การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันเพื่อเพิ่มฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

Structural Modification of Curcuminoids from *Curcuma longa* L. to Enhance Their Antimicrobial Activities

ชัชวาลย์ ช่างทำ
อภิชาต สุขสำราญ
เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2553

ชื่อเรื่อง	การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันเพื่อเพิ่มฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์
ผู้วิจัย	ชัชวาลย์ ช่างทำ อภิชาต สุขสำราญ เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร
สถาบัน	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีที่พิมพ์	2555
สถานที่พิมพ์	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
จำนวนหน้ารายงานวิจัย	45 หน้า
คำสำคัญ	การปรับเปลี่ยนโครงสร้าง, เคอร์คิวมินอยด์, ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์, จุลินทรีย์, แอนาลอก
ลิขสิทธิ์	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

ได้ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์คือ เคอร์คิวมิน (1) ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (2) และบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (3) โดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีได้แอนาลอกทั้งหมดจำนวน 16 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น ดีเมทิลแอนาลอกจำนวน 3 ชนิด ไอซอกซาโซลแอนาลอกจำนวน 3 ชนิด โบรโมเพนทิลอีเทอร์แอนาลอกจำนวน 7 ชนิด และพิริดิเนียมแอนาลอกจำนวน 3 ชนิด เคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอกที่สังเคราะห์ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 6 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PA) และ *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC), *Candida albicans* NCPF 3153 (CA) และ *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113 (CN) การทดสอบนี้ได้ใช้ยา vancomycin, gentamicin และ amphotericin B เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดสอบพบว่าเคอร์คิวมินอยด์ 1-3 แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดในระดับต่ำซึ่งมีค่า MIC ที่ช่วง 200 ถึง >200 μg/ml ดีเมทิลแอนาลอก (31-33) และ ไอซอกซาโซลแอนาลอก (34-36) แสดงฤทธิ์ได้ใกล้เคียงกับสารตั้งต้น ยกเว้นสาร 33 ที่แสดงฤทธิ์ต้าน MRSA ได้สูงกว่าสารตั้งต้น (2) มากกว่า 3 เท่า และสารผสม 35a+35b แสดงฤทธิ์ต้าน SA ได้สูงกว่าสารตั้งต้น (2) มากกว่า 6 เท่า เมื่อเตรียมเคอร์คิวมินอยด์ให้เป็นโบรโมเพนทิลอีเทอร์แอนาลอก (37-43) พบว่าฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

หมดไป ส่วนพิริดิเนียมแอนาลอก (44-46) แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย SA และ MRSA มีค่า MIC ที่ช่วง 8 ถึง 128 µg/ml สูงกว่าสารตั้งต้นประมาณ 2-25 เท่า

สารเคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอกที่สังเคราะห์ได้ยังแสดงฤทธิ์ได้ต่ำกว่ายามาตรฐาน แต่อย่างไรก็ตามผลจากการทดลองนี้ทำให้ทราบถึงข้อมูลเบื้องต้นที่จะพัฒนาการออกแบบสังเคราะห์เคอร์คิวมินอยด์ให้มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ให้สูงขึ้นได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานหรือสูงกว่า

Research Title	Structural Modification of Curcuminoids from *Curcuma longa* L. to Enhance Their Antimicrobial Activities
Researchers	Chatchawan Changtam Apichart Suksamrarn Souwalak Phongpaichit
Institution	Huachiew Chalermprakiet University
Year of Publication	2012
Publisher	Huachiew Chalermprakiet University
Sources	Huachiew Chalermprakiet University
No. of Pages	45 pages
Keywords	Structural Modification, Curcuminoids, antimicrobial activities, microorganism, analogue
Copyright	Huachiew Chalermprakiet University

บทคัดย่อ

The parent curcuminoids, curcumin (1), demethoxycurcumin (2) and bisdemethoxycurcumin (3), have been chemically modified to give 16 analogues. These included 3 demethyl analogues, 3 isoxazole alaogues, 7 bromopentyl ether analogues and 3 pyridinium analogues. Curcuminoids and analogues were subjected to antimicrobial activity evaluations, using *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (SA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (PA), *Escherichia coli* ATCC25922 (EC), *Candida albicans* NCPF3153 (CA) and *Cryptococcus neoformans* ATCC90113 (CN). In this assay, vancomycin, gentamicin and amphotericin B were used as standard drugs. The parent curcuminoids (**1-3**) showed low antimicrobial activity, with MIC values of 200 to >200 ug/ml. The demethyl analogues (**31-33**) and isoxazole analogues (**34-36**) showed comparable activity to the parent curcuminoids, except compound **33** that exhibited activity against MRSA of more than 3-fold higher than **2**, and **35a+35b** mixture exhibited activity against SA more than 6-

fold higher than **2**. The bromopentyl ether analogues **(37-43)** were inactive to the test. The pyridinium analogues **(44-46)** were the most active analogues against SA and MRSA, with MIC values in the range 8 - 128 ug/ml, which were 2- to 25-folds more active than the parent compounds.

The parent curcuminoids and their analogues that have been synthesized showed lower antimicrobial activities than the standard drugs. However, the knowledge gained from this work is valuable for the design of structural modification of curcuminoids to other analogues with enhanced antimicrobial activities, possibly comparable or higher than the standard drugs.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คุณทิพวรรณ จูประจบ คุณอนันต์ อธิพรชัย คุณณัฐธิสา นิยมธรรม คุณกันยารัตน์ จันทร์แจ้ง นักศึกษาปริญญาเอก และปริญญาโท คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ได้ช่วยเหลือในการบันทึกนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม Electrospray mass spectra และการบันทึกอินฟราเรดสเปกตรัม ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ในสาขาวิชาวิทยาศาสตร์กายภาพทุก ๆ ท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ค

กิตติกรรมประกาศ.....จ

สารบัญ.....ฉ

สารบัญตาราง.....ช

สารบัญภาพ.....ซ

สัญลักษณ์และคำย่อ.....ฌ

บทที่ 1 บทนำ.....1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

ขอบเขตของการวิจัย.....2

นิยามศัพท์เฉพาะ.....2

สมมติฐานของการวิจัย.....3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

กรอบแนวคิดการวิจัย.....12

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย.....14

อุปกรณ์ สารเคมี และจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....14

วิธีดำเนินการวิจัย.....16

บทที่ 4 ผลการวิจัย.....23

บทที่ 5 อภิปราย และสรุปผลการทดลอง.....35

บรรณานุกรม.....39

ภาคผนวก

ก ตัวอย่างการคำนวณร้อยละผลผลิต.....43

ข ประวัติย่อผู้วิจัย.....45

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของสารเคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอก.....34

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์	1
2	โครงสร้างแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์และน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าขมิ้นชัน	5
3	โครงสร้างแอนาลอกของเคอร์คิวมินที่สังเคราะห์โดย Mishra และคณะ	6
4	โครงสร้างแอนาลอกของเคอร์คิวมินที่สังเคราะห์โดย Singh และคณะ	7
5	โครงสร้างแอนาลอกของ bis(pyridinium)alkanes ที่สังเคราะห์โดย Ng และคณะ	9
6	การสังเคราะห์ 5,6-dihydro-4H-1,2-oxazines โดย Manjula และคณะ	10
7	โครงสร้างแอนาลอกของ caffeics acid amides สังเคราะห์โดย Fu และคณะ	11
8	โครงสร้างแอนาลอกของ quinazolin-4(3*H*)-one สังเคราะห์โดย Kadi	11
9	โครงสร้างที่มีฤทธิ์ต้าน MRSA สังเคราะห์โดย Osorio และคณะ	12

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

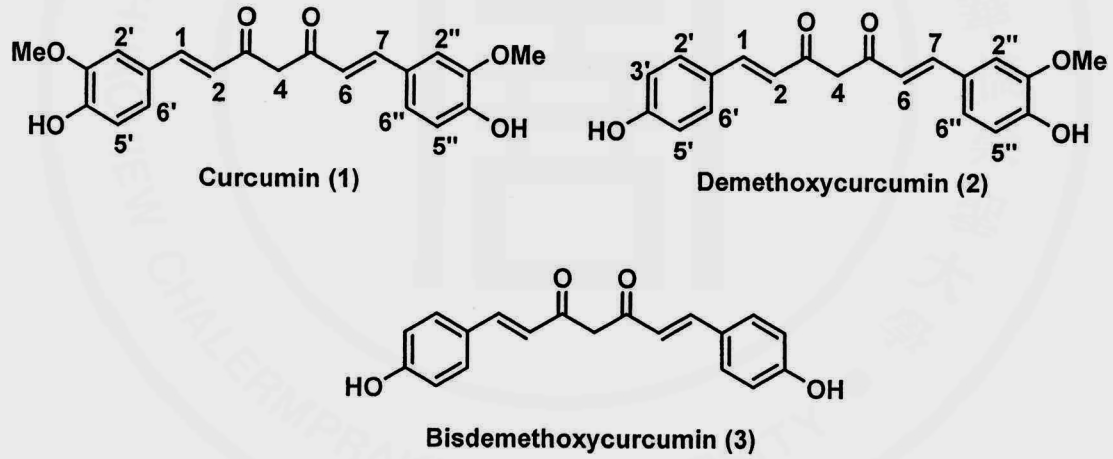
สัญลักษณ์และคำย่อ

g	=	Gram
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
mg/ml	=	Milligram/milliliter
µg/ml	=	Microgram/milliliter
µl	=	Micro liter
µm	=	Micron
δ	=	chemical shift
Hz	=	Hertz
%	=	Percent
ESMS	=	Electrospray mass spectrum
^{1}H-NMR	=	Proton nuclear magnetic resonance
IR	=	Infrared
J	=	Coupling constant
Mp.	=	Melting point
Rel.abund.	=	Relative abundance
s	=	Singlet
d	=	Doublet
t	=	Triplet
m	=	Multiplet
br s	=	Broad singlet
br d	=	Broad doublet
m/z	=	Mass/charge
ν	=	Frequency
MIC	=	Minimum inhibitory concentration
MBC	=	Minimum bactericidal concentration
MFC	=	Minimum fungicidal concentration

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหาการวิจัย

เคอร์คิวมินอยด์เป็นสารประกอบหลักสีเหลืองที่สกัดได้จากเหง้าของขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) ซึ่งเป็นสมุนไพรที่นิยมใช้มาตั้งแต่อดีต เช่น ใช้เป็นยาพื้นบ้านรักษาโรค ปวดท้อง ท้องอืด จุกเสียด ผดผื่นคัน สมานแผล ลดการอักเสบ ใช้เป็นสีผสมในอาหาร ใช้เป็นสีย้อม และในปัจจุบันได้มีการนำส่วนสกัดจากขมิ้นชันมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากมาย เช่น ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร แคปซูลต้านมะเร็ง รักษาอาการจุกเสียด ยาเตรียมในรูปแบบเจลรักษาโรคเรื้อนของสัตว์เลี้ยง เป็นต้น สารเคอร์คิวมินอยด์ที่พบในขมิ้นชันมี 3 ชนิดคือ เคอร์คิวมิน (curcumin, 1) ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (demethoxycurcumin, 2) และ บิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (bisdemethoxycurcumin, 3) โครงสร้างดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์

มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคอร์คิวมินอยด์ที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านโปรโตซัว ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ จากสรรพคุณของขมิ้นชันและสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ ที่มีประโยชน์หลากหลายเหล่านี้ จึงเป็นเหตุให้นักวิจัยทั้งในประเทศและต่างประเทศให้ความสนใจในการนำสารเคอร์คิวมินอยด์มาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีอย่างกว้างขวางและเพิ่มมากขึ้น

จุลินทรีย์มีทั้งชนิดที่เป็นประโยชน์ เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ด้านการเกษตรควบคุมโรคพืช และจุลินทรีย์ชนิดที่ก่อให้เกิดโรค เช่น เมื่อปลายปี ค.ศ. 1950 เชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์เป็นจำนวนมาก และเชื้อเกิดการดื้อต่อยาเพนิซิลิน (penicillin) ทำให้ผู้ที่ได้รับ

เชื้อนี้เสียชีวิตในที่สุด ปัจจุบันจุลินทรีย์เกิดการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญมาก และพบอย่างกว้างขวางแล้วทั่วโลก (Guzeldemirci และคณะ. 2010) จึงมีการค้นหายาปฏิชีวนะขึ้นมาใหม่อยู่เรื่อย ๆ แต่การระบาดของโรคก็เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน อีกทั้งยาบางชนิดยังแสดงผลข้างเคียง (side effects) ต่อผู้ป่วยด้วย เช่น Amphotericin B ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อราได้หลายชนิดแต่มีความเป็นพิษต่อไตทั้งในระยะเฉียบพลันและระยะเรื้อรัง (Barret. 2002) ดังนั้นจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องเร่งหายาชนิดใหม่ที่มีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างไปจากเดิมที่มีรายงานแล้ว ให้มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคและมีความปลอดภัยต่อผู้ป่วย

สมุนไพรขมิ้นชันมีการใช้รักษาโรคผดผื่นคัน รักษาแผลในกระเพาะอาหารที่มีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์มาตั้งแต่โบราณ และยังไม่มีการรายงานถึงความเป็นพิษต่อผู้บริโภค จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารเคอร์คิวมินอยด์พบว่าแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในระดับที่ต่ำ และจากรายงานส่วนใหญ่เป็นการนำเอาเฉพาะเคอร์คิวมินเท่านั้นมาปรับเปลี่ยนโครงสร้างและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่วนสารดีเมทอกซีเคอร์คิวมินและบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน ยังมีการนำมาศึกษาในจำนวนน้อย เพราะฉะนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจนำสารเคอร์คิวมินอยด์ทั้งสามชนิดมาปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมี ให้เป็นแอนาลอกต่าง ๆ เพื่อพัฒนาและปรับปรุงสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินี้ให้มีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ในระดับที่สูงขึ้น และพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์จากธรรมชาติให้เป็น แอนาลอกต่าง ๆ
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารเคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอกต่าง ๆ ที่สังเคราะห์ได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์โดยวิธีทางเคมี และหาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารเคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอกต่าง ๆ ที่สังเคราะห์ได้

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ

เคอร์คิวมินอยด์ (Curcuminoid) เป็นสารประกอบหลักที่พบในเหง้าของพืชขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) มีสีเหลือง-ส้ม ซึ่งประกอบไปด้วยสาร เคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน และบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

การปรับเปลี่ยนโครงสร้าง (Structural modification) คือการเปลี่ยนแปลงบางตำแหน่งในโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบทางเคมีจากหมู่หนึ่งให้เป็นอีกหมู่หนึ่งโดยใช้วิธีทางเคมีหรือวิธีการอื่น ๆ

จุลินทรีย์ (Microorganism) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจึงจำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ แบคทีเรีย รา และยีสต์ เป็นต้น

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) คือฤทธิ์ของสารที่สามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา หรือ โปรโตซัว

แอนาลอก (Analogues) เป็นสารที่ได้จากการปรับเปลี่ยนสารตั้งต้น (ในที่นี้คือเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิด) ให้เป็นสารที่มีหมู่ฟังก์ชันและ/หรือโครงสร้างบางส่วนแตกต่างไป เช่น เป็น demethyl analogues เป็นแอนาลอกสายโซ่ยาว หรือมีหมู่ที่มีขั้วมากขึ้น หรือมีวงเฮตเทอโรไซคลิก เป็นต้น

1.5 สมมติฐานของการวิจัย

แอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์ที่สังเคราะห์ได้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายและแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ในระดับที่สูงขึ้นมากกว่าสารเคอร์คิวมินอยด์เริ่มต้นจากธรรมชาติ

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected Benefits)

1. ได้ทราบวิธีในการสังเคราะห์ทางเคมี แอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์
2. ได้ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของเคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอกที่สังเคราะห์ได้
3. ได้ความรู้พื้นฐานที่จะนำสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคในอนาคต
4. แอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์ที่สังเคราะห์ได้สามารถนำไปทดสอบฤทธิ์อื่น ๆ ได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

