

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin-layer chromatography, TLC)
- 2) โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (Column chromatography, CC)
- 3) เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) ยี่ห้อ Buchi รุ่น R-124
- 4) เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Melting Point) ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-565
- 5) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น CP324S
- 6) เครื่องทำสุญญากาศ (Vacuum pump) ยี่ห้อ PHYWE รุ่น DOA-V130-BN
- 7) เครื่องกวนสารชนิดแม่เหล็กพร้อมให้ความร้อน (Hotplates Magnetic Stirrer) ยี่ห้อ IKA รุ่น C-MAG HS 7
- 8) เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer; NMR) ยี่ห้อ BRUKER รุ่น Avance 400
- 9) เครื่องดูดกลืนรังสีอินฟราเรด (Infrared spectrometer; FTIR) ยี่ห้อ BRUKER รุ่น ALPHA
- 10) เครื่องส่อง UV
- 11) ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์
- 12) ถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม
- 13) เครื่องไมโครเพลท ริดเดอร์

3.2 สารเคมี

- 1) กรด 3-คลอโรเปอร์เบนโซอิก (3-Chloroperbenzoic acid, *m*-CPBA), Analytical grade, ALDRICH
- 2) โพแทสเซียมคาร์บอเนต (Potassium carbonate, K_2CO_3), Reagent grade, MERCK
- 3) เอ็น เอ็น-ไดเมทิลฟอร์มามิด (N,N-Dimethylformamide, C_3H_7NO) (Reagent grade, DAEJUNG)
- 4) คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต เพนตะไฮเดรต (Copper (II) sulfate pentahydrate, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Reagent grade, DAEJUNG
- 5) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, CH_2Cl_2) (Analytical grade, RCI Labscan)
- 6) โพรพาร์กิล โบรไมด์ (Propargyl bromide, C_3H_3Br), Reagent grade, TCI
- 7) เอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate, $C_4H_8O_2$), Commercial grade, Zenpoint
- 8) เฮกเซน (Hexane, C_6H_{14}), Commercial grade, Zenpoint
- 9) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) Analytical grade, Ajax Finechem
- 10) โซเดียมเอไซด์ (Sodium azide, NaN_3), Laboratory grade, LABCHEM

- 11) โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl), Laboratory grade, UNILAB
- 12) โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (Sodium hydrogen carbonate, NaHCO₃), Laboratory grade, UNILAB
- 13) โซเดียม แอสคอร์เบต (Sodium ascorbate, C₆H₇NaO₆), Reagent grade, TCI
- 14) ซิลิกา เจล 60 (Silica gel 60), MERCK
- 15) เบนซิล โบรไมด์ (Benzyl bromide, C₆H₅CH₂Br), Reagent grade, Alfa Aesar
- 16) แอลฟา-โบรโม-พารา-ไซลีน (α -Bromo-*p*-xylene, C₈H₉Br), Reagent grade, TCI
- 17) 1-โบรโมบิวเทน (1-Bromobutane, CH₃(CH₂)₃Br), Reagent grade, FLUKA
- 18) 1-โบรโมออกเทน (1-Bromooctane, CH₃(CH₂)₇Br), Reagent grade, TCI
- 19) 2-ฟลูออโรเบนซิล โบรไมด์ (2-Fluorobenzyl bromide, C₇H₆BrF), Reagent grade, TCI
- 20) 3-ฟลูออโรเบนซิล โบรไมด์ (3-Fluorobenzyl bromide, C₇H₆BrF), Reagent grade, TCI
- 21) 4-โบรโมเบนซิล โบรไมด์ (4-Bromobenzyl bromide, C₇H₆Br₂), Reagent grade, TCI
- 22) 4-ฟลูออโรเบนซิล โบรไมด์ (4-Fluorobenzyl bromide, C₇H₆BrF), Reagent grade, TCI
- 23) 4-ไนโตรเบนซิล โบรไมด์ (4-Nitrobenzyl bromide, C₇H₆BrNO₂), Reagent grade, TCI
- 24) 4-คลอโรเบนซิล โบรไมด์ (4-Chlorobenzyl bromide, C₇H₆BrCl), Reagent grade, TCI
- 25) 4-เมทอกซีเบนซิล โบรไมด์ (4-Methoxybenzyl bromide, CH₂BrC₆H₄OCH₃), Reagent grade, TCI
- 26) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide), Reagent grade, DAEJUNG
- 27) เซลล์มะเร็ง cholangiocarcinoma ชนิด KKU-213, KKU-055, KKU-214, KKU-100 เซลล์ MMNK-1
- 28) MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

