



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารในกลุ่ม capsaicinoids capsinoids และ metabolites เพื่อเพิ่มความคงตัวและลดความเผ็ดร้อน

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุทัย วิชัย และคณะ

เดือน พฤศจิกายน 2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารในกลุ่ม capsaicinoids capsinoids และ metabolites เพื่อเพิ่มความคงตัวและลดความเผ็ดร้อน

หัวหน้าโครงการ	ผศ.ดร.อุทัย วิชัย	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
นักวิจัยร่วมโครงการ	ผศ.ดร.ศิริรัตน์ จันท์จารุณี	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
	ผศ.ดร.ฟิลิป คีร์ลาร์	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
	รศ.ดร.ศักดิ์ชัย วิทยาอารักษ์กุล	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

พริกมี 2 ประเภทคือพริกที่เผ็ดและพริกที่ไม่เผ็ด ในพริกที่เผ็ดมีสารกลุ่ม capsaicinoids ในขณะที่พริกที่ไม่เผ็ดนั้นมีสารกลุ่ม capsinoids เป็นองค์ประกอบหลัก โดยสารทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันคือ capsaicinoids มีการเชื่อมต่อระหว่างส่วนที่เป็น fatty acid กับ aromatic amine ด้วยพันธะเอไมด์ (amide bond) ในขณะที่ capsinoids เป็นการใช้อนุพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ในการเชื่อมต่อระหว่าง fatty acid กับ aromatic alcohol ซึ่งประโยชน์ของทั้ง capsaicinoids และ capsinoids คือ ช่วยเพิ่มการเผาผลาญพลังงานในร่างกายและเร่งการสลายของไขมัน

แต่การใช้ประโยชน์จากสารทั้งสองกลุ่มยังมีข้อจำกัดคือ 1) ในกรณีพริกเผ็ด สารกลุ่ม capsaicinoids ส่งผลอย่างมากต่อการนำไปใช้ประโยชน์ เพราะมีข้อจำกัดของปริมาณของ capsaicinoids ที่ต้องบริโภคเพื่อให้ได้ประโยชน์และผลที่ชัดเจน ส่งผลให้ผู้บริโภคไม่สามารถทนต่อความเผ็ดของ capsaicinoids ได้ ดังนั้นต้องใช้หลายเทคนิคในการลดข้อจำกัดนี้ เช่น การทำ encapsulation ของ capsaicinoids ก่อนการนำไปใช้ประโยชน์ซึ่งมีราคาสูงในการไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ 2) ในกรณีพริกที่ไม่เผ็ด สารกลุ่ม capsinoids มีข้อที่ควรระวังคือความไม่คงตัวโดยเฉพาะในตัวทำละลายที่มีขี้ สส่งผลให้มีปัญหาระหว่างการสกัด การผลิต และการแปรรูป นอกเหนือจากสารกลุ่ม capsaicinoids และ capsinoids แล้ว metabolites ของสารกลุ่ม capsaicinoids และ capsinoids ที่พบในธรรมชาติสามารถนำไปใช้เป็นสารเสริมอาหารได้ โดย metabolite ดังกล่าวถูกผลิตขึ้นมาจากการสลายตัวจากความร้อน (Thermal degradation) และจากการหมัก (Fermentation) ทั้งนี้ประโยชน์ของ metabolites จากพริกมีโอกาที่จะถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคตแต่ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ด้วยเหตุผลดังกล่าวส่งผลให้การนำประโยชน์จากทั้ง capsaicinoids capsinoids และ metabolites จากพริกจึงต้องมีการวิจัยและพัฒนาเพิ่มเติม

โดยแนวทางในการลดความเผ็ดของสารในกลุ่ม capsaicinoids มี 3 แนวทางคือ 1) การปรับเปลี่ยนกลุ่ม hydroxyl ที่วง aromatic 2) การปรับเปลี่ยนกลุ่ม methoxy ที่วง aromatic และ 3) การปรับเปลี่ยนส่วนที่เป็น long chain hydrocarbon ทั้งนี้พบว่าแนวทางที่ 3 มีอนุพันธ์ของ capsaicin 3 ตัวที่ระคายเคืองน้อยที่สุดเพราะความเป็นพิษต่อ fibroblast skin น้อยที่สุด คือ N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(1H-indol-1-yl)pentanamide (IC5) N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(1H-indol-1-yl)hexanamide (IC6) และ N-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-5-(5-nitro-1H-indol-1-yl)pentanamide (NIC5)

สำหรับการเพิ่มความคงตัวของสารในกลุ่ม capsinoids นั้น มีแนวทางการปรับปรุงไว้ 2 แนวทางคือ 1) ทำการ deactivation กลุ่ม hydroxyl ด้วย protecting groups ที่เหมาะสม และ 2) ปรับโครงสร้างและสลับตำแหน่งของ ester bond พบว่าในเบื้องต้น ทั้ง 2 แนวทางสามารถเพิ่มความคงตัวของ capsinoids ได้ดี ทั้ง acetyl capsiate และ แบบ reverse ester capsiate ซึ่งเป็นการปรับปรุงตามแนวทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ส่วนการเตรียม metabolite นั้นแบ่งเป็นการสังเคราะห์ capsaicin sulfate ซึ่งเป็นอนุพันธ์ตัวใหม่ของ capsaicin ที่เป็น partial protection และสามารถปรับเปลี่ยนเป็น capsaicin ได้ขึ้นกับสภาวะที่กำหนดเหมาะสมสำหรับการเป็น candidate ในการศึกษาเพิ่มเติมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ทั้งนี้ทาง...ได้ดำเนินการร่างยื่นจดสิทธิบัตรการสังเคราะห์และประโยชน์ของสารดังกล่าวแล้ว และการสังเคราะห์ medium chain fatty acid ด้วยการทำ hydrolysis จาก capsaicinoids ซึ่งง่ายและได้ปริมาณที่สูง แต่สำหรับ medium chain fatty acid บางตัวที่มีโครงสร้างซับซ้อนยังมีปัญหาในการสังเคราะห์เนื่องจากการไม่เสถียรของ intermediate ที่เกิดขึ้น

สุดท้ายคือการเตรียม capsaicinoids formulation ที่มีความคงตัว จากการศึกษาในเบื้องต้น พบว่าการเก็บสารสกัดพริกลักษณะเข้มข้นเป็นสภาวะที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นสภาวะที่มีความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมี หากต้องการนำมาใช้งาน เช่น นำไปหยดผสมลงในตำรับน้ำพริกเพื่อปรับความเผ็ดให้เข้าตามมาตรฐาน ควรนำสารสกัดพริกเข้มข้นดังกล่าวมาเจือจางด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร

จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ทั้งหมดในการศึกษานี้ สารอนุพันธ์ต่างๆได้ถูกนำไปศึกษาเพิ่มเติมในหน่วยงานต่างๆ ดังนี้คือ อนุพันธ์ของ capsaicin ที่มี indole และ nitroindole เป็นองค์ประกอบได้ส่งต่อไปทำการศึกษา beta amyloid activity ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สารในกลุ่ม medium chain fatty acid ได้ส่งต่อไปทำการศึกษาการขยายตัวของหลอดเลือดที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และ ศึกษาเรื่องการลด cholesterol ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และอนุพันธ์ของ halogenated capsaicin ได้ส่งไปทำการศึกษาต่อเรื่อง adipogenesis และ adipolysis และ acetylcholine esterase inhibition ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

ข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์ของ capsaicinoids และ capsinoids คือความเผ็ดและความไม่คงตัวตามลำดับส่งผลให้มีการนำไปใช้ประโยชน์น้อย อย่างไรก็ตาม capsaicinoids และ capsinoids ยังคงได้รับความสนใจในการเป็นสารเสริมอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการคั้นน้ำหนักร ในการศึกษา 3 แนวทางหลักได้นำมาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่น่าจะเหมาะสมกับ end user คือ 1) การลดความเผ็ด 2) การเพิ่มความเสถียร และ 3) การเตรียม metabolite ชนิดใหม่สำหรับเป็นสารเสริมอาหารด้านการคั้นน้ำหนักร โดยพบว่าอนุพันธ์ 3 ตัวของ capsaicinoids ได้แก่ N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(1H-indol-1-yl)pentanamide (IC5) N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(1H-indol-1-yl)hexanamide (IC6) และ N-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-5-(5-nitro-1H-indol-1-yl)pentanamide (NIC5) มีสมบัติที่ระคายเคืองน้อยที่สุดเพราะมีความเป็นพิษต่อ fibroblast skin น้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า acetate capsaicin และ reverse ester capsate มีความคงตัวที่ดีมากกว่า capsinoids ที่มีความคงตัวในระดับนาโนเมื่ออยู่ในน้ำหรือแอลกอฮอล์ นอกจากการลดความเผ็ดและการเพิ่มความคงตัวแล้ว capsaicin sulfate ซึ่งเป็น metabolite ชนิดใหม่จาก capsaicin ได้ถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกในการวิจัยนี้ โดย capsaicin sulfate สามารถเปลี่ยนกลับไปเป็น capsaicin ได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และจากสมบัติที่เหมือนการพรางตัวนี้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็น food supplementary ที่ดีในอนาคต และสุดท้ายสารในกลุ่ม medium chain fatty acid ที่เตรียมได้ง่ายจากการทำ acid hydrolysis ของ capsaicin จะเป็น metabolite ที่สำคัญด้านการคั้นน้ำหนักรในอนาคต

Abstract

Limitation of capsaicinoids and capsinoids raised from the pungency and the structural instability, respectively leading to less applications use from both natural substances. However, capsaicinoids and capsinoids are received much attention due to the application use as food supplementary especially for weigh control. In this investigation, three main approaches are focused in order to discover the new compounds or develop the suitable derivatives that fit with the need of the end user; 1) reduction of pungency of capsaicinoids 2) stability enhancement of capsinoids and 3) preparation of the novel metabolite for future food supplementary. It was revealed that three different capsaicinoid derivatives, N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(1H-indol-1-yl)pentanamide (IC5) N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(1H-indol-1-yl)hexanamide (IC6) และ N-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-5-(5-nitro-1H-indol-1-yl)pentanamide (NIC5), exhibited less toxicity to skin fibroblast cell that indirectly indicated for less irritation and less pungent. Moreover, two capsinoid derivatives, acetyl capsiate and reverse ester capsiate possessed much better stability than those in capsinoids, which rapidly decomposed in water or ethanol within minutes. In addition to reduction of pungency and stability improvement, capsaicin sulfate was firstly synthesized with high yield and can transform itself to capsaicin under certain condition and this camouflage property make capsaicin sulfate can be further used as the next candidate for food supplementary. Finally, medium chain fatty acid, which prepared via simple acid hydrolysis of capsaicin, was one of the leading food supplementary for weigh control.

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับเมื่อสิ้นสุดการวิจัย	2
1.4 กระบวนการผลักดันผลงานออกสู่การใช้ประโยชน์	3
1.5 เอกสารอ้างอิง	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 บทนำ	4
2.2 อนุพันธ์ของสาร capsaicin ที่มีอยู่ในธรรมชาติ	5
2.3 อนุพันธ์ของสาร capsaicin ที่เกิดจากการสังเคราะห์	6
2.4 อนุพันธ์ของสาร capsiate ที่เกิดจากการสังเคราะห์	9
2.5 เอกสารอ้างอิง	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	13
3.1 การเตรียม 90% capsaicinoids จากสารสกัดพริกด้วยวิธีการตกผลึก	13
3.2 การเตรียม capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลง	14
3.3 การพัฒนา capsinoids โดยปรับปรุงให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้น	22
3.4 การเตรียม metabolites ของ capsaicinoids และ capsinoids	25
3.5 การทดสอบการระคายเคืองกับผิวหนัง	28
3.6 การทดสอบความคงตัวภายใต้สภาวะของอุณหภูมิและแสงต่างๆ ด้วย HPLC technique	34
3.7 การเตรียม formulation ที่เหมาะสมของ capsaicinoids ที่ได้ปรับปรุงให้มีความเผ็ดลดลง capsinoids ที่มีความคงตัวเพิ่มขึ้น และ metabolites ของ capsaicinoids และ capsinoids เพื่อทำ การทดสอบสมบัติต่างๆ	35
3.8 เอกสารอ้างอิง	42
บทที่ 4 สรุปผลการศึกษา	43
ภาคผนวก 1.1	A-1
ภาคผนวก 1.2	B-1
ภาคผนวก 1.3	C-1
ภาคผนวก 2	D-1
ภาคผนวก 3	E-1

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 สารอนุพันธ์ capsaicinoids ในธรรมชาติที่มีความแตกต่างกันในส่วนของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน.....	5
ตาราง 2 สารอนุพันธ์ capsinoids ในธรรมชาติที่มีความแตกต่างกับสาร capsaicinoids ในส่วนของพันธะ.....	6
ตาราง 3 สารอนุพันธ์ capsaicinoids ในธรรมชาติที่มีความแตกต่างกับสาร capsaicinoids ในส่วนของอะโรมาติก.....	6
ตาราง 4 การปรับปรุงโครงสร้างอนุพันธ์ capsaicin บนตำแหน่งต่างๆ ในส่วนของวงแหวนอะโรมาติก	7
ตาราง 5 การปรับปรุงโครงสร้างอนุพันธ์ capsaicin ในส่วนของพันธะ.....	8
ตาราง 6 การปรับปรุงโครงสร้างอนุพันธ์ capsaicin ในส่วนของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน.....	9
ตาราง 7 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ PEG 400 ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 0.5–10 %v/v	29
ตาราง 8 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ความเข้มข้น 125-1000 µg/ml	30
ตาราง 9 ความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของ capsaicin และอนุพันธ์ capsaicin ที่ความเข้มข้น 2.3 mM	32
ตาราง 10 แสดงปริมาณคงเหลือของ Switch capsate และ Acetyl capsate เทียบกับ Capsate ทุกๆ 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ ambient condition	34
ตาราง 11 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ capsaicin และ dihydrocapsaicin ในสารสกัดพริกเข้มข้น.....	35
ตาราง 12 แสดงผลลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก ร่วมกับ 20% HPMC ความเข้มข้นร้อยละ 12.5, 25 และ 50 โดยน้ำหนัก และ/หรือ Tween 80 และ Span 80 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5.0 และ 10.0 โดยน้ำหนัก.....	36
ตาราง 13 แสดงผลลักษณะทางกายภาพของการผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยน้ำหนัก ร่วมกับ 2% HPMC AN5 และ AN 15 ความเข้มข้นร้อยละ 7.5, 15 และ 30 โดยน้ำหนัก และ/หรือ Tween 80 และ Span 80 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5.0 และ 6.0 โดยน้ำหนัก...	37
ตาราง 14 แสดงผลลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 20-100 โดยน้ำหนัก และ Deep Eutectic Mixture (DEM) ความเข้มข้นร้อยละ 0-80 โดยน้ำหนัก..	41

สารบัญตารางภาคผนวก 1.1

หน้า

ตาราง 1.1.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ PEG 400 ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 0.5–10 %v/v	A-42
ตาราง 1.1.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 125-1000 µg/ml ครั้งที่ 1	A-44
ตาราง 1.1.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 125-1000 µg/ml ครั้งที่ 2	A-45
ตาราง 1.1.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 125 - 1000 µg/ml ครั้งที่ 3.....	A-46
ตาราง 1.1.5 ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของ capsaicin และอนุพันธ์ capsaicin ที่ระดับความเข้มข้น 2.3 มิลลิโมลาร์ ครั้งที่ 1.....	A-49
ตาราง 1.1.6 ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของ capsaicin และอนุพันธ์ capsaicin ที่ระดับความเข้มข้น 2.3 มิลลิโมลาร์ ครั้งที่ 2.....	A-49
ตาราง 1.1.7 สรุปผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin	A-50
ตาราง 1.1.8 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ capsaicin และ dihydrocapsaicin ในสารสกัดพริกเข้มข้น	A-54
ตาราง 1.1.9 แสดงผลลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกรูปแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก ร่วมกับ 20% HPMC ความเข้มข้นร้อยละ 12.5, 25 และ 50 โดยน้ำหนัก และ/หรือ Tween 80 และ Span 80 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5.0 และ 10.0 โดยน้ำหนัก.....	A-55
ตาราง 1.1.10 แสดงผลลักษณะทางกายภาพของการผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกรูปแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยน้ำหนัก ร่วมกับ 2% HPMC AN5 และ AN 15 ความเข้มข้นร้อยละ 7.5, 15 และ 30 โดยน้ำหนัก และ/หรือ Tween 80 และ Span 80 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5.0 และ 6.0 โดยน้ำหนัก	A-56
ตาราง 1.1.11 แสดงผลลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกรูปแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 20-100 โดยน้ำหนัก และ Deep Eutectic Mixture (DEM) ความเข้มข้นร้อยละ 0-80 โดยน้ำหนัก.....	A-57

สารบัญตารางภาคผนวก 1.3

	หน้า
ตาราง 1.3.1 เครื่องมือและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์	C-2
ตาราง 1.3.2 ค่า LOD และ LOQ ของสารมาตรฐาน capsaicin และ dihydrocapsaicin	C-4
ตาราง 1.3.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin + dihydrocapsaicin ในตัวอย่างที่เวลา 0 เดือน วิเคราะห์วันที่ 2017-12-07	C-6
ตาราง 1.3.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin + dihydrocapsaicin ในตัวอย่างที่เวลา 3 เดือน วิเคราะห์วันที่ 2018-03-13	C-7
ตาราง 1.3.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin + dihydrocapsaicin ในตัวอย่างที่เวลา 6 เดือน วิเคราะห์วันที่ 2018-06-06	C-7
ตาราง 1.3.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร capsaicinoids ในตัวอย่างที่เวลา 0 เดือน วิเคราะห์วันที่ 2017-12-07	C-8
ตาราง 1.3.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร capsaicinoids ในตัวอย่างที่เวลา 3 เดือน วิเคราะห์วันที่ 2018-03-03	C-10
ตาราง 1.3.8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร capsaicinoids ในตัวอย่างที่เวลา 6 เดือน วิเคราะห์วันที่ 2018-06-06	C-12

สารบัญตารางภาคผนวก 3

หน้า

ตาราง 3.1 เปรียบเทียบ Output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง	E-2
---	-----

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 โครงสร้างทั่วไปของสารในกลุ่ม capsaicinoids ที่มี amide bond เป็นพันธะที่เชื่อมระหว่างส่วนที่เป็น long chain fatty acid กับ aromatic amine และ โครงสร้างทั่วไปของสารในกลุ่ม capsinoids ที่มี ester bond เป็นพันธะที่เชื่อมระหว่างส่วนที่เป็น long chain fatty acid กับ aromatic alcohol.....	1
ภาพ 2 กลไกการเกิดการสลายตัวของ capsate ผ่าน <i>p</i> -quinone methide degradation pathway.....	2
ภาพ 3 โครงสร้าง TRPV1 ที่จับกับ capsaicin	4
ภาพ 4 โครงสร้างทางเคมีของ capsaicin และ capsate	4
ภาพ 5 โครงสร้างทั่วไปทางเคมีของ capsaicin ที่แบ่งเป็น 3 ส่วนคือ 1) ส่วนของวงแหวนอะโรมาติก (A) 2) โครงสร้างส่วนของพันธะ (B) และ 3) โครงสร้างส่วนของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน (C)	5
ภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ของ capsinoids ที่สังเคราะห์ด้วย Mitsunobu reaction	9
ภาพ 7 การสกัดและการทำ capsaicinoids ให้บริสุทธิ์จากพริกพีโร	13
ภาพ 8 ปฏิกริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ capsaicin ด้วยสารในกลุ่ม acetate, carbamate, phosphate, proline และ glucose ที่ hydroxyl group ของวง aromatic.....	15
ภาพ 9 แนวทางการปรับปรุง capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลงด้วยการแทนที่กลุ่ม methoxy.....	16
ภาพ 10 ภาพรวมการสังเคราะห์ capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลงด้วยการแทนที่กลุ่ม methoxy ของ aromatic moiety	17
ภาพ 11 การสังเคราะห์ benzaldehyde derivatives.....	17
ภาพ 12 การสังเคราะห์ fluoro benzaldehyde derivatives โดยใช้ปฏิกิริยาของ Duff Reaction.....	18
ภาพ 13 การสังเคราะห์ benzyl amine derivatives	18
ภาพ 14 การสังเคราะห์ MCFA จากปฏิกิริยา hydrolysis ของสารสกัดจากพริก	19
ภาพ 15 การสังเคราะห์ demethoxy capsaicin bromo capsaicin และ nitro capsaicin โดยปฏิกิริยา coupling reaction ด้วย HOBT/TBTU เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	19
ภาพ 16 การสังเคราะห์ fluoro capsaicin difluoro capsaicin และ trifluoromethoxyl capsaicin โดยปฏิกิริยา coupling reaction ด้วย HOBT/EDC เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	20
ภาพ 17 การสังเคราะห์ capsaicin derivatives ปรับปรุงในส่วน fatty acid residue และ aromatic moiety	21
ภาพ 18 โครงสร้าง capsaicin derivatives ปรับปรุงในส่วน fatty acid residue และวง aromatic.....	22
ภาพ 19 กลไกการสลายตัวของ capsate ผ่าน quinone methide degradation	22
ภาพ 20 แนวทางการเพิ่มความคงตัวของสารในกลุ่ม capsinoids 2 แบบคือ 1) ทำการ deactivation กลุ่ม hydroxyl และ 2) ปรับโครงสร้างและสลับตำแหน่งของ ester bond.....	23
ภาพ 21 โครงสร้างทางเคมีของการพัฒนา capsinoids โดยการปรับปรุงให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้นด้วย carbamate / phosphate / proline / acetate ที่ hydroxyl group ของ aromatic.....	23
ภาพ 22 การสังเคราะห์ acetyl capsate	24
ภาพ 23 การสังเคราะห์ switch capsate.....	24
ภาพ 24 โครงสร้างของ capsaicin และ dihydrocapsaicin sulfate ester	25
ภาพ 25 การเกิด medium chain fatty acid ที่เกิดจากการสลายตัวของสารในกลุ่ม capsinoids.....	26

ภาพ 26 metabolite ในกลุ่มของ medium chain fatty acid ที่เกิดจาก bioconversion ของ capsaicin ด้วย microorganism.....	26
ภาพ 27 การสังเคราะห์ MCFA จากปฏิกิริยา hydrolysis ของสารสกัดจากพริก	27
ภาพ 28 การสังเคราะห์ 8-methylenedec-6-enoic acid	27
ภาพ 29 ผลการทดสอบความเข้มข้นของ PEG 400 ที่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไฟโบรบลาสต์.....	29
ภาพ 30 ผลความอยู่รอดของเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ capsaicin ตั้งแต่ 125 – 1000 µg/ml.....	30
ภาพ 31 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ capsaicin ที่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์	31
ภาพ 32 ความเป็นพิษของ capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ระดับความเข้มข้น 2.3 mM.....	33
ภาพ 33 แสดงลักษณะของสารสกัดพริกเข้มข้นเริ่มต้น	39
ภาพ 34 แสดงตำรับที่ 12 ที่มีการตกตะกอนเป็นสีส้มของสารสกัดพริก.....	39
ภาพ 35 สารละลาย capsicum ตัวอย่าง เลขที่ตำรับต่างๆ ที่เวลา 0 เดือน (ถ่ายเมื่อ 2017-12-07)	40
ภาพ 36 สารละลาย capsicum ตัวอย่าง เลขที่ตำรับต่างๆ ที่เวลา 3 เดือน (ถ่ายเมื่อ 2018-03-13).....	40
ภาพ 37 สารละลาย capsicum ตัวอย่าง เลขที่ตำรับต่างๆ ที่เวลา 6 เดือน (ถ่ายเมื่อ 2018-06-06).....	40

สารบัญภาพภาคผนวก 1.1

หน้า

ภาพ 1.1.1 การสกัดและการทำ capsaicinoids ให้บริสุทธิ์จากพริกพีโรธ.....	A-3
ภาพ 1.1.2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ tetraacetyl- α -D-glucose fluoride.....	A-5
ภาพ 1.1.3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ capsaicin- β -D-glucopyranoside	A-6
ภาพ 1.1.4 การสังเคราะห์ benzaldehyde derivatives	A-7
ภาพ 1.1.5 การสังเคราะห์ fluoro benzaldehyde derivatives โดยใช้ปฏิกิริยาของ Duff	A-8
ภาพ 1.1.6 การสังเคราะห์ benzylamine derivatives โดยปฏิกิริยาเกิดผ่าน oxime.....	A-9
ภาพ 1.1.7 การสังเคราะห์ benzylamine derivatives โดยใช้วิธีของ Nelson และ Ganett.....	A-10
ภาพ 1.1.8 ปฏิกิริยาการเตรียม ammonium formate	A-11
ภาพ 1.1.9 การสังเคราะห์ 3-nitro-4-hydroxy benzylamine hydrochloride โดยใช้ปฏิกิริยาของ Leuckart	A-12
ภาพ 1.1.10 แผนภาพการทำปฏิกิริยา Wittig reaction.....	A-12
ภาพ 1.1.11 แผนภาพการสังเคราะห์ E-isomer ของ MCFA.....	A-13
ภาพ 1.1.12 การสังเคราะห์ MCFA จากปฏิกิริยา hydrolysis ของสารสกัดจากพริก	A-14
ภาพ 1.1.13 แผนภาพการสังเคราะห์ capsaicin derivatives โดยปฏิกิริยา coupling พันธะ amide	A-15
ภาพ 1.1.14 การสังเคราะห์ capsaicin derivatives โดยใช้ HOBt และ EDC.HCl เป็น coupling reagent	A-16
ภาพ 1.1.15 การสังเคราะห์ capsaicin derivatives ปรับปรุงในส่วน fatty acid residue และ aromatic moiety	A-18
ภาพ 1.1.16 การสังเคราะห์ 3-nitro-4-hydroxybenzylamine ด้วย Leuckart reaction	A-19
ภาพ 1.1.17 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ indole acetic acid ด้วย alkylation และ hydrolysis.....	A-19
ภาพ 1.1.18 การสังเคราะห์อนุพันธ์ nitroindole acetic acid ด้วย alkylation and hydrolysis.....	A-21
ภาพ 1.1.19 การสังเคราะห์อนุพันธ์ capsaicin	A-22
ภาพ 1.1.20 การสังเคราะห์ 3-methoxy-4-hydroxyl benzyl alcohol	A-27
ภาพ 1.1.21 การสังเคราะห์ capsate ด้วยปฏิกิริยา Mitsunobu's.....	A-27
ภาพ 1.1.22 การสังเคราะห์ Switch 7-Capsate ด้วย esterification	A-29
ภาพ 1.1.23 การสังเคราะห์ Switch 8-Capsate ด้วย esterification	A-30
ภาพ 1.1.24 โครงสร้างทางเคมีของสาร capsaicinoid sulfate ester.....	A-31
ภาพ 1.1.25 โครงสร้างทางเคมีของ 8-methylenenon-8-enoic acid (1)	A-33
ภาพ 1.1.26 แนวทางการสังเคราะห์ 8-methylenenon-8-enoic acid (1).....	A-34
ภาพ 1.1.27 ปฏิกิริยา Wittig reaction ของ (2-bromomethyl-betene)triphenyl phosphonium bromide (4) และ 6-oxohexanoic acid (5).....	A-34
ภาพ 1.1.28 การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) ด้วยวิธีที่ 1.....	A-35
ภาพ 1.1.29 การสังเคราะห์ (methyl)triphenylphosphonium iodide (19)	A-35
ภาพ 1.1.30 การสังเคราะห์ 2-methyl-butene (9) ด้วย Wittig reaction.....	A-35
ภาพ 1.1.31 การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) โดยใช้ปฏิกิริยา bromination.....	A-36
ภาพ 1.1.32 การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) ด้วยวิธีที่ 2.....	A-36
ภาพ 1.1.33 การสังเคราะห์ 2-methylene-butanal (12) ด้วยปฏิกิริยา α -methylenation	A-36
ภาพ 1.1.34 การสังเคราะห์ 2-methylene-butan-1-ol (10) ด้วยปฏิกิริยา reduction.....	A-37

ภาพ 1.1.35	การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) โดยใช้ปฏิกิริยา bromination.....	A-37
ภาพ 1.1.36	การสังเคราะห์ (2-bromomethyl-butene)triphenylphosphonium bromide (4).....	A-38
ภาพ 1.1.37	การสังเคราะห์ 6-oxohexanoic acid (5) โดยใช้ปฏิกิริยาเปิดวง	A-38
ภาพ 1.1.38	การสังเคราะห์ 8-methylene-6-decenoic acid (1) ด้วย Wittig reaction	A-38
ภาพ 1.1.39	ปฏิกิริยา Wittig reaction ของ (5-carboxypentyl)triphenylphosphonium bromide (15) และ 2-methylene-butanal (12) (แนวทางที่ 2).....	A-39
ภาพ 1.1.40	การสังเคราะห์ (5-carboxypentyl)triphenylphosphonium bromide (15).....	A-39
ภาพ 1.1.41	การสังเคราะห์ 8-methylene-6-decenoic acid (1) ด้วย Wittig reaction ตามแนวทางที่ 2	A-40
ภาพ 1.1.42	รูปร่างเซลล์ (cell morphology) จากการทดสอบความเป็นพิษของ PEG 400 ต่อ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 0.5–10 %v/v ที่กำลังขยาย 10X	A-42
ภาพ 1.1.43	ผลความอยู่รอดของเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ capsaicin ตั้งแต่ 125–1000 µg/ml ครั้งที่ 1 ...	A-44
ภาพ 1.1.44	ผลความอยู่รอดของเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ capsaicin ตั้งแต่ 125–1000 µg/ml ครั้งที่ 2 ...	A-45
ภาพ 1.1.45	ผลความอยู่รอดของเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ capsaicin ตั้งแต่ 125–1000 µg/ml ครั้งที่ 3 ...	A-46
ภาพ 1.1.46	รูปร่างเซลล์ (cell morphology) การทดสอบความเป็นพิษของ capsaicin ต่อเซลล์ ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 125-1000 µg/ml ที่กำลังขยาย 10X	A-47
ภาพ 1.1.47	รูปร่างเซลล์ (cell morphology) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin.....	A-51
ภาพ 1.1.48	สารอนุพันธ์ capsaicin ที่มีข้อจำกัดในการละลาย ได้แก่ NIC6, NIC7 และ NINC6 ที่ความเข้มข้น 2.3 มิลลิโมลาร์ โดยใช้สารละลาย PEG 400 เป็นตัวช่วยละลายและ กำหนดให้มีปริมาณ PEG400 ไม่เกิน 2% v/v	A-52

สารบัญภาพภาคผนวก 1.2

หน้า

ภาพ 1.2.1 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร capsaicinoids >90% HPLC; (CDCl_3 , 400 MHz).....	B-2
ภาพ 1.2.2 –ESI-MS m/z ของสาร capsaicin ในสาร capsaicinoids >90% HPLC.....	B-3
ภาพ 1.2.3 –ESI-MS m/z ของสาร dihydrocapsaicin ในสาร capsaicinoids >90% HPLC.....	B-4
ภาพ 1.2.4 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ acetyl capsaicin; (CDCl_3 , 400 MHz)	B-5
ภาพ 1.2.5 Mass spectrum ของ acetyl capsaicin.....	B-6
ภาพ 1.2.6 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารผลิตภัณฑ์ tetraacetyl- α -D-glucose fluoride ใน chloroform- <i>d</i>	B-7
ภาพ 1.2.7 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ capsaicin- β -D-glucopyranoside.....	B-8
ภาพ 1.2.8 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของ capsaicin- β -D-glucopyranoside.....	B-9
ภาพ 1.2.9 FT-IR spectrum ของ capsaicin- β -D-glucopyranoside	B-10
ภาพ 1.2.10 (+ESI) LC-MS-MS spectrum ของ capsaicin- β -D-glucopyranoside.....	B-11
ภาพ 1.2.11 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde ใน chloroform- <i>d</i>	B-12
ภาพ 1.2.12 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 3-nitro-4-hydroxybenzaldehyde ใน chloroform- <i>d</i>	B-13
ภาพ 1.2.13 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 3-trifluoromethoxyl-4-hydroxybenzaldehyde ใน chloroform- <i>d</i>	B-14
ภาพ 1.2.14 FT-IR spectrum ของ 3-trifluoromethoxyl-4-hydroxybenzaldehyde	B-15
ภาพ 1.2.15 Mass spectrum ของ 3-trifluoromethoxyl-4-hydroxybenzaldehyde.....	B-16
ภาพ 1.2.16 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 3-fluoro-4-hydroxybenzaldehyde ใน chloroform- <i>d</i>	B-17
ภาพ 1.2.17 FT-IR spectrum ของ 3-fluoro-4-hydroxybenzaldehyde	B-18
ภาพ 1.2.18 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 3,5-difluoro-4-hydroxybenzaldehyde ใน chloroform- <i>d</i>	B-19
ภาพ 1.2.19 FT-IR spectrum ของ 3,5-difluoro-4-hydroxybenzaldehyde	B-20
ภาพ 1.2.20 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 4-hydroxybenzylamine hydrochloride ใน D_2O	B-21
ภาพ 1.2.21 FT-IR spectrum ของ 4-hydroxybenzylamine hydrochloride	B-22
ภาพ 1.2.22 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 3-bromo-4-hydroxybenzylamine ใน D_2O	B-23
ภาพ 1.2.23 FT-IR spectrum ของ 3-bromo-4-hydroxybenzylamine.....	B-24
ภาพ 1.2.24 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 3-trifluoromethoxyl-4-hydroxybenzylamine hydrochloride ใน D_2O	B-25
ภาพ 1.2.25 FT-IR spectrum ของ 3-trifluoromethoxyl-4-hydroxybenzylamine hydrochloride.....	B-26
ภาพ 1.2.26 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 3-fluoro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride ใน D_2O	B-27
ภาพ 1.2.27 FT-IR spectrum ของ 3-fluoro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride.....	B-28
ภาพ 1.2.28 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 3,5-difluoro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride ใน D_2O	B-29
ภาพ 1.2.29 FT-IR spectrum ของ 3,5-difluoro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride; $1,632\text{ cm}^{-1}$ (N-H bending of amine)	B-30
ภาพ 1.2.30 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ 3-nitro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride ใน D_2O	B-31
ภาพ 1.2.31 FT-IR spectrum 3-nitro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride.....	B-32
ภาพ 1.2.32 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ <i>E/Z</i> -isomer ของ MCFA.....	B-33

ภาพ 1.2.33 ¹ H-NMR spectrum ของสารผสมระหว่าง (<i>E</i>)-8-methyl-6-nonenoic acid และ 8-methylnonanoic acid	B-34
ภาพ 1.2.34 ¹ H-NMR spectrum ของ (a) = (<i>E</i>)- <i>N</i> -(4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide (b) = (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-bromo-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide และ (c) = (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-nitro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide	B-35
ภาพ 1.2.35 Mass spectrum ของ (a) = (<i>E</i>)- <i>N</i> -(4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide (b) = (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-bromo-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide และ (c) = (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-nitro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide	B-36
ภาพ 1.2.36 ¹ H-NMR spectrum ของ (<i>E</i>)- <i>N</i> -(4-hydroxy-3-(trifluoromethoxy)benzyl)-8-methyl-6-nonenamide ใน chloroform- <i>d</i>	B-37
ภาพ 1.2.37 Mass spectrum ของ (<i>E</i>)- <i>N</i> -(4-hydroxy-3-(trifluoromethoxy)benzyl)-8-methyl-6-nonenamide	B-38
ภาพ 1.2.38 ¹ H-NMR spectrum ของ (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-fluoro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide ใน chloroform- <i>d</i>	B-39
ภาพ 1.2.39 Mass spectrum ของ (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-fluoro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide	B-40
ภาพ 1.2.40 ¹ H-NMR spectrum ของ (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3,5-difluoro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide ใน chloroform- <i>d</i>	B-41
ภาพ 1.2.41 Mass spectrum ของ (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3,5-difluoro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide	B-42
ภาพ 1.2.42 ¹ H-NMR spectrum ของ vanillyl oxime ใน Chloroform- <i>d</i>	B-43
ภาพ 1.2.43 ¹ H-NMR spectrum ของ vanillyl amine hydrochloride ใน DMSO- <i>d</i> ₆	B-44
ภาพ 1.2.44 FT-IR spectrum ของ 4-Hydroxy-3-methoxybenzylamine hydrochloride	B-45
ภาพ 1.2.45 ¹ H-NMR spectrum ของ 3-nitro-4-hydroxybenzylamine ใน DMSO- <i>d</i> ₆	B-46
ภาพ 1.2.46 FT-IR spectrum ของ 3-nitro-4-hydroxybenzylamine	B-47
ภาพ 1.2.47 ¹ H-NMR spectra ของ (a) = (1 <i>H</i> -indol-1-yl)pentanoic acid (b) = (1 <i>H</i> -indol-1-yl)hexanoic acid และ (c) = (1 <i>H</i> -indol-1-yl)heptanoic acid in DMSO- <i>d</i> ₆	B-48
ภาพ 1.2.48 ¹³ C-NMR spectrum ของ 5-(1 <i>H</i> -indol-1-yl)pentanoic acid ใน DMSO- <i>d</i> ₆	B-49
ภาพ 1.2.49 FT-IR spectrum ของ 5-(1 <i>H</i> -indol-1-yl)pentanoic acid	B-50
ภาพ 1.2.50 ¹³ C-NMR spectrum ของ 6-(1 <i>H</i> -indol-1-yl)hexanoic acid ใน DMSO- <i>d</i> ₆	B-51
ภาพ 1.2.51 FT-IR spectrum ของ 6-(1 <i>H</i> -indol-1-yl)hexanoic acid	B-52
ภาพ 1.2.52 ¹³ C-NMR spectrum ของ 7-(1 <i>H</i> -indol-1-yl)heptanoic acid in DMSO- <i>d</i> ₆	B-53
ภาพ 1.2.53 FT-IR spectrum ของ 7-(1 <i>H</i> -indol-1-yl)heptanoic acid	B-54
ภาพ 1.2.54 ¹ H-NMR spectra ของ (a) = 5-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)pentanoic acid	B-55
ภาพ 1.2.55 ¹³ C-NMR spectrum ของ 5-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)pentanoic acid ใน chloroform- <i>d</i> ...	B-56
ภาพ 1.2.56 FT-IR spectrum ของ 5-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)pentanoic acid	B-57
ภาพ 1.2.57 Mass spectrum ของ 5-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)pentanoic acid	B-58
ภาพ 1.2.58 ¹³ C-NMR spectrum ของ 6-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)hexanoic acid ใน chloroform- <i>d</i>	B-59
ภาพ 1.2.59 FT-IR spectrum ของ 6-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)hexanoic acid	B-60
ภาพ 1.2.60 Mass spectrum ของ 6-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)hexanoic acid	B-61
ภาพ 1.2.61 ¹³ C-NMR spectrum ของ 7-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)heptanoic acid ใน chloroform- <i>d</i> ...	B-62
ภาพ 1.2.62 FT-IR spectrum ของ 7-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)heptanoic acid	B-63

ภาพ 1.2.63	Mass spectrum ของ 7-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)heptanoic acid.....	B-64
ภาพ 1.2.64	¹ H-NMR spectra ของ (a) = <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(1 <i>H</i> -indol-1-yl) pentanamide (b) = <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(1 <i>H</i> -indol-1-yl)hexanamide และ (c) = <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(1 <i>H</i> -indol-1-yl)heptanamide ใน Methanol- <i>d</i> ₄	B-65
ภาพ 1.2.65	¹³ C-NMR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(1 <i>H</i> -indol-1-yl) pentanamide ใน Methanol- <i>d</i> ₄	B-66
ภาพ 1.2.66	FT-IR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(1 <i>H</i> -indol-1-yl) pentanamide.....	B-67
ภาพ 1.2.67	Mass spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(1 <i>H</i> -indol-1-yl) pentanamide.....	B-68
ภาพ 1.2.68	¹³ C-NMR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(1 <i>H</i> -indol-1-yl) hexanamide ใน Methanol- <i>d</i> ₄	B-69
ภาพ 1.2.69	FT-IR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(1 <i>H</i> -indol-1-yl) hexanamide	B-70
ภาพ 1.2.70	Mass spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(1 <i>H</i> -indol-1-yl) hexanamide	B-71
ภาพ 1.2.71	¹³ C-NMR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(1 <i>H</i> -indol-1-yl) heptanamide ใน Methanol- <i>d</i> ₄	B-72
ภาพ 1.2.72	FT-IR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(1 <i>H</i> -indol-1-yl) heptanamide.....	B-73
ภาพ 1.2.73	Mass spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(1 <i>H</i> -indol-1-yl) heptanamide.....	B-74
ภาพ 1.2.74	¹ H-NMR spectra ของ (a) = <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) pentanamide, (b) = <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) hexanamide และ (c) = <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) heptanamide ใน Acetone- <i>d</i> ₆	B-75
ภาพ 1.2.75	¹³ C-NMR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) pentanamide ใน Acetone- <i>d</i> ₆	B-76
ภาพ 1.2.76	FT-IR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) pentanamide.....	B-77
ภาพ 1.2.77	Mass spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) pentanamide.....	B-78
ภาพ 1.2.78	¹³ C-NMR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) hexanamide ใน Acetone- <i>d</i> ₆	B-79
ภาพ 1.2.79	FT-IR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) hexanamide	B-80
ภาพ 1.2.80	Mass spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) hexanamide	B-81

ภาพ 1.2.81 ^{13}C -NMR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) heptanamide ใน Acetone- d_6	B-82
ภาพ 1.2.82 FT-IR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) heptanamide.....	B-83
ภาพ 1.2.83 Mass spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) heptanamide.....	B-84
ภาพ 1.2.84 ^1H -NMR spectra ของ (a) = <i>N</i> -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-5-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) pentanamide (b) = <i>N</i> -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-6-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)hexanamide และ (c) = <i>N</i> -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-7-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)heptanamide ใน Acetone- d_6	B-85
ภาพ 1.2.85 ^{13}C -NMR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-5-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) pentanamide ใน Acetone- d_6	B-86
ภาพ 1.2.86 FT-IR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-5-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) pentanamide.....	B-87
ภาพ 1.2.87 Mass spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-5-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) pentanamide.....	B-88
ภาพ 1.2.88 ^{13}C -NMR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-6-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) hexanamide ใน Acetone- d_6	B-89
ภาพ 1.2.89 FT-IR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-6-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) hexanamide	B-90
ภาพ 1.2.90 Mass spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-6-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) hexanamide	B-91
ภาพ 1.2.91 ^{13}C -NMR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-7-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) heptanamide ใน Acetone- d_6	B-92
ภาพ 1.2.92 FT-IR spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-7-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) heptanamide.....	B-93
ภาพ 1.2.93 Mass spectrum ของ <i>N</i> -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-7-(5-nitro-1 <i>H</i> -indol-1-yl) heptanamide.....	B-94
ภาพ 1.2.94 ^1H -NMR spectrum ของ 3-methoxy-4-hydroxybenzyl alcohol ใน chloroform- <i>d</i>	B-95
ภาพ 1.2.95 ^1H -NMR spectrum ของ <i>E/Z</i> capsate ใน chloroform- <i>d</i>	B-96
ภาพ 1.2.96 ^{13}C -NMR spectrum ของ <i>E/Z</i> capsate ใน chloroform- <i>d</i>	B-97
ภาพ 1.2.97 ^1H -NMR spectrum ของ (<i>E</i>)-7-methyl-5-octen-1-yl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acetate ใน chloroform- <i>d</i>	B-98
ภาพ 1.2.98 ^1H -NMR spectrum ของ (<i>E</i>)-8-methyl-6-nonen-1-yl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acetate และ 8-methylnonyl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetate ใน chloroform- <i>d</i>	B-99
ภาพ 1.2.99 FT-IR spectrum ของ (<i>E</i>)-8-methyl-6-nonen-1-yl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acetate และ 8-methylnonyl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetate.....	B-100
ภาพ 1.2.100 ^1H -NMR ของ capsaicin sulfate ester	B-101
ภาพ 1.2.101 ^{13}C NMR ของ capsaicin sulfate ester	B-102

ภาพ 1.2.102 ESI-MS scan chromatogram ของ capsaicin sulfate ester.....	B-103
ภาพ 1.2.103 FT-IR chromatogram ของ capsaicin sulfate ester	B-104
ภาพ 1.2.104 ^1H -NMR ของ dihydrocapsaicin sulfate ester.....	B-105
ภาพ 1.2.105 ^{13}C NMR ของ dihydrocapsaicin sulfate ester	B-106
ภาพ 1.2.106 ESI-MS scan chromatogram ของ dihydrocapsaicin sulfate ester.....	B-107
ภาพ 1.2.107 FT-IR chromatogram ของ dihydrocapsaicin sulfate ester	B-108

สารบัญภาพภาคผนวก 1.3

หน้า

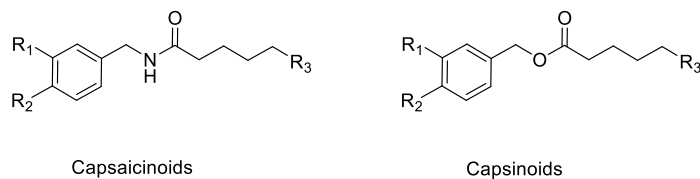
ภาพ 1.3.1 HPLC โครมาโตแกรมการแยกของสารมาตรฐาน capsaicin และ dihydrocapsaicin ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml.....	C-2
ภาพ 1.3.2 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน capsaicin (A) และ dihydrocapsaicin (B) ที่ความเข้มข้น 5.0, 25.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 µg/ml	C-3
ภาพ 1.3.3 HPLC โครมาโตแกรมการแยกของสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ในตัวอย่าง	C-5

บทที่ 1

บทนำ

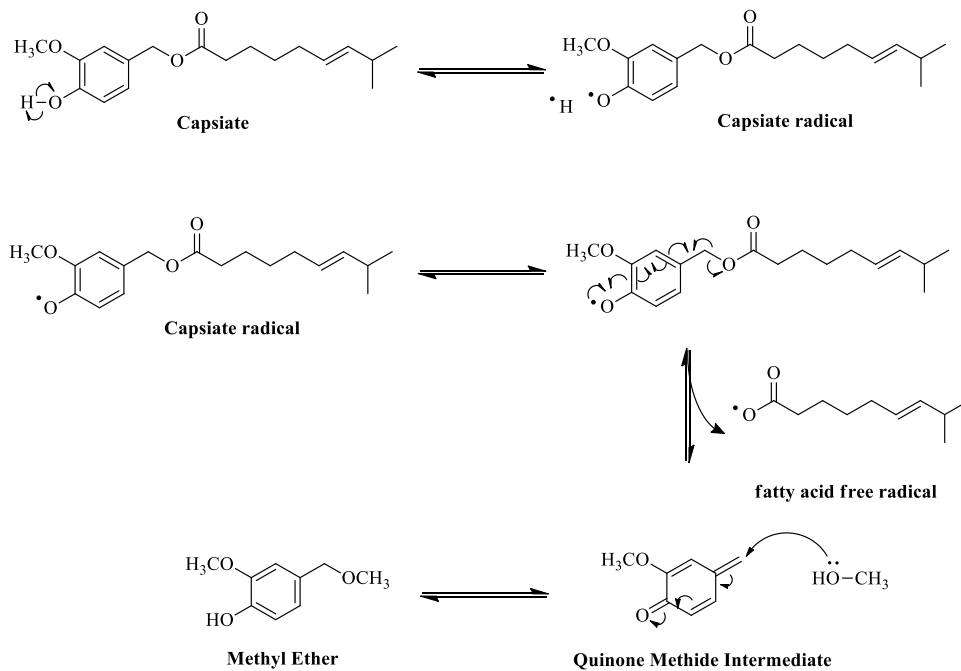
1.1 ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

โดยทั่วไปพริกมี 2 ประเภทคือพริกที่เผ็ดและพริกที่ไม่เผ็ด ทั้งนี้พบว่าพริกที่เผ็ดมีสารกลุ่ม capsaicinoids ในขณะที่พริกที่ไม่เผ็ดนั้นไม่มีสารกลุ่ม capsinoids เป็นองค์ประกอบหลัก โดยสารทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันคือ capsaicinoids มีการเชื่อมต่อกันระหว่างส่วนที่เป็น fatty acid กับ aromatic amine ด้วยพันธะเอไมด์ (amide bond) ในขณะที่ capsinoids เป็นการใช้นพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ในการเชื่อมต่อกันระหว่าง fatty acid กับ aromatic alcohol (ภาพ 1) ซึ่งประโยชน์ของทั้ง capsaicinoids และ capsinoids คือ ช่วยเพิ่มการเผาผลาญพลังงานในร่างกายและเร่งการสลายของไขมัน โดย capsaicin จะเข้าไปกระตุ้น TRPV1 และไปส่งผลต่อ sympathetic nervous system (SNS)¹⁻⁴ ในขณะที่ capsiate จะเข้าไปกระตุ้น TRPV1 ภายในช่องปาก⁵ ซึ่ง TRPV1 ที่บริเวณช่องปากจะส่งผลต่อการเผาผลาญในร่างกายอย่างเด่นชัดเมื่อเทียบกับ TRPV1 ในส่วนอื่นของร่างกาย⁶ โดยในปัจจุบันมีการบริโภคพริกทั้ง 2 ประเภทที่อยู่ในรูปแบบของอาหารและแบบสารเสริมอาหาร เช่น บริษัท Ajinomoto ได้ทำการขายสารเสริมอาหารที่มีสารในกลุ่ม capsinoids เป็นองค์ประกอบหลักในรูปแบบ capsule ภายใต้ชื่อทางการค้าคือ capsiate natura⁷ ทั้งนี้สามารถสั่งซื้อทาง online และใช้เป็นยาตามการวินิจฉัยของแพทย์



ภาพ 1 โครงสร้างทั่วไปของสารในกลุ่ม capsaicinoids ที่มี amide bond เป็นพันธะที่เชื่อมระหว่างส่วนที่เป็น long chain fatty acid กับ aromatic amine และ โครงสร้างทั่วไปของสารในกลุ่ม capsinoids ที่มี ester bond เป็นพันธะที่เชื่อมระหว่างส่วนที่เป็น long chain fatty acid กับ aromatic alcohol

แต่การใช้ประโยชน์จากสารทั้งสองกลุ่มยังมีข้อจำกัดดังนี้คือ 1) ในกรณีพริกเผ็ดที่มีสารในกลุ่ม capsaicinoids นั้น ความเผ็ดของสารในกลุ่มนี้ส่งผลอย่างมากต่อการนำไปใช้ประโยชน์ เพราะมีข้อจำกัดของปริมาณของ capsaicinoids ที่ต้องบริโภคเพื่อให้ได้ประโยชน์และผลที่ชัดเจน และผู้บริโภคส่วนใหญ่ไม่สามารถทนต่อความเผ็ดของ capsaicinoids ได้ ดังนั้นต้องใช้หลายเทคนิคในการลดข้อจำกัดนี้ เช่น การทำ encapsulation ของ capsaicinoids ก่อนการนำไปใช้ประโยชน์ซึ่งมีราคาสูงในการไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ 2) ในกรณีพริกที่ไม่เผ็ดนั้นไม่มีสารกลุ่ม capsinoids ทั้งนี้ข้อที่ควรระวังคือ capsinoids คือไม่คงตัวเพราะเกิดการสลายตัวผ่าน *p*-quinone methide degradation pathway (ภาพ 2) โดยเฉพาะในตัวทำละลายที่มีขั้ว⁸ ส่งผลให้มีปัญหาระหว่างการสกัด การผลิต และการแปรรูป



ภาพ 2 กลไกการเกิดการสลายตัวของ capsiate ผ่าน *p*-quinone methide degradation pathway

นอกเหนือจากสารกลุ่ม capsaicinoids และ capsinoids แล้ว metabolites ของสารกลุ่ม capsaicinoids และ capsinoids ที่พบในธรรมชาติสามารถนำไปใช้เป็นสารเสริมอาหารได้ โดย metabolite ดังกล่าวอาจถูกผลิตขึ้นมาจากการสลายตัวจากความร้อน (Thermal degradation) และจากการหมัก (Fermentation) ทั้งนี้ประโยชน์ของ metabolites จากพริกมีโอกาที่จะถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคตแต่ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยเหตุผลดังกล่าวส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากทั้ง capsaicinoids capsinoids และ metabolites จากพริกจึงต้องมีการวิจัยและพัฒนาเพิ่มเติม

ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้เน้นหาแนวทางในการพัฒนาและการเตรียม capsaicinoids ที่เผ็ดน้อยลง สารในกลุ่ม capsinoids ที่มีความคงตัวเพิ่มขึ้น และการเตรียม metabolites เพื่อสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความหลากหลายและเป็นการเพิ่มมูลค่าของพริก รวมทั้งการไปใช้ในการศึกษาสมบัติทางชีวภาพของ capsaicinoids และ capsinoids และ metabolites หลังการพัฒนาและปรับปรุง

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 ปรับปรุงโครงสร้างของ capsaicinoids ให้มีความเผ็ดลดลง
- 1.2.2 ปรับปรุงโครงสร้างของ capsinoids ให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้น
- 1.2.3 หาแนวทางที่เหมาะสมในการเตรียม metabolites ของ capsaicinoids และ capsinoids

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับเมื่อสิ้นสุดการวิจัย

- 1.3.1 ได้ capsaicinoids ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์และมีความเผ็ดลดลง
- 1.3.2 ได้ capsinoids ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์และมีความคงตัวเพิ่มขึ้น
- 1.3.3 ได้ metabolites ของ capsaicinoids และ capsinoids ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์
- 1.3.4 ได้ formulation ที่เหมาะสมในการเตรียมผลิตภัณฑ์จากสารสกัดพริก

1.4 กระบวนการผลิตต้นผลงานออกสู่การใช้ประโยชน์

ถ่ายทอดข้อมูลให้กับสาธารณะ เช่น การนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ หรือการถ่ายทอดข้อมูลผลงานวิจัยให้แก่ บริษัทเอกชน เพื่อขยายผลงานวิจัยและต่อยอดงานวิจัยสู่เชิงพาณิชย์ต่อไป

1.5 เอกสารอ้างอิง

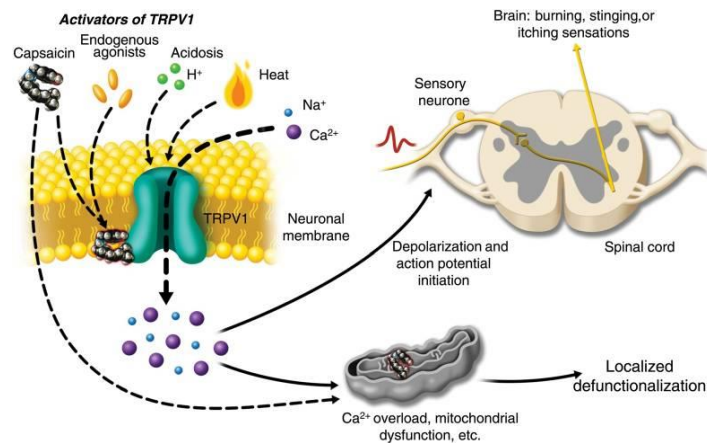
- [1] Iwai, K., Yazawa, A. and Watanabe, T. (2003). Roles as metabolic regulators for the non-nutrients capsaicin and capsiate supplemented to diet. *Proc. Japan Acad.*, 79B (7), 207-212.
- [2] Kawada, T., Hagihara, K. and Iwai, K. (1986). Effects of Capsaicin on Lipid Metabolism in Rats Fed a High Fat Diet. *The Journal of Nutrition*, 116, 1272-1278.
- [3] Kawada, T., Watanabe, T., Takaisshi, T., Tanaka, T. and Iwai, K. (1986). Capsaicin-Induced β -Adrenergic Action on Energy Metabolism in Rats: Influence of Capsaicin on Oxygen Consumption, the Respiratory Quotient, and Substrate Utilization *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 183, 250-256.
- [4] Yoshioka, M., St-Pierre, S., Suzuki, M. and Tremblay, A. (1998). Effects of red pepper added to high-fat and high-carbohydrate meals on energy metabolism and substrate utilization in Japanese women. *British Journal of Nutrition*, 80, 503-510.
- [5] Iida, T., Moriyama, T., Kobata, K., Morita, A., Murayama, N., Hashizume, S., Fushiki, T., Yazawa, S., Watanabe, T. and Tominaga, M. (2003). TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. *Neuropharmacology*, 44, 958-967.
- [6] Ohnuki, K., Haramizui, S., Watanabe, T., Yazawa, S. and Fushiki, T. (2001). CH-19 sweet, nonpungent cultivar of red pepper, increased body temperature in mice with vanilloid receptors stimulation by capsiate. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 47(4), 295-8.
- [7] Ajinomoto Co. (2009). "Capsiate Natura: The first and only dietary supplement with natural capsinoids," https://www.ajinomoto.com/en/presscenter/press/detail/g2007_07_12.html. (Accessed August 03, 2018)
- [8] Kumar, T., Payel, G., Mukherjee, T., Barman, K. and Maity, S. (2016). Nano-encapsulation of capsaicin on lipid vesicle and evaluation of their hepatocellular protective effect. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 236-243.
- [9] Sutoh, K., Kobata, K. and Watanabe, T. (2001). Stability of Capsinoid in Various Solvents, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4026-4030.

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

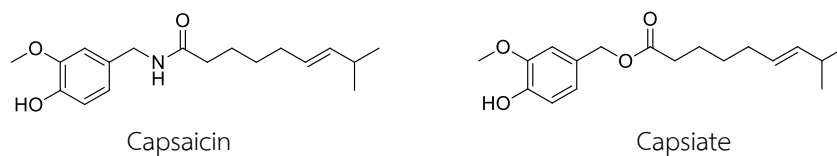
2.1 บทนำ

capsaicin เป็นสารให้ความเผ็ดจากพริกที่จัดอยู่ในกลุ่มของ capsaicinoids มีบทบาททางชีวภาพที่หลากหลาย¹⁻⁷ ทั้งผลต่อระบบประสาทอัตโนมัติ⁸⁻⁹ และระบบเอนโดไคซีน¹⁰⁻¹² โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นตัวกระตุ้นเส้นประสาทรับรู้ความรู้สึกโดยไปจับกับ TRPV1 ซึ่งจะไปกระตุ้นการเปิดของช่องไอออน ทำให้เกิดการกระตุ้นเส้นประสาทรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวด และส่งสัญญาณไปที่สมอง ทำให้เกิดความรู้สึกแสบร้อน (ภาพ 3)



ภาพ 3 โครงสร้าง TRPV1 ที่จับกับ capsaicin¹³

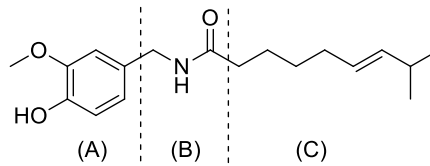
จากความสามารถของ capsaicin ในการกระตุ้น TRPV1 ได้เป็นเวลานาน จึงมีแนวทางที่จะพัฒนานำ capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin มาใช้เป็นยาบรรเทาอาการเจ็บปวดที่อยู่ในรูปของยาครีม^{1,14-16} นอกจากนี้ยังพบว่า capsaicin มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ในการรักษาโรคอื่นๆ ได้อีกหลากหลายชนิด เช่น โรคกระดูกเรื้อรัง โรคหัวใจและโรคหลอดเลือด โรคภายในระบบทางเดินอาหาร โรคอ้วน และรักษาอาการบาดเจ็บจากการขาดเลือดไปหล่อเลี้ยง^{4, 7, 17-19} อย่างไรก็ตามในธรรมชาติยังพบสารที่มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์คล้ายกันกับ capsaicin ที่มีชื่อว่า “capsiate” ซึ่งสามารถแยกได้จากสายพันธุ์พริกชนิดไม่เผ็ด เช่น CH-19 sweet^{17, 20-22} (ภาพ 4)



ภาพ 4 โครงสร้างทางเคมีของ capsaicin และ capsiate

ดังนั้น capsaicin จึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย จึงมีกลุ่มนักวิจัยจำนวนมากสนใจที่จะนำเอา capsaicin มาพัฒนาปรับปรุง เปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีเพื่อให้ได้อนุพันธ์ของ capsaicin ที่มีความจำเพาะเจาะจงและเหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ในด้านต่างๆ โดยยังคงไว้ซึ่งคุณสมบัติที่ดีของ capsaicin เอาไว้ แต่ลดความเผ็ดและอาการแสบร้อน ซึ่งเป็นข้อเสียที่สำคัญของสารนี้ โดยสามารถจำแนกการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของ capsaicin ออกเป็น 3 แนวทางหลัก ดังนี้ 1) การปรับปรุง

โครงสร้างส่วนของวงแหวนอะโรมาติก (A) 2) การปรับปรุงโครงสร้างส่วนของพันธะ (B) และ 3) การปรับปรุงโครงสร้างส่วนของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน (C) (ภาพ 5)



ภาพ 5 โครงสร้างทั่วไปทางเคมีของ capsaicin ที่แบ่งเป็น 3 ส่วนคือ 1) ส่วนของวงแหวนอะโรมาติก (A) 2) โครงสร้างส่วนของพันธะ (B) และ 3) โครงสร้างส่วนของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน (C)

2.2 อนุพันธ์ของสาร capsaicin ที่มีอยู่ในธรรมชาติ

สารอนุพันธ์ capsaicin ที่มีอยู่ในธรรมชาตินั้นมีอยู่ด้วยกันหลากหลายชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติด้านให้ความรู้สึกร้อนที่แตกต่างกันออกไป โดยสารในกลุ่ม capsaicinoids สามารถพบได้ในพริกประเภท *Capsicum* ซึ่งมีโครงสร้างที่แตกต่างกันดัง ตาราง 1

ตาราง 1 สารอนุพันธ์ capsaicinoids ในธรรมชาติที่มีความแตกต่างกันในส่วนของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน

ชื่อสาร	โครงสร้างทางเคมี
Capsaicin	
Dihydrocapsaicin	
Nordihydrocapsaicin	
Homocapsaicin	
Homodihydrocapsaicins	
Nonivamide	

ในปี 1989 Kobata และคณะ²⁰ ได้มีการค้นพบสารกลุ่ม capsinoids (ตาราง 2) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่มีความเผ็ดและไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง โดยสามารถสกัดได้จากพริกหวานที่มีชื่อว่า “CH-19 sweet” ซึ่งเป็นพริกที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถรับประทานได้โดยไม่ก่อให้เกิดอาการปวดแสบปวดร้อน และจากการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม capsinoids และอนุพันธ์ของ capsinoids ที่สกัดได้จากพริกชนิดนี้พบว่าในส่วนของวงแหวนอะโรมาติกและส่วนของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ซึ่งแตกต่างจากสารในกลุ่มของ capsaicinoids ที่จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอไมด์ ความแตกต่างของพันธะทั้งสองโมเลกุลนี้ส่งผลทำให้ความเผ็ด และการระคายเคืองต่อผิวหนังแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตาราง 2 สารอนุพันธ์ capsinoids ในธรรมชาติที่มีความแตกต่างกับสาร capsaicinoids ในส่วนของพันธะ

ชื่อสาร	โครงสร้างทางเคมี
Capsiate	
Dihydrocapsiate	
Nordihydrocapsiate	

ในปี 2006 Fumiharui และคณะ²³ ค้นพบสารประกอบกลูโคไซด์ใหม่ 2 ชนิดคือ capsaicin- β -D-glucopyranoside และ dihydrocapsaicin- β -D-glucopyranoside (ตาราง 3) ในพริก *Capsicum annuum* สายพันธุ์ ‘High Heat’ จากข้อมูลนี้จึงทำให้ทราบว่าในธรรมชาติสารประกอบ capsaicin ไม่เพียงแต่สามารถอยู่ในรูปของ free form ได้แต่ยังสามารถพบได้ในรูปแบบของอนุพันธ์สารประกอบกลูโคไซด์ได้อีกด้วย

ตาราง 3 สารอนุพันธ์ capsaicinoids ในธรรมชาติที่มีความแตกต่างกับสาร capsaicinoids ในส่วนของอะโรมาติก

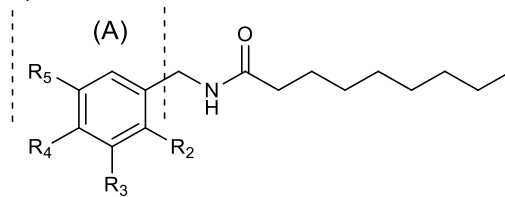
ชื่อสาร	โครงสร้างทางเคมี
Capsaicin- β -D-glucopyranoside	
Dihydrocapsaicin- β -D-glucopyranoside	

2.3 อนุพันธ์ของสาร capsaicin ที่เกิดจากการสังเคราะห์

ในปี ค.ศ. 1993 Walpole และคณะ²⁴⁻²⁶ ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร capsaicin และศึกษาความสัมพันธ์ของหมู่แทนที่ในตำแหน่งต่างๆ บนโครงสร้างทางเคมีของสาร capsaicin ต่อการกระตุ้นการไหลของ Ca^{2+} ใน TRPV1 โดยแบ่งการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีออกเป็น 3 ส่วน คือ วงแหวนอะโรมาติก พันธะ และสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนของโครงสร้าง

โดยในส่วนของการสังเคราะห์การปรับปรุงโครงสร้างในส่วนของวงแหวนอะโรมาติกของอนุพันธ์สาร capsaicin (nonivamide) ได้ทำการเปลี่ยนหมู่แทนที่ตำแหน่ง R ที่แตกต่างกัน จากนั้นจึงทำการศึกษาความสามารถในการเกิด Ca^{2+} influx ในหลอดทดลองได้ผลเปรียบเทียบค่า EC_{50} (ตาราง 4) ซึ่งพบว่า การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง R₄ มีผลทำให้ค่า EC_{50} สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง R₄ จึงมีความสำคัญต่อการกระตุ้นการไหลของ Ca^{2+} ใน TRPV1 ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการยึดจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนกับ Ion channel

ตาราง 4 การปรับปรุงโครงสร้างอนุพันธ์ capsaicin บนตำแหน่งต่างๆ ในส่วนของวงแหวนอะโรมาติก

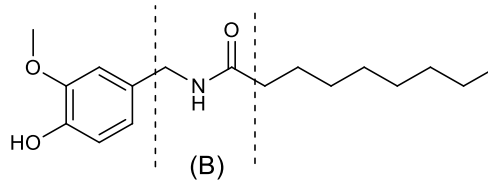


ชื่อสาร	ส่วนของวงแหวนอะโรมาติก (A)				Ca ²⁺ influx EC ₅₀ (μM)
	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	
Capsaicin*	H	OCH ₃	OH	H	0.30±0.04
nonivamide	H	OCH₃	OH	H	0.55±0.08
1	H	H	H	H	>100
2	H	OCH ₃	OCH ₃	H	6.41±0.14
3	H	OCH ₃	H	H	>100
4	H	H	OCH ₃	H	>100
5	OCH ₃	H	H	H	>100
6	H	OH	H	H	>100
7	H	OH	OH	H	0.63±0.03
8	H	OCH ₃	H	OH	>100
9	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	>100
10	OCH ₃	H	OH	H	>100
11	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	>100
12	OH	OH	OH	H	7.64±1.09
13	H	OCH ₃	SH	H	>100
14	H	OCH ₃	NO ₂	H	7.91±1.95
15	H	OCH ₃	NH ₂	H	>10

*capsaicin มีสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน คือ (CH₂)₄-(E)-CH=CHCH(CH₃)₂

จากนั้น Walpole และคณะ²⁵ ได้ทำการสังเคราะห์เพื่อปรับปรุงโครงสร้างในส่วนของพันธะบนโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์สาร capsaicin ในรูปแบบที่แตกต่างกัน ซึ่งผลการศึกษา Ca²⁺ influx โดยเปรียบเทียบค่า EC₅₀ ของพันธะต่างๆ (ตาราง 5) พบว่า พันธะที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการไหลของ Ca²⁺ สูงที่สุดคือ พันธะไทโออีโคโน แต่อย่างไรก็ตามการแทนที่ด้วยหมู่ไทโออีโคโนอาจส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยได้ เนื่องจากสารประกอบที่มีหมู่ไทโออีโคโน ส่วนใหญ่เป็นพิษ ดังนั้นพันธะเอไมด์จึงเป็นพันธะที่มีความเหมาะสมในการจับตัวกับ TRPV1 ที่มีความเหมาะสมในเชิงโครงสร้างเมื่อเปรียบเทียบกับค่า EC₅₀ ที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพันธะชนิดอื่นๆ

ตาราง 5 การปรับปรุงโครงสร้างอนุพันธ์ capsaicin ในส่วนของพันธะ



ชื่อสาร	ส่วนของพันธะ (B)	Ca ²⁺ influx EC ₅₀ (μM)	ชื่อสาร	ส่วนของพันธะ (B)	Ca ²⁺ influx EC ₅₀ (μM)
capsaicin	CH ₂ NHCO	0.30±0.01	12	CH ₂ COO	0.67±0.11
nonivamide	CH ₂ NHCO	0.55±0.08	13	CH ₂ COS	1.17±0.10
1	NHCO	4.48±0.26	14	CH ₂ NHCONH	0.36±0.04
2	(CH ₂) ₂ NHCO	18.30±2.80	15	CH ₂ NHCSNH	0.06±0.01
3	CH ₂ N(CH ₃)CO	>100	16	NHCSNH	2.57±0.90
4	CH ₂ OCO	14.20±0.06	17	CH ₂ N(CH ₃)CSNH	>100
5	CH ₂ NHCS	0.28±0.02	18	CH ₂ NHCSN(CH ₃)	0.53±0.08
6	CH ₂ NHSO ₂	1.32±0.03	19	CH ₂ NHCSNHCO	>100
7	CH ₂ CONH	0.30±0.01	20	CH ₂ NHCNH	3.28±0.63
8	CONH	>100	21	CH ₂ CH ₂ CO	2.13±0.24
9	(CH ₂) ₂ CONH	2.32±0.21	22	CH ₂ COCH ₂	3.78±0.45
10	CH ₂ CON(CH ₃)	6.29±0.25	23	CH ₂ CH ₂ CH ₂	>100
11	CH(OH)CONH	1.16±0.03			

*capsaicin มีสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน คือ (CH₂)₄-(E)-CH=CHCH(CH₃)₂

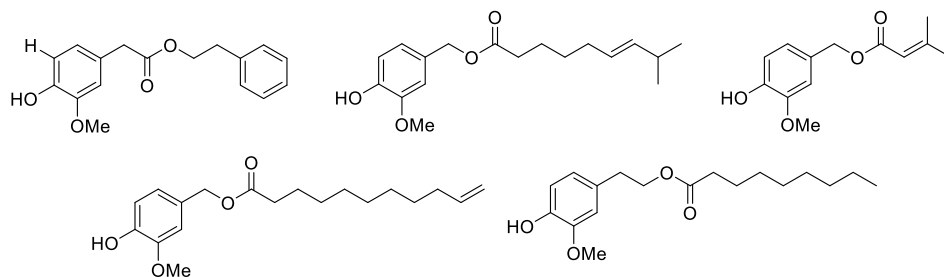
อย่างไรก็ตาม Walpole และคณะ²⁶ ยังได้ทำการสังเคราะห์ปรับปรุงโครงสร้างในส่วนของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนบนโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์สาร capsaicin ในรูปแบบที่แตกต่างกัน จากนั้นทำการศึกษา Ca²⁺ influx โดยเปรียบเทียบค่า EC₅₀ ของพันธะต่างๆ (ตาราง 6) ซึ่งพบว่า ความยาวของสายโซ่ที่ 9 อะตอมคาร์บอนของ capsaicin ให้ค่า EC₅₀ ที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับความยาวของสายโซ่ที่สั้นลง หรือยาวขึ้น ดังนั้นหากสายโซ่ของไฮโดรคาร์บอนในส่วนนี้สั้นไป หรือยาวเกินไปจะส่งผลทำให้ค่า EC₅₀ สูงขึ้น

ตาราง 6 การปรับปรุงโครงสร้างอนุพันธ์ capsaicin ในส่วนของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน

ชื่อสาร	ส่วนของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน (C)	Ca ²⁺ influx EC ₅₀ (μM)
Capsaicin	(CH ₂) ₄ -(E)-CH=CHCH(CH ₃) ₂	0.30±0.04
Dihydrocapsaicin	(CH ₂) ₆ CH(CH ₃) ₂	0.19±0.02
Nonivamide	(CH ₂) ₇ CH ₃	0.55±0.08
1	(CH ₂) ₅ NHBoc	79.80±10.70
2	(CH ₂) ₅ NH ₃ ⁺ TFA ⁻	>100
3	(CH ₂) ₁₀ COOH	>100
4	CH ₂ O(CH ₂) ₂ OCH ₃	>100
5	CH ₂ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ OCH ₃	>100
6	(CH ₂) ₁₆ CH ₃	>100
7	(CH ₂) ₇ -(E)-CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	0.36±0.07
8	(CH ₂) ₇ -(Z)-CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	0.17±0.03
9	CH ₂ Br	>100
10	CH ₂ Cl	>100

2.4 อนุพันธ์ของสาร capsiate ที่เกิดจากการสังเคราะห์

สำหรับการสังเคราะห์และการปรับปรุงโครงสร้างของ capsiate นั้นมีการศึกษาที่เน้นการสังเคราะห์โดยใช้ Mitsunobu reaction ในการทำการสังเคราะห์แบบ chemoselective โดยใช้ alcohol และ phenol หลายชนิดมาทำการ coupling กัน โดยใช้ Diisopropyl azodicarboxylate และ Triphenylphosphine เป็น catalyst พบว่าสามารถสังเคราะห์สารกลุ่มอนุพันธ์ของสาร capsiate ที่มีความยาวของ hydrocarbon chain ที่หลากหลาย แต่ปัญหาในการแยกให้บริสุทธิ์นั้น ยังไม่สามารถแก้ไขได้เพราะสารส่วนใหญ่ไวต่ออากาศและอุณหภูมิ แก้ไขโดยใช้ GPC ในการแยกให้บริสุทธิ์ แต่การสังเคราะห์เพื่อเพิ่มความคงตัวนั้นยังไม่มีรายงานการพัฒนา ดังกล่าว



ภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ของ capsinoids ที่สังเคราะห์ด้วย Mitsunobu reaction²⁸

2.5 เอกสารอ้างอิง

- [1] Conway, S J. (2008). TRPing the switch on pain: an introduction to the chemistry and biology of capsaicin and TRPV1. *Chem Soc Rev.*, 37(8), 1530-1545.
- [2] Prasad, B. C., Kumar, V., Gururaj, H. B., Parimalan, R., Giridhar, P. and Ravishankar, G. A. (2006). Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (csy1) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum* sp.). *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(36), 13315-13320.
- [3] Andrews, J. (1995) *Peppers: the domesticated Capsicums*. New ed. Austin: University of Texas Press.
- [4] Min, J. K., Han, K.Y., Kim, E.C., et al. (2004). Capsaicin inhibits in vitro and in vivo angiogenesis. *Cancer Res.*, 64(2), 644-651.
- [5] Ito, K.; Nakazato, T.; Yamato, K.; et al. Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2004; 64(3):1071-1078.
- [6] Mazzone, S. B. and Geraghty, D.P. (1999). Respiratory action of capsaicin microinjected into the nucleus of the solitary tract: involvement of vanilloid and tachykinin receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 127(2), 473-481.
- [7] Reyes-Escogido, M.D. (2011). Gonzalez-Mondragon, E. G.; Vazquez-Tzompantzi, E. Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. *Molecules*, 16(2), 1253-1270.
- [8] Yoshioka, M., St-Pierre, S., Drapeau, V., Dionne, I., Doucet, E., Suzuki, M., and Tremblay, A. (1999). Effects of red pepper on appetite and energy intake. *British Journal of Nutrition*, 82(2), 115-123.
- [9] Matsumoto, T., Miyawaki, C., Ue, H., Yuasa, T., Miyatsuji, A., and Moritani, T. (2000). Effects of capsaicin-containing yellow curry sauce on sympathetic nervous system activity and diet-induced thermogenesis in lean and obese young women. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*, 46, 309–315.
- [10] Matsuo, T., Yoshioka, M. and Suzuki, M. (1996). Capsaicin in the diet does not affect glycogen contents in the liver and skeletal muscle of rats before and after exercise. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 42, 249-256.
- [11] Shin, K.O. and Moritani, T. (2007). Alterations of autonomic nervous activity and energy metabolism by capsaicin ingestion during aerobic exercise in healthy men. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 53(2), 124-132.
- [12] Lejeune, P.G.M., Manuela, Kovacs, M. R., Eva and Margriet, S. (2003). Effect of capsaicin on substrate oxidation and weight maintenance after modest body-weight loss in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 90, 651–659.
- [13] Anand, P. and Bley, K. (2011). Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *British Journal of Anaesthesia*, 107 (4), 490–502.
- [14] Fumio, T.H. (2012). Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Inflammation and Autoimmune Diseases. *Pharmaceuticals*, 5, 16.

- [15] Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D. and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816-824.
- [16] Breitenbucher, J.G., Chaplan, S.R. and Carruthers, N.I. (2005). The TRPV1 vanilloid receptor: A target for therapeutic intervention. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 40, 185-198.
- [17] Luo, X.J., Peng, J. and Li, Y.J. (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology*, 650(1), 1-7.
- [18] Szallasi, A. and Appendino, G. (2004). Vanilloid receptor TRPV1 antagonists as the next generation of painkillers. Are we putting the cart before the horse? *J Med Chem.*, 47(11), 2717-2723.
- [19] Wang, M.H., Ji, P., Wang, R.R., Zhao, L.F. and Xia, Z.Y. (2012). TRPV1 Agonist Capsaicin Attenuates Lung Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbits. *Journal of Surgical Research*, 173(1), 153-160.
- [20] Kobata, K., Todo, T., Yazawa, S., Iwai, K. and Watanabe, T. (1998). "Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 Sweet of pepper" *J. Agri. Food Chem.*, 46, 1695-1697.
- [21] Ohnuki, K., Haramizu, S., Oki, K., Watanabe, T., Yazawa, S. and Fushiki, T. (2001). Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65(12), 2735-2740.
- [22] Macho, A., Lucena, C., Sancho, R. and et al. (2003). Non-pungent capsaicinoids from sweet pepper-Synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential. *European Journal of Nutrition*, 42(1), 2-9.
- [23] Fumihar, H., Hiroyasu, N., Hideo, H. and Takashi, K. (2006). Purification and Structure Determination of Glucosides of Capsaicin and Dihydrocapsaicin from Various Capsicum Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 5948-5953.
- [24] Walpole, C., Wrigglesworth, R. and Bevan, S. (1993). Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 1. The aromatic "A-Region". *J. Med Chem.*, 36, 2362-2372.
- [25] Walpole, C., Wrigglesworth, R. and Bevan, S. (1993). Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 2. The amide bond "B-Region". *J. Med Chem.*, 36, 2373-2380.
- [26] Walpole, C., Wrigglesworth, R., Bevan, S. (1993). Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 3. The hydrophobic side-chain "C-Region". *J. Med Chem.*, 36, 2381-2389.
- [27] Hussanee, S., Prakit, K., Chanokbhorn, P. and Thanaset, S. (2011). Study on Histone Deacetylase-inhibiting Activity of Capsaicin and Its Derivative (6-hydroxy-N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-8-methylnonanamide). *The Graduate Research Conference 12th, Khon Kaen University.*, BMP11.

- [28] Appendino, G., Minassi, A., Daddario, N., Bianchi, F. and Tron, G. C. (2002). Chemoselective Esterification of Phenolic Acids and Alcihols. *Organic letters.*, 4(22), 3839-3841.

บทที่ 3

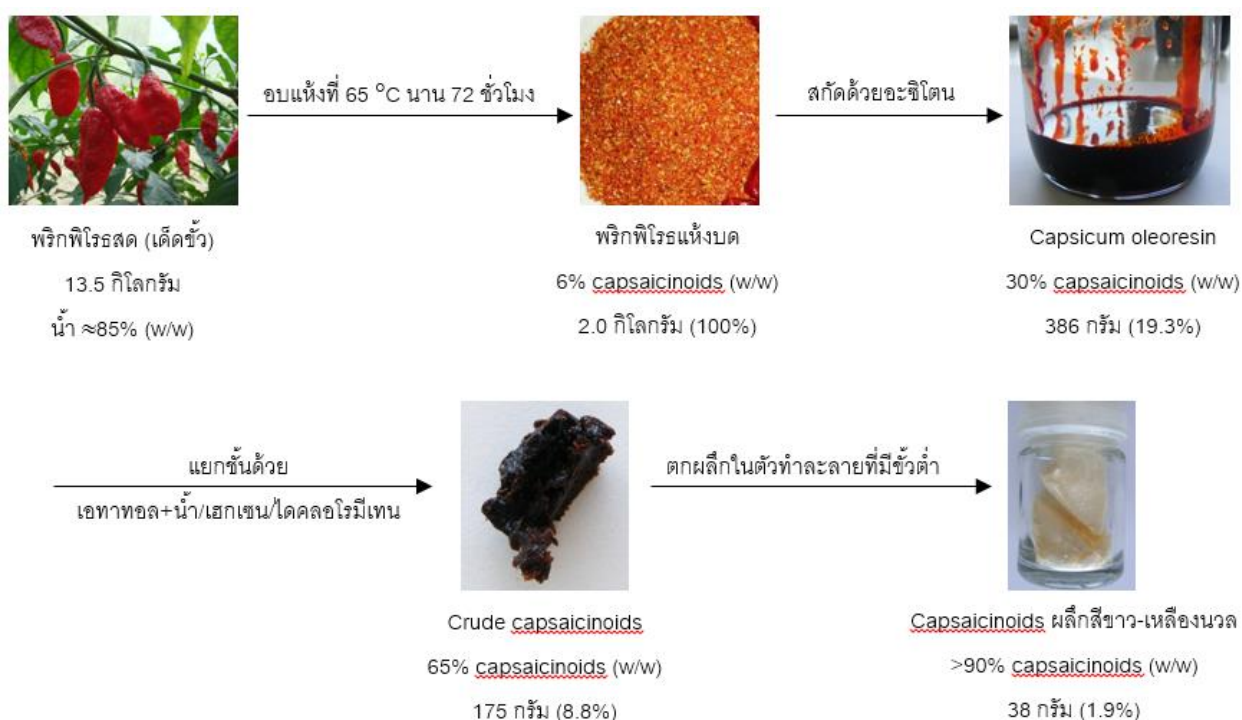
วิธีดำเนินการวิจัยและผลการศึกษา

3.1 การเตรียม 90% capsaicinoids จากสารสกัดพริกด้วยวิธีการตกผลึก

ในงานวิจัยนี้ใช้สารตั้งต้นคือ capsaicinoids สำหรับการปรับโครงสร้างให้มีความเผ็ดลดลง รวมทั้งใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียม metabolite ที่สนใจ และใช้สารสกัดพริกแบบหยาบในการทำ formulation และศึกษาความคงตัว ซึ่งต้องใช้สารสกัดพริกในปริมาณที่สูง ดังนั้นการเตรียม capsaicinoids ที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันจากพริกจึงเป็นแนวทางที่ประหยัดและเหมาะสมสำหรับการศึกษาวิจัยนี้

โดยการเตรียม capsaicinoids ที่ความบริสุทธิ์ต่าง ๆ นั้น สามารถเริ่มจากการใช้พริกสด (พริกพืโรธจากโครงการพัฒนาระบบการปลูกพริกพืโรธเชิงการค้าในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน) มาอบจนแห้งทำการสกัดด้วยอะซิโตน และทำการระเหยอะซิโตนออกจนหมดจะได้สารสกัดพริกมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีแดงเข้มที่มี capsaicinoids ประมาณ 30% w/w ซึ่งนำไปใช้ในการทำ formulation เพื่อศึกษาความคงตัว

สำหรับการเตรียม 90% capsaicinoids นั้นสามารถทำได้โดยการตกผลึกด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 1.9% ต่อน้ำหนักพริกแห้ง (ภาพ 7) ทั้งนี้ทำการยืนยันโครงสร้างของ 90% capsaicinoids ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณของ aromatic proton ในช่วง 6.60-7.90 ppm ส่วนที่เป็น long chain hydrocarbon พบสัญญาณในช่วง 1.00-2.30 ppm และที่สำคัญคือสัญญาณของ amide proton ที่ 5.91 ppm ซึ่งมีลักษณะที่ broad และสัญญาณของ methoxy proton ที่ 3.84 ppm ทั้งนี้ยืนยันผลการวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค mass spectrometry พบ ESI-MS: m/z $[\text{M-H}]^-$ ของ capsaicin และ dihydrocapsaicin เท่ากับ 304.1918 และ 306.2075 ตามลำดับ



ภาพ 7 การสกัดและการทำ capsaicinoids ให้บริสุทธิ์จากพริกพืโรธ

3.2 การเตรียม capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลง

เพื่อลดความเผ็ดของสารกลุ่ม capsaicinoids ในการศึกษานี้จะใช้ capsaicin เป็นสารที่ใช้ในการศึกษาเบื้องต้น ทั้งนี้แนวทางการปรับความเผ็ดให้ลดลงแบ่งเป็น 3 แนวทางคือ 1) การปรับเปลี่ยนกลุ่ม hydroxyl ที่วง aromatic 2) การปรับเปลี่ยนกลุ่ม methoxy ที่วง aromatic และ 3) การปรับเปลี่ยนส่วนที่เป็น long chain hydrocarbon

3.2.1 การปรับปรุง capsaicin ด้วยสารกลุ่ม acetate carbamate phosphate proline และ glucose ที่ hydroxyl group ของวง aromatic (รายละเอียดวิธีการสังเคราะห์แสดงในภาคผนวก 1.1 และ ข้อมูล spectroscopic data ในภาคผนวก 1.2)

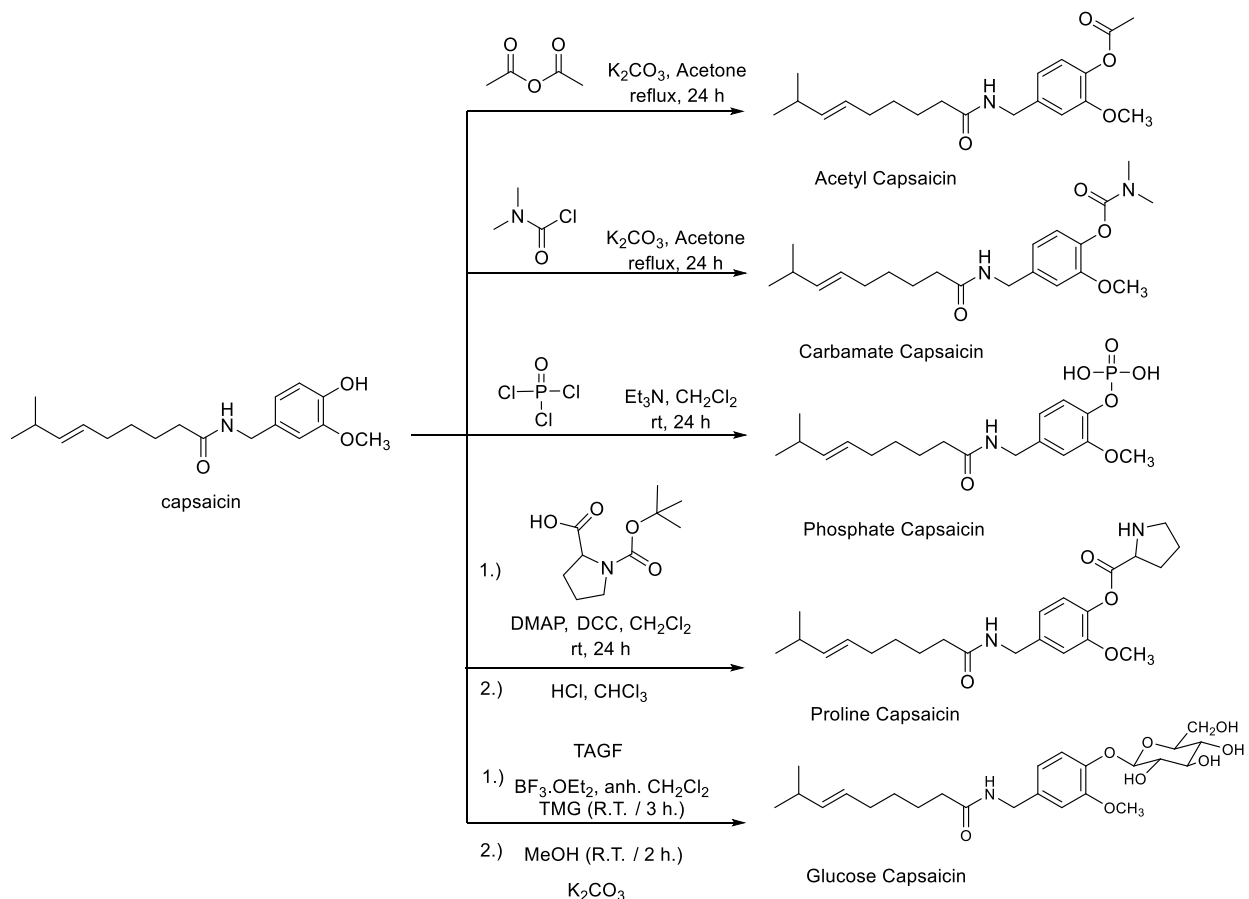
สำหรับแนวคิดในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ hydroxyl group ที่วง aromatic และน่าที่จะส่งผลให้ความเผ็ดลดลง มาจากข้อมูลการศึกษาของรายงานที่ผ่านมาโดย Higashigushi และคณะ ซึ่งได้ทำการแยก capsaicin glucopyranoside จากพริก *Capsicum C. annuum*, *C. frutescens*, และ *C. chinense* ซึ่งพบในปริมาณที่น้อยและไม่มีสมบัติทางชีวภาพที่น่าสนใจ แต่ไม่มีสมบัติที่เผ็ดร้อน¹ จึงทำให้เกิดแนวคิดในการปรับโครงสร้างที่ hydroxyl group ขึ้น โดยมีแนวคิดหลักคือสามารถทำได้ง่ายและร้อยละของผลผลิตสูง และเมื่อนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์สามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างมาเป็น capsaicin ได้หลังการใช้งาน เช่น หลังการทา การกิน หรือ การฉีด เพื่อให้มีสมบัติทางชีวภาพที่ต้องการ

ดังนั้นการเปลี่ยน hydroxyl group ที่วง aromatic ด้วยสารกลุ่ม acetate กลุ่ม carbamate กลุ่ม phosphate และ กลุ่ม proline ได้ถูกเลือกในเบื้องต้นเพราะสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น capsaicin ได้เมื่อเข้าไปในร่างกายเพราะมี enzyme ที่เหมาะสมในร่างกายที่จะทำการ hydrolysis กลุ่มสารดังกล่าว

ทั้งนี้ในการสังเคราะห์แบ่งเป็น การสังเคราะห์ glucose capsaicin ที่พบในธรรมชาติด้วยปฏิกิริยา glycosylation ระหว่าง capsaicin กับ glucose² และ การสังเคราะห์ acetyl capsaicin carbamate capsaicin phosphate capsaicin และ proline capsaicin ด้วยปฏิกิริยา esterification ระหว่าง capsaicin และ acetic anhydride dimethylcarbamoyl chloride phosphoryl chloride และ Boc-L-proline เพื่อสังเคราะห์ acetyl capsaicin carbamate capsaicin phosphate capsaicin และ proline capsaicin ตามลำดับ

ทั้งนี้การยืนยันโครงสร้างนั้นใช้ MS เป็นข้อมูลหลักสำหรับการยืนยันในเบื้องต้นของ acetyl capsaicin carbamate capsaicin phosphate capsaicin และ proline capsaicin โดยพบว่า 1) acetyl capsaicin มีค่า ESI-MS: m/z 348 [M+H]⁺, 370 [M+Na]⁺, 386 [M+K]⁺ 2) carbamate capsaicin มีค่า ESI-MS: m/z 377 [M+H]⁺, 399 [M+Na]⁺, 415 [M+K]⁺ 3) phosphate capsaicin มีค่า ESI-MS: m/z 384 [M-H]⁻ และ 4) proline capsaicin ESI-MS: m/z 525 [M+H]⁺, 541 [M+Na]⁺

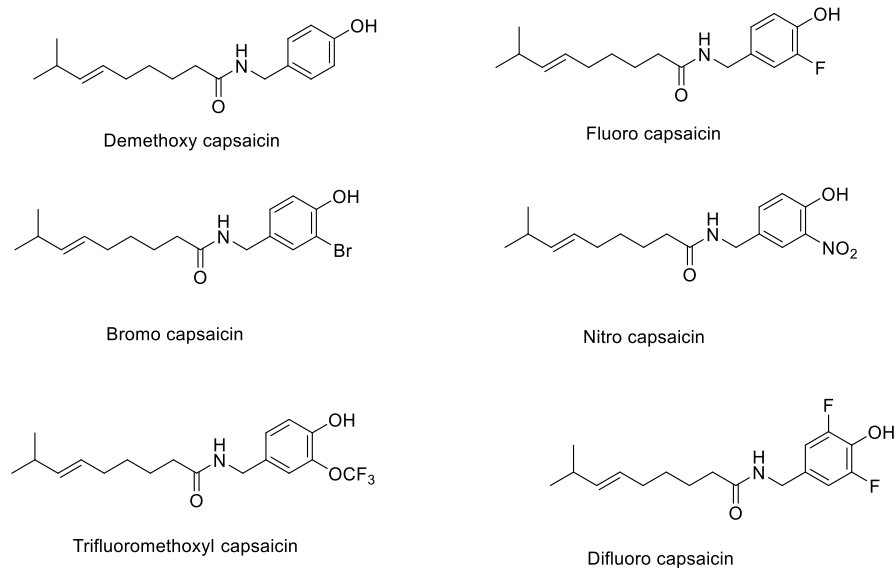
สำหรับ glucose capsaicin นั้นใช้ข้อมูล ¹H NMR และ MS ในการยืนยันโครงสร้าง พบว่า NMR ของ glucose capsaicin จะพบสัญญาณหลักของ glucose ที่ 4.86 ppm (d, 1H anomeric proton) ที่บ่งชี้ว่ามี glucose ต่อกับ capsaicin และ มีค่า ESI-MS m/z 490.2411 [M+H]⁺



ภาพ 8 ปฏิกริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ capsaicin ด้วยสารในกลุ่ม acetate, carbamate, phosphate proline และ glucose ที่ hydroxyl group ของวง aromatic

3.2.2 การปรับปรุง capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลงด้วยการแทนที่กลุ่ม methoxy ของวง aromatic (รายละเอียดวิธีการสังเคราะห์แสดงในภาคผนวก 1.1 และ ข้อมูล spectroscopic data ในภาคผนวก 1.2)

สำหรับแนวคิดในการปรับปรุงโครงสร้างของ capsaicin ด้วยแนวทางนี้มาจากการวิเคราะห์ของการเข้าจับของ capsaicin กับ TRPV1 จากงานวิจัยที่ผ่านมาของ Zeng และคณะในปี 2015³ พบว่ากลุ่ม methoxy ของวง aromatic ไม่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องของการเกิดอันตรกิริยากับ TRPV1 ทำให้การปรับโครงสร้างที่ตำแหน่งนี้ ไม่น่าที่จะส่งผลต่อสมบัติทางชีวภาพของ capsaicin มาก ทั้งนี้กลุ่มแทนที่ที่เหมาะสมในการศึกษานี้คือ กลุ่ม electron withdrawing (ภาพ 9) เพราะมีความสามารถในการ manipulation การเกิด stacking interaction ระหว่างวง aromatic กับ TRPV1 ได้ดี และน่าที่จะทำให้สมบัติทางชีวภาพดีขึ้น และจากผลการทดลองในเบื้องต้น พบว่า การเติม nitro group แทนที่ methoxy group ส่งผลต่อความระคายเคืองกับผิวหนังลดลง

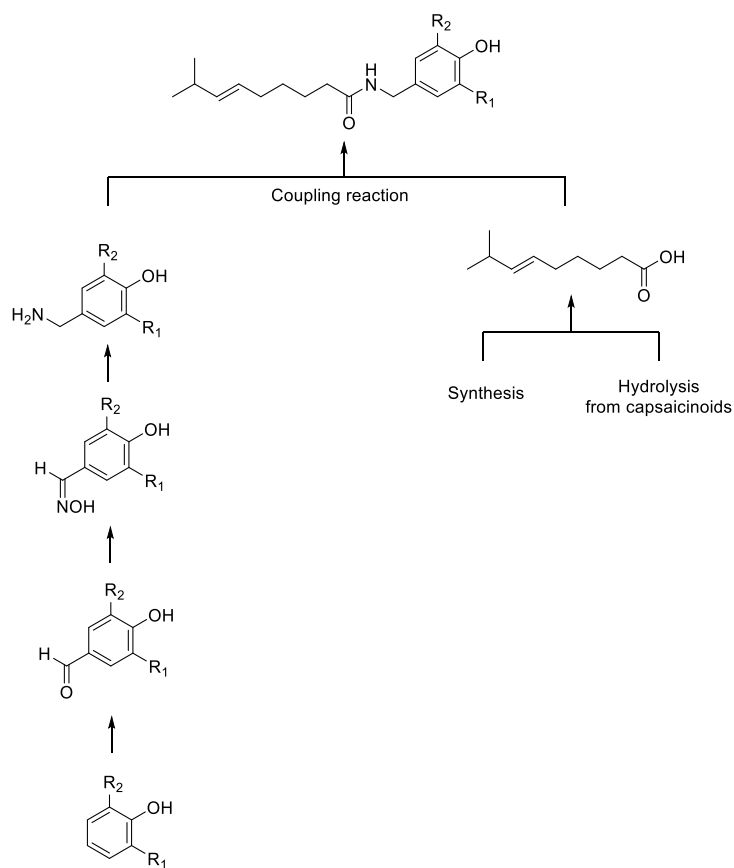


ภาพ 9 แนวทางการปรับปรุง capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลงด้วยการแทนที่กลุ่ม methoxy ของวง aromatic ด้วย กลุ่ม electron withdrawing group

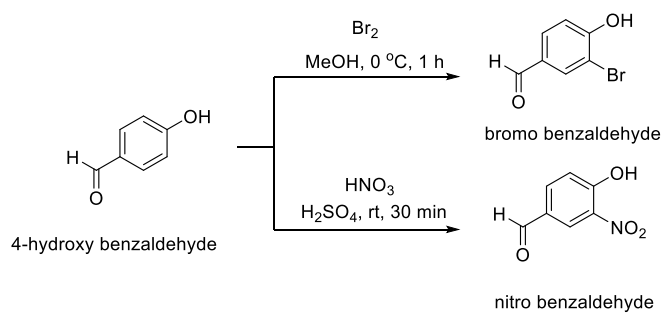
ทั้งนี้แนวทางการสังเคราะห์ของ demethoxy capsaicin fluoro-, bromo-, nitro-, trifluoromethoxyl- และ difluoro capsaicin สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนหลักคือ 1) การเตรียมส่วนวง aromatic amine 2) การเตรียม long chain fatty acid และ 3) การ coupling ระหว่าง aromatic amine และ long chain fatty acid ด้วย peptide coupling reagent (**ภาพ 10**)

ในการเตรียม aromatic amine นั้นเริ่มจากการเปลี่ยนกลุ่ม aldehyde ให้ไปเป็น oxime และทำการ reduction ให้เป็น amine (**ภาพ 10**) สำหรับ demethoxy capsaicin นั้นใช้ 4-hydroxy benzaldehyde เป็นสารเริ่มต้น ส่วน bromo- และ nitro capsaicin นั้นใช้ 4-hydroxy benzaldehyde มาทำปฏิกิริยา bromination และ nitration เพื่อเตรียมอนุพันธ์ของ bromo และ nitro benzaldehyde (**ภาพ 11**) และสำหรับ fluoro-, difluoro-, และ trifluoromethoxyl capsaicin นั้น ในการเตรียม aldehyde ต้องเริ่มจากสารในกลุ่ม phenol มาทำปฏิกิริยากับ hexamethylenetriamine เพื่อให้ได้ อนุพันธ์ของ fluoro-, difluoro- และ trifluoromethoxyl benzaldehyde (**ภาพ 12**)

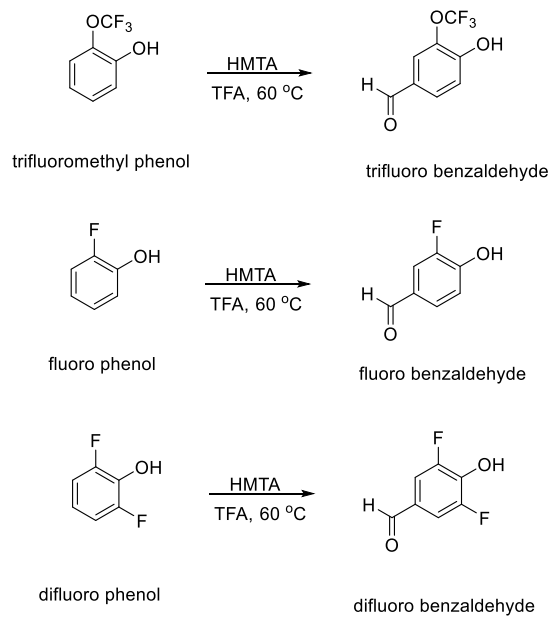
ขั้นตอนต่อมาคือการเตรียมอนุพันธ์ของ aromatic amine สำหรับอนุพันธ์ fluoro-, difluoro- และ trifluoromethoxyl benzaldehyde ทำการ reduction ด้วยวิธีของ Ganett⁴ ด้วย palladium/carbon ภายใต้สภาวะแก๊สไฮโดรเจนและกรดเพื่อหลีกเลี่ยงการ hydrogenation บนวง aromatic และได้อนุพันธ์ fluoro-, difluoro- และ trifluoromethoxyl benzyl amine ทั้งนี้ร้อยละของผลผลิตอยู่ในระดับปานกลางถึงดีคืออยู่ในช่วง 35-76% สำหรับ 4-hydroxy benzaldehyde และอนุพันธ์ bromo benzaldehyde นั้นทำปฏิกิริยา reduction โดยใช้ Zn และ ammonium chloride ได้อนุพันธ์ของ demethoxy benzyl amine และ bromo benzyl amine โดยร้อยละของผลผลิตอยู่ในระดับปานกลางอยู่ในช่วง 28-35% และสำหรับอนุพันธ์ nitro benzaldehyde นำมาทำปฏิกิริยา reduction โดยใช้ ammonium formate ได้อนุพันธ์ของ nitro benzyl amine โดยร้อยละของผลผลิตอยู่ที่ 31% (**ภาพ 13**)



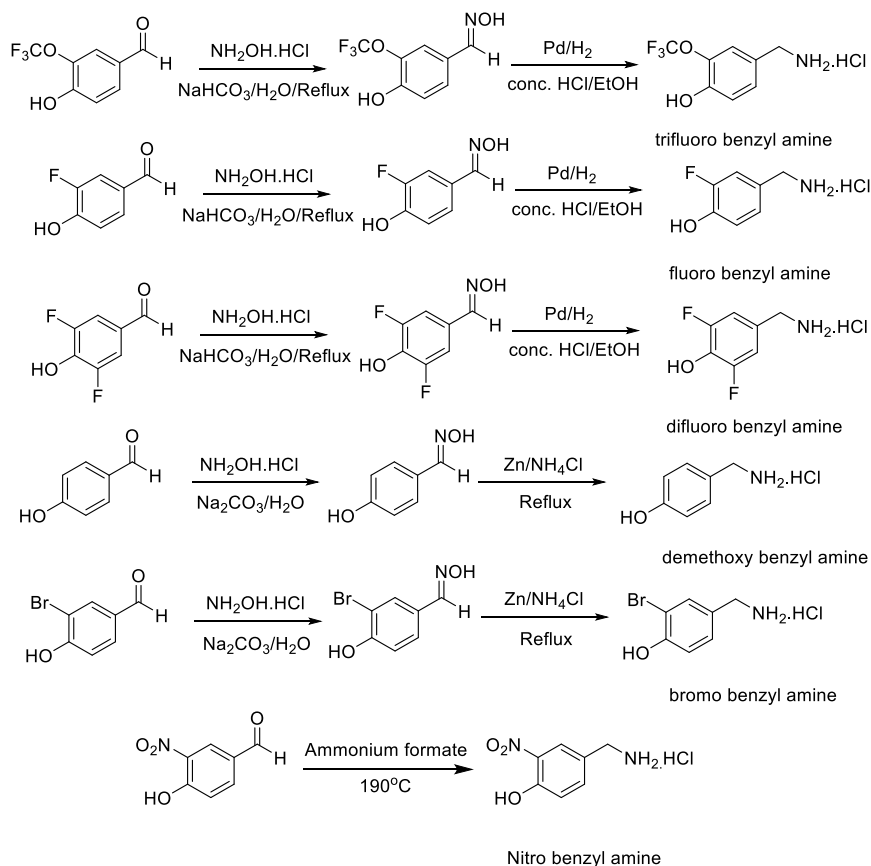
ภาพ 10 ภาพรวมการสังเคราะห์ capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลงด้วยการแทนที่กลุ่ม methoxy ของ aromatic moiety



ภาพ 11 การสังเคราะห์ benzaldehyde derivatives



ภาพ 12 การสังเคราะห์ fluoro benzaldehyde derivatives โดยใช้ปฏิกิริยาของ Duff Reaction⁵

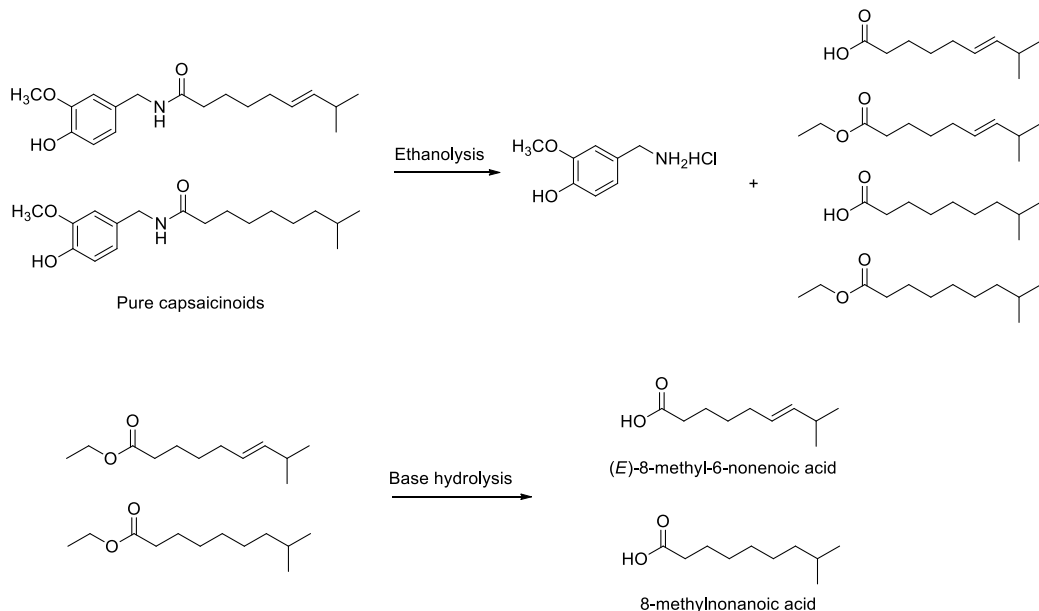


ภาพ 13 การสังเคราะห์ benzyl amine derivatives

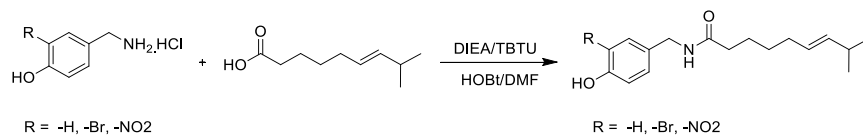
ขั้นตอนสุดท้ายคือการเชื่อมต่อ benzyl amine derivatives กับ long chain fatty acid ที่ได้จากทำ acid hydrolysis ของ capsaicinoids เพื่อให้ได้ long chain fatty acid ที่สะอาดและส่งผลให้ร้อยละของผลผลิตในปฏิกิริยา coupling reaction สูงและง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้าย ทั้งนี้ยืนยันโครงสร้างของ long chain fatty acid ที่จะใช้ในขั้นตอนการ coupling คือ 8-methyl-6-nonenoic acid ด้วย ^1H NMR จะพบ

สัญญาณที่ 2.35 (t, 2H, CH₂, $J=7.5\text{Hz}$), 2.23 (dq, H, CH, $J=13.2\text{Hz}$, $J=6.7\text{Hz}$), 2.00 (q, 2H, CH₂, $J=6.9\text{Hz}$) เป็นการยืนยันของ double bond coupling pattern ในโครงสร้าง (ภาพ 14)

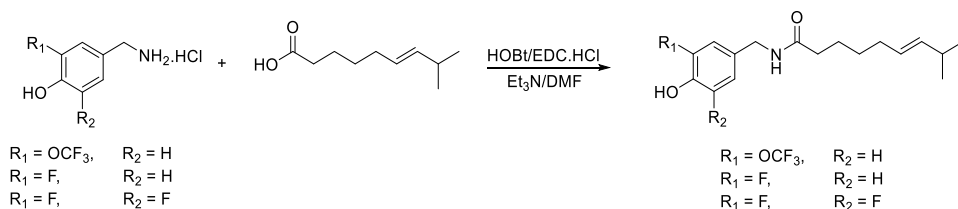
หลังจากนั้นทำ coupling reaction ระหว่าง benzyl amine derivatives กับ long chain fatty acid โดยใช้ standard peptide coupling agent เช่น HOBt/TBTU หรือ HOBt/EDC ขึ้นกับชนิดของกลุ่มแทนที่บนวง aromatic (ภาพ 15-16) ทั้งนี้การแยกสารให้บริสุทธิ์ใช้ HPLC ในการแยกและยืนยันโครงสร้างสุดท้ายด้วย ¹H NMR เพื่อระบุการเชื่อมต่อของโครงสร้างระหว่าง aromatic amine และ long chain fatty acid ซึ่งจะเกิดเป็น amide bond โดยดูการเกิดขึ้นของ NH ของ amide bond (1H) ที่สัญญาณประมาณ 5.74-6.11 ppm รวมทั้งใช้ HRMS ร่วมยืนยันโครงสร้างของ capsaicin derivatives ที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่า 1) demethoxy capsaicin มีค่า Calcd. For C₁₇H₂₅NO₂: m/z 276.20, found m/z 276.1958 (M+H)⁺ 2) bromo capsaicin Calcd. For C₁₇H₂₄BrNO₂: m/z 354.11, found m/z 354.1063 (M+H)⁺. 3) nitro capsaicin Calcd. For C₁₇H₂₄N₂O₄: m/z 320.17, found m/z 321.1809 (M+H)⁺. 4) trifluoromethoxyl capsaicin Calcd. For C₁₈H₂₄F₃NO₃: m/z 359.17, found 360.1832 m/z (M+H)⁺. 5) fluoro capsaicin Calcd. For C₁₇H₂₄FNO₂Na: m/z 316.17, found m/z 316.1683 (M+Na)⁺. และ 6) difluoro capsaicin Calcd. For C₁₇H₂₃F₃NO₂: m/z 330.1675, found m/z 330.1641 (M+H)⁺.