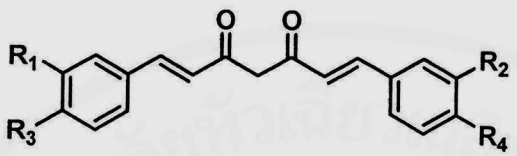
2.1 เคอร์คิวมินอยด์

เคอร์คิวมินอยด์เป็นสารที่มีอยู่ในส่วนเหง้าของพืชสมุนไพรขมิ้นชัน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* L. อยู่ในวงศ์ (family) Zingiberaceae สกุล (genus) *Curuma* มีชื่อพ้อง *C. domestica* Valeton และ *Ammonum curcuma* Jacq (Ammon และ Wahl. 1991) ชื่อท้องถิ่นในประเทศไทยที่ใช้เรียก เช่น ขมิ้น (ทั่วไป) ขมิ้นแกง ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว (เชียงใหม่) ขี้มิ้น หมิ้น (ภาคใต้)เป็นต้น (เต็ม สมิตินันทน์. 2544) นอกจากนี้ยังพบเคอร์คิวมินอยด์ได้ในพืชชนิดอื่น เช่น *C. xanthorhiza Roxb., C. wenyujin, C. sichuanensis, C. aeruginosa Roxb.* ซึ่งเป็นพืชที่ปลูกในประเทศจีน แต่ละแหล่งที่พบจะมีปริมาณเคอร์คิวมินอยด์แตกต่างกัน (Lin และคณะ. 2001)

สมุนไพรขมิ้นชันพบได้ทั่วไปในแถบเขตร้อนของทวีปเอเชีย เช่น กัมพูชา จีน อินเดีย อินโดนีเซีย ลาว มาเลเซีย เวียดนาม และประเทศที่มีการปลูกเป็นจำนวนมากคือ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย และไทยรวมทั้งประเทศในแถบแอฟริกา (WHO Geneva. 1999) ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างหลากหลายทั้งเป็นอาหารในลักษณะเครื่องเทศเพิ่มสีสัน กลิ่น และรสชาด ใช้ผสมในเครื่องสำอาง และที่สำคัญคือใช้รักษาโรคต่าง ๆ ตามแพทย์แผนโบราณมาอย่างยาวนานจนเป็นที่ยอมรับและจัดอยู่ในตำรายาของหลายประเทศ เช่น อินเดีย จีน ญี่ปุ่น เกาหลี เยอรมัน (มาตรฐานสมุนไพรไทย. 2544) ซึ่งสรรพคุณทางยาของขมิ้นชันในแต่ละประเทศอาจมีความแตกต่างกัน เช่น ในประเทศอินเดียใช้ผงขมิ้นผสมกับน้ำมะนาวพอกเพื่อรักษาอาการบาดเจ็บ บวม เคล็ดขัดยอก รักษาความผิดปกติของระบบน้ำดี แก้ไอ แก้หวัด แผลจากโรคเบาหวาน โรคข้อรูมาติซึมและไซนัสอักเสบ เป็นต้น ในประเทศจีน ใช้รักษาอาการปวดท้อง ท้องมาน ดีซ่าน (Araujo และ Leon. 2001; Amon และคณะ. 1992) ในประเทศไทยใช้รักษาอาการผอมเหลือง แก้โรคผิวหนัง แก้ท้องร่วง สมานแผล ขับลม รักษาอาการท้องอืดท้องเฟ้อ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร (สุนทรี สิงหบุตรา. 2536) มีสรรพคุณอย่างหนึ่งของขมิ้นชันที่คล้ายคลึงกันเกือบทุกประเทศคือ ช่วยบรรเทาอาการอาหารไม่ย่อย ซึ่งมีผลงานวิจัยยืนยันสรรพคุณนี้โดย Thamlikitkul และคณะ (1989) นอกจากนี้ผลของการใช้ขมิ้นชันยังไม่มีรายงานถึงความเป็นพิษต่อผู้บริโภค ดังนั้นคณะกรรมการแห่งชาติด้านยาจึงได้คัดเลือกขมิ้นชันเข้าในบัญชียาหลักแห่งชาติเพื่อรักษาอาการแน่น จุกเสียด เนื่องจากอาหารไม่ย่อย (คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. 2543)

องค์ประกอบทางเคมีในส่วนเหง้าของขมิ้นชัน ประกอบด้วยสารสำคัญ 2 กลุ่มคือ เคอร์คิวมินอยด์ และน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) โดยผงขมิ้นชันจะมีเคอร์คิวมินอยด์อยู่ประมาณ

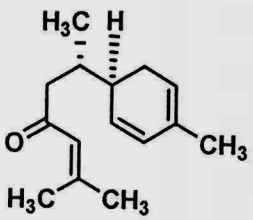
5% ลักษณะสีเหลือง-ส้มประกอบด้วยสารเคอร์คิวมิน (1) มีปริมาณมากที่สุด ส่วนดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (2) และบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (3) มีปริมาณลดลงตามลำดับ ในส่วนน้ำมันหอมระเหยมีประมาณ 6% ลักษณะสีเหลืองอ่อนสารสำคัญที่พบ เช่น α-turmerone, β-turmerone, α-zingiberene, ar-turberone เป็นต้น ดังภาพที่ 2 (WHO Geneva. 1999)



Curcumin (1): $R_1 = R_2 = OCH_3$; $R_3 = R_4 = OH$

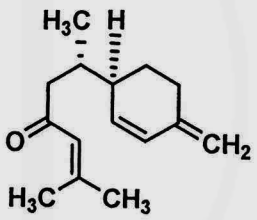
Demethoxycurcumin (2): $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = R_4 = OH$

Bisdemethoxycurcumin (3): $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = R_4 = OH$



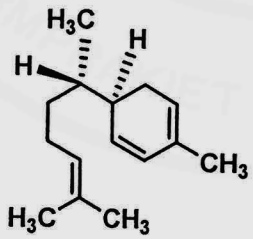
α-Turmerone

(4)



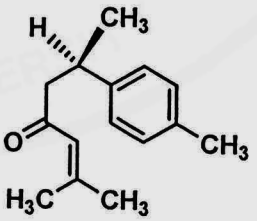
β-Turmerone

(5)



α-Zingiberene

(6)



ar-Turmerone

(7)

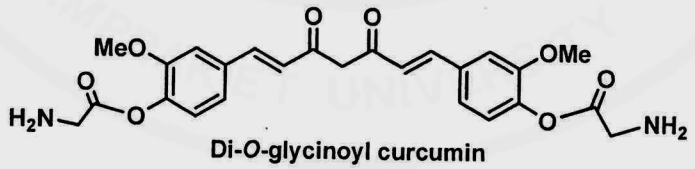
ภาพที่ 2 โครงสร้างของเคอร์คิวมินอยด์และน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าขมิ้นชัน

ในปัจจุบันขมิ้นชันเป็นพืชที่โดดเด่นมากและเป็นที่สนใจของนักวิจัยทั่วโลก เนื่องจากสารเคอร์คิวมินอยด์แสดงฤทธิ์ได้อย่างหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Ruby และคณะ. 1995; Kuo และคณะ. 1996; Gringberg และคณะ. 1996) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Ishida และคณะ. 2002; Lin

และคณะ. 2006) ฤทธิ์ต้านโปรโตซัว (Araujo และคณะ. 1999; Changtam และคณะ. 2010) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Chan และคณะ. 1995; Ali และคณะ. 1995; Chan และคณะ. 1998) และ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมา ในปี ค.ศ. 1995 Apisariyakul และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราหลายชนิดในกลุ่ม เดอร์มาโตไฟต์ (dermatophytes) โมลด์ (molds) และ ยีสต์ (yeasts) ของสาร turmeric oil และสาร curcumin ที่แยกได้จากขมิ้นชัน พบว่า สาร turmeric oil แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ทั้งสามชนิด ส่วนสาร curcumin ยับยั้งได้เฉพาะยีสต์ ต่อมาในปี ค.ศ. 1999 Nagi และคณะ ได้รายงานถึงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ของส่วนสกัดน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน พบว่าส่วนสกัดที่ได้จาก การสกัดด้วย 5% ของเอทิลอะซีเตตใน เฮกเซน สามารถยับยั้งจุลินทรีย์เหล่านี้ได้มากที่สุด

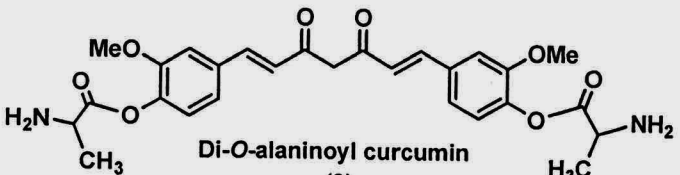
2.2 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างเคอร์คิวมินและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

Mishra และคณะ (2005) ได้ทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารเคอร์คิวมิน ให้อยู่ในรูป curcumin bioconjugates โดยการเติมหมู่กรดอะมิโน ไกลซีน (glycine) ดี-อะลานีน (D-alanine) ไพเพอรีน (piperine) และ ดี-กลูโคส (D-glucose) เข้าไปที่บริเวณหมู่ไฮดรอกซีของเคอร์คิวมิน (ดังภาพที่ 3) และได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา พบว่าแอนาลอกที่สังเคราะห์ได้เหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ดีมากกว่าสารตั้งต้นเคอร์คิวมิน และแอนาลอกบางชนิดยังให้ฤทธิ์ที่สูงกว่ายา cefeprime ซึ่งเป็นยาต้านแบคทีเรียที่ขายทั่วไปในตลาดด้วย



Di-*O*-glycinoyl curcumin

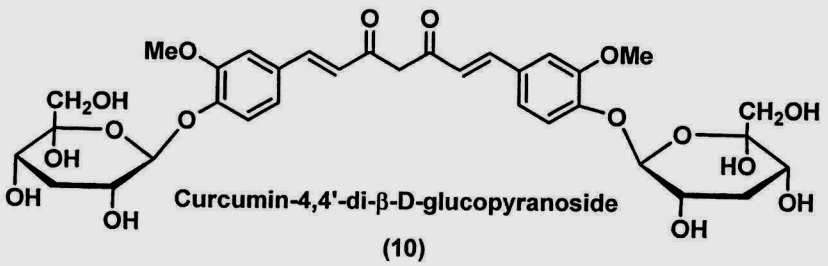
(8)



Di-*O*-alaninoyl curcumin

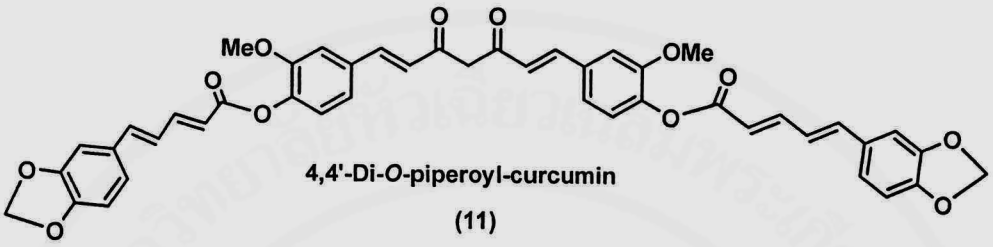
(9)

ภาพที่ 3 โครงสร้างแอนาลอกของเคอร์คิวมินที่สังเคราะห์โดย Mishra และคณะ



Curcumin-4,4'-di-β-D-glucopyranoside

(10)

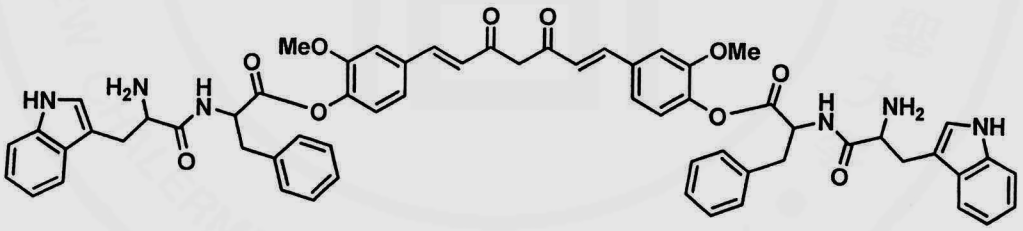


4,4'-Di-*O*-piperoyl-curcumin

(11)

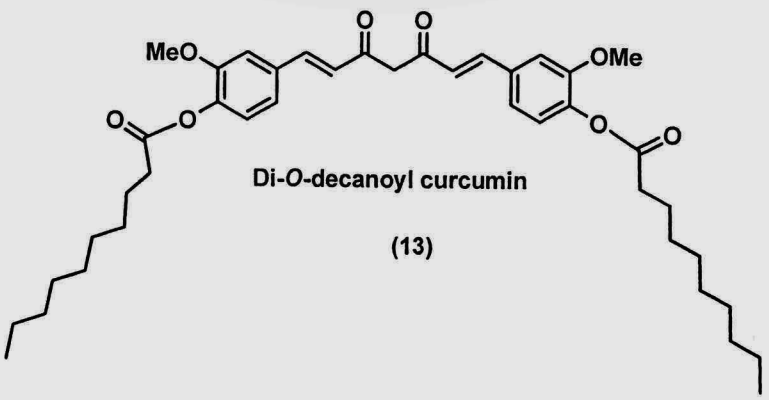
ภาพที่ 3 โครงสร้างแอนาลอกของเคอร์คิวมินที่สังเคราะห์โดย Mishra และคณะ (ต่อ)

Singh และคณะ (2010) นำเคอร์คิวมินมาทำการปรับเปลี่ยนในทำนองเดียวกับกลุ่ม Mishra โดยการเติมหมู่ไดเปปไทด์ กรดไขมัน และกรดโฟลิกเข้าไปที่บริเวณหมู่ไฮดรอกซีของเคอร์คิวมิน (ดังภาพที่ 4)



Di-*O*-tryptophanylphenylalaninecurcumin

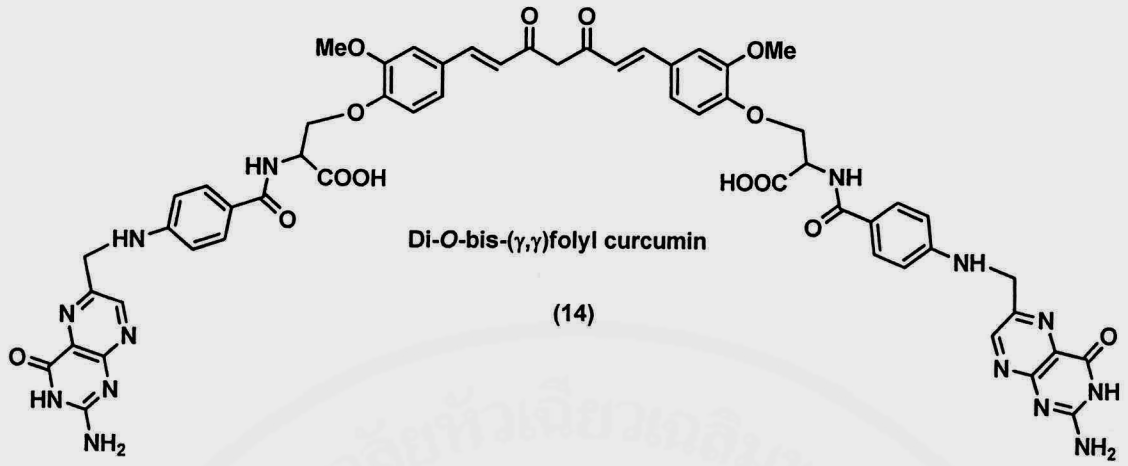
(12)



Di-*O*-decanoyl curcumin

(13)

ภาพที่ 4 โครงสร้างแอนาลอกของเคอร์คิวมินที่สังเคราะห์โดย Singh และคณะ



ภาพที่ 4 โครงสร้างแอนาลอกของเคอร์คิวมินที่สังเคราะห์โดย Singh และคณะ (ต่อ)

