



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง “การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านการอักเสบของอนุพันธ์  
ฟลูออโรไตรเอริลมีเทน”

Synthesis and Anti-Inflammatory Evaluation of  
Fluorinated Triarylmethane Derivatives

โดย

ผศ.ดร. จเร จรัสจรรยาพงศ์

และ

รศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง “การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านการอักเสบของอนุพันธ์  
ฟลูออโรไตรเอริลมีเทน”

Synthesis and Anti-Inflammatory Evaluation of  
Fluorinated Triarylmethane Derivatives

โดย

ผศ.ดร. จเร จรัสจรรยาพงศ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการสังเคราะห์สารประกอบไตรเอริลมีเทนที่มีฟลูออรีนอยู่ในโมเลกุล ได้แก่ สาร JJAF1-7 JJBF1-12 และ JJBF15 ด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ 1) ปฏิกิริยาของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบแบบขั้นตอนเดียว ได้แก่ 1,2,4-trimethoxybenzene หรือ 2-methylfuran หรือ benzaldehyde หรือ 4-fluorobenzaldehyde และ tert-butylcarbamate จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ สาร tert-butyl diarylmethyl carbamate ทำปฏิกิริยาแทนที่โดยใช้ indole หรือ 6-fluoroindole เป็นนิวคลีโอไฟล์ ได้สาร JJAF1-3 2) ปฏิกิริยาของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบแบบขั้นตอนเดียว โดยใช้ indole หรือ 6-fluoroindole และ benzaldehyde หรือ 4-fluorobenzaldehyde และ N,N-dimethylaniline เป็นสารตั้งต้นภายใต้สภาวะที่มี  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  10 โมล% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้สาร JJAF4-6 3) ปฏิกิริยาระหว่าง 6-fluoroindole กับ methyl orthoformate ภายใต้สภาวะที่มี  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  10 โมล% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้สาร JJAF7 และ 4) ปฏิกิริยา Friedel-Crafts ของ 1,3,5-, 1,2,4- และ 1,2,3-trimethoxybenzene กับ benzaldehyde ชนิดต่างๆ ที่มีฟลูออรีนแทนที่บนวงเบนซีน ภายใต้สภาวะที่มีไอโอดีนหรือ  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  10 โมล% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้สาร JJBF1-12 และ JJBF15. สารประกอบไตรเอริลมีเทนที่มีฟลูออรีนในโครงสร้างที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 20 ชนิด ได้นำไปศึกษาความสามารถในการต้านอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจภายใต้ภาวะกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) จากการศึกษาพบว่าสารประกอบไตรเอริลมีเทนที่มีฟลูออรีนในโครงสร้างไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ ยกเว้น สาร JJAF1-7 และ JJBF3 นอกจากนี้ในงานวิจัยพบว่าสารสังเคราะห์ 5 ชนิด ได้แก่ JJBF9, JJBF10, JJBF11, JJBF12 และ JJBF15 แสดงความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าอะมิโนควานินตินซึ่งใช้เป็นยาต้านอักเสบในปัจจุบัน โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $18.8 \pm 0.9$ ,  $14.2 \pm 0.7$ ,  $6.98 \pm 0.47$ ,  $9.65 \pm 0.73$  และ  $10.6 \pm 0.9$  ไมโครโมล ตามลำดับ จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสารไตรเอริลมีเทนที่มีฟลูออรีนในโครงสร้าง 5 ชนิด ได้แก่ JJBF9, JJBF10, JJBF11, JJBF12 และ JJBF15 น่าจะมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นสารต้านการอักเสบชนิดใหม่ในอนาคต

**คำสำคัญ :** สารอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบ, ฟลูออโรไตรเอริลมีเทน,ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

## ABSTRACT

The aim of this research is the synthesis of fluorinated triarylmethanes, **JJAF1-7**, **JJBF1-12** and **JJBF15**, from different procedures i.e. 1) one-pot, three-component aza-Friedel-Crafts reaction of 1,2,4-trimethoxybenzene or 2-methylfuran with benzaldehyde or 4-fluorobenzaldehyde and tert-butylcarbamate followed by the nucleophilic substitution of the resulting tert-butyl diarylmethyl carbamate with indole or 6-fluoroindole leading to **JJAF1-3** 2) one-pot, three component reaction of indole or 6-fluoroindole, benzaldehyde or 4-fluorobenzaldehyde and N,N-dimethylaniline in the presence of Bi(OTf)<sub>3</sub> 10 mol% as catalyst to afford **JJAF4-6** 3) reaction of 6-fluoroindole with methyl orthoformate using Bi(OTf)<sub>3</sub> 10 mol% as catalyst to give **JJAF7** and 4) Friedel-Crafts reaction of 1,3,5-, 1,2,4- and 1,2,3-trimethoxybenzene with benzaldehyde containing fluorine substituent on the benzene ring using I<sub>2</sub> or Bi(OTf)<sub>3</sub> 10 mol% as catalyst, leading to **JJBF1-12** and **JJBF15**. The twenty newly synthesized fluorinated triarylmethane derivatives were investigated for their anti-inflammatory ability in lipopolysaccharide (LPS)-activated RAW 264.7 macrophages. All of the tested fluorinated triarylmethanes did not show significant cytotoxic effect against macrophage cells, except for compounds **JJAF1-7** and **JJBF3**. Among them, five compounds (**JJBF9**, **JJBF10**, **JJBF11**, **JJBF12** and **JJBF15**) showed significant NO inhibitory effect better than aminoguanidine, an iNOS inhibitor with, the IC<sub>50</sub> values of 18.8 ± 0.9, 14.2 ± 0.7, 6.98±0.47, 9.65±0.73 and 10.6 ± 0.9 μM, respectively. The results showed that the fluorinated triarylmethane derivatives, compounds **JJBF9**, **JJBF10**, **JJBF11**, **JJBF12** and **JJBF15** might be potentially useful for future development of a novel agent for the treatment of inflammation-associated diseases.

**Keywords:** Organic fluorine Compounds, Fluorotriarylmethane, Anti-Inflammatory Activity

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 66/2559

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ สุดท้ายขอขอบคุณ นางสาวชญามน จันทนา นางสาวจุฬารัตน์ ไม้หอม นางสาวนันทน์ภัส ชุมศรี นางสาวกรรณิการ์ ละอองทอง และนางสาว วิภาดา ศิริตันหยง สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
กิตติกรรมประกาศ	3
บทที่ 1 บทนำ	5
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	5
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	9
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	9
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	9
1.5 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	11
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	24
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	26
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	36
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	59
บรรณานุกรม	60
ผลผลิตของโครงการวิจัย (Output)	64

# บทที่ 1

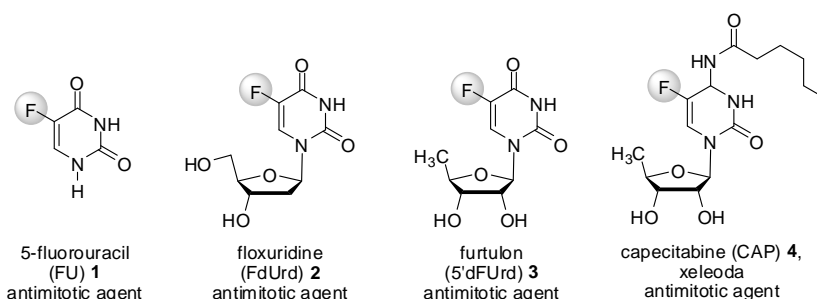
## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สารอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบ (organic fluorine compounds) เป็นสารอินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและมีการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากการศึกษาพบว่ายาที่มีขายในปัจจุบันมียาที่เป็นสารอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบมากกว่าร้อยละ 20 (Isanbor, C. & O'Hagan, D., 2006, O'Hagan, D., 2010) และส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟลูออรีนที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นมา สำหรับตัวอย่างของสารอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ทางยาแบ่งตามกลุ่มการออกฤทธิ์แสดงได้ดังนี้

- 1) สารอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ในปัจจุบันสารประกอบฟลูออรีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบ่งตัวของเซลล์ (antimitotic agents) และต้านการเกิดเนื้องอก (antitumor agents) ที่ใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งมีมากมายหลายชนิด (Cozzi et al., 2004) ที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ 5-fluoropyrimidines เช่น 5-fluorouracil (5-FU) **1**, 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FdUrd) **2**, และอนุพันธ์ **3-4** ที่เป็น prodrug โดย prodrug เหล่านี้สามารถเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ออกฤทธิ์ได้ภายในเซลล์ (Danenberg, P V., 2004)

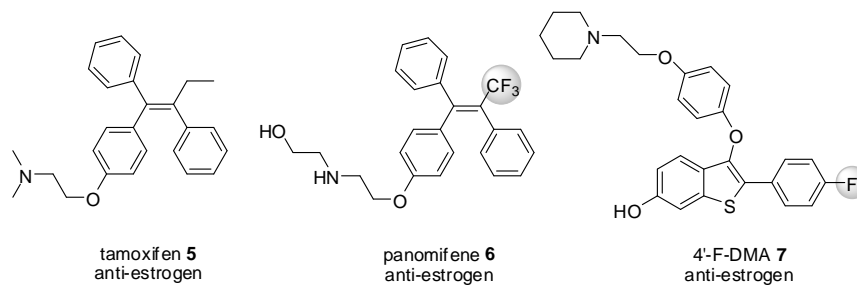


ยา 5-FU ในปัจจุบันสามารถใช้รักษาโรคมะเร็งผิวหนัง มะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้ได้ อย่างไรก็ตาม การให้ยา 5-FU ต้องทำโดยการฉีดเข้าเส้นเลือดดำ อีกทั้งยา 5-FU ทำให้เกิดอาการข้างเคียง (side effect) ต่อระบบประสาทและหัวใจได้ ต่อมาจึงได้พัฒนายาที่เป็น Prodrug ของ 5-FU ซึ่งสามารถได้รับยาโดยทานเข้าไปได้ เช่น furtulon **3** และ capecitabine **4** และลดปัญหาของการเกิดผลข้างเคียงจากการได้รับยาอีกด้วย

- 2) สารอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอสโตรเจน (anti-estrogens)

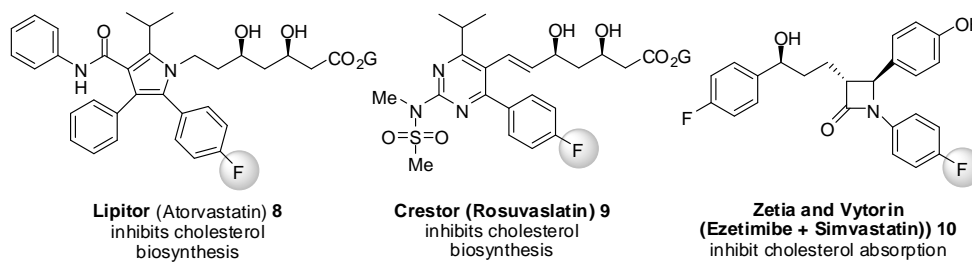
ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอสโตรเจน (anti-estrogens) เป็นยาที่ปรับระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกาย ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านม (Santen et al., 1999) ยาที่ใช้ยับยั้งเอสโตรเจนที่ไม่ได้เป็นกลุ่ม สเตียรอยด์ หรือ NSAID ที่รู้จักกันดี ได้แก่ ยา Tamoxifen (nolvadex) **5** ซึ่งเป็นสารประกอบ

triphenylethylene แม้ว่ายาชนิดนี้สามารถให้ผลดีในการรักษาโรคมะเร็งเต้านม แต่ก็มีผลข้างเคียงทำให้เยื่อบุผนังมดลูกหนาตัวผิดปกติ ต่อมาได้มีการพัฒนายา Panomifene (EGIS-5656, GYKI-13504) **6** ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบออลคีนที่มีหมู่แทนที่ 4 หมู่ โดยหมู่แทนที่หมู่หนึ่งเป็นหมู่ CF<sub>3</sub> พบว่ายาชนิดนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอสโตรเจนที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคมะเร็งเต้านมได้ดีกว่ายา Tamoxifen **5** และมีผลข้างเคียงลดลง (Konno et al., 2004) เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการพัฒนายากลุ่มฟลูออโรอีทิลชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอสโตรเจน ได้แก่ ยา 4'-F-DMA **7** ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ benzothiophene ที่มีหมู่ fluorophenyl ที่ตำแหน่งที่ 2



### 3) สารอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบที่ใช้เป็นยาลดไขมัน

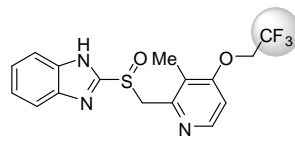
ยากลุ่ม statin เป็นยาที่รักษาไขมันในเลือดสูง โดยการยับยั้งสารบางอย่างในร่างกายที่จำเป็นต่อการสร้างไขมัน cholesterol นอกจากนี้ยากลุ่มนี้ยังป้องกันคราบไขมันที่เกาะกับผนังหลอดเลือด ทำให้ป้องกันการเกิดเส้นเลือดอุดตันได้ ตัวอย่างของยากลุ่มนี้ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบ เช่น Lipitor (atorvastatin) **8** Crestor (Rosuvastatin) **9** นอกจากนี้ยังมียา Zetia and Vytorin **10** ที่เป็นยารักษาโรคไขมันในเลือดสูงแต่มีกลไกแตกต่างกัน โดยยา Zetia and Vytorin **10** จะมีหน้าที่ไปยับยั้งการดูดซึม cholesterol (O'Hagan, D., 2010)



### 4) สารอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบที่ใช้เป็นยาลดกรดในกระเพาะอาหาร (antacids)

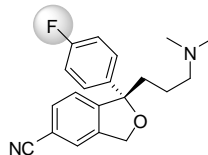
ยาที่ใช้รักษาโรคกระเพาะอาหารอักเสบ (Anti Peptic Ulcer agent) มี 2 ประเภท ได้แก่ ยาลดกรด (antacids) และยาลดการสร้างกรด สำหรับยาที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบที่มีฤทธิ์เป็นยาลดกรด (antacids) จะช่วยรักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ส่วนต้น และป้องกันไม่ให้เกิดการระคายเคืองกระเพาะอาหารจากยาต่างๆ เช่น Prevacids (Lansoprazole) **11** (O'Hagan, D., 2010)





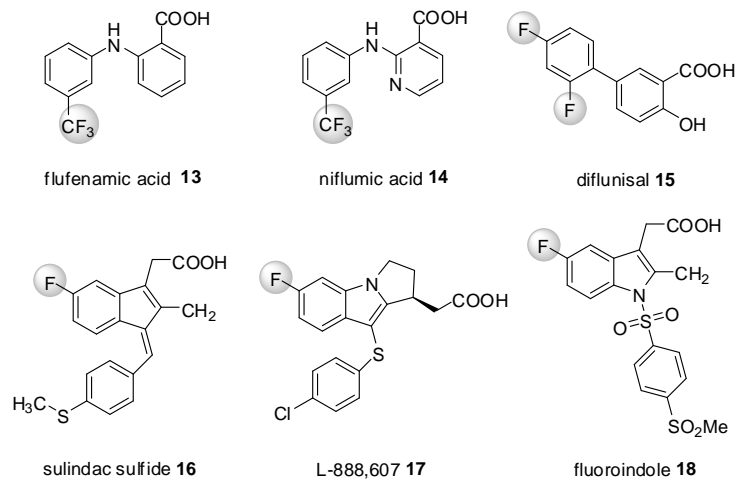
**Prevacid (Lansoprazole) 11**  
antacid/stomach ulcers

5) สารอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบที่ใช้เป็นยารักษาโรคซึมเศร้า (antidepressants) ยารักษาอาการซึมเศร้า (antidepressants) เป็นยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยที่มีอาการซึมเศร้าที่เกิดจากสาเหตุภายในร่างกาย (endogenous) ซึ่งเกิดขึ้นเองในจิตใจของบุคคลโดยไม่ทราบสาเหตุ ในผู้ป่วยบางรายที่อาการหนักอาจคิดฆ่าตัวตายได้ ในปัจจุบันยาที่ใช้รักษาอาการซึมเศร้าที่ได้ผลดีชนิดหนึ่งได้แก่ **Laxapro** (Ciprexal, Escitalopram) **12** (O'Hagan, D., 2010) ซึ่งจัดเป็นสารประกอบฟลูออรีน

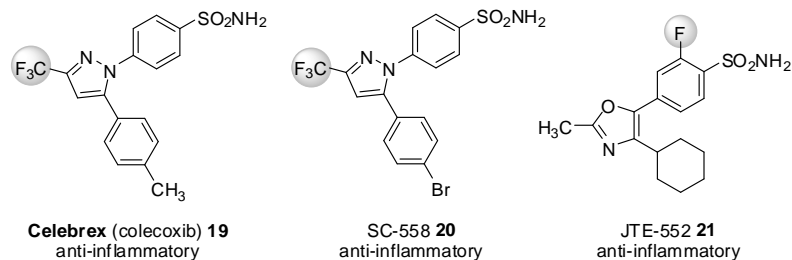


**Laxapro (Ciprexal, Escitalopram) 12**  
Depression/anxiety

6) สารอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบที่ใช้เป็นยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) การอักเสบ (inflammation) ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในร่างกาย และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมาเร็ง โรคไขข้อเสื่อม โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (Septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคเบาหวาน โรคกระเพาะและลำไส้ อักเสบ เป็นต้น ยาต้านการอักเสบ แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ ยาต้านการอักเสบกลุ่มที่เป็นสเตียรอยด์ ซึ่งยากลุ่มนี้อาจส่งผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายได้ ยาต้านการอักเสบอีกกลุ่มหนึ่งเป็นสารที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ ซึ่งรวมทั้งยาต้านการอักเสบที่ในโครงสร้างมีอะตอมฟลูออรีนเป็น ตัวอย่าง เช่น flufenamic acid **13** niflumic acid **14** diflunisal **15** sulindac sulfide **16** L-888,607 **17** และ fluorindole **18** ซึ่งสารกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเอนไซม์ cyclo-oxygenases (Armer et al., 2005)



เอนไซม์ cyclooxygenase (COX) มี 2 ไอโซฟอร์ม คือ COX-1 ซึ่งมีการแสดงออกเป็นประจำเพื่อผลิตโพรสตาแกลนดินเพื่อควบคุมระบบหลอดเลือดและป้องกันเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารและอีกไอโซฟอร์ม คือ COX-2 เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้ากลุ่มเดียวกับ iNOS ทำให้เกิดการหลั่งของโพรสตาแกลนดิน E2 ในปริมาณมากและเกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Katzung, 2001) ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่กลุ่มสเตียรอยด์ NASIDs โดยทั่วไป เช่น indomethacin และ aspirin จะยับยั้งทั้ง COX-1 และ COX-2 ซึ่งการยับยั้ง COX-1 จะทำให้เกิดผลข้างเคียงคือทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร ดังนั้นงานวิจัยในปัจจุบันได้พัฒนาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่กลุ่มสเตียรอยด์ที่ให้ผลยับยั้งต่อ COX-2 อย่างเฉพาะเจาะจง ตัวอย่างเช่น Celebrex (colecobix) 19 SC-558 20 และ JTE-522 21



จนถึงปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเพราะเหตุใดสารที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบส่งผลให้ฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้น แต่จากงานวิจัยการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบออกาโนฟลูออรีนกับโปรตีนด้วยเทคนิค X-ray crystallography พบว่า สารอินทรีย์ที่มีพันธะ C-F จะเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนแล้วทำให้มีเสถียรภาพเพิ่มขึ้น (Paulini et al., 2005, Olsen et al. 2004) ซึ่งอาจทำให้ยาที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบสามารถเข้าไปจับกับ active site ได้ดีขึ้น

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าสารประกอบอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบมีการพัฒนาเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคต่างๆ อย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาเป็นยาต้านการอักเสบกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์สารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ต้องใช้การสังเคราะห์หลายขั้นตอน หรือต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีราคาแพงและใช้สภาวะการทดลองที่รุนแรง งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์สารประกอบฟลูออโรโรโตรเอริลมีเทนโดยใช้วิธีการที่ง่าย ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีราคาถูกและเป็น

มิตรต่อสิ่งแวดล้อม ทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง และนำสารฟลูออโรไตรเอริลมีเทนที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบเพื่อหวังว่าจะค้นพบสารประกอบฟลูออโรกลุ่มใหม่ที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่สามารถสังเคราะห์ได้ง่าย ในปริมาณมาก มีฤทธิ์ที่ดีกว่าสารที่ใช้อยู่ในปัจจุบันและไม่มีผลข้างเคียงเพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์สารฟลูออโรไตรเอริลมีเทนที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ศึกษาผลของหมู่ฟลูออโรและหมู่ฟังก์ชันชนิดต่างๆบนโครงสร้างไตรเอริลมีเทนเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบสูงสุดนำไปศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุล และเพื่อสร้างและพัฒนานิสิตระดับปริญญาตรีและปริญญาโทให้เป็นนักวิจัยรุ่นใหม่

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

### 1) การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารไตรฟลูออโรไตรเอริลมีเทน

สังเคราะห์อนุพันธ์ของสารไตรฟลูออโรไตรเอริลมีเทน จำนวนประมาณ 20 ชนิด โดยใช้สารตั้งต้นที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ ประเภทเฮทเทอโรอะโรมาติก ที่มีอะตอมฟลูออรีนปีนองค์ประกอบ เช่น 5-fluoroindole 6-fluoroindole หรือใช้สารประกอบอะโรมาติกอัลดีไฮด์ที่มีฟลูออรีนในโมเลกุลเป็นอิเล็กโตรไฟล์ ได้แก่ 2-fluorobenzaldehyde 3-fluorobenzaldehyde และ 4-fluorobenzaldehyde

### 2) วิเคราะห์ พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี

วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค High Resolution Mass Spectroscopy (HRMS) วิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Infrared Spectroscopy (IR) พิสูจน์เอกลักษณ์และยืนยันโครงสร้างสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) ทั้ง  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$

### 3) การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของฟลูออโรไตรเอริลมีเทน

นำสารฟลูออโรไตรเอริลมีเทนที่สังเคราะห์ได้จากหัวข้อ 1) มาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide ซึ่งเป็นการจำลองเหตุการณ์การอักเสบในหลอดทดลอง และนำตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงมาทดสอบการยับยั้งการผลิตโปรสตาแกลดิน E2 จากนั้นศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารที่มีฤทธิ์สูงที่สุดในการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบ

## 1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ไนตริกออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นจากเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) มีทั้งหมด 3 ไอโซฟอร์ม คือ neuronal nitric oxide synthase (nNOS) และ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ซึ่งมีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive isoforms) ผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณต่ำ และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) จะมีการแสดงออกของยีนเมื่อถูกกระตุ้นโดย