ภาพ 14 การสังเคราะห์ MCFA จากปฏิกิริยา hydrolysis ของสารสกัดจากพริก



ภาพ 15 การสังเคราะห์ demethoxy capsaicin bromo capsaicin และ nitro capsaicin โดยปฏิกิริยา coupling reaction ด้วย HOBt/TBTU เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



ภาพ 16 การสังเคราะห์ fluoro capsaicin difluoro capsaicin และ trifluoromethoxyl capsaicin โดยปฏิกิริยา coupling reaction ด้วย HOBt/EDC เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

3.2.3 การปรับปรุง capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลงผ่านการปรับปรุงในส่วน fatty acid residue และ aromatic moiety (รายละเอียดวิธีการสังเคราะห์แสดงในภาคผนวก 1.1 และ ข้อมูล spectroscopic data ในภาคผนวก 1.2)

สำหรับการออกแบบในการปรับปรุงโครงสร้างนี้ใช้แนวทางของผลการทดลองในเบื้องต้นที่พบว่า nitro capsaicin ไม่มีการระคายเคืองจากการแสบและเผ็ดร้อน ร่วมกับการปรับความยาวของสายโซ่ของ long chain hydrocarbon และเพิ่มกลุ่มที่สามารถเกิด stacking interaction ที่ปลายสายโซ่ เพื่อให้สามารถเพิ่มการเกิดอันตรกิริยากับ TRPV1 ได้ดี³ และน่าจะจะทำให้มีสมบัติทางชีวภาพที่ดีในขณะที่ความเผ็ดลดลง ทั้งนี้โครงสร้างที่ได้ออกแบบไว้มีทั้งหมด 9 โครงสร้าง และสามารถทำการสังเคราะห์ได้โดยปฏิกิริยาระหว่าง vanillyl amine derivatives กับ MCFA derivatives ด้วย standard peptide coupling agent ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ต่างๆ (ภาพ 17-18)

ผลการสังเคราะห์ indole capsaicin analogues (IC5, IC6 และ IC7)

สำหรับการสังเคราะห์ indole capsaicin analogues (IC5, IC6 และ IC7) ได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 45%, 41%, และ 78% ตามลำดับ สารผลิตภัณฑ์ที่ได้ยืนยันด้วยเทคนิค ^1H NMR (แสดงในภาคผนวก 1.2) โดย ^1H NMR ของ indole capsaicin แสดงความสัมพันธ์ระหว่างวงอะโรมาติกของส่วน vanillylamine กับ indole โดยที่ ^1H NMR แสดงสัญญาณที่ 6.68, 6.72, 6.80 ppm เป็น proton บนวงอะโรมาติก (3H) ที่ 4.22 ppm ของ methylene ที่เชื่อมอยู่ระหว่างวงเบนซีนกับพันธะเอไมด์ (2H) และ ที่ 3.73 ppm ของ methoxy (3H) โดยส่วนสัญญาณโปรตอนของ indole derivatives ปรากฏสัญญาณที่ 7.00-7.52 และ 6.40 ppm ของวงอินโดล (6H) และ สัญญาณของ long chain hydrocarbon ที่ 1.23-1.37 และ 4.2 ppm ของ IC5 (8H) , IC6 (10H) และ IC7 (12H) ตามลำดับ และทำการยืนยันโครงสร้างด้วย HRMS โดยพบว่า indole capsaicin analogues (IC5, IC6 และ IC7) มีค่าดังนี้คือ calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$: m/z 375.1678, found m/z 375.1679 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$: m/z 389.1844, found m/z 389.1836 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. และ calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$: m/z 403.1999, found m/z 403.1992, $[\text{M}+\text{Na}]^+$. ตามลำดับ

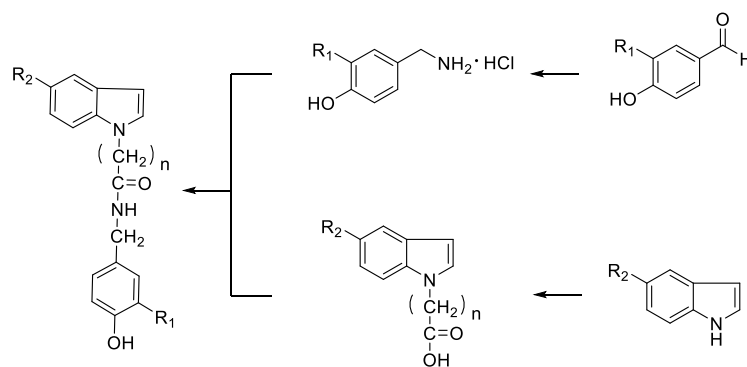
ผลการสังเคราะห์ nitroindole capsaicin analogues (NIC5, NIC6 และ NIC7)

สำหรับการสังเคราะห์ nitroindole capsaicin analogues (NIC5, NIC6 และ NIC7) ได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 73%, 72%, และ 65% ตามลำดับ สารผลิตภัณฑ์ที่ได้ยืนยันด้วยเทคนิค ^1H NMR (แสดงในภาคผนวก 1.2) โดย ^1H NMR ของ nitroindole capsaicin แสดงสัญญาณที่ 6.60-6.80 ppm เป็น proton บนวงอะโรมาติก (3H) ที่ 4.23 ppm ของ methylene ที่เชื่อมอยู่ระหว่างวงเบนซีนกับพันธะเอไมด์ (2H) และ ที่ 3.73 ppm ของ methoxy (3H) โดยส่วนสัญญาณโปรตอนของ nitroindole derivatives ปรากฏสัญญาณที่ 7.40-8.53 และ 6.64 ppm ของวงไนโตรอินโดล (5H) และ สัญญาณของ long chain hydrocarbon ที่ 1.21-2.17 และ 4.23 ppm ของ IC5 (8H) , IC6 (10H) และ IC7 (12H) ตามลำดับ และทำการยืนยันโครงสร้างด้วย HRMS โดยพบว่า nitroindole

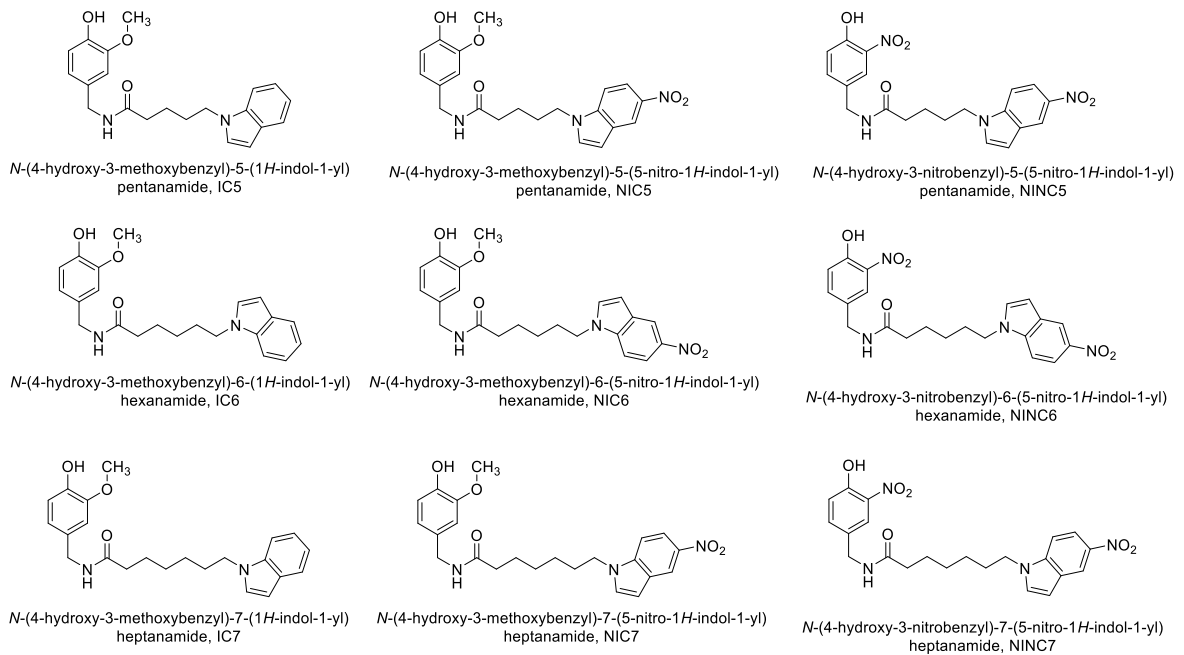
capsaicin analogues (NIC5, NIC6 และ NIC7) มีค่าดังนี้คือ calcd for $C_{21}H_{23}N_3O_5Na$: m/z 420.1539, found m/z 420.1530, $[M+Na]^+$. calcd for $C_{22}H_{25}N_3O_5Na$: m/z 434.1683, found m/z 434.1686, $[M+Na]^+$. calcd for $C_{23}H_{27}N_3NaO_5$: m/z 448.1849, found m/z 448.1843, $[M+Na]^+$. ตามลำดับ

ผลการสังเคราะห์ nitroindole nitrocapsaicin analogues (NINC5, NINC6 และ NINC7)

สำหรับการสังเคราะห์ nitroindole nitrocapsaicin analogues (NINC5, NINC6 และ NINC7) ได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 35%, 35%, และ 30% ตามลำดับ สารผลิตภัณฑ์ที่ได้ยืนยันด้วยเทคนิค 1H NMR (แสดงในภาคผนวก 1.2) โดย 1H NMR ของ nitroindole nitrocapsaicin แสดงสัญญาณที่ 7.99, 7.60 และ 7.10 ppm เป็น proton บนวงอะโรมาติก (3H) ที่ 4.37 ppm ของ methylene ที่เชื่อมอยู่ระหว่างวงเบนซีนกับพันธะเอไมด์ (2H) และที่ 3.73 ppm ของ methoxy (3H) โดยส่วนสัญญาณโปรตอนของ nitroindole derivatives ปรากฏสัญญาณที่ 6.75, 7.56, 7.63, 8.04 และ 8.56 ppm ของวงไนโตรอินโดล (5H)) และ สัญญาณของ long chain hydrocarbon ที่ 1.29-2.21 และ 4.31 ppm ของ IC5 (8H) , IC6 (10H) และ IC7 (12H) ตามลำดับ และทำการยืนยันโครงสร้างด้วย HRMS โดยพบว่า nitroindole nitrocapsaicin analogues (NINC5, NINC6 และ NINC7) มีค่าดังนี้คือ calcd for $C_{20}H_{20}N_4O_6Na$: m/z 435.1277, found m/z 435.1275, $[M+Na]^+$ calcd for $C_{21}H_{22}N_4O_6Na$: m/z 449.1435, found m/z 449.1432, $[M+Na]^+$ calcd for $C_{22}H_{24}N_4O_6Na$: m/z 463.1585, found m/z 463.1588, $[M+Na]^+$. ตามลำดับ



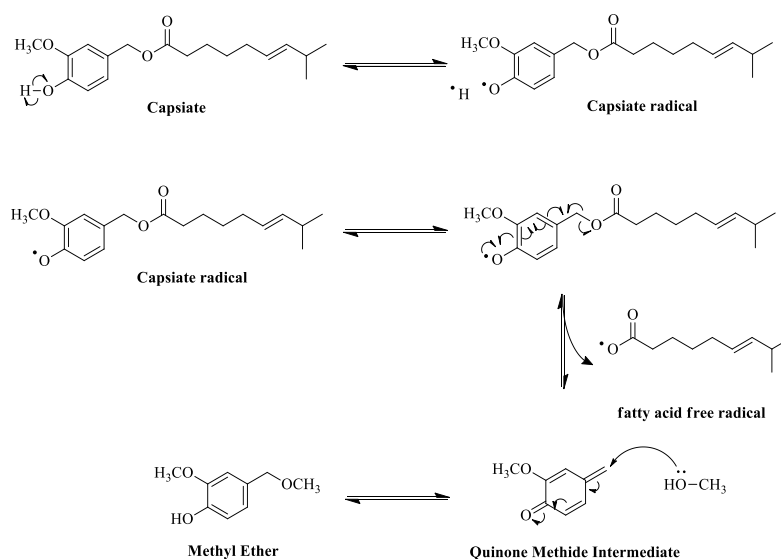
ภาพ 17 การสังเคราะห์ capsaicin derivatives ปรับปรุงในส่วน fatty acid residue และ aromatic moiety



ภาพ 18 โครงสร้าง capsaicin derivatives ปรับปรุงในส่วน fatty acid residue และวง aromatic

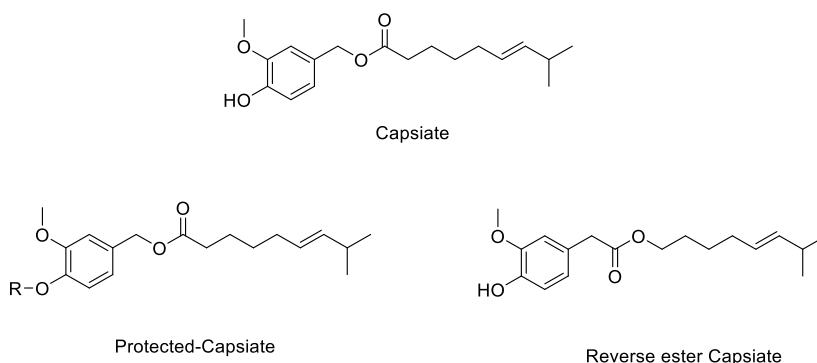
3.3 การพัฒนา capsinoids โดยปรับปรุงให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้น

จากข้อมูลประโยชน์ของสารในกลุ่ม capsinoids ที่เพิ่มการเผาผลาญพลังงาน และใช้เป็นสารเสริมอาหารสำหรับการควบคุมน้ำหนัก และมีการทำเป็น commercial product แต่ความคงตัวของสาร capsinoids ในผลิตภัณฑ์ยังทำ formulation ในรูปของน้ำมันเพื่อลดการสลายตัวของ capsinoids ทั้งนี้ความไม่คงตัวของ capsinoids เกิดขึ้นตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บเกี่ยว การสกัดด้วย non-polar solvent เพราะจากการศึกษาในเบื้องต้นของกลุ่มวิจัยพบว่า capsiate ซึ่งเป็นสารหลักในกลุ่ม capsinoids นั้นจะสลายตัวไปอย่างน้อย 50% ในเวลา 30 นาที และจะสลายตัวอย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะที่เป็นกรดและด่าง ทั้งนี้ผ่านกลไก quinone methide degradation (ภาพ 19)



ภาพ 19 กลไกการสลายตัวของ capsiate ผ่าน quinone methide degradation

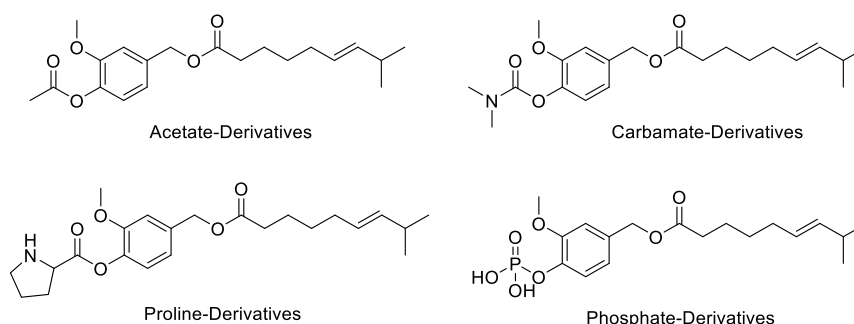
จากกลไก พบว่ากลุ่มที่มีผลต่อการสลายตัวมากที่สุดคือ hydroxyl group ที่เกิด radical เมื่อโดนแสงหรือความร้อนจะสลายตัวเป็น quinone methide และทำปฏิกิริยากับ protic solvent เช่น น้ำ และ alcohol ได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นสารในกลุ่ม capsinoids จึงไม่เสถียรถ้าหากละลายใน polar protic solvent ตามรายงานที่ผ่านมา⁶ ในการศึกษา¹¹ เสนอแนวทางแก้ไขและสามารถเพิ่มความคงตัว 2 แบบคือ 1) ทำการ deactivation กลุ่ม hydroxyl โดยการทำให้ protection ด้วย protecting groups ที่เหมาะสม และ 2) ปรับโครงสร้างและสลับตำแหน่งของ ester bond เพื่อป้องกันการเกิด quinone methide degradation (ภาพ 20)



ภาพ 20 แนวทางการเพิ่มความคงตัวของสารในกลุ่ม capsinoids 2 แบบคือ 1) ทำการ deactivation กลุ่ม hydroxyl และ 2) ปรับโครงสร้างและสลับตำแหน่งของ ester bond

3.3.1 การปรับปรุงให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้นด้วย carbamate / phosphate / proline / acetate ที่ hydroxyl group ของวง aromatic (รายละเอียดวิธีการสังเคราะห์แสดงในภาคผนวก 1.1 และ ข้อมูล spectroscopic data ในภาคผนวก 1.2)

ในแนวทางแรก การทำ protection กลุ่ม hydroxyl ของ capsiate (เลือก capsiate เป็นตัวแทนของสารในกลุ่ม capsinoids เพราะมีปริมาณที่มากที่สุดในธรรมชาติ) ด้วยกลุ่มแทนที่ที่เหมาะสมนั้น ได้ทำการเลือกใช้กลุ่มสาร carbamate / phosphate / proline / acetate ในการปรับโครงสร้างเช่นเดียวกันกับการลดความเผ็ดของ capsaicin เพราะสามารถเปลี่ยนมาเป็น capsiate ได้เมื่อเข้าไปในร่างกาย (ภาพ 21)

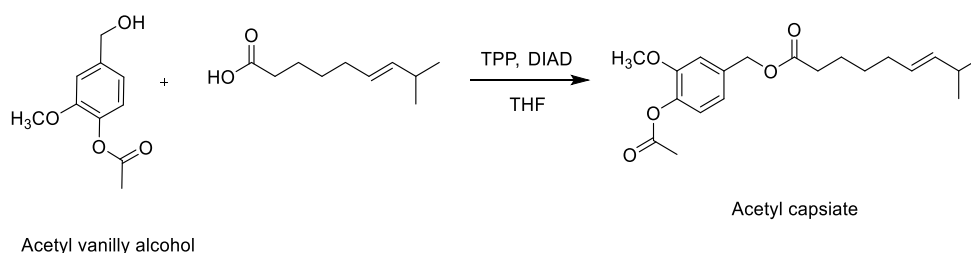


ภาพ 21 โครงสร้างทางเคมีของการพัฒนา capsinoids โดยการปรับปรุงให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้นด้วย carbamate / phosphate / proline / acetate ที่ hydroxyl group ของ aromatic

ทั้งนี้ในการสังเคราะห์ acetyl capsiate นั้นจะใช้ acetyl vanillyl alcohol ทำปฏิกิริยากับ 8-methyl-6-nonenoic acid โดยใช้ Mitsunobu reaction ทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography (30:70 EtOAc : Hexane) และ HPLC ได้ผลิตภัณฑ์เป็น acetyl capsiate ได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 67% ทั้งนี้ยืนยันโครงสร้าง

ด้วย ^1H NMR ภายใต้อcid free CDCl_3 พบสัญญาณหลักที่ 5.03 (2H) ของ methylene ที่อยู่ระหว่างวง aromatic และ long chain fatty acid และยืนยันโครงสร้างด้วย HRMS โดยพบ Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_4$: m/z 306.1831, found m/z 329.1736 ($\text{M}+\text{Na}^+$)

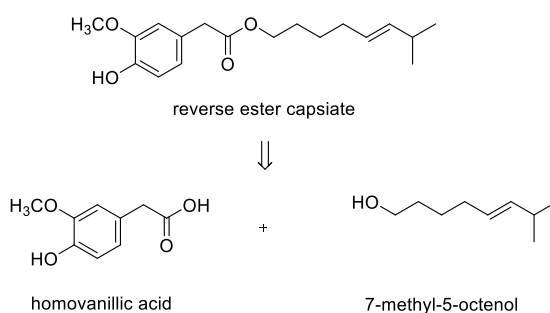
ส่วน carbamate- phosphate- และ proline capsate นั้นไม่สามารถสังเคราะห์ได้ตามที่วางแผนไว้ เนื่องจากไม่สามารถทำการ coupling ส่วนที่เป็น alcohol กับ long chain fatty acid ได้ อาจเนื่องมาจากกลุ่ม protecting groups ที่มีขนาดใหญ่ หรือ coupling reagent อาจไม่เหมาะสม ซึ่งอาจต้องทำการปรับสภาวะในการ coupling ใหม่เพิ่มเติมในอนาคต (ภาพ 22)



ภาพ 22 การสังเคราะห์ acetyl capsate

3.3.2 การปรับปรุงให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้นในส่วนของ fatty acid residue

ในการปรับโครงสร้างแนวทางที่ 2 คือการสังเคราะห์ reverse ester capsate เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการสลายตัวของสารผ่าน quinone methide โดยทำการสังเคราะห์จาก homovanillic acid ทำปฏิกิริยากับ 7-methyl-5-octenol โดยใช้ peptide coupling reagent ในการเชื่อมต่อ homovanillic acid กับ alcohol และทำการตกผลึกจาก hexane ได้ reverse ester capsate ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 60% หลังทำการแยกด้วย HPLC ทั้งนี้ยืนยันโครงสร้างด้วย ^1H NMR พบสัญญาณหลักที่ 5.41-5.24 (2H) ของ methylene proton ที่อยู่ระหว่างวง homovanillic acid และ long chain fatty acid และยืนยันการเกิด ester bond ด้วย FTIR ที่เลขคลื่น 1,735 ($\text{C}=\text{O}$ stretching) และ 1,035 ($\text{C}-\text{O}$ stretching) (ภาพ 23) (รายละเอียดวิธีการสังเคราะห์แสดงในภาคผนวก 1.1 และ ข้อมูล spectroscopic data ในภาคผนวก 1.2)



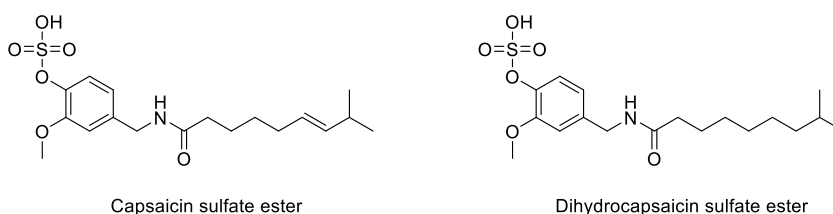
ภาพ 23 การสังเคราะห์ reverse ester capsate

3.4 การเตรียม metabolites ของ capsaicinoids และ capsinoids

metabolite ของสารในกลุ่ม capsaicinoids และ capsinoids นั้น เป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีแนวโน้มในการพัฒนาต่อยอดเป็นสารเสริมอาหารและ drug candidate ได้ในอนาคต ในงานวิจัยนี้ได้ดำเนินการศึกษาเริ่มต้นและพบว่า metabolite ที่มีแนวโน้มที่ดีในการสังเคราะห์และศึกษาต่อยอดแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ 1) metabolite ของสารในกลุ่ม capsaicinoids ที่พืช สัตว์ชั้นสูง หรือ microorganism นำไปใช้หรือทำการลดสมบัติที่เผ็ดร้อนลดลง และ 2) metabolite ที่เกิดจากการสลายตัวของ capsinoids และ เกิดจากการ biodegradation ของ capsaicinoids

3.4.1) การเตรียม metabolite ของ capsaicinoids และ capsinoids ในส่วนของวง vanilliod

สำหรับการสังเคราะห์และศึกษา metabolite ที่พืช สัตว์ชั้นสูง หรือ microorganism นำไปใช้หรือทำการลดสมบัติที่เผ็ดร้อนลดลงของสารในกลุ่ม capsaicinoids นั้น ทางทีมวิจัยพบว่าหนอนบางประเภทหลังจากกินพริกแล้วจะเปลี่ยน capsaicinoids ไปเป็น capsaicinoids sulfate ที่ไม่แสดงการระคายเคืองต่อผิวหนังและสามารถเปลี่ยนโครงสร้างกลับมาเป็น capsaicin ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ซึ่งสมบัติดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำเป็น drug candidate ได้ในอนาคต (ภาพ 24)

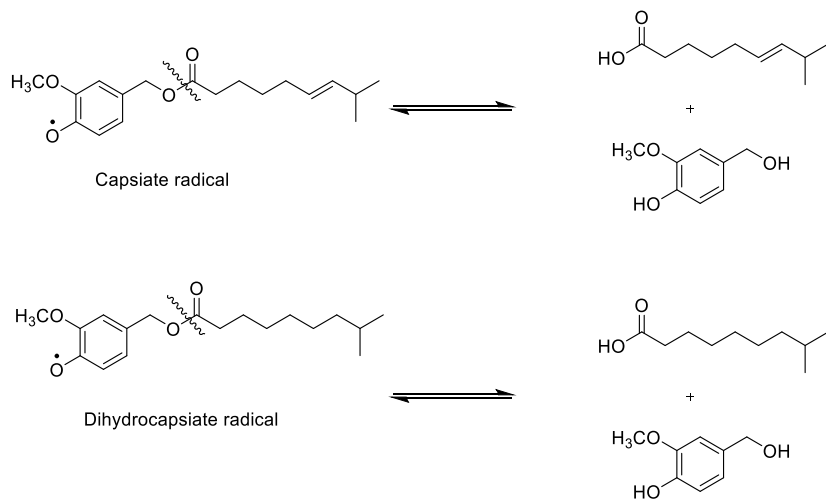


ภาพ 24 โครงสร้างของ capsaicin และ dihydrocapsaicin sulfate ester

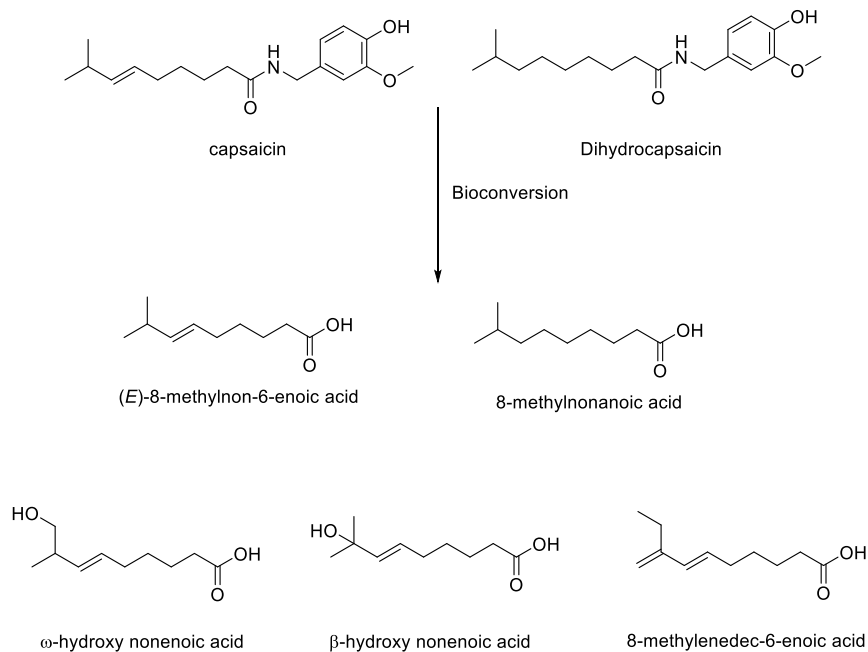
การสังเคราะห์ capsaicin และ dihydrocapsaicin sulfate เตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง capsaicin และ dihydrocapsaicin กับ กรดซัลฟูริกที่อุณหภูมิต่ำและการแยกบริสุทธิ์ด้วย column chromatography ในสภาวะเบสจะได้ผลึกสีขาวของ capsaicin และ dihydrocapsaicin sulfate ester และยืนยันโครงสร้างด้วย ESI-MS พบ capsaicin sulfate ester มีค่า m/z คือ calcd. $[M-H]^-$ ($C_{18}H_{27}NO_6S$) 384.1486, found 384.1502 และ dihydrocapsaicin sulfate ester มีค่า m/z คือ calcd. $[M-H]^-$ ($C_{18}H_{29}NO_6S$) 386.1643 found 386.1738 ตามลำดับ

3.4.2 การเตรียม metabolite ของ capsaicinoids และ capsinoids ในส่วน fatty acid residue โดยใช้ Wittig reaction

สำหรับ metabolite ที่เกิดจากการสลายตัวของ capsinoids และ เกิดจาก biodegradation ของ capsaicinoids นั้น ทางทีมวิจัยให้ความสำคัญกับ metabolite ที่เกิดจากการสลายตัวของ capsinoids จากการถูกความร้อนหรือแสง เพราะจะทำให้ได้เป็นสารในกลุ่ม vanillyl alcohol และ medium chain fatty acid เกิดขึ้น (ภาพ 25) และการเกิด bioconversion ของ capsaicin ด้วย microorganism จะให้ metabolite ในกลุ่มของ medium chain fatty acid เช่นเดียวกัน (ภาพ 26)

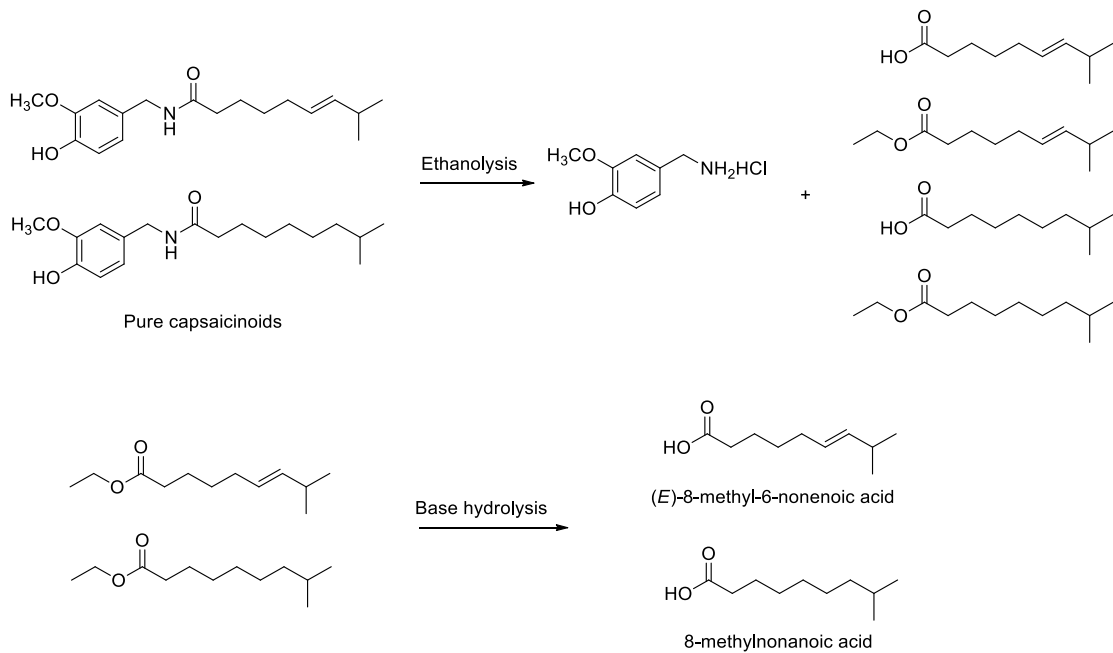


ภาพ 25 การเกิด medium chain fatty acid ที่เกิดจากการสลายตัวของสารในกลุ่ม capsinoids



ภาพ 26 metabolite ในกลุ่มของ medium chain fatty acid ที่เกิดจาก bioconversion ของ capsaicin ด้วย microorganism

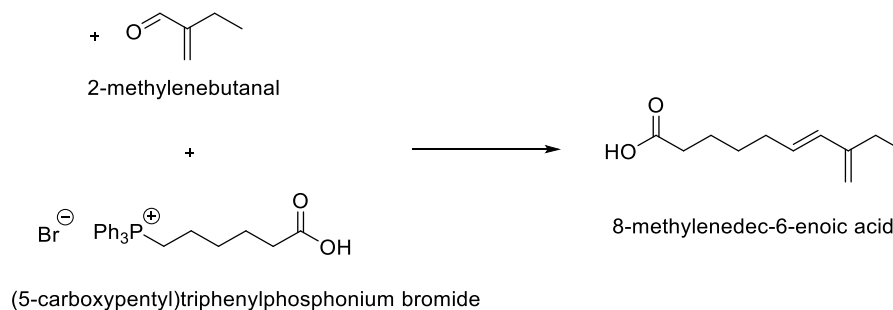
ในการสังเคราะห์ medium chain fatty acid ของ 8-methyl-6-nonenic acid และ 8-methylnonanoic acid สามารถทำการสังเคราะห์ด้วยการทำ transesterification ของ capsaicinoids ด้วย ethanol แล้วตามด้วย base hydrolysis จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวใส ซึ่งสามารถทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography ด้วย 20% ethyl acetate ใน hexane จะได้สารผสมระหว่าง 8-methyl-6-nonenic acid และ 8-methylnonanoic acid และสามารถแยกให้บริสุทธิ์ต่อกับ HPLC และถ้าหากมีสารผสมในปริมาณสูงสามารถทำการแยกแบบ fractional distillation ภายใต้สภาวะลดความดันได้ ทั้งนี้จาก ^1H NMR พบว่าไม่พบสัญญาณในช่วง 6-8 ppm ซึ่งเป็นของวง aromatic ในผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ และพบสัญญาณที่ 5.36 (2H) ของ methylene proton ที่อยู่ติดกับ carboxylic acid (ภาพ 27)



ภาพ 27 การสังเคราะห์ MCFA จากปฏิกิริยา hydrolysis ของสารสกัดจากพริก

การสังเคราะห์ metabolite ในกลุ่มของ medium chain fatty acid ที่เกิดจาก bioconversion ของ capsaicin ด้วย microorganism นั้น ได้วางแนวทางการศึกษาไว้ทั้งหมด 3 ตัวดังแสดง (ภาพ 26) คือ ω -hydroxy nonenoic acid β -hydroxy nonenoic acid และ 8-methylene-6-decenoic acid ทั้งนี้พบว่า ทั้ง ω -hydroxy nonenoic acid และ β -hydroxy nonenoic acid ยังไม่สามารถสังเคราะห์ได้ ทั้งนี้เนื่องจากสารตั้งต้นในการสังเคราะห์มีความเสถียรต่ำและเกิด self-aldol condensation ได้ง่าย

สำหรับในการเตรียม 8-methylene-6-decenoic acid นั้น สามารถเตรียมได้จากการทำปฏิกิริยา Wittig reaction ระหว่าง (5-carboxypentyl)triphenylphosphonium bromide กับ 6-oxohexanoic acid และนำสารตั้งต้นที่สังเคราะห์ได้ไปทำ Wittig reaction กับ 2-methylene-butanal ที่อุณหภูมิ 0 °C ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน และทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography ต่อไป พบว่าสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้นั้นเป็นของผสม *E,Z*-diastereoisomeric ได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 60% และยืนยันโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค mass spectrometry มีค่าเท่ากับ 182.1234



ภาพ 28 การสังเคราะห์ 8-methylenedec-6-enoic acid

3.5 การทดสอบการระคายเคืองกับผิวหนัง

จากการออกแบบการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลง ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 แนวทางในการออกแบบ คือ การเปลี่ยนหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง hydroxyl บนวง aromatic, การเปลี่ยนหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง O-methoxyl บนวง aromatic และการปรับเปลี่ยนในส่วนที่เป็น long chain hydrocarbon นั้น ขั้นตอนการศึกษาต่อมาคือการวิเคราะห์ความเผ็ดของสารอนุพันธ์ capsaicin ที่สังเคราะห์ขึ้น

การประเมินค่าความเผ็ดของพริกโดยวิธีดั้งเดิม เรียกว่า Scoville Heat Units (SHU) วิธีการนี้เดิมจะใช้ผู้ทดสอบชิมที่มีประสบการณ์ในการชิมตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ใช้เตรียมจากการผสมพริกบดกับสารละลายน้ำตาล หลังจากนั้นจึงนำมาเจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นต่ำลงหลายๆความเข้มข้น และนำค่าคงที่ของการเจือจาง (Dilution factor) ที่ได้ของสารละลายพริกมาคำนวณ โดยจะใช้ค่าที่ผู้ทดสอบชิม สามารถรับรสชาติได้โดยที่ไม่รู้สึกเผ็ดมาคำนวณหาค่า SHU โดย 1.5 SHU มีค่าเท่ากับความเผ็ด 1 ppm แต่ในปัจจุบันมีแนวทางในการประเมินความเผ็ดของพริกด้วยเทคนิคที่หลากหลายเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การประเมินความเผ็ดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถนสูง (HPLC) โดยวิธีการเหล่านี้จะตรวจวัดปริมาณ capsaicin โดยการกำหนดหน่วยความเผ็ดของพริกนั้น จะวัดจากปริมาณ capsaicin บริสุทธิ์ที่ 1 ppm จะได้ความเผ็ด 15 - 16 ล้านหน่วย SHU และตามวิธีของ American Spice Trade Association (ASTA) ระบุให้คูณปริมาณ capsaicin ด้วย 15,000,000 SHU แต่สำหรับงานวิจัยนี้ อนุพันธ์ของ capsaicin ที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นไม่สามารถใช้การวิเคราะห์ค่าความเผ็ดแบบ SHU ได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้มีการพัฒนาการทดสอบความเผ็ดผ่านการระคายเคืองในเซลล์ผิวหนัง Normal Human Dermal Fibroblast (NHDF) โดยใช้เทคนิค XTT Assay (sodium 3'-[1-[(phenylamino) carbo-nyl]-3, 4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate เป็นดัชนีชี้วัดความเผ็ด โดยประเมินจากความเป็นพิษต่อเซลล์ Normal Human Dermal Fibroblast (NHDF) (รายละเอียดการทดลองแสดงในภาคผนวก 1.1)

ในการทดสอบความเป็นพิษของอนุพันธ์ของสาร capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ สามารถทดสอบผ่านการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ (viability) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของอนุพันธ์ของสาร capsaicin โดยตรวจสอบจากความเข้มข้นของสารที่ส่งผลต่อเมตาบอลิซึม และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ผ่านเทคนิค XTT Assay (sodium 3'-[1-[(phenylamino) carbo-nyl]-3, 4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate ซึ่งเป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ และมีความสม่ำเสมอในการทดสอบ

อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารอนุพันธ์ของ capsaicin มีความสามารถในการละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ต่ำ ดังนั้นในขั้นตอนการทดสอบด้วยเทคนิคนี้จึงต้องอาศัยตัวช่วยละลาย (solubilizer) ในการทดสอบ ซึ่งทางผู้วิจัยได้เลือกใช้ PEG 400 (polyethylene glycol 400) เป็นตัวช่วยละลายในการทดสอบ เนื่องจาก PEG 400 เป็นตัวช่วยละลายที่มีความเป็นพิษน้อย จึงสามารถใช้ในปริมาณที่มากกว่าตัวช่วยละลายชนิดอื่นสำหรับการช่วยละลายสารอนุพันธ์ของ capsaicin ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยทางผู้วิจัยได้แบ่งแนวทางการศึกษาการทดสอบความเป็นพิษของสารอนุพันธ์ของ capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวช่วยละลาย PEG 400 (solubilizer) ในอาหารเลี้ยงเซลล์
2. การหาความเข้มข้นของ capsaicin ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์
3. การเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของ capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin

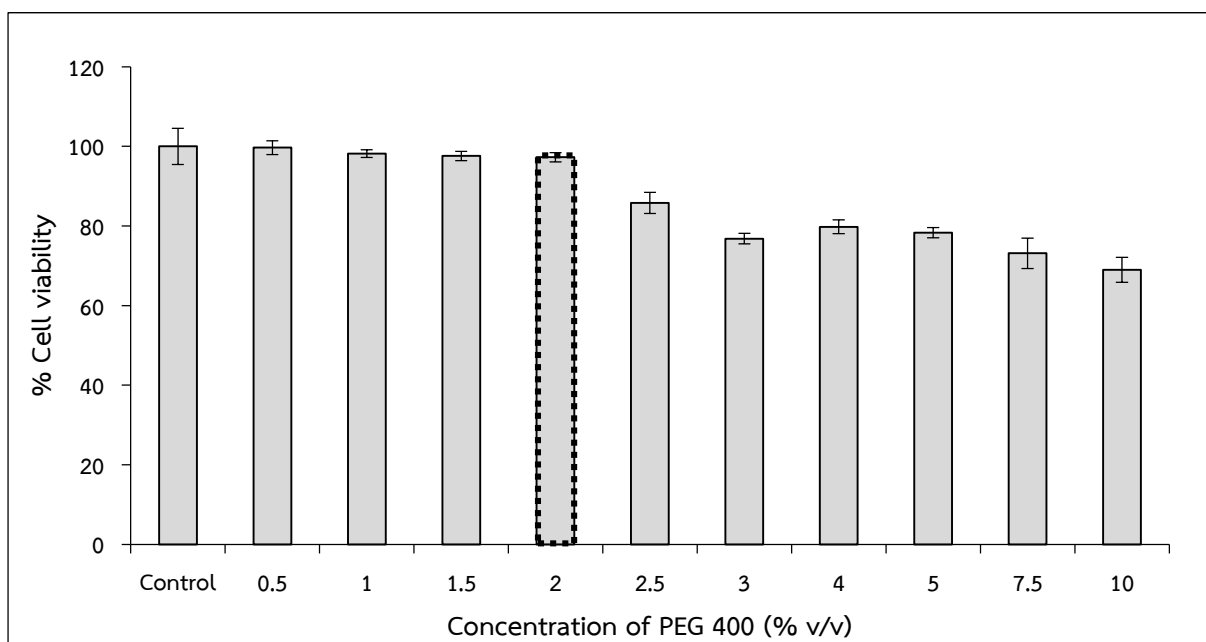
3.5.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวช่วยละลาย PEG 400 ในอาหารเลี้ยงเซลล์

เนื่องจาก PEG 400 ถูกนำมาใช้เป็นตัวช่วยละลายของสารอนุพันธ์ของ capsaicin ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM-low glucose) สำหรับการทดสอบในงานวิจัยนี้ ดังนั้นในขั้นตอนแรกของการทดสอบจึงต้องมีการทดสอบหาความเข้มข้นของ PEG 400 ที่เหมาะสมในการใช้เป็นตัวช่วยละลาย ที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

โฟโบริบลาสต์ ซึ่งจะทำให้การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในขั้นตอนต่อไปไม่มีผลความเป็นพิษที่มาจาก PEG 400 ร่วมด้วย ซึ่งจะทำให้ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร capsaicin และ อนุพันธ์ของ capsaicin มีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ เพราะผลทดสอบที่ได้จะเป็นผลความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มาจากสารอนุพันธ์ของ capsaicin เท่านั้น ทั้งนี้ผลการทดสอบความเป็นพิษของตัวช่วยละลาย PEG 400 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อเซลล์โฟโบริบลาสต์ แสดงดังตาราง 7

ตาราง 7 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ PEG 400 ต่อเซลล์โฟโบริบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 0.5–10 %v/v

TIME	Control	Concentration of PEG 400 (%v/v)									
		10	7.5	5	4	3	2.5	2	1.5	1	0.5
1	0.724	0.498	0.524	0.553	0.564	0.559	0.623	0.694	0.699	0.678	0.719
2	0.745	0.484	0.518	0.563	0.577	0.557	0.607	0.685	0.689	0.732	0.689
3	0.682	0.499	0.528	0.565	0.572	0.533	0.612	0.709	0.707	0.698	0.732
Average	0.717	0.494	0.523	0.560	0.571	0.550	0.614	0.696	0.698	0.703	0.713
%Viability	100.00	68.98	73.13	78.30	79.79	76.80	85.79	97.25	97.58	98.18	99.67
SD	4.55	1.72	0.96	1.15	1.15	2.67	1.33	1.74	1.29	3.85	3.13



ภาพ 29 ผลการทดสอบความเข้มข้นของ PEG 400 ที่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์โฟโบริบลาสต์

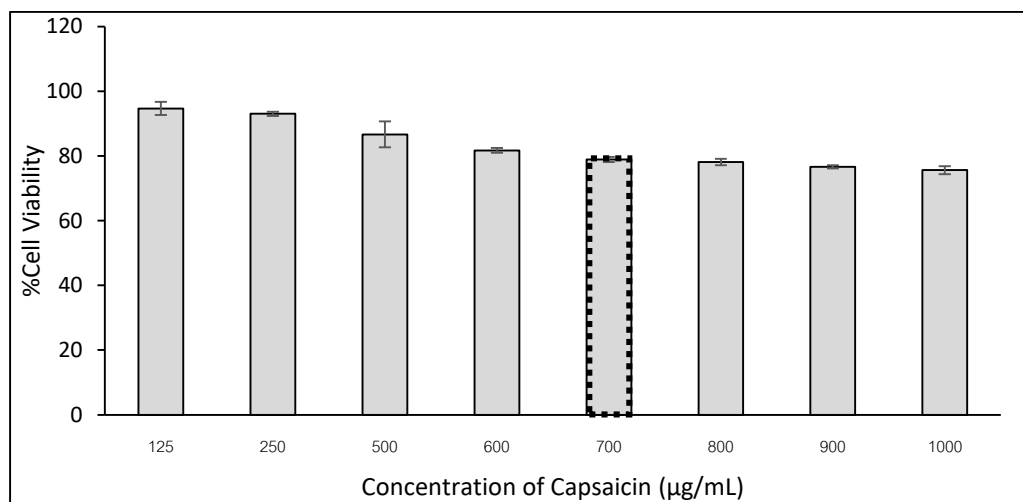
จากผลการทดสอบพบว่าสารละลาย PEG 400 ที่ความเข้มข้น 2% v/v มีค่า % cell viability ที่ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.5$ ซึ่งถือได้ว่าที่ความเข้มข้น 2% v/v ของ PEG 400 นี้ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์โฟโบริบลาสต์ ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลาย PEG400 ที่ความเข้มข้น 2% v/v เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวช่วยละลาย ในการช่วยละลายสาร capsaicin และ อนุพันธ์ของ capsaicin ที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โฟโบริบลาสต์ในขั้นตอนต่อไป

3.5.2 การหาความเข้มข้นของ capsaicin ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์

การศึกษานี้เป็นการหาความเข้มข้นของ capsaicin บริสุทธิ์ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ คือทำให้เซลล์อยู่รอดได้น้อยกว่า 80 % (มีความเป็นพิษต่อเซลล์) สำหรับใช้ในการกำหนดเป็นปริมาณความเข้มข้นของตัวแปรควบคุมของอนุพันธ์ของ capsaicin ที่จะใช้ในการทดสอบในขั้นตอนต่อไป โดยจะทำการเปรียบเทียบความเป็นพิษของ capsaicin บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 125-1000 $\mu\text{g/ml}$ ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง (ครั้งละ 3 ขั้ว) เพื่อกำหนดความเข้มข้นที่แน่นอนในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์ของ capsaicin ในการทดสอบต่อไป ทั้งนี้ผลการทดสอบความเป็นพิษของ capsaicin บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีตัวช่วยละลาย (PEG 400) 2%v/v ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ แสดงดังตาราง 8

ตาราง 8 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 125-1000 $\mu\text{g/ml}$

TIME	Control	Concentration of Capsaicin ($\mu\text{g/ml}$)							
(Average)		1000	900	800	700	600	500	250	125
1	100.00	74.22	76.11	79.21	79.64	82.61	88.27	93.07	94.35
2	100.00	76.45	76.69	77.39	78.1	81.27	82.09	92.31	92.84
3	100.00	76.29	77.13	77.71	78.99	81.31	89.63	93.69	96.84
%Viability	100.00	75.65	76.64	78.10	78.91	81.73	86.66	93.02	94.68
SD	0.00	1.24	0.51	0.97	0.77	0.76	4.02	0.69	2.02



ภาพ 30 ผลความอยู่รอดของเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ capsaicin ตั้งแต่ 125 – 1000 $\mu\text{g/ml}$

จากการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของ capsaicin ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 700 $\mu\text{g/mL}$ ขึ้นไปมีค่า % cell viability น้อยกว่า 80% (เป็นพิษต่อเซลล์) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงสามารถสรุปได้ว่า capsaicin ที่ระดับความเข้มข้น 700 $\mu\text{g/mL}$ หรือเทียบเท่ากับ 2.3 mM เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 2.3 mM เป็นตัวแปรควบคุมของอนุพันธ์ของสาร capsaicin ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป

3.5.3 การเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของ capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin

การทดสอบระดับความเป็นพิษของสารอนุพันธ์ของ capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยการศึกษาในงานวิจัยนี้จะทำการเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ระหว่าง capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันคือ 2.3 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ capsaicin ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ครั้ง (ครั้งละ 3 ชั่วโมง) โดยทางผู้วิจัยจะแบ่งระดับความเป็นพิษออกเป็น 4 ระดับโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสาร capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin คือ

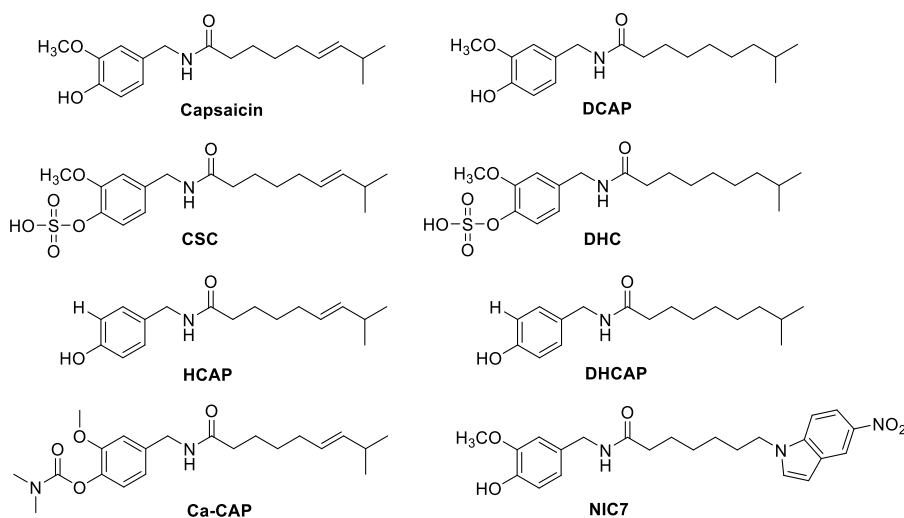
กลุ่มที่ 1 : %cell viability >80% ถือว่า non-cytotoxic ต่อเซลล์ NHDF

กลุ่มที่ 2 : %cell viability ที่อยู่ในช่วง 70-79% ถือว่า non-cytotoxic ต่อเซลล์ NHDF

กลุ่มที่ 3 : %cell viability ที่ไม่แตกต่างจากสาร capsaicin อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

กลุ่มที่ 4 : %cell viability น้อยกว่าสาร capsaicin ถือว่า cytotoxic ต่อเซลล์ NHDF มากกว่า capsaicin

จากผลการทดสอบเบื้องต้นที่ระดับความเข้มข้น 2.3 mM ของอนุพันธ์ของ capsaicin เมื่อเปรียบเทียบกับ capsaicin พบว่าอนุพันธ์ capsaicin ที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ทั้งหมด 7 อนุพันธ์ ประกอบด้วย CSC, DHC, NIC7, Ca-CAP, HCAP, DCAP และ DHCAP ดังภาพ 31 โดยพบว่าอนุพันธ์ของ capsaicin ที่มี indole และ nitroindole เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ รวมถึงอนุพันธ์ของ capsaicin ที่มีการปรับปรุงในส่วนของ O-methoxyl มีค่า cell viability สูงขึ้นมากกว่า 70 % ขึ้นไป (ยกเว้น HCAP และ DCAP) แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้เป็นแนวทางเบื้องต้นในการประเมินความเผ็ดและการระคายเคืองที่มีการใช้ค่าใช้จ่ายน้อยและไม่มีการใช้สัตว์ทดลองในการศึกษา ซึ่งถ้าหากสารอนุพันธ์ตัวใดที่มีแนวโน้มที่ดี สามารถนำมาใช้สำหรับในการศึกษาในรูปแบบ 3D-reconstructed human epidermis test ได้ต่อไป ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลความระคายเคืองต่อผิวหนังมีผลที่ดีมากยิ่งขึ้น



ภาพ 31 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ capsaicin ที่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์

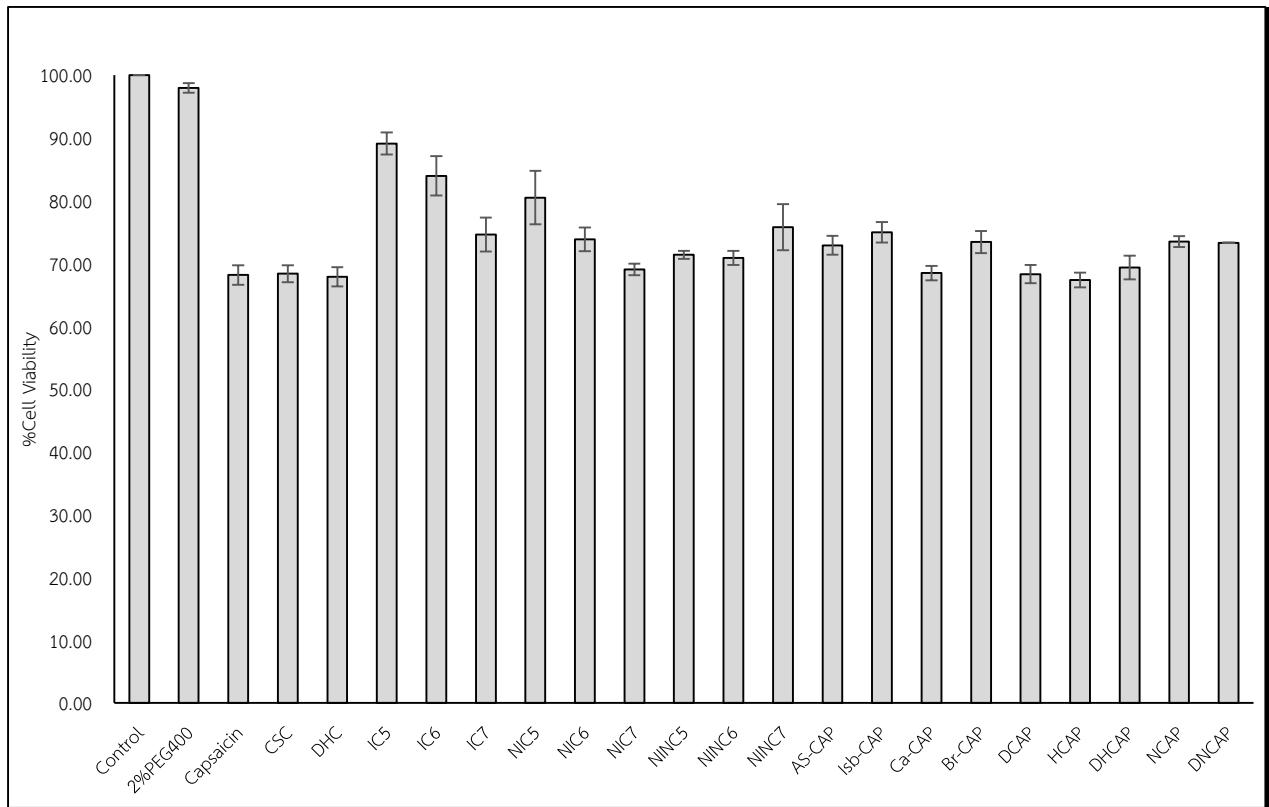
ตาราง 9 ความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของ capsaicin และอนุพันธ์ capsaicin ที่ความเข้มข้น 2.3 mM

CHEMICAL STRUCTURE	CODE	TIME 1	TIME 2	Average	SD	Results	Note
	Capsaicin	67.06	69.25	68.16	1.55	>80%	Control
	CSC	67.4	69.32	68.36	1.36	not significant	-
	DHC	66.78	68.93	67.86	1.52	cytotoxic	-
	IC5	87.84	90.35	89.10	1.77	>80%	-
	IC6	81.74	86.15	83.95	3.12	>80%	-
	IC7	72.69	76.5	74.60	2.69	non-cytotoxic	-
	NIC5	77.45	83.47	80.46	4.26	>80%	-
	NIC6	72.49	75.15	73.82	1.88	non-cytotoxic	insoluble
	NIC7	68.39	69.7	69.05	0.93	not significant	insoluble
	NINC5	70.9	71.82	71.36	0.65	non-cytotoxic	-
	NINC6	70.06	71.66	70.86	1.13	not significant	insoluble
	NINC7	73.18	78.36	75.77	3.66	non-cytotoxic	-
	AS-CAP	71.82	73.95	72.89	1.51	non-cytotoxic	-
	Isb-CAP	73.78	76.1	74.94	1.64	non-cytotoxic	-
	Ca-CAP	67.65	69.27	68.46	1.15	not significant	-
	Br-CAP	72.17	74.64	73.41	1.75	non-cytotoxic	-
	DCAP	67.25	69.32	68.29	1.46	not significant	-
	HCAP	66.53	68.18	67.36	1.17	cytotoxic	-
	DHCAP	68.02	70.68	69.35	1.88	not significant	-
	NCAP	72.84	74.08	73.46	0.88	non-cytotoxic	-
	DNCAP	73.33	73.26	73.30	0.05	non-cytotoxic	-

กลุ่มที่ 1 : %cell viability >80% ถือว่า non-cytotoxic ต่อเซลล์ NHDF ได้แก่ IC5, IC6 และ NIC5

กลุ่มที่ 2 : %cell viability ที่อยู่ในช่วง 70-79% ถือว่า non-cytotoxic ต่อเซลล์ NHDF ได้แก่ IC7, NIC6, NINC5, NINC6, NINC7, As-CAP, Isb-CAP, BrCAP, NCAP และ DNCAP

กลุ่มที่ 3 : %cell viability ที่ไม่แตกต่างจากสาร capsaicin อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 95% ได้แก่ CSC , NIC7, Ca-CAP, DCAP และ DHCAP
 กลุ่มที่ 4 : %cell viability น้อยกว่าสาร capsaicin ถือว่า cytotoxic ต่อเซลล์ NHDF ได้แก่ DHC และ HCAP



ภาพ 32 ความเป็นพิษของ capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์
 ที่ระดับความเข้มข้น 2.3 mM

3.6 การทดสอบความคงตัวของอนุพันธ์ capsinoids และแสงต่างๆ ด้วย HPLC technique

เพื่อเป็นการยืนยันแนวคิดในการเพิ่มความคงตัวของอนุพันธ์ capsinoids ที่ได้ออกแบบทั้ง 2 แนวทางคือการ protection ที่ hydroxyl group ของ capsinoids และการปรับและสลับตำแหน่งของ ester bond เพื่อไม่ให้เกิดการสลายตัวผ่าน quinone methide นั้น สามารถทำการทดสอบการสลายตัวในเบื้องต้นด้วยเทคนิค HPLC โดยทำการเตรียม Reverse ester capsate /Acetyl capsate และ Capsate ความเข้มข้น 1 mM ละลายใน polar protic solvent ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}/80:20$ v/v with 0.025 M CH_3COOH) และทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ ambient condition และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่คงเหลือทุกๆ 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากตาราง 10 แสดงปริมาณที่คงเหลือของ Reverse ester capsate และ Acetyl capsate เทียบกับ Capsate พบว่าผ่านไป 24 ชั่วโมง ทั้ง Reverse ester capsate และ Acetyl capsate ยังมีปริมาณที่ไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่ capsate เหลือเพียงร้อยละ 85 หลังจาก 24 ชั่วโมง จากข้อมูลเบื้องต้นบ่งชี้ว่า การปรับโครงสร้างทั้งสองแบบสามารถเพิ่มความคงตัวได้ สำหรับ acetyl capsate นั้น การ protection กลุ่ม hydroxyl เป็นเพียง partial protection และสามารถหลุดออกได้ขึ้นกับสภาวะกรด ด่าง การศึกษาในสภาวะที่ pH ต่างๆ อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

ตาราง 10 แสดงปริมาณคงเหลือของ Reverse ester capsate และ Acetyl capsate เทียบกับ Capsate ทุกๆ 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ ambient condition

เวลา (ชม.)	ร้อยละของสารที่คงเหลือ		
	Reverse ester Capsate	Acetyl Capsate	Capsate
0	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
6	100.02 $\pm$ 0.02	100.30 $\pm$ 0.49	93.49 $\pm$ 2.08
12	100.01 $\pm$ 0.03	100.02 $\pm$ 1.12	91.84 $\pm$ 2.12
18	100.08 $\pm$ 0.12	99.01 $\pm$ 0.79	86.43 $\pm$ 2.24
24	100.21 $\pm$ 0.07	100.28 $\pm$ 0.67	85.70 $\pm$ 0.56

3.7 การเตรียม formulation ที่เหมาะสมของ capsaicinoids ที่ได้รับการปรับปรุงให้มีความเผ็ดลดลง capsinoids ที่มีความคงตัวเพิ่มขึ้น และ metabolites ของ capsaicinoids และ capsinoids เพื่อทำการทดสอบสมบัติต่างๆ

ในการศึกษาการทำ formulation ที่เหมาะสมนั้นเริ่มต้นวางแผนที่จะเลือกสารที่มีสมบัติที่เหมาะสมหรือมีสมบัติที่โดดเด่นมาทำ formulation จาก capsaicinoids ที่มีความเผ็ดลดลง capsinoids ที่มีความคงตัวเพิ่มขึ้น และ metabolites ที่มีสมบัติทางชีวภาพที่ดี แต่เนื่องจากยังไม่ได้มีการศึกษา toxicity และปริมาณที่สังเคราะห์ในเบื้องต้นอยู่ในปริมาณ 100-500 มิลลิกรัม ดังนั้นจึงทำการศึกษาการทำ formulation ในเบื้องต้นของ capsaicin ซึ่งมี core structure หลักของอนุพันธ์หลายๆตัวก่อน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการทำ formulation ของอนุพันธ์อื่นๆต่อไป

3.7.1 การเตรียมผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกูปแบบน้ำใส

การเตรียมผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกูปแบบน้ำใสความเข้มข้นสูงที่มีความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมี และมีอายุการใช้งานนานอย่างน้อย 2 ปี โดยใช้สารสกัดพริกจากการวิจัยของอุทัย วิชัยและคณะฯ (พ.ศ. 2558) ซึ่งเป็นสารสกัดพริกที่มีความเข้มข้นสูง มีลักษณะขุ่นหนืด สีน้ำตาลเข้ม มีปริมาณสารสำคัญ capsaicin ร้อยละ 2.85 และ dihydrocapsaicin ร้อยละ 2.58 โดยน้ำหนัก หรือคิดเป็นค่ารวมของ capsaicin และ dihydrocapsaicin ร้อยละ 5.43-5.45 โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ capsaicin และ dihydrocapsaicin ในสารสกัดพริกเข้มข้น

Code	น้ำหนักตัวอย่าง (mg)	ปริมาณสาร			
		capsaicin (mg)	dihydrocapsaicin (mg)	capsaicin + dihydrocapsaicin	
				(mg)	(% weight/weight)
Capsicum-2	157.2	4.48	4.05	8.53	5.43
Capsicum-3	162.1	4.64	4.17	8.81	5.44
Capsicum-4	161.9	4.66	4.17	8.83	5.45

3.7.2 การเตรียมผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกูปแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก

ในการเตรียมใช้พอลิเมอร์ Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) ที่ความหนืด 2 ระดับ คือ AN5 และ AN15 โดยการเตรียมเป็นสารละลายพอลิเมอร์เข้มข้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ทั้ง 2 ชนิด จากนั้นนำสารละลายพอลิเมอร์เข้มข้นที่เตรียมได้มาผสมร่วมกับสารสกัดพริกเข้มข้น โดยใช้สารละลายพอลิเมอร์เข้มข้นร้อยละ 12.5, 25 และ 50 โดยน้ำหนักของตำรับตามลำดับ และทำการทดลองในลักษณะเดียวกันโดยใช้สารลดแรงตึงผิว 2 ชนิด คือ Tween 80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่เข้ากันกับน้ำได้ดี และ Span 80 ที่เข้ากันกับน้ำมันได้ดี ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 และ 5.0 โดยน้ำหนักของตำรับตามลำดับ จากนั้นใช้ส่วนผสมของสารละลายพอลิเมอร์และสารลดแรงตึงผิวต่างๆ กัน ดังแสดงในตาราง 12 และตาราง 130 และบันทึกผลการทดลองทันทีและภายหลังการเก็บเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

ตาราง 12 แสดงผลลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกในรูปแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก ร่วมกับ 20% HPMC ความเข้มข้นร้อยละ 12.5, 25 และ 50 โดยน้ำหนัก และ/หรือ Tween 80 และ Span 80 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5.0 และ 10.0 โดยน้ำหนัก

Rx	ความเข้มข้นคิดเป็น %w/w					Water	บันทึกผล ลักษณะทางกายภาพ
	Capsicum	20% HPMC AN5	20% HPMC AN15	Tween 80	Span 80		
1	50.0	-	-	-	-	50.0	แยกเป็นส่วนใสสีส้มที่ก้นหลอด สูงประมาณ 0.4 ซม. ด้านบนเป็นสีสารสกัด
2	50.0	12.5	-	-	-	37.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มเกือบทั้งหมด เหลือเป็นส่วนใส สีสารสกัดด้านบนสูง 0.9 ซม.
3	50.0	25.0	-	-	-	25.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มกระจายตัวอยู่ในสารสกัดพริกทั่วทั้งหลอด
4	50.0	50.0	-	-	-	0.00	แยกเป็นส่วนใสที่ก้นหลอดสูง 1.9 ซม. ด้านบนเป็นสีของสารสกัดพริก
5	50.0	-	12.5	-	-	37.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มทั่วทั้งหลอด
6	50.0	-	25.0	-	-	25.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มกระจายตัวอยู่ในสารสกัดพริกทั่วทั้งหลอด
7	50.0	-	50.0	-	-	0.00	แยกเป็นส่วนใสที่ก้นหลอดสูง 1.5 ซม. ด้านบนเป็นสีของสารสกัด
8	50.0	-	-	2.5	-	47.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มทั่วทั้งหลอด
9	50.0	-	-	5.0	-	45.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มทั่วทั้งหลอด
10	50.0	-	-	10.0	-	40.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มทั่วทั้งหลอด
11	50.0	-	-	-	2.5	47.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มปนน้ำตาลเข้ม/ดำทั่วทั้งหลอด
12	50.0	-	-	-	5.0	45.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มปนน้ำตาลเข้ม/ดำทั่วทั้งหลอด
13	50.0	-	-	-	10.0	40.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มปนน้ำตาลเข้ม/ดำทั่วทั้งหลอด
14	50.0	25.0	-	2.5	-	22.5	เข้ากันได้ แต่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มีส่วนใสๆ ของพอลิเมอร์แทรกในสารสกัด
15	50.0	25.0	-	5.0	-	20.0	เข้ากันได้ แต่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มีส่วนใสๆ ของพอลิเมอร์แทรกในสารสกัด
16	50.0	-	25.0	2.5	-	22.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มและไม่เป็นเนื้อเดียวกัน

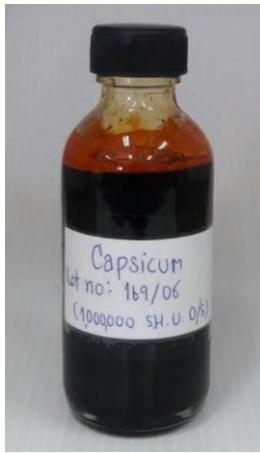
Rx	ความเข้มข้นคิดเป็น %w/w						บันทึกผล ลักษณะทางกายภาพ
	Capsicum	20% HPMC AN5	20% HPMC AN15	Tween 80	Span 80	Water	
17	50.0	-	25.0	5.0	-	20.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มและแยกเป็น ส่วนใสด้านบนสูง 1 ซม.
18	50.0	25.0	-	-	2.5	22.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มและไม่เป็นเนื้อ เดียวกัน
19	50.0	25.0	-	-	5.0	20.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มปนน้ำตาลเข้ม และไม่เป็นเนื้อเดียวกัน
20	50.0	-	25.0	-	2.5	22.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มและไม่เป็นเนื้อ เดียวกัน
21	50.0	-	25.0	-	5.0	20.0	แยกเป็นชั้นใสด้านล่างสูง 0.5 ซม. ด้านบนเป็นสีขาวขุ่น

ตาราง 13 แสดงผลลักษณะทางกายภาพของการผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกในรูปแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 70 โดย
น้ำหนัก ร่วมกับ 2% HPMC AN5 และ AN 15 ความเข้มข้นร้อยละ 7.5, 15 และ 30 โดยน้ำหนัก และ/หรือ
Tween 80 และ Span 80 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5.0 และ 6.0 โดยน้ำหนัก

Rx	ความเข้มข้นคิดเป็น %w/w						บันทึกผล ลักษณะทางกายภาพ
	Capsicum	20% HPMC AN5	20% HPMC AN15	Tween 80	Span 80	Water	
22	70.0	-	-	-	-	30.0	แยกเป็นตะกอนสีส้มทั่วทั้ง หลอด
23	70.0	15.0	-	-	-	15.0	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็น เนื้อเดียวกัน
24	70.0	30.0	-	-	-	0.0	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็น เนื้อเดียวกัน
25	70.0	-	15.0	-	-	15.0	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็น เนื้อเดียวกัน แต่หนืดมากกว่า 24
26	70.0	-	30.0	-	-	0.00	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็น เนื้อเดียวกัน แต่หนืดมากกว่า 24
27	70.0	-	-	2.5	-	27.5	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็น เนื้อเดียวกัน
28	70.0	-	-	5.0	-	25.0	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็น เนื้อเดียวกัน
29	70.0	-	-	6.0	-	24.0	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็น เนื้อเดียวกัน

Rx	ความเข้มข้นคิดเป็น %w/w						บันทึกผล ลักษณะทางกายภาพ
	Capsicum	20% HPMC AN5	20% HPMC AN15	Tween 80	Span 80	Water	
30	70.0	-	-	-	2.5	27.5	ตกเป็นตะกอนสีส้ม
31	70.0	-	-	-	5.0	25.0	แยกเป็น 2 ชั้น ตะกอนสีอ่อนกว่าอยู่ด้านล่างครึ่งหลอดและด้านบนเป็นสีสารสกัด
32	70.0	-	-	-	6.0	24.0	ดูเหมือนสารสกัดแต่เป็นเมือกไม่เป็นเนื้อเดียวกันกับสารสกัด
33	70.0	15.0	-	2.5	-	12.5	เปลี่ยนสีเป็นออกแดง เป็นเนื้อเดียวกัน
34	70.0	15.0	-	5.0	-	10.0	เปลี่ยนสีเป็นออกแดง เป็นเนื้อเดียวกัน แต่หนืดกว่า 33
35	70.0	-	15.0	2.5	-	12.5	แยกเป็นส่วนใสด้านล่างสูง 0.4 ซม.
36	70.0	-	15.0	5.0	-	10.0	แยกเป็นส่วนใสด้านล่างสูง 0.5 ซม.
37	70.0	15.0	-	-	2.5	12.5	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็นเนื้อเดียวกัน
38	70.0	15.0	-	-	5.0	10.0	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็นเนื้อเดียวกัน
39	70.0	-	15.0	-	2.5	12.5	แยกเป็นส่วนใสด้านล่าง สูง 0.4 ซม.
40	70.0	-	15.0	-	5.0	10.0	แยกเป็นส่วนใสด้านล่าง สูง 0.4 ซม.
41	70.0	30.0 (40% PG)	-	-	-	-	ไม่เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน กลับขูดแล้วมีสีของตะกอนสีส้มติดรอบขูด ตั้งทิ้งไว้แล้วค่อยๆ แยกชั้น

จากผลการทดลองการเตรียมตำรับสารสกัดพริกแบบน้ำใสจำนวน 41 ตำรับ ภาพ 33 แสดงลักษณะสารสกัดพริกเข้มข้นเริ่มต้นที่ไม่ได้ผสมกับสารชนิดอื่นๆ พบว่าการเตรียมตำรับโดยการนำสารสกัดพริกเข้มข้นผสมกับน้ำกลั่นไม่ว่าจะเป็นความเข้มข้นของสารสกัดร้อยละ 50 (ตำรับที่ 1) หรือ 70 (ตำรับที่ 22) โดยน้ำหนัก ก็จะทำให้สารสกัดพริกตกตะกอนออกมาเป็นชั้นตะกอนสีส้ม จากนั้นจึงทำการทดลองโดยการสุมตำรับที่มีการตกตะกอนในลักษณะเดียวกันเป็นตำรับที่ 12 ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดพริก Span 80 และน้ำ ร้อยละ 50.0, 5.0 และ 45 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ที่มีลักษณะการตกตะกอนบางส่วนเป็นสีส้มปนน้ำตาลเข้ม/ดำทั่วทั้งหลอด ดังแสดงในภาพ 34



ภาพ 33 แสดงลักษณะของสารสกัดพริกเข้มข้นเริ่มต้น



ภาพ 34 แสดงตำรับที่ 12 ที่มีการตกตะกอนเป็นสีส้มของสารสกัดพริก

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin ในตำรับที่ 12 ที่มีการตกตะกอนเป็นสีส้ม พบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณ capsaicin คงเหลืออยู่ในตำรับได้ร้อยละ 53.24-58.85 โดยน้ำหนัก จากปริมาณที่ใส่เริ่มต้นในตำรับร้อยละ 50.0 โดยน้ำหนัก แสดงให้เห็นว่าการตกตะกอนของสารสกัดเป็นตะกอนสีส้มนั้นไม่ได้มีผลทำให้ปริมาณ capsaicin ลดต่ำลงแต่อย่างใด กล่าวคือตำรับสารสกัดเกิดการตกตะกอนเป็นสีส้มเป็นการเปลี่ยนแปลงความคงตัวทางกายภาพที่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความคงตัวทางเคมีเมื่อเทียบกับสารสกัดพริกเข้มข้นเริ่มต้นที่ไม่มีการตกตะกอน ตำรับที่มีการตกตะกอนเป็นสีส้มนั้นสามารถนำมาใช้ได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ย้อนกลับมาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมในกระบวนการวิเคราะห์ด้วย HPLC ซึ่งในทางปฏิบัติสารที่อยู่ในลักษณะเชิงซ้อนดังกล่าวก็ไม่สามารถให้รสเผ็ดร้อน หรือออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ แต่เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วก็สามารถละลาย และออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ต่อไป แต่อย่างไรก็ตาม ตำรับที่มีการตกตะกอนเป็นสีส้มก็จะมีผลต่อการตัดสินใจของผู้บริโภคสำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีขายในท้องตลาดต่อไป

ตำรับที่ได้รับการคัดเลือกเพื่อศึกษาความคงตัวในชั้นถัดไปคือตำรับที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่เกิดเป็นตะกอนสีส้ม ภายหลังจากเก็บเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และความขุ่นไม่มากจนเทออกจากขวดยาก จึงเหลือตำรับที่ 24, 29 และ 42 แต่เนื่องจากตำรับที่ 24 เกิดการแยกชั้นบางส่วนภายหลังจากเก็บ 24 ชั่วโมง จึงเหลือตำรับที่ 29 และตำรับที่ 42 ที่นำไปศึกษาความคงตัวทางเคมีในระยะยาวต่อไป



เลขที่ดำรับ Rx 29-A (เก็บที่ 30 องศาเซลเซียส)
ที่เวลา 0 เดือน



เลขที่ดำรับ Rx 29-B (เก็บที่ 40 องศาเซลเซียส)
ที่เวลา 0 เดือน



เลขที่ดำรับ Rx 42-A (เก็บที่ 30 องศาเซลเซียส)
ที่เวลา 0 เดือน



เลขที่ดำรับ Rx 42-B (เก็บที่ 40 องศาเซลเซียส)
ที่เวลา 0 เดือน

ภาพ 35 สารละลาย capsicum ตัวอย่าง เลขที่ดำรับต่างๆ ที่เวลา 0 เดือน (ถ่ายเมื่อ 2017-12-07)



เลขที่ดำรับ Rx 29-A (เก็บที่ 30 องศาเซลเซียส)
ที่เวลา 3 เดือน



เลขที่ดำรับ Rx 29-B (เก็บที่ 40 องศาเซลเซียส)
ที่เวลา 3 เดือน



เลขที่ดำรับ Rx 42-A (เก็บที่ 30 องศาเซลเซียส)
ที่เวลา 3 เดือน



เลขที่ดำรับ Rx 42-B (เก็บที่ 40 องศาเซลเซียส)
ที่เวลา 3 เดือน

ภาพ 36 สารละลาย capsicum ตัวอย่าง เลขที่ดำรับต่างๆ ที่เวลา 3 เดือน (ถ่ายเมื่อ 2018-03-13)



เลขที่ดำรับ Rx 29-A (เก็บที่ 30 องศาเซลเซียส)
ที่เวลา 6 เดือน



เลขที่ดำรับ Rx 42-A (เก็บที่ 30 องศาเซลเซียส)
ที่เวลา 6 เดือน

ภาพ 37 สารละลาย capsicum ตัวอย่าง เลขที่ดำรับต่างๆ ที่เวลา 6 เดือน (ถ่ายเมื่อ 2018-06-06)

ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยใช้ตัวทำละลายชนิดที่เตรียมขึ้นใหม่เป็น Deep Eutectic Mixture (DEM) ซึ่งเตรียมได้จากการผสมน้ำตาลทรายขาว (Sucrose) ร่วมกับ Chlorine Chloride (ChCl) ในอัตราส่วน 1:1 จนได้เป็นของผสมทางกายภาพที่มีลักษณะใสและข้นหนืด ที่มีการศึกษาแล้วพบว่าสามารถนำมาใช้เป็นตัวทำละลายที่ดีกับสารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิด (Wilken: 2015, Craveiro: 2016) Eutectic Mixture หมายถึง สารที่เป็นของแข็งที่มีจุดหลอมเหลวสูง 2 ชนิดผสมกันเกิดเป็นสารผสมทางกายภาพที่กลายเป็นของเหลว หรือมีจุดหลอมเหลวที่ต่ำลง (ต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง) ทำให้ได้ของผสมที่มีลักษณะข้นหนืดและมีขี้ตัวดำ สามารถละลายสารสกัดที่มีขี้ตัวน้อย (หรือละลายน้ำยาก) ได้ดี

โดยการเตรียมตำรับสารสกัดพริกเข้มข้นร่วมกับ DEM ที่ความเข้มข้นของ DEM ร้อยละ 20-80 โดยน้ำหนักตามลำดับ โดยที่ทุกตำรับที่เตรียมขึ้นนำมาเทียบกับสารสกัดพริกเข้มข้นเริ่มต้น (ตำรับที่ 42) ผลการทดลองแสดงในตาราง 14

ตาราง 14 แสดงผลลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกในรูปแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 20-100 โดยน้ำหนัก และ Deep Eutectic Mixture (DEM) ความเข้มข้นร้อยละ 0-80 โดยน้ำหนัก

Rx	ความเข้มข้นคิดเป็น %w/w		บันทึกผล ลักษณะทางกายภาพ
	สารสกัดพริก	DEM	
42	100.0	-	สารสกัดเป็นเนื้อเดียว สีน้ำตาลเข้ม/ดำ ค่อนข้างหนืดแต่ไหลได้ดี ไม่มีตะกอน
43	80.0	20.0	แยกออกเป็นชั้นของสารสกัดด้านบนและ DEM ด้านล่างชัดเจน ความสูงของส่วนใสเท่ากับปริมาณ DEM ที่ใส่ลงไปคือ 1 ใน 4
44	60.0	40.0	แยกออกเป็นชั้นของสารสกัดด้านบนและ DEM ด้านล่างชัดเจน ความสูงของส่วนใสเท่ากับปริมาณ DEM ที่ใส่ลงไปคือ 2 ใน 4
45	40.0	60.0	แยกออกเป็นชั้นของสารสกัดด้านบนและ DEM ด้านล่างชัดเจน ความสูงของส่วนใสเท่ากับปริมาณ DEM ที่ใส่ลงไปคือ 2 ใน 3
46	20.0	80.0	แยกออกเป็นชั้นของสารสกัดด้านบนและ DEM ด้านล่างชัดเจน ความสูงของส่วนใสเท่ากับปริมาณ DEM ที่ใส่ลงไปคือ 3 ใน 4

จากผลการศึกษาในเบื้องต้นของการทำ formulation ที่ใช้ capsaicin เป็น model ต้นแบบ สามารถสรุปได้ดังนี้ ในการทำสารสกัดพริกเข้มข้นมีความหนืดสูง สีน้ำตาลเข้ม สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 30 °C และ 40 °C ได้เป็นเวลานาน โดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพและทางเคมี ปริมาณสารสำคัญ capsaicin และ dihydrocapsaicin ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเตรียมตำรับไม่ว่าจะเป็นการเจือจางด้วยน้ำเป็นตัวทำละลาย การเพิ่มความหนืดด้วยสารพอลิเมอร์ หรือการใช้สารลดแรงตึงผิว อาจช่วยให้ตำรับมีลักษณะดีภายหลังการเตรียม แต่จะเริ่มมีการแยกชั้นหรือตกตะกอนเป็นสีส้มหลังจากตั้งทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าการเก็บสารสกัดพริกลักษณะเข้มข้นเป็นสภาวะที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นสภาวะที่มีความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมี หากต้องการนำมาใช้งาน เช่น นำไปหยดผสมลงในตำรับน้ำพริกเพื่อปรับความเผ็ดให้เข้าตามมาตรฐาน ควรนำสารสกัดพริกเข้มข้นดังกล่าวมาเจือจางด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร หากไม่ต้องการใช้แอลกอฮอล์หรือตัวทำละลายอินทรีย์อื่น ควรใช้สารลดแรงตึงผิว เช่น Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5-10 โดยน้ำหนัก แล้วปั่นละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนการนำไปใช้

3.8 เอกสารอ้างอิง

- [1] Higashiguchi, F., Nakamura, H., Hayashi, H., and Kometani, T. (2006). Purification and structure determination of glucosides of capsaicin and dihydrocapsaicin from various capsicum fruits. *J. Agric. Food Chem.*, *54*, 5948-5953.
- [2] Hamada, H., Nishida, K., Furuya, T.; Ishihara, K., and Nakajima, N. (2001). Preparation of a new pepper: chemoenzymatic synthesis of capsaicin oligosaccharide and 8-nordihydro capsaicin oligosaccharide. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, *16*, 115–119.
- [3] Yang, F., Xlao, X., Cheng, W., Yang. W., Yu, P., Song, Z., Yaro-Yarovoy, v., and Zheng, J. (2015). Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nature chemical biology.*, *11*, 518-524.
- [4] Gannett, P. M., Nagel, D. L., Reilly, P. J., Lawson, T., Sharpe, J., & Toth, B. (1988). The capsaicinoids: Their separation, synthesis, and mutagenicity. *J. Org. Chem.*, *53*(5), 1064-1071.
- [5] Epifano, F., Sosa, S., Tubaro, A., Marcotullio, M. C., Curini, M., and Genovese, S. (2011). Topical anti-inflammatory activity of boropinic acid and its natural and semi-synthetic derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, *21*, 769–772.
- [6] Kumar, T., Payel, G., Mukherjee, T., Barman, K. and Maity, S. (2016). Nano-encapsulation of capsaicin on lipid vesicle and evaluation of their hepatocellular protective effect. *International Journal of Biological Macromolecules*, *88*, 236-243.

บทที่ 4

สรุปผลการศึกษา

จากข้อจำกัดของการใช้ประโยชน์ของ capsaicinoids และ capsinoids คือ 1) ในกรณีพริกเผ็ดที่มีสารในกลุ่ม capsaicinoids นั้น ความเผ็ดของสารในกลุ่มนี้ส่งผลอย่างมากต่อการนำไปใช้ประโยชน์ เพราะมีข้อจำกัดของปริมาณของ capsaicinoids ที่ต้องบริโภคเพื่อให้ได้ประโยชน์และผลที่ชัดเจน และผู้บริโภคส่วนใหญ่ไม่สามารถทนต่อความเผ็ดของ capsaicinoids ได้ ดังนั้นต้องใช้หลายเทคนิคในการลดข้อจำกัดนี้ เช่น การทำ encapsulation ของ capsaicinoids ก่อนการนำไปใช้ประโยชน์ซึ่งมีราคาแพงในการไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ 2) ในกรณีพริกที่ไม่เผ็ดนั้นมีสารกลุ่ม capsinoids ทั้งนี้ข้อที่ควรระวังคือ capsinoids คือไม่คงตัวเพราะเกิดการสลายตัวผ่าน *p*-quinone methide degradation pathway และไม่คงตัวในตัวทำละลายที่มีขั้วส่งผลให้มีปัญหาระหว่างการสกัด การผลิต และการแปรรูปนั้น ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้เน้นหาแนวทางในการพัฒนาและการเตรียม capsaicinoids ที่เผ็ดน้อยลง สารในกลุ่ม capsinoids ที่มีความคงตัวเพิ่มขึ้น และหาแนวทางที่เหมาะสมในการเตรียม metabolites ของ capsaicinoids และ capsinoids

โดยแนวทางในการลดความเผ็ดของสารในกลุ่ม capsaicinoids มี 3 แนวทางคือ 1) การปรับเปลี่ยนกลุ่ม hydroxyl ที่วง aromatic 2) การปรับเปลี่ยนกลุ่ม methoxy ที่วง aromatic และ 3) การปรับเปลี่ยนส่วนที่เป็น long chain hydrocarbon พบว่า IC5, IC6 และ NIC5 มีความเป็นพิษต่อ skin fibroblast น้อยที่สุด

สำหรับการเพิ่มความคงตัวของสารในกลุ่ม capsinoids นั้น มีแนวทางการปรับปรุงไว้ 2 แนวทางคือ 1) ทำการ deactivation กลุ่ม hydroxyl โดยการทำให้ protection ด้วย protecting groups ที่เหมาะสม และ 2) ปรับโครงสร้างและสลับตำแหน่งของ ester bond เพื่อป้องกันการเกิด quinone methide degradation พบว่าในเบื้องต้น ทั้ง 2 แนวทางสามารถเพิ่มความคงตัวของ capsinoids ได้ดี ทั้งการทำแบบ partial protection ของ acetyl capsate และ แบบ reverse ester capsate

ส่วนการเตรียม metabolite นั้น การศึกษาวิจัยนี้ให้ความสนใจในการเตรียม capsaicin sulfate ที่เป็น novel capsaicin derivatives ที่เป็น partial protection และสามารถปรับเปลี่ยนเป็น capsaicin ได้ขึ้นกับสภาวะที่กำหนด เหมาะสมสำหรับการเป็น candidate ในการศึกษาเพิ่มเติมต่อ ทั้งนี้ทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการร่างยื่นขอจดสิทธิบัตรการสังเคราะห์และการใช้ประโยชน์ของสารดังกล่าว ดังแสดงในภาคผนวก 2 นอกจากนี้ capsaicin sulfate แล้ว สารในกลุ่ม medium chain fatty acid ได้ทำการสังเคราะห์ด้วยการทำ hydrolysis จาก capsaicinoids ซึ่งง่ายและได้ปริมาณที่สูง แต่สำหรับ medium chain fatty acid บางตัวที่มีโครงสร้างซับซ้อนยังมีปัญหาในการสังเคราะห์เนื่องจากการไม่เสถียรของ intermediate ที่เกิดขึ้น

สุดท้ายคือการเตรียม capsaicinoids formulation ที่มีความคงตัวได้ทำการศึกษาในเบื้องต้น พบว่าการเก็บสารสกัดพริกลักษณะเข้มข้นเป็นสภาวะที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นสภาวะที่มีความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมี หากต้องการนำมาใช้งาน เช่น นำไปหยดผสมลงในตำรับน้ำพริกเพื่อปรับความเผ็ดให้เข้าตามมาตรฐาน ควรนำสารสกัดพริกเข้มข้นดังกล่าวมาเจือจางด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร

จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ทั้งหมดในการศึกษานี้ สารอนุพันธ์ต่างๆได้ถูกนำไปศึกษาเพิ่มเติมในหน่วยงานต่างๆ ดังนี้คือ อนุพันธ์ของ capsaicin ที่มี indole และ nitroindole เป็นองค์ประกอบได้ส่งต่อไปทำการศึกษา beta amyloid activity ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สารในกลุ่ม medium chain fatty acid ได้ส่งต่อไปทำการศึกษาการขยายตัวของหลอดเลือดที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และ ศึกษาเรื่องการลด cholesterol ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และอนุพันธ์ของ halogenated capsaicin ได้ส่งไปทำการศึกษาต่อเรื่อง adipogenesis และ adipolysis และ acetylcholine esterase inhibition ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ภาคผนวก 1.1
รายละเอียดวิธีการทดลอง

1) เตรียม 90% capsaicinoids จากสารสกัดพริกด้วยวิธีการตกผลึก

วิธีการทดลอง

นำผลพริกพีโรสด (สุกแดงทั่วทั้งผล) มาเด็ดขั้วออก น้ำหนัก 13.5 กิโลกรัม อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 65 °C จนแห้งใช้เวลา 72 ชั่วโมง (พริกพีโรมีน้ำประมาณ 85 %) นำผลพริกที่อบแห้งแล้วมาปั่นบดจนละเอียด (6% capsaicinoids w/w) ซึ่งน้ำหนักพริกบด 2.0 กิโลกรัม ใส่ลงในถังพลาสติกขนาด 20 ลิตร ทำการสกัดด้วย acetone 10 ลิตร โดยวิธีการปั่นกวนด้วย mechanical stirrer นาน 1 ชั่วโมง กรองสารสกัดพริกออกจากกากพริกด้วยกระดาษกรอง (ชุดกรอง suction) ล้างกากพริกด้วย acetone 10 ลิตร รวมสารสกัดพริกที่กรองได้เข้าด้วยกัน ระเหย acetone ออกจนหมดด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน จะได้สารสกัดพริกสีแดงเข้มลักษณะเป็นของเหลวหนืด (capsicum oleoresin, 30% capsaicinoids) น้ำหนัก 386 กรัม (19.3% yield) ละลายซ้ำด้วยสารละลายผสมระหว่างเอทานอล-น้ำ ทำการสกัดแยกสาร carotenoids ออกด้วยสารละลาย hexane จากนั้นทำการสกัดแยกสาร capsaicinoids ออกจากชั้นเอทานอล-น้ำด้วยสารละลาย dichloromethane ระเหยตัวทำละลายออกจนแห้งได้สารสกัด crude capsaicinoids มีลักษณะเป็นของแข็งหนืดสีแดงเข้ม (crude capsaicinoids, 65% capsaicinoids) น้ำหนัก 175 กรัม (8.8% yield) ทำการตกผลึกในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ ทำซ้ำ 2-3 ครั้งจนได้สาร capsaicinoids ที่มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มเล็กสีขาว-เหลืองนวล (capsaicinoids, >90% capsaicinoids) น้ำหนัก 38 กรัม (1.9% yield) ดังภาพ 1.1.1 และยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ mass spectrometry

Capsaicin

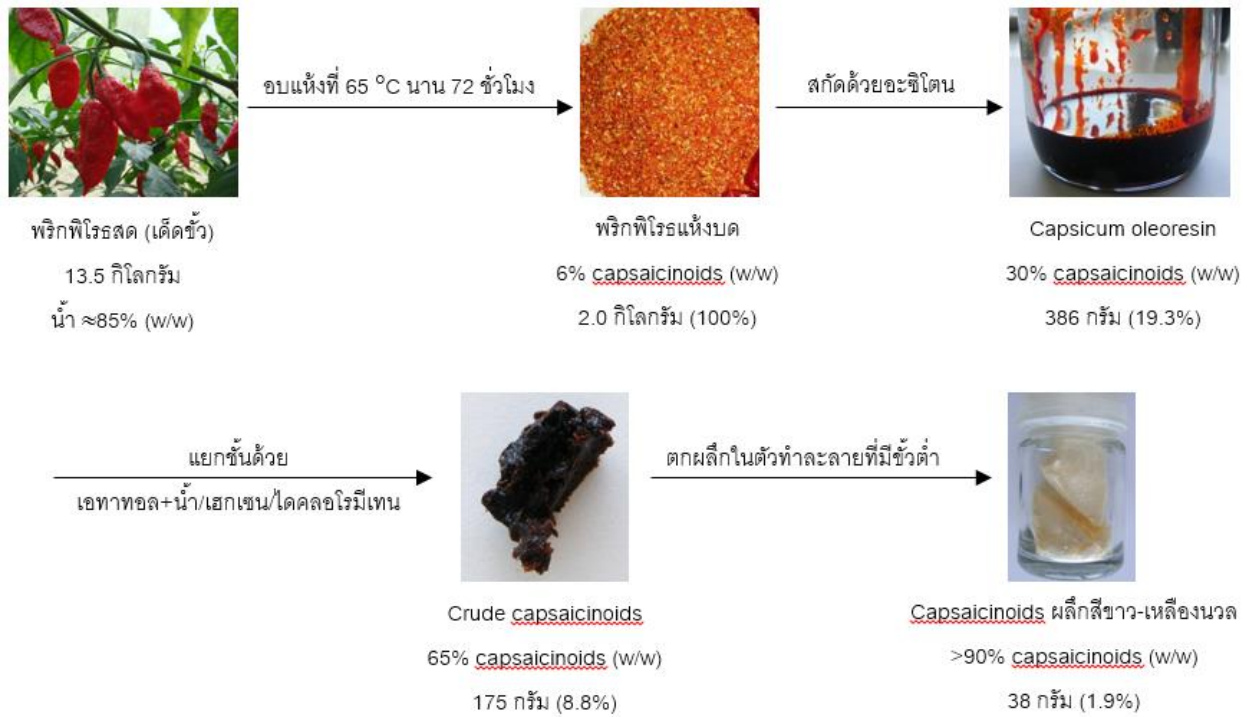
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.93 (d, J = 6.8 Hz, 6H), 1.36 (m, 2H), 1.63 (m, 2H), 1.97 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 2.17-2.21 (m, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.32 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 5.33 (m, 2H), 5.91 (s, 1H), 6.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.84 (d, J = 8.0 Hz, 1H).

ESI-MS: m/z 304.1867 $[\text{M-H}]^-$, 340.1627 $[\text{M+Cl}]^-$, 350.1913 $[\text{M+COOH}]^-$

Dihydrocapsaicin

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.84 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 1.12 (m, 2H), 1.22-1.32 (m, 6H), 1.49 (m, 1H), 1.63 (m, 2H), 2.17-2.19 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 4.32 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 5.91 (s, 1H), 6.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.84 (d, J = 8.0 Hz, 1H).

