.2 ($\text{C}_{1''}\text{O}$), 164.95 (C_3), 162.34, (C_1), 161.97 (C_6), 156.67, (C_{4a}), 155.26 (C_{4b}), 145.39 ($\text{C}_{3''}$), 142.1 (C_7), 130.87 (C_5 , C_6), 129.53 ($\text{C}_{6''}$, $\text{C}_{8''}$), 127.00 ($\text{C}_{4''}$), 129.53, (C_7), 118.34 (C_5), 118.31 (C_8), 118.31 ($\text{C}_{2''}$), 108.46 (C_2), , 115.56, (C_8), 101.55 (C_{8b}), 94.18 (C_4), 82.09, (C_5), 79.50, (C_3), 73.47, (C_1), 71.08 (C_4), 70.62, (C_2), 61.97, (C_6)

สรุปผลการทดลอง

แมงจีเฟอรินเกิดปฏิกิริยากับ p-Cl-cinnamoyl chloride โดยใช้ Pyridine เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง โดยที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม MeOH/CH₂Cl₂ ได้สารผลิตภัณฑ์ 6d เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน น้หนัก 0.062 กรัม จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ 609.1976 (M-H) ของ C₂₈H₂₃ClNaO₁₂ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอสเทอร์ฟิเคชันเคชัน 1 หมู่ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 45 % และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสาร ที่เกิดขึ้นจากผลวิเคราะห์จาก NMR spectroscopy ¹HNMR ¹³CNMR, HMQC และ HMBC สามารถยืนยันโครงสร้างของสาร ที่เกิดขึ้น เป็น monoacylation

2. การสังเคราะห์อนุพันธ์แมงจีเฟอริน กับ o-Cl cinnamoyl chloride



วิธีทดลอง

ละลาย แมงจีเฟอริน 0.1000 กรัม (0.23 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม o-Chlorocinnamoyl chloride 0.06 กรัม (0.28 mmol) และกวนที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม ระเหยภายใต้สุญญากาศ นำ crude ที่ได้มาทำการแยก โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl₃ ได้สารผลิตภัณฑ์ น้หนัก 0.069 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS, NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจีเฟอริน 0.1000 กรัม (0.23 mmol) ละลายใน pyridine 6 มล และเติม o-Chlorocinnamoyl chloride 0.06 กรัม (0.28 mmol) และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง ทำการแยก crude ที่ได้โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl₃ ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง น้หนัก 0.069 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ m/z = 609.052 (M+Na) ของ C₂₈H₂₃ClNaO₁₂ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอสเทอร์ฟิเคชัน 1 หมู่ ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 50

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสาร ที่เกิดขึ้นจากผลวิเคราะห์จาก

IR (CH₃OH, cm⁻¹): 3437(b), 2923, 1737, 1689, 1623, 1469, 1277, 754. 570

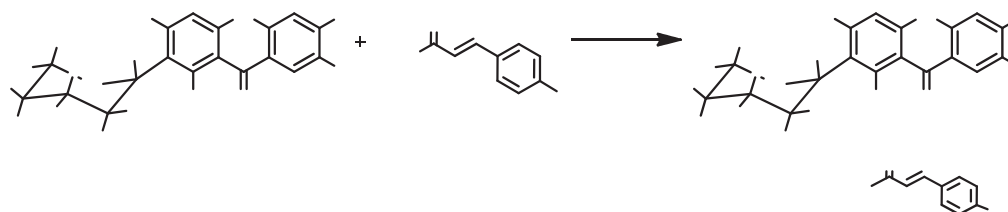
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) 13.72 (s, 1H, OH₁), 11.3-10.9 (bs, 1H, OH), 8.13 (d, J = 15.6 Hz, 1H, H_{3''}), 7.81 (s, 1H, H₈), 7.61 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H_{6''}), 7.49-7.46 (m, 3H, H_{7''}, H_{8''}, H_{9''}), 7.73 (s, 1H, H₅), 7.04 (d, J = 15.6 Hz, 1H, H_{2''}), 6.44 (s, 1H, H₄), 4.90 (bs, 2H, OH), 4.6-4.5 (m, 2H OH), 4.59 (d, J = 8 Hz, 1H, H₁), 4.12 (m, 1H, H₂), 3.81 (m, 1H, H_{2'}), 3.78 (m, 1H, H_{6'a}), 3.45 (m, 1H, H_{6'b}), 3.5 - 3.0 (m, 3H, H₃, H₄, H₅)

^{13}C NMR (100 MHz, (CD₃)₂SO) 179.32 (CO), 164.92 (C_{1''}O), 164.59 (C₃), 163.12 (C₁), 157.5 (C₆), 156.71 (C_{4a}), 155.31 (C_{4b}), 141.45 (C_{3''}), 137.22 (C₇), 134.46 (C_{5''}), 132.85 (C_{4''}), 131.86 (C_{6''}), 130.58 (C_{7''}), 128.7 (C_{5''}), 128.24 (C_{3''}), 120.45 (C_{2''}), 119.19 (C₈), 111.8 (C_{8a}), 108.55 (C₂), 104.11 (C₅), 101.65 (C_{8b}), 94.98 (C₄), 82.11 (C₅), 73.49 (C₁), 71.48 (C₃), 71.12 (C₄), 70.65 (C₂), 61.98 (C₆)

สรุปผลการทดลอง

แมงจีเฟอรินเกิดปฏิกิริยากับ o-Chlorocinnamoyl chloride โดยใช้ Pyridine เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง โดยที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม MeOH/CH₂Cl₂ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ 6e เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อนหนัก 0.069 กรัม (50% yield) จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ^1H NMR ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้น เป็น monoacylation

3. การสังเคราะห์อนุพันธ์ แมงจีเฟอริน กับ p-methoxy cinnamoyl chloride



วิธีทดลอง

ละลาย แมงจีเฟอริน 0.1000 กรัม (0.23 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม p-Methoxycinnamoyl chloride 60 มิลลิกรัม (0.06 mmol) และกวนที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม ระเหยภายใต้สุญญากาศ นำ crude ที่ได้มาทำการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl₃ ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.060 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจีเฟอริน 0.1000 กรัม (0.23 mmol) ละลายใน pyridine 6 มล และเติม p-Methoxycinnamoyl chloride 60 มิลลิกรัม (0.28 mmol) และปล่อยให้ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทุก 3 ชั่วโมง พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ปล่อยให้

ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง ทำการแยก crude ที่ได้ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl_3 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 581.282$ (M-H) ของ $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{O}_{13}$ คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 44 (0.060 กรัม)

IR (CH_3OH , cm^{-1}): 3437(b), 1633, 1513, 1172, 1033, 1014, 749, 612

การพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้น

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 13.61 (s, 1H, OH), 11.3-10.9 (bs, 1H, OH), 7.85 (d, $J = 16$ Hz 1H, $\text{H}_{3''}$), 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{6''}$), 7.72 (s, 1H, H_8), 7.10 (s, 1H, H_5), 7.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{6''}$), 6.75 (d, $J = 16$ Hz 1H, $\text{H}_{2''}$), 6.51 (s, 1H, H_4), 4.91 (bs, 2H, OH), 4.6-4.5 (m, 3H OH), 4.59 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 4.12 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.87 (m, 1H, $\text{H}_{6'a}$), 3.73 (m, 1H, $\text{H}_{6'b}$), 3.3 - 3.0 (m, 3H, H_3 , H_4 , H_5)

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 179.25 (CO), 165.2 ($\text{C}_{1''}\text{O}$), 164.98 (C_3), 162.34, (C_1), 161.97 (C_6), 159.89 ($\text{C}_{7''}$), 156.67, (C_{4a}), 155.26 (C_{4b}), 146.79, ($\text{C}_{3''}$), 142.1 (C_7), 131.03 ($\text{C}_{5''}$, C_9), 127.00 ($\text{C}_{4''}$), 120.90, (C_8), 115.56, (C_{8a}), 114.96, ($\text{C}_{8''}$, C_6), 114.58 ($\text{C}_{2''}$), 108.46 (C_2), 104 (C_5), 101.55 (C_{8b}), 94.18 (C_4), 82.1, (C_5), 79.5, (C_3), 73.48, ($\text{C}_{1'}$), 71.11 (C_4), 70.62, (C_2), 61.97, (C_6), 55.86 (OCH₃)

สรุปผลการทดลอง

แมงจีเฟอริน เกิดปฏิกิริยากับ p-Methoxycinnamoyl chloride โดยใช้ Pyridine เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง โดยที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม MeOH/ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 6f เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อนหนัก 0.060 กรัม (44% yield) จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ^1H NMR ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC สามารถยืนยันโครงสร้างของสาร ที่เกิดขึ้นเป็น monoacylation

5.2.4. การทดสอบคุณสมบัติการละลายของอนุพันธ์ แมงจีเฟอริน

เพื่อศึกษาพฤติกรรมของการละลายของอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่ทำการดัดแปลงในแบบต่างๆ และทำการเปรียบเทียบกับ การละลายของแมงจีเฟอริน ซึ่งจะช่วยให้ได้ข้อมูลเพื่อประกอบการนำไปใช้งานด้านเภสัชวิทยา ได้ทำการตรวจสอบสมบัติการละลายของอนุพันธ์ที่เตรียมขึ้นในตัวทำละลายต่างๆ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพด้านการละลายเบื้องต้นของอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้

วิธีทดลอง

1. ทดสอบการละลายน้ำ โดยชั่งสารตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม เติมน้ำ ครั้งละ 0.5 มล จนได้สารละลายใส บันทึกปริมาตรของตัวทำละลาย
2. ทดสอบการละลายของอนุพันธ์แมงจีเฟอรินใน paraffin oil โดยชั่งสารตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม เติมน้ำ paraffin oil 5 มล สังเกตการละลาย
3. ทดสอบการละลาย ของอนุพันธ์ แมงจีเฟอริน โดยชั่งสารตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม เติมน้ำ ตัวทำละลาย อินทรีย์คือ DMSO, MeOH, CHCl_3 อย่างละ 5 มล สังเกตการละลาย

ผลการทดลอง

ทดสอบการละลายน้ำ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 การละลายน้ำของอนุพันธ์ แมนจิเฟอริน

สารที่ทดสอบ	การละลายน้ำ	มก/มล
แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	-
ไซเตียม แมนจิเฟอริน	ละลาย	2
โปรแตสเซียม แมนจิเฟอริน	ละลาย	0.2
แคลเซียม แมนจิเฟอริน	ละลาย	0.5
methoxy แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	
O-hexyl แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	
O-allyl แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	
O-benzyl แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	-
acetyl แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	-
octanoyl แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	
luaroyl แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	
cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	-
p-OMe Cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	-
p-Cl Cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	-
o-Cl Cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	-

ผลการทดสอบการละลายของอนุพันธ์แมนจิเฟอรินใน paraffin oil และตัวทำละลายอินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 การละลายของ อนุพันธ์แมนจิเฟอรินใน oil และตัวทำละลายอินทรีย์

สารที่ทดสอบ	การละลาย ใน oil	การละลายใน CHCl_3	การละลายใน MeOH	การละลายใน DMSO
แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลายได้เล็กน้อย	ละลาย
ไซเตียม แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลายได้เล็กน้อย	ละลาย
โปรแตสเซียม แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลายได้เล็กน้อย	ละลาย
แคลเซียม แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลายได้เล็กน้อย	ละลาย**
O-Methoxy แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย
O-hexyl แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย
O-allyl แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย**
O-benzyl แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย
acetyl แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย	ละลาย**
octanoyl แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย
luaroyl แมนจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย

cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	ละลายได้น้อย	ละลาย*	ละลาย
p-OMe cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	ละลายได้น้อย	ละลายได้ดีมาก**	ละลาย**
p-Cl cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	ละลายได้น้อย	ละลายได้ดีมาก**	ละลาย**
o-Cl cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	ละลายได้น้อย	ละลายได้ดีมาก**	ละลาย**

*ละลายตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ในเมธานอล

**ละลายตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ใน DMSO เป็นเวลานาน

สรุปผลการทดลอง

แนวโน้มการละลายของสารที่ได้ของสารที่ได้จากการจากการดัดแปลงโครงสร้าง พบว่าเกลือโซเดียม, โปแตสเซียม และแคลเซียม แมงจีเฟอริน มีความสามารถในการละลายน้ำที่ดีขึ้น โดยละลายน้ำได้ดีกว่าแมงจีเฟอริน และเกลือที่เตรียมได้สามารถละลายในตัวทำละลายมีขั้วสูงได้เล็กน้อยเช่น MeOH และ DMSO นอกจากนี้เกลือที่สังเคราะห์ได้ไม่ละลายใน oil และละลายได้น้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไปยกเว้น DMSO

การดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันฟีนอลบนวงอะโรมาติก โดยอาศัยปฏิกิริยาแอลคิลเลชัน ให้ได้หมู่แอลคอกซี (OR) ที่เป็น (benzyl, $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ และแอลลิล) ให้สารอนุพันธ์ที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายใน MeOH ได้ปานกลาง และละลายใน DMSO ได้ดีมาก ในขณะที่อนุพันธ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเช่น octanoyl, lauroyl, cinnamoyl, p-OMe cinnamoyl, p-Cl cinnamoyl และ o-Cl cinnamoyl มีแนวโน้มในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ protic solvent และตัวทำละลายที่มีขั้วได้ดีขึ้นคือละลายในแอลกอฮอล์และ DMSO ซึ่งมีสาเหตุจากการที่โครงสร้างมีส่วน non polar ของสายคาร์บอนจำนวนมาก และไม่ละลายใน oil สำหรับอนุพันธ์ acetyl ซึ่งหมู่ $-\text{OH}$ บนวงเป็นแอลคอกซีเอซิลหลายตำแหน่งสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วคือ แอลกอฮอล์และคลอโรฟอร์ม นอกจากนี้อนุพันธ์ cinnamoyl จะเกิดการสลายตัวเปลี่ยนกลับไปเป็นแมงจีเฟอริน อย่างช้าๆ ในแอลกอฮอล์ และสารทุกตัวจะค่อยๆ สลายตัวเป็นแมงจีเฟอรินเมื่อตั้งทิ้งไว้ในตัวทำละลายเป็นเวลานาน

5.3 การทดสอบและหาแนวโน้มของฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน antiherpes ของอนุพันธ์ของ แมงจีเฟอริน

เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้ง herpes simplex virus (HSV) ของอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้และหาแนวโน้มการยับยั้ง HSV กับความสามารถในการละลายน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกันของอนุพันธ์เกลือของแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่ถูกดัดแปลงให้มีหมู่ acyl และ alkoxy ที่แตกต่างกัน

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบและหาแนวโน้มฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน antiherpes ของอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้

เชื้อจุลินทรีย์และเซลล์เพาะเลี้ยง

1. Herpes simplex virus type 1 strain F (HSV-1F)
2. Vero cell

อาหาร สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

1. 70% alcohol
2. 96-well plate
3. 24-well plate
4. Crystal violet
5. Minimum Essential Medium (MEM)
6. Trypsin-EDTA
7. 0.05 M Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4
8. Overlay medium
9. เครื่อง Rocking platform
10. CO₂ incubator
11. Micropipette
12. Pipette tip
13. Flask T-25 cm²

5.3.1 การทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างต่อ Vero cell

วิธีการทดลอง

1. นำเมกซิเฟอรินและอนุพันธ์เมกซิเฟอรินที่ต้องการทดสอบมาทำการเจือจางด้วย MEM medium โดย

ช่วงของความเข้มข้นของ Methoxy mangifein *p*-OMe Cinnamoyl mangifein *p*-Cl Cinnamoyl mangifein และ *o*-Cl Cinnamoyl mangifein ที่ทำการทดสอบอยู่ในช่วง $1.0 - 9.77 \times 10^{-4}$ mg/ml ส่วน mangifein, sodium mangifein, potassium mangifein, calcium mangifein, O-allyl mangifein, Acetyl mangifein และ O-Hexyl เมกซิเฟอริน อยู่ในช่วง $2.0 - 1.95 \times 10^{-3}$ mg/ml สำหรับ O-benzyl mangifein octanoyl mangifein และ lauroyl mangifein อยู่ในช่วง $3.0 - 2.93 \times 10^{-4}$ mg/ml

2. เติมหาตัวอย่างลงในจานเพาะเลี้ยง 96 หลุม หลุมละ 100 μ l โดยเติมความเจือจางละ 4 หลุม ก่อน

เติม cell suspension ที่มีปริมาณเซลล์ 3×10^5 cells/ml ลงในหลุมที่ต้องการจะทดสอบ หลุมละ 100 μ l และเติม MEM 100 μ l ลงในหลุมควบคุม

3. นำไปบ่มที่ 37 °C ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 3 วัน จนเซลล์เจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียวเต็มผิว พลาสติก

ของทุกหลุม

4. ดูอาหารในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุมทั้ง แล้วทำการย้อมสีเซลล์ด้วย 0.1% (w/v) crystal violet ทั้ง

ไว้ประมาณ 20 นาที

5. ตรวจสอบการติดสีของเซลล์ แล้วคำนวณหา CD₅₀

5.3.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ HSV-1

วิธีการทดลอง

1. เพาะเลี้ยง Vero cell ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม เมื่อเซลล์เจริญเต็มพื้นผิว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์

ออกหลุมละ 300 μ l

2. ทำการเจือจางไวรัสให้ได้จำนวนไวรัสประมาณ 50-100 plaque แล้วเติมไวรัสลงไปหลุมละ 100 μ l แล้ว

นำไปป้อนที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่อง rocking platform เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. เติมน้ำตัวอย่างที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ต่ำกว่าค่า CD_{50}) ลงในหลุมที่ทำการทดสอบหลุมละ

200 μ l (ความเข้มข้นละ 4 หลุม) โดยความเข้มข้นของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่ใช้ในการทดสอบแสดงในตารางที่ 3.10 สำหรับหลุมควบคุมเติม medium 200 μ l แทนสารทดสอบ

ตารางที่ 3.10 ช่วงความเข้มข้นของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อ HSV-1

สารทดสอบ	ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (mg/ml)
แมงจีเฟอริน	500-750
โซเดียม แมงจีเฟอริน	500-750
โบตาสเซียม แมงจีเฟอริน	500-750
แคลเซียม แมงจีเฟอริน	50-250
Hexyl แมงจีเฟอริน	50-250
O-allyl แมงจีเฟอริน	50-250
acetyl แมงจีเฟอริน	50-250
o-Cl Cinnamoyl mangifein	30-100
p-Cl Cinnamoyl mangifein	30-100
O-Methoxy แมงจีเฟอริน	25-150
octanoyl แมงจีเฟอริน	20-50
luaroyl แมงจีเฟอริน	20-40
p-OMe Cinnamoyl mangifein	15-150
Cinnamoyl mangifein	5-30
O-benzyl แมงจีเฟอริน	5-20

4. เติมน้ำ overlay medium หลุมละ 300 μ l ทุกหลุม แล้วนำไปป้อนที่ 37 °C ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 2-3

วัน

5. ดูด medium ในแต่ละหลุมทิ้งไป และทำการย้อมสีเซลล์ที่ติดเชื้อด้วย 0.1% (w/v) crystal violet ทิ้งไว้

ประมาณ 20 นาที

6. ตรวจสอบการติดสีของเซลล์ และนับปริมาณ plaque ที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณหาปริมาณไวรัสโดยมี

หน่วยเป็น plaque forming unit/ml (PFU/ml)

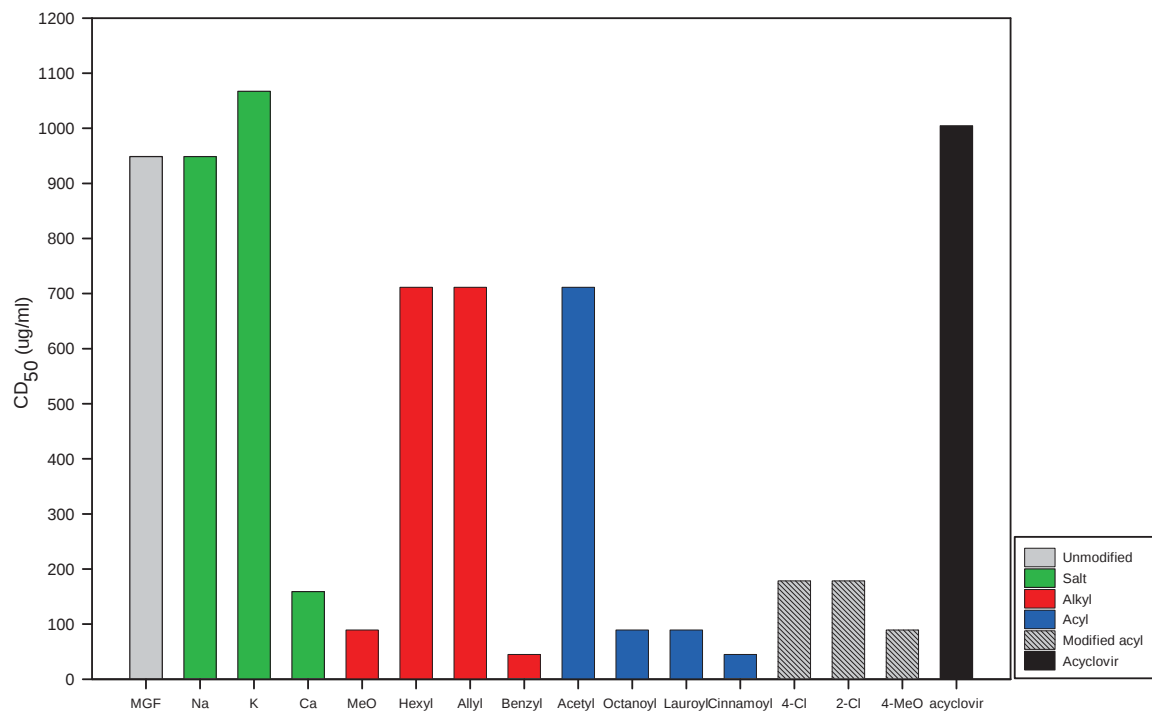
ผลการทดลอง

ผลการยับยั้งเชื้อ HSV-1F หลังเกาะติดกับเซลล์โดยแมงจิเฟอรินและสารอนุพันธ์ดังแสดงในภาพที่ 3.17 ใน

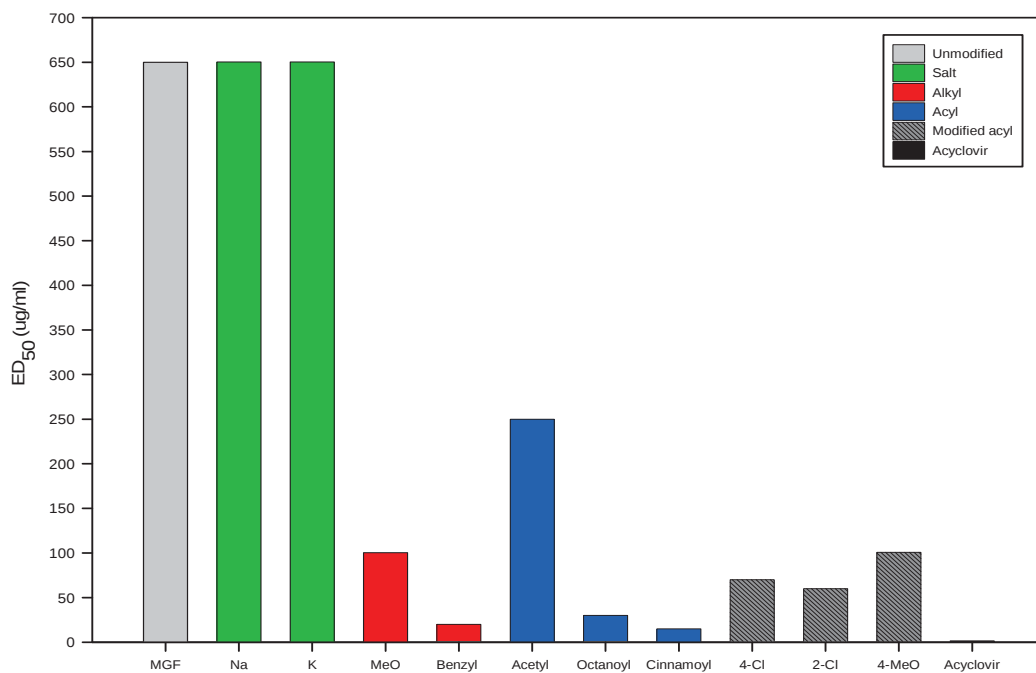
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (Vero cells) เมื่อเปรียบเทียบค่า CD_{50} ของกลุ่มอนุพันธ์เกลือของแมงจิเฟอริน พบว่า แคลเซียม แมงจิเฟอริน มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำหน้าที่เป็น host ของไวรัสสูงที่สุด โดยมีความเป็นพิษสูงกว่าแมงจิเฟอรินที่ไม่ได้ทำการดัดแปลงโครงสร้างประมาณ 6 เท่า ในขณะที่โซเดียม แมงจิเฟอริน มีค่า CD_{50} ใกล้เคียงกับแมงจิเฟอริน ส่วนโปแตสเซียม แมงจิเฟอริน มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุดในกลุ่มอนุพันธ์เกลือ (ดังภาพ 3.15 และตารางที่ 3.11) เมื่อพิจารณาความเป็นพิษของอนุพันธ์แมงจิเฟอรินที่ดัดแปลงให้เป็นหมู่ alkoxy ต่างๆ เช่น methoxy, O-benzyl, O-allyl, และ O-hexyl บนโครงสร้างของแมงจิเฟอริน พบว่า O-benzyl แมงจิเฟอริน มีความเป็นพิษต่อ vero cells สูงที่สุด โดยมีความเป็นพิษสูงกว่าแมงจิเฟอรินที่ไม่ได้ดัดแปลงโครงสร้างถึง 21 เท่า ส่วนอนุพันธ์ของ methoxy แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงสูงกว่าแมงจิเฟอริน ประมาณ 10 เท่า โดยการดัดแปลงโครงสร้างของแมงจิเฟอรินให้มี O-hexyl และ O-allyl อยู่บนโมเลกุลนั้น แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงสูงกว่าแมงจิเฟอรินเพียง 1.3 เท่า จากภาพที่ 3.15 และตารางที่ 3.11 พบว่าในการดัดแปลงแมงจิเฟอรินให้มีหมู่ acyl ต่างๆ เช่น acetyl, octanoyl, lauroyl และ cinnamoyl นั้น การเพิ่ม cinnamoyl บนโครงสร้างของแมงจิเฟอริน ส่งผลต่อความเป็นพิษต่อ vero cells เป็นอย่างมาก โดย cinnamoyl แมงจิเฟอริน มีความเป็นพิษสูงกว่าแมงจิเฟอรินที่ไม่ได้ดัดแปลงโครงสร้างถึง 21 เท่า ซึ่งเท่ากับ benzyl แมงจิเฟอริน ส่วนอนุพันธ์ของ lauroyl และ octanoyl แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงสูงกว่าแมงจิเฟอริน ประมาณ 10 เท่า ในขณะที่ acetyl แมงจิเฟอรินแสดงความเป็นพิษต่อ vero cells สูงกว่าแมงจิเฟอรินเพียง 1.3 เท่า ทั้งนี้เมื่อทำการดัดแปลงโครงสร้างของแมงจิเฟอรินโดยทำการเติมหมู่ chloro และ methoxy เพิ่มเติมบน cinnamoyl แมงจิเฟอริน พบว่าการเติมหมู่ดังกล่าวช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงได้ โดยพบว่า 4-chlorocinnamoyl และ 2-chlorocinnamoyl แมงจิเฟอริน มีค่า CD_{50} อยู่ที่ 178.25 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสูงกว่า แมงจิเฟอริน ที่ไม่ได้ทำการดัดแปลงโครงสร้างประมาณ 5 เท่า ส่วน methoxy cinnamoyl แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงสูงกว่าแมงจิเฟอริน ประมาณ 10 เท่า ดังแสดงในภาพ 3.15 และตารางที่ 3.11

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 strain F ของ แมงจิเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินที่

สังเคราะห์ได้หลังไวรัสเกาะติดเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี plaque reduction assay โดยความเข้มข้นสูงสุดของแมงจิเฟอรินและอนุพันธ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบจะต้องมีความเป็นพิษต่อ Vero cells ต่ำกว่าค่า CD_{50} จากผลการทดลองในตารางที่ 3.11 และภาพ 3.16 พบว่าค่า ED_{50} ของแมงจิเฟอรินมีค่าเท่ากับ 650 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินที่สังเคราะห์ได้โดยทำการดัดแปลงอยู่ในรูปของอนุพันธ์เกลือนั้นมีค่า ED_{50} ตั้งแต่ 15-650 $\mu\text{g/ml}$ โดยพบว่าอนุพันธ์เกลือของโปแตสเซียมและโซเดียมแมงจิเฟอริน แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 strain F ใกล้เคียงกับแมงจิเฟอริน ดังภาพ 3.16 ในขณะที่แคลเซียมแมงจิเฟอริน มีความสามารถในการ

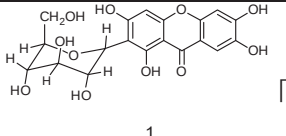
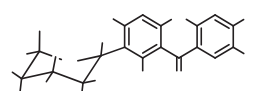
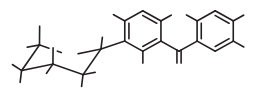
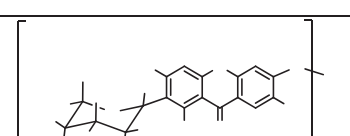
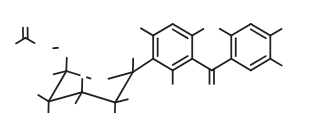
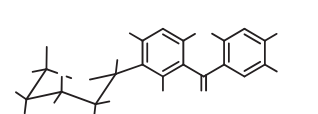
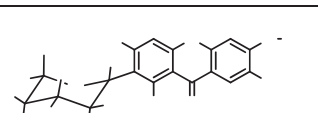
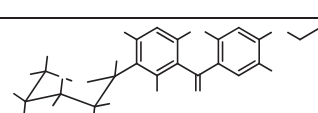
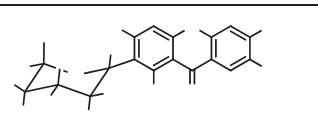
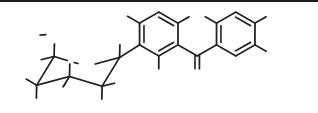
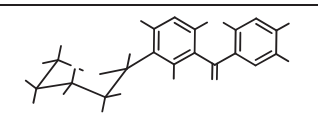


ภาพ 3.15 ค่า CD₅₀ ของแมงจีเฟอริน อนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่ดัดแปลงให้มีหมู่ต่างๆ และ acyclovir ต่อ vero cells

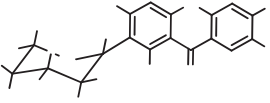
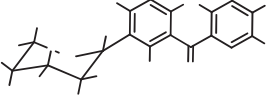
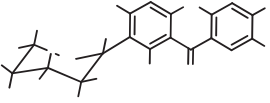
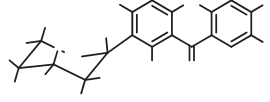
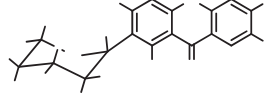


ภาพ 3.16 ค่า ED₅₀ ของแมงจีเฟอริน อนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่ดัดแปลงให้มีหมู่ต่างๆ และ acyclovir ต่อ HSV-1 strain F

ตารางที่ 3.11 แสดงความเป็นพิษและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 strain F ของ แมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของ แมงจีเฟอริน หลังไวรัสเกาะติดเซลล์

สารตัวอย่าง	สูตรโครงสร้าง	CD ₅₀ (µg/ml)	ED ₅₀ * (µg/ml)	TI (CD ₅₀ /ED ₅₀)
แมงจีเฟอริน	 1	948.70	650.03	1.46
ไซเตียม แมงจีเฟอริน		948.70	650.25	1.46
โพลีแซคคาไรด์ แมงจีเฟอริน		1,066.97	650.36	1.64
แคลเซียม แมงจีเฟอริน		158.88	ND**	ND
โมโนเอสเทอร์ แมงจีเฟอริน ***		ND	ND	ND
Methoxy แมงจีเฟอริน		89.13	100.29	0.89
O-hexyl แมงจีเฟอริน		711.31	ND	ND
O-allyl แมงจีเฟอริน		711.31	ND	ND
Benzyl แมงจีเฟอริน		44.77	20.00	2.24
Acetyl แมงจีเฟอริน		711.31	250.00	2.85
Octanoyl แมงจีเฟอริน	 6a R = C(O)C ₇ H ₁₅	89.34	30.00	2.98

ตารางที่ 3.11 (ต่อ) แสดงความเป็นพิษและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 strain F ของ แมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของ แมงจีเฟอริน หลังไวรัสเกาะติดเซลล์

สารตัวอย่าง	สูตรโครงสร้าง	CD ₅₀ (µg/ml)	ED ₅₀ * (µg/ml)	TI (CD ₅₀ /ED ₅₀)
Lauroyl แมนจิเฟอริน	 6b R = C(O)C ₁₁ H ₂₃	89.34	ND	ND
Cinnamoyl แมนจิเฟอริน	 6c R = C(O)CH=CHC ₆ H ₅	44.77	15.00	2.99
4-Chlorocinnamoyl แมนจิเฟอริน	 6d R = C(O)CH=CHC ₆ H ₄ (p-Cl)	178.25	70.00	2.55
2-Chlorocinnamoyl แมนจิเฟอริน	 6e R = C(O)CH=CHC ₆ H ₄ (o-Cl)	178.25	60.00	2.97
4-methoxycinnamoyl แมนจิเฟอริน	 6f R = C(O)CH=CHC ₆ H ₄ (p-OMe)	89.13	100.68	0.88
acyclovir		1004.69	1.50	669.79

* ค่า ED₅₀ คำนวณจากกราฟระหว่างค่าเฉลี่ย % การยับยั้งการเจริญของ HSV-1F และความเข้มข้นของสารทดสอบ (จาก 2 การทดลอง),

** ND: ไม่สามารถคำนวณได้เนื่องจาก % การยับยั้งของ HSV-1F ที่ได้จากการทดลองมีค่าไม่ถึง 50%

*** สารละลายตัวอย่างรวดเร็วไม่สามารถทดสอบได้

┌

┐

(ก) แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 750 µg/ml

┌

(ข) โซเดียม แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 750 µg/ml

┐

(ค) โปแตสเซียม แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 750 µg/ml

(ง) แคลเซียม แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml

ภาพที่ 3.17 การยับยั้งเชื้อ HSV-1F หลังเกาะติดกับเซลล์โดยสารของ แมนจิเฟอริน (ก) อนุพันธ์ของ แมนจิเฟอริน (ข-ง) และ acyclovir (ด) เปรียบเทียบกับไวรัสควบคุม (ต)

┌

┐

(จ) Methyl แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 150 µg/ml

┌

(ฉ) O-allyl แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml

┐

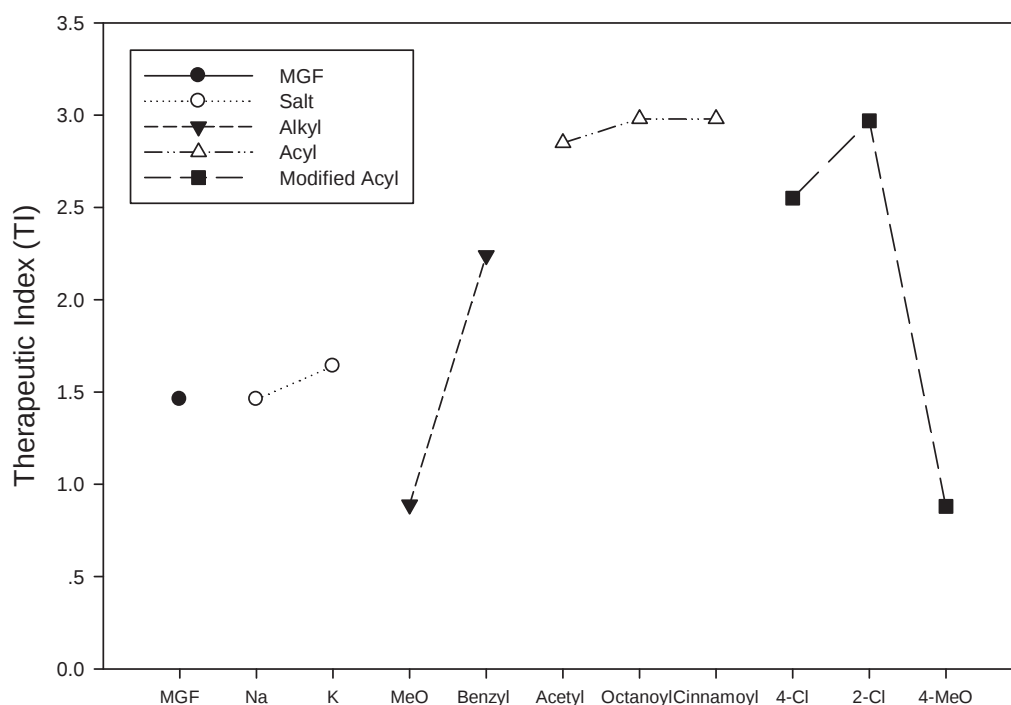
(ช) Benzyl แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml

(ซ) O-hexyl แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 250

	µg/ml
Γ	Γ
(ณ) Acetyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml	(ญ) Cinnamoyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 30 µg/ml
Γ	Γ
(ณ) Octanoyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml	(ญ) Lauroyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 40 µg/ml
Γ	Γ
(ฐ) 2-Chlorocinnamoyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml	(ฑ) 4-Chlorocinnamoyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml
Γ	Γ
(ฒ) 4-methoxycinnamoyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 150 µg/ml	(ด) Acyclovir ที่ความเข้มข้น 1.5 µg/ml
Γ	
(ต) ไวรัสควบคุม	

ภาพที่ 3.17 (ต่อ) การยับยั้งเชื้อ HSV-1F หลังเกาะติดกับเซลล์โดยสารของ แลงจีเฟอริน (ก) อนุพันธ์ของ แลงจีเฟอริน (ข-ฒ) และ acyclovir (ด) เปรียบเทียบกับไวรัสควบคุม (ต)

ยับยั้ง HSV-1 strain F น้อยกว่าแลงจีเฟอริน (ตารางที่ 3.11) เมื่อพิจารณาผลของฤทธิ์ในการยับยั้ง HSV-1 ในกลุ่มของอนุพันธ์ของแลงจีเฟอรินที่ดัดแปลงให้มีหมู่ alkyl พบว่าค่า ED_{50} ของ O-benzyl แลงจีเฟอรินมีค่าต่ำสุด โดยมีค่าเท่ากับ 20 µg/ml ส่วน methoxy แลงจีเฟอรินมีค่า ED_{50} เท่ากับ 100.29 µg/ml ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 ที่ดีขึ้น ทั้งนี้พบว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบของ O-hexyl และ O-allyl แลงจีเฟอรินนั้นไม่สามารถยับยั้งเชื้อ HSV-1 ได้ต่ำกว่า 50% (ตารางที่ 3.11) เมื่อพิจารณาค่า ED_{50} ของอนุพันธ์แลงจีเฟอรินที่มีการดัดแปลงด้วยหมู่ acyl พบว่าการดัดแปลงแลงจีเฟอรินโดยการเพิ่ม cinnamoyl นั้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 strain F ได้โดยค่า ED_{50} ของ cinnamoyl แลงจีเฟอรินมีค่าต่ำกว่าแลงจีเฟอรินถึง 43 เท่า ซึ่งต่ำที่สุดในกลุ่มของอนุพันธ์แลงจีเฟอรินทุกอนุพันธ์ที่ทำการทดสอบ ส่วน octanoyl แลงจีเฟอรินมีค่า ED_{50} ต่ำกว่าแลงจีเฟอริน 22 เท่า สำหรับ acetyl แลงจีเฟอรินนั้นมีค่า ED_{50} เท่ากับ 250 µg/ml ซึ่งต่ำกว่าแลงจีเฟอริน 2.6 เท่า (ภาพที่ 3.16 และตารางที่ 3.11) จากผลของ plaque reduction (ภาพที่ 3.17) พบว่าการดัดแปลงโครงสร้างของแลงจีเฟอรินโดยการเติม lauroyl นั้นไม่สามารถเพิ่มความสามารถในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 ได้ เมื่อทำการดัดแปลง cinnamoyl แลงจีเฟอริน โดยทำการเพิ่มหมู่ chloro และ methoxy พบว่า o-Cl-cinnamoyl แลงจีเฟอริน มีค่า ED_{50} ที่สูงกว่า cinnamoyl แลงจีเฟอริน ประมาณ 4 เท่า แต่ p-Cl-cinnamoyl แลงจีเฟอริน และ p-OMe-cinnamoyl แลงจีเฟอริน มีค่า ED_{50} ที่สูงกว่าแลงจีเฟอรินประมาณ 4.6 และ 6.6 เท่า ตามลำดับ



ภาพ 3.18 ค่า TI ของแมงจีเฟอร์ริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอร์รินที่ดัดแปลงให้มีหมู่ต่างๆ

เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการต้านไวรัสของอนุพันธ์แมงจีเฟอร์ริน ด้วยค่า therapeutic index (TI) โดยคำนวณจากค่า CD_{50} และ ED_{50} ซึ่งเป็นค่าที่สามารถใช้บ่งบอกประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของอนุพันธ์ของแมงจีเฟอร์รินในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส HSV-1 strain F จากตารางที่ 3.11 พบว่าค่า TI ของแมงจีเฟอร์รินมีค่าเท่ากับ 1.46 ส่วนอนุพันธ์ของแมงจีเฟอร์ริน มีค่า TI ตั้งแต่ 0.885-2.985 เมื่อพิจารณาจากภาพ 3.18 พบว่าในกลุ่มของอนุพันธ์เกลือมีเพียงโปแตสเซียม แมงจีเฟอร์ริน ที่มีค่า TI สูงกว่าแมงจีเฟอร์ริน ส่วน O-benzyl แมงจีเฟอร์รินเป็นอนุพันธ์เพียงอนุพันธ์เดียวในกลุ่ม alkoxy ที่แสดงค่า TI ที่สูงกว่าแมงจีเฟอร์ริน โดยมีค่าสูงกว่าประมาณ 1.5 เท่า ทั้งนี้เมื่อพิจารณาค่า TI ของอนุพันธ์ที่ดัดแปลงด้วยหมู่ acyl พบว่าการดัดแปลงแมงจีเฟอร์รินให้มีหมู่ cinnamoyl นั้นสามารถเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 strain F ได้ดีที่สุด โดยค่า TI ที่ได้มีค่าเท่ากับ 2.97 ซึ่งสูงกว่าค่า TI ของแมงจีเฟอร์รินถึง 2 เท่า ส่วน octanoyl แมงจีเฟอร์ริน มีค่า TI สูงรองลงมาซึ่งเท่ากับ 2.98 (ตารางที่ 3.11) นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มหมู่ chloro ลงไปบนอนุพันธ์ของ cinnamoyl ในตำแหน่งที่ต่างกันจะแสดงความจำเพาะในการยับยั้งได้ต่างกัน โดย o-Cl-cinnamoyl แมงจีเฟอร์ริน มีค่า TI เท่ากับ 2.97 แต่ p-Cl-cinnamoyl แมงจีเฟอร์ริน มีค่า TI เพียง 2.55 และยังพบว่า p-OMe-cinnamoyl แมงจีเฟอร์รินให้ค่า TI ที่ลดลงจาก cinnamoyl แมงจีเฟอร์รินถึง 3.8 เท่า

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบและหาแนวโน้มของฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F ของอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 14 อนุพันธ์ เมื่อพิจารณาค่า TI ของแมงจีเฟอรินเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ที่ดัดแปลงแล้ว พบว่าการดัดแปลงโครงสร้างให้มีอนุพันธ์เกลืออยู่ในโครงสร้างของแมงจีเฟอรินไม่ได้เพิ่มความสามารถในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F อย่างมีนัยสำคัญ โดยอนุพันธ์เกลือที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสได้ดีกว่าแมงจีเฟอรินนั้น คือ โปแตสเซียม แมงจีเฟอริน ในขณะที่การดัดแปลงโครงสร้างของอนุพันธ์แมงจีเฟอรินให้มีหมู่ acyl ที่แตกต่างกันสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสได้สูงกว่าอนุพันธ์เกลือ โดย cinamoyl แมงจีเฟอริน และ octanoyl แมงจีเฟอรินนั้นมีค่า TI ที่สูงที่สุด ส่วน lauroyl แมงจีเฟอริน นั้นพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F น้อยที่สุดในกลุ่มนี้ ในขณะที่การดัดแปลงแมงจีเฟอรินด้วยหมู่ alkoxy โดยเพิ่ม methoxy, O-allyl และ O-hexyl ให้กับแมงจีเฟอรินนั้นจะลดความสามารถในการยับยั้ง HSV-1 strain F ยกเว้นในกรณีของอนุพันธ์ O-benzyl การเติมหมู่ benzyl 2 หมู่เข้าไปที่โมเลกุลของแมงจีเฟอริน จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 strain F ได้ เมื่อพิจารณาการดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอรินโดยการเพิ่ม chloro เติมบนโมเลกุลของ cinnamoyl แมงจีเฟอรินพบว่า การดัดแปลงโครงสร้างของอนุพันธ์แมงจีเฟอริน โดย chloro ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 strain F ได้ แม้ว่าการเติมหมู่ chloro เข้าไปที่หมู่อะโรมาติกของ cinnamoyl จะช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง แต่ค่า ED_{50} ในการยับยั้ง HSV-1 ก็ลดต่ำลงด้วยเช่นกัน ส่วนการเติมหมู่ methoxy ที่หมู่อะโรมาติกของ cinnamoyl กลับลดความสามารถในการยับยั้ง HSV-1 ให้ต่ำลงกว่ากรณีของแมงจีเฟอริน

จากแนวโน้มของฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน antiherpes ของอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้ พบว่าการเติมหมู่ acyl หรือ alkoxy บนโครงสร้างของแมงจีเฟอริน มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์เพาะเลี้ยง และความสามารถในการยับยั้งไวรัส HSV-1 มากกว่าอนุพันธ์เกลือโดยพบว่า การดัดแปลงโครงสร้างของอนุพันธ์แมงจีเฟอริน โดยอาศัยปฏิกิริยาแอลคิลเลชัน เปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์แอลคอกไซด์ พบว่าเมื่อจำนวน carbon ของหมู่ alkyl มากขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัส HSV-1 ลดลงยกเว้นกรณีของ benzyl แมงจีเฟอริน ส่วนการ เปลี่ยนให้เป็นหมู่เอสเตอร์โดยอาศัยปฏิกิริยาเอซิลเลชันเติมหมู่ acyl บนโครงสร้างของแมงจีเฟอริน พบว่า cinnamoyl แมงจีเฟอริน เป็นอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในบรรดาอนุพันธ์เอซิลที่เป็นสายไฮโดรคาร์บอนยาวที่สังเคราะห์ได้อื่นๆ อาจจะเป็นเพราะการเพิ่มจำนวนของ carbon อยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จึงส่งผลให้อนุพันธ์ดังกล่าวสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ที่ติดเชื้อได้ดีกว่าอนุพันธ์อื่นๆ เนื่องจากไวรัส HSV-1 มี envelope ที่เป็นชั้นไขมันห่อหุ้ม 16 ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV จะลดลงอย่างมาก เมื่อมีการเติมหมู่ electron releasing group เช่น OMe บนวงอะโรมาติกของ cinnamoyl ที่ตำแหน่ง para ส่วนการเติมหมู่ electron withdrawing group เช่น Cl บนวงอะโรมาติกของ cinnamoyl แมงจีเฟอริน ที่ตำแหน่ง para ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 ลดลงเช่นกันเมื่อเทียบกับ cinnamoyl แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 มีผลลดน้อยกว่า เมื่อเทียบกับการเติมหมู่ OMe ที่ตำแหน่ง para และเมื่อเติมหมู่ electron withdrawing group เช่น Cl บนวงอะโรมาติกของ cinnamoyl แมงจีเฟอรินที่ตำแหน่ง ortho พบว่าส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 ลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ cinnamoyl และ p-Cl cinnamoyl แมงจีเฟอริน ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F จะขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของชนิดของหมู่และจำนวนของ carbon ที่ทำการดัดแปลง รวมไปถึงตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงอะโรมาติกของหมู่เอซิลประเภทอะโรมาติก

5.4 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase II ของแมงจิเฟอริน และอนุพันธ์แมงจิเฟอรินที่สังเคราะห์ได้

Herpes simplex viruses หรือ HSV มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายตรงเกลียวคู่ (linear double-stranded DNA) มีความยาวตั้งแต่ 120-230 Kbp HSV จะอาศัยเอนไซม์หลายชนิดจากเซลล์เจ้าบ้าน (host) ในการจำลองตนเอง (replication) ได้แก่ topoisomerase (topo) I และ II, DNA ligase I และ DNA polymerase-primase ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่ม topoisomerase I และ II เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการพัฒนายาต้าน HSV ที่ดื้อต่อยา acyclovir เอนไซม์ topoisomerase ทำหน้าที่คลายเกลียว (unwinding) และเชื่อมต่อ (re-ligation) สายคู่ของดีเอ็นเอในกระบวนการจำลองตนเอง รวมถึงการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) และกระบวนการถอดรหัส (transcription) ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ topoisomerase จึงทำให้ไวรัสไม่สามารถสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ ซึ่งทำให้กระบวนการถอดรหัสและการแปลรหัสของไวรัสจะถูกยับยั้งในที่สุด ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ในการต้านการทำงานของเอนไซม์ human Topoisomerase II α ของแมงจิเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินที่สังเคราะห์ได้

อุปกรณ์และสารเคมี

- สารเคมี

1. Eukaryotic Topoisomerase II Drug Screening Kit (บริษัท TopoGEN, Inc, USA)
2. Human Topoisomerase II α (Sigma aldrich, USA)
3. Agarose
4. Ethidium bromide
5. Tris-base
6. Boric acid
7. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
8. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
9. Protinase K
10. Linear polyacrylamide
11. เอทานอล
12. Chloroform
13. Isoamyl alcohol
14. 3 M Sodium acetate buffer

- อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Agarose gel electrophoresis apparatus
2. Power supply
3. Microcentrifuge
4. Microcentrifuge tube

5. Micropipettes
6. Yellow tips
7. Blue tips
8. UV transilluminator และ Image analyzer
9. Thermal dry bath

วิธีการทดลอง

1. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase II ของ แมงจิเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินที่สังเคราะห์

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ human Topoisomerase II α ของ แมงจิเฟอริน และอนุพันธ์ เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II α นั้นได้ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Eukaryotic Topoisomerase II Drug Screening ในการทดลอง ซึ่งชุดน้ำยาสำเร็จรูปมีองค์ประกอบดังตารางที่ 3.12

ตารางที่ 3.12 องค์ประกอบของน้ำยาสำเร็จรูป Eukaryotic Topoisomerase II Drug Screening

สารเคมี	ความเข้มข้นหรือปริมาตรสารเคมี
Supercoiled DNA [pHOT1]	25 μ g
Linear pHOT1 DNA	25 μ g
10X Topoisomerase II assay buffer	500 μ l
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	10% (w/v)
10X Gel loading buffer	200 μ l
Etoposide (positive control)	100 μ l

ในปฏิบัติการการยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II α ของแมงจิเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจิเฟอริน ปริมาตรปฏิกริยารวม 20 μ l ประกอบด้วย

ตารางที่ 3.13 ปฏิกริยาการยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II α ปริมาตรรวม 20 μ l

สารเคมี	ปริมาตร (μ l)
10X Topoisomerase II assay buffer	2
Supercoiled pHOT1 DNA	1
Purified human topoisomerase II α (4-6 Units)	2
1 mM แมงจิเฟอริน หรืออนุพันธ์ที่ต้องการทดสอบ หรือสำหรับ positive control ให้ใช้ etoposide (VP16)	2
H ₂ O sterile	13

เมื่อปิเปตสารละลายดังตารางที่ 3.13 ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml แล้วผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันโดยการเคาะหลอดเบาๆ จากนั้นนำสารละลายไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15-30

นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2 μ l ของสารละลาย SDS (10% w/v) และสารละลาย Proteinase K ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 μ g/ml แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 37°C ต่อมา 15 นาที จากนั้นทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าลงไปผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที แล้วจึงเปิดสารละลายส่วนใสด้านบนลงในหลอด microcentrifuge ใหม่ จากนั้นผสม 6X loading dye กับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ และวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II α ด้วย 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis

2. เทคนิค agarose gel electrophoresis

วิธีเตรียมสาร

1. 50X Tris- acetate (TAE) Buffer (Concentrate stock solution)

ละลาย Tris-base 242 g ในน้ำ deionized เติม glacial acetic acid ปริมาตร 57.1 ml และ 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 100 ml (โดยซึ่ง EDTA 18.61 กรัม ละลายในน้ำ deionized ปรับ pH เป็น 8.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml) แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เมื่อต้องการใช้งานให้เจือจาง 50X TAE buffer ลงเหลือ 1 X

2. Loading buffer (6X Buffer)

ผสม Bromophenol blue 0.025 g และ Glycerol ปริมาตร 3 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (ปริมาณที่ใช้จะเป็น 1/6 ของปริมาตรรวมของสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย)

3. Ethidium bromide (ความเข้มข้น 2.5 μ g/ml)

Ethidium bromide (Stock solution ความเข้มข้น 10 mg/ml) ปริมาตร 250 μ l ปรับปริมาตรเป็น 1 L ด้วย 1X TAE Buffer

ในการทำเตรียม 0.8% (w/v) agarose gel ทำได้โดยซึ่งผง agarose 0.8 g ละลายใน 1X TAE buffer ปริมาตร 100 ml นำไปต้มให้เดือด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง และเติม Ethidium bromide ลงไปให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.5 μ g/ml แล้วนำมาเทลงในถาดของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสขณะอุ่น โดยให้เจลมีความหนาประมาณ 0.8 cm นำหัวเสียบ (comb) มาเสียบไว้ (พยายามอย่าให้มีฟองอากาศบนเจลและระหว่างหัวเสียบ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวแล้วดึงหัวเสียบออก นำไปวางบน chamber ของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วเท 1X TAE Buffer ลงไปให้ท่วมเจล)

ผสม Loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ และสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด แล้วนำไปหยอดลงในช่องของ agarose gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 45 โวลต์ เมื่อเห็นสีของ Bromophenol blue เคลื่อนที่ไปประมาณ 2/3 ของความยาวเจล จึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจลที่ได้มาส่องดูด้วย UV transilluminator แล้วถ่ายภาพเจลเพื่อบันทึกผลการทดลอง

ผลการทดลอง

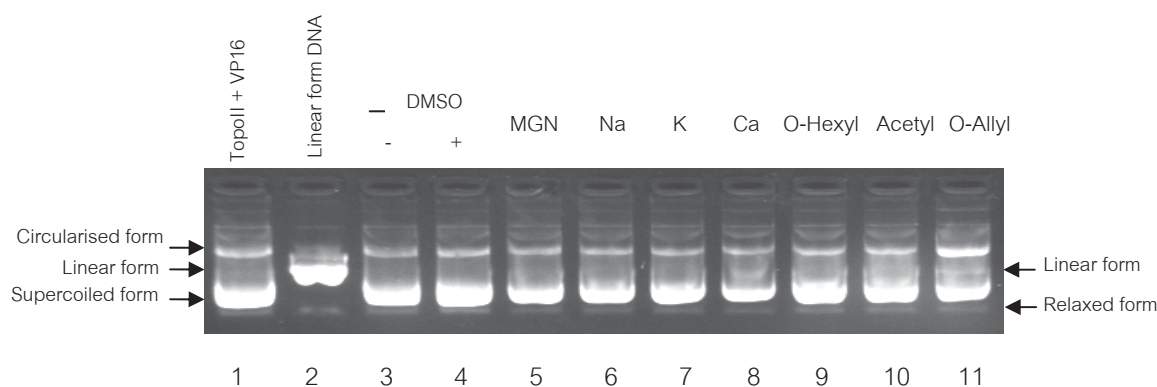
การยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α ของ แมงจิเฟอริน และอนุพันธ์ของ แมงจิเฟอริน

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α ใน agarose gel electrophoresis โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Eukaryotic Topoisomerase II Drug Screening สามารถทดสอบการยับยั้ง human topoisomerase II α โดยสารที่มีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งจะกระตุ้นการเกิด cleavable

complexes ของ human topoisomerase II α จากดีเอ็นเอสายเกลียวคู่ทรงกลมของ pHOT1 ให้อยู่ในรูปร่างเส้นตรง (linear form) และรูปร่างทรงกลมปลายเปิด (nick open circular form) โดย solvent control ของการทดลองนี้ คือ DMSO ซึ่งใช้ในการละลายแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 3.19

จากภาพที่ 3.19 lane ที่ 4 พบดีเอ็นเอรูปร่างคลายเกลียว (relaxed form) และแถบดีเอ็นเอรูปร่างเกลียว (supercoiled form) ซึ่งการเกิดลักษณะของดีเอ็นเอรูปร่างคลายเกลียว แสดงให้เห็นว่า DMSO ไม่ได้ยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α แต่เมื่อเติม etoposide หรือ VP16 ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α โดยใช้เป็นกลุ่มควบคุมชนิดให้ผลบวก (positive control) (ภาพที่ 3.19 lane ที่ 1) พบว่ามีแถบของดีเอ็นเอรูปร่างเส้นตรง (linear form) เกิดขึ้นซึ่งอยู่ระหว่างดีเอ็นเอรูปร่างเกลียวและทรงกลมปลายเปิด (circularised form)

เมื่อทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้ง human topoisomerase II α ของแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน ซึ่งได้แก่ Na, K, Ca, O-Hexyl, Acetyl และ O-Allyl แมงจีเฟอริน ที่มีความเข้มข้นสูงสุด 100 μM จากภาพที่ 3.19 lane ที่ 5-11 พบแถบดีเอ็นเอรูปร่างเส้นตรง (ดังลูกศรชี้) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α โดยที่ lane 8 และ 11 จะสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอรูปร่างเส้นตรงได้ชัดเจนที่สุด



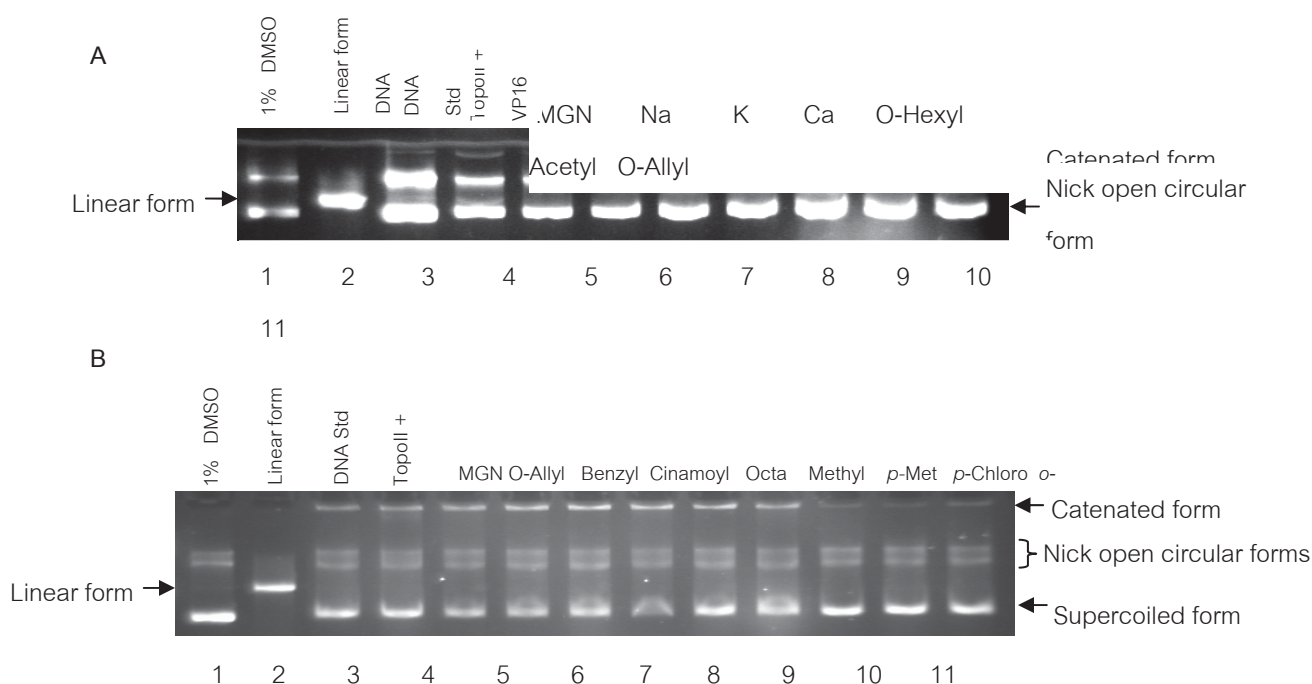
ภาพที่ 3.19 Agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pHOT1 ในการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II ของแมงจีเฟอริน (lane 5) และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน ได้แก่ Na (lane 6), K (lane 7), Ca (lane 8), O-Hexyl (lane 9), Acetyl (lane 10) และ O-Allyl (lane 11) โดยใช้ etoposide (หรือ VP16) เป็น positive control (lane 1)

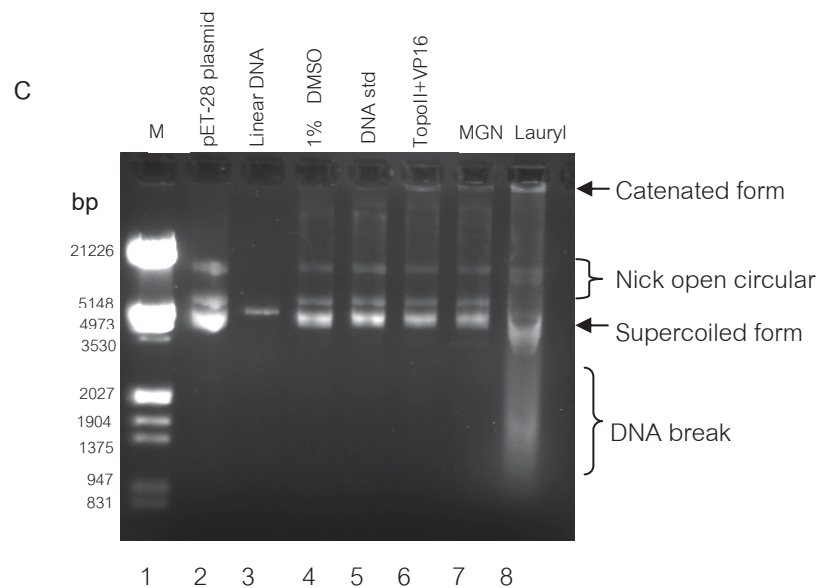
เพื่อยืนยันผลการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α ของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้ จึงทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวกับพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ในการคลายเกลียวของดีเอ็นเอจากรูป catenated เป็น decatenated (ภาพที่ 3.20) เมื่อสารทดสอบยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α จะทำให้ดีเอ็นเออยู่ในรูป catenated จำนวนมาก ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากรูปร่าง catenated จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอแบบอื่น

Γ

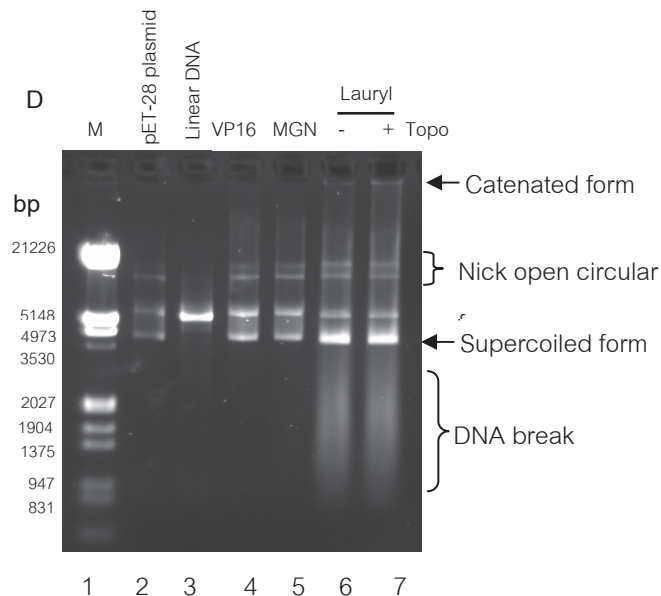
ภาพที่ 3.20 การทำงานของ topoisomerase II ในการคลายเกลียวของพลาสมิดดีเอ็นเอจากรูปร่าง catenated เป็น decatenated DNA

การศึกษาการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α ของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินบน agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 3.21) พบว่า DMSO ซึ่งเป็นใช้เป็นตัวทำละลายไม่มียับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α (ดังภาพที่ 3.21 A และ 3.21 B lane 1) และเมื่อใช้ VP16 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมชนิดให้ผลบวก พบว่า VP16 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ human topoisomerase II α โดยพลาสมิดดีเอ็นเอ pET28a ไม่สามารถเปลี่ยนรูปร่างจาก catenated เป็น decatenated ได้ (ภาพที่ 3.21 A และ 3.21 B lane 4) และเมื่อทดสอบการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α โดยใช้แมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินทั้ง 14 ชนิด ได้แก่ Na, K, Ca, O-Hexyl, Acetyl, O-Allyl, Benzyl, Cinnamoyl, Octanoyl, OMe, *p*-OMe-cinnamoyl, *p*-Cl-cinnamoyl และ *o*-Cl-cinnamoyl, lauroyl ในหลอดทดลอง (*in vitro* assay) ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีรูปร่าง catenated (ดังลูกศรชี้) ดังแสดงในภาพที่ 3.21 A lane ที่ 5-11 และ 3.21 B lane ที่ 5-13 โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีรูปร่าง catenated (ดังลูกศรชี้) นอกจากนี้ยังพบว่า lauroyl นั้นมีคุณสมบัติในการทำลาย plasmid DNA pET-28a ที่ใช้ในการทดสอบ โดยจะพบแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดระหว่าง 900-200 bp ซึ่งเกิดจากการแตกหักของ plasmid DNA (ดังแสดงในภาพที่ 3.21 C lane ที่ 8 และ 3.21 D lane ที่ 6-7)

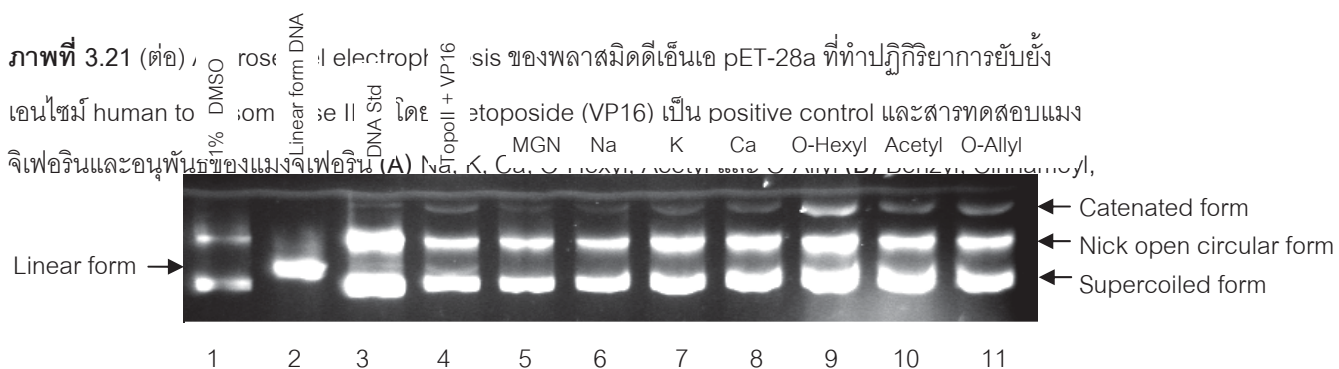




ภาพที่ 3.21 Agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ที่ทำปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ human topoisomerase II α โดยใช้ etoposide (VP16) เป็น positive control และสารทดสอบแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน (A) Na, K, Ca, O-Hexyl, Acetyl และ O-Allyl (B) Benzyl, Cinnamoyl, Octanoyl, Methoxy, *p*-Methoxycinnamoyl, *p*-Chlorocinnamoyl และ *o*-Chlorocinnamoyl (C) และ (D) lauroyl