สิ่งเร้าต่างๆ มีการผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณมาก ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับตัวกันของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ในการกำจัดจุลชีพที่บุกรุกโดยเซลล์แมคโครฟาจ ไนตริกออกไซด์ที่สร้างในเซลล์แมคโครฟาจนี้ ถูกผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ cytokine endotoxin ของแบคทีเรีย หรือ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางของการอักเสบที่สำคัญที่ถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมคโครฟาจ ถึงแม้ว่าไนตริกออกไซด์จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพที่รุกรานร่างกายมนุษย์ แต่ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปจาก iNOS พบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดอาการของโรคต่างๆ เช่น โรคจากการอักเสบต่างๆ ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน และ ischemia/reperfusion injury

โพรสตาแกลนดิน เป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อหลอดเลือด ระบบประสาท และเซลล์ ในการตอบสนองต่อการอักเสบ ในการสังเคราะห์โพรสตาแกลนดินจาก arachidonic acid ถูกควบคุมโดยเอนไซม์หลักคือ cyclooxygenase (COX) เอนไซม์นี้มี 2 ไอโซฟอร์ม คือ COX-1 ซึ่งมีการแสดงออกเป็นประจำเพื่อผลิตโพรสตาแกลนดินเพื่อควบคุมระบบหลอดเลือดและป้องกันเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารและอีกไอโซฟอร์ม คือ COX-2 เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้ากลุ่มเดียวกับ iNOS ทำให้เกิดการหลั่งของโพรสตาแกลนดิน E2 ในปริมาณมากและเกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Katzung, 2001) มียาที่ให้ผลยับยั้งต่อ COX-2 อย่างเฉพาะเจาะจงถูกพัฒนาขึ้น และใช้ในการรักษาอาการอักเสบ (Dhikav, 2002) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบแน่ชัดต่อการตอบสนองต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ (Tunctan, 2003)

การอักเสบ เป็นปฏิกิริยาของร่างกาย ที่ทำการตอบโต้ ตอบสนอง หรือผ่อนคลายนความรุนแรงของอันตรายที่กำลังกระทำต่อร่างกาย การอักเสบ เป็นกระบวนการปกป้อง คุ้มครองตั้งแต่ระดับเซลล์ จนถึงชีวิตมนุษย์ การอักเสบมีสาเหตุจากการติดเชื้อ (infection) และสาเหตุที่ไม่ใช่การติดเชื้อ เช่น สารเคมี หรือปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น เมื่อมีอันตรายแบบใดๆ กระทำต่อร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันร่างกายที่ซับซ้อน จะทำการตอบสนองในขั้นแรก ด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เพื่อควบคุมลด จำกัดและทำลายสาเหตุก่อนการอักเสบในทันที รวมทั้งกำจัดเนื้อเยื่อที่เสียหาย หรือตายด้วย เรียกการตอบสนองเช่นนี้ว่า การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ คือ การขยายตัวของหลอดเลือด ทำให้เลือดมาเลี้ยงเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดทำให้เซลล์เม็ดเลือดออกนอกหลอดเลือดได้ และเซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนเข้าสู่เนื้อเยื่อที่เกิดภัยอันตราย ความเสียหายหรือผลจากการอักเสบเช่นนี้ ร่างกายมักจะซ่อมแซมจนหายได้ดี แทบไม่พบความผิดปกติของอวัยวะหรือการทำงานของระบบบกร่องรุนแรง แต่หากระบบภูมิคุ้มกัน ควบคุมสาเหตุก่อการอักเสบเฉียบพลันไม่ได้ดี ทำให้การทำลาย ลูกกลม รุกรานอย่างต่อเนื่องนานออกไปอีก ระบบภูมิคุ้มกันจะขยายผลการควบคุม เพิ่มประสิทธิภาพการทำลายสาเหตุก่อการอักเสบอีก เรียกภาวะเช่นนี้ว่า การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) สิ่งที่แตกต่างกันไปจากการอักเสบเฉียบพลันคือ เซลล์หรือเนื้อเยื่อถูกทำลายมากขึ้นและหาก

การควบคุมยังทำได้ไม่ดีจะทำให้เกิดความบกพร่องของระบบและเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคไขข้อเสื่อม โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน โรคเบาหวาน โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ

ในการอักเสบทั้งชนิดฉับพลันและเรื้อรัง จะมีการหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบหลายชนิด เช่น โพรสตาแกลนดิน E2 ไนตริกออกไซด์ และไซโตไคน์เป็นจำนวนมาก สารเหล่านี้จะเป็นเครื่องมือทำให้เกิดการตอบสนอง และการอักเสบมากขึ้น (Van der Vliet, 2000) จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการยับยั้งการหลั่งสารเหล่านี้จะทำให้การอักเสบลดลง เป้าหมายของยาต้านการอักเสบจึงมุ่งยับยั้งหรือลดการหลั่งสารเหล่านี้ การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และโพรสตาแกลนดิน E2 ที่มากเกินไปจะช่วยป้องกันและรักษาโรคต่างๆที่สารทั้งสองเข้าไปเกี่ยวข้อง วิธีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และโพรสตาแกลนดิน E2 มีหลายวิธี เช่น การใช้ตัวยับยั้งแอกทิวิตีของเอนไซม์ การยับยั้งในระดับการสร้าง mRNA ของเอนไซม์หรือโคแฟกเตอร์ (cofactor) รวมทั้งการกระตุ้นเอนไซม์ anti-inflammatory เช่น Heme oxygenase-1 (HO-1) แต่ยาส่วนใหญ่ยังขาดความจำเพาะ และมีผลข้างเคียงจากการใช้ยาเป็นเวลานาน (Dhikav, 2002) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะหาวิธีหรือยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น

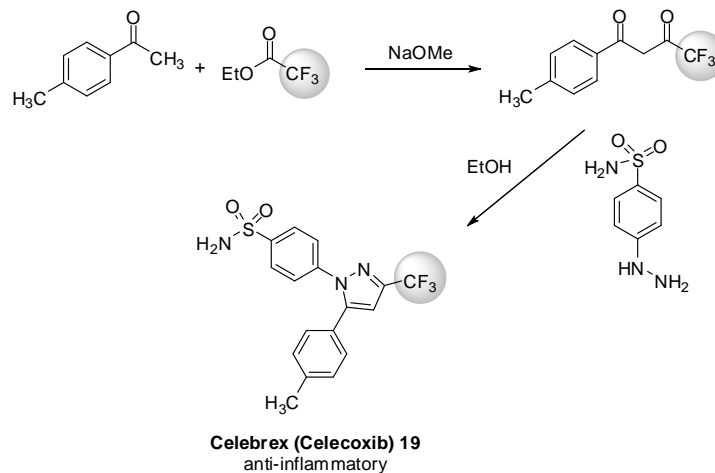
จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าสารประกอบฟลูออโรเป็นสารกลุ่มหนึ่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างมากมาย และยาในปัจจุบันเป็นสารอินทรีย์ที่มีฟลูออโรเป็นส่วนประกอบมากกว่า 18% (Isanbor, C. & O'Hagan, D., 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาต้านการอักเสบที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่มสเตียรอยด์ หรือ NSAID ที่มีฟลูออโรเป็นส่วนประกอบที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาใหม่พบว่ามีกลไกต้านการอักเสบที่เฉพาะเจาะจงในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ไม่ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 ทำให้ไม่เกิดผลข้างเคียงในการทำลายเยื่อบุกระเพาะอาหาร อย่างไรก็ตามงานวิจัยเพื่อสังเคราะห์สารอินทรีย์ที่มีฟลูออโรเป็นส่วนประกอบที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบชนิดใหม่และไม่มีผลข้างเคียงก็ยังคงมีความจำเป็น อีกทั้งการศึกษากลไกในระดับโมเลกุลก็มีความสำคัญเพื่อความเข้าใจและยืนยันการออกฤทธิ์ของสารที่ได้เหล่านั้นได้

### 1.5 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

สารอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบ (organic fluorine compounds) เป็นสารอินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างมากมาย และในปัจจุบันได้มีการใช้สารกลุ่มนี้เป็นยารักษาโรคต่างๆ เช่น ยารักษาโรคมะเร็ง (anti-cancer) ยารักษาโรคซึมเศร้า (anti-depressants) ยาลดไขมัน ยารักษาแผลในกระเพาะอาหาร (antacid/stomach ulcers) และยาต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้เราสนใจศึกษาการสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบที่ไม่ใช่สารกลุ่มสเตียรอยด์ เนื่องจากการอักเสบ (inflammation) เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคไขข้อเสื่อม โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว ภาวะช็อกจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (Septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคเบาหวาน โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ เป็นต้น สารอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นส่วนประกอบที่ไม่ใช่กลุ่มสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่เคยมีรายงานการสังเคราะห์มีหลายชนิด ตัวอย่างการสังเคราะห์ที่น่าสนใจแสดงได้ดังนี้

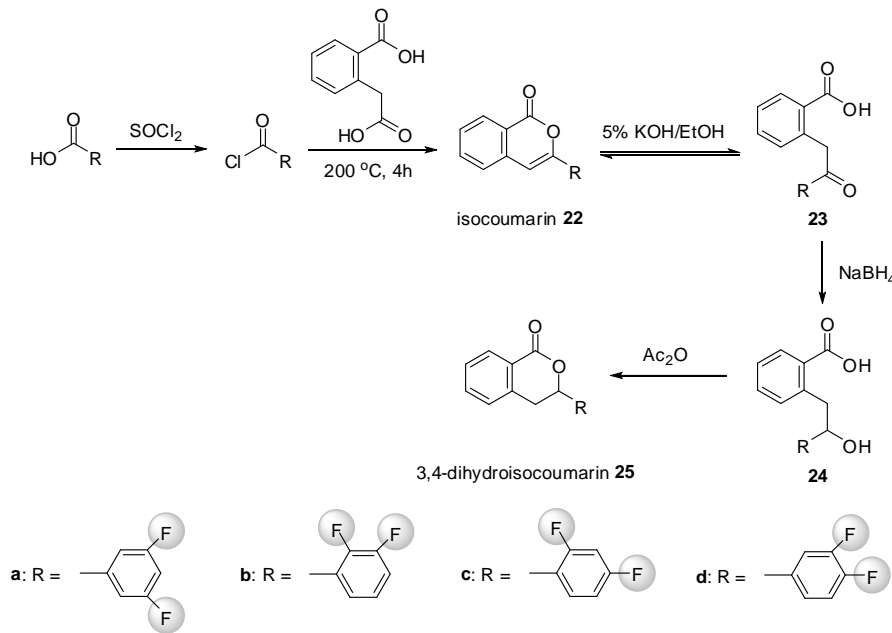
ในปี ค.ศ. 1997 Penning และคณะ (Pending et al., 1997) ได้รายงานการสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านการอักเสบของยา **Celebrex** (Celecoxib) **19** ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบกลุ่มที่ไม่ใช่สารสเตียรอยด์ที่ยังใช้ในอยู่ปัจจุบัน โดยสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 4-methylacetophenone กับ ethyl 2,2,2-trifluoroacetate ภายใต้สภาวะเบสได้เป็นสารประกอบ fluorinated 1,3-diketone จากนั้นทำปฏิกิริยา condensation กับ 4-hydrazinylbenzenesulfonamide ในเอทานอลได้เป็นยา **Celebrex** (Celecoxib) **19** ภายใน 2 ขั้นตอน (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การสังเคราะห์ Celebrex (Celecoxib) 19

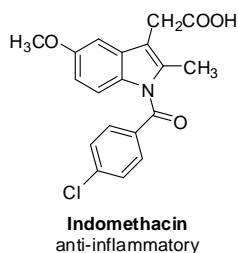
นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังพบว่าสาร **Celebrex** (Celecoxib) **19** มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ cyclo-oxygenase-2 (COX-2) อย่างเฉพาะเจาะจงเมื่อเทียบกับฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ cyclo-oxygenase-1 (COX-1) ทำให้ **Celebrex** (Celecoxib) **19** สามารถใช้เป็นยาต้านการอักเสบที่ดีและไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงที่เกิดจากการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร โดยกลไกต้านการอักเสบของยา **Celebrex** จะเกี่ยวข้องกับการยับยั้ง prostaglandin เมื่อร่างกายเกิดการอักเสบ (Pending et al., 1997)

ในปี ค.ศ. 2007 Qadeer และคณะ (Qadeer et al., 2007) ได้สังเคราะห์สารกลุ่ม fluorinated isocoumarins และ fluorinated 3,4-dihydroisocoumarins และนำสารที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ในขั้นเริ่มต้น Qadeer และคณะได้นำ fluorinated carboxylic acid มาเปลี่ยนให้เป็น acid chloride ด้วย thionyl chloride จากนั้นทำปฏิกิริยากับ 2-(carboxymethyl)benzoic acid ภายใต้ความร้อนที่อุณหภูมิ 200 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ได้เป็นอนุพันธ์ fluorinated isocoumarins **22** ซึ่งสามารถเปลี่ยนให้เป็น fluorinated 3,4-dihydroisocoumarin **25** ได้โดยทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสภายใต้สภาวะเบสได้เป็นสาร **23** จากนั้นทำปฏิกิริยารีดักชันของหมู่คาร์บอนิลด้วย sodium borohydride ได้เป็นสาร **24** และทำปฏิกิริยาการปิดวงแหวนด้วย acetic anhydride ได้เป็น fluorinated 3,4-dihydroisocoumarin **25** ตามลำดับ (รูปที่ 2)

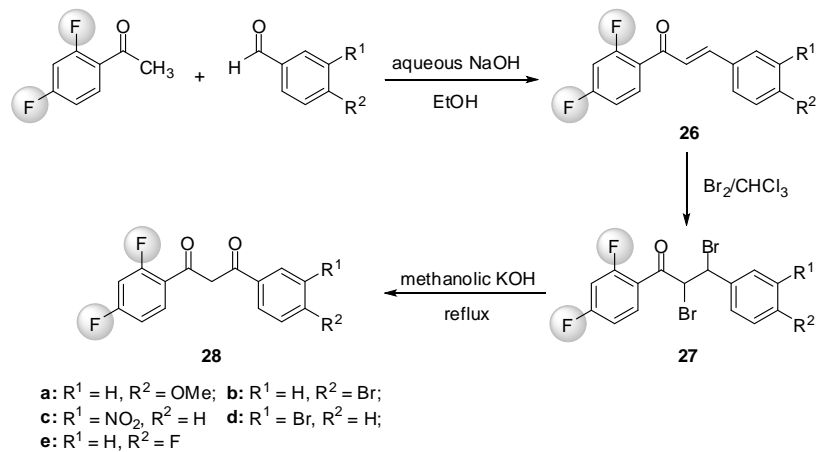


รูปที่ 2 การสังเคราะห์ fluoro substituted isocoumarins และ dihydroisocoumarins

งานวิจัยต่อมา Qadeer และคณะ ได้นำสาร fluorinated isocoumarins **22a-d** fluoro-compounds **23a-d**, **24a-d** และ fluorinated 3,4-dihydroisocoumarins **25a-d** ไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยศึกษาการลดการบวมของหูหนูที่เกิดจากการอักเสบเนื่องจากถูกกระตุ้นด้วย 12-O-tetradecanoylphorbol-12-acetate (TPA) จากผลการศึกษาพบว่าสาร fluorinated coumarin **22b** ให้ฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีที่สุด (103.7 % of inhibition of inflammation, 1 mg/ear) ซึ่งดีกว่ายาต้านการอักเสบ Indomethacin (91.4 % of inhibition of inflammation, 1 mg/ear) ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ขณะที่สาร **23d** และ **24a** มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเท่ากับ 92.2% และ 93.1% ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์ต้านการอักเสบอยู่ในระดับเดียวกับ Indomethacin

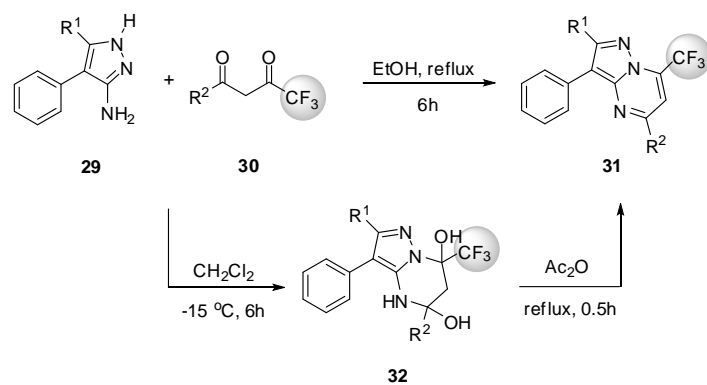


ในปี ค.ศ. 2010 More และ Ramaa (More, A. H. & Ramaa, C. S., 2010) ได้สังเคราะห์สารประกอบฟลูออรีนกลุ่มใหม่ คือ 1-(2',4'-difluorophenyl)-3-(substitutedphenyl)-1,3-propanediones **28** จาก 2',4'-difluorinated chalcones **26** (รูปที่ 3) จากนั้นนำสารที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในอุ้งเท้าหนูซึ่งถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบโดย carrageenan เปรียบเทียบกับยา indomethacin พบว่าสารกลุ่มนี้มีความสามารถในการต้านการอักเสบอยู่ในระดับ 70-93% เมื่อเทียบกับ indomethacin ภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกันสามารถต้านการอักเสบได้ 79% โดยสาร 28d จะให้ฤทธิ์ต้านการอักเสบสูงสุด คือ 93%



**รูปที่ 3** การสังเคราะห์ 1-(2',4'-difluorophenyl)-3-(substitutedphenyl)-1,3-propane-diones **28**

เมื่อเร็วๆนี้ Aggarwal และคณะ (Aggarwal et al., 2014) ได้รายงานการสังเคราะห์และตรวจสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสาร 7-trifluoromethylpyrazolo[1,5- $\alpha$ ]-pyrimidines **31** โดย Aggarwal และคณะได้สังเคราะห์สาร **31** จากปฏิกิริยา condensation ระหว่าง 3(5)-amino-4-phenyl-5(3)-*H*/methyl-1*H*-pyrazoles **29** กับ trifluoromethyl- $\beta$ -diketones ในเอทานอลภายใต้สภาวะ reflux เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นอกจากนี้ Aggarwal และคณะยังพบว่าถ้าทำปฏิกิริยาในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่อุณหภูมิต่ำ -15 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะได้สารมัธยันต์ (intermediate) **32** ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ **31** ได้เช่นเดียวกันโดยทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride ภายใต้สภาวะ reflux เป็นเวลา 30 นาที (ดังรูปที่ 4)



Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>31a</b>	H	CF <sub>3</sub>	<b>31g</b>	CH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>
<b>31b</b>	H	CH <sub>3</sub>	<b>31h</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b>31c</b>	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<b>31i</b>	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
<b>31d</b>	H	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<b>31j</b>	CH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
<b>31e</b>	H	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	<b>31k</b>	CH <sub>3</sub>	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
<b>31f</b>	H	2-thienyl	<b>31l</b>	CH <sub>3</sub>	2-thienyl

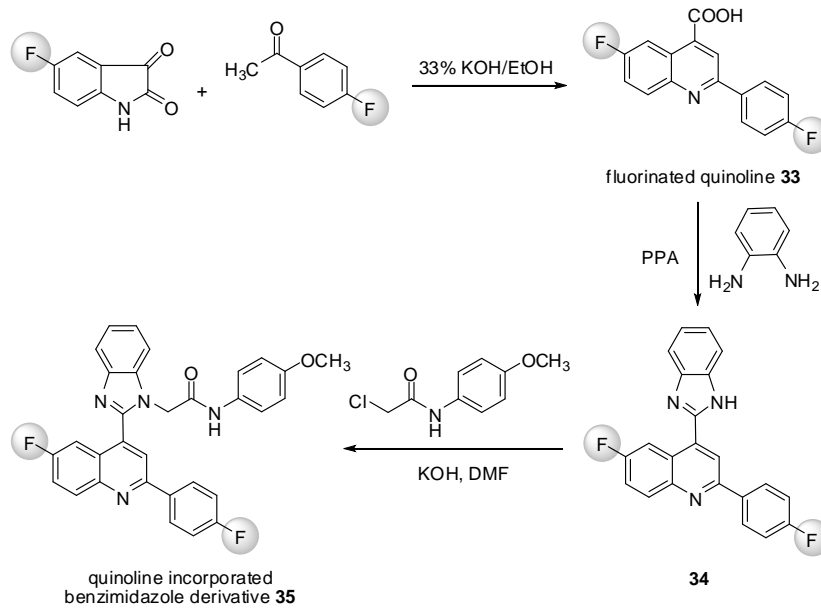
**รูปที่ 4** การสังเคราะห์ 7-trifluoromethylpyrazolo[1,5- $\alpha$ ]pyrimidines **31**



จากนั้น Aggarwal และคณะ (Aggarwal et al., 2014) ได้นำสารประกอบฟลูออโรที่สังเคราะห์ขึ้นมา 9 ชนิด ได้แก่ **31a-f** **31h-i** และ **31k** ไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี Carrageenan-induced rat paw edema assay โดยเปรียบเทียบกับยา indomethacin จากผลการศึกษาพบว่า สารประกอบฟลูออโร **31e** แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีที่สุด (83.4%) และใกล้เคียงกับยา indomethacin (84.2%)

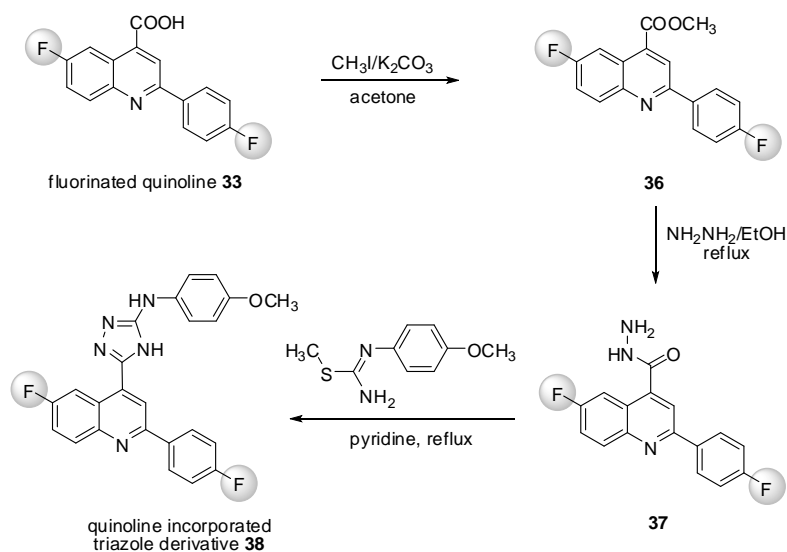
นอกจากนี้ Aggarwal และคณะ ยังได้นำสารประกอบฟลูออโร **31a-l** ที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวก 2 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* และ *B. subtilis* และแบคทีเรียชนิด แกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *E. Coli* และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี agar diffusion โดยเปรียบเทียบกับยา Ciprofloxacin จากผลการทดลองพบว่าสารประกอบฟลูออโร **31a-l** ที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้ในระดับปานกลาง (diameter of growth of inhibition zone ประมาณ 12.0-19.3 mm) เมื่อเทียบกับยา Ciprofloxacin (diameter of growth of inhibition zone ของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *B. subtilis* เท่ากับ 26.6 mm และ 24.0 mm ตามลำดับ) ขณะที่สารประกอบฟลูออโร **31a-l** ที่สังเคราะห์ขึ้นไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ นอกจากนี้ในงานวิจัยยังพบว่า สารประกอบฟลูออโร **31a-l** สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. niger* และ *A. flavus* ได้ในระดับปานกลาง (Mycelial growth inhibition ประมาณ 48.8-61.1 %) เมื่อเทียบกับยา Fluconazole (Mycelial growth inhibition ของเชื้อ *A. niger* และ *A. flavus* เท่ากับ 81.1% และ 77.7% ตามลำดับ)