พบว่าแอนาลอกที่สังเคราะห์ได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ทั้ง Gram-positive และ Gram-negative ได้ดีมากกว่าสารเริ่มต้นเคอร์คิวมิน และแอนาลอกบางชนิดยังให้ฤทธิ์ที่สูงกว่ายามาตรฐาน Ampicillin trihydrate และ Gentamicin sulfate ซึ่งเป็นยาต้านแบคทีเรียที่ใช้เปรียบเทียบในการทดลอง

ส่วนประกอบที่สำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคอร์คิวมินอยด์ประกอบด้วย วงเบนซีน 2 วง ที่เชื่อมต่อกันด้วยคาร์บอน 7 คาร์บอน และมีหมู่เบต้าไดคีโตนอยู่บริเวณกลางสายโซ่คาร์บอน นอกจากนี้หมู่เมทอกซี และหมู่ไฮดรอกซีที่เกาะอยู่กับวงเบนซีนก็เป็นส่วนที่สำคัญเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามส่วนประกอบเหล่านี้จะมีความสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน เช่น พันธะคู่ที่สายโซ่คาร์บอนมีความสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็ง นั้นคือถ้าพันธะคู่ถูกรีดิวซ์เป็นพันธะเดี่ยวจะทำให้ฤทธิ์ต้านมะเร็งลดลง (Ohtsu และคณะ. 2002) ในทางตรงกันข้ามสารที่ถูกรีดิวซ์เป็นพันธะเดี่ยว เช่น เตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน (tetrahydrocurcumin) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารเคอร์คิวมิน (Somparn และคณะ. 2007) เป็นต้น

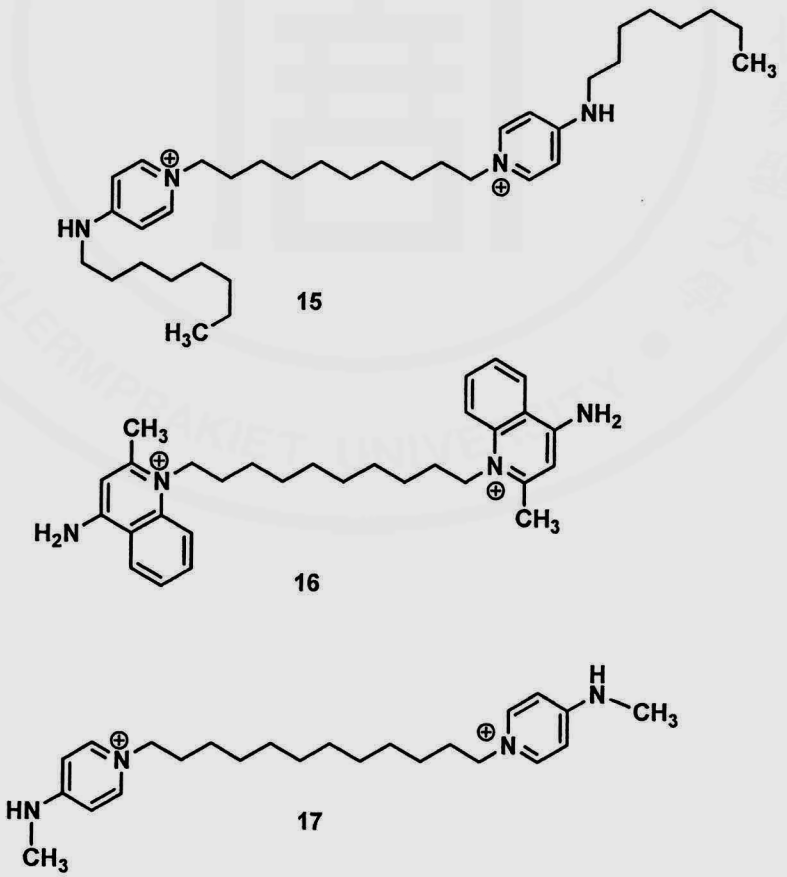
การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารเคอร์คิวมินอยด์ส่วนใหญ่เป็นการปรับเปลี่ยนสารเคอร์คิวมินที่หมู่ไฮดรอกซี ให้เป็นหมู่เอสเทอร์ต่าง ๆ คือ curcumin bioconjugates (Mishra และคณะ. 2005; Dubey และคณะ. 2008; Parvathy และคณะ. 2009; Singh และคณะ. 2010) พบว่าสารที่สังเคราะห์ได้เหล่านี้มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารเคอร์คิวมินเริ่มต้นอาจเนื่องมาจาก

(1) Curcumin bioconjugate มีความเสถียรมากกว่าสารเคอร์คิวมิน นั้นคือไม่เกิดการสลายตัวไปเป็นสารอื่นโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมเมื่ออยู่ในเซลล์หรือเกิดขึ้นได้แต่ช้า ในขณะที่สารเคอร์คิวมินจะถูกเมตาบอไลท์เป็นสารอื่นได้ง่าย

(2) ความสามารถในการละลายหรือความมีขั้ว คือ curcumin bioconjugate เป็นสารที่มีขั้วจะละลายได้ดีและถูกสะสมอยู่ในเซลล์มากขึ้น ส่วนสารเคอร์คิวมินเป็นสารที่ไม่มีขั้ว และไม่ละลายในน้ำจึงมีผลต่อการแสดงฤทธิ์ต่ำ อย่างไรก็ตาม curcumin bioconjugate บางชนิดเป็นสารที่ไม่มีขั้วเช่น สาร di-*O*-decanoylcurcumin แต่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้สูงกว่าสารเคอร์คิวมิน (Singh และคณะ. 2010) อาจเนื่องมาจากลักษณะของโครงสร้างคล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้หมู่เอสเทอร์ต่าง ๆ ทั้งกรดอะมิโน กรดไขมัน กรดโฟลิก และน้ำตาลยังเป็นส่วนสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วย

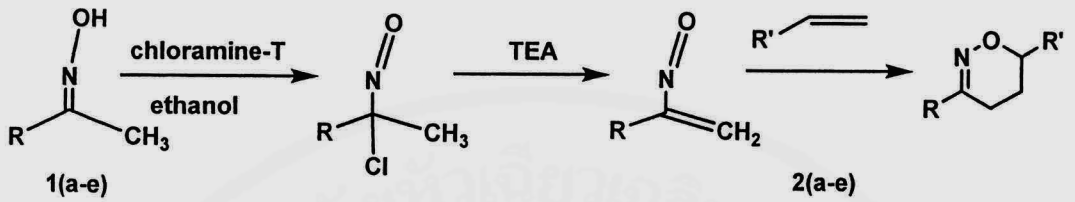
2.3 สารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

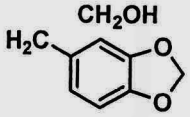
Ng และคณะ (2007) ได้สังเคราะห์สารกลุ่ม bis(pyridinium)alkanes (ดังภาพที่ 5) และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่าสารที่สังเคราะห์ได้แสดงฤทธิ์ในการต้าน *C. neoformans* มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.7 - >350 μM และ *C. albicans* มีค่า MIC อยู่ในช่วง 1.4 - 175 μM



ภาพที่ 5 โครงสร้างแอนาลอกของ bis(pyridinium)alkanes ที่สังเคราะห์โดย Ng และคณะ

Manjula และคณะ (2009) ได้สังเคราะห์สารกลุ่ม 5,6-dihydro-4H-1,2-oxazines โดยใช้ปฏิกิริยา ดีล-อัลเดอร์ (Diels-Alder reaction) ระหว่าง α-nitrosoolefins กับ alkenes ต่าง ๆ ดังภาพที่ 6

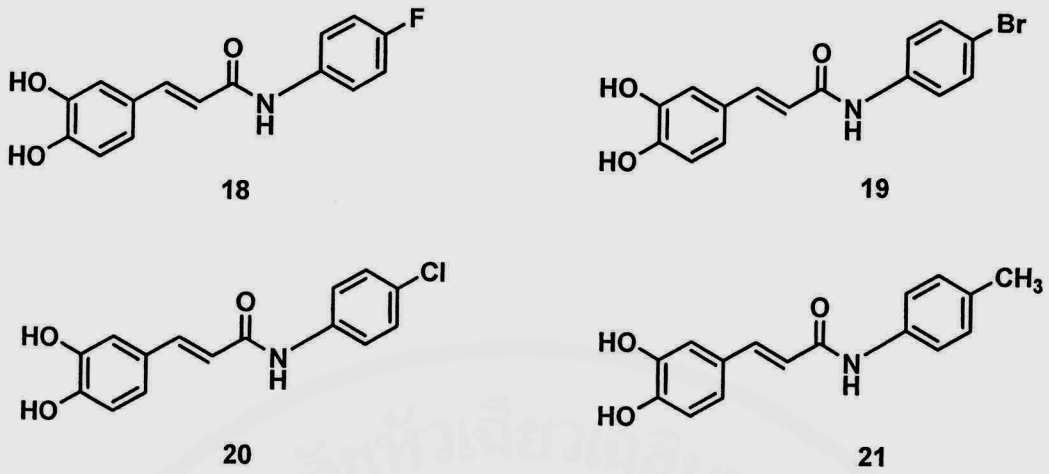


1	R	2	R'
a	p-CH_3.C_6H_4	a	CN
b	3,4-$(CH_3)_2$.C_6H_4	b	CH_2OH
c	Indan-5-yl	c	CH_2OH
d	p-(OCH_3).C_6H_4	d	
e	3,4-$(OCH_3)_2$.C_6H_3	e	CO_2Et

ภาพที่ 6 การสังเคราะห์ 5,6-dihydro-4H-1,2-oxazines โดย Manjula และคณะ

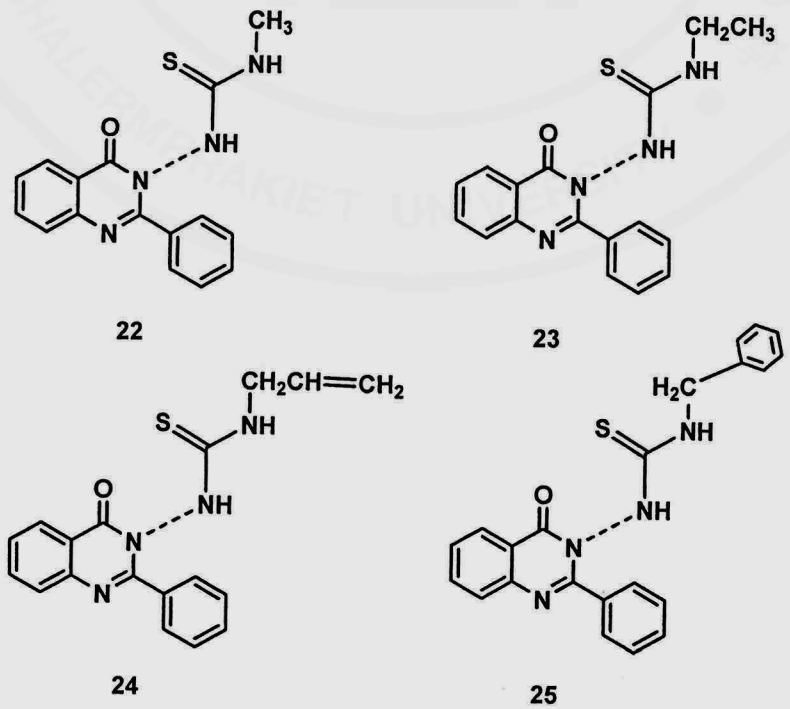
สารต่าง ๆ ที่สังเคราะห์ได้แสดงฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Klebsiella neumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* มีค่า MIC ช่วง 10 - 35 µg/ml และฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme* และ *Fusarium oxysporum* มีค่า MIC อยู่ในช่วง 10 - 40 µg/ml

Fu และคณะ (2010) ได้สังเคราะห์สารกลุ่ม caffeic acid amides และศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* และเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Candida albicans* และ *Trichophyton rubrum* สารที่สังเคราะห์ได้แสดงฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* มีค่า MIC ช่วง 1.18 - >50 µg/ml ส่วนเชื้ออื่นแสดงฤทธิ์ได้ค่อนข้างต่ำ โครงสร้างแอนาลอกบางชนิดของ caffeic acid amides แสดงดังภาพที่ 7



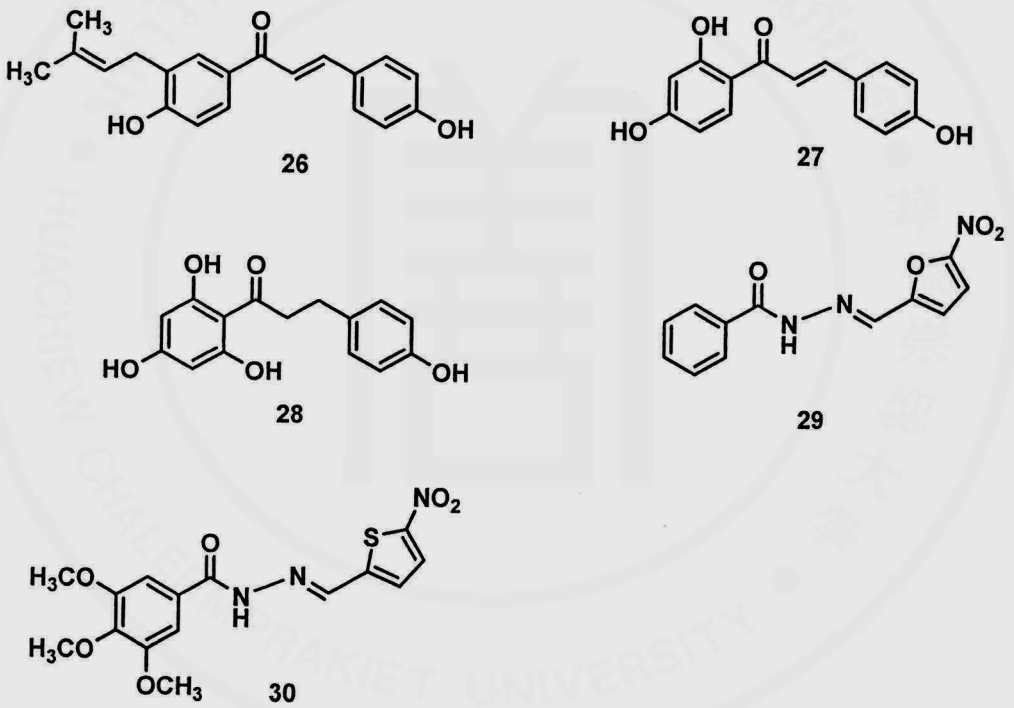
ภาพที่ 7 โครงสร้างแอนาลอกของ caffeic acid amides สังเคราะห์โดย Fu และคณะ

Kadi (2011) ได้สังเคราะห์แอนาลอก quinazolin-4(3*H*)-one และศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* และเชื้อรา *C. albicans* โดยมียา ampicillin และ clotrimazole เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบฤทธิ์ พบว่าสารบางชนิดแสดงฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น สาร 22 แสดงฤทธิ์ในการต้าน *B. subtilis*, *E. coli* และ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 12.5, 50 และ 12.5 µg/ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารที่สังเคราะห์ได้แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ต่ำกว่าสารมาตรฐาน โครงสร้างแอนาลอกบางชนิดของ quinazolin-4(3*H*)-one แสดงดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 โครงสร้างแอนาลอกของ quinazolin-4(3*H*)-one สังเคราะห์โดย Kadi

Osorio และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 และ methicillin-resistant *S. aureus* ของสารกลุ่ม chalcones, hydrazones และ oxadiazoles ทั้งหมด 65 ชนิด ซึ่งเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ พบว่ามีสารกลุ่ม chalcones 3 ชนิด (26, 27, 28) และสารกลุ่ม hydrazones 2 ชนิด (29, 30) ที่สามารถแสดงฤทธิ์ต้าน MRSA ได้ที่ MIC เท่ากับ 7.8 - >1000 µg/ml โดยมียา vancomycin เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบแสดงฤทธิ์ต้าน MRSA แต่ละสายพันธ์ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.2 - 0.8 µg/ml โครงสร้างที่มีฤทธิ์ต้าน MRSA แสดงดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 โครงสร้างที่มีฤทธิ์ต้าน MRSA สังเคราะห์โดย Osorio และคณะ

