โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของอนุพันธ์กรดซาลิไซลิก

Synthesis and antimicrobial activity evaluation of salicylic acid derivative

โดย

นสภ. เจิมพล	ตาบทิพย์วัฒนา	รหัส 58210024
นสภ. รัฐธรรมนูญ	ชนะสงคราม	รหัส 58210139
นสภ. กันตวัฒน์	ฤทธิ์เต็ม	รหัส 58210149

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2562

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของอนุพันธ์กรดซาลิไซลิก

Synthesis and antimicrobial activity evaluation of salicylic acid derivative

โดย

นสภ. เจิมพล	ตาบทิพย์วัฒนา	รหัส 58210024
นสภ. รัฐธรรมนูญ	ชนะสงคราม	รหัส 58210139
นสภ. กันตวัฒน์	ฤทธิ์เต็ม	รหัส 58210149

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2562
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

โครงงานวิจัยเล่มนี้เป็น การวิจัยทางเภสัชศาสตร์ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาและประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารที่มีโครงสร้างอนุพันธ์ของกรดซาลิไซลิก ซึ่งใช้ระบบคอมพิวเตอร์เพื่อช่วยในการออกแบบ จากนั้นทำการสังเคราะห์โครงสร้างของสารที่ได้ออกแบบไว้และนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งผลชองงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยขน์ต่อการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนายาต้านเชื้อจุลชีพต่อไปในอนาคต

คณะผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยเล่มนี้จะมีประโยชน์และมีส่วนในการส่งเสริมการวิจัยด้านการพัฒนายาต้านเชื้อจุลชีพในอนาคตต่อไป

คณะผู้วิจัย

25 พฤศจิกายน 2562

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2561

เรื่อง การสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของอนุพันธ์กรดซาลิไซลิก

ผู้จัดทำโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ. เจิมพล ตาบทิพย์วัฒนา รหัส 58210024
2. นสภ. รัฐธรรมนูญ ชนะสงคราม รหัส 58210139
3. นสภ. กันตวัฒน์ ฤทธิ์เต็ม รหัส 58210149

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภญ. อ. ดร.อนงค์ ตีระวนิชพงศ์
2. ผศ. ดร.อนุเทพ ภาสุระ, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันเกิดสถานการณ์เชื้อดื้อยาเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก ส่งผลให้ยาต้านเชื้อจุลชีพที่ใช้ในปัจจุบันมีประสิทธิภาพลดลง เนื่องจากเชื้อจุลชีพได้เกิดการวิวัฒนาการจนสามารถทนต่อยาต้านเชื้อจุลชีพในความเข้มข้นที่สูงขึ้นได้ และอัตราการตายจากการติดเชื้อที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ทำให้การพัฒนายาต้านเชื้อจุลชีพสำหรับการป้องกันและรักษามีความสำคัญเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงต้องการพัฒนายาต้านเชื้อจุลชีพชนิดใหม่ โดยการออกแบบสารที่เป็นอนุพันธ์กรดซาลิไซลิกและทำการคัดเลือกโครงสร้างด้วยเทคนิค computer-aided drug design โดยพิจารณาพารามิเตอร์ที่สำคัญ คือ binding energy (BE) และ inhibition constant (IC_{50}) เพื่อให้ได้โครงสร้างที่มีประสิทธิภาพมากสุด เพื่อนำมาสังเคราะห์ แยกสารให้บริสุทธิ์ และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทาง spectroscopy ได้แก่ IR, NMR, และ mass spectrometry โดยโครงสร้างที่ได้ออกแบบไว้คือ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl) phenyl)carbamothioyl)benzamide จากนั้นจึงนำสารที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี disc diffusion รวมไปถึงการหาค่า MIC และ MBC ซึ่งสามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพในเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่เป็นเชื้อดื้อยาที่องค์การอนามัยโลกให้ความสำคัญในการพัฒนายาต้านเชื้อจุลชีพในระดับสูงได้ โดยมีค่า MIC ของ MRSA 2 สายพันธุ์ (สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43300 และสายพันธุ์ DMST 20646) เท่ากับ 0.5 และ 0.25 μg/mL ตามลำดับ และได้ค่า MBC เท่ากับ 4 และ 8 μg/mL ตามลำดับ

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ภญ.อ.ดร.อนงค์ ตีระวนิชพงศ์

Senior Project Academic Year 2019

: Synthesis and antimicrobial activity evaluation of salicylic acid derivatives

By

1. Mr. Jermphon Tabthipwattana ID 58210024
2. Mr. Rattathammanoon Chanasongkram ID 58210139
3. Mr. Kantawat Rittem ID 58210149

Advisor:

1. Dr. Anong Teeravanichpong
2. Assist. Prof. Dr. Anuthep Pasura, Faculty of Science, Burapha University

---

Abstract

Nowadays, antimicrobial drug resistance has raised dramatically and results in the decrease in the efficacy of antimicrobial drug treatments. Because of the evolution of microbials that resistance to antimicrobial drugs and the increase in mortal rate every year, lead to the necessary of development of new antimicrobial drugs. Therefore, this project is aimed to develop the new antimicrobial drug using salicylic acid as lead compound. Then, parameters from CADD techniques were considered in order to select the appropriate compound for synthesis. The structure of newly synthesized compound was identified by spectroscopy method such as IR, NMR and mass spectrometry and in agreement with the structure of design compound which is 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide. Antimicrobial activity evaluation was performed by disc diffusion method, broth dilution method and re-culturing broth dilution method. The compound showed activity against many microbials especially MRSA with zone inhibition of 23.78 mm and 25 mm in ATCC 43300 and DMST 20646, the MIC of the compound was 0.5 μg/mL and 0.25 μg/mL in ATCC 43300 and DMST 20646 and the MBC of the compound was 4 μg/mL and 8 μg/mL in ATCC 43300 and DMST 2064.

Major Advisor Anong Teeravanichpong, Ph.D.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยการสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของอนุพันธ์กรดซาลิไซลิก ครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วง และบรรลุตามเป้าวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ งานวิจัยครั้งนี้จะไม่มีทางสำเร็จหากไม่ได้รับความช่วยเหลือและความกรุณาจากหลายฝ่าย ฉะนั้นในโอกาสนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนและทุกความช่วยเหลือที่ขับเคลื่อนให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ภญ. อ. ดร.อนงค์ ตีระวนิชพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักโครงงานวิจัย และ ผศ. ดร. อนุเทพ ภาสุระ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในความกรุณา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการดำเนินการในการวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.สรายุทธ เวชสิทธิ์ นักวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี ผู้ให้คำแนะนำและปรึกษาในด้านการสังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสาร และคุณวรนาฏ จงโยธา นักวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีพวิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา ผู้ให้คำแนะนำและปรึกษาในการดำเนินงานในส่วนของการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

เจิมพล ตาบทิพย์วัฒนา
รัฐธรรมนูญ ชนะสงคราม
กันตวัฒน์ ฤทธิ์เต็ม
25 พฤศจิกายน 2562

สารบัญ

สารบัญ(ต่อ)

สารบัญรูปภาพ

สารบัญตาราง

บทที่ 1

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ยาต้านเชื้อจุลชีพ เป็นยาที่มีความสำคัญในทางการแพทย์มากกลุ่มหนึ่ง เนื่องจากเป็นยาที่ใช้ควบคุมโรคจากการติดเชื้อ ซึ่งที่ผ่านมายาต้านเชื้อจุลชีพได้ช่วยชีวิตหลายล้านชีวิต อย่างไรก็ตามแบคทีเรียได้มีวิวัฒนาการมาเรื่อย ๆ ทำให้สามารถทนต่อยาต้านเชื้อจุลชีพในความเข้มข้นที่สูงขึ้น[2] ส่งผลให้การรักษาโรคติดเชื้อจุลชีพไม่มีประสิทธิภาพ[3] นอกจากนี้การใช้ที่ผิดวิธีและใช้มากเกินความจำเป็น สามารถส่งผลให้กระบวนการนี้เกิดขึ้นและแพร่กระจาย อย่างรวดเร็วมากยิ่งขึ้น[4]

การดื้อยาต้านเชื้อจุลชีพเป็นหนึ่งในภัยคุกคามทางสุขภาพที่สำคัญมากในช่วงศตวรรษที่ 21[5,6] การประมาณการณ์คาดว่าปัจจุบันทั่วโลกมีคนเสียชีวิตจากเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพประมาณปีละ 700,000 คน และหากไม่มีการแก้ปัญหาอย่างจริงจัง คาดว่าใน ค.ศ. 2050 การเสียชีวิตจะสูงถึง 10 ล้านคน โดยทวีปเอเชียและแอฟริกาจะเสียชีวิตมากที่สุด คือ 4.7 และ 4.2 ล้านคน ตามลำดับ[7] แนวโน้มที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องของชนิดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาหลายชนิดส่งผลให้โลกหลังยุคยาปฏิชีวนะ(Post-antibiotic era) ที่การติดเชื้อแบคทีเรียเพียงเล็กน้อยอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้[8] และที่สำคัญคืออาจทำให้การรักษาทางการแพทย์แผนปัจจุบันล้มเหลว (Collapse of modern medicine) เนื่องจากไม่สามารถทำหัตถการทางการแพทย์ เช่น การผ่าตัดทั่วไป การผ่าตัดเพื่อเปลี่ยนหรือเพื่อปลูกถ่ายอวัยวะ รวมทั้งการรักษามะเร็งด้วยเคมีบำบัด เพราะการรักษาทางการแพทย์เหล่านี้ ต้องพึ่งประสิทธิภาพของยาต้านเชื้อจุลชีพในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อ[9]

องค์การอนามัยโลก (World Health Organization) ได้จัดทำแผนปฏิบัติการโลกในการจัดการกับเชื้อดื้อยา โดยองค์การอนามัยโลกได้จัดลำดับความสำคัญของเชื้อดื้อยาเพื่อเป็นแนวทางในการวิจัย และพัฒนายาต้านเชื้อจุลชีพตัวใหม่ โดยแบ่งเป็น 3 ระดับ[10] ดังนี้

1. ความสำคัญระดับวิกฤติ ได้แก่
    1.1. *Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems
    1.2. *Pseudomonas aeruginosa* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems
    1.3. Enterobacteriaceae ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem และ 3rd generation cephalosporins

2. ความสำคัญระดับสูง ได้แก่
   2.1. *Enterococcus faecium* ที่ดื้อต่อยา vancomycin
   2.2. *Helicobacter pylori* ที่ดื้อต่อยา clarithromycin
   2.3. *Salmonella species* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม fluoroquinolones
   2.4. *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา vancomycin และ methicillin
   2.5. *Campylobacter species* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม fluoroquinolones
   2.6. *Neisseria gonorrhoeae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม 3rd generation cephalosporin และ fluoroquinolones
3. ความสำคัญระดับปานกลาง ได้แก่
   3.1. *Streptococcus pneumoniae* ที่เริ่มไม่ตอบสนองต่อ penicillin
   3.2. *Haemophilus influenzae* ที่ดื้อต่อยา ampicillin
   3.3. *Shigella* species ที่ดื้อต่อยากลุ่ม fluoroquinolones

จากอัตราการติดเชื้อที่มีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปีส่งผลกระทบต่อค่าใช้จ่ายในการรักษาที่เพิ่มขึ้นของระบบประกันสุขภาพ ด้วยเหตุนี้ความต้องการในการพัฒนายาต้านเชื้อจุลชีพ สำหรับป้องกันและรักษาเชื้อจึงมีความสำคัญเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก[10]

ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงต้องการพัฒนายาต้านเชื้อจุลชีพตัวใหม่โดยหวังว่าข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนายาต้านเชื้อจุลชีพที่มีประสิทธิภาพต่อเชื้อดื้อยาในอนาคต

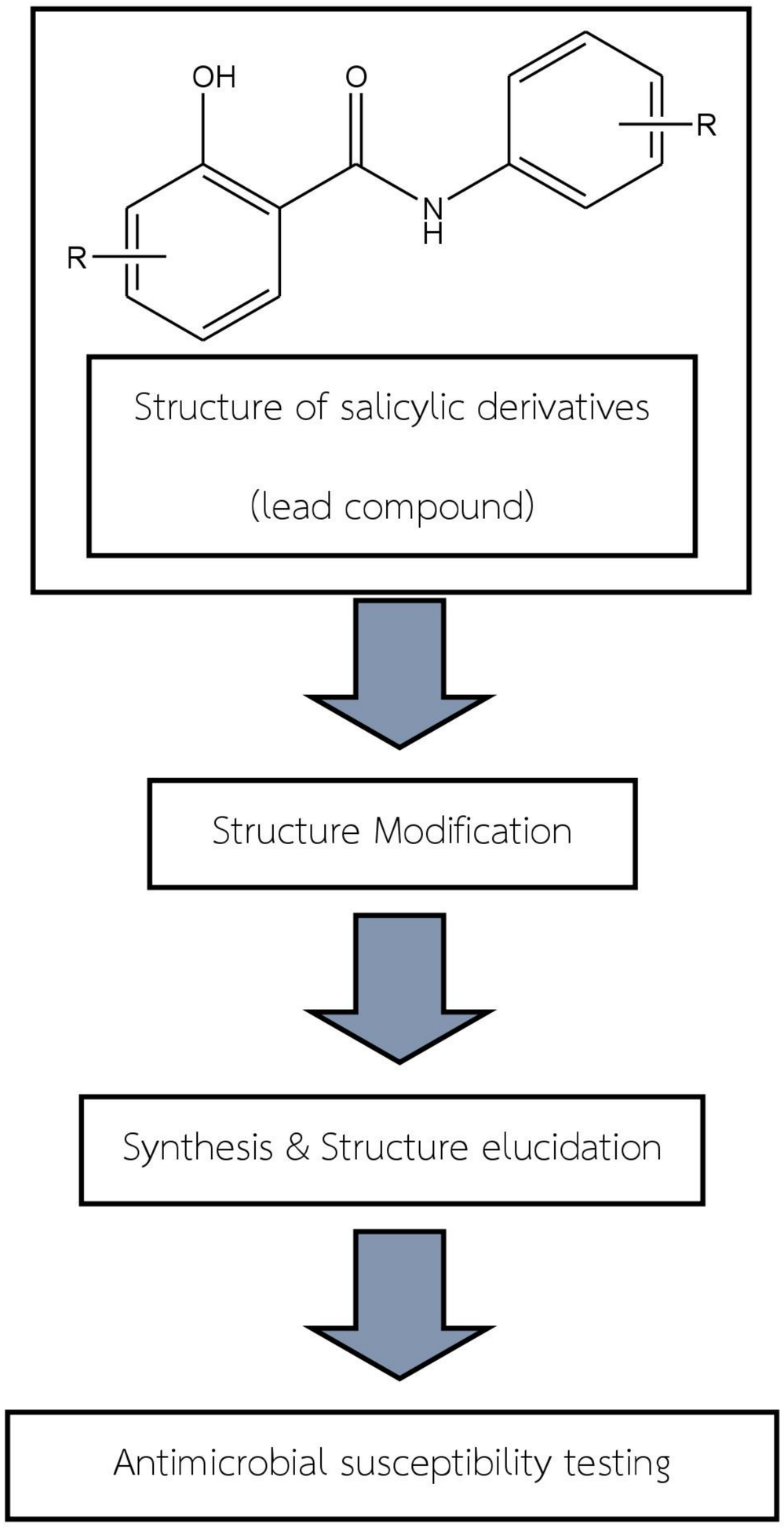
2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของอนุพันธ์กรดซาลิไซลิก

3. สมมติฐาน

สารที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

4. กรอบแนวคิด



ใช้โครงสร้างของอนุพันธ์กรดซาลิไซลิกมาเป็นสารต้นแบบในการออกแบบและพัฒนาสารใหม่ให้มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพที่ดีขึ้น

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้รับความรู้เกี่ยวกับกระบวนการทำงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์
2) ได้รับความรู้เกี่ยวกับวิธีการออกแบบ และสังเคราะห์ยาใหม่
3) ได้รับความรู้ในการพิสูจน์โครงสร้างของสารเคมี (structure elucidation)
4) ได้รับความรู้เกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ของกรดซาลิไซลิก

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

1. ยาต้านเชื้อจุลชีพ

ในช่วงศตวรรษที่ 20 มีการพัฒนายาต้านเชื้อจุลชีพใหม่ ๆ มากมาย ซึ่งนับเป็นความสำเร็จที่สำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากยาต้านเชื้อจุลชีพที่พัฒนาใหม่เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการรักษาสูง ทำให้อัตราการตายของผู้ป่วยลดลง แต่อย่างไรก็ตามยังมีเชื้อจุลชีพหลายชนิดที่ทนทานต่อยาต้านเชื้อจุลชีพและพัฒนาเป็นเชื้อดื้อยาซึ่งทวีความรุนแรงของการดื้อยาและจำนวนเชื้อที่ดื้อต่อยาเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งเกิดขึ้นกับหลายประเทศ จนองค์การอนามัยโลกได้จัดลำดับความสำคัญของเชื้อที่ดื้อต่อยาเป็น 3 ระดับตามความเร่งด่วนของการพัฒนายาใหม่ [11]

องค์การอนามัยโลกได้เสนอแนะถึงคุณสมบัติของยาต้านเชื้อจุลชีพรุ่นใหม่ที่สามารถใช้กับเชื้อที่ดื้อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพหลัก ๆ ดังนี้

1) ไม่มีการแพ้ยาข้ามกลุ่มกับยาที่มีในปัจจุบัน
2) เป็นกลุ่มสารเคมีใหม่
3) ยามีเป้าหมายในการจับใหม่
4) ยามีกลไกใหม่ในการออกฤทธิ์

จึงต้องมีการพัฒนายาต้านเชื้อจุลชีพตามคุณสมบัติดังกล่าว ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างจากกลุ่มยาต้านเชื้อจุลชีพที่ใช้ในปัจจุบัน โดยกลุ่มยาต้านเชื้อจุลชีพที่ใช้ในปัจจุบันมีดังนี้

1.1 กลุ่มยาที่ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Inhibitors of bacterial cell wall synthesis) [1,12-15]

1.1.1 β-lactam antibiotics

1) Penicillins

ยาในกลุ่ม penicillins จะออกฤทธิ์โดยการยับยั้งขั้นตอนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียในขั้นตอนสุดท้าย หรือ cross-linking ระหว่างสาย peptidoglycan ที่เป็นหน่วยย่อยของผนังเซลล์แบคทีเรีย [12,15] ซึ่งจะประกอบไปด้วยกลไก ดังนี้

(1) ยาจะไปจับกับ penicillin-binding proteins (PBP) ที่อยู่บน cytoplasmic membrane แล้วทำการยับยั้งเอนไซม์ transpeptidase ที่เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม penicillin-binding proteins (PBPs) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเกิด cross-linking ระหว่างสาย peptidoglycan ได้ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ [1,13-14]

(2) ยาจะไปกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ autolysin ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดการย่อยสลายของเซลล์แบคทีเรียมากขึ้น[1]

โดยยาในกลุ่ม penicillins จะแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม [12] ได้แก่

(1) Natural penicillins ที่เป็นยา penicillins ที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อรา *Penicillium chrysogenum* [11] ได้แก่ penicillin G และ penicillin V [12]

(2) Antistaphylococcal penicillins ที่เป็นยาที่ทนต่อการเกิด hydrolysis จากเอนไซม์ penicillinase หรือ β-lactamase ได้ เช่น dicloxacillin [12]

(3) Extended-spectrum penicillins เป็นยาที่ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น ซึ่งเพิ่มความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมากขึ้น แต่ไม่ทนต่อ hydrolysis จากเอนไซม์ β-lactamase เช่น ampicillin, amoxicillin [14]

(4) Anti-pseudomonal penicillins ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *P. aeruginosa* เช่น piperacillin, ticarcillin [12]

2) Cephalosporins

ยาในกลุ่มนี้จะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่เหมือนกับ penicillins คือ จับกับ PBP แล้วยับยั้งเอนไซม์ transpeptidase ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ autolysin ทำให้แบคทีเรียเกิดการย่อยสลายตัวเองมากขึ้น ซึ่ง ณ ปัจจุบันมีทั้งสิ้น 5 generations[12] ได้แก่

(1) First generation ยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมได้ดี (เช่น streptococci และ staphylococci) [14] และยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Proteus mirabilis*, *E. coli* และ *K. pneumoniae* ได้ นอกจากนี้ยาในกลุ่มนี้สามารถต่อต้านเอนไซม์ penicillinase จากเชื้อกลุ่ม staphylococci ได้ ทำให้สามารถครอบคลุมเชื้อ methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) ได้ [12] ยาในกลุ่มนี้เช่น cefazolin และ cephalexin [14]

(2) Second generation ยาในกลุ่มนี้จะมีฤทธิ์ครอบคุลมเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มากขึ้น [14] แต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกลดลง [12] เช่น cefuroxime และ cefoxitin [1,12-15]

(3) Third generation ยาในกลุ่มนี้ครอบคลุมทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ [13] เช่น ceftriaxone และ ceftazidime [1,12-15]

(4) Fourth generation ยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งรวมไปถึง *P. aeruginosa* เช่น cefepime [12]

(5) Advanced generation ยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ครอบคลุมได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบเพิ่มขึ้น รวมไปถึงครอบคลุมเชื้อ *P. aeruginosa* และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ได้ เช่น ceftaroline [12]

3) Carbapenems

ยาในกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกับ penicillins และครอบคลุมเชื้อได้ค่อนข้างกว้าง โดยสามารถต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ[13] ซึ่งยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal)[1] ยาในกลุ่มนี้ เช่น imipenem และ meropenem

4) Monobactams

ยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก[12] เนื่องจากยาในกลุ่มนี้ไม่จับกับ PBP ของแบคทีเรียแกรมบวก [1] ซึ่งยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal) และทนต่อเอนไซม์ β-lactamase [1,12] โดยยาในกลุ่มนี้ เช่น aztreonam

