



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง “การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารกลุ่ม

3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole”

Synthesis and anti-bacterial activity of 3-substituted

indole และ 2-substituted pyrrole derivatives

โดย

ผศ.ดร. จเร จรัสจรรณพงศ์

และ

ผศ.ดร. อุมภาพร ทาไธสง

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง “การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารกลุ่ม

3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole”

Synthesis and anti-bacterial activity of 3-substituted

indole และ 2-substituted pyrrole derivatives

โดย

ผศ.ดร. จเร จรัสจรรยาพงศ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ.ดร. อุมพร ทาไธสง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้า ผศ.ดร. จเร จรัสจรรณพงศ์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารกลุ่ม 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole (ภาษาอังกฤษ) Synthesis and anti-bacterial activity of 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole derivatives รหัสโครงการ 2559A10802053/สัญญาเลขที่ 99/2559 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 880,000 บาท (แปดแสนแปดหมื่นบาทถ้วน) ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2559)

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการสังเคราะห์สารประกอบ 3,3'-bis(indoyl)arylmethanes ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ 3-substituted indoles จากปฏิกิริยาฟรีเดิลคราฟท์ ของอนุพันธ์อินโดลกับแอลดีไฮด์ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่มี $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 15 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิห้อง ในตัวทำละลายเมทานอล อะซีโทไนไตรล์ หรือไนโตรมีเทน โดยได้สารผลิตภัณฑ์ 3,3'-bis(indoyl)arylmethanes 25 ชนิด จากนั้นนำสารสังเคราะห์ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียเบื้องต้นและจากผลการทดสอบได้เลือกสารสังเคราะห์จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ สาร 4-(di(1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3f**) 3,3'-((4-methoxyphenyl)-methylene)bis(1H-indole) (**3g**) 4-(di(1H-indol-3-yl)methyl)benzene-1,2-diol (**3h**) 3,3'-(2-methylpropane-1,1-diyl)bis(1H-indole) (**3j**) 4-(bis(5-methoxy-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3n**) 4-(bis(5-chloro-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3q**) 3,3'-(phenyl-methylene)bis(6-fluoro-1H-indole) (**3t**) 4-(bis(6-fluoro-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3u**) และ 5-(bis(6-fluoro-1H-indol-3-yl)methyl)-2-nitrophenol (**3w**) ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคผ่านทางอาหารและทำให้อาหารเน่าเสียบางชนิด จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสังเคราะห์ทั้ง 9 ชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยมีขนาดของ inhibition zone อยู่ในช่วง 7.00 ± 0.00 - 16.33 ± 0.58 มิลลิเมตร โดยสาร **3u** มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูง

ที่สุดเมื่อพิจารณาค่า MIC และค่า MBC ของสารทดสอบต่อ *B. cereus*, *B. subtilis* และ *S. aureus* พบว่ามีค่าต่างกันเกิน 4 เท่า แสดงว่าสารต้านจุลินทรีย์มีฤทธิ์แบบยับยั้ง อย่างไรก็ตามพบว่าสารสังเคราะห์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 4 ชนิด

คำสำคัญ : 3-substituted indole, 3,3'-bis(indolyl)arylmethanes, Friedel-Crafts, ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Output / Outcome)

1. Onnicha Khaikate, Chayamon Chantana, Umaporn Thathaisong and Jaray Jaratjaroonphong. Green synthesis and anti-bacterial activity of some novel 3,3'-bis(indolyl)arylmethanes. (Manuscript in preparation).
2. Nuttiya Jintana, Chayamon Chantana, Umaporn Thathaisong and Jaray Jaratjaroonphong. FeCl₃·6H₂O catalyzed-triple arylation of alkyl orthoformate: the facile synthesis and anti-bacterial activity of some novel symmetrical tris(aryl)- and tris(heteroaryl)methanes. (Manuscript in preparation).
3. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ ระดับปริญญาโท 2 คน สาขาเคมี คือ นางสาวสุรีย์พร เรืองแสงทองกุล และนางสาวชญามน จันทนา และระดับปริญญาตรี สาขาเคมี จำนวน 7 คน คือ นางสาวนัตติยา จินตนา นางสาวประภาพร บุญเพ็ง นางสาวอรณิชา ไช้เกษ นางสาวชุตินา บัณชิต นางสาวพรพรรณ แยมทรัพย์นางสาวณัชวลัญช์ สวัสดิ์อักษรชื่น และนางสาวนิศาชล จันทร์ครุฑ

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยที่เสร็จล่าช้ากว่ากำหนดเวลามีปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ 1 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้มีค่าค่าเข้าในการจัดส่ง ประการที่ 2 คือ เครื่องมือ Nuclear Magnetic Spectrometry (NMR) ที่ใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาและหาโครงสร้างสารของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มีช่วงเวลาที่ใช้งานไม่ได้และต้องปิดซ่อมแซมหรือเติมแก๊สไนโตรเจนหรือฮีเลียมเป็นบางครั้ง

ในการทำวิจัยในปีที่ 1 (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558) สามารถสังเคราะห์สาร 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ชนิดต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ภายใต้สภาวะการทดลองที่ไม่รุนแรงและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และเมื่อนำสารสังเคราะห์ไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคผ่านทางอาหารและทำให้อาหารเน่าเสียบางชนิด จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ด้วยวิธี disc

diffusion พบว่าสารสังเคราะห์กลุ่ม 3-substituted indole สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีกว่า สารสังเคราะห์กลุ่ม 2-substituted pyrrole โดยสาร Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**) มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุดโดยมีขนาดของ inhibition zone อยู่ประมาณ 11.16 ± 0.4 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตาม ในปีที่ 2 (จึงบประมาณ พ.ศ. 2559) ได้ดำเนินการปรับปรุงโครงสร้างสารโดยสังเคราะห์สารกลุ่ม 3,3'-bis(indolyl)methanes จำนวน 25 ชนิด โดยประกอบด้วยวงฟีนอลในโครงสร้าง เนื่องจากการศึกษาในปีที่ 1 พบว่า สารกลุ่ม 1,1-di(3-indolyl)arylmethanes ที่มีวงฟีนอลจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี พบว่า สารสังเคราะห์ทั้ง 25 ชนิดมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยสาร 4-(bis(6-fluoro-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3u**) มีประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียแกรมบวกสูงที่สุด ซึ่งมีค่า MIC ต่อ *S.aureus*, *B. subtilis* และ *B. cereus* เท่ากับ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือสาร 3,3'-(2-methylpropane-1,1-diy)bis(1H-indole) (**3j**) มีค่า MIC อยู่ในช่วง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อพิจารณาค่า MIC และค่า MBC ของสารทดสอบต่อ *B. cereus*, *B. subtilis* และ *S. aureus* พบว่ามีค่าต่างกันเกิน 4 เท่า แสดงว่าสารต้านจุลินทรีย์มีฤทธิ์แบบยับยั้ง (bacteriostatic) (Pankey & Sabath, 2004) ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าสารสังเคราะห์ที่ต่อสารทดสอบมากที่สุด ข้อมูลจากงานวิจัยนี้มีประโยชน์เพื่อปรับปรุงพัฒนาหาสารสังเคราะห์ที่สามารถมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้สูงขึ้น และเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำสารเคมีดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร และทางด้านการแพทย์ต่อไปในอนาคตได้

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการสังเคราะห์สารประกอบ 3,3'-bis(indoyl)arylmethanes ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ 3-substituted indoles จากปฏิกิริยาฟรีเดิลคราฟท์ ของอนุพันธ์อินโดลกับแอลดีไฮด์ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่มี $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 15 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิห้อง ในตัวทำละลายเมทานอล อะซีโทไนโตรล หรือไนโตรมีเทน โดยได้สารผลิตภัณฑ์ 3,3'-bis(indoyl)arylmethanes 25 ชนิด จากนั้นนำสารสังเคราะห์ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียเบื้องต้นและจากผลการทดสอบได้เลือกสารสังเคราะห์จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ สาร 4-(di(1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3f**) 3,3'-((4-methoxyphenyl)methylene)bis(1H-indole) (**3g**) 4-(di(1H-indol-3-yl)methyl)benzene-1,2-diol (**3h**) 3,3'-(2-methylpropane-1,1-diy)bis(1H-indole) (**3j**) 4-(bis(5-methoxy-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3n**) 4-(bis(5-chloro-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3q**) 3,3'-(phenylmethylene)bis(6-fluoro-1H-indole) (**3t**) 4-(bis(6-fluoro-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3u**) และ 5-(bis(6-fluoro-1H-indol-3-yl)methyl)-2-nitrophenol (**3w**) ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคผ่านทางอาหารและทำให้อาหารเน่าเสียบางชนิด จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสังเคราะห์ทั้ง 9 ชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยมีขนาดของ inhibition zone อยู่ในช่วง 7.00 ± 0.00 - 16.33 ± 0.58 มิลลิเมตร โดยสาร **3u** มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุดเมื่อพิจารณาค่า MIC และค่า MBC ของสารทดสอบต่อ *B. cereus*, *B. subtilis* และ *S. aureus* พบว่ามีค่าต่างกันเกิน 4 เท่า แสดงว่าสารต้านจุลินทรีย์มีฤทธิ์แบบยับยั้ง อย่างไรก็ตามพบว่าสารสังเคราะห์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 4 ชนิด

คำสำคัญ : 3-substituted indole, 3,3'-bis(indoyl)arylmethanes, Friedel-Crafts, ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ABSTRACT

The aim of this research is the synthesis of 3,3'-bis(indoyl)arylmethanes which is 3-substituted indole analogs via Friedel-Crafts reaction of indole with a variety of aldehyde using $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 15 mol% as catalyst in methanol, acetonitrile or nitromethane as solvent at room temperature leading to twenty-five 3,3'-bis(indoyl)arylmethane derivatives. Then, the synthesized compounds were tested the antibacterial activity. From the results, the nine synthesized compound such as 4-(di(1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3f**) 3,3'-((4-methoxyphenyl)methylene)bis(1H-indole) (**3g**) 4-(di(1H-indol-3-yl)methyl)benzene-1,2-diol (**3h**) 3,3'-(2-methylpropane-1,1-diyl)bis(1H-indole) (**3j**) 4-(bis(5-methoxy-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3n**) 4-(bis(5-chloro-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3q**) 3,3'-(phenyl-methylene)bis(6-fluoro-1H-indole) (**3t**) 4-(bis(6-fluoro-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3u**) and 5-(bis(6-fluoro-1H-indol-3-yl)methyl)-2-nitrophenol (**3w**) were chosen to examined the antibacterial activity against seven species of bacteria i.e. *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633, by agar disc diffusion method. The results showed that all four synthesized compounds had inhibitory effect on the growth of three type of gram positive bacteria i.e. *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633 and *S. aureus* ATCC 25923. The inhibition zones are in the range of 7.00 ± 0.00 to 16.33 ± 0.58 mm. Among all synthesized compounds, the compound **3u** had the most inhibition on the growth of gram positive bacterial strains tested. On the other hand, the all synthesized compounds were found inactive against four type of gram negative bacteria.

คำสำคัญ : 3-substituted indole, 2-substituted pyrrole, Friedel-Crafts, ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 99/2559

1. การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ สุดท้ายขอขอบคุณ นางสาวสุริษา ถึงปัญญา นางสาวสุรีย์พร เรืองแสงทองกุล นางสาวนัตติยา จินตนา นางสาวประภาพร บุญเพ็ง นางสาวอรณิชา ไช้เกษ นางสาวชญามน จันทนา นางสาวนันท์นภัส ชุมศรี นางสาวกรรณิการ์ ละอองทอง นางสาวชุติมา บัณฑิต นางสาวพรพรรณ แยมทรัพย์ นางสาวณัชชวลัญช์ สวัสดิ์อักษรชื่นและนางสาวนิศาชล จันทร์ครุฑ สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
กิตติกรรมประกาศ	3
บทที่ 1 บทนำ	5
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	5
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	7
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	8
1.5 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	9
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	17
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	19
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	23
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	55
บรรณานุกรม	57
ผลผลิตของโครงการวิจัย (Output)	58