ESI-MS: m/z 306.2022 $[\text{M-H}]^-$, 342.1782 $[\text{M+Cl}]^-$, 352.2073 $[\text{M+COOH}]^-$



ภาพ 1.1.1 การสกัดและการทำ capsaicinoids ให้บริสุทธิ์จากพริกพริก

2) เตรียม capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลง

2.1) ปรับปรุง capsaicin ด้วยสารในกลุ่ม acetate, carbamate, phosphate, proline และ glucose ที่ hydroxyl group ของวง aromatic

2.1.1) การสังเคราะห์ acetyl capsaicin

นำ capsaicin (0.65 mmol) ละลายในตัวทำละลาย acetone (5 ml) เติม potassium carbonate (0.98 mmol) และ acetic anhydride (6.55 mmol) ตามลำดับ โดยปฏิกิริยาจะถูกให้ความร้อนแบบรีฟลักซ์ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสารผสมจะถูกทิ้งให้เย็นในอุณหภูมิห้องและนำไประเหยตัวทำละลายออก ผลิตภัณฑ์ส่วนที่เหลือจะถูกนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค คอลัมน์โครมาโตกราฟีบนซิลิกา (20% ethylacetate/dichloromethane) สารสังเคราะห์ที่ได้จะอยู่ในรูปของน้ำมันใสไม่มีสี คิดเป็นร้อยละ 91 ของผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ Mass spectrometry

Acetyl capsaicin

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 6.97-6.99 (d, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.83-6.85 (d, 1H), 5.69 (s, 1H), 5.28 5.41 (m, 1H), 4.41-4.42 (d, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 2.19-2.23 (t, 2H), 1.97-2.02 (q, 1H), 1.62-1.68 (m, 4H), 1.35-1.43 (m, 1H), 1.26-1.31 (m, 2H), 1.13-1.17 (m, 1H), 0.94-0.95 (d, 3H), 0.84-0.86 (d, 3H)

ESI-MS: m/z 348 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 370 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 386 $[\text{M}+\text{K}]^+$

2.1.2) การสังเคราะห์ carbamate capsaicin

นำ capsaicin (0.49 mmol) ไปละลายในตัวทำละลาย acetone (5 ml) เติม potassium carbonate (0.74 mmol) และ dimethylcarbamoyl chloride (4.91 mmol) ตามลำดับ ปฏิกิริยาจะถูกให้ความร้อนแบบรีฟลักซ์ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้องและนำไประเหยตัวทำละลายออก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะถูกแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีบนซิลิกา (20% ethylacetate/dichloromethane) สารสังเคราะห์ที่ได้จะอยู่ในรูปของน้ำมันสีเหลืองใส คิดเป็นร้อยละ 55 ของผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ Mass spectrometry

Carbamate capsaicin

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 6.99-7.01 (d, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.80-6.82 (d, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.28-5.31 (m, 1H), 4.37-4.40 (d, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.99-3.13 (dd, 3H), 2.16-2.22 (m, 2H), 1.97-1.99 (dd, 1H), 1.63-1.67 (m, 2H), 1.38-1.41 (m, 1H), 1.25-1.32 (m, 4H) 0.95-0.96 (d, 3H), 0.81-0.85 (d, 3H)

ESI-MS: m/z 377 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 399 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 415 $[\text{M}+\text{K}]^+$

2.1.3) การสังเคราะห์ phosphate capsaicin

นำ capsaicin (0.49 mmol) ไปละลายในตัวทำละลาย dichloromethane (15 ml) จากนั้นเติม diethylamine (4.91 mmol) และ phosphoryl chloride (1.47 mmol) ลงในสารละลายตามลำดับ ตั้งให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเสร็จแล้วนำสารผสมที่ได้มาปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 12 ด้วย 1 M sodium hydroxide นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออก แล้วนำไปปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยกรด hydrochloric acid นำส่วนที่เหลือไปทำให้แห้งด้วยเทคนิคพรีชดราย สารที่ได้จะถูกแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟสคอลัมน์โครมาโตกราฟีบนซิลิกา (SiliaBond® C18, Silicycle) โดย

ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างน้ำและอะซิโตรไนไตรล์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในรูปของแข็งสีเหลือง คัดเป็นร้อยละ 20 ของผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ Mass spectrometry

Phosphate capsaicin

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 7.49-7.51 (d, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.76-6.78 (d, 1H), 5.31-5.42 (m, 2H) 4.28 (s, 2H), 3.81 (s, 4H), 2.20-2.23 (t, 3H), 2.02-1.97 (dd, 2H), 1.59-1.66 (m, 2H), 1.35-1.40 (m, 2H), 0.96-0.97 (d, 6H)

ESI-MS: m/z 384 $[\text{M-H}]^-$

2.1.4) การสังเคราะห์ proline capsaicin

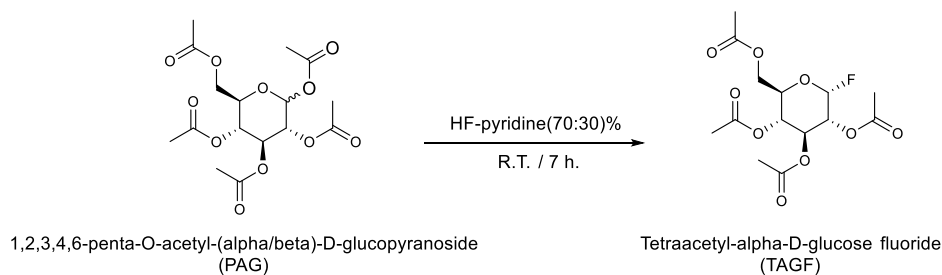
นำ capsaicin (0.49 mmol) Boc-L-proline (0.54 mmol) และ 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (0.2 mmol) ไปละลายในตัวทำละลาย dichloromethane (10 ml) จากนั้นเติมสารละลายของ N,N' -dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (1.47 mmol) ลงในสารละลายผสม ตั้งให้ทำปฏิกิริยาในอุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารผสมที่ได้ไปกรองตะกอนและนำไประเหยตัวทำละลายออก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะถูกแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีบนซิลิกา (20% ethylacetate/dichloromethane) แล้วกำจัดหมู่ปกป้อง Boc ด้วยการนำกรด sulfuric acid เข้มข้นไปหยดซ้ำๆ ลงในสารละลายผสมของ sodium chloride และกรด hydrochloric acid เพื่อสร้างแก๊สของ hydrochloric acid จากนั้นฟองแก๊สจะถูกนำไปไหลผ่านสารอนุพันธ์ของ capsaicin ที่มี N-Boc Proline เป็นหมู่ปกป้อง (0.1 g) ที่ละลายใน chloroform (50 ml) ประมาณ 30 นาที เมื่อเสร็จแล้วนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออก ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค Mass spectrometry

Proline capsaicin

ESI-MS: m/z 525 $[\text{M+H}]^+$, 541 $[\text{M+Na}]^+$

2.1.5) การสังเคราะห์ glucose capsaicin

ปฏิกิริยาแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ 1) การสังเคราะห์ tetraacetyl- α -D-glucose fluoride เพื่อใช้เป็น reagent สำหรับสังเคราะห์ capsaicin- β -D-glucopyranoside และ 2) การสังเคราะห์ capsaicin- β -D-glucopyranoside



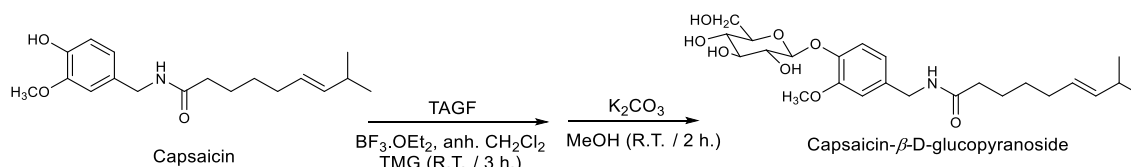
ภาพ 1.1.2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ tetraacetyl- α -D-glucose fluoride

การสังเคราะห์สาร tetraacetyl- α -D-glucose fluoride สังเคราะห์โดยใช้ 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- α/β -D-glucopyranoside ทำปฏิกิริยากับ 70% HF-Pyridine ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยา

เกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว ให้นำหลอดของสารละลายผสมที่เตรียมได้แช่ลงในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นปรับสารละลายให้เป็นกลางด้วยสารละลายอิ่มตัวของ sodium bicarbonate และสกัดด้วยสารละลาย dichloromethane ระเหยตัวทำละลายออกและแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (100% dichloromethane) ได้ผลิตภัณฑ์สาร tetraacetyl- α -D-glucose fluoride ที่มีลักษณะเป็นผงของแข็งสีขาว (คิดเป็นร้อยละ 62 ของสารผลิตภัณฑ์) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy

Tetraacetyl- α -D-glucose fluoride

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 1.97-2.15 (s, 12H), 4.11-4.22 (m, 2H), 4.28 (dd, $J_1 = 12.2$, $J_2 = 3.8$ Hz, 1H), 4.95 (ddd, $J_1 = 24.2$, $J_2 = 10.2$, $J_3 = 2.8$ Hz, 1H), 5.15 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H), 5.49 (t, $J = 9.9$ Hz, 1H), 5.74 (dd, $J_1 = 52.9$, $J_2 = 2.7$ Hz, 1H)



ภาพ 1.1.3 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ capsaicin- β -D-glucopyranoside

การสังเคราะห์สาร capsaicin- β -D-glucopyranoside ทำได้โดยนำ capsaicin ทำปฏิกิริยากับ boron trifluoride etherate ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$), tetraacetyl- α -D-glucose fluoride และ 1,1,3,3-tetramethylguanidine ที่ละลายอยู่ในสารละลาย dichloromethane ที่ทำให้ปราศจากน้ำ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้วค่อยๆ เติมสารละลายอิ่มตัวของ sodium bicarbonate ลงไป และสกัดด้วย ethylacetate และระเหยตัวทำละลายออก จากนั้นเติมโพแทสเซียมคาร์บอเนต กวนสารละลายให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีตกผลึกด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและน้ำ

ได้ผลิตภัณฑ์ capsaicin- β -D-glucopyranoside เป็นของแข็งสีขาว (คิดเป็นร้อยละ 79 ของสารผลิตภัณฑ์) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FT-IR และ Mass spectrometry

Capsaicin- β -D-glucopyranoside

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 0.96 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H), 1.39 (m, 2H), 1.63 (m, 2H), 1.99 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.22 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.21 (m, 1H), 3.38-3.51 (m, 4H), 3.68 (dd, $J_1 = 12.1$ Hz, $J_2 = 5.1$ Hz, 1H), 3.86 (dd, $J_1 = 15.1$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 4.30 (s, 2H), 4.86 (d, 1H anomeric H), 5.36 (m, 2H), 6.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.11 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H)

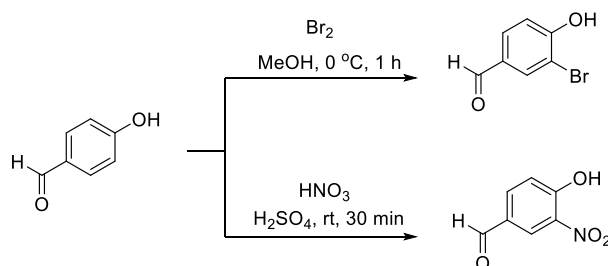
$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 176.04, 150.93, 147.18, 139.15, 127.86, 121.26, 118.19, 113.26, 102.99, 78.20, 77.86, 74.93, 71.36, 62.52, 56.73, 43.77, 36.98, 33.25, 32.28, 30.34, 26.56, 23.11 (x2)

FT-IR: 3566, 3363, 3285, 2961, 2921, 2855, 1647, 1597, 1538, 1514, 1467, 1427, 1372, 1265, 1219, 1154, 1130, 1108, 1075, 1052, 1018, 969, 898, 858, 799, 730, 715, 671, 590, 527, 507, 419 cm^{-1}

ESI-MS: m/z 490.2411 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2.2) การปรับปรุง capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลงด้วยการแทนที่กลุ่ม methoxy ของ aromatic moiety

2.2.1) การสังเคราะห์ benzaldehyde derivatives



ภาพ 1.1.4 การสังเคราะห์ benzaldehyde derivatives

การสังเคราะห์ 3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde

สังเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยา electrophilic aromatic substitution กับ 4-hydroxybenzaldehyde โดยใช้ bromine solution เป็นรีเอเจนต์ นำ Bromine solution (1.0 mol eq.) ละลายใน methanol (2.00 mL) ที่ 0 °C จากนั้นค่อยๆ เติม bromine solution ลงใน 4-hydroxy benzaldehyde (1.0 mol eq.) ที่ 0 °C และปล่อยให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึงอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อทำปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์แล้ว เติมสารละลาย 5% sodium bisulfite ในสารละลายผสม สกัดด้วย diethyl ether (3 x 20 mL) จากนั้นล้างสารละลายผสมด้วยสารละลายอิ่มตัว sodium bisulfite (5 x 30 mL) และสารละลาย brine (3 x 15 mL) ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกด้วย ethanol จากนั้นทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (methanol/dichloromethane, 9 : 1) ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว คิดเป็นร้อยละ 75 ของผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR spectroscopy

3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde

¹H-NMR 400 MHz (d₆-DMSO): δ (ppm) = 9.78 (br, 1H, CHO), 8.06 (s, 2H, Ar), 7.76 (s, 1H, Ar), 3.34 (br, 1H, OH)

การสังเคราะห์ 3-nitro-4-hydroxybenzaldehyde

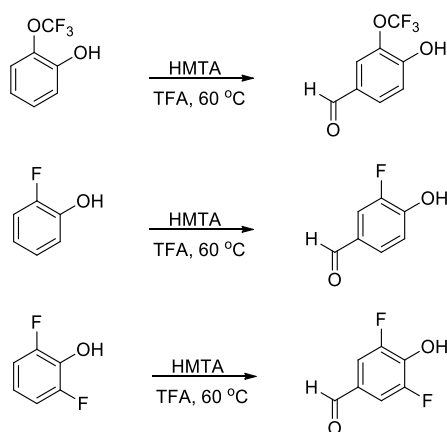
สำหรับการสังเคราะห์ 3-nitro-4-hydroxybenzaldehyde ใช้ปฏิกิริยา nitration โดยใช้กรด nitric acid และกรด sulfuric acid เป็นรีเอเจนต์ นำ 4-hydroxy benzaldehyde (1.0 mol eq.) ละลายในกรด sulfuric acid (2.00 mL) ที่อุณหภูมิเย็น (ใช้น้ำแข็ง) จากนั้นค่อยๆ หยดสารผสมลงในสารละลายเย็น nitrating solution (37% ของกรด sulfuric acid 1.2 mol eq. 65% กรด nitric acid 1.2 mol eq.) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเทสารละลายผสมลงในน้ำแข็ง กวนจนกระทั่งตกตะกอนของแข็งสีเหลือง กรองด้วย cooled ethanol (5 x 5 mL) ทำบริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกด้วย ethanol กรองและทำให้แห้ง ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็นร้อยละ 70 ของผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR และ FT-IR

3-nitro-4-hydroxybenzaldehyde

¹H-NMR 400 MHz (CDCl₃): δ (ppm) = 11.03 (s, 1H, OH), 9.94 (s, 2H, CHO), 8.63 (d, 1H, Ar, J=2.0 Hz), 8.15-8.12 (m, 1H, Ar), 7.31 (t, 1H, Ar, J=8.8 Hz),

FT-IR (KBr) cm⁻¹: 3,230 (OH), 1,686 (C=O), 1,566 1,332 (NO₂)

2.2.2) การสังเคราะห์ fluoro benzaldehyde derivatives



ภาพ 1.1.5 การสังเคราะห์ fluoro benzaldehyde derivatives โดยใช้ปฏิกิริยาของ Duff

3-trifluoro-4-hydroxy benzaldehyde, 3-fluoro-4-hydroxy benzaldehyde และ 3,5-difluoro-4-hydroxy benzaldehyde ใช้ปฏิกิริยาของ Duff สังเคราะห์ ซึ่งปฏิกิริยานี้เป็น formylation reaction ปฏิกิริยาใช้ hexamethylenetetramine (HMTA, 1.2 mol eq.) เป็นรีเอเจนต์ ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น phenol derivatives (1.0 mol eq.) ภายใต้สภาวะกรด (สารละลายกรด TFA, 5 mL) ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์แล้วทำการสกัดด้วย ethyl acetate (3 x 20 mL)

สำหรับ 3-trifluoro-4-hydroxy benzaldehyde ทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (1% methanol/dichloromethane) คิดเป็นร้อยละ 44 ของผลิตภัณฑ์, 3-fluoro-4-hydroxy benzaldehyde ทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (2% methanol/dichloromethane) คิดเป็นร้อยละ 41 ของผลิตภัณฑ์ และ 3,5-difluoro-4-hydroxy benzaldehyde ทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกผลึกด้วย 40% ethanol ในสารละลายน้ำ คิดเป็นร้อยละ 82 ของผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FT-IR และ Mass spectrometry

3-trifluoromethyl-4-hydroxy benzaldehyde

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 9.86 (1H, s, CHO), 7.77 (2H, m, ArH), 7.19 (1H, d, $J=8.4$ Hz, ArH)

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 190.0, 153.5, 130.8, 130.1, 122.3, 122.0, 119.4, 118.0

FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,338 (OH stretching), 2,854 (C-H stretching of CHO), 1,678 (C=O stretching of CHO)

HRMS: Calcd. for $\text{C}_8\text{H}_5\text{F}_3\text{O}_3$: m/z 206.0190, found m/z 207.0322 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

3-fluoro-4-hydroxy benzaldehyde

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 9.84 (1H, d, $J=2$ Hz, CHO), 7.66-7.60 (2H, m, ArH), 7.15 (1H, t, $J=8$ Hz, ArH)

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 190.03, 152.59, 150.20, 149.76, 128.61, 117.75, 115.81

FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,138 (OH stretching), 2,846 (C-H stretching of CHO), 1,672 (C=O stretching of CHO)

HRMS: Calcd. For $C_7H_6FO_2$: m/z 141.0346, found 141.0330 m/z (M+H)⁺

3,5-difluoro-4-hydroxy benzaldehyde

¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 9.81 (1H, t, $J=4.0$ Hz, CHO), 7.55-7.42 (2H, m, ArH)

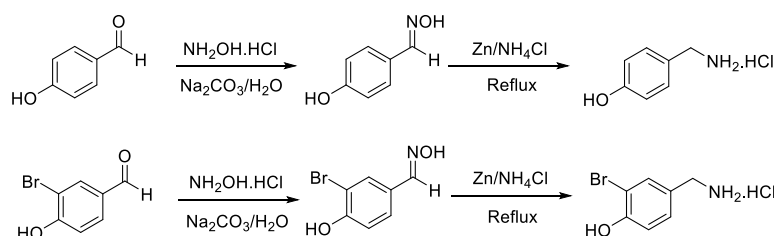
¹³C-NMR: (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 189.04, 153.17, 150.72, 139.03, 128.39, 113.37

FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,138 (OH stretching), 3,216 (OH stretching), 2,733 (C-H stretching of CHO), 1,689 (C=O stretching of CHO)

HRMS: Calcd. For $C_7H_5F_2O_2$: m/z 159.0252, found 159.0244 m/z (M+H)⁺

2.2.3) การสังเคราะห์ benzylamine derivatives

การสังเคราะห์ benzylamine derivatives แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนได้แก่ 1) การสังเคราะห์เปลี่ยนหมู่ aldehyde ให้เป็นหมู่ oxime โดยใช้ปฏิกิริยาของ Nelson และ 2) ทำปฏิกิริยา reduction เปลี่ยนหมู่ oxime ให้เป็นหมู่ amine โดยใช้ hydroxylamine hydrochloride เป็นรีเอเจนต์ จากนั้นทำปฏิกิริยา reduction โดยใช้ Zn และ ammonium chloride เป็นรีเอเจนต์ ซึ่งเป็น specific reducing agent กับหมู่ฟังก์ชัน oxime



ภาพ 1.1.6 การสังเคราะห์ benzylamine derivatives โดยปฏิกิริยาเกิดผ่าน oxime แล้วถูกรีดิวซ์โดยใช้ Zn และ ammonium chloride เป็นรีเอเจนต์

การสังเคราะห์ 4-hydroxy benzylamine

สำหรับ 4-hydroxy benzylamine สังเคราะห์โดยใช้ 4-hydroxy benzaldehyde (1.2 mol eq.) เป็นสารตั้งต้น ทำปฏิกิริยากับ hydroxylamine hydrochloride ($NH_2OH.HCl$, 2.0 mol eq.) โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ลอดอุณหภูมิสารละลายลงด้วยอ่างน้ำแข็ง และค่อยๆ หยดสารละลายผสม sodium carbonate (1.0 mol eq.) จากนั้นนำสารละลายผสมออกจากน้ำแข็งมารีฟลักซ์ที่ 45 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว สกัดด้วย ethyl acetate (3 x 25 mL) ได้เป็นผลิตภัณฑ์ของ 4-hydroxy benzaldehyde oxime เป็นของแข็งสีขาว เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ของ oxime derivatives (1.0 mol eq.) แล้วนำมาทำปฏิกิริยา reduction กับ activated zinc (3.0 mol eq.) โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย (10.0 mL) จากนั้นเติม ammonium chloride (NH_4Cl) (3.0 mol eq.) รีฟลักซ์ที่ 70 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อทำปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้วสกัดด้วย ethyl acetate (3 x 20 mL) ล้างชั้นสารละลายอินทรีย์ด้วยสารละลาย brine (3 x 20 mL) แล้วปรับให้เป็นกลางด้วย 6 M HCl ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นอยู่ในรูปของเกลือ amine hydrochloride derivatives ลักษณะของแข็งสีขาว คิดเป็นร้อยละ 21 ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR และ FT-IR

4-hydroxy benzylamine hydrochloride

¹H-NMR (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 6.89-6.71 (m, 2H, Ar), 6.61-6.58 (m, 2H, Ar), 4.09 (s, 2H, CH_2).

FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,436 (NH), 1,615 (NH)

การสังเคราะห์ 3-bromo-4-hydroxy benzylamine

การสังเคราะห์ 3-bromo-4-hydroxy benzylamine ใช้วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียม 4-hydroxy benzylamine ที่กล่าวมาข้างต้น โดยในส่วนการทำปฏิกิริยา reduction ใช้เวลาการเกิดปฏิกิริยา 3 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นเกลือ 3-bromo-4-hydroxy benzylamine hydrochloride ลักษณะเป็นของแข็งสีขาว คิดเป็นร้อยละ 28 ของผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างของ 4-hydroxy benzylamine hydrochloride และ 3-bromo-4-hydroxy benzylamine hydrochloride ด้วยเทคนิค FT-IR และ $^1\text{H-NMR}$

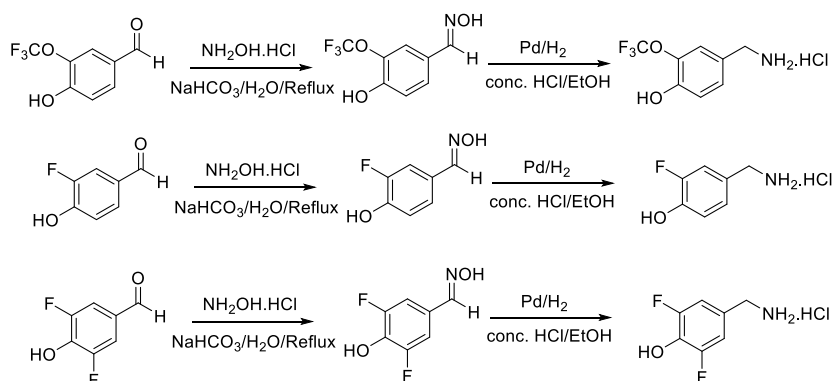
3-bromo-4-hydroxy benzylamine hydrochloride

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 7.04 (d, 1H, Ar, $J=1.94$ Hz), 6.92-6.90 (m, 1H, Ar), 6.62 (d, 1H, Ar, $J=8.0$ Hz), 4.18 (s, 1H, CH_2)

FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,413 (NH), 3,160 (OH)

การสังเคราะห์ fluoro benzylamine derivatives

สำหรับการสังเคราะห์ 3-trifluoromethoxy-4-hydroxy benzylamine, 3-fluoro-4-hydroxy benzylamine และ 3,5-difluoro-4-hydroxy benzylamine ใช้การเกิดปฏิกิริยาผ่าน oxime เหมือนปฏิกิริยาข้างต้น แต่ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา reduction ใช้วิธีของ Ganett ที่ใช้ palladium on carbon เป็นรีเอเจนต์ ปฏิกิริยาเกิดภายใต้สภาวะแก๊สไฮโดรเจนและกรด ปฏิกิริยานี้เป็น direct hydrogenation และหลีกเลี่ยงการ hydrogenation บนวง aromatic ผลิตภัณฑ์ที่ได้เกิดเป็นเกลือ amine hydrochloride derivatives การทำปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 1.1.7



ภาพ 1.1.7 การสังเคราะห์ benzylamine derivatives โดยใช้วิธีของ Nelson และ Ganett

การสังเคราะห์ 3-trifluoro-4-hydroxy benzylamine ใช้ 3-trifluoromethoxy-4-hydroxy-benzaldehyde (1.0 mol eq.) ทำปฏิกิริยาโดยใช้ hydroxylamine hydrochloride เป็นรีเอเจนต์ โดยใช้ น้ำที่มี sodium hydrogen carbonate (1.2 mol eq.) เป็นตัวทำละลาย ทำรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว จากนั้นตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วสกัดด้วย ethyl acetate (3 x 20 mL) แล้วนำชั้นสารละลายอินทรีย์ไปทำการแยกให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน แล้วนำผลิตภัณฑ์ oxime derivatives (1.0 mol eq.) ที่ได้ ไปทำปฏิกิริยา reduction โดยไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อน ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ใช้ palladium on carbon (1.2 mol eq.) เป็นรีเอเจนต์ ทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะแก๊สไฮโดรเจนและกรด โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว นำสารละลายผสมกรองผ่าน celite แล้วระเหยตัวทำละลายออก ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกด้วย ethyl acetate โดยใช้

ethanol เป็น co-solvent ผลิตรภัณฑ์ที่ได้อยู่ในรูปของเกลือ amine hydrochloride ของ 3-trifluoromethoxy-4-hydroxy benzylamine hydrochloride ลักษณะเป็นของแข็งสีขาว คิดเป็นร้อยละ 31 ของผลิตรภัณฑ์

การสังเคราะห์ 3-fluoro-4-hydroxy benzylamine และ 3,5-difluoro-4-hydroxy benzylamine ปฏิกริยาดำเนินเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ 3-trifluoromethoxy-4-hydroxy benzylamine hydrochloride ข้างต้น ผลิตรภัณฑ์ที่ได้อยู่ในรูปเกลือ amine hydrochloride ลักษณะเป็นของแข็งสีขาว 3-fluoro-4-hydroxy benzylamine hydrochloride และ 3,5-difluoro-4-hydroxy benzylamine hydrochloride คิดเป็นร้อยละ 71 และ 76 ของผลิตรภัณฑ์ ตามลำดับ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FT-IR และ Mass spectroscopy

การยืนยันโครงสร้างของ 3-trifluoromethoxy-4-hydroxybenzylamine hydrochloride, 3-fluoro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride และ 3,5-difluoro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FT-IR และ Mass spectrometry

3-trifluoromethoxy-4-hydroxybenzylamine hydrochloride

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 7.45 (1H, s, $J=1.8$ Hz, ArH), 7.33 (1H, dd, ArH), 7.12 (1H, d, $J=8.4$ Hz, ArH), 4.13 (2H, s, CH_2)

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, D_2O) δ (ppm) = 148.8, 129.3, 125.1, 123.7, 118.3, 117.4, 115.4, 42.32

FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,120 (N-H stretching), 1,604 (N-H bending)

HRMS: Calcd. For $\text{C}_8\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_2$: m/z 207.0507, found 208.0635 m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

3-fluoro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 7.22 (1H, dd, $J=11.9, 2.0$ Hz, ArH), 7.11 (1H, dd, $J=8.4, 2.1$ Hz, ArH), 7.03 (1H, t, $J=7.9$ Hz, ArH), 4.12 (2H, s, CH_2)

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, D_2O) δ (ppm) = 152.39, 150.00, 125.75, 125.22, 118.27, 117.05, 42.42

FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,179 (N-H stretching), 1,626 (N-H bending)

HRMS: Calcd. For $\text{C}_7\text{H}_9\text{FON}$: m/z 142.0663, found 142.0644 m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

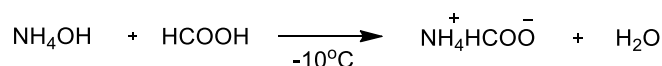
3,5-difluoro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 7.10 (2H, dd, $J = 8, 4$ Hz, ArH), 4.12 (2H, s, CH_2)

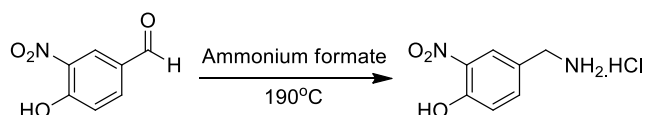
FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,418 (NH stretching), 1,632 (NH bending of amine)

HRMS: Calcd. For $\text{C}_7\text{H}_8\text{F}_2\text{ON}$: m/z 160.0568, found 160.0560 m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

การสังเคราะห์ 3-nitro-4-hydroxybenzylamine



ภาพ 1.1.8 ปฏิกริยาการเตรียม ammonium formate



ภาพ 1.1.9 การสังเคราะห์ 3-nitro-4-hydroxy benzylamine hydrochloride โดยใช้ปฏิกิริยาของ Leuckart

สำหรับการสังเคราะห์ 3-nitro-4-hydroxybenzylamine นั้น ใช้ปฏิกิริยา Leuckart สังเคราะห์ ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ 1) การเตรียม ammonium formate และ 2) การสังเคราะห์ 3-nitro-4-hydroxy benzylamine โดยใช้ ammonium formate เป็นรีเอเจนต์

การเตรียม ammonium formate เตรียมน้ำ ammonium hydroxide (1.0 mol eq.) มาทำให้เย็นที่ 0 °C จากนั้นเติม formic acid (1.0 mol eq.) อย่างช้าๆ ลงใน ammonium hydroxide ที่ถูกทำให้เย็นแล้ว จนกระทั่งสารละลายเป็นกลาง กวนต่ออีก 30 นาที แล้วกวนต่อที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 3 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้วนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเทคนิคพรีชดาเย ได้สารผลิตภัณฑ์ของเกลือ ammonium formate คิดเป็นร้อยละ 92 ของผลิตภัณฑ์

จากนั้นนำ ammonium formate (6.0 mol eq.) ที่เตรียมได้ไปทำปฏิกิริยากับ 3-nitro-4-hydroxy benzaldehyde (1.0 mol eq.) รีฟลักซ์ที่ 190 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นปล่อยสารผสมให้เย็นแล้วเติม conc.HCl (2 mL) แล้วทำรีฟลักซ์อีกครั้งที่ 100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว กรองตะกอนแล้วล้างด้วย ethanol ทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกด้วย ethanol ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวเหลือง คิดเป็นร้อยละ 64 ของผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ FT-IR

3-nitro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride

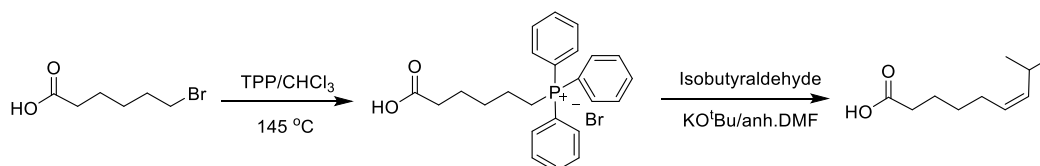
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 8.18 (s, 1H, Ar), 7.71-7.66 (m, 1H, Ar), 7.24-7.21 (m, 1H, Ar), 4.21 (s, 2H, CH_2)

FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,283 (NH), 3,121 (OH), 1,536 and 1,337 (NO_2)

2.2.4) การสังเคราะห์ MCFA

สามารถสังเคราะห์ได้ 2 แนวทางคือ 1) สังเคราะห์จาก Wittig reaction และ 2) ได้มาจากการทำปฏิกิริยา hydrolysis กับ capsaicinoids ที่ได้จากสารสกัดพริก

การสังเคราะห์ MCFA โดย Wittig reaction

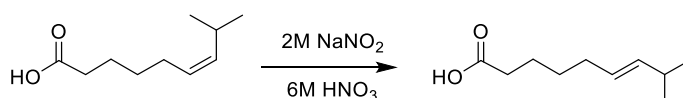


ภาพ 1.1.10 แผนภาพการทำปฏิกิริยา Wittig reaction

นำ 6-bromohexanoic acid (1.0 mol eq.) ทำปฏิกิริยากับ triphenylphosphine (1.2 mol eq.) ที่ 145 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และตกผลึกด้วย triturating agent (anh.CHCl_3 :

dry ether, 1 : 1) แล้วล้างผลึกด้วย chloroform สุดท้ายทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลาย dichloromethane ได้ผลิตภัณฑ์เกลือ tri-phenylphosphine เป็นของแข็งสีขาว คิดเป็นร้อยละ 92 ของผลิตภัณฑ์

ต่อมานำเกลือ tri-phenylphosphine (1.0 mol eq.) ทำปฏิกิริยากับ isobutyraldehyde (1.2 mol eq.) โดยใช้ anh.DMF เป็นตัวทำละลาย กวนที่อุณหภูมิ 0 °C ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายผสมลงใน potassium *t*-butoxide (2.5 mol eq.) ที่มี anh.DMF กวนปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ที่ 0 °C หลังจากนั้นทำการกวนปฏิกิริยา ที่ 25 °C เป็นเวลา 1 คืน เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว เทสารละลายผสมลงในน้ำแข็ง สาร triphenylphosphine oxide จะตกตะกอนลงมา ทำการกรองตะกอนออกด้วยวิธีการกรองแบบสุญญากาศ และล้างด้วยสารละลาย benzene ที่มี 2 M HCl ผสมอยู่ด้วย ในชั้นของสารละลายถูกสกัดด้วย diethyl ether (4 x 25 mL) ล้างชั้นสารละลายอินทรีย์ด้วยสารละลาย brine และทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (50% ethyl acetate/hexane) ได้สารผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ผสมของ *E/Z* isomer



ภาพ 1.1.11 แผนภาพการสังเคราะห์ *E*-isomer ของ MCFA

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก Wittig reaction เป็น *Z*-isomer ดังนั้นจึงต้องทำการเปลี่ยน isomer จาก *Z* เป็น *E* โดยใช้ 2 M sodium nitrite (NaNO_2) (1 mol eq.) ในสภาวะกรด (6 M HNO_3 , 2 mol eq.) ทำปฏิกิริยากับ *E/Z*-isomer MCFA (28 mol eq.) ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อทำปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์แล้วสกัดด้วย diethyl ether จากนั้นล้างสารละลายอินทรีย์ด้วยสารละลาย brine (3 x 20 mL) นำชั้นสารละลายอินทรีย์ระเหยตัวทำละลายออก ผลิตภัณฑ์จะอยู่ในรูปแบบของ nitrosonium cation ลักษณะน้ำมันสีเหลืองอ่อนของ (*E*)-8-methylnon-6-enoic acid ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy

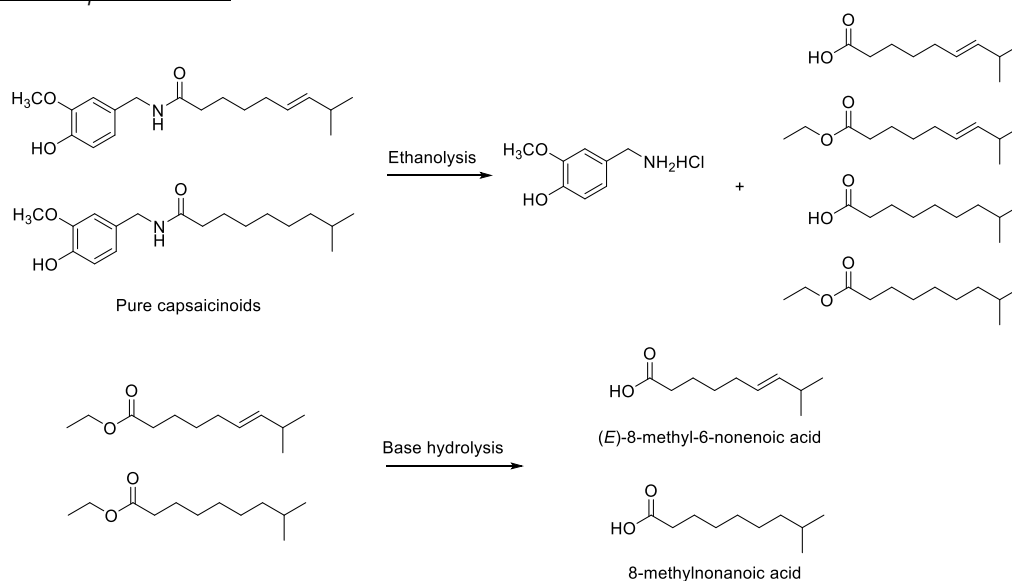
(*Z*)-8-methylnon-6-enoic acid

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5.36 (m, 2H), 2.55 (m, 1H, CH), 2.35 (t, 2H, CH_2 , $J=7.5\text{Hz}$), 2.05 (m, 2H, CH_2), 1.64 (m, 2H, CH_2), 1.38 (m, 2H, CH_2), 0.93 (d, 6H, $2\times\text{CH}_3$, $J=6.8\text{Hz}$)

(*E*)-8-methylnon-6-enoic acid

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5.36 (m, 2H), 2.35 (t, 2H, CH_2 , $J=7.5\text{Hz}$), 2.23 (m, 1H, CH), 2.05 (m, 2H, CH_2), 1.64 (m, 2H, CH_2), 1.38 (m, 2H, CH_2), 0.93 (d, 6H, $2\times\text{CH}_3$, $J=6.8\text{Hz}$)

การสังเคราะห์ MCFA จากการทำปฏิกิริยา hydrolysis จากสารประกอบ capsaicinoids ที่ได้จากกรดเตรียม $\geq 90\%$ capsaicinoids



ภาพ 1.1.12 การสังเคราะห์ MCFA จากปฏิกิริยา hydrolysis ของสารสกัดจากพริก

ปฏิกิริยาเกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา hydrolysis ของ $\geq 90\%$ capsaicinoids (1.0081 กรัม) ภายใต้สภาวะกรด (4 N HCl 50 mL) โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด ทำการสกัดด้วย petroleum ether (2 x 50 mL) นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้ผลิตภัณฑ์ผสมลักษณะน้ำมันสีเหลือง ทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (5-20% ethyl acetate/hexane) ได้ผลิตภัณฑ์ผสมระหว่าง ethyl (E)-8-methyl-6-nonenoate และ ethyl 8-methylnonanoate

ขั้นตอนต่อมา นำผลิตภัณฑ์ผสมระหว่าง ethyl (E)-8-methyl-6-nonenoate และ ethyl 8-methylnonanoate ข้างต้น (0.2320 g) ทำปฏิกิริยา hydrolysis อีกครั้งในสภาวะที่เป็นเบส (4 N KOH 10 mL) โดยใช้ 1,4-dioxane 10 mL และ DMF 10 mL เป็นตัวทำละลาย ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด ทำการเติมปรับ pH=2 ด้วย 6 M HCl แล้วกวนสารละลายต่อ 15 นาที จากนั้นทำการสกัดด้วย petroleum ether (2 x 20 mL) ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (20% ethyl acetate/hexane) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวใสของสารผสมของ (E)-8-methyl-6-nonenoic acid และ 8-methylnonanoic acid ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

(E)-8-methylnon-6-enoic acid

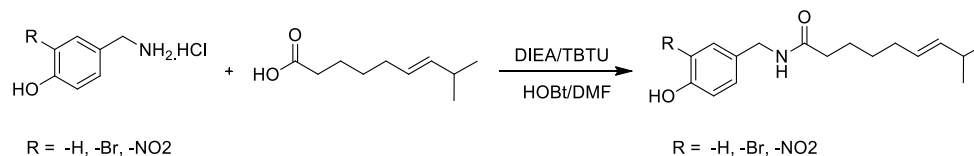
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5.36 (m, 2H), 2.35 (t, 2H, CH_2 , $J=7.5\text{Hz}$), 2.23 (dq, H, CH, $J=13.2\text{Hz}$, $J=6.7\text{Hz}$), 2.00 (q, 2H, CH_2 , $J=6.9\text{Hz}$), 1.64 (m, 2H, CH_2), 1.41 (m, 2H, CH_2), 0.96 (d, 6H, $2\times\text{CH}_3$, $J=6.8\text{Hz}$)

8-methylnonanoic acid

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 2.35 (t, 2H, CH_2 , $J=7.5\text{Hz}$), 1.64 (m, 2H, CH_2), 1.52 (m, 1H, CH), 1.34-1.28 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 1.16 (m, 2H, CH_2), 0.86 (d, 6H, $2\times\text{CH}_3$, $J=6.6\text{Hz}$)

2.2.6) การสังเคราะห์ capsaicin derivatives

การสังเคราะห์ capsaicin derivatives โดยใช้ N,N-diisopropylethylamine (DIEA), 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate (TBTU) และ 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) เป็น coupling agent



ภาพ 1.1.13 การสังเคราะห์ capsaicin derivatives โดยปฏิกิริยา coupling พันธะ amide

เมื่อสังเคราะห์ MCFA จากปฏิกิริยา Wittig แล้ว นำมา coupling กับ benzylamine derivatives ด้วย amide coupling reagent ปฏิกิริยาที่ใช้สังเคราะห์ ใช้ DIEA (2.2 mol eq.) และ TBTU (1.1 mol eq.) เป็นรีเอเจนต์ ทำปฏิกิริยากับ benzylamine derivatives (1.2 mol eq.) ภายใต้สภาวะบรรยากาศแก๊สไนโตรเจน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาและสกัดด้วย ethyl acetate และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (MeOH/CH₂Cl₂, 1:9) และทำการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR และ Mass spectroscopy ของผลิตภัณฑ์ได้แก่ (*E*)-*N*-(4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide, (*E*)-*N*-(3-bromo-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide และ (*E*)-*N*-(3-nitro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นลักษณะน้ำมันใสไม่มีสี ของทั้ง (*E*)-*N*-(4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide และ (*E*)-*N*-(3-bromo-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide และเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อนของ (*E*)-*N*-(3-nitro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide คิดเป็นร้อยละ 34, 38 และ 42 ของผลิตภัณฑ์ ตามลำดับ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FT-IR และ Mass spectrometry

(*E*)-N-(4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.06-7.03 (d, 2H, Ar, *J*=8.4 Hz), 6.78-6.77 (d, 2H, Ar, *J*=4 Hz), 6.01 (s, 1H, NH), 5.17-5.14 (m, 2H, CH₂), 4.31-4.29 (d, 2H, CH₂, *J*=8 Hz), 2.54-2.53 (m, 1H, CH₂), 2.22-2.17 (m, 2H, CH₂), 2.03-1.99 (m, 2H, CH), 1.65-1.62 (m, 2H, CH₂), 1.38-1.32 (m, 2H, CH₂), 0.93-0.91 (d, 6H, CH₃, *J*=8 Hz)

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 138.2, 129.5, 126.6, 115.7, 43.2, 36.8, 35.0, 32.3, 31.1, 31.0, 29.8, 29.4, 25.3, 25.2, 22.8, 21.0

FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,290 (NH), 2,955 (OH), 1,644 (C=O)

HRMS: Calcd. For $C_{17}H_{25}NO_2$: m/z 275.19, found m/z 276.19 ($M+H$)⁺

(*E*)-N-(3-bromo-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.33-7.32 (d, 1H, Ar, *J*=4 Hz), 7.04-7.02 (d, 1H, Ar, *J*=8 Hz), 6.90-6.88 (d, 1H, Ar, *J*=8 Hz), 6.11 (br, 1H, NH), 5.32-5.29 (m, 2H, CH₂), 4.29-4.28 (d, 2H, CH₂, *J*=4 Hz), 2.54-2.52 (m, 1H, CH), 2.22-2.19 (m, 2H, CH₂), 2.04-1.99 (m, 2H, CH₂), 1.65-1.59 (m, 2H, CH₂), 1.38-1.30 (m, 2H, CH₂), 0.91-0.89 (d, 6H, CH₃ *J*=8 Hz)

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 138.2, 131.5, 129.0, 128.9, 126.6, 116.0, 63.2, 42.6, 36.6, 35.0, 31.1, 31.0, 30.4, 29.8, 29.4, 25.3, 21.0

FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,349 (NH), 2,927 (OH), 1,644 (C=O)

HRMS: Calcd. For $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{BrNO}_2$: m/z 353.10, found m/z 354.11 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

(E)-N-(3-nitro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.97-7.96 (d, 1H, Ar, $J=2$ Hz), 7.52-7.50 (d, 1H, Ar, $J=8$ Hz), 7.11-7.09 (d, 1H, $J=8$ Hz), 6.01 (br, 1H, NH), 5.34-5.31 (m, 2H, CH_2), 4.39-4.38 (d, 2H, $J=4$ Hz), 2.23-2.20 (m, 1H, CH), 1.97-1.96 (m, 2H, CH_2), 1.65-1.61 (m, 2H, CH_2), 1.38-1.34 (m, 2H, CH_2), 1.23 (s, 2H, CH_2), 0.94-0.90 (d, 6H, CH_3 , $J=16$ Hz)

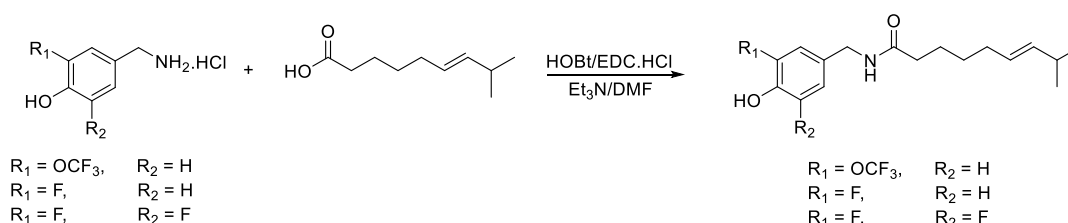
¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 138.2, 126.5, 123.8, 120.6, 115.5, 63.2, 42.3, 36.7, 36.5, 35.0, 32.3, 31.0, 30.4, 29.8, 29.4, 25.3, 25.1, 22.8, 21.0

FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,311 (NH), 2,962 (OH), 1,644 (C=O), 1,545 และ 1,318 (NO_2)

HRMS: Calcd. For $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$: m/z 320.17, found m/z 321.18 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

การสังเคราะห์ capsaicin derivatives โดยใช้ HOBt และ (3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC.HCl) เป็น coupling agent

นำสารผสม MCFA ที่ได้การ hydrolysis จาก capsaicinoids (1.2 mol eq.) มาทำปฏิกิริยา coupling พันธะ amide กับ benzylamine derivatives (1.0 mol eq.) โดยใช้ EDC.HCl (2.4 mol eq.) และ HOBt (2.4 mol eq.) เป็นรีเอเจนต์ โดยใช้ anh.DMF เป็นตัวทำละลาย ทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพ 1.1.14 การสังเคราะห์ capsaicin derivatives โดยใช้ HOBt และ EDC.HCl เป็น coupling reagent

เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว ทำให้เจือจางด้วยสารละลาย brine และสกัดด้วย ethyl acetate (3 x 20 mL) จากนั้นล้างชั้นสารละลายอินทรีย์ด้วย 10% citric acid (3 x 20 mL) และ 0.5 M NaHCO_3 (3 x 20 mL) ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์จะเป็นสารผสมระหว่าง capsaicin และ dihydrocapsaicin derivatives ดังนั้นจึงนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC จะได้ผลิตภัณฑ์ capsaicin derivatives บริสุทธิ์ ผลิตภัณฑ์ (E)-N-(4-hydroxy-3-(trifluoromethoxy)benzyl)-8-methyl-6-nonenamide, (E)-N-(3-fluoro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide และ (E)-N-(3,5-difluoro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide มีลักษณะเป็น น้ำมันใสไม่มีสีทั้ง 3 ผลิตภัณฑ์ คิดเป็นร้อยละ 16, 7 และ 20 ของผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FT-IR และ Mass spectrometry

(E)-N-(3-trifluoromethoxy-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.10 (2H, m, ArH), 6.96 (1H, m, Ar), 5.74 (1H, s, NH), 5.33 (2H, m, CH=CH), 4.37 (2H, d, *J* = 5.8 Hz, CH₂), 2.21 (3H, m, CH₂,CH), 1.99 (2H, m, CH₂), 1.64 (2H, m, CH₂), 1.38 (2H, p, *J* = 7.6 Hz, CH₂), 0.95 (6H, d, *J* = 6.8 Hz, CH₃, CH₃)

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 173.23, 147.47, 138.29, 131.31, 127.64, 126.56, 121.08, 119.54, 117.73, 42.83, 36.78, 33.32, 31.11, 29.37, 25.35, 22.78

FT-IR (KBr) cm⁻¹: 3,279 (N-H stretching), 1,623 (N-H bending).

HRMS: Calcd. For C₁₈H₂₄F₃NO₃: *m/z* 359.17, found 360.1832 *m/z* (M+H)⁺

(E)-N-(3-fluoro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide;

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6.97 (1H, dd, *J* = 12, 4 Hz, ArH), 6.94-6.87 (2H, m, ArH), 5.42-5.26 (2H, m, CH=CH), 4.33 (2H, d, *J* = 4 Hz), 2.26-2.16 (3H, m, CH₂, CH), 1.98 (2H, q, *J* = 8 Hz, CH₂), 1.69-1.60 (2H, m, CH₂), 1.41-1.34 (2H, m, CH₂), 0.94 (6H, d, *J* = 4 Hz, CH₃)

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 173.43, 152.42, 150.05, 143.46, 138.29, 131.08, 126.57, 124.15, 117.71, 115.34, 42.96, 36.76, 32.28, 31.10, 29.37, 25.34, 22.78

HRMS: Calcd. For C₁₇H₂₄FNO₂Na: *m/z* 316.17, found *m/z* 316.1683 (M+Na)⁺

(E)-N-(3,5-difluoro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide;

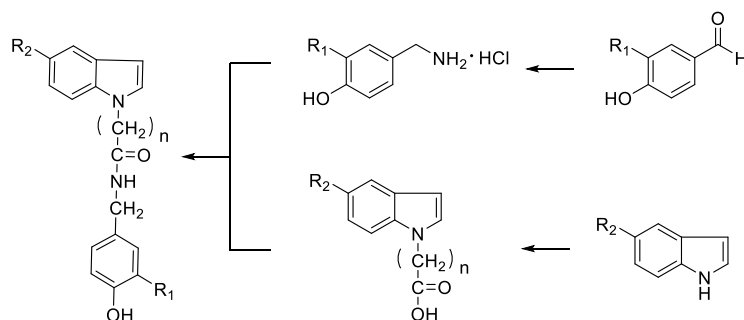
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6.75 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, ArH), 5.48-5.20 (2H, m, CH=CH), 4.31 (2H, d, *J* = 5.6 Hz, CH₂), 2.31-2.15 (3H, m, CH, CH₂), 2.02-1.94 (2H, m, CH₂), 1.72-1.59 (2H, m, CH₂), 1.42-1.34 (2H, m, CH₂), 0.94 (6H, d, *J* = 6.8 Hz)

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 173.75, 153.34, 150.86, 126.53, 110.83, 42.67, 36.69, 32.28, 31.10, 29.37, 25.30, 22.77

HRMS: Calcd. For C₁₇H₂₃F₃NO₂: *m/z* 330.1675, found *m/z* 330.1641 (M+H)⁺

2.3) การปรับปรุงให้มีความเสถียรผ่านการปรับปรุงในส่วน fatty acid residue และ aromatic moiety

การสังเคราะห์ capsaicin derivatives ที่ปรับปรุงในส่วน fatty acid residue และ aromatic moiety แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ 1) การสังเคราะห์ส่วน aromatic ให้เป็น amine derivatives, 2) การสังเคราะห์ส่วน MCFA และ 3) การทำปฏิกิริยา coupling ระหว่างส่วน aromatic moiety และ MCFA ด้วย amide coupling agent



ภาพ 1.1.15 การสังเคราะห์ capsaicin derivatives ปรับปรุงในส่วน fatty acid residue และ aromatic moiety

2.3.1) การสังเคราะห์ส่วน aromatic ให้เป็น amine derivatives

การสังเคราะห์ vanillyl amine

เตรียมสารละลายผสมของ vanillin (9.86 mmol), hydroxylamine (11.83 mmol) และ sodium acetate (11.83 mmol) ในสารละลายน้ำ และกวนสารละลายผสม 80 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้เย็นลงมาที่อุณหภูมิห้อง จะเกิดตะกอนของสารผลิตภัณฑ์และกรองตะกอนที่เกิดขึ้น และล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง จะได้ vanillyl oxime คิดเป็นร้อยละ 65 ของผลิตภัณฑ์ มีค่า R_f = 0.17 (CH₂Cl₂) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR

Vanillyl oxime

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 8.07 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.00 (dd, *J*₁ = 8.2, *J*₂ = 1.9 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H)

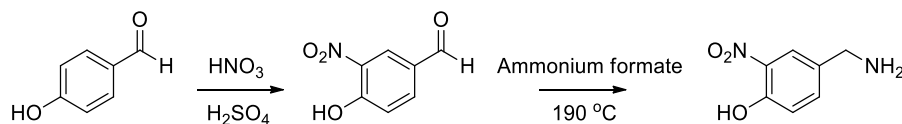
จากนั้นนำ vanillyl oxime (5.98 mmol) มาทำ hydrogenation ด้วย 5%Pd/C 0.40 กรัม ที่ละลายใน EtOH 50 มิลลิลิตร ภายใต้บรรยากาศแก๊สไฮโดรเจนและเติมกรด HCl 5 มิลลิลิตร โดยเติมแบบต่อเนื่อง 10 นาที ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 4 ชั่วโมง นำสารละลายผสมกรองผ่าน celite plug และนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกและทำการตกตะกอนใน acetone กรองและล้างตะกอนหลายๆครั้ง ทำการระเหยตัวทำละลายออก จะได้สาร 4-hydroxy-3-methoxybenzylamine hydrochloride คิดเป็นร้อยละ 91 ของสารผลิตภัณฑ์ มีค่า R_f = 0.31 (25% MeOH :CH₂Cl₂) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR และ FT-IR

4-hydroxy-3-methoxybenzylamine hydrochloride

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 9.22 (s, 1H), 8.43 (s, 3H), 7.19 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.85 (dd, *J*₁ = 8.1, *J*₂ = 2.0 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.86 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H).

FT-IR (ATR) cm^{-1} : 3,163 (N-H stretching), 3,024 (C-H stretching), 1,611 (N-H bending), 1,258 และ 1,033 (C-O stretching)

การสังเคราะห์ 3-nitro-4-hydroxybenzylamine



ภาพ 1.1.16 การสังเคราะห์ 3-nitro-4-hydroxybenzylamine ด้วย Leuckart reaction

ทำการสังเคราะห์โดยละลาย 4-hydroxybenzaldehyde (8.19 mmol) ในกรด sulfuric acid (2 mL) และทำให้เย็นด้วยอ่างน้ำแข็ง จากนั้นค่อยๆเติมสารละลายผสมระหว่าง 0.43 mL nitrating solution (9.01 mmol ของ 37% sulfuric acid และ 9.02 mmol ของ 65% nitric acid) กวนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และเทสารละลายผสมลงในน้ำแข็งและกวนจนเกิดตะกอน ทำการกรองตะกอนที่เกิดขึ้นและล้างด้วย ethanol เย็น จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกด้วย ethanol จะได้สารผลิตภัณฑ์ของ 3-nitro-4-hydroxybenzaldehyde จากนั้นนำมาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเอมีนด้วยการนำ 3-nitro-4-hydroxybenzaldehyde (1.19 mmol) มาทำปฏิกิริยากับ ammonium formate (5.98 mmol) ที่อุณหภูมิ 190 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเติม กรด HCl (2 mL) และทำการ reflux ที่ 100 °C อีก 1 ชั่วโมง จะได้ตะกอนของสารผลิตภัณฑ์ 3-nitro-4-hydroxybenzylamine เป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็นร้อยละ 64 ของสารผลิตภัณฑ์ มีค่า $R_f = 0.07$ (10% MeOH/CH₂Cl₂) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR และ FT-IR

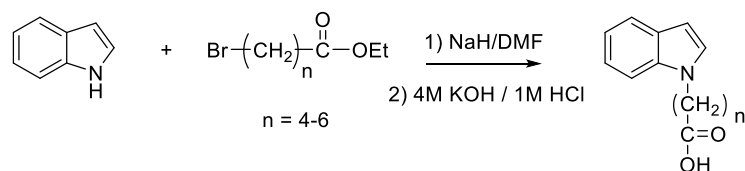
3-nitro-4-hydroxybenzylamine

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm) = 8.25 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.74 (dd, $J_1 = 8.7$, $J_2 = 2.3$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.23 (s, 2H)

FT-IR (ATR) cm^{-1} : 3,281 (N-H stretching), 3,089 (C-H stretching), 1,631 (N-H bending), 1,534 and 1,332 (NO₂ stretching), 1,240 (C-O stretching)

2.3.2) การสังเคราะห์ส่วน MCFA derivatives

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ indole acetic acid



ภาพ 1.1.17 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ indole acetic acid ด้วย alkylation และ hydrolysis

ทำการสังเคราะห์โดยละลาย Indole (1.0 mol eq.) ใน anh.DMF จากนั้นเติม NaH (17.1 mmol) กวนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ลดอุณหภูมิของสารละลายผสมลงมาที่ 0 °C และเติมสาร ethyl-5-bromopentanoate หรือ ethyl-6-bromohexanoate หรือ ethyl-7-bromoheptanoate (1.2 mol eq.)

กวนสารละลายที่ 0 °C 1 ชั่วโมงและทำปฏิกิริยาต่ออีก 20 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม สารละลาย 4M KOH 4 mL กวนสารละลายผสม 1 ชั่วโมง ทำการเติมสารละลายกรด 1M HCl จนได้ pH 2 จากนั้นทำการสกัดด้วย dichloromethane (2x50 mL), brine (3x25 mL) และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (25% EtOAc/Hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นน้ำมันสีน้ำตาล ของ indole acetic acid analogues

5-(1*H*-indol-1-yl)pentanoic acid เป็นน้ำมันสีน้ำตาล คิดเป็นร้อยละ 34 ของสารผลิตภัณฑ์ มีค่า $R_f = 0.44$ (50% EtOAc/Hexane) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FT-IR และ Mass spectrometry

5-(1*H*-indol-1-yl)pentanoic acid

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.02 (s, 1H), 7.54 (d, $J = 7.0$, 1H), 7.46 (dd, $J_1 = 8.3$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.12 (td, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 1.2$ Hz, 1H), 7.01 (td, $J_1 = 6.9$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 6.42 (dd, $J_1 = 3.0$, $J_2 = 0.8$ Hz, 1H), 4.17 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.23 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.82 – 1.70 (m, 2H), 1.52-1.40 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 174.21, 135.62, 128.49, 128.07, 120.87, 120.36, 118.77, 109.68, 100.36, 45.12, 40.14, 33.16, 29.28, 21.85

FT-IR (ATR) cm^{-1} : 3,048 (C-H stretching), 1,699 (C=O stretching), 1,312 (C-O stretching).

6-(1*H*-indol-1-yl)hexanoic acid เป็นน้ำมันสีน้ำตาล คิดเป็นร้อยละ 66 ของสารผลิตภัณฑ์ มีค่า $R_f = 0.25$ (25% EtOAc/Hexane) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FT-IR และ Mass spectrometry

6-(1*H*-indol-1-yl)hexanoic acid

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.00 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J_1 = 8.3$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.12 (td, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 7.00 (td, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 6.41 (dd, $J = 3.0$, 0.8 Hz, 1H), 4.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.17 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.80 – 1.68 (m, 2H), 1.58 – 1.45 (m, 2H), 1.31 – 1.17 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 174.31, 135.60, 128.50, 128.07, 120.86, 120.36, 118.74, 109.66, 100.31, 45.29, 33.55, 29.56, 25.84, 24.08

FT-IR (ATR) cm^{-1} : 3,048 (C-H stretching), 1,700 (C=O stretching), 1,312 (C-O stretching).

7-(1*H*-indol-1-yl)heptanoic acid เป็นน้ำมันสีน้ำตาล คิดเป็นร้อยละ 63 ของสารผลิตภัณฑ์ มีค่า $R_f = 0.25$ (25% EtOAc/Hexane) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FT-IR และ Mass spectrometry

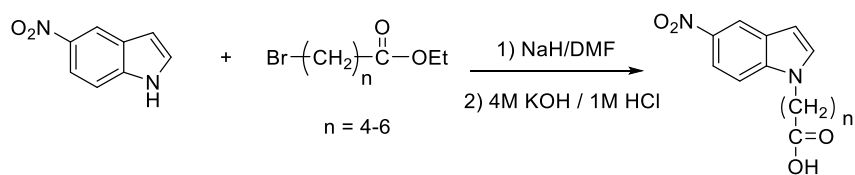
7-(1*H*-indol-1-yl)heptanoic acid

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 11.97 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J = 8.3$, 1.0 Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.11 (td, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 7.00 (td, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 6.41 (dd, $J = 3.1$, 0.8 Hz, 1H), 4.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.17 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.79 – 1.67 (m, 2H), 1.53 – 1.39 (m, 2H), 1.36 – 1.16 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 174.35, 135.60, 128.48, 128.05, 120.83, 120.34, 118.71, 109.64, 100.29, 45.32, 33.50, 29.64, 28.05, 25.93, 24.34

FT-IR (ATR) cm^{-1} : 3,048 (C-H stretching), 1,703 (C=O stretching), 1,305 (C-O stretching)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ nitroindole acetic acid



ภาพ 1.1.18 การสังเคราะห์อนุพันธ์ nitroindole acetic acid ด้วย alkylation and hydrolysis

ทำการสังเคราะห์โดยละลาย 5-nitroindole (1.0 mol eq.) ใน anh.DMF จากนั้นเติม NaH (3.0 mol eq.) กวนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ลดอุณหภูมิของสารละลายผสมลงมาที่ 0 °C และเติมสาร ethyl-5-bromopentanoate, ethyl-6-bromohexanoate หรือ ethyl-7-bromoheptanoate (1.2 mol eq.) กวนสารละลายที่ 0 °C 1 ชั่วโมงและทำปฏิกิริยาต่ออีก 20-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม สารละลาย 4M KOH 4 mL กวนสารละลายผสม 1 ชั่วโมง ทำการเติมสารละลายกรด 1M HCl จนได้ pH 2 จะได้ตะกอนของสารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลืองของ nitroindole acetic acid

5-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)pentanoic acid เป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็นร้อยละ 96 ของสารผลิตภัณฑ์ มีค่า $R_f = 0.56$ (10% MeOH/CH₂Cl₂) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FT-IR และ Mass spectrometry

5-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)pentanoic acid

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 8.58 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.11 (dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 2.3$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.68 (dd, $J_1 = 3.2$, $J_2 = 0.7$ Hz, 1H), 4.20 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.38 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.99 – 1.86 (m, 2H), 1.70 – 1.59 (m, 2H)

¹³C-NMR: (100 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 178.01, 141.77, 138.90, 130.96, 127.92, 118.46, 117.41, 109.26, 104.30, 46.66, 33.29, 29.64, 22.05

FT-IR (ATR) cm⁻¹: 3,109 (C-H stretching), 1,698 (C=O stretching), 1,503 and 1,329 (NO₂ stretching), 1,315 (C-O stretching)

HRMS: calcd for C₁₃H₁₄N₂O₄Na: m/z 285.0849, found m/z 285.0846, [M+Na]⁺

6-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)hexanoic acid เป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็นร้อยละ 94 ของสารผลิตภัณฑ์ มีค่า $R_f = 0.56$ (12.5% MeOH/CH₂Cl₂) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FT-IR และ Mass spectrometry

6-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)hexanoic acid

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 8.58 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.11 (dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 2.2$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.24 (t, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 4.18 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.35 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.95 – 1.85 (m, 2H), 1.74 – 1.61 (m, 2H), 1.44 – 1.31 (m, 2H)

¹³C-NMR: (100 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 178.55, 141.73, 138.93, 131.01, 127.88, 118.44, 117.37, 109.29, 104.19, 46.73, 33.63, 30.04, 26.40, 24.24

FT-IR (ATR) cm⁻¹: 1,699 (C=O stretching), 1,506 and 1,320 (NO₂ stretching), 1,288 (C-O stretching).

HRMS: calcd for $C_{14}H_{16}N_2O_4Na$: m/z 299.1004, found m/z 299.1002, $[M+Na]^+$

7-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)heptanoic acid เป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็นร้อยละ 78 ของสารผลิตภัณฑ์ มีค่า $R_f = 0.46$ (10% MeOH/ CH_2Cl_2) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค 1H -NMR, ^{13}C -NMR, FT-IR และ Mass spectrometry

7-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)heptanoic acid

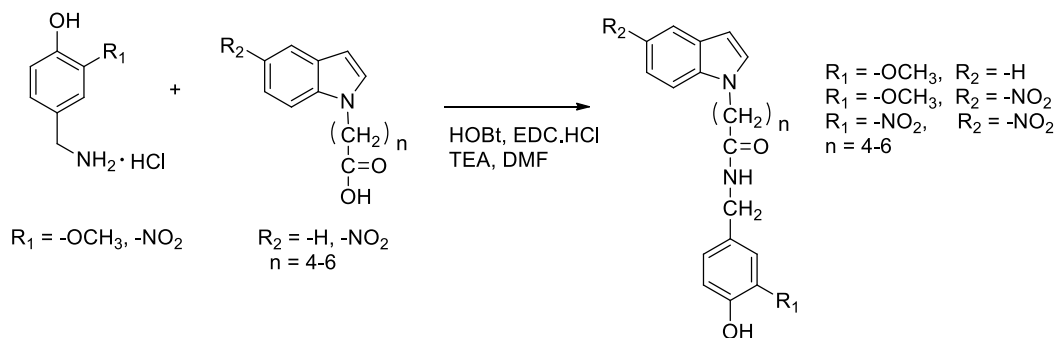
1H -NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 8.58 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.11 (dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 2.2$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J_1 = 3.2$, $J_2 = 0.8$ Hz, 1H), 4.16 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.33 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.93 – 1.79 (m, 2H), 1.67 – 1.57 (m, 2H), 1.45 – 1.26 (m, 4H)

^{13}C -NMR: (100 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 178.91, 141.69, 138.94, 131.01, 127.85, 118.42, 117.32, 109.29, 104.11, 46.88, 33.73, 30.11, 28.64, 26.64, 24.50

FT-IR (ATR) cm^{-1} : 1704 (C=O stretching), 1,508 and 1,335 (NO_2 stretching), 1,297 (C-O stretching).

HRMS: calcd. for $C_{15}H_{18}N_2O_4Na$: m/z 313.1163, found m/z 313.1159, $[M+Na]^+$

2.3.3) การทำปฏิกิริยา coupling ระหว่างส่วน aromatic moiety และ MCFA ด้วย amide coupling agent



ภาพ 1.1.19 การสังเคราะห์อนุพันธ์ capsaicin

การสังเคราะห์อนุพันธ์ capsaicin สังเคราะห์โดยละลาย Indole acetic acid analogues (1.0 mol eq.) ในสารละลาย anh. DMF จากนั้นลดอุณหภูมิของสารละลายลงมาที่ 0 °C ด้วยอ่างน้ำแข็ง และเติม EDC.HCl (1.2 mol eq.) และ HOBT (1.2 mol eq.) กวนสารละลายผสมที่ 0 °C เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายผสมระหว่าง vanillylamine hydrochloride (1.2 mol eq.) และ triethylamine (3 mol eq.) ที่ละลายอยู่ใน anh. DMF ทำการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการเจือจางด้วยสารละลาย brine และสกัดด้วย ethyl acetate นำชั้นสารละลายอินทรีย์มาสกัดด้วยสารละลาย 10% citric acid และ 0.5 M $NaHCO_3$ และกำจัดน้ำด้วย sodium sulfate จะได้สารผลิตภัณฑ์ของอนุพันธ์ capsaicin

N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(1*H*-indol-1-yl)pentanamide ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (50%EtOAc:Hexane, $R_f = 0.25$) เป็นของแข็งสีขาว คิดเป็นร้อยละ 45 ของสารผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค 1H -NMR, ^{13}C -NMR, FT-IR และ Mass spectrometry

N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(1*H*-indol-1-yl)pentanamide

¹H-NMR (400 MHz, Me-*thanol-d*₄): δ (ppm) = 7.52 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 7.11 (td, J_1 = 8.2, J_2 = 7.0 Hz, 1H), 7.00 (td, J_1 = 7.5, J_2 = 7.0 Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.68 (dd, J_1 = 7.8, J_2 = 1.1 Hz, 1H), 6.40 (dd, J_1 = 7.6, J_2 = 0.9 Hz, 1H), 4.22 (s, 2H), 4.16 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.22 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.89 – 1.77 (m, 2H), 1.68 – 1.55 (m, 2H)

¹³C-NMR: (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ (ppm) = 175.46, 149.00, 146.80, 137.42, 131.45, 130.14, 128.92, 122.21, 121.64, 121.43, 120.01, 116.12, 112.48, 110.36, 101.75, 56.32, 46.73, 43.98, 36.56, 30.86, 24.40

FT-IR (ATR) cm⁻¹: 3,278 (N-H stretching), 3,095 (C-H stretching), 1,645 (C=O stretching), 1,622 (N-H bending), 1,513 (C=C stretching), 1,241 and 1,118 (C-O stretching)

HRMS: calcd. for C₂₁H₂₄N₂O₃Na: m/z 375.1678, found m/z 375.1679 [M+Na]⁺

N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(1*H*-indol-1-yl)hexanamide ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (2% MeOH:CH₂Cl₂, R_f = 0.26) เป็นของแข็งสีขาว คิดเป็นร้อยละ 41 ของสารผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FT-IR และ Mass spectrometry

***N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(1*H*-indol-1-yl)hexanamide**

¹H-NMR (400 MHz, Me-*thanol-d*₄): δ (ppm) = 7.52 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.11 (td, J_1 = 7.6, J_2 = 1.0 Hz, 1H), 6.99 (J_1 = 7.6, J_2 = 0.9 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.74 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.69 (dd, J_1 = 8.1, J_2 = 1.9 Hz, 1H), 6.39 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 4.22 (s, 2H), 4.14 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.17 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.87 – 1.78 (m, 2H), 1.68 – 1.57 (m, 2H), 1.35 – 1.22 (m, 2H)

¹³C-NMR: (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ (ppm) = 175.73, 149.0, 146.9, 137.5, 131.53, 130.1, 128.97, 122.16, 121.63, 121.50, 119.95, 116.14, 112.64, 110.36, 101.65, 56.38, 46.84, 43.98, 36.88, 31.02, 27.43, 26.59

FT-IR (ATR) cm⁻¹: 3,316 (N-H stretching), 3,045 (C-H stretching), 1,651 (C=O stretching), 1,626 (N-H bending), 1,511 (C=C stretching), 1,239 and 1,121 (C-O stretching)

HRMS: calcd. for C₂₂H₂₆N₂O₃Na: m/z 389.1844, found m/z 389.1836 [M+Na]⁺

N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(1*H*-indol-1-yl)heptanamide ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (50% EtOAc:Hexane, R_f = 0.18) เป็นของแข็งสีขาว คิดเป็นร้อยละ 78 ของสารผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FT-IR และ Mass spectrometry

***N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(1*H*-indol-1-yl)heptanamide**

¹H-NMR (400 MHz, Me-*thanol-d*₄): δ (ppm) = 7.52 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.35 (dd, J_1 = 8.2, J_2 = 1.0 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 7.11 (td, J_1 = 7.6, J_2 = 1.0 Hz, 1H), 6.99 (td, J_1 = 7.5, J_2 = 1.0 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.70 (dd, J_1 = 8.1, J_2 = 1.8 Hz, 1H), 6.40 (dd, J_1 = 3.1, J_2 = 0.9 Hz, 1H), 4.23 (s, 2H), 4.13 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 2.17 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.84 – 1.75 (m, 2H), 1.63 – 1.52 (m, 2H), 1.37 – 1.23 (m, 4H)

¹³C-NMR: (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ (ppm) = 175.90, 148.98, 146.81, 137.45, 131.55, 130.12, 128.97, 122.13, 121.61, 121.45, 119.94, 116.09, 112.53, 110.37, 101.60, 56.35, 46.91, 43.96, 36.94, 31.19, 29.78, 27.57, 26.89

FT-IR (ATR) cm⁻¹: 3,279 (N-H stretching), 3,054 (C-H stretching), 1,637 (C=O stretching), 1,599 (N-H bending), 1,510 (C=C stretching), 1,234 and 1,122 (C-O stretching)

HRMS: calcd. for C₂₃H₂₈N₂O₃Na: m/z 403.1999, found m/z 403.1992, [M+Na]⁺

N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)pentanamide ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (100% EtOAc, R_f = 0.48) เป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็นร้อยละ 73 ของสารผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FT-IR และ Mass spectrometry

***N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)pentanamide**

¹H-NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆): δ (ppm) = 8.53 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.04 (dd, *J* = 9.1, 2.2 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.74 – 6.64 (m, 3H), 4.28 – 4.20 (m, 4H), 3.75 (s, 3H), 2.24 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.91 – 1.79 (m, 2H), 1.69 – 1.56 (m, 2H)

¹³C-NMR: (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ (ppm) = 175.27, 148.98, 146.85, 142.63, 140.28, 132.78, 131.46, 129.23, 121.47, 118.72, 117.69, 116.11, 112.54, 110.69, 104.73, 56.32, 47.23, 44.00, 36.40, 30.79, 24.23

FT-IR (ATR) cm⁻¹: 3,273 (N-H stretching), 3,100 (C-H stretching), 1,646 (C=O stretching), 1,623 (N-H bending), 1,509 and 1,328 (NO₂ stretching), 1,282 (C-O stretching)

HRMS: calcd for C₂₁H₂₃N₃O₅Na: m/z 420.1539, found m/z 420.1530, [M+Na]⁺

N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)hexanamide ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (100% EtOAc, R_f = 0.46) เป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็นร้อยละ 72 ของสารผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FT-IR และ Mass spectrometry

***N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)hexanamide**

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ (ppm) = 8.52 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.04 (dd, *J*₁ = 9.1, *J*₂ = 2.3 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J*₁ = 3.3, *J*₂ = 0.9 Hz, 1H), 4.22 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 4.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 2.18 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.90 – 1.78 (m, 2H), 1.71 – 1.58 (m, 2H), 1.35 – 1.21 (m, 2H)

¹³C-NMR: (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ (ppm) = 175.60, 148.96, 146.84, 142.56, 140.30, 132.81, 131.52, 129.18, 121.48, 118.72, 117.65, 116.12, 112.60, 110.69, 104.67, 56.35, 47.33, 43.97, 36.77, 30.97, 27.29, 26.47

FT-IR (ATR) cm⁻¹: 3,277 (N-H stretching), 1,634 (C=O stretching), 1,611 (N-H bending), 1,507 and 1,336 (NO₂ stretching), 1,272 (C-O stretching)

HRMS: calcd for C₂₂H₂₅N₃O₅Na: m/z 434.1683, found m/z 434.1686, [M+Na]⁺

N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)heptanamide ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (100% EtOAc, R_f = 0.53) เป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็นร้อยละ 65 ของสารผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FT-IR และ Mass spectrometry

***N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)heptanamide**

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4): δ (ppm) = 8.52 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.05 (dd, J_1 = 9.1, J_2 = 9.12.3 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.23 (s, 2H), 4.19 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 2.17 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.85 – 1.77 (m, 2H), 1.62 – 1.54 (m, 2H), 1.39 – 1.21 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101 MHz, Chloroform- d) δ (ppm) = 175.83, 148.97, 146.82, 142.57, 140.31, 132.82, 131.58, 129.19, 121.46, 118.72, 117.65, 116.12, 112.59, 110.69, 104.64, 56.37, 47.41, 43.96, 36.90, 31.11, 29.68, 27.47, 26.81

FT-IR (ATR) cm^{-1} : 3,476 (-OH stretching), 3,288 (N-H stretching), 1,635 (C=O stretching), 1,612 (N-H bending), 1,506 and 1,336 (NO_2 stretching), 1,262 (C-O stretching)

HRMS: calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{NaO}_5$: m/z 448.1849, found m/z 448.1843, $[\text{M}+\text{Na}]^+$

N-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-5-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)pentanamide ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (100% EtOAc, R_f = 0.43) เป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็นร้อยละ 35 ของสารผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FT-IR และ Mass spectrometry

***N*-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-5-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)pentanamide**

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6): δ (ppm) = 8.56 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.04 (dd, J_1 = 9.1, J_2 = 2.3 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.60 (dd, J_1 = 8.6, J_2 = 2.2 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.75 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 4.37 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.34 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.29 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.99 – 1.84 (m, 2H), 1.72 – 1.60 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, Acetone- d_6) δ (ppm) = 172.91, 154.23, 142.24, 139.77, 137.68, 133.34, 132.77, 128.71, 124.22, 120.63, 118.37, 117.21, 110.70, 104.40, 47.00, 42.16, 35.90, 30.50, 23.55

FT-IR (ATR) cm^{-1} : 3,302 (N-H stretching), 3,036 (N-H stretching), 1,641 (C=O stretching), 1,629 (N-H bending), 1,536 and 1,330 (NO_2 stretching), 1,261 (C-O stretching)

HRMS: calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}$: m/z 435.1277, found m/z 435.1275, $[\text{M}+\text{Na}]^+$

N-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-6-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)hexanamide ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (100% EtOAc, R_f = 0.46) เป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็นร้อยละ 35 ของสารผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FT-IR และ Mass spectrometry

***N*-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-6-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)hexanamide**

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6): δ (ppm) = 8.56 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.04 (dd, J_1 = 9.1, J_2 = 2.3 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.60 (dd, J_1 = 8.6, J_2 = 2.3 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.74 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 4.37 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 4.32 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.22 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.94 – 1.83 (m, 2H), 1.74 – 1.61 (m, 2H), 1.37 – 1.33 (m, 2H)

¹³C-NMR: (100 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) = 173.14, 154.22, 142.08, 139.79, 137.64, 133.42, 132.82, 128.70, 124.14, 120.64, 118.35, 117.21, 110.73, 104.35, 47.06, 42.12, 36.33, 30.68, 27.01, 25.78

FT-IR (ATR) cm⁻¹: 3,262 (N-H stretching), 3,099 (N-H stretching), 1,630 (C=O stretching), 1,579 (N-H bending), 1,532 and 1,325 (NO₂ stretching), 1,251 (C-O stretching)

HRMS: calcd for C₂₁H₂₂N₄O₆Na: m/z 449.1435, found m/z 449.1432, [M+Na]⁺

N-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-7-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)heptanamide ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (100% EtOAc, R_f = 0.55) เป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็นร้อยละ 30 ของสารผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FT-IR และ Mass spectrometry

***N*-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-7-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)heptanamide**

¹H-NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆): δ (ppm) = 8.56 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.05 (dd, *J*₁ = 9.1, *J*₂ = 2.3 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J*₁ = 8.6, *J*₂ = 2.2 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.37 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.21 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.93 – 1.81 (m, 2H), 1.66 – 1.54 (m, 2H), 1.40 – 1.29 (m, 4H).

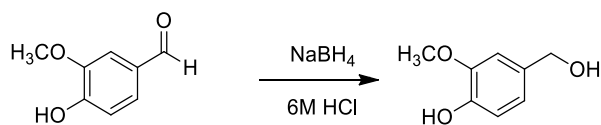
¹³C-NMR: (100 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) = 173.26, 154.20, 142.11, 139.80, 137.66, 133.47, 132.78, 128.69, 124.14, 120.61, 118.36, 117.21, 110.72, 104.36, 47.13, 42.12, 36.41, 30.75, 29.36, 27.13, 26.13

FT-IR (ATR) cm⁻¹: 3,296 (N-H stretching), 3,108 (N-H stretching), 1,642 (C=O stretching), 1,629 (N-H bending), 1,536 and 1,315 (NO₂ stretching), 1,247 (C-O stretching)

HRMS: calcd for C₂₂H₂₄N₄O₆Na: m/z 463.1585, found m/z 463.1588, [M+Na]⁺

3) การพัฒนา capsinoids โดยปรับปรุงให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้นในส่วน fatty acid residue

3.1) การสังเคราะห์ capsiate

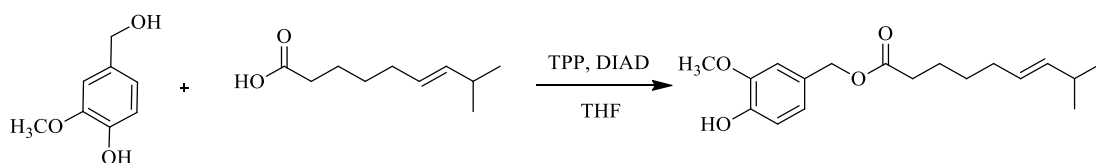


ภาพ 1.1.20 การสังเคราะห์ 3-methoxy-4-hydroxyl benzyl alcohol

ทำการสังเคราะห์โดยละลาย 3-Methoxy-4-hydroxybenzaldehyde (1.45 mmol) ใน ethanol (5 mL) และทำให้เย็นด้วยอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลายผสมของสาร reducing agent (1.74 mmol ของ sodium borohydride (NaBH_4) และ 5 mL ของ 0.01M NaOH) จากนั้นปล่อยให้อุณหภูมิของสารละลายผสมมาสู่อุณหภูมิห้องและกวนเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปรับให้เป็นกรดด้วย 6M HCl จะได้ตะกอนของแข็งสีขาว กรองตะกอนที่เกิดขึ้น และทำการสกัดสารละลายด้วย ethyl acetate (3 x 20 mL) เมื่อระเหยตัวทำละลายออกและตกผลึกด้วย dichloromethane จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีน้ำตาลอ่อน คิดเป็นร้อยละ 84 ของสารผลิตภัณฑ์ มีค่า $R_f = 0.43$ (9:1 CH_2Cl_2 :MeOH); ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

3-methoxy-4-hydroxyl benzyl alcohol

$^1\text{H-NMR}$ 400 MHz (CDCl_3): δ (ppm) = 6.93-6.83 (m, 3H), 4.60 (d, 2H, $J=5.6$ Hz), 3.90 (s, 3H)



ภาพ 1.1.21 การสังเคราะห์ capsiate ด้วยปฏิกิริยา Mitsunobu's

ทำการสังเคราะห์เตรียมสารละลายผสมของอนุพันธ์ aromatic benzyl alcohol (0.268 mmol) 85% (*E*)-8-methyl-6-nonenic acid (0.224 mmol) และ triphenylphosphine (0.353 mmol) ในสารละลาย anhydrous THF (3 mL) กวนสารละลายผสมที่ 0°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม DIAD (0.353 mmol) และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการระเหยตัวทำละลายออกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (30:70 EtOAc:Hexane) ได้สารผลิตภัณฑ์ผสมระหว่าง (*E*) และ (*Z*) isomers ของสารผลิตภัณฑ์ capsiate เป็นน้ำมันใส คิดเป็นร้อยละ 67 ของสารผลิตภัณฑ์ มีค่า $R_f = 0.55$ (30:70 EtOAc:hexane) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FT-IR และ Mass spectrometry

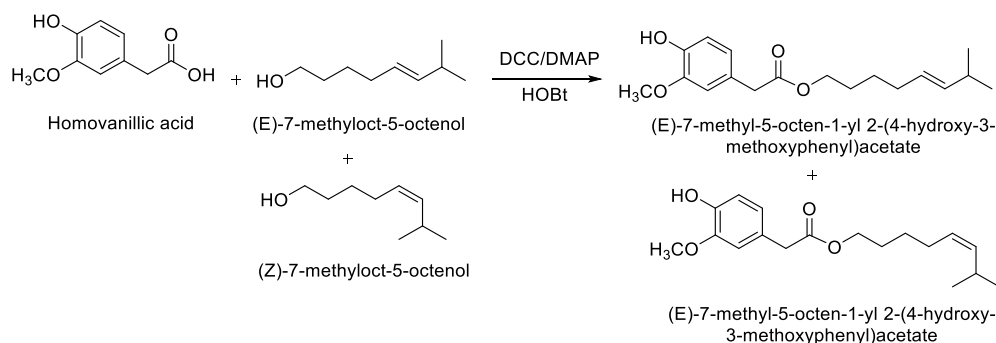
Capsiate

¹H-NMR 400 MHz (CDCl₃): δ (ppm) = 6.88-6.87 (m, 3H), 5.36-5.32 (m, 2H), 5.03 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 2.33 (t, 2H, $J=7.6$ Hz), 2.17-2.03 (m, 1H), 1.98-1.97 (m, 2H), 1.66-1.61 (m, 2H), 1.38-1.37 (m, 2H), 1.27-1.26 (m, 2H), 0.95 (d, 6H, $J=6.8$ Hz)

¹³C-NMR: 100 MHz (CDCl₃) δ (ppm) = 173.1, 147.7, 147.6, 139.6, 129.3, 124.8, 124.7, 115.8, 111.3, 66.7, 56.1, 34.0, 33.7, 31.7, 29.3, 25.1, 22.6

HRMS: Calcd. m/z 306.1831, found m/z 329.1736 (M+Na)⁺

3.2) การสังเคราะห์อนุพันธ์ (E)-7-methyl-5-octen-1-yl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-acetate (Reverse ester 7-Capsiate)



ภาพ 1.1.22 การสังเคราะห์ Reverse ester 7-Capsiate ด้วย esterification

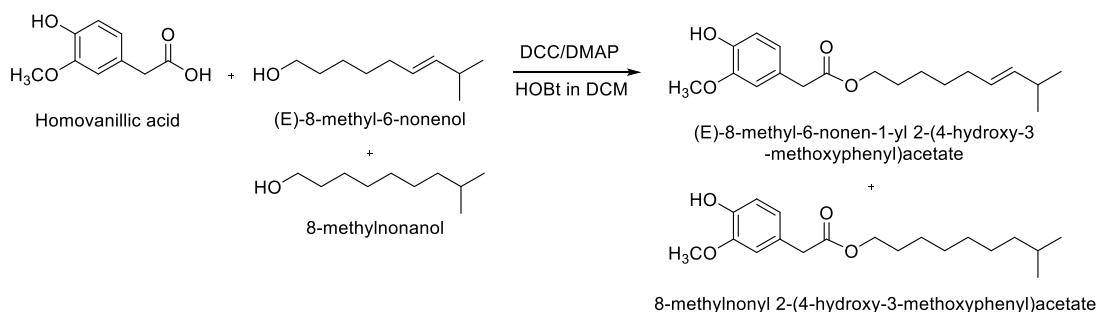
ทำการสังเคราะห์โดยละลาย homovanillic acid (2.62 mmol) HOBt (4.36 mmol) (E/Z)-7-methyl-5-octenol (2.18 mmol) และ DMAP (4.36 mmol) ใน an $\text{h}.$ CH $_2$ Cl $_2$ (5.00 mL) และลดอุณหภูมิของสารละลายผสมมาที่ 0 °C ด้วยอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย DCC (4.36 mmol) ที่ละลายอยู่ใน an $\text{h}.$ CH $_2$ Cl $_2$ (2.00 mL) ด้วยการเติมแบบ dropwise และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองตะกอนที่เกิดขึ้นและล้างตะกอนด้วย dichloromethane เย็น นำชั้นสารละลายอินทรีย์มาสกัดด้วย diethyl ether (3 x 20 mL) และ สารละลาย brine (3 x 20 mL) ระเหยตัวทำละลายออกจะได้สารผลิตภัณฑ์และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (EtOAc:Hexane/30:70 v/v) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นน้ำมันใสไม่มีสี คิดเป็นร้อยละ 62 ของสารผลิตภัณฑ์ มีค่า R_f = 0.54 (30:70 EtOAc:Hexane) สารผลิตภัณฑ์ผสมระหว่าง (E/Z)-isomer ทำการแยกด้วย HPLC (column, VertiSep $^{\text{TM}}$ UPS C $_{18}$, 4.6 x 250 mm, 5 μm , mobile phase, CH $_3$ OH:H $_2$ O/80:20 v/v with 0.025 M CH $_3$ COOH, flow rate 0.5 mL/min, detection UV 280 nm) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ FT-IR

(E)-7-methyl-5-octen-1-yl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetate

$^1\text{H-NMR}$ 400 MHz (CDCl $_3$): δ (ppm) = 6.85 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.76 (dd, J = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 5.41 – 5.24 (m, 2H), 4.10 – 4.05 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.53 (s, 2H), 2.22 (dq, J = 13.4, 6.7 Hz, 1H), 2.01 – 1.93 (m, 2H), 1.61 (ddd, J = 18.7, 10.0, 4.9 Hz, 2H), 1.44 – 1.32 (m, 2H), 0.97 – 0.93 (m, 6H)

FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,447 (O-H stretching), 1,735 (C=O stretching), 1,035 (C-O stretching)

3.3) การสังเคราะห์ (E)-8-methyl-6-nonen-1-yl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-acetate และ 8-methylnonyl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetate (Reverse ester 8-Capsiate)



ภาพ 1.1.23 การสังเคราะห์ Reverse ester 8-Capsiate ด้วย esterification

ทำการสังเคราะห์โดยละลาย homovanillic acid (3.38 mmol) HOBt (5.64 mmol), (E)-8-methyl-6-nonenol, 8-methylnonan-1-ol (2.82 mmol) และ DMAP (5.64 mmol) ใน anhydrous CH_2Cl_2 (5.00 mL) และลดอุณหภูมิของสารละลายผสมมาที่ 0°C ด้วยอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย DCC (5.64 mmol) ที่ละลายอยู่ใน anhydrous CH_2Cl_2 (2.00 mL) ด้วยการเติมแบบ dropwise และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองตะกอนที่เกิดขึ้นและล้างตะกอนด้วย dichloromethane เสร็จแล้วนำชั้นสารละลายอินทรีย์มาสกัดด้วย diethyl ether (3 x 20 mL) และ สารละลาย brine (3 x 20 mL) ระเหยตัวทำละลายออกจะได้สารผลิตภัณฑ์และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (EtOAc:Hexane/30:70 v/v) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นน้ำมันใสไม่มีสี คิดเป็นร้อยละ 77 ของสารผลิตภัณฑ์ มีค่า $R_f = 0.52$ (30:70 EtOAc:Hexane) สารผลิตภัณฑ์ผสมระหว่าง (E/Z)-isomer ทำการแยกด้วย HPLC (column, VertiSepTM UPS C_{18} , 4.6 x 250 mm, 5 μm , mobile phase, $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}/80:20$ v/v with 0.025 M CH_3COOH , flow rate 0.5 mL/min, detection UV 280 nm) ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ FT-IR

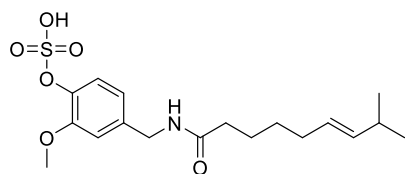
(E)-8-methyl-6-nonen-1-yl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetate และ 8-methylnonyl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetate

$^1\text{H-NMR}$ 400 MHz (CDCl_3): δ (ppm) = 6.94 – 6.80 (m, 6H), 5.44 – 5.21 (m, 2H), 4.12 – 3.99 (m, 4H), 3.92 – 3.88 (m, 6H), 3.76 (s, 2H), 3.57 (s, 2H), 2.30 – 2.12 (m, 1H), 2.03 – 1.86 (m, 2H), 1.72 – 1.55 (m, 4H), 1.53 – 1.43 (m, 1H), 1.40 – 1.18 (m, 12H), 1.18 – 1.07 (m, 2H), 0.99 – 0.91 (m, 6H), 0.90 – 0.80 (m, 6H)

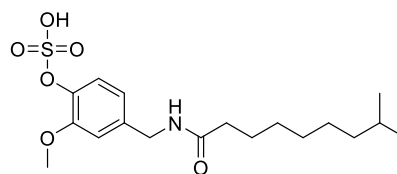
FT-IR (KBr) cm^{-1} : 3,447 (O-H stretching), 1,735 (C=O stretching), 1,035 (C-O stretching)

4) เตรียม metabolites ของ capsaicinoids และ capsinoids (small scale)

4.1) การสังเคราะห์สาร capsaisinoids sulfate ester จากสาร capsaicinoids



Capsaicin sulfate ester



Dihydrocapsaicin sulfate ester

ภาพ 1.1.24 โครงสร้างทางเคมีของสาร capsaisinoids sulfate ester

4.1.1) การสังเคราะห์และการแยกบริสุทธิ์สาร capsaicin sulfate ester จากสาร capsaicin

การสังเคราะห์สาร capsaicin sulfate ester สามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายแบ่งออกเป็น 3 หลอด ดังนี้ 1). เตรียมสารละลาย capsaicin น้ำหนัก 1.2438 กรัม (4.07 mmol) ใน *N, N*-dimethylformamide (DMF) 5.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดสกัดพลาสติกโพลีพรอพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท 2). เตรียมสารละลาย dicyclohexylcarbodiimide (DCC) น้ำหนัก 4.2000 กรัม (20.36 mmol) ใน DMF 7.1 มิลลิลิตร ในหลอดสกัดพลาสติกโพลีพรอพิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท 3). เตรียมสารละลายกรด sulfuric acid น้ำหนัก 0.4032 กรัม (4.11 mmol) ใน DMF 5.1 มิลลิลิตร ในหลอดสกัดพลาสติกโพลีพรอพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท นำสารละลายที่เตรียมได้ทั้ง 3 หลอดแช่ในอ่างน้ำแข็งผสมเกลือที่เย็นจัดนาน 15 นาที จากนั้นนำสารละลาย capsaicin แช่เย็นที่เตรียมได้เทใส่ลงในหลอดสารละลาย DCC อย่างรวดเร็ว ปิดฝาให้สนิท เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายกรด sulfuric acid แช่เย็นที่เตรียมได้เทใส่ลงในหลอดสารละลายผสมของ DCC และ capsaicin อย่างรวดเร็ว ปิดฝาให้สนิท เขย่าแรงๆ ให้เข้ากันอย่างต่อเนื่องนาน 15 นาที จะเกิดตะกอนสีขาวของสาร dicyclohexylurea (DCU) เกิดขึ้น ตรวจสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography; TLC) เติมน้ำสารละลาย ethylacetate ให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 200 มิลลิลิตร กวนสารละลายให้เข้ากัน กรองแยกตะกอนสีขาวของสาร DCU ออกจากสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างตะกอนด้วยสารละลาย ethylacetate 200 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล 60 เป็นเฟสคงที่ทำการชะตามลำดับด้วยสารละลายผสมที่มี ammonium hydroxide ผสมอยู่ด้วย 0.3% ของ 100% ethylacetate, 5% methanol/ethylacetate และ 10% methanol/ethylacetate ตามลำดับ เก็บรวบรวมสารละลายผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ ระเหยเอาตัวทำละลายออกจนเกือบแห้ง เติมน้ำสารละลายผสม 1 ต่อ 1 ระหว่าง ethylacetate และ hexane ลงในขวดของสารผลิตภัณฑ์จะเกิดตะกอนสีขาว กรองแยกตะกอนสีขาวของสารผลิตภัณฑ์ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างตะกอนด้วยสารละลายผสม 1 ต่อ 1 ระหว่าง ethylacetate และ hexane นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ ได้สาร capsaicin sulfate ester ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวน้ำหนัก 0.810 กรัม คิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ร้อยละ 51.60 ของสารผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FT-IR และ Mass spectrometry

Capsaicin sulfate ester

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.96 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 1.38 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 2.01 (m, 2H), 2.23 (m, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.32 (s, 2H), 5.37 (m, 2H), 6.82 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.39 (d, J = 8.2 Hz, 1H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 23.1, 26.6, 30.4, 32.3, 33.3, 37.0, 43.9, 56.6, 113.5, 120.5, 123.6, 127.9, 137.7, 139.1, 142.1, 153.2, 176.0

ESI-MS: m/z 384.1502 $[\text{M-H}]^-$

FT-IR: 564, 634, 707, 751, 812, 851, 966, 1030, 1058, 1130, 1159, 1248, 1297, 1418, 1457, 1512, 1540, 1596, 1644, 2867, 2925, 3317

4.1.2) การสังเคราะห์และการแยกบริสุทธิ์สารได dihydrocapsaicin sulfate ester จากสาร dihydrocapsaicin

การสังเคราะห์สาร dihydrocapsaicin sulfate ester สามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายแบ่งออกเป็น 3 หลอด ดังนี้ 1).เตรียมสารละลาย dihydrocapsaicin น้ำหนัก 1.0000 กรัม (3.25 mmol) ใน DMF 4.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดสกัดพลาสติกโพลีพรอพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท 2). เตรียมสารละลาย DCC น้ำหนัก 3.3570 กรัม (16.27 mmol) ใน DMF 5.7 มิลลิลิตร ในหลอดสกัดพลาสติกโพลีพรอพิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท 3). เตรียมสารละลายกรด sulfuric acid น้ำหนัก 0.3221 กรัม (3.28 mmol) ใน DMF 4.1 มิลลิลิตร ในหลอดสกัดพลาสติกโพลีพรอพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท นำสารละลายที่เตรียมได้ทั้งสามหลอดเข็นในอ่างน้ำแข็งผสมเกลือที่เย็นจัดนาน 15 นาที จากนั้นนำสารละลาย dihydrocapsaicin เข้มข้นที่เตรียมได้เทใส่ลงในหลอดสารละลาย DCC อย่างรวดเร็ว ปิดฝาให้สนิท เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายสารกรด sulfuric acid เข้มข้นที่เตรียมได้เทใส่ลงในหลอดสารละลายผสมของ DCC และ dihydrocapsaicin อย่างรวดเร็ว ปิดฝาให้สนิท เขย่าแรงๆ ให้เข้ากันอย่างต่อเนื่องนาน 15 นาที จะเกิดตะกอนสีขาวของสาร DCU ตรวจสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี เติมน้ำสารละลาย ethylacetate ให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 150 มิลลิลิตร กวนสารละลายให้เข้ากัน กรองแยกตะกอนสีขาวของสาร DCU ออกจากสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างตะกอนด้วยสารละลาย ethylacetate 150 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล 60 เป็นเฟสคงที่ทำการชะตามลำดับด้วยสารละลายผสมที่มี ammonium hydroxide ผสมอยู่ด้วย 0.3% ของ 100% ethylacetate, 5% methanol/ethylacetate และ 10% methanol/ethylacetate ตามลำดับ เก็บรวมสารละลายผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ ระเหยเอาตัวทำละลายออกจนเกือบแห้ง เติมน้ำสารละลายผสม 1 ต่อ 1 ระหว่าง ethylacetate และ hexane ลงในขวดของสารผลิตภัณฑ์จะเกิดตะกอนสีขาว กรองแยกตะกอนสีขาวของสารผลิตภัณฑ์ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างตะกอนด้วยสารละลายผสม 1 ต่อ 1 ระหว่าง ethylacetate และ hexane นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ ได้สาร dihydrocapsaicin sulfate ester ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวน้ำหนัก 0.456 กรัม คิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ร้อยละ 36.18 ของสารผลิตภัณฑ์ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, FT-IR และ Mass spectrometry

Dihydrocapsaicin sulfate ester

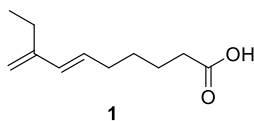
^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 0.88 (d, J = 7.2 Hz, 6H), 1.18 (m, 2H), 1.33 (m, 6H), 1.53 (m, 1H), 1.63 (m, 2H), 2.23 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 4.32 (s, 2H), 6.81 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 6.96 (s, J = 2.0 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.2 Hz, 1H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 23.0, 27.1, 28.4, 29.1, 30.4, 30.7, 37.1, 40.1, 43.8, 56.6, 113.5, 120.5, 123.6, 137.7, 142.0, 153.2, 176.1

ESI-MS: m/z 386.1738 $[\text{M-H}]^-$

FT-IR: 564, 637, 715, 750, 812, 852, 862, 1033, 1052, 1133, 1161, 1220, 1270, 1415, 1470, 1514, 1543, 1596, 1645, 2853, 2923, 3319

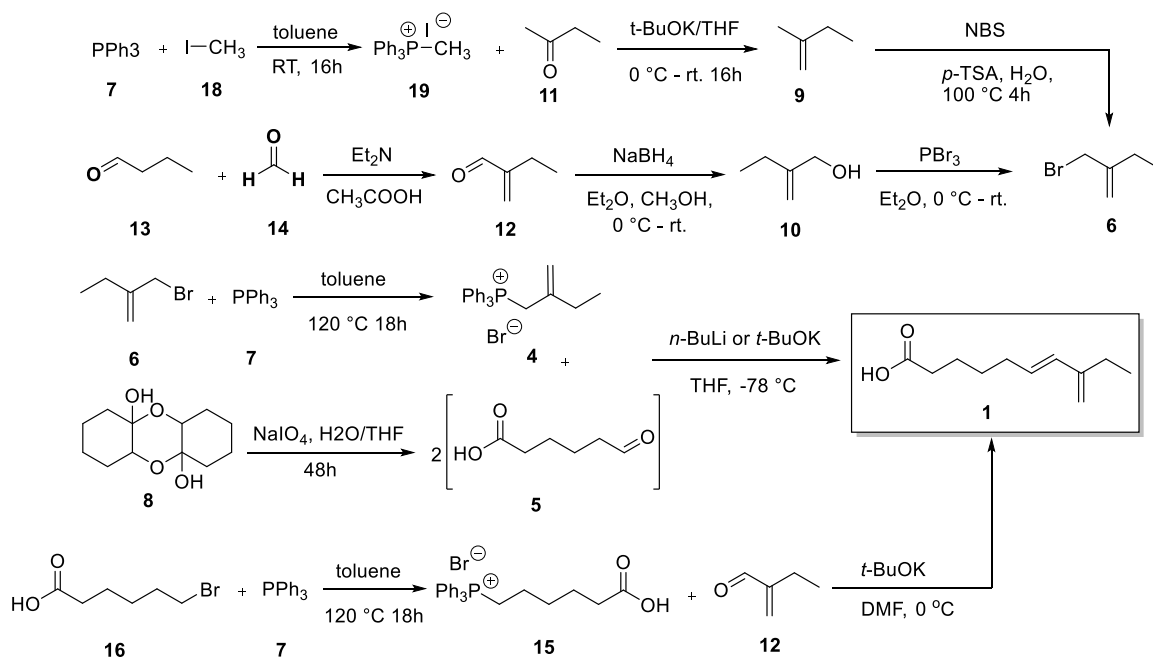
4.2) การพัฒนา metabolite ของ capsaicinoids และ capsinoids ในส่วน fatty acid residue โดยใช้ Wittig reaction



ภาพ 1.1.25 โครงสร้างทางเคมีของ 8-methylenenon-8-enoic acid (1)

4.2.1) การสังเคราะห์ 8-methylenenon-6-enoic acid (1)

การสังเคราะห์ 8-methylenenon-8-enoic acid สามารถสังเคราะห์ได้หลายแนวทาง การสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยา Wittig reaction สามารถสังเคราะห์โดยอาศัยแนวทางอย่างน้อย 2 แนวทาง การสังเคราะห์ 8-methylene-6-decenoic acid (1) แนวทางที่ 1 สามารถสังเคราะห์ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้น (2-bromomethyl-butene) triphenylphosphonium bromide (4) และ 6-oxohexanoic acid (5) ผ่านปฏิกิริยา Wittig reaction โดยสารตั้งต้น (2-bromomethyl-butene) triphenylphosphonium bromide (4) สังเคราะห์ได้ด้วยการทำปฏิกิริยาระหว่าง 2-bromomethyl-butene (6) และ triphenyl phosphine (7) ผ่านปฏิกิริยาการแทนที่ อย่างไรก็ตาม 2-bromomethyl-butene (6) สามารถสังเคราะห์ได้ 2 วิธี คือวิธีที่ 1 สังเคราะห์ได้ด้วยปฏิกิริยา bromination ของ 2-methylbut-1-ene (9) ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง (methyl)triphenylphosphonium iodide กับ 2-butanone (11) ผ่าน Wittig reaction และวิธีที่ 2 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา bromination ของ 2-methylenebutan-1-ol (10) โดยสังเคราะห์จากปฏิกิริยา reduction ของ 2-methylene-butanal (12) ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1-butanal (13) และ formaldehyde (14) ผ่านปฏิกิริยา α -methylenation สำหรับสารตั้งต้น 6-oxohexanoic acid (5) สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาการเปิดวงของ 2-hydroxycyclohexanone dimer (8) ในส่วน การสังเคราะห์ 8-methylene-6-decenoic acid (1) ในแนวทางที่ 2 สามารถสังเคราะห์ได้จากการทำปฏิกิริยา Wittig reaction ระหว่าง (5-carboxypentyl) triphenylphosphonium bromide (15) ที่ได้จากปฏิกิริยาการแทนที่ระหว่าง 6-bromohexanoic acid (16) กับ triphenyl phosphine (7) และ 2-methylene-butanal (12) ซึ่งได้จากปฏิกิริยา α -methylenation ของ 1-butanal (13)

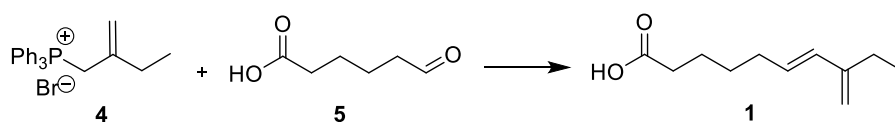


ภาพ 1.1.26 แนวทางการสังเคราะห์ 8-methylenenon-8-enoic acid (1)

จากแผนการทดลองการสังเคราะห์ 8-methylene-6-decenoic acid (1) ดังกล่าวข้างต้น สามารถสังเคราะห์ได้จาก 2 แนวทาง คือ

แนวทางที่ 1

ปฏิกิริยา Wittig reaction ของ (2-bromomethyl-butene)triphenyl phosphonium bromide (4) และ 6-oxohexanoic acid (5)

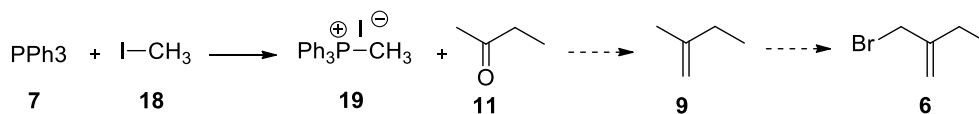


ภาพ 1.1.27 ปฏิกิริยา Wittig reaction ของ (2-bromomethyl-butene)triphenyl phosphonium bromide (4) และ 6-oxohexanoic acid (5)

การสังเคราะห์ 8-methylene-6-decenoic acid (1) สามารถสังเคราะห์ด้วย Wittig reaction ของ (2-bromomethyl-butene)triphenylphosphonium bromide (4) กับ 6-oxohexanoic acid (5) ซึ่ง (2-bromomethyl-butene)triphenylphosphonium bromide (4) สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาการแทนที่ระหว่าง triphenylphosphine กับ 2-bromomethyl-butene (6) โดย 2-bromomethyl-butene (6) สังเคราะห์ได้จาก 2 วิธี คือวิธีที่ 1 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา bromination ของ 2-methyl-butene (9) และวิธีที่ 2 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา bromination ของ 2-methylene-butanol (10) ส่วน 6-oxohexanoic acid (5) ได้จากปฏิกิริยาเปิดวงของ 6-hydroxycyclohexanone dimer (8) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6)

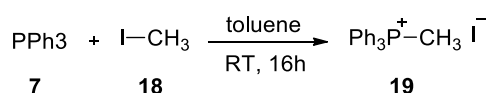
1.1 การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) ด้วยวิธีที่ 1



ภาพ 1.1.28 การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) ด้วยวิธีที่ 1

การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) เริ่มต้นจากการสังเคราะห์ (methyl)triphenylphosphonium iodide (19) ด้วยปฏิกิริยาการแทนที่ของ iodomethane (17) กับ triphenylphosphine นำสารที่ได้ทำปฏิกิริยาต่อยด้วย Wittig reaction กับ 2-butanone (11) ได้ 2-methyl-butene (9) จากนั้นนำสารที่ได้ไปทำปฏิกิริยา bromination ต่อจนได้ 2-bromomethyl-butene (6) ขั้นตอนการสังเคราะห์ดังกล่าวมีรายละเอียดต่อไปนี้

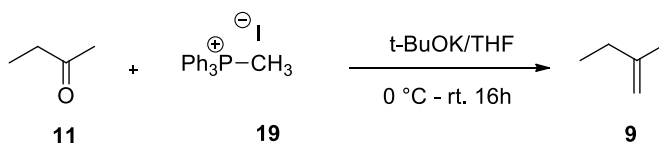
1.1.1 การสังเคราะห์ (methyl)triphenylphosphonium iodide (19)



ภาพ 1.1.29 การสังเคราะห์ (methyl)triphenylphosphonium iodide (19)

ละลาย triphenylphosphine (7) น้หนัก 18.0000 g ใน THF ปริมาตร 75 มิลลิลิตร (68.60 mmol) และผสม iodomethane (18) ปริมาตร 8.4 มิลลิลิตร (135 mmol) ใน THF ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลม กวนสารที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน เมื่อครบเวลาทำการกรองแบบลดความดันโดยใช้ büchner funnel และล้างตะกอนด้วย diethyl ether จะได้ตะกอนสีขาว นำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

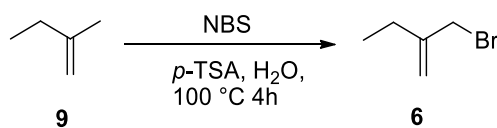
1.1.2 การสังเคราะห์ 2-methyl-butene (9) ด้วย Wittig reaction



ภาพ 1.1.30 การสังเคราะห์ 2-methyl-butene (9) ด้วย Wittig reaction

ชั่ง methyltriphenylphosphonium iodide (19) น้หนัก 29.2452 g (72 mmol) ละลายใน THF ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมแบบ 2 คอ แช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติม t-BuOK 8.0751 g (72 mmol) จะมีตะกอนสีเหลืองเกิดขึ้น กวนสารที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลา ค่อยๆหยด 2-butanone (11) ปริมาตร 5.4 มิลลิลิตร (60 mmol) ที่ละลายใน THF 90 มิลลิลิตร กวนสารต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำสารละลายมากลั่นลำดับส่วน จากนั้นนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ และนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

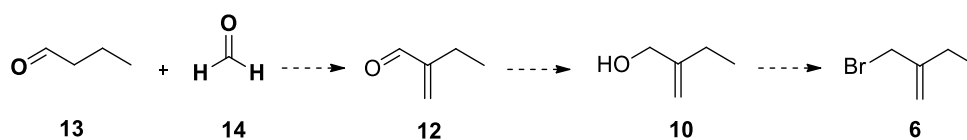
1.1.3 การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) โดยใช้ปฏิกิริยา bromination ของ 2-methyl-butene (9)



ภาพ 1.1.31 การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) โดยใช้ปฏิกิริยา bromination

ละลาย 2-methyl-butene (9)หนัก 0.7500 กรัม ใน THF ปริมาตร 5.8 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมแบบ 2 คอ จากนั้นเติม N-bromosuccinimide 3.0648 กรัม (17 mmol) และ *p*-toluene sulfonic acid 0.2963 กรัม (1.7 mmol) ตามลำดับ ทำการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และเติมน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร สกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate (3x50 mL) รวมสารละลายชั้นอินทรีย์ และทำให้แห้งด้วย sodium sulfate และกรองเอาสารละลายมาทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (10% EtOAc/hexane)

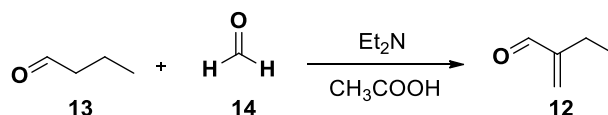
1.2 การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) ด้วยวิธีที่ 2



ภาพ 1.1.32 การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) ด้วยวิธีที่ 2

การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) วิธีที่ 2 เริ่มต้นจากการสังเคราะห์ 2-methylene-butanal โดยใช้ปฏิกิริยา α -methylenation ของ butanal (13) กับ formaldehyde (14) นำสารที่ได้ไปทำปฏิกิริยา reduction ได้ 2-methylene-butanol (10) จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา bromination ต่อได้ 2-bromomethyl-butene (6) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1.2.1 การสังเคราะห์ 2-methylene-butanal (12) ด้วยปฏิกิริยา α -methylenation

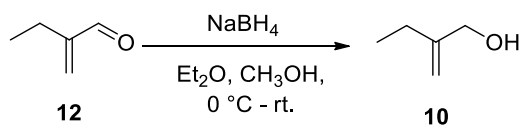


ภาพ 1.1.33 การสังเคราะห์ 2-methylene-butanal (12) ด้วยปฏิกิริยา α -methylenation

เติม formaldehyde (14) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร (600 mmol), diethylamine ปริมาตร 52 มิลลิลิตร (500 mmol) ลงในขวดก้นกลมปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติม glacial acetic acid ปริมาตร 29 มิลลิลิตร (500 mmol) ที่อุณหภูมิ 0 °C ค่า และให้ pH ของสารละลายเท่ากับ 6-7 ให้ความร้อนแก่สารละลายอุณหภูมิ 72 °C จากนั้นค่อยๆหยด 1-butanol (13) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (500 mmol) ผ่าน addition funnel ภายใน

เวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการกวนสารเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการเก็บสารด้วยวิธี steam distillation (b.p. 68-72 °C) เก็บสารจนอุณหภูมิของ distillation ถึง 90 °C จากนั้นเติมสารละลาย brine กรอง และเก็บที่อุณหภูมิ -40 °C

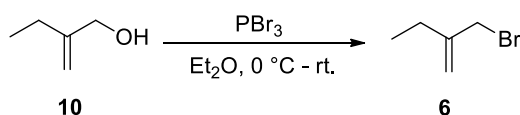
1.2.2 การสังเคราะห์ 2-methylene-butan-1-ol (10) ด้วยปฏิกิริยา reduction



ภาพ 1.1.34 การสังเคราะห์ 2-methylene-butan-1-ol (10) ด้วยปฏิกิริยา reduction

นำ 2-methylene-butanal (12) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร (11.89 mmol) เติมลงในสารละลาย diethyl ether กับ methanol (8 mL : 2 mL) ในขวดก้นกลม 2 คอ ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำแข็งอุณหภูมิ 0 °C จากนั้นค่อยๆเติม sodium borohydride 0.5314 g (14.04 mmol) หลังจากนั้นทำการกวนสารที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลากวนสารละลายต่อที่อุณหภูมิห้องอีก 3-4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม diethyl ether ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายสารละลายใส่กรวยแยก และล้างด้วยน้ำปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการแยกชั้นน้ำ และชั้นอินทรีย์ โดยชั้นน้ำนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ diethyl ether (2x20 mL) ทำการรวมชั้นสารอินทรีย์เข้าด้วยกัน และทำให้แห้งโดยเติม sodium sulfate จากนั้นทำการกรอง และนำสารละลายที่ได้ไประเหยภายใต้ความดัน ซึ่งน้ำหนัก นำไปวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ และนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

1.2.3 การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) โดยใช้ปฏิกิริยา bromination



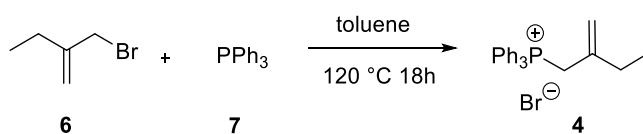
ภาพ 1.1.35 การสังเคราะห์ 2-bromomethyl-butene (6) โดยใช้ปฏิกิริยา bromination

นำสารละลายผลิตภัณฑ์ (10) จากข้อ 1.2.2 น้ำหนัก 0.7065 กรัม (8.202 mmol) เติมลงใน diethyl ether ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดก้นกลมแบบ 2 คอ ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำแข็งจนอุณหภูมิ 0 °C ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน ค่อยๆหยด phosphorus tribromide ปริมาตร 0.57 มิลลิลิตร (6.0308 mmol) และกวนสารต่อที่อุณหภูมิห้อง 8-10 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 0 °C และ quench ด้วยการเติมน้ำแข็ง จากนั้นถ่ายสารละลายใส่ในกรวยแยกและล้างด้วยน้ำอีกครั้ง แยกชั้นน้ำและชั้นสารละลายอินทรีย์ จากนั้นสกัดชั้นน้ำด้วย diethyl ether (3x10 mL) แล้วรวมชั้นสารละลายอินทรีย์เข้าด้วยกัน ทำให้แห้งโดยการเติม sodium sulfate และกรอง นำสารละลายไประเหยภายใต้ความดัน ซึ่งน้ำหนัก นำไปวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ และนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

การสังเคราะห์ 8-methylene-6-decenoic acid (1) เริ่มต้นจากการสังเคราะห์สารตั้งต้น (2-bromomethyl-butene) triphenylphosphonium bromide (4) โดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่ของ 2-bromomethyl-butene (6) กับ triphenylphosphine (7) และ 6-oxohexanoic acid (5) โดยใช้ปฏิกิริยาเปิด

วงของ 6-hydroxycyclohexanone dimer (8) จากนั้นนำสารที่ได้ทำ Wittig reaction ได้ 8-methylene-6-decenoic acid (1) มีรายละเอียดดังนี้

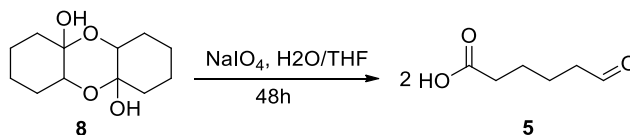
2. การสังเคราะห์ (2-bromomethyl-butene)triphenylphosphonium bromide (4) โดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่



ภาพ 1.1.36 การสังเคราะห์ (2-bromomethyl-butene)triphenylphosphonium bromide (4) โดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่

ซึ่ง triphenylphosphine (7) น้หนัก 1.9096 g (7.28 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลมแบบ 2 คอ จากนั้นเติม toluene ปริมาตร 7.5 mL และกวนสารจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติม 2-bromomethyl-butene (6) น้หนัก 0.5238 กรัม (3.514 mmol) ลงไป ทำการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจะได้ตะกอนสีขาว ทำการกรองโดยใช้ büchner funnel และล้างตะกอนด้วย dry diethyl ether จากนั้นนำสารไประเหยภายใต้ความดันและเก็บใน desiccator เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

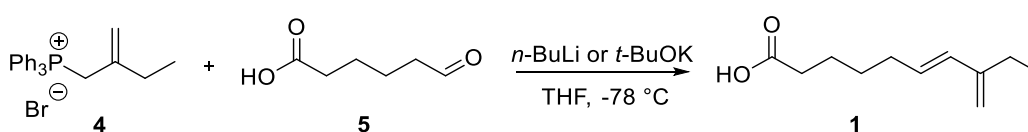
3. การสังเคราะห์ 6-oxohexanoic acid (5) โดยใช้ปฏิกิริยาเปิดวง



ภาพ 1.1.37 การสังเคราะห์ 6-oxohexanoic acid (5) โดยใช้ปฏิกิริยาเปิดวง

เติม 2-hydroxycyclohexanone dimer (8) น้หนัก 0.5010 กรัม (2.19 mmol) ละลายใน THF ปริมาตร 27 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม sodium periodate น้หนัก 1.1720 กรัม (5.47 mmol) และน้ำปริมาตร 18 มิลลิลิตร กวนสารให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเจือจางสารละลายด้วย ethyl acetate ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ล้างด้วยสารละลาย brine (2x20 mL) จากนั้นทำให้แห้งโดยการนำไประเหยภายใต้ความดัน นำ crude product ที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

4. การสังเคราะห์ 8-methylene-6-decenoic acid (1) ด้วย Wittig reaction ตามแนวทางที่ 1

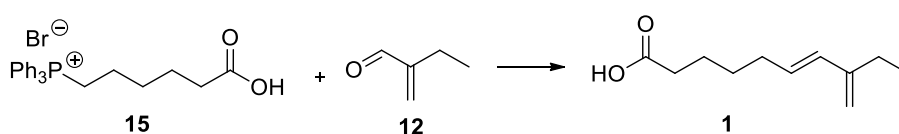


ภาพ 1.1.38 การสังเคราะห์ 8-methylene-6-decenoic acid (1) ด้วย Wittig reaction

การสังเคราะห์ 8-methylene-6-decenoic acid (**1**) สามารถสังเคราะห์ด้วย Wittig reaction (แนวทางที่ 1) โดยซิง (2-bromomethyl-butene)triphenylphosphonium bromide (**4**) หนัก 0.6420 กรัม (1.5608 mmol) ลงในขวดก้นกลมแช่เย็น -40 °C และภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน จากนั้นเติม THF ปริมาตร 6.00 มิลลิลิตร กวนให้ละลายและอุณหภูมิ -40 °C แล้วค่อยๆหยด *n*-BuLi ปริมาตร 0.78 มิลลิลิตร (*t*-BuOK 0.1751 g) กวนสารต่อที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแช่สารละลายในขวดปฏิกิริยาให้เย็น -78 °C และเติมสารละลาย 6-oxohexanoic acid (**5**) หนัก 0.2200 กรัม (1.5608 mmol) ที่ละลายใน THF ปริมาตร 6.00 มิลลิลิตร โดยค่อยๆหยด 6-oxohexanoic acid (**5**) ลงในสารละลาย จากนั้นกวนสารต่อที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการเจือจางโดยการเติม diethyl ether ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเติม HCl ปริมาตร 3.8 มิลลิลิตร นำสารละลายมาล้างด้วย HCl, น้ำ, สารละลาย brine อย่างละ 10 มิลลิลิตร ทำการรวมชั้นอินทรีย์ที่ได้นำไปทำให้แห้งโดยใช้ MgSO₄ และกรองนำสารละลายไประเหยภายใต้ความดัน นำไปทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีต่อไป

แนวทางที่ 2

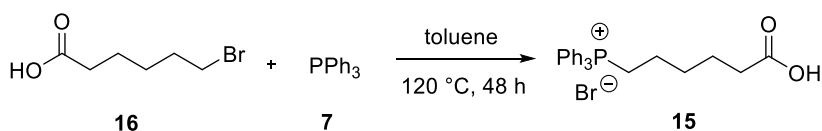
ปฏิกิริยา Wittig reaction ของ (5-carboxypentyl)triphenylphosphonium bromide (**15**) และ 2-methylene-butanal (**12**)



ภาพ 1.1.39 ปฏิกิริยา Wittig reaction ของ (5-carboxypentyl)triphenylphosphonium bromide (**15**) และ 2-methylene-butanal (**12**) (แนวทางที่ 2)

การสังเคราะห์ 8-methylene-6-decenoic acid (**1**) แนวทางที่ 2 เริ่มต้นจากการสังเคราะห์ สารตั้งต้น (5-carboxypentyl)triphenylphosphonium bromide (**15**) โดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่ของ 6-bromohexanoic acid (**16**) กับ triphenylphosphine (**7**) และนำสารตั้งต้นที่สังเคราะห์ได้ไปทำ Wittig reaction กับ 2-methylene-butanal (**12**) เพื่อให้ได้ 8-methylene-6-decenoic acid (**1**) มีรายละเอียดดังนี้

1. การสังเคราะห์ (5-carboxypentyl)triphenylphosphonium bromide (**15**) โดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่

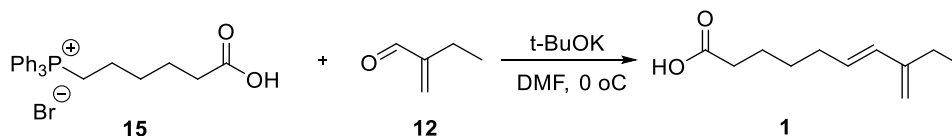


ภาพ 1.1.40 การสังเคราะห์ (5-carboxypentyl)triphenylphosphonium bromide (**15**) โดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่

ซิง triphenylphosphine (**7**) หนัก 7.38 กรัม (28.1 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลมแบบ 2 คอ จากนั้นเติม toluene ปริมาตร 80 มิลลิลิตร และกวนสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติม 6-bromohexanoic acid (**16**)

หนัก 5.00 กรัม (25.69 mmol) ทำการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจะได้ตะกอนสีขาว เติมกรดจน pH ของสารละลายต่ำกว่า 7 ทำการกรองแบบลดความดันโดยใช้ büchner funnel และล้างตะกอนด้วย dry diethyl ether จากนั้นระเหยภายใต้ความดันและเก็บใน desiccator เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

2. การสังเคราะห์ 8-methylene-6-decenoic acid (**1**) ด้วย Wittig reaction ตามแนวทางที่ 2



ภาพ 1.1.41 การสังเคราะห์ 8-methylene-6-decenoic acid (**1**) ด้วย Wittig reaction ตามแนวทางที่ 2

ซึ่ง (5-carboxypentyl)triphenylphosphonium bromide (**15**) หนัก 1.0000 กรัม (2.18 mmol) ลงในขวดก้นกลมแบบ 2 คอ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม DMF ปริมาตร 4.2 มิลลิลิตร และ 2-methylbutanal (**12**) ปริมาตร 0.22 มิลลิลิตร (2.22 mmol) กวนสารให้เข้ากัน แช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 °C ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน เตรียมสารละลายเบส โดยซึ่ง t-BuOK หนัก 1.9000 กรัม (16.93 mmol) ละลายใน DMF ปริมาตร 5.25 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่ 0 °C ค่อยๆเติม t-BuOK ลงในสารละลาย aldehyde และ phosphonium salt ทำการกวนสารที่อุณหภูมิห้อง 15 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทสารละลายลงในน้ำกับน้ำแข็งปริมาตร 15.75 มิลลิลิตร จากนั้นทำการกรอง ถ่ายสารละลายที่กรองได้ใส่กรวยแยก ล้างด้วย 2M HCl (2x25 mL) สกัดด้วย diethyl ether (4x20 mL) ล้างด้วยสารละลาย brine (4x15 mL) ทำการรวมชั้นสารละลายอินทรีย์ และเติม MgSO₄ และกรองนำสารละลายไประเหยภายใต้ความดัน นำไปทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีต่อไป

5) การทดสอบความเป็นพิษในเซลล์ไฟโบรบลาสต์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์สามารถทดสอบผ่านการตรวจการมีชีวิตรอดของเซลล์ (Viability) ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร capsaicin และอนุพันธ์ capsaicin ที่ส่งผลต่อเมตาบอลิซึม และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ด้วยเทคนิค XTT (sodium 3'-[1-[(phenylamino) carbo-nyl]-3, 4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความถูกต้องแม่นยำ มีความสม่ำเสมอ และได้รับการยอมรับสำหรับใช้เป็นมาตรฐานในการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์

5.1) การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวช่วยละลาย PEG 400 (solubilizer) ในอาหารเลี้ยงเซลล์

เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลาย PEG400 ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวช่วยละลาย (solubilizer) สาร capsaicin และ อนุพันธ์ของ capsaicin เนื่องจากข้อจำกัดในการละลายสาร capsaicin ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM-low glucose) โดยความเข้มข้นดังกล่าวจะต้องไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

วิธีการทดลอง

Cell type: Normal Human Dermal Fibroblast (NHDF)

Passage number: 5

Samples: PEG400 ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7.5 และ 10% v/v

1) นำเซลล์ปริมาณ 1×10^4 เซลล์ ซึ่งกระจายตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ปิเปตลงใน 96-well plate แล้วทำการบ่มเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ CO₂ ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

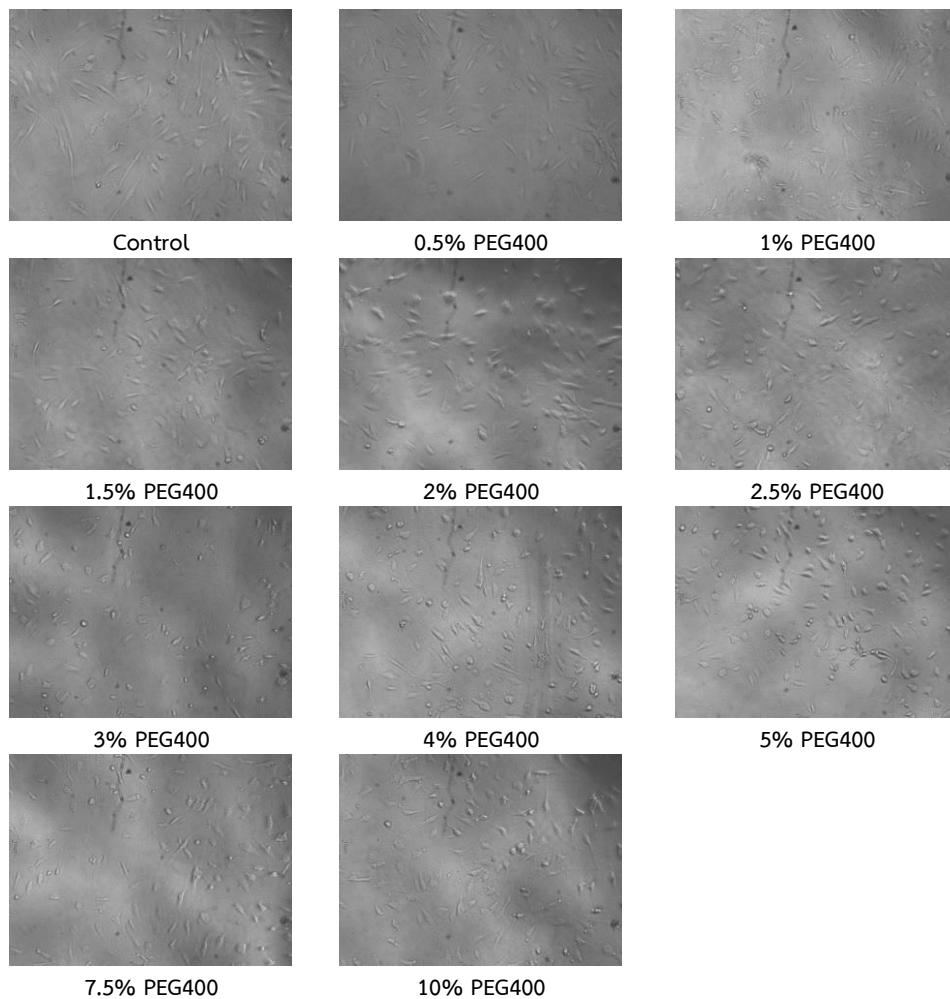
2) หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบที่ไม่มี FBS จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (ที่ไม่มี Fetal Bovine Serum) ที่มีสารละลาย PEG400 ที่อยู่ในความเข้มข้นต่างๆ (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7.5 และ 10% v/v) ลงไปในเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

3) เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดในความเข้มข้นต่างๆ ออก แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบที่ไม่มี FBS (2 รอบ) จากนั้นเติมสารละลาย XTT solution ลงไปหุลุมละ 50 ไมโครลิตรและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (ที่ไม่มี FBS) ลงไปหุลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสและ CO₂ ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4) อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ (อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากสารสกัด) โดยปรับให้ค่าการดูดกลืนตัวแสงที่วัดได้จากตัวอย่างที่เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ มีเปอร์เซ็นต์ ที่เซลล์มีชีวิตอยู่ (% cell viability) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 1.1.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ PEG 400 ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 0.5–10 %v/v

TIME	Control	Concentration of PEG 400 (%v/v)									
		10	7.5	5	4	3	2.5	2	1.5	1	0.5
1	0.724	0.498	0.524	0.553	0.564	0.559	0.623	0.694	0.699	0.678	0.719
2	0.745	0.484	0.518	0.563	0.577	0.557	0.607	0.685	0.689	0.732	0.689
3	0.682	0.499	0.528	0.565	0.572	0.533	0.612	0.709	0.707	0.698	0.732
Average	0.717	0.494	0.523	0.560	0.571	0.550	0.614	0.696	0.698	0.703	0.713
%Viability	100.00	68.98	73.13	78.30	79.79	76.80	85.79	97.25	97.58	98.18	99.67
SD	4.55	1.72	0.96	1.15	1.15	2.67	1.33	1.74	1.29	3.85	3.13



ภาพ 1.1.42 รูปร่างเซลล์ (cell morphology) จากการทดสอบความเป็นพิษของ PEG 400 ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 0.5–10 %v/v ที่กำลังขยาย 10X

5.2 การหาความเข้มข้นของ capsaicin ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เพื่อหาความเข้มข้นที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของ capsaicin เพื่อใช้กำหนดระดับความเข้มข้นของอนุพันธ์ capsaicin สำหรับใช้เป็นตัวแปรควบคุมในการเปรียบเทียบผลความเป็นพิษต่อเซลล์ระหว่าง capsaicin กับสารอนุพันธ์ capsaicin ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยค่า %cell viability ต้องมากกว่า 80% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ ซึ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากสาร capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin) ถึงจะไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

วิธีการทดลอง

Cell type: Normal Human Dermal Fibroblast (NHDF)

Passage number: 6

Samples: 125, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1,000 µg/mL of Capsaicin

1) นำเซลล์ปริมาณ 1×10^4 เซลล์ ซึ่งกระจายตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 200 ไมโครลิตรปิเปตลงใน 96-well plate แล้วทำการบ่มเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ CO₂ ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

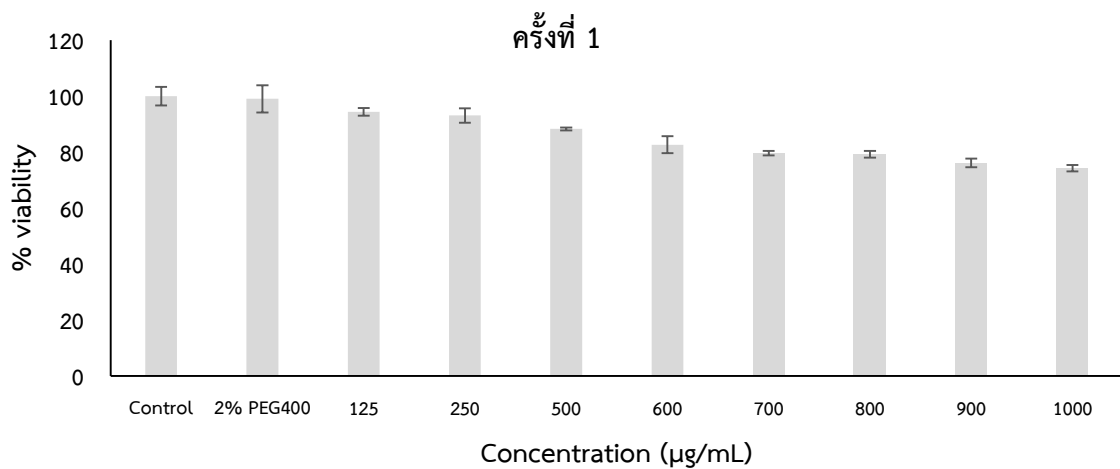
2) หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบที่ไม่มี FBS จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (ที่ไม่มี Fetal Bovine Serum) ที่มีสาร capsaicin ละลายอยู่ในความเข้มข้นต่างๆ (125 - 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงไปในเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลาย PEG400 เป็นตัวทำละลายและกำหนดให้มีปริมาณ PEG400 ไม่เกิน 2% v/v

3) เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร capsaicin ในความเข้มข้นต่างๆ ออก แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบที่ไม่มี FBS (2 รอบ) จากนั้นเติมสารละลาย XTT solution ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (ที่ไม่มี FBS) ลงไปหลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสและ CO₂ ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4) อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ (อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากสารสกัด) โดยปรับให้ค่าการดูดกลืนตัวแสงที่วัดได้จากตัวอย่างที่เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ มีเปอร์เซ็นต์ที่เซลล์มีชีวิตอยู่ (% cell viability) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 1.1.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 125-1000 $\mu\text{g/ml}$ ครั้งที่ 1

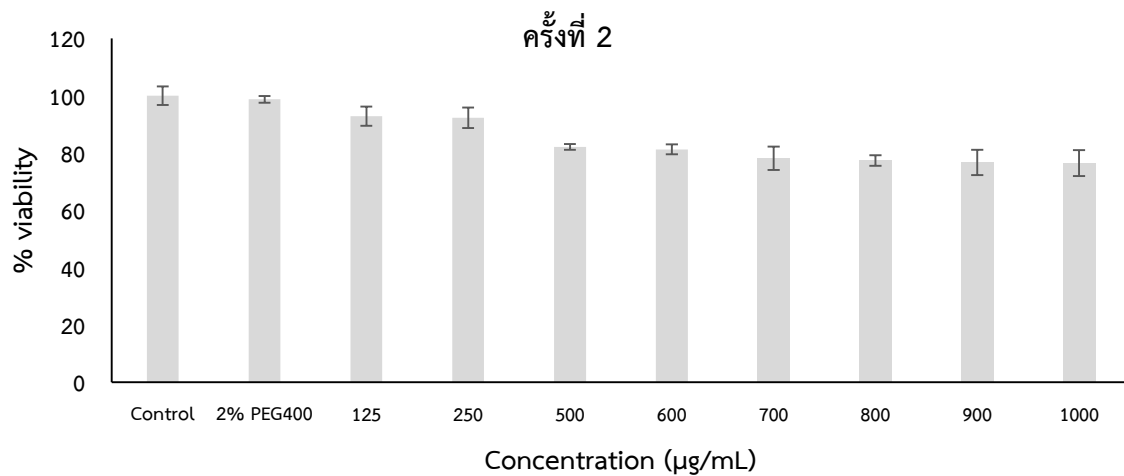
Sample	Control	2% PEG400	Concentration of Capsaicin ($\mu\text{g/mL}$)							
			1000	900	800	700	600	500	250	125
1	0.534	0.515	0.408	0.417	0.439	0.44	0.445	0.486	0.521	0.516
2	0.542	0.548	0.411	0.411	0.435	0.437	0.445	0.481	0.496	0.511
3	0.569	0.566	0.402	0.424	0.429	0.433	0.469	0.485	0.514	0.525
Average	0.548	0.543	0.407	0.417	0.434	0.437	0.453	0.484	0.510	0.517
%Viability	100.00	99.03	74.22	76.11	79.21	79.64	82.61	88.27	93.07	94.35
SD	3.30	4.84	1.37	2.55	0.55	3.01	0.81	1.16	1.56	1.13



ภาพ 1.1.43 ผลความอยู่รอดของเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ capsaicin ตั้งแต่ 125–1000 $\mu\text{g/ml}$ ครั้งที่ 1

ตาราง 1.1.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 125-1000 $\mu\text{g/ml}$ ครั้งที่ 2

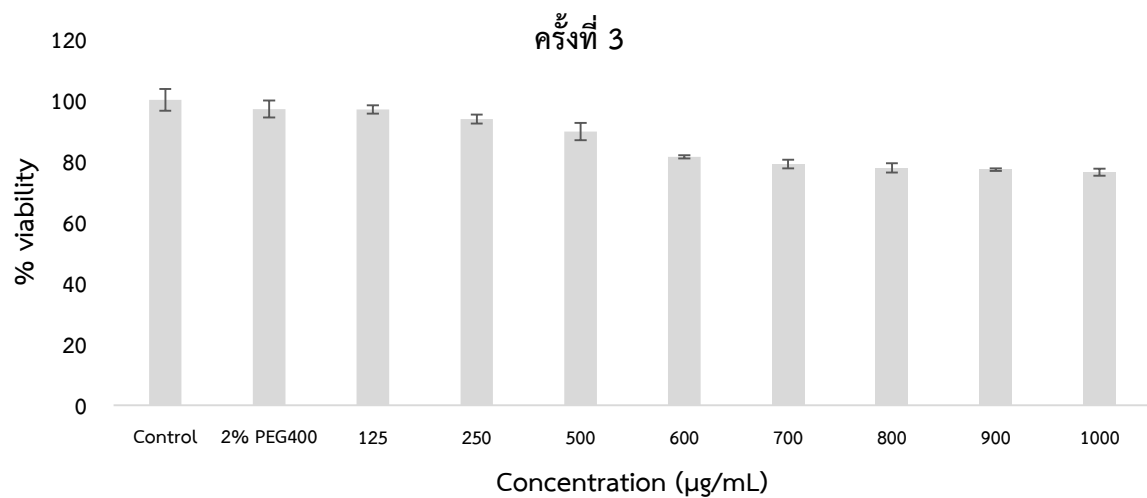
Sample	Control	2% PEG400	Concentration of Capsaicin ($\mu\text{g/mL}$)							
			1000	900	800	700	600	500	250	125
1	0.568	0.555	0.453	0.452	0.447	0.453	0.467	0.471	0.504	0.507
2	0.586	0.558	0.414	0.415	0.44	0.454	0.452	0.462	0.524	0.536
3	0.549	0.568	0.435	0.439	0.431	0.423	0.465	0.465	0.489	0.538
Average	0.568	0.560	0.434	0.435	0.439	0.443	0.461	0.466	0.524	0.527
%Viability	100	98.71	76.45	76.69	77.39	78.10	81.27	82.09	92.31	92.84
SD	3.27	1.21	3.36	3.59	0.98	1.78	4.07	1.83	4.37	4.52



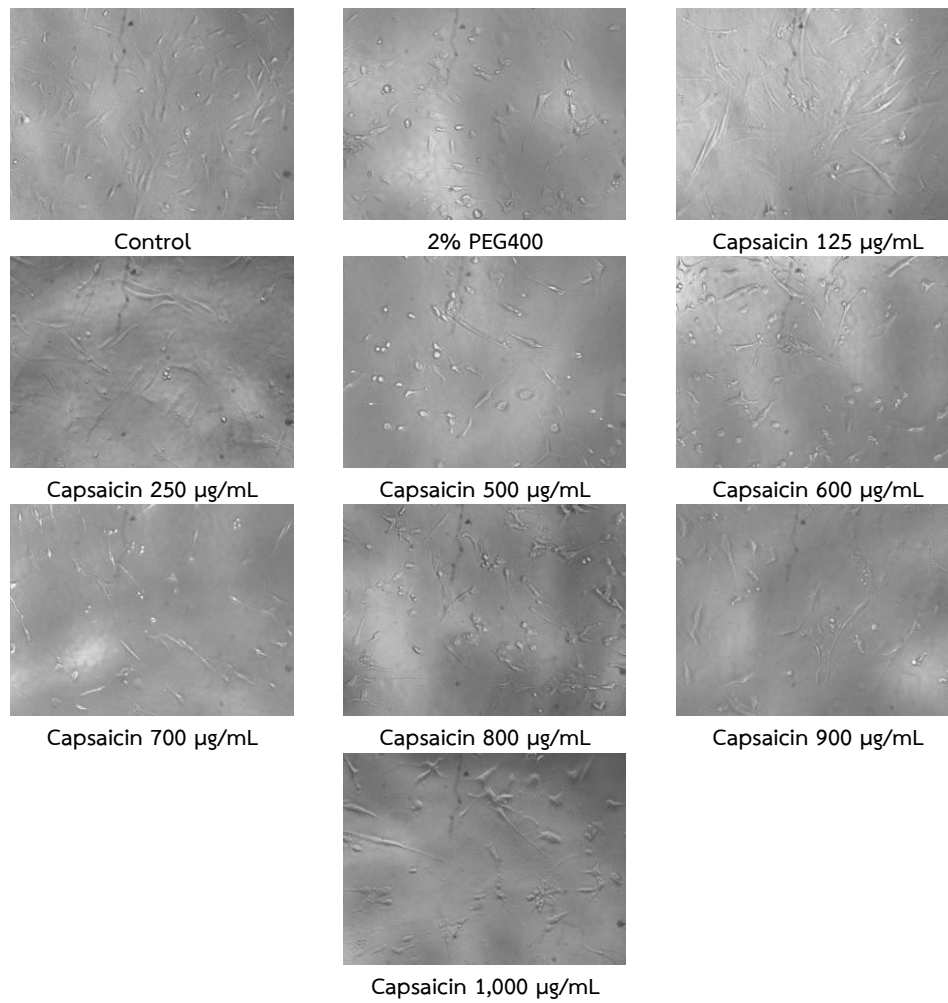
ภาพ 1.1.44 ผลความอยู่รอดของเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ capsaicin ตั้งแต่ 125–1000 $\mu\text{g/ml}$ ครั้งที่ 2

ตาราง 1.1.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 125-1000 $\mu\text{g/ml}$ ครั้งที่ 3

Sample	Control	2% PEG400	Concentration of Capsaicin ($\mu\text{g/mL}$)							
			1000	900	800	700	600	500	250	125
1	0.505	0.494	0.393	0.401	0.398	0.407	0.423	0.449	0.477	0.494
2	0.539	0.518	0.391	0.398	0.399	0.404	0.419	0.472	0.486	0.501
3	0.508	0.493	0.4	0.398	0.409	0.415	0.42	0.47	0.491	0.508
Average	0.517	0.502	0.395	0.399	0.402	0.409	0.421	0.464	0.485	0.501
%Viability	100	96.97	76.29	77.13	77.71	78.99	81.31	89.63	93.69	96.84
SD	3.57	2.78	1.40	1.47	2.79	0.49	1.38	1.50	0.43	1.19



ภาพ 1.1.45 ผลความอยู่รอดของเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ capsaicin ตั้งแต่ 125–1000 $\mu\text{g/ml}$ ครั้งที่ 3



ภาพ 1.1.46 รูปร่างเซลล์ (cell morphology) การทดสอบความเป็นพิษของ capsaicin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 125-1000 µg/ml ที่กำลังขยาย 10X

5.3 การเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของ capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin

นำสารอนุพันธ์ของแคปไซซินที่สังเคราะห์ขึ้นที่ความเข้มข้นเดียวกับสาร capsaicin (700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 2.3 มิลลิโมลาร์) มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีการเดียวกับข้างต้น โดยค่า %cell viability ต้องมากกว่ากลุ่ม capsaicin รวมถึงการเทียบกับกลุ่มควบคุม (เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ ซึ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากสาร capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin)

วิธีการทดลอง

Cell type: Normal Human Dermal Fibroblast (NHDF)

Passage number: 7

Samples: Capsaicin, CSC-sulfate, DHC-sulfate, IC5, IC6, IC7, NIC5, NIC6, NIC7, NINC5, NINC6, NINC7, CAP, As-CAP, Isb-CAP, Ca-CAP, BrCAP, DCAP, HCAP, DHCAP, NCAP, DNCAP, LCAP และ PCAP

1) นำเซลล์ปริมาณ 1×10^4 เซลล์ ซึ่งกระจายตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 200 ไมโครลิตรปิเปต ลงใน 96-well plate แล้วทำการบ่มเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ CO₂ ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบที่ไม่มี FBS จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (ที่ไม่มี Fetal Bovine Serum) ที่มีสาร capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin (Capsaicin, CSC-sulfate, DHC-sulfate, IC5, IC6, IC7, NIC5, NIC6, NIC7, NINC5, NINC6, NINC7, CAP, As-CAP, Isb-CAP, Ca-CAP, BrCAP, DCAP, HCAP, DHCAP, NCAP, DNCAP, LCAP และ PCAP) ละลายอยู่ที่ความเข้มข้น 2.3 มิลลิโมลาร์ลงไปเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลาย PEG400 เป็นตัวทำละลายและกำหนดให้มีปริมาณ PEG400 ไม่เกิน 2% v/v

3) เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดในความเข้มข้นต่างๆ ออก แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบที่ไม่มี FBS (2 รอบ) จากนั้นเติมสารละลาย XTT solution ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตรและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (ที่ไม่มี FBS) ลงไปหลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสและ CO₂ ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4) อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ (อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากสาร capsaicin และ อนุพันธ์ capsaicin) โดยปรับให้ค่าการดูดกลืนตัวแสงที่วัดได้จากตัวอย่างที่เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ มีเปอร์เซ็นต์ที่เซลล์มีชีวิตอยู่ (% cell viability) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 1.1.5 ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของ capsaicin และอนุพันธ์ capsaicin ที่ระดับความเข้มข้น 2.3 มิลลิโมลาร์ ครั้งที่ 1

TIME	Control	Capsaicin and capsaicin derivatives (Conc. 2.3 mM)									
		2% PEG400	Capsaicin	CSC-sulfate	DHC-sulfate	IC5	IC6	IC7	NIC5	NIC6	NIC7
1	1.37	1.30	0.90	0.90	0.90	1.16	1.07	0.98	1.00	0.96	0.89
2	1.33	1.33	0.90	0.90	0.89	1.19	1.09	0.98	1.07	0.98	0.91
3	1.33	1.30	0.90	0.92	0.91	1.19	1.13	0.97	1.06	0.98	0.95
Average	1.34	1.31	0.90	0.91	0.90	1.18	1.10	0.98	1.04	0.97	0.92
%Viability	100.00	97.40	67.06	67.40	66.78	87.84	81.74	72.69	77.45	72.49	68.39
SD	1.84	1.31	0.33	1.45	1.06	1.37	2.48	0.46	3.83	1.00	3.21

TIME	Capsaicin and capsaicin derivatives (Conc. 2.3 mM)											
	NINC5	NINC6	NINC7	As-CAP	Isb-CAP	Ca-CAP	BrCAP	DCAP	HCAP	DHCAP	NCAP	DNCAP
1	0.96	0.95	0.99	0.99	0.97	0.91	0.98	0.89	0.91	0.91	0.96	1.00
2	0.95	0.91	1.00	0.99	0.99	0.92	0.98	0.90	0.88	0.90	0.99	0.97
3	0.95	0.97	0.97	0.92	1.02	0.90	0.96	0.92	0.89	0.94	0.99	0.99
Average	0.95	0.94	0.98	0.97	0.99	0.91	0.97	0.90	0.89	0.91	0.98	0.99
%Viability	70.90	70.06	73.18	71.82	73.78	67.65	72.17	67.25	66.53	68.02	72.84	73.33
SD	0.34	3.36	1.49	4.24	2.23	0.94	1.23	1.44	1.35	1.98	1.49	1.27

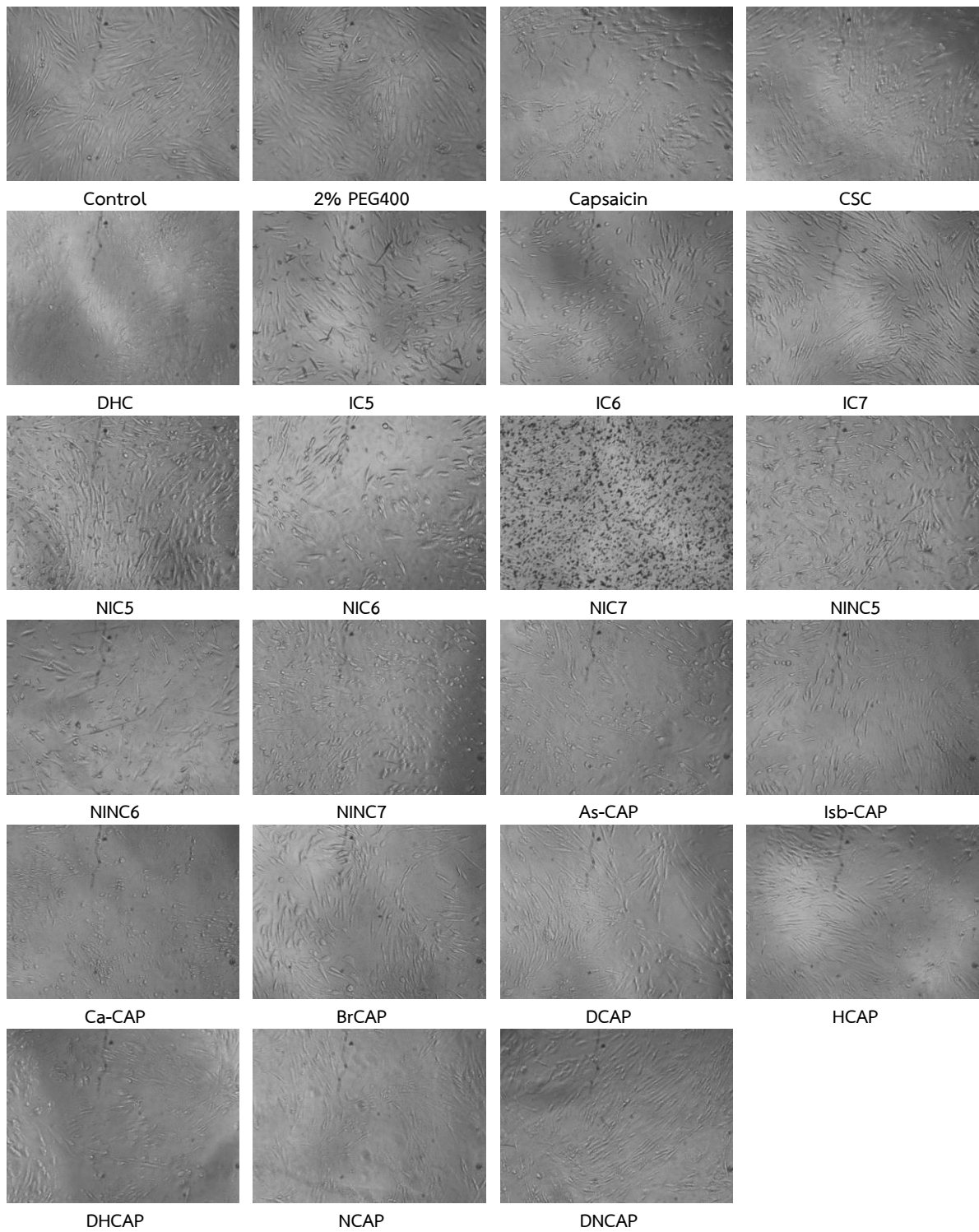
ตาราง 1.1.6 ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของ capsaicin และอนุพันธ์ capsaicin ที่ระดับความเข้มข้น 2.3 มิลลิโมลาร์ ครั้งที่ 2

TIME	Control	Capsaicin and capsaicin derivatives (Conc. 2.3 mM)									
		2% PEG400	Capsaicin	CSC-sulfate	DHC-sulfate	IC5	IC6	IC7	NIC5	NIC6	NIC7
1	1.21	1.21	0.86	0.86	0.86	1.14	1.09	0.96	1.07	0.92	0.86
2	1.29	1.24	0.89	0.88	0.88	1.11	1.07	0.96	0.99	0.98	0.88
3	1.27	1.25	0.86	0.87	0.86	1.16	1.08	0.95	1.08	0.93	0.88
Average	1.25	1.24	0.87	0.87	0.86	1.13	1.08	0.96	1.05	0.94	0.87
%Viability	100.00	98.51	69.25	69.32	68.93	90.35	86.15	76.50	83.47	75.15	69.70
SD	3.37	1.74	1.82	0.89	1.31	2.27	0.60	0.59	4.78	3.82	1.22

TIME	Capsaicin and capsaicin derivatives (Conc. 2.3 mM)											
	NINC5	NINC6	NINC7	As-CAP	Isb-CAP	Ca-CAP	BrCAP	DCAP	HCAP	DHCAP	NCAP	DNCAP
1	0.93	0.90	0.99	0.92	0.98	0.87	0.94	0.87	0.86	0.88	0.93	0.89
2	0.88	0.89	0.99	0.97	0.92	0.87	0.94	0.87	0.85	0.90	0.91	0.92
3	0.89	0.90	0.97	0.90	0.97	0.87	0.93	0.87	0.86	0.88	0.94	0.94
Average	0.90	0.90	0.98	0.93	0.95	0.87	0.94	0.87	0.86	0.89	0.93	0.92
%Viability	71.82	71.66	78.36	73.95	76.10	69.27	74.67	69.32	68.18	70.68	74.08	73.26
SD	3.15	0.76	1.06	3.79	3.68	0.07	0.44	0.07	0.35	1.71	1.56	2.87

ตาราง 1.1.7 สรุปผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin

ลำดับที่	ชื่อสาร	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	หมายเหตุ
1	Capsaicin (CAPS)	-	-	ตัวเปรียบเทียบ
2	CSC-sulfate	not significantly	not significantly	-
3	DHC-sulfate	cytotoxic	cytotoxic	-
4	IC5	>80%	>80%	-
5	IC6	>80%	>80%	-
6	IC7	non-cytotoxic	non-cytotoxic	-
7	NIC5	>80%	>80%	-
8	NIC6	non-cytotoxic	non-cytotoxic	insoluble
9	NIC7	not significantly	not significantly	insoluble
10	NINC5	non-cytotoxic	non-cytotoxic	-
11	NINC6	not significantly	not significantly	insoluble
12	NINC7	non-cytotoxic	non-cytotoxic	-
13	As-CAP	non-cytotoxic	non-cytotoxic	-
14	Isb-CAP	non-cytotoxic	non-cytotoxic	-
15	Ca-CAP	not significantly	not significantly	-
16	Br-CAP	non-cytotoxic	non-cytotoxic	-
17	DCAP	not significantly	not significantly	-
18	HCAP	cytotoxic	cytotoxic	-
19	DHCAP	not significantly	not significantly	-
20	NCAP	non-cytotoxic	non-cytotoxic	-
21	DNCAP	non-cytotoxic	non-cytotoxic	-



ภาพ 1.1.47 รูปร่างเซลล์ (cell morphology) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ capsaicin และอนุพันธ์ของ capsaicin



NIC6



NIC7



NINC6

ภาพ 1.1.48 สารอนุพันธ์ capsaicin ที่มีข้อจำกัดในการละลาย ได้แก่ NIC6, NIC7 และ NINC6 ที่ความเข้มข้น 2.3 มิลลิโมลาร์ โดยใช้สารละลาย PEG 400 เป็นตัวช่วยละลายและกำหนดให้มีปริมาณ PEG400 ไม่เกิน 2% v/v

6) การทดสอบความคงตัวของอนุพันธ์ capsinoids ภายใต้สภาวะของอุณหภูมิและแสงต่างๆ ด้วย HPLC technique

วิธีการทดลอง

สามารถทำการศึกษาโดยใช้ HPLC โดยเตรียม capsinoid derivatives ความเข้มข้น 1 mM โดยใช้ polar protic solvent ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}/80:20$ v/v with 0.025 M CH_3COOH) โดยทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C และทำการดั่งสารละลายที่จะวิเคราะห์หาปริมาณคงเหลือของ capsinoids derivatives โดยทำการดั่งสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ครั้งละ 20 μL และทำการวิเคราะห์ทุกๆ 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

7) เตรียม formulation ที่เหมาะสมของ capsaicinoids ที่ได้ปรับปรุงให้มีความเผ็ดลดลง capsinoids ที่มีความคงตัวเพิ่มขึ้น และ metabolites ของ capsaicinoids และ capsinoids เพื่อทำการทดสอบสมบัติต่างๆ

วิธีการทดลอง

ส่วนที่ 1 เตรียมผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกในรูปแบบน้ำใส

เตรียมผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกในรูปแบบน้ำใสความเข้มข้นสูงที่มีความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมี และมีอายุการใช้งานอย่างน้อย 2 ปี โดยใช้สารสกัดพริกจากการวิจัยของอุทัย วิชัยและคณะฯ (พ.ศ. 2558) ซึ่งเป็นสารสกัดพริกที่มีความเข้มข้นสูง มีลักษณะขุ่นหนืด สีน้ำตาลเข้ม วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ capsaicin ร้อยละ 2.85 และ dihydrocapsaicin ร้อยละ 2.58 โดยน้ำหนัก หรือคิดเป็นค่ารวมของ capsaicin และ dihydrocapsaicin ร้อยละ 5.43-5.45 โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตาราง 1.1.8

ตาราง 1.1.8 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ capsaicin และ dihydrocapsaicin ในสารสกัดพริกเข้มข้น

Code	น้ำหนักตัวอย่าง (mg)	ปริมาณสาร			
		capsaicin (mg)	dihydrocapsaicin (mg)	capsaicin + dihydrocapsaicin (mg) (% weight/weight)	
Capsicum-2	157.2	4.48	4.05	8.53	5.43
Capsicum-3	162.1	4.64	4.17	8.81	5.44
Capsicum-4	161.9	4.66	4.17	8.83	5.45

1. เตรียมผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกในรูปแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก

ใช้พอลิเมอร์ Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) ที่ความหนืด 2 ระดับ คือ AN5 และ AN15 โดยเตรียมเป็นสารละลายพอลิเมอร์เข้มข้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ทั้ง 2 ชนิด จากนั้นนำสารละลายพอลิเมอร์เข้มข้นที่เตรียมได้มาผสมร่วมกับสารสกัดพริกเข้มข้น โดยใช้สารละลายพอลิเมอร์เข้มข้นร้อยละ 12.5, 25 และ 50 โดยน้ำหนักของตำรับตามลำดับ

ทำการทดลองในลักษณะเดียวกันโดยใช้สารลดแรงตึงผิว 2 ชนิด คือ Tween 80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่เข้ากันกับน้ำได้ดี และ Span 80 ที่เข้ากันกับน้ำมันได้ดี ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 และ 5.0 โดยน้ำหนักของตำรับตามลำดับ จากนั้นใช้ส่วนผสมของสารละลายพอลิเมอร์และสารลดแรงตึงผิวต่างๆ กัน ดังแสดงในตาราง 1.1.9 และ ตาราง 1.1.10 ดูผลการทดลองทันทีและทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมงแล้วบันทึกผล

ตาราง 1.1.9 แสดงผลลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกรูปแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก ร่วมกับ 20% HPMC ความเข้มข้นร้อยละ 12.5, 25 และ 50 โดยน้ำหนัก และ/หรือ Tween 80 และ Span 80 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5.0 และ 10.0 โดยน้ำหนัก

Rx	ความเข้มข้นคิดเป็น %w/w						บันทึกผล ลักษณะทางกายภาพ
	Capsicum	20% HPMC AN5	20% HPMC AN15	Tween 80	Span 80	Water	
1	50.0	-	-	-	-	50.0	แยกเป็นส่วนใสสีส้มที่ก้นหลอด สูงประมาณ 0.4 ซม. ด้านบนเป็นสีสารสกัด
2	50.0	12.5	-	-	-	37.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มเกือบทั้งหมด เหลือเป็นส่วนใส สีสารสกัดด้านบนสูง 0.9 ซม.
3	50.0	25.0	-	-	-	25.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มกระจายตัวอยู่ในสารสกัดพริกทั่วทั้งหลอด
4	50.0	50.0	-	-	-	0.00	แยกเป็นส่วนใสที่ก้นหลอดสูง 1.9 ซม. ด้านบนเป็นสีของสารสกัดพริก
5	50.0	-	12.5	-	-	37.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มทั่วทั้งหลอด
6	50.0	-	25.0	-	-	25.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มกระจายตัวอยู่ในสารสกัดพริกทั่วทั้งหลอด
7	50.0	-	50.0	-	-	0.00	แยกเป็นส่วนใสที่ก้นหลอดสูง 1.5 ซม. ด้านบนเป็นสีของสารสกัด
8	50.0	-	-	2.5	-	47.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มทั่วทั้งหลอด
9	50.0	-	-	5.0	-	45.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มทั่วทั้งหลอด
10	50.0	-	-	10.0	-	40.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มทั่วทั้งหลอด
11	50.0	-	-	-	2.5	47.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มปนน้ำตาลเข้ม/ดำทั่วทั้งหลอด
12	50.0	-	-	-	5.0	45.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มปนน้ำตาลเข้ม/ดำทั่วทั้งหลอด
13	50.0	-	-	-	10.0	40.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มปนน้ำตาลเข้ม/ดำทั่วทั้งหลอด
14	50.0	25.0	-	2.5	-	22.5	เข้ากันได้ แต่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มีส่วนใสๆ ของพอลิเมอร์แทรกในสารสกัด
15	50.0	25.0	-	5.0	-	20.0	เข้ากันได้ แต่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มีส่วนใสๆ ของพอลิเมอร์แทรกในสารสกัด
16	50.0	-	25.0	2.5	-	22.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มและไม่เป็นเนื้อเดียวกัน
17	50.0	-	25.0	5.0	-	20.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มและแยกเป็นส่วนใส ด้านบนสูง 1 ซม.
18	50.0	25.0	-	-	2.5	22.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มและไม่เป็นเนื้อเดียวกัน
19	50.0	25.0	-	-	5.0	20.0	ตกเป็นตะกอนสีส้มปนน้ำตาลเข้มและไม่เป็นเนื้อเดียวกัน
20	50.0	-	25.0	-	2.5	22.5	ตกเป็นตะกอนสีส้มและไม่เป็นเนื้อเดียวกัน
21	50.0	-	25.0	-	5.0	20.0	แยกเป็นชั้นใสด้านล่างสูง 0.5 ซม. ด้านบนเป็นสีสารสกัด

ตาราง 1.1.10 แสดงผลลักษณะทางกายภาพของการผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยน้ำหนัก ร่วมกับ 2% HPMC AN5 และ AN 15 ความเข้มข้นร้อยละ 7.5, 15 และ 30 โดยน้ำหนัก และ/หรือ Tween 80 และ Span 80 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5.0 และ 6.0 โดยน้ำหนัก

Rx	ความเข้มข้นคิดเป็น %w/w						บันทึกผล ลักษณะทางกายภาพ
	Capsicum	20% HPMC AN5	20% HPMC AN15	Tween 80	Span 80	Water	
22	70.0	-	-	-	-	30.0	แยกเป็นตะกอนสีส้มทั่วทั้งหลอด
23	70.0	15.0	-	-	-	15.0	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็นเนื้อเดียวกัน
24	70.0	30.0	-	-	-	0.0	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็นเนื้อเดียวกัน
25	70.0	-	15.0	-	-	15.0	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็นเนื้อเดียวกัน แต่หนืดมากกว่า 24
26	70.0	-	30.0	-	-	0.00	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็นเนื้อเดียวกัน แต่หนืดมากกว่า 24
27	70.0	-	-	2.5	-	27.5	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็นเนื้อเดียวกัน
28	70.0	-	-	5.0	-	25.0	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็นเนื้อเดียวกัน
29	70.0	-	-	6.0	-	24.0	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็นเนื้อเดียวกัน
30	70.0	-	-	-	2.5	27.5	ตกเป็นตะกอนสีส้ม
31	70.0	-	-	-	5.0	25.0	แยกเป็น 2 ชั้น ตะกอนสีอ่อนกว่าอยู่ด้านล่างครึ่งหลอดและด้านบนเป็นสีสารสกัด
32	70.0	-	-	-	6.0	24.0	ดูเหมือนสารสกัดแต่เป็นเมือก ไม่เป็นเนื้อเดียวกันกับสารสกัด
33	70.0	15.0	-	2.5	-	12.5	เปลี่ยนสีเป็นออกแดง เป็นเนื้อเดียวกัน
34	70.0	15.0	-	5.0	-	10.0	เปลี่ยนสีเป็นออกแดง เป็นเนื้อเดียวกัน แต่หนืดกว่า 33
35	70.0	-	15.0	2.5	-	12.5	แยกเป็นส่วนใสด้านล่างสูง 0.4 ซม.
36	70.0	-	15.0	5.0	-	10.0	แยกเป็นส่วนใสด้านล่างสูง 0.5 ซม.
37	70.0	15.0	-	-	2.5	12.5	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็นเนื้อเดียวกัน
38	70.0	15.0	-	-	5.0	10.0	เข้ากันได้ดีกับสารสกัดพริกเป็นเนื้อเดียวกัน
39	70.0	-	15.0	-	2.5	12.5	แยกเป็นส่วนใสด้านล่าง สูง 0.4 ซม.
40	70.0	-	15.0	-	5.0	10.0	แยกเป็นส่วนใสด้านล่าง สูง 0.4 ซม.
41	70.0	30.0 (40% PG)	-	-	-	-	ไม่เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน กลับขวดแล้วมีสีของตะกอนสีส้มติดรอบขวด ตั้งทิ้งไว้แล้วค่อยๆ แยกชั้น

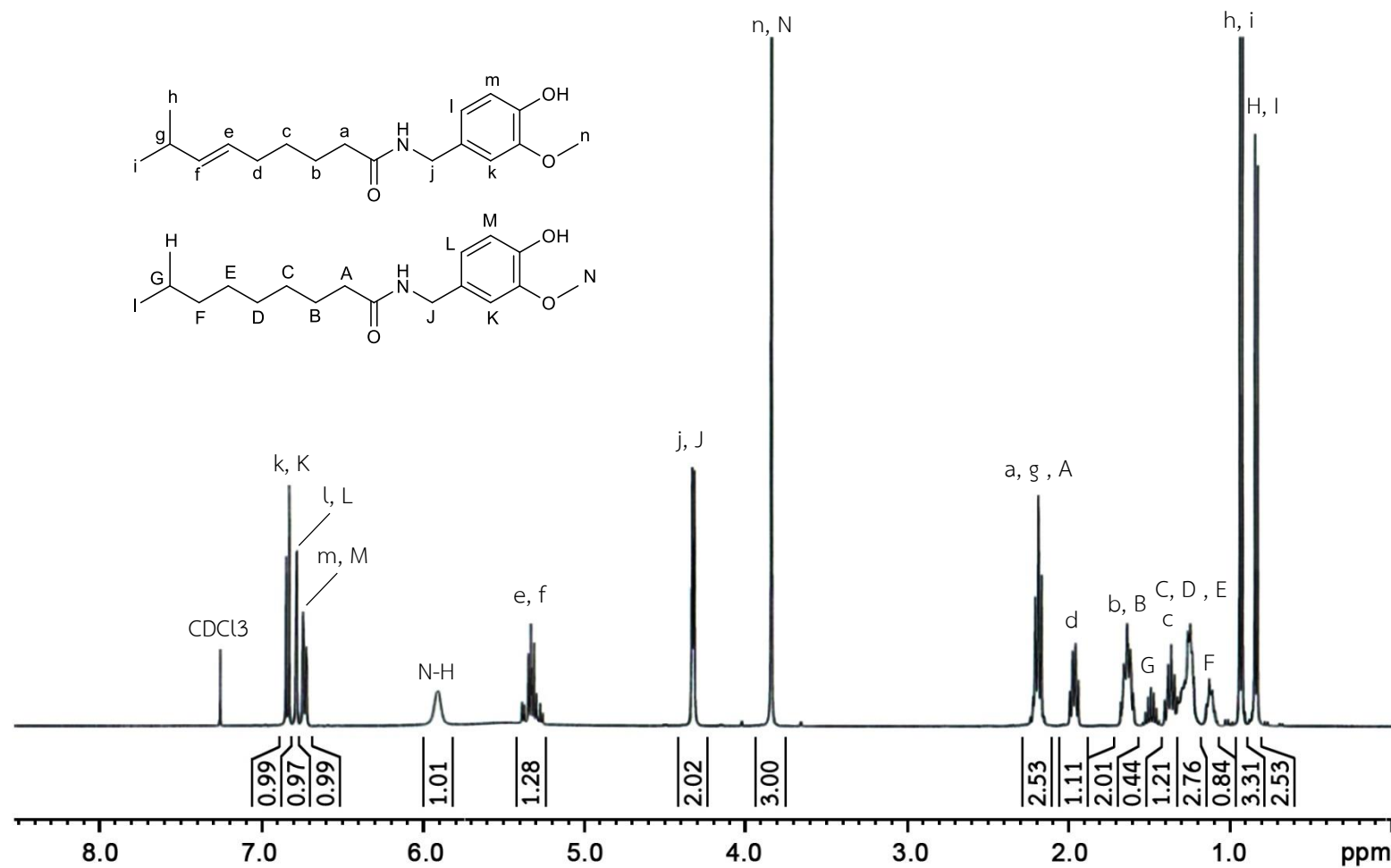
ตาราง 1.1.11 แสดงผลลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกแบบน้ำใสความเข้มข้นร้อยละ 20-100 โดยน้ำหนัก และ Deep Eutectic Mixture (DEM) ความเข้มข้นร้อยละ 0-80 โดยน้ำหนัก

Rx	ความเข้มข้นคิดเป็น %w/w		บันทึกผล ลักษณะทางกายภาพ
	สารสกัดพริก	DEM	
42	100.0	-	สารสกัดเป็นเนื้อเดียว สีน้ำตาลเข้ม/ดำ ค่อนข้างหนืดแต่ไหลได้ดี ไม่มีตะกอน
43	80.0	20.0	แยกออกเป็นชั้นของสารสกัดด้านบนและ DEM ด้านล่างชัดเจน ความสูงของส่วนใสเท่ากับปริมาณ DEM ที่ใส่ลงไปคือ 1 ใน 4
44	60.0	40.0	แยกออกเป็นชั้นของสารสกัดด้านบนและ DEM ด้านล่างชัดเจน ความสูงของส่วนใสเท่ากับปริมาณ DEM ที่ใส่ลงไปคือ 2 ใน 4
45	40.0	60.0	แยกออกเป็นชั้นของสารสกัดด้านบนและ DEM ด้านล่างชัดเจน ความสูงของส่วนใสเท่ากับปริมาณ DEM ที่ใส่ลงไปคือ 2 ใน 3
46	20.0	80.0	แยกออกเป็นชั้นของสารสกัดด้านบนและ DEM ด้านล่างชัดเจน ความสูงของส่วนใสเท่ากับปริมาณ DEM ที่ใส่ลงไปคือ 3 ใน 4

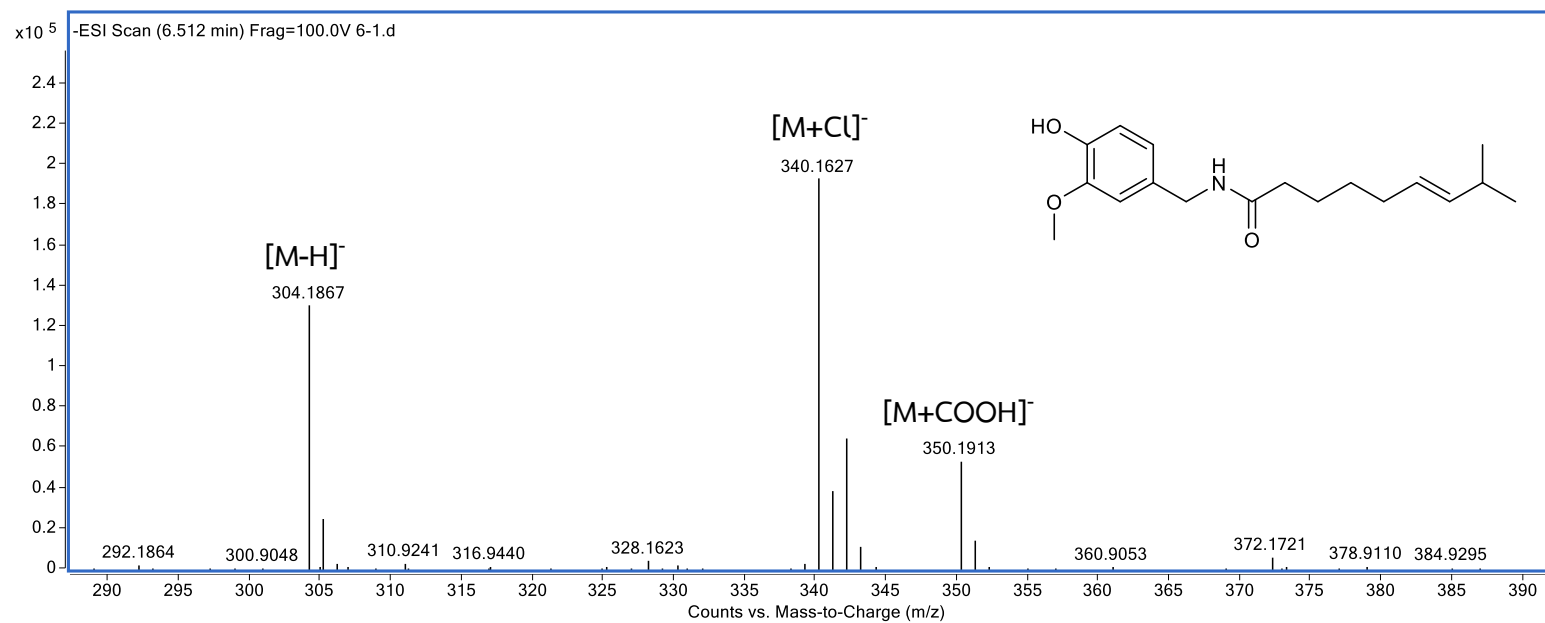
ภาคผนวก 1.2

^1H , ^{13}C -NMR, FT-IR และ Mass spectrum ของสารผลิตภัณฑ์

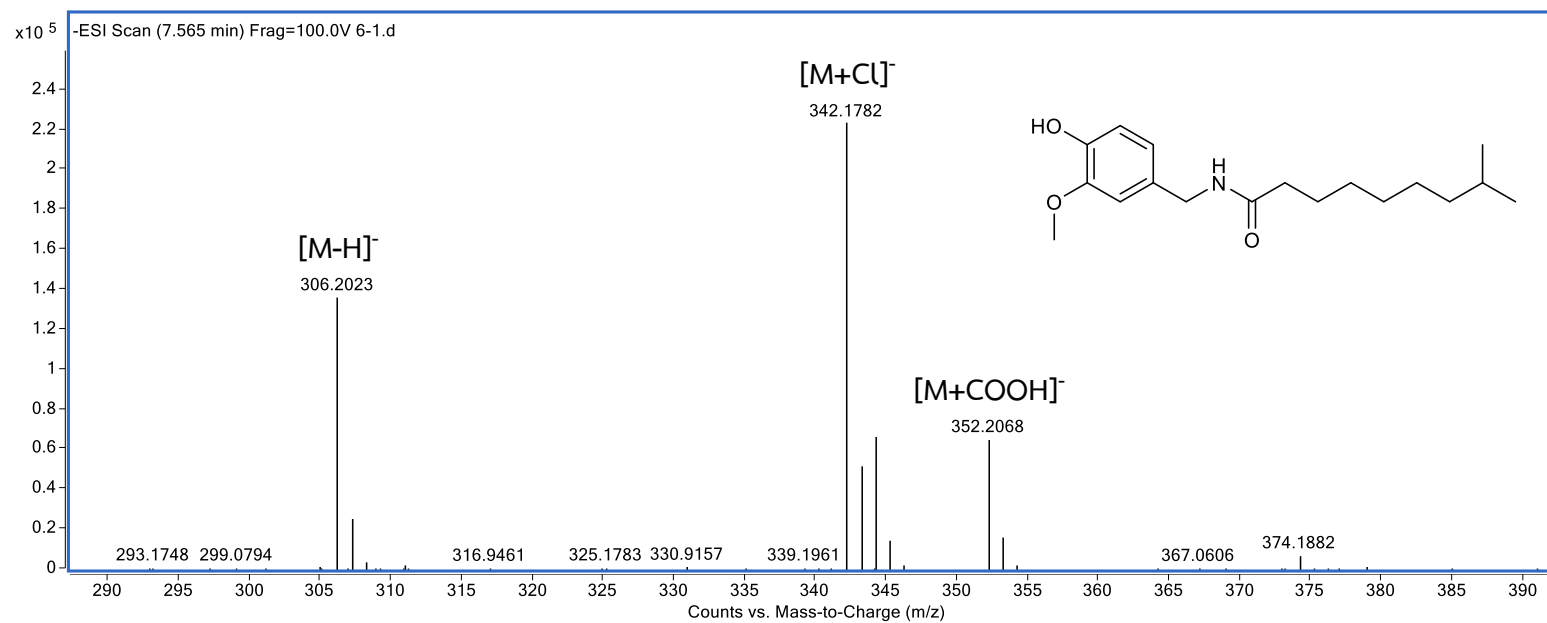
1) เตรียม 90% capsaicinoids จากสารสกัดพริกด้วยวิธีการตกผลึก



ภาพ 1.2.1 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร capsaicinoids >90% HPLC; (chloroform-*d*, 400 MHz)



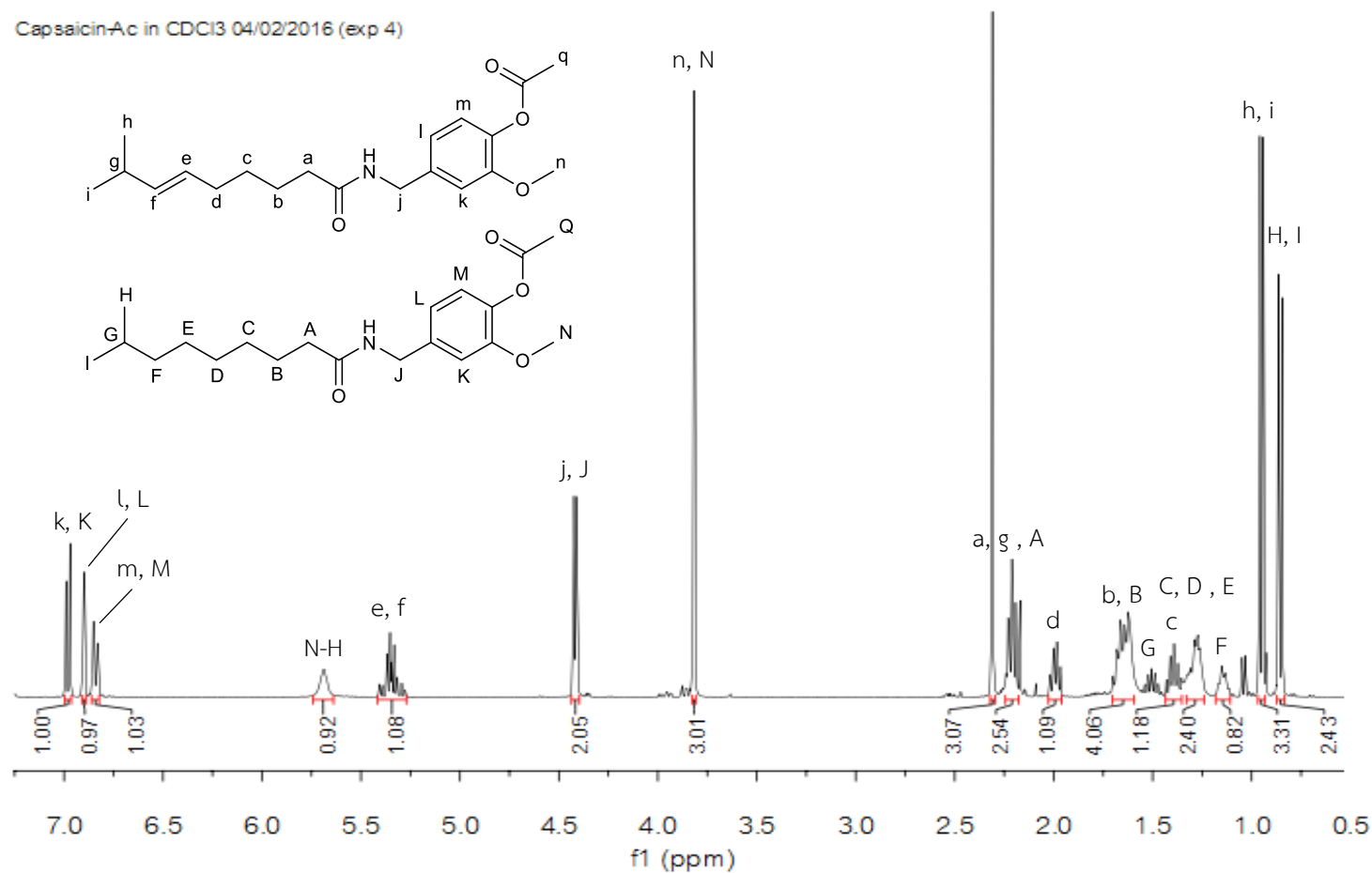
ภาพ 1.2.2 –ESI-MS m/z ของสาร capsaicin ในสาร capsaicinoids >90% HPLC



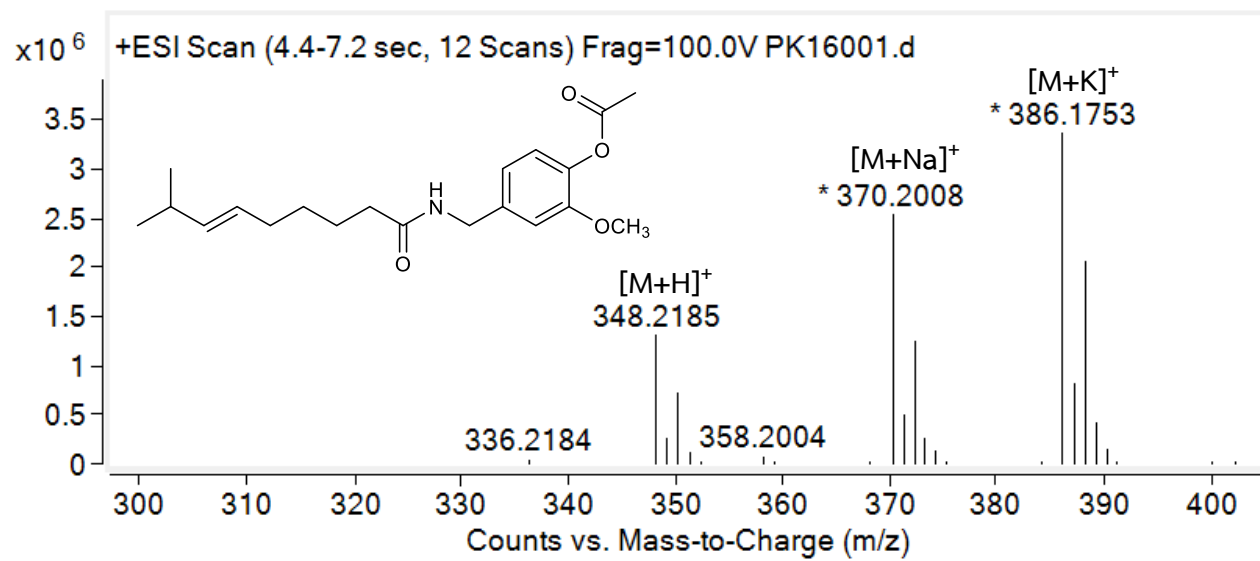
ภาพ 1.2.3 –ESI-MS m/z ของสาร dihydrocapsaicin ในสาร capsaicinoids >90% HPLC

2) เตรียม capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลง

2.1) โดยการปรับปรุง capsaicin ด้วยสารในกลุ่ม acetate carbamate phosphate proline และ glucose ที่ hydroxyl group ของ aromatic moiety

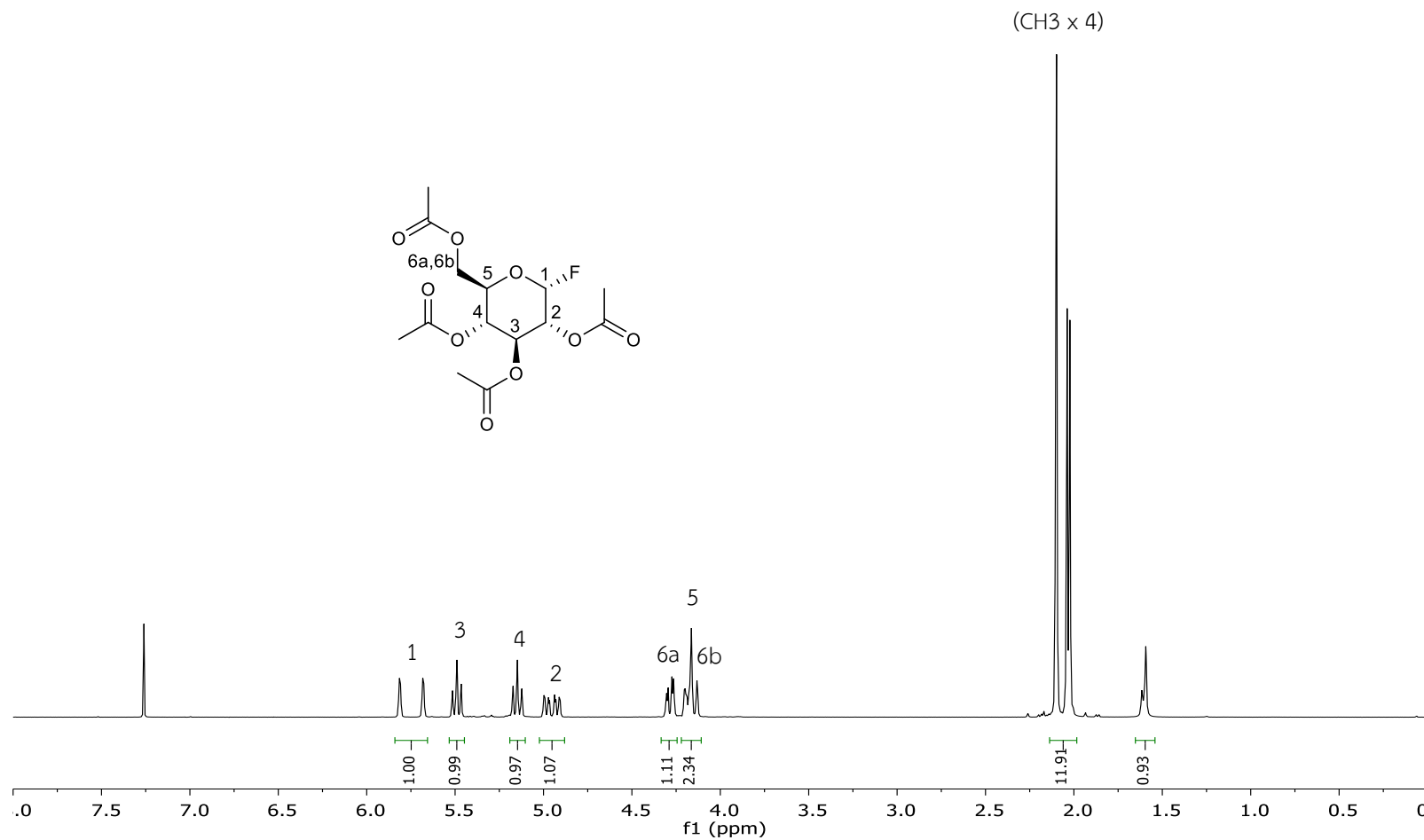


ภาพ 1.2.4 ¹H-NMR spectrum ของ acetyl capsaicin; (chloroform-*d*, 400 MHz)



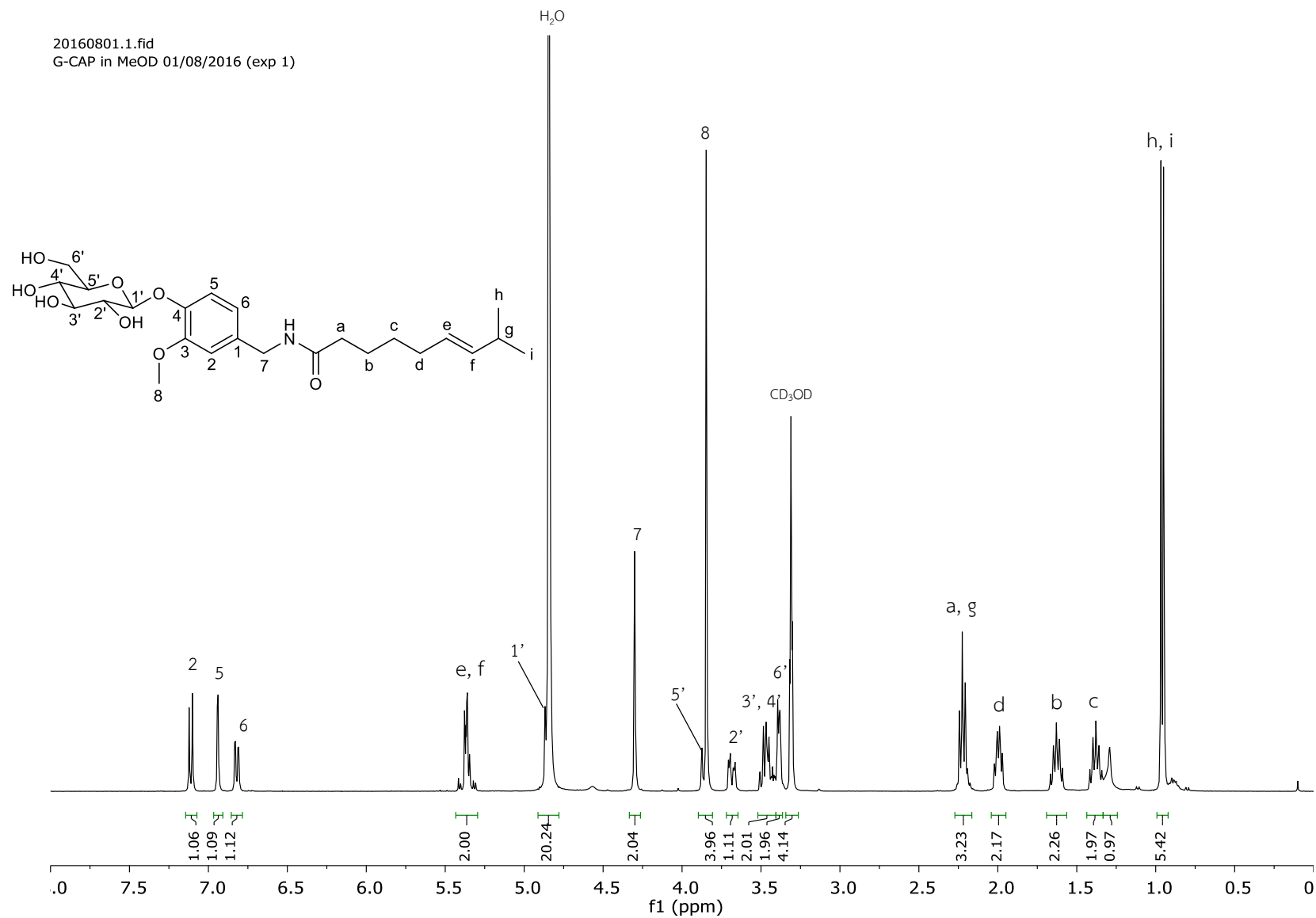
ภาพ 1.2.5 Mass spectrum ของ acetyl capsaicin

2.1.1) การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ glucose capsaicin



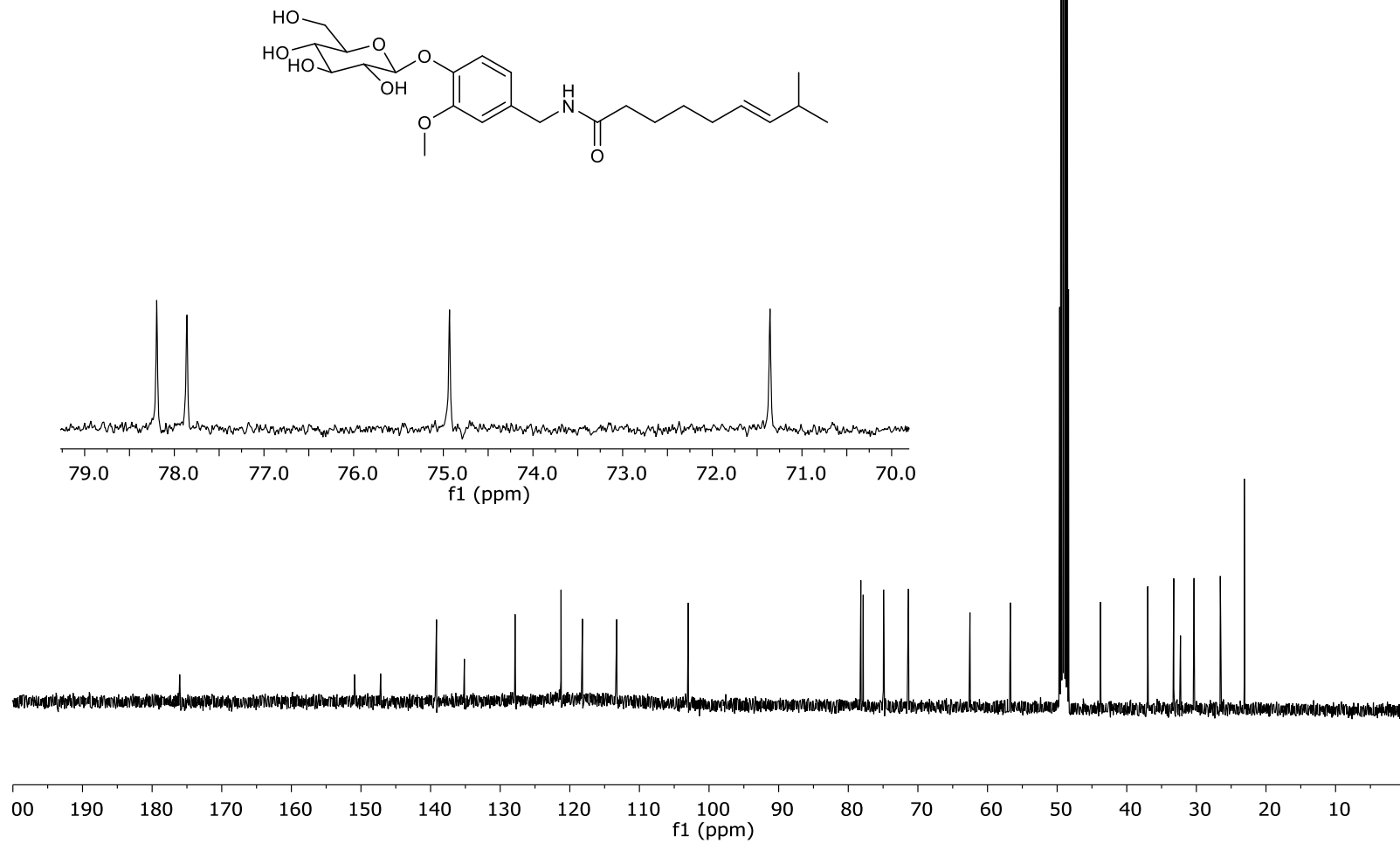
ภาพ 1.2.6 ^1H -NMR spectrum ของสารผลิตภัณฑ์ tetraacetyl- α -D-glucose fluoride ใน chloroform-*d*

20160801.1.fid
G-CAP in MeOD 01/08/2016 (exp 1)

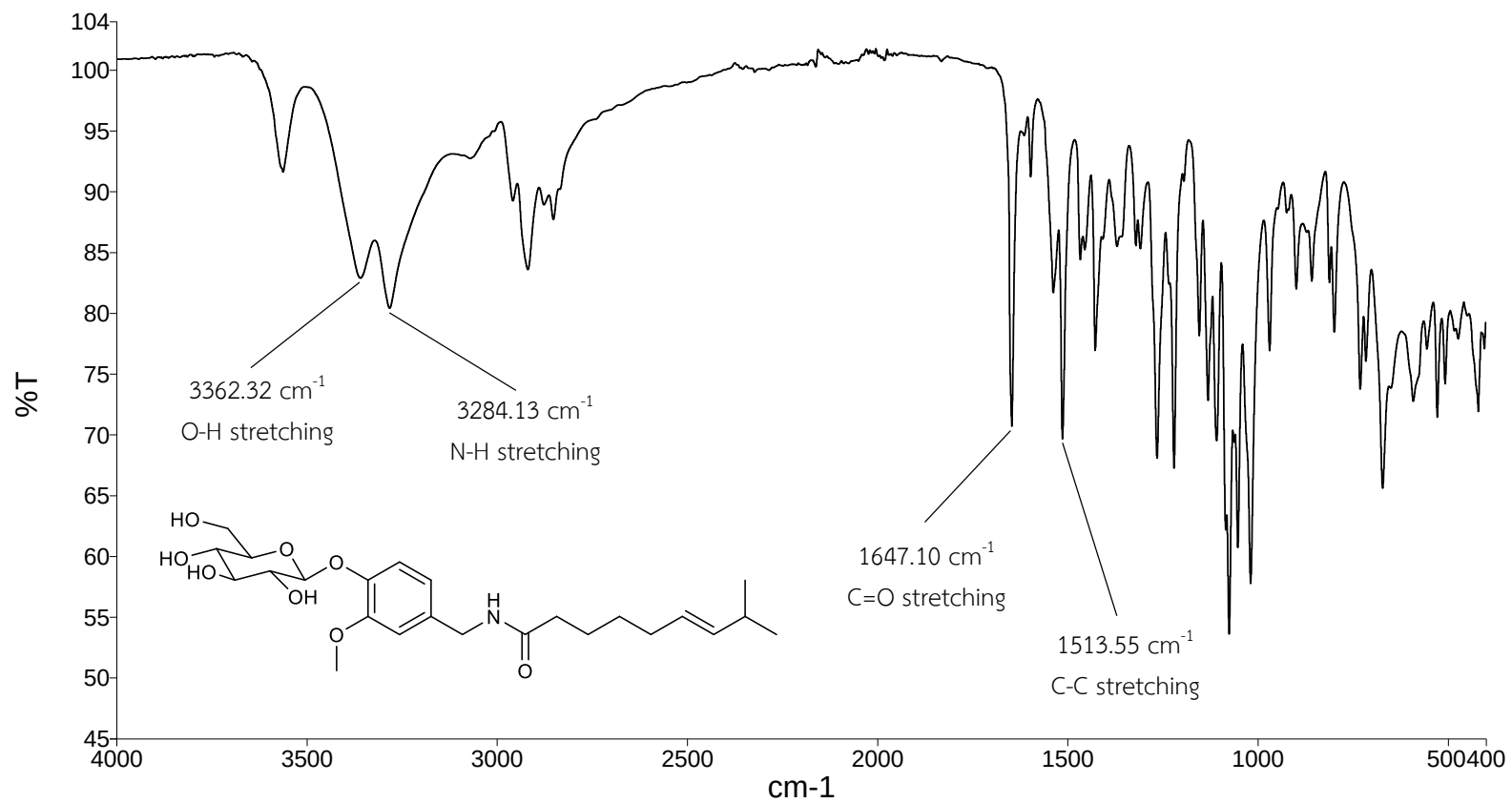


ภาพ 1.2.7 ^1H -NMR spectrum ของ capsaicin- β -D-glucopyranoside

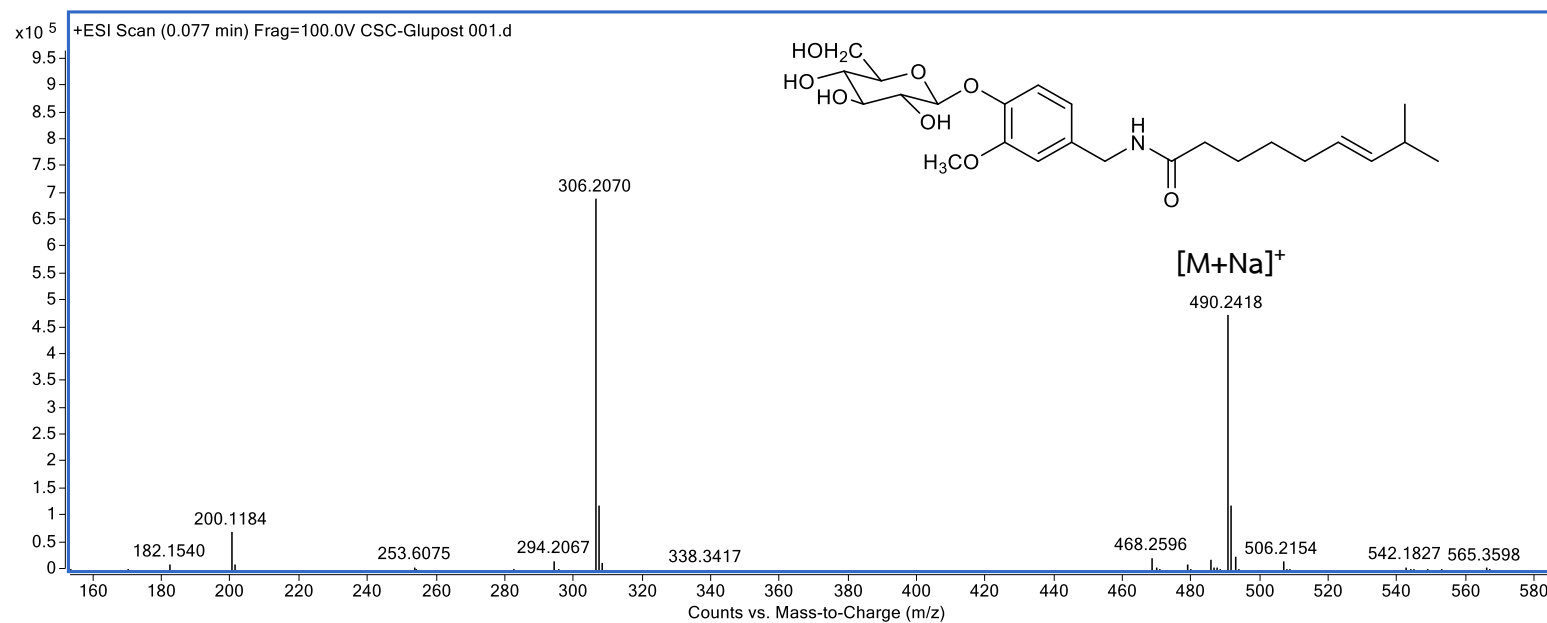
20160801.2.fid
 13C G-CAP in MeOD 01/08/2016 (exp 2)



ภาพ 1.2.8 ^{13}C -NMR spectrum ของ capsaicin- β -D-glucopyranoside

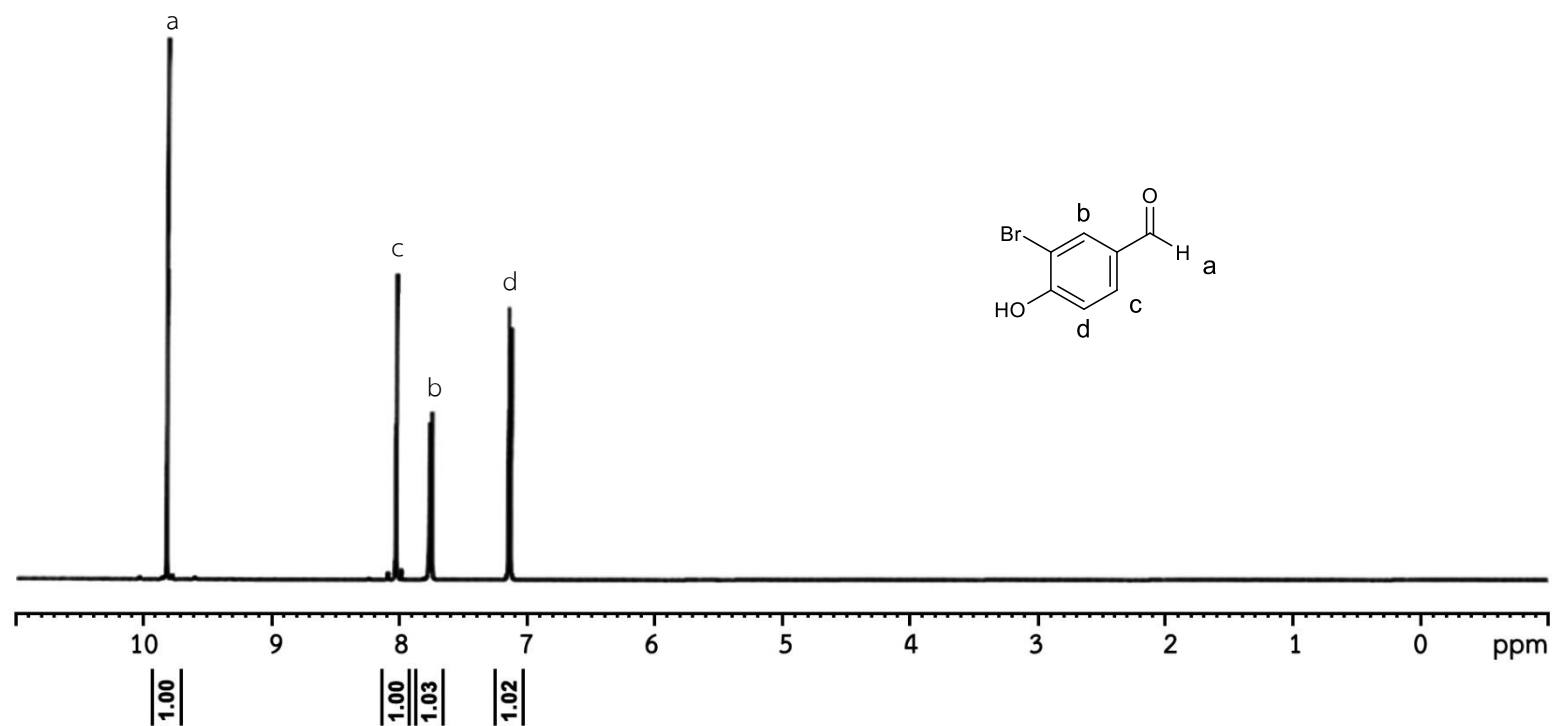


ภาพ 1.2.9 FT-IR spectrum ของ capsaicin- β -D-glucopyranoside



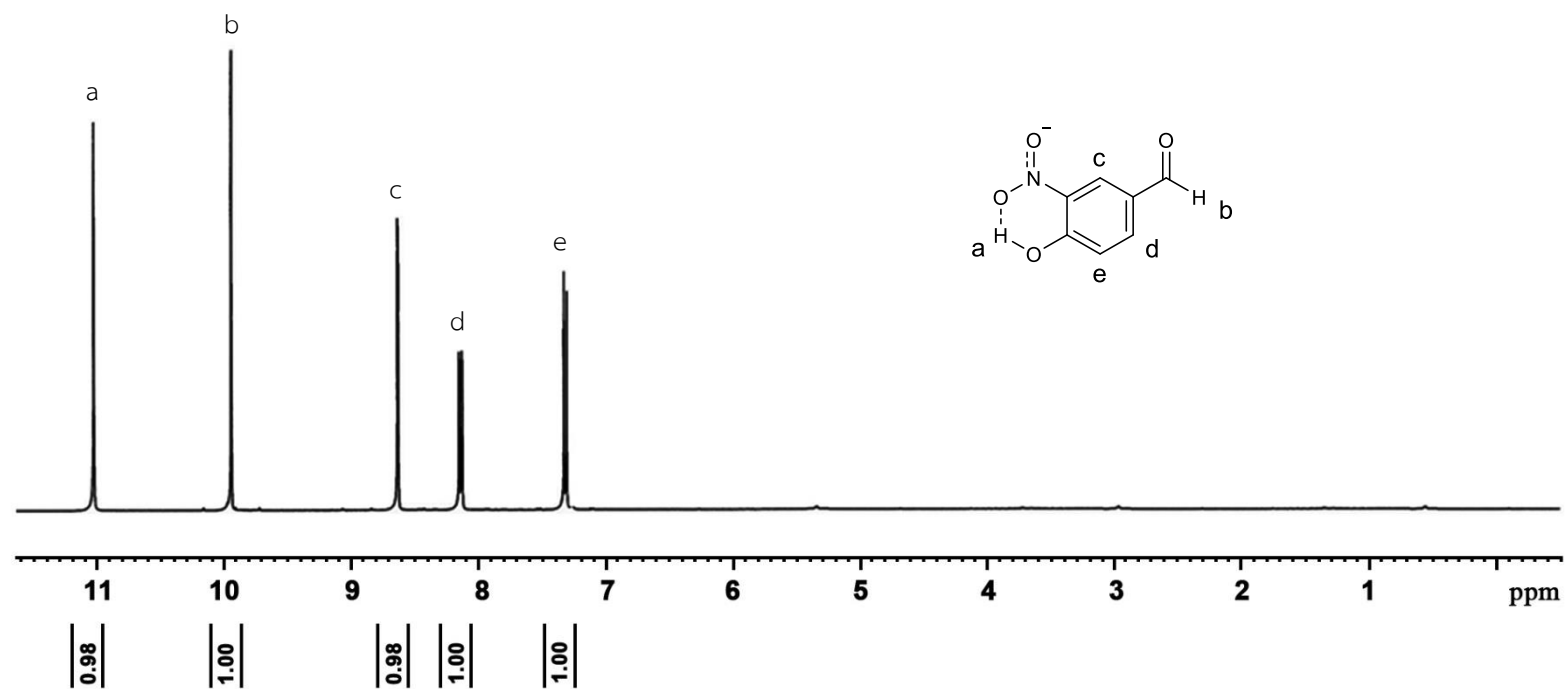
ภาพ 1.2.10 (+ESI) LC-MS-MS spectrum ของ capsaicin- β -D-glucopyranoside

2.2) การปรับปรุง capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลงด้วยการแทนที่กลุ่ม methoxy ของ aromatic moiety โดยปฏิกิริยา coupling reaction ระหว่าง vanillylamine derivatives กับ medium chain fatty acid (MCFA) derivatives โดยใช้ standard peptide coupling agent



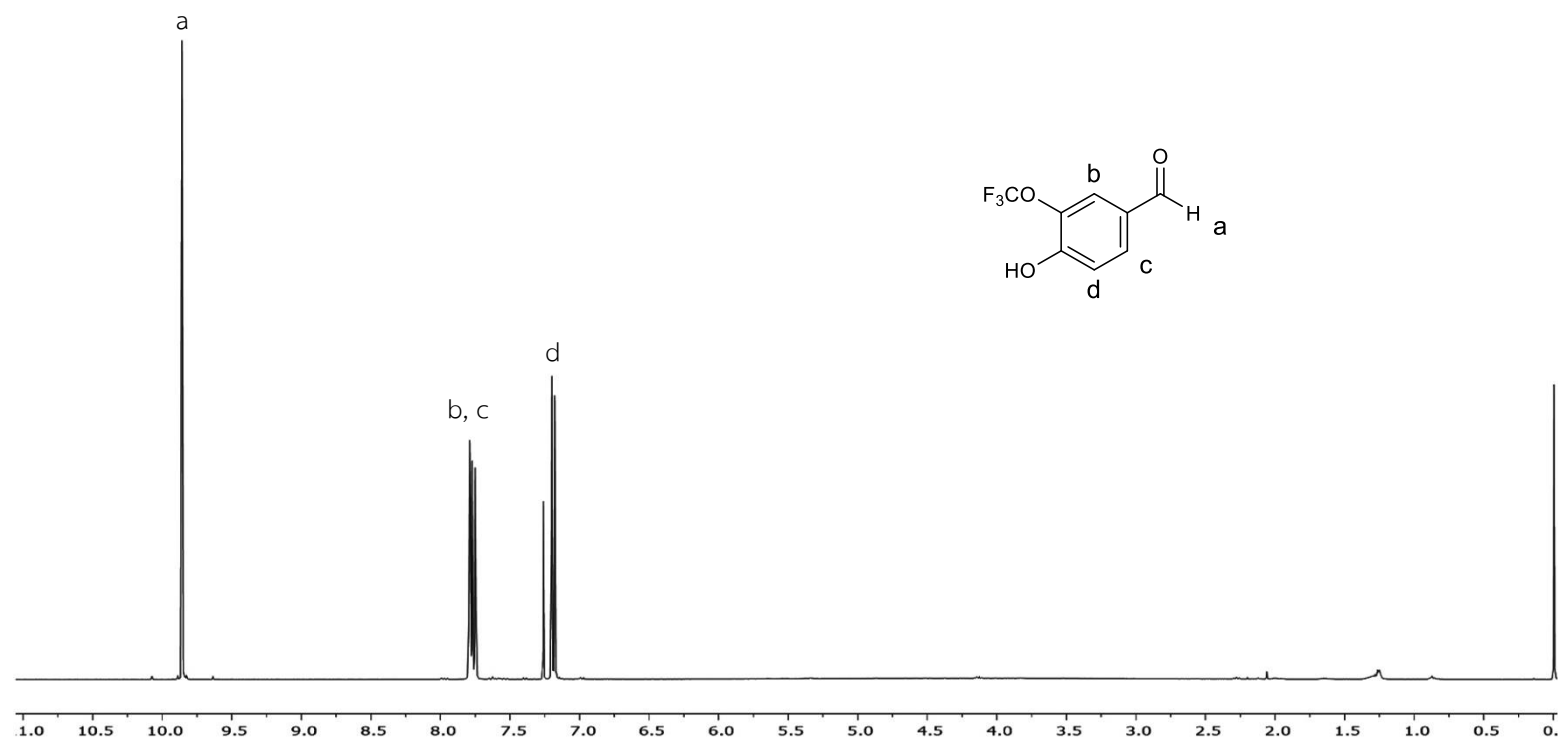
ภาพ 1.2.11 ^1H -NMR spectrum ของ 3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde ใน $\text{chloroform-}d$

การสังเคราะห์ 3-nitro-4-hydroxybenzaldehyde

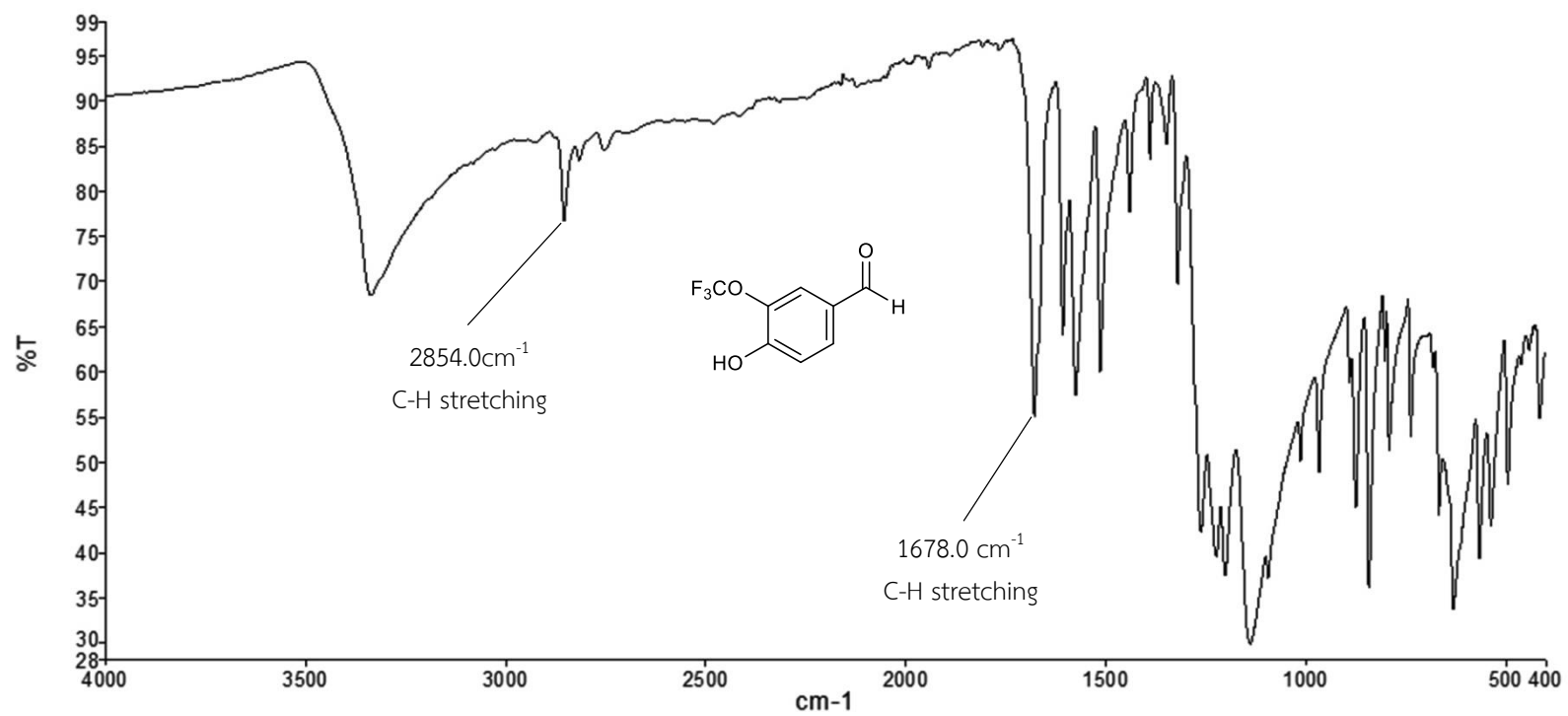


ภาพ 1.2.12 ^1H -NMR spectrum ของ 3-nitro-4-hydroxybenzaldehyde ใน $\text{chloroform-}d$

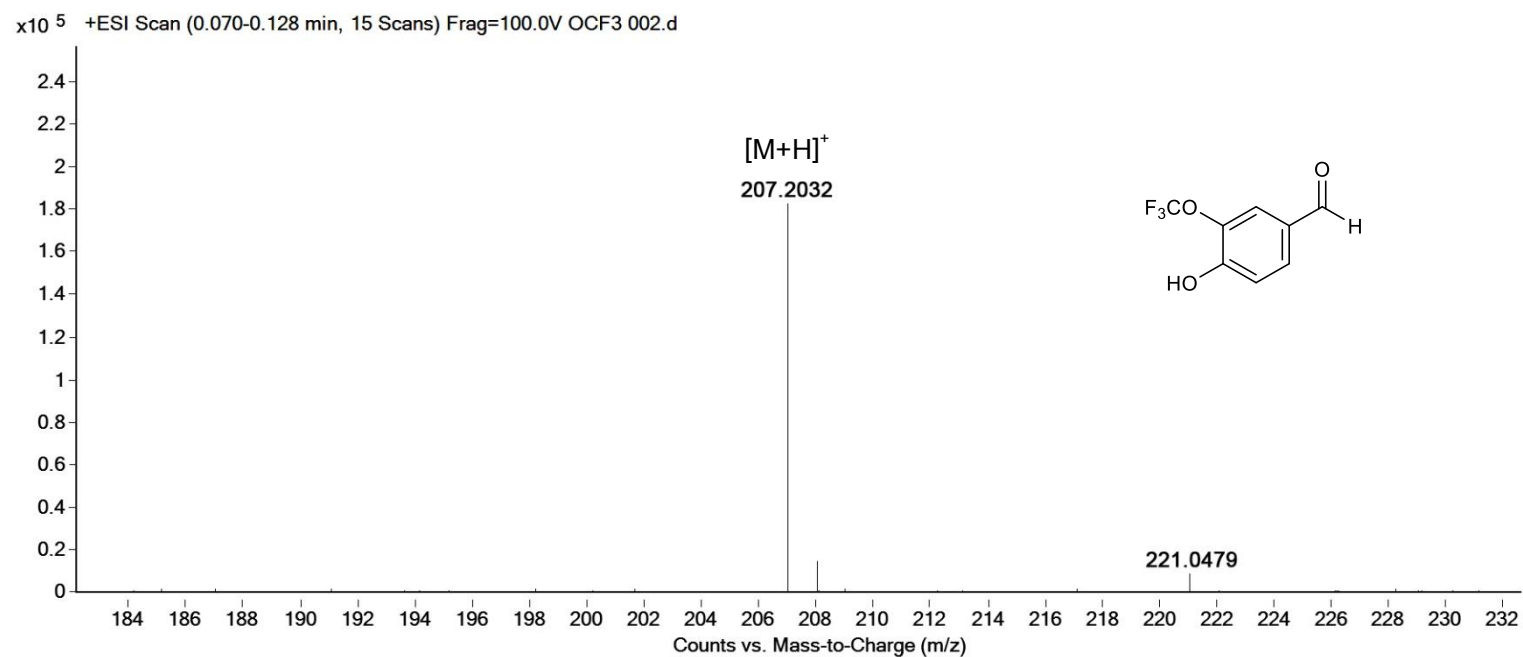
2.2.1) การสังเคราะห์ fluoro benzaldehyde derivatives



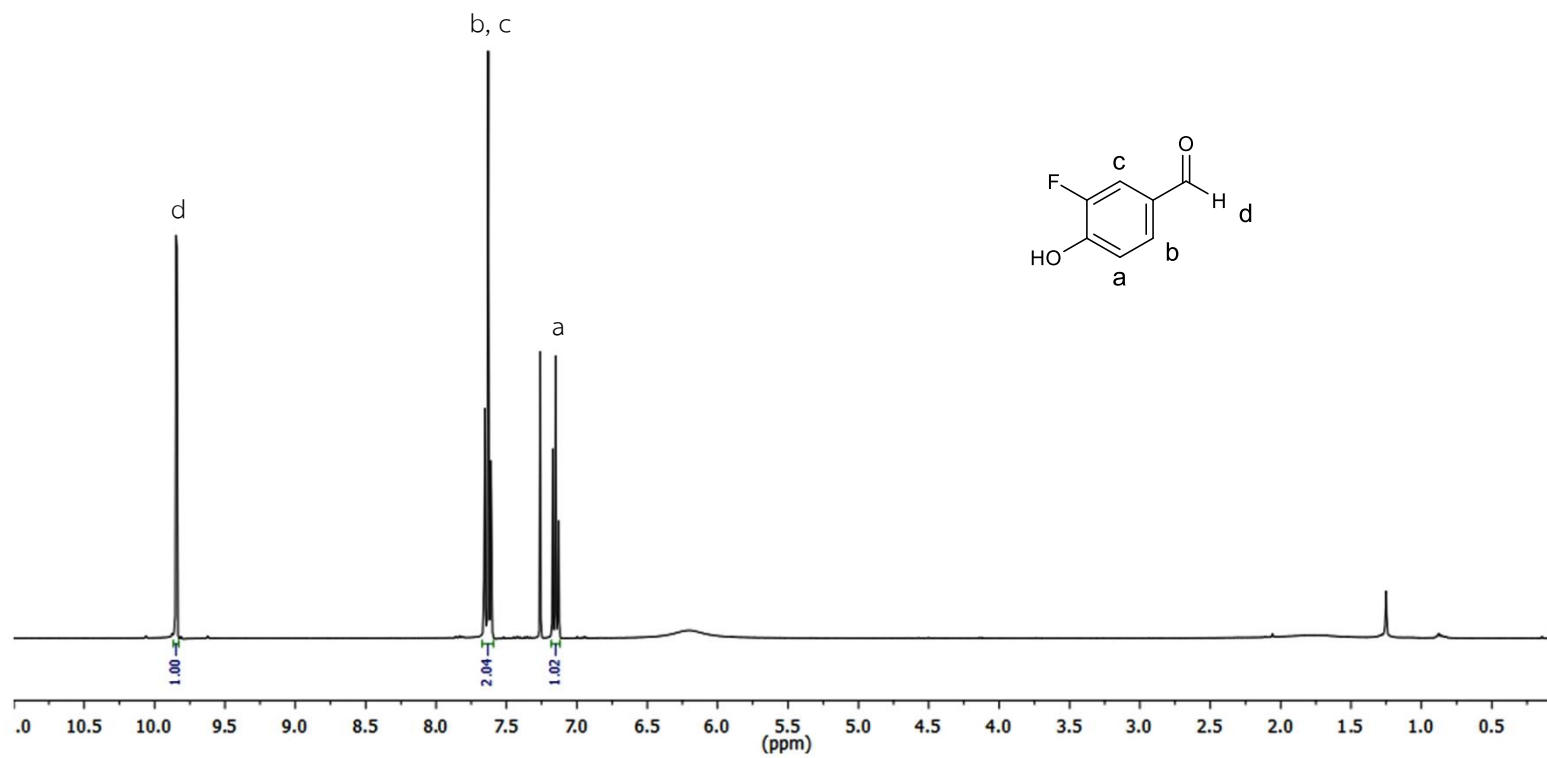
ภาพ 1.2.13 ^1H -NMR spectrum ของ 3-trifluoromethoxy-4-hydroxybenzaldehyde ใน chloroform-*d*



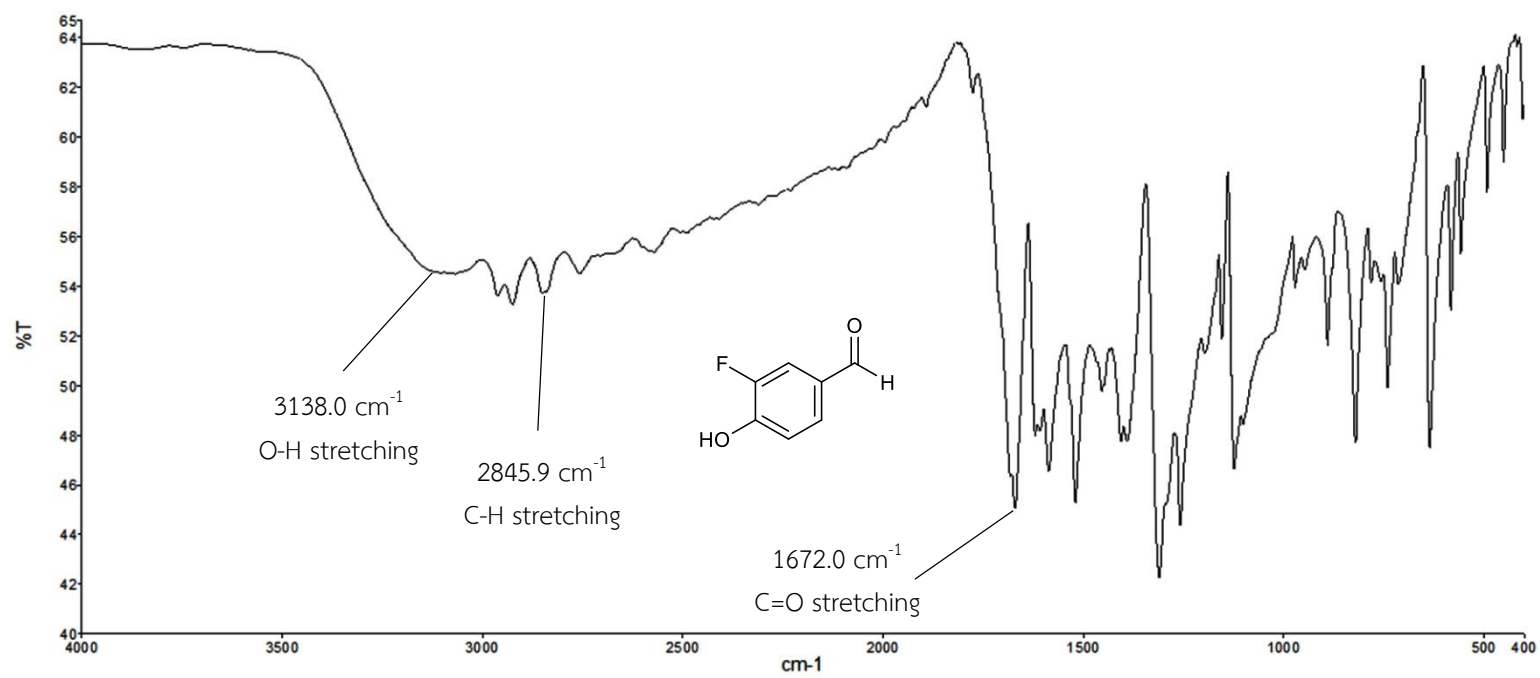
ภาพ 1.2.14 FT-IR spectrum ของ 3-trifluoromethoxy-4-hydroxybenzaldehyde



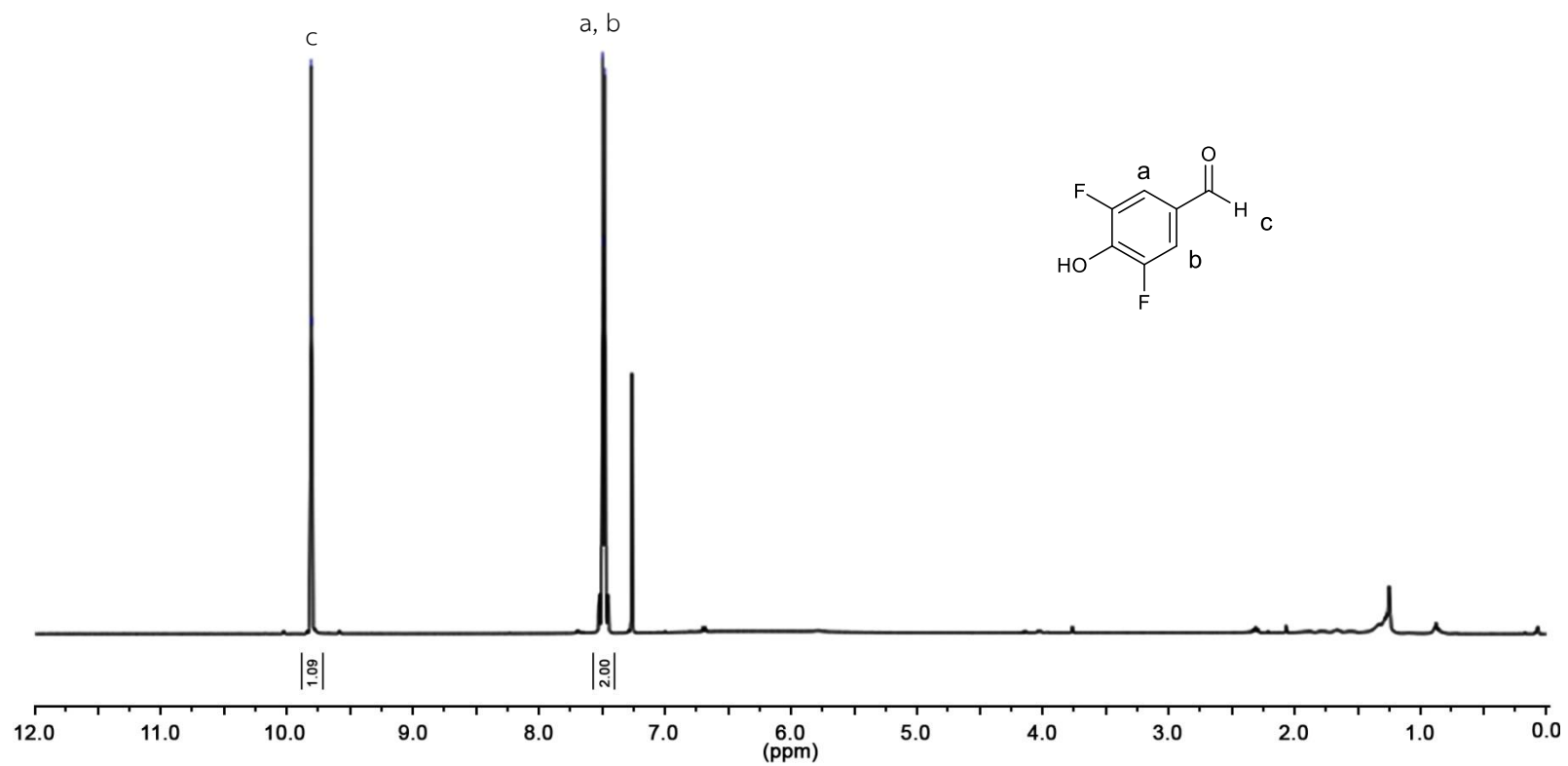
ภาพ 1.2.15 +ESI scan mass spectrum ของ 3-trifluoromethoxy-4-hydroxybenzaldehyde



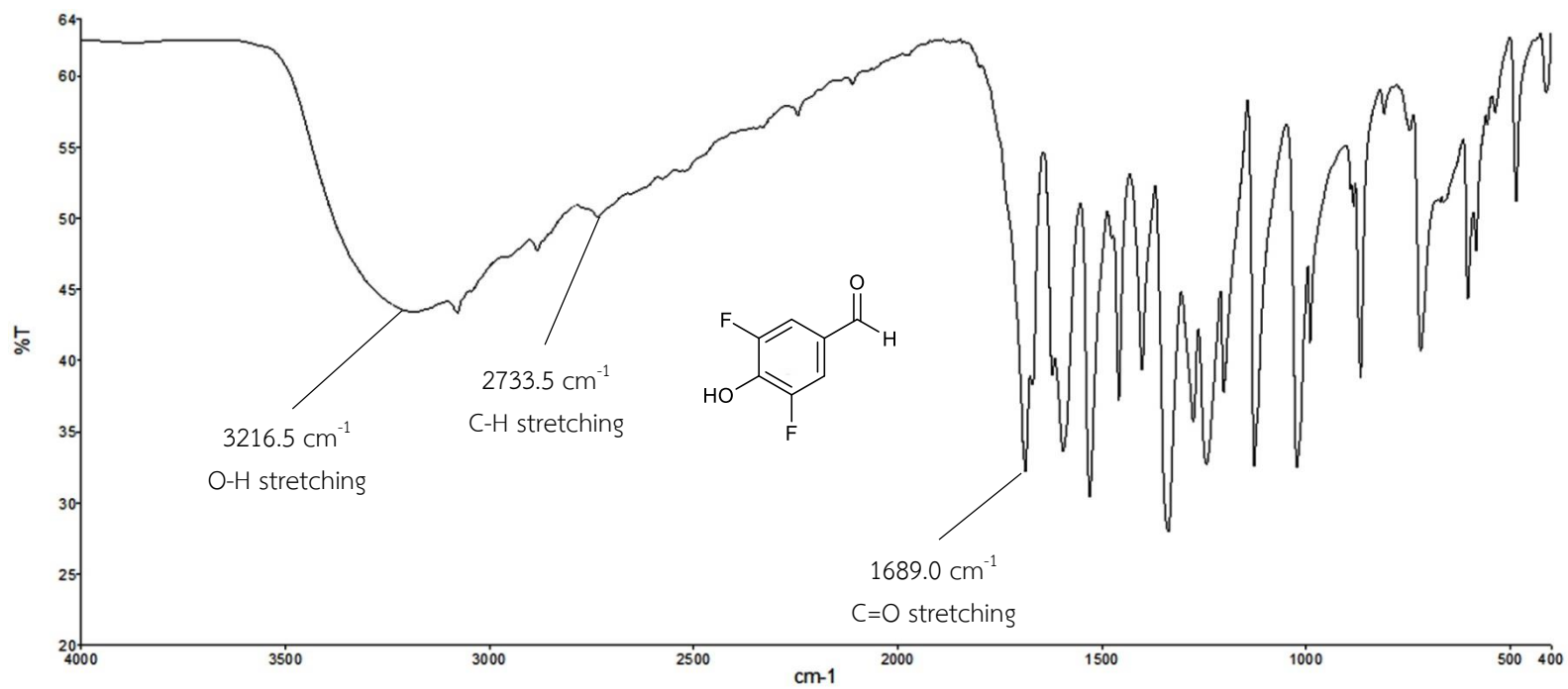
ภาพ 1.2.16 ^1H -NMR spectrum ของ 3-fluoro-4-hydroxybenzaldehyde ใน chloroform-d



ภาพ 1.2.17 FT-IR spectrum ของ 3-fluoro-4-hydroxybenzaldehyde

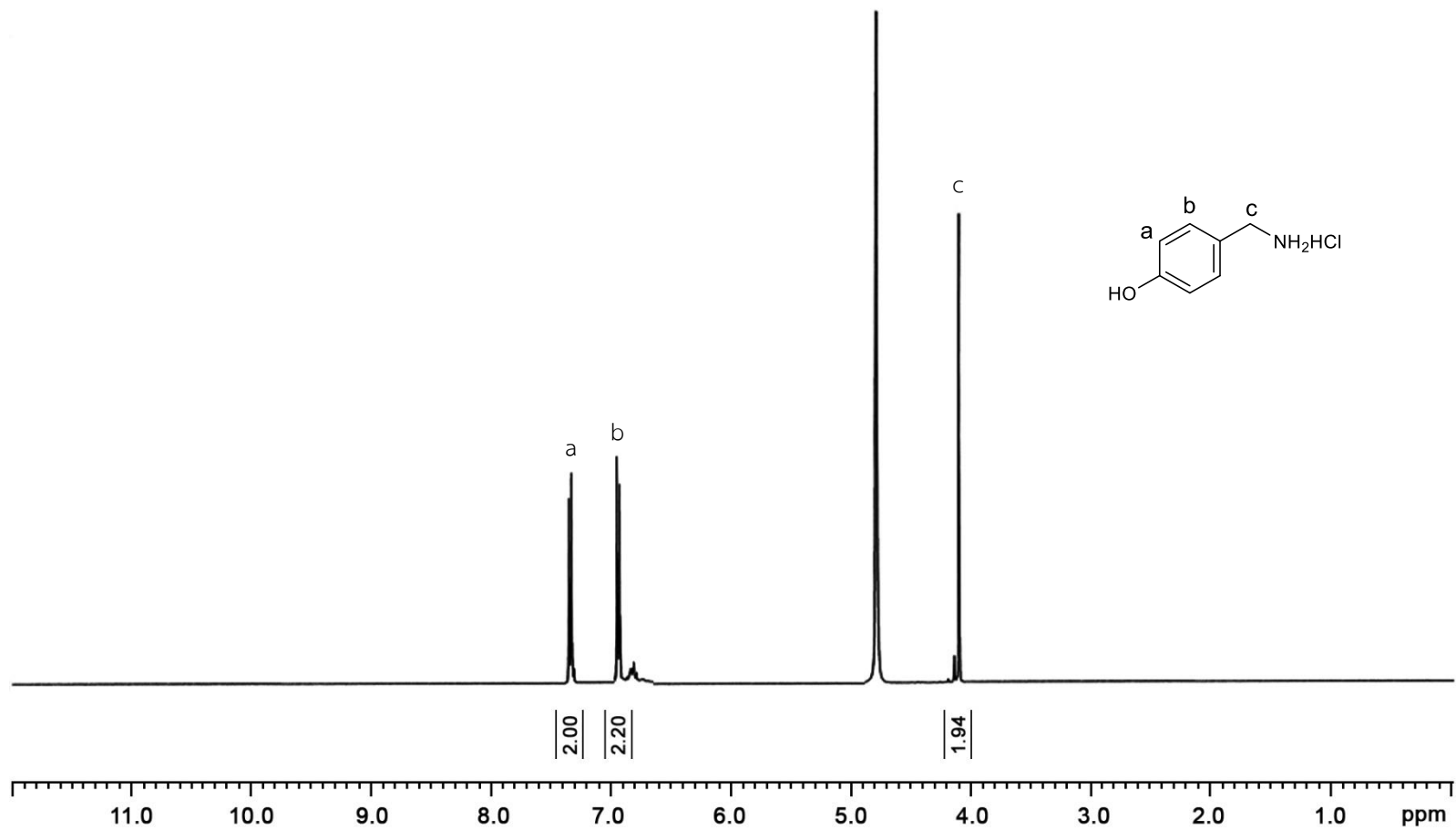


ภาพ 1.2.18 ^1H -NMR spectrum ของ 3,5-difluoro-4-hydroxybenzaldehyde ใน $\text{chloroform-}d$

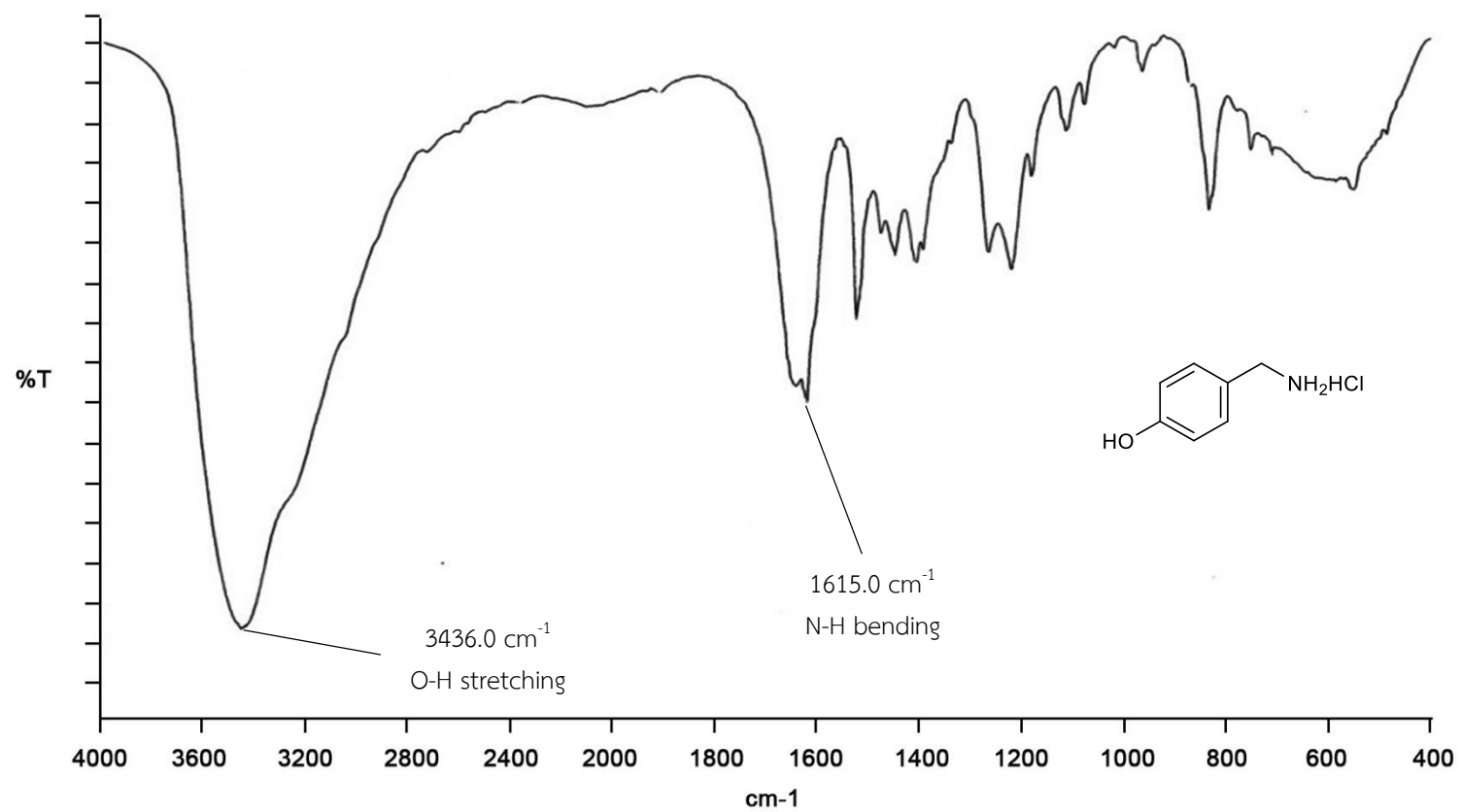


ภาพ 1.2.19 FT-IR spectrum ของ 3,5-difluoro-4-hydroxybenzaldehyde

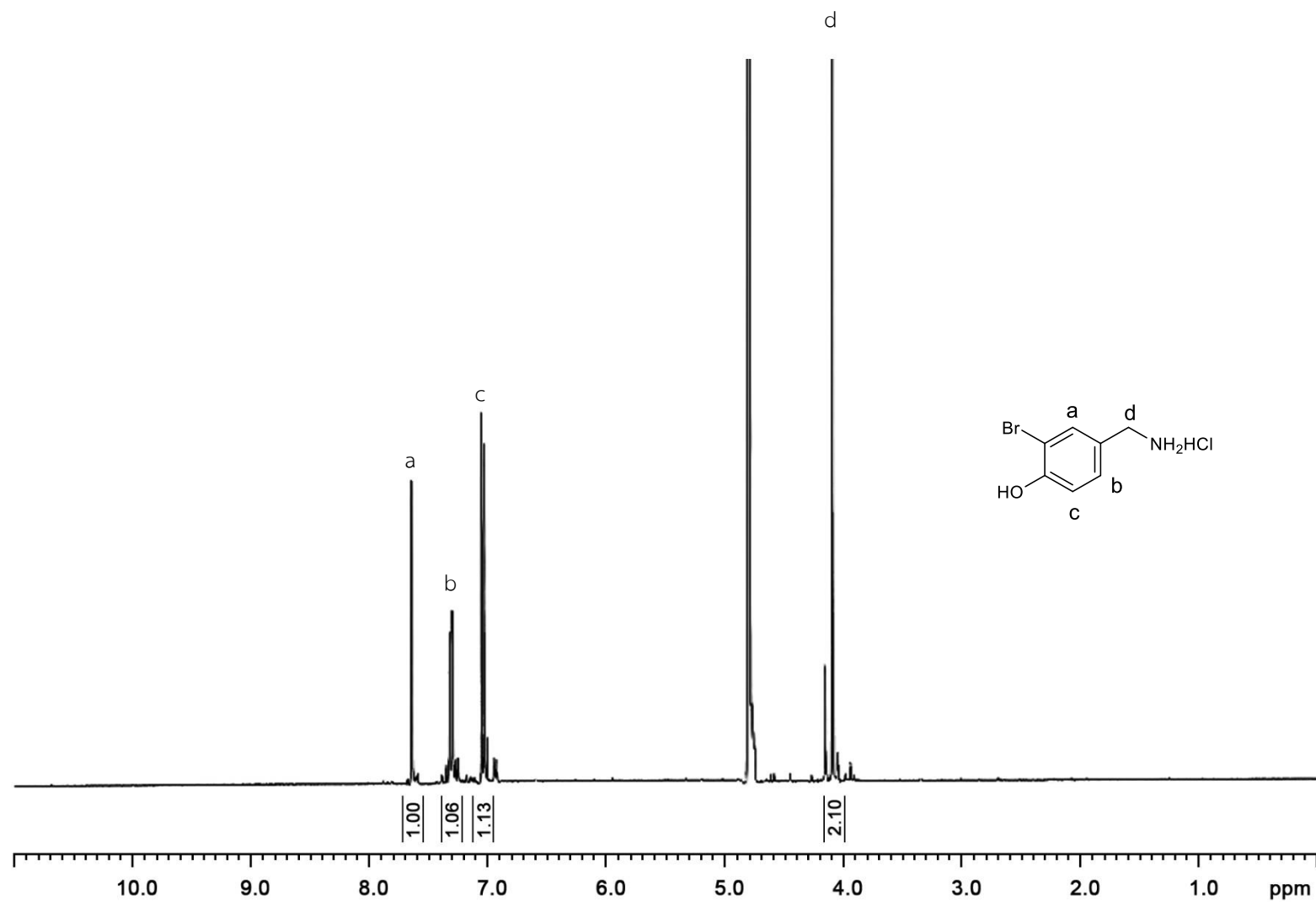
2.2.2) การสังเคราะห์ benzylamine derivatives



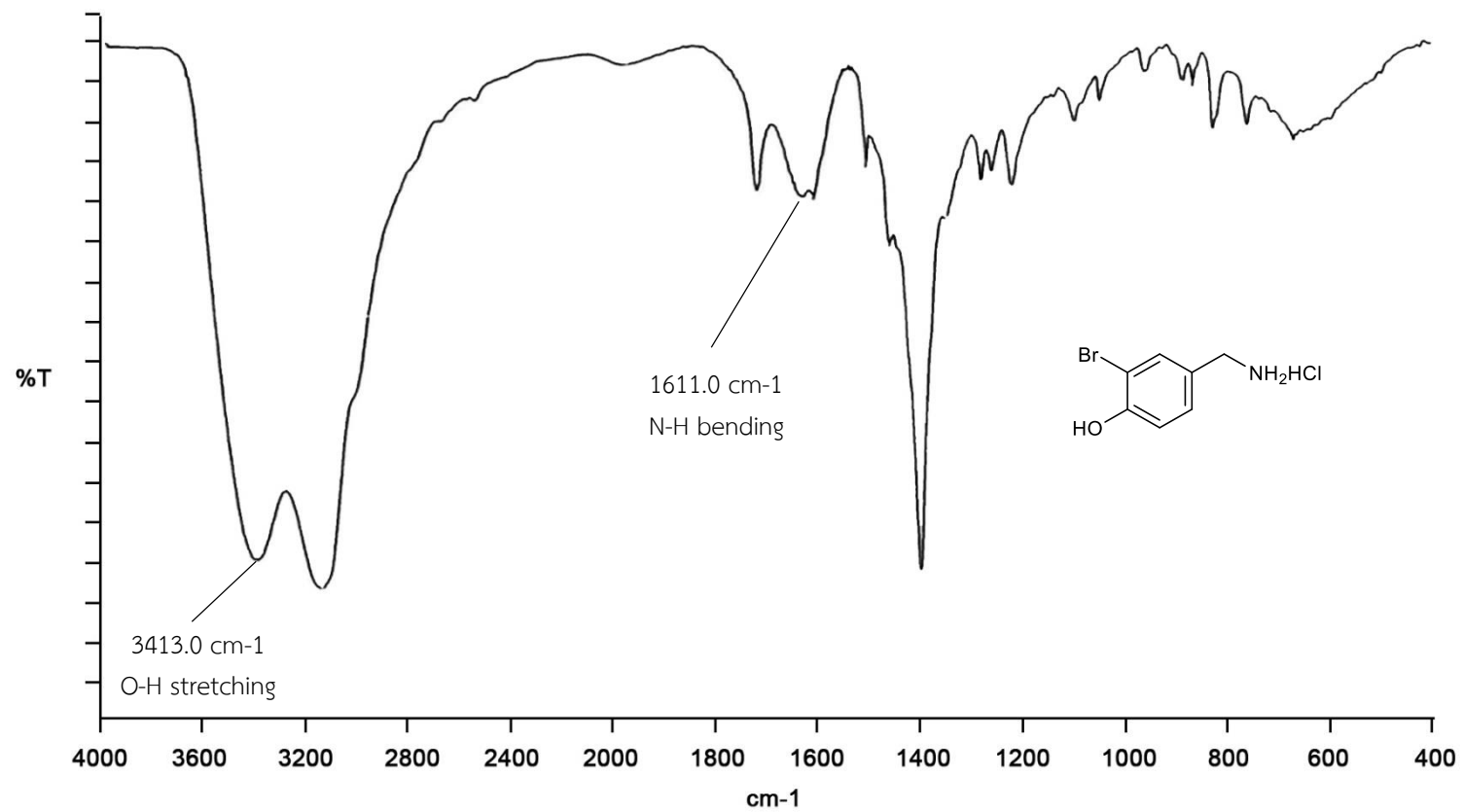
ภาพ 1.2.20 ^1H -NMR spectrum ของ 4-hydroxybenzylamine hydrochloride ใน D_2O



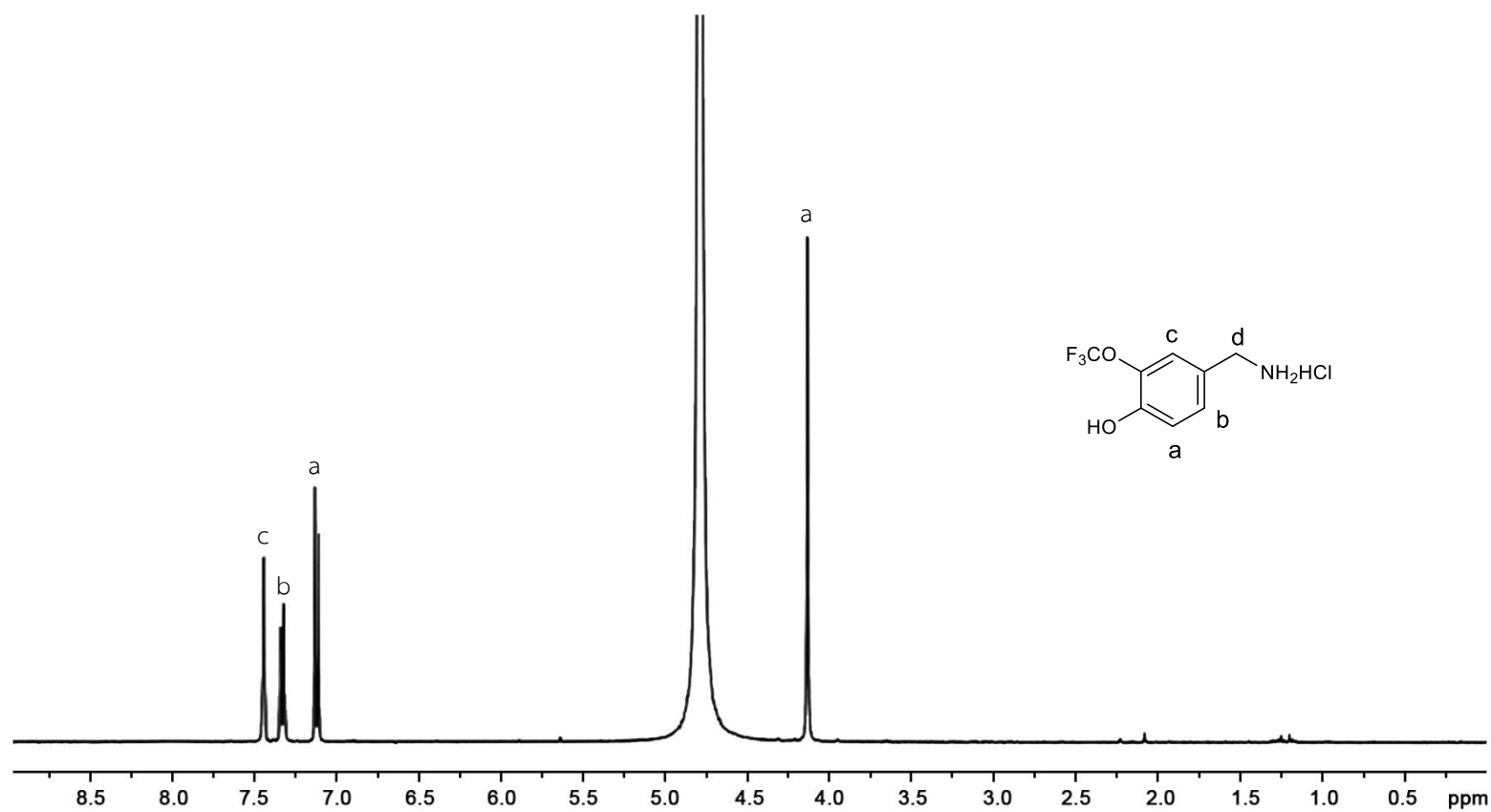
ภาพ 1.2.21 FT-IR spectrum ของ 4-hydroxybenzylamine hydrochloride



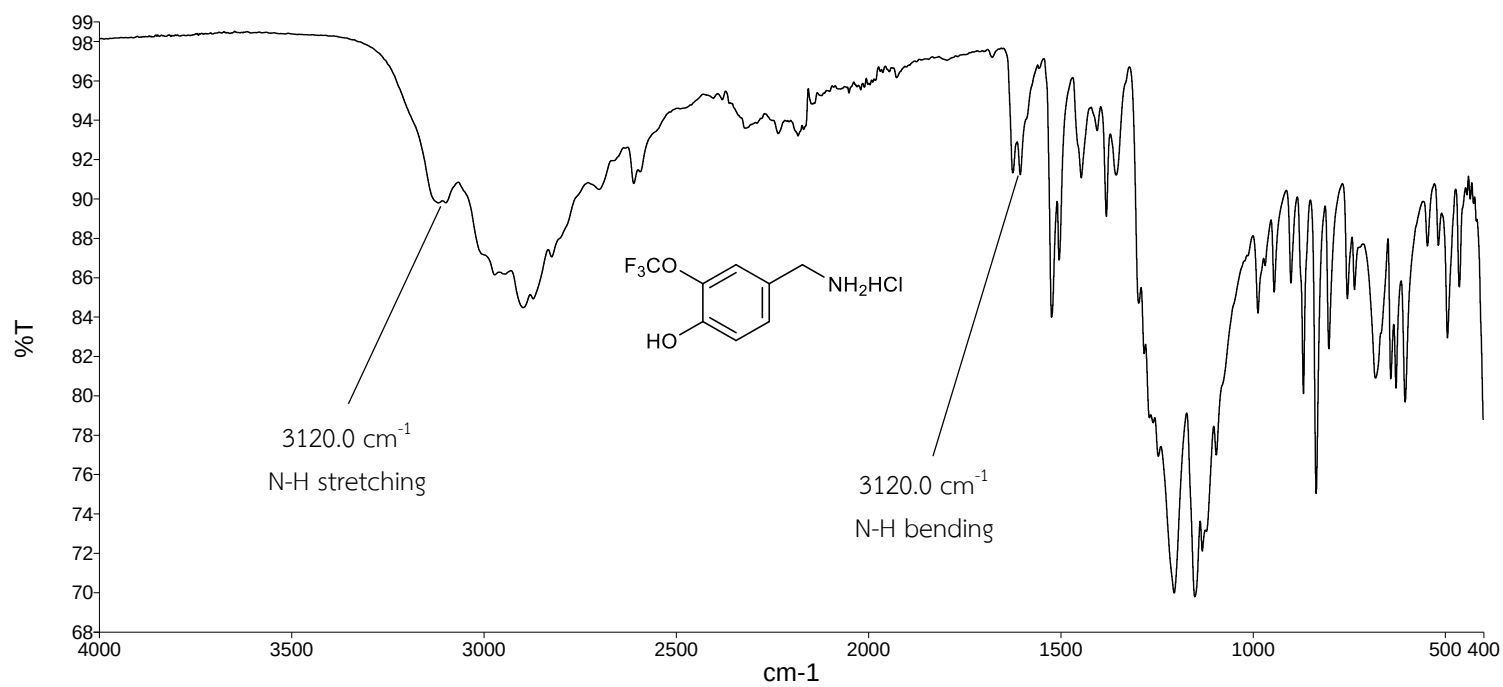
ภาพ 1.2.22 ^1H -NMR spectrum ของ 3-bromo-4-hydroxybenzylamine ใน D_2O



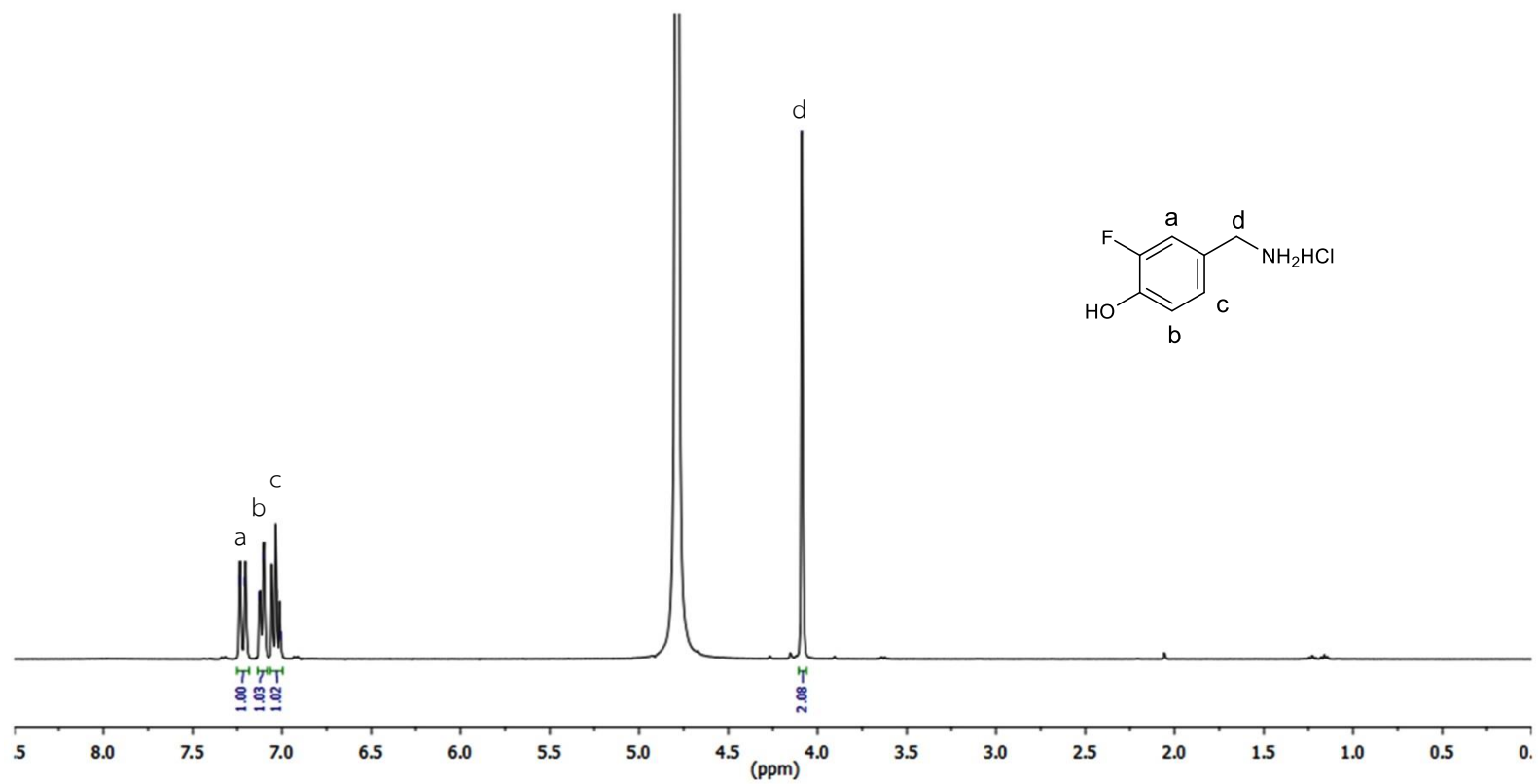
ภาพ 1.2.23 FT-IR spectrum ของ 3-bromo-4-hydroxybenzylamine



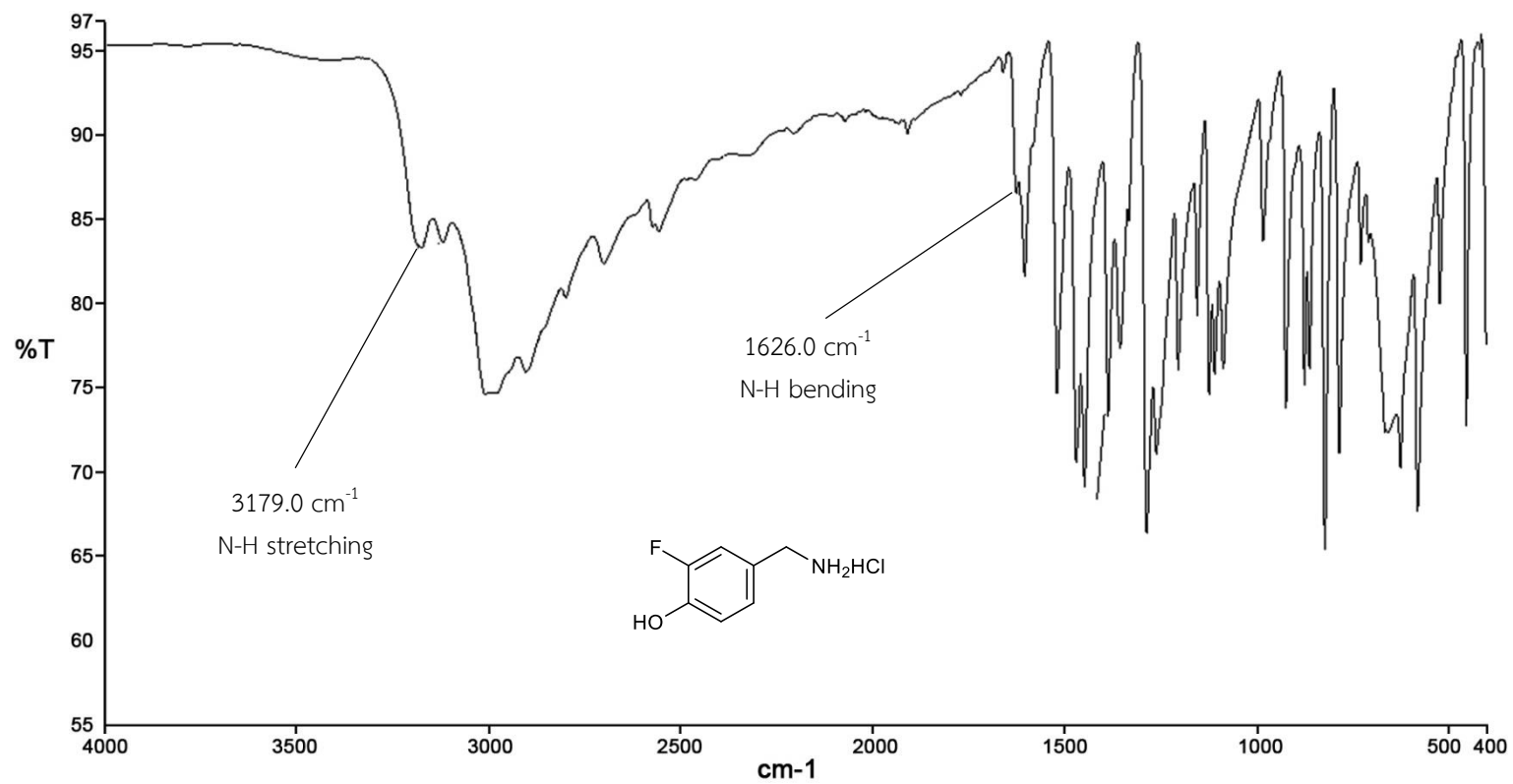
ภาพ 1.2.24 ^1H -NMR spectrum ของ 3-trifluoromethoxy-4-hydroxybenzylamine hydrochloride ใน D_2O



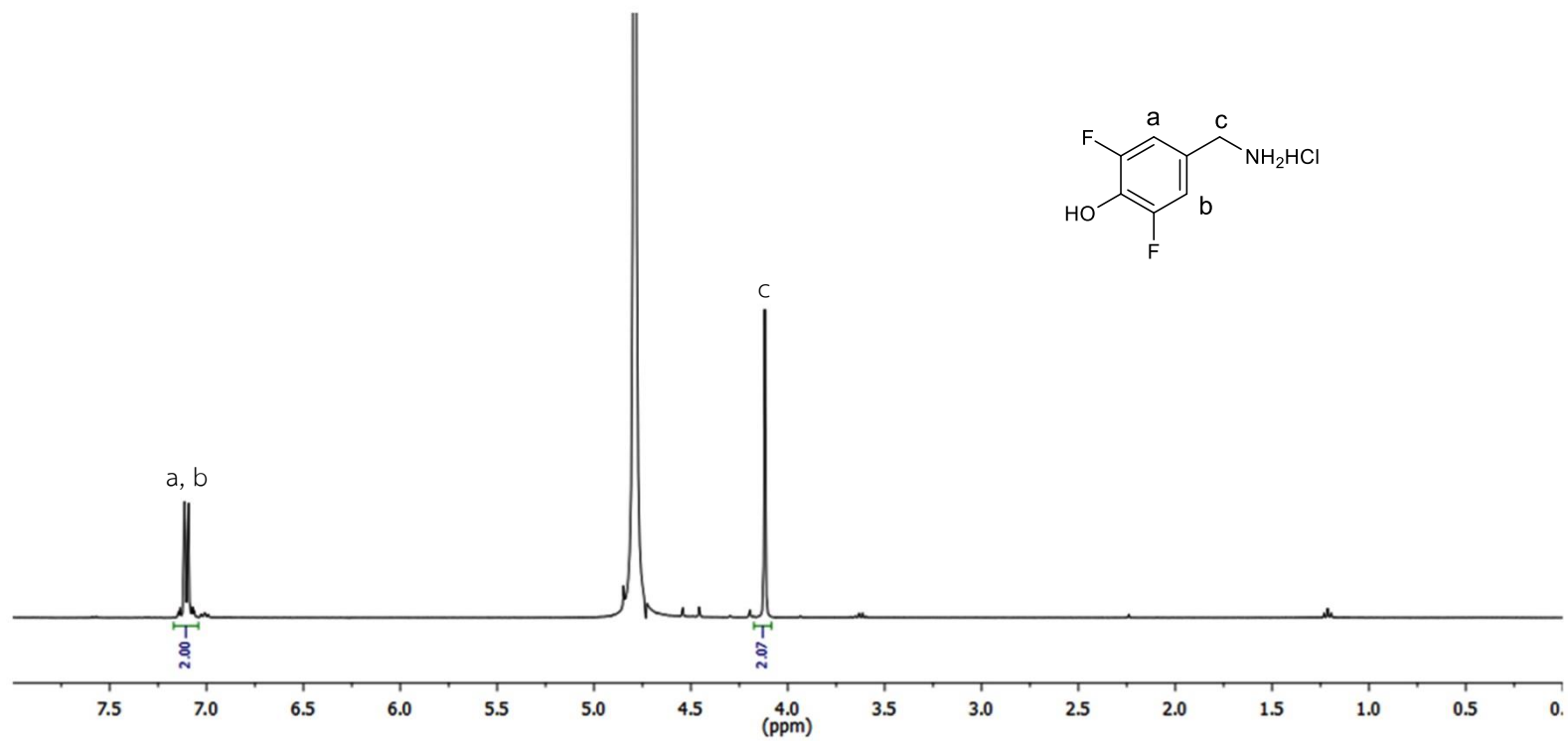
ภาพ 1.2.25 FT-IR spectrumของ 3-trifluoromethoxy-4-hydroxybenzylamine hydrochloride



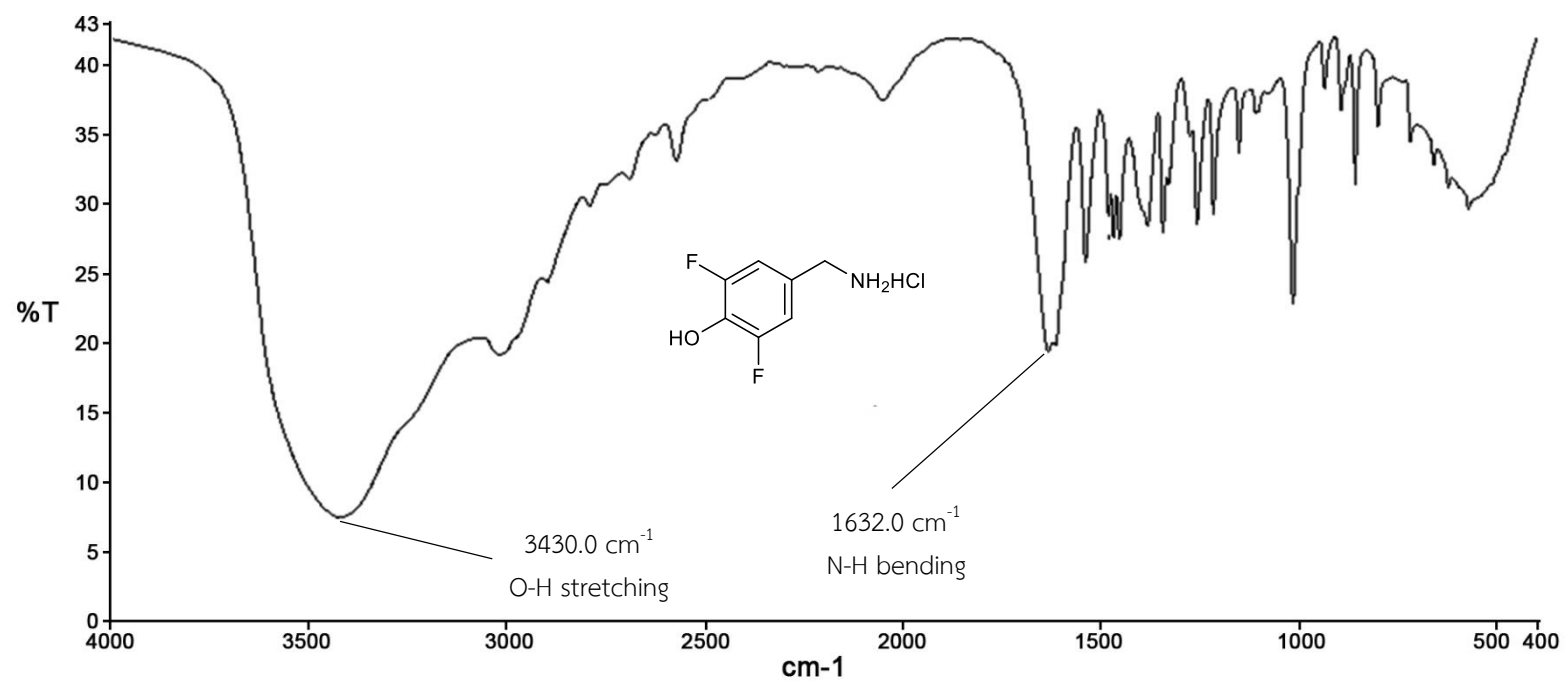
ภาพ 1.2.26 ^1H -NMR spectrum ของ 3-fluoro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride ใน D_2O



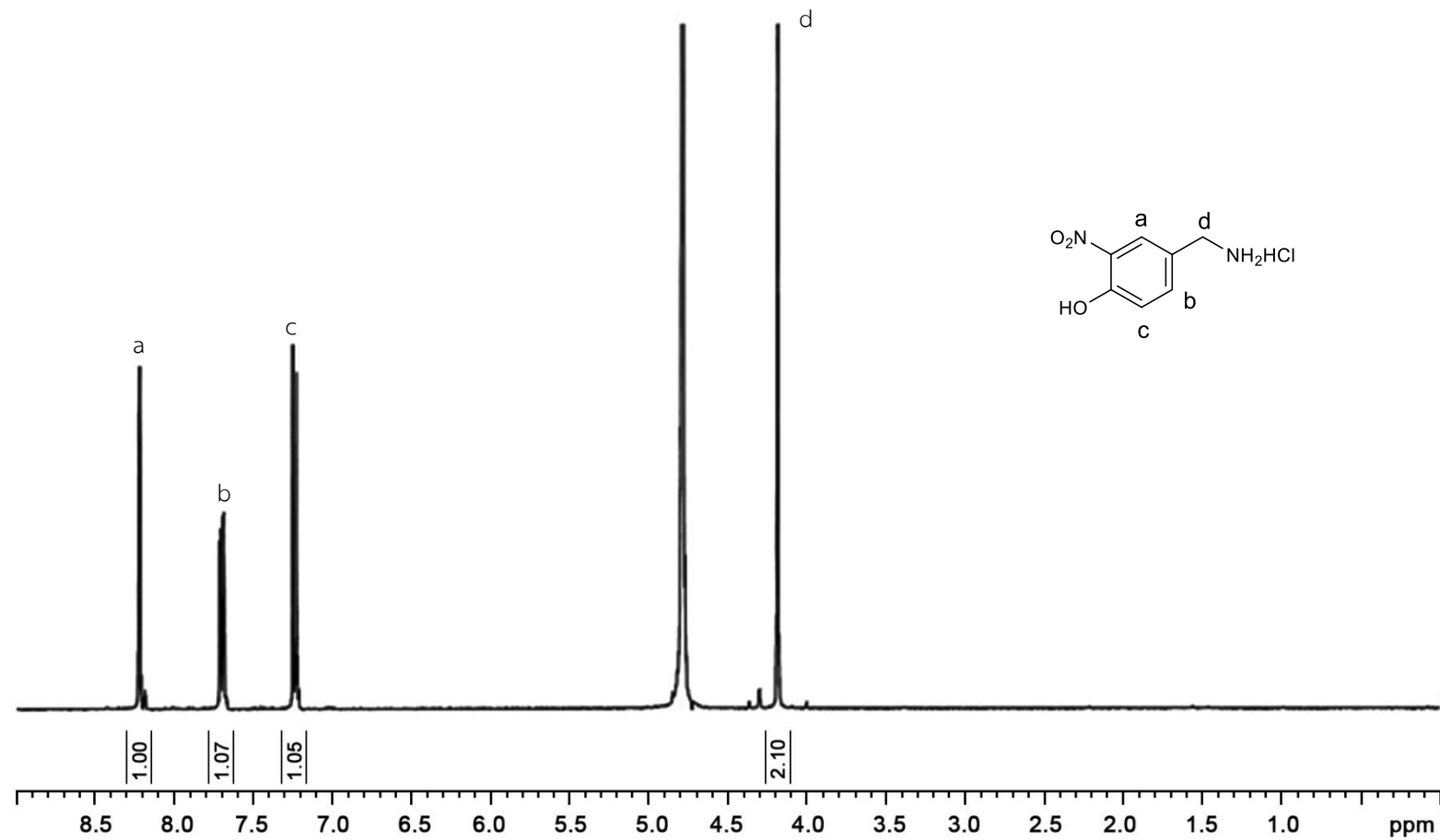
ภาพ 1.2.27 FT-IR spectrum ของ 3-fluoro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride



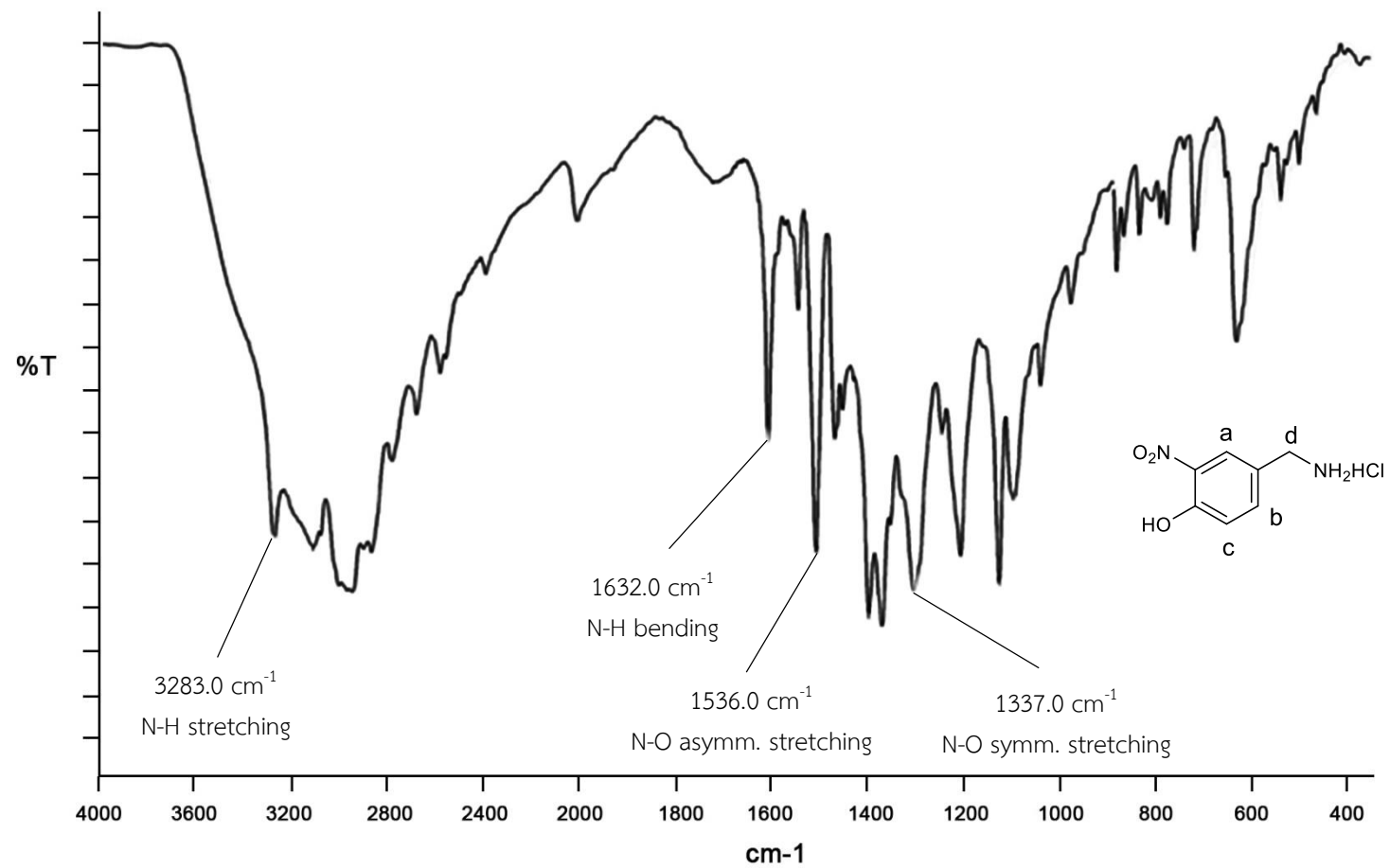
ภาพ 1.2.28 ^1H -NMR spectrum ของ 3,5-difluoro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride ใน D_2O



ภาพ 1.2.29 FT-IR spectrum ของ 3,5-difluoro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride; 1,632 cm⁻¹ (N-H bending of amine)

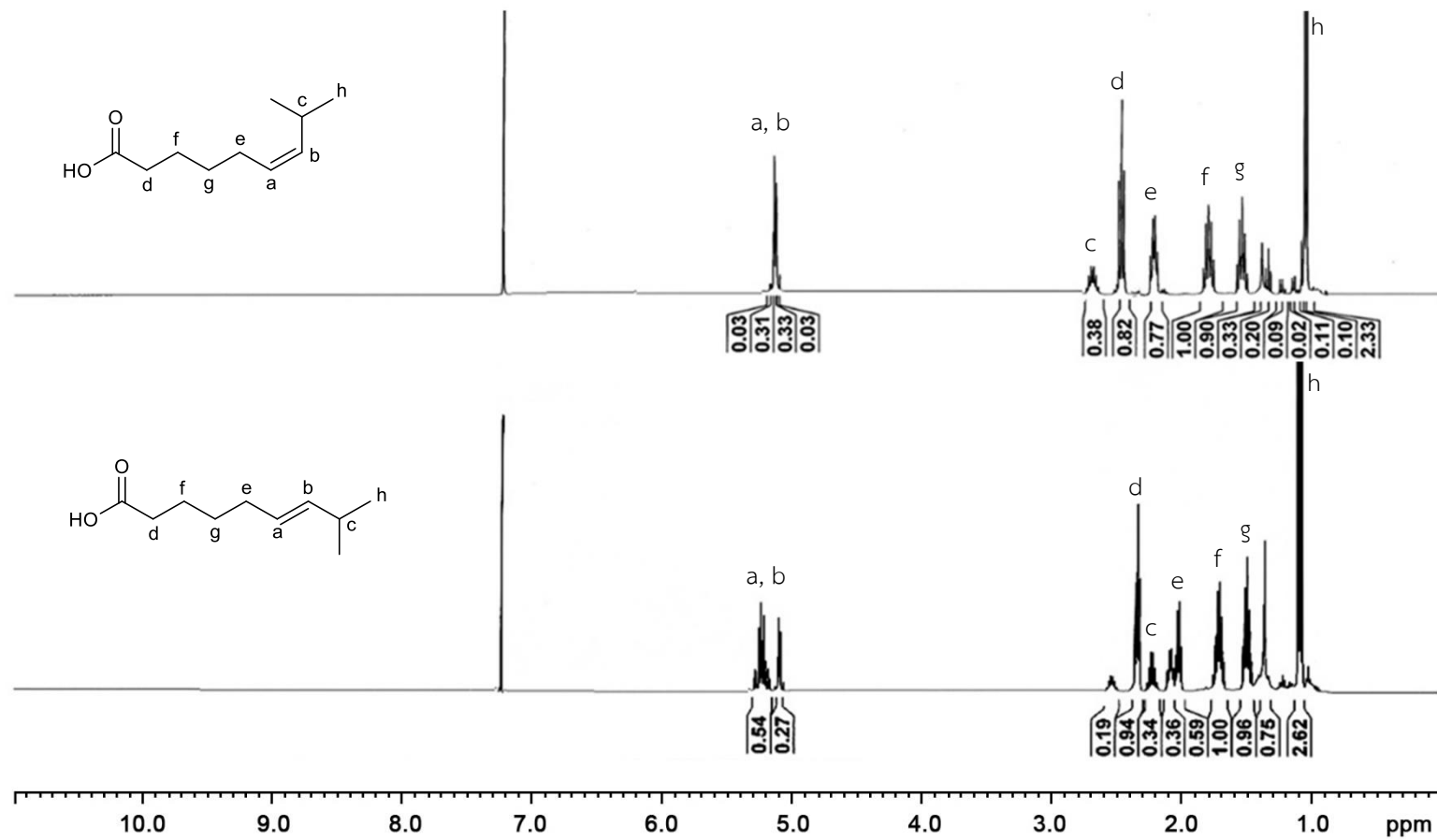


ภาพ 1.2.30 ^1H -NMR spectrum ของ 3-nitro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride ใน D_2O

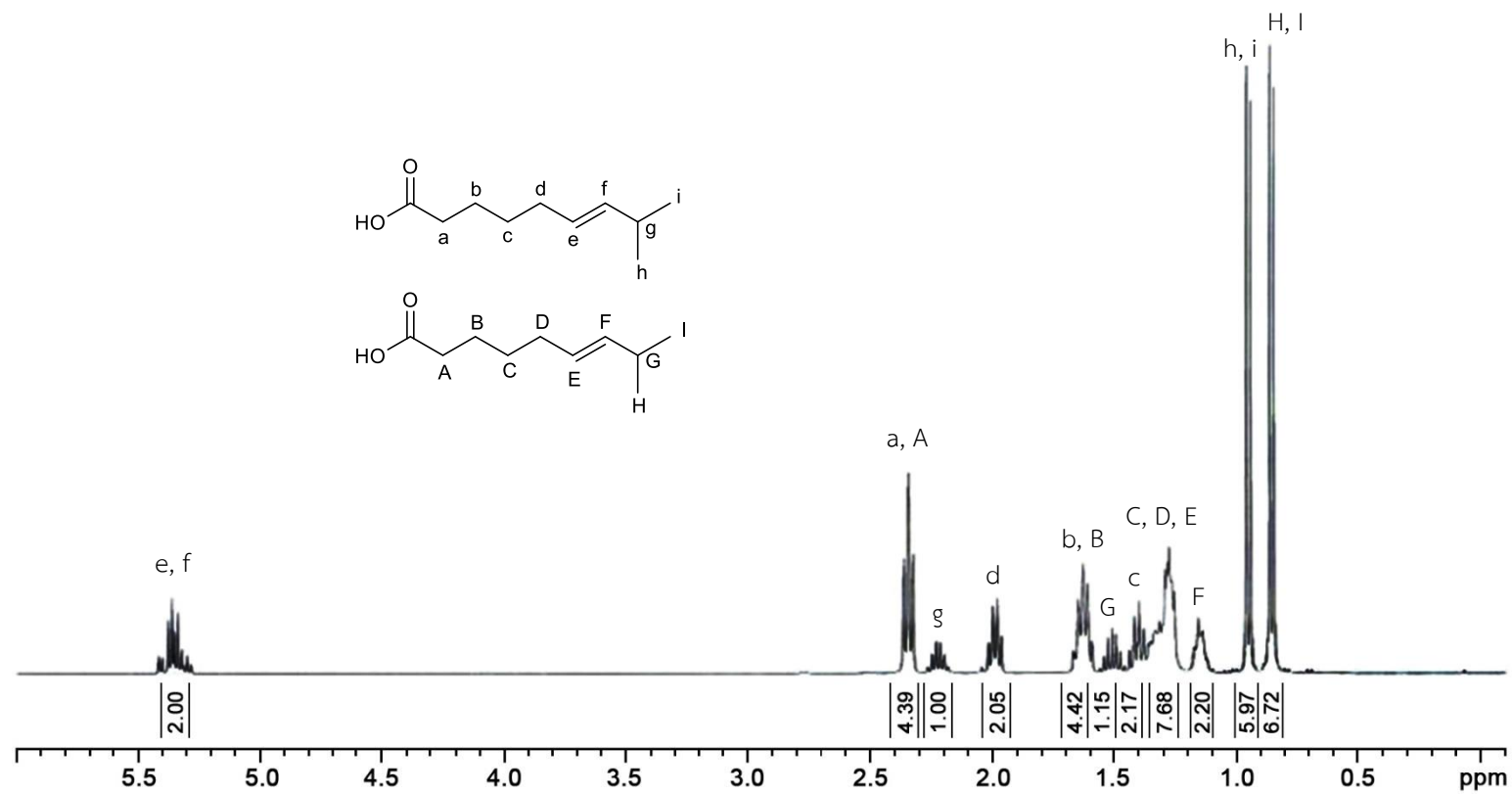


ภาพ 1.2.31 FT-IR spectrum 3-nitro-4-hydroxybenzylamine hydrochloride

2.2.3) การสังเคราะห์ MCFA

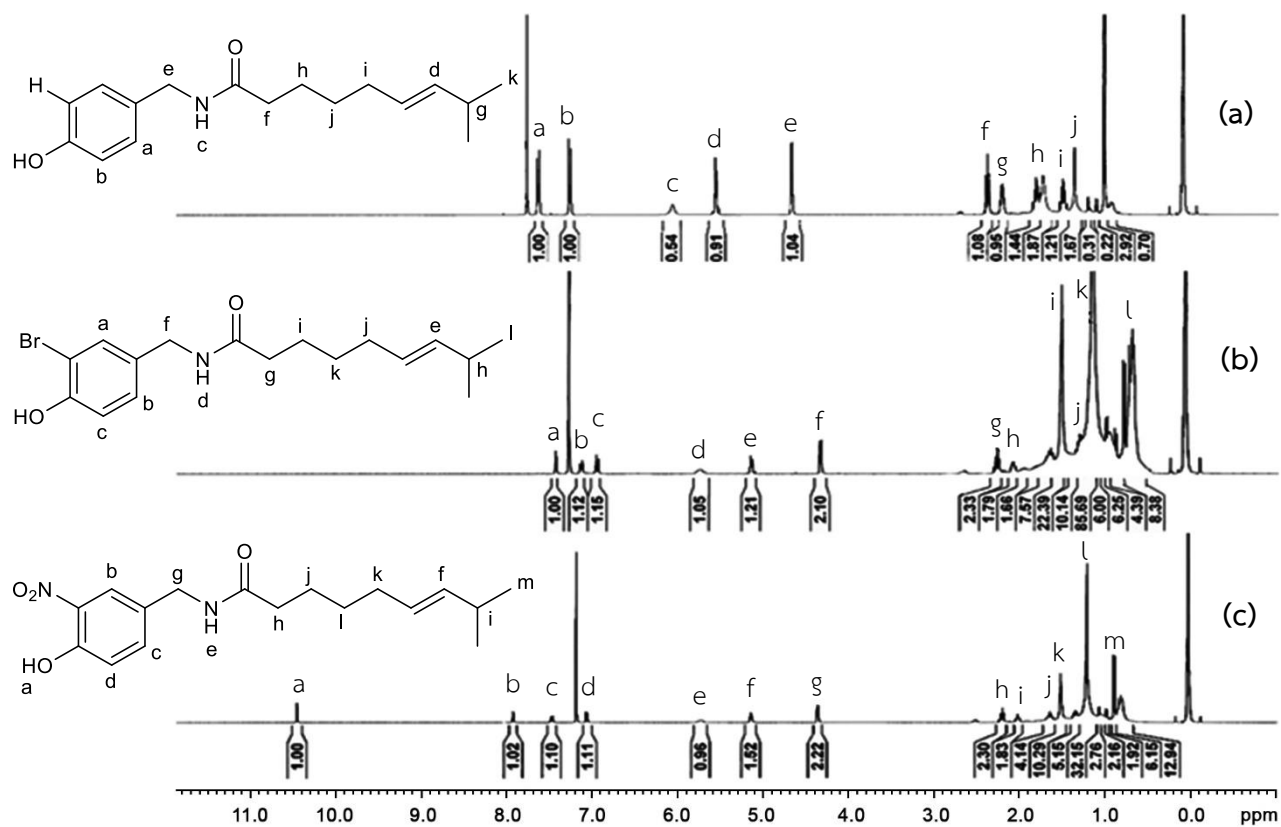


ภาพ 1.2.32 ^1H -NMR spectrum ของ *E/Z*-isomer ของ MCFA

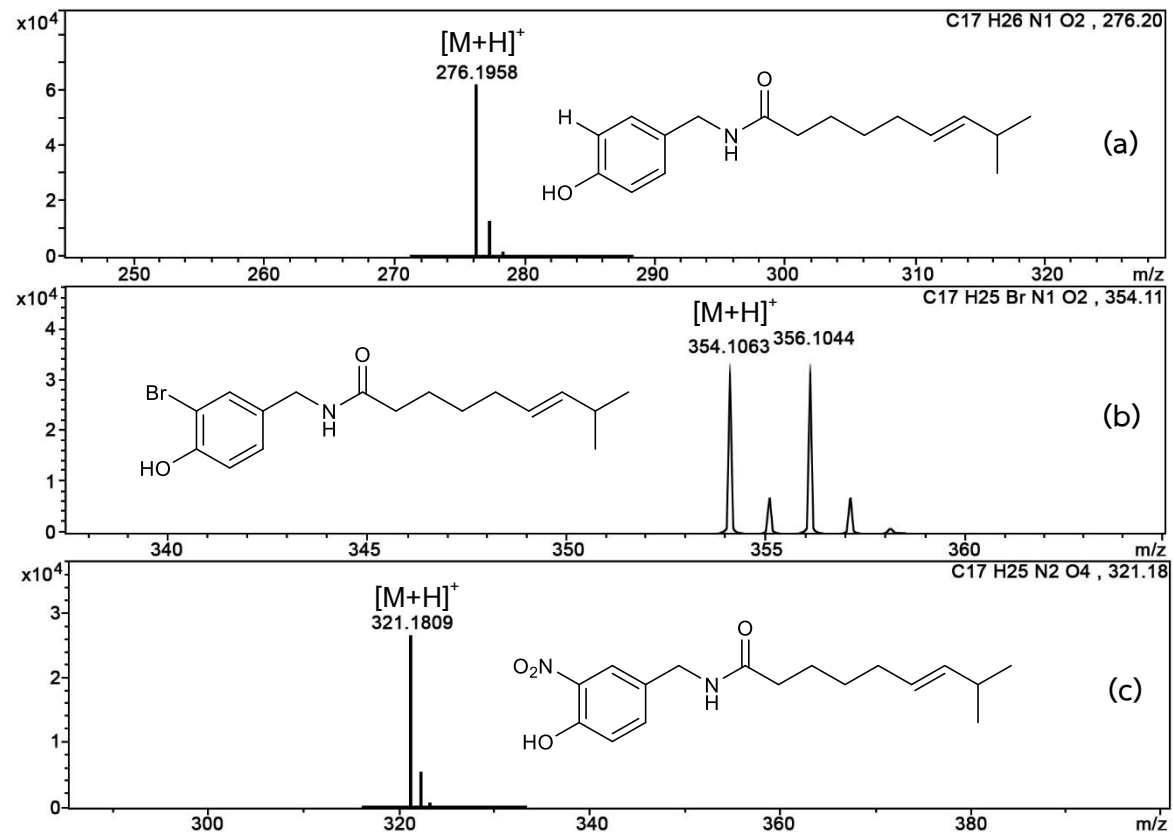


ภาพ 1.2.33 ¹H-NMR spectrum ของสารผสมระหว่าง (E)-8-methyl-6-nonenic acid และ 8-methylnonanoic acid

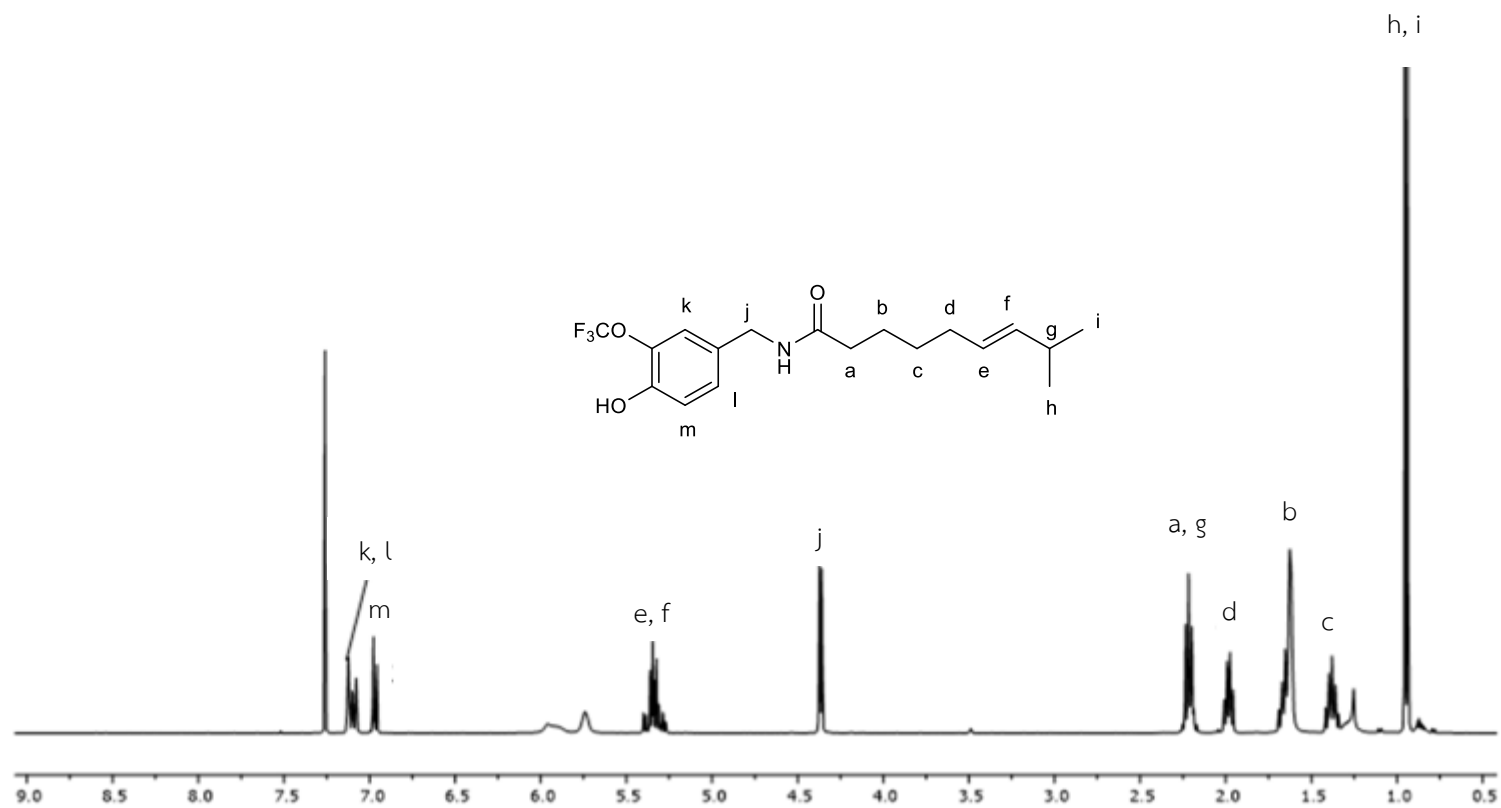
การสังเคราะห์ capsaicin derivatives



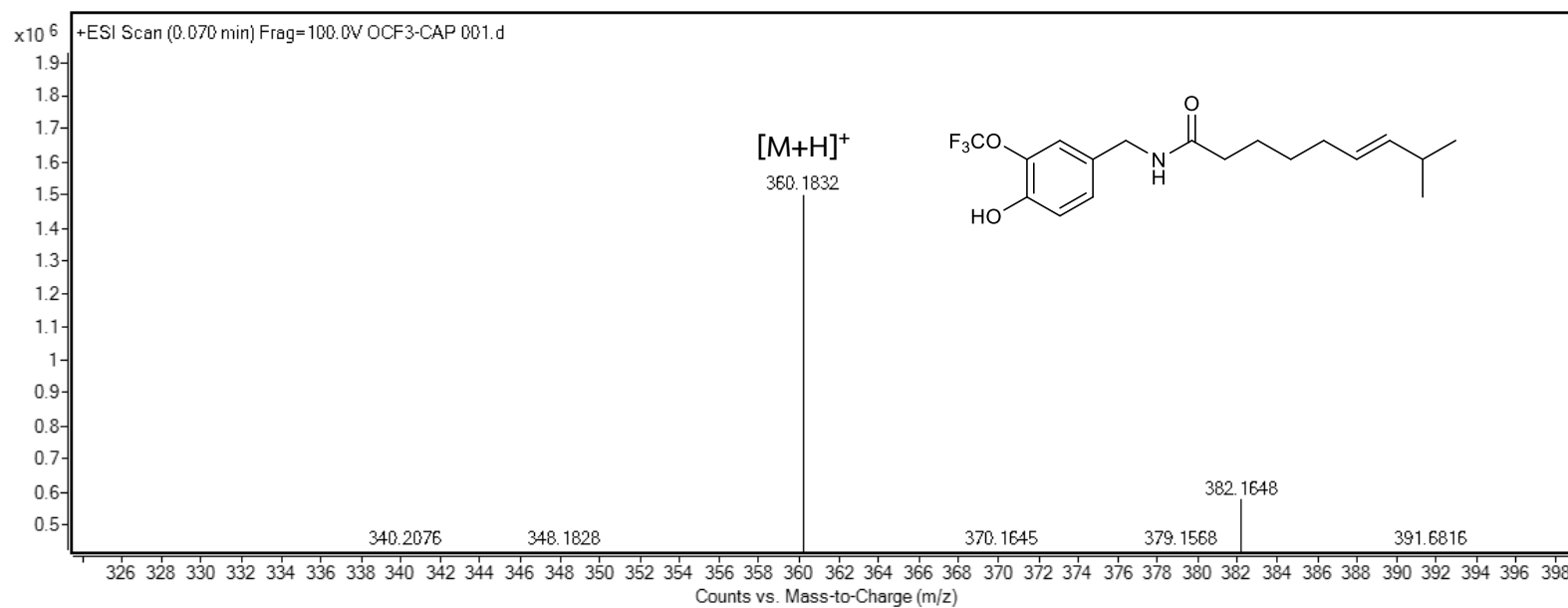
ภาพ 1.2.34 ^1H -NMR spectrum ของ (a) = (E) - N -(4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide
 (b) = (E) - N -(3-bromo-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide และ
 (c) = (E) - N -(3-nitro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide



ภาพ 1.2.35 Mass spectrum ของ (a) = (E) - N -(4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide
 (b) = (E) - N -(3-bromo-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide และ
 (c) = (E) - N -(3-nitro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide

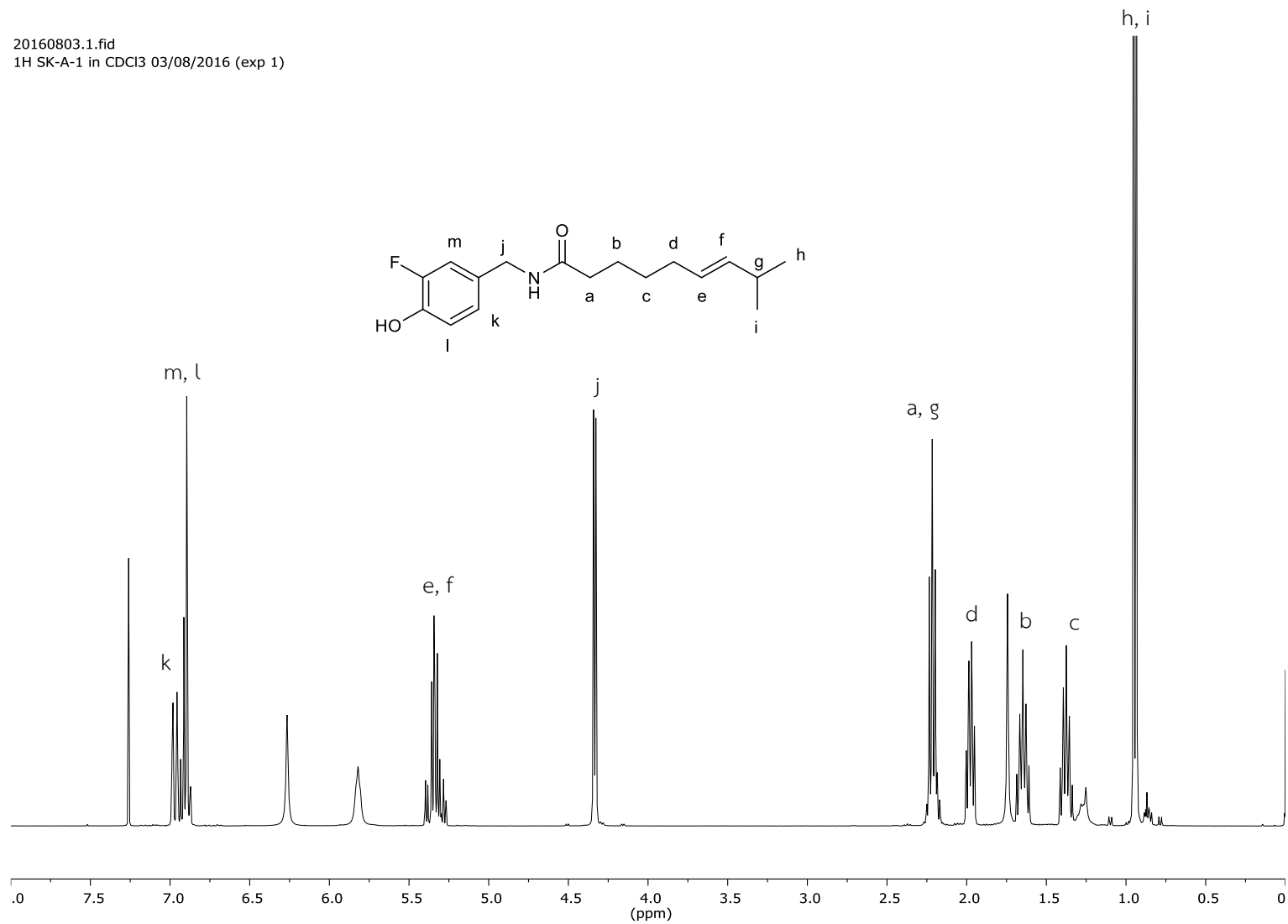


ภาพ 1.2.36 ^1H -NMR spectrum ของ *(E)*-*N*-(4-hydroxy-3-(trifluoromethoxy)benzyl)-8-methyl-6-nonenamide ใน $\text{chloroform-}d$

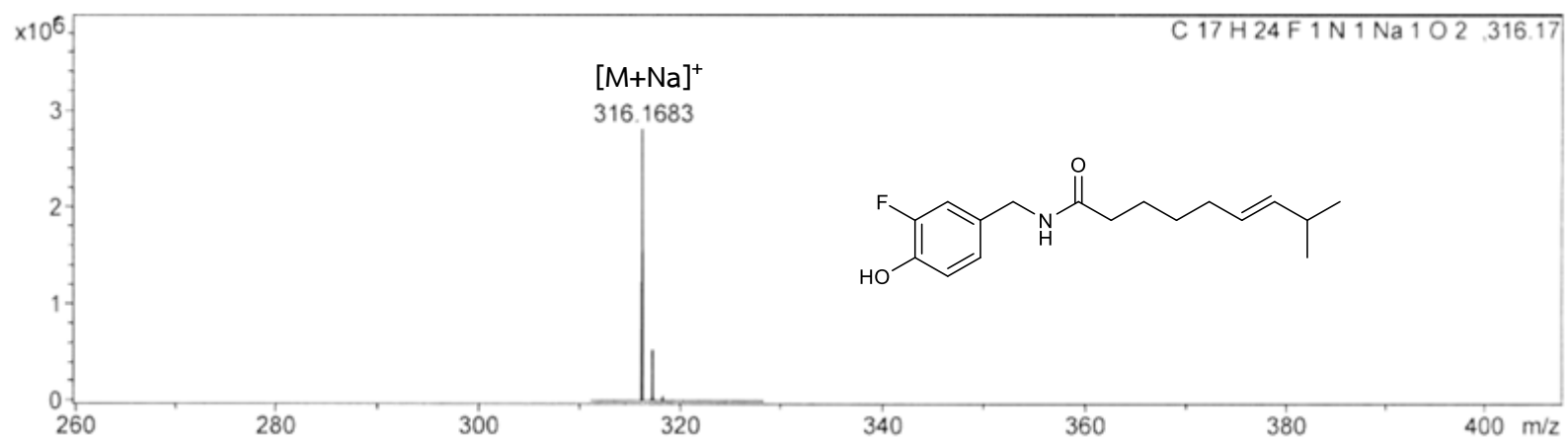


ภาพ 1.2.37 Mass spectrum ของ (*E*)-*N*-(4-hydroxy-3-(trifluoromethoxy)benzyl)-8-methyl-6-nonenamide

20160803.1.fid
 1H SK-A-1 in CDCl3 03/08/2016 (exp 1)

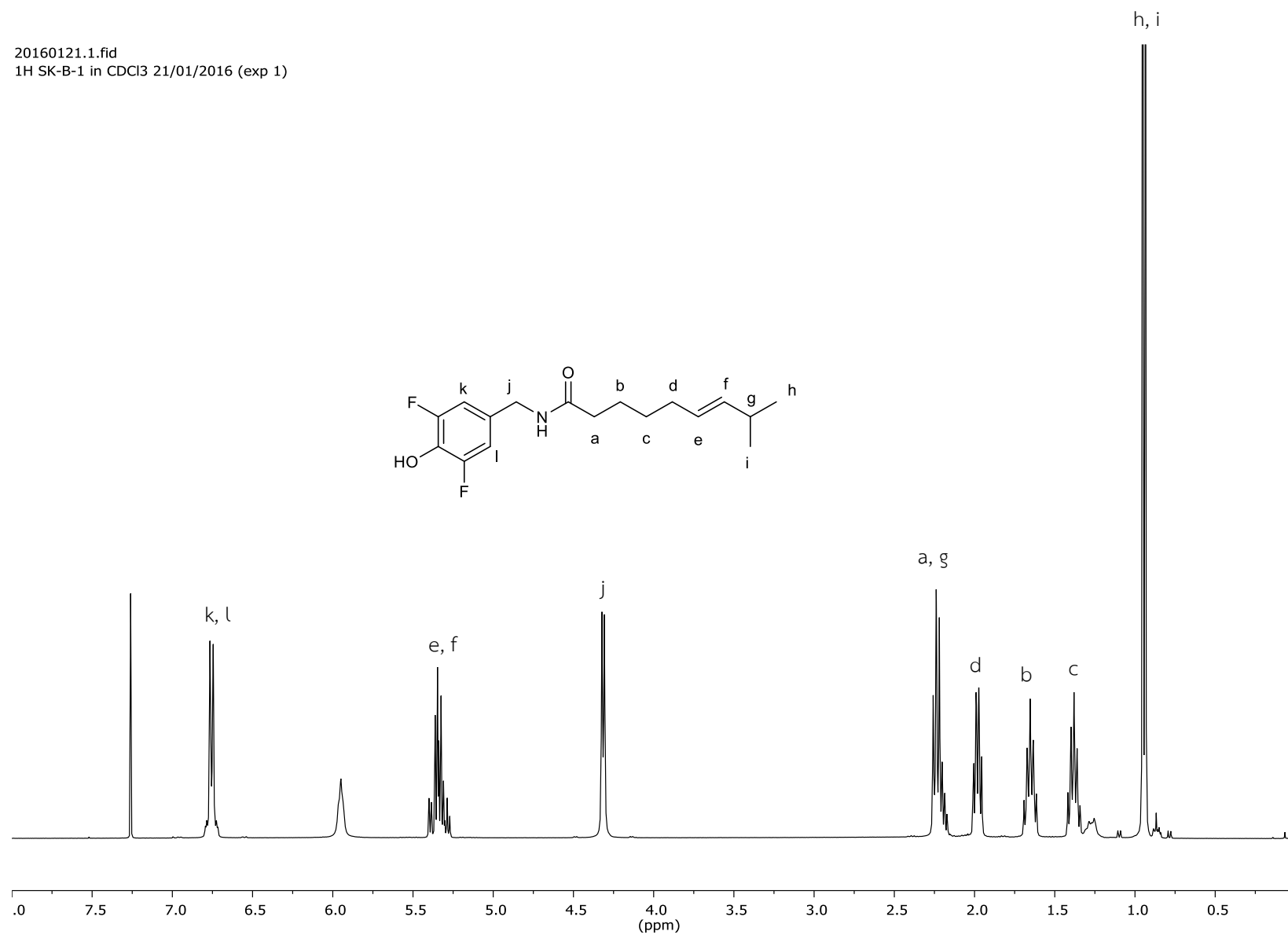


ภาพ 1.2.38 ¹H-NMR spectrum ของ (E)-N-(3-fluoro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide ใน chloroform-d

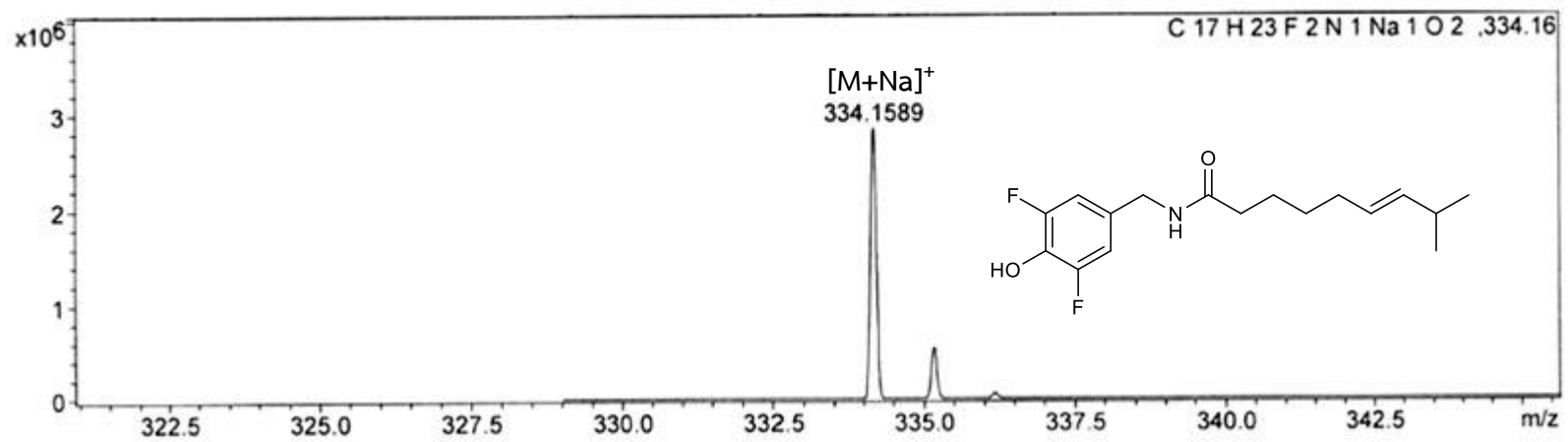


ภาพ 1.2.39 Mass spectrum ของ (E)-N-(3-fluoro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide

20160121.1.fid
1H SK-B-1 in CDCl3 21/01/2016 (exp 1)

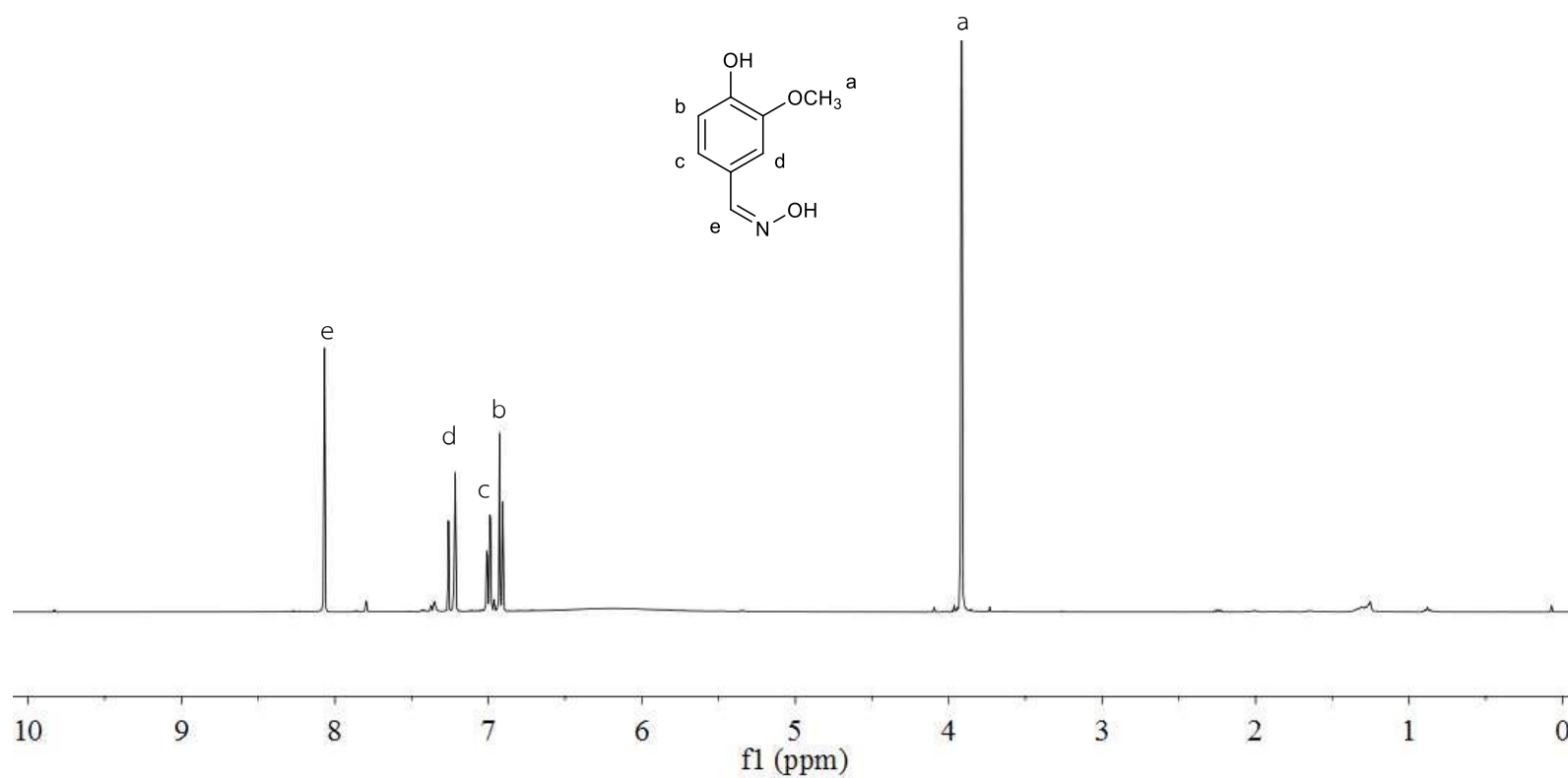


ภาพ 1.2.40 ¹H-NMR spectrum ของ *(E)*-N-(3,5-difluoro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide ใน chloroform-*d*

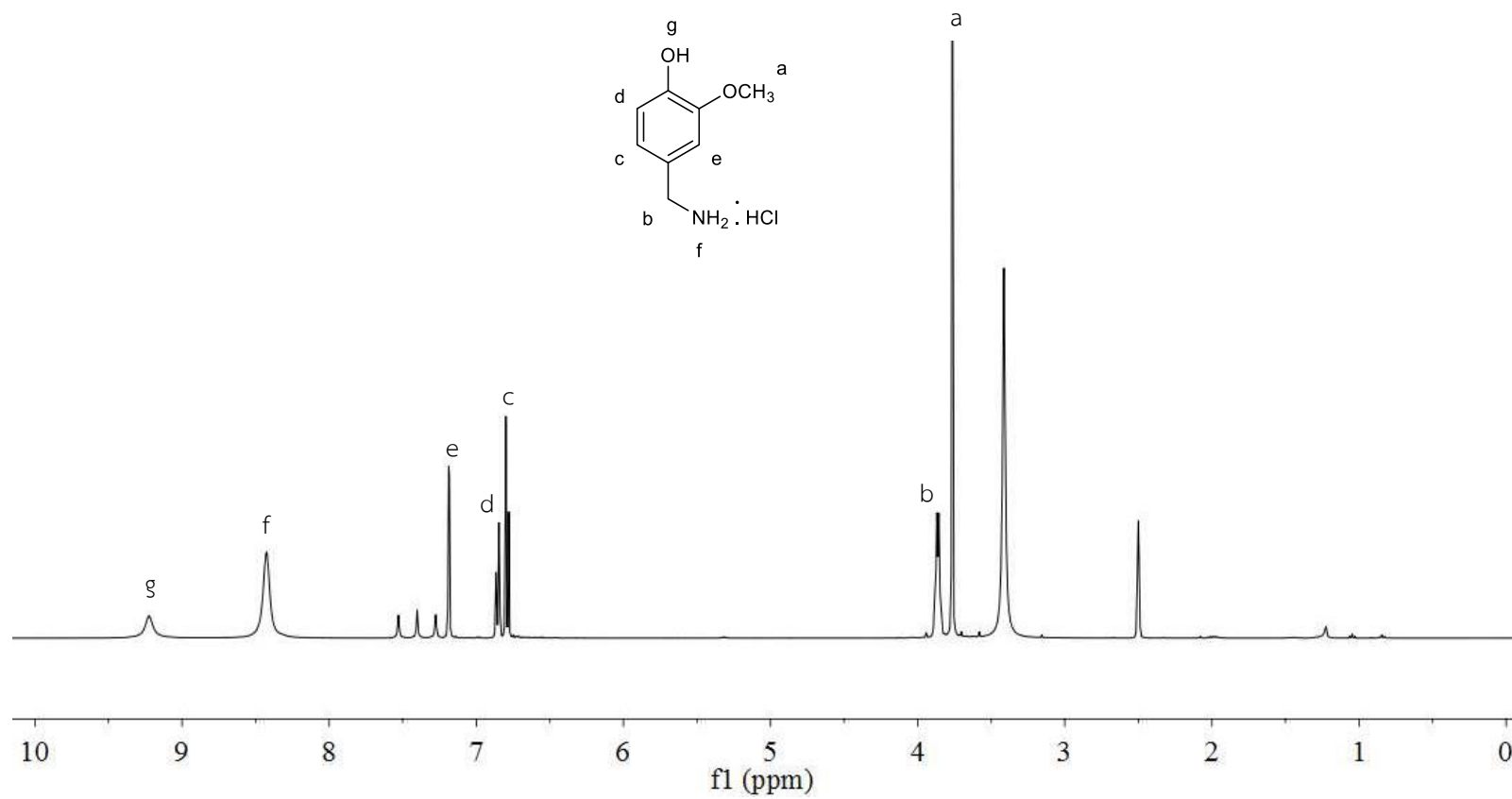


ภาพ 1.2.41 Mass spectrum ของ (*E*)-*N*-(3,5-difluoro-4-hydroxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide

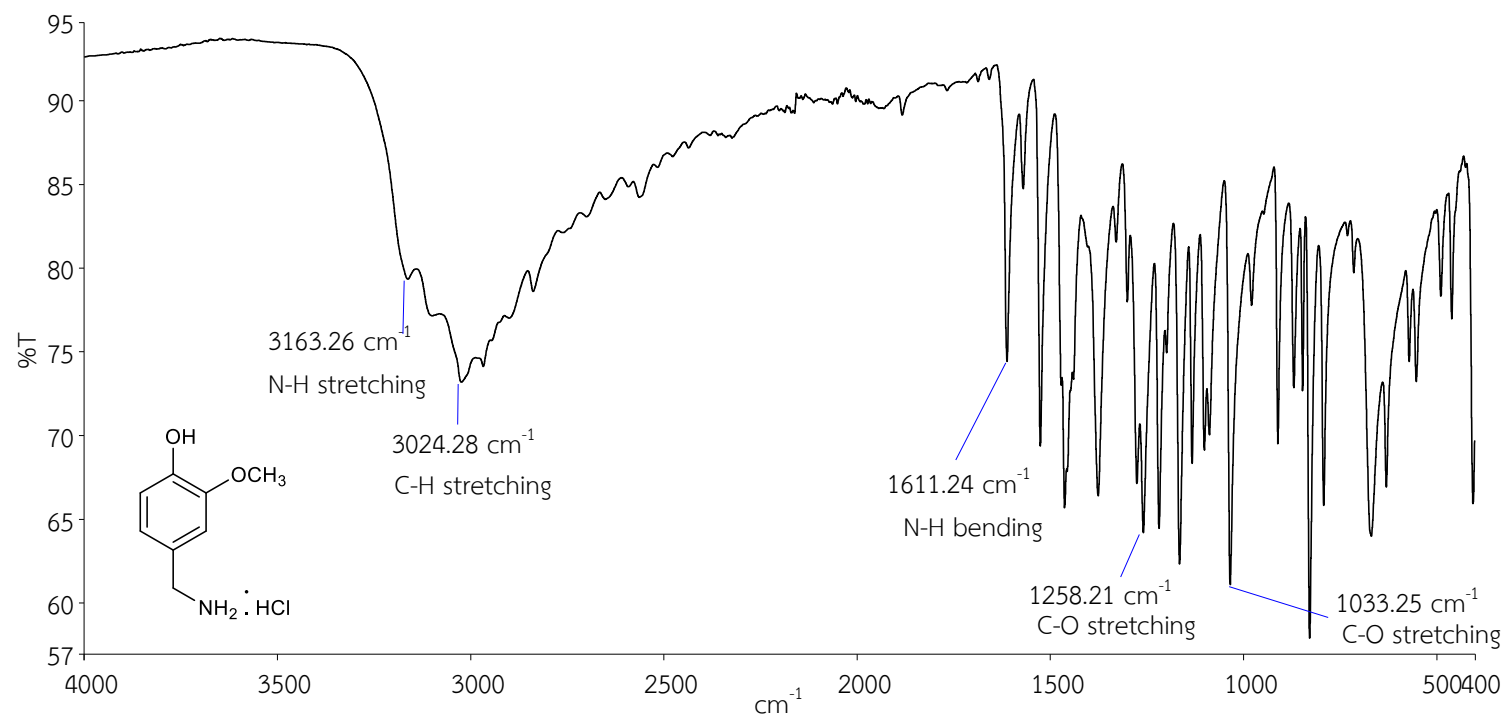
2.3) พัฒนาโดยการปรับปรุงให้มีความเผ็ดลดลงผ่านการปรับปรุงในส่วน fatty acid residue และ aromatic moiety



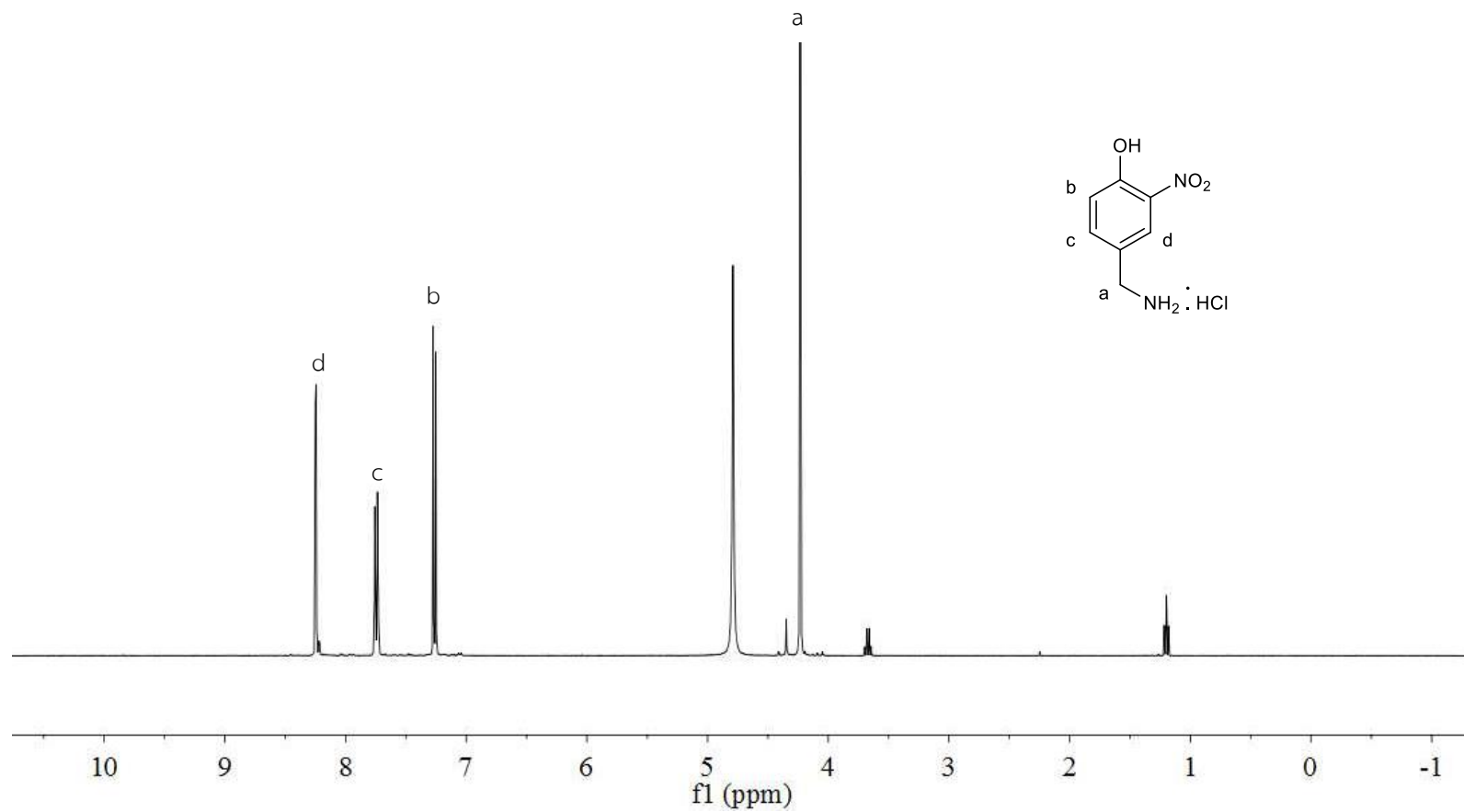
ภาพ 1.2.42 ^1H -NMR spectrum ของ vanillyl oxime ใน $\text{Chloroform-}d$



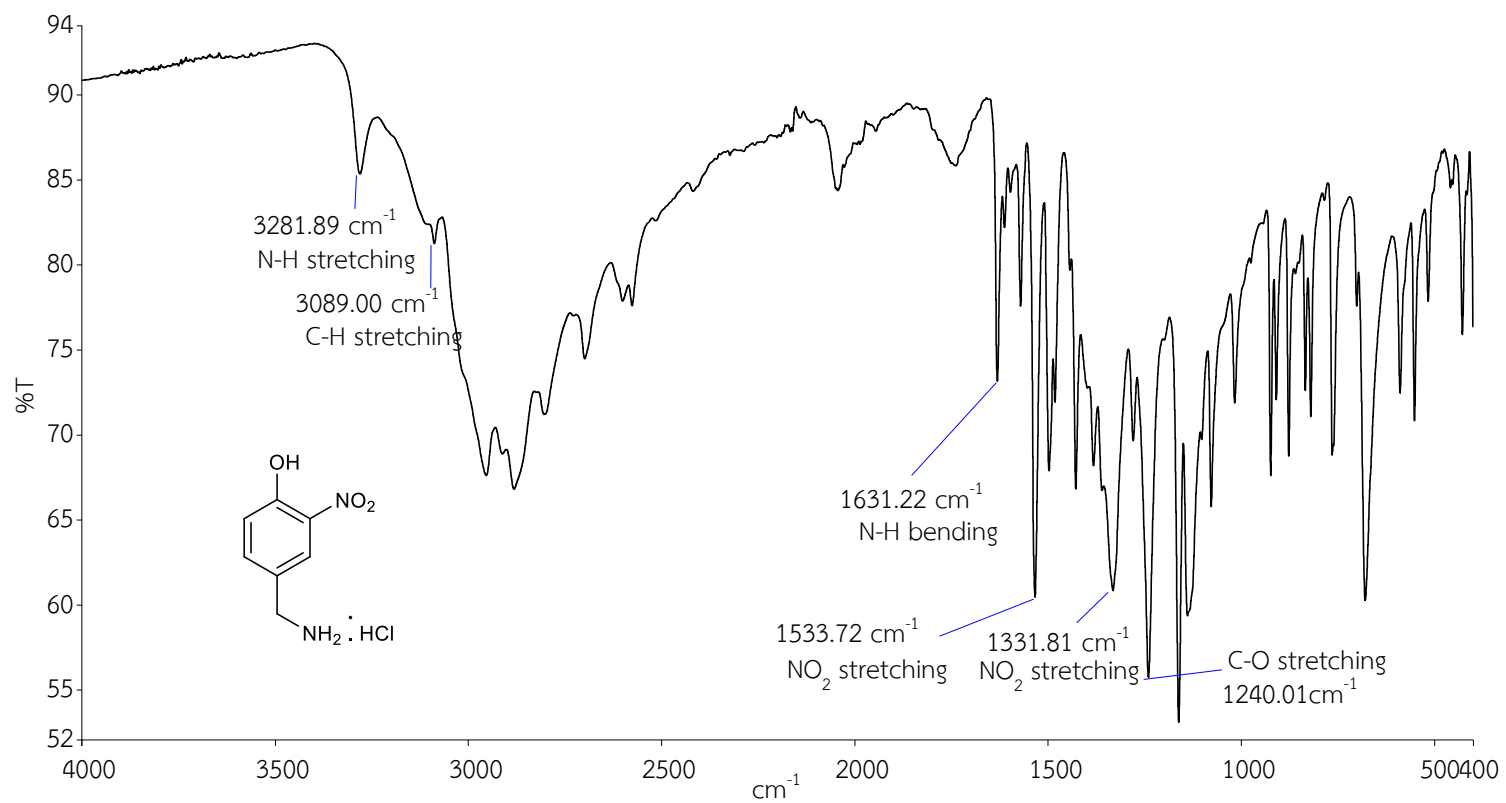
ภาพ 1.2.43 ^1H -NMR spectrum ของ vanillyl amine hydrochloride ใน $\text{DMSO}-d_6$



ภาพ 1.2.44 FT-IR spectrum ของ 4-Hydroxy-3-methoxybenzylamine hydrochloride

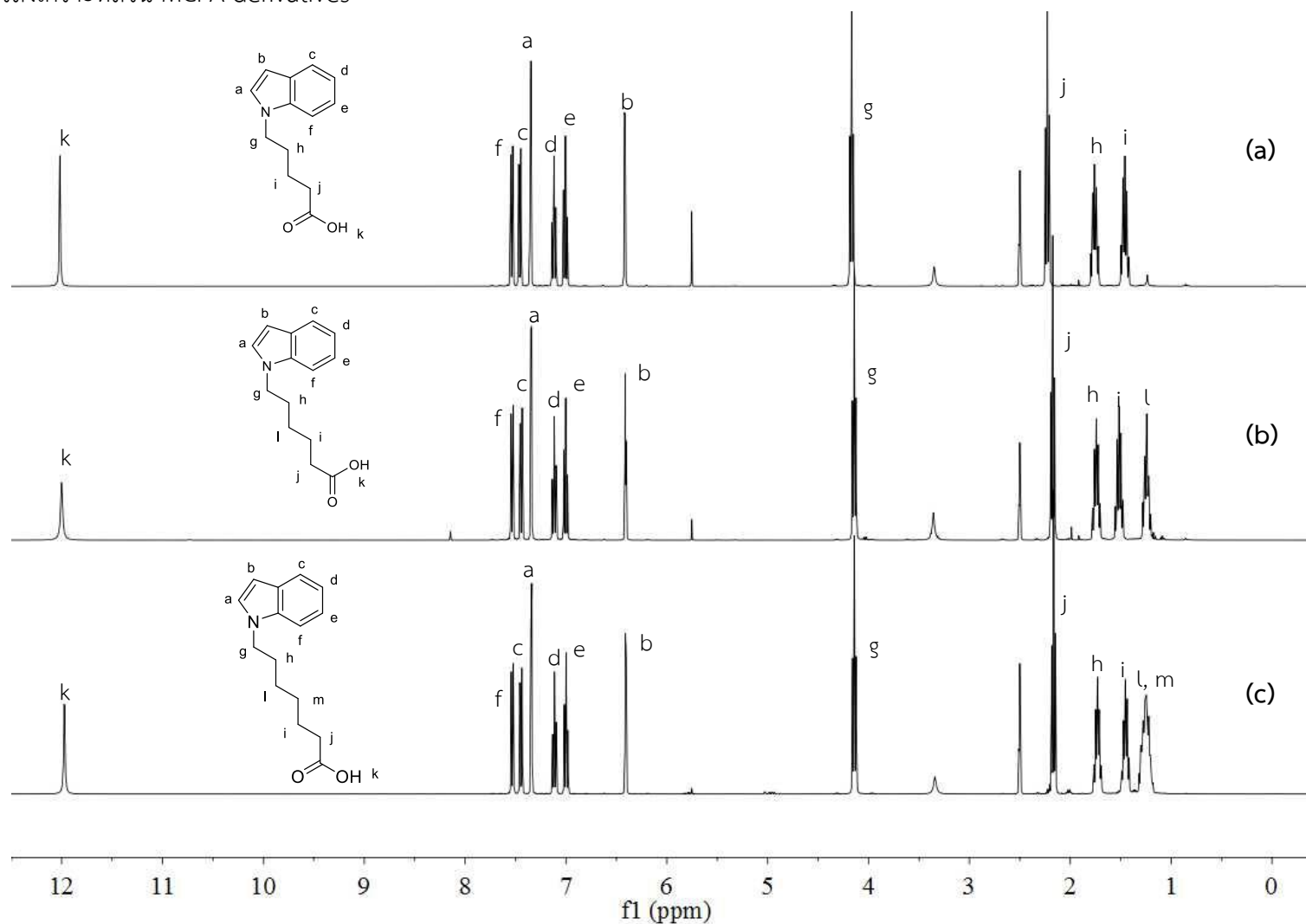


ภาพ 1.2.45 ^1H -NMR spectrum ของ 3-nitro-4-hydroxybenzylamine ใน $\text{DMSO}-d_6$

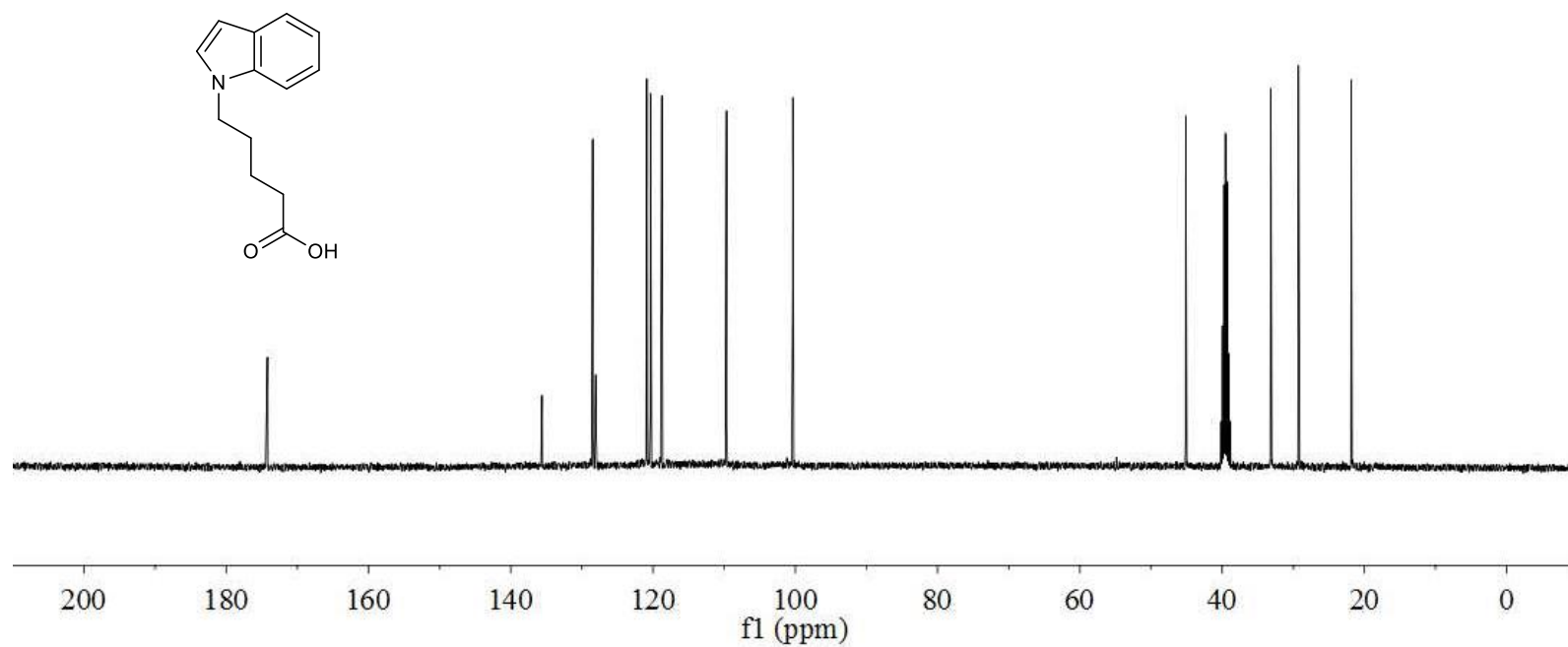


ภาพ 1.2.46 FT-IR spectrum ของ 3-nitro-4-hydroxybenzylamine

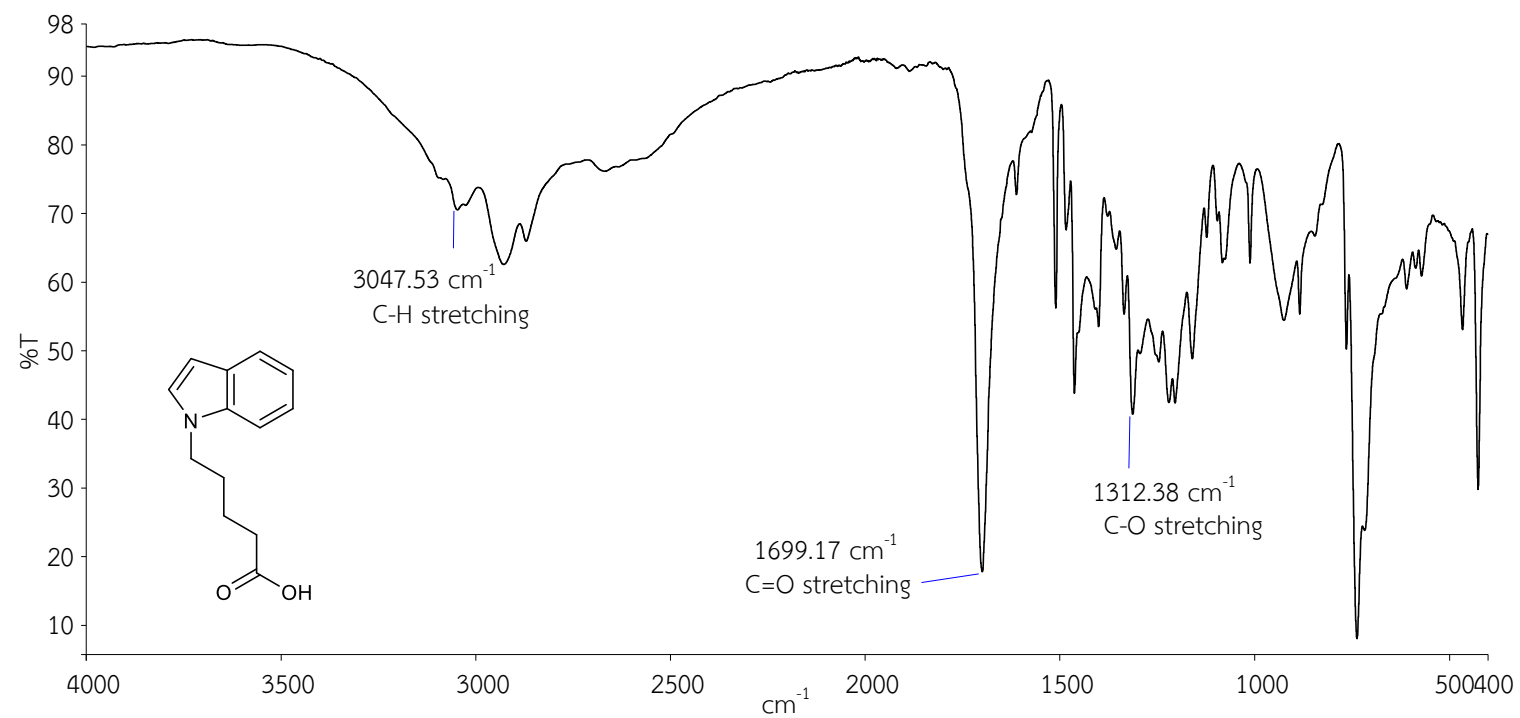
2.3.2) การสังเคราะห์ส่วน MCFA derivatives



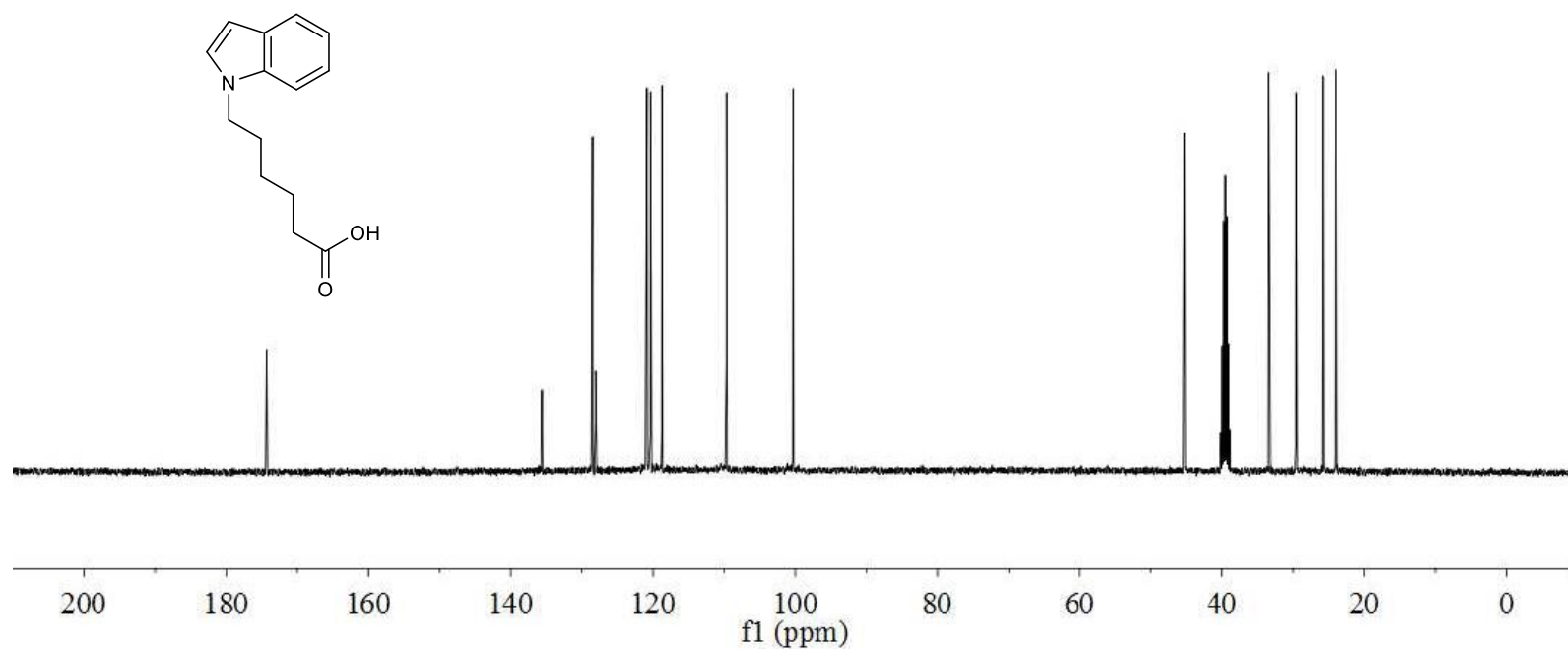
ภาพ 1.2.47 ^1H -NMR spectra ของ (a) = $(1H\text{-indol-1-yl})\text{pentanoic acid}$
 (b) = $(1H\text{-indol-1-yl})\text{hexanoic acid}$ และ (c) = $(1H\text{-indol-1-yl})\text{heptanoic acid}$ in $\text{DMSO}-d_6$



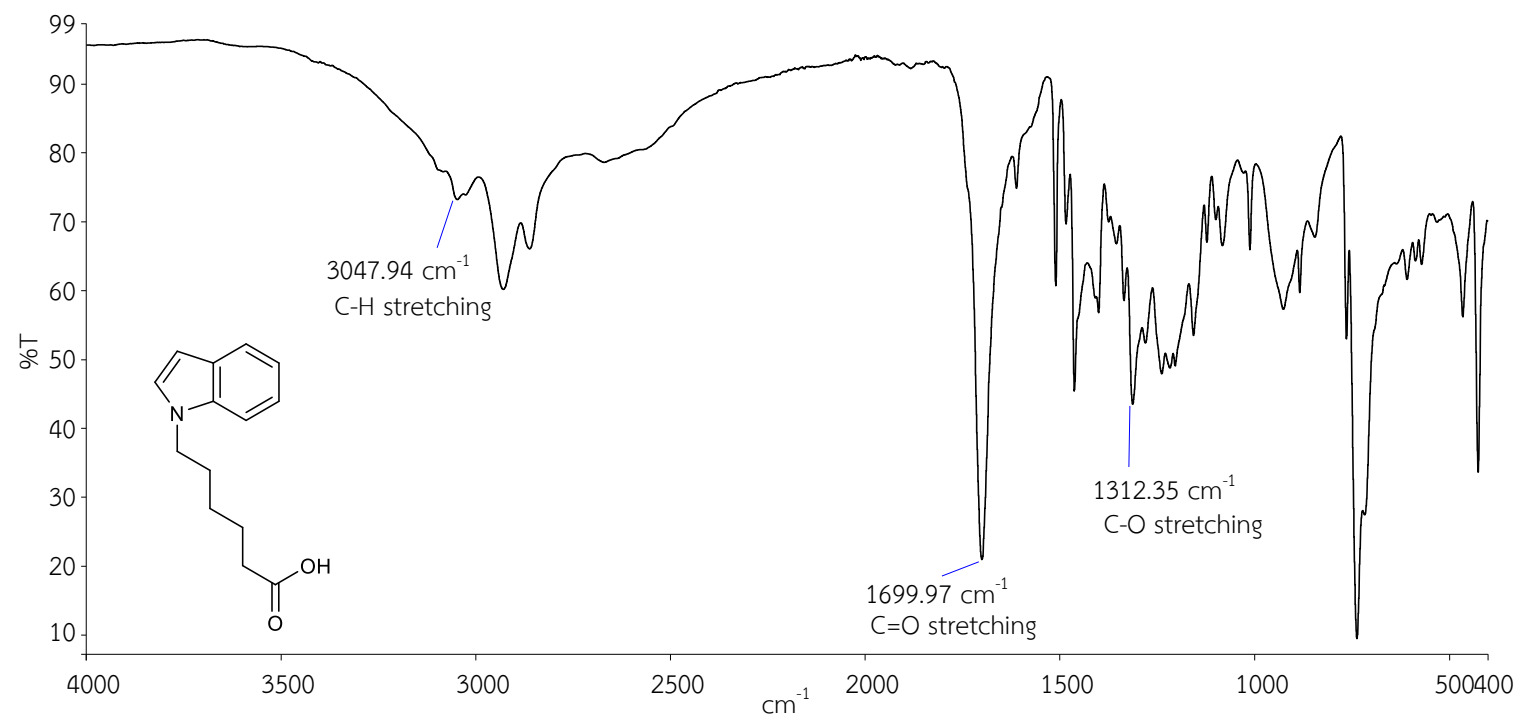
ภาพ 1.2.48 ^{13}C -NMR spectrum ของ 5-(1*H*-indol-1-yl)pentanoic acid ใน $\text{DMSO-}d_6$



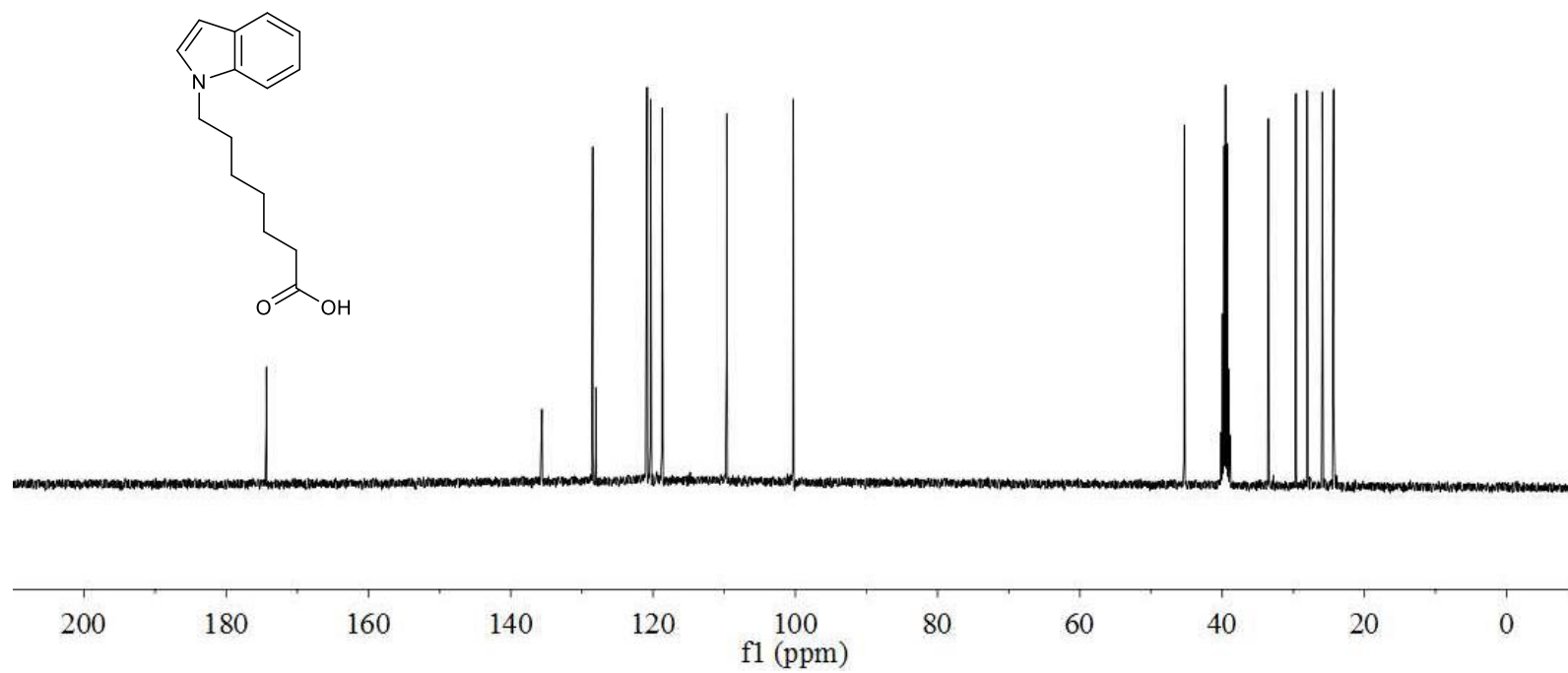
ภาพ 1.2.49 FT-IR spectrum ของ 5-(1H-indol-1-yl)pentanoic acid



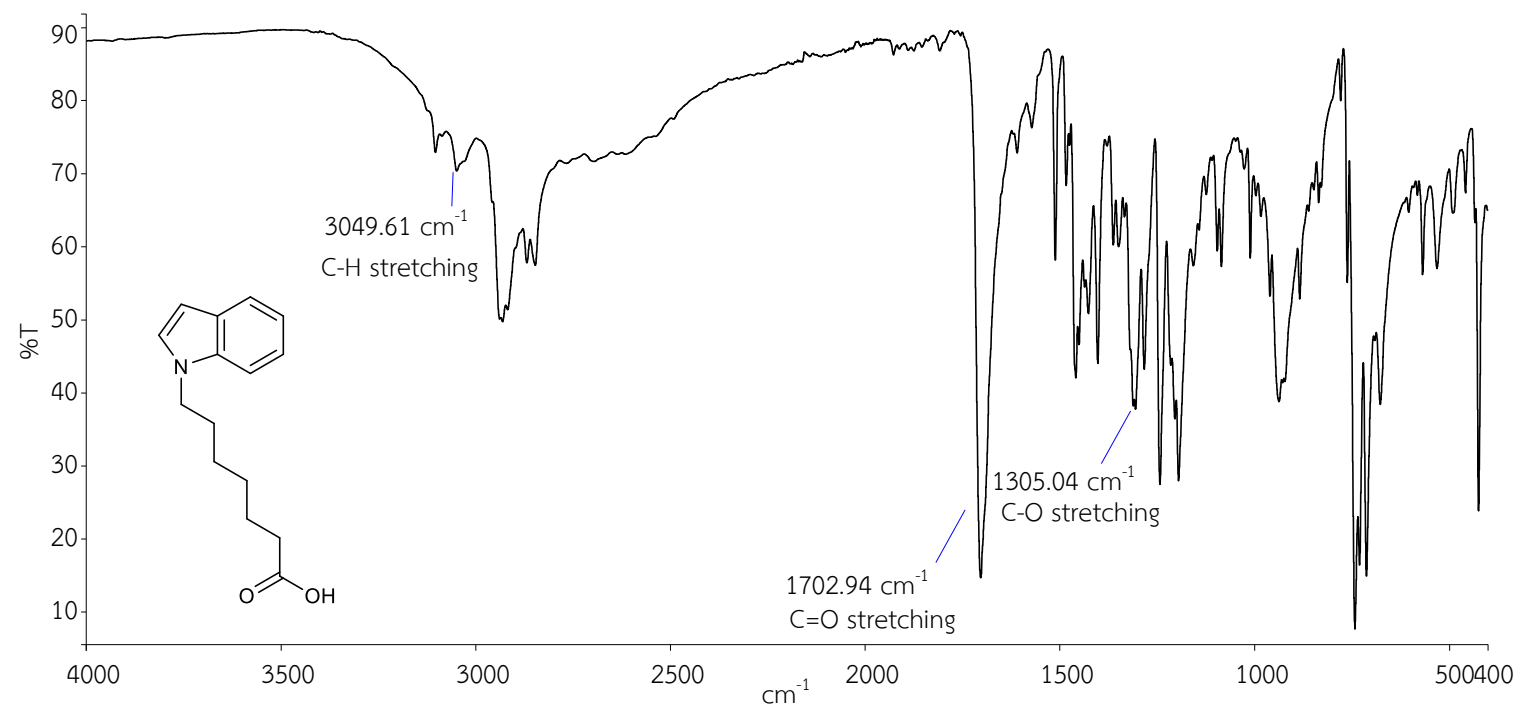
ภาพ 1.2.50 ^{13}C -NMR spectrum ของ 6-(1*H*-indol-1-yl)hexanoic acid ใน $\text{DMSO}-d_6$



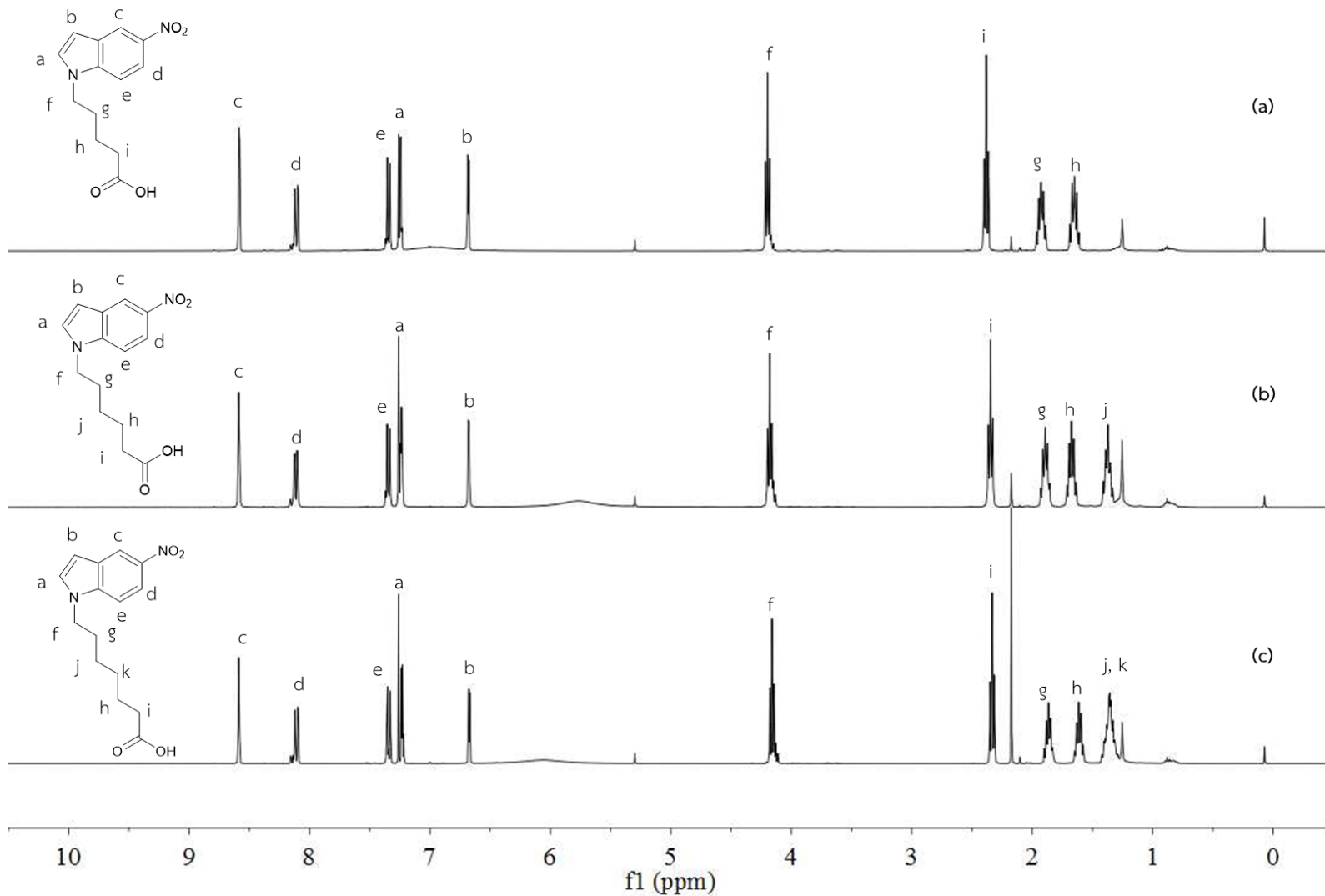
ภาพ 1.2.51 FT-IR spectrum ของ 6-(1*H*-indol-1-yl)hexanoic acid



ภาพ 1.2.52 ^{13}C -NMR spectrum ของ 7-(1*H*-indol-1-yl)heptanoic acid in $\text{DMSO-}d_6$

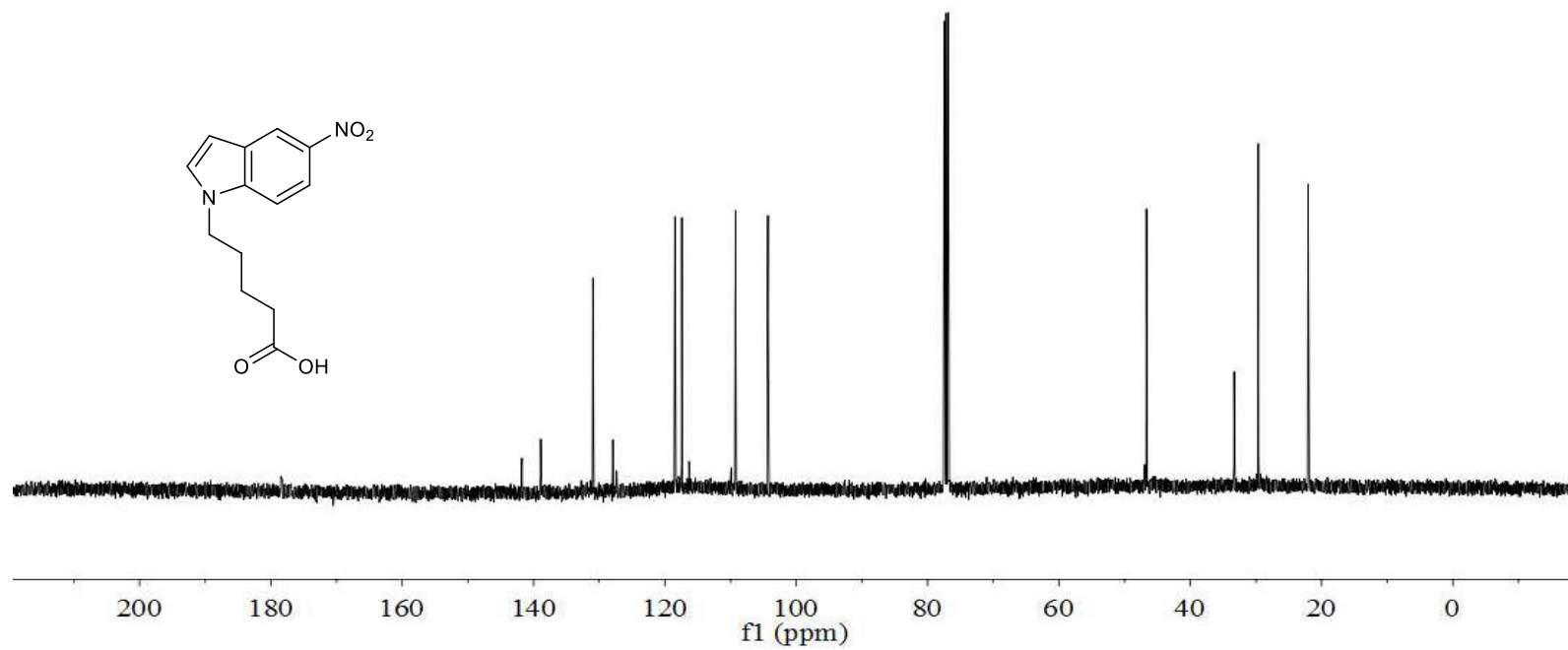


ภาพ 1.2.53 FT-IR spectrum ของ 7-(1H-indol-1-yl)heptanoic acid

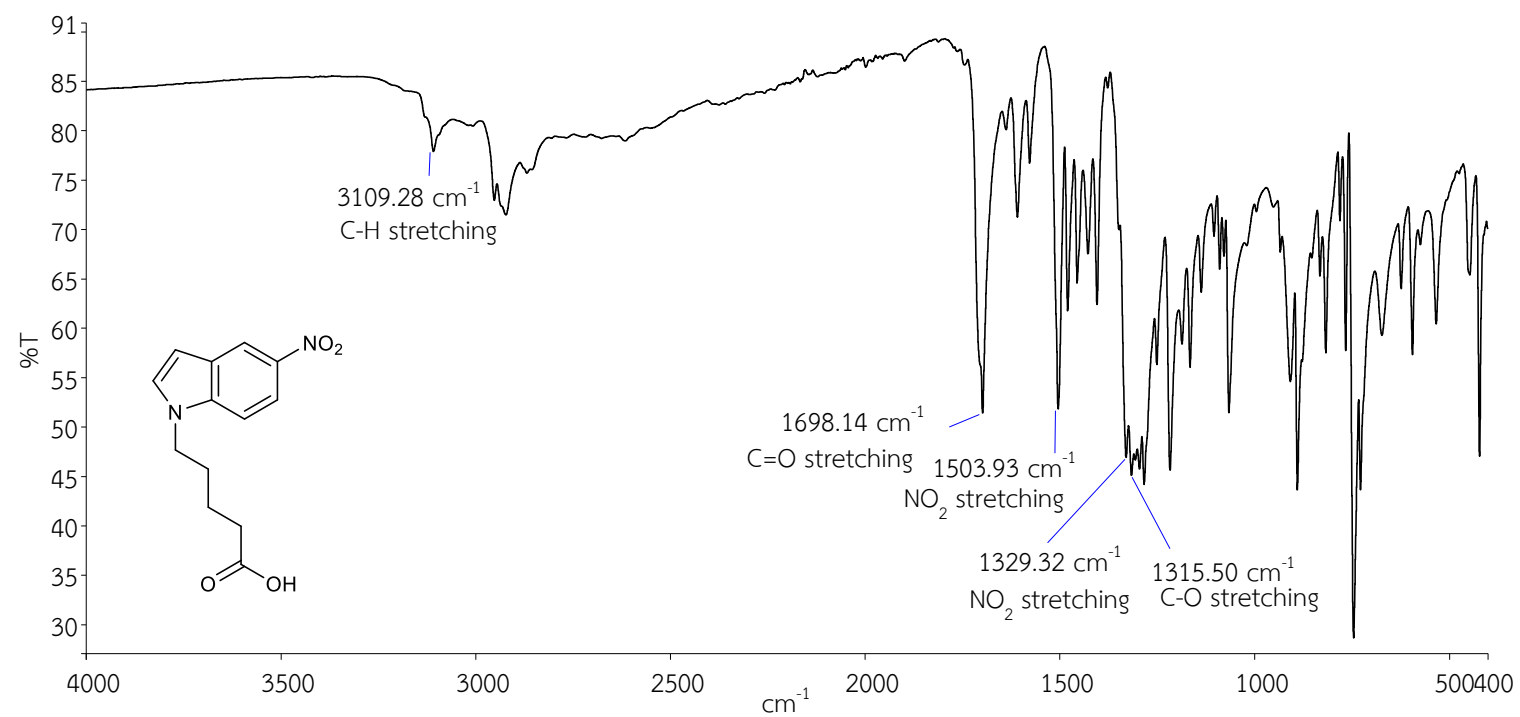


ภาพ 1.2.54 ^1H -NMR spectra ของ (a) = 5-(5-nitro-1H-indol-1-yl)pentanoic acid

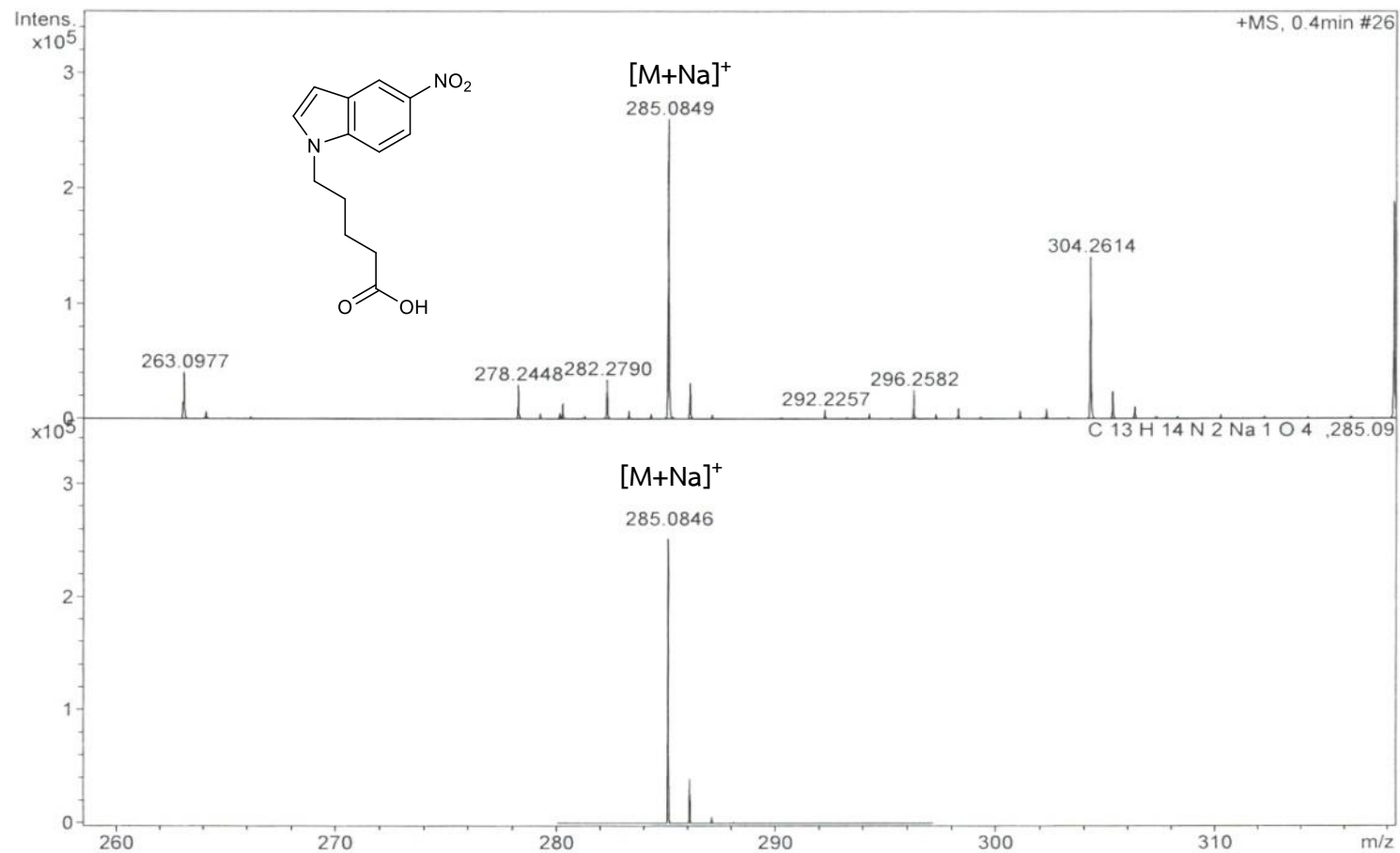
(b) = 6-(5-nitro-1H-indol-1-yl)hexanoic acid และ (c) = 7-(5-nitro-1H-indol-1-yl)heptanoic acid ใน chloroform-*d*



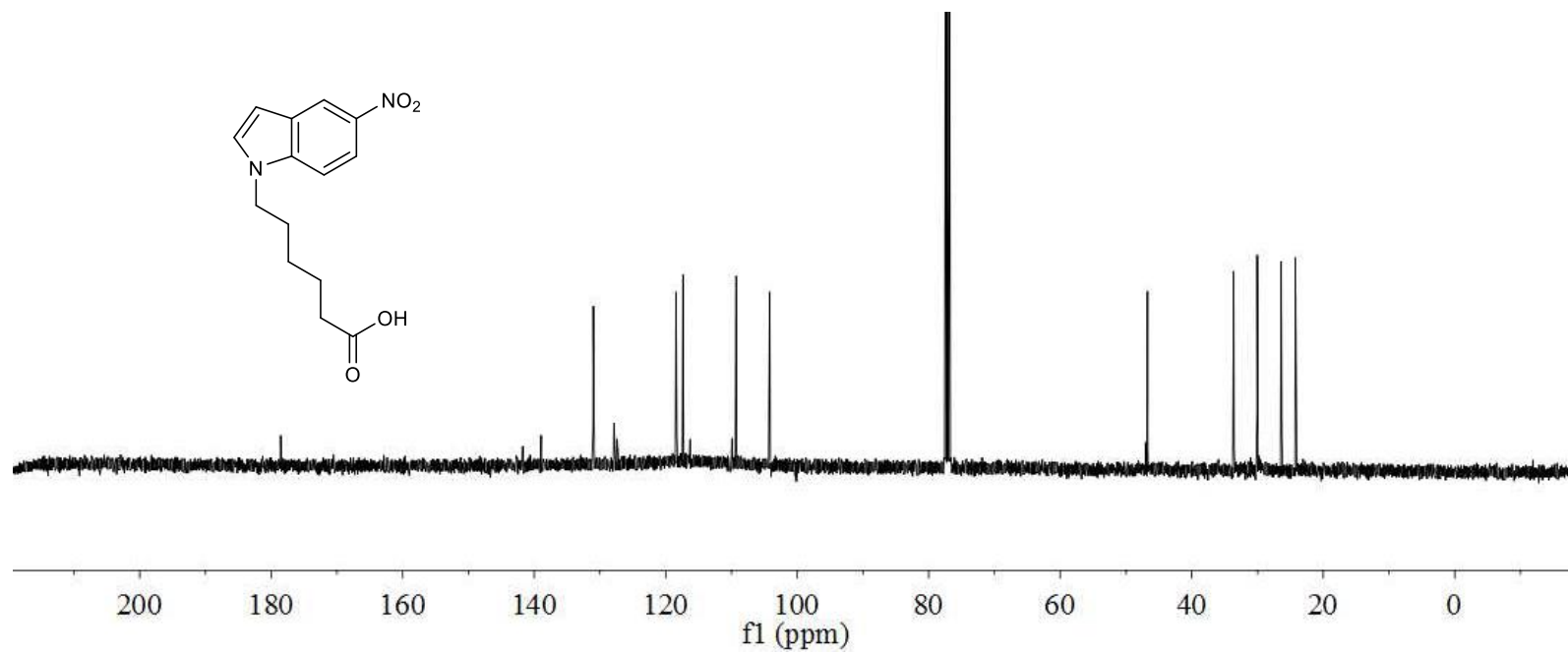
ภาพ 1.2.55 ^{13}C -NMR spectrum ของ 5-(5-nitro-1H-indol-1-yl)pentanoic acid ใน CDCl_3



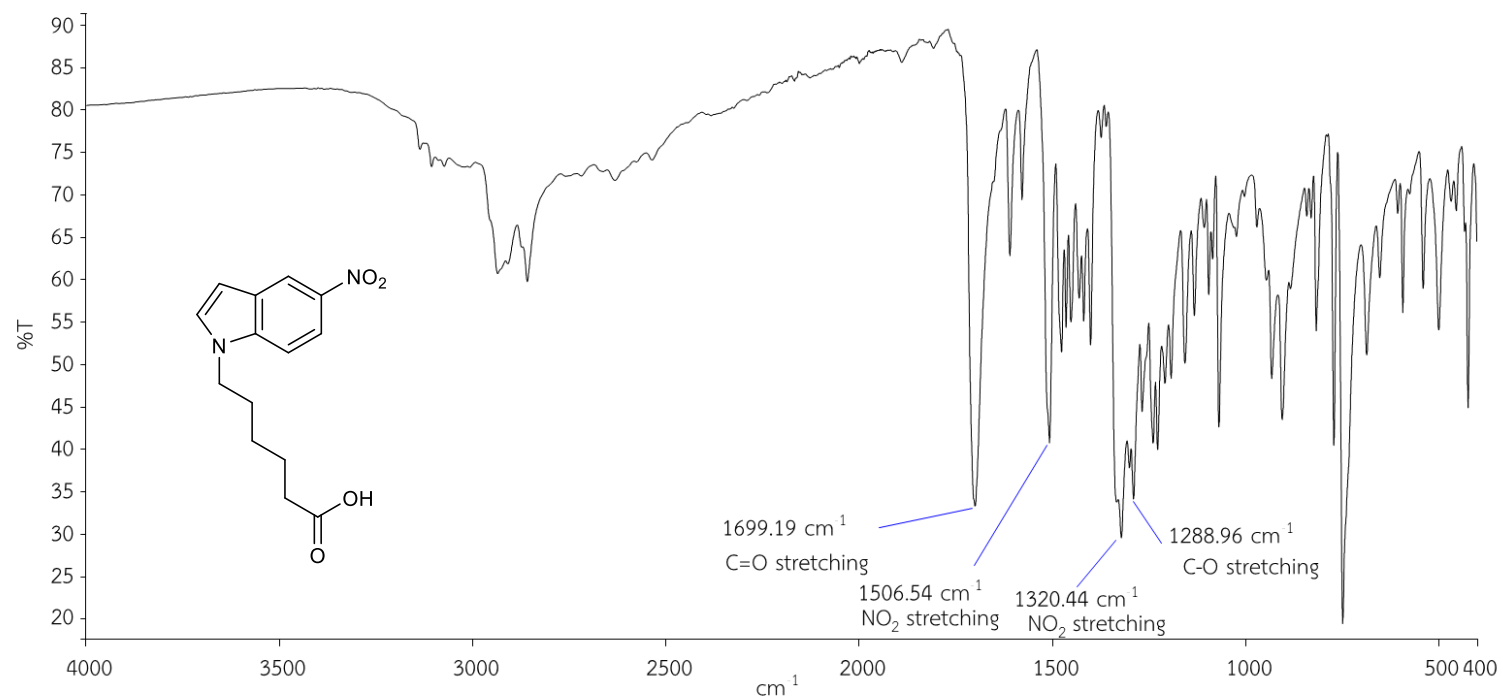
ภาพ 1.2.56 FT-IR spectrum ของ 5-(5-nitro-1H-indol-1-yl)pentanoic acid



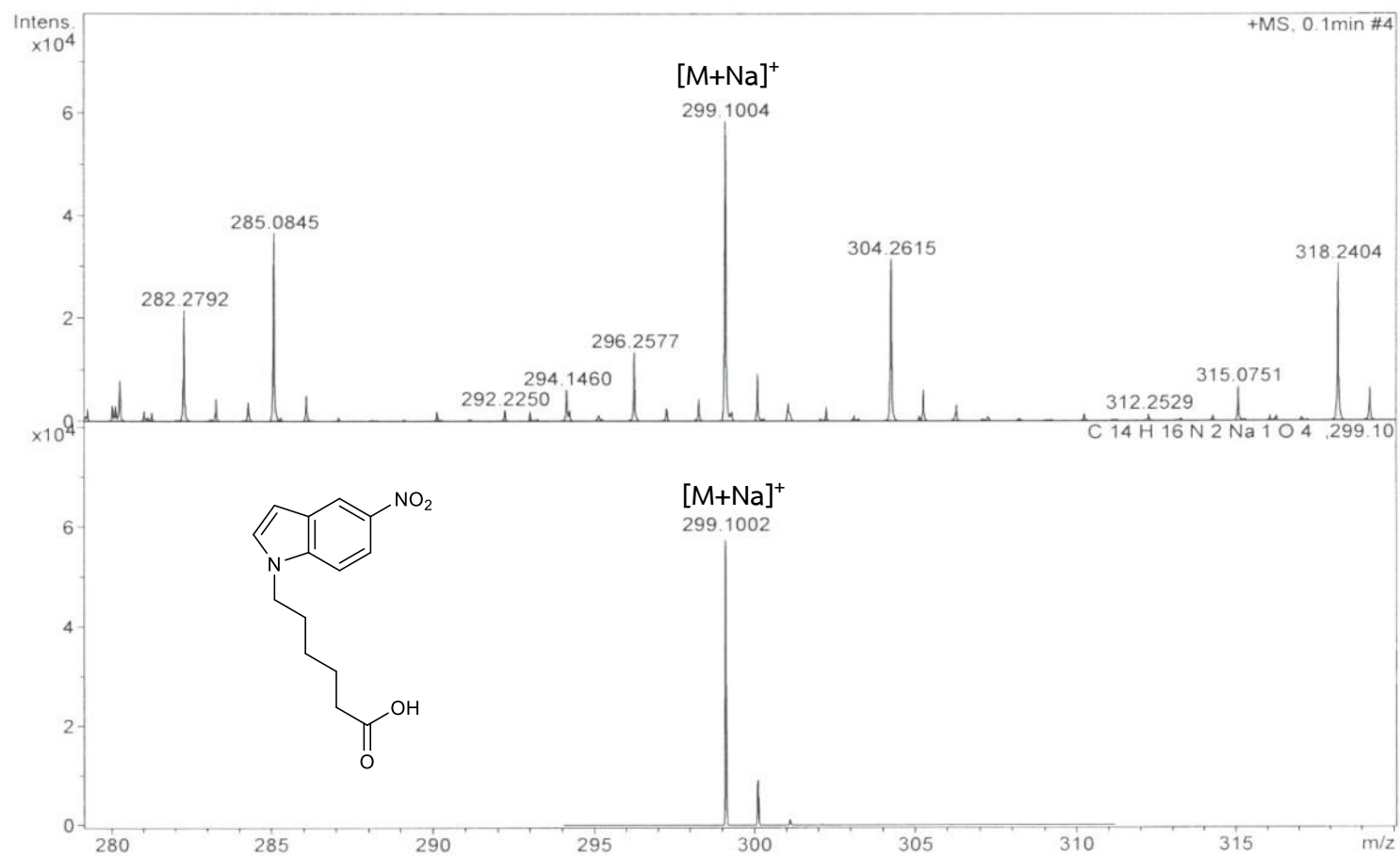
ภาพ 1.2.57 Mass spectrum ของ 5-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)pentanoic acid



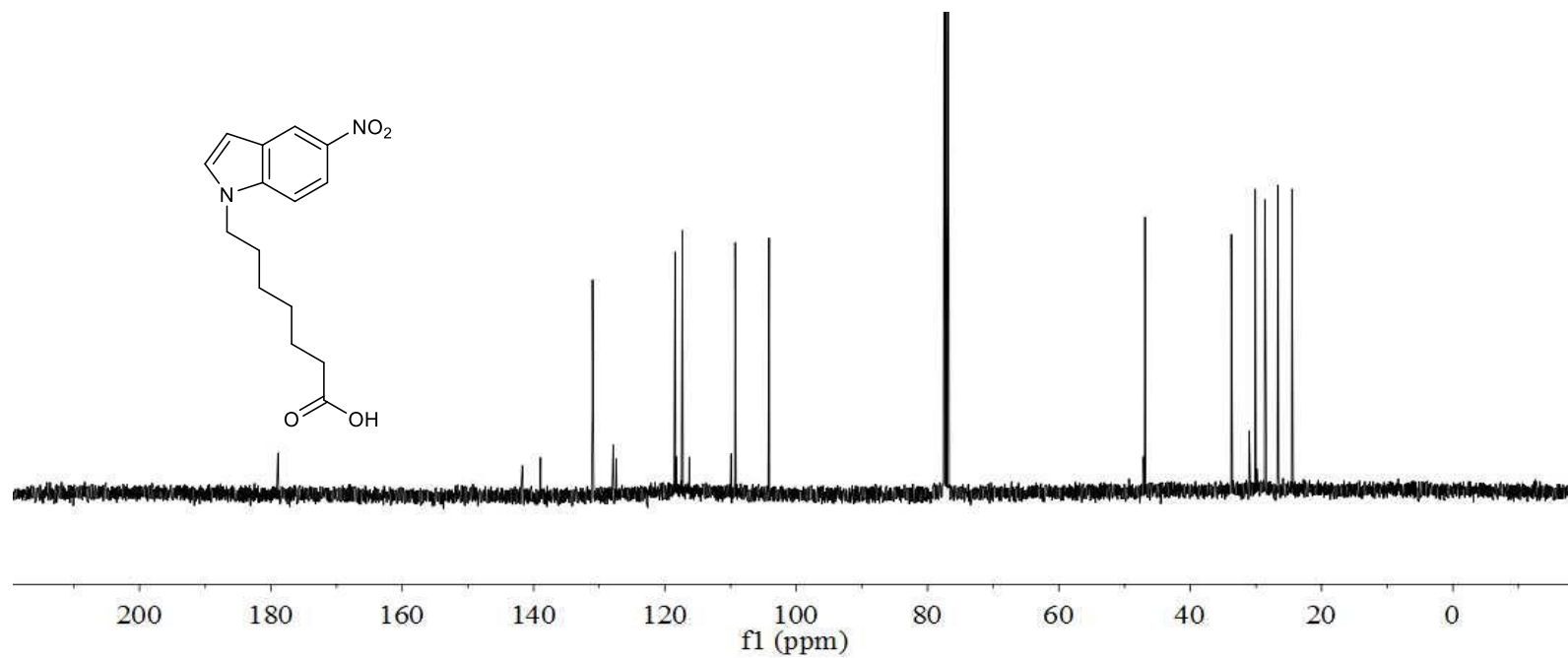
ภาพ 1.2.58 ^{13}C -NMR spectrum ของ 6-(5-nitro-1H-indol-1-yl)hexanoic acid ใน CDCl_3



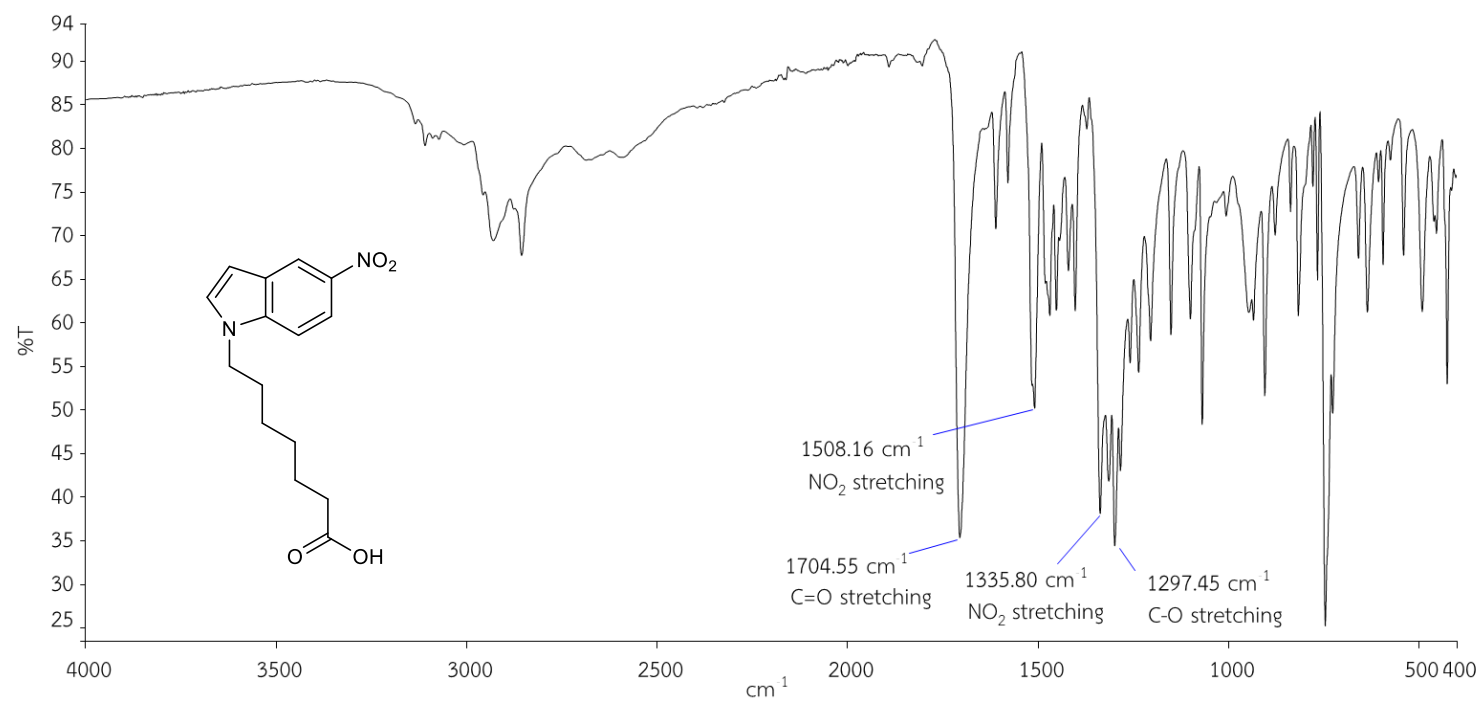
ภาพ 1.2.59 FT-IR spectrum ของ 6-(5-nitro-1H-indol-1-yl)hexanoic acid



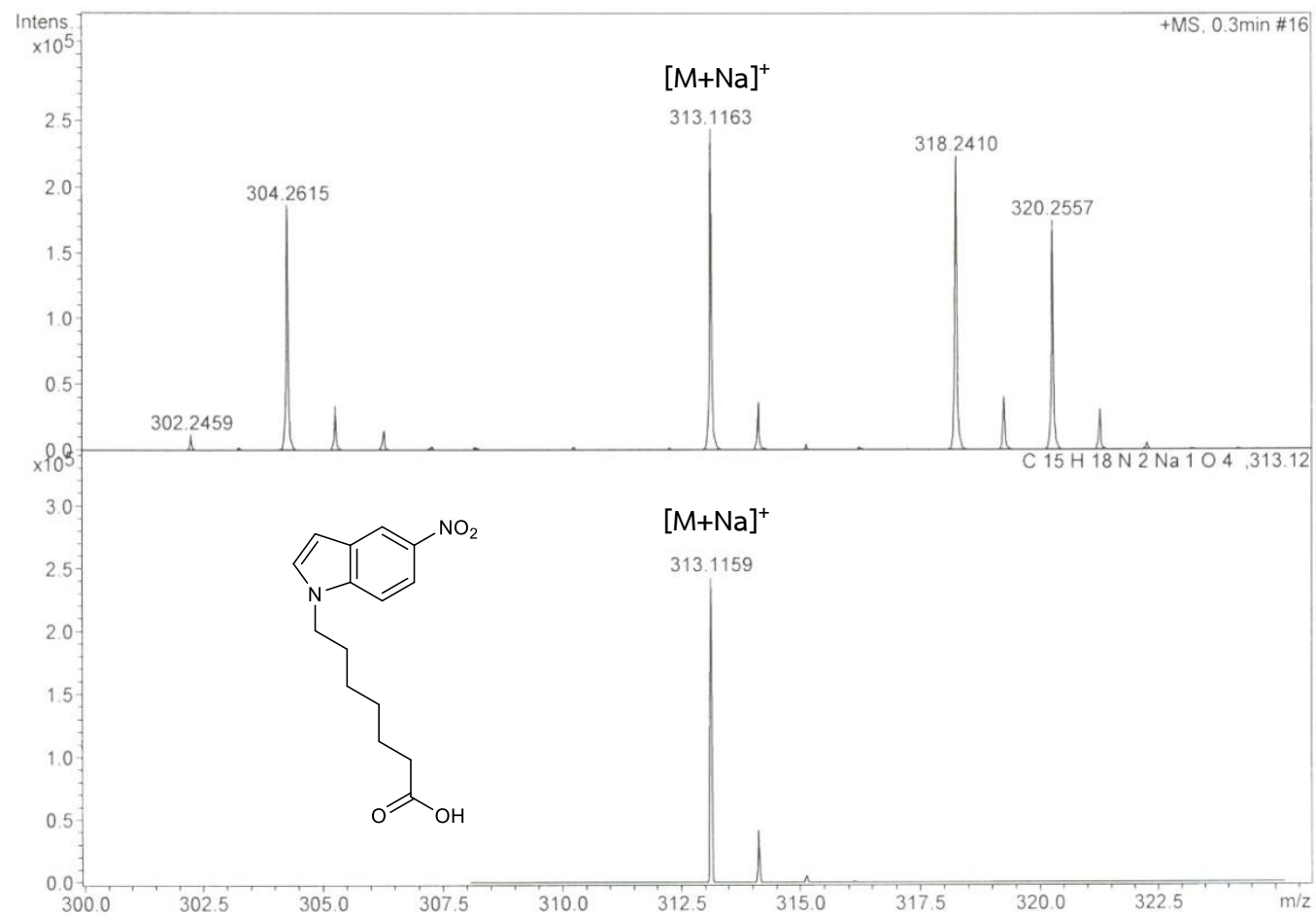
ภาพ 1.2.60 Mass spectrum ของ 6-(5-nitro-1H-indol-1-yl)hexanoic acid



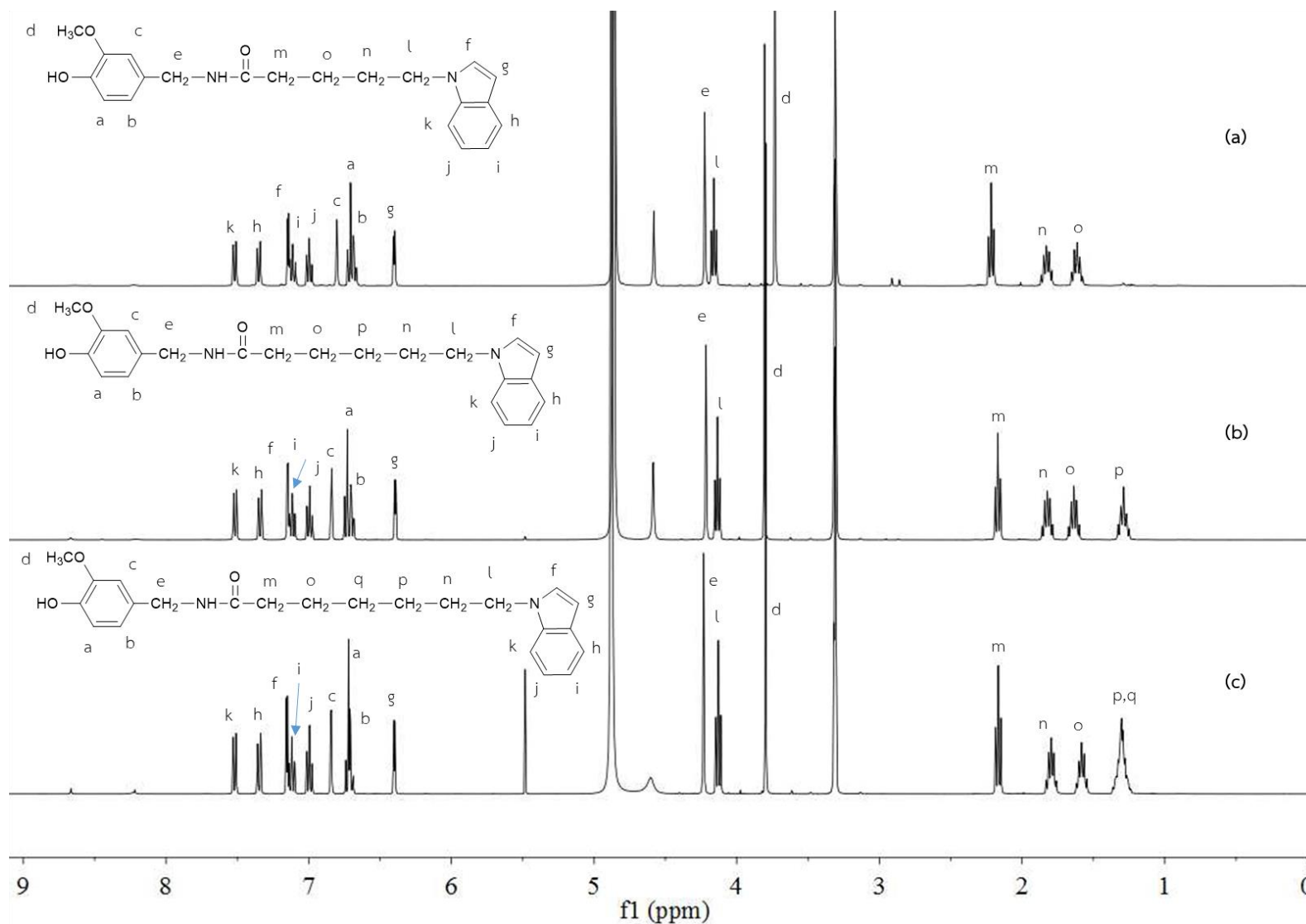
ภาพ 1.2.61 ^{13}C -NMR spectrum ของ 7-(5-nitro-1H-indol-1-yl)heptanoic acid ใน $\text{chloroform-}d$



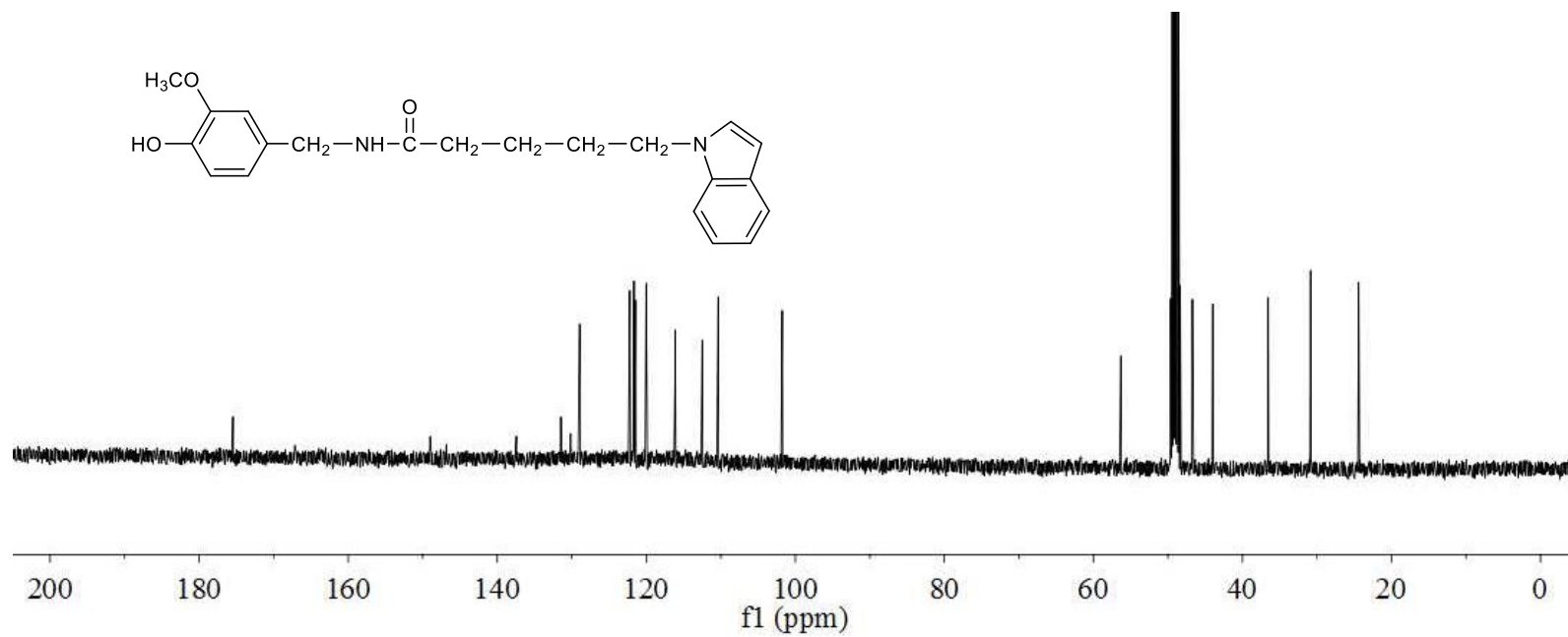
ภาพ 1.2.62 FT-IR spectrum ของ 7-(5-nitro-1H-indol-1-yl)heptanoic acid



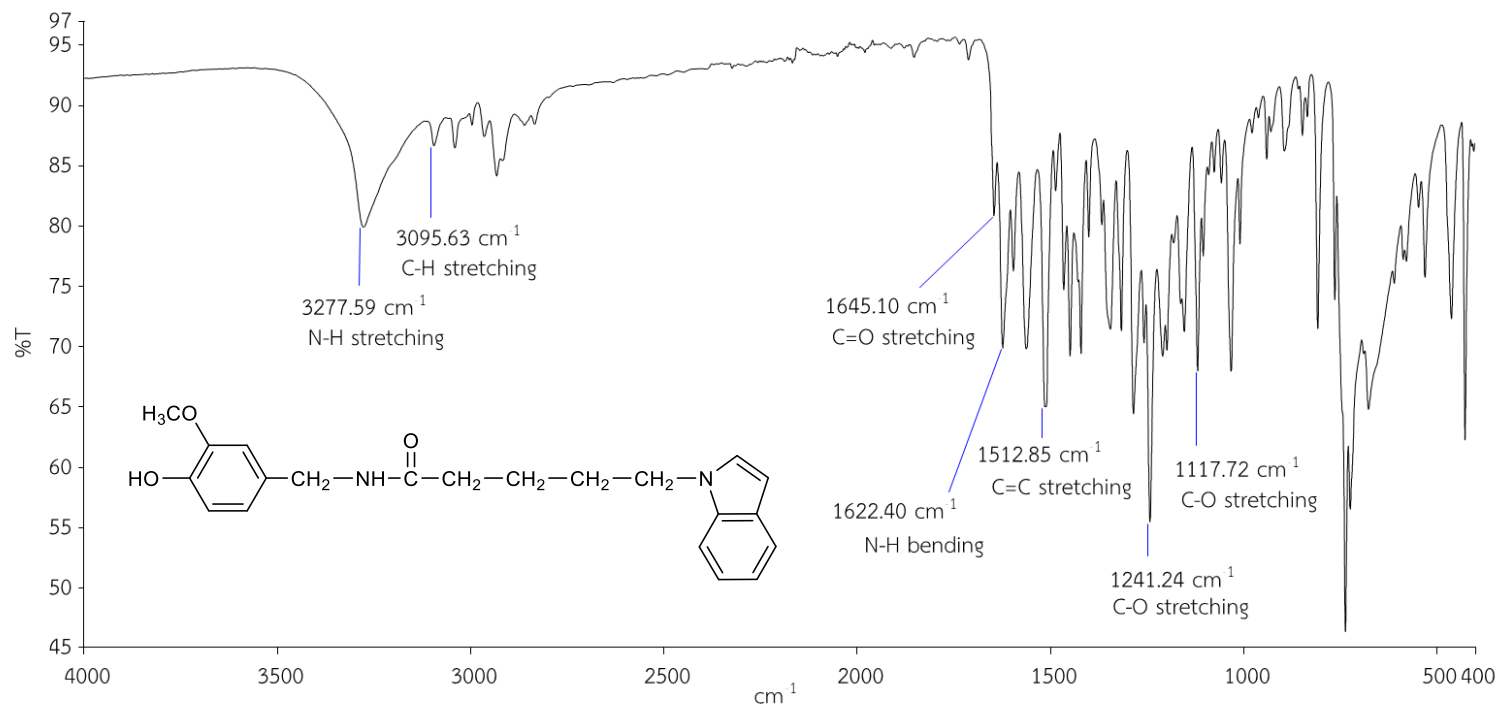
ภาพ 1.2.63 Mass spectrum ของ 7-(5-nitro-1H-indol-1-yl)heptanoic acid



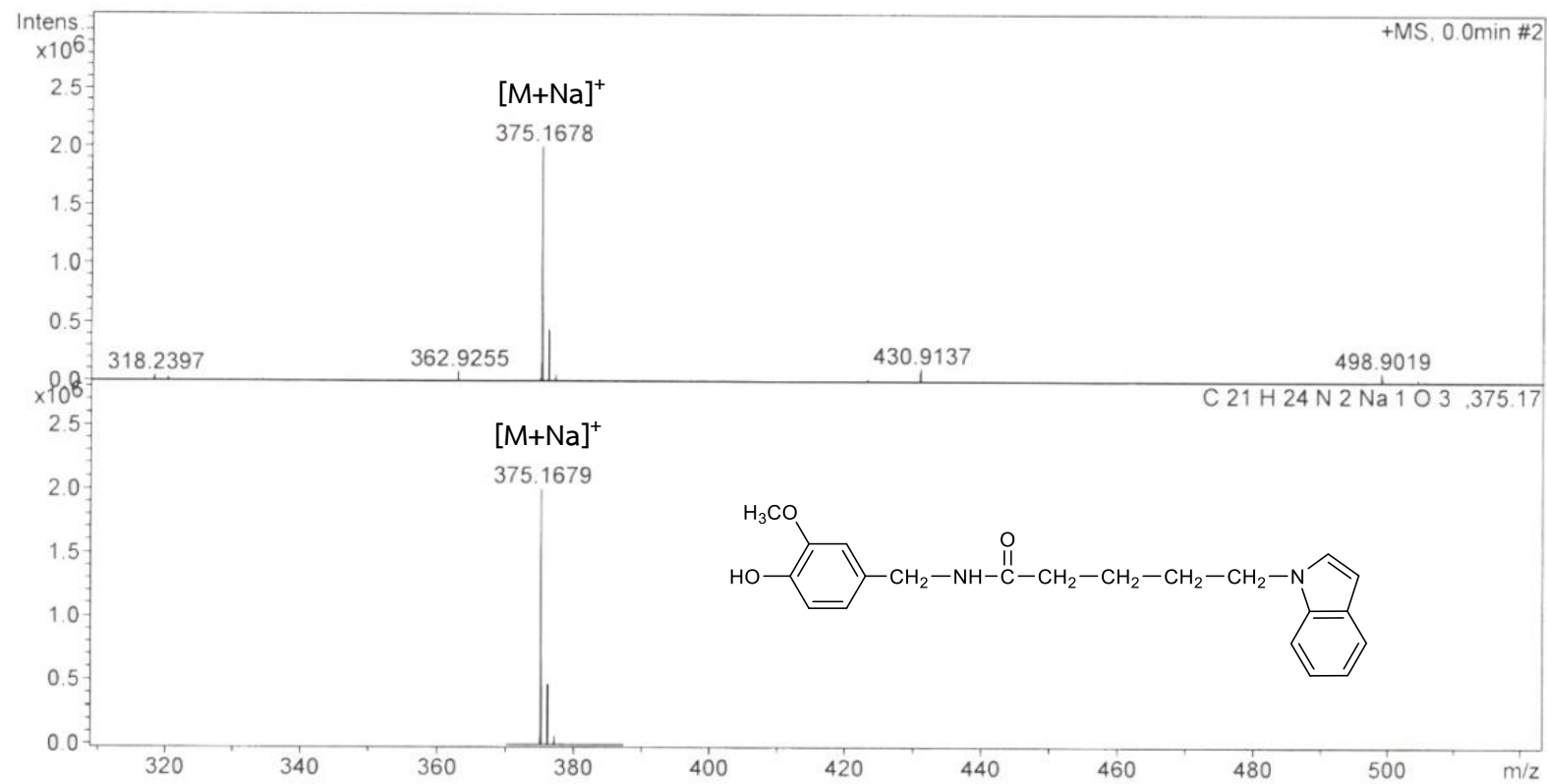
ภาพ 1.2.64 ^1H -NMR spectra ของ (a) = N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(1H-indol-1-yl)pentanamide (b) = N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(1H-indol-1-yl)hexanamide และ (c) = N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(1H-indol-1-yl)heptanamide ใน Methanol- d_4



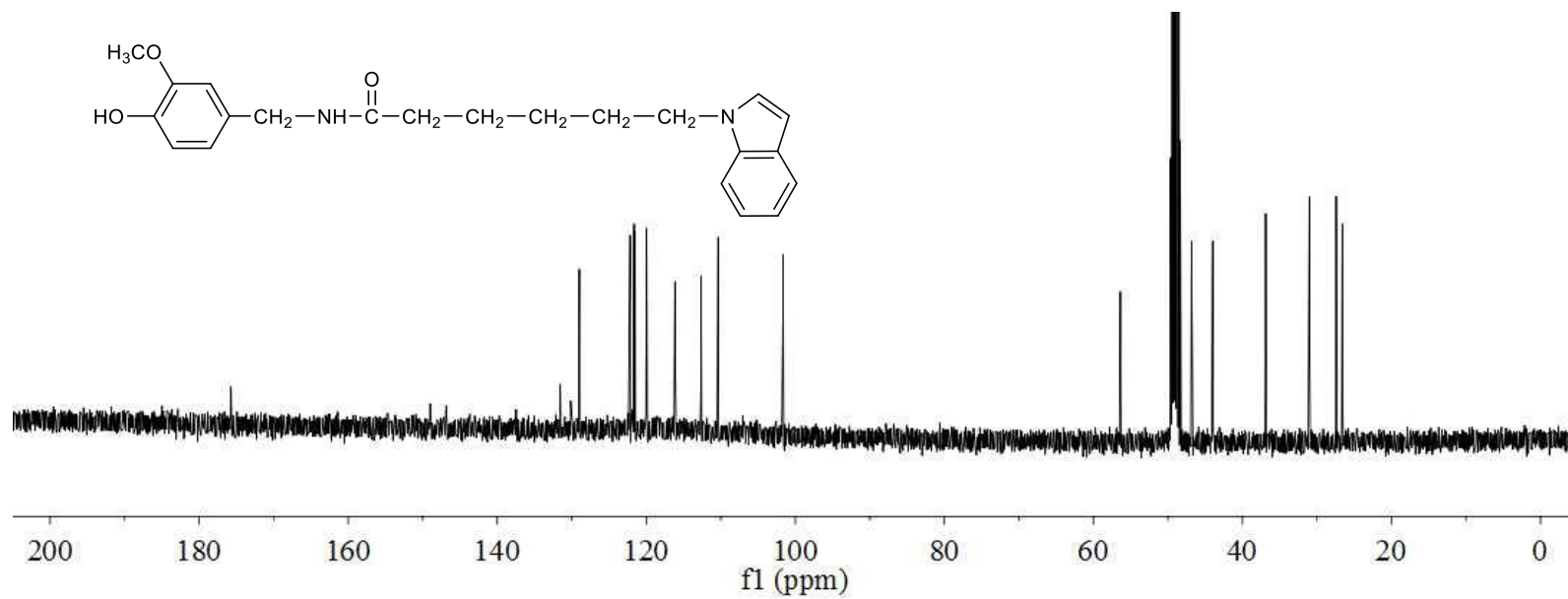
ภาพ 1.2.65 ¹³C-NMR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(1*H*-indol-1-yl)pentanamide ใน Methanol-*d*₄



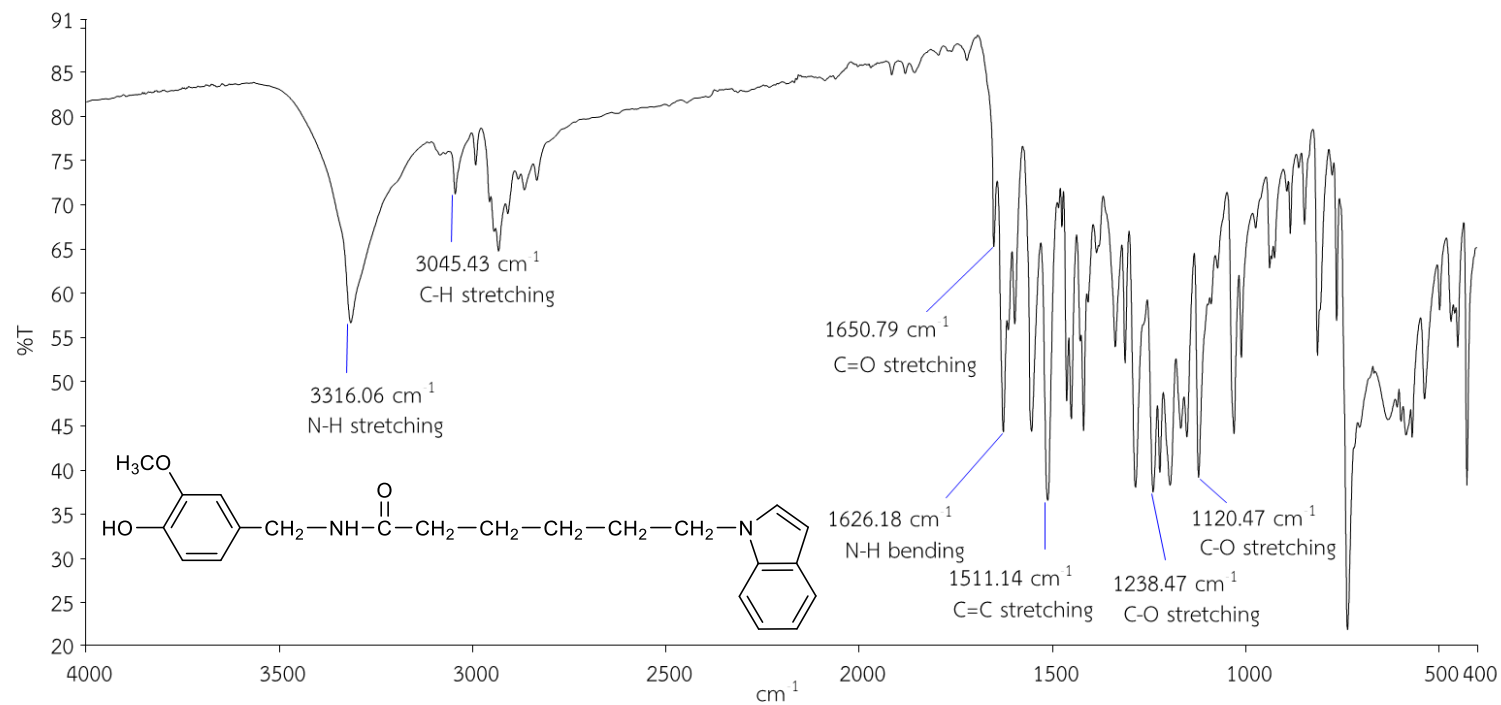
ภาพ 1.2.66 FT-IR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(1*H*-indol-1-yl) pentanamide



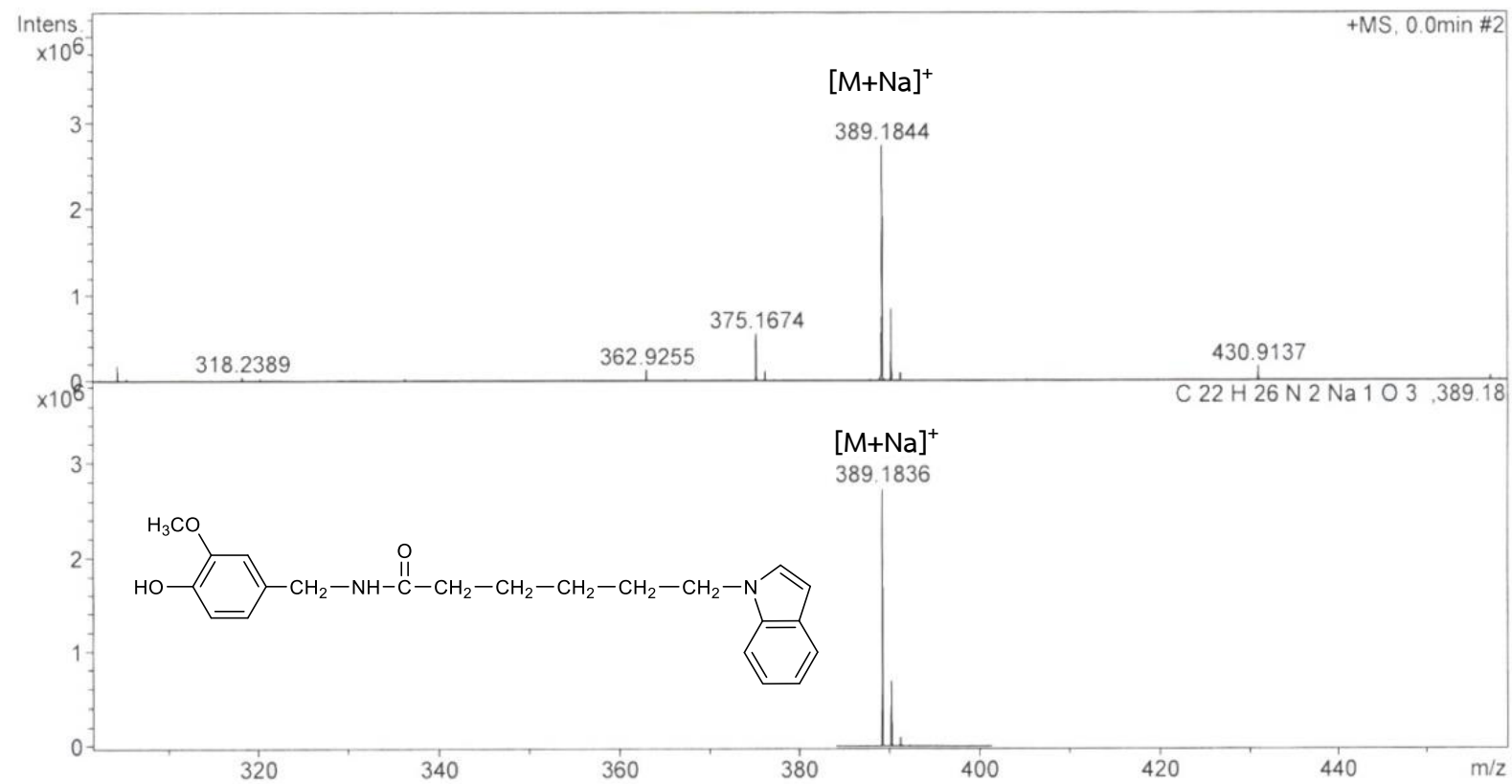
ภาพ 1.2.67 Mass spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(1*H*-indol-1-yl) pentanamide



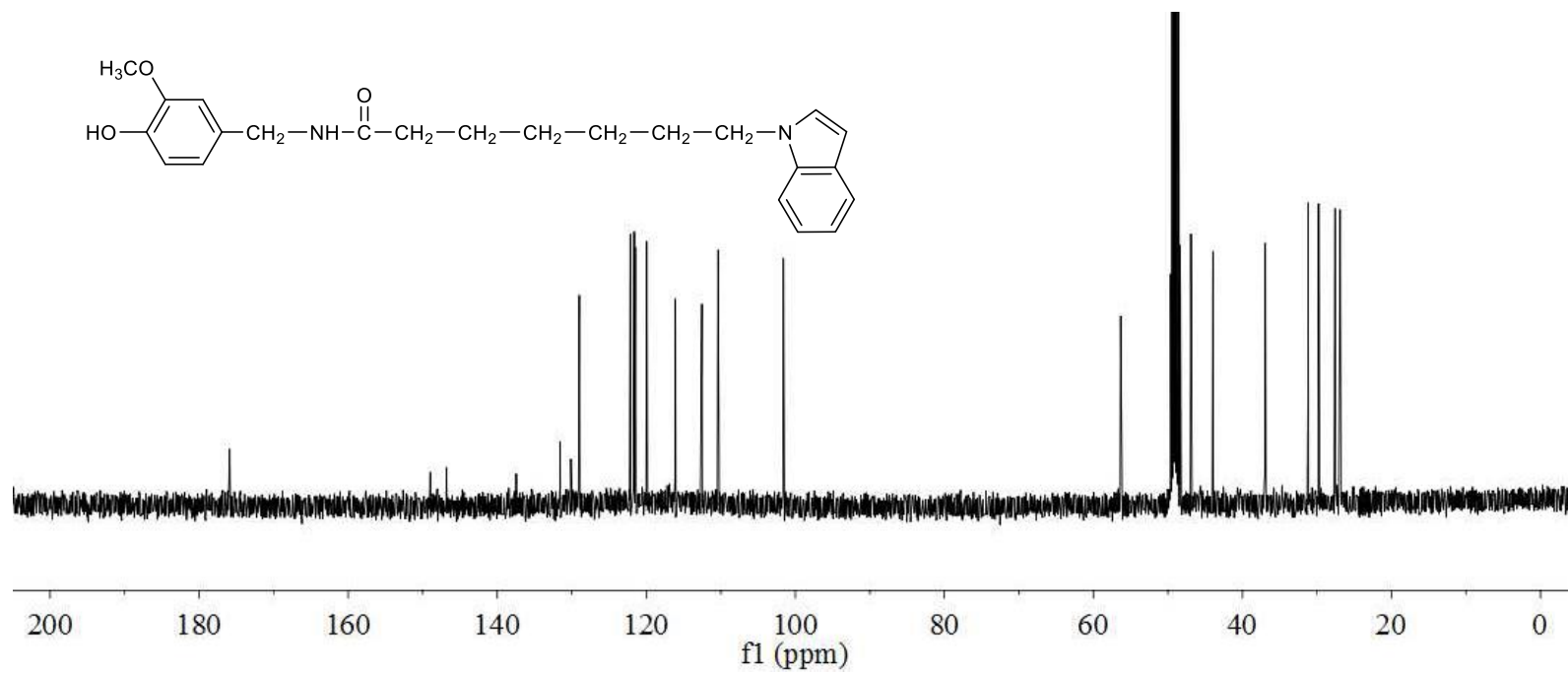
ภาพ 1.2.68 ¹³C-NMR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(1*H*-indol-1-yl)hexanamide ใน Methanol-*d*₄



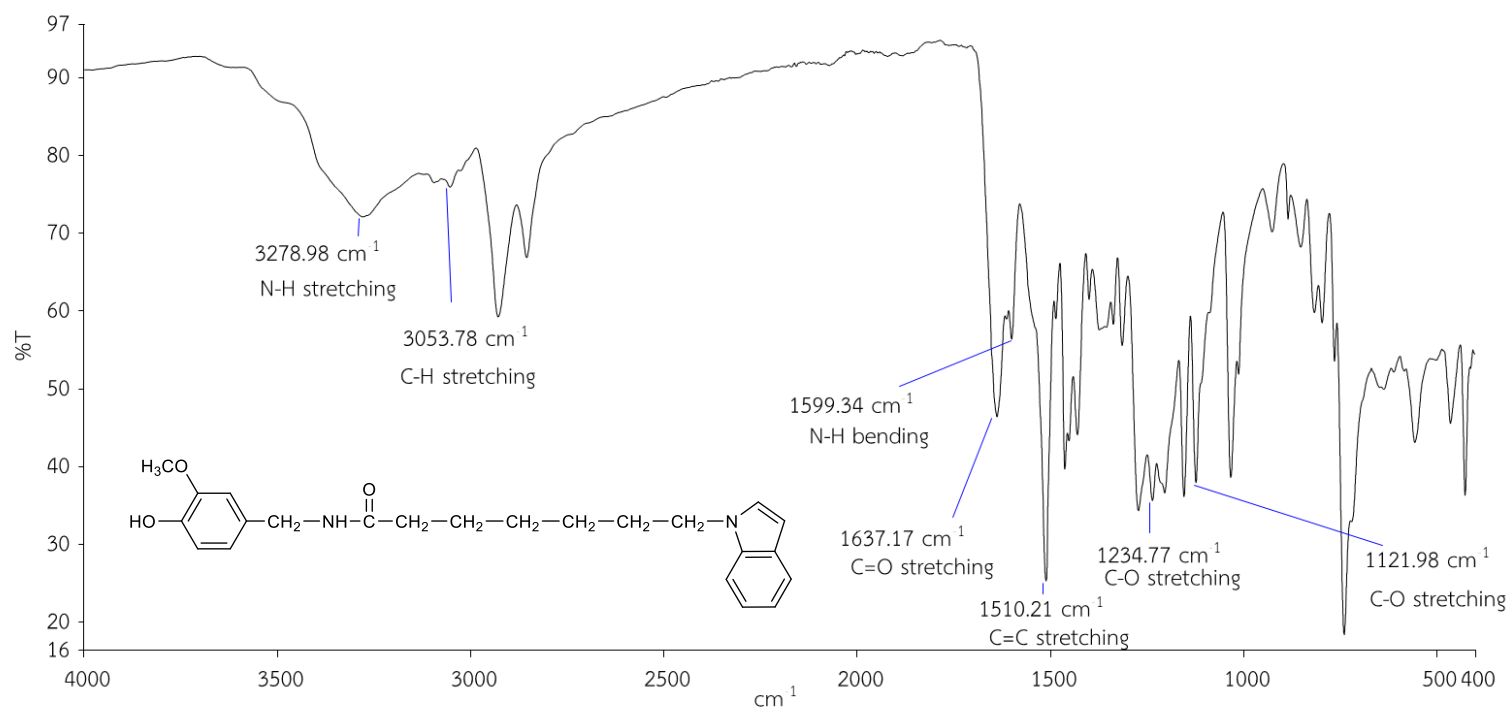
ภาพ 1.2.69 FT-IR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(1*H*-indol-1-yl)hexanamide



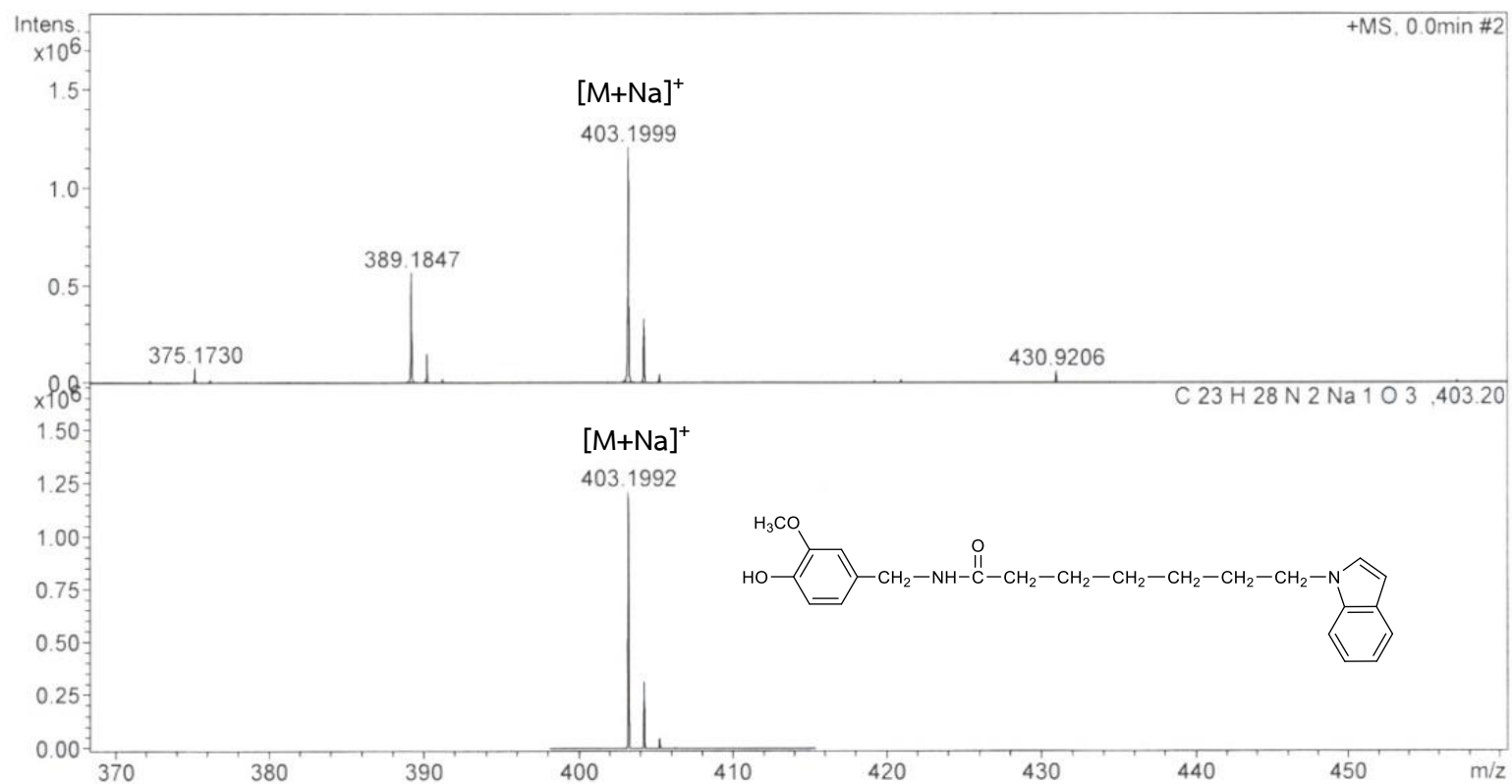
ภาพ 1.2.70 Mass spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(1*H*-indol-1-yl) hexanamide



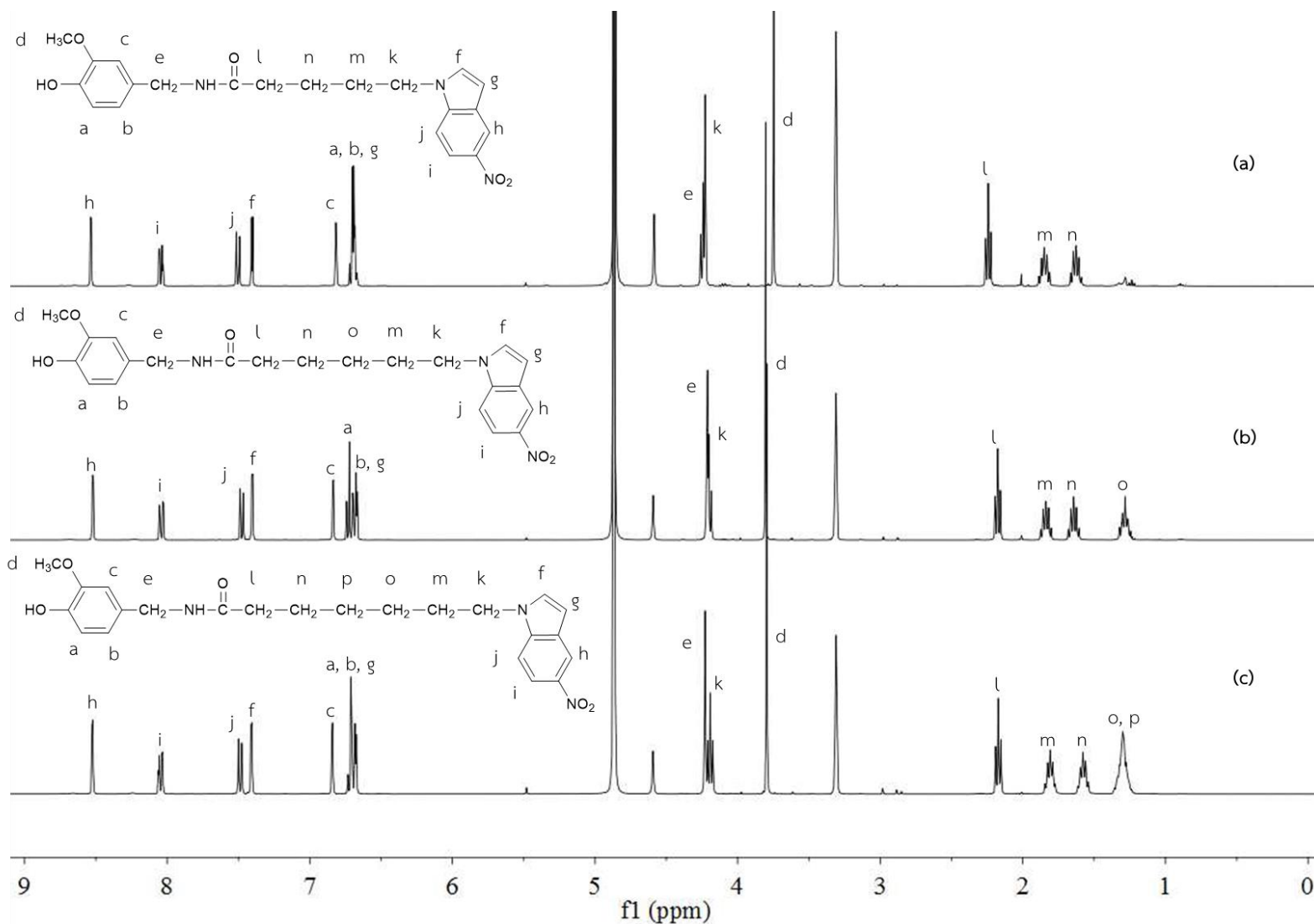
ภาพ 1.2.71 ¹³C-NMR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(1*H*-indol-1-yl)heptanamide ใน Methanol-*d*₄



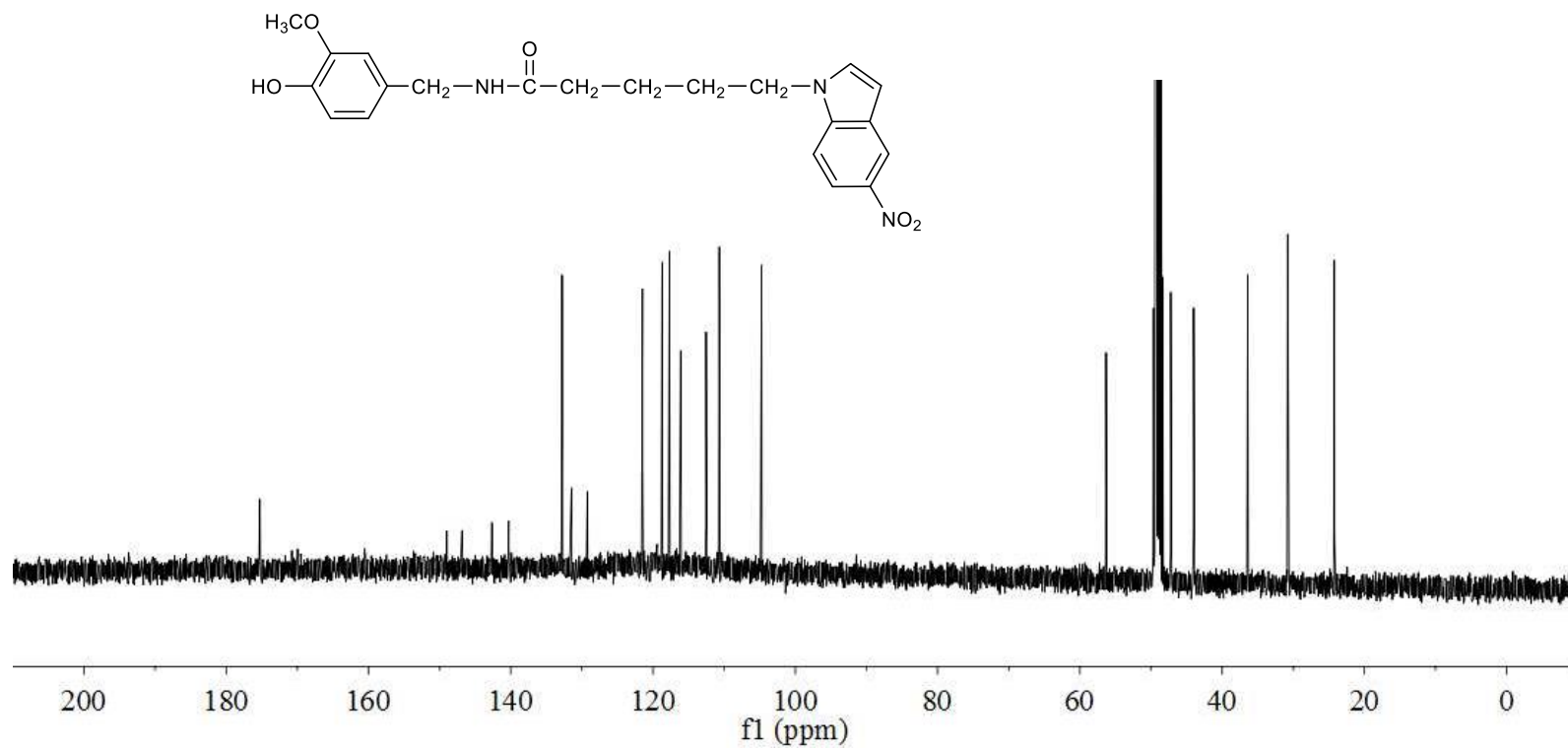
ภาพ 1.2.72 FT-IR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(1*H*-indol-1-yl) heptanamide



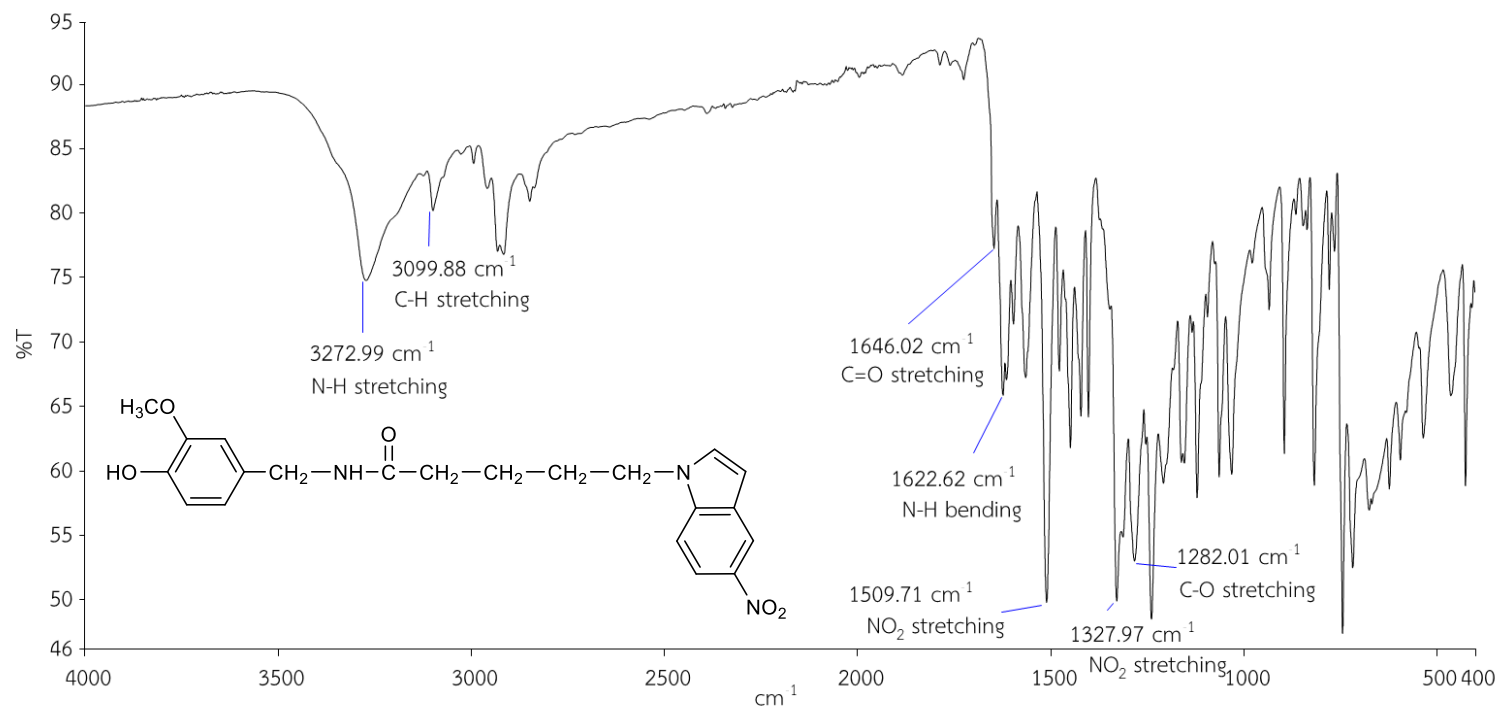
ภาพ 1.2.73 Mass spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(1*H*-indol-1-yl) heptanamide



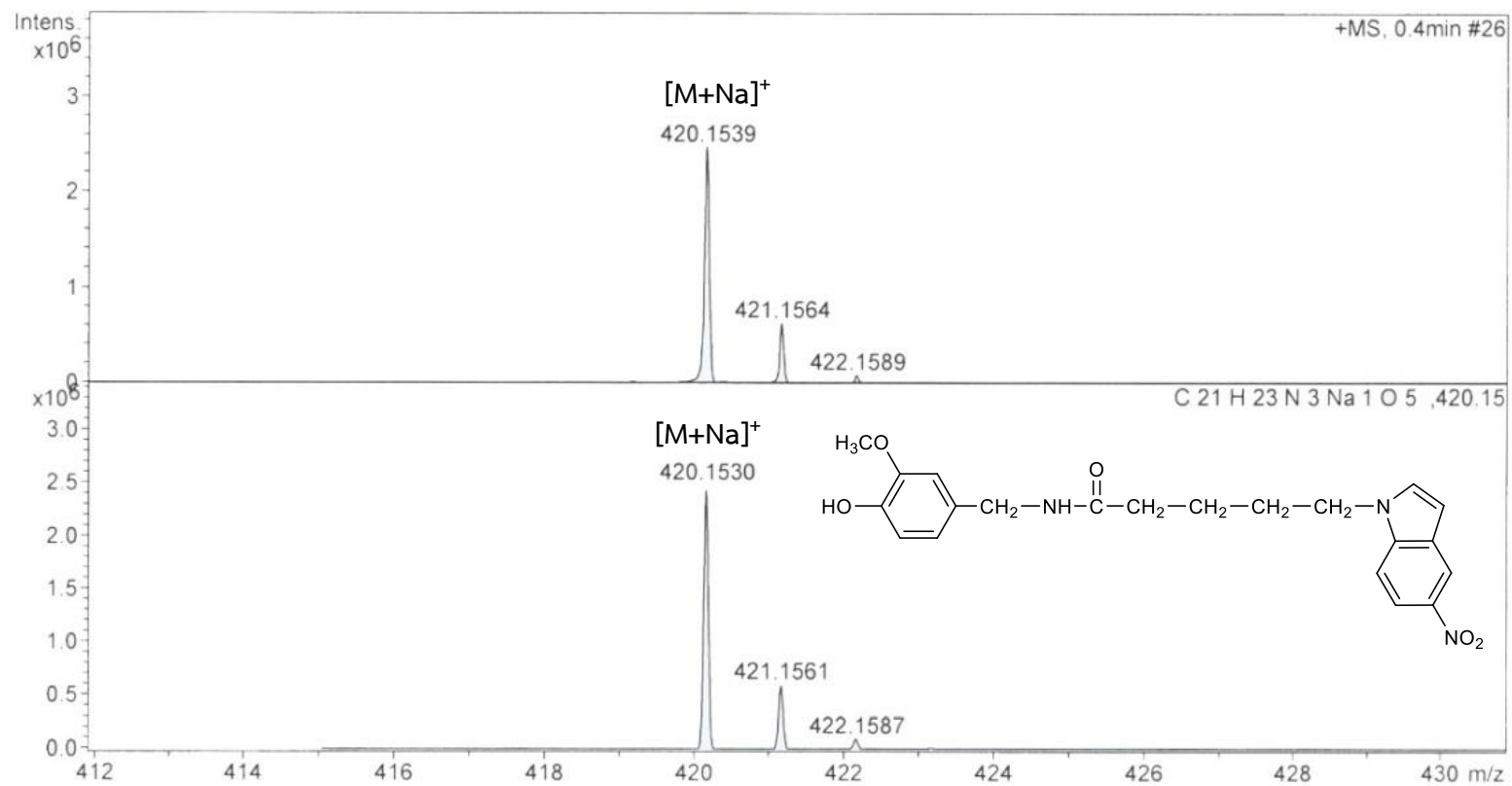
ภาพ 1.2.74 ^1H -NMR spectra ของ (a) = *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(5-nitro-1H-indol-1-yl)pentanamide, (b) = *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(5-nitro-1H-indol-1-yl)hexanamide และ (c) = *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(5-nitro-1H-indol-1-yl)heptanamide ใน $\text{Acetone-}d_6$



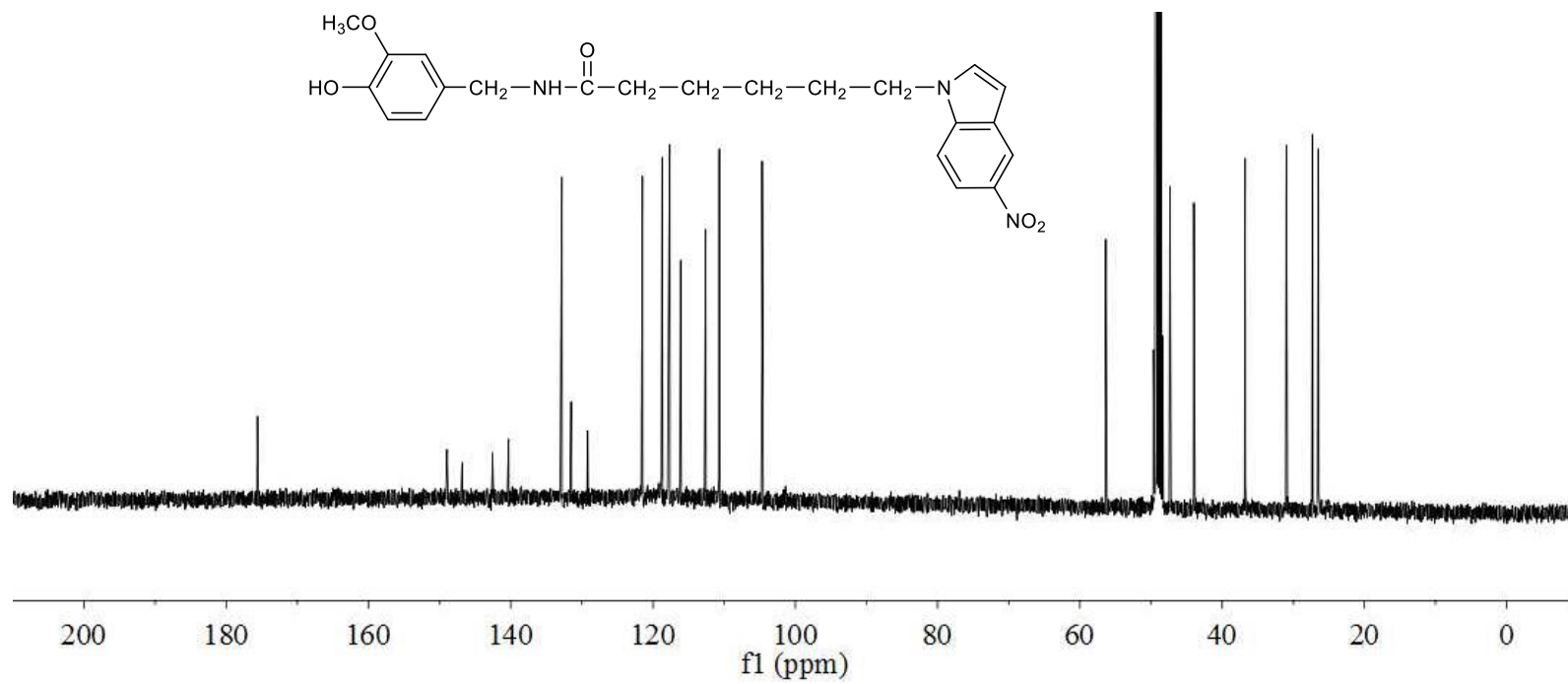
ภาพ 1.2.75 ¹³C-NMR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl) pentanamide ใน Acetone-*d*₆



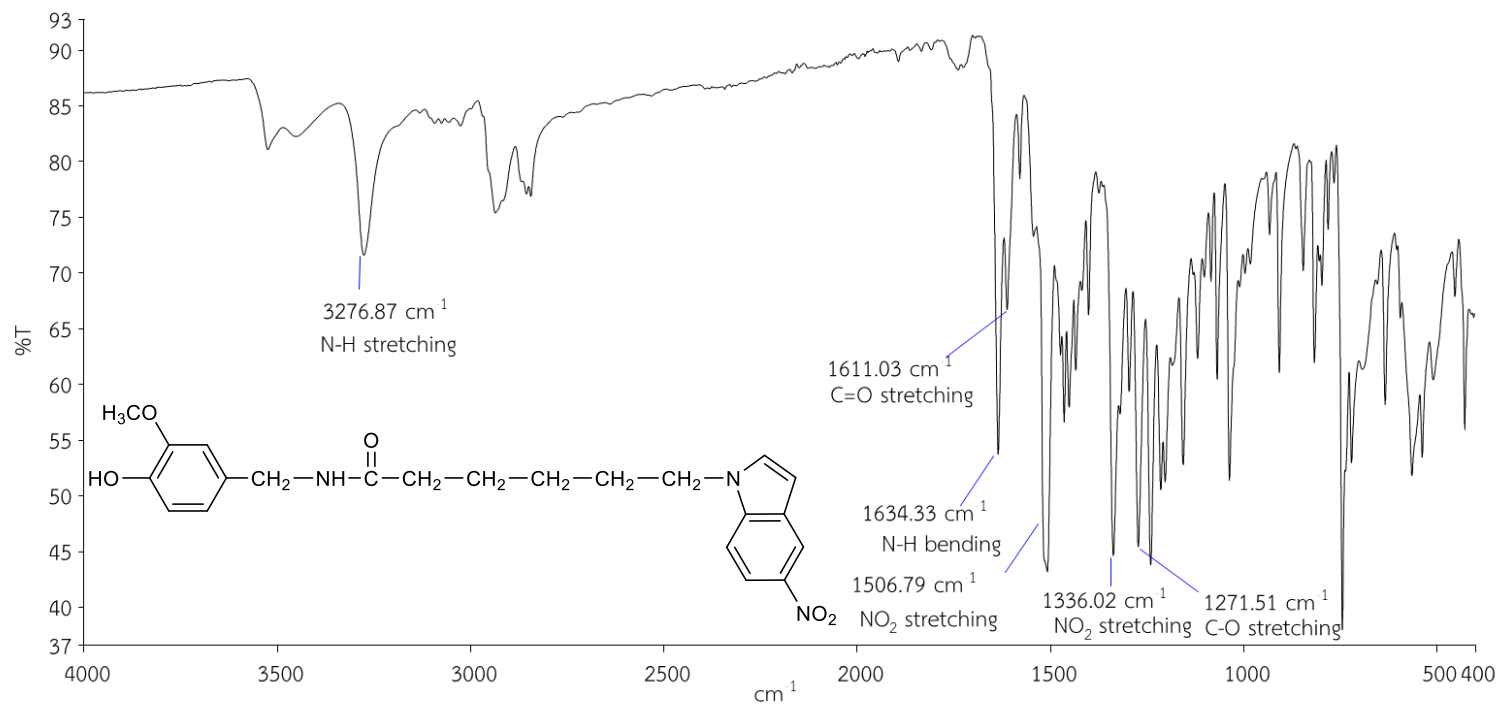
ภาพ 1.2.76 FT-IR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(5-nitro-1*H*-indol -1-yl)pentanamide



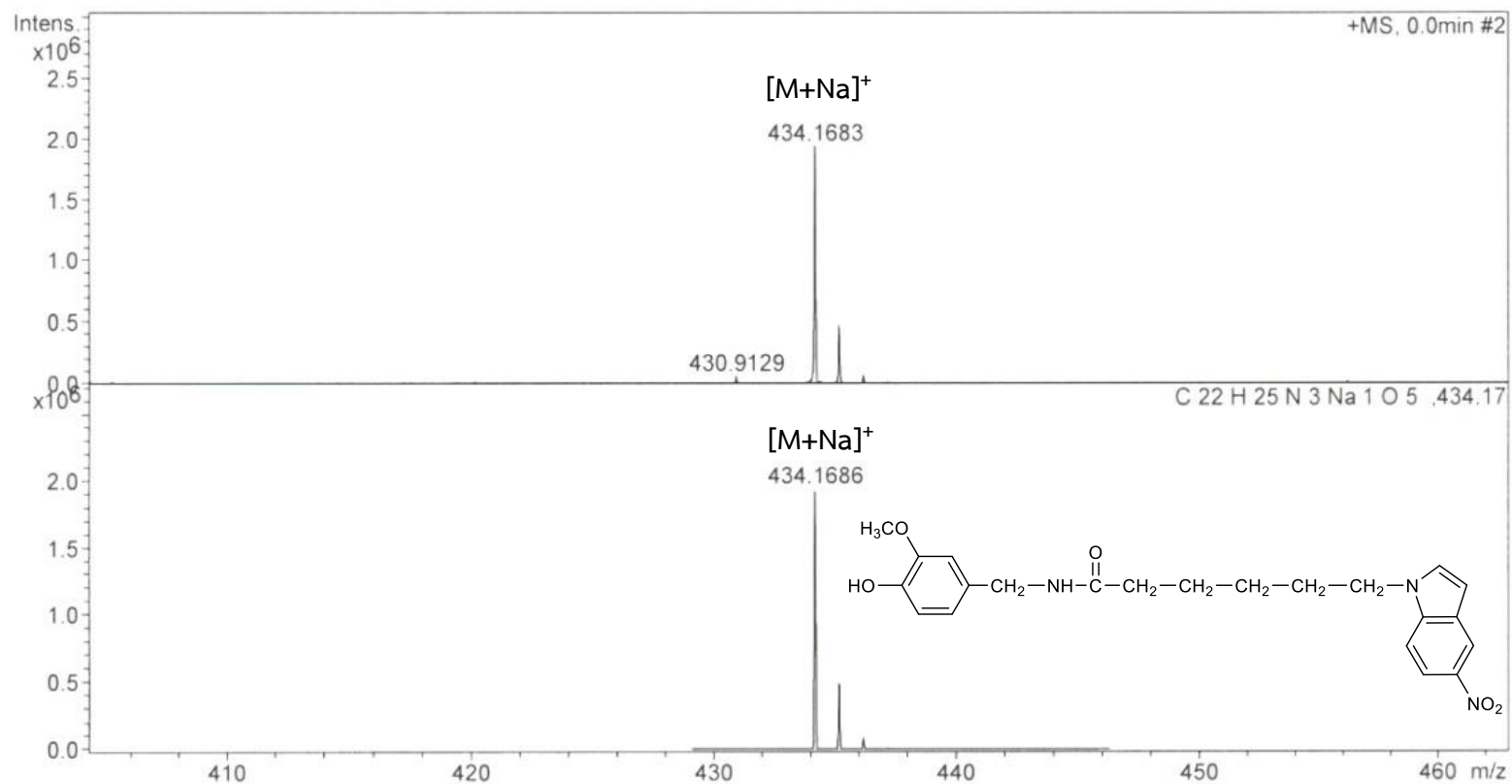
ภาพ 1.2.77 Mass spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-5-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)pentanamide



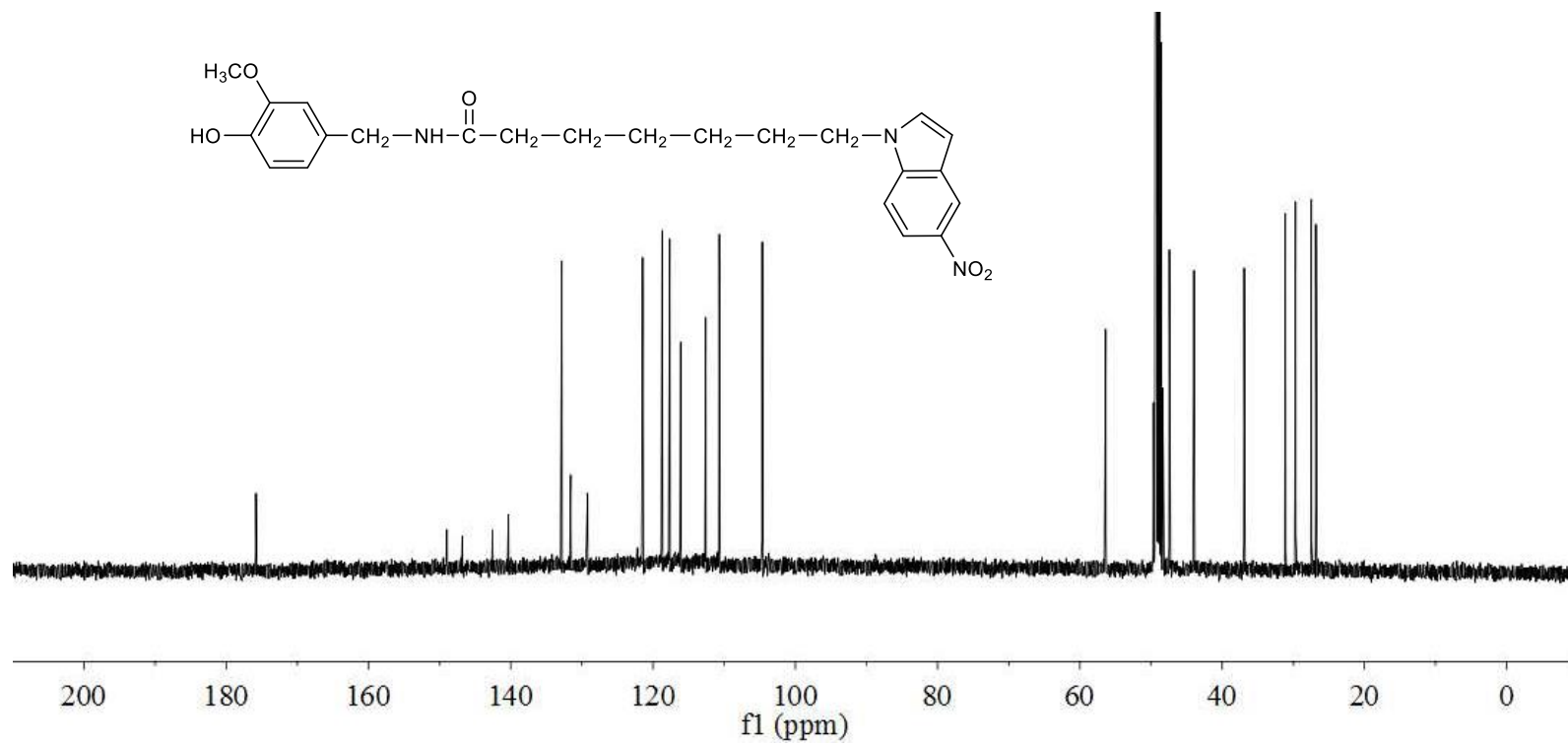
ภาพ 1.2.78 ¹³C-NMR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl) hexanamide ใน Acetone-*d*₆



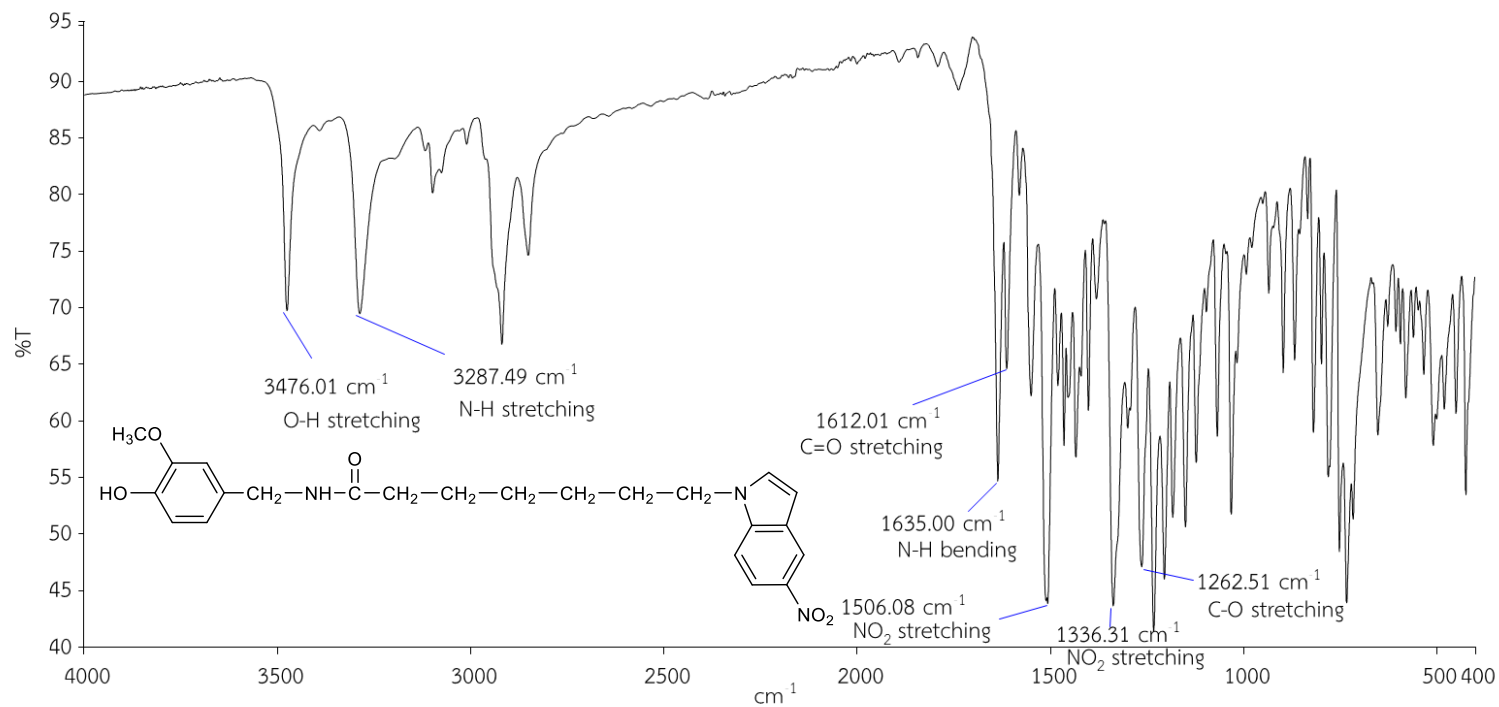
ภาพ 1.2.79 FT-IR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)hexanamide



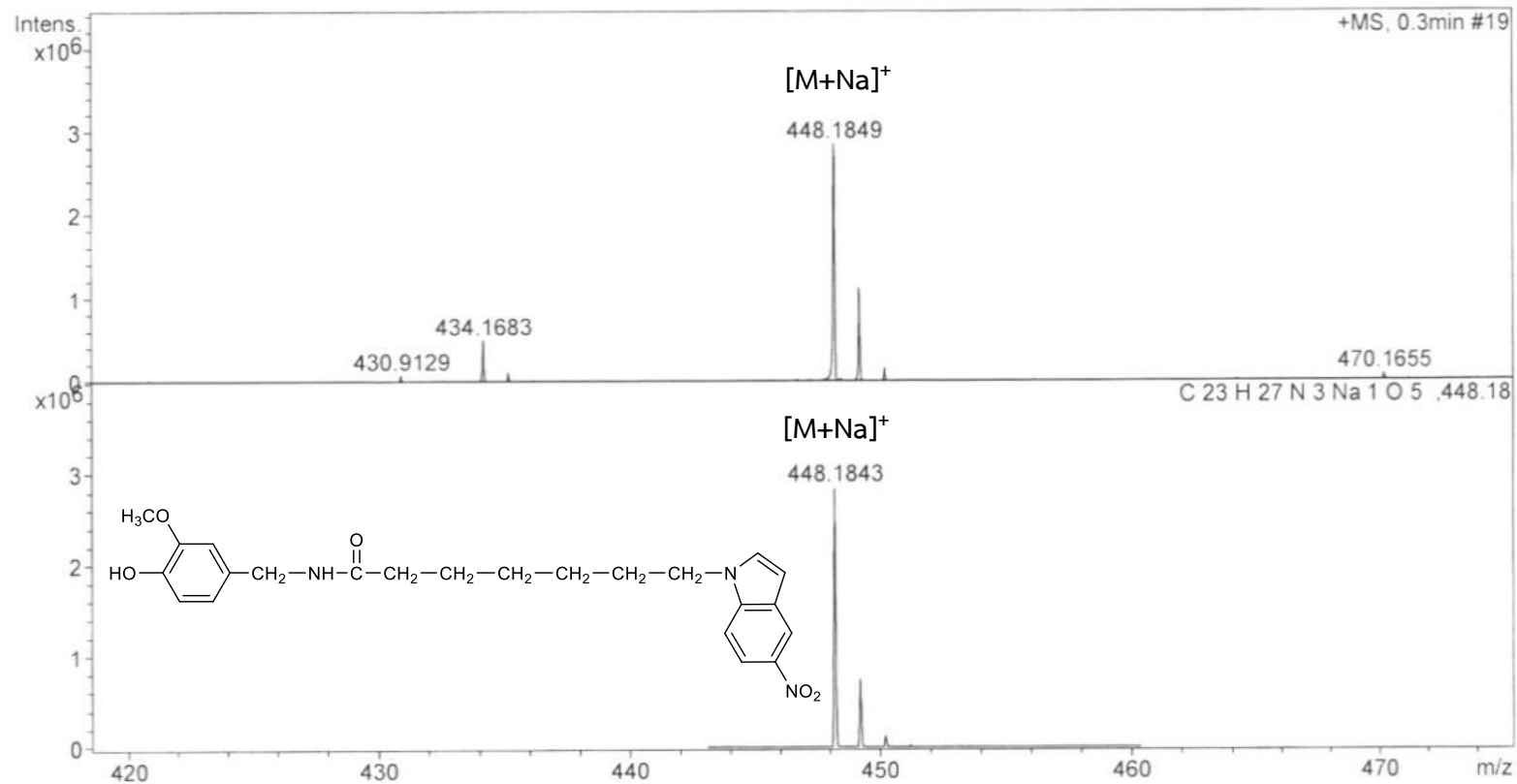
ภาพ 1.2.80 Mass spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-6-(5-nitro-1*H*-indol -1-yl)hexanamide



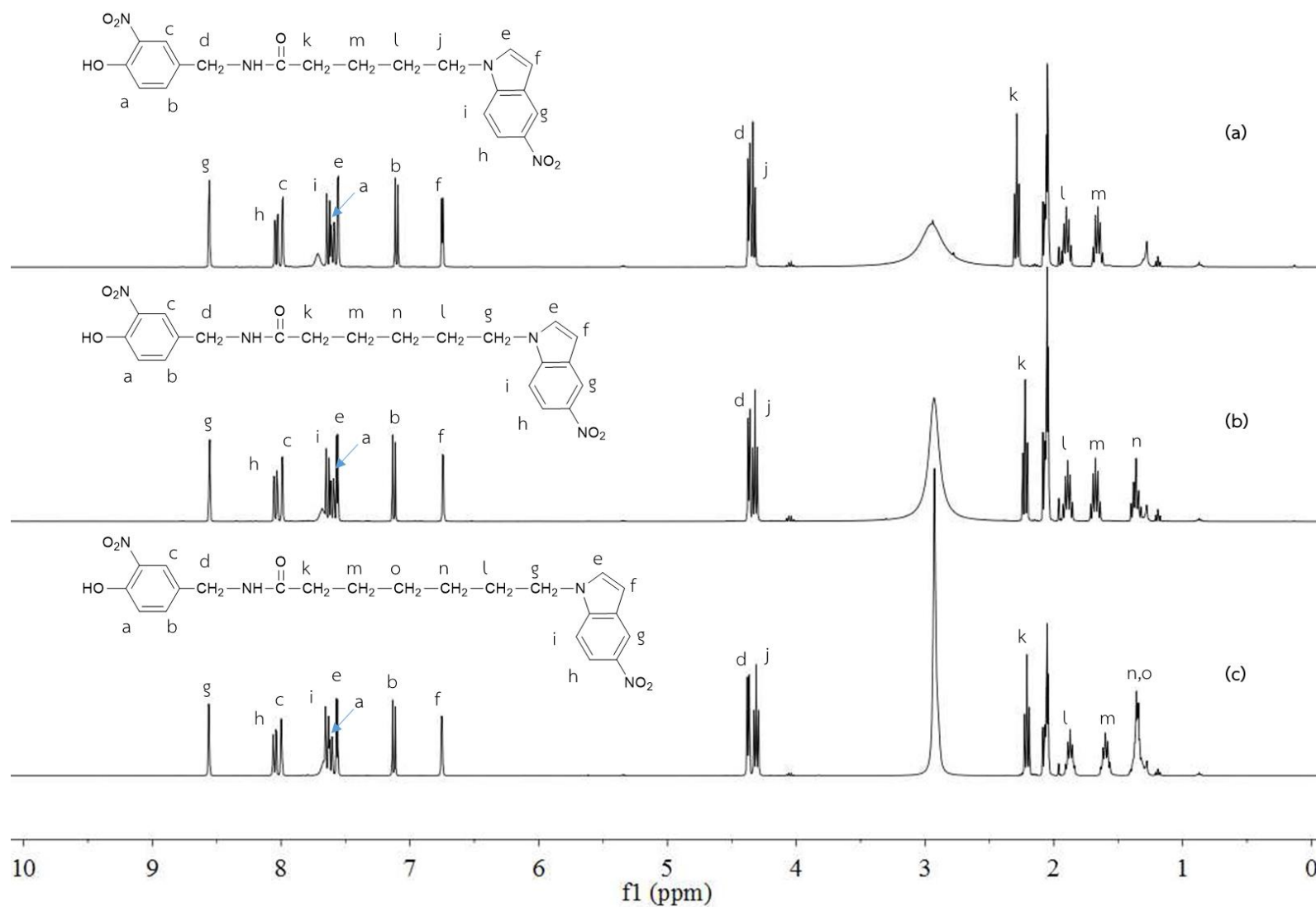
ภาพ 1.2.81 ¹³C-NMR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl) heptanamide ใน Acetone-*d*₆



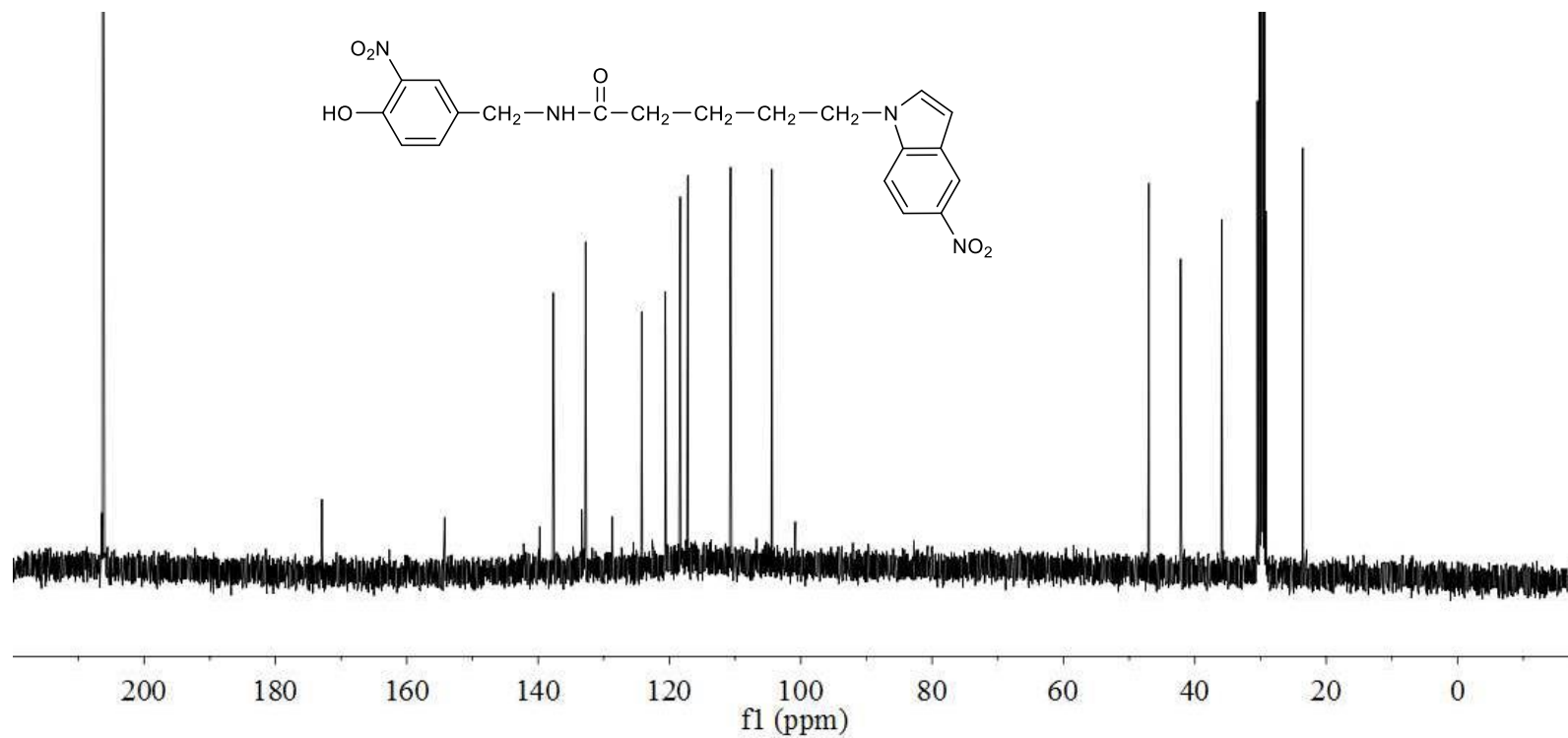
ภาพ 1.2.82 FT-IR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(5-nitro-1*H*-indol -1-yl) heptanamide



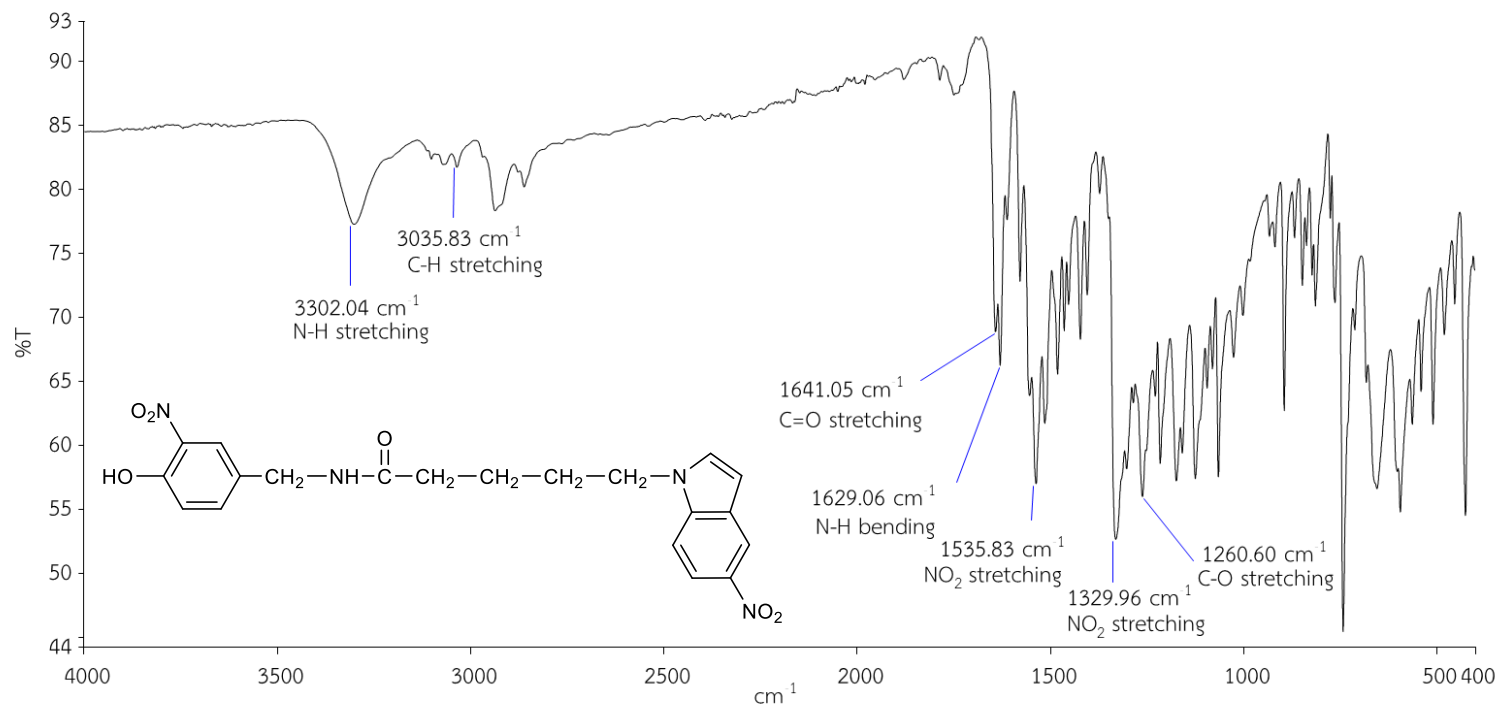
ภาพ 1.2.83 Mass spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)heptanamide



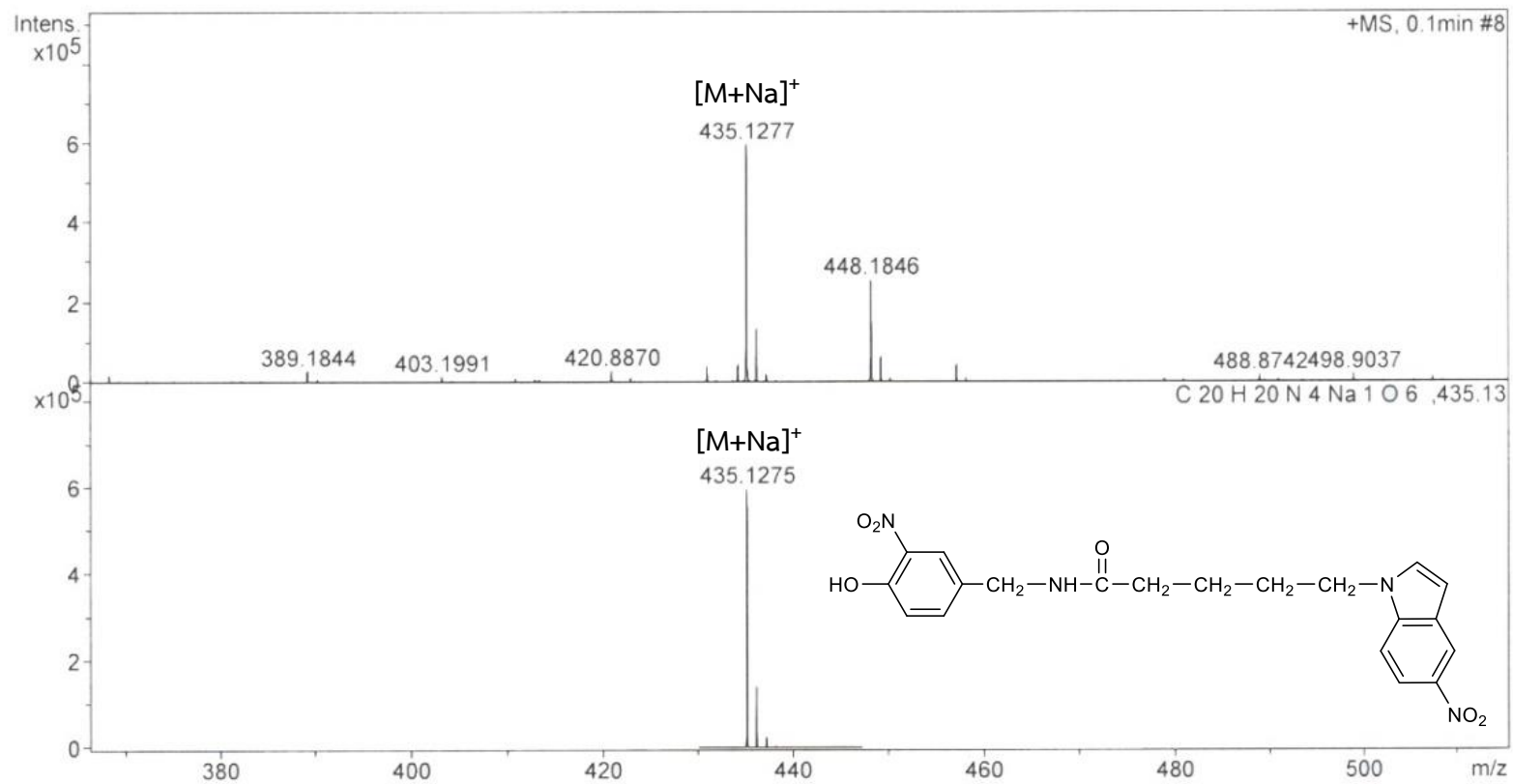
ภาพ 1.2.84 ^1H -NMR spectra ของ (a) = N -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-5-(5-nitro-1H-indol-1-yl)pentanamide (b) = N -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-6-(5-nitro-1H-indol-1-yl)hexanamide และ (c) = N -(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-7-(5-nitro-1H-indol-1-yl)heptanamide ใน $\text{Acetone-}d_6$



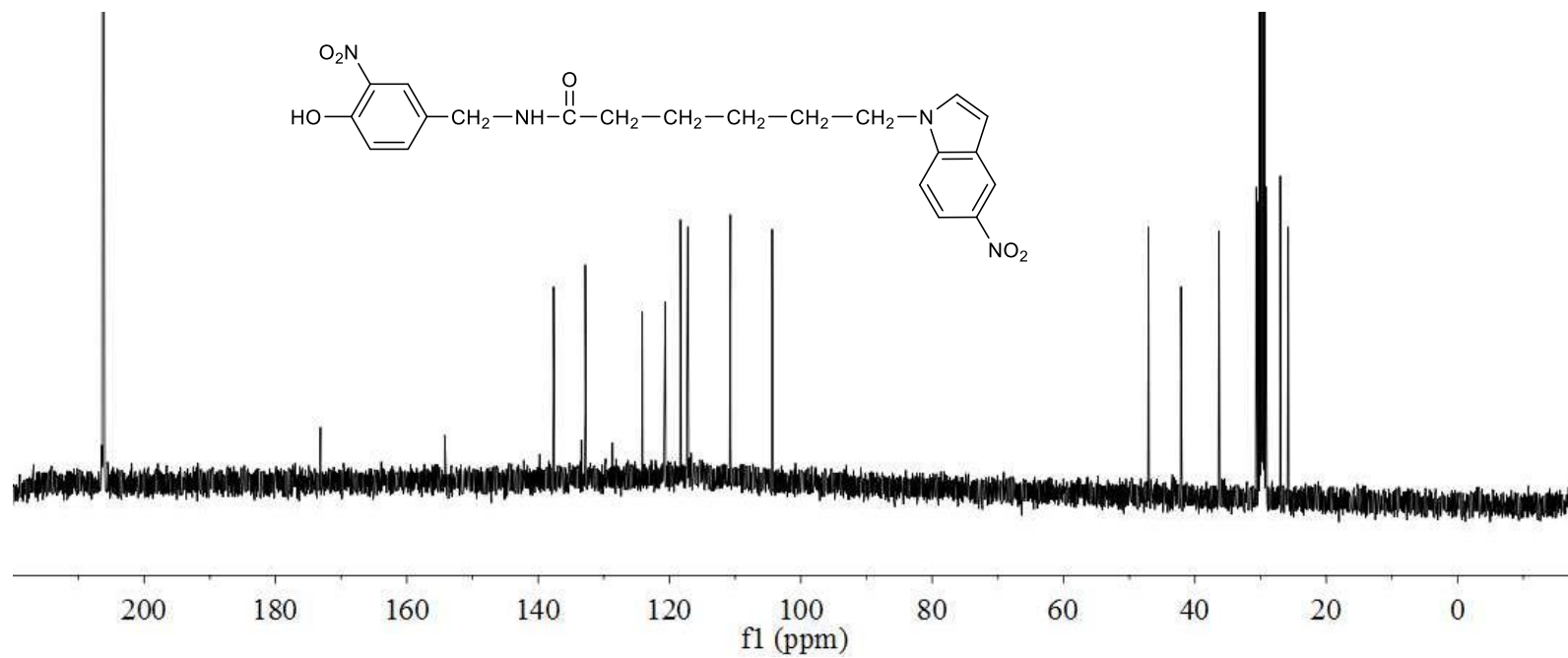
ภาพ 1.2.85 ^{13}C -NMR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-5-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)pentanamide ใน $\text{Acetone-}d_6$



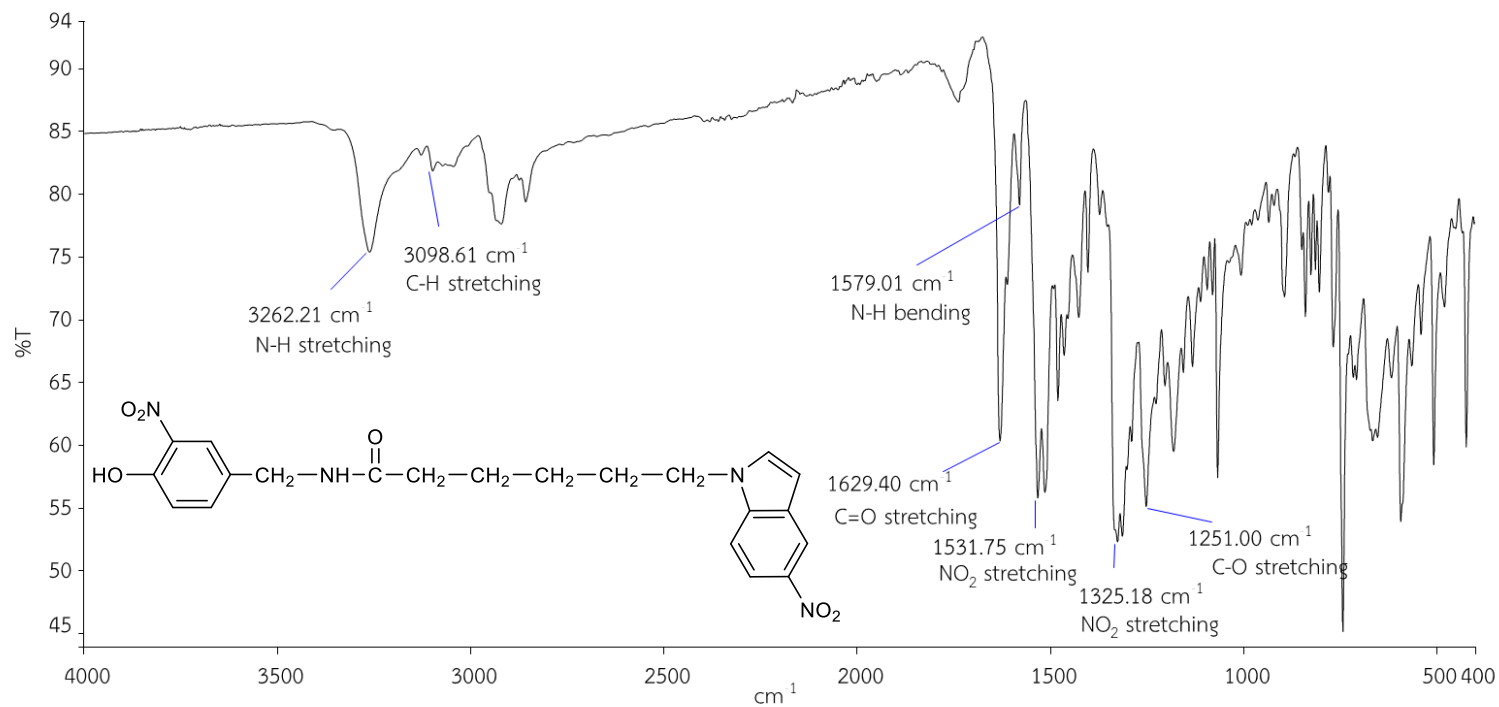
ภาพ 1.2.86 FT-IR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-5-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)pentanamide



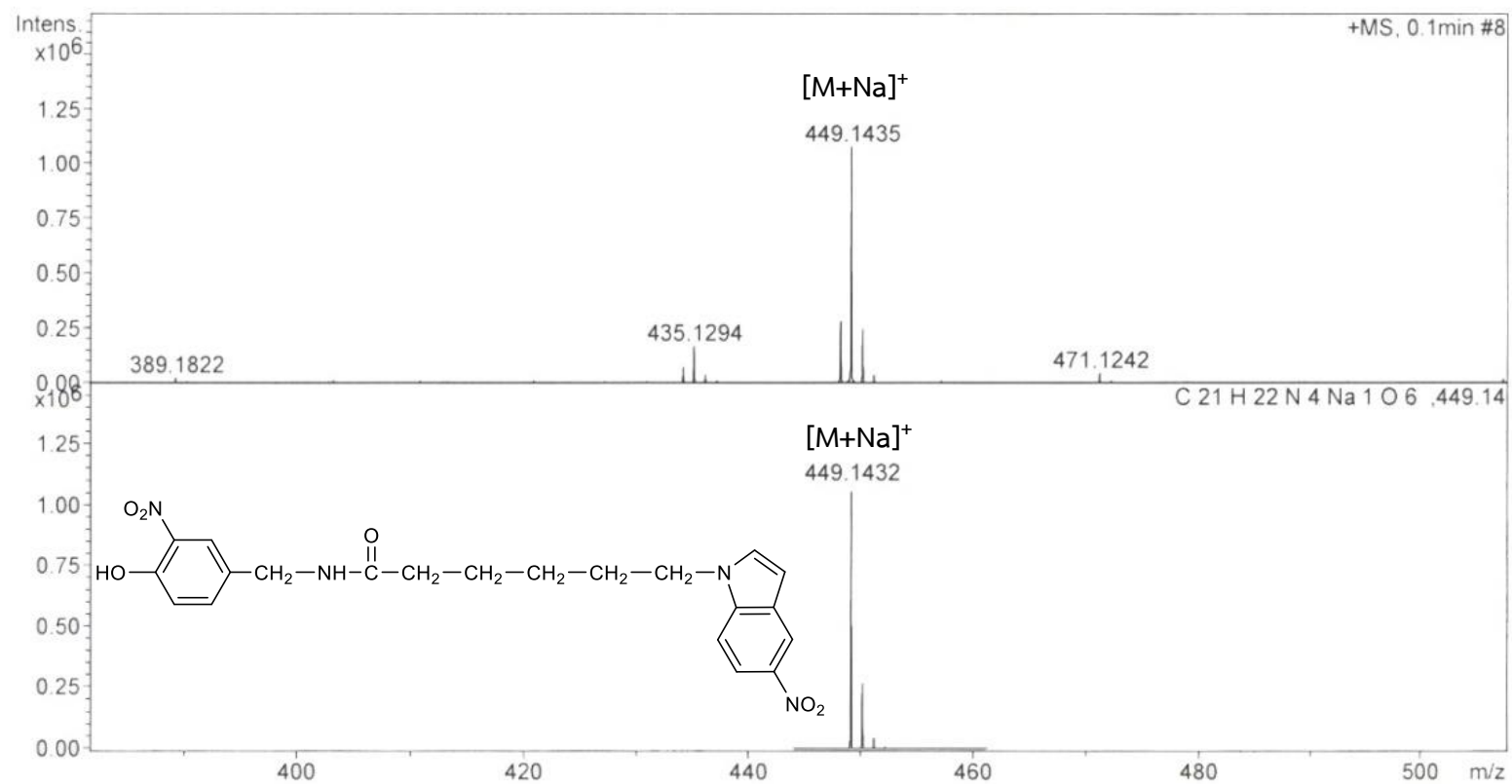
ภาพ 1.2.87 Mass spectrum ของ N-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-5-(5-nitro-1H-indol-1-yl)pentanamide



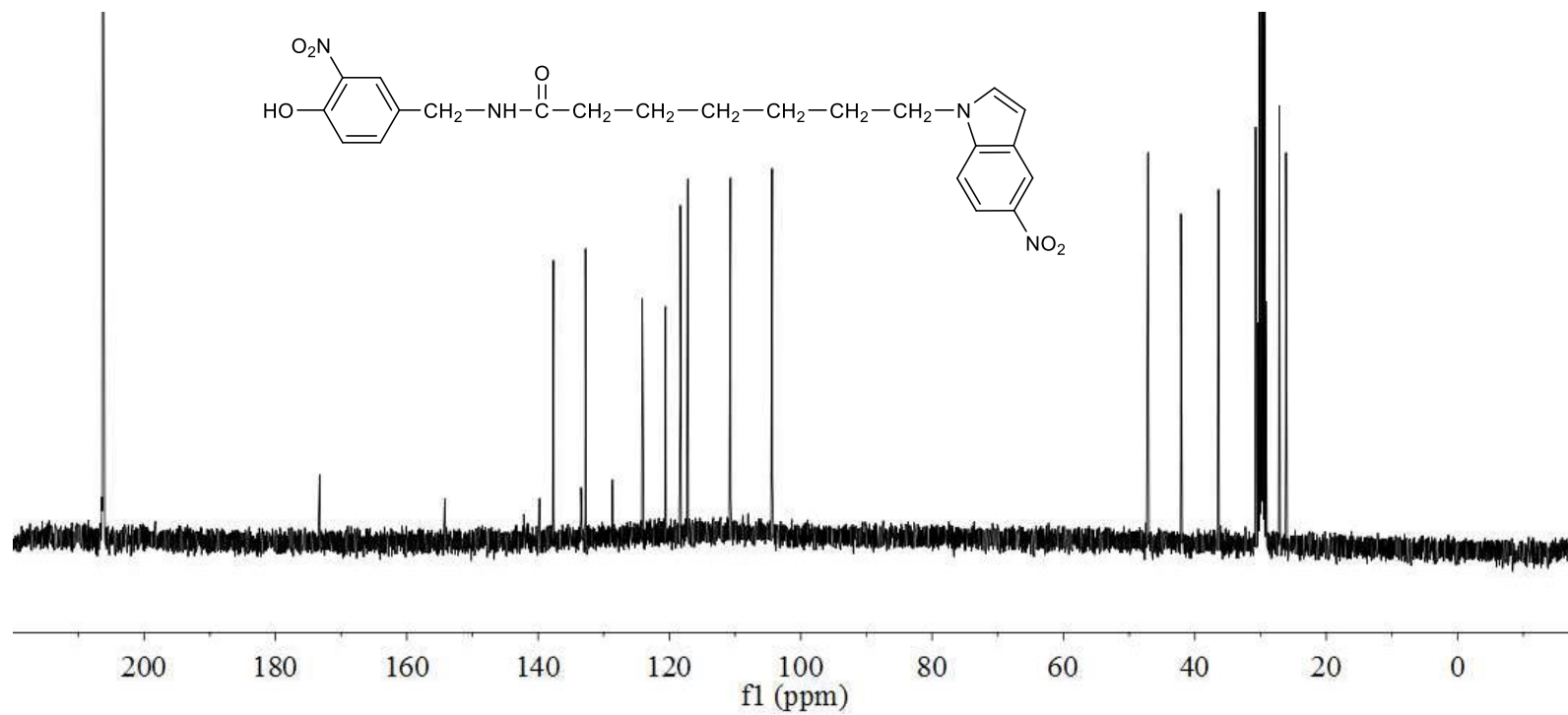
ภาพ 1.2.88 ¹³C-NMR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-6-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)hexanamide ใน Acetone-*d*₆



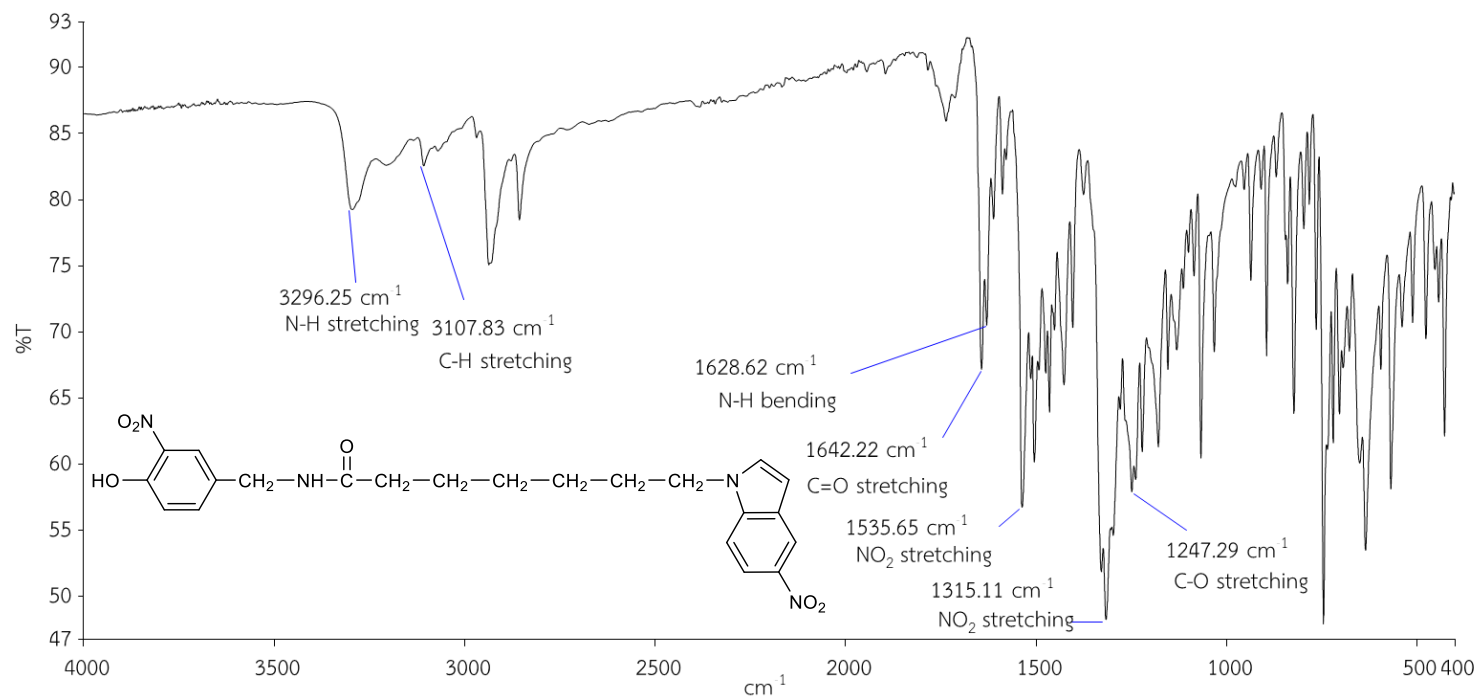
ภาพ 1.2.89 FT-IR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-6-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)hexanamide



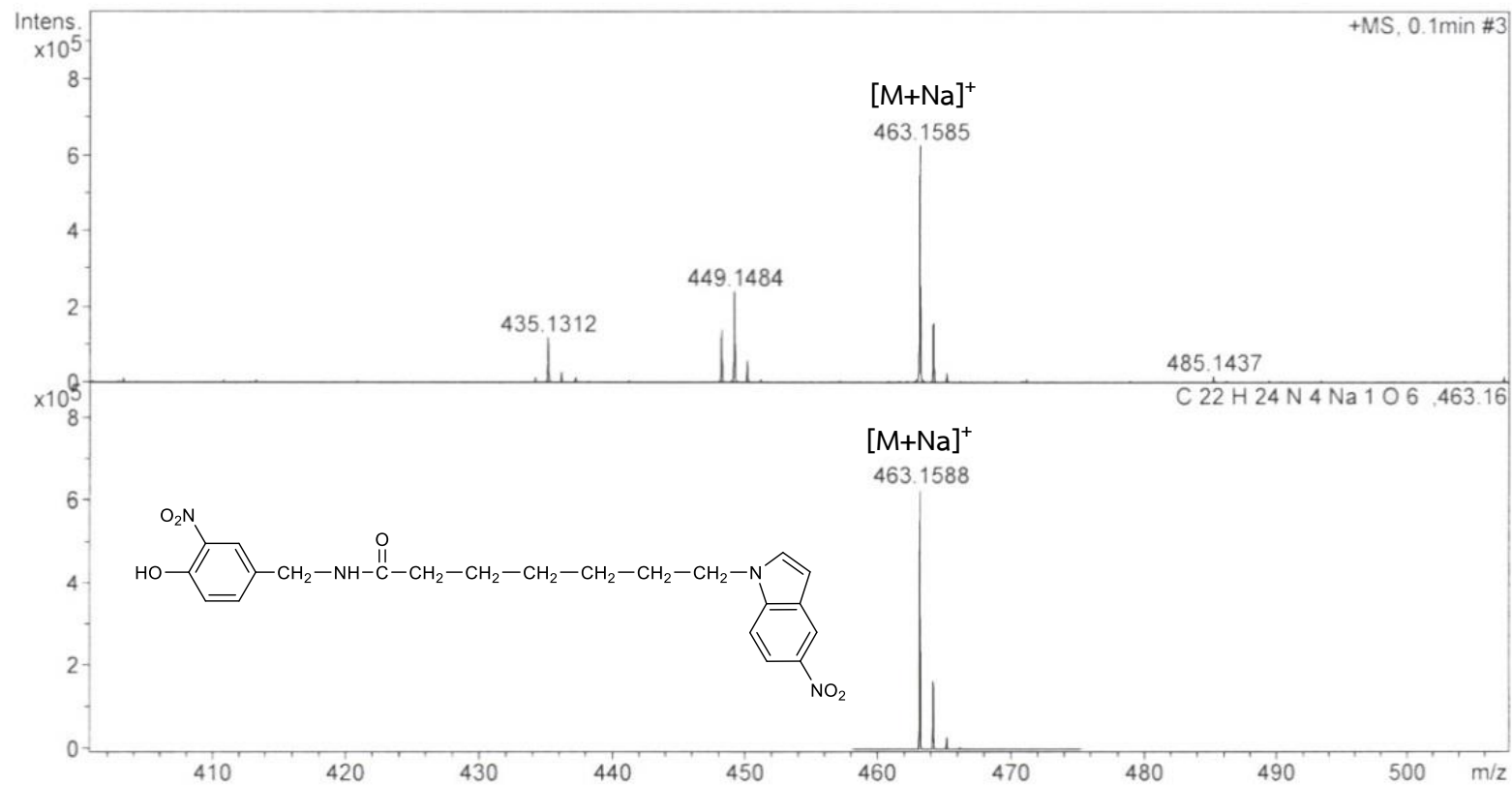
ภาพ 1.2.90 Mass spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-6-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)hexanamide



ภาพ 1.2.91 ^{13}C -NMR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-7-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)heptanamide ใน Acetone- d_6

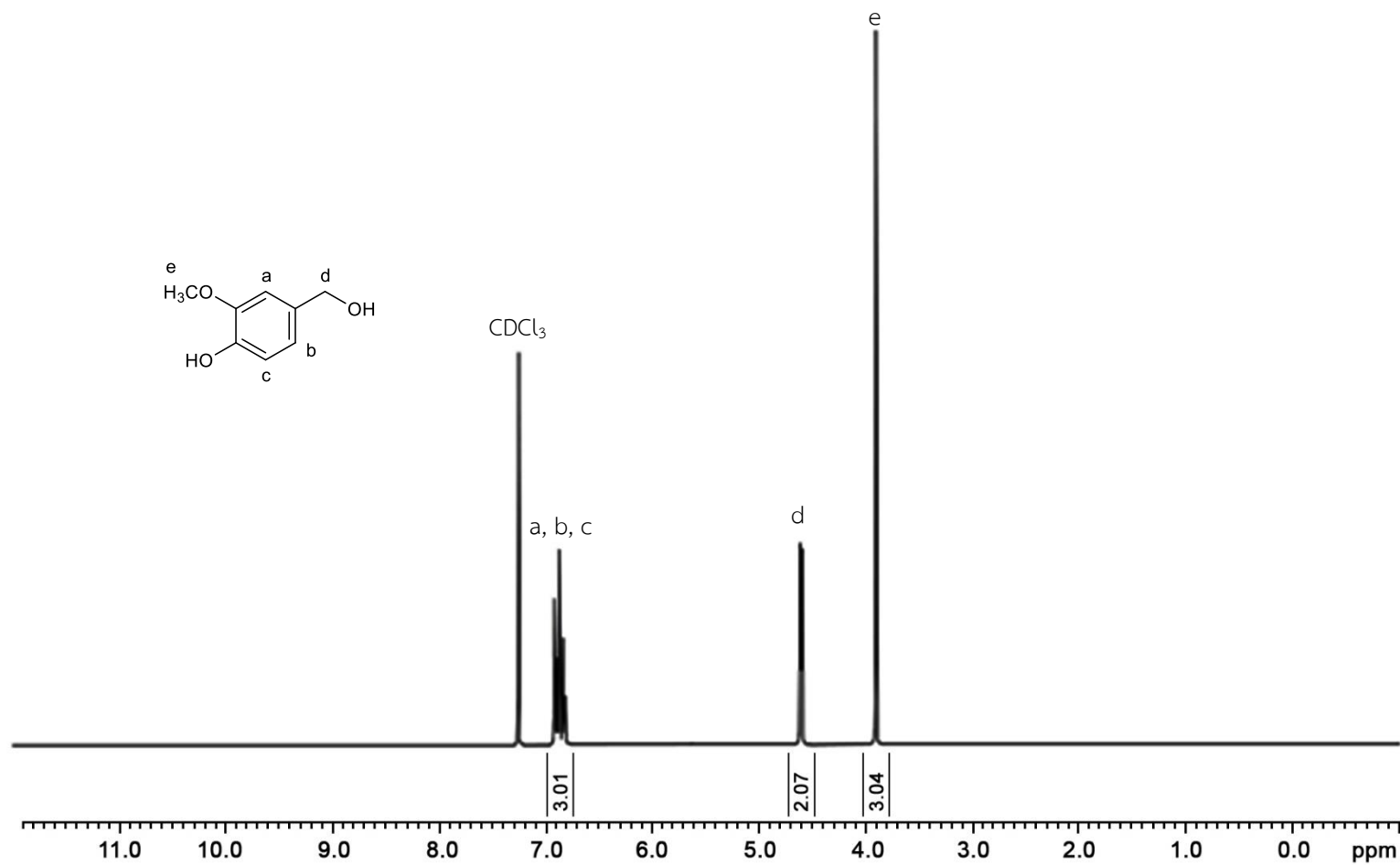


ภาพ 1.2.92 FT-IR spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-7-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)heptanamide

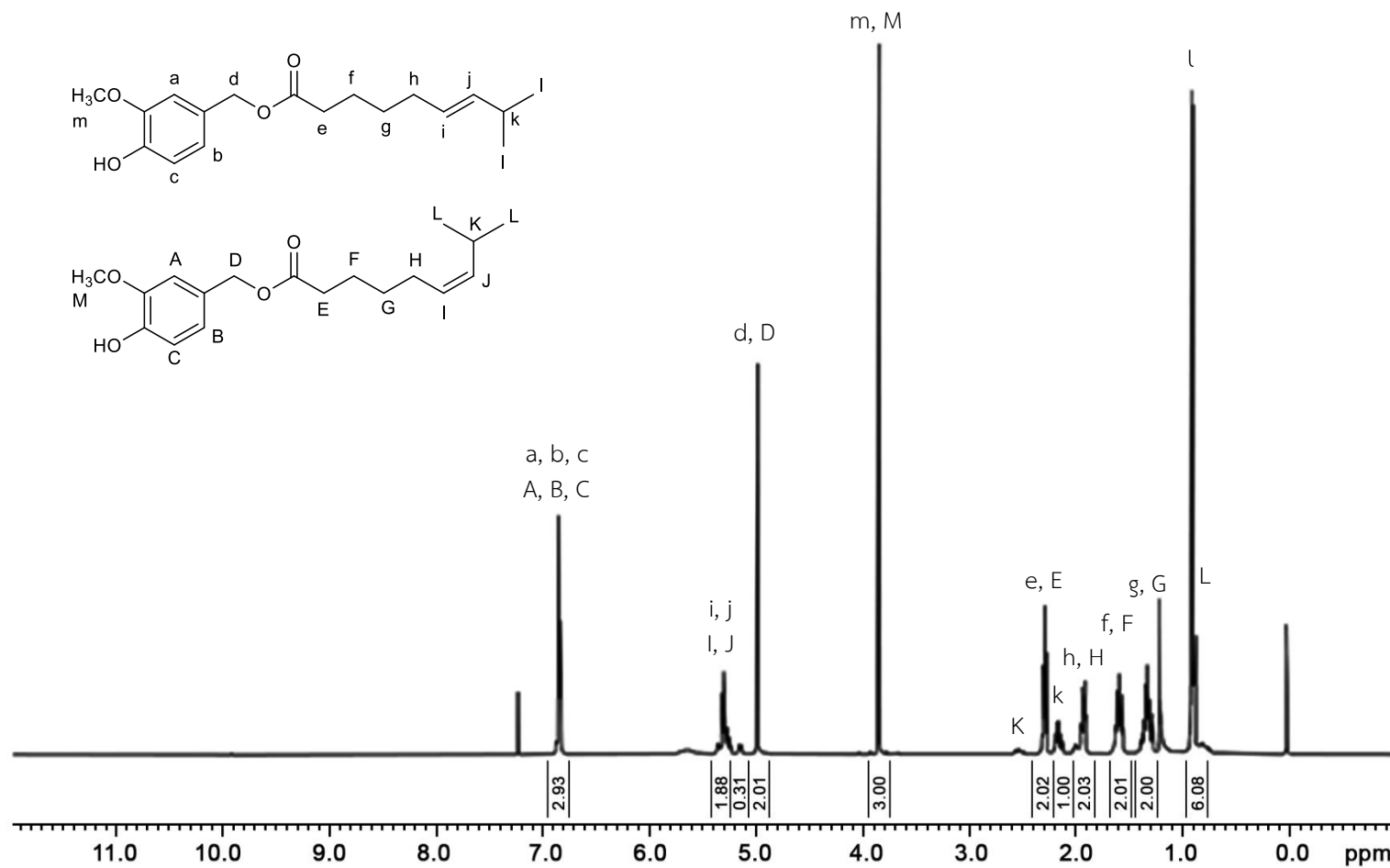


ภาพ 1.2.93 Mass spectrum ของ *N*-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-7-(5-nitro-1*H*-indol-1-yl)heptanamide

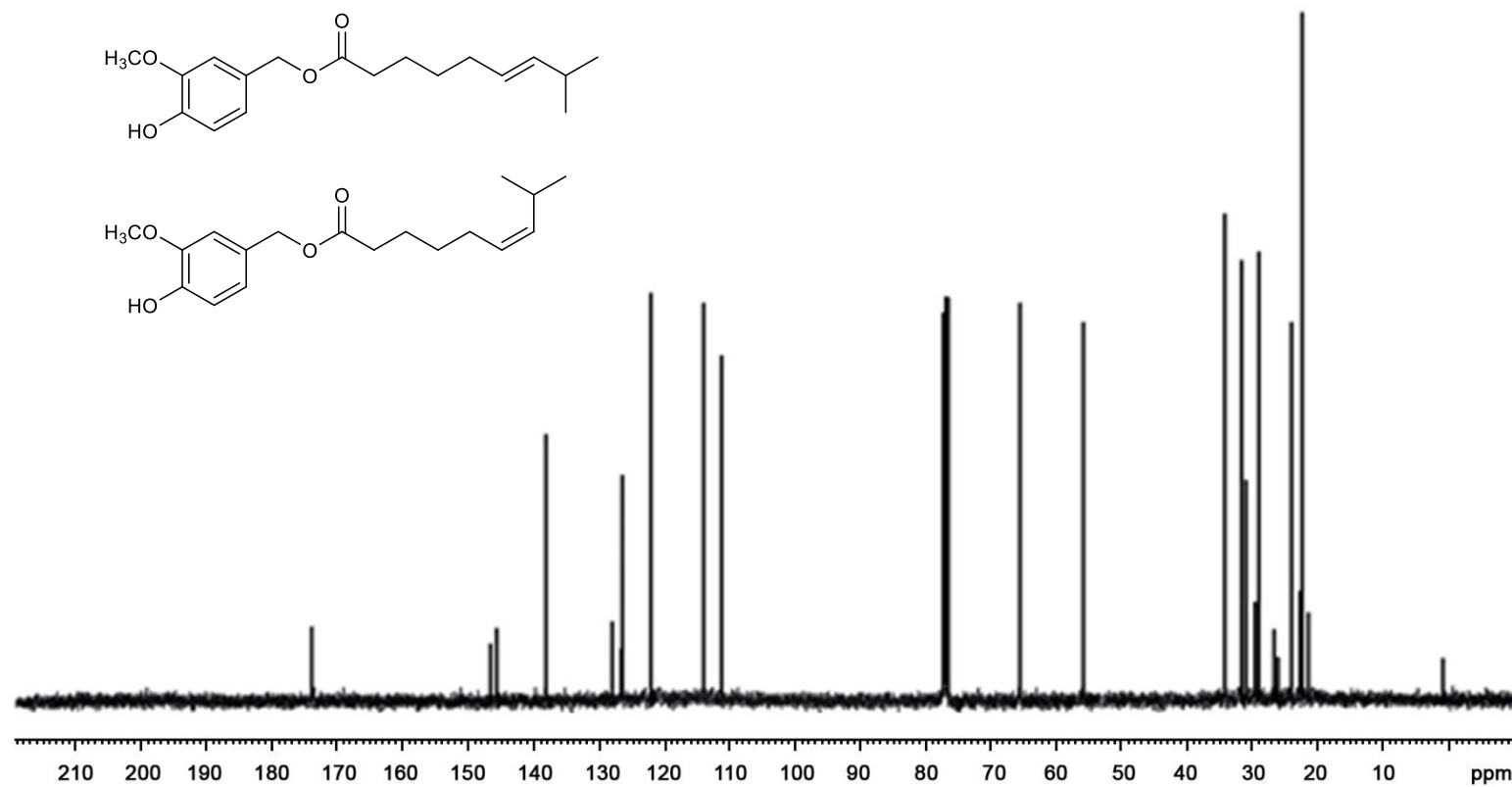
3) การพัฒนา capsinoids โดยปรับปรุงให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้นในส่วน fatty acid residue



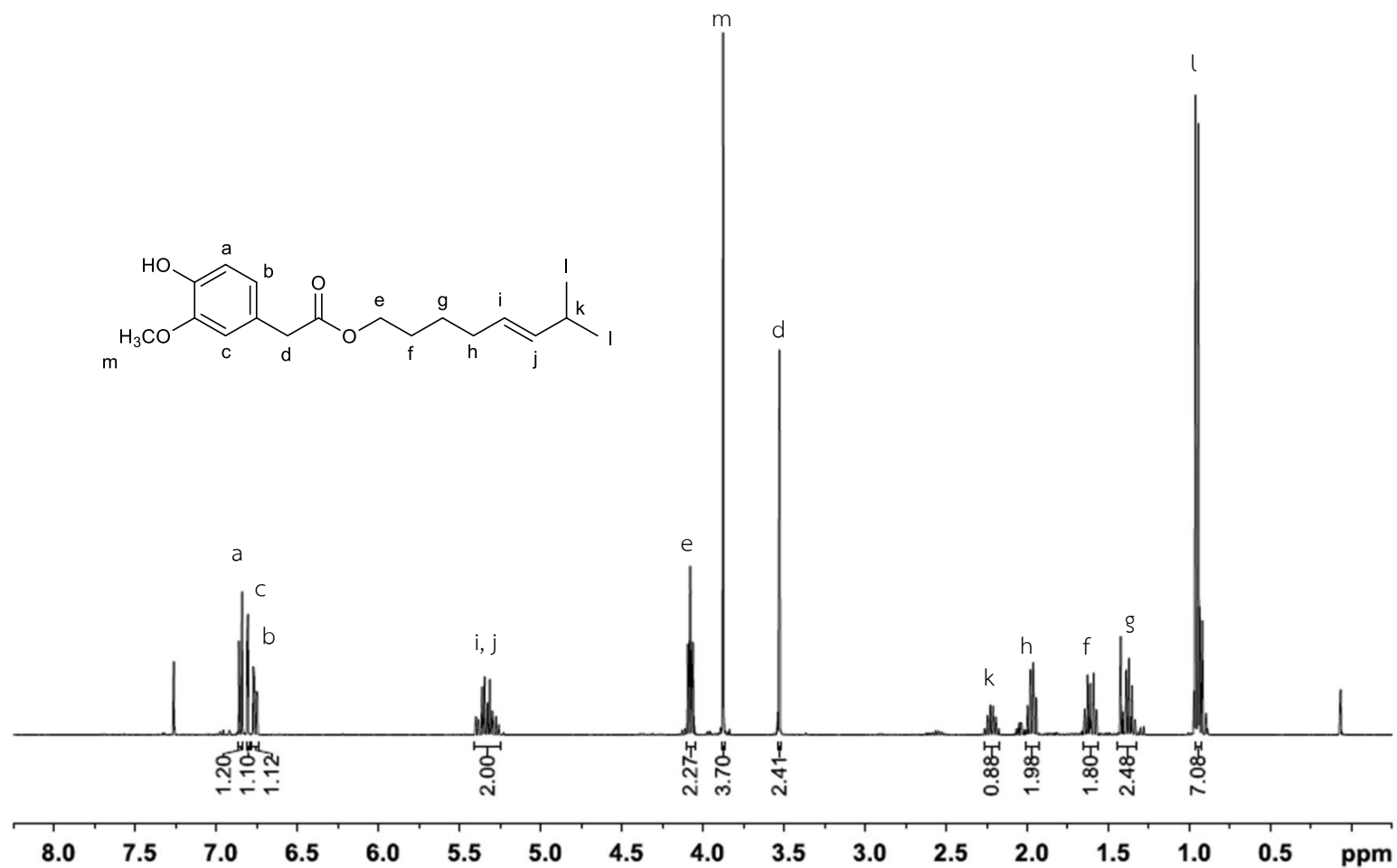
ภาพ 1.2.94 ^1H -NMR spectrum ของ 3-methoxy-4-hydroxybenzyl alcohol ใน $\text{chloroform-}d$



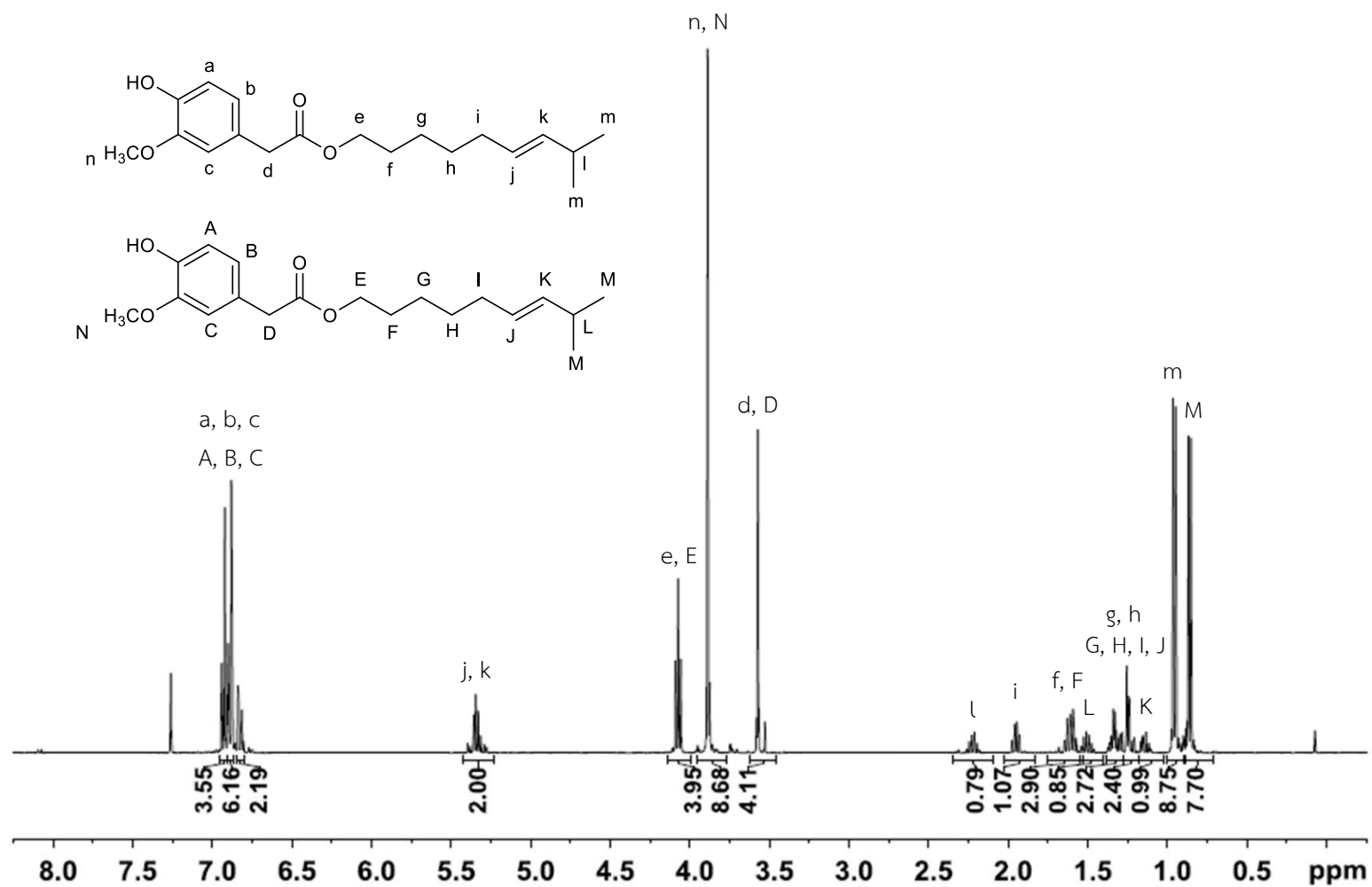
ภาพ 1.2.95 ^1H -NMR spectrum ของ *E/Z* capsiate ใน $\text{chloroform-}d$



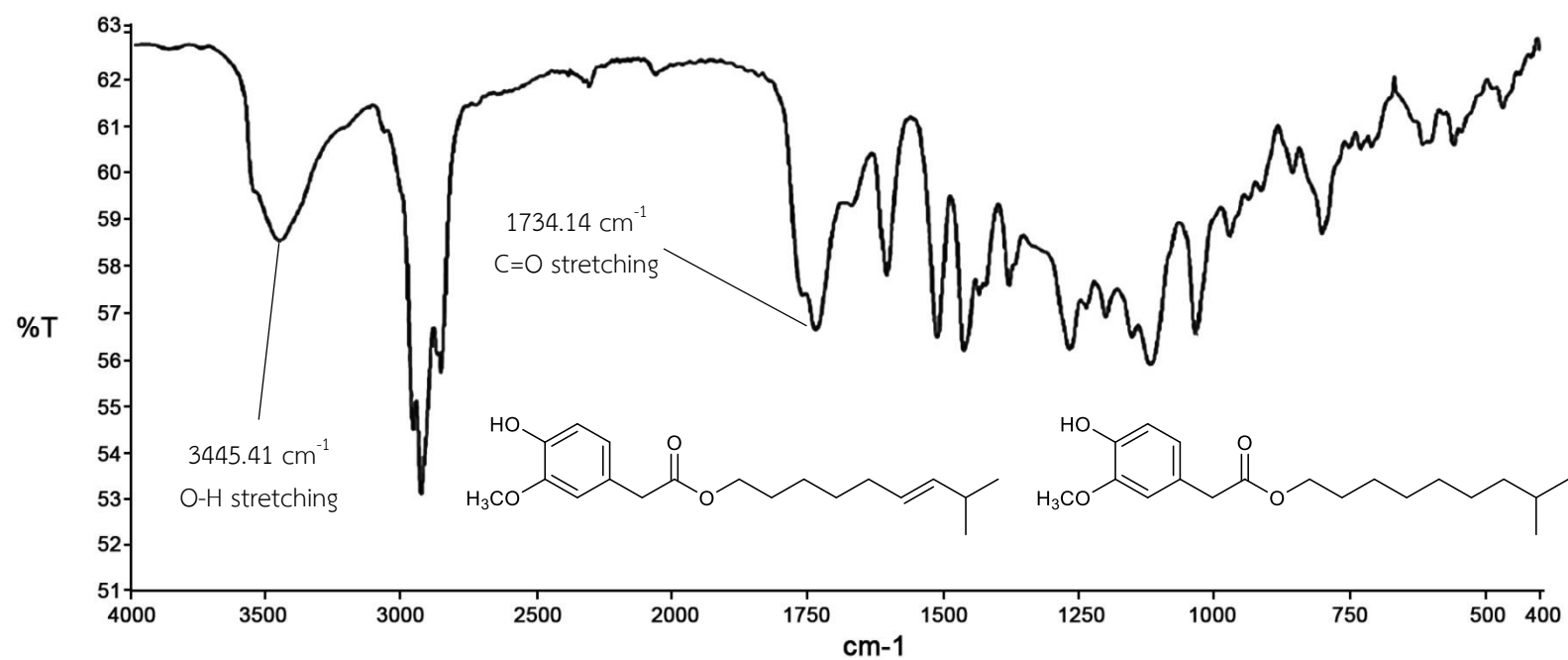
ภาพ 1.2.96 ^{13}C -NMR spectrum ของ *E/Z* capsate ใน $\text{chloroform-}d$



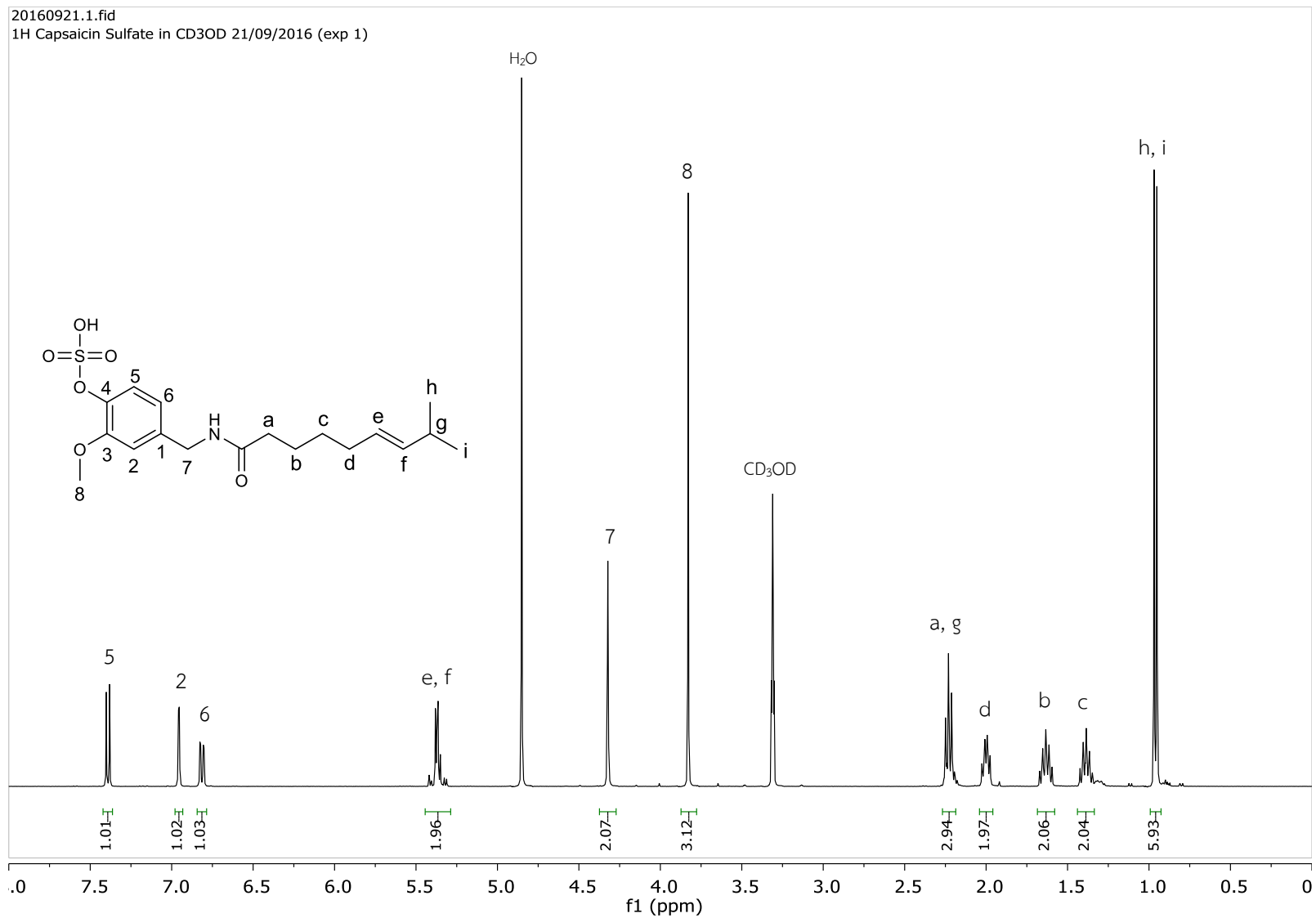
ภาพ 1.2.97 ^1H -NMR spectrum ของ (E)-7-methyl-5-octen-1-yl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetate ใน chloroform-*d*



ภาพ 1.2.98 ^1H -NMR spectrum ของ (E)-8-methyl-6-nonen-1-yl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetate และ 8-methylnonyl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetate ใน chloroform-d



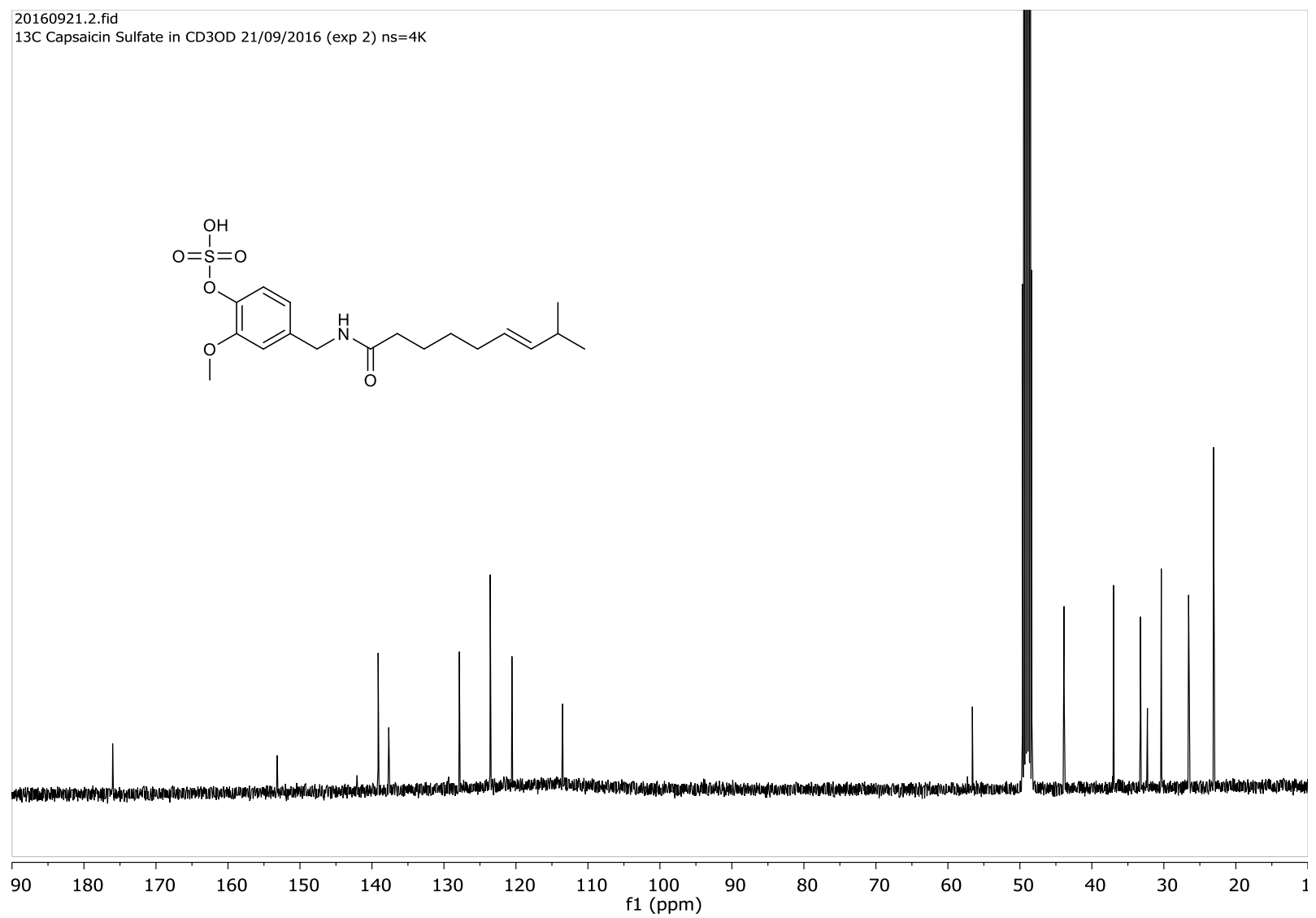
ภาพ 1.2.99 FT-IR spectrum ของ (*E*)-8-methyl-6-nonen-1-yl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetate และ 8-methylnonyl 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetate



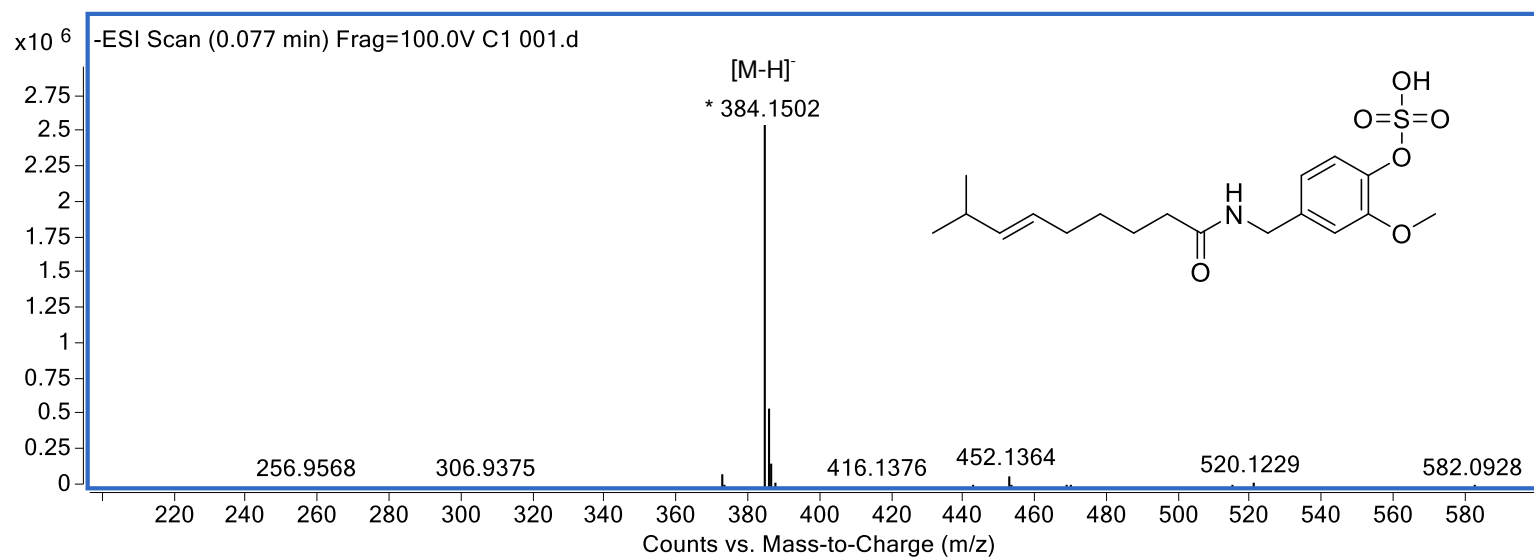
ภาพ 1.2.100 ¹H-NMR ของ capsaicin sulfate ester

20160921.2.fid

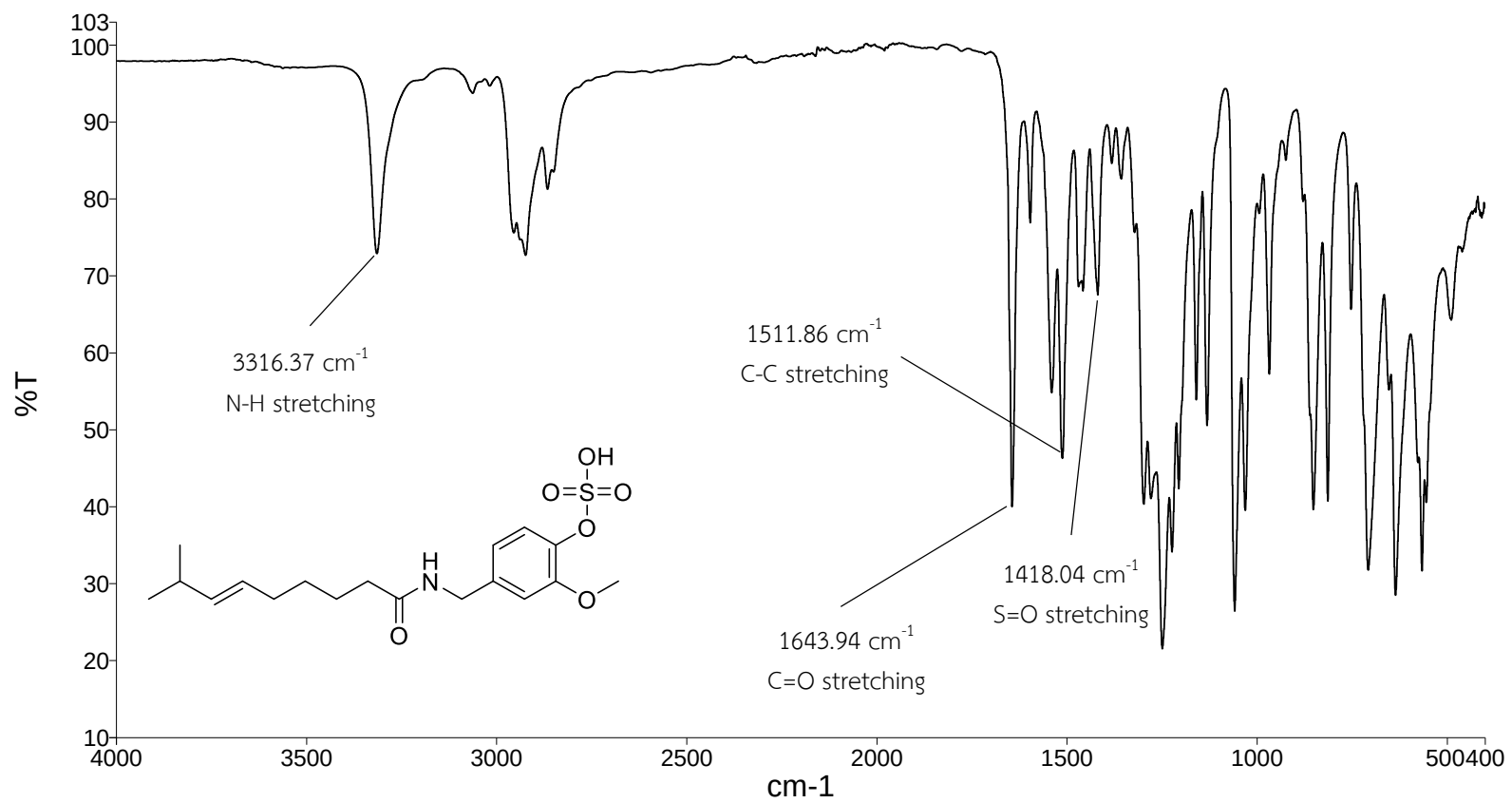
¹³C Capsaicin Sulfate in CD3OD 21/09/2016 (exp 2) ns=4K



ภาพ 1.2.101 ¹³C NMR ของ capsaicin sulfate ester

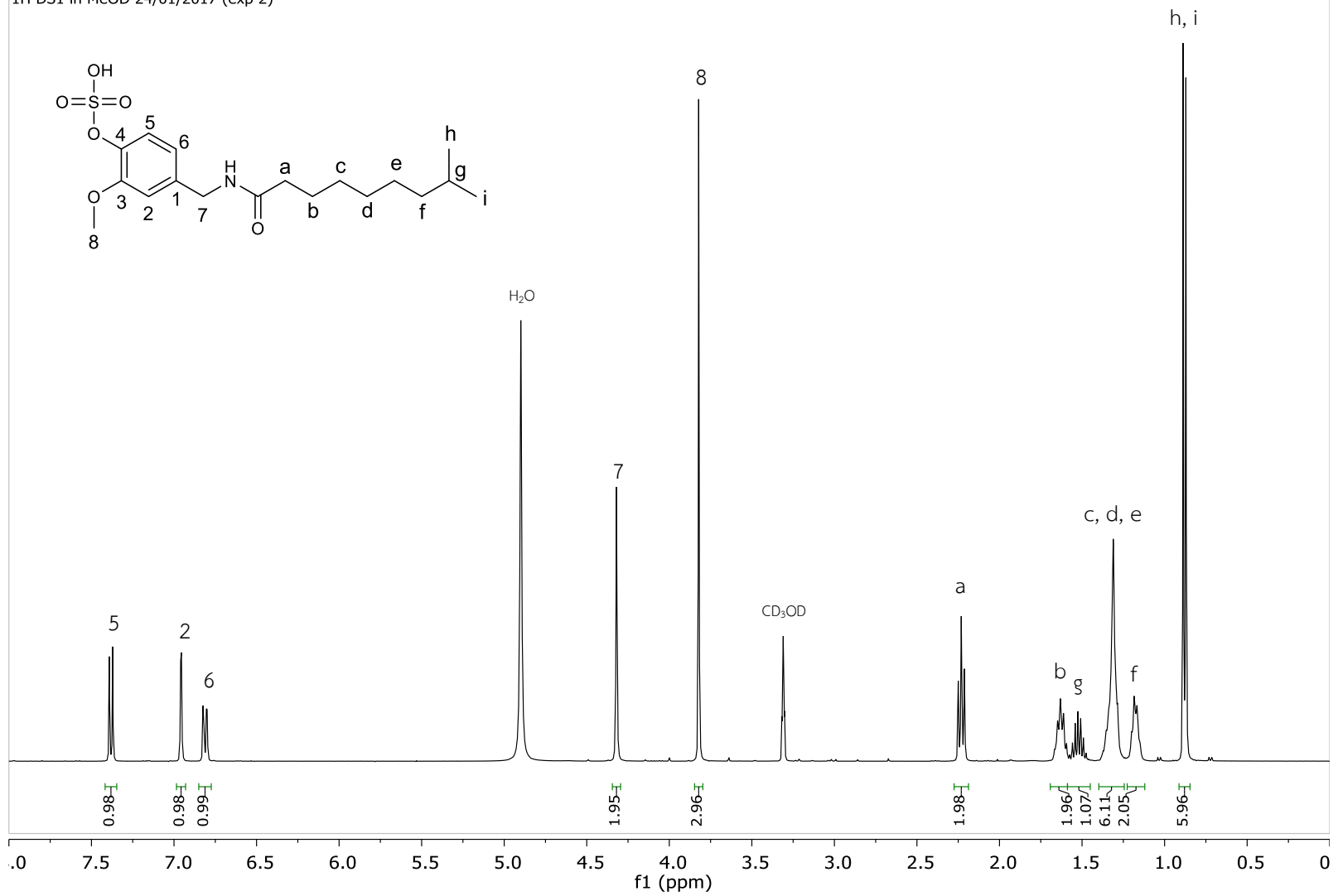


ภาพ 1.2.102 -ESI-MS scan mass spectrum ของ capsaicin sulfate ester



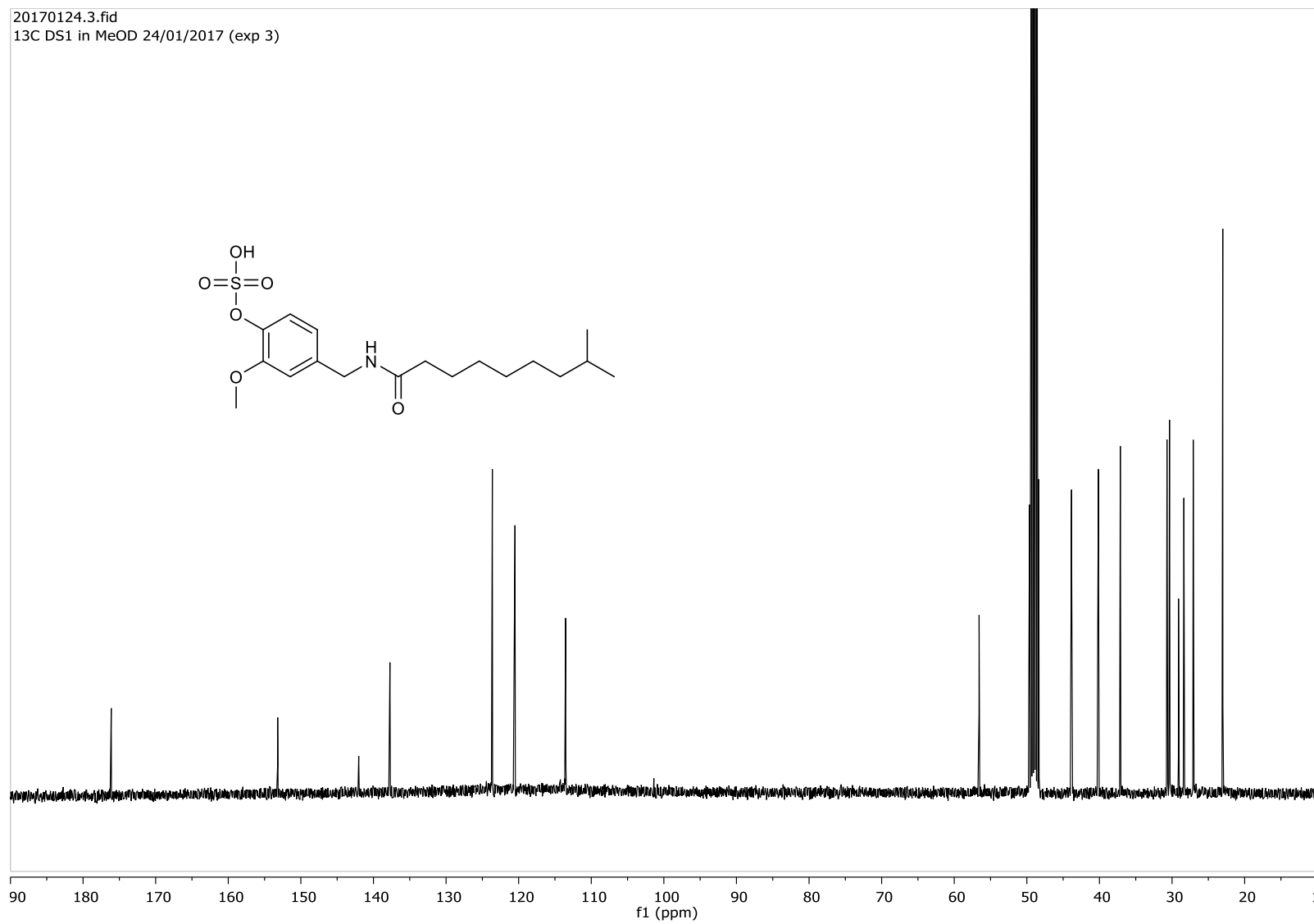
ภาพ 1.2.103 FT-IR chromatogram ของ capsaicin sulfate ester

20170124.2.fid
1H DS1 in MeOD 24/01/2017 (exp 2)

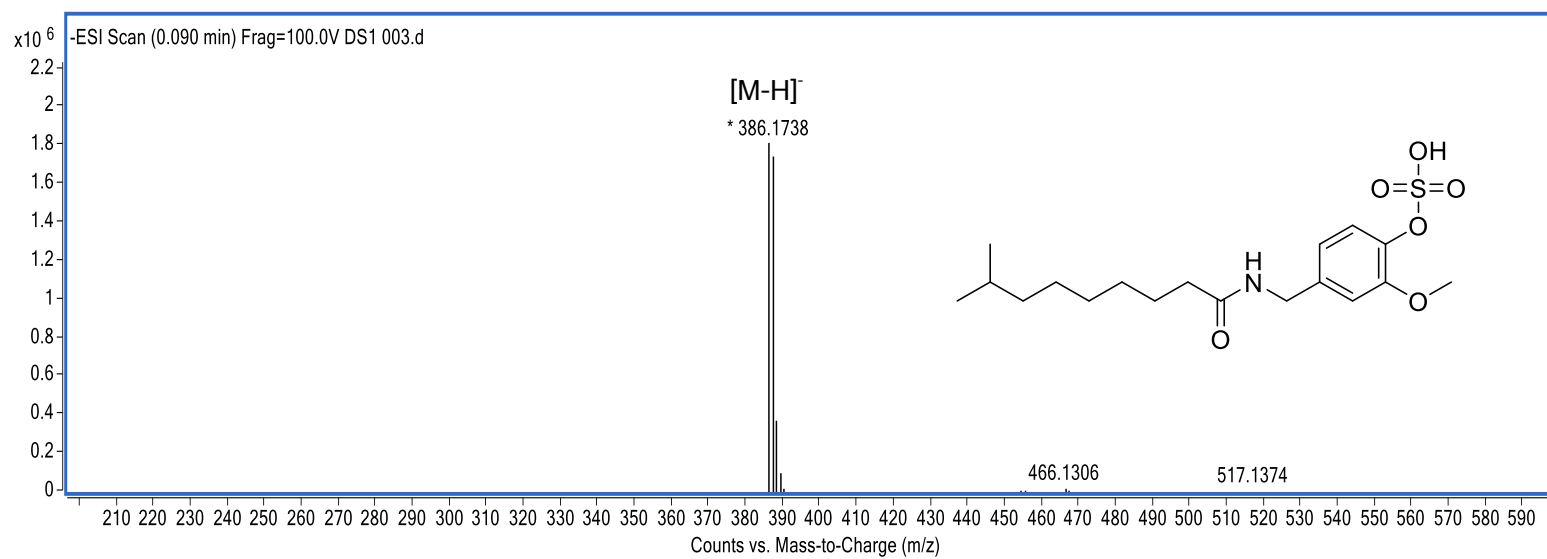


ภาพ 1.2.104 ¹H-NMR ของ dihydrocapsaicin sulfate ester

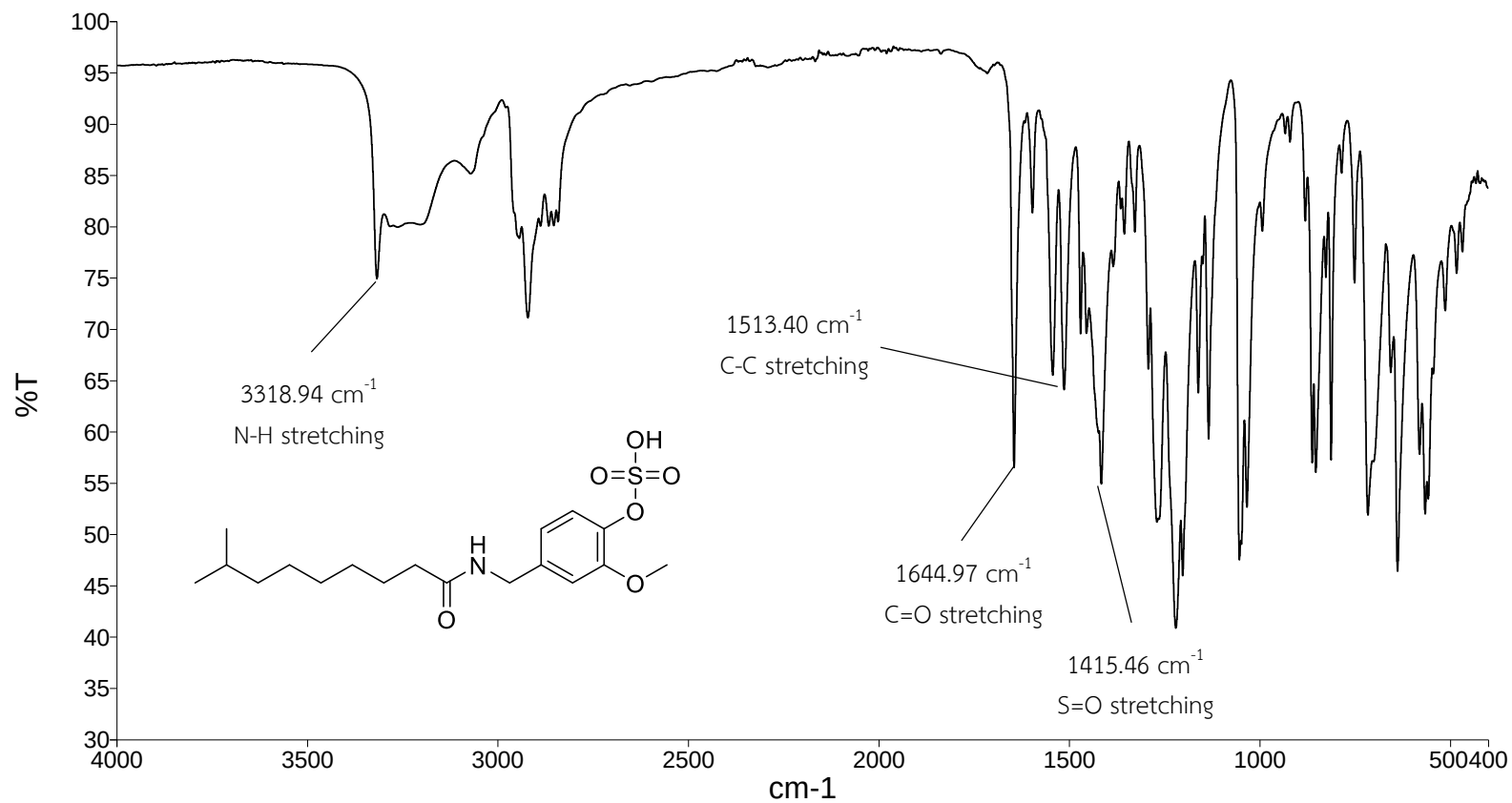
20170124.3.fid
13C DS1 in MeOD 24/01/2017 (exp 3)



ภาพ 1.2.105 ^{13}C NMR ของ dihydrocapsaicin sulfate ester



ภาพ 1.2.106 -ESI-MS scan mass spectrum ของ dihydrocapsaicin sulfate ester



ภาพ 1.2.107 FT-IR chromatogram ของ dihydrocapsaicin sulfate ester

ภาคผนวก 1.3

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin

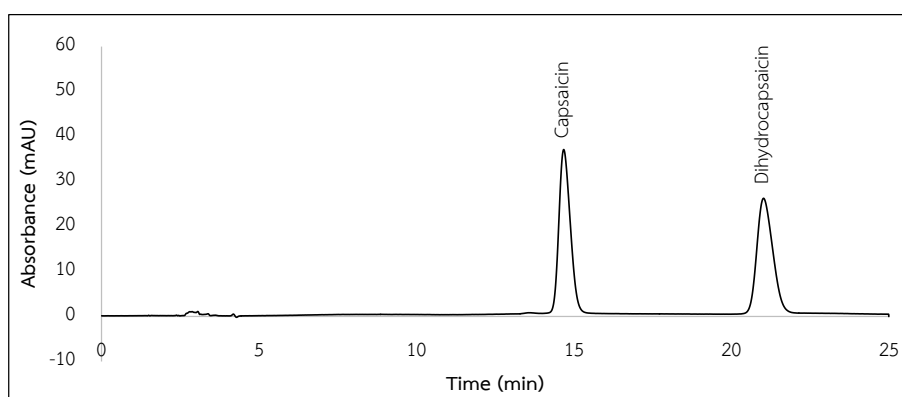
1.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ในตำรับสารสกัดพริก

สารเคมี

≥95%, Capsaicin (M2028) CAS Number 404-86-4 จาก *Capsicum* sp. ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich
 ~90%, Dihydrocapsaicin (M1022) CAS Number: 19408-84-5 ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich

ตาราง 1.3.1 เครื่องมือและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

HPLC	Agilent 1260 Series HPLC
Reversed column	VertiSep UPS C18 HPLC COLUMN, 4.6 x 250 mm, 5 μ m
Detector	DAD detector at 280 nm reference off bandwidth 4 nm
Mobile phase	A = 0.1% formic acid in water B = acetonitrile
Elution	Isocratic (50% A and 50% B)
Flow rate	1.2 mL/min
Injection volume	20 μ l
Column temperature	25 °C

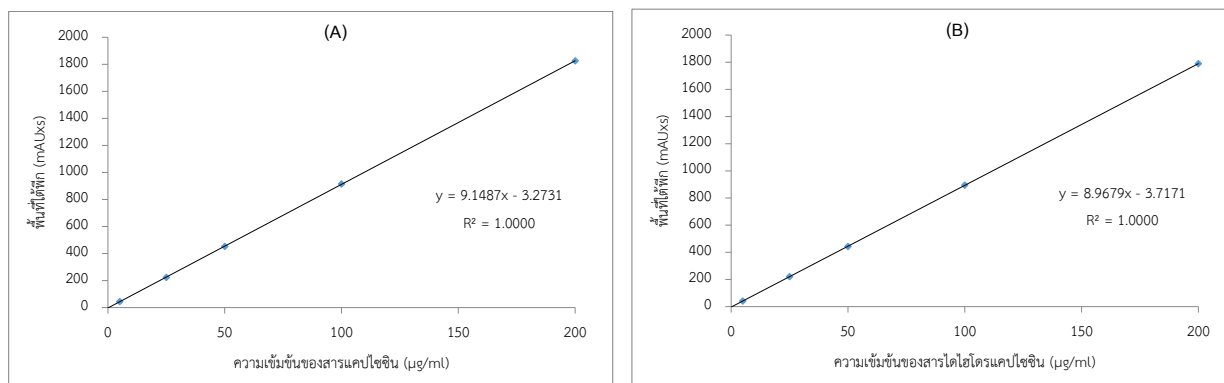


ภาพ 1.3.1 HPLC โครมาโตแกรมการแยกของสารมาตรฐาน capsaicin และ dihydrocapsaicin ที่ความเข้มข้น 100 μ g/ml

1. การศึกษา method validation ของเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน capsaicin และ dihydrocapsaicin

การแยกของสารมาตรฐาน capsaicin และ dihydrocapsaicin ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ โดยใช้สภาวะดังตาราง 1.3.1 แสดงดังภาพ 1.3.1 ซึ่งวิธีการทดลองทำได้โดย ฉีดสารละลายมาตรฐาน capsaicin และ dihydrocapsaicin ที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 5.0, 25.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าค่า R^2 ที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิดแสดงดังภาพ 1.3.2



ภาพ 1.3.2 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน capsaicin (A) และ dihydrocapsaicin (B)

ที่ความเข้มข้น 5.0, 25.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 $\mu\text{g/ml}$

จากกราฟมาตรฐานข้างต้นพบว่าค่า R^2 จากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน capsaicin และ dihydrocapsaicin มีค่า 1.0000 (มากกว่า 0.995 ขึ้นไป) ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้

1.2 การหาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantification (LOQ)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (limit of quantification; LOQ) ทำได้โดยวิเคราะห์สารมาตรฐาน capsaicin และ dihydrocapsaicin ทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml จำนวน 10 ซ้ำ พบว่าได้ผลการทดลอง ดังตาราง 1.3.2

ตาราง 1.3.2 ค่า LOD และ LOQ ของสารมาตรฐาน capsaicin และ dihydrocapsaicin

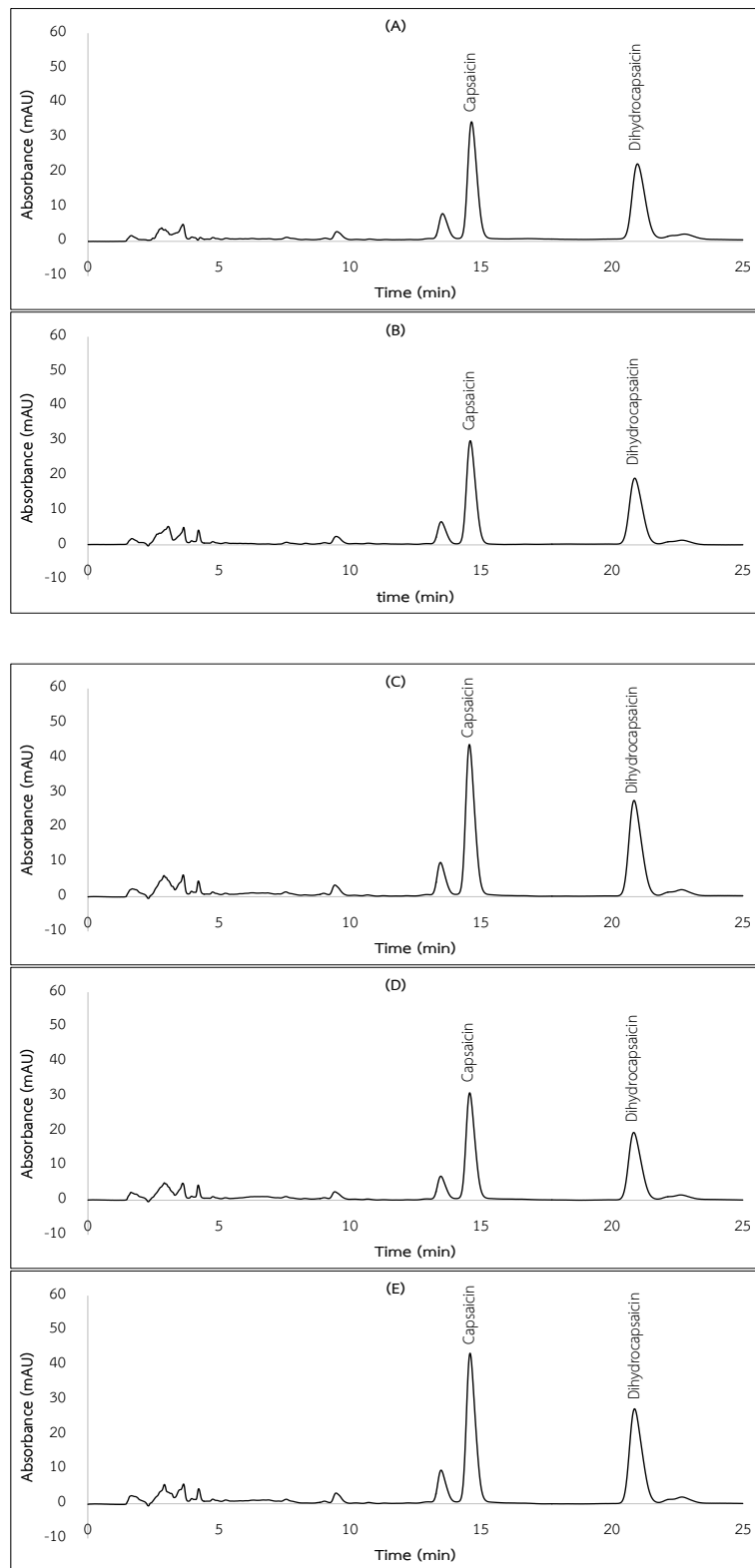
ครั้งที่	ความเข้มข้น (ug/ml)	ความเข้มข้น (ug/ml)
	capsaicin	dihydrocapsaicin
1	5.19	5.03
2	5.22	5.04
3	5.12	5.02
4	5.10	5.02
5	5.02	5.09
6	5.09	5.04
7	5.18	5.09
8	5.12	5.08
9	5.14	5.05
10	5.09	5.04
SD	0.06	0.03
LOD (3SD)	0.17	0.08
LOQ (10SD)	0.57	0.26

จากตาราง 1.3.2 พบว่า LOD ของสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin มีค่า 0.17 และ 0.08 µg/ml และ LOQ มีค่า 0.57 และ 0.26 µg/ml ตามลำดับ

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ในตัวอย่าง

ซังสารละลาย capsicum lot no: 169/06 น้ำหนัก 160 mg ละลายและปรับปริมาตรเป็น 50.0 ml ด้วยสารละลาย 95% เอทานอล กรองสารละลายผ่าน syringe filter, nylon membrane ขนาด 0.45 µm นำไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ด้วยเทคนิค HPLC

ซังสารละลายตัวอย่าง (ผลิตภัณฑ์สารสกัดพริกูปแบบน้ำใส) น้ำหนัก 100 mg ละลายและปรับปริมาตรเป็น 25.0 ml ด้วยสารละลาย 95% เอทานอล กรองสารละลายผ่าน syringe filter, nylon membrane ขนาด 0.45 µm นำไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณ capsaicin และ dihydrocapsaicin ด้วยเทคนิค HPLC



ภาพ 1.3.3 HPLC โครมาโตแกรมการแยกของสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ในตัวอย่าง

(A) = สารละลาย capsicum lot no: 169/06 (160 mg/50 mL)

(B) = สารละลายเลขที่ดำรับ Rx 29-A (เก็บที่ 30 องศาเซลเซียส) ที่เวลา 3 เดือน (100 mg/25 mL)

(C) = สารละลายเลขที่ดำรับ Rx 42-A (เก็บที่ 30 องศาเซลเซียส) ที่เวลา 3 เดือน (100 mg/25 mL)

(D) = สารละลายเลขที่ดำรับ Rx 29-B (เก็บที่ 40 องศาเซลเซียส) ที่เวลา 3 เดือน (100 mg/25 mL)

(E) = สารละลายเลขที่ดำรับ Rx 42-B (เก็บที่ 40 องศาเซลเซียส) ที่เวลา 3 เดือน (100 mg/25 mL)

ตาราง 1.3.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin + dihydrocapsaicin ในตัวอย่างที่เวลา 0 เดือน

Code	ค่าเฉลี่ยผลรวมสาร capsaicin + dihydrocapsaicin	Scoville Heat Units	% Remaining	n
	(% weight/weight)	(SHU)		
Capsicum	5.44 (± 0.013)	875,770 ($\pm 2,122$)	100.00 (± 0.242)	3
12-0-0M	2.90 (± 0.027)	466,258 ($\pm 4,276$)	53.24 (± 0.488)	3
12-1-0M	3.20 (± 0.030)	515,348 ($\pm 4,909$)	58.85 (± 0.561)	3
Average	3.05 (± 0.216)	490,803 ($\pm 34,712$)	56.04 (± 3.964)	3
29-1A-0M	3.85 (± 0.002)	620,029 (± 292)	70.80 (± 0.033)	3
29-2A-0M	3.89 (± 0.019)	625,617 ($\pm 3,037$)	71.44 (± 0.347)	3
29-3A-0M	3.88 (± 0.005)	624,212 (± 749)	71.28 (± 0.086)	3
Average	3.87 (± 0.018)	623,286 ($\pm 2,907$)	71.17 (± 0.332)	3
29-1B-0M	3.85 (± 0.007)	619,406 ($\pm 1,189$)	70.73 (± 0.136)	3
29-2B-0M	3.89 (± 0.015)	626,320 ($\pm 2,418$)	71.52 (± 0.276)	3
29-3B-0M	3.87 (± 0.010)	623,084 ($\pm 1,629$)	71.15 (± 0.186)	3
Average	3.87 (± 0.021)	622,937 ($\pm 3,459$)	71.13 (± 0.395)	3
42-1A-0M	5.50 (± 0.008)	884,756 ($\pm 1,210$)	101.03 (± 0.138)	3
42-2A-0M	5.50 (± 0.004)	885,663 (± 710)	101.13 (± 0.081)	3
42-3A-0M	5.48 (± 0.005)	881,817 (± 812)	100.69 (± 0.093)	3
Average	5.49 (± 0.012)	884,079 ($\pm 2,010$)	100.95 (± 0.230)	3
42-1B-0M	5.47 (± 0.003)	880,787 (± 547)	100.57 (± 0.062)	3
42-2B-0M	5.47 (± 0.003)	881,157 (± 510)	100.62 (± 0.058)	3
42-3B-0M	5.49 (± 0.013)	883,700 ($\pm 2,113$)	100.91 (± 0.241)	3
Average	5.48 (± 0.010)	881,881 ($\pm 1,586$)	100.70 (± 0.181)	3

หมายเหตุ

ทำการเขย่าสารละลายตัวอย่างทุกขวดให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนการ sampling เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ยกเว้นสารละลายตัวอย่างขวดที่ 12-0 และ 12-1 ไม่ได้เขย่าสารละลายให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกันก่อนการ sampling

Capsicum ใช้ผลการวิเคราะห์ที่เวลา T0 เดือน

ตาราง 1.3.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin + dihydrocapsaicin ในตัวอย่างที่เวลา 3 เดือน

Code	ค่าเฉลี่ยผลรวมสาร capsaicin + dihydrocapsaicin	Scoville Heat Units	% Remaining	n
	(% weight/weight)	(SHU)		
Capsicum	5.44 (± 0.013)	875,770 ($\pm 2,122$)	100.00 (± 0.242)	3
29-1A-3M	3.84 (± 0.012)	618,340 ($\pm 1,921$)	70.61 (± 0.219)	3
29-2A-3M	3.85 (± 0.002)	620,125 (± 254)	70.81 (± 0.029)	3
29-3A-3M	3.83 (± 0.007)	616,604 ($\pm 1,177$)	70.41 (± 0.134)	3
Average	3.84 (± 0.011)	618,356 ($\pm 1,761$)	70.61 (± 0.201)	3
29-1B-3M	3.79 (± 0.008)	610,526 ($\pm 1,229$)	69.71 (± 0.140)	3
29-2B-3M	3.83 (± 0.005)	617,180 (± 866)	70.47 (± 0.099)	3
29-3B-3M	3.81 (± 0.002)	613,848 (± 303)	70.09 (± 0.035)	3
Average	3.81 (± 0.021)	613,852 ($\pm 3,327$)	70.09 (± 0.380)	3
42-1A-3M	5.42 (± 0.004)	873,417 (± 623)	99.73 (± 0.071)	3
42-2A-3M	5.43 (± 0.005)	874,026 (± 745)	99.80 (± 0.085)	3
42-3A-3M	5.44 (± 0.002)	875,550 (± 290)	99.97 (± 0.033)	3
Average	5.43 (± 0.007)	874,331 ($\pm 1,099$)	99.84 (± 0.125)	3
42-1B-3M	5.41 (± 0.035)	871,373 ($\pm 5,611$)	99.50 (± 0.641)	3
42-2B-3M	5.42 (± 0.012)	872,666 ($\pm 1,861$)	99.65 (± 0.212)	3
42-3B-3M	5.41 (± 0.006)	870,263 (± 977)	99.37 (± 0.112)	3
Average	5.41 (± 0.007)	871,434 ($\pm 1,203$)	99.50 (± 0.137)	3

หมายเหตุ

ทำการเขย่าสารละลายตัวอย่างทุกขวดให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนการ sampling เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin

Capsicum ใช้ผลการวิเคราะห์ที่เวลา T0 เดือน

ตาราง 1.3.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin + dihydrocapsaicin ในตัวอย่างที่เวลา 6 เดือน

Code	ค่าเฉลี่ยผลรวมสาร capsaicin + dihydrocapsaicin	Scoville Heat Units	% Remaining	n
	(% weight/weight)	(SHU)		
Capsicum	5.44 (± 0.013)	875,770 ($\pm 2,122$)	100.00 (± 0.242)	3
29-1A-6M	3.88 (± 0.006)	624,112 ($\pm 1,015$)	71.26 (± 0.116)	3
29-2A-6M	3.89 (± 0.007)	626,928 ($\pm 1,198$)	71.59 (± 0.137)	3
29-3A-6M	3.87 (± 0.001)	623,284 (± 152)	71.17 (± 0.017)	3
Average	3.88 (± 0.012)	624,774 ($\pm 1,910$)	71.34 (± 0.218)	3
42-1A-6M	5.52 (± 0.005)	888,562 (± 870)	101.46 (± 0.099)	3
42-2A-6M	5.49 (± 0.007)	884,041 ($\pm 1,103$)	100.94 (± 0.126)	3
42-3A-6M	5.51 (± 0.008)	886,438 ($\pm 1,337$)	101.22 (± 0.153)	3
Average	5.51 (± 0.014)	886,347 ($\pm 2,262$)	101.21 (± 0.258)	3

หมายเหตุ

ทำการเขย่าสารละลายตัวอย่างทุกขวดให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนการ sampling เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin

Capsicum ใช้ผลการวิเคราะห์ที่เวลา T0 เดือน

ตาราง 1.3.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ในตัวอย่างที่เวลา 0 เดือน

Code	น้ำหนักตัวอย่าง (mg)	ปริมาณสาร			
		capsaicin	dihydrocapsaicin	capsaicin + dihydrocapsaicin	
		(mg)	(mg)	(mg)	(% weight/weight)
Capsicum-2	157.2	4.48	4.05	8.53	5.43
Capsicum-3	162.1	4.64	4.17	8.81	5.44
Capsicum-4	161.9	4.66	4.17	8.83	5.45
12-0-0M-1	101.1	1.54	1.41	2.95	2.92
12-0-0M-2	101.2	1.52	1.38	2.90	2.87
12-0-0M-4	101.6	1.55	1.40	2.95	2.90
12-1-0M-1	101.0	1.71	1.56	3.27	3.24
12-1-0M-2	101.9	1.70	1.55	3.25	3.19
12-1-0M-5	101.7	1.69	1.54	3.24	3.18
29-1A-0M-1	101.1	2.04	1.86	3.90	3.85
29-1A-0M-3	101.2	2.04	1.85	3.90	3.85
29-1A-0M-5	100.6	2.03	1.84	3.87	3.85
29-2A-0M-1	101.1	2.05	1.86	3.92	3.88
29-2A-0M-2	102.2	2.07	1.89	3.96	3.87
29-2A-0M-3	100.7	2.06	1.87	3.93	3.91
29-3A-0M-1	101.2	2.06	1.87	3.92	3.88
29-3A-0M-3	100.2	2.04	1.85	3.89	3.88
29-3A-0M-4	101.8	2.07	1.88	3.94	3.87
29-1B-0M-2	100.3	2.02	1.83	3.85	3.84
29-1B-0M-3	100.9	2.03	1.85	3.88	3.85
29-1B-0M-4	101.3	2.04	1.86	3.91	3.86
29-2B-0M-2	101.4	2.06	1.87	3.93	3.87
29-2B-0M-3	100.6	2.06	1.87	3.93	3.90
29-2B-0M-4	100.8	2.06	1.87	3.92	3.89
29-3B-0M-1	101.2	2.05	1.86	3.91	3.87
29-3B-0M-2	100.7	2.04	1.85	3.89	3.86
29-3B-0M-3	101.5	2.06	1.88	3.94	3.88
42-1A-0M-3	101.0	2.92	2.64	5.56	5.50
42-1A-0M-4	100.6	2.90	2.63	5.53	5.49
42-1A-0M-5	100.9	2.91	2.63	5.54	5.49
42-2A-0M-1	101.5	2.93	2.65	5.58	5.50
42-2A-0M-3	101.3	2.92	2.65	5.57	5.50
42-2A-0M-4	101.6	2.93	2.66	5.59	5.51

ตาราง 1.3.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ในตัวอย่างที่เวลา 0 เดือน (ต่อ)

Code	น้ำหนักตัวอย่าง (mg)	ปริมาณสาร			
		capsaicin	dihydrocapsaicin	capsaicin + dihydrocapsaicin	
		(mg)	(mg)	(mg)	(% weight/weight)
42-3A-0M-2	101.0	2.90	2.63	5.53	5.48
42-3A-0M-3	101.3	2.91	2.64	5.55	5.48
42-3A-0M-5	101.3	2.91	2.64	5.54	5.47
42-1B-0M-1	101.2	2.90	2.63	5.53	5.47
42-1B-0M-2	100.8	2.89	2.62	5.52	5.47
42-1B-0M-5	101.4	2.91	2.64	5.55	5.47
42-2B-0M-1	100.8	2.89	2.62	5.51	5.47
42-2B-0M-4	100.8	2.89	2.62	5.52	5.47
42-2B-0M-5	100.9	2.90	2.63	5.52	5.48
42-3B-0M-2	101.1	2.90	2.63	5.53	5.47
42-3B-0M-3	100.9	2.91	2.64	5.54	5.49
42-3B-0M-4	100.6	2.90	2.63	5.53	5.50

ตาราง 1.3.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ในตัวอย่างที่เวลา 3 เดือน

Code	น้ำหนักตัวอย่าง (mg)	ปริมาณสาร			
		capsaicin	dihydrocapsaicin	capsaicin + dihydrocapsaicin	
		(mg)	(mg)	(mg)	(% weight/weight)
29-1A-3M-1	99.9	2.00	1.82	3.82	3.83
29-1A-3M-3	101.6	2.05	1.86	3.91	3.85
29-1A-3M-4	101.4	2.05	1.85	3.90	3.85
29-2A-3M-1	100.2	2.03	1.84	3.86	3.85
29-2A-3M-2	101.5	2.05	1.85	3.91	3.85
29-2A-3M-4	100.1	2.03	1.83	3.86	3.85
29-3A-3M-3	100.8	2.02	1.83	3.85	3.82
29-3A-3M-4	101.2	2.04	1.84	3.88	3.84
29-3A-3M-5	100.0	2.01	1.82	3.83	3.83
29-1B-3M-3	101.5	2.02	1.83	3.85	3.79
29-1B-3M-4	100.6	2.00	1.81	3.81	3.78
29-1B-3M-5	101.2	2.02	1.83	3.84	3.80
29-2B-3M-2	101.3	2.04	1.84	3.88	3.83
29-2B-3M-3	100.7	2.03	1.83	3.86	3.83
29-2B-3M-4	101.3	2.04	1.85	3.89	3.84
29-3B-3M-1	101.5	2.03	1.84	3.87	3.81
29-3B-3M-2	100.7	2.02	1.82	3.84	3.81
29-3B-3M-5	100.0	2.01	1.81	3.81	3.81
42-1A-3M-2	100.8	2.87	2.59	5.47	5.42
42-1A-3M-3	101.0	2.88	2.60	5.48	5.43
42-1A-3M-5	100.7	2.87	2.59	5.46	5.42
42-2A-3M-1	100.4	2.86	2.59	5.45	5.43
42-2A-3M-2	100.5	2.86	2.60	5.46	5.43
42-2A-3M-4	100.2	2.86	2.58	5.44	5.43
42-3A-3M-2	100.6	2.87	2.60	5.47	5.44
42-3A-3M-4	100.1	2.86	2.58	5.44	5.44
42-3A-3M-5	100.5	2.87	2.60	5.47	5.44
42-1B-3M-1	100.0	2.83	2.56	5.39	5.39
42-1B-3M-2	100.9	2.86	2.58	5.44	5.40
42-1B-3M-3	100.4	2.88	2.60	5.47	5.45
42-2B-3M-2	100.8	2.87	2.59	5.47	5.42
42-2B-3M-4	101.2	2.89	2.61	5.50	5.43
42-2B-3M-5	100.4	2.85	2.58	5.43	5.41

ตาราง 1.3.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร capsaicin และ dihydrocapsaicin ในตัวอย่างที่เวลา 3 เดือน (ต่อ)

Code	น้ำหนักตัวอย่าง (mg)	ปริมาณสาร			
		capsaicin	dihydrocapsaicin	capsaicin + dihydrocapsaicin	
		(mg)	(mg)	(mg)	(% weight/weight)
42-3B-3M-2	101.4	2.88	2.60	5.48	5.41
42-3B-3M-3	100.3	2.85	2.58	5.43	5.41
42-3B-3M-4	101.1	2.86	2.59	5.46	5.40

ตาราง 1.3.8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ capsaicin และ dihydrocapsaicin ในตัวอย่างที่เวลา 6 เดือน

Code	น้ำหนักตัวอย่าง (mg)	ปริมาณสาร			
		capsaicin	dihydrocapsaicin	capsaicin + dihydrocapsaicin	
		(mg)	(mg)	(mg)	(% weight/weight)
29-1A-6M-2	100.7	2.04	1.87	3.91	3.88
29-1A-6M-3	100.9	2.04	1.87	3.91	3.87
29-1A-6M-5	100.4	2.03	1.86	3.89	3.87
29-2A-6M-1	100.1	2.03	1.86	3.89	3.89
29-2A-6M-3	100.3	2.04	1.87	3.91	3.90
29-2A-6M-5	100.4	2.04	1.87	3.91	3.89
29-3A-6M-3	100.5	2.03	1.86	3.89	3.87
29-3A-6M-4	100.4	2.03	1.86	3.89	3.87
29-3A-6M-5	100.5	2.03	1.86	3.89	3.87
42-1A-6M-3	100.3	2.90	2.63	5.53	5.51
42-1A-6M-4	100.4	2.90	2.64	5.54	5.52
42-1A-6M-5	100.9	2.92	2.66	5.57	5.52
42-2A-6M-3	100.3	2.88	2.63	5.51	5.50
42-2A-6M-4	100.2	2.87	2.63	5.50	5.49
42-2A-6M-5	100.1	2.88	2.61	5.49	5.48
42-3A-6M-1	100.6	2.90	2.64	5.54	5.51
42-3A-6M-2	100.3	2.89	2.63	5.51	5.50
42-3A-6M-4	100.0	2.89	2.63	5.51	5.51

ภาคผนวก 2
บทความสำหรับการเผยแพร่

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

Capsaicin derivatives containing indole and nitroindole for improved anti-inflammatory activity

Chaiyot Mukthung, Sirirat Chancharunee, Filip Kielar, Sutatip Pongcharoen,

Uthai Wichai

Naresuan University Journal: Science and Technology

Issue July-September, Volume 26, No. 3, 2018,

(<http://www.journal.nu.ac.th/index.php/NUJournal> / accepted: December 18, 2017)

Thai Journal Impact Factors (TJIF) = 0.097 / Y2016

(TCI-1)

Capsaicin derivatives containing indole and nitroindole for improved anti-inflammatory activity

Chaiyot Mukthung¹, Sirirat Chancharunee³, Filip Kielar^{1,4}, Sutatip Pongcharoen^{2,5}

Uthai Wichai^{1,4,5*}

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, 65000

²Department of Medicine, Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, 65000

³Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, 50200

⁴Center of Excellence in Biomaterials, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, 65000

⁵Research Center for Academic Excellence in Petroleum, Petrochemical and Advanced Materials, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, 65000

* Corresponding author. E-mail address: uthaiw@nu.ac.th

Abstract

In this investigation, capsaicin derivatives which containing indole or nitroindole in the tail region and a nitro group on the 4-hydroxybenzyl residue at the head region, were designed to mimic the benzyl residue at the terminal part of the daphnane diterpenoid moiety in resiniferatoxin (RTX). The novel capsaicin derivatives were readily synthesized using the peptide coupling reaction between heterocyclic acetic acid derivatives and benzylamine derivatives with moderate yield. Furthermore, novel capsaicin derivatives were evaluated for their ability to inhibit the production of tumor necrosis factor- α (TNF- α), one of the pro-inflammatory cytokines, by lipopolysaccharides (LPS)-stimulated human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in which the transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 (TRPV1) channel is present. It was found that capsaicin derivatives containing nitroindole in the tail region and a nitro group on the 4-hydroxybenzyl residue at the head region exhibited the highest activity for inhibition of TNF- α production, in comparison with capsaicin, giving reductions from 47.65%–51.95% and basis for this significant enhancement of the anti-inflammatory activity could potentially originate from the promotion of binding with TRPV1 on PBMCs through π - π stacking interactions provided from the nitrobenzylic and nitroindole residues at both ends.

Keywords: Capsaicin, TNF- α , TRPV1, anti-inflammatory activity

Introduction

Capsaicin, an abundant active compound found in chilis, was first isolated in 1876 by Thresh *et. al.* (Thresh, 1876) and its structure was determined in 1919 by Nelson *et. al.* (Nelson., 1919). The hot and pungent properties

are the prominent characteristic of capsaicin and generally cause irritation and burning sensation of the exposed area. However, capsaicin remarkably possessed various interesting medical applications. For example, alleviation of neuropathic pain (Maihofner & Heskamp, 2013) (Anand & Bley, 2011), utilization as antitumor agent (Sharma et al., 2013), lowering the risk of degenerative diseases and obesity (Leung, 2014), treatment for cardiovascular and gastrointestinal diseases (Sharma et al., 2013). Additionally, capsaicin has received much attention especially for analgesic and inflammation treatment (Kim & Lee, 2014; Devesa et al., 2011; Kim et al., 2003; Winter et al., 1995), which involves the interaction between capsaicin and the transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 (TRPV1) (Tsuji & Aono, 2012).

TRPV1, the protein found in humans and mammals, is a lipophilic tetramer. Each monomer protein is made from six transmembrane domains where domains S1, S2, S3, and S4 from the four monomer proteins are arranged in four-folded symmetrical structure around ion-permeable channel. Furthermore, the S4-S5 linker located between domains S4 and S5 acts as the allosteric regulator of channel gating. Finally, domains S5 and S6 together with their linker, which forms the selectivity filter in other ion channels, form the ion channel and are involved in its functioning (Figure 1). This receptor, which acts as nociceptor and non-selective cation channel, can be activated by capsaicin, heat (43 °C), and acid (protons).

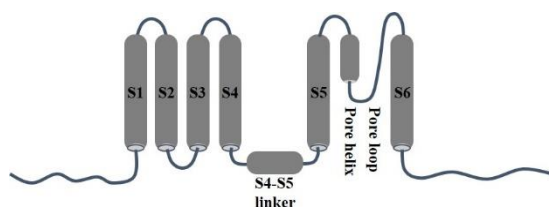


Figure 1 Representation of TRPV1 subunit structure, a lipophilic monomer, composed of S1 to S4 domain, S4-S5 linker and S5-pore-S6 domain. (Liao et al., 2013)

In 2013, the 3D-structure of ratTRPV1 (rTRPV1), which shares 85.7% similarity with humanTRPV1 (hTRPV1), was initially revealed using cryo-EM technique to observe the rTRPV1 structure with 3.4 Å resolution. This study has visualized important information about the interactions inside the rTRPV1 structure. For example, the S3 and S4 domains contain clusters of tyrosine and phenylalanine residues causing the S1-S4 domains to become relatively rigid, and leading to their conformation being unchanged during the channel activation (Liao et al., 2013). Even though the cryo-EM of rTRPV1 provided significant amount of detail for *de novo* atomic model construction, it

still could not provide accurate information of the specific ligand–rTRPV1 interactions due to scattering around small ligands such as capsaicin or resiniferatoxin (RTX)(Figure 2).

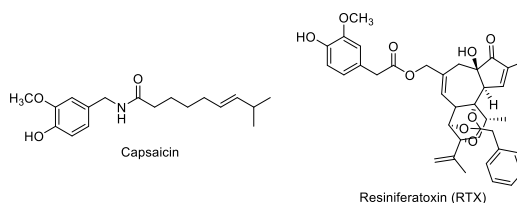


Figure 2 Chemical structures of vanilloid-containing compounds of natural origin capsaicin from; capsaicin and resiniferatoxin

Using combined structural computational approaches and functional analyses of cryo–EM data to rectify the ambiguous information, it was revealed that the vanillyl group of bound ligands (e.g. capsaicin, resiniferatoxin) is pointed downward towards the glutamic acid (E571) of the S4–S5 linker and is involved in hydrogen bonding with the protein (Yang et al., 2015). Furthermore, the amide bond showed a strong interaction with threonine (T511) and this was identified as the main contribution to capsaicin–rTRPV1 binding during the activation stage. Moreover, the long hydrocarbon (HC) chain was pointed upward establishing non-specific Van der Waal interactions. Interestingly, the HC chain of capsaicin was the first part that came in contact with rTRPV1 during the activation process before the amide bond and vanillyl residue forming the hydrogen bonding with rTRPV1 (Yang et al., 2015). The activation mechanism of rTRPV1 by capsaicin was proposed to involve dual hydrogen bonding formations. Once the hydrogen bonding between threonine (T511) and the amide bond of capsaicin is established, the hydroxyl group of vanillyl residue subsequently forms hydrogen bonding with glutamic acid (E571), which causes the S6 domain to move away from the S5 domain causing the ion-permeable gate to be opened.

By employing the interpolated elastic network modeling (iENM), the authors found out that the phenylalanine (F544) is the residue juxtaposed to the terminal part of the long HC chain of capsaicin. Additionally, it was mentioned that the sterically demanding daphnane diterpenoid at the terminal part of RTX significantly assisted its tight-binding during the gate opening. (Yang et al., 2015) Therefore, it was envisaged that the manipulation of the terminal region of the HC chain in capsaicin should confer improved binding interaction with TRPV1 and consequently enhancement of biological activities in areas such as anti-pain and anti-inflammatory.

In this work, we proposed the synthesis of novel capsaicin derivatives by installation indole and nitroindole moieties in the tail part of the HC chain. The effect of the length (4 or 5 atoms) between the amide bond and the heterocyclic residues was also to be investigated. The novel capsaicin derivatives were then to be evaluated for their

anti-inflammatory activities using a TNF- α production assay, which can be considered an indirect but simple and quick method for preliminary screening to provide the evidence of TRPV1 interaction for potential novel ligands.

Methods and Materials

Materials and Apparatus

All reagents were analytical grade with > 97% purity and used without purification unless otherwise mentioned. For the syntheses, the following compounds were used: 4-hydroxybenzaldehyde, hydroxylamine hydrochloride, indole, 5-nitroindole, ethyl 5-bromovalerate, and ethyl 6-bromohexanoate (Sigma-Aldrich, Missouri, United States); 10% Palladium on activated carbon and 1-hydroxy benzotriazole (HOBt) (Acros organic, Geel, Belgium); *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC.HCl) (GL Biochem, Shanghai, China). For anti-inflammatory assay, the following compounds and materials were used: lipopolysaccharides from *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, Missouri, United States), RPMI 1640 without L-glutamine, trypan blue, fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, United States); Lymphoprep, penicillin streptomycin (pen strep), and phosphate buffer saline (PBS) (Biotech and Scientific, Bangkok, Thailand); The human TNF- α Elisa kit (Advanced Medical Science, Bangkok, Thailand). ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker NMR spectrometer operating at 400 MHz for ^1H NMR and 100 MHz for ^{13}C NMR in appropriate deuterated solvents. Chemical shifts (δ) were reported in part per million (ppm) relative to either tetramethylsilane (TMS) or the residual protonated solvent signal as a reference. Coupling constants (*J*) were reported in hertz (Hz). Peak multiplicities were reported in singlet (s), doublet (d), triplet (t), multiplet (m), doublet of doublets (dd) and triplet of doublets (td). FT-IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer Model 1600 Series FT-IR spectrometer in the wavenumber range of 4000–400 cm^{-1} . Mass spectra were measured in positive ion mode with a static accelerating voltage of +20 kV on a Bruker Daltonics Microflex microTOF mass spectrometer using sodium formate for calibration.

Experiment

1. Synthesis of benzylamine derivatives **3** and **6**

1.1 Synthesis of 4-hydroxy-3-methoxybenzylamine hydrochloride (**3**)

The mixture of vanillin (**1**) (1.00 eq.), hydroxylamine hydrochloride (1.20 eq.), and sodium acetate (1.20 eq.) were dissolved in water and stirred at 80 °C to produce oxime **2**. After that, the oxime **2** (1.00 eq.) was reduced using 10% palladium on carbon (400 mg) in ethanolic hydrochloride solution. The reaction mixture was filtered, dried under reduced pressure to obtain **3** in 91% yield. R_f = 0.31 (25% MeOH:CH₂Cl₂); melting point (mp): 225–226

$^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.21 (s, 1H), 8.44 (s, 3H), 7.19 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.86 (dd, $J_1 = 8.1$, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.86 (s, 2H), 3.77 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 147.5, 146.8, 124.6, 121.7, 115.3, 113.9, 55.7, 41.9; FT-IR (ATR) cm^{-1} : 3163 (N-H stretching) and 1611 (N-H bending)

1.2 Synthesis of 4-hydroxy-3-nitrobenzylamine hydrochloride (**6**)

4-hydroxybenzaldehyde (**4**) (1.00 eq.) was dissolved in sulfuric acid and cooled in an ice bath. The mixture of ice-cold nitrating agent (Icke et al., 2003) 0.43 mL was slowly added. After that, the reaction mixture was stirred at room temperature. The mixture was poured into ice and stirred until yellow solid was precipitated out, then filtered, washed, and then crystallized from ethanol to obtain **5**. Next, compound **5** (1.00 eq.) and ammonium formate (5.00 eq.) were mixed and refluxed at 190°C . After that, the mixture was cooled and 37% HCl (2.00 mL) was added and further refluxed at 100°C . The crude **6** was slowly precipitated out, filtered, washed and recrystallized with absolute ethanol to give pure **6** as light yellow crystal in 64% yield. $R_f = 0.44$ (25% MeOH/ CH_2Cl_2); mp: $265\text{--}266^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.25 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.74 (dd, $J_1 = 8.7$, $J_2 = 2.3$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.23 (s, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 153.8, 138.0, 127.4, 126.3, 125.1, 120.7, 42.0; FT-IR (ATR) cm^{-1} : 3281 (N-H stretching), 1631 (N-H bending), 1534 and 1332 (NO_2 stretching); HRMS : calcd. for $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3$: m/z 169.0608, found m/z 169.0605 $[\text{M}]^+$

2. Synthesis of indole and 5-nitroindole acetic acid derivative **11-14**

Indole derivatives **7** or **8** (1.00 eq.) were reacted with NaH (3.00 eq.) in anh. DMF and stirred at room temperature. The mixture was cooled to 0°C and esters **9** or **10** (1.20 eq.) were added. The reaction mixture was stirred at 0°C and then at room temperature. The reaction mixture was hydrolyzed with 4M KOH and adjusted to pH 2 with 1M HCl to obtain crude product. The compounds **11-14** were subjected to column chromatography.

Compound **11** brown oil (34 %); $R_f = 0.44$ (50% EtOAc/Hexane); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.02 (s, 1H), 7.54 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J_1 = 8.3$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.12 (td, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 7.01 (td, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 6.42 (dd, $J_1 = 3.0$, $J_2 = 0.9$ Hz, 1H), 4.17 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.23 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.82 – 1.70 (m, 2H), 1.52–1.40 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 174.2, 135.6, 128.5, 128.1, 120.9, 120.4, 118.8, 109.7, 100.4, 45.1, 33.2, 29.3, 21.9; FT-IR (ATR) cm^{-1} : 1699 (C=O stretching), 1312 (C–O stretching)

Compound **12** brown oil (66 %); $R_f = 0.25$ (25% EtOAc/Hexane); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.00 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.12 (td, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 7.00 (td, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 6.41 (dd, $J_1 = 3.0$, $J_2 = 0.8$ Hz, 1H), 4.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.17 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.80 – 1.68 (m, 2H), 1.58 – 1.45 (m, 2H), 1.31 – 1.17 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 174.3, 135.6, 128.5, 128.1, 120.9, 120.4, 118.7, 109.7, 100.3, 45.3, 33.6, 29.6, 25.8, 24.1; FT-IR (ATR) cm^{-1} ; 1700 (C=O stretching), 1312 (C-O stretching)

Compound **13** yellow solid (96%); $R_f = 0.56$ (10% MeOH/ CH_2Cl_2); mp: 142–143 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.58 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.11 (dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 2.3$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J_1 = 3.2$ Hz, 1H), 4.20 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.38 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.99 – 1.86 (m, 2H), 1.70 – 1.59 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 178.0, 141.8, 138.9, 131.0, 127.9, 118.5, 117.4, 109.3, 104.3, 46.7, 33.3, 29.6, 22.1; FT-IR (ATR) cm^{-1} ; 1698 (C=O stretching), 1503 and 1329 (NO_2 stretching)

Compound **14** yellow solid (94%); $R_f = 0.56$ (12.5% MeOH/ CH_2Cl_2); mp: 130–132 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.58 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.11 (dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 2.2$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.24 (t, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 4.18 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.35 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.95 – 1.85 (m, 2H), 1.74 – 1.61 (m, 2H), 1.44 – 1.31 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 178.6, 141.7, 138.9, 131.0, 127.9, 118.4, 117.4, 109.3, 104.2, 46.7, 33.6, 30.0, 26.4, 24.2; FT-IR (ATR) cm^{-1} ; 1699 (C=O stretching), 1506 and 1320 (NO_2 stretching)

3. Synthesis of capsaicin derivatives 15–20

Compounds **11–14** (1.00 eq.) were dissolved in anh. DMF and then cooled to 0 °C with ice bath. EDC.HCl (1.20 eq.) and HOBT (1.20 eq.) were added and the mixtures were stirred at 0 °C. and then at room temperature. After that, the mixture of **3** or **6** (1.20 eq.) and triethylamine (3.00 eq.) was added, and the solution was at room temperature. Next, the reaction mixture was diluted with brine, extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with a citric acid solution (10% w/v), 0.5 M NaHCO_3 and dried over anh. sodium sulfate. The solution was then concentrated to obtain crude products. The desired capsaicin derivatives **15–20** were purified by column chromatography.

Compound **15** white solid (45%), $R_f = 0.25$ (50%EtOAc:Hexane); mp: 122–123 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.11 (td, $J_1 = 7.7$, J_2

= 1.0 Hz, 1H), 7.00 (td, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.73–6.66 (m, 2H), 6.40 (dd, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 0.9$ Hz, 1H), 4.22 (s, 2H), 4.16 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.22 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.89 – 1.77 (m, 2H), 1.68 – 1.55 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 175.5, 149.0, 146.8, 137.4, 131.5, 130.1, 128.9, 122.2, 121.6, 121.4, 120.0, 116.1, 112.5, 110.4, 101.8, 56.3, 46.7, 44.0, 36.6, 30.9, 24.4; FT-IR (ATR) cm^{-1} ; 3278 (N-H stretching), 1645 (C=O stretching), 1622 (N-H bending), 1241 and 1118 (C-O stretching); HRMS : calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$: m/z 375.1678, found m/z 375.1679 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

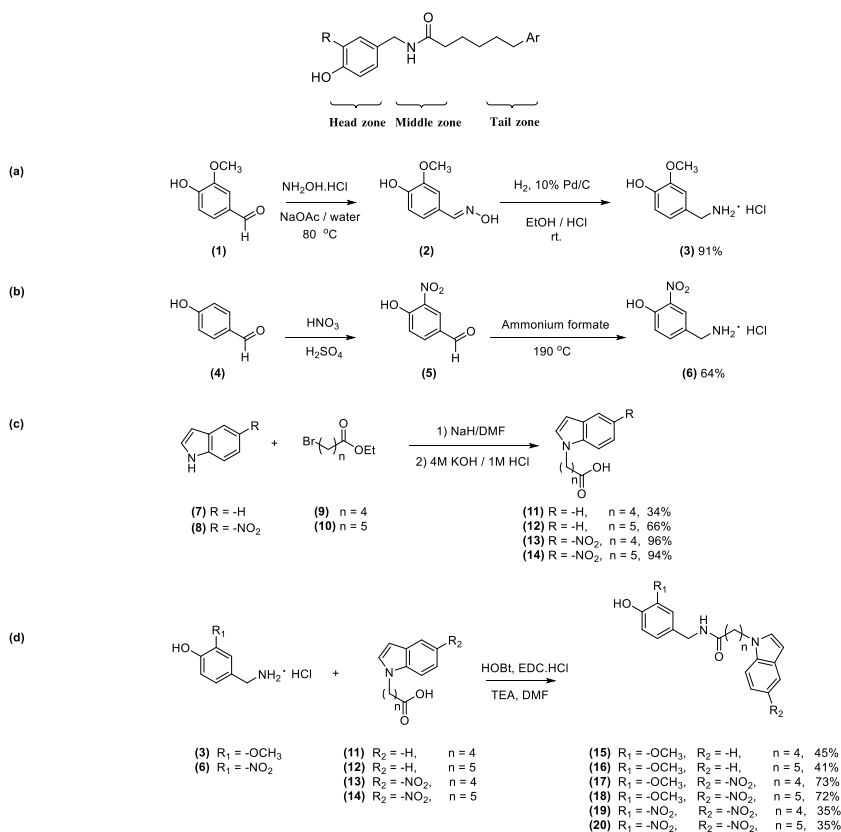
Compound **16** white solid (41%); $R_f = 0.26$ (2% MeOH: CH_2Cl_2); mp: 105–106 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.11 (td, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 6.99 ($J_1 = 7.6$, $J_2 = 0.9$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.76–6.67 (m, 2H), 6.39 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 4.22 (s, 2H), 4.14 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.17 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.87 – 1.78 (m, 2H), 1.68 – 1.57 (m, 2H), 1.35 – 1.22 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 175.7, 149.0, 146.9, 137.5, 131.5, 130.1, 129.0, 122.2, 121.6, 121.5, 120.0, 116.1, 112.6, 110.4, 101.7, 56.4, 46.8, 44.0, 36.9, 31.0, 27.4, 26.6; FT-IR (ATR) cm^{-1} ; 3316 (N-H stretching), 1651 (C=O stretching), 1626 (N-H bending), 1239 and 1121 (C-O stretching); HRMS : calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$: m/z 389.1844, found m/z 389.1836 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Compound **17** yellow solid (73%); $R_f = 0.48$ (100% EtOAc); mp: 134–135 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.53 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.04 (dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 2.2$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.74 – 6.64 (m, 3H), 4.28 – 4.20 (m, 4H), 3.75 (s, 3H), 2.24 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.91 – 1.79 (m, 2H), 1.69 – 1.56 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 175.3, 149.0, 146.9, 142.6, 140.3, 132.8, 131.5, 129.2, 121.5, 118.7, 117.7, 116.1, 112.5, 110.7, 104.7, 56.3, 47.2, 44.0, 36.4, 30.8, 24.2; FT-IR (ATR) cm^{-1} ; 3273 (N-H stretching), 1646 (C=O stretching), 1623 (N-H bending), 1509 and 1328 (NO_2 stretching), 1282 (C-O stretching); HRMS : calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$: m/z 420.1539, found m/z 420.1530, $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Compound **18** yellow solid (72%); $R_f = 0.46$ (100% EtOAc); mp: 115–116 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.52 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.04 (dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 2.3$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.75–6.67 (m, 3H), 4.23 – 4.18 (m, 4H), 3.80 (s, 3H), 2.18 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.90 – 1.78 (m, 2H), 1.71 – 1.58 (m, 2H), 1.35 – 1.21 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 175.6, 149.0, 146.8, 142.6, 140.3, 132.8, 131.5, 129.2, 121.5, 118.7, 117.7, 116.1, 112.6,

110.7, 104.7, 56.4, 47.3, 44.0, 36.8, 31.0, 27.3, 26.5; FT-IR (ATR) cm^{-1} ; 3277 (N-H stretching), 1634 (C=O stretching), 1611 (N-H bending), 1507 and 1336 (NO_2 stretching), 1272 (C-O stretching); HRMS : calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$: m/z 434.1683, found m/z 434.1686, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Compound **19** yellow solid (35%); R_f = 0.43 (100% EtOAc); mp: 139–140 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3) δ 8.56 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.04 (dd, J_1 = 9.1, J_2 = 2.3 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.60 (dd, J_1 = 8.6, J_2 = 2.2 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.75 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 4.39–4.31 (m, 4H), 2.29 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.99 – 1.84 (m, 2H), 1.72 – 1.60 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3) δ 172.9, 154.2, 142.2, 139.8, 137.7, 133.3, 132.8, 128.7, 124.2, 120.6, 118.4, 117.2, 110.7, 104.4, 100.8, 47.0, 42.2, 35.9, 30.5, 23.6; FT-IR (ATR) cm^{-1} ; 3302 (N-H stretching), 3036 (N-H stretching), 1641 (C=O stretching), 1629 (N-H bending), 1536 and 1330 (NO_2 stretching), 1261 (C-O stretching); HRMS : calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}$: m/z 435.1277, found m/z 435.1275, $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Compound **20** yellow solid (35%); R_f = 0.46 (100% EtOAc); mp: 124–125 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3) δ 8.56 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.04 (dd, J_1 = 9.1, J_2 = 2.3 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.60 (dd, J_1 = 8.6, J_2 = 2.3 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.74 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 4.37 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 4.32 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.22 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.94 – 1.83 (m, 2H), 1.74 – 1.61 (m, 2H), 1.37 – 1.33 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3) δ 173.1, 154.2, 142.1, 139.8, 137.7, 133.4, 132.8, 128.7, 124.1, 120.6, 118.4, 117.2, 110.7, 104.4, 100.8, 47.1, 42.1, 36.3, 30.7, 27.0, 25.8; FT-IR (ATR) cm^{-1} ; 3262 (N-H stretching), 3099 (N-H stretching), 1640 (C=O stretching), 1629 (N-H bending), 1532 and 1325 (NO_2 stretching), 1251 (C-O stretching); HRMS : calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}$: m/z 449.1435, found m/z 449.1432, $[\text{M}+\text{Na}]^+$



Scheme 1 Overview of the syntheses of capsaicin derivatives **15–20** divided into three steps: i) preparation of benzylamine derivatives (a) and (b) ii) construction of indole and 5-nitroindole acetic acid derivatives (c) iii) formation of capsaicin derivatives via peptide coupling reagents (d)

Biological activity

1. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) procedure

Buffy coats were diluted with phosphate buffer saline (PBS) and gently mixed to give homogeneous buffy coat solution. After that, the buffy coats solution (30 mL) was gently added on the top layer of lymphoprep (15 mL) solution without spreading of blood. The mixture was then centrifuged at $800 \times g$ with no break at approximately 20°C in a swing-out rotor. After centrifugation, the PBMCs were removed from the mixture, washed with PBS, then centrifuged at $600 \times g$ with break at approximately 5°C in swing-out rotor. Finally, the PBMCs were washed with PBS and centrifuged at $200 \times g$ with break at approximately 5°C in swing-out rotor to give the desired PBMCs.

2. Effect of capsaicin and capsaicin derivatives on cell viability

PBMCs in RPMI solution were added into 96-well plate at a concentration of 1×10^5 cell/well. The volume in each well was 100 μL . Capsaicin and capsaicin derivatives in RPMI containing 1 %PEG (100 μL) were added to achieve concentrations of 10, 100 and 200 μM and plates were incubated for 18 and 24 hours. After that, PBMCs

suspension was mixed with trypan blue and then visually examined via microscope. A viable cell was a clear cytoplasm whereas a nonviable cell was a blue cytoplasm.

3. Effect of capsaicin and capsaicin derivatives **15–20** TNF- α production by LPS-stimulated PBMCs (modification of protocol from Hougee et al. (Hougee et al., 2005))

3.1 Sample preparation

PBMCs in RPMI solution were added into 96-well microplate at 1×10^5 cells/well in 100 μ L of media. After that, a mixture of 20 μ M of compounds **15–20** in 1% of PEG/RPMI (50 μ L) and 100 nM of LPS in RPMI (50 μ L) was added to the test wells. The plates containing the cell suspension were incubated for 16 hours in 5% CO₂ at 37 °C. After that, the culture supernatant was collected.

3.2. Human TNF- α assay procedure

The concentration of TNF- α in culture supernatants was assessed by enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA). The assays were conducted utilizing the LEGEND MAX™ Human TNF- α ELISA Kit with pre-coated plates according to the manufacturer instructions. The supernatant solution was thawed, diluted properly in assay diluents and assayed for TNF- α concentration with duplicate run. The absorbance of each well was read at 450 nm on a microplate reader (PerkinElmer Life Sciences, Downers Grove, IL, USA). TNF- α was measured from standard curve using Synergy H1 Hybrid Reader (Bio-Tek) and relative inhibition (%) was calculated as shown in the equation below:

$$\text{Relative inhibition increase (\%)} = \frac{(\text{Average conc. of TNF-}\alpha \text{ of capsaicin} - \text{Average conc. of TNF-}\alpha \text{ of sample}) \times 100}{\text{Average conc. of TNF-}\alpha \text{ of capsaicin}}$$

Results

In this investigation, the studied capsaicin derivatives **15–20** were inspired by mimicking the benzyl group of the daphnane diterpenoid found in the terminal region of RTX, which might assist its extraordinary potency against TRPV1 that was almost 6 orders of magnitudes greater than that of capsaicin. Moreover, the position of phenylalanine (F544) located close to HC chain of capsaicin, as described the study by Yang et. al (Yang et al., 2015), could be an interesting residue for the introduction of additional interactions. This led us to modify the HC chain of capsaicin by placing either an indole or a nitroindole residue at its tail part and placing either vanillyl or 4-hydroxy-3-nitrobenzyl residues at the head part (Scheme 1). Additionally, the length of the linker in the novel capsaicin derivatives was varied to contain 4 or 5 atoms in order to observe the effect on the interaction of the potential ligands in the focus area of TRPV1.

Synthesis Part

Synthesis of benzylamine derivatives **3** and **6**

Compound **3** was easily prepared via oximation and hydrogenation. Hydrogen gas was used at atmospheric pressure to avoid over reduction of the aromatic residue. This reaction gave benzylamine **3** in high yield (91%). Next, compound **6** was synthesized via nitration and reductive amination. Leuckart reaction (Crossley & Moore, 1944) for chemoselective reduction to give the desired amine **6** in moderate yield (64%).

Synthesis of indole and 5-nitroindole acetic acid derivatives **11-14**

Indole derivatives **11** and **12** and 5-nitroindole derivatives **13** and **14** alkylated on the nitrogen atom with carboxy terminated alkyl chains were prepared via *N*-alkylation reaction (Fan et al., 1998) of indole (**7**) with brominated alkyl ethyl esters **9** and **10** to obtain carboxylic acids **11** and **12**, respectively in moderate yield (34–66%). Carboxylic acids **13** and **14** were obtained in high yield (94–96%) by reacting 5-nitroindole (**8**) with similar reaction and reagents as those used in the synthesis of **11** and **12**.

Synthesis of capsaicin derivatives **15-20**

Capsaicin derivatives **15-18** were readily prepared by reaction between carboxylic acids **11-14** and benzylamine **3** while capsaicin derivatives **19-20** were synthesized from reaction between carboxylic acids **13-14** and benzylamine **6** using EDC.HCl and HOBt as coupling reagent. Compounds **15-20** were obtained in satisfactory yield (35–73%)

Biological activity

Determination of anti-inflammatory activity was performed using the inhibition of TNF- α production assay, which was selected as preliminary screening on PBMCs, which express TRPV1 and TRPV2; however, TRPV2 does not respond on capsaicin or proton, but only to extreme heat (Montell, 2001). Therefore, the reduction of TNF- α production, which could originate from the interaction of novel capsaicin derivatives with TRPV1, was used for the simple and quick screening of the novel capsaicin derivatives in this investigation (Engler et al., 2007).

First, the suitable concentration of capsaicin and novel capsaicin derivatives needed to be identified prior to the inflammation testing. Therefore, the cell viability test was initially conducted with the PBMCs by using the trypan blue; it was found that PBMCs were more than 90% viable at 10 μ M for both capsaicin and novel capsaicin derivatives. The effect of capsaicin and all capsaicin derivatives on TNF- α production was studied at 5 μ M, which is approximately 2

times lower than the concentration at which PMBCs are more than 90 % viable and thus should ensure viability of the cells during the testing. Positive control of TNF- α production by the PBMCs was obtained with their stimulation with LPS in the absence of capsaicin and novel derivatives **15–20**. The test runs were then performed with co-administration of LPS and the test compounds. The production of TNF- α was evaluated using a commercial ELISA based kit with a absorbance readout at 450 nm. The relative increment of inhibition of TNF- α caused by the administration derivatives **15–20** in comparison to capsaicin was also calculated and is shown in Table 1.

Table 1 Preliminary data of concentration of TNF- α production and relative increase inhibition of TNF- α production comparing with capsaicin after dose 5 μ M of capsaicin and capsaicin derivatives **15–20** on LPS-stimulated PBMCs

Sample	Conc. of TNF- α (pg/ml)	Relative increase of inhibition of TNF- α production compared with capsaicin (%)
PBMCs	–	–
PBMCs+LPS	426.55 $\pm$ 9.35	–
PBMCs+LPS+ 15	45.10 $\pm$ 1.82	29.15
PBMCs+LPS+ 16	49.13 $\pm$ 0.68	22.81
PBMCs+LPS+ 17	42.35 $\pm$ 0.23	33.46
PBMCs+LPS+ 18	43.81 $\pm$ 0.46	31.18
PBMCs+LPS+ 19	33.32 $\pm$ 0.23	47.65
PBMCs+LPS+ 20	30.58 $\pm$ 0.91	51.95
PBMCs+LPS+Capsaicin	63.65 $\pm$ 2.51	–

As can be seen in Table 1, PBMCs were stimulated with LPS in the absence of the tested compounds formed 426.55 pg/ml of TNF- α . The content of TNF- α released into the media dropped to 63.65 pg/ml upon the co-administration of capsaicin. Furthermore, administrations of **15** and **16**, which contain indole at the tail region, exhibited content of TNF- α significant lower in comparison to that obtained with capsaicin administration. The observed TNF- α concentrations were 45.10 pg/ml and 49.13 pg/ml for **15** and **16**, respectively. Approximately, similar contents of TNF- α as with **15** and **16** were also observed after the administration of **17** and **18** that bear nitroindole at the tail region. The concentrations of TNF- α in this case were 42.35 pg/ml and 43.81 pg/ml for compounds **17** and **18**, respectively. Interestingly, **19** and **20**, possessing nitroaromatic at the head part and nitroindole at the tail part, showed the lowest TNF- α production with concentration of 33.32 pg/ml and 30.58 pg/ml, respectively. Surprisingly, increasing the length of the HC chain between the amide bond and the heterocyclic residues from 4 to 5 carbon atoms did not show any significant effect on the inhibition of TNF- α production. However, addition of nitro group at both sides of capsaicin in **19** and **20** significantly improved the inhibition of TNF- α production.

Discussion

In this study, we aim to demonstrate the relationship of increasing the anti-inflammatory activity and binding interaction of ligands with TRPV1 with an indirect, easy, and simple approach. First, the mechanism of interactions of TRPV1 signaling pathways and anti-inflammatory effects was previously discussed by Tsuihi et al (Tsuiji & Aono, 2012). Second, the PBMCs that were employed in this investigation were also reported to express TRPV1 (Engler et al., 2007). Therefore, the PMBCs were considered as a good choice for this study as there were expected to provide results utilizing experiments that would be both cost and time effective.

Comparison of **15–18** with capsaicin has shown that the novel derivatives show increased relative inhibition of TNF- α productions with moderate increases in effectiveness (22.81%–33.46%) in comparison to capsaicin. This improved performance probably originates from the replacement of the HC chain in capsaicin with indole and nitroindole moieties that can interact with other molecules by hydrogen bonding via the NH moiety. (Shimazaki et al., 2009) Additionally, nitroindole residue was previously incorporated into ribose or 2-deoxyribose as a universal base in DNA and PNA (Loakes & Brown, 1994; Loakes et al., 1995; Wheaton et al., 2006) due to its non-ambiguous complementary base pairing with strong binding interaction via π - π stacking interactions. Therefore, it is reasonable to assume that the π - π stacking interactions at the tail part of **15–18** would probably enable the indole and nitroindole moieties to freely rotate inside the terminal part of the S1–S4 domain, which has relatively large content of aromatic residues, to attain the decent binding interaction with TRPV1. This in turn probably causes better inhibition of TNF- α production than that seen for capsaicin, which contains only HC chain at the tail part possess, which devoid of π - π stacking potential.

Furthermore, **17** and **18** exhibited improved inhibition of TNF- α production and this probably might originate from the nitro group on nitroindole ring that strongly enhances dipole moment on aromatic rings, which is one of the key parameters that contributes to π - π stacking interactions by polarizing the aromatic ring and thereby promoting electrostatic interactions (Loakes & Brown, 1994; Wheaton et al., 2006; Wichai, 2003). Moreover, the effect of nitro group was even clearly revealed that when two nitro groups were attached on both the nitrobenzylic and nitroindole moieties; consequently, **19** and **20** exhibited even more significantly improved inhibition of TNF- α production due to the dual-stacking interactions at both ends. The relative increase of inhibition of TNF- α for **19** and **20** comparing with capsaicin reached 47.65% and 51.95%, respectively.

The preliminary data of improved anti-inflammation effects of capsaicin derivatives **15–20** presented herein, suggest that **15–20** could exhibit better binding with TRPV1 on PMBCs than capsaicin as a result of their improved π - π properties. Clearly, **19** and **20** constitute the most promising compounds for further study of π - π stacking and binding affinity in TRPV1

Conclusion

In conclusion, new capsaicin derivatives were designed with the aim to mimic the terminal part of RTX. The ability to manipulate the binding interaction and the biological activity of the capsaicin derivatives was demonstrated. The length of HC chain between the amide bond and heterocyclic residues showed no effect on the inhibition of TNF- α production. However, the effect of the nitro groups present on aromatic residues at both ends of capsaicin derivatives **19** and **20** resulted in the most promising biological activity. These novel capsaicin derivatives with enhanced stacking interactions at both ends should be one of the criteria for better design of capsaicin derivatives for pharmaceutical applications in the future. However, the identification of exact position of indole and nitroindole moieties during their interaction with TRPV1 receptor still needs further study by docking and simulation methods. Additionally, the standard testing of compounds with HEK-293 cells expressing rTRPV1 and hTRPV1 is currently being performed.

Acknowledgement

This project was financially supported by Thailand Research Fund (TRF) RDG6020016. Mukthung, C. was financially supported by Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and Naresuan University. The authors would like to thank Department of Chemistry and Science Lab Centre (SLC), Faculty of Science, Naresuan University and Naresuan University Hospital. The authors sincerely thank Emeritus Prof. Nuntavan Bunyaphrathatsara for comments and capsaicinoids extracts.

References

- Anand, P., & Bley, K. (2011). Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, *107*(4), 490–502. doi:10.1093/bja/aer260
- Crossley, F. S., & Moore, M. L. (1944). Studies on the leuckart reaction. *The Journal of Organic Chemistry*, *09*(6), 529–536. doi:10.1021/jo01188a006

- Devesa, I., Planells-Cases, R., Fernández-Ballester, G., González-Ros, J. M., Ferrer-Montiel, A., & Fernández-Carvajal, A. (2011). Role of the transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and sepsis. *Journal of Inflammation Research*, 4, 67–81. doi:10.2147/JIR.S12978
- Engler, A., Aeschlimann, A., Simmen, B. R., Michel, B. A., Gay, R. E., Gay, S., & Sprott, H. (2007). Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*, 359(4), 884–888. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.178
- Fan, X., You, J., Kang, J., Ou, Q., & Zhu, Q. (1998). New reagents for determination of amino acids by liquid chromatography with pre-column fluorescence derivatization. *Analytica Chimica Acta*, 367(1–3), 81–91. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00125-1
- Hougee, S., Sanders, A., Faber, J., Graus, Y. M., van den Berg, W. B., Garssen, J., . . . Hoijer, M. A. (2005). Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochem Pharmacol*, 69(2), 241–248. doi:10.1016/j.bcp.2004.10.002
- Icke, R. N., Redemann, C. E., Wisegarver, B. B., & Alles, G. A. (2003). m-Nitrobenzaldehyde Dimethylacetal *Organic Syntheses*: John Wiley & Sons, Inc.
- Kim, C.-S., Kawada, T., Kim, B.-S., Han, I.-S., Choe, S.-Y., Kurata, T., & Yu, R. (2003). Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cellular Signalling*, 15(3), 299–306. doi:http://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00086-4
- Kim, Y., & Lee, J. (2014). Anti-Inflammatory Activity of Capsaicin and Dihydrocapsaicin through Heme Oxygenase-1 Induction in Raw264.7 Macrophages. *Journal of Food Biochemistry*, 38(4), 381–387. doi:10.1111/jfbc.12064
- Leung, F. W. (2014). Capsaicin as an anti-obesity drug. *Prog Drug Res*, 68, 171–179.
- Liao, M., Cao, E., Julius, D., & Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 504(7478), 107–112. doi:10.1038/nature12822
- Loakes, D., & Brown, D. M. (1994). 5-Nitroindole as an universal base analogue. *Nucleic Acids Research*, 22(20), 4039–4043.

- Loakes, D., Brown, D. M., Linde, S., & Hill, F. (1995). 3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR. *Nucleic Acids Research*, 23(13), 2361–2366.
- Maihofner, C., & Heskamp, M. L. (2013). Prospective, non-interventional study on the tolerability and analgesic effectiveness over 12 weeks after a single application of capsaicin 8% cutaneous patch in 1044 patients with peripheral neuropathic pain: first results of the QUEPP study. *Curr Med Res Opin*, 29(6), 673–683. doi:10.1185/03007995.2013.792246
- Montell, C. (2001). Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, 2001(90), re1. doi:10.1126/stke.2001.90.re1
- Nelson., E. K. (1919). "The constitution of capsaicin, the pungent principle of capsicum". *Journal of the American Chemical Society*, 41, 1115–1121.
- Sharma, S. K., Vij, A. S., & Sharma, M. (2013). Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *Eur J Pharmacol*, 720(1–3), 55–62. doi:10.1016/j.ejphar.2013.10.053
- Shimazaki, Y., Yajima, T., Takani, M., & Yamauchi, O. (2009). Metal complexes involving indole rings: Structures and effects of metal-indole interactions. *Coordination Chemistry Reviews*, 253(3), 479–492. doi:https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.04.012
- Thresh, J. C. (1876). Isolation of capsaicin. *The Pharmaceutical Journal and Transactions*, 6(3), 941–947.
- Tsuji, F., & Aono, H. (2012). Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Inflammation and Autoimmune Diseases. *Pharmaceuticals*, 5(8), 837–852. doi:10.3390/ph5080837
- Vanier, G. S. (2007). Simple and Efficient Microwave-Assisted Hydrogenation Reactions at Moderate Temperature and Pressure. *Synlett*, 1, 131–135. doi:10.1055/s-2006-958428
- Wheaton, C. A., Dobrowolski, S. L., Millen, A. L., & Wetmore, S. D. (2006). Nitrosubstituted aromatic molecules as universal nucleobases: Computational analysis of stacking interactions. *Chemical Physics Letters*, 428(1), 157–166. doi:https://doi.org/10.1016/j.cplett.2006.07.051
- Wichai, U. (2003). *Synthesis and Investigation of PNA-DNA Complexes Containing Novel Aromatic Residues*: University of Alabama.
- Winter, J., Bevan, S., & Campbell, E. A. (1995). Capsaicin and pain mechanisms. *Br J Anaesth*, 75(2), 157–168.

Yang, F., Xiao, X., Cheng, W., Yang, W., Yu, P., Song, Z., . . . Zheng, J. (2015). Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nat Chem Biol*, *11*(7), 518–524.
doi:10.1038/nchembio.1835

ร่างสิทธิบัตร

กรรมวิธีการสังเคราะห์และแยกบริสุทธิ์สารแคปไซซินอยด์ซัลเฟตเอสเทอร์ (capsaicinoids sulfate ester) ชนิดใหม่ที่ไม่ได้เกิดจากสารแคปไซซินอยด์ (capsaicinoid)

ร่างรายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการสังเคราะห์และแยกบริสุทธิ์สารแคปไซซินอยด์ซัลเฟตเอสเทอร์ (capsaicinoids sulfate ester) ชนิดใหม่ที่ไม่เผ็ดจากสารแคปไซซินอยด์ (capsaicinoid) ที่มีความเผ็ด

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

ในการประดิษฐ์นี้เป็นการนำเสนอวิธีการสังเคราะห์ปรับปรุงโครงสร้างของสารแคปไซซินอยด์ที่มีความเผ็ดร้อน สูงถึง 16,000,000 หน่วยความเผ็ด (Scoville heat units) เพื่อให้ได้สารแคปไซซินอยด์ซัลเฟตเอสเทอร์ (capsaicinoids sulfate ester) ที่ไม่เผ็ดร้อน โดยวิธีการสังเคราะห์ที่ใช้มีประสิทธิภาพสูง ง่าย สะดวก และรวดเร็ว จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์อนุพันธ์สารแคปไซซินอยด์ที่สังเคราะห์ได้โดยใช้วิธีการทางโครมาโทกราฟี (chromatography)

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

วิทยาศาสตร์ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการปรับปรุงโครงสร้าง การสังเคราะห์ การสกัดและการแยกบริสุทธิ์อนุพันธ์สารแคปไซซินอยด์

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

แคปไซซินอยด์เป็นสารอัลคาลอยด์ชนิดหนึ่งที่พบได้ในพริกซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในสกุลแคปซิคัม (genus capsicum) องค์กรประกอบโดยประมาณของสารในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วย แคปไซซิน (capsaicin) 48.6%, ไดไฮโดรแคปไซซิน (dihydrocapsaicin) 36.0%, นอร์ไดไฮโดรแคปไซซิน (nordihydrocapsaicin) 7.4%, โฮโมไดไฮโดรแคปไซซิน (homodihydrocapsaicin) 2.0%, โฮโมแคปไซซิน (homocapsaicin) 2.0%, โนโนอิล วานิลลิเลอไมด์ (nonoily vanillylamide) 1.0% และเดโคอิล วานิลลิเลอไมด์ (decoryl vanillylamide) 1.5% (Kosuge and Furuta, 1970) โดยผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารแคปไซซินอยด์พบว่าสามารถจับตัวกับ TRPV1 receptor ส่งผลให้ลดอาการปวด ลดการอักเสบของกล้ามเนื้อชนิดเรื้อรังได้ดี (Szolcsanyi, 1984)

แต่การใช้สารแคปไซซินอยด์เพื่อการรักษาอาการปวดก็มีผลข้างเคียงคือสามารถเกิดปฏิกิริยากับ ion channel ของ TRPV1 receptor นำไปสู่การรู้สึกเจ็บปวดทางระบบประสาทหรือที่เราเรียกกันว่าความรู้สึกละมุนได้อีกด้วย (Szolcsanyi, 1984) ซึ่งความรู้สึกละมุนนี้เองจึงเป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อการนำสารแคปไซซินอยด์ที่มีความเข้มข้นสูงไปใช้เป็นยาลดอาการปวด หรือลดการอักเสบของกล้ามเนื้อ

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

กรรมวิธีการสังเคราะห์สารแคปไซซินอยด์ซัลเฟตเอสเทอร์จากสารแคปไซซินอยด์แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนที่สำคัญดังนี้

ขั้นตอนแรก เป็นส่วนของกรรมวิธีการสังเคราะห์สารแคปไซซินอยด์ซัลเฟตเอสเทอร์โดยใช้ปฏิกิริยาการเตรียมซัลเฟตเอสเทอร์ผ่านปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลกับกรดซัลฟูริกและไดไซโครเฮกซิลไดอิมิด (dicyclohexylcarbodiimide; DCC) ในสถานะเข้มข้น (Charles, 1969)

ขั้นตอนที่สอง เป็นส่วนของกรรมวิธีการแยกบริสุทธิ์สารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้โดยใช้วิธีการทางโครมาโทกราฟีเพื่อให้ได้สารแคปไซซินอยด์ซัลเฟตเอสเทอร์ที่มีความบริสุทธิ์สูงและคงตัว

ตัวอย่างการสังเคราะห์และการแยกบริสุทธิ์สารแคปไซซินซัลเฟตเอสเทอร์จากสารแคปไซซิน

1. เตรียมสารละลายแคปไซซินน้ำหนัก 1.2438 กรัม (4.07 มิลลิโมล) ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (N, N-dimethylformamide) 5.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดสกัดพลาสติกโพลีพรอพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท
2. เตรียมสารละลายไดไซโครเฮกซิลไดอิมิดน้ำหนัก 4.2000 กรัม (20.36 มิลลิโมล) ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 7.1 มิลลิลิตร ในหลอดสกัดพลาสติกโพลีพรอพิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท
3. เตรียมสารละลายกรดซัลฟูริก (sulfuric acid) น้ำหนัก 0.4032 กรัม (4.11 มิลลิโมล) ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 5.1 มิลลิลิตร ในหลอดสกัดพลาสติกโพลีพรอพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท
4. นำสารละลายที่เตรียมได้ทั้งสามหลอดลงในอ่างน้ำแข็งผสมเกลือที่เย็นจัดนาน 15 นาที
5. นำสารละลายแคปไซซินแช่เย็นที่เตรียมได้เทใส่ลงในหลอดสารละลายไดไซโครเฮกซิลไดอิมิดอย่างรวดเร็ว ปิดฝาให้สนิท เขย่าให้เข้ากัน
6. นำสารละลายสารกรดซัลฟูริกแช่เย็นที่เตรียมได้เทใส่ลงในหลอดสารละลายผสมของไดไซโครเฮกซิลไดอิมิดและแคปไซซินอย่างรวดเร็ว ปิดฝาให้สนิท เขย่าแรงๆ ให้เข้ากันอย่างต่อเนื่องนาน 15 นาที จะเกิดตะกอนสีขาวของสารไดไซโครเฮกซิลยูเรีย (dicyclohexylurea; DCU) เกิดขึ้น
7. ตรวจสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography; TLC)
8. เติมสารละลายเอทิลอะซิเตตให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 200 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน
9. กรองแยกตะกอนสีขาวของสารไดไซโครเฮกซิลยูเรียออกจากสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างตะกอนด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตต 200 มิลลิลิตร
10. นำสารละลายที่ได้ไปแยกบริสุทธิ์ต่อยด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล 60 เป็นเฟสคงที่ ทำการชะตามลำดับด้วยสารละลายผสมที่มีแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ผสมอยู่ด้วย 0.3% ของ 100% เอทิลอะซิเตต 5% เมทานอลในเอทิลอะซิเตต และ 10% เมทานอลในเอทิลอะซิเตต ตามลำดับ
11. เก็บรวมสารละลายผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ ระเหยเอาตัวทำละลายออกจนเกือบแห้ง
12. เติมสารละลายผสม 1 ต่อ 1 ระหว่างเอทิลอะซิเตตและเฮกเซน ลงในขวดของสารผลิตภัณฑ์จะเกิดตะกอนสีขาว
13. กรองแยกตะกอนสีขาวของสารผลิตภัณฑ์ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างตะกอนด้วยสารละลายผสม 1 ต่อ 1 ระหว่างเอทิลอะซิเตตและเฮกเซน
14. นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ
15. ได้สารแคปไซซินซัลเฟตเอสเทอร์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวน้ำหนัก 0.810 กรัม คิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ร้อยละ 51.60

รูป 1 โครงสร้างทางเคมีที่สังเคราะห์ได้ของสารแคปไซซินซัลเฟตเอสเทอร์ (capsaicin sulfate ester) $C_{18}H_{27}NO_6S$, น้ำหนักโมเลกุล 385.48 กรัม/โมล

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 0.96 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 1.38 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 2.01 (m, 2H) 2.23 (m, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.32 (s, 2H), 5.37 (m, 2H), 6.82 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.39 (d, J = 8.2 Hz, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 23.1, 26.6, 30.4, 32.3, 33.3, 37.0, 43.9, 56.6, 113.5, 120.5, 123.6, 127.9, 137.7, 139.1, 142.1, 153.2, 176.0.

LCMS (ESI): คำนวณจาก $[M-H]^-$ ($C_{18}H_{27}NO_6S$) ต้องมีค่ามวล/ประจุ (m/z) = 384.1486 โดยจากผลการวิเคราะห์พบว่าค่ามวล/ประจุ = 384.1502.

FT-IR ($\nu_{\max}$, cm^{-1}): 564, 634, 707, 751, 812, 851, 966, 1030, 1058, 1130, 1159, 1248, 1297, 1418, 1457, 1512, 1540, 1596, 1644, 2867, 2925, 3317.

ตัวอย่างการสังเคราะห์และการแยกบริสุทธิ์สารไดไฮโดรแคปไซซินซัลเฟตเอสเทอร์จากสารไดไฮโดรแคปไซซิน

1. เตรียมสารละลายไดไฮโดรแคปไซซินน้ำหนัก 1.0000 กรัม (3.25 มิลลิโมล) ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 4.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดสกัดพลาสติกโพลีพรอพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท
2. เตรียมสารละลายไดไฮโดรเฮกซิลไดอิมิดน้ำหนัก 3.3570 กรัม (16.27 มิลลิโมล) ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 5.7 มิลลิลิตร ในหลอดสกัดพลาสติกโพลีพรอพิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท
3. เตรียมสารละลายกรดซัลฟูริก น้ำหนัก 0.3221 กรัม (3.28 มิลลิโมล) ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 4.1 มิลลิลิตร ในหลอดสกัดพลาสติกโพลีพรอพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท
4. นำสารละลายที่เตรียมได้ทั้งสามหลอดแขวนอ่างน้ำแข็งผสมเกลือที่เย็นจัดนาน 15 นาที
5. นำสารละลายไดไฮโดรแคปไซซินแช่เย็นที่เตรียมได้เทใส่ลงในหลอดสารละลายไดไฮโดรเฮกซิลไดอิมิดอย่างรวดเร็ว ปิดฝาให้สนิท เขย่าให้เข้ากัน
6. นำสารละลายสารกรดซัลฟูริกแช่เย็นที่เตรียมได้เทใส่ลงในหลอดสารละลายผสมของไดไฮโดรเฮกซิลไดอิมิดและไดไฮโดรแคปไซซินอย่างรวดเร็ว ปิดฝาให้สนิท เขย่าแรงๆ ให้เข้ากันอย่างต่อเนื่องนาน 15 นาที จะเกิดตะกอนสีขาวของสารไดไฮโดรเฮกซิลยูเรีย เกิดขึ้น
7. ตรวจสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography; TLC)
8. เติมสารละลายเอทิลอะซิเตตให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 150 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน
9. กรองแยกตะกอนสีขาวของสารไดไฮโดรเฮกซิลยูเรียออกจากสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างตะกอนด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตต 150 มิลลิลิตร
10. นำสารละลายที่ได้ไปแยกบริสุทธิ์ต่อยด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล 60 เป็นเฟสคงที่ ทำการชะตามลำดับด้วยสารละลายผสมที่มีแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ผสมอยู่ด้วย 0.3% ของ 100% เอทิลอะซิเตต 5% เมทานอลในเอทิลอะซิเตต และ 10% เมทานอลในเอทิลอะซิเตต ตามลำดับ
11. เก็บรวบรวมสารละลายผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ ระเหยเอาตัวทำละลายออกจนเกือบแห้ง
12. เติมสารละลายผสม 1 ต่อ 1 ระหว่างเอทิลอะซิเตตและเฮกเซน ลงในขวดของสารผลิตภัณฑ์จะเกิดตะกอนสีขาว
13. กรองแยกตะกอนสีขาวของสารผลิตภัณฑ์ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างตะกอนด้วยสารละลายผสม 1 ต่อ 1 ระหว่างเอทิลอะซิเตตและเฮกเซน
14. นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ
15. ได้สารไดไฮโดรแคปไซซินซัลเฟตเอสเทอร์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวน้ำหนัก 0.456 กรัม คิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ร้อยละ 36.18

รูป 2 โครงสร้างทางเคมีที่สังเคราะห์ได้ของสารไดไฮโดรแคปไซซินซัลเฟตเอสเทอร์ (dihydrocapsaicin sulfate ester) $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_6\text{S}$, น้ำหนักโมเลกุล 387.49 กรัม/โมล

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 0.88 (d, J = 7.2 Hz, 6H), 1.18 (m, 2H), 1.33 (m, 6H), 1.53 (m, 1H), 1.63 (m, 2H), 2.23 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 4.32 (s, 2H), 6.81 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 6.96 (s, J = 2.0 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.2 Hz, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 23.0, 27.1, 28.4, 29.1, 30.4, 30.7, 37.1, 40.1, 43.8, 56.6, 113.5, 120.5, 123.6, 137.7, 142.0, 153.2, 176.1.

LCMS (ESI): คำนวณจาก $[M-H]^-$ ($C_{18}H_{29}NO_6S$) ต้องมีค่ามวล/ประจุ (m/z) = 386.1643 โดยจากผลการวิเคราะห์พบว่ามีค่ามวล/ประจุ = 386.1738

FT-IR ($\nu_{\max}$, cm^{-1}): 564, 637, 715, 750, 812, 852, 862, 1033, 1052, 1133, 1161, 1220, 1270, 1415, 1470, 1514, 1543, 1596, 1645, 2853, 2923, 3319.

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้อถ้อยสิทธิ

1. กรรมวิธีการสังเคราะห์สารแคปไซซินอยด์อัลเฟตเอสเทอร์ชนิดใหม่ที่ไม่เผ็ดร้อนจากสารแคปไซซินอยด์ที่เผ็ดร้อน

1.1 กรรมวิธีการสังเคราะห์สารแคปไซซินอัลเฟตเอสเทอร์จากสารแคปไซซิน

1.2 กรรมวิธีการสังเคราะห์สารไดไฮโดรแคปไซซินอัลเฟตเอสเทอร์จากสารไดไฮโดรแคปไซซิน

2. กรรมวิธีการแยกบริสุทธิ์สารแคปไซซินอยด์อัลเฟตเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้ให้มีความบริสุทธิ์สูงโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซิลิกาเจล 60 เป็นเฟสคงที่ ทำการชะด้วยสารละลายผสมของ 100% เอทิลอะซิเตต 5% เมทานอลในเอทิลอะซิเตต และ 10% เมทานอลในเอทิลอะซิเตต ตามลำดับ โดยสารละลายที่ใช้จะถูกปรับสภาพให้เป็นเบสด้วยการเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 0.01-1.00% เพื่อปรับสภาพของคอลัมน์ซิลิกาเจลให้เป็นเบสและคงสภาพของสารแคปไซซินอยด์อัลเฟตที่สังเคราะห์ได้ไม่ให้สลายตัวกลับไปเป็นสารแคปไซซินอยด์

บทสรุปการประดิษฐ์

ในการประดิษฐ์นี้เป็นการนำเสนอวิธีการสังเคราะห์และแยกบริสุทธิ์สารแคปไซซินอยด์อัลเฟตเอสเทอร์ที่มีความบริสุทธิ์สูงและคงตัว โดยสารผลิตภัณฑ์ใหม่ที่สังเคราะห์ได้นี้ไม่มีความเผ็ดร้อน และหากผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่าสามารถช่วยลดอาการปวด ลดการอักเสบของกล้ามเนื้อชนิดเรื้อรังได้ ก็น่าจะสามารถใช้ทดแทนสารแคปไซซินอยด์ที่มีความเผ็ดร้อนสูงได้ในอนาคต

ภาคผนวก 3

เปรียบเทียบ Output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง

ตาราง 3.1 เปรียบเทียบ Output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง

Output		ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ท่านระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่าน ดำเนินการ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/หรือจากการปรับแผน	ผลสำเร็จ (%)	
1. การเตรียม 90% capsaicinoids จากสารสกัดพริกด้วยวิธีการตกผลึก	100%	
2. การเตรียม capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลง	93%	
2.1 การปรับปรุง capsaicin ด้วยสารกลุ่ม acetate, carbamate, phosphate, proline และ glucose ที่ hydroxyl group ของวง aromatic	80%	-phosphate และ proline capsaicin สังเคราะห์ได้ แต่ร้อยละของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้น้อย เพราะสารมีขั้วสูงทำให้ไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้
2.2 การปรับปรุง capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลงด้วยการแทนที่กลุ่ม methoxy ของวง aromatic	100%	
2.3 การปรับปรุง capsaicin ให้มีความเผ็ดลดลงผ่านการปรับปรุงในส่วน fatty acid residue และ aromatic moiety	100%	
3. การพัฒนา capsinoids โดยปรับปรุงให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้น	62.5%	
3.1 การปรับปรุงให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้นด้วย carbamate / phosphate / proline / acetate ที่ hydroxyl group ของวง aromatic	25%	carbamate- phosphate- และ proline capsate ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ เนื่องจากไม่สามารถ coupling ส่วนที่เป็น alcohol กับ long chain fatty acid ได้ อาจเนื่องมาจากกลุ่ม protecting groups ที่มีขนาดใหญ่ หรือ coupling reagent อาจไม่เหมาะสม ซึ่งอาจต้องทำการปรับสภาวะในการ coupling
3.2 การปรับปรุงให้มีความคงตัวเพิ่มขึ้นในส่วนของ fatty acid residue	100%	
4. การเตรียม metabolites ของ capsaicinoids และ capsinoids	100%	
4.1 การเตรียม metabolite ของ capsaicinoids และ capsinoids ในส่วนของวง vanilliod	100%	
4.2 การเตรียม metabolite ของ capsaicinoids และ capsinoids ในส่วน fatty acid residue โดยใช้ Wittig reaction	100%	
5. การทดสอบการระคายเคืองกับผิวหนัง	100%	

Output		ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ท่านระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่าน ดำเนินการ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/หรือจากการปรับแผน	ผลสำเร็จ (%)	
6. การทดสอบความคงตัวของ อุณหภูมิและแสงต่างๆ ด้วย HPLC technique	100%	ทำการทดสอบ chemical stability ใน เบื้องต้นได้ทดสอบในสถานะที่เป็น ambient condition คือ ในสถานะที่โดน แสงและอุณหภูมิประมาณ 30-35 องศา เซลเซียส พบว่า สารมีความคงตัวดีใน เบื้องต้น
7. การเตรียม formulation ที่เหมาะสมของ capsaicinoids ที่ได้ปรับปรุงให้มีความเผ็ดลดลง capsinoids ที่มีความคงตัวเพิ่มขึ้น และ metabolites ของ capsaicinoids และ capsinoids เพื่อทำการทดสอบสมบัติต่างๆ	45%	แต่เนื่องจากยังไม่ได้มีการศึกษา toxicity ของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ และ ปริมาณที่สังเคราะห์ในเบื้องต้นอยู่ใน ปริมาณ 100-500 มิลลิกรัม ดังนั้นจึง ทำการศึกษาการทำ formulation ใน เบื้องต้นของ capsaicin ซึ่งมี core structure หลักของอนุพันธ์หลายๆตัว ก่อน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการทำ formulation ของอนุพันธ์อื่นๆต่อไป