หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

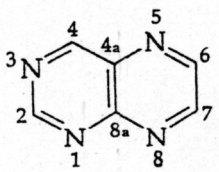
บทที่ 1

บทนำ

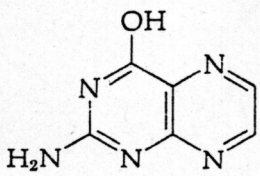
1.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของ 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซีพเทอริดีนหรือพเทอริน (pterine)

2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7, 8-ไดไฮโดรพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต (2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7, 8-dihydropteridine pyrophosphate; DHPP) เป็นสารประกอบหนึ่งซึ่งเป็นสารระหว่างกลาง (intermediate) ในวิถีของชีวสังเคราะห์ (biosynthetic pathway) ของเตตระไฮโดรโฟเลต (tetrahydrofolate) (Jaenicke และ Chan, 1960) สารนี้สามารถเตรียมขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการ แต่อย่างไรก็ดีการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพยังมีไม่มากนัก เนื่องจาก DHPP ประกอบด้วยวงพเทอริดีน (pteridine) ดังนั้นคุณสมบัติของ DHPP ควรจะคล้ายคลึงกับอนุพันธ์ของพเทอริดีนอื่น ๆ

พเทอริดีนประกอบด้วยวงไพริมิดีน (pyrimidine ring) เชื่อมติดกับวงไพราซีน (pyrazine ring) ส่วนพเทอรินคือ 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซีพเทอริดีน พเทอริดีนและพเทอรินมีสูตรโครงสร้างดังนี้

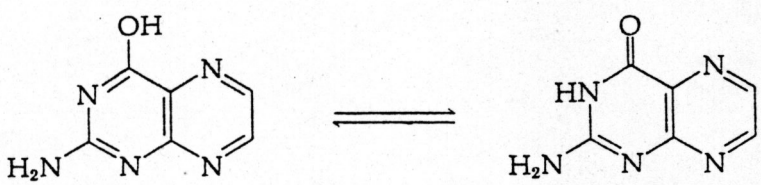


พเทอริดีน



พเทอริน

พเทอรินจะอยู่ในสภาวะสมดุลระหว่างสารประกอบ enolic (I) และสารประกอบ amide (II) ตามรูปที่แสดงดังนี้



(I) (II)

โดยปกติพเทอรินจะอยู่ในรูปของสารประกอบ amide (II) มากกว่าในรูปของสารประกอบ enolic (I) (Pfleiderer และคณะ, 1960: Brown และ Jacobson, 1961) แต่ถึงอย่างไรก็ตามรูปของสารประกอบ (I) นิยมเขียนกันมากกว่ารูปของสารประกอบ (II) ในทางชีวเคมี

พเทอริดีน (Albert และคณะ, 1951) เป็นของแข็งมีสีเหลือง, ไวต่อแสงและจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเมื่อถูกกับแสง สามารถละลายได้ดีทั้งในน้ำและในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) พเทอริดีนมีคุณสมบัติไม่เสถียร เมื่อถูกแทนที่ด้วยหมู่แทนที่ตำแหน่งที่ 4 จะทำให้พเทอริดีนมีความเสถียรมากขึ้นและถ้ามีการแทนที่ทั้งในตำแหน่งที่ 2 และ 4 ความเสถียรก็ยิ่งเพิ่มมากขึ้น หมู่แทนที่ของพเทอริดีน (Albert, 1952) จะมีผลต่อคุณสมบัติในการละลายและจุดหลอมเหลวของพเทอริดีนคือ พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ของหมู่แทนที่ระหว่างโมเลกุลของพเทอริดีนจะทำให้พเทอริดีนมีจุดหลอมเหลวสูงขึ้นและความสามารถในการละลายต่ำลง และหมู่แทนที่ที่ให้อิเล็กตรอน (electron-donating substituent) จะทำให้โมเลกุลเสถียรขึ้น หมู่แทนที่เหล่านี้ได้แก่ หมู่อะมิโน (amino group), หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) และหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl group) หมู่แทนที่ที่ให้อิเล็กตรอนทำให้พเทอริดีนเสถียรขึ้น ความเสถียรของพเทอริดีนจะลดลงเมื่อถูกรีดิวส์ (reduced) ไฮโดรจีเนชั่น (hydrogenation) ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในวงไพราซีนเนื่องจากถูกไฮโดรจีเนตได้ง่าย (O'Dell และคณะ, 1947; Pohland และคณะ, 1951; Codulich และคณะ, 1952) ในขณะที่วงไพริมิดีนถูกไฮโดรจีเนตได้ยาก (Brown และ Johnson, 1923; Lythgoe และ Rayner, 1951) โดยเฉพาะในสารละลายที่เป็นด่าง

