

การสังเคราะห์ และประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารอนุพันธ์ 9,13-Disubstituted berberine



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

พฤษภาคม 2557

การสังเคราะห์ และประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารอนุพันธ์ 9,13-Disubstituted berberine



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

พฤษภาคม 2557

เฉลิมชัย จำปาแดง. (2557). การสังเคราะห์ และประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารอนุพันธ์

9,13-Disubstituted berberine

ปริญญาานิพนธ์ วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

คณะกรรมการควบคุม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริธร สโมสร

เบอร์เบอรีน (Berberine) เป็นอัลคาลอยด์ที่มีนิวเคลียสเป็น isoquinoline พบในพืชหลายวงศ์ เช่น Berberidaceae และ Papaveraceae เป็นต้น เบอร์เบอรีนมีสรรพคุณในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิด ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ของเบอร์เบอรีนที่ตำแหน่ง 9 และ 13 ให้เป็นหมู่ alkoxy เพื่อเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดเล็ก (NCI-H187 small cell lung cancer) มะเร็งช่องปาก (KB-oral cavity cancer) และมะเร็งเต้านม (MCF-7 breast cancer) ซึ่งขั้นตอนการสังเคราะห์เกิดผ่านสารตัวกลาง 13-phenol betaine ของ 9-alkoxyberberine ตามด้วยปฏิกิริยา O-alkylation ให้สารอนุพันธ์ 9,13-disubstituted berberine ตามต้องการ โดยมีร้อยละผลผลิตที่ได้ปานกลาง ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้พบว่า สารอนุพันธ์ 9-propyloxy-13-pentyloxyberberine มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปาก และ เซลล์มะเร็งเต้านม ได้ดีกว่าสารตั้งต้นเบอร์เบอรีนถึง 2 และ 19 เท่า ตามลำดับ

SYNTHESIS AND CYTOTOXICITY EVALUATION AGAINST CANCER CELLS OF
9,13-DISUBSTITUTED BERBERINE DERIVATIVES



Presented in partial fulfillment of the requirements for the
Master of Science degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University
May 2014

Chalueomchai Jampadang. (2014). *Synthesis and Cytotoxicity Evaluation against*

Cancer Cells of 9, 13-Disubstituted Berberine Derivatives.

Master thesis, M.Sc. (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot

University. Advisor Committee :

Asst. Prof. Dr.Siritron Samosorn

Berberine, a naturally occurring isoquinoline alkaloid widely spread in many medicinal plant families such as Berberidaceae and Papaveraceae, has been shown to suppress the growth of breast, lung and tongue cancer cells. Introduction of various substituents into the 9 and 13 positions of berberine has been reported to have better anticancer activities than berberine. In this study, a series of 9,13-disubstituted berberine derivatives was synthesized and evaluated for cytotoxic activities against human cancer cell lines. The key synthetic precursor was the phenol betaine derived from berberine. Subsequently O-alkylation of the betaine with alkyl bromide gave 9,13-disubstituted berberine derivatives in moderate yields. A novel compound, 9-propyloxy-13-pentyloxyberberine was shown to be more active than berberine 2- and 19-fold against KB-oral cavity cancer and MCF-7 breast cancer cell lines, respectively

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริธร สโมสร์ ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในทุกขั้นตอนของการวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล และรองศาสตราจารย์ ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์อภิชาติ สุขสำราญ และ นางสาวกัญญารัตน์ จันทร์แจ้ง ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้ความอนุเคราะห์บันทึกข้อมูลแมสสเปกโตรเมตรี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ ความเมตตาแก่ผู้วิจัยในการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมีเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ นิสิตปริญญาโท-ปริญญาเอกทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ท้ายนี้คุณค่าและประโยชน์ใด ๆ อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่บิดา มารดา ครู อาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

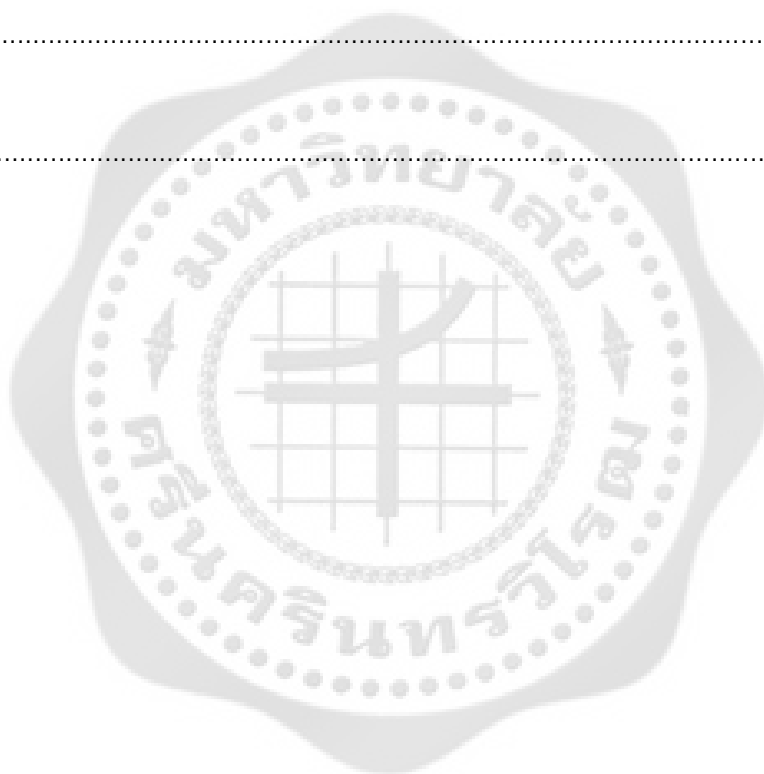
เฉลิมชัย จำปาแดง

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
มะเร็ง.....	1
Berberine.....	4
การออกแบบสารอนุพันธ์ของ berberine เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง.....	5
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	6
ความสำคัญของการวิจัย.....	6
ขอบเขตของการวิจัย.....	7
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของ berberine และสาร อนุพันธ์ของ berberine.....	8
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมี	17
แนวทางการสังเคราะห์ของสารอนุพันธ์ 9,13-disubstituted berberine (4-5)	18
การสังเคราะห์ของสารอนุพันธ์ 9-N-6'-aminohexyl,13-alkoxyberberine (4)	18
การสังเคราะห์ของสารอนุพันธ์ 9,13-dialkoxyberberine (5)	20
แนวทางการพิสูจน์ยืนยันสูตรโครงสร้างของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้	22
การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	23
การวิเคราะห์ข้อมูลจากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	24
4 ผลการทดลอง.....	30
ข้อมูลทางกายภาพและสเปกโทรสโกปีของสารที่สังเคราะห์.....	30
ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	43

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	45
การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ ของ berberine (85-97).....	45
การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	53
สรุปและข้อเสนอแนะ.....	58
บรรณานุกรม.....	59
อภิธานศัพท์.....	63
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	66



บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 จำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งรายใหม่ และจำนวนผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็ง ทั่วโลกโดยประมาณในปี 2008.....	2
2 สภาวะของปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร 59a-b 60a-b 61a-b และ 5a-d การทำสารให้บริสุทธิ์ และร้อยละของผลิตภัณฑ์.....	25
3 ข้อมูล ^1H NMR ของสารประกอบ Berberine (1), 8-Acetyldihydro berberine (55) และ 13-Hydroxyberberine (56) ข้อมูล ^1H NMR ของ.....	33
4 ข้อมูล ^1H NMR ของสารประกอบ 13-Oxidoberberine (57), 13-Butoxyberberine (58) และ Berberrubine (59)	34
5 ข้อมูล ^1H NMR ของสารประกอบ 60a, 60b เทียบ Berberrine (1)	35
6 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 61a บันทึกใน CDCl_3	36
7 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 61b บันทึกใน DMSO.....	37
8 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 5a บันทึก ใน CDCl_3	38
9 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 5b บันทึก ใน CDCl_3	39
10 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 5c บันทึก ใน CDCl_3	41
11 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 5d บันทึก ใน CDCl_3	42
12 ผลิตภัณฑ์และร้อยละของผลิตภัณฑ์.....	47
13 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	55

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างและตำแหน่งในโมเลกุลของ berberine (1).....	5
2 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ berberine 2-5.....	6
3 การเกิดโครงสร้าง G-quadruplex ใน telomere DNA สามารถยับยั้ง การทำงานของ telomerase ในการเพิ่มความยาวของ telomere ที่ปลาย chromosome	9
4 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 9-substituted berberine 5-8.....	10
5 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 9-substituted berberine 9-15.....	10
6 แสดงตำแหน่งของ NHE III ₁ ใน Oncogene <i>c-myc</i> และการเกิด โครงสร้าง G-quadruplex.....	11
7 โครงสร้างสารอนุพันธ์ 9-substituted berberine 16-25.....	12
8 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 9-substituted berberine 26-35.....	13
9 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 13-substituted berberine 36 และ 37.....	14
10 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 13-substituted berberine 39-40 palmatine 38 และ สารอนุพันธ์ 13-substituted palmatine 41- 42	14
11 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 13-substituted berberine 43-48.....	15
12 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 13-substituted berberine 49-54.....	16
13 แนวทางการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 9-N-6'-aminohexyl, 13-alkoxyberberine 4.....	18
14 แนวทางการสังเคราะห์ของสารอนุพันธ์ 9,13-dialkoxyberberine 5.....	20
15 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-hydroxyberberine (56).....	45
16 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-butyloxyberberine (58).....	46
17 การสังเคราะห์สารประกอบ Bererrubine (59).....	48
18 การสังเคราะห์สารประกอบ 60a-60b.....	49
19 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 9-alkoxy-13-hydroxyberberine (61a-61b).....	50
20 การสังเคราะห์สารประกอบ 5a และ 5c.....	51
21 การสังเคราะห์สารประกอบ 5b, 5d.....	52
22 สูตรโครงสร้างของสาร (59a, 59b, 60a, 60b และ 5a-5d).....	54

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

1.1 มะเร็ง

มะเร็งเป็นเนื้องอกชนิดร้ายที่เกิดขึ้นมาจากเนื้อเยื่อปกติของร่างกาย โดยมีการเจริญเติบโตอยู่นอกเหนือการควบคุมของร่างกาย และเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้อัตราการตายของประชากรโลกเพิ่มสูงขึ้น ในปี ค.ศ. 2008 มีการรายงานจากองค์การอนามัยโลกพบว่า มีผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งรายใหม่ทั้งสิ้น 12.7 ล้านคน และมีผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งสูงถึง 7.6 ล้านคนทั่วโลก ซึ่งผู้ป่วยโรคมะเร็งร้อยละ 56 เป็นผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา (Jemal; et al. 2011: 69-90) สำหรับประเทศไทยในช่วงปีพ.ศ. 2549-2553 โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับแรกของสาเหตุการตายทั้งหมด (สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. 2554. ออนไลน์) จากรายงานจำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ที่พบมากที่สุด 4 อันดับแรกในประเทศไทย จำแนกตามเพศ ในปี พ.ศ. 2552 ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบว่า ในเพศชายโรคมะเร็งที่พบมากที่สุด คือ มะเร็งปอด (lung cancer) ร้อยละ 18.5 รองลงมาคือ มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (colorectal cancer) ร้อยละ 14.1 มะเร็งตับ (liver cancer) ร้อยละ 12.4 และมะเร็งช่องปาก (oral cavity cancer) ร้อยละ 8.4 ส่วนในเพศหญิงโรคมะเร็งที่พบมากที่สุด คือ มะเร็งเต้านม (breast cancer) ร้อยละ 37.0 รองลงมาคือ มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) ร้อยละ 14.4 มะเร็งลำไส้ใหญ่ ร้อยละ 8.1 และมะเร็งปอด ร้อยละ 6.8 (รายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 2553)

มะเร็งปอด จากสถิติทั่วโลกในปี 2008 (ตาราง 1) พบว่ามีอัตราการเสียชีวิตในเพศชายมากที่สุด และเป็นมะเร็งที่ตรวจพบในเพศหญิงเป็นอันดับที่สี่ แต่มีอัตราการตายในเพศหญิงเป็นอันดับสอง จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลกในปี 2008 พบผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งปอดรายใหม่ 1.6 ล้านราย และเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งปอด 1.4 ล้านราย จากประชากรทั่วโลก (Jemal; et al. 2011: 69-90) สาเหตุสำคัญของการเกิดโรคมะเร็งปอดพบว่ามาจากการสูบบุหรี่ (สมชัย บวรกิตติ; และคนอื่นๆ. 2544: 69-82) มะเร็งปอด แบ่งตามลักษณะพยาธิวิทยาแบ่งได้หลายลักษณะ เช่น ชนิดเซลล์ขนาดใหญ่ (large cell type) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการกระจายตัวได้ช้า และเซลล์ขนาดเล็ก (small cell type) ซึ่งมะเร็งชนิดนี้มีการกระจายตัวได้เร็วมาก พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งชนิดนี้มักพบในระยะที่มีการแพร่กระจายแล้ว (ไพรัช เทพมงคล. 2528: 154-208)

มะเร็งเต้านม เป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อยมากในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย จากการรายงานของ องค์การอนามัยโลกในปี 2008 พบผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเต้านมรายใหม่ 1.38 ล้านราย และเสียชีวิต 458,400 ราย ซึ่งร้อยละ 60 ของผู้เสียชีวิตอาศัยอยู่ในประเทศกำลังพัฒนา (Jemal; et al. 2011: 69-90) ในประเทศไทยพบว่าประชากรเพศหญิงมีอัตราการเป็นโรคมะเร็งเต้านม เท่ากับ 17.2 ต่อประชากรเพศหญิง 100,000 คน (Martin; & Cheirsilpa. 2003: 47-48) มะเร็งเต้านมเกิดมาจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น พันธุกรรม สภาวะแวดล้อม และพฤติกรรมในการบริโภคอาหาร เป็นต้น

ตารางที่ 1 จำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งรายใหม่ และจำนวนผู้ที่เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งทั่วโลก โดยประมาณในปี 2008 (Jemal; et al. 2011: 69-90)

ชนิดของโรคมะเร็ง	จำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งรายใหม่ (คน)	จำนวนผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็ง (คน)
ปอดและหลอดลม	1,600,000	1,400,000
เต้านม	1,383,500	458,400
ลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	1,200,000	608,700
ตับ	748,300	695,900
ปากมดลูก	529,800	275,100
ช่องปาก	263,900	128,000

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (ตาราง 1) โรคมะเร็งชนิดนี้พบทั้งในเพศหญิงและเพศชาย ใกล้เคียงกัน ในปี 2008 พบผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักรายใหม่ 1.2 ล้านราย ทั่วโลก และเสียชีวิต 608,700 ราย มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักพบบ่อยในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ เป็นต้น (Jemal; et al. 2011: 69-90) ในประเทศไทยพบมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในเพศชายเป็นอันดับสองรองมาจากมะเร็งปอด และในเพศหญิงพบเป็นอันดับสามคือ 8.1% จากมะเร็งทั้งหมดที่ตรวจพบ (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. 2553) ปัจจัยของการเกิดมะเร็งลำไส้และทวาร

หนักมีหลายสาเหตุ เช่น การรับประทานอาหารที่มีปริมาณเส้นใยต่ำ หรือการรับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย เช่น การดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำ เป็นต้น (Jemal; et al. 2011: 69-90)

มะเร็งตับ จากข้อมูลองค์การอนามัยโลกในปี 2008 (ตาราง 1) พบผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งตับ 748,300 ราย และเสียชีวิต 695,900 ราย ครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตด้วยโรคนี้นพบในประเทศจีน อัตราการเสียชีวิตพบในเพศชายมากเป็นอันดับสองรองมาจากมะเร็งปอด ในเพศหญิงพบว่ามีอัตราการเสียชีวิตเป็นอันดับที่หก (Jemal; et al. 2011: 69-90) ประชากรส่วนใหญ่มักเป็นมะเร็งตับที่เรียกว่ามะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ (primary carcinomas of the liver) โดยเฉพาะชนิด Hepatocellular carcinoma (HCC) ซึ่งพบว่าสูงถึง 70-85% ของมะเร็งตับที่ตรวจพบ (Jemal; et al. 2011: 69-90)

มะเร็งปากมดลูก จากข้อมูลองค์การอนามัยโลกในปี 2008 (ตาราง 1) พบผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งปากมดลูก 529,800 ราย และเสียชีวิต 275,100 ราย มากกว่า 85% ของผู้ป่วยและเสียชีวิตพบในประเทศที่พัฒนาแล้ว (Jemal; et al. 2011: 69-90) ในประเทศไทยเพศหญิงพบมะเร็งปากมดลูกเป็นอันดับสองรองมาจากมะเร็งเต้านม (รายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 2553) ปัจจัยสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูกมาจากการติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) (Jemal; et al. 2011: 69-90)

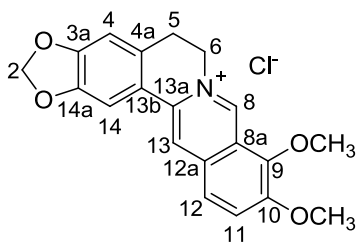
มะเร็งช่องปากและริมฝีปาก ในปี 2008 (ตาราง 1) องค์การอนามัยโลกพบผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งช่องปากและริมฝีปากทั่วโลก 263,900 ราย และเสียชีวิต 128,000 ราย โรคมะเร็งชนิดนี้พบทั้งในเพศหญิงและเพศชาย สาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งในช่องปากมาจากการดื่มแอลกอฮอล์ เชื้อไวรัส HPV การสูดดมหมอกควัน รวมทั้งการสูบบุหรี่ ซึ่งพบว่าผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งในช่องปาก 42% ของผู้เสียชีวิตทั้งหมดจากโรคนี้นี้สาเหตุมาจากการสูบบุหรี่ และ 16% มาจากการดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำ (Jemal; et al. 2011: 69-90) หรืออาจมาจากการไม่รักษาความสะอาดในช่องปาก การกินหมาก เป็นต้น (ไพรัช เทพมงคล. 2528: 154-208)

มะเร็งหลายชนิดสามารถรักษาให้หายขาดได้ถ้าผู้ป่วยได้รับการบำบัดตั้งแต่เริ่มแรก การใช้เคมีบำบัดเป็นวิธีการรักษาโรคมะเร็งวิธีหนึ่ง ซึ่งมักใช้ร่วมกับวิธีการรักษาแบบอื่น เช่น การผ่าตัด หรือการฉายรังสี ซึ่งปัญหาหลักของการใช้เคมีบำบัด คือ การขาดความจำเพาะในการออกฤทธิ์ของยาต่อเซลล์มะเร็ง มีผลทำให้เกิดการทำลายทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนายาต้านมะเร็งชนิดใหม่ๆอย่างต่อเนื่อง โดยนำความรู้เกี่ยวกับกลไกการก่อมะเร็งระดับโมเลกุลมาใช้ในการ