ต่อมาเมื่อไม่นานมานี้ El-Feky และคณะ (El-Feky et al., 2014) ได้สังเคราะห์สารประกอบ fluorinated quinolone ด้วยปฏิกิริยา Pfitzinger จากนั้นนำไปต่อกับสารประกอบ benzimidazole ซึ่งสารประกอบฟลูออโรที่ได้จัดเป็นสารประกอบฟลูออโรกลุ่มใหม่ โดยเริ่มต้น El-Feky และคณะได้เตรียมสารประกอบ 6-fluoro-2-(4-fluorophenyl)quinoline-4-carboxylic acid **33** ด้วยปฏิกิริยา Pfitzinger ระหว่างสารตั้งต้น 2 ชนิด คือ 5-fluoroisatin กับ 4-fluoroacetophenone ใน aqueous ethanol จากนั้นนำสาร fluorinated quinoline **33** ไปสังเคราะห์เป็นสาร **34** ซึ่งมีโครงสร้างของ quinoline ต่ออยู่กับวง benzimidazole โดยการนำสาร **33** ทำปฏิกิริยากับ 1,2-benzenediamine (o-phenylenediamine) ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดของ polyphosphoric acid (PPA) ภายหลังจากแยกสาร **34** ให้บริสุทธิ์โดยการแยกด้วยเทคนิค column chromatography ก็จะไปทำปฏิกิริยาต่อกับ 2-chloro-N-arylacetylamide ในตัวทำละลาย DMF และใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นเบส จะได้สาร **35** เป็นผลิตภัณฑ์ ดังรูปที่ 5



**รูปที่ 5** การสังเคราะห์ quinolone incorporated benzimidazole derivative **35**

นอกจากนี้ El-Feky และคณะ (El-Feky et al., 2014) ยังได้นำสาร fluorinated quinoline **33** ไปต่อกับวง triazoles โดยการนำสาร **33** ทำปฏิกิริยากับ methyl iodide ใน acetone ภายใต้สภาวะที่มี potassium carbonate เป็นเบส พบว่าจะได้ ester **36** จากนั้นทำปฏิกิริยา hydrazinolysis กับ hydrazine hydrate ในตัวทำละลายเอทานอลจะได้สารประกอบ carbohydrazide **37** ในร้อยละผลิตภัณฑ์ที่สูง และเมื่อนำสาร **37** ทำปฏิกิริยากับ phenylisothiouronium iodide จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่เป็นวง fluorinated quinoline ต่ออยู่กับวง triazole **38** (ดังรูปที่ 6)



**รูปที่ 6** การสังเคราะห์ quinolone incorporated triazole derivative **38**

จากนั้น El-Feky และคณะ ได้นำสารประกอบ fluorinated quinoline ที่เชื่อมต่อกับวง benzimidazole **34** และ **35** และ fluorinated quinoline ที่เชื่อมต่อกับวง triazole **38** ที่สังเคราะห์ได้ ไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนู ด้วยวิธี carrageenan induced edema bioassay โดยเทียบกับยา Celecoxib ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์เฉพาะเจาะจงในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ผลการทดลองพบว่า สาร **34** **35** และ **38** มีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีกว่ายา Celecoxib เล็กน้อย ดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ของสาร **34** **35** และ **38** ในหนูด้วยวิธี carrageenan induced edema bioassay

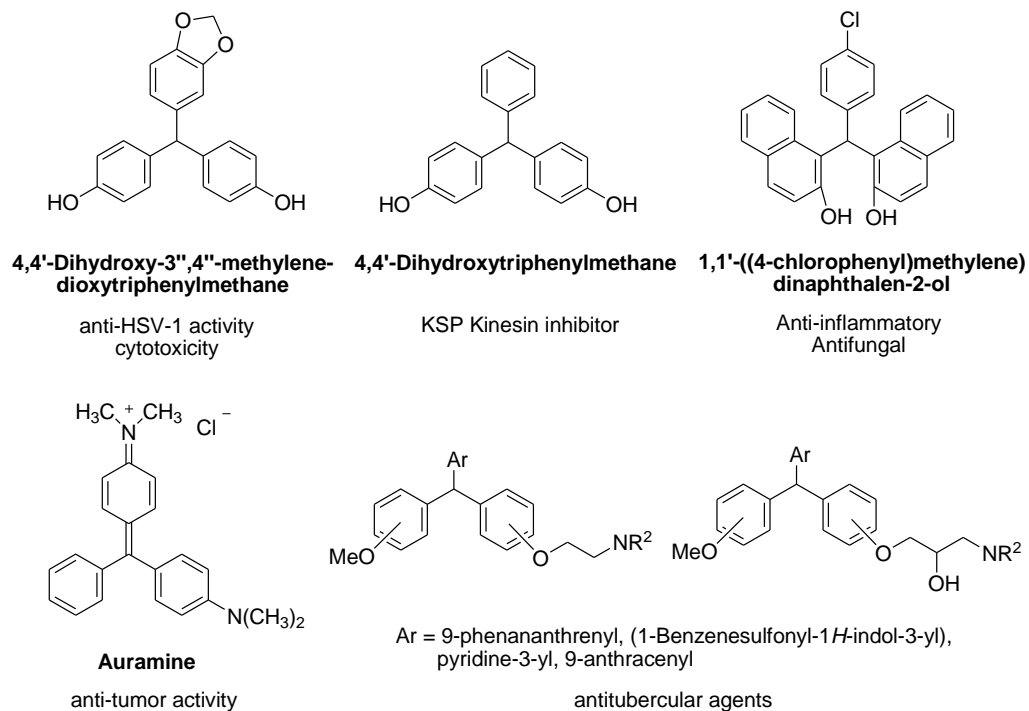
Compounds	Protection at 50 mg/kg dose (%)
<b>34</b>	51
<b>35</b>	55
<b>38</b>	50.6
Celecoxib	50

นอกจากนี้ El-Feky และคณะยังได้นำสาร **34** **35** และ **38** ไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารในหนู (ulcerogenic potential in rat) เนื่องจากยาต้านการอักเสบส่วนใหญ่ นอกจากยับยั้งเอนไซม์ COX-2 แล้ว ยังยับยั้งเอนไซม์ COX-1 ซึ่งทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารเป็นผลข้างเคียงได้ โดยผลการทดลองพบว่าสาร **35** และ **38** ที่ปริมาณ 50-250 mg/kg ไม่ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนู ขณะที่สาร **34** ที่ปริมาณ 150 และ 250 mg/kg จะทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร 10% และ 15% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับยา Celecoxib พบว่าสารที่สังเคราะห์ได้ไม่ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารหนูหรือเกิดน้อยกว่า (ตารางที่ 2) ข้อดีอีกประการหนึ่งคือสารสังเคราะห์ทั้ง 3 ชนิดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับที่ต่ำมาก ( $Ald_{50} = 2000$  mg/kg)

**ตารางที่ 2** ฤทธิ์การทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนู (ulcerogenic activity) ของสาร **34** **35** และ **38**

Compounds	Dose (mg/kg) ip	Ulcer production (%)	Compounds	Dose (mg/kg) ip	Ulcer production (%)
<b>34</b>	50	0	<b>38</b>	50	0
	150	10		150	0
	250	15		250	0
<b>35</b>	50	0	Celecoxib	50	30
	150	0		150	70
	250	0		250	85

ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สนใจสังเคราะห์สาร triarylmethane (TRAMs) เป็นจำนวนมาก เนื่องจากอนุพันธ์ของสารในกลุ่ม triarylmethane พบได้ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถใช้เป็นยารักษาโรคได้ เช่น 4,4'-dihydroxy-3'',4''-methylenedioxytriphenylmethane มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสชนิด herpes simplex virus type 1 (Anti-HSV-1) (Mibu et al., 2005) 4,4'-dihydroxytriphenylmethane ยับยั้งเชื้อ KSC Kinesin (Podder et al., 2007) 1,1'-((4-chlorophenyl)methylene)dinaphthalen)-2-ol มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และยับยั้งเชื้อรา (antifungal) (Lewis et al., 1952) ดังแสดงในรูปที่ 7 เมื่อเร็ว ๆ นี้ยังพบว่าอนุพันธ์ของ triarylmethane บางชนิดมีฤทธิ์เป็น antitubercular (anti-TB) (Parai et al., 2008) นอกจากนี้ในทางอุตสาหกรรมสามารถนำอนุพันธ์ของสาร triaryl-methane และ diarylalkylmethane มาใช้เป็นสีย้อม (dyes) เป็นหมู่ป้องกันการเกิดปฏิกิริยา (protective group) และใช้เป็น photochromic agent (Esquivias et al., 2006) ได้อีกด้วย

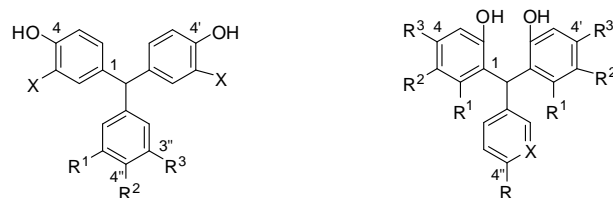


รูปที่ 7 ตัวอย่างของสารอนุพันธ์ของ triarylmethane ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาข้อมูลในฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์พบว่าการศึกษากการสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารประกอบ fluorinated triarylmethane ยังมีอยู่น้อย ตัวอย่างวิธีการสังเคราะห์สารประกอบไตรเอริลมีเทนที่เคยมีรายงานไว้แสดงได้ดังนี้

ในปี ค.ศ. 2005 Sumoto และคณะ (Podder et al. 2007) ได้รายงานการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 4,4'- และ 2,2'-dihydroxy-triphenylmethanes ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสชนิด herpes simplex virus type 1 (Anti-HSV-1) จากปฏิกิริยา condensation ระหว่างสารประกอบฟีนอลและ aromatic

aldehyde ภายใต้สภาวะของกรดแก่ชนิดต่างๆ ได้แก่  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  หรือ  $\text{H}_2\text{SO}_4$  พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ปานกลางถึงสูง ดังแสดงในรูปที่ 8 และตารางที่ 3 สารที่สังเคราะห์ที่ได้ถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ anti-HSV-1 และ cytotoxicity ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสาร **39b** มีค่าการออกฤทธิ์ anti-HSV-1 อยู่ในระดับดี ( $\text{EC}_{50} = 0.79 \mu\text{g/mL}$ ) และมีค่า cytotoxicity ต่ำ ( $\text{CC}_{50} = 30.2 \mu\text{g/mL}$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4 entry 2



anti-HSV-1

anti-HSV-1

**39a:** X = H,  $\text{R}^1, \text{R}^3 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2 = \text{OMe}$

**39b:** X = H,  $\text{R}^1 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2, \text{R}^3 = \text{OCH}_2\text{O}$

**39c:** X = H,  $\text{R}^1, \text{R}^3 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2 = \text{OPh}$

**39d:** X = H,  $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3 = \text{OMe}$

**39e:** X = Br,  $\text{R}^1, \text{R}^3 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2 = \text{CF}_3$

**40a:** X = C,  $\text{R}^1, \text{R}^3 = \text{OMe}$ ,  $\text{R}^2 = \text{H}$ ,  $\text{R} = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$

**40b:** X = C,  $\text{R}^1 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2, \text{R}^3 = \text{OCH}_2\text{O}$ ,  $\text{R} = \text{OMe}$

**40c:** X = N,  $\text{R}^1 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2, \text{R}^3 = \text{OCH}_2\text{O}$ ,  $\text{R} = \text{H}$

### รูปที่ 8 โครงสร้างของ triarylmethane ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัส ชนิด HSV-1

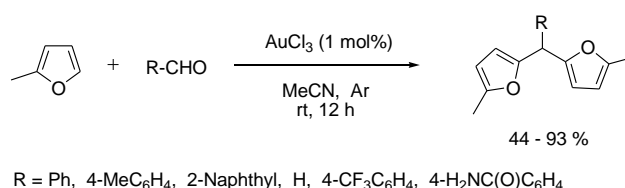
ตารางที่ 3 ปฏิกริยาของฟีนอลกับอัลดีไฮด์

Entry	Product	Method	Acid	Ratio of AcOH:ArCHO:acid	Conditions	Yield %
1	<b>39a</b>	A	$\text{CF}_3\text{COOH}$	2:1:10	rt, 1 d	26
2	<b>39a</b>	C	$\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{WO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	20:1:0.006	60 °C, 19h, $\text{N}_2$	82
3	<b>39b</b>	B	$\text{H}_2\text{SO}_4$	2:1:2	rt, 39h, AcOH	41
4	<b>39c</b>	B	$\text{H}_2\text{SO}_4$	2.35:1:2.5	rt, 20h, AcOH	83
5	<b>39d</b>	A	$\text{CF}_3\text{COOH}$	2:1:10	rt, 3 d	66
6	<b>39e</b>	B	$\text{H}_2\text{SO}_4$	2:1:2	rt, 5h, 55 °C, 20 min, AcOH	30

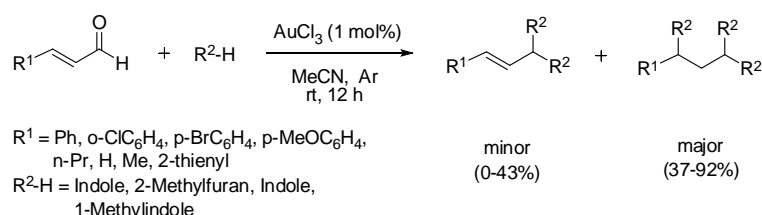
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ Anti-HSV-1 activity ( $\text{EC}_{50}$ ) และ cytotoxicity ( $\text{CC}_{50}$ ) ของ 4,4'- และ 2,2'-dihydroxy-triphenylmethanes

Compound	$\text{EC}_{50}$ (mg/mL)	$\text{CC}_{50}$ (mg/mL)
<b>39a</b>	1.7	11.8
<b>39b</b>	<b>0.79</b>	<b>30.2</b>
<b>39c</b>	3.3	10.2
<b>39d</b>	4.65	41.0
<b>39e</b>	3.5	18.5
<b>40a</b>	ND	18.0
<b>40b</b>	6.6	19.6
<b>40c</b>	2.7	>50

ในปี ค.ศ. 2005 และ 2006 Nair และคณะ (Nair et al., 2005, Nair et al., 2006) ได้ศึกษาปฏิกิริยาการสังเคราะห์ triarylmethane และ triheteroarylmethane โดยใช้  $\text{AuCl}_3$  (1 mol%) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิห้อง และใช้สารตั้งต้นเป็น electron-rich arenes ชนิดต่างๆ ได้แก่ 1,2,3-trimethoxybenzene, 2-methylfuran, 2,4-dimethylthiophene และ 3-methylindole ทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ formaldehyde, isobutyraldehyde, aromatic aldehydes heteroaromatic aldehydes และ  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes ในตัวทำละลายอะซิโตไนตร (acetonitrile) ภายใต้บรรยากาศของแก๊สอาร์กอน แต่งานวิจัยส่วนใหญ่จะมุ่งศึกษาเฉพาะปฏิกิริยาการเตรียม triheteroarylmethane พบว่าเมื่อนำ 2-methylfuran มาทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์จะได้ผลิตภัณฑ์ในเปอร์เซ็นต์ปานกลางถึงสูงขึ้นอยู่กับชนิดของอัลดีไฮด์ที่ใช้ ในกรณี formaldehyde, 4-trifluoromethyl, benzaldehyde และ 4-formylbenzamide จะให้เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 44 45 และ 48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ถ้าใช้อัลดีไฮด์ที่เป็น benzaldehyde 4-methylbenzaldehyd และ Naphthalene-2-carbaldehyde จะได้ผลิตภัณฑ์ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงคือ 80–93 % ดังรูปที่ 9 นอกจากนี้ Nair และคณะได้ศึกษาปฏิกิริยา Hydroarylation ของ  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes กับ heteroaromatic โดยใช้  $\text{AuCl}_3$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและภายใต้บรรยากาศของแก๊สอาร์กอน พบว่าจะได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ สาร 3 (ผลิตภัณฑ์รอง) และสาร 4 (ผลิตภัณฑ์หลัก) ดังแสดงในรูปที่ 10



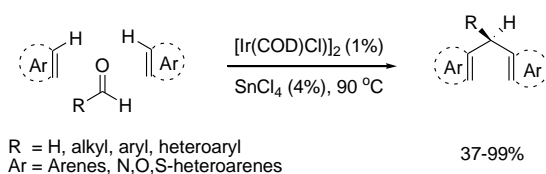
### รูปที่ 9 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ triarylmethane และ triheteroarylmethane



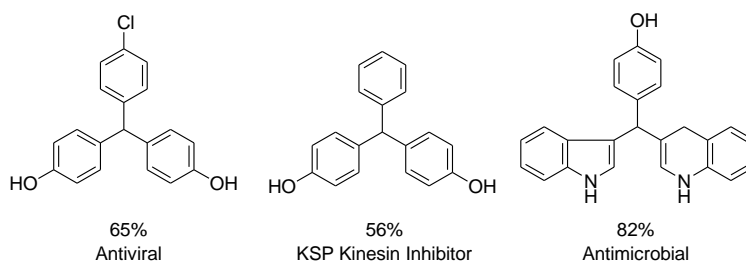
### รูปที่ 10 ปฏิกิริยา Hydroarylation ของสารประกอบ $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes

ในปี ค.ศ. 2007 Podder และคณะ (Podder et al., 2007) ได้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยา Friedel-Crafts alkylation ของอัลดีไฮด์ชนิดต่างๆ ได้แก่ formaldehyde, aliphatic aldehyde, aromatic aldehyde และ heteroaromatic aldehyde กับ arene และ heteroarenes ชนิดต่างๆ โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาผสมระหว่าง  $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2$  กับ  $\text{SnCl}_4$  ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5-24

ชั่วโมง พบว่าในกรณีของสารตั้งต้นชนิด aromatic และ heteroaromatic aldehydes จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์สารประกอบ triarylmethane ในเปอร์เซ็นต์ปานกลางถึงสูง (37-99%) ขณะที่เมื่อใช้สารตั้งต้นที่เป็น formaldehyde และ aliphatic aldehyde จะได้ diarylalkylmethane เป็นผลิตภัณฑ์ในเปอร์เซ็นต์ปานกลาง (30-37%) ดังแสดงได้ในรูปที่ 11 นอกจากนี้ Roy ยังได้นำวิธีการที่ค้นพบไปใช้สังเคราะห์อนุพันธ์ triarylmethane ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 12

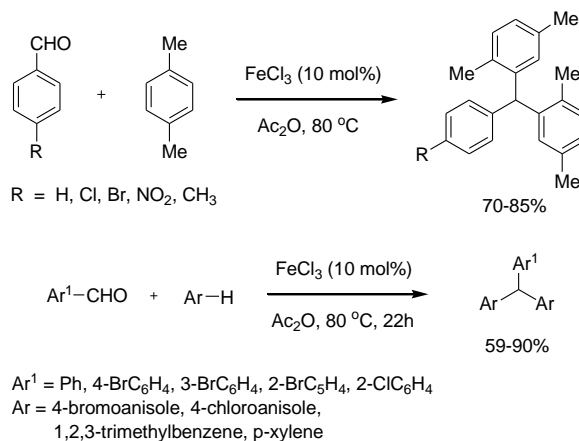


รูปที่ 11 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ triarylmethane และ diarylalkylmethane โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาผสมระหว่าง  $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2$  กับ  $\text{SnCl}_4$



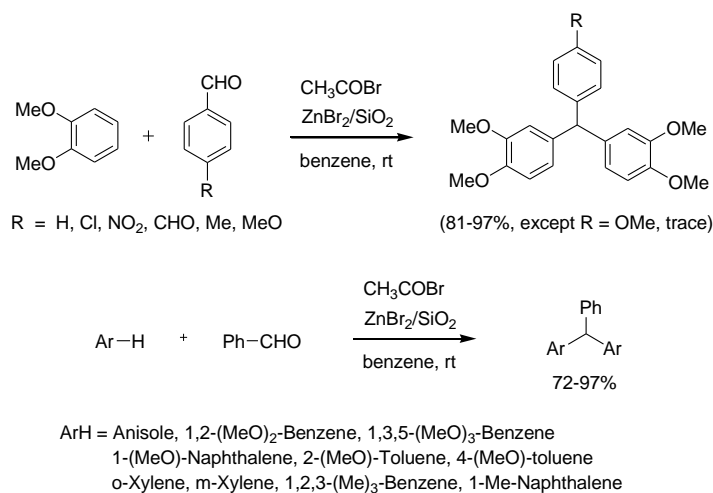
รูปที่ 12 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ triarylmethane ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาผสมระหว่าง  $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2$  กับ  $\text{SnCl}_4$

Li และคณะ (Li et al., 2008) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ triarylmethane จากอะโรมาติกอัลดีไฮด์กับ electron-rich arenes โดยใช้  $\text{FeCl}_3$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น p-xylene ทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์ชนิดต่างๆ ในตัวทำละลาย acetic anhydride เป็นเวลา 22 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80 °C พบว่าเมื่อใช้อัลดีไฮด์เป็น benzaldehyde, 4-chlorobenzaldehyde และ 4-bromobenzaldehyde จะให้เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 79, 75 และ 78% ตามลำดับ แต่ถ้าอัลดีไฮด์ที่ใช้เป็น 4-nitrobenzaldehyde ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 °C พบว่าต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นเป็น 50 ชั่วโมงจึงจะให้ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 70% ขณะที่ในกรณีของ 4-methylbenzaldehyde พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 °C พบว่าใช้เวลาเพียง 10 ชั่วโมง ก็สามารถเกิดผลิตภัณฑ์ได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงถึง 85% ดังแสดงในรูปที่