1.1.2 Glycoproteins

ยาในกลุ่ม glycopeptides มีกลไกการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจับที่ปลาย D-alanyl-D-alanine ของสาย peptidoglycan [1,14] ซึ่งเป็นการยับยั้งปฏิกิริยา transglycosylase ทำให้ยับยั้งการต่อสายและ cross-linking ของสาย peptidoglycan ส่งผลให้สาย peptidoglycan อ่อนแอลง [14] ทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิด lysis ได้ง่ายขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ยามีขนาดโมเลกุลใหญ่ ทำให้ไม่สามารถผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้[13] ยาในกลุ่มนี้ เช่น vancomycin

1.1.3 Bacitracin [13]

ยานี้มีโครงสร้างเป็น polypeptide ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั้งรูปร่างกลม (cocci) และแท่ง (bacilli)[13]

1.2 กลุ่มยาที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในแบคทีเรีย (Inhibitors of bacterial protein synthesis)

1.2.1 Aminoglycosides

ยาในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์จับ 30s ribosomal subunit ของแบคทีเรียส่งผลให้เกิดการหยุดชะงักในขั้นตอน translation ส่งผลให้เกิดรหัสพันธุกรรมที่ไม่ถูกต้อง ไม่สมประกอบ ซึ่งใช้การไม่ได้ สะสมอยู่ในแบคทีเรีย นอกจากนี้ aminoglycoside ยังสามารถเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัว outer membrane ในแบคทีเรียแกรมลบเกิดเป็นช่องโหว่ขึ้นที่ผนังเซลล์ส่งผลให้ระบบเลือกผ่านมีปัญหา ยาในกลุ่มนี้ เช่น gentamicin[16]

1.2.2 Tetracyclines

ยาในกลุ่มนี้จะจับกับ 30s ribosomal subunit ใน messenger RNA (mRNA) ส่งผลให้การ translation และ translocation ของ RNA เสียไป ทำให้มีการสร้างโปรตีนลดลงและสร้างโปรตีนที่ผิดปกติ คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เสียไปทำให้เกิดการรั่วไหลของสารที่มีประจุออกนอกเซลล์และยับยั้งการแบ่งตัวของ DNA[17]

1.2.3 Macrolides & Lincosamides

ยากลุ่มทั้ง 2 กลุ่มนี้มีกลไกการทำงานเดียวกัน [18] นั้น คือ การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียโดยการจับที่ 50s ribosomal subunit ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ peptidyl-tRNA ออกจากสาย peptide ซึ่งส่งผลให้การ elongation หยุดลงทันที ยาในกลุ่มนี้ เช่น azithromycin (macrolides) & clindamycin (lincosamides) [19]

1.2.4 Chloramphenicol

ยากลุ่มนี้ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียโดยการจับที่ 50s ribosomal subunit (major) และ 30s ribosomal subunit (minor) ของเชื้อแบคทีเรีย ส่งผลให้ยามีฤทธิ์ bacteriostati

1.2.5 Oxazolidinones [13]

ยากลุ่มนี้จับที่ P site ของ 50s ribosomal subunit หยุดการ form ของ ribosomal-fMet-tRNA complex ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์โปรตีน ยาในกลุ่มนี้ เช่น linezolid

1.3 กลุ่มยาที่ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (Inhibitors of nucleic acid synthesis)[14]

1.3.1 Quinolones [13]

ยากลุ่มนี้จับเอนไซม์ 2 ชนิด คือ DNA gyrase (topoisomerase II) ในแบคทีเรียแกรมลบ และ topoisomerase IV ในแบคทีเรียแกรมบวก ส่งผลให้ไม่สามารถคลายเกลียวของสาย DNA ที่พันกันแน่น ทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเกิด DNA replication และ transcription ยาในกลุ่มนี้ เช่น norfloxacin, ciprofloxacin และ levofloxacin

1.3.2 Folate antagonists [12]

1) Sulfonamides [13]

ยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (bacteriostatic) ที่มีโครงสร้างเป็น analogs ของ *para*-aminobenzoic acid (PABA) โดยยาจะเข้าไปแย่งจับ dihydropteroate synthase ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์ folic acid ได้ ทำให้มีผลไปหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ยาในกลุ่มนี้ เช่น sulfamethoxazole และ sulfisoxazole

2) Trimethoprim

ยานี้จะทำการเข้าไปยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolate reductase ส่งผลให้ dihydrofolic acid ไม่ถูกเปลี่ยนเป็น tetrahydrofolic acid [13] และไม่สามารถสังเคราะห์ purine รวมไปถึง DNA ได้ [22] ซึ่งยานี้ส่วนในมักนำไปใช้ร่วมกับยา sulfamethoxazole ในชื่อ co-trimoxazole เพื่อให้เกิด synergistic effect ทำให้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้มากยิ่งขึ้น [13]

1.4 กลุ่มยาต้านแบคทีเรียอื่น ๆ (Miscellaneous antibacterial drugs)

1.4.1 Polymyxins [13]

ยากลุ่มนี้มีประสิทธิภาพต่อเชื้อแกรมลบรวมไปถึงเชื้อ Enterobacter spp., E. coli และ Klebsiella โดยตัวยาจะทำปฏิกิริยากับ phospholipids ทำลายโครงสร้างผนังเซลล์และเปลี่ยนแปลง permeability ของโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อแบคทีเรีย ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ polymyxin B และ colistin (polymyxin E)

1.4.2 Lipopeptides [13]

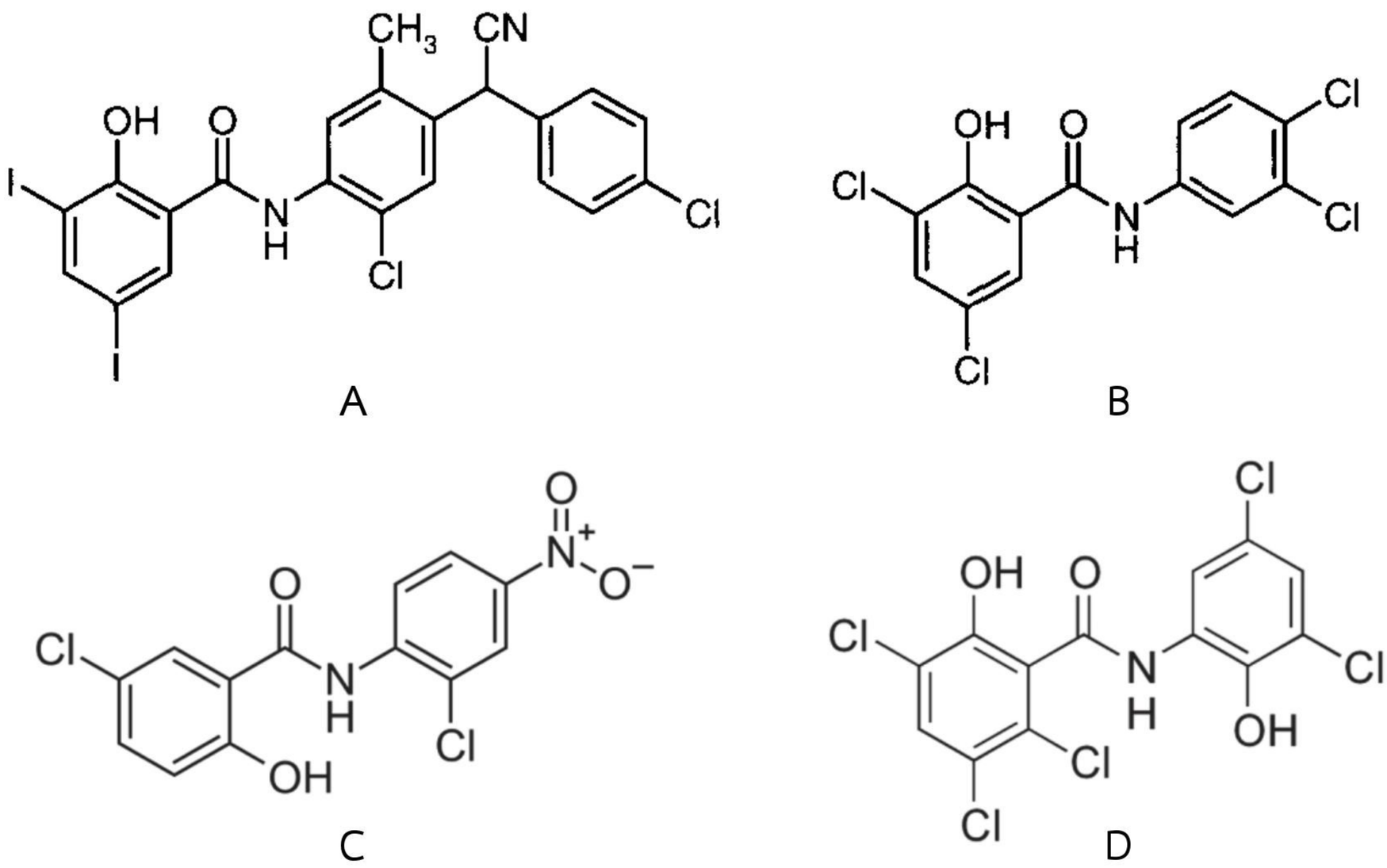
ยากลุ่มนี้เกาะจับที่ membrane เซลล์แบคทีเรียส่งผลให้เกิด depolarization เป็นเหตุให้เกิดการสูญเสียความต่างศักย์เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane potential) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถส่งสัญญาณได้และตายในที่สุด ยากลุ่มนี้ เช่น daptomycin

2. อนุพันธ์กรดซาลิไซลิก (salicylic acid derivatives)

ได้มีการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอนุพันธ์กรดซาลิไซลิก (salicylic acid derivatives) ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ซึ่งการพัฒนาอนุพันธ์กรดซาลิไซลิกให้เป็นยาต้านเชื้อจุลชีพสามารถจัดเป็นสารเคมีกลุ่มใหม่นอกเหนือจากที่รู้จักกันทั่วไป

อนุพันธ์กรดซาลิไซลิก (salicylic acid derivatives) มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น salicylanilides ที่เป็น aromatic rings 2 วง เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ amide ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ salicyloyl ring และ anilide moiety[29] โดยโครงสร้างดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ (antimicrobial activity) ซึ่งจากการทบทวนงานวิจัยได้พบทั้งหมด 4 โครงสร้าง ได้แก่ closantel(A), tetrachlorosalicylanilide(B), niclosamide(C) และ oxyclozanide(D)[21-22] (ภาพที่ 1) แต่ทั้ง 4 โครงสร้างนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ค่อนข้างแตกต่างกัน โดย closantel และ tetrachlorosalicylanilide มีกลไกในการยับยั้ง two-component system (TCS) ในแบคทีเรีย ทำให้เกิดการยับยั้ง signaling pathway ที่สำคัญในแบคทีเรีย จนทำให้เซลล์แบคทีเรียตายลงได้[22] ส่วน oxyclozanide มีกลไกในการสลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยไม่ได้ทำให้

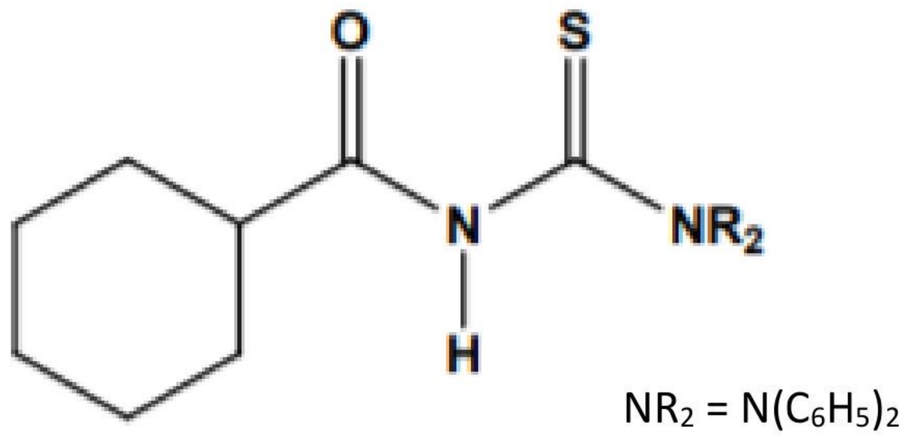
เซลล์แตก (lysis) แต่ niclosamide ยังมีกลไกต้านเชื้อจุลชีพที่ไม่แน่ชัด[22] ซึ่งทั้ง 4 โครงสร้างสามารถต้านเชื้อแบคเรียแกรมบวกได้ เช่น *S. aureus* และ *E. faecium* [29-30] แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ [21-22]



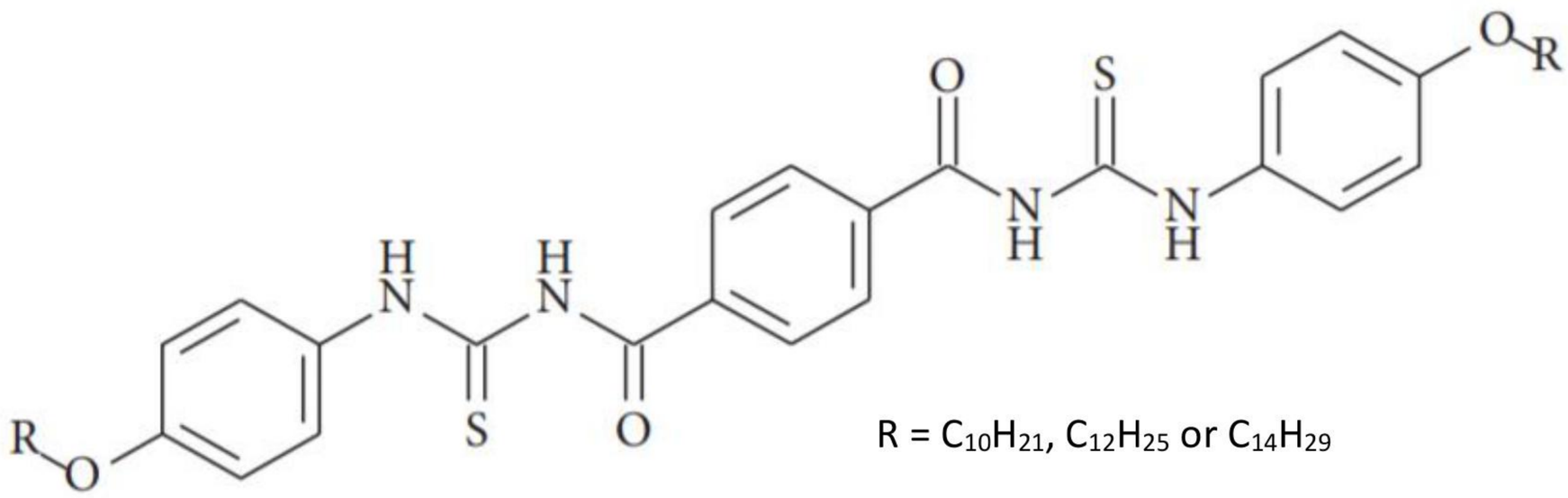
ภาพที่ 1 โครงสร้างของ closantel(A), tetrachlorosalicylanilide(B), niclosamide(C) และ oxyclozanide(D) [21-22]

นอกจากนี้ยังพบว่ามีโครงสร้างของอนุพันธ์ของ thiourea มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพเช่นกัน ซึ่งในอนุพันธ์ดังกล่าวมีสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับอนุพันธ์กรดซาลิไซลิกอยู่ ซึ่งจากการทบทวนงานวิจัยได้พบโครงสร้างของ thiourea ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับอนุพันธ์กรดซาลิไซลิกทั้งหมด 2 โครงสร้าง ได้แก่ *N*-(diphenyl carbamothioyl)cyclohexanecarboxamide [23] และสารกลุ่ม bis(thiourea) derivatives [24] (ภาพที่ 2 และ 3) ซึ่ง N-(diphenyl carbamothioyl)cyclohexanecarboxamide สามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก (ได้แก่ *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecium*, *S. pyogenes* และ *B. cereus*) และแกรมลบ (ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *P. vulgaris*, *E. aerogenes*) ส่วนสารกลุ่ม bis(thiourea) derivatives นั้นสามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* ได้

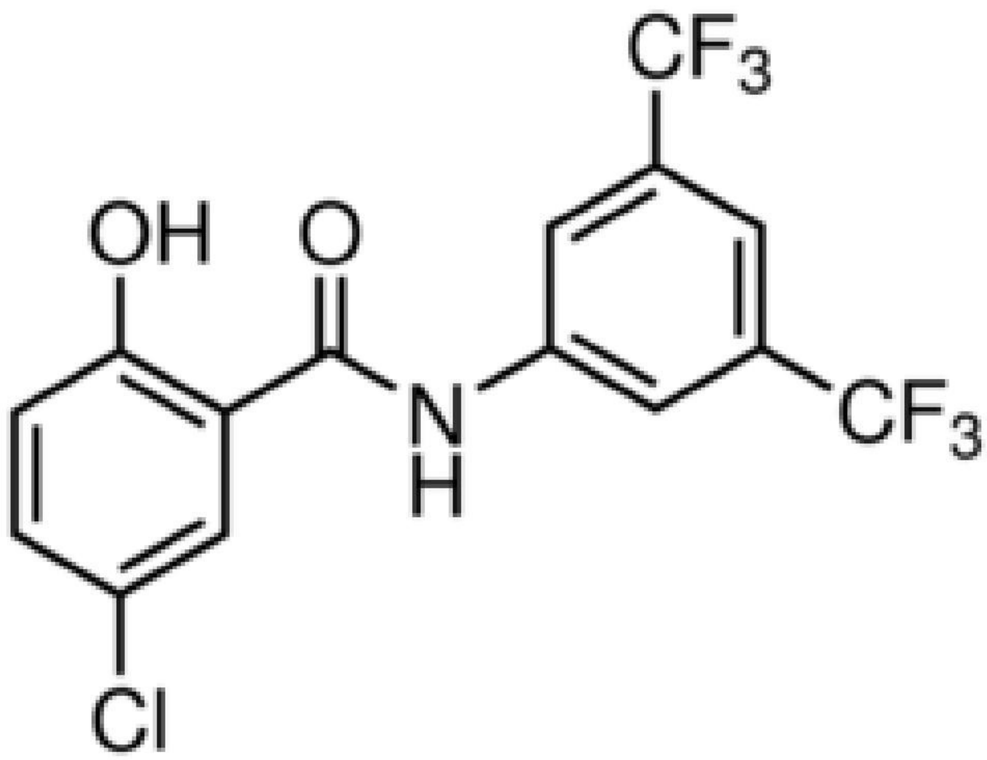
และจากการทบทวนงานวิจัยเกี่ยวกับอนุพันธ์กรดซาลิไซลิกเพิ่มเติม พบว่าโครงสร้างของ IMD-0354 (ภาพที่ 4) มีส่วนช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการต้านเชื้อจุลชีพของยา [25] ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำโครงสร้างของ IMD-0354 มาปรับใช้ร่วมกับโครงสร้างของ thiourea derivatives ในการออกแบบตัวยาที่เป็นอนุพันธ์กรดซาลิไซลิก โดยหวังว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลชีพได้



ภาพที่ 2 โครงสร้างของ *N*-(diphenyl carbamothioyl)cyclohexanecarboxamide [23]



ภาพที่ 3 โครงสร้างของ bis(thiourea) derivatives [24]



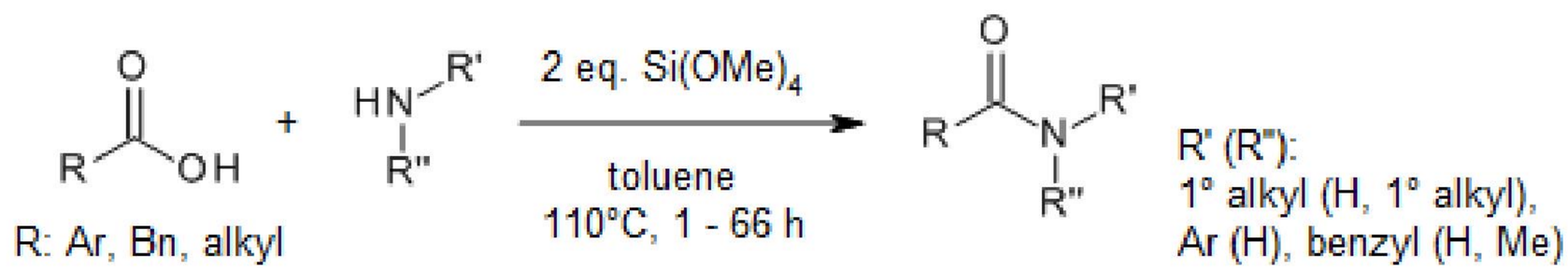
ภาพที่ 4 โครงสร้างของ IMD-0354

ที่มา: https://www.sigmaaldrich.com

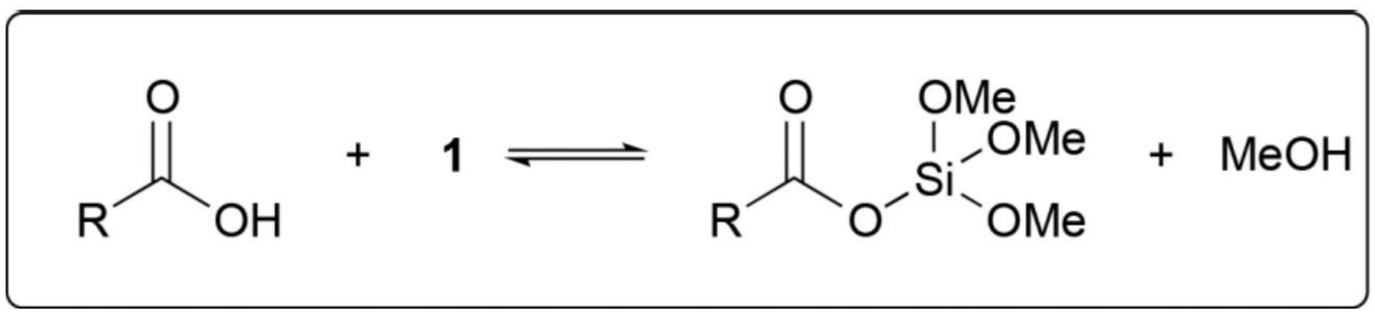
3. กระบวนการสังเคราะห์เอไมด์ (Amidation)