ภาพที่ 3.21 (ต่อ) Agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ที่ทำปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ human topoisomerase II α โดยใช้ etoposide (VP16) เป็น positive control และสารทดสอบแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน (A) Na, K, Ca, O-Hexyl, Acetyl และ O-Allyl (B) Benzyl, Cinnamoyl, Octanoyl, Methoxy, *p*-Methoxycinnamoyl, *p*-Chlorocinnamoyl และ *o*-Chlorocinnamoyl (C) และ (D) lauroyl



Octanoyl, Methoxy, *p*-Methoxycinnamoyl, *p*-Chlorocinnamoyl และ *o*-Chlorocinnamoyl (C) และ (D) lauroyl

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินทั้ง 14 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α ในหลอดทดลอง (ยกเว้น lauroyl ที่มีคุณสมบัติในการทำลาย DNA ทำให้ DNA แตกหัก ดังภาพ 3.21 C และ D) ซึ่งกลไกการยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α มีโอกาสเป็นไปได้สองแบบคือ แบบที่โมเลกุลสารแทรกเข้าไประหว่างสายของดีเอ็นเอ (แบบ intercalating agent) และแบบที่สารจับกับเอนไซม์ topoisomerase II α โดยตรง (แบบ non-intercalating agent) เพื่อตรวจสอบกลไกการยับยั้ง จึงได้ทำการทดสอบกลไกดังกล่าวโดยใช้ DNA-unwinding assay

การทดสอบแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี DNA-unwinding Assay

กลไกการยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α สามารถจำแนกได้ 2 แบบ คือ แบบที่ 1 เป็นการยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α โดยสารทดสอบจะเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างสายดีเอ็นเอ เรียกว่า intercalator ซึ่งทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอบิดเบี้ยว และส่งผลยับยั้งการเชื่อมต่อกัน (re-ligation) ของสายดีเอ็นเอ แบบที่ 2 เป็นการยับยั้งโดยที่สารทดสอบจะเข้าไปจับกับ topoisomerase II α โดยตรง เรียกว่า non-intercalator ซึ่งในการทดลองนี้จะทำการทดสอบกลไกการยับยั้งของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ด้วยวิธี DNA-unwinding assay ซึ่งเป็นการทดสอบการยับยั้งการทำงานของ T4 DNA ligase ในการเชื่อมต่อพันธะ phosphodiester ของปลาย 5'-phosphate และ 3'-hydroxyl ของดีเอ็นเอสายตรง (linear form) ดังนั้นเมื่อสารทดสอบแสดงคุณสมบัติเป็น intercalating agent จะเกิดการแทรกตัวระหว่างสายของดีเอ็นเอ และทำให้โครงสร้างดีเอ็นเอที่บิดเบี้ยว จึงยับยั้งการเชื่อมต่อกันของสายดีเอ็นเอได้

วิธีการทดลอง DNA-unwinding assay

1. การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอสายตรงของ pET-28a

ในการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอสายคู่ตรง (linearized DNA) ของ pET-28a ทำได้โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-

28a มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อให้ได้ปลายเหนียว (sticky end) และสายของดีเอ็นเอเป็นสายตรง แล้วจึงวิเคราะห์การตัดดีเอ็นเอด้วย 1% (w/v) agarose gel electrophoresis โดยย้อมดีเอ็นเอในเจลด้วย ethidium bromide ใน TAE buffer

2. แล้วทำพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ให้บริสุทธิ์สายตรงที่ถูกตัดด้วย *EcoRI* เรียบร้อยแล้วด้วย phenol และตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย 100% เอทานอล จะได้สายดีเอ็นเอสายคู่ตรงที่ถูกตัดด้วย *EcoRI* พร้อมสำหรับการ

ทดลองด้วยวิธี DNA-unwinding assay

3. ปฏิบัติการของวิธี DNA-unwinding นั้นประกอบด้วยสารเคมีดังตารางที่ 3.13 ซึ่งมีปริมาตรรวม 20 μ l

ตารางที่ 3.14 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิบัติการ DNA-unwinding assay ปริมาตรรวม 20 μ l

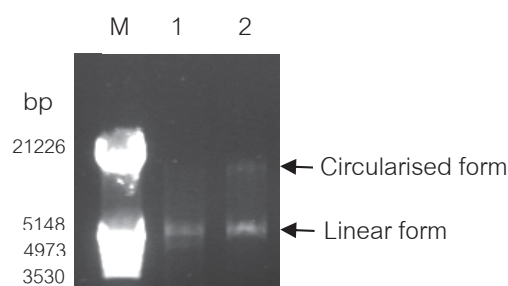
สารเคมี	ปริมาตร (μl)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a/ <i>EcoRI</i> (1 -2 μg)	3
Sterile deionised water	12.5
10X T4 DNA ligase buffer	2
สารที่ใช้ในการทดสอบ (1 mM)	2
T4 DNA ligase	0.5
ปริมาตรรวม	20

- ปิเปตสารเคมีและเอนไซม์ทั้งหมดตามตารางที่ 3.14 แล้วเขย่าสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันโดยการเคาะหลอด microcentrifuge เบาๆ จากนั้นนำสารละลายไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 16°C นาน 30 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายเป็น 65°C นาน 15 นาที เพื่อทำลาย activity ของ T4 DNA ligase
4. ปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดเป็น 100 μl ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วจึงทำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาให้บริสุทธิ์ด้วยการเติม Chloroform:Isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ลงไปปริมาตร 1 เท่าตัวของสารละลายนำไป vortex นาน 10 วินาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
 5. จากนั้นทำการปิเปตสารละลายส่วนใสด้านบนลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ จากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทานอล ปริมาตร 250 μl
 6. นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% (v/v) เอทานอล และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย Sterile deionized water
 7. ทำการวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วย 1.0% (w/v) agarose gel electrophoresis และบันทึกผล
- การทดลองด้วยการถ่ายภาพภายใต้ UV transilluminator

ผลการทดลอง

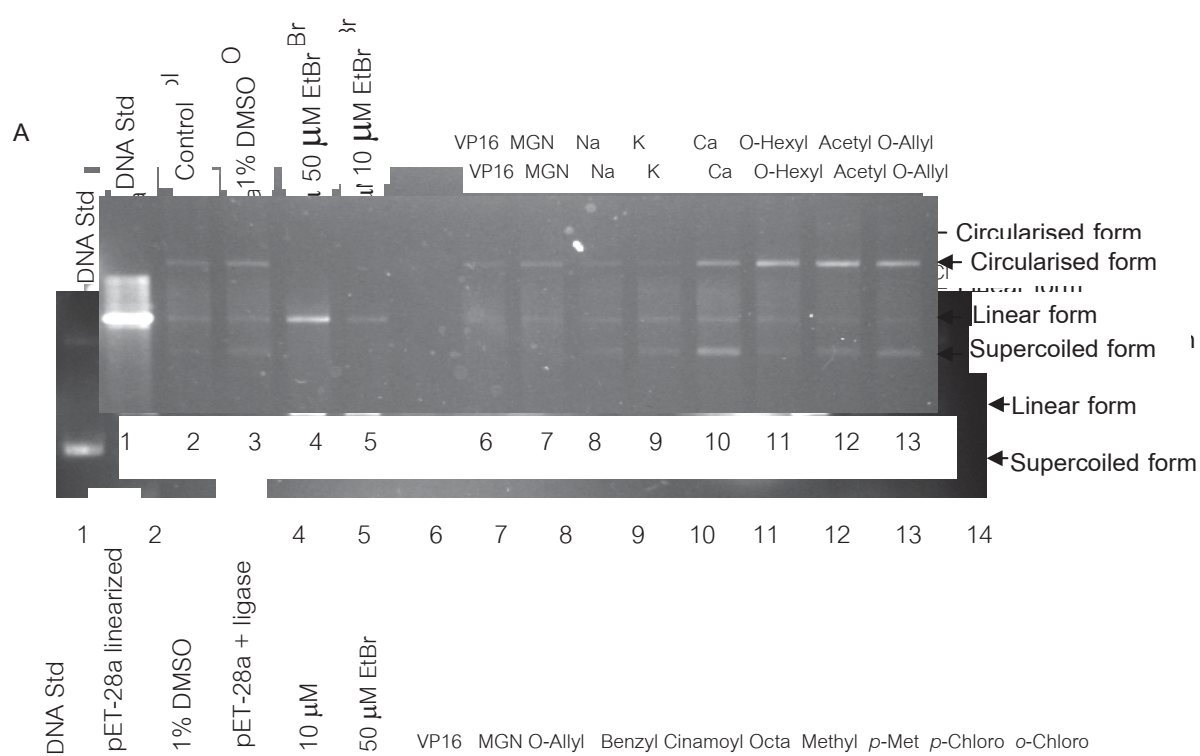
การทดสอบสาร แมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ใหม่ด้วยวิธี DNA-unwinding assay

ภายหลังจากการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a สายตรงโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และวิเคราะห์ พลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ด้วย agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 3.21) พบว่าการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ด้วย *EcoRI* จะได้แถบของพลาสมิดดีเอ็นเอสายตรงเกลียวคู่เพียงแถบเดียว (ภาพที่ 3.22 lane ที่ 2) ที่มีขนาดประมาณ 5 Kb

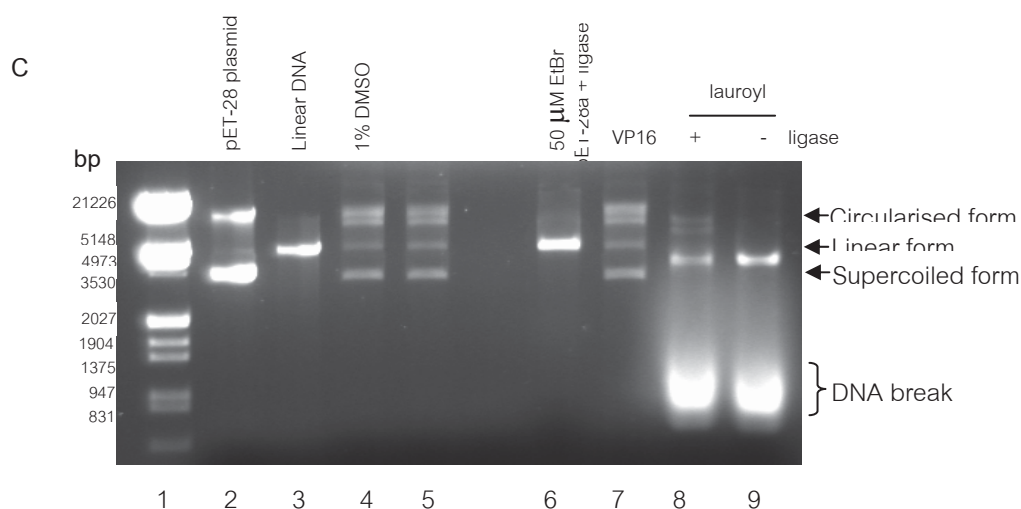


ภาพที่ 3.22 Agarose gel electrophoresis ของการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a สายตรงด้วย *EcoRI* เมื่อใช้ λ DNA ที่ตัดด้วย *HindIII* และ *EcoRI* (lane M), lane 1: pET-28a ตัดด้วย *EcoRI* และ Lane 2: พลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a

ในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของ T4 DNA ligase ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ใหม่ด้วยวิธี DNA-unwinding assay ภาพที่ 3.23 A และ B แสดงให้เห็นว่า DMSO และ VP16 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมผลลบ (negative control) ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของ T4 DNA ligase (ภาพที่ 3.23 A lane ที่ 3 และ 6 และภาพที่ 3.23 B lane ที่ 3 และ 7) จึงสังเกตพบดีเอ็นเอที่มีรูปร่าง circularised (circularised form) บางส่วน (ดังลูกศรชี้) และเมื่อเติม ethidium bromide (EtBr) ซึ่งเป็น intercalating agent ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) พบว่า EtBr สามารถยับยั้งการทำงานของ T4 DNA ligase โดย EtBr จะเข้าไปแทรกตัวระหว่างสายเกลียวคู่ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ทำให้พบดีเอ็นเอที่มีรูปร่าง linear ดังภาพที่ 3.23 A lane ที่ 4 และ 5 และ 3.23 B lane 5 และ 6 จากการทดสอบแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน ได้แก่ Na, K, Ca, O-hexyl, acetyl, O-allyl, O-benzyl, cinnamoyl, octanoyl, methoxy, *p*-OMe-cinnamoyl, *p*-Cl-cinnamoyl และ *o*-Cl-cinnamoyl โดยใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 mM พบว่ามีอนุพันธ์ของ Na, K, Ca, O-hexyl, acetyl, O-allyl, O-Benzyl, cinnamoyl, octanoyl, methoxy, *p*-Cl-cinnamoyl และ *o*-Cl-cinnamoyl ไม่มีฤทธิ์การยับยั้งการเชื่อมต่อของพลาสมิดดีเอ็นเอสายตรงของ T4 DNA ligase เนื่องจากเอนไซม์ T4 DNA ligase ยังคงทำงานได้ โดยสังเกตพบแถบของดีเอ็นเอรูปร่าง circularised ดังแสดงในภาพที่ 3.23 A lane ที่ 7-13 และภาพที่ 3.23 B lane ที่ 8-13 และ 15-16 ยกเว้นอนุพันธ์ *p*-OMe-cinnamoyl (ภาพที่ 3.23 B lane ที่ 14) เพียงชนิดเดียวที่แสดงความสามารถในการยับยั้ง T4 DNA ligase ในการเชื่อมต่อพลาสมิดดีเอ็นเอสายตรง ซึ่งจะสังเกตได้จากแถบของดีเอ็นเอรูปร่างเส้นตรง (Linear form) ที่มีลักษณะเหมือนกับแถบดีเอ็นเอในการยับยั้งการทำงานของ ethidium bromide ตารางที่ 3.15 แสดงผลการยับยั้งการทำงานของ T4 DNA ligase ของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน ทั้งนี้การทดสอบการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α และ DNA-unwinding assay เป็นการทดสอบเบื้องต้นในสภาวะในหลอดทดลอง เพื่อยืนยันฤทธิ์ของแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์จึงควรพิจารณาผลการยับยั้ง HSV ในเซลล์เพาะเลี้ยงต่อไปควบคู่ไปด้วย



B



ภาพที่ 3.23 agarose gel electrophoresis ในการทดสอบ DNA-unwinding assay ของแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินด้วย T4 DNA ligase ได้แก่ (A) Na, K, Ca, O-Hexyl, Acetyl และ O-Allyl (B) Benzyl, Cinnamoyl, Octanoyl, Methoxy, *p*-OMe-cinnamoyl, *p*-Cl-cinnamoyl และ *o*-Cl-cinnamoyl (C) Lauroyl ที่ความเข้มข้น 1 mM และบ่มที่อุณหภูมิ 16°C นาน 30 นาที

ตารางที่ 3.15 การศึกษาการยับยั้งการทำงานของ T4 DNA ligase ของสารแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ขึ้นที่ความเข้มข้น 1 mM ด้วยวิธี DNA-unwinding assay

สารทดสอบ	DNA-unwinding assay ด้วย T4 DNA ligase	
	non-intercalator	Intercalator
Ethidium bromide (+)	-	+
DMSO (- control)	+	-
VP16 (- control)	+	-
แมงจีเฟอริน	+	-
แมงจีเฟอริน- Na^+	+	-

ลงนาม.....

(ผศ. ดร. ศิริรัตน์ จันทจำรูญ)

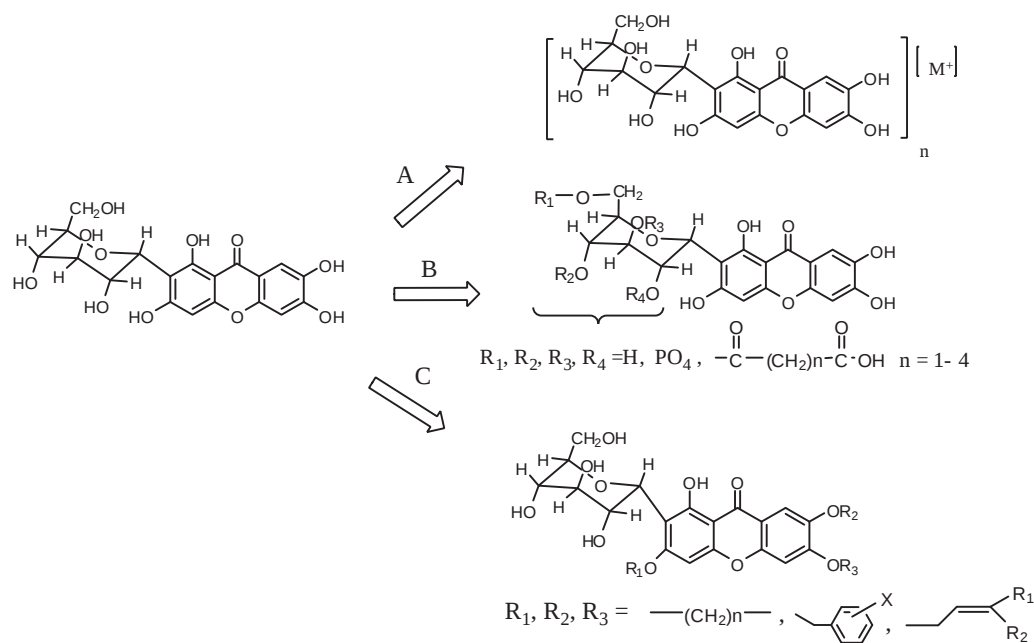
วันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2555

บทที่ 3

การทดลองและผลการทดลอง

แมงจิเฟอร์มีฤทธิ์ในการยับยั้ง herpes viruses แต่เนื่องจากแมงจิเฟอร์มีสมบัติการละลายได้น้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์และ oil ทำให้เกิดความยุ่งยากในการเตรียมส่วนผสมเพื่อใช้ในด้านเครื่องสำอางและอาหาร และอาจลดความสามารถในการใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การดัดแปลงโครงสร้างของแมงจิเฟอร์เช่น การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลบนวง xanthone หรือ วงน้ำตาลให้มีหมู่แอลคิลที่ยาวขึ้น อาจช่วยให้มีคุณสมบัติที่สามารถละลายในตัวทำละลายต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลงไป และอาจนำไปสู่โครงสร้างใหม่ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง herpes viruses ที่ดีขึ้น นอกจากนี้การศึกษากลไกของโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปต่อเอนไซม์ topoisomerase ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีผู้ให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการพัฒนายาต้าน herpes simplex จะช่วยให้ได้ข้อมูลแนวโน้มของโครงสร้างที่มีผลต่อคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และแนวโน้มของการยับยั้งของสารที่เป็น intercalators ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษากลไกของการดัดแปลงส่วนโครงสร้างแมงจิเฟอร์ต่อการยับยั้ง herpes viruses ให้ได้สารที่มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งที่ดีขึ้น

โครงสร้างของแมงจิเฟอร์มีส่วนของหมู่ฟังก์ชันที่สามารถดัดแปลงได้โดยอาศัยปฏิกิริยาอย่างง่าย 3 แบบ คือ แบบ (A) การเปลี่ยนให้เป็นเกลือของโลหะประเภทต่างๆ แบบ (B) การเปลี่ยนหมู่แอลกอฮอล์บนวงน้ำตาล ให้เป็นหมู่ที่ละลายน้ำได้เช่น ฟอสเฟต, คาร์บอกซิเลต แบบ (C) การเปลี่ยนหมู่ OH บนวง xanthone ให้มีหมู่แอลคิล, ไวนิลดีน หรืออนุพันธ์เบนซิล (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 แนวทางการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง แมงจิเฟอร์

3.1 การสกัดและการแยกสารแมนจิเฟอรินจากเปลือกและใบมะม่วงให้ได้สารบริสุทธิ์

เนื่องจากการดัดแปลงโครงสร้างของแมนจิเฟอรินต้องใช้สารตั้งต้นในปริมาณมาก และสารดังกล่าวมีราคาสูง จึงทำการสกัดสารตั้งต้นจากใบมะม่วงและทำการแยกบริสุทธิ์ เพื่อให้ได้สารปริมาณมากและได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์รวมถึงความบริสุทธิ์ของสารที่ได้เพื่อนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสกัดสารแมนจิเฟอรินจากใบมะม่วงเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้น
2. สามารถแยกบริสุทธิ์สารแมนจิเฟอรินจากสารสกัดใบมะม่วงได้

เครื่องมือและสารเคมี

1. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Fisher Scientific, United State America
2. เครื่องชั่ง (Balance) 2 ตำแหน่ง, Sartorius, Germany
3. เครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Rotary Evaporator), Buchi B-171, Switzerland
4. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance), Bruker 400 MHz, Germany
5. 95% เอทานอล (C_2H_5OH), Commercial Grade
6. Acetic acid (CH_3COOH), Glacial Grade, Lab Scan, Thailand
7. สารมาตรฐาน Mangiferin from *Mangifera indica* bark 98% (Sigma-Aldrich)

วิธีการทดลอง

ในการสกัดและแยกบริสุทธิ์สารแมนจิเฟอรินจากใบมะม่วง มีขั้นตอนในการดำเนินการทั้งหมด 3 ขั้นตอน คือ การเตรียมตัวอย่างใบมะม่วง การสกัดสารแมนจิเฟอรินจากใบมะม่วง และการแยกบริสุทธิ์สารแมนจิเฟอริน ด้วยวิธีการตกผลึก (crystallization) ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างใบมะม่วง

นำใบมะม่วงมาล้างให้สะอาด และเช็ดให้แห้งเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน จากนั้นนำไปตากแดดให้แห้งสนิท สุดท้ายนำใบมะม่วงแห้งนั้นมาบดให้ละเอียด เพื่อทำการสกัดต่อไป

2. การสกัดสารแมนจิเฟอรินจากใบมะม่วง

นำใบมะม่วงที่บดละเอียด 300 กรัม ใส่ในถังสกัด เติมสารละลาย 95% เอทานอล ทิ้งไว้ 2 วัน (โดยกวนบ่อยๆ) รินของเหลวออกจากถังสกัด กรองเอากากทิ้งไปด้วยผ้าขาวบาง ทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นกรองสารสกัดที่ได้ด้วยชุดกรองสุญญากาศ และล้างตะกอนบนกระดาษกรองด้วยสารละลาย 95% เอทานอล จะได้ สารสกัดเป็นตะกอนสีน้ำตาล

3. การแยกบริสุทธิ์สารแมนจิเฟอริน จากใบมะม่วงด้วยวิธีการตกผลึก (crystallization)

นำสารสกัดที่ได้ ใส่ลงในปีกเกอร์ เติมสารละลาย 50% เอทานอลในน้ำ ให้ความร้อนจนกระทั่งมีอุณหภูมิ $70^{\circ}C$ ต้มต่อไปอีกเป็นเวลา 30 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ พร้อมกับคนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก จากนั้นนำของเหลวที่ได้ไปกรองขณะร้อน แล้วเก็บของเหลวที่กรองได้ไว้ในขวดรูปชมพู่ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน เพื่อให้แมนจิเฟอริน ตกผลึกออกมา ทำการกรองผลึกแมนจิเฟอริน และล้างผลึกด้วยสารละลาย 50% เอทานอล (เย็น) บนกระดาษกรองจนได้ผลึกสีเหลืองอ่อน ทิ้งไว้ให้ผลึกแห้ง และทำการตกผลึกซ้ำอีกครั้ง

ด้วยสารละลาย 50% กรดอะซิติกในน้ำ ด้วยวิธีการเดียวกับการตกผลึกด้วยสารละลาย 50% เอทานอล และซังน้ำหนักของสารแมงจีเฟอรินที่ตกผลึกได้ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร แมงจีเฟอริน ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR)

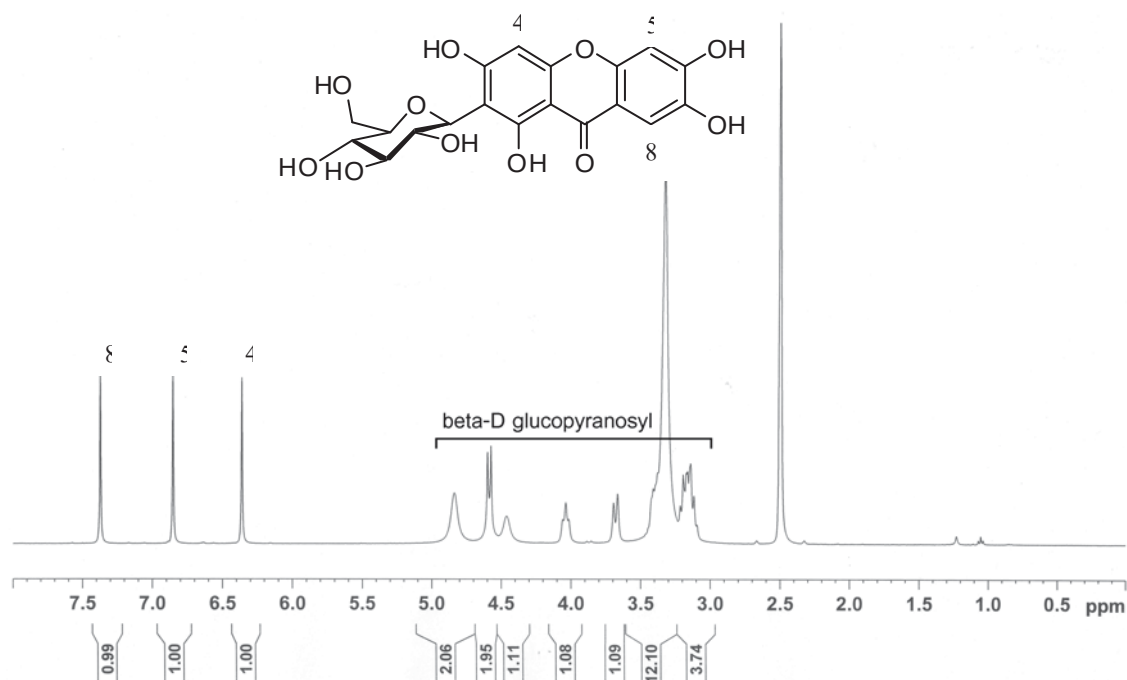
ผลการทดลอง

เมื่อทำการสกัดใบมะม่วง ด้วยสารละลาย 95 % เอทานอล จะได้ของเหลวที่มีลักษณะเป็นสีเขียวเข้ม ทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ จะได้ตะกอนเกิดขึ้น และเมื่อนำไปกรองแยกตะกอนและ ล้างคลอโรฟิลล์ออกจากตะกอนด้วยสารละลาย 95% เอทานอล จะได้ตะกอนสีน้ำตาล และเมื่อนำตะกอนสีน้ำตาลที่ได้ มาทำการตกผลึกด้วยสารละลาย 50 % เอทานอลในน้ำ จะได้ตะกอนสีเหลืองออกมา และเมื่อทำการตกผลึกซ้ำอีกครั้งด้วย 50% กรดอะซิติกในน้ำ จะได้ตะกอนสีเหลืองอ่อน จำนวน 20.67 กรัม คิดเป็นร้อยละ 7 จากใบมะม่วงแห้ง จำนวน 300 กรัม

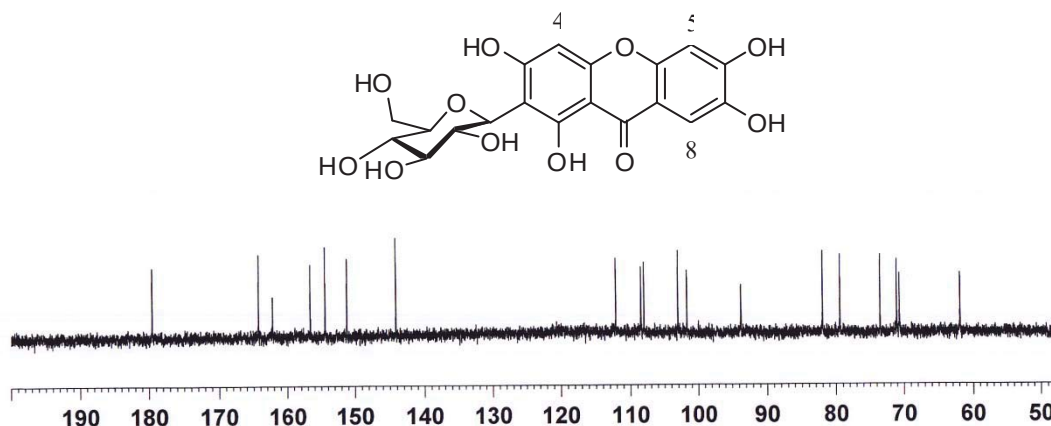
จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารแมงจีเฟอริน ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสารแมงจีเฟอรินที่เกิดขึ้น จากผลวิเคราะห์ ^1H NMR Spectrum (ภาพ 3.2) และ ^{13}C NMR Spectrum (ภาพ 3.3) สามารถระบุโครงสร้างของสารดังกล่าวดังนี้

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ตรวจพบสัญญาณที่ δ 7.37 (s, 1H, H_8), 6.85 (s, 1H, H_5), 6.36 (s, 1H, H_4) ซึ่งเป็นช่วงของอะโรเมติก และช่วง 4.84 – 3.10 ppm ซึ่งเป็นช่วงของกลุ่มน้ำตาล

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ตรวจพบสัญญาณที่ δ 179.56 (CO), 164.3 (C_3), 162.26 (C_1), 156.68 (C_{4a}), 154.48 (C_6), 151.24 (C_{4b}), 144.19 (C_7), 112.19 (C_{8a}), 108.54 (C_8), 108.09 (C_2), 103.09 (C_5), 101.77 (C_{8b}), 93.78 (C_4), 82.05, (C_5), 79.46 (C_3), 73.55 (C_1), 71.11 (C_4), 70.70 (C_2), 61.96 (C_6)



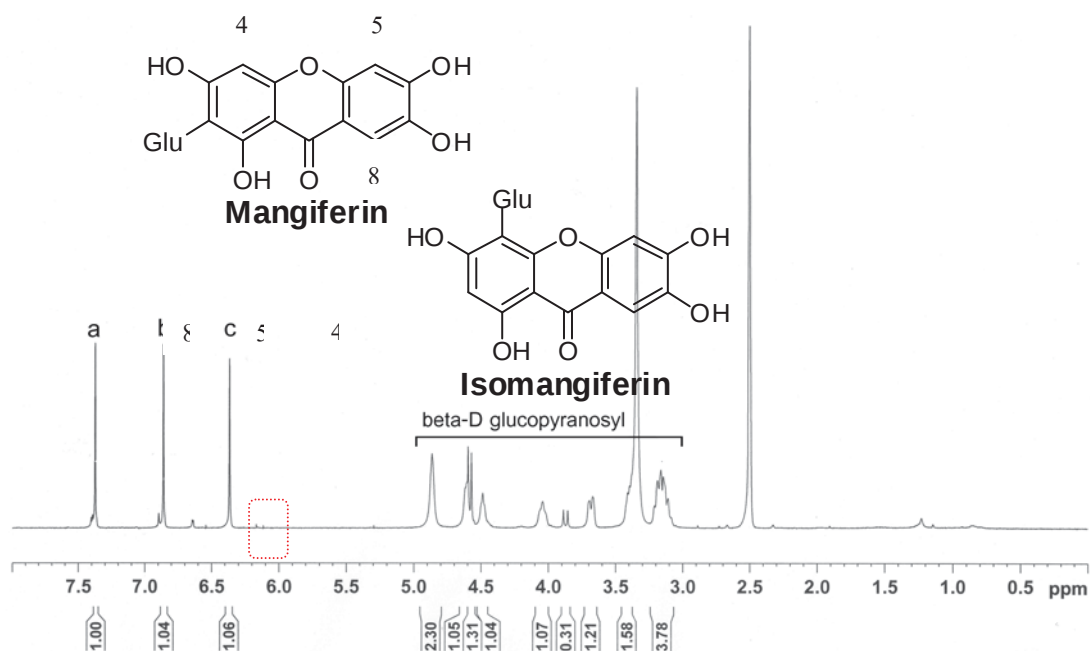
ภาพที่ 3.2 ^1H NMR spectrum ของสารแมงจีเฟอรินที่สกัดได้จากใบมะม่วง



ภาพที่ 3.3 ^{13}C NMR spectrum ของสารแมงจิเฟอรินที่สกัดได้จากใบมะม่วง

สรุปผลการทดลอง

เมื่อทำการสกัดใบมะม่วง ด้วยสารละลาย 95 % เอทานอล และทำการตกผลึกด้วยสารละลาย 50% เอทานอลในน้ำ จะได้ตะกอนสีเหลืองออกมา และเมื่อทำการตกผลึกซ้ำอีกครั้งด้วย 50% กรดอะซิติกในน้ำ ซึ่งจะได้ตะกอนสีเหลืองนวล ๆ ออกมา จำนวน 21.22 กรัม คิดเป็นร้อยละ 7 และเมื่อนำสารแมงจิเฟอรินที่สามารถสกัดออกมาได้นั้น มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารสกัดที่สกัดได้นั้นเป็นสารแมงจิเฟอรินบริสุทธิ์ เนื่องจากมีค่า Retention time เท่ากับสารแมงจิเฟอรินมาตรฐาน คือ 6.8 นาที และเมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^1H NMR spectroscopy เปรียบเทียบกับสารแมงจิเฟอรินมาตรฐาน (ภาพ 3.4) พบว่าสารแมงจิเฟอรินที่สกัดได้นั้นมีความบริสุทธิ์มากกว่าสารแมงจิเฟอรินมาตรฐาน ซึ่งสามารถสังเกตได้จากในช่วงสัญญาณ 7.37 - 6.36 ppm ที่เป็นช่วงของกลุ่มอะโรมาติกที่ไม่พบสัญญาณโปรตอนจากสาร ไอโซแมงจิเฟอริน (isomangiferin) ในช่วงดังกล่าวใน ^1H NMR ของสารที่สกัดได้ ในขณะที่พบสัญญาณโปรตอนของไอโซแมงจิเฟอรินปนอยู่บางส่วนในสารมาตรฐาน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารแมงจิเฟอริน ที่แยกบริสุทธิ์ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่าสารแมงจิเฟอรินที่ซื้อจากบริษัทผู้ผลิต



ภาพ 3.4 ^1H NMR spectrum ของสาร แมงจีเฟอรินมาตรฐานที่ซื้อจากบริษัทผู้ผลิต

3.2 ดัดแปลงโครงสร้างของ แมงจีเฟอริน ให้ได้สารอนุพันธ์ของ แมงจีเฟอรินที่อยู่ในรูปเกล็ด อนุพันธ์น้ำตาลและอนุพันธ์ฟีนอล

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่อยู่ในรูปเกล็ด, อนุพันธ์น้ำตาลและอนุพันธ์ฟีนอล
2. เพื่อศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโคปีของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้

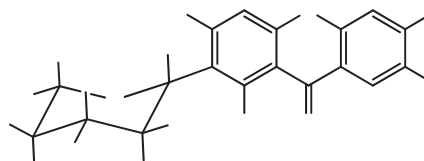
เครื่องมือและสารเคมี

1. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Fisher Scientific, United State America
2. เครื่องชั่ง (Balance) 4 ตำแหน่ง, Sartorius, Germany
3. เครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Rotary Evaporator), Buchi B-171, Switzerland
4. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance), Bruker 400 MHz, Germany
5. UV-spectrometer, Perkin-Elmer
6. Ethy acetate, Commercial Grade
7. Dicloromethane, CH_2Cl_2 , commercial grade
8. Dmethyl formamide, $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$, Labscan
9. 2-methyl-2-butanol, commercial grade
10. NaHCO_3 , 98%, Fluka
11. K_2CO_3 , 98%, Fluka

12. DMSO-d₆, 98% Wilmard
13. DMSO, 98%, Fluka
14. 95% เอทานอล (C₂H₅OH), Commercial Grade
15. CHCl₃, Commercial Grade
16. แมงจีเฟอริน, จากที่สกัดแยกได้
17. CaCl₂·2H₂O, Commercial Grade
18. Acetone, commercial grade
19. Vinyl acetate, 98%, Sigma Aldrich
20. Lipase , Novozyme 435, Sigma Aldrich
21. Vinyl palmitate, เตรียมขึ้นเองตามวิธีในเอกสารอ้างอิง¹³
22. Dimethyl sulphate, 98%, Fluka
23. Methyl iodide, 98%, Sigma Aldrich
24. Cinnamoyl chloride, 98% Sigma Aldrich
25. Benzyl chloride, 98%, Sigma Aldrich
26. Acetic anhydride, commercial grade
27. Silica gel g 60, Merck, Germany
28. Lipase B acrylic resin from *Candida Antarctica*: Novozyme 435, Sigma Aldrich
29. Lipase B *Candida antarctica* immobilized on Immobead 150, recombinant from *Aspergillus oryzae*
30. Vinyl laurate, เตรียมขึ้นเองตามวิธีในเอกสารอ้างอิง
31. Methyl iodide, 98%, Sigma Aldrich
32. Allyl bromide, 98%, Sigma Aldrich
33. 1-bromohexane, 98%, Sigma Aldrich
34. Octanoyl chloride, 98% Sigma Aldrich
35. Cinnamoyl chloride, 98% Sigma Aldrich
36. Benzyl chloride, 98%, Sigma Aldrich
37. Acetic anhydride, commercial grade
38. p-methoxy-Cinnamoyl chloride เตรียมขึ้นเองตามวิธีในเอกสารอ้างอิง¹⁴
39. p-Chloro-Cinnamoyl chloride เตรียมขึ้นเองตามวิธีในเอกสารอ้างอิง¹⁴
40. o-Chloro- Cinnamoyl chloride เตรียมขึ้นเองตามวิธีในเอกสารอ้างอิง¹⁴

*ตัวทำละลาย commercial grade ทุกชนิด ทำการ dry และ กลั่นก่อนใช้งาน

3.2.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือของ แมนจีเฟอริน



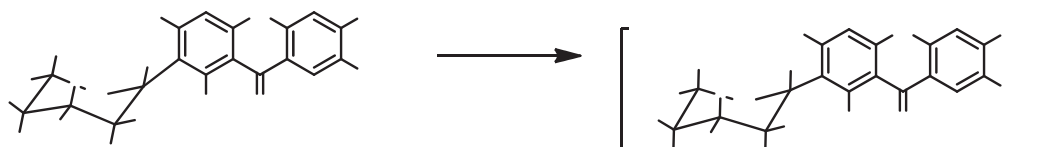
1

เนื่องจากแมนจีเฟอรินมีสมบัติการละลายน้ำได้น้อย การดัดแปลงโครงสร้างของสารโดยการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปเกลือของโลหะจะช่วยให้ได้อนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติที่สามารถละลายในน้ำได้ดีขึ้นและอาจเป็นประโยชน์ต่อการเตรียมส่วนผสม เพื่อใช้ในด้านเครื่องสำอางและเภสัชและอาจส่งผลต่อฤทธิ์การต้านไวรัสได้ดีขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของแมนจีเฟอรินที่อยู่ในรูปเกลือ
2. เพื่อศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโคปี UV และ NMR ของเกลือที่สังเคราะห์ได้ และเพื่อเปรียบเทียบสมบัติของ UV และ NMR ของเกลือที่สังเคราะห์ได้

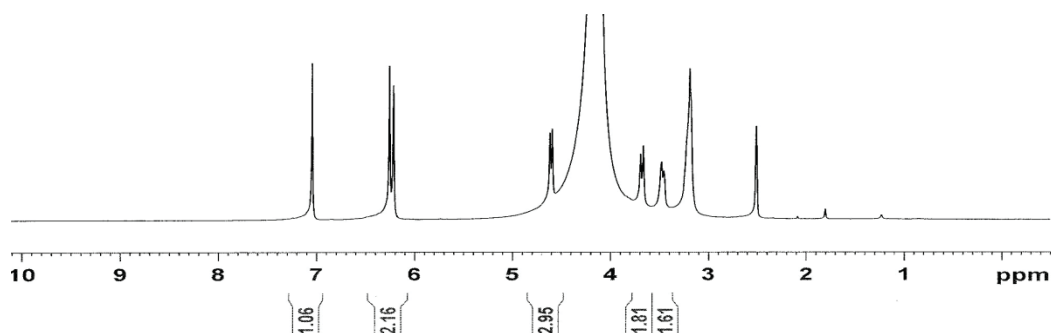
3.2.1.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือโซเดียมของ แมนจีเฟอริน



ชั่งแมนจีเฟอริน 0.132 กรัม (0.3 mmol) ละลายในของผสมของน้ำและเอทานอล อัตราส่วน 1:9 ปริมาตร 2.5 มล ค่อยๆ เติม สารละลาย NaHCO_3 0.026 กรัม (0.3 mmol) ละลายในน้ำ 2 มล อย่างช้าๆ ประมาณ 30 นาที ได้สารละลายใส และเติมสารละลายผสม เอทานอล: Ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1.5 (v/v) จนเกิดตะกอน กรองของแข็ง นำไปอบที่ 60°C ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.130 กรัม

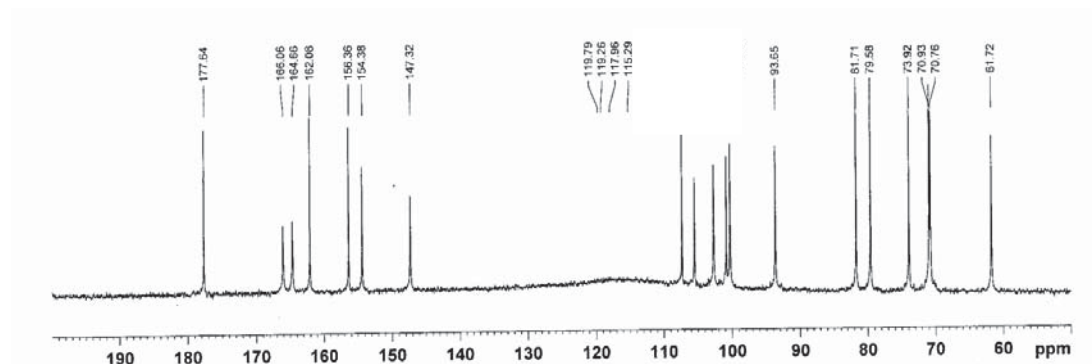
ผลการทดลอง

เมื่อนำแมนจีเฟอริน 0.132 กรัม มาละลายในของผสมของน้ำและเอทานอล แล้วค่อยๆ เติมสารละลาย NaHCO_3 อย่างช้าๆ จะได้สารละลายใสสีเหลืองและเมื่อนำไปเติมสารละลายผสม เอทานอล: Ethyl acetate จะได้ตะกอนสีเหลืองเกิดขึ้น เมื่อนำไปกรองและอบที่ 60°C ได้สารผลิตภัณฑ์ของแข็งสีเหลืองอ่อนหนัก 0.130 กรัม (93% yield) จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเกลือโซเดียมแมนจีเฟอริน ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ให้ข้อมูลดังนี้ ^1H NMR (ดังแสดงในภาพที่ 3.1) ^{13}C NMR (ดังแสดงในภาพที่ 3.1) ซึ่งแสดงลักษณะที่แตกต่างจากแมนจีเฟอริน และ HMQC และ HMBC แสดงการเกิด phenoxide ของ-OH ที่ตำแหน่ง C-6



ภาพที่ 3.5 ^1H NMR spectrum ของ 3,4,5-ไตรเมทอกซีฟีนอล

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ตรวจพบสัญญาณของวงอะโรมาติกที่ δ 7.04 (s, 1H, H_8), 6.26 (s, 1H, H_5) และ 6.21 (s, 1H, H_4) และช่วง 4.61-3.2 ซึ่งเป็นช่วงของกลุ่มน้ำตาล โดยแสดงสัญญาณตำแหน่งไกลที่สุดของวงกลูโคส ที่ 4.61 (1H, d, $J = 9.8$ Hz) ซึ่งแสดงลักษณะ beta-glycoside



ภาพที่ 3.6 ^{13}C NMR spectrum ของ 3,4,5-ไตรเมทอกซีฟีนอล

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ตรวจพบสัญญาณที่ δ 177.64 (CO), 166.06 (C_6), 164.66 (C_3), 162.08 (C_1), 156.36 (C_{4a}), 154.38 (C_{4b}), 147.32 (C_7), 107.32 (C_2), 105.48 (C_{8a}), 102.69 (C_8), 100.85 (C_5), 100.30 (C_{8b}), 93.65 (C_4), 81.71 (C_5), 79.58 (C_3), 73.92 (C_1), 70.93 (C_4), 70.76 (C_2), 61.72 (C_6)

สรุปผลการทดลอง

สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือโซเดียมของแมงจีเฟอรินได้ 0.130 กรัม เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 93% โดยเกลือโซเดียมแสดงค่าเคมีคัลลิตีที่แตกต่างกับแมงจีเฟอรินทั้ง ^1H NMR และ ^{13}C NMR โดยเฉพาะค่าเคมีคัลลิตี ^{13}C NMR ของคาร์บอนในวง B ซึ่งมีค่าที่เปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 6, 4b, 7, 8a และ 8 โดยเฉพาะที่ C_6 ซึ่งมีค่าเปลี่ยนแปลงมากที่สุด ดังแสดงค่าเปรียบเทียบในตารางที่ 3.1 และตารางแสดงความเชื่อมโยงของโปรตอน-คาร์บอน 2D NMR HMQC และ HMBC ดังในตารางที่ 3.2 ทำให้สามารถยืนยันการเกิด phenoxide ของ -OH ที่ตำแหน่ง C-6 และ HMBC ดังนี้

ตารางที่ 3.1 แสดงการเปรียบเทียบค่าเคมีคัลชิฟท์ของ ^{13}C NMR ของแมงจีเฟอรอนกับไซเดียมแมงจีเฟอรอน

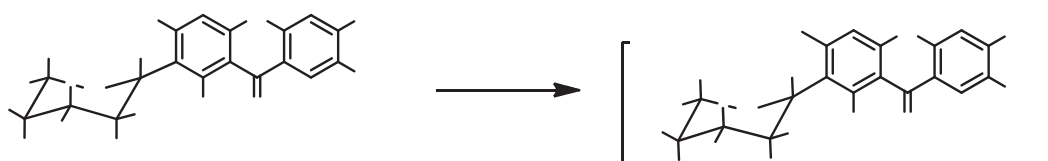
C	แมงจีเฟอริน	Na แมงจีเฟอริน	$\Delta\delta$
CO	179.56	177.64	-1.92
3	164.30	164.66	0.36
1	162.26	162.08	-0.18
4a	156.68	156.36	-0.32
6	154.48	166.06	11.58
4b	151.24	154.38	3.14
7	144.19	147.32	3.13
8a	112.19	105.48	-6.71
8	108.54	102.69	-5.85
2	108.09	107.32	-0.77
5	103.09	100.3	-2.79
8b	101.77	100.85	-0.92
4	93.78	93.65	-0.13

ตารางที่ 3.2 แสดงข้อมูล 2D NMR HMQC, HMBC ของเกลือไซเดียมแมงจีเฟอริน

	H	δ (ppm) HMQC	δC (ppm)	HMBC
(CO)			177.64 (CO)	
C ₁			162.08	
C ₂			107.32	
C ₃			164.66	
C ₅	5	6.26 (s, 1H)	100.85	C _{8a} , C _{8b} , C7, CO
C ₆			166.06	
C ₇			147.32	
C ₈	8	7.04 (s, 1H)	102.69	C _{8a} , C _{8b} , C7, CO
C _{4a}			156.36	
C _{4b}			154.38	
C _{8a}			105.48	
C _{8b}			100.85	
C ₄	4	6.21 (s, 1H)	93.65	C ₃ , C _{4a} , C _{4b} , CO
C _{1'}	1'	4.61 (1H, d, J = 9.8 Hz)	73.92	C _{1''} , C _{3'} , C _{2'} , C _{6'}

C _{2'}	2'	4.03 (1H, d, J = 9.8 Hz)	70.76	C _{1'} , C _{3'}
C _{3'}	3'	3.16 (3H, m)	79.58	C _{5'} , C _{4'}
C _{4'}	4'	3.16 (3H, m)	70.93	C _{5'}
C _{5'}	5'	4.16 (1H, d, J = 9.8 Hz)	81.71	C _{4'} , C _{6'}
C _{6'}	6'	3.4, 3.6 (2H, dd 11.0Hz, 2.1 Hz)	61.72	C _{5'}

3.2.1.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์เกลียวโปแตสเซียมของ แมนจิเฟอริน



ซึ่งแมนจิเฟอริน 0.422 กรัม (1 mmol) ละลายในเอทานอล 7 มล เติมน้ำ 3 มล ค่อยๆ กวน และ เติม สารละลาย K₂CO₃ (0.055 กรัม 0.4 mmol) ละลายในน้ำ 27.6 มล) อย่างช้าๆ จนได้สารละลายใส เติม สารละลายผสม เอทานอล : CHCl₃ อัตราส่วน 7:1 (v/v) จนเกิดตะกอน กรองของแข็ง นำไปอบที่ 60°C ได้สาร ผลิตภัณฑ์หนัก 0.448 กรัม

ผลการทดลอง

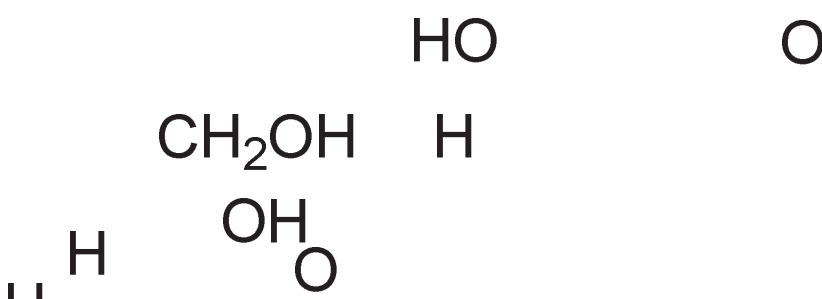
เมื่อนำแมนจิเฟอริน 0.422 กรัม ละลายในของผสมของน้ำและเอทานอล แล้วค่อยๆ เติม สารละลาย K₂CO₃ อย่างช้าๆ จะได้สารละลายใสสีเหลืองอ่อน เมื่อเติมสารละลายผสม เอทานอล: CHCl₃ จะได้ตะกอนสี เหลืองเกิดขึ้น เมื่อนำไปกรองและอบที่ 60°C ได้สารผลิตภัณฑ์ของแข็งสีเหลืองอ่อนหนัก 0.448 กรัม (97% yield) จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเกลียวโปแตสเซียม แมนจิเฟอริน ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ให้ข้อมูล ¹H NMR (ดังแสดงในภาพที่ 3.7) ¹³C NMR (ดังแสดงในภาพที่ 3.8) ซึ่งแสดงลักษณะที่แตกต่างจากแมนจิเฟอริน และ HMQC และ HMBC แสดงการเกิด phenoxide ของ-OH ที่ตำแหน่ง C-6

Γ

ภาพที่ 3.7 ¹H NMR spectrum ของโปแตสเซียมแมนจิเฟอริน

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) ตรวจพบสัญญาณของวงอะโรเมติกที่ δ 7.10 (s, 1H, H₈), 6.45 (s, 1H, H₅) และ 6.26 (s, 1H, H₄) และช่วง 4.58-3.1 ซึ่งเป็นช่วงของกลุ่มน้ำตาล โดยแสดงสัญญาณตำแหน่งไกล ที่สุดของวงกลูโคส ที่ 4.61 (d, J = 9.8 Hz, 1H) ซึ่งแสดงลักษณะ beta-glycoside

Γ ภาพที่ 3.8 ¹³C NMR spectrum ของโปแตสเซียมแมนจิเฟอริน

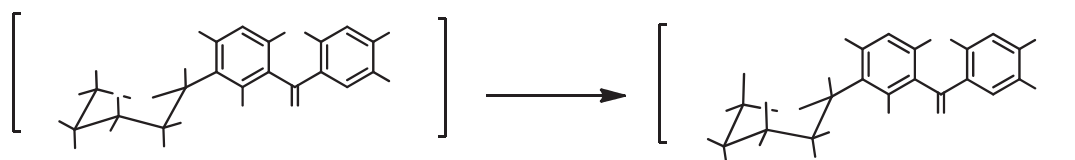


^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) ตรวจพบสัญญาณที่ δ 178.10 (CO), 163.90 (C_6), 163.90 (C_3), 161.54 (C_1), 156.49 (C_{4a}), 153.88 (C_{4b}), 146.39 (C_7), 107.05 (C_2), 106.89 (C_{8a}), 103.92 (C_8), 101.20 (C_5), 101.15 (C_{8b}), 93.75 (C_4), 81.41 (C_5), 79.03 (C_3), 73.61 (C_1), 70.60 (C_4), 70.60 (C_2), 61.58 (C_6)

สรุปผลการทดลอง

สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือโปแตสเซียมของแมงจีเฟอริน ได้ 0.448 กรัม เปรอร์เซ็นต์ผลผลิต 97% โดยเกลือโปแตสเซียมที่สังเคราะห์ได้แสดงค่าเคมีคัลลิสพท์ที่แตกต่างกับแมงจีเฟอรินทั้ง ^1H NMR และ ^{13}C NMR และมีค่าเคมีคัลลิสพท์เปลี่ยนแปลงไปในทำนองเดียวกันกับเกลือโซเดียมแมงจีเฟอริน ซึ่งมีค่าที่เปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดที่วง B ที่คาร์บอนตำแหน่ง 6, 4b, 7, 8a และ 8 โดยเฉพาะที่ C_6 ซึ่งมีค่าเปลี่ยนแปลงมากที่สุดเช่นกัน ทำให้สามารถยืนยันการเกิด phenoxide ของ $-\text{OH}$ ที่ตำแหน่ง C-6

3.2.1.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือแคลเซียมของ แมงจีเฟอริน



ชั่งเกลือโปแตสเซียมแมงจีเฟอริน 0.230 กรัม (0.5 mmol) ละลายในน้ำ 25 มล ค่อยๆ กวนของผสมและเติมสารละลาย CaCl_2 0.050 กรัม (0.05 mmol) ละลายในน้ำ 15 มล อย่างช้าๆ และทำให้ของผสมเย็นลงที่ 4°C นาน 3 ชั่วโมง ได้ของแข็งตกตะกอน กรองตะกอนที่ได้นำไปอบที่ 60°C ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.116 กรัม

ผลการทดลอง

เมื่อนำโปแตสเซียมแมงจีเฟอริน 0.230 กรัม ละลายในน้ำและค่อยๆ เติมสารละลาย CaCl_2 0.050 กรัม อย่างช้าๆ ประมาณ 30 นาที จะได้สารละลายใสสีเหลืองและเมื่อนำไป ทำให้เย็นที่ 4°C จะได้ตะกอนสีเหลืองอมเขียวเกิดขึ้น เมื่อนำไปกรองและอบที่ 60°C ได้สารผลิตภัณฑ์ของแข็งสีเขียวยกขึ้น มีน้ำหนัก 0.116 กรัม คิดเป็น เปรอร์เซ็นต์ผลผลิต 53%

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเกลือแคลเซียมแมงจีเฟอรินด้วยเทคนิค NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้นจากผลวิเคราะห์จาก ^1H NMR Spectrum ดังกล่าวดังนี้

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) ตรวจพบสัญญาณของวงอะโรเมติกที่ δ 7.18 (s, 1H, H_8), 6.51 (s, 1H, H_5) และ 6.31 (s, 1H, H_4), และช่วง 4.59-3.0 ซึ่งเป็นช่วงของกลุ่มน้ำตาล โดยแสดงสัญญาณตำแหน่งไกลที่สุดของวงกลูโคส ที่ 4.59 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H,) ซึ่งแสดงลักษณะ beta-glycoside

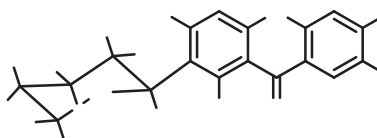
Γ

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) ตรวจพบสัญญาณที่ δ 178.57 (CO), 164.13 (C_6), 162.14 (C_3), 162.14 (C_1), 156.46 (C_{4a}), 153.21 (C_{4b}), 146.49 (C_7), 108.08 (C_2), 107.60 (C_{8a}), 105.08 (C_8), 102.5 (C_5), 101.71 (C_{8b}), 93.66 (C_4), 82.56 (C_5), 80.20 (C_3), 73.76 (C_1), 70.75 (C_4), 70.03 (C_2), 61.86 (C_6)

สรุปผลการทดลอง

สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือกเคลือบของแมงจิเฟอริน ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 53% เกลือกที่เตรียมขึ้นได้ แสดงเอกลักษณ์ทาง ^1H NMR อย่างเห็นได้ชัด และแตกต่างจากสารตั้งต้นอย่างชัดเจน โดยเฉพาะค่า chemical shift ของโปรตอนบนวงอะโรมาติก ที่แสดงแนวโน้มของ upfield ซึ่งตำแหน่งที่ได้รับอิทธิพลสูงสุดคือ H_5 ซึ่งยืนยันตำแหน่งของประจุลบที่อยู่ใกล้คาร์บอนในตำแหน่งคาร์บอนที่ 6 ดังแสดงค่าเปรียบเทียบในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงค่าเปรียบเทียบ chemical shift ของ แมงจิเฟอริน และเกลือกอนุพันธ์ของแมงจิเฟอริน



H	แมงจิเฟอริน	โซเดียมแมงจิเฟอริน	$\Delta\delta$	โปแตสเซียมแมงจิเฟอริน	$\Delta\delta$	แคลเซียมแมงจิเฟอริน	$\Delta\delta$
H_8	7.37	7.04	0.33	7.10	0.07	7.18	0.19
H_5	6.85	6.26	0.59	6.45	0.4	6.51	0.34
H_4	6.36	6.21	0.15	6.23	0.13	6.31	0.05

3.2.1.4 การวิเคราะห์ธาตุโลหะสารอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินที่อยู่ในรูปเกลือก

ในการยืนยันองค์ประกอบโลหะของเกลือกที่เตรียมได้ทั้งสามชนิด ได้ทำการตรวจหาปริมาณธาตุโลหะโดยวิธี Inductively Coupled Plasma Optical Emission

วิธีทดลอง

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยละลายตัวอย่างด้วยน้ำ deionized water ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.01% (W/V) แล้วนำไปวัดด้วยเครื่องมือ Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer, Spectro CIROSCCD

ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุโลหะด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma Optical Emission ดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 เปอร์เซนต์ธาตุโลหะของเกลือกทั้งสามชนิด

ตัวอย่าง	ปริมาณธาตุ %(w/w)			ปริมาณธาตุ %(w/w) ทางทฤษฎี
	Na	K	Ca	
Na- แมงจีเฟอริน	3.5 ± 0.05	<0.0085	<0.014	5.17
K- แมงจีเฟอริน	<0.0015	3.5 ± 0.06	<0.014	7.98
Ca- แมงจีเฟอริน	<0.0015	1.6 ± 0.02	3.3 ± 0.2	4.53

สรุปผลการทดลอง

อนุพันธ์เกลือโซเดียมและโปแตสเซียมของแมงจีเฟอรินมีองค์ประกอบธาตุโซเดียมและโปแตสเซียมตามลำดับ และปริมาณ % ของธาตุโซเดียมและโปแตสเซียมแตกต่างจากเปอร์เซ็นต์ทางทฤษฎี (คำนวณจาก Elemental Analysis) อาจเนื่องมาจากเกลือโซเดียมของ แมงจีเฟอริน และเกลือโปแตสเซียมของแมงจีเฟอรินเป็นเกลือที่มีน้ำผลึกเป็นองค์ประกอบที่อยู่ในลักษณะ hydrate เกลือแคลเซียมที่เตรียมได้ มีเปอร์เซ็นต์ของแคลเซียมน้อยกว่าปริมาณ % ทางทฤษฎี และจากการวิเคราะห์ % ของธาตุโลหะพบไฮดรอกไซด์ของโปแตสเซียมปนอยู่เล็กน้อย ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากขั้นตอนการเตรียมเกล็ดดังกล่าวที่ต้องผ่านการเตรียมจากเกลือโปแตสเซียมของแมงจีเฟอริน ทำปฏิกิริยากับสารละลาย CaCl_2 และทำการตกผลึก โดยปฏิกิริยามีผลึก KCl ที่เกิดขึ้นซึ่งอาจจับอยู่กับเกลือแคลเซียมที่เกิดขึ้นบางส่วน

3.2.1.4 การศึกษาสมบัติทาง UV spectroscopy

เพื่อให้ได้ข้อมูลทางสเปกโทรสโคปีเพื่อใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และเปรียบเทียบความแตกต่างของเกลือ

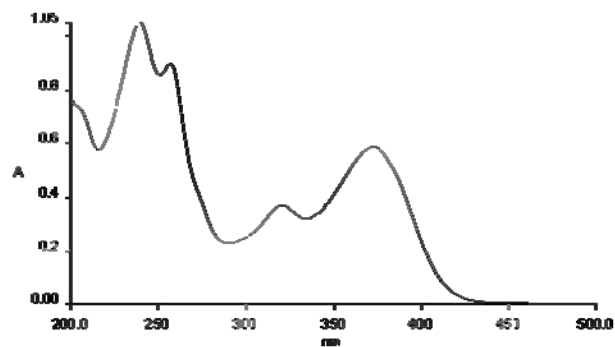
ที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 3 ชนิด จึงได้ทำการศึกษาคูณสมบัติทาง UV ของเกลือ โซเดียม, โปแตสเซียม และ แคลเซียมเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น

วิธีทดลอง

1. เตรียมสารละลาย แมงจีเฟอริน เข้มข้น 3.5×10^{-5} M โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 200-500 nm
2. เตรียมสารละลายโซเดียม แมงจีเฟอริน เข้มข้น 5.2×10^{-5} M โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 200-500 nm
3. เตรียมสารละลายโปแตสเซียม แมงจีเฟอริน เข้มข้น 6.3×10^{-5} M โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 200-500 nm
4. เตรียมสารละลาย แคลเซียม แมงจีเฟอริน เข้มข้น 3.1×10^{-5} M โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย นำสารละลายไปวัด ค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 200-500 nm

ผลการทดลอง

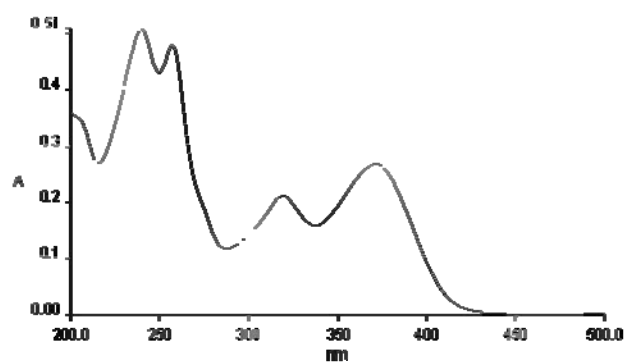
เกลือทั้งสามชนิด ซึ่งมีสมบัติละลายน้ำได้ดีมาก ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 3.11-3.14



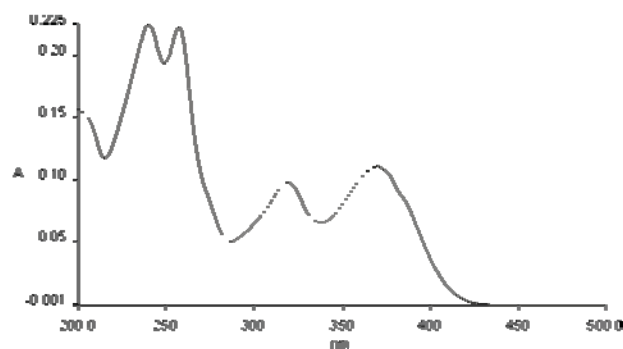
ภาพที่ 3.11 แสดง UV spectrum สารละลายแมงจิเฟอรินในน้ำ

┐

ภาพที่ 3.12 แสดง UV spectrum สารละลายเกลือโซเดียมแมงจิเฟอริน ในน้ำ



ภาพที่ 3.13 แสดง UV spectrum สารละลายเกลือโปแตสเซียมแมงจิเฟอริน ในน้ำ



ภาพที่ 3.14 แสดง UV spectrum สารละลายเกลือแคลเซียมแมงจิเฟอริน ในน้ำ

เกลือทั้งสามชนิดที่เตรียมขึ้นได้ แสดงเอกลักษณ์ ทาง UV ที่คล้ายกัน และมีค่า ϵ ที่แตกต่างกันและต่างจากสารตั้งต้น แมงจิเฟอริน ดังแสดงในตารางที่ 3.5

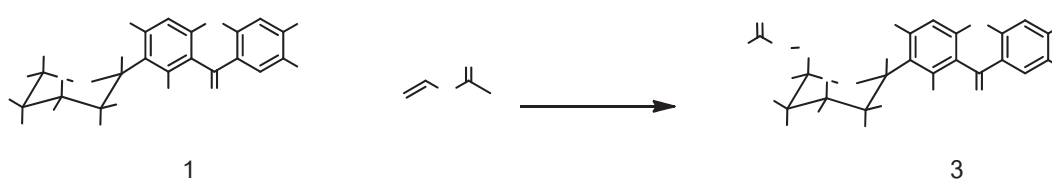
ตาราง 3.5 เปรียบเทียบค่าการดูดกลืน UV ของแมงจีเฟอรินกับเกลือโซเดียม, ไปแทสเซียม และแคลเซียม

Wavelength (nm)	ค่า ϵ			
	240	257	317	365
แมงจีเฟอริน	20,269.57	17,371.98	7,132.957	11302.7
โซเดียม แมงจีเฟอริน	6,283.57	6,080.87	2,695.85	3,200.66
ไปแทสเซียม แมงจีเฟอริน	8,054.76	7,582.07	3,356.41	4,246.28
แคลเซียม แมงจีเฟอริน	7,346.73	7,274.87	2,910.60	3,604.44

3.2.2 ดัดแปลงโครงสร้างของ แมงจีเฟอริน โดยการเปลี่ยนหมู่แอลกอฮอล์บนวงน้ำตาลให้ได้ สารอนุพันธ์ของ แมงจีเฟอริน ตามแนวทาง B

เนื่องจากแมงจีเฟอรินมีสมบัติการละลายได้น้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์และ oil ทำให้เกิดความยุ่งยากในการเตรียมส่วนผสมเพื่อใช้ในด้านเภสัชวิทยาและทำให้ลดความสามารถในการใช้เป็นสารออกฤทธิ์ การดัดแปลงโครงสร้างของสาร โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลบนวงน้ำตาลให้มีหมู่แอลคิลที่ยาวขึ้นอาจช่วยให้คุณสมบัติที่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ดีขึ้นและอาจนำไปสู่ผลการออกฤทธิ์ที่ดีขึ้น ในการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยวิธีทางชีวภาพ เนื่องจากสารตั้งต้นมีหมู่น้ำตาลบนวงหลายตำแหน่ง การใช้วิธีทางปฏิกิริยาเคมีไม่สามารถควบคุมตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาแบบจำเพาะ (regioselective) จะทำให้เกิดของผสมของผลิตภัณฑ์ที่เกิดปฏิกิริยาหลายตำแหน่งพร้อมกัน ในการทดลองจึงเลือกศึกษาวิธีที่ทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์ไลเปสในการเกิดปฏิกิริยา transesterification เพื่อให้มีความจำเพาะกับหมู่แอลกอฮอล์ปฐมภูมิบนวงน้ำตาล

3.2.2.1 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของแมงจีเฟอรินกับ vinyl acetate



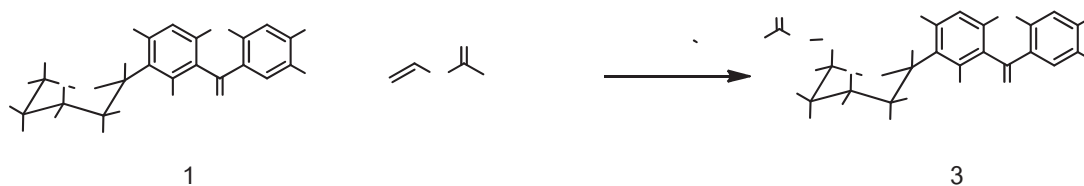
วิธีทดลอง

ละลายแมงจีเฟอริน 0.211 กรัม (1 mmol) ใน acetone ปริมาตร 5 มล และเติม vinyl acetate 92 ไมโครลิตร (1 mmol) เติมไลเปส 32 มิลลิกรัม และ 3 Å molecular sieves 25 มิลลิกรัม เขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40°C และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC

ผลการทดลอง

เมื่อเติมแมงจีเฟอริน 0.211 กรัม ใน acetone ปริมาตร 5 มล ได้ของผสมสีเหลืองมีลักษณะขุ่นและเติม vinyl acetate 92 ไมโครลิตร ไลเปส 32 มิลลิกรัม และ 3 Å molecular sieves 25 มิลลิกรัม และเขย่าโดยควบคุมอุณหภูมิ 40°C และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงจากการตรวจสอบ TLC พบเพียงจุดของสารตั้งต้นและไม่พบสารผลิตภัณฑ์

5.2.2.2 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของแมงจีเฟอรินกับ vinyl palmitate



วิธีทดลอง

ละลายแมงจีเฟอริน 0.063 กรัม (0.03 mmol) ใน 2-methyl-2-butanol ปริมาตร 5 มล และเติม สารละลาย 20% dimethylsulfoxide เติม vinyl palmitate (0.15 mmol) 0.211 กรัม เติมไลเปส 125 มิลลิกรัม และ 3 Å molecular sieves 125 มิลลิกรัม เขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40°C และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC

ผลการทดลอง

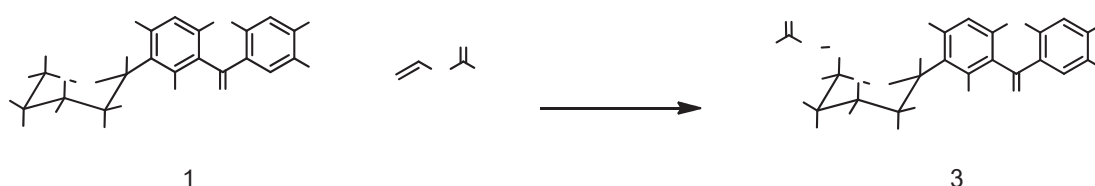
เมื่อเติม 2-methyl-2-butanol ปริมาตร 5 มล ลงใน แมงจีเฟอริน 0.063 กรัม ได้สารละลายมีลักษณะ ขุ่นและเติมสารละลาย 20% dimethylsulfoxide สารละลายใสขึ้น แต่ยังคงมีของแข็งลอยอยู่บางส่วน เมื่อเติม vinyl palmitate (0.15 M) 0.211 กรัม ไลเปส 125 มิลลิกรัม และ 3 Å molecular sieves 125 มิลลิกรัม. เขย่า บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40°C และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ไม่พบ สารผลิตภัณฑ์ TLC พบเพียงจุดของสารตั้งต้น และ palmitic acid ที่เกิดจากการสลายตัวของ vinyl palmitate

สรุปผลการทดลอง

การดัดแปลงปฏิกิริยาโครงสร้างของแมงจีเฟอริน โดยการเปลี่ยนหมู่แอลกอฮอล์บนวงน้ำตาลให้ได้สารอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน ตามแนวทาง B ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ทั้งที่ใช้ vinyl acetate และ vinyl palmitate ไม่สามารถทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดในการเลือกตัวทำละลายในการทำปฏิกิริยา เนื่องจากสารตั้งต้นมีสมบัติละลายที่ละลายได้ยากในตัวทำละลายอินทรีย์เกือบทุกชนิด ทำให้ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูงเช่น acetone, DMSO และ 2-methyl-2-butanol ซึ่งตัวทำละลายคู่ผสมที่ใช้ อาจไม่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่มักเกิดปฏิกิริยาในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย

5.2.2.1 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของ แมงจีเฟอริน กับ acyl donor ในตัวทำละลายต่างๆ

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายคู่ผสมที่ใช้ อาจมีผลทำให้ไม่สามารถเตรียมสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ ในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันบนวงน้ำตาล และศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ acyl donor ที่เหมาะสม และตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของ แมงจีเฟอริน ที่ตำแหน่ง -OH ของวงน้ำตาล โดยอาศัยปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปส



วิธีทดลอง

ละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.5 mmol) ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ (acetone, DMSO, 2-methyl-2-butanol, Butylmethyl imidazolium tetrafluoroborate (BmIMBF₄) ปริมาตร 5 มล และเติม vinyl acetate 92 ไมโครลิตร (1 mmol) หรือ vinyl laurate (1 mmol) เติมไลเปส 32 มิลลิกรัม และ 3 Å molecular sieves 25 มิลลิกรัม เขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40°C และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.5 mmol) มาเติมตัวทำละลายชนิดต่างๆ พบว่าตัวทำละลาย acetone และ 2-methyl-2-butanol สามารถละลายสารตั้งต้นได้น้อย และ DMSO และ Butylmethyl imidazolium tetrafluoroborate (BmIMBF₄) สามารถละลายสารตั้งต้นได้ดี เมื่อเติมเอนไซม์ไลเปส และเขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40°C และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 3.6 ไม่พบสารผลิตภัณฑ์ และพบเพียงสารตั้งต้นที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 3.6 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงสภาวะในการทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส	Acyl donor	ตัวทำละลาย	ผลการติดตาม TLC
Novozyme 435	vinyl acetate	Acetone	ไม่พบสารผลิตภัณฑ์
Novozyme 435	vinyl acetate	2-methyl-2-butanol	ไม่พบสารผลิตภัณฑ์
Novozyme 435	vinyl acetate	DMSO	ไม่พบสารผลิตภัณฑ์
Novozyme 435	vinyl laurate	20% 2-methyl-2-butanol /DMSO	ไม่พบสารผลิตภัณฑ์
Novozyme 435	vinyl acetate	Butylmethyl imidazolium tetrafluoroborate (BmIMBF ₄)	ไม่พบสารผลิตภัณฑ์
Lipase B:Immbead	vinyl acetate	2-methyl-2-butanol	ไม่พบสารผลิตภัณฑ์
Lipase B:Immbead	vinyl acetate	DMSO	ไม่พบสารผลิตภัณฑ์

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ acyl donor และตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยา เอส-

เทอร์ฟิเคชันของแมงจีเฟอรินที่ตำแหน่ง -OH ของวงน้ำตาล โดยอาศัยปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปส โดยการเขย่าและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40°C แสดงให้เห็นว่าวิธีดังกล่าวไม่สามารถเตรียมสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ ทั้งนี้จะมีสาเหตุเนื่องมาจากข้อจำกัดของเอนไซม์ที่เอนไซม์ไลเปสที่มัก

เกิดปฏิกิริยาในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยที่อุณหภูมิ 40°C และ เนื่องจากสารตั้งต้นมีสมบัติที่ละลายได้ยากในตัวทำละลายอินทรีย์ acetone และ 2-methyl-2-butanol และตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูงเช่น ตัวทำละลายผสม 2-methyl-2-butanol และ DMSO และ BMe₃ อาจไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

5.2.2.2 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของแมงจีเฟอรินกับ vinyl acetate โดยอาศัย Ultrasound irradiations

เนื่องจากการสังเคราะห์ตามแนวทาง B โดยอาศัยการเขย่าไม่สามารถทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ได้ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาตามแนวทาง B จึงได้ทำการปรับปรุงวิธีการทดลองโดยอาศัยเครื่อง Ultrasound irradiations

วิธีการทดลอง

1. Ultrasound irradiations โดยใช้ sonic probe

ละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.5 mmol) ในตัวทำละลาย DMSO 1.25 มล 60°C เติม Vinyl acetate 0.13 มล (3 mmol) lipase Novozyme 435 0.0076 กรัม ลงใน vial ขนาด 5 มล และ 3 Å molecular sieves 5 มิลลิกรัม ทำการ sonicate โดยใช้ ultrasonic probe ด้วยกำลัง 100 W เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC

2. Ultrasound irradiations โดยใช้ sonic bath

ละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.5 mmol) ในตัวทำละลาย DMSO 1.25 มล 60°C เติม Vinyl acetate 0.13 มล (3 mmol) lipase Novozyme 435 0.0076 กรัม ลงใน vial ขนาด 5 มล และ 3 Å molecular sieves 5 มิลลิกรัม ทำการ sonicate โดยใช้ ultrasonic bath ด้วยกำลัง 100 W เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC กรองของแข็งออกและนำสารละลายไประเหยตัวทำละลาย นำ crude product ที่ได้แยกบริสุทธิ์ด้วย silica gel chromatography (chloroform-เอทานอล, 4:1) ได้ของเหลวหนืดสีเหลือง

ผลการทดลอง

เมื่อปล่อยให้แมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.5 mmol) ที่ละลายใน DMSO 1.25 มล 60°C ทำปฏิกิริยากับ Vinyl acetate 0.13 มล (3 mmol) และ lipase Novozyme 435 0.007 กรัม โดยใช้ sonic probe ด้วยกำลัง 100 W ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่าปฏิกิริยาเริ่มเกิดขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง และจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นเล็กน้อย เมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง ผลการติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่ามีจุดสารเกิดขึ้นเล็กน้อย และเมื่อดึงของแข็งที่ทำหน้าที่ตรึงเอนไซม์เริ่มแตกจึงหยุดปฏิกิริยา

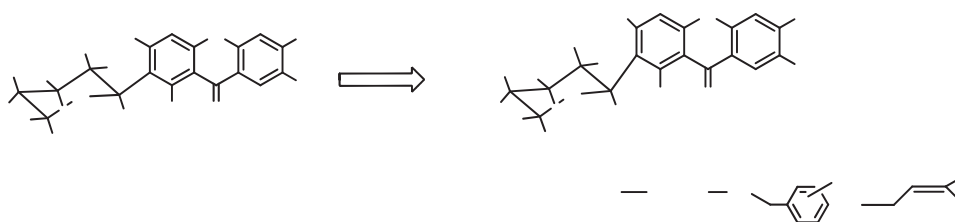
เมื่อปล่อยให้แมงจีเฟอรินทำปฏิกิริยากับ Vinyl acetate ที่ 60°C โดยใช้ปริมาณและตัวทำละลายเช่นเดียวกันกับตอนต้น โดยมี lipase Novozyme 435 0.0076 กรัม โดยใช้ ultrasonic bath ด้วยกำลัง 100W ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่าปฏิกิริยาเริ่มเกิดขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง และจุดของสารผลิตภัณฑ์เข้มข้นตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง ผลการติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่ามีจุดสารเกิดขึ้นหลายจุด เมื่อกรองของแข็งออกและนำสารละลายไประเหยตัวทำละลาย นำ crude product ที่ได้แยกบริสุทธิ์ด้วย silica gel chromatography (chloroform-เอทานอล, 4:1) ได้ของเหลวหนืดสีเหลือง ได้สารผลิตภัณฑ์ 0.005 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 487.0856$ ($M+Na$)⁺ ของ C₂₀H₂₀NaO₁₁ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 5% พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ

13.83 (1H, s, 1-OH), 10.40 (3H, bs, 3, 6, 7-OH), 7.36 (1H, s, 8-H), 6.86 (1H, s, 5-H), 6.40 (1H, s, 4-H), 5.0-4.78 (1H, m, 1'-H), 4.39 (2H, m, 6'-H), 3.85-3.5 (4H, m, 5', 4', 3', 2'-H) 2.07 (3H, s, CH₃CO₂) 2.04 (3H, s, CH₃CO₂) สารที่เกิดขึ้นสลายตัวอย่างรวดเร็วโดยเปลี่ยนแปลงกลับเป็นแมงจิเฟอริน เมื่อตั้งทิ้งไว้ในสารละลาย DMSO

สรุปผลการทดลอง

การใช้เอนไซม์ไลเปสทั้งแบบ Novozyme 435 และ Lipase B:Immobilized ในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันบนวงน้ำตาลของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายต่างๆ ทั้งที่ละลายได้ดี เช่น DMSO และ Butylmethylimidazolium tetra fluoroborate (BMIMBF₄) และที่ละลายได้น้อย เช่น acetone และ 2-methyl-2-butanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มักใช้สำหรับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของไลเปส ไม่สามารถให้สารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นได้ แม้จะทำการเปลี่ยน acyl donor ทั้งที่เป็นสายสั้นๆ เช่น vinyl acetate และที่เป็นสายยาว เช่น vinyl laurate โดยวิธีการเขย่าที่ อุณหภูมิ 60°C ไม่สามารถให้สารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นได้ แต่เมื่อทำปฏิกิริยาโดยอาศัย Ultrasound irradiations ทั้งแบบ ultrasonic probe และ ultrasonic bath พบว่ามีสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น โดยที่ ultrasonic probe มีสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยมากและมีการแตกของสาร supporter ปะปนมากับของผสมของสารผลิตภัณฑ์ การใช้ ultrasonic bath ด้วยกำลัง 100 W เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ให้ crude product ที่มีสารผสมของสารผลิตภัณฑ์และเมื่อนำไปแยกบริสุทธิ์ด้วย silica gel chromatography (chloroform: เอทานอล, 4:1) ได้ของเหลวหนืดสีเหลือง จาก ¹H NMR แสดงให้เห็นว่าเกิดทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งให้ผล NMR ใกล้เคียงกับรายงานที่มีมาก่อน 15 วิธีการนี้ได้สารผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่น้อยโดยให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตเพียง 5% และสารที่เกิดขึ้นสลายตัวอย่างรวดเร็วโดยเปลี่ยนแปลงกลับเป็นแมงจิเฟอรินเมื่อตั้งทิ้งไว้ในสารละลาย DMSO

3.2.2 ดัดแปลงโครงสร้างของแมงจิเฟอรินโดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลบนวงอะโรมาติกให้ได้สารอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินตามแนวทาง C

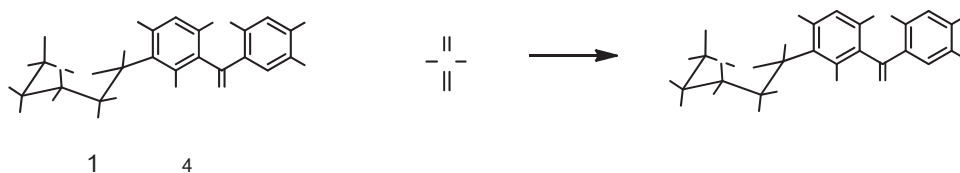


5.2.3 การดัดแปลงโครงสร้างของแมงจิเฟอรินโดยการเปลี่ยนหมู่อนุพันธ์ฟีนอลได้สารอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินตามแนวทาง C

การดัดแปลงโครงสร้างของสารแมงจิเฟอรินที่หมู่ไฮดรอกซิลของ Xanthone ตามแนวทาง C อาจช่วยให้ได้สารที่มีคุณสมบัติที่สามารถละลายในตัวทำละลายต่างๆ ดีขึ้น และอาจเป็นประโยชน์ต่อการเตรียมส่วนผสมเพื่อใช้ในด้านเภสัชวิทยา โดยการเปลี่ยนแปลงที่เป็นไปได้ที่อาศัยปฏิกิริยาเคมีอย่างง่ายขั้นตอนเดียวโดยไม่รบกวนโครงสร้างหลักของแมงจิเฟอริน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สามารถยับยั้งไวรัสได้ คือการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชัน -OH ของ ฟีนอลซึ่งมี 2 วิธี ที่เป็นไปได้คือการทำปฏิกิริยาเอสเตอร์ฟิเคชัน เปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์แอลคอกไซด์ที่มีหมู่แอลคิล และการเปลี่ยนให้เป็นหมู่เอสเตอร์โดยอาศัยปฏิกิริยาเอสเตอร์ฟิเคชันที่หมู่ -OH

5.2.3.1 ปฏิกิริยาเอสเตอร์ฟิเคชันของแมงจิเฟอริน

ปฏิกิริยาเมทิลเลชันของแมนจิเฟอรินกับ dimethyl sulphate

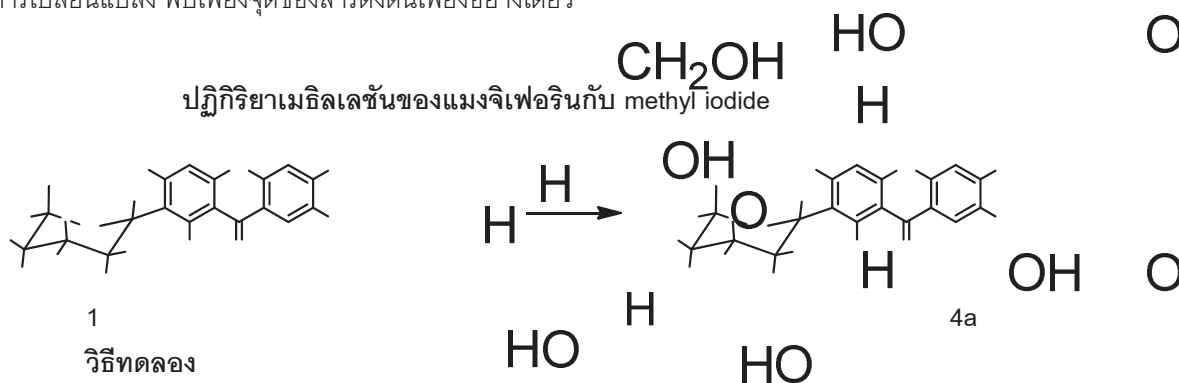


วิธีทดลอง

สารละลาย แมนจิเฟอริน 0.2110 (0.5 mmol) ใน acetone ปริมาตร 60 มล เติม dimethyl sulphate 0.425 กรัม (3.3 mmol) และเติม K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC

ผลการทดลอง

เมื่อเติม acetone ลงใน แมนจิเฟอริน 0.2110 กรัม และเติม dimethyl sulphate ที่อุณหภูมิห้องและกวนของผสมเป็นเวลา 7 วัน ได้ของผสมสีเหลืองมีลักษณะขุ่น ผลจากการตรวจสอบปฏิกิริยา ด้วย TLC ไม่พบการเปลี่ยนแปลง พบเพียงจุดของสารตั้งต้นเพียงอย่างเดียว



วิธีทดลอง

ละลายแมนจิเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล เติม methyl iodide 0.25 มล (6 mmol) และ K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) ทำการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ $60^\circ C$ เป็นเวลา 24 ชม. และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา นำของผสมไประเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อละลายแมนจิเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล และเติม methyl iodide 6 mmol ได้สารละลายใสสีเหลืองและปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาโดยทำการรีฟลักซ์เป็นเวลา 24 ชม. ผลจากการตรวจสอบปฏิกิริยา โดยติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบจุดของสารที่คาดว่าป็นสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และยังคงมีจุดของสารตั้งต้นเหลืออยู่บางส่วน เมื่อนำ crude ไประเหยภายใต้สุญญากาศ และแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ 4a ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 38 (0.080 กรัม) พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 459.0906 (M+Na)^+$ ของ $C_{20}H_{20}NaO_{11}$

IR (KBr, cm^{-1}): 3452 (b), 3023, 2980, 1627, 1586, 1492, 1419, 1375, 1363, 1263, 1178, 1027, 818, 792, 500

NMR spectroscopy 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 13.83 (1H, s, OH), 9.89 (2H, bs, OH), 7.39 (1H, s, H8), 7.15 (1H, s, H5), 6.45 (1H, s, H4), 4.88 (2H, br, OH), 4.58 (1H, d, $J = 8$ Hz

H_{1'}), 4.45 (2H, br, OH) 4.06 (1H, m, H_{2'}), 3.93 (3H, s, OCH₃), 3.67, 3.4 (d, J = 8 Hz, H_{6'}), 3.15 (m, 3H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'})

¹³CNMR (100 MHz, DMSO-d₆, δ , ppm): 179.58 (CO), 164.79 (C₃), 162.22 (C₁), 156.75 (C_{4a}), 155.50 (C₆), 151.13 (C_{4b}), 144.77 (C₇), 112.98 (C_{8a}), 108.27, (C₈), 108.05 (C₂), 101.80 (C₅), 100.63 (C_{8b}), 93.85 (C₄), 82.05 (C_{5'}), 79.49 (C_{3'}), 73.52 (C_{1'}), 71.11 (C_{4'}), 70.66 (C_{2'}), 61.96 (C_{6'}), 56.82, OCH₃

ตารางที่ 3.7 แสดงข้อมูล 2D NMR HMQC, HMBC ของเมธิลแมงจีเฟอริน

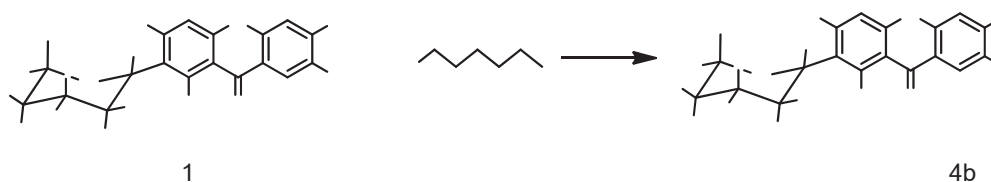
atom	C	HMQC		HMBC
CO	179.58			
C ₃	164.79			
C ₁	162.22			
C _{4a}	156.75			
C ₆	155.50			
C _{4b}	151.13			
C ₇	144.77			
C _{8a}	112.98			
C ₈	108.27	7.39	(s, 1H, H ₈),	CO, C ₆ , C ₇ , C _{8a} , C _{8b}
C ₂	108.05			
C ₅	101.80	7.15	(s, 1H, H ₅),	CO, C ₆ , C ₇ , C _{8a} , C _{8b}
C _{8b}	100.63			
C ₄	93.85	6.45	(s, 1H, H ₄),	CO, C ₅ , C ₈ , C ₃ , C _{4a}
C _{5'}	82.05	3.15	(m, 3H, H _{3'} , H _{4'} , H _{5'})	
C _{3'}	79.49	3.15	(m, 3H, H _{3'} , H _{4'} , H _{5'})	
C _{1'}	73.52	4.58	(1H, d, J = 8 Hz H _{1'}),	C ₂ , C _{2'} , C ₁ , C ₃
C _{4'}	71.11	3.15	(m, 3H, H _{3'} , H _{4'} , H _{5'})	
C _{2'}	70.66	4.06	(1H, m, H _{2'})	
C _{6'}	61.96	3.67, 3.4	(d, J = 8 Hz, 2H, H _{6'})	
OCH ₃	56.82	3.93	(3H, s, OCH ₃),	C ₆

สรุปผลการทดลอง

เมื่อให้แมงจีเฟอรินในการทำปฏิกิริยาเมทิลชันโดยใช้ไดเมทิลซัลเฟตใน acetone พบว่าไม่เกิดสารผลิตภัณฑ์ น่าจะมีสาเหตุมาจากความสามารถในการละลายของแมงจีเฟอรินที่ละลายได้น้อยใน acetone แต่เมื่อละลายแมงจีเฟอรินใน dry DMF และเติม methyl iodide และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาโดยการรีฟลักซ์ที่

60°C เป็นเวลา 12 ชม. ผลจากการตรวจสอบปฏิกิริยาโดยติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบจุดของสารที่คาดว่าเป็นสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นและยังมีสารตั้งต้นเหลืออยู่บางส่วน ซึ่งโดยทั่วไปหากต้องการทำให้สารตั้งต้นลดลง อาจทำการเติมเมธิลไอโอไดด์เพิ่มได้ แต่เนื่องจากบนวงแมงจีเฟอรินมีตำแหน่ง -OH ที่เกิดปฏิกิริยาได้หลายหมู่ การเติมเมธิลไอโอไดด์ลงไปจำนวนมากอาจทำให้ได้สารหลายไอโซเมอร์ ทำให้ยุ่งยากในการแยกจึงได้หยุดปฏิกิริยาเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชม. เมื่อนำ crude ไประเหยภายใต้สุญญากาศ และแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH₂Cl₂ ได้สารหนัก 0.080 กรัม (38% yield) จากการพิสูจน์โครงสร้างทั้ง ¹H NMR, ¹³C NMR, HMQC และ HMBC (ดังแสดงในตารางที่ 3.6) แสดงให้เห็นว่าสารมีโครงสร้างเป็น monomethoxy-แมงจีเฟอริน ในตำแหน่งคาร์บอนที่ 6

5.2.3.2 ปฏิกิริยาแอลคิลเลชันของแมงจีเฟอรินกับ 1-bromohexane



ละลายแมงจีเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล เติม 1-bromohexane 0.28 มล (2 mmol) และ K₂CO₃ 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) รีฟลักซ์ที่ 60°C ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา 20 ชม. นำของผสมไประเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH₂Cl₂ พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS, NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อละลาย แมงจีเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล และเติม 1-bromohexane 0.28 มล (2 mmol) และ K₂CO₃ 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 60°C ได้สารละลายลักษณะสีส้มเข้ม และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา 24 ชม. นำของผสมไประเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ MeOH และ CH₂Cl₂ ได้สารผลิตภัณฑ์สีเหลืองหนืดหนัก 0.080 กรัม (33% yield) พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ m/z = 507.1868 (M+H)⁺ ตรงกับค่าคำนวณของ C₂₅H₃₁O₁₁ และ NMR spectroscopy ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดโมโนแอลคิลเลชัน

IR (CH₃OH, cm⁻¹): 3437(b), 2962, 1634 (b), 1469, 1277, 1224, 1196, 1080, 1020, 620

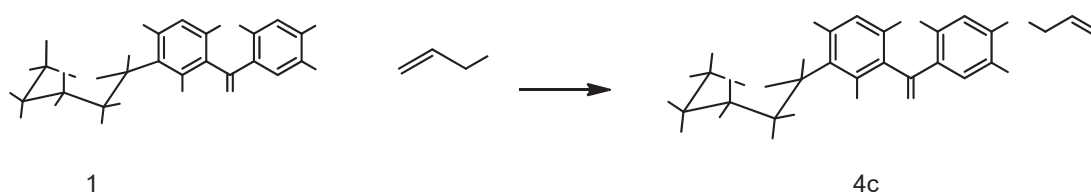
NMR spectroscopy ¹H NMR Spectrum (400 MHz, DMSO-d₆, δ, ppm): 13.68 (br, 1H, OH),

8.8 (br, 2H, OH), 8.46 (br, 5H, OH) 7.39 (s, 1H, H₈), 7.13 (s, 1H, H₅), 6.45 (s, 1H, H₄), 4.9-4.5 (br, 4H, -OH), 4.59 (m, 1H, H₁), 3.67, 3.33 (m, 2H, H_{6a}, H_{6b}), 4.02 (m, 2H, H_{1'}), 3.74-3.15 (m, H₂, H₃, H_{4'}, H₅) 1.78 (2H, m, H_{2'}), 1.31 (m, 6H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}), 0.89 (3H, m, H_{6'}) ¹³C NMR Spectrum (100 MHz, DMSO-d₆, δ, ppm), 179.6, (CO), 168.13, (C₃), 164.57, (C₁), 162.22, (C_{4a}), 156.72, (C₆), 154.92, (C_{4b}), 151.16, (C₇), 115.39, (C_{8a}), 108.21, (C₈), 108.06, (C₂), 101.8, (C₅), 99.13, (C_{8b}), 93.81, (C₄), 82.04, (C₅), 79.47, (C₃), 73.5, (C_{1'}), 71.09, (C₄), 70.66, (C_{2'}), 69.4, (C₁), 61.94, (C₆), 34.7, (C_{2''}), 28.78, (C_{3'}), 25.55, (C_{4''}), 22.54, (C_{5''}), 14.40, (C_{6''})

สรุปผลการทดลอง

แมงจีเฟอรินสามารถเกิดปฏิกิริยาแอลคิลเลชันโดยใช้ 1-bromohexane โดยมี K_2CO_3 ใน dry DMF ที่อุณหภูมิ $60^\circ C$ โดยเมื่อนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสม MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 4b เป็นของแข็งหนืดสีเหลือง หนัก 0.080 กรัม (33% yield) พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 507.1868 (M+H)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $C_{25}H_{31}O_{11}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดโมโนแอลคิลเลชัน จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค 1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้น มีลักษณะเป็น mono alkylation ที่ตำแหน่งคาร์บอน 6

5.2.3.3 วิธีการสังเคราะห์ ปฏิกิริยาแอลคิลเลชันของแมงจีเฟอรินกับแอลลิลโบรไมด์



ละลาย แมงจีเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล เติม Allyl bromide 0.049 กรัม (6 mmol) และ K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) รีฟลักซ์ที่ $60^\circ C$ ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา 22 ชม. ระเหยภายใต้สูญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 0.057 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

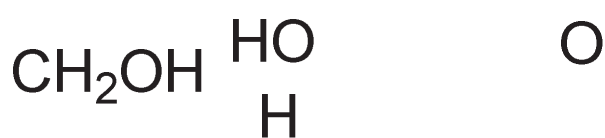
เมื่อละลาย แมงจีเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล เติม allyl bromide 0.049 กรัม (6 mmol) และ K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) รีฟลักซ์ที่ $60^\circ C$ ได้สารละลายสีส้มแดง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา 22 ชม. ระเหยภายใต้สูญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งหนืดสีเหลือง หนัก 0.057 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 463.1244 (M+H)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $C_{22}H_{23}O_{11}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากโมโนแอลคิลเลชัน

IR (CH_3OH , cm^{-1}): 3418 (b), 1651, 1645, 1047, 1025, 997, 837, 765, 631

NMR spectroscopy 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$, δ , ppm) 13.66 (bs, 1H, OH), 7.43 (s, 1H, H_8), 7.15 (s, 1H, H_5), 6.49 (s, 1H, H_4), 6.06 (m, 1H, $H_{2''}$), 5.45 (d, $J = 17$ Hz, $H_{3'a}$), 5.32 (d, $J = 11$ Hz, $H_{3''b}$), 4.89-4.5 (5H, OH), 4.68 (d, $J = 5$ Hz, 2H, $H_{1''}$), 4.57 (d, $J = 10$ Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.02 (t, 9Hz, H_2), 3.6-3.5 (m, 2H, $H_{6a}, 6b$) (3.5-3.3 (m, H_3, H_4, H_5)

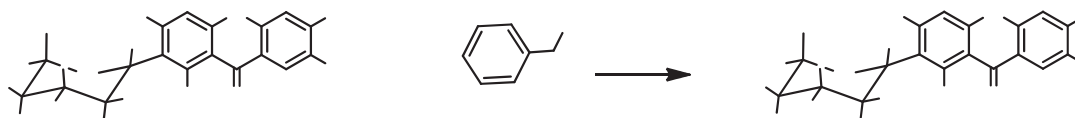
^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$, δ , ppm) 179.59 (CO), 164.57, (C_3), 162.15 (C_1), 156.67 (C_{4a}), 154.26 (C_6), 150.95 (C_{4b}), 144.88 (C_7), 133.25 ($C_{2''}$), 118.80 ($C_{3''}$), 113.02 (C_{8a}), 108.31 (C_8), 108.15 (C_2), 101.83 (C_5), 101.66 (C_{8b}), 93.86 (C_4), 81.95, (C_5), 79.41 (C_3), 73.43 (C_1), 71.01 (C_4), 70.60 ($C_{2'}$), 69.85 ($C_{1''}$), 61.85 (C_6)

สรุปผลการทดลอง



แมงจีเฟอรินสามารถเกิดปฏิกิริยาแอลคิลเลชันใช้ Allyl bromide โดยมี K_2CO_3 ใน dry DMF ที่อุณหภูมิ $60^\circ C$ โดยเมื่อนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 4c เป็นของแข็งสีเหลือง น้ำหนัก 0.057 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 463.1244$ $(M+H)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $C_{22}H_{23}O_{11}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากโมโนแอลคิลเลชัน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 25% จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค 1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น monoallylate ที่ -OH ตำแหน่ง 6

5.2.3.4 ปฏิกิริยา benzylation ของแมงจีเฟอรินกับ benzyl chloride



วิธีทดลอง

ละลายแมงจีเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล เติม benzyl chloride 0.252 กรัม (2 mmol) และ K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ $60^\circ C$ ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา 24 ชม. ระเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสม MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 0.078 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

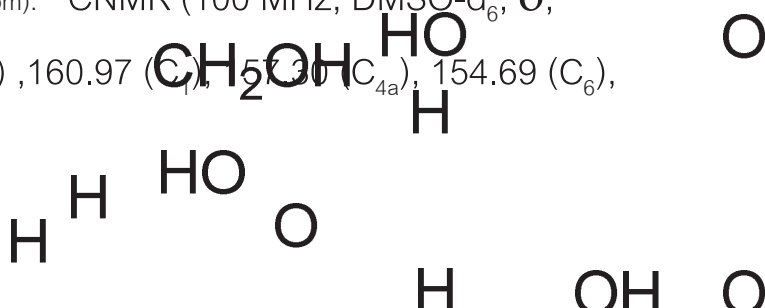
ผลการทดลอง

เมื่อละลายแมงจีเฟอริน 0.210 กรัม (0.5 mmol) ใน dry DMF 10 มล เติม benzyl chloride 0.252 (2 mmol) และ K_2CO_3 50 มิลลิกรัม (0.36 mmol) รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ $60^\circ C$ ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อครบเวลา 24 ชม. ระเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสม MeOH และ CH_2Cl_2 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ benzyl mangiferin ของแข็งสีเหลือง จุดหลอมเหลว $130-133^\circ C$ มีน้ำหนัก 0.078 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 603.19$ $(M+H)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $C_{33}H_{31}O_{11}$ และ NMR spectroscopy ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดไดเบนซิลเลชัน

IR (CH₃OH, cm⁻¹) 3358 (b), 2923, 1606 (sh), 1467, 1250, 1180, 1000, 950

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ดังนี้ 1H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 13.48 (1H, s), 7.63~7.29 (10H, m, 2H_{3a}, 2H_{4a}, H_{5a}, 2H_{3b}, 2H_{4b}, H_{5b}), 7.49 (s, 1H, H₈), 7.23 (s, 1H, H₅), 6.74 (1H, s, H₄), 5.29 (1H, bs, OH), 5.22~5.14 (4H, m, 2H_{1a}, 2H_{1b}), 4.89 (bs 2H, OH), 4.68 (1H, d, J = 8 Hz, H₁), 4.48 (m, 1H, H₂), 4.0-3.0 (2H, m, OH), 3.8, 3.7 (m, 2H, H_{6a}, H_{6b}), 3.4 - 3.15 (m, 3H, H₃, H₄, H₅)

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d₆, δ , ppm): 179.69 (CO), 164.72 (C₃), 160.97 (C₁), 157.30 (C_{4a}), 154.69 (C₆),

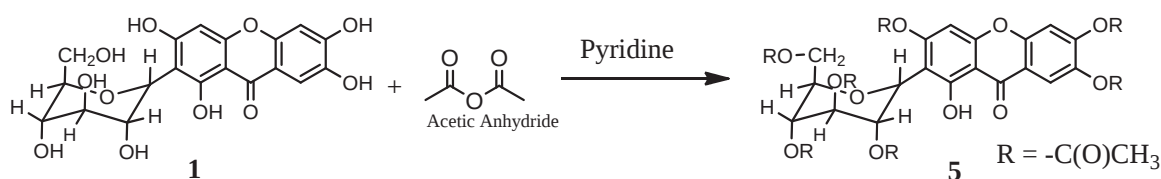


151.07 (C_{4b}), 145.45 (C_7), 136.98 ($C_{2a''}$), 136.55 ($C_{2b''}$), 129.03 ($C_{3a''}$, $C_{7a''}$),
 128.74 ($C_{4a''}$, $C_{6a''}$), 128.65 ($C_{3b''}$, $C_{7b''}$), 128.40 ($C_{4b''}$, $C_{6b''}$), 128.12 ($C_{5a''}$),
 127.40 ($C_{5b''}$), 113.32 (C_{8a}), 109.44 (C_2), 108.24 (C_8), 102.45 (C_{8b}),
 101.80 (C_5), 91.96 (C_4), 82.31 (C_5), 71.16 ($C_{1a'}$), 70.84 ($C_{1b'}$),
 79.44 (C_3), 73.97 ($C_{1'}$), 71.2 (C_4), 70.39 (C_2), 62.29 (C_6)

สรุปผลการทดลอง

แมงจีเฟอรินสามารถเกิดปฏิกิริยาเบนซิลเลชันโดยใช้ benzyl chloride โดยมี K_2CO_3 ใน dry DMF ที่อุณหภูมิ $60^\circ C$ โดยเมื่อนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 4d เป็นของแข็งสีเหลืองหนัก 0.078 กรัม จุดหลอมเหลว $130-133^\circ C$ พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 603.19 (M+H)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $C_{33}H_{31}O_{11}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดไดเบนซิลเลชัน เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 26% จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค 1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC, HMBC และ Mass spectrometry สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น dibenzylation ที่ -OH ตำแหน่ง 6, 7 ทั้งนี้ไม่พบสารที่เกิดจาก monobenzylation ซึ่งแตกต่างจากกรณีของเมธิลไฮโดรไดด์และ 1-bromohexane ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากการที่ benzyl bromide เป็น alkylating agent ที่มีขนาดใหญ่ ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้อย่างช้าๆ ในขณะที่บนวง xanthone มีหมู่ hydroxyl หลายหมู่ จึงทำให้เกิด alkylation ได้หลายตำแหน่งกัน โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดไดเบนซิลเลชันน่าจะมาจากการเกิด alkylation ต่อเนื่องจากผลิตภัณฑ์ monobenzyl และสาเหตุที่ปฏิกิริยาหยุดที่ dibenzyl น่าจะมีสาเหตุจากอัตราส่วน mol ratio อุณหภูมิที่ใช้ และความเกะกะของ หมู่ benzyl ที่ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาต่อเนื่อง และการที่เกิดปฏิกิริยา alkylation ที่ตำแหน่ง 6 และ 7 และไม่เกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง 1 และ 3 น่าจะมีสาเหตุมาจากการที่ -OH ตำแหน่ง 1 และ 3 ที่อยู่ใกล้กับหมู่ glycoside ซึ่งมีความเกะกะมากกว่า ตำแหน่ง 6 และ 7

5.2.3.5 ปฏิกิริยาอะเซทิลเลชันของแมงจีเฟอรินกับ Acetic anhydride



ละลายแมงจีเฟอริน 0.050 กรัม (0.12 mmol) ใน pyridine 4 มล เติม acetic anhydride 0.3 มล (0.3 mmol) กวนของผสมที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ระเหยภายใต้สูญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ของผสม Ethyl acetate/ hexane ได้สารผลิตภัณฑ์สีขาวปนน้ำตาลหนัก 0.091 กรัม ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.016 กรัม (17%) พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจีเฟอริน 0.050 กรัม ละลายใน pyridine 4 มล และเติม acetic anhydride และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น 2 จุด ไม่พบว่า

มีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีขาว crude ที่ได้ละลายได้ดีใน CHCl_3 เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม Ethyl acetate/ hexane จะได้ของแข็งสีเหลืองอ่อนหนัก 0.016 กรัม พิสจูน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 781.1597$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ ตรงกับค่าคำนวณของ $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{NaO}_{19}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชันที่หมู่ -OH ที่ตำแหน่ง C_1 , C_3 , C_6 , C_7 และ -OH ตำแหน่ง C_2 , C_3 , C_4 , และ C_6 ตามลำดับคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 17% พิสจูน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

IR (KBr, cm^{-1}) 3010, 2939, 1760, 1756, 1655, 1620, 1450, 1371, 1176, 1050, 919, 597

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 8.07 (s, 1H, H_8), 7.43 (s, 1H, H_5), 7.26 (1H, s, H_4), 5.74 (1H, m, H_{11}), 5.34 (m, 1H, H_4), 5.32 (m, 1H, H_3), 4.86 (1H, d, $J = 8$ Hz, H_2), 4.45, 4.03 (m, 2H, H_{6a} , H_{6b}), 3.85 (m, 1H, H_5), 2.44 (s, CH_3), 2.42 (s, CH_3), 2.24 (s, CH_3), 2.23 (s, CH_3), 2.00 (s, CH_3), 1.98 (s, CH_3), 1.96 (s, CH_3), 1.95 (s, CH_3)

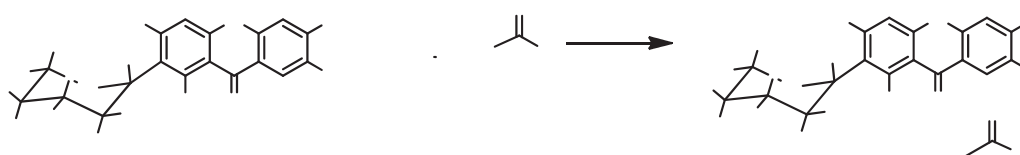
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 173.58 (CO), 170.46 (CO), 170.27 (CO), 169.59 (CO), 168.46 (CO), 167.98 (CO), 167.63 (CO), 157.42 (C_3), 154.37 (C_1), 152.91 (C_{4a}), 149.59 (C_6), 147.65 (C_{4b}), 139.36 (C_7), 122.45 (C_{8a}), 120.80 (C_8), 118.26 (C_2), 114.54 (C_{4b}), 112.64 (C_{8b}), 111.70 (C_5), 109.92 (C_4), 77.23 (C_5), 76.56 (C_4), 74.35 (C_2), 72.43 (C_1), 68.14 (C_3), 61.90 (C_6), 21.38, 20.76, 20.48 (C_2)

สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจีเฟอริน 0.0500 กรัม ทำปฏิกิริยา acetylation โดยละลายสารใน pyridine และเติม acetic anhydride และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น 2 จุด ไม่พบว่ามีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีขาว crude ที่ได้ละลายได้ดีใน CHCl_3 เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม Ethyl acetate/ Hexane จะได้ของแข็งสีเหลืองอ่อนหนัก 0.0160 กรัม (17% yield) จากการพิสจูน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 781.1597$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ ตรงกับค่าคำนวณของ $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{NaO}_{19}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชันที่หมู่ -OH ที่ตำแหน่ง C_1 , C_3 , C_6 , C_7 และ -OH ตำแหน่ง C_2 , C_3 , C_4 , และ C_6 ตามลำดับการพิสจูน์เอกลักษณ์เทคนิค NMR spectroscopy ^1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC, HMBC สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้น

การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวทำให้การละลายของสารเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด โดยที่สารอนุพันธ์ acylation ที่ได้สามารถละลายในคลอโรฟอร์ม ในขณะที่อนุพันธ์อื่นๆ ที่เตรียมขึ้นส่วนใหญ่ละลายได้ใน DMSO

5.2.3.6 ปฏิกิริยาอะเซทิลเลชันของ แมงจีเฟอริน กับ Octanoyl chloride



ละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.24 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม octanoyl chloride 0.05 กรัม (0.28 mmol) กวนของผสมที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ระเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl_3 ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.041 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.25 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม octanoyl chloride 0.05 มล (0.3 mmol) ได้สารละลายสีเหลืองอ่อน กวนของผสมที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ระเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl_3 ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.041 กรัม จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 549.1964 (M+H)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{O}_{12}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชัน 1 หมู่ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 32 % yield

พิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค

IR (CH_3OH , cm^{-1}): 3428 (b), 2951, 1634, 1468, 1451, 1016, 748

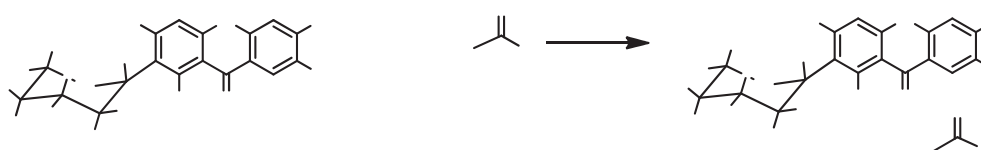
^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm): 13.40 (bs, 1H, OH), 11.3-10.5 (bs, 1H, OH), 7.44 (s, 1H, H_8), 6.82 (s, 1H, H_5), 6.36 (s, 1H, H_4), 4.8-4.61 (brs, 5H, -OH), 4.20 (m, 1H, H_1), 3.90, 3.88 (m, 1H, $\text{H}_{6a}, \text{H}_{6b}$), 3.77 (m, 1H, H_2), 3.76-3.48 (m, 3H, $\text{H}_3, \text{H}_4, \text{H}_5$), 2.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{H}_{2''}$), 1.63 (m, 2H, H_3''), 1.62 (m, 8H, $\text{H}_4, \text{H}_5, \text{H}_6, \text{H}_7$), 0.95 (q, 3H, H_8'')

^{13}C NMR (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm) 179.93 (CO), 174.85 (C_1O), 163.82 (C_3), 162.50 (C_1), 158.15 (C_{4a}), 151.78 (C_6), 150.12 (C_{4b}), 144.41 (C_7), 115.74 (C_{8a}), 107.72 (C_8), 106.31 (C_2), 102.05 (C_5), 101.89 (C_{8b}), 93.47 (C_4), 81.21 (C_5), 78.78 (C_3), 73.96 (C_1), 71.22 (C_4), 70.40 (C_2), 61.48 (C_6), 33.40 ($\text{C}_{2''}$), 31.43 ($\text{C}_{3''}$), 29.34 ($\text{C}_{4''}$), 28.74, ($\text{C}_{5''}$) 24.63, ($\text{C}_{6''}$) 22.23 ($\text{C}_{7''}$), 12.97 ($\text{C}_{8''}$)

สรุปผลการทดลอง

แมงจีเฟอริน สามารถเกิดปฏิกิริยาเอซิลเลชันโดยใช้ octanoyl chloride โดยใช้ Pyridine เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 6a ลักษณะของแข็งหนืดสีเหลืองหนัก 0.041 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 32 % yield จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค ESI-MS $^1\text{HNMR}$, $^{13}\text{CNMR}$, HMQC และ HMBC spectroscopy ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชัน 1 หมู่

5.2.3.7 ปฏิกิริยาอะเซิลเลชันของ แมงจีเฟอริน กับ luaroyl chloride



ละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.25 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม luaroyl chloride 0.06 มล (0.28 mmol) กวนของผสมที่อุณหภูมิห้อง 20 ชั่วโมง ระเหยภายใต้สุญญากาศ และนำ crude ที่ได้มาทำการแยกโดย

วิธี column chromatography ด้วย นำส่วนที่เป็นชั้นสารละลายอินทรีย์ dry ด้วย Na_2SO_4 และแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี isopropanol และ Dichloromethane ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.061 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.23 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม luaroyl chloride 0.06 มล (0.28 mmol) ได้สารละลายสีเหลืองอ่อน กวนของผสมที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศได้ crude มีลักษณะเหนียวน้ำตาลเข้ม และเมื่อนำ crude ที่ได้มาทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl_3 ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.061 กรัม

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 605.2589 (M+H)^+$ ตรงกับค่าคำนวณของ $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{O}_{12}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชัน 1 หมู่ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 42%

IR (CH_3OH , cm^{-1}): 3394 (b), 2922, 1738, 1620, 1466, 1277, 1109, 1081, 750

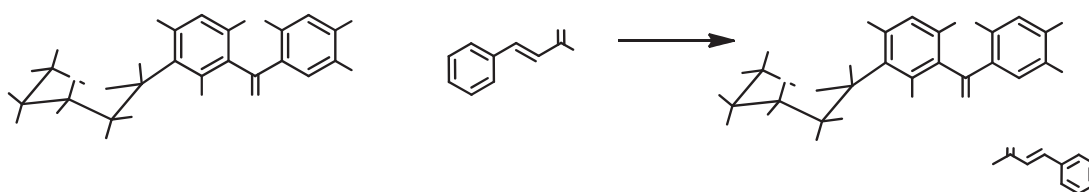
^1H NMR Spectrum (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm): 13.53 (s, 1H, OH), 11.51 (s, 1H, OH), 10.81 (s, 1H, OH), 8.00 (s, 1H, H_8), 7.01 (s, 1H, H_5), 6.42 (s, 1H, H_4), 4.89 (m, 2H, -OH), 4.62 (m, 1H, -OH), 4.6 (d, $J = 10$ Hz, 1H, H_{11}), 4.0 (m, 1H, -OH), 4.12 (m, 1H, H_2), 3.70 (m, 1H, H_{6b}), 3.41 (m, 1H, H_{6a}), 3.2-3.0 (m, 3H, H_3 , H_4 , H_5), 2.62 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{H}_{2''}$), 1.63 (m, 2H, $\text{H}_{3''}$), 1.5-1.0 (m, 16H, $\text{H}_{4''}$, H_5 , H_6 , H_7 , H_8 , H_9 , H_{10} , $\text{H}_{11''}$), 0.82 (q, 3H, $\text{H}_{12''}$)

^{13}C NMR (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm) 179.93 (CO), 171.85 ($\text{C}_{1''}\text{O}$), 165 (C_3), 162.2 (C_1), 157.01 (C_{4a}), 156.71 (C_6), 155.04 (C_{4b}), 137.01 (C_7), 119.3 (C_8), 112.5 (C_{8a}), 108.59 (C_2), 104.04 (C_5), 101.98 (C_{8b}), 99.05 (C_4), 82.11 (C_5), 79.446 (C_3), 73.47 ($\text{C}_{1'}$), 70.67 (C_2), 73.47 (C_4), 62.04 (C_6), 33.62 ($\text{C}_{2''}$), 31.77 ($\text{C}_{3''}$), 29.47 ($\text{C}_{4''}$, $\text{C}_{5''}$), 29.37 (C_6), 29.18 (C_7), 29.16 (C_8), 28.79 (C_9), 24.81 ($\text{C}_{10''}$), 22.56 ($\text{C}_{11''}$), 14.42 ($\text{C}_{12''}$)

สรุปผลการทดลอง

แมงจีเฟอรินสามารถเกิดปฏิกิริยาเอซิลเลชันโดยใช้ luaroyl chloride โดยใช้ Pyridine เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำ crude ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 6b เป็นของแข็งสีเหลืองหนัก 0.061 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 42 % yield จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค ESI-MS $^1\text{HNMR}$, $^{13}\text{CNMR}$, HMQC และ HMBC spectroscopy ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชัน 1 หมู่

5.2.3.8 ปฏิกิริยาเอซิลเลชันของแมงจีเฟอรินของแมงจีเฟอรินกับ cinnamoyl chloride



วิธีทดลอง

ละลายแมงจีเฟอริน 0.200 กรัม (0.47 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม cinnamoyl chloride 100 มิลลิกรัม (0.6 mmol) และกวนที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ระเหยภายใต้สุญญากาศ นำ crude ที่ได้มาทำการแยก

ให้บริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl_3 ได้สารผลิตภัณฑ์ หนัก 0.086 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจีเฟอริน 0.200 กรัม (0.5 mmol) ละลายใน pyridine 6 มล และเติม cinnamoyl chloride 10 มิลลิกรัม (0.06 mmol) และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทุก 3 ชั่วโมง พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม MeOH/ CH_2Cl_2 ได้ของแข็งสีเหลืองอ่อน ได้สารบริสุทธิ์หนัก 0.086 กรัม จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 553.1338$ ($\text{M}+\text{H}^+$) ตรงกับค่าคำนวณของ $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{O}_{12}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอซิลเลชัน 1 หมู่ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 33 % yield พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้นจากผลวิเคราะห์

IR (CH_3OH , cm^{-1}): 3413 (b), 2924, 1714, 1621, 1473, 1296, 1195, 1153, 1079, 822, 766, 572

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 7.90 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, $\text{H}_{3''}$), 7.82 (s, 1H, H_8), 7.68 (m, 2H, $\text{H}_{5''}$, $\text{H}_{9''}$), 7.44 (m, 3H, $\text{H}_{6''}$, $\text{H}_{7''}$, $\text{H}_{8''}$), 6.90 (s, 1H, H_5), 6.79 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, $\text{H}_{2''}$), 6.36 (s, 1H, H_4), 4.75 (m, 1H, H_1), 4.15 (m, 1H, H_2), 3.87 (dd, $J = 1.8, 12.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{6'a}$), 3.78 (m, 1H, $\text{H}_{6'b}$), 3.42 (m, 1H, H_4), 3.47 (m, 3H, H_3 , H_4 , H_5)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) 179.62 (CO), 165.2 ($\text{C}_{1''}\text{O}$), 163.1 (C_3), 161.2 (C_1), 161.97 (C_6), 156.66 (C_{4a}), 155.34 (C_{4b}), 146.98 ($\text{C}_{3''}$), 136.93 (C_7), 131.03 ($\text{C}_{7''}$), 128.73 ($\text{C}_{5''}$, $\text{C}_{9''}$), 128.16 ($\text{C}_{6''}$, $\text{C}_{8''}$), 144.91 ($\text{C}_{4''}$), 118.75 (C_8), 115.56 (C_{8a}), 117.22 ($\text{C}_{2''}$), 108.46 (C_2), 107.78 (C_5), 101.55 (C_{8b}), 93.82 (C_4), 82.2 (C_5), 78.77 (C_3), 73.97 ($\text{C}_{1'}$), 71.2 ($\text{C}_{4'}$), 70.39 ($\text{C}_{2''}$), 61.45 (C_6)

สรุปผลการทดลอง

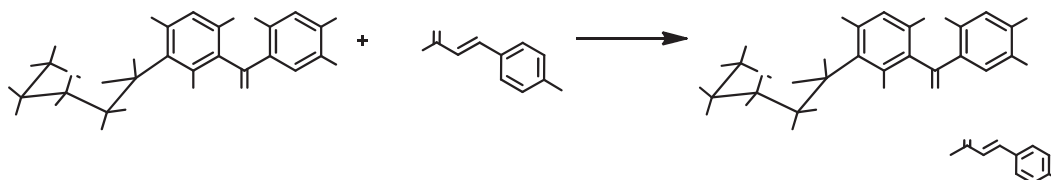
แมงจีเฟอรินเกิดปฏิกิริยากับ cinnamoyl chloride โดยใช้ Pyridine เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง โดยที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นและมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ และพบว่าหากทำการเติม cinnamoyl chloride เพิ่ม และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาจะเกิดปฏิกิริยาที่ควบคุมไม่ได้โดยสังเกตจาก TLC จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหลายจุด ยากต่อการแยกบริสุทธิ์ จึงเลือกใช้สภาวะที่ยังคงเหลือสารตั้งต้น เมื่อนำ crude ที่ได้ไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม MeOH/ CH_2Cl_2 ได้สารผลิตภัณฑ์ 6c เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน หนัก 0.086 กรัม จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 553.1338$ ($\text{M}+\text{H}^+$) ตรงกับค่าคำนวณของ $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{O}_{12}$ ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 33% จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ^1H NMR ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้น เป็น monoacylation

5.2.3.9 ปฏิกิริยาเอซิลเลชันของแมงจีเฟอรินกับ substituted cinnamoyl chloride

จากการประเมินค่า TI แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชัน -OH เป็นกลุ่ม cinnamoyl มีแนวโน้มที่ให้การต้านไวรัสได้ดี และแต่มีผลต่อความเป็นพิษ เนื่องจากหมู่ cinnamoyl มีวงอะโรมาติกอยู่บน

โครงสร้างดังนั้น การเพิ่มหมู่แทนที่ ทั้งหมู่ที่ให้อิเล็กทรอนิกส์ตรอน (electron donating group) และหมู่ที่ดึงอิเล็กทรอนิกส์ตรอน (electron withdrawing group) บนวง รวมถึงตำแหน่งของหมู่ดังกล่าวบนวง น่าจะมีผลต่อความเป็นพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการทดลองนี้จึงได้ทำการปรับปรุงหมู่แทนที่บนวงอะโรมาติกของ cinnamoyl เพื่อดูแนวโน้มของหมู่ฟังก์ชัน

1. การสังเคราะห์อนุพันธ์แมงจีเฟอรินกับ p-Cl cinnamoyl chloride



วิธีทดลอง

ละลายแมงจีเฟอริน 0.100 กรัม (0.23 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม p-Chlorocinnamoyl chloride 0.06 g มิลลิกรัม (0.28 mmol) และกวนที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม ระเหยภายใต้สูญญากาศ นำ crude ที่ได้มาทำการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl_3 ได้สารผลิตภัณฑ์หนัก 0.062 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจีเฟอริน 0.1000 กรัม (0.23 mmol) ละลายใน pyridine 6 มล และเติม p-Chlorocinnamoyl chloride 0.06 มิลลิกรัม (0.28 mmol) และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC โดยปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สูญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง ทำการแยก crude ที่ได้ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl_3 ได้ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.062 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ 609.1976 (M-H) ของ $\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{ClNaO}_{12}$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอเทอร์ฟิเคชันเคชัน 1 หมู่ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 45 % และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสาร ที่เกิดขึ้นจากผลวิเคราะห์จาก

IR (CH_3OH , cm^{-1}): 3437 (b), 1634 (b), 1455, 1216, 1032, 1015, 748, 687

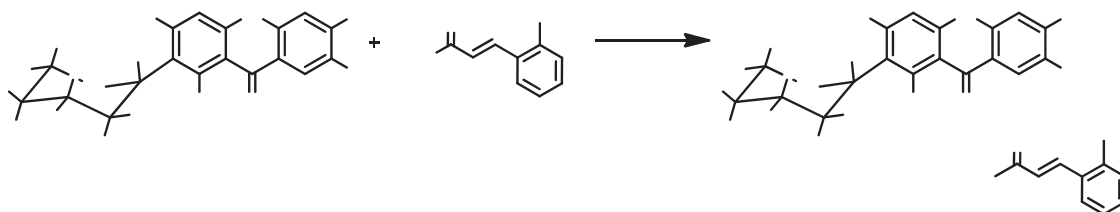
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 13.66 (s, 1H, OH_1), 11.3-10.9 (bs, 2H, OH) 7.88 (d, J = 8Hz, 2H, $\text{H}_{5''}$, $\text{H}_{9''}$), 7.86 (d, J = 16 Hz, 1H, $\text{H}_{3''}$), 7.7 (s, 1H, H_8), 7.54 (d, J = 8 Hz, 2H, $\text{H}_{6''}$, $\text{H}_{8''}$), 6.90 (s, 1H, H_5), 6.94 (d, J = 16 Hz, 1H, $\text{H}_{2''}$), 6.47 (s, 1H, H_4), 4.90 (bs, 2H, OH), 4.6-4.5 (m, 2H OH), 4.59 (2, J = 9.5 Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 4.12 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$), 3.78 (m, 1H, $\text{H}_{6'a}$), 3.45 (m, 1H, $\text{H}_{6'b}$), 3.5 - 3.0 (m, 3H, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{4'}$, $\text{H}_{5'}$)

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 179.25 (CO), 165.2 ($\text{C}_{1''}\text{O}$), 164.95 (C_3), 162.34, (C_1), 161.97 (C_6), 156.67, (C_{4a}), 155.26 (C_{4b}), 145.39 ($\text{C}_{3''}$), 142.1 (C_7), 130.87 (C_5 , C_6), 129.53 ($\text{C}_{6''}$, $\text{C}_{8''}$), 127.00 ($\text{C}_{4''}$), 129.53, (C_7), 118.34 (C_5), 118.31 (C_8), 118.31 ($\text{C}_{2''}$), 108.46 (C_2), , 115.56, (C_8), 101.55 (C_{8b}), 94.18 (C_4), 82.09, (C_5), 79.50, (C_3), 73.47, (C_1), 71.08 (C_4), 70.62, (C_2), 61.97, (C_6)

สรุปผลการทดลอง

แมงจิเฟอรินเกิดปฏิกิริยากับ p-Cl-cinnamoyl chloride โดยใช้ Pyridine เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง โดยที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม MeOH/CH₂Cl₂ ได้สารผลิตภัณฑ์ 6d เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน น้หนัก 0.062 กรัม จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ 609.1976 (M-H) ของ C₂₈H₂₃ClNaO₁₂ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอสเทอร์ฟิเคชันเคชัน 1 หมู่ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 45 % และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสาร ที่เกิดขึ้นจากผลวิเคราะห์จาก NMR spectroscopy ¹HNMR ¹³CNMR, HMQC และ HMBC สามารถยืนยันโครงสร้างของสาร ที่เกิดขึ้น เป็น monoacylation

2. การสังเคราะห์อนุพันธ์แมงจิเฟอริน กับ o-Cl cinnamoyl chloride



วิธีทดลอง

ละลาย แมงจิเฟอริน 0.1000 กรัม (0.23 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม o-Chlorocinnamoyl chloride 0.06 กรัม (0.28 mmol) และกวนที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม ระเหยภายใต้สุญญากาศ นำ crude ที่ได้มาทำการแยก โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl₃ ได้สารผลิตภัณฑ์ น้หนัก 0.069 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS, NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจิเฟอริน 0.1000 กรัม (0.23 mmol) ละลายใน pyridine 6 มล และเติม o-Chlorocinnamoyl chloride 0.06 กรัม (0.28 mmol) และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง ทำการแยก crude ที่ได้โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl₃ ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง น้หนัก 0.069 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ m/z = 609.052 (M+Na) ของ C₂₈H₂₃ClNaO₁₂ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเอสเทอร์ฟิเคชัน 1 หมู่ ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 50

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสาร ที่เกิดขึ้นจากผลวิเคราะห์จาก

IR (CH₃OH, cm⁻¹): 3437(b), 2923, 1737, 1689, 1623, 1469, 1277, 754. 570

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 13.72 (s, 1H, OH₁), 11.3-10.9 (bs, 1H, OH), 8.13 (d, J = 15.6 Hz, 1H, H_{3''}), 7.81 (s, 1H, H₈), 7.61 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H_{6''}), 7.49-7.46 (m, 3H, H_{7''}, H_{8''}, H_{9''}), 7.73 (s, 1H, H₅), 7.04 (d, J = 15.6 Hz, 1H, H_{2''}), 6.44 (s, 1H, H₄), 4.90 (bs, 2H, OH), 4.6-4.5 (m, 2H OH), 4.59 (d, J

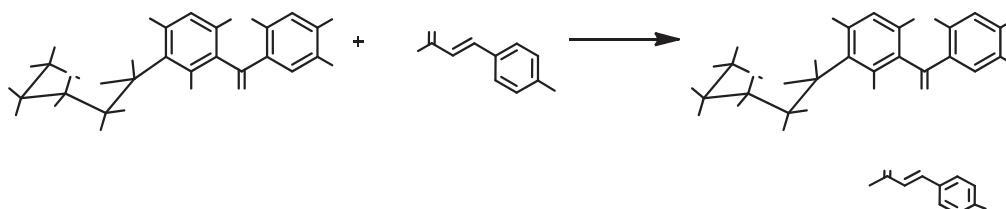
= 8 Hz, 1H, H_{1'}), 4.12 (m, 1H, H_{2'}), 3.81 (m, 1H, H_{2''}), 3.78 (m, 1H, H_{6a'}), 3.45 (m, 1H, H_{6b'}), 3.5 - 3.0 (m, 3H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'})

¹³CNMR (100 MHz, (CD₃)₂SO) 179.32 (CO), 164.92 (C_{1''}O), 164.59 (C₃), 163.12 (C₁), 157.5 (C₆), 156.71 (C_{4a}), 155.31 (C_{4b}), 141.45 (C_{3''}), 137.22 (C₇), 134.46 (C_{5''}), 132.85 (C_{4''}), 131.86 (C_{6''}), 130.58 (C_{7''}), 128.7 (C_{5'}), 128.24 (C_{6'}), 120.45 (C_{2''}), 119.19 (C₈), 111.8 (C_{8a}), 108.55 (C₂), 104.11 (C₅), 101.65 (C_{8b}), 94.98 (C₄), 82.11 (C₅), 73.49 (C_{1'}), 71.48 (C_{3'}), 71.12 (C_{4'}), 70.65 (C_{2'}), 61.98 (C_{6'})

สรุปผลการทดลอง

แมงจีเฟอรินเกิดปฏิกิริยากับ o-Chlorocinnamoyl chloride โดยใช้ Pyridine เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง โดยที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม MeOH/CH₂Cl₂ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ 6e เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน หนัก 0.069 กรัม (50% yield) จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ¹HNMR ¹³CNMR, HMQC และ HMBC สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้น เป็น monoacylation

3. การสังเคราะห์อนุพันธ์ แมงจีเฟอริน กับ p-methoxy cinnamoyl chloride



วิธีทดลอง

ละลาย แมงจีเฟอริน 0.1000 กรัม (0.23 mmol) ใน pyridine 6 มล เติม p-Methoxycinnamoyl chloride 60 มิลลิกรัม (0.06 mmol) และกวนที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม ระเหยภายใต้สุญญากาศ นำ crude ที่ได้มาทำการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี MeOH และ CHCl₃ ได้สารผลิตภัณฑ์ หนัก 0.060 กรัม พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS และ NMR spectroscopy

ผลการทดลอง

เมื่อนำแมงจีเฟอริน 0.1000 กรัม (0.23 mmol) ละลายใน pyridine 6 มล และเติม p-Methoxycinnamoyl chloride 60 มิลลิกรัม (0.28 mmol) และปล่อยให้ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทุก 3 ชั่วโมง พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง ผลการทำ TLC พบจุดของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ เมื่อนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ของแข็งสีเหลือง ทำการแยก crude ที่ได้ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

MeOH และ CHCl_3 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ESI-MS พบพีคของไอออนหลักที่ $m/z = 581.282$ (M-H) ของ $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{O}_{13}$ คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 44 (0.060 กรัม)

IR (CH_3OH , cm^{-1}): 3437(b), 1633, 1513, 1172, 1033, 1014, 749, 612

การพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy สามารถยืนยันโครงสร้างของสารที่เกิดขึ้น

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 13.61 (s, 1H, OH), 11.3-10.9 (bs, 1H, OH), 7.85 (d, $J = 16$ Hz 1H, $\text{H}_{3''}$), 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{6''}$), 7.72 (s, 1H, H_8), 7.10 (s, 1H, H_5), 7.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{6''}$), 6.75 (d, $J = 16$ Hz 1H, $\text{H}_{2''}$), 6.51 (s, 1H, H_4), 4.91 (bs, 2H, OH), 4.6-4.5 (m, 3H OH), 4.59 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 4.12 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.87 (m, 1H, $\text{H}_{6'a}$), 3.73 (m, 1H, $\text{H}_{6'b}$), 3.3 - 3.0 (m, 3H, H_3 , H_4 , H_5)

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 179.25 (CO), 165.2 ($\text{C}_{1''}\text{O}$), 164.98 (C_3), 162.34, ($\text{C}_{1'}$), 161.97 (C_6), 159.89 ($\text{C}_{7''}$), 156.67, (C_{4a}), 155.26 (C_{4b}), 146.79, ($\text{C}_{3''}$), 142.1 (C_7), 131.03 ($\text{C}_{5''}$, $\text{C}_{9''}$), 127.00 ($\text{C}_{4''}$), 120.90, (C_8), 115.56, (C_{8a}), 114.96, ($\text{C}_{8''}$, $\text{C}_{9''}$), 114.58 ($\text{C}_{2''}$), 108.46 (C_2), 104 (C_5), 101.55 (C_{8b}), 94.18 (C_4), 82.1, ($\text{C}_{5'}$), 79.5, (C_3), 73.48, ($\text{C}_{1'}$), 71.11 ($\text{C}_{4'}$), 70.62, ($\text{C}_{2'}$), 61.97, (C_6), 55.86 (OCH₃)

สรุปผลการทดลอง

แมงจิเฟอริน เกิดปฏิกิริยากับ p-Methoxycinnamoyl chloride โดยใช้ Pyridine เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง โดยที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 24 ชั่วโมง เมื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ของผสม $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ได้สารผลิตภัณฑ์ 6f เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อนหนัก 0.060 กรัม (44% yield) จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ^1H NMR ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC สามารถยืนยันโครงสร้างของสาร ที่เกิดขึ้นเป็น monoacylation

5.2.4. การทดสอบคุณสมบัติการละลายของอนุพันธ์ แมงจิเฟอริน

เพื่อศึกษาพฤติกรรมการละลายของอนุพันธ์แมงจิเฟอรินที่ทำการดัดแปลงในรูปแบบต่างๆ และทำการเปรียบเทียบกับสารละลายของแมงจิเฟอริน ซึ่งจะช่วยให้ได้ข้อมูลเพื่อประกอบการนำไปใช้งานด้านเภสัชวิทยา ได้ทำการตรวจสอบสมบัติการละลายของอนุพันธ์ที่เตรียมขึ้นในตัวทำละลายต่างๆ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพด้านการละลายเบื้องต้นของอนุพันธ์แมงจิเฟอรินที่สังเคราะห์ได้