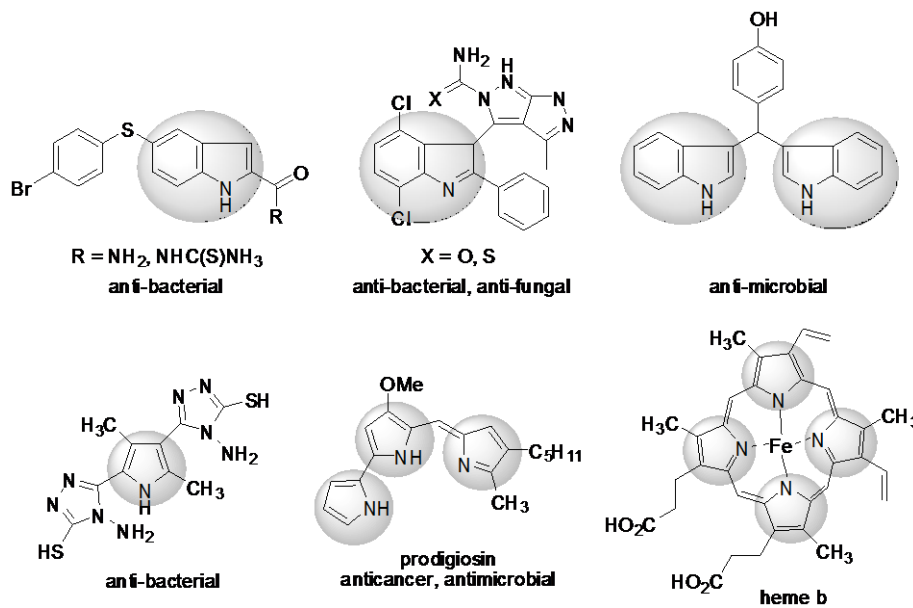
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จุลินทรีย์เป็นสาเหตุหนึ่งของการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น เนื้อสัตว์ ผัก ผลไม้ และอาหารทะเล เป็นต้น การบริโภคอาหารที่เน่าเสียอาจทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษซึ่งเป็นผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค แบคทีเรียที่มักปนเปื้อนในอาหารและทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น ปัจจุบันพบความถี่ของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นอุตสาหกรรมอาหารได้พยายามปรับปรุงผลิตภัณฑ์อาหารให้มีความปลอดภัยทางด้านจุลินทรีย์ โดยมีการพัฒนาเทคโนโลยีและวิธีการใหม่ๆ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและคงความสดของอาหาร เช่น การใช้วิธีทางกายภาพและทางเคมีเพื่อกำจัดหรือลดจำนวนเชื้อก่อโรคและ/หรือทำให้อาหารเน่าเสีย มีนักวิจัยบางส่วนสนใจนำสารจากธรรมชาติมาใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร โดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา ขมิ้น ออริกาโน สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคผ่านทางอาหารได้หลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยมีกลิ่นแรงส่งผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของอาหาร จึงมีข้อจำกัดในการทำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอาหาร นอกจากนี้มีนักวิจัยจำนวนมากสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารชนิดใหม่ๆ ซึ่งไม่มีกลิ่น สำหรับใช้ในการถนอมอาหาร และนำมาใช้กับอาหารได้หลายหลาย เช่น Lauroyl arginate ethyl ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว และ Allyl isothiocyanate เป็นต้น ดังนั้น การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารชนิดใหม่ๆ ต่อแบคทีเรียก่อโรคผ่านทางอาหารและหรือทำให้อาหารเน่าเสีย จึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ควบคุมจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารและยืดอายุการเก็บรักษา

เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีรายงานในวารสารทางวิทยาศาสตร์เป็นจำนวนมากพบว่าสารในกลุ่ม 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole เป็นสารกลุ่มที่พบได้ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ฤทธิ์ยับยั้งเนื้องอก ฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็นต้น ตัวอย่าง เช่น สารประกอบ diindoyl(4-hydroxyphenyl)methane ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสาร 3-substituted indole มีฤทธิ์ anti-microbial สาร prodigiosin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ 2-substituted pyrrole แยกได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces* และ *Serratia* ซึ่งมีฤทธิ์ anticancer และ antimicrobial (Walsh et. al., 2006 and Bandgar et. al., 2003) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ตัวอย่างของสารอนุพันธ์ของ indole และ pyrrole ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากความสำคัญและที่มาของปัญหาข้างต้น งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะสังเคราะห์สาร 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เรียกกันว่าเพ็ญในอาหารและทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* สำหรับใช้ในการถนอมอาหาร และนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำสารกลุ่มนี้ไปใช้เป็นยาในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสังเคราะห์กลุ่ม 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ด้วยวิธี disc diffusion
- 2) ศึกษาผลและตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างของสาร 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ที่มีอิทธิพลต่อความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย
- 3) ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ดีที่สุด
- 4) หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารกลุ่ม 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ที่สามารถยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลาย (Minimal bactericidal concentration, MBC) เชื้อได้
- 5) เพื่อผลิตและตีพิมพ์ผลงานวิจัยร่วมกับนิสิตและอาจารย์ในวารสารนานาชาติที่เป็นที่ยอมรับ อีกทั้งยังเป็นการสร้างองค์ความรู้ด้านการทำงานวิจัยแก่นิสิต

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1) การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole
สังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole จำนวน 15-20 สาร โดยใช้นำสารประกอบ indole และ pyrrole ชนิดต่างๆมาทำปฏิกิริยากับอิเล็กโตรไฟล์ที่เหมาะสม ได้แก่ อัลดีไฮด์ ไตรเมทิลออร์โธฟอร์เมต เบนซิลอัลกอฮอล์ เป็นต้น
- 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) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสังเคราะห์กลุ่ม 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ด้วยวิธี disc diffusion
นำอนุพันธ์ของสาร 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นต่อแบคทีเรียจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี disc diffusion โดยใช้ยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin (positive control) เป็นสารอ้างอิงมาตรฐาน และทุกๆ การทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง
- 4) ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด
จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุพันธ์สาร สาร 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ในการดำเนินการต่อไปจะเลือกโครงสร้างที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุด มาเป็นโครงสร้างหลักเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุด
- 5) การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารกลุ่ม 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ที่สามารถยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลาย (Minimal bactericidal concentration, MBC) เชื้อได้

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพทั่วไปนั้น หมายถึงการใช้เทคนิควิธีในหลอดทดลอง เพื่อตรวจสอบความไวหรือการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ โดยนำมาหาค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อได้ โดยหน่วยที่นิยมใช้ คือ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่า MIC สามารถใช้เป็นค่าเพื่อดูความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดได้ หลังจากนั้นนำมาหาค่า MBC (Minimum bactericidal concentration) หมายถึง ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ ซึ่งอาจเป็นค่าเดียวกันกับค่า MIC หรือไม่ใช่ค่าเดียวกันก็ได้ (นันทนาอรุณฤกษ์, 2537) การทดสอบความไวนี้มีวิธีการหลัก 2 ประการคือ Dilution method และ Diffusion method

Dilution method (ภัทรชัย กิรติสิน, 2549) เป็นการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธีการเจือจางยา (dilution) เป็นลำดับให้มีความเข้มข้นต่างกัน โดยทั่วไปจะเจือจางยาให้มีความเข้มข้นลดลง 2 เท่าตามลำดับ (two-fold dilution) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีตามมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) คือ broth dilution method และ agar dilution method

วิธี Broth dilution method เป็นการทดสอบโดยใช้อาหารเหลว สามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ macrodilution method และ microdilution method วิธี macrodilution method จะทำการทดสอบในหลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิเมตร ด้วยการเจือจางยาในอาหารเหลวปริมาตร 1 ถึง 2 มิลลิลิตร ขณะที่วิธี microdilution method จะทำการทดสอบในถาดหลุม (microtiter plate) โดยการเจือจางยาในอาหารเหลวปริมาตรประมาณ 0.05 ถึง 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นอ่านผลโดยสังเกตความขุ่นหรือดูความใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ อ่านผลค่า MIC สำหรับวิธี macrodilution จะมีความยุ่งยากมากกว่าวิธี microdilution เพราะต้องใช้หลอดทดลองจำนวนมาก สำหรับการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยทั่วไปจึงนิยมวิธี microdilution มากกว่าโดยใช้ถาดหลุม ซึ่งสามารถใช้ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันในถาดเดียวกัน

วิธี Agar dilution method เป็นการทดสอบโดยใช้อาหารร่วน เป็นการทดสอบโดยการผสมกันระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น agar medium กับยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบในอัตราส่วน 1 ต่อ 19 (ยา ต่อ agar medium) ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ การทดสอบโดยใช้อาหารร่วนเป็นการทดสอบที่ให้ผลมาตรฐานเชื่อถือได้ และสามารถใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดได้พร้อมกัน แต่โดยทั่วไปไม่นิยมทำเนื่องจากมีความยุ่งยากและเสียเวลามากในการเตรียมอาหารร่วนที่ผสมยาในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยเฉพาะหากต้องการทดสอบกับยาหลายชนิด ปัจจุบันจึงนิยมใช้การทดสอบด้วยวิธี broth dilution method มากกว่า

Diffusion method เป็นการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธีการแพร่ของยา (diffusion) อาศัยการแพร่ของยาจากแผ่นกระดาษกรองชุบยาต้านจุลชีพ (antibiotic disc หรือ Kirby-bauer disc) สู่อาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือการวางแผ่นกระดาษกรองบนผิวหน้าของอาหารร่วนเพื่อให้ยาแพร่กระจายออกไปสู่เนื้ออาหารร่วนที่เรียกว่า disc diffusion test หรือ Kirby-bauer test

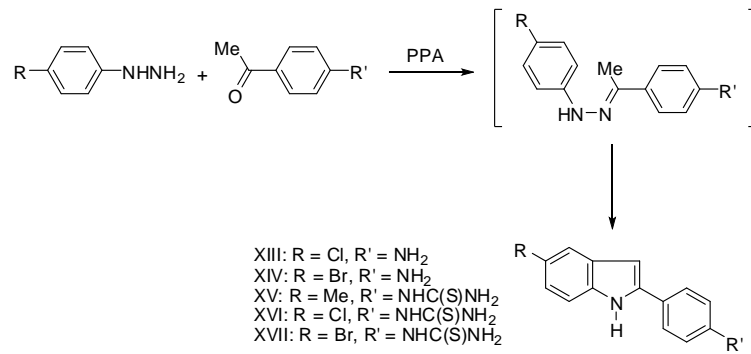
บริเวณอาหารวุ้นที่อยู่รอบแผ่นกระดาษกรองจะมีความเข้มข้นของยาสูง และลดลงตามลำดับในบริเวณที่อยู่ห่างออกไป ในการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion test จะแสดงถึงความสัมพันธ์ของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone รอบๆ disc ยาต้านจุลชีพ ซึ่งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone จะเป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ โดยนำมาแปลผลความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ โดยเทียบกับค่ามาตรฐานสำหรับเชื้อและยาชนิดนั้น การทดสอบด้วยวิธีนี้เป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบันเนื่องจากสามารถทำได้ง่าย การแปลผลมีความน่าเชื่อถือสูง และราคาถูกเมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยวิธีอื่น อย่างไรก็ตาม การทดสอบด้วยวิธีนี้มีข้อควรระวังในการแปลผล ค่ามาตรฐานที่ใช้ในการตัดสินความไวต่อยาชนิดหนึ่งอาจแตกต่างกันสำหรับเชื้อต่างชนิดกัน ดังนั้นห้องปฏิบัติการควรมีความระมัดระวังในการแปลผลโดยไม่นำค่าที่ใช้ในการแปลผลสำหรับเชื้อชนิดหนึ่งไปใช้กับเชื้อชนิดอื่นที่ไม่ได้ระบุไว้ตามมาตรฐานอ้างอิง

การใช้ยาสมุนไพรเป็นที่รู้จักกันดีว่ามีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลชีพ ซึ่งมีประโยชน์ในการใช้เป็นยารักษาโรคหรือเป็นสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาสมุนไพรต้องใช้ความชำนาญ และสูตรยาเฉพาะตัวของหมอพื้นบ้าน ทำให้ไม่เกิดความสะดวก ไม่แพร่หลาย อีกทั้งไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รองรับว่าสูตรยานั้นจะมีประสิทธิภาพจริงและไม่อันตรายต่อสุขภาพ เนื่องจากในสมุนไพรนั้นประกอบด้วยสารเป็นพันๆชนิด ที่ไม่ได้เกี่ยวกับการรักษาและอาจทำให้เกิดอาการข้างเคียงขึ้นได้ นอกจากนี้อาจจะต้องใช้สมุนไพรเป็นจำนวนมากในการรักษาโรคซึ่งอาจจะมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการรักษาและไม่สะดวกในการพัฒนาเป็นยาหรือใช้เป็นวัตถุดิบต้านเชื้อจุลชีพในอุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นการวิจัยเพื่อสังเคราะห์สารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพที่ชนิดใหม่และไม่มีผลข้างเคียงจึงมีความจำเป็น

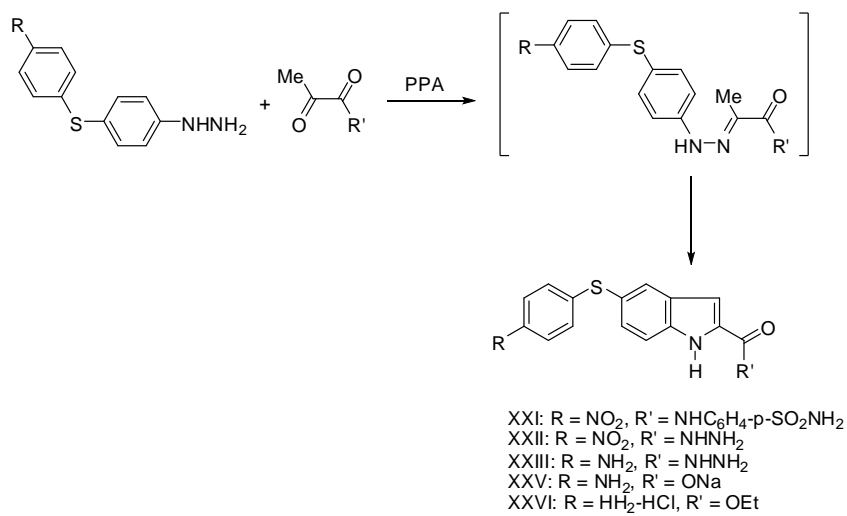
1.5 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