3.3 แหล่งที่มาของตัวอย่างเปลือกไม้ใหญ่

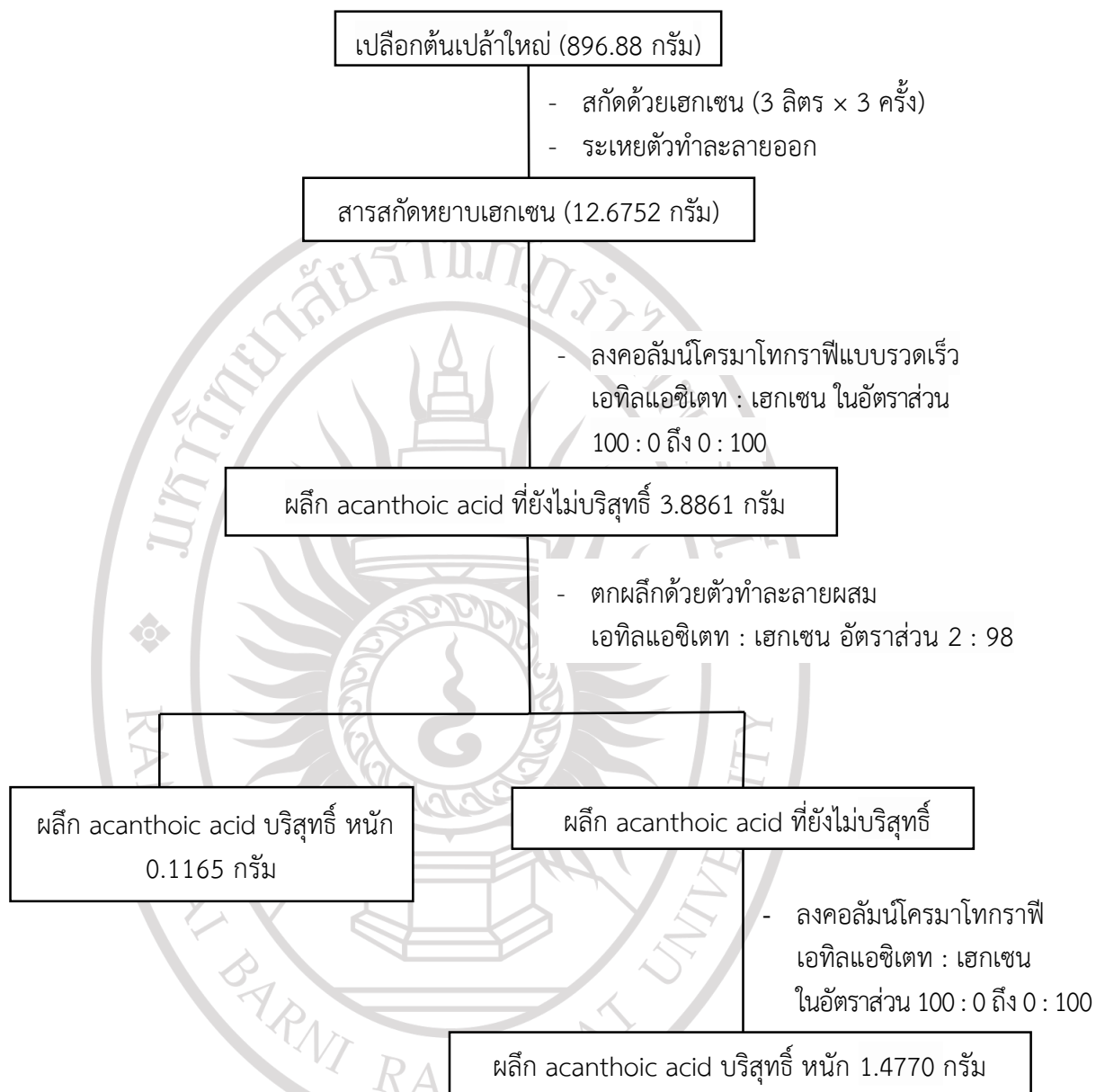
เก็บตัวอย่างเปลือกต้นเปลือกไม้ใหญ่ในเขตอำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี เมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม 2558 เวลา 10.39 นาที โดยมีน้ำหนัก 896.88 กรัม อยู่ในพิภพที่ 194° ใต้ อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี 13° เหนือ 31' 26" 99° ตะวันออก 14' 33"