วิธีทดลอง

1. ทดสอบการละลายน้ำ โดยชั่งสารตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม เติมน้ำ ครั้งละ 0.5 มล จนได้สารละลายใส บันทึกปริมาตรของตัวทำละลาย
2. ทดสอบการละลายของอนุพันธ์แมงจิเฟอรินใน paraffin oil โดยชั่งสารตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม เติม paraffin oil 5 มล สังเกตการละลาย
3. ทดสอบการละลาย ของอนุพันธ์ แมงจิเฟอริน โดยชั่งสารตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม เติม ตัวทำละลาย อินทรีย์คือ DMSO, MeOH, CHCl_3 อย่างละ 5 มล สังเกตการละลาย

ผลการทดลอง

ทดสอบการละลายน้ำ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 การละลายน้ำของอนุพันธ์ แมงจิเฟอริน

สารที่ทดสอบ	การละลายน้ำ	มก/มล
แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	-
ไซเตียม แมงจิเฟอริน	ละลาย	2
โปแตสเซียม แมงจิเฟอริน	ละลาย	0.2
แคลเซียม แมงจิเฟอริน	ละลาย	0.5
methoxy แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	
O-hexyl แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	
O-allyl แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	
O-benzyl แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	-
acetyl แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	-
octanoyl แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	
luaroyl แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	
cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	-
p-OMe Cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	-
p-Cl Cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	-
o-Cl Cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	-

ผลการทดสอบการละลายของอนุพันธ์แมงจิเฟอรินใน paraffin oil และตัวทำละลายอินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 การละลายของ อนุพันธ์แมงจิเฟอรินใน oil และตัวทำละลายอินทรีย์

สารที่ทดสอบ	การละลายใน oil	การละลายใน CHCl_3	การละลายใน MeOH	การละลายใน DMSO
แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลายได้เล็กน้อย	ละลาย
ไซเตียม แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลายได้เล็กน้อย	ละลาย
โปแตสเซียม แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลายได้เล็กน้อย	ละลาย
แคลเซียม แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลายได้เล็กน้อย	ละลาย**
O-Methoxy แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย
O-hexyl แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย
O-allyl แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย**
O-benzyl แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย
acetyl แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย	ละลาย**
octanoyl แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย
luaroyl แมงจิเฟอริน	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย	ละลาย
cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	ละลายได้น้อย	ละลาย*	ละลาย
p-OMe cinnamoyl	ไม่ละลาย	ละลายได้น้อย	ละลายได้ดีมาก**	ละลาย**

mangifein				
p-Cl cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	ละลายได้น้อย	ละลายได้ดีมาก**	ละลาย**
o-Cl cinnamoyl mangifein	ไม่ละลาย	ละลายได้น้อย	ละลายได้ดีมาก**	ละลาย**

*ละลายตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ในเมธานอล

**ละลายตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ใน DMSO เป็นเวลานาน

สรุปผลการทดลอง

แนวโน้มการละลายของสารที่ได้ของสารที่ได้จากการจากการดัดแปลงโครงสร้าง พบว่าเกลือโซเดียม, โปแตสเซียม และแคลเซียม แมงจีเฟอริน มีความสามารถในการละลายน้ำที่ดีขึ้น โดยละลายน้ำได้ดีกว่าแมงจีเฟอริน และเกลือที่เตรียมได้สามารถละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วสูงได้เล็กน้อยเช่น MeOH และ DMSO นอกจากนี้เกลือที่สังเคราะห์ได้ไม่ละลายใน oil และละลายได้น้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไปยกเว้น DMSO

การดัดแปลงหมู่ฟังก์ชันฟีนอลบนวงอะโรมาติก โดยอาศัยปฏิกิริยาแอลคิลเลชัน ให้ได้หมู่แอลคอกซี (OR) ที่เป็น (benzyl, $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ และแอลلیل) ให้สารอนุพันธ์ที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายใน MeOH ได้ปานกลาง และละลายใน DMSO ได้ดีมาก ในขณะที่อนุพันธ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเช่น octanoyl, lauroyl, cinnamoyl, p-OMe cinnamoyl, p-Cl cinnamoyl และ o-Cl cinnamoyl มีแนวโน้มในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ protic solvent และตัวทำละลายที่มีขั้วได้ดีขึ้นคือละลายในแอลกอฮอล์และ DMSO ซึ่งมีสาเหตุจากการที่โครงสร้างมีส่วน non polar ของสายคาร์บอนจำนวนมาก และไม่ละลายใน oil สำหรับอนุพันธ์ acetyl ซึ่งหมู่ $-\text{OH}$ บนวงเป็นแอลคอกซีเอซิลหลายตำแหน่งสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วคือ แอลกอฮอล์และคลอโรฟอร์ม นอกจากนี้อนุพันธ์ cinnamoyl จะเกิดการสลายตัวเปลี่ยนกลับไปเป็นแมงจีเฟอรินอย่างช้าๆ ในแอลกอฮอล์ และสารทุกตัวจะค่อยๆ สลายตัวเป็นแมงจีเฟอรินเมื่อตั้งทิ้งไว้ในตัวทำละลายเป็นเวลานาน

5.3 การทดสอบและหาแนวโน้มของฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน antiherpes ของอนุพันธ์ของ แมงจีเฟอริน

เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้ง herpes simplex virus (HSV) ของอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้และหาแนวโน้มการยับยั้ง HSV กับความสามารถในการละลายน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกันของอนุพันธ์เกลือของแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่ถูกดัดแปลงให้มีหมู่ acyl และ alkoxy ที่แตกต่างกัน

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบและหาแนวโน้มฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน antiherpes ของอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้

เชื้อจุลินทรีย์และเซลล์เพาะเลี้ยง

1. Herpes simplex virus type 1 strain F (HSV-1F)
2. Vero cell

อาหาร สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

1. 70% alcohol

2. 96-well plate
3. 24-well plate
4. Crystal violet
5. Minimum Essential Medium (MEM)
6. Trypsin-EDTA
7. 0.05 M Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4
8. Overlay medium
9. เครื่อง Rocking platform
10. CO₂ incubator
11. Micropipette
12. Pipette tip
13. Flask T-25 cm²

5.3.1 การทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างต่อ Vero cell

วิธีการทดลอง

1. นำแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่ต้องการทดสอบมาทำการเจือจางด้วย MEM medium โดย

ช่วงของความเข้มข้นของ Methoxy mangifein *p*-OMe Cinnamoyl mangifein *p*-Cl Cinnamoyl mangifein และ *o*-Cl Cinnamoyl mangifein ที่ทำการทดสอบอยู่ในช่วง $1.0 - 9.77 \times 10^{-4}$ mg/ml ส่วน mangifein, sodium mangifein, potassium mangifein, calcium mangifein, O-allyl mangifein, Acetyl mangifein และ O-Hexyl แมงจีเฟอริน อยู่ในช่วง $2.0 - 1.95 \times 10^{-3}$ mg/ml สำหรับ O-benzyl mangifein octanoyl mangifein และ lauroyl mangifein อยู่ในช่วง $3.0 - 2.93 \times 10^{-4}$ mg/ml

2. เติมน้ำตัวอย่างลงในจานเพาะเลี้ยง 96 หลุม หลุมละ 100 μ l โดยเติมความเจือจางละ 4 หลุม ก่อน

เติม cell suspension ที่มีปริมาณเซลล์ 3×10^5 cells/ml ลงในหลุมที่ต้องการจะทดสอบ หลุมละ 100 μ l และเติม MEM 100 μ l ลงในหลุมควบคุม

3. นำไปบ่มที่ 37 °C ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 3 วัน จนเซลล์เจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียวเต็มผิว พลาสติก

ของทุกหลุม

4. ดูดอาหารในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุมทิ้ง แล้วทำการย้อมสีเซลล์ด้วย 0.1% (w/v) crystal violet ที่

ไว้ประมาณ 20 นาที

5. ตรวจสอบการติดสีของเซลล์ แล้วคำนวณหา CD₅₀

5.3.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ HSV-1

วิธีการทดลอง

1. เพาะเลี้ยง Vero cell ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม เมื่อเซลล์เจริญเต็มพื้นผิว ดูดอาหารเลี้ยง เซลล์

ออกหลุมละ 300 μ l

2. ทำการเจือจางไวรัสให้ได้จำนวนไวรัสประมาณ 50-100 plaque แล้วเติมไวรัสลงไปหลุมละ 100 μ l แล้ว

นำไปป้อนที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่อง rocking platform เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. เติมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ต่ำกว่าค่า CD_{50}) ลงในหลุมที่ทำการทดสอบหลุมละ

200 μ l (ความเข้มข้นละ 4 หลุม) โดยความเข้มข้นของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่ใช้ในการทดสอบแสดงในตารางที่ 3.10 สำหรับหลุมควบคุมเติม medium 200 μ l แทนสารทดสอบ

ตารางที่ 3.10 ช่วงความเข้มข้นของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อ HSV-1

สารทดสอบ	ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (mg/ml)
แมงจีเฟอริน	500-750
โซเดียม แมงจีเฟอริน	500-750
โปแตสเซียม แมงจีเฟอริน	500-750
แคลเซียม แมงจีเฟอริน	50-250
Hexyl แมงจีเฟอริน	50-250
O-allyl แมงจีเฟอริน	50-250
acetyl แมงจีเฟอริน	50-250
o-Cl Cinnamoyl mangifein	30-100
p-Cl Cinnamoyl mangifein	30-100
O-Methoxy แมงจีเฟอริน	25-150
octanoyl แมงจีเฟอริน	20-50
luaroyl แมงจีเฟอริน	20-40
p-OMe Cinnamoyl mangifein	15-150
Cinnamoyl mangifein	5-30
O-benzyl แมงจีเฟอริน	5-20

4. เติม overlay medium หลุมละ 300 μ l ทุกหลุม แล้วนำไปป้อนที่ 37 °C ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 2-3

วัน

5. ดูด medium ในแต่ละหลุมทิ้งไป และทำการย้อมสีเซลล์ที่ติดเชื้อมีด้วย 0.1% (w/v) crystal violet ที่ทิ้งไว้

ประมาณ 20 นาที

6. ตรวจสอบการติดสีของเซลล์ และนับปริมาณ plaque ที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณหาปริมาณไวรัสโดยมีหน่วยเป็น plaque forming unit/ml (PFU/ml)

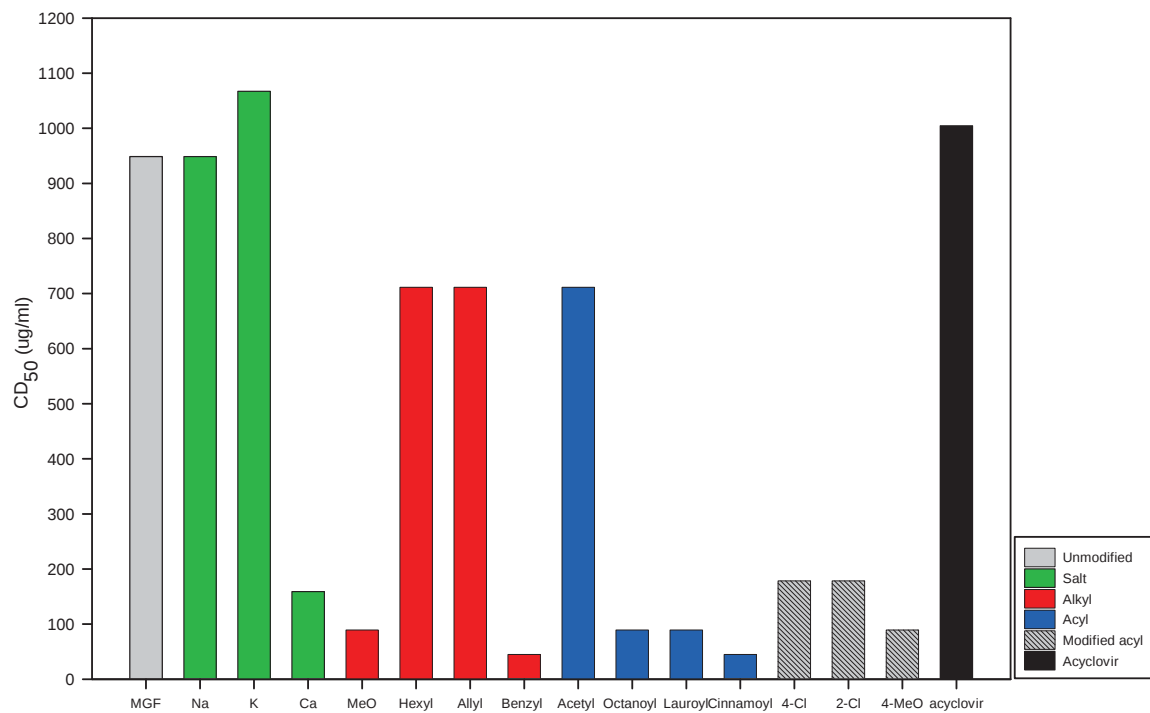
ผลการทดลอง

ผลการยับยั้งเชื้อ HSV-1F หลังเกาะติดกับเซลล์โดยแมงจิเฟอรินและสารอนุพันธ์ดังแสดงในภาพที่ 3.17 ใน

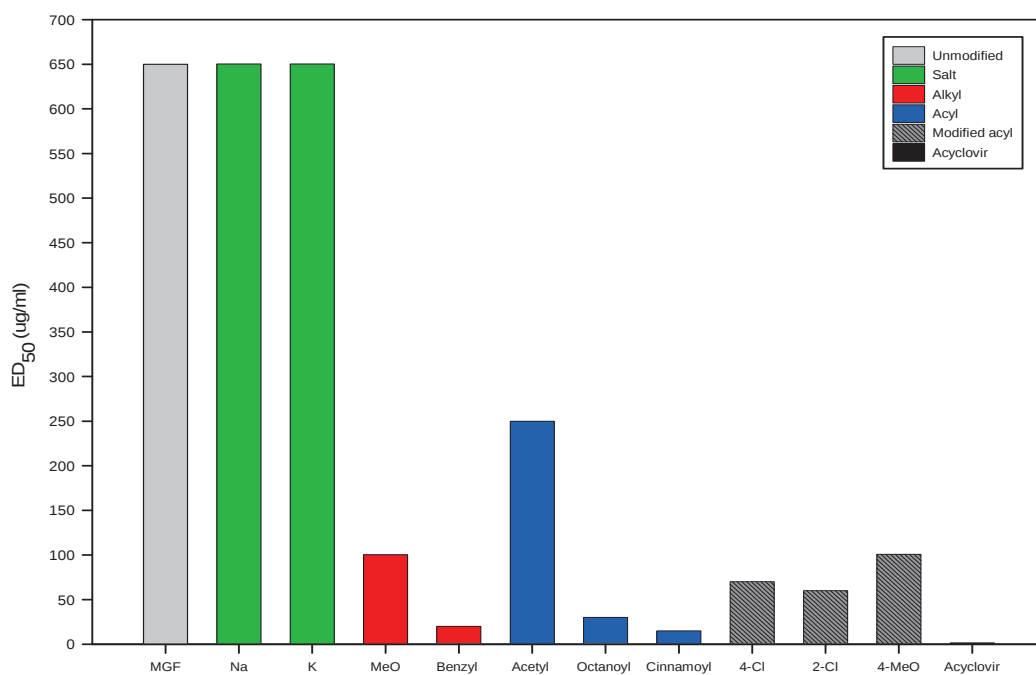
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (Vero cells) เมื่อเปรียบเทียบค่า CD_{50} ของกลุ่มอนุพันธ์เกล็ดของแมงจิเฟอริน พบว่า แคลเซียม แมงจิเฟอริน มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำหน้าที่เป็น host ของไวรัสสูงที่สุด โดยมีความเป็นพิษสูงกว่าแมงจิเฟอรินที่ไม่ได้ทำการดัดแปลงโครงสร้างประมาณ 6 เท่า ในขณะที่โซเดียม แมงจิเฟอริน มีค่า CD_{50} ใกล้เคียงกับแมงจิเฟอริน ส่วนโปแตสเซียม แมงจิเฟอริน มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุดในกลุ่มอนุพันธ์เกล็ด (ดังภาพ 3.15 และตารางที่ 3.11) เมื่อพิจารณาความเป็นพิษของอนุพันธ์แมงจิเฟอรินที่ดัดแปลงให้เป็นหมู่ alkoxy ต่างๆ เช่น methoxy, O-benzyl, O-allyl, และ O-hexyl บนโครงสร้างของแมงจิเฟอริน พบว่า O-benzyl แมงจิเฟอริน มีความเป็นพิษต่อ vero cells สูงที่สุด โดยมีความเป็นพิษสูงกว่าแมงจิเฟอรินที่ไม่ได้ดัดแปลงโครงสร้างถึง 21 เท่า ส่วนอนุพันธ์ของ methoxy แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงสูงกว่าแมงจิเฟอริน ประมาณ 10 เท่า โดยการดัดแปลงโครงสร้างของแมงจิเฟอรินให้มี O-hexyl และ O-allyl อยู่บนโมเลกุลนั้น แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงสูงกว่าแมงจิเฟอรินเพียง 1.3 เท่า จากภาพที่ 3.15 และตารางที่ 3.11 พบว่าในการดัดแปลงแมงจิเฟอรินให้มีหมู่ acyl ต่างๆ เช่น acetyl, octanoyl, lauroyl และ cinnamoyl นั้น การเพิ่ม cinnamoyl บนโครงสร้างของแมงจิเฟอริน ส่งผลต่อความเป็นพิษต่อ vero cells เป็นอย่างมาก โดย cinnamoyl แมงจิเฟอริน มีความเป็นพิษสูงกว่าแมงจิเฟอรินที่ไม่ได้ดัดแปลงโครงสร้างถึง 21 เท่า ซึ่งเท่ากับ benzyl แมงจิเฟอริน ส่วนอนุพันธ์ของ lauroyl และ octanoyl แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงสูงกว่าแมงจิเฟอริน ประมาณ 10 เท่า ในขณะที่ acetyl แมงจิเฟอรินแสดงความเป็นพิษต่อ vero cells สูงกว่าแมงจิเฟอรินเพียง 1.3 เท่า ทั้งนี้เมื่อทำการดัดแปลงโครงสร้างของแมงจิเฟอรินโดยทำการเติมหมู่ chloro และ methoxy เพิ่มเติมบน cinnamoyl แมงจิเฟอริน พบว่าการเติมหมู่ดังกล่าวช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงได้ โดยพบว่า 4-chlorocinnamoyl และ 2-chlorocinnamoyl แมงจิเฟอริน มีค่า CD_{50} อยู่ที่ 178.25 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสูงกว่า แมงจิเฟอริน ที่ไม่ได้ทำการดัดแปลงโครงสร้างประมาณ 5 เท่า ส่วน methoxy cinnamoyl แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงสูงกว่าแมงจิเฟอริน ประมาณ 10 เท่า ดังแสดงในภาพ 3.15 และตารางที่ 3.11

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 strain F ของ แมงจิเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินที่

สังเคราะห์ได้หลังไวรัสเกาะติดเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี plaque reduction assay โดยความเข้มข้นสูงสุดของแมงจิเฟอรินและอนุพันธ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบจะต้องมีความเป็นพิษต่อ Vero cells ต่ำกว่าค่า CD_{50} จากผลการทดลองในตารางที่ 3.11 และภาพ 3.16 พบว่าค่า ED_{50} ของแมงจิเฟอรินมีค่าเท่ากับ 650 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินที่สังเคราะห์ได้โดยทำการดัดแปลงอยู่ในรูปของอนุพันธ์เกล็ดนั้นมีค่า ED_{50} ตั้งแต่ 15-650 $\mu\text{g/ml}$ โดยพบว่าอนุพันธ์เกล็ดของโปแตสเซียมและโซเดียมแมงจิเฟอริน แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 strain F ใกล้เคียงกับแมงจิเฟอริน ดังภาพ 3.16 ในขณะที่แคลเซียมแมงจิเฟอริน มีความสามารถในการ

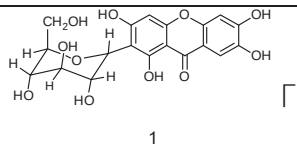
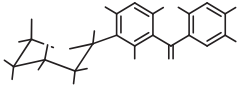
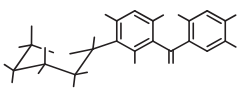
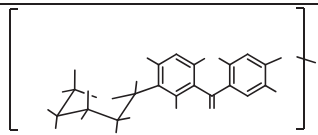
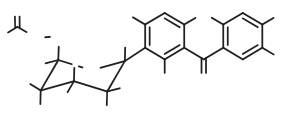
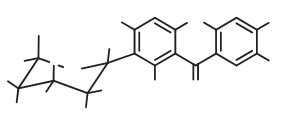
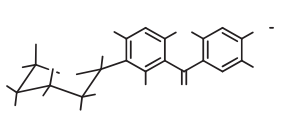
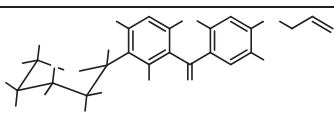
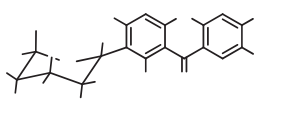
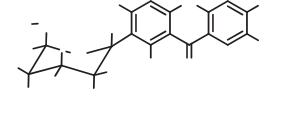
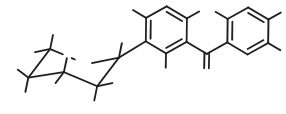


ภาพ 3.15 ค่า CD₅₀ ของแมงจีเฟอริน อนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่ดัดแปลงให้มีหมู่ต่างๆ และ acyclovir ต่อ vero cells

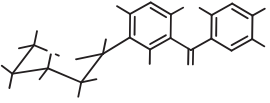
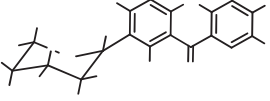
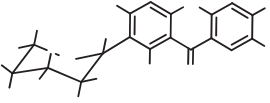
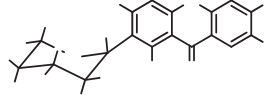
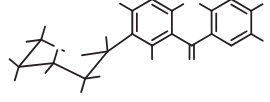


ภาพ 3.16 ค่า ED₅₀ ของแมงจีเฟอริน อนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่ดัดแปลงให้มีหมู่ต่างๆ และ acyclovir ต่อ HSV-1 strain F

ตารางที่ 3.11 แสดงความเป็นพิษและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 strain F ของ แมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของ แมงจีเฟอริน หลังไวรัสเกาะติดเซลล์

สารตัวอย่าง	สูตรโครงสร้าง	CD ₅₀ (µg/ml)	ED ₅₀ * (µg/ml)	TI (CD ₅₀ /ED ₅₀)
แมงจีเฟอริน	 1	948.70	650.03	1.46
ไซเตียม แมงจีเฟอริน		948.70	650.25	1.46
โพลีแซคคาไรด์ แมงจีเฟอริน		1,066.97	650.36	1.64
แคลเซียม แมงจีเฟอริน		158.88	ND**	ND
โมโนเอสเทอร์ แมงจีเฟอริน ***		ND	ND	ND
Methoxy แมงจีเฟอริน		89.13	100.29	0.89
O-hexyl แมงจีเฟอริน		711.31	ND	ND
O-allyl แมงจีเฟอริน		711.31	ND	ND
Benzyl แมงจีเฟอริน		44.77	20.00	2.24
Acetyl แมงจีเฟอริน		711.31	250.00	2.85
Octanoyl แมงจีเฟอริน	 6a R = C(O)C ₇ H ₁₅	89.34	30.00	2.98

ตารางที่ 3.11 (ต่อ) แสดงความเป็นพิษและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 strain F ของ แมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของ แมงจีเฟอริน หลังไวรัสเกาะติดเซลล์

สารตัวอย่าง	สูตรโครงสร้าง	CD ₅₀ (µg/ml)	ED ₅₀ * (µg/ml)	TI (CD ₅₀ /ED ₅₀)
Lauroyl แมนจิเฟอริน	 6b R = C(O)C ₁₁ H ₂₃	89.34	ND	ND
Cinnamoyl แมนจิเฟอริน	 6c R = C(O)CH=CHC ₆ H ₅	44.77	15.00	2.99
4-Chlorocinnamoyl แมนจิเฟอริน	 6d R = C(O)CH=CHC ₆ H ₄ (p-Cl)	178.25	70.00	2.55
2-Chlorocinnamoyl แมนจิเฟอริน	 6e R = C(O)CH=CHC ₆ H ₄ (o-Cl)	178.25	60.00	2.97
4-methoxycinnamoyl แมนจิเฟอริน	 6f R = C(O)CH=CHC ₆ H ₄ (p-OMe)	89.13	100.68	0.88
acyclovir		1004.69	1.50	669.79

* ค่า ED₅₀ คำนวณจากกราฟระหว่างค่าเฉลี่ย % การยับยั้งการเจริญของ HSV-1F และความเข้มข้นของสารทดสอบ (จาก 2 การทดลอง),

** ND: ไม่สามารถคำนวณได้เนื่องจาก % การยับยั้งของ HSV-1F ที่ได้จากการทดลองมีค่าไม่ถึง 50%

*** สารละลายตัวอย่างรวดเร็วไม่สามารถทดสอบได้

┌

┌

(ก) แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 750 µg/ml

┌

(ข) โซเดียม แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 750 µg/ml

┌

(ค) โปแตสเซียม แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 750 µg/ml

(ง) แคลเซียม แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml

ภาพที่ 3.17 การยับยั้งเชื้อ HSV-1F หลังเกาะติดกับเซลล์โดยสารของ แมนจิเฟอริน (ก) อนุพันธ์ของ แมนจิเฟอริน (ข-ง) และ acyclovir (ด) เปรียบเทียบกับไวรัสควบคุม (ต)

┌

┌

(จ) Methyl แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 150 µg/ml

┌

(ฉ) O-allyl แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml

┌

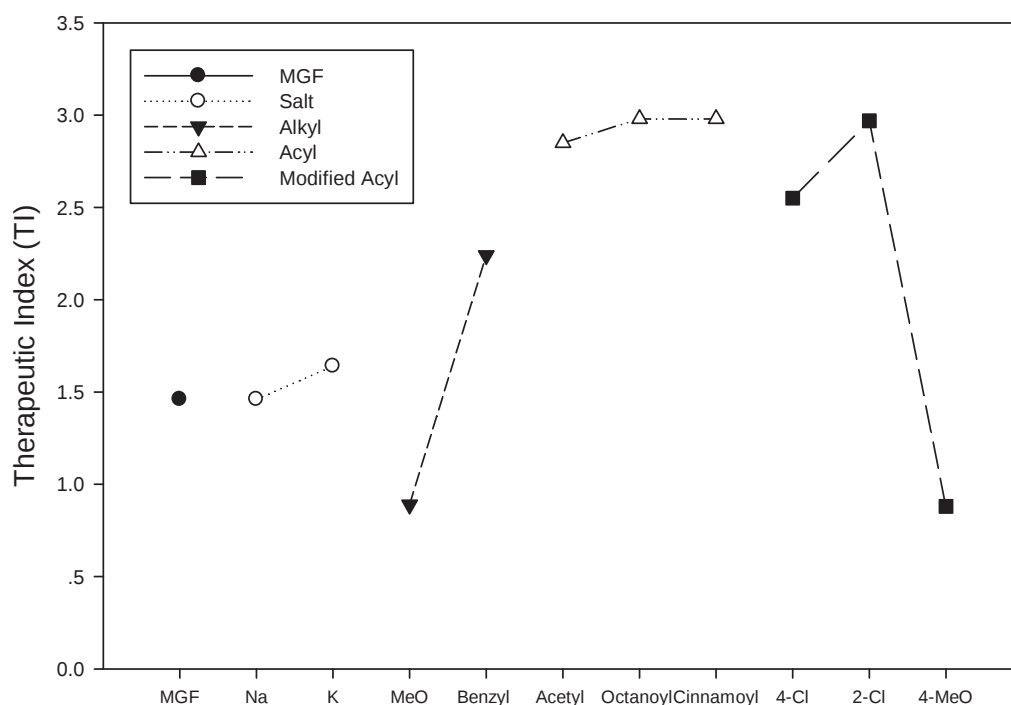
(ช) Benzyl แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml

(ซ) O-hexyl แมนจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 250

	µg/ml
┐	┐
(ณ) Acetyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml	(ญ) Cinnamoyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 30 µg/ml
┐	┐
(ณ) Octanoyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml	(ญ) Lauroyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 40 µg/ml
┐	┐
(ฐ) 2-Chlorocinnamoyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml	(ฑ) 4-Chlorocinnamoyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml
┐	┐
(ฒ) 4-methoxycinnamoyl แลงจีเฟอริน ที่ความเข้มข้น 150 µg/ml	(ด) Acyclovir ที่ความเข้มข้น 1.5 µg/ml
┐	
(ต) ไวรัสควบคุม	

ภาพที่ 3.17 (ต่อ) การยับยั้งเชื้อ HSV-1F หลังเกาะติดกับเซลล์โดยสารของ แลงจีเฟอริน (ณ) อนุพันธ์ของ แลงจีเฟอริน (ช-ฒ) และ acyclovir (ด) เปรียบเทียบกับไวรัสควบคุม (ต)

ยับยั้ง HSV-1 strain F น้อยกว่าแลงจีเฟอริน (ตารางที่ 3.11) เมื่อพิจารณาผลของฤทธิ์ในการยับยั้ง HSV-1 ในกลุ่มของอนุพันธ์ของแลงจีเฟอรินที่ดัดแปลงให้มีหมู่ alkyl พบว่าค่า ED_{50} ของ O-benzyl แลงจีเฟอรินมีค่าต่ำสุด โดยมีค่าเท่ากับ 20 µg/ml ส่วน methoxy แลงจีเฟอรินมีค่า ED_{50} เท่ากับ 100.29 µg/ml ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 ที่ดีขึ้น ทั้งนี้พบว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบของ O-hexyl และ O-allyl แลงจีเฟอรินนั้นไม่สามารถยับยั้งเชื้อ HSV-1 ได้ต่ำกว่า 50% (ตารางที่ 3.11) เมื่อพิจารณาค่า ED_{50} ของอนุพันธ์แลงจีเฟอรินที่มีการดัดแปลงด้วยหมู่ acyl พบว่าการดัดแปลงแลงจีเฟอรินโดยการเพิ่ม cinnamoyl นั้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 strain F ได้โดยค่า ED_{50} ของ cinnamoyl แลงจีเฟอรินมีค่าต่ำกว่าแลงจีเฟอรินถึง 43 เท่า ซึ่งต่ำที่สุดในกลุ่มของอนุพันธ์แลงจีเฟอรินทุกอนุพันธ์ที่ทำการทดสอบ ส่วน octanoyl แลงจีเฟอรินมีค่า ED_{50} ต่ำกว่าแลงจีเฟอริน 22 เท่า สำหรับ acetyl แลงจีเฟอรินนั้นมีค่า ED_{50} เท่ากับ 250 µg/ml ซึ่งต่ำกว่าแลงจีเฟอริน 2.6 เท่า (ภาพที่ 3.16 และตารางที่ 3.11) จากผลของ plaque reduction (ภาพที่ 3.17) พบว่าการดัดแปลงโครงสร้างของแลงจีเฟอรินโดยการเติม lauroyl นั้นไม่สามารถเพิ่มความสามารถในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 ได้ เมื่อทำการดัดแปลง cinnamoyl แลงจีเฟอริน โดยทำการเพิ่มหมู่ chloro และ methoxy พบว่า o-Cl-cinnamoyl แลงจีเฟอริน มีค่า ED_{50} ที่สูงกว่า cinnamoyl แลงจีเฟอริน ประมาณ 4 เท่า แต่ p-Cl-cinnamoyl แลงจีเฟอริน และ p-OMe-cinnamoyl แลงจีเฟอริน มีค่า ED_{50} ที่สูงกว่าแลงจีเฟอรินประมาณ 4.6 และ 6.6 เท่า ตามลำดับ



ภาพ 3.18 ค่า TI ของแมงจีเฟอร์ริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอร์รินที่ดัดแปลงให้มีหมู่ต่างๆ

เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการต้านไวรัสของอนุพันธ์แมงจีเฟอร์ริน ด้วยค่า therapeutic index (TI) โดยคำนวณจากค่า CD_{50} และ ED_{50} ซึ่งเป็นค่าที่สามารถใช้บ่งบอกประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของอนุพันธ์ของแมงจีเฟอร์รินในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส HSV-1 strain F จากตารางที่ 3.11 พบว่าค่า TI ของแมงจีเฟอร์รินมีค่าเท่ากับ 1.46 ส่วนอนุพันธ์ของแมงจีเฟอร์ริน มีค่า TI ตั้งแต่ 0.885-2.985 เมื่อพิจารณาจากภาพ 3.18 พบว่าในกลุ่มของอนุพันธ์เกลือมีเพียงโปแตสเซียม แมงจีเฟอร์ริน ที่มีค่า TI สูงกว่าแมงจีเฟอร์ริน ส่วน O-benzyl แมงจีเฟอร์รินเป็นอนุพันธ์เพียงอนุพันธ์เดียวในกลุ่ม alkoxy ที่แสดงค่า TI ที่สูงกว่าแมงจีเฟอร์ริน โดยมีค่าสูงกว่าประมาณ 1.5 เท่า ทั้งนี้เมื่อพิจารณาค่า TI ของอนุพันธ์ที่ดัดแปลงด้วยหมู่ acyl พบว่าการดัดแปลงแมงจีเฟอร์รินให้มีหมู่ cinnamoyl นั้นสามารถเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 strain F ได้ดีที่สุด โดยค่า TI ที่ได้มีค่าเท่ากับ 2.97 ซึ่งสูงกว่าค่า TI ของแมงจีเฟอร์รินถึง 2 เท่า ส่วน octanoyl แมงจีเฟอร์ริน มีค่า TI สูงรองลงมาซึ่งเท่ากับ 2.98 (ตารางที่ 3.11) นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มหมู่ chloro ลงไปบนอนุพันธ์ของ cinnamoyl ในตำแหน่งที่ต่างกันจะแสดงความจำเพาะในการยับยั้งได้ต่างกัน โดย o-Cl-cinnamoyl แมงจีเฟอร์ริน มีค่า TI เท่ากับ 2.97 แต่ p-Cl-cinnamoyl แมงจีเฟอร์ริน มีค่า TI เพียง 2.55 และยังพบว่า p-OMe-cinnamoyl แมงจีเฟอร์รินให้ค่า TI ที่ลดลงจาก cinnamoyl แมงจีเฟอร์รินถึง 3.8 เท่า

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบและหาแนวโน้มของฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F ของอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 14 อนุพันธ์ เมื่อพิจารณาค่า TI ของแมงจีเฟอรินเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ที่ดัดแปลงแล้ว พบว่าการดัดแปลงโครงสร้างให้มีอนุพันธ์เกลืออยู่ในโครงสร้างของแมงจีเฟอรินไม่ได้เพิ่มความสามารถในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F อย่างมีนัยสำคัญ โดยอนุพันธ์เกลือที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสได้ดีกว่าแมงจีเฟอรินนั้น คือ โปแตสเซียม แมงจีเฟอริน ในขณะที่การดัดแปลงโครงสร้างของอนุพันธ์แมงจีเฟอรินให้มีหมู่ acyl ที่แตกต่างกันสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสได้สูงกว่าอนุพันธ์เกลือ โดย cinamoyl แมงจีเฟอริน และ octanoyl แมงจีเฟอรินนั้นมีค่า TI ที่สูงที่สุด ส่วน lauroyl แมงจีเฟอริน นั้นพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F น้อยที่สุดในกลุ่มนี้ ในขณะที่การดัดแปลงแมงจีเฟอรินด้วยหมู่ alkoxy โดยเพิ่ม methoxy, O-allyl และ O-hexyl ให้กับแมงจีเฟอรินนั้นจะลดความสามารถในการยับยั้ง HSV-1 strain F ยกเว้นในกรณีของอนุพันธ์ O-benzyl การเติมหมู่ benzyl 2 หมู่เข้าไปที่โมเลกุลของแมงจีเฟอริน จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 strain F ได้ เมื่อพิจารณาการดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอรินโดยการเพิ่ม chloro เติมบนโมเลกุลของ cinnamoyl แมงจีเฟอรินพบว่า การดัดแปลงโครงสร้างของอนุพันธ์แมงจีเฟอริน โดย chloro ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 strain F ได้ แม้ว่าการเติมหมู่ chloro เข้าไปที่หมู่อะโรมาติกของ cinnamoyl จะช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง แต่ค่า ED_{50} ในการยับยั้ง HSV-1 ก็ลดต่ำลงด้วยเช่นกัน ส่วนการเพิ่มหมู่ methoxy ที่หมู่อะโรมาติกของ cinnamoyl กลับลดความสามารถในการยับยั้ง HSV-1 ให้ต่ำลงกว่ากรณีของแมงจีเฟอริน

จากแนวโน้มของฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน antiherpes ของอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้ พบว่าการเพิ่มหมู่ acyl หรือ alkoxy บนโครงสร้างของแมงจีเฟอริน มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์เพาะเลี้ยง และความสามารถในการยับยั้งไวรัส HSV-1 มากกว่าอนุพันธ์เกลือโดยพบว่า การดัดแปลงโครงสร้างของอนุพันธ์แมงจีเฟอริน โดยอาศัยปฏิกิริยาแอลคิลเลชัน เปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์แอลคอกไซด์ พบว่าเมื่อจำนวน carbon ของหมู่ alkyl มากขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัส HSV-1 ลดลงยกเว้นกรณีของ benzyl แมงจีเฟอริน ส่วนการ เปลี่ยนให้เป็นหมู่เอสเตอร์โดยอาศัยปฏิกิริยาเอซิลเลชันเพิ่มหมู่ acyl บนโครงสร้างของแมงจีเฟอริน พบว่า cinnamoyl แมงจีเฟอริน เป็นอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในบรรดาอนุพันธ์เอซิลที่เป็นสายไฮโดรคาร์บอนยาวที่สังเคราะห์ได้อื่นๆ อาจจะเป็นเพราะการเพิ่มจำนวนของ carbon อยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จึงส่งผลให้อนุพันธ์ดังกล่าวสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ที่ติดเชื้อได้ดีกว่าอนุพันธ์อื่นๆ เนื่องจากไวรัส HSV-1 มี envelope ที่เป็นชั้นไขมันห่อหุ้ม 16 ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV จะลดลงอย่างมาก เมื่อมีการเติมหมู่ electron releasing group เช่น OMe บนวงอะโรมาติกของ cinnamoyl ที่ตำแหน่ง para ส่วนการเติมหมู่ electron withdrawing group เช่น Cl บนวงอะโรมาติกของ cinnamoyl แมงจีเฟอริน ที่ตำแหน่ง para ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 ลดลงเช่นกันเมื่อเทียบกับ cinnamoyl แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 มีผลลดน้อยกว่า เมื่อเทียบกับการเติมหมู่ OMe ที่ตำแหน่ง para และเมื่อเติมหมู่ electron withdrawing group เช่น Cl บนวงอะโรมาติกของ cinnamoyl แมงจีเฟอรินที่ตำแหน่ง ortho พบว่าส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 ลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ cinnamoyl และ p-Cl cinnamoyl แมงจีเฟอริน ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F จะขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของชนิดของหมู่และจำนวนของ carbon ที่ทำการดัดแปลง รวมไปถึงตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงอะโรมาติกของหมู่เอซิลประเภทอะโรมาติก

5.4 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase II ของแมงจิเฟอร์ และอนุพันธ์แมงจิเฟอร์ที่สังเคราะห์ได้

Herpes simplex viruses หรือ HSV มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายตรงเกลียวคู่ (linear double-stranded DNA) มีความยาวตั้งแต่ 120-230 Kbp HSV จะอาศัยเอนไซม์หลายชนิดจากเซลล์เจ้าบ้าน (host) ในการจำลองตนเอง (replication) ได้แก่ topoisomerase (topo) I และ II, DNA ligase I และ DNA polymerase-primase ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่ม topoisomerase I และ II เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการพัฒนายาต้าน HSV ที่ดื้อต่อยา acyclovir เอนไซม์ topoisomerase ทำหน้าที่คลายเกลียว (unwinding) และเชื่อมต่อ (re-ligation) สายคู่ของดีเอ็นเอในกระบวนการจำลองตนเอง รวมถึงการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) และกระบวนการถอดรหัส (transcription) ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ topoisomerase จึงทำให้ไวรัสไม่สามารถสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ ซึ่งทำให้กระบวนการถอดรหัสและการแปลรหัสของไวรัสจะถูกยับยั้งในที่สุด ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ในการต้านการทำงานของเอนไซม์ human Topoisomerase II α ของแมงจิเฟอร์และอนุพันธ์ของแมงจิเฟอร์ที่สังเคราะห์ได้

อุปกรณ์และสารเคมี

- สารเคมี

1. Eukaryotic Topoisomerase II Drug Screening Kit (บริษัท TopoGEN, Inc, USA)
2. Human Topoisomerase II α (Sigma aldrich, USA)
3. Agarose
4. Ethidium bromide
5. Tris-base
6. Boric acid
7. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
8. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
9. Protinase K
10. Linear polyacrylamide
11. เอทานอล
12. Chloroform
13. Isoamyl alcohol
14. 3 M Sodium acetate buffer

- อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Agarose gel electrophoresis apparatus
2. Power supply
3. Microcentrifuge
4. Microcentrifuge tube

5. Micropipettes
6. Yellow tips
7. Blue tips
8. UV transilluminator และ Image analyzer
9. Thermal dry bath

วิธีการทดลอง

1. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase II ของ แมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแอมจีเฟอรินที่สังเคราะห์

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ human Topoisomerase II α ของ แมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II α นั้นได้ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Eukaryotic Topoisomerase II Drug Screening ในการทดลอง ซึ่งชุดน้ำยาสำเร็จรูปมีองค์ประกอบดังตารางที่ 3.12

ตารางที่ 3.12 องค์ประกอบของน้ำยาสำเร็จรูป Eukaryotic Topoisomerase II Drug Screening

สารเคมี	ความเข้มข้นหรือปริมาตรสารเคมี
Supercoiled DNA [pHOT1]	25 μ g
Linear pHOT1 DNA	25 μ g
10X Topoisomerase II assay buffer	500 μ l
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	10% (w/v)
10X Gel loading buffer	200 μ l
Etoposide (positive control)	100 μ l

ในปฏิบัติการการยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II α ของแอมจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแอมจีเฟอริน ปริมาตรปฏิกริยารวม 20 μ l ประกอบด้วย

ตารางที่ 3.13 ปฏิกริยาการยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II α ปริมาตรรวม 20 μ l

สารเคมี	ปริมาตร (μ l)
10X Topoisomerase II assay buffer	2
Supercoiled pHOT1 DNA	1
Purified human topoisomerase II α (4-6 Units)	2
1 mM แมงจีเฟอริน หรืออนุพันธ์ที่ต้องการทดสอบ หรือสำหรับ positive control ให้ใช้ etoposide (VP16)	2
H ₂ O sterile	13

เมื่อปิเปตสารละลายดังตารางที่ 3.13 ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml แล้วผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันโดยการเคาะหลอดเบาๆ จากนั้นนำสารละลายไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15-30

นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2 μ l ของสารละลาย SDS (10% w/v) และสารละลาย Proteinase K ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 μ g/ml แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 37°C ต่อมา 15 นาที จากนั้นทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าลงไปผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที แล้วจึงเปิดสารละลายส่วนใสด้านบนลงในหลอด microcentrifuge ใหม่ จากนั้นผสม 6X loading dye กับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ และวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II α ด้วย 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis

2. เทคนิค agarose gel electrophoresis

วิธีเตรียมสาร

1. 50X Tris- acetate (TAE) Buffer (Concentrate stock solution)

ละลาย Tris-base 242 g ในน้ำ deionized เติม glacial acetic acid ปริมาตร 57.1 ml และ 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 100 ml (โดยซึ่ง EDTA 18.61 กรัม ละลายในน้ำ deionized ปรับ pH เป็น 8.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml) แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เมื่อต้องการใช้งานให้เจือจาง 50X TAE buffer ลงเหลือ 1 X

2. Loading buffer (6X Buffer)

ผสม Bromophenol blue 0.025 g และ Glycerol ปริมาตร 3 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C (ปริมาณที่ใช้จะเป็น 1/6 ของปริมาตรรวมของสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย)

3. Ethidium bromide (ความเข้มข้น 2.5 μ g/ml)

Ethidium bromide (Stock solution ความเข้มข้น 10 mg/ml) ปริมาตร 250 μ l ปรับปริมาตรเป็น 1 L ด้วย 1X TAE Buffer

ในการทำเตรียม 0.8% (w/v) agarose gel ทำได้โดยซึ่งผง agarose 0.8 g ละลายใน 1X TAE buffer ปริมาตร 100 ml นำไปต้มให้เดือด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง และเติม Ethidium bromide ลงไปให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.5 μ g/ml แล้วนำมาเทลงในถาดของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสขณะอุ่น โดยให้เจลมีความหนาประมาณ 0.8 cm นำหัวเสียบ (comb) มาเสียบไว้ (พยายามอย่าให้มีฟองอากาศบนเจลและระหว่างหัวเสียบ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวแล้วดึงหัวเสียบออก นำไปวางบน chamber ของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วเท 1X TAE Buffer ลงไปให้ท่วมเจล)

ผสม Loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ และสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด แล้วนำไปหยอดลงในช่องของ agarose gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 45 โวลต์ เมื่อเห็นสีของ Bromophenol blue เคลื่อนที่ไปประมาณ 2/3 ของความยาวเจล จึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจลที่ได้มาส่องดูด้วย UV transilluminator แล้วถ่ายภาพเจลเพื่อบันทึกผลการทดลอง

ผลการทดลอง

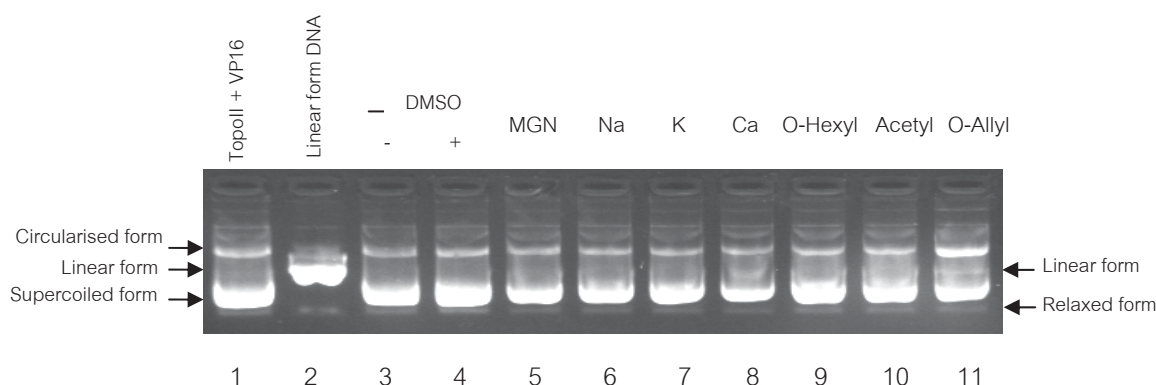
การยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α ของ แมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของ แมงจีเฟอริน

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α ใน agarose gel electrophoresis โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Eukaryotic Topoisomerase II Drug Screening สามารถทดสอบการยับยั้ง human topoisomerase II α โดยสารที่มีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งจะกระตุ้นการเกิด cleavable

complexes ของ human topoisomerase II α จากดีเอ็นเอสายเกลียวคู่ทรงกลมของ pHOT1 ให้อยู่ในรูปร่างเส้นตรง (linear form) และรูปร่างทรงกลมปลายเปิด (nick open circular form) โดย solvent control ของการทดลองนี้ คือ DMSO ซึ่งใช้ในการละลายแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 3.19

จากภาพที่ 3.19 lane ที่ 4 พบดีเอ็นเอรูปร่างคลายเกลียว (relaxed form) และแถบดีเอ็นเอรูปร่างเกลียว (supercoiled form) ซึ่งการเกิดลักษณะของดีเอ็นเอรูปร่างคลายเกลียว แสดงให้เห็นว่า DMSO ไม่ได้ยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α แต่เมื่อเติม etoposide หรือ VP16 ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α โดยใช้เป็นกลุ่มควบคุมชนิดให้ผลบวก (positive control) (ภาพที่ 3.19 lane ที่ 1) พบว่ามีแถบของดีเอ็นเอรูปร่างเส้นตรง (linear form) เกิดขึ้นซึ่งอยู่ระหว่างดีเอ็นเอรูปร่างเกลียวและทรงกลมปลายเปิด (circularised form)

เมื่อทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้ง human topoisomerase II α ของแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน ซึ่งได้แก่ Na, K, Ca, O-Hexyl, Acetyl และ O-Allyl แมงจีเฟอริน ที่มีความเข้มข้นสูงสุด 100 μM จากภาพที่ 3.19 lane ที่ 5-11 พบแถบดีเอ็นเอรูปร่างเส้นตรง (ดังลูกศรชี้) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α โดยที่ lane 8 และ 11 จะสังเกตแถบดีเอ็นเอรูปร่างเส้นตรงได้ชัดเจนที่สุด



ภาพที่ 3.19 Agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pHOT1 ในการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II ของแมงจีเฟอริน (lane 5) และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน ได้แก่ Na (lane 6), K (lane 7), Ca (lane 8), O-Hexyl (lane 9), Acetyl (lane 10) และ O-Allyl (lane 11) โดยใช้ etoposide (หรือ VP16) เป็น positive control (lane 1)

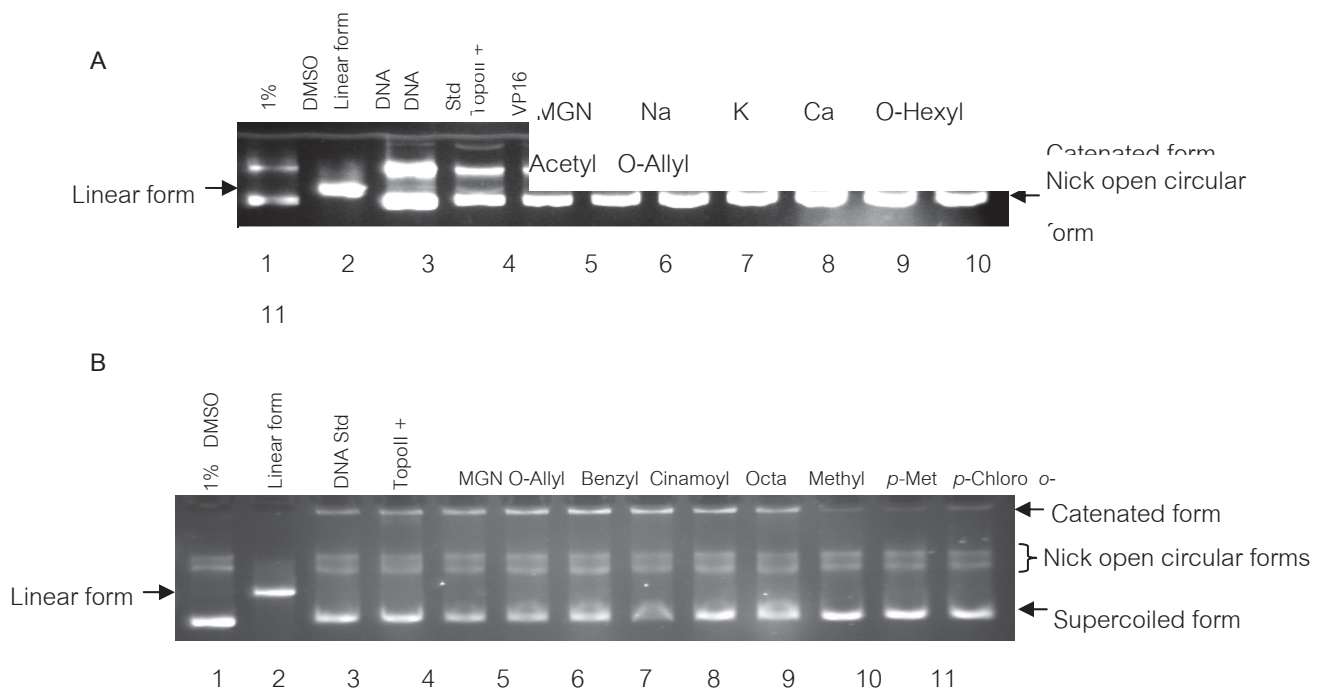
เพื่อยืนยันผลการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α ของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์แมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ได้ จึงทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวกับพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ในการคลายเกลียวของดีเอ็นเอจากรูป catenated เป็น decatenated (ภาพที่ 3.20) เมื่อสารทดสอบยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α จะทำให้ดีเอ็นเออยู่ในรูป catenated จำนวนมาก ซึ่งเมื่อทำการ

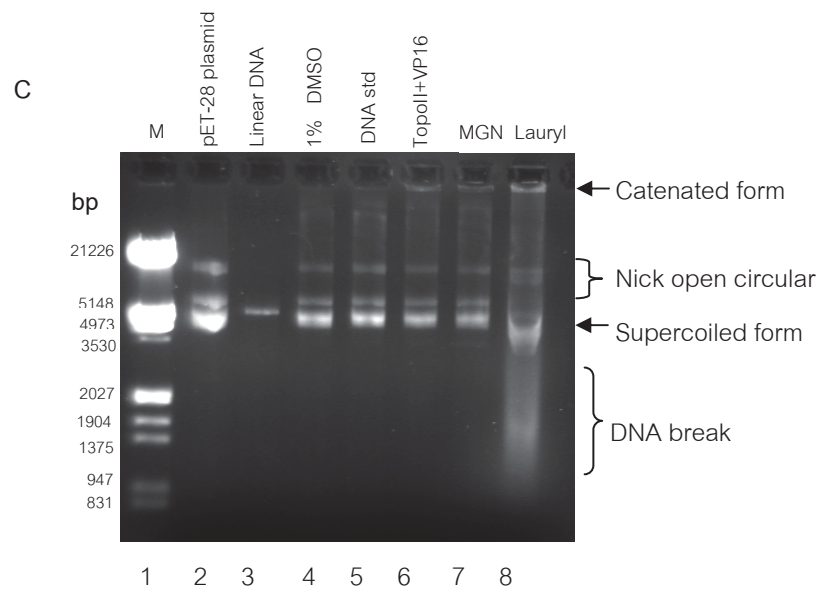
วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากรูปร่าง catenated จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอแบบอื่น

┐

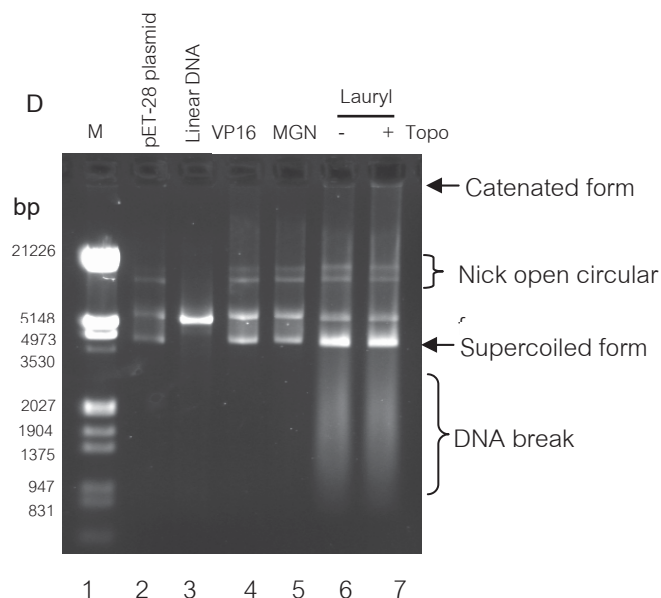
ภาพที่ 3.20 การทำงานของ topoisomerase II ในการคลายเกลียวของพลาสมิดดีเอ็นเอจากรูปร่าง catenated เป็น decatenated DNA

การศึกษาการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α ของแมงจิเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินบน agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 3.21) พบว่า DMSO ซึ่งเป็นใช้เป็นตัวทำละลายไม่มียับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α (ดังภาพที่ 3.21 A และ 3.21 B lane 1) และเมื่อใช้ VP16 ซึ่งเป็นกลุ่มควมคุมชนิดให้ผลบวก พบว่า VP16 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ human topoisomerase II α โดยพลาสมิดดีเอ็นเอ pET28a ไม่สามารถเปลี่ยนรูปร่างจาก catenated เป็น decatenated ได้ (ภาพที่ 3.21 A และ 3.21 B lane 4) และเมื่อทดสอบการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α โดยใช้แมงจิเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินทั้ง 14 ชนิด ได้แก่ Na, K, Ca, O-Hexyl, Acetyl, O-Allyl, Benzyl, Cinnamoyl, Octanoyl, OMe, *p*-OMe-cinnamoyl, *p*-Cl-cinnamoyl และ *o*-Cl-cinnamoyl, lauroyl ในหลอดทดลอง (*in vitro* assay) ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีรูปร่าง catenated (ดังลูกศรชี้) ดังแสดงในภาพที่ 3.21 A lane ที่ 5-11 และ 3.21 B lane ที่ 5-13 โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีรูปร่าง catenated (ดังลูกศรชี้) นอกจากนี้ยังพบว่า lauroyl นั้นมีคุณสมบัติในการทำลาย plasmid DNA pET-28a ที่ใช้ในการทดสอบ โดยจะพบแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดระหว่าง 900-200 bp ซึ่งเกิดจากการแตกหักของ plasmid DNA (ดังแสดงในภาพที่ 3.21 C lane ที่ 8 และ 3.21 D lane ที่ 6-7)





ภาพที่ 3.21 Agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ที่ทำปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ human topoisomerase II α โดยใช้ etoposide (VP16) เป็น positive control และสารทดสอบแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน (A) Na, K, Ca, O-Hexyl, Acetyl และ O-Allyl (B) Benzyl, Cinnamoyl, Octanoyl, Methoxy, *p*-Methoxycinnamoyl, *p*-Chlorocinnamoyl และ *o*-Chlorocinnamoyl (C) และ (D) lauroyl



ภาพที่ 3.21 (ต่อ) Agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ที่ทำปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ human topoisomerase II α โดยใช้ etoposide (VP16) เป็น positive control และสารทดสอบแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน (A) Na, K, Ca, O-Hexyl, Acetyl และ O-Allyl (B) Benzyl, Cinnamoyl, Octanoyl, Methoxy, *p*-Methoxycinnamoyl, *p*-Chlorocinnamoyl และ *o*-Chlorocinnamoyl (C) และ (D) lauroyl

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าแมงจิเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินทั้ง 14 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α ในหลอดทดลอง (ยกเว้น Iuaroyl ที่มีคุณสมบัติในการทำลาย DNA ทำให้ DNA แตกหัก ดังภาพ 3.21 C และ D) ซึ่งกลไกการยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α มีโอกาสเป็นไปได้สองแบบคือ แบบที่โมเลกุลสารแทรกเข้าไประหว่างสายของดีเอ็นเอ (แบบ intercalating agent) และแบบที่สารจับกับเอนไซม์ topoisomerase II α โดยตรง (แบบ non-intercalating agent) เพื่อตรวจสอบกลไกการยับยั้ง จึงได้ทำการทดสอบกลไกดังกล่าวโดยใช้ DNA-unwinding assay

การทดสอบแมงจิเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี DNA-unwinding Assay

กลไกการยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α สามารถจำแนกได้ 2 แบบ คือ แบบที่ 1 เป็นการยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α โดยสารทดสอบจะเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างสายดีเอ็นเอ เรียกว่า intercalator ซึ่งทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอบิดเบี้ยว และส่งผลยับยั้งการเชื่อมต่อกัน (re-ligation) ของสายดีเอ็นเอ แบบที่ 2 เป็นการยับยั้งโดยที่สารทดสอบจะเข้าไปจับกับ topoisomerase II α โดยตรง เรียกว่า non-intercalator ซึ่งในการทดลองนี้จะทำการทดสอบกลไกการยับยั้งของแมงจิเฟอรินและอนุพันธ์ด้วยวิธี DNA-unwinding assay ซึ่งเป็นการทดสอบการยับยั้งการทำงานของ T4 DNA ligase ในการเชื่อมต่อพันธะ phosphodiester ของปลาย 5'-phosphate และ 3'-hydroxyl ของดีเอ็นเอสายตรง (linear form) ดังนั้นเมื่อสารทดสอบแสดงคุณสมบัติเป็น intercalating agent จะเกิดการแทรกตัวระหว่างสายของดีเอ็นเอ และทำให้โครงสร้างดีเอ็นเอที่บิดเบี้ยว จึงยับยั้งการเชื่อมต่อกันของสายดีเอ็นเอได้

วิธีการทดลอง DNA-unwinding assay

1. การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอสายตรงของ pET-28a

ในการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอสายคู่ตรง (linearized DNA) ของ pET-28a ทำได้โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-

28a มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อให้ได้ปลายเหนียว (sticky end) และสายของดีเอ็นเอเป็นสายตรง แล้วจึงวิเคราะห์การตัดดีเอ็นเอด้วย 1% (w/v) agarose gel electrophoresis โดยย้อมดีเอ็นเอในเจลด้วย ethidium bromide ใน TAE buffer

2. แล้วทำพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ให้บริสุทธิ์สายตรงที่ถูกตัดด้วย *EcoRI* เรียบร้อยแล้วด้วย phenol และตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย 100% เอทานอล จะได้สายดีเอ็นเอสายคู่ตรงที่ถูกตัดด้วย *EcoRI* พร้อมสำหรับการ

ทดลองด้วยวิธี DNA-unwinding assay

3. ปฏิบัติการของวิธี DNA-unwinding นั้นประกอบด้วยสารเคมีดังตารางที่ 3.13 ซึ่งมีปริมาตรรวม 20 μ l

ตารางที่ 3.14 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา DNA-unwinding assay ปริมาตรรวม 20 μ l

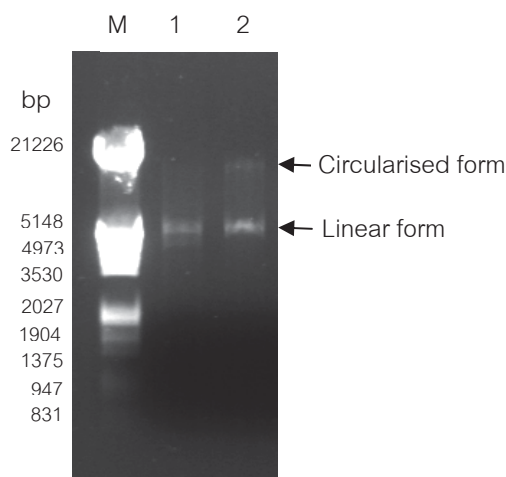
สารเคมี	ปริมาตร (μ l)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a/ <i>Eco</i> RI (1 -2 μ g)	3
Sterile deionised water	12.5
10X T4 DNA ligase buffer	2
สารที่ใช้ในการทดสอบ (1 mM)	2
T4 DNA ligase	0.5
ปริมาตรรวม	20

- ปิเปตสารเคมีและเอนไซม์ทั้งหมดตามตารางที่ 3.14 แล้วเขย่าสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันโดยการเคาะหลอด microcentrifuge เบาๆ จากนั้นนำสารละลายไปป้อนไว้ที่อุณหภูมิ 16°C นาน 30 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายเป็น 65°C นาน 15 นาที เพื่อทำลาย activity ของ T4 DNA ligase
4. ปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดเป็น 100 μ l ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วจึงทำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาให้บริสุทธิ์ด้วยการเติม Chloroform:Isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ลงไปปริมาตร 1 เท่าตัวของสารละลายนำไป vortex นาน 10 วินาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
5. จากนั้นทำการปิเปตสารละลายส่วนใสด้านบนลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ จากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทานอล ปริมาตร 250 μ l
6. นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% (v/v) เอทานอล และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย Sterile deionized water
7. ทำการวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วย 1.0% (w/v) agarose gel electrophoresis และบันทึกผล
- การทดลองด้วยการถ่ายภาพภายใต้ UV transilluminator

ผลการทดลอง

การทดสอบสาร แมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ใหม่ด้วยวิธี DNA-unwinding assay

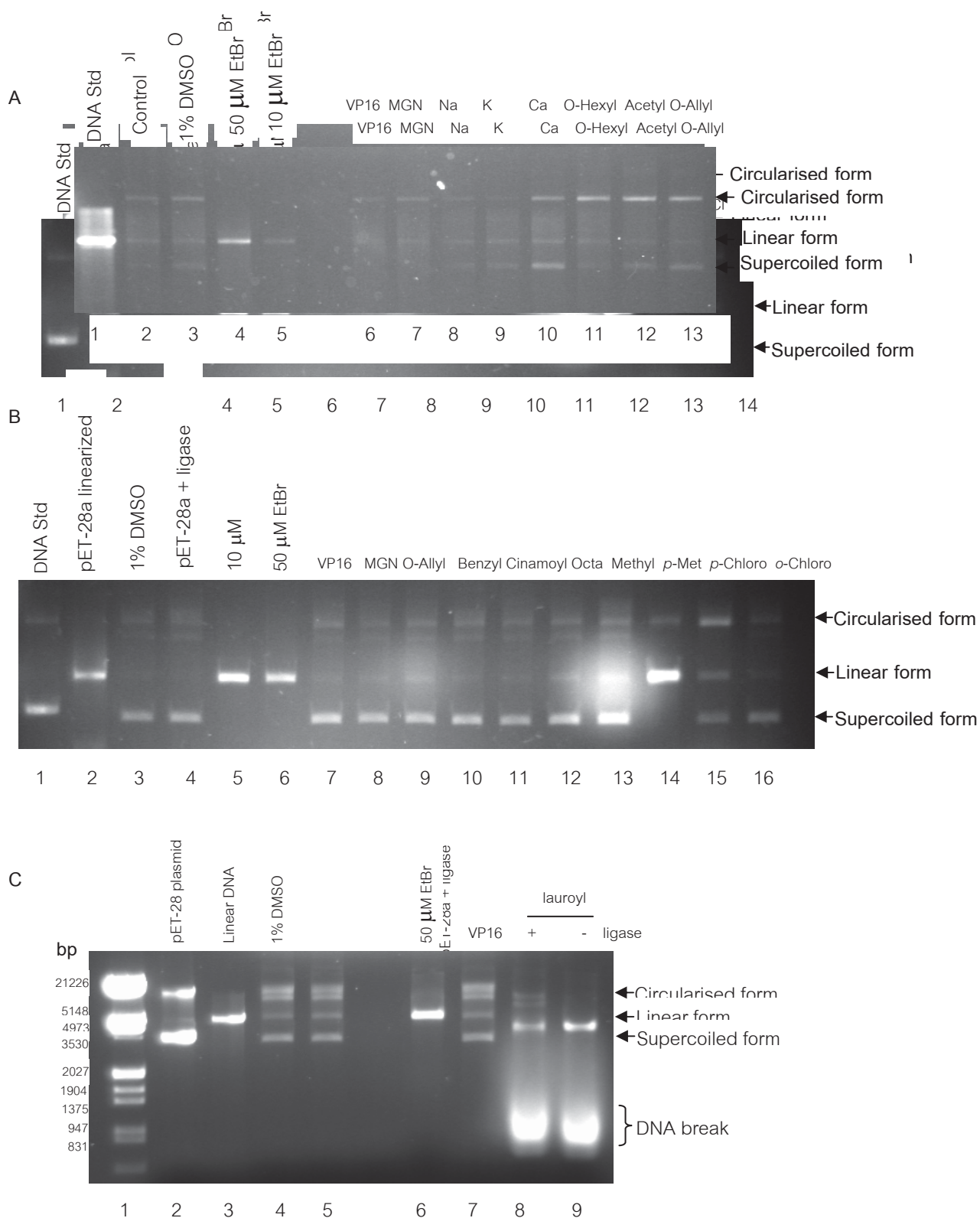
ภายหลังจากการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a สายตรงโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และวิเคราะห์ พลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ด้วย agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 3.21) พบว่าการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ด้วย *Eco*RI จะได้แถบของพลาสมิดดีเอ็นเอสายตรงเกลียวคู่เพียงแถบเดียว (ภาพที่ 3.22 lane ที่ 2) ที่มีขนาดประมาณ 5 Kb



ภาพที่ 3.22 Agarose gel electrophoresis ของการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a สายตรงด้วย *EcoRI* เมื่อใช้ λ DNA ที่ตัดด้วย *HindIII* และ *EcoRI* (lane M), lane 1: pET-28a ตัดด้วย *EcoRI* และ Lane 2: พลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a

ในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของ T4 DNA ligase ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ใหม่ด้วยวิธี DNA-unwinding assay ภาพที่ 3.23 A และ B แสดงให้เห็นว่า DMSO และ VP16 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมผลลบ (negative control) ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของ T4 DNA ligase (ภาพที่ 3.23 A lane ที่ 3 และ 6 และภาพที่ 3.23 B lane ที่ 3 และ 7) จึงสังเกตพบดีเอ็นเอที่มีรูปร่าง circularised (circularised form) บางส่วน (ดังลูกศรชี้) และเมื่อเติม ethidium bromide (EtBr) ซึ่งเป็น intercalating agent ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) พบว่า EtBr สามารถยับยั้งการทำงานของ T4 DNA ligase โดย EtBr จะเข้าไปแทรกตัวระหว่างสายเกลียวคู่ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pET-28a ทำให้พบดีเอ็นเอที่มีรูปร่าง linear ดังภาพที่ 3.23 A lane ที่ 4 และ 5 และ 3.23 B lane 5 และ 6 จากการทดสอบแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน ได้แก่ Na, K, Ca, O-hexyl, acetyl, O-allyl, O-benzyl, cinnamoyl, octanoyl, methoxy, *p*-OMe-cinnamoyl, *p*-Cl-cinnamoyl และ *o*-Cl-cinnamoyl โดยใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 mM พบว่ามีอนุพันธ์ของ Na, K, Ca, O-hexyl, acetyl, O-allyl, O-Benzyl, cinnamoyl, octanoyl, methoxy, *p*-Cl-cinnamoyl และ *o*-Cl-cinnamoyl ไม่มีฤทธิ์การยับยั้งการเชื่อมต่อของพลาสมิดดีเอ็นเอสายตรงของ T4 DNA ligase เนื่องจากเอนไซม์ T4 DNA ligase ยังคงทำงานได้ โดยสังเกตพบแถบของดีเอ็นเอรูปร่าง circularised ดังแสดงในภาพที่ 3.23 A lane ที่ 7-13 และภาพที่ 3.23 B lane ที่ 8-13 และ 15-16 ยกเว้นอนุพันธ์ *p*-OMe-cinnamoyl (ภาพที่ 3.23 B lane ที่ 14) เพียงชนิดเดียวที่แสดงความสามารถในการยับยั้ง T4 DNA ligase ในการเชื่อมต่อพลาสมิดดีเอ็นเอสายตรง ซึ่งจะสังเกตได้จากแถบของดีเอ็นเอรูปร่างเส้นตรง (Linear form) ที่มีลักษณะเหมือนกับแถบดีเอ็นเอในการยับยั้งการทำงานของ ethidium bromide ตารางที่ 3.15 แสดงผลการยับยั้งการทำงานของ T4 DNA ligase ของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอริน ทั้งนี้การทดสอบการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α และ DNA-unwinding assay

เป็นการทดสอบเบื้องต้นในสภาวะในหลอดทดลอง เพื่อยืนยันฤทธิ์ของแมงจิเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจิเฟอรินที่สังเคราะห์จึงควรพิจารณาผลการยับยั้ง HSV ในเซลล์เพาะเลี้ยงต่อไปควบคู่ไปด้วย



ภาพที่ 3.23 agarose gel electrophoresis ในการทดสอบ DNA-unwinding assay ของแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินด้วย T4 DNA ligase ได้แก่ (A) Na, K, Ca, O-Hexyl, Acetyl และ O-Allyl (B) Benzyl, Cinnamoyl, Octanoyl, Methoxy, *p*-OMe-cinnamoyl, *p*-Cl-cinnamoyl และ *o*-Cl-cinnamoyl (C) Lauroyl ที่ความเข้มข้น 1 mM และบ่มที่อุณหภูมิ 16°C นาน 30 นาที

ตารางที่ 3.15 การศึกษาการยับยั้งการทำงานของ T4 DNA ligase ของสารแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินที่สังเคราะห์ขึ้นที่ความเข้มข้น 1 mM ด้วยวิธี DNA-unwinding assay

สารทดสอบ	DNA-unwinding assay ด้วย T4 DNA ligase	
	non-intercalator	Intercalator
Ethidium bromide (+)	-	+
DMSO (- control)	+	-
VP16 (- control)	+	-
แมงจีเฟอริน	+	-
แมงจีเฟอริน- Na^+	+	-
แมงจีเฟอริน- K^+	+	-
แมงจีเฟอริน- Ca^{2+}	+	-
O-Hexyl แมงจีเฟอริน	+	-
acetyl แมงจีเฟอริน	+	-
O-Allyl แมงจีเฟอริน	+	-
O-Benzyl แมงจีเฟอริน	+	-
Cinnamoyl แมงจีเฟอริน	+	-
Octanoyl แมงจีเฟอริน	+	-
Methoxy แมงจีเฟอริน	+	-
<i>p</i> -OMe-cinnamoyl แมงจีเฟอริน	-	+
<i>p</i> -Cl-cinnamoyl แมงจีเฟอริน	+	-
<i>o</i> -Cl-cinnamoyl แมงจีเฟอริน	+	-
<i>o</i> -Cl-cinnamoyl แมงจีเฟอริน	+	-

+ = non-intercalator

- = intercalator

* = DNA break

สรุปผลการทดลอง

ในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase II α ของ แมงจีเฟอริน และอนุพันธ์แมงจีเฟอรินซึ่ง ได้แก่ Na, K, Ca, O-hexyl, acetyl, O-allyl, O-benzyl, cinnamoyl, octanoyl, methoxy, *p*-OMe-cinnamoyl, *p*-Cl-cinnamoyl *o*-Cl-cinnamoyl และ lauroyl ด้วย eukaryotic topoisomerase II drug

screening kit พบว่าแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์แมงจีเฟอรินทุกชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II α ได้

ในการทดสอบตรวจสอบกลไกการยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α (topoisomerase II poisons) ของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินด้วยวิธี DNA-unwinding Assay พบว่า แมงจีเฟอริน, Na, K, Ca, O-Hexyl, Acetyl, O-allyl, O-benzyl, cinnamoyl, octanoyl, methoxy, *p*-Cl-cinnamoyl *o*-Cl-cinnamoyl และ luaroyl แมงจีเฟอริน มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบ non-intercalator ซึ่งสารทดสอบดังกล่าวแสดงความสามารถในการยับยั้งแบบ non-intercalator ซึ่งอาจจะจับกับเอนไซม์ topoisomerase II α โดยตรง ซึ่งอาจจะทำการศึกษาการจับกันระหว่างแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์แมงจีเฟอรินกับ topoisomerase II α ด้วย surface plasmon resonance assay เพื่อพิสูจน์กลไกต่อไป อย่างไรก็ตามพบว่า อนุพันธ์ของ *p*-OMe-cinnamoyl แมงจีเฟอรินมีกลไกการยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α แบบ intercalator โดย *p*-Methoxycinnamoyl จะเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างสายของดีเอ็นเอ ซึ่งส่งผลต่อโครงสร้างของดีเอ็นเอที่บิดเบี้ยวไปและมีผลยับยั้งของการเชื่อมต่อกัน (re-ligation) ของสายดีเอ็นเอ

ลงนาม.....

(ผศ. ดร. ศิริวิรัตน์ จันท์จารุณี)

วันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2555

บทที่ 4

สรุปผลการศึกษา

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการดัดแปรโครงสร้างของแมงจีเฟอร์ินให้ได้สารอนุพันธ์ของแมงจีเฟอร์ินชนิดใหม่ และปรับปรุงความสามารถในการละลายของอนุพันธ์แมงจีเฟอร์ินที่สังเคราะห์ได้ พร้อมทั้งศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน anti-herpes ของอนุพันธ์แมงจีเฟอร์ินที่สังเคราะห์ได้

ผลการศึกษาพบว่าสามารถสังเคราะห์อนุพันธ์เกลือโซเดียม โปแตสเซียมและ แคลเซียมของแมงจีเฟอร์ิน ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 53%-93% เกลือที่เตรียมขึ้นได้ แสดงเอกลักษณ์ทาง ^1H NMR อย่างเห็นได้ชัดเจน และแตกต่างจากสารตั้งต้นอย่างชัดเจน และสามารถทำการดัดแปรโครงสร้างของสารแมงจีเฟอร์ินต่างๆ ที่หมู่ไฮดรอกซิลของ Xanthone โดยทำการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชัน $-\text{OH}$ ของ ฟีนอล ซึ่งมี 2 วิธี ที่เป็นไปได้คือการทำปฏิกิริยาแอลคิลเลชัน เปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์แอลคอกไซด์ ($-\text{OR}$) และการเปลี่ยนให้เป็นหมู่เอซิลโดยอาศัยปฏิกิริยาเอซิเลชัน

งานวิจัยนี้เตรียมอนุพันธ์ได้ 4 ชนิด OMe, O-Hexyl O-allyl, O-benzyl ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 17%-25% และการเปลี่ยนให้เป็นหมู่เอซิลโดยอาศัยปฏิกิริยาเอซิเลชันที่หมู่ $-\text{OH}$ ของแมงจีเฟอร์ิน ได้สารอนุพันธ์ 7 ชนิด acetyl octanoyl, lauroyl, cinnamoyl, p-Cl-cinnamoyl o-Cl-cinnamoyl, p-OMe-cinnamoyl ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 17-50% สารที่สังเคราะห์ได้ส่วนใหญ่เป็นแบบ monoalkylation และ acylation ยกเว้น alkylating agent บางตัว เช่น benzyl bromide ให้สารผลิตภัณฑ์ที่มีหมู่ benzyl ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยามากกว่า 1 หมู่ ซึ่งไม่สามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากบนวงของแมงจีเฟอร์ินมี $-\text{OH}$ ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ถึง 8 แห่ง สำหรับกรณีของปฏิกิริยาเอซิเลชัน ส่วนใหญ่เป็น monoacylation ยกเว้น acetylation เนื่องจาก acylating agent ที่ใช้คือ acetyl chloride มีขนาดเล็กและเป็น acylating agent ที่มีความว่องไวอย่างมาก การเกิดปฏิกิริยาจึงให้ของผสมของ acylation ที่ตำแหน่งต่างๆ ปนกัน ทำให้แยกบริสุทธิ์ได้ลำบากมาก จึงให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ต่ำ การทำปฏิกิริยาต่อกับหมู่เอซิลแบบเฉพาะเจาะจง (regioselective) ของแมงจีเฟอร์ิน สามารถทำได้โดยการเปลี่ยนหมู่แอลกอฮอล์บนวงน้ำตาลให้ได้สารอนุพันธ์ของแมงจีเฟอร์ิน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสปฏิกิริยาโดยอาศัย Ultrasound irradiations แต่ปฏิกิริยาดังกล่าวให้สารผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่น้อยโดยให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตเพียง 5% และสารที่เกิดขึ้นสลายตัวอย่างรวดเร็วโดยเปลี่ยนแปลงกลับเป็นแมงจีเฟอร์ินเมื่อตั้งทิ้งไว้ในสารละลาย DMSO

สารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้มีแนวโน้มการละลายที่แตกต่างจากแมงจีเฟอร์ิน พบว่าการดัดแปรโครงสร้างให้อยู่ในรูปเกลือโซเดียม, โปแตสเซียม และแคลเซียม แมงจีเฟอร์ิน มีความสามารถในการละลายน้ำที่ดีขึ้น โดยละลายน้ำได้ดีกว่าแมงจีเฟอร์ิน และเกลือที่เตรียมได้สามารถละลายในตัวทำละลายมีขั้วสูงได้เล็กน้อยเช่น MeOH และ DMSO นอกจากนี้เกลือที่สังเคราะห์ได้ไม่ละลายใน oil และละลายได้น้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไป ยกเว้น DMSO การดัดแปรหมู่ฟังก์ชันฟีนอลบนวงอะโรมาติก โดยอาศัยปฏิกิริยาแอลคิลเลชันให้ได้หมู่แอลคอกไซด์ ($-\text{OR}$) ที่เป็น benzyl ($-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$) และ allyl ให้สารอนุพันธ์ที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายใน MeOH ได้ปานกลาง และละลายใน DMSO ได้ดีมาก ในขณะที่อนุพันธ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเอซิเลชันเช่น octanoyl, lauroyl, cinnamoyl, p-OMe-cinnamoyl, p-Cl-cinnamoyl และ o-Cl-cinnamoyl มีแนวโน้มในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ protic solvent และตัวทำละลายที่มีขั้วได้ดีขึ้นคือละลายในแอลกอฮอล์และ DMSO ซึ่งมีสาเหตุจากการที่โครงสร้างมีส่วน non polar ของสายคาร์บอนจำนวนมาก และไม่ละลายใน oil สำหรับอนุพันธ์ acetyl ซึ่งหมู่ $-\text{OH}$ บนวงเป็น เอซิลหลาย

ตำแหน่งสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วคือแอลกอฮอล์และคลอโรฟอร์ม นอกจากนี้อนุพันธ์ cinnamoyl จะเกิดการสลายตัวเปลี่ยนกลับไปเป็นแมนจิเฟอรินอย่างช้าๆ ในแอลกอฮอล์ และสารทุกตัวจะค่อยๆ สลายตัวเป็นแมนจิเฟอรินเมื่อตั้งทิ้งไว้ในตัวทำละลายเป็นเวลานาน

จากการทดสอบและหาแนวโน้มของฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน anti-herpes ของอนุพันธ์ของแมนจิเฟอรินที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 14 อนุพันธ์ เมื่อทำการประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F อนุพันธ์ทุกตัว ยกเว้นอนุพันธ์ที่อยู่ในรูปเกลือแสดงค่า ED_{50} ที่น้อยกว่าของแมนจิเฟอรินมาก แต่อนุพันธ์ของแมนจิเฟอรินที่สังเคราะห์ได้บางตัวแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำหน้าที่เป็น host ของไวรัสมากขึ้นกว่าแมนจิเฟอริน เช่นกัน จากค่า TI พบว่าการดัดแปลงโครงสร้างให้มีอนุพันธ์เกลืออยู่ในโครงสร้างของแมนจิเฟอรินไม่ได้เพิ่มความสามารถในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F ในขณะที่การดัดแปลงโครงสร้างของอนุพันธ์แมนจิเฟอรินให้เป็นหมู่ acyl ส่วนใหญ่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสได้สูงกว่าแมนจิเฟอริน อนุพันธ์เกลือของแมนจิเฟอริน และอนุพันธ์ alkoxy ยกเว้นกรณีของ methoxy และอนุพันธ์เอซิล *p*-OMe-cinnamoyl ที่มีค่า TI ในการยับยั้ง HSV-1 strain F ได้น้อยกว่าของแมนจิเฟอริน

เมื่อทำการพิจารณาในส่วนของหมู่ alkoxy (OMe, O-Bn, O-allyl และ O-hexyl แมนจิเฟอริน) พบว่าการดัดแปลงโครงสร้างของแมนจิเฟอรินโดยการเติมหมู่ hexyl, allyl และ benzyl เข้าไปทำให้ค่า TI เพิ่มขึ้น โดยความยาวของสายแอลคิล เช่น hexyl มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำหน้าที่เป็น host ของไวรัส เพิ่มขึ้นกว่าแมนจิเฟอริน หมู่ alkoxy ที่มีขนาดเล็ก เช่น methyl มีความเป็นพิษสูงกว่าหมู่ alkoxy สายยาว แต่กลับมีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F สูงขึ้น (ED_{50}) แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า TI สารกลุ่มดังกล่าวมีค่า TI น้อยกว่าของแมนจิเฟอริน การเติมหมู่ alkoxy ที่มีส่วนของ unsaturated carbon เช่น allyl และ benzyl แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำหน้าที่เป็น host ของไวรัสเพิ่มขึ้นกว่าแมนจิเฟอริน โดยเฉพาะ benzyl ซึ่งเป็นแบบ dialkoxy ที่แสดงความเป็นพิษที่สูงมากแต่ขณะเดียวกันก็สามารถยับยั้ง HSV-1 strain F (ED_{50}) ที่สูงมากกว่าแมนจิเฟอริน และมีค่า TI ในการยับยั้ง HSV-1 strain F ได้ดีขึ้นกว่าแมนจิเฟอริน

การเติมหมู่ acyl เข้าไปที่โมเลกุลของแมนจิเฟอรินที่มีความยาวมากๆ เช่น octanoyl, lauroyl มีแนวโน้มทำให้ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำหน้าที่เป็น host ของไวรัสเพิ่มมากขึ้นกว่าแมนจิเฟอรินอย่างมาก และเพิ่มความสามารถในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F ดีขึ้นกว่าแมนจิเฟอริน (ค่า ED_{50} น้อยกว่าของแมนจิเฟอริน) กรณีของ octanoyl มีค่า ED_{50} ที่ต่ำกว่าของแมนจิเฟอรินมาก เมื่อเพิ่มความยาวของสายให้ยาวขึ้นมาก เช่น lauroyl กลับให้ค่าความสามารถในการยับยั้ง HSV-1 strain F จะลดต่ำลง สำหรับการเติมหมู่ acyl ซึ่งมีขนาดของสายที่สั้นกว่า เข้าไปที่โมเลกุลของแมนจิเฟอรินแต่มีจำนวนหมู่เอซิลหลายหมู่ มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำหน้าที่เป็น host ของไวรัส น้อยกว่าเอซิลประเภทอื่น แต่มีค่าความสามารถในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F ก็ลดลงตามไปด้วย (ค่า ED_{50} มากกว่าเอซิลประเภทอื่น) การเติมหมู่เอซิลที่มีลักษณะ unsaturation เช่น cinnamoyl เข้าไปที่โมเลกุลของแมนจิเฟอริน 1 หมู่ มีแนวโน้มทำให้ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำหน้าที่เป็น host ของไวรัสเพิ่มมากขึ้นกว่าแมนจิเฟอรินอย่างมาก แต่ขณะเดียวกันก็มีความสามารถในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F ดีขึ้นกว่าแมนจิเฟอริน (ค่า ED_{50} น้อยกว่าของแมนจิเฟอริน) เมื่อทำการเติมหมู่ electron withdrawing group เช่น หมู่ chloro บนส่วนของวงอะโรมาติกของ cinnamoyl ทั้งที่ตำแหน่ง ortho และ para พบว่าการเติม electron withdrawing group ประเภทหมู่ Cl จะช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง แต่ค่า ED_{50} ในการยับยั้ง HSV-1 ก็ลดต่ำลงด้วยเช่นกัน ซึ่งไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 strain F ได้ ส่วนการเติมหมู่ electron

donating group เช่น methoxy ไปที่โมเลกุลของ cinnamoyl ที่ตำแหน่ง para ช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์ เพราะเลี่ยนได้เล็กน้อย แต่ความสามารถในการยับยั้ง HSV-1 ก็ลดต่ำลงด้วยอย่างมากเช่นกัน และให้ค่า TI ในการยับยั้ง HSV-1 strain F ที่ต่ำกว่าของแมงจีเฟอริน

จากการเปรียบเทียบค่า TI พบว่าการดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอรินโดยอาศัยการเกิดเอซีเลชันให้หมู่ acyl (acetyl, cinnamoyl, octanoyl และ lauroyl แมงจีเฟอริน) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F ได้ โดยการเพิ่มหมู่เอซิลที่มีลักษณะ unsaturation เช่น cinnamoyl เข้าไปที่โมเลกุลของแมงจีเฟอริน 1 หมู่ จะเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด ให้ค่า TI เท่ากับ 2.99 รองลงมา คือ octanoyl (TI = 2.98) และ acetyl แมงจีเฟอรินที่มีการเติมหมู่ acetyl เข้าไปถึง 8 หมู่ (TI = 2.85) เมื่อเพิ่มหมู่เอซิลที่มีสายคาร์บอนยาวมากขึ้น เช่น lauroyl แมงจีเฟอริน พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F น้อยที่สุดในกลุ่มนี้ และเมื่อทำการดัดแปลงโครงสร้างของแมงจีเฟอริน โดยทำการเพิ่ม chloro เติมบนวงอะโรมาติกของ cinnamoyl และหมู่ -OMe ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 strain F ได้

จากการดัดแปลงโครงสร้างและผลทดสอบทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าเป็น cinnamoyl แมงจีเฟอริน เป็นอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการต่อต้านอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้อื่นๆ อาจจะเป็นเพราะการเพิ่มขนาดของหมู่ (จำนวน carbon) อยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ซึ่งใกล้เคียงกับ octanoyl (C_8) จึงส่งผลให้อนุพันธ์ดังกล่าวจะสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าเดิมกว่าอนุพันธ์อื่นๆ เนื่องจากไวรัส HSV-1 มี envelope ที่เป็นชั้นไขมันห่อหุ้ม แต่เมื่อทำการเพิ่มจำนวนของ carbon มากขึ้น เช่น lauroyl (C_{12}) และทำการเติมหมู่อื่นๆ บนโครงสร้างพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 จะเริ่มลดลง ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งไวรัส HSV-1 strain F จะขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของจำนวนของ carbon และหมู่ฟังก์ชันประเภท acyl จึงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง HSV-1 ดีที่สุด นอกจากนี้สารดังกล่าวมีสมบัติในการละลายที่เปลี่ยนแปลงจากแมงจีเฟอรินคือละลายในคลอโรฟอร์ม และแอลกอฮอล์ได้ดีกว่าแมงจีเฟอริน

ในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase II α ของ แมงจีเฟอริน และอนุพันธ์แมงจีเฟอรินซึ่ง ได้แก่ Na, K, Ca, O-hexyl, acetyl, O-allyl, O-benzyl, cinnamoyl, octanoyl, methoxy, *p*-OMe-cinnamoyl, *p*-Cl-cinnamoyl และ *o*-Cl-cinnamoyl ด้วย eukaryotic topoisomerase II drug screening kit พบว่าแมงจีเฟอริน และอนุพันธ์แมงจีเฟอรินทุกชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II α ได้

ในการทดสอบตรวจสอบกลไกการยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α (topoisomerase II poisons) ของแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์ของแมงจีเฟอรินด้วยวิธี DNA-unwinding Assay พบว่า แมงจีเฟอริน, Na, K, Ca, O-hexyl, acetyl, O-allyl, O-benzyl, cinnamoyl, octanoyl, Methoxy, *p*-Cl-cinnamoyl *o*-Cl-cinnamoyl แมงจีเฟอริน และ lauroyl มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบ non-intercalator ซึ่งสารดังกล่าวอาจจะจับกับเอนไซม์ topoisomerase II α โดยตรง และ lauroyl มีคุณสมบัติในการทำลาย plasmid DNA pET-28a ที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งอาจจะทำการศึกษาการจับกันระหว่างแมงจีเฟอรินและอนุพันธ์แมงจีเฟอรินกับ topoisomerase II α ด้วย surface plasmon resonance assay เพื่อพิสูจน์กลไกต่อไป ส่วนอนุพันธ์ของ *p*-OMe-cinnamoyl แมงจีเฟอรินมีกลไกการยับยั้งการทำงานของ topoisomerase II α แบบ intercalator โดย *p*-OMe-cinnamoyl จะเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างสายของดีเอ็นเอ ซึ่งส่งผลต่อโครงสร้างของดีเอ็นเอที่บิดเบี้ยวไปและมีผลยับยั้งของการเชื่อมต่อกัน (re-ligation) ของสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้การทดสอบการยับยั้งการทำงานของ human topoisomerase II α และ

DNA-unwinding assay เป็นการทดสอบเบื้องต้นในสถานะในหลอดทดลอง เพื่อยืนยันฤทธิ์ของแมงจิเฟอร์ริน และอนุพันธ์ของแมงจิเฟอร์รินที่สังเคราะห์ห้จึงควรพิจารณาผลการยับยั้ง HSV ในเซลล์เพาะเลี้ยงต่อไปควบคู่ไปด้วย

ภาคผนวก ก

ตารางเปรียบเทียบ วัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมา
ผลที่ได้รับตลอดโครงการ

1. ตารางแผนงานวิจัย

ระยะเวลา	วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่เสนอ		กิจกรรมที่ทำจริง		หมายเหตุ
		กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	
6 เดือนที่ 1	ดัดแปลงโครงสร้างของ mangiferin ให้ได้สารของสาร mangiferin อนุพันธ์ใหม่ตามแนวทาง 1 และ 2	1. สกัดและทำการแยกสาร mangiferin จากเปลือกและใบมะม่วง		1. สกัดและทำการแยกสาร mangiferin จากเปลือกและใบมะม่วง		
		2. นำ mangiferin มาทำปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง mangiferin ตามแนวทางที่ A และ B	1. พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี	2. นำ mangiferin มาทำปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง mangiferin ตามแนวทางที่ A, B และ C	1. พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี	เนื่องจากมีปัญหาด้านเฮนไซม์เสื่อมสภาพต้องจัดซื้อใหม่ซึ่งต้องใช้เวลากว่า 45 วัน จึงต้องหยุดแนวทาง B และทำการดัดแปลงโครงสร้างตามแนวทางสังเคราะห์ C แทน
		3. ศึกษาแนวโน้มของหมู่ฟังก์ชันและพฤติกรรมการละลายของ mangiferin อนุพันธ์ใหม่	3. ศึกษาแนวโน้มของหมู่ฟังก์ชันและพฤติกรรมการละลายของ mangiferin อนุพันธ์ใหม่	3. ศึกษาแนวโน้มของหมู่ฟังก์ชันและพฤติกรรมการละลายของ mangiferin อนุพันธ์ใหม่		เนื่องจากอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นได้ตามวิธี A มีสมบัติการละลายน้ำที่ต่ำมากจึงนำไปทดสอบการต้าน herpes เปรียบเทียบกับ mangiferin ที่ละลายน้ำได้น้อย เพื่อสังเกตแนวโน้มของการละลายน้ำที่มีต่อการออกฤทธิ์ต้าน herpes เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงโครงสร้างตามแบบ B และ 3.

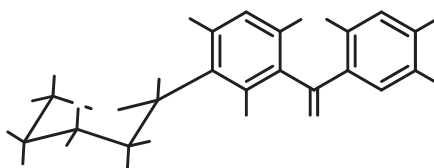
						ในช่วง เดือน ที่ 7 และ 8
6 เดือนที่ 2	ดัดแปลงโครงสร้างของ mangiferin ให้ได้สารของ สาร mangiferin อนุพันธ์ ใหม่ตามแนวทาง C	1. นำ mangiferin มาทำ ปฏิริยาเพื่อเปลี่ยนแปลง โครงสร้าง ตามแนวทาง C 2. พิสูจน์โครงสร้างด้วย เทคนิคทางสเปคโตรสโคปี	1. ศึกษาแนวโน้มของการ พังกั้นและพฤติกรรมการ ละลายของ mangiferin	1. นำ mangiferin มาทำ ปฏิริยาเพื่อเปลี่ยนแปลง โครงสร้าง ตามแนวทาง B และ C 2. พิสูจน์โครงสร้างด้วย เทคนิคทางสเปคโตรสโคปี	1. ปรับปรุงวิธีสังเคราะห์ ตามแนวทาง B และ C 2. ศึกษาแนวโน้มของการ พังกั้นและพฤติกรรมการ ละลายของ mangiferin	
	ทดสอบการออกฤทธิ์ทาง สีภาพด้าน antihesperes	3. ทดสอบฤทธิ์ทางสีภาพ ด้าน antihesperes ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ ทดสอบความเป็นพิษของ สาร mangiferin อนุพันธ์ ต่อเซลล์เลี้ยงไวรัส ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ สารอนุพันธ์ที่ได้ต่อการยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase II				
		4. ทดสอบกลไกการเกิด DNA binding ของ Anti-herpes				
6 เดือนที่ 3	ดัดแปลงโครงสร้างของ mangiferin ให้ได้สาร mangiferin อนุพันธ์ใหม่ที่มี การปรับปรุงตามผลของ	1. ดำเนินการสังเคราะห์ อนุพันธ์ใหม่ของ mangiferin ให้มีโครงสร้างที่เป็นไปตาม แนวโน้มของสมบัติทาง		1. ดำเนินการสังเคราะห์ อนุพันธ์ใหม่ของ mangiferin ให้มีโครงสร้างที่เป็นไปตาม แนวโน้มของสมบัติทาง		ไม่สามารถศึกษาการออกฤทธิ์ ทางสีภาพด้าน antihesperes ของสาร mangiferin อนุพันธ์ ใหม่ที่ปรับปรุงเพิ่มเติมประสพ

	การศึกษานวนิยมของหนู ฟังชัน	กายภาพ ผลที่มีต่อการออก ฤทธิ์และการยับยั้งการ ทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase II คุณสมบัติการเป็น non- intercalating compounds หรือ intercalators แวนโธมของหนูฟังชันบน โครงสร้างที่ได้ทำการ ดัดแปลงต่อการออกฤทธิ์ ทางชีวภาพของสาร mangiferin อนุพันธ์ใหม่ และสาร mangiferin อนุพันธ์ใหม่ที่มีการปรับปรุง เพิ่มเติม	กายภาพ ผลที่มีต่อการออก ฤทธิ์และการยับยั้งการ ทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase II คุณสมบัติการเป็น non- intercalating compounds หรือ intercalators		ปัญหาด้านการสังเคราะห์ เนื่องจากสารที่สังเคราะห์ได้ หลายตัว มีปัญหาด้านความ เสถียรในขณะทำการแยก เช่น เปลี่ยนกลับไปเป็นสารตั้งต้น เมื่อถูก silica gel หรือ Methanol หรือ Ethanol และ ความชื้น ทำให้ล่าช้าต่อการทดสอบ activity ตามแผนของ โครงการ ควรจะได้แนวทางใน การเลือกหนูฟังชันเพื่อ สังเคราะห์สาร ที่มีแวนโธม activity ที่ดีกว่าเดิม แต่ ขณะนี้ยังไม่สามารถทดสอบ สารได้ครบทุกตัว
	ศึกษากายภาพออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพด้าน antihyper- ของสาร mangiferin อนุพันธ์ใหม่ที่ได้รับการปรับปรุง เพิ่มเติม	1. ศึกษาความเป็นพิษของ อนุพันธ์ใหม่และสาร mangiferin ที่มีการปรับปรุง ต่อเซลล์เลี้ยงไวรัส			
6 เดือนที่ 4	-	-	1 ศึกษาความเป็นพิษของ อนุพันธ์ mangiferin อนุพันธ์ ใหม่และสาร mangiferin ที่มี การปรับปรุงต่อเซลล์เลี้ยง	การทดสอบ activity ตาม แผนของโครงการ ช่วง 6 เดือนที่ 3 ได้แนวทางในการเลือกหนู	

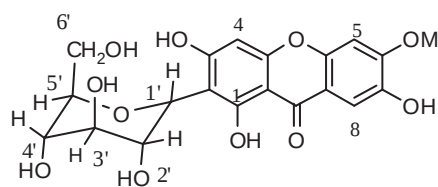
				ไวรัส	ฟังก์ชันเพื่อสังเคราะห์สารที่มีแนวโน้ม activity ที่ดีกว่าเดิม	
				ดำเนินการสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ของ mangiferin ให้มีโครงสร้างที่เป็นไปตามแนวโน้มของการออกฤทธิ์และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase II คุณสมบัตการเป็น non-intercalating compounds หรือ intercalators	ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร mangiferin อนุพันธ์ใหม่และสาร mangiferin อนุพันธ์ใหม่ที่มีการปรับปรุงเพิ่มเติม	

ภาคผนวก ข

ดัชนีโครงสร้างและเลขตำแหน่งกำกับโครงสร้าง

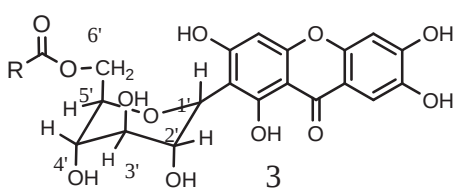
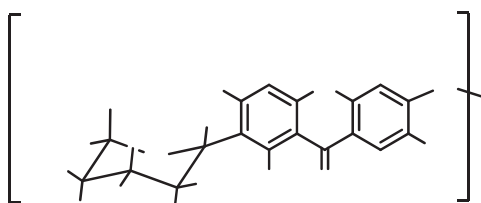


1

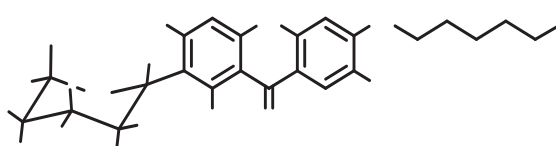


2a M = Na

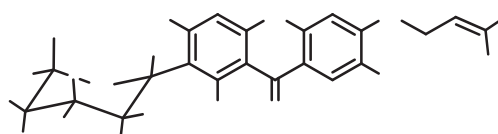
2b M = K



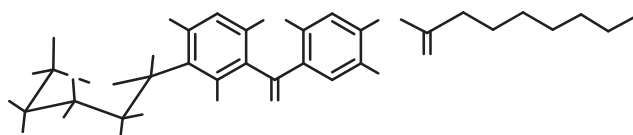
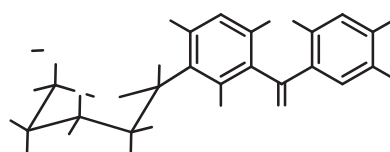
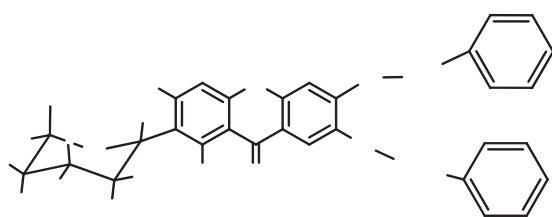
4a



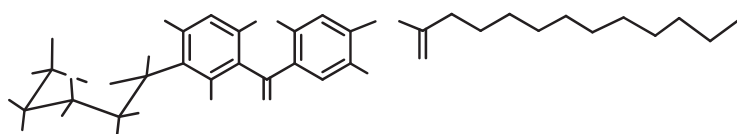
4b



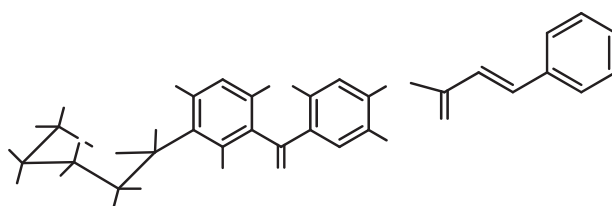
4c



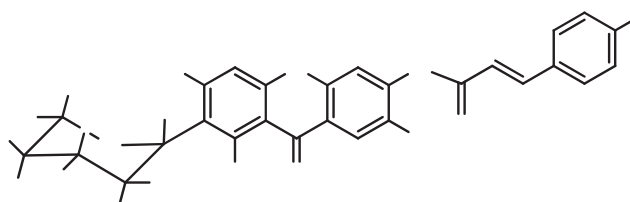
6a



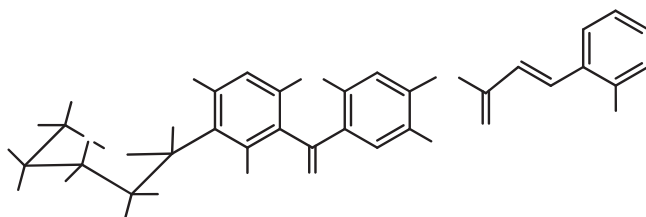
6b



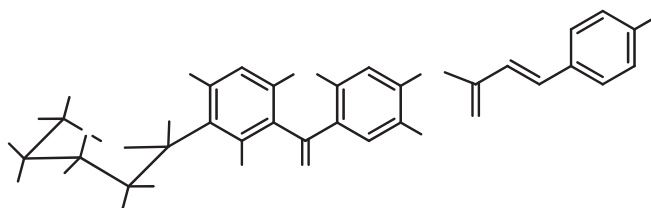
6c



6d



6e

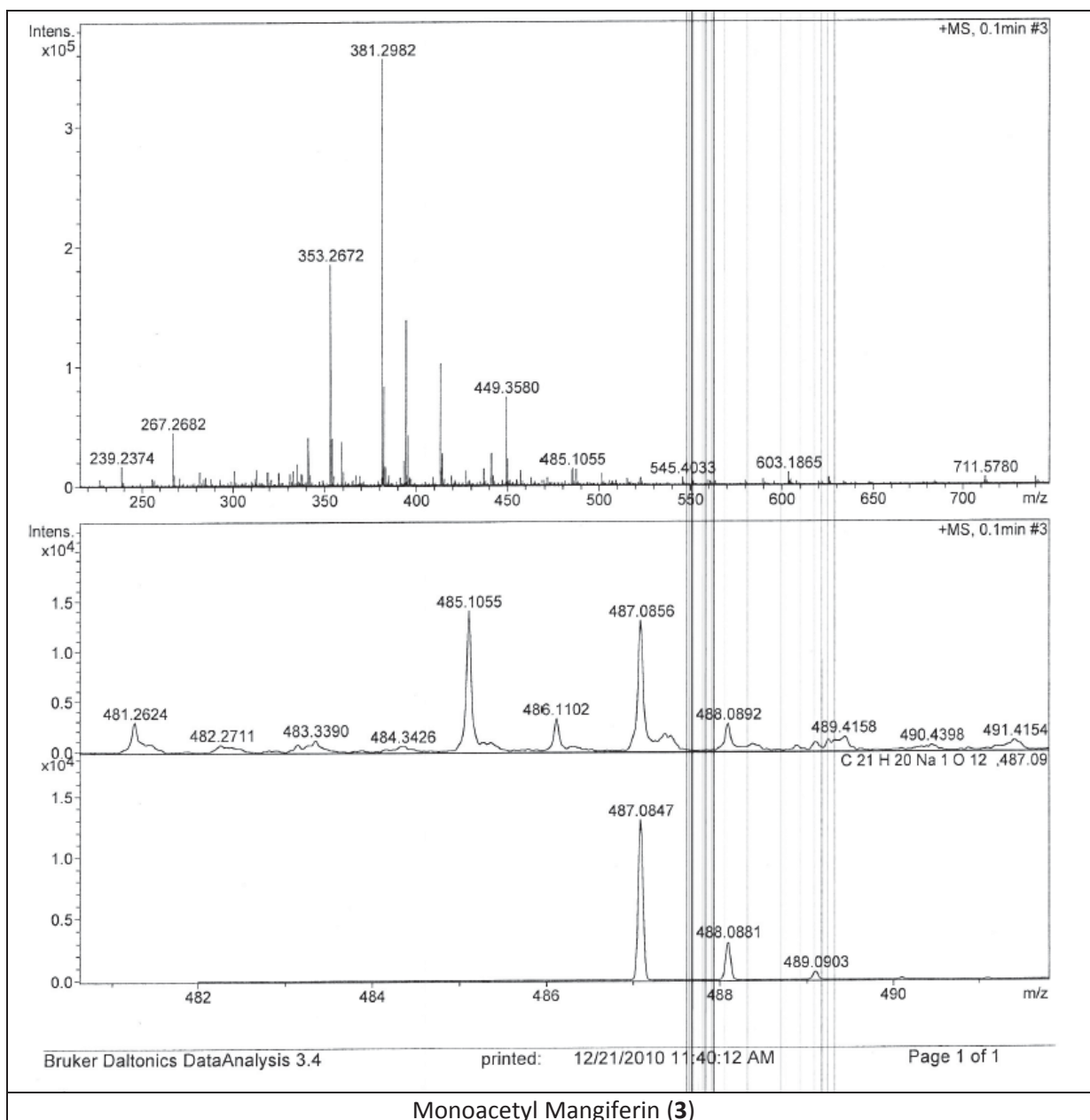


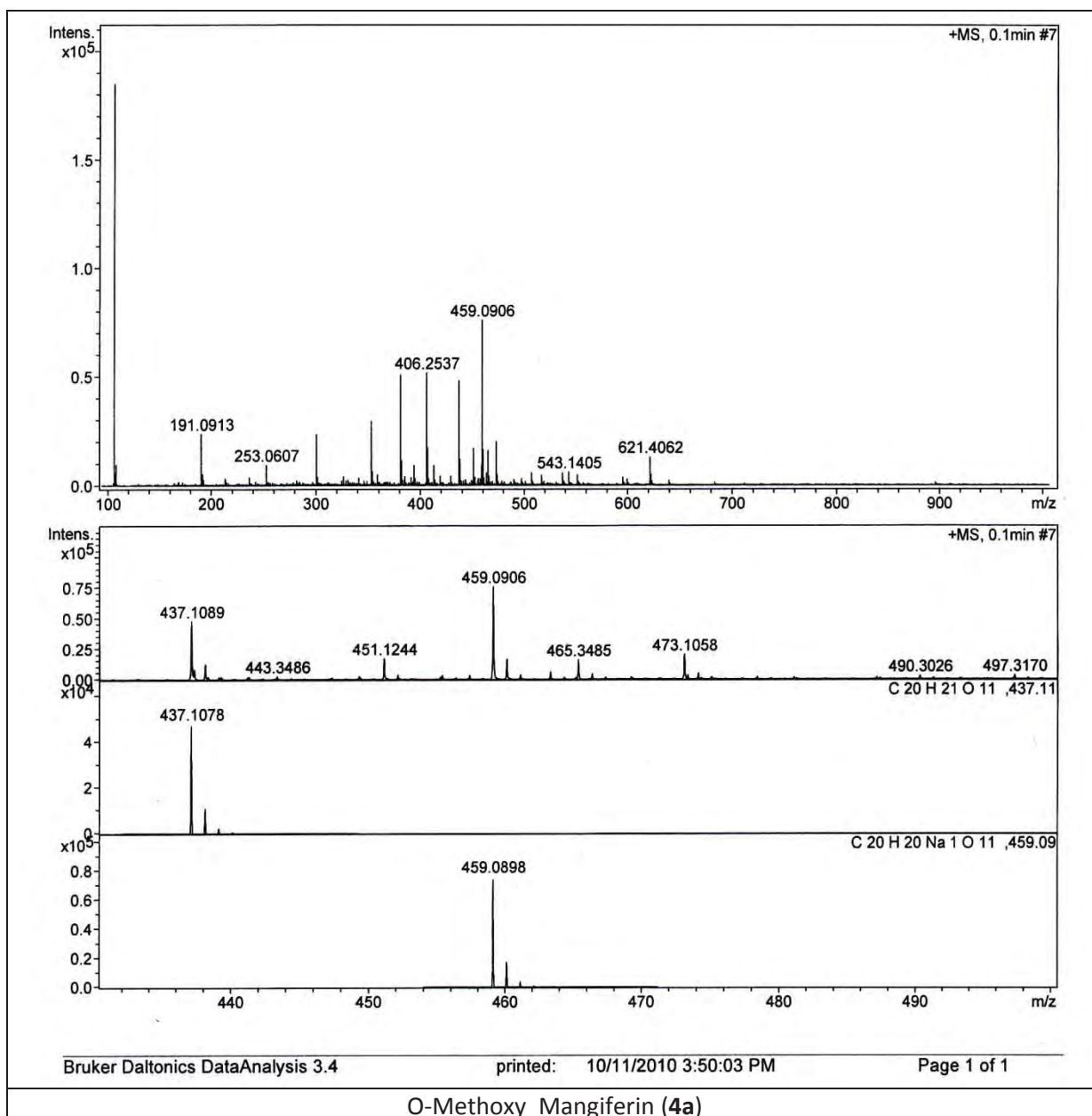
6f

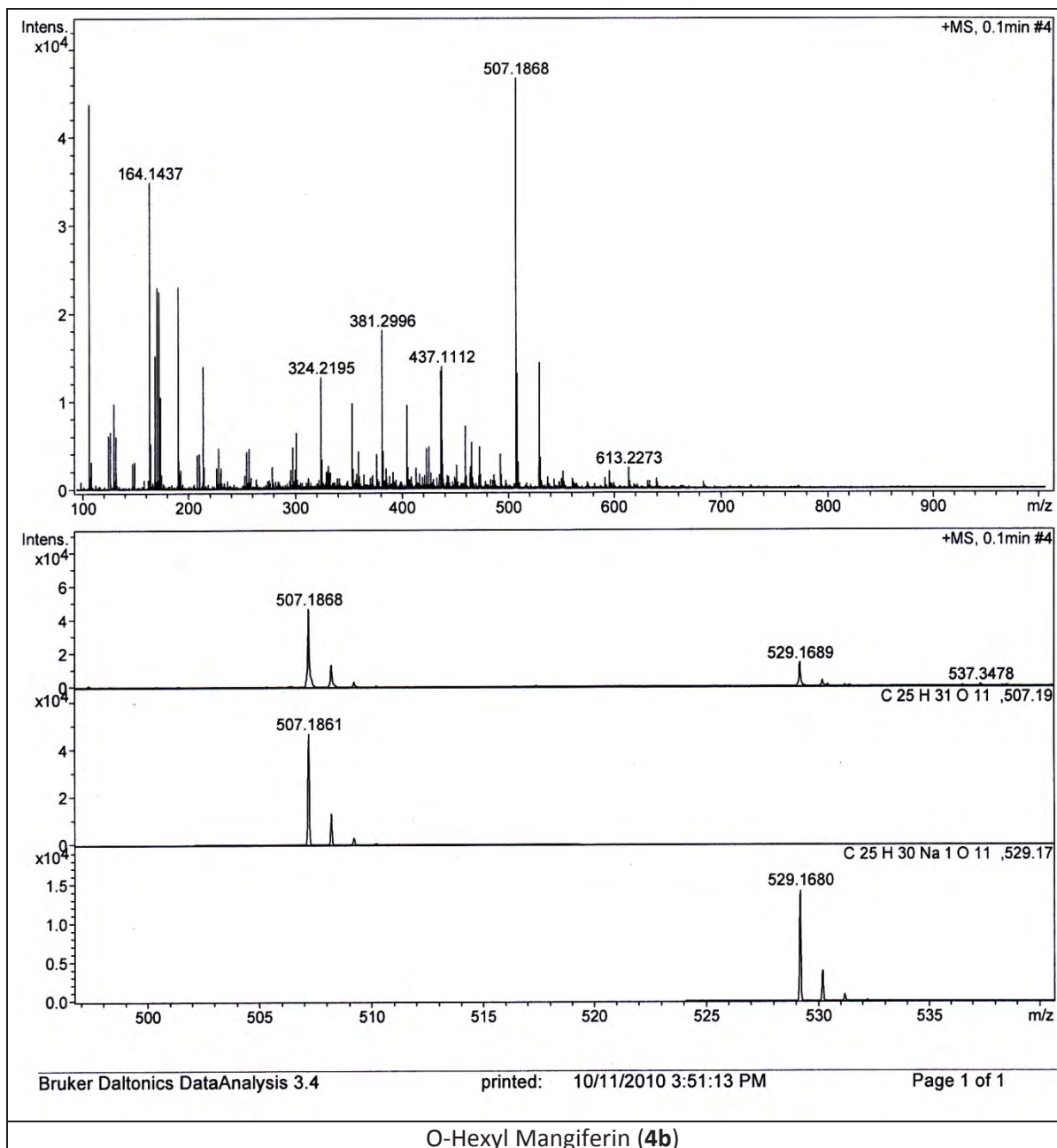
H^{4'} H^{5'}
HO

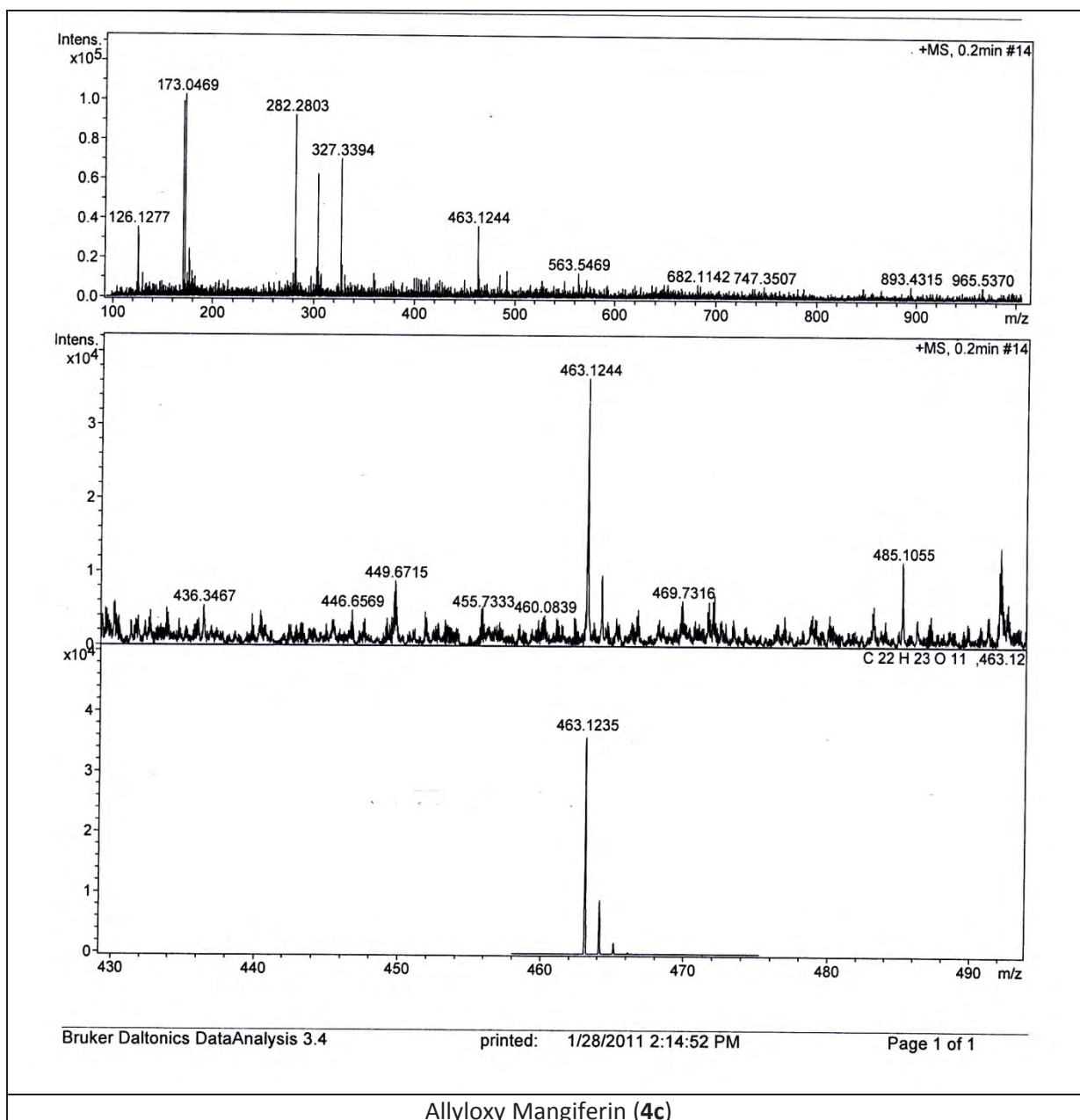
H^{4'} H^{5'}
HO

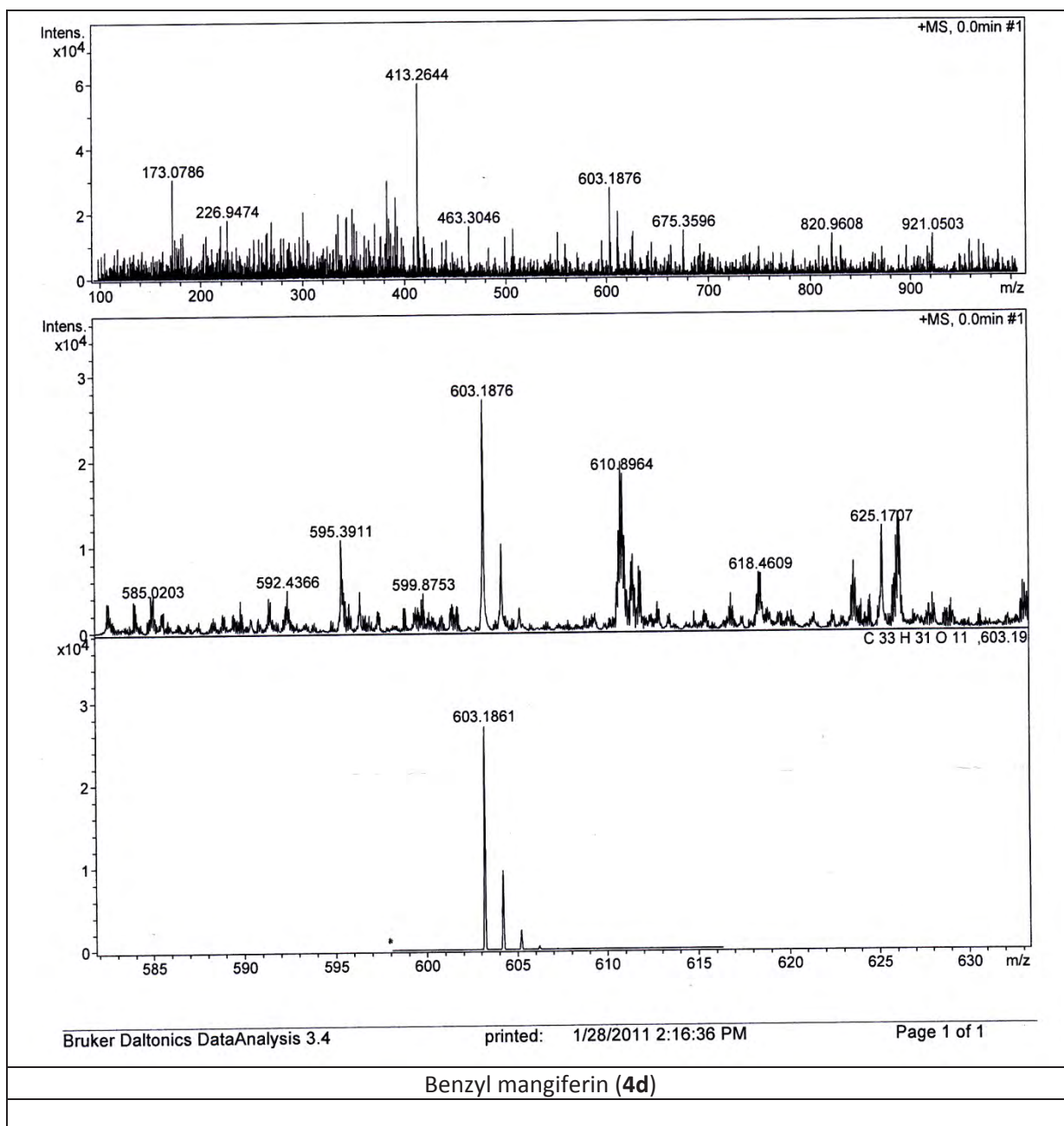
ภาคผนวก ค
ข้อมูล Mass Spectrum

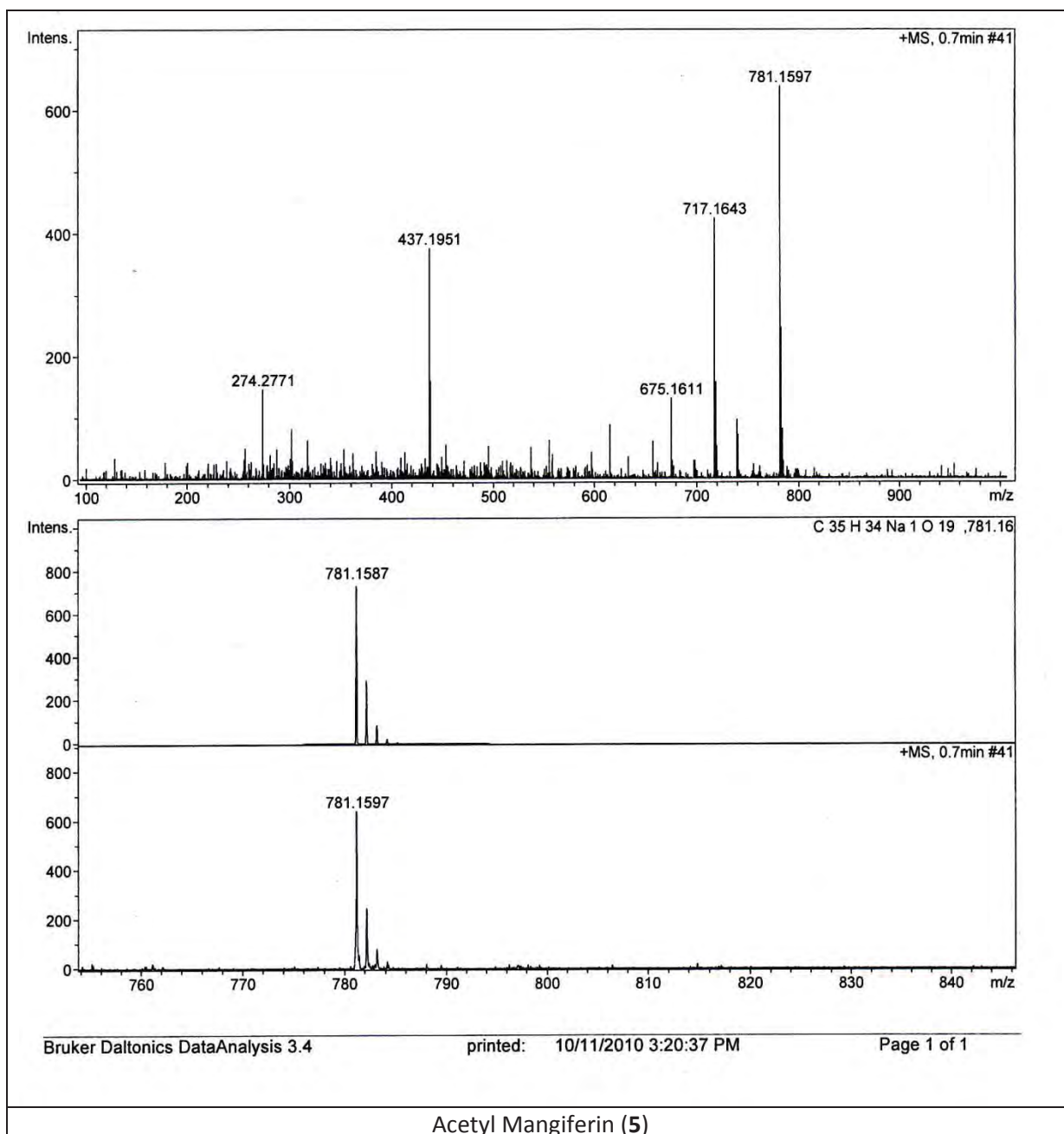


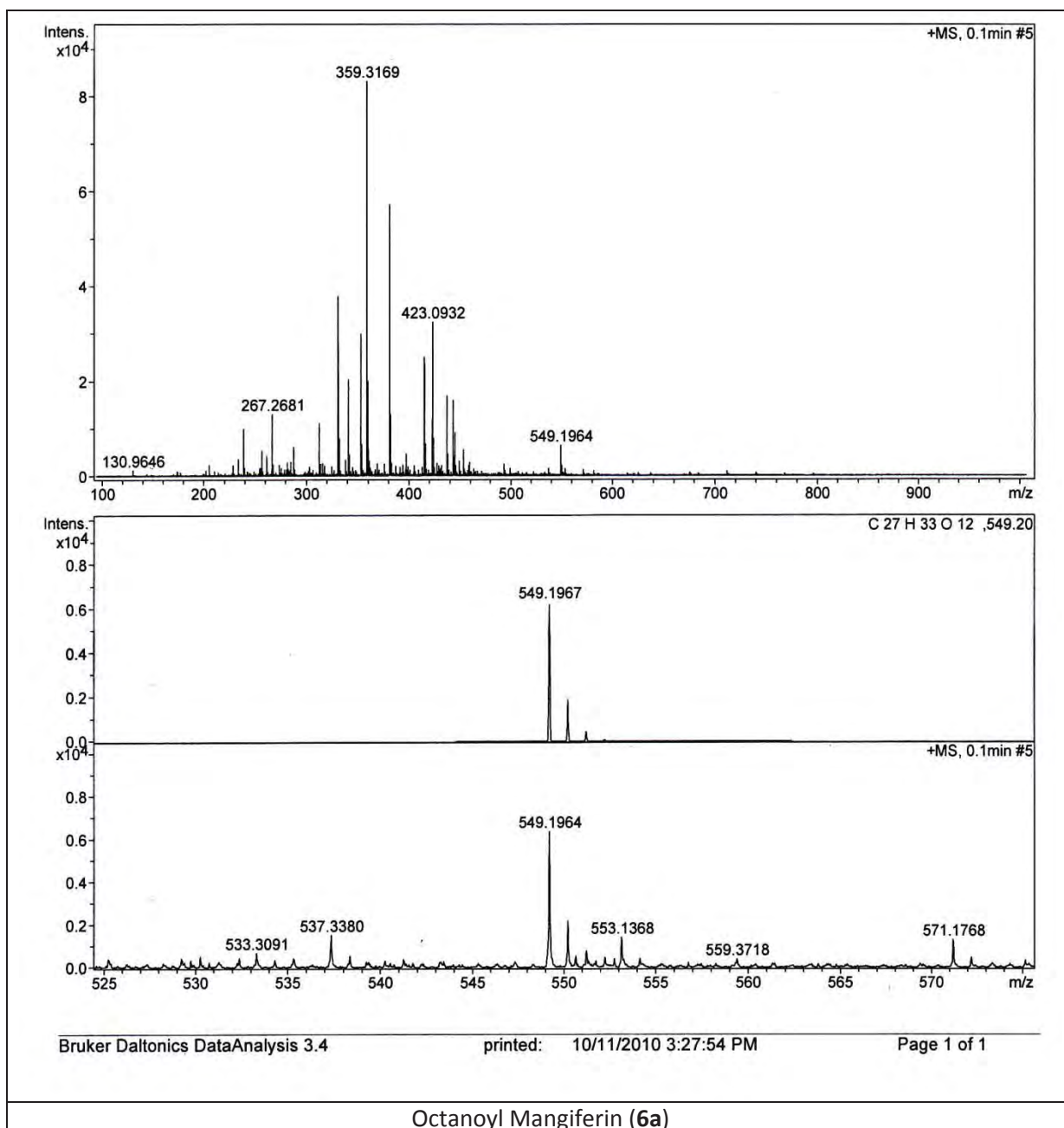


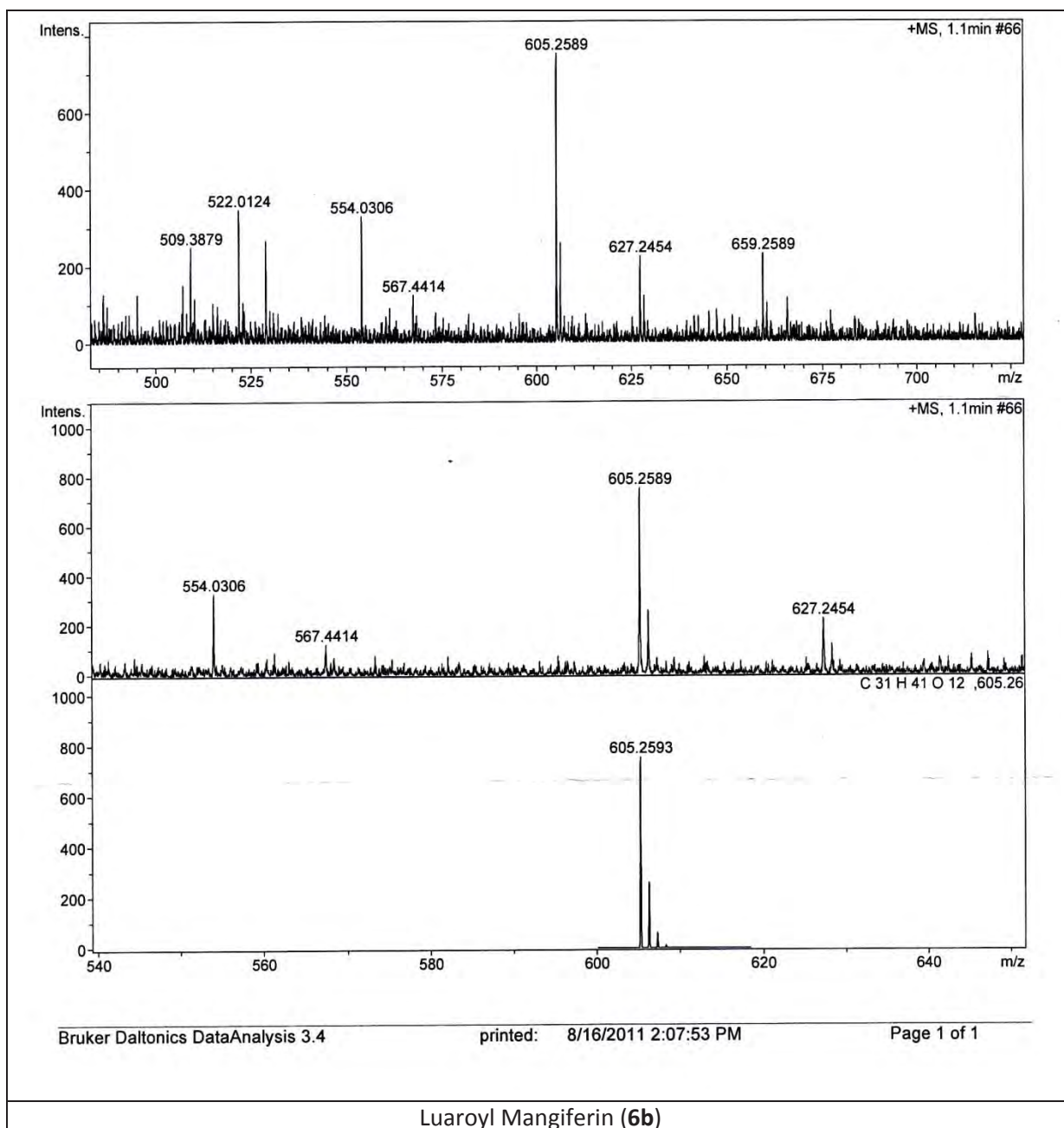


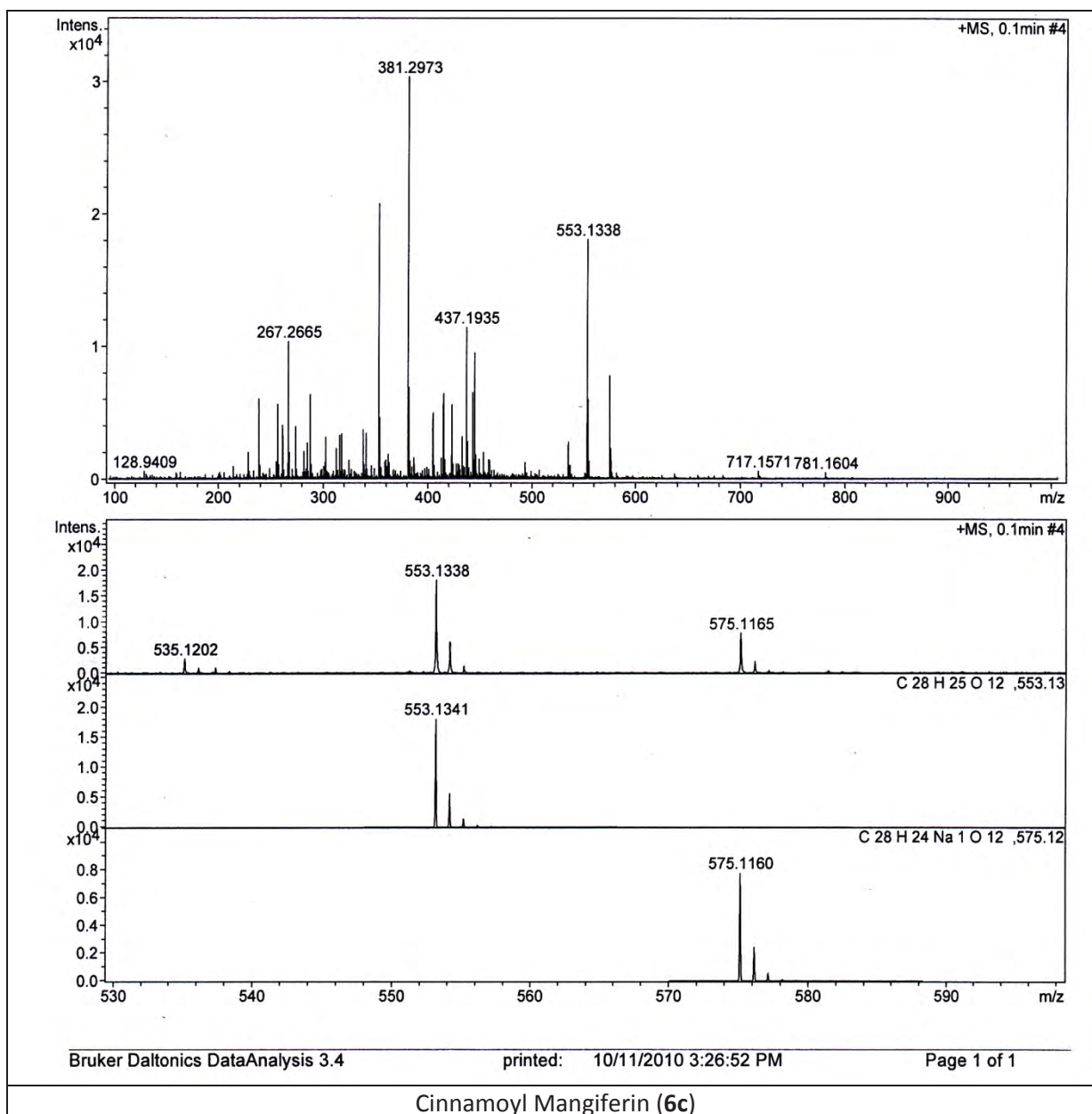


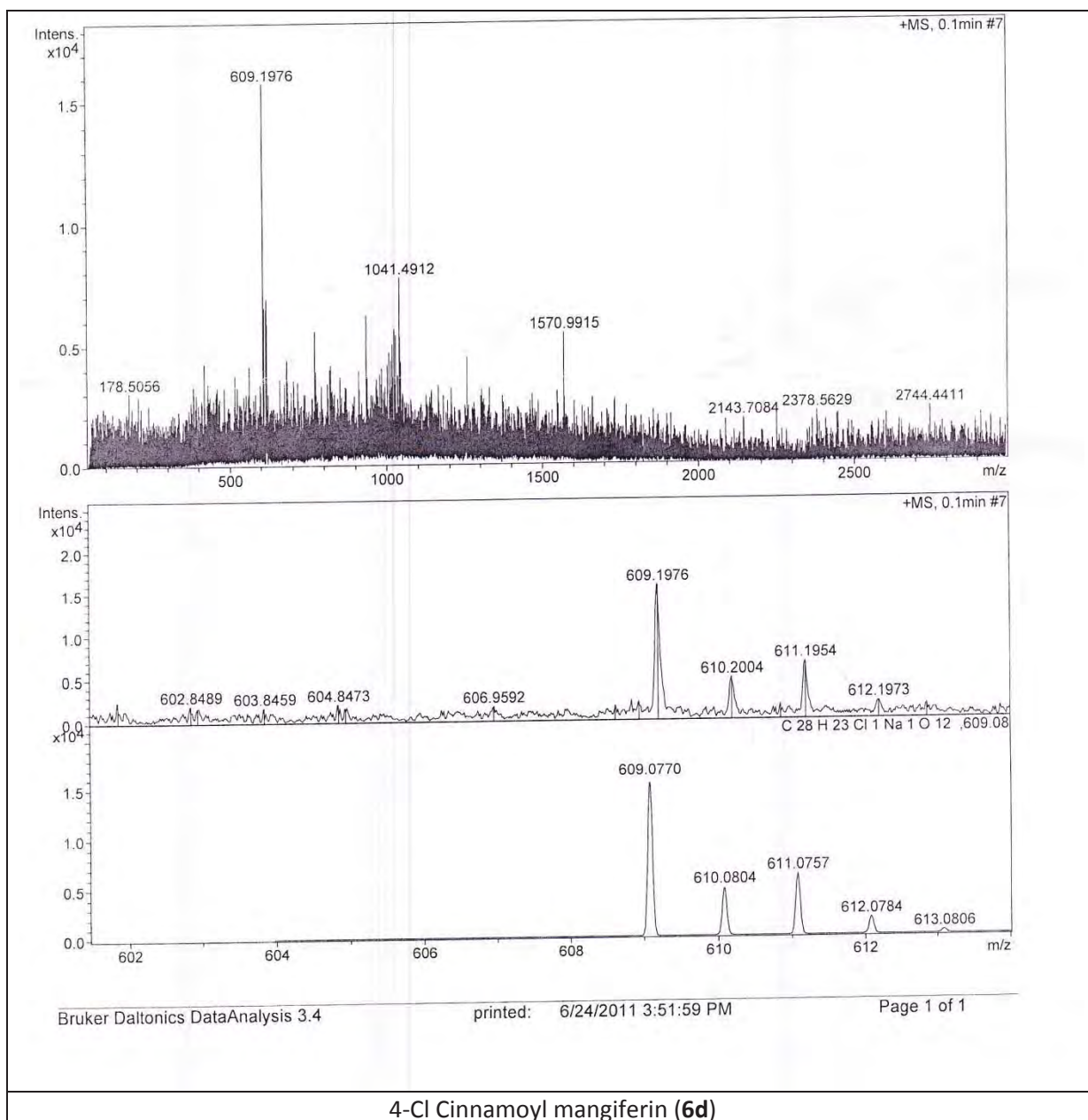


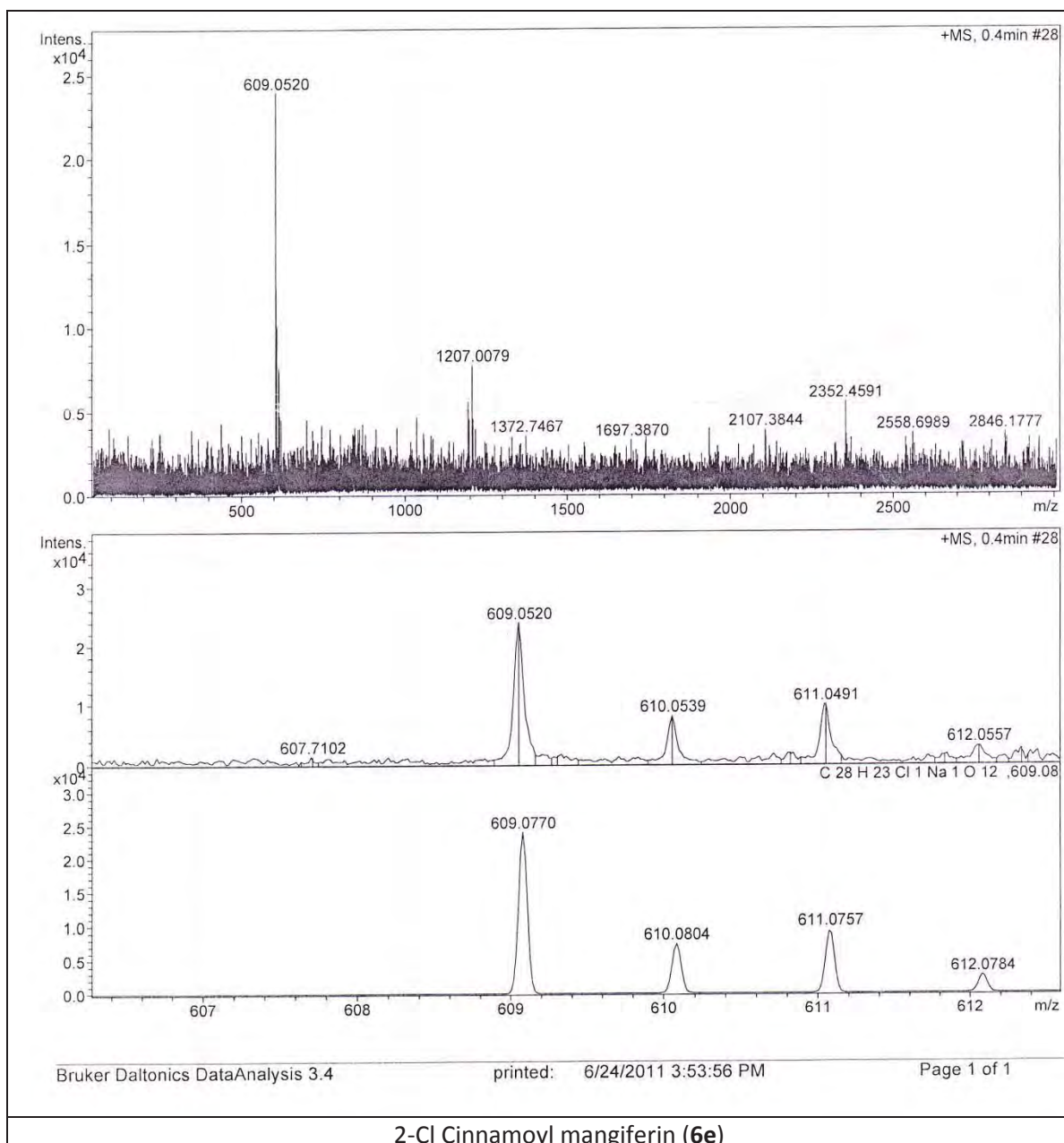


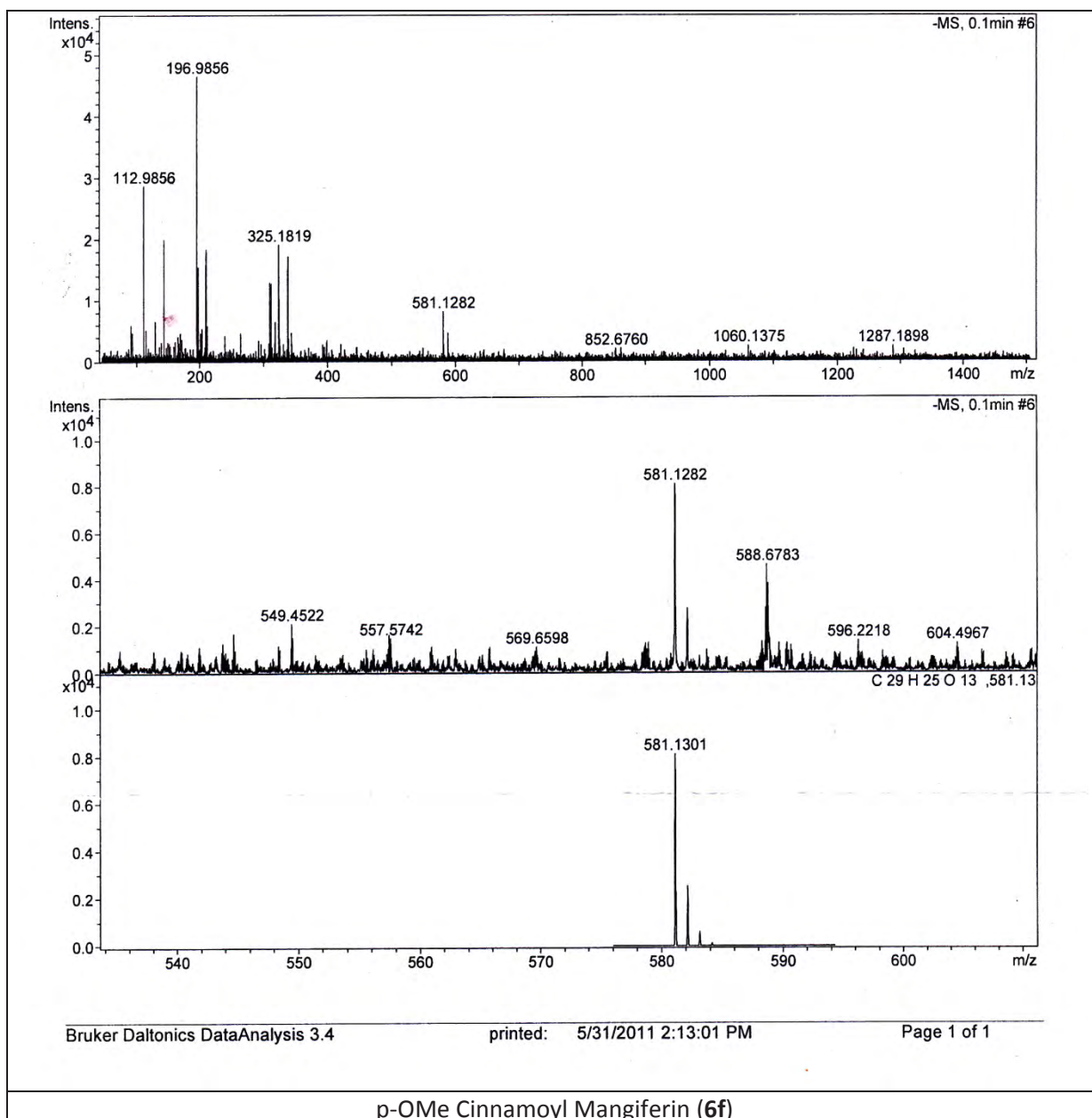






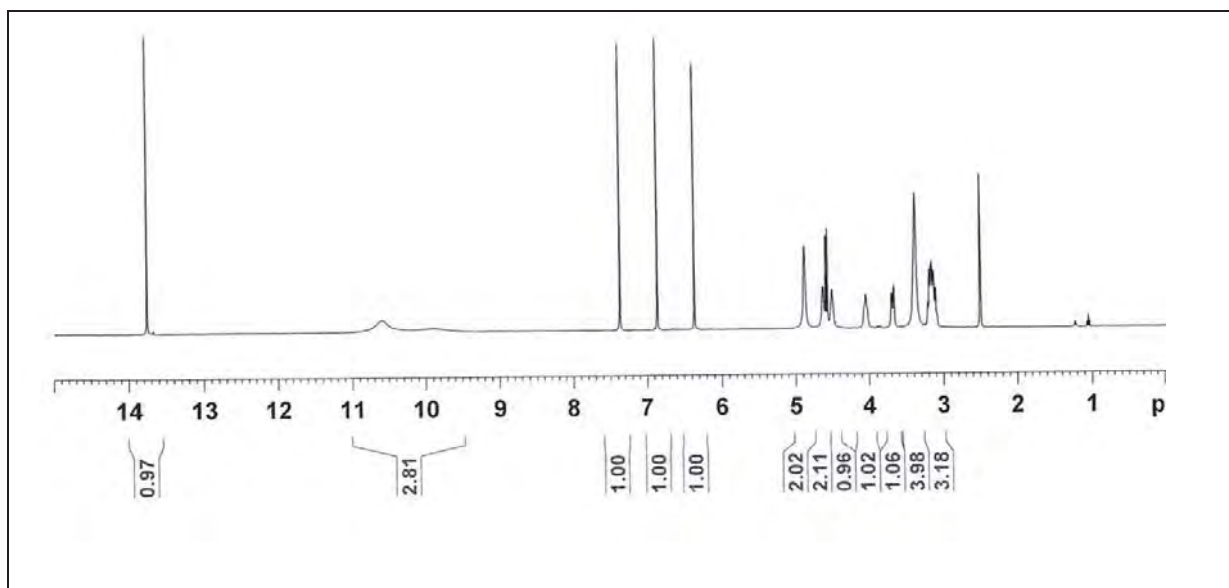
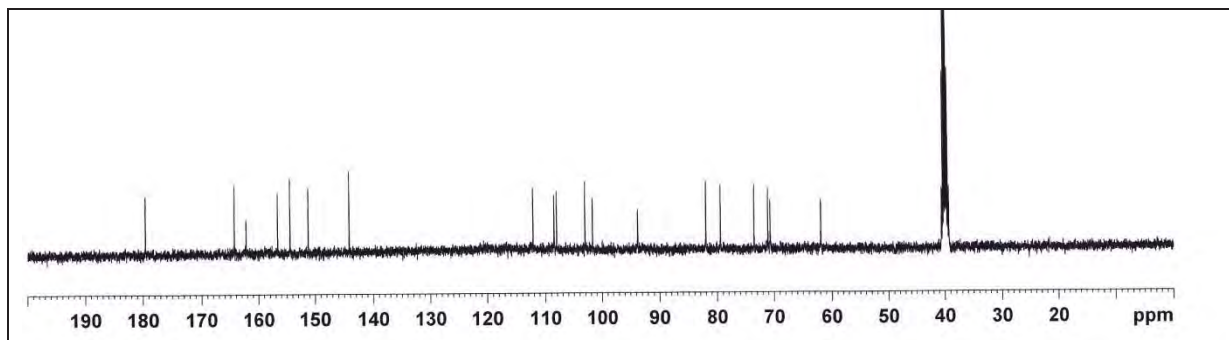


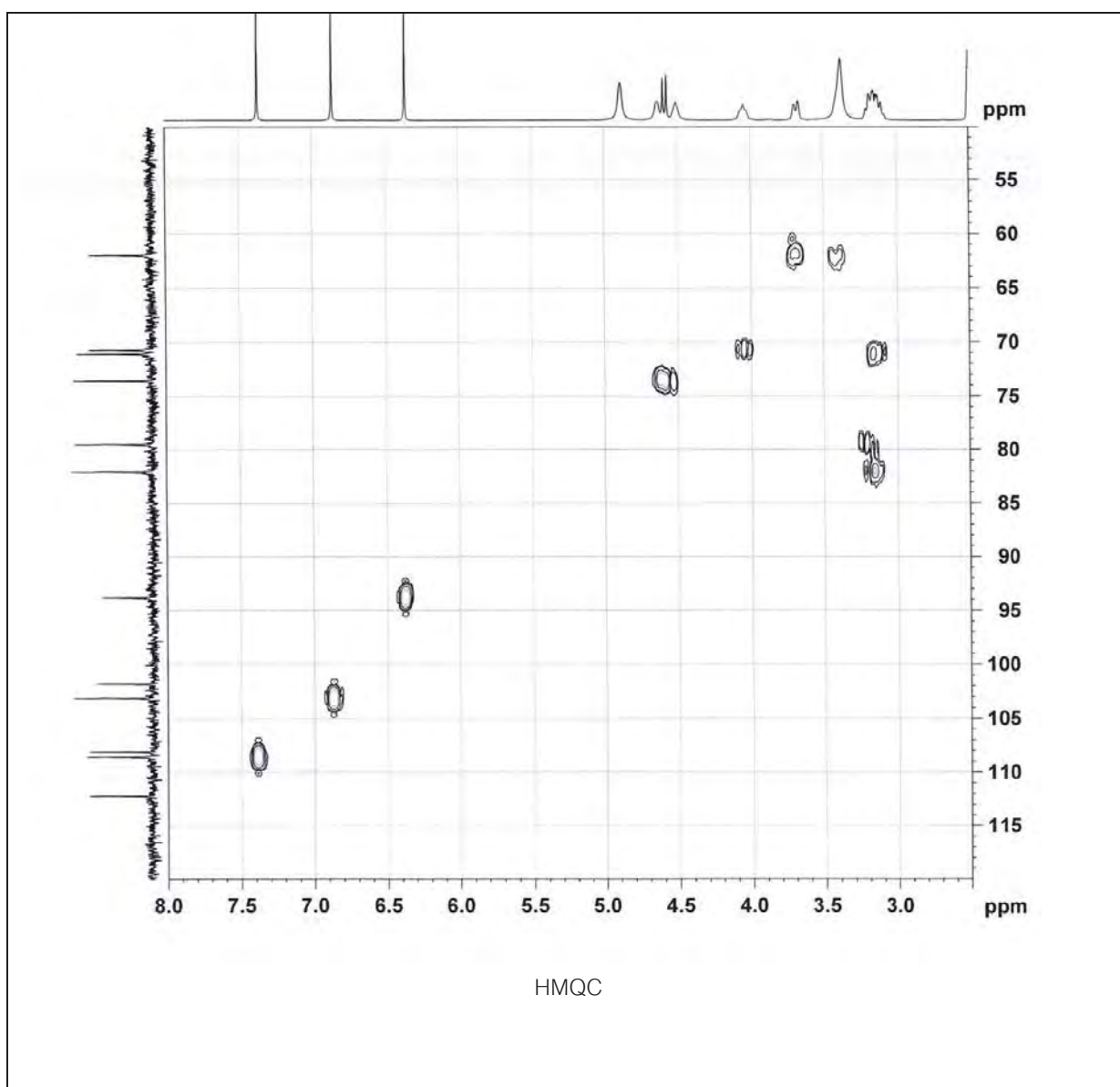


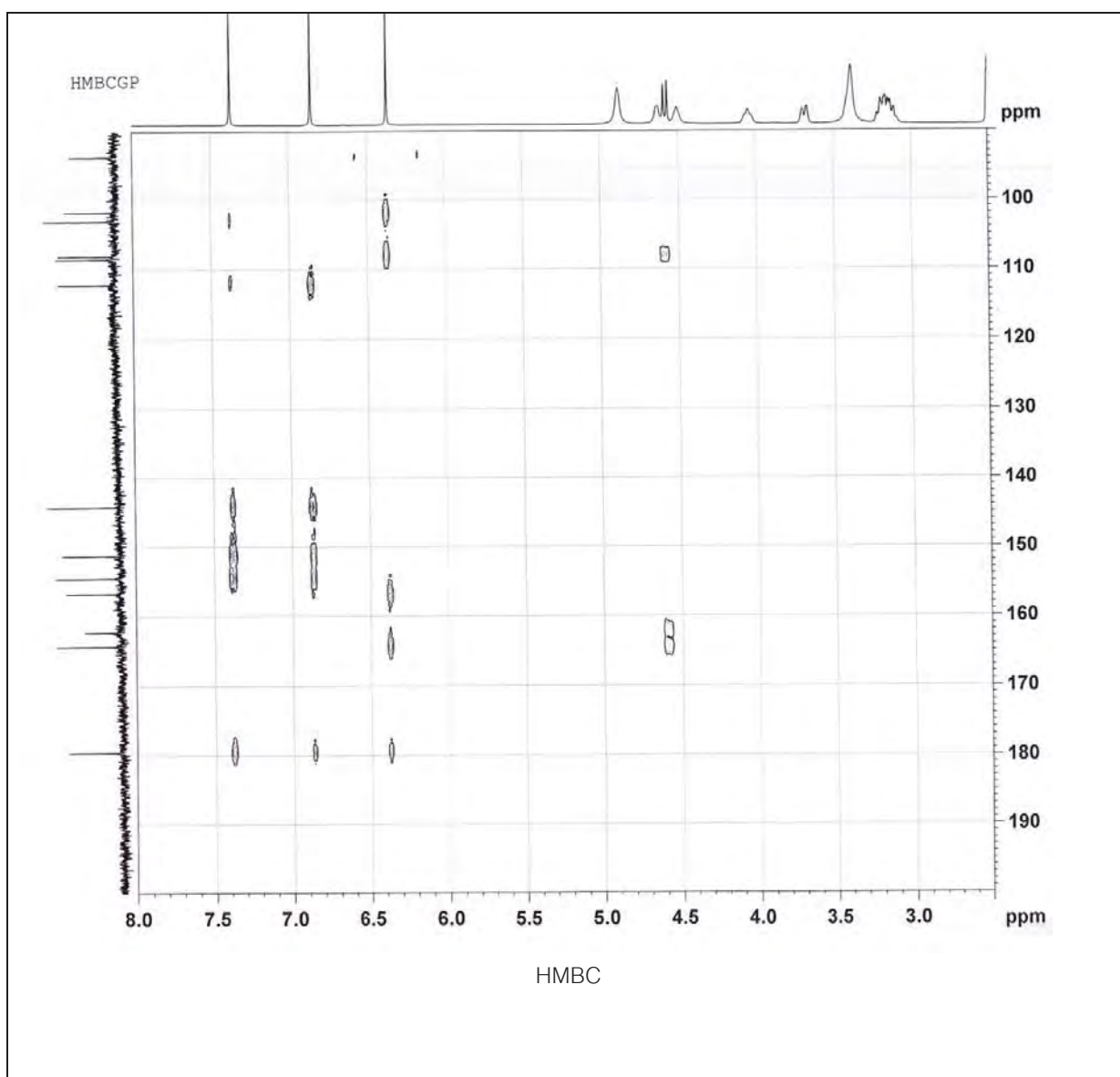


ภาคผนวก ง
NMR Spectral data

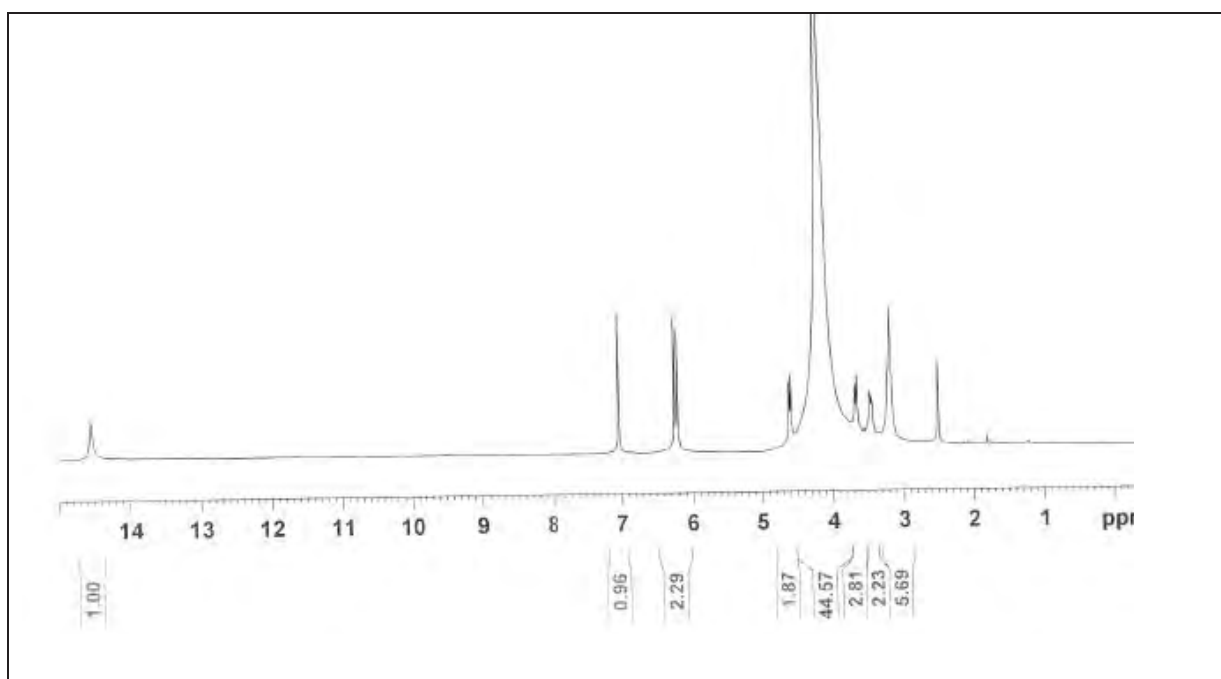
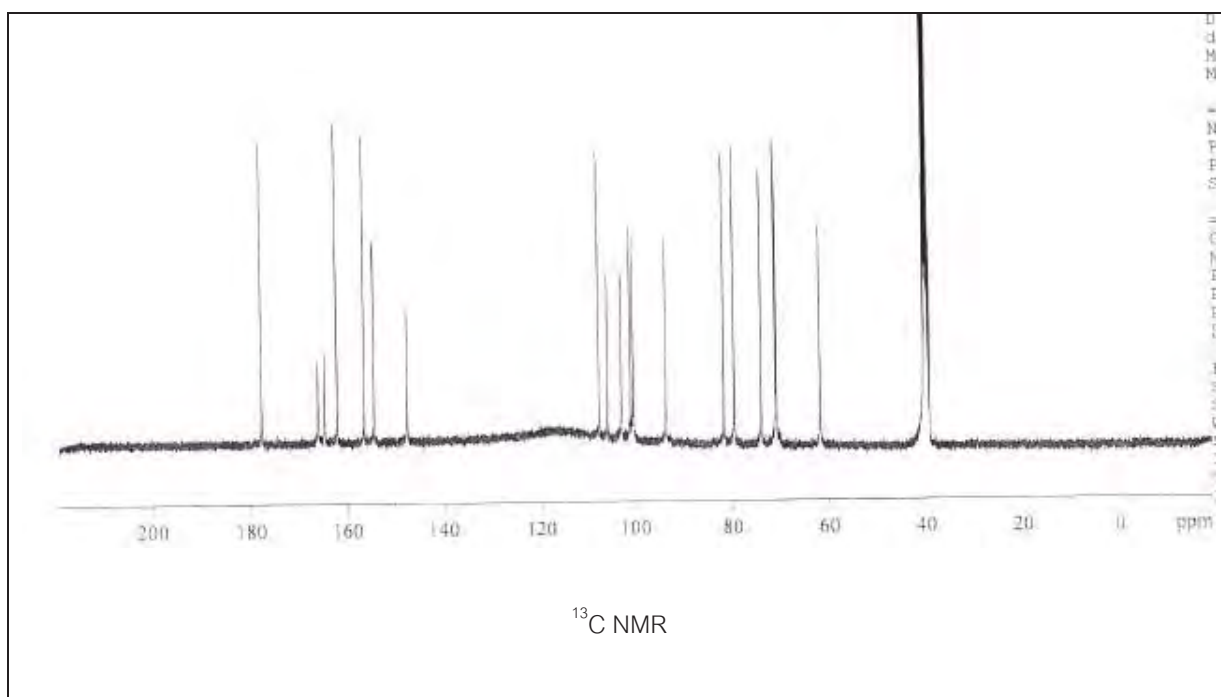
Mangiferin (1)

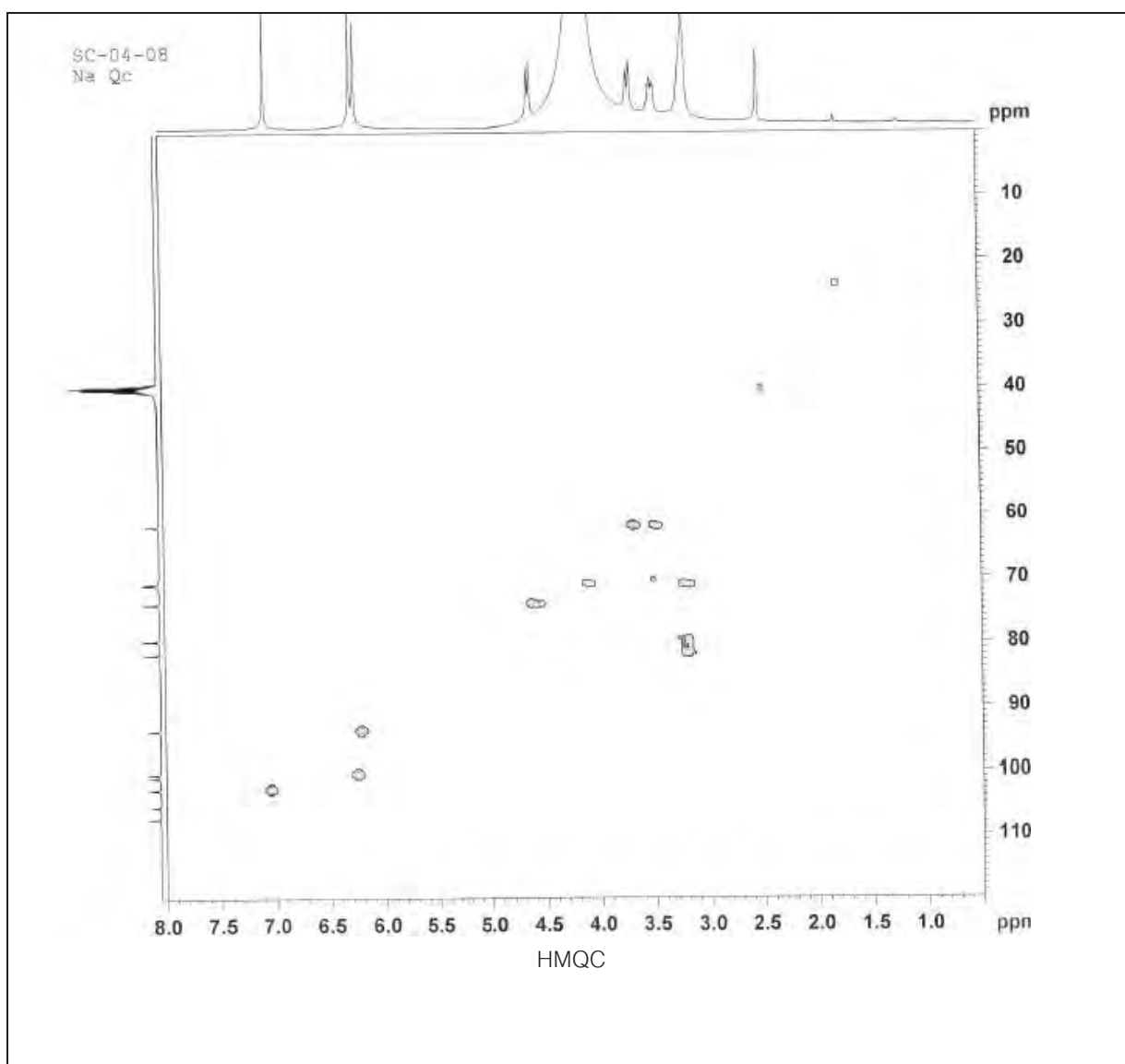
¹H NMR¹³C NMR

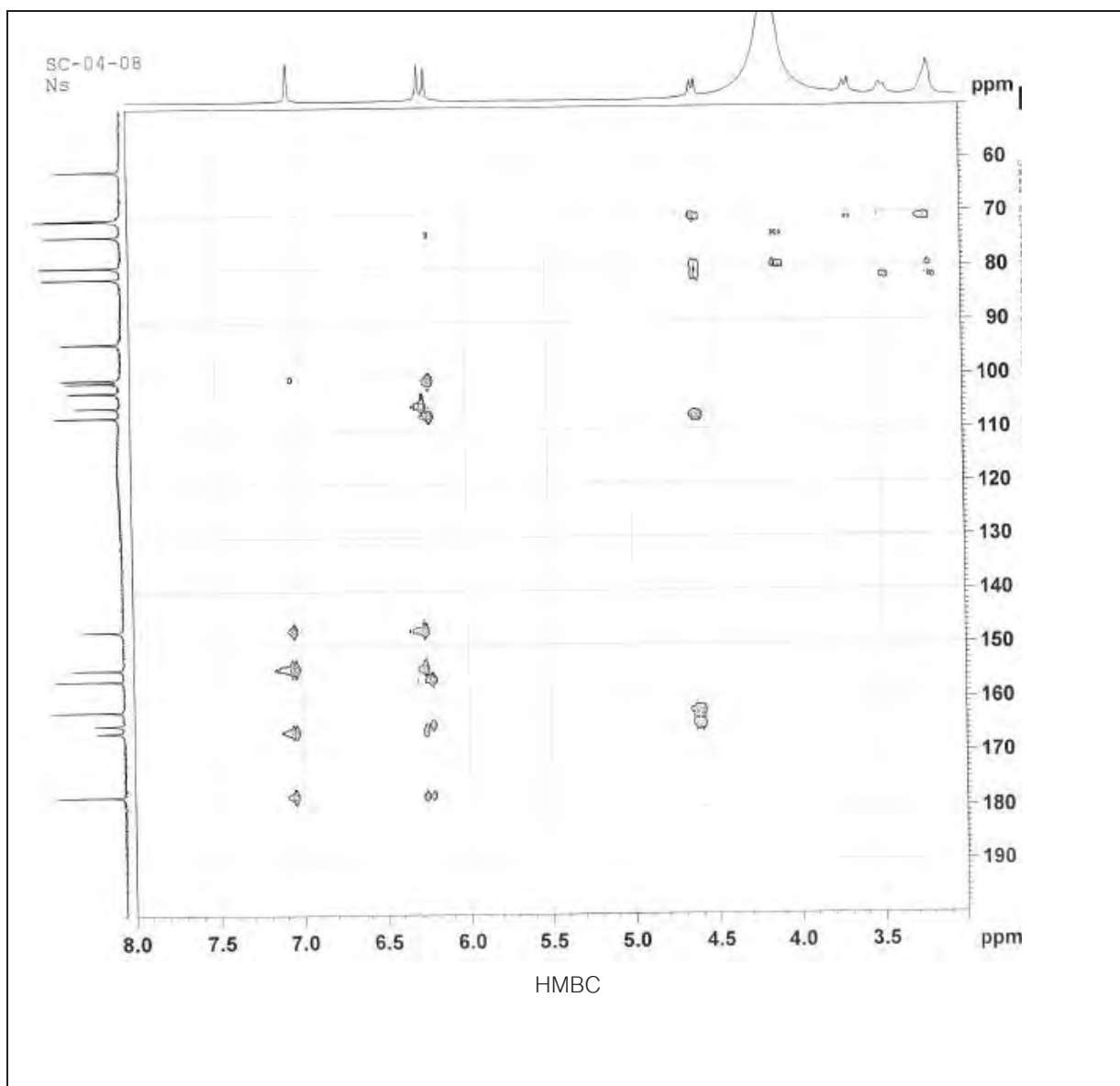




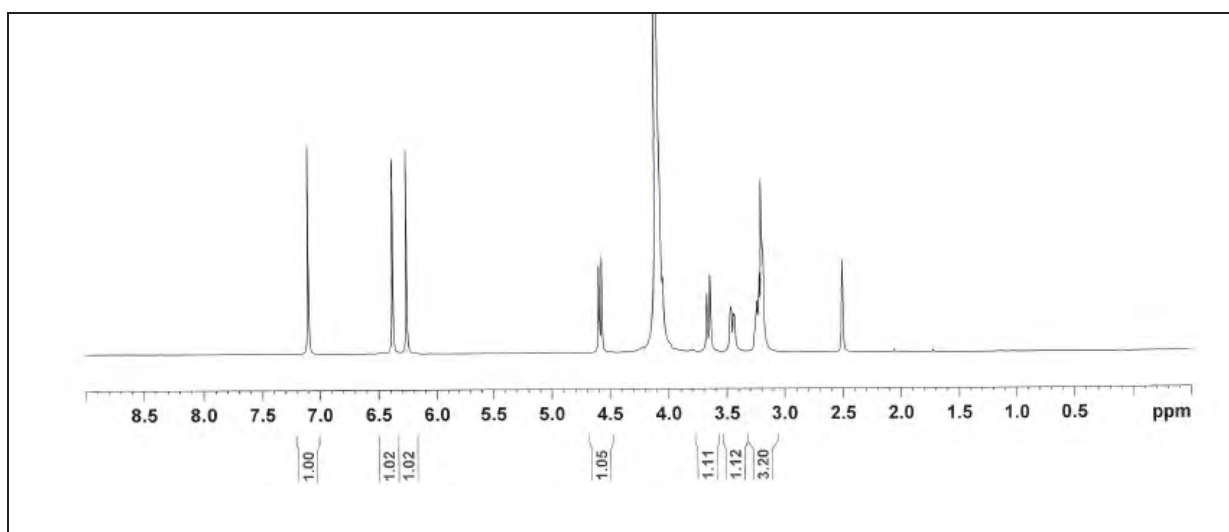
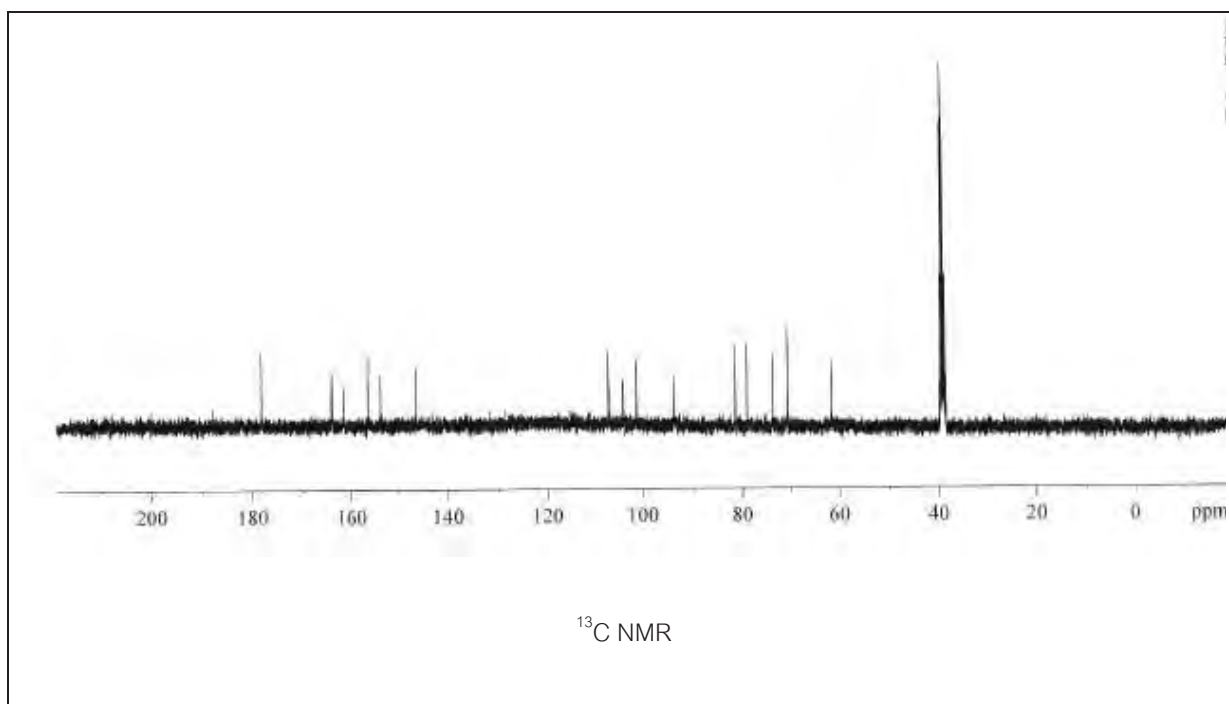
Sodium Mangiferin (2a)

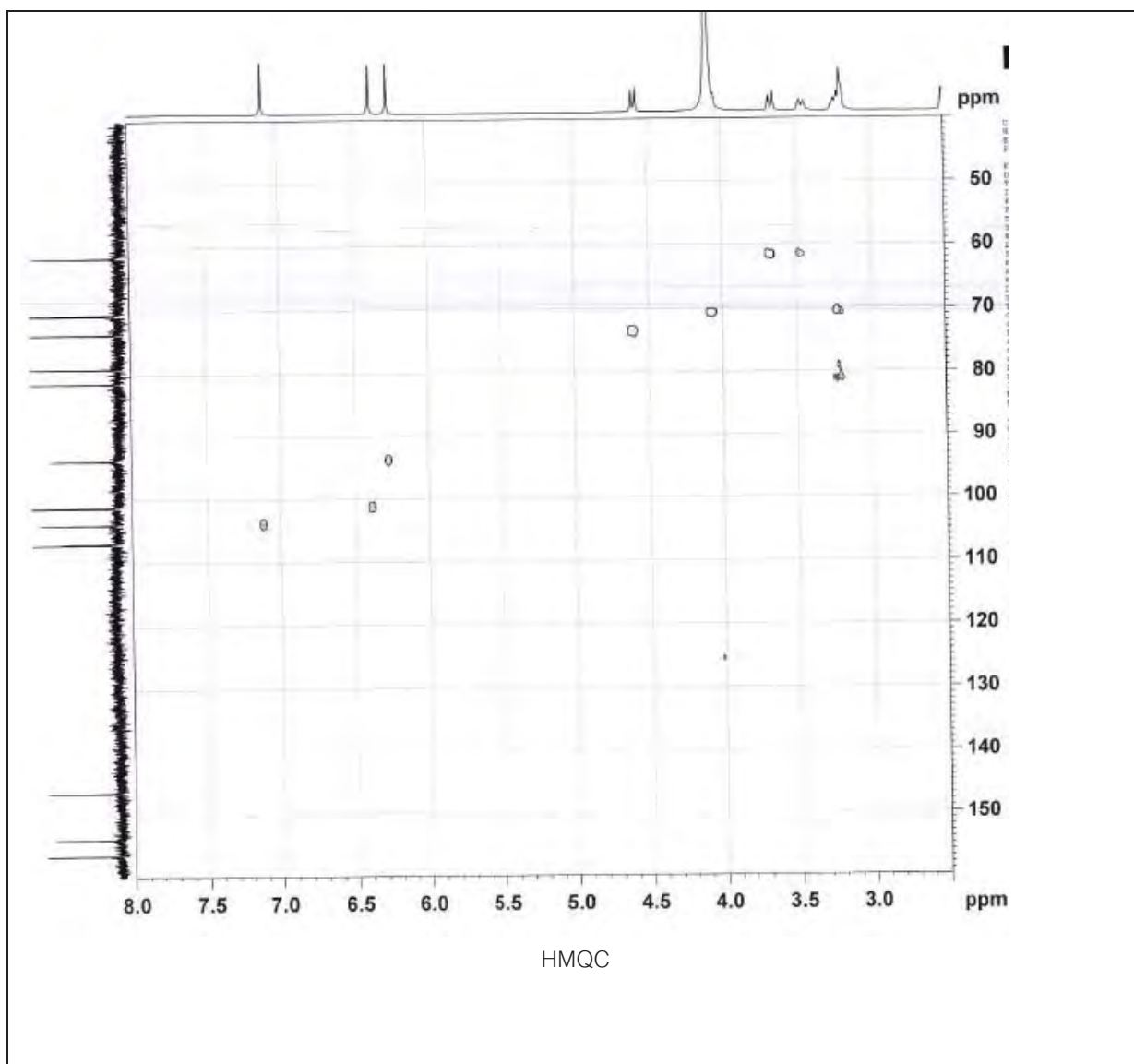
 ^1H NMR ^{13}C NMR

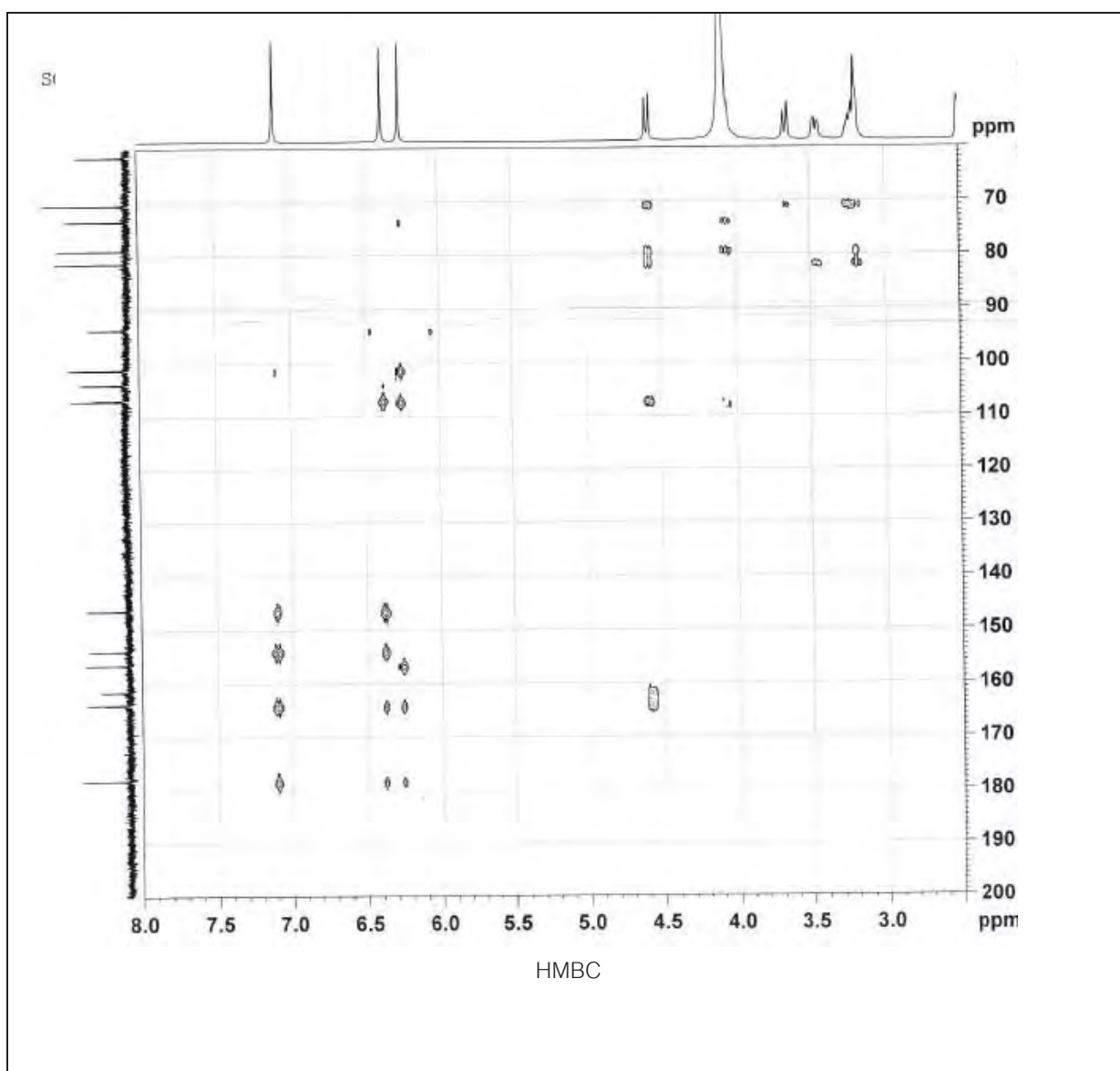




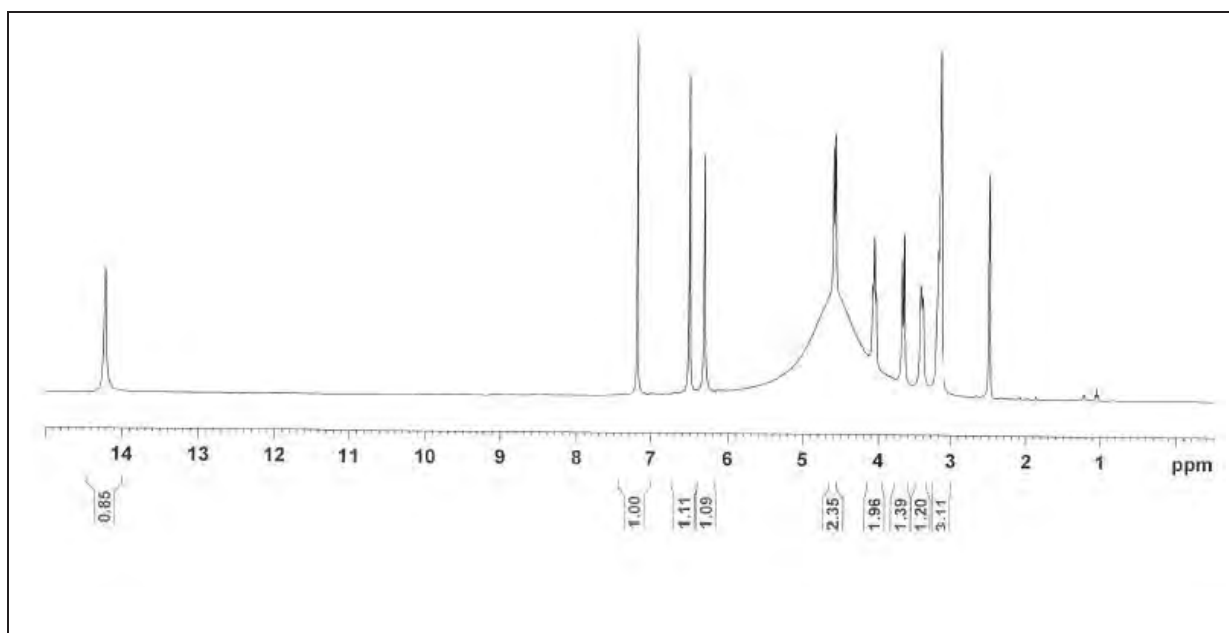
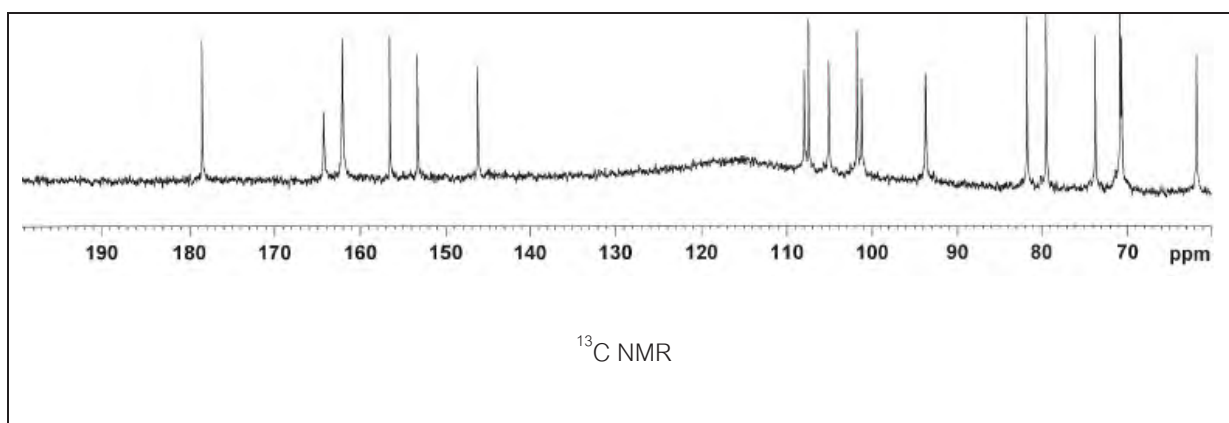
Potassium Mangiferin (2b)

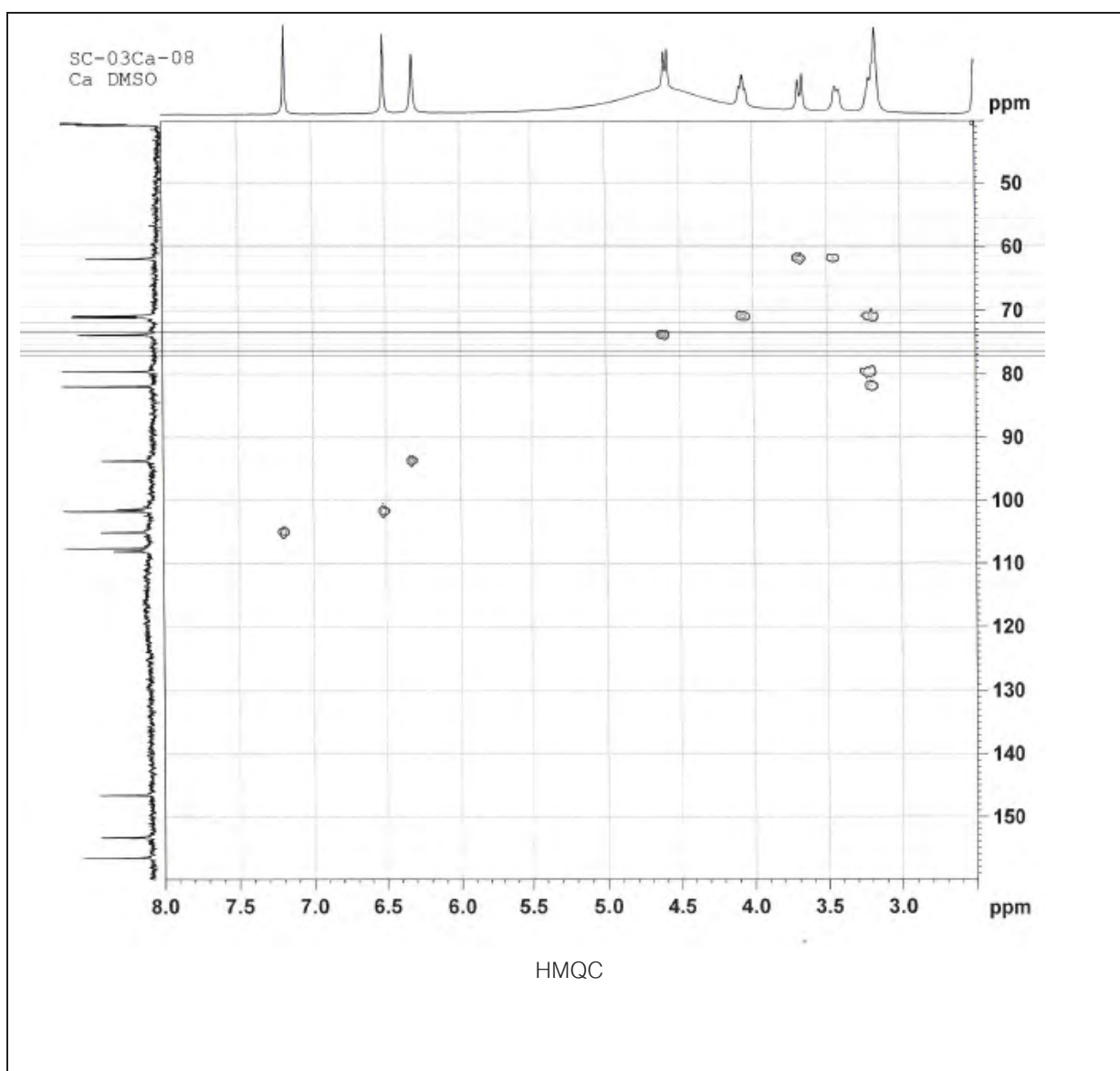
 ^1H NMR ^{13}C NMR

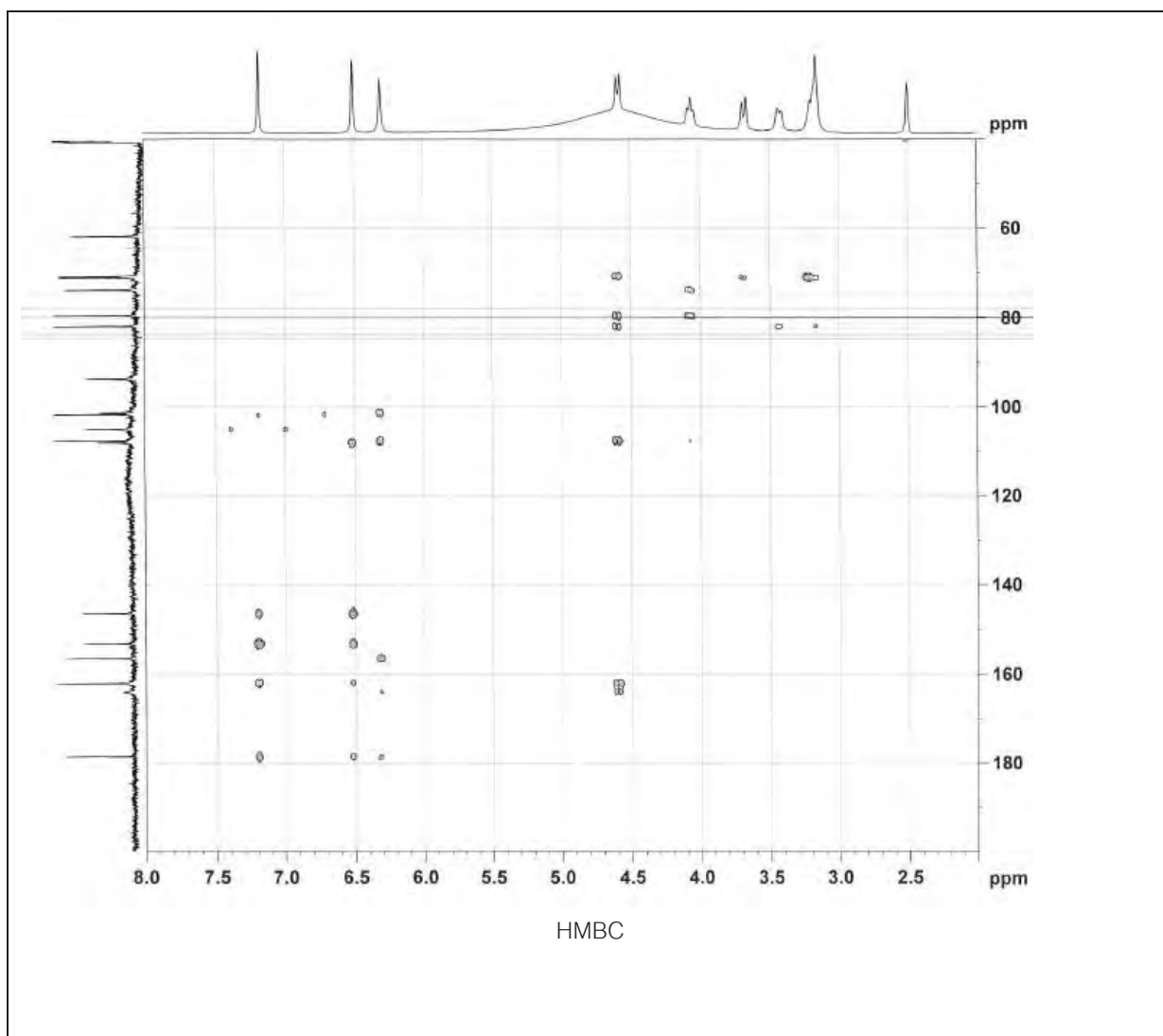




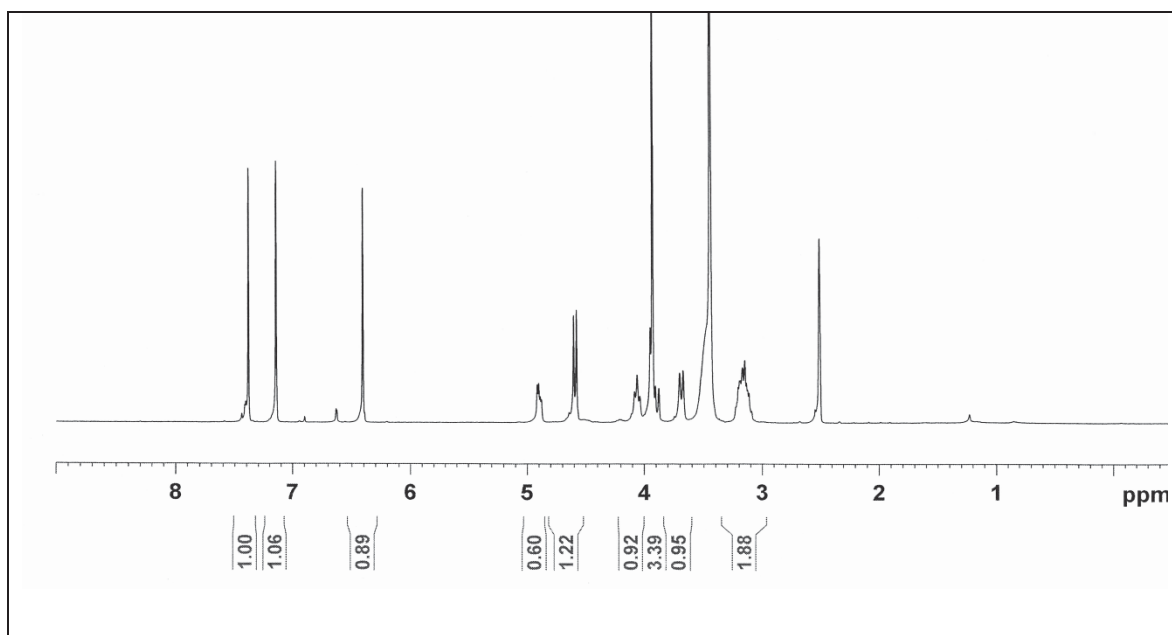
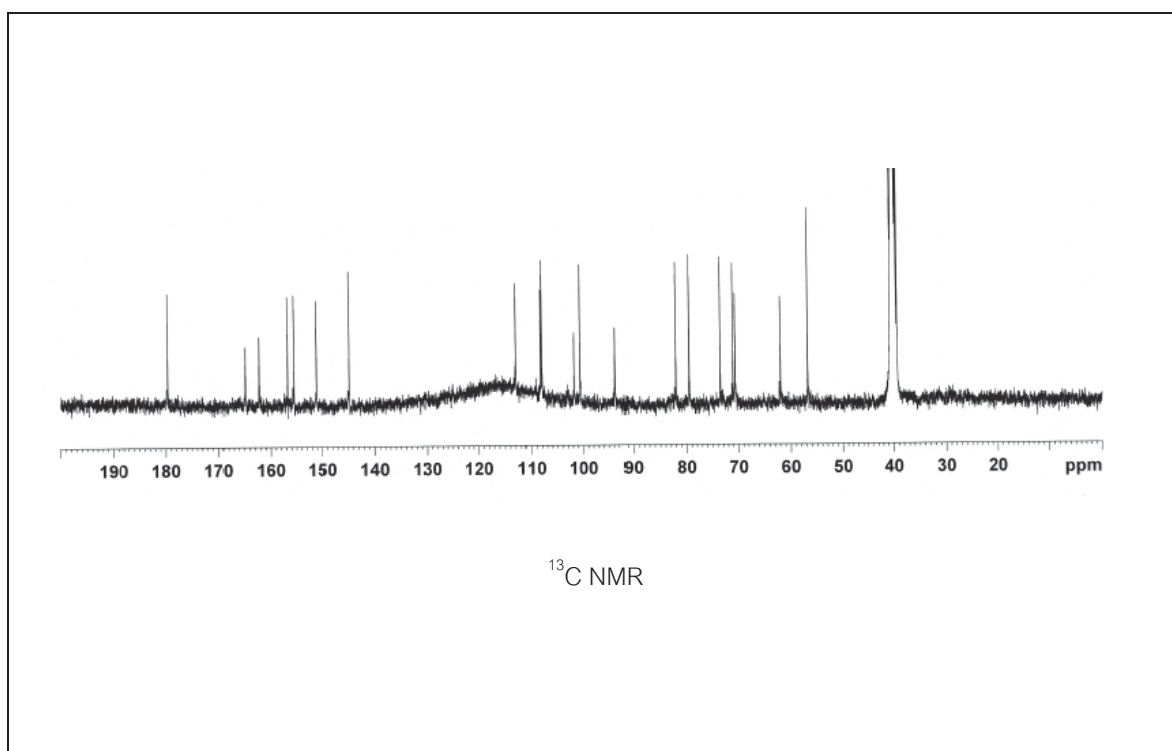
Calcium Mangiferin (2c)