ปัจจุบันพบความถี่ของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสาเหตุหนึ่งมาจากการบริโภคอาหารที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหาร ดังนั้นอุตสาหกรรมอาหารจึงได้พยายามปรับปรุงผลิตภัณฑ์อาหารให้มีความปลอดภัยทางด้านจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียต่างๆ โดยมีการพัฒนาสารเคมีใหม่ๆ เพื่อกำจัดหรือลดจำนวนเชื้อก่อโรคและ/หรือทำให้อาหารเน่าเสีย นอกจากนี้สารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ค้นพบจะมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมแล้ว สารบางชนิดยังใช้เป็นยารักษาโรคที่มีแบคทีเรียเป็นตัวก่อให้เกิดโรคอีกด้วย สำหรับตัวอย่างงานวิจัยการสังเคราะห์สารและการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เคยมีรายงานไว้แสดงรายละเอียดดังนี้

ในปี ค.ศ. 1998 Chikvaidze และคณะ (Chikvaidze et.al., 1998) ได้สังเคราะห์สารประกอบ 2-aryl-5-substituted indole XIII-XXVI จากปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน (condensation) ระหว่าง arylhydrazine กับสารประกอบ ketone ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3



รูปที่ 2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 2,5-disubstituted indole



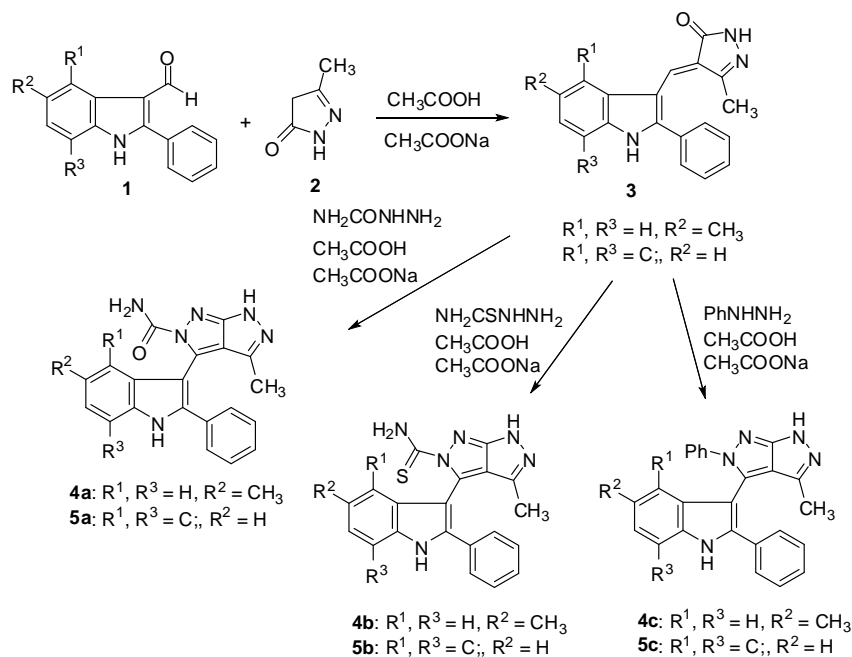
รูปที่ 3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 2,5-disubstituted indole

เมื่อนำสาร 2,5-disubstituted indole XIII-XVII ไปทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรีย (anti-bacterial activity) และเชื้อรา (anti-fungal activity) พบว่าสาร 2,5-disubstituted indole XXVI มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดในระดับเดียวกันกับยา isoniazide ที่ใช้เป็นยาอ้างอิง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบ anti-bacterial และ anti-fungal activity แบบ in vitro ของสารสังเคราะห์ชนิด 2,5-disubstituted indoles

Compound	Minimum inhibiting concentration, %							
	<i>S. aureus</i>	<i>Bac. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pr. vulgaris</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>M. canis</i>	<i>Tr. gypseum</i>	<i>C. albicans</i>
	ATCC 6538-p	ATCC 6633	ATCC 25922	ATCC 6898	ATCC 2853	3/84	5/85	ATCC 885-653
XIII	31.2	125	250	250	250	125	125	250
XIV	125	250	250	250	250	62.5	250	250
XV	125	250	250	250	250	250	250	250
XVI	31.2	62.5	250	250	250	125	125	250
XVII	125	125	250	250	250	62.5	62.5	250
XXI	250	250	250	250	250	250	250	250
XXII	250	250	250	250	250	250	250	250
XXIII	250	250	250	250	250	250	250	250
XXV	250	250	250	250	250	250	250	250
XXVI	15.6	15.6	250	250	31.2	31.2	250	250

Rao และคณะ (Rao et.al., 2011) ได้สังเคราะห์สารอนุพันธ์ pyrazolo-pyrazole ชนิดใหม่ที่มี indole เป็นส่วนประกอบและนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (anti-microbial activity) โดยวิธีการสังเคราะห์แสดงได้ดังรูปที่ 4



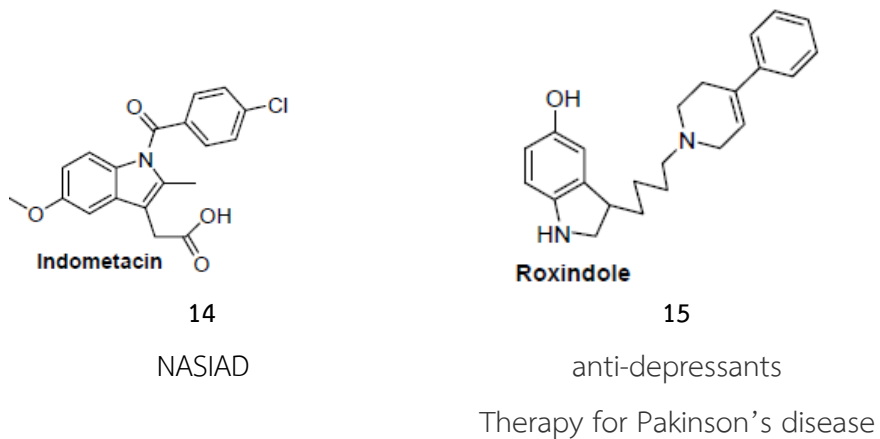
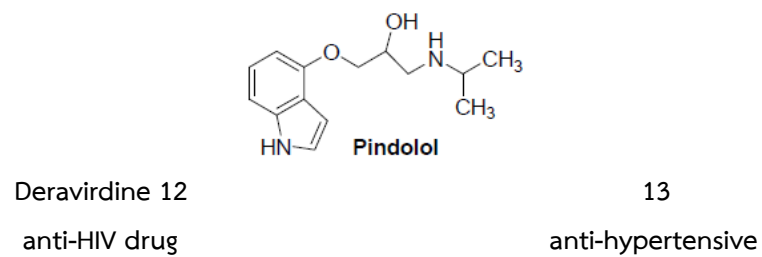
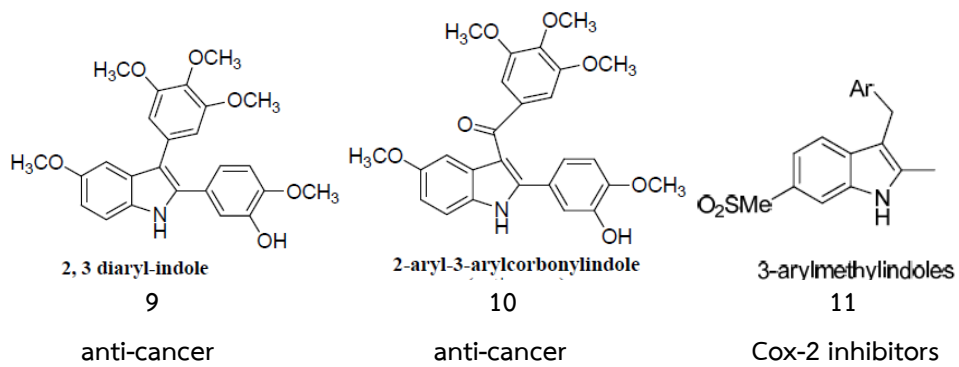
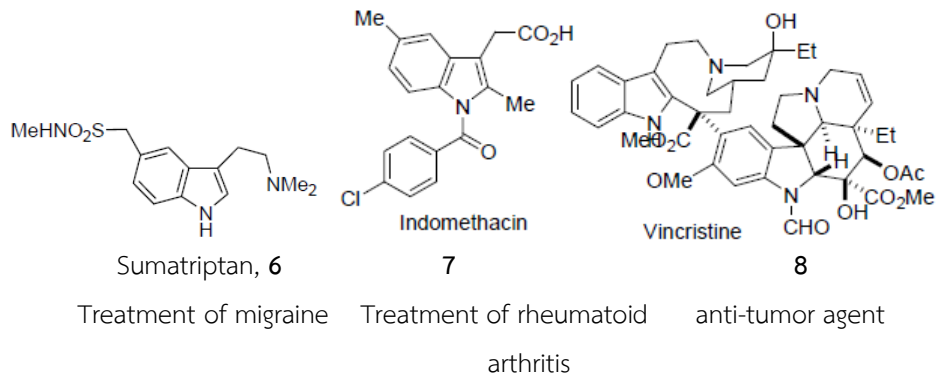
รูปที่ 4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 2,3-disubstituted indole

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยเทียบกับยา gentamicin และฤทธิ์การต้านเชื้อราโดยเทียบกับยา nystatin ของสารอนุพันธ์ pyrazolo-pyrazole ที่มี indole เป็นองค์ประกอบ พบว่าสารส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียและเชื้อราใกล้เคียงกับยาที่ใช้เปรียบเทียบ แสดงได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ anti-bacterial และ anti-fungal activity แบบ in vitro ของสารสังเคราะห์ ชนิด 2,3-disubstituted indole

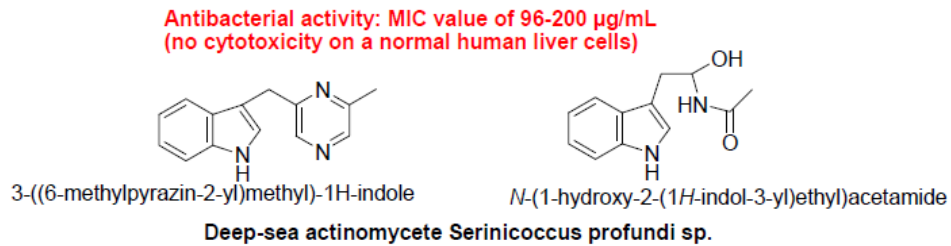
compound	Conc ($\mu\text{g}/\text{ML}$) in DMF	Zone of inhibition in mm				
		Antibacterial activity			Anti Fungal Activity	
Diameter of well (bore size)-6mm		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>
3a	1000	12	15	12	19	17
3b	1000	15	18	17	15	15
3c	1000	15	10	14	17	18
5a	1000	17	19	21	21	19
5b	1000	19	19	20	18	18
5c	1000	12	9	10	10	11
Gentamicin	1000	22	20	21	-	-
Nystatin	1000	-	-	-	22	21

เมื่อเร็วๆ นี้ Kaushik และคณะ (2013) ได้ตีพิมพ์บทความเกี่ยวกับสารประกอบ indole ที่มีฤทธิ์ทางยา พบว่าสารประกอบมีฤทธิ์ทางยามากมายหลายชนิด ตัวอย่างเช่น Sumatripta (6) มีฤทธิ์รักษาโรคไมเกรน Indomethacin (7) ใช้รักษาโรครูมาตอยด์ซึ่งเป็นโรคข้ออักเสบที่เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันทำลายข้อตัวเอง ทำให้เกิดการอักเสบของข้อ เนื้อเยื่อรอบข้อ อาการที่สำคัญคือปวดข้อและอาการนอกข้อ Vincristine (8) เป็นสารยับยั้งเนื้องอก สาร 2,3-diarylindole 9 และ 10 มีฤทธิ์รักษาโรคมะเร็ง สาร 3-arylmethylindole มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ชนิด Cox-2 inhibitor สาร Deravirdine (12) เป็นยารักษาโรคเอดส์ Pindolol (13) มีฤทธิ์เป็นยาลดความดันเลือด (anti-hypertensive) สาร Indometasin (14) เป็นยาระงับอาการอักเสบชนิดที่ไม่ใช่สารสเตียรอยด์ หรือ NASIAD (non-steroidal anti-inflammatory drug) ยา Roxindole (15) ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้รักษาโรคจิตเภท (Schizophrenia) แต่พบว่ามีฤทธิ์มีฤทธิ์เป็นยารักษาโรคซึมเศร้า (anti-depressants) และสามารถใช้รักษาโรคพาคินสัน (Therapy for Parkinson's disease) ดังแสดงในรูปที่ 5

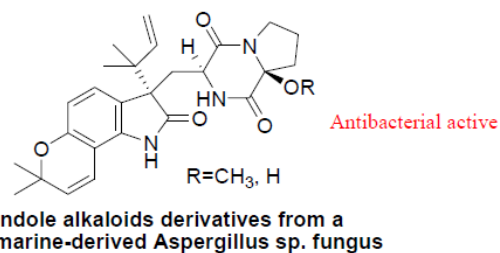


รูปที่ 5 สารประกอบ indole ที่มีฤทธิ์ทางยาชนิดต่างๆ

นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบ indole ที่แยกได้จากสัตว์และพืชในทะเลลึก และ indole ที่แยกได้จากราทะเลยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียอีกด้วย ดังแสดงในรูปที่ 6 และ 7 ตามลำดับ (Kaushik et.al. 2013)



