



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การออกแบบ สังเคราะห์ และพิสูจน์โครงสร้างของสารที่เป็นอนุพันธ์ของ
Fluorosalan

(Design, Synthesis and Structure Elucidation of Fluorosalan Analog)

โดย

นสภ.พจนีย์วรรณ	รุ่งแข่งเจริญ	57210197
นสภ.วชิรภัทร	กลางอรุณ	57210212
นสภ.พันธุ์กาญจน์	จรัญญากรณ์	57210235

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การออกแบบ สังเคราะห์ และพิสูจน์โครงสร้างของสารที่เป็นอนุพันธ์ของ
Fluorosalan
(Design, Synthesis and Structure Elucidation of Fluorosalan Analog)

โดย

นสภ.พจนีย์วรรณ	จุ๋เซ่งเจริญ	57210197
นสภ.วชิรภัทร	กลางอรุณ	57210212
นสภ.พันธุ์กาญจน์	จรัญญากรณ์	57210235

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

รายงานผลการวิจัยเรื่อง การออกแบบ สังเคราะห์ และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารที่เป็นอนุพันธ์ของ Fluorosalan เพื่อให้มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ได้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของ Fluorosalan ที่ทำการดัดแปลง ทดสอบ และ สังเคราะห์เพื่อให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น และสามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างอนุพันธ์ของ Fluorosalan กับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของโครงสร้างนั้นๆ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของรายวิชา 791591 โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2 คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานผลการวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจศึกษาค้นคว้าเพื่อนำไปพัฒนาต่อให้มีความทันสมัยและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

คณะผู้วิจัย

พฤศจิกายน 2561

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2561

เรื่อง การออกแบบ สังเคราะห์ และพิสูจน์โครงสร้างของสารที่เป็นอนุพันธ์ของ

Fluorosalan

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ.พจนีย์วรรณ จูเซ่งเจริญ รหัส 57210197
2. นสภ.วชิรภัทร กลางอรัญ รหัส 57210212
3. นสภ.พันธุ์กาญจน์ จรรย์ญากรณ์ รหัส 57210235

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภาณุ.อ.ดร.อนงค์ ตีระวนิชพงศ์
2. ผศ.ดร.จันทวรรณ แสงแข คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ เพื่อออกแบบและสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของสาร Fluorosalan ซึ่งสารต้นแบบ Fluorosalan มีฤทธิ์ในการยับยั้ง NF-kB โดยเข้าจับที่ IKK receptor ทำให้ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ คณะผู้วิจัยจึงได้ออกแบบสารที่เป็นอนุพันธ์ของสาร Fluorosalan และทำการคัดเลือกสารที่ออกแบบด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ซึ่งได้ค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญคือ ค่า BE เท่ากับ -6.50 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.25 μ M จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ แยกสารให้บริสุทธิ์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างด้วยเทคนิคทาง spectroscopy ผลจาก IR, NMR และ Mass spectra สอดคล้องกับโครงสร้างของสารที่ออกแบบคือ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxy benzamide ได้สารที่มีลักษณะเป็นผงสีขาว มีค่า m.p. เท่ากับ 238.1 °C และสามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา Amidation ที่ให้ %Yield สูงถึง 92.5%

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ภาณุ.อ.ดร.อนงค์ ตีระวนิชพงศ์

Senior Project Academic Year 2018

: Design, Synthesis and Structure Elucidation of Fluorosalan Analog

By

1. Miss. Pojjaneewan Jusengjaroen ID 57210197

2. Mr. Wachiraphat Krangaran ID 57210212

3. Mr. Pantakarn Jarunyakorn ID 57210235

Advisor:

1. Anong Teeravanishpong, Ph.D.

2. Assist. Prof. Jantarawan Saenkae, Ph.D. Faculty of Allied Health Sciences,
Burapha University

ABSTRACT

The aim of this research is to design and synthesis Fluorosalan analog as a potential anticancer drug. Fluorosalan was reported to inhibit the process of NF- κ B through binding of IKK receptor resulted in an inhibition of cancer cell growth. In this research, we had use computer-aided drug design method had Method of Fluorosalan analog and choose one designed compound which give important paramiters such as BE = 6.50 and IC₅₀ = 20.25 μ m. The compound was synthesized, purified and identified the structure by spectroscopic technique. The result from IR, NMR and Mass spectra confirmed that the designed structure is 5-bromo-*N*-(2, 6-dimethylphenyl)-2-hydroxy benzamide. The appearance is white powder, m.p.= 238.1 °C and can synthesis from Amidation reaction that give %Yield = 92.5%.

Major Advisor Anong Teeravanishpong, Ph.D.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การออกแบบ สังเคราะห์ และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็งของสารที่เป็นอนุพันธ์ของ Fluorosalan เพื่อให้มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฉบับนี้สำเร็จล่วงไป ได้ด้วยความกรุณาจาก ภาณุ.อ.ดร.อนงค์ ตีระวนิชพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักโครงการวิจัย และ ผศ.ดร.จันทวรรณ แสงแข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการวิจัยที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา แนวคิด และให้ความรู้ในการจัดทำโครงการวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆจนโครงการวิจัยนี้เสร็จ สมบูรณ์ คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ดร. สรายุทธ เวชสิทธิ์ นักวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยบูรพาที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำในการสังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสาร

พจนีย์วรรณ จูแข่งเจริญ
วชิรภัทร กลางอรัญ
พันธุ์กาญจน์ จรัญญากรณ์
30 พฤศจิกายน 2561

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
กรอบแนวคิดการวิจัย	3
สมมติฐานการวิจัย	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
มะเร็ง(cancer)	5
ยารักษาโรคมะเร็งที่ใช้ในปัจจุบัน	7
NF-KB pathways	9
กระบวนการสังเคราะห์เอไมด์(Amidation)	12
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	18
เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย	18
สารเคมี	19
วิธีดำเนินงานวิจัย	20
บทที่ 4 ผลการวิจัย	26
ผลการออกแบบโครงสร้างจากสารต้นแบบ	26
ผลการทำ Computer-Aided Drug Design	27

สารบัญ

ผลการสังเคราะห์สาร 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide	29
ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย IR spectrometer	30
ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย ^1H NMR spectrometer	32
ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย ^{13}C NMR spectrometer	34
ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย Mass spectrometer	35
ผลการทดสอบ Differential Scanning Calorimeter	36
บทที่ 5 อภิปรายผลการทำวิจัย	37
เอกสารอ้างอิง	40

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 Activation of NF- K B signaling by TNF receptors	11
รูปที่ 2 เครื่อง Bruker AVANCE Ultrashield 400 MHz spectrometer	14
รูปที่ 3 ตัวอย่าง ^1H NMR สเปกตรัมของสารอินทรีย์	15
รูปที่ 4 ค่า chemical shift โดยประมาณของโปรตอน	16
รูปที่ 5 เครื่อง Gas Chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	17
รูปที่ 6 การออกแบบโครงสร้างสารต้นแบบ	26
รูปที่ 7 โครงสร้างของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide	29
รูปที่ 8 แสดงตำแหน่ง wavenumber บน FT-IR spectrum ของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide	31
รูปที่ 9 แสดงการกำหนดตำแหน่งโปรตอนของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide	32
รูปที่ 10 แสดงตำแหน่ง chemical shift บน NMR spectrum ของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide	33
รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่าง chemical shift กับตำแหน่งคาร์บอนของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide	34
รูปที่ 12 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย Mass spectrometer ของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide	35
รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่าง อุณหภูมิ กับ ค่าพลังงานที่ให้เข้าไปของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide	36

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 Grid box parameters	21
ตารางที่ 2 Docking parameters	21
ตารางที่ 3 แสดงผลของ conformation ของ Compound ที่เกิด interaction บริเวณ active site	27
ตารางที่ 4 แสดงผลการสังเคราะห์สาร 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxy benzamide	30
ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง wavenumber (cm^{-1}) กับหมู่ฟังก์ชันทางเคมีของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide	30
ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่าง chemical shift กับตำแหน่งโปรตอนของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide	32

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งเป็นกลุ่มโรคที่เกิดจากความผิดปกติที่ DNA หรือสารพันธุกรรมของเซลล์ในร่างกาย ส่งผลทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในปริมาณที่มากกว่าปกติ เกิดเป็นก้อนเนื้อผิดปกติลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง หลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง และทำให้เกิดการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ส่งผลให้การทำงานของอวัยวะเหล่านั้นผิดปกติ (1) จากสถิติสาเหตุการตายในประเทศไทย ปี 2558 พบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 รองลงมาคือ โรคระบบไหลเวียนโลหิต โรคติดเชื้อและปรสิต โรคของระบบทางเดินหายใจ และสาเหตุการตายอื่นๆตามลำดับ ซึ่งข้อมูลล่าสุดจากกระทรวงสาธารณสุขพบว่าคนไทยเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งและเนื้องอกทุกชนิดเป็นจำนวน 73,938 คน เมื่อเทียบอัตราการตายต่อประชากร 100,000 คน คิดเป็นร้อยละ 113.7(2) และมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นเรื่อยๆ

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วยวิธีการรักษาแบบมุ่งเป้า โดยเข้าจับกับโมเลกุลเป้าหมายจำเพาะ (targeted molecule) ที่มีความจำเพาะต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (3) เป็นอย่างมากและ Nuclear factor-kB pathway (NF-kB) เป็นอีกหนึ่งโมเลกุลเป้าหมายที่มีกระบวนการสำคัญในการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบการทำงานของภูมิคุ้มกัน ในมนุษย์ซึ่งการทำงานที่ผิดปกติของ NF-kB จะนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ รวมไปถึงโรคมะเร็งเนื่องจาก NF-kB มีความสามารถในการที่จะยับยั้งการตายของเซลล์ (Apoptosis), การแพร่กระจายของเซลล์ (cellular proliferation) และกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ proto-oncogene ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการแสดงออกมากจนทำให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ NF-kB ยังมีส่วนในการควบคุมการแสดงออกของสารและเอนไซม์ต่างๆ เช่น cell adhesion proteins,

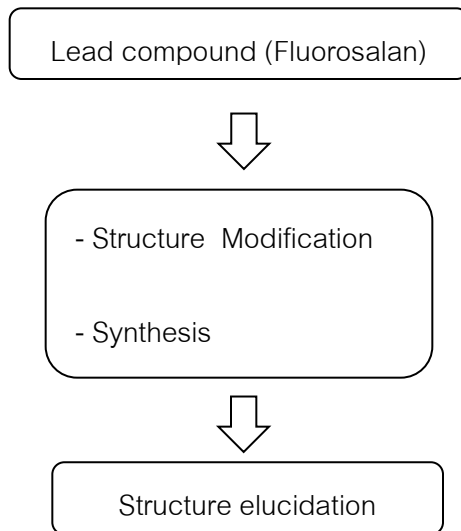
cyclooxygenase, nitric oxide synthase, chemokine และ inflammatory cytokines ซึ่งสารต่างๆ ที่กล่าวมาล้วนมีคุณสมบัติในการส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งสามารถแพร่ กระจายไปยังเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่นๆ (Metastasis) และกระตุ้นให้เกิดการสร้างเส้นเลือด (Angiogenesis) ไปเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (4, 5) ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B จึงเป็นการยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งได้ด้วย

จากการศึกษาเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B พบว่าสาร Fluorosalan เป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ผ่านการยับยั้งกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ของ IK β ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการทำงานของ NF- κ B โดยจากการการศึกษาพบว่าค่าความเข้มข้นที่สารนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC₅₀) ของ Fluorosalan อยู่ที่ 2.8 μ M(6) จึงถือเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการนำมาพัฒนายาต้านมะเร็ง คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะออกแบบและสังเคราะห์สารที่เป็นอนุพันธ์ของสาร Fluorosalan เพื่อให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อออกแบบและสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของสาร Fluorosalan

กรอบแนวคิดการวิจัย



โดยการออกแบบและพัฒนาสารใหม่ เพื่อให้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยมี Fluorosalan เป็นสารต้นแบบ (lead) และพิสูจน์โครงสร้างของสารที่ออกแบบ

สมมติฐานการวิจัย

1. สารที่ออกแบบและสังเคราะห์เป็นอนุพันธ์ของสาร Fluorosalan คาดว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้

นัยสำคัญเฉพาะ

1. Computational Docking Simulation

เป็นกระบวนการจำลองการเข้าจับของสารกับตัวรับโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เข้าช่วย