กรอบแนวคิดในการวิจัย

จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในปัจจุบันพบว่าเป็นปัญหาอย่างยิ่งและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทั่วโลก (Guzeldemirci และคณะ. 2010) เนื่องจากจุลินทรีย์เกิดการดื้อต่อยา และยาบางชนิดแสดงความเป็นพิษต่อคนไข้ด้วย เช่น ยา Amphotericin B ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อรา (Barret. 2002) ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องหายาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค ปลอดภัยต่อคนไข้ และเพื่อป้องกันการดื้อต่อยาของจุลินทรีย์ด้วย

กลุ่มผู้วิจัยได้คำนึงถึงสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติคือสารเคอร์คิวมินอยด์ ซึ่งเป็นสารที่มีอยู่ในขมิ้นชันสมุนไพรของไทย มีสรรพคุณมากมายและหาได้ง่าย ทั้งใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร ในเครื่องสำอาง และใช้เป็นยารักษาโรคต่าง ๆ ตามแบบแผนโบราณมาอย่างยาวนาน อีกทั้งสารเคอร์คิวมินอยด์ยังไม่มีรายงานถึงความเป็นพิษต่อผู้บริโภค จึงสนใจนำสารเคอร์คิวมินอยด์มาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นแอนาลอกต่าง ๆ โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่วงเบนซีนให้เป็นสารประกอบที่มีขั้วและไม่มีขั้วและบริเวณหมู่ไดคีโตที่สายโซ่คาร์บอนให้เป็นแอนาลอกที่มีวงเฮตเทอโรอะตอมอยู่ในโมเลกุล เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่อการแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ คาดว่าแอนาลอกบางชนิดที่สังเคราะห์ได้น่าจะแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเคอร์คิวมินอยด์ตั้งต้น

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometer): Bruker AVANCE 400
2. แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass spectrometer, MS): Finnigan LC-Q
3. อินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Infrared spectrophotometer, IR): Perkin-Elmer FT-IR
4. คอลัมน์ (Column)
5. แผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin layer chromatograph, TLC): Merck
6. ตู้ตรวจวัดรังสีอัลตราไวโอเลต (UV detector)
7. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Electrothermal melting point apparatus)
8. เครื่องชั่ง 4 และ 5 ตำแหน่ง
9. ปั๊มลม (Pump)
10. ขวดก้นกลม (Round bottom flask)
11. บีกเกอร์ (Beaker)
12. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
13. กรวยแยก (Separatory funnel)
14. หลอดทดลอง (Test tube)
15. แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)
16. หลอดฉีดยา (Syringe)
17. เครื่องควบแน่น (Condenser)
18. เครื่องกวน (Stirrer)
19. ขวดแก้วขนาดเล็ก (Vial)
20. หลอดหยด (Dropper)
21. Eppendorf
22. Aluminium foil

3.1.2 สารเคมี

1. สารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ผสม (Crude curcuminoid extract); Thai-China Flavours and Fragrances
2. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, CH_2Cl_2)
3. เมทานอล (Methanol, MeOH)
4. เอทิลอะซีเตต (Ethyl acetate, EtOAc)
5. เฮกเซน (Hexane)
6. พิริดีน (Pyridine)
7. 1,5- ไดโบรโมเพนเทน (1,5-Dibromopentane)
9. โบรอนไตรโบรไมด์ (Boron tribromide, BBr_3)
10. ไฮดราซีนโมโนไฮเดรต (Hydrazine monohydrate, $NH_2NH_2.H_2O$)
11. ไฮดรอกซิลามีนไฮโดรคลอไรด์ (Hydroxylamine hydrochloride, $NH_2OH.HCl$)
12. อะซีโตน (Acetone)
13. ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether)
14. ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (Dimethylformamide, DMF)
15. โพแทสเซียมคาร์บอเนต (Potassium carbonate, K_2CO_3)
16. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Sodium sulfate anhydrous, Na_2SO_4)
17. แก๊สไนโตรเจน (N_2)
18. Sulfuric acid (H_2SO_4); Merck
19. Silica gel 60 size less than 0.063 mm no.107729 (ชนิดละเอียด); Merck
20. Silica gel 60 size 0.063 – 0.200 mm no.107734 (ชนิดหยาบ); Merck
21. Deuterochloroform ($CDCl_3$); Merck
22. Deuteromethanol (CD_3OD); Merck
23. Vancomycin
24. Gentamicin
25. Amphotericin B
26. Resazurin

3.1.3 อาหารเพาะเชื้อและสารเคมี

1. Nutrient agar
2. Mueller-Hinton broth (MHB)
3. Sterile normal saline solution (NSS)

4. Sabouraud dextrose agar (SDA)

3.1.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
2. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
3. *Escherichia coli* ATCC 25922
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
5. *Candida albicans* NCPF3153
6. *Cryptococcus neoformans* ATCC90113

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 แยกสารเริ่มต้นเคอร์คิวมินอยด์และวิเคราะห์โครงสร้าง

นำสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ผสมมาจำนวน 100 g แยกสารเคอร์คิวมิน (1) ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (2) และบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (3) ออกจากกันด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. ใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดหยาบบรรจุลงในคอลัมน์สูง 15 ซม. ใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายในการเตรียมคอลัมน์และชะสารออกจากคอลัมน์จนกระทั่งได้สาร 1 ออกมาเกือบหมดจำนวน 60 g จากนั้นเปลี่ยนระบบตัวทำละลายเป็นไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยค่อย ๆ เพิ่มปริมาณเมทานอล(0.5-10%) ได้สารผสม 1, 2 และ 3 และนำสารผสมนี้มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีอีก 2 ครั้งโดยใช้ระบบตัวชะสารคล้ายเดิมได้สาร 2 จำนวน 15 g และสาร 3 จำนวน 1.5 g นำเคอร์คิวมินอยด์ที่บริสุทธิ์มาวิเคราะห์หาโครงสร้างที่แน่นอนด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) และเปรียบเทียบกับสารที่มีอยู่แล้ว

3.2.2 ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์โดยวิธีทางเคมีและวิเคราะห์โครงสร้าง

3.2.2.1 สังเคราะห์สารดีเมทิลแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์

1. สังเคราะห์สารดีเมทิลแอนาลอกของเคอร์คิวมิน

ละลายสาร 1 (850 mg) ใน dry CH_2Cl_2 90 ml คนสารละลายที่ 0-5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นค่อย ๆ เติมโบรอนไตรโบรไมด์ (BBr_3) 1 ml คนสารละลายผสมต่อไปอีกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมน้ำลงไป 20 ml สกัดด้วยเอทิลอะซีเตต 150 ml จำนวน 3 ครั้ง

และล้างส่วนสกัดชั้นอินทรีย์ด้วยน้ำ ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 นำส่วนสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกให้แห้ง แล้วนำไปแยกผลิตภัณฑ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดละเอียดและตัวชะเป็นไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (10:1) ได้สาร 31 จำนวน 240 mg (29%) และสาร 32 จำนวน 450 mg (57%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

2. สังเคราะห์สารดีเมทิลแอนาลอกของดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

นำสาร 2 มาทำปฏิกิริยาดีเมทิเลชันในทำนองเดียวกันกับสาร 1 ได้สาร 33 (46%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3.2.2.2 สังเคราะห์ไอซอกซาโซลแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์

1. สังเคราะห์ไอซอกซาโซลแอนาลอกของเคอร์คิวมิน

ละลายสาร 1 (300 mg) ในพิริดีน 6 ml แล้วเติมไฮดรอกซิลามีนไฮโดรคลอไรด์ 250 mg คนสารละลายผสมที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำลงไป 10 ml สกัดด้วยเอทิลอะซีเตต 100 ml จำนวน 3 ครั้ง และล้างส่วนสกัดชั้นอินทรีย์ด้วยน้ำ ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 นำส่วนสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกให้แห้ง แล้วนำไปแยกผลิตภัณฑ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับเป็น ซิลิกาเจลชนิดละเอียดและตัวชะเป็น ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (100:1.5) ได้สาร 34 จำนวน 238 mg (80%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

2. สังเคราะห์ไอซอกซาโซลแอนาลอกของดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

นำสาร 2 มาทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ในทำนองเดียวกันกับสาร 1 ได้สารผสมไอโซเมอร์ของ demethoxycurcumin isoxazole (35a+35b, 72%) นำสารผสมที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3. สังเคราะห์ไอซอกซาโซลแอนาลอกของบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

นำสาร 3 มาทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ในทำนองเดียวกันกับสาร 1 ได้สาร 36 (65%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3.2.2.3 สังเคราะห์สารอัลคิลแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์

1. สังเคราะห์ไดโบรโมเพนทิลเคอร์คิวมิน

ละลายสาร 1 (500 mg) ด้วย dimethylformamide 6 ml เติม anhydrous K_2CO_3 (300 mg) แล้วเติม 1,5-dibromopentane (0.6 ml) นำสารละลายผสมไปคนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำลงไป 20 ml จากนั้นสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 100 mg ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง นำส่วนสกัดที่ได้มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวชะไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (250:2) ได้สาร 37 จำนวน 200 mg (28%) และสาร 38 จำนวน 450 mg (50%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

2. สังเคราะห์ไดโบรโมเพนทิลดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

นำสาร 2 (600 mg) มาละลายด้วยอะซีโตน 7 ml เติม 1,5-dibromopentane 1.5 ml นำไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำลงไป 20 ml จากนั้นสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 100 ml ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง นำส่วนสกัดที่ได้มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวชะไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (250:2) ได้สาร 39 จำนวน 150 mg (17%) สาร 40 170 mg (20%) และสาร 41 จำนวน 400 mg (36%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3. สังเคราะห์ไดโบรโมเพนทิลบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

ละลายสาร 3 (200 mg) ด้วยอะซีโตน 5 ml เติม K_2CO_3 100 mg เติม 1,5-dibromopentane 0.5 ml นำไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำ 20 ml สกัดด้วยเอทิลอะซีเตตจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 100 ml ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง นำส่วนสกัดที่ได้มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ตัวชะไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (100:1) ได้สาร 42 จำนวน 40 mg (13%) และสาร 43 จำนวน 130 mg (33%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3.2.2.4 สังเคราะห์แอนาลอกเคอร์คิวมินอยด์ทีมีความมีขั้วสูง

1. สังเคราะห์พิริดิเนียมแอนาลอกของเคอร์คิวมิน

ละลายสาร 38 (200 mg) ด้วยพิริดีน 3.5 ml นำสารละลายผสมมารีฟลักซ์ภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 1.5 วัน นำสารละลายออกมาวางให้เย็นแล้วเติม ไดเอทิล

อีเทอร์ 20 ml แล้วแช่น้ำแข็ง จากนั้นกรองผลึกและล้างด้วยไดเอทิลอีเทอร์และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ตกผลึกซ้ำด้วย เมทานอล-ไดเอทิลอีเทอร์ หลาย ๆ ครั้งได้สาร 44 จำนวน 180 mg (90%) นำสารที่ได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

2. สังเคราะห์พิริดิเนียมแอนาลอกของดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

ละลายสาร 41 (100 mg) ด้วยพิริดีน 2.5 ml นำสารละลายผสมมารีฟลักซ์ภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 1 วัน นำสารละลายออกมาวางให้เย็นแล้วแช่น้ำแข็งกรองผลึกและตกผลึกซ้ำด้วย เมทานอล-ไดเอทิลอีเทอร์ หลาย ๆ ครั้งได้สาร 45 จำนวน 115 mg (91%) นำสารที่ได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3. สังเคราะห์พิริดิเนียมแอนาลอกของบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

ละลายสาร 43 (70 mg) ด้วยพิริดีน 2.0 ml นำสารละลายผสมมา รีฟลักซ์ภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 10 ชั่วโมง นำสารละลายออกมาวางให้เย็นแล้วแช่น้ำแข็ง กรองผลึกและตกผลึกซ้ำด้วย เมทานอล-ไดเอทิลอีเทอร์ หลาย ๆ ครั้งได้สาร 46 จำนวน 65 mg (71%) นำสารที่ได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

3.2.3.1 การเตรียมยามาตรฐาน

ชั่งยามาตรฐานด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยา vancomycin และ gentamicin และ amphotericin B เตรียมที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 mg/ml หลังจากนั้นละลายยาโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ยาที่ละลายแล้วเก็บใส่หลอด Eppendorf ไว้เป็น stock solution ที่อุณภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

ละลายสารตัวอย่างด้วย dimethylsulfoxide ให้ได้ความเข้มข้น 10 mg/ml เก็บเป็น stock solution ที่อุณภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3.3 การเตรียมสี Resazurin

เตรียม 1.8 % resazurin โดยใช้น้ำกลั่นในการละลายและกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 μm เก็บไว้ในหลอด Eppendorf ห่อด้วย aluminium foil เพื่อป้องกันแสง เก็บเป็น stock solution ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลาจะใช้นำมาเจือจาง 1:20 ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

3.2.3.4 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการทดสอบ

แบคทีเรีย

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (SK1)
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

ยีสต์

- *Candida albicans* NCPF 3153
- *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมา streak บนอาหาร nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ มา 3-5 โคโลนี ลงใน nutrient broth (NB) จากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความขุ่นโดยใช้ 0.85% sterile normal saline solution (NSS) ให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard และเจือจาง 1:200 ด้วย Mueller-Hinton broth (MHB)

การเตรียมเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ที่ต้องการทดสอบมา streak บน Sabouraud dextrose agar (SDA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. neoformans* แล้วใช้ loop เขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆมา 3-5 โคโลนี ลงใน Sabouraud dextrose broth (SDB) จากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความขุ่นโดยใช้ 0.85% sterile NSS ให้ได้เท่ากับ 2 McFarland standard และเจือจาง 1:20 ด้วย SDB

3.2.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นที่ความเข้มข้น 200 µg/ml

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (ดัดแปลงจาก CLSI M7-A4. 2002a)

นำสารตัวอย่างความเข้มข้น 10 mg/ml มาเจือจางด้วยอาหาร MHB ในอัตราส่วน 1:25 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 400 µg/ml ดูดสารปริมาตร 50 µl ใส่ใน 96 well plate สารละ 3 หลุม นำเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard และเจือจางด้วย MHB ในอัตราส่วน 1:200 แล้วดูดมา 50 µl ใส่ลงในหลุมที่มีสารตัวอย่าง ทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นเท่ากับ 200 µg/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง หยดสี resazurin (0.09%) 20 µl ใส่ในแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มต่อ 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ (Sarker และคณะ. 2007)

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของยาต้านแบคทีเรียควบคู่กับสารตัวอย่างทุกครั้งโดยใช้ยา vancomycin สำหรับเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ใช้ยา gentamicin สำหรับเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ (ดัดแปลงจาก CLSI M27-A2. 2002b)

ทำการทดสอบในทำนองเดียวกันกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย แต่ใช้อาหาร SDB ในการทดสอบ และใช้เชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. albicans* และ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. neoformans* จากนั้นทำการหยอดสี resazurin (0.09%) 20 µl ใส่ในแต่ละหลุม บ่มต่อ 2-3 ชั่วโมงสำหรับ *C. albicans* และ 24 ชั่วโมงสำหรับ *C. neoformans*

ทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์ของยาต้านยีสต์ควบคู่กับสารตัวอย่างทุกครั้งโดยใช้ยา amphotericin B ทดสอบกับยีสต์ทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml

การอ่านผลแบคทีเรียและยีสต์

สังเกตการยับยั้งเชื้อจากการเปลี่ยนแปลงของสี resazurin ในอาหารเลี้ยงเชื้อและบันทึกผลดังนี้