ออกแบบสังเคราะห์ยา เพื่อให้ได้ยาที่มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น และช่วยลดปัญหาข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยา

1.2 Berberine

Berberine (1) เป็นอัลคาลอยด์ที่มีนิวเคลียสเป็น isoquinoline พบในพืชวงศ์ Berberidaceae Menispermaceae Ranunculaceae Papaveraceae Rutaceae Rubiaceae Rhamnaceae Magnoliaceae และ Annonaceae (Verpoorte; 1998: 397-433) berberine พบมากในประเทศญี่ปุ่น จีน และเกาหลี ในญี่ปุ่นมีการนำส่วนต่าง ๆ ของพืชที่มี berberine เป็นส่วนประกอบมาใช้เป็นยาแผนโบราณในการรักษาโรคต่างๆ เช่น อหิวาตกโรค ท้องเสีย รักษาแผลอักเสบ (Iwasa; et al. 1999: 1077-1083) และในประเทศไทยพบในพืชหลายชนิด เช่น ขมิ้นเครือ (*Arcangelisia flava*) และ เห้ม (*Rhizophoreceae ceriops*) (เต็ม สมิตินันท์; 2544: 62) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยเพิ่มเติมว่า berberine มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Iwasa; et al. 1996: 469-478) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Park; et al. 2006: 3913-3916) ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (Iwasa; et al. 1999: 1077-1083) ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase หรือ AChE) (Cho; et al. 2006: 2317-2320) ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส (Telomerase) (Naasani; et al. 1999, 59: 4004-4011) และมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Ho; et al. 2009: 4063-4070) (James; et al. 2011: 1-7) อีกทั้งยังมีรายงานเกี่ยวกับการใช้ berberine ร่วมกับยา doxorubicin ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งปอด (A549) ของมนุษย์ พบว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าการใช้ยา doxorubicin เพียงชนิดเดียว (Tong; et al. 2012: 1263-1267)



1

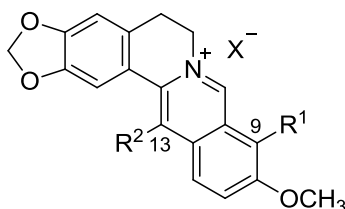
ภาพประกอบ 1 โครงสร้างและตำแหน่งในโมเลกุลของ berberine (1)

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ berberine การออกฤทธิ์ทางชีวภาพคาดว่าเนื่องมาจาก iminium ion ($C=N^+$) ในโมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยาได้กับกรดอะมิโนใน enzyme และ receptor ของเชื้อจุลินทรีย์และเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้โครงสร้างของ berberine มีลักษณะแบนราบทำให้สามารถจับกับสายดีเอ็นเอได้ โดยแทรกอยู่ระหว่างชั้นของคู่เบส (intercalation) ทำให้เชื้อจุลินทรีย์และเซลล์มะเร็งไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ ดังนั้น berberine จึงเป็นโมเลกุลที่น่าสนใจอย่างมากในการนำมาใช้เป็นสารต้นแบบสำหรับการพัฒนาปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นสารอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่มีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น

1.3 การออกแบบสารอนุพันธ์ของ berberine เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาผลของหมู่แทนที่ด้วยหมู่ที่สามารถเพิ่ม lipophilicity และหมู่ที่สามารถให้อิเล็กตรอน (electron donating group) ที่ตำแหน่ง 9 หรือ ตำแหน่ง 13 ของ berberine พบว่าสารอนุพันธ์เหล่านั้นสามารถเพิ่มการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้สูงมากขึ้น เช่น สารอนุพันธ์ 9-N-substituted berberine ที่มีหมู่ amino ที่ปลายโซ่ (สาร 2 ภาพประกอบ 2) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าจับกับโครงสร้างของ G-quadruplex DNA เป็นอย่างดีซึ่งช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส มีผลทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า berberine (Ma; et al. 2008: 7582-7591) หรือ การแทนที่ hydrogen ที่ตำแหน่ง 13 ด้วยหมู่ alkoxyl (สาร 3) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า berberine (Samosorn; et al. 2011. *Thai Patent Application Number 1101002293*.) ดังนั้นถ้ามีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ berberine ที่ตำแหน่ง 9 และตำแหน่ง 13 ทั้งสองตำแหน่งคาดว่าจะช่วยเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า berberine และจากการศึกษาข้อมูลที่ผ่านมา พบว่ายังไม่เคยมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารดังกล่าวมาก่อน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะศึกษาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ

berberine โดยทำการแทนที่ที่ตำแหน่ง 9 ด้วยหมู่ alkyl diamine หรือ alkoxyl ที่เป็นไฮโดรเจน และแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 13 ด้วยหมู่ alkoxyl ที่เป็นไฮโดรเจน (สาร 4-5) คาดว่าน่าจะออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างเฉพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็ง และทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเทียบกับสารตั้งต้น berberine



2: $R^1 = \text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$; $R^2 = \text{H}$; $X = \text{Cl}$

3: $R^1 = \text{OCH}_3$; $R^2 = \text{OC}_3\text{H}_7$ หรือ OC_5H_{11} ; $X = \text{Br}$

4: $R^1 = \text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$; $R^2 = \text{OC}_3\text{H}_7$ หรือ OC_5H_{11} ; $X = \text{halide}$

5: $R^1, R^2 = \text{alkoxyl group}$; $X = \text{halide}$

ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ berberine (2-5)

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ berberine ให้เป็นสารอนุพันธ์ 9-N-substituted, 13-O-substituted berberine หรือ สารอนุพันธ์ 9-O-substituted, 13-O-substituted berberine (สาร 4-5)
2. เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างของสารอนุพันธ์ที่ได้จากการสังเคราะห์
3. เพื่อประเมินฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารที่สังเคราะห์ได้

ความสำคัญของงานวิจัย

1. ทราบวิธีการสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ berberine และทราบสูตรโครงสร้างของสารอนุพันธ์ 9,13-disubstituted berberine ที่ออกแบบสังเคราะห์
2. ทราบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก มะเร็งช่องปาก มะเร็งเต้านม และความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้

ขอบเขตของการวิจัย

1. สังเคราะห์ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ berberine ให้เป็นสารอนุพันธ์ 9-*N*-substituted,13-*O*-substituted berberine หรือ สารอนุพันธ์ 9-*O*-substituted,13-*O*-substituted berberine (สาร 4-5)
2. ยืนยันสูตรโครงสร้างของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีชนิดต่างๆ เช่น เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) และ แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry)
3. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารอนุพันธ์ 9,13-disubstituted berberine ที่สังเคราะห์ได้

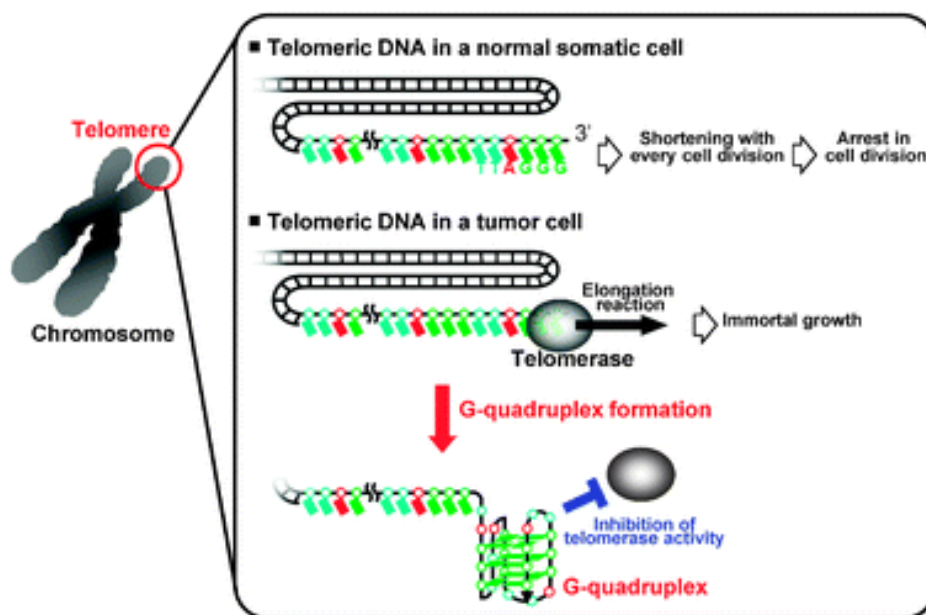


บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของ berberine และสารอนุพันธ์ของ berberine

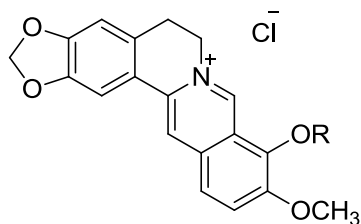
เทโลเมียร์ (teromere) เป็นดีเอ็นเอส่วนปลายของโครโมโซม (chromosome) ทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันการถูกทำลายของโครโมโซม (ภาพประกอบ 3) เมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้นเทโลเมียร์จะมีความยาวสั้นลง และสั้นลงเรื่อยๆ ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ ในเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่ประมาณ 85% พบเอนไซม์เทโลเมอเรส แต่มักจะไม่พบในเซลล์ปกติ (White; Wright;& Shay. 2001: 114-120.) เทโลเมอเรสมีหน้าที่เพิ่มความยาวของเทโรเมียร์บนปลายโครโมโซมทำให้เซลล์มีอายุยืนยาวขึ้นและเกิดการเจริญเติบโตจนไม่สามารถควบคุมได้ (Kim; et al. 1994: 2011–2014) ส่วนเทโรเมียร์ปลายด้านที่มีเบสกวานีนสูงและเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (เป็นด้านที่เทโลเมอเรสเข้าจับกับเทโลเมียร์) สามารถเกิดเป็นโครงสร้าง G-quadruplex ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวทำให้เทโลเมอเรสไม่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอและต่อความยาวให้กับเทโลเมียร์ได้ จากการศึกษาของ อิชโอบาคา และคนอื่นๆ พบว่าสารที่สามารถรักษาเสถียรภาพของดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างแบบ G-quadruplex สามารถยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรสได้ (Izbicka; et al.1999: 639-644) และกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์มะเร็ง (Riou; et al. 2002: 2672-2677) ดังนั้นสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์เทโลเมอเรส หรือ สารที่สามารถรักษาเสถียรภาพของดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างแบบ G-quadruplex ได้ จะมีฤทธิ์ยับยั้งที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเท่านั้นโดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ



ภาพประกอบ 3 การเกิดโครงสร้าง G-quadruplex ใน telomere DNA สามารถยับยั้งการทำงานของ telomerase ในการเพิ่มความยาวของ telomere ที่ปลาย chromosome (Yaku; et al. 2012: 6203-6216)

berberine สามารถรักษาเสถียรภาพของโครงสร้าง G-quadruplex DNA ส่งผลให้ berberine มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้น berberine จึงเป็นสารที่ดึงดูดนักวิจัยเป็นอย่างมากในการนำมาใช้เป็นสารต้นแบบและทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่ตำแหน่ง 9 หรือ 13 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการรักษาเสถียรภาพของ G-quadruplex DNA และศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

แปง และคนอื่นๆ ได้เสนองานวิจัย ที่มีการแทนที่หมู่ methoxyl ที่ตำแหน่ง 9 ของ berberine ด้วยหมู่ hydroxyethoxyl หมู่ aminoethoxyl หมู่ imidazolylethoxyl และหมู่ N-methylpiperazinylethoxyl ให้สารผลิตภัณฑ์ 5-8 (ภาพประกอบ 4) และศึกษาการเข้าจับกับสายของดีเอ็นเอจากต่อมไทมัสของลูกวัว (calf-thymus DNA, CT-DNA) ของสารอนุพันธ์ดังกล่าว พบว่าสารทั้ง 4 ชนิดมีประสิทธิภาพในการเข้าจับกับสายของ CT-DNA ได้ดีกว่า berberine โดยคาดว่าเกิดผ่านกลไกการแทรกอยู่ระหว่างสายของดีเอ็นเอ โดยเฉพาะสาร 6 ซึ่งมีการแทนที่ที่ตำแหน่ง 9 ด้วยหมู่อะมิโนปฐมภูมิ (primary amino group) พบว่ามีประสิทธิภาพในการเข้าจับกับ CT-DNA ได้ดีที่สุดและดีกว่า berberine 7 เท่า (Pang; et al. 2005: 5835-5840)



5 : R = -CH₂CH₂OH

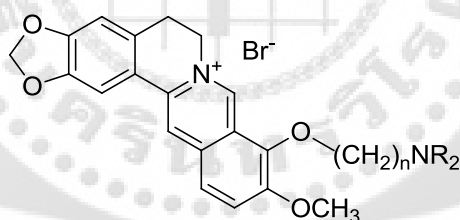
7 : R = -CH₂CH₂N

6 : R = -CH₂CH₂NH₂

8 : R = -CH₂CH₂N-CH₃

ภาพประกอบ 4 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 9-substituted berberine 5-8

ฉาง และคนอื่นๆ ได้ศึกษาการแทนที่หมู่ methoxyl ที่ตำแหน่ง 9 ของ berberine ด้วยหมู่ alkoxyl ชนิดไฮดรอกซีที่มีหมู่ amino ที่ปลายไฮดรอกซี ให้สารผลิตภัณฑ์ 9-15 (ภาพประกอบ 5) พบว่าสามารถรักษาเสถียรภาพของโครงสร้าง G-quadruplex ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น berberine และเป็นผลให้ลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ดียิ่งขึ้น โดยที่ค่า IC₅₀ ของสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมดมีค่าต่ำกว่าสารตั้งต้น 1 โดยเฉพาะสาร 11 ให้ค่า IC₅₀ ที่ 7.5 μ M ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าสารตั้งต้น 1 ถึงสิบเท่า (Zhang ;et al. 2007: 5493-5501)



9 : n=3

NR₂ = -N(CH₃)₂

13 : n=3

NR₂ = -N

10 : n=3

NR₂ = -N(C₂H₅)₂

14 : n=2

NR₂ = -N(C₂H₅)₂

11 : n=3

NR₂ = -N

15 : n=2

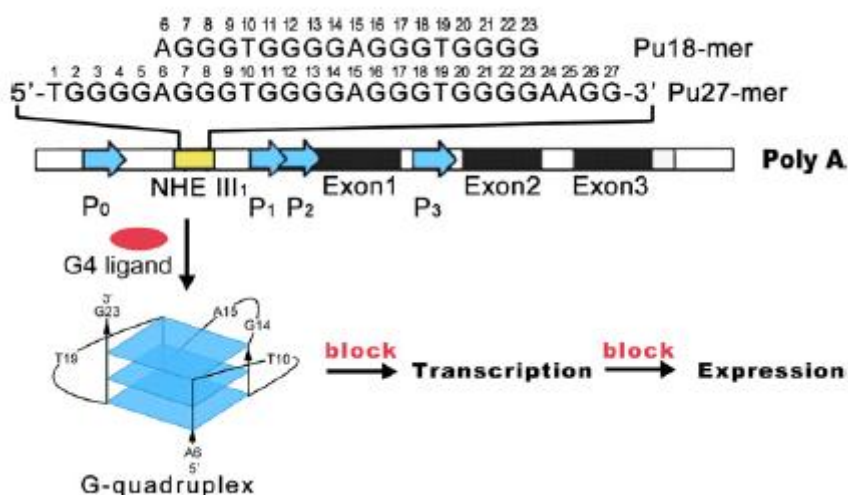
NR₂ = -N[CH(CH₃)₂]₂

12 : n=3

NR₂ = -N

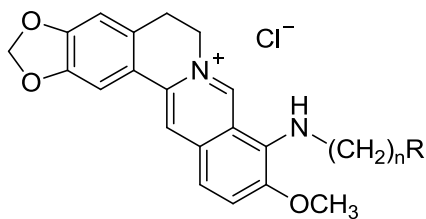
ภาพประกอบ 5 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 9-substituted berberine 9-15

Oncogenes เป็นยีนที่ผิดปกติ ซึ่งมีความสำคัญในการติดตามและตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลง (mutation) จากยีนที่ปกติ ในการถอดรหัส (transcription) เพื่อนำไปสู่การแบ่งเซลล์จะถูกควบคุมด้วย P1, P2 โปรโมเตอร์ และ nuclease hypersensitivity element III1 (NHE III₁) (ภาพประกอบ 6) โดยเฉพาะ NHE III₁ เป็นบริเวณที่ประกอบไปด้วยเบส guanine จำนวนมากที่สามารถม้วนตัวเกิดเป็นโครงสร้าง G-quadruplex ได้ และสามารถนำไปสู่การป้องกันการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ (Ma; et al. 2008: 7582-7591)

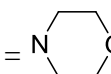


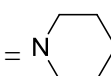
ภาพประกอบ 6 แสดงตำแหน่งของ NHE III₁ ใน Oncogene *c-myc* และการเกิดโครงสร้าง G-quadruplex (Ma; et al. 2008: 7582-7591)

มา และคนอื่นๆ ได้เสนอรายงานวิจัย การแทนที่ตำแหน่งที่ 9 ของ berberine ด้วยสารอนุพันธ์ของ primary amines ให้สารผลิตภัณฑ์ 16-25 (ภาพประกอบ 7) และศึกษาการเข้าจับกับ G-quadruplex DNA ในยีน *c-myc* ของ oncogene ผลจากการศึกษาพบว่าสารอนุพันธ์ทั้งหมดสามารถเพิ่มเสถียรภาพในโครงสร้าง G-quadruplex DNA ได้ดี รวมทั้งมีความจำเพาะและส่งผลต่อการยับยั้งการถอดรหัสของยีน *c-myc* ในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (HL 60 lymphomas cell line) ได้ดีกว่า berberine โดยเฉพาะสาร 20 และ 25 เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งพบว่า มีค่า IC₅₀ ที่ต่ำกว่าสารตั้งต้น 1 มากกว่า 50 และ 25 เท่า ตามลำดับ (Ma; et al. 2008: 7582-7591)