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1) การสกัดสาร acanthoic acid จากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่

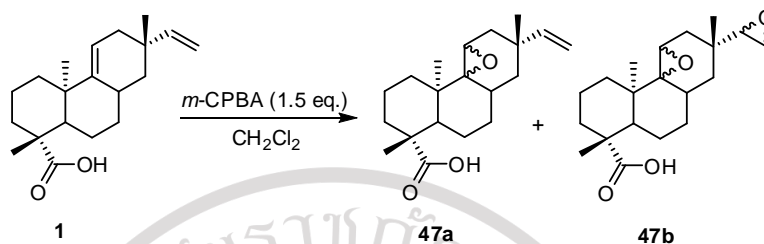
นำเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่ปริมาณ 896.88 กรัม ในอำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ครั้งละ 3 ลิตร โดยสกัดซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง นำสารละลายที่ได้มากรอง และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนจะได้สารสกัดหยาบเฮกเซนมีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลเหลือง และนำมาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (quick column chromatography) บนซิลิกาเจล (silica gel) โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสม เอทิลเอซิเตท : เฮกเซน ในอัตราส่วน 100 : 0 ถึง 0 : 100 ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วย Thin-layer chromatography (TLC) นำสารสกัดที่ได้ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน มาตกผลึก acanthoic acid ที่ยังไม่บริสุทธิ์ปริมาณ 3.8861 กรัม ด้วยเอทิลเอซิเตท : เฮกเซน อัตราส่วน 2 : 98 จะได้สาร acanthoic acid บริสุทธิ์ปริมาณ 0.1165 กรัม จากนั้นนำสาร acanthoic acid ที่ยังไม่บริสุทธิ์จากการตกผลึกมาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสม เอทิลเอซิเตท : เฮกเซน ในอัตราส่วน 100 : 0 ถึง 0 : 100 ได้สาร acanthoic acid บริสุทธิ์ปริมาณ 1.4770 กรัม ดังภาพที่ 3.1 คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 0.178 จากนั้นตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี และหาจุดหลอมเหลว

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



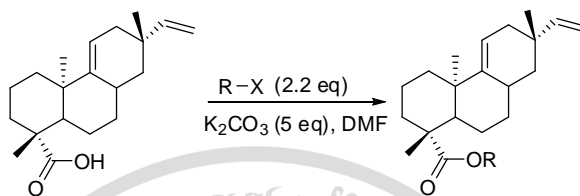
ภาพที่ 3.1 การสกัดแยกสาร acanthoic acid จากเปลือกต้นกล้วย

3.4.2) การสังเคราะห์อนุพันธ์ epoxy acanthoic acid ด้วยปฏิกิริยา epoxidation



ซึ่งสาร acanthoic acid หนัก 2004.50 มิลลิกรัม (6.62 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลม จากนั้นละลายด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ปริมาตร 20.00 มิลลิลิตร กวนด้วยเครื่องกวนสารชนิดแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิห้อง เติม 3-chloroperbenzoic acid (*m*-CPBA) หนัก 1732.20 มิลลิกรัม (10.04 มิลลิโมล) ตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC ด้วยระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน (30% EtOAc/hexane) จนเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตอิ่มตัว (NaHCO_3 sat.) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต (EtOAc) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ล้างสารละลายชั้นเอทิลอะซิเตต (EtOAc) ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง และสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคลอไรด์ (NaCl sat.) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายชั้นเอทิลอะซิเตต มาดูดความชื้นด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ (Na_2SO_4 anh.) และกรองสารละลายที่ได้ใส่ขวดก้นกลมนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ (crude product) ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) ด้วยระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน และนำผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบสุญญากาศ และทำให้แห้งด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) ได้ผลิตภัณฑ์ **27a** หนัก 17.00 มิลลิกรัม ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 11 และ **27b** หนัก 651.40 มิลลิกรัม ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 29 ลักษณะของแข็งสีขาว มีค่า R_f 0.49 และ 0.33 ตามลำดับ (ในระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน) และมีจุดหลอมเหลว 94-95 และ 131-133 องศา-เซลเซียส ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR-spectroscopy และ IR-spectroscopy

3.4.3) การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ alkyl acanthoate 48a-k ด้วยปฏิกิริยา Esterification