ในกระบวนการสังเคราะห์เอไมด์ จะใช้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอไมด์ได้ ที่สามารถสังเคราะห์ได้หลายวิธี ดังนี้

3.1

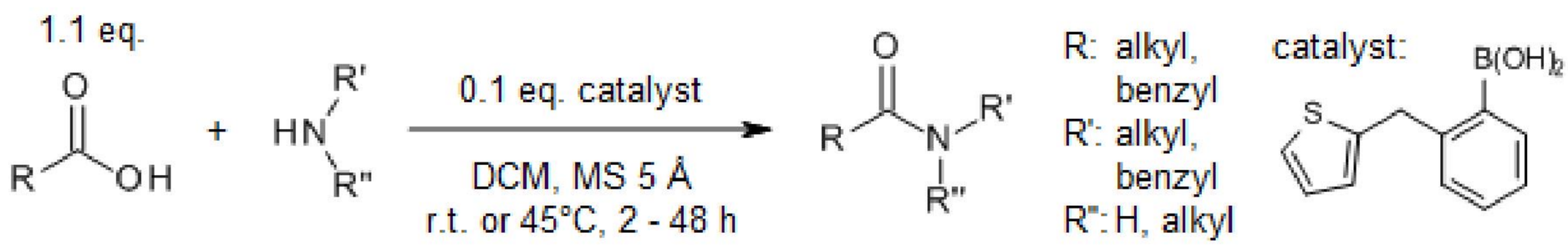


จากปฏิกิริยาใช้ tetramethyl orthosilicate (TMOS) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาโดยตรงกับ carboxylic acids ทั้งแบบ aliphatic และ aromatic กับ primary amines, cyclic amines, acyclic amines และ anilines โดยจะเกิดผ่าน intermediate คือ silyl ester ดังภาพที่ 2 นอกจากนี้ TMOS เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่หาได้ง่าย และมีราคาไม่แพง รวมถึงให้ผลิตภัณฑ์เอไมด์ที่บริสุทธิ์และมีค่า yield ที่สูง[26]



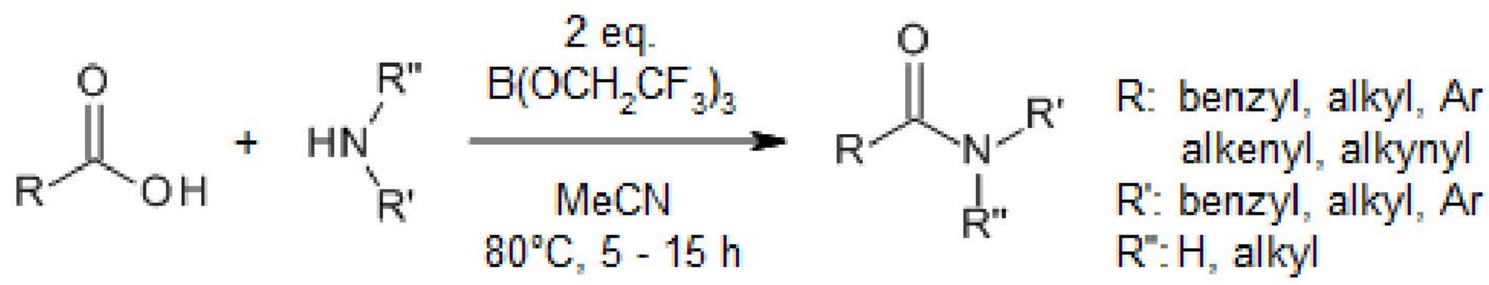
ภาพที่ 5 แสดงปฏิกิริยาการเกิด silyl ester intermediate (1 = TMOS) [23]

3.2



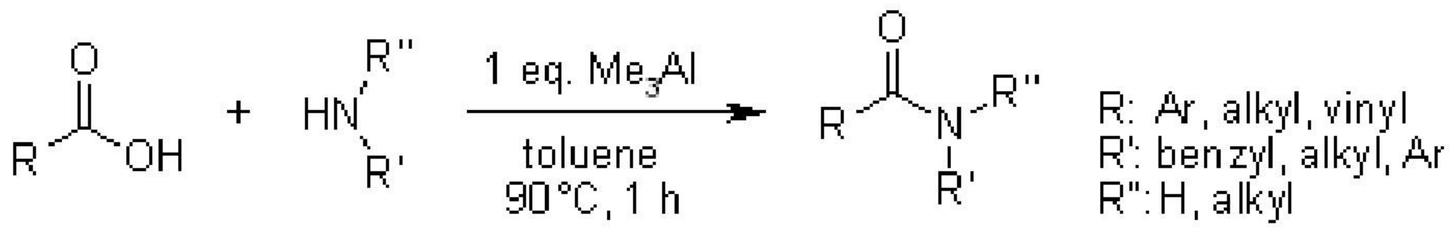
จากปฏิกิริยาใช้ (2-(Thiophen-2-ylmethyl)phenyl)boronic acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาสูง โดยสามาถเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอไมด์โดยตรงกับ carboxylic acids และ amines ได้ที่อุณหภูมิห้องซึ่งจะใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมและให้ yield ในปริมาณสูง[27]

3.3



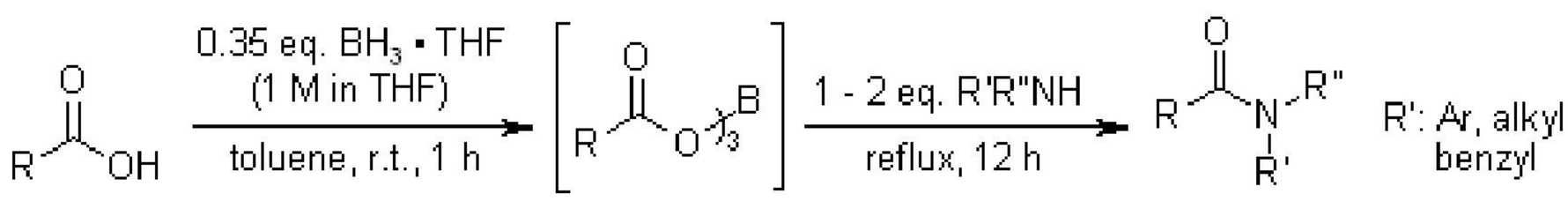
จากปฏิกิริยาใช้ Tris-(2,2,2-trifluoroethyl) borate ($B(OCH_2CF_3)_3$) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่สามารถเตรียมได้จาก B_2O_3 และ 2,2,2-trifluoroethanol ที่หาได้ง่าย ซึ่งจะทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอไมด์โดยตรงกับ carboxylic acids และ amines ได้หลายประเภท[28]

3.4



จากปฏิกิริยาใช้ trimethylaluminium เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง carboxylic acids และ amines ในสารละลาย toluene ที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง[29]

3.5

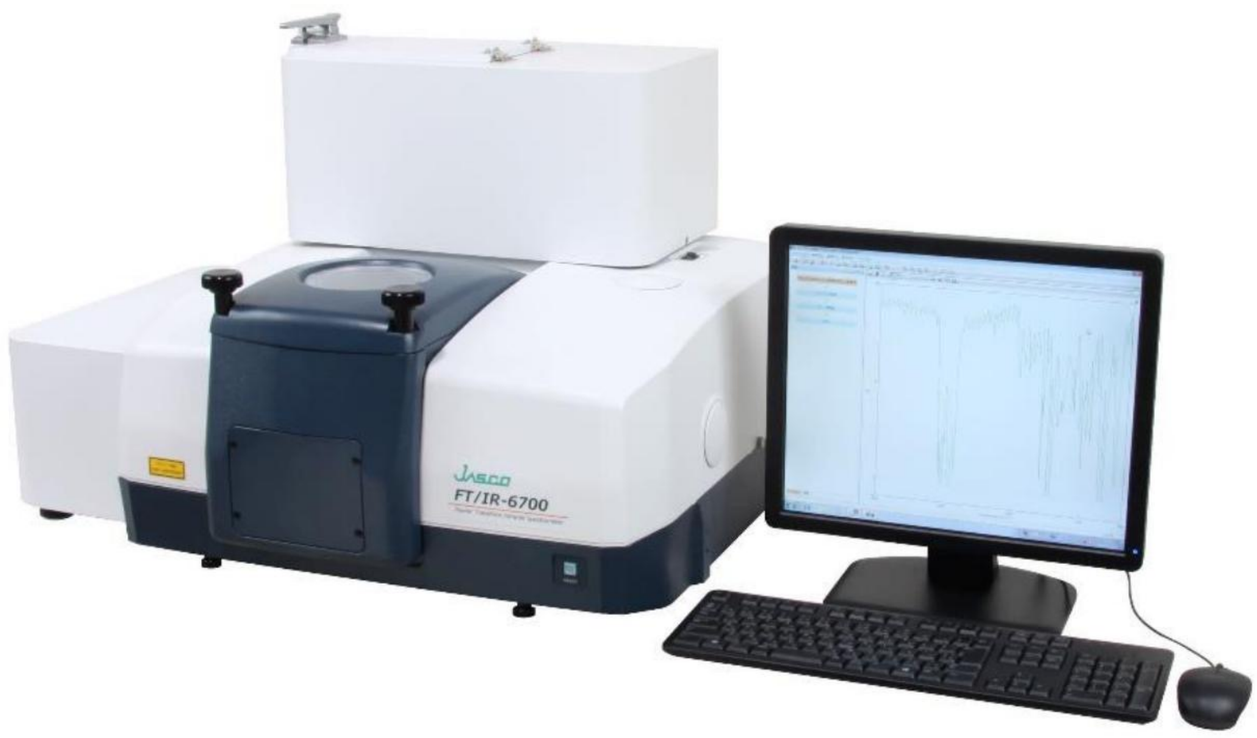


จากปฏิกิริยาใช้ Borane-tetrahydrofuran complex หรือ borane-methyl sulfide complex เกิดปฏิกิริยากับ carboxylic acids เกิดเป็น triacyloxyboranes ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกับ nucleophiles เช่น alkylamines, arylamines, hydrazides, alcohols และ phenols ผ่านการ reflux ในสารละลาย toluene ได้เป็น amides ที่มี yield ในปริมาณสูง[30]

4. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

4.1 Fourier Transform Infrared Spectrometer

Fourier Transform Infrared Spectrometer หรือ FT-IR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกประเภทของสารต่าง ๆ รวมไปถึงพันธะเคมี โดยใช้หลักการตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของสารตัวอย่างที่ความถี่ต่าง ๆ โดยฉายรังสีจากแหล่งกำเนิดไปยังสารที่ต้องการตรวจสอบ สารตัวอย่างจะดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นที่ต่างกัน จากนั้นแสงที่ผ่านตัวอย่างจะหักเหผ่าน Michelson interferometer เข้าสู่ detector เพื่อทำการวิเคราะห์สัญญาณและแสดงออกมาเป็น interferogram จากนั้นใช้ Fast Fourier Transform แปลงข้อมูลให้เป็น spectrum [31-33]



ภาพที่ 6 เครื่อง Fourier Transform Infrared หรือ FT-IR

ที่มา : http://www.directindustry.com

4.2 Mass spectrometer

Mass spectrometer หรือ MS เป็นเทคนิควิเคราะห์หาเอกลักษณ์สารที่มีความแม่นยำสูง ซึ่งมีการใช้เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์สารอย่างแพร่หลายในวิทยาศาสตร์สาขาต่าง ๆ โดยอุปกรณ์จะประกอบไปด้วยส่วนหลัก 4 ส่วน ได้แก่ ion source เป็นที่บรรจุตัวอย่างที่ถูกทำให้กลายเป็นไอออนแล้วโดยวิธีการ Electron ionization ทำให้ตัวอย่างกลายเป็นไอ mass analyzer เป็นส่วนที่จะคัดแยกประจุของตัวอย่างตามอัตราส่วนมวลต่อประจุ detector เป็นส่วนที่ใช้วัดประจุที่แยกแล้วโดยเก็บข้อมูลเป็นสัญญาณไฟฟ้า และส่วนสุดท้าย recording device เป็นส่วนที่แปลงสัญญาณไฟฟ้าให้เป็นค่าที่เหมาะสมต่อการนำไปศึกษาต่อไป [34]

ภาพที่ 7 เครื่อง mass spectrometer หรือ MS spectrometer

ที่มา : https://www.cmu.edu

4.3 Nuclear Magnetic Resonance spectrometer

Nuclear Magnetic Resonance spectrometer หรือ NMR spectrometer เป็นเทคนิคที่ใช้หาข้อมูลในด้านโครงสร้างทางเคมีของสารและพลศาสตร์ของชีวโมเลกุลโดยจะทำการส่งคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าเพื่อทำให้นิวเคลียสของสารอยู่ในภาวะกระตุ้น (Excited state) จากนั้นสารจะกลับสู่สภาวะพื้น (Ground state) โดยการปล่อยพลังงานออกมาในรูปแบบของคลื่นแม่เหล็กและนำมาสร้างเป็นสัญญาณภาพและวิเคราะห์ออกมาในรูปแบบของกราฟ [35]

ภาพที่ 8 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance spectrometer หรือ NMR spectrometer

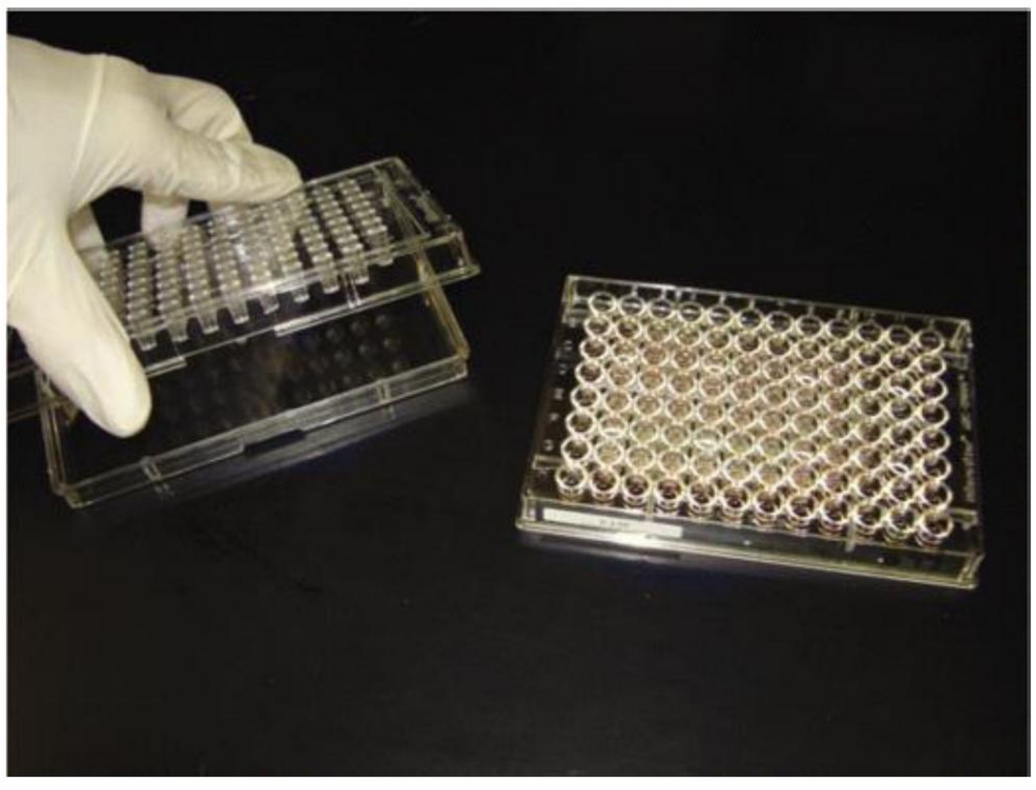
ที่มา : http://www.directindustry.it

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antimicrobial susceptibility testing)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย มีหลายวิธี ได้แก่

5.1 Broth dilution tests [36]

วิธีนี้จะเป็นวิธีที่ใช้ยาต้านเชื้อจุลชีพมาทำการเจือจางลงทีละ 2 เท่า (เช่น 1, 2, 4, 8, และ 16 μg/mL) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่อยู่ในหลอดทดลอง จากนั้นใส่เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานความเข้มข้น 1-5×10^5CFU/mL ลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C ข้ามคืน จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตด้วยตาเปล่า โดยพิจารณาจากความขุ่น (turbidity) ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านเชื้อจุลชีพที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโต จะรายงานออกมาเป็นค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ซึ่งสามารถนำสารที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ค่า MIC ขึ้นไปมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลชีพได้ (minimal bactericidal concentration; MBC) ได้[37] วิธีทดสอบนี้มีข้อดี คือ สามารถรายงานผลการวิเคราะห์ออกมาในเชิงปริมาณได้ (เช่น ค่า MIC) แต่มีข้อเสีย คือ ต้องเตรียมสารละลายยาต้านเชื้อจุลชีพเองทำให้มีโอกาสเกิดความคลาดเคลื่อนจากการเตรียมสารละลายได้ รวมถึงต้องใช้ปริมาณน้ำยาทดสอบและพื้นที่ในการทดสอบ



ภาพที่ 9 การทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี broth dilution tests [36]

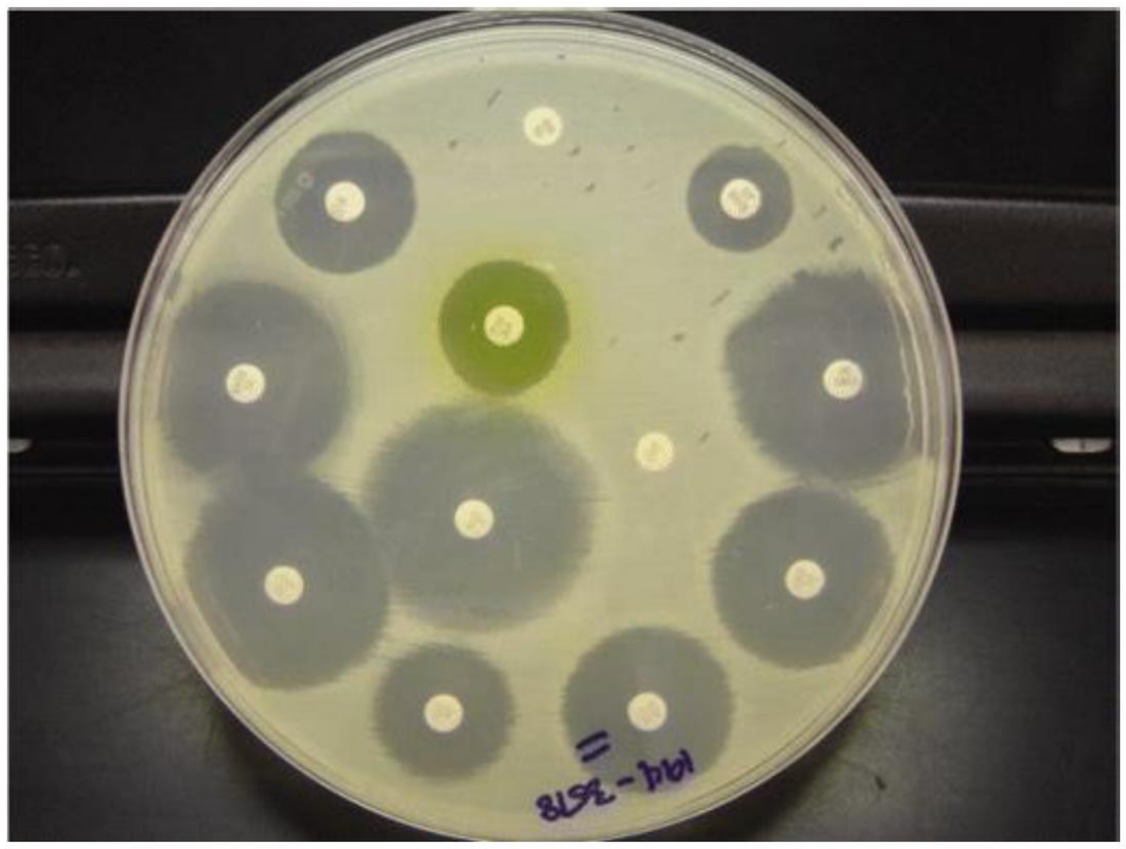
5.2 Antimicrobial gradient method [36]

วิธีนี้จะใช้แผ่นพลาสติกที่มียาต้านเชื้อจุลชีพในความเข้มข้นต่าง ๆ ตามสเกลของแผ่นจากต่ำไปสูง วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (agar) ที่ใส่เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานลงไป แล้วนำไปบ่มข้ามคืน จากนั้นทำการอ่านผล โดยดูจากพื้นที่ที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (zones of growth inhibition) ซึ่งสามารถหาค่า MIC ได้จากการอ่านค่าสเกลความเข้มข้นของยาต้านเชื้อจุลชีพในจุดที่เริ่มเกิดพื้นที่ที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียขึ้น วิธีการทดสอบนี้เหมาะสมที่สุดสำหรับการหาค่า MIC ของยา 1 หรือ 2 ชนิด และให้ผลที่สัมพันธ์กันกับวิธี Broth dilution tests

ภาพที่ 10 การทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี antimicrobial gradient method[36]

5.3 Disc diffusion test[36]

เป็นวิธีการทดสอบที่ง่ายและมีมาตรฐาน ทำโดยการใส่เชื้อแบคทีเรียประมาณ 1–2×10^8CFU/mL ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton จากนั้นวางแผ่นกระดาษที่มียาต้านเชื้อจุลชีพในความเข้มข้นที่ต้องการ (disk) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดขนาดของ zones of growth inhibition รอบ ๆ disk โดยวัดออกมาเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางเป็นมิลลิเมตร ซึ่งวิธีการทดสอบนี้เป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ โดยจะดูว่าเชื้อแบคทีเรียนั้นมีความไว (susceptible) ต่อยาต้านเชื้อจุลชีพหรือไม่ และวิธีทดสอบนี้มีข้อดีคือทำได้ง่ายและไม่ต้องใช้อุปกรณ์ยุ่งยาก



ภาพที่ 11 การทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี disk diffusion test[36]

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

1.1. คอมพิวเตอร์

1.1.1. Notebook PC ASUS GL552JX Intel(R) Core (TM) i7-4720HQ CPU @ 2.60GHz (8 CPUs) 2.59 GHz with 12.0 GB of RAM, Windows 10 Enterprise 64-bit

1.1.2. Notebook PC MSI GP73 Leopard 8RE Intel(R) Core (TM) i7-8750H CPU @ 2.20GHz (12 CPUs) 2.20 GHz with 16.0 GB of RAM, Windows 10 Home Single Language 64-bit

1.1.3. Notebook PC HP OMEN 15-ce0xx Intel(R) Core (TM) i7-8750H CPU @ 2.80GHz (8 CPUs) 2.81 GHz with 8.0 GB of RAM, Windows 10 Home Single Language 64-bit

1.2. โปรแกรม

1.2.1. AutoDock 4.2.6

1.2.2. ChemDraw 8.0

1.2.3. Chem 3D Ultra 8.0

1.2.4. Discovery Studio 2017R2

1.3. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.3.1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์กรดซาลิไซลิก

1) Two-neck round-bottom flask
2) Round-bottom flask
3) Analytical balance
4) Heating magnetic stirrer
5) Glass chromatography column 1.3.6 Rotary evaporator
6) TLC tank
7) TLC plates
8) UV lamp (254/365nm, Buchi Thailand Ltd.)
9) Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker Avance III HD 400 MHz.)