\+ มีการยับยั้ง อาหารเลี้ยงเชื้อยังคงเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วงหลังจากการบ่ม

\- ไม่มีการยับยั้ง อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพูหลังจากการบ่ม

นำสารสกัดที่ให้ผลบวกทั้งหมด ไปหาค่า MIC, MBC และ MFC ต่อไป

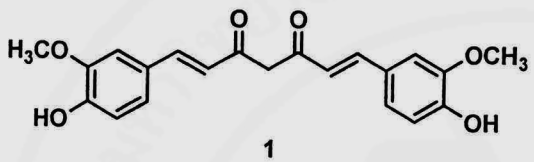
3.2.3.6. **การหาค่า** minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) **และ** minimum fungicidal concentrations (MFC) **ของสารตัวอย่าง**

ทำการทดสอบใน 96 well plate โดยใช้สารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.25-128 µg/ml ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ เช่นเดียวกับการทดสอบเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 200 µg/ml การอ่านค่า MIC จะอ่านที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (สีน้ำเงิน/ม่วง) และนำสารหลุมที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ทุกหลุมมา streak บนอาหาร NA สำหรับแบคทีเรีย และบนอาหาร SDA สำหรับยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ *C. albicans* บ่มที่อุณหภูมิห้อง สำหรับ *C. neoformans* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการอ่านค่า MBC (แบคทีเรีย) และ MFC (ยีสต์) ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (ไม่มีเชื้อขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ)

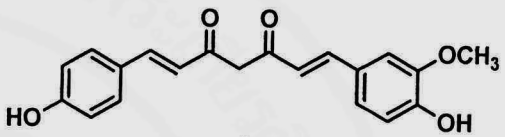
บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 แยกสารเริ่มต้นเคอร์คิวมินอยด์และวิเคราะห์โครงสร้าง

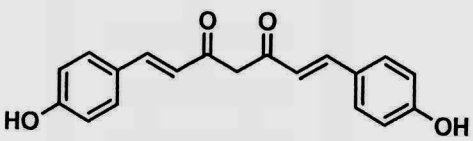
นำเคอร์คิวมินอยด์ที่บริสุทธิ์มาวิเคราะห์หาโครงสร้างที่แน่นอนด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมตรี (Mass spectrometry) และเปรียบเทียบกับสารที่มีอยู่แล้ว



1



2



3

สารเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิดมีข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีดังนี้

Curcumin (1)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 3.93 (s, 6H, 2 x OCH_3), 5.78 (s, 1H, H-4), 5.85 (br s, 2H, 2 x OH), 6.47 (d, *J* = 15.7 Hz, 2H, H-2 และ H-6), 6.91 (br d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-5' และ H-5"), 7.03 (br s, 2H, H-2' และ H-2"), 7.10 (br d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-6' และ H-6"), 7.57 (d, *J* = 15.7 Hz, 2H, H-1 และ H-7)

ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 369 $[M + H]^+$ (100)

Demethoxycurcumin (2)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$ + 4 drops of CD_3OD): δ 3.89 (s, 3H, OCH_3), 5.74 (s, 1H, H-4), 6.42 และ 6.43 (each d, *J* = 15.8 Hz, 2H, H-2 และ H-6), 6.80 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-3' และ H-5'), 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-5"), 7.01 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H-2"), 7.06 (dd, *J* = 8.2, 1.7, Hz, 1H, H-6"), 7.39 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-2' และ H-6'), 7.52 และ 7.54 (each d, *J* = 15.8 Hz, 2H, H-1 และ H-7)

ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 339 $[M + H]^+$ (100)

Bisdemethoxycurcumin (3)

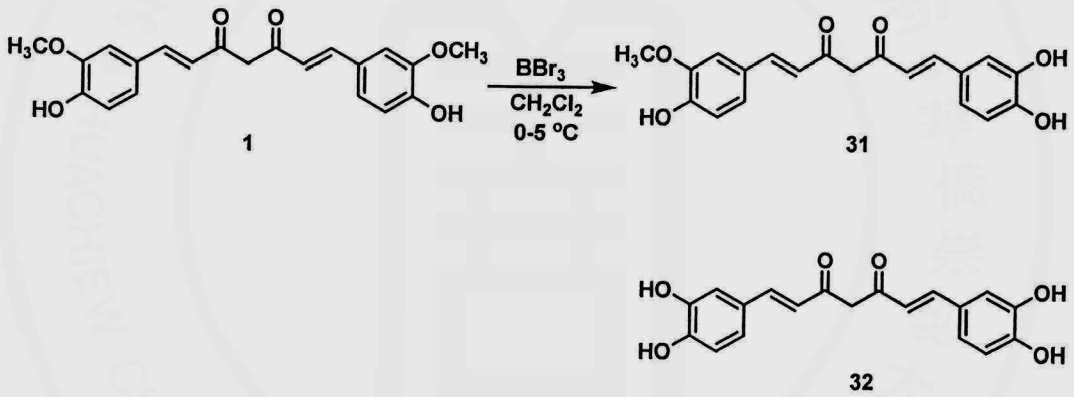
^{1}H-NMR ($CDCl_3$ + 6 drops of CD_3OD): δ 6.41 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H, H-2 และ H-6), 6.79 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H, H-3', H-5', H-3", H-5"), 7.39 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H, H-2', H-6', H-2", H-6"), 7.53 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H, H-1 และ H-7)

ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 309 $[M + H]^+$ (100)

4.2 ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์โดยวิธีทางเคมีและวิเคราะห์โครงสร้าง

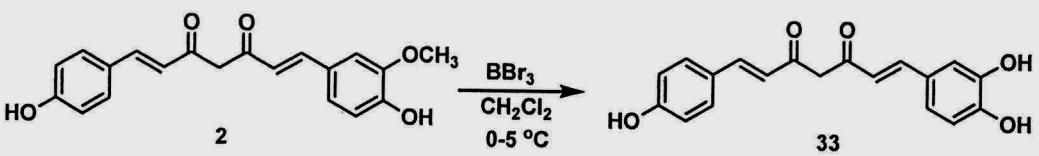
4.2.1 สังเคราะห์สารดีเมทิลแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์

1. สังเคราะห์สารดีเมทิลแอนาลอกของเคอร์คิวมิน



เมื่อนำเคอร์คิวมิน (1) 850 mg มาทำปฏิกิริยาดีเมทิเลชันได้ mono-*O*-demethylcurcumin (31) 240 mg (29%) และ di-*O*-demethylcurcumin (32) 450 mg (55%) และวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยการหาข้อมูลทางโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปีและแมสสเปกโตรเมตรีได้โครงสร้างที่สอดคล้องกับสาร 31 และ 32 และสอดคล้องกับที่เคยรายงานแล้ว (Venkateswarlu และคณะ. 2005)

2. สังเคราะห์สารดีเมทิลแอนาลอกของดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

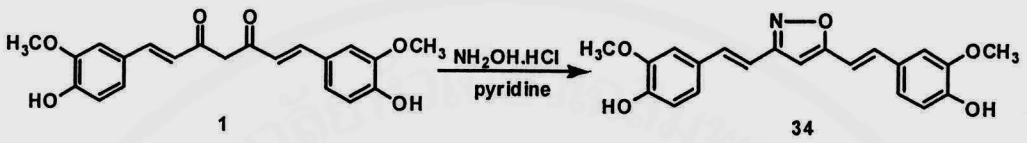


เมื่อนำดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (2) มาทำปฏิกิริยาดีเมทิเลชันในทำนองเดียวกันกับสาร 1 ได้ผลิตภัณฑ์เป็น *O*-demethyldemethoxycurcumin (33, 46%) และวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยการหา

ข้อมูลทางโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปีและแมสสเปกโตรเมตรีได้โครงสร้างที่สอดคล้องกับสาร 33 และสอดคล้องกับที่เคยรายงานแล้ว (Venkateswarlu และคณะ. 2005)

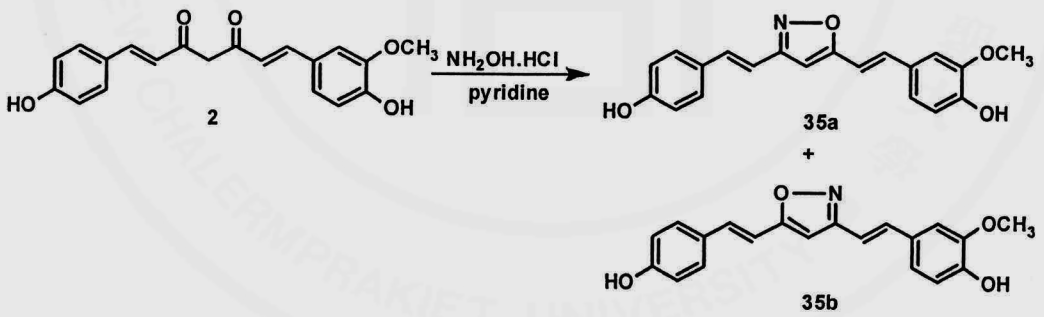
4.2.2 สังเคราะห์สารแอนาลอกที่มีวงเฮตเทอโรไซคลิกอยู่ในโมเลกุล

1. สังเคราะห์ไอซอกซาโซลแอนาลอกของเคอร์คิวมิน



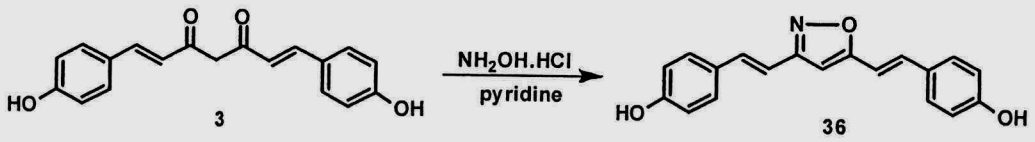
เมื่อนำเคอร์คิวมิน (1) 300 mg มาทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซิลามีนไฮโดรคลอไรด์ จะได้สาร curcumin isoxazole (34) 238 mg (80%) และวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยการหาข้อมูลทางโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปีและแมสสเปกโตรเมตรีได้โครงสร้างที่สอดคล้องกับสาร 34 และสอดคล้องกับที่เคยรายงานแล้ว (Mishra และคณะ. 2008)

2. สังเคราะห์ไอซอกซาโซลแอนาลอกของดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน



เมื่อนำสาร 2 มาทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ในทำนองเดียวกันกับสาร 1 ได้สารผสมไอโซเมอร์ของ demethoxycurcumin isoxazole (35a+35b, 72%) และวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยการหาข้อมูลทางโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปีและแมสสเปกโตรเมตรีได้โครงสร้างที่สอดคล้องกับสารผสม 35a และ 35b และสอดคล้องกับที่เคยรายงานแล้ว (Changtam และคณะ. 2010b)

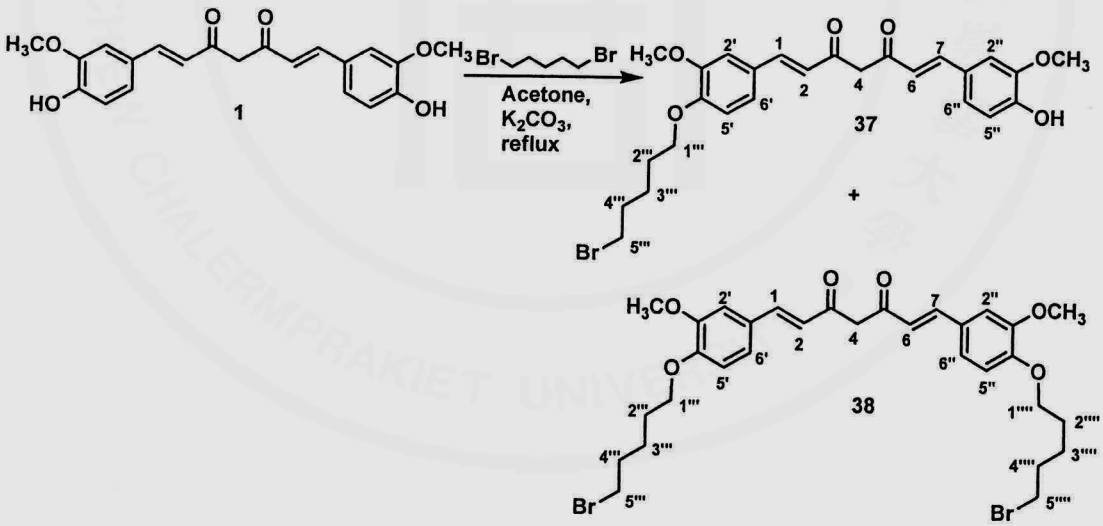
3. สังเคราะห์ไอซอกซาโซลแอนาลอกของบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน



เมื่อนำสาร 3 มาทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ในทำนองเดียวกันกับสาร 1 ได้สาร bisdemethoxycurcumin isoxazole (36, 65%) และวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยการหาข้อมูลทางโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปีและแมสสเปกโตรเมตรีได้โครงสร้างที่สอดคล้องกับสาร 36 และสอดคล้องกับที่เคยรายงานแล้ว (Changtam และคณะ. 2010b)

4.2.3 สังเคราะห์สารอัลคิลแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์

1. สังเคราะห์ไดโบรโมเพนทิลเคอร์คิวมิน



เมื่อนำเคอร์คิวมิน (1) 500 mg มาทำปฏิกิริยาไดโบรโมเพนทิเลชันจะได้ mono-*O*-(5-bromopentyl)curumin (37) 200 mg (28%) และ di-*O*-(5-bromopentyl)curumin (38) 450 mg (50%) สารทั้งสองชนิดมีข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีดังนี้

Mono-*O*-(5-bromopentyl)curcumin (**37**): Brow foam

IR: ν_{max} 3399, 2935, 2860, 1625, 1582, 1511, 1463, 1425, 1263, 1134, 1031, 965, 844, 807 cm^{-1}

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 1.60 (m, 2H, H-3‴), 1.85 และ 1.91 (each m, 4H, H-2‴, H-4‴), 3.41 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-5‴), 3.87 และ 3.89 (each s, 6H, 2 x OCH_3), 4.02 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-1‴), 5.77 (s, 1H, H-4), 6.45 (d, *J* = 15.0 Hz, 2H, H-2 และ H-6), 6.82 และ 6.89 (each d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-5' และ H-5"), 7.00 และ 7.03 (each s, 2H, H-2' และ H-2"), 7.08 (d, 7.4 Hz, 2H, H-6' และ H-6"), 7.55 (d, *J* = 15.0 Hz, 2H, H-1 และ H-7)

ESMS (-ve): *m/z* (% rel. abund.) 516 $[M-H]^-$ (100)

Di-*O*-(5-bromopentyl)curcumin (**38**): Yellow amorphous

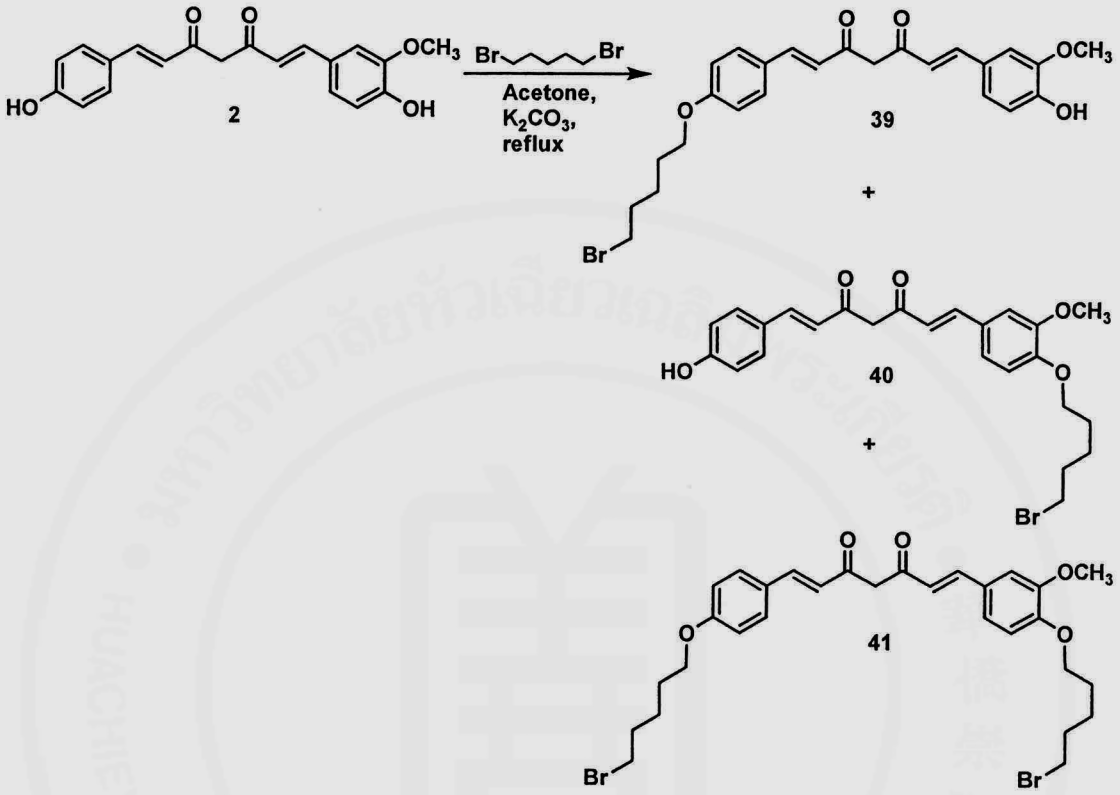
Mp. 116-117 °C

IR: ν_{max} 2946, 2866, 1620, 1595, 1579, 1510, 1467, 1421, 1338, 1264, 1229, 1131, 1030, 968, 850, 794 cm^{-1}

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 1.62 (m, 4H, H-3‴ และ H-3⁗), 1.87 และ 1.93 (each m, 8H, H-2‴, H-4‴, H-2⁗, H-4⁗), 3.42 (t, 6.6 Hz, 4H, H-5‴ และ H-5⁗), 3.89 (s, 6H, 2 x OCH_3), 4.04 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H, H-1‴ และ H-1⁗), 5.79 (s, 1H, H-4), 6.47 (d, *J* = 15.5 Hz, 2H, H-2 และ H-6), 6.84 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-5' และ H-5"), 7.05 (br s, 2H, H-2' และ H-2"), 7.10 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-6' และ H-6"), 7.58 (d, *J* = 15.5 Hz, 2H, H-1 และ H-7)

ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 667 $[M + H]^+$ (100)

2. สังเคราะห์ไดโบรโมเพนทิลดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน



เมื่อนำสาร 2 มาทำปฏิกิริยาไดโบรโมเพนทิเลชันทำนองเดียวกันกับสาร 1 จะได้ mono-*O*'-(5-bromopentyl)demethoxycurcumin (**39**) 150 mg (17%) mono-*O*''-(5-bromopentyl) demethoxycurcumin (**40**) 170 mg (20%) และ di-*O*-(5-bromopentyl)demethoxycurcumin (**41**) 400 mg (36%) สารทั้งสามชนิดมีข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีดังนี้

Mono-*O*'-(5-bromopentyl)demethoxycurcumin (**39**): Orange amorphous solid

Mp. 155-157 °C

IR: ν_{max} 3406, 2943, 2866, 1625, 1601, 1571, 1510, 1424, 1258, 1171, 1146, 1030, 969, 826, 809, 732 cm^{-1}

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 1.61 (m, 2H, H-3'''), 1.81 และ 1.92 (each m, 4H, H-2''', H-4'''), 3.42 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-5'''), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 3.98 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-1'''), 5.76 (s, 1H, H-4), 6.45 และ 6.47 (each d, *J* = 15.7 Hz, 2H, H-2 และ H-6), 6.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-3' และ H-5'), 6.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-5''), 7.03 (s, 1H, H-2''), 7.10 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-6''),

7.48 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-2' และ H-6'), 7.56 และ 7.58 (each d, *J* = 15.7 Hz, 2H, H-1 และ H-7)

ESMS (-ve): *m/z* (% rel. abund.) 486 $[M - H]^-$ (100).

Mono-*O*''-(5-bromopentyl)demethoxycurcumin (**40**): Orange amorphous solid

Mp. 158-159 °C

IR: ν_{max} 3364, 2941, 2866, 1623, 1599, 1578, 1511, 1463, 1425, 1263, 1171, 1135, 1031, 966, 841 cm^{-1}

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 1.61 (m, 2H, H-3'''), 1.87 และ 1.93 (each m, 4H, H-2''', H-4'''), 3.42 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-5'''), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 4.04 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-1'''), 5.77 (s, 1H, H-4), 6.47 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H, H-2 และ H-6), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3' และ H-5'), 6.84 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-5''), 7.06 (s, 1H, H-2''), 7.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-6''), 7.44 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-2' และ H-6'), 7.58 และ 7.59 (each d, *J* = 15.8 Hz, 2H, H-1 และ H-7)

ESMS (-ve): *m/z* (% rel. abund.) 486 $[M - H]^-$ (100)

Di-*O*-(5-bromopentyl)demethoxycurcumin (**41**): Yellow amorphous solid

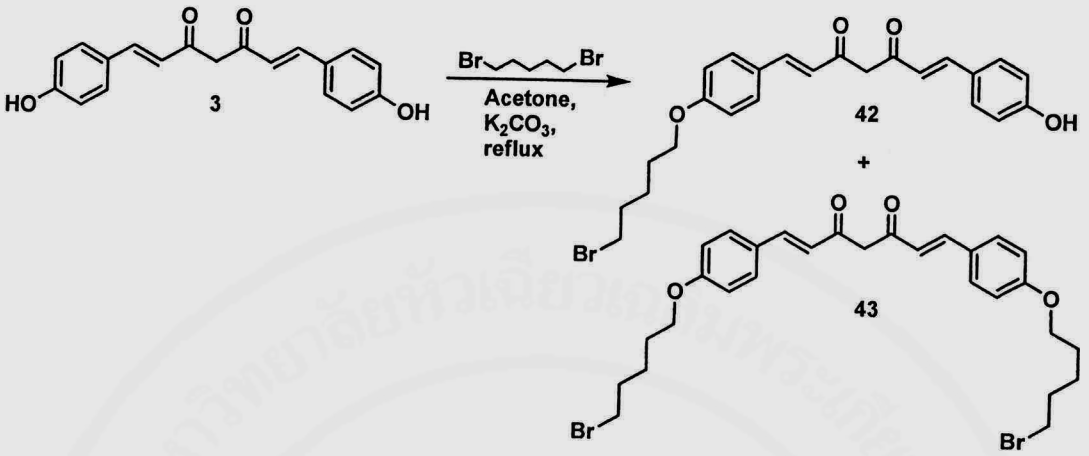
Mp. 116-118 °C

IR: ν_{max} 2947, 2868, 1620, 1603, 1575, 1520, 1414, 1346, 1280, 1261, 1176, 1132, 1032, 975, 847, 830 cm^{-1}

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 1.61 (m, 4H, H-3''' และ H-3''''), 1.77- 1.96 (m, 8H, H-2''', H-4''', H-2'''', H-4''''), 3.42 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H, H-5''' และ H-5''''), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 3.89 และ 4.04 (each t, *J* = 6.2 Hz, 4H, H-1''' และ H-1''''), 5.77 (s, 1H, H-4), 6.47 (d, *J* = 15.5 Hz, 2H, H-2 และ H-6), 6.84 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-5''), 6.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-3' และ H-5'), 7.05 (s, 1H, H-2''), 7.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-6''), 7.47 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-2' และ H-6'), 7.59 (d, *J* = 15.5 Hz, 2H, H-1 และ H-7)

ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 637 $[M+H]^+$ (100)

3. สังเคราะห์ไดโบรโมเพนทิลบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน



เมื่อนำสาร 3 มาทำปฏิกิริยาไดโบรโมเพนทิเลชันทำนองเดียวกันกับสาร 1 จะได้ mono-*O*-(5-bromopentyl)bisdemethoxycurcumin (**42**) 40 mg (13%) และ di-*O*-(5-bromopentyl)bis-demethoxycurcumin (**43**) 130 mg (33%) สารทั้งสองชนิดมีข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีดังนี้

Mono-*O*-(5-bromopentyl)bisdemethoxycurcumin (**42**): Orange amorphous solid

^{1}H-NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD 3 drops): δ 1.59 (m, 2H, H-3'''), 1.79 (m, 2H, H-2'''), 1.90 (m, 2H, H-4'''), 3.40 (m, 2H, H-5'''), 3.97 (m, 2H, H-1'''), 5.73 (s, 1H, H-4), 6.43 และ 6.45 (each d, *J* = 15.0 Hz, 2H, H-2 และ H-6), 6.80 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-3'และ H-5'), 6.86 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-3'' และ H-5''), 7.40 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-2' และ H-6'), 7.46 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-2'' และ H-6''), 7.56 (br d, *J* = 15.0 Hz, 2H, H-1 และ H-7)

ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 457 $[M+H]^+$ (100)

Di-*O*-(5-bromopentyl)bisdemethoxycurcumin (**43**): Yellow amorphous solid

Mp. 129-130 °C

IR: ν_{max} 2945, 2867, 1616, 1600, 1571, 1509, 1473, 1422, 1308, 1246, 1172, 1128, 1036, 959, 829, 731 cm^{-1}

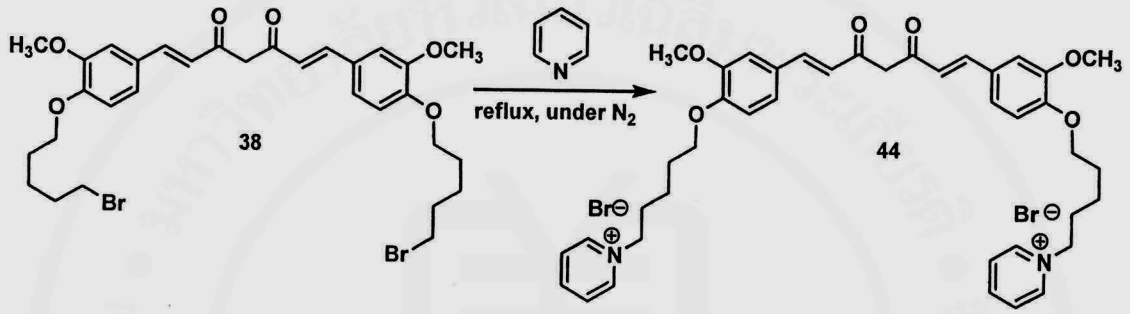
^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 1.62 (m, 4H, H-3''', H-3''''), 1.81 (quint, *J* = 6.7 Hz, 4H, H-2''', H-2''''), 1.92 (quint, *J* = 6.2 Hz, 4H, H-4''' และ H-4''''), 3.42 (t, *J* = 6.7 Hz, 4H, H-2''' และ H-2''''), 3.98 (t, *J* = 6.2 Hz, 4H, H-1''' และ H-1''''), 5.75 (s, 1H, H-4), 6.47 (d, *J* = 15.7 Hz, 2H, H-2 และ H-

6), 6.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H, H-3', H-5', H-3" และ H-5"), 7.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H, H-2', H-6', H-2" และ H-6"), 7.59 (d, *J* = 15.7 Hz, 2H, H-1 และ H-7)

ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 607 $[M + H]^+$ (100)

4.2.4 สังเคราะห์สารทีมีความมีขั้วสูง

1. สังเคราะห์พิริดิเนียมแอนาลอกของเคอร์คิวมิน



เมื่อนำสาร 38 (200 mg) มาทำปฏิกิริยากับพิริดีนจะได้พิริดิเนียมแอนาลอกของเคอร์คิวมิน 44 (180 mg, 90%) ซึ่งมีข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีดังนี้

Bispentylpyridiniumcurcumin (44); orange amorphous solid

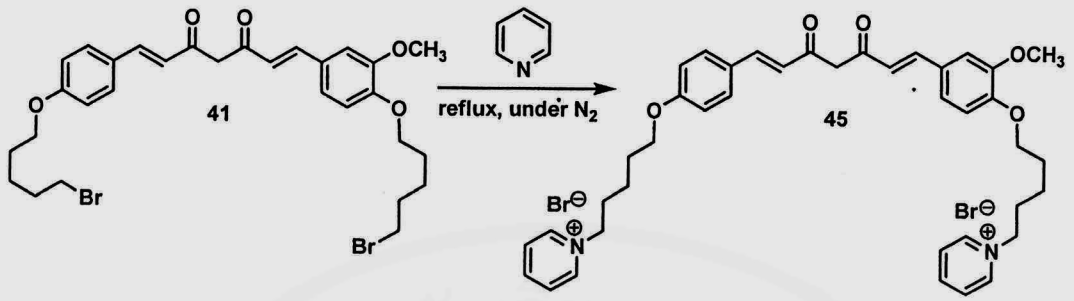
Mp. 215-217 °C

IR: ν_{max} 3418, 3053, 2945, 2859, 1622, 1580, 1509, 1468, 1423, 1309, 1262, 1233, 1138, 1030, 1002, 822, 778, 690 cm^{-1}

^{1}H-NMR (CD_3OD+ $CDCl_3$ 12 drops): δ 1.60 (m, 4H, H-3''' และ H-3''''), 1.90 (quint, *J* = 6.7 Hz 4H, H-4''' และ H-4''''), 2.13 (quint, *J* = 7.3 Hz, 4H, H-2''', H-2''''), 3.87 (s, 6H, 2 x OCH_3), 4.07 (t, *J* = 5.8 Hz, 4H, H-5''' และ H-5''''), 4.68 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H, H-1''' และ H-1''''), 6.65 (d, *J* = 15.4 Hz, 2H, H-2 และ H-6), 6.94 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-5' and H-5"), 7.17 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-6' และ H-6"), 7.58 (d, *J* = 15.4 Hz, 2H, H-1 และ H-7), 7.81 (s, 2H, H-2' และ H-2"), 8.10 และ 8.12 (each d, *J* = 6.6 Hz, 4H, m-ArH x 2), 8.59 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, p-ArH x 2), 9.01 (d, *J* = 6.6 Hz, 4H, o-ArH x 2)

ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 332 $[M\text{-}2Br^-]^{2+}$ (100)

2. สังเคราะห์พิริดิเนียมแอนาลอกของดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน



เมื่อนำสาร 41 (100 mg) มาทำปฏิกิริยากับพิริดีนทำนองเดียวกันกับสาร 1 จะได้พิริดิเนียมแอนาลอกของดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน 45 (115 mg, 91%) ซึ่งมีข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีดังนี้

Bispentylpyridiniumdemethoxycurcumin (45); orange amorphous solid

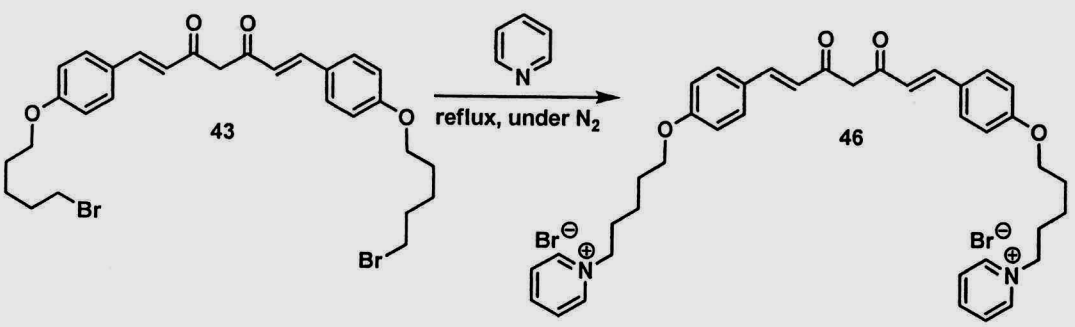
Mp. 155-156 °C

IR: ν_{max} 3418, 3124, 2943, 2868, 1620, 1597, 1509, 1469, 1422, 1261, 1175, 1131, 988, 836, 777, 684 cm^{-1}

^{1}H-NMR (CD_3OD): δ 1.60 (m, 4H, H-3''' และ H-3''''), 1.88 (m, 4H, H-4''' และ H-4''''), 2.12 (m, 4H, H-2''' และ H-2''''), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 4.05 (m, 4H, H-5''' และ H-5''''), 4.69 (m, 4H, H-1''' และ H-1''''), 6.68 (m, 2H, H-2 และ H-6), 6.94 (m, 3H, H-3', H-5', H-5''), 7.24 (m, 2H, H-2'' และ H-6''), 7.58 (m, 4H, H-2', H-6', H-1, H-7), 8.12 (m, 4H, m-ArH), 8.60 (m, 2H, p-ArH), 9.03 (m, 4H, o-ArH)

ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 317 $[M-2Br^-]^{2+}$ (100)

3. สังเคราะห์พิริดิเนียมแอนาลอกของบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน



เมื่อนำสาร 43 (70 mg) มาทำปฏิกิริยากับพิริดีนทำนองเดียวกันกับสาร 1 จะได้พิริดิเนียมแอนาลอกของบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน 46 (65 mg, 71 %) ซึ่งมีข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีดังนี้

Bispentylpyridiniumbisdemethoxycurcumin (46); yellow amorphous solid

Mp. 178-180 °C

IR: ν_{max} 3400, 3041, 2943, 2869, 1617, 1597, 1568, 1508, 1485, 1471, 1421, 1311, 1249, 1173, 1125, 989, 835, 776, 681 cm^{-1}

^{1}H-NMR (CD_3OD): δ 1.59 (m, 4H, H-3''' และ H-3''''), 1.88 (m, 4H, H-4''' และ H-4''''), 2.11 (m, 4H, H-2''' และ H-2''''), 4.05 (m, 4H, H-5''' และ H-5''''), 4.68 (m, 4H, H-1''' และ H-1''''), 6.65 (d, *J* = 15.0 Hz, 2H, H-2 และ H-6), 6.93 (d, *J* = 6.8 Hz, 4H, H-3', H-5', H-3", H-5"), 7.57 (overlapping signal, 4H, H-2', H-6', H-2", H-6"), 7.61 (overlapping signal, 2H, H-1 และ H-7), 7.58 (m, 4H, H-2', H-6', H-1, H-7), 8.12 (m, 4H, m-ArH), 8.60 (m, 2H, p-ArH), 9.02 (m, 4H, o-ArH)

ESMS (+ve): *m/z* (% rel. abund.) 302 $[M-2Br^-]^{2+}$ (100)

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของสารเคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอก

นำสารเคอร์คิวมินอยด์ 1-3 และสารแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์ที่สังเคราะห์ได้ 31-46 มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยีสต์ โดยเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน vancomycin, gentamicin และ amphotericin B ให้ผลการทดสอบดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของสารเคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอก

สาร	แบคทีเรีย								ยีสต์			
	SA		MRSA SK1		PA		EC		CA 3153		CN 90113	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC	MIC	MFC
1	>200		>200		>200		>200		>200		200	>200
2	200	>200	200	>200	>200		>200		200	200	200	>200
3	>200		>200		>200		>200		>200		200	>200
31	200	>200	128	>200	>200		>200		200	200	200	>200
32	>200		200	200	>200		>200		>200		200	>200
33	128	>200	64	>200			>200		>200		128	>200
34	200	>200	>200		>200		>200		>200		200	>200
35a+35b	32	>200	64	>200	>200		>200		200	>200	128	200
36	>200		>200		>200		>200		>200		>200	
37	>200		>200		>200		>200		>200		>200	
38	>200		>200		>200		>200		>200		>200	
39	>200		>200		>200		>200		>200		>200	
40	>200		>200		>200		>200		>200		>200	
41	>200		>200		>200		>200		>200		>200	
42	ND		ND		ND		ND		ND		ND	
43	>200		>200		>200		>200		>200		>200	
44	64	>200	128	200	>200		128	>200	200	>200	128	>200
45	64	>200	64	200	>200		200		200	>200	64	200
46	8	32	8	128	>200		>200		32	64	>200	
Van.	0.25	1	0.5	1								
Gen.					0.125	0.5	0.25	1				
Amp.									0.125	0.25	0.125	0.25

หมายเหตุ: SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923 , MRSA = methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* , PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, EC = *Escherichia coli* ATCC25922 CA = *Candida albicans* NCPF3153, CN90113 = *Cryptococcus neoformans* ATCC90113 flucytosine – resistant, MIC = minimum inhibitory concentration (ug/ml) , MBC= minimum bactericidal concentration (ug/ml) , MFC= minimum fungicidal concentration (ug/ml); ND= Not determined; Van. = vancomycin; Gen. = gentamicin; Amp. = amphotericin B

บทที่ 5
อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

1. การแยกสารเคอร์คิวมินอยด์

สารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ประกอบด้วยเคอร์คิวมิน (1) ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (2) และบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (3) จากบริษัทเครื่องหอมไทยจีน (Thai-China Flavours and Fragrances, TCFF) นำมาแยกสารเคอร์คิวมินอยด์ออกจากกันให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดหยาบ และตัวชะเป็นไดคลอโรมีเทนในการเตรียมคอลัมน์และชะสาร 1 ออกมาก่อนเกือบหมด จากนั้นจึงใช้ตัวชะเป็นตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเมทานอล โดยค่อย ๆ เพิ่มความมีขั้วจะได้สาร 2 และ 3 ออกมาตามลำดับ สารเคอร์คิวมินอยด์ทั้งสามชนิดที่แยกได้ตรวจสอบโครงสร้างโดยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปีและแมสสเปกโตรสโกปี พบว่าสอดคล้องกับสารที่เคยรายงานแล้ว

2. การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์

ได้ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์ทั้งสามชนิดโดยวิธีทางเคมีได้แอนาลอกทั้งหมด 16 ชนิด ซึ่งแบ่งแต่ละกลุ่มออกเป็นดังนี้

1. ดีเมทิลแอนาลอกของสาร 1 และ 2 โดยนำสาร 1 ทำปฏิกิริยาดีเมทิเลชันด้วยโบรอนไตรโบรไมด์ได้สารที่ถูกกำจัดหมู่เมทิลออกไปหนึ่งหมู่เป็นสาร 31 และสองหมู่เป็นสาร 32 ส่วนสาร 2 ทำปฏิกิริยาในทำนองเดียวกันได้สาร 33 สารที่สังเคราะห์ได้มีสภาพความมีขั้วมากกว่าสารตั้งต้นและมีการพิสูจน์โครงสร้างเรียบร้อยแล้ว
2. แอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์ที่มีเฮตเทอโรอะตอมอยู่ในโมเลกุลโดยนำสาร 1, 2 และ 3 มาทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซิลามีนไฮโดรคลอไรด์ ได้สาร 34, 35a+35b และ 36 ตามลำดับ สารที่สังเคราะห์ได้มีการพิสูจน์โครงสร้างเรียบร้อยแล้ว
3. อัลคิลอีเทอร์แอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์ โดยสาร 1 ทำปฏิกิริยากับ 1,5-ไดโบรโมเพนเทน ได้สาร 37 และ 38 ในทำนองเดียวกันได้เตรียมสารโบรโมเพนทิลสาร 2 ได้สาร 39, 40 และ 41 ส่วนโบรโมเพนทิลแอนาลอก 42 และ 43 เตรียมได้จากสาร 3 สารที่สังเคราะห์ได้มีการพิสูจน์โครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี ดังแสดงในบทที่ 4
4. พิริดิเนียมแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์ ซึ่งเป็นการเตรียมอนุพันธ์ที่มีความมีขั้วสูงสามารถละลายได้ในน้ำ โดยนำสาร 38 ทำปฏิกิริยากับพิริดีน ได้สาร 44 ส่วนสาร 41

และ 43 ทำปฏิกิริยาในทำนองเดียวกัน ได้สาร 45 และ 46 ตามลำดับสารที่สังเคราะห์ได้มีการพิสูจน์โครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีดังแสดงในบทที่ 4

2. ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของเคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอก

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 6 ชนิดแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1) แบคทีเรีย Gram-positive ประกอบด้วย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA) และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 2) แบคทีเรีย Gram-negative ประกอบด้วย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PA) และ *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC) 3) ยีสต์ ประกอบด้วย *Candida albicans* NCPF 3153 (CA) และ *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113 (CN) สารมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทั้งสามกลุ่มคือ vancomycin, gentamicin และ amphotericin B ตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเคอร์คิวมินอยด์ดังแสดงในตารางที่ 1 จะเห็นว่าสารเคอร์คิวมินอยด์ 1-3 แสดงฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทุกชนิดได้ต่ำมากหรืออาจกล่าวได้ว่าแทบไม่มีฤทธิ์ (ค่า MIC อยู่ในช่วง 200 ถึง >200 μg/ml) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่ควรนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้มาพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพในการต้านจุลินทรีย์ แอนาลอกชนิดแรกที่ปรับเปลี่ยนคือ การกำจัดหมู่เมทิลที่วงเบนซีนของสาร 1 ออกไปหนึ่งหมู่ได้สาร 31 พบว่าแสดงฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้ในระดับต่ำใกล้เคียงกับสาร 1 ยกเว้น MRSA ที่แสดงฤทธิ์ได้สูงกว่าสาร 1 มากกว่าสองเท่า (มีค่า MIC ที่ 128 μg/ml) แต่มีฤทธิ์ในการฆ่า MRSA ในระดับต่ำ (ค่า MBC >200 μg/ml) และเมื่อกำจัดหมู่เมทิลของสาร 1 ออกไปหมดได้สาร 32 แสดงฤทธิ์ต้าน MRSA และ CN ที่ MIC 200 μg/ml เพิ่มขึ้นเล็กน้อยไม่ต่างกับสาร 1 ส่วนเชื้ออื่นให้ผลลบ นั้นคือแสดงค่า MIC ที่มากกว่า 200 μg/ml การกำจัดหมู่เมทิลสาร 2 ได้สาร 33 พบว่าแสดงฤทธิ์ในการต้าน SA, MRSA และ CN มากกว่าสาร 2 มากว่าสองเท่า แต่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทั้งสามชนิดในระดับต่ำเช่นเดียวกันกับสาร 31 แสดงว่าการเพิ่มความมีขั้วให้กับสารเคอร์คิวมินอยด์และหมู่ไฮดรอกซีอิสระที่วงเบนซีนมีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์แต่ยังเห็นผลที่ไม่ชัดเจน แอนาลอกต่อมาเป็นการปรับเปลี่ยนที่หมู่คาร์บอนิลของสาร 1, 2, และ 3 ให้เป็นเคอร์คิวมินอยด์ไอซอกซาโซล 34, สารผสม 35a+35b และ 36 ตามลำดับพบว่าสาร 34 และ 36 แสดงฤทธิ์ไม่ต่างจากสารตั้งต้น ส่วนไอซอกซาโซน 35a+35b แสดงฤทธิ์ในการต้าน SA, MRSA และ CN มากกว่าสาร 2 มากกว่า 6, 3 และ 2 เท่าตามลำดับ (มีค่า MIC ที่ 32, 64 และ 128 μg/ml) แต่ยังมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทั้งสามชนิดในระดับต่ำ เพื่อให้ผลการทดสอบที่ชัดเจนถึงความมีขั้วของเคอร์คิวมินอยด์และหมู่ไฮดรอกซีอิสระที่วงเบนซีน จึงเตรียมอัลคิลอีเทอร์แอนาลอกของสารเคอร์คิวมินอยด์ซึ่งเป็น

การลดความมีขั้วลง จากงานวิจัยของ Singh และคณะ (2010) ได้ทำการปรับเปลี่ยนที่หมู่ไฮดรอกซีของสาร 1 โดยทำปฏิกิริยากับกรดไขมันได้แอนาลอกอัลคิลเอสเทอร์ซึ่งมีความมีขั้วต่ำ พบว่าแสดงฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียได้สูงมากกว่าสาร 1 ซึ่งได้อธิบายว่าอาจมีบางส่วนของโครงสร้างที่คล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงเตรียมอนุพันธ์ของเคอร์คิวมินอยด์ที่มีขั้วต่ำโดยทำปฏิกิริยากับ 1,5-dibromopentane ได้อนุพันธ์ 37-43 พบว่าแอนาลอกเหล่านี้ไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทุกชนิด อาจเกิดจากสาเหตุเรื่องการละลายในขณะทดลอง เนื่องจากเป็นสารที่มีขั้วต่ำละลายได้น้อยและไม่ละลายน้ำจึงไม่ถูกสะสมในเซลล์ หรือมีโครงสร้างที่แตกต่างจากผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ และสารเหล่านี้มีการสร้างพันธะระหว่างหมู่ไฮดรอกซีกับหมู่โบรโมเพนทิลเป็นพันธะอีเทอร์ ซึ่งจะถูกตัดได้ยากเมื่อเทียบกับพันธะเอสเทอร์ในขณะที่สารเข้าสู่เซลล์ แสดงว่าความมีขั้วและหมู่ที่เข้ามาต่อกับหมู่ไฮดรอกซีของสาร 1-3 น่าจะมีผลต่อการแสดงฤทธิ์ จึงนำสาร 38, 41 และ 43 มาเตรียมให้เป็นอนุพันธ์เกลือพิริดิเนียม 44, 45 และ 46 ตามลำดับ ซึ่งเป็นสารที่มีความมีขั้วสูงสามารถละลายได้ในน้ำ พบว่าแสดงฤทธิ์ในการต้าน จุลินทรีย์ได้อย่างน่าสนใจคือ สาร 44 แสดงค่า MIC ที่ช่วง 64 ถึง >200 μg/ml โดยฤทธิ์ในการต้าน SA มากกว่าสาร 1 มากกว่าสามเท่า และ MRSA, EC, CN มากกว่าสาร 1 มากกว่าสองเท่า สาร 45 แสดงฤทธิ์ในการต้าน SA, MRSA และ CN แสดงค่า MIC ที่ 64 μg/ml ซึ่งมากกว่าสาร 2 มากกว่าสามเท่า สาร 44 และ 45 ยังคงแสดงฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อดังกล่าวได้ในระดับต่ำ ส่วนสาร 46 แสดงฤทธิ์ในการต้าน SA, MRSA และ CA ที่ค่า MIC 8, 8 และ 32 μg/ml ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าสาร 3 มากกว่า 25 และ 6 เท่า และยังแสดงฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทั้งสามชนิดที่ค่า MBC 32, 128 และ 64 μg/ml ตามลำดับ แต่ไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อ PA, EC และ CN แสดงว่าความมีขั้วและหมู่แคตไอออนิคของพิริดิเนียมมีนัยสำคัญต่อการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ng และคณะ (2007) ที่ได้สังเคราะห์สารกลุ่ม bis(pyridinium)alkanes พบว่าสารหลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้านราได้ในระดับที่ค่อนข้างสูง และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแอนาลอกพิริดินียมทั้งสามชนิด 44-46 พบว่าเมื่อหมู่เมทอกซีที่วงเบนซีนลดลงส่งผลให้มีแนวโน้มในการแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น

อย่างไรก็ตามแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดนั้น ยังแสดงฤทธิ์ได้ต่ำกว่ายามาตรฐานทั้งสามชนิด แต่จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นความรู้พื้นฐานที่สามารถนำไปออกแบบการสังเคราะห์แอนาลอกอื่น ๆ เพื่อเพิ่มฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ให้สูงขึ้นใกล้เคียงกับยามาตรฐานหรือสูงกว่า เช่น ทดลองปรับเปลี่ยนความยาวสายโซ่คาร์บอนของหมู่อัลคิล หรือปรับเปลี่ยนอนุพันธ์ของพิริดีน เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถแยกสารผสมเคอร์คิวมินอยด์ออกจากกันได้เป็นสาร เคอร์คิวมิน (1) ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (2) และบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (3)
2. สามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์ทั้งสามชนิดได้แอนาลอกทั้งหมด 16 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มคือ 1) ดีเมทิลแอนาลอก 31-33 2) ไอซอกซาโซลแอนาลอก 34-36 3) โบรโมเพนทิลอีเทอร์แอนาลอก 37-43 4) พิริดิเนียมแอนาลอก 44-46 โดยสารทุกชนิดได้พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีเรียบร้อยแล้ว
3. เมื่อนำเคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอกที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 6 ชนิด พบว่าสารกลุ่มที่ 1 ดีเมทิลแอนาลอก แสดงฤทธิ์ได้ใกล้เคียงหรือสูงกว่าสารตั้งต้นเล็กน้อย ยกเว้นสาร 33 ที่แสดงฤทธิ์ต้าน MRSA ได้สูงกว่าสารตั้งต้น มากกว่า 3 เท่า สารกลุ่มที่ 2 ไอซอกซาโซลแอนาลอก แสดงฤทธิ์ได้ใกล้เคียงหรือสูงกว่าสารตั้งต้นเล็กน้อย ยกเว้นสารผสม 35a+35b ที่แสดงฤทธิ์ต้าน SA ได้สูงกว่าสารตั้งต้น มากกว่า 6 เท่า สารกลุ่มที่ 3 โบรโมเพนทิลอีเทอร์แอนาลอก ไม่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทุกชนิด และสารกลุ่มที่ 4 พิริดิเนียมแอนาลอก แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Gram positive (SA และ MRSA) ซึ่งแสดงค่า MIC ที่ช่วง 8 - 128 μg/ml นอกจากนี้สาร 46 ยังสามารถแสดงฤทธิ์ในการฆ่าจุลินทรีย์ได้ด้วย ซึ่งแสดงค่า MBC และ MFC ที่ช่วง 32 - 128 μg/ml สารเคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอกที่สังเคราะห์ได้เหล่านี้แสดงฤทธิ์ได้ต่ำกว่ายามาตรฐาน
4. ได้แนวทางการออกแบบการสังเคราะห์เคอร์คิวมินอยด์เพื่อพัฒนาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ให้สูงขึ้น

ศูนย์บรรณสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บรรณานุกรม

คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. (2543) **บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2542** (บัญชียาจากสมุนไพร). กรุงเทพฯ. หน้า 3: 16-23. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

เต็ม สิมิตินันทน์ (2544) **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย** (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544). ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ: หน้า 160.

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2544) **มาตรฐานสมุนไพรไทย เล่ม 2 ขมิ้นชัน** กรุงเทพฯ. หน้า 1-2. โรงพิมพ์ ร.ส.พ.

สุนทรี สิงหบุตรา (2536) **สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด** กรุงเทพฯ. คุณ 39 จำกัด.

Ali, M., Bagati, A. and Gupta, J. (1995) "Comparison of anti-inflammatory activity of curcumin analogs" **Indian Drugs** 32: page 502-505.

Ammon, H. P. T. and Wahl, M. A. (1991) "Pharmacology of *Curcuma longa*" **Planta Med.** 57: page 1-7.

Ammon, H. P.T. et al. (1992) "Curcumin: a potent inhibitor of Leukotriene B4 formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL)" **Planta Med.** 58: page 26.

Apisariyakul, A., Vanittanakom, N. and Buddhasukh, D. (1995) "Antifungal activity of oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae)" **J. Ethnopharm.** 49: page 163-169.

Araújo, C. A. C. and Leon, L. L. (1992) "Biological activities of *curcuma longa* L" **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.** 96 (5): page 723-728.

Araujo, C. A. C. et al. (1999) "Studies on the effectiveness of the diarylheptanoid derivatives against *Leishmania amazoensis*" **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.** 94: page 791-794.

Barret, D. (2002) "From natural products to clinically useful antifungals" **Biochim. Biophys. Acta** 1587: page 224-233.

Changtam, C. et al. (2010a) "Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species" **Eur. J. Med. Chem.** 45: page 941-956.

Changtam, C., Hongmanee, P. and Suksamrarn, A. (2010b) "Isoxazole analogs with highly potent multi drug-resistant antimycobacterial activity" **Eur. J. Med. Chem.** 45: page 4446-4457.

Chan, M. M. Y., Ho, C. T. and Huang, H. I. (1995) "Effects of three dietary phytochemicals from tea, rosemary and turmeric on inflammation-induced nitrite production" **Cancer Lett.** 96: page 23-29.

Chan, M. M. Y. et al. (1998) "In vivo inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties" **Biochem. Pharmacol.** 55: page 1955-1962.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2002a) **Reference method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved standard M7-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2002b) **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** Approved standard, 2nd ed. M27-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

Dubey, S.K. et al. (2008) "Design, synthesis and characterization of some bioactive conjugates of curcumin with glycine, glutamic acid, valine and demethylenated piperic acid and study of their antimicrobial and antiproliferative properties" **Eur. J. Med. Chem.** 43: page 1837-1846.

Fu, J. et al. (2010) "Synthesis, structure and structure-activity relationship analysis of caffeic acid amides as potential antimicrobials" **Eur. J. Med. Chem.** 45: page 2638-2643.

Gringberg, L. N. et al. (1996) "Studies on curcumin and curcuminoids. XXVI. Antioxidant effects of curcumin on the red blood cell membrane" **Int. J. Pharmaceut.** 132: page 251-257.

Guzeldemeric, N. U. and Kucubasmac, O. (2010) "Synthesis antimicrobial activity evaluation of new 1,2,4-triazoles and 1,3,4-thaiadizoles bearing imidazo[2,1-b]thiazole moiety" **Eur. J. Med. Chem.** 45: page 63-68.

Ishida, J. et al. (2002) "Antitumor agents. Part 214. Synthesis and evaluation of curcumin analogues as cytotoxic agents" **Bioorg. Med. Chem.** 10: page 3481-3487.

Kadi, A. A. (2011) "Synthesis and antimicrobial activity of some new quinazolin-4(3H)-one derivatives" **J. Saudi Chem. Soc.** 15: page 95-100.

Kuo, M. L., Huang, T. S. and Lin, J. K, (1996) "Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells" **Biochim. Biophys. Acta** 131: page 95-100.

Lin, L. et al. (2006) "Antitumor agents 247. New 4-ethoxycarbonylethyl curcumin analogs as potential antiandrogenic agents" **Bioorg. Med. Chem.** 14: page 2527-2534.

Manjula, M. K. et al. (2009) "Synthesis of new series of 5,6-dihydro-4H-1,2-oxazines via hetero Diels-Alder reaction and evaluation of antimicrobial activity" **Eur. J. Med. Chem.** 44: page 280-288.

Lin, J.-K. and Lin-Shiau, S.-Y. (2001) "Mechanism of cancer chemoprevention by curcumin" **Proc. Natl. Sci. Counc. ROC(B)** 25: page 59-66.

Mishra, S. et al. (2005) "Design, development and synthesis of mixed bioconjugates of piperic acid-glycine, curcumin-glycine/alanine and curcumin-glycine-piperic acid and their antibacterial and antifungal properties" **Bioorg. Med. Chem.** 13: page 1477-1486.

Mishra, S. et al. (2008) "Synthesis and exploration of novel curcumin analogues as anti-malarial agents" **Bioorg. Med. Chem.** 16: page 2894-2902.

Negi, P. S. et al. (1999) "Antimicrobial activity of turmeric oil: A by-product from curcumin manufacturer" **Agric. Food Chem.** 47: page 4297-4300.

Ng, C. K. L. et al (2007) "Synthesis, antifungal and haemolytic activity of a series of bis(pyridinium)alkanes" **Bioorg. Med. Chem.** 15: page 3422-3429.

Ohtsu, H. et al. (2002) "Antitumor agent. 217. Curcumin analogues as novel androgen receptor antagonists with potential as anti-prostate cancer agents" **J. Med. Chem.** 45(23): page 5037-5042.

Osorio T. M. et al. (2012) "Antibacterial activity of chalcones, hydrazones and oxadiazoles against methicillin-resistant Staphylococcus aureus" **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 22: page 225-230.

Parvathy, K. S., Negi, P. S. and Srinivas, P. (2009) "Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of curcumin-β-diglucoside" **Food Chem.** 115: page 265-271.

Ruby, A. J. et al. (1995) "Anti-tumor and antioxidant activity natural curcuminoids" **Cancer Lett.** 911: page 79-83.

Sarker, D. S., Nahar, L. and Kumarasamy, Y. (2007) "Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals" **Methods** 42(4): page 321-324.

Singh, R. K. et al. (2010) "Synthesis antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acid and folic acid" **Bioorg. Med. Chem.** 45: page 1078-1086.

Somparn, P. et al. (2007) "Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives" **Biol. Pharm. Bull.** 30(1): page 74-78.

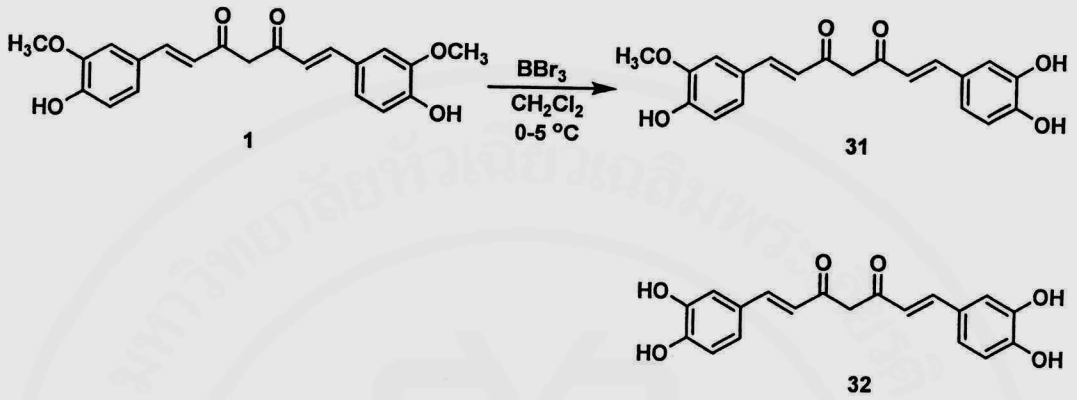
Thamlikitkul, V. et al. (1989) "Randomized double blind study of Curcuma domestica Val. for dyspepsia" **J. Med. Assoc. Thai** 72(11): page 613-620.

Venkateswarlu, S., Ramachandra, M. S. and Subbaraju. G. V. (2005) "Synthesis and biological evaluation of polyhydroxycurcuminoids" **Bioorg. Med. Chem.** 13: page 6374-6380.

World Health Organization. (1999) "Rhizoma Curcumae Longae" In: WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. I. Malta: page 115-124.

ภาคผนวก ก
ตัวอย่างการคำนวณร้อยละผลผลิต

การคำนวณร้อยละผลผลิตของสาร 31 และ 32



ใช้สาร 1 จำนวน 850 มิลลิกรัม ทำปฏิกิริยาแล้วได้ สาร 31 จำนวน 240 มิลลิกรัม และ สาร 32 จำนวน 450 มิลลิกรัม สามารถคำนวณร้อยละผลผลิตได้ดังนี้

มวลโมเลกุลของสาร 1 = 368 กรัมต่อโมล

มวลโมเลกุลของสาร 31 = 354 กรัมต่อโมล

มวลโมเลกุลของสาร 32 = 340 กรัมต่อโมล

ดังนั้นจากสมการ

จำนวนโมลของสาร 1 = 850 มิลลิกรัมต่อ 368 กรัมต่อโมล = 2.31 มิลลิโมล

จำนวนโมลของสาร 31 = 240 มิลลิกรัมต่อ 354 กรัมต่อโมล = 0.68 มิลลิโมล

จำนวนโมลของสาร 32 = 450 มิลลิกรัมต่อ 340 กรัมต่อโมล = 1.32 มิลลิโมล

คำนวณร้อยละผลผลิตของสาร 31

น้ำหนักของสาร 31 ตามทฤษฎีที่ควรได้ = 2.31 มิลลิโมล x 354 กรัมต่อโมล

= 817.74 มิลลิกรัม

ร้อยละผลผลิต (percentage yield) = (น้ำหนักสารที่ได้จริงจากการทดลอง/ น้ำหนักของสารตามทฤษฎี)x100

น้ำหนักสาร 31 ที่ได้จริง = 240 มิลลิกรัม

ดังนั้นร้อยละผลผลิตของสาร 31 = (240/817.74)x100 = 29%

คำนวณร้อยละผลผลิตของสาร 32

น้ำหนักของสาร 32 ตามทฤษฎีที่ควรได้ = 2.31 มิลลิโมล x 340 กรัมต่อโมล

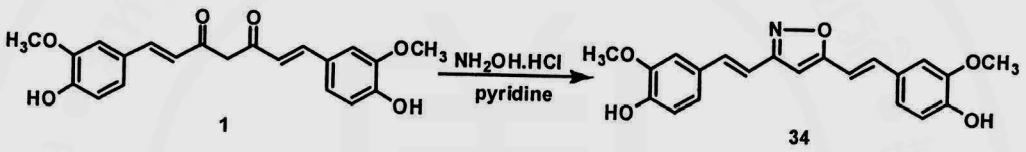
= 785.40 มิลลิกรัม

ร้อยละผลผลิต (percentage yield) = (น้ำหนักสารที่ได้จริงจากการทดลอง/ น้ำหนักของสารตามทฤษฎี)x100

น้ำหนักสาร 32 ที่ได้จริง = 450 มิลลิกรัม

ดังนั้นร้อยละผลผลิตของสาร 31 = (450/785.40)x100 = 57%

การคำนวณร้อยละผลผลิตของสาร 34



1 34

ใช้สาร 1 จำนวน 300 มิลลิกรัม ทำปฏิกิริยาแล้วได้สาร 34 จำนวน 238 มิลลิกรัม สามารถคำนวณร้อยละผลผลิตได้ดังนี้

มวลโมเลกุลของสาร 1 = 368 กรัมต่อโมล

มวลโมเลกุลของสาร 34 = 365 กรัมต่อโมล

ดังนั้นจากสมการ

จำนวนโมลของสาร 1 = 300 มิลลิกรัมต่อ 368 กรัมต่อโมล = 0.82 มิลลิโมล

จำนวนโมลของสาร 34 = 238 มิลลิกรัมต่อ 365 กรัมต่อโมล = 0.65 มิลลิโมล

คำนวณร้อยละผลผลิตของสาร 34

น้ำหนักของสาร 34 ตามทฤษฎีที่ควรได้ = 0.82 มิลลิโมล x 365 กรัมต่อโมล

= 299.30 มิลลิกรัม

ร้อยละผลผลิต (percentage yield) = (น้ำหนักสารที่ได้จริงจากการทดลอง/ น้ำหนักของสารตามทฤษฎี)x100

น้ำหนักสาร 34 ที่ได้จริง = 238 มิลลิกรัม

ดังนั้นร้อยละผลผลิตของสาร 34 = (238/299.30)x100 = 80%

ภาคผนวก ข
ประวัติย่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล นายชัชวาลย์ ช่างทำ

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เคมี) มหาวิทยาลัยรามคำแหง

วท.ม. (เคมีประยุกต์) มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ปร.ด. (เคมีประยุกต์) มหาวิทยาลัยรามคำแหง

สถานที่ติดต่อ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-นามสกุล นายอภิชาต สุขสำราญ

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เคมี) มหาวิทยาลัยมหิดล

วท.ม. (เคมีอินทรีย์) มหาวิทยาลัยมหิดล

Ph.D. (Organic Chemistry) University of Cambridge, United Kingdom

ตำแหน่งทางวิชาการ ศาสตราจารย์

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาวเสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร

ประวัติการศึกษา ภ.บ. (เภสัชศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล

Dr. sc.hum (จุลชีววิทยา) University of Cambridge, United Kingdom

ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์