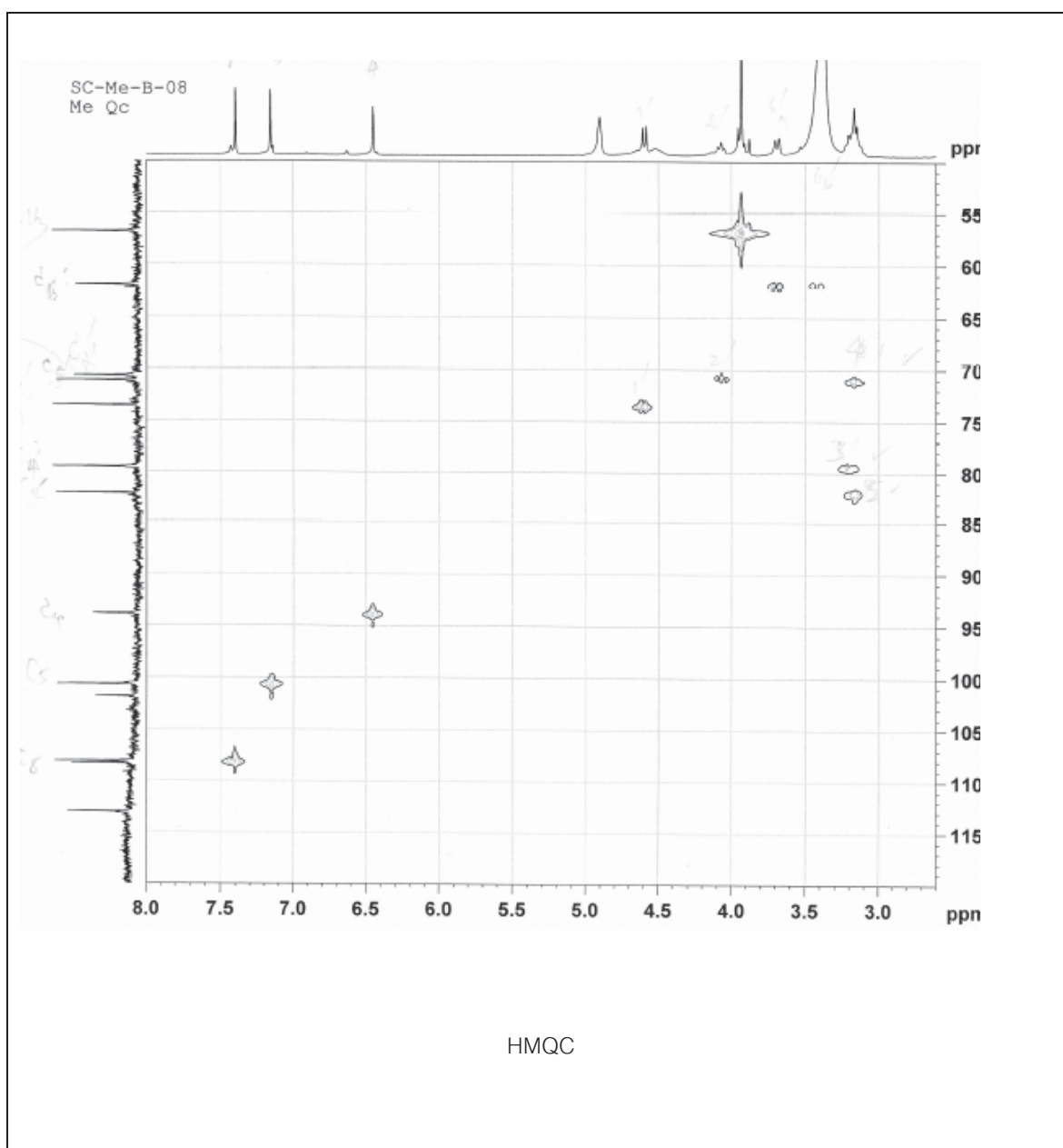
¹H NMR¹³C NMR

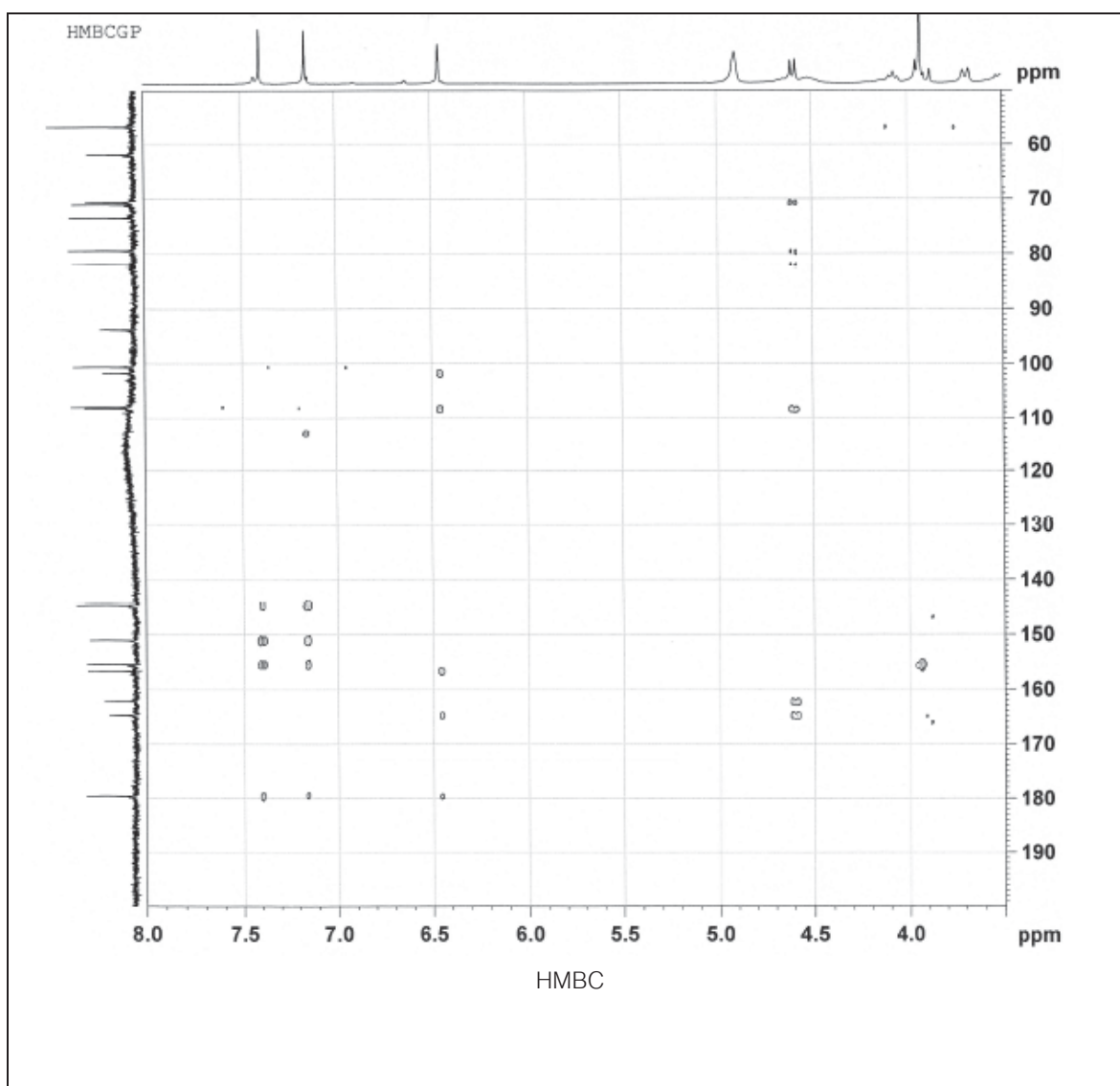




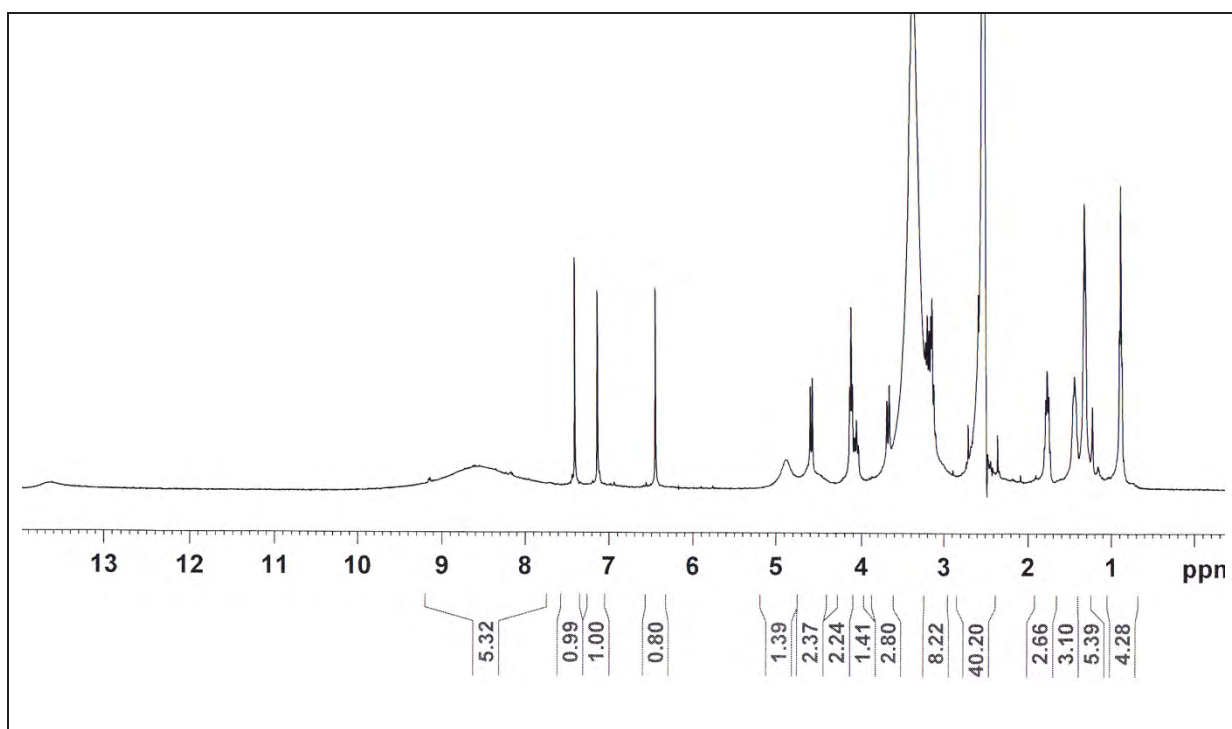
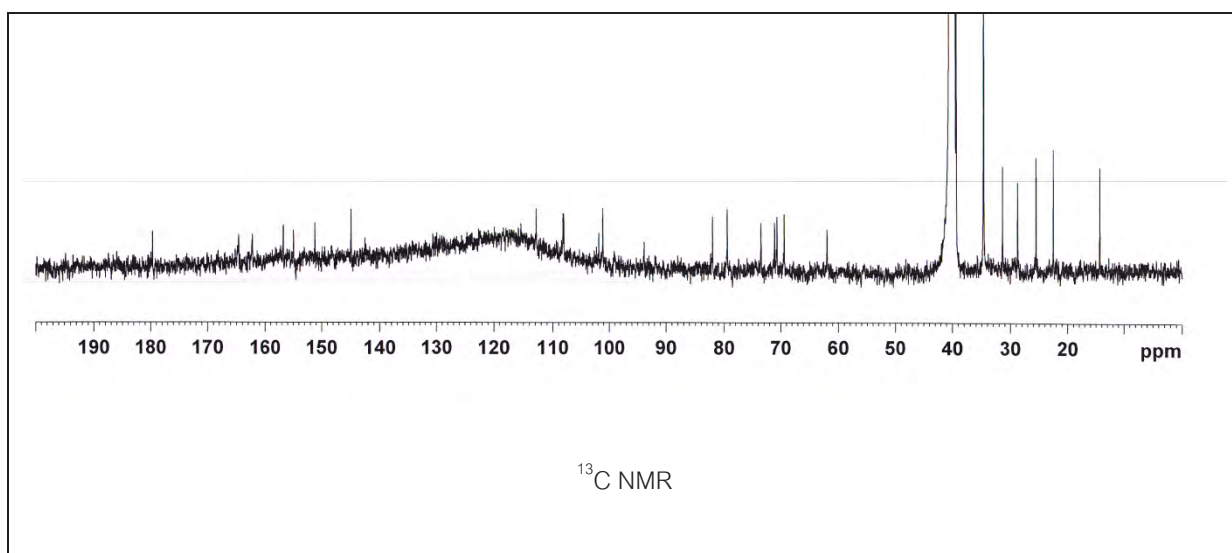
Methoxy Mangiferin (4a)

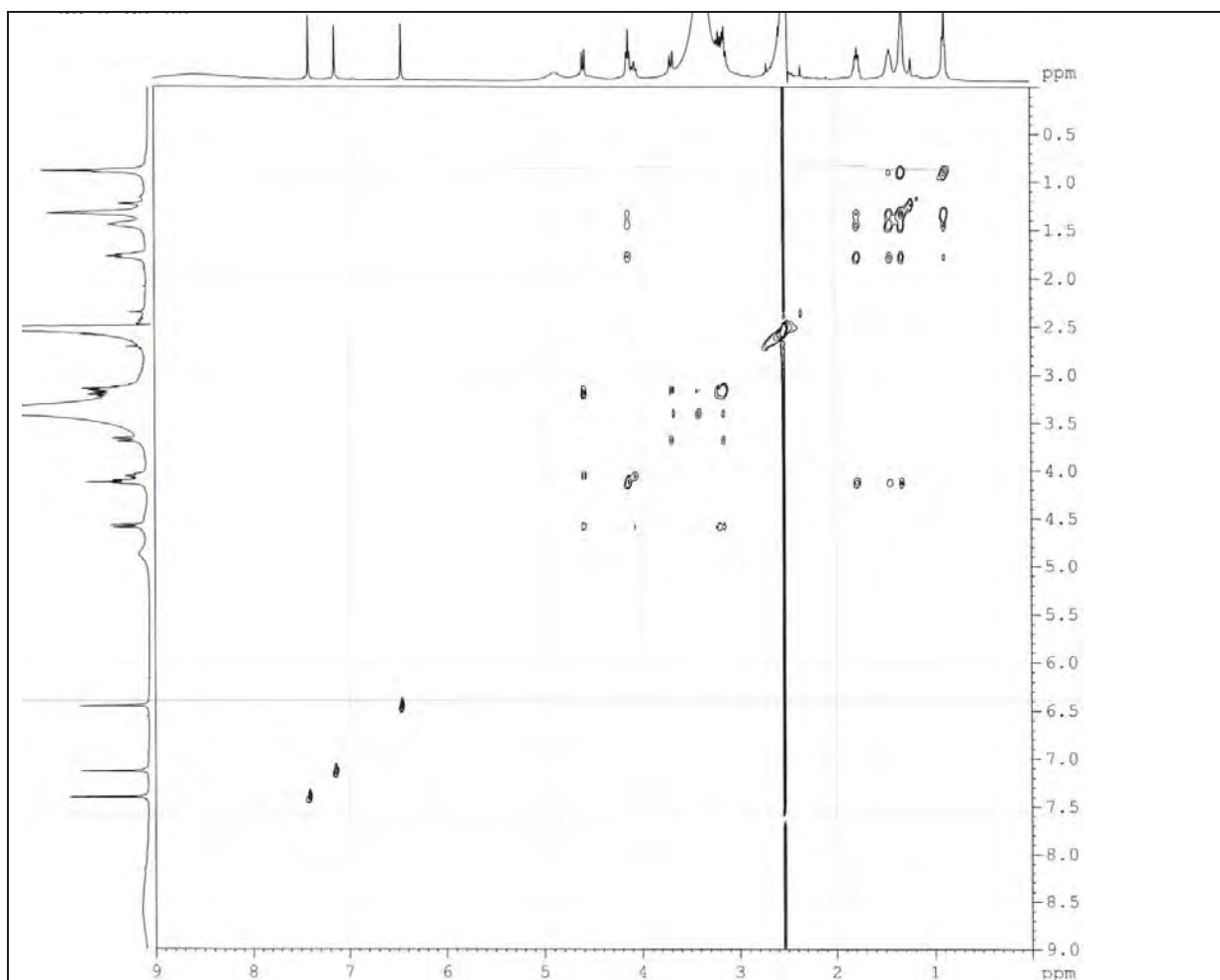
¹H NMR¹³C NMR



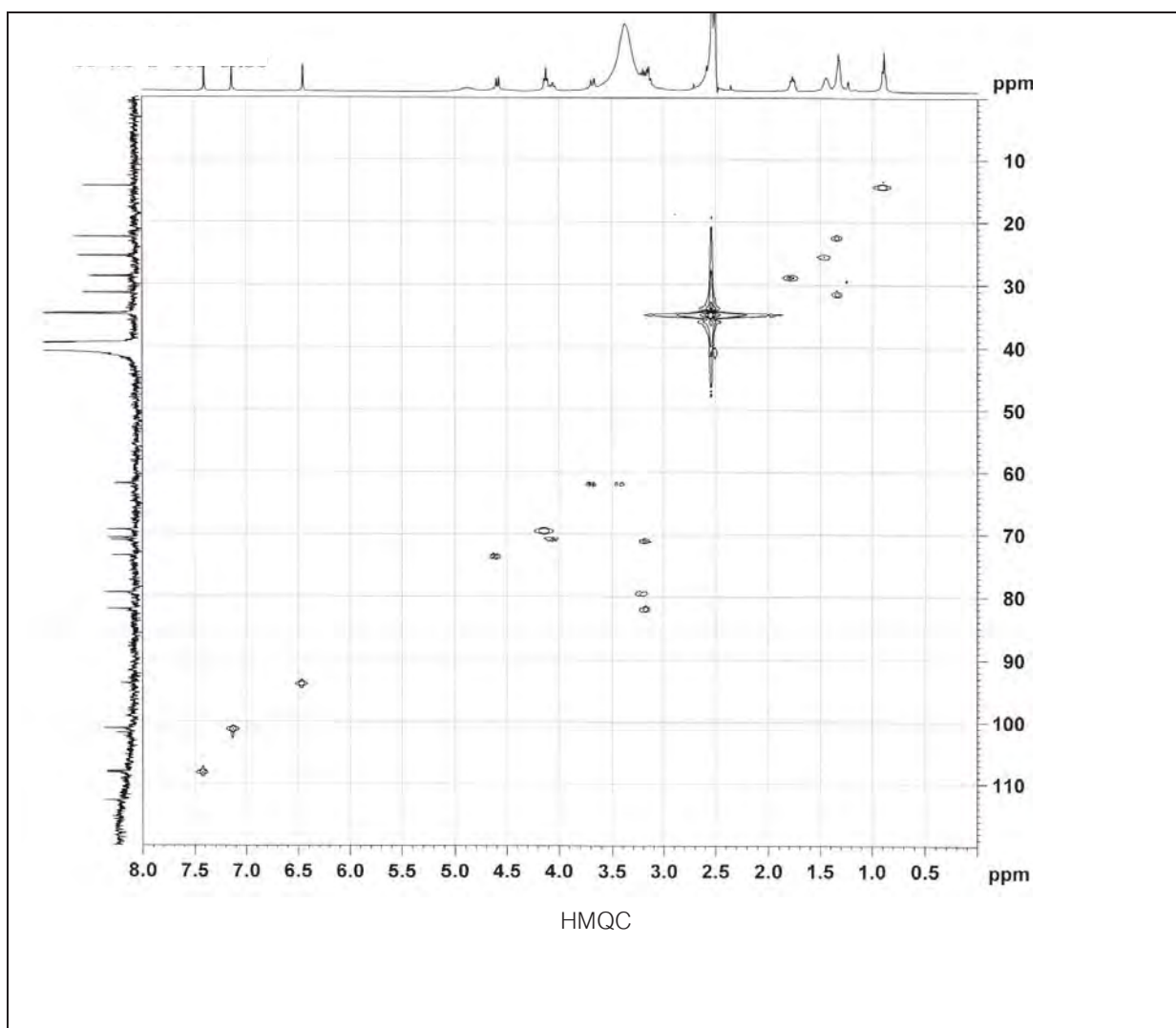


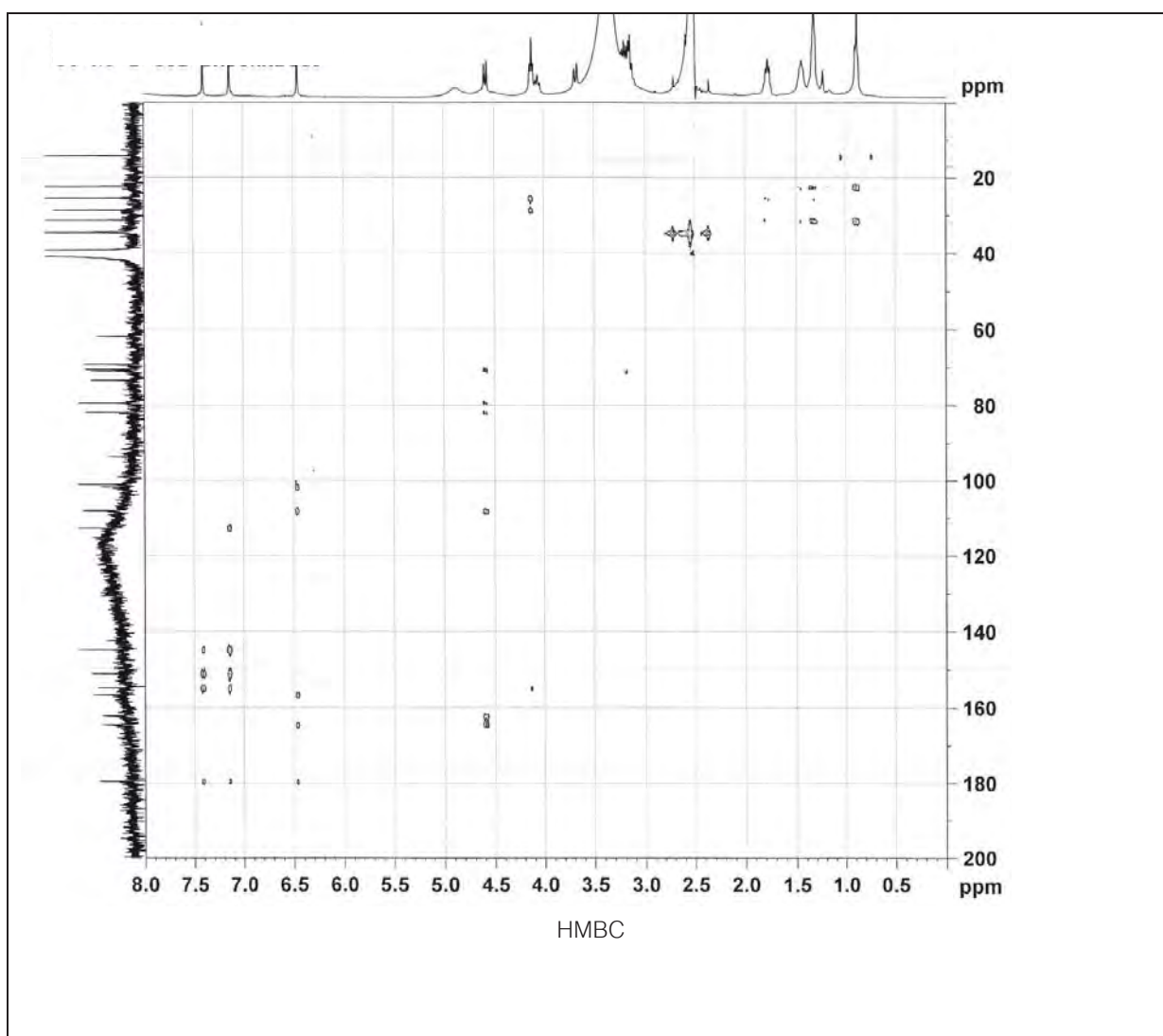
O-Hexyl Mangiferin (4b)

 ^1H NMR ^{13}C NMR

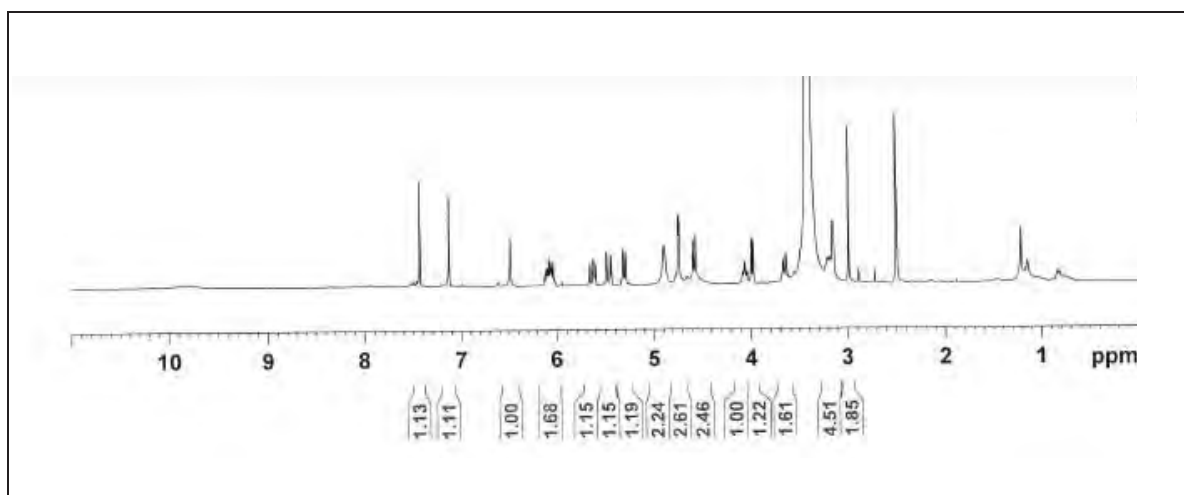
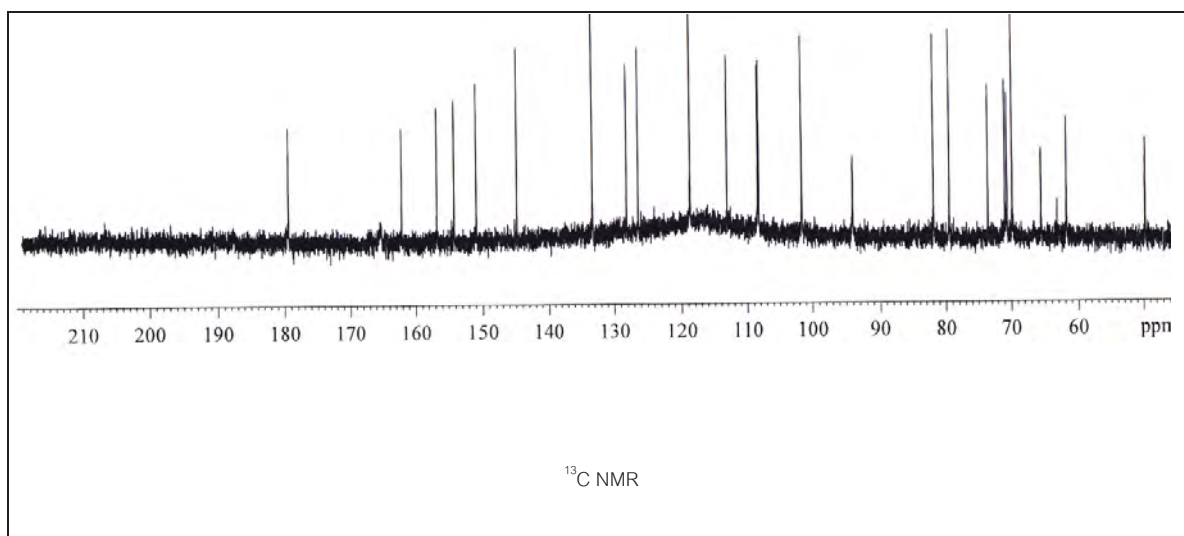


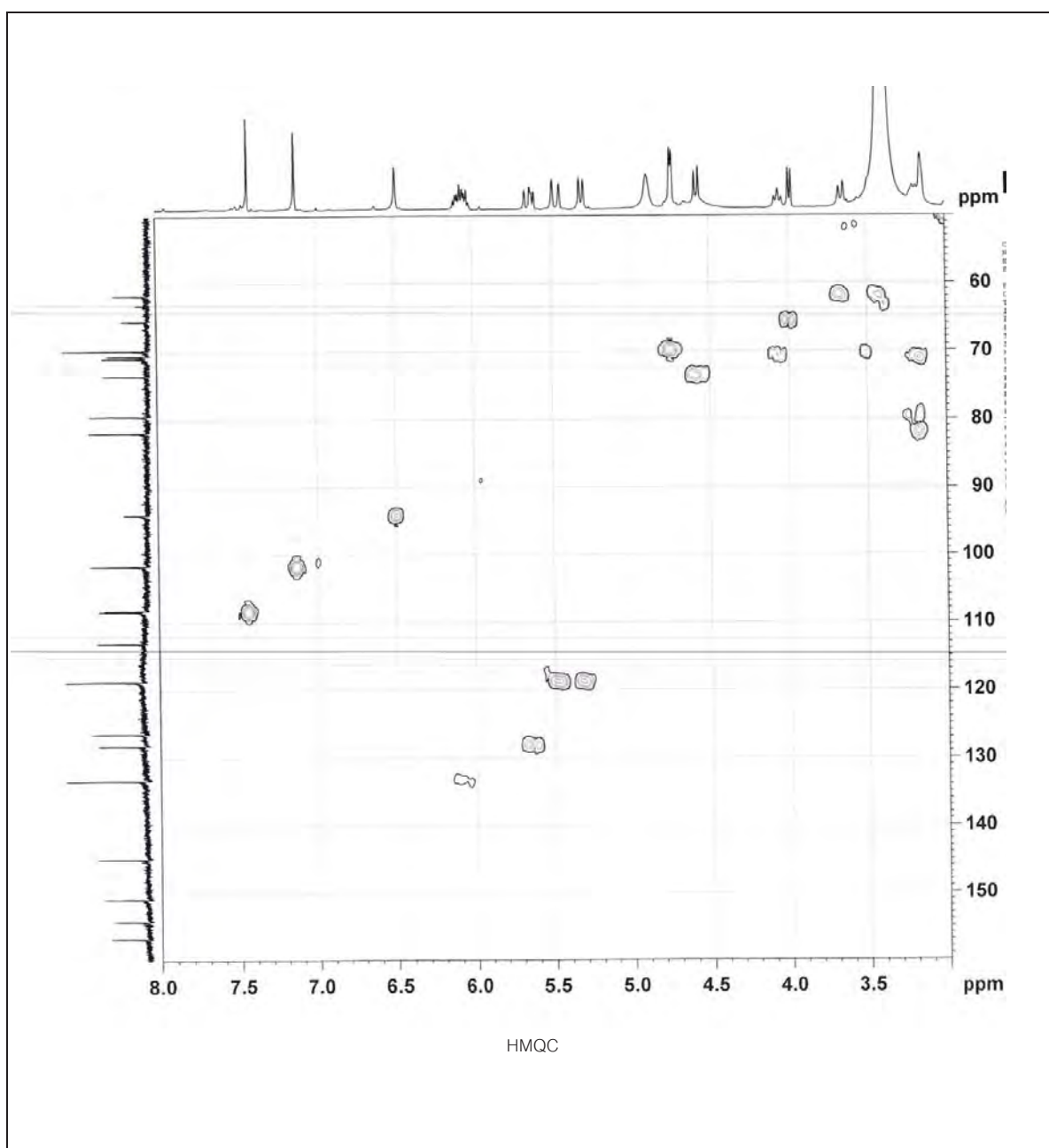
COSY

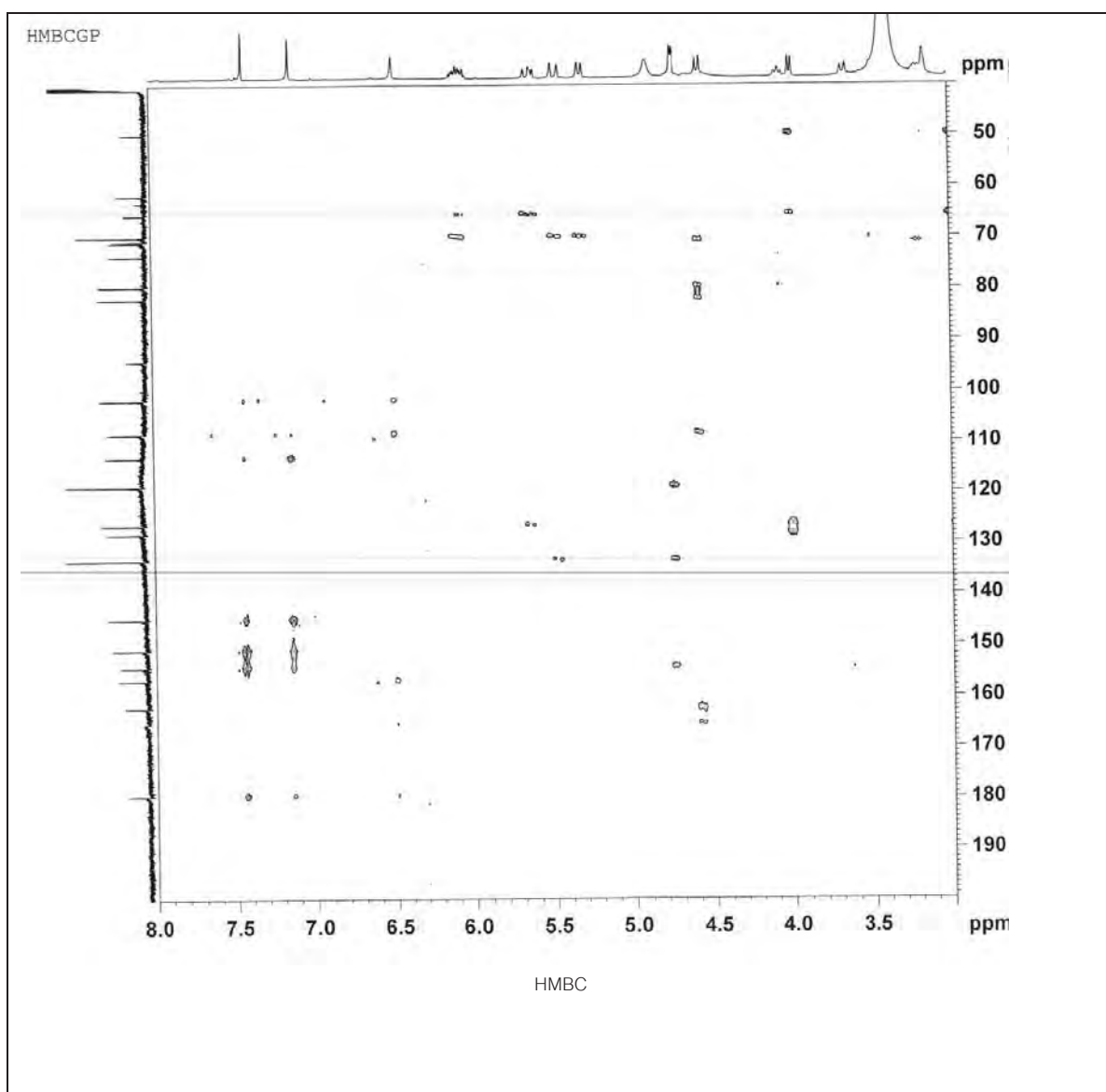




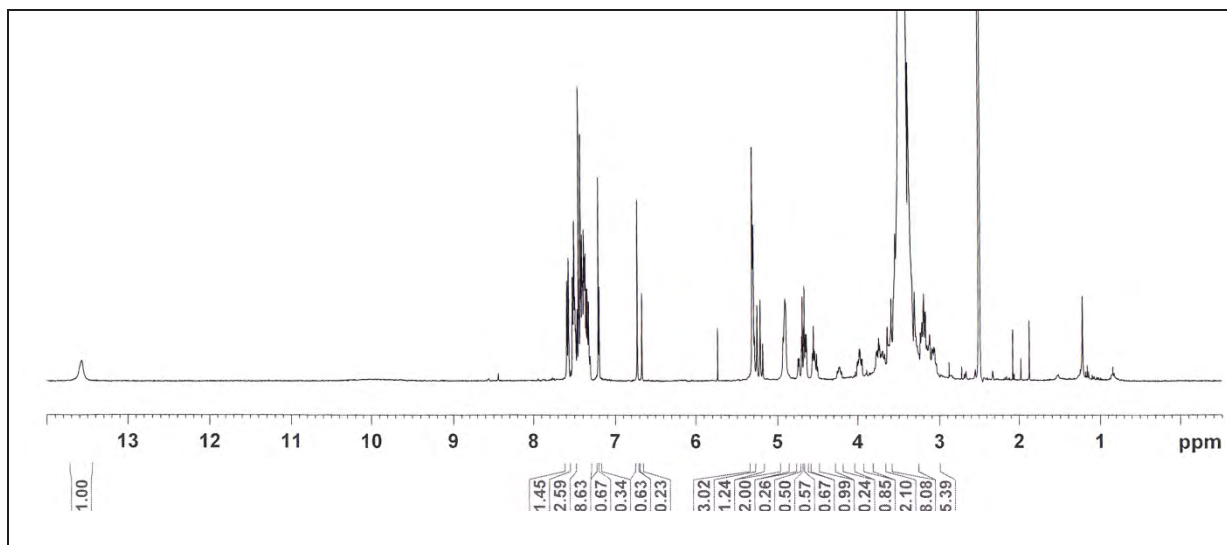
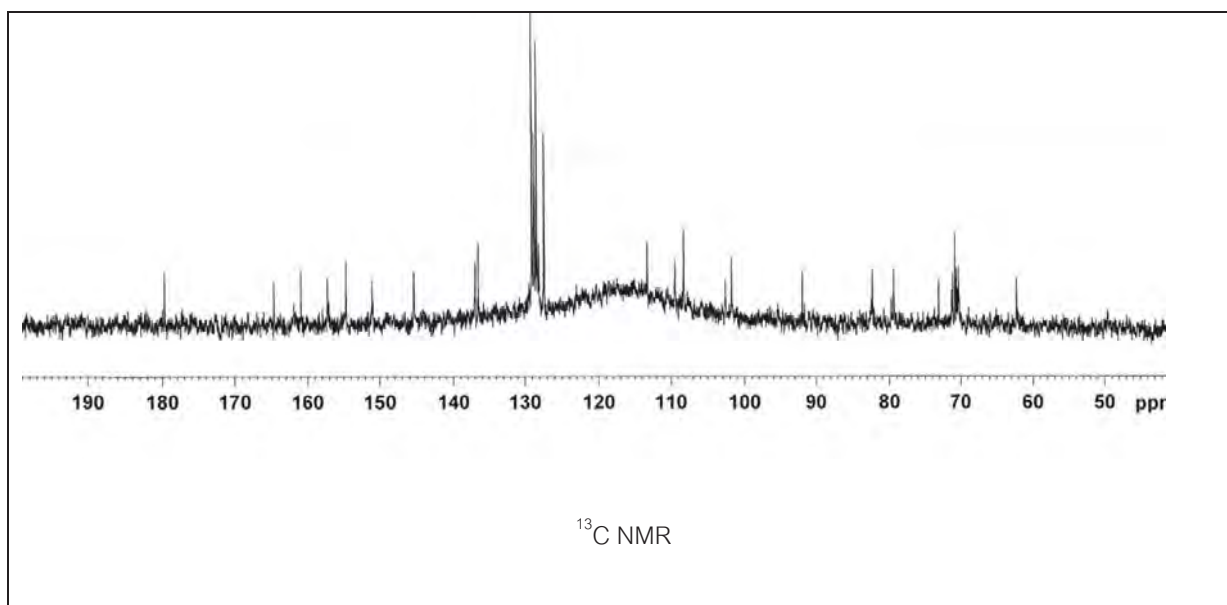
O-Allyl Mangoferin (4c)

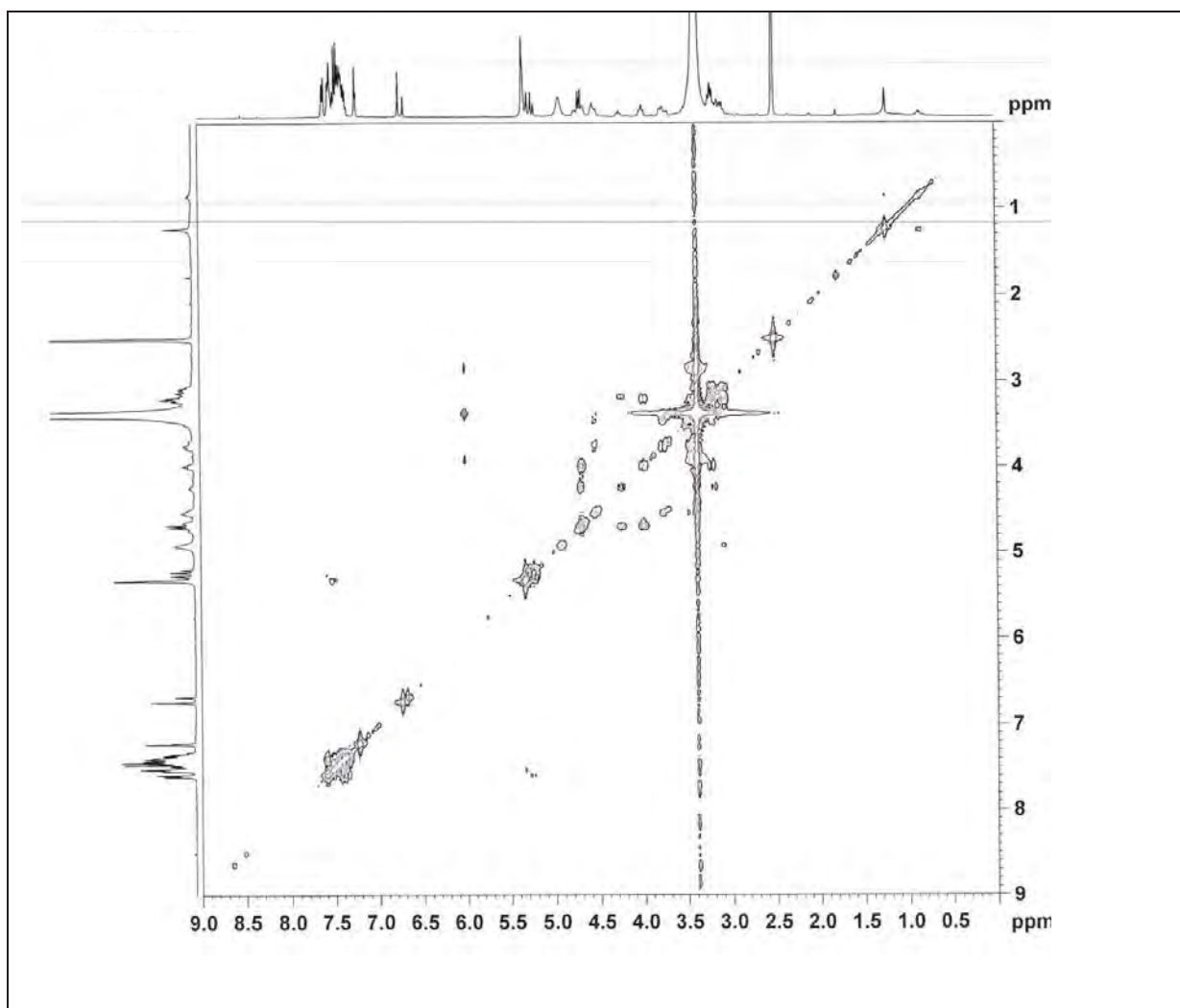
¹H NMR¹³C NMR



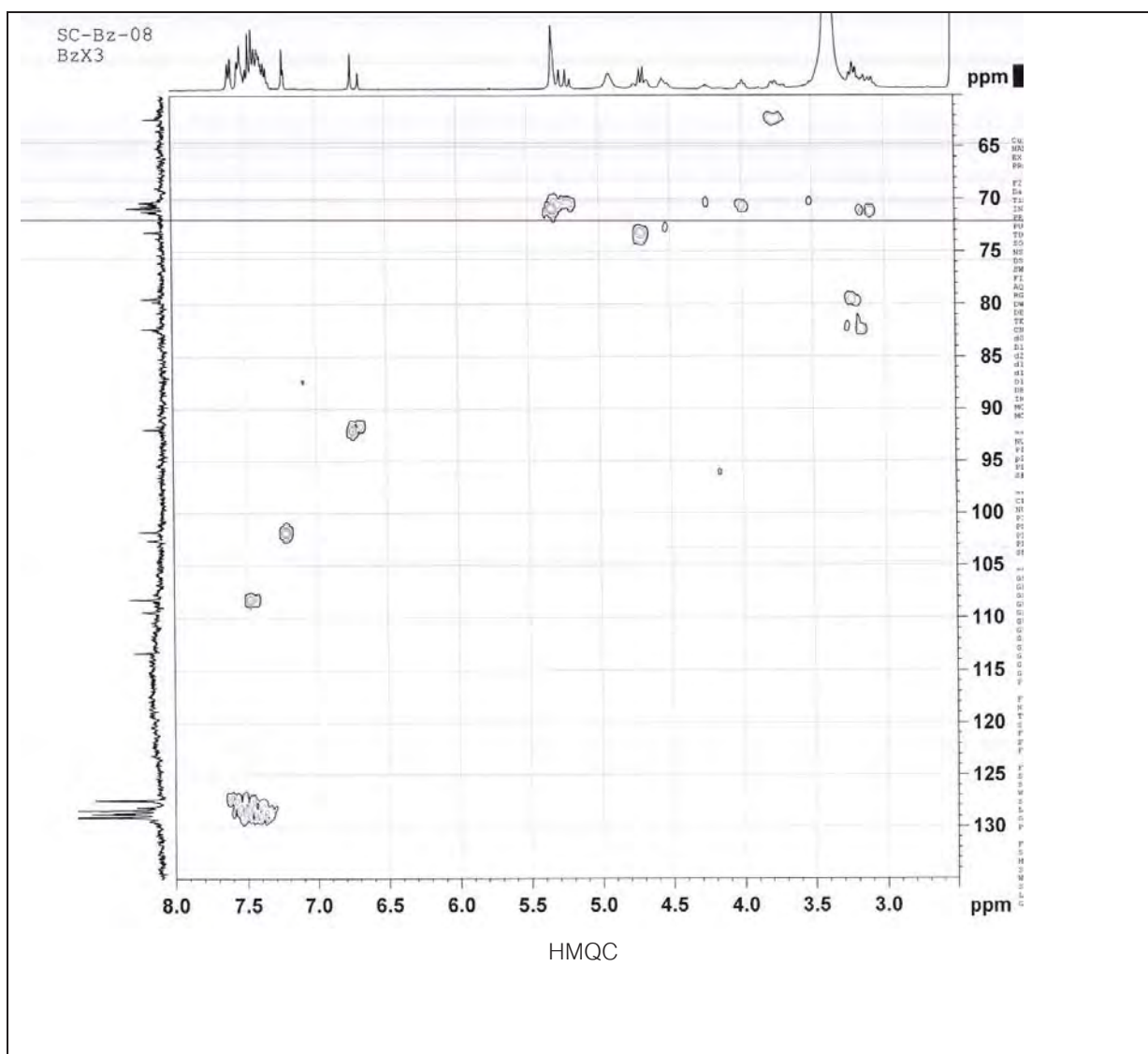


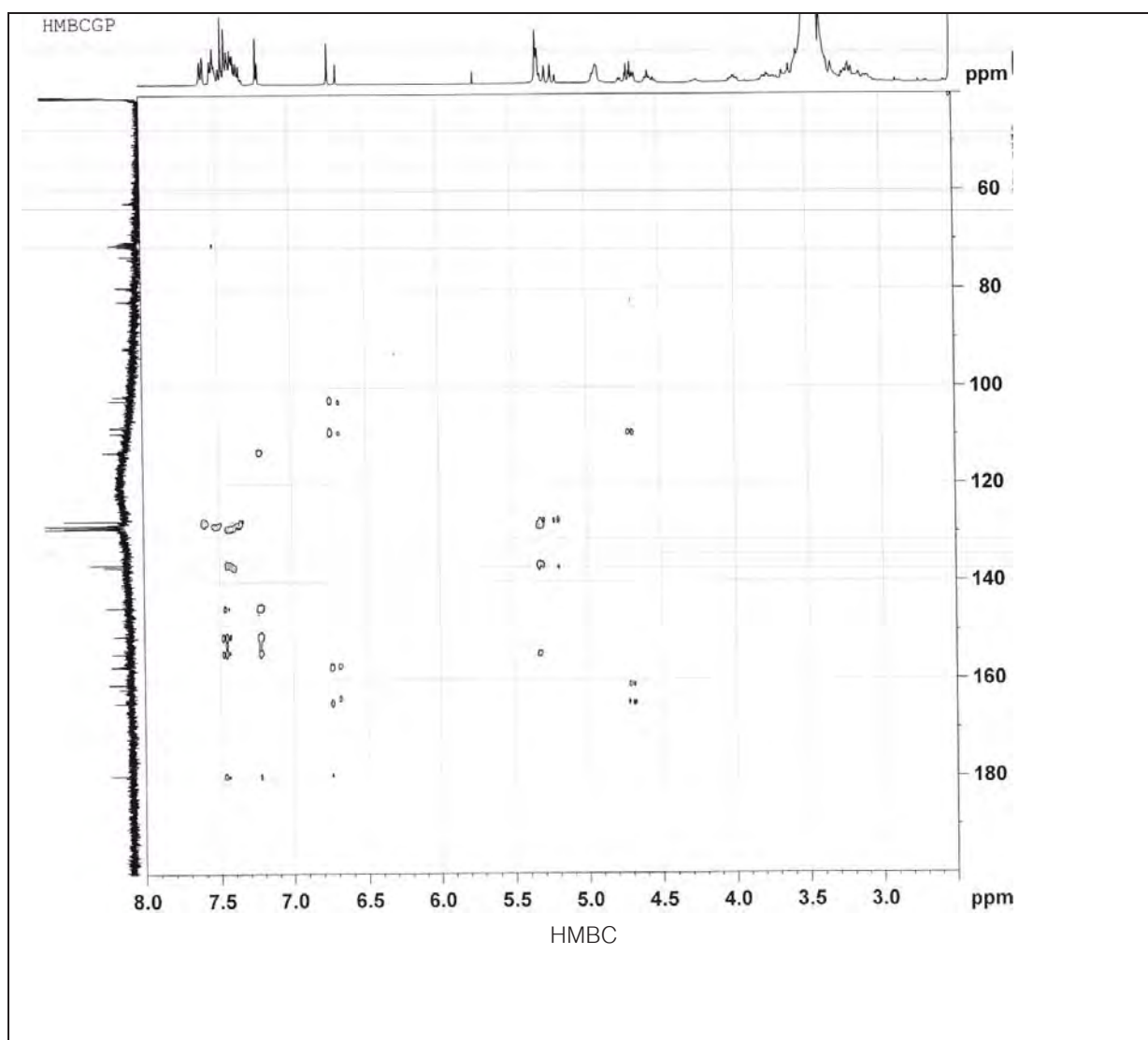
Benzyl Mangiferin (4d)

¹H NMR¹³C NMR

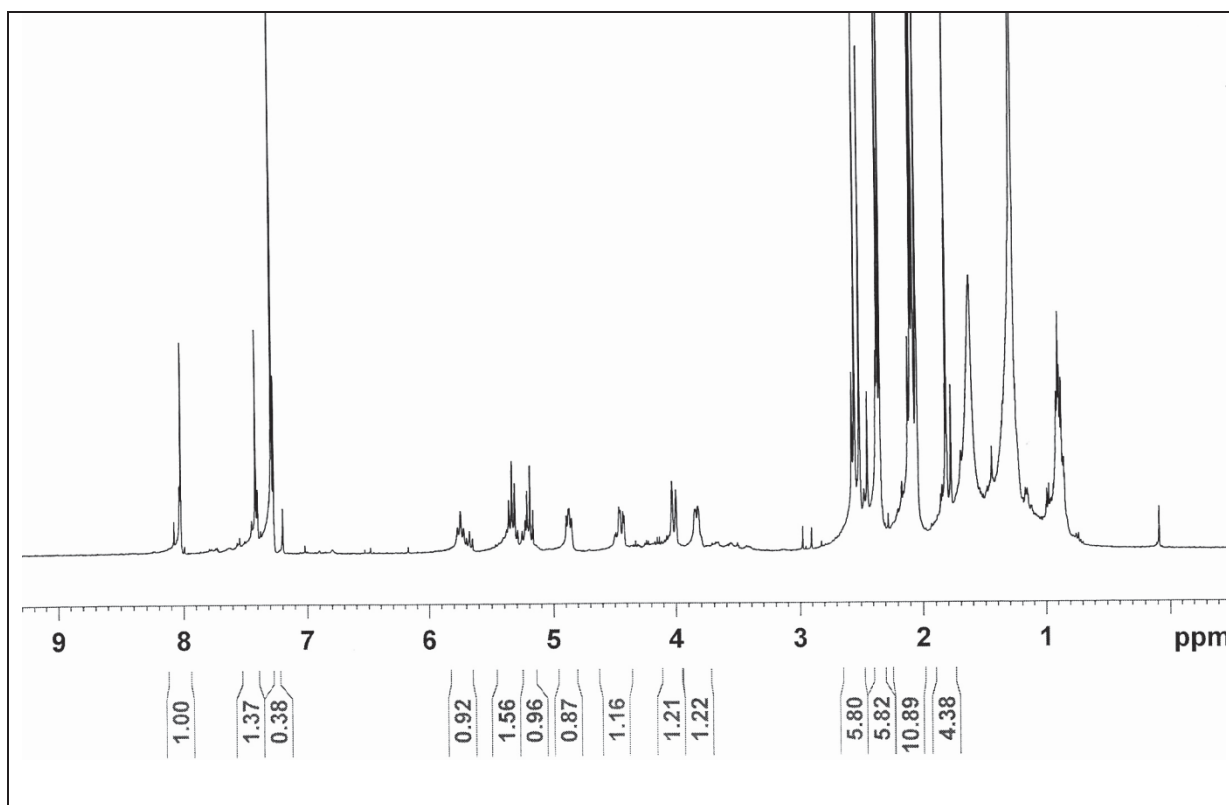
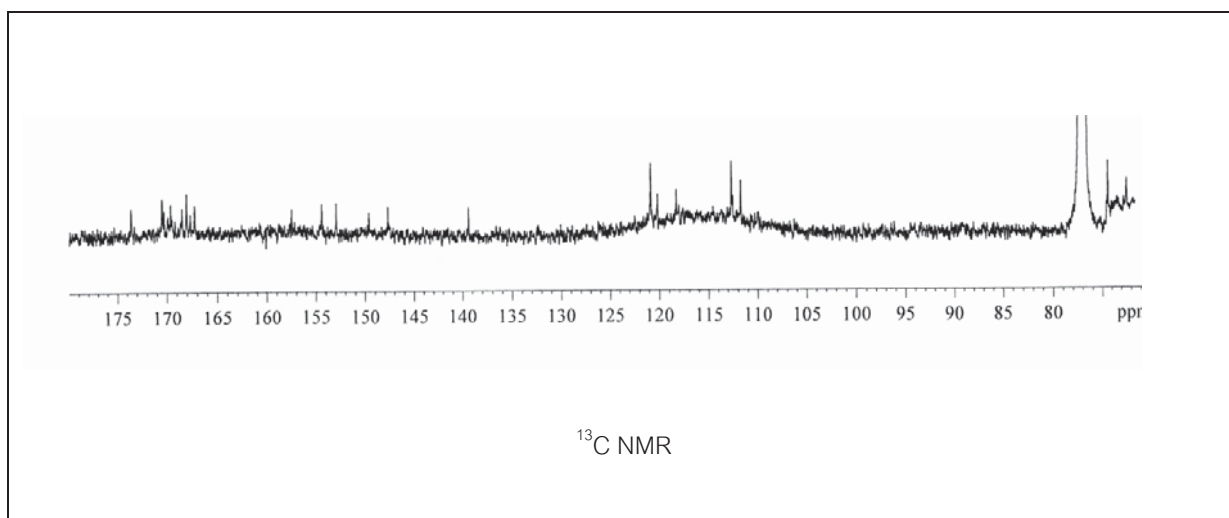


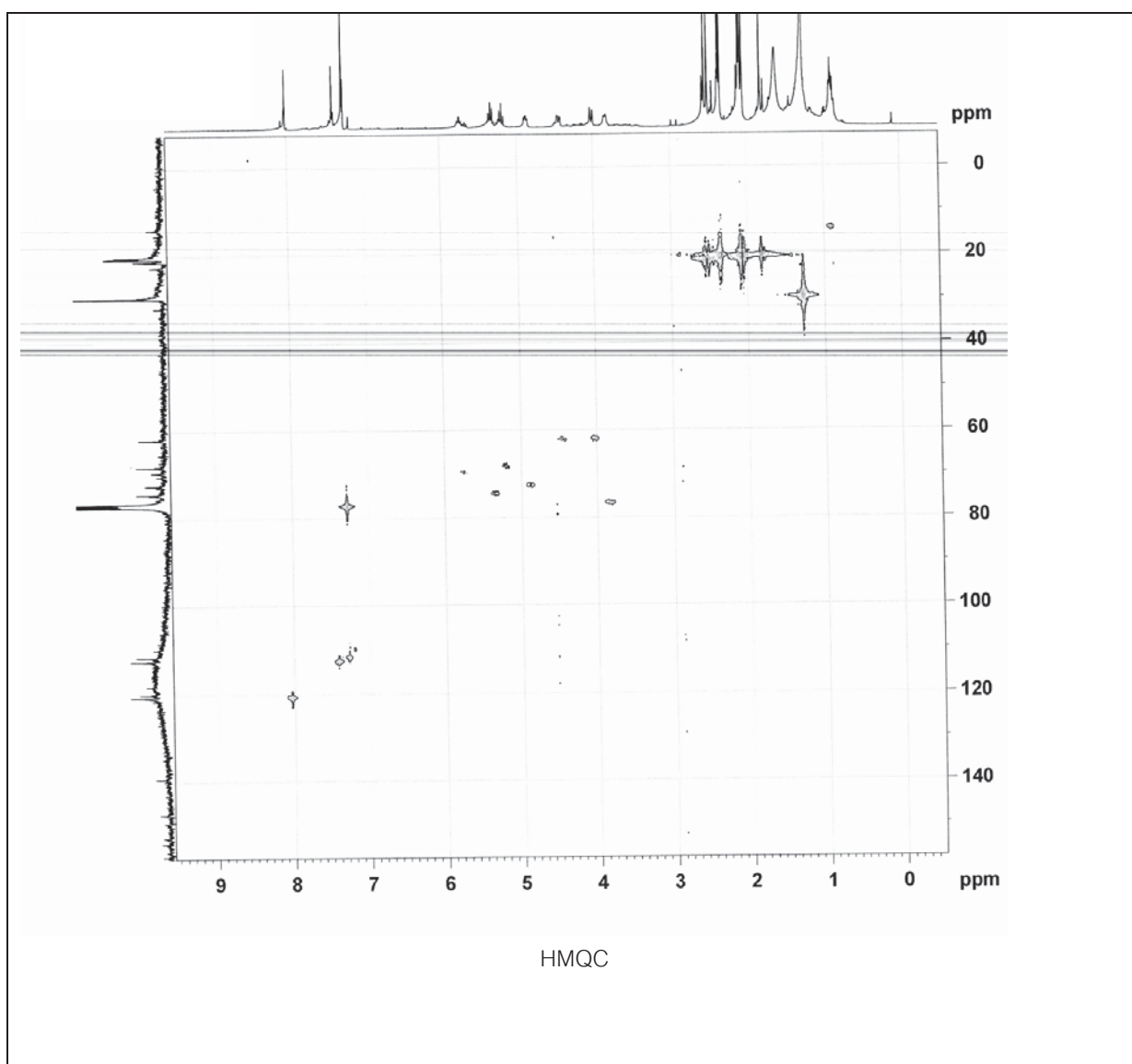
COSY

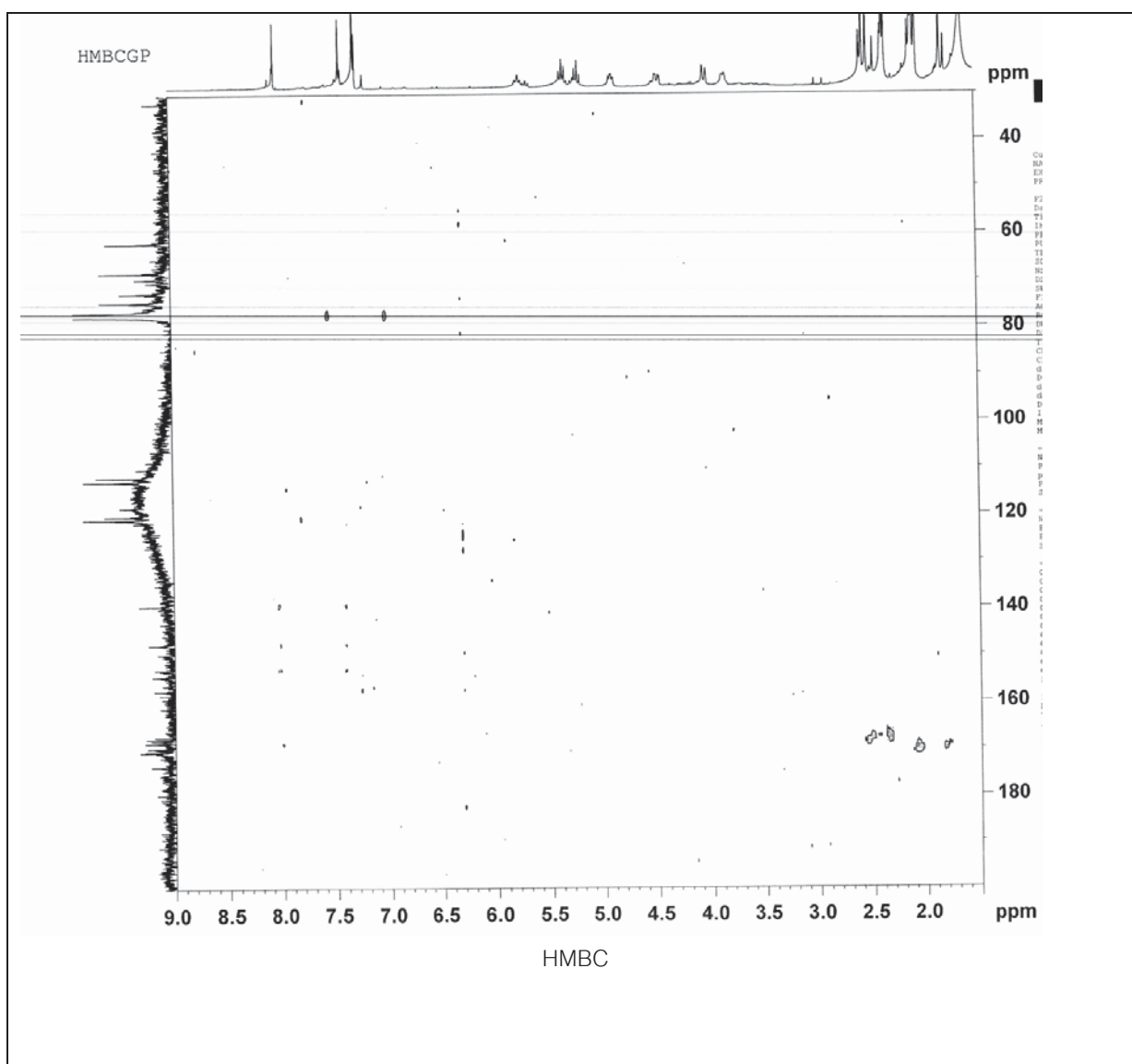




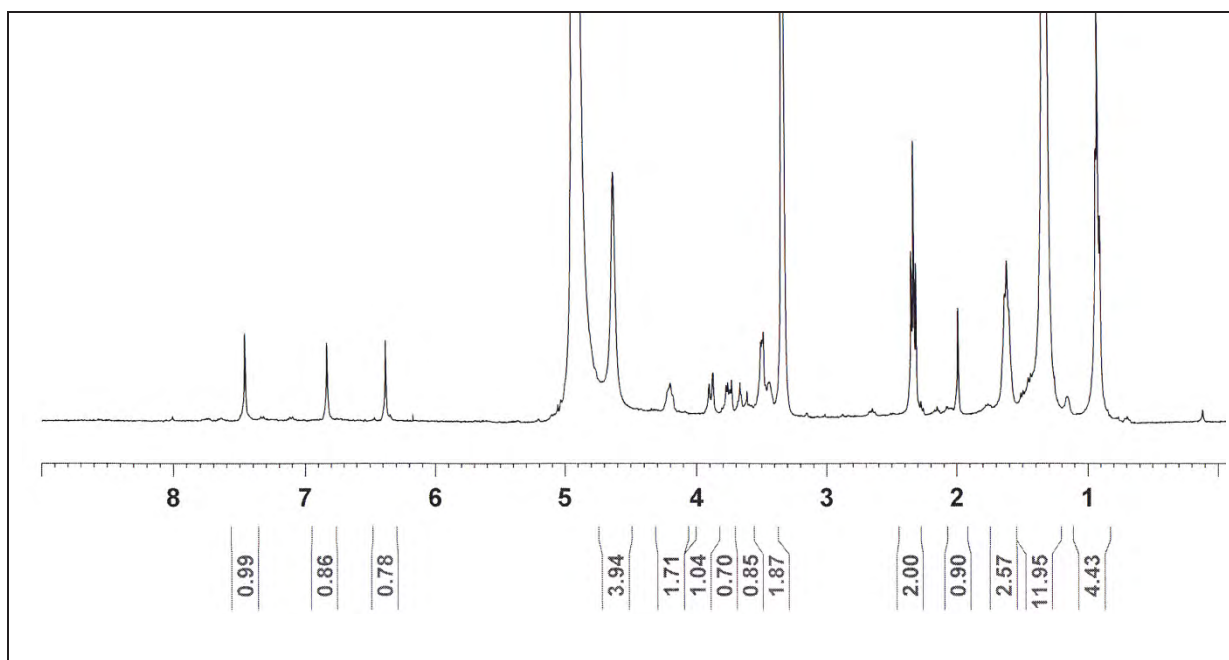
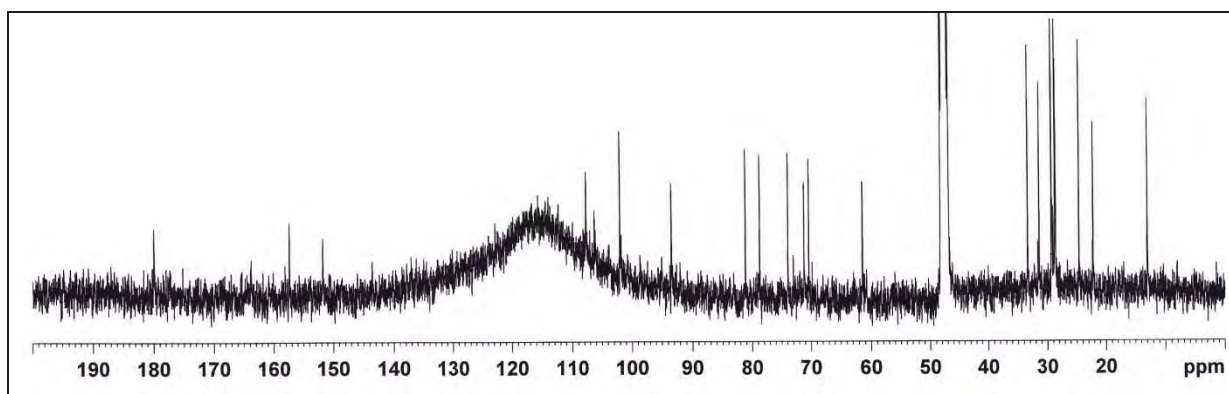
Acetyl Mangiferin (5)