16 : $n = 2$ $R = N(CH_3)_2$ 21 : $n = 3$ $R = N(CH_3)_2$

17 : $n = 2$ $R =$  22 : $n = 3$ $R =$ 

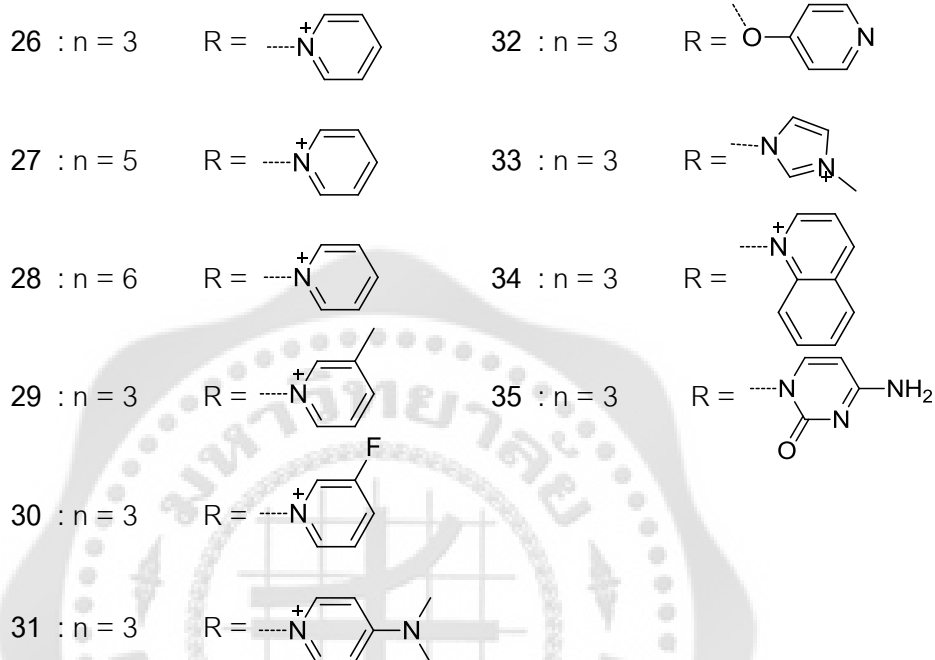
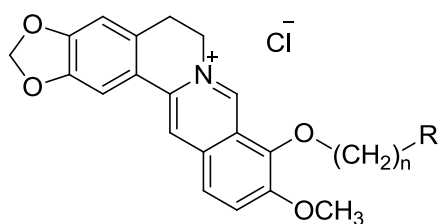
18 : $n = 2$ $R =$  23 : $n = 3$ $R =$ 

19 : $n = 2$ $R = OH$ 24 : $n = 3$ $R =$ 

20 : $n = 2$ $R =$  25 : $n = 6$ $R = NH_2$

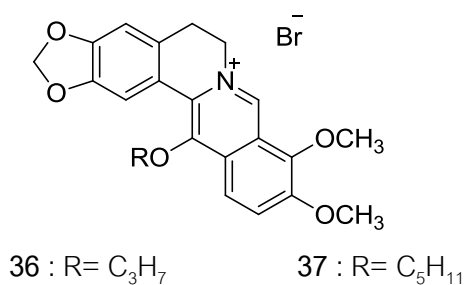
ภาพประกอบ 7 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 9-substituted berberine 16-25

มา และคนอื่นๆ ยังได้ทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ berberine ที่แทนที่หมู่ alkoxy ที่ตำแหน่ง 9 ของ berberine ด้วยหมู่ alkoxy ชนิดไซตรงที่มีหมู่ aza-aromatic ที่ปลายไซ ให้สารอนุพันธ์ 26-35 และศึกษาการทำด็อกกิ้ง (docking) ของสาร 26-35 กับ telomeric G-quadruplex DNA โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ AUTODOCK 4.0 พบว่าสารอนุพันธ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการเข้าจับกับโครงสร้างของ G-quadruplex ได้ดีกว่า berberine และพบว่าการเพิ่มหมู่ aza-aromatic ที่ปลายไซของหมู่ alkoxy ในโครงสร้างของ สาร 26-35 (ภาพประกอบ 8) ช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างของ G-quadruplex ได้ดียิ่งขึ้น (Ma; et al. 2009: 3414-3417)



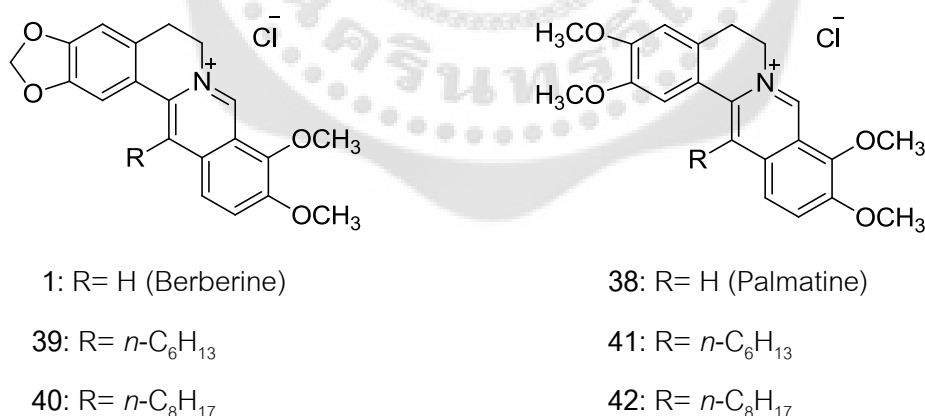
ภาพประกอบ 8 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 9-substituted berberine 26-35

จากงานวิจัยของ สิริธร สโมสร และคนอื่นๆ ในการแทนที่ไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง 13 ด้วยหมู่ alkoxyl ชนิดโซ่ตรงที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 1 ถึง 10 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H187 และเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB-oral cavity) ได้ดีกว่า berberine โดยเฉพาะเมื่อจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 3 (สาร 36) และ 5 (สาร 37) ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.002 และ 0.0003 $\mu\text{g/mL}$ ต่อเซลล์มะเร็งปอด และ 0.33 และ 0.004 $\mu\text{g/mL}$ ต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก ซึ่งดีกว่า berberine 80-500 เท่า (Samosorn; et al. 2011. *Thai Patent Application Number 1101002293*.)



ภาพประกอบ 9 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 13-substituted berberine 36 และ 37

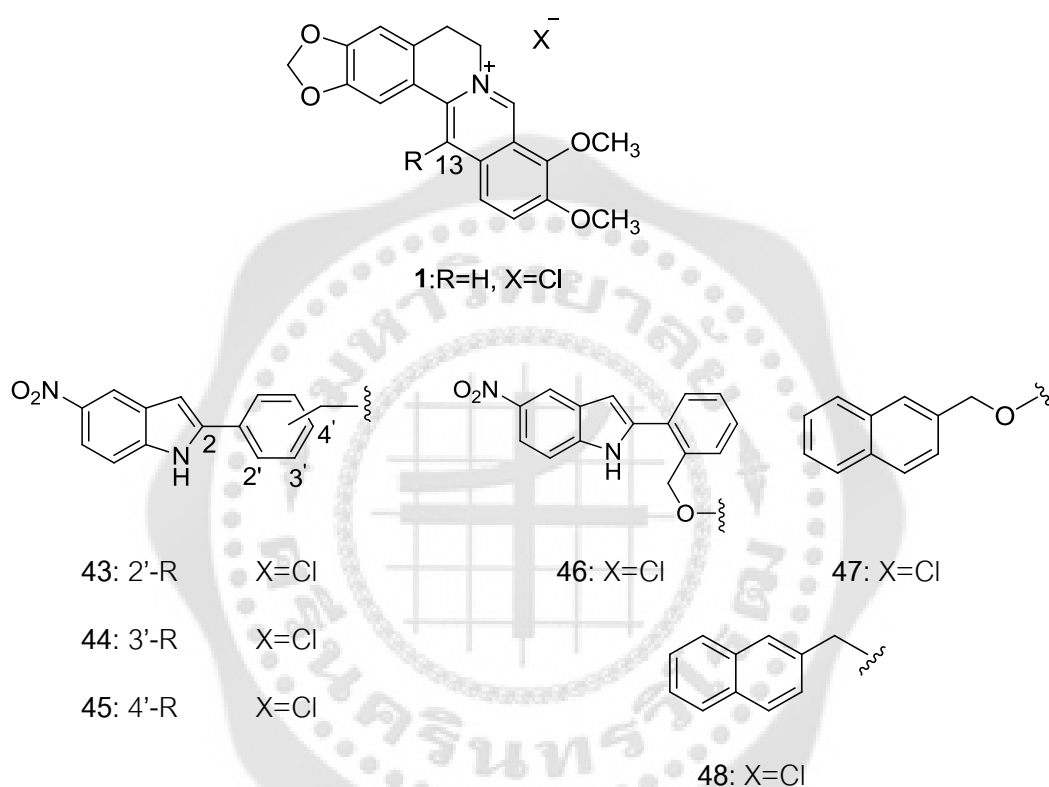
นาง และคนอื่นๆ ได้สังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ berberine และ palmatine (38) ที่มีการแทนที่ไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง 13 ด้วยหมู่ *n*-alkyl ได้สารอนุพันธ์ (39-42) และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 7 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งตับ 3 ชนิด (7710QGY, SMMC7721, HepG2) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (CEM) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ดื้อต่อยา vincristine (CEM/VCR) เซลล์มะเร็งผิวหนัง (K III) และเซลล์มะเร็งปอด (Lewis) พบว่าสารอนุพันธ์ทุกตัวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทุกชนิดได้ดีกว่า สารตั้งต้น berberine และ palmatine โดยเฉพาะสาร 40 และ 42 มีค่า IC₅₀ ในช่วง 0.02 ± 0.01 ถึง 13.58 ± 2.84 μM ต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 7 ชนิดซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารตั้งต้นทั้งสองถึงหกเท่า อย่างไรก็ตามจากผลการทดสอบความเป็นพิษในหนู สารเหล่านี้มีความเป็นพิษสูงเมื่อเทียบกับสารตั้งต้นทั้งสองชนิด (Zhang; et al. 2012: 11294-11302)



ภาพประกอบ 10 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 13-substituted berberine 39-40 palmatine (38) และสารอนุพันธ์ 13-substituted palmatine 41-42

กอร์แนล และคนอื่นๆ ได้สังเคราะห์สารอนุพันธ์ berberine ที่มีการแทนที่ไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง 13 ด้วยหมู่ 5-nitro-2-phenylindolyloxy และ 2-naphthalenyloxy ให้สารอนุพันธ์ 43-48

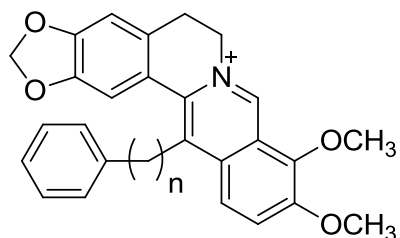
และศึกษาการเข้าจับกับโครงสร้างของ duplex DNA 3 แบบ (D1, D2, F10) และ G-quadruplex DNA 3 แบบ (Q4, Q1, Q2) โดยใช้เทคนิค Electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS) เพื่อศึกษาความจำเพาะในการเข้าจับของสารอนุพันธ์เหล่านี้กับโครงสร้างของดีเอ็นเอทั้งสองแบบ พบว่าสารอนุพันธ์ดังกล่าวมีความจำเพาะในการเข้าจับกับโครงสร้างของ G-quadruplex มากกว่าโครงสร้างของ duplex DNA และเข้าจับได้ดียิ่งกว่าสารตั้งต้น 1 (Gornall; et al. 2010: 6602-6604)



ภาพประกอบ 11 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 13-substituted berberine 43-48

บสาวมิด และคนอื่นๆ ได้ทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ berberine ที่มีการแทนที่ไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง 13 ด้วยหมู่ alkyl ที่มีหมู่ phenyl ที่ปลายโซ่ (terminal phenyl group) ให้สารผลิตภัณฑ์ (49-54) และศึกษาเปรียบเทียบขนาดความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน (alkyl chain) ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการเข้าจับกับโครงสร้างของ G-quadruplex DNA จากต่อมไทมัสของลูกวัว พบว่าการแทนที่ด้วยหมู่ phenylalkyl ดังกล่าวสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าจับกับ CT-DNA ได้ดีโดยเฉพาะสาร 51 ที่มีจำนวนคาร์บอนของหมู่ alkyl เท่ากับ 3 คาร์บอน สามารถเพิ่มเสถียรภาพของโครงสร้าง G-quadruplex DNA ได้ดีกว่าสารตั้งต้น berberine ถึงหกเท่า จากการศึกษานี้พบว่าการ

แทนที่ในตำแหน่งที่ 13 ของ berberine มีผลต่อการเพิ่มเสถียรภาพในโครงสร้าง G-quadruplex DNA ซึ่งน่าจะมีประโยชน์ในการพัฒนายารักษามะเร็งต่อไป (Bhowmik; et al. 2012: 2314-2324)



49: n=1

52: n=4

50: n=2

53: n=5

51: n=3

54: n=6

ภาพประกอบ 12 สูตรโครงสร้างสารอนุพันธ์ 13-substituted berberine 49-54

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์/เครื่องมือ และสารเคมี

วัสดุและสารเคมี

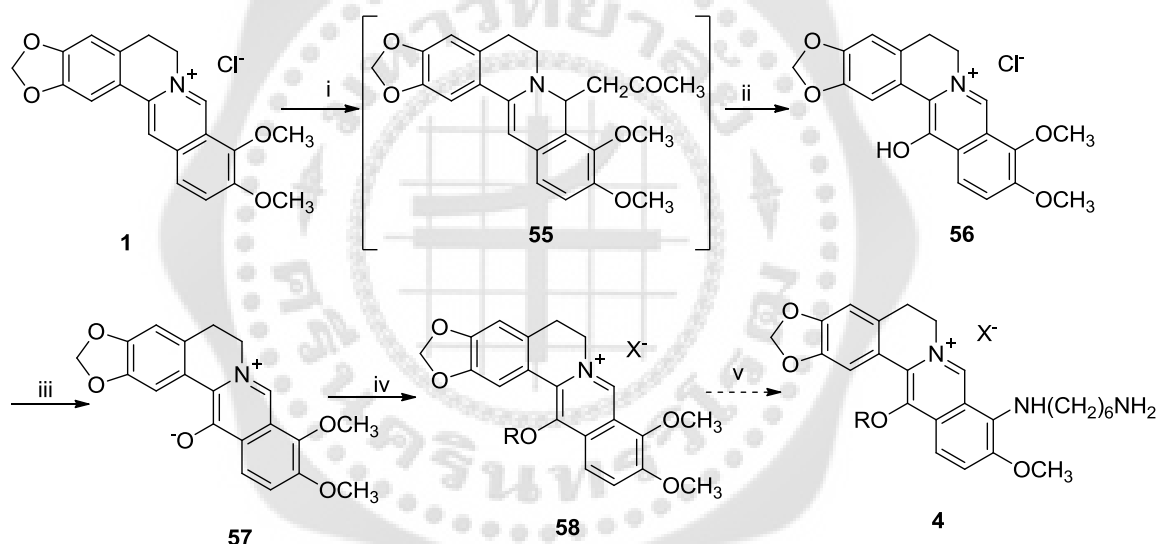
1. สาร berberine chloride (Fluka: 14050)
2. ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น
3. Acetonitrile (Analytical grade; BDH : 103866x)
4. Anhydrous potassium carbonate (Analytical grade; Riedel-de Haen : 12609)
5. Anhydrous sodium sulfate (Analytical grade; Univar : AF706007)
6. 1-Bromobutane (Analytical grade; ACROS organic : 106772500)
7. 1-Bromopentane (Analytical grade; Fluka : 17920)
8. 1-Bromopropane (Analytical grade; Fluka : 82140)
9. Calcium chloride (Analytical grade; Unilab : A960)
10. 1,6-hexyldiamine 98% (Analytical grade; Aldrich : H11696)
11. Hydrochloric acid 37% (Analytical grade; Carloerba : 403872)
12. Molecular Sieve UOP Type 5A (Analytical grade; Fluka : 69848)
13. Potassium permanganate
14. Pre-coated TLC aluminium sheet of silica gel 60 GF254
15. Sodium hydroxide (Analytical grade; Merck : 6498.1000)
16. สารดูดซับ
 - Aluminium oxide (basic) (Analytical grade; Aldrich : 19,944-3)
 - Aluminium oxide (neutral) (Analytical grade ; Merck :1077)
 - Celite (Analytical grade; Fluka : 22139)
 - Silica gel สำหรับ column chromatography
 - Silica gel (0.063-0.200mm, Merck : 7734)
 - Silica gel (<0.063mm, Merck :7729)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. หลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm (Spectroline Model CM-10)
2. Nuclear magnetic resonance spectrometer (Bruker AVANCE 300 MHz)
3. Mass spectrometer (Thermo Finnigan LC-Q)
4. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin)

3.2 แนวทางการสังเคราะห์ของสารอนุพันธ์ 9,13-disubstituted berberine (4-5)

3.2.1 การสังเคราะห์ของสารอนุพันธ์ 9-N-6'-aminohexyl,13-alkoxyberberine (4)



ภาพประกอบ 13 แนวทางการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 9-N-6'-aminohexyl,13-alkoxyberberine (4)

สารเคมีและสภาวะการทดลอง i: CH_3COCH_3 , NaOH (aq); ii: (a) KMnO_4 , CH_3COCH_3 , cold; (b) HCl in EtOH; iii: NaOH, CH_2Cl_2 ; iv: RX, CH_3CN , reflux; v: $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$, EtOH, reflux.

ในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 9-N-6'-aminohexyl,13-alkoxyberberine (4) ได้วางแผนการสังเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยา 5 ขั้นตอน (ภาพประกอบ 13) โดยนำ berberine มาทำปฏิกิริยา Mannich กับ acetone และ sodium hydroxide ได้สารอนุพันธ์ 8-acetylberberine (55) ตามด้วยปฏิกิริยา oxidation ด้วย potassium permanganate ได้สารอนุพันธ์ 13-hydroxyberberine (56) จากนั้นทำ

ปฏิกิริยา deprotonation โดยใช้สารละลาย NaOH ให้สารอนุพันธ์ berberine phenol betaine (57) ตามด้วยปฏิกิริยา alkylation กับสารประกอบ alkyl halide ให้สารอนุพันธ์ 13-alkoxyberberine (58) และสุดท้ายทำปฏิกิริยา nucleophilic aromatic substitution กับ 1,6-hexyldiamine ให้สารผลิตภัณฑ์ 4 ตามต้องการ แต่เนื่องจากในขั้นการทดลอง ผู้วิจัยได้ทำการทดลองแทนที่คาร์บอนในตำแหน่งที่ 9 โดยใช้สาร 58 เมื่อ $R = C_4H_9$ (13-butyloxyberberine) ทำปฏิกิริยากับ 1,6-hexyldiamine ในเอทานอล ผลปรากฏว่าจากการติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่า เกิดสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณที่น้อยมากจนไม่สามารถแยกออกมาให้บริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนการทำสารให้บริสุทธิ์ ไม่สามารถแยกสารที่ต้องการออกมาได้ ผู้วิจัยจึงได้ยุติแผนการสังเคราะห์สาร 4

3.2.1.1 การสังเคราะห์สาร 13-hydroxyberberine (56)

ละลาย berberine (1) 100 mg (0.27 mmol) ใน acetone 10 mL ค่อยๆ เติม 30% NaOH จนสารละลายมี pH ประมาณ 11 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมน้ำเย็น กรองแยกเอาผลึกสีเหลืองออกมา ล้างผลึกด้วย MeOH ประมาณ 10 mL จะได้สาร 8-Acetyldihydroberberine (55) 71 mg (67.1%) แล้วละลายผลึกโดยการเติม acetone 10 mL กวนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมสารละลาย $KMnO_4$ 10 mL (10 mg, 0.63 mmol/น้ำ 10 mL) กวนปฏิกิริยาต่อที่ -20 องศาเซลเซียส กรองเอาตะกอนสีดำออก นำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกให้แห้ง แล้วละลายด้วย MeOH 2 mL และ hydrochloric acid เข้มข้น 2 mL reflux ที่ 65-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก กรองเอาผลึก และทำการตกผลึกซ้ำด้วย EtOH ใน CH_2Cl_2 ล้างผลึกด้วย EtOH เย็น จะได้ของแข็งสีเหลืองเข้มของ 13-hydroxyberberine (56) 62 mg (79.5 %) (บงกช ตันวิรัตน์. 2552: 35-52.)

3.2.1.2 การสังเคราะห์สาร 13-butyloxyberberine (58)

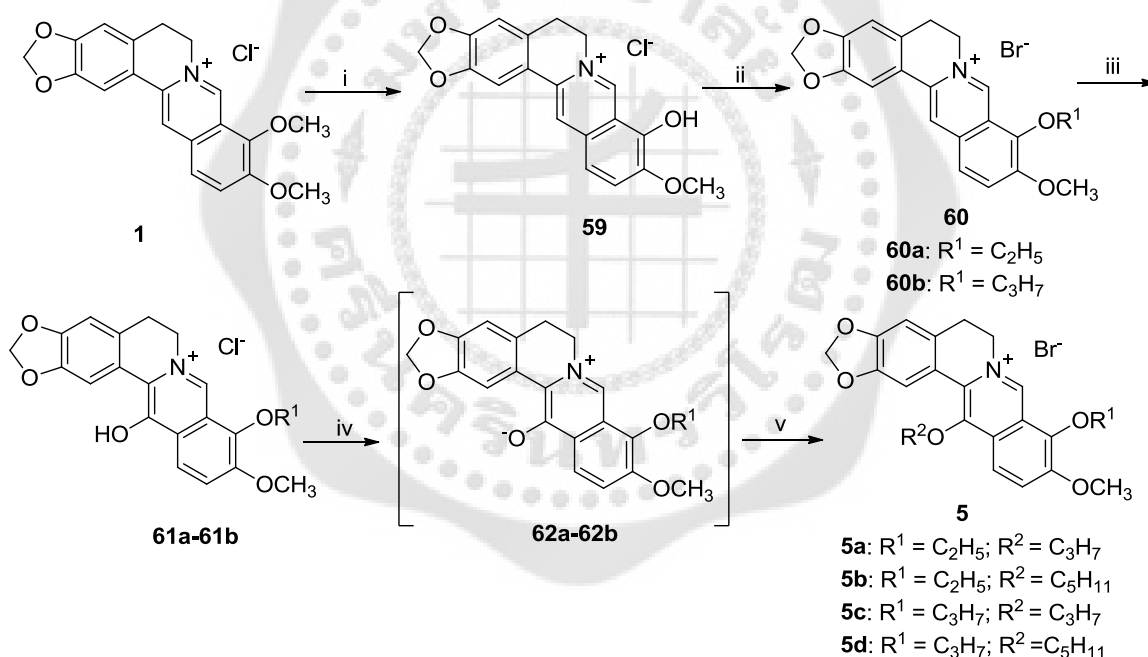
นำสาร 13-hydroxyberberine (56) 60 mg (0.15 mmol) เติม 5% NaOH แล้วสกัดด้วย CH_2Cl_2 จำนวน 5 ครั้ง รวมขึ้น CH_2Cl_2 เติม Na_2SO_4 anhydrous กรองแล้วนำไปทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ จะได้ berberine phenol betaine (57) 40 mg แล้วนำ berberine phenol betaine 40 mg ละลายใน CH_3CN 2 mL ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน แล้วเติม 1-bromobutane 0.4 mL (3.72 mmol) กวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ นำสารผสมที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออก และทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์

ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ได้ของแข็งสีเหลือง ของ 13-butyloxyberberine (58) 16 mg (28.8%) (บงกช ตันวิรัตน์. 2552: 35-52.)

3.2.1.3 ความพยายามในการสังเคราะห์สาร 4

นำ 13-butyloxyberberine (58) 16 mg (0.03 mmol) ผสมกับ 1,6-hexyldiamine 40 mg (0.34 mmol) ในขวดกั่นกลม แล้วเติม EtOH 2 mL กวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่าเกิดสารผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าจะเป็สาร 4 ในปริมาณที่น้อยมาก และได้ทำปฏิกิริยานี้ซ้ำ พบว่าผลการทดลองยังเหมือนเดิม และเมื่อได้นำสารผสมที่เกิดขึ้นไปแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ ไม่สามารถแยกออกมาได้ ผู้วิจัยจึงได้ยุติการสังเคราะห์สาร 4

3.2.2 การสังเคราะห์ของสารอนุพันธ์ 9,13-dialkoxyberberine (5)



ภาพประกอบ 14 การสังเคราะห์ของสารอนุพันธ์ 9,13-dialkoxyberberine (5a-5d)

สารเคมีและสภาวะการทดลอง i: DMF, heat; ii: K₂CO₃, R¹X, DMF, reflux; iii: (a) CH₃COCH₃, NaOH (aq); (b) KMnO₄, CH₃COCH₃, cold; (c) HCl in EtOH; iv: NaOH, CH₂Cl₂; v: R²X, CH₃CN, reflux .

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 9,13-dialkoxyberberine (5a-5d) ทำโดยใช้ปฏิกิริยา 5 ขั้นตอน (ภาพประกอบ 14) โดยนำ berberine มาทำปฏิกิริยา Demethylation ด้วยความร้อนสูงให้

berberubine (59) แล้วนำไปทำปฏิกิริยา alkylation กับสารประกอบ alkyl halide ในสภาวะที่เป็นต่าง ให้สารอนุพันธ์ 9-alkoxyberberine (60a-60b) หลังจากนั้นนำสารที่ได้ไปทำปฏิกิริยา Mannich กับ acetone และ NaOH ตามด้วยปฏิกิริยา oxidation ด้วย KMnO_4 ได้สารอนุพันธ์ 9-alkoxy,13-hydroxyberberine (61a-61b) และทำปฏิกิริยา deprotonation โดยใช้สารละลาย NaOH ให้สารอนุพันธ์ phenol betaine (62a-62b) ซึ่งไม่เสถียรต้องนำไปทำปฏิกิริยา alkylation ต่อทันทีกับสารประกอบ alkyl halide ให้สารอนุพันธ์ 9,13-dialkoxyberberine (5a-5d) ตามต้องการ

3.2.2.1 การสังเคราะห์สาร berberrubine (59)

นำ berberine 1.00 g (2.690 mmol) เติม DMF 5 mL กวนที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ใน sealed tube เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง นำสารที่ได้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เจือจางด้วย EtOH 20 mL นำไประเหยตัวทำละลายจนแห้ง ตกตะกอนด้วย 5% HCl ใน EtOH ล้างตะกอนด้วย EtOH เย็น ทำให้แห้ง ได้ของแข็งสีแดงของสาร 59 น้ก 0.840 g (87.7%)

3.2.2.2 การสังเคราะห์สาร 9-alkoxyberberine (60)

นำสาร 59 (1.61 mmol) ละลายใน DMF 2 mL แล้วเติม K_2CO_3 (0.796 mmol) กวนที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส แล้วเติม 1-bromoethane (13.39 mmol) หรือ 1-bromopropane (11.00 mmol) กวนและให้ความร้อนต่อที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออก ทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ได้ของแข็งสีเหลืองของสาร 60a 382 mg (61.0%) หรือ 60b 370 mg (57.5%) (ตารางที่ 2)

3.2.2.3 การสังเคราะห์สาร 9-alkoxy,13-hydroxyberberine (61)

นำสาร 60a หรือ 60b (1.22 mmol) เติม acetone 50 mL กวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลาย 30% NaOH 30 mL สารละลายจะมีค่า pH ประมาณ 11 reflux ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที - 1 ชั่วโมง เติมน้ำเย็น ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ตกตะกอน จากนั้นกรองและล้างด้วยน้ำเย็น จนกระทั่ง pH ของ filtrate เป็นกลาง จะได้ของแข็งสีเหลืองนวล เนื่องจากสารที่ได้ไม่เสถียร ต้องทำปฏิกิริยา oxidation ต่อไปทันที โดยนำของแข็งที่ได้มาเติม acetone 30 mL กวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลาย KMnO_4 20 mg ในน้ำ 20 mL (1.26 mmol) กวนต่อที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง กรองตะกอนสีดำออกและล้างตะกอนด้วย acetone นำส่วนของ filtrate มาระเหยตัวทำละลายจนแห้ง นำของแข็งที่ได้มาเติม

MeOH 5 mL และ HCl เข้มข้น 2 mL reflux ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออก แล้วทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี จะได้สาร **61a** หรือ สาร **61b** (ตารางที่ 2)

3.2.2.4 การสังเคราะห์สาร 9,13-dialkoxyberberine (5)

นำสาร **61a** หรือ **61b** (0.27 mmol) เติม สารละลาย 5% NaOH 30 mL สกัดด้วย CH_2Cl_2 (15 mL x 5) รวมชั้น CH_2Cl_2 เติม Na_2SO_4 anhydrous กรอง ระเหยตัวทำละลายออก ทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ได้ phenol betaine **62a** หรือ **62b** เป็นของแข็งสีเหลืองเข้มหนัก 104 mg (86.86 %) และ 101 mg (84.35 %) ตามลำดับ นำ phenol betaine **62a** หรือ **62b** ที่ได้ 0.11 mmol เติม CH_3CN 2 mL เติม 1-bromopropane (5.35 mmol) หรือ 1-bromopentane (4.40 mmol) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออก ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ให้สารผลิตภัณฑ์ **5a-5d** ตามต้องการ (ตารางที่ 2)

3.3 การพิสูจน์ยืนยันสูตรโครงสร้างของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้

นำสารผลิตภัณฑ์ที่ทำให้บริสุทธิ์ มาหาสูตรโครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโตรสโกปี โดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลต่างๆ ของสารกับสารที่มีผู้รายงานไว้แล้ว ในงานวิจัยนี้บันทึกค่า R_f ของสารบนแผ่น precoated silica gel 60 GF254 การหาตำแหน่งของสารบน TLC ใช้แสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 และ/หรือ 365 nm จะปรากฏเป็นสีแตกต่างกัน การบันทึกข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ใช้เครื่อง Bruker AVANCE 300 FT-NMR สเปกโตรมิเตอร์ ที่ 300 MHz สำหรับ ^1H NMR สเปกตรัม และที่ 75 MHz สำหรับ ^{13}C NMR โดยรายงานในหน่วย δ บันทึกในตัวทำละลาย CDCl_3 หรือตัวทำละลายชนิดอื่น ตามที่ระบุในการรายงานข้อมูล โดยใช้ตำแหน่งของสัญญาณตัวทำละลาย CDCl_3 ที่ไม่ถูกควมทเทอเรดที่ δ 7.24 และ 77.00 เป็นจุดอ้างอิงสำหรับ ^1H NMR spectrum และ ^{13}C NMR spectrum ตามลำดับ หรือ TMS ที่ δ 0.00 เป็นจุดอ้างอิง สำหรับ ^1H NMR spectrum และข้อมูลของ ESI แมสสเปกตรัม บันทึกด้วยเครื่อง Thermo Finnigan LC-Q mass spectrometer

3.4 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, BIOTEC)

3.4.1 Cancer cell growth inhibition

Resazurin microplate assay (REMA) was performed using the method described by Brien et al. Cells at a logarithmic growth phase are harvested and diluted to 2.2×10^4 cells/mL for KB, 3.3×10^4 cells/mL for MCF-7, and NCI-H187, in fresh medium. Successively, 5 μ L of test sample diluted in 5% DMSO and 45 μ L of cell suspension were added to 384-well plates then incubated at 37°C in 5% CO₂ incubator. After the incubation period (3 days for KB and MCF-7, and 5 days for NCI-H187), 12.5 μ L of 62.5 μ g/mL resazurin solution was added to each well, and the plates were then incubated at 37°C for 4 h. Fluorescence signal was measured using SpectraMax M5 multi-detection microplate reader (Molecular Devices, USA) at the excitation and emission wavelengths of 530 nm and 590 nm.

3.4.2 Cytotoxicity against primate cell line

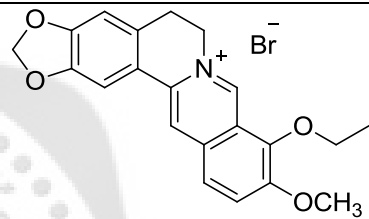
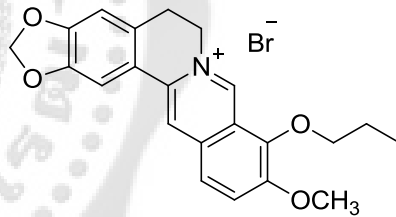
The Green fluorescent protein-expressing Vero cell line was generated in National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) by stably transfecting the African green monkey kidney cell line (Vero, ATCC CCL-81), with pEGFP-N1 plasmid (Clontech). The cell line was maintained in minimal essential medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1.5 g/L sodium bicarbonate and 0.8 mg/ml geneticin, at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. The assay was carried out by adding 45 μ L of cell suspension at 3.3×10^4 cells/mL to each well of 384-well plates containing 5 μ L of test compounds previously diluted in 0.5% DMSO, and then incubating for 4 days in 37°C incubator with 5% CO₂. Fluorescence signals were measured by using SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, USA) in the bottom reading mode with excitation and emission wavelengths of 485 and 535 nm.

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลจากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

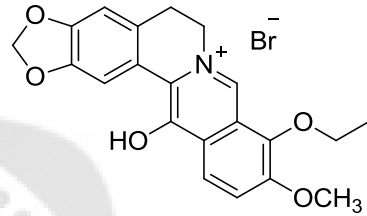
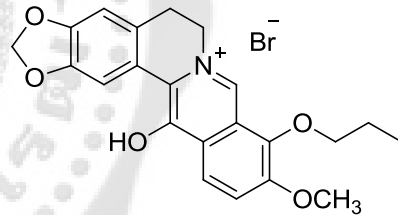
นำผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ได้ มาวิเคราะห์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร



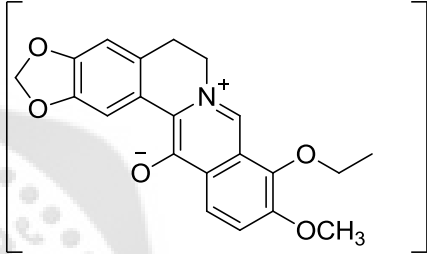
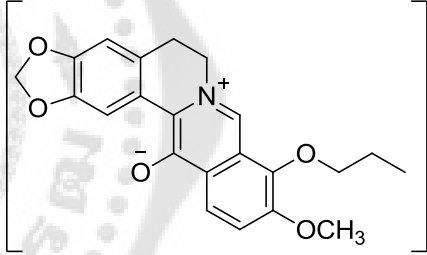
ตาราง 2. สภาวะของปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร 60a-b และ 5a-d การทำสารให้บริสุทธิ์ และร้อยละของผลิตภัณฑ์

รีเอเจนต์	สภาวะ	การทำสารให้บริสุทธิ์	ผลิตภัณฑ์	น้ำหนักผลิตภัณฑ์และร้อยละผลิตภัณฑ์
สาร 59 520 mg (1.61 mmol) K ₂ CO ₃ 110 mg (0.796 mmol) 1-bromoethane 1.0 mL (13.39 mmol)	ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-80 °C 2-3 ชั่วโมง	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มหัว ทีละ 1%	 60a	382 mg (61.0%)
สาร 59 520 mg (1.61 mmol) K ₂ CO ₃ 110 mg (0.796 mmol) 1-bromopropane 1.0 mL (11.00 mmol)	ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-80 °C 2-3 ชั่วโมง	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มหัว ทีละ 1%	 60b	370 mg (57.5%)

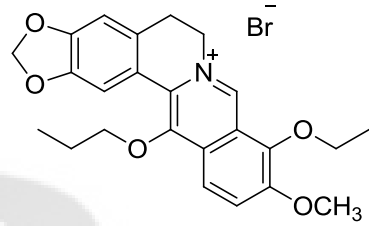
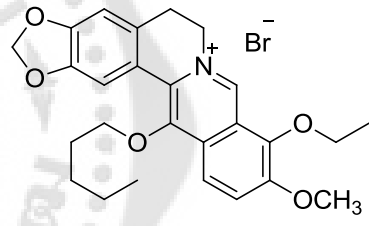
ตาราง 2 (ต่อ)

รีเอเจนต์	สภาวะ	การทำสารให้บริสุทธิ์	ผลิตภัณฑ์	น้ำหนักผลิตภัณฑ์และร้อยละผลิตภัณฑ์
สาร 60a i) 525 mg (1.22 mmol) acetone 50 mL 30% NaOH 30 mL ii) acetone 30 mL, KMnO ₄ 0.020 g (1.26 mmol) ในน้ำ 20 mL	ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-70 °C 30 นาที – 1 ชั่วโมง pH ประมาณ 11 กรองและ ล้างด้วยน้ำเย็นจนกระทั่ง pH ของ filtrate เป็นกลางทำ ปฏิกิริยา oxidation ต่อที่ อุณหภูมิ -20 °C	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063- 0.200mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มหัว ทีละ 1%	 61a	153 mg (28%)
สาร 60b i) 525 mg (1.22 mmol) acetone 50 mL 30% NaOH 30 mL ii) acetone 30 mL, KMnO ₄ 0.020 g (1.26 mmol) ในน้ำ 20 mL	ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-70 °C 30 นาที – 1 ชั่วโมง pH ประมาณ 11 กรองและ ล้างด้วยน้ำเย็นจนกระทั่ง pH ของ filtrate เป็นกลางทำ ปฏิกิริยา oxidation ต่อที่ อุณหภูมิ -20 °C	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063- 0.200 mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มหัว ทีละ 1%	 61b	121 mg (22.2%)