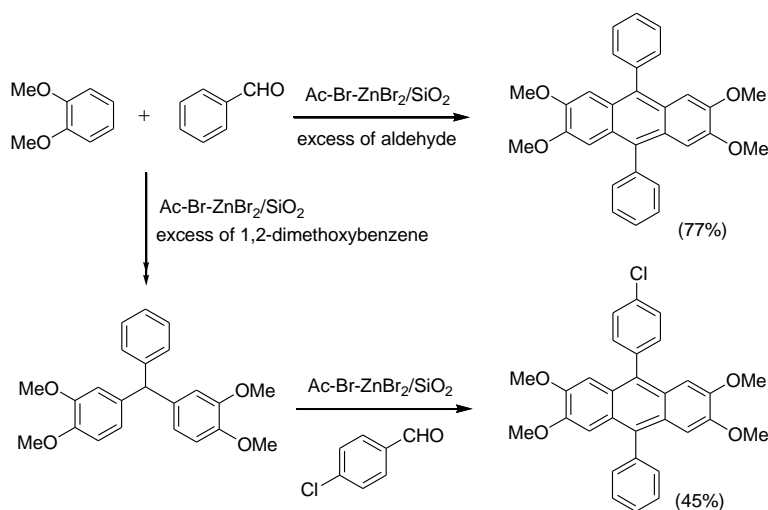
### รูปที่ 13 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์หอนุพันธ์ triarylmethane โดยใช้ $\text{Ac}_2\text{O}$ และ $\text{FeCl}_3$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

เมื่อเร็วๆ นี้ ในปี ค.ศ. 2008 Kodomari และคณะ (Kodomari et al., 2008) ได้ศึกษาการสังเคราะห์ triarylmethane และ 9,10-diarylanthracenes โดยเกิดผ่านปฏิกิริยา Friedel-Crafts alkylation จากสารตั้งต้น electron-rich arenas ทำปฏิกิริยากับอะโรมาติกอัลดีไฮด์และ acetyl bromide ในตัวทำละลายเบนซีนและใช้  $\text{ZnBr}_2/\text{SiO}_2$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ในเปอร์เซ็นต์สูง แสดงดังรูปที่ 14 และ 15 ตามลำดับ



### รูปที่ 14 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์หอนุพันธ์ triarylmethane โดยใช้ $\text{CH}_3\text{COBr}$ และ $\text{ZnBr}_2/\text{SiO}_2$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



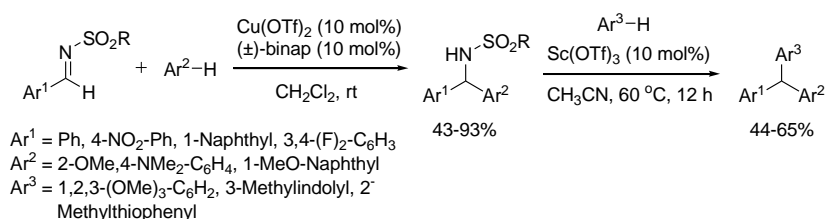


**รูปที่ 15** ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 9,10-diarylanthracenes โดยใช้  $\text{CH}_3\text{COBr}$  และ  $\text{ZnBr}_2/\text{SiO}_2$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ triarylmethane นอกจากใช้วิธีการ Friedel-Crafts alkylation แล้ว ยังมีรายงานการสังเคราะห์โดยใช้วิธีการอื่นๆ ซึ่งตัวอย่างที่น่าสนใจแสดงได้ดังนี้

การสังเคราะห์ asymmetrical triarylmethane ด้วยปฏิกิริยา Aza-Friedel-Crafts reaction

ในปี ค.ศ. 2006 Esquivias และคณะ (Esquivias et al., 2006) ได้ศึกษาการสังเคราะห์ asymmetrical triarylmethane ด้วยปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts reaction ระหว่าง arenes ชนิดต่างๆ กับ aromatic N-tosyl-imine โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น  $\text{Cu}(\text{OTf})_2$  ร่วมกับ (±)-binap ได้ผลิตภัณฑ์เป็น diarylmethylamine จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อกับ arenes โมเลกุลที่สองโดยใช้  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ได้ triarylmethane ที่มีหมู่ aryl ทั้ง 3 หมู่แตกต่างกันเป็นผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในรูปที่ 16

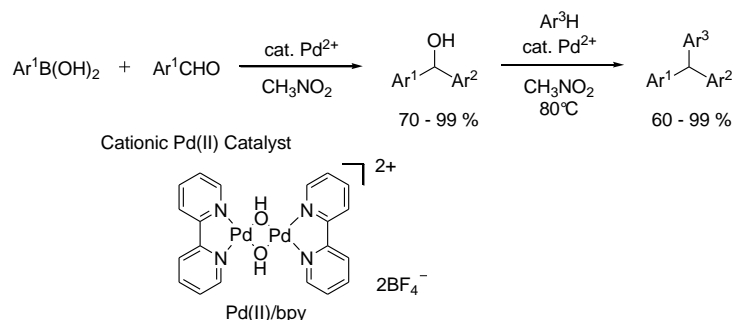


**รูปที่ 16** การใช้  $\text{Cu}(\text{OTf})_2/(\pm)\text{-binap}$  และ  $(\text{ScOTf})_3$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในการสังเคราะห์ asymmetrical triarylmethanes

การสังเคราะห์ asymmetrical triarylmethane ด้วยปฏิกิริยา Cationic  $\text{Pd}(\text{II})/\text{bipyridine}$ -catalyzed addition of arylboronic acids to aromatic aldehydes.

ในปี ค.ศ. 2007 Lin และคณะ (Lin et al., 2007) ได้ใช้  $\text{Pd}^{2+}$  ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแคทไอออนิก (cationic) ในปฏิกิริยาการเติมโดยใช้สารตั้งต้นเป็น arylboronic acid ทำปฏิกิริยากับ aromatic

aldehyde และ electron-rich arene เพื่อสังเคราะห์ triarylmethane ที่มีหมู่ aryl ทั้ง 3 หมู่แตกต่างกัน เป็นผลิตภัณฑ์ ดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ asymmetrical triarylm

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

### 1) เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จะเป็นการค้นพบสารประกอบอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นองค์ประกอบกลุ่มใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและไม่ใช่สารสเตียรอยด์ ได้แก่ สารฟลูออโรโรไตรเอริลมีเทน ซึ่งสังเคราะห์ได้ด้วยปฏิกิริยา condensation ของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ mono-fluoroindole N,N-dimethylaniline และ aldehyde ซึ่งเป็นวิธีการสังเคราะห์ที่ใหม่และสังเคราะห์ภายในขั้นตอนเดียว และสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา Friedel-Crafts ของ aromatic หรือ heteroaromatic กับ fluorobenzaldehyde ชนิดต่างๆ นอกจากนี้สารที่สังเคราะห์ได้และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีจะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวารสารวิชาการเป็นการสร้างชื่อเสียงให้แก่ประเทศไทย เป็นพื้นฐานและองค์ความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอด และผลิตเป็นยาชนิดใหม่ได้

### 2) บริการความรู้แก่ประชาชน

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จะเป็นการค้นพบสารประกอบอินทรีย์ที่มีฟลูออรีนเป็นองค์ประกอบกลุ่มใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและไม่ใช่สารสเตียรอยด์ ได้แก่ สารฟลูออโรโรไตรเอริลมีเทน สามารถให้ความรู้ความเข้าใจแก่ประชาชนทั่วไปโดยทำการเผยแพร่ผ่านสื่อต่างๆ เช่น รายการวิทยุเพื่อประชาชน จัดนิทรรศการเผยแพร่ในงานสัปดาห์วันวิทยาศาสตร์หรือเผยแพร่ทางวารสารทางวิชาการ

### 3) บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ และนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

อนุพันธ์ของสารฟลูออโรโรไตรเอริลมีเทนที่สังเคราะห์ได้อาจจะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับเดียวกันหรือสูงกว่ายาต้านการอักเสบที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน แต่มีผลข้างเคียงลดลงหรือไม่มีผลข้างเคียง ทำให้สามารถใช้สารกลุ่มนี้เป็นยาทางเลือกใหม่ในการรักษาอาการอักเสบหรือโรคที่เกิดจากการอักเสบ หลังจากจดสิทธิบัตรแล้วสามารถให้ข้อมูลแก่ภาคธุรกิจได้แก่ องค์การเภสัชกรรม หรือ บริษัทฯ เพื่อนำไปผลิตเป็นสูตรยาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

#### 4) เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

ประชากรทั่วไปของประเทศไทยโดยเฉพาะผู้สูงอายุที่มีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคการอักเสบมาก จะสามารถได้ใช้ยาที่มีคุณภาพมากกว่าเดิม และผลข้างเคียงน้อยลง นอกจากนี้ในโครงการวิจัยนี้เมื่อแล้วเสร็จ คาดว่าจะสามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ภายใต้การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาและเป็นโครงการวิจัยย่อยแก่นิสิตระดับปริญญาตรี

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ได้แก่ สถาบันการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านชีวเคมี เภสัชเคมี เช่น คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ในการนำผลการศึกษาไปศึกษาต่อยอด และองค์การเภสัชกรรม หรือ หน่วยงาน บริษัทอุตสาหกรรมยา ในการนำไปพัฒนาเป็นสูตรยา

## บทที่ 2

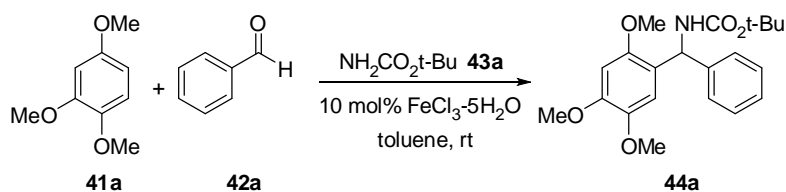
### วิธีการทดลอง

#### กิจกรรมส่วนที่ 1 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes

1. การสังเคราะห์สารประกอบ 6-fluoro-3-diarylmethylindoles ชนิดต่างๆ โดยผ่านปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts ตามด้วย Nucleophilic addition ด้วย electron-rich arenes โดยวิธีการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

##### 1.1 การสังเคราะห์สารประกอบ 6-fluoro-3-diarylmethylindoles (JJAF1)

1) การสังเคราะห์ *tert*-butyl (2,4,5-trimethoxyphenyl)(phenyl)methylcarbamate จากปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts alkylation ระหว่าง benzaldehyde กับ *tert*-butyl carbamate และ 1,2,4-trimethoxybenzene

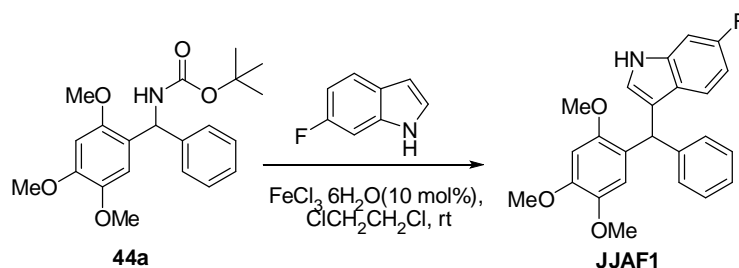


#### วิธีการทดลอง

เติม 1,2,4-trimethoxybenzene (41a) 0.1172 g (1.00 mmol) และ *tert*-butyl carbamate 0.1172 g (1.00 mmol) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลาย toluene (1.00 mL) เติม Benzaldehyde (2a) 0.11 mL (1.10 mmol) และเติม  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0270 g (10 mol %) ปิดหลอดทดลองด้วย septum คนสารตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยเปรียบเทียบกับ 1,2,4-trimethoxybenzene และ benzaldehyde ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดเติมสารละลายอิ่มตัวของ  $\text{NaHCO}_3$  หยุดปฏิกิริยาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 10$  mL) ตามด้วย น้ำ (10 mL) และสารละลายอิ่มตัวของ  $\text{NaCl}$  (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  มาทำให้แห้งด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydrous นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product มีลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี

นำ crude product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค radial chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย hexane (50 mL) ตามด้วย 5%, 10%, 20% และ 30% EtOAc ใน hexane (ตัวทำละลายละ 50 mL) ตามลำดับเพื่อแยกสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมา นำ fraction ของผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump

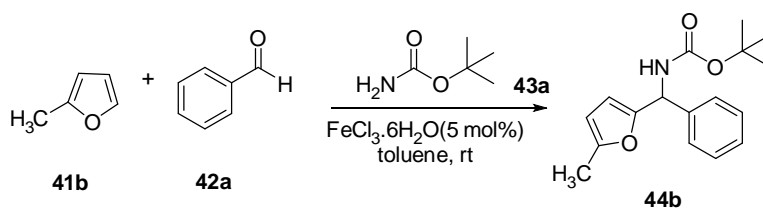
2) การสังเคราะห์สารประกอบ 6-fluoro-3-diarylmethylindoles (JJAF1) จากปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts alkylation ระหว่าง *tert*-butyl phenyl(2,4,5-trimethoxyphenyl)methylcarbamate (**44a**) กับ 6-fluoroindole



ทำการทดลองโดยเติมสาร **44a** 0.1495 g (0.40 mmol) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลาย ไทคลอโรอีเทน 2 mL เติม 6-fluoroindole 0.0556 g (0.41 mmol) แล้วเติม  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0112 g (10 mol%) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้ crude product มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล จากนั้นนำไปแยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค radial chromatography

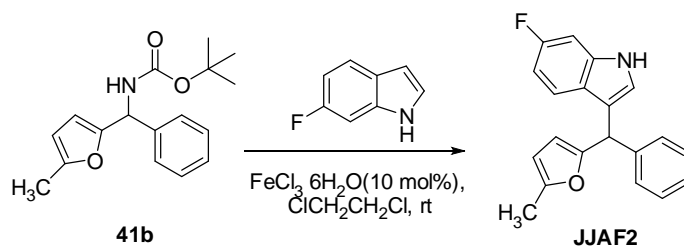
## 1.2 การสังเคราะห์สารประกอบ 6-fluoro-3-diarylmethylindoles (JJAF2)

1) การสังเคราะห์ *tert*-butyl (5-methyl furan-2-yl) (phenyl)methylcarbamate (**44b**) ด้วยปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts alkylation ระหว่าง benzaldehyde กับ *tert*-butyl carbamate และ 2-methylfuran



ทำการทดลอง โดยเติม 2-methylfuran (**41b**) 0.090 mL (1.00 mmol) และ *tert*-butyl carbamate 0.1173 g (1.00 mmol) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลาย toluene (1 mL) เติม benzaldehyde 0.110 mL (1.10 mmol) แล้วเติม  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0206 g (5 mol %) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้ crude product มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล จากนั้นนำไปแยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค radial chromatography

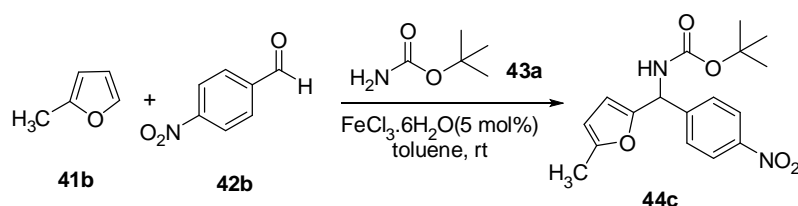
2) การสังเคราะห์สารประกอบ 6-fluoro-3-diarylmethylindoles (JJAF2) จากปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts alkylation ระหว่าง *tert*-butyl (5-methyl furan-2-yl) (phenyl)methylcarbamate (**44b**) กับ 6-fluoroindole



ทำการทดลองโดยเติม *tert*-butyl (5-methylfuran-2-yl) (phenyl)methylcarbamate (**41b**) 0.0863 g (0.30 mmol) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลายไดคลอโรอีเทน 2 mL เติม 6-fluoroindole 0.0419 g (0.31 mmol) แล้วเติม  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0083 g (10 mol%) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้ crude product มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ จากนั้นนำไปแยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค radial chromatography

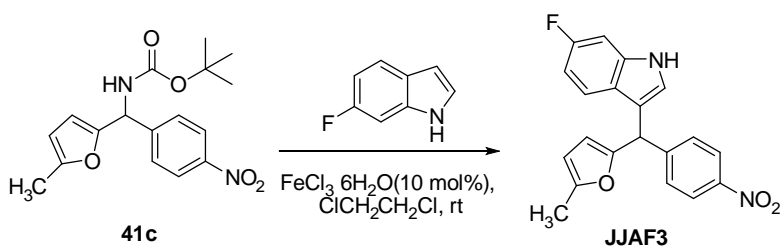
### 1.3 การสังเคราะห์สารประกอบ 6-fluoro-3-diarylmethylindoles (JJAF3)

1) การสังเคราะห์ *tert*-butyl (5-methylfuran-2-yl)(4-nitrophenyl) methylcarbamate (**44c**) ด้วยปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts alkylation ระหว่าง 4-nitrobenzaldehyde กับ *tert*-butyl carbamate และ 2-methylfuran



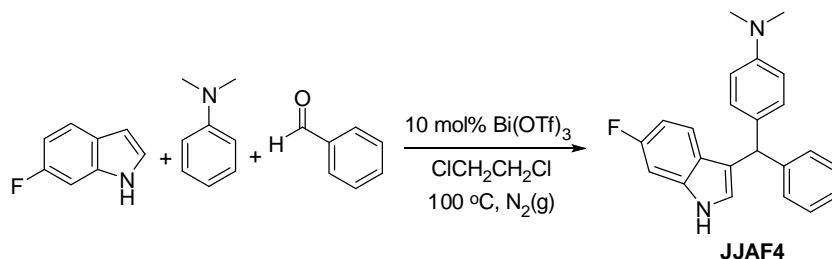
ทำการทดลอง โดยเติม 2-methylfuran (**41b**) 0.090 mL (1.00 mmol) และ *tert*-butyl carbamate 0.1175 g (1.00 mmol) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลาย toluene (1 mL) เติม 4-nitrobenzaldehyde 0.1664 g (1.10 mmol) แล้วเติม  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0270 g (5 mol %) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้ crude product มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง จากนั้นนำไปแยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค radial chromatography

2) การสังเคราะห์สารประกอบ 6-fluoro-3-diarylmethylindoles (JJAF3) จากปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts alkylation ระหว่าง *tert*-butyl (5-methylfuran-2-yl)(4-nitrophenyl) methylcarbamate (**44c**) กับ 6-fluoroindole



ทำการทดลองโดยเติม *tert*-butyl (5-methylfuran-2-yl)(4-nitrophenyl) methylcarbamate (**41b**) 0.1329 g (0.40 mmol) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำทำละลายไดคลอโรอีเทน 2 mL เติม 6-fluorindole 0.0556 g (0.41 mmol) แล้วเติม  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0109 g (10 mol%) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง พบว่าได้ crude product มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีแดง จากนั้นนำไปแยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค radial chromatography

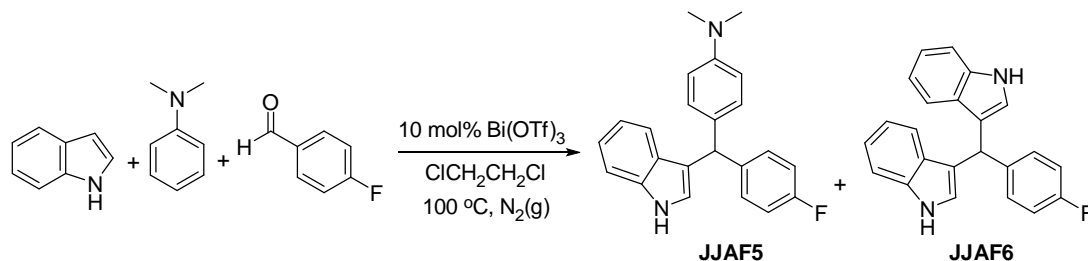
2. การสังเคราะห์ 4-((6-fluoro-1H-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-*N,N*-dimethylaniline (**JJAF4**) จากปฏิกิริยา aza Friedel-Crafts alkylation ระหว่าง benzaldehyde กับ 6-fluorindole และ *N,N*-dimethylaniline



### วิธีการทดลอง

เติม benzaldehyde (**1a**) 0.20 mL (2.0 mmol), 6-fluorindole 0.1351 g (1.0 mmol) และ *N,N*-dimethylaniline 0.25 mL (2.0 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลมเติมน้ำทำละลาย  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$  2.0 mL และเติม  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  10 mol% นำไป reflux ที่อุณหภูมิ 100 °C ภายใต้แก๊สไนโตรเจน และคนสารตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยเปรียบเทียบกับ 4-fluorobenzaldehyde ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดเติมน้ำละลายอิมัตัวของ  $\text{NaHCO}_3$  เพื่อหยุดปฏิกิริยา ทำการสกัดด้วยน้ำทำละลาย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3×10 mL) ตามด้วยน้ำ (10 mL) และสารละลายอิมัตัวของ  $\text{NaCl}$  (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  มาเติม  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydrous เพื่อดูดน้ำออก นำไปประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product นำ crude product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค radial chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย hexane (50 mL) ตามด้วย 5%, 10%, 20%, และ 30% EtOAc ใน Hexane ตามลำดับ เพื่อแยกสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมา นำ fraction ของผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ไปประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump

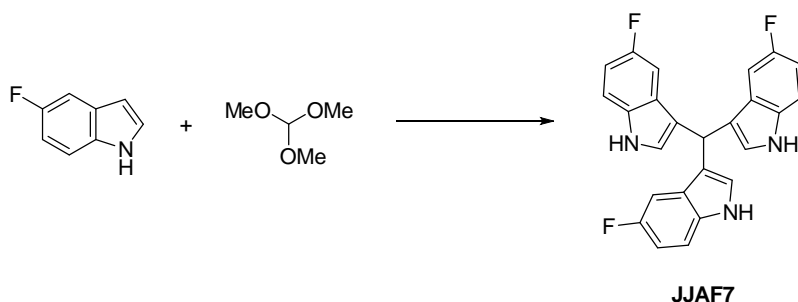
3. การสังเคราะห์ 4-((4-fluorophenyl)(1H-indol-3-yl)methyl)-*N,N*-dimethylbenzenamine (JJAF5) และ 3,3'-((4-fluorophenyl)methylene)bis(1H-indole) (JJAF6) จากปฏิกิริยา aza Friedel-Crafts alkylation ระหว่าง 4-fluorobenzaldehyde กับ indole และ *N,N*-dimethylaniline



เติม 4-fluorobenzaldehyde 0.2145 g (2.0 mmol), indole 0.1172 g (1.0 mmol) และ *N,N*-dimethylaniline 0.25 mL (2.0 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลมเติมตัวทำละลาย ClCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl 2.0 mL และเติม Bi(OTf)<sub>3</sub> 10 mol% นำไป reflux ที่อุณหภูมิ 100 °C ภายใต้แก๊สไนโตรเจน และคนสารตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยเปรียบเทียบกับ 4-fluorobenzaldehyde ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดเติมสารละลายอิ่มตัวของ NaHCO<sub>3</sub> เพื่อหยุดปฏิกิริยา ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×10 mL) ตามด้วยน้ำ (10 mL) และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> มาเติม Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydrous เพื่อดูดน้ำออก นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product

นำ crude product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค radial chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย hexane (50 mL) ตามด้วย 5%, 10%, 20%, และ 30% EtOAc ใน Hexane ตามลำดับ เพื่อแยกสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมา นำ fraction ของผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump

4. การสังเคราะห์สารประกอบ tris(fluorinated indoyl)methanes จากปฏิกิริยาระหว่าง fluorinated indoles กับ trialkyl orthoformate

