



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
การสังเคราะห์ข้อมูลของยูจีนอล เพื่อพัฒนาเป็นยาชาเฉพาะที่
และยาสลบในสัตว์น้ำ

โดย จตุรงค์ สุภาพพร้อม และคณะ

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ กันยายน 2555

ร่างรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสังเคราะห์ข้อมูลของยูจีนอล เพื่อพัฒนาเป็นยาชาเฉพาะที่
และยาสลบในสัตว์น้ำ

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|------------------------------------|---|
| 1. ดร. จตุรงค์ สุภาพพร้อม | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| 2. ดร. อัญชลี สิริกุลขจร | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| 3. ดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี | ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา |
| 4. ผศ.ดร. บุญรัตน์ ประทุมชาติ | ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา |
| 5. รศ.ดร. ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล | ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชกรรม
มหาวิทยาลัยนเรศวร |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล เพื่อพัฒนาเป็นยาชาเฉพาะที่และยาสลบในสัตว์น้ำ สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความร่วมมือจากหลายฝ่าย ขอขอบคุณแหล่งทุนวิจัย ได้แก่ ทุนวิจัยและพัฒนาฝ่ายเกษตรของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปี 2553 (RDG5320022) ขอขอบคุณศ.ดร.นันทวัน บุญยะประสงค์ ผู้ประสานงานโครงการ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือให้คำแนะนำด้วยดีเสมอมา ดร.อุทัย วิชัย ที่เป็นจุดเริ่มต้นให้ข้าพเจ้าสนใจในงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณดร.อัญชลี สิริกุลขจร ผู้ร่วมวิจัยในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ รศ.ดร.ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล ผู้ร่วมวิจัยในการเตรียมตัวรับสารอนุพันธ์ ผศ.ดร.บุญรัตน์ ประทุมชาติ และดร.ณอมศักดิ์ บุญภักดี ผู้ร่วมวิจัยในการทดสอบฤทธิ์ในสัตว์น้ำ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร และห้องปฏิบัติการภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนในด้านสถานที่ และสาธารณูปโภคในระหว่างการทำวิจัย ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยเคมีอินทรีย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ดร.อนุสรณ์ วรสิงห์ และผศ.ดร.วิจิตร อุดอ้าย ที่แบ่งปันพื้นที่ในห้องวิจัย 502 ขอขอบคุณทุกท่านที่กล่าวมา โดยเฉพาะนายฐิติพงษ์ คำเคน ซึ่งได้รับทุนบัณฑิตศึกษาของศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) ที่ได้ช่วยเหลือด้วยความอุตสาหะให้งานวิจัยนี้ดำเนินไปได้ และสำเร็จลุล่วงด้วยดี รวมทั้งทีมงานในกลุ่มวิจัยการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของยูจีนอล ได้แก่ นายประดิษฐ์ ปิงกัน นางสาวหทัย ปัญสุวรรณ นางสาวสุภารัตน์ แสนเศษ นางสาวสาลิณี ขำแสง นายสุวิธาน มจกรณ์ นางสาวปฐวิภรณ์ นามราช นางสาวปรานวดี แก้วเมือง นางสาวชนันต์นันท์ ทองเถื่อน นางสาวเสาวลักษณ์ มหาโคตร นางสาวมยุรี เพ็งจันทร์ นางสาววนิดา พันธุ์งาม นางสาวกุสุมา รอดภัย นางสาวพัชรี เส็งเอียด นางสาวสุปราณี ทงจาก นางสาวเกตุรณี ผลกรด นายมิติ สิริอารีย์ นางสาวณัฐนรี บุญมา นายยุทธพงศ์ พิมพา นางสาวเบญจรัตน์ อุ่นทิม และนิสิตคนอื่นๆ ที่ไม่ได้เอ่ยนาม ที่ได้ช่วยเหลือในด้านต่างๆ ระหว่างการทำวิจัย หากปราศจากบุคคลเหล่านี้ งานคงจะดำเนินไปอย่างล่าช้า สุดท้ายนี้ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ต้นสังกัดที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ที่จำเป็นในงานวิจัย

รหัสโครงการ : RDG5320022

ชื่อโครงการ : การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล เพื่อพัฒนาเป็นยาชาเฉพาะที่และยาสลบในสัตว์น้ำ

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : 1. ดร. จตุรงค์ สุภาพพรอม
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. ดร. อัญชลี สิริกุลขจร
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

3. ดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี
ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

4. ผศ.ดร. บุญรัตน์ ประทุมชาติ
ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

5. รศ.ดร. ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล
ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชกรรม มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล เพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ 4 ชนิดได้แก่ ปลาดุก ปลากะพง กุ้งขาว และปูม้า โดยได้ออกแบบและดัดแปรโครงสร้างอนุพันธ์ของยูจีนอลทั้งหมด 25 ชนิด แบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม และนำไปเตรียมเป็นตำรับสารละลายอิมัลชัน โดยใช้สารก่ออิมัลชันเป็น Tween 80 และ Span 80 โดยกำหนดให้ Total required HLB เท่ากับ 10 และความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันเท่ากับร้อยละ 5 หลังจากนั้นนำตำรับของอนุพันธ์ของยูจีนอลไปทดสอบฤทธิ์การสลบในสัตว์น้ำ พบว่าอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการสลบปลาดุกและกุ้งขาว คือ อนุพันธ์ P7 ที่มีการดัดแปรหมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่ไพโรพอกซี อนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการสลบปลากะพง คือ อนุพันธ์ P26 ที่มีการดัดแปรหมู่แอลกอฮอล์ด้วยหมู่ไอโซแอลลิล และอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการสลบปูม้า คือ อนุพันธ์ P4 ที่มีการดัดแปรหมู่แอลกอฮอล์ด้วยหมู่ไพโรฟิด โดยอนุพันธ์ดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์ในการสลบได้เร็ว และนาน มีอัตราการรอดตายสูงเมื่อเทียบกับสารอ้างอิงยูจีนอล อนุพันธ์ดังกล่าวจึงน่าจะเป็นอนุพันธ์ที่มีศักยภาพที่ดีในการนำไปทดสอบการเป็นยาสลบในสัตว์น้ำประเภทอื่น และศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในด้านความเข้มข้นที่เหมาะสม เทคนิคการใช้ ระยะเวลาในการสลบ การลำเลียงจริง ความเป็นพิษ การตกค้างสะสมในเนื้อเยื่อต่อไป

Keywords: ยูจีนอล ยาสลบ อิมัลชัน ปลาดุก ปลากะพง กุ้งขาว ปูม้า

Project Code : RDG5320022

Project title : Synthesis of eugenol derivatives for anesthetic agent in aquaculture

Investigators :

1. Dr. Chaturong Suparpprom
Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University
2. Dr. Anchalee Sirikulajorn
Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University
3. Dr. Thanomsak Boonpakdee
Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University
4. Asist. Prof. Dr. Boonyarath Pratoomchat
Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University
5. Assoc. Prof. Dr. Sakchai Wittaya-areekul
Department of Pharmaceutical Technology , Faculty of Pharmaceutical, Naresuan University

Abstract

In this research, 25 eugenol derivatives were designed into 8 categories and synthesized to application use in aquatic animals such as Catfish (*Clarias gariepinus*), Asian seabass (*Lates calcarifer*), Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Blue crab (*Portunus pelagicus*). All derivatives were further prepared in an emulsion solution form by using Tween 80 and Span 80 as emulsifiers (Total required HLB = 10 and concentration of emulsifiers = 5%). After that, the whole derivatives were tested as anesthetic agent in those aquacultures. The anesthetic results revealed as following; the most efficiency agent in Catfish and Pacific white shrimp was P7 which was modified by replacing hydroxyl group with propoxy group, the most efficiency agent in Asian seabass was P26 which was modified by replacing allyl group with isoallyl group and the most efficiency agent in Blue crab was P4 which was modified by replacing allyl group with propyl group. The candidates can anesthetized in shorter time, longer recovery with high survival rate comparing to standard eugenol and will be further investigated in other aquaculture types in aspect of appropriate concentration, using technique, maximum anesthesia time, real sample transportation, toxicity and remaining residue in the tissue.

Keywords: Eugenol, anesthetic, emulsion, Catfish, Asian seabass, Pacific white shrimp, Blue crab

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ 1 เรื่อง (Proceeding)

ผู้แต่ง : Thitiphong Khamkhen, Anchalee Sirikulajorn, Sakchai Wittaya-arekul, Boonyarath Pratoomchat, Thanomsak Boonphakdee, Chaturong Suparpprom*

ชื่อเรื่อง : Alkylation Reaction For Hydroxy-Modified Eugenol For Anesthetic Test in *Clarias macrocephalus* (Bighead Catfish)

ชื่องาน: 4th Science Research Conference

สถานที่: มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

วันที่ 12-13 มีนาคม ปี: 2012 หน้า: 101

2. ผลงานนำเสนอแบบโปสเตอร์ระดับนานาชาติ 1 เรื่อง

ผู้แต่ง : Thitiphong Khumkhan, Anchalee Sirikulajorn, Sakchai Wittaya-arekul, Boonyarat Pratomchad, Thanomsak Boonphakdee, Chaturong Suparpprom*

ชื่อเรื่อง : Synthesis of Eugenol Derivatives for Anesthetic Test in Some Aquatic Animals

ชื่องาน: 6th Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON2012)

สถานที่: The Empress Convention Center, Chaing Mai, THAILAND

วันที่ 11-13 มกราคม ปี: 2012 หน้า: 849

3. ผลงานนำเสนอแบบโปสเตอร์ระดับชาติ 7 เรื่อง

3.1 ผู้แต่ง : จตุรงค์ สุภาพพร้อม*, ประดิษฐ์ ปิงกัน, จิตติพงษ์ คำเคน

ชื่อเรื่อง : การศึกษาการสังเคราะห์ยูจีนอล

ชื่องาน: 2nd Science Research Conference

สถานที่: มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

วันที่ 9-10 มีนาคม ปี: 2010 หน้า: 172

3.2 ผู้แต่ง : Thitiphong Khamkhen, Napaporn Junseeta, Sujitra Bootdama, Anchalee Sirikulajorn, Sakchai Wittaya-arekul, Chaturong Suparpprom*

ชื่อเรื่อง : Synthesis of Eugenol derivatives for Anesthetic test in Aquatic Animals

ชื่องาน: PERCH-CIC Congress VII

สถานที่: Jomtien Palm Beach Hotel & Resort Pattaya, Chonburi THAILAND

วันที่ 4-7 พฤษภาคม ปี: 2011 หน้า: 301

3.3 ผู้แต่ง : Haruthai Pansuwan, Chaturong Suparpprom *

ชื่อเรื่อง : Synthesis of 3-Allyl-1-bromo-2-methoxybenzene

ชื่องาน: 4th Science Research Conference

สถานที่: มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

วันที่ 12-13 มีนาคม ปี: 2012 หน้า: 352

3.4 ผู้แต่ง : Chaturong Suparpprom *, Salinee Khamsaeng, Suwichan Majakorn,

ชื่อเรื่อง : Synthesis of 4-Allyl-2-methoxyaniline by Smiles Rearrangement Reaction

ชื่องาน: 4th Science Research Conference

สถานที่: มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

วันที่ 12-13 มีนาคม ปี: 2012 หน้า: 353

3.5 ผู้แต่ง : Chaturong Suparpprom *, Pattawikorn Namrach, Sudarat Saenset

ชื่อเรื่อง : Synthesis of 4-Allyl-2-bromoanisole

ชื่องาน: 4th Science Research Conference

สถานที่: มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

วันที่ 12-13 มีนาคม ปี: 2012 หน้า: 354

3.6 ผู้แต่ง : Sudarat Saenset, Patawikorn Namrat, Suwichan Majakorn, Salinee Khamsaeng

Sakchai Wittaya-areekul, Boonyarath Pratoomchat, Chaturong Suparpprom*

ชื่อเรื่อง : Modification of Eugenol with Bromo and Amino Group for Anesthetic test in *Litopenaeus vannamei* and *Lates calcarifer*

ชื่องาน: การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท. 38)

สถานที่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่

วันที่ 12-13 มีนาคม ปี: 2012 หน้า: 116

3.7 ผู้แต่ง : Haruthai Pansuwan, Sakchai Wittaya-areekul, Boonyarath Pratoomchat, Chaturong Suparpprom*

ชื่อเรื่อง : Replacement of Hydroxy Group on Eugenol with Bromine and Hydrogen For Anesthetic Test in *Litopenaeus vannamei* and *Lates calcarifer*

ชื่องาน: การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท. 38)

สถานที่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่

วันที่ 12-13 มีนาคม ปี: 2012 หน้า: 114

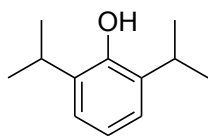
บทที่ 1

บทนำ

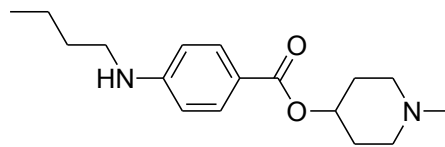
1.1 ที่มาของปัญหา

อุตสาหกรรมส่งออกสัตว์น้ำ ไม่ว่าจะเป็นกุ้งสด ปลาสด สัตว์น้ำประเภทครัสเตเชีย รวมทั้งปลาสวยงาม หรือพันธุ์ปลานิตต่างๆ นับเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่มีความสำคัญในระดับประเทศ โดยเฉพาะการส่งออกสัตว์น้ำเพื่อการบริโภค โดยข้อมูลจากศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร โดยความร่วมมือจากกรมศุลกากร ได้รายงานมูลค่าการส่งออกสินค้าสำคัญในปี 2551 ได้แก่ ปลาสด แช่เย็น แช่แข็ง มูลค่า 8,953 ล้านบาท กุ้งสด แช่เย็น แช่แข็ง มูลค่า 42,755 ล้านบาท ปลาหมึกสด แช่เย็น แช่แข็ง มูลค่า 12,531 ล้านบาท สัตว์น้ำประเภทครัสเตเชีย มูลค่า 3,420 ล้านบาท ปลามีชีวิตและพันธุ์ปลา มูลค่า 894 ล้านบาท [1] การส่งออกดังกล่าวในเชิงพาณิชย์ต้องคำนึงถึงคุณภาพของสินค้าทั้งในด้านกายภาพและชีวภาพ เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค เช่น สภาพความสดใหม่ของสินค้า ปลอดภัยจากโรคและสารปนเปื้อน มีคุณภาพผ่านมาตรฐานที่ประเทศคู่ค้ากำหนด ในปัจจุบัน การส่งออกสัตว์น้ำมีชีวิตและพันธุ์ปลาสวยงามหรือปลาหายาก ไม่ว่าจะเป็นเพื่อการบริโภค หรือเพื่อการเพาะเลี้ยง เป็นทางเลือกหนึ่ง ที่ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับการส่งออกสัตว์น้ำในลักษณะแช่เย็นหรือแช่แข็ง ในกรณีเพื่อการบริโภค เชื่อกันว่าสัตว์น้ำที่ยังมีชีวิต จะสามารถรักษาคุณภาพความสดและโภชนาการของสินค้าได้ดีกว่า และมีรสชาติดีกว่า สินค้าแช่เย็น และแช่แข็ง อย่างไรก็ตามเนื่องจากจะต้องผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การคัดเลือกคุณภาพ การให้วัคซีนหรือยาบางชนิด รวมทั้งกระบวนการขนส่ง อาจทำให้เกิดภาวะเครียดอันไม่พึงประสงค์ขึ้นในสัตว์น้ำได้ ซึ่งมีผลทำให้สัตว์ดังกล่าว ไม่มีชีวิตชีวา อ่อนแอ มีความต้านทานโรคต่ำลง จนกระทั่งเจ็บป่วยและเสียชีวิตได้ แนวทางในการแก้ไขแนวทางหนึ่งคือการใช้สารที่ออกฤทธิ์เป็นสารบรรเทาความเจ็บปวด ยาชาเฉพาะที่ หรือยาสลบ เพื่อลดสภาวะเครียดให้ลดน้อยลงในระหว่างกระบวนการขนส่ง ตัวอย่างสารประเภทนี้บางชนิด ได้แก่ tricaine methanesulfonate (Finquel หรือ MS222), metomidate, benzocaine, ketamine hydrochloride, quinaldine sulfate, propanidid, phenoxyethanol และ clove oil ดังแสดงโครงสร้างในภาพ 1.1 สารเหล่านี้บางชนิดได้ถูกนำมาใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ หรือยาสลบในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ เช่น ปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout) [2], ปลาแซลมอนแอตแลนติก (atlantics salmon) [3], ปลาซิลเวอร์เพิร์ช (silver perch) [4], ปลาไน (common carp) [5], ปลา fathead minnows [6], และ ปลาหมึก (common octopus) [7] เป็นต้น โดยเฉพาะ MS222 เป็นสารเพียงชนิดเดียวที่ผ่านการรับรองโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) ส่วนสารชนิดอื่นๆ ที่ใช้นั้นยังไม่มีรายงานการรับรองดังกล่าว ในขณะที่ยูจินอล (2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol) นั้นเป็นน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชธรรมชาติ เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันที่สกัดได้จากดอกกานพลู (*Eugenia caryophyllus* Bullock & Harrison MYRTACEAE) ซึ่งมีรายงานว่ามียุทธวิธีเป็นยาชาเฉพาะที่ (local anesthetic) [2-7] ในตำรายาไทยใช้ดอกตูมแห้งแก้ปวดฟัน โดยใช้ดอก 5-8 ดอก

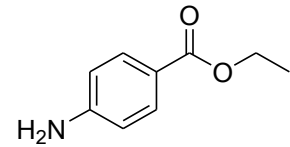
แช่เหล้าเอาสำลีชุบอุดรูฟัน นอกจากนี้ยังใช้ผสมในยาอมบ้วนปาก ดับกลิ่นปาก [8] และได้รับการรายงานว่าเป็นสารที่มีความปลอดภัย (generally regarded as safe) [9] นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เตรียมสารชนิดนี้เป็นยาสลบในสัตว์น้ำของ ผศ. ดร. ดวงดาว จันทศาสตร์ ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้คิดค้นตำรับยาสลบสัตว์น้ำจากน้ำมันกานพลู ซึ่งมีสารยูจีนอลเป็นส่วนประกอบหลัก โดยมีคุณสมบัติเป็นยาสลบปลาได้แทนสารเคมีอันตราย และได้พัฒนาน้ำมันกานพลูให้เป็นผลิตภัณฑ์ สำหรับใช้เป็นยาสลบสัตว์น้ำได้ประมาณ 10 ชั่วโมง เพื่อทดแทนสารเคมีที่ก่อให้เกิดปัญหาสารตกค้างในชุดโครงการ “การจัดการผลผลิตสัตว์น้ำและพืชน้ำ” และ “การใช้สมุนไพรในการผลิตสัตว์” ของสกว. ฝ่ายเกษตร ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่าสารในกลุ่มของยูจีนอลน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ในการประยุกต์ใช้เป็นยาชาเฉพาะที่หรือยาสลบในสัตว์น้ำ เนื่องจากว่ายูจีนอลเป็นสารสกัดจากธรรมชาติมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ สามารถหาได้ง่ายในประเทศไทย และมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อนจึงน่าจะสมารถทำการสังเคราะห์ยูจีนอล และปรับปรุงโครงสร้างเพื่อให้ได้อนุพันธ์ของมันได้ไม่ยากนัก โดยคาดว่าจะการปรับปรุงโครงสร้างบางส่วนของยูจีนอลจะได้อนุพันธ์ที่มีผลต่อสมบัติการเป็นสารบรรเทาความเจ็บปวด ยาชาเฉพาะที่หรือยาสลบต่อสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่ให้ประสิทธิภาพแตกต่างกัน



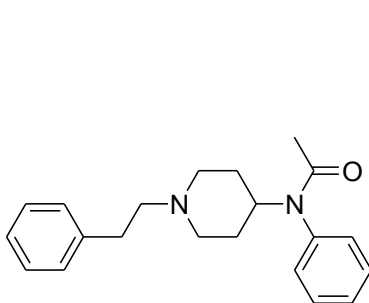
Propofol



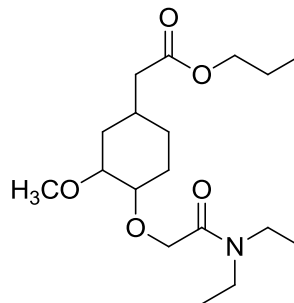
Paridocain



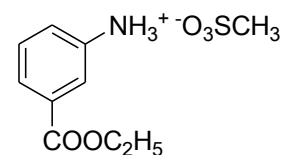
Benzocaine



Fentanyl

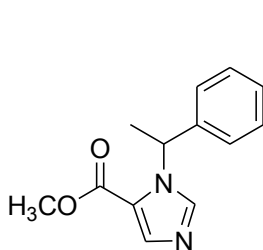


Propanidid

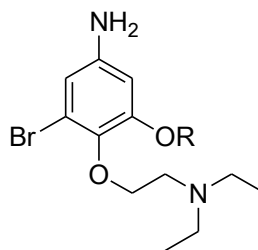


tricane methanesulfonate

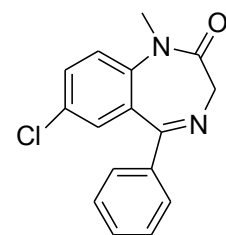
(MS222)



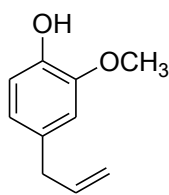
Metomidate



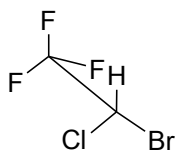
Procaine derivatives



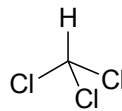
Diazepam (Valium)



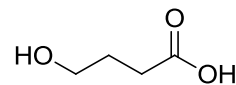
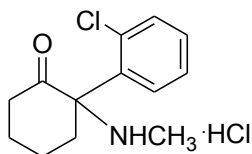
Eugenol



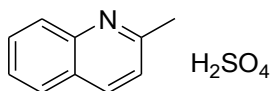
Halothane



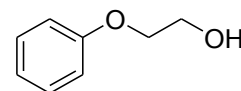
Chloroform

 γ -hydroxy butyric acid

Ketamine hydrochloride



Quinaldine sulfate



2-Phenoxyethanol

ภาพ 1.1 ตัวอย่างโครงสร้างของยาชาเฉพาะที่ หรือยาสลบบางชนิด

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลจากอนุพันธ์ของสารประเภทฟีนอลและอื่นๆ โดยทำปฏิกิริยากับแอลคิลเฮไลด์ ด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างๆ แนวทางในการออกแบบโมเลกุลต้องการให้สารอนุพันธ์มีส่วนที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน และส่วนที่เป็นไฮโดรโฟบิก เพื่อให้เกิดอันตรกิริยากับนิวโรทรานสมิตเตอร์ รีเซพเตอร์ ดังที่เคยมีรายงานไว้โดย Sandorfy [10] โดยคาดว่าสารประเภทนี้น่าจะสามารถนำไปใช้เป็นสารออกฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่ในอุตสาหกรรมทางการแพทย์สัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีชีวิตได้ ซึ่งผลเบื้องต้นนี้จะสามารถนำไปต่อยอดในงานวิจัยเพื่อหาฤทธิ์ในการใช้เป็นยาชาหรือยาสลบในสัตว์น้ำต่อไป ถ้าได้ผลของการออกฤทธิ์ที่ยาวนานขึ้น ก็จะสามารถลดต้นทุนในการนำเข้ายาชาหรือยาสลบจากต่างประเทศ หรือผลิตเป็นสารสำคัญในเชิงพาณิชย์ต่อไปได้

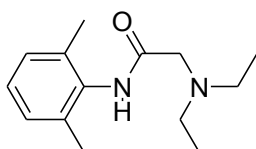
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review) และเอกสารอ้างอิง

- ข้อมูลทางเภสัชวิทยาของสารที่ออกฤทธิ์สลบปลา

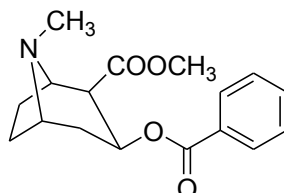
ยาชา (Local anesthetic agents) [11] เป็นยาที่ยับยั้งการนำกระแสไฟฟ้าผ่านผนังของเส้นประสาทและกล้ามเนื้อ โมเลกุลของยาชาที่ใช้ในมนุษย์มักประกอบด้วย aromatic ring ต่อกับส่วน tertiary amine ด้วย intermediate chain ซึ่งอาจเป็นกลุ่มเอสเทอร์ หรือเอไมด์ จึงจัดเป็นยาชากลุ่ม aminoester หรือ aminoamide ส่วนที่เป็น aromatic ring เป็นส่วนที่ละลายไขมันได้ดี (lipophilic) ในขณะที่ส่วน tertiary amine เป็นส่วนที่ละลายน้ำได้ดี (hydrophilic)

ความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ของยา [12] ที่มีการใช้ในทางคลินิกประกอบด้วย

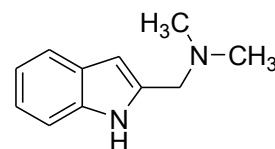
1. อะตอมของคาร์บอน sp^2 ซึ่งมีหมู่แอลคิลและหมู่เอริลเชื่อมต่อโดยตรง หรือผ่าน heteroatom ดังปรากฏในโครงสร้างของยาชากลุ่ม lidocaine
2. ถ้าหมู่เอริลเชื่อมต่อโดยตรงกับอะตอมคาร์บอน sp^2 ดังปรากฏในโครงสร้างของยาชากลุ่มโคเคน ฤทธิ์ทำให้ชาสัมพันธ์กับหมู่แอลคิลที่มาต่อ
3. ถ้าหมู่แอลคิลเชื่อมต่อโดยตรงกับอะตอมคาร์บอน sp^2 ดังปรากฏในโครงสร้างของยาชากลุ่มไอโซกรา มีน ฤทธิ์ทำให้ชาต้องการการจับของหมู่เอริลผ่านตัวเชื่อมไนโตรเจน



Lidocaine



Cocaine



Isogramine

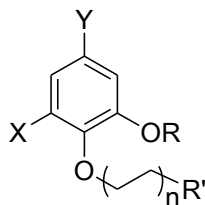
อย่างไรก็ตาม การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ของยานี้โดยส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษายาชาสำหรับใช้ในมนุษย์ ยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ของยาชาในสัตว์น้ำ โดยยูจีนอลเป็นยาชาเฉพาะที่ชนิดหนึ่งซึ่งสามารถใช้ในมนุษย์ได้ ในขณะเดียวกันพบว่าสามารถออกฤทธิ์กับสัตว์น้ำได้เช่นกัน ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ของยาชาในสัตว์น้ำ โดยเริ่มต้นจะทำการดัดแปลงให้ได้อนุพันธ์ของยูจีนอลในส่วนต่างๆ โดยอิงข้อมูลบางส่วนจากอนุพันธ์ของยาชาต่างๆ ที่ใช้ในมนุษย์

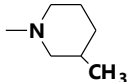
สำหรับสารยูจีนอล อนุพันธ์ของยูจีนอล และสารกลุ่มอัลคอกซีอะนิลีน (alkoxyaniline) ได้ถูกสังเคราะห์และนำมาทดสอบฤทธิ์ทางยาทั้งที่ใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ ยาสลบในสัตว์น้ำ รวมทั้งความเป็นพิษ ดังงานวิจัยที่รวบรวมต่อไปนี้

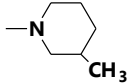
ในปี ค.ศ. 1961 R. O. Clinton และคณะ [13] สนใจศึกษาสารที่มีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่และยาสลบโดยการหาสารที่ให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า procaine ซึ่งเป็นยาสลบที่นิยมใช้ กลุ่มวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารในกลุ่ม alkoxy-dialkylaminoalkoxyanilines โดยสังเคราะห์อนุพันธ์ทั้งหมด 16 ตัว (สาร 1-16) และนำไปศึกษาฤทธิ์ยาสลบกับหมู (anaesthetic activity) ศึกษาความเป็นพิษกับหนู (toxicity) และศึกษาการระคายเคืองกับกระต่าย (irritancy) ผลที่ได้พบว่ามีสาร 2 ชนิดคือ 7 กับ 8 เท่านั้นที่ให้ประสิทธิภาพดีกว่า procaine ส่วนสารอื่นๆ ที่เหลือมีประสิทธิภาพดีกว่า การศึกษาผลของโครงสร้างที่มีต่อฤทธิ์เป็นยาสลบกับความเป็นพิษได้ข้อสรุปดังนี้

1. ผลของความยาวของโซ่ข้างที่ตำแหน่ง 5-alkoxy (สาร 1-5) พบว่าความยาวของโซ่ข้างที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มทั้งฤทธิ์ของยาสลบและความเป็นพิษ โดยให้ประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น 3.5 เท่าและ 60 เท่าสำหรับหมู่ methoxy และหมู่ hexoxy ตามลำดับ

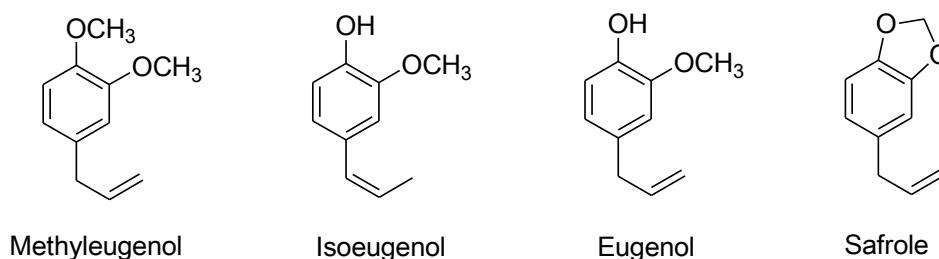
2. การแทนที่หมู่ -NH_2 ด้วย -NHCOCH_3 ทำให้ฤทธิ์เป็นยาสงบและความเป็นพิษลดลงอย่างมาก
3. การแทนที่หมู่ Br บนวงเบนซีนด้วย Cl (สาร 1 กับ 9 และ 2 กับ 10) ไม่มีผลต่อฤทธิ์การเป็นยาสงบ



หมายเลขสาร	โครงสร้าง				
	Y	X	R	n	R'
1	-NH_2	Br	-CH_3	2	$\text{-N(C}_2\text{H}_5)_2$
2	-NH_2	Br	$\text{-C}_2\text{H}_5$	2	$\text{-N(C}_2\text{H}_5)_2$
3	-NH_2	Br	$\text{-C}_3\text{H}_7$	2	$\text{-N(C}_2\text{H}_5)_2$
4	-NH_2	Br	$\text{-C}_4\text{H}_9$	2	$\text{-N(C}_2\text{H}_5)_2$
5	-NH_2	Br	$\text{-C}_6\text{H}_{13}$	2	$\text{-N(C}_2\text{H}_5)_2$
6	-NH_2	Br	$\text{-CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	2	$\text{-N(C}_2\text{H}_5)_2$
7	-NHCOCH_3	Br	$\text{-C}_2\text{H}_5$	2	$\text{-N(C}_2\text{H}_5)_2$
8	-NHCOCH_3	Cl	-CH_3	2	$\text{-N(C}_2\text{H}_5)_2$
9	-NH_2	Cl	-CH_3	2	$\text{-N(C}_2\text{H}_5)_2$
10	-NH_2	Cl	$\text{-C}_2\text{H}_5$	2	$\text{-N(C}_2\text{H}_5)_2$
11	-NH_2	Cl	-CH_3	2	$\text{-N(CH}_3)_2$
12	-NH_2	Cl	-CH_3	3	$\text{-N(CH}_3)_2$
13	-NH_2	Cl	-CH_3	3	$\text{-N(C}_2\text{H}_5)_2$
14	-NH_2	Cl	-CH_3	2	

15	-NH ₂	Cl	-CH ₃	3	
16	-NH ₂	Cl	-C ₂ H ₅	3	-N(C ₂ H ₅) ₂

ในปี ค.ศ. 2000 I. G. Sipes และคณะ [14] ได้ศึกษาสาร 4 ชนิด ได้แก่ eugenol, methyleugenol, isoeugenol และ safrole ในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ซึ่งใช้วิธีวัดการปลดปล่อยสาร lactate dehydrogenase (LDH) และความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity) ซึ่งใช้วิธี unscheduled DNA synthesis (UDS) assay โดยทำการทดลองกับหนู ผลการทดลองพบว่า methyleugenol และ safrole ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่เป็นสาเหตุทำให้เกิด UDS ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10 – 500 μM ส่วน isoeugenol และ eugenol พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์โดยค่า LC₅₀ พบที่ประมาณ 200-300 μM แต่ไม่ทำให้เกิด UDS นอกจากนี้เมื่อทดลองกระตุ้นทางชีวภาพ (bioactivation) ด้วยสาร methyleugenol และ safrole พบว่าสารทั้งสองมีแนวโน้มเป็นพิษต่อเซลล์และเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเพิ่มขึ้น



ภาพ 1.2 โครงสร้างของ methyleugenol, isoeugenol, eugenol และ safrole

ในปี ค.ศ. 2004 M. A. Kildea และคณะ [4] ทำการตรวจวัดการสะสมและการหายไปของสาร eugenol ในเนื้อเยื่อปลาซิลเวอร์เพิร์ชหลังถูกทำให้สลบ ผลจากการศึกษาพบว่าทำให้ปลาสลบในครั้งแรกด้วยน้ำมันกานพลู (clove oil) หลังการฟื้นสลบปลาเป็นเวลา 48 ชั่วโมงสามารถกำจัดสาร eugenol ออกจากเนื้อเยื่อปลาให้อยู่ในระดับที่ตรวจวัดไม่พบ แต่เมื่อปลาถูกทำให้สลบเป็นครั้งที่สอง แม้ว่าจะทำการฟื้นสลบปลาเป็นเวลา 1 อาทิตย์พบว่ายังสามารถตรวจพบสาร eugenol ในเนื้อเยื่อปลาที่ค่าเฉลี่ย 0.32 mg.kg⁻¹ นอกจากนี้การศึกษาค้นคว้าของอุณหภูมิต่อการสะสมและการหายไปของ eugenol ในการทดลองมีการใช้สาร 2 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบกันคือน้ำมันกานพลู 50 mg.kg⁻¹ น้ำมันกานพลู 15 mg.kg⁻¹ AQUI-S™ 15 mg.kg⁻¹ และชุดควบคุม ผลที่ได้ (ตาราง 1.1) พบว่าความเข้มข้นและอุณหภูมิมีผลต่อการสะสมของ eugenol ส่วนการศึกษากายการหายไปของยาสลบปลาพบว่าอุณหภูมิสูงการหายไปของสารที่เนื้อเยื่อปลาเกิดขึ้นได้เร็วกว่า

ตาราง 1.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการสะสมและการหายไปของยาสลับปลา

ชนิดของยาสลับ	การสะสมของยาสลับ		การหายไปของยาสลับ	
	T สูง	T ต่ำ	T สูง	T ต่ำ
น้ำมันกานพลู 50 mg.kg ⁻¹	มาก	น้อย	เร็ว	ช้า
น้ำมันกานพลู 15 mg.kg ⁻¹	น้อย	มาก	เร็ว	ช้า
AQUI-S™ 15 mg.kg ⁻¹	น้อย	มาก	เร็ว	ช้า

ในปี ค.ศ. 2005 J. Velisek และคณะทำการศึกษาผลของการใช้น้ำมันกานพลูเป็นยาสลับในปลาคาร์พ [5] และปลาเรนโบว์เทราท์ [15] โดยทำการวัดค่า haematological profiles และ biochemical profiles ในเลือดปลา รวมทั้งติดตามผลกระทบต่อปลาหลังจากผ่านการทำให้สลับ ผลการศึกษาปริมาณน้ำมันกานพลูที่ทำให้เกิดพิษฉับพลันในปลาเรนโบว์เทราท์และปลาคาร์พดังแสดงในตาราง 1.2

ตาราง 1.2 ผลการศึกษาปริมาณการเกิดพิษฉับพลันของน้ำมันกานพลูต่อปลาเรนโบว์เทราท์และปลาคาร์พ

ความเป็นพิษของน้ำมันกานพลู	ปลาเรนโบว์เทราท์ (หน่วยความเป็นพิษ mg.L ⁻¹)	ปลาคาร์พ (หน่วยความเป็นพิษ mg.L ⁻¹)
LC ₅₀ ที่ 10 นาที	81.1	74.3
LC _{0.1} ที่ 10 นาที	63.9	51.6
LC _{99.9} ที่ 10 นาที	100.1	110.1
LC ₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง	14.1	18.1
LC _{0.1} ที่ 96 ชั่วโมง	12.5	15.45
LC _{99.9} ที่ 96 ชั่วโมง	16.2	19.8

ผลการศึกษาสรุปได้ว่าน้ำมันกานพลูไม่มีผลต่อ haematological และ biochemical profiles ในเลือดของปลาทั้งสองชนิด โดยปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่เหมาะสมคือ 30 mg.L⁻¹ นอกจากนี้สิ่งที่พบต่างกันคือ

กรณีของปลาเรนโบว์เทราท์จะพบการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของกลูโคสและแอมโมเนีย พบการลดลงของ AST หลังการสลบไป 10 นาที นอกจากนี้พบว่าปลา 20% เกิด sporadic ectasia ที่เหงือกหลังจากสลบ 24 ชั่วโมง ส่วนกรณีของปลาคาร์พพบการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของกลูโคสและฟอสเฟตหลังจากปลาสัมผัสน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 30 mg.L^{-1} เป็นเวลา 10 นาที และยังพบว่าปลาเกิด capillary ectasia ที่เหงือกทันทีที่สัมผัสน้ำมันกานพลู

ในปี ค.ศ. 2006 D. Palic และคณะ [6] ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยดังต่อไปนี้คือ ความเข้มข้นของ plasma cortisol และการเกิด neutrophil function จากการใช้สาร 3 ชนิดเปรียบเทียบกับ ได้แก่ tricaine methanesulfonate (MS-222), metomidate hydrochloride (MTMD) และ eugenol (EUG) ความเข้มข้นของสารในการทดลองเป็นดังนี้ MS-222 75 mg.L^{-1} , EUG 30 mg.L^{-1} และ MTMD 4 mg.L^{-1} ปลา fathead minnows ที่ใช้ศึกษาถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม SA มีการเติมสารทำให้สลบ กับกลุ่ม S ไม่มีการเติมสารทำให้สลบ ผลการทดลองสรุปได้ดังตาราง 1.3 โดยพบว่า eugenol และ MTMD เป็นสารที่ช่วยป้องกันการเกิดภาวะเครียดในปลา

ตาราง 1.3 ผลการศึกษานานิตของยาสลบปลาที่ช่วยลดภาวะเครียดในปลา fathead minnows

การเปลี่ยนแปลงหลังทำให้เกิดความเครียดเป็นเวลา 30 นาที	ปลากลุ่ม S	ปลากลุ่ม SA		
		SA MS-222	SA EUG	SAMTMD
ความเข้มข้นของ plasma cortisol	เพิ่มขึ้น	เพิ่มขึ้น	คงที่	คงที่
Neutrophil function	เพิ่มขึ้น	เพิ่มขึ้น	คงที่	คงที่

ในปี ค.ศ. 2007 Dong-Won Seol และคณะ [7] นำน้ำมันกานพลูไปใช้ในการสลบปลาหมึกยักษ์ โดยทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ ($15, 20$ และ 25°C) และความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู ($50, 100, 150, 200, 250$ และ 300 mg.L^{-1}) ที่มีต่อเวลาที่ใช้ในการทำให้อสลบและการฟื้นจากสลบของปลาหมึก ผลการศึกษพบว่าความเข้มข้นกับอุณหภูมิมีผลต่อเวลาในการสลบและการฟื้นอย่างมีนัยสำคัญคือ เวลาที่ใช้ในการสลบจะลดลงเมื่อความเข้มข้นและอุณหภูมิเพิ่มขึ้น ส่วนเวลาที่ใช้ในการฟื้นจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นและอุณหภูมิลดลง การทดลองที่ผ่านมาไม่พบการตายของปลาหมึก ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการสลบและฟื้นจากสลบอย่างรวดเร็วคือที่ 200 mg.L^{-1}

ในปี ค.ศ. 2007 P. Vachon และคณะ [2] สนใจศึกษา pharmacokinetic study ของสาร eugenol ในปลาเรนโบว์เทราท์ การทดลองทำการแช่ปลาจำนวน 30 ตัวที่มีความยาวและน้ำหนักใกล้เคียงกันลงในสารละลายของ eugenol ที่ความเข้มข้น 75 mg.L^{-1} เป็นเวลา 15 นาที หลังจากฟื้นสลบปลาอย่างดี ปลาแต่ละตัวจะถูกจับแยกกันอยู่ในถังน้ำที่มีการให้อากาศออกซิเจนตลอดเวลา จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดตามเวลาที่กำหนดคือ ก่อนแช่น้ำยาให้สลบ หลังแช่น้ำในถังออกซิเจนที่เวลา 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 และ 48 ชั่วโมง ตัวอย่างเลือดที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค mass spectrometry ผลของ pharmacokinetic study มีค่าดังนี้ $C_{\max} 10.53 \mu\text{g/mL}$, $AUC_{0-t} 16.55 \mu\text{g}$

h/mL, AUC_{0-inf} 17.04 μg h/mL และครึ่งชีวิต 12.14 ชั่วโมง จากผลที่ได้แสดงว่า eugenol สามารถถูกดูดซึมและกำจัดออกจากตัวปลาได้ง่ายโดยการแช่ปลาในอ่างที่อุณหภูมิ 4 °C และการที่ eugenol มีครึ่งชีวิตที่นานจะทำให้เกิดการสะสมของ eugenol ในปลาเมื่อมีการทำให้สลบซ้ำหลายๆ ครั้ง

ในปี พ.ศ. 2550 ฎิลก วงศ์เสถียร และธีระพงศ์ โปธา [16] ทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูที่จะมีผลต่อระยะเวลาการสลบและฟื้นสลบในปลาทอง ได้แก่ ปลาทองพันธุ์หัวสิงห์ ออรรันดา และโคเมท คละเพศอย่างละ 30 ตัว โดยปลาจะถูกแช่ในน้ำที่มีน้ำมันกานพลูที่ 3 ความเข้มข้นคือ 25, 50 และ 100 ppm ณ อุณหภูมิของน้ำ 26.6 °C ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำเท่ากับ 4.6 ppm และ pH ของน้ำเท่ากับ 6.75 ผลการทดลองแสดงดังตาราง 1.4 พบว่าการใช้น้ำมันกานพลูที่ 100 ppm ทำให้ระยะเวลาการเข้าสู่ระดับการสลบขั้นที่ 3 ระดับที่ 2 เร็วกว่าและทำให้ระยะเวลาการเข้าสู่ระดับการฟื้นขั้นที่ 5 นานกว่าที่ความเข้มข้น 50 และ 25 ppm อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างที่ความเข้มข้น 50 และ 25 ppm ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มการทดลอง

ตาราง 1.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่มีต่อระยะเวลาในการสลบและฟื้นตัวของปลาทองโคเมท

ความเข้มข้น (ppm)	เวลาในการสลบเข้าสู่ขั้นที่ 3 ระดับ 2 (นาที)	เวลาในการฟื้นเข้าสู่ขั้นที่ 5 (นาที)
25	18.5	8.5
50	10	10
100	4.5	14

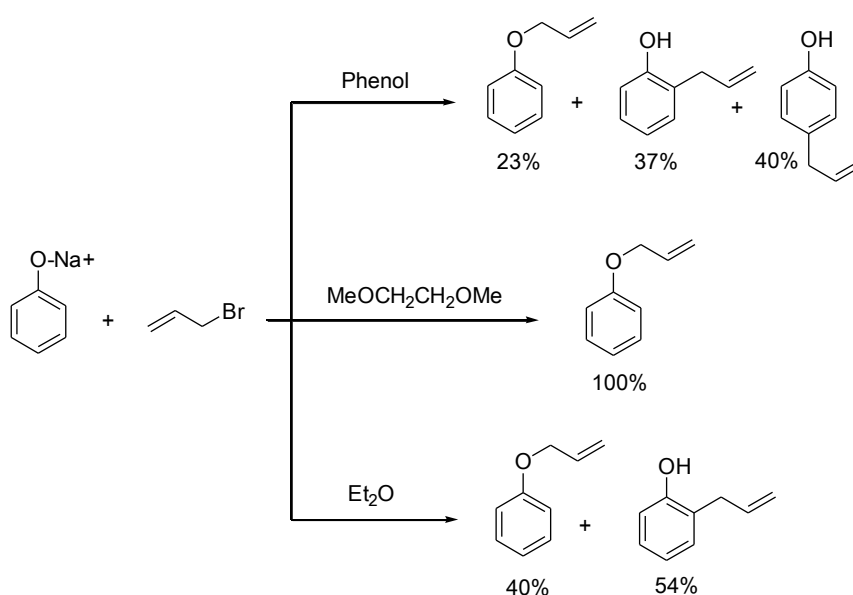
ในปี พ.ศ. 2550 สุรัชย์ พิกุลแก้วและคณะ [17] ศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาและพฤติกรรมการสลบและการฟื้นสลบของปลาบึก 60 ตัว ระหว่างการใช้น้ำมันกานพลูกับสาร MS-222 ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ผลการศึกษาพบว่าการใช้ น้ำมันกานพลูในทุกความเข้มข้นเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบที่ระดับ 3 โดยเวลาที่ใช้จะน้อยลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูสูงขึ้น สำหรับการให้ MS-222 พบว่าที่ความเข้มข้น 100 เท่านั้นที่ทำให้เกิดการสลบที่ระดับ 3 นอกจากนี้พฤติกรรมในการสลบของปลาบึก เมื่อใช้น้ำมันกานพลูจะแสดงอาการกระวนกระวายมากกว่าเมื่อใช้ MS-222 และปลาบึกที่ได้รับขนาดของยาสูงจะมีระยะเวลาการฟื้นสลบที่นานกว่า

จากงานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมด จะเห็นได้ว่าสารยูจีนอลนั้นมีศักยภาพสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบและช่วยป้องกันการเกิดภาวะเครียดในสัตว์น้ำได้หลายชนิด เช่นเดียวกับสารในกลุ่มเดียวกัน ได้แก่ MS-222, metomidate hydrochloride, alkoxy-dialkylaminoalkoxyanilines แต่ยังไม่มียางานการสังเคราะห์สารอนุพันธ์เพื่อทดสอบการสลบในปลา ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยออกแบบโครงสร้างด้วยข้อมูลจากสารเหล่านี้ เพื่อให้ได้สารอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ลดการสะสมในเนื้อเยื่อ และมีราคาถูกลง

- งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ยูจีนอลและสารที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ยูจีนอลส่วนใหญ่จะเป็นปฏิกิริยา C-allylation ของอนุพันธ์ของฟีนอล โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้

ในปี ค.ศ.1962 N. Kornblum และคณะ [18] ได้ทำการศึกษาตัวทำละลายที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา alkylation ของ ambident anion จากการศึกษาจะใช้ sodium phenoxide ทำปฏิกิริยากับ allyl bromide หรือ allyl chloride ใน phenol พบว่า สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เป็น C-allylation ที่ตำแหน่ง *ortho* ร้อยละ 37 และที่ตำแหน่ง *para* ร้อยละ 40 และเมื่อใช้ตัวทำละลายเป็น 1,2-dimethoxyethane จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น O-allylation และเมื่อใช้ diethyl ether เป็นตัวทำละลายจะได้ O-allylation ร้อยละ 40 และ C-allylation ที่ตำแหน่ง *para* ร้อยละ 54 ดังภาพ 1.3

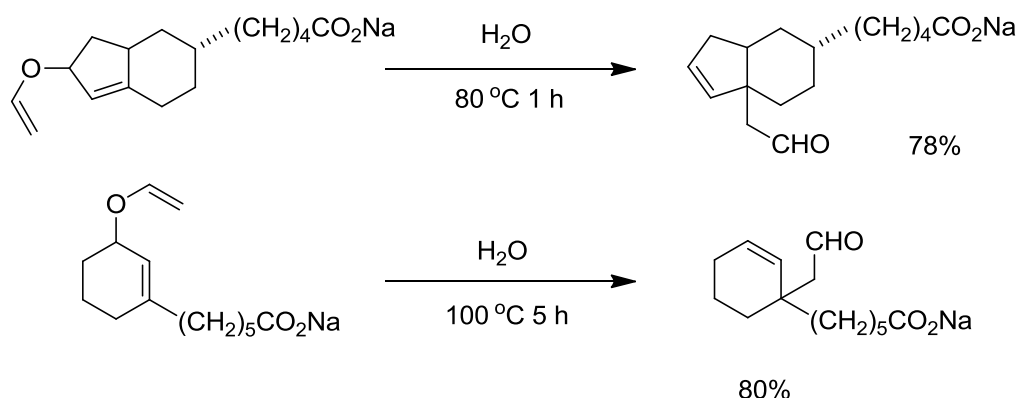


ภาพ 1.3 ปฏิกิริยา alkylation ของ sodium phenoxide ของ Kornblum และคณะ

ในปี ค.ศ.1979 S. Akaboli และคณะ [19] ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยา allylation ของ sodium phenoxide โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น crown ethers และ polymers บางชนิด เช่น 18-crown-6-benzo-18-crown-6, benzo-15-crown-5, poly(vinylmonobenzo-15-crown-5) และ poly(vinyl-monobenzo-18-crown-6) และพบว่าเมื่อใช้ poly(vinylmonobenzo-15-crown-5) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เป็น C-allylation ร้อยละ 7 และ O-allylation ร้อยละ 93 ในขณะที่เมื่อใช้ benzo-15-crown-5 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เป็น C-allylation ร้อยละ 17 และ O-allylation ร้อยละ 73 ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้ sodium phenoxide ทำปฏิกิริยากับ allyl chloride ในตัวทำละลายน้ำ

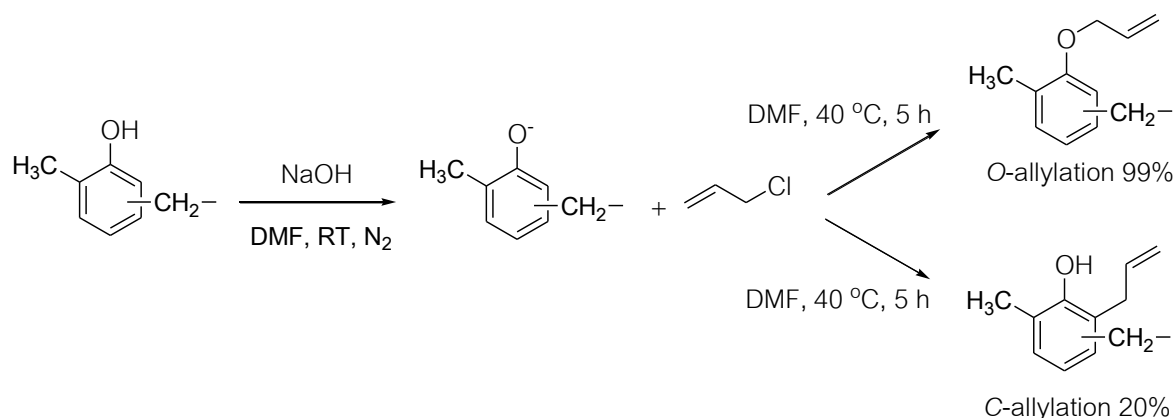
ในปี ค.ศ. 1989 P. A. Grieco และคณะ [20] ได้ทำการศึกษาการปรับปรุงโครงสร้างด้วยปฏิกิริยา Claisen rearrangement ในตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์มีอิทธิพลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา Claisen

rearrangement ซึ่งในการสังเคราะห์ต้องใช้อุณหภูมิ 80 ถึง 100 °C และได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น C-allylation ร้อยละ 78 และ 80 ตามลำดับ ดังภาพ 1.4



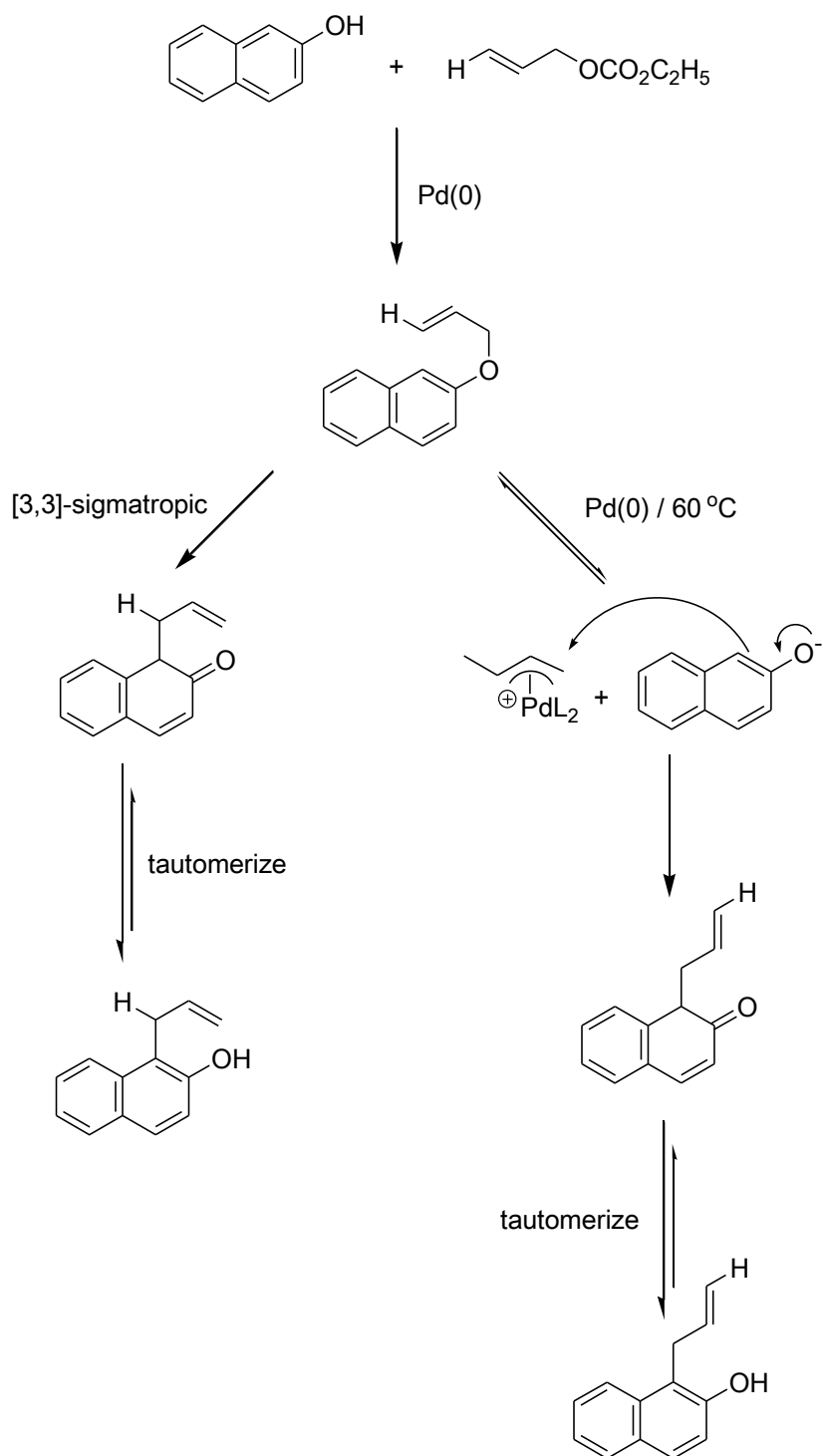
ภาพ 1.4 ปฏิกิริยา Claisen rearrangement โดย Paul A. Grieco และคณะ

ในปี ค.ศ. 1989 Z. K. Liao และคณะ [21] ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยา polyallylation ของ *o*-cresol novolac เพื่อศึกษา regioselectivity ในการเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ระหว่าง O-allylation กับ C-allylation พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น O-allylation ของ *o*-cresol novolac ได้ร้อยละ 99 เมื่อเปรียบเทียบกับ C-allylation ได้ร้อยละ 20 ซึ่งในการสังเคราะห์จะใช้ *o*-cresol novolac ทำปฏิกิริยากับ sodium hydroxide ใน DMF ที่อุณหภูมิประมาณ 45-50 °C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เพื่อให้ได้ polyphenoxides เป็นสารตั้งต้น จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ allyl chloride เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ดังภาพ 1.5



ภาพ 1.5 ปฏิกิริยา polyallylation ของ *o*-cresol novolac ของ Z. K. Liao และคณะ

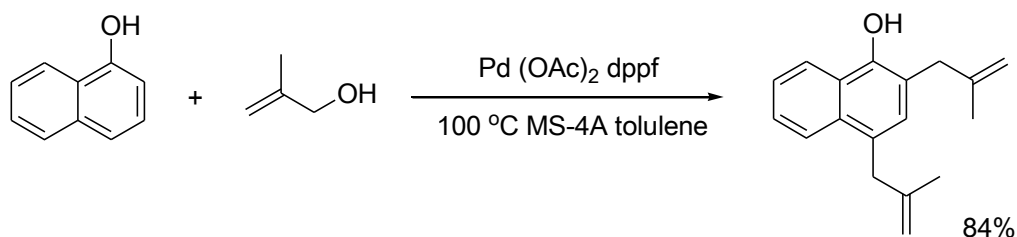
ในปี ค.ศ. 1995 C. Goux และคณะ [22] ได้ทำการศึกษาผลของ stereoselectivity และ regioselectivity ในการเตรียมปฏิกิริยา allylic etherification โดยใช้พาลเลเดียม (palladium) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเกิดการแทนที่ของหมู่ allyl ที่ตำแหน่ง *ortho* ของ 1-allylnaphthalen-2-ol โดยผ่านปฏิกิริยา Claisen rearrangement ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิที่สูงและถูกควบคุมโดย stereo-selectivity เนื่องจากมีอิทธิพลจาก steric effect และ electronic factor



ภาพ 1.6 ปฏิกิริยา allylation โดยใช้ Pd เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ของ Catherine Goux และคณะ

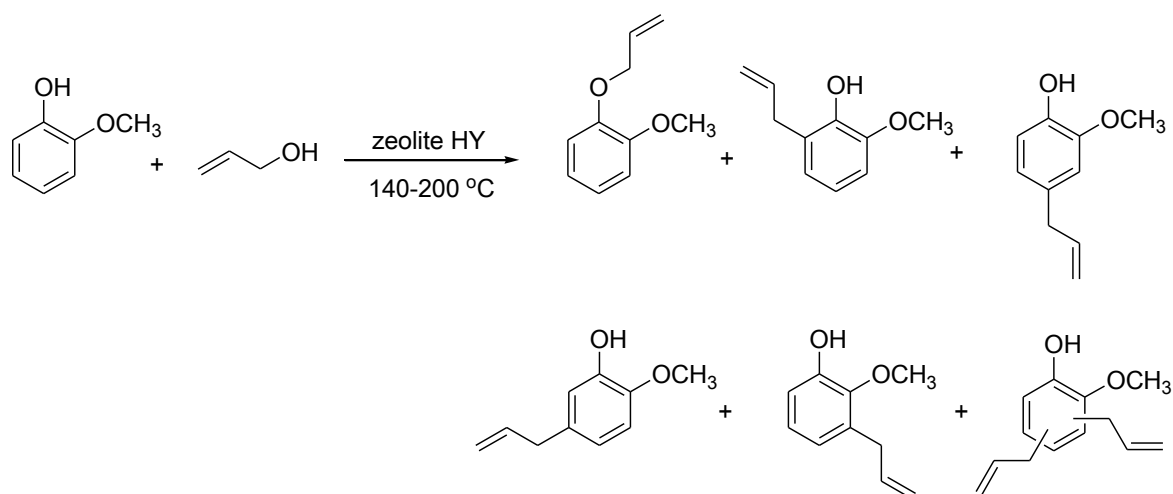
ในปี ค.ศ. 1996 Y. Tada และคณะ [23] ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยา C-allylation ของ α -naphthols ทำปฏิกิริยากับ allylic alcohol โดยใช้ palladium acetate และ 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene (dppf) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาใน toluene ภายใต้สภาวะที่กลาง พบว่าสามารถสังเคราะห์ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น C-allylation ของ 1- และ 2-

naphthol โดยมีการแทนที่ของหมู่แอลคิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 4 นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ 2,6-dihydroxynaphthalene ทำปฏิกิริยากับ allyl alcohol ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น C-allylation เช่นกัน



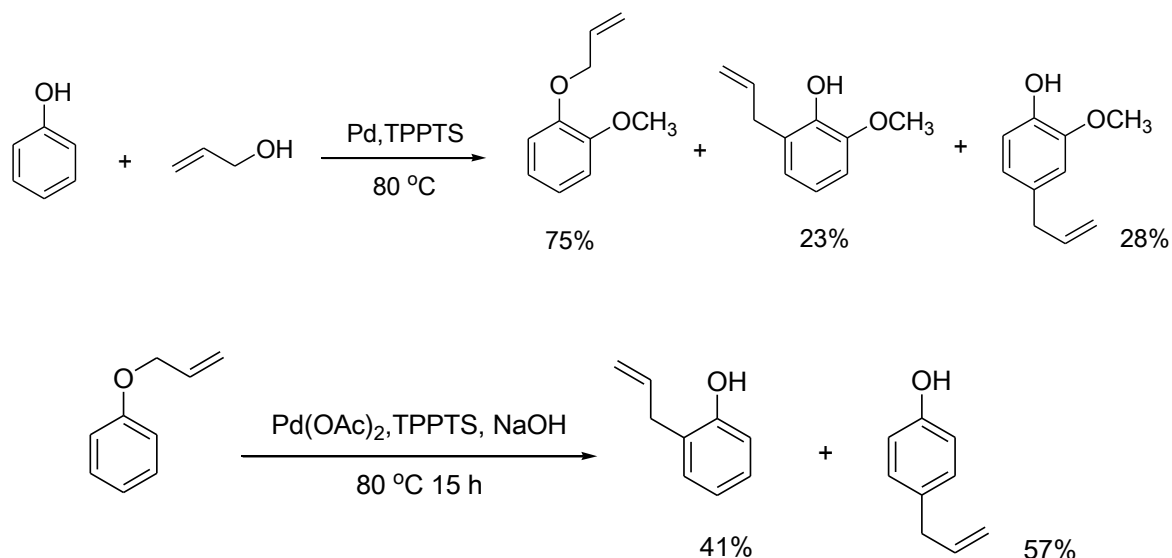
ภาพ 1.7 ปฏิกิริยา 1-และ 2-naphthol กับ allylic alcohol ของ Yuzuki Tada

ในปี ค.ศ. 2005 S. M. Kumbar และคณะ [24] ได้ศึกษาการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ไม่ใช้พาลลาเดียมได้แก่ zeolite ชนิดต่างๆ ในการสังเคราะห์ monoallyl guaiacol โดยใช้ allyl alcohol กับ guaiacol อัตราส่วน 1 ต่อ 4 ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน และอุณหภูมิสูงประมาณ 140-200 °C พบว่าเมื่อใช้ zeolite HY ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์สูงสุดถึงร้อยละ 46 เมื่อเปรียบเทียบกับ zeolite H-beta ร้อยละ 28 H-mordenite ร้อยละ 15 และ HZSM-5 ร้อยละ 4



ภาพ 1.8 ปฏิกิริยาที่ใช้ zeolite ชนิดต่างๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ของ S.M. Kumbar และคณะ

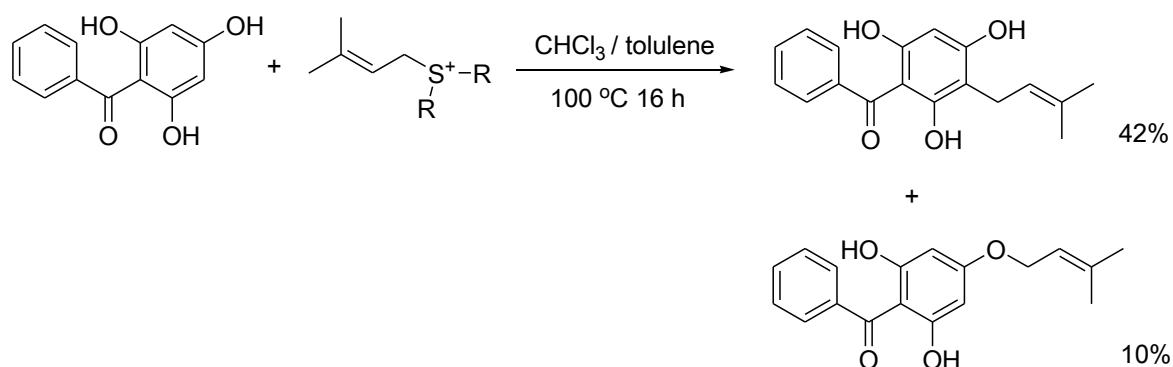
ในปี ค.ศ. 2006 E. Kuntz และคณะ [25] ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยา C-allylation ของ phenol guaiacol โดยใช้ allyl alcohol ในตัวทำละลายน้ำ แทนการใช้ allyl halide โดยใช้ palladium-(m-sulfonatophenyl)phosphine trisodium salt complex ($\text{Pd}(0)\text{TPPTS}$) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เป็น C-allylation ของ electron-rich phenol หรือ guaiacol มากกว่า O-allylation อย่างจำเพาะเจาะจง และได้ศึกษาการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเดียวกันร่วมกับ NaOH และ allyl aryl ether ในปฏิกิริยาไฮโซเมอไรเซชันของ O-allylation product ให้เปลี่ยนเป็น C-allylation product โดยผ่าน Claisen rearrangement จะให้เปอร์เซ็นต์ conversion ที่สูง



ภาพ 1.9 ปฏิกิริยา allylation ของ phenol กับ allyl alcohol และปฏิกิริยา

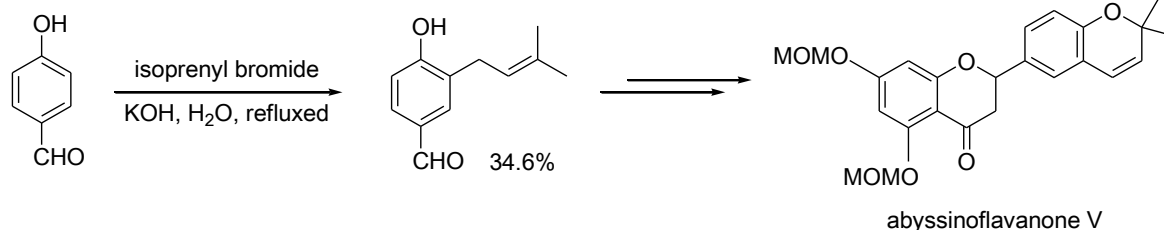
Claisen rearrangement ของ Emile Kuntz

ในปี ค.ศ. 2007 S. Brajeul และคณะ [26] ได้ศึกษาการใช้ allyl source ชนิดอื่นๆ นอกเหนือ จาก allyl halide หรือ allyl alcohol คือ dihexyl(3-methylbut-2-enyl)sulfonium ซึ่งในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ benzoylphloroglucinol โดยใช้ sulfonium salts เช่น prenyl, geranyl และ iso-lavandulyl ในตัวทำละลายผสมของ toluene และ chloroform พบว่า ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น C-prenylation ร้อยละ 42 และ O-prenylation ร้อยละ 10



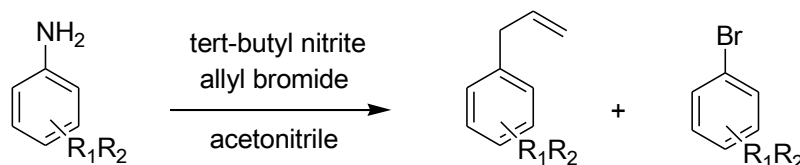
ภาพ 1.10 ปฏิกิริยา allylation ของ Solenn Brajeul และคณะ

และในปี ค.ศ. 2008 Jin Hui Yang และคณะ [27] ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์สารabyssinoflavanone V โดยเริ่มจาก 4-hydroxybenzaldehyde และ 2,4,6-trihydroxyacetophenone พบว่าสามารถได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น C-prenylation ได้ถึงร้อยละ 34.6 ดังภาพ 1.11



ภาพ 1.11 ปฏิกริยา allylation ในการสังเคราะห์ abyssinoflavanone V ของ Jin Hui Yang

Frejd และคณะได้รายงานการวิจัยในปี 2002 [28] ว่าสามารถแทนที่หมู่อะมิโนด้วยหมู่แอลคิล โดยใช้ tert-butyl nitrite เป็นรีเอเจนต์ โดยไม่ต้องใช้โลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าสามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ของ allyl aromatic ได้ ผลิตรัตที่ percent yield สูง ดังภาพ 1.12



ภาพ 1.12 ปฏิกริยา allylation ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ allyl benzene ของ Frejd

จากงานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมด จะเห็นว่าปฏิกิริยา allylation ของอนุพันธ์ของเบนซีนนั้น มีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาหลายชนิด เช่น palladium catalyst, zeolite HY, potassium hydroxide, sulfonium salt derivatives และ basic catalysts เป็นต้น พบว่าผลิตรัตที่เกิดขึ้นมักจะเป็น O-allylation มากกว่า C-allylation แสดงให้เห็นถึง chemoselectivity ของปฏิกิริยาดังกล่าว ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการสังเคราะห์ยูจีนอลโดยเริ่มจากอนุพันธ์ของฟีนอลกับ allyl halide หรือ allyl alcohol โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างๆ และคาดหวังให้เกิดผลิตรัตชนิด C-allylation เป็นผลิตรัตหลักเพื่อให้ได้ผลิตรัตเป้าหมายเป็นยูจีนอล และจะใช้เป็นปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นต้นแบบในการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลต่อไป รวมทั้งการดัดแปรหมู่ฟังก์ชันตำแหน่งอื่นๆ ของยูจีนอล ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซี โดยการเปลี่ยนให้เป็นหมู่อื่นที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้เช่นเดียวกัน และดัดแปรหมู่แอลคิล โดยการเปลี่ยนให้เป็นหมู่อื่นที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกเช่นเดียวกับแอลคิล ซึ่งคาดว่าจะได้อนุพันธ์ชนิดต่างๆ ของยูจีนอลจำนวนมาก เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ในการสลับสัตว์น้ำต่อไป

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล
2. ทดสอบฤทธิ์การสลับในสัตว์น้ำเศรษฐกิจของอนุพันธ์ของยูจีนอลที่สังเคราะห์ขึ้น
3. ปรับปรุงและพัฒนาโครงสร้างของอนุพันธ์ของยูจีนอล เพื่อให้ได้ฤทธิ์การสลับในสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่ดีที่สุด

เอกสารอ้างอิงบทที่ 1

- [1] ข้อมูลกรมส่งเสริมการส่งออก, สืบค้นเมื่อวันที่ 2 เมษายน 2552, จาก http://www2.ops3.moc.go.th/export/recode_export_rank/report.asp.
- [2] Guenette, S. A.; Uhland, F. C.; Helie, P.; Beaudry, F.; Vachon, P.; Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, **2007**, 266, 262-265.
- [3] Iversen, M.; Finstad, B.; McKinley, R. S.; Eliassen, R. A.; The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-STM and Benzoak[®] as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts and their potential stress-reducing capacity, *Aquaculture*, **2003**, 221, 549-566.
- [4] Kildea, M. A.; Allan, G. L.; Kearney, R. E.; Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-STM from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*), *Aquaculture*, **2004**, 232, 265-277.
- [5] Velisek, J.; Svobodova, Z.; Piackova, V.; Groch, L.; Nepejchalova, L.; Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Vet. Med. – Czech*, **2005**, 50(6), 269-275.
- [6] Palic, D.; Herolt, D. M.; Andreasen, C. B.; Menzel, B. W.; Roth, J. A.; Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820), *Aquaculture*, **2006**, 254, 675-685.
- [7] Seol, D.-W.; Lee, J.; Im, S.-Y.; Park, I.-S.; Clove oil as an anaesthetic for common octopus (*Octopus minor*, Sasaki), *Aquaculture Research*, **2007**, 38, 45-49.
- [8] วุฒิ วุฒิธรรมเวช, สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ, 2540, 102.
- [9] U.S. Department of health and human services, Food and drug administration, Center for veterinary medicine, Concerns related to the use of clove oil as an anesthetic for fish, 2007.
- [10] Sandorfy, C., Hydrogen bonding and anaesthesia, *Journal of Molecular structure*, **2004**, 708, 3-5.
- [11] วรรณฯ สมบูรณ์วิบูลย์ และคณะ, วิสัณณูวิทยาพื้นฐาน, ภาควิชาวิสัณณูวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, เท็กซ์ แอนด์เจอร์นัลส์ พับลิเคชัน, 2544, 125.
- [12] เฉลิม ทราโยอินทร์, ยาชา เล่ม 1 (Medicinal chemistry Series, Volume 1: Local Anesthetics), ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2545.
- [13] Luduena, F. P.; Hoppe, J. O.; Page, D. F.; Clinton, R. O., Local anaesthetic studies with some alkoxy-dialkylaminoalkoxyanilines, *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, **1961**, 3, 3, 545-553.

- [14] Burkey, J. L.; Sauer, J.-M.; McQueen, C. A.; Sipes, I. G., Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners – a mechanism of activation for methyleugenol, *Mutation Research*, **2000**, 453, 25-33.
- [15] Velisek, J.; Svobodova, Z.; Piackova, V., Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Acta Vet. Brno*, **2005**, 74, 139-146.
- [16] Wongsathein, D.; Potha, T. ; Anesthetic and recovery times of clove oil as anesthetic in goldfish (*Carassius auratus* Linn.), *KKU. Vet. J.*, **2007**, 17(3), 1-11.
- [17] Songkaew, A.; Chokboonmongkol, C.; Khattiya, R.; Wongsathein, D.; Mengumpun, K.; Pikulkeaw, S., Induction time and behavior of anesthesia and recovery in Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*) after anesthetized with clove oil and tricane methanesulfonate (MS-222), *J. Thai Vet. Med. Assoc.*, **2007**, 58(2), 12-21.
- [18] Kornblum, N.; Berrigan, P. J.; Le Noble, W. J.; Solvation as a Factor in the Alkylation of Ambident Anions: The Importance of the Hydrogen Bonding Capacity of the Solvent, **1962**, 85, 1141-1147.
- [19] Akabori, S.; Miyamoto, S.; Tanabe, H.; Allylation of Phenoxides by Crown Ethers and their Polymers. *Journal of Polymer Science*, **1979**, 17, 3933-3987.
- [20] Grieco, P. A.; Brandes, E. B.; McCann, S.; Cjark , J. D.; Water as a Solvent for the Claisen Rearrangement: Practical Implication for Synthesis Organic Chemistry. *Journal of Organic Chemistry*, **1989**, 54, 5849-5851.
- [21] Liao, Z. K.; Wang, C. S.; The study of the polyallylation reaction of *o*-cresol novolac and the regioselectivity of *O*-allylation vs *C*-allylation. *Polymer Bulletin*, **1989**, 22, 9-14.
- [22] Goux, C.; Massacret, M.; Lhoste, P.; Sinou, D.; Stereo-and Regioselectivity in Palladium-Catalyzed Allylic Etherification. *Organometallics*, **1995**, 14, 4585-4593.
- [23] Tada, Y.; Satake, A.; Shimizu, I.; Yamamoto, A.; Palladium-Catalyzed *C*-allylation of Naphthols by Direct Use of Allylic Alcohols under Neutral Conditions. *Chemistry Letters*, **1996**, 1021-1022.
- [24] Kumbar, S. M.; Shanbhag, G. V.; Halligudi, S. B.; Synthesis of monoallyl guaiacol *via* allylation using HY zeolite. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2005**, 244, 278-282.
- [25] Kuntz, E.; Amgoune, A.; Lucas, C.; Godard, G.; Palladium TPPTS catalyst in water: *C*-allylation of phenol and guaiacol with allyl alcohol and novel isomerisation of allyl ethers of phenol and guaiacol. *Journal of molecular catalysis*, **2005**, 244, 124-138.
- [26] Brajeul, S.; Delpech, B.; Marazano, C.; Sulfonium salts as prenyl, geranyl and iso-lavandulyl transfer agents towards benzoylphloroglucinol derivatives. *Tetrahedron Letters*, **2007**, 48, 5597-5600.
- [27] Yang, J. H.; Zhao, Y. M.; Bin Ji, C.; First total synthesis of (±)-abyssinoflavanone V. *Chinese Chemical Letter*, **2008**, 19, 658-660.
- [28] Ek, F.; Axelsson, O.; Wistrand, L.-G.; Frejd, T., Aromatic allylation via diazotization: Metal-free C-C bond formation, *Journal of Organic Chemistry*, **2002**, 67, 6376-6381.

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 การศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล

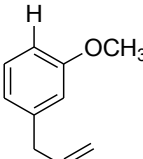
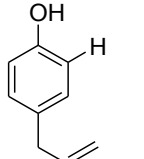
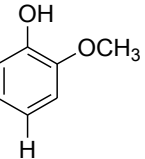
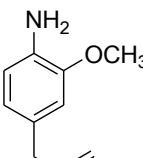
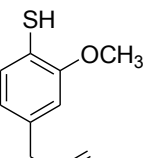
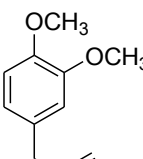
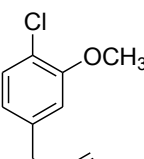
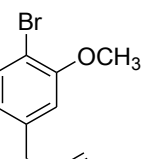
2.1.1 อุปกรณ์และสารเคมี

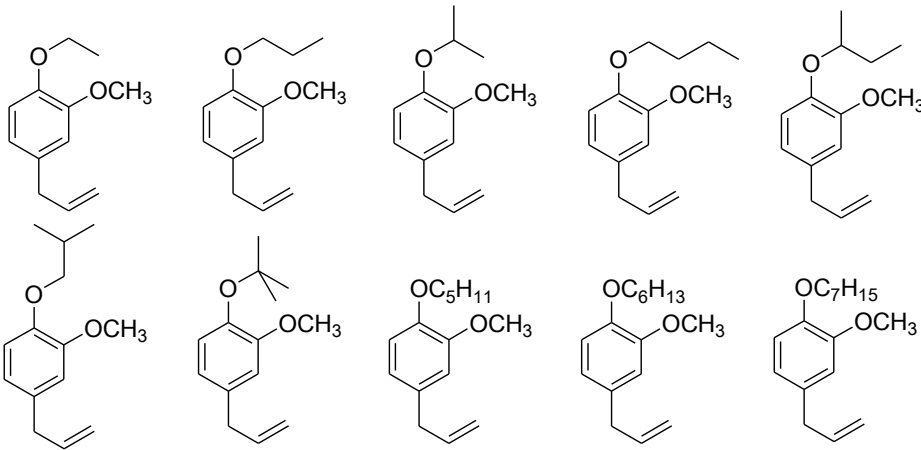
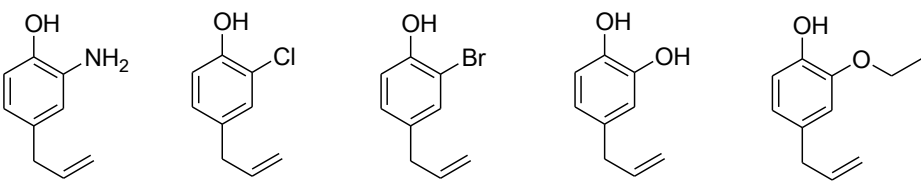
รีเอเจนต์ที่ใช้ซื้อจากบริษัท Fluka AG, MERCK, Aldrich Company Ltd. หรือ Acros Chemical และนำมาใช้โดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยทำการชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง Sartorius ตัวทำละลายชนิด commercial grade ที่ใช้ในการทำโครมาโตกราฟี ได้แก่ เอทิลอะซีเตต เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล จากบริษัท เวชกิจ เคมีภัณฑ์ จำกัด บริษัท ทีทีเค ซายเอนซ์ จำกัด และบริษัท อิตัลมาร์ จำกัดนำมาใช้โดยการกลั่น ตัวทำละลายชนิด AR grade ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจากบริษัท เจที เบเกอร์ จำกัด บริษัท เอซีเอส ซีนอน จำกัด บริษัท เมอร์ค ประเทศไทย จำกัด ได้แก่ เอทิลอะซีเตต เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน ไดเอทิลอีเทอร์ เอทานอล เมทานอล นำมาใช้โดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ สำหรับตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน ทำให้ปราศจากน้ำโดยการกลั่นกับโลหะโซเดียมและเบนโซฟีโนน และระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายความดันต่ำ Büchi Rotavapor R-124 และ water aspirator model B-490 หรือ diaphragm pump ตั้งปฏิกิริยาด้วยเครื่องกวนสารละลาย/เครื่องให้ความร้อนของ Heidolph และติดตามปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินแลย์โครมาโตกราฟี โดยใช้แผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ยี่ห้อ Merck ขนาด 1x5 cm สารที่สังเคราะห์ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี ด้วยซิลิกาเจล ขนาด 70-230 mesh และขนาด 230-400 mesh (flash column) และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ^1H NMR โดยใช้เครื่อง Varian Mercury-400 plus หรือ Bruker Avance 400 NMR spectrometers โดยกระทำที่ 400 MHz

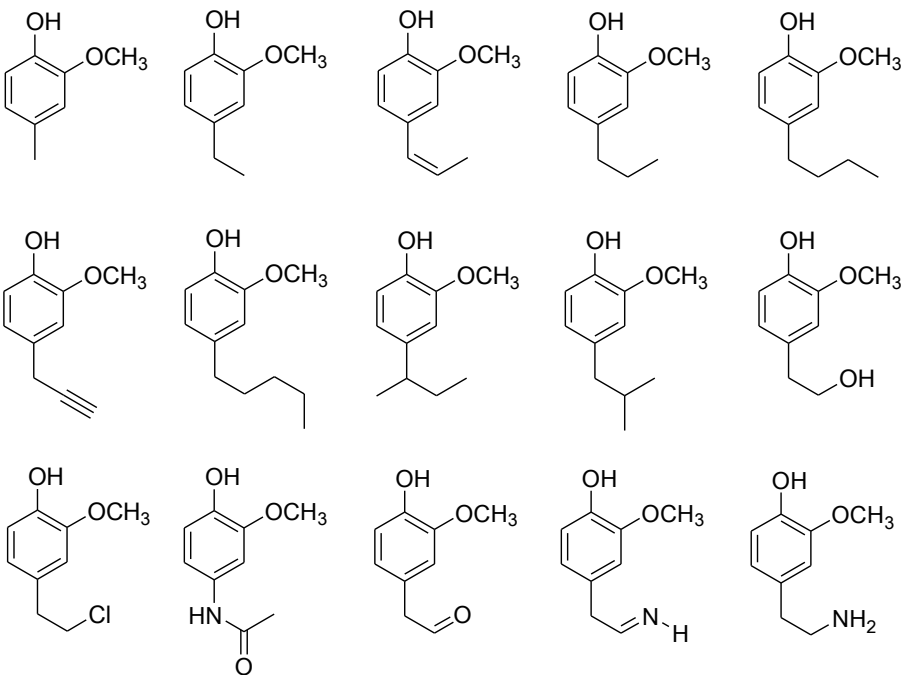
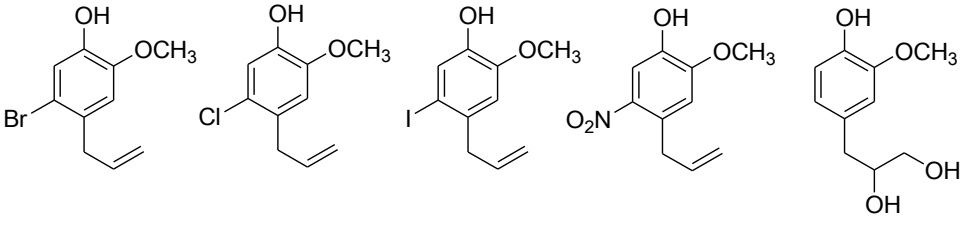
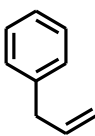
2.1.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล

ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบและดัดแปลงโครงสร้างอนุพันธ์ของยูจีนอล เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะฤทธิ์การเป็นยาสลบในสัตว์น้ำ โดยในขั้นต้นมีรายละเอียดแผนการออกแบบการสังเคราะห์ แสดงดังตาราง 2.1 โดยงานในส่วนนี้ดำเนินการโดย ดร. จตุรงค์ สุภาพพร้อม และ ดร. อัญชลี สิริกุลขจร ณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ตามที่ได้เสนอไว้ทั้งหมด เนื่องจากมีการปรับลดจำนวนชนิดสารเป้าหมายลง ซึ่งเป็นการพิจารณาร่วมกันระหว่างผู้วิจัย และผู้ทรงคุณวุฒิของสกว. และได้รับความเห็นชอบแล้ว ซึ่งจะได้กล่าวรายละเอียดในบทที่ 3 เรื่องผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ตาราง 2.1 แนวทางการออกแบบอนุพันธ์ของยูจีนอลที่วางแผนจะสังเคราะห์ในงานวิจัยนี้

ลำดับ	แนวทางการออกแบบ
1	การแทนที่หมู่แทนที่ต่างๆ ในยูจีนอลด้วยไฮโดรเจน วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาถึงความสำคัญของหมู่แทนที่ต่างๆ ที่อาจจะเป็น active site ต่อฤทธิ์การเป็นยาสลบในสัตว์น้ำเบื้องต้น ดังแสดงโครงสร้าง การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลนี้เริ่มจากสารตั้งต้นประเภทฟีนอลหรือไพโรแคทีคอล ด้วยการแทนที่หมู่แทนที่ต่างๆ ด้วยไฮโดรเจน ผลการทดสอบนี้ จะนำไปใช้ประกอบการพิจารณาการออกแบบโครงสร้างในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ตัวอื่นๆ ต่อไป   
2	การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่อะมิโน หรือซัลไฟด์ วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bond donor) ได้ เช่นเดียวกับหมู่ไฮดรอกซี เช่น หมู่อะมิโน (เริ่มจากอะนิลีน) หมู่ไทออล (เริ่มจากไทโอฟีนอล) เป็นต้น โดยยังคงหมู่แอลลิลและเมทอกซีภายในโมเลกุลไว้ ดังแสดงโครงสร้าง การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลนี้ใช้สารตั้งต้นชนิดอื่นๆ เริ่มจากอะนิลีน หรือเริ่มจากไทโอฟีนอล  
3	การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เมทอกซี คลอโรหรือโบรโม วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bond acceptor) ได้ เช่นเดียวกับหมู่ไฮดรอกซี เช่น หมู่เมทอกซี (เริ่มจากไพโรแคทีคอล) หมู่คลอโร โบรโม (เริ่มจากแฮโลเบนซีน) เป็นต้น โดยยังคงหมู่แอลลิลและเมทอกซีภายในโมเลกุลไว้ ดังแสดงโครงสร้าง การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลนี้ใช้สารตั้งต้นชนิดอื่นๆ เริ่มจากไพโรแคทีคอล หรือเริ่มจากแฮโลเบนซีน   

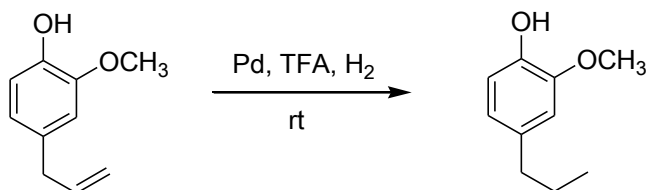
ลำดับ	แนวทางการออกแบบ
4	การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่แอลคอกซี วัตถุประสงค์ : เป็นการเปลี่ยนไฮดรเจนของหมู่ไฮดรอกซีให้เป็นหมู่ไฮโดรคาร์บอนที่มีขนาดยาวขึ้นเพื่อเพิ่มความเป็นไฮโดรโฟบิกในโมเลกุล เช่น หมู่เมทิล เอทิล โพรพิล บิวทิล จนถึงเฮปทิล เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบไฮโดรโฟบิกจะมีผลต่อฤทธิ์การสลบอย่างไร ดังแสดงโครงสร้าง การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลนี้เริ่มจากสารตั้งต้นยูจีนอล 
5	การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ต่างๆ วัตถุประสงค์ : เป็นการแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ เช่น หมู่อะมิโน และ/หรือสายโซ่คาร์บอนที่มีขนาดยาวขึ้น เช่น หมู่เอทิล เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบให้พันธะไฮโดรเจนหรือไฮโดรโฟบิกจะมีผลต่อฤทธิ์การสลบอย่างไร ดังแสดงโครงสร้าง การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลนี้ใช้สารตั้งต้นชนิดอื่นๆ เริ่มจากอนุพันธ์ของฟีนอล หรือแอลลิลฟีนอล 
6	การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่แอลลิล วัตถุประสงค์ : เป็นการแทนที่หมู่แอลลิลให้เป็นหมู่ไฮโดรโฟบิกชนิดอื่นๆ เช่น หมู่เมทิล เอทิล โพรพิล ไอโซโพรพิล บิวทิล เซค-บิวทิล เทอร์เชียรีบิวทิล เป็นต้น รวมทั้งหมู่ที่มีโครงสร้างและความยาวพันธะคล้ายกับหมู่แอลลิล เช่น methylene carbonyl, methylene imine เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบใดจะมีผลต่อฤทธิ์การสลบอย่างไรดังแสดงโครงสร้าง การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลนี้ใช้สารตั้งต้นชนิดอื่นๆ เริ่มจากอนุพันธ์ของฟีนอล ไพโรแคทีคอล หรือยูจีนอล

ลำดับ	แนวทางการออกแบบ
6	
7	การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการนำยูจีนอลมาทำปฏิกิริยาต่างๆ วัตถุประสงค์ : เป็นการนำยูจีนอลเป็นสารตั้งต้น แล้วนำมาทำปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว เช่น แอลคิเลชัน แอลคิลเลชัน หรือออกซิเดชัน เป็นต้น เพื่อให้ได้อนุพันธ์ของยูจีนอลแบบต่างๆ ดังแสดงโครงสร้าง 
8	การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการปรับปรุงโครงสร้างหลายตำแหน่งพร้อมกัน วัตถุประสงค์ : เป็นการออกแบบการปรับโครงสร้างหลายตำแหน่ง เช่น บริเวณที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี หรือ บริเวณที่เป็นหมู่แอลคิล ซึ่งการออกแบบในหัวข้อนี้ จะขึ้นอยู่กับข้อมูลผลการทดลองฤทธิ์ในการสลับปลาของอนุพันธ์ทั้งหมด 
	รวมสารที่คาดว่าจะเตรียมได้ทั้งหมดประมาณ 44 ชนิด

สำหรับขั้นตอนการสังเคราะห์นั้นจะไม่มีลำดับที่แน่นอน ขึ้นอยู่กับความยากง่ายของโครงสร้างโมเลกุล โดยการสังเคราะห์จะอ้างอิงจากเอกสารอ้างอิงต่างๆ โดยการสังเคราะห์เพื่อให้ได้มาซึ่งสารผลิตภัณฑ์นั้น จะสังเคราะห์ในระดับ gram-scale อย่างน้อยประมาณ 2-4 กรัม เพื่อนำไปใช้ในการเตรียมสูตรละลายให้มีความเข้มข้นอยู่ที่ 40000 ppm ตามที่ฝ่ายทดสอบฤทธิ์ในสัตว์น้ำต้องการ โดยมีรายละเอียดการสังเคราะห์ที่ได้ดำเนินการ ดังนี้

การสังเคราะห์ 2-methoxy-4-propylphenol (PMP) โดยใช้ปฏิกิริยา hydrogenation

Product Code: P4



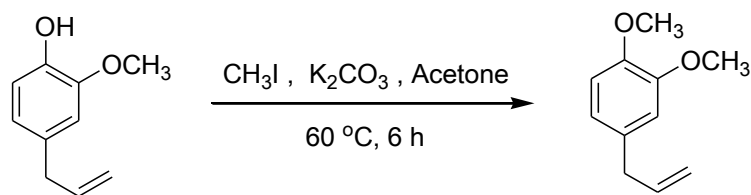
ที่มา ; Judy L. Bolton, Ellen Comeau and Vesna Vukomanonic, The influence of 4-alkyl substituents on the formation and reactivity of 2-methoxy-quinone methides: evidence that extended π -conjugation dramatically stabilizes the quinone methide formed from eugenol, *Chemico-Biological Interactions*, 1995, 95, 279-290.

ซึ่ง Eugenol 3.28 g (20 mmol) ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 mL ละลายด้วย ethanol 30 mL จากนั้นเติม Palladium on activated carbon 0.23 g (10 mmol) และค่อยๆ หยด Trifluoroacetic acid 0.3 mL เป็นเวลา 5 นาที นำไปคนด้วยเครื่องคนสารชนิดแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศ H_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นติดตามผลของปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้ ethyl acetate และ hexane ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 เป็นเฟสเคลื่อนที่ พบว่าเกิดสารผลิตภัณฑ์ใหม่ขึ้น หลังจากนั้นนำมากรองผ่าน celite และล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วย ethyl acetate 20 mL จำนวน 3 ครั้ง เก็บชั้น ethyl acetate นำมากำจัดน้ำด้วย sodium sulfate anhydrous นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ ethyl acetate และ hexane ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 เป็นเฟสเคลื่อนที่ เก็บสารละลายที่ R_f เท่ากับ 0.71 นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลาย และทำให้แห้งด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น 2-methoxy-4-propylphenol (PMP) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด สีเหลืองเข้ม น้ำหนัก 2.72 g (82.1% yield)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ_H 0.95 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.63 (sextet, $J=7.4$ Hz, 2H, CH_2), 2.54 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, CH_2 benzyl), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 6.70 (d, $J=4.0$ Hz, 2H, Ar-H), 6.87 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, Ar-H)

การสังเคราะห์ 4-allyl-1,2-dimethoxybenzene (methyleugenol) ด้วยปฏิกิริยา methylation

Product Code: P5

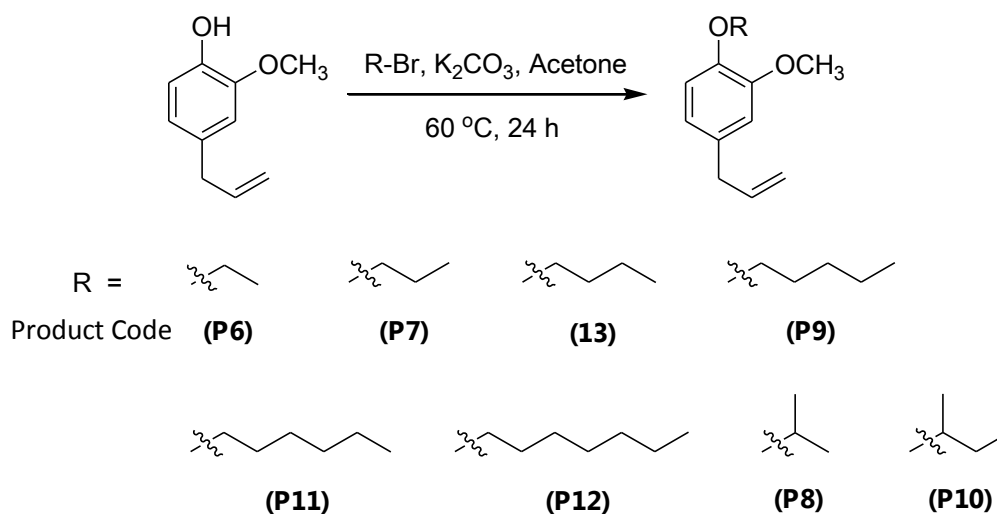


ที่มา ; Vyas, G. N.; Shah, N. M. *Org. Synth.*, Collect. Vol. IV 1963, 836.

ชั่ง K_2CO_3 4.14 g (30 mmol) ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 mL ละลายด้วย acetone 50 mL หลังจากนั้นเติม eugenol 3.28 g (20 mmol) และ methyl iodide 7.09 g (50 mmol) นำไปคนด้วยเครื่องคนสารชนิดแม่เหล็กที่อุณหภูมิ $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นติดตามผลของปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้ ethyl acetate และ hexane ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 เป็นเฟสเคลื่อนที่ พบว่าเกิดสารผลิตภัณฑ์ใหม่ขึ้น หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 mL แล้วสกัดสารละลายที่ได้ด้วย ethyl acetate 20 mL จำนวน 3 ครั้ง เก็บชั้นตัวทำละลายอินทรีย์นำมาทำให้น้ำด้วย sodium sulfate anhydrous นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ ethyl acetate และ hexane ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 เป็นเฟสเคลื่อนที่ เก็บสารละลายที่ R_f เท่ากับ 0.57 นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลาย และทำให้แห้งด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น 4-allyl-1,2-dimethoxybenzene มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด สีเหลืองเข้ม น้ำหนัก 3.19 g (89.7% yield)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):) δ_{H} 3.33 (d, $J=6.6$ Hz, 2H, CH_2 methylene), 3.85 (s, 3H, OCH_3 methyl), 3.86 (s, 3H, OCH_3 methyl), 5.07 (m, 1H, *cis*-CH terminal alkene), 5.12 (q, $J=3.5, 1.6$ Hz, 1H, *trans*-CH terminal alkene), 5.96 (m, 1H, CH alkenyl), 6.70 (d, $J=4.0$ Hz, 2H, Ar-H), 6.90 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, Ar-H)

การสังเคราะห์ eugenol derivatives ด้วยปฏิกิริยา O-alkylation ตามแนวทางการสังเคราะห์ข้อที่ 4



ที่มา; 1. Xiuli Bu, Huanwang Jing, Li Wang, Tao Chang, Lili Jin and Yongmin Liang, Organic base catalyzed O-alkylation of phenols under solvent-free condition, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2006, 259, 121-124.

2. C F. H. Allen and J. W. Gates, *Organic Synthesis*, Coll. Vol. 3, 418 1955: Vol. 25, p. 49.

การสังเคราะห์ 4-allyl-1-ethoxy-2-methoxybenzene (ethyleugenol)

Product Code: P6

ซึ่ง K_2CO_3 4.14 g (30 mmol) ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 mL ละลายด้วย acetone 50 mL หลังจากนั้นเติม eugenol 3.28 g (20 mmol) และ ethyl bromide 7.09 g (50 mmol) นำไปคนด้วยเครื่องคนสารชนิดแม่เหล็กที่อุณหภูมิ $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นติดตามผลของปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้ ethyl acetate และ hexane ในอัตราส่วน 1 ต่อ 8 เป็นเฟสเคลื่อนที่ พบว่าเกิดสารผลิตภัณฑ์ใหม่ขึ้น หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 mL แล้วสกัดสารละลายที่ได้ด้วย ethyl acetate 20 mL จำนวน 3 ครั้ง เก็บชั้น ethyl acetate นำมากำจัดน้ำด้วย sodium sulfate anhydrous นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ ethyl acetate และ hexane ในอัตราส่วน 1 ต่อ 8 เป็นเฟสเคลื่อนที่ เก็บสารละลายที่ R_f เท่ากับ 0.69 นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลาย และทำให้แห้งด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นอนุพันธ์ของยูจีนอล มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด สีเหลืองเข้ม น้ำหนัก 4.20 g (54.7% yield)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 1.44 (t, $J=6.8$ Hz, 3H, CH_3 ethyl), 3.33 (d, $J=6.6$ Hz, 2H, CH_2 methylene), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 4.06 (q, $J=14.1, 7.0$ Hz, 2H, OCH_2), 5.07 (m, 1H, *cis*-CH terminal alkene), 5.12 (q, $J=3.5, 1.6$ Hz, 1H, *trans*-CH terminal alkene), 5.97 (m, 1H, CH alkenyl), 6.70 (d, $J=4$ Hz, 2H, Ar-H), 6.90 (d, $J=4$ Hz, 1H, Ar-H)

การสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxy-1-propoxybenzene (propyleugenol)

Product Code: P7

วิธีการสังเคราะห์ทำในลักษณะเดียวกันกับสารผลิตภัณฑ์ P6

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 1.03 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, CH_3 propyl), 1.85 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 3.33 (d, $J=6.6$ Hz, 2H, CH_2 methylene), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.95 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, OCH_2), 5.07 (m, 1H, *cis*-CH terminal alkene), 5.12 (q, $J=3.5, 1.6$ Hz, 1H, *trans*-CH terminal alkene), 5.95 (m, 1H, CH alkenyl), 6.80 (d, $J=4.0$ Hz, 2H, Ar-H), 7.21 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, Ar-H), $R_f = 0.68$

การสังเคราะห์ 4-allyl-1-butoxy-2-methoxybenzene (butyleugenol)

Product Code: P13

วิธีการสังเคราะห์ทำในลักษณะเดียวกันกับสารผลิตภัณฑ์ P6

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0.97 (t, $J=7.3$ Hz, 3H, CH_3 butyl), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.81 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_3$), 3.34 (d, $J=6.5$ Hz, 2H, CH_2 methylene), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.99 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, OCH_2), 5.07 (m, 1H, *cis*-CH terminal alkene), 5.12 (q, $J=3.5, 1.6$ Hz, 1H, *trans*-CH terminal alkene), 5.94 (m, 1H, CH alkenyl), 6.71 (d, $J=4.0$ Hz, 2H, Ar-H), 6.83 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, Ar-H), $R_f = 0.90$

การสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxy-1-pentoxybenzene (pentyleugenol)

Product Code: P9

วิธีการสังเคราะห์ทำในลักษณะเดียวกันกับสารผลิตภัณฑ์ P6

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0.93 (t, $J=6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.38 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.43 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_3$), 1.82 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.33 (d, $J=6.6$ Hz, 2H, CH_2 methylene), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.98 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, OCH_2), 5.05 (m, 1H, *cis*-CH terminal alkene), 5.12 (q, $J=3.5, 1.6$ Hz, 1H, *trans*-CH terminal alkene), 5.96 (m, 1H, CH alkenyl), 6.70 (d, $J=4.0$ Hz, 2H, Ar-H), 6.82 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, Ar-H), $R_f = 0.70$

การสังเคราะห์ 4-allyl-1-hexyloxy-2-methoxybenzene (hexyleugenol)

Product Code: P11

วิธีการสังเคราะห์ทำในลักษณะเดียวกันกับสารผลิตภัณฑ์ P6

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0.89 (t, $J=6.9$ Hz, 3H, CH_3), 1.32 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.44 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_3$), 1.61 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.81 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.32 (d, $J=6.6$ Hz, 2H, CH_2 methylene), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.98 (t, $J=6.9$ Hz, 2H, OCH_2), 5.05 (m, 1H, *cis*-CH terminal alkene), 5.12

(q, $J=3.5, 1.6$ Hz, 1H, *trans*-CH terminal alkene), 5.96 (m, 1H, CH alkenyl), 6.70 (d, $J=4.0$ Hz, 2H, Ar-H), 6.82 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, Ar-H), $R_f = 0.70$

การสังเคราะห์ 4-allyl-1-heptyloxy-2-methoxybenzene (heptyleugenol)

Product Code: P12

วิธีการสังเคราะห์ทำในลักษณะเดียวกันกับสารผลิตภัณฑ์ P6

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0.88 (t, $J=6.7$ Hz, 3H, CH_3), 1.33 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.34 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_3$), 1.46 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.81 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.83 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.33 (d, $J=6.6$ Hz, 2H, CH_2 methylene), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.97 (t, $J=6.9$ Hz, 2H, OCH_2), 5.05 (m, 1H, *cis*-CH terminal alkene), 5.12 (q, $J=3.5, 1.6$ Hz, 1H, *trans*-CH terminal alkene), 5.95 (m, 1H, CH alkenyl), 6.70 (d, $J=4.0$ Hz, 2H, Ar-H), 6.82 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, Ar-H), $R_f = 0.90$

การสังเคราะห์ 4-allyl-1-isopropoxy-2-methoxybenzene (isopropyleugenol)

Product Code: P8

วิธีการสังเคราะห์ทำในลักษณะเดียวกันกับสารผลิตภัณฑ์ P6

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 1.35 (d, $J=6.0$ Hz, 3H, CH_3 isopropyl), 1.36 (d, $J=6.0$ Hz, 3H, CH_3 isopropyl), 3.33 (d, $J=6.6$ Hz, 2H, CH_2 methylene), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 4.47 (m, 1H, OCH alkyne), 5.07 (m, 1H, *cis*-CH terminal alkene), 5.11 (q, $J=3.5, 1.6$ Hz, 1H, *trans*-CH terminal alkene), 5.96 (m, 1H, CH alkenyl), 6.71 (d, $J=4.0$ Hz, 2H, Ar-H), 6.83 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, Ar-H), $R_f = 0.71$

การสังเคราะห์ 4-allyl-1-isobutoxy-2-methoxybenzene (sec-butyleugenol)

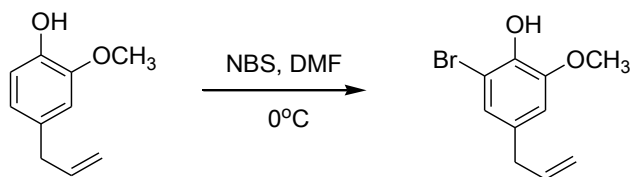
Product Code: P10

วิธีการสังเคราะห์ทำในลักษณะเดียวกันกับสารผลิตภัณฑ์ P6

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0.99 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, CH_3 isobutyl), 1.30 (t, $J=6.1$ Hz, 3H, CH_3 sec-butyl), 1.62 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 3.33 (d, $J=6.6$ Hz, 2H, CH_2 methylene), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 4.23 (m, 1H, OCH alkyne), 5.06 (m, 1H, *cis*-CH terminal alkene), 5.11 (q, $J=3.5, 1.6$ Hz, 1H, *trans*-CH terminal alkene), 5.98 (m, 1H, CH alkenyl), 6.71 (d, $J=4.0$ Hz, 2H, Ar-H), 6.83 (d, $J=4.0$ Hz, 1H, Ar-H), $R_f = 0.69$

การสังเคราะห์ 4-allyl-2-bromo-6-methoxyphenol

Product Code: P24



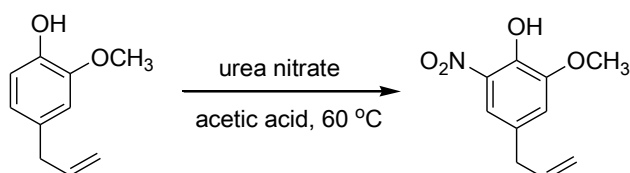
ที่มา; Bovonsombat, P.; Ali, R.; Khan, C.; Leykajarakul, J.; Pla-on, K.; Aphimanchindakul, S.; Pungcharoenpong, N.; Timsuea, N.; Arunrat, A.; Punpongjareorn, N. Facile *p*-toluenesulfonic acid-promoted *para*-selective monobromination and chlorination of phenol and analogues. *Tetrahedron*, 2010, 66, 6928-6935.

ละลายยูจีนอล 0.77 mL (5.00 mmol) ใน DMF 5 mL คนบนอ่างน้ำแข็งด้วยเครื่องคนสารชนิดแม่เหล็ก และละลาย *N*-Bromosuccinimide (NBS) 1.0675 g (5.99 mmol) ใน DMF 10 mL จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายที่ได้ลงในสารละลายยูจีนอลที่อุณหภูมิ 0°C ทำการคนสารละลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 mL และสกัดด้วย dichloromethane (CH_2Cl_2) (20 mLx3) และระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลอะซิเตตและเฮกเซน (EtOAc : Hexane) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อน (47.7 % yield)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 3.26 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, CH_2), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 5.05 (m, 2H, CH_2 terminal), 5.89 (m, 1H, CH), 6.61 (d, $J=1.2$ Hz, 1H, Ar-H), 6.90 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, Ar-H)

การสังเคราะห์ 4-allyl-2-nitro-6-methoxyphenol

Product Code: P25



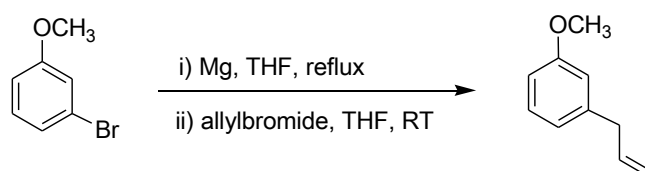
ที่มา; 1) Sudarma, I. M., Ulfa, M. and Sarkono, Chemical transformation of eugenol isolated from clove oil to 4-allyl-2-methoxy-6-sulfonicphenol and 4-allyl-2-methoxy-6-aminophenol, *Indo. J. Chem.*, 2009, 9(2), 267-270. 2) Nitin, S.N.; Mayur, J.B.; Sachin, R.J.; Bhalchandra, M.B. Ultrasound promoted regioselective nitration of phenols using dilute nitric acid in the presence of phase transfer catalyst. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2007, 14, 41-45.

ซังยูเรียไนเตรต (Urea nitrate) 0.20 g (1.63 mmol) ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 mL ละลายด้วยกรดอะซิติก 50 mL คนด้วยเครื่องคนสารชนิดแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และเติมยูจีนอลลงไป 0.10 mL (0.65 mmol) คนและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเทสารผสมลงในน้ำเย็น นำมาปรับ pH ด้วย NaHCO_3 ให้ได้ pH ประมาณ 7-8 และสกัดด้วย CH_2Cl_2 (20 mLx3) นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้ระบบตัวทำละลายเป็นสารผสมระหว่างเอทิลอะซิเตตและเฮกเซน (EtOAc : Hexane) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อน (47.9 % yield)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 3.36 (d, $J=6.0$ Hz, 2H, CH_2), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 5.13 (m, 2H, CH_2 terminal), 5.90 (m, 1H, CH), 6.95 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, Ar-H), 6.751 (s, 1H, Ar-H)

การสังเคราะห์ 3-allylanisole

Product Code: P26



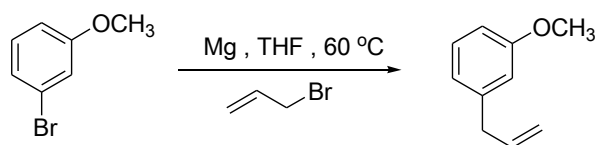
ที่มา; Cheng, X.; Prehm, M.; Kumar, D.M.; Kain, J.; Baumeister, U.; Diele, S.; Leine, D.; Blume, A.; Tschierske, C. Calamitic Bolaamphiphiles with (Semi) Perfluorinated Lateral Chains: Polyphilic Block Molecules with New Liquid Crystalline Phase Structures. *Journal of American Chemical Society*. 2003, 125, 10977-10996.

ซังแมกนีเซียม (Mg) 0.43g (18 mmol) ลงไปในขวดก้นกลมขนาด 50 mL ละลายด้วย tetrahydrofuran (THF) anhydrous 10 mL และหยด 3-bromoanisole 2.80 g (15 mmol) นำไปคนด้วยเครื่องคนสารชนิดแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมเกล็ดไฮโดรเจน และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงมาที่อุณหภูมิห้องแล้วค่อยๆ หยด allyl bromide 2.17 mL (18 mmol) นำสารผสมไปคนต่อภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นติดตามผลของปฏิกิริยาด้วย TLC โดยเอทิลอะซิเตตและเฮกเซนในอัตราส่วน 1 ต่อ 8 เป็นเฟสเคลื่อนที่ พบว่าเกิดสารผลิตภัณฑ์ขึ้น จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต (20 mLx3) เก็บชั้นเอทิลอะซิเตตนำมากำจัดน้ำด้วย Sodium sulfate anhydrous นำสารละลายที่ได้ ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย hexane 100% เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส (64.1 % yield)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 3.40 (d, $J=6.7$ Hz, H, CH_2), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 5.10 (m, 1H, *cis*-CH terminal alkene), 5.11 (q, $J=2.8, 1.7$ Hz, 1H, *trans*-CH terminal alkene), 5.61 (m, 1H, CH alkenyl), 6.78 (d, $J=5.4$ Hz, 2H, Ar-H), 6.82 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, Ar-H), 7.24 (t, $J=8.5, 16.4$ Hz, 1H, Ar-H)

การสังเคราะห์ 3-allylanisole

Product Code: P27

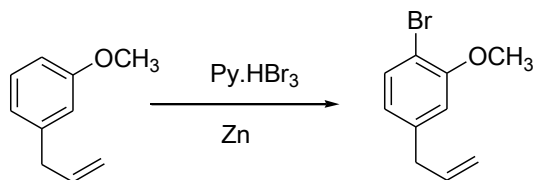


ซึ่ง Mg 0.44 กรัม (15 mmol) และ I_2 ใส่ในขวดก้นกลม ใส่อากาศออกด้วยเครื่องดูดอากาศและทำให้อิ่มตัวด้วยบรรยากาศไนโตรเจน เติมน้ำแห้ง tetrahydrofuran (THF) 10 mL และ 3-bromoanisole 1.98 mL (12 mmol) นำไปคนด้วยเครื่องคนสารชนิดแม่เหล็กที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม Allyl Bromide 1.56 mL (18 mmol) คนสารต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC หลังจากสารตั้งต้นหมดแล้ว สกัดด้วยเอทิลอะซีเตต (20 mL $\times$ 3) นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น Hexane จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นสารละลายใสไม่มีสี (1.22 g, 54.9% yield)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ_{H} 3.45 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2 benzylic), 3.84 (s, 3H, OCH_3 methyl), 5.16 (m, 1H, *cis*-CH terminal alkene), 5.20 (dd, $J=3.5, 1.6$ Hz, 1H, *trans*-CH terminal alkene), 6.04 (m, 1H, CH alkenyl), 6.84 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH aromatic), 7.14 (s, 1H, ArH), 7.28 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.32 (d, $J = 8.78$ Hz, 1H, ArH)

การสังเคราะห์ 4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene

Product Code: P28



ที่มา ; Farouk S.E., Steve F.C., Rebecca L.B., Antimicrobial neolignans of sassafras randaiense roots. *Journal of natural products*, 1983, 46, 493-498.

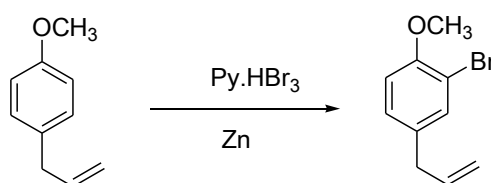
การเตรียม Pyridinium hydrobromide perbromide (PHP) เริ่มจากผสม pyridine (0.05 mol), hydrobromic acid (0.05 mol) และ bromine (0.1 mol) ในขวดก้นกลมและคนในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปกรองและทำให้แห้งภายใต้ภาวะสุญญากาศจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีแดงนำไปใช้ในปฏิกิริยา

ซึ่ง PHP ($\text{Py} \cdot \text{HBr}_3$) ที่เตรียมขึ้นเอง 0.77 กรัม (3 mmol) ใส่ในขวดก้นกลม ละลาย 3-allylanisole 0.3 g (2 mmol) ด้วย CH_3COOH 6 mL ทำการผสมแล้วคนด้วยเครื่องคนสารชนิดแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และทำการเติมกรดอะซิติก 1 mL คนด้วยเครื่องคนสารชนิดแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเติม toluene 20 mL และปรับ pH ด้วย NaHCO_3 ให้ได้ pH ~ 7-8 จากนั้นทำการสกัดด้วยน้ำ (25 mLx3) นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศจะได้น้ำมันสีเหลือง จากนั้นนำน้ำมันสีเหลืองมาละลายด้วย diethyl ether 6 mL และกรดอะซิติก 2 mL และเติม zinc dust 0.13 g รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำออกมาทำการคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปรับ pH ด้วย NaHCO_3 ให้ได้ pH ~ 7-8 และทำการสกัดด้วย ethyl acetate (20 mLx3) นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศจะได้เป็นของเหลวใส แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น Hexane เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี (0.078 g, 17% yield)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 3.38 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, *cis*-CH), 3.48 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, *trans*-CH), 3.77 (s, 3H, OCH_3 methyl), 5.07 (m, 1H, *cis*-CH terminal alkene), 5.11 (m, 1H, *trans*-CH terminal alkene), 5.95 (m, 1H, CH alkenyl), 6.64 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, ArH), 6.79 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, ArH), 7.43 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, ArH)

การสังเคราะห์ 4-allyl-2-bromo-1-methoxybenzene

Product Code: P29



ที่มา; Chaing-Ming, C.; Yeuk-Chuen, L., A concise synthesis of honokiol, *Tetrahedron Letters*, 2009, 50, 10, 1151-1152.

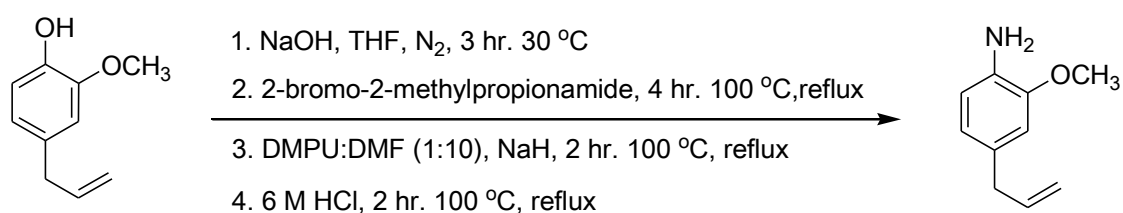
ซึ่ง Pyridinium hydrobromide perbromide ($\text{Py} \cdot \text{HBr}_3$) 1.923 g (5 mmol) ใส่ในขวดก้นกลม จากนั้นทำการละลายสารตั้งต้น (4-Allylanisole) 0.78 mL ในกรดอะซิติก 15 mL แล้วค่อยๆ เติลงในขวดก้นกลมที่เตรียมไว้ข้างต้น แล้วคนด้วยเครื่องคนสารชนิดแม่เหล็กอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมกรดอะซิติก 5 mL

ทำการคนด้วยเครื่องคนสารชนิดแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะได้เป็นสารละลายสีแดงอมส้ม จากนั้นทำการเติม toluene 15 mL แล้วปรับ pH ด้วย NaHCO_3 ให้ได้ pH ~ 7-8 แล้วสกัดด้วยน้ำ (25 mLx3) เก็บชั้นสารอินทรีย์ ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ แล้วจึงทำการ debromination โดยซิงค์ Zn 1.028 g ละลายใน diethyl ether 10 mL คนด้วยเครื่องคนสารชนิดแม่เหล็กที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปรับ pH ด้วย NaHCO_3 ให้ได้ pH ~ 7-8 และทำการสกัดด้วย ethyl acetate (20 mLx3) นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศจะได้เป็นของเหลวใส แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น Hexane เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส (0.069 g, 6.9% yield)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ_{H} 3.31 (d, J = 6.8 Hz, 2H, CH_2 benzylic), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 5.07 (d, J = 4.4 Hz, 1H, *trans*-CH terminal alkene), 5.08 (d, J = 1.2 Hz, 1H, *cis*-CH terminal alkene), 5.89 (m, 1H, CH alkene), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.08 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.36 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH)

การสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline

Product Code: P30



ที่มา ; Carlo, B.; Maria, F.; Rosanna, S.; Piero, S., Smiles rearrangement for the synthesis of 5-amino-substituted[1]benzothieno[2,3-b]pyridine, *Tetrahedron*, 2003, 59, 7515-7520.