เมื่อใช้ไดไทโอไนต์ (dithionite) ในการรีดิวส์พเทอรินจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น 7, 8-ไดไฮโดรพเทอริน ซึ่งอาจแสดงโครงสร้างทางเคมีได้โดยอุลตราไวโอเลตสเปกตรา (ultraviolet spectra) และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรา (nuclear magnetic resonance spectra) (Forrest และ Nawa, 1962 ; Pastore และคณะ, 1963 ; และ Hillcoat และ Blakley,1964 , Struat และคณะ, 1964; Zukzewski, 1966; และ Whiteley และ Huennekens, 1967; Fushima และ Akino, 1968; Viscontini และ Furuta, 1973) Rinker และคณะ (1959) พบว่ามี SO_2^- radical ion อยู่ในสารละลาย

โซเดียมไดไทโอไนต์ (sodium dithionite) โดยอิเล็กตรอนพาราแมกเนติกเรโซแนนซ์ (electron paramagnetic resonance) Kawai และคณะ (1970) ได้เสนอกลไกของการเกิดไดไฮโดรโฟเลต (dihydrofolate) จากโฟเลต (folate) โดย SO_2^- free radical

7, 8-ไดไฮโดรพเทอรินอาจถูกออกซิไดส์ (oxidised) ไปเป็นพเทอรินตามเดิมในสารละลายที่เป็นกรดหรือด่าง (Lister และคณะ, 1954) สารที่ใช้ในการรีดิวส์พเทอรินได้แก่ โซเดียมไดไทโอไนต์ (sodium dithionite) (Friedkin และคณะ, 1962; Nagai, 1968), โซเดียมไบโรไฮไดรด์ (sodium borohydride) (Shiota และคณะ, 1962), โปตัสเซียมไบโรไฮไดรด์ (potassium borohydride) (Smith และคณะ, 1963) และสารที่ใช้ในการป้องกันการถูกออกซิไดส์ของพเทอริน ได้แก่กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) (May และคณะ, 1951), 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol) (Osborn และ Huennekens, 1958), 2,3-ไดเมอร์แคปโตโพรพานอล (2,3-dimercaptopropanol) (Blakley, 1958) และไดไทโอทรีทอล (dithiothreitol) (Ferone, 1973)

สารประกอบพเทอริดีนมีช่วงของการดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum absorption peak) ในอุลตราไวโอเลตสเปกตราที่สำคัญ 2 ช่วง (peak) คือที่ความยาวคลื่นแสงประมาณ 280 และ 330 นาโนเมตร ในการหาปริมาณความเข้มข้นของ 7, 8-ไดไฮโดรพเทอรินอาจหาได้โดยการคำนวณจากความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 330 นาโนเมตร และ molar extinction coefficient ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.2×10^3 (โมล/ลิตร)$^{-1}$ (เซนติเมตร)$^{-1}$ ที่ pH เป็นกลาง (Nagai, 1968) ซึ่ง Shiota และคณะ (1968) ได้นำมาใช้ในการหาความเข้มข้นของ 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7, 8-ไดไฮโดรพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต (DHPP) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้

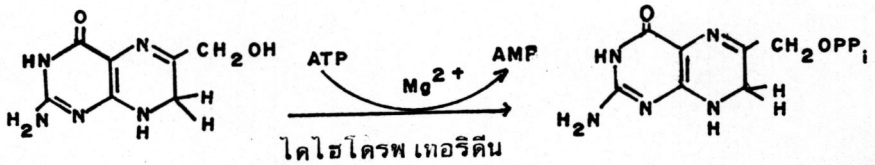
1.2 คุณสมบัติของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส

ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไดไฮโดรพเทอโรเอต (dihydropteroate) จากกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก (*p*-aminobenzoic acid; PABA) และ 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7, 8-ไดไฮโดรพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต (DHPP) (Brown และคณะ, 1961; Weisman และ Brown, 1964; Shiota

และ Disraeley,1961; Richey และ Brown, 1969) ไดไฮโดรพเทอโรเอตเป็นสาร ระหว่างกลาง(intermediate) ชนิดหนึ่งในขบวนการสังเคราะห์เตตระไฮโดรโฟเลต ซึ่งเป็น โคเอนไซม์ (co-enzyme) ในการสังเคราะห์พิวรีน (Buchanan และ Sonne, 1946), เซรีน (Elwyn และ Sprinson, 1950), เมไทโอนีน (Sakami และ Welch, 1950) และไทมีน (Friedkin และ Kornberg,1957) ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส พบในจุลชีพหลายชนิด ในแบคทีเรียเช่น *Escherichia coli* (Brown และคณะ, 1961), *Lactobacillus plantarum* (Shiota และ Disraeley, 1961), *Veillonella* strain V_2 (Shiota และคณะ, 1964), *Diplococcus pneumoniae* (Ortiz, 1970), *Neisseria menigitis, Neisseria gonorrhoeae* (Ho และคณะ, 1974), *Serratia indica* (Iwai และ Kabashi,1975), ในยีสต์ (Jaenicke และ Chan, 1960), ในโปรโตซัว เช่น *Plasmodium berghei* (Ferone , 1973), *Plasmodium chabaudi* (Walter และ Konick , 1974) และในพืช (Mitsuda และ Suzuki, 1968; Iwai และคณะ, 1968; Okinaka และ Iwai, 1969)