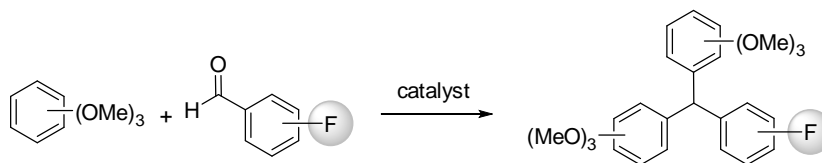


เติมสารตั้งต้น 6-fluoroindole (1 mmol) และ methyl orthoformate (1 mmol) ตามลำดับ ลงไปในขวดก้นกลมที่มี magnetic stirrer และตัวทำละลาย dichloromethane จากนั้นกวนสารละลาย



ด้วยเครื่องกวนสาร (stirrer) ที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวเร่งปฏิกิริยา  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  (10 mol%) ลงไปในสารละลายข้อหนึ่ง กวนสารต่ออีก 30 นาทีลงในสารละลายที่อุณหภูมิห้อง และกวนสารต่อไปที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาจนปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ด้วย thin layer chromatography เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุด หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายอิ่มตัวของ sodium hydrogen carbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) 10 mL สกัดผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกด้วยกรวยแยกโดยใช้ methylene chloride 2 ครั้ง ครั้งละ 10 mL ล้างส่วนสกัดด้วยน้ำ 10 mL ดึงน้ำออกจากตัวทำละลายด้วย anhydrous sodium sulfate หรือ anhydrous magnesium sulfate กรองและนำตัวทำละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator แยก crude product ให้บริสุทธิ์ด้วย column หรือ radial chromatography พบว่าได้สาร JJAF7 น้ำหนัก 0.0822 g (60%)

5. สังเคราะห์สารประกอบ fluorinated triarylmethane (JJBF) จากปฏิกิริยา Friedel-Crafts ระหว่างอะโรมาติกและเฮทเทอโรอะโรมาติกกับอะโรมาติกอัลดีไฮด์ ภายใต้สภาวะการทดลองที่ไม่รุนแรงและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 การสังเคราะห์อนุพันธ์สาร fluorotriarylmethane ด้วยปฏิกิริยา Friedel-Crafts ระหว่างอะโรมาติกหรือเฮทเทอโรอะโรมาติกกับอัลดีไฮด์

#### General procedure A

เติม 1,3,5-trimethoxybenzene 0.3 mL (2.0 mmol) และ 4-fluorobenzaldehyde 0.11 mL (1.0 mmol) ใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติม toluene 1.0 mL และเติม  $\text{I}_2$  10 mol% ปิดหลอดทดลองด้วย septum คนตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดเติมสารละลายอิ่มตัวของ  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  เพื่อเปลี่ยนไอโอดีนที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยาให้เป็นไอโอดีนที่ละลายน้ำได้ ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2x20 mL) ตามด้วยน้ำ (10 mL) และสารละลายอิ่มตัวของ  $\text{NaCl}$  (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  มาทำให้แห้งด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydrous นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump

#### General procedure B

ชั่ง 1,3,5-trimethoxybenzene 0.3364 g (2.0 mmol) และ 4-fluorobenzaldehyde 0.11 mL (1.0 mmol) ใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติม toluene 1.0 mL และเติม  $\text{I}_2$  10 mol% ปิดหลอดทดลอง

ด้วย septum คนตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดเติมสารละลายอิมตัวของ  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  เพื่อเปลี่ยนไอโอดีนที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยาให้เป็นไอโอดีนที่ละลายน้ำได้ ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2x20 mL) ตามด้วย น้ำ (10 mL) และสารละลายอิมตัวของ  $\text{NaCl}$  (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  มาทำให้แห้งด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydrous นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump

### General procedure C

ซึ่ง 1,2,3-trimethoxybenzene (**22**) 0.3364 g (2.0 mmol) และ 4-fluorobenzaldehyde (**19b**) 0.11 mL (1.0 mmol) ใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติม toluene 1.0 mL และเติม  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  10 mol% ปิดหลอดทดลองด้วย septum คนตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดเติมสารละลายอิมตัวของ  $\text{NaHCO}_3$  ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2x20 mL) ตามด้วย น้ำ (10 mL) และสารละลายอิมตัวของ  $\text{NaCl}$  (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  มาทำให้แห้งด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydrous นำไประเหยตัวทำ

### กิจกรรมส่วนที่ 2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้เพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างที่แท้จริงโดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่  $^1\text{H}$ - และ  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy IR spectroscopy High Resolution Mass spectroscopy และ อื่นๆ

### กิจกรรมส่วนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สังเคราะห์ได้

1. การเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7  
เลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งมี 100 U/ml penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, 4 mM L-glutamine, 25 mM D-glucose, 1 mM sodium pyruvate และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ในตู้บอ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %
2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7  
การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์นั้นทดสอบโดยใช้วิธี MTT assay ซึ่งเอนไซม์ dehydrogenase ในไมโตรคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสาร tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ให้เป็นสาร formazan ซึ่งปริมาณสาร formazan ที่เกิดขึ้นนี้มีสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ นำสารบริสุทธิ์ที่สังเคราะห์ได้มาละลายใน DMSO แล้วผสมสารลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (10% FBS ใน DMEM) ให้มีความเข้มข้นต่างๆ พร้อมทั้งใส่ LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้บอ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดใส่สารละลาย MTT แล้วนำกลับไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2

ชั่วโมง จากนั้นละลายสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (Srisook และ Cha, 2004) แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ/ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ) X 100

### 3. การวิเคราะห์แอกทีวิตีของเอนไซม์ iNOS และ COX-2

ไนไตรท์ (nitrite) เกิดจากการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ ที่ผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (10% FBS ใน DMEM) เป็นดัชนีที่บ่งชี้แอกทีวิตีของเอนไซม์ iNOS ปริมาณไนไตรท์ทดสอบได้โดยปฏิกิริยา Griess โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ นำสารบริสุทธิ์ที่สังเคราะห์ได้มาละลายใน DMSO แล้วผสมสารลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ พร้อมทั้งใส่ LPS และเลี้ยงเซลล์ ในตู้บัพ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml และนำอาหารเลี้ยงเซลล์นี้จำนวน 100  $\mu$ l ผสมกับสารละลาย Griess [0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5 % phosphoric acid] จำนวน 100  $\mu$ l จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก sodium nitrite (Srisook และ Cha, 2005) นำตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงมาทดสอบการยับยั้งการผลิต PGE<sub>2</sub> โดยที่ PGE<sub>2</sub> เป็นดัชนีที่บ่งชี้แอกทีวิตีของเอนไซม์ COX-2 ทดสอบโดยวิเคราะห์ปริมาณ PGE<sub>2</sub> ที่ถูกหลั่งจากเซลล์ออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ PGE<sub>2</sub> ELISA kit ในการทดสอบผลของสารทดสอบต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE<sub>2</sub> นี้ จะใช้ยาแก้อักเสบที่ไม่ใช่สารสเตียรอยด์และมีเป้าหมายที่เอนไซม์ iNOS และ COX-2 ที่ขายในท้องตลาดเป็นตัวเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารบริสุทธิ์ที่ได้

## **กิจกรรมส่วนที่ 4** การทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารที่สังเคราะห์ได้ (ทำในปีที่ 2 งบประมาณ พ.ศ. 2560)

1. การทดสอบปริมาณ mRNA ของยีน iNOS และ COX-2 โดยเทคนิค Real time reverse transcription-polymerase chain reaction (real time RT-PCR)

ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน iNOS ในเซลล์ที่สัมผัสกับสารทดสอบ และ LPS สร้าง cDNA จาก RNA ทั้งหมดโดยเอนไซม์ reverse transcriptase และ oligo(dT) primer ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย dNTPs และ RNase Inhibitor โดยทำปฏิกิริยาที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยา real time RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ cDNA ของ iNOS, COX-2 และ EF เปรียบเทียบค่า Cycle of threshold ของผลผลิตที่ได้หลังจากที่ standadize กับ Cycle of threshold ของ EF ในแต่ละปฏิกิริยา

2. การทดสอบการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ โดยเทคนิค Western Blotting

ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน iNOS, และ COX-2 ในเซลล์ที่สัมผัสกับสารทดสอบ และ LPS โดยนำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ มาทำให้เซลล์แตกโดยการเติม RIPA lysis buffer จะได้ whole cell protein extract วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดย BCA protein assay kit (Pierce, U.S.A.) จากนั้นทำการแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE ก่อนย้ายโปรตีนไปที่ PVDF membrane และบ่มด้วย primary antibody ที่

จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ ตามด้วย goat anti-mouse หรือ goat anti-rabbit IgG:horseradish peroxidase secondary antibodies และตรวจวิเคราะห์ผลโดย chemiluminescence โดยใช้ SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce, U.S.A.) เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้บนแผ่น X-ray film หลังจากที่ได้ standadize กับความเข้มของแถบ  $\beta$ -actin ในแต่ละปฏิกิริยาโดยโปรแกรม BIOPROFIL Bio-1D version 11.9 (Vilber Lourmat Biotechnology)

### 3. การทดสอบผลของสารทดสอบต่อการเคลื่อนที่ของ NF- $\kappa$ B เข้าสู่นิวเคลียส

NF- $\kappa$ B เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ดังนั้นจึงทดสอบโดยวิเคราะห์ปริมาณ phospho-I $\kappa$ B  $\alpha$  ในโปรตีนจาก cytosolic extract และ NF- $\kappa$ B/p65 ใน nuclear extract โดยวิธี Western blot analysis และเปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้จากสภาวะที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ กับสภาวะที่เติมสารสังเคราะห์ วิธีแยกโปรตีนจาก cytosolic extract และ nuclear extract อธิบายไว้ใน Srisook และคณะ (2010) โดยมีโปรตีนควบคุมภายในคือ  $\beta$ -actin สำหรับ cytosolic extract และ lamin A สำหรับ nuclear extract

### 4. การทดสอบผลของสารทดสอบต่อการจับของ NF- $\kappa$ B กับดีเอ็นเอโดยเทคนิค electrophoresis mobility shift assay (EMSA)

นำโปรตีนจาก nuclear extract ในข้อ 3 มาจับกับ oligonucleotide ที่จำเพาะกับ NF- $\kappa$ B ( $\kappa$ B site) ซึ่ง oligonucleotide นี้ติดฉลากด้วย biotin จากนั้นนำสารจากปฏิกิริยาที่ได้มาแยกโปรตีนโดย 5% nondenaturing-PAGE ก่อนย้ายโปรตีนไปที่ PVDF membrane และบ่มด้วย primary antibody ที่จำเพาะต่อ biotin ตามด้วย secondary antibodies ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP และตรวจวิเคราะห์ผลโดย chemiluminescence โดยใช้ SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce, U.S.A.) เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้บนแผ่น X-ray film จากเซลล์ในสภาวะที่ให้สัมผัสกับ LPS และ/หรือสารทดสอบ

### 5. การทดสอบผลของสารทดสอบต่อ iNOS promoter activity

ทำการโคลนชิ้นโปรโมเตอร์ของ iNOS ที่ตำแหน่งที่ -1588 ถึง +165 โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะ คือ 5'-GGTACCGACTTTGATATGCTGAAATCCATA-3' และ 5'-GATCTAGTTGACTAGG CTA CTCCGTG-3' ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นโปรโมเตอร์ดังกล่าวจาก gDNA ด้วยวิธี PCR ก่อนนำ PCR product เข้าสู่ พลาสมิด pGEM-T easy vector ทำการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้น inserted DNA ก่อน subclone เข้าสู่ pGL3-basic vector ที่บริเวณ KpnI/BglII จากนั้นนำไป transfection เข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ก่อนให้สัมผัสกับ LPS และ/หรือสารทดสอบ และตรวจสอบ luciferase activity โดยเครื่อง luminometer ในการทดสอบใช้ pSV- $\beta$ -galactosidase control vector เป็นตัวควบคุมภายใน

### 6. การทดสอบผลของสารทดสอบต่อการส่งสัญญาณชีวภาพในวิถี MAPK

เนื่องจากวิถี MAPK เป็นวิถีที่มีการส่งสัญญาณเมื่อมีการกระตุ้นด้วย LPS จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน MAPK ในเซลล์ที่สัมผัสกับสารทดสอบ และ LPS โดยนำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ มาทำให้เซลล์แตกโดยการเติม RIPA lysis buffer จะได้ whole cell protein extract วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดย BCA protein assay kit (Pierce, U.S.A.) จากนั้นทำการแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE ก่อนย้ายโปรตีน

ไปที่ PVDF membrane และบ่มด้วย primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ คือ p38, p-p38, JNK, pJNK, ERK, pERK ตามด้วย goat anti-mouse หรือ goat anti-rabbit IgG:horseradish peroxidase secondary antibodies และตรวจวิเคราะห์ผลโดย chemiluminescence โดยใช้ SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce, U.S.A.) เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้บนแผ่น X-ray film ในแต่ละปฏิกิริยาโดยโปรแกรม BIOPROFIL Bio-1D version 11.9 (Vilber Lourmat Biotechnology)

### บทที่ 3

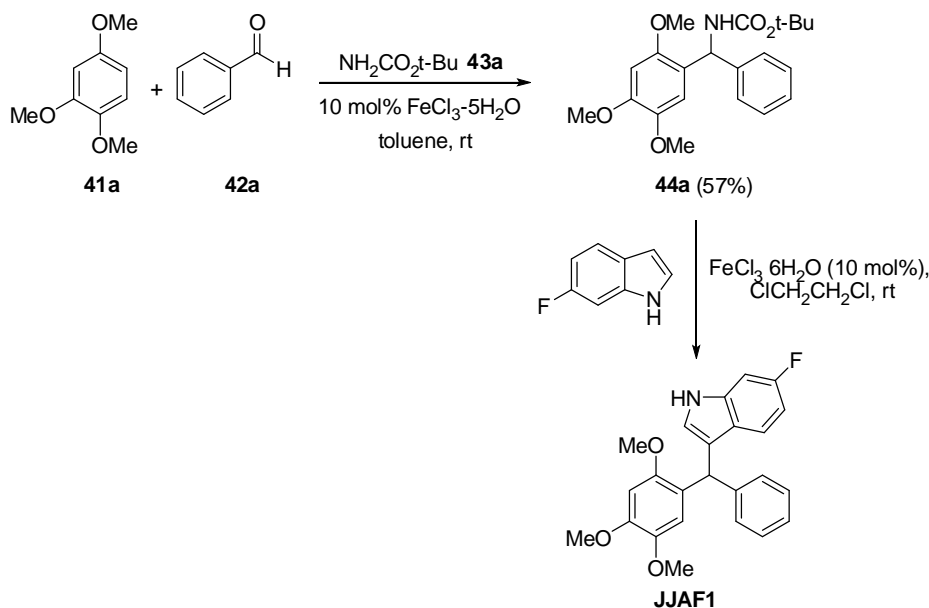
#### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

##### กิจกรรมส่วนที่ 1 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes

1. การสังเคราะห์สารประกอบ 6-fluoro-3-diarylmethylindoles (JJAF1-3) โดยผ่านปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts ตามด้วย Nucleophilic addition ด้วย electron-rich arenes โดยวิธีการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

##### 1) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJAF1)

สาร JJAF1 สังเคราะห์ได้โดยผ่านปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน ในขั้นตอนที่ 1 สังเคราะห์สารตั้งต้น **44a** ด้วยปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts ของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ 1,2,4-trimethoxybenzene, benzaldehyde และ tert-butyl carbamate โดยใช้  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10 mol%) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า ได้สาร **44a** 57 % มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จากนั้นนำสาร **44a** มาทำปฏิกิริยากับ 6-fluoroindole ในตัวทำละลายไดคลอโรอีเทน โดยมี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10 mol%) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้ 6-fluoro-3-diarylmethylindoles (JJAF1) 80% มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง ดังรูปที่ 19

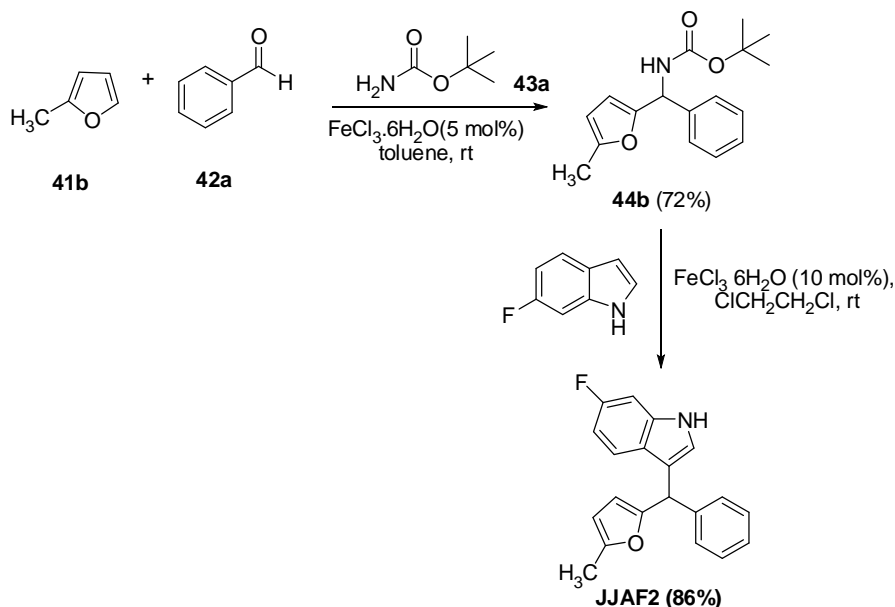


รูปที่ 19 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJAF1)

##### 2) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJAF2)

สาร JJAF2 สังเคราะห์ได้โดยผ่านปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน ในขั้นตอนที่ 1 สังเคราะห์สารตั้งต้น **44b** ด้วยปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts ของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ 2-methylfuran, benzaldehyde และ tert-butyl carbamate โดยใช้  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10 mol%) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

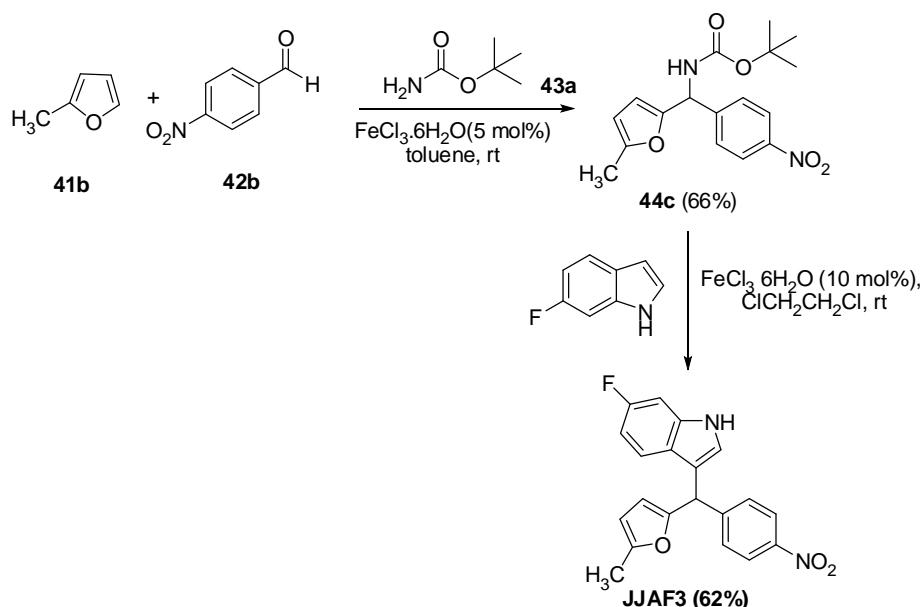
พบว่า ได้สาร **44b** 72 % มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดแดงเข้ม จากนั้นนำสาร **44b** มาทำปฏิกิริยากับ 6-fluoroindole ในตัวทำละลายไดคลอโรอีเทน โดยมี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10 mol%) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้ 6-fluoro-3-diarylmethylindoles (JJAF2) 86% มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง ดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJAF2)

### 3) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJAF3)

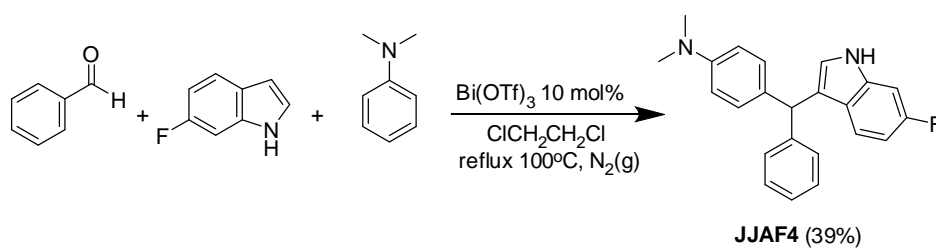
สาร JJAF3 สังเคราะห์ได้โดยผ่านปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน ในขั้นตอนที่ 1 สังเคราะห์สารตั้งต้น **44c** ด้วยปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts ของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ 2-methylfuran, 4-nitrobenzaldehyde และ tert-butyl carbamate โดยใช้  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10 mol%) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า ได้สาร **44c** 66 % มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง จากนั้นนำสาร **44c** มาทำปฏิกิริยากับ 6-fluoroindole ในตัวทำละลายไดคลอโรอีเทน โดยมี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10 mol%) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้ 6-fluoro-3-diarylmethylindoles (JJAF3) 62% มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJAF3)

## 4) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJAF4)

สาร JJAF4 สังเคราะห์ได้ด้วยปฏิกิริยา condensation ของสารตั้งต้น 3 องค์ประกอบโดยใช้สารตั้งต้นเป็น benzaldehyde 0.20 mL (2.0 mmol), 6-fluoroindole 0.1351 g (1.0 mmol) และ *N,N*-dimethylaniline 0.25 mL (2.0 mmol) ในตัวทำละลาย  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$  2.0 mL และใช้  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 °C ภายใต้แก๊สไนโตรเจน พบว่าได้สาร 4-((6-fluoro-1H-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-*N,N*-dimethylbenzenamine (JJAF4) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.1326 g (39%) มีค่า  $R_f = 0.35$  เมื่อใช้ 20% EtOAc ใน hexane เป็นตัวเคลื่อนที่ ดังรูป 22



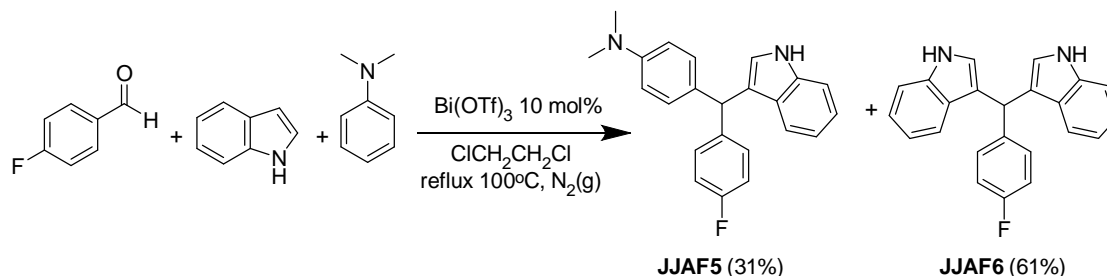
รูปที่ 22 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJAF4)

## 5) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJAF5) และ (JJAF6)

สาร JJAF5 และ JJAF6 สังเคราะห์ได้ด้วยปฏิกิริยา condensation ของสารตั้งต้น 3 องค์ประกอบโดยใช้สารตั้งต้นเป็น 4-fluorobenzaldehyde 0.2145 mL (2.0 mmol), indole 0.1172 g (1.0 mmol) และ *N,N*-dimethylaniline 0.25 mL (2.0 mmol) ในตัวทำละลาย  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$  2.0 mL และใช้  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 °C ภายใต้แก๊สไนโตรเจน พบว่าได้ 4-((1H-



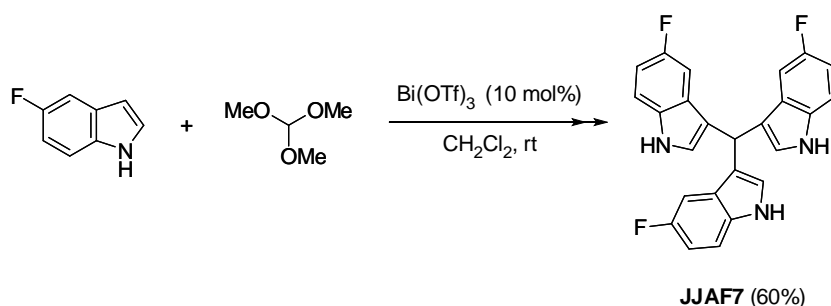
indol-3-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-*N,N*-dimethylbenzenamine (JJAF5) น้ำหนัก 0.1064 g (31%) มีลักษณะเป็นของแข็งสีม่วง มีค่า  $R_f = 0.33$  เมื่อใช้ 20% EtOAc ใน hexane เป็นตัวเคลื่อนที่ และได้ 3,3'-(4-fluorophenyl)methylene)bis(1H-indole) (JJAF6) น้ำหนัก 0.1030 g (61%) มีลักษณะของแข็งสีน้ำเงินและของแข็งสีส้ม มีค่า  $R_f = 0.23$  เมื่อใช้ 20% EtOAc ใน hexane ดังรูป 23



รูปที่ 24 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJAF5 and JJAF6)

#### 6) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJAF7)

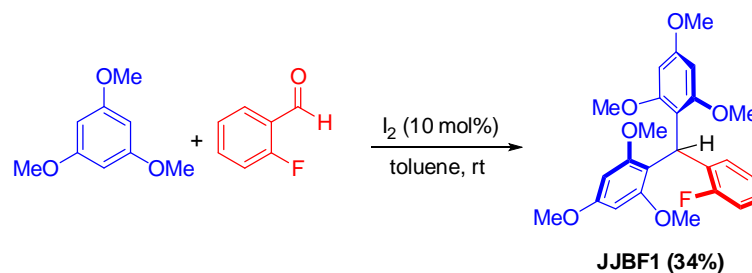
สาร JJAF7 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 6-fluoroindole กับ methyl orthoformate ในตัวทำละลาย dichloromethane ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ภาวะที่มี  $\text{Bi(OTf)}_3$  (10 mol%) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าได้สาร JJAF7 น้ำหนัก 0.0822 g (60%) ดังรูปที่ 25



รูปที่ 25 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJAF7)

#### 7) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF1)

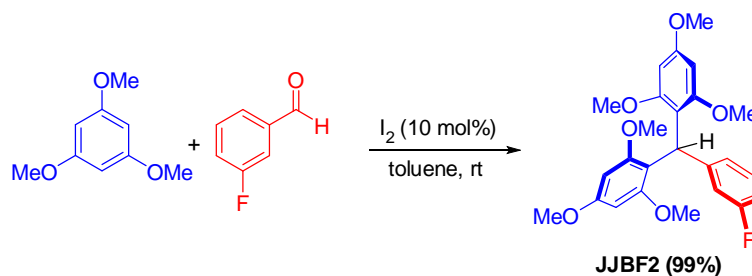
สาร JJBF1 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,3,5-trimethoxybenzene กับ 2-fluorobenzaldehyde ภายใต้ภาวะที่มี  $\text{I}_2$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิห้อง (General procedure B) พบว่าได้สาร JJBF1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.1592 g คิดเป็น 34% ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJB1)

## 8) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJB2)

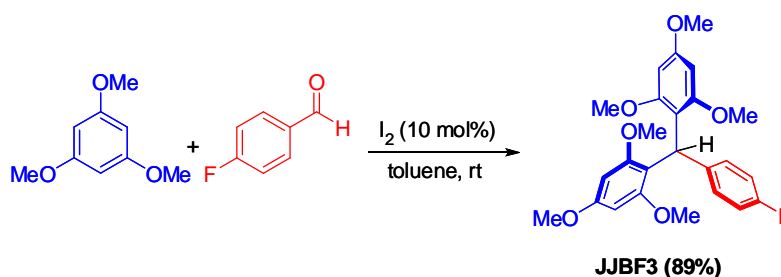
สาร JJB2 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,3,5-trimethoxybenzene กับ 3-fluorobenzaldehyde ภายใต้ภาวะที่มี  $I_2$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิห้อง (General procedure B) พบว่าได้สาร JJB2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.5267 g คิดเป็น 99 % ดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJB2)

## 9) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJB3)

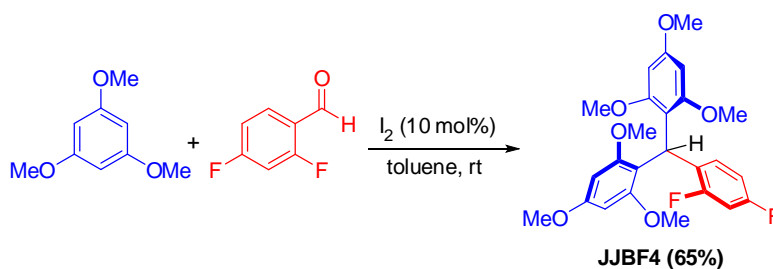
สาร JJB3 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,3,5-trimethoxybenzene กับ 4-fluorobenzaldehyde ภายใต้ภาวะที่มี  $I_2$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิห้อง (General procedure B) พบว่าได้สาร JJB3 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.3928 g คิดเป็น 89 % ดังรูปที่ 28



รูปที่ 28 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJB3)

### 10) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF4)

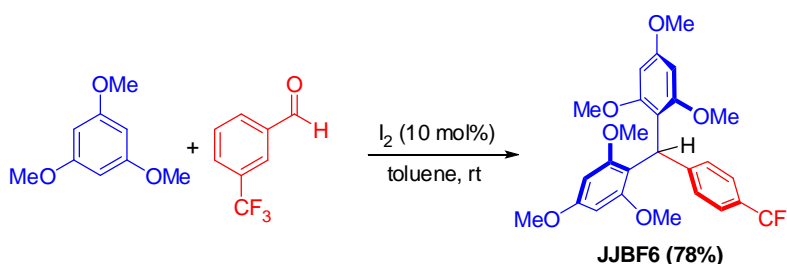
สาร JJBF4 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,3,5-trimethoxybenzene กับ 2,4-difluorobenzaldehyde ภายใต้ภาวะที่มี  $I_2$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิห้อง (General procedure B) พบว่าได้สาร JJBF4 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.2991 g คิดเป็น 65 % ดังรูปที่ 29



รูปที่ 29 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF4)

### 11) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF5)

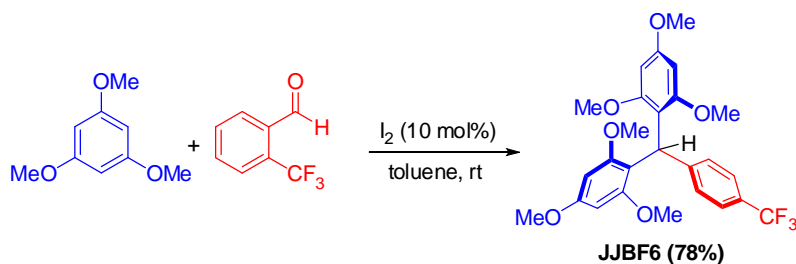
สาร JJBF5 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,3,5-trimethoxybenzene กับ 3-trifluoromethylbenzaldehyde ภายใต้ภาวะที่มี  $I_2$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิห้อง (General procedure B) พบว่าได้สาร JJBF5 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.3379 g คิดเป็น 69 % ดังรูปที่ 30



รูปที่ 30 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF5)

### 12) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF6)

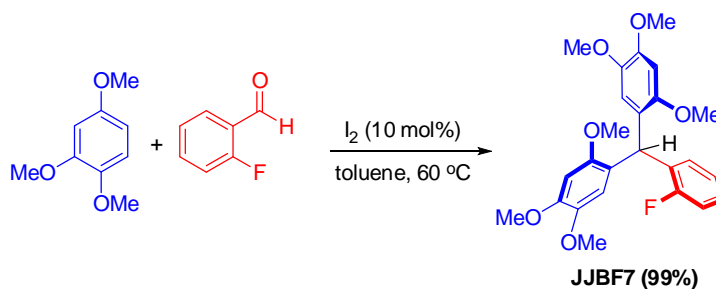
สาร JJBF6 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,3,5-trimethoxybenzene กับ 4-trifluoromethylbenzaldehyde ภายใต้ภาวะที่มี  $I_2$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิห้อง (General procedure B) พบว่าได้สาร JJBF6 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.3842 g คิดเป็น 78 % ดังรูปที่ 31



รูปที่ 31 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJB6)

## 13) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJB7)

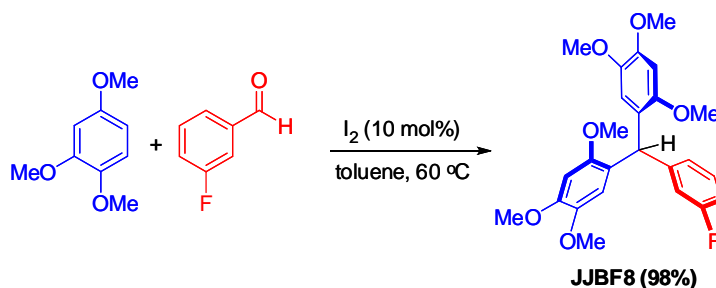
สาร JJB7 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,2,4-trimethoxybenzene กับ 2-fluorobenzaldehyde ภายใต้ภาวะที่มี  $I_2$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิ  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (General procedure A) พบว่าได้สาร JJB7 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก  $0.5040\text{ g}$  คิดเป็น 99% ดังรูปที่ 32



รูปที่ 32 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJB7)

## 14) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJB8)

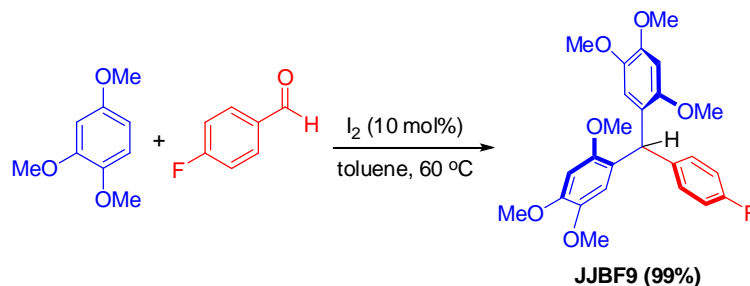
สาร JJB8 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,2,4-trimethoxybenzene กับ 3-fluorobenzaldehyde ภายใต้ภาวะที่มี  $I_2$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิ  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (General procedure A) พบว่าได้สาร JJB8 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก  $0.4378\text{ g}$  คิดเป็น 98% ดังรูปที่ 33



รูปที่ 33 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJB8)

### 15) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF9)

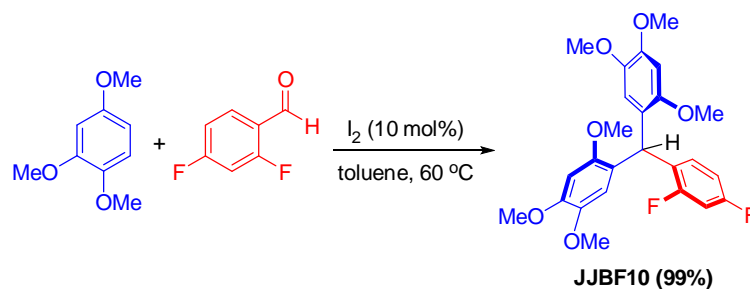
สาร JJBF9 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,2,4-trimethoxybenzene กับ 4-fluorobenzaldehyde ภายใต้ภาวะที่มี  $I_2$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิ  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (General procedure A) พบว่าได้สาร JJBF9 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.4512 g คิดเป็น 99 % ดังรูปที่ 34



รูปที่ 34 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF9)

### 16) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF10)

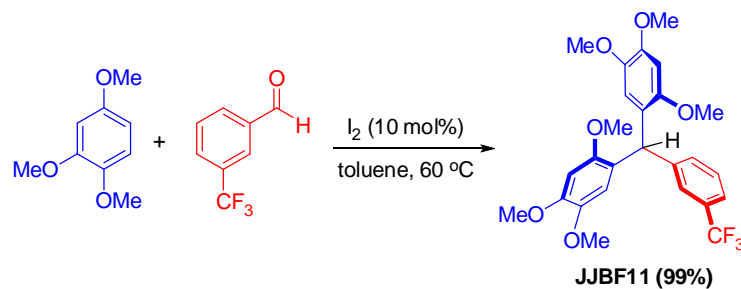
สาร JJBF10 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,2,4-trimethoxybenzene กับ 2,4-difluorobenzaldehyde ภายใต้ภาวะที่มี  $I_2$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิ  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (General procedure A) พบว่าได้สาร JJBF10 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.4610 g คิดเป็น 99 % ดังรูปที่ 35



รูปที่ 35 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF10)

### 17) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF11)

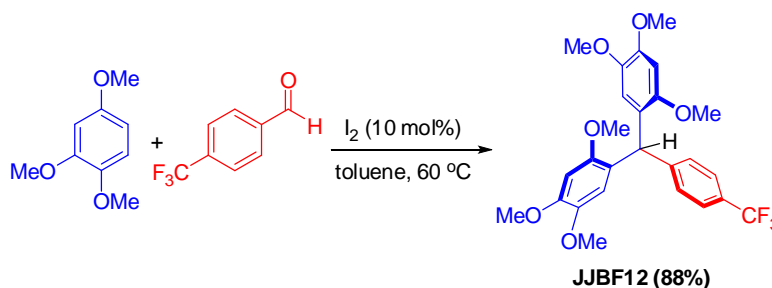
สาร JJBF11 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,2,4-trimethoxybenzene กับ 3-trifluoromethylbenzaldehyde ภายใต้ภาวะที่มี  $I_2$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิ  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (General procedure A) พบว่าได้สาร JJBF11 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.5485 g คิดเป็น 99 % ดังรูปที่ 36



รูปที่ 36 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF11)

**18) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF12)**

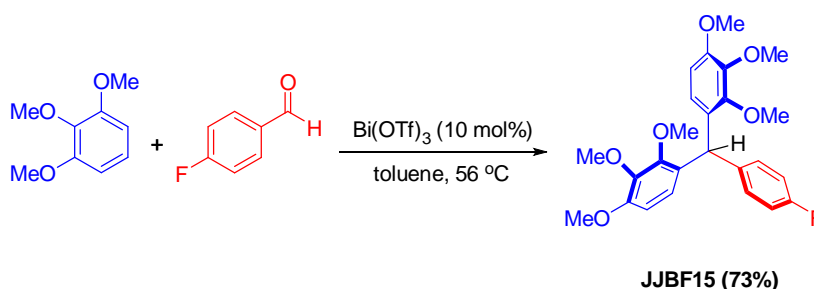
สาร JJBF12 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,2,4-trimethoxybenzene กับ 4-trifluoromethylbenzaldehyde ภายใต้ภาวะที่มี  $I_2$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิ 60 °C (General procedure A) พบว่าได้สาร JJBF12 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.4318 g คิดเป็น 88 % ดังรูปที่ 37



รูปที่ 37 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF12)

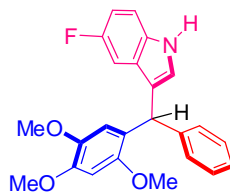
**19) การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF15)**

สาร JJBF15 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,2,3-trimethoxybenzene กับ 4-trifluorobenzaldehyde ภายใต้ภาวะที่มี  $Bi(OTf)_3$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิ 56 °C (General procedure C) พบว่าได้สาร JJBF15 มีลักษณะเป็นของหนืดใสไม่มีสี น้ำหนัก 0.3316 g คิดเป็น 73 % ดังรูปที่ 38

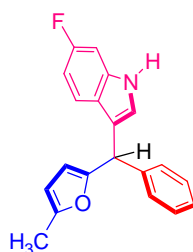


รูปที่ 38 การสังเคราะห์สาร fluorinated triarylmethanes (JJBF15)

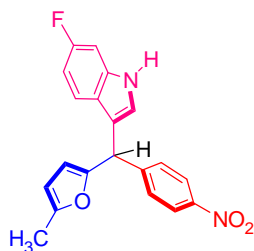
## 2. การพิสูจน์หาเอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีทาง spectroscopy



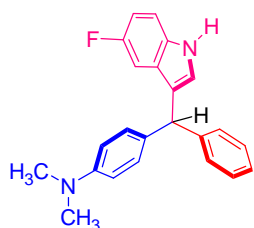
สารประกอบ JJAF1: ของเหลวหนืดสีเหลือง;  $R_f = 0.62$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.04 (s, 1H, 1xNH ของ indole), 7.32-7.23 (m, 5H, 5xCH ของ aromatic), 6.63 (s, 1H, 1xCH ของ 1,2,4-trimethoxybenzene), 6.61 (s, 1H, 1xCH ของ 1,2,4-trimethoxybenzene), 6.55 (s, 1H, 1xCH ของ 6-fluoroindole), 6.01 (s, 1H, 1xCH), 3.92 (s, 3H, 1xCH<sub>3</sub> ของ 1,2,4-trimethoxybenzene), 3.76 (s, 3H, 1xCH<sub>3</sub> ของ 1,2,4-trimethoxybenzene), 3.62 (s, 3H, 1xCH<sub>3</sub> ของ 1,2,4-trimethoxybenzene)  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  161.3 (C), 158.9 (C), 151.5 (C), 148.4 (C), 144.1 (C), 143.1 (C), 128.9 (2xCHPh), 128.2 (2xCHPh), 126.1 (CHPh), 124.3 (C), 123.9 (CH), 120.1 (C), 114.7 (CH), 108.2 (CH), 108.0 (C), 98.4 (CH), 97.5 (CH), 97.5 (CH), 57.1 (OCH<sub>3</sub>), 56.8 (OCH<sub>3</sub>), 56.3 (OCH<sub>3</sub>), 41.0 (CH)



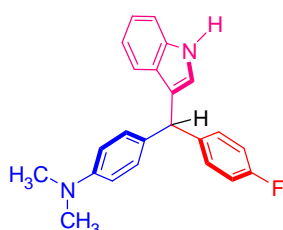
สารประกอบ JJAF2: ของเหลวหนืดสีเหลือง;  $R_f = 0.62$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.00 (s, 1H, 1xNH ของ 6-fluoroindole), 7.34-7.27 (m, 5H, 5xCH ของ aromatic), 7.05 (d, 1H,  $J = 1.7$  Hz, 1xCH ของ 6-fluoroindole), 7.03 (d, 1H,  $J = 1.7$  Hz, 1xCH ของ 6-fluoroindole), 6.82 (d, 1H,  $J = 2.1$  Hz, 1xCH ของ 6-fluoroindole), 6.77 (s, 1H, 1xCH ของ 6-fluoroindole), 5.92 (d, 1H,  $J = 2.6$  Hz, 1xCH ของ 2-methylfuran), 5.85 (d, 1H,  $J = 2.6$  Hz, 1xCH ของ 2-methylfuran), 5.60 (s, 1H, 1xCH), 2.29 (s, 3H, 1xCH<sub>3</sub> ของ 2-methylfuran)  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  161.2 (C), 158.9 (C), 154.9 (C), 151.3 (C), 142.0 (C), 128.5 (2xCHPh), 128.5 (2xCHPh), 126.7 (CHPh), 123.6 (C), 123.6 (CH), 120.6 (CH), 117.9 (C), 108.4 (CH), 108.2 (CH), 106.1 (CH), 97.5 (CH), 42.8 (CH), 13.7 (CH<sub>3</sub>)



สารประกอบ **JJAF3**: ของเหลวหนืดสีเหลือง;  $R_f = 0.62$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.18 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, 2 $\times$ CH), 8.13 (1H, br s, NH), 7.46 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, 2 $\times$ CH), 7.23 (1H, dd,  $J = 5.3, 8.7$  Hz, CH), 7.08 (1H, dd,  $J = 9.5, 2.1$  Hz, CH), 6.83 (1H, td,  $J = 8.4, 1.9$  Hz, CH), 6.81 (1H, br s, CH), 5.92 (1H, d,  $J = 2.6$  Hz, CH ของ furan), 5.88 (1H, d,  $J = 2.6$  Hz, CH ของ furan), 5.68 (1H, s, CH), 2.28 (3H, s,  $\text{CH}_3$ )

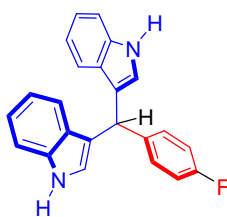


สารประกอบ **JJAF4**: ของแข็งสีขาว;  $R_f = 0.35$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.94 (brs, 1H, NH), 7.33-7.19 (m, 5H, 5 $\times$ CH ของ aromatic), 7.17-7.07 (m, 3H, 3 $\times$ CH ของ aromatic), 7.03 (dd,  $J = 9.4, 2.1$  Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.76 (td,  $J = 9.4, 2.1$  Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.70 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, 2 $\times$ CH ของ aromatic), 6.57 (sd,  $J = 1.0$  Hz, 1H, CH ของ aromatic), 5.56 (s, 1H, CH), 2.94 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  159.9 (d,  $J = 236$  Hz, CF ของ aromatic), 144.4 (CN ของ aromatic), 136.8 (C ของ aromatic), 136.6 (C ของ aromatic), 129.5 (2 $\times$ CH ของ aromatic), 128.8 (2 $\times$ CH ของ aromatic), 128.2 (2 $\times$ CH ของ aromatic), 126.0 (2 $\times$ CH ของ aromatic), 124.2 (CH ของ aromatic), 124.1 (CH ของ aromatic), 123.7 (C ของ aromatic), 120.8 (CH ของ aromatic), 120.7 (CH ของ aromatic), 112.6 (C ของ aromatic), 108.0 (d,  $J = 24$  Hz, CH ของ aromatic), 97.2 (d,  $J = 24$  Hz, CH-CF ของ aromatic), 47.8 (CH), 40.7 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ )

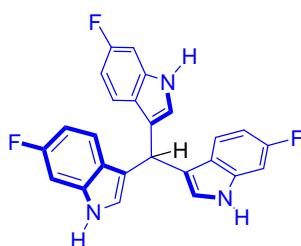




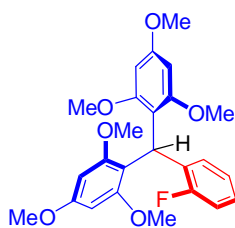
สารประกอบ **JJAF5**: ของแข็งสีม่วง;  $R_f = 0.33$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.94 (brs, 1H, NH), 7.36 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.31-7.18 (m, 4H, 2×CH, ของ aromatic), 7.13 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.08-6.95 (m, 3H, 3×CH ของ aromatic), 6.74 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.58 (brd,  $J = 1.2$  Hz, 1H, CH ของ aromatic), 5.62 (s, 1H, CH), 2.97 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  161.3 (d,  $J = 242$  Hz, CF ของ aromatic), 149.1 (C ของ aromatic), 120.6 (C ของ aromatic), 136.7 (C ของ aromatic), 131.9 (C ของ aromatic), 130.3 (2×CH ของ aromatic), 129.4 (2×CH ของ aromatic), 126.9 (C ของ aromatic), 123.9 (CH ของ aromatic), 122.0 (CH ของ aromatic), 120.5 (C ของ aromatic), 120.0 (CH ของ aromatic), 119.3 (CH ของ aromatic), 114.9 (d,  $J = 21$  Hz, 2×CH-CF ของ aromatic), 112.6 (2×CH ของ aromatic), 111.0 (CH ของ aromatic), 47.1 (CH), 40.7 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ )



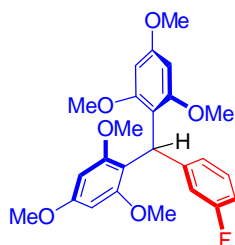
สารประกอบ **JJAF6**: ของแข็งสีส้ม;  $R_f = 0.23$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.82 (brs, 2H, 2×NH), 7.42 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.39-7.29 (m, 4H, 4×CH ของ aromatic), 7.23 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.07 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.00 (t,  $J = 8.4$  Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.61 (sd,  $J = 1.5$  Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 5.91 (s, 1H, CH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  161.4 (d,  $J = 242$  Hz, CF ของ aromatic), 139.7 (2×C ของ aromatic), 136.7 (C ของ aromatic), 130.1 (2×CH ของ aromatic), 126.9 (2×C ของ aromatic), 123.5 (2×CH ของ aromatic), 122.0 (2×CH ของ aromatic), 119.8 (2×CH ของ aromatic), 119.5 (2×C ของ aromatic), 119.3 (2×CH ของ aromatic), 114.9 (d,  $J = 21$  Hz, 2×CH-CF ของ aromatic), 111.1 (2×CH ของ aromatic), 39.4 (CH)



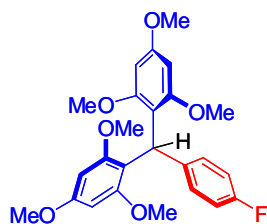
สารประกอบ **JJAF7** ของแข็งสีส้ม; m.p. 203-207 °C;  $R_f = 0.55$  (100%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.94 (br s, 3H, 3xNH), 7.39 (dd,  $J = 8.6$  Hz  $J = 5.4$  Hz, 3xCH), 7.07 (dd,  $J = 9.6$  Hz,  $J = 1.9$  Hz, 3H, 3xCH), 6.82-6.77 (m, 6H, 6xCH), 6.07 (s, 1H, CHPh);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  159.6 ( $U = 235.0$  Hz, C-F), 136.3 ( $U = 12.0$  Hz, C), 123.3 (C), 123.1 ( $U = 3.0$  Hz, C), 120.3 ( $U = 10.0$  Hz, CH), 118.8 (CH), 107.6 ( $U = 24.0$  Hz, CH), 97.0 ( $U = 26.0$  Hz, CH), 31.0 (CHPh); IR (film):  $\nu_{\text{max}}$  3415 (N-H), 1706, 1625, 1496, 1456, 1341, 1304, 1213, 1138, 1089, 951, 836, 804, 749  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_3$   $[\text{M}-\text{H}]^+$  414.1213, found: 414.1214.



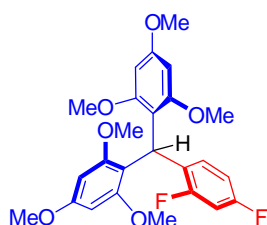
สารประกอบ **JJBF1** ของแข็งสีขาว;  $R_f = 0.29$  (20 % EtOAc ใน hexane);  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.51 (s, 12H, 4xOCH<sub>3</sub>), 3.78 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>), 6.10 (s, 4H, 4xCH ของวง aromatic A), 6.31 (s, 1H, CH), 6.95-6.85 (m, 3H, 3xCH ของวง aromatic B), 7.10-7.70 (m, 1H, CH ของวง aromatic B);  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  31.49 (CH), 55.12 (2xOCH<sub>3</sub>), 55.23 (2xOCH<sub>3</sub>), 55.98 (2xOCH<sub>3</sub>), 91.86 (CH ของ aromatic A), 92.92 (CH ของ aromatic A), 113.53 (2xCH ของ aromatic A), 116.44 (C ของ aromatic B), 122.86 (C ของ aromatic A), 125.90 (C ของ aromatic A), 128.73 (C ของ aromatic B), 130.12 (d,  $J_{\text{CF}} = 4$  Hz, C-C-C-F ของ aromatic B), 132.28 (d,  $J_{\text{CF}} = 15$  Hz, C-C-C-F ของ aromatic B), 159.70 (C ของ aromatic A), 161.94 (d,  $J_{\text{CF}} = 79$  Hz, C-F ของ aromatic B); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  1590 (C=C), 1224 (C-O), 809 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$



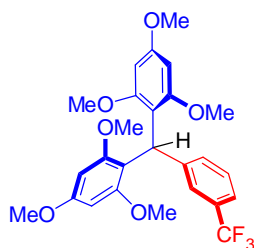
สารประกอบ **JJBF2** ของแข็งสีขาว;  $R_f = 0.27$  (20 % EtOAc ใน hexane);  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.55 (s, 12H, 4xOCH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>), 6.14 (s, 4H, 4xCH ของวง aromatic A), 6.23 (s, 1H, CH), 6.80-6.75 (m, 2H, 2xCH ของวง aromatic B), 6.86 (d,  $J = 7.7$  Hz, H, CH ของวง aromatic B), 7.15-7.05 (m, 1H, CH ของวง aromatic B); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  1603 (C=C), 1224 (C-O), 814 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$



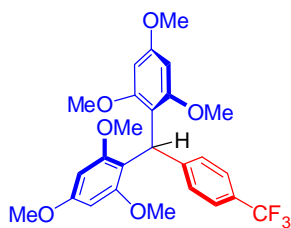
สารประกอบ JJBF3 ของแข็งสีขาว;  $R_f = 0.35$  (20 % EtOAc ใน hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.51 (s, 12H,  $4 \times \text{OCH}_3$ ), 3.78 (s, 6H,  $2 \times \text{OCH}_3$ ), 6.10 (s, 4H,  $4 \times \text{CH}$  ของวง aromatic A), 6.16 (s, 1H, CH), 6.83 (t,  $J = 8.8$  Hz, 2H,  $2 \times \text{CH}$  ของวง aromatic B), 7.00 (dd,  $J = 8.3, 5.8$  Hz, 2H,  $2 \times \text{CH}$  ของวง aromatic B); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  1600 (C=C), 1225 (C-O), 806 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$



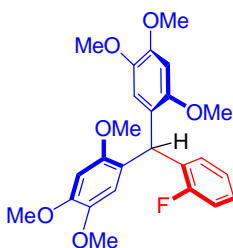
สารประกอบ JJBF4 ของแข็งสีขาว;  $R_f = 0.38$  (20 % EtOAc ใน hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.56 (s, 12H,  $4 \times \text{OCH}_3$ ), 3.81 (s, 6H,  $2 \times \text{OCH}_3$ ), 6.13 (s, 4H,  $4 \times \text{CH}$  ของวง aromatic A), 6.28 (s, 1H, CH), 6.73-6.64 (m, 2H,  $2 \times \text{CH}$  ของวง aromatic B), 6.95-6.85 (m, H, CH ของวง aromatic B); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  1603 (C=C), 1225 (C-O), 811 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$



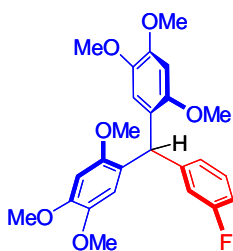
สารประกอบ JJBF5 ของแข็งสีขาว;  $R_f = 0.38$  (20 % EtOAc ใน hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.54 (s, 12H,  $4 \times \text{OCH}_3$ ), 3.82 (s, 6H,  $2 \times \text{OCH}_3$ ), 6.14 (s, 4H,  $4 \times \text{CH}$  ของวง aromatic A), 6.27 (s, 1H, CH), 7.21 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, CH ของวง aromatic B), 7.28 (d,  $J = 6.7$  Hz, 1H, CH ของวง aromatic B), 7.34 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, CH ของวง aromatic B), 7.38 (s, 1H, CH ของวง aromatic B); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  1606 (C=C), 1204 (C-O), 812 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$



สารประกอบ JJBF6 ของแข็งสีขาว;  $R_f = 0.37$  (20 % EtOAc ใน hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.52 (s, 12H, 4xOCH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>), 6.12 (s, 4H, 4xCH ของวง aromatic A), 6.26 (s, 1H, CH), 7.15 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, 2xCH ของวง aromatic B), 7.41 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, 2xCH ของวง aromatic B);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  37.03 (CH), 55.24 (2xOCH<sub>3</sub>), 55.49 (2xOCH<sub>3</sub>), 55.74 (2xOCH<sub>3</sub>), 91.70 (2xCH ของ aromatic A), 113.17 (2xCH ของ aromatic B), 123.92 (2xC ของ aromatic B), 126.38 (2xC ของ aromatic A), 128.14 (2xC ของ aromatic A), 150.26 (2xC ของ aromatic A), 159.61 (d,  $J_{CF} = 28$  Hz, C-F ของ aromatic B); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  1606 (C=C), 1204 (C-O), 811 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$

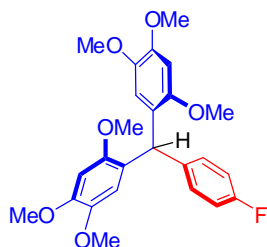


สารประกอบ JJBF7 ของแข็งสีขาว;  $R_f = 0.15$  (20 % EtOAc ใน hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.65 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>), 3.70 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>), 6.29 (s, 1H, CH), 6.42 (s, 2H, 2xCH ของวง aromatic A), 6.57 (s, 2H, 2xCH ของวง aromatic A), 6.88 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, CH ของวง aromatic B), 7.05-6.98 (m, 2H, 2xCH ของวง aromatic B), 7.23-7.15 (m, 1H, CH ของวง aromatic B); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  1608 (C=C), 1205 (C-O), 819 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$

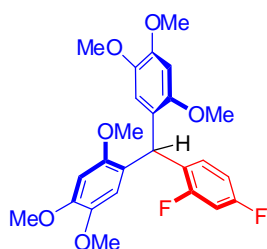


สารประกอบ JJBF8 ของแข็งสีขาว;  $R_f = 0.15$  (20 % EtOAc ใน hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.66 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>), 3.69 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>), 3.91 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>), 6.08 (s, 1H,

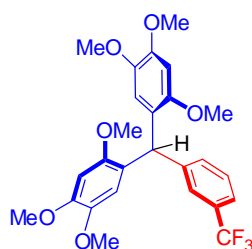
CH), 6.43 (s, 2H, 2xCH ของวง aromatic A), 6.57 (s, 2H, 2xCH ของวง aromatic A), 6.76 (d,  $J = 10.4$  Hz, 1H, CH ของวง aromatic B), 6.90-6.84 (m, 2H, 2xCH ของวง aromatic B), 7.25-7.18 (m, 1H, CH ของวง aromatic B);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  42.37 (CH), 56.09 ( $2\times\text{OCH}_3$ ), 56.71 ( $2\times\text{OCH}_3$ ), 56.89 ( $2\times\text{OCH}_3$ ), 98.33 ( $2\times\text{CH}$  ของ aromatic A), 112.73 (t,  $J_{\text{CCF}} = 28$  Hz, C-C-F ของ aromatic B), 114.52 ( $2\times\text{CH}$  ของ aromatic A), 115.81 (d,  $J_{\text{CF}} = 22$  Hz, C-C-F ของ aromatic B), 129.24 (d,  $J_{\text{CCCF}} = 9$  Hz, C-C-C-F ของ aromatic B), 124.71 ( $2\times\text{C}$  ของ aromatic A), 142.78 (C ของ aromatic B), 148.28 ( $2\times\text{C}$  ของ aromatic A), 147.56 ( $2\times\text{C}$  ของ aromatic A), 151.59 ( $2\times\text{C}$  ของ aromatic A), 162.84 (d,  $J_{\text{CF}} = 243$  Hz, C-F ของ aromatic B); IR (Film):  $\mathbf{V}_{\text{max}}$  1612 (C=C), 1206 (C-O), 819 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$



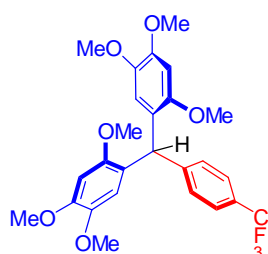
สารประกอบ JJBF9 ของแข็งสีขาว;  $R_f = 0.14$  (20 % EtOAc ใน hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.64 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ), 3.67 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ), 3.88 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ), 6.03 (s, 1H, CH), 6.39 (s, 2H, 2xCH ของวง aromatic A), 6.54 (s, 2H, 2xCH ของวง aromatic A), 6.92 (t,  $J = 8.6$  Hz, 2H, 2xCH ของวง aromatic B), 7.00 (dd,  $J = 8.6, 5.7$  Hz, 2H, 2xCH ของวง aromatic B);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  41.92 (CH), 56.08 ( $2\times\text{OCH}_3$ ), 56.68 ( $2\times\text{OCH}_3$ ), 56.93 ( $2\times\text{OCH}_3$ ), 98.55 ( $2\times\text{CH}$  ของ aromatic A), 113.84 ( $2\times\text{CH}$  ของ aromatic A), 114.45 (d,  $J_{\text{CCF}} = 37$  Hz, C-C-F ของ aromatic B), 124.27 ( $2\times\text{C}$  ของ aromatic A), 140.01 (C ของ aromatic B), 130.33 (d,  $J_{\text{CCCF}} = 8$  Hz, C-C-C-F ของ aromatic B), 142.75 ( $2\times\text{C}$  ของ aromatic A), 148.17 ( $2\times\text{C}$  ของ aromatic A), 151.55 ( $2\times\text{C}$  ของ aromatic A), 161.15 (d,  $J_{\text{CF}} = 242$  Hz, C-F ของ aromatic B); IR (Film):  $\mathbf{V}_{\text{max}}$  1602 (C=C), 1210 (C-O), 819 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$



สารประกอบ **JJBF10** ของแข็งสีขาว;  $R_f = 0.19$  (20 % EtOAc ใน hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.66 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ), 3.70 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ), 3.91 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ), 6.21 (s, 1H, CH), 6.40 (s, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของวง aromatic A), 6.57 (s, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของวง aromatic A), 6.87-6.71 (m, 3H,  $3\times\text{CH}$  ของ aromatic B);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  35.82 (CH), 56.07 ( $2\times\text{OCH}_3$ ), 56.76 ( $2\times\text{OCH}_3$ ), 56.89 ( $2\times\text{OCH}_3$ ), 98.41 ( $2\times\text{CH}$  ของ aromatic A), 103.58 ( $2\times\text{CH}$  ของ aromatic A), 110.55 (d,  $J_{\text{CF}} = 17$  Hz, C-C-F ของ aromatic B), 114.17 (d,  $J_{\text{CCF}} = 37$  Hz, C-C-F ของ aromatic B), 130.52 (d,  $J_{\text{CCCF}} = 5$  Hz, C-C-C-F ของ aromatic B), 127.50 ( $2\times\text{C}$  ของ aromatic A), 130.62 (d,  $J_{\text{CCCF}} = 6$  Hz, C-C-C-F ของ aromatic B), 142.75 ( $2\times\text{C}$  ของ aromatic A), 148.39 ( $2\times\text{C}$  ของ aromatic A), 151.51 ( $2\times\text{C}$  ของ aromatic A), 159.77 (d,  $J_{\text{CF}} = 95$  Hz, C-F ของ aromatic B), 162.24 (d,  $J_{\text{CF}} = 92.5$  Hz, C-F ของ aromatic B); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  1604 (C=C), 1206 (C-O), 819 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$

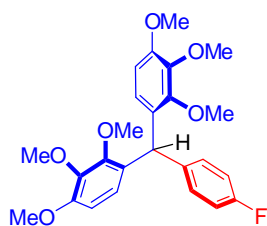


สารประกอบ **JJBF11** ของหนืดสีเหลือง  $R_f = 0.19$  (20 % EtOAc ใน hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.66 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ), 3.68 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ), 3.91 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ), 6.11 (s, 1H, CH), 6.41 (s, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของวง aromatic A), 6.57 (s, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของวง aromatic A), 7.24 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, CH ของวง aromatic B), 7.36 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของวง aromatic B), 7.45 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, CH ของวง aromatic B); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  1609 (C=C), 1207 (C-O), 818 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$



สารประกอบ **JJBF12** ของแข็งสีขาว  $R_f = 0.18$  (20 % EtOAc ใน hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.66 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ), 3.69 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ), 3.91 (s, 6H,  $2\times\text{OCH}_3$ ), 6.12 (s, 1H, CH), 6.42 (s, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของวง aromatic A), 6.57 (s, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของวง aromatic A), 7.18 (d,  $J =$

8.2 Hz, 2H, 2xCH ของวง aromatic B), 7.51 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, 2xCH ของวง aromatic B); IR (Film):  $\nu_{\max}$  1616 (C=C), 1206 (C-O), 818 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$

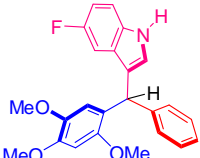
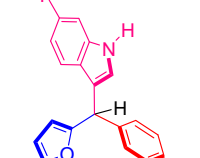
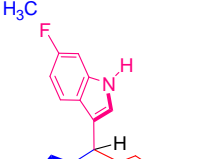
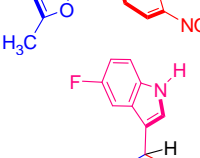
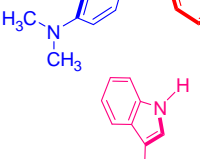
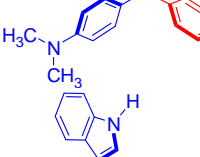
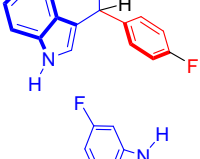


สารประกอบ JJBF15 ของเหลวหนืดใสไม่มีสี  $R_f = 0.24$  (20 % EtOAc ใน hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.60 (s, 6H, 2x $\text{OCH}_3$ ), 3.85 (s, 6H, 2x $\text{OCH}_3$ ), 3.88 (s, 6H, 2x $\text{OCH}_3$ ), 6.07 (s, 1H, CH), 6.49 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H, 2x CH ของวง aromatic A), 6.58 (d,  $J=8.7$  Hz, 2H, 2x CH ของวง aromatic A), 6.97 (t,  $J = 8.7$  Hz, 2H, 2xCH ของวง aromatic B), 7.1 (dd,  $J = 8.4, 5.6$  Hz, 2H, 2xCH ของวง aromatic B); IR (Film):  $\nu_{\max}$  1598 (C=C), 1277 (C-O), 808 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$

### 3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสังเคราะห์

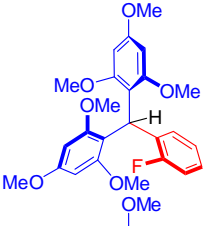
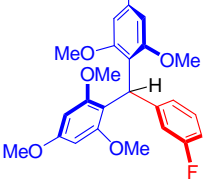
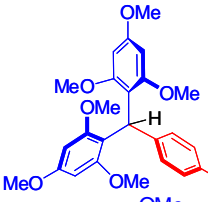
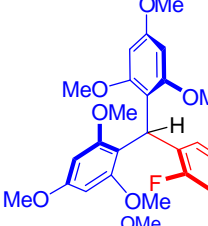
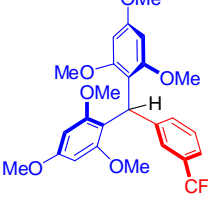
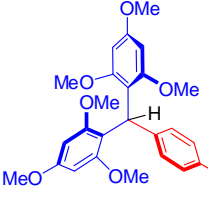
หลังจากที่ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์สารกลุ่ม fluorinated triarylmethane จำนวน 20 ชนิด ในงานวิจัยต่อไปได้นำสารทั้ง 20 ชนิดนี้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเริ่มต้นได้นำไปทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ (% Cell viability) เพื่อดูว่าสารที่สังเคราะห์ขึ้นมานี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 หรือไม่ และมีความสามารถในการต้านอักเสบโดยลดการผลิตไนตริกออกไซด์แมคโครฟาจ RAW 264.7 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS มากน้อยเพียงใด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5

**ตารางที่ 5** ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และผลการการวิเคราะห์แอกทีวิตีของเอนไซม์ iNOS

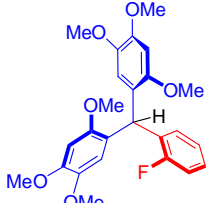
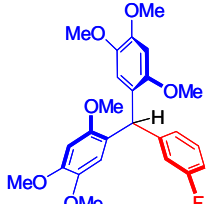
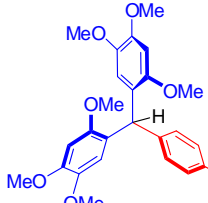
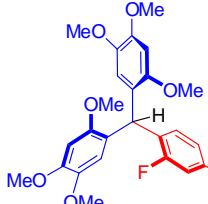
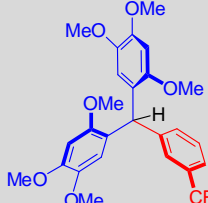
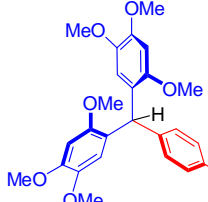
Test compound	Structure	% Cell viability <sup>b</sup>	NO production (inhibition %) <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) of NO inhibition <sup>e</sup>
Control	-	100±0	-	-
LPS	-	92.21 ± 1.39	0	-
AG <sup>d</sup> (50 μM)	-	100.27 ± 0.83	51.73 ± 2.50***	-
DMSO (0.1% v/v)	-	95.39 ± 5.01	-	56.91±1.47
JJAF1		24.33 ± 2.39***	93.54 ± 1.03***	-
JJAF2		3.25 ± 0.12***	95.62 ± 2.54***	-
JJAF3		3.41 ± 0.48***	94.97 ± 1.26***	-
JJAF4		45.72 ± 4.31***	84.82 ± 9.19***	-
JJAF5		4.22 ± 0.75***	95.68 ± 1.57***	-
JJAF6		1.25 ± 0.62***	96.34 ± 1.91***	-
JJAF7		3.67 ± 0.18***	94.57 ± 2.13***	-