10) Infrared Spectrometer (Thermo Spectra-Tech, P/N 700-0085, Ver3.9 10/01, Shelton, USA and APW1200202, Becthai Thailand)

11) Gas Chromatograph-Mass Spectrometer/Mass Spectrometer (7890GC/ 7000C GCMS TripleQuad)

1.3.2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

1) ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ
2) ไมโครปิเปต (Rainin, USA)
3) Tips ปลอดเชื้อ
4) Disc ปลอดเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
5) จานเพาะเชื้อ (petri disc) ปลอดเชื้อ
6) Forceps
7) Biohazard cabinet class II (Nuaire, USA)
8) หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หรือ Vial 1 dram
9) 96 U-Well microtiter plate (Thermo Scientific Nunc)
10) Microplate reader (BMG Labtech Spectro StarNano, Germany)
11) DEN-1 Densitometer (suspension turbidity detector)
12) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Tomy^{R} SS-325, Japan)
13) ตู้บ่ม (Cool Incubator) (Binder KB240, Germany)

2. สารเคมี

2.1. สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์กรดซาลิไซลิก

2.1.1. 5-Chlorosalicylic acid (Sigma-Aldrich, USA)

2.1.2. [3-(Trifluoromethyl)phenyl]thiourea (Sigma-Aldrich, USA)

2.1.3. Dichloromethane (RCI Labscan, Thailand)

2.1.4. Dimethylformamide (RCI Labscan, Thailand)

2.1.5. Triethylamine (Carlo Erba, Italy)

2.1.6. Oxalyl chloride (Sigma-Aldrich, USA)

2.1.7. Methanol (RCI Labscan, Thailand)

2.1.8. Hexane (RCI Labscan, Thailand)

2.1.9. Nitrogen gas high priority 99.95%

2.1.10. Silica gel 1.07734.1000 (Merck, Germany)

2.2. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

2.2.1. Ethanol 95%

2.2.2. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (EMD, MilliporeR, German)

2.2.3. NaCl (UNIVAR, Australia)

2.2.4. McFarland Standard No. 0.5

2.2.5. Gentamicin 10 µg/disc

2.2.6. Ciprofloxacin 5 µg/disc

3. จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

3.1. แบคทีเรียแกรมบวก

3.1.1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.1.2.*Staphylococcus aureus* ATCC 25913

3.1.3. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

3.1.4. *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300

3.1.5. *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20646

3.1.6. *Bacillus cereus* TSTR 687

3.1.7. *Listeria monocytogenes* DMST 17303

3.2. แบคทีเรียแกรมลบ

3.2.1. *Vibrio parahaemolyticus* DMST 5665

3.2.2. *Escherichia coli* ATCC 25922

3.2.3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.2.4. *Salmonella thyphimurium* ATCC13311

3.2.5. *Enterococcus aerogenes* ATCC13048

3.2.6. *Salmonella enteritidis* DMST 15676

3.2.7. Klebsiella pneumoniae

3.2.8. Proteus mirabilis

3.2.9. Acenitobacter baumanii

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1. Trypticase Soy agar (TSA) (BD Difco^{TM}, USA)

4.2. Trypticase Soy broth (TSB) (BD Difco^{TM}, USA)

4.3. Brain Heart Infusion broth (BHI) (BD Difco^{TM}, USA)

4.4. Mueller-Hinton agar (MHA) (oxoid, United Kingdom)

4.5. Mueller-Hinton broth (MHB) (oxoid, United Kingdom)

5. วิธีดำเนินงานวิจัย

5.1. การออกแบบโครงสร้างยาใหม่โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

การเตรียมและคัดเลือก DNA gyrase enzyme เป็นโครงสร้างชีวโมเลกุลเป้าหมาย (https://www.rcsb.org/structure/1KZN)

5.1.1. คัดเลือกและนำโครงสร้างสามมิติของชีวโมเลกุลเป้าหมาย จากข้อมูลผลึก 3 มิติของเอนไซม์ DNA Gyrase (1kzn, http://www.rscb.org/pdb/) ที่จับเป็นสารประกอบกับไลแกนด์ที่อยู่ในฐานข้อมูลในรูป .pdb file มาเตรียมเป็น .pdbqt file เพื่อใช้ในการ docking

5.1.2. ใช้โปรแกรม Biovia เพื่อตัดโมเลกุลที่ไม่ต้องการในโปรตีนออกเพื่อให้มีความจำเพาะต่อสารมากยิ่งขึ้น

5.1.3. เตรียมชีวโมเลกุลเป้าหมายให้อยู่ในรูป .pdbqt file โดยเปิดโครงสร้างชีวโมเลกุลเป้าหมายที่ได้ดาวน์โหลดมาโดยใช้โปรแกรม Autodock 4.2.6 ดังนี้

1) กำจัดโมเลกุลไลแกนด์ และน้ำ จากนั้นเติมอะตอมของไฮโดรเจน จากนั้นคำนวณประจุแบบ Gasteiger
2) บันทึกเป็นไฟล์ในนามสกุล .pdbqt

5.1.4. เตรียมไลแกนด์ให้อยู่ในรูปไฟล์ .pdbqt โดยเปิดโครงสร้างของชีวโมเลกุลเป้าหมายที่ได้ดาวน์โหลดมาโดยใช้โปรแกรม Autodock 4.2.6 ลบโมเลกุลอื่น ๆ ให้เหลือไว้เพียงเฉพาะไลแกนด์

5.1.5. Validate เอนไซม์ DNA Gyrase เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของชีวโมเลกุลเป้าหมายในการทำ docking โดยใช้โปรแกรม Autodock 4.2.6 ดังนี้

1) เตรียม Grid parameter (การทำ autogrid) ในรูป .gpf โดยเลือกชีวโมกุลเป้าหมาย ซึ่งเป็นไฟล์ .pdb ที่เตรียมไว้ จากเมนู grid จากนั้นจึงเลือกชนิดของ Grid map ที่ต้องการสร้าง และกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 2 บันทึกเป็นไฟล์ .gpf

ตารางที่ 1 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการทำ Autogrid

Grid box parameter	Parameters
Number of points in x,y,z	46,46,46
Spacing (angstrom)	0.375
Center grid box x,y,z	19.259,29.159,42.461

2) เตรียม docking parameters (การทำ autodock) ในรูป .dpf โดยเปิดไฟล์ชีวโมเลกุลเป้าหมาย (1kzn) และไลแกนด์ ซึ่งเป็นไฟล์ .pdbqt file ที่เตรียมไว้จากเมนู docking จากนั้นกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 3 และบันทึกไฟล์เป็น Lamarckian GA

ตารางที่ 2 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการทำ Autodock

Docking parameters	
Number of GA run	200
Population size	150
Maximum number of energy evaluations	2,500,000
Maximum number of salicylanilide generations	27,000
Maximum number of top individuals 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 generations for picking worst individual	10

3) ทำการ docking parameters เพื่อให้ได้ไฟล์ .dlg และ analysis ในโปรแกรม เพื่อหาค่า binding energy

5.2. เตรียมไลแกนด์ที่จะใช้ในการ docking

5.2.1. โครงสร้างที่ออกแบบเป็นสารกลุ่ม thioureide เริ่มด้วยการวาดโครงสร้างของสารที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม ChemDraw 8.0 วาดโครงสร้างเป็น 2 มิติ หลังจากนั้นใช้โปรแกรม Chem3D Ultra 8.0 เพื่อแปลงโครงสร้างจาก 2 มิติ เป็น 3 มิติ และจัดโครงสร้างให้มี conformation ที่มีพลังงานต่ำสุด โดยการ minimize energy ด้วยหลักการ MM2 ที่อยู่ในโปรแกรม Chem3D Ultra 8.0 และบันทึกเป็นไฟล์ protein data bank (.pdb)

5.2.2. เปิดโครงสร้างไลแกนด์ที่เตรียมไว้ โดยใช้โปรแกรม Autodock 4.2.6 เพื่อทำการdocking ซึ่งการ docking จะเป็นการหาแรงในการจับกับเอนไซม์ DNA Gyrase โดยทำเหมือนขั้นตอนการ validate และรายงานผลของการศึกษาเป็นค่า binding energy (ประกอบด้วย intermolecular energy และ torsional energy) โดยรายงาน conformation ที่มี binding energy และ docking energy เป็นลบมากที่สุด

5.3. การสังเคราะห์อนุพันธ์กรดซาลิไซลิก

5.3.1. การสังเคราะห์สารประกอบ thioureide ใช้การเกิดปฏิกิริยา 2 steps ดังนี้

1) การสังเคราะห์ acid chloride

(1) ชั่งสาร 5-Chlorosalicylic acid (0.86 g, 5.00 mmol) ใส่ในขวดก้นกลม 2 คอ ขนาด 250 mL

(2) เติมสารละลาย double dry dichloromethane 20 ml ลงในขวดก้นกลม 2 คอ

(3) เติม oxalyl chloride (0.59 mL, 7.00 mmol) และเติมตัวเร่งปฏิกิริยา dimethylformamide 3 หยด โดยทำในสภาวะปิดภายใต้ที่มีแก๊สไนโตรเจนและคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 2-8 °C

(4) คนสารละลายอย่างต่อเนื่องจนได้สารละลายใส

2) การสังเคราะห์ thioureide

(1) ชั่งสาร [3-(Trifluoromethyl)phenyl]thiourea (1.54 g, 7.00 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 mL

(2) เติมสารละลาย double dry dichloromethane 15 ml

(3) เติม triethylamine (0.98 mL, 7.00 mmol)

(4) นำสารในขวดก้นกลมที่ได้จากข้อ 2) เติมลงในขวดก้นกลมที่ได้จากขั้นตอนที่ 4 ของปฏิกิริยา Acid chloride synthesis โดยทำในสภาวะปิดภายใต้บรรยากาศที่มีแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

(5) หาค่า %yield

5.3.2. การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1) บรรจุซิลิการเจลลงในคอลัมน์ โดยมี mobile phase คือ Dichloromethane: Hexane ในอัตราส่วน 7:3
2) ผสมสารตัวอย่างเข้ากับซิลิกา แล้วนำไประเหยแห้ง
3) บรรจุสารตัวอย่างที่ผสมกับซิลิกาแล้วลงในคอลัมน์ จากนั้นเปิด stopcock ให้อัตราการไหลพอเหมาะกับการแยก
4) เก็บสารละลายตัวอย่างจากคอลัมน์ แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC เพื่อหา fraction ที่มีสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์
5) นำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 365 nm จากนั้นคำนวณหาค่า Retention factor (Rf)
6) นำ fraction ของสารตัวอย่างที่มีค่า Rf value เท่ากันมารวมกัน
7) นำแต่ละ fraction ไประเหยตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิ 50 °C โดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator
8) เก็บสารตัวอย่างเพื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์

5.3.3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้ โดยใช้เครื่องมือต่าง ๆ ดังนี้

1) Infrared Spectrometer (IR Spectrometer) เพื่อตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญที่มีอยู่ในโครงสร้าง
2) Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR Spectrometer)
   (1) ^{1}H NMR Spectroscopy เพื่อดูลักษณะและชนิดของไฮโดรเจนที่เกาะอยู่บนคาร์บอน, ไนโตรเจน และออกซิเจนในโครงสร้าง
   (2) ^{13}C NMR Spectroscopy เพื่อดูลักษณะและชนิดของคาร์บอนที่สำคัญในโครงสร้าง
3) Mass Spectrometer เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของสาร

5.4. การตรวจกรองฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารตัวอย่างด้วยวิธี Disc Diffusion

5.4.1. การเพาะเลี้ยงและเก็บรักษาสายพันธุ์

เก็บรักษาแบคทีเรียทั้งสามชนิดแบบแช่แข็งที่ -80 °C ก่อนนำไปใช้ทดสอบให้เพาะเลี้ยงบนอาหาร Trypticase Soy agar (TSA) ที่บรรยากาศปกติ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงและผ่านการ subculture อย่างน้อย 3 รอบ และเก็บรักษาแบคทีเรียเหล่านี้ใน agar slant ที่ 4 °C

5.4.2. การเตรียมเซลล์แบคทีเรียแขวนลอย (bacterial suspension) สำหรับทดสอบ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร TSA ที่ 37 °C ที่บรรยากาศปกติ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวเพื่อเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร Trypticase Soy broth (TSB) ที่บรรยากาศปกติเป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเตรียมเซลล์แขวนลอยโดยใช้ 0.85% NaCl ให้มีความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 1 x 10^8 CFU/mm โดยเทียบความขุ่นกับสารมาตรฐาน MacFarland No. 5 (มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm ประมาณ 0.07-0.08)

5.4.3. การเตรียมสารสังเคราะห์ และ Gentamicin

เตรียมสารละลายของสารสังเคราะห์โดยละลายใน 100% DMSO ให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL หลังจากนั้นหยดสารละลายที่ได้ปริมาตร 20 µL ลงบนดิสก์เปล่าปลอดเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm จะได้ปริมาณสารตัวอย่าง 20 µg/disc ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 15 นาที จะได้ดิสก์พร้อมสำหรับทดสอบ

5.4.4. การทดสอบฤทธิ์

ใช้ไม้พันสำลีจุ่มเซลล์แขวนลอยที่เตรียมไว้ บิดสำลีที่ข้างหลอดเบา ๆ แล้วนำมาป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) ให้ทั่วจานอาหาร ทิ้งไว้ไม่เกิน 15 นาที ใช้ปากคีบปลอดเชื้อ (จุ่มแอลกอฮอล์แล้วเผาไฟ) คีบแผ่นดิสก์บรรจุสารตัวอย่างมาวางบนบนจานอาหารนี้ ซึ่งใช้ ciprofloxacin 5 µg/disc หรือ gentamicin 10 µg/disc เป็น positive control และตัวควบคุมระบบ ส่วนดิสก์ที่มี 10% DMSO ใช้เป็น Negative control หลังจากนั้นนำแบคทีเรียไปบ่มที่ 35-37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

วัดผลการทดสอบโดยการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (zone of inhibition) โดยวัดจากขอบของวงใสขางหนึ่งไปยังขอบใสอีกขางหนึ่งโดยใหผานจุดศูนยกลางของดิสก์ บันทึกผลในหนวยเปนมิลลิเมตร (mm) โดยขอบของบริเวณยับยั้งต้องเป็นบริเวณใสที่ชัดเจน ถ้ามีแบคทีเรียเจริญบาง ๆ ใหถือว่าบริเวณนั้นยังมีปริมาณสารตัวอย่างที่ยังไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้

5.5. การทดสอบหาค่า Minimum Inhibition Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

5.5.1. การเพาะเลี้ยงและเก็บรักษาสายพันธุ์

เก็บรักษาแบคทีเรียทั้งสามชนิดแบบแช่แข็งที่ -80 °C ก่อนนำไปใช้ทดสอบให้เพาะเลี้ยงบนอาหาร Trypticase Soy agar (TSA) ที่บรรยากาศปกติ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงและผ่านการ subculture อย่างน้อยสามรอบและเก็บรักษาแบคทีเรียเหล่านี้ใน agar slant ที่ 4 °C

5.5.2. การเตรียมเซลล์แบคทีเรียแขวนลอย (bacterial suspension) สำหรับทดสอบ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร TSA ที่ 37 °C ที่บรรยากาศปกติ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวเพื่อเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร Trypticase Soy broth (TSB) ที่บรรยากาศปกติเป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเตรียมเซลล์แขวนลอยโดยใช้ 0.85% NaCl ให้มีความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 1×10^8 CFU/mL โดยเทียบความขุ่นกับสารมาตรฐาน MacFarland No. 5 (มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ประมาณ 0.07-0.08) แล้วเจือจางเซลล์แขวนลอยให้ได้ 10×10^6 CFU/mL ด้วยอาหาร Mueller-Hinton broth เพื่อนำไปใช้ทดสอบ และนับจำนวนแบคทีเรียในเซลล์แขวนลอยโดยใช้เทคนิค drop plate บนอาหาร TSA หรือ BHA

5.5.3. การเตรียมสารสังเคราะห์ และ Gentamicin

เตรียมสารละลายของสารสังเคราะห์และยา gentamicin ให้ได้ความเข้มข้น 12,800 µg/mL หลังจากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 128 µg/mL และเจือจางต่อให้มีความเข้มข้นลดลง 1:2 โดยใช้อาหาร Mueller-Hinton broth (MHB) ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 64-0.125 µg/mL

5.5.4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสังเคราะห์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยวิธี broth microdilution

ใส่สารละลายของสารสังเคราะห์ และ Gentamicin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 50 µL ลงในหลุมทดสอบ (96 U-Well microtiter plate) เติมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย 50 µL ลงไปในหลุมทดสอบที่มีสารสังเคราะห์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C บรรยากาศปกติ 18-24 ชั่วโมง อ่านค่า MIC โดยเป็นค่าความเข้มข้นของสารสังเคราะห์หรือยาจากผลการทดสอบในหลุมที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย (อาหารในหลุมไม่ขุ่น)

5.5.5. การหาค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

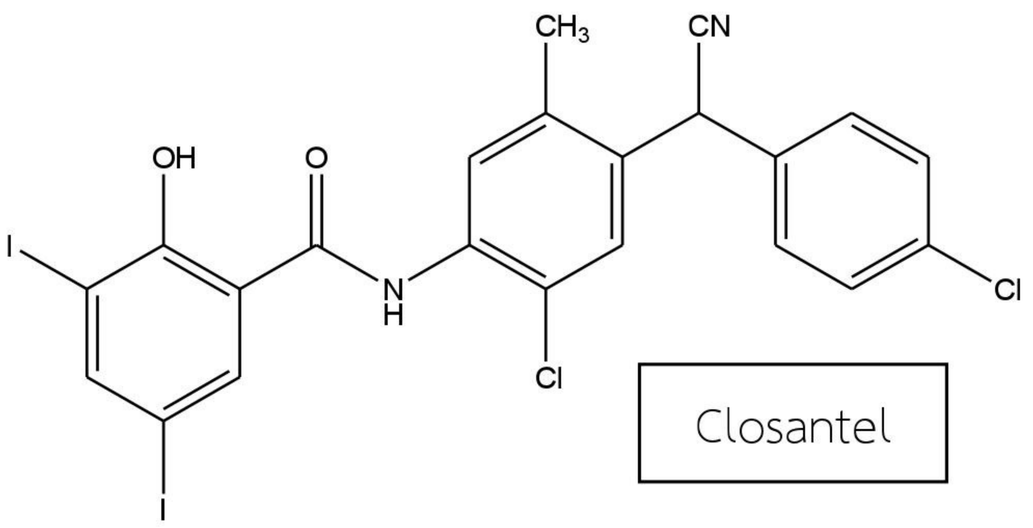
นำสารในหลุมทดสอบที่เห็นว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย คืออาหารในหลุมทดสอบไม่ขุ่น ปริมาตร 10 µL หยด (spot) ลงบนอาหาร TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C บรรยากาศปกติ 18-24 ชั่วโมง ความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสังเคราะห์ในหลุมทดสอบที่ไม่มีการเจริญของเชื้อจากการ subculture ลงบนอาหาร TSA คือค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

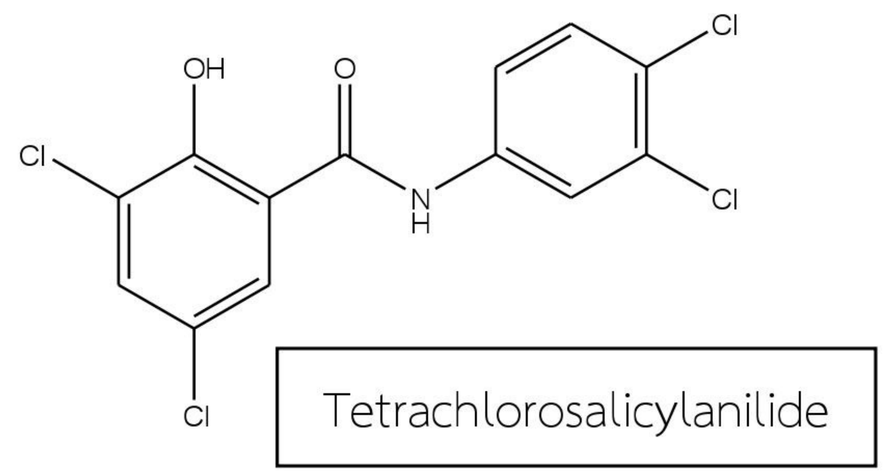
บทที่ 4

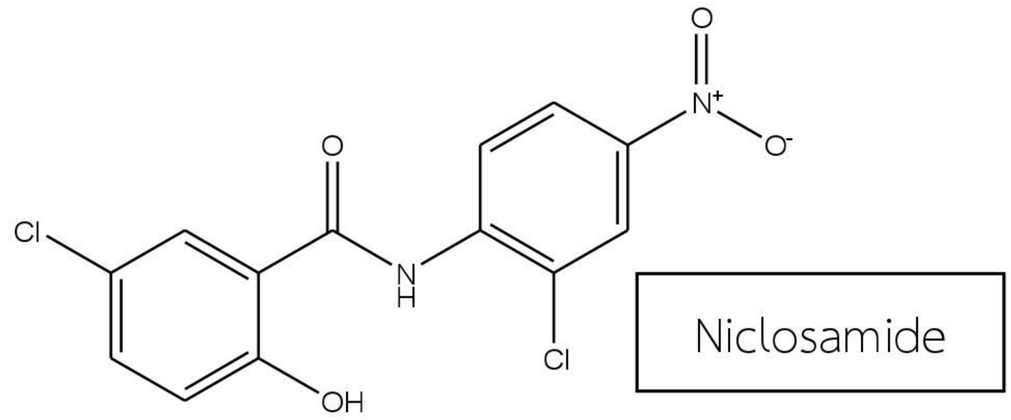
ผลการวิจัย

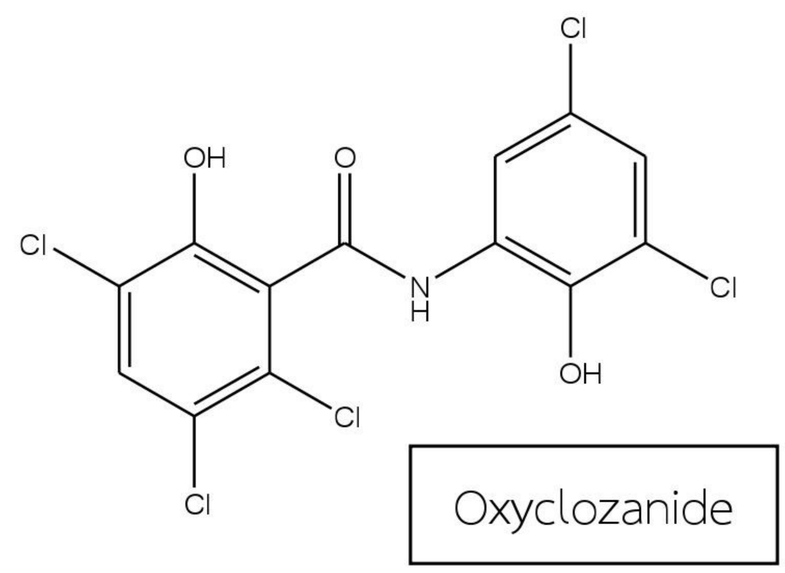
1. การออกแบบโครงสร้างจากสารต้นแบบ (Lead compound)

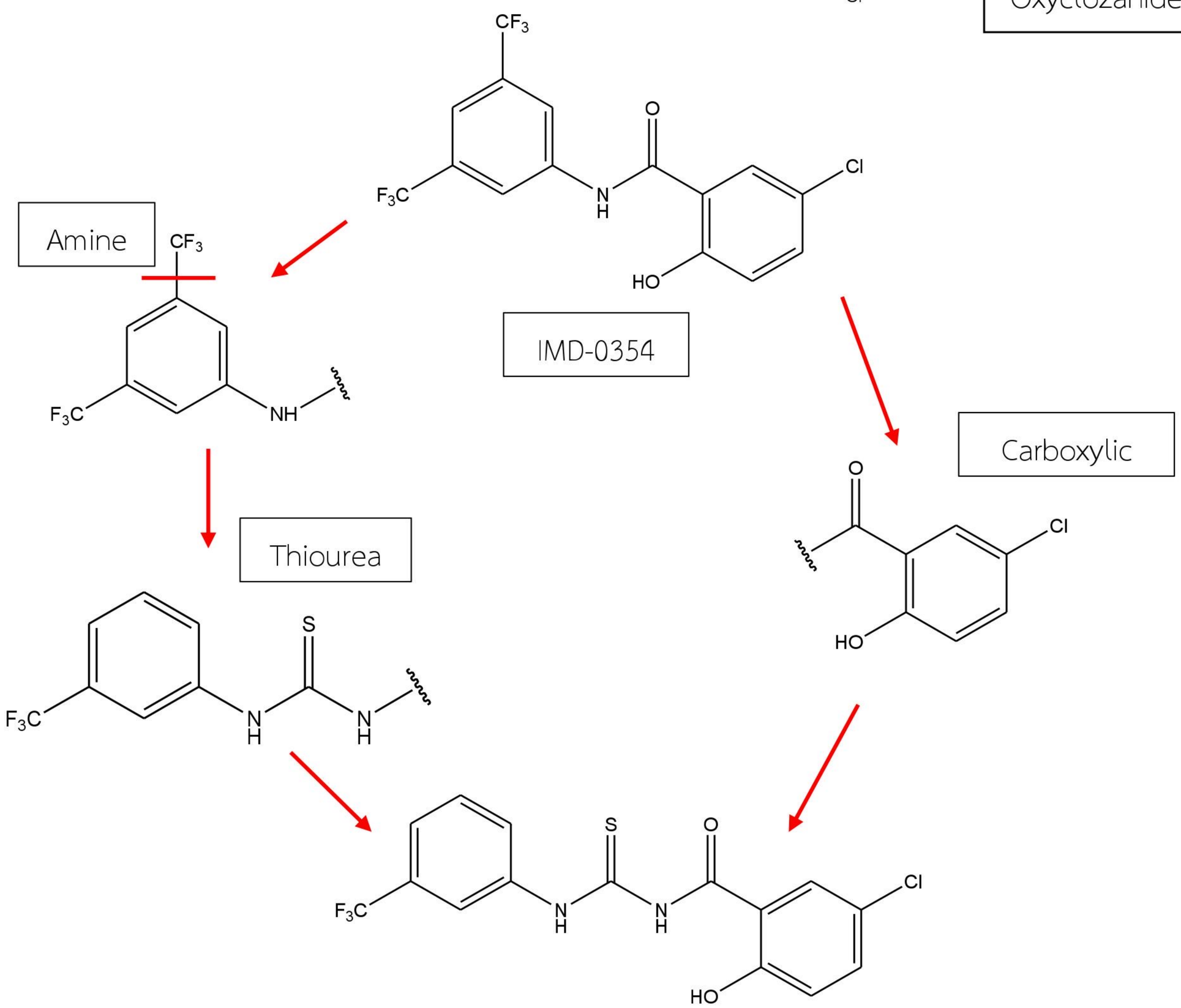
จากการออกแบบโครงสร้างอนุพันธ์ของกรดซาลิไซลิกโดยใช้ IMD-0354 (*N*-(3,5-bis-trifluoro-methyl)phenyl)-5-Chloro-2-hydroxylbenzamide) และอนุพันธ์กรดซาลิไซลิก (salicylic acid derivatives) ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพทั้ง 4 โครงสร้าง (ได้แก่ closantel, tetrachlorosalicylanilide, niclosamide และ oxyclozanide[21-22]) เป็นสารต้นแบบ โดยได้ทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก amine ไปเป็น thiourea และตัด trifluoromethyl ในตำแหน่งที่ 5 ของโครงสร้างออก โดยที่ยังคงส่วน carboxylic acid ไว้ ได้เป็น 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide ดังภาพที่ 12









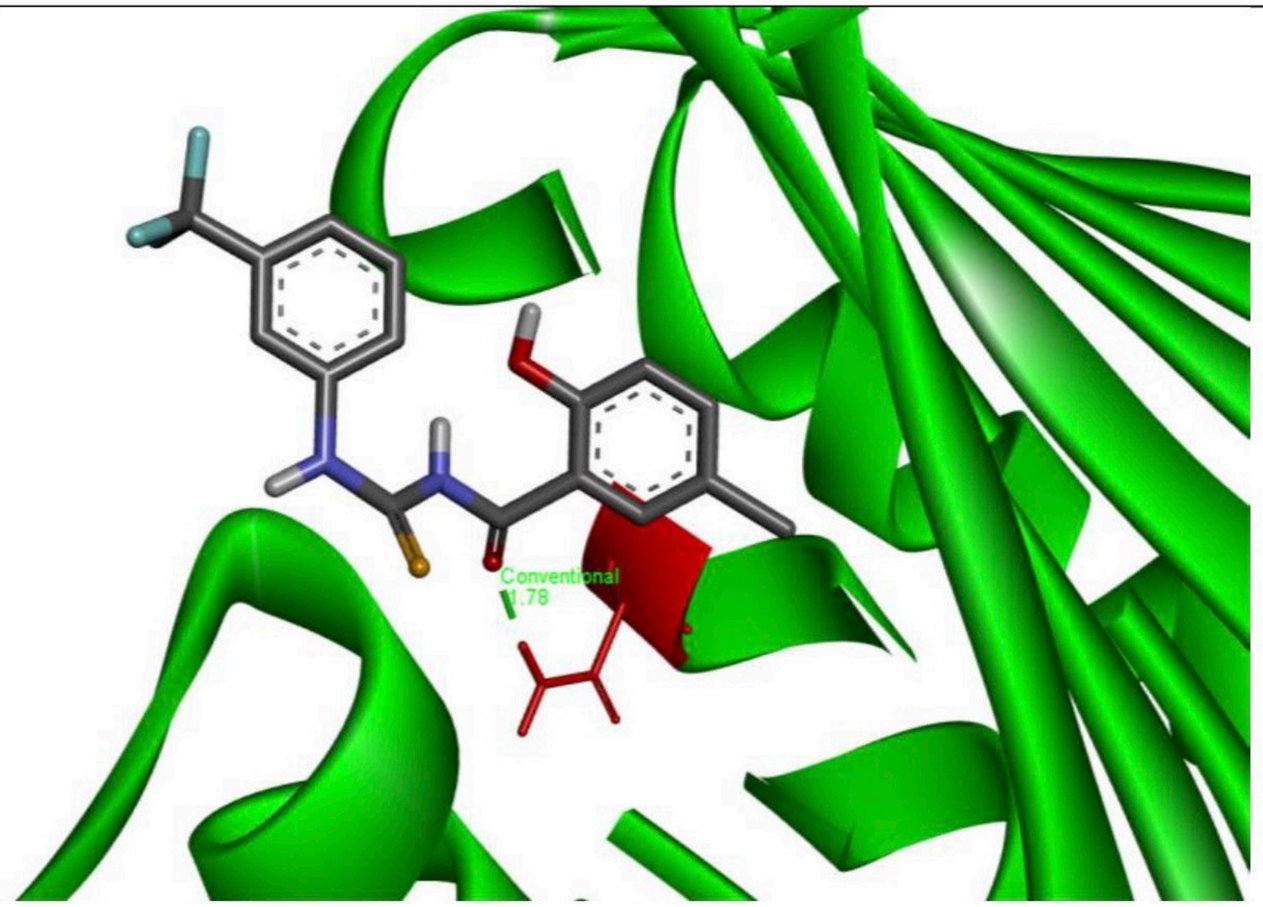


5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide

ภาพที่ 12 การออกแบบโครงสร้างจากสารต้นแบบ

2. ผลการทำ Computer-Aided Drug Design

ตารางที่ 3 ผลของ conformation ของ compound ที่เกิด interaction บริเวณ binding site

Compound	Order Conformation	Docked pose	Binding Energy (BE)	Inhibition Constant (IC_{50})	Bonding
5-Chloro-2-hydroxy-N-((3-(trifluoromethyl) phenyl) carbamothioyl) benzamide	200		-5.36	118.58 μM	H-bond (ASN46)

3. ผลการสังเคราะห์สาร 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl) carbamothioyl)benzamide

จากการสังเคราะห์สารและแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ column chromatography ได้ผลการสังเคราะห์ดังตารางที่ 4 โดยสาร 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl) benzamide ที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว และได้ %yield เท่ากับ 12.81%

ตารางที่ 4 ผลการสังเคราะห์ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl) carbamothioyl)benzamide

List	*5-Chloro-2-hydroxy-*N-*((3-(trifluoromethyl)phenyl) carbamothioyl)benzamide*
%yield	12.81
Product appearance	ผงละเอียดสีขาว

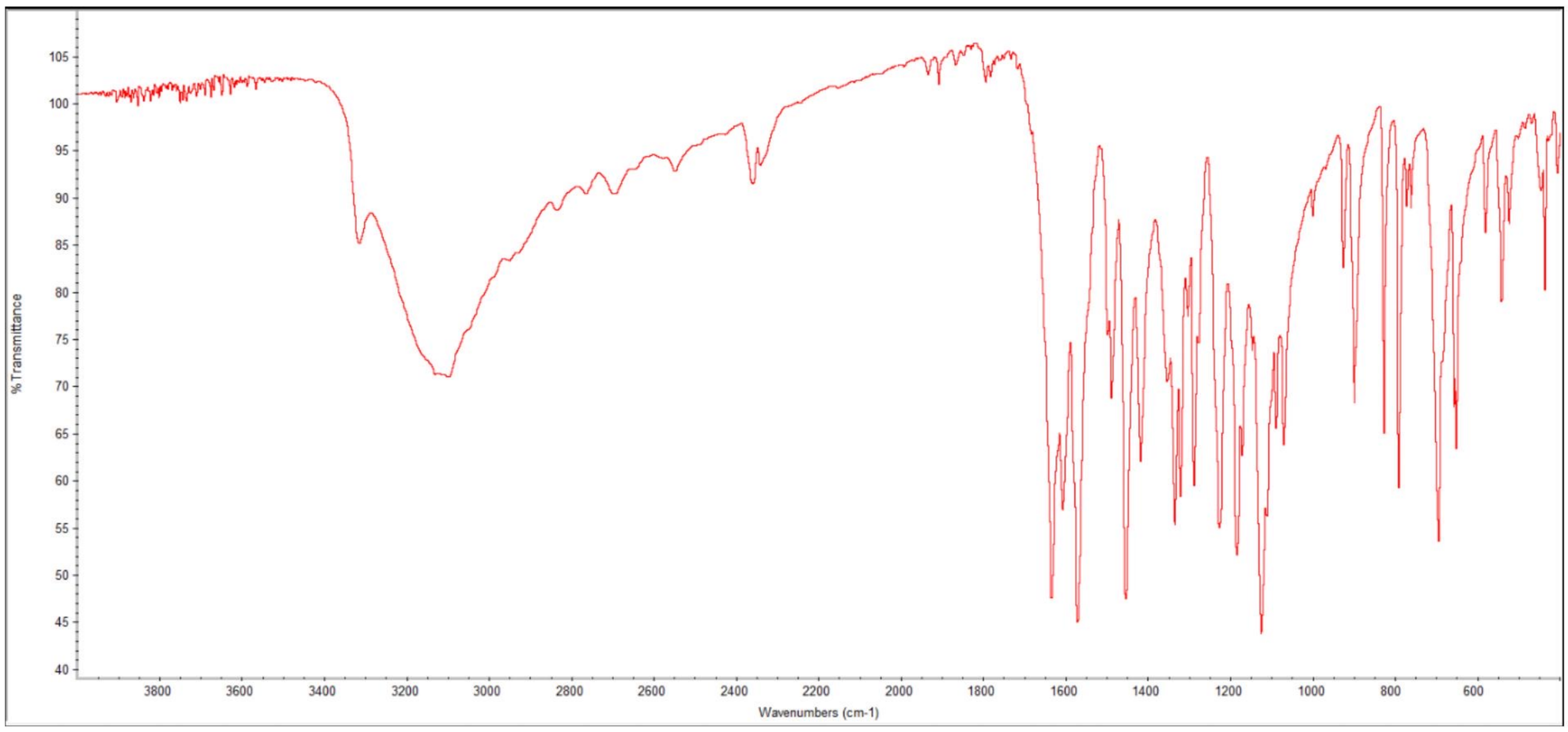
4. การตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่องมือทาง Spectroscopy

4.1. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย IR spectrometer

จากการ FT-IR spectrum ของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl) carbamothioyl)benzamide จะพบ peak ของ N–H stretching ของหมู่ thioureide ที่ wavenumber 3315.19 cm^{-1} เป็นแบบ singlet แสดงว่าเป็น secondary nitrogen ของ thioureide พบ O–H stretching ของ aromatic ring ที่ wavenumber 3102.67 cm^{-1} ซึ่งมีลักษณะเป็น broad peak พบ C=O stretching ของหมู่ thioureide ที่ wavenumber 1632.32 cm^{-1} พบ C–O stretching ของหมู่ thioureide ที่ wavenumber 1125.73 cm^{-1} พบ C=S stretching ของหมู่ thioureide ที่ wavenumber ประมาณ 1290 cm^{-1} และพบ C=C stretching ของ aromatic ring ที่ wavenumber 1615.13, 1568.07 และ 1451.92 cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 13

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง wavenumber (cm^{-1}) กับหมู่ฟังก์ชั่นทางเคมีของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide

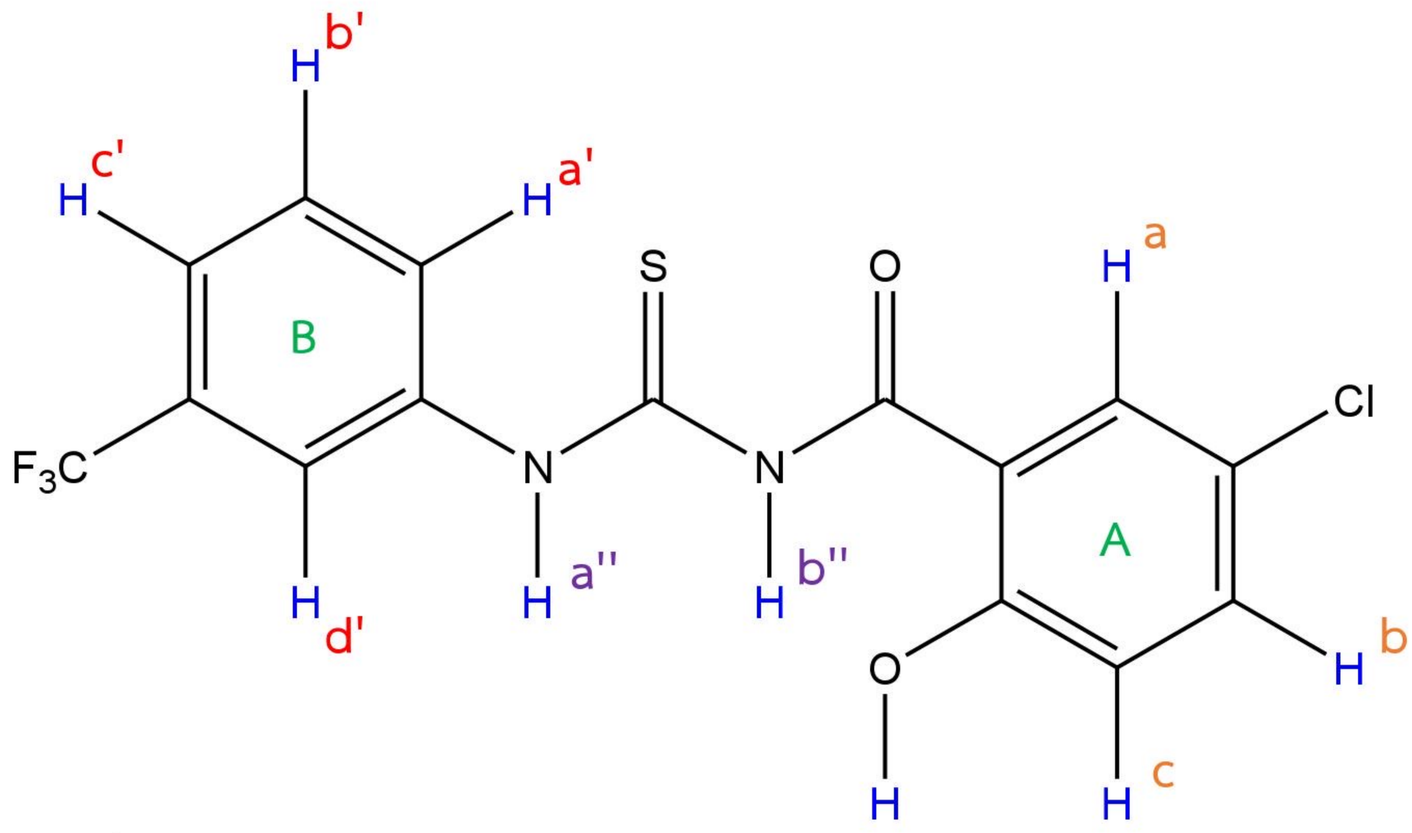
Wavenumber (cm^{-1})	Attributed to
3315.19	N–H stretching ของหมู่ thioureide
3102.67	O–H stretching ของ aromatic ring
1632.32	C=O stretching ของหมู่ thioureide
1125.73	C–O stretching ของ aromatic ring
1290	C=S stretching ของหมู่ thioureide
1615.13, 1568.07 และ 1451.92	C=C stretching ของ aromatic ring



ภาพที่ 13 FT-IR spectrum ของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide

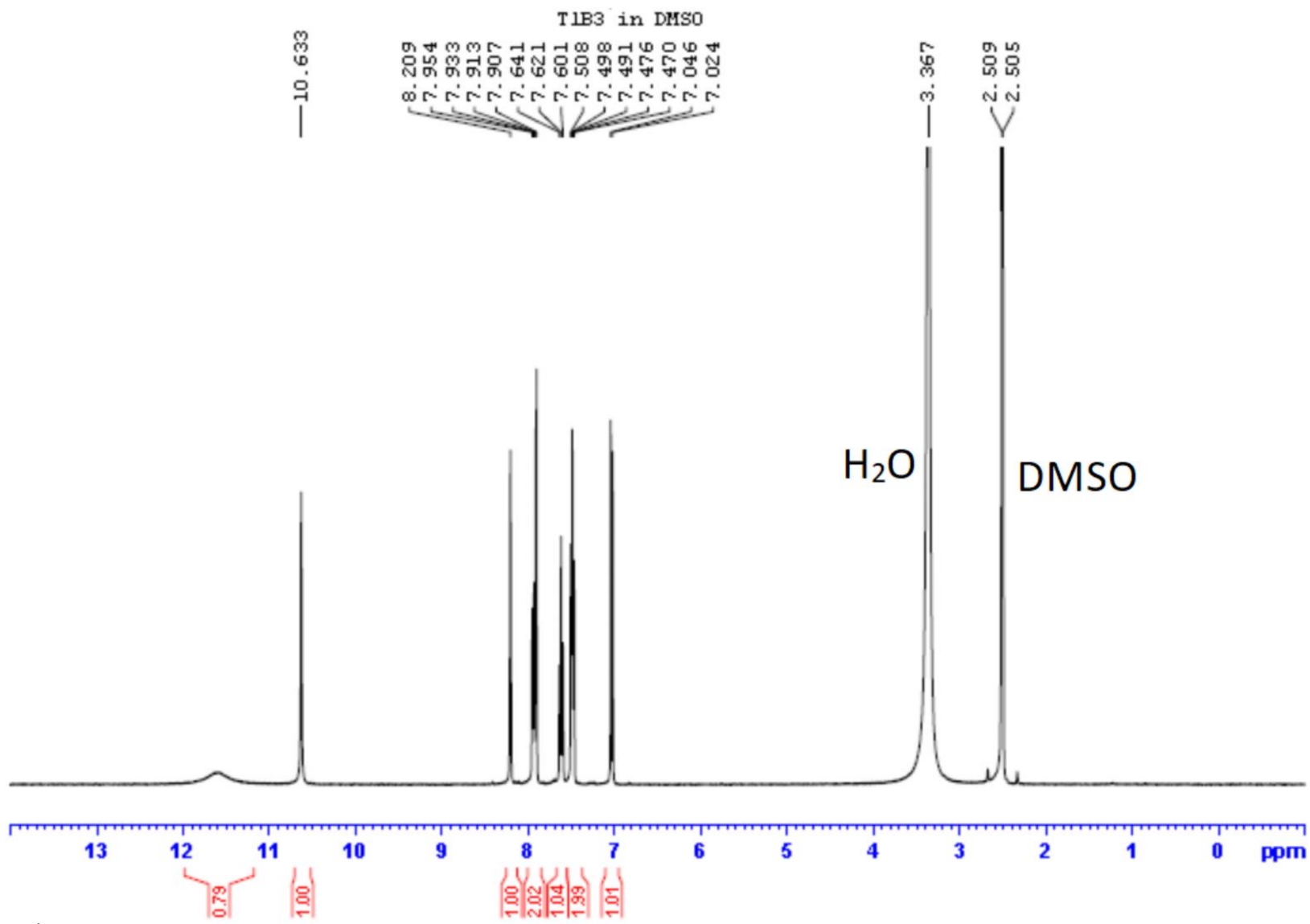
4.2. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย ^{1}H-NMR spectrometer

ตำแหน่งของอะตอมของไฮโดรเจนในโครงสร้างของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoro-methyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide ได้ถูกแสดงในภาพที่ 14

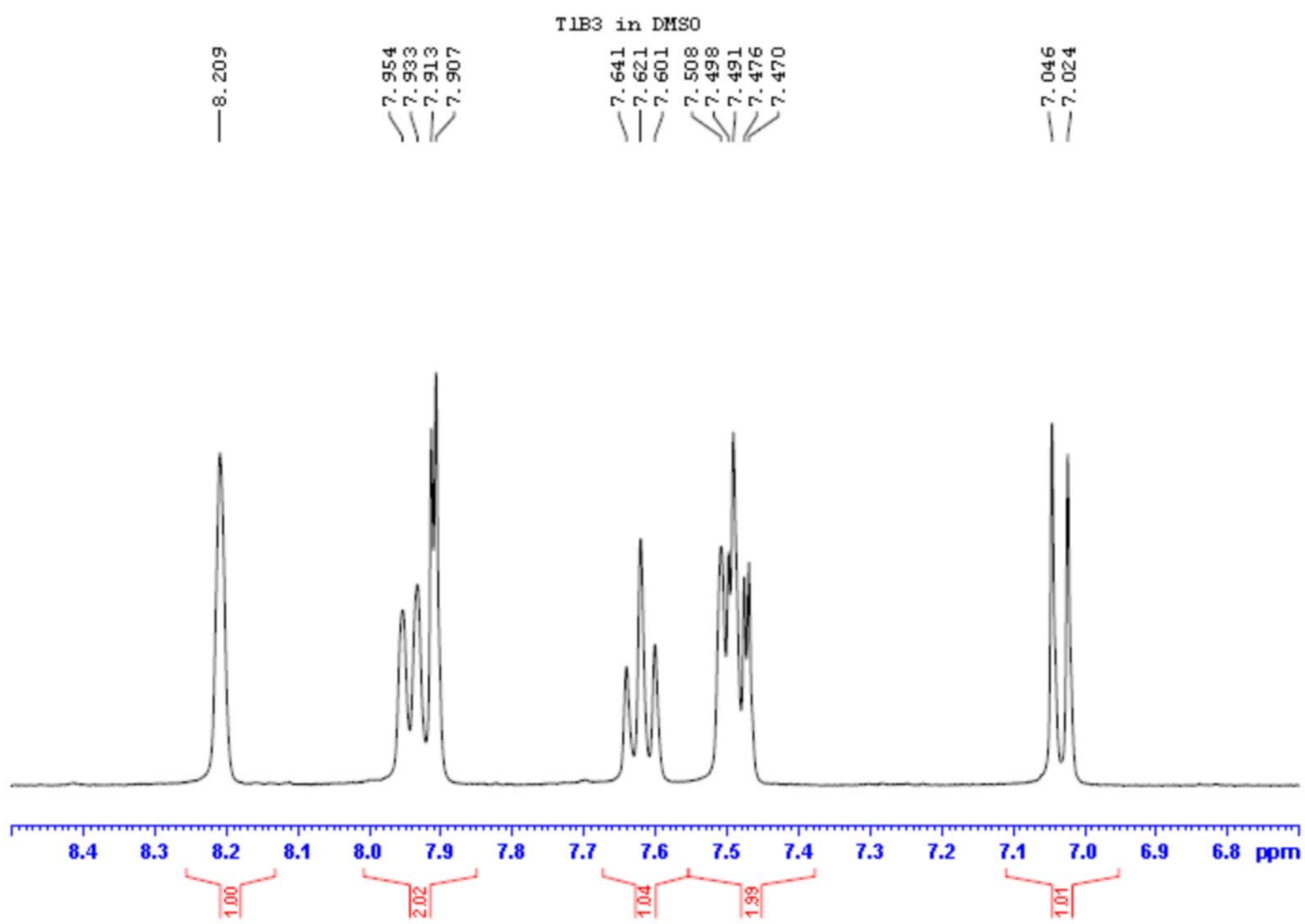


ภาพที่ 14 แสดงการกำหนดตำแหน่งโปรตอนของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide

จาก ^{1}H spectrum ให้ peak ทั้งหมด 9 peaks ดังภาพที่ 15 โดยมี 2 peak ที่ chemical shift 2.505–2.509 และ 3.367 ppm เป็น peaks ของ DMSO และน้ำ (H_2O) ตามลำดับ และที่เหลืออีก 7 peaks เป็นของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide และได้ขยาย scale ของ peaks ในช่วง 6.8-8.4 ppm ดังภาพที่ 16 โดยมี 5 peaks เป็น peak ของ H ที่ต่อกับ aromatic ring ซึ่งมีจำนวน 7 H’s ส่วน peak ที่ chemical shift 10.633 ppm เป็น peak ของ OH และที่ประมาณ 11.62 ppm เป็นของ NH บน thioureide ซึ่งเป็นไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง a'' บนไนโตรเจน แต่ไม่เห็น peak ของไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง b'' เนื่องจากตำแหน่งดังกล่าวเป็น acidic H ที่สามารถแตกตัวได้ง่าย ทำให้ไม่ขึ้น peak ของโปรตอนบน ^{1}H spectrum ในภาพที่ 15 โดยแสดงค่า chemical shift ดังตารางที่ 6



ภาพที่ 15 ตำแหน่งของโปรตอนใน ^{1}H spectrum (ppm) ของสาร 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl) carbamothioyl)benzamide ใน DMSO ในช่วง 0-12 ppm



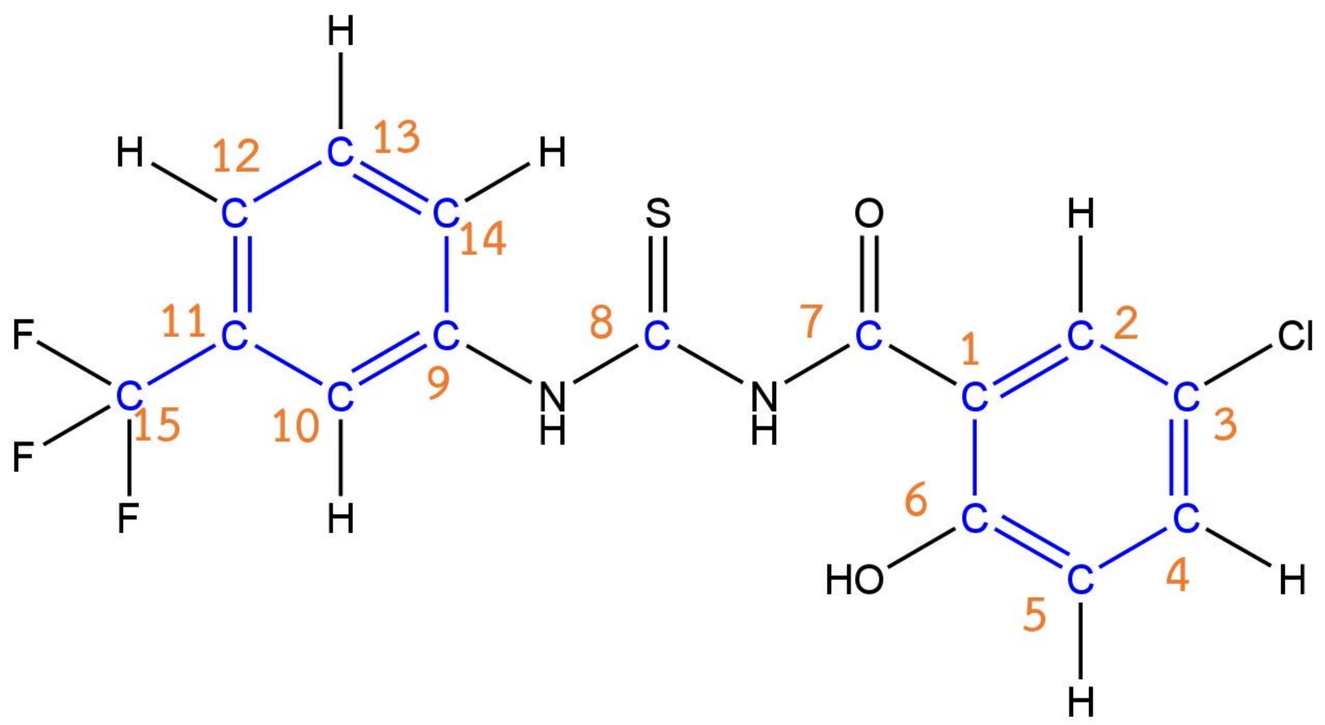
ภาพที่ 16 ตำแหน่งของ aromatic protons ใน ^{1}H spectrum (ppm) ของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide ใน DMSO โดยขยายในช่วง 6.8-8.4 ppm

ตารางที่ 6 ค่า chemical shift และ coupling pattern ของ protons (H) ในโครงสร้าง 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide

Assigned protons	Chemical shift (ppm)	Characteristic
N-Ha''	11.62	Singlet
O-H	10.633	Singlet
Ha	8.209	Singlet
Hb	7.933 และ 7.954	Doublet
Hc	7.907 และ 7.913	Doublet
Ha'	7.601, 7.621 และ 7.641	Triplet
Hb'	7.491, 7.498 และ 7.508	Triplet
Hc'	7.470 และ 7.476	Doublet
Hd'	7.024 และ 7.046	Doublet

4.3. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย ^{13}C-NMR spectrometer

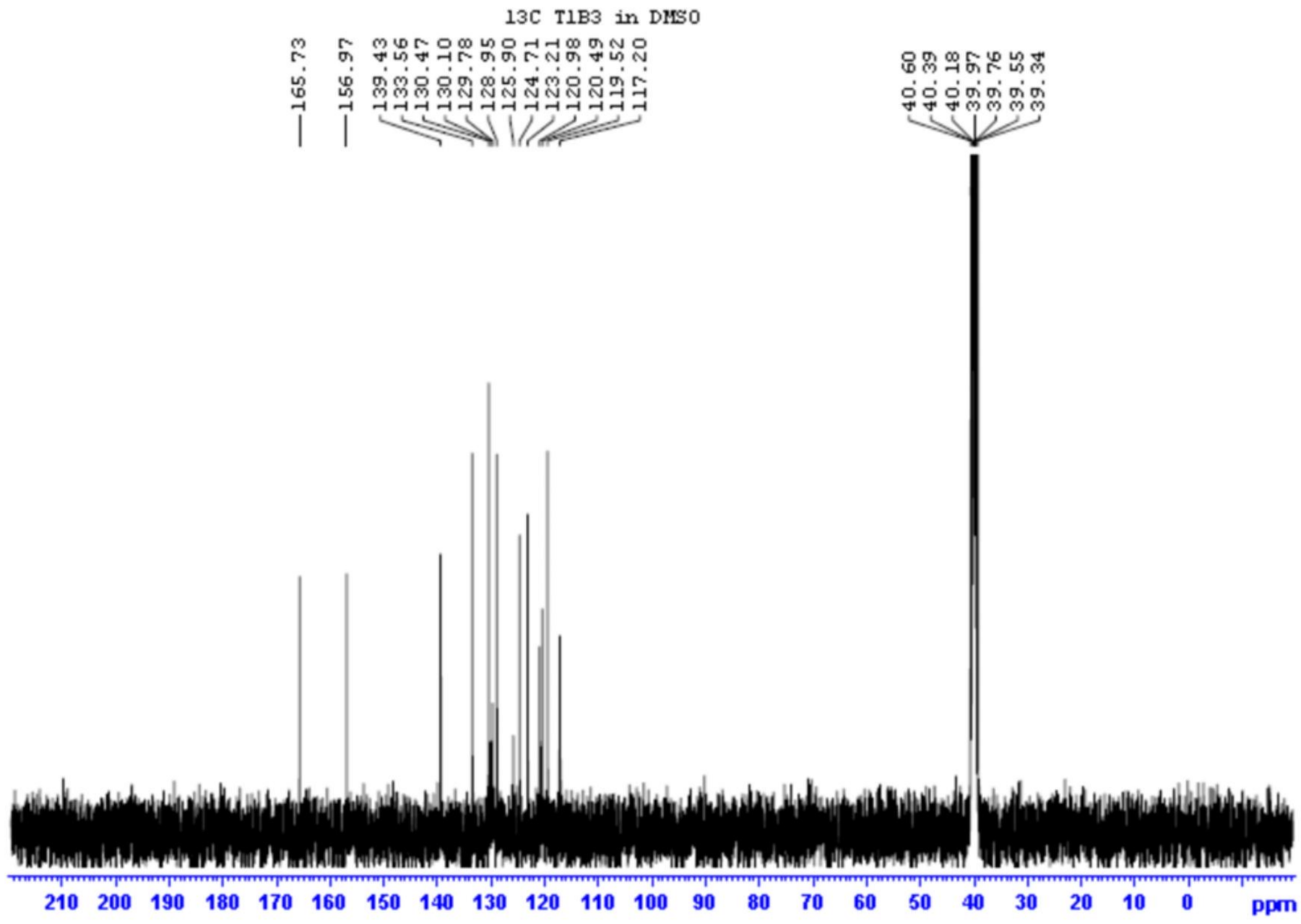
ตำแหน่งของอะตอมของคาร์บอนในโครงสร้างของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide ได้ถูกแสดงในภาพที่ 17



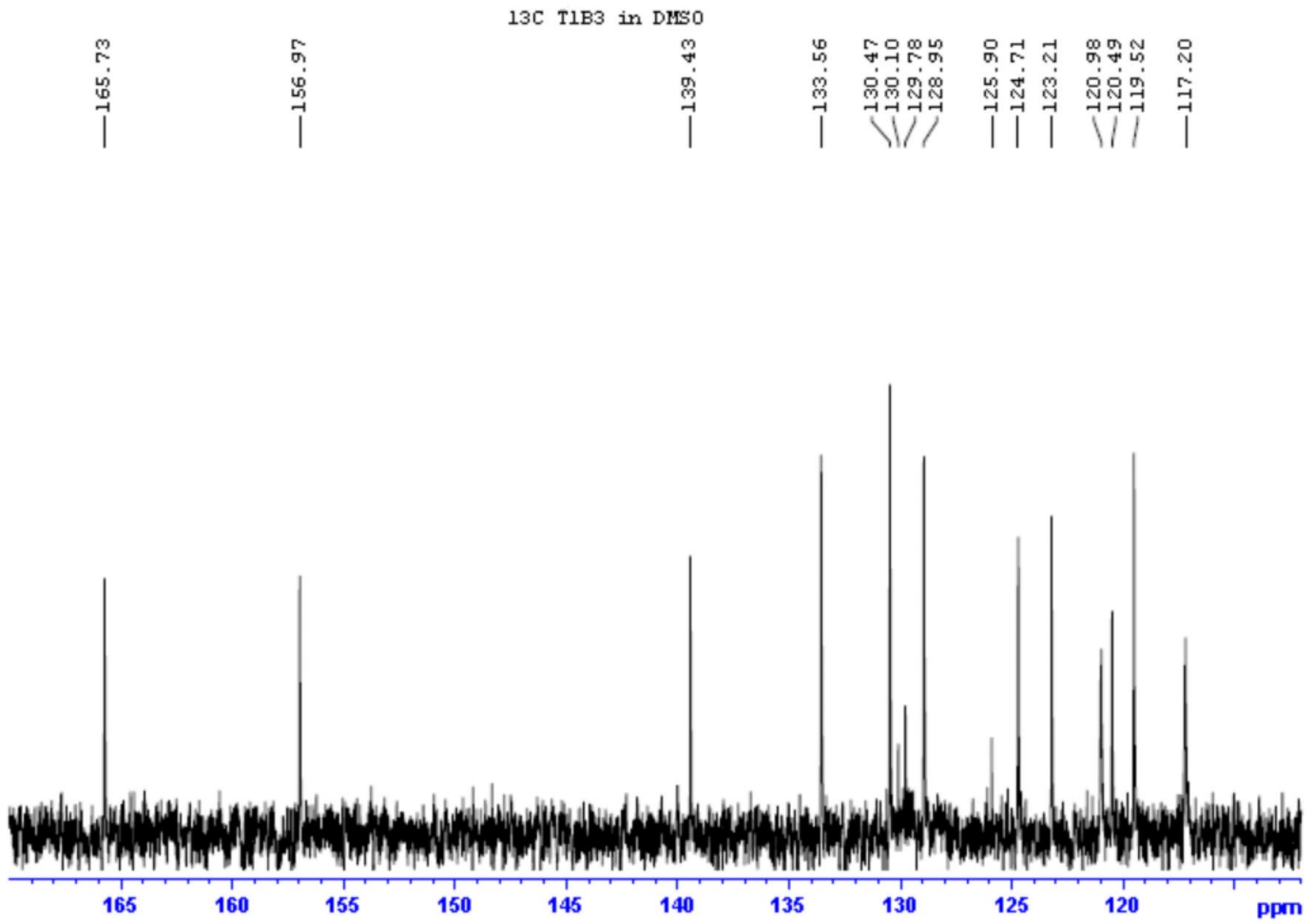
ภาพที่ 17 แสดงการกำหนดตำแหน่งคาร์บอนของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide

^{13}C NMR spectrum ได้แสดงถึงอะตอมคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ดังภาพที่ 18 โดย peak ที่ chemical shift ประมาณ 40 ppm จะเป็น peak ของ DMSO ส่วน peak ของอะตอมคาร์บอนจะอยู่ในช่วง chemical shift ประมาณ 115–165 ppm ดังภาพที่ 18 และ 19 โดยใน ^{13}C NMR spectrum ได้แสดง peak ของคาร์บอนทั้งสิ้น 15 peaks ซึ่งตรงกับจำนวนคาร์บอนที่มีในโครงสร้างทั้ง 15 อะตอมเช่นกัน โดย

peak ที่ chemical shift 139.43 ppm เป็น peak ของคาร์บอนในตำแหน่งที่ 6 ที่เกาะกับหมู่ hydroxy (OH) พบ peak ที่ chemical shift 156.97 ppm เป็น peak ของคาร์บอนในตำแหน่งที่ 7 ซึ่งเป็น peak ของหมู่ carbonyl (C=O) และพบ peak ที่ chemical shift 165.73 ppm เป็น peak ของคาร์บอนในตำแหน่งที่ 8 ซึ่งเป็น peak ของหมู่ thiocarbonyl (C=S) ดังภาพที่ 18 และ 19