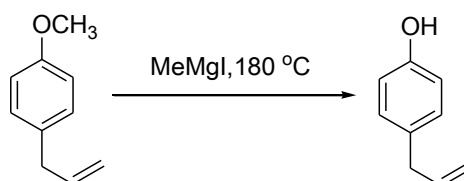
ซิงค์ไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.30 กรัม (7.4 mmol) ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 mL ละลายด้วยเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) 15 mL จากนั้นเติมยูจีนอล (eugenol) 3.8 mL (6 mmol) และคนด้วยเครื่องคนสารแบบแม่เหล็กเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เติม 2-bromo-2-methylpropionamide 1.23 กรัม (7.4 mmol) แล้วรีฟลักซ์ (reflux) ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นปล่อยสารให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติม DMPU:DMF (*N,N'*-dimethylpropyleneurea : *N,N*-dimethylformamide) ในอัตราส่วน 1:10 และเติมโซเดียมไฮไดรด์ (NaH) 0.27 กรัม (12.36 mmol) และรีฟลักซ์ต่อที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้อุณหภูมิห้องแล้วเติม 6M HCl 50 mL แล้วรีฟลักซ์ต่อที่ 100 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้อุณหภูมิเย็นแล้วปรับให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ติดตามผลโดยเช็ค TLC พบว่าเกิดสารผลิตภัณฑ์ขึ้นและเช็คหมู่เอมีนด้วย TLC โดยใช้ไนน์ไฮดริน (Ninhydrin) พบว่าเกิดสีม่วงเกิดขึ้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 20 mL และสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต

(ethyl acetate) 20 mL เป็นจำนวนสามครั้ง เก็บชั้นเอทิลอะซิเตตล้างด้วยน้ำกลั่น 20 mL จำนวนสามครั้ง และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตอีกสองครั้ง เก็บชั้นเอทิลอะซิเตต แล้วนำมากำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Na_2SO_4) นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ตัวทำละลายระหว่างเอทิลอะซิเตตและเฮกเซน ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 เป็นเฟสเคลื่อนที่ เก็บสารละลายที่ R_f เท่ากับ 0.14 นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลาย และทำให้แห้งด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ ผลึกภัณฑ์ที่ได้เป็น 4-allyl-2-methoxyaniline มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองขุ่น น้ำหนัก 0.46 g (45.3 % yield)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ_{H} 3.31 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, *cis*-terminal alkene), 3.33 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, *trans*-terminal alkene), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 5.06 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, CH_2 benzylic), 5.08 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, CH_2 benzylic), 5.94 (m, 1H, CH -alkenyl), 6.32 (s, 1H, NH_2) 6.65 (d, $J = 8$ Hz, 1H, ArH), 6.71 (br, 1H, ArH), 6.89 (d, $J = 8$ Hz, 1H, ArH), 7.445 (br, 1H, NH_2)

การสังเคราะห์ 4-allylphenol

Product Code: P32



ที่มา ; Jae-Hwan, K.; Young, A.C.; Jae-Yong, J.; Seung-Yong, S.; Heesoon, L.; Jin T.H.; Sang-Bae H.; Kiho, L.; Young-Shin, K.; Jae-Kyung, J., Expedient synthesis of 4-O-methylhonokiol *via* Suzuki-Miyaura cross-coupling. *Tetrahedron*, 2011, 67, 48, 9401-9404.

ปิเปต 4-allylanisole 2.3 mL (15 mmol) ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 mL ละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) 10 mL และเติม methyl magnesium iodide 8 mL (40 mmol) คนด้วยเครื่องคนสารชนิดแม่เหล็กที่อุณหภูมิ 180 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหลังจากนั้นทำการปรับ pH ด้วย NaHCO_3 ให้ได้ pH ~ 7-8 และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต (20 mL x 3) และนำชั้นน้ำมาปรับ pH ด้วย 0.5 M HCl ให้ได้ 2-3 และสกัดด้วย EtOAc (20 mL x 3) เก็บชั้นตัวทำละลายอินทรีย์นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สุญญากาศ แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้ระบบตัวทำละลายเป็นสารผสมระหว่างเอทิลอะซิเตตและเฮกเซน (EtOAc : Hexane) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลือง (60% yield) ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ_{H} 3.33 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2 benzylic), 4.88 (s, 1H, OH), 5.04 (m, 1H, *cis*- CH terminal alkene), 5.12 (q, $J = 3.5, 1.6$ Hz, 1H, *trans*- CH terminal alkene), 5.99 (m, 1H, CH alkenyl), 6.80 (d, $J = 4$ Hz, 2H, ArH), 7.07 (d, $J = 4$ Hz, 2H, ArH)

2.2 การตั้งตำรับอิมัลชันอนุพันธ์ของยูจีนอล

การตั้งตำรับอิมัลชันอนุพันธ์ของยูจีนอลเพื่อศึกษาหาสัดส่วนและชนิดของคู่ของสารก่ออิมัลชันที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตำรับยูจีนอลอิมัลชันที่มีความคงตัวดี โดยงานในส่วนนี้ดำเนินการโดย รศ.ดร. ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล ณ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชกรรม มหาวิทยาลัยนเรศวร

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาอิทธิพลของค่า Hydrophilic-Lipophilic-Balance (HLB) ต่อความคงตัวของยูจีนอลอิมัลชัน

อิมัลชันที่เตรียมประกอบด้วยยูจีนอลและสารก่ออิมัลชันความเข้มข้นร้อยละ 4 และ 5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 กรัม แล้วเปลี่ยนค่า HLB เป็น 5, 8, 10 และ 12 ซึ่งในการทดลองนี้เป็นการเตรียมอิมัลชันปริมาณ 50 กรัมต่อตำรับ จำนวน 3 หลอดต่อตำรับ โดยมีขั้นตอนการเตรียมตำรับดังนี้

- 1.1 คำนวณอัตราส่วนของ Tween 80 และ Span 80 เพื่อให้ได้ค่า HLB: 5, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ โดยคำนวณให้ได้ปริมาณสารก่ออิมัลชันความเข้มข้นรวมเท่ากับร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก
- 1.2 จากอัตราส่วนที่ได้คำนวณน้ำหนักของ Tween 80 และ Span 80 ให้ได้น้ำหนักรวม 2.5 กรัม สำหรับการเตรียมอิมัลชันปริมาณ 50 กรัม
- 1.3 นำส่วนของวัตถุดิบน้ำมันได้แก่ Span 80 และยูจีนอลที่บรรจุอยู่ในปิอกเกอร์นำไปอุ่นใน water bath ให้ได้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส (oil phase)
- 1.4 นำส่วนของวัตถุดิบน้ำ ได้แก่ Tween 80 และน้ำที่บรรจุอยู่ในปิอกเกอร์ นำไปอุ่นใน water bath ให้ได้อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส (aqueous phase)
- 1.5 ค่อยๆ เทวัตถุดิบน้ำให้เป็นสายลงในวัตถุดิบน้ำมันช้าๆ พร้อมทั้งคนอย่างสม่ำเสมอจนเย็น จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer ความเร็วรอบ 8500 รอบต่อนาที (rpm/min) เป็นเวลา 5 นาที
- 1.6 แบ่งอิมัลชันเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกประเมินผลหลังจากตั้งทิ้งไว้ 30 นาที อีกส่วนหนึ่งตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์แล้วประเมินผล จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์แล้วประเมินผล

2. การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันต่อความคงตัวของยูจีนอลอิมัลชัน

อิมัลชันที่เตรียมประกอบด้วยยูจีนอลความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก กำหนดค่า HLB เป็น 10 แล้วเปลี่ยนความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันเป็นร้อยละ 1, 3, 5, 10 และ 15 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 กรัม ซึ่งในการทดลองนี้เป็นการเตรียมอิมัลชันปริมาณ 50 กรัมต่อตำรับ จำนวน 3 หลอดต่อตำรับ โดยมีขั้นตอนการเตรียมตำรับดังนี้

- 2.1 คำนวณหาอัตราส่วนของ Tween 80 และ Span 80 ให้ได้ค่า HLB = 10 จากสัดส่วนที่ได้นำมาใช้ในการคำนวณหาน้ำหนักรวมของ Tween 80 และ Span 80 โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของสารทำอิมัลชันเป็นร้อยละ 1, 3, 5, 10 และ 15 ตามลำดับ

2.2 เตรียมอิมัลชันในปริมาณ 50 กรัม เช่นเดียวกับข้อ 1.3-1.5

2.3 ประเมินผลเช่นเดียวกับข้อ 1.6 และบันทึกผล

3. การศึกษาอิทธิพลของสูตรก่ออิมัลชันชนิดต่างๆ ต่อความคงตัวของยูจีนอลอิมัลชัน

อิมัลชันที่เตรียมประกอบด้วยยูจีนอลความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก กำหนดค่า HLB เป็น 10 แล้วเปลี่ยนความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันเป็นร้อยละ 1, 3, 5, 10 และ 15 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 กรัม ซึ่งในการทดลองนี้เป็นการเตรียมอิมัลชันปริมาณ 50 กรัมต่อตัวรับ จำนวน 3 หลอดต่อตัวรับ โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวรับดังนี้

3.1 จากสูตรทำอิมัลชันชนิดต่างๆ คำนวณหาสัดส่วนของ Tween และ Span ที่ให้ได้ค่า HLB = 10 แล้วคำนวณหาปริมาณของ Tween และ Span ที่ใช้เพื่อให้ได้น้ำหนักสารทำอิมัลชันรวม 2.5 กรัม

3.2 เตรียมอิมัลชันในปริมาณ 50 กรัม เช่นเดียวกับข้อ 1.3-1.5

3.3 ประเมินผลเช่นเดียวกับข้อ 1.6 และบันทึกผล

4. เกณฑ์การประเมินผลความคงตัวของยูจีนอลอิมัลชัน

4.1 Creaming

เป็นวิธีการศึกษาความคงตัวของอิมัลชันโดยหาปริมาณการรวมตัวกันของอนุภาคของวัตถุภาคภายในของอิมัลชันแล้วลอยตัวแยกออกเป็นชั้นครีมอยู่บนผิวของอิมัลชัน โดยสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ Creaming} = \frac{\text{ความสูงของวัฏภาคภายในที่แยกออกมา} \times 100}{\text{ความสูงของอิมัลชันทั้งหมด}}$$

อิมัลชันที่มีความคงตัวดีจะมีชั้นครีมที่หนา คำนวณได้ % Creaming ที่สูง เนื่องจากวัตถุภาคภายนอกและภายในไม่ได้แยกตัวออกจากกัน

4.2 Cracking

เป็นวิธีการศึกษาความคงตัวของอิมัลชันโดยหาปริมาณการรวมตัวกันของอนุภาคของวัตถุภาคภายในของอิมัลชันโดยที่อนุภาคเล็กๆ รวมตัวกันเกิดเป็นชั้นของวัตถุภาคภายในลอยตัวอยู่บนผิวของอิมัลชันเป็นชั้นของน้ำมันอยู่บนผิวของอิมัลชัน อิมัลชันที่มีความคงตัวดีจะมีการแยกตัวของชั้นน้ำมันออกจากเนื้ออิมัลชันน้อย เนื่องจากวัตถุภาคภายนอกและภายในไม่ได้แยกตัวออกจากกัน

4.3 Apparent Viscosity

การประเมินความหนืดของอิมัลชันแบบง่าย สามารถทำได้โดยการบรรจุอิมัลชันที่ต้องการประเมินลงในหลอดทดลองขนาดเล็กสูง 10 เซนติเมตร แล้วค่อยๆ เติงหลอดทดลองทีละน้อยจนผิวส่วนบนของอิมัลชันเริ่มไหลจนไหลไปได้ 3 เซนติเมตร จับเวลาตั้งแต่เริ่มไหลจนกระทั่งไหลไปได้ 3 เซนติเมตร

อิมัลชันที่มีความหนืดสูงจะใช้เวลาในการไหลนานกว่าอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ การประเมินความหนืดอาจสามารถบอกได้ถึง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในอิมัลชัน เช่น เมื่ออุณหภูมิเกิดการแยกตัวเป็นชั้นของน้ำมัน ความหนืดที่ประเมินได้จะมีค่าลดลง

4.4 Physical Appearance

ประเมินลักษณะต่างๆ ที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า เช่น สีของอิมัลชัน อิมัลชันที่มีอนุภาคของวัตถุภายในเล็ก จะได้ลักษณะของอิมัลชันที่มีสีขาวนวล คล้ายน้ำมัน

หมายเหตุ:

วิธีการคำนวณปริมาณสารก่ออิมัลชันแต่ละชนิด ใช้หลักการคำนวณโดยนำค่า HLB ของสารก่ออิมัลชันแต่ละชนิดมาคำนวณ จากนั้นหาปริมาณสารก่ออิมัลชันแต่ละชนิดโดยใช้วิธี allegation ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ตัวอย่างการคำนวณด้วยวิธี Allegation

Required HLB เท่ากับ 5, ปริมาณของสารก่ออิมัลชันรวมเท่ากับ 2.5 กรัม

	HLB	สัดส่วน	ปริมาณสารที่ใช้
Tween 80	15	$= 4.3 - 5 = 0.7$	$(0.7 * 2.5) / 10.7 = 0.1636$
Span 80	4.3	$= 15 - 5 = 10$	$(10 * 2.5) / 10.7 = 2.3365$
		รวม 10.7	2.5

ดังนั้น เพื่อให้ได้ HLB ของตำรับเท่ากับ 5 ปริมาณของ Tween 80 และ Span 80 จะเท่ากับ 0.1636 และ 2.3365 กรัมตามลำดับ โดยผลรวมของสารก่ออิมัลชันจะเท่ากับ 2.5 กรัม

2.3 การทดสอบฤทธิ์การสลบในสัตว์น้ำ

การทดสอบฤทธิ์ในสัตว์น้ำเป็นงานทางด้านวชิรศาสตร์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สังเคราะห์ขึ้น โดยเน้นเฉพาะฤทธิ์การเป็นยาสลบในสัตว์น้ำประเภทปลา ปู และกุ้งเป็นหลัก โดยงานในส่วนนี้ดำเนินการโดย ผศ.ดร. บุญรัตน์ ประทุมชาติ และดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี ณ ภาควิชาวชิรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยทำการทดลองภายในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวชิรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

สัตว์ทดลอง

ทั้งหมดเป็นสัตว์เศรษฐกิจ ต้องการการการสลบเพื่อการขนส่ง และมีผลกระทบทางธุรกิจของประเทศไทยสูง แบ่งเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ครัสเตเชียน (Crustacean)

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ทดสอบในกุ้งขาววัยอ่อน (post larva 20) และกุ้งขาววัยรุ่นคละเพต กุ้งขาววัยอ่อน ความยาวลำตัว 1.06 ± 0.32 เซนติเมตร และกุ้งขาววัยรุ่นคละเพตความยาวลำตัว 11.13 ± 0.56 เซนติเมตร น้ำหนัก 10.64 ± 0.68 กรัม

ปูม้า (*Portunus pelagicus*) คละเพตระยะคราบแข็ง (Intermolt stage) น้ำหนักประมาณ 100 กรัม

กลุ่มที่ 2 กลุ่มปลามีเกล็ด

ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) วัยอ่อนอายุ 1 เดือน 20 วัน ความยาวลำตัว 2.23 ± 0.07 เซนติเมตร และปลากะพงขาววัยรุ่น (ขนาดตลาด) น้ำหนัก 324.3 ± 5.5 กรัม

กลุ่มที่ 3 ปลาไม่มีเกล็ด

ปลาตุ๊กปึกอุย (male *Clarias gariepinus* x female *Clarias macrocephalus*) ปลาตุ๊กวัยอ่อนอายุ 1 เดือน 15 วัน ความยาวลำตัว 2.25 ± 0.04 เซนติเมตร น้ำหนัก 4.20 ± 0.15 กรัม และปลาตุ๊กวัยรุ่น 17.5 ± 0.8 เซนติเมตร น้ำหนักลำตัว 80.5 ± 3.5 กรัม

สัตว์ทดลองทั้งหมดจะพักไว้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวชิรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มีแสงนเปิดบ่อเพื่อลดแสงประมาณ 60% ให้ออกซิเจนที่ 6.5 ppm ความเค็มน้ำ 30 ppt (กรณีน้ำทะเล) อุณหภูมิมีน้ำ 27-29 °C pH 7.8-8.5 และงดให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง โดยน้ำทะเลที่ใช้ได้มาจากแหล่งตำบลแสมสาร จังหวัดชลบุรี

ขั้นตอนการทดสอบการออกฤทธิ์การสลบเบื้องต้นของสารอนุพันธ์

1. เตรียมภาชนะขนาด 3.5 L ใส่ น้ำทะเลหรือน้ำจืด ปริมาณ 1 L โดยควบคุมให้ออกซิเจนที่ 4.6 ppm อุณหภูมิมีน้ำประมาณ 27-28 °C ความเค็มของน้ำ 29.6 ppm (กรณีน้ำทะเล) pH ~ 7-8 โดยเตรียมไว้ 2 ชุด คือ ชุดการทดลอง (มีสารอนุพันธ์) และชุดสำหรับพื้นสลบ (ไม่มีสารอนุพันธ์)

2. นำสารอนุพันธ์ของยูจีนอลทั้งสิ้น 26 ชนิด คือ (P1-P14, P20-P32) ดังแสดงในตาราง 3.14 (หน้า 92) ใส่ลงในภาชนะแต่ละใบ โดยเตรียมที่ระดับความเข้มข้น 2 ความเข้มข้น ได้แก่ 25 และ 50 ppm และมีชุดควบคุมคือ P14 (control หรือ placebo) (ทำ 3 ซ้ำต่อ 1 การทดลอง) โดยอนุพันธ์ทั้ง 26 ชนิด เตรียมโดยใช้ตัวรับการเตรียมที่ใช้ Tween80/Span80 เป็นสารก่ออิมัลชัน ดังแสดงรายละเอียดในหน้า 33
3. นำสัตว์ทดลองใส่ลงในภาชนะในข้อ 2 จำนวน 10 ตัว/ภาชนะ (กรณีกึ่งวัยอ่อน ปลาตุ๋นวัยอ่อน และปลากะพงวัยอ่อน) และ 3 ตัว/ภาชนะ (กรณีกึ่งวัยรุ่น ปลาตุ๋นลูกผสม ปลากะพงวัยรุ่น และปูม้าวัยรุ่น)
4. ทำการทดสอบระยะเวลาที่สลบ โดยบันทึกระยะเวลาที่ทำให้สัตว์ทดลองสลบในระดับที่ 2 100% โดยยึดถือหลักเกณฑ์ดังตาราง 3.19 (หน้า 103) ระยะเวลาที่ฟื้นภายหลังการสลบ และอัตราการรอดตาย
5. ทำการฟื้นสลบทันที โดยการย้ายสัตว์ทดลองลงในภาชนะที่เตรียมไว้สำหรับฟื้นสลบ และตรวจสอบจำนวนสัตว์ทดลองที่ฟื้นทุกๆ 1 นาที จนสัตว์ทดลองทั้งหมดที่รอดชีวิต ฟื้น 100%
6. บันทึกระยะเวลาที่สัตว์ทดลองฟื้น จำนวนสัตว์ทดลองที่ฟื้นปกติและผิดปกติจากลักษณะภายนอก (พิจารณาจากการทรงตัว การว่ายน้ำ สีลำตัว กล้ามเนื้อ การเกร็งของกล้ามเนื้อ และการตอบสนองต่อสิ่งเร้า)
7. นำผลการทดลองที่ได้ไปพลอตกราฟระยะเวลาในการสลบ กราฟระยะเวลาในการฟื้นสลบ และอัตราการรอดตาย และคำนวณค่าทางสถิติด้วย one way ANOVA และ Duncan's new multiple range test ต่อไป

เอกสารอ้างอิงบทที่ 2

- [1] Judy L. Bolton; Ellen Comeau; Vesna Vukomanonic, The influence of 4-alkyl substituents on the formation and reactivity of 2-methoxy-quinone methides: evidence that extended π -conjugation dramatically stabilizes the quinone methide formed from eugenol, *Chemico-Biological Interactions*, **1995**, 95, 279-290.
- [2] Vyas, G. N.; Shah, N. M. Synthesis of Quinacetophenone Monomethylether, *Org. Synth.*, Collect. Vol. IV, **1963**, 836.
- [3] Xiuli Bu, Huanwang Jing, Li Wang, Tao Chang, Lili Jin, Yongmin Liang, Organic base catalyzed O-alkylation of phenols under solvent-free condition, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2006**, 259, 121-124.
- [4] C F. H. Allen; J. W. Gates, *Organic Synthesis*, Coll. Vol. 3, **1955**, 418, 25, 49.
- [5] Bovonsombat, P.; Ali, R.; Khan, C.; Leykajarakul, J.; Pla-on, K.; Aphimanchindakul, S.; Pungcharoenpong, N.; Timsuea, N.; Arunrat, A.; Punpongjareorn, N. Facile *p*-toluenesulfonic acid-promoted *para*-selective monobromination and chlorination of phenol and analogues. *Tetrahedron*, **2010**, 66, 6928-6935.
- [6] Sudarma, I. M.; Ulfa, M.; Sarkono, Chemical transformation of eugenol isolated from clove oil to 4-allyl-2-methoxy-6-sulfonicphenol and 4-allyl-2-methoxy-6-aminophenol, *Indo. J. Chem.*, **2009**, 9(2), 267-270.
- [7] Nitin, S.N.; Mayur, J.B.; Sachin, R.J.; Bhalchandra, M.B. Ultrasound promoted regioselective nitration of phenols using dilute nitric acid in the presence of phase transfer catalyst. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2007**, 14, 41-45.
- [8] Cheng, X.; Prehm, M.; Kumar, D.M.; Kain, J.; Baumeister, U.; Diele, S.; Leine, D.; Blume, A.; Tschierske, C. Calamitic Bolaamphiphiles with (Semi) Perfluorinated Lateral Chains: Polyphilic Block Molecules with New Liquid Crystalline Phase Structures. *Journal of American Chemical Society*. **2003**, 125, 10977-10996.
- [9] Farouk S.E., Steve F.C., Rebecca L.B., Antimicrobial neolignans of sassafras randaiense roots. *Journal of Natural Products*, **1983**, 46, 493-498.
- [10] Chaing-Ming, C.; Yeuk-Chuen, L., A concise synthesis of honokiol, *Tetrahedron Letters*, **2009**, 50, 10, 1151-1152.
- [11] Carlo, B.; Maria, F.; Rosanna, S.; Piero, S., Smiles rearrangement for the synthesis of 5-amino-substituted[1]benzothieno[2,3-b]pyridine, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 7515-7520.

-
- [12] Jae-Hwan, K.; Young, A.C.; Jae-Yong, J.; Seung-Yong, S.; Heesoon, L.; Jin T.H.; Sang-Bae H.; Kiho, L.; Young-Shin, K.; Jae-Kyung, J., Expedient synthesis of 4-O-methylhonokiol *via* Suzuki-Miyaura cross-coupling. *Tetrahedron*, **2011**, 67, 48, 9401-9404.

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล

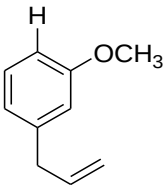
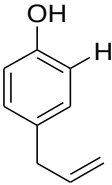
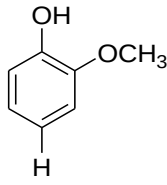
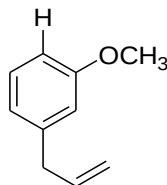
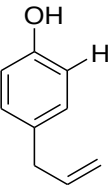
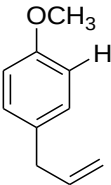
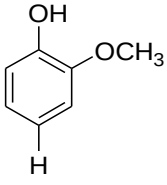
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลชนิดต่างๆ จะดำเนินการควบคู่ไปกับการศึกษาความสัมพันธ์ทางด้านโครงสร้างของสารกับฤทธิ์การเป็นยาเสพติด (SAR: Structure-Activity Relationship) ซึ่งจะได้กล่าวในหัวข้อต่อไป เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาพัฒนาและปรับปรุงเพื่อออกแบบการสังเคราะห์สารที่มีประสิทธิภาพต่อไป โดยการทดสอบในส่วนนี้ร่วมมือกับ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญรัตน์ ประทุมชาติ และ ดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อย่างไรก็ตามอ้างอิงจากรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 2 จากผลการทดลองการสลับปลาเบื้องต้น ประกอบกับความเห็นจากผู้ทรงคุณวุฒิข้อ 2 (ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการทบทวนและปรับปรุง คิดว่าไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์อนุพันธ์ที่คล้ายกัน และการทดสอบประสิทธิภาพของสารที่สังเคราะห์ในสัตว์น้ำหลายๆ ชนิด มากกว่าที่จะสังเคราะห์สารจำนวนมากชนิด)

ทางผู้วิจัยจึงขอเสนอให้มีการเปลี่ยนแปลงการออกแบบอนุพันธ์บางกลุ่มเพื่อให้สอดคล้องกับการสังเคราะห์ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยไม่ใช้เวลานานเกินไป โดยจะไม่สังเคราะห์สารบางชนิดที่มีแนวโน้มว่าจะให้ผลที่ไม่ต่างจากสารที่มีอยู่แล้ว แต่ยังคงแนวทางการออกแบบเพื่อศึกษาผลของการดัดแปรหมู่ต่างๆ ต่อฤทธิ์การสลับปลาในสัตว์น้ำอย่างครบถ้วน โดยจะเน้นนำสารที่มีศักยภาพดีไปทดสอบในสัตว์น้ำชนิดอื่น ได้แก่ ปลากระพง และกุ้งขาวแวน โดยจะทำการดัดแปรโครงสร้างอนุพันธ์ของยูจีนอลทั้งหมด 8 กลุ่ม ดังรายละเอียดแสดงดังนี้

1. การแทนที่หมู่แทนที่ต่างๆ ในยูจีนอลด้วยไฮโดรเจน
2. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่อะมิโน หรือ ซัลไฟด์
3. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เมทอกซี คลอไรหรือโบรโม
4. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่แอลคอกซี
5. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ต่างๆ
6. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่แอลลิค
7. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการนำยูจีนอลมาทำปฏิกิริยาต่างๆ
8. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการปรับปรุงโครงสร้างหลายตำแหน่งพร้อมกัน

กลุ่มที่ 1 การแทนที่หมู่แทนที่ต่างๆ ในยูจีนอลด้วยไฮโดรเจน

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาถึงความสำคัญของหมู่แทนที่ต่างๆ ที่อาจจะเป็น active site ต่อฤทธิ์การเป็นยาสลบในสัตว์น้ำเบื้องต้น ดังแสดงโครงสร้าง

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด			
แนวทางเดิม			
			
แนวทางที่เสนอใหม่			
			

เหตุผลประกอบ : เนื่องจากการศึกษาการดัดแปรหมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่แอลคิล (P1-P13) พบว่าอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ในการสลบปลาได้ดี คือ อนุพันธ์ P5 P7 P10 และ P13 ซึ่งต่างก็เป็นหมู่แอลคิล โดย P5 และ P7 เป็นอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้ดีกว่ายูจีนอลที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีมาก ประกอบกับอนุพันธ์ที่เสนอมานี้ มีแนวทางการสังเคราะห์ที่ค่อนข้างยาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่าจะเสนอเปลี่ยนโครงสร้างจากหมู่ไฮดรอกซี (-OH) เป็นหมู่ เมทอกซี (-OCH₃) เพื่อให้สอดคล้องกับผลการทดสอบฤทธิ์การสลบปลา ซึ่งสารนี้เป็นสารที่มีจำหน่าย ดังนั้นผู้วิจัยสามารถนำไปทดสอบฤทธิ์ได้โดยตรง

กลุ่มที่ 2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เอมีโน หรือ ซัลไฟด์

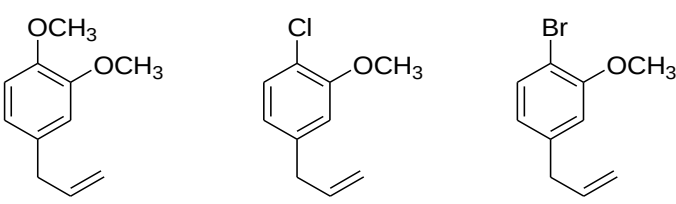
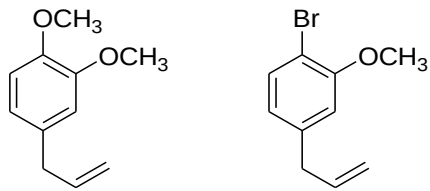
วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bond donor) ได้เช่นเดียวกับหมู่ไฮดรอกซี เช่น หมู่เอมีโน (เริ่มจากอะนิลีน) หมู่ไทออล (เริ่มจากไทโอฟีนอล) เป็นต้น โดยยังคงหมู่แอลลิลและหมู่เมทอกซีภายในโมเลกุลไว้ ดังแสดงโครงสร้าง

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด	
แนวทางเดิม <chem>Nc1ccc(CC=C)cc1OC</chem> <chem>S1C=CC(=C(C=C1)OC)CC=C</chem>	
แนวทางที่เสนอใหม่ <chem>Nc1ccc(CC=C)cc1OC</chem>	

เหตุผลประกอบ : ในกลุ่มนี้จะเป็นการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เอมีโน หรือ ซัลไฟด์ เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนแบบ H-bond donor ได้ ซึ่งผู้วิจัยเห็นว่าการเปลี่ยนจากหมู่ไฮดรอกซี เป็นหมู่เอมีโนน่าจะเพียงพอต่อการได้ข้อมูลในเชิงวิเคราะห์แล้ว จึงขอเสนอตัดการแทนที่ด้วยหมู่ซัลไฟด์ออก เพราะเป็นหมู่ฟังก์ชันในกลุ่มของ H-bond donor เช่นเดียวกับหมู่เอมีโน โดยอนุพันธ์ที่แทนที่ด้วยหมู่เอมีโนนี้สามารถสังเคราะห์ได้แล้ว

กลุ่มที่ 3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เมทอกซี คลอโรหรือโบรโม

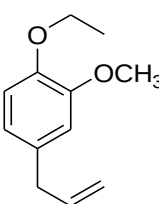
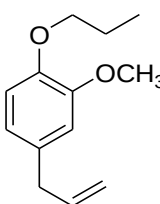
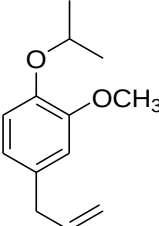
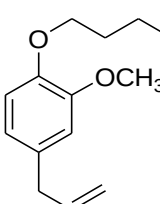
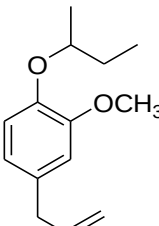
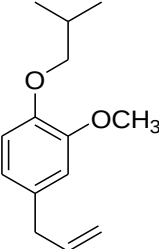
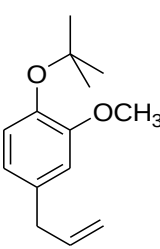
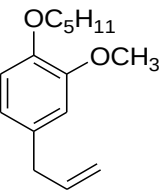
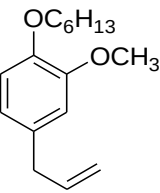
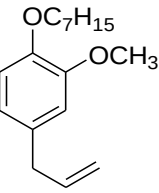
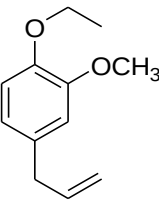
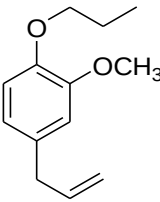
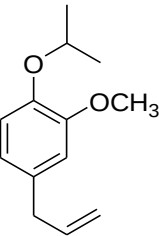
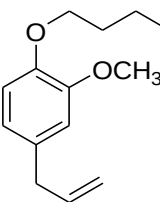
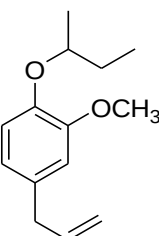
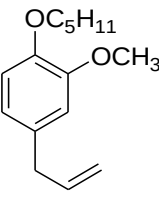
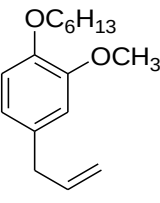
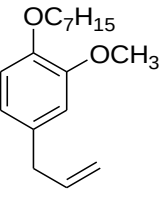
วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bond acceptor) ได้ เช่นเดียวกับหมู่ไฮดรอกซี เช่น หมู่เมทอกซี (เริ่มจากไพโรแคทีคอล) หมู่คลอโร โบรโม (เริ่มจากเฮโลเบนซีน) เป็นต้น โดยยังคงหมู่แอลลิลและเมทอกซีภายในโมเลกุลไว้ ดังแสดงโครงสร้าง

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด		
แนวทางเดิม 		
แนวทางที่เสนอใหม่ 		

เหตุผลประกอบ : ในกลุ่มนี้จะเป็นการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยคลอโรหรือโบรโม เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนแบบ H-bond acceptor ได้ ในส่วนของการแทนที่ด้วยเมทอกซีนั้นมีสารแล้ว ส่วน คลอโรและโบรโมนั้น เป็นหมู่ฟังก์ชันในกลุ่มเดียวกัน ผู้วิจัยจึงเห็นว่าการเปลี่ยนจากหมู่ไฮดรอกซี เป็น คลอโร หรือ โบรโม ตัวใดตัวหนึ่ง น่าจะเพียงพอต่อการได้ข้อมูลในเชิงวิเคราะห์แล้ว จึงขอเสนอสังเคราะห์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น โดยในที่นี้ได้เลือกอนุพันธ์ของโบรโม เนื่องจากน่าจะสังเคราะห์ได้ง่ายกว่า

กลุ่มที่ 4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่แอลคอกซี

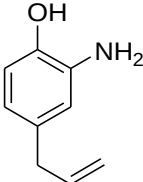
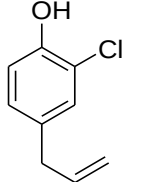
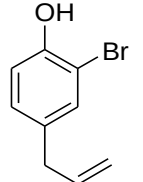
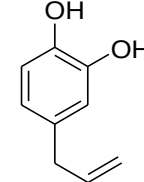
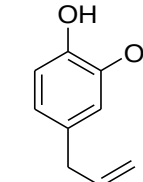
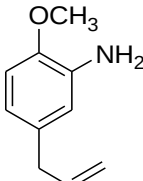
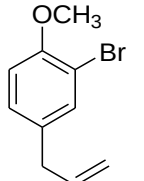
วัตถุประสงค์ : เป็นการเปลี่ยนไฮดรเจนของหมู่ไฮดรอกซีให้เป็นหมู่ไฮโดรคาร์บอนที่มีขนาดยาวขึ้นเพื่อเพิ่มความเป็นไฮโดรโฟบิกในโมเลกุล เช่น หมู่เมทิล เอทิล โพรพิล บิวทิล จนถึงเฮปทิล เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบไฮโดรโฟบิกจะมีผลต่อฤทธิ์การสลับอย่างไร ดังแสดงโครงสร้าง

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด				
แนวทางเดิม				
				
				
แนวทางที่เสนอใหม่				
				
				

เหตุผลประกอบ : ในกลุ่มนี้จะเป็นการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่แอลคอกซี ซึ่งจากผลทดสอบการสลับปลาตุกเบื้องต้นพบว่าอนุพันธ์ P5 P7 P10 และ P13 นั้นมีศักยภาพที่ดี โดยอนุพันธ์ที่มีศักยภาพดีที่สุด คือ P5 และ P7 ซึ่งมีความยาวของหมู่แอลคิล คือ C1 และ C3 ดังนั้น อนุพันธ์ที่แทนที่ด้วย isobutyl และ tertiarybutyl จึงน่าจะให้ผลที่ไม่แตกต่างจาก sec-butyl หรือ ethyl มากนัก ผู้วิจัยจึงขอเสนอไม่สังเคราะห์สารดังกล่าว

กลุ่มที่ 5 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ต่างๆ

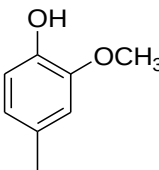
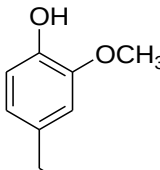
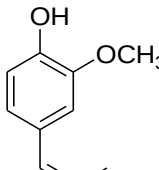
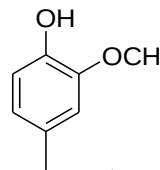
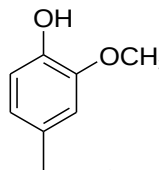
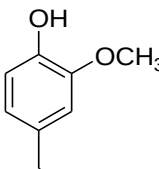
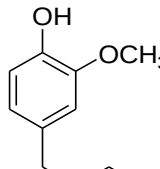
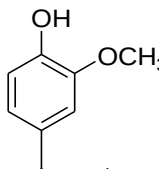
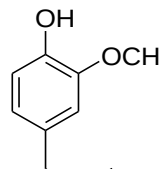
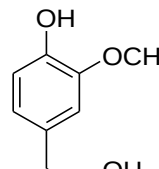
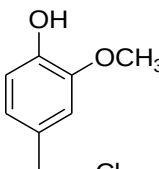
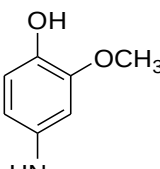
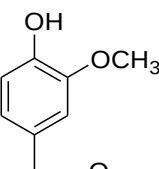
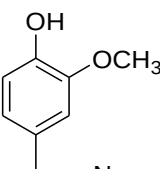
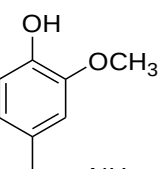
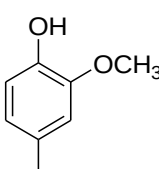
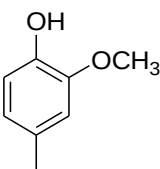
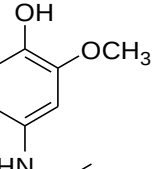
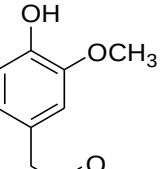
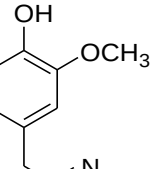
วัตถุประสงค์ : เป็นการแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ เช่น หมู่อะมิโน และ/หรือ สายโซ่คาร์บอนที่มีขนาดยาวขึ้น เช่น หมู่เอทิล เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบให้พันธะไฮโดรเจนหรือไฮโดรโฟบิกจะมีผลต่อฤทธิ์การสลับอย่างไร ดังแสดงโครงสร้าง

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด				
แนวทางเดิม				
				
แนวทางที่เสนอใหม่				
				

เหตุผลประกอบ : ในกลุ่มนี้จะเป็นการแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ต่างๆ ซึ่งจากผลทดสอบการสลับเบื้องต้นของอนุพันธ์ P20 ทำให้ทราบว่าหมู่เมทอกซีดังกล่าวไม่น่าจะมีผลต่อฤทธิ์การสลับปลา เพราะโครงสร้างของอนุพันธ์ P20 นั้นไม่มีหมู่เมทอกซี แต่ยังคงออกฤทธิ์ในการสลับ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเห็นว่าการดัดแปรโครงสร้างบริเวณนี้ ไม่น่าจะมีผลต่อฤทธิ์การสลับมากนัก อย่างไรก็ตาม จะขอเสนอโครงสร้างที่มีการแทนที่หมู่เมทอกซี ด้วยหมู่อะมิโน และ คลอโรหรือโบรโม ไว้เพื่อไว้เป็นข้อมูลเชิงวิเคราะห์ โดยจะขอเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซีเดิม เป็นหมู่เมทอกซี ตามที่ได้ชี้แจงรายละเอียดไว้ในกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 6 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่แอลลิล

วัตถุประสงค์ : เป็นการแทนที่หมู่แอลลิลให้เป็นหมู่ไฮโดรโฟบิกชนิดอื่นๆ เช่น หมู่เมทิล เอทิล โพรพิล ไอโซโพรพิล บิวทิล เซค-บิวทิล เทอร์เชียรีบิวทิล เป็นต้น รวมทั้งหมู่ที่มีโครงสร้างและความยาวพันธะคล้ายกับหมู่แอลลิล เช่น methylene carbonyl, methylene imine เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบใดจะมีผลต่อฤทธิ์การสลายอย่างไรดังแสดงโครงสร้าง

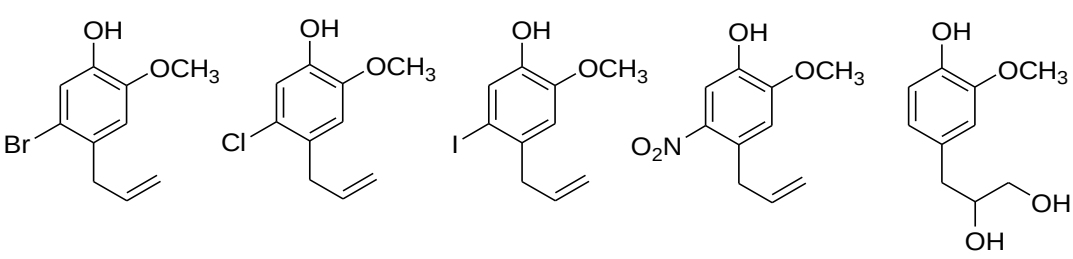
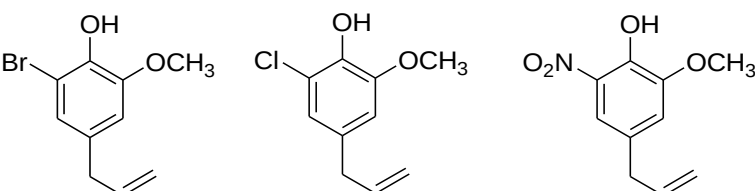
แนวทางการออกแบบ/ปรับลด				
แนวทางเดิม				
				
				
				
แนวทางที่เสนอใหม่				
				

เหตุผลประกอบ : ในกลุ่มนี้จะเป็นการแทนที่หมู่แอลลิลด้วยหมู่ต่างๆ ซึ่งจากผลทดสอบการสลายเบื้องต้นในอนุพันธ์ P3 P4 P21 P22 (P21 และ P22 จะรายงานในความก้าวหน้าครั้งที่ 3) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่ไม่มีหมู่แอลลิล พบว่าอนุพันธ์กลุ่มดังกล่าวไม่ออกฤทธิ์เป็นยาสลายในสัตว์น้ำ หรือออกฤทธิ์ช้ากว่ายูจีนอล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหมู่แอลลิลน่าจะมีความสำคัญมากในโครงสร้างของสารที่จะออกฤทธิ์เป็นยาสลายในสัตว์น้ำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงขอเสนอการ

ออกแบบอนุพันธ์ในกลุ่มนี้ใหม่ โดยเห็นว่าควรคงในส่วนของหมู่แอลลิลไว้ ส่วนอนุพันธ์ที่ออกแบบโดยการเปลี่ยนหมู่แอลลิลนั้นไม่น่าจะให้ผลออกฤทธิ์เป็นยาสลบที่ดีนัก จึงขอตัดออกเพื่อให้สอดคล้องกับผลการทดสอบในสัตว์น้ำ โดยในกลุ่มนี้จะเหลืออนุพันธ์ที่ต้องสังเคราะห์อยู่ 4 ชนิด ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายแอลลิล กล่าวคือมีพันธะอยู่ โดยจะเปลี่ยนจาก C=C เป็น C=N หรือ C=O แทน ซึ่งน่าจะช่วยให้บอกถึงความสำคัญของหมู่นี้ได้

กลุ่มที่ 7 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการนำยูจีนอลมาทำปฏิกิริยาต่างๆ

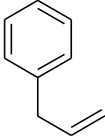
วัตถุประสงค์ : เป็นการนำยูจีนอลเป็นสารตั้งต้น แล้วนำมาทำปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว เช่น แฮโลจีเนชัน แอลคิลเลชัน หรือออกซิเดชัน เป็นต้น เพื่อให้ได้อนุพันธ์ของยูจีนอลแบบต่างๆ ดังแสดงโครงสร้าง

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด	
แนวทางเดิม 	
แนวทางที่เสนอใหม่ 	

เหตุผลประกอบ : ในกลุ่มนี้จะเป็นการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการเติมหมู่ต่างๆ เข้าไป โดยจะขอเปลี่ยนแปลงตำแหน่งในการเติมเป็นตำแหน่งออร์โท (ortho) กับหมู่ไฮดรอกซี และขอปรับลดในกรณีของคลอโร หรือ โบรโม ซึ่งจะเลือกสังเคราะห์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง เนื่องจากเป็นหมู่ฟังก์ชันในกลุ่มเดียวกัน ส่วนอนุพันธ์ชนิดสุดท้าย เสนอตัดออกเพราะเป็นการเปลี่ยนแปลงหมู่แอลลิล ดังอธิบายไว้ในกลุ่มที่ 6

กลุ่มที่ 8 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการปรับปรุงโครงสร้างหลายตำแหน่งพร้อมกัน

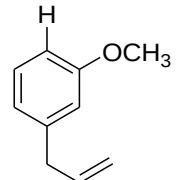
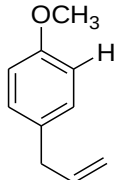
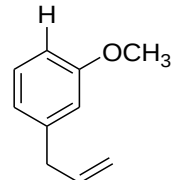
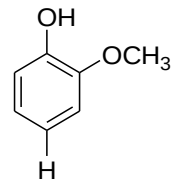
วัตถุประสงค์: เป็นการออกแบบการปรับโครงสร้างหลายตำแหน่ง เช่น บริเวณที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี หรือ บริเวณที่เป็นหมู่แอลลิล ซึ่งการออกแบบในหัวข้อนี้ จะขึ้นอยู่กับข้อมูลผลการทดลองฤทธิ์ในการสลายของอนุพันธ์ทั้งหมด

แนวทางการออกแบบ/ปรับลด
<u>แนวทางคงเดิม</u> 

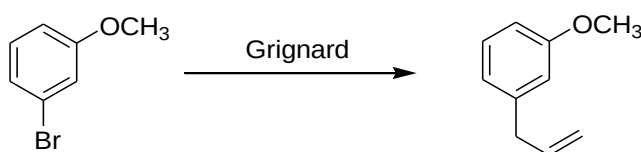
สำหรับสารอนุพันธ์ที่ทำการปรับลดออก รวมทั้งหมด 19 ชนิด ดังนั้น คาดว่าสารอนุพันธ์ที่น่าจะเตรียมได้ทั้งหมด คงเหลือ 24 ชนิด

สำหรับการสังเคราะห์สารอนุพันธ์แต่ละชนิด มีรายละเอียดดังนี้

3.1.1 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 1 การแทนที่หมู่แทนที่ต่างๆ ในยูจีนอลด้วยไฮโดรเจน

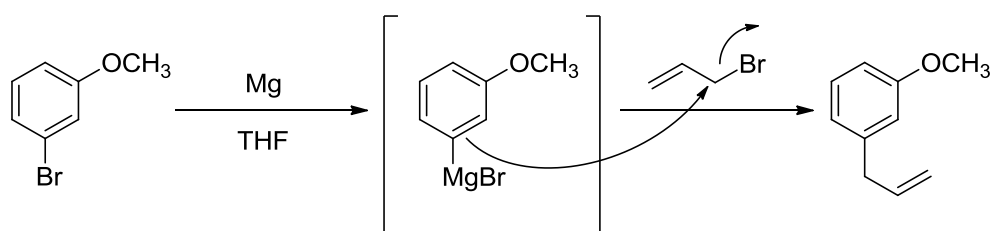
	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	P27	P20	P32
Name	3-allylanisole	4-allylanisole	4-allylphenol
โครงสร้าง			
Code	P21		
Name	Guaiacol		

สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ ได้แก่ 3-allylanisole (P27) เป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซี (-OH) 4-allylanisole (P20) เป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่ไม่มีหมู่เมทอกซี (-OCH₃) และแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เมทอกซี ส่วน Guaiacol (P21) เป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่ไม่มีหมู่แอลลิล (-CH₂CH=CH₂) เพื่อศึกษาถึงความสำคัญของหมู่แทนที่ต่างๆ ที่อาจจะเป็น active site ต่อฤทธิ์การเป็นยาสลับในสัตว์น้ำเบื้องต้น โดยที่สารอนุพันธ์ 2 ชนิดหลัง คือ 4-allylanisole เป็นสารเคมีของ Aldrich และ Guaiacol เป็นสารเคมีของ Acros Chemical จึงจัดซื้อมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์การเป็นยาสลับในสัตว์น้ำโดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ส่วน 3-allylanisole สามารถสังเคราะห์ได้โดยเริ่มจากสารตั้งต้น คือ 3-bromoanisole ซึ่งเป็นสารที่มีจำหน่าย เปลี่ยนให้เป็น 3-allylanisole โดยการทำให้ปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ที่เป็นแหล่งของหมู่โบรมิ โดยใช้ตัวเข้าทำปฏิกิริยาและตัวทำละลายชนิดต่างๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยหมู่โบรมิ โดยมีแผนการสังเคราะห์แสดงดัง **ภาพ 3.1**



ภาพ 3.1 แนวทางการสังเคราะห์ 3-allylanisole (P27)

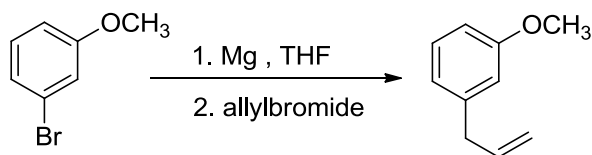
ปฏิกิริยากรีนยาสามารถทำได้โดยเตรียมจากสารตั้งต้น 3-bromoanisole เปลี่ยนให้เป็น aryl magnesium bromide (ArMgBr) โดยใช้โลหะแมกนีเซียมรีฟลักซ์ในตัวทำละลายชนิดอะโปรติก (aprotic solvent) คือ tetrahydrofuran เมื่อผ่านไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติม allyl bromide ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นอิเล็กโตรไฟล์และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง สารจะมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวขุ่น ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เปรียบเทียบระหว่างสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ ในระบบตัวทำละลาย hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 8 : 1 พบว่าบนแผ่น TLC จะเกิดสารผลิตภัณฑ์ขึ้นสองจุด ซึ่งสามารถ ตรวจสอบได้ด้วยสารละลาย KMnO₄ พบว่าจุดบนที่มีค่า R_f = 0.69 สามารถให้ผลบวกกับสารละลาย KMnO₄ คาดว่าน่าจะเป็น 3-allylanisole โดยการสังเคราะห์และกลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดัง **ภาพ 3.2**



ภาพ 3.2 กลไกการเกิดปฏิกิริยาแอลลิลชันผ่านกรีนยารีเอเจนต์ของ 3-bromoanisole

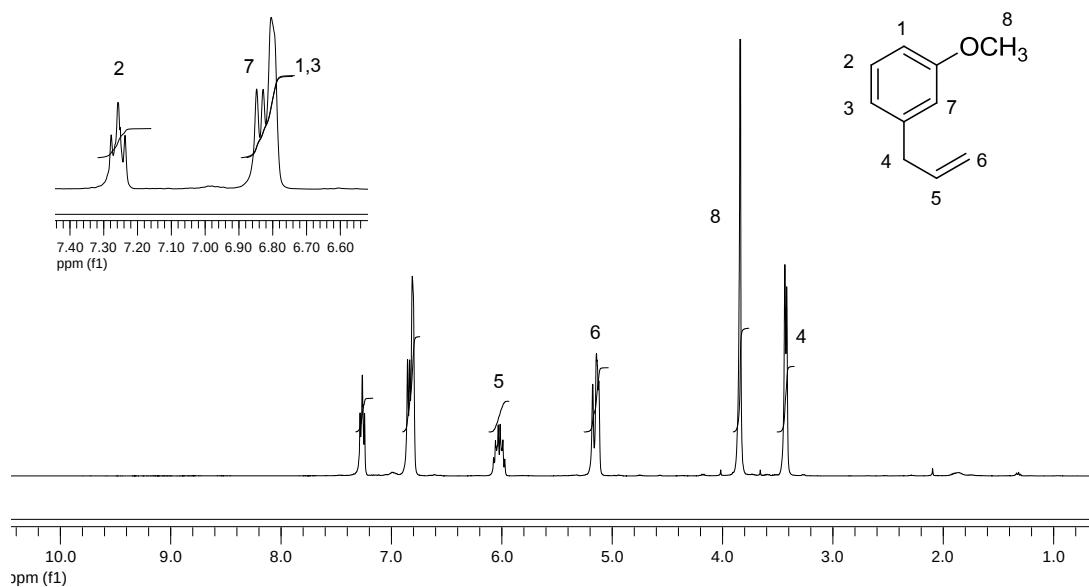
ปฏิกิริยาการเตรียม 3-allylanisole ในงานวิจัยนี้ ได้ผลแสดงดัง **ตาราง 3.1** โดยจะได้ผลผลิตประมาณร้อยละ 39.2-57.7

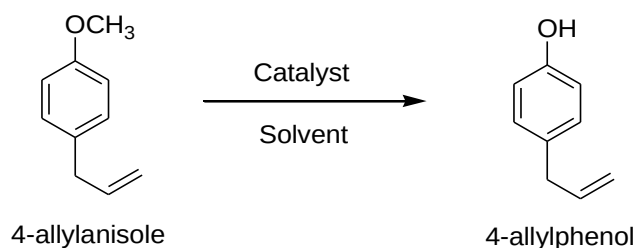
ตาราง 3.1 แสดงผลการเกิดปฏิกิริยากรีนยา (Grignard)



ครั้งที่	จำนวนโมล 3-bromoanisole	จำนวนโมล allylbromide	น้ำหนักผลิตภัณฑ์	ผลลิตร้อยละ
1	15×10^{-3}	18×10^{-3}	1.22	55.0
2	15×10^{-3}	18×10^{-3}	1.13	51.2
3	15×10^{-3}	18×10^{-3}	1.21	54.6
4	15×10^{-3}	18×10^{-3}	0.93	41.8
5	15×10^{-3}	18×10^{-3}	0.98	44.2
6	15×10^{-3}	18×10^{-3}	1.28	57.7
7	15×10^{-3}	18×10^{-3}	1.00	45.2
8	15×10^{-3}	18×10^{-3}	0.87	39.2
			เฉลี่ย	48.6

หลังจากทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ จะได้สารผลิตภัณฑ์ P27 มีลักษณะเป็นของเหลวใส และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) จากผลการทดสอบพบว่าการแทนที่ด้วยหมู่ allyl ลงไปบนวงอะโรมาติก ดังแสดงในภาพ 3.3

ภาพ 3.3 ^1H NMR สเปกตรัมของ 3-allylanisole ใน CDCl_3



ภาพ 3.4 ปฏิกิริยา demethylation ในการสังเคราะห์ 4-allylphenol

ในการทำปฏิกิริยา demethylation นั้นจะต้องอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาและสภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง โดยได้ทำการศึกษการสังเคราะห์วิธีต่างๆ จากเอกสารอ้างอิง ดังแสดงในตาราง 3.2 โดยปกติตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้จะเป็นกรดลิวอิส หรือเบสลิวอิส เช่น aluminum chloride ($AlCl_3$) หรือ sodium ethanethiolate ($NaSEt$) [1] โดยได้ทดลองใช้ $AlCl_3$ ในกรดชนิดต่างๆ (วิธีที่ 1-3) และได้ทดลองใช้เบสลิวอิส (วิธีที่ 11) ปรากฏว่าไม่สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ หรือได้สารที่มีลักษณะเป็นของผสมที่ไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ ดังนั้นจึงได้ปรับสภาวะการทดลองโดยใช้ Lithium chloride/*N,N*-dimethylformamide ($LiCl$ -DMF) ร่วมกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ค่อนข้างจำเพาะเจาะจงต่อการกำจัดหมู่เมทิลในเมทอกซี (วิธีที่ 4) [2,3] อย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยาดังกล่าวก็ไม่ประสบความสำเร็จเช่นเดียวกัน อาจจะเป็นเนื่องมาจากหมู่ฟังก์ชันแอลลิลในโครงสร้างที่รบกวนการทำปฏิกิริยา

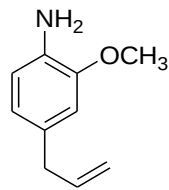
ต่อมาจึงได้ทดลองใช้ Trimethylsilyl chloride ($(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$) ใน pyridine (วิธีที่ 5) และ *tetra-n*-butylammonium bromide (TBAB) ในตัวทำละลายผสมของ 48% HBr/acetic acid (วิธีที่ 6) [4] ซึ่งยังคงไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ หรือการใช้โลหะโซเดียม ทั้งที่มีและไม่มี 1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctadecane (18-Crown-6) (วิธีที่ 7-8) [5] รวมถึงการใช้ iodicyclohexane (วิธีที่ 10) ก็ไม่ประสบความสำเร็จ และการใช้ NaSEt ก็ให้ของผสมจำนวนมากที่ไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ สุดท้ายได้ทดลองใช้ methyl magnesium iodide (MeMgI) ใน THF (วิธีที่ 9) [6] ผลปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์ 4-allylphenol ได้ผลผลิตร้อยละ 70 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า สามารถสังเคราะห์สารอนุพันธ์ P32 ได้ โดยมีรายละเอียดดังแสดงในตาราง 3.2

ตาราง 3.2 ปฏิกิริยา demethylation ในกาสังเคราะห์ 4-allylphenol

วิธี	รีเอเจนต์	ตัวทำละลาย	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (h)	Yield (%)
1	AlCl ₃	CH ₃ CN	0	24	NR
2	AlCl ₃	CH ₂ Cl ₂	0-35	24	NR
3	AlCl ₃	EtOAc	50	24	NR
4	LiCl	DMF	MW	72	NR
5	(CH ₃) ₃ SiCl	Pyridine	35	24	NR
6	TBAB	HBr/AcOH	reflux	24	NR
7	Na	THF/NH ₃	35	48	NR
8	Na/18-Crown-6	THE	35	24	NR
9	MeMgI	THF	reflux	24	70
10	Iodocyclohexane	DMF	reflux	48	NR
11	NaSEt	DMF	reflux	3	mixture