ตาราง 2 (ต่อ)

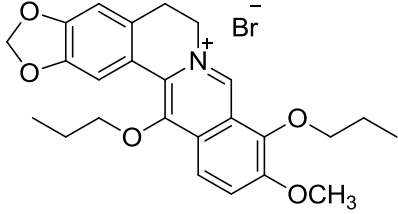
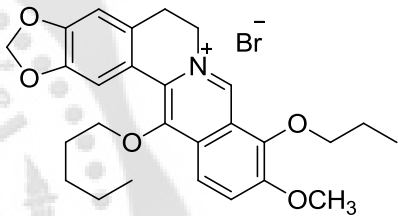
รีเอเจนต์	สภาวะ	การทำสารให้บริสุทธิ์	ผลิตภัณฑ์	น้ำหนักผลิตภัณฑ์และร้อยละผลิตภัณฑ์
สาร 61a 120 mg (0.27 mmol) 5% NaOH 30 mL สกัดด้วย CH ₂ Cl ₂ (15 mL x 5)	ที่อุณหภูมิห้อง	ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้ง ภายใต้สุญญากาศ	 62a	104 mg (86.9 %)
สาร 61b 120 mg (0.27 mmol) 5% NaOH 30 mL สกัดด้วย CH ₂ Cl ₂ (15 mL x 5)	ที่อุณหภูมิห้อง	ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้ง ภายใต้สุญญากาศ	 62b	101 mg (84.4 %)

ตาราง 2 (ต่อ)

รีเอเจนต์	สภาวะ	การทำสารให้บริสุทธิ์	ผลิตภัณฑ์	น้ำหนักผลิตภัณฑ์และร้อยละผลิตภัณฑ์
สาร 62a (50 mg, 0.11 mmol) 1-bromopropane (0.4 ml, 4.40 mmol) CH ₃ CN (2 mL)	ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-65 °C 20 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศของ แก๊สไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มหัว ทีละ 1%	 5a	32 mg (58.0%)
สาร 62a (50 mg, 0.11 mmol) 1-bromopentane (0.4 ml, 3.21 mmol) CH ₃ CN (2 mL)	ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-65 °C 20 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศของ แก๊สไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มหัว ทีละ 1%	 5b	31 mg (52.7%)

ตาราง 2 (ต่อ)

รีเอเจนต์	สภาวะ	การทำสารให้บริสุทธิ์	ผลิตภัณฑ์	น้ำหนักผลิตภัณฑ์และร้อยละผลิตภัณฑ์
-----------	-------	----------------------	-----------	------------------------------------

สาร 61b (50 mg, 0.11 mmol) 1-bromopropane (0.4 mL, 4.40 mmol) CH ₃ CN (2 mL)	ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-65 °C 20 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศของ แก๊สไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มหัว ทีละ 1%	 5c	28 mg (51.4%)
สาร 61b (50 mg, 0.11 mmol) 1-bromopentane (0.4 mL, 3.21 mmol) CH ₃ CN (2 mL)	ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-65 °C 20 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศของ แก๊สไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มหัว ทีละ 1%	 5d	28 mg (49.2%)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ข้อมูลทางกายภาพและสเปกโทรสโกปีของสารที่สังเคราะห์

8-Acetyldihydroberberine (55) (Iwasa; et al. 1998: 748-751.)

ของแข็งสีเหลืองสว่าง 63 mg (59.5%)

Rf 0.71 (3% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR (CDCl_3) แสดงในตาราง 3

ESI-MS (+ve) m/z : 393 (ตรงกับ $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{NO}_5$)

13-Hydroxyberberine (56) (Iwasa; et al. 1998: 748-751.)

ของแข็งสีเหลืองขุ่น (2.75 g, 71%)

Rf 0.37 (3% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR (CDCl_3) แสดงในตาราง 3

ESI-MS (+ve) m/z : 352 (ตรงกับ $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}^+\text{O}_5$)

13-Oxidoberberine (57) (Iwasa; et al. 1998: 748-751.)

ของแข็งสีเหลือง (100 mg, 85%)

Rf 0.37 (3% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR (CDCl_3) แสดงในตาราง 4

ESI-MS (+ve) m/z : 351 (ตรงกับ $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}^+\text{O}_5$)

13-Butyloxy-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo
[5,6-a]quinolizinium bromide (58) (บงกช ตันวิรัตน์. 2552: 35-52.)

ของแข็งสีเหลืองนวล 16 mg (28.8%)

m.p. 172-173 °C, Rf 0.42 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR แสดงในตาราง 4

ESI-MS (+ve) m/z : 408.3 (ตรงกับ $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}^+\text{O}_5$)

Berberrubine (59) (Jeon Y. W.; et al. 2002: 391-394)

ของแข็งสีแดง 0.840 g (87.7%)

Rf 0.29 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR (CDCl_3) แสดงในตาราง 4

ESI-MS (+ve) m/z : 322 (ตรงกับ $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}^+\text{O}_4$)

9-Ethoxy-10-methoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium
bromide (60a) (Kim; et al. 2003: KR02061 20011129)

ของแข็งสีเหลือง 382 mg (61.0%)

Rf 0.34 (5% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR (CDCl_3) แสดงในตาราง 5

ESI-MS (+ve) m/z : 350.2 (ตรงกับ $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}^+\text{O}_4$)

10-Methoxy-9-propyloxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium
bromide (60b) (Kim; et al. 2003: KR02061 20011129)

ของแข็งสีเหลือง 370 mg (57.5%)

Rf 0.34 (5% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR (CDCl_3) แสดงในตาราง 5

ESI-MS (+ve) m/z : 364.2 (ตรงกับ $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}^+\text{O}_4$)

9-Ethoxy-13-hydroxy-10-methoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-
a]quinolizinium bromide (61a)

ของแข็งสีเหลือง 153 mg (28.0%)

Rf 0.39 (5% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC (CDCl_3)) แสดงในตาราง 6

ESI-MS (+ve) m/z : 366.4 (ตรงกับ $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}^+\text{O}_5$)

13-Hydroxy-10-methoxy-9-propyloxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-
a]quinolizinium bromide (61b)

ของแข็งสีเหลือง 121 mg (22.2%)

Rf 0.39 (5% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC (CDCl_3)) แสดงในตาราง 7

ESI-MS (+ve) m/z : 380.4 (ตรงกับ $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}^+\text{O}_5$)

9-Ethoxy-10-methoxy-13-propyloxy-5,6-dihydrobenzo[*g*]-1,3-benzodioxolo[5,6-*a*]quinolizinium bromide (5a)

ของแข็งสีเหลืองนวล 32 mg (58.0%)

Rf 0.32 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC (CDCl_3)) แสดงในตาราง 8

ESI-MS (+ve) m/z : 408 (ตรงกับ $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}^+\text{O}_5$)

9-Ethoxy-10-methoxy-13-(pentyloxy) -5,6-dihydrobenzo[*g*]-1,3-benzodioxolo[5,6-*a*]quinolizinium bromide (5b)

ของแข็งสีเหลืองนวล 31 mg (52.7%)

Rf 0.32 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC (CDCl_3)) แสดงในตาราง 9

ESI-MS (+ve) m/z : 436.3 (ตรงกับ $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}^+\text{O}_5$)

10-Methoxy-9,13-dipropyloxy-5,6-dihydrobenzo[*g*]-1,3-benzodioxolo[5,6-*a*]quinolizinium bromide (5c)

ของแข็งสีเหลืองนวล 28 mg (51.4%)

Rf 0.32 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC (CDCl_3)) แสดงในตาราง 10

ESI-MS (+ve) m/z : 422.5 (ตรงกับ $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}^+\text{O}_5$)

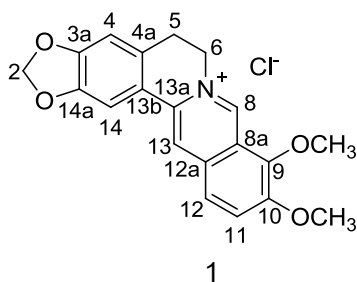
10-Methoxy-13-(pentyloxy)-9-propyloxy-5,6-dihydrobenzo[*g*]-1,3-benzodioxolo[5,6-*a*]quinolizinium bromide (5d)

ของแข็งสีเหลืองนวล 28 mg (49.2%)

Rf 0.32 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC และ HMBC (CDCl_3)) แสดงในตาราง 11

ESI-MS (+ve) m/z : 450.2 (ตรงกับ $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}^+\text{O}_5$)



ตาราง 3 ข้อมูล ^1H NMR ของสารประกอบ Berberine (1), 8-Acetyldihydroberberine (55) และ 13-Hydroxyberberine (56)

ตำแหน่ง	Berberine (1) ^a	55 ^a	56 ^a
	บันทึกใน CD_3OD	บันทึกใน CDCl_3	บันทึกใน CD_3OD
2	6.15 (s, 2H)	5.98 (s, 2H)	6.07 (s, 2H)
4	7.01 (s, 1H)	6.74 (s, 1H)	6.95 (s, 1H)
5	3.30 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H)	2.61-2.81 (m, 2H)	3.17 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H)
6	4.95 (br s, 2H)	3.11-3.28 (m, 2H)	4.83 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H)
8	9.82 (s, 1H)	5.19 (dd, $J = 6.3$ Hz, 5.1 Hz, 1H)	9.39 (s, 1H)
11 ^b	8.04 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	6.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H)	8.06 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)
12 ^b	8.16 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H)	8.21 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)
13	8.74 (s, 1H)	6.48 (s, 1H)	
14	7.70 (s, 1H)	7.23 (s, 1H)	8.01 (s, 1H)
9-OCH ₃	4.25 (s, 3H)	3.75 (s, 3H)	4.18 (s, 3H)
10-OCH ₃	4.15 (s, 3H)	3.75 (s, 3H)	4.11 (s, 3H)
CH ₂ CO		2.91 (dd, $J = 14.7, 4.5$ Hz, 1H)	
		2.30 (dd, $J = 14.7, 4.5$ Hz, 1H)	
COCH ₃		2.02 (s, 3H)	

^a Iwasa; et al. 1998. 64: 748-751.

^b สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 4 ข้อมูล ^1H NMR ของสารประกอบ 13-Oxidoberberine (57), 13-Butoxyberberine (58) และ Berberrubine (59)

ตำแหน่ง	57 ^a บันทึกใน CDCl_3	58 ^b บันทึกใน CDCl_3	Berberrubine (59) ^c บันทึกใน DMSO
2	5.98 (s, 2H)	6.20 (s, 2H)	6.16 (s, 2H)
4	6.80 (s, 1H)	6.87 (s, 1H)	7.08 (s, 1H)
5	3.07 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H)	3.30 (t, $J = 12.0$ Hz, 2H)	3.19 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H)
6	4.66 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H)	5.28 (t, $J = 12.0$ Hz, 2H)	4.94 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H)
8	8.66 (s, 1H)	10.38 (s, 1H)	9.74 (s, 1H)
11 ^d	7.64 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)	7.84 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H)	8.15 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)
12 ^d	8.21 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)	7.98 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H)	7.98 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)
13			8.93 (s, 1H)
14	8.37 (s, 1H)	7.94 (s, 1H)	7.78 (s, 1H)
9-OCH ₃ ^e	4.05 (s, 3H)	4.35 (s, 3H)	
10-OCH ₃ ^e	4.03 (s, 3H)	4.08 (s, 3H)	4.03 (s, 3H)
1'		3.84 (t, $J = 13.0$ Hz, 2H)	
2'		1.75-1.80 (m, 2H)	
3'		1.52-1.58 (m, 2H)	
4'		0.986 (t, $J = 15.5$ Hz, 3H)	

^a Iwasa; et al. 1998. 64: 748-751.

^b บงกช ตันวิรัตน์. 2552: 35-52.

^c Jeon Y. W.; et al. 2002: 391-394.

^{d, e} สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 5 ข้อมูล ^1H NMR ของสารประกอบ 60a และ 60b เทียบกับ Berberine (1)

ตำแหน่ง	Berberine (1) ^a บันทึกใน CD_3OD	60a บันทึกใน CDCl_3	60b บันทึกใน DMSO
2	6.15 (s, 2H)	5.94 (s, 2H)	6.16 (s, 2H)
4	7.01 (s, 1H)	6.71 (s, 1H)	7.08 (s, 1H)
5	3.30 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H)	3.10 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H)	3.19 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H)
6	4.95 (br s, 2H)	4.81 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H)	4.94 (t, $J = 6$ Hz, 2H)
8	9.82 (s, 1H)	9.56 (s, 1H)	9.74 (s, 1H)
11 ^b	8.04 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	7.78 (d, $J = 8$ Hz, 1H)	8.15 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H)
12 ^b	8.16 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	7.76 (d, $J = 8$ Hz, 1H)	7.98 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H)
13	8.74 (s, 1H)	8.29 (s, 1H)	8.93 (s, 1H)
14	7.70 (s, 1H)	7.31 (s, 1H)	7.78 (s, 1H)
9-OCH ₃	4.25 (s, 3H)	-	-
10-OCH ₃	4.15 (s, 3H)	3.92 (s, 3H)	4.03 (s, 3H)
1'		4.36 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H)	4.24 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H)
2'		1.36 (t, $J = 7$ Hz, 3H)	1.81-1.91 (m, 2H)
3'			1.03 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H)

^a Iwasa; et al. 1998. 64: 748-751.

^b สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 6 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 61a บันทึกใน CDCl_3

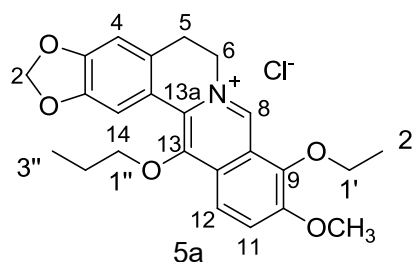
ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	HMQC	HMBC
2	5.94 (s, 2H)	100.9	C-2	C-3a, C-14a
3a		146.1		
4	6.57 (s, 1H)	106.8	C-4	C-3a, C-5, C-14a
4a		123.7		
5	2.97 (t, $J = 6$ Hz, 2H)	28.6	C-5	C-4, C-4a, C-6
6	4.43 (t, $J = 6$ Hz, 2H)	57.5	C-6	C-4a, C-5, C-8
8	8.88 (s, 1H)	108.8	C-8	C-8a, C-12a, C-12a
8a		126.4		
9		141.2		
10		150.3		
11 ^a	8.26 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	121.9	C-11	C-9, C-10, C-13a
12 ^a	7.30 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	117.4	C-12	C-8a, C-10, C-11, C-12a, C-13
12a		123.9		
13		130.8		
13a		124.2		
13b		146.1		
14	7.71 (s, 1H)	117.2	C-14	C-4a, C-13, C-13a, C-14a
14a		146.3		
10-OCH ₃	3.93 (s, 3H)	56.4	10-OCH ₃	C-10
1'	4.19 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H)	69.3	C-1'	C-9, C-2'
2'	1.41 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H)	15.7	C-2'	C-1'

^a สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 7 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 61b บันทึกใน DMSO-d_6

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	HMQC	HMBC
2	6.00 (s, 2H)	100.7	C-2	C-3a, C-14a
3a		145.2		
4	8.88 (s, 1H)	107.4	C-4	C-3a, C-13b, C-14a
4a		127.2		
5	2.99 (t, $J = 6$ Hz, 2H)	27.6	C-5	C-4, C-4a, C-6, C-13b
6	4.60 (t, $J = 6$ Hz, 2H)	56.4	C-6	C-4a, C-5, C-8
8	7.97 (s, 1H)	117.2	C-8	C-6, C-8a, C-9, C-12a, C-13a
8a		130.2		
9		141.3		
10		150.2		
11 ^a	7.49 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	117.6	C-11	C-8a, C-9, C-10, C-12a
12 ^a	8.06 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	121.1	C-12	C-9, C-10, C-11, C-12a, C-13
12a		123.7		
13		165.0		
13a		122.2		
13b		123.9		
14	6.86 (s, 1H)	107.2	C-14	C-3a, C-4a, C-13a, C-13b, C-14a
14a		145.2		
10-OCH ₃	3.93 (s, 3H)	56.2	10-OCH ₃	C-10
1'	4.60 (t, $J = 6$ Hz, 2H)	74.9	C-1'	C-9, C-2'
2'	1.73-1.84 (m, 2H)	22.8	C-2'	C-1', C-3'
3'	1.00 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H)	10.2	C-3'	C-2'

^a สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้



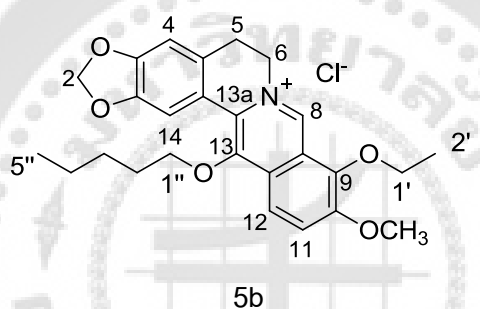
ตาราง 8 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 5a บันทึกใน CDCl_3

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	HMQC	HMBC
2	6.01 (s, 2H)	101.9	C-2	C-3a, C-14a
3a		151.1		
4	6.80 (s, 1H)	108.4	C-4	C-3a, C-5, C-13b, C-14a
4a		131.0		
5	3.17 (t, $J = 6$ Hz, 2H)	28.0	C-5	C-4, C-4a, C-6, C-13b
6	4.91 (t, $J = 6$ Hz, 2H)	57.0	C-6	C-4a, C-5, C-8
8	9.68 (s, 1H)	142.6	C-8	C-6, C-8a, C-9, C-12a, C-13a
8a		129.8		
9		150.5		
10		150.8		
11 ^a	7.92 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	117.8	C-11	C-8a, C-9, C-10, C-12a
12 ^a	7.81 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	125.6	C-12	C-9, C-10, C-11, C-12a, C-13
12a	-	130.0		
13		151.1		
13a		132.2		
13b		132.0		
14	7.85 (s, 1H)	108.4	C-14	C-3a, C-4a, C-13a, C-13b, C-14a
14a		147.8		
10- OCH_3	3.99 (s, 3H)	57.2	10- OCH_3	C-10

ตาราง 8 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	HMQC	HMBC
1'	4.43 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H)	71.2	C-1'	C-9, C-2'
2'	1.46 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H)	15.7	C-2'	C-1'
1''	3.72 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H)	76.4	C-1''	C-13, C-2''
2''	1.75-1.85 (m, 2H)	23.4	C-2''	C-1'', C-3''
3''	1.00 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H)	10.4	C-3''	C-1'', C-2''