Ferone และ Webb (1975) และ Suckling (1977) พบว่ากลไกการเข้าจับกับไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส ของซับสเตรต (substrate) เป็นกลไกที่เป็นระเบียบ (ordered mechanism) กล่าวคือ DHPP เป็นซับสเตรตตัวแรกและจะเหนี่ยวนำบริเวณยึด (binding site) ของเอนไซม์สำหรับซับสเตรตที่สองคือ กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกและได้ผลิตภัณฑ์ เป็นไดไฮโดรพเทอโรเอต Ferone และ Webb พบว่าทั้ง DHPP และไดไฮโดรพเทอโรเอตจะ ป้องกันเอนไซม์จากการถูกทำลายสภาพตามธรรมชาติ (denature) ด้วยความร้อน แต่ไม่ สามารถป้องกันเอนไซม์จากการถูกทำลายสภาพตามธรรมชาติโดยกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก และไพโรฟอสเฟต (pyrophosphate)

วิถีของขบวนการสังเคราะห์ไดไฮโดรโฟเลตใน *Serratia indica* (Iwai และ Kabashi, 1975) โดยเริ่มต้นจาก 2-อะมิโน-4-ออกโซ-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7, 8-ไดไฮโดร-พเทอริดีน (2-amino-4-oxo-6-hydroxymethyl-7, 8-dihydropteridine) ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1

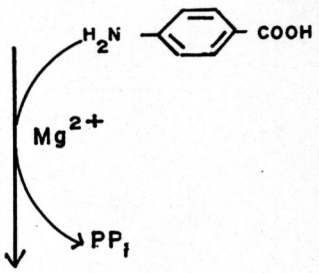


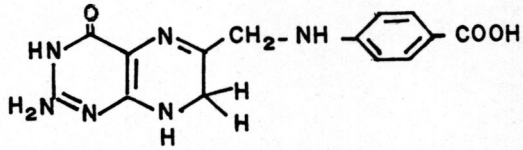
ไดไฮโดรพเทอริดีน ไพโรฟอสโฟไคเนส

2-อะมิโน-4-ออกโซ-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7,8-ไดไฮโดรพเทอริดีน

2-อะมิโน-4-ออกโซ-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7, 8-ไฮโดรพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต

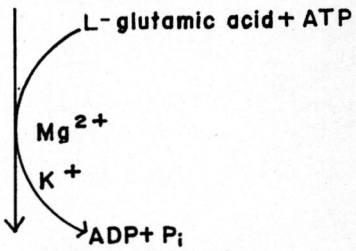
ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส

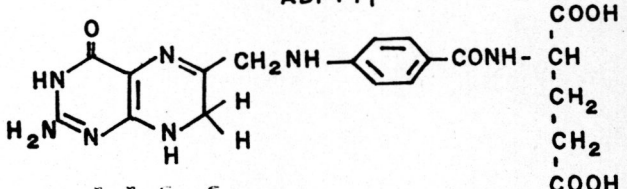




7,8-ไดไฮโดรพเทอโรเอต

ไดไฮโดรโฟเลต ซินเทเทส



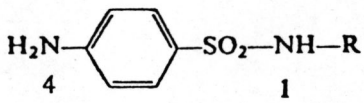


ไดไฮโดรโฟเลต

รูปที่ 1 วิถีของขบวนการสังเคราะห์ไดไฮโดรโฟเลต ใน *Serratia indica* (Iwai และ Kabashi, 1975)

1.3 กลไกและปฏิกิริยาของสารพวกซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides)

ซัลโฟนาไมด์เป็นอนุพันธ์ของซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide) หรือพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนาไมด์ (*p*-aminobenzenesulfonamide) ซัลโฟนาไมด์มีสูตรโครงสร้างโดยทั่วไปเป็นดังนี้



การเตรียมพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนาไมด์ เริ่มขึ้นโดย Gelmo (1908) ซึ่งเป็นผู้สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้เป็นสีย้อมในทางอุตสาหกรรม ต่อมา Heidelberger และ Jacobs (1919) ได้เตรียมอะโซซัลโฟนาไมด์ (azosulfonamide) ชนิดหนึ่งจาก diazotized *p*-aminobenzenesulfonamide กับ dihydrocupreine และได้พบว่าสารนี้มีคุณสมบัติต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial property) Domark (1935a, 1935b) ได้แสดงว่าสีย้อม 2',4'-ไดอะมิโนอะโซเบนซีน-4-ซัลโฟนาไมด์ (Prontosil) สามารถรักษาการติดเชื้อจาก *Pneumococcus* และ *Streptococcus hemolyticus* ในสัตว์ทดลองและสามารถนำมารักษาการติดเชื้อนี้ได้ในคน ต่อมา Fourneau และคณะ (1936) ได้แสดงว่าซัลโฟนาไมด์จะถูกแยกออกจาก Prontosil ในเนื้อเยื่อ (tissue) และเป็นส่วนที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (bacteriostatic activity)ได้ Woods(1940) ได้แสดงว่า กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกสามารถลดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยซัลฟานิลาไมด์ได้หลายชนิดใน *in vitro* และเสนอว่าความสัมพันธ์ของสารประกอบทั้งสองนี้เป็นแบบแข่งขัน (competitive) จากการทดลองของการลดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนี้ Woods และ Fildes (1940) ได้เสนอทฤษฎี Antimetabolite ว่าซัลโฟนาไมด์จะยับยั้งการใช้กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกใน enzyme system ที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย เนื่องจากมีโครงสร้างที่คล้ายกัน จากการศึกษาวิถีของขบวนการสังเคราะห์โฟเลตในแบคทีเรีย (Brown, 1962; Shiota และคณะ, 1964, Ortizและ Hotchkiss, 1966; Brown, 1971; Miller และคณะ, 1972; Thijssen, 1973; McCullough และ Maren, 1973) ในโปรโตซัว (Ferone,

1972; Walter และ Konigk, 1974) และในพืช (Mitsuda และ Suzuki, 1968; Okinaka และ Iwai, 1969) พบว่าซัลโฟนาไมด์จะยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอตซินเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไดไฮโดรพเทอโรเอตโดยการแข่งขันกันกับกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกในการเข้าจับกับบริเวณยึดของเอนไซม์

Bell และ Roblin(1942), Roblin และ Bell (1943) พบว่าคาร์บอกซิเลตไอออนของ พารา-อะมิโนเบนโซเอตมีความเป็นประจุลบมากกว่าหมู่ซัลโฟนิลของซัลโฟนาไมด์ เนื่องจากหมู่คาร์บอกซิเลตมีประจุลบอยู่ ดังนั้นถ้าหมู่ซัลโฟนิลมีความเป็นประจุลบมากขึ้นซัลโฟนาไมด์ก็จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับคาร์บอกซิเลตไอออนมากขึ้น ดังนั้น Bell และ Roblin จึงเสนอทฤษฎีว่าถ้าหมู่ซัลโฟนิลของซัลโฟนาไมด์มีความเป็นประจุลบมากขึ้นซัลโฟนาไมด์ก็จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมากขึ้น Bell และ Roblin ได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ pH7 pKa ของซัลโฟนาไมด์พบว่าความสัมพันธ์เป็นแบบพาราโบลา (parabola) โดย pKa ของซัลโฟนาไมด์ควรจะมีค่าประมาณ 6-7 จึงจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้มากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากหมู่ซัลโฟนิลสามารถดึงดูดอิเล็กตรอนได้และหมู่ซัลโฟนามิโด (sulfonamido group) ที่แตกตัวซึ่งมีประจุลบจะเพิ่มความหนาแน่นของอิเล็กตรอน (electron density) ของหมู่ซัลโฟนิลด้วย ดังนั้นซัลโฟนาไมด์ที่มีประจุจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้มากกว่าซัลโฟนาไมด์ที่ไม่มีประจุ อย่างไรก็ดีหมู่ R จะต้องมีแรงดึงดูดอิเล็กตรอนที่เหมาะสมที่จะทำให้หมู่ซัลโฟนาไมด์เกิดการแตกตัวและทำให้หมู่ซัลโฟนิลมีความเป็นประจุลบมากที่สุด ต่อมา Cowles (1942) และ Breuckner (1943) ได้เสนอทฤษฎีว่าซัลโฟนาไมด์ที่ซึมผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้จะอยู่ในรูปที่ไม่มีประจุ แต่เมื่ออยู่ในแบคทีเรียซัลโฟนาไมด์ในรูปที่มีประจุเท่านั้นที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ผลการทดลองของ Cowles และ Breuckner แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและค่า pKa ของซัลโฟนาไมด์เป็นแบบพาราโบลาเช่นกัน

Northey (1948)ได้สรุปกฎเกณฑ์เกี่ยวกับลักษณะโครงสร้างที่จำเพาะของซัลโฟนาไมด์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไว้ดังนี้

1. ซัลโฟนาไมด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจะต้องมีหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งที่ 4 ของหมู่ซัลโฟนิล การเปลี่ยนแปลงหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งที่ 4 เป็นหมู่อื่นเช่น ไฮโดรเจน,

ไฮดรอกซิล, คาร์บอกซิล, อะมิโนซัลโฟนิล, อัลคิล หรือ ฮาโลเจน จะทำให้ซัลโฟนาไมด์สูญเสียคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

2. การเปลี่ยน benzene ring เป็น ring system อื่น จะลดคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของซัลโฟนาไมด์ และหมู่แทนที่ที่ benzene ring ส่วนใหญ่จะทำให้ซัลโฟนาไมด์สูญเสียคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

3. การเปลี่ยนหมู่ซัลโฟนามิโดเป็นหมู่อื่นจะทำให้คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของซัลโฟนาไมด์ลดลงหรือสูญเสียไป และหมู่แทนที่ที่หมู่อะมิโดจะทำให้ซัลโฟนาไมด์มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไป

Thijssen (1974) ได้ทำการทดลองพบว่า N^1 N^1dialkyl sulfonamide ยับยั้งการสังเคราะห์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ในสารละลายสกัด (cell free extract)ของ *E. coli* B ได้เช่นเดียวกับ monosubstituted analog และ De Benedetti และ Rastelli (1981) ได้แสดงว่า acidic, neutral (amidic และ imidic) sulfonamides สามารถยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส และยับยั้งการเจริญของ *E. coli* K_{12} J_{53} ได้ผลการทดลองทั้งสองนี้สนับสนุนทฤษฎีของ Bell และ Roblin ที่ว่าทั้งซัลโฟนาไมด์ที่มีประจุและซัลโฟนาไมด์ที่ไม่มีประจุสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

Miller และคณะ (1972) ได้ทำการทดลองพบว่า 2-chloro-4-nitro-N^1-phenylsulfonamide (parent compound) ซึ่งมีค่า pKa 6.8 มี MIC (minimum inhibitory concentration) ใน *E. coli* สูงกว่า N^1-acetyl derivative ทั้งนี้เนื่องมาจากสาร parent compound มีรูปที่มีประจุมากกว่า N^1-acetyl derivative (ซึ่งไม่มีประจุ) ดังนั้นสาร parent compound จึงซึมผ่านผนังเซลล์ได้น้อย ในขณะที่ N^1-acetyl derivative สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้มากกว่าและเมื่อเข้าเซลล์แล้ว N^1-acetyl derivative อาจถูกแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysed) ไปอยู่ในรูปที่มีประจุของสาร parent compound ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ซึ่งสนับสนุนทฤษฎีของ Cowles และ Breuckner แต่อย่างไรก็ตาม Miller และคณะพบว่า N^1-phenyl และ N^1-pyridyl sulfonamides ที่มีประจุและที่ไม่มีประจุไม่แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญต่อการซึมผ่านผนังเซลล์ (permeability) ของแบคทีเรีย ยกเว้นซัลโฟนาไมด์ที่มีประจุจะมีมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

Miller และคณะ (1972) ได้แสดงว่าค่าคงที่ไฮโดรโฟบิกของหมู่แทนที่ (hydrophobic substituent constant) ซึ่งแสดงด้วยค่า π ที่ตำแหน่งพารา (para) และเมตา (meta) ของ N^1-phenyl และ N^1-pyridyl sulfonamides ไม่แสดงความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับ MIC ของ *E. coli* mutaflor (ซึ่งเป็นมิวแตนท์ชนิดหนึ่งของ *E. coli*) และ I_{50} (concentration required for 50% inhibition) เมื่อการซึมผ่านผนังเซลล์ไม่ถูกจำกัดโดยการแตกตัวเป็นประจุ Foye และคณะ (1982) ได้ทดลองการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก sulfanilamide-resistant *Neisseria gonorrheae* โดย sodium 4-aminobenzenesulfonamidoethanethiosulfate และ sodium 4-aminobenzenesulfonamidopropanethiosulfate พบว่าการเพิ่มไฮโดรโฟบิซิตีของโครงสร้างของซัลฟานิลาไมด์ไม่ได้เพิ่มการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อย่างไรก็ดี Fujita และ Hansch (1967) ได้แสดงว่าค่าคงที่ไฮโดรโฟบิกของหมู่แทนที่ซึ่งแสดงด้วยค่า π ที่เหมาะสมของ substituted sulfanilanilides และ substituted N^1-benzoylsulfanilamides เป็นส่วนประกอบสำคัญอันหนึ่งต่อการยับยั้งการเจริญของ *Pneumococcus, Freidlander's bacillus, E. coli* และ *M.smegamatis* และจากการทดลองของ Bartels และ Bock (1983) พบว่าไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยวิธีไฮโดรโฟบิกอินเตอร์แอคชั่นโครมาโตกราฟี (hydrophobic interaction chromatography) ของ phenyl-Sepharose CL-4B และเมื่อเปลี่ยน phenyl-Sepharose CL-4B เป็น octyl-Sepharose CL-4B พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยตัวชะ (eluent) ชนิดเดียวกับที่ใช้สำหรับแยกเอนไซม์โดยคอลัมน์ของ phenyl-Sepharose CL-4B ดังนั้นเอนไซม์อาจมีบางส่วนที่มีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิก นอกจากนั้น Miller และคณะ (1972) พบว่าค่า I_{50} และ MIC ของ N^1-phenyl และ N^1-pyridyl sulfonamides มีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรง

Kimming (1947) ได้ทำการศึกษาอุลตราไวโอเลตสเปกตราของซัลโฟนาไมด์และรายงานว่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของซัลโฟนาไมด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจะอยู่ในช่วงความยาวคลื่นแสงระหว่าง 250-300 นาโนเมตร และการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเมื่อซัลโฟนาไมด์มีช่วงของการดูดกลืนแสงสูงสุดเคลื่อนมาทางความยาวคลื่นแสง 300 นาโนเมตร แต่จากการศึกษาในเวลาต่อมา (Yamabe, 1950; Maschka และคณะ ,

1953; Maschka และคณะ , 1954; Grammaticakis, 1954; Qaun และคณะ, 1954; Valyashko และ Romasanowitsch, 1956; Vignoli และคณะ, 1963) พบว่าเป็นการยากที่จะแสดงกฎเกณฑ์โดยทั่วไปสำหรับความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นแสงที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดกับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของซัลโฟนาไมด์

Rastelli และคณะ (1975) ได้ทำการทดลองพบว่า symmetric stretching frequency mode ของอินฟราเรดสเปกตรา (infrared spectra) ของหมู่ซัลโฟนิลของ acidic, amidic และ imidic sulfonamides มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับค่าลอการิทึมของส่วนกลับของ MIC ในส่วนความเข้มข้นที่เป็นประจุลบ โดยเมื่อ stretching frequency มีค่าต่ำลง ค่าลอการิทึมของส่วนกลับของ MIC จะลดลง และจากการทดลองของ Seydel (1966), Miller และคณะ (1972) ได้แสดงว่า chemical shift ของหมู่อะมิโนของ substituted anilines และ 3-aminopyridines ซึ่งเป็นหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง N^1 ของซัลโฟนาไมด์มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับค่า I_{50} และค่า MIC โดยค่า I_{50} และ MIC จะลดลงเมื่อค่า chemical shift (ppm) สูงขึ้น นอกจากนี้ De Benedetti และคณะ (1978) ได้แสดงความสัมพันธ์แบบเส้นตรงระหว่างค่า chemical shift ของโปรตอนที่ตำแหน่ง N^4 (*p*-aminoproton) ของ acidic, amidic และ imidic sulfonamides กับค่า MIC โดยคิดเฉพาะความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ในส่วนที่เป็นประจุลบ โดยเมื่อค่า chemical shift เพิ่มขึ้น MIC จะมีค่าลดลง

นอกจากซัลโฟนาไมด์จะสามารถยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทสแล้ว Brown (1962) และ Shiota และคณะ (1964) พบว่าการพรีอินคิวเบต (preincubate) ซัลโฟนาไมด์กับสารละลายสกัดจากแบคทีเรีย (bacterial extract) และไดไฮโดรพเทอริดีนจะไม่มีไดไฮโดรพเทอโรเอตเกิดขึ้นหลังจากเติมกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก การทดลองนี้ได้นำมาสู่สมมุติฐานที่ว่าซัลโฟนาไมด์อาจทำปฏิกิริยากับไดไฮโดรพเทอริดีนที่มีอยู่ทั้งหมดได้เป็นไดไฮโดรพเทอริดีน-ซัลโฟนาไมด์ แอดดักต์ (dihydropteridine-sulfonamide adduct) Brown (1962) พบว่าจุดซึ่งแสดงกัมมันตภาพรังสีบนโครมาโตแกรมของสารละลายของปฏิกิริยาที่มีซัลเฟอร์-35-กรดซัลฟานิลิก (^{35}S - sulfanilic acid), ไดไฮโดรพเทอริดีน, แมกเนเซียมไอออน และสารละลายสกัดจาก *E. coli* จุดนี้อาจเป็นพเทอริดีน-กรดซัลฟานิลิก แอดดักต์ (pteridine-sulfanilic acid adduct) ซึ่งอาจเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Bock และคณะ (1974)

ได้ทำการทดลองการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* โดยซัลเฟอร์-35-ซัลฟาเมโทซาโซล (^{35}S-sulfamethoxazole) พบว่า *E. coli* สามารถสังเคราะห์พเทอริดีนซัลฟาเมโทซาโซลโฟเลตอะนาลอก (pteridine-sulfamethoxazole folate analog) ซึ่งสารนี้มีคุณสมบัติทางโครมาโตกราฟีเหมือนกับ เอ็น^4-(2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-7, 8-ไดไฮโดร-6-พเทอริดินิลเมทิล) ซัลฟาเมโทซาโซล [N^4(2-amino-4-hydroxy-7, 8-dihydro-6-pteridinylmethyl) sulfamethoxazole] ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นทางเคมี Swedberg และคณะ (1979) ได้แสดงว่าสารละลายสกัดของ *E. coli* สามารถสังเคราะห์พเทอริดีน-ซัลฟาไทอะโซล แอดดักต์ (pteridine-sulfathiazole adduct) ได้ และจากการทดลองของ Roland และคณะ (1979) พบว่า ซัลฟาเมโทซาโซล (sulfamethoxazole) สามารถถูกใช้เป็นซับสเตรตของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* ได้ผลิตภัณฑ์เป็น เอ็น^4-(2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-7, 8-ไดไฮโดร-6-พเทอริดินิลเมทิล)ซัลฟาเมโทซาโซล ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ในปริมาณความเข้มข้นที่สูงกว่าที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ดังนั้น เอ็น^4-(2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-7, 8-ไดไฮโดร-6-พเทอริดินิลเมทิล)ซัลฟาเมโทซาโซลที่เกิดขึ้นในเซลล์จะไม่มีส่วนสำคัญต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

1.4 ไฮโดรโฟบิซิตีและค่าไฮโดรโฟบิซิตีของ side chain ของกรดอะมิโน

แรงกระทำไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) มีความสำคัญต่อการศึกษาและวิจัยในทางชีวเคมีและชีววิทยามาก ในโปรตีนส่วนใหญ่ (Kanzmann, 1959) จะมีสัดส่วนของกรดอะมิโนซึ่งมี non-polar side chain ค่อนข้างสูง เช่น หมู่ isopropyl ของวาลีน, secondary butyl ของลูซีน, iso-butyl ของไอโซลูซีนและ benzyl ของเฟนิลอะลานีน โปรตีนส่วนใหญ่จะมีกรดอะมิโน 20-30 เปอร์เซ็นต์ที่เป็นวาลีน, ลูซีน, ไอโซลูซีน หรือ เฟนิลอะลานีน ถ้าโปรตีนมีอะลานีนและทริปโตเฟนรวมอยู่ด้วยโปรตีนก็จะมีกรดอะมิโนที่มี non-polar side chain สูงเป็น 35-40 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก non-polar side chain มีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับน้ำได้น้อย ดังนั้นลักษณะ configuration ของสายโพลีเปปไทด์จะนำเอาหมู่ต่าง ๆ เหล่านี้เข้ามายึดเกาะซึ่งกันและกันและเหนี่ยวนำให้หมู่เหล่านี้ออกห่าง aqueous phase การเหนี่ยวนำหมู่นอน-โพลาร์ของโปรตีนเพื่อที่จะยึดเหนี่ยวซึ่งกันและกันใน aqueous environment เรียกว่า การกระทำระหว่างไฮโดรโฟบิกซึ่งแรงกระทำระหว่างไฮโดรโฟบิกนี้อาจ

เป็นส่วนประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับความเสถียรของ configuration ของโปรตีนธรรมชาติ (native protein)

Nazaki และ Tanford (1971) ได้แสดงการหาค่าไฮโดรโฟบิซิตีของกรดอะมิโนโดยคำนวณจากการถ่ายทอดพลังงานอิสระ (free energy of transfer; ΔFt) ของกรดอะมิโน (ตัวถูกละลาย) จากน้ำไปยังเอทานอล (ethanol) และไดออกเซน (dioxane) ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ การถ่ายทอดพลังงานอิสระคือ การเปลี่ยนแปลง chemical potential ของตัวถูกละลายในน้ำไปยังตัวทำละลายอินทรีย์ที่มี mole fraction ของตัวถูกละลายเท่ากันเมื่อความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสารละลายมีค่าน้อยมาก ดังรายละเอียดซึ่งแสดงไว้ในภาคผนวก

ไฮโดรโฟบิซิตีของ side chain ของกรดอะมิโน (Δft) คำนวณได้จากผลต่างของค่า ΔFt ของกรดอะมิโนกับค่า ΔFt ของไกลซีน ในการหาความสามารถในการละลายของกรดอะมิโนในเอทานอลหรือไดออกเซนที่มีความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ไม่สามารถหาได้เนื่องจากกรดอะมิโนละลายในตัวทำละลายดังกล่าวได้น้อยมาก ดังนั้นค่า Δft สำหรับหมู่ไฮโดรโฟบิก side chain ในตัวทำละลายที่มีความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์จะหาได้โดยการ extrapolation จากค่า ΔFt หรือ $\Delta F't$ ตามที่แสดงในภาคผนวกหรือ Δft ที่ความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ต่ำกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ ค่า Δft ที่ได้จากการ extrapolation ในแต่ละวิธีมีความคลาดเคลื่อนประมาณ $\pm$ 50 คาลอรี/โมล ไฮโดรโฟบิซิตีของ side chain ของกรดอะมิโนมีค่าดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงไฮโดรโฟบิซิตี (Δft) สำหรับการถ่ายทอดพลังงานอิสระของ side chain ของกรดอะมิโนจากตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ไปยังน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กรดอะมิโน	หมู่ side chain	Δft (คาลอรี/โมล)
ไกลซีน	-H	0
อะลานีน	$-CH_3$	500
เมไทโอนีน	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$	1300
วาลีน	$-CH(CH_3)-CH_3$	1500
ลูซีน	$-CH_2-CH(CH_3)-CH_3$	1800
ไทโรซีน	$-CH_2-C_6H_4-OH$	2300
เฟนิลอะลานีน	$-CH_2-C_6H_5$	2500

Leo และคณะ (1971) ได้ให้คำจำกัดความของค่าคงที่ไฮโดรโฟบิกของหมู่แทนที่ (π) โดยให้ค่า π_X คือค่าลอการิทึมของ partition coefficient ของหมู่หน้าที่ X (function X) มีค่าเท่ากับ

$$\pi_X = \log P_X - \log P_H$$

เมื่อ P_H คือ partition coefficient ของสาร parent compound

P_X คือ partition coefficient ของสารที่เป็นอนุพันธ์ของ parent compound

partition coefficient คำนวณได้จากอัตราส่วนของความสามารถในการละลายของสารใน n-octanol (ตัวทำละลายอินทรีย์) และความสามารถในการละลายของสารในน้ำ ในเทอมของความเข้มข้น

ค่า π ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกมีค่าดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า π ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิไดอัลคาโนอิก

กรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิไดอัลคาโนอิก	หมู่ side chain	π (1)
เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีน	$-H$	0.00
เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)อะลานีน	$-CH_3$	0.50
เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีน	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$	1.45
เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)วาลีน	$-\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{}{CH}}-CH_3$	1.30
เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ลูซีน	$-CH_2-\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{}{CH}}-CH_3$	1.80
เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีน	$-CH_2-C_6H_4-OH$	1.96
เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เฟนิลอะลานีน	$-CH_2-C_6H_5$	2.63

(1) ค่า π ได้จากค่าที่รายงานไว้โดย Hansch และ Coats (1970), Leo และคณะ (1971)

1.5 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและกิจกรรมทางชีววิทยา (biological activity) ของสารที่ใช้เป็นยา เป็นปัญหาหนึ่งในการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ และซัลโฟนาไมด์ซึ่งเป็นสารที่ใช้เป็นยาได้มีการสังเคราะห์ขึ้นและมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีต่าง ๆ เพื่อหาความสัมพันธ์นี้

ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในทางเคมีบำบัด เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีเฉพาะในแบคทีเรีย แต่ไม่มีในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานได้โดยซัลโฟนาไมด์ ซัลโฟนาไมด์จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและการทำงานของเอนไซม์ได้มากน้อยเพียงใดขึ้นกับลักษณะโครงสร้างทางเคมี เนื่องจากส่วนหนึ่งของบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิก และบริเวณบางส่วนของเอนไซม์อาจ

มีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิก (Bartels และ Bock, 1983) ดังนั้นถ้าสารพวกซัลโฟนาไมด์มีไฮโดรโฟบิซิตี เพิ่มขึ้น ซัลโฟนาไมด์อาจจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากขึ้น ในการวิจัยนี้ได้เตรียมกรดจำพวกพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกซึ่งเป็นอนุพันธ์ของซัลฟานิลาไมด์ชนิดหนึ่งที่มีไฮโดรโฟบิซิตีมากน้อยต่าง ๆ กัน เพื่อศึกษาถึงบทบาทของหมู่ไฮโดรโฟบิกต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งอาจจะใช้เป็นแนวทางหนึ่งในการสังเคราะห์ซัลโฟนาไมด์ใหม่ ๆ ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยมีดังนี้คือ

1. เพื่อเตรียมกรดจำพวกพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่มีไฮโดร-โฟบิซิตีต่าง ๆ กัน

2. เพื่อศึกษาความสามารถของกรดจำพวกพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกต่อการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* โดยพิจารณาจากค่า MIC

3. เพื่อศึกษาความสามารถของกรดจำพวกพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกต่อการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *Escherichia coli* โดยพิจารณาจากค่าดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์ และการเข้มข้นของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก; $\frac{[I_{50}]}{[S]}$)

4. เพื่อศึกษาบทบาทของหมู่ไฮโดรโฟบิกของกรดจำพวกพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกต่อการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และการทำงานของไดไฮโดร-พเทอโรเอต ซินเทส จาก *Escherichia coli*

010130