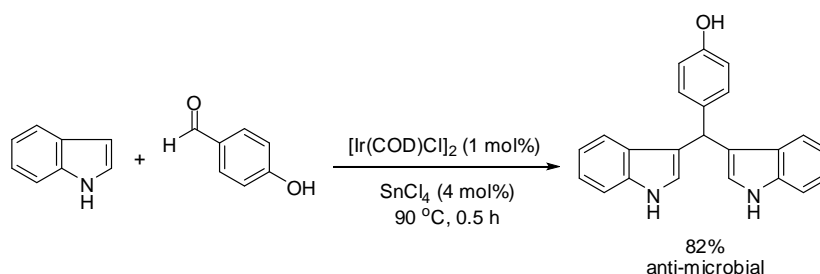
รูปที่ 6 สารประกอบ indole ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเลลึก



รูปที่ 7 สารประกอบ indole ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากราทะเล

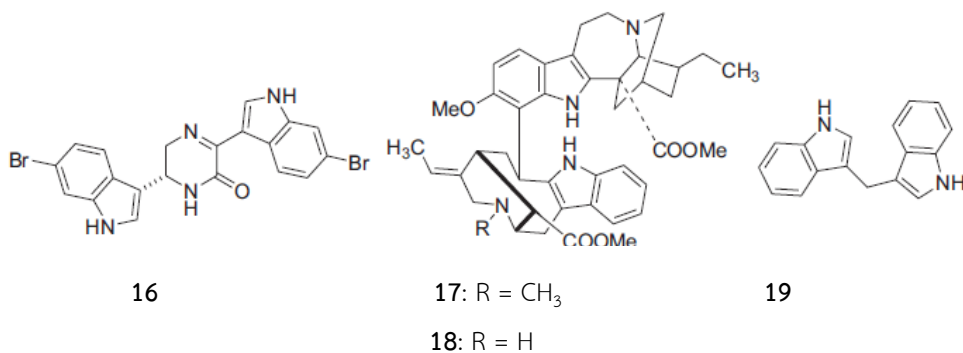
นอกจากสารประกอบ indole ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจแล้ว จากการค้นคว้าเอกสารงานวิจัย ยังพบว่าสารประกอบ bis-indole หรือสารประกอบที่มี indole 2 วงในโครงสร้างเดียวกัน ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจอีกด้วย ตัวอย่างการสังเคราะห์สารประกอบ bis-indole และฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจมีดังนี้

Roy และคณะ (Podder et.al., 2007) ได้สังเคราะห์สารประกอบ bis-indole จากปฏิกิริยาระหว่าง indole กับ 4-hydroxybenzaldehyde โดยใช้สารประกอบ Ir-Sn เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าได้ bis-indole เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารประกอบที่สังเคราะห์ได้นี้เคยมีรายงานว่า มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (anti-microbial) ได้ (รูปที่ 8)



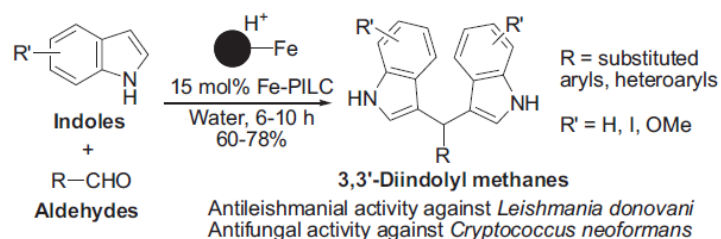
รูปที่ 8 การสังเคราะห์ bis-indole ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ Ir-Sn เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

Vishwakarma และคณะ (2013) ได้กล่าวไว้ในงานวิจัยว่า สารประกอบ bis-indole เป็นกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ทางยามากมายหลายชนิด เช่น ยับยั้งโรคมะเร็ง (anticancer) ยับยั้งจุลินทรีย์ (anti-microbial) เช่น สาร Hamacanthin A (16) เป็นสารประกอบ bis-indole alkaloid ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลสายพันธุ์ *Hamacantha sp* และ *Spongosorites sp* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus aureus* และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) เท่ากับ 6.45 mM และ 3.22 mM ตามลำดับ นอกจากนี้ สารประกอบ bis-indoles 17 และ 18 ยังสามารถยับยั้งโปรโตซัวลิชมาเนีย (*Leishmania parasite*) ที่ก่อให้เกิดโรคลิชมาเนียซึ่งส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการโลหิตจางอย่างรุนแรง ตับและม้ามโต นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบ bis-indoles 17 และ 18 ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่สูงกว่าสารประกอบชนิด monomeric indole หรือสารประกอบที่มีวง indole ในโมเลกุลเพียงวงเดียว สารประกอบ diindolylmethane (DIM, 19) ซึ่งเป็นสารต้านมะเร็งที่พบได้ในผักกลุ่ม cruciferous ได้แก่ บร็อคโคลี่ คะน่ำ บรัสเซล สปรอท (Brussel Sprouts) กะหล่ำปลี ดอกกะหล่ำ



รูปที่ 9 สารประกอบ bis-indoles ที่มีฤทธิ์ทางยาชนิดต่างๆ

Vishwakarma และคณะ (2013) ได้สังเคราะห์สารประกอบ 3,3'-diindolyl-methane จากปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบ indole 2 โมเลกุล กับอัลดีไฮด์ 1 โมเลกุล โดยใช้ Fe-PILC เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังรูปที่ 10

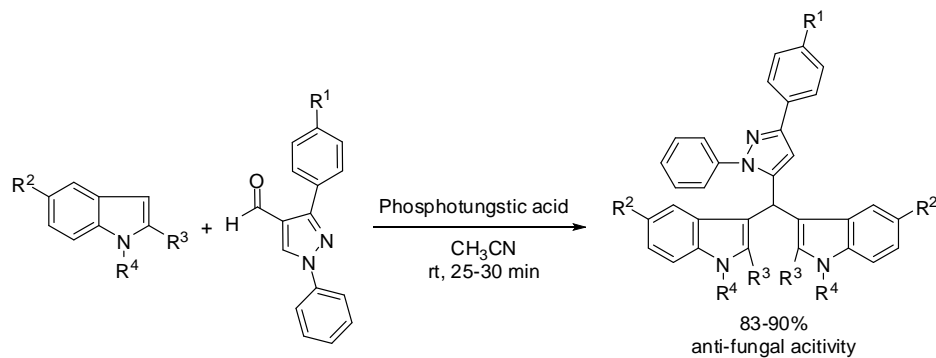


รูปที่ 10 การสังเคราะห์สารประกอบ bis-indole โดยใช้ Fe-PILC เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

Vishwakarma และคณะ ได้นำสารประกอบ bis-indole ที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRS) และ *Mycobacterium intracellulare* พบว่าสารประกอบ 3,3'-diindolylmethanes มีค่า IC₅₀ ที่ต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

Methicillin-resistant *Staphylo-coccus aureus* (MRS) เท่ากับ 1.89 μM และ 1.15 μM ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับยา Ciprofloxacin ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.39 μM ทั้งสองสายพันธุ์ และยังพบว่า สารประกอบ 3,3'-diindolylmethanes มีค่า IC_{50} ที่ต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium intracellulare* เท่ากับ 3.49 μM โดยเปรียบเทียบกับยา Ciprofloxacin ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.35 μM นอกจากนี้ สารประกอบ 3,3'-diindolylmethanes บางชนิดยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ได้ดีอีกด้วย (Vishwakarma et.al., 2013)

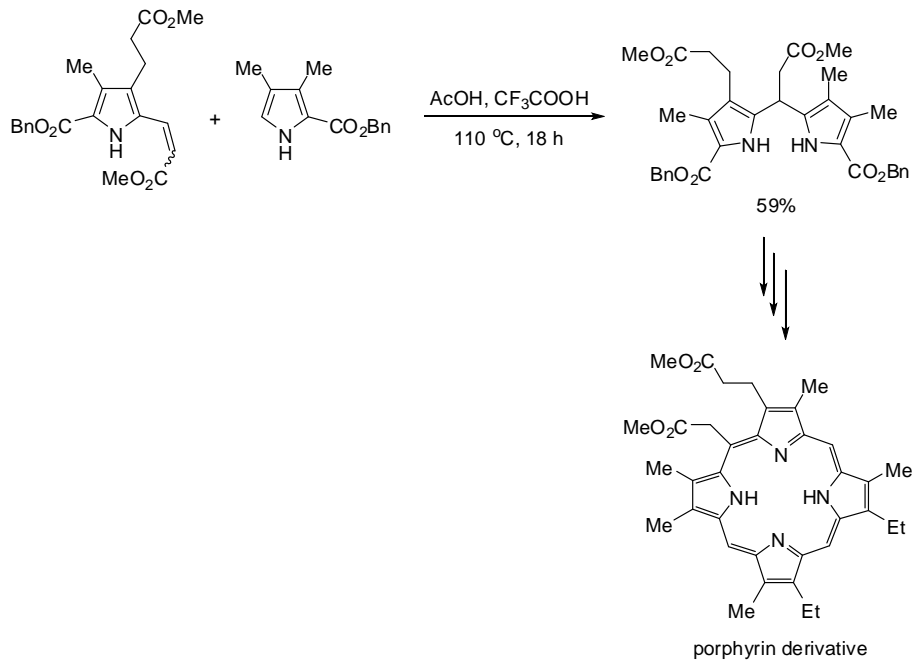
สารประกอบ pyrazolylbisindole ยังเป็นสารประกอบ indole อีกชนิดหนึ่ง ที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ตัวอย่างเช่น สารประกอบ pyrazolylbisindole ที่สังเคราะห์ได้จากสารประกอบ indole กับ pyrazolylaldehyde โดยทำปฏิกิริยาในตัวละลาย acetonitrile และใช้ phosphotungstic acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 การสังเคราะห์สารประกอบ pyrazolylbisindoles ที่มีฤทธิ์

ยับยั้งเชื้อราโดยใช้ phosphotungstic acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

สำหรับตัวอย่างสารประกอบ pyrrole ที่สำคัญได้แก่ สารประกอบ porphyrin ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบได้ใน hemoglobin และ chlorophyll ในปี ค.ศ. 1990 Burns และคณะ (1990) ได้สังเคราะห์สารประกอบ unsymmetrical dipyrrolylmethane โดยนำสารประกอบ pyrrole มาทำปฏิกิริยา 1,4-addition หรือ Michael reaction กับสารประกอบ β -pyrrolyl- α,β -unsaturated carbonyl compound ในสารละลายกรดอะซิติกและ trifluoroacetic acid ที่อุณหภูมิ 110 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น unsymmetrical dipyrrolylmethane ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการสังเคราะห์ porphyrin (Burns et. al., 1990) ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 การสังเคราะห์สารประกอบ unsymmetrical dipyrrolylmethane

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

การสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารกลุ่ม 3-substituted indole และ 2-substituted pyrroles ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่มักพบเป็นนในอาหารและทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* เป็นองค์ความรู้ใหม่ในด้านการค้นพบประกอบ 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ชนิดใหม่ๆ ที่สามารถใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหาร หรือใช้เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้จะเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้ และมีความเป็นไปได้ที่จะนำองค์ความรู้ที่ได้ไปต่อยอดเพื่อนำไปสู่การนำสารดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และใช้เป็นยาในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้อีกด้วย

2) บริการความรู้แก่ประชาชน

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการค้นพบสารกลุ่ม 3-substituted indole และ 2-substituted pyrroles ซึ่งเป็นสารกลุ่มใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเป็นพื้นฐานองค์ความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอดเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา สามารถถ่ายทอดความรู้ความเข้าใจแก่ประชาชนทั่วไปโดยทำการเผยแพร่ผ่านสื่อต่างๆ เช่น รายการวิทยุเพื่อประชาชน และวารสารต่างๆ

3) บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ และนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

อนุพันธ์ของสาร 3-substituted indole และ 2-substituted pyrroles ที่สังเคราะห์ได้ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีในระดับเดียวกันหรือสูงกว่ายาปฏิชีวนะ ciprofloxacin (positive control) ทำให้สามารถใช้สารกลุ่มนี้เป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียในอาหารหรือนำไปใช้เป็นยาทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย หลังจากจดสิทธิบัตรแล้วสามารถให้ข้อมูลแก่ภาคธุรกิจได้แก่ โรงงานผลิตอาหาร องค์การเภสัชกรรม หรือ บริษัทฯ เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการผลิตอาหารหรือใช้ผลิตเป็นสูตรยาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

4) เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

ประชากรทั่วไปสามารถบริโภคอาหารที่ปลอดภัยเชื้อแบคทีเรีย และสามารถใช้อย่างต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณภาพมากกว่าเดิม และผลข้างเคียงน้อยลง นอกจากนี้ในโครงการวิจัยนี้เมื่อแล้วเสร็จ คาดว่าจะสามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ภายใต้การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาและเป็นโครงการวิจัยย่อยแก่นิสิตระดับปริญญาตรี

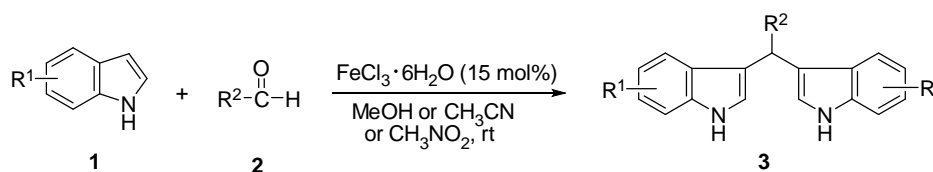
หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ ได้แก่ สถาบันการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านชีวเคมี เภสัชเคมี เช่น คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ในการนำผลการศึกษาไปศึกษาต่อยอด และองค์การเภสัชกรรม หรือ หน่วยงาน บริษัทอุตสาหกรรมยา ในการนำไปพัฒนาเป็นสูตรยา โรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารทั้งที่ผลิตเพื่อจำหน่ายภายในประเทศหรือส่งออกนอกประเทศ

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

การสังเคราะห์สาร 3-substituted indole ประเภท 3,3'-bis(indolyl)methanes ชนิดต่างๆ

General procedure A



ซึ่งอนุพันธ์ Indole (1) (2.0 mmol) และ Aldehyde (1.0 mmol) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลาย CH_3CN หรือ MeOH หรือ CH_3NO_2 (10.00 mL) จากนั้นเติม $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 15 mol% ปิดหลอดทดลองด้วย septum คนสารตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยเปรียบเทียบกับ Aldehyde ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายอิ่มตัวของ NaHCO_3 ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย EtOAc (3×10 mL) ตามด้วย น้ำ (10 mL) และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น EtOAc มาทำให้แห้งด้วย Na_2SO_4 anhydrous นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product

นำ crude product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค radial chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย Hexane (50 mL) ตามด้วย 5%, 10%, 20% และ 70% EtOAc ใน Hexane ตามลำดับ เพื่อแยกสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมา นำ fraction ของผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้

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

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสังเคราะห์

3.1 แบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*

3.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับทดสอบ

เลี้ยงเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีของเชื้อทดสอบประมาณ 5-7 โคโลนี เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย NaCl 0.85% ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml (หัวเชื้อสำหรับทดสอบ disc diffusion) จากนั้นจุด bacterial suspension มา 100 ul เจือจางด้วย MHB ในอัตราส่วน 1:100 ให้ได้ปริมาณเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/ml และนำไปใช้ภายใน 15 นาที (หัวเชื้อสำหรับทดสอบหาค่า MIC และ MBC)

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสังเคราะห์ต่อแบคทีเรีย ด้วยวิธี disc diffusion (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012a)

3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับทดสอบ

- 1) เพาะเชื้อทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2) เชื้อโคโลนีเดี่ยวของเชื้อทดสอบประมาณ 3-5 โคโลนี เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง
- 3) ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร และทำการนับจำนวนเชื้อบนอาหารแข็ง PCA

3.3.2 การทดสอบ

- 1) ละลายสารสังเคราะห์แต่ละชนิดด้วย DMSO จากนั้นหยดสารลงบนดิสก์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร/ดิสก์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที
- 2) ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่เตรียมไว้ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 จากนั้นป้ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ให้ทั่ว (3 ระบาย) วางดิสก์บรรจุสารสังเคราะห์ ดิสก์ที่บรรจุ DMSO (negative control, 20 ไมโครลิตร/ดิสก์) และดิสก์ยา gentamicin (positive control, 10 ไมโครกรัม/ดิสก์) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 3) นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
- 4) อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

3.4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ของสารสังเคราะห์ ด้วยวิธี broth microdilution (CLSI, 2012b)

3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับทดสอบ

- 1) เพาะเชื้อทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2) เชียโคโลนีเดี่ยวของเชื้อทดสอบประมาณ 3-5 โคโลนี เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง
- 3) ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร และทำการนับจำนวนเชื้อบนอาหารแข็ง PCA
- 4) ดูด bacterial suspension ที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร มา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร MHB 9.9 มิลลิลิตร จะได้เชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร และนำไปใช้ภายใน 15 นาที

3.4.2 หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC)

- 1) เติมหาอาหาร MHB 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ 96 well-plate
- 2) เติมหาสารสังเคราะห์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดสารละลายจากหลุมที่ 1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่ 2 ผสมให้เข้ากัน เจือจางต่อไปเรื่อยๆ จนถึงหลุมที่ 10 และดูดสารละลายในหลุมที่ 10 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไป (2 ซ้ำ) สำหรับสาร 3, 3'-((5-methyl furan-2-yl) methylene) bis(1H-indole) และ Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethan ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมที่ 1-10 เท่ากับ 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสาร Tris-[5-ethyl-1H-pyrrole-2-yl] methane และ Tris-[1H-indole-3-yl] methane ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมที่ 1-10 เท่ากับ 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78, 39 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ
- 3) เติมหาเชื้อที่เตรียมไว้ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1-10 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อเท่ากับ 5×10^5 CFU/มิลลิลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายของสาร 3, 3'-((5-methyl furan-2-yl) methylene) bis(1H-indole) และ Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethan เท่ากับ 160-0.313 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสาร Tris-[5-ethyl-1H-pyrrole-2-yl] methane และ Tris-[1H-indole-3-yl] methane เท่ากับ 5000-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร [ชุดควบคุมประกอบด้วย (1) growth control คือหลุมที่เติม DMSO และเชื้อทดสอบ (2) sterility control คือหลุมที่เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB (3) positive control คือหลุมที่เติมยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 4-0.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเชื้อทดสอบ (4) quality control คือหลุมที่เติมยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 4-0.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ *Escherichia coli* ATCC 25922]

4) นำ 96 well-plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านค่า MIC โดยสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ทำการทดลอง 3 ครั้ง) ค่า MIC คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสังเคราะห์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในหลอดทดลอง (อาหารเลี้ยงเชื้อใส)

3.5 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อ (MBC) ของสารสังเคราะห์ (CLSI, 1999)

ผสมสารละลายในหลุมที่ไม่ขุ่นในขั้นตอนการหาค่า MIC ให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายในหลุมที่ไม่ขุ่นมาปริมาตร 10 ไมโครลิตร (2 ซ้ำ) หยดลงบนอาหาร TSA ด้วยวิธีการ drop plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านค่า MBC โดยสังเกตการเจริญของแบคทีเรียทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (ทำการทดลอง 3 ครั้ง) ค่า MBC คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสังเคราะห์ที่สามารถทำลายเชื้อได้ (ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง)

บทที่ 3

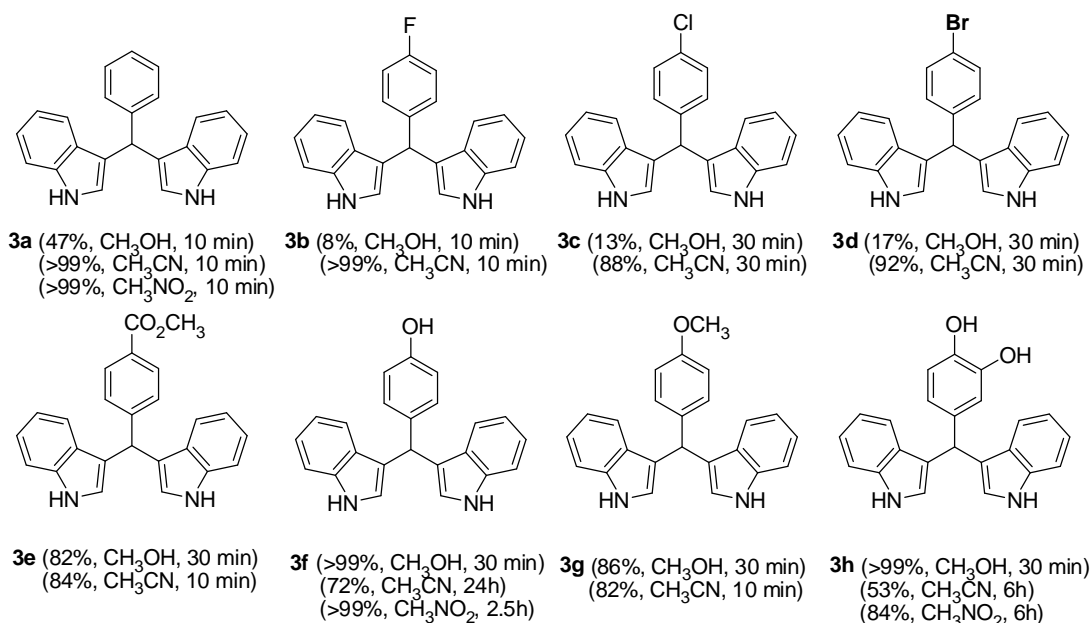
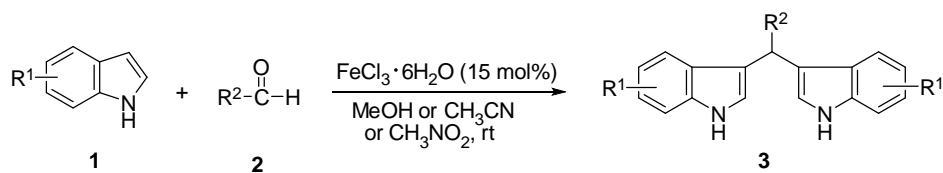
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

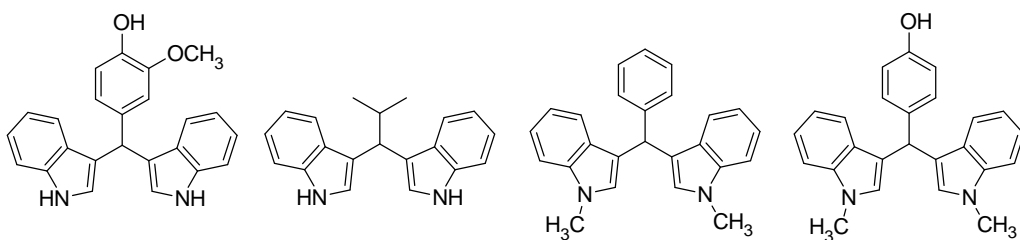
ผลการทดลอง

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร 3-substituted indole ประเภท 3,3'-bis(indolyl)methanes ชนิดต่างๆ

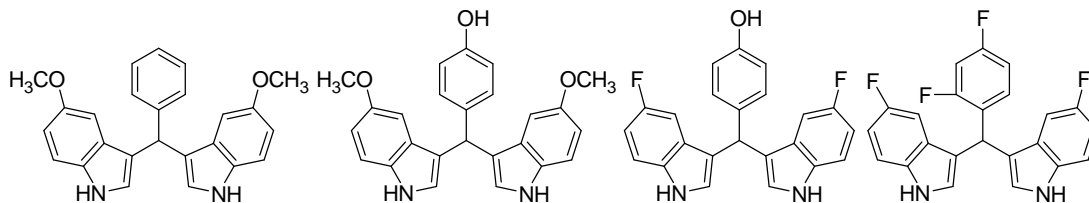
การสังเคราะห์สาร 3-substituted indole ประเภท 3,3'-bis(indolyl)methanes ชนิดต่างๆ ได้สังเคราะห์จากปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ indole หรืออนุพันธ์ (2 มิลลิโมล) กับ aldehyde ชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มี $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (15 mol%) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาในตัวทำละลาย MeOH, CH_3CN หรือ CH_3NO_2 ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้ผลการทดลองแสดงดังในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การสังเคราะห์ 3-substituted indole ประเภท 3,3'-bis(indolyl)methanes ชนิดต่างๆ ด้วยปฏิกิริยาระหว่างสารอนุพันธ์ indole กับ Aldehyde ภายใต้สภาวะที่มี $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

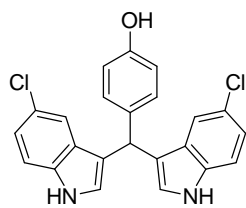




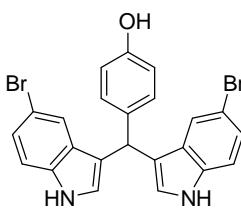
3i (>99%, CH₃OH, 10 min)
(51%, CH₃CN, 24h) **3j** (16%, CH₃OH, 24 h)
(61%, CH₃CN, 5 min) **3k** (96%, CH₃CN, 30 min) **3l** (98%, CH₃OH, 1h)
(98%, CH₃CN, 40min)
(40%, CH₃NO₂, 10min)



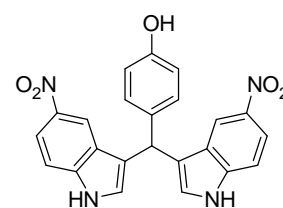
3m (91%, CH₃OH, 10min)
(86%, CH₃CN, 24h) **3n** (>99%, CH₃OH, 10min)
(12%, CH₃CN, 48h)
(46%, CH₃NO₂, 48h) **3o** (89%, CH₃OH, 1.3h)
(25%, CH₃CN, 48h) **3p** (68%, CH₃OH, 24h)
(81%, CH₃CN, 30min)



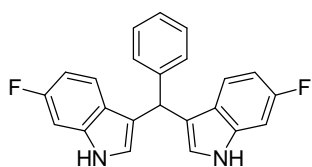
3q (>99%, CH₃OH, 24h)



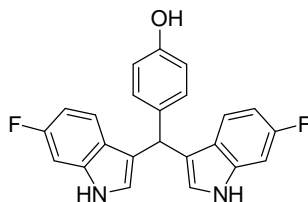
3r (96%, CH₃OH, 6.5h)
(75%, CH₃CN, 48h)



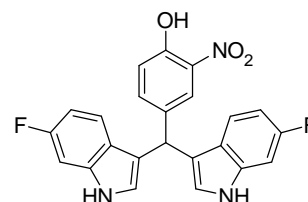
3s (35%, CH₃OH, 48h)
(45%, CH₃CN, 48h)



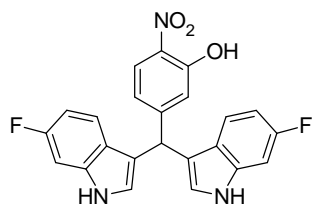
3t (93%, CH₃OH, 10 min)
(99%, CH₃CN, 24h)



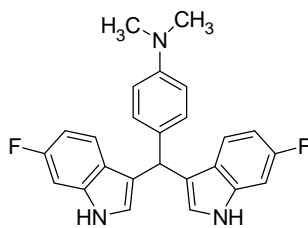
3u (99%, CH₃OH, 3h)
(60%, CH₃CN, 48h)
(99%, CH₃NO₂, 5h)



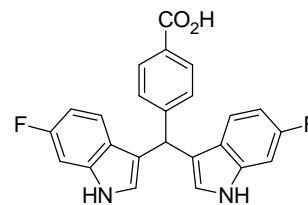
3v (95%, CH₃OH, 24 h)
(96%, CH₃CN, 24h)



3w (20%, CH₃OH, 24 h)
(80%, CH₃CN, 24h)



3x (87%, CH₃OH, 24 h)
(95%, CH₃CN, 24h)

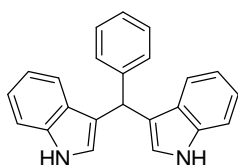


3y (63%, CH₃OH, 24 h)
(98%, CH₃CN, 4h)

จากผลการทดลองในตารางที่ 3 พบว่า เมื่อนำ Indole ทำปฏิกิริยากับ Benzaldehyde, 4-Fluoro, 4-Chloro- และ 4-Bromobenzaldehyde และ 2-methylpropanal พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาในตัวทำละลายชนิด polar aprotic solvent ได้แก่ CH₃CN หรือ CH₃NO₂ จะได้ผลิตภัณฑ์ 3a-d และ 3j ในร้อยละสูงกว่าในตัวทำละลายชนิด polar protic solvent ได้แก่ CH₃OH ขณะที่เมื่อนำ Indole ทำปฏิกิริยากับ aromatic aldehyde ที่มี hydroxyl เป็นหมู่แทนที่พบว่า ปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีในตัวทำละลาย CH₃OH โดยจะได้ผลิตภัณฑ์ 3f 3h และ 3i ในร้อยละที่สูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารตั้งต้น aromatic aldehyde ที่มี hydroxyl เป็นหมู่แทนที่จะละลายได้ดีในตัวทำละลาย CH₃OH แต่ละลายได้ไม่ดีในตัวทำละลาย CH₃CN หรือ CH₃NO₂ นอกจากนี้เมื่อนำ Indole มาทำปฏิกิริยากับ Methyl 4-formylbenzoate และ 4-methoxybenzaldehyde พบว่า สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีทั้งในตัวทำละลาย CH₃OH และ CH₃CN โดยได้ผลิตภัณฑ์ 3e และ 3g ในปริมาณใกล้เคียงกัน เนื่องจากสารตั้งต้นสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายทั้งสองชนิด ในงานวิจัยนี้นอกจากใช้ Indole เป็นสารตั้งต้นแล้ว ยังได้ศึกษาปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 3,3'-Bis(indolyl)arylmethanes ชนิดต่าง ๆ โดยใช้อนุพันธ์ของ Indole ได้แก่ N-Methylindole และ 5-Methoxy-, 5-Fluoro-, 6-Fluoro-, 5-Chloro-, 5-Bromo-, 5-Nitrobenzaldehyde เป็นสารตั้งต้น ทำปฏิกิริยากับ Aromatic aldehyde ชนิดต่าง ๆ ได้ผลิตภัณฑ์ 3k-y ในร้อยละปานกลางถึงสูง (ตารางที่ 3)

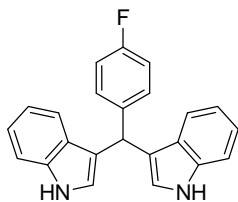
2. การพิสูจน์หาเอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีทาง spectroscopy

โครงสร้างของสารประกอบ (3a)



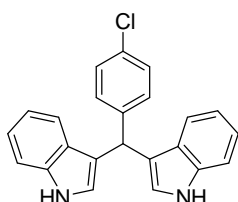
สารประกอบ 3a: ของแข็งสีส้ม; $R_f = 0.27$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃): δ 7.80 (brs, 2H, 2xNH), 7.44 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.41-7.29 (m, 5H, 5xCH ของ aromatic), 7.27 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.22 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.06 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.62 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic) 5.93 (s, 1H, CH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃): δ 144.3 (C ของ aromatic), 136.9 (2xC ของ aromatic), 129.0 (2xCH ของ aromatic), 128.5 (CH ของ aromatic), 127.3 (2xC ของ aromatic), 126.4 (2xC ของ aromatic), 123.9 (2xCH ของ aromatic), 122.2 (2xCH ของ aromatic), 120.2 (2xCH ของ aromatic), 119.8 (2xCH ของ aromatic), 119.5 (2xCH ของ aromatic), 111.4 (2xCH ของ aromatic), 40.5 (CH); IR (Film): ν_{max} 3414 (NH), 1601, 1493 และ 1456 (aromatic ring), 743 (CN indole) cm⁻¹

โครงสร้างของสารประกอบ 3b



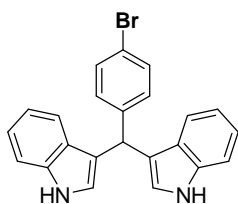
สารประกอบ **3b**: ของแข็งสีส้ม; $R_f = 0.23$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.82 (brs, 2H, 2 \times NH), 7.42 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 7.39-7.29 (m, 4H, 4 \times CH ของ aromatic), 7.23 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 7.07 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 7.00 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 6.61 (sd, $J = 1.5$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 5.91 (s, 1H, CH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 161.4 (d, $J = 242$ Hz, CF ของ aromatic), 139.7 (2 \times C ของ aromatic), 136.7 (C ของ aromatic), 130.1 (2 \times CH ของ aromatic), 126.9 (2 \times C ของ aromatic), 123.5 (2 \times CH ของ aromatic), 122.0 (2 \times CH ของ aromatic), 119.8 (2 \times CH ของ aromatic), 119.5 (2 \times C ของ aromatic), 119.3 (2 \times CH ของ aromatic), 114.9 (d, $J = 21$ Hz, 2 \times CH-CF ของ aromatic), 111.1 (2 \times CH ของ aromatic), 39.4 (CH)

โครงสร้างของสารประกอบ 3c



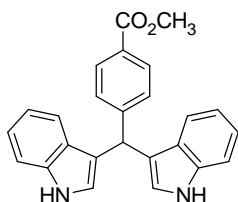
สารประกอบ **3c**: ของเหลวหนืดสีส้มแดง; $R_f = 0.24$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.97 (s, 2H, 2 \times NH), 7.38 (d, $J = 7.7$ Hz, 4H, 4 \times CH ของ aromatic), 7.28 (d, $J = 5.0$ Hz, 4H, 4 \times CH ของ aromatic), 7.13 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 7.04 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 6.66 (s, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 5.88 (s, 1H, CH); IR (Film): ν_{max} 3412 (NH), 1618, 1488 และ 1456 (aromatic ring), 787 (C-Cl), 743 (CN indole) cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 3d



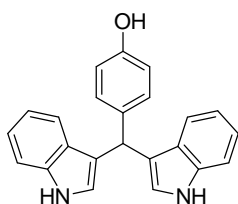
สารประกอบ 3d: ของแข็งสีส้มแดง; $R_f = 0.24$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.98 (s, 2H, 2xNH), 7.42-7.34 (m, 6H, 6xCH ของ aromatic), 7.25-7.18 (m, 4H, 4xCH ของ aromatic), 7.30 (dd, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.67 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 5.32 (s, 1H, CH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 143.4 (C ของ aromatic), 136.9 (2x C ของ aromatic), 131.4 (2xCH ของ aromatic), 130.6 (2xCH ของ aromatic), 127.1 (2x C ของ aromatic), 123.7 (2xCH ของ aromatic), 122.2 (2xCH ของ aromatic), 120.0 (C ของ aromatic), 119.9 (2xCH ของ aromatic), 119.5 (2xCH ของ aromatic), 119.3 (2x C ของ aromatic), 111.3 (2x C ของ aromatic), 39.9 (CH); IR (Film): ν_{max} 3413 (NH), 1617, 1485 และ 1456 (aromatic ring), 785 (CBr), 743 (CN) cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 3e



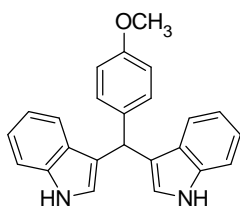
สารประกอบ 3e: ของเหลวหนืดสีส้มแดง; $R_f = 0.13$ (1:4 EtOAc/hexane); IR (Film): ν_{max} 3350 (NH), 1719 (C=O), 1609, 1519 และ 1457 (aromatic ring), 1281 (C-O-CH₃), 747 (CN indole) cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 3f



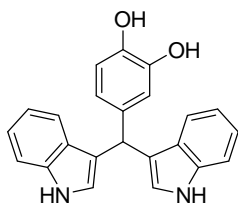
สารประกอบ **3f**: ของแข็งสีแดงเลือดหมู; $R_f = 0.10$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.94 (brs, 2H, 2 \times NH), 7.41 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 7.38 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 7.23-7.17 (m, 4H, 4 \times CH ของ aromatic), 7.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 6.76 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 6.68 (s, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 5.85 (s, 1H, CH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 153.8 (C ของ aromatic), 136.7 (2 \times C ของ aromatic), 136.3 (C ของ aromatic), 129.8 (2 \times CH ของ aromatic), 127.0 (2 \times C ของ aromatic), 123.5 (2 \times CH ของ aromatic), 121.9 (2 \times CH ของ aromatic), 120.0 (2 \times CH ของ aromatic), 119.2 (2 \times CH ของ aromatic), 115.0 (2 \times CH ของ aromatic), 111.0 (2 \times CH, 2 \times C ของ aromatic), 39.3 (CH); IR (Film): ν_{max} 3411, 1611, 1509, 1456, 1417, 1337, 1169, 1093, 744 cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ **3g**



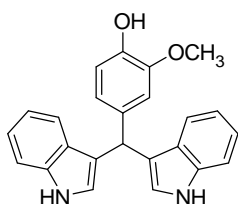
สารประกอบ **3g**: ของแข็งสีส้มเข้ม; $R_f = 0.19$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.89 (brs, 2H, 2 \times NH), 7.42 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 7.37 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 7.28 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 7.20 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 7.04 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 6.85 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 6.65 (sd, $J = 1.4$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 5.87 (s, 1H, CH), 3.81 (s, 3H, OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 157.9 (C ของ aromatic), 136.7 (2 \times C ของ aromatic), 136.2 (C ของ aromatic), 129.6 (2 \times CH ของ aromatic), 127.0 (2 \times C ของ aromatic), 123.8 (2 \times CH ของ aromatic), 121.8 (2 \times CH ของ aromatic), 120.0 (2 \times C ของ aromatic), 119.9 (2 \times CH ของ aromatic), 119.2 (2 \times CH ของ aromatic), 113.5 (2 \times CH ของ aromatic), 111.0 (2 \times CH ของ aromatic), 55.2 (OCH_3), 39.3 (CH)

โครงสร้างของสารประกอบ 3h



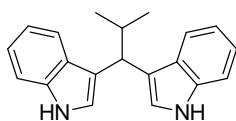
สารประกอบ **3h**: ของแข็งสีชมพู; $R_f = 0.24$ (3:7 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.94 (brs, 2H, 2xNH), 7.39 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.35 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.16 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.01 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.81-6.79 (m, 3H, 3xCH ของ aromatic), 6.66 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 5.78 (s, 1H, CH); IR (Film): ν_{max} 3411, 1698, 1608, 1513, 1456, 1418, 1338, 1279, 1218, 1189, 1094, 745 cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 3i



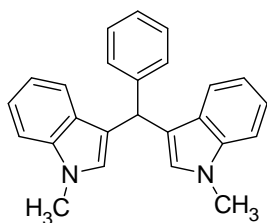
สารประกอบ **3i**: ของแข็งสีแดงเลือดหมู; $R_f = 0.19$ (3:7 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.22-7.15 (m, 7H, 7xCH ของ aromatic), 6.72 (t, 4xCH ของ aromatic), 3.80 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, CH), 2.94 (sd, $J = 2.0$ Hz, 12H, 2xN(CH₃)₂), 2.62 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH₂), 2.38-2.32 (m, 2H, CH₂); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 146.6 (C ของ aromatic), 144.2 (C ของ aromatic), 137.0 (C ของ aromatic), 136.4 (C ของ aromatic), 127.4 (C ของ aromatic), 123.6 (2xC ของ aromatic), 122.1 (2xCH ของ aromatic), 121.7 (CH ของ aromatic), 120.3 (2xCH ของ aromatic), 120.1 (2xCH ของ aromatic), 119.4 (2xCH ของ aromatic), 114.3 (CH ของ aromatic), 111.9 (CH ของ aromatic), 111.1 (4xCH ของ aromatic), 56.1 (OCH₃), 40.1 (CH); IR (Film): ν_{max} 3412 (NH), 1610, 1509 และ 1456 (aromatic ring), 1269 (C-O-CH₃), 743 (CN indole) cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 3j



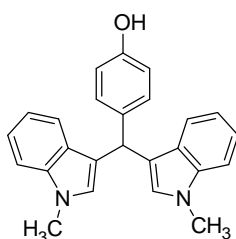
สารประกอบ 3j: ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอม่วง; $R_f = 0.24$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.94 (s, 2H, 2×NH), 7.66 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.34 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.15 (t, $J = 9.0$ Hz, 4H, 4×CH ของ aromatic), 7.06 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 4.29 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH), 2.71-2.65 (m, 1H, CH), 1.04 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, 2×CH₃)

โครงสร้างของสารประกอบ 3k



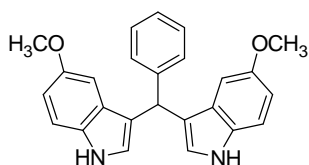
สารประกอบ 3k: ของแข็งสีส้ม; $R_f = 0.59$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.44-7.35 (m, 4H, 4×CH ของ aromatic), 7.35-7.27 (m, 4H, 4×CH ของ aromatic), 7.23 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, 3×CH ของ aromatic), 7.03 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.56 (s, 2H, 2×CH, ของ aromatic), 5.91 (s, 1H, CH), 3.71 (s, 6H, 2×NCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 144.4 (C ของ aromatic), 137.4 (2×C ของ aromatic), 128.7 (2×CH ของ aromatic), 128.2 (2×CH ของ aromatic), 127.4 (2×C ของ aromatic), 126.0 (CH ของ aromatic), 121.4 (2×CH ของ aromatic), 120.0 (2×CH ของ aromatic), 118.6 (2×CH ของ aromatic), 118.2 (2×C ของ aromatic), 109.0 (2×CH, 2×CH ของ aromatic), 40.1 (CH), 32.6 (2×NCH₃)

โครงสร้างของสารประกอบ 3l



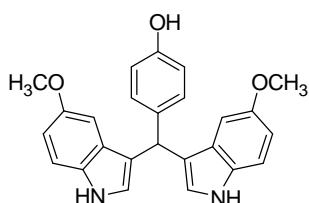
สารประกอบ **3l**: ของแข็งสีชมพู; $R_f = 0.23$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.42-7.33 (m, 4H, 4 \times CH ของ aromatic), 7.32-7.25 (m, 4H, 4 \times CH ของ aromatic), 7.23 (t, $J = 7.7$ Hz, 3H, 3 \times CH ของ aromatic), 7.02 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 6.56 (s, 2H, 2 \times CH, ของ aromatic), 5.91 (s, 1H, CH), 3.71 (s, 6H, 2 \times NCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO) : δ 155.8 (C ของ aromatic), 137.5 (2 \times C ของ aromatic), 135.5 (C ของ aromatic), 129.6 (2 \times CH ของ aromatic), 128.2 (2 \times C ของ aromatic), 127.5 (2 \times CH ของ aromatic), 121.4 (2 \times CH ของ aromatic), 119.8 (2 \times CH ของ aromatic), 118.7 (2 \times CH ของ aromatic), 118.5 (2 \times CH ของ aromatic), 115.3 (2 \times C ของ aromatic), 110.0 (2 \times CH, ของ aromatic), 39.1 (CH), 32.7 (2 \times NCH_3); IR (Film): \mathbf{V}_{max} 3400, 2929, 1612, 1509, 1471, 1370, 1328, 1227, 1155, 1118, 740 cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ **3m**



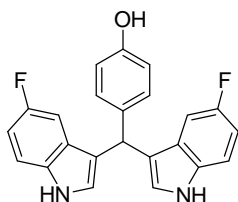
สารประกอบ **3m**: ของแข็งสีส้มเข้ม; $R_f = 0.24$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.85 (brs, 2H, 2 \times NH), 7.37 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 7.33-7.19 (m, 5H, 5 \times CH ของ aromatic), 6.88-6.79 (m, 3H, 3 \times CH ของ aromatic), 6.69 (sd, $J = 1.8$ Hz, 2H, 2 \times CH ของ aromatic), 5.79 (s, 1H, CH), 3.71 (s, 6H, 2 \times OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 153.7 (C ของ aromatic), 143.9 (C ของ aromatic), 131.8 (2 \times C ของ aromatic), 128.7 (2 \times CH ของ aromatic), 128.2 (2 \times CH ของ aromatic), 127.5 (2 \times C ของ aromatic), 126.1 (CH ของ aromatic), 124.4 (2 \times CH ของ aromatic), 119.3 (2 \times C ของ aromatic), 111.9 (2 \times CH ของ aromatic), 111.6 (2 \times CH ของ aromatic), 102.0 (2 \times CH ของ aromatic), 55.8 (2 \times OCH_3), 40.3 (CH)

โครงสร้างของสารประกอบ **3n**



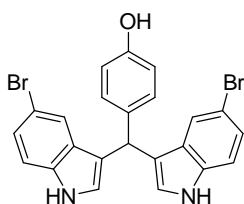
สารประกอบ **3n**: ของแข็งสีน้ำตาลแดง; $R_f = 0.17$ (3:7 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 7.84 (brs, 0.19H (H บางส่วนเกิดการ exchange กับ CD_3OD), NH), 7.73 (brs, 0.18H (H บางส่วนเกิดการ exchange กับ CD_3OD), NH) 7.21 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.76-6.71 (m, 6H, 6xCH ของ aromatic), 6.64 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 5.67 (s, 1H, CH), 3.61 (s, 6H, 2xOCH₃); IR (Film): ν_{max} 3410, 1582, 1509, 1483, 1209, 1170, 1092 cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ **3o**



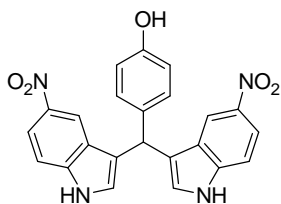
สารประกอบ **3o**: ของแข็งสีน้ำตาลแดง; $R_f = 0.08$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 7.89 (brs, 0.05H (H บางส่วนเกิดการ exchange กับ CD_3OD) 2xNH), 7.29 (dd, $J = 8.7, 4.4$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.14 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.89-6.80 (m, 4H, 4xCH ของ aromatic), 6.74 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.72 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 5.65 (s, 1H, CH); IR (Film): ν_{max} 3425, 1628, 1612, 1582, 1509, 1484, 1452, 1239, 1214, 1168, 1092, 801 cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ **3r**



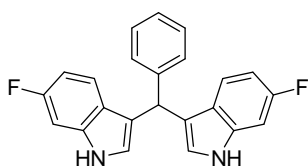
สารประกอบ **3r**: ของแข็งสีแดงเลือดหมู $R_f = 0.08$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 7.37 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.27 (brd, $J = 8.4$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.16-7.10 (m, 4H, 4xCH ของ aromatic), 6.75 (brd, $J = 6.3$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.67 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 5.65 (s, 1H, CH); IR (Film): ν_{max} 3426, 1698, 1611, 1509, 1456, 1319, 1214, 1169, 1095, 798 cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 3s



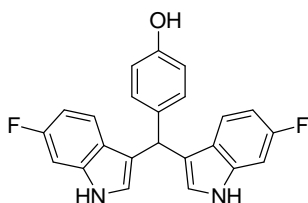
สารประกอบ 3s: ของแข็งสีส้ม $R_f = 0.30$ (5% MeOH ใน CH_2Cl_2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) : δ 9.29 (brs, 1H, OH)*, 8.30 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.98 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.54 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.18 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.10 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.72 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.06 (s, 1H, CH); IR (Film): ν_{max} 3370, 1735, 1509, 1471, 1327, 1093 cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 3t



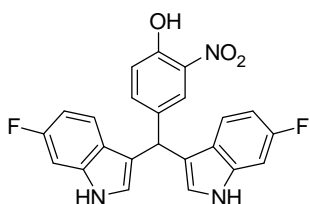
สารประกอบ 3t: ของแข็งสีแดงเข้ม $R_f = 0.30$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.90 (s, 2H, 2xNH), 7.37-7.24 (m, 8H, 8xCH ของ aromatic), 7.04 (dd, $J = 9.6, 2.4$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.79 (dt, $J = 9.2, 2.2$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.64 (d, $J = 1.2$ Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.62 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 5.85 (s, 1H, CH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 161.1 ($J = 236.0$ Hz, 2x $\text{C}_{1\text{C-F}}$ ของ aromatic), 158.8 (C ของ aromatic), 143.6 (2xC ของ aromatic), 136.6 ($J = 12.0$ Hz, 2x $\text{C}_{3\text{C-F}}$ ของ aromatic), 128.5 (2xCH ของ aromatic), 126.4 (CH ของ aromatic), 123.8 (2xCH ของ aromatic), 120.6 ($J = 18.0$ Hz, 2x $\text{C}_{2\text{C-F}}$ ของ aromatic), 108.1 (2xC ของ aromatic), 97.3 ($J = 32.0$ Hz, 2x $\text{C}_{2\text{C-F}}$ ของ aromatic), 40.3 (CH); IR (Film): ν_{max} 3426, 3053, 1625, 1454, 1405, 1337, 1301, 1085, 950, 754 cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 3u



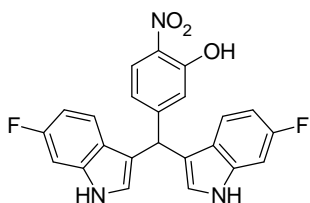
สารประกอบ **3u**: ของแข็งสีส้มแดง $R_f = 0.10$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) : δ 7.87 (brs, 0.19H (H บางส่วนเกิดการ exchange กับ CD_3OD) $2\times\text{NH}$), 7.19 (dd, $J = 8.6, 5.4$ Hz, 2H, $2\times\text{CH}$ ของ aromatic), 7.12 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $2\times\text{CH}$ ของ aromatic), 7.03 (d, $J = 10.0$ Hz, 2H, $2\times\text{CH}$ ของ aromatic), 6.72 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H, $2\times\text{CH}$ ของ aromatic), 6.66 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H, $2\times\text{CH}$ ของ aromatic), 6.61 (s, 2H, $2\times\text{CH}$ ของ aromatic), 5.70 (s, 1H, CH); IR (Film): ν_{max} 3422, 1626, 1509, 1455, 1342, 1138, 805 cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ **3v**



สารประกอบ **3v**: ของแข็งสีส้มเข้ม $R_f = 0.19$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 10.55 (s, 1H, OH), 8.04 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, $2\times\text{NH}$, CH ของ aromatic), 7.59 (dd, $J = 8.6, 1.8$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.28-7.23 (m, 2H, CH ของ aromatic), 7.12-7.06 (m, 3H, $3\times\text{CH}$ ของ aromatic), 6.82 (dt, $J = 9.2$ Hz, 2H, $2\times\text{CH}$ ของ aromatic), 6.67 (s, 2H, $2\times\text{CH}$ ของ aromatic), 5.83 (s, 1H, CH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 161.3 ($J = 237.0$ Hz, $2\times\text{C}_{1\text{C-F}}$ ของ aromatic), 158.9 (C ของ aromatic), 153.8 (C ของ aromatic), 138.1 ($2\times\text{C}$ ของ aromatic), 136.3 ($J = 12.2$ Hz, $\text{C}_{3\text{C-F}}$ ของ aromatic), 133.5 ($2\times\text{CH}$ ของ aromatic), 123.8 ($J = 39.4$ Hz, $2\times\text{C}_{2\text{C-F}}$ ของ aromatic), 122.9 (CH ของ aromatic), 120.1 ($2\times\text{CH}$ ของ aromatic), 97.8 ($J = 26.0$ Hz, $2\times\text{C}_{2\text{C-F}}$ ของ aromatic), 77.0 (CH); IR (Film): ν_{max} 3426, 3065, 1584, 1534, 1456, 1335, 1244, 1037, 952, 805, 733 cm^{-1}

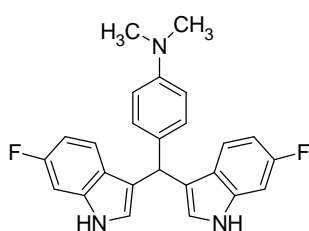
โครงสร้างของสารประกอบ **3w**



สารประกอบ **3w**: ของแข็งสีเหลืองทอง $R_f = 0.20$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 10.65 (s, 1H, OH), 8.06 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, $2\times\text{NH}$), 7.26 (dd, $J = 9.2$ Hz, 2H, $2\times\text{CH}$ ของ aromatic), 7.10-6.99 (m, 3H, $3\times\text{CH}$ ของ aromatic), 6.83 (dt, $J = 9.2$ Hz, 2H, $2\times\text{CH}$ ของ aromatic)

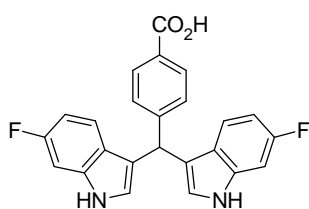
aromatic), 6.72 (s, 2H, 2×CH ของ aromatic), 5.84 (s, 1H, CH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 161.3 ($J = 237.0$ Hz, $2\times\text{C}_{1\text{C-F}}$ ของ aromatic), 158.9 (C ของ aromatic), 155.2 (C ของ aromatic), 136.6 ($J = 12.4$ Hz, $2\times\text{C}_{3\text{C-F}}$ ของ aromatic), 132.1 (C ของ aromatic), 125.1 (CH ของ aromatic), 132.1 ($J = 3.4$ Hz, $\text{C}_{3\text{C-F}}$ ของ aromatic), 123.8-123.1 (2×CH ของ aromatic), 121.1-119.4 (2×CH ของ aromatic), 117.5 (CH ของ aromatic), 109.4-108.4 (2×CH ของ aromatic), 97.6 (2×CH ของ aromatic), 77.3-76.7 ($J = 31.8$ Hz, $2\times\text{C}_{2\text{C-F}}$ ของ aromatic), 40.3 (CH); IR (Film): ν_{max} 3426, 1622, 1585, 1531, 1402, 1320, 1139, 950, 805, 733 cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 3x



สารประกอบ 3x: ของแข็งสีม่วงแดง $R_f = 0.12$ (1:4 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.93 (s, 2H, 2×NH), 7.31-7.28 (m, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.19 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.03 (dd, $J = 10.0, 2.0$ Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.80-6.65 (m, 6H, 6×CH ของ aromatic), 5.74 (s, 1H, CH), 2.94 (s, 6H, 2×CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 129.1 (2×C ของ aromatic), 123.6 ($J = 290.0$ Hz, $\text{C}_{1\text{C-F}}$ ของ aromatic), 120.7 ($J = 10.0$ Hz, $2\times\text{C}_{3\text{C-F}}$ ของ aromatic), 120.7 (2×CH ของ aromatic), 112.6 (C ของ aromatic), 108.0 ($J = 24.0$ Hz, $2\times\text{C}_{2\text{C-F}}$ ของ aromatic), 107.8 (2×CH ของ aromatic), 97.4 ($J = 26.0$ Hz, $2\times\text{C}_{2\text{C-F}}$ ของ aromatic), 97.1 (2×C ของ aromatic), 77.3-77.0 (4×CH ของ aromatic), 76.7 (CH ของ aromatic), 40.8 (2×CH₃); IR (Film): ν_{max} 3405, 1606, 1516, 1337, 1136, 803 cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 3y



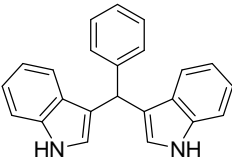
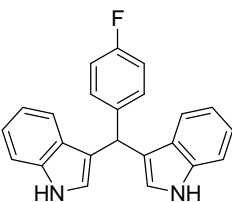
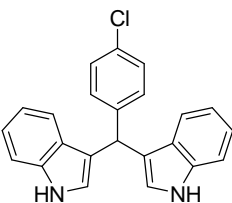
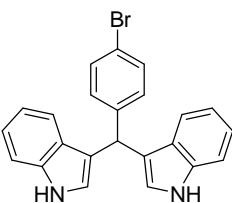
สารประกอบ 3y: ของเหลวหนืดสีแดงเข้ม $R_f = 0.06$ (3:2 EtOAc/hexane); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.07-8.03 (brm, 2H, 2×NH), 8.03 (s, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.43 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.28-7.24 (m, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.04 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H,

2×CH ของ aromatic), 6.79 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.63 (s, 2H, 2×CH, ของ aromatic), 5.89 (s, 1H, CH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 171.2 (C ของ COOH), 161.2 ($J = 236.5$ Hz, 2× $\text{C}_{1\text{C-F}}$ ของ aromatic), 158.8 (C ของ aromatic), 149.9 (2×C ของ aromatic), 130.4 (2×CH ของ aromatic), 128.8 (2×CH ของ aromatic), 123.8 (C ของ aromatic), 120.4 ($J = 10.0$ Hz, 2× $\text{C}_{3\text{C-F}}$ ของ aromatic), 108.1 ($J = 24.4$ Hz, 2× $\text{C}_{2\text{C-F}}$ ของ aromatic), 97.4 (2×C ของ aromatic), 77.0 ($J = 31.7$ Hz, 2× $\text{C}_{2\text{C-F}}$ ของ aromatic), 60.5 (2×CH ของ aromatic), 40.3 (CH_3); IR (Film): ν_{max} 3425, 2925, 1686, 1497, 1420, 1340, 1284, 1139, 951, 804, 729 cm^{-1}

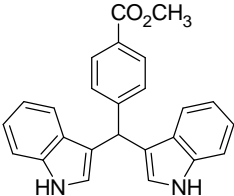
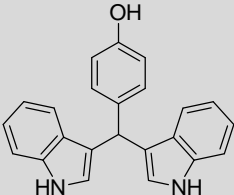
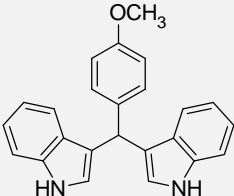
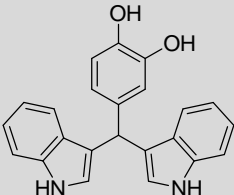
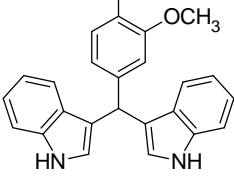
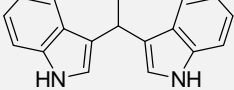
3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสังเคราะห์

เมื่อนำสารสังเคราะห์ จำนวน 25 ชนิด ที่สังเคราะห์ได้ มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นต่อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ด้วยวิธี disc diffusion ให้ผลดังตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของสารสังเคราะห์และยา gentamicin ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

ลำดับ	ชื่อสาร	โครงสร้าง	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (mm)	
			<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
1	3a		8	7
2	3b		8.5	8
3	3c		9	10
4	3d		8	11.5

ตารางที่ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของสารสังเคราะห์และยา gentamicin ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion (ต่อ)

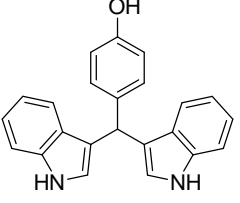
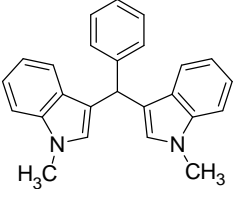
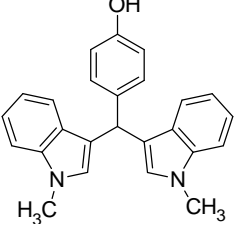
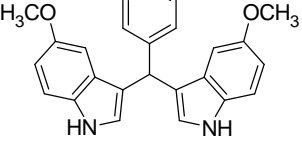
ลำดับ	ชื่อสาร	โครงสร้าง	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (mm)	
			<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
5	3e		7.5	13
6	3f		13	15
7	3g		8.5	7
8	3h		12	14
9	3i		6.5	11
10	3j		11	11

จากผลการทดลองในตารางที่ 4 ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ของโครงสร้างสารประกอบ 3,3'-bis(indolyl)methanes โดยโครงสร้างประกอบด้วย คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของวง Indole ที่ไม่มีหมู่แทนที่ 2 วง ต่ออยู่กับคาร์บอนอะตอมเดียวกัน และคาร์บอนอะตอมนี้ต่ออยู่กับวงอะโรมาติกเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ชนิดต่างๆ (สาร 3a-i) หรือต่อกับอะลิฟาติก ได้แก่ Isopropyl (สาร 3j) พบว่า สารประกอบ 3,3'-bis(indolyl)methanes (3a-j)

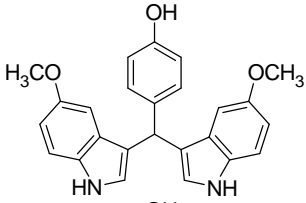
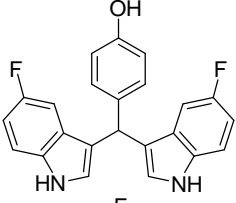
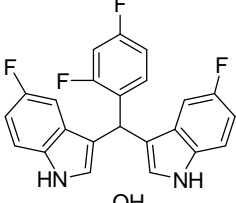
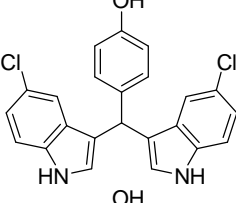
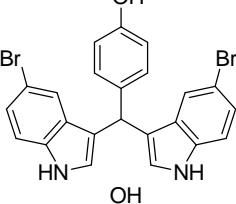
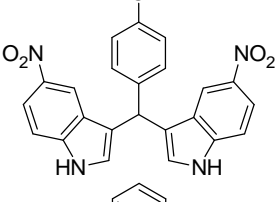
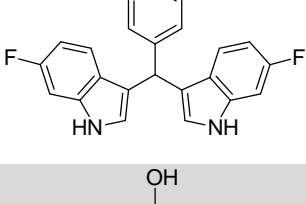
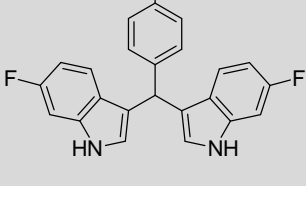
ทั้ง 10 ชนิด สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 2 ชนิดได้ดี โดยพบว่า สารที่มีหมู่ไฮดรอกซีต่ออยู่กับวงเบนซีนจะให้ฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า ดิสก์บรรจุ DMSO (20 ไมโครลิตร/ดิสก์) ซึ่งใช้เป็น negative control ไม่เกิด inhibition zone และพบว่าดิสก์ยา gentamicin (ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ดิสก์) ซึ่งใช้เป็น positive control มีขนาด inhibition zone ต่อแบคทีเรียทดสอบทุกชนิด อยู่ในช่วง 20.67-23.33 มิลลิเมตร

ในงานวิจัยต่อมา ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ของโครงสร้างสารประกอบ 3,3'-bis(indolyl)methanes โดยปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้วง Indole ทั้ง 2 วง ที่มีหมู่แทนที่ชนิดต่าง ๆ ที่ตำแหน่ง 1 5 และ 6 ของวง Indole ต่ออยู่กับคาร์บอนอะตอมเดียวกัน และคาร์บอนอะตอมนี้ต่ออยู่กับวงอะโรมาติกเบนซีนที่ไม่มีหมู่แทนที่หรือมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีหรือฟลูออรีน โดยเปรียบเทียบกับโครงสร้างสาร 3f ในตารางที่ 4 ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของสารสังเคราะห์และยา gentamicin ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

ลำดับ	ชื่อสาร	โครงสร้าง	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (mm)	
			<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
1	3f		13	15
2	3k		13	8
3	3l		7	NZ
4	3m		-	-

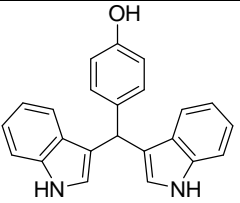
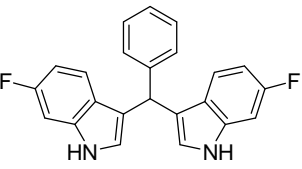
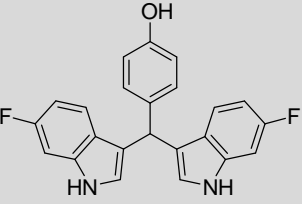
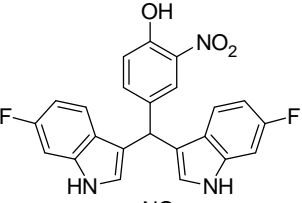
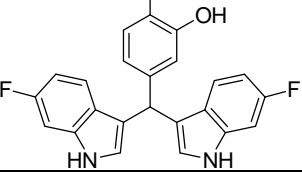
ตารางที่ 5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของสารสังเคราะห์และยา gentamicin ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อสาร	โครงสร้าง	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (mm)	
			<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
5	3n		13	14
6	3o		9	7
7	3p		11	8
8	3q		10.5	11
9	3r		10	9
10	3s		10	8
11	3t		10	12
12	3u		16	16

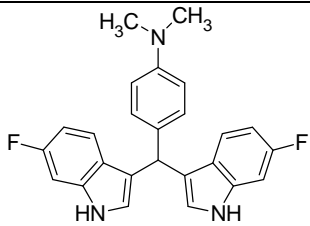
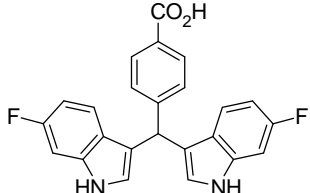
จากผลการทดลองในตารางที่ 5 พบว่า สาร 3,3'-bis(indolyl)arylmethane **3u** (ตารางที่ 6 ลำดับที่ 12) ซึ่งมีอะตอมฟลูออรีนเป็นหมู่แทนที่บนวง Indole ที่ตำแหน่งที่ 6 และมีหมู่ไฮดรอกซีต่ออยู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 4 ของวงเบนซีน มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* สูงกว่าสาร **3f** ซึ่งในโครงสร้างเป็นวง Indole ที่ไม่มีหมู่แทนที่ (ตารางที่ 6 ลำดับที่ 1)

ในงานวิจัยต่อไปจึงศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* โดยปรับปรุงโครงสร้างสาร 3,3'-bis(indolyl)arylmethane **3u** โดยเพิ่มหมู่แทนที่บนวงเบนซีนหรือเปลี่ยนชนิดของหมู่แทนที่บนวงเบนซีน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของสารสังเคราะห์และยา gentamicin ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

ลำดับ	ชื่อสาร	โครงสร้าง	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (mm)	
			<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
1	3f		13	15
2	3t		10	12
3	3u		16	16
4	3v		9.5	10
5	3w		12	11

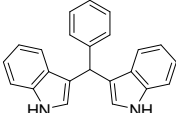
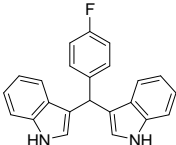
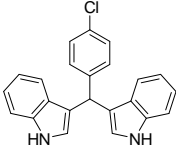
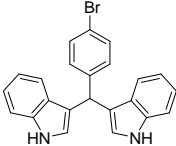
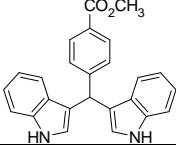