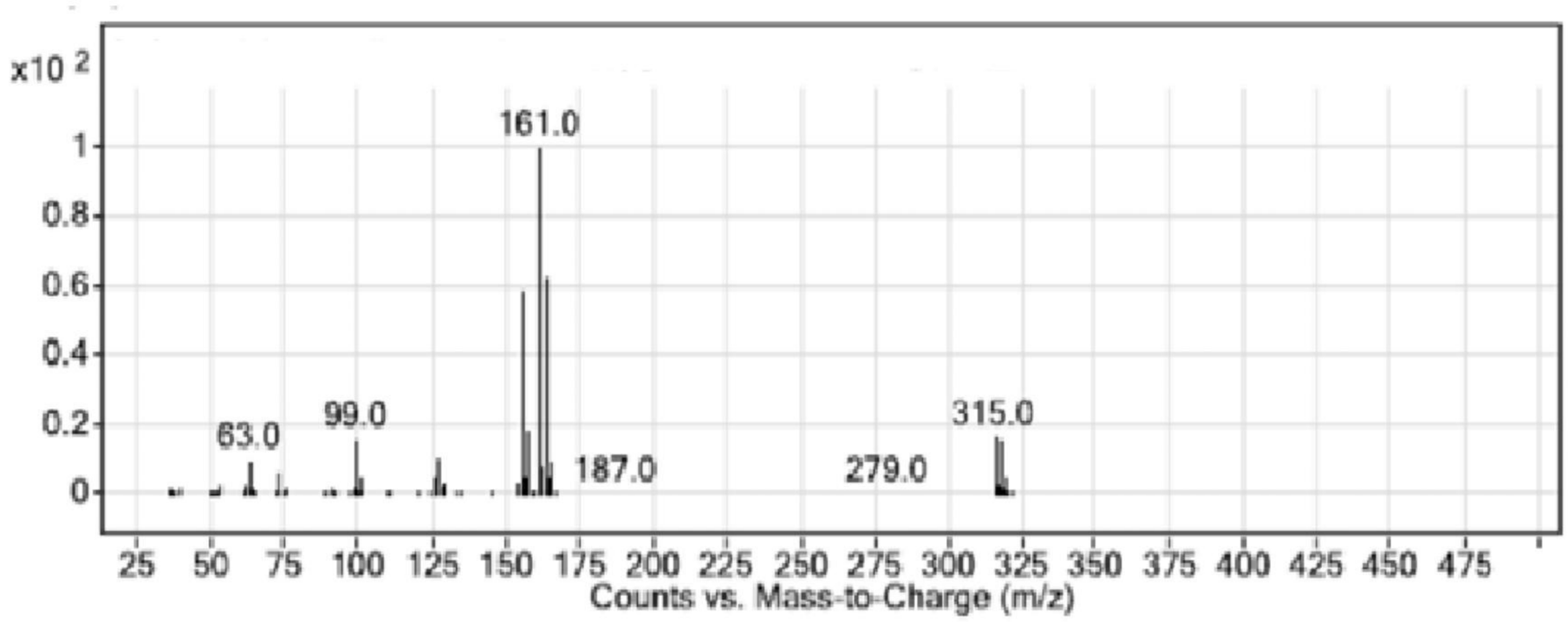
ภาพที่ 18 ตำแหน่งของคาร์บอนใน ^{13}C spectrum (ppm) ของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide ใน DMSO ในช่วง 0-210 ppm



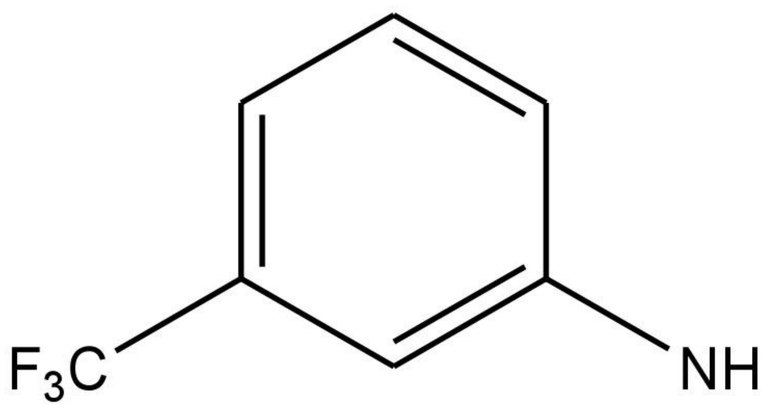
ภาพที่ 19 ตำแหน่งของ aromatic carbons ใน ^{13}C spectrum (ppm) ของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide ใน DMSO โดยขยายในช่วง 115-165 ppm

4.4. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย Mass spectrometer

จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเครื่อง Mass spectrometer ของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide ดังภาพที่ 20 พบ base peak ที่เป็นเอกลักษณ์ของสาร ที่ตำแหน่ง mass-to-charge (m/z) เท่ากับ 161.0 ซึ่งเป็น fragment ของโครงสร้างที่เสถียรที่สุด คือ (3-(trifluoromethyl)phenyl)- λ^2-azane ดังภาพที่ 21 โดยโครงสร้างดังกล่าวมีมวลโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับที่ตำแหน่งดังกล่าว คือ 161



ภาพที่ 20 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย Mass spectrometer ของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide



ภาพที่ 21 โครงสร้างของ (3-(trifluoromethyl)phenyl)-λ^2-azane

5. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี disc diffusion

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพโดยใช้เชื้อจำนวน 12 ชนิด 15 strains เป็นแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด 6 strains และแบคทีเรียแกรมลบ 9 ชนิด 9 strains ได้ผลดังตารางที่ 7 พบว่า สารที่สังเคราะห์ได้มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพจำนวน 4 ชนิด 7 strains ได้แก่ *S. aureus* จำนวน 4 strain เป็น MSSA 2 strain (ATCC 25923 และ ATCC 6538) และ MRSA 2 strain (ATCC 43300 และ DMST 20646), *L. monocytogenes*, *B. cereus* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งแสดง zone of inhibition ของแต่ละเชื้อดังภาพที่ 22-28 แต่ไม่มีฤทธิ์ในเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella Thyphimurium*, *E. aerogenes*, *Salmonella Enteritidis*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* และ *A. baumanii* โดยมีผลต้านเชื้อที่น่าสนใจ คือผลต่อเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin (MRSA) 2 strains (ATCC 43300 และ DMST 20646) ซึ่งสารให้ค่า zone of inhibition ที่ 23.78 mm และ 25 mm ตามลำดับ ซึ่งแสดงดังภาพที่ 24 และ 25

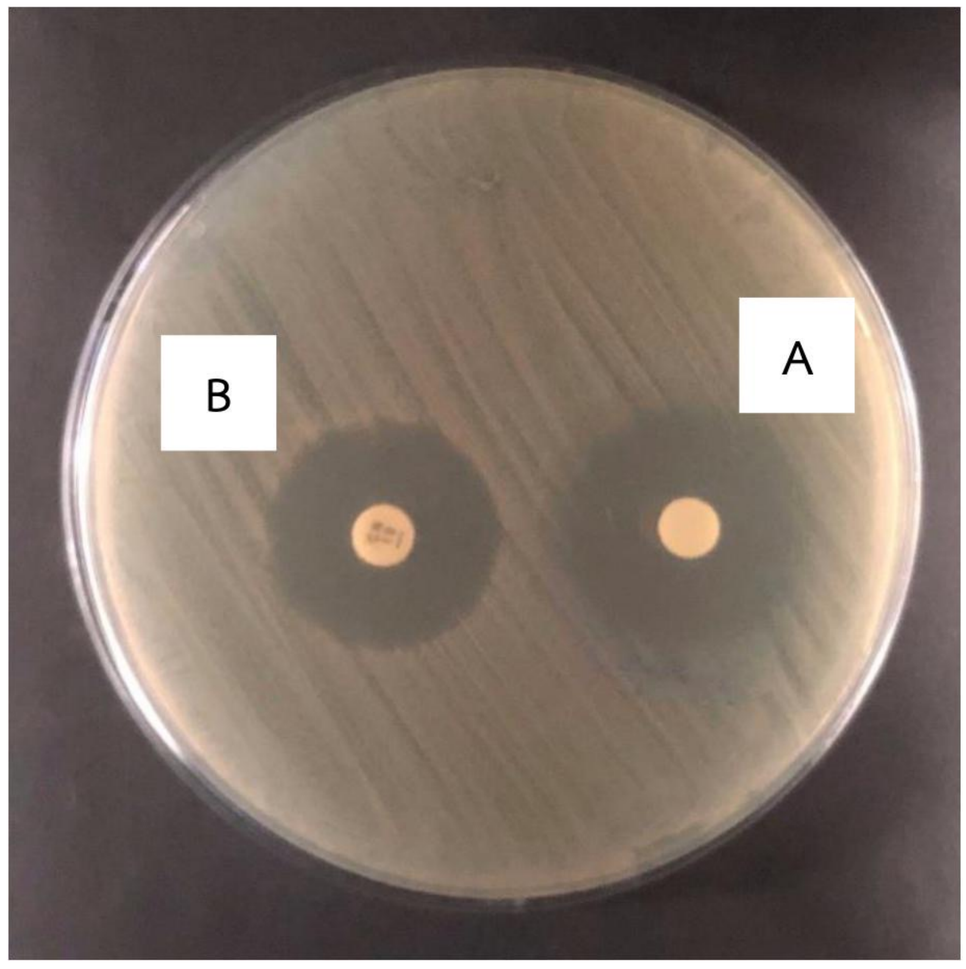
ตารางที่ 7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี disc diffusion

	average zone of inhibition (mm) ± SD
S. aureus ATCC 25923	25.33 ± 3.43 *
S. aureus ATCC 6538	30 ± 1.00 *
S. aureus ATCC 43300	23.78 ± 0.44 *
S. aureus DMST 20646	25 ± 0 *
L. monocytogenes DMST17303	30 ± 0 **
B. cereus TSTR 687	21.33 ± 1.63 **
V. parahaemolyticus DMST 5665	6.5 ± 0 **
E. coli ATCC 25922	0 ± 0 *
P. aeruginosa ATCC 27853	0 ± 0 *
Salmonella Thyphimurium ATCC13311	0 ± 0 *
E. aerogenes ATCC13048	0 ± 0 *
Salmonella Enteritidis DMST 15676	0 ± 0 *
K. pneumoniae	0 ± 0 *
P. mirabilis	0 ± 0 *
A. baumanii	0 ± 0 *

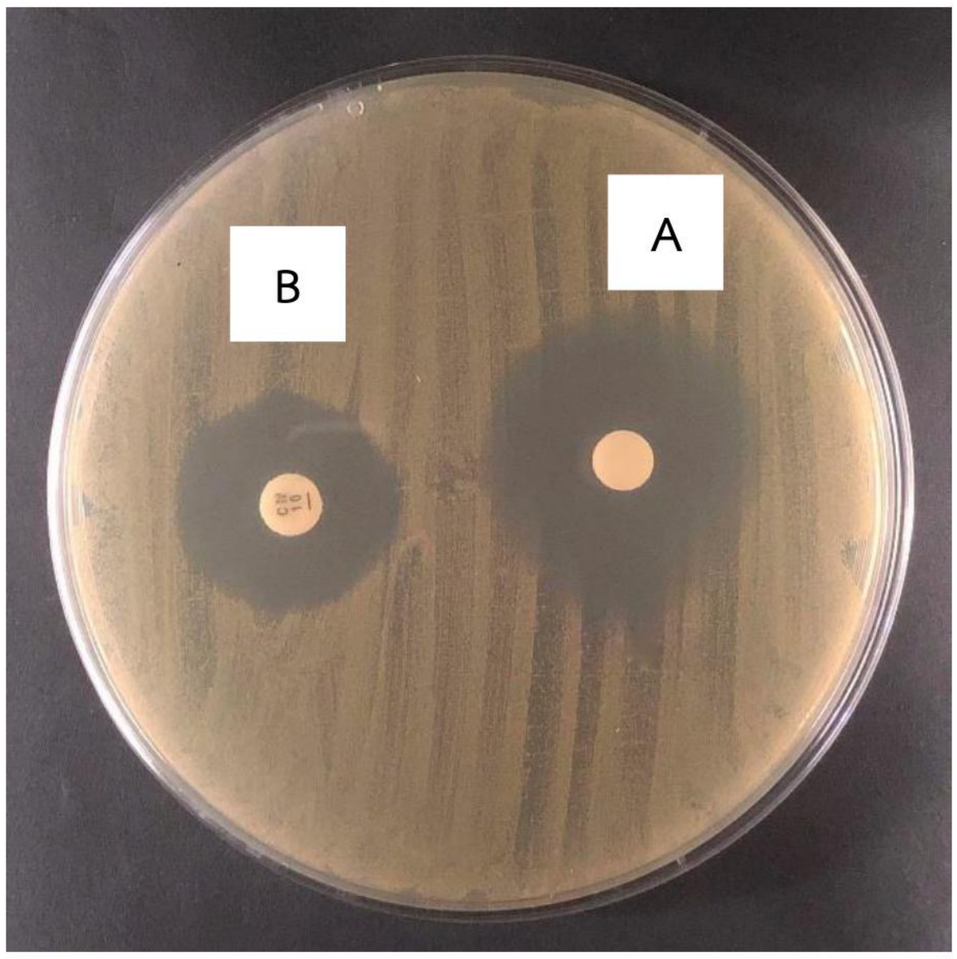
*n = 9

**n = 6

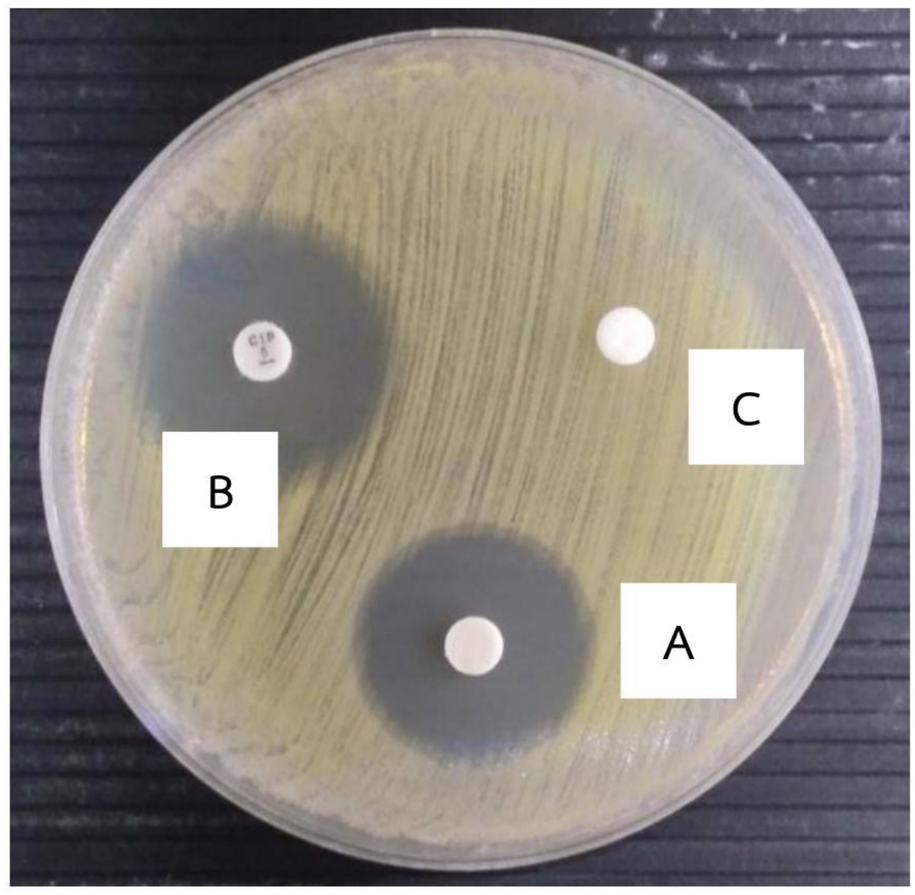
SD = Standard deviation



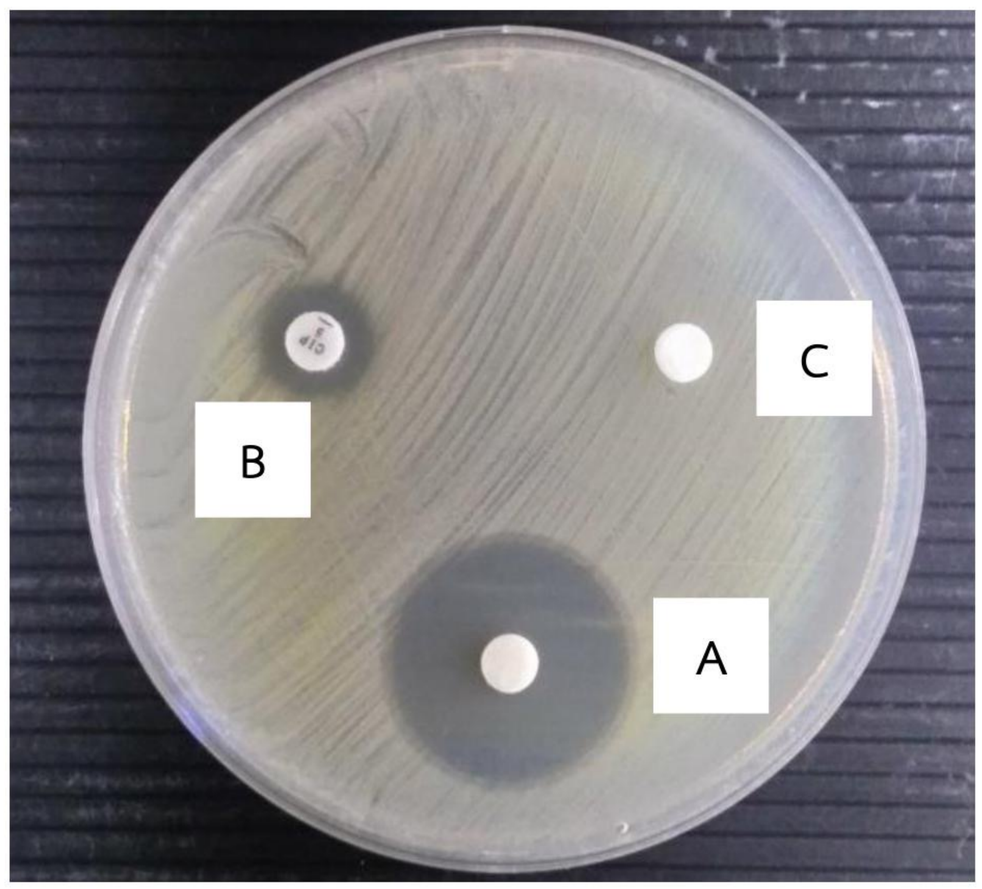
ภาพที่ 22 Zone of inhibition ของ *S. aureus* ATCC 25923 ระหว่าง 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide 20 µg/disc (A) และ gentamicin (CN) 10 µg/disc (B)



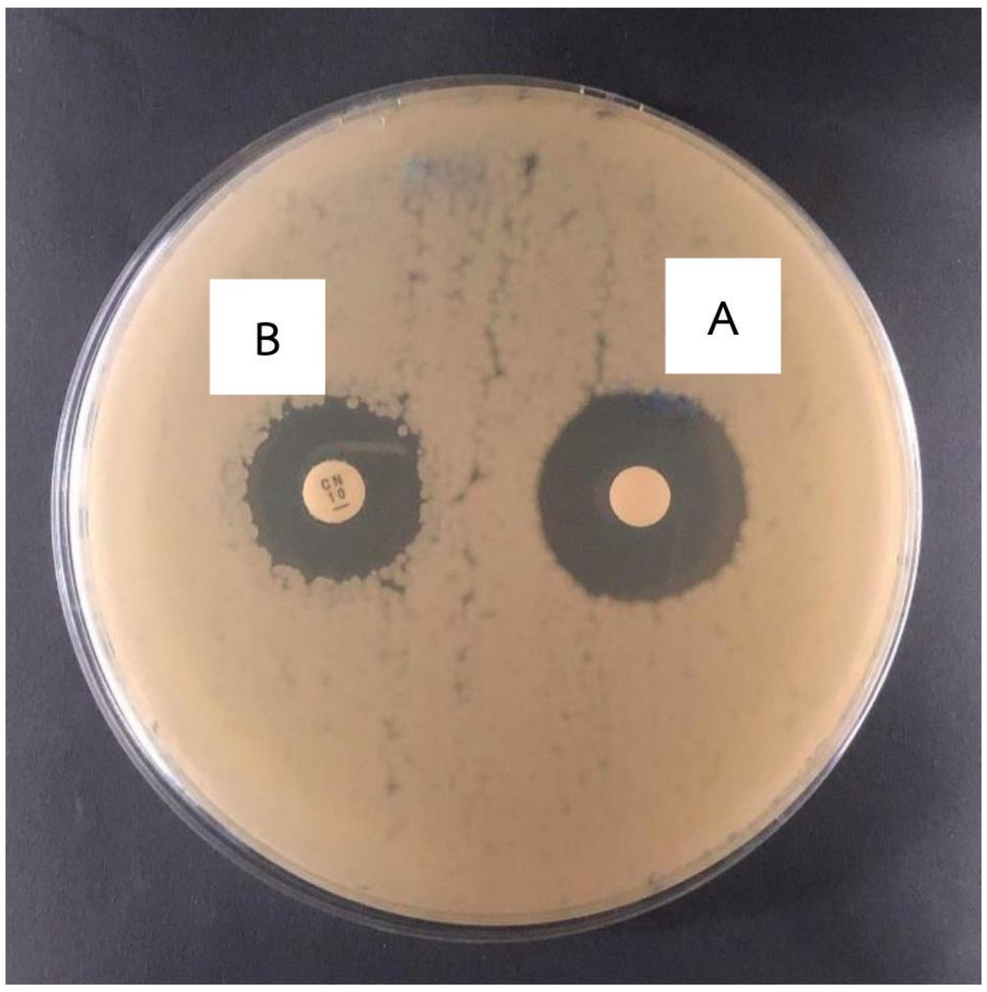
ภาพที่ 23 Zone of inhibition ของ *S. aureus* ATCC 6538 ระหว่าง 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide 20 µg/disc (A) และ gentamicin (CN) 10 µg/disc (B)



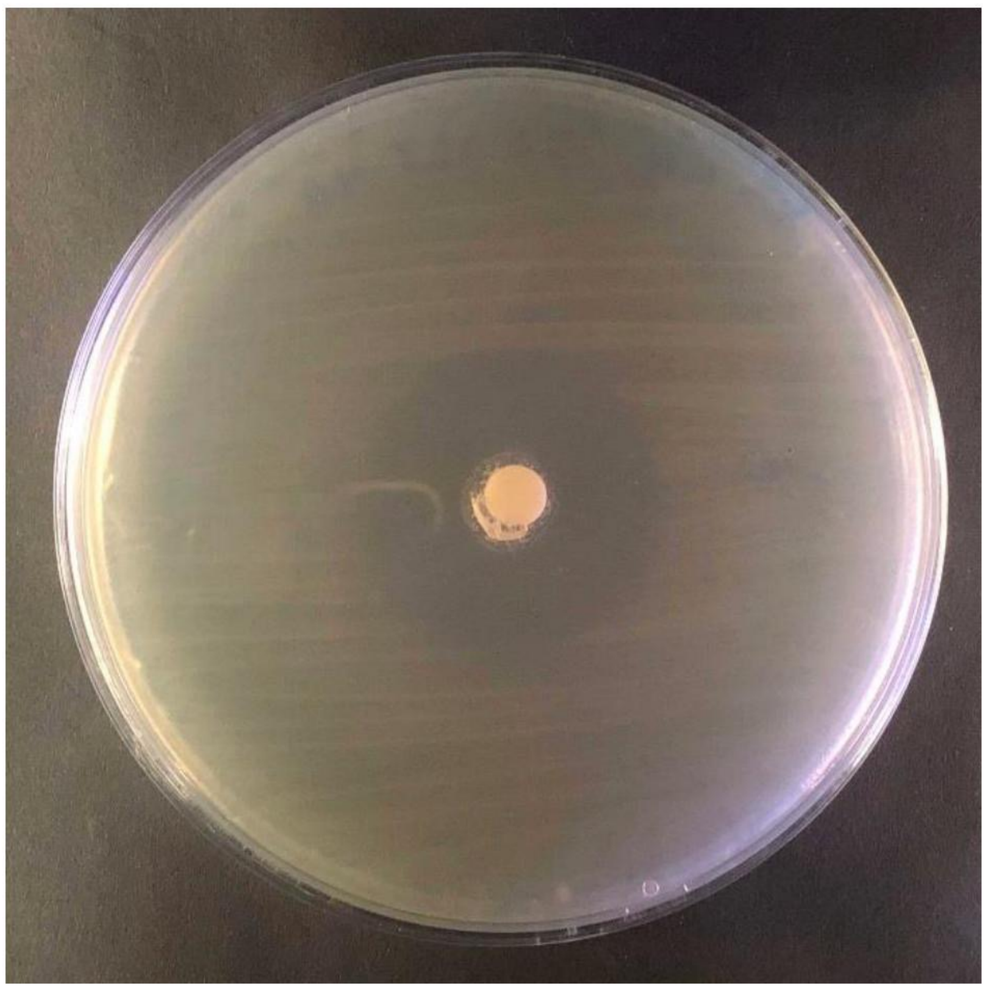
ภาพที่ 24 Zone of inhibition ของ *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) ของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide 20 µg/disc (A) โดยมี ciprofloxacin 5 µg/disc (B) เป็น positive control และ DMSO (C) เป็น negative control



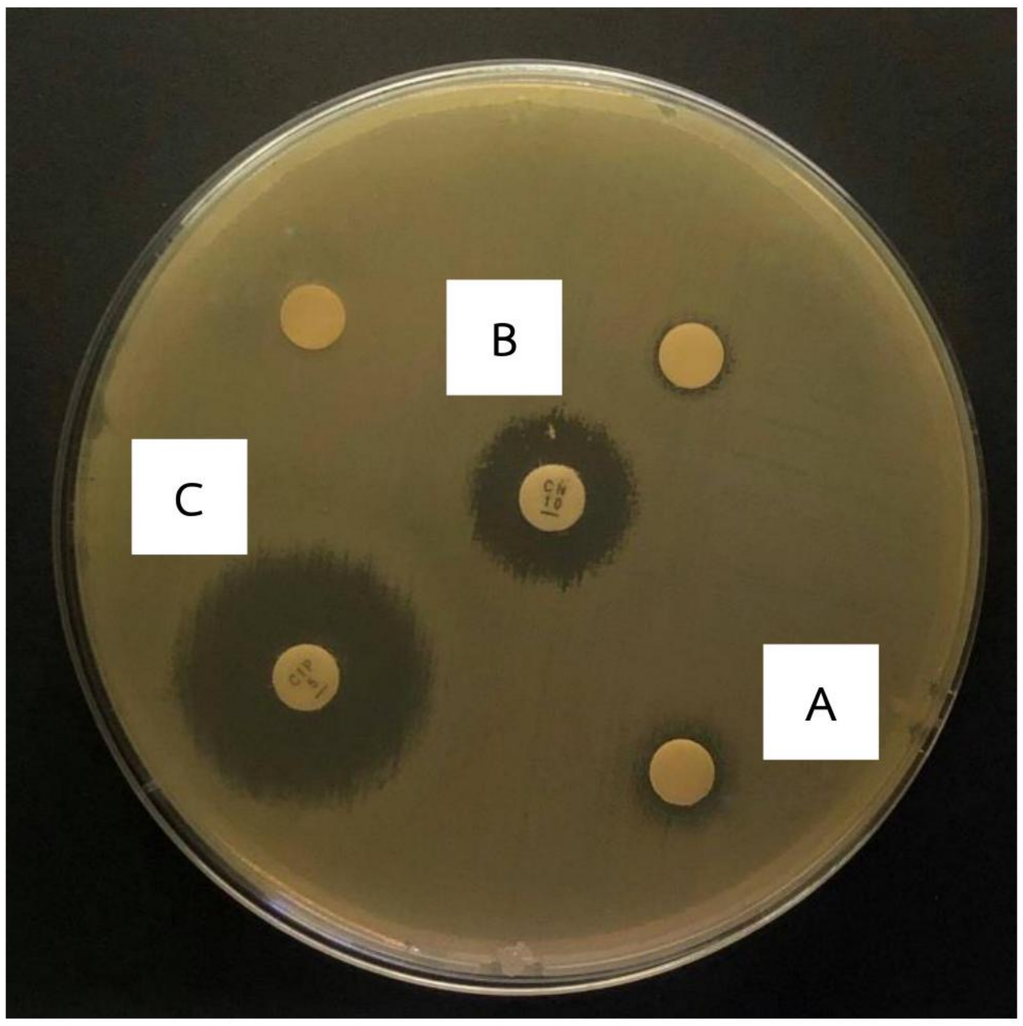
ภาพที่ 25 Zone of inhibition ของ *S. aureus* DMST 20646 (MRSA) ของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide 20 µg/disc (A) โดยมี ciprofloxacin 5 µg/disc (B) เป็น positive control และ DMSO (C) เป็น negative control



ภาพที่ 26 Zone of inhibition ของ *B. cereus* TSTR 687 ระหว่าง 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide 20 µg/disc (A) และ gentamicin (CN) 10 µg/disc (B)



ภาพที่ 27 Zone of inhibition ของ *L. monocytogenes* DMST 17303 ของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide 20 µg/disc



ภาพที่ 28 Zone of inhibition ของ *V. parahaemolyticus* DMST 5665 ระหว่าง 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide 20 µg/disc (A), gentamicin (CN) 10 µg/disc (B) และ ciprofloxacin 5 µg/disc (C)

6. ผลการทดสอบหาค่า Minimum Inhibition Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

จากผลการทำ disc diffusion method ซึ่งสารให้ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจำนวน 4 ชนิด จึงได้นำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ (Minimum Inhibition Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลชีพ (Minimum Bacterial Concentration; MBC) ของสารในเชื้อทั้ง 7 ชนิดนี้ ได้ผลดังตารางที่ 8 โดยใน *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 6538 ให้ MIC ที่ <0.125 µg/mL และ MBC ที่ 32 µg/mL ส่วน *S. aureus* ATCC 25913 และ *S. aureus* ATCC 43300 ให้ค่า MIC ที่ 0.5 µg/mL และ MBC ที่ 4 µg/mL ขณะที่ *S. aureus* DMST 20646 ให้ MIC ที่ 0.25 µg/mL และค่า MBC ที่ 8 µg/mL สำหรับเชื้อ *B. cereus* ให้ MIC ที่ 16 µg/mL และ MBC ที่ 32 µg/mL และ *V. parahaemolyticus* ให้ MIC ที่ 2 µg/mL และค่า MBC ที่ 32 µg/mL และ

ตารางที่ 8 ผล Minimum Inhibition Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

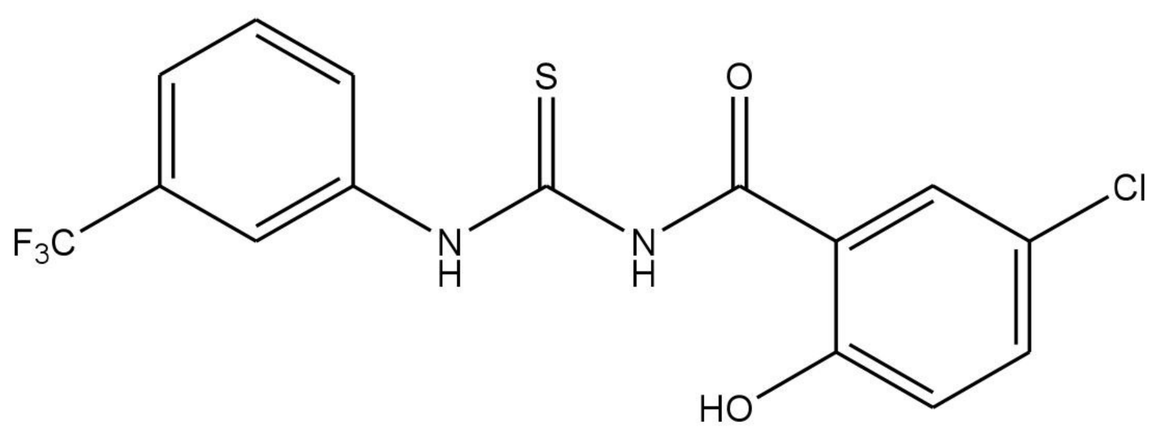
เชื้อจุลชีพ	MIC (µg/mL) ± SD (n=3)	MBC (µg/mL) ± SD (n=3)
S. aureus ATCC 25923	<0.125 ± 0	32 ± 0
S. aureus ATCC 6538	<0.125 ± 0	32 ± 0
S. aureus ATCC 25913	0.5 ± 0	4 ± 0
S. aureus (MRSA) ATCC 43300	0.5 ± 0	4 ± 0
S. aureus (MRSA) DMST 20646	0.25 ± 0	8 ± 0
B. cereus	16 ± 0	32 ± 0
V. parahaemolyticus	2 ± 0	32 ± 0

SD = Standard deviation

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ออกแบบยาต้านเชื้อจุลชีพโดยอาศัยอนุพันธ์กรดซาลิไซลิกทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ closantel, tetrachlorosalicylanilide, niclosamide และ oxyclozanide[21-22] เป็นต้นแบบในการออกแบบยา ซึ่งทั้ง 4 โครงสร้างนั้นมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียประเภทแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการปรับปรุงโครงสร้างของสารโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก amide เป็น thioureide จึงได้มาเป็น 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamo thioyl)benzamide ดังภาพที่ 29 โดยคาดหวังว่าสารที่ออกแบบจะมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้



ภาพที่ 29 โครงสร้างของ 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl) carbamothioyl)benzamide

จากนั้นนำโครงสร้างที่ออกแบบมาทำ molecular docking กับเอนไซม์ DNA gyrase ด้วยกระบวนการ computer-aided drug design ซึ่งให้ค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญ คือ binding energy เท่ากับ -5.36 และค่า predicted inhibition constant (IC_{50}) เท่ากับ 118.58 μM

จากนั้นจึงได้ทำการสังเคราะห์สารนี้ขึ้นมาโดยอาศัยปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2 ขั้นตอน ได้แก่ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ acid chloride และนำ acid chloride ที่เตรียมขึ้นได้ไป coupling กับ thiourea ได้เป็นสารประกอบ thioureide โดยสารที่สังเคราะห์ขึ้นได้มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว และมี %yield เท่ากับ 12.81 % และได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยวิธีการทาง spectroscopy ได้แก่ FT-IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR และ mass spectroscopy

จากนั้นนำสารสังเคราะห์ที่บริสุทธิ์แล้วมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี disc diffusion เพื่อ screen หาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพชนิดต่าง ๆ โดยใช้แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบชนิดต่าง ๆ พบว่าสาร 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-((3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamothioyl)benzamide มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียประเภทแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus*, *B. cereus* และ *L. monocytogenes* ส่วนแบคทีเรียแกรมลบนั้นให้ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพเฉพาะ *V. parahaemolyticus* อย่างไรก็ตามพบว่าในเชื้อแกรม

บวก *S. aureus* ที่ทำการทดสอบสารแสดงความจำเพาะเจาะจงกับการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพต่อ *S. aureus* ทั้งชนิด Methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA, ATCC 25923 และ ATCC 6538) และ Methicillin-resistance *S. aureus* (MRSA, ATCC 43300 และ DMST 20646) โดยมีค่า zone of inhibition ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* DMST 20646, *L. monocytogenes*, *B. cereus* และ *V. parahaemolyticus* คือ 25.33, 30, 23.78, 25, 30, 21.33 และ 6-7 mm ตามลำดับ

จากนั้นจึงได้ทดลองหาค่า Minimum Inhibition Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของสารในเชื้อที่ออกฤทธิ์นี้ ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25913, MRSA ATCC 43300, MRSA DMST 20646, *B. cereus* และ *V. parahaemolyticus* ได้ค่า MIC เท่ากับ <0.125, <0.125, 0.5, 0.5, 0.25, 16 และ 2 µg/mL ตามลำดับ และมีค่า MBC เท่ากับ 32, 32, 4, 4, 8, 32 และ 32 µg/mL ตามลำดับ

ซึ่งจากการที่สารแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ชนิด MRSA ซึ่งเป็น 1 ในเชื้อที่ได้ระบุให้อยู่ในความสำคัญระดับสูงโดย WHO ทำให้งานวิจัยครั้งนี้มีประโยชน์ในการนำไปพัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพที่มีโครงสร้างกลุ่มใหม่ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการดื้อยาและเพิ่มประสิทธิภาพของยาต้านเชื้อจุลชีพในอนาคตได้

ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้มีระยะเวลาในการศึกษาที่จำกัด และเนื่องจากปัญหาจากสังเคราะห์ ได้แก่ การที่ปฏิกิริยาที่ใช้ไม่เกิดปฏิกิริยากับสารตั้งต้น และต้องสั่งสารจากต่างประเทศ รวมทั้งการที่ต้องแยกสารหลายครั้งเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ ส่งผลให้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารที่สังเคราะห์ได้เกิดความล่าช้า

2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านฤทธิ์ของสารต่อเชื้อ MRSA ในสัตว์ทดลอง เพื่อดูประสิทธิภาพและความเป็นพิษของสารในระยะก่อนคลินิก

เอกสารอ้างอิง

1. ณัฐวุธ สิบหมู่. เภสัชวิทยา: เนื้อหาสำคัญและแบบฝึกหัด (pharmacology: principles and exercises). กรุงเทพมหานคร: โฮลิสติก พับลิชชิ่ง; 2559. p. 475-502.
2. Alos JI. Antibiotic resistance: A global crisis. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica. 2015;33(10):692-9.
3. World Health Organization. Antimicrobial Resistance Fact Sheet. 2016. 2016.
4. RoA Resistance. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations: Review on antimicrobial resistance; 2016.
5. Howell L, editor Global Risks 2013—Eight Edition. Internet] World Economic Forum, Cologny/Geneva, Switzerland; 2013.
6. Huttner A, Harbarth S, Carlet J, Cosgrove S, Goossens H, Holmes A, et al. Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. Antimicrobial resistance and infection control. 2013;2(1):31.
7. O'Neil J. Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations 2014.
8. World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for action Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2012.
9. Davies DS VE. WISH Antimicrobial Resistance Report 2013. Antimicrobial resistance: In search of a collaborative solution 2013 .Al Rayyan: World Innovation Summit for Health.
10. World Health Organization. Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. World Health Organization; 2017
11. World Health Organization. Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. World Health Organization; 2017
12. Whalen K. Lippincott Illustrated Reviews: Pharmacology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2015. p. 483-493, 522.
13. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th ed. McGraw-Hill Publishing Company; p. 2011. 1464-1466, 1468, 1477-1501, 1535-1540, 1542-1544.

14. Katzung BG, Trevor AJ. Basic and Clinical Pharmacology. 13th ed. New York: McGraw-Hill Publishing Company; 2015. 771-782, 809 p.
15. Bennett PN, Brown MJ. Clinical Pharmacology. 10th ed. Elsevier Health Sciences; 2009. p. 188-206.
16. Leggett JE. 143 - Aminoglycosides. In: Cohen J, Powderly WG, Opal SM, editors. Infectious Diseases (Fourth Edition): Elsevier; 2017. p. 1233-8.e1.
17. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev.. 2001 Jun 1;65(2):232-60.
18. Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. Journal of molecular biology. 2003;330(5):1005-14.
19. Hashisaki GT. Update on macrolide antibiotics. American Journal of Otolaryngology. 1995;16(3):153-7.
20. van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M-P, Glupczynski Y, Tulkens PM. 137 - Mechanisms of Action. In: Cohen J, Powderly WG, Opal SM, editors. Infectious Diseases (Fourth Edition): Elsevier; 2017. p. 1162-80.e1.
21. Hlasta DJ, Demers JP, Foleno BD, Fraga-Spano SA, Guan J, Hilliard JJ, et al. Novel inhibitors of bacterial two-component systems with gram positive antibacterial activity: Pharmacophore identification based on the screening hit closantel. Bioorganic Med Chem Lett. 1998;8(14):1923–8.
22. Rajamuthiah R, Fuchs BB, Conery AL, Kim W, Jayamani E, Kwon B, et al. Repurposing salicylanilide anthelmintic drugs to combat drug resistant Staphylococcus aureus. PLoS One. 2015;10(4):1–19.
23. Arslan H, Duran N, Borekci G, Ozer CK, Akbay C. Antimicrobial activity of some thiourea derivatives and their nickel and copper complexes. Molecules. 2009;14(1):519–27.
24. Halim ANA, Ngaini Z. Synthesis and bacteriostatic activities of bis(Thiourea) derivatives with variable Chain Length. Journal of Chemistry. 2016;2016.

25. Vieira CS, Moreira OC, Batista KKS, Ratcliffe NA, Castro DP, Azambuja P. The NF- κB inhibitor, IMD-0354, affects immune gene expression, bacterial microbiota and Trypanosoma cruzi infection in Rhodnius prolixus midgut. Frontiers in Physiology. 2018;9(AUG):1–11.
26. Rowley BC, Fussell SJ, Lickiss PD, Pugh D, Santhakumar G, Braddock DC, et al. Tetramethyl Orthosilicate (TMOS) as a Reagent for Direct Amidation of Carboxylic Acids. Org Lett. 2018;20(4):950–3.
27. 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. J Org Chem. 2015;80(9):4532–44.
28. Lanigan RM, Starkov P, Sheppard TD. Direct synthesis of amides from carboxylic acids and amines using $B(OCH_2CF_3)_3$. J Org Chem. 2013;78(9):4512–23.
29. Chung S, Uccello D, Choi H, Montgomery J, Chen J. Trimethylaluminium-Facilitated Direct Amidation of Carboxylic Acids. Synlett. 2011 Sep 3;2011(14):2072–4.
30. Huang Z, Reilly J, Buckle R. An Efficient Synthesis of Amides and Esters via Triacyloxyboranes. Synlett. 2007 Apr;2007(7):1026–30.
31. Ferrer N. Forensic Science, Applications of IR Spectroscopy. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry [Online]. 1999 [cited 2019 March 19]:603–15. doi:10.1006/rwsp.2000.0100
32. Synchrotron Light Research Institute. Light transportation 4.1: IR Spectroscopy and Imaging [Online]. n.d. [cited 2019 March 19]. Available from: https://www.slri.or.th/th/beamline/bl41.html
33. Essential FTIR. The Fast Fourier Transform (FFT) applied to FTIR Data [Online]. n.d. [cited 2019 March 19]. Available from: https://www.essentialftir.com/fftTutorial.html
34. Mellon FA. MASS SPECTROMETRY | Principles and Instrumentation. In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Elsevier; 2003. p. 3739–49.
35. Diehl B. Principles in NMR Spectroscopy. In: NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis. Elsevier; 2008. p. 1–41.
36. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Clin Infect Dis. 2009 Dec;49(11):1749–55.

37. Hoseinzadeh E, Makhdoumi P, Taha P, Hossini H, Pirsaheb M, Omid Rastegar S, et al. A review of available techniques for determination of nano-antimicrobials activity. Toxin Reviews. 2017;36(1):18–32.