2. Kappa B kinase (IKK β)

เป็นเอนไซม์ที่อยู่ใน NF- κ B signaling pathway ที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อการอักเสบ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ศึกษากระบวนการออกแบบด้วยวิธีการทางคอมพิวเตอร์
2. ได้ศึกษาและเรียนรู้เทคนิคการสังเคราะห์สารด้วยปฏิกิริยา amidation
3. ได้ศึกษากระบวนการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างสารด้วยวิธีการทาง spectroscopy
4. สารและข้อมูลที่ได้สามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาฤทธิ์ของสารได้

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. มะเร็ง (cancer)

1.1 อุบัติการณ์การเกิดมะเร็ง

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆ ของคนทั่วโลก องค์การอนามัยโลกพบว่าในปี พ.ศ. 2551 มีผู้ป่วยรายใหม่จำนวน 12.7 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งราว 7.6 ล้านคน หรือคิดเป็น 13% จากสาเหตุการเสียชีวิตของคนทั่วโลก ซึ่งจำนวนผู้เสียชีวิตพบได้มากกว่าการเสียชีวิตด้วย โรคเอดส์ วัณโรค และมาลาเรียรวมกัน(7)

จากข้อมูลของสำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์ รายงานว่าในปี พ.ศ. 2554 ประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตด้วย โรคมะเร็งประมาณ 61,082 คน เป็นเพศชาย 35,437 คน เป็นเพศหญิง 25,645 คน ซึ่งถือเป็นสาเหตุ การตายอันดับหนึ่งและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดย เพศชายมีจำนวนผู้เสียชีวิต 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งช่องปากและคอหอย มะเร็งเม็ดเลือดขาว ส่วนเพศหญิง มีจำนวนผู้เสียชีวิต 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และ มะเร็งลำไส้ใหญ่ จะเห็นได้ว่าโรคมะเร็งที่เป็นปัญหาสำคัญ 5 อันดับแรกของประเทศ คือ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งคิดเป็น 56.38% ของมะเร็งทั้งหมด(8)

1.2 มะเร็ง

โรคมะเร็ง คือ โรคที่มีความผิดปกติของเซลล์ในอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์ ก่อให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็งที่มีการเจริญเติบโตโดยไม่อยู่ภายใต้การควบคุมที่เหมาะสม ผลลัพธ์คือ การเกิดเป็นก้อนเนื้อมะเร็งที่เติบโตรบกวนการทำงานของเซลล์

ปกติในอวัยวะ นอกจากนี้อาจยังสามารถถูกกลืนแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นได้ด้วย มะเร็งอาจมีความแตกต่างได้มากมาย ตามตำแหน่งของอวัยวะที่เป็นจุดกำเนิดของมะเร็ง และชนิดของเนื้อเยื่อที่อยู่ภายในอวัยวะนั้นๆ(9)

การที่เซลล์จะทำงานอย่างเป็นปกติ ส่วนหนึ่งเกิดจากการกำหนดหน้าที่ของเซลล์ด้วยสารพันธุกรรมที่เรียกว่าดีเอ็นเอ (DNA) ภายในเซลล์ หากเกิดการเปลี่ยนแปลงข้อมูลของ DNA เซลล์นั้นอาจมีความผิดปกติในการแบ่งตัวเจริญเติบโต ถ้ามีการสะสมความเปลี่ยนแปลงมากพอ เซลล์จะกลายไปเป็นเซลล์ก่อกำเนิดมะเร็ง และพัฒนาจนกลายเป็นเนื้อเยื่อมะเร็งในที่มะเร็งที่เกิดขึ้นในอวัยวะที่ต่างกันจะมีความแตกต่างกัน ทั้งในด้านลักษณะของเซลล์ การเจริญเติบโต การแพร่กระจาย การตอบสนองต่อการรักษา มะเร็งที่เริ่มต้นในอวัยวะหนึ่ง แม้ว่าแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นที่ไกลออกไป แต่ยังคงคุณสมบัติส่วนใหญ่ของเซลล์มะเร็งชนิดเดิม เช่น มะเร็งปอดที่แพร่กระจายไปที่ตับ ยังคงเป็นเซลล์มะเร็งปอด ไม่ได้กลายไปเป็นมะเร็งของเซลล์ตับ การรักษายังคงใช้ยาสำหรับรักษาโรคมะเร็งปอด ซึ่งแตกต่างจากยาสำหรับรักษาโรคมะเร็งตับ เป็นต้น(9)

1.3 วงจรชีวิตของเซลล์

จากความรู้ที่ว่าสิ่งมีชีวิตประกอบขึ้นด้วยเซลล์(10) เซลล์ดำรงอยู่ใน 2 สถานภาพ คือ สถานภาพที่อยู่เฉยไม่มีการแบ่งตัวที่เรียกว่า “Quiescence stage” หรือ Go (G = Gap) สำหรับระยะ Go นี้ เซลล์อาจจะดำรงอยู่ในระยะดังกล่าวนี้ได้นานเป็นวันๆ เป็นสัปดาห์ หรืออาจจะนานเป็นปีก็ได้ และอีกสถานภาพคือ สภาพที่มีการแบ่งตัว หรือเพิ่มขยายจำนวน ซึ่งคือวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) แบ่งเป็นระยะต่างๆ 4 ระยะ คือ

1. Pre-synthetic phase หรือ G1 phase คือ ระยะที่เริ่มมีการเตรียมการสร้าง DNA และสารต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการแบ่งตัวที่จะเกิดขึ้น เซลล์จะเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น
2. DNA synthetic phase หรือ S phase คือ ระยะที่มีการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธีการจำลอง DNA ขึ้นทั้งชุด (DNA replication) และสร้างสารต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการแบ่งตัว

3. Pre-mitotic phase หรือ G2 phase คือ ระยะก่อนที่จะเข้าสู่ระยะแบ่งตัว เป็นระยะที่เซลล์จะตรวจสอบตนเองว่ามีการเพิ่มจำนวน DNA เสร็จเรียบร้อยแล้วหรือไม่ ก่อนที่จะมีการแบ่งตัวในระยะ M ระยะย่อยทั้งสามระยะคือ G1, S และ G2 ก็คือ Interphase

4. Mitotic phase หรือ M phase คือ ระยะที่เกิดมีการแบ่งตัวเกิดขึ้น และโครโมโซมที่เพิ่มจำนวนไว้แล้ว ถูกแบ่งไปอยู่ในเซลล์ใหม่ทั้ง 2 เซลล์อย่างเท่าเทียมกัน

เซลล์มะเร็ง มีคุณสมบัติของการถ่ายทอดทางตรง (breed-trueproperty) มีการเจริญเติบโตโดยมีวงจรชีวิตของเซลล์เหมือนเซลล์ปกติ แต่เซลล์มะเร็งจะสร้างดีเอ็นเอซ้ำกว่า หรือใกล้เคียงกับเซลล์ปกติ และเซลล์มะเร็งตายยากกว่า เพราะเซลล์ค้างอยู่ในระยะใดระยะหนึ่งของวงจรชีวิตของเซลล์ ส่วนใหญ่ที่พบ คือ ในระยะ G1 และ G0 การที่เซลล์มะเร็งมีการตายน้อยกว่าเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่ และมีอัตราการแบ่งตัวเร็วกว่าเซลล์ปกติ จึงเป็นผลทำให้เซลล์มะเร็งรวมกันโตเป็นก้อน(11)

2. ยารักษาโรคมะเร็งที่ใช้ในปัจจุบัน

2.1 ยาเคมีบำบัด (Chemotherapy)

ยาเคมีบำบัดจะออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ตามระยะต่างๆ (G0 - M phase) ในวงจรการแบ่งตัวของเซลล์ (cell cycle) โดยระยะที่ถูกยับยั้งจะขึ้นกับชนิดของยาเคมีบำบัด นอกจากยาเคมีบำบัดจะยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติด้วย โดยเฉพาะในกลุ่มเซลล์ปกติที่มีอัตราการงอกและผลัดเซลล์สูง (high turn over rate) เช่น เซลล์ของเส้นผม เยื่อบุช่องปาก หรือการสร้างเม็ดเลือดต่างๆในไขกระดูก ดังนั้นการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดนั้น นอกจากจะสามารถยับยั้งและฆ่าเซลล์มะเร็งได้ ในขณะเดียวกันก็ยังส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติโดยเฉพาะในกลุ่มเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการผลัดเซลล์เร็ว ซึ่งผลกระทบดังกล่าวก็คือ ผลข้างเคียงที่พบได้บ่อยๆจากการให้ยาเคมีบำบัด เช่น ผมร่วง เยื่อบุช่องปากอักเสบ หรือภาวะเม็ดเลือดต่างๆลดลง(12)

2.2 ยารักษาแบบมุ่งเป้า (Targeted therapy)

การรักษาแบบมุ่งเป้าเป็นวิธีการรักษาด้วยยา หรือสารอย่างหนึ่งที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยจะไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลเป้าหมายจำเพาะ (targeted molecule) ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งนั้นๆ โดยมักจะพบโมเลกุลเป้าหมายเฉพาะนี้ในเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ จะเห็นได้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ของการรักษาแบบมุ่งเป้าจะแตกต่างจากยาเคมีบำบัด กล่าวคือยาเคมีบำบัดส่วนมากจะไปยับยั้งขบวนการแบ่งตัว อย่างรวดเร็วของเซลล์มะเร็งในขั้นตอนต่างๆของ cell cycle แต่ในขณะเดียวกันเซลล์ปกติที่มีการแบ่งตัวเร็วเช่น เส้นผม ไขกระดูก ก็ย่อมถูกผลกระทบจากการออกฤทธิ์ของยาเคมีบำบัดด้วย จึงทำให้เกิดผลข้างเคียงต่างๆ ได้แก่ ผมร่วง ภาวะเม็ดเลือดต่างๆ ต่ำ ดังนั้นในทางทฤษฎีแล้วการรักษามะเร็งแบบมุ่งเป้า น่าจะมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าและมีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติน้อยกว่าการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด(13)

ยารักษาแบบมุ่งเป้าจะออกฤทธิ์กับเซลล์มะเร็งผ่านกลไก inhibition of proliferation, induced apoptosis และ antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ในปัจจุบันแบ่งยารักษาแบบมุ่งเป้าเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ monoclonal antibodies และ small molecule inhibitor(13)

1. ยากลุ่ม monoclonal antibodies ยากลุ่มนี้มักเป็นสารที่สามารถละลายในน้ำและมีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ (water soluble with large molecular weights) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเป้าหมายที่อยู่นอกเซลล์เมมเบรน (Extracellular components) โดยอาศัยกลไกการออกฤทธิ์ต่างๆกัน เช่น ไม่ให้ตัวกระตุ้นไปจับกับตัวรับที่จำเพาะ (inhibition of binding and neutralizing ligands), ยับยั้งการส่งวิธีสัญญาณที่บริเวณตัวรับ (Blocking receptor signaling) รวมถึงการขัดขวางการส่งสัญญาณภายในเซลล์เมมเบรน (Interfering with downstream intracellular molecules) เป้าหมายของยากลุ่มนี้ประกอบด้วย (13)

- ตัวกระตุ้นต่างๆ (Ligands) เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF)

- ตัวรับต่างๆ (Receptors) ได้แก่ epidermal growth factor receptor (EGFR หรือ HER1), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu)

2. ยากลุ่ม small molecule inhibitors ยาในกลุ่มนี้ส่วนมากจะออกฤทธิ์ขัดขวางวิถี สัญญาณ ตั้งแต่บริเวณนอกเซลล์เมมเบรน ไฮโดรฟาสซึม จนถึงในนิวเคลียส โดยมักจะมีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งแบบแย่งจับ (competitive inhibitor) ซึ่งมักจะมีโครงสร้างคล้ายกับสารตั้งต้น (substrate) ดังนั้นสารตั้งต้น (substrate) และตัวยับยั้งชนิดนี้จึงแย่งกันจับกับเอนไซม์ แต่ตัวยับยั้งไม่สามารถทำปฏิกิริยาหรือส่งวิถีสัญญาณต่อไปได้(13)

ตัวอย่างเป้าหมายของยากลุ่มนี้ได้แก่เอนไซม์ tyrosine kinases (EGFR, HER2, และ VEGF receptors) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ขนส่งหมู่ฟอสเฟตจากอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate, ATP) ไปที่กรดอะมิโนชื่อไทโรซีน (tyrosine residue) ทำให้เกิดการกระตุ้นการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ ตัวอย่างของยากลุ่ม tyrosine kinase inhibitor ที่ประสบความสำเร็จในการรักษาเป็นครั้งแรก ได้แก่ การใช้ imatinib mesylate ในผู้ป่วย chronic myeloid leukemia (CML) โดย imatinib จะไปยับยั้งแบบแข่งขันกับสารตั้งต้น (substrate) ที่ ABL-kinases และโปรตีนที่เกิดจากการเชื่อมตัวกันที่ผิดปกติระหว่างยีน ของ BCR และ ABL (BCR-ABL kinase fusion protein) ซึ่งพบได้ในผู้ป่วย CML(13)

ในปัจจุบันมีงานวิจัยทางการแพทย์ที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพ ของยาที่ออกฤทธิ์มุ่งเป้า สำหรับการรักษาโรคมะเร็งมากมาย และองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาได้พิสูจน์และยอมรับการใช้ยากลุ่มดังกล่าว สำหรับรักษาผู้ป่วยมะเร็งตามข้อบ่งชี้ต่างๆ

3. NF-**KB** pathways

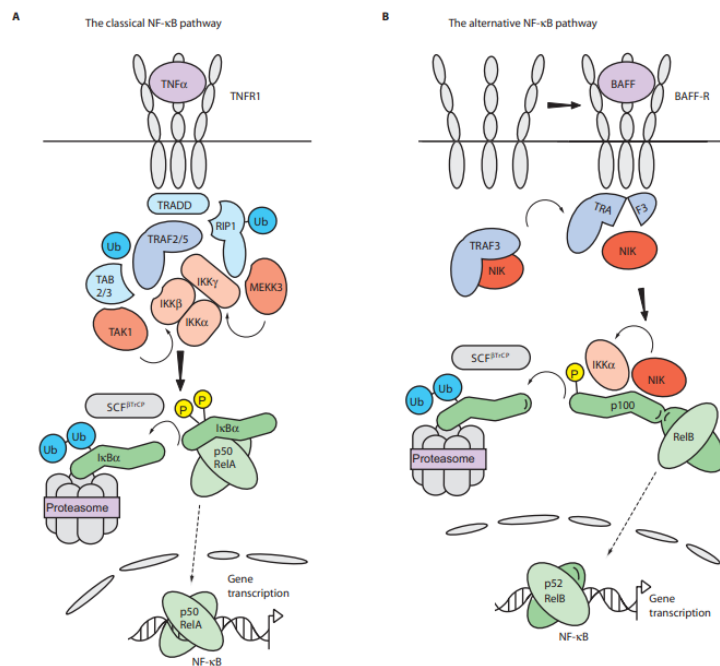
Nuclear factor **KB** (NF-**KB**) เป็น transcription factors ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ gene ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและกระบวนการอักเสบของร่างกาย โดย transcription

factor ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันนั้นประกอบไปด้วย NF-**KB**1 (p50), NF-**KB**2 (p52), RelA (p65), RelB และ c-Rel ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการถอดรหัสของยีนเป้าหมายโดยการเข้าจับส่วนของ DNA ที่มีความจำเพาะเจาะจง, **KB** enhancer ที่อยู่ในรูปของ hetero-dimer หรือ homo-dimer โดย NF-**KB** โดยปกติจะถูกเก็บอยู่ใน cytoplasm และถูกยับยั้งการทำงานด้วยโปรตีนในกลุ่ม **IKB** และโปรตีนที่มีลักษณะเฉพาะที่มี ankyrin repeats เป็นองค์ประกอบ โดยโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม **IKB** ที่มีความสำคัญและมีการศึกษามากที่สุดคือ **IKB α** นอกจากนี้ โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น ให้กลับ transcription factor ในกลุ่มนี้ยังทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง NF-**KB** ได้อีกด้วยเนื่องจากมีส่วนของ C-terminal portion ที่มีลักษณะเหมือนโปรตีนในกลุ่ม **IKB** ทำให้มีความสามารถในการยับยั้ง NF-**KB** ได้(14)

การทำงาน NF-**KB** เป็นการทำงานร่วมกันของ 2 signaling pathways คือ canonical pathways และ noncanonical pathways โดยทั้ง 2 pathways เป็นส่วนสำคัญในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน และการตอบสนองต่อการอักเสบแม้ว่าทั้ง 2 pathways จะมีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน โดยการทำงานของ canonical NF-**KB** pathway จะตอบสนองต่อตัวกระตุ้นได้หลากหลายประกอบไปด้วย ligands ของ cytokine receptors, pattern recognition receptors (PRRs), TNF receptor (TNFR) superfamily, T-cell receptor (TCR) และ B-cell receptor โดยกลไกในการกระตุ้น canonical NF-**KB** pathway คือ การกระตุ้นให้เกิดการแยกตัวของ **IKB α** โดยการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา phosphorylation ที่บริเวณที่มีความจำเพาะด้วย multi-subunit **IKB** kinase (IKK) complex ซึ่ง IKK complex ประกอบไปด้วย 2 catalytic subunits คือ **IKK α** , **IKK β** และ NF-**KB** essential modulator (NEMO ; **IKK γ**) ซึ่ง IKK complex จะทำงานเมื่อถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นต่างๆ เช่น cytokines, growth factors, mitogens, microbial และ stress agents ซึ่งจะทำให้เกิด phosphorylation ที่ N-terminal serines ของ **IKB α** แล้วทำให้เกิด ubiquitin-dependent degradation ของ **IKB α** ใน proteasome ส่งผลให้นิวเคลียสมีการย้ายที่ (Nuclear translocation) ของ p50/RelA และ p50/c-Rel dimers ที่เป็นส่วนหนึ่งของ canonical NF-**KB** ในขณะที่ noncanonical pathways จะถูกกระตุ้นด้วย **LT β R**, **BAFFR**, **CD40** และ **RANK** ที่เป็นส่วนหนึ่งใน

ligand ของ TNF receptor (TNFR) superfamily โดยการทำงานของ noncanonical pathway ไม่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสลายตัวของ **IKB α** แต่จะเกี่ยวข้องกับการทำงานของ NF-**KB** precursor protein และ p100 โดยโมเลกุลที่ทำหน้าที่หลักในการส่งสัญญาณใน pathways นี้คือ NF-**KB**-inducing kinase (NIK) ที่ทำงานร่วมกับ **IKK α** ทำให้เกิด phosphorylation ของ p100 แล้วทำให้เกิดการแยกตัวโดยการแยกตัวของ p100 จะเริ่มที่ C-terminal **IKB**-like structure ทำให้เกิด NF-**KB** p52 และเกิด nuclear translocation ของ noncanonical NF-**KB** complex p52/RelB(14)

การทำงานของ canonical pathways นั้นจะมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในทุกๆ ด้านในขณะที่ noncanonical pathways จะทำหน้าที่เสริมร่วมกับ canonical pathways ในการควบคุม adaptive immune system นอกจากนี้การยับยั้ง NF-**KB** activation ผ่าน alternative NF-**KB** pathway ทำให้เกิดการเข้าจับกับ DNA และควบคุมการแสดงออกของยีนส่งผลให้เกิดการเจริญของ cancer ได้อีกด้วย(15)

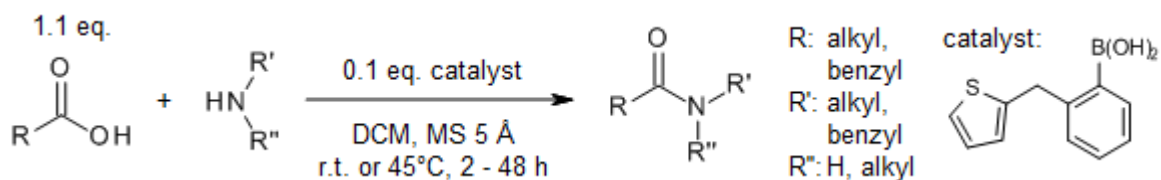


รูปที่ 1 Activation of NF-**KB** signaling by TNF receptors. (15)

4. กระบวนการสังเคราะห์เอไมด์(Amidation)

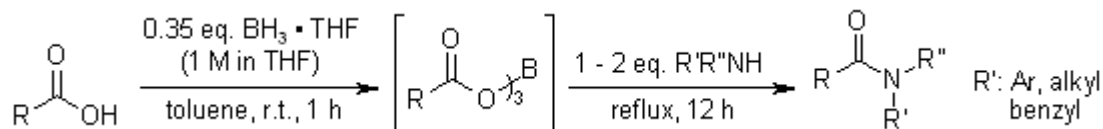
ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอไมด์ สามารถสังเคราะห์ได้หลายวิธี ดังนี้

4.1



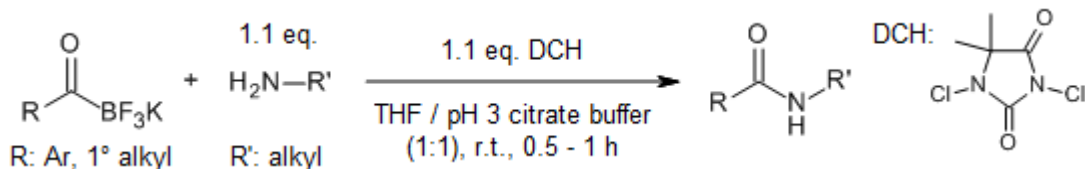
จากปฏิกิริยาใช้สารตั้งต้น carboxylic acids และ amines ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิ 45 °C นาน 2-48 ชั่วโมง และใช้ (2-(Thiophen-2-ylmethyl)phenyl)boronic acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา(16)

4.2



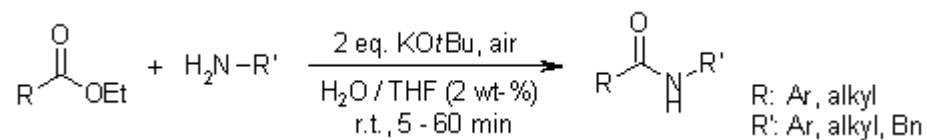
Borane-tetrahydrofuran complex หรือ borane-methyl sulfide complex เกิดปฏิกิริยากับ carboxylic acid ได้เป็น triacyloxyboranes ที่มีคุณสมบัติเป็น electrophile ทำปฏิกิริยาได้ดีกับสารที่เป็น nucleophiles(alkylamines, arylamines, hydrazides, alcohols, phenols) ผ่านการ reflux ในสารละลาย toluene ได้ผลิตภัณฑ์เป็น amides(17)

4.3



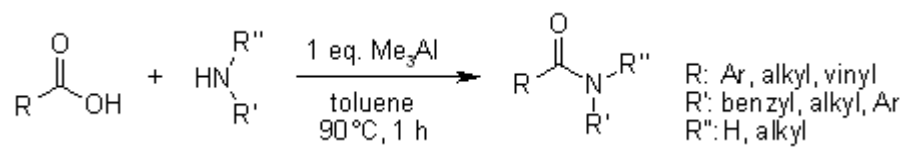
จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์ให้ primary amines และ potassium acyltrifluoroborates เป็นสารตั้งต้น ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วในสภาวะกรด(18)

4.4



Aliphatic หรือ aromatic esters เปลี่ยนเป็น amides โดยใช้ tert-butoxide น้ำและอากาศ ในสภาวะ mild conditions ปฏิกริยานี้มีประสิทธิภาพสูง เกิดได้ไว เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและประหยัดต้นทุนในการสังเคราะห์ จึงมักนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ ชีวเคมีและอุตสาหกรรมเคมี(19)

4.5



Carboxylic acids ทำปฏิกิริยากับ amine ในสารละลาย toluene และใช้ trimethylaluminium เป็นตัวเร่ง ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง(20)

5. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร สามารถตรวจสอบได้หลายเทคนิค โดยใช้เครื่องมือดังต่อไปนี้

5.1 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR spectrometer)



รูปที่ 2 เครื่อง Bruker AVANCE Ultrashield 400 MHz spectrometer(21)

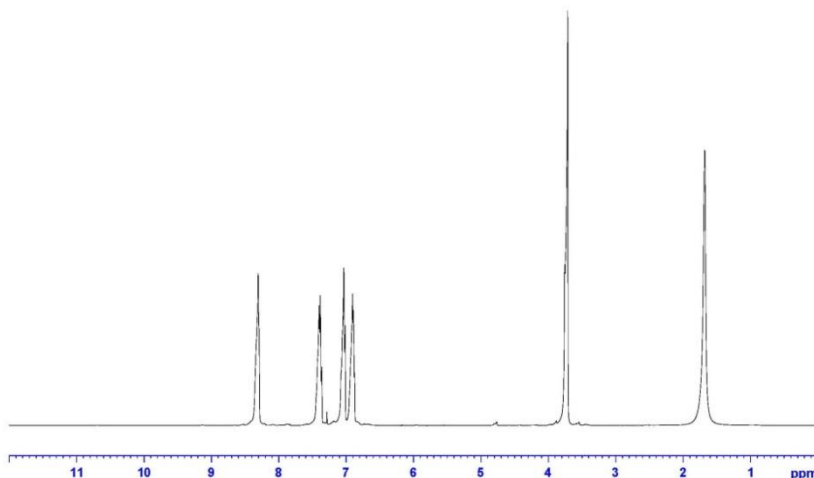
เครื่อง NMR spectrometer ประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก 4 ส่วนคือ

1. เครื่องคอมพิวเตอร์และซอฟต์แวร์ในการควบคุมการประมวลผลข้อมูล (Computer Control or WorkStation) ทำหน้าที่สั่งงานเครื่อง NMR spectrometer ประมวลผล และสั่งพิมพ์ผลการทดลอง
2. ส่วนควบคุมปฏิบัติการ (Spectrometer console) ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณไปกระตุ้นสารตัวอย่างภายใน magnet และตรวจจับสัญญาณที่สารตัวอย่างปล่อยออกมาแล้วส่งไปให้ Computer Control
3. แม่เหล็กกำลังสูง (Magnet) ทำหน้าที่ในการสร้างสถานะที่เหมาะสมในการทดลองโดยให้สนามแม่เหล็กความเข้มสูงที่คงที่ (Strong and homogenous magnetic field) โดยความเข้มของสนามแม่เหล็กจะสัมพันธ์กับความถี่ของคลื่นวิทยุที่ผ่านเข้าไปยังเครื่อง ดังนั้นจึงนิยามที่จะระบุ

สมรรถนะหรือ specification ของเครื่อง NMR spectrometer ในรูปแบบของค่าความถี่ เช่น 60 MHz, 100 MHz, 300 MHz และ 400 MHz เป็นต้น

4. หัวตรวจหรือโพรบ (NMR Probe) ติดตั้งอยู่ด้านในระหว่างแม่เหล็กทั้ง 2 (magnet gap) และมีหน้าที่คอยช่วยพองหรือรักษาระดับ (hold) ของสารตัวอย่าง(22)

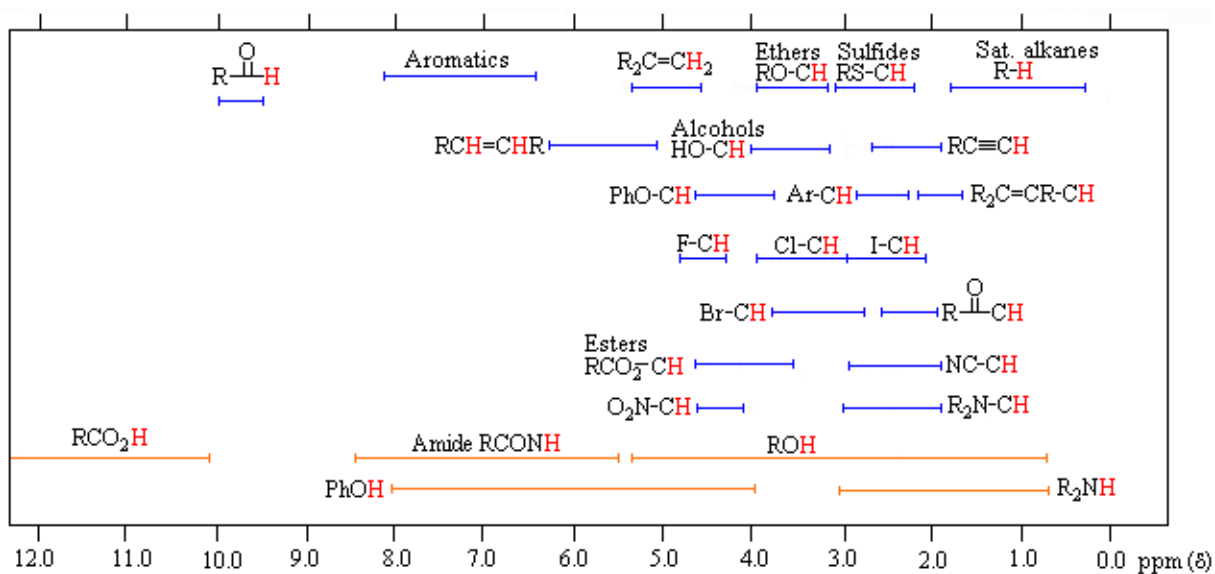
การวัดสัญญาณของเครื่อง FT-NMR spectrometer จะใช้เทคนิคที่เรียกว่า Pulsed NMR โดยเครื่อง NMR spectrometer จะส่งสัญญาณคลื่นวิทยุทุกความถี่ในช่วงที่สนใจเข้าไปยังตัวอย่างที่วิเคราะห์ การทำเช่นนี้จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสปินของนิวเคลียสทั้งหมดทันที ซึ่งเราจะเรียกสภาวะดังกล่าวว่าสถานะถูกกระตุ้น (excited state) จากนั้นนิวเคลียสดังกล่าวจะกลับสู่สถานะพื้น (ground state) โดยการคายพลังงานออกมาในรูปของคลื่นวิทยุในรูปของคลื่นที่ซ้อนกันที่เรียกว่าสัญญาณ FID (free induction decay) ซึ่งเราสามารถแยกออกเป็นความถี่ต่างๆ ที่มีความแรงของสัญญาณแตกต่างกันได้ โดยอาศัยคอมพิวเตอร์เก็บข้อมูลและประมวลผลออกมาเป็นสเปกตรัมที่เรียกว่า NMR spectrum ที่มีลักษณะเป็นพีค ดังรูปที่ 3 โดยมีแกนนอน (x-axis) เป็นค่า chemical shift(21)



รูปที่ 3 ตัวอย่าง ^1H NMR สเปกตรัมของสารอินทรีย์(16)

การดูดกลืนพลังงานจากสนามแม่เหล็กของนิวเคลียสของธาตุแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน แม้กระทั่งนิวเคลียสของธาตุชนิดเดียวกันที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันก็จะให้สัญญาณ

การดูดกลืนพลังงานที่แตกต่างกันด้วย ยกตัวอย่างการดูดกลืนพลังงานของนิวเคลียสของ H อะตอมของโมเลกุลสารอินทรีย์ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างกัน ที่จะปรากฏค่า chemical shift ที่แตกต่างกันดังในรูปที่ 4(21)



รูปที่ 4 ค่า chemical shift โดยประมาณของโปรตอน(21)

5.2 Gas Chromatography-mass spectrometer (GC-MS spectrometer)



รูปที่ 5 เครื่อง Gas Chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (23)

GC-MS spectrometer เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ในสารผสมหรือสารเดี่ยว(23) ซึ่งประกอบด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) และเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (MS)

GC-MS spectrometer ใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารจากการเปรียบเทียบ fingerprint ของเลขมวล (mass number) ของสารตัวอย่างนั้นๆ กับข้อมูลที่มีอยู่ โดยการทำให้โมเลกุลของสารแตกตัวใน ion source ซึ่งอาจใช้วิธียิงอิเล็กตรอน (Electron Impact, EI) หรือใช้วิธียิงสารมีประจุ (Chemical Ionization, CI) ไปที่สารตัวอย่าง แล้วทำให้แตกตัวเป็นไอออน ด้วยปฏิกิริยาเคมี โดยใช้ไอออนบวก (secondary ion) จากนั้นแยกส่วน fragments ต่างๆ ด้วย mass analyzer (quadrupole) ตามค่ามวลต่อประจุ(m/z) ของสนามแม่เหล็กหรือสนามไฟฟ้า(23)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

1.1 คอมพิวเตอร์

1.1.1 Notebook PC Intel Core i7-6700HQ CPU (2.60 - 3.50 GHz) with 16 GB
of RAM, Microsoft Windows 10 Home

1.2 โปรแกรม

1.2.1 AutoDock 1.5.6

1.2.2 ChemDraw Pro16.0

1.2.3 Chem3D Ultra12.0

1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.3.1 Separatory funnel

1.3.2 Round bottom flask

1.3.3 Analytical balance

1.3.4 Heating magnetic stirrer

1.3.5 Glass chromatography column

1.3.6 Rotary evaporator

1.3.7 TLC tank

1.3.8 TLC plates

1.3.9 UV lamp (254/365nm, Buchi Thailand Ltd

1.3.10 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer

(Bruker Avance III HD 400 MHz.)

1.3.11 Infrared Spectrometer (Thermo Spectra-Tech, P/N 700-0085, Ver3.9

10/01, Shelton, USA and APW1200202, Becthai Thailand)

1.3.12 Gas Chromatograph-Mass Spectrometer/Mass Spectrometer

(7890GC/ 7000C GCMS TripleQuad)

2. สารเคมี

2.1 2,6-dimethylaniline (Fluka, Switzerland)

2.2 5-bromo-2-hydroxybenzoic acid (Alfa Aesar, USA)

2.3 Dichloromethane (RCI Labscan, Thailand)

2.4 Dimethylformamide (RCI Labscan, Thailand)

2.5 Toluene (RCI Labscan, Thailand)

2.6 Triethylamine (Carlo Erba, Italy)

2.7 Oxalyl chloride (Sigma-Aldrich, USA)

2.8 Sodium chloride (Unilab, USA)

2.9 Sodium hydroxide (RCI Labscan, Thailand)

2.10 Magnesium sulfate (RCI Labscan, Thailand)

2.11 Methanol (RCI Labscan, Thailand)

2.12 Hexane (RCI Labscan, Thailand)

2.13 Nitrogen gas high priority 99.95%

2.14 Silica gel 1.07734.1000 (Merck, Germany)

3. วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 ศึกษาและออกแบบโครงสร้างยาโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

3.1.1 คัดเลือกและนำโครงสร้างสามมิติของสารชีวโมเลกุลเป้าหมายจากข้อมูลการ
 เอ็กซ์เรย์ผลึกสามมิติของเอนไซม์ IKK β ที่จับอยู่กับลิแกนด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล
 ของ Protein Data Bank ที่อยู่ในรูปของไฟล์ .pdb

3.1.2 เตรียมสารชีวโมเลกุลเป้าหมายจากเดิมที่อยู่ในรูป .pdb ให้อยู่ในรูป .pdbqt
 โดยใช้โปรแกรม AutoDockTools-1.5.6 ที่มีขั้นตอนดังนี้

1) เติมอะตอมของไฮโดรเจนเข้าไปในโครงสร้างของเอนไซม์ IKK β จากนั้นทำ
 การกำจัดโมเลกุลของน้ำและลิแกนด์ จากนั้นคำนวณประจุแบบแบบ
 Gasteiger ซึ่งค่าที่ออกมาต้องเท่าเดิมทุกครั้งเพื่อเป็นการยืนยันว่า
 สารชีวโมเลกุลเป้าหมายเป็นสารเดิม

2) บันทึกไฟล์ในนามสกุล .pdbqt

3.1.3 เตรียมลิแกนด์สำหรับการจับกับสารชีวโมเลกุลเป้าหมายการสร้างโครงสร้างใน
 โปรแกรม ChemDrawProfessional 16.0 และนำโครงสร้างที่ได้จาก Chem-
 DrawProfessional 16.0 ไปวางในโปรแกรม Chem3D 16.0 เพื่อให้สารอยู่
 ในรูปที่เสถียรที่สุด

3.1.4 เมื่อได้ลิแกนด์ที่อยู่ในรูปที่เสถียรที่สุดแล้วบันทึกโครงสร้างดังกล่าวให้อยู่รูปไฟล์
 .pdb ที่จะนำไปเปิดในโปรแกรม AutoDockTool-1.5.6 เพื่อแปลงไฟล์ให้อยู่ใน
 รูป .pdbqt

3.1.5 เปิดไฟล์เอนไซม์ IKK β ที่อยู่ในรูป .pdbqt ด้วยโปรแกรม AutoDockTools-
 1.5.6 และทำการกำหนด residual sites ที่เป็นเป้าหมายที่ต้องการให้ลิแกนด์
 เข้าจับ

3.1.6 ทำการกำหนด Grid box เพื่อกำหนดบริเวณที่จะจำลองการเข้าจับทั้งหมด

โดยให้ครอบคลุมทั้งลิแกนด์และ residual sites โดยทำการกำหนด ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

Grid box parameter	Parameters
Number of point in X, Y, Z-dimension	100, 100, 100
Spacing (Ao)	0.375
Center Grid Box	Center to residual site

ตารางที่ 1 Grid box parameters

3.1.7 ทำการ save Grid box ให้อยู่ในรูปแบบ .gpf และทำ Autogrid เพื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของเอนไซม์ IKK β และลิแกนด์

3.1.8 เตรียม Docking parameters ในโปรแกรม AutoDockTools-1.5.6 ในรูปแบบเปิดไฟล์เอนไซม์ IKK β และลิแกนด์ที่เป็นไฟล์ .pdbqt แล้วทำการกำหนดพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

Docking parameters	
Number of GA run	100
Population size (Medium)	150
Maximum number of energy evaluations	2,500,000
Maximum number of generation	27,000
Maximum number of top individual that automatically survive	1
Rate of gene mutation	0.02
Rate of crossover	0.8
Mean of Cauchy distribution for gene mutation	0.0

Variance of Cauchy distribution for gene mutation	1.0
Number of generation for picking worst individual	10

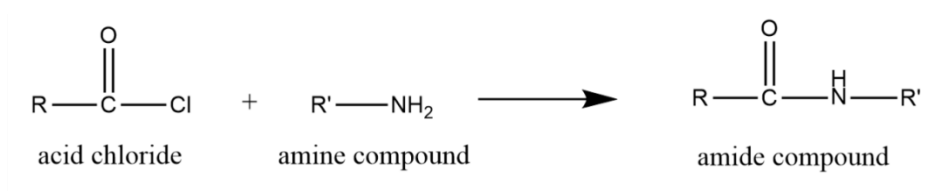
ตารางที่ 2 Docking parameters

3.1.9 ทำการ Docking เพื่อให้ได้ไฟล์ .dlg ซึ่งรายงานผลเป็น Binding energy โดยเลือก Conformation ที่มี Binding energy เป็นลบมากที่สุดมาเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์

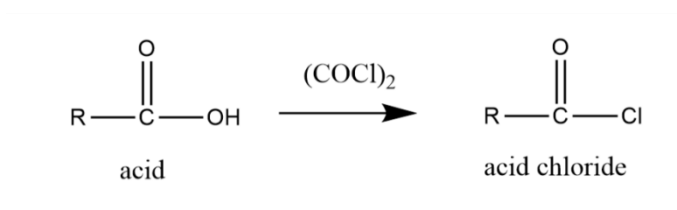
3.2 สังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร Fluorosalan

3.2.1 การสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์ ใช้การเกิดปฏิกิริยา 2 steps ดังนี้

A. Acid chloride synthesis



B. Amide synthesis



3.2.2 กระบวนการสังเคราะห์สารเคมี

3.2.2.1 Acid chloride synthesis

1) ชั่งสาร 5-bromo-2-hydroxybenzoic acid (1.11 g, 4.4146 mmol)

ใส่ในขวดก้นกลม

- 2) เติมสารละลาย Toluene 15 ml ลงในขวดก้นกลม
- 3) เติม oxalyl chloride (0.75 ml, 5.9088 mmol) และเติมตัวเร่งปฏิกิริยา dimethylformamide 3 หยด โดยทำในสภาวะปิดภายใต้ที่มีแก๊สไนโตรเจนและคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 2-8 °C
- 4) นำไป reflux ที่อุณหภูมิ 110 °C โดยทำในสภาวะปิดภายใต้บรรยากาศที่มีแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 5) นำไประเหยตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิ 90 °C โดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator

3.2.2.2 Amide synthesis

- 1) นำสาร 2,6-dimethylaniline (0.956 ml, 0.5069 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม
- 2) เติมสารละลาย dry Dichloromethane (dry DCM) 15 ml ทำในสภาวะปิดภายใต้บรรยากาศที่มีแก๊สไนโตรเจน
- 3) เติมสารละลาย triethylamine (0.75 ml, 14.6742 mmol) ทำในสภาวะปิดภายใต้บรรยากาศที่มีแก๊สไนโตรเจน
- 4) นำสารในขวดก้นกลมที่ได้จากข้อ 3) เติมลงในขวดก้นกลมที่ได้จากขั้นตอนที่ 5 ของปฏิกิริยา Acid chloride synthesis และกลั่นขวดก้นกลมด้วย dry DCM ทำในสภาวะปิดภายใต้บรรยากาศที่มีแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- 5) เก็บสารตัวอย่างที่ 0, 1/2, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง เพื่อตรวจการเกิดปฏิกิริยาเคมี
- 6) หาค่า %yield

3.2.2.3 ขั้นตอนเตรียมสารเคมีเพื่อพิสูจน์การเกิดปฏิกิริยาเคมี

- 1) เตรียมสารตัวอย่าง 2,6-dimethylaniline ผสมกับ DCM:Hexane ในอัตราส่วน 1:1
- 2) เตรียมสารตัวอย่าง 5-bromo-2-hydroxybenzoic acid ผสมกับ DCM:Hexane ในอัตราส่วน 1:1
- 3) ดูดสารตัวอย่างโดยใช้หลอด capillary
- 4) spot สารตัวอย่างลงบนแผ่น TLC โดยกำหนด Starting point ห่างจากขอบล่าง 1 cm และกำหนด solvent front ให้ห่างจากขอบบน 0.5 cm
- 5) วางแผ่น TLC ใน TLC tank โดย Mobile phase ประกอบด้วย DCM:Hexane ในอัตราส่วน 1:1 เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปจนถึงขอบบนจึงนำแผ่น TLC ออก
- 6) นำแผ่น TLC ส่องดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 365 nm คำนวณหาค่า Retention factor (Rf)

3.3 การแยกสกัดสารด้วยตัวทำละลาย

- 3.2.1 เติมสารละลาย Dichloromethane 10 ml ลงในขวดกั่นกลม จากนั้นดูดสารละลายใส่ในกรวยแยก และเติม Dichloromethane 140 ml ลงไป
- 3.2.2 เติมสารละลาย 1N NaOH จำนวน 20 ml และ NaCl จำนวน 20 ml
- 3.2.3 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 ml เขย่าเพื่อให้เกิดการดึงสารตามสภาพขั้วให้ไปอยู่ในแต่ละวัฏภาค
- 3.2.4 เก็บชั้นน้ำมาสกัดต่อด้วย DCM จำนวน 200 ml 2 ครั้ง
- 3.2.5 รวมชั้น DCM ที่ได้จากการสกัดแยก 3 ครั้ง มาสกัดแยกด้วยน้ำอีก 400 ml 1 ครั้ง
- 3.2.6 ไซชั่นน้ำทิ้ง แล้วสกัดชั้น DCM ด้วยน้ำ 400 ml อีก 1 ครั้ง

3.2.7 นำสารละลายที่ได้จากการสกัดแยกเติม anhydrous MgSO_4 จนได้สารละลาย

ใส กรองด้วยสำลีและเก็บชั้นสารละลายใส

3.2.8 นำสารละลายใสที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิ $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ โดยใช้
เครื่อง Rotary Evaporator

3.4 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.2.1 บรรจุซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ โดยมี mobile phase คือ DCM:Hexane ใน
อัตราส่วน 1:1

3.2.2 ละลายสารตัวอย่างด้วย mobile phase เล็กน้อย (3-5 drops)

3.2.3 หยดสารละลายตัวอย่างลงในคอลัมน์ แล้วเปิด stopcock ให้อัตราการไหล
พอเหมาะกับการแยก

3.2.4 เก็บสารละลายตัวอย่างจากคอลัมน์ แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC เพื่อ
หา fraction ที่มีสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์

3.2.4 นำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 365 nm
จากนั้นคำนวณหาค่า Retention factor (R_f)

3.2.5 นำ fraction ของสารตัวอย่างที่มีค่า R_f value เท่ากันมารวมกัน

3.2.6 นำแต่ละ fraction ไประเหยตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิ $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ โดยใช้เครื่อง
Rotary Evaporator

3.2.7 เก็บสารตัวอย่างเพื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์

3.5 พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้โดยใช้เครื่องมือต่างๆ ดังนี้

3.5.1 Infrared Spectrometer (IR Spectrometer)

3.5.2 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR Spectrometer)

3.2.2.1 ^1H NMR Spectroscopy

3.2.2.1 ^{13}C NMR Spectroscopy

3.5.3 Mass Spectrometer

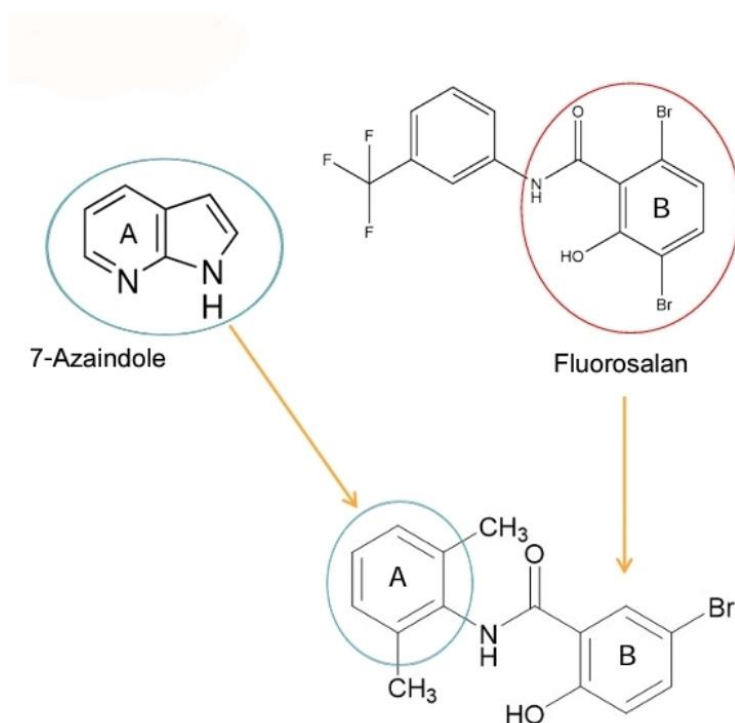
3.5.4 Differential Scanning Calorimeter

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการออกแบบโครงสร้างจากสารต้นแบบ

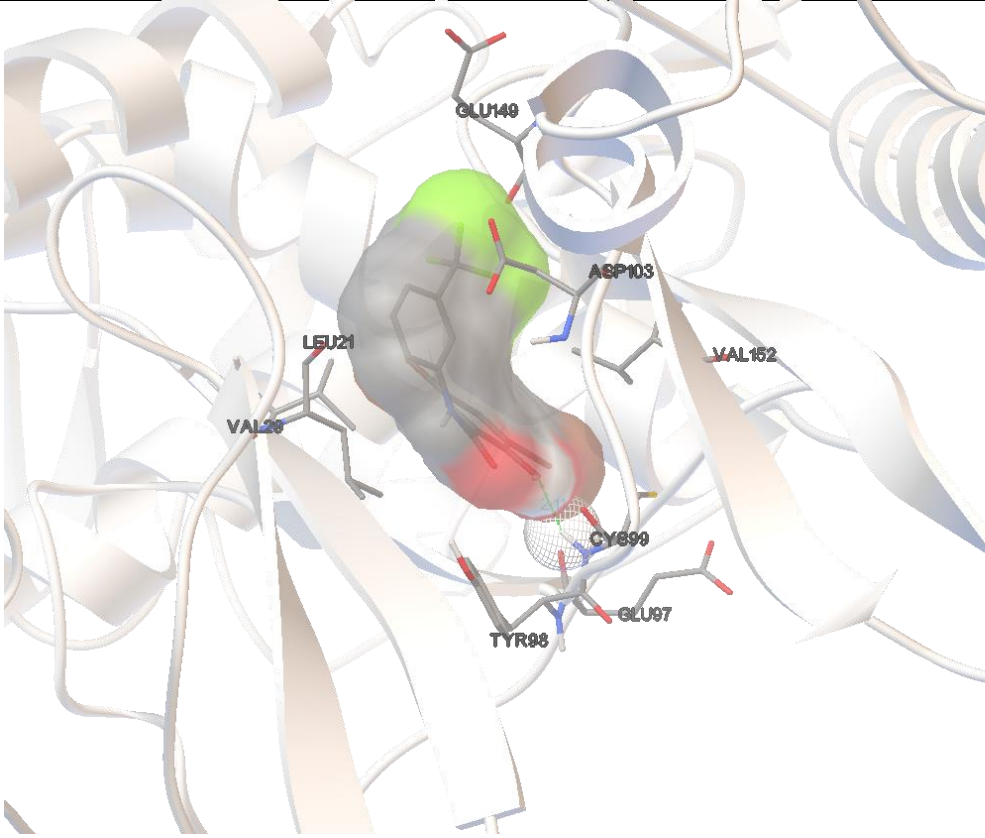
จากการออกแบบโครงสร้างของสารตัวอย่าง โดยการใช้สาร Fluorosalan มาเป็นต้นแบบในส่วน B และในส่วน A ใช้สาร 7-azaindole มาเป็นต้นแบบ โดยได้นำสองส่วนนี้เชื่อมกันด้วยพันธะเอไมด์ และดัดแปลงโครงสร้างเพื่อให้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดียิ่งขึ้นโดยพิจารณาจากผลของ steric hindrance ต่อ receptor และผลของ inductive effect จากการมีหมู่แทนที่ Electron donating group บน aromatic ring ในการช่วยจับกับ receptor ให้ดียิ่งขึ้น

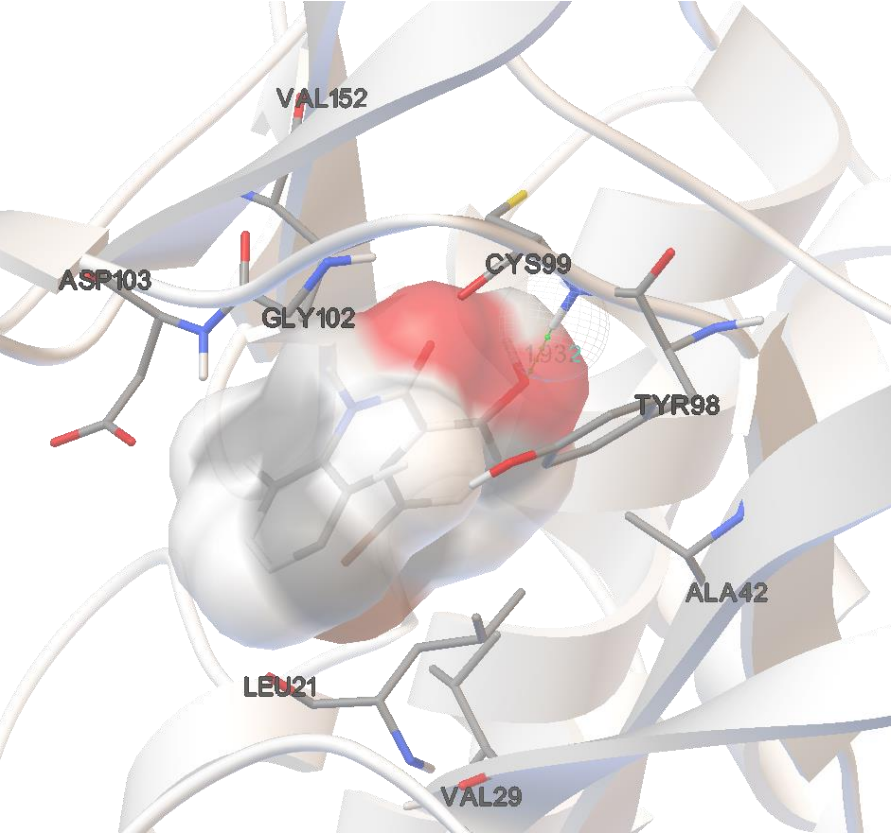


รูปที่ 6 การออกแบบโครงสร้างจากสารต้นแบบ

4.2 ผลการทำ Computer-Aided Drug Design

ตารางที่ 3 แสดงผลของ conformation ของ Compound ที่เกิด interaction บริเวณ active site

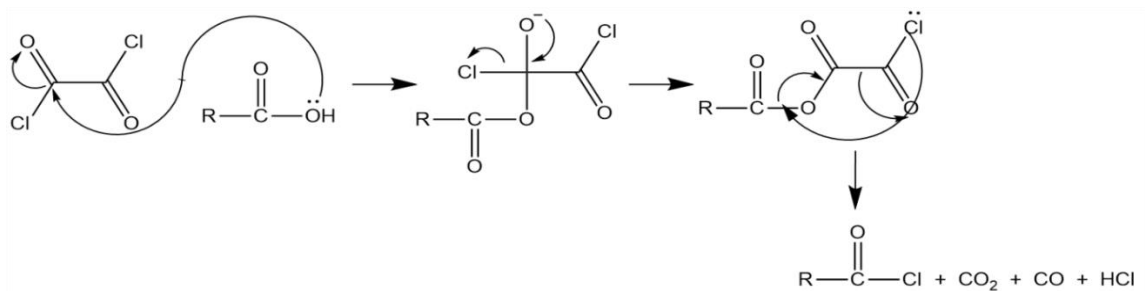
Compound	Order Conformation	Docked pose	BE	IC ₅₀	Bonding
Fluorosalan	100		-7.06	6.72 μ M	1 H-bond(CYS99)

Compound	Order Conformation	Docked pose	BE	IC ₅₀	Bonding
A9B4	100		-6.50	20.25 μ M	1 H-bond(CYS99)

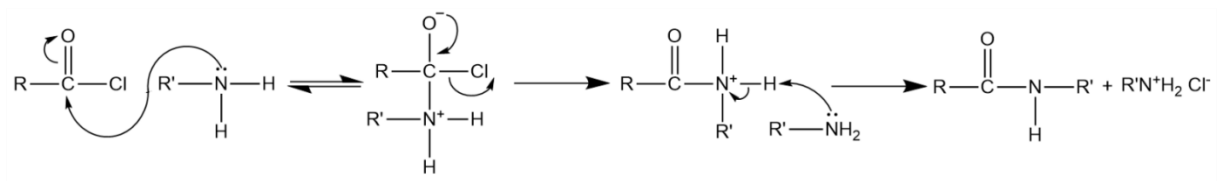
4.3 ผลการสังเคราะห์สาร 5-bromo-*N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide

ในขั้นตอนการสังเคราะห์สาร 5-bromo-*N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ

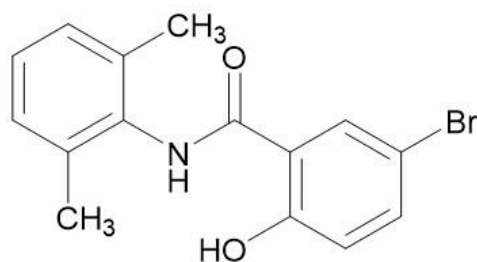
1. Acid chloride synthesis โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังนี้



2. Amide synthesis โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังนี้



จากการสังเคราะห์สารผ่าน 2 ปฏิกิริยา จะได้สารประกอบ 5-bromo-*N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide ที่มีโครงสร้างดังรูป



รูปที่ 7 โครงสร้างของ 5-bromo-*N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide

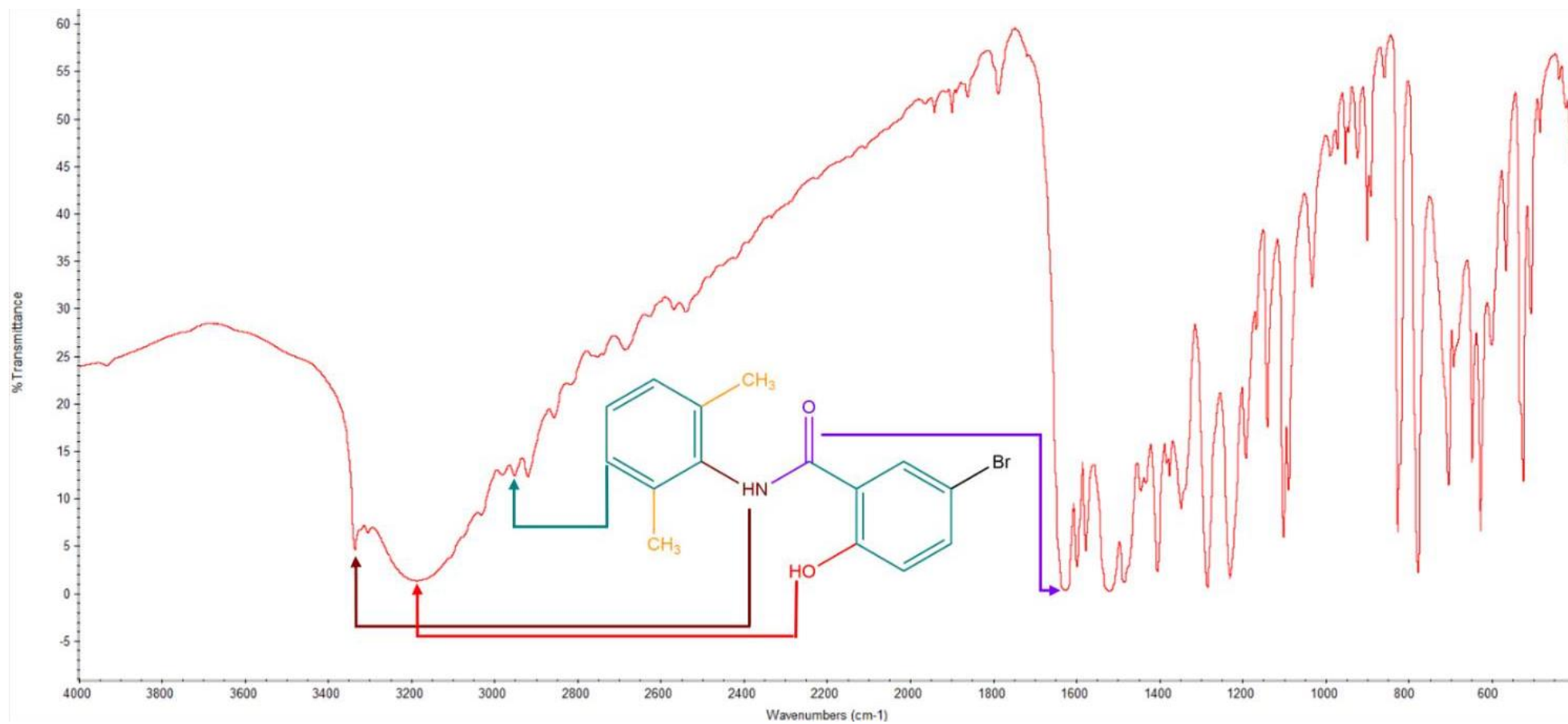
ตารางที่ 4 แสดงผลการสังเคราะห์สาร 5-bromo-*N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide

List	5-bromo- <i>N</i> -(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide
%Yield(Pure)	92.5%
Physical appearance	ลักษณะเป็นผงสีขาว
m.p.	238.1

4.4 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย IR spectrometer

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy พบว่าได้ผลดังตารางที่ 5
 ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง wavenumber (cm^{-1}) กับหมู่ฟังก์ชันทางเคมีของ 5-bromo-*N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide

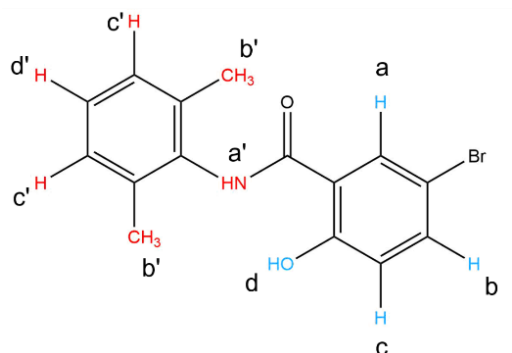
Wavenumber(cm^{-1})	Attributed to
3,336	การยืดของพันธะ N-H ของเอไมด์, secondary amine
3,188	การยืดของพันธะ O-H ของแอลกอฮอล์
2,977	การยืดของพันธะ =C-H ของวงเบนซีน
1,624	การยืดของพันธะ C=O ของเอไมด์



รูปที่ 8 แสดงตำแหน่ง wavenumber บน FT-IR spectrum ของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide

4.5 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย ^1H NMR spectrometer

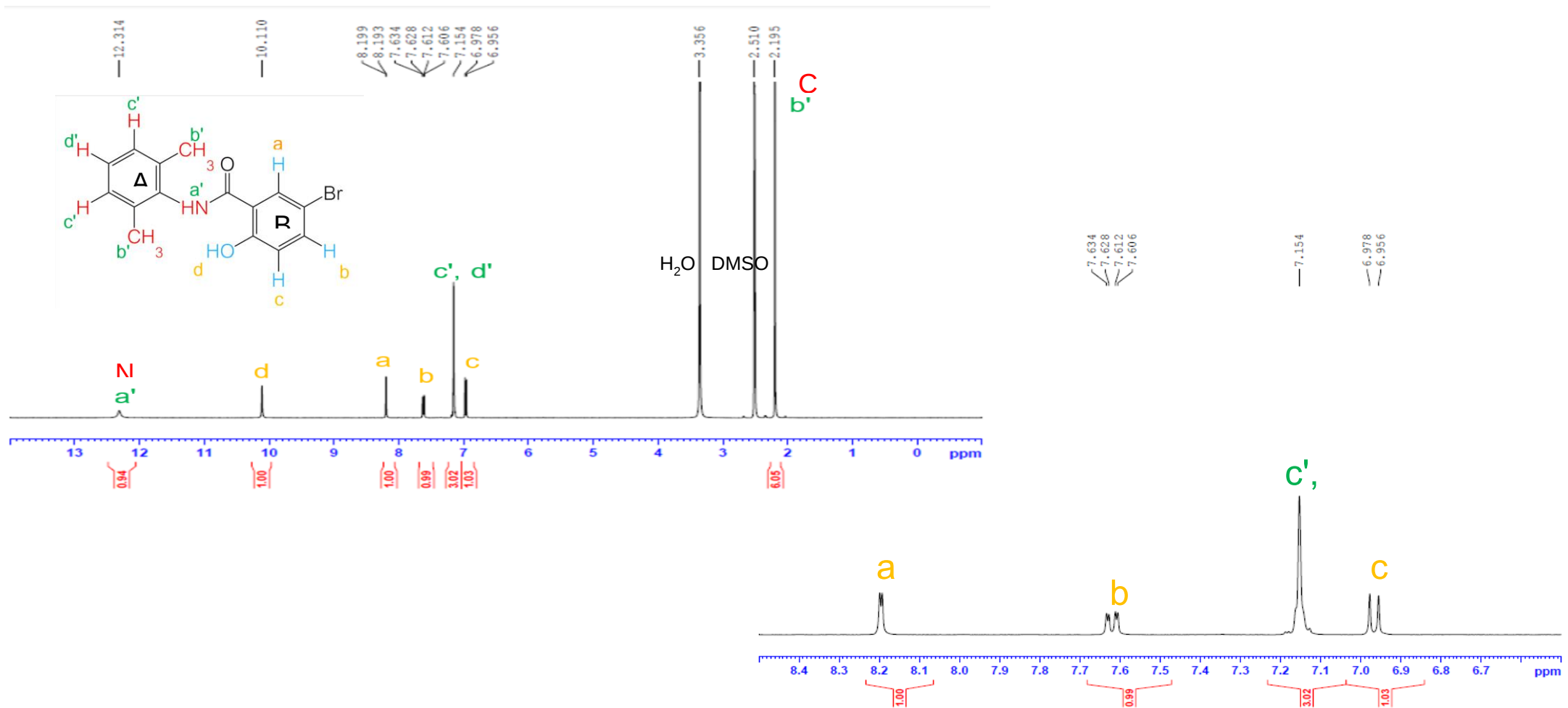
จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy พบว่าได้ผลดังดังนี้



รูปที่ 9 แสดงการกำหนดตำแหน่งโปรตอนของ 5-bromo-*N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide

ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่าง chemical shift กับตำแหน่งโปรตอนของ 5-bromo-*N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide

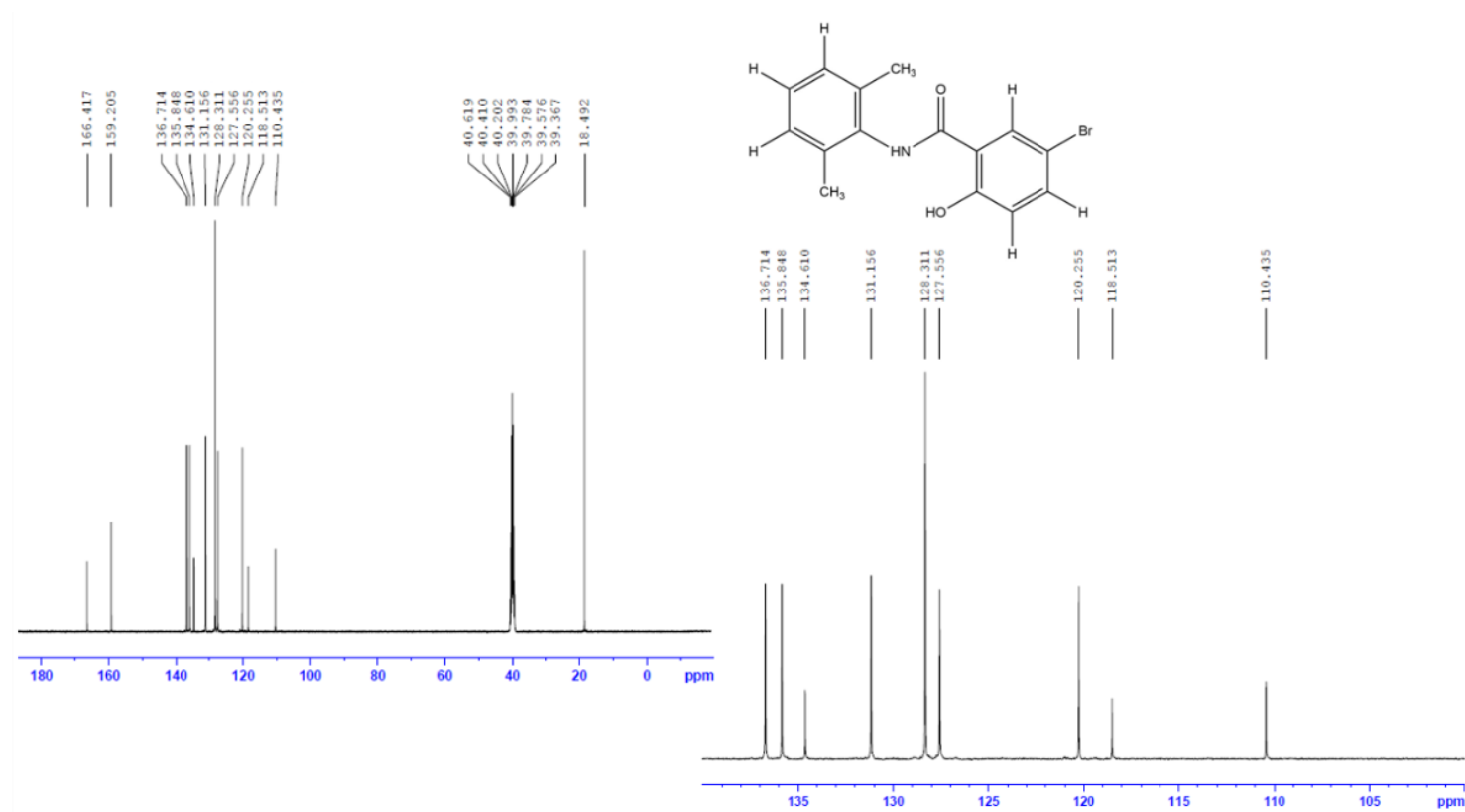
Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Shape
a'	2.195	Singlet
c	6.956 และ 6.970	Doublet
c' และ d'	7.154	Singlet
b	7.606, 7.612, 7.628 และ 7.634	Doublet of doublet
a	8.193 และ 8.199	Doublet
d	10.110	Singlet
a'	12.314	Singlet



รูปที่ 10 แสดงตำแหน่ง chemical shift บน NMR spectrum ของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide

4.6 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย ^{13}C NMR spectrometer

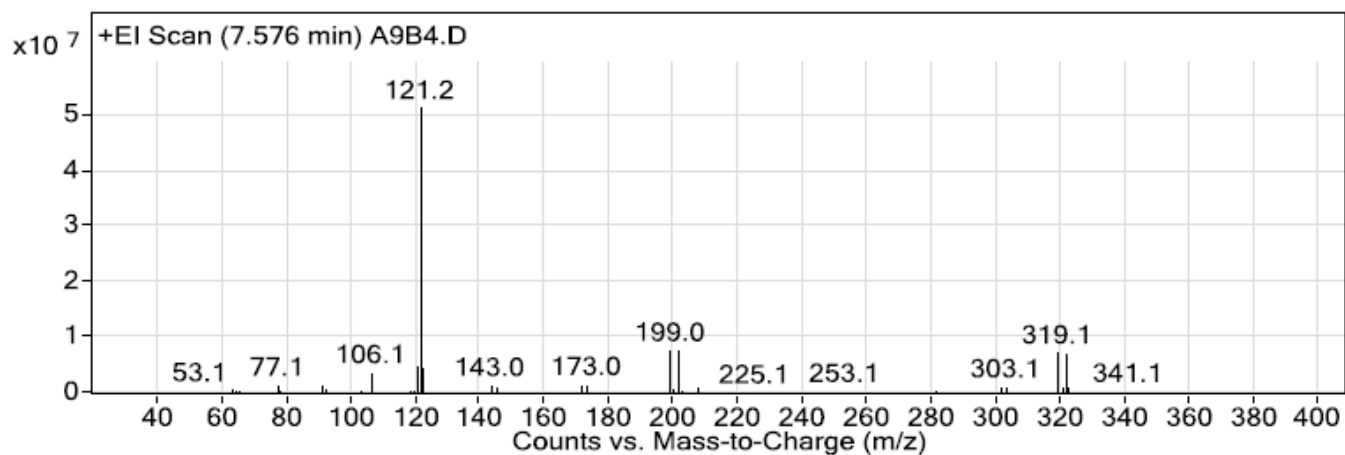
จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{13}C NMR spectroscopy พบว่าได้ผลการทดลองดังนี้



รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่าง chemical shift กับตำแหน่งคาร์บอนของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide

4.7 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย Mass spectrometer

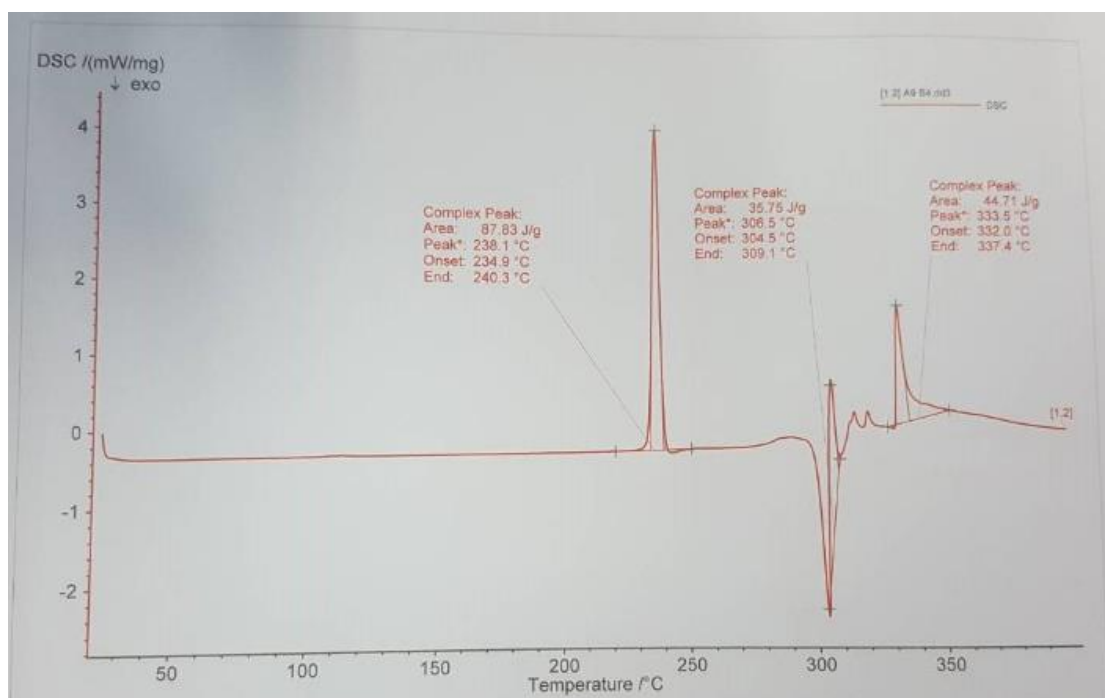
จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยเครื่อง Mass spectrometer พบว่าสารที่ออกแบบ มีสูตรโมเลกุล $C_{15}H_{14}BrNO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 320.18 มี m/z : 319.02, 321.02, 320.02, 322.02, 321.03, 323.03



รูปที่ 12 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย Mass spectrometer ของ 5-bromo-*N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide

4.8 ผลการทดสอบ Differential Scanning Calorimeter

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย Differential Scanning Calorimeter พบว่าสารที่
ออกแบบมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 238.1 °C ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่าง Temperature กับ ค่าพลังงานที่ให้เข้าไปของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide

บทที่ 5

อภิปรายผลการทำวิจัย

สารต้นแบบ Fluorosalan มีฤทธิ์ในการยับยั้ง NF- κ B โดยเข้าจับที่ IKK receptor ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาสารใหม่ โดยทำการออกแบบและสังเคราะห์สารที่เป็นอนุพันธ์ของสาร Fluorosalan เพื่อให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

จากการออกแบบโครงสร้างของสารโดยใช้สารต้นแบบ Fluorosalan แล้วนำมาดัดแปลงโครงสร้างจากนั้นโครงสร้างไปจำลองการจับกับ residue ที่กำหนดบน IKK receptor ด้วยวิธีการทางคอมพิวเตอร์ และพิจารณาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น ค่าพลังงานในการเกิดพันธะของสารที่ดัดแปลงโครงสร้างแล้วกับ residue บน receptor ที่กำหนด จนได้สารที่ออกแบบมา ผลการทำ molecular docking พบว่า Fluorosalan มีค่า binding energy เท่ากับ -7.06 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.72 μ M โดยเกิดพันธะไฮโดรเจน 1 พันธะ ที่ตำแหน่ง CYS-99 ในขณะที่สารที่ออกแบบมีค่า binding energy เท่ากับ -6.50 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.25 μ M โดยเกิดพันธะไฮโดรเจน 1 พันธะ ที่ตำแหน่ง CYS-99 สารที่ออกแบบที่คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะนำเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างคือ สาร 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide

กระบวนการสังเคราะห์สารเพื่อให้ได้ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide เกิดจาก 2 ปฏิกริยาหลัก คือ ปฏิกริยาการสังเคราะห์ Acid chloride และเปลี่ยน Acid chloride เป็นสารประกอบเอไมด์ จากการสังเคราะห์พบว่าได้สารที่มีลักษณะเป็นผงสีขาว และมี %Yield เท่ากับ 92.5%

จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารโดยใช้เครื่องมือทาง spectroscopy พบว่าสารที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้ คือ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide ที่สามารถสังเคราะห์ได้เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง 2,6-dimethylaniline และ 5-bromo-2-hydroxybenzoic acid ผ่านปฏิกิริยา Amidation ได้เป็นสารประกอบเอไมด์ ซึ่งจะพบ 2° N-H stretching singlet ของหมู่ฟังก์ชันเอไมด์ที่ wavenumber $3,336\text{ cm}^{-1}$ และพบ C=O stretching ที่ wavenumber $3,472\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นหมู่ carbonyl ของหมู่ฟังก์ชันเอไมด์ จึงพิสูจน์ได้ว่าสาร 2,6-dimethylaniline ทำปฏิกิริยากับ 5-bromo-2-hydroxybenzoic acid ในรูป acid chloride ได้เป็นสารประกอบเอไมด์

จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารโดยใช้ ^1H NMR spectrometer พบว่า 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า chemical shift กับตำแหน่งโปรตอนของ N-H ที่ 12.314 ppm เกิด downfield มากที่สุด เนื่องจากอยู่ติดกับหมู่ carbonyl ซึ่งเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน และ integrate proton ได้ 1 H และค่า chemical shift ในช่วง $6.9\text{--}8.4\text{ ppm}$ เป็นตำแหน่งที่แสดงโปรตอนของ aromatic ring โดย Hc ปรากฏที่ตำแหน่ง 6.9 ppm มีลักษณะเป็น doublet ซึ่งการแตกของ peak จะสัมพันธ์กับการ conjugate กับ Hb ที่ตำแหน่ง 7.6 ppm และผลจากการอยู่ใกล้ Electron donating group จึงทำให้ตำแหน่งของ Hb เกิด upfield ส่วนตำแหน่งที่ 8.2 ppm เป็นตำแหน่งที่แสดงโปรตอน Ha ที่มีลักษณะเป็น doublet และ integrated ได้เท่ากับ 1 H ซึ่งเป็นตำแหน่งของโปรตอนบนวง aromatic ที่มีการเกิด downfield มากที่สุด เนื่องจากอยู่ใกล้กับหมู่ carbonyl และอะตอมของ Br ซึ่งเป็น electron withdrawing group และที่ตำแหน่ง 7.1 ppm , singlet เป็นตำแหน่งที่แสดงโปรตอนของ Hc' และ Hd' ที่เกิดการ coupling ซึ่งกันและกัน integrated ได้เท่ากับ 3 H จาก ^1H NMR spectrum แสดงให้เห็นถึงโปรตอนที่อยู่ในโครงสร้างของสาร 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide ทั้งหมด 14 โปรตอน และในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารโดยใช้เทคนิค ^{13}C NMR spectroscopy พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า chemical shift กับตำแหน่งที่แสดงอะตอมคาร์บอนของ 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide ทั้งหมด 13 ตำแหน่ง โดยเป็นสัญญาณของตัวทำละลาย DMSO 1 ตำแหน่ง ซึ่งตามสูตรโมเลกุลของสาร 5-bromo-

N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide คือ $C_{15}H_{14}BrNO_2$ ตำแหน่งที่หายไปเกิดจาก carbon บน aromatic ring เกิดการ coupling กัน ทำให้ตำแหน่งที่แสดงคาร์บอนเกิดการซ้อนทับกัน

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยเครื่อง Mass spectrometer พบว่าสารที่ออกแบบมี Molecular ion peak เท่ากับ m/z 319.1 และ 321.1 ในอัตราส่วน 1 : 1 แสดงถึงการมี Br ในโมเลกุล และมีส่วนแตกหักที่สำคัญเป็น base peak ซึ่งมีค่า m/z เท่ากับ 121.2 ซึ่งเป็นส่วนที่เกิดการแตกหักของพันธะเอไมด์ โดยที่ m/z 121.2 เป็นส่วนของ ring B นอกจากนี้ยังมี m/z 199.0 และ 201.1 เป็นส่วนของ ring A

จากการทดสอบด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter ซึ่งเป็นกราฟที่มีการดูดพลังงานเป็นทิศทางบวก พบว่าสารมีการดูดพลังงาน ซึ่งสารมีการดูดพลังงานเพื่อใช้ในการเปลี่ยนสถานะจากของแข็งเป็นของเหลวที่อุณหภูมิ $238.1\text{ }^{\circ}\text{C}$

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้ โดยใช้เครื่องมือทาง Spectroscopy ทำให้ทราบถึงโครงสร้างของสารที่ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้น และสามารถพิสูจน์การเกิดปฏิกิริยาของสารว่า สาร 2,6-dimethylaniline ทำปฏิกิริยากับ 5-bromo-2-hydroxybenzoic acid ในรูป acid chloride ได้เป็นสาร 5-bromo-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-hydroxybenzamide ที่มีสูตรโมเลกุล $C_{15}H_{14}BrNO_2$ และมีน้ำหนักมวลโมเลกุลเท่ากับ 320.18 g/mol มีลักษณะเป็นผงสีขาว มีจุดหลอมเหลวที่ $238.1\text{ }^{\circ}\text{C}$

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ออกแบบและสังเคราะห์สารที่เป็นอนุพันธ์ของสาร Fluorosalan โดยคาดว่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วน ofฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ปัญหาของงานวิจัยนี้คือ งานวิจัยมีระยะเวลาในการศึกษาที่จำกัด จึงทำให้ไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ได้ทัน

เอกสารอ้างอิง

1. National Cancer Institute. What Is Cancer [Online]. 2015 Feb 9 [cited 2018 February 19]; Available from: URL:<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer?redirect=true/>
2. สำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์. สถิติสาธารณสุข พ.ศ. 2558: Public Health Statistics 2015 A.D.2015. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2559.
3. Walter HS, Ahmed S. Targeted therapies in cancer. Surgery - Oxford International Edition. 2018;36(3):122-7.
4. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF-kappaB, an active player in human cancers. Cancer Immunol Res. 2014;2(9):823-30.
5. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-**KB** signaling in inflammation and cancer. Molecular Cancer. 2013;12(1):86.
6. Miller SC, Huang R, Sakamuru S, Shukla SJ, Attene-Ramos MS, Shinn P, et al. Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-**KB** signaling and their mechanism of action. Biochemical Pharmacology. 2010;79(9):1272-80.
7. คณะกรรมการจัดทำแผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข. แผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด; 2556.
8. Vatanasapt V, Martin N, Sriplung H, Chindavijak K, Sontipong S, Sriamporn H, et al. Cancer incidence in Thailand, 1988-1991. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 1995;4(5):475.

9. มะเร็งวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย. โรคมะเร็ง [Online]. 2009 July 1 [cited 2018 February 20]; Available from:

URL:http://www.thethaicancer.com/Webdocument/People_article/People_article_001.html

10. ศูนย์ผลิตและพัฒนาสื่อคอมพิวเตอร์เพื่อการศึกษา (C.A.I.) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ระยะเวลาต่างๆ ในวัฏจักรของเซลล์ [Online]. Cai.md.chula.ac.th. n.d. [cited 2018 February 21]; Available from:

URL:http://www.cai.md.chula.ac.th/lesson/lesson4511/html/section1_3.html

11. เครือข่ายข้อมูลกาญจนาภิเษก. ขั้นตอนของการเกิดมะเร็ง [Online]. n.d. [cited 2018 February 21]; Available from:

URL:<http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=9&chap=6&page=t9-6-infodetail05.html>

12. ไนยรัฐ ประสงค์สุข. Common Side Effects of Chemotherapy [Online]. 2016 [cited 2018 February 24]; Available from:

URL:http://www.thethaicancer.com/PDF/Physician/common_SE.pdf

13. ไนยรัฐ ประสงค์สุข. การรักษาแบบมุ่งเป้า(Targeted therapy) & ยาระบบ ภูมิคุ้มกัน (Immunotherapy) [Online]. 2016 [cited 2018 February 24]; Available from:

URL:http://www.thethaicancer.com/PDF/Physician/Target_immuno.pdf

14. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- κ B signaling in inflammation. Signal Transduction And Targeted Therapy. 2017;2:17023.

15. Häcker H, Karin M. Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases. Science's STKE. 2006;2006(357):re13-re.

16. Mohy El Dine T, Erb W, Berhault Y, Rouden J, Blanchet J. Catalytic Chemical Amide Synthesis at Room Temperature: One More Step Toward Peptide Synthesis. The Journal of Organic Chemistry. 2015;80(9):4532-44.

17. Huang Z, Reilly J, Buckle R. An Efficient Synthesis of Amides and Esters via Triacyloxyboranes. *Synlett*. 2007;2007(7):1026-1030.
18. Gálvez AO, Schaack CP, Noda H, Bode JW. Chemoselective Acylation of Primary Amines and Amides with Potassium Acyltrifluoroborates under Acidic Conditions. *Journal of the American Chemical Society*. 2017;139(5):1826-9.
19. Kim BR, Lee H-G, Kang S-B, Sung GH, Kim J-J, Park JK, et al. tert-Butoxide-Assisted Amidation of Esters under Green Conditions. *Synthesis*. 2012;44(01):42-50.
20. Chung S, Uccello DP, Choi H, Montgomery JI, Chen J. Trimethylaluminium-Facilitated Direct Amidation of Carboxylic Acids. *Synlett*. 2011;22(14):2072-4.
21. ห้องปฏิบัติการนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. หลักการของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี [Online]. 2016 [cited 2018 February 20]; Available from:
URL:<http://www.science.buu.ac.th/part/nmr/index.php/home/principles.html>
22. ห้องปฏิบัติการนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. องค์ประกอบและการทำงานของเครื่อง NMR [Online]. 2016 [cited 2018 February 20]; Available from:
URL:<http://science.buu.ac.th/part/nmr/index.php/home/components-and-applications.html>
23. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยรังสิต. Gas Chromatography-mass spectrometry [Online]. 2015 [cited 2018 February 20]; Available from:
URL: <https://www.rsu.ac.th/strec/analysis2.php?id=27>