วิธีการเตรียมทั่วไป A

ซึ่งสาร acanthoic acid 0.33 มิลลิโมล ใส่ขวดก้นกลม จากนั้นละลายสาร acanthoic acid ด้วยตัวทำละลาย *N,N*-dimethylformamide (DMF) ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร กวนด้วยเครื่องกวนสารชนิดแม่เหล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เติม potassium carbonate (K_2CO_3) 0.5159-1.6555 มิลลิโมล เติม alkyl halide 0.7278-4.6253 มิลลิโมล ตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC ด้วยระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน จนเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์อิ่มตัว (NH_4Cl sat.) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ล้างสารละลายชั้นเอทิลอะซิเตตด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง และสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายชั้นเอทิลอะซิเตต มาดูความเข้มข้นด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ และกรองสารละลายที่ได้ใส่ขวดก้นกลมจากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ (crude product) ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ด้วยระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน และนำผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ และทำให้แห้งด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ ได้ผลิตภัณฑ์ 29a-c ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR-spectroscopy และ IR-spectroscopy

1) 2-Propynyl acanthoate 48a

เตรียมตามวิธีทั่วไป A โดยซึ่ง acanthoic acid 100.30 กรัม (0.33 มิลลิโมล) potassium carbonate (K_2CO_3) 228.50 กรัม (1.65 มิลลิโมล) และ propargyl Bromide 0.05 มิลลิลิตร (0.73 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1.30 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ 48a ของแข็งสีขาว 89.10 มิลลิกรัม ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 79 จุดหลอมเหลว 43-44 องศาเซลเซียส และ R_f 0.62 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

2) Butyl acanthoate 48b

เตรียมตามวิธีทั่วไป A โดยซึ่ง acanthoic acid 101.00 มิลลิกรัม (0.33 มิลลิโมล) potassium carbonate (K_2CO_3) 228.70 (1.65 มิลลิโมล) และ 1-bromobutane 0.50 มิลลิลิตร (4.63 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 2.00 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไป

ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **48b** ของเหลวหนืดใส 47.10 มิลลิกรัม ร้อยละผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 40 และ R_f 0.69 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

3) Octyl acanthoate **48c**

เตรียมตามวิธีทั่วไป A โดยชั่ง acanthoic acid 100.80 มิลลิกรัม (0.33 มิลลิโมล) potassium carbonate (K_2CO_3) 228.80 มิลลิกรัม (1.65 มิลลิโมล) และ 1-bromooctane 0.13 มิลลิลิตร (4.63 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1.00 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **48c** ของเหลวหนืดใส 106.40 มิลลิกรัม ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 77 และ R_f 0.68 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

4) Benzyl acanthoate **48d**

เตรียมตามวิธีทั่วไป A โดยชั่ง acanthoic acid 100.80 มิลลิกรัม (0.33 มิลลิโมล) potassium carbonate (K_2CO_3) 228.70 มิลลิกรัม (1.65 มิลลิโมล) และ benzyl bromide 0.087 มิลลิลิตร (0.73 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1.00 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **48d** ของเหลวหนืดใส 92.20 มิลลิกรัม ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 70 และ R_f 0.58 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

5) 4-Nitrobenzyl acanthoate **48e**

เตรียมตามวิธีทั่วไป A โดยชั่ง acanthoic acid 100.90 มิลลิกรัม (0.33 มิลลิโมล) potassium carbonate (K_2CO_3) 229.00 มิลลิกรัม (1.65 มิลลิโมล) และ 4-nitrobenzyl bromide 157.80 มิลลิกรัม (0.73 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1.00 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **48e** ของเหลวหนืดใส 34.50 มิลลิกรัม ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 24 และ R_f 0.39 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

6) 4-Methylbenzyl acanthoate **48f**

เตรียมตามวิธีทั่วไป A โดยชั่ง acanthoic acid 100.30 มิลลิกรัม (0.33 มิลลิโมล) potassium carbonate (K_2CO_3) 229.60 มิลลิกรัม (1.65 มิลลิโมล) และ α -bromo-*p*-xylene 137.80 มิลลิกรัม (0.74 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 0.50 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **48f** ของเหลวหนืดใส 132.40

มิลลิกกรัม ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 98 และ R_f 0.63 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