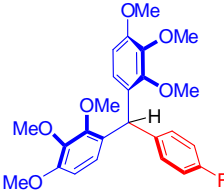
ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และผลการการวิเคราะห์แอกทีวิตีของเอนไซม์ iNOS (ต่อ)

Test compound	Structure	% Cell viability <sup>b</sup>	NO production (inhibition %) <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) of NO inhibition <sup>e</sup>
Control	-	100±0	-	-
LPS	-	92.21 ± 1.39	0	-
DMSO (0.2% v/v)	-	100.27 ± 0.83	51.73 ± 2.50***	-
AG <sup>d</sup> (50 μM)	-	95.39 ± 5.01	-	56.91±1.47
JJBF1		81.43 ± 3.81***	15.30 ± 6.74	-
JJBF2		95.04 ± 3.36	19.65 ± 8.67	-
JJBF3		66.36 ± 6.13***	29.68 ± 11.79***	-
JJBF4		83.41 ± 2.47**	29.51 ± 7.59***	-
JJBF5		94.83 ± 3.19	39.46 ± 6.81***	-
JJBF6		100.85 ± 1.36	35.61 ± 6.23***	-

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และผลการการวิเคราะห์แอกทีวิตีของเอนไซม์ iNOS (ต่อ)

Test compound	Structure	% Cell viability <sup>b</sup>	NO production (inhibition %) <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) of NO inhibition <sup>e</sup>
Control	-	100±0	-	-
LPS	-	92.21 ± 1.39	0	-
DMSO (0.2% v/v)	-	100.27 ± 0.83	51.73 ± 2.50***	-
AG <sup>d</sup> (50 μM)	-	95.39 ± 5.01	-	56.91±1.47
JJBF7		85.54 ± 3.01*	49.47 ± 4.97***	-
JJBF8		81.74 ± 6.24***	59.49 ± 7.80***	-
JJBF9		94.21 ± 6.54	80.83 ± 4.39***	18.76±0.85
JJBF10		86.78 ± 8.73	85.75 ± 1.63***	14.20±0.67
JJBF11		94.14 ± 2.09	80.52 ± 2.35***	6.98±0.47
JJBF12		93.61 ± 1.14	83.11 ± 3.51***	9.65±0.73

**ตารางที่ 5** ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และผลการการวิเคราะห์แอกทีวิตีของเอนไซม์ iNOS (ต่อ)

Test compound	Structure	% Cell viability <sup>b</sup>	NO production (inhibition %) <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) of NO inhibition <sup>e</sup>
Control	-	100±0	-	-
LPS	-	92.21 ± 1.39	0	-
DMSO (0.2% v/v)	-	100.27 ± 0.83	51.73 ± 2.50***	-
AG <sup>d</sup> (50 μM)	-	95.39 ± 5.01	-	56.91±1.47
JJBF15		99.34 ± 1.39	78.63 ± 7.77***	10.58±0.86

<sup>a</sup> All data are mean ± SD of at least three independent experiments with triplicate samples.

<sup>b</sup> Cell viability of each treatment was presented as percentage of unstimulate cells (control).

<sup>c</sup> The percentage inhibition of NO production of each treatment was determined in comparison to LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells (LPS).

<sup>d</sup> AG (Aminoguanidine)-a specific inhibitor of iNOS activity.

<sup>e</sup> Concentration of compound was inhibited the production of nitrite with 50%.

<sup>f</sup> Under our experimental conditions.

\*  $p < 0.05$  compared to LPS-treated cells.

จากผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 พบว่า สารกลุ่ม JJFA1-7 ซึ่งในโครงสร้างประกอบด้วยวง indole หรือ 6-fluoroindole อย่างน้อย 1 วง พบว่าสารทั้ง 7 ตัวมีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ปานกลางถึงสูง โดยสาร JJAF2 JJAF3 และ JJAF5-7 เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่นำมาทดสอบมีชีวิตรอดน้อยกว่า 5% แสดงว่าสารกลุ่ม JJAF1-7 ไม่เหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นสารต้านอักเสบ ขณะที่สารกลุ่ม JJBF1-12 และ JJBF15 ซึ่งภายในโครงสร้างไม่มีวง indole หรือ 6-fluoroindole เป็นส่วนประกอบ แต่โครงสร้างหลักประกอบด้วย triphenylmethane ที่มีหมู่ methoxy และ fluorine อะตอมอยู่ในโครงสร้างตำแหน่งต่างๆ กัน พบว่า JJBF1-2 และ JJBF4-12 และ JJBF15 จำนวน 12 โครงสร้างไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีเพียง JJBF3 ที่แสดงความเป็นพิษในระดับปานกลาง จากนั้นได้นำสาร JJBF1-2 และ JJBF4-12 และ JJBF15 จำนวน 12 โครงสร้างไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบโดยดูความสามารถในการผลิตไนตริกออกไซด์ ผลการทดลองพบว่า สาร JJBF9-12 และ JJBF15 ได้ดีกว่าสาร aminoguanidine ซึ่งใช้เป็น positive control และมีฤทธิ์ในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้มากกว่าร้อยละ 78 และเมื่อพิจารณาค่า IC<sub>50</sub> พบว่าสาร JJBF11 จะมีค่า IC<sub>50</sub> ดีที่สุดคือ 6.98±0.47 μM สารที่มีค่า IC<sub>50</sub> รองลงมาได้แก่ JJBF12 และ JJBF15 โดยมีค่าเท่ากับ 9.65±0.73 และ 10.58±0.86 μM ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า สาร JJBF11 มีความสามารถที่จะนำไปใช้เป็นยาต้านการอักเสบได้ โดยในขั้นตอนต่อไปจะนำสาร JJBF11 ไปทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์โดยวางแผนไว้ที่จะศึกษาในปีที่สอง

#### กิจกรรมส่วนที่ 4 การทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารที่สังเคราะห์ได้

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และการวิเคราะห์แอกทีวิตีของ เอนไซม์ iNOS ของสารประกอบ fluorinated triarylmethanes ในตารางที่ 5 พบว่าสาร สาร **JJBF11** ให้ผลการทดลองที่ดีกว่าสาร aminoguanidine ซึ่งใช้เป็นยาต้านอักเสบในปัจจุบันมาก ในงานวิจัยต่อไปจึง ได้เลือกสาร สาร **JJBF11** ไปทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบซึ่งเป็นส่วนของงานวิจัยที่จะ ดำเนินการต่อในปีที่ 2

## บทที่ 4

### สรุปและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์สารประกอบ fluorine triarylmethane JJAF1-7 จำนวน 7 ชนิด และ JJBF1-12 และ JJBF15 จำนวน 13 ชนิด รวมสาร fluorine triarylmethane ที่สังเคราะห์ทั้งหมด 20 ชนิด โดยสาร JJAF1-3 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts ของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ arenes, aromatic aldehyde และ tert-butyl carbamate ได้เป็นสารประกอบ tert-butyl diarylmethyl carbamate จากนั้นทำปฏิกิริยา Nucleophilic addition โดยการแทนที่หมู่ carbamate ด้วยสารประกอบ indole ขณะที่สาร JJAF4-6 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาแบบขั้นตอนเดียวของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ สารประกอบ indole, 4-fluorobenzaldehyde และ N,N-dimethylaniline หรือสารประกอบ 6-fluoroindole, benzaldehyde และ N,N-dimethylaniline ภายใต้สภาวะที่มี  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  และสารกลุ่ม JJBF1-12 และ JJBF15 สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา Friedel-Crafts ของสารประกอบ 1,3,5-, 1,2,4- หรือ 1,2,3-trimethoxybenzene กับสารประกอบ fluorinated aromatic aldehyde โดยสาร fluorine triarylmethane ทั้ง 20 ชนิดสามารถสังเคราะห์ได้ในปริมาณปานกลางถึงสูง จากนั้นนำสารที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยตรวจสอบจากความสามารถในการผลิตไนตริกซ็อกไซด์ พบว่า สารกลุ่ม JJFA1-7 ซึ่งในโครงสร้างประกอบด้วยวง indole หรือ 6-fluoroindole อย่างน้อย 1 วง พบว่าสารทั้ง 7 ตัวมีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ปานกลางถึงสูง โดยสาร JJAF2 JJAF3 และ JJAF5-7 เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่นำมาทดสอบมีชีวิตรอดน้อยกว่า 5% แสดงว่าสารกลุ่ม JJAF1-7 ไม่เหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นสารต้านอักเสบ ขณะที่สารกลุ่ม JJBF1-12 และ JJBF15 ซึ่งภายในโครงสร้างไม่มีวง indole หรือ 6-fluoroindole เป็นส่วนประกอบ แต่โครงสร้างหลักประกอบด้วย triphenylmethane ที่มีหมู่ methoxy และ fluorine อะตอมอยู่ในโครงสร้างตำแหน่งต่างๆ กัน พบว่า JJBF1-2 และ JJBF4-12 และ JJBF15 จำนวน 12 โครงสร้างไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีเพียง JJBF3 ที่แสดงความเป็นพิษในระดับปานกลาง จากนั้นได้นำสาร JJBF1-2 และ JJBF4-12 และ JJBF15 จำนวน 12 โครงสร้างไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบโดยดูความสามารถในการผลิตไนตริกซ็อกไซด์ ผลการทดลองพบว่า สาร JJBF9-12 และ JJBF15 ได้ดีกว่าสาร aminoguanidine ซึ่งใช้เป็น positive control และมีฤทธิ์ในการยับยั้งไนตริกซ็อกไซด์ได้มากกว่าร้อยละ 78 และเมื่อพิจารณาค่า  $\text{IC}_{50}$  พบว่าสาร JJBF11 จะมีค่า  $\text{IC}_{50}$  ดีที่สุดคือ  $6.98 \pm 0.47 \mu\text{M}$  สารที่มีค่า  $\text{IC}_{50}$  รองลงมาได้แก่ JJBF12 และ JJBF15 โดยมีค่าเท่ากับ  $9.65 \pm 0.73$  และ  $10.58 \pm 0.86 \mu\text{M}$  ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า สาร JJBF11 มีความสามารถที่จะนำไปใช้เป็นยาต้านการอักเสบได้

## บรรณานุกรม

- Aggarwal, R., Masan, E., Kaushik, P., Kaushik, D., Sharma, C. and Aneja, K. R. (2014) "Synthesis and biological evaluation of 7-trifluoromethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidines as anti-inflammatory and antimicrobial agents". *Journal of Fluorine Chemistry* 168, 16-24.
- Armer, R. E., Ashton, M. R., Boyd, E. A. et al. (2005) "Indole-3-acetic acid antagonists of the prostaglandin D2 receptor CRTH2" *Journal of Medicinal Chemistry* 48: 6174-6177.
- Ballester, M., Riera, J., Castaner, J., Rovira, C. and Armed, O. (1986) "An easy, high-yield synthesis of highly chlorinated mono-, di- and triarylmethanes,". *Synthesis* 64-66.
- Cannella, R., Clerici, A., Pastori, N., Regolini, E. and Porta, O. (2005) "One-pot four-component reaction: Aqueous  $TiCl_3/PhN_2^+$ -mediated alkyl radical addition to imines generated in situ". *Organic Letters* 7, 645-648.
- Chakrabarty, M. and Sark, S. (2002) "Novel clay-mediated, tandem addition-elimination-(Michael) addition reactions of indoles with 3-formylindole: an eco-friendly route to symmetrical and unsymmetrical triindolylmethanes". *Tetrahedron Letters* 43, 1351-1353.
- Cozzi, P., Mongelli, N., Suarato, A. (2004) "Recent anticancer cytotoxic agents" *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents* 4, 93-121.
- Danenberg, P V. (2004) "Pharmacogenomics of thymidylate synthase in cancer treatment". *Frontiers in Bioscience* 9, 2484-2494.
- Dent, H., O'Hagan, D., Schaffrath, C. (2004) "Fluorometabolite biosynthesis and the fluorinase from *Streptomyces cattleya*" *Natural Product Reports* 21, 773-784.
- El-Feky, S. A., Thabet, H. Kh., Ubeid, M. T. (2014) "Synthesis, molecular modeling and anti-inflammatory screening of novel fluorinated quinolone incorporated benzimidazole derivatives using the Pfitzinger reaction". *Journal of Fluorine Chemistry* 161, 87-94.
- Esquivias, J., Arrayas, R. G. and Carretero, J. C. (2006) "A copper(II)-catalyzed aza-Friedel-Crafts reaction of N-(2-pyridyl)sulfonyl aldimines: synthesis of unsymmetrical diary amines and triarylmethanes". *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 629-633 and references cited therein.
- Isanbor, C., O'Hagan, D. (2006) "Fluorine in medicinal chemistry: a review of anti-

- cancer agents” *Journal of Fluorine Chemistry* 127, 303-319.
- Jereb, M., Vrazic, D. and Zupan, M. (2011) “Iodine-catalyzed transformation of molecules containing oxygen functional group”. *Tetrahedron* 67, 1355-1387.
- Kodomari, M., Nagamatsu, M. Akaike, M. and Aoyama, T. (2008) “Convenient synthesis of triarylmethanes and 9,10-diarylanthracenes by alkylation of arenes with aromatic aldehydes using acetyl bromide and  $ZnBr_2/SiO_2$ ”. *Tetrahedron Letters* 49, 2537-2540.
- Konno, T., Daitoh, T., Noiri, A. et al. (2004) “A highly regio- and stereoselective carbocupration of fluoroalkylated internal alkynes: a short total synthesis of the antiestrogenic drug panomifene”. *Organic Letters* 6, 933-936.
- Lewis, M. R. and Goland, P. P. (1952) “The tumor-inhibitory activity of diaryl- and triarylmethane dyes. I. The ethylic ascites mouse tumor”. *Cancer Research* 12, 130-136.
- Li, Z., Duan, Z., Kang, J., Wang, H., Yu, L. and Wu, Y. (2008) “A simple access to triarylmethane derivatives from aromatic aldehydes and electron-rich arenes catalyzed by  $FeCl_3$ ”. *Tetrahedron* 64, 1924-1930.
- Lin, S. and Lu, X. (2007) “Cationic Pd(II)/bipyridine-catalyzed addition of arylboronic acids to arylaldehydes. One-Pot synthesis of unsymmetrical triarylmethanes”. *Journal of Organic Chemistry* 72, 9757-9760.
- Mibu, N., Yokomizo, K., Uyeda, M. and Sumoto, K. (2005) “Synthesis and antiviral activities of some 4,4'- and 2,2'-dihydroxytriphenylmethanes”. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 53, 1171-1174.
- More, A. H. and Ramaa, C. S. (2010) “Synthesis and anti-inflammatory activity of fluorinated propanedione derivatives”. *Indian Journal of Chemistry* 49B, 364-367.
- Nair, V., Abhilash, K. G. and Vidya, N. (2005) “Practical synthesis of triaryl- and triheteroarylmethanes by reaction of aldehydes and activated arenes promoted by gold(III) chloride”. *Organic Letters* 26, 5857-5859.
- Nair, V., Abhilash, K. G. and Vidya, N. (2006) “Efficient condensation reactions of electron-rich arenes with aldehydes and enals promoted by gold(III) chloride: Practical synthesis of triaryl- and triheteroarylmethanes and related compounds”. *Synthesis* 21, 3647-3653.
- Nair, V., Thomas, S., Mathew, S. C. and Abhilash, K. G. (2006) “Recent advances in the chemistry of triaryl- and triheteroarylmethanes”. *Tetrahedron* 62, 6731-6747.

- Niwa, T., Yorimitsu, H. and Oshima, K. (2007) "Palladium-catalyzed direct arylation of aryl(azaaryl)methanes with aryl halides providing triarylmethanes". *Organic Letters* 9, 2373-2375.
- O'Hagan, D. (2010) "Fluorine in health care: organofluorine containing blockbuster drugs". *Journal of Fluorine Chemistry* 131, 1071-1081.
- Olsen, J. A., Banner, D. W., Seiler, P., et al. (2004) "Fluorine interactions at the thrombin active site: protein backbone fragments H-C(alpha)-C=O comprise a favorable C-F environment and interactions of C-F with electrophiles". *ChemBioChem*. 5, 666-675.
- Parai, M. K., Panda, G., Chaturvedi, V., Manju, Y. K. and Sinha, S. (2008) "Thiophene containing triarylmethanes as antitubercular agents". *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18, 289-292.
- Paulini, R., Mueller, K., Diederich, F. (2005) "Orthogonal Multipolar Interactions in Structural Chemistry and Biology" *Angewandte Chemie International Edition* 44, 1788-1805.
- Penning, T. D. Talley, J. J. Bertenshaw, S. R. et al. (1997) "Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 Inhibitors: identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib)". *Journal of Medicinal Chemistry* 40, 1347-1365.
- Podder, S., Choudhury, J., Roy, U. K. and Roy, S. (2007) "Dual-reagent catalysis within Ir-Sn domain: Highly selective alkylation of arenes and heteroarenes with aromatic aldehydes". *Journal of Organic Chemistry* 72, 3100-3103.
- Qadeer, G., Rama, N. H., Garduno-Ramirez, M. L. (2007) "Synthesis and anti-Inflammatory activity of fluorinated isocoumarins and 3,4-dihydroisocoumarins". *Journal of Fluorine Chemistry* 128, 641-646.
- Reese, C. B. and Yan, H. (2001) "Reactions between pyrrole and orthoesters: preparation of tri-(pyrrol-2-yl)alkanes". *Tetrahedron Letters* 42, 5545-5547.
- Rudzevich, Y., Rudzevich, V., Schollmeyer, D., Thondord, I. and Bohmer, V. (2005) "Hydrogen bonded dimers of triurea derivatives of triphenylmethanes". *Organic Letters* 7, 613-616.
- Santen, R. J. and Harvey, H. A. (1999) "Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma" *Endocrine Related Cancer* 6, 75-92.
- Shagufta, Srivastava, A. K. Sharma, R., Mishra, R. Balapure, A. K., Murthy, P. S. R. and



- Panda, G. (2006) "Substituted phenanthrenes with basic amino side chains: A new series of anti-breast cancer agents". *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 1497-1505.
- Shirakawa, S. and Kobayashi, S. (2006) "Carboxylic acid catalyzed three-component aza-Friedel-Crafts reactions in water for the synthesis of 3-substituted indoles". *Organic Letters* 8, 4939-4942.
- Srivastava, N., Sangita, Ray, S. Singh, M. M., Dwivedi, A. and Kumar, A. (2004) "Diaryl naphthyl methanes a novel class of anti-implantation agents". *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, 1011-1012.
- Stroganova, T. A., Butin, A. V., Sorotskaya, L. N. and Kul'nevich, V. G. (2000) "Aryl(2-furyl)alkanes and their derivatives, 20.<sup>1</sup> Synthesis of symmetric bis- and tris(2-furyl)methanes". *Arkivoc*, 6411-659.
- Togo, H. and Iida, S. (2006) "Synthetic use of molecular iodine for organic synthesis". *Synlett* 14, 2159-2175.
- Tunctan, B., Altug, S., Uludag, O., Demirkay, B., Abacioglu, N., (2003). Effects of cyclooxygenase inhibitors on nitric oxide production and survival in a mice model of sepsis. *Pharmacological Research* 48, 37.
- Yu, J.-Y. and Kuwano, R. (2008) "Suzuki-Miyaura coupling of diarylmethylcarbonates with arylboronic acids: A new access to triarylmethanes". *Organic Letters* 10: 973-976.
- Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Cross, C.E. (2000) "Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease?" *Respiratory Research* 1, 67.

### ผลผลิตของโครงการวิจัย (Output / Outcome)

1. Siritanyong, W., Jaratjaroonphong, J., & Srisook, K. (2017). Nitric oxide inhibitory activity of selected fluorinated triarylmethane derivatives in LPS-activated RAW 264.7 macrophage. In *proceeding of Pure and Applied Chemistry International Conference 2017* (pp. 944-949). Bangkok: Mongkut's University of Technology North Bangkok.
2. ชญามน จันทนา, จุฬารัตน์ ไม้หอม, วิภาดา ศิริตันหยง, กล่าวขวัญ ศรีสุขและ จเร จรัสจรรยาพงศ์\* (๒๕๖๐). การสังเคราะห์สารฟลูออโรไตรเอริลมีเทนที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ. ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 9” หน้า CH63-71 ชลบุรี มหาวิทยาลัยบูรพา (25-26 พฤษภาคม 2560)
3. Chantana, C., Siritanyong, W., Srisook, K., & Jaratjaroonphong, J. Facile synthesis of fluorinated triarylmethanes as a novel potent anti-inflammatory agents. (Manuscript in preparation).
4. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ ระดับปริญญาโท 2 คน โดยเป็น สาขาเคมี 1 คน คือ นางสาวชญามน จันทนา และ สาขาชีวเคมี 1 คน ได้แก่ นางสาววิภาดา ศิริตันหยง ระดับปริญญาตรี สาขาเคมี จำนวน 1 คน คือ นางสาวจุฬารัตน์ ไม้หอม

## รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก)...2559A10802172.....สัญญาเลขที่...66/2559.....

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านการอักเสบของอนุพันธ์ฟลูออโรไตรเออร์ลิมีเทน

(ภาษาอังกฤษ) **Synthesis and Anti-Inflammatory Evaluation of  
Fluorinated Triarylmethane Derivatives**

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร. จเร จรัสจรรยาพงศ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน พ.ศ. 2560

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 9 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558

### รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50 %) 440,000 บาท เมื่อวันที่ 28 ธันวาคม พ.ศ. 2558

งวดที่ 2 (40 %) 352,000 บาท เมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม พ.ศ. 2559

งวดที่ 3 (10 %) 88,000 บาท เมื่อวันที่

รวม 880,000 บาท

### รายจ่าย

รายการ	งบประมาณ ที่ตั้งไว้	งบประมาณ ที่ใช้จริง	จำนวนเงิน คงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	176,000 บาท	187,500 บาท	- บาท
2. ค่าจ้าง	126,000 บาท	126,000 บาท	- บาท
3. ค่าวัสดุ	467,000 บาท	455,500 บาท	- บาท
4. ค่าใช้สอย	70,000 บาท	70,000 บาท	- บาท
5. ค่าครุภัณฑ์	- บาท	- บาท	- บาท
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ ได้แก่ ค่าสาธารณูปโภค โดย สนับสนุนให้มหาวิทยาลัยเป็นจำนวน 10 %	88,000 บาท	88,000 บาท	- บาท
รวม	880,000 บาท	880,000 บาท	- บาท

(.....)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน