



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การสังเคราะห์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชันของ pinostrobin Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of Transition Metal Complexes of Pinostrobin
ชื่อนิสิต	นายประจักษ์ ชุมพลอย
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสังเคราะห์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารประกอบเชิงซ้อน
โลหะทรานซิชันของ pinostrobin
Synthesis and cytotoxicity evaluation of transition metal
complexes of pinostrobin

โดย
นายประจักษ์ ชุมพลอย

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560

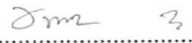
โครงการ การสังเคราะห์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชันของ
pinostrobin

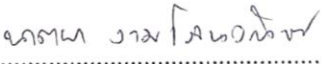
โดย นายประจักษ์ ชุมพลอย

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.....  ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล)

.....  อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา พุดหอม)

.....  กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นัตยา งามโรจนวิชัย)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชัน
ของ pinostrobin

ชื่อนิสิตในโครงการ นายประจักษ์ ชุมพลอย เลขประจำตัว 5733125323

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะ Cu(II), Fe(III), Co(II), Ni(II) และ Zn(II) ของ pinostrobin (L) ซึ่งเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์หลักของรากกระชายเหลือง (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปีแสดงโครงสร้างโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบเชิงซ้อนได้ดังนี้ $\text{CuL}_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1), FeL_2 (2), $\text{CoL}_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3), $\text{NiL}_2\text{Cl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (4) และ $\text{ZnL}_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (5) เมื่อนำสารเชิงซ้อนและ pinostrobin มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม 2 ชนิด คือ MCF-7 และ MDA-MB-231 ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารเชิงซ้อน 1 และ 2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} 2.75 และ 2.54 μM ตามลำดับ นอกจากนี้สารเชิงซ้อน 2, 4 และ 5 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} 22.00, 7.13 และ 29.61 μM ตามลำดับ ในขณะที่ pinostrobin (L) ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 2 ชนิด ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$)

คำสำคัญ: pinostrobin, สารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชัน, ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง



Project Title Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of Transition Metal Complexes of
Pinostrobin

Student Name Mr. Prajak Khumploy Student ID 5733125323

Advisor Name Associate Professor Khanitha Pudhom, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017

Abstract

In this research, the Cu(II), Fe(III), Co(II), Ni(II) and Zn(II) complexes with pinostrobin(L) a naturally occurring flavonoid from *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf have been synthesized. The proposed molecular structures based on spectroscopic methods are as follow: $\text{CuL}_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1**), FeL_2 (**2**), $\text{CoL}_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**3**), $\text{NiL}_2\text{Cl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**4**) and $\text{ZnL}_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**5**). All complexes and pinostrobin (L) were evaluated for their cytotoxicity against two human breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231, by MTT assay. Complexes **1** and **2** showed strong cytotoxicity against MCF-7 with IC_{50} 2.75 and 2.54 μM , respectively. Moreover, complexes **2**, **4** and **5** displayed moderate cytotoxicity against MDA-MB-231 with IC_{50} 22.00, 7.13 and 29.61 μM respectively, while pinostrobin (L) showed no activity against both cancer cell lines. ($\text{IC}_{50}>100 \mu\text{M}$)

Keyword: pinostrobin, transition metal complexes, cytotoxicity

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่ง ในการเอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการเคมี เครื่องมือ สารเคมีในการทำวิจัย ตลอดจนการเขียนรายงานฉบับนี้จนสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อรรวรรณ ชัยลภากุล และรองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวิชัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ นางสาวสุจิตรา หาญทะนง และนางสาวญาณิศา มิตรภาพ ที่คอยให้คำแนะนำเทคนิคต่างๆ และสนับสนุนอุปกรณ์ในระหว่างการทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

โครงการนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2560 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง



สารบัญ

เรื่อง	หน้า
ปกใน	ก
หน้าอำนวยการ	ข
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ค
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตารางประกอบ	ฉ
สารบัญรูปประกอบ	ช
สารบัญภาคผนวก	ซ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 การเกิดมะเร็งและวัฏจักรเซลล์	2
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1. ยาสำหรับการต้านมะเร็ง	4
2. การเข้าจับของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชันกับดีเอ็นเอ	7
3. โครโมน (chromone) โครงสร้างพื้นฐานของสารต้านมะเร็ง	8
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	11
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	11
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	12
2.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	12
2.2 สารเคมี	13
2.3 เซลล์ไลน์สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	14
2.4 ขั้นตอนการทดลอง	14
2.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	16
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	17
3.1 การแยก pinostrobin (L)	17
3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร pinostrobin (L)	18
3.3 การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชัน-pinostrobin	20
3.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร Cu(II)-pinostrobin complex (1)	21
3.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร Fe(III)-pinostrobin complex (2)	22

3.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร Co(II)-pinostrobin complex (3)	22
3.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร Ni(II)-pinostrobin complex (4)	23
3.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร Zn(II)-pinostrobin complex (5)	24
3.9 สูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชัน-pinostrobin	24
3.10 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	30
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	33
บรรณานุกรม	34
ภาคผนวก	40
ประวัติผู้วิจัย	49



สารบัญญัตรางประกอบ

ตารางที่	หน้า
3.1 ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของสาร pinostrobin	19
3.2 ผลผลิต (%yield) ของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิซีน-pinostrobin	20
3.3 แสดงความถี่ในการสั่นของ pinostrobin และ สารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิซีน-pinostrobin	27
3.4 สมบัติทางกายภาพของ pinostrobin และ สารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิซีน-pinostrobin	30
3.5 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของ pinostrobin และ สารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิซีน-pinostrobin	32



สารบัญรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
1.1 การแบ่งเซลล์	2
1.2 วัฏจักรเซลล์	3
1.3 ตัวอย่างของสารกลุ่ม alkylating agents	5
1.4 โครงสร้างทางเคมีของ Co(III) นิโอมัยซินในคู่สายดีเอ็นเอ	6
1.5 (a) โครงสร้างของ doxorubicin	6
(b) โครงสร้างของ การเข้าจับของ doxorubicin-d(CGATCG) ₂	6
1.6 สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะทรานซิชันที่เข้าจับกับดีเอ็นเอ	7
1.7 โครงสร้างของโครโมน (chromone)	8
1.8 โครงสร้างทางเคมีของสารที่ทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง (a) cisplatin (b) cis-[Pt(AF) ₂ Cl ₂]	9
1.9 โครงสร้างทางเคมีของลิแกนด์ 3-aminoflavone และโครงสร้างโมเลกุล [Cu(3-af) ₂ (NO ₃) ₂]	9
1.10 โครงสร้าง 6-hydroxy chromone-3-carbaldehyde thiosemicarbazone Ni(II) complex	10
2.1 การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชัน-pinostrobin	15
2.2 โครงสร้างทางเคมีของ MTT	16
3.1 โครงสร้างทางเคมีของ pinostrobin	18
3.2 ปฏิกริยาทั่วไปสำหรับการสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชัน-pinostrobin	20
3.3 สเปกตรัม ¹ H NMR	25
3.4 อินฟราเรดสเปกตรัม	27
3.5 แมสสเปกตรัม (MALDI-TOF)	28
3.6 กราฟการหาค่า IC ₅₀	31

สารบัญภาคผนวก

รูปที่	หน้า
A.1 สเปกตรัม ^{13}C -NMR ของ pinostrobin (L) ใน DMSO-d_6	41
A.2 อินฟราเรดสเปกตรัมของ pinostrobin (L)	41
A.3 อินฟราเรดสเปกตรัมของ Cu(II)-pinostrobin complex (1)	42
A.4 อินฟราเรดสเปกตรัมของ Fe(III)-pinostrobin complex (2)	42
A.5 อินฟราเรดสเปกตรัมของ Co(III)-pinostrobin complex (3)	43
A.6 อินฟราเรดสเปกตรัมของ Ni(II)-pinostrobin complex (4)	43
A.7 อินฟราเรดสเปกตรัมของ Zn(II)-pinostrobin complex (5)	44
A.8 แมสสเปกตรัม Cu(II)-pinostrobin complex (1) จากการคำนวณด้วยโปรแกรม	44
A.9 แมสสเปกตรัม Fe(III)-pinostrobin complex (2) จากการคำนวณด้วยโปรแกรม	45
A.10 แมสสเปกตรัม Co(III)-pinostrobin complex (3) จากการคำนวณด้วยโปรแกรม	45
A.11 แมสสเปกตรัม Ni(II)-pinostrobin complex (4) จากการคำนวณด้วยโปรแกรม	46
A.12 แมสสเปกตรัม Zn(II)-pinostrobin complex (5) จากการคำนวณด้วยโปรแกรม	46
A.13 กราฟการหาค่า IC_{50} MCF-7	47
A.14 กราฟการหาค่า IC_{50} MDA-MB-231	48



อธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$^{13}\text{C-NMR}$	carbon nuclear magnetic resonance
$^1\text{H-NMR}$	proton nuclear magnetic resonance
J	coupling constant
s	singlet (NMR)
d	doublet (NMR)
dd	doublet of doublet (NMR)
t	triplet (NMR)
Hz	hertz
%	percent
ppm	part per million
g	กรัม
mg	มิลลิกรัม
μg	ไมโครกรัม
μM	ไมโครโมลาร์
mL	มิลลิลิตร
nm	นาโนเมตร



บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของประชากรโลก การหาวิธีการรักษาโรคมะเร็งจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ในการรักษามีทั้งการผ่าตัด เคมีบำบัด รังสีบำบัด หรือการรักษาแบบองค์รวม ซึ่งวิธีการรักษานั้นขึ้นกับชนิดและระยะของโรคมะเร็ง ในการพัฒนายาสำหรับใช้ในเคมีบำบัดนั้นจะต้องมีคุณสมบัติสำคัญคือ (1) สามารถละลายได้ดีในน้ำเกลือ (saline) และมีความเสถียรเพียงพอในการเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย (2) สามารถเคลื่อนที่ในกระแสเลือดและเยื่อหุ้มเซลล์ (3) สามารถจับกับดีเอ็นเอ (DNA-binding) ได้ดี แต่การจับกับโปรตีน (protein-binding) เกิดได้ช้า (4) สามารถยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็งได้ดีเทียบเท่ากับยา^[1]

สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชันเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการพัฒนายารักษาโรคมะเร็ง ตัวอย่างของยาที่ใช้อย่างแพร่หลายเช่น cisplatin ที่เข้าจับกับพิวรีนเบสของดีเอ็นเอ เป็นการขัดขวางการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นสาเหตุให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแบบ apoptosis^[2] เนื่องจากโลหะแทรนซิชันมีความหลากหลายของ oxidation states จึงสามารถจับกับโมเลกุลที่มีประจุลบของสารชีวโมเลกุลได้ดี โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชันคือการจับกับโปรตีนและกรดนิวคลีอิกที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์และการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกภายในเซลล์^[3] ตัวอย่างของลิแกนด์ที่เกิดโคออร์ดิเนชันกับสารประกอบโลหะแทรนซิชันที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพคือสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกที่มีโครงสร้างหลักเป็นวงอะโรมาติก 2 วงที่เชื่อมด้วยคาร์บอน 3 อะตอมและมักเป็นสารประกอบ oxygenated heterocyclic และยิ่งไปกว่านั้น ได้มีการรายงานวิจัยชี้ให้เห็นถึงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจของสารประกอบเชิงซ้อนของฟลาโวนอยด์กับโลหะแทรนซิชันเช่น สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant properties), มีพฤติกรรมเลียนแบบเอนไซม์ (enzyme-mimicking behavior), และมีศักยภาพในเชิงการรักษาโรค (therapeutic potential)^[4] เป็นต้น และยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ฆ่าและ/หรือยับยั้งเซลล์มะเร็งและเอนไซม์สำคัญ DNA topoisomerase ของสารประกอบเชิงซ้อนของฟลาโวนอยด์กับโลหะแทรนซิชัน^[5] โดยงานวิจัยนี้สนใจสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีชื่อว่า pinostrobin

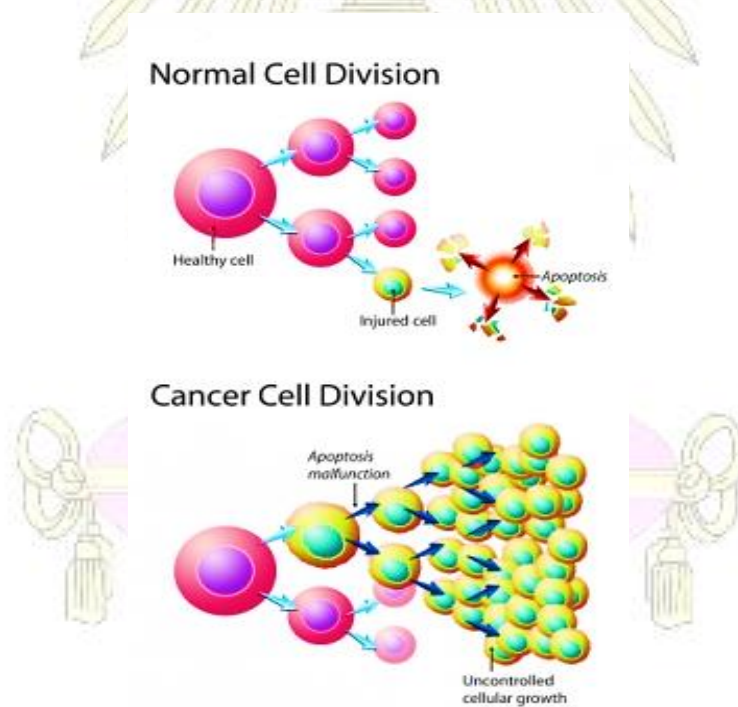
pinostrobin เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบมากในเหง้ากระชายเหลือง (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) โดยตัวมันเองได้มีงานวิจัยว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

glioblastoma (U-251) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)^[6] และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโครงสร้างพื้นฐานของ pinostrobin สามารถเกิดเป็นสารประกอบโลหะเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชันได้ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งและ/หรือฆ่าเซลล์มะเร็งนั้นดียิ่งขึ้นได้^[7]

งานวิจัยนี้จึงสนใจสังเคราะห์สารประกอบโลหะเชิงซ้อนของ pinostrobin กับโลหะแทรนซิชัน Cu(II) Fe(II) Co(II) Ni(II) และ Zn(II) พิสูจน์ทราบโครงสร้างสารที่สังเคราะห์ได้ และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำไปพัฒนาให้ได้สารที่มีฤทธิ์ดียิ่งขึ้นจนสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาต่อไปได้

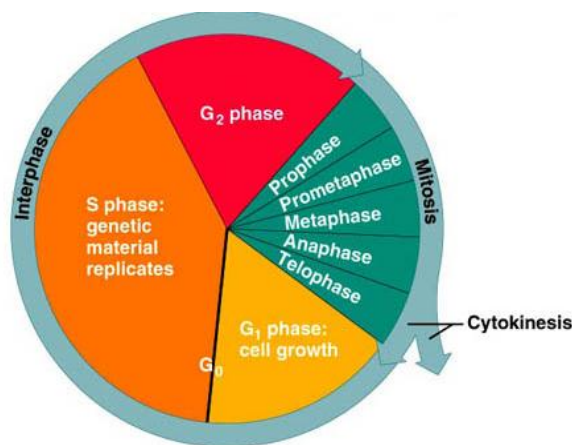
1.1 การเกิดมะเร็งและวัฏจักรเซลล์

มะเร็งมีสาเหตุจากการเกิดจากกระบวนการแบ่งเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ (รูปที่ 1.1) ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลก (WHO) พบว่ามะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรโลก เป็นอันดับสองจากโรคหัวใจและหลอดเลือด^[8] อัตราการเสียชีวิตของประชากรไทยจากโรคมะเร็งยังคงมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในทุก ๆ ปี โดยเป็นโรคที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตเป็นอันดับหนึ่ง^[9]



รูปที่ 1.1 การแบ่งเซลล์ของเซลล์ปกติ (normal cell division) และเซลล์มะเร็ง (cancer cell division)^[10]

กระบวนการแบ่งเซลล์ของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งมี 4 ระยะ เรียกว่า“วัฏจักรเซลล์ (cell cycle)”
(รูปที่ 1.2)



รูปที่ 1.2 วัฏจักรเซลล์ ^[11]

วัฏจักรเซลล์

- วัฏจักรเซลล์ประกอบด้วย 4 ระยะคือ G₁, S, G₂ และ Mitosis
- G₁ และ G₂ เป็นช่องว่างระหว่างช่วงการโตของเซลล์กับช่วงการเตรียมแบ่งเซลล์
- S เป็นระยะที่เซลล์มีการสังเคราะห์และการจำลองตัวโครโมโซม(DNA replication)
- ไมโทซิส (Mitosis) เป็นระยะที่ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ แบ่งเป็น 2 เซลล์
- G เป็นระยะพักของเซลล์ที่ไม่เกิดการแบ่งเซลล์

ระยะไมโทซิส(Mitosis phase)

- ระยะไมโทซิสของเซลล์ปกติ เป็นระยะที่มีการแบ่งออกเป็น 2 เซลล์ที่มีสารพันธุกรรมเหมือนกัน
- ระยะไมโทซิสประกอบด้วย 4 ระยะ
 - Prophase : ระยะที่สายโครโมโซมอัดแน่นอยู่ตรงกลาง เยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกออก และมีการสร้าง spindle fiber
 - Metaphase : ระยะที่เกิดการจำลองโครโมโซม และโครโมโซมเรียงตัวอยู่ตรงกลางเซลล์
 - Anaphase : โครโมโซมแยกออกจากกัน เซลล์ยารมีโครโมโซมที่ปลายของเซลล์ทั้งสองด้าน

- Telophase : สร้างเยื่อหุ้มนิวเคลียสในส่วนปลายแต่ละด้าน และสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ใหม่แยกออกเป็น 2 เซลล์

การสังเคราะห์สารพันธุกรรม (DNA Synthesis, S phase)

- มนุษย์มี 46 โครโมโซมจากการเข้าสู่ของ 23 คู่โครโมโซมจากเซลล์สืบพันธุ์
- โครโมโซมประกอบจากดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีนิวคลีโอไทด์จำนวนมากหลายล้านนิวคลีโอไทด์
- โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) จะมียีนที่เหมือนกัน และอาจมียีนที่แตกต่างกันได้
- ในทุกเซลล์มะเร็งจำนวนโครโมโซมอาจมีการเปลี่ยนแปลงทั้งหมดหรือบางส่วนเรียกเซลล์ดังกล่าวนี้ว่า aneuploid cell
- ความผิดพลาดระหว่างการจำลองตัว (replication) ของดีเอ็นเอ ส่งผลให้เกิดการกลาย (mutation) และอาจทำให้เซลล์พัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งต่อไป
- เซลล์มีกลไกการตรวจสอบความถูกต้องของการจำลองตัว (replication) ของสายดีเอ็นเอ
- การใช้เคมีบำบัดมักมีเป้าหมายในระยะ S phase ของวัฏจักรการแบ่งเซลล์

มะเร็ง มีสาเหตุของโรคจากการกลาย (mutation) เนื่องจากความผิดพลาดของลำดับเบสของดีเอ็นเอในระหว่างวัฏจักรการแบ่งเซลล์ ดังนั้นดีเอ็นเอจึงเป็นเป้าหมายหลักของการพัฒนายาต้านมะเร็ง

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ยาที่ใช้ในการรักษามะเร็ง

ยาที่ใช้ในกระบวนการเคมีบำบัด สำหรับการรักษามะเร็ง มีแหล่งที่มาหลากหลาย อาทิ สารย้อมสี (dyestuffs) สารเคมีสังเคราะห์ สารจากพืช และ จุลชีพ กลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญสำหรับการพัฒนายาต้านมะเร็งนั้นต้องสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งโดยไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติ สารสำคัญสำหรับการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทหลัก ขึ้นกับประเภทของการออกฤทธิ์คือ สารที่ออกฤทธิ์กับ DNA และสารที่ออกฤทธิ์กับ mitotic^[12] โดยในงานวิจัยนี้สนใจสารสังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์กับ DNA

1.1 ยาต้านมะเร็งที่ออกฤทธิ์กับ DNA

ยาที่ออกฤทธิ์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย ของเซลล์มะเร็งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ยาที่ออกฤทธิ์รบกวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (drugs interfering DNA synthesis) และยาที่ออกฤทธิ์โดยตรงกับดีเอ็นเอ (drugs interacting directly DNA)

1.1.1 ยาที่ออกฤทธิ์รบกวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (drugs interfering DNA synthesis)

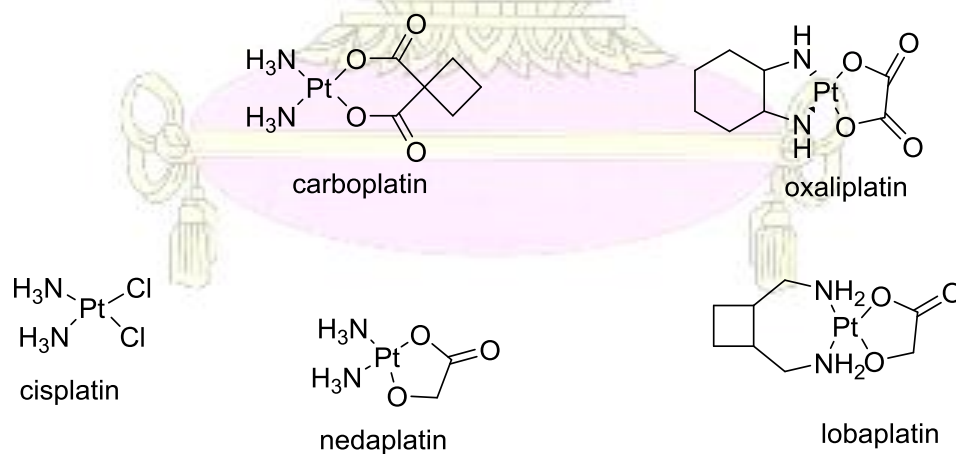
ยาที่ออกฤทธิ์รบกวนกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เป็นการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ จำนวนหนึ่งที่มีส่วนในกระบวนการสังเคราะห์ DNA สารยับยั้งนี้เรียกว่า antimetabolites ซึ่งเป็นการหยุดหรือยับยั้งขั้นตอนที่สำคัญของกระบวนการการสังเคราะห์ DNA สารยับยั้งที่ถูกใช้เป็นยาในการรักษามะเร็งเช่น tetrahydrofolate, purine, pyrimidine, DNA/RNA polymerase และ ribonucleotide reductase ^[13]

1.1.2 ยาที่ออกฤทธิ์โดยตรงกับดีเอ็นเอ (drugs interacting directly DNA)

ยาสามารถเข้าจับโดยตรงกับดีเอ็นเอ ได้ในหลายลักษณะ

alkylating agent

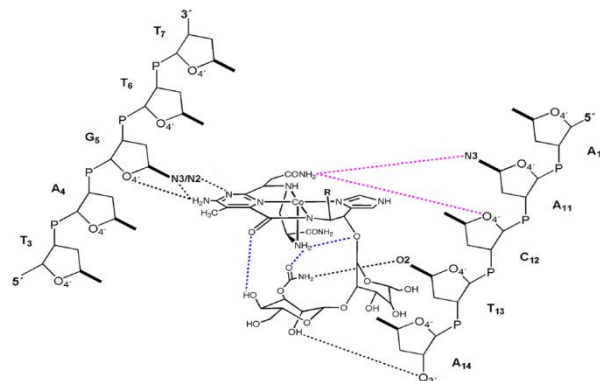
alkylating agent เป็นสารประกอบที่สามารถเกิดปฏิกิริยาโดยหมู่เอซิล เกิดพันธะโควาเลนต์กับบางส่วนของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับโมเลกุลดีเอ็นเอ ตัวอย่างเช่น Nitrogen mustards, aziridine, nitrosoureas, triazines, hydrazine และ methanesulphonate ester สารดังกล่าวทำให้เกิด DNA crosslink ซึ่งเชื่อว่าจะสามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์และมีผลออกฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์มะเร็ง ^[13]



รูปที่ 1.3 ตัวอย่างของสารกลุ่ม alkylating agent

Groove binding agent

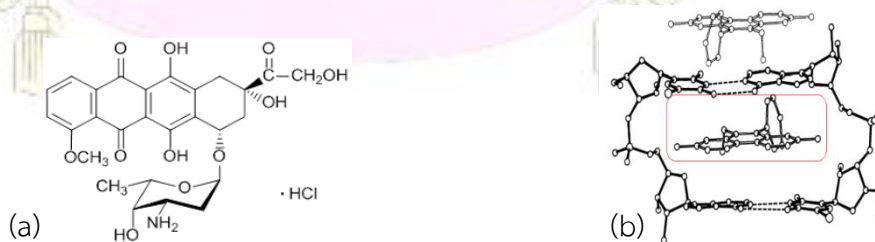
สารประกอบกลุ่มนี้สามารถเข้าตัดสายของดีเอ็นเอ ตัวอย่างเช่นบลีโอมัยซิน (bleomycin) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารกลูโคเปปไทด์ที่มีฤทธิ์แอนติไบโอติก ซึ่งแยกได้จาก *Streptomyces verticillus* โลหะไอออนและออกซิเจนในบลีโอมัยซิน เป็นปัจจัยสำคัญของการเข้าจับกับ minor groove ของดีเอ็นเอ และมีความจำเพาะกับลำดับเบสของ DNA จึงมีความเลือกจำเพาะในการตัดสาย DNA^[14]



รูปที่ 1.4 โครงสร้างทางเคมีของ Co(III)-bleomycin ในคู่สาย DNA

DNA Intercalating agent

สารกลุ่มนี้สามารถเข้าแทรกระหว่างสายคู่ของ DNA โดยการเข้าแทรกระหว่างคู่เบสที่อยู่ติดกันของสาย DNA ดังนั้นลักษณะทางกายภาพของสารประกอบกลุ่มนี้จึงมักจะเป็นระนาบ (planar) และมีระบบวงอะโรมาติก ซึ่งการเข้าจับระหว่างระนาบกับคู่เบสโดย van der Waals และ interaction สารในกลุ่ม DNA Intercalating มีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างหลากหลาย เช่นการยับยั้งกระบวนการจำลองตัว (replication) และการแปลรหัสพันธุกรรม (transcription) ของ DNA ซึ่งอาจออกฤทธิ์ยับยั้งต่อการทำงานของ DNA/RNA polymerase ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้เช่น daunorubicin, daunomycin, doxorubicin และ adriamycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม anthracycline ซึ่งแยกได้จาก *Streptomyces species*^[14]

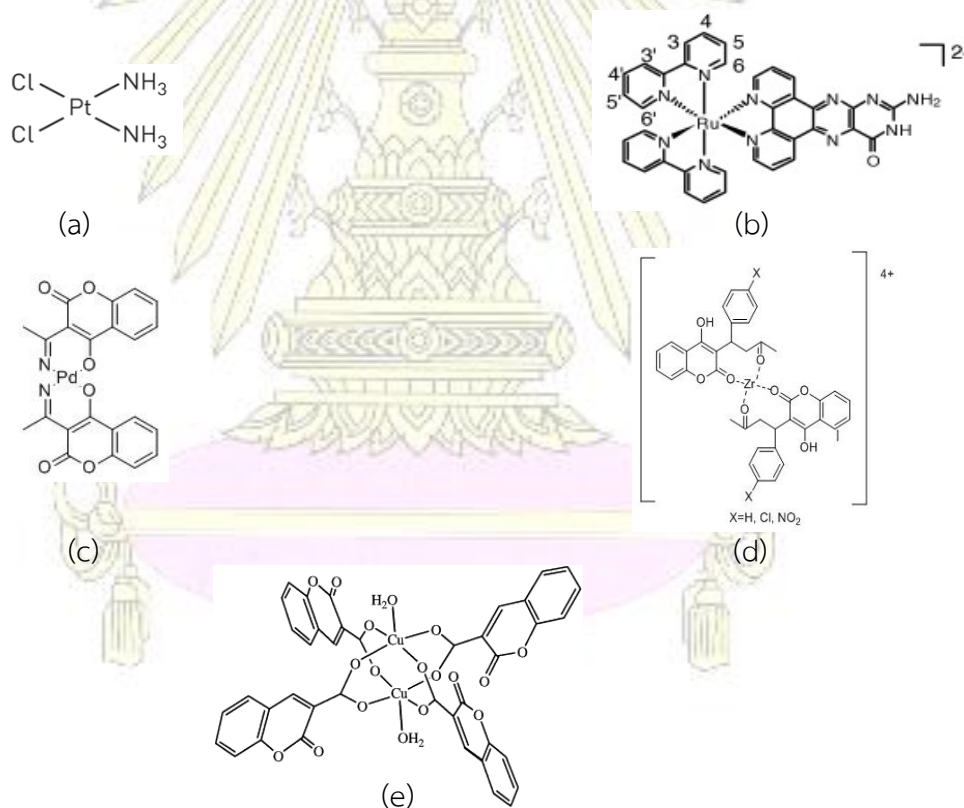


รูปที่ 1.5 โครงสร้างของ (a) doxorubicin (b) การเข้าจับของ doxorubicin-d(CGATCG)₂

จากที่กล่าวมาในข้างต้นเราสามารถจัดประเภทของยาที่เกิด interaction โดยตรงกับดีเอ็นเอ ได้ 3 กลุ่ม คือ alkylating agents, groove binding agents และ Intercalating agents ผลจาก interaction และหลายปัจจัย สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะจึงเป็นสารที่เหมาะสมสำหรับเป็นสารต้านมะเร็ง

2. การเข้าจับของสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชันกับดีเอ็นเอ

จากวัฏจักรการแบ่งเซลล์ การจำลองตัว (replication) การถอดรหัสสารพันธุกรรม (transcription) และการซ่อมแซมของ DNA เกิดจากการทำงานของกลุ่มโปรตีน ดังนั้นการเข้าจับของสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะกับสาย DNA ของเซลล์จึงอาจเป็นสาเหตุให้เซลล์นั้นไม่สามารถแบ่งเซลล์ต่อไปได้ หรือเซลล์นั้นอาจตายลง สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะที่ถูกใช้เป็นยาในการรักษามะเร็งได้แก่ cisplatin ($\text{cis}-(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}_2$) (รูปที่ 1.6a), ruthenium(II) polypyridyl complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{appo})]^{2+}$ ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase^[13] (รูปที่ 2.6b), palladium(II) complex ของ 3-(1-aminoethyl)-4-hydroxychromen^[15] (รูปที่ 1.6c), zirconium(IV) complex ของ warfarin, coumachlor niffcoumar^[16] (รูปที่ 1.6d), และ copper(II) complex ของ coumarin-3-carboxylic acid (CcaH)^[17] (รูปที่ 1.6e)

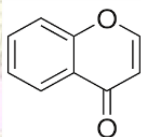


รูปที่ 1.6 สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชันที่เข้าจับกับ DNA

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น การรักษามะเร็งด้วยเคมีบำบัดมีความแตกต่าง ของการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ ตัวอย่างเช่น alkylating agents ออกฤทธิ์อย่างไม่มีจำเพาะ ในทุกระยะของวัฏจักรการแบ่งเซลล์ และไม่มี ความจำเพาะกับเซลล์มะเร็งเพียงอย่างเดียว สามารถเกิดการเข้าจับกับสาย DNA ของเซลล์ปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุให้ การเติบโตของเซลล์ผิดปกติไป สำหรับ antimetabolic agents สามารถเข้าจับอย่างเฉพาะเจาะจงกับ สายDNA ในระยะการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ตัวอย่างของ antimetabolites คือ folic acid antagonists, purine antagonists, และ pyrimidine antagonists สารเหล่านี้จะเข้าขัดขวางการสังเคราะห์ DNA โดยเปลี่ยน folic acid ให้เป็น tetrahydrofolate และยับยั้งการสร้างเบสพิวรีน และเบสไพริมิดีน สำหรับสารที่เข้าขัดขวาง (intercalating agent) เช่น bleomycin และ doxorubicin สารกลุ่มนี้จะเกิดการแทรกสอด (intercalate) ระหว่างพื้นที่ว่างของคู่ DNA และหยุดการจำลองตัว (replication) และการถอดรหัสสารพันธุกรรม (transcription) ของ DNA และ RNA เพื่อการค้นคว้าและพัฒนาสารในการต้านมะเร็งชนิดใหม่ที่ออกฤทธิ์โดยตรง กับดีเอ็นเอ กลไกของสารประกอบในการเข้าแทรก (intercalate) ระหว่างสาย DNA จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการ สังเคราะห์สารประกอบที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยลิแกนด์ pinostrobin ซึ่งมีโครงสร้างพื้นฐานเป็นโครโมน (chromone) ซึ่งมีงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ของ pinostrobin เมื่อมีการจับกับโลหะไอออน ที่ให้สารประกอบเชิงซ้อน ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง

3. โครโมน (chromone) โครงสร้างพื้นฐานของสารต้านมะเร็ง

โครโมน chromone (1,4-benzopyrone) คืออนุพันธ์ของเบนโซไพโรน (benzopyrone) ที่มีหมู่คีโตน เป็นหมู่แทนที่บนวงไพแรน (pyran) อนุพันธ์ของ chromone เรียกรวม chromones ซึ่งโครงสร้างเป็นพื้นฐาน ของสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง เช่น coumarin, flavonoid และ rotenoid



รูปที่ 1.7 โครงสร้างของโครโมน (chromone) ^[18]

3.1 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) เป็นตัวอย่างของลิแกนด์ที่สามารถเกิด coordinate กับโลหะไอออน และให้ สารประกอบเชิงซ้อนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบกลุ่มฟิโนลิก ที่มีโครงสร้างพื้นฐาน เป็นวงอะโรมาติก 2 วง ที่เชื่อมกันด้วยคาร์บอน 3 อะตอม และมักเป็น oxygenated heterocyclic ^[19] มีงานวิจัย

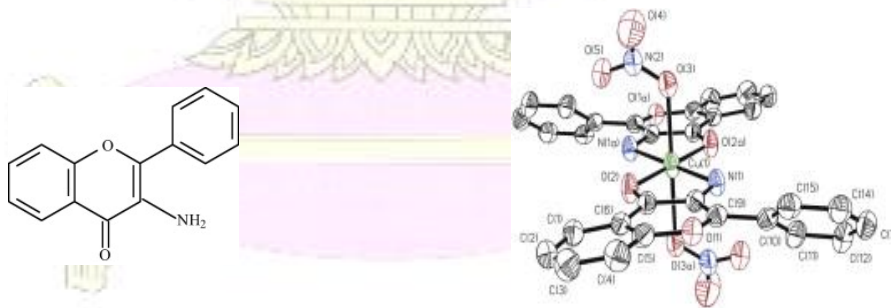
จำนวนมากเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและการยับยั้งเอนไซม์ DNA topoisomerase ของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะแพลนตินัม - ฟลาโวนอยด์

ในปี 2006, Kosmider และคณะ ได้ศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ cis-bis(3-aminoflavone)dichloroplatinum(II) โดยเปรียบเทียบกับ cisplatin โดยสารประกอบทั้งสองชนิดถูกทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่มีชีวิตพบว่า เซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ apoptosis และ necrosis ได้สูง และสารประกอบ cis-bis(3-aminoflavone)dichloroplatinum(II) ยังทำให้เซลล์เกิดสภาวะ genotoxic กับเซลล์ lymphocytes ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับ cisplatin ^[20]



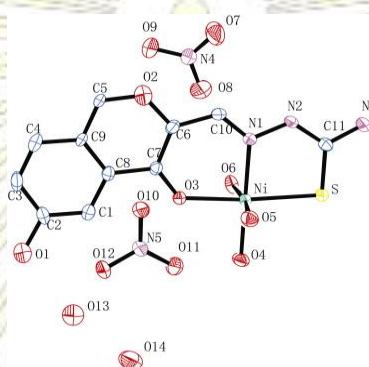
รูปที่ 1.8 โครงสร้างทางเคมีของสารที่ทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง (a) cisplatin (b) cis-[Pt(AF)₂Cl₂]

ในปี 2009, Zurowska และคณะได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแพลนตินัมชนิดใหม่ ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง $[M(3\text{-af})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ โดยที่ $M = \text{Co(II)}, \text{Ni(II)}$ และ Zn(II) และมี $n = 0, 2, 0$ ตามลำดับ จากผลการศึกษาสารประกอบ $[\text{Cu}(3\text{-af})_2(\text{NO}_3)_2]$ สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (L1210) ในหนูทดลอง และสามารถยับยั้งกระบวนการ proliferation เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (L1210) ^[21]



รูปที่1.9 โครงสร้างทางเคมีของลิแกนด์ 3-aminoflavone และโครงสร้างโมเลกุล $[\text{Cu}(3\text{-af})_2(\text{NO}_3)_2]$

ในปี 2009, Wang และคณะ ได้สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน Ni(II)-6-hydroxychromone-3-carbaldehyde thiosemicarbazone นำลิแกนด์และสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดคือ THP-1, Raji และ Hela พบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของลิแกนด์ (Hela, $IC_{50} > 300 \mu\text{M}$; Raji, $IC_{50} = 240.2 \mu\text{M}$; Thp-1, $IC_{50} > 300 \mu\text{M}$) ส่วนความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด ของสารประกอบเชิงซ้อน Ni(II)-6-hydroxychromone-3-carbaldehyde thiosemicarbazone มีค่าต่ำกว่าลิแกนด์อย่างมีนัยสำคัญ (Hela, $IC_{50} = 118 \mu\text{M}$; Raji, $IC_{50} = 97 \mu\text{M}$; Thp-1, $IC_{50} = 89 \mu\text{M}$) จากการทดสอบการเข้าจับของสารประกอบเชิงซ้อน Ni(II) และลิแกนด์ดังกล่าวกับ DNA ของ calf thymus ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อน Ni(II) เข้าจับกับสาย DNA โดยการเข้าแทรก (intercalating) ระหว่างคู่สาย DNA^[22]



รูปที่ 1.10 โครงสร้าง 6-hydroxy chromone-3-carbaldehyde thiosemicarbazone Ni(II) complex

จากงานวิจัยข้างต้น สารประกอบเชิงซ้อนโลหะของ flavonoid มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และสามารถยับยั้ง DNA topoisomerase โดยมีลักษณะที่สำคัญดังนี้ 1. มีตำแหน่งที่เป็นระนาบ (planar) ในการเข้าแทรก (intercalating) ระหว่างคู่สาย DNA 2. มีหมู่คาร์บอนิลและไฮดรอกซิลที่สามารถเกิด coordination กับโลหะไอออนและ 3. การเกิด intermolecular interaction กับคู่สาย DNA นอกจากนี้ไอออนโลหะทรานซิชัน (first row transition) ที่มีโครงสร้างเป็น chromone-based structure ยังสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งในมนุษย์หลายชนิด จากโครงสร้างพื้นฐานของ metal-chromone ที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จึงเป็นสิ่งที่สนใจของงานวิจัยจำนวนมากในการค้นหาสารในกลุ่ม metal-chromone ที่ให้ฤทธิ์ในการยับยั้งได้สูงกับเซลล์มะเร็ง ในงานวิจัยนี้จึงสนใจสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชันโดยมีลิแกนด์เป็น flavonoid และศึกษาฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง^[21,22]

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. สังเคราะห์สารเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชั่นของ pinostrobin ได้
2. ทำนายสูตรโมเลกุลทางเคมีที่เป็นไปได้ของสารเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชั่นที่สังเคราะห์ได้โดยเทคนิคสเปกโทรสโกปีต่างๆ
3. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชั่นที่สังเคราะห์ได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สารเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชั่นของ pinostrobin และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่สังเคราะห์ได้จากเหง้าของกระชายเหลือง *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.



บทที่ 2

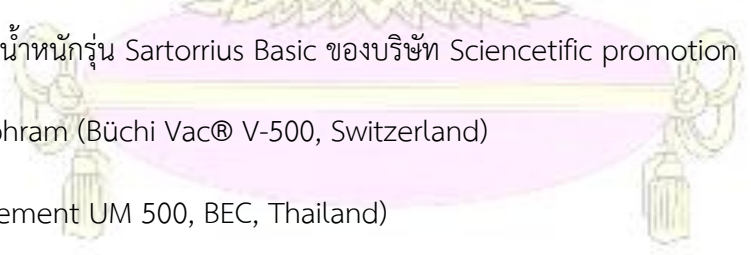
วิธีการทดลอง

2.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 
- ปีกเกอร์
 - หลอดทดลอง
 - กระจกนาฬิกา
 - กรวยแก้ว
 - กรวยบุชเนอร์
 - กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42
 - ไมโครเพลท 96 หลุม (96 well plates)
 - ไซริงขนาด 1,5 มิลลิลิตร
 - คอนเดนเซอร์
 - หลอดแคปิลลารี
 - กระจบอกลดวง
 - ขวดรูปกรวย
 - แท่งแก้วคนสาร
 - ขวดก้นกลมสองคอ
 - หลอดหยด
 - ไมโครปิเปต
 - ซ้อนตักสาร
 - ป้อน้ำ/สายยาง

2.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 
- เครื่องชั่งน้ำหนักรุ่น Sartorius Basic ของบริษัท Scientefic promotion
 - ป้อน diaphragm (Büchi Vac® V-500, Switzerland)
 - ตู้อบ (Mement UM 500, BEC, Thailand)
 - Sonicator (Branson, USA)
 - Safety Laboratory Hood (Asia chemical and engineering Co.,Ltd,Thailand)
 - เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) ของบริษัท IKA Labortechnik

- Nuclear Magnetic Resonance Spectrophotometer YH 400 ของบริษัท Bruker
- Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) Nicolet 6700
- MALDI-TOF Mass Spectrometry SHIMADZU
- Microplate reader ยี่ห้อ Biotek รุ่น POWERWAVE XS2

2.2 สารเคมี

2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์

- เอทานอล (ethanol)
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1 โมลาร์
- Copper(II) chloride dihydrate ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Iron(III) chloride Hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Cobalt(II) chloride Hexahydrate ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Nickel(II) acetate tetrahydrate ($\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- Zinc (II) chloride (ZnCl_2)
- Calcium chloride (anh, CaCl_2)

2.2.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการพิสูจน์ทราบโครงสร้าง

- การวิเคราะห์ด้วย NMR Spectrophotometer : CDCl_3 (chloroform-d), dimethyl sulfoxide (DMSO-d_6)
- การวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF mass spectrometry : DCTB matrix, trichloromethane (CHCl_3)

2.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

- dimethyl sulfoxide (DMSO, cell culture grade)

2.3 เซลล์ไลน์สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

- เซลล์มะเร็งเต้านม (human breast adenocarcinoma cell line; MCF-7)
- เซลล์มะเร็งเต้านม (human breast adenocarcinoma cell line; MDA-MB-231)

2.4 ขั้นตอนการทดลอง

2.4.1 การเตรียม pinostrobin (L)

ขั้นตอนการเตรียมส่วนสกัด

1. นำเหง้าของกระชายเหลือง (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf) ที่ผ่านการตากแห้งและทำการบดละเอียดแล้วทั้งหมด 300 กรัม นำไปแช่ไดคลอโรมีเทน 2 ลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน
2. กรองเอาส่วนที่เป็นสารละลายมาระเหยตัวทำละลายออกไป โดยใช้ Rotary Vacuum Evaporator จะได้ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนหนัก 42.9 กรัม

ขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดต่างๆ ของเหง้ากระชายเหลืองให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

การแยกจากส่วนสกัดเฮกเซนของเหง้ากระชายเหลือง

1. แบ่งส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนมาเล็กน้อย มาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อทำการหา ระบบของตัวทำละลายผสมหรือวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่จะทำการลงคอลัมน์เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมี โดยอาศัยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC)
2. นำส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนทั้งหมดมาทำ Quick Column โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่งด้วยระบบตัวทำละลายของอะซิโตนและเฮกเซนในสัดส่วนตั้งแต่ 10%-50% และท้ายสุดเป็นระบบเอทิลอะซิเตต 100%

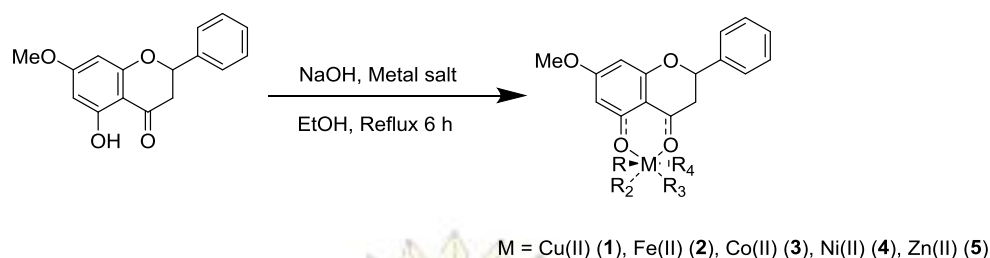
3. เก็บส่วนย่อยที่ออกมาจากคอลัมน์ นำมาตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค TLC แล้วนำส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกันมารวมกัน และระเหยตัวทำละลายออก ซึ่งจะได้ 10 ส่วนย่อย (A-J) และได้ของแข็งสีขาวตกผลึกออกมาในส่วนย่อย B จึงได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด (pinostrobin)^[23]

2.4.2 การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชัน^[24]

1.) การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของ Copper(II) - Pinostrobin (1)

นำ pinostrobin 50.0 มิลลิกรัม (0.185 mM) ใส่ขวดสองคอและเติมเอทานอล 5 มิลลิลิตร และ magnetic stirrer ต่อ condenser และ CaCl₂ guard column เข้ากับขวดกันกลม ให้ความร้อน 30 องศาเซลเซียสผ่านอ่างน้ำมัน (Oil bath) จนสารละลายหมด เติมสารละลาย NaOH เข้มข้น 1 โมลาร์ จนสารละลายในขวดกันกลมมี pH \approx 12 (ทดสอบด้วยกระดาษยูนิเวอร์ซัลอินดิเคเตอร์) ค่อยๆหยดสารละลาย CuCl₂·2H₂O 32.0 มิลลิกรัม (0.185 mM) ที่ละลายในเอทานอล 5 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ลดอุณหภูมิปฏิกิริยาจนถึงอุณหภูมิต่ำ กรองล้างผลิตภัณฑ์ของแข็งสีเขียวอ่อนด้วย 1:3 (เอทานอล-น้ำ) และทำให้ผลิตภัณฑ์แห้งที่อุณหภูมิต่ำ ได้สารประกอบ (1) 34 %yield





รูปที่ 2.1 การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชัน

2.) การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของ Iron(III) - Pinostrobin (2)

วิธีการสังเคราะห์เป็นวิธีเดียวกับข้อ 1.) แต่ใช้เกลือโลหะเป็น $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ได้ผลิตภัณฑ์ของแข็งสีน้ำตาลแดงได้สารประกอบ (2) 66 % yield

3.) การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของ Cobalt(II) - Pinostrobin (3)

วิธีการสังเคราะห์เป็นวิธีเดียวกับข้อ 1.) แต่ใช้เกลือโลหะเป็น $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ได้ผลิตภัณฑ์ของแข็งสีเขียวอมเหลือง ได้สารประกอบ (3) 48 % yield

4.) การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของ Nickel(II) - Pinostrobin (4)

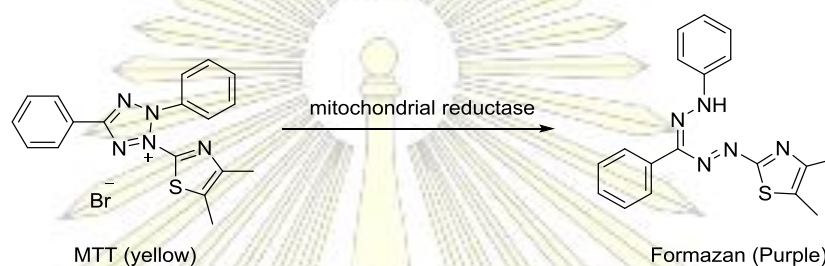
วิธีการสังเคราะห์เป็นวิธีเดียวกับข้อ 1.) แต่ใช้เกลือโลหะเป็น $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ได้ผลิตภัณฑ์ของแข็งสีม่วง ได้สารประกอบ (4) 68 % yield

5.) การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของ Zinc(II) - Pinostrobin (5)

วิธีการสังเคราะห์เป็นวิธีเดียวกับข้อ 1.) แต่ใช้เกลือโลหะเป็น ZnCl_2 ได้ผลิตภัณฑ์ของแข็งสีขาว ได้สารประกอบ (5) 24 % yield

2.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นการทดสอบแบบ in vitro โดยวิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีการเปรียบเทียบความเข้มสี (calorimetric method) ซึ่งเป็นการวัดการเกิดรีดักชันของ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltriazolium bromide) ด้วยเอนไซม์ mitochondrial succinate dehydrogenase โดย MTT จะเข้าสู่เซลล์ในส่วนไมโทคอนเดรียและถูกรีดิวซ์ได้มีสีม่วงเข้มของ formazan จากนั้นทำให้สารละลายเข้ากันแล้วจึงวัดค่าความเข้มของสีด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี ปฏิกิริยารีดักชันของ MTT จะเกิดขึ้นในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ระดับของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพจึงสามารถวัดได้จากปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ MTT (สีเหลือง) และ Formazan (สีม่วง) ในเซลล์ที่มีชีวิต

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay) โดยวิธี MTT assay^[25]

- 1.) ทำการเตรียมเซลล์ใน 96 well plate โดยใน 1 หลุมมีเซลล์ 50,000 เซลล์ และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C ความชื้นและสภาวะบรรยากาศที่มี 5% CO₂ ในตู้บ่ม
- 2.) จากนั้นทำการ pretreat เซลล์ด้วยสารที่สังเคราะห์ได้หรือ DMSO สำหรับชุดควบคุม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำ media ออกจากแต่ละหลุมและเติมสารละลาย MTT (10 µL, 5mg/mL ใน PBS) ลงในแต่ละหลุม จากนั้นทำการบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง
- 3.) เติม DMSO (100 µL/well) เพื่อละลายผลึกของฟอร์มazanที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader
- 4.) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์

$$\% \text{ การอยู่รอดของเซลล์} = \frac{OD_{test} \times 100}{OD_{control}}$$

เมื่อ OD_{test} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสาร

$OD_{Control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

บทที่ 3

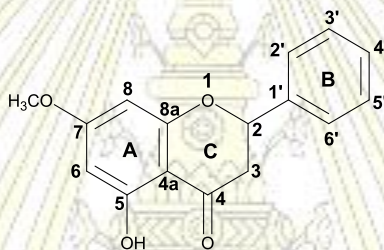
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การแยก pinostrobin (L)

pinostrobin (L) จากเหง้ากระชายเหลือง (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) สกัดหยาบด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคหนึ่ง และใช้ระบบตัวทำละลายของอะซิโตนและเฮกเซนในสัดส่วนตั้งแต่ 10-50% และท้ายสุดเป็นระบบเอทิลอะซิเตต 100 % เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ได้สารบริสุทธิ์หนัก 2.75 กรัม

3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร pinostrobin (L)

การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ pinostrobin ที่ผ่านการแยก โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลจากเทคนิคสเปกโทรสโกปี



รูปที่ 3.1 โครงสร้างทางเคมีของ pinostrobin

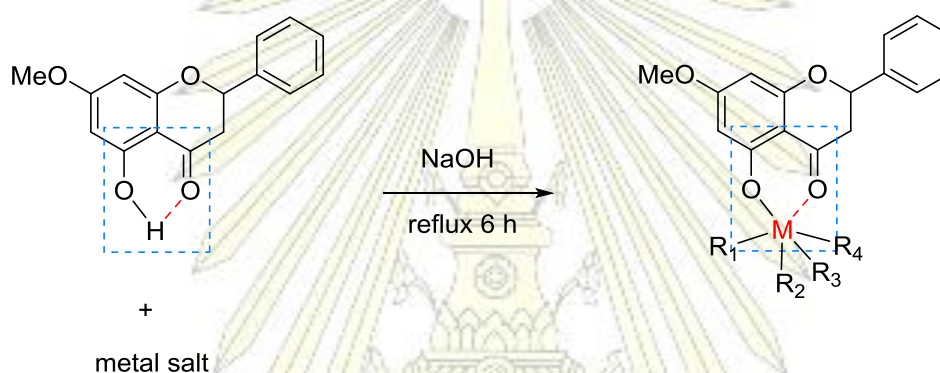
จากข้อมูล IR spectrum ของ pinostrobin ที่ปรากฏพิคการสั่นในตำแหน่ง $3,457\text{cm}^{-1}$ (OH-stretching), 1644 cm^{-1} (C=O stretching) และ 1508 cm^{-1} (C=C stretching) จากข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสาร pinostrobin (ตารางที่ 3.1) พบสัญญาณแบบ singlet ของหมู่ methoxy ที่ δ_{H} 3.79 สัญญาณของโปรตอนแบบ singlet ที่ δ_{H} 12.10 ของหมู่ไฮดรอกซีที่เกิด chelate กับหมู่คาร์บอนิล ตำแหน่งที่ 4 สัญญาณโปรตอนของวงอะโรมาติก A แบบ doublet of doublet ที่ δ_{H} 6.14 ($J = 2.0\text{ Hz}$) และ δ_{H} 6.10 ($J = 2.5\text{ Hz}$) เป็นของโปรตอนในตำแหน่งที่ 6 และ 8 ตามลำดับ สัญญาณแบบ multiplet ที่ δ_{H} 7.37 – 7.53 เป็นของโปรตอนที่ไม่ได้ถูกแทนที่บนวงอะโรมาติก B และจากข้อมูล ^{13}C NMR (ตารางที่ 3.1) พบสัญญาณของหมู่คาร์บอนิลที่ค่อนข้างแก่กับวงอะโรมาติกที่ δ_{C} 195.80 สัญญาณของคาร์บอนที่ต่อกับหมู่ไฮดรอกซีที่ δ_{C} 162.9 และสัญญาณของคาร์บอนในตำแหน่ง -Ome ที่ δ_{C} 55.8

ตารางที่ 3.1 ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของสาร pinostrobin

ตำแหน่ง	δ_{H}	δ_{C}
2	5.63 (dd, 1H, $J=3.0,13.0$ Hz)	79.4
3	3.31 (dd, 1H, $J=12.5,30.0$ Hz) 2.82 (dd, 1H, $J=3.0,20.0$ Hz)	43.5
4	-	195.8
4a	-	103.3
5	-	126.9
6	6.14 (d, 1H, $J=2.0$ Hz)	95.3
7	-	168.4
8	6.10 (d, 1H, $J=2.5$ Hz)	94.4
8a	-	164.3
1'	-	138.5
2'	7.46 (m,1H)	126.2
3'	7.45 (m,1H)	126.2
4'	7.41 (m,1H)	129.0
5'	7.43 (m,1H)	126.2
6'	7.46 (m,1H)	126.2
5-OH	12.10 (s,1H)	126.9
7-OMe	3.79 (s, 3H)	55.8

3.3 การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชัน-pinostrobin

เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของสารฟลาโวนอยด์ pinostrobin มีหมู่ไฮดรอกซี ที่เกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนที่มีค่า chemical shift ที่มีลักษณะเฉพาะที่ δ_H 12.10 จึงมีความเหมาะสมในการเป็นลิแกนด์ของโลหะทรานซิชัน ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน Metal-pinostrobin สามารถเกิดได้อย่างง่ายดายโดยนำสารทำปฏิกิริยากันในสถานะที่เป็นเบสซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ NaOH และรีฟลักซ์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (รูปที่ 3.3) สำหรับโลหะที่เลือกใช้มี 5 ชนิด ได้แก่ Cu(II), Fe(III), Co(II), Ni(II) และ Zn(II) โดยได้ผลผลิตของสารประกอบเชิงซ้อนแต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ปฏิกิริยาทั่วไปสำหรับการสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชัน-pinostrobin

ตารางที่ 3.2 ผลผลิต (%yield) ของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชัน-pinostrobin ที่สังเคราะห์ได้

สารประกอบเชิงซ้อน Metal-pinostrobin	%ผลผลิต
Cu(II)-pinostrobin	34
Fe(III)-pinostrobin	66
Co(II)-pinostrobin	48
Ni(II)-pinostrobin	68
Zn(II)-pinostrobin	24

3.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน Cu(II)-pinostrobin complex (1)

^1H NMR spectrum ของ Cu(II)-pinostrobin complex (1) โดย Cu(II) มีสมบัติเป็น paramagnetic (d^9) แสดงการเกิดเรโซแนนซ์ของลิแกนด์ pinostrobin กับโลหะไอออน เนื่องจากการเกิดโคออร์ดิเนชันกับโลหะไอออนจะเกิดผ่านหมู่ไฮดรอกซี และ หมู่คาร์บอนิลของลิแกนด์ โดยสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซี ในตำแหน่งที่ 5 δ_{H} 12.09 มีค่า intensity ต่ำลง (รูปที่ 3.1b) เนื่องจากการเพิ่มของ charge delocalization เมื่อเกิดโคออร์ดิเนชันกับโลหะไอออน สัญญาณของโปรตอนตำแหน่ง 7-OMe มีความเข้มของสัญญาณลดลง จากการเปลี่ยนแปลงการคัปปลิง กับโปรตอนของวงอะโรมาติกในตำแหน่งที่ 6 และ 8 (รูปที่ 3.1(b)) ซึ่งเป็นผลจากการเกิดโคออร์ดิเนชันกับโลหะไอออน สัญญาณแบบ doublet of doublet เป็นสัญญาณของโปรตอนในตำแหน่งที่ 3 เกิดการเลื่อนตำแหน่งมีค่า chemical shift ลดลงจาก ที่ δ_{H} 3.31, 2.82 ในลิแกนด์ เป็น 2.82, 2.49 ตามลำดับเมื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน อันเนื่องจากการเกิดโคออร์ดิเนชันในตำแหน่งที่ 4 ของหมู่คาร์บอนิล สัญญาณแบบ singlet ที่ δ_{H} 1.22 และ quartet ที่ δ_{H} 2.81-2.84 ซึ่งบ่งบอกถึงการมี $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ในโมเลกุลสารเชิงซ้อน และสัญญาณที่ δ_{H} 3.31 ซึ่งบ่งบอกถึงการมี H_2O ในโมเลกุลสารเชิงซ้อน

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลง การดูดกลืนสัญญาณของ IR spectrum ระหว่าง ลิแกนด์อิสระและลิแกนด์ที่เกิดโคออร์ดิเนชัน (รูปที่ 3.2 (b)) พบว่า broad band ของ ν_{OH} stretching ที่ความถี่ในช่วง 3457.06 cm^{-1} ซึ่งบ่งบอกว่าในโมเลกุลสารเชิงซ้อนเกิดโคออร์ดิเนชันของน้ำภายในโมเลกุล ความถี่เฉพาะการสั่นของหมู่คาร์บอนิล ($\nu_{\text{C=O}}$ 1644.50 cm^{-1} และ $\nu_{\text{C-O}}$ 1210.20 cm^{-1}) เมื่อเกิดเป็นโคออร์ดิเนตลิแกนด์ เกิดการเลื่อนตำแหน่งลดลงเป็น 1613.45 และ 1159.93 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งบ่งบอกถึงการเกิดโคออร์ดิเนชันของโลหะไอออนผ่านอะตอมออกซิเจนที่หมู่คาร์บอนิลของลิแกนด์

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาแมสสเปกตรัม (MALDI) ของสารประกอบเชิงซ้อน 1 พบ m/z $\text{Cu}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})(\text{H}_2\text{O})$: 666.1526 (จากการคำนวณ 666.1521) ซึ่ง fragment pattern ของสารมีลักษณะตรงกับ pattern ที่ทำนายด้วยโปรแกรม ดังแสดงในรูปที่ A.1 จากข้อมูลทั้งหมด ทำให้สามารถยืนยันโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน 1 ได้เป็น $\text{Cu}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$: 666.1526

3.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน Fe(III)-pinostrobin complex (2)

^1H NMR spectrum ของ Fe(III)-pinostrobin complex (2) โดย Fe(III) มีสมบัติเป็น paramagnetic (d^5) ลักษณะของสัญญาณ NMR มีลักษณะ board เนื่องจากการรบกวนของอิเล็กตรอนสปินใน ดี-ออร์บิทัล เนื่องจากการเกิดโคออร์ดิเนชันกับโลหะไอออนจะเกิดผ่านหมู่ไฮดรอกซี และ หมู่คาร์บอนิลของลิแกนด์ โดยสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซี ในตำแหน่งที่ 5 δ_{H} 12.09 มีลักษณะ board และมี intensity ต่ำลง (รูปที่ 3.1(c)) สัญญาณของโปรตอนในตำแหน่งที่ 6, 8 และ 2 มีลักษณะ board และเลื่อนตำแหน่งมีค่า chemical shift ลดลง สัญญาณของโปรตอนในตำแหน่งที่ 3 เลื่อนตำแหน่งมาซ้อนทับกับสัญญาณโปรตอนของ $-\text{OCH}_3$ และสัญญาณของตัวทำละลาย DMSO ซึ่งเป็นผลมาจากจากการเกิดโคออร์ดิเนชันกับโลหะไอออนผ่านหมู่ไฮดรอกซิลและคาร์บอนิลของลิแกนด์ สัญญาณแบบ singlet ที่มีลักษณะ board ที่ δ_{H} 7.46 ของโปรตอนบนวงอะโรมาติก บ่งบอกว่า โมเลกุลสารเชิงซ้อนมีความสมมาตรของโมเลกุล

สัญญาณ IR spectrum ของ Fe complex (รูปที่ 3.2 (c)) มีความถี่เฉพาะการสั่นของหมู่คาร์บอนิล ในลิแกนด์อิสระ มีค่าลดลงจาก 1644.50 cm^{-1} เป็น 1614.63 cm^{-1} เมื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งบ่งถึงการเกิดโคออร์ดิเนชันของโลหะไอออนผ่านอะตอมออกซิเจนที่หมู่คาร์บอนิลของลิแกนด์ ความถี่ในการสั่นของ $\nu_{\text{C-HO}}$ และ $\nu_{\text{C-O}}$ ในสารประกอบเชิงซ้อนโลหะเนื่องจากการเพิ่มของพันธะในตำแหน่ง 5C-OH

จากผลของแมสสเปกตรัม (MALDI) พบ m/z $\text{Fe}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)_2 : 596.1134$ (จากการคำนวณ 595.1253) ซึ่ง fragment pattern ของสารมีลักษณะตรงกับ pattern ที่ทำนายด้วยโปรแกรม ดังแสดงในรูปที่ A.2 จากข้อมูลทั้งหมด ทำให้สามารถยืนยันโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน 2 ได้เป็น $\text{Fe}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)_2$

3.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน Co(II)-pinostrobin complex (3)

^1H NMR spectrum ของ Co(II)-pinostrobin complex (3) โดย Co(II) มีสมบัติเป็น paramagnetic (d^7) ลักษณะของสัญญาณ NMR มีลักษณะ board เนื่องจากการรบกวนของอิเล็กตรอนสปินใน ดี-ออร์บิทัล สัญญาณของโปรตอนในตำแหน่งที่ 6, 8 และ 2 มีลักษณะ board และเลื่อนตำแหน่งมีค่า chemical shift ลดลง สัญญาณของโปรตอนในตำแหน่งที่ 3 เลื่อนตำแหน่งมาซ้อนทับกับสัญญาณโปรตอนของ $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, H_2O และสัญญาณของตัวทำละลาย $\text{DMSO-}d_6$ ซึ่งเป็นผลจากการเกิดโคออร์ดิเนชันกับโลหะไอออนผ่านหมู่ไฮดรอกซีและหมู่คาร์บอนิลของลิแกนด์ (รูปที่ 3.1(d))

การเกิดโคออร์ดิเนชันของน้ำปรากฏสัญญาณใน IR spectrum ของ Co complex (รูปที่ 3.2 (d)) ความถี่เฉพาะการสั่นของหมู่คาร์บอนิล ($\nu_{C=O}$) ในลิแกนด์อิสระมีค่าลดลงจาก 1644.50 cm^{-1} เป็น 1608.10 cm^{-1} ในสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งบ่งบอกว่าเกิดการโคออร์ดิเนชันของโลหะไอออนผ่านอะตอมออกซิเจนที่หมู่คาร์บอนิลของลิแกนด์

จากผลแมสสเปกตรัม (MALDI) พบ m/z $\text{Co}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})(\text{H}_2\text{O})$: 685.580 (จากการคำนวณ 685.1454) ซึ่ง fragment pattern ของสารมีลักษณะตรงกับ pattern ที่ทำนายด้วยโปรแกรม ดังแสดงในรูปที่ A.3 จากข้อมูลทั้งหมด ทำให้สามารถยืนยันโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน 3 ได้เป็น $\text{Co}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$

3.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน Ni(II)-pinostrobin complex (4)

^1H NMR spectrum ของ Ni(II)-pinostrobin complex (4) โดย Ni(II) มีสมบัติเป็น paramagnetic (d^8) ลักษณะของสัญญาณโปรตอน NMR ไม่ปรากฏสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซี การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณโปรตอนในตำแหน่งที่ 6, 8 และ 2 มีลักษณะ broad และเลื่อนตำแหน่งมีค่า chemical shift ลดลง สัญญาณโปรตอนของหมู่ 7-OMe มีค่า δ_{H} ลดลงจาก 3.79 เป็น 3.76 ซึ่งเป็นผลจากการเกิดโคออร์ดิเนชันกับโลหะไอออนผ่านหมู่ไฮดรอกซีและหมู่คาร์บอนิลของลิแกนด์ (รูปที่ 3.1(e))

การเกิดโคออร์ดิเนชันของน้ำปรากฏสัญญาณใน IR spectrum ของ Co complex (รูปที่ 3.2(e)) มีสัญญาณลักษณะ broad band ของ ν_{OH} stretching ที่ความถี่ในช่วง 3356.47 cm^{-1} ความถี่เฉพาะการสั่นของหมู่คาร์บอนิล ($\nu_{C=O}$) ในลิแกนด์อิสระมีค่าลดลงจาก 1644.50 cm^{-1} เป็น 1583.74 cm^{-1} ในสารประกอบเชิงซ้อน และ $\nu_{C=O}$ ในลิแกนด์มีค่าลดลงจาก 1210.20 cm^{-1} เป็น 1156.12 cm^{-1} เมื่อเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งบ่งบอกว่าเกิดการโคออร์ดิเนชันของโลหะไอออนผ่านอะตอมออกซิเจนที่หมู่คาร์บอนิลของลิแกนด์

จากผลของแมสสเปกตรัม (MALDI) พบ m/z $[\text{Ni}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)\text{Cl}_2\text{H}_2\text{O}]^{+2}$: 923.318 (จากการคำนวณ 462.0141) ซึ่ง fragment pattern ของสารมีลักษณะตรงกับ pattern ที่ทำนายด้วยโปรแกรม ดังแสดงในรูปที่ A.4 จากข้อมูลทั้งหมด ทำให้สามารถยืนยันโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน 4 ได้เป็น $\text{Ni}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)\text{Cl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$

3.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน Zn(II)-pinostrobin complex (5)

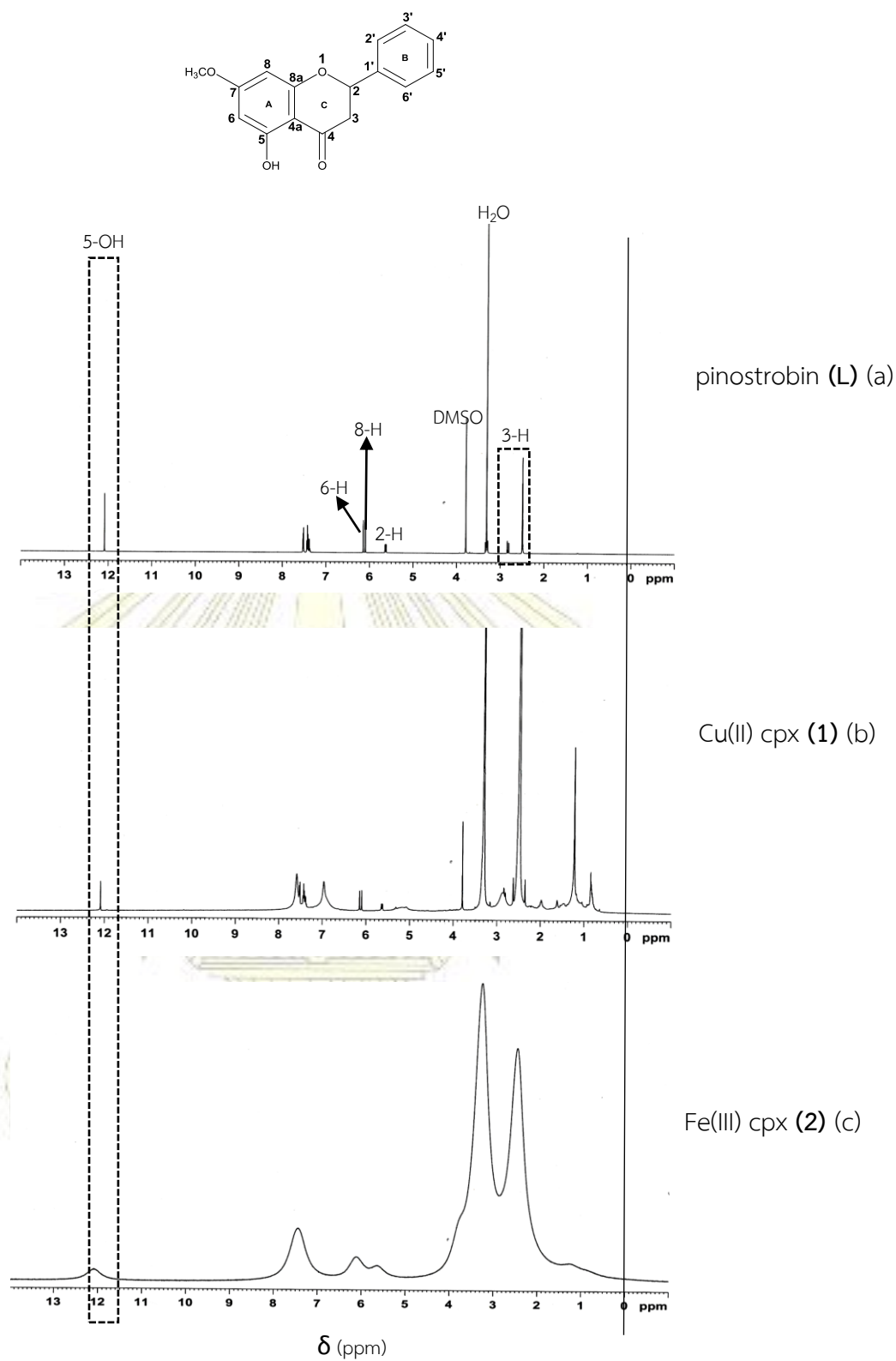
^1H NMR spectrum ของ Zn(II)-pinostrobin complex (5) โดย Zn(II) มีสมบัติเป็น diamagnetic (d^{10}) พบสัญญาณแบบ singlet ของหมู่เมททอกซีที่ δ_{H} 3.79 สัญญาณของโปรตอนแบบ singlet ที่ δ_{H} 12.10 ของหมู่ไฮดรอกซีอิสระตำแหน่งที่ 5 สัญญาณแบบ doublet ที่ δ_{H} 6.14 ($J = 2.5$ Hz) และ δ_{H} 6.09 ($J = 2.0$ Hz) เป็นของโปรตอนในตำแหน่งที่ 6 และ 8 ตามลำดับ สัญญาณแบบ multiplet ที่ δ_{H} 7.37–7.45 เป็นของโปรตอนที่ไม่ได้ถูกแทนที่บนวงอะโรมาติก B (รูปที่ 3.1 (f))

สัญญาณ IR spectrum ของ Zn complex (รูปที่ 3.2 (f)) การเกิดโคออร์ดิเนชันของไอออนโลหะซึ่งผ่านอะตอมออกซิเจน ที่หมู่คาร์บอนิลของลิแกนด์ แสดงให้เห็นจากการลดลงของความถี่ในการสั่นของหมู่คาร์บอนิล ($\nu_{\text{C=O}}$) จาก 1644.50 cm^{-1} ในลิแกนด์ เป็น 1617.35 cm^{-1} เมื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน

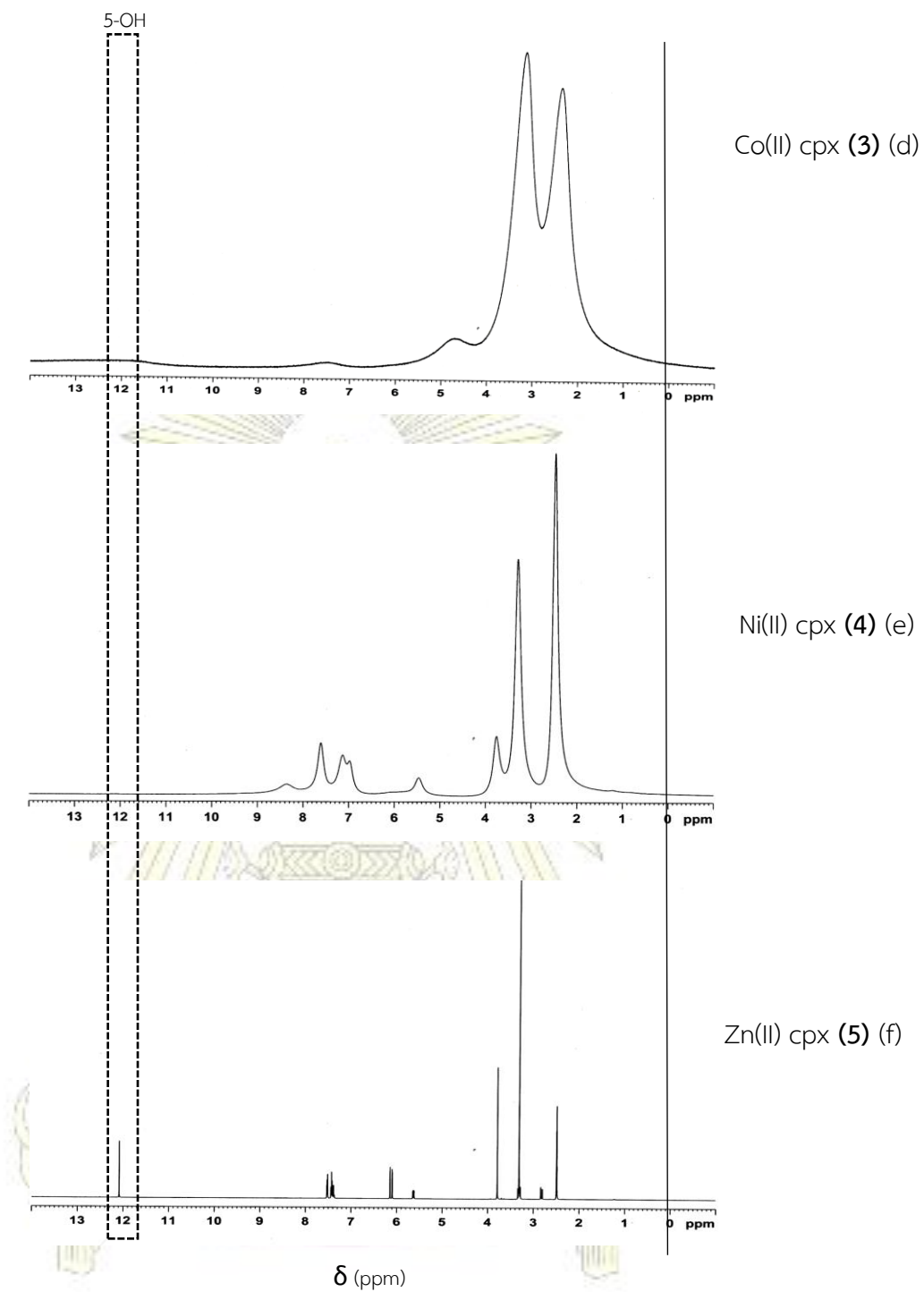
จากแมสสเปกตรัม (MALDI) พบ m/z $\text{Zn}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)_2 (\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{H}_2\text{O}$: 664.138 (จากการคำนวณ 668.1595) ซึ่ง fragment pattern ของสารมีลักษณะตรงกับ pattern ที่ทำนายด้วยโปรแกรม ดังแสดงในรูปที่ A.5 จากข้อมูลทั้งหมดทำให้สามารถยืนยันโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน 5 ได้เป็น $\text{Zn}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$

3.9 สูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชัน-pinostrobin

จากผลแมสสเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชัน-pinostrobin ที่ได้จากวิธี Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำให้สารเกิดไอออนเซชัน หรือแตกตัวเป็นไอออน ก่อนที่จะเข้าสู่เครื่องวัดมวลโมเลกุล (mass spectrometer) เป็นเทคนิคการทำให้สารเกิดการไอออนเซชันแบบ Soft ionization ใช้เมทริกซ์ที่มีความจำเพาะต่อสารที่จะทำการวิเคราะห์ ในงานวิจัยนี้ใช้เมทริกซ์เป็น DCTB (*trans*-2-[3-(4-*tert*-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene] malononitrile) ซึ่งเป็นเมทริกซ์สำหรับสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะ^[26] โดยให้แสงเลเซอร์ผ่านไปยัง crystals ใน MALDI spot เมื่อ matrix ได้พลังงานจากแสงเลเซอร์ทำให้เกิดการไอออนเซชันและมีการถ่ายเทประจุไปยังตัว analyte ทำให้ analyte เกิดกระบวนการไอออนเซชัน จากนั้นไอออนก็จะผ่านไปยัง analyser ซึ่งเป็นแบบ Time of Flight (TOF) จึงสามารถตรวจพบ molecular ion ที่ชัดเจน จึงสามารถคาดเดาสูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารประกอบเชิงซ้อนได้จากเทคนิคดังกล่าวดังแสดงในตารางที่ 3.3



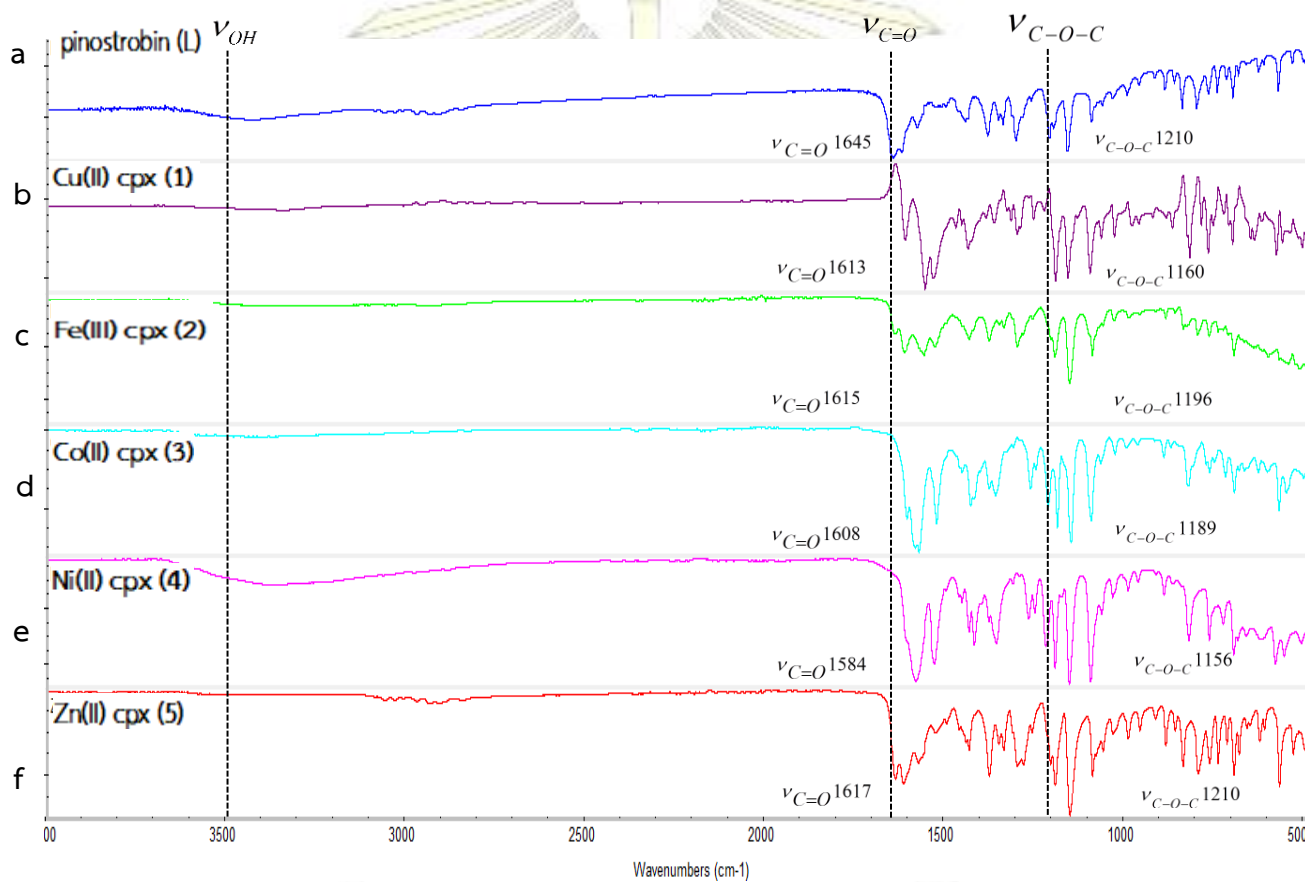
รูปที่ 3.3 สเปกตรัม ^1H NMR ของ pinostrobin (L) (a), Cu complex (1) (b), Fe complex (2) (c), Co complex (3) (d), Ni complex (4) (e), และ Zn complex (5) (f)



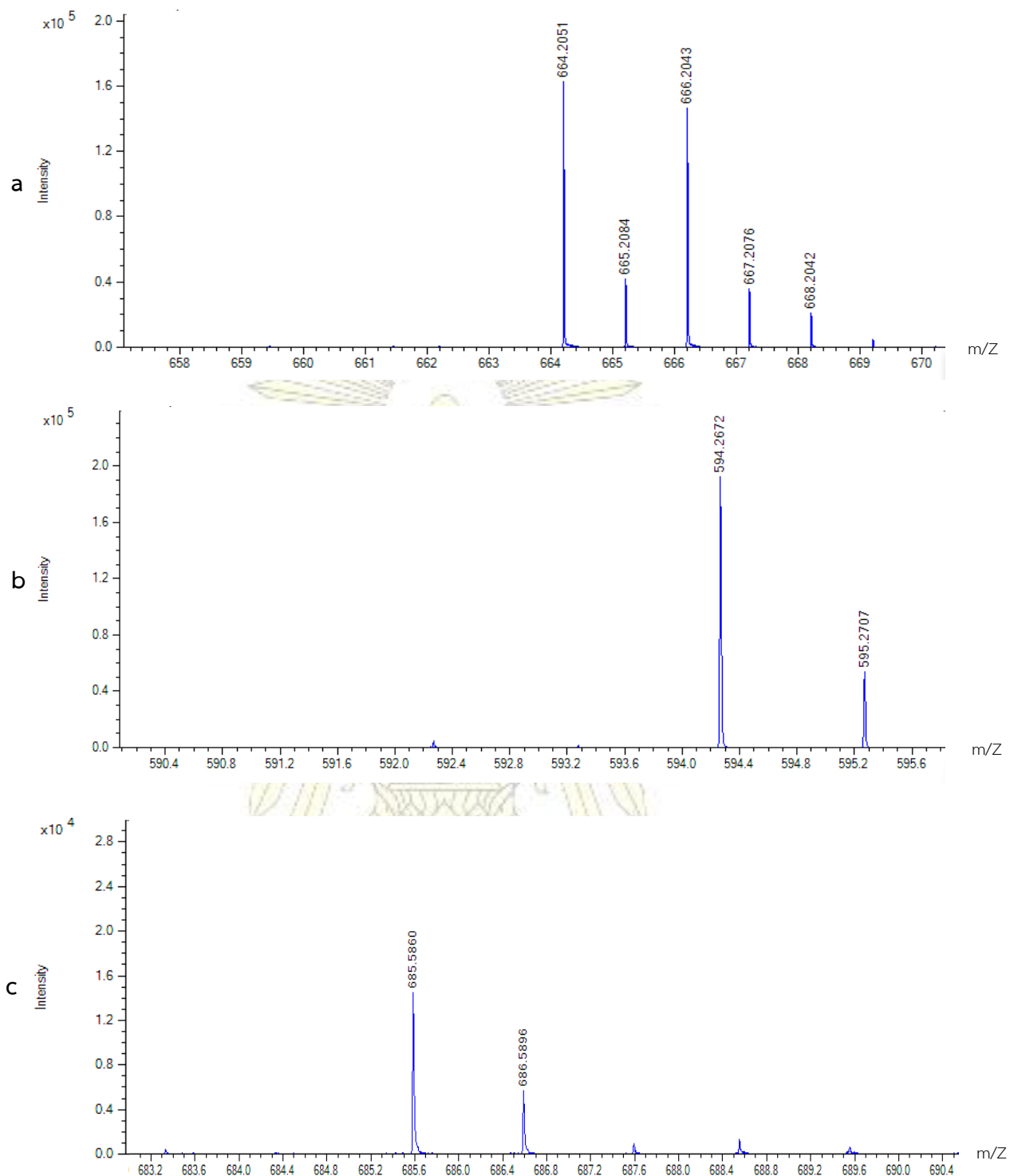
รูปที่ 3.3 (ต่อ) สเปกตรัม ^1H NMR ของ pinostrobin (L) (a), Cu complex (1) (b), Fe complex (2) (c), Co complex (3) (d), Ni complex (4) (e), และ Zn complex (5) (f)

ตารางที่ 3.3 แสดงความถี่ในการสั่นของ pinostrobin และสารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชัน-pinostrobin

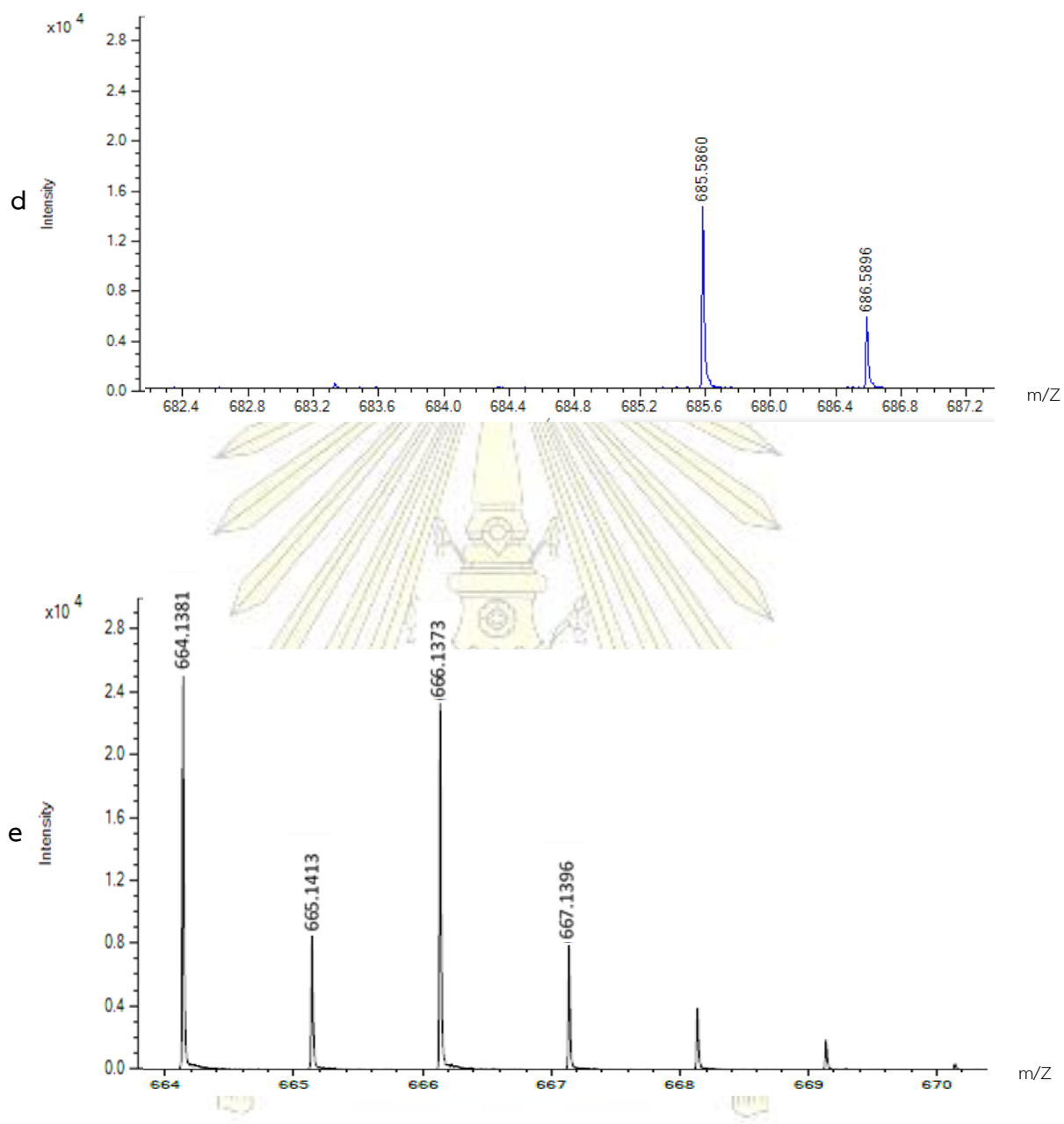
Complexes	ν_{OH}	$\nu_{C=O}$	ν_{C-C}	ν_{C-O-C}
Pinostrobin(L)	3436	1645	1444	1210
Cu(II) cpx (1)	-	1613	1438	1160
Fe(III) cpx (2)	-	1614	1435	1196
Co(II) cpx (3)	-	1608	1430	1189
Ni(II) cpx (4)	3357	1584	1435	1156
Zn(II) cpx (5)	-	1618	1435	1210



รูปที่ 3.4 อินฟราเรดสเปกตรัม pinostrobin (L) (a), Cu complex (1) (b), Fe complex (2) (c), Co complex (3) (d), Ni complex (4) (e), และ Zn complex (5) (f)



รูปที่ 3.5 แมสสเปกตรัม(MALDI-TOF) เมทริกซ์DCTB (trans-2-[3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile) Cu complex (1) (a), Fe complex (2) (b), Co complex (3) (c) , Ni complex (4) (d), และ Zn complex (5) (e)



รูปที่ 3.5 (ต่อ) แมสสเปกตรัม(MALDI-TOF) เมทริกซ์DCTB (trans-2-[3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile) Cu complex (1) (a), Fe complex (2) (b), Co complex (3) (c) , Ni complex (4) (d), และ Zn complex (5) (e)

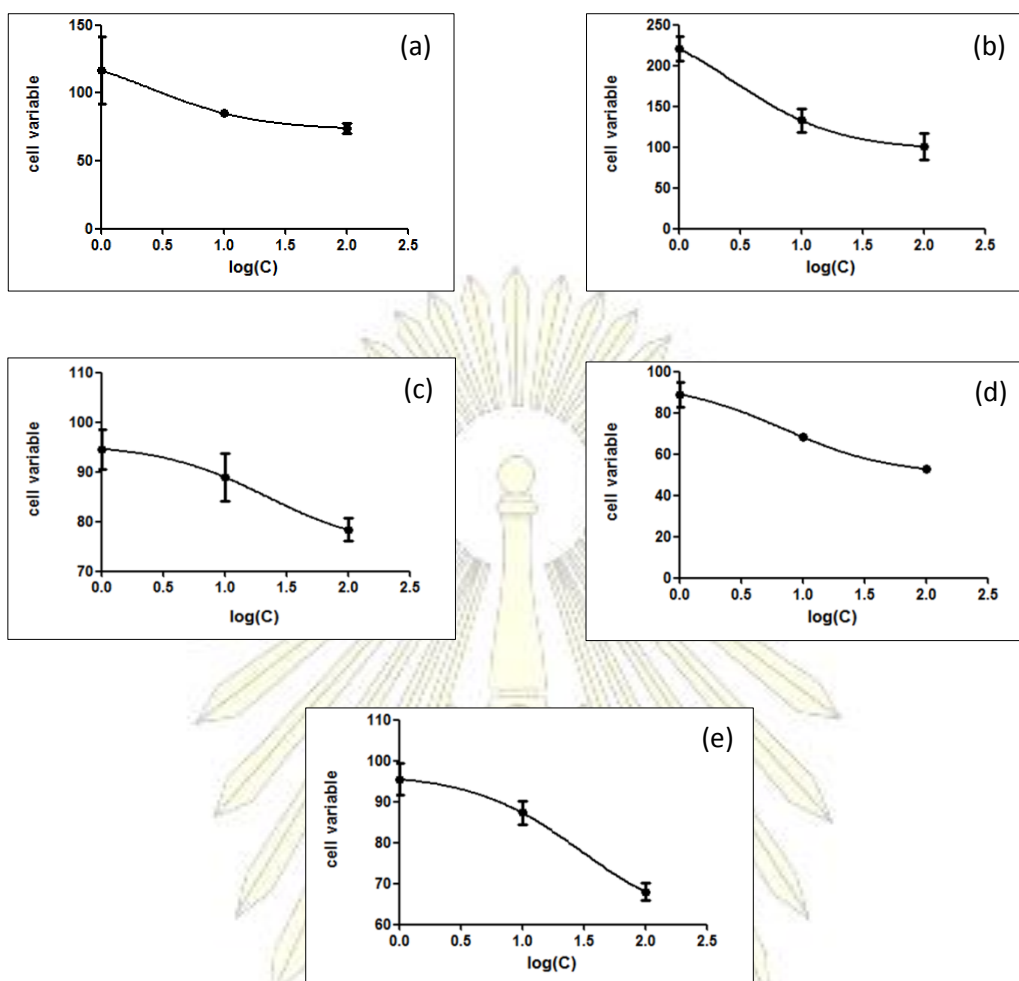
ตารางที่ 3.4 สมบัติทางกายภาพของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชัน-pinostrobin

สารประกอบ	สี	น้ำหนักโมเลกุล (g/mol)	น้ำหนักโมเลกุล คำนวณ (g/mol)	สูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้
Cu(II) cpx (1)	เขียวเข้ม	666.1526	666.1521	$\text{Cu}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$
Fe(III) cpx (2)	น้ำตาลแดง	596.1134	595.1253	$\text{Fe}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)_2$
Co(II) cpx (3)	เขียวอ่อน	685.580	685.1454	$\text{Co}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$
Ni(II) cpx (4)	เหลืองอมเขียว	923.318	462.0141*	$\text{Ni}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)\text{Cl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
Zn(II) cpx (5)	เหลืองอ่อน	664.138	668.1595	$\text{Zn}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4)_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$

* เกิดประจุในการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโตรม (MALDI-TOF) เป็น +2

3.10 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม 2 ชนิดคือเซลล์ MCF-7 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ขึ้นกับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเอสโตรเจน และ MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิดก้าวร้าวและ metastasis โดยได้ทำการทดสอบเบื้องต้นที่ 100 μM และสำหรับสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นนี้ จะถูกนำมาทดลองซ้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า IC_{50} จากผลการทดลอง พบว่าสารประกอบเชิงซ้อน (1) และ (2) มีความเป็นพิษอย่างจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ในระดับดีด้วยค่า IC_{50} ที่ 2.75 และ 2.54 μM ตามลำดับ นอกจากนี้ยังเห็นได้สารประกอบเชิงซ้อน (1), (3) และ (4) มีความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 อย่างไรก็ตาม พบว่าสารพลาไวโนอยด์ pinostrobin หรือลิแกนด์เพียงอย่างเดียวไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดแม้ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ 100 μM ดังแสดงในตารางที่ 4.3



รูปที่ 3.6 กราฟการหาค่า IC_{50} ของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชัน-pinostrobin ในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7; Cu complex (1) (a), Fe complex (2) (b) และในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231; Fe complex (2) (c) , Ni complex (4) (d), และ Zn complex (5) (e)

ตารางที่ 3.5 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชัน-pinostrobin และ ลิแกนด์

สารประกอบ	IC ₅₀ (μM)	
	MCF-7	MDA-MB-231
pinostrobin (L)	>100	>100
Cu(II) complex (1)	2.75	>100
Fe(III) complex (2)	2.54	22.00
Co(II) complex (3)	>100	>100
Ni(II) complex (4)	>100	7.13
Zn(II) complex (5)	>100	29.61

จากผลความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด พบว่าไอออนโลหะเมื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสามารถเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับความเป็นพิษต่อเซลล์ของลิแกนด์ โดยเป็นผลจากองค์ประกอบที่สำคัญของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะแทรนซิชัน-pinostrobin ดังนี้ 1. มีตำแหน่งที่เป็นระนาบ (planar) ในการเข้าแทรก (intercalating) ระหว่างคู่สาย DNA 2. มีหมู่คาร์บอนิลที่สามารถเกิดโคออร์ดิเนชันกับโลหะไอออนและการเกิด intermolecular interaction กับคู่สาย DNA นอกจากนี้ไอออนโลหะแทรนซิชัน (first row transition) ที่มี positive charge ในโมเลกุลสารประกอบเชิงซ้อน จึงช่วยในการเข้าจับกับคู่สาย DNA และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

สารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชัน Cu(II), Fe(III), Co(II), Ni(II) และ Zn(II) กับ pinostrobin ที่สังเคราะห์ขึ้นมีโครงสร้างโมเลกุลเป็น $\text{CuL}_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1), FeL_2 (2), $\text{CoL}_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3), $\text{NiL}_2\text{Cl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (4) และ $\text{ZnL}_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (5) เมื่อนำสารเชิงซ้อนและ pinostrobin มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม 2 ชนิด คือ MCF-7 และ MDA-MB-231 ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารเชิงซ้อน 1 และ 2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} 2.75 และ 2.54 μM ตามลำดับ นอกจากนั้นสารเชิงซ้อน 2, 4 และ 5 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} 22.00, 7.13 และ 29.61 μM ตามลำดับ ในขณะที่ pinostrobin (L) ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 2 ชนิด ($\text{IC}_{50}>100 \mu\text{M}$)



บรรณานุกรม

- [1] Krosggaard-Larsen, P.; Liljefors, T.; Madsen, U. Textbook of drug design and discovery. *Taylor&Francis Inc, New York*. **2002**, 3, 51-58
- [2] Dasari, S.; Paul Tchounwou, B. Cisplatin in cancer therapy ; molecular mechanisms of action. *Eur J Phamacol*. **2014**, 364 – 378.
- [3] Selvaganapathy, M.; Raman, N. Pharmacological Activity of a Few Transition Metal Complexes: A Short Review. *J Chem Biol Ther*. **2016**, 1, 1-17.
- [4] Maria, M. Kasprzak; Andrea Erxleben; Justyn Ochocka. Properties and applications of flavonoid metal Complexes. *RCS. Adv*. **2015**, 5, 45853-45877
- [5] Bergeret, A.; Gadelle, D.; Forterre, P. Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus Shibatae*. Athermostable enzyme with both bacterial and eucaryaal features. *J.Biol. Chem*. **1994**, 269, 27663-27666
- [6] Walter A. Roman Junior; Denise B. Gomes; Barbara Zanchet; Amanda P.Schönell; Kriptsan A.P. Diel;Thais P. Banzatoc; Ana L.T.G. Ruizc; João E. Carvalhoc; Angelita Neppel; Andersson Barisone; Cid Aimbiré M. Santos.

Antiproliferative effects of pinostrobin and 5,6-dehydrokavain isolated from leaves of *Alpinia zerumbet*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2017**, 27, 592 – 598

- [7] Norma Estefania Andrades Ikeda; Estela Maria Novak; Durvanei Augusto Maria; Adélia Segin Velosa; Regina Mara Silva Pereira. Synthesis, characterization and biological evaluation of Rutin– zinc(II) flavonoid - metal complex. *Chemico-Biological Interactions*. **2015**, 239, 184–191
- [8] Cancer statistics WHO. [http:// www.who.int/ cancer/ en/](http://www.who.int/cancer/en/) (accessed April 23, 2018)
- [9] อุบัติการณ์โรคมะเร็งในประเทศไทย. [http://www.nci.go.th/th/file_ download/d_index/nccp_2556-2560.pdf](http://www.nci.go.th/th/file_download/d_index/nccp_2556-2560.pdf) (accessed April 23, 2018)
- [10] Cancer cell division. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-division-and-cancer-14046590> (accessed April 23, 2018)
- [11] Cell cycle. <https://genius.com/Biology-genius-cell-cycle-annotated> (accessed April 23, 2018)
- [12] Krogsgaard-Larsen, P.; Liljefors, T.; Madsen, U. Textbook of drug design and discovery, *Taylor & Francis Inc, New York*. **2002**, 51-58.

- [13] Goodwin, K.D.; Lewis, M.A.; Long, E.C.; Georgiadis, M.M. Crystal structure of DNA-bound Co(III)-bleomycin B2: insights on intercalation and minor groove binding. *P. Natl. Acad. Sci., USA*. **2008**, 105, 5052-5056.
- [14] Close, P.; D'Angio G. J.; Sinniah, D.; Meadows, A.T. Basic principles of chemotherapy. *Practical pediatric oncology*. New York: Wiley-Liss. **1992**, 155-63.
- [15] Wang, A. Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.20 resolution. *Biochemistry*. **1987**, 26, 1152-1163.
- [16] Karaliota, A.; Kretsi, O.; Tzougraki, C., Synthesis and characterization of a binuclear coumarin-3-carboxylate copper(II) complex *J. Inorg. Biochem.* **2001**, 84 (1-2), 33-37.
- [17] Budzisz, E.; Keppler, B.K.; Giester, G.; Wozniczka, M.; Kufelnicki, A.; Nawrot, B. Synthesis, crystal structure and biological characterization of a novel palladium(II) complex with a coumarin-derived ligand. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 4412-4419.

- [18] Kostova, I.; Manolov, I.; Karaivanova, M. Synthesis, physicochemical characterization and cytotoxic screening of new zirconium complexes with coumarin derivatives. *Arch. Pharm., Pharm. Chem.* **2001**, 334, 157-162
- [19] Bergeret, A.; Gadelle, D.; Forterre, P. Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*. a thermostable enzyme with both bacterial and eucaryal features. *J.Biol.Chem.* **1994**, 269, 7663-27669.
- [20] Kosmider, B.; Zawlik, I.; Liberski, P. P.; Osiecka, R.; Zyner, E.; Ochocki, J.; Bartkowiak, J. Evaluation of *P53* and *BAX* gene expression and induction of apoptosis and necrosis by the *cis*-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (*cis*-DDP) in human lymphocytes. *Mutat. Res.* **2006**, 604, 28–35.
- [21] Zurowska, B.; Erxleben, A.; Glinka, L.; Łeczycka, M.; Zyner, B. E.; Ochocki, J. Synthesis, spectroscopy and magnetism of novel metal complexes of 3-aminoflavone (3-af). X-ray crystal structure of 3-af and $[\text{Cu}(\text{3-af})_2(\text{NO}_3)_2]$. *Inorg. Chim. Acta*, **2009**, 362, 739–744.

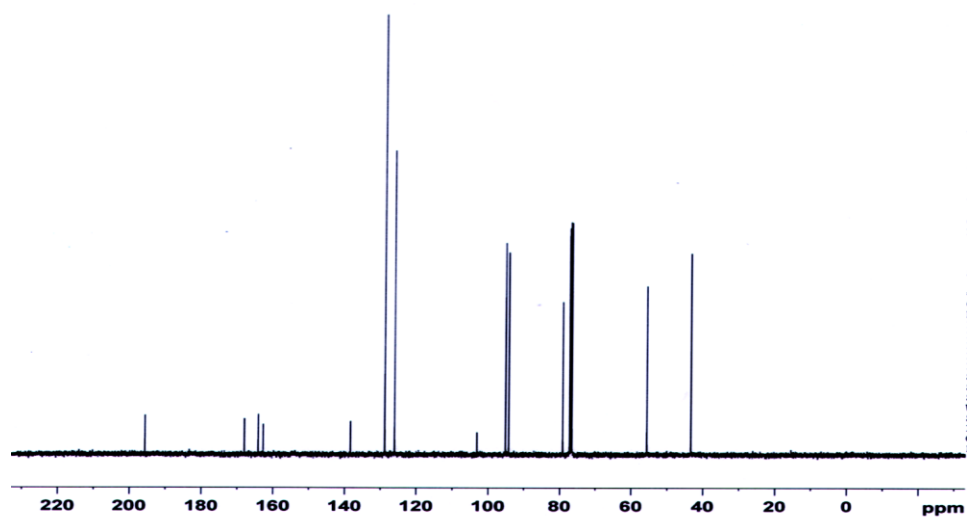
- [22] Wang, D. B.; Yang, Y. Z.; L, H. M.; Hai, J.; Wang, Q.; Chen, N. Z. Synthesis, characterization, cytotoxic activity and DNA binding Ni(II) complex with the 6-hydroxy chromone-3-carbaldehyde thiosemicarbazone. *J. Organomet. Chem.* **2009**, 4069-4075.
- [23] Abdelwahab, S.; Mohan, S.; Abdulla, M.A.; Sukari, M.A.; Abdul A.B.; Taha M.M.; Syam, S.; Ahmad, S.; Lee, KH. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: possible involvement of indirect antioxidant action. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, 137(2), 963-970.
- [24] Mashentseva, A.A.; Seytembetova, T.S.; Adekenovb, S.M.; Tuleuovb B.I.; Loikoc, O.P.; Khalitova, A.I. Synthesis and Biological Activity of the Pinostrobin Oxime Complex Compounds with Some d-Metals. *R. J. of General Chemistry.* **2011**, 81(1), 96-101.
- [25] Yoshioka, H.; Renold, W.; Fischer, N.; Higo, A.; Mabry, T. Sesquiterpene lactones from *Ambrosia confertiflora* (Compositae). *Phytochemistry.* **1970**, 9, 823-832.

- [26] Christian, J.; Paul, O.; Dirk van den, B.; MALDI-TOF Mass Spectrometry
A Versatile Tool for High-Performance DNA Analysis. *Molecular
Biotechnology*. 2004, 26, 1073–6085.

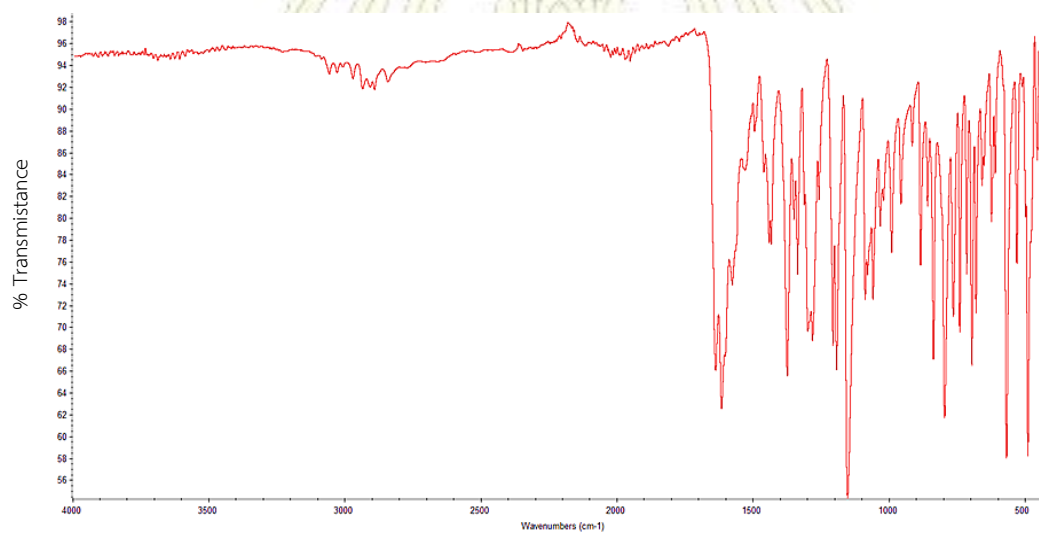




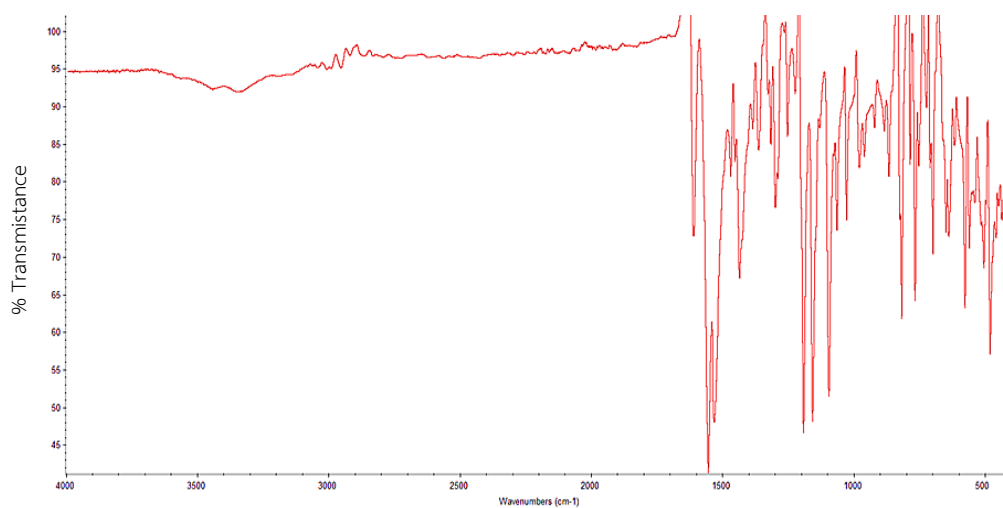
ภาคผนวก



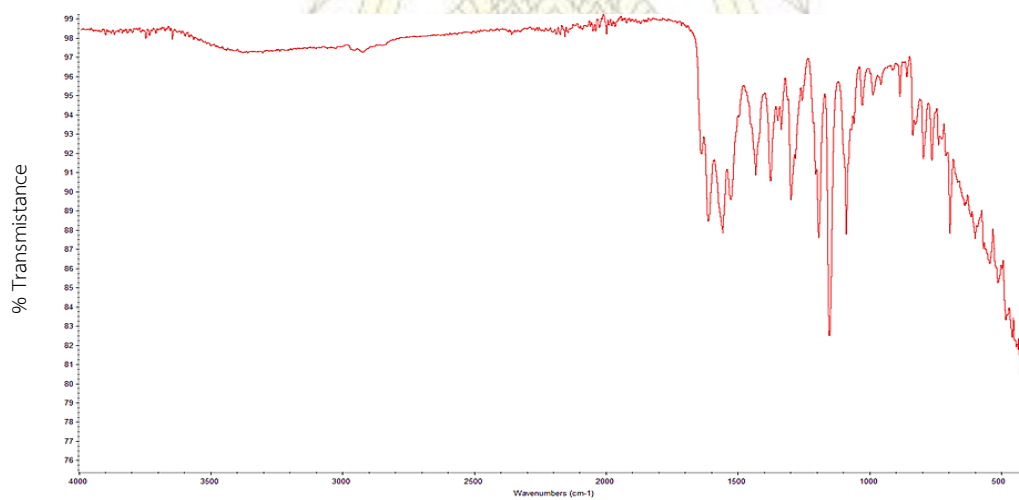
รูปที่ A.1 สเปกตรัม ^{13}C -NMR ของ pinostrobin (L) ใน DMSO



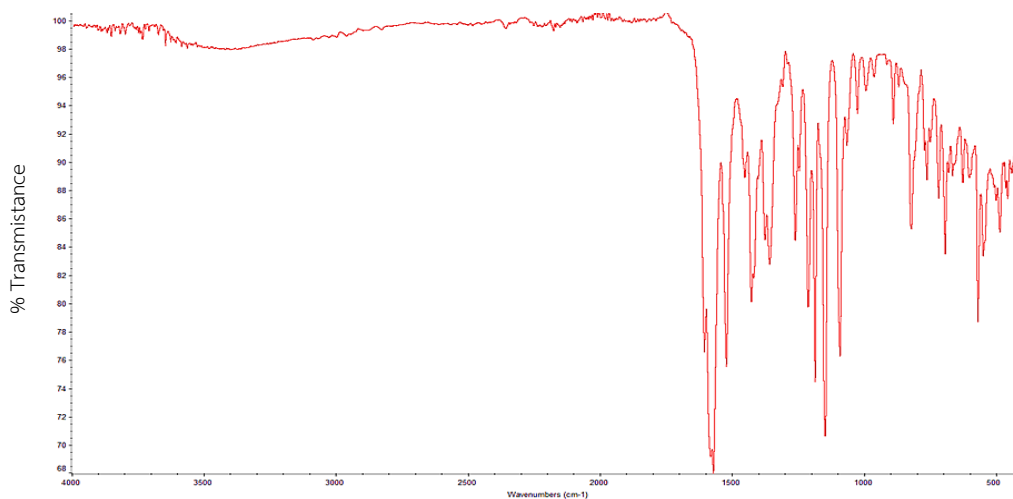
รูปที่ A.2 อินฟราเรดสเปกตรัมของ pinostrobin (L)



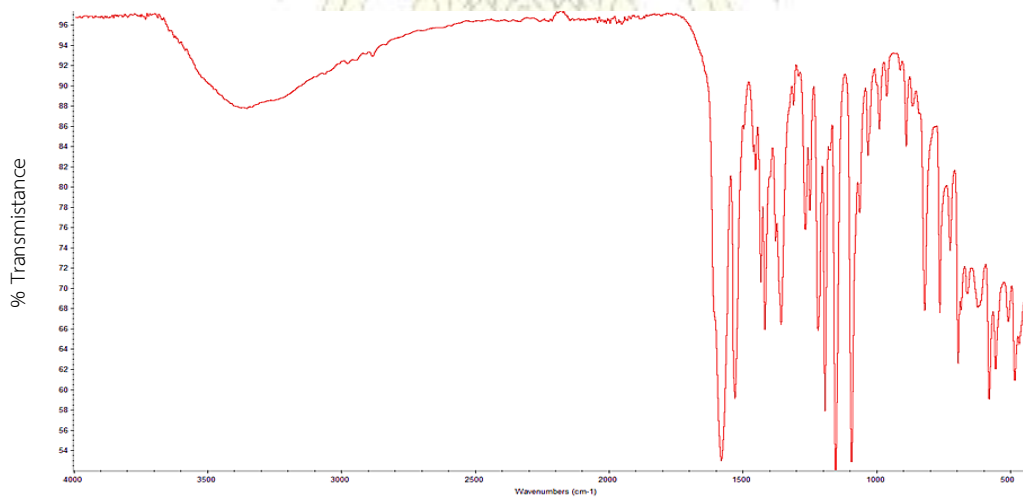
รูปที่ A.3 อินฟราเรดสเปกตรัมของ Cu(II)-pinostrobin complex (1)



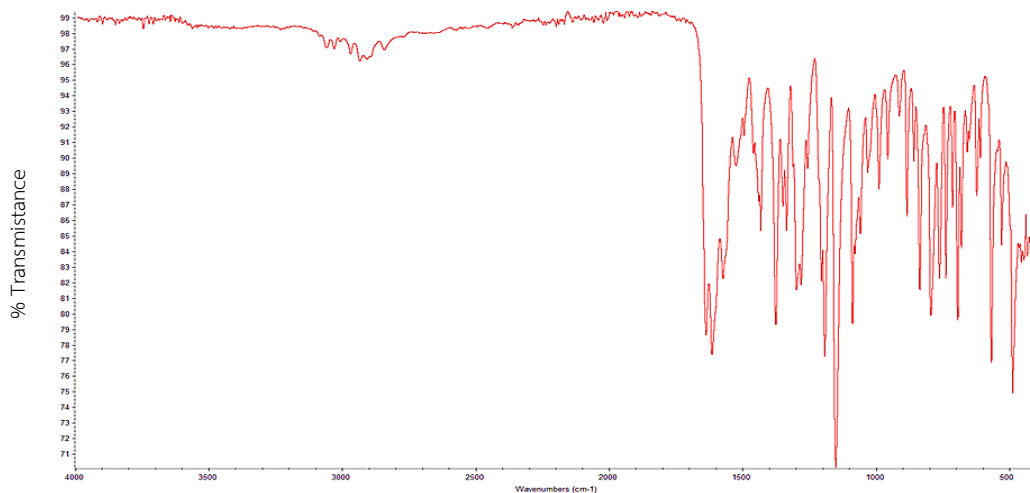
รูปที่ A.4 อินฟราเรดสเปกตรัมของ Fe(III)-pinostrobin complex (2)



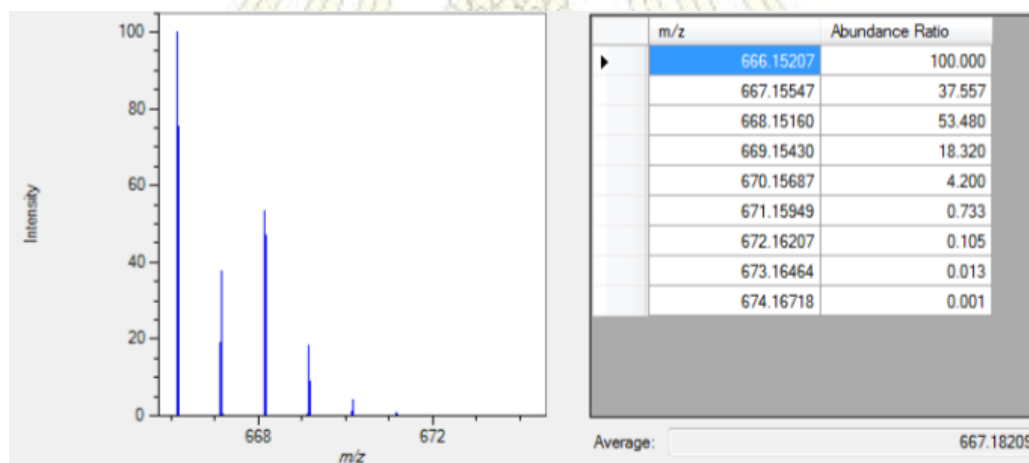
รูปที่ A.5 อินฟราเรดสเปกตรัมของ Co(II)-pinostrobin complex (3)



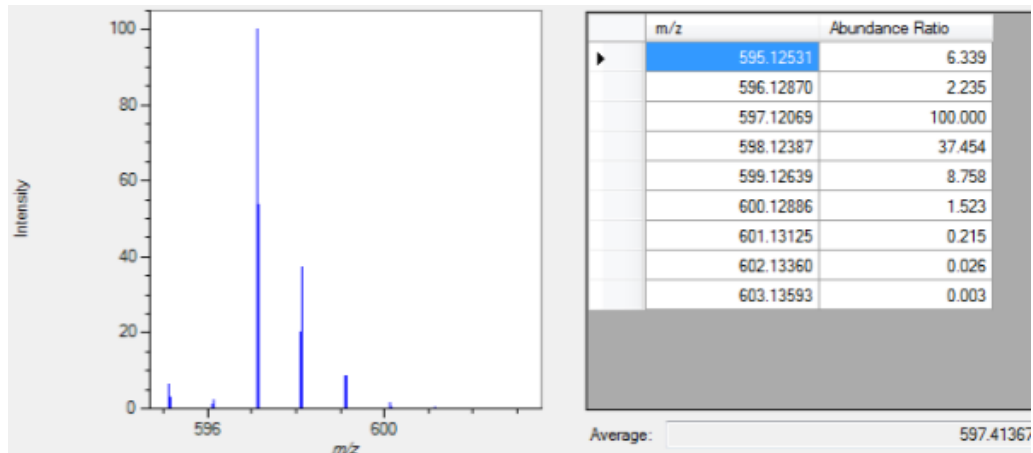
รูปที่ A.6 อินฟราเรดสเปกตรัมของ Ni(II)-pinostrobin complex (4)



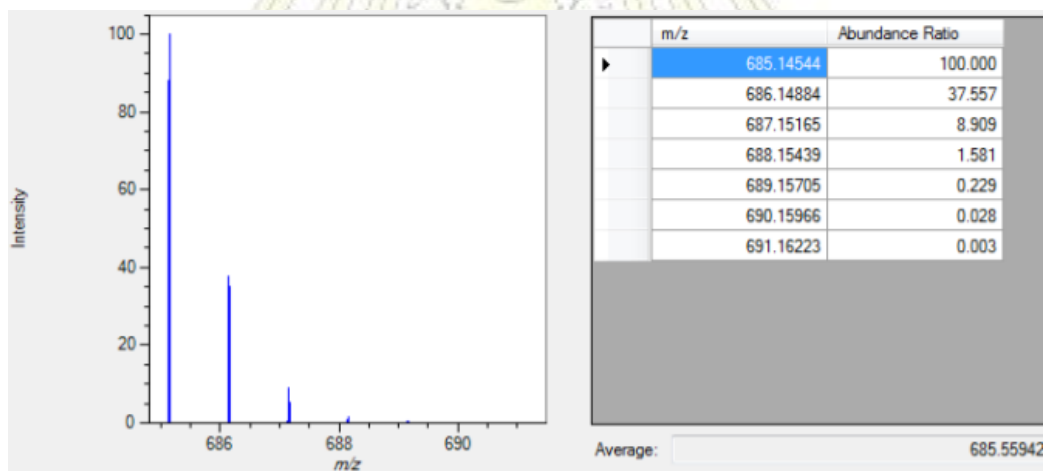
รูปที่ A.7 อินฟราเรดสเปกตรัมของ Zn(II)-pinostrobin complex (5)



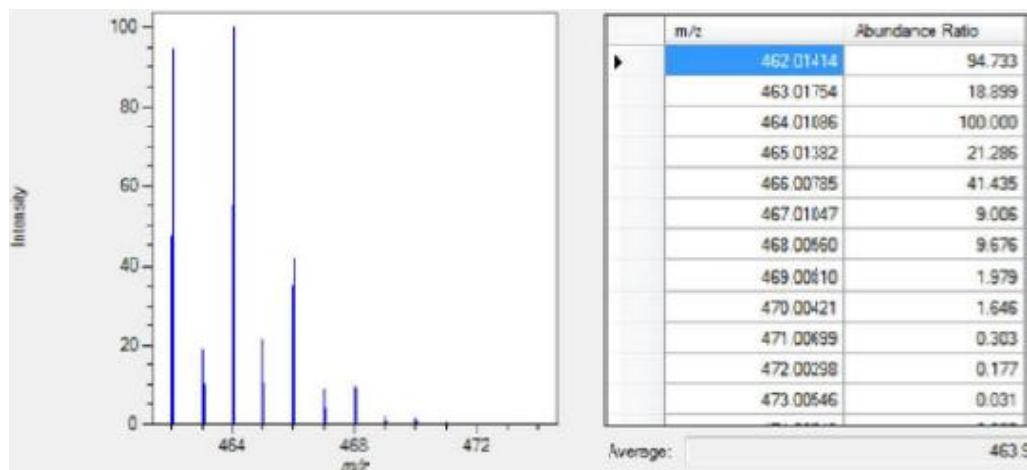
รูปที่ A.8 แมสสเปกตรัม Cu(II)-pinostrobin complex (1) จากการคำนวณด้วยโปรแกรม Isotope Pattern Simulator



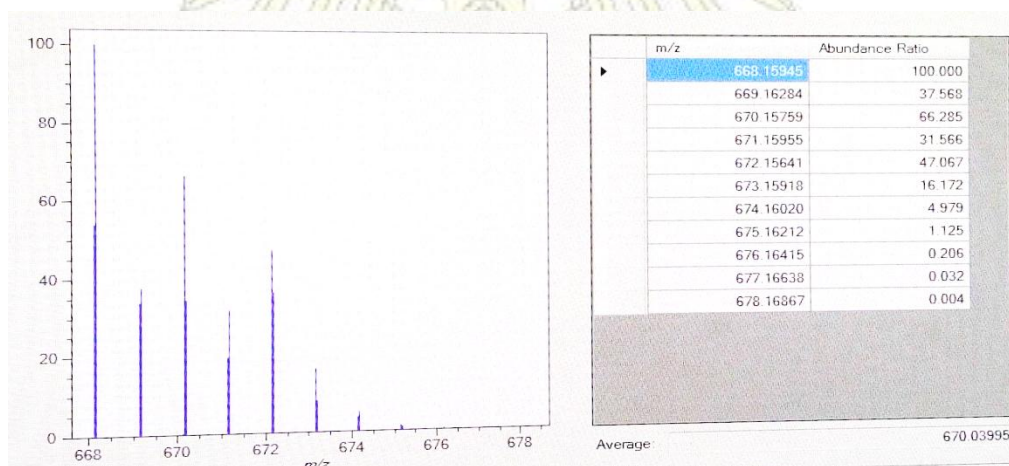
รูปที่ A.9 แมสสเปกตรัม Fe(III)-pinostrobin complex (2) จากการคำนวณด้วยโปรแกรม Isotope Pattern Simulator



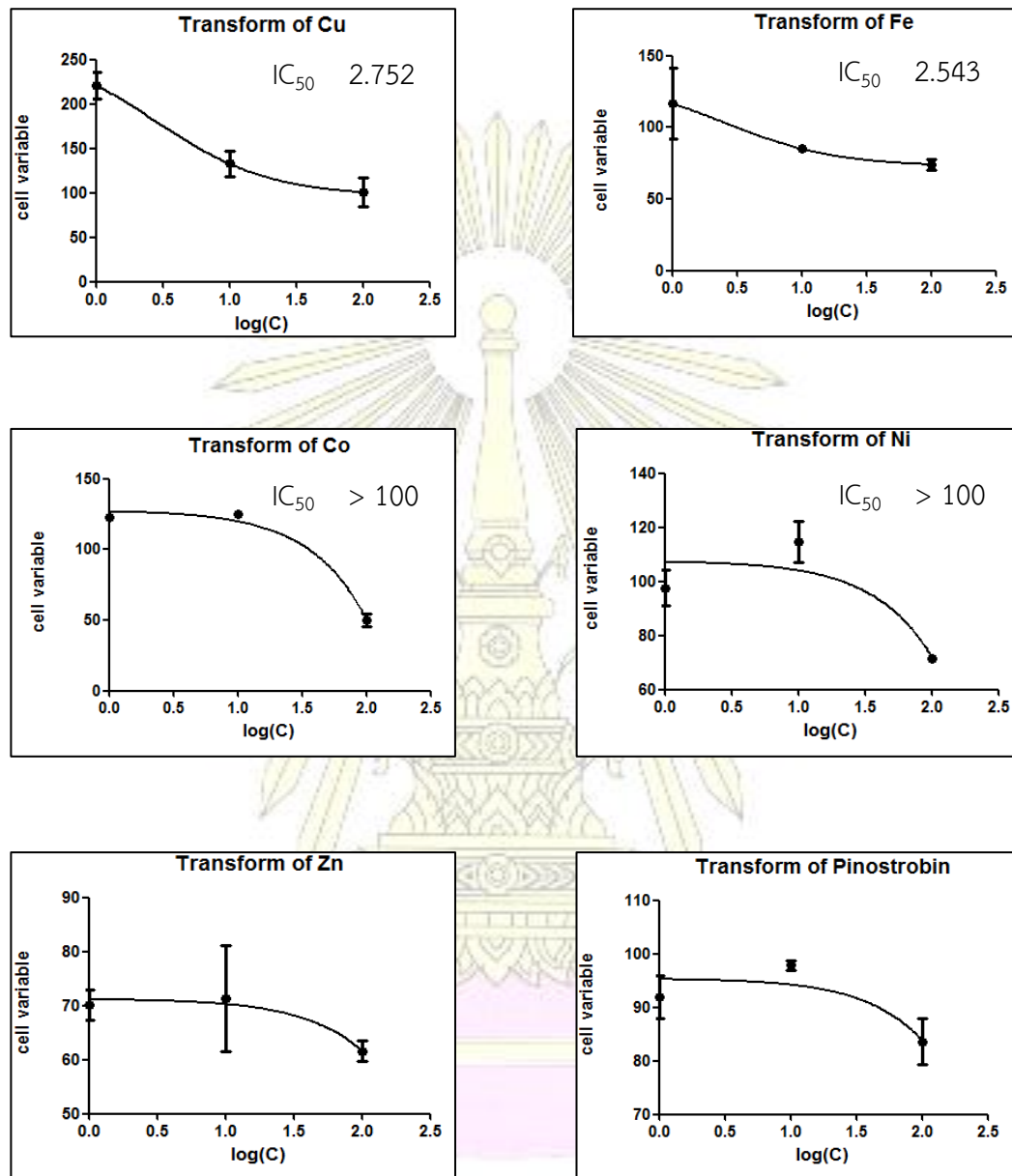
รูปที่ A.10 แมสสเปกตรัม Co(III)-pinostrobin complex (4) จากการคำนวณด้วยโปรแกรม Isotope Pattern Simulator



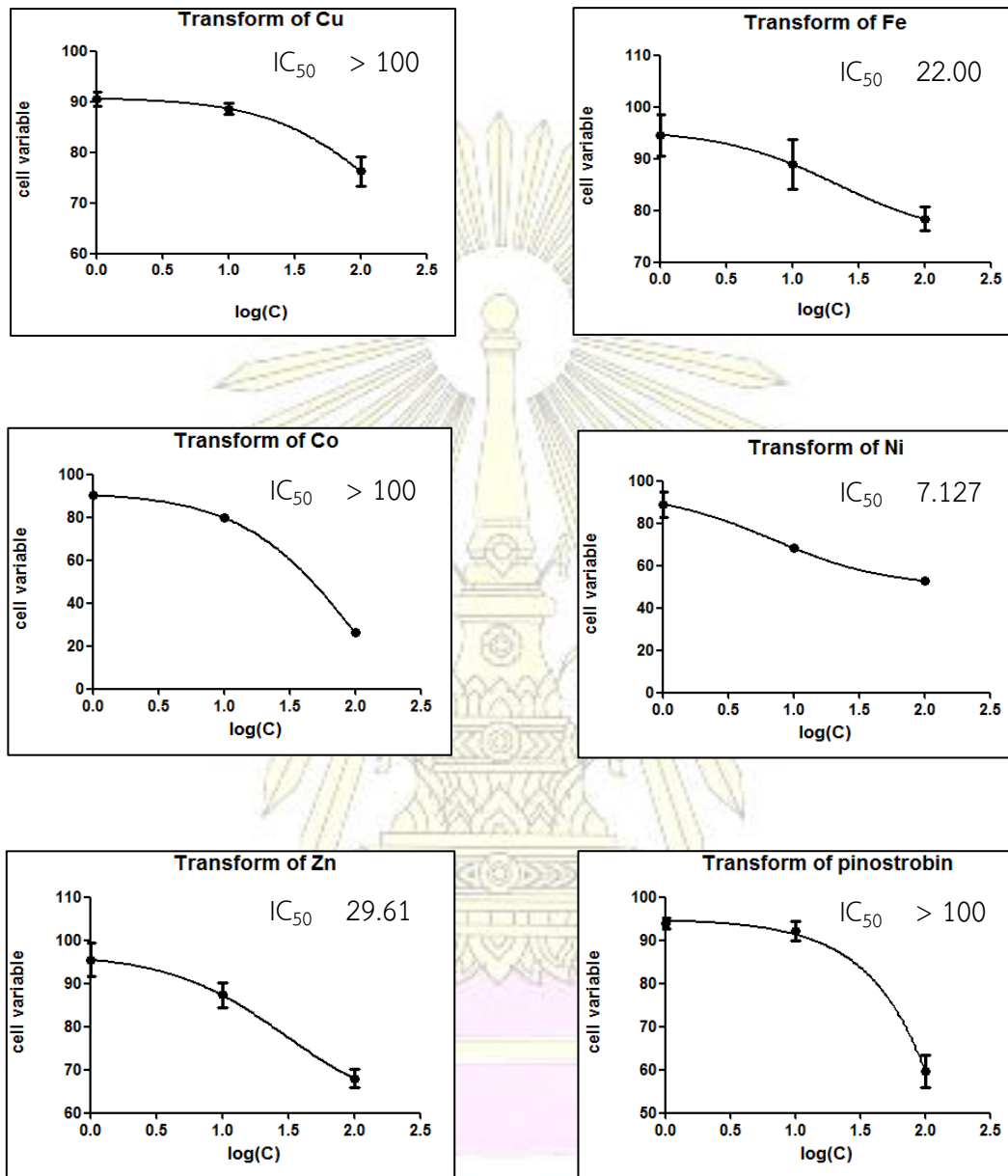
รูปที่ A.11 แมสสเปกตรัม Ni(II)-pinostrobin complex (4) จากการคำนวณด้วยโปรแกรม Isotope Pattern



รูปที่ A.12 แมสสเปกตรัม Zn(II)-pinostrobin complex (5) จากการคำนวณด้วยโปรแกรม Isotope Pattern



รูปที่ A.13 กราฟการหาค่า IC₅₀ ในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชัน-
pinostrobin และ pinostrobin



รูปที่ A.14 กราฟการหาค่า IC₅₀ ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ของสารประกอบเชิงซ้อนโลหะทรานซิชัน-
pinostrobin และ pinostrobin

ประวัติผู้วิจัย

นายประจักษ์ ขุมพลอย เกิดเมื่อวันที่ 15 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2538 ที่จังหวัดอ่างทอง สำเร็จการศึกษา
ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทย์-คณิต จากโรงเรียนสตรีอ่างทอง จังหวัดอ่างทอง เมื่อปีการศึกษา
2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ
ปีการศึกษา 2557 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 82/2 ตำบลบางจัก อำเภอวิเศษชัยชาญ จังหวัด อ่างทอง
รหัสไปรษณีย์ 14110 อีเมล khoomploy.pk@gmail.com