^a สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

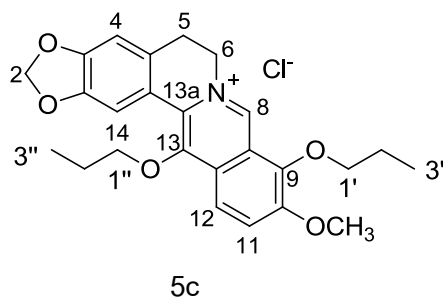
ตาราง 9 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 5b บันทึกใน CDCl_3

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	HMQC	HMBC
2	6.06 (s, 2H)	101.9	C-2	C-3a, C-14a
3a		149.8		
4	6.82 (s, 1H)	108.4	C-4	C-3a, C-5, C-13b, C-14a
4a		132.2		
5	3.29 (t, $J = 6$ Hz, 2H)	28.2	C-5	C-4, C-4a, C-6, C-13b
6	5.26 (t, $J = 6$ Hz, 2H)	57.2	C-6	C-4a, C-5, C-8
8	10.23 (s, 1H)	143.4	C-8	C-6, C-8a, C-9, C-12a, C-13a
8a		131.0		
9		145.8		

ตาราง 9 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	HMQC	HMBC
10		151.5		
11 ^a	7.94 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	117.6	C-11	C-8a, C-9, C-10, C-12a
12 ^a	7.79 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	125.2	C-12	C-9, C-10, C-11, C-12a, C-13
12a		130.0		
13		150.6		
13a		123.5		
13b		118.7		
14	7.91 (s, 1H)	108.4	C-14	C-3a, C-4a, C-13a, C-13b, C-14a
14a		147.8		
10-OCH ₃	4.04 (s, 3H)	57.0	10-OCH ₃	C-10
1'	4.60 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H)	71.6	C-1'	C-9, C-2'
2'	1.62 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H)	16.0	C-2'	C-1'
1''	3.80 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H)	75.8	C-1''	C-13, C-2''
2''	1.78-1.85 (m, 2H)	29.0	C-2''	C-1'', C-3'', C-4''
3''	1.41-1.48 (m, 2H)	28.1	C-3''	C-4''
4''	1.18-1.25 (m, 2H)	22.4	C-4''	C-3''
5''	0.92 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)	13.9	C-5''	C-3'', C-4''

^a สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้



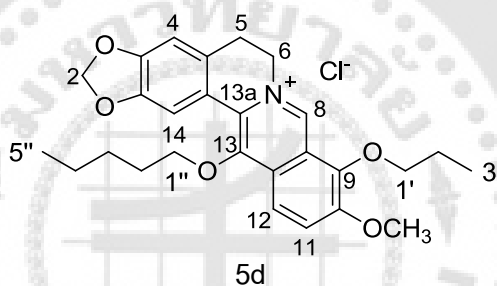
ตาราง 10 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 5c บันทึกใน CDCl_3

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	HMQC	HMBC
2	6.06 (s, 2H)	101.9	C-2	C-3a, C-14a
3a		149.8		
4	7.91 (s, 1H)	108.4	C-4	C-3a, C-5, C-13b, C-14a
4a		132.2		
5	3.30 (t, $J = 6$ Hz, 2H)	28.5	C-5	C-4, C-4a, C-6, C-13b
6	5.26 (t, $J = 6$ Hz, 2H)	57.2	C-6	C-4a, C-5, C-8
8	10.18 (s, 1H)	143.3	C-8	C-6, C-8a, C-9, C-12a, C-13a
8a		130.8		
9		147.4		
10		151.2		
11 ^a	7.95 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	118.5	C-11	C-8a, C-9, C-10, C-12a
12 ^a	7.79 (d, $J = 9$ Hz, 1H)	125.3	C-12	C-9, C-10, C-11, C-12a, C-13
12a		130.8		
13		150.6		
13a		123.2		
13b		118.5		
14	6.82 (s, 1H)	108.4	C-14	C-3a, C-4a, C-13a, C-13b, C-14a
14a		149.8		
10-OCH ₃	4.03 (s, 3H)	57.0	10-OCH ₃	C-10

ตาราง 10 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	HMQC	HMBC
1'	4.46 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H)	77.1	C-1'	C-9, C-2'
2'	1.80-1.90 (m, 2H)	22.4	C-2'	C-1'
3'	1.11 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H)	10.3	???	????
1''	3.77 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H)	77.2	C-1''	C-13, C-2''
2''	2.02-2.12 (m, 2H)	22.6	C-2''	C-1'', C-3'', C-4''
3''	1.11 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H)	10.5	C-3''	C-4''

^a สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 11 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 5d บันทึกใน CDCl_3

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	HMQC	HMBC
2	6.06 (s, 2H)	101.9	C-2	C-3a, C-14a
3a		147.4		
4	7.91 (s, 1H)	108.4	C-4	C-3a, C-5, C-13b, C-14a
4a		132.2		
5	3.30 (t, $J = 6$ Hz, 2H)	28.2	C-5	C-4, C-4a, C-6, C-13b
6	5.25 (t, $J = 6$ Hz, 2H)	57.2	C-6	C-4a, C-5, C-8
8	10.15 (s, 1H)	143.1	C-8	C-6, C-8a, C-9, C-12a, C-13a
8a		123.1		
9		145.8		

ตาราง 11 (ต่อ)

ตำแหน่ง	¹ H	¹³ C	HMQC	HMBC
10		150.6		
11 ^a	7.94 (d, <i>J</i> = 9 Hz, 1H)	117.5	C-11	C-8a, C-9, C-10, C-12a
12 ^a	7.79 (d, <i>J</i> = 9 Hz, 1H)	125.3	C-12	C-9, C-10, C-11, C-12a, C-13
12a		129.9		
13		150.6		
13a		130.1		
13b		118.5		
14	6.82 (s, 1H)	108.4	C-14	C-3a, C-4a, C-13a, C-13b, C-14a
14a		1479.8		
10-OCH ₃	4.03 (s, 3H)	57.2	10-OCH ₃	C-10
1'	4.47 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H)	76.5	C-1'	C-9, C-2'
2'	2.02-2.11 (m, 2H)	23.6	C-2'	C-1'
3'	1.10 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 3H)	10.3	???	????
1''	3.80 (t, <i>J</i> = 5.7 Hz, 2H)	75.8	C-1''	C-13, C-2''
2''	1.76-1.85 (m, 2H)	29.8	C-2''	C-1'', C-3'', C-4''
3''	1.42-1.52 (m, 2H)	28.0	C-3''	C-4''
4''	1.32-1.42 (m, 2H)	22.4	C-4''	C-3''
5''	0.92 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H)	13.9	C-5''	C-3'', C-4''

^a สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

สารที่ได้จากการทำปฏิกิริยา คือสาร 59a, 59b, 60a, 60b และ 5a-5d นำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ เซลล์ปกติที่ได้จากไตของลิง (Vero cells, ATCCCL-81) และเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (NCI-H187 small cell lung cancer, ATCC CRL-5804) เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB-Oral cavity cancer cell line, ATCCCL-17) และ

เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7-breast cancer cell line, ATCC HTB-22) และผลจากการทดสอบแสดง
ในตาราง 13



บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

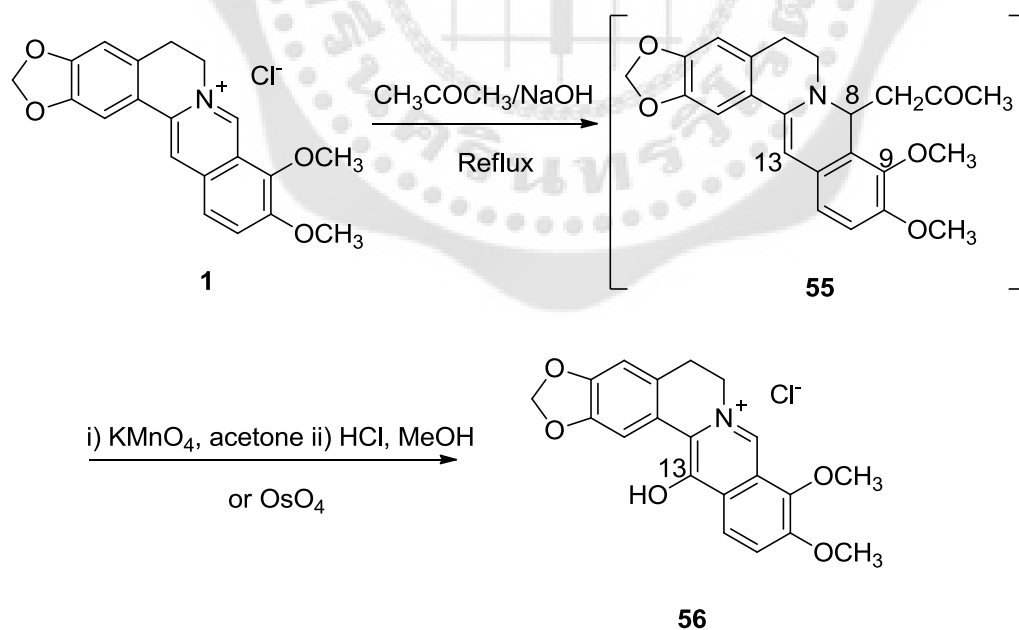
5.1 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ ของ berberine

จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้ เพื่อสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ berberine (1) ที่มีหมู่แทนที่ในตำแหน่งที่ 9 และตำแหน่งที่ 13 โดยแผนแรกในการทดลอง ได้ทำการทดลองแทนที่ในตำแหน่งที่ 9 ด้วยหมู่ alkyl diamine ผลปรากฏว่าการแทนที่ในตำแหน่งที่ 9 ด้วยหมู่ alkyl diamine เกิดสารผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่น้อยมาก จนไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์เพื่อนำมาวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้หยุดทำแผนการทดลองที่หนึ่ง สำหรับวิธีการสังเคราะห์สาร 9-*N*-6'-aminohexyl,13-alkoxyberberine (4) ก่อนจะถึงการยุติแผนการสังเคราะห์นี้

5.1.1 ความพยายามในการสังเคราะห์สาร 9-*N*-6'-aminohexyl,13-alkoxyberberine (4)

5.1.1.1 การสังเคราะห์สาร 13-hydroxyberberine (56)

การสังเคราะห์สารประกอบ 56 จากการศึกษาข้อมูล มีการรายงานการสังเคราะห์สารเหล่านี้มาก่อน โดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอนุพันธ์ 8-acetonyldihydroberberine กับตัวออกซิไดซ์ชนิดต่างๆ เช่น KMnO_4 หรือ OsO_4 (Iwasa; et al. 1998. 64: 748-751.) (ภาพประกอบ 15)



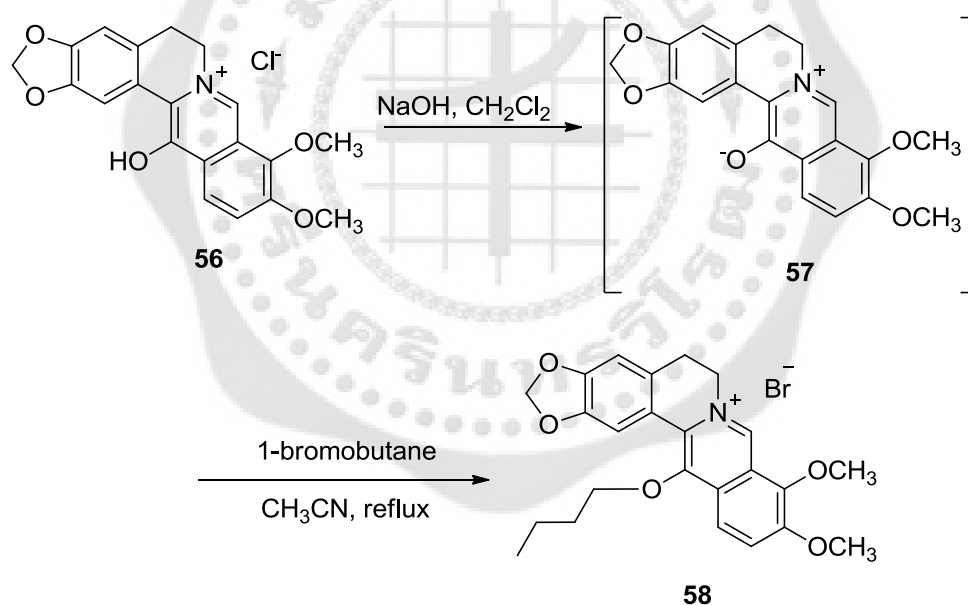
ภาพประกอบ 15 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-hydroxyberberine (56)

จากข้อมูลดังกล่าว จึงได้ทำการเตรียมสาร 56 โดยนำสาร 1 มาทำปฏิกิริยา Mannich กับ acetone และ NaOH ได้ สารอนุพันธ์ 8-acetonyldihydroberberine (55) 67.1% จากนั้นทำปฏิกิริยา

oxidation ด้วย KMnO_4 ได้สารอนุพันธ์ 13-hydroxyberberine (56) 79.5 % การยืนยันโครงสร้างของสาร 56 โดยใช้ข้อมูล ^1H NMR (ตาราง 3) เทียบกับข้อมูล ^1H NMR ของ Berberine (1) พบการหายไปของสัญญาณ singlet ที่ δ 9.82 ที่ตรงกับ H-8 ของสารตั้งต้น 1 แต่พบสัญญาณ doublet of doublet ของ methine proton ที่ δ 5.19 ตรงกับ H-8 ของสาร 55 แทน นอกจากนี้พบสัญญาณ doublet of doublet ของ methylene proton ที่ δ 2.3 และสัญญาณ singlet ของ methyl proton ที่ δ 2.02 ซึ่งตรงกับหมู่ acetyl ($-\text{CH}_2\text{COCH}_3$) และยืนยันเพิ่มเติมโดยข้อมูล ESI-MS พบสัญญาณ ที่ m/z 393 ซึ่งตรงกับมวลโมเลกุลของสาร 55

5.1.1.2 การสังเคราะห์สาร 13-butyloxyberberine (58)

การเตรียมสาร 58 ทำได้โดยการนำสาร 56 เติม 5% NaOH แล้วสกัดด้วย CH_2Cl_2 จำนวน 5 ครั้ง แล้วนำไปทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศจะได้ berberine phenol betaine (57) แล้วนำ berberine phenol betaine ไปทำปฏิกิริยาต่อกับ 1-bromobutane ได้สาร 13-butyloxyberberine (58) 28.8% (ภาพประกอบ 16)



ภาพประกอบ 16 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-butyloxyberberine (58)

การยืนยันโครงสร้างของสาร 58 โดยใช้ข้อมูล ^1H NMR (ตาราง 4) เทียบข้อมูลที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว (บงกช ดันวิรัตน์. 2552: 35-52.) พบสัญญาณ triplet ของ methylene proton ที่ δ 3.84 ตรงกับหมู่ $-\text{OCH}_2-$ พบสัญญาณ multiplet ของ methylene proton 2 ชุด ที่ δ ช่วง 1.52-1.58 และ 1.751.80 และพบสัญญาณ triplet ของ methyl proton ที่ δ 0.986 และยืนยันเพิ่มเติมโดยข้อมูล

ESI-MS พบสัญญาณของ positive ion $[M]^+$ ที่ m/z 408.3 ซึ่งตรงกับน้ำหนักไอออนโมเลกุล (molecular ion) ของสาร 58

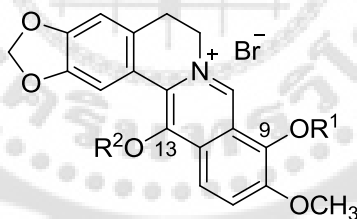
5.1.1.3 ความพยายามในการสังเคราะห์สาร 4

ผู้วิจัยได้พยายามสังเคราะห์สาร 4 โดยการนำสาร 13-butyloxyberberine (58) ทำปฏิกิริยากับ 1,6-hexyldiamine พบว่าเกิดสารผลิตภัณฑ์สีแดงที่คาดว่าจะเป็สาร 4 ในปริมาณที่น้อยมาก และได้ทำปฏิกิริยานี้ซ้ำ พบว่าผลการทดลองยังเหมือนเดิม และหลังจากทดลองทำปฏิกิริยาผู้วิจัยยังได้พยายามแยกสารผสมที่เกิดขึ้นโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีที่เป็น silica gel basic alumina หรือ nutral alumina แต่ปรากฏว่าสารผลิตภัณฑ์สีแดงยึดติดแน่นกับ stationary phase ทำให้ไม่สามารถแยกสารสีแดงที่ต้องการให้บริสุทธิ์ได้ ผู้วิจัยจึงได้ยุติการสังเคราะห์สาร 4

5.1.2 การสังเคราะห์ของสารอนุพันธ์ 9,13-dialkoxyberberine (5)

ในแผนการทดลองที่สองแทน ผู้วิจัยได้ทำการแทนที่ตำแหน่งที่ 9 ด้วยหมู่ alkoxy ที่มีจำนวนคาร์บอน 2 และ 3 อะตอม (60a-60b) และทำการแทนที่ตำแหน่งที่ 13 ด้วยหมู่ alkoxy ที่มีจำนวนคาร์บอน 3 และ 5 อะตอม (5a-5d) เพื่อให้ได้สารประกอบ 5a-5d ในปริมาณร้อยละ 49-58% (ตาราง 12)

ตาราง 12 ผลิตภัณฑ์และร้อยละของผลิตภัณฑ์



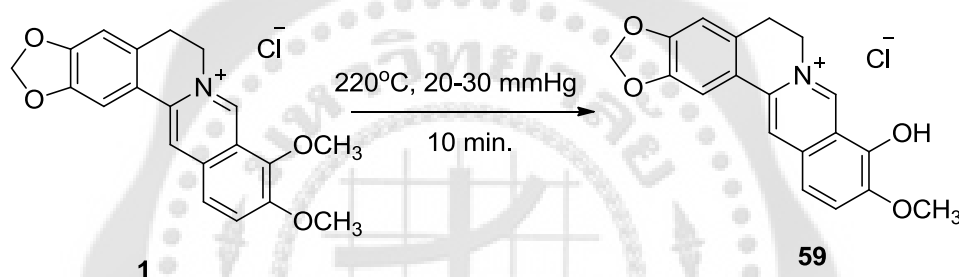
สาร 5a-5d: R^1, R^2 = alkyl group

สารผลิตภัณฑ์	R^1	R^2	ร้อยละของสาร ผลิตภัณฑ์
5a	C_2H_5	C_3H_7	58.0
5b	C_2H_5	C_5H_{11}	52.7
5c	C_3H_7	C_3H_7	51.4
5d	C_3H_7	C_5H_{11}	49.2

ในการพิสูจน์โครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ยืนยันโดยใช้ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกโทรสโกปีและเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ เช่น COSY (Correlation spectroscopy) HMQC (Heteronuclear multiple quantum correlation) และ HMBC (Heteronuclear multiple bond correlation) และข้อมูล MS (Mass spectrometry) รายละเอียดในการสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมีดังนี้

5.1.2.1 การสังเคราะห์สารประกอบ Bererrubine (59)

การสังเคราะห์สารประกอบ Bererrubine ได้เคยมีรายงานการเตรียมสารชนิดนี้โดยใช้ปฏิกิริยา Demethylation ด้วยความร้อน 220 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 20-30 mmHg เป็นเวลา 10 นาที ให้สารผลิตภัณฑ์ 70.1% (ภาพประกอบ 17) (Arana & Freile; 2007, 4-7)

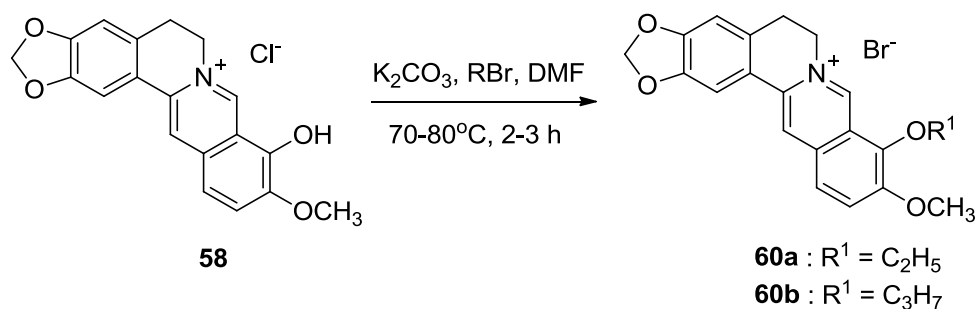


ภาพประกอบ 17 การสังเคราะห์สารประกอบ Bererrubine (59)

จากข้อมูลดังกล่าว จึงได้ทำการเตรียมสาร 59 โดยนำสาร 1 มาทำปฏิกิริยา Demethylation ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส โดยใช้หลอด (seal tube) เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์ 59 (87.7%) การยืนยันโครงสร้างของสาร 59 โดยข้อมูล ^1H NMR (ตาราง 4) เทียบกับข้อมูล ^1H NMR ของ Berberine (1) พบสัญญาณ singlet ที่ δ 4.25 ที่ตรงกับ 9-OCH₃ ของสารตั้งต้น 1 หายไป ส่วนข้อมูลของ ^1H NMR ตรงตำแหน่งอื่นๆ ยังคงปรากฏเช่นเดิม

5.1.2.2 การสังเคราะห์สารประกอบ 9-ethoxy-10-methoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (60a) และสารประกอบ 10-methoxy-9-propyloxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (60b)

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 60a และ 60b (Kim; et al. 2003: KR02061 20011129) ทำได้โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกัน โดยนำสาร 59 มาทำปฏิกิริยากับ 1-bromoethane หรือ 1-bromopropane ในสภาวะเบสภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 18)

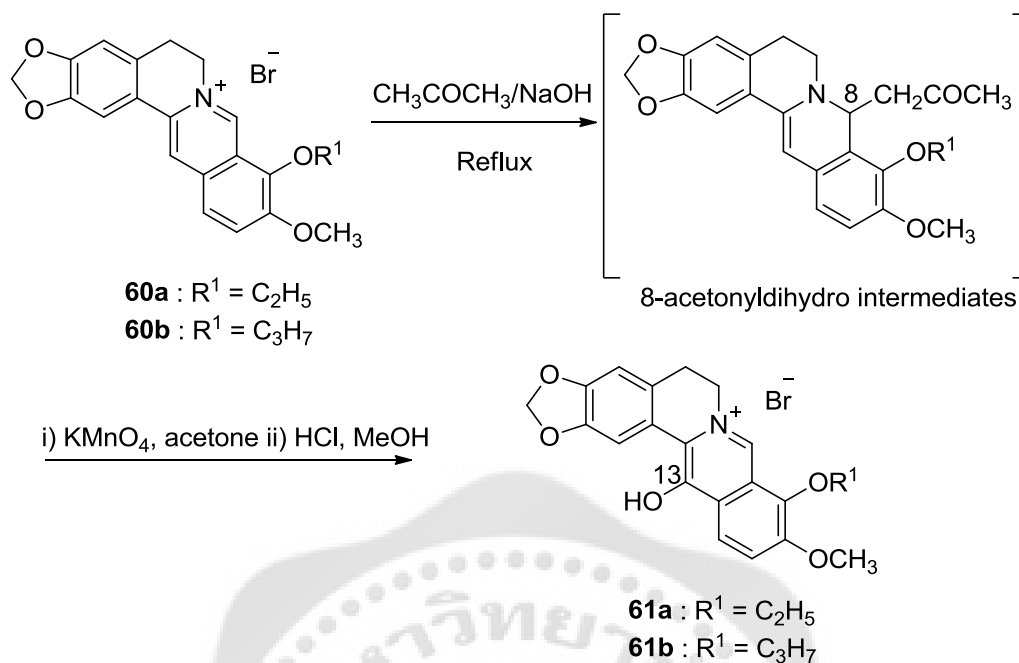


ภาพประกอบ 18 การสังเคราะห์สารประกอบ 60a และ 60b

นำสารผสมที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยเทคนิค Column chromatography ให้สารผลิตภัณฑ์ 60a และ 60b ตามต้องการ โดยมีร้อยละของผลผลิต 61.0 และ 57.5% ตามลำดับ การยืนยันโครงสร้างของสาร 60a และ 60b โดยการวิเคราะห์ข้อมูล NMR spectroscopy และ mass spectrometry เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR ของสาร 60a และ 60b กับสาร 1 พบว่ามีข้อมูลคล้ายคลึงกัน (ตาราง 5) แต่แตกต่างกันที่สาร 60a พบสัญญาณ quartet ของ methylene proton ที่ δ 4.36 ตรงกับหมู่ $-\text{OCH}_2-$ และพบสัญญาณ triplet ของ methyl proton ที่ δ 1.36 ในส่วนของสาร 60b พบสัญญาณ triplet ของ methylene proton ที่ δ 4.24 ตรงกับหมู่ $-\text{OCH}_2-$ สัญญาณ multiplet ของ methylene proton ที่ δ ในช่วง 1.81-1.91 และสัญญาณ triplet ของ methyl proton ที่ δ 1.36 แต่ทั้ง 60a และ 60b ไม่พบสัญญาณ singlet ของ $9-\text{OCH}_3$ ที่ตำแหน่ง δ 4.25 และยืนยันเพิ่มเติมโดยข้อมูล ESI-MS พบสัญญาณของ positive ion $[\text{M}]^+$ ที่ m/z 350.2 ตรงกับน้ำหนักไอออนโมเลกุลของสาร 60a และ positive ion $[\text{M}]^+$ ที่ m/z 364.2 ตรงกับน้ำหนักไอออนโมเลกุลของสาร 60b

5.1.2.3 การสังเคราะห์สารประกอบ 9-ethoxy-13-hydroxy-10-methoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (61a) และสารประกอบ 13-hydroxy-10-methoxy-9-propyloxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (61b)

การสังเคราะห์สารประกอบ 61a และ 61b จากการศึกษาค้นคว้าข้อมูลไม่เคยปรากฏว่ามีการรายงานการสังเคราะห์สารเหล่านี้มาก่อน แต่เคยมีการรายงานการเตรียมสาร 13-hydroxyberberine ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอนุพันธ์ 8-acetyl dihydroberberine กับตัวออกซิไดซ์ชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับการเตรียมสาร 56 (Iwasa; et al. 1998. 64: 748-751.) (ภาพประกอบ 19)

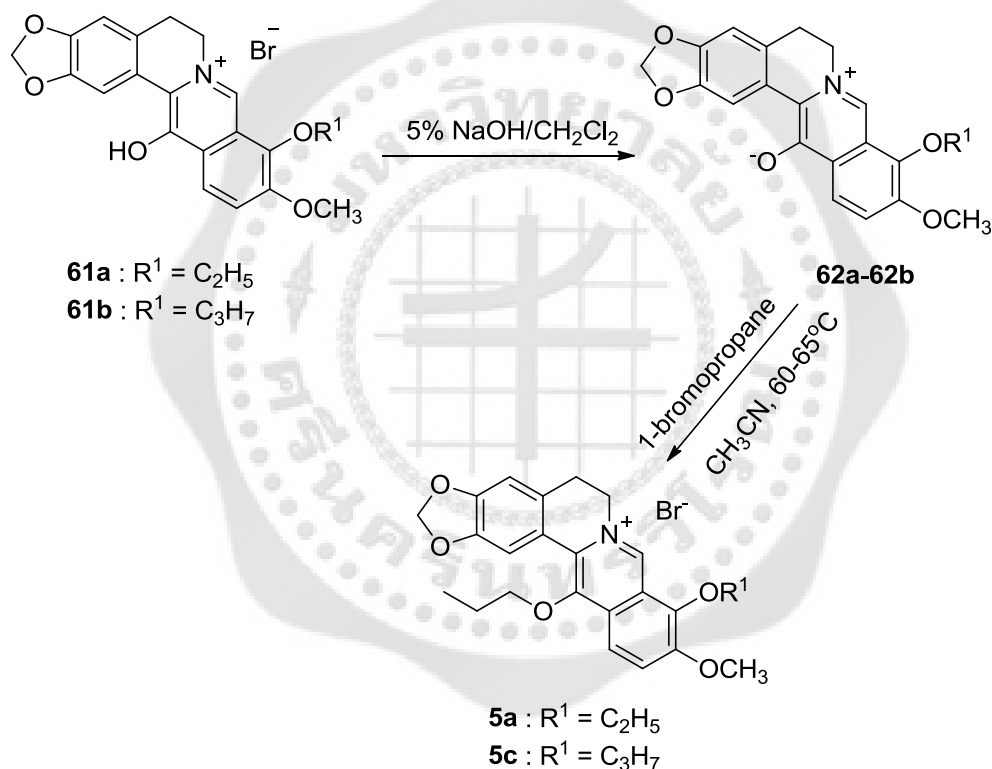


ภาพประกอบ 19 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 9-alkoxy-13-hydroxyberberine (61a และ 61b)

จากข้อมูลดังกล่าว จึงได้ทำการเตรียมสาร 61a และ 61b โดยนำสาร 60a หรือ 60b มาทำปฏิกิริยากับ acetone และสารละลาย 30% sodium hydroxide กวนสารละลายที่ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นกรองเอาตะกอนของ 8-acetonyldihydro intermediate ของสาร 59a หรือ 59b ที่เกิดขึ้น แต่เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสลายตัวได้อย่างรวดเร็ว จึงต้องทำปฏิกิริยา oxidation ต่อทันทีด้วย KMnO_4 ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมกรด hydrochloric เข้มข้น และ methanol แล้ว reflux ต่ออีก 12 ชั่วโมง ให้ผลึกสีเหลืองส้มของสารผลิตภัณฑ์ ทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี จะได้สาร 61a (28%) หรือสาร 61b (22.2%) การยืนยันโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ 61a และ 61b โดยอาศัยข้อมูลจาก ^1H NMR (ตาราง 4) เปรียบเทียบกับสารตั้งต้น 60a และ 60b พบว่ามีลักษณะของสเปกตรัมที่คล้ายคลึงกัน แต่ 61a และ 61b ไม่พบสัญญาณ singlet ของ aromatic proton ของ H-13 ที่ δ 8.29 หรือ ที่ δ 8.93 ตามลำดับ อีกทั้งจากข้อมูล ESI MS พบสัญญาณของ positive ion $[\text{M}]^+$ ที่ m/z 366.4 ตรงกับน้ำหนักไอออนโมเลกุลของสาร 61a และ positive ion $[\text{M}]^+$ ที่ m/z 380.4 ตรงกับน้ำหนักไอออนโมเลกุลของสาร 61b

5.1.2.4 การสังเคราะห์สารประกอบ 9-ethoxy-10-methoxy-13-propyloxy-5,6-dihydrobenzo[*g*]-1,3-benzodioxolo[5,6-*a*]quinolizinium bromide (**5a**) และสารประกอบ 9-ethoxy-10-methoxy-13-pentyloxy -5,6-dihydrobenzo[*g*]-1,3-benzodioxolo[5,6-*a*]quinolizinium bromide (**5c**)

นำสาร **61a** หรือ **61b** มาเติมสารละลาย 5% sodium hydroxide และสกัดด้วย dichloromethane ให้สารอนุพันธ์ phenol betaine ของ **62a** และ **62b** ตามลำดับ มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ตามด้วยปฏิกิริยา O-alkylation ระหว่างสาร **62a** หรือ **62b** กับ 1-bromopropane โดยมี acetonitrile เป็นตัวทำละลาย ทำการกวนภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 60-65°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 20)



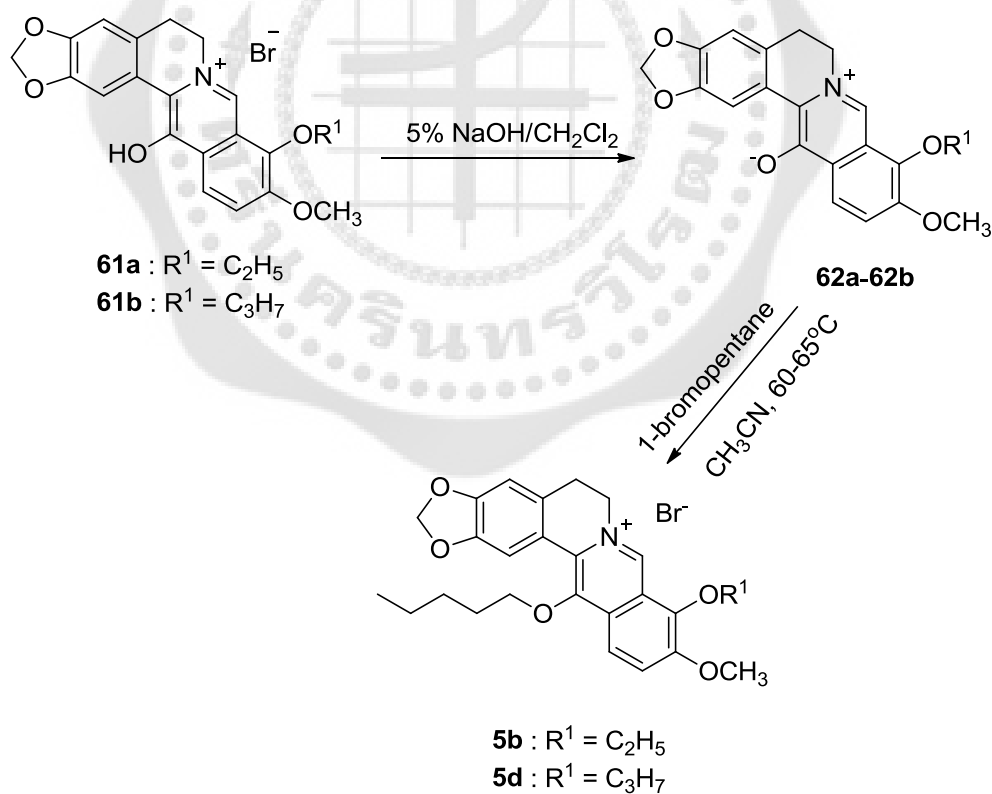
ภาพประกอบ 20 การสังเคราะห์สารประกอบ **5a** และ **5c**

นำสารผสมที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยเทคนิค Column chromatography โดยมีร้อยละของสาร **5a** เป็น 58.0% และ **5c** เป็น 51.4% การยืนยันโครงสร้างของสารทั้งสองชนิด โดยการวิเคราะห์ข้อมูล NMR spectroscopy และ mass spectrometry เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล 1H NMR ของสาร **5a** กับสารตั้งต้น **61a** พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกัน (ตาราง 8) โดยจะพบสัญญาณ triplet ของ methylene proton ที่ δ 3.72 ตรงกับหมู่ $-OCH_2-$ พบสัญญาณ multiplet ของ methylene proton ที่ δ ช่วง 1.75-1.85 และพบสัญญาณ triplet ของ methyl proton ที่ δ 1.00 ในส่วนของ 1H NMR ของสาร **5c** กับสาร

ตั้งต้น 61b มีลักษณะเช่นเดียวกัน (ตาราง 10) แต่จะพบข้อมูลสัญญาณเพิ่มขึ้นมา คือ พบสัญญาณ triplet ของ methylene proton ที่ δ 3.77 ตรงกับหมู่ $-\text{OCH}_2-$ พบสัญญาณ multiplet ของ methylene proton ที่ δ ในช่วง 2.02-2.12 และพบสัญญาณ triplet ของ methyl proton ที่ δ 1.11 นอกจากนี้ จากข้อมูล ESI MS พบสัญญาณของ positive ion $[\text{M}]^+$ ที่ m/z 408.3 ตรงกับน้ำหนักไอออนโมเลกุลของสาร 5a และ positive ion $[\text{M}]^+$ ที่ m/z 422.5 ตรงกับน้ำหนักไอออนโมเลกุลของสาร 5c

5.1.2.5 การสังเคราะห์สารประกอบ 9-ethoxy-10-methoxy-13-pentyloxy -5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (5b) และสารประกอบ 10-methoxy-13-pentyloxy-9-propyloxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (5d)

สารอนุพันธ์ 5b และ 5d เตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่างสาร 61a หรือ 61b กับ 1-bromopentane ใน acetonitrile ภายใต้สภาวะเดียวกับการสังเคราะห์สาร 5a หรือ 5c ได้สารผลิตภัณฑ์ 5b (52.7%) และ 5d (49.2%) (ภาพประกอบ 21)

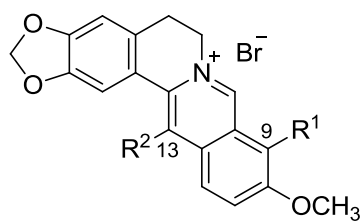


ภาพประกอบ 21 การสังเคราะห์สารประกอบ 5b และ 5d

โดยข้อมูล ^1H NMR ของสารผลิตภัณฑ์ 5b (ตาราง 9) คล้ายกับสาร 60a และพบสัญญาณเพิ่มเติมคือ สัญญาณ triplet ของ methylene proton ที่ δ 3.80 ตรงกับหมู่ $-\text{OCH}_2-$ พบสัญญาณ multiplet ของ methylene proton 3 ตำแหน่งที่ δ ช่วง 1.78 - 1.85, 1.41-1.48 และ 1.18 -1.25 และพบสัญญาณ triplet ของ methyl proton ที่ δ 0.92 ในส่วนของ ^1H NMR ของสาร 5d (ตาราง 11) กับสารตั้งต้น มีลักษณะเช่นเดียวกัน แต่จะพบข้อมูลสัญญาณเพิ่มขึ้นมา คือ สัญญาณ triplet ของ methylene proton ที่ δ 3.80 ตรงกับหมู่ $-\text{OCH}_2-$ พบสัญญาณ multiplet ของ methylene proton 3 ตำแหน่งที่ δ ในช่วง 1.76-1.85, 1.42-1.52 และ 1.32-1.42 และพบสัญญาณ triplet ของ methyl proton ที่ δ 0.92 และจากข้อมูล ESI MS พบสัญญาณของ positive ion $[\text{M}]^+$ ที่ m/z 436.3 ตรงกับน้ำหนักไอออนโมเลกุลของสาร 5b และ positive ion $[\text{M}]^+$ ที่ m/z 450.2 ตรงกับน้ำหนักไอออนโมเลกุลของสาร 5d

5.2 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

สารอนุพันธ์ 9-substituted berberine และ 9,13-disubstituted berberine (60a, 60b, 61a, 61b และ 5a-5d) ที่ได้จากการสังเคราะห์ นำมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ได้จากไตของลิง (Vero cells, ATCCCL-81) และ เซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (NCI-H187 small cell lung cancer, ATCC CRL-5804) เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB-Oral cavity cancer cell line, ATCCCL-17) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7-breast cancer cell line, ATCC HTB-22) ในการทดสอบการออกฤทธิ์ใช้ยา doxorubicin และ ellipticine เป็น positive control โดยมีค่า IC_{50} แสดงถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% ผลที่ได้จากการทดสอบแสดงในตาราง 13



60a : $R^1 = -OCH_2CH_3$ $R^2 = H$

60b : $R^1 = -OCH_2CH_2CH_3$ $R^2 = H$

61a : $R^1 = -OCH_2CH_3$ $R^2 = -OH$

61b : $R^1 = -OCH_2CH_2CH_3$ $R^2 = -OH$

5a : $R^1 = -OCH_2CH_3$ $R^2 = -OCH_2CH_2CH_3$

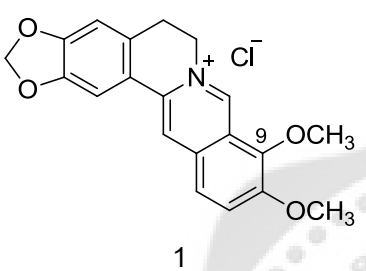
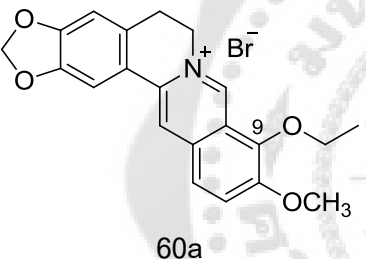
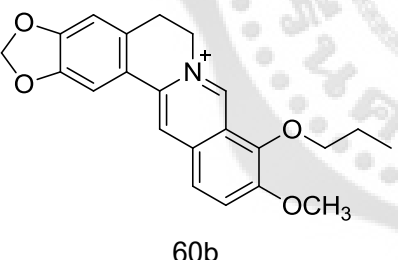
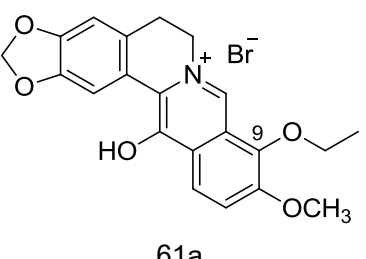
5b : $R^1 = -OCH_2CH_3$ $R^2 = -OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$

5c : $R^1 = -OCH_2CH_2CH_3$ $R^2 = -OCH_2CH_2CH_3$

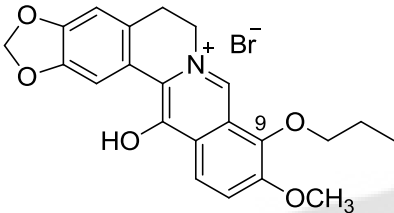
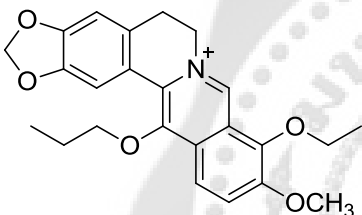
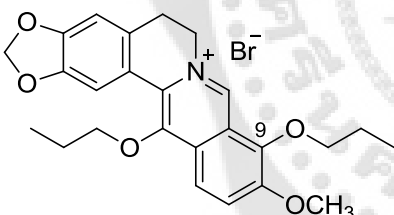
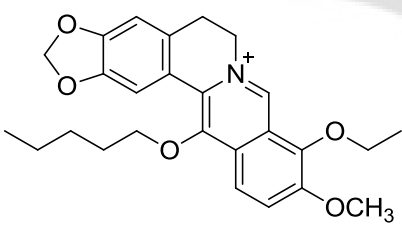
5d : $R^1 = -OCH_2CH_2CH_3$ $R^2 = -OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$

ภาพประกอบ 22 สูตรโครงสร้างของสาร 60a, 60b, 61a, 61b และ 5a-5d

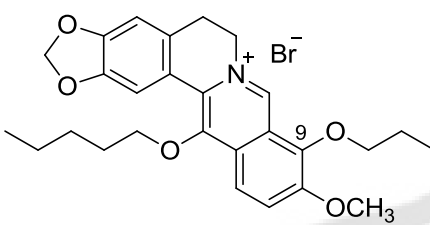
ตาราง 13 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

สารตัวอย่าง	IC ₅₀ (μg/mL)			
	Vero cells	NCI-H187	KB-Oral cavity cancer	MCF7-Breast cancer
 1	>50	0.16	1.63	37.90
 60a	>50	0.38	5.41	2.19
 60b	>50	0.27	2.26	1.40
 61a	>50	>50	>50	34.22

ตาราง 13 (ต่อ)

สารตัวอย่าง	IC ₅₀ (μg/mL)			
	Vero cells	NCI-H187	KB-Oral cavity cancer	MCF7-Breast cancer
 61b	>50	19.05	>50	>50
 5a	>50	4.19	6.69	>50
 5c	20.22	1.83	6.56	>50
 5b	2.22	0.26	2.39	1.09

ตาราง 13 (ต่อ)

สารตัวอย่าง	IC ₅₀ (μg/mL)			
	Vero cells	NCI-H187	KB-Oral cavity cancer	MCF7-Breast cancer
 5d	2.48	0.67	0.89	1.98
Elipticine	0.829	0.684	0.448	>50
Doxorubicin	not tested	0.035	0.249	0.573

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า การแทนที่หมู่ methoxyl ที่ตำแหน่ง 9 ของ berberine ด้วยหมู่ ethoxyl (สาร 60a) หรือ หมู่ *n*-propyloxy (สาร 60b) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมสูงกว่า berberine 17 หรือ 27 เท่า ตามลำดับ แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กและเซลล์มะเร็งช่องปาก น้อยกว่า berberine และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

เมื่อแทนที่ hydrogen ที่ตำแหน่ง 13 ของสาร สาร 60a และ 60b ด้วยหมู่ hydroxyl (สาร 651a และ 61b) พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 4 ชนิดที่ทำการทดสอบลดลงเมื่อเทียบกับ berberine

เมื่อแทนที่หมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง 13 ของสาร สาร 61a และ 61b ด้วยหมู่ *n*-propyloxy (สาร 5a และ 5b) หรือแทนที่ด้วยหมู่ *n*-pentyloxy (สาร 5c และ 5d) พบว่า เมื่อหมู่ *n*-propyloxy แทนที่ที่ตำแหน่ง 13 และ หมู่ ethoxyl แทนที่ที่ตำแหน่ง 9 (สาร 5a) หรือ มีหมู่ *n*-propyloxy แทนที่ที่ตำแหน่ง 9 (สาร 5c) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดลดลงเมื่อเทียบกับ berberine ในขณะที่ ถ้าหมู่ *n*-pentyloxy แทนที่ที่ตำแหน่ง 13 และที่ตำแหน่ง 9 มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ ethoxyl (สาร 5b) หรือ หมู่ *n*-propyloxy (สาร 5d) พบว่า มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมสูงกว่า berberine 35 และ 19 เท่า ตามลำดับ และมีฤทธิ์สูงกว่ายา elipticine มากกว่า 46 และ 25 เท่า ตามลำดับ แสดงว่าหมู่ *n*-pentyloxy ที่ตำแหน่ง 13 มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม

5.3 สรุปและข้อเสนอแนะ

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 9,13-disubstituted berberine ชนิดใหม่ 6 สาร (สาร 61a-b และ 5a-d) เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด พบว่า สาร 5b มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมสูงสุด ที่ค่า IC_{50} 1.09 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่าสารตั้งต้น berberine 35 เท่า และสูงกว่า ยา ellipticine 46 เท่า ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของสารอนุพันธ์ที่ทำการสังเคราะห์ พบว่า:

1. การเพิ่มจำนวนคาร์บอนของหมู่ alkoxy ที่ตำแหน่ง 9 ของ berberine ช่วยเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม
2. การแทนที่ด้วยหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง 13 ของสารอนุพันธ์ 9-alkoxy berberine ทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดหายไป
3. หมู่แทนที่ *n*-pentyloxy ที่ตำแหน่ง 13 ของสารอนุพันธ์ 9-alkoxy berberine มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม





บรรณานุกรม

กลุ่มภารกิจด้านข้อมูลข่าวสารและสารสนเทศสุขภาพ สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงาน

ปลัดกระทรวงสาธารณสุข <http://bps.moph.go.th/Healthinformation/2.3.6.53.pdf>

เต็ม สมิตินันท์. (2544). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย* (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2554). กรุงเทพฯ

บงกช ตันวิรัตน์. (2552). การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine และการออกฤทธิ์

เป็นสารต้านแบคทีเรีย และสารยับยั้งการทำงานของ Nor A ปัมในโมเลกุลเดียวกัน. ปริญญานิพนธ์

วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อัดสำเนา.

ไพรัช เทพมงคล. (2528). *โรคมะเร็งสำหรับแพทย์เวชปฏิบัติทั่วไป และนักศึกษาแพทย์*. กรุงเทพฯ:

อักษรเจริญทัศน์.

รายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 2553.

สมชัย บวรกิตติ; และคนอื่นๆ. (2544). *มะเร็งระบบหายใจ*. กรุงเทพฯ: อรุณวิพิทัศน์.

Arana M.& Freile M. (2007). Preparation of Berberrubine. Chemistry and Biological Activity.

Mol. Med. Chem. 13: 4-7.

Bhowmik, D.; et al. (2012). Biophysical Studies on the Effect of the 13 Position Substitution

of the Anticancer Alkaloid Berberine on Its DNA Binding. *J. Phys. Chem., B* 116 :

2314-2324.

Cho, K-M.; Yoo, I-D.& Kim, W.-G.. (2006). 8-Hydroxydihydrochelerythrine and

8-Hydroxydihydrosanguinarine with a Potent Acetylcholinesterase Inhibitory Activity

from *Chelidonium Majus*. *Biol. Pharm. Bull.*, 29: 2317-2320.

Gornall, K. C.; et al. (2010). A Mass Spectrometric Investigation of Novel Quadruplex DNA-

Selective Berberine Derivatives. *Chem. Commun.*, 46: 6602-6604.

Ho, Y. T.; et al. (2009). Berberine Induced Apoptosis via Promoting the Expression of

Aspase-8, -9 and -3, Apoptosis-inducing Factor and Endonuclease G in SCC-4

Human Tongue Squamous Carcinoma Cancer Cells. *Anticancer Res.*, 29: 4063-

4070.

- Iwasa, K.; et al. (1996). Antibacterial Activity and Structure-activity Relationships of Berberine Analogs. *Eur. J. Med. Chem.*, 31: 469-478.
- Iwasa, K.; et al. (1999). Structure-activity Relationships of Quaternary Protoberberine Alkaloids Having an Antimalarial Activity *Eur. J. Med. Chem.* 34: 1077-1083.
- Iwasa K.; et al. (1998). Structure-activity Relationships of Protoberberines Having Antimicrobial Activity. *Planta Med.*, 64:748-751.
- Izbicka, E.; et al. Effects of Cationic Porphyrins as G-quadruplex Interactive Agents in Human Tumor Cells. *Cancer Res*, 1999. 59: p. 639-44.
- James, M. A.; et al. (2011). Dietary Administration of Berberine Alone or in Phellodendron Amurense Extract is Equally Effective in the Inhibition of Lung Tumorigenesis. *Mole. Carc.* 50: 1-7.
- Jemal, A.; et al. (2011). Global Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin.*, 61: 69-90.
- Jeon Y. W.; et al. (2002). NMR Studies on Antitumor Drug Candidates, Berberine and Berberrubine. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23:391-394.
- Kim J.-H.; Kim S.-H. and Lee S.-J. Inventors; Kim J.-H.; Kim S.-H. and Lee S.-J., Newtree Industry Co.Ltd. New Derivatives of Berberrubine and Their Salts for Antibiotics and Antifungal Agents. WO2001KR02061 20011129. 2003 Jul. 26.
- Kim, N.W.; et al. (1994). Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science.* , 266: 2011-2014.
- Ma, Y.; et al. (2008). 9-*N*-Substituted Berberine Derivatives: Stabilization of G-quadruplex DNA and Down-regulation of Oncogene c-myc. *Bioorg. Med. Chem.* 16 : 7582–7591.
- Ma, Y.; et al. (2009). Synthesis and Evaluation of 9-*O*-Substituted Berberine Derivatives Containing Aza-aromatic Terminal Group as Highly Selective Telomeric G-quadruplex Stabilizing Ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19: 3414-3417.
- Martin, N.& Cheirsilpa A, (2003), Breast. Ministry of Public Health, Bangkok Cancer vol. 3: 47-48.

- Naasani, I.; et al. (1999). A Potent Telomerase Inhibitor Identified by Exploiting the Disease-oriented Screening Program with COMPARE Analysis. *Cancer Res.*, 59: 4004- 4011.
- Pang, J.-Y.; et al. (2005). Synthesis and DNA-binding Affinities of Monomodified Berberines. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 5835–5840
- Park K. D.; et al. (2006). Synthesis of 13-(substituted benzyl) Berberine and Berberrubine Derivatives as Antifungal Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 3913–3916.
- Riou, J. F.; et al. (2002). Cell Senescence and Telomere Shortening Induced by a New Series of Specific G-quadruplex DNA Ligands. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 2672-2677.
- Samosorn, S.; Tanwirat B. and Suksamrarn A.. (2011). 13-Arylalkyleneoxyberberine derivatives as anti-breast cancer agents. *Thai Patent Application Number 1101002293*. (27 September 2011).
- Tong, N.; et al. (2012). Berberine Sensitizes Multiple Human Cancer Cells to the Anticancer Effects of Doxorubicin *in vitro* . *Oncol Lett.* 3: 1263-1267.
- Verpoorte, R. (1998). Antimicrobially Active Alkaloids. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*; Plenum Press: New York, pp 397-433.
- White, L. K.; Wright, W. E. and Shay, J. W. (2001). Telomerase Inhibitors. *Trends Biotechnol.* 19: 114-120.
- Yaku, H.; et al. (2012). Phthalocyanines: a New Class of G-quadruplex-ligands with Many Potential Applications. *Chem. Commun.*, 48: 6203-6216
- Zhang, L.; et al. (2012). Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of 13-*n*-Alkyl Berberine and Palmatine Analogues as Anticancer Agents. *Molecules*, 17: 11294-11302 .
- Zhang, W.J.; et al. (2007). 9-Substituted Berberine Derivatives as G-quadruplex Stabilizing Ligands In Telomeric DNA. *Bioorg. Med. Chem.*, 15: 5493-5501.

อภิธานศัพท์



อภิธานศัพท์

AChE	= Acetylcholinesterase
<i>br</i>	= broad (for NMR spectra)
CDCl ₃	= deuterated chloroform
CH ₂ Cl ₂	= dichloromethane
CHCl ₃	= chloroform
CH ₃ CN	= acetonitrile
CH ₃ COCH ₃	= acetone
CT-DNA	= calf thymus-deoxyribonucleic acid
°C	= degree Celsius
¹³ C NMR	= carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
δ	= chemical shift
<i>d</i>	= doublet (for NMR spectra)
DMF	= <i>N,N</i> -dimethylformide
DMSO	= dimethyl sulfoxide
EtOH	= ethanol
ESI MS	= electrospray ionization mass spectrometry
g	= gram
HCl	= hydrochloric acid
¹ H NMR	= proton Nuclear Magnetic Resonance
HMBC	= Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	= Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Hz	= hertz
IC ₅₀	= half maximal Inhibitory Concentration
<i>J</i>	= coupling constant
K ₂ CO ₃	= potassium carbonate
KMnO ₄	= potassium permanganate
λ _{max}	= wavelength at maximal absorption
<i>m</i>	= multiplet (for NMR spectra)

อภิธานศัพท์ (ต่อ)

$[M]^+$	= molecular ion
MeOH	= methanol
mg	= milligram
mL	= milliliter
mm	= millimeter
mmol	= millimole
m/z	= mass to charge ratio
NaOH	= sodium hydroxide
Na_2SO_4	= sodium sulfate
$NH_2(CH_2)_6NH_2$	= 1,6-hexyldiamine
NMR	= Nuclear magnetic resonance
nm	= nanometer
s	= singlet (for NMR spectra)
t	= triplet (for NMR spectra)
TLC	= thin-layer chromatography
UV	= ultraviolet
ν_{max}	= wave number at maximal absorption
$\mu g/mL$	= microgram per milliliter



ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ สกุล	นายเฉลิมชัย จำปาแดง
วัน เดือน ปี เกิด	3 ธันวาคม 2523
สถานที่เกิด	อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	60 หมู่ 1 ต. นาสีนวน อ. กันทรวิชัย จ. มหาสารคาม 44150
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	ข้าราชการ ครู คศ.1
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนเขาทะลุพิทยาคม ต.เขาทะลุ อ.สวี จ.ชุมพร
ประวัติการศึกษา	

พ.ศ. 2543	มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนกันทรวิชัย จ. มหาสารคาม
พ.ศ. 2547	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี) จากมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
พ.ศ. 2548	ประกาศนียบัตรบัณฑิตวิชาชีพครู จากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม
พ.ศ. 2557	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