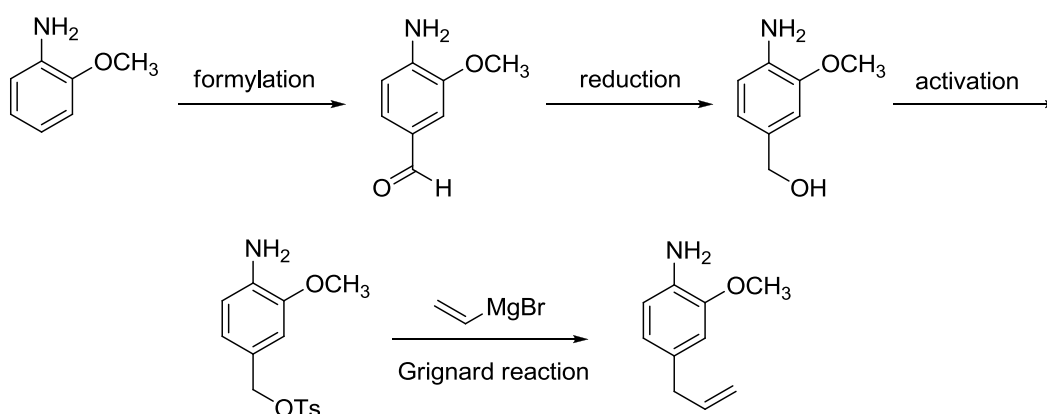
Note: NR = No reaction, MW = Microwave (100 W, 160 °C)

3.1.2 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่อะมิโน

	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	P30		
Name	4-allyl-2-methoxyaniline		

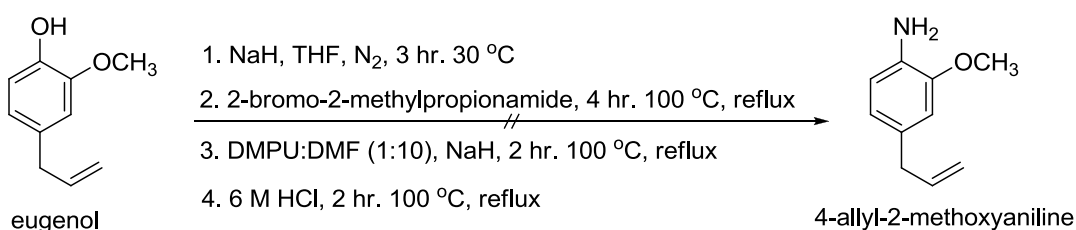
สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ ได้แก่ 4-allyl-2-methoxyaniline (P30) เป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่มีการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่อะมิโน เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bond donor) ได้ เช่นเดียวกับหมู่ไฮดรอกซี เช่น หมู่อะมิโน (อนุพันธ์ของอะนิลีน) เป็นต้น โดยยังคงหมู่แอลคิลและหมู่เมทอกซีภายในโมเลกุลไว้ และได้ทำการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยมีแนวทางในการสังเคราะห์ 2 วิธี โดยวิธีแรกจะใช้

o-anisidine เป็นสารตั้งต้น จะมีแนวทางการสังเคราะห์ดังแสดงในภาพ 3.5 โดยให้ทำปฏิกิริยา formylation เพื่อแทนที่หมู่ฟอรมิลลงบนวงเบนซีนแล้วรีดิวซ์หมู่แอลดีไฮด์ให้เป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นเปลี่ยนหมู่แอลกอฮอล์ให้เป็น leaving group ที่ดี แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยากับ vinyl magnesium bromide เกิดการแทนที่ด้วยหมู่ไวนิลจะได้ 4-allyl-2-methoxyaniline เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย อย่างไรก็ตามแนวทางนี้ไม่ได้ดำเนินการเนื่องจากมีวิธีการหลายขั้นตอน และแนวทางที่สองที่มีขั้นตอนน้อยกว่านั้นประสบความสำเร็จด้วยดี



ภาพ 3.5 แผนการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยใช้ *o*-anisidine เป็นสารตั้งต้น

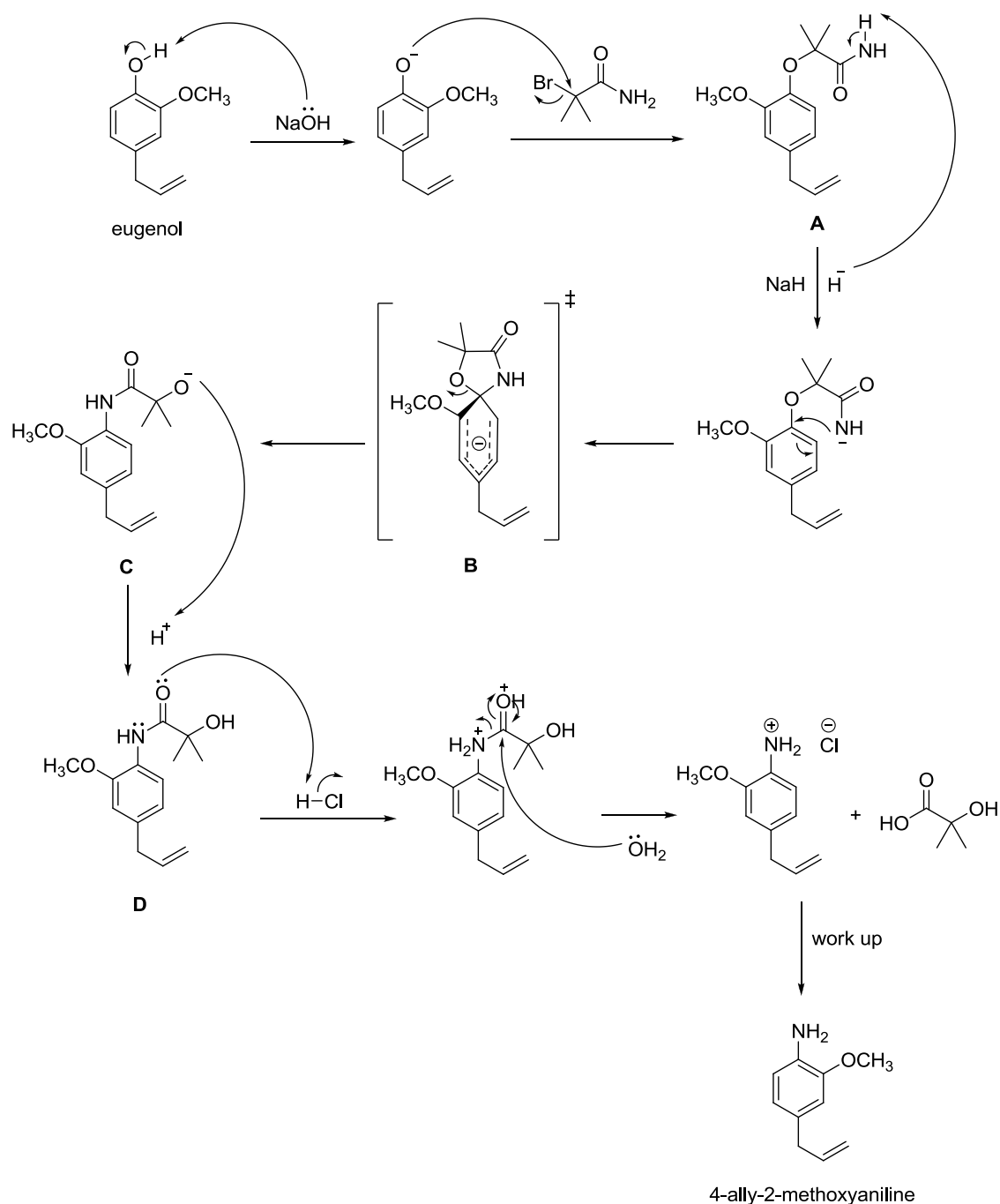
แผนการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline แนวทางที่สอง คือ การใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้น โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซีอะโรมาติกภายในวงแหวนเบนซีน โดยทำการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ให้เป็นหมู่อะมิโน (-NH₂) ซึ่งจากรายงานตามเอกสารอ้างอิงของ Carlo Bonini และคณะ [7] พบว่ามีปฏิกิริยาที่สามารถเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซีบนวงอะโรมาติกให้เป็นหมู่อะมิโนได้ในขั้นตอนเดียว นั่นคือการทำปฏิกิริยา Smiles rearrangement ดังแสดงในภาพ 3.6



ภาพ 3.6 แผนการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยปฏิกิริยา Smiles rearrangement โดยใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้น

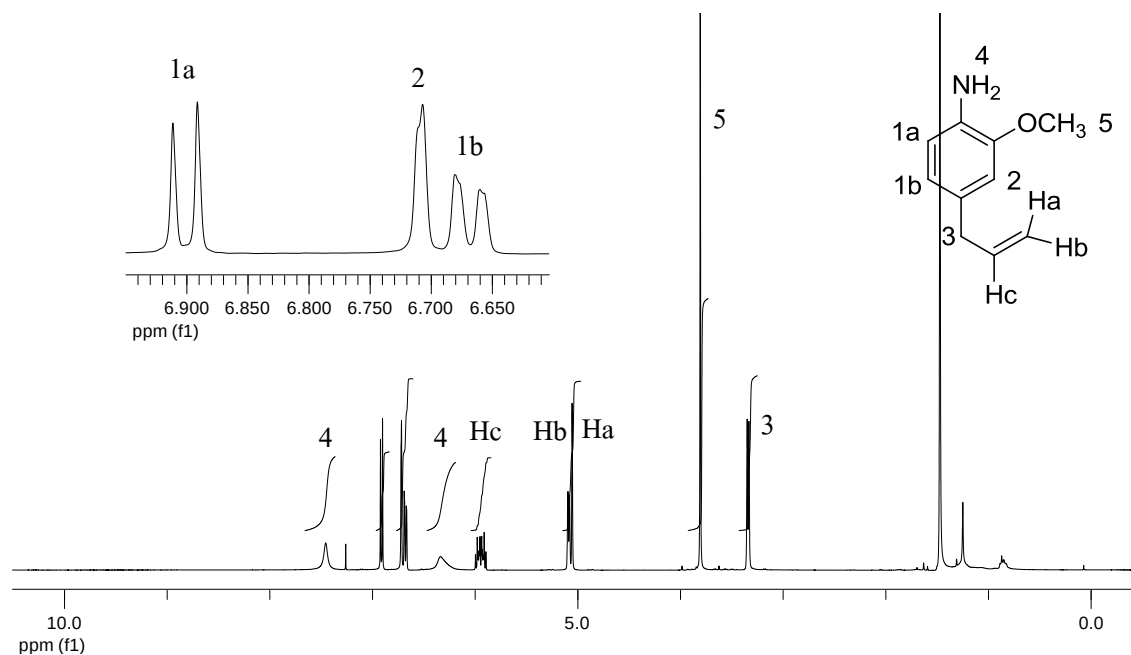
ดังนั้นจึงได้ทำการสังเคราะห์ตามวิธีของ Carlo Bonini และคณะ โดยใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้น ซึ่งในการทดลองเบื้องต้นพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาเป็นสารผลิตภัณฑ์ตามต้องการ จากนั้นจึงได้ทำการทดลองเปลี่ยนรีเอเจนต์ที่ใช้จากเบส NaH เป็นเบส NaOH จากผลการทดลองพบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ โดยเริ่มจากการละลายยูจีนอลใน

THF แล้วเติม NaOH ซึ่งอ้างอิงจากงานวิจัยของ Masahiro Mizuno และคณะ [8] ตามด้วยการเติม 2-bromo-2-methylpropionamide แล้วรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม DMPU:DMF ในอัตราส่วน 1:10 แล้วรีฟลักซ์ต่อที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมกรด 6 M HCl แล้วรีฟลักซ์ต่ออีกที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 4-allyl-2-methoxyaniline คิดเป็นร้อยละ 89.0 โดยทั้งหมดนี้เกิดขึ้นภายในภาชนะเดียวกัน (one-pot reaction) โดยปฏิกิริยา Smiles rearrangement ของยูจีนอลนี้มีกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังแสดงในภาพ 3.7



ภาพที่ 3.7 กลไกการเกิดปฏิกิริยา Smiles rearrangement ของ 4-allyl-2-methoxyaniline

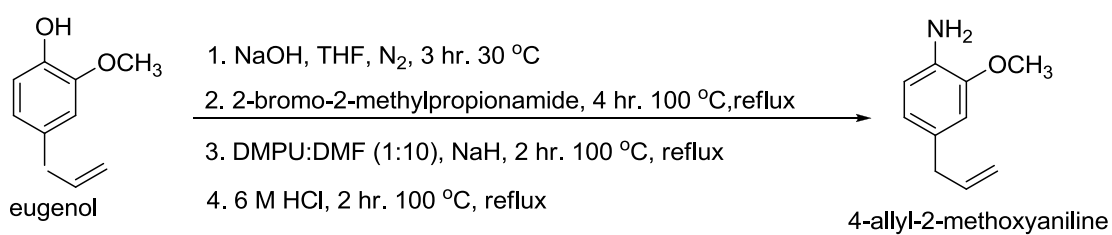
จาก ^1H NMR สเปกตรัมสามารถยืนยันโครงสร้างของ 4-allyl-2-methoxyaniline ที่ได้ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ดังแสดงในภาพ 3.8



ภาพที่ 3.8 ^1H NMR สเปกตรัมของ 4-allyl-2-methoxyaniline

ผลการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยใช้ปฏิกิริยา Smiles rearrangement แสดงผลดังตาราง 3.3 โดยทำการทดลองทั้งหมด 8 ครั้ง ได้ผลผลิตร้อยละ 30.5-89.0 คิดเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ 61.2

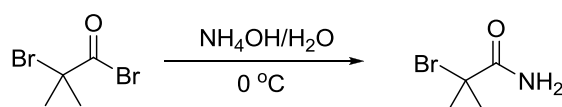
ตาราง 3.3 การสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยปฏิกิริยา Smiles rearrangement



ครั้งที่	จำนวนโมลของยูจีนอล (mmol)	ผลิตภัณฑ์ (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก
1	1.0	0.081	49.7
2	6.0	0.299	30.5
3	6.0	0.456	46.6
4	8.0	0.646	49.5
5	6.0	0.615	62.8
6	6.0	0.872	89.0

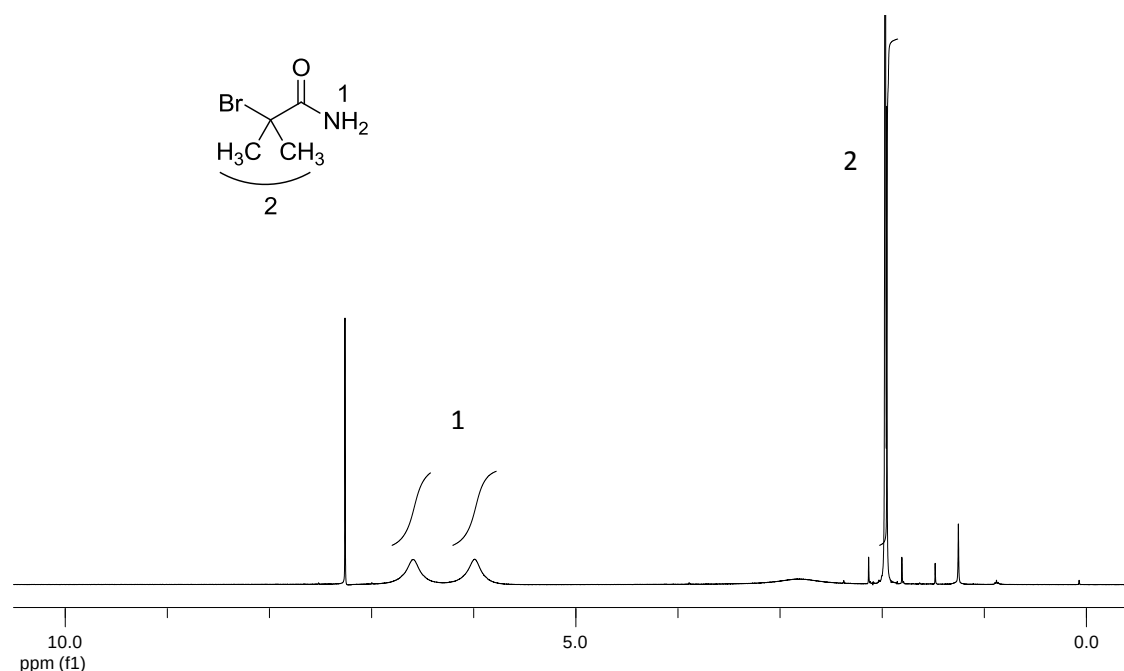
ครั้งที่	จำนวนโมลของยูจีนอล (mmol)	ผลิตภัณฑ์ (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก
7	6.0	0.795	81.2
8	6.0	0.785	80.2
		เฉลี่ย	61.2

เมื่อพิจารณาจากกลไกการเกิดปฏิกิริยา Smiles rearrangement จะเห็นว่ารีเอเจนต์ที่สำคัญตัวหนึ่งในปฏิกิริยา คือ 2-bromo-2-methylpropionamide ซึ่งเป็นสารที่มีราคาค่อนข้างแพง (4000 บาท/5 g) ดังนั้นจึงได้ทดลองเตรียม bromoacetamide และ 2-bromo-2-methyl propionamide เพื่อศึกษาว่าจะสามารถสังเคราะห์รีเอเจนต์ดังกล่าวขึ้นเองเพื่อใช้ทดแทนในปฏิกิริยาได้หรือไม่ โดยจะสังเคราะห์ 2-bromo-2-methylpropionamide ที่สามารถเตรียมได้จาก α -Bromoisobutyrylbromide (2100 บาท/100 g) ทำปฏิกิริยากับ NH_4OH ในตัวทำละลายน้ำ รายละเอียดแสดงดังภาพ 3.9 โดยได้ผลผลิตร้อยละ 70.1



ภาพที่ 3.9 การสังเคราะห์ 2-bromo-2-methylpropionamide

จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม สามารถยืนยันโครงสร้างของ 2-bromo-2-methylpropionamide ที่สังเคราะห์ได้ดังแสดงในภาพ 3.10



ภาพ 3.10 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 2-bromo-2-methylpropionamide

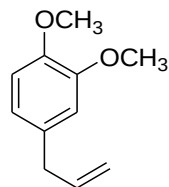
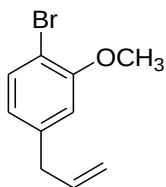
หลังจากนั้นจึงได้นำรีเอเจนต์ 2-bromo-2-methylpropionamide ที่สังเคราะห์ขึ้นเองมาใช้ในการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยวิธี Smiles rearrangement พบว่ารีเอเจนต์ที่สังเคราะห์ขึ้นเองนั้น สามารถนำมาใช้ทดแทนรีเอเจนต์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์โดยมีร้อยละของผลผลิตอยู่ระหว่าง 23.8-59.1 คิดเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ 42.3 ซึ่งได้ผลการทดลองแสดงในตาราง 3.5

ตาราง 3.5 การสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยใช้รีเอเจนต์ 2-bromo-2-methylpropionamide ที่สังเคราะห์ขึ้นมาเองในปฏิกิริยา Smiles rearrangement

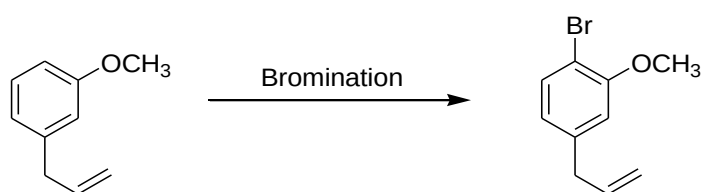
ครั้งที่	จำนวนโมลของยูจีนอล (mmol)	ผลิตภัณฑ์ (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก
1	6.0	0.229	23.4
2	10.0	0.964	59.1
3	10.0	0.724	44.4
		เฉลี่ย	42.3

เมื่อเปรียบเทียบการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline โดยใช้รีเอเจนต์ที่สั่งซื้อกับรีเอเจนต์ที่สังเคราะห์ขึ้นเองพบว่า เมื่อใช้ 2-bromo-2-methylpropionamide ที่สั่งซื้อมาจากบริษัท Aldrich จะได้ผลผลิตร้อยละของผลิตภัณฑ์เฉลี่ย 61.2 และเมื่อใช้ 2-bromo-2-methylpropionamide ที่สังเคราะห์ขึ้นเอง จะได้ผลผลิตร้อยละของผลิตภัณฑ์เฉลี่ย 42.3 ดังนั้นการใช้รีเอเจนต์ที่สังเคราะห์ขึ้นเองนั้น สามารถสังเคราะห์สารเป้าหมายได้ แม้ว่าผลผลิตร้อยละที่ได้จะน้อยกว่าในกรณีเมื่อใช้รีเอเจนต์ที่สั่งซื้อ อาจเป็นผลเนื่องมาจากขั้นตอนการสังเคราะห์รวมทั้งการทำให้บริสุทธิ์ อาจมีสิ่งเจือปนอยู่ จึงทำให้ได้ผลผลิตร้อยละน้อยลง แต่เพื่อลดต้นทุนในการสังเคราะห์สาร การใช้รีเอเจนต์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาเองนั้นสามารถนำมาใช้ทดแทนในการสังเคราะห์ 4-allyl-2-methoxyaniline ได้

3.1.3 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เมทอกซี คลอโรหรือโบรโม

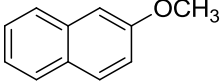
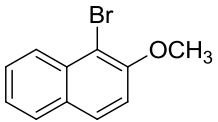
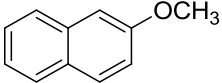
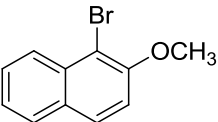
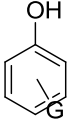
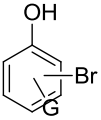
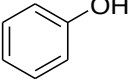
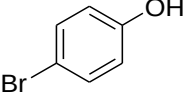
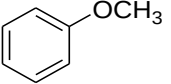
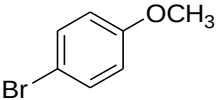
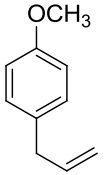
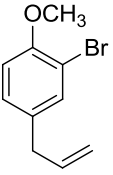
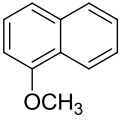
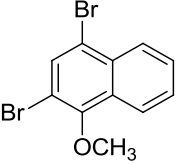
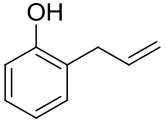
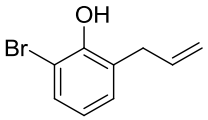
	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	P5	P28	
Name	Methyleugenol	4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene	

สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ได้แก่ methyleugenol (P5) และ 4-allyl-2-methoxyaniline (P28) เป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่มีการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เมทอกซี และหมู่โบรโม เพื่อศึกษาผลของหมู่แทนที่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bond acceptor) ได้เช่นเดียวกับหมู่ไฮดรอกซี เช่น หมู่เมทอกซี หมู่โบรโม เป็นต้น โดยยังคงหมู่แอลลิลและเมทอกซีภายในโมเลกุลไว้ สำหรับการสังเคราะห์ methyleugenol จะขอกล่าวรายละเอียดการสังเคราะห์ในกลุ่มที่ 4 เพราะปฏิกิริยาการสังเคราะห์มีความคล้ายคลึงกัน ส่วนการสังเคราะห์ 4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene สามารถเริ่มจาก 3-allylanisole (P27) ที่ได้กล่าวรายละเอียดไปแล้วในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 1 โดยนำมาทำปฏิกิริยาโบรมิเนชัน ซึ่งจะเป็นการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมที่ตำแหน่งออร์โทของหมู่เมทอกซีด้วยโบรมีนอะตอมด้วยปฏิกิริยาโบรมิเนชัน ซึ่งจากการสืบค้นเอกสารอ้างอิง พบว่าการแทนที่โบรมีนอะตอมลงบนวงแหวนอะโรมาติกสามารถทำได้หลายวิธี ดังแสดงในภาพ 3.11 และตาราง 3.6



ภาพ 3.11 แนวทางการสังเคราะห์ 4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene

ตาราง 3.6 ตัวอย่างปฏิกิริยาโบรมิเนชันของสารประกอบอะโรมาติกจากการสืบค้นเอกสารอ้างอิง

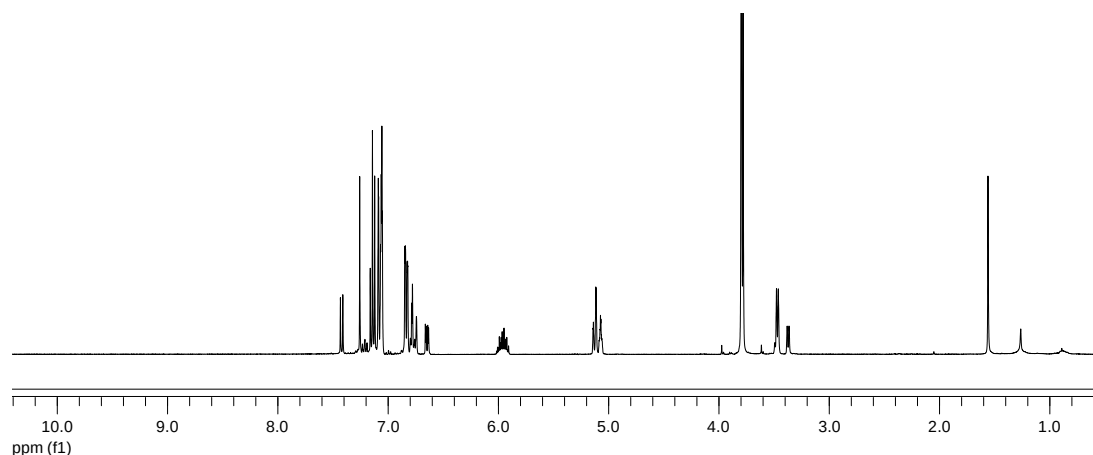
วิธี	สารตั้งต้น	สารผลิตภัณฑ์	รีเอเจนต์	% Yield	Ref
1			HBr, DMSO, RT, 2h	96	[9]
2			LiBr, CAN, MeCN, N ₂	98	[10]
3			NBS, MeCN, hv	100	[11]
4			PhCH ₂ Ph ₃ PHSO ₅ , KBr, MeCN, RT	92	[12]
5			NBS, pTsOH, MeCN, RT	95	[13]
6			5 mol% Bu ₄ NBr, HNO ₃	99	[14]
7			Py•HBr ₃ , Zn	94	[15]
8			Br ₂ , NaHCO ₃ , Methanol	33	[16]
9			NBS, ⁱ Pr ₂ NH, CH ₂ Cl ₂	86	[17]

และจากการศึกษาปฏิกิริยาโบรมิเนชันต่างๆ ตามเอกสารอ้างอิง จึงได้ทดลองโดยมีการปรับสภาวะและตัวทำละลาย ดังแสดงในตาราง 3.7 นี้

ตาราง 3.7 สภาวะที่ใช้ในการทดลองปฏิกิริยาโบรมิเนชันของ 3-allylanisole

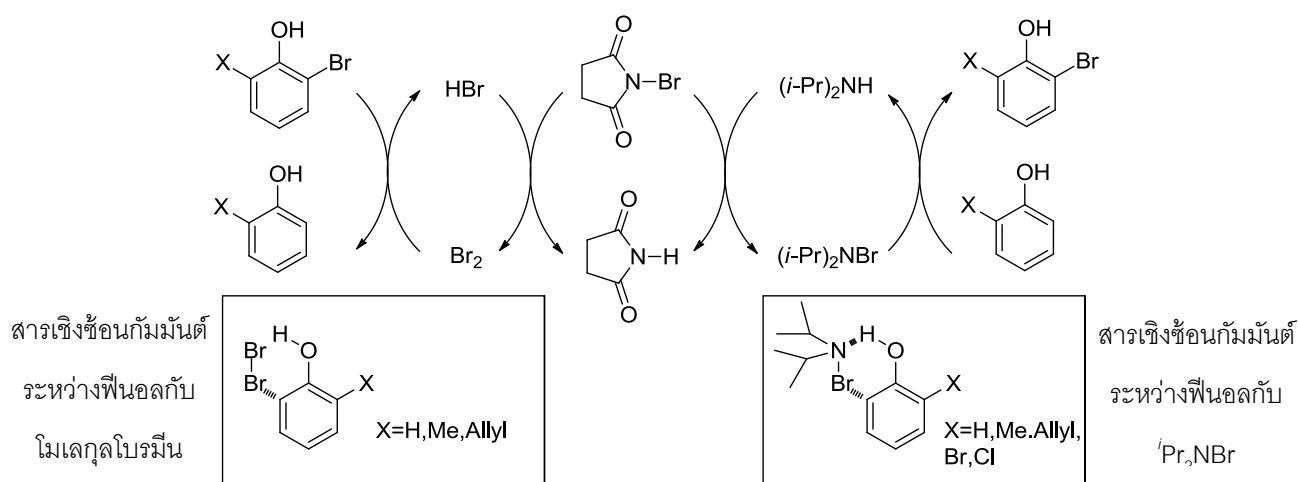
วิธี	รีเอเจนต์	สารเติมแต่ง	ตัวทำละลาย	สภาวะ	Ref	% Yield
1	NBS	-	DMF	N ₂ , 0 °C	[11]	-
2		-	MeCN	N ₂ , RT	[11]	-
3		-	THF	N ₂ , 0 °C	[11]	-
4		(<i>i</i> -Pr) ₂ NH	CH ₂ Cl ₂	0 °C	[17]	-
5		<i>p</i> -TsOH	MeCN	RT	[13]	-
6	HBr	-	DMSO	RT	[9]	-
7		CH ₃ COOH	DMSO	RT	[9]	-
8	Br ₂	FeCl ₃	MeCN	0 °C	-	-
9	Py•HBr ₃	Zn	-	RT ถึง 60 °C	[15]	54.6

จากตาราง 3.7 พบว่าวิธีที่ 1-3 จะใช้ NBS ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ dimethyl-formamide (DMF) acetonitrile (MeCN) และ tetrahydrofuran (THF) จากผลการทดลองพบว่า ไม่ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ ซึ่งคาดว่าในงานวิจัยนี้ใช้สารตั้งต้นเป็น 3-allylanisole ซึ่งต่างจากเอกสารอ้างอิง ซึ่งใช้ anisole ซึ่งเป็นสารอะโรมาติกอย่างง่าย เป็นสารตั้งต้น ในขณะที่ 3-allylanisole จะมีส่วนของหมู่ allyl ที่อาจเกิดการแทนที่ที่ตำแหน่ง benzyl (Ph-CH₂-R) หรือเกิดการเติมที่พันธะคู่ของหมู่แอลลิล ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่ยากต่อการทำให้บริสุทธิ์ ดังแสดงในตัวอย่างของ ¹H NMR สเปกตรัมของของผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวใน CDCl₃ ในภาพ 3.12



ภาพ 3.12 ตัวอย่าง ¹H NMR สเปกตรัมของของผสมใน CDCl₃

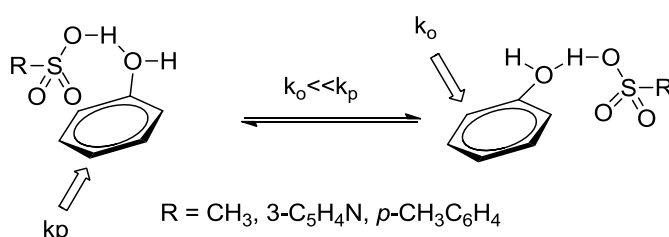
ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้สืบค้นเอกสารอ้างอิงเพิ่มเติม พบว่า Calo V. และคณะ [10] ได้ใช้ iso-propylamine เป็นสารเติมแต่ง เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแทนที่ของโบรมีนอะตอมที่ตำแหน่งออร์โทหมู่ไฮดรอกซีของอนุพันธ์ฟีนอล โดยใช้ NBS ร่วมกับ diisopropylamine จะเกิดเป็นสารมัธยันต์ *N*-bromo-*N*-isopropylpropane-2-amine ซึ่งสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างไนโตรเจนอะตอมกับหมู่ไฮดรอกซีบนวงอะโรมาติก ทำให้เกิดจีโอเมทรีที่เหมาะสมในการเกิดการแทนที่ของโบรมีนอะตอมที่ตำแหน่งออร์โท กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 3.13



ภาพ 3.13 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชันโดยใช้ diisopropylamine เป็นสารเติมแต่ง [10]

โดยตามรายงานจากเอกสารอ้างอิง สามารถสังเคราะห์ได้ผลิตภัณฑ์ได้ถึงร้อยละ 86 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ประยุกต์ใช้วิธีนี้ในการสังเคราะห์สารเป้าหมาย (วิธีที่ 4) แต่พบว่าปฏิกิริยาดังกล่าวไม่ประสบความสำเร็จ ทั้งนี้คาดว่าสารตั้งต้นที่ใช้เป็นอนุพันธ์ของอะนิโซล ซึ่งมีหมู่เมทอกซี ($-\text{OCH}_3$) แทนหมู่ไฮดรอกซี ($-\text{OH}$) ทำให้ไม่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ดังกลไกที่แสดง จึงไม่เกิดผลิตภัณฑ์ตามต้องการ

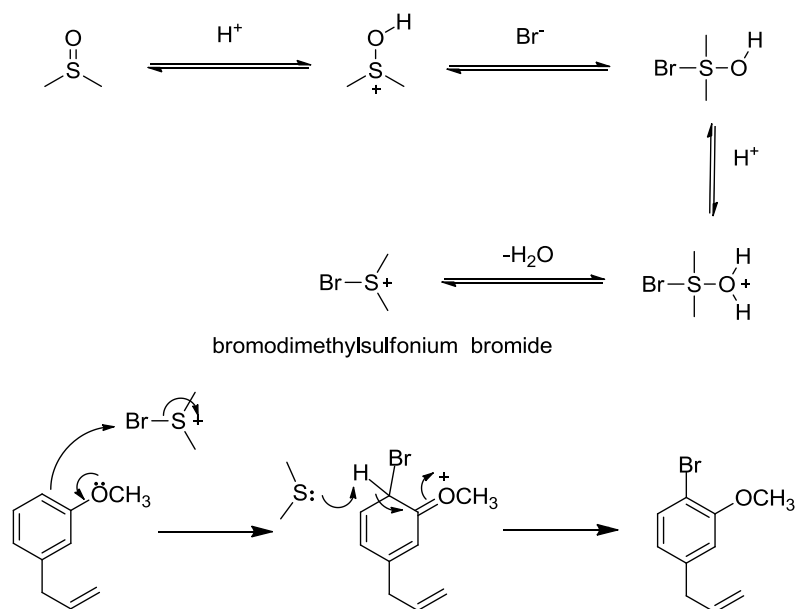
ในขณะเดียวกัน Bovonsombat P. และคณะ [18] ได้รายงานการใช้ *p*-toluenesulfonic acid ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์เป็นสารเติมแต่งเพื่อทำให้เกิด regioselectivity ของปฏิกิริยาโบรมิเนชันที่ตำแหน่งพารามากกว่าตำแหน่งออร์โทโดยอาศัยผลความเกะกะ (steric effect) แสดงดังภาพ 3.14 อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองตามวิธีที่ 5 พบว่าปฏิกิริยาดังกล่าวไม่ประสบความสำเร็จ เช่นเดียวกับวิธีที่ 4



ภาพ 3.14 แสดงการเลือกเข้าของโบรมีนบนวงอะโรมาติก โดยใช้ *p*-toluenesulfonic acid เป็นสารเติมแต่ง

หลังจากไม่สามารถสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมายด้วยการใช้ NBS เป็นรีเอเจนต์ ผู้วิจัยจึงทดลองใช้กรดไฮโดรโบรมิก (HBr) และ DMSO เป็นรีเอเจนต์ (วิธีที่ 6) ตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง

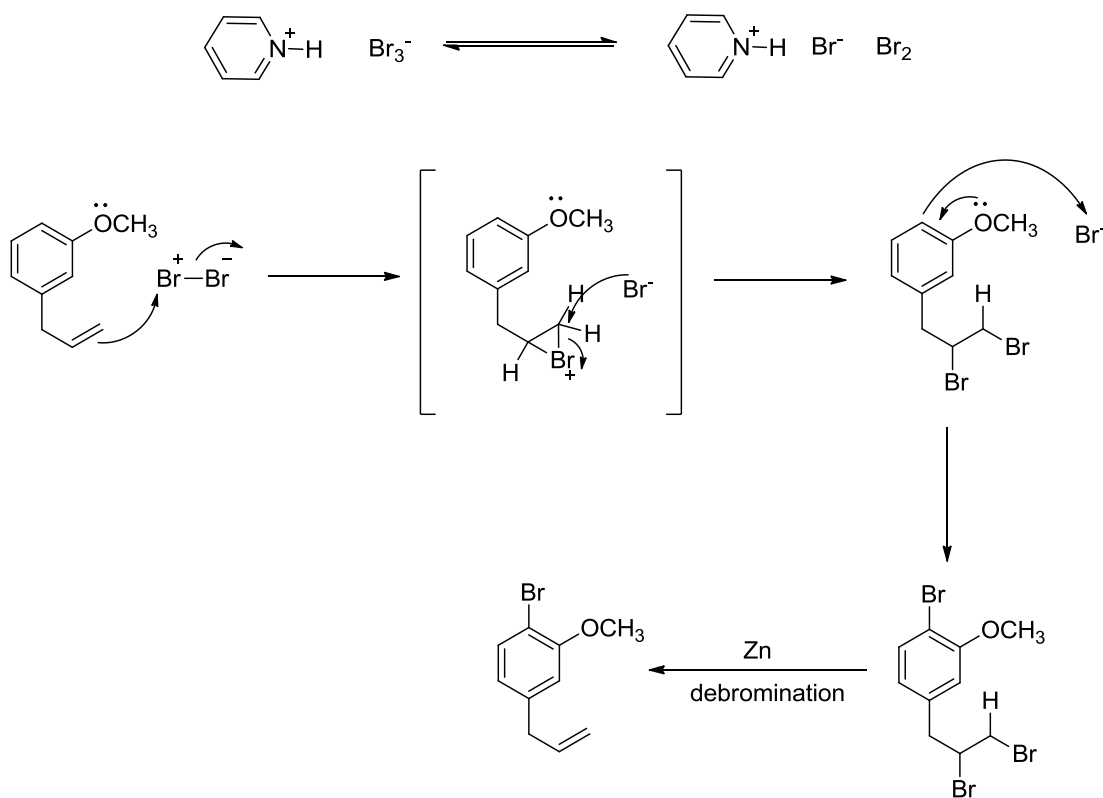
จากเอกสารอ้างอิง [11] พบว่ามีการแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชันของสารประกอบโดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดผ่านสารมัธยันต์ dimethylsulfonium bromide ดังภาพ 3.15



ภาพ 3.15 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชัน ผ่าน bromodimethylsulfonium bromide

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลอง พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาตามต้องการ ซึ่งอาจเกิดจากสภาวะที่ใช้กรดไม่เพียงพอต่อการเกิดสารมัธยันต์ดังกล่าว จึงได้ปรับสภาวะโดยการเติมกรดอะซิติก (HOAc) เพิ่ม (วิธีที่ 7) ซึ่งเอกสารอ้างอิงรายงานว่าจะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้น [11] แต่พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาเช่นเดียวกับวิธีที่ 6 โดยวิธีนี้อาจจะไม่เหมาะสม เนื่องจากว่าในกรณีที่มีหมู่แอลคิลภายในโมเลกุลอาจจะเกิดปฏิกิริยาการเติมแข่งขันได้ ต่อมาผู้วิจัยจึงได้ทดสอบปฏิกิริยาโบรมิเนชันด้วยวิธีมาตรฐาน คือ ใช้โบรมีน (Br_2) และมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น FeBr_3 แต่ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ใช้ FeCl_3 ใน acetonitrile แทน (วิธีที่ 8)

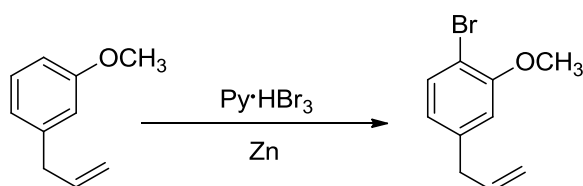
ในทำนองเดียวกับวิธีที่ 1-7 พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาตามต้องการ ต่อมาผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองโดยใช้ pyridinium hydrobromide perbromide ($\text{Py}^+\text{HBr}^+\text{Br}_2^-$; PHP) และกรดอะซิติกเป็นรีเอเจนต์ตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง [17] สารมัธยันต์นี้สามารถเข้าสู่สมดุได้อย่างรวดเร็วและเป็นของแข็ง สามารถให้ผลิตภัณฑ์ได้ร้อยละ 54.6 โดยพบว่าในขั้นแรกจะได้สารมัธยันต์ที่มีการเติมโบรมีนลงไปที่พันธะคู่ และการแทนที่ไปที่วงอะโรมาติก ดังนั้นจึงต้องทำขั้นตอนที่ 2 ที่ทำปฏิกิริยา debromination โดยใช้ Zn เป็นรีเอเจนต์ จึงจะได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพ 3.16



ภาพ 3.16 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชัน ผ่าน pyridinium hydrobromide perbromide

ปฏิกิริยาการเตรียม 4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene จากรายงานเอกสารอ้างอิง [17] ได้ผลแสดงดังตาราง 3.8 โดยจะได้ผลผลิตเฉลี่ยร้อยละ 47.6

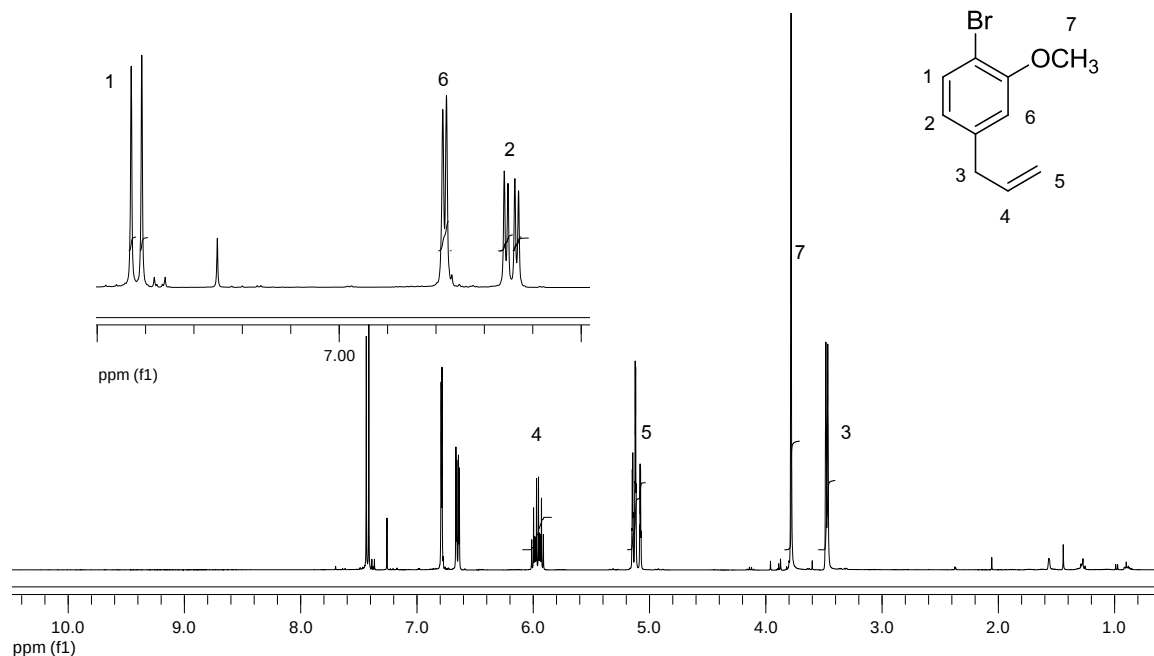
ตาราง 3.8 แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชัน (Bromination)



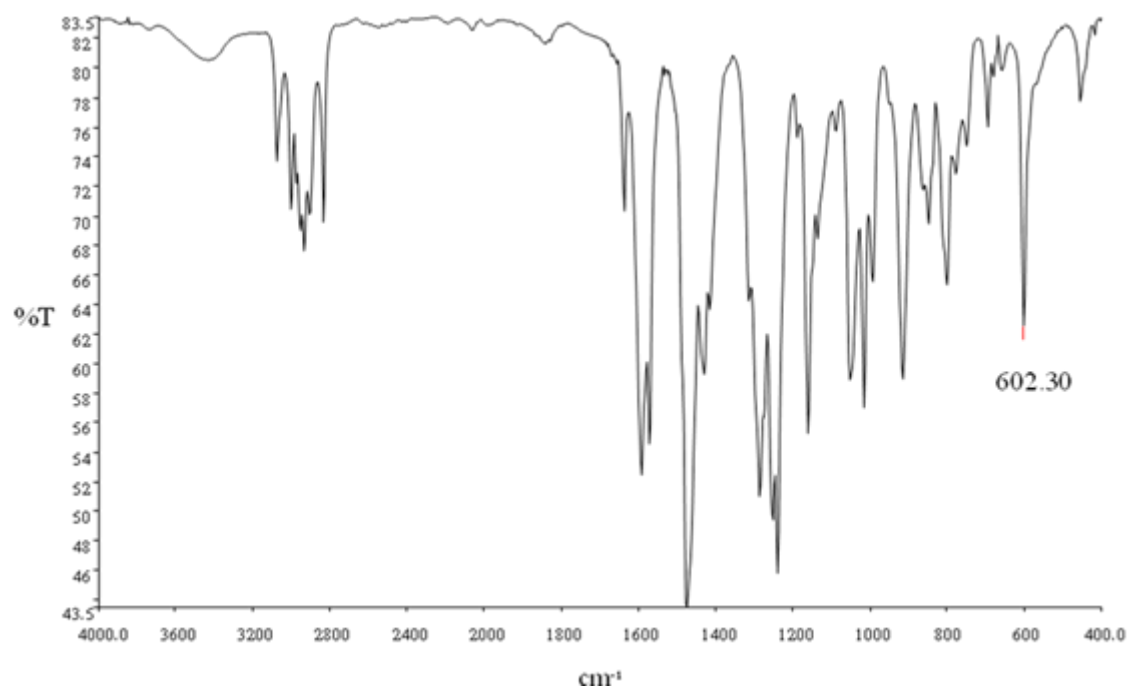
ครั้งที่	จำนวนโมล 3-allylbromide	จำนวนโมล Py·HBr ₃	จำนวนโมล Zn	น้ำหนัก ผลิตภัณฑ์	ร้อยละของ ผลิตภัณฑ์ที่ได้
1	5.9x10 ⁻³	5.9x10 ⁻³	6.0 x10 ⁻³	0.12	9.1*
2	3.5x10 ⁻³	3.5x10 ⁻³	3.6x10 ⁻³	0.32	40.6
3	2.1x10 ⁻³	2.1x10 ⁻³	2.2x10 ⁻³	0.26	54.6
				เฉลี่ย	47.6

*ไม่ได้นำมาคิดในร้อยละของผลิตภัณฑ์เฉลี่ยที่ได้เนื่องจากเกิดความผิดพลาดระหว่างการทดลอง

หลังจากทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) จากผลการทดสอบพบว่าการแทนที่ด้วยหมู่โบรมีนลงไปบนวงอะโรมาติกจริง ดังแสดงในภาพ 3.17



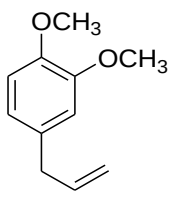
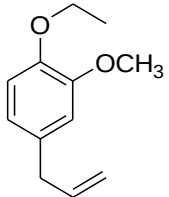
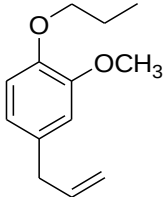
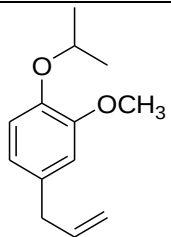
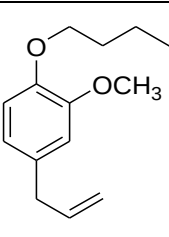
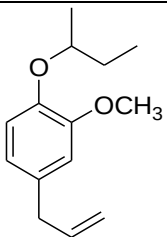
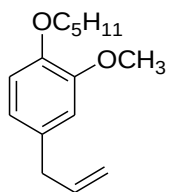
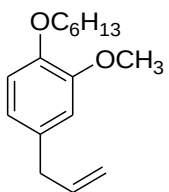
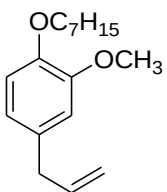
ภาพ 3.17 ^1H NMR สเปกตรัมของ 4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene ใน CDCl_3



ภาพ 3.18 IR spectrum ของ 4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene

นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันการเข้าแทนที่ของหมู่โบรมิบนวงอะโรมาติกของ 4-allyl-1-bromo-2-methoxybenzene จาก IR spectroscopy ซึ่งโดยปกติพันธะ C-Br จะปรากฏสัญญาณที่เลขคลื่น $650-511\text{ cm}^{-1}$ (C-Br stretching) และจากสเปกตรัมพบว่าเกิดสัญญาณของ C-Br stretching ที่เลขคลื่น 602.30 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับการพิจารณาโครงสร้าง 4-allyl-1-brom-2-methoxybenzene แสดงดังภาพ 3.18

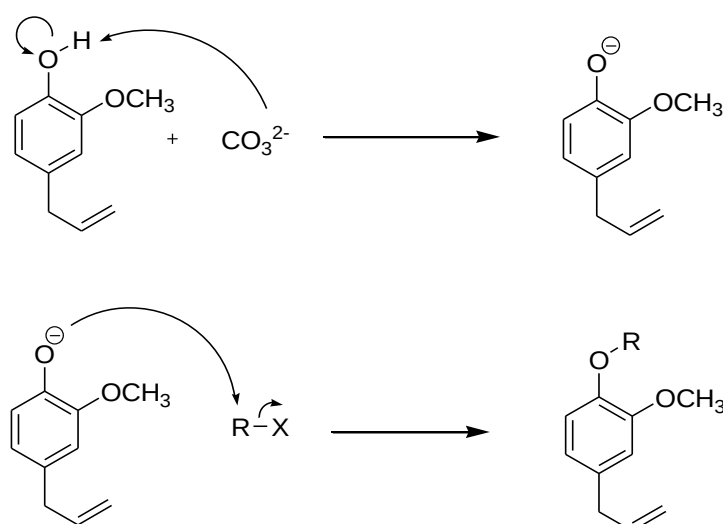
3.1.4 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่แอลคอกซี

	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	P5	P6	P7
Name	Methyleugenol	Ethyleugenol	Propyleugenol
โครงสร้าง			
Code	P8	P13	P10
Name	Isopropyleugenol	Butyleugenol	Sec-Butyleugenol
โครงสร้าง			
Code	P9	P11	P12
Name	Pentyleugenol	Hexyleugenol	Heptyleugenol

สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ได้แก่ methyleugenol (P5) ethyleugenol (P6) propyleugenol (P7) isopropyleugenol (P8) butyleugenol (P13) sec-butyleugenol (P10) pentyleugenol (P9) hexyleugenol (P11) และ heptyleugenol (P12) ซึ่งเป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่มีการเปลี่ยนไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซีให้เป็นหมู่

ไฮโดรคาร์บอนที่มีขนาดยาวขึ้นเพื่อเพิ่มความเป็นไฮโดรโฟบิกในโมเลกุล เช่น หมูเมทิล เอทิล โพรพิล บิวทิล จนถึง เฮปทิล เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบไฮโดรโฟบิกจะมีผลต่อฤทธิ์การสลับอย่างไร

โดยได้ศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลที่มีการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซีให้เป็นหมู่แอลคอกซีโดยปฏิกิริยา o-alkylation โดยให้ทำปฏิกิริยากับแอลคิลเฮไลด์ ในตัวทำละลายและชนิดของเบสที่ต่างกันเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา o-alkylation กลไกการเกิดปฏิกิริยาแอลคิลเลชันแสดงดังภาพ 3.19



ภาพ 3.19 แผนการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลโดยปฏิกิริยา o-alkylation

เมื่อ R แทนหมู่แอลคิลชนิดต่างๆ ($-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, ..., $-\text{C}_7\text{H}_{15}$)

สำหรับสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจะใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้น ทำปฏิกิริยากับแอลคิลเฮไลด์ชนิดต่างๆ โดยมีเบสเป็นรีเอเจนต์ร่วมในตัวทำละลายชนิดต่างๆ และสภาวะที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตาราง 3.9

ตาราง 3.9 สภาวะในการทดลองและผลผลิตร้อยละของปฏิกิริยาแอลคิลเลชันของยูจีนอล

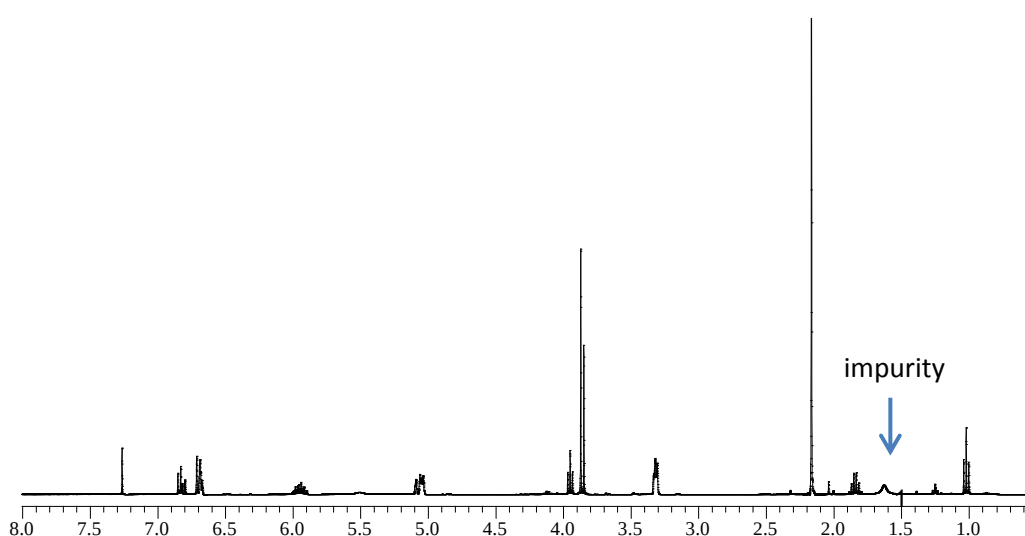
สภาวะ	ตัวเข้าทำปฏิกิริยา	เบส	ตัวทำละลาย	%yield
1	Methyl iodide	K_2CO_3	Acetone	46.0
2	Ethyl bromide	K_2CO_3	Acetone	42.4
3	Propyl bromide	K_2CO_3	Acetone	30.3
4	Propyl bromide	NaH	THF	ของผสม
5	Propyl bromide	NaOH	Methanol	ของผสม
6	Isopropyl bromide	K_2CO_3	Acetone	25.3
7	Isopropyl bromide	NaH	THF	ของผสม

สภาวะ	ตัวเข้าทำปฏิกิริยา	เบส	ตัวทำละลาย	%yield
8	Isopropyl bromide	NaOH	Methanol	ของผสม
9	Butylbromide	K ₂ CO ₃	Acetone	53.6
10	Isobutylbromide	K ₂ CO ₃	Acetone	17.8
11	Pentylbromide	K ₂ CO ₃	Acetone	56.0
12	Hexylbromide	K ₂ CO ₃	Acetone	61.2
13	Heptylbromide	K ₂ CO ₃	Acetone	62.3

สภาวะการทดลองที่แสดงในตาราง 3.9 แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่ 3-8 นั้นเป็นไปได้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาแอลคิลเลชันเพื่อให้ได้ผลผลิตร้อยละของผลิตภัณฑ์มากที่สุด ซึ่งผลที่ได้เอากมานั้นจะพบว่าในการใช้โพแทสเซียมคาร์บอเนตเป็นเบสและใช้อะซีโตนเป็นตัวทำละลายจะให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด

การเปรียบเทียบผลที่ได้จากการทดลองที่ 3-5 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแอลคิลเลชันของ propyl bromide พบว่าการใช้เบสเป็น K₂CO₃ และตัวทำละลายเป็นอะซีโตน (การทดลองที่ 3) จะให้ผลผลิตร้อยละของผลิตภัณฑ์สูงสุด และผลิตภัณฑ์หลังผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่ามีความบริสุทธิ์สูง ไม่มีสารอื่นปน แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสภาวะการทดลองอื่น (การทดลองที่ 4 และ 5) จะให้ผลผลิตร้อยละที่ต่ำกว่า และสารผลิตภัณฑ์ไม่ค่อยบริสุทธิ์ แม้ว่าจะผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีมาแล้ว

ส่วนการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการทดลองที่ 6-8 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแอลคิลเลชันของ isopropyl bromide พบว่าการใช้เบสเป็น NaOH และตัวทำละลายเป็นเมทานอล (การทดลองที่ 8) จะให้ผลผลิตร้อยละสูงสุดแต่สารผลิตภัณฑ์ที่ได้พบว่าไม่ค่อยบริสุทธิ์ สังเกตได้จาก NMR spectrum ที่มีพีคที่ไม่ใช่ของสารผลิตภัณฑ์ที่ปรากฏ

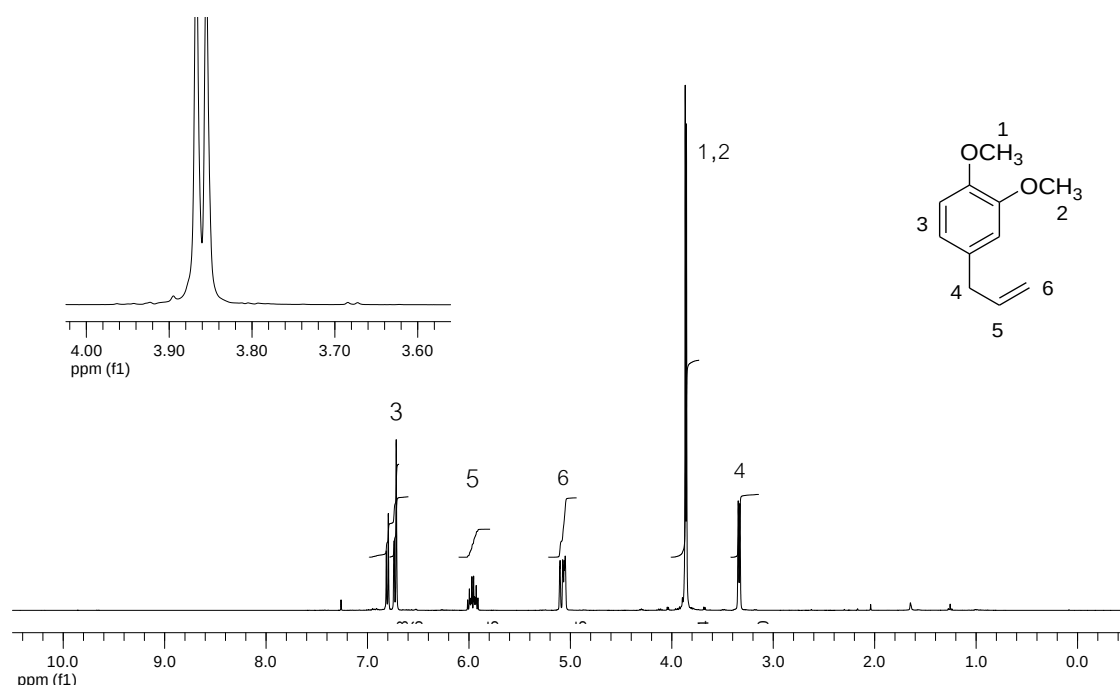


ภาพ 3.20 ¹H NMR สเปกตรัมของ propyleugenol ที่สังเคราะห์ได้โดยใช้ NaOH เป็นเบส

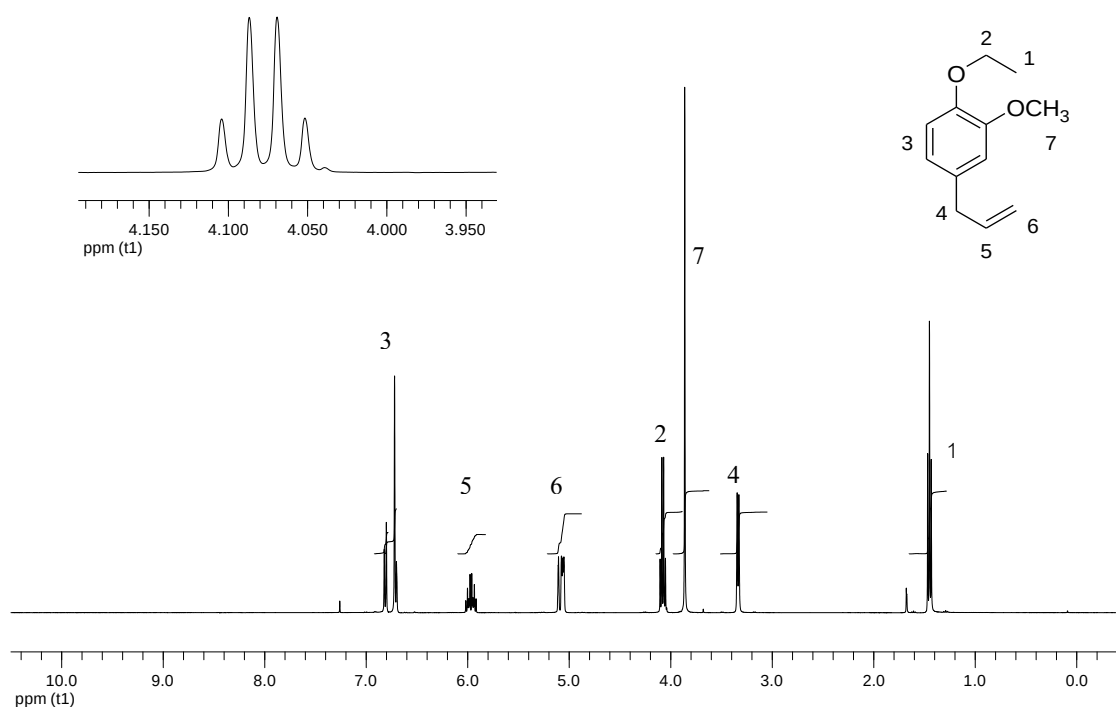
เช่นเดียวกับการใช้เบสเป็น NaH และ THF จะให้ผลผลิตร้อยละที่ต่ำกว่าและพบการปนเปื้อนของสารผลิตภัณฑ์ ส่วนสภาวะการทดลองที่ใช้เบสเป็น K_2CO_3 และอะซิโตนเป็นตัวทำละลาย แม้ว่าจะให้ผลผลิตร้อยละที่ต่ำกว่าแต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ ดังนั้นในการทดลองของปฏิกิริยาแอลคิลเลชันอื่นๆ จึงเลือกใช้สภาวะการทดลองที่มีเบสเป็น K_2CO_3 และอะซิโตนเป็นตัวทำละลาย

นอกจากนี้พบว่าปฏิกิริยาแอลคิลเลชันของหมู่แอลคิลที่เป็นโซ่ตรงจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีผลผลิตร้อยละสูงกว่าหมู่แอลคิลที่เป็นโซ่กิ่ง (เปรียบเทียบจากการทดลองที่ 3 กับ 6 และการทดลองที่ 9 กับ 10) ผลการทดลองที่ได้นี้อาจจะอธิบายได้จากผลของความเกะกะของหมู่แอลคิลที่เป็นโซ่กิ่งจึงทำให้การเข้าทำปฏิกิริยาเกิดขึ้นยากกว่า

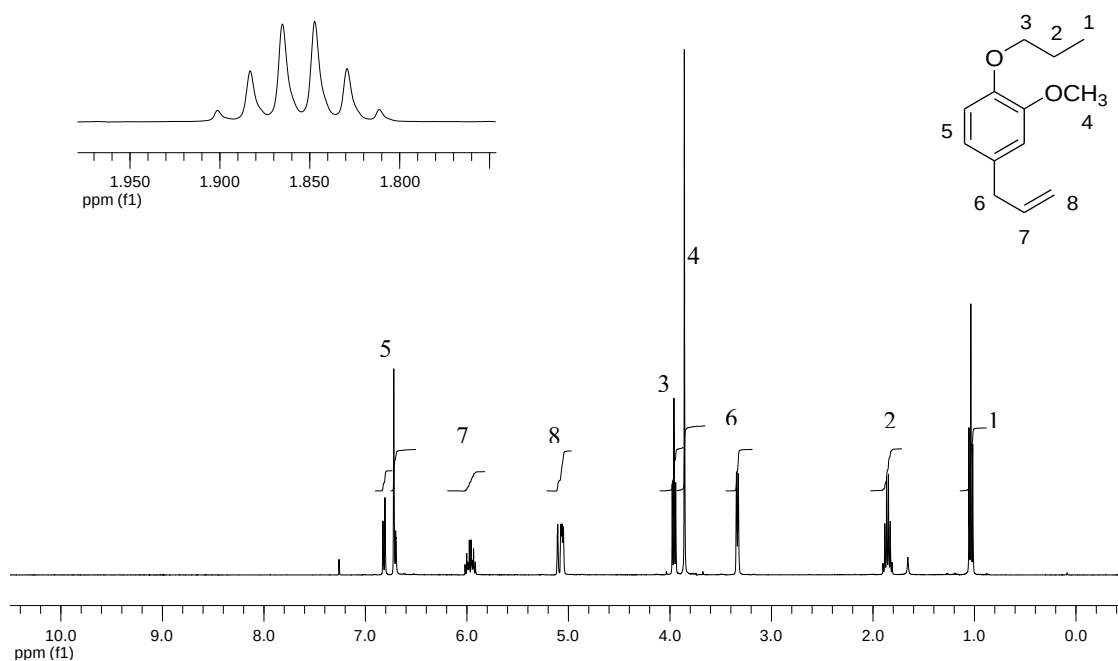
จากการศึกษาโครงสร้างของสารทั้งหมดที่ได้สังเคราะห์ด้วยวิธีเทคนิค Nuclear magnetic resonance (NMR) ออกมาจะพบว่าได้ผล 1H NMR สเปกตรัมสามารถยืนยันโครงสร้างของสารแต่ละตัวได้ดังนี้



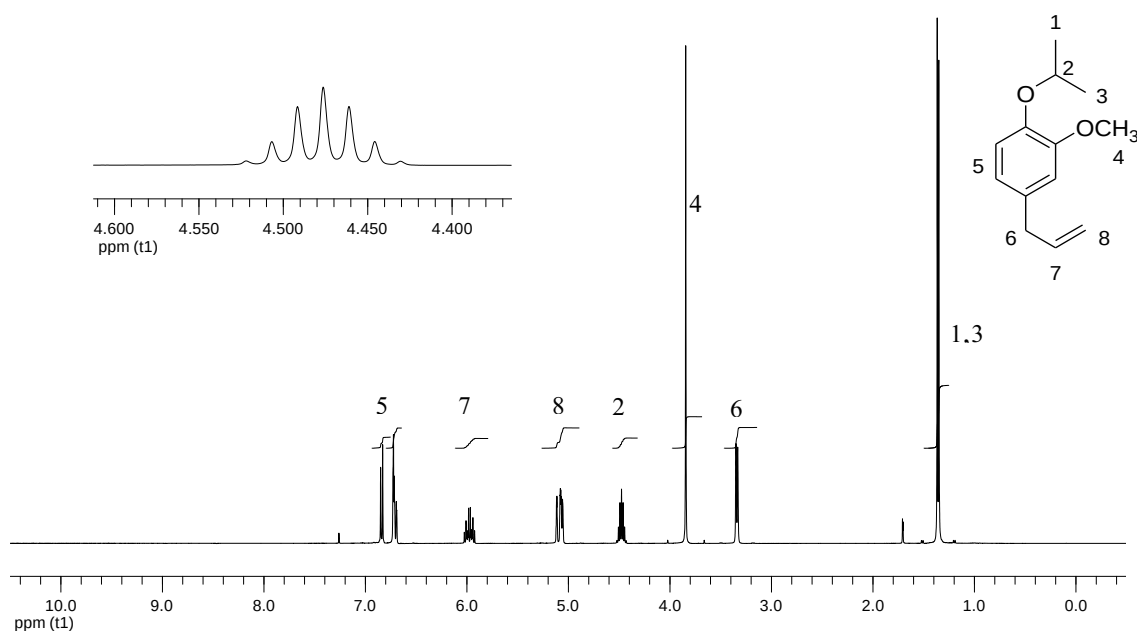
ภาพ 3.21 1H NMR สเปกตรัมของ methyleugenol ที่สังเคราะห์ได้



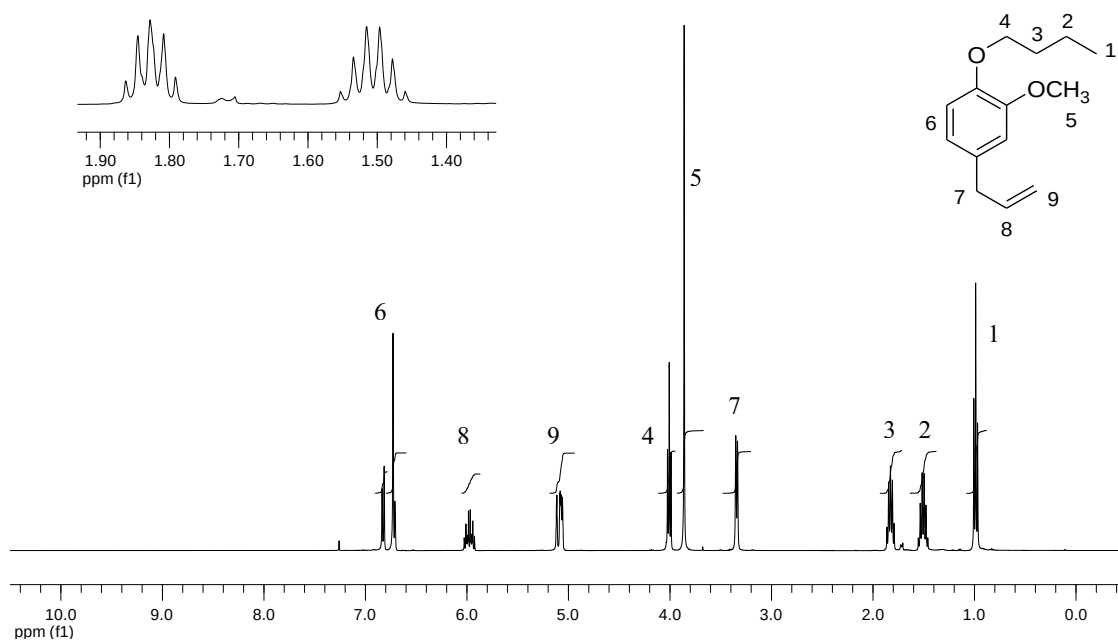
ภาพ 3.22 ^1H NMR สเปกตรัมของ ethyleugenol ที่สังเคราะห์ได้



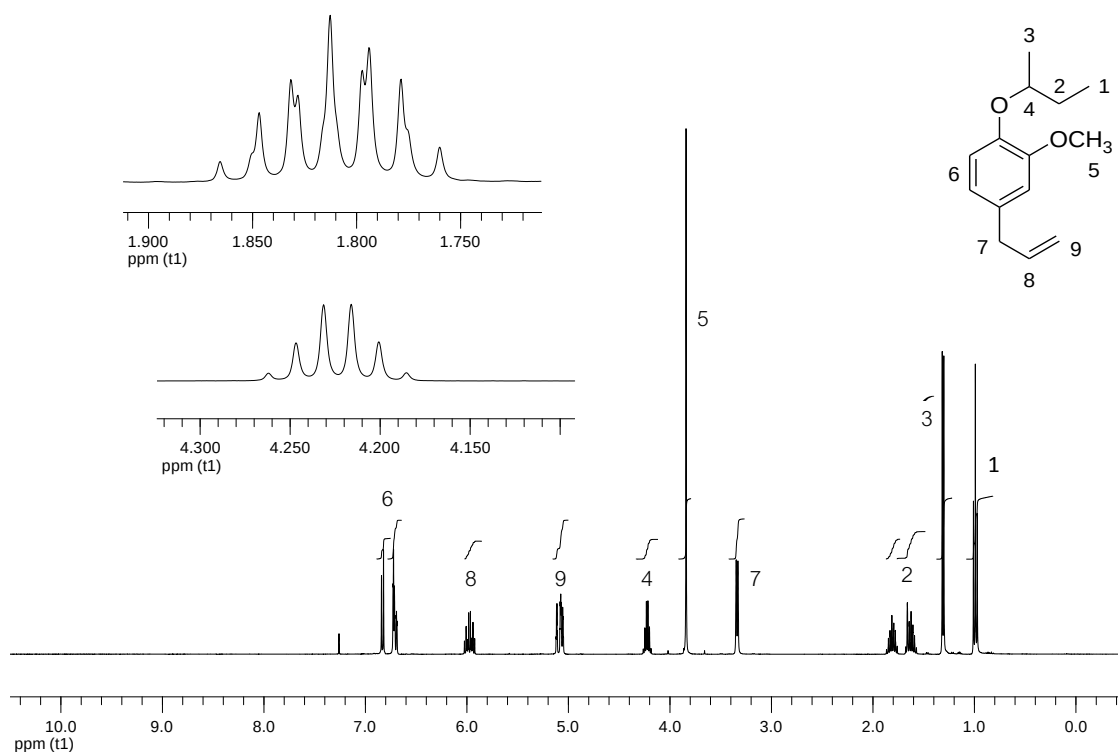
ภาพ 3.23 ^1H NMR สเปกตรัมของ propyleugenol ที่สังเคราะห์ได้



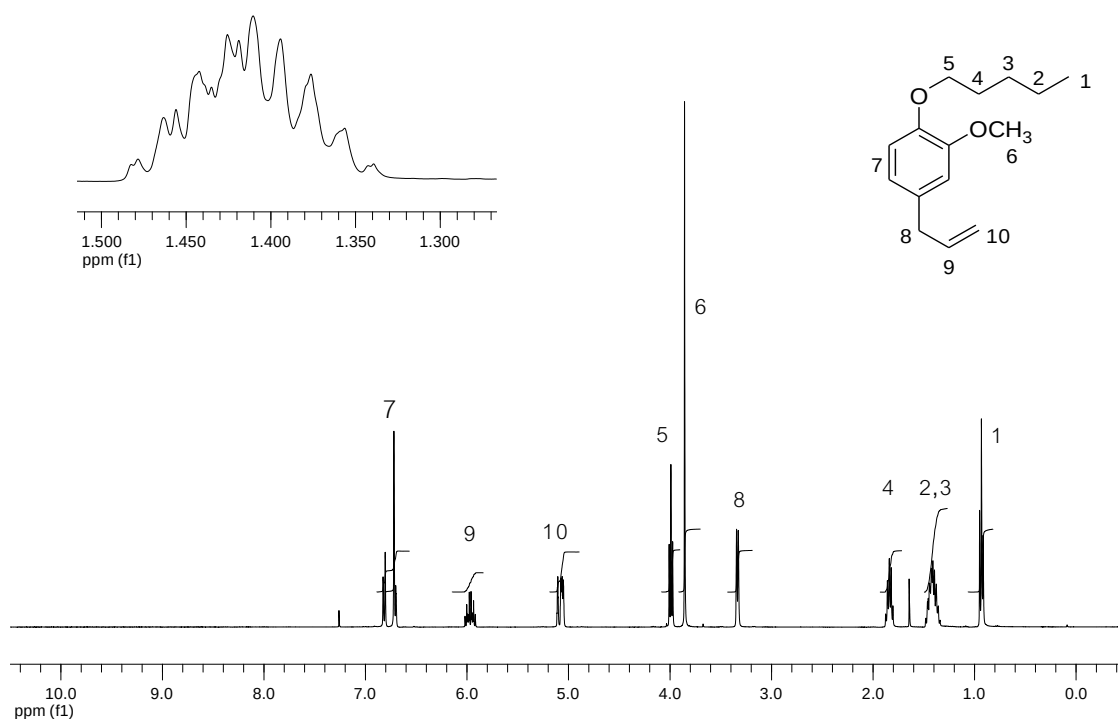
ภาพ 3.24 ^1H -NMR สเปกตรัมของ isopropyleugenol ที่สังเคราะห์ได้



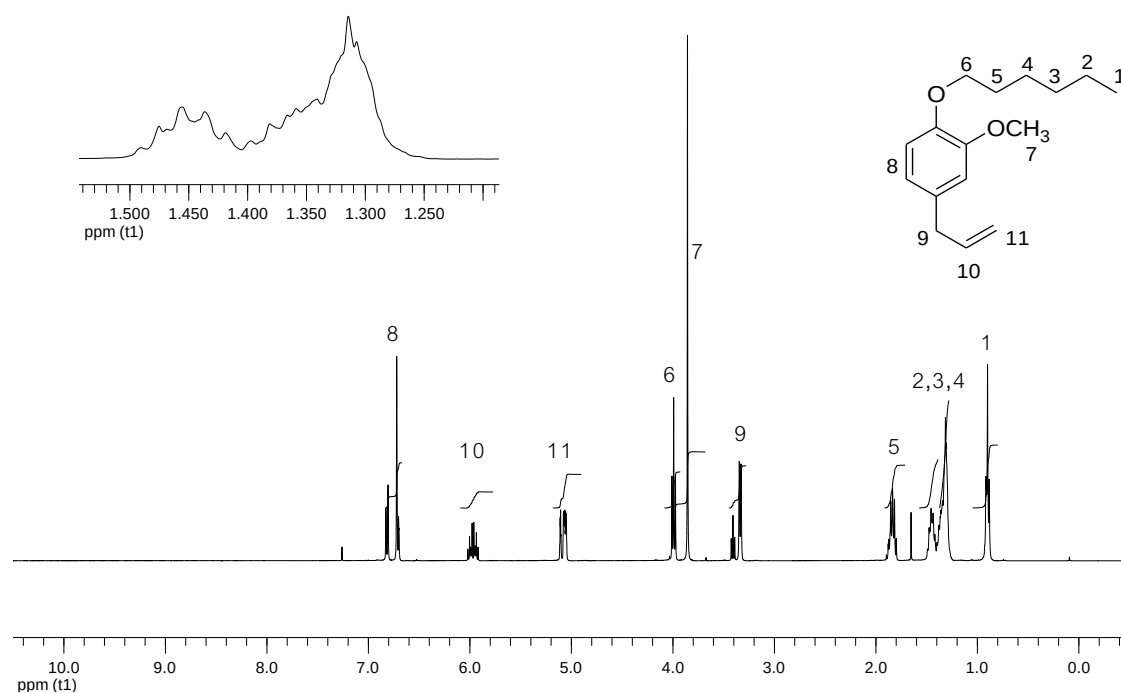
ภาพ 3.25 ^1H NMR สเปกตรัมของ butyleugenol ที่สังเคราะห์ได้



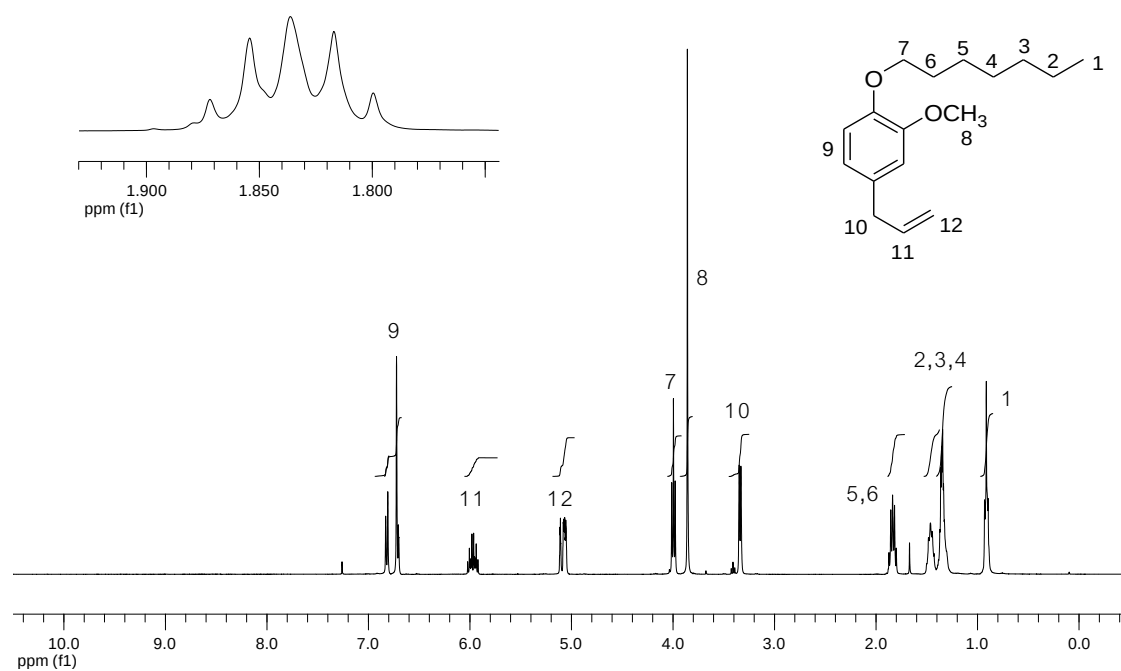
ภาพ 3.26 ^1H NMR สเปกตรัมของ sec-butyleugenol ที่สังเคราะห์ได้



ภาพ 3.27 ^1H NMR สเปกตรัมของ pentyleugenol ที่สังเคราะห์ได้

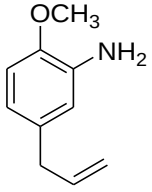
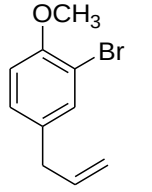


ภาพ 3.28 ^1H NMR สเปกตรัมของ hexyleugenol ที่สังเคราะห์ได้

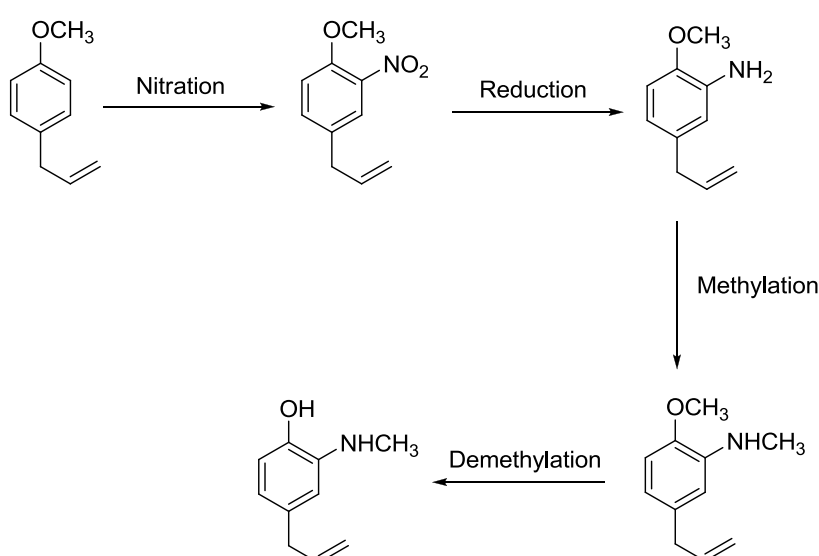


ภาพ 3.29 ^1H NMR สเปกตรัมของ heptyleugenol ที่สังเคราะห์ได้

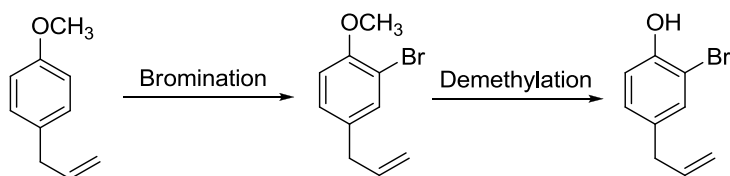
3.1.5 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 5 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ต่างๆ

	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	-	P29	
Name	5-allyl-2-hydroxy-N-methylaniline	4-allyl-2-bromophenol	

สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ได้แก่ 5-allyl-2-hydroxy-N-methylaniline และ 4-allyl-2-bromophenol (P29) ซึ่งเป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่มีการแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ เช่น หมู่อะมิโน และหมู่โบรโม เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบให้พันธะไฮโดรเจนหรือไฮโดรโฟบิกจะมีผลต่อฤทธิ์การสลายอย่างไร โดยได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล จากสารตั้งต้น 4-allylanisole โดย 5-allyl-2-hydroxy-N-methylaniline มีแนวทางการสังเคราะห์จากปฏิกิริยาไนเตรชัน จะได้สารประกอบไนโตร แล้วจากจากนั้นทำการเปลี่ยนหมู่ไนโตรไปเป็นหมู่เอมีนด้วยปฏิกิริยารีดักชัน แล้วจึงทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันได้สารประกอบเป็น N-methylaniline และในขั้นสุดท้ายจะทำปฏิกิริยาดีเมทิลเลชันได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น 5-allyl-2-hydroxy-N-methylaniline ส่วน 4-allyl-2-bromophenol สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาโบรมิเนชัน และปฏิกิริยาดีเมทิลเลชัน ซึ่งมีแผนการสังเคราะห์แสดงดังภาพ 3.30 และภาพ 3.31

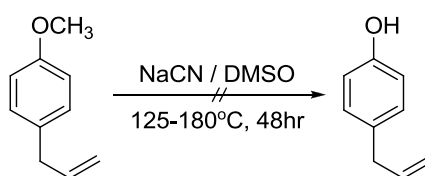


ภาพ 3.30 แผนการสังเคราะห์ 5-allyl-2-hydroxy-N-methylaniline



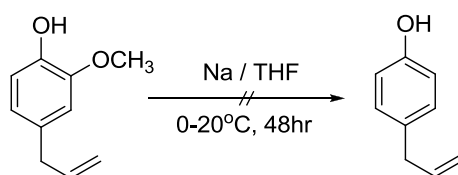
ภาพ 3.31 แผนการสังเคราะห์ 4-allyl-2-bromophenol

ในขั้นแรกนั้นได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนหมู่เมทอกซีของ 4-allylanisole ให้เป็นหมู่ไฮดรอกซีโดยใช้ปฏิกิริยาดีเมทิลเลชันตามรายงานจากเอกสารอ้างอิงของ Greene [19] ซึ่งแสดงปฏิกิริยาดังภาพ 3.32



ภาพ 3.32 ปฏิกิริยา Demethylation ของ 4-allylanisole

จากผลการทดลองปรากฏว่าปฏิกิริยาดีเมทิลเลชันของ 4-allylanisole ไม่ประสบความสำเร็จตามที่คาดหวัง แม้จะใช้สภาวะค่อนข้างรุนแรงที่อุณหภูมิประมาณ 180°C และใช้ระยะเวลาประมาณ 48 ชั่วโมงแล้วก็ตาม ในขั้นต่อมาจึงได้ลองเปลี่ยนแนวทางการสังเคราะห์โดยเริ่มจากยูจีนอล ทำปฏิกิริยากำจัดหมู่เมทอกซีอ้างอิงจากงานวิจัยของ Azzena และคณะ [20] ด้วยปฏิกิริยา demethoxylation ผ่านกลไกการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของโลหะ Na ในสารละลาย THF ปฏิกิริยาแสดงได้ดังภาพ 3.33

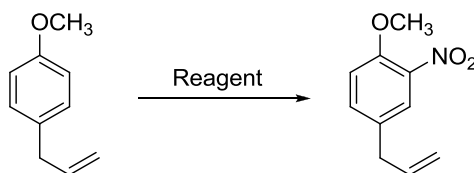


ภาพ 3.33 ปฏิกิริยา demethoxylation ของยูจีนอล

ผลปรากฏว่าปฏิกิริยาดีเมทอกซีเลชันของยูจีนอลก็ไม่ประสบความสำเร็จเช่นเดียวกับปฏิกิริยาดีเมทิลเลชัน ดังนั้นเพื่อเป็นการลดขั้นตอนในการสังเคราะห์ ผู้วิจัยจึงใช้ 4-allylanisole เป็นสารตั้งต้นโดยจะไม่มี การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของ 4-allylanisole จากหมู่เมทอกซีเป็นหมู่ไฮดรอกซี ทั้งนี้เนื่องจากพิจารณาเห็นว่าฤทธิ์การสลับเบี่ยงต้นของ methyleugenol นั้น ไม่ต่างจากยูจีนอลมากนัก โดยคาดว่าหมู่ไฮดรอกซี หรือ หมู่เมทอกซี ในโครงสร้างดังกล่าว ไม่น่าจะมีผลกระทบมากนักต่อการออกฤทธิ์เป็นยาสลับในสัตว์น้ำ ดังนั้นจึงคงหมู่เมทอกซีไว้ดังเดิมโดยจะนำ 4-allylanisole มาศึกษาการทำปฏิกิริยาไนเตรชันและปฏิกิริยาโบรมิเนชันต่อไป

ในการศึกษาปฏิกิริยา nitration ของ 4-allylanisole โดยได้ทดลองรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ ในสภาวะต่างๆ ตามที่ได้ศึกษาจากเอกสารอ้างอิง โดยมีรายละเอียดการทดลองแสดงดังตาราง 3.10

ตาราง 3.10 ปฏิกิริยาไนเตรชัน ที่ใช้ในการสังเคราะห์ในครั้งนี้ เมื่อใช้ 4-allylanisole เป็นสารตั้งต้น



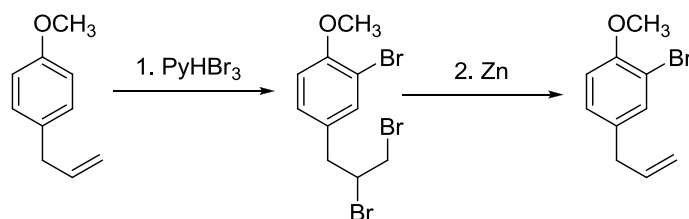
ลำดับ	รีเอเจนต์ / สภาวะ	ร้อยละผลผลิต	เอกสารอ้างอิง
1	Urea nitrate, AcOH / 60 °C, 24 h	NR	[15]
2	Ac ₂ O, HNO ₃ / 0 °C, 4 h	NR	[16]
3	H ₂ SO ₄ , HNO ₃ , Ac ₂ O / RT, 4 h	NR	[16]
4	TBAB, HNO ₃ / 20 °C, 4-6 h	NR	[16]
5	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O, CH ₂ Cl ₂ / 40 °C, 8 h (silica gel)	NR	[17]
6	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O, Al ₂ O ₃ , Toluene / 100 °C, 8 h	NR	[17]
7	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O, Toluene / 100 °C, 8 h	NR	[17]
8	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O, CH ₂ Cl ₂ / 40 °C, 8 h (MS4A)	NR	[17]

NR = No reaction

จากตาราง 3.10 พบว่าปฏิกิริยาไนเตรชันที่ใช้ urea nitrate เป็นรีเอเจนต์ โดยมีกรดอะซิติกเป็นตัวทำละลายนั้น อ้างอิงจากงานวิจัยของ Nitin และคณะ [21] ไม่ประสบผลสำเร็จตามที่คาดหวังจึงได้ศึกษาการทำปฏิกิริยาไนเตรชันด้วยวิธีใหม่ คือ วิธีที่ 2 3 และ 4 ซึ่งวิธีดังกล่าวจะใช้กรดไนตริกเป็นรีเอเจนต์ทั้งหมดร่วมกับสารชนิดอื่น ได้แก่ acetic anhydride, sulfuric acid, หรือ TBAB ตามลำดับ โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Joshi และคณะ [22] พบว่าไม่ประสบความสำเร็จตามที่คาดหวัง จึงได้ลองเปลี่ยนวิธีการทดลองใหม่โดยศึกษาปฏิกิริยาไนเตรชันอีกกลุ่มคือการใช้ Bi(NO₃)₃·5H₂O เป็นแหล่งให้หมู่ไนโตร โดยวิธีที่ 5 ใช้ CH₂Cl₂ เป็นตัวทำละลาย ที่อุณหภูมิ 40 °C ส่วนวิธีที่ 6 และ 7 จะใช้ toluene เป็นตัวทำละลาย โดยวิธีที่ 6 มีการใช้ Al₂O₃ เป็นรีเอเจนต์ร่วมด้วย โดยทั้งหมดอ้างอิงจากงานวิจัยของ Canales และคณะ [23] อย่างไรก็ตามก็พบว่ายังไม่สามารถเกิดผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ ทั้งนี้จะเนื่องมาจากสภาวะต่างๆ ดังกล่าวตามที่อ้างอิงจะกระทำกับสารตั้งต้นที่เป็นอนุพันธ์อย่างง่ายของฟีนอล ในขณะที่งานวิจัยนี้เริ่มต้นจาก 4-allylanisole ซึ่งคาดว่าส่วนของหมู่แอลลิล ซึ่งเป็น electron-rich region น่าจะมี

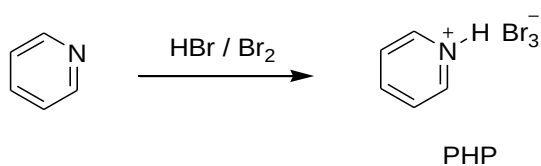
ผลกระทบทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาตามที่คาดหวัง หรืออาจจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่นๆ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาวิธีการสังเคราะห์ 4-Allyl-2-bromoanisole ด้วยปฏิกิริยาโบรมิเนชันแทน

ปฏิกิริยาโบรมิเนชัน ซึ่งใช้ในการสังเคราะห์ 4-Allyl-2-bromoanisole นั้นอ้างอิงการทดลองของ Chuen [24] โดยมีรูปแบบและขั้นตอนการเตรียมแสดงดังภาพ 3.34

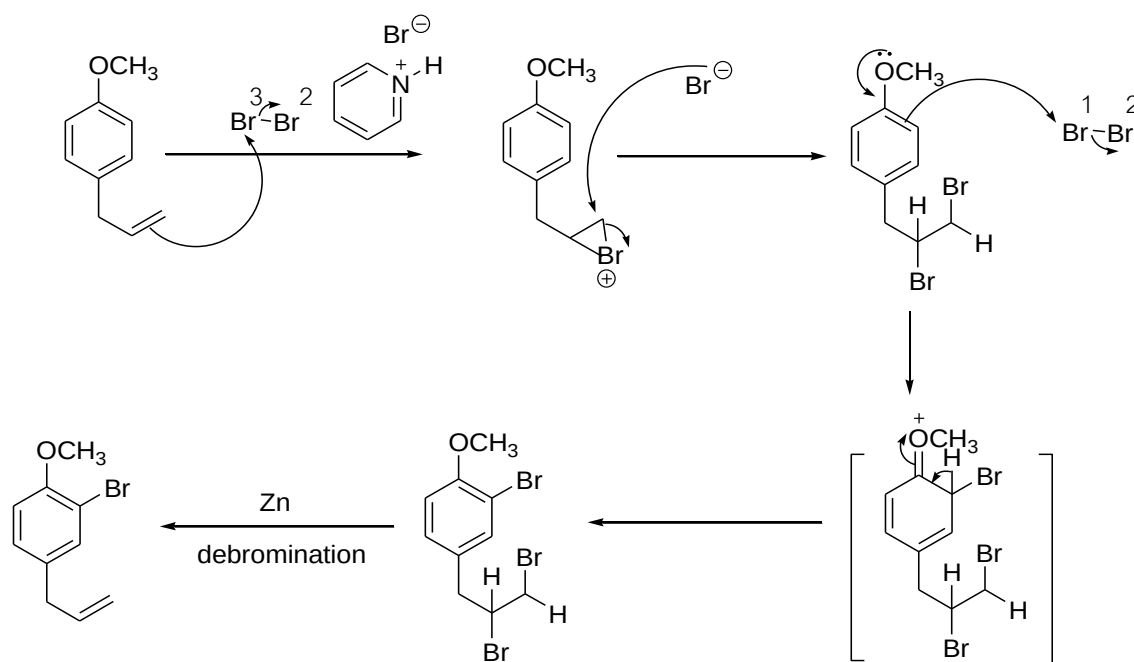


ภาพ 3.34 ปฏิกิริยาโบรมิเนชันของ 4-allylanisole

ในปฏิกิริยานี้จะใช้ pyridinium hydrobromide perbromide (PHP) เป็นแหล่งให้โบรมีน โดยสามารถเตรียมได้จากการนำกรดไฮโดรโบรมิกเติมลงในสารละลายไพริดีนที่สภาวะ 0 °C จากนั้นเติมโบรมีนลงไปจะได้ของแข็งสีเหลืองอมส้ม แล้วนำออกมาทำให้แห้ง ซึ่งการเตรียม Pyridinium hydrobromide perbromide แสดงดังสมการ

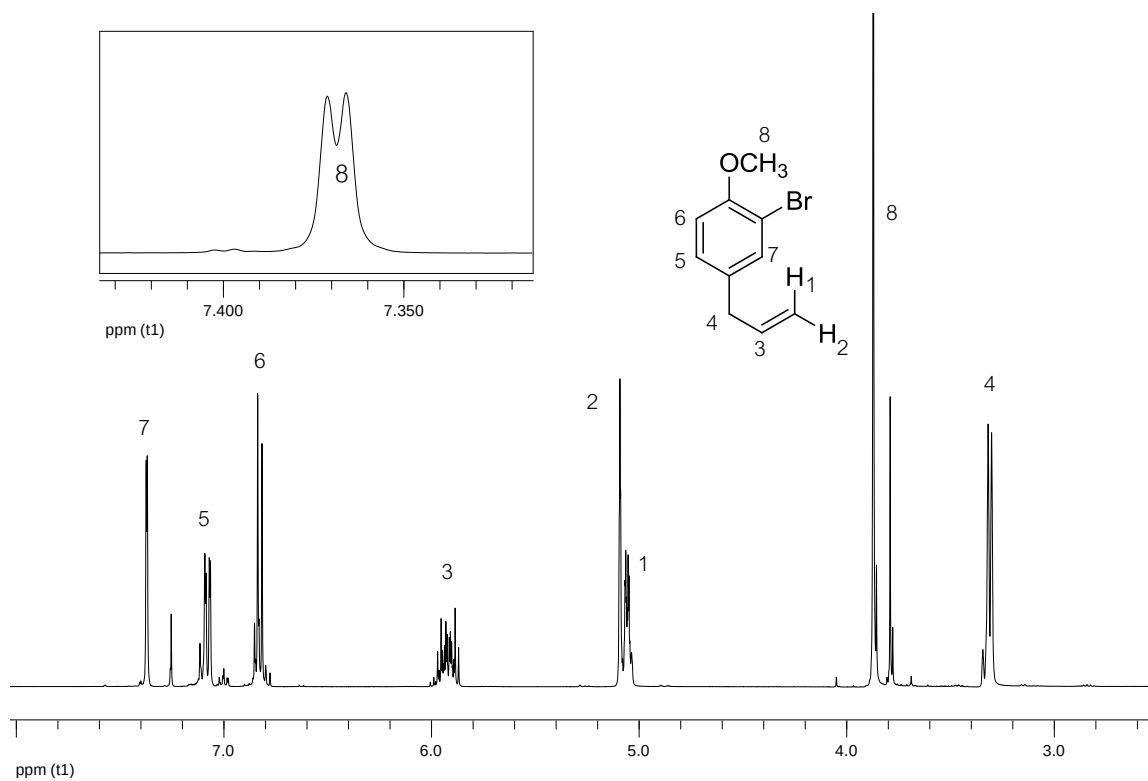


กลไกการเกิดปฏิกิริยาขั้นแรกจะเกิดการเติมโบรมีนที่ตำแหน่งพันธะคู่ แล้วจึงเกิดการแทนที่ด้วยโบรมีนบนวงแหวนเบนซีน ได้สารมัธยันต์ที่มีการเติมและการแทนที่ขึ้นก่อน ในขั้นตอนต่อมาจึงทำปฏิกิริยาด้วยโลหะสังกะสีในสารละลายไดเอทิลอีเทอร์ที่สภาวะรีฟลักซ์ที่ 35-40 °C ซึ่งจะเกิดการกำจัดโบรมีนที่ตำแหน่งพันธะคู่เดิม (debromination) ทำให้ได้พันธะคู่กลับมาได้ผลิตภัณฑ์เป็น 4-allyl-2-bromoanisole ตามที่ต้องการ โดยการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 3.35



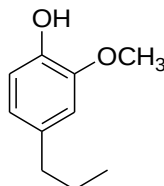
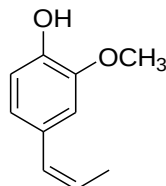
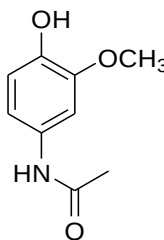
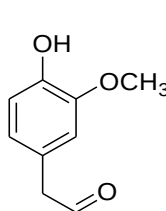
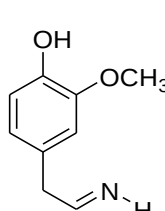
ภาพ 3.35 กลไกการเกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชันด้วย PyHBr_3 ของ 4-allylanisole

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถยืนยันโครงสร้างด้วย ^1H NMR ดังภาพ 3.36



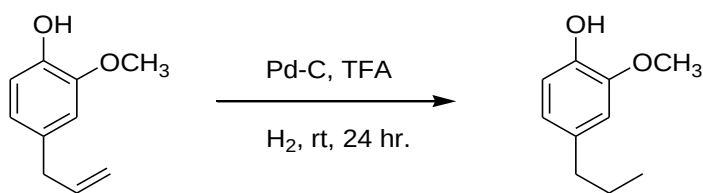
ภาพ 3.36 ^1H NMR spectrum ของสาร 4-Allyl-2-bromoanisole ใน CDCl_3

3.1.6 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์กลุ่มที่ 6 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่แอลลิล

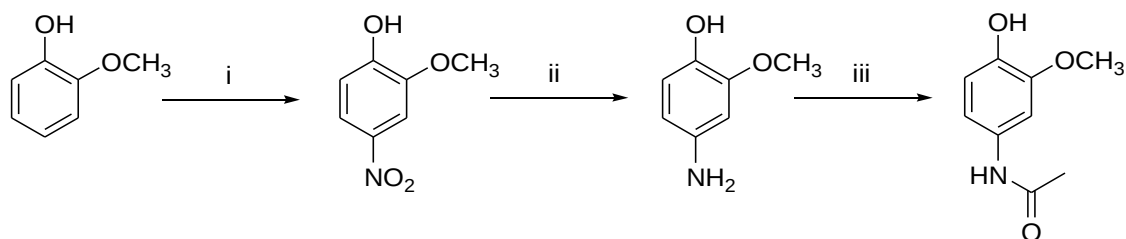
	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	P4	P26	
Name	2-methoxy-4-propylphenol	Isoeugenol	
โครงสร้าง			
Code	-	-	-
Name	N-acetyl-4-aminoguaiacol	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetaldehyde	4-(2-iminoethyl)-2-ethoxyphenol

สารอนุพันธ์กลุ่มนี้ ได้แก่ 2-methoxy-4-propylphenol (P4), Isoeugenol (P26), N-acetyl-4-amino guaiacol, 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetaldehyde และ 4-(2-iminoethyl)-2-ethoxyphenol ซึ่งเป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่มีการแทนที่หมู่แอลลิลให้เป็นหมู่ไฮโดรโฟบิกชนิดอื่นๆ เช่น โพรพิล เป็นต้น รวมทั้งหมู่ที่มีโครงสร้างและความยาวพันธะคล้ายกับหมู่แอลลิล เช่น methylene carbonyl, methylene imine เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบใดจะมีผลต่อฤทธิ์การสลายอย่างไร โดย Isoeugenol (P26) นั้นเป็นสารที่มีจำหน่ายของบริษัท Acros Chemical และนำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์การเป็นยาสลายโดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ส่วน 2-methoxy-4-propylphenol (P4) นั้นสามารถสังเคราะห์ได้โดยใช้ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันของยูจีนอล โดยใช้โลหะพาลลาเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาใน trifluoroacetic acid (TFA) ภายใต้สภาวะแก๊สไฮโดรเจน [25] โดยจะเกิดการเติมไฮโดรเจนเข้าที่หมู่แอลลิลเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ 2-methoxy-4-propylphenol (PMP) (P4) ผลผลิตร้อยละ 82 แสดงดังภาพ 3.37

ส่วนการสังเคราะห์ N-acetyl-4-amino guaiacol นั้นมีแนวทางการสังเคราะห์แสดงดังภาพ 3.38 โดยเริ่มจากสารตั้งต้น guaiacol ทำปฏิกิริยาไนเตรชันเพื่อแทนที่หมู่ไฮโดรเจนในวงแหวนเบนซีนและจากนั้นทำการรีดิวซ์หมู่ไนโตรให้กลายเป็นหมู่อะมิโน และในขั้นสุดท้ายทำปฏิกิริยาอะเซทิลเลชัน ก็จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น N-acetyl-4-amino guaiacol ที่แทนที่หมู่แอลลิลในยูจีนอลด้วยหมู่ N-acetyl ที่มีลักษณะคล้ายหมู่แอลลิล



ภาพ 3.37 การสังเคราะห์ 2-methoxy-4-propylphenol ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน

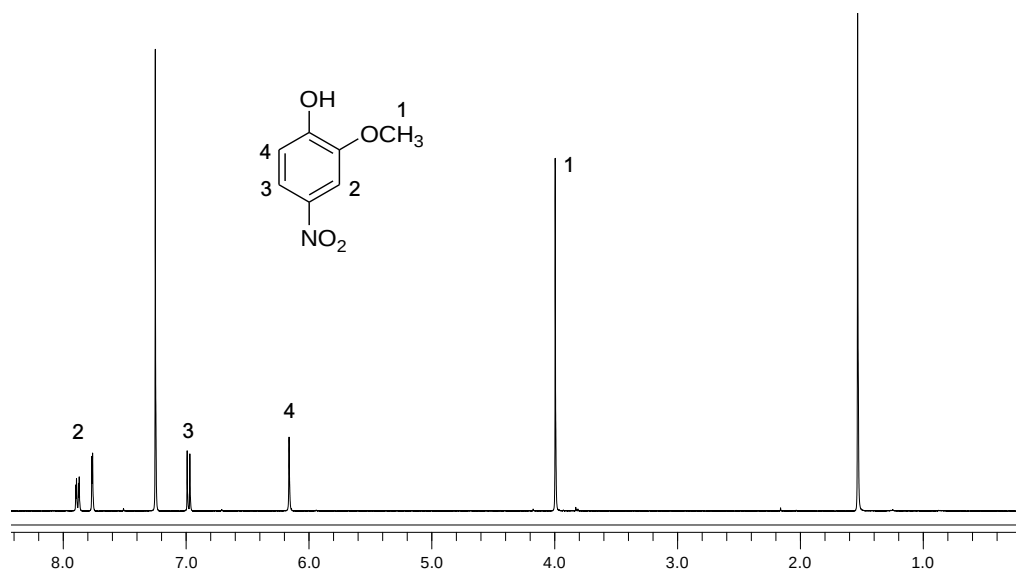


Reagents and conditions: i. $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, CH_2Cl_2 , 0°C or $\text{NaNO}_3/\text{KHSO}_4$, $\text{SiO}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1:1), CH_2Cl_2 , rt [26];

ii. Zn/HCl , 0°C , iii. AcCl , DMF

ภาพ 3.38 แนวทางการสังเคราะห์ *N*-acetyl-4-aminoguaiacol

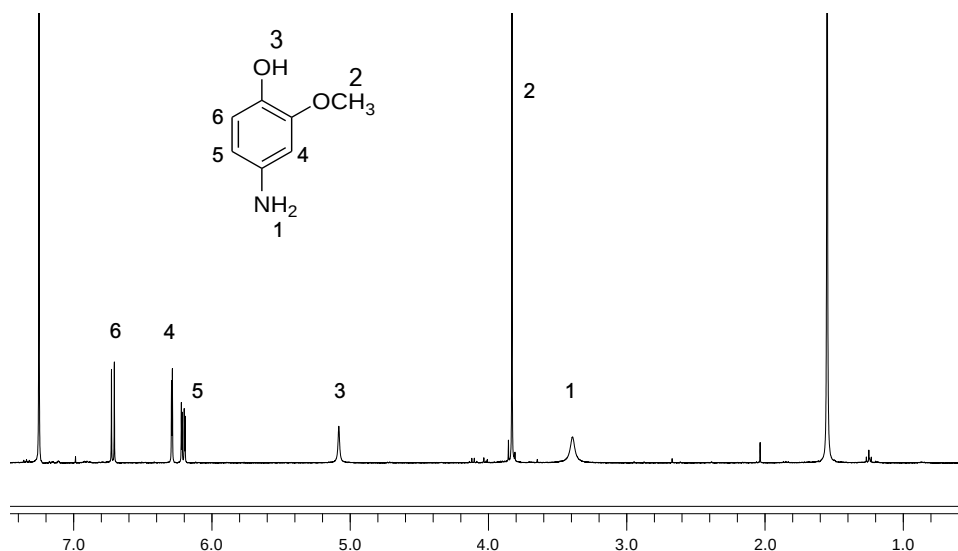
ปฏิกิริยาการแทนที่หมู่ไนโตรลงบนวงเบนซีน โดยใช้ Guaiacol เติม Urea nitrate และ CH_3COOH เป็นรีเอเจนต์ที่อุณหภูมิ 60°C ได้สารผลิตภัณฑ์เป็น 4-nitroguaiacol ได้ผลผลิตร้อยละ 13.5 ผลจาก NMR สเปกตรัมของสารที่ได้จากปฏิกิริยาในเตรนซ์แสดงดังภาพ 3.39



ภาพ 3.39 ^1H NMR สเปกตรัมของ 4-nitroguaiacol ใน CDCl_3 ที่สังเคราะห์ได้จาก

Condition: Urea nitrate, CH_3COOH , 60°C

จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation) โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น 10%mol Pd/C และใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ภายใต้สภาวะแก๊สไฮโดรเจน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 4-aminoguaiacol ได้ผลผลิตร้อยละ 29.4 ดังแสดงในภาพ 3.40 ผลจาก NMR สเปกตรัมของสารที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน

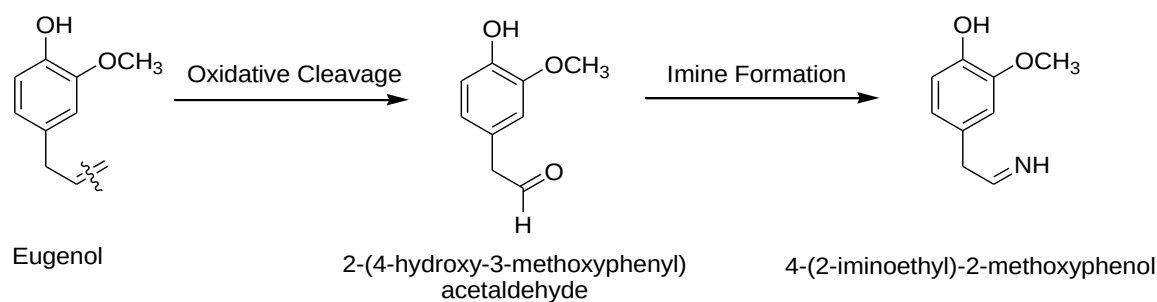


ภาพ 3.40 ^1H NMR สเปกตรัมของ 4-aminoguaiacol ใน CDCl_3 ที่สังเคราะห์ได้จาก

Condition: 10%mol Pd/C, H_2

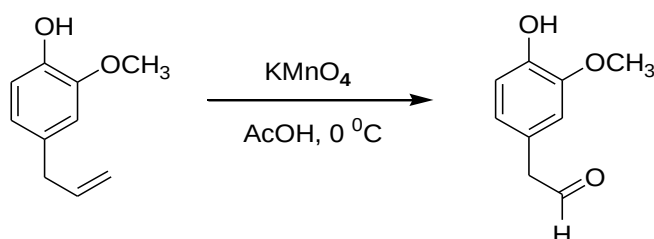
อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาอะเซทิลเลชันของ 4-aminoguaiacol นั้นยังไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสังเคราะห์ *N*-acetyl-4-aminoguaiacol ได้ตามที่วางแผนไว้

เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetaldehyde และ 4-(2-iminoethyl)-2-ethoxyphenol ซึ่งมีแผนการสังเคราะห์โดยใช้สารตั้งต้นประเภทอนุพันธ์ของยูจีนอลและใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างๆ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแบบ Oxidative Cleavage เพื่อให้เกิดการสลายพันธะคู่ในตำแหน่งคาร์บอนส่วนปลายของยูจีนอล เพื่อให้เกิดการแทนที่ของหมู่แอลดีไฮด์ที่ตำแหน่งคาร์บอนส่วนปลายของยูจีนอล จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetaldehyde ในขั้นตอนแรกมาทำการสังเคราะห์ต่อด้วยปฏิกิริยา Imine Formation ด้วยแอมโมเนียเพื่อเปลี่ยนหมู่แอลดีไฮด์ให้เป็นหมู่อิมีนตรงตำแหน่งแอลดีไฮด์เป็นไปตามแผนการสังเคราะห์ทั่วไป ดังภาพ 3.41



ภาพ 3.41 แผนการสังเคราะห์ 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetaldehyde
และ 4-(2-iminoethyl)-2-methoxyphenol

จากรายงานในเอกสารอ้างอิง พบว่ามีการสังเคราะห์ 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetaldehyde โดยใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้นและใช้โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและใช้กรดอะซิติกเป็นตัวทำละลายเป็นน้ำ [27] ทำการทดลองที่ 0°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แต่พบว่าไม่เกิดผลิตภัณฑ์เนื่องจากเวลาหรือสภาวะในการทำทดลองไม่เหมาะสม



ภาพที่ 3.42 ปฏิกิริยา Oxidative Cleavage ในการสังเคราะห์ 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetaldehyde

จึงได้ทดลองเปลี่ยนสภาวะการทำปฏิกิริยาและรีเอเจนต์ต่างๆ ดังแสดงในตาราง

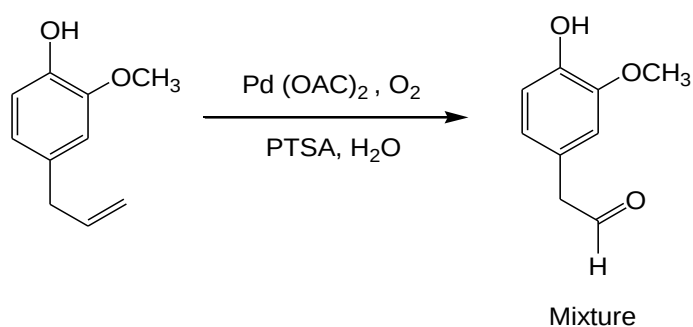
ตาราง 3.11 แสดงผลการทดลองปฏิกิริยา Oxidative Cleavage ในสภาวะต่างๆ

วิธี	สภาวะ	ตัวทำละลาย	อุณหภูมิ	%Yield
1	KMnO ₄ / AcOH	H ₂ O	0°C	-
2	Na ₂ Cr ₂ O ₇ / AcOH	H ₂ O	-	-
3	K ₂ Cr ₂ O ₇ / AcOH	H ₂ O	-	-
4	3%mol Pd(OAc) ₂ / PTSA, O ₂	H ₂ O	-	ของผสม
5	KMnO ₄	THF	40°C	-
6	10%mol PdCl ₂ / CuCl, O ₂	DMF:H ₂ O(7:1)	80°C	ของผสม
7	CoCl ₂ / O ₂	CH ₃ CN	75°C	-

จากผลการทดลองในตาราง พบว่าปฏิกิริยาส่วนใหญ่ยังมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ ส่วนปฏิกิริยาที่คาดว่าจะเกิดผลิตภัณฑ์ มี 2 วิธี คือ วิธีที่ 4 และ วิธีที่ 6 โดยพบว่าเกิดผลิตภัณฑ์แต่ยังคงมีสารผสมอื่นๆ โดยมีรายละเอียดดังนี้

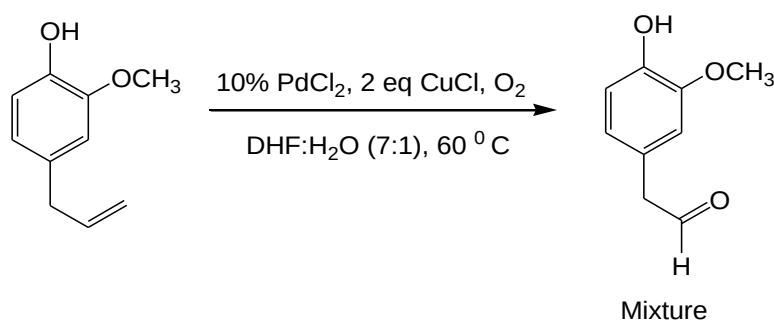
จากวิธีที่ 1 และ 5 ที่ใช้โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยใช้ น้ำเป็นตัวทำละลายที่สภาวะแตกต่างกัน โดยคาดหวังว่าให้โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์โดยเติม O_2 เข้าไปแล้วเกิดเป็นแอลดีไฮด์ตรงตำแหน่ง $C=C$ ตรงส่วนปลายของยูจีนอล แต่ทั้งนี้ในสองวิธีนี้ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ อาจเนื่องมาจากโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ค่อนข้าง sensitive กับความชื้น ซึ่งความชื้นนี้อาจจะมีผลทำให้รีเอเจนต์เสื่อมสภาพได้ เพราะเก็บไว้เป็นเวลานานและอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้ นอกจากนี้ ยังอาจจะเกิด over-oxidation โดยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตจะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่แอลดีไฮด์ของผลิตภัณฑ์ และเปลี่ยนหมู่แอลดีไฮด์ไปเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก ทำให้ไม่ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ

จากนั้นผู้ทำการทดลองจึงเปลี่ยนวิธี โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยามาเป็นแพลลาเดียมอะซิเตต ในวิธีที่ 4 นั้นคาดว่าจะเกิดผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่า เพื่อเปลี่ยนแอลคีนไปเป็นแอลดีไฮด์ อย่างไรก็ตามพบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารผสม แสดงดังภาพ 3.43



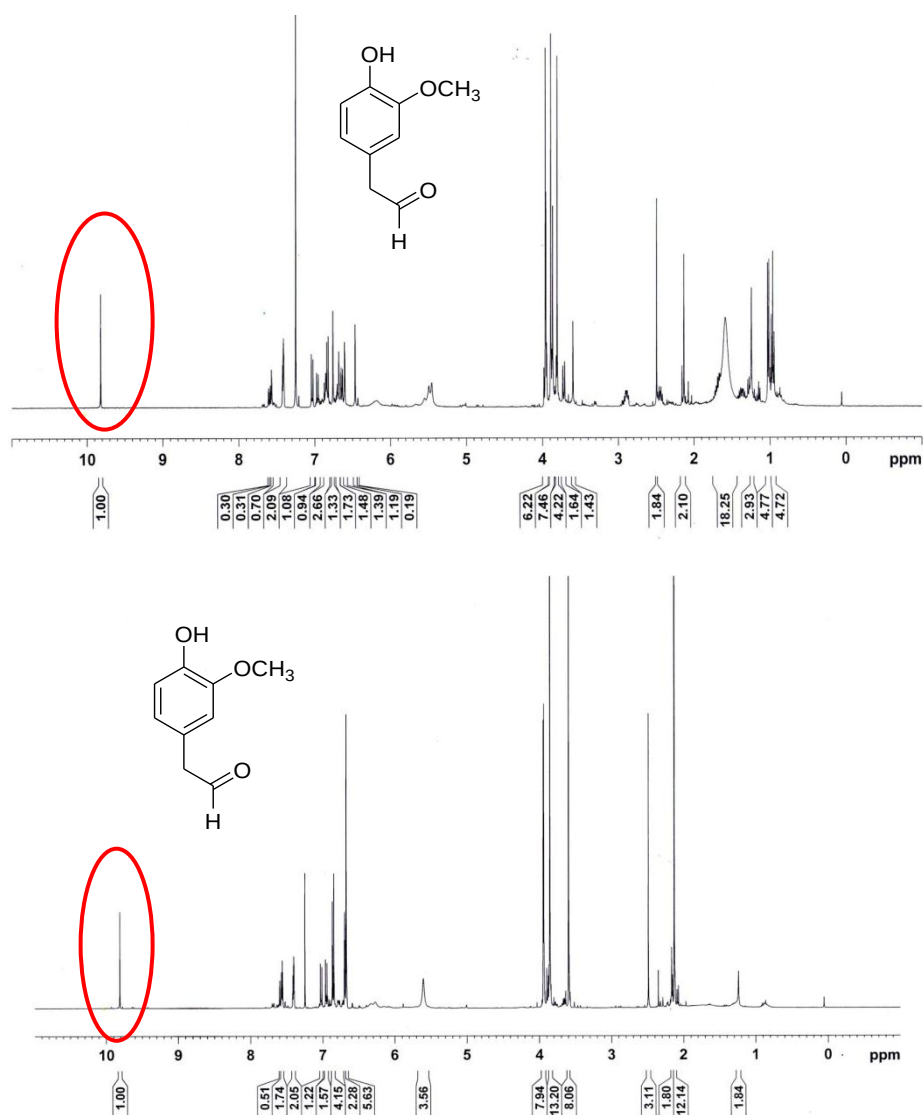
ภาพ 3.43 การเกิดปฏิกิริยา Oxidative cleavage โดยใช้แพลลาเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ส่วนปฏิกิริยาที่ใช้ แพลลาเดียมคลอไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในวิธีที่ 6 นั้นคาดว่าจะสามารถเปลี่ยนแอลคีนไปเป็นหมู่แอลดีไฮด์ได้ โดยพบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารผสม แสดงดังภาพ 3.44 โดยนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย NMR



ภาพ 3.44 กลไกการเกิดปฏิกิริยา Oxidative cleavage โดยใช้แพลลาเดียมคลอไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมสามารถยืนยันโครงสร้างของหมู่ที่เกิดเป็นแอลดีไฮด์โดยมีค่า chemical shift ปรากฏพีคที่ 9.80 ppm ของ CHO ของหมู่แอลดีไฮด์ดังแสดงในภาพ 3.45

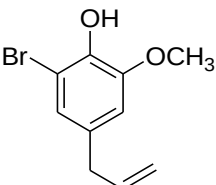
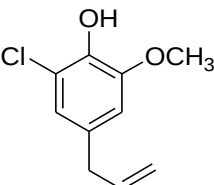
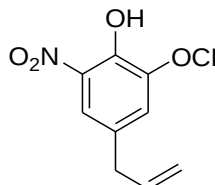
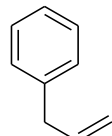


ภาพ 3.45 $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัมของ 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acetaldehyde

ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีที่ 4 และวิธีที่ 6

จากผลการทดลอง $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัมที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้แพลลาเดียมอะซิเตตและออกซิเจนเป็นรีเอเจนต์ (วิธีที่ 4) และจากการสังเคราะห์โดยใช้แพลลาเดียมคลอไรด์เป็นรีเอเจนต์ (วิธีที่ 6) ซึ่งเกิดสเปกตรัมของแอลดีไฮด์ที่ 9.80 ppm และผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นสารผสมเช่นเดียวกัน จากการวิเคราะห์ที่ได้จาก $^1\text{H NMR}$ ที่ได้จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอลที่ใช้ปฏิกิริยาของ Oxidative cleavage จะเกิดพีคของแอลดีไฮด์เกิดขึ้นแล้วเกิดพีคของสารผสมที่มีสิ่งปนเปื้อนอยู่ ซึ่งยังไม่สามารถแยกสารผสมออกจากกันได้ โดยจะนำไปหาวิธีในการแยกต่อไป

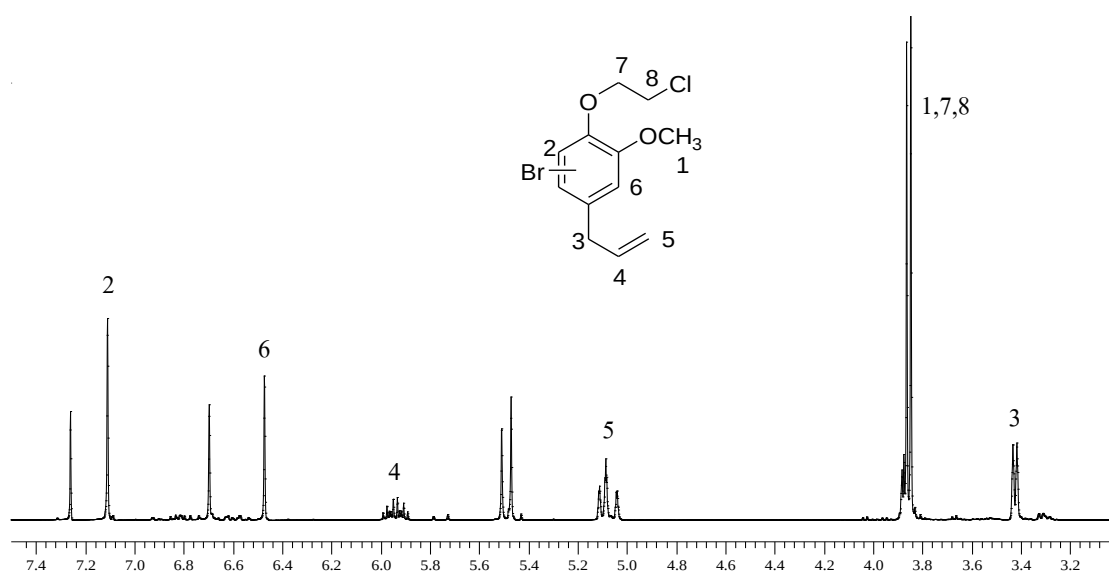
3.1.7 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ กลุ่มที่ 7 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการนำยูจีนอลมาทำปฏิกิริยาต่างๆ และกลุ่มที่ 8 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการปรับปรุงโครงสร้างหลายตำแหน่งพร้อมกัน

	สารอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์		
โครงสร้าง			
Code	P24	-	P25
Name	Bromoeugenol	Chloroeugenol	Nitro Eugenol
โครงสร้าง			
Code	P2		
Name	Allylbenzene		

สารอนุพันธ์ในกลุ่มที่ 7 และกลุ่มที่ 8 ได้แก่ Bromoeugenol (P24), Chloroeugenol, Nitro Eugenol (P25) และ Allylbenzene (P2) ซึ่งเป็นตัวแทนอนุพันธ์ของยูจีนอลที่นำมาทำปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว เช่น แอลคิเลชัน แอลคิลเลชัน หรือออกซิเดชัน เป็นต้น เพื่อให้ได้อนุพันธ์ของยูจีนอลแบบต่างๆ เพื่อศึกษาว่าหมู่แทนที่แบบใดจะมีผลต่อฤทธิ์การสลายอย่างไร หรือเป็นการออกแบบการปรับโครงสร้างหลายตำแหน่ง เช่น บริเวณที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี หรือบริเวณที่เป็นหมู่เมทอกซี ซึ่งการออกแบบในหัวข้อนี้ จะขึ้นอยู่กับข้อมูลผลการทดสอบฤทธิ์ในการสลายของอนุพันธ์ทั้งหมด โดย Allylbenzene (P2) นั้นเป็นสารที่มีจำหน่ายของบริษัท Fluka และนำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์การเป็นยาสลายโดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ส่วน Bromoeugenol (P24) และ Nitro Eugenol (P25) นั้นสามารถสังเคราะห์ได้โดยใช้ปฏิกิริยาโบรมิเนชัน และไนเตรชันของยูจีนอล ตามลำดับ

ผู้ทดลองได้ทดลองทำปฏิกิริยาโบรมิเนชันโดยใช้สารตั้งต้นเป็นยูจีนอลทำปฏิกิริยากับ Br_2 ในตัวทำละลายเป็น 1,2-dichloroethane ปรับอุณหภูมิไปที่ 0°C ในขั้นตอนนี้สารผสมมีลักษณะเป็นของเหลวใสสีส้ม หลังคนทิ้งไว้นาน 3 ชั่วโมง ทำการติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วย TLC ในระบบตัวทำละลายเป็นสารผสมระหว่าง ethyl acetate และ hexane ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 พบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งต่ำกว่าตำแหน่งของยูจีนอล จากนั้นทำการเติมน้ำเพื่อหยุดปฏิกิริยาและเติม sodium metabisulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) เพื่อทำการกำจัดโบรมีนที่เหลือออก ให้เกิดเป็น NaBr เมื่อโบรมีนที่เหลือถูกกำจัดออกหมดสารละลายมีลักษณะสีขาวขุ่น จากนั้นทำการสกัดด้วย dichloromethane (CH_2Cl_2) และทำการตรวจสอบอีกครั้งด้วย TLC เพื่อให้แน่ใจว่าสารที่สกัดออกมานั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

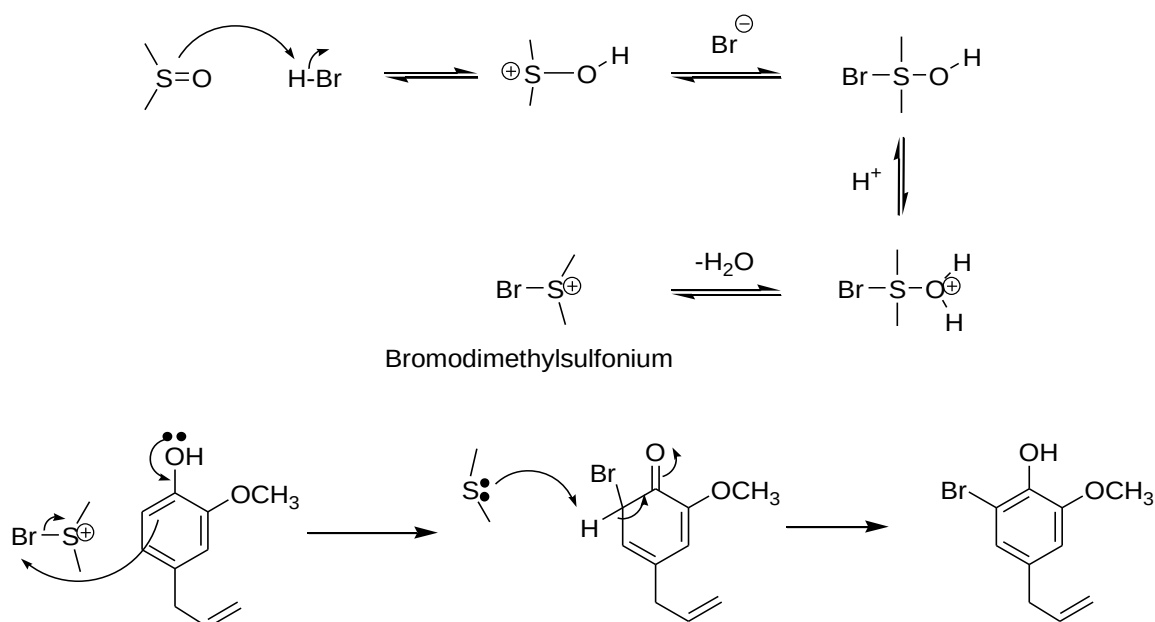
จากนั้นทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้วละลายด้วย ethanol ทำการเติม Zn powder เพื่อเป็นตัว reduce Br ในปฏิกิริยาที่อาจจะมี Br เข้าไปแทนที่ในหลายตำแหน่ง โดยเฉพาะตำแหน่งของหมู่ allyl ให้กลับมาเป็น alkene เหมือนเดิม ในขั้นตอนนี้สารละลายมีลักษณะเป็นสีเทาขุ่น จากนั้นทำการเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 60°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้วทำการกรองเอาผงสังกะสีออกและระเหยตัวทำละลาย สุดท้ายสกัดด้วยน้ำจะได้สารละลายที่มีลักษณะใสไม่มีสี นำมาทำให้สารมีความบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ในระบบตัวทำละลายเป็นสารผสมระหว่าง ethyl acetate และ hexane ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อน จากนั้นส่งทดสอบเพื่อหาเอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ผลจากการทดสอบหาเอกลักษณ์ของสารพบว่านอกจากจะมีหมู่ Br แทนที่เข้าไปบนวงอะโรมาติกของยูจีนอลแล้ว คาดว่าน่าจะมีการแทนที่ของ 1,2-dichloroethane ตรงตำแหน่ง -OH ของยูจีนอล ซึ่งไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการโดย NMR spectrum แสดงดังภาพ 3.46 จึงทำการปรับเปลี่ยนสภาวะการทดลอง



ภาพ 3.46 ^1H NMR สเปกตรัมของ bromoeugenol ใน CDCl_3 ที่สังเคราะห์ได้

จาก condition : Br_2 , 1,2-dichloroethane, 0°C , 3 h.

จากรายงานในเอกสารอ้างอิง [11] พบว่าปฏิกิริยาโบรมิเนชันของสารประกอบอะโรมาติกที่เกิดผ่าน bromodimethylsulfonium bromide ในตัวทำละลายเป็น DMSO ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะให้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงถึง 96% yield ผู้ทดลองจึงได้ทดลองทำปฏิกิริยาโบรมิเนชัน (bromination) โดยใช้สารตั้งต้นเป็นยูจีนอลทำปฏิกิริยากับ hydrobromic acid (HBr) ในตัวทำละลายเป็น DMSO โดยคาดหวังว่า HBr จะเข้าทำปฏิกิริยากับ DMSO แล้วเกิดเป็น bromodimethylsulfonium และ bromodimethyl sulfonium ion เข้าดึงโปรตอนจากยูจีนอล เกิดเป็น bromoeugenol แผนภาพการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 3.47

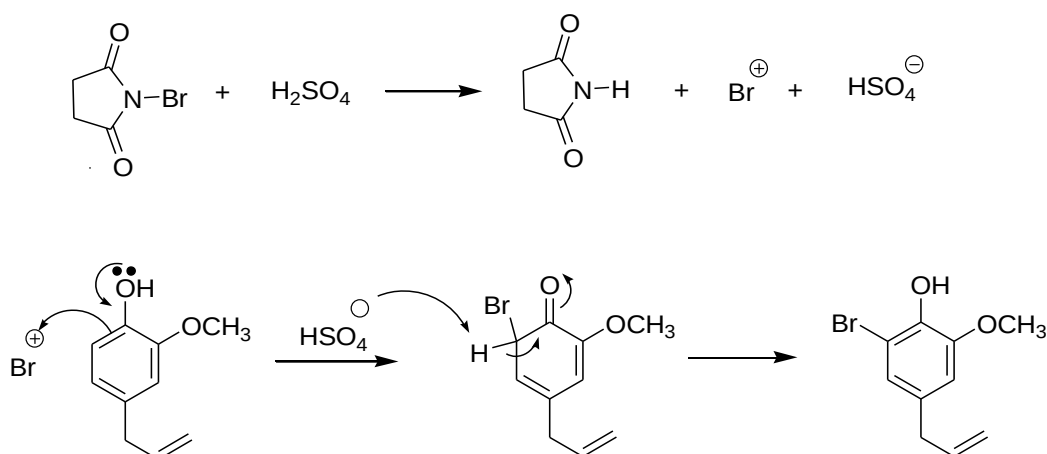


ภาพ 3.47 กลไกการเกิดปฏิกิริยา bromoeugenol โดยใช้ HBr เป็นตัวเข้าทำปฏิกิริยาในตัวทำละลาย DMSO

ปฏิกิริยาเริ่มต้นจากละลายยูจีนอลใน dimethyl sulfoxide 3 mL แล้วค่อยๆ เติม 48% HBr ลงไป ขั้นตอนนี้สารละลายมีลักษณะใสสีเหลืองอ่อน ทำการคนทิ้งนาน 3 วัน เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อครบ 3 วันสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม จากนั้นติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วย TLC และเติมน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา ทำการปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้ได้ pH ประมาณ 7-8 เพื่อให้สารละลายอยู่ในรูปที่เป็นกลาง และทำให้สารบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลือง จากนั้นส่งทดสอบเพื่อหาเอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ผลจากการทดสอบหาเอกลักษณ์ของสารพบว่ามีความสอดคล้องกันจำนวนมาก ทั้งนี้คาดว่าสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะเป็นของผสมที่ไม่สามารถแยกออกได้ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

จากรายงานในเอกสารอ้างอิง [28] พบว่าได้มีการศึกษาปฏิกิริยาโบรมิเนชันของ deactivated aromatics ที่ใช้ *N*-bromosuccinimide (NBS) ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้นทำปฏิกิริยากับ 3-nitrobenzaldehyde ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 3-bromo-5-nitrobenzaldehyde ถึง 92% yield

ผู้ทดลองจึงได้ทดลองทำปฏิกิริยาโบรมิเนชัน (bromination) โดยใช้สารตั้งต้นเป็นยูจีนอลทำปฏิกิริยากับ *N*-bromosuccinimide (NBS) ในตัวทำละลายเป็น sulfuric acid และให้ปฏิกิริยาเกิดที่ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยคาดหวังว่า *N*-bromosuccinimide (NBS) จะเข้าทำปฏิกิริยากับ sulfuric acid แล้วหลุดโบรมิเนียมไฮดรอกไซด์ออกมา จากนั้นโบรมิเนียมไฮดรอกไซด์จะเข้าทำปฏิกิริยากับยูจีนอลโดยมี sulfuric anion เข้าตั้งโปรตอนจากยูจีนอลเกิดเป็น bromoeugenol กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดง ดังภาพ 3.48



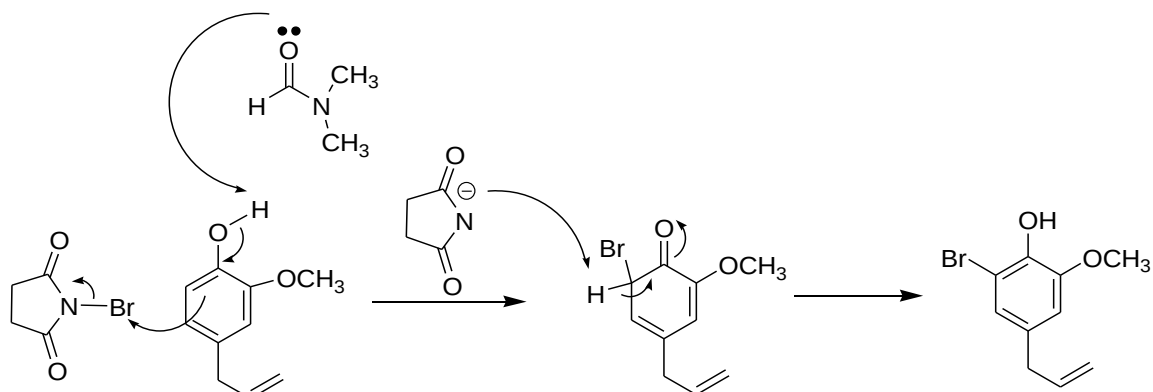
ภาพ 3.48 กลไกการเกิด bromoeugenol โดยใช้ NBS เป็นตัวเข้าทำปฏิกิริยาในตัวทำละลาย H₂SO₄

ปฏิกิริยาเริ่มต้นจากผสมยูจีนอลลงใน sulfuric acid โดยค่อยๆ หยดยูจีนอลลงไป และวางบนอ่างน้ำแข็ง และละลาย N-bromosuccinimide ด้วย sulfuric acid จากนั้นค่อยๆ เติมลงไป แต่เนื่องจาก sulfuric acid เป็นกรดที่แรงจึงทำให้ควบคุมปฏิกิริยาได้ยาก เมื่อทำการเติมสารผสมเข้าด้วยกันสารผสมที่ได้มีลักษณะเป็นสีดำ และเมื่อทำให้สารบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์แล้วจะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นส่งทดสอบเพื่อหาเอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ผลจากการทดสอบหาเอกลักษณ์ของสารพบว่ามีสัญญาณขึ้นจำนวนมากซึ่งคาดว่าสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะเป็นของผสมที่ไม่สามารถแยกออกได้ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ทั้งนี้ปฏิกิริยาที่ไม่เกิดตามที่ต้องการคาดว่าน่าจะมาจากสภาวะที่ใช้ไม่เหมาะสมคืออุณหภูมิอาจจะสูงเกินไป อีกทั้ง sulfuric acid ยังเป็นกรดที่แรงจึงเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงกับยูจีนอลทำให้เมื่อทดสอบหาเอกลักษณ์ของสารพบ peak ขึ้นจำนวนมาก ผู้ทดลองจึงได้ทดลองทำปฏิกิริยาต่อไปโดยเปลี่ยนตัวทำละลายและเปลี่ยนสภาวะใหม่เพื่อให้มีความเหมาะสมมากขึ้นในการเกิดปฏิกิริยา

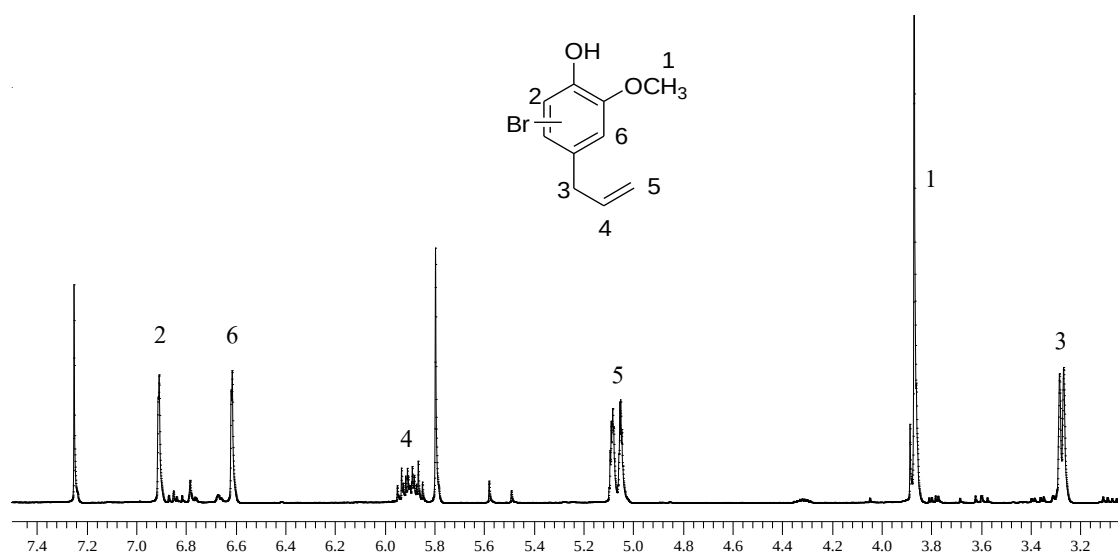
หลังจากนั้นผู้วิจัยได้ใช้สารตั้งต้นเป็นยูจีนอลทำปฏิกิริยากับ N-bromosuccinimide (NBS) แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น DMF และเปลี่ยนสภาวะในการเกิดปฏิกิริยาเป็นที่ 0°C นาน 1 ชั่วโมง โดยคาดหวังว่า DMF จะเข้าดึงโปรตอนจากยูจีนอล จากนั้น NBS จะเข้าทำปฏิกิริยากับยูจีนอลเกิดเป็น bromoeugenol กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 3.49

ปฏิกิริยาเริ่มต้นจากผสมยูจีนอลใน DMF 5 mL โดยค่อยๆ หยดยูจีนอลลงไป และวางบนอ่างน้ำแข็ง จากนั้นละลาย NBS ด้วย DMF จากนั้นค่อยๆ เติมลงในยูจีนอล ขั้นตอนนี้สารละลายผสมมีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองและเมื่อคนทิ้งไว้ครบ 1 ชั่วโมง สารละลายผสมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม และเมื่อนำมาทำให้สารบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อนๆ จากนั้นส่งทดสอบเพื่อหา

เอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ผลจากการทดสอบหาเอกลักษณ์ของสาร
แสดงดังภาพ 3.50



ภาพ 3.49 กลไกการเกิด bromoeugenol โดยใช้ NBS เป็นตัวเข้าทำปฏิกิริยาในตัวทำละลาย DMF

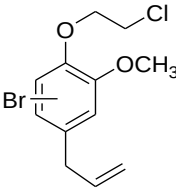
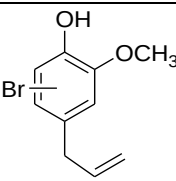


ภาพ 3.50 ^1H -NMR สเปกตรัมของ bromoeugenol ใน CDCl_3 ที่สังเคราะห์ได้

จาก condition : NBS, DMF, 0°C , 1 h.

จากการทดลองทำปฏิกิริยาโบรมิเนชันสภาวะต่างๆ ที่ได้กล่าวมาสามารถสรุปได้ในตาราง 3.12

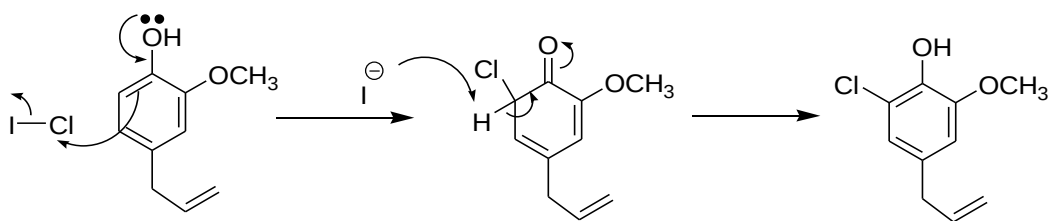
ตาราง 3.12 สภาวะการทดลองและ % yield ของปฏิกิริยาโบรมิเนชัน

วิธี	รีเอเจนต์	ตัวทำละลาย	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น	% yield
1	Bromine	1,2-dichloroethane		82.6
2	HBr	DMSO	ผลิตภัณฑ์เกิดเป็นของผสม	-
3	HBr, DMSO	Ethyl acetate	ผลิตภัณฑ์เกิดเป็นของผสม	-
4	NBS	Sulfuric acid	ผลิตภัณฑ์เกิดเป็นของผสม	-
5	NBS	DMF		47.7

สำหรับปฏิกิริยาคลอรีเนชัน (chlorination) เป็นปฏิกิริยาของหมู่ฮาโลเจนที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารอะโรมาติก จากรายงานในเอกสารอ้างอิง [29] พบว่าปฏิกิริยา oxychlorination ของยูจีนอล ทำปฏิกิริยากับ sodium chloride โดยมี copper(II)chloride เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเกิดเป็น monochlorination ที่ให้ผลิตภัณฑ์ที่สูงถึง 99% yield

ผู้วิจัยจึงได้ทดลองทำปฏิกิริยาคลอรีเนชัน (chlorination) โดยใช้สารตั้งต้นเป็นยูจีนอลทำปฏิกิริยากับ NaCl โดยมี copper(II)chloride เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในตัวทำละลายเป็น acetic acid ปฏิกิริยานี้เริ่มจากการเตรียมสารละลายผสม NaCl และ copper(II)chloride จากนั้นเติมลงในยูจีนอลที่ละลายในกรดอะซิติก (CH₃COOH) ทำการคนทิ้งไว้ (open air) พบว่าปฏิกิริยาไม่เกิด ไม่พบสารใหม่เกิดขึ้น และสารในปฏิกิริยายังคงเป็นยูจีนอลตัวเดิมเมื่อทำการติดตามการเกิดปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น ทั้งนี้การที่ปฏิกิริยาไม่เกิดนี้คาดว่าน่าจะมาจากสภาวะที่ใช้ อาจจะยังไม่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยา โดยอาจจะใช้อุณหภูมิที่ยังไม่เหมาะสมทำให้ยูจีนอลไอออนไปจับกับโปรตอนแล้วเกิดเป็นสารตั้งต้นตัวเดิม โดยไม่ทำปฏิกิริยากับคลอโรเนียมไอออน

หลังจากนั้นจึงได้ทดลองใช้สารตั้งต้นเป็นยูจีนอลทำปฏิกิริยากับ iodine monochloride (ICl) และใช้ตัวทำละลายเป็น acetonitrile สภาวะในการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 8 ชั่วโมง โดยคาดหวังว่า ICl จะเข้าทำปฏิกิริยากับยูจีนอลเกิดเป็น chloroeugenol กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 3.51



ภาพ 3.51 กลไกการเกิด chloroeugenol โดยใช้ ICl เป็นตัวเข้าทำปฏิกิริยาในตัวทำละลาย CH_3CN

ปฏิกิริยานี้เริ่มจากละลายยูจีนอลใน CH_3CN โดยค่อยๆ หยดยูจีนอลลงไป จากนั้นละลาย ICl ด้วย CH_3CN และค่อยๆ เติมลงในยูจีนอล ขั้นแรกนี้สารผสมมีลักษณะใสสีน้ำตาลอ่อน ทำการคนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ และสกัดด้วย CH_2Cl_2 ทำให้สารบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ตัวทำละลายเป็นสารผสมระหว่างเอทิลอะซิเตตและเฮกเซน ($\text{EtOAc} : \text{Hexane}$) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลือง จากนั้นส่งทดสอบเพื่อหาเอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ผลจากการทดสอบหาเอกลักษณ์ของสารพบว่าจากสเปกตรัม ^1H NMR ของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับสัญญาณ ^1H NMR ของสารตั้งต้นยูจีนอลยังคงพบสัญญาณของ aromatic โปรตอน แต่ไม่พบสัญญาณของ allyl โปรตอน แสดงให้เห็นว่ามีหมู่แทนที่เข้าไปแทนที่บนตำแหน่งของหมู่ allyl ของสารตั้งต้นแทนการเข้าที่ตำแหน่งบนวงอะโรมาติกของสารตั้งต้นยูจีนอล

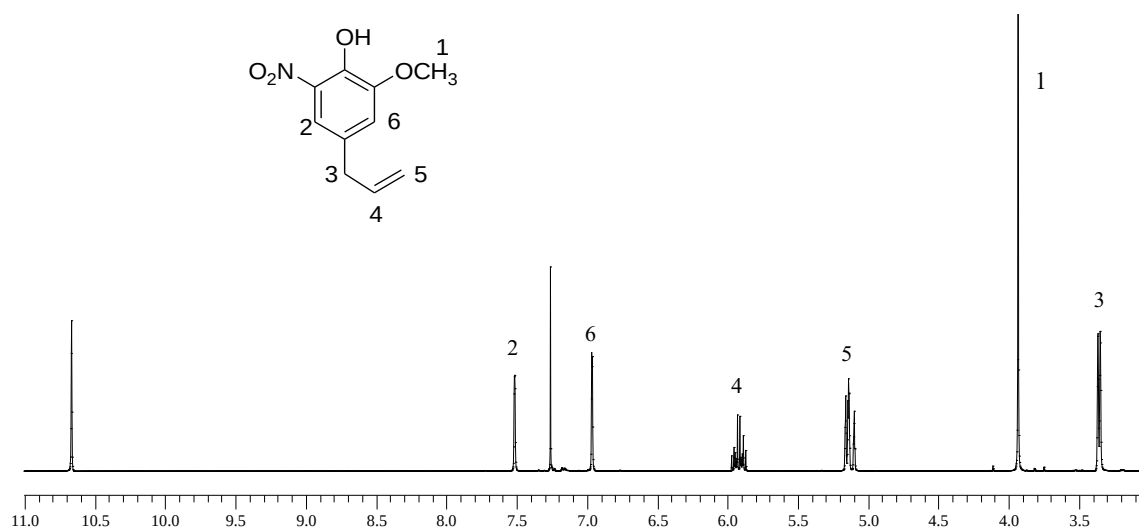
ตาราง 3.13 สภาวะการทดลองและ % yield ของปฏิกิริยาคลอรีนชัน

วิธี	ตัวเข้าทำปฏิกิริยา	ตัวทำละลาย	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น	% yield
1	Sodium chloride	Acetic acid	ไม่เกิดผลิตภัณฑ์	-
2	Iodine monochloride	Acetonitrile		24.7

ดังนั้นจึงไม่สามารถสังเคราะห์ Chloroeugenol ได้ตามแผนที่วางไว้

สำหรับปฏิกิริยาไนเตรชัน (nitration) โดยทั่วไปของสารอะโรมาติกเป็นปฏิกิริยาของเบนซีนกับกรดไนตริก (HNO_3) โดยมีกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผู้วิจัยจึงได้ทดลองทำปฏิกิริยาไนเตรชัน (nitration) โดยใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับ urea nitrate ในตัวทำละลายเป็น acetic acid โดยจะใช้ไอออนของไนโตรเนียมจาก urea nitrate เป็นตัวเข้าทำปฏิกิริยากับยูจีนอล โดยขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มจากละลายยูเรียไนเตรตในกรดอะซิติกเพื่อให้ยูเรียไนเตรตอยู่ในรูปของอินเทอร์มีเดียตที่พร้อมที่จะเข้าทำปฏิกิริยา จากนั้นเติมยูจีนอล

แล้วเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ยูจีนอลและยูเรียในเตรมีพลังงานมากพอที่จะเกิดการแตกพันธะเดิมและมีการสร้างพันธะใหม่ได้ ในขั้นแรกนี้สารผสมมีลักษณะใสไม่มีสีและเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง สารผสมเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นทำการติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วย TLC เปรียบเทียบสารผลิตภัณฑ์กับสารตั้งต้นในระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมคือสารผสมระหว่าง ethyl acetate และ hexane ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 โดยผลจาก TLC พบ spot ของสารเพียง spot เดียวบน TLC ซึ่งอยู่ในตำแหน่งที่ต่ำกว่าตำแหน่งของสารตั้งต้น จากนั้นจึงทำการเติมน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยาและทำการปรับ pH ของสารผสมให้ได้ pH ประมาณ 7-8 ด้วยเบสอ่อนคือ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) เพื่อให้สารผสมมีสภาพที่เป็นกลาง จากนั้นจึงทำการสกัดด้วย dichloromethane (CH_2Cl_2) สารที่ทำการสกัดออกมาได้มีลักษณะใสสีเหลืองส้ม หลังจากนั้นทำการตรวจสอบอีกครั้งด้วย TLC เพื่อให้แน่ใจว่าสารที่สกัดออกมานั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ทำการกำจัดน้ำออกโดยการเติม sodium sulfate ทำให้สารมีความบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อน จากนั้นส่งทดสอบเพื่อหาเอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ผลจากการทดสอบหาเอกลักษณ์ของสารพบว่า มีหมู่แทนที่เข้าไปแทนที่บนวงอะโรมาติกของสารตั้งต้น เมื่อเปรียบเทียบกับ NMR spectrum ของสารตั้งต้นยูจีนอล ดังแสดงในภาพ 3.52



ภาพ 3.52 ^1H -NMR สเปกตรัมของ nitro Eugenol ใน CDCl_3 ที่สังเคราะห์ได้

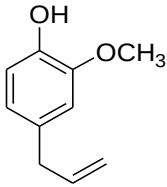
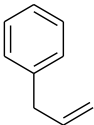
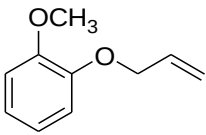
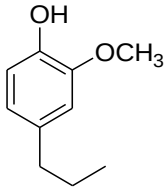
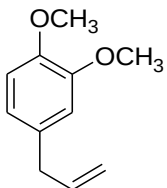
จาก condition : urea nitrate, CH_3COOH , 60°C , 24 h

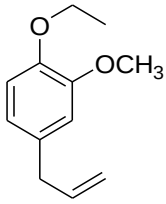
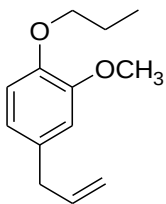
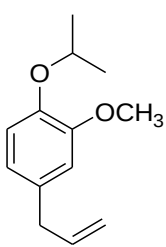
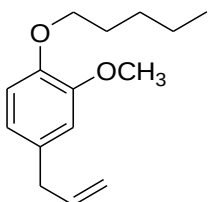
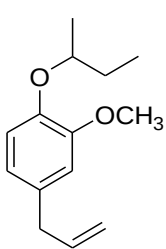
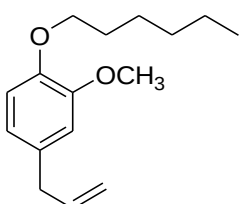
จาก ^1H -NMR สเปกตรัมสามารถยืนยันโครงสร้างของ nitro Eugenol ที่ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาในปี ค.ศ. 2009 ของ Sudarma I. M. และคณะ [30] ที่พบว่า มีหมู่ $-\text{NO}_2$ เข้าแทนที่บนวงอะโรมาติกของยูจีนอลในตำแหน่ง ortho กับหมู่ $-\text{OH}$ จากการศึกษาด้วยปฏิกิริยาไนเตรชันโดยใช้ยูจีนอลเป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับ potassium hydrogen sulfate (KHSO_4), sodium nitrate (NaNO_3) ในสภาวะที่มีการใช้ wet silica และตัวทำ

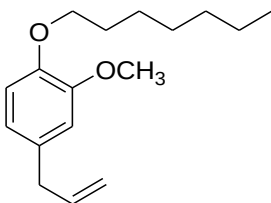
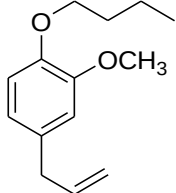
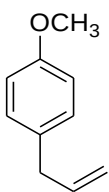
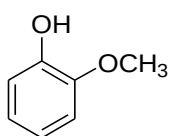
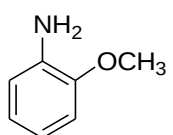
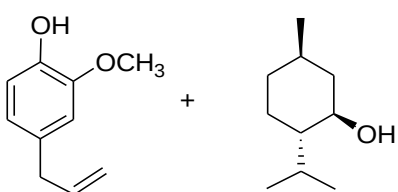
ละลายเป็น dichloromethane (CH_2Cl_2) ได้ผลึกทั้งหมด 75% yield [30] ส่วนผลึกที่ผู้วิจัยสามารถสังเคราะห์ได้คือ 47.9% yield

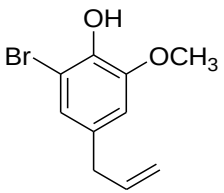
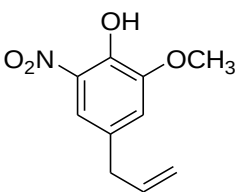
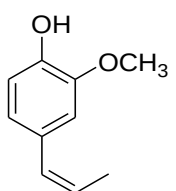
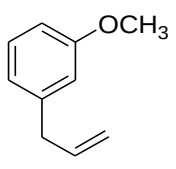
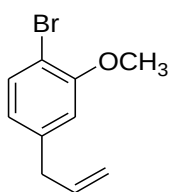
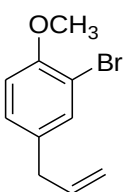
ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสามารถสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของยูจีนอลกลุ่มที่ 1 ถึงกลุ่มที่ 8 ได้ทั้งหมด 17 อนุพันธ์ รวมกับอนุพันธ์ที่มีจำหน่ายอยู่แล้ว 9 อนุพันธ์ รวมเป็นสารอนุพันธ์ที่มีการดัดแปรโครงสร้างที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์การเป็นยาขับในสัตว์น้ำทั้งหมด 26 อนุพันธ์ ดังแสดงรายละเอียดในตาราง 3.14

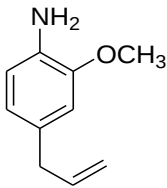
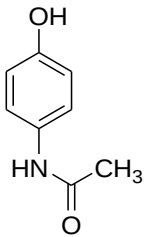
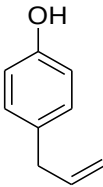
ตาราง 3.14 รหัส โครงสร้าง และน้ำหนักของสารอนุพันธ์ที่สามารถเตรียมได้จากงานวิจัยครั้งนี้

รหัส	อนุพันธ์	Yield (%)	น้ำหนักที่ได้ (g)	หมายเหตุ
P1		-	-	เป็นสารที่มีจำหน่าย (Eugenol)
P2		-	-	เป็นสารที่มีจำหน่าย (Allyl benzene)
P3		-	-	เป็นสารที่มีจำหน่าย (O-allyl guaiacol)
P4		82.1	2.72	
P5		89.7	3.19	

รหัส	อนุพันธ์	Yield (%)	น้ำหนักที่ได้ (g)	หมายเหตุ
P6		54.7	4.20	
P7		86.3	7.12	
P8		67.6	5.57	
P9		81.0	5.70	
P10		56.6	3.73	สารใหม่
P11		98.0	7.30	

รหัส	อนุพันธ์	Yield (%)	น้ำหนักที่ได้ (g)	หมายเหตุ
P12		75.1	5.91	
P13		90.5	6.60	
P14	-			Placebo Solution
P20		-	-	เป็นสารที่มี จำหน่าย (4-Allyl anisole)
P21		-	-	เป็นสารที่มี จำหน่าย (Guaiacol)
P22		-	-	เป็นสารที่มี จำหน่าย (O-Anisidine)
P23*		-	-	เป็นสารที่มี จำหน่าย (Eugenol + Menthol)

รหัส	อนุพันธ์	Yield (%)	น้ำหนักที่ได้ (g)	หมายเหตุ
P24		47.7	5.48	
P25		47.9	3.31	
P26		-	4.00	เป็นสารที่มี จำหน่าย (isoeugenol)
P27		64.1	2.43	
P28		17.0	0.50	
P29		6.9	0.50	

รหัส	อนุพันธ์	Yield (%)	น้ำหนักที่ได้ (g)	หมายเหตุ
P30		45.3	2.00	สารใหม่
P31		-	4.00	เป็นสารที่มี จำหน่าย (paracetamol)
P32		60.0	2.00	
รวมสารอนุพันธ์ทั้งหมด 26 ชนิด				

*หมายเหตุ : อนุพันธ์ P23 เป็นสารผสมระหว่างยูจีนอลและเมนทอลในอัตราส่วน 1.1 : 0.9 ซึ่งอยู่นอกเหนือ

วัตถุประสงค์ของโครงการ อย่างไรก็ตามมีรายงานจากเอกสารอ้างอิง (Aquaculture, 2009, 298, 162–167) ว่าสารชนิดนี้ สามารถใช้ในการสับกั๊กามกรามได้ ผู้วิจัยจึงได้เตรียมเป็นอนุพันธ์เพื่อทดสอบการสลับในสัตว์น้ำในครั้งนี้ด้วย

3.2 การตั้งตำรับอิมัลชันของสารอนุพันธ์ยูจีนอลที่สังเคราะห์ได้

การตั้งตำรับอิมัลชันของสารอนุพันธ์ยูจีนอลที่สังเคราะห์ได้ เพื่อศึกษาหาสัดส่วนและชนิดของคู่ของสารก่ออิมัลชันที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตำรับยูจีนอลอิมัลชันที่มีความคงตัวดี โดยงานในส่วนนี้ดำเนินการโดย รศ.ดร. ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล ณ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชกรรม มหาวิทยาลัยนเรศวร ตามที่ได้กล่าวรายละเอียดในบทที่ 2 โดยจะแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1. การศึกษาอิทธิพลของค่า Hydrophilic-Lipophilic-Balance (HLB) ต่อความคงตัวของยูจีนอลอิมัลชัน
2. การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันต่อความคงตัวของยูจีนอลอิมัลชัน
3. การศึกษาอิทธิพลของคู่สารก่ออิมัลชันชนิดต่างๆ ต่อความคงตัวของยูจีนอลอิมัลชัน
4. การประเมินผลความคงตัวของยูจีนอลอิมัลชัน เช่น Creaming, Cracking, Apparent Viscosity และ Physical Appearance

โดยได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

ตาราง 3.15 การประเมินผลของค่า HLB ต่อความคงตัวของอิมัลชัน

HLB	การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที			การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์		
	% Creaming	Cracking	App-η (s)	% Creaming	Cracking	App-η (s)
5	-	-	9.67 (SD 1.15)	-	++	3.67 (SD 1.15)
8	-	-	9.33 (SD 2.52)	-	+	5.00 (SD 2.00)
10	-	-	9.33 (SD 2.52)	-	-	3.67 (SD 1.53)
12	-	-	11.00 (SD 3.61)	3.37 (SD 1.14)	++++	3.00 (SD1.00)

หมายเหตุ

1. ลักษณะของอิมัลชันเริ่มต้นเป็นลักษณะขาวขุ่นเหมือนน้ำมันมทุกหลอด
2. เมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานาน 7 วัน พบว่ามีการรวมตัวของหยดน้ำมันเกิดขึ้นบางส่วนโดยที่ส่วนที่เป็นน้ำมันยูจีนอลจะไปรวมตัวนอนอยู่ที่ก้นหลอด ซึ่งต่างไปจากน้ำมันทั่วไปที่จะลอยอยู่บนผิวหน้า
3. ลักษณะการแยกชั้นแบ่งได้เป็น

- ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่น ไม่มีการแยกของหยดน้ำมัน
- + ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยดน้ำมันที่ก้นหลอดเล็กน้อย
- ++ ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยดน้ำมันใหญ่ที่ก้นหลอด
- +++ ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยดน้ำมันแยกได้เป็นชั้นที่ก้นหลอด
- ++++ อิมัลชันแยกชั้นชัดเจน

ตาราง 3.16 ค่า HLB โดยประมาณของสารลดแรงตึงผิว

ชื่อสาร	HLB
Tween 20	16.7
Tween 60	14.9
Tween 80	15.0
Span 20	8.6
Span 60	4.7
Span 80	4.3

ตาราง 3.17 การประเมินผลของความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันต่อความคงตัวของอิมัลชัน (HLB = 10)

ความเข้มข้น (% w/w)	การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที			การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์		
	% Creaming	Cracking	App-η (s)	% Creaming	Cracking	App-η (s)
1	-	-	7.67 (SD 0.58)	2.94 (SD 0.64)	+++	2.67 (SD 0.58)
3	-	-	10.00 (SD 1.00)	-	+	2.67 (SD 0.58)
5	-	-	8.00 (SD 2.65)	-	-	2.67 (SD 0.58)
10	-	-	8.00 (SD 3.46)	-	-	3.33 (SD 0.58)
15	-	-	10.67 (SD 1.15)	-	-	12.67 (SD 2.52)

หมายเหตุ

1. ลักษณะของอิมัลชันเริ่มต้นเป็นลักษณะขาวขุ่นเหมือนนํ้านมทุกหลอด
2. เมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานาน 7 วัน พบว่ามีการรวมตัวของหยดน้ำมันเกิดขึ้นบางส่วนโดยที่ส่วนที่เป็นน้ำมันยูจีนอลจะไปรวมตัวนอนอยู่ที่ก้นหลอด ซึ่งต่างไปจากน้ำมันทั่วไปที่จะลอยอยู่บนผิวนํ้า
3. ลักษณะการแยกชั้นแบ่งได้เป็น
 - ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่น ไม่มีการแยกของหยดน้ำมัน
 - + ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยดน้ำมันที่ก้นหลอดเล็กน้อย
 - ++ ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยดน้ำมันใหญ่ที่ก้นหลอด
 - +++ ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยดน้ำมันแยกได้เป็นชั้นที่ก้นหลอด
 - ++++ อิมัลชันแยกชั้นชัดเจน

ตาราง 3.18 การประเมินผลของคู่ของสารก่ออิมัลชันต่อความคงตัวของอิมัลชัน (HLB = 10)

ความเข้มข้น (% w/w)	การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที			การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์		
	% Creaming	Cracking	App-η (s)	% Creaming	Cracking	App-η (s)
T20S20	2.56	-	5.00 (SD 1.00)	3.27 (SD 2.95)	+++	3.00 (SD 0.00)
T20S60	-	+	5.33 (SD 0.58)	-	++	ไม่ไหล
T20S80	-	-	5.00 (SD 0.00)	2.52 (SD 1.66)	++	3.33 (SD 0.58)
T60S20	2.59	-	5.33 (SD 0.58)	-	++	3.67 (SD 0.58)
T60S60	-	-	4.67 (SD 0.58)	-	+	5.67 (SD 4.04)
T60S80	3.41	+	5.33 (SD 2.31)	-	+	3.67 (SD 0.58)
T80S20	1.08	-	5.00 (SD 1.00)	2.11	++	3.33 (SD 1.53)

ความเข้มข้น (% w/w)	การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที			การประเมินหลังตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์		
	% Creaming	Cracking	App-η (s)	% Creaming	Cracking	App-η (s)
T80S60	1.00	-	5.00 (SD 1.73)	2.06	+	3.33 (SD 0.58)
T80S80	-	-	5.00 (SD 1.00)	-	-	3.00 (SD 1.73)

หมายเหตุ

1. ลักษณะของอิมัลชันเริ่มต้นเป็นลักษณะขาวขุ่นเหมือนน้ำมันมทุกหลอด
2. ลักษณะการแยกชั้นแบ่งได้เป็น
 - ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่น ไม่มีการแยกของหยดน้ำมัน
 - + ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยดน้ำมันที่ก้นหลอดเล็กน้อย
 - ++ ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยดน้ำมันใหญ่ที่ก้นหลอด
 - +++ ยังคงเป็นอิมัลชันขาวขุ่นแต่มีหยดน้ำมันแยกได้เป็นชั้นที่ก้นหลอด
 - ++++ อิมัลชันแยกชั้นชัดเจน

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การประเมินผลตำรับภายหลังการเตรียม พบว่าอิมัลชันมีลักษณะเป็นอิมัลชันสีขาวขุ่น คล้ายน้ำมัน ซึ่งแม้ว่าการทดลองนี้จะไม่สามารถทดสอบชนิดของอิมัลชันที่ประเมินจากความสามารถในการละลายของสีระหว่างในวัตถุน้ำและน้ำมันได้ เนื่องจากสีที่ใช้ทดสอบ methylene blue สามารถละลายได้ทั้งในน้ำมันยูจีนอลและในน้ำ อย่างไรก็ตามจากการประเมินสัดส่วนของปริมาณของวัตถุน้ำและน้ำมันแล้ว ตำรับนี้ น่าจะเป็นประเภทน้ำในน้ำมัน เนื่องจากปริมาณของน้ำในตำรับค่อนข้างสูงถึงร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก
2. เนื่องจากน้ำมันที่ใช้เป็นน้ำมันยูจีนอลที่มีลักษณะเป็นของเหลว อมเหลือง ความถ่วงจำเพาะไม่มากนัก (specific gravity: 1.064- 1.070) ความเข้มข้นที่ใช้เพียงร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก และองค์ประกอบส่วนใหญ่ของตำรับเป็นน้ำ ดังนั้นตำรับที่เตรียมได้ จึงได้มีความหนืดน้อย ไหลได้ง่าย และระยะเวลาในการไหลจึงไม่แตกต่างกันมากนัก ยกเว้นในกรณีที่ใช้ความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันในปริมาณที่สูงเช่น ร้อยละ 15 โดยน้ำหนักตำรับจะไหลยากขึ้น แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้นานพบว่าตำรับอิมัลชันที่ได้ไม่มีความคงตัว ถึงแม้จะมีความหนืดสูง
3. ความไม่คงตัวของตำรับส่วนใหญ่เกิดจากการเกิด creaming ซึ่งจะพบหยดน้ำมันยูจีนอลแยกชั้นออกมาอยู่ด้านล่าง เป็นเพราะน้ำมันยูจีนอลนั้นหนักกว่าน้ำ ส่วนการเกิด cracking พบว่าตำรับที่เตรียมได้ส่วนใหญ่ไม่เกิด

cracking ยกเว้นในกรณีที่ใช้สารก่ออิมัลชันเป็น Tween 20 และ Span 60 ซึ่งพบว่าการเกิด cracking ทั้ง 3 ครั้งที่มีการทำการทดลอง

4. สำหรับการหาค่า HLB ที่มีเหมาะสมเมื่อใช้ Tween 80 และ Span 80 เป็นสารก่ออิมัลชันที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก พบว่า HLB 8 และ HLB 10 ทำให้ตำรับมีความคงตัวยังคงเป็นอิมัลชันดี แม้จะตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา นาน ดังแสดงในตารางที่ 4 และเมื่อกำหนดให้ HLB ของตำรับเท่ากับ 10 โดยน้ำหนัก โดยใช้ Tween 80 และ Span 80 เป็นสารก่ออิมัลชัน พบว่า ความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันร้อยละ 5 และ 10 เป็นความเข้มข้นที่ทำให้ตำรับอิมัลชัน ยูจีนอลมีความคงตัวเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 5
5. อิทธิพลของคู่สารทำอิมัลชันชนิดต่างๆ ต่อความคงตัวของอิมัลชันซึ่งกำหนดให้ HLB เท่ากับ 10 และความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันเท่ากับร้อยละ 5 พบว่าคู่สารก่ออิมัลชัน Tween 20 และ Span 80 กับ Tween 80 และ Span 80 ให้อิมัลชันที่มีความคงตัวดีเมื่อตั้งทิ้งไว้ ดังแสดงผลในตารางที่ 6
6. เมื่อพิจารณาผลของการทดลองในภาพรวมพบว่าการใช้สารก่ออิมัลชันเป็น Tween 80 และ Span 80 โดยกำหนดให้ Total required HLB ของตำรับเท่ากับ 10 และความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันเท่ากับร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก น่าจะเหมาะสมในการนำมาเตรียมตำรับยูจีนอลอิมัลชัน

สรุปผลการทดลองการเตรียมตำรับสารอนุพันธ์ของยูจีนอลที่สังเคราะห์ได้

จากผลการทดลองพบว่าตำรับที่เหมาะสมในการเตรียมยูจีนอลอิมัลชันให้มีความคงตัวคือ ตำรับที่มีสารก่ออิมัลชันเป็น Tween 80 และ Span 80 โดยกำหนดให้ Total required HLB ของตำรับเท่ากับ 10 และความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันเท่ากับร้อยละ 5 และตำรับอนุพันธ์ของยูจีนอลที่เตรียมได้ทั้งหมดจะถูกส่งไปทดสอบฤทธิ์ที่ภาควิชาวชิชาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาต่อไป

3.3 การทดสอบฤทธิ์การสลบในสัตว์น้ำ

การทดสอบฤทธิ์ในสัตว์น้ำเป็นงานทางด้านวชิรศาสตร์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยเน้นเฉพาะฤทธิ์การเป็นยาสลบในสัตว์น้ำประเภทปลา กุ้ง และปูเป็นหลัก โดยงานในส่วนนี้ดำเนินการโดย ผศ.ดร.บุญรัตน์ ประทุมชาติ และดร.ธนอมศักดิ์ บุญศักดิ์ ณ ภาควิชาวชิรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยทำการทดลองภายในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวชิรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี โดยสัตว์ทดลองทั้งหมดเป็นสัตว์เศรษฐกิจ ต้องการการสลบเพื่อการขนส่ง และมีผลกระทบทางธุรกิจของประเทศไทยสูง แบ่งเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ครัสเตเชียน (Crustacean)

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ปูม้า (*Portunus pelagicus*)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มปลาที่มีเกล็ด

ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

กลุ่มที่ 3 ปลาไม่มีเกล็ด

ปลาตุ๊กปึกอุย (male *Clarias gariepinus* x female *Clarias macrocephalus*)

สัตว์ทดลองทั้งหมดจะพักไว้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวชิรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มีแสงนปิดบ่อเพื่อลดแสงประมาณ 60% ให้ออกซิเจนที่ 6.5 ppm ความเค็มน้ำ 10 ppt (กรณีน้ทะเล) อุณหภูมิ น้ำ 27-29 °C pH 7.8-8.5 และงดให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง โดยน้ำทะเลที่ใช้ได้มาจากแหล่งตำบลแสมสาร จังหวัดชลบุรี

ในการทดลองทั้งหมดนี้ จะใช้ความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ที่ 25 และ 50 ppm โดยพิจารณาจากรายงานในเอกสารอ้างอิงหลายฉบับ ซึ่งส่วนใหญ่จะให้ความเข้มข้นในการทดสอบการสลบปลาอยู่ในช่วง 15-80 ppm ขึ้นอยู่กับชนิดของปลาหรือสัตว์น้ำที่ใช้ และขนาดน้ำหนักตัวของสัตว์น้ำ ประกอบกับผลการทดลองเบื้องต้นที่มีมาก่อนหน้านี้ว่าความเข้มข้นในช่วง 20-50 ppm เป็นความเข้มข้นที่สามารถสลบปลาได้ถึงระยะที่ 2 โดยมีอัตราการรอดสูง

การทดสอบจะทดสอบในสัตว์น้ำ 4 ชนิด ได้แก่ 1. ปลาตุ๊กปึกอุย 2. ปลากะพงขาว 3. กุ้งขาว และ 4. ปูม้า และในสัตว์น้ำแต่ละชนิดจะทำการทดลอง 3 ขั้นตอน คือ

1. ระยะเวลาในการสลบ (Anesthetic time)

ระยะเวลาในการสลบ หมายถึง ระยะเวลาที่ทำให้สัตว์น้ำเริ่มสลบในระดับที่ 3 (ตาราง 3.19) หลังจากนำสัตว์น้ำลงสู่ภาชนะที่มีสารอนุพันธ์อยู่ โดยสารอนุพันธ์ที่มีระยะเวลาในการสลบที่เร็ว หมายความว่า การออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ที่รวดเร็ว โดยจะเปรียบเทียบกับยูจีนอลเป็นหลัก

2. ระยะเวลาในการฟื้นสลบ (Recovery time)

ระยะเวลาในการฟื้นสลบ หมายถึง ระยะเวลาที่ทำให้สัตว์น้ำเริ่มฟื้นจากการสลบเข้าสู่ภาวะปกติ หลังจากนำสัตว์น้ำลงสู่ภาชนะพักฟื้น โดยสารอนุพันธ์ที่มีระยะเวลาในการฟื้นสลบที่ช้า หมายความว่า การออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ที่ยาวนาน โดยจะเปรียบเทียบกับยูจีนอลเป็นหลัก

3. อัตราการรอดตาย (Survival rate)

อัตราการรอดตาย หมายถึง จำนวนของสัตว์น้ำที่นำมาทำการทดลอง หลังจากที่ผ่านมาการทดลองแล้ว 24 ชั่วโมง สารอนุพันธ์ที่มีอัตราการรอดตายสูง หมายความว่า ความปลอดภัยในการนำมาใช้กับสัตว์น้ำชนิดนั้น โดยจะเปรียบเทียบกับยูจีนอลเป็นหลัก โดยอัตราการรอดตายของสัตว์น้ำที่ยอมรับได้ คือ มากกว่าร้อยละ 80

สรุปหลักเกณฑ์ในการพิจารณาสารอนุพันธ์ที่มีศักยภาพในการเป็นยาสลบสัตว์น้ำ

1. ใช้ระยะเวลาในการสลบสัตว์น้ำได้เร็ว (สลบได้เร็ว) ใกล้เคียงหรือดีกว่ายูจีนอล
2. ใช้ระยะเวลาในการฟื้นสลบสัตว์น้ำนาน (สลบได้นาน) ใกล้เคียงหรือนานกว่ายูจีนอล
3. มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 80
4. มีวิธีการสังเคราะห์ง่าย ไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน

ตาราง 3.19 ระดับของการสลบของสัตว์น้ำ

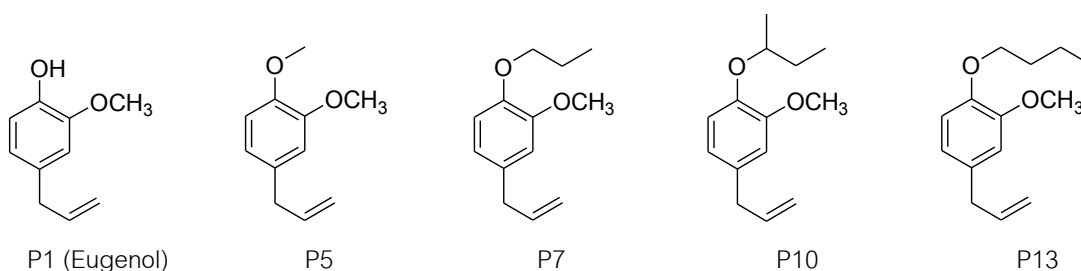
ระดับ	ลักษณะ	พฤติกรรมหรือการตอบสนอง
1	Sedation	การเคลื่อนไหวและการหายใจลดลง
2	Anesthesia	เสียสมดุลบางส่วน และมีการตอบสนองต่อการจับหรือสัมผัส
3	Surgical anesthesia	เสียสมดุลทั้งหมด และไม่ตอบสนองต่อการจับหรือการสัมผัส
4	Death	หยุดหายใจและหัวใจหยุดทำงาน

ที่มา : Coyle, S. D.; Durborow, R. M.; Tidwell, J. H., *Anaesthetics in aquaculture*. Kentucky State University Aquaculture Research Center. 2004.

3.3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การสลบในปลาอุกบึกอุย

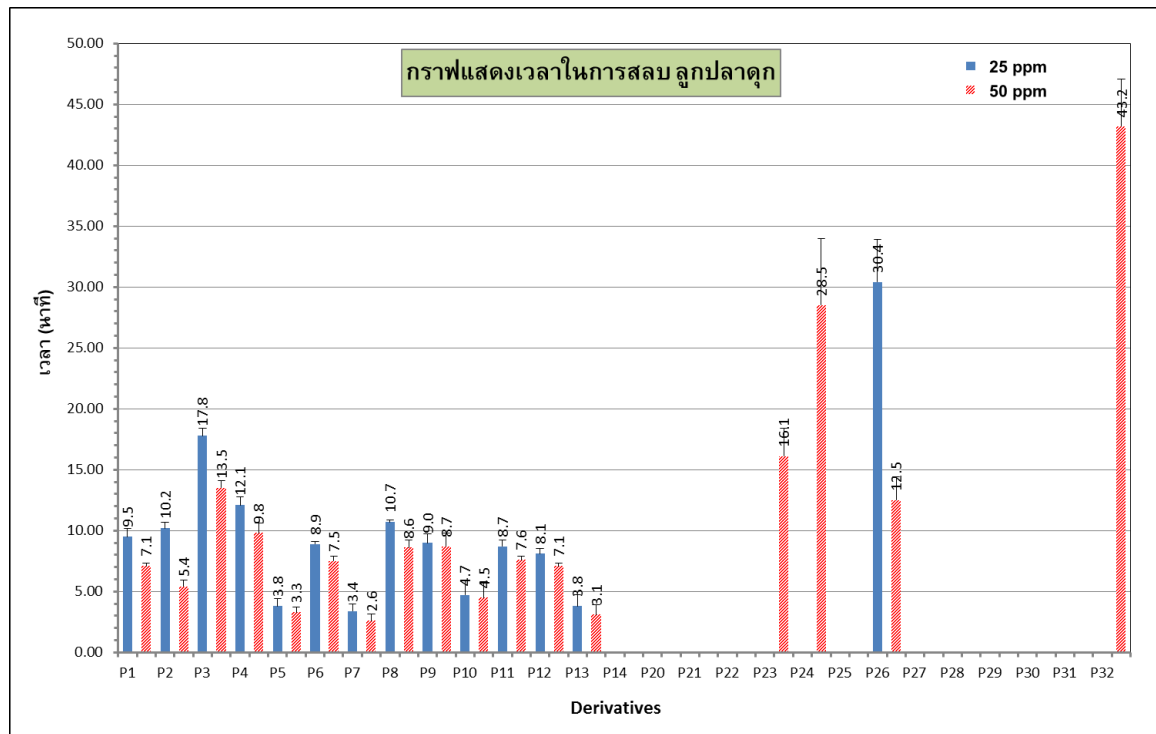
ปลาอุกที่ใช้ในการทดลองมี 2 ขนาด ได้แก่ วัยอ่อน (ความยาวเฉลี่ย 2.8 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 4.2 กรัม) และวัยรุ่น (ความยาวเฉลี่ย 18.3 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 80.5 กรัม) ก่อนการทดลองจะพักไว้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มีแอสอนปิดบ่อเพื่อลดแสงประมาณ 60% ให้ออกซิเจนที่ 6.5 ppm อุณหภูมิ 27-29 °C pH 7.8-8.2 และงดให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง

ในการทดลองทั้งหมดนี้ จะใช้ความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ที่ 25 และ 50 ppm หลังจากทดสอบใช้ความเข้มข้นทั้งสองความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ยูจีนอลที่เตรียมได้ทั้งสิ้น 25 ชนิด (P2-13 และ P20-P32) และชุดควบคุม P14 (control) ที่ไม่มีสารอนุพันธ์ของยูจีนอล เปรียบเทียบกับยูจีนอล (P1) พบว่า การออกฤทธิ์ต่อปลาอุกวัยอ่อนและปลาอุกวัยรุ่นมีลักษณะใกล้เคียงกันโดยสามารถพิจารณาได้จากกราฟการสลบ การฟื้นสลบ และอัตราการรอดตายที่มีลักษณะเหมือนกัน โดยสารอนุพันธ์ที่ให้ประสิทธิภาพดีในการสลบปลาทั้ง 2 กลุ่ม คือ P5 P7 P10 และ P13 โดยพิจารณาจากระยะเวลาที่สั้นที่สุดที่สามารถทำให้ปลาสลบได้ เมื่อเทียบกับยูจีนอล (P1) (กราฟ 3.1a-b)

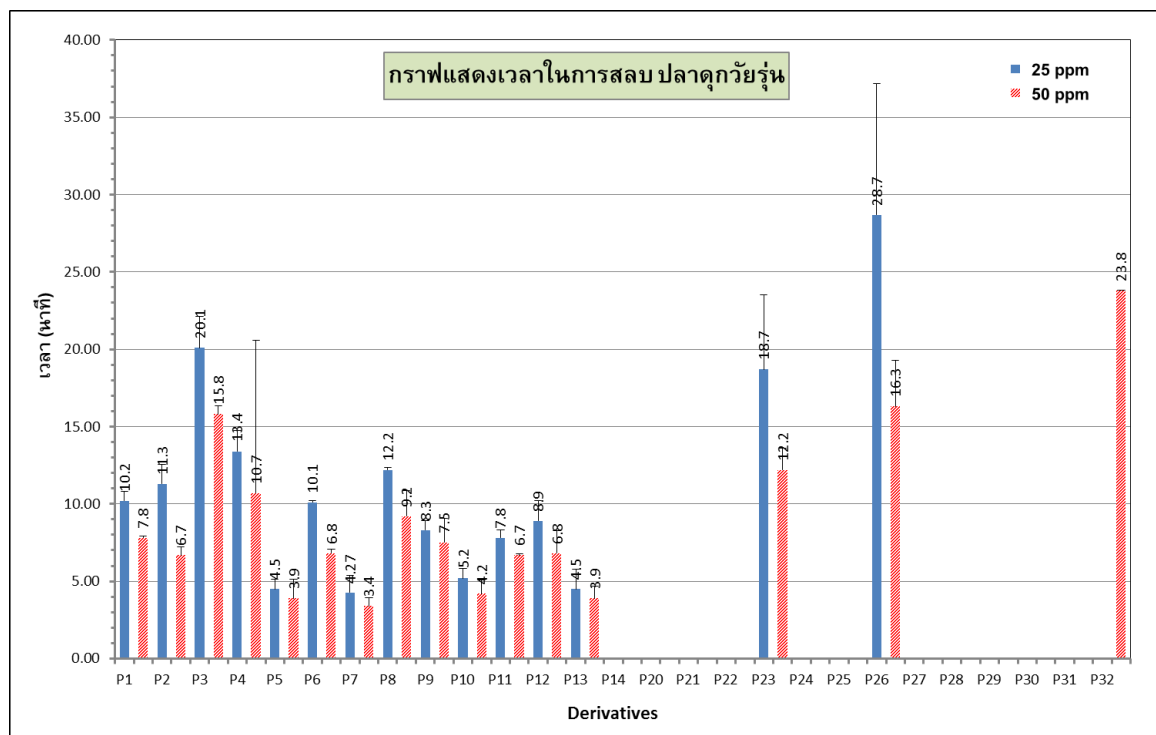


เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างแล้ว จะเห็นว่าอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้ดี ส่วนใหญ่จะเป็นอนุพันธ์ที่ทำการดัดแปรหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซี (-OH) ของยูจีนอลให้เป็นหมู่แอลคิลชนิดต่างๆ (methyl ถึง heptyl) P5-P13 ซึ่งจะให้ฤทธิ์ในการสลบเทียบเท่าหรือดีกว่ายูจีนอล โดยอนุพันธ์ที่ให้ฤทธิ์การสลบที่ดี จะมีโครงสร้างที่มีความยาวของสายโซ่คาร์บอนประมาณ 1-4 อะตอม (methyl ใน P5, propyl ใน P7, sec-butyl ใน P10 และ butyl ใน P13) ยกเว้น ethyl ที่จะให้ผลในทำนองเดียวกับ pentyl hexyl และ heptyl คือออกฤทธิ์ไม่ต่างจากยูจีนอลมากนัก

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของสายคาร์บอนที่หมู่ไฮดรอกซีและเวลาในการสลบของทั้งปลาอุกวัยอ่อนและปลาอุกวัยรุ่น แสดงดังกราฟ 3.2a-b จะพบว่าอนุพันธ์ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 (C1) 3 (C3 และ C4B) และ 4 (C4) อะตอม จะให้ฤทธิ์การสลบที่ดี แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มหมู่แอลคิลที่มีความยาวและขนาดที่เหมาะสม โดยไม่ยาวเกินไป หรือสั้นเกินไปที่ตำแหน่งของไฮดรอกซี จะเพิ่มประสิทธิภาพในการสลบปลาอุกทั้งปลาอุกวัยอ่อนและปลาอุกวัยรุ่นได้

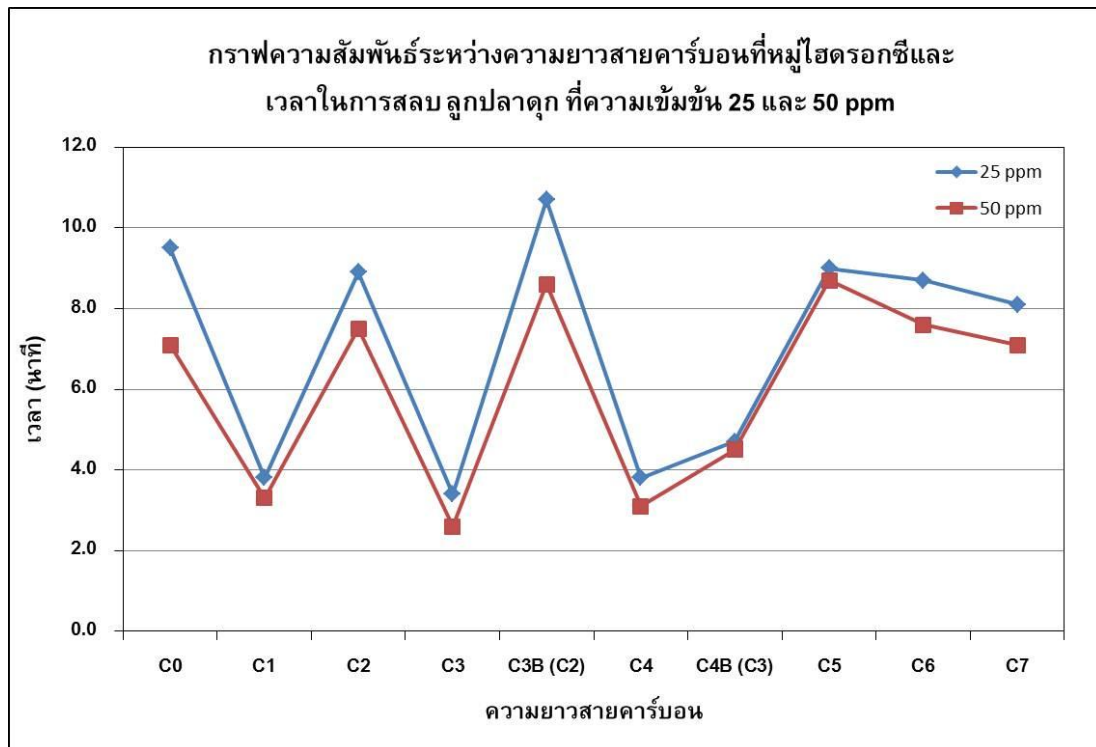


a)

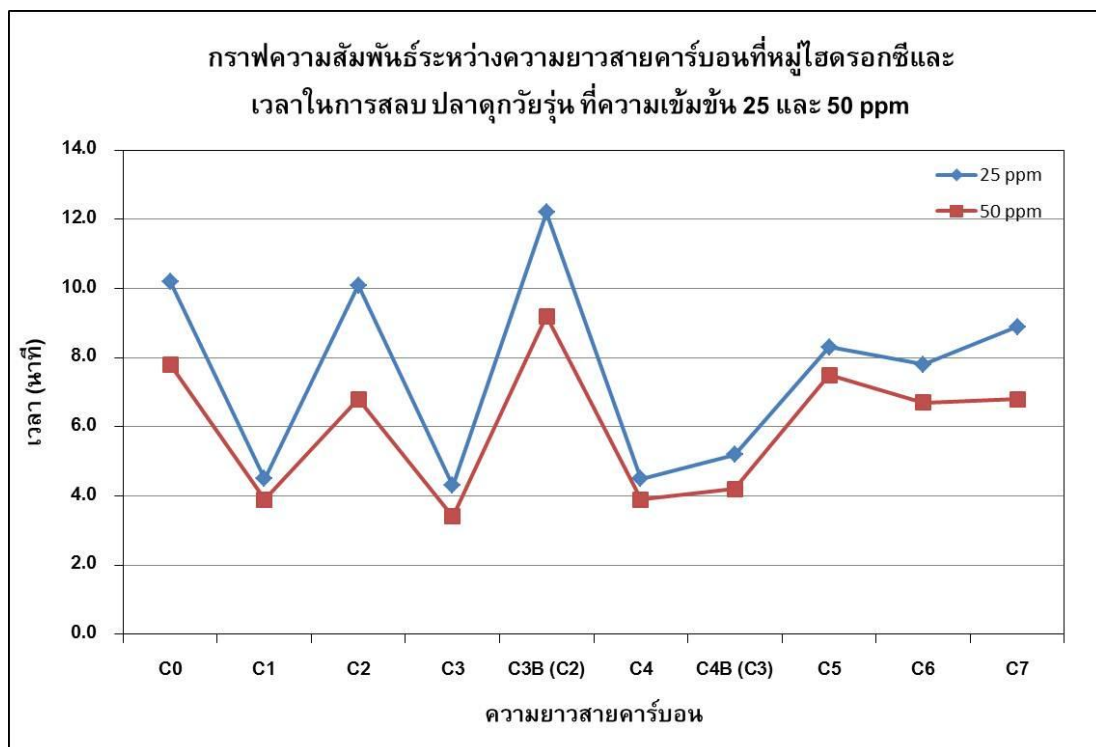


b)

กราฟ 3.1 เวลาที่ใช้ในการสลับปลาตกลูกผสม a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น ด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm



a)



b)

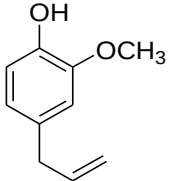
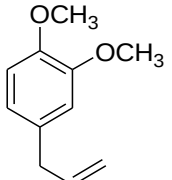
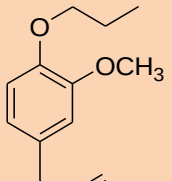
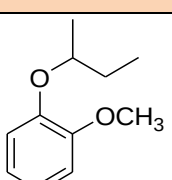
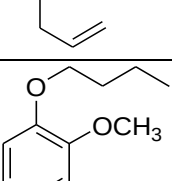
กราฟ 3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวสายคาร์บอนกับเวลาในการสลับปลูกปลาดุกผสม a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น ด้วยอนุพันธ์ P1 (C0) P5 (C1) P6 (C2) P7 (C3) P8 (C3B) P13 (C4) P10 (C4B) P9 (C5) P11 (C6) P12 (C7) ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

โดยในกลุ่มปลาตุ๋นและปลาตุ๋นร้อน สารอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด คือ P7 เมื่อเทียบกับยูจีนอล (P1) กล่าวคือ ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm จะสามารถสลบได้ภายในเวลา 3.4 และ 2.6 นาที สำหรับปลาตุ๋นร้อนและ 4.3 และ 3.4 นาที สำหรับปลาตุ๋นเย็น ซึ่งออกฤทธิ์เร็วกว่ายูจีนอลทั้ง 2 กรณี (9.5 และ 7.1 นาที และ 10.2 และ 7.8 นาที ตามลำดับ) ระยะเวลาฟื้นคืน 36.7 และ 43.5 นาที สำหรับปลาตุ๋นร้อน และ 30.6 และ 40.5 นาที สำหรับปลาตุ๋นเย็น ซึ่งช้ากว่ายูจีนอลทั้ง 2 กรณี (14.5 และ 16.7 นาที และ 10.3 และ 12.4 นาที ตามลำดับ) และอัตราการรอดตายอยู่ที่ 100% เมื่อเทียบกับยูจีนอลที่มีอัตราการรอดตายอยู่ที่ 86% และ 75% และ 81% และ 70% ตามลำดับ โดยสารที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน คือ P5 P10 และ P13 คือ มีระยะเวลาที่ใช้ในการสลบที่ช้ากว่า และมีระยะเวลาในการฟื้นคืนสลบเร็วกว่า และอัตราการรอดตายสูง มากกว่า 80% ซึ่งทั้งสามอนุพันธ์ก็ให้ผลที่ดีกว่ายูจีนอล และสามารถสรุปได้ว่าอนุพันธ์ P7 นั้นออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดแสดงดังตาราง 3.20

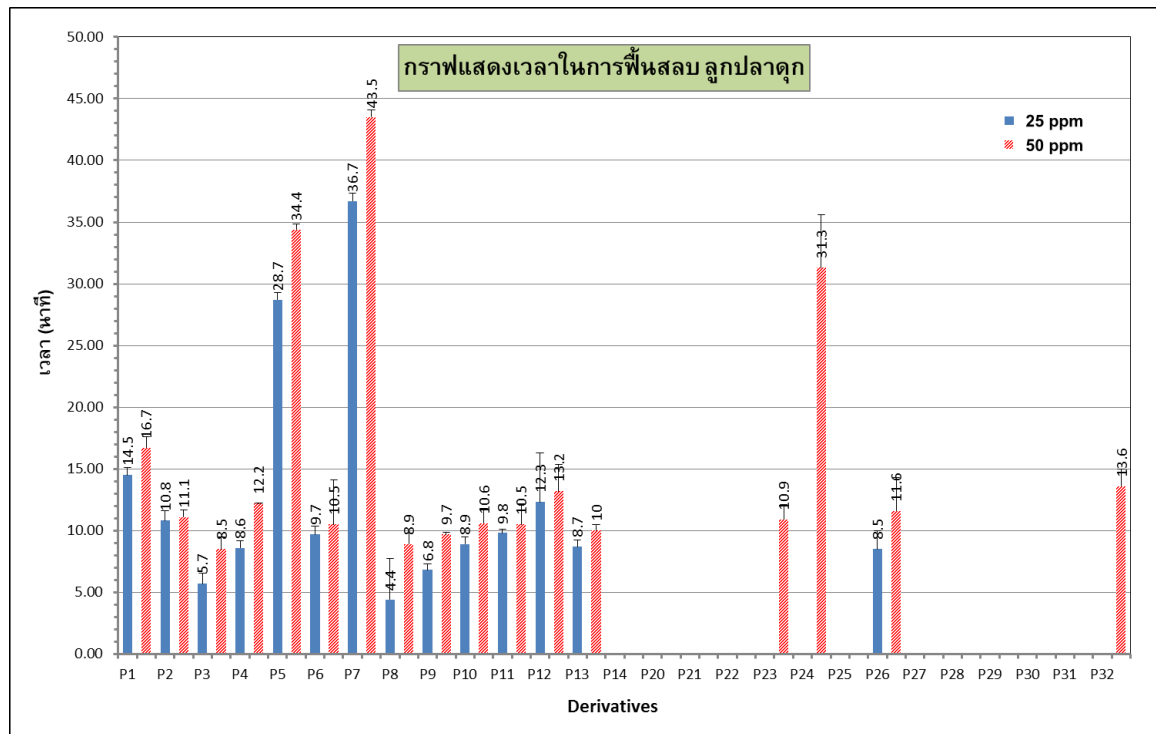
สำหรับการทดลองการฟื้นการสลบ จะให้ผลสอดคล้องกับผลการสลบ คือ อนุพันธ์ที่มีระยะเวลาในการออกฤทธิ์สั้น จะใช้ระยะเวลาในการฟื้นสลบนาน ดังจะเห็นได้จากกราฟที่ 3.3a-b อนุพันธ์ P5 และ P7 ซึ่งใช้เวลาในการสลบได้รวดเร็ว จะใช้เวลาในการฟื้นสลบค่อนข้างนาน ประมาณ 30-40 นาที กล่าวคือสารอนุพันธ์ยังออกฤทธิ์ได้ดี แม้จะมีการเคลื่อนย้ายปลาจากอ่างสลบมายังอ่างพักฟื้นแล้วก็ตาม ซึ่งในขณะที่อนุพันธ์ชนิดอื่นๆ จะใช้เวลาในการฟื้นสลบได้เร็วกว่า โดยจะใช้ระยะเวลาในการฟื้นสลบประมาณ 5-15 นาที

เมื่อพิจารณาผลการทดลองทั้งหมด จะพบว่าอนุพันธ์ที่มีศักยภาพที่ดีที่จะใช้ในการสลบปลาคือ อนุพันธ์ P5 และ P7 เนื่องจากสามารถสลบปลาคูได้รวดเร็วเร็วกว่ายูจีนอล ถึงแม้ว่าจะใช้ระยะเวลาในการฟื้นสลบค่อนข้างนาน แต่ถ้าพิจารณาในทางปฏิบัติ การฟื้นสลบที่ช้าจะทำให้มีระยะเวลาในการเคลื่อนย้ายหรือทำกิจกรรมอื่นๆ ได้มากกว่า และนอกจากนี้ อนุพันธ์ P5 และ P7 ยังมีอัตราการรอดที่สูงกว่า P10 P13 และยูจีนอลอีกด้วย

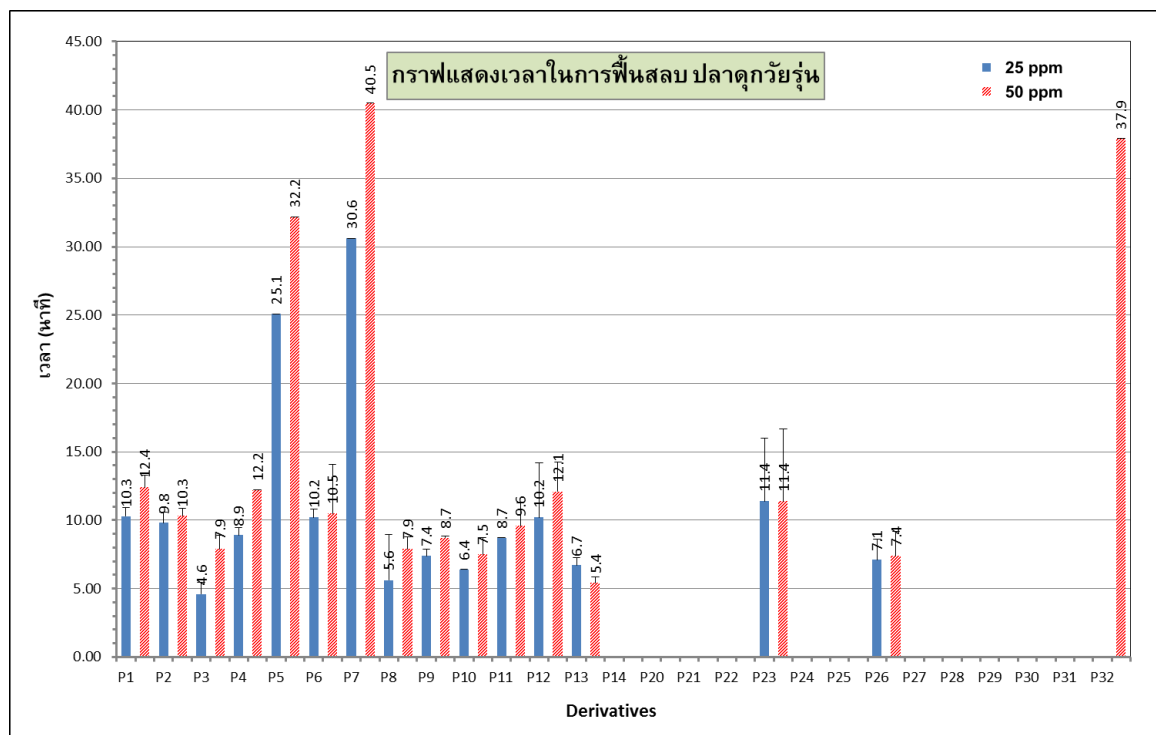
ตาราง 3.20 สารอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการสลบปลาดุกลูกผสม ระยะวัยอ่อนและวัยรุ่น ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

อนุพันธ์	โครงสร้าง	conc	เวลาในการสลบ (นาที)		เวลาในการฟื้นสลบ (นาที)		อัตราการรอดตาย (%)	
			ลูก	วัยรุ่น	ลูก	วัยรุ่น	ลูก	วัยรุ่น
P1 (Eugenol)		25	9.5±0.7	10.2±0.6	14.5±0.6	10.3±0.6	86±4	81±4
		50	7.1±0.2	7.8±0.1	16.7±0.9	12.4±0.9	75±7	70±7
P5		25	3.8±0.6	4.5±0.6	28.7±0.6	25.1±0.0	100±2	100±2
		50	3.3±0.4	3.9±1.2	34.4±0.4	32.2±0.0	94±3	100±3
P7		25	3.4±0.6	4.3±1.1	36.7±0.6	30.6±0.0	100±2	100±2
		50	2.6±0.5	3.4±0.5	43.5±0.6	40.5±0.0	100±2	100±2
P10		25	4.7±1.2	6.2±0.6	8.9±0.6	6.4±0.0	100±1	100±1
		50	4.5±1.3	4.2±0.9	10.6±1.2	7.5±1.2	86±2	90±2
P13		25	4.8±0.9	4.5±1.3	8.7±0.6	6.7±0.6	92±5	92±5
		50	3.1±0.8	3.9±0.8	10.0±0.5	5.4±0.5	94±5	88±5
P14 (Placebo)	-	25	NA	NA	NA	NA	100±0	100±0
		50	NA	NA	NA	NA	100±0	100±0

*NA = No Anesthetic (ไม่แสดงฤทธิ์การสลบ)

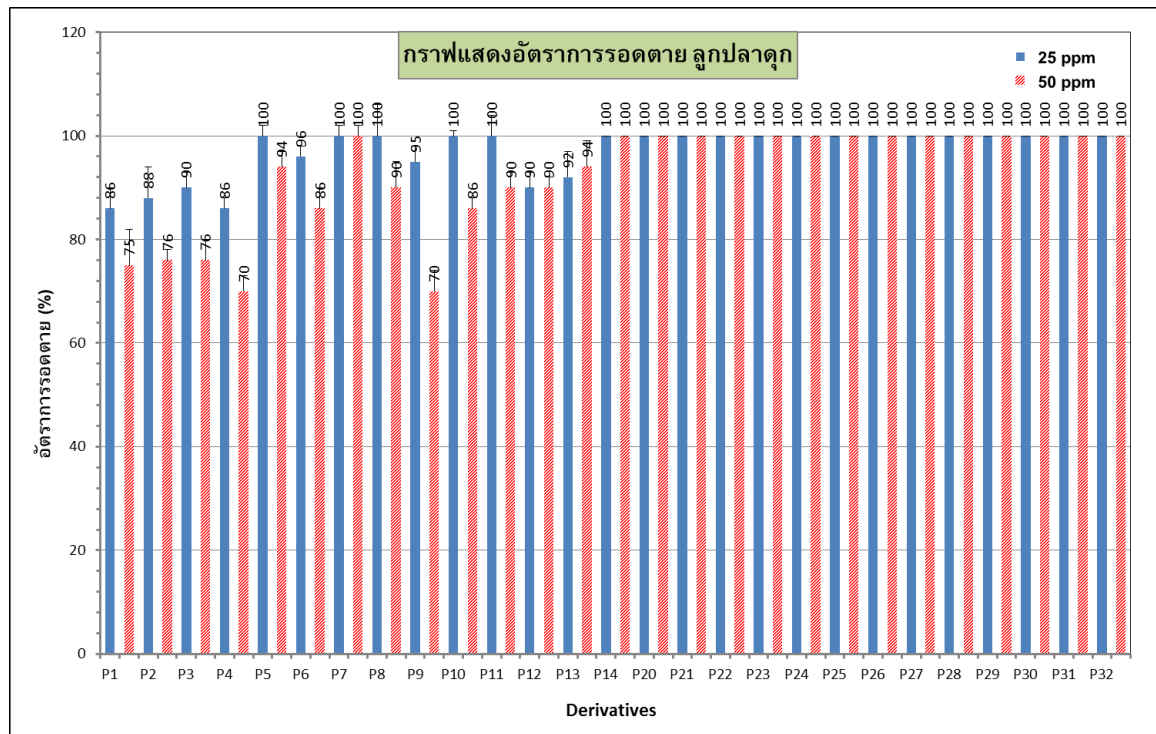


a)

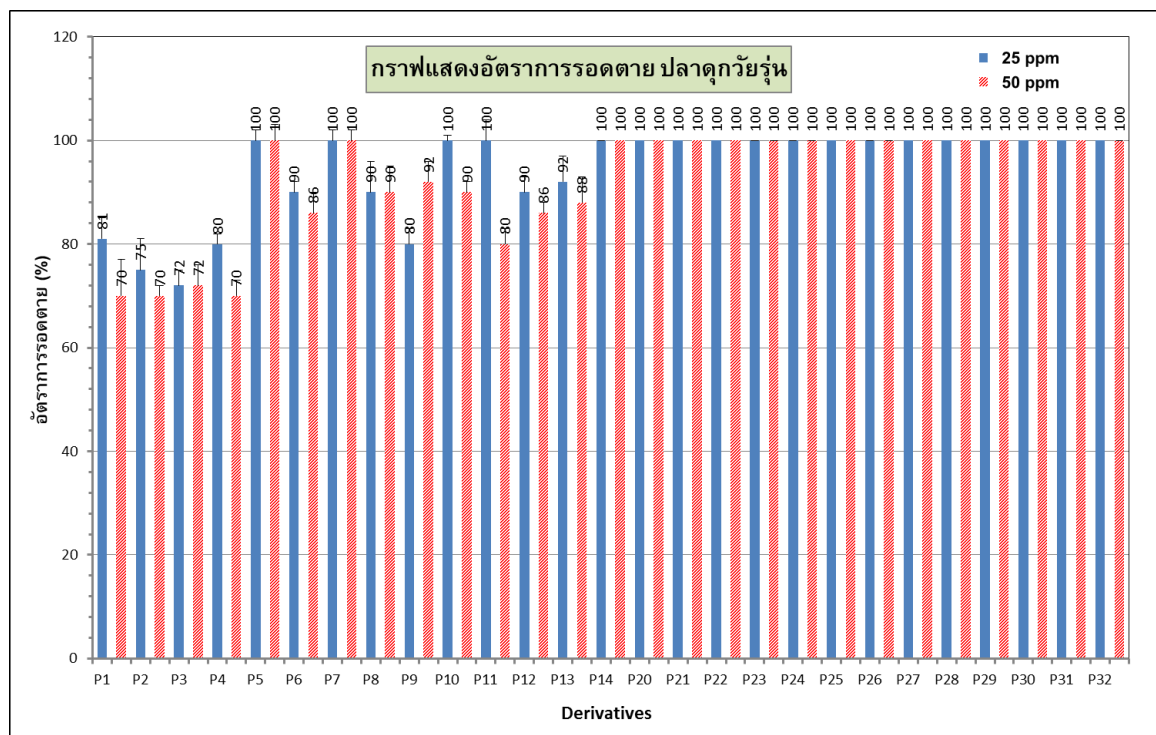


b)

กราฟ 3.3 ระยะเวลาที่ใช้ในการฟื้นของปลาดุกลูกผสม a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น ด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm



a)



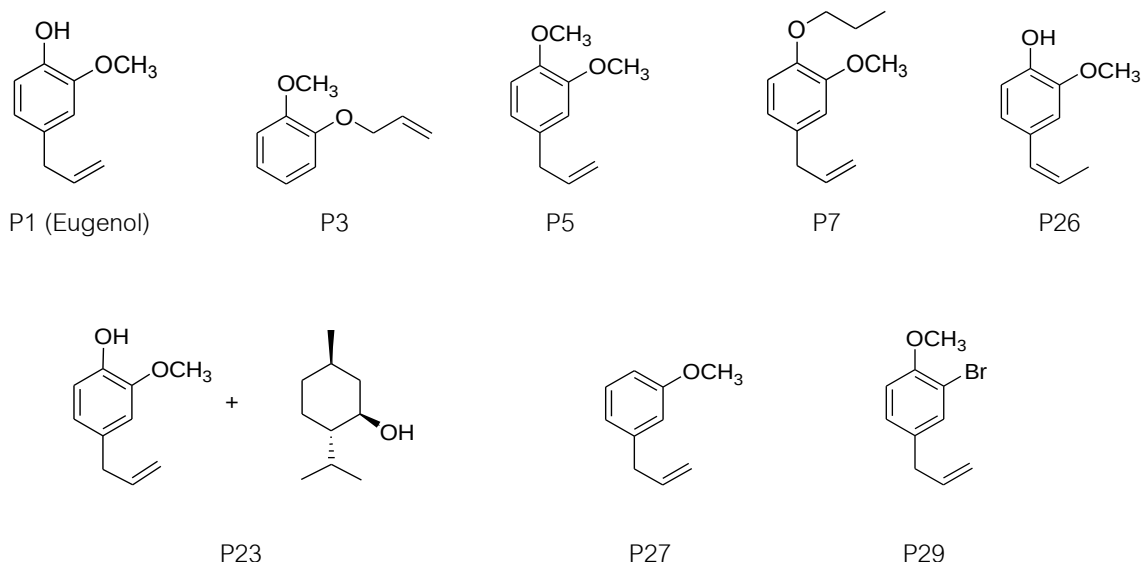
b)

กราฟ 3.4 อัตราการรอดตายของปลาดุกลูกผสม a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น เมื่อทำการสลับด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

3.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การสลายในปลากะพงขาว

ปลากะพงขาวที่ใช้ในการทดลองมี 2 ขนาด ได้แก่ ปลากะพงขาววัยอ่อน (ความยาวเฉลี่ย 1.1 เซนติเมตร) ปลากะพงขาววัยรุ่น (ความยาวเฉลี่ย 9.7 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 15.3 กรัม) ก่อนการทดลองจะพักไว้ภายในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มีแสงนปิดบ่อเพื่อลดแสงประมาณ 60% ให้ออกซิเจนที่ 6.5 ppm อุณหภูมิที่ 27-29 °C pH 7.8-8.2 และงดให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง

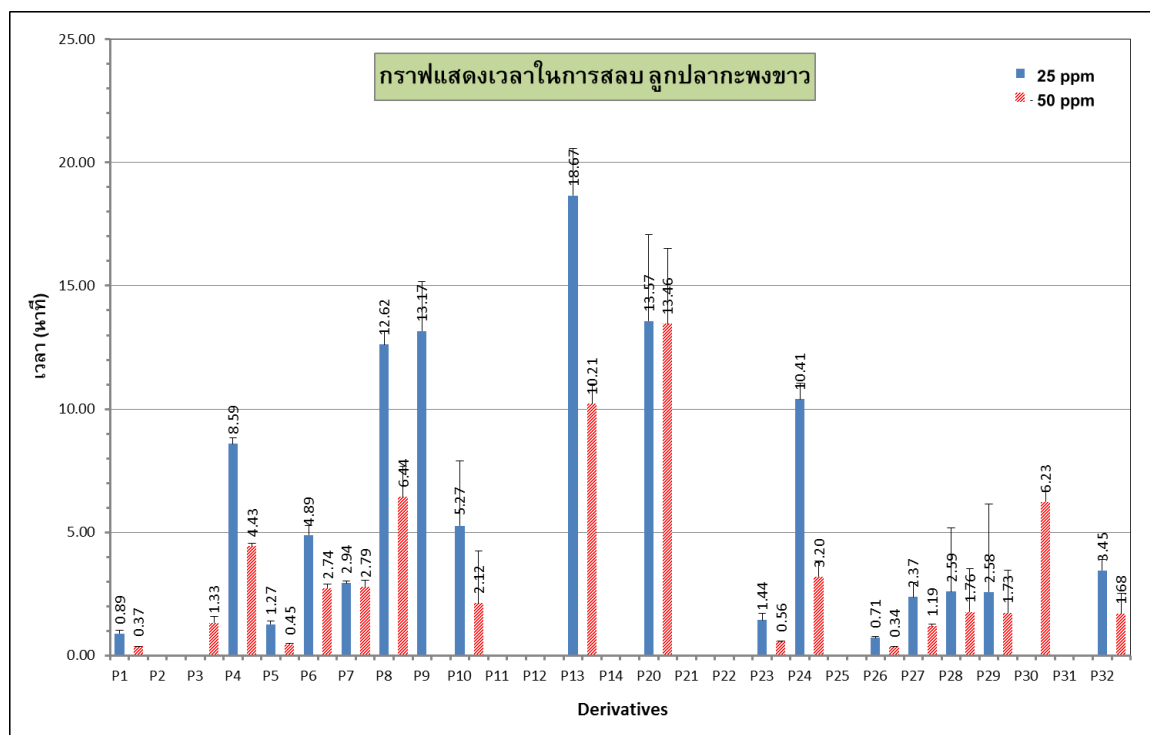
ในการทดลองทั้งหมดนี้ จะใช้ความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ที่ 25 และ 50 ppm หลังจากทดสอบใช้ความเข้มข้นทั้งสองความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ยูจีนอลที่เตรียมได้ทั้งสิ้น 25 ชนิด (P2-13 และ P20-P32) และชุดควบคุม P14 (control) ที่ไม่มีสารอนุพันธ์ของยูจีนอล เปรียบเทียบกับยูจีนอล (P1) พบว่า การออกฤทธิ์ต่อลูกปลากะพงและปลากะพงขาววัยรุ่นมีผลแตกต่างกันเล็กน้อย โดยสามารถพิจารณาได้จากกราฟการสลายเป็นหลัก (กราฟ 3.5a-b) โดยสารอนุพันธ์ที่ให้ประสิทธิภาพดีในการสลายปลาทั้ง 2 กลุ่ม คือ อนุพันธ์ที่สามารถสลายปลากะพงขาววัยอ่อน และปลากะพงขาววัยรุ่น ได้ภายในเวลา 5 นาที ได้แก่ P3 P4 P5 P6 P7 P8 P23 P24 P26 P27 P28 P29 และ P32 รวม 13 ชนิด โดยพิจารณาจากระยะเวลาที่สั้นที่สุด เมื่อเทียบกับยูจีนอล (P1) ดังแสดงในตาราง 3.21 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบอนุพันธ์ที่มีศักยภาพในการสลายปลากะพงขาววัยอ่อน และปลากะพงขาววัยรุ่น โดยอนุพันธ์ P4 P6 P8 P24 จะออกฤทธิ์ได้เร็วในปลากะพงขาววัยรุ่น ส่วน P28 และ P32 จะออกฤทธิ์ได้เร็วในปลากะพงขาววัยอ่อน ดังนั้นเมื่อพิจารณาโดยรวมแล้วจะพบว่าอนุพันธ์ที่มีศักยภาพในการสลายปลากะพงขาววัยอ่อน และปลากะพงขาววัยรุ่น ได้แก่ P3 P5 P7 P23 P26 P27 และ P29 รวม 7 ชนิด



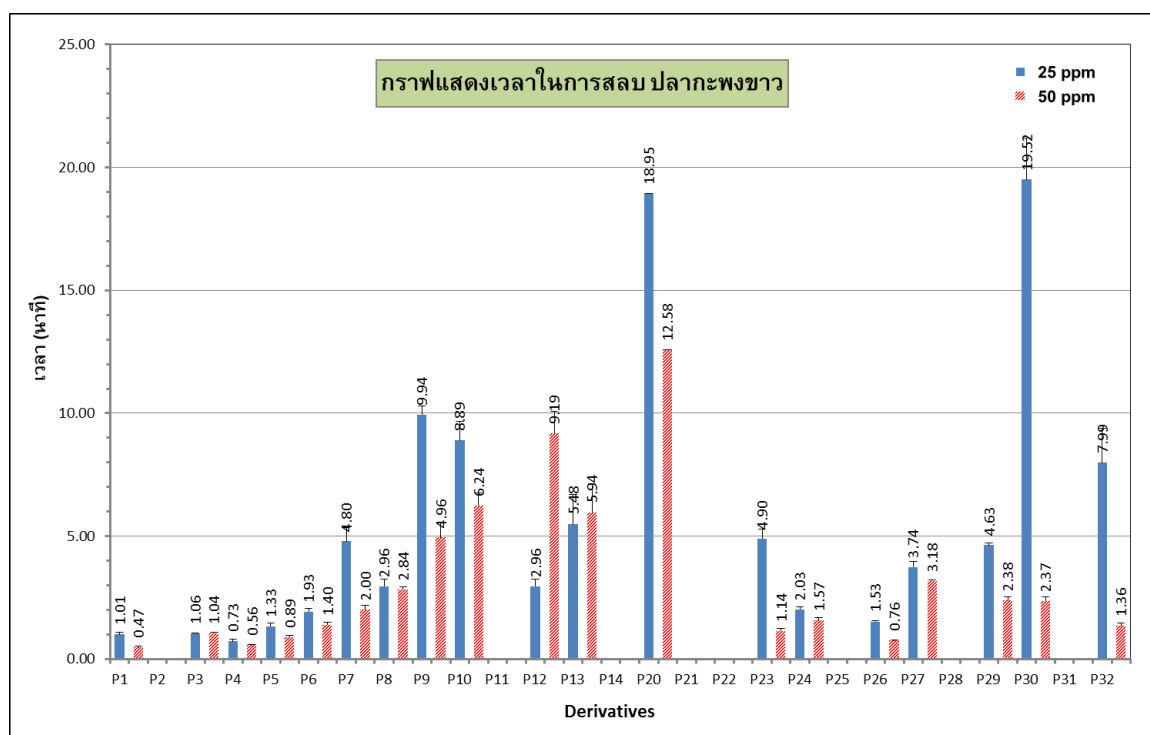
เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างแล้ว จะเห็นว่าอนุพันธ์ที่สามารถออกฤทธิ์การสลายปลาในกลุ่มปลากะพงขาวได้นั้นจะโครงสร้างที่หลากหลาย แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าอนุพันธ์ส่วนใหญ่จะเป็นอนุพันธ์ที่มีส่วนของแอลคิลอยู่ภายในโมเลกุล ในขณะที่หมู่ไฮดรอกซีและหมู่เมทอกซีนั้น จะต้องมีความเหมาะสม (เช่นเดียวกับกรณีของปลาอุก)

ตาราง 3.21 สารอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการสลายปลากะพงขาววัยอ่อนและปลากะพงขาววัยรุ่น ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

อนุพันธ์ (ความเข้มข้น/ppm)		เวลาที่ใช้ในการสลาย (นาที)	
		ลูกปลากะพงขาว	ปลากะพงขาววัยรุ่น
P1 Eugenol	25	0.89±0.12	1.01+0.09
	50	0.37±0.01	0.47+0.05
P3	25	NA	1.06+0.01
	50	1.33±0.26	1.04+0.04
P4	25	8.59±0.22	0.73+0.09
	50	4.43±0.11	0.56+0.01
P5	25	1.27±0.14	1.33+0.13
	50	0.45±0.04	0.89+0.07
P6	25	4.89±0.37	1.93+0.12
	50	2.74±0.15	1.40+0.11
P7	25	2.94±0.08	4.80+0.54
	50	2.79±0.26	2.00+0.19
P8	25	11.62±0.55	2.96+0.28
	50	6.44±1.25	2.84+0.11
P23	25	1.44±0.27	4.90+0.39
	50	0.56±0.03	1.14+0.09
P24	25	10.41±0.63	2.03+0.10
	50	3.20±0.65	1.57+0.12
P26	25	0.71±0.06	1.53+0.04
	50	0.34±0.03	0.76+0.02
P27	25	2.37±0.58	3.74+0.22
	50	1.19±0.06	3.18+0.04
P28	25	2.59±2.59	NA
	50	1.76±1.76	NA
P29	25	2.58±3.58	4.63+0.08
	50	1.73±1.73	2.38+0.16
P32	25	3.45±0.44	7.99+1.39
	50	1.68±0.85	1.36+0.13



a)



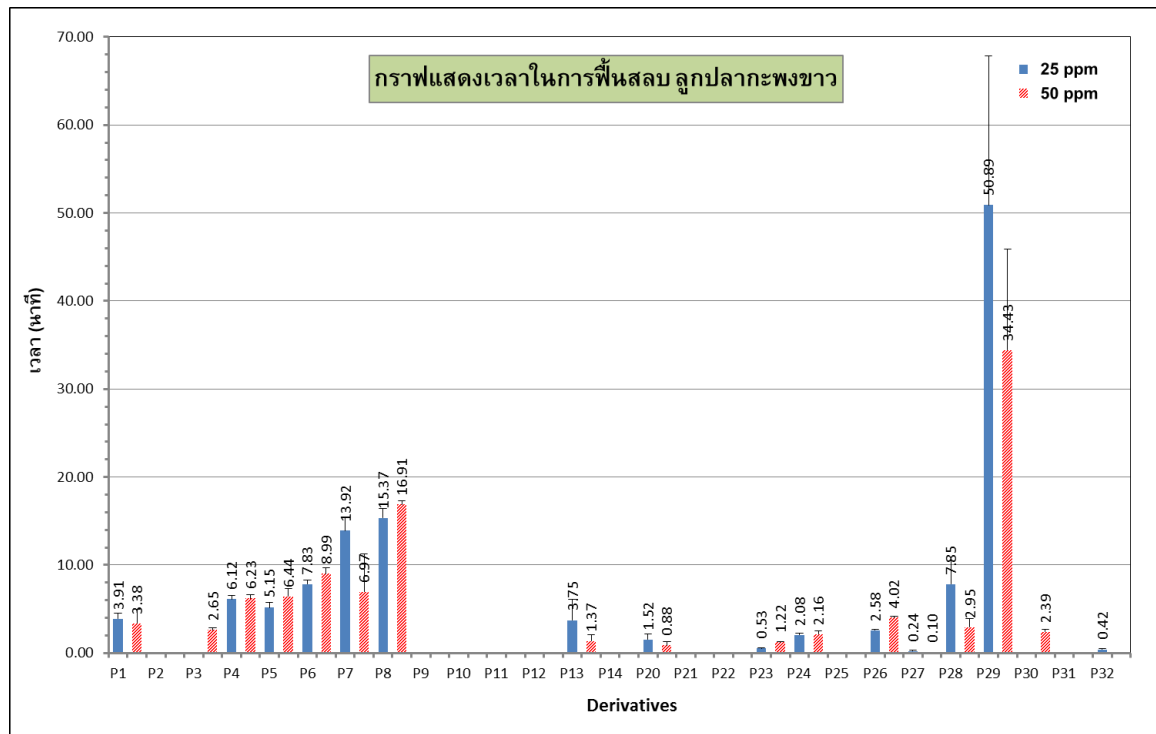
b)

กราฟ 3.5 เวลาที่ใช้ในการสลับปลากะพงขาว a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น เมื่อทำการสลับด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

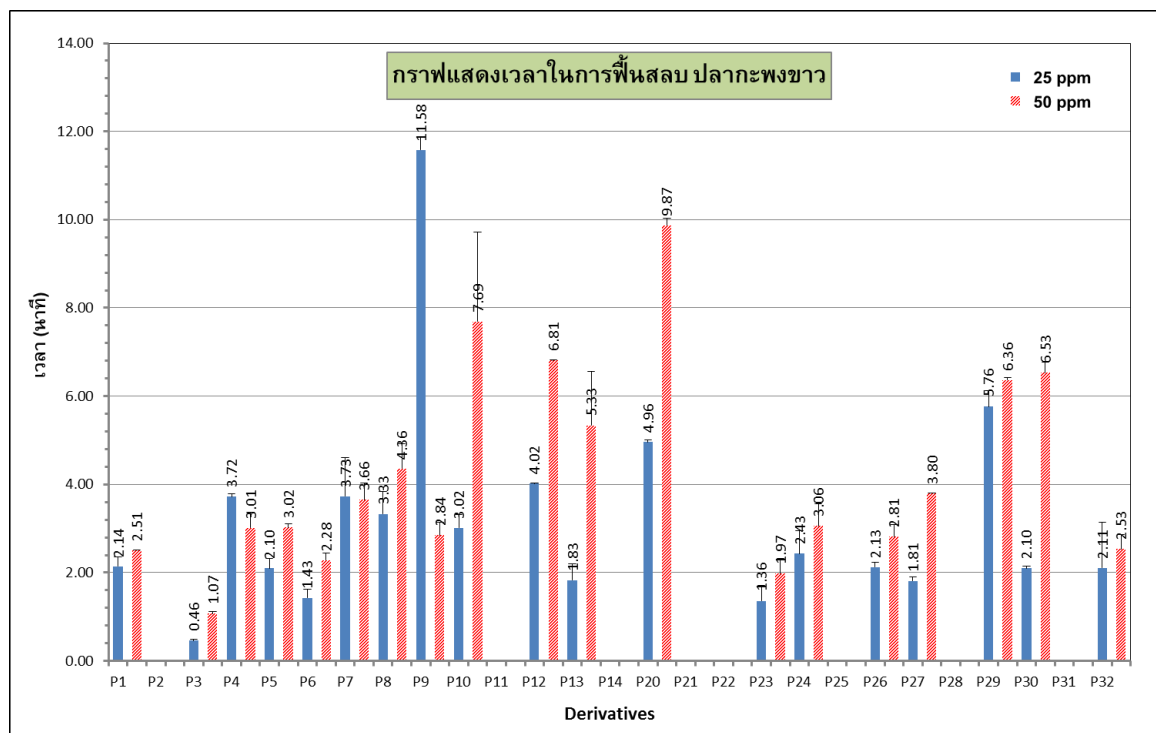
อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับยูจีนอลแล้วจะพบว่า สารข้างอิงยูจีนอลยังคงให้ผลการสลบที่ดีที่สุด โดยอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพใกล้เคียงที่สุด คือ อนุพันธ์ P26 (Isoeugenol)

สำหรับการทดลองการฟื้นการสลบ จะพบว่าในกรณีของปลากะพงนั้น จะมีอัตราในการฟื้นสลบได้ค่อนข้างเร็วเมื่อเทียบกับปลาดุก โดยปลากะพงทั้งปลากะพงขาววัยอ่อนและวัยรุ่น จะสามารถฟื้นสลบได้ภายในระยะเวลา 5 นาที ดังจะเห็นได้จากกราฟที่ 3.6a-b อนุพันธ์ที่ทำให้ฟื้นสลบช้าที่สุด คือ อนุพันธ์ P29 ที่จะใช้เวลาในช่วง 30-50 นาที ในปลากะพงขาววัยอ่อน และ 5-6 นาที ในปลากะพงขาววัยรุ่น แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับอัตราการรอดตาย พบว่าในปลากะพงขาววัยอ่อน อนุพันธ์ที่มีศักยภาพ จะมีอัตราการรอดตายอยู่ในเกณฑ์ดี ยกเว้น P7 และ P29 ที่มีอัตราการรอดตายที่ค่อนข้างต่ำ (ร้อยละ 50-97 สำหรับ P7 และร้อยละ 60-80 สำหรับ P29) ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากปลากะพงขาววัยอ่อนนั้นจะมีความทนทานที่ต่ำ และตอบสนองต่อปัจจัยแวดล้อมภายนอกได้ง่ายกว่า ส่วนในปลากะพงวัยรุ่นนั้น อนุพันธ์ที่มีศักยภาพทั้งหมดจะมีอัตราการรอดตายที่ร้อยละ 100

เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองโดยรวมทั้งหมด ทั้งเวลาที่ใช้ในการสลบ ฟื้นสลบ และอัตราการรอดตาย ความสะดวกในการเตรียมและการสังเคราะห์ จะพบว่าอนุพันธ์ที่มีศักยภาพที่ดีที่จะใช้ในการสลบปลาในกลุ่มปลากะพงขาว ทั้งปลากะพงขาววัยอ่อนและปลาวัยรุ่น คือ อนุพันธ์ P5 และ P26 เนื่องจากสามารถสลบและฟื้นสลบได้มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับยูจีนอล และมีอัตราการรอดตายที่สูงมากกว่าร้อยละ 97

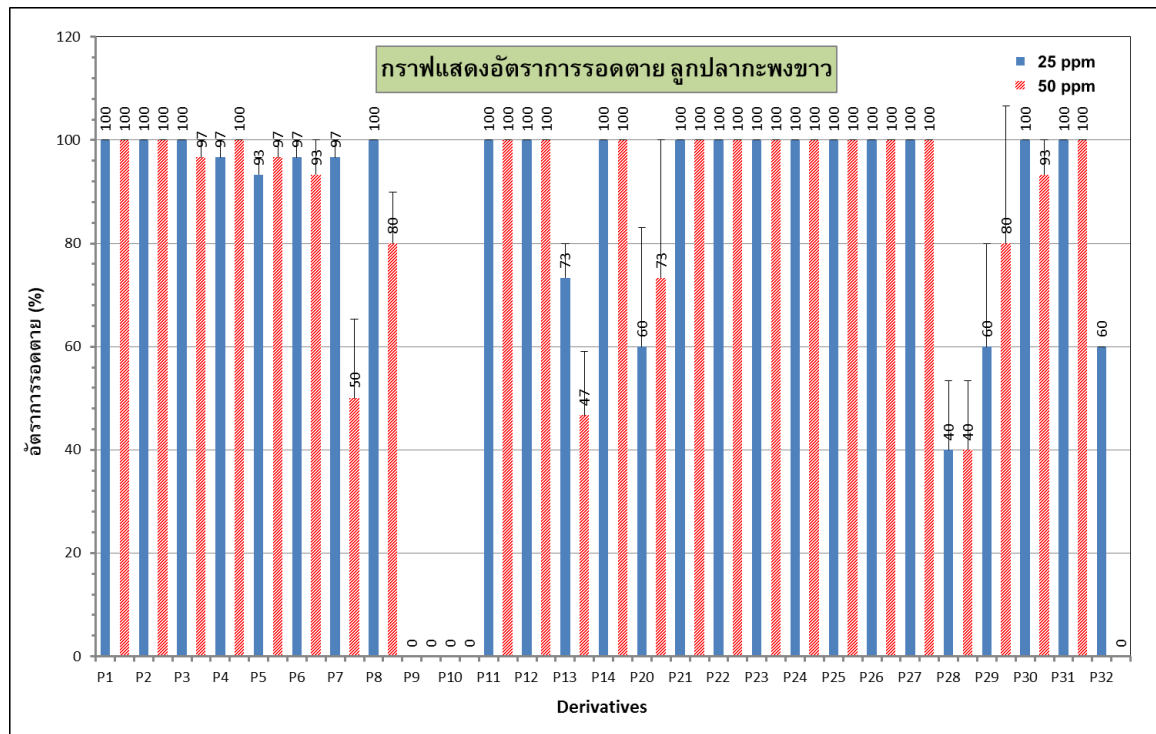


a)

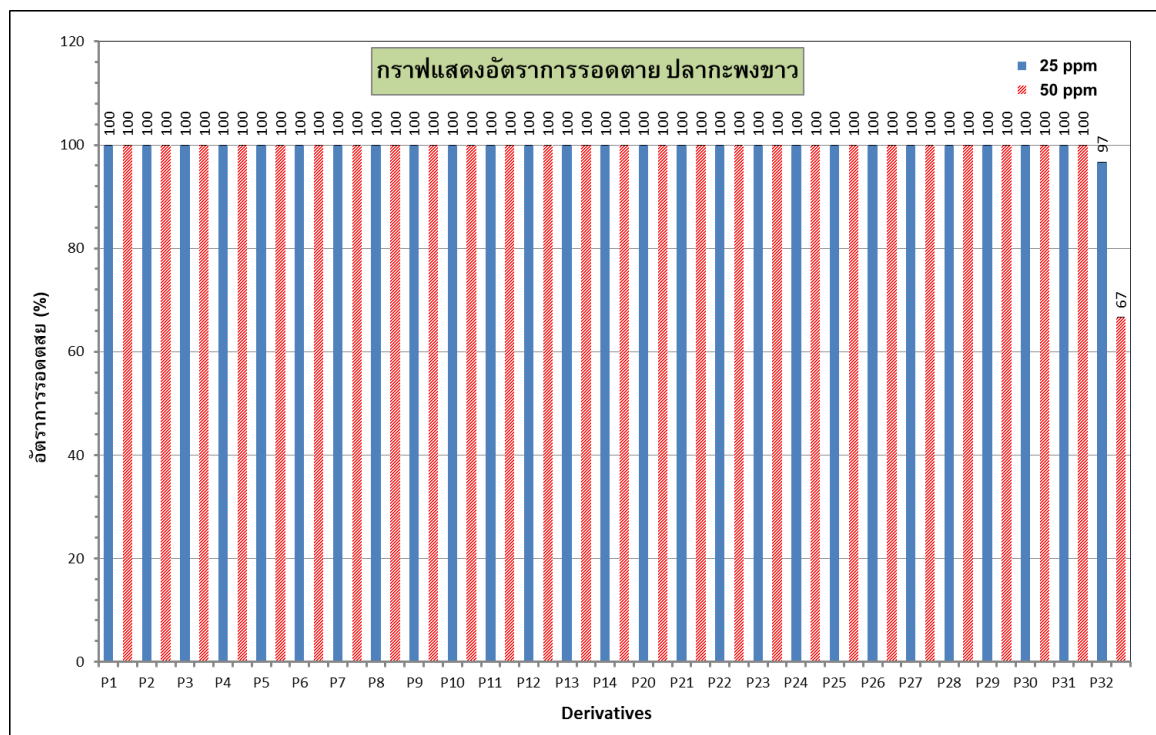


b)

กราฟ 3.6 เวลาที่ใช้ในการฟื้นสลับ ในปลากะพงขาว a) วัชซ่อน b) วัชรุ่น ด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm



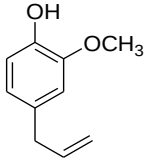
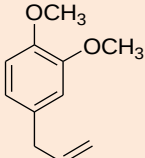
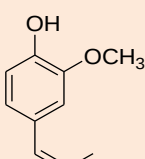
a)



b)

กราฟ 3.7 อัตราการรอดตายของปลากะพงขาว a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น เมื่อทำการสลับด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

ตาราง 3.22 สารอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการสลบ ปลากะพงขาววัยอ่อน และ ปลากะพงขาววัยรุ่น ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

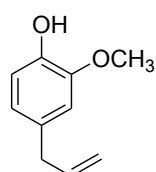
อนุพันธ์	โครงสร้าง	conc	เวลาในการสลบ (นาท)		เวลาในการฟื้น สลบ (นาท)		อัตราการรอดตาย (%)	
			ลูก	วัยรุ่น	ลูก	วัยรุ่น	ลูก	วัยรุ่น
P1 (Eugenol)		25	0.89±0.12	1.01±0.09	3.91±0.62	2.14±0.23	100±0	100±0
		50	0.37±0.01	0.47±0.05	3.38±1.61	2.51±0.01	100±0	100±0
P5		25	1.27±0.14	1.33±0.13	5.15±0.62	2.10±0.23	93±3	100±0
		50	0.45±0.04	0.89±0.07	6.44±0.86	3.02±0.08	97±3	100±0
P26		25	0.71±0.06	1.53±0.04	2.58±0.08	2.13±0.11	100±0	100±0
		50	0.34±0.03	0.76±0.02	4.02±0.16	2.81±0.28	100±0	100±0
P14 (Placebo)	-	25	NA	NA	NA	NA	100±0	100±0
		50	NA	NA	NA	NA	100±0	100±0

*NA = No Anesthetic (ไม่แสดงฤทธิ์การสลบ)

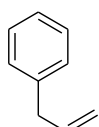
3.3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การสลบในกุ้งขาว

กุ้งขาวที่ใช้ในการทดลองมี 2 ขนาด ได้แก่ กุ้งขาววัยอ่อน (ความยาวเฉลี่ย 1.0 เซนติเมตร) และกุ้งขาววัยรุ่น (ความยาวเฉลี่ย 11.13 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 10.64 กรัม) ก่อนการทดลองจะพักไว้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มีแสงนปิดบ่อเพื่อลดแสงประมาณ 60% ให้ ออกซิเจนที่ 6.5 ppm อุณหภูมิ น้ำ 27-29 °C pH 7.8-8.2 และงดให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง

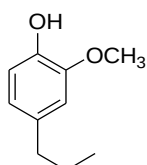
ในการทดลองนี้ จะใช้ความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ที่ 25 และ 50 ppm หลังจากทดสอบใช้ความเข้มข้นทั้งสองความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ยูจีนอลที่เตรียมได้ทั้งสิ้น 25 ชนิด (P2-13 และ P20-P32) และชุดควบคุม P14 (control) ที่ไม่มีสารอนุพันธ์ของยูจีนอล เปรียบเทียบกับยูจีนอล (P1) พบว่า ในกรณีกุ้งขาววัยอ่อน อนุพันธ์ของยูจีนอลที่ทำการสังเคราะห์ในงานวิจัยยังให้ผลการสลบไม่ด้นักเมื่อเทียบกับสารอ้างอิงยูจีนอล โดยอนุพันธ์ที่ให้ประสิทธิภาพพอประมาณในการสลบกุ้งขาววัยอ่อน ได้แก่ P4 P7 P28 และ P29 โดยสามารถสลบได้ภายในระยะเวลาไม่เกิน 10 นาที เมื่อเทียบกับยูจีนอลที่ใช้เวลา 3-4 นาที (กราฟ 3.1a-b) ในทางตรงกันข้าม อนุพันธ์ที่ให้ประสิทธิภาพดีในการสลบกุ้งขาววัยรุ่น โดยออกฤทธิ์ได้ดีกว่ายูจีนอล มีทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ P2 P6 P7 P9 P10 P11 P13 P20 P27 และ P28



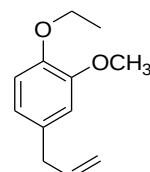
P1 (Eugenol)



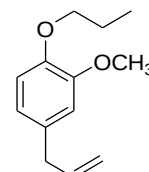
P2



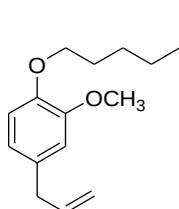
P4



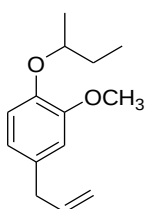
P6



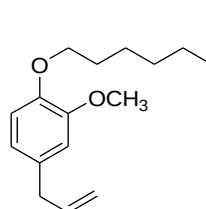
P7



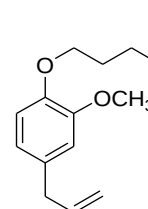
P9



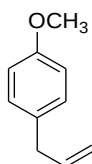
P10



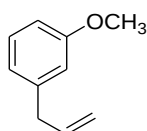
P11



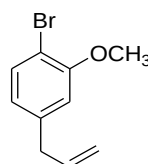
P13



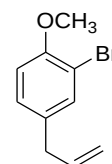
P20



P27



P28

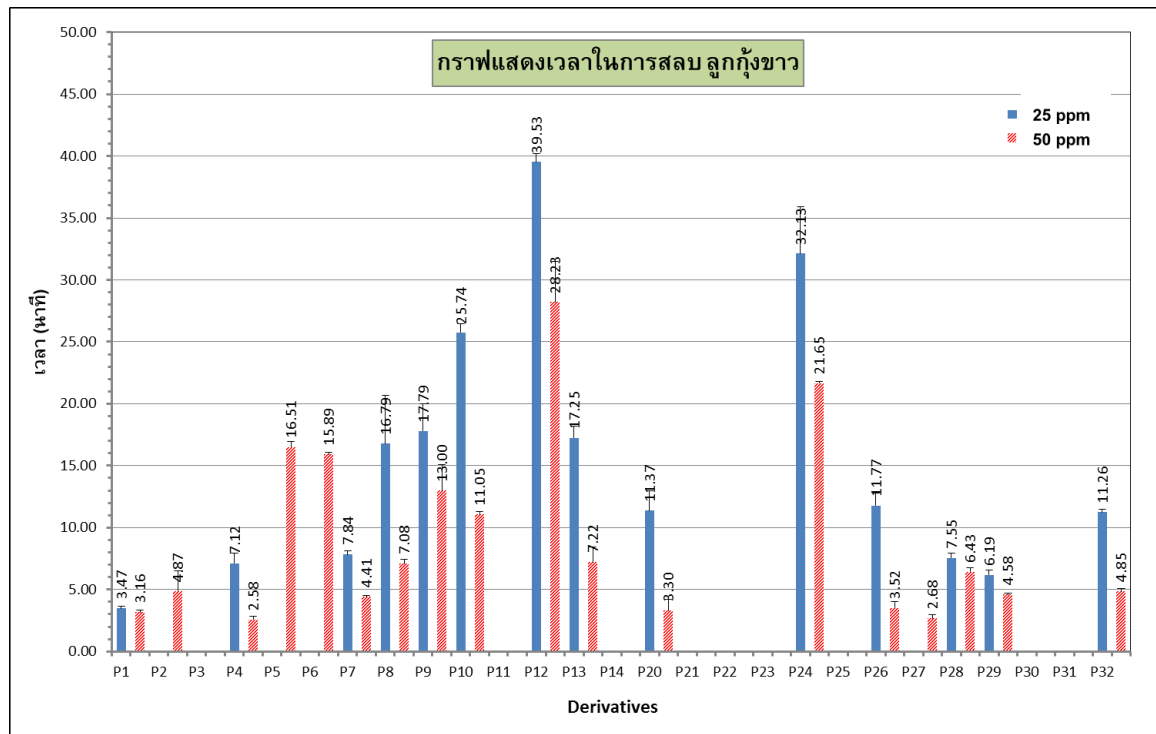


P29

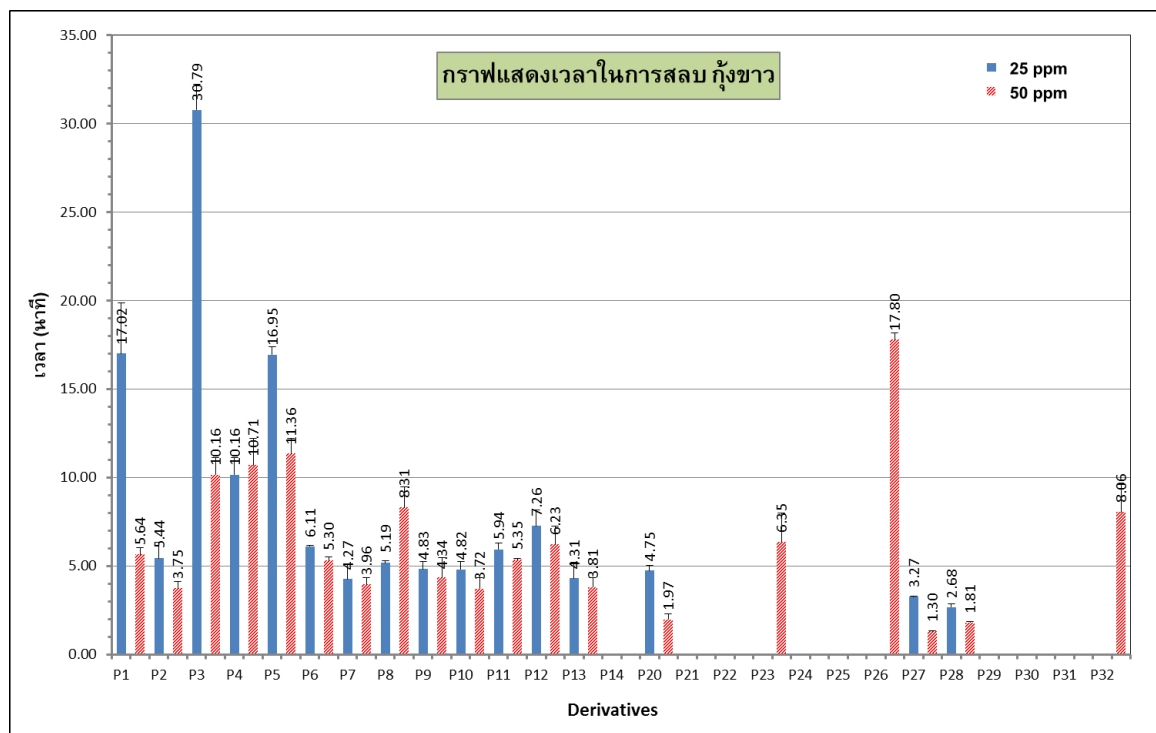
ตาราง 3.23 สารอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการสลบ กุ้งขาววัยอ่อน และกุ้งขาววัยรุ่น ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

อนุพันธ์ (ความเข้มข้น/ppm)		เวลาที่ใช้ในการสลบ (นาที)	
		ลูกกุ้งขาว	กุ้งขาวขนาดกลาง
P1 Eugenol	25	3.47±0.16	17.02±2.86
	50	3.16±0.19	5.64±0.41
P2	25	NA	5.44±0.91
	50	4.87±1.63	3.75±0.36
P4	25	7.12±0.85	10.16±0.97
	50	2.58±0.28	10.71±1.50
P6	25	NA	6.11±0.08
	50	15.89±0.17	5.30±0.20
P7	25	7.84±0.30	4.27±0.80
	50	4.41±0.13	3.96±0.38
P9	25	17.79±2.19	4.83±0.43
	50	13.00±2.08	4.34±1.13
P10	25	25.74±0.70	4.82±0.44
	50	11.05±0.22	3.72±0.63
P11	25	NA	5.94±0.36
	50	NA	5.35±0.07
P13	25	17.25±0.94	4.31±0.89
	50	7.22±1.21	3.81±0.56
P20	25	11.37±1.63	4.75±0.29
	50	8.30±0.89	1.97±0.30
P27	25	NA	3.27±0.01
	50	2.68±0.27	1.30±0.03
P28	25	7.55±0.42	2.68±0.20
	50	6.43±0.32	1.81±0.07
P29	25	6.19±0.41	d
	50	4.58±0.11	d

*NA = No Anesthetic (ไม่แสดงฤทธิ์การสลบ) และ d = สัตว์น้ำตายร้อยละ 100



a)



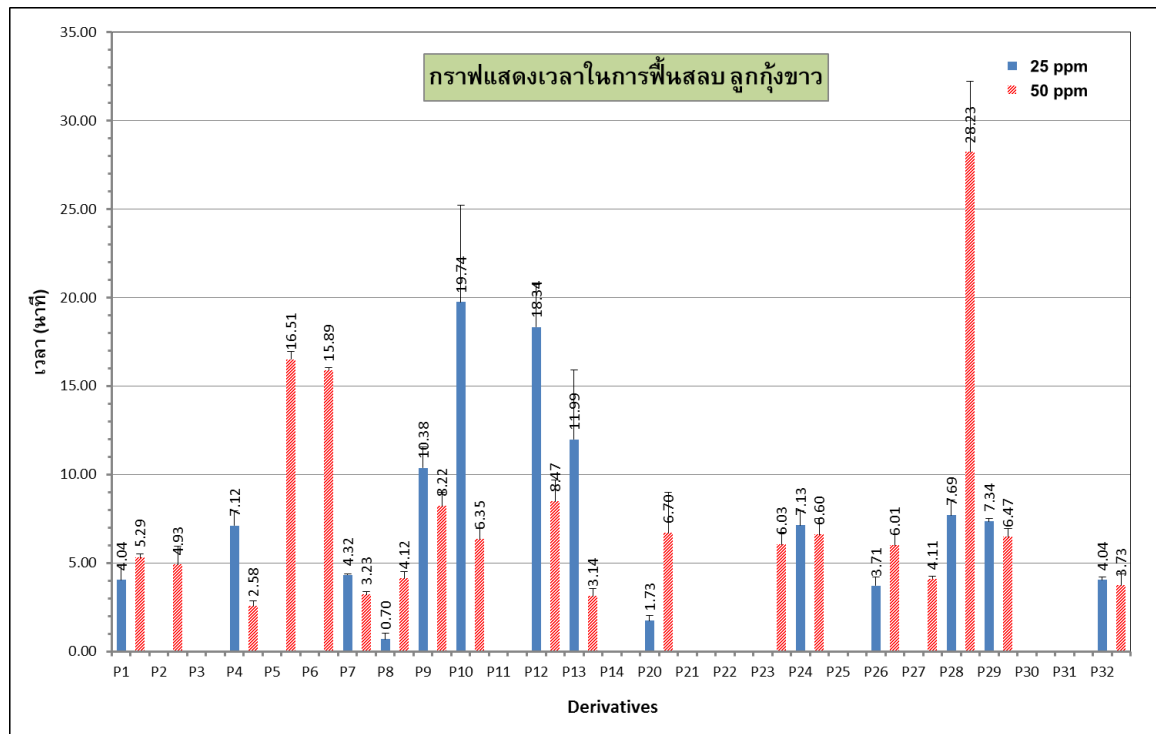
b)

กราฟ 3.8 เวลาที่ใช้ในการสลับกุ้งขาว a) วัชช่อน b) วัชรุ่น เมื่อทำการสลับด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

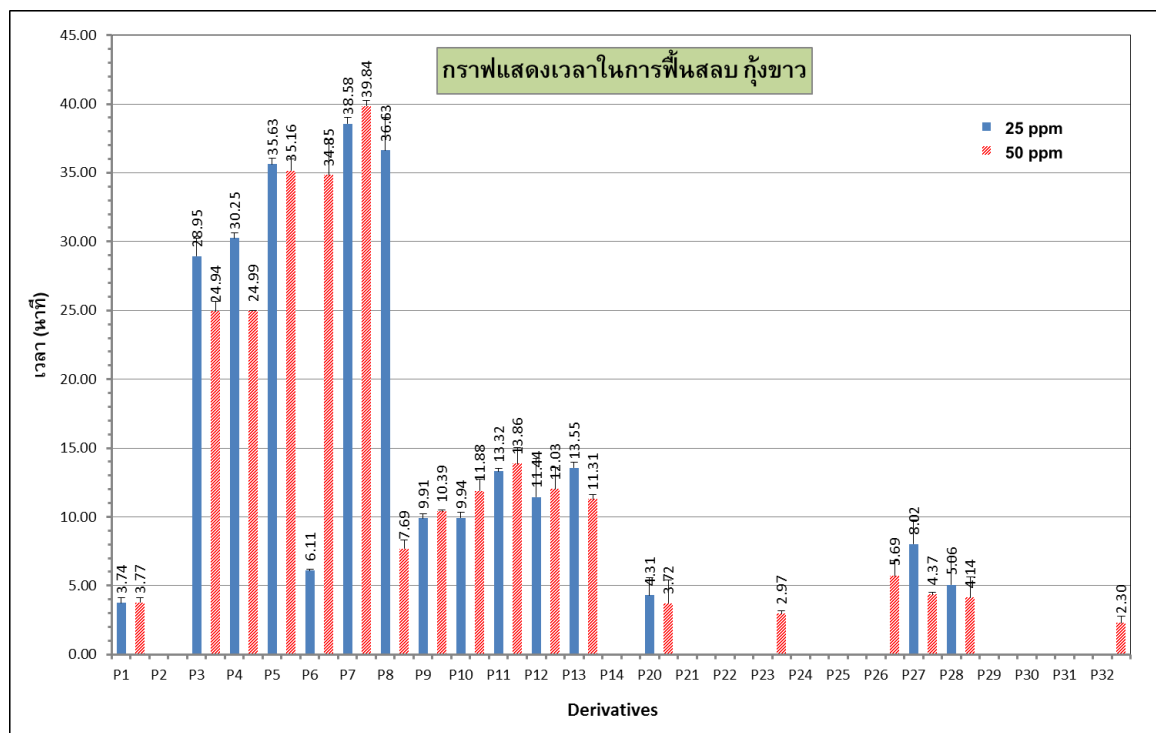
เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้ดีในกึ่งขาวแล้ว จะเห็นว่าสามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการดัดแปรโครงสร้างบริเวณหมู่ไฮดรอกซี ได้แก่ อนุพันธ์ P6 P7 P9 P10 P11 และ P13 ซึ่งจะออกฤทธิ์ได้ดีโดยเฉพาะในกึ่งขาววัยรุ่น และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน โดยจะมีความยาวของสายโซ่ตั้งแต่ 2 อะตอม จนถึง 6 อะตอม อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาอนุพันธ์ที่มีคาร์บอน 1 อะตอม และ 7 อะตอม รวมถึงสายโซ่ที่เป็นกิ่งก็พบว่าแสดงฤทธิ์การเป็นยาสลบเช่นกัน แต่ไม่ดีเทียบเท่ากับอนุพันธ์ที่กล่าวมา แสดงว่าการดัดแปรหมู่ไฮดรอกซีด้วยการแทนที่ด้วยสายโซ่คาร์บอนด้วยความยาวที่เหมาะสม จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์เป็นยาสลบได้ดียิ่งขึ้น ส่วนอนุพันธ์อีกกลุ่มหนึ่งเป็นกลุ่มที่มีการดัดแปรโครงสร้างบริเวณอื่นๆ ได้แก่ อนุพันธ์ P2 P4 P20 P27 P28 และ P29 เช่น P2 ที่มีการกำจัดหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซีและเมทอกซีออก หรือ P4 ที่เปลี่ยนหมู่แอลคิลเป็นแอลคิล หรือ P20 ที่กำจัดหมู่เมทอกซีออกและดัดแปรหมู่ไฮดรอกซีเป็นเมทอกซี หรือ P27 ที่มีการกำจัดหมู่ไฮดรอกซีออก หรือ P28 ที่มีการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยโบรมีนอะตอม หรือ P29 ที่มีการแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยโบรมีนอะตอมและดัดแปรหมู่ไฮดรอกซีเป็นเมทอกซี โดยสามารถพิจารณาแยกเป็นสองส่วน คือ การสลบกึ่งขาววัยรุ่น และการสลบกึ่งขาววัยรุ่น ในส่วนของกึ่งขาววัยรุ่น นั้นจะเห็นได้ว่าอนุพันธ์ดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์ในการสลบกึ่งขาววัยรุ่นได้ แต่จะให้ผลได้ไม่ดีเทียบเท่ากับสารอ้างอิงยูจีนอล โดยจะใช้ระยะเวลาในการสลบนานกว่า ส่วนในกึ่งขาววัยรุ่น อนุพันธ์ดังกล่าวจะออกฤทธิ์ได้เร็วกว่ายูจีนอลทั้งหมด ยกเว้น P4 ที่ออกฤทธิ์ได้ช้ากว่า และอนุพันธ์ P2 P9 P10 P11 P13 P28 และ P29 ที่มีอัตราการตายของสัตว์น้ำสูงจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการสลบกึ่งขาว แสดงรายละเอียดดังกราฟ 3.8a-b

เมื่อพิจารณาในส่วนของการฟื้นฟูสภาพ สรรพอนุพันธ์ทั้งหมด มีระยะเวลาของการฟื้นฟูสภาพในเกณฑ์ดี โดยจะใช้เวลาในการฟื้นฟูสภาพอยู่ในช่วงประมาณ 4-40 นาที เมื่อเทียบกับยูจีนอลที่ใช้เวลาประมาณ 3 นาที และมีอัตราการรอดตายภายหลังการทดสอบที่ดี ประมาณร้อยละ 90-100 (ยกเว้นอนุพันธ์ P2 P9 P10 P11 P13 P28 และ P29 ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว) เมื่อเทียบกับยูจีนอลที่มีอัตราการรอดตายประมาณร้อยละ 87-100 แสดงรายละเอียดดังกราฟ 3.9a-b และกราฟ 3.10a-b

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าอนุพันธ์ที่มีศักยภาพในการสลบกึ่งขาวนั้น ได้แก่ P6 P7 P20 และ P27 โดย P6 จะออกฤทธิ์ได้ดีในกึ่งขาววัยรุ่น ส่วน P20 และ P27 จะมีอัตราการฟื้นฟูสภาพค่อนข้างเร็ว โดยที่ P7 น่าจะมีศักยภาพที่ดีที่สุด เนื่องจากสามารถออกฤทธิ์ได้ดีทั้งในกึ่งขาววัยรุ่น กึ่งขาววัยรุ่น อัตราการฟื้นฟูสภาพในช่วงประมาณ 30-40 นาที และมีอัตราการรอดตายสูง แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ที่สามารถแสดงฤทธิ์การสลบกึ่งขาวได้นั้นจะมีโครงสร้างที่มีการดัดแปรหมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เอทอกซี ($-OCH_2CH_3$) หรือ หมู่โพรพอกซี ($-OCH_2CH_2CH_3$) หรือในโครงสร้างอาจจะไม่มีหมู่ไฮดรอกซี หรือหมู่เมทอกซีก็ได้ แต่จะต้องมีส่วนของวงอะโรมาติกที่มีหมู่แอลคิลเป็นส่วนประกอบหลัก แสดงดังตาราง 3.24

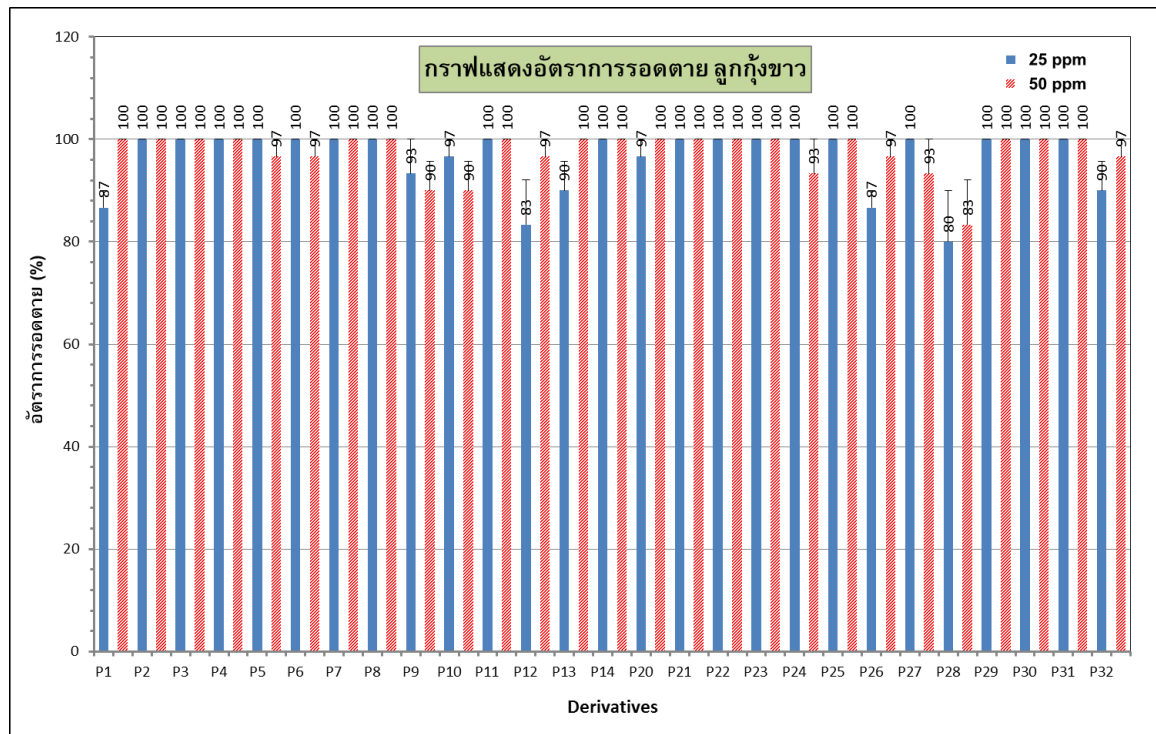


a)

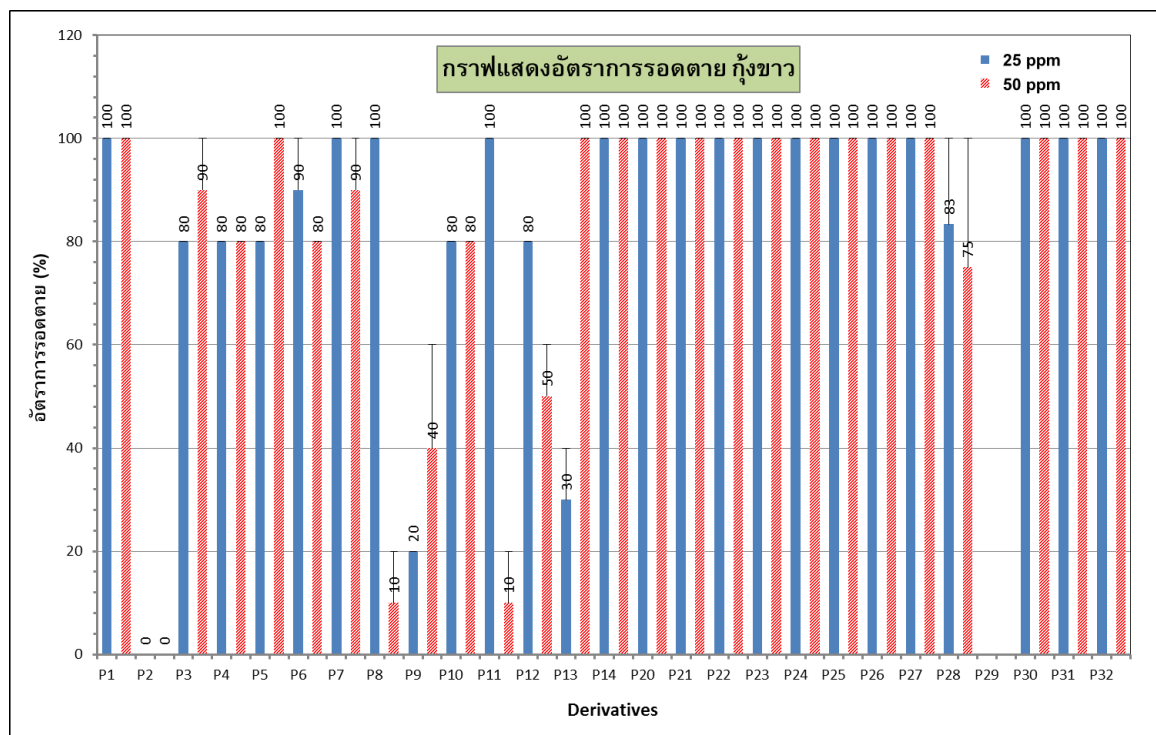


b)

กราฟ 3.9 เวลาที่ใช้ในการฟิ้นสลบกุ้งขาว a) วั้ยอ่อน b) วั้ยรุ่น ด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm



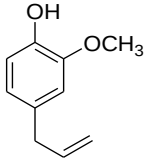
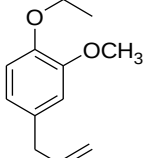
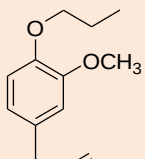
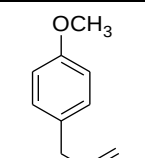
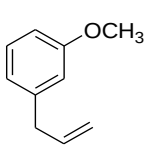
a)



b)

กราฟ 3.10 อัตราการรอดตายของกุ้งขาว a) วัยอ่อน b) วัยรุ่น เมื่อทำการสลับด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

ตาราง 3.24 สารอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการสลบ กุ้งขาววัยอ่อน และ กุ้งขาววัยรุ่น ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

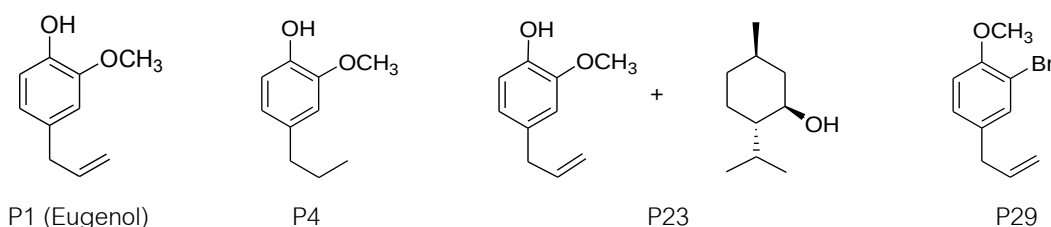
อนุพันธ์	โครงสร้าง	conc	เวลาในการสลบ (นาท)		เวลาในการฟื้น สลบ (นาท)		อัตราการรอดตาย (%)	
			ลูก	วัยรุ่น	ลูก	วัยรุ่น	ลูก	วัยรุ่น
P1 (Eugenol)		25	3.47±0.16	17.02±2.86	4.04±0.82	3.74±0.36	87±3	100±0
		50	3.16±0.19	5.64±0.41	5.29±0.23	3.77±0.36	100±0	100±0
P6		25	NA	6.11±0.08	NA	6.11±0.08	100±0	90±10
		50	15.89±0.17	5.30±0.20	15.89±0.17	34.85±2.55	97±3	80±0
P7		25	7.84±0.30	4.27±0.80	4.32±0.07	38.58±0.45	100±0	100±0
		50	4.41±0.13	3.96±0.38	3.23±0.17	39.84±0.40	100±0	90±10
P20		25	11.37±1.63	4.75±0.29	1.73±0.29	4.31±1.25	97±3	100±0
		50	8.30±0.89	1.97±0.30	6.70±2.30	3.92±1.67	100±0	100±0
P27		25	NA	3.27±0.01	NA	8.02±1.74	100±0	100±0
		50	2.68±0.27	1.30±0.03	4.11±0.14	4.37±0.15	93±7	100±0
P14 (Placebo)	-	25	NA	NA	NA	NA	100±0	100±0
		50	NA	NA	NA	NA	100±0	100±0

*NA = No Anesthetic (ไม่แสดงฤทธิ์การสลบ)

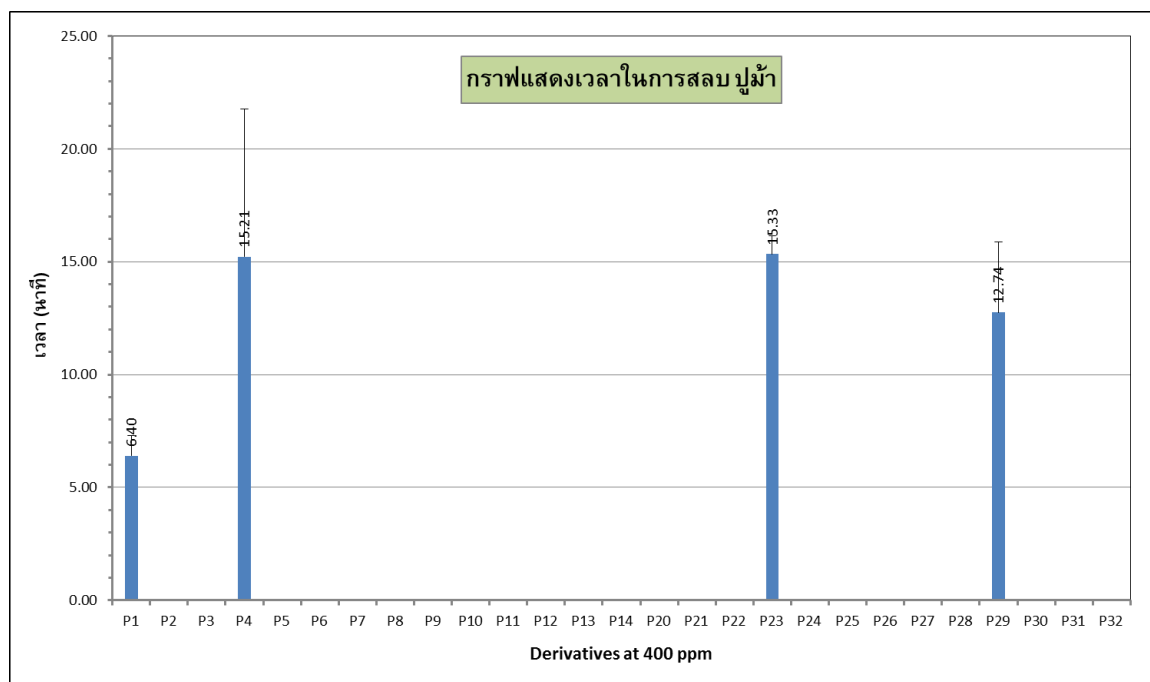
3.3.4 ผลการทดสอบฤทธิ์การสลายในปูม้า

ปูม้าที่ใช้ในการทดลองมีขนาดเดียว (ความยาวเฉลี่ย 11.0 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 94.4 กรัม) ก่อนการทดลองจะพักไว้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยมีแสงนิตบ่อเพื่อลดแสงประมาณ 60% ให้ออกซิเจนที่ 6.5 ppm อุณหภูมิ 28-29 °C pH 7.9-8.1 และงดให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง

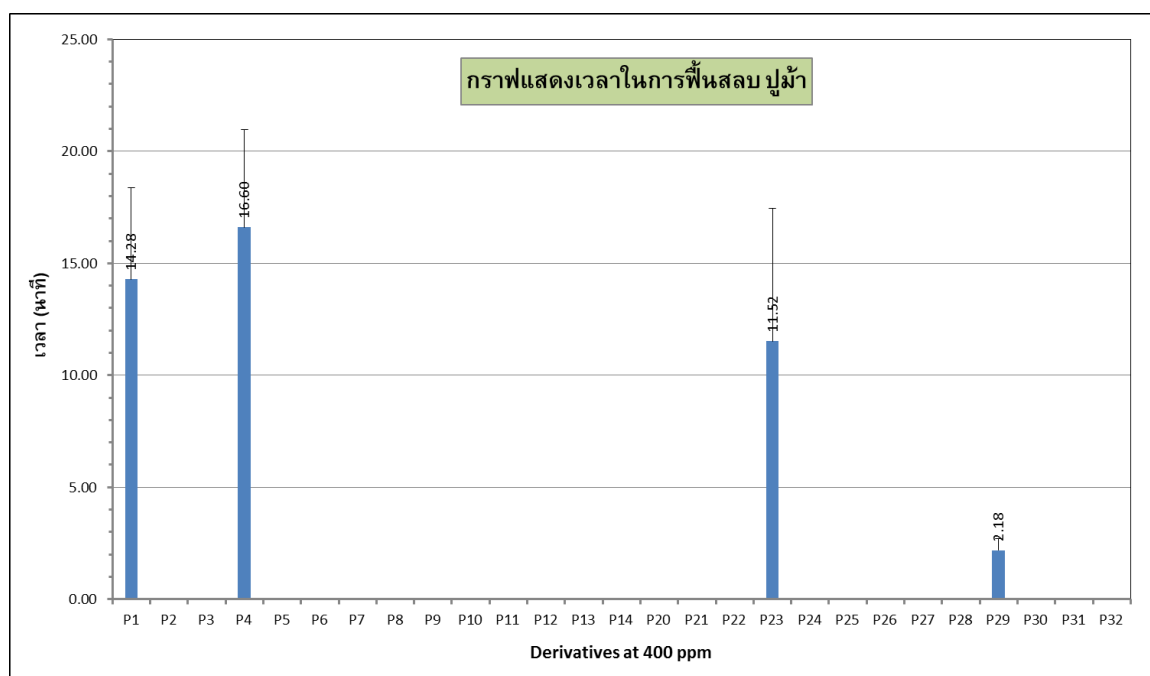
ในการทดลองในปูม้านี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงการใช้ความเข้มข้นของสารอนุพันธ์จากเดิมที่ใช้ความเข้มข้นที่ 25 และ 50 ppm ซึ่งไม่สามารถทำให้ปูสลบได้ จึงได้ทดลองเพิ่มความเข้มข้นขึ้น จนถึงความเข้มข้น 400 ppm และได้ใช้ความเข้มข้นนี้ของสารอนุพันธ์ยูจีนอลที่เตรียมได้ทั้งสิ้น 25 ชนิด (P2-P13 และ P20-P32) และชุดควบคุม P14 (control) ที่ไม่มีสารอนุพันธ์ของยูจีนอล เปรียบเทียบกับยูจีนอล (P1) พบว่าอนุพันธ์ส่วนใหญ่ยังคงไม่สามารถสลบปูม้าได้ โดยอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้บ้าง ได้แก่ อนุพันธ์ P4 P23 และ P29 โดยใช้เวลาประมาณ 15.21 16.33 และ 12.74 นาที ตามลำดับเมื่อเทียบกับยูจีนอล (P1) ที่ใช้เวลาในการสลบเพียง 6.40 นาที (กราฟ 3.11)



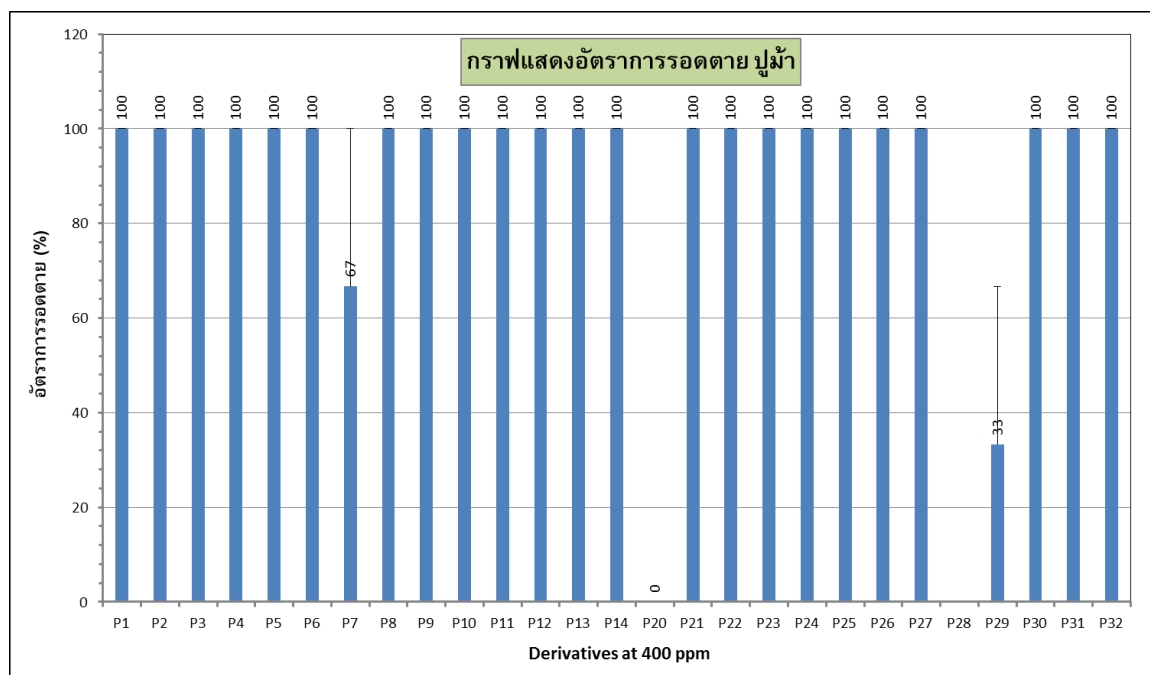
ในส่วนของการฟื้นฟูสลบ อนุพันธ์ P4 P23 และ P29 จะใช้เวลาในการฟื้นฟูสลบประมาณ 16.60 11.52 และ 2.18 นาที ตามลำดับเมื่อเทียบกับยูจีนอล (P1) ที่ใช้เวลาในการฟื้นฟูสลบ 14.28 นาที (กราฟ 3.12) และมีอัตราการรอดตาย 100% ยกเว้นอนุพันธ์ P29 ที่มีอัตราการรอดตายต่ำ (33%) แสดงว่ามีความเป็นพิษสูง เมื่อเทียบกับยูจีนอลที่มีอัตราการรอดตายร้อยละ 100 แสดงรายละเอียดดังกราฟ 3.13 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าปูม้ามีความทนทานต่อการสลบสูง อาจจะเนื่องมาจากปูม้ามีโครงสร้างของเหงือกที่แตกต่างไปจากสัตว์น้ำชนิดอื่น ซึ่งอาจจะมีการดูดซึมหรือการแพร่ผ่านของสารอนุพันธ์ได้ไม่ดีพอ หรือปูม้าอาจจะมีระบบประสาทที่ตอบสนองต่อสารสลบต่ำ หรืออนุพันธ์ที่ใช้ยังไม่สอดคล้องกับการรับรู้ของระบบประสาท แม้กระทั่งสารอ้างอิงยูจีนอลที่สามารถสลบปลาตุ๊ก ปลากระพง และกุ้งขาวได้ดี ยังต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 400 ppm โดยสารอนุพันธ์ที่พอจะมีศักยภาพในการใช้เป็นยาสลบในปูม้าได้ คือ อนุพันธ์ P4 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่มีการดัดแปรหมู่แอลคิลให้กลายเป็นแอลเคน และอนุพันธ์ P23 ซึ่งเป็นของผสมระหว่างยูจีนอลกับเมนทอล เป็นที่น่าสังเกตว่าผลการทดลองนี้จะต่างจากในปลาตุ๊ก ปลากระพง และกุ้งขาว ที่อนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ส่วนใหญ่จะเป็นการดัดแปรหมู่ฟังก์ชันบริเวณอื่น โดยจะต้องคงหมู่แอลคิลไว้ภายในโครงสร้างโมเลกุล ในขณะที่ปูม้าอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้จะเป็นอนุพันธ์ที่มีการดัดแปรโครงสร้างบริเวณหมู่แอลคิล ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ได้สังเคราะห์ขึ้นเพียงชนิดเดียวเท่านั้น (เนื่องจากพิจารณาจากผลของการสลบในปลาตุ๊ก ปลากระพง และกุ้งขาวเป็นหลัก) ผู้วิจัยมีความเห็นว่าถ้าต้องการพัฒนายาสลบในปูม้าต่อไปในอนาคตนั้น อาจจะต้องเน้นการสังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีการดัดแปรบริเวณหมู่แอลคิลเป็นหลัก



กราฟ 3.11 เวลาที่ใช้ในการสลับปุ๋ย เมื่อทำการสลับด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

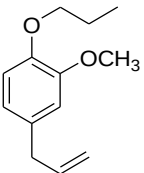
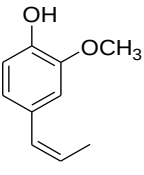
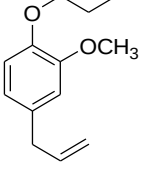
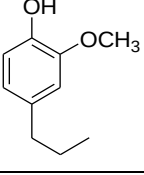


กราฟ 3.12 เวลาที่ใช้ในการพ่นสลับปุ๋ย ด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm



กราฟ 3.13 อัตราการดูดซับของไอน้ำ เมื่อทำการสลับด้วยอนุพันธ์ P1-P14, P20-P32 ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 ppm

ตาราง 3.25 สารปนเปื้อนที่มีศักยภาพที่ต่ำที่สุดในการสลาย ปลาสด ปลากระพง กุ้งขาว และปูม้า เมื่อเทียบกับสารอ้างอิงจีนอล (เลขในวงเล็บ)

ประเภท	อนุพันธ์	โครงสร้าง	ppm	ผลการทดสอบ* (นาทีก/%)		
				เวลาสลาย**	เวลาฟื้นสลาย**	อัตราการรอด**
ปลาสด	P7		25	4.3 (10.2)	30.6 (10.3)	100 (81)
			50	3.4 (7.8)	40.5 (12.4)	100 (70)
ปลากระพง	P26		25	1.53 (1.01)	2.13 (2.14)	100 (100)
			50	0.76 (0.47)	2.81 (2.51)	100 (100)
กุ้งขาว	P7		25	4.27 (17.02)	38.58 (3.74)	100 (100)
			50	3.96 (5.64)	39.84 (3.77)	90 (100)
ปูม้า	P4		400	15.21 (6.40)	16.60 (14.28)	100 (100)

* แสดงผลเฉพาะในปลาสด กล้วยน้ำว้า ปลากระพงขาว กุ้งขาวขนาดกลางและปูม้า

** ผลการทดลองด้วยสารอ้างอิงจีนอลแสดงในวงเล็บ

เอกสารอ้างอิงบทที่ 3

- [1] Wilhelm, H., Wessjohann, L. A. An efficient synthesis of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin from xanthohumol by a novel demethylation process. *Tetrahedron*, **2006**, 62, 6961-6966.
- [2] Bernini, R., Barontini, M., Mosesso, P., Pepe, G., Willfor, S. M., Sjöholm, R. E., Eklundb, P. C., Saladino, R. A selective de-O-methylation of guaiacyl lignans to corresponding catechol derivatives by 2-iodoxybenzoic acid (IBX). The role of the catechol moiety on the toxicity of lignans. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2009**, 7, 2367-2377.
- [3] Augusto, J., Rodrigues, R., Pedro de Oliveira Filho, A., Paulo Moran, J. S. Regioselectivity of the nitration of phenol by acetyl nitrate adsorbed on silica gel. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 6733-6738.
- [4] Jin-mei, Z., Yue-qing, L., Wei-jie, Z. Demethylating Reaction of Methyl Ethers. *The Proceedings of the 3rd International Conference on Functional Molecules*. China: State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116012.
- [5] Zuo, L., Yao, S., Wang, W., Duan, W. An efficient method for demethylation of aryl methyl ethers. *Tetrahedron letters*, **2008**, 49, 4054-4056.
- [6] Kwak, J. H., Cho, Y. A., Jang, J. Y., Seo, S. Y., Lee, H., Hong, J. T., Han, S. B., Lee, K., Kwak, Y. S. and Jung, J. K. Expedient synthesis of 4-O-methylhonokiol via Suzuki-Miyaura cross-coupling. *Tetrahedron*, **2011**, 67(48), 1-4.
- [7] Bonin, C., Funicello, M., Scialpi, R., Spagnolo, P. Smiles rearrangement for the synthesis of 5-amino-substituted[1]benzothieno[2,3-b]pyridine. *Tetrahedron*, **2003**, 59, 7515-7520.
- [8] Mizuno, M., Yamano, M. A New Practical One-Pot Conversion of Phenols to Anilines. *Organic Letters*, **2005**, 7, 3629-3631.
- [9] Banno, T., Hayakawa, Y., Umeno, M. Some applications of the Grignard cross-coupling reaction in the industrial field. *Journal of Organometallic Chemistry*, **2008**, 653, 288-291.
- [10] Fujisaki, S., Eguchi, H., Omura, A., Regioselective bromination of phenol. *Journal of Organic Chemistry*, **1993**, 66, 6-16.
- [11] Majetich, G., Hicks, R., Reister, S. Electrophilic Aromatic Bromination Using Bromodimethyl sulfonium Bromide Generated in Situ. *Journal of Organic Chemistry*, **1997**, 62, 4321-4326.
- [12] Roy, S. C., Guin, C., Rana, K. K., Maitib, G. An efficient chemo and regioselective oxidative nuclear bromination of activated aromatic compounds using lithium bromide and ceric ammonium nitrate. *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 6941-6942.

- [13] Joshi, A. V., Baidossi, M., Mukhopadhyay, S., Sasson, Y. Oxidative Bromination of Activated Aromatic Compounds Using Aqueous Nitric Acid as an Oxidant. *Organic Process Research & Development*, **2004**, 8, 568-570.
- [14] Choi, H. Y., Srisook, E., Jang, K. S., Chi, D. Y. Electrophilic Aromatic Addition Reaction: Electrophilic Attack at an Aromatic H Substituent Position. *Journal of Organic Chemistry*, **2005**, 70, 1222-1226.
- [15] Prakash, K. C., Ramaswamy, A. V., Suresh, B. W. Regioselective, photochemical bromination of aromatic compounds using *N*-bromosuccinimide. *Tetrahedron Letters*, **2008**, 49, 189-194.
- [16] Adibi, H., Abdol, R. H., Hashemi, M. A convenient and regioselective oxidative bromination of electron-rich aromatic rings using potassium bromide and benzyltriphenylphosphonium peroxymonosulfate under nearly neutral reaction conditions. *Tetrahedron Letters*, **2007**, 48, 1255-1259.
- [17] Chen, C. M., Liu, Y. C. A concise synthesis of honokiol. *Tetrahedron Letters*, **2009**, 50, 1151-1152.
- [18] Bovonsombat, P., Ali, R., Khan, C. Facile *p*-toluenesulfonic acid-promoted para-selective monobromination and chlorination of phenol and analogues. *Tetrahedron*, **2010**, 66, 6928-6935.
- [19] Greene, T. W., Wuts, P. G. M. Protective groups in organic synthesis, *A Wiley-Interscience Publication USA*., **1999**, 251.
- [20] Azzena, U., Dettori, G., Idini, M. V., Pisano, L., Sechi, G. Regioselective reductive demethoxylation of 3,4,5-trimethoxystilbenes. *Tetrahedron*, **2003**, 59, 7961-7966.
- [21] Nitin, S., Nandurkar, M. J., Bhanushali, S. R., Bhalchandra, J., Bhanage, M. Ultrasound promoted regioselective nitration of phenols using dilute nitric acid in the presence of phase transfer catalyst, *Ultrasonics Sonochemistry*, **2007**, 14, 41-45.
- [22] Joshi, A. V., Baidossi, M., Mukhopadhyay, S., Sasson, Y. Nitration of Phenol and Substituted Phenols with Dilute Nitric Acid Using Phase-Transfer Catalysts. *Organic Process Research and Department*. **2003**, 7(1), 95-97.
- [23] Canales, L., Bandyopadhyay, D., Banik, B. K. Bismuth nitrate pentahydrate-induced novel nitration of eugenol. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 1-9.
- [24] Chen, C. M., Liu, Y. C. A concise synthesis of honokiol, *Tetrahedron Letters*, **2009**, 50, 1151-1152.
- [25] Bolton, J. L., Comeau, E. and Vukonmanovic, V. The influence of 4-alkyl substituents on the formation and reactivity of 2-methoxy-quinone methides: evidence that extended conjugation dramatically stabilizes the quinone methide formed from eugenol. *Chemico-Biological Interactions*, **1995**, 95, 279-290.

- [26] Carrasco, A. H., Espinosa, C. L., Cardile, V., Gallardo, C., Cardona, W., Lombardo, L., Catalan, M. K., Cuellar, F. M., Russo, A., Eugenol and its synthetic analogue inhibit cell growth of human cancer cells (part I). *Journal of Brazilian Chemical Society*, **2008**, 19, 3, 543-548.
- [27] Wang, A., Jiang, H. Palladium-Catalyzed Direct Oxidation of Alkenes with Molecular Oxygen: General and Practical Methods for the Preparation of 1,2-Diols, Aldehydes, and Ketones, *Journal of Organic Chemistry*, **2010**, 75, 7, 2321-2326.
- [28] Rajesh, K., Somasundaram, M., Saiganesh, R., Balasubramanian, K. K. Bromination of Deactivated Aromatic. A simple and Efficient Method, *Journal of Organic Chemistry*, **2007**, 5867-5869.
- [29] Menini, L., Elena V. G. Novel highly selective catalytic oxychlorination of phenols, *Chemistry Communication*, **2006**, 209-211.
- [30] Sudarma, I. M., Ulfa, M., Sarkono. Chemical Transformation of Eugenol Isolated from Clove Oil to 4-allyl-2-methoxy-6-sulfonicphenol and 4-allyl-2-methoxy-6-aminophenol, *Indonesia Journal of Chemistry*, **2009**, 9(2), 267-270.

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล และเตรียมเป็นสารละลายเพื่อใช้ในการทดสอบการเป็นยาขับในสัตว์น้ำ 4 ประเภท ได้แก่ ปลาดุก ปลากะพง กุ้งขาว และปูม้า โดยได้เตรียมสารอนุพันธ์ขึ้นทั้งหมด 25 ชนิด ได้ผลผลิตร้อยละ 6.9-98.0 ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและขั้นตอนในการสังเคราะห์ แบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม คือ 1. การแทนที่หมู่แทนที่ต่างๆ ในยูจีนอลด้วยไฮโดรเจน 2. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่อะมิโน หรือ ซัลไฟด์ 3. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่เมทอกซี คลอโรหรือโบรโม 4. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่แอลคอกซี 5. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่เมทอกซีด้วยหมู่ต่างๆ 6. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยแทนที่หมู่แอลลิล 7. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการนำยูจีนอลมาทำปฏิกิริยาต่างๆ และ 8. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของยูจีนอล โดยการปรับปรุงโครงสร้างหลายตำแหน่งพร้อมกัน หลังจากนั้นนำสารที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดไปเตรียมตำรับสารละลายอิมัลชันเพื่อให้สามารถใช้ในสารละลายน้ำได้ โดยพบว่าตำรับที่เหมาะสมในการเตรียมยูจีนอลอิมัลชันให้มีความคงตัว คือ ใช้สารก่ออิมัลชันเป็น Tween 80 และ Span 80 โดยกำหนดให้ Total required HLB ของตำรับเท่ากับ 10 และความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันเท่ากับร้อยละ 5 และตำรับอนุพันธ์ของยูจีนอลที่เตรียมได้ทั้งหมด จะนำไปทดสอบฤทธิ์การขับในสัตว์น้ำ โดยอนุพันธ์ยูจีนอลที่สังเคราะห์ขึ้น 25 ชนิด ได้แก่ P1-P14 และ P20-32 พบว่าอนุพันธ์ที่มีศักยภาพที่ดีในการขับปลาดุก ปลากะพง กุ้งขาว และปูม้า คือ อนุพันธ์ P7 อนุพันธ์ P26 อนุพันธ์ P7 และอนุพันธ์ P4 ตามลำดับ โดยอนุพันธ์ P7 เป็นอนุพันธ์ที่มีการดัดแปรที่ตำแหน่งไฮดรอกซีโดยการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีด้วยหมู่ไพโรพอกซี ทำให้มีสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนที่ยาวขึ้น ช่วยในเรื่องการละลายและมีขนาดเหมาะสมกับบริเวณรับในสัตว์น้ำ ส่วนอนุพันธ์ P26 และ P4 เป็นอนุพันธ์ที่มีการดัดแปรที่ตำแหน่งแอลลิลโดยการแทนที่หมู่แอลลิลด้วยหมู่ไอโซแอลลิล และไพโรฟิลตามลำดับ อนุพันธ์ที่กล่าวมาดังกล่าวเป็นอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงหรือดีกว่ายูจีนอล โดยออกฤทธิ์การขับเร็ว และออกฤทธิ์ได้นานทำให้สัตว์น้ำฟื้นสภาพ และมียาอัตราการรอดตายในเกณฑ์สูง ดังนั้นอนุพันธ์ดังกล่าวจึงน่าจะเป็นอนุพันธ์ที่มีศักยภาพที่ดีในการนำไปทดสอบการเป็นยาขับกับสัตว์น้ำประเภทอื่น ทั้งความเข้มข้นที่เหมาะสม เทคนิคในการใช้ ระยะเวลาที่สามารถขับได้นานที่สุด การลำเลียงจริง ความเป็นพิษ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาอย่างละเอียดต่อไป