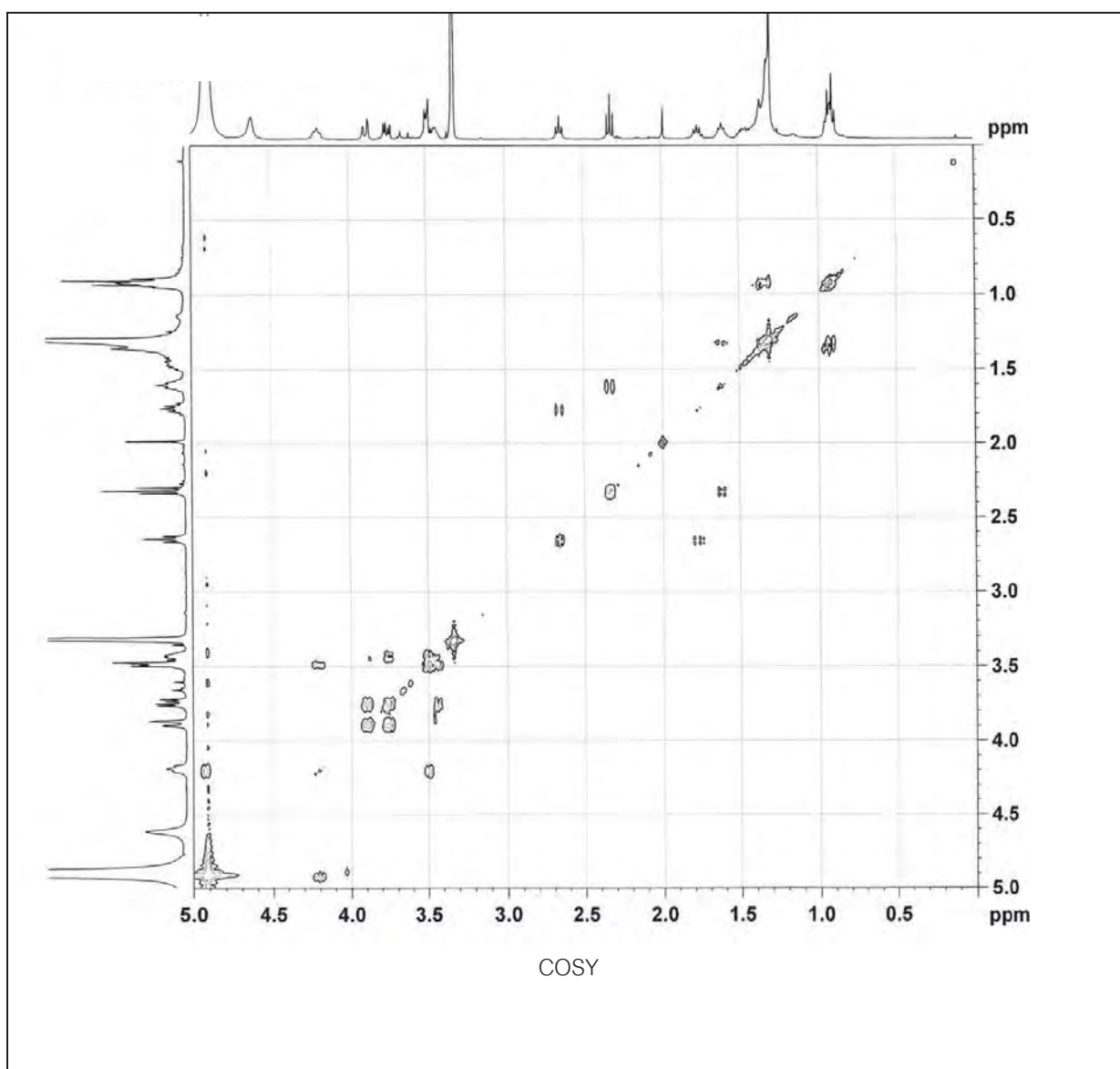
 ^1H NMR ^{13}C NMR

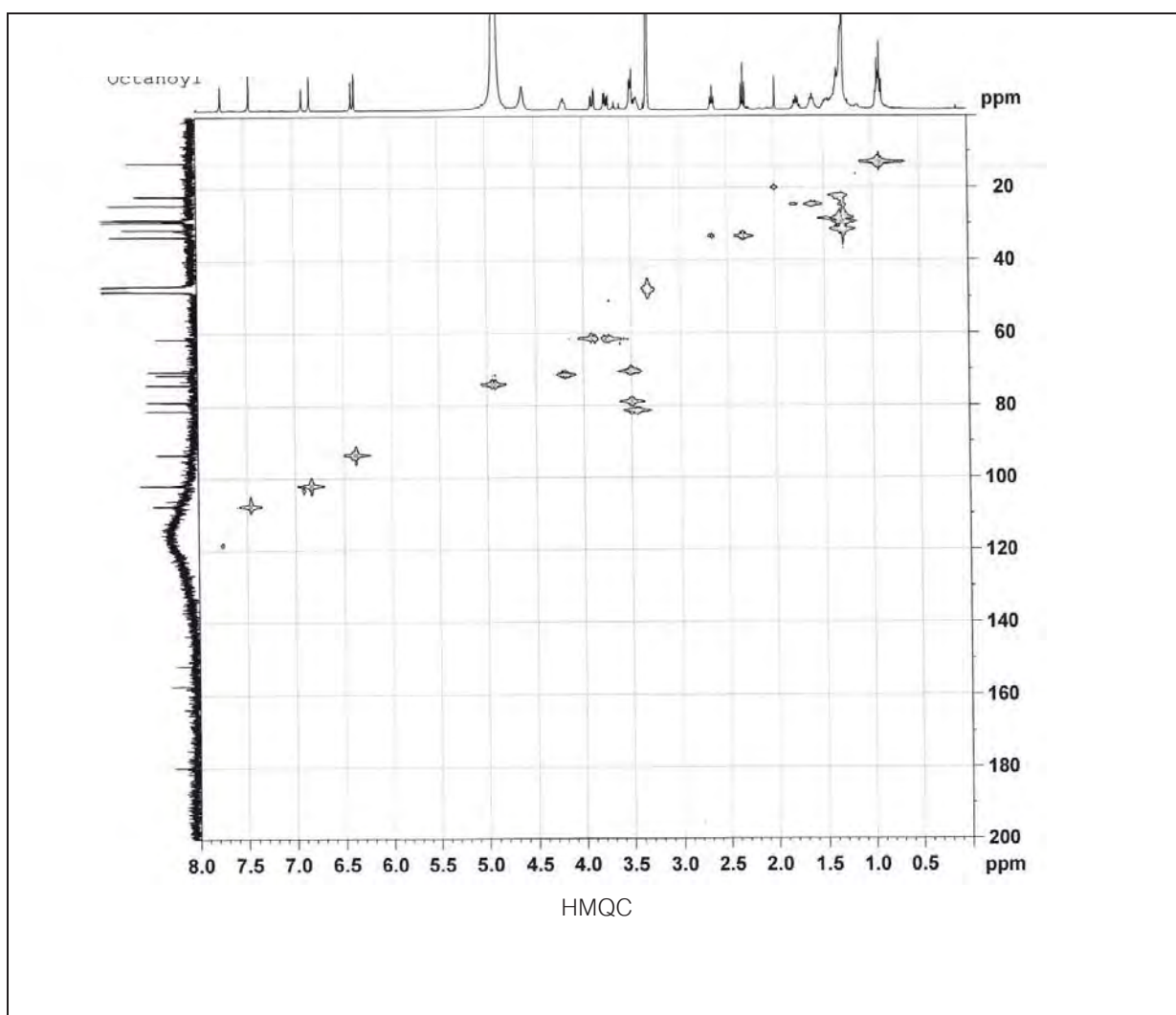


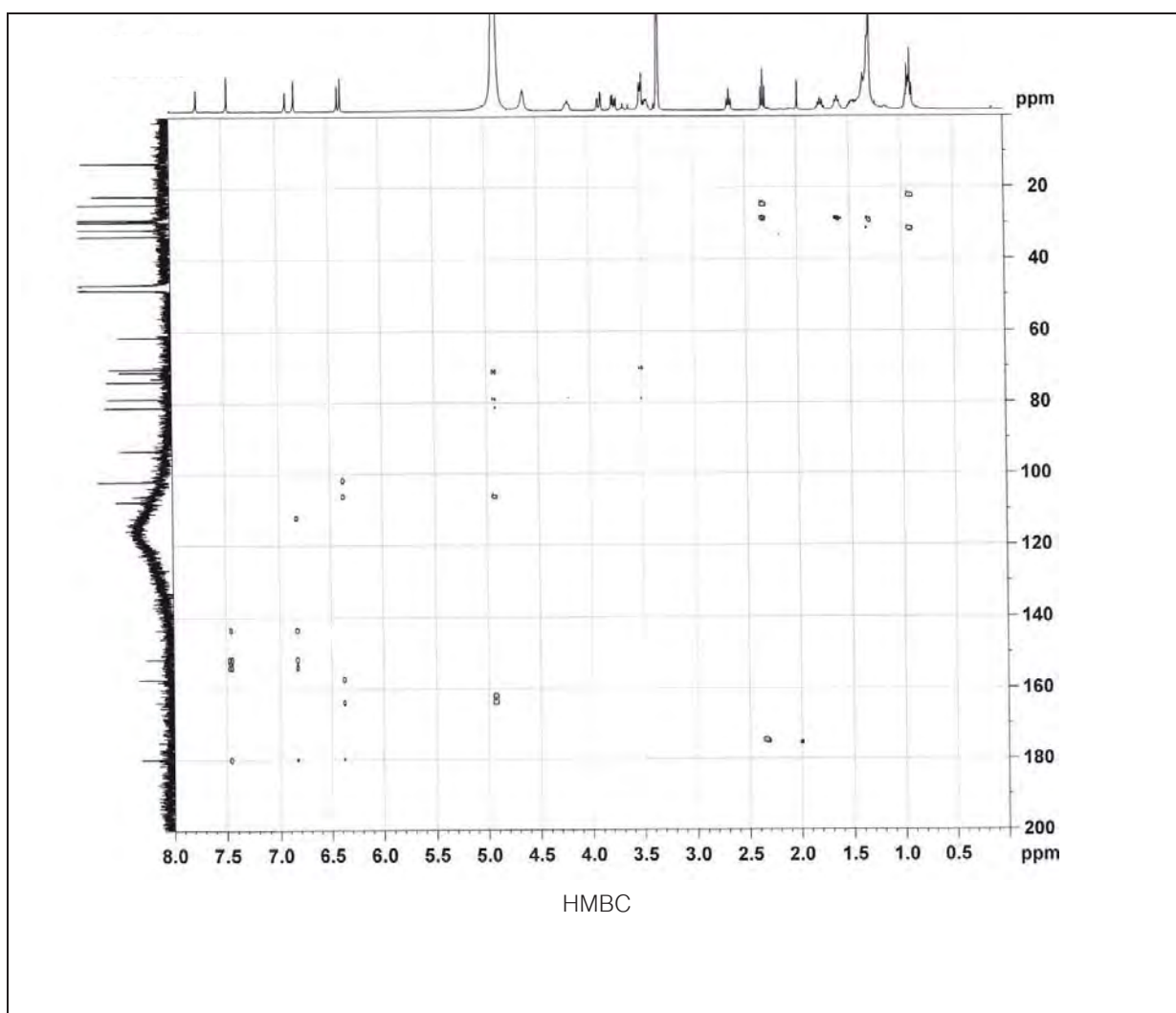


Octanoyl-Cinnamoyl Mangiferin (6a)

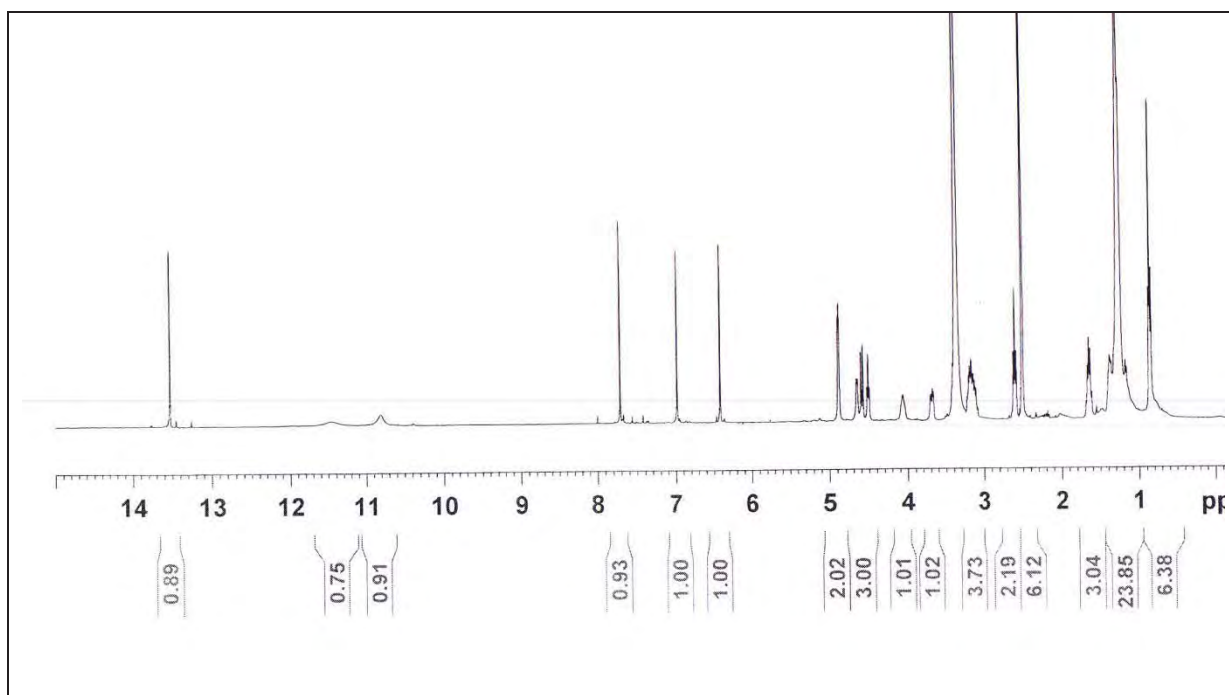
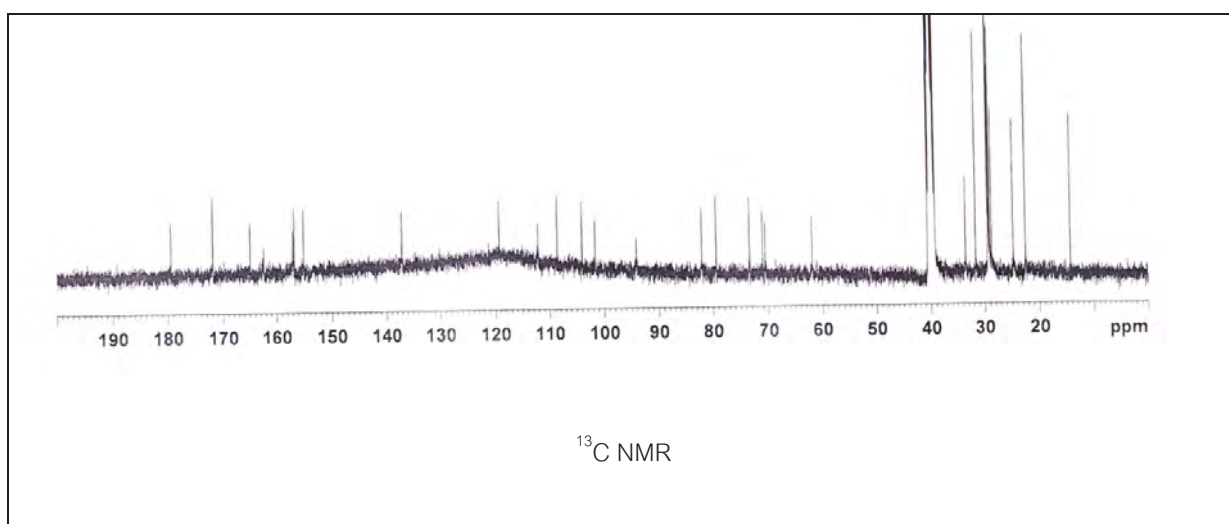
¹H NMR¹³C NMR

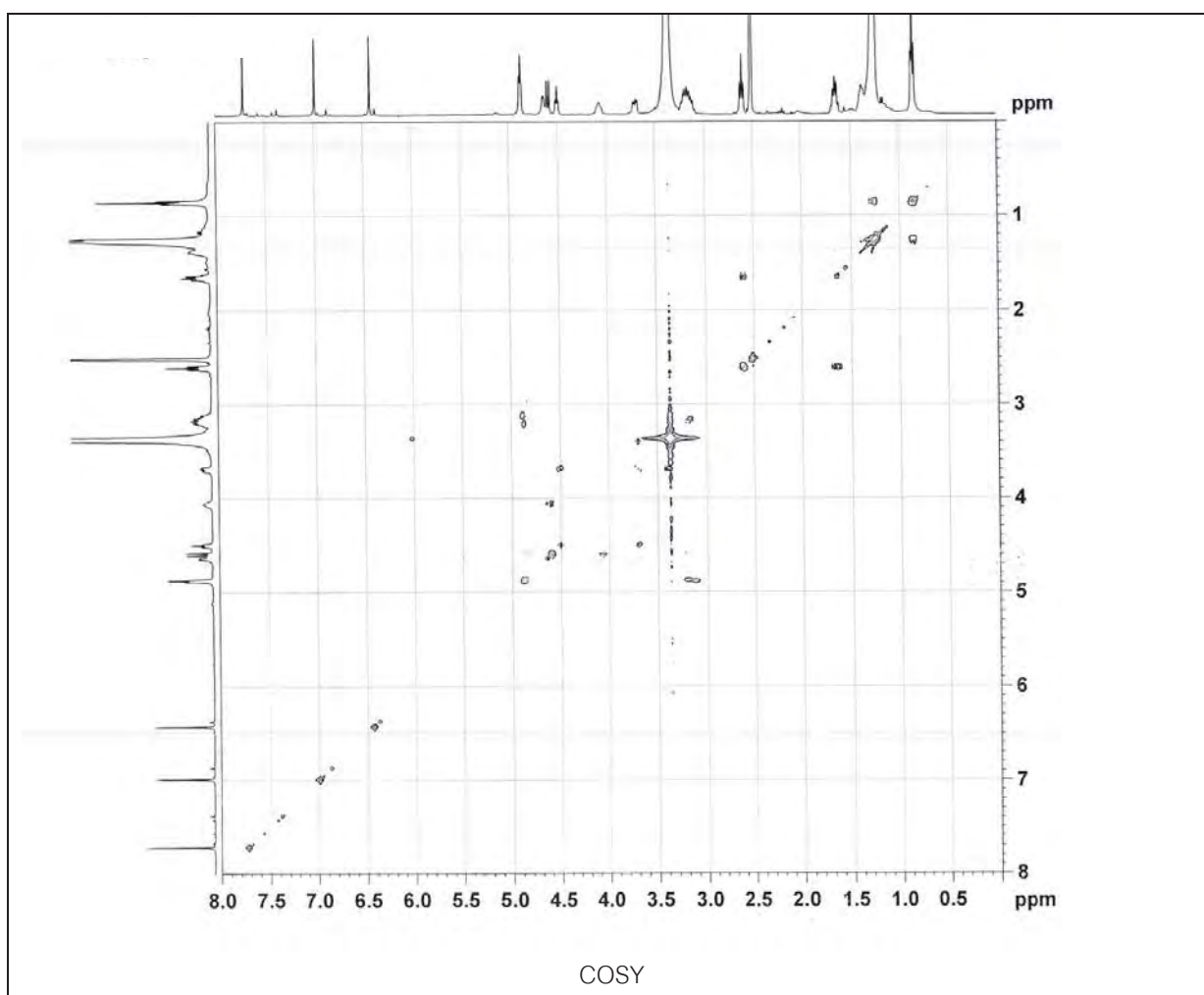


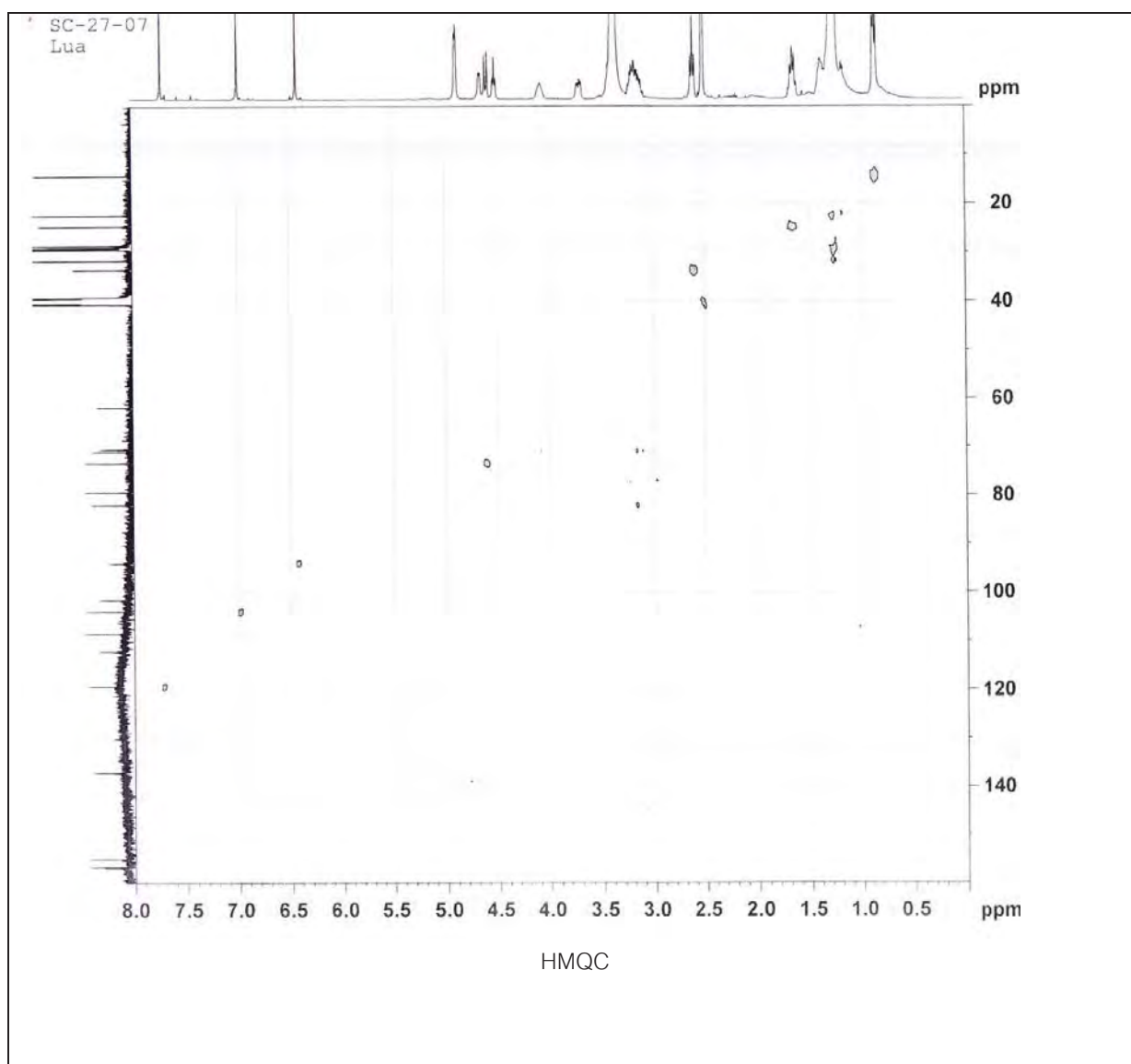


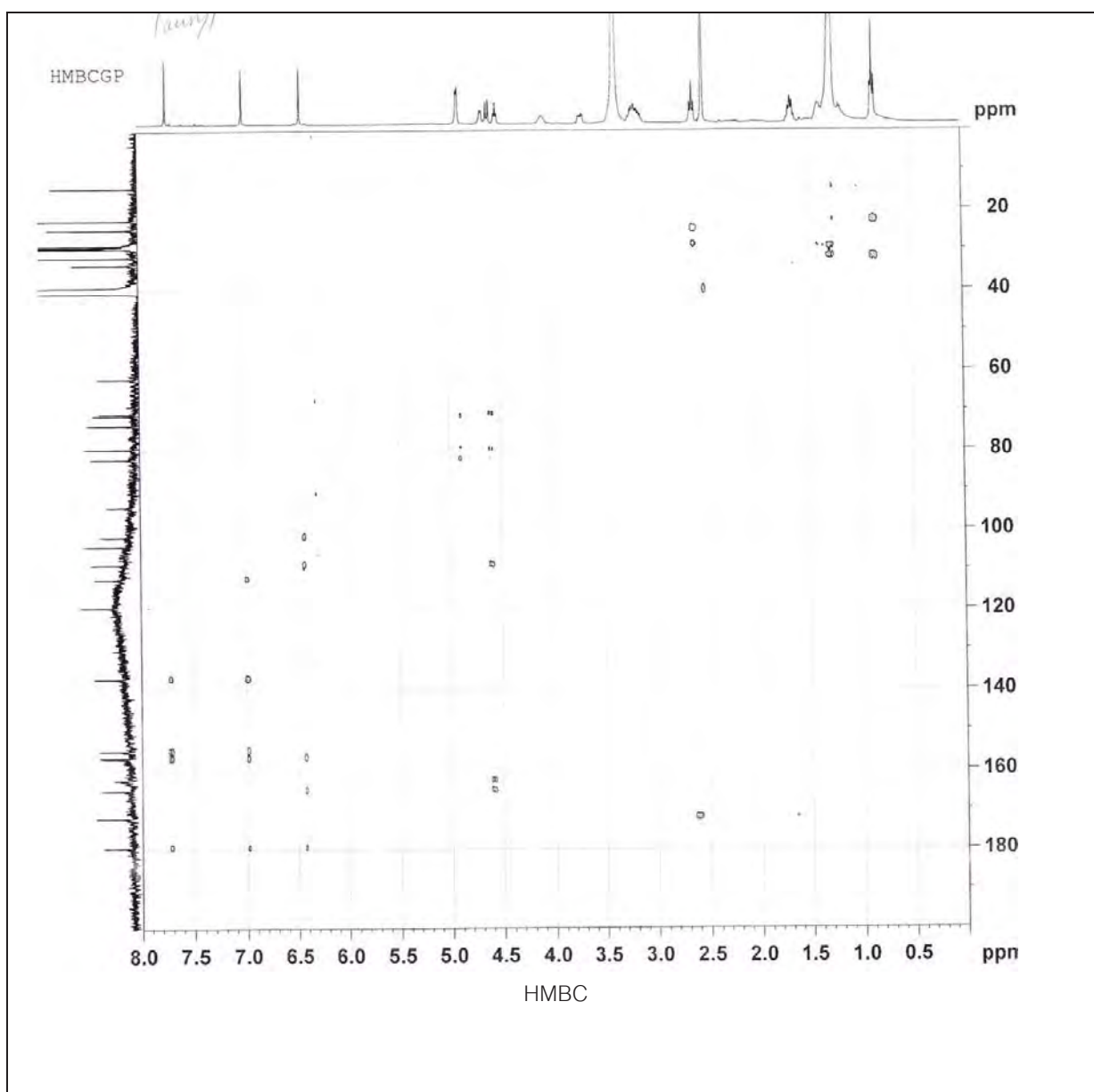


Luaroyl Mangiferin (6b)

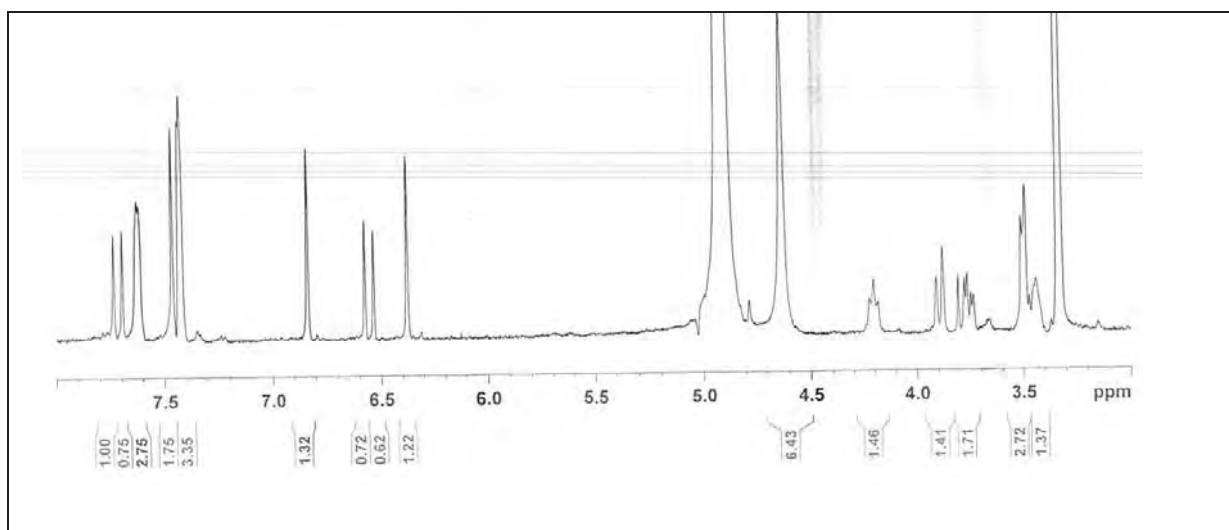
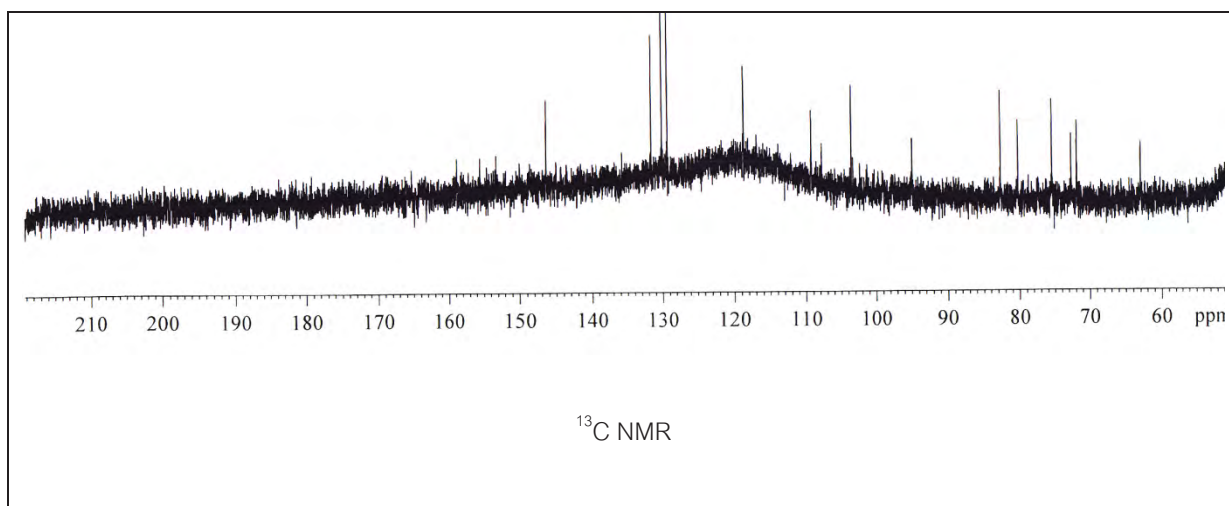
¹H NMR¹³C NMR

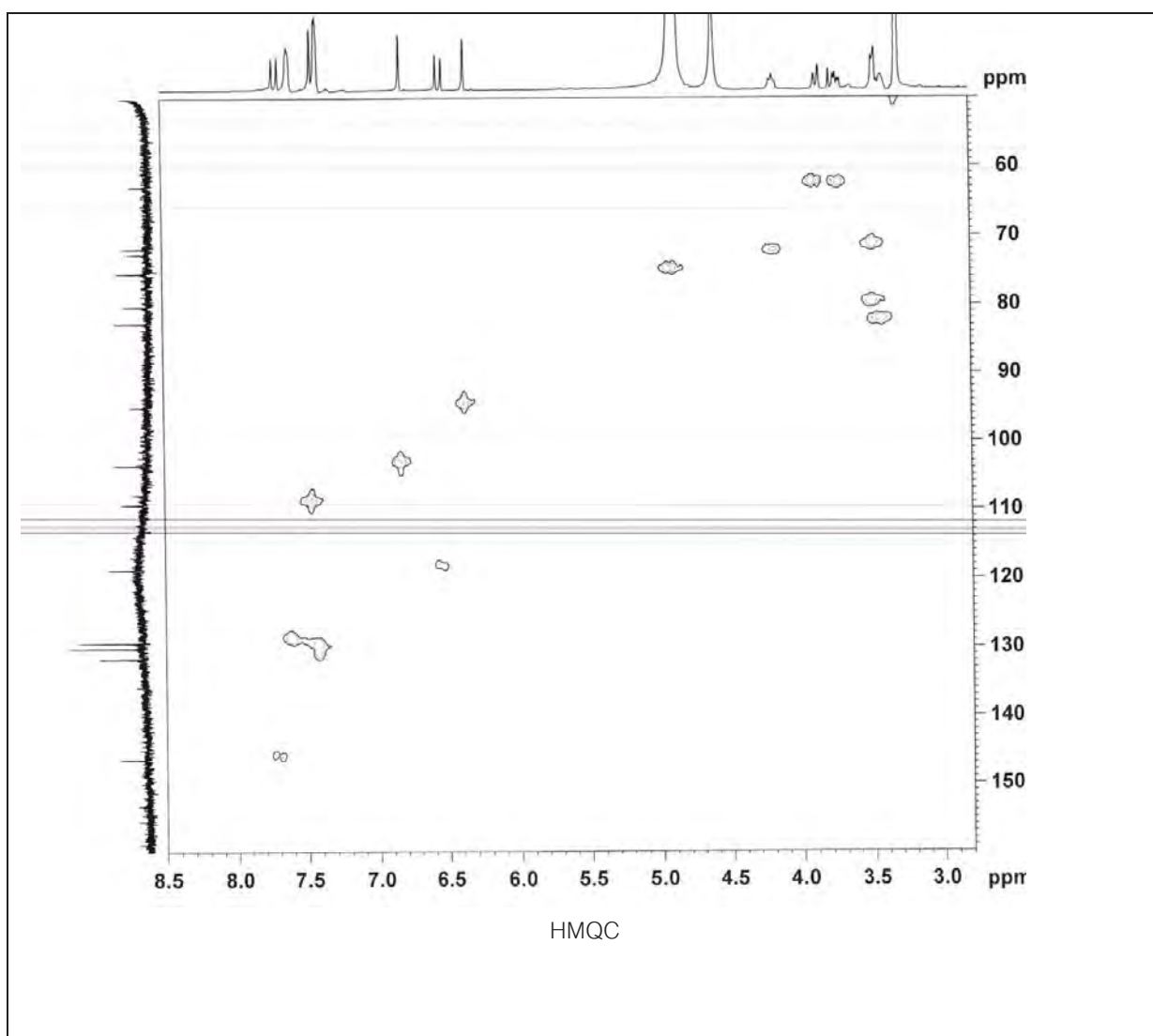


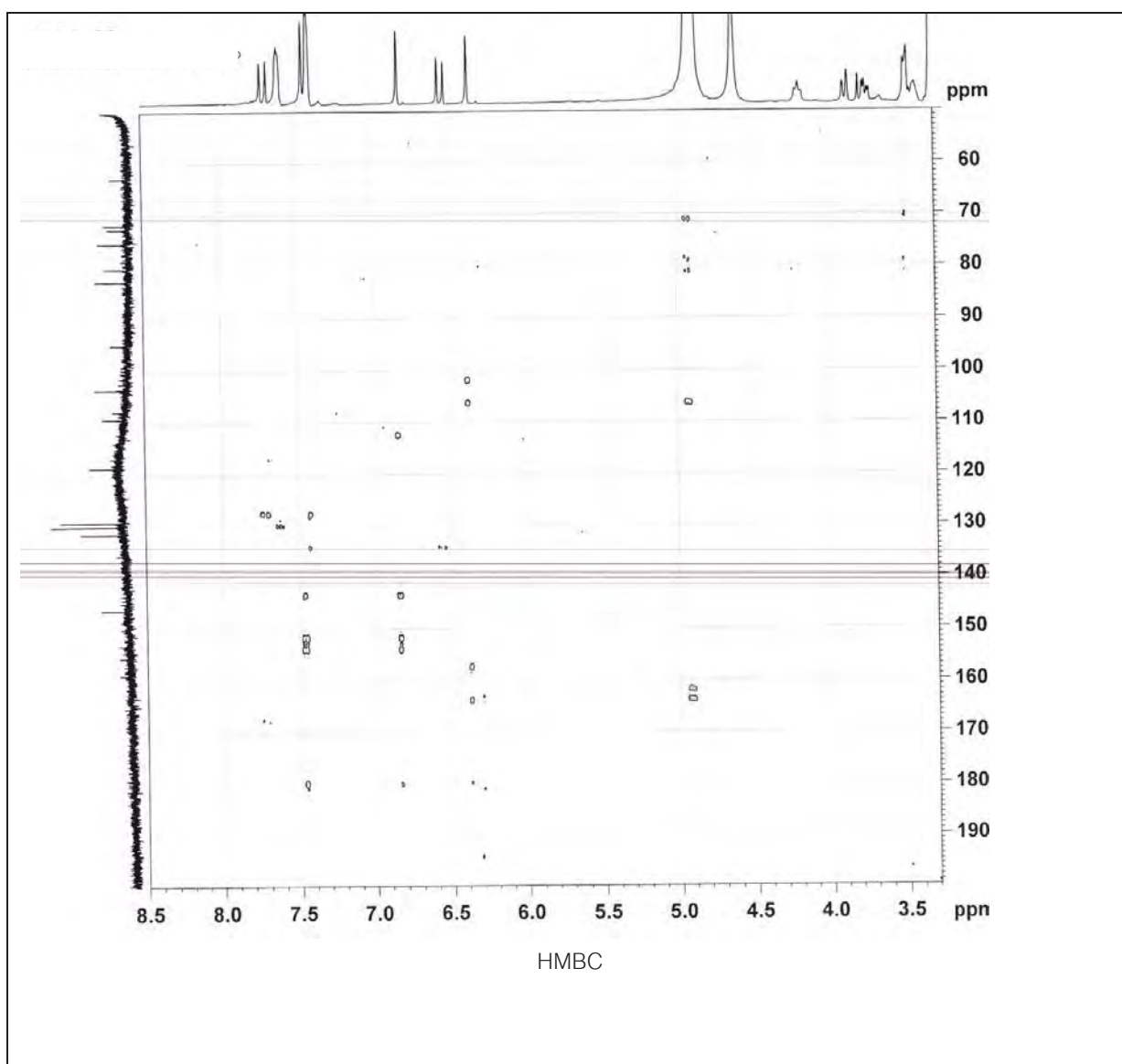




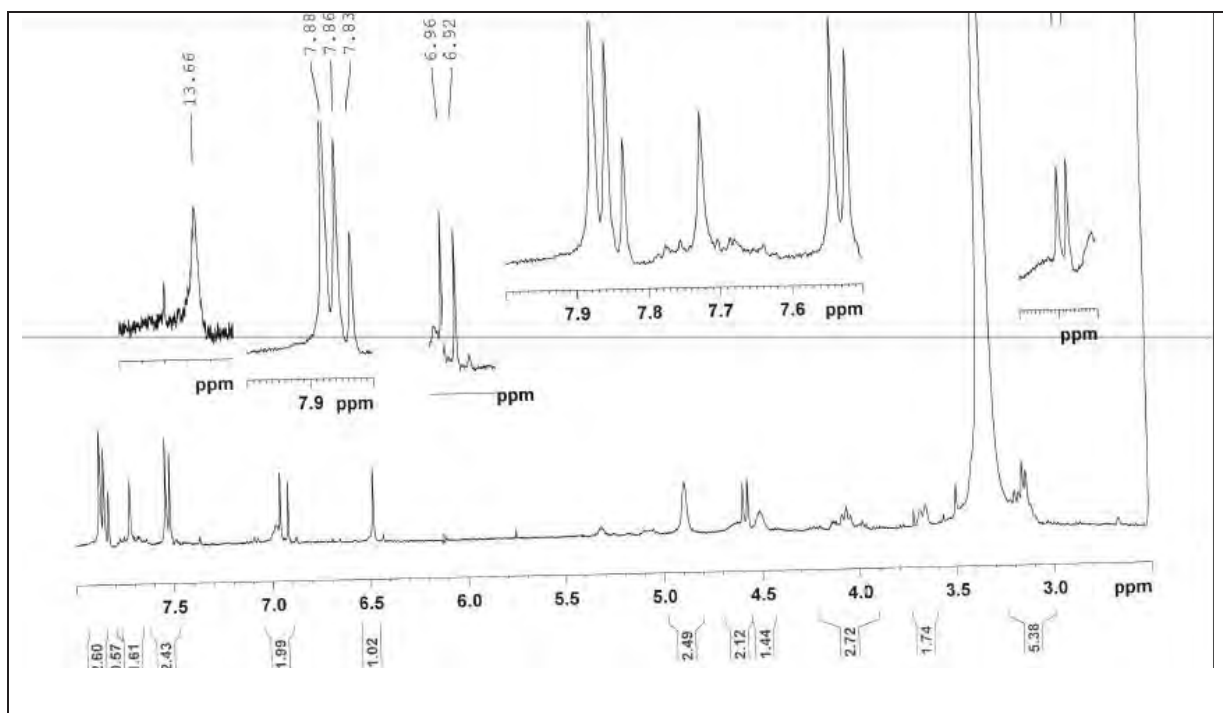
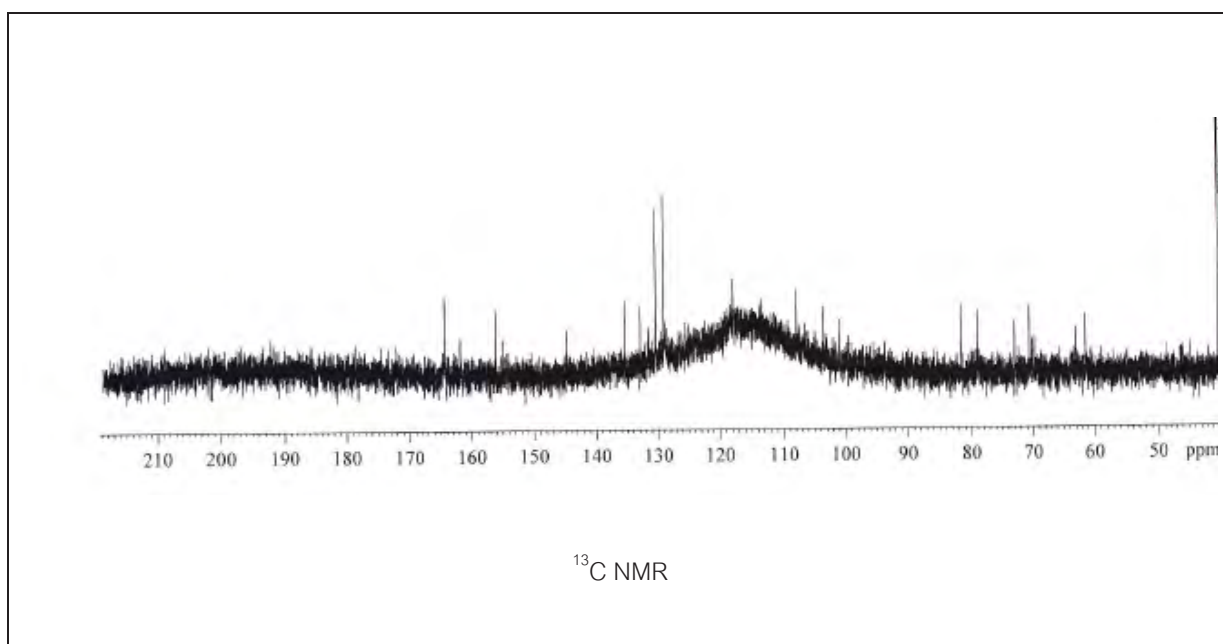
Cinnamoyl Mangiferin (6c)

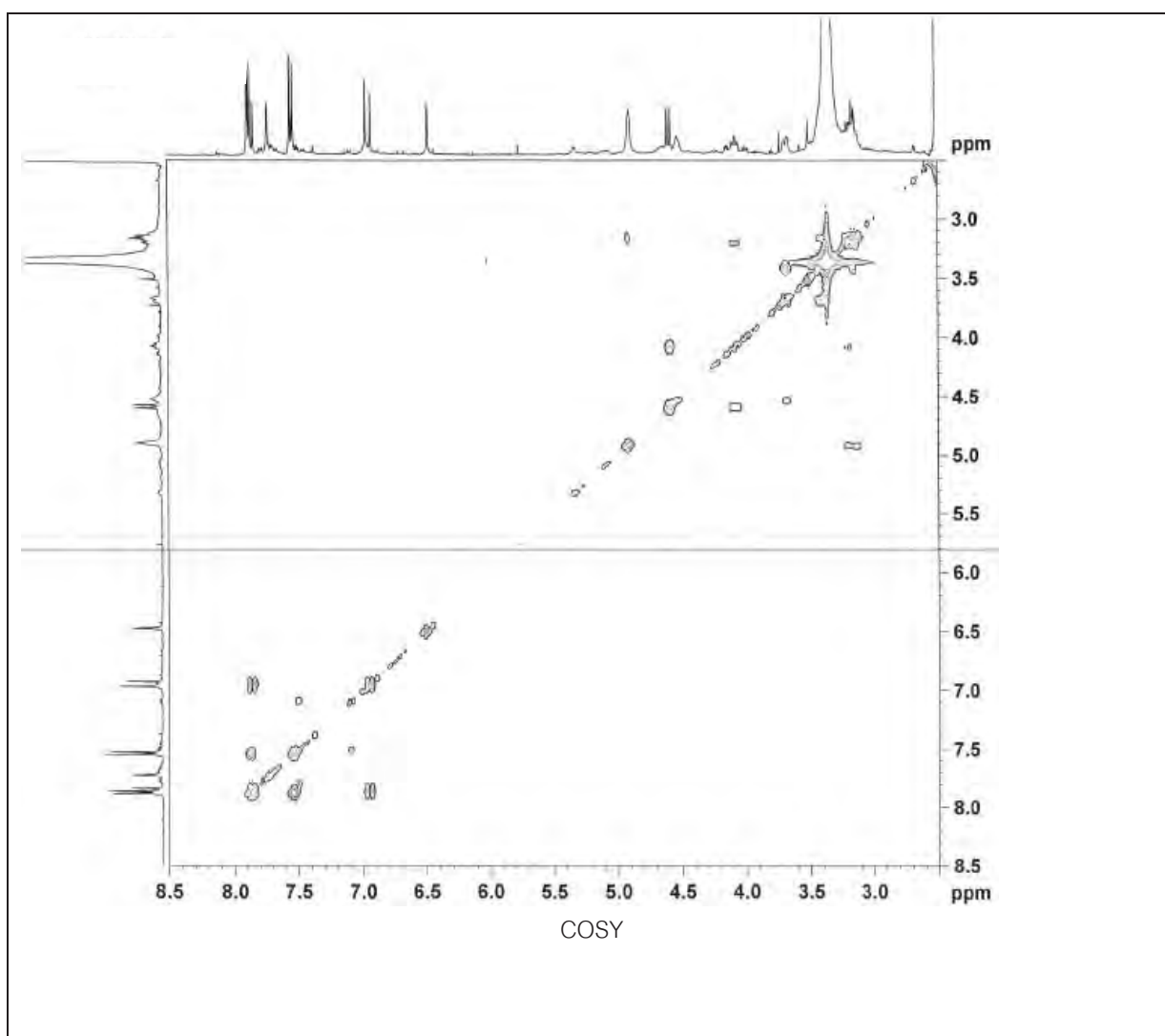
¹H NMR¹³C NMR

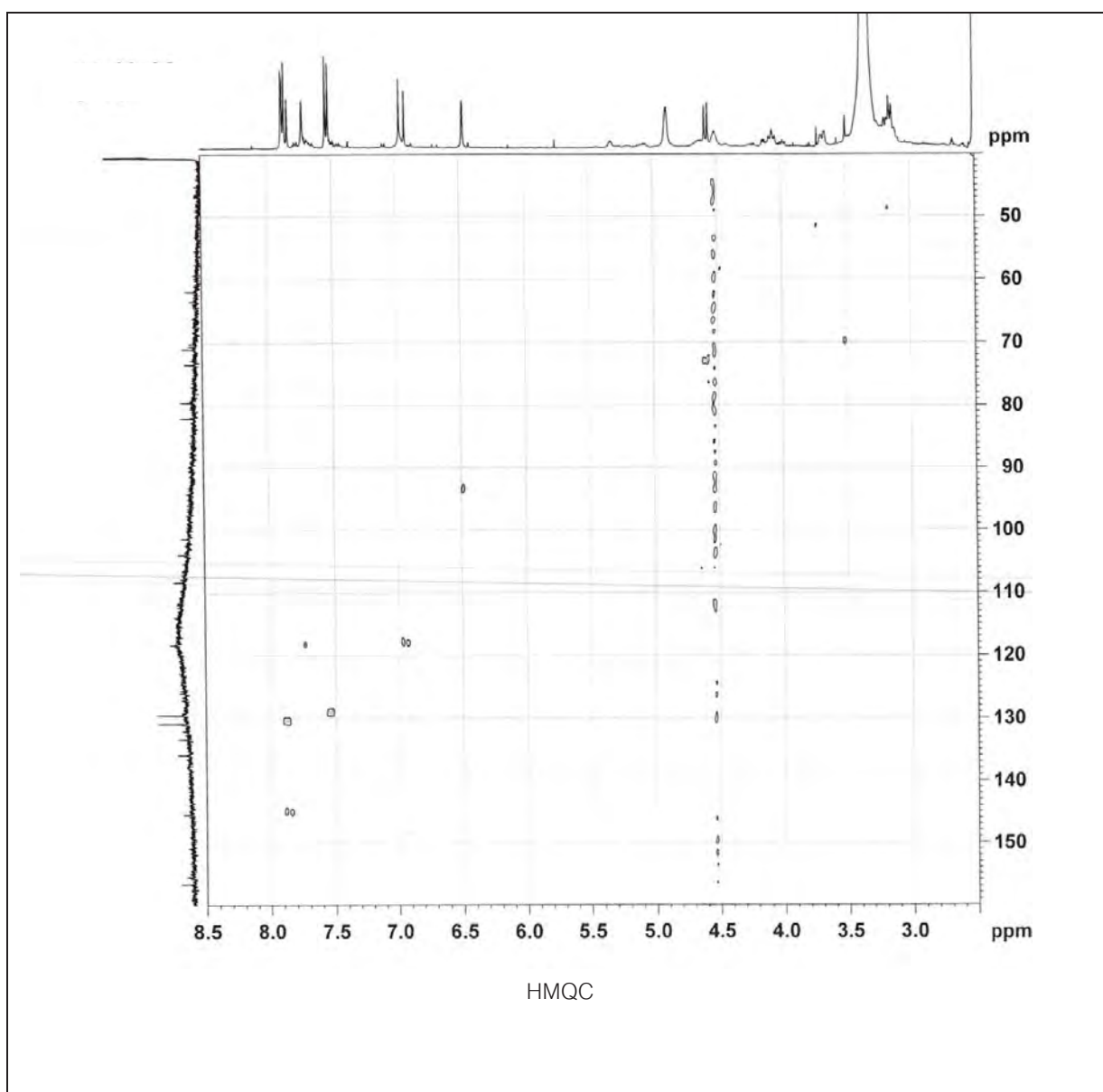


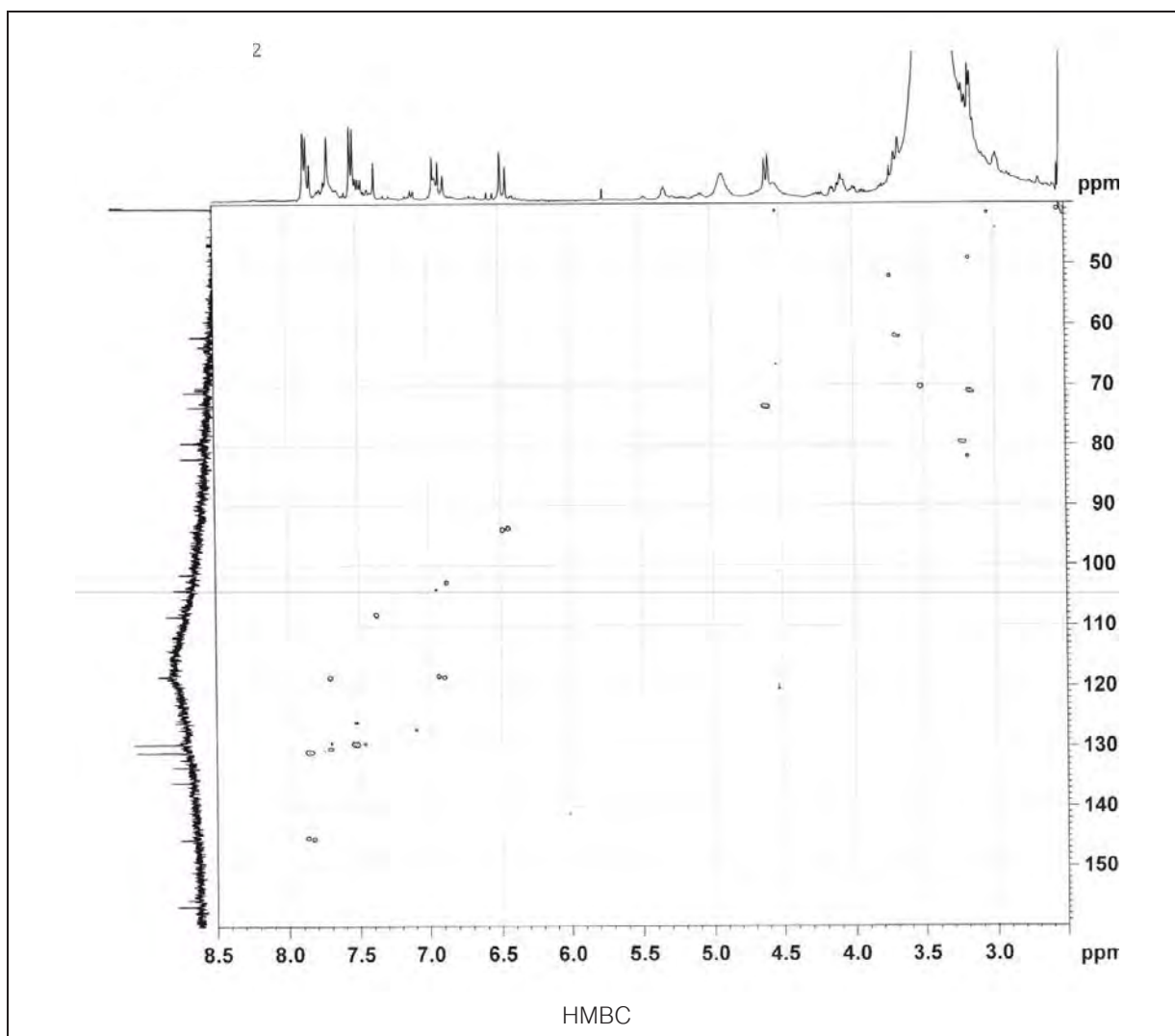


p-Cl-Cinnamoyl Mangiferin (6d)

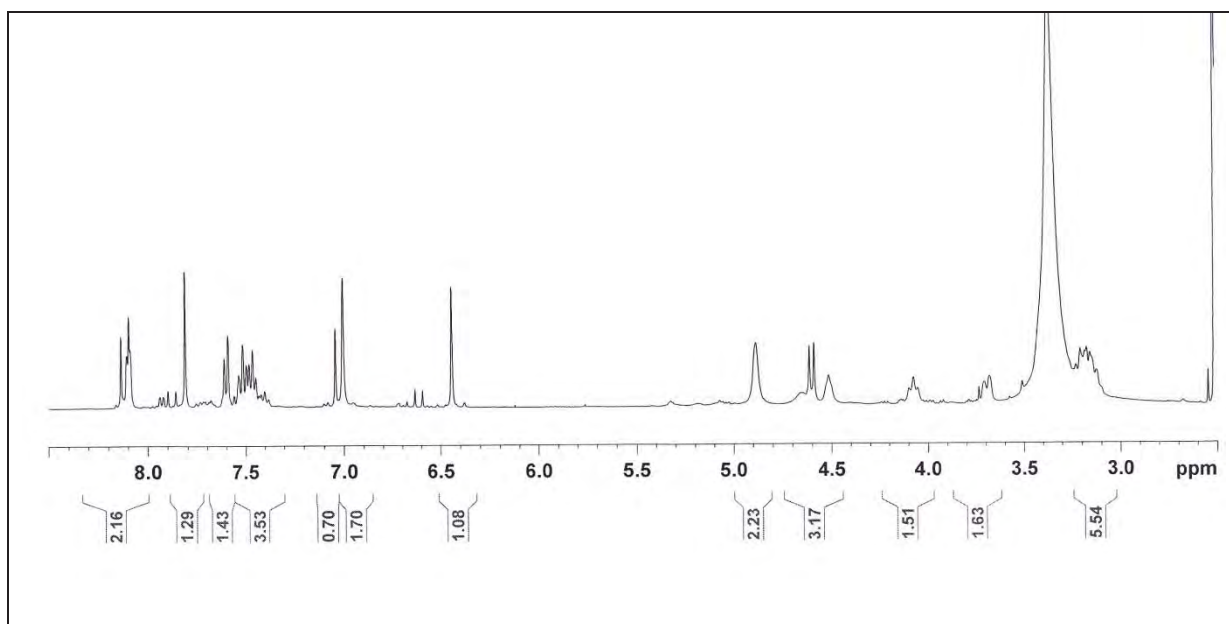
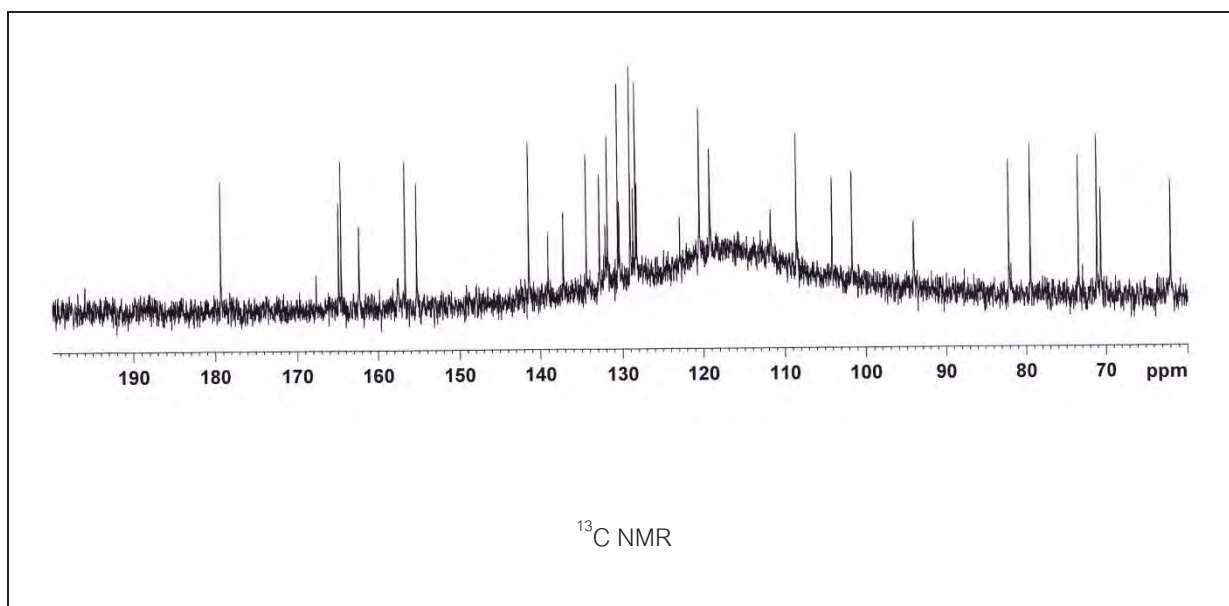
¹H NMR¹³C NMR

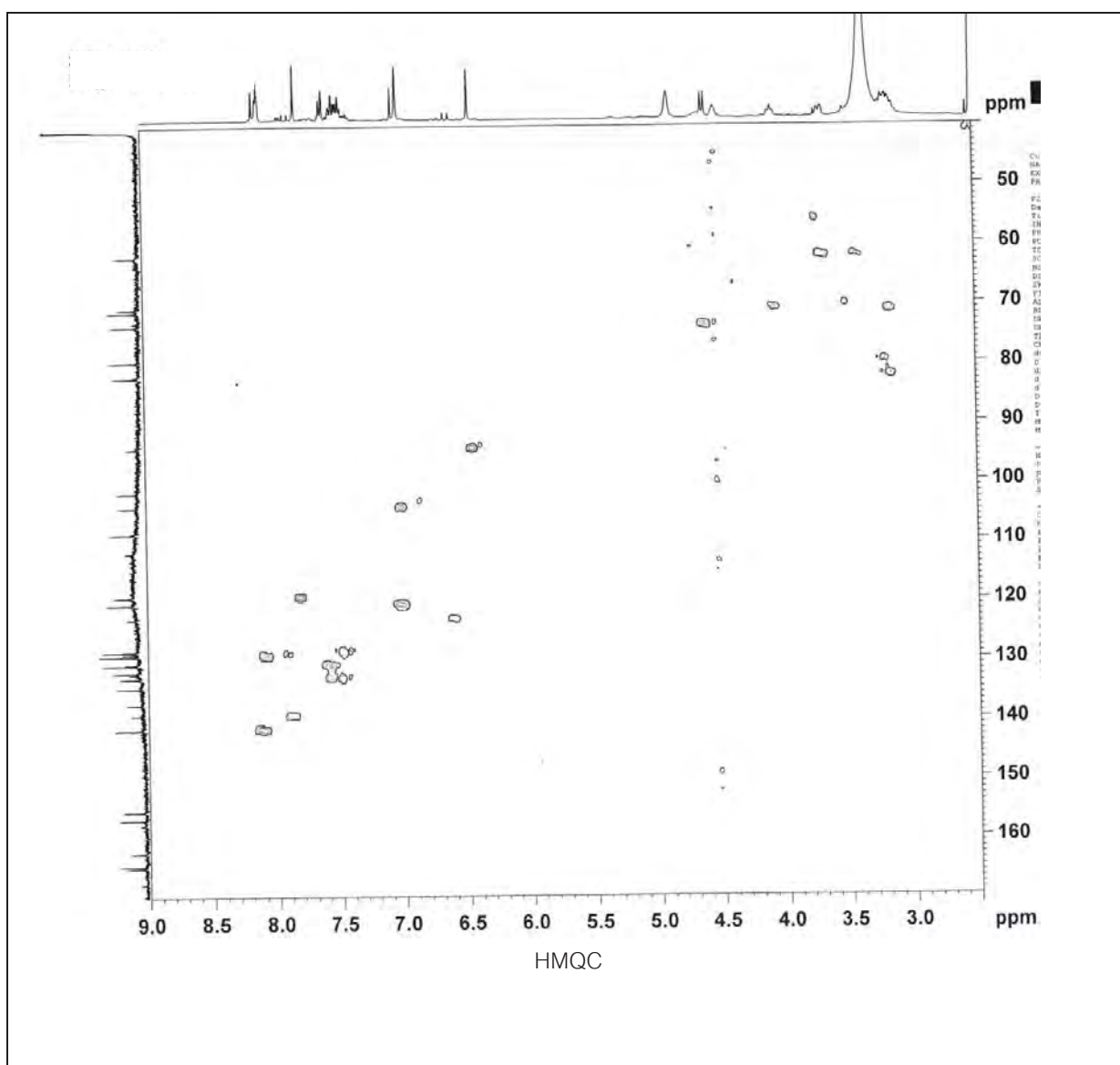


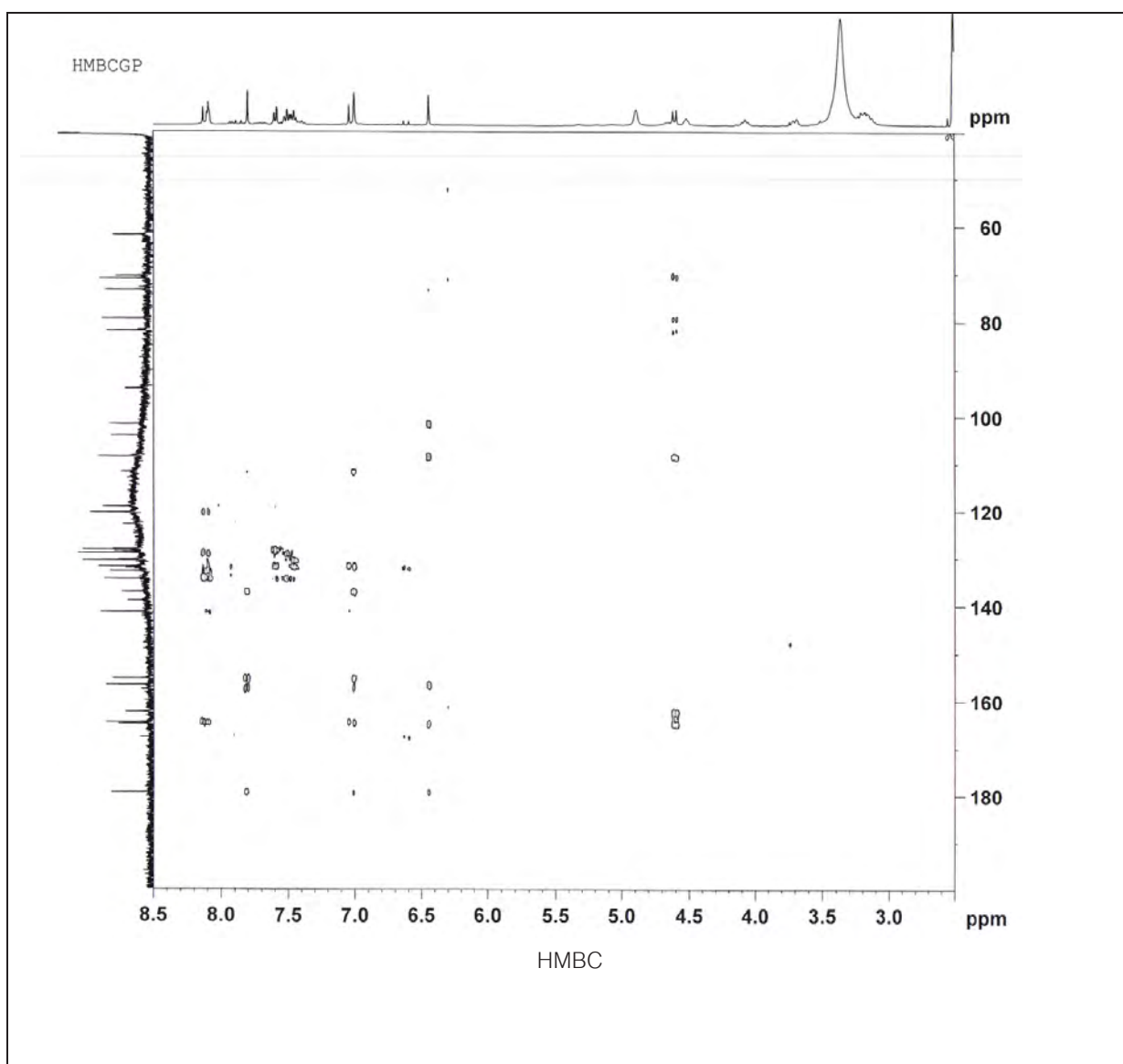




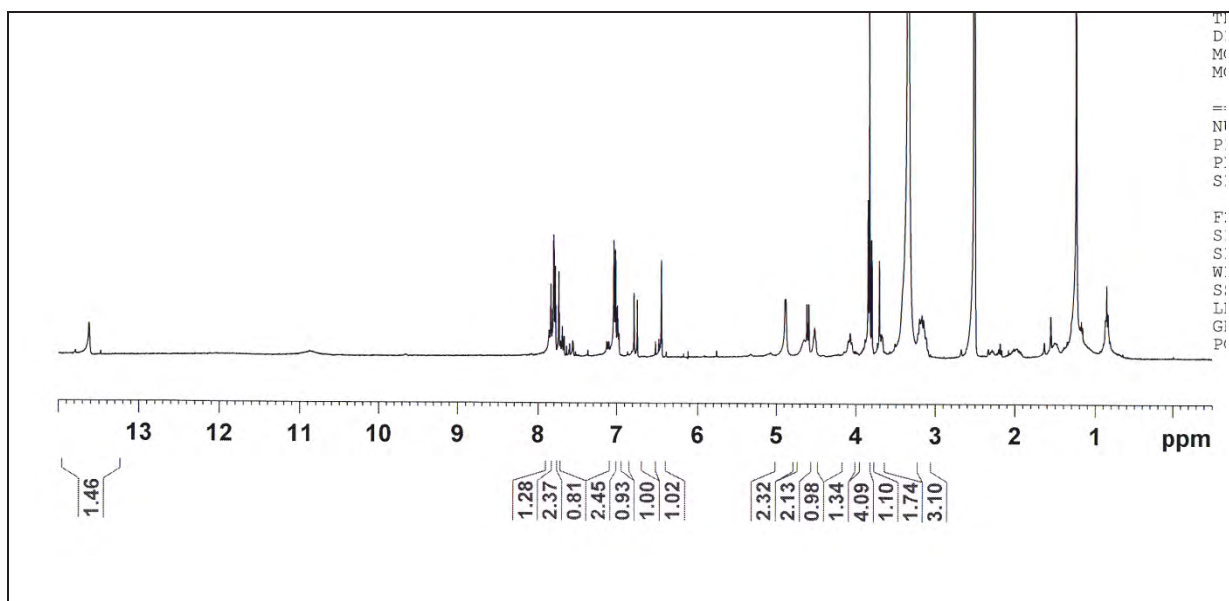
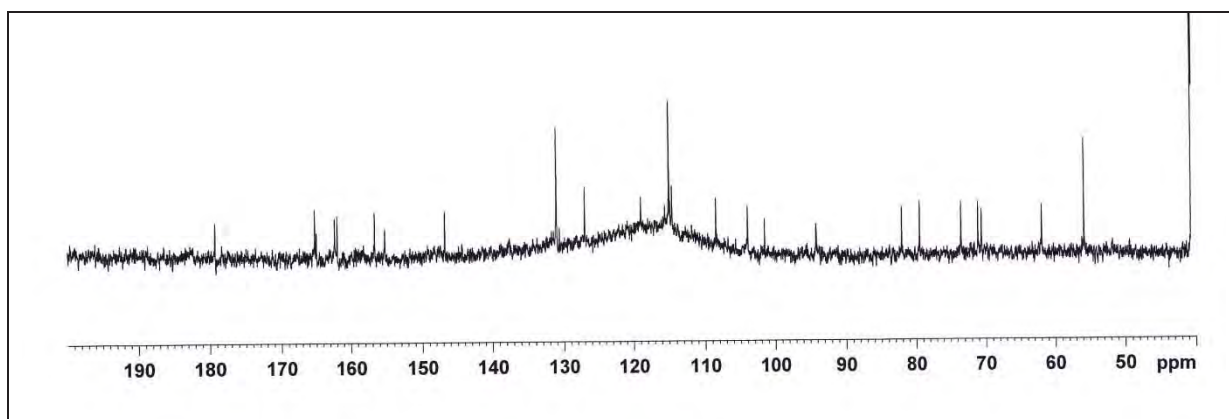
o-Cl-Cinnamoyl Mangiferin (6e)

¹H NMR¹³C NMR





p-OMe-Cinnamoyl Mangiferin (6f)

¹H NMR¹³C NMR