7) 4-Methoxybenzyl acanthoate **48g**

เตรียมตามวิธีทั่วไป A โดยชั่ง acanthoic acid 102.20 มิลลิกกรัม (0.34 มิลลิโมล) potassium carbonate (K_2CO_3) 228.50 มิลลิกกรัม (1.65 มิลลิโมล) และ 4-methoxybenzyl chloride 0.10 มิลลิลิตร (0.73 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1.50 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **48g** ของเหลวหนืดใส 108.20 มิลลิกกรัม ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 76 และ R_f 0.53 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

8) 2-Fluorobenzyl acanthoate **48h**

เตรียมตามวิธีทั่วไป A โดยชั่ง acanthoic acid 101.00 มิลลิกกรัม (0.33 มิลลิโมล) potassium carbonate (K_2CO_3) 228.90 มิลลิกกรัม (1.65 มิลลิโมล) และ 2-fluorobenzyl bromide 0.087 มิลลิลิตร (0.73 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 0.50 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **48h** ของเหลวหนืดใส 103.00 มิลลิกกรัม ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 75 และ R_f 0.61 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

9) 3-Fluorobenzyl acanthoate **48i**

เตรียมตามวิธีทั่วไป A โดยชั่ง acanthoic acid 100.50 มิลลิกกรัม (0.33 มิลลิโมล) potassium carbonate (K_2CO_3) 228.80 มิลลิกกรัม (1.65 มิลลิโมล) และ 3-fluorobenzyl bromide 0.09 มิลลิลิตร (0.73 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 15.00 นาที สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **48i** ของเหลวหนืดใส 106.40 มิลลิกกรัม ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 78 และ R_f 0.62 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

10) 4-Fluorobenzyl acanthoate **48j**

เตรียมตามวิธีทั่วไป A โดยชั่ง acanthoic acid 101.00 มิลลิกกรัม (0.33 มิลลิโมล) potassium carbonate (K_2CO_3) 228.80 มิลลิกกรัม (1.65 มิลลิโมล) และ 4-fluorobenzyl bromide 0.09 มิลลิลิตร (0.73 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 15.00 นาที สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **48j** ของเหลวหนืดใส 98.70

มิลลิกรัม ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 72 และ R_f 0.60 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

11) 4-Chlorobenzyl acanthoate **48k**

เตรียมตามวิธีทั่วไป A โดยชั่ง acanthoic acid 100.90 มิลลิกรัม (0.33 มิลลิโมล) potassium carbonate (K_2CO_3) 228.90 มิลลิกรัม (1.65 มิลลิโมล) และ 4-chlorobenzyl bromide 149.6 มิลลิกรัม (0.73 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1.00 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **48k** ของเหลวหนืดใส 116.20 มิลลิกรัม ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 82 และ R_f 0.66 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

12) 4-Bromobenzyl acanthoate **48l**

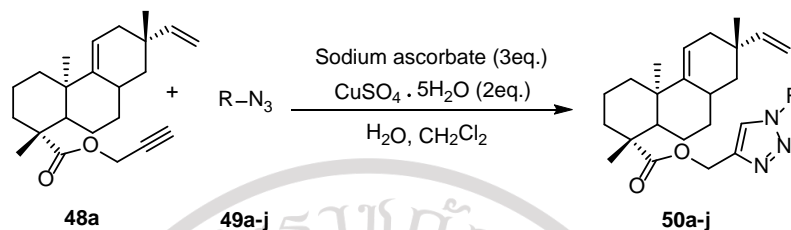
เตรียมตามวิธีทั่วไป A โดยชั่ง acanthoic acid 100.00 มิลลิกรัม (0.33 มิลลิโมล) potassium carbonate (K_2CO_3) 228.60 มิลลิกรัม (1.65 มิลลิโมล) และ 4-bromobenzyl bromide 149.6 มิลลิกรัม (0.73 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 0.50 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **48l** ของเหลวหนืดใส 153.10 มิลลิกรัม ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 98 และ R_f 0.61 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

13) 2-Allyl acanthoate **48m**

เตรียมตามวิธีทั่วไป A โดยชั่ง acanthoic acid 100.00 มิลลิกรัม (0.33 มิลลิโมล) potassium carbonate (K_2CO_3) 231.60 มิลลิกรัม (1.65 มิลลิโมล) และ allyl bromide 61.6 ไมโครลิตร (0.73 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1.00 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **48m** ของเหลวหนืดใส 68.50 มิลลิกรัม ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 61 และ R_f 0.60 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 10 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.4.4) การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ triazolyl acanthoic esters 51a-j



วิธีเตรียมทั่วไป C

ซึ่งสาร copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.15-0.15 มิลลิโมล ใส่ขวดก้นกลมขวดที่หนึ่ง ละลายด้วยน้ำกลั่น 1.00 มิลลิลิตร กวนด้วยเครื่องกวนสารชนิดแม่เหล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เติม sodium ascorbate ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$) จากนั้นนำอนุพันธ์ **48a** ใส่ขวดก้นกลมขวดที่สอง ละลายด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) 1.00 มิลลิลิตร และกวนด้วยเครื่องกวนสารชนิดแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer) ที่อุณหภูมิห้อง เติมแอลคิลเอไซด์ (alkyl azide, **49**) 2.98-5.79 มิลลิโมล จากนั้นนำสารละลายในขวดก้นกลมทั้งสองขวดผสมกัน ตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC ด้วยระบบตัวทำละลายผสมเอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน จนเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 30 มิลลิลิตร สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ล้างสารละลายชั้นเอทิลอะซิเตต ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง และล้างด้วยสารละลายอิมัลชันโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายชั้นเอทิลอะซิเตต มาดูความชื้นด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ และกรองสารละลายที่ได้ใส่ขวดก้นกลมจากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ (crude product) ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ด้วยระบบตัวทำละลายผสมเอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน และนำผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ และทำให้แห้งด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR-spectroscopy และ IR-spectroscopy

1) Octal triazolyl acanthoic ester **50a**

เตรียมตามวิธีทั่วไป C โดยซึ่ง copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 146.70 มิลลิกรัม (0.59 มิลลิโมล) sodium ascorbate ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$) 175.40 มิลลิกรัม (0.89 มิลลิโมล) 2-propynyl acanthoate **48a** 100.70 กรัม (0.89 มิลลิโมล) และ octal azide 0.09 มิลลิลิตร (0.58 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 0.30 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 20 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **50a** ของเหลวหนืดใส 100.00 มิลลิกรัม ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 80 และ R_f 0.22 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 20 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

2) Benzyl triazolyl acanthoic ester **50b**

เตรียมตามวิธีทั่วไป C โดยซัง copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 147.20 มิลลิกรัม (0.59 มิลลิโมล) sodium ascorbate ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$) 175.10 มิลลิกรัม (0.88 มิลลิโมล) 2-propynyl acanthoate **48a** 97.80 มิลลิกรัม (0.29 มิลลิโมล) และ benzyl azide 0.08 มิลลิลิตร (0.59 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1.00 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 20 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **50b** ของเหลวหนืดใส 121.40 มิลลิกรัม ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 88 และ R_f 0.22 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 20 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

3) 4-Methylbenzyl triazolyl acanthoic ester **50c**

เตรียมตามวิธีทั่วไป C โดยซัง copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 147.90 มิลลิกรัม (0.58 มิลลิโมล) sodium ascorbate ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$) 175.80 มิลลิกรัม (0.89 มิลลิโมล) 2-propynyl acanthoate **48a** 101.00 มิลลิกรัม (0.30 มิลลิโมล) 4-methylbenzyl azide 0.09 มิลลิลิตร (0.59 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 0.40 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 20 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **50c** ของเหลวหนืดใส 100.40 มิลลิกรัม ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 62 และ R_f 0.27 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 20 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

4) 4-Methoxybenzyl triazolyl acanthoic ester **50d**

เตรียมตามวิธีทั่วไป C โดยซัง copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 147.50 มิลลิกรัม (0.59 มิลลิโมล) sodium ascorbate ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$) 174.80 มิลลิกรัม (0.88 มิลลิโมล) 2-propynyl acanthoate **48a** 101.00 มิลลิกรัม (0.29 มิลลิโมล) และ 4-methoxybenzyl azide 0.10 มิลลิลิตร (0.59 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 0.30 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **50d** ของเหลวหนืดใส 122.40 มิลลิกรัม ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 83 และ R_f 0.49 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

5) 2-Fluorobenzyl triazolyl acanthoic ester **50e**

เตรียมตามวิธีทั่วไป C โดยซัง copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 147.60 มิลลิกรัม (0.59 มิลลิโมล) sodium ascorbate ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$) 175.50 มิลลิกรัม (0.89 มิลลิโมล) 2-propynyl acanthoate **48a** 92.70 มิลลิกรัม (0.27 มิลลิโมล) และ 2-fluorobenzyl azide 0.09 มิลลิลิตร (0.59 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 0.30 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบ

ตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **50d** ของเหลวหนืดใส 122.40 กรัม ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 89 และ R_f 0.27 ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน

6) 3-Fluorobenzyl triazolyl acanthoic ester **50f**

เตรียมตามวิธีทั่วไป C โดยซัง copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 146.60 มิลลิกรัม (0.59 มิลลิโมล) sodium ascorbate ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$) 178.70 มิลลิกรัม (0.90 มิลลิโมล) 2-propynyl acanthoate **48a** 97.80 มิลลิกรัม (0.2874 มิลลิโมล) และ 3-fluorobenzyl azide 0.09 มิลลิลิตร (0.59 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 15.00 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 20 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **50f** ของเหลวหนืดใส 117.80 กรัม ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 83 และ R_f 0.27 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 20 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซนเอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

7) 4-Fluorobenzyl triazolyl acanthoic ester **50g**

เตรียมตามวิธีทั่วไป C โดยซัง copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 146.70 มิลลิกรัม (0.5876 มิลลิโมล) sodium ascorbate ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$) 175.1000 มิลลิกรัม (0.8839 มิลลิโมล) 2-propynyl acanthoate **48a** 101.20 มิลลิกรัม (0.30 มิลลิโมล) และ 4-fluorobenzyl azide 0.09 มิลลิลิตร (0.59 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1.00 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **50g** ของเหลวหนืดใส 111.80 มิลลิกรัม ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 77 และ R_f 0.33 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

8) 4-Chlorobenzyl triazolyl acanthoic ester **50h**

เตรียมตามวิธีทั่วไป C โดยซัง copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 147.60 มิลลิกรัม (0.59 มิลลิโมล) sodium ascorbate ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$) 174.70 มิลลิกรัม (0.88 มิลลิโมล) 2-propynyl acanthoate **48a** 999.70 มิลลิกรัม (0.29 มิลลิโมล) และ 4-chlorobenzyl azide 0.10 มิลลิลิตร (0.59 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 18.00 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **50g** ของเหลวหนืดใส 122.40 มิลลิกรัม ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 82 และ R_f 0.44 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

9) 4-Bromobenzyl triazolyl acanthoic ester **50i**

เตรียมตามวิธีทั่วไป C โดยซัง copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 147.50 มิลลิกรัม (0.5908 มิลลิโมล) sodium ascorbate ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$) 175.7000

มิลลิกรัม (0.89 มิลลิโมล) 2-propynyl acanthoate **48a** 100.90 มิลลิกรัม (0.30 มิลลิโมล) และ 4-bromobenzyl azide 0.12 มิลลิลิตร (0.59 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 0.30 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบ ตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **50i** ของเหลวหนืดใส 111.00 มิลลิกรัม ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 68 และ R_f 0.40 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

10) 4-Nitrobenzyl triazolyl acanthoic ester **50j**

เตรียมตามวิธีทั่วไป C โดยซิง copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 149.50 มิลลิกรัม (0.60 มิลลิโมล) sodium ascorbate ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$) 177.40 มิลลิกรัม (0.90 มิลลิโมล) 2-propynyl acanthoate **48a** 97.00 มิลลิกรัม (0.29 มิลลิโมล) และ 4-nitrobenzyl azide 0.10 มิลลิลิตร (0.59 มิลลิโมล) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 0.30 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบ ตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน ได้ผลิตภัณฑ์ **50j** ของเหลวหนืดใส 124.30 มิลลิกรัม ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 84 และ R_f 0.22 (ระบบตัวทำละลายผสมร้อยละ 30 เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน)

3.4.5) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ได้รับความอนุเคราะห์ในการทดสอบจาก Prof. Dr. Seiji Okada มหาวิทยาลัย Kumamoto ประเทศญี่ปุ่น โดยมะเร็งที่ใช้ทดสอบคือ มะเร็งท่อน้ำดี ชนิด KKU-213 KKU-055 KKU-214 และ KKU-100 และใช้เซลล์ปกติ เป็นเซลล์ตับ ชนิด MMNK-1 โดยใช้วิธี MTT assay โดยทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติดังกล่าวจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงต่อในภาชนะหลอดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมให้ได้ความหนาแน่น 2500 เซลล์/หลุม และบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง เติมนสารสังเคราะห์ที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ถูกเติมลงในเซลล์และบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 48 ชั่วโมง และนำไปทดสอบด้วยวิธี MTT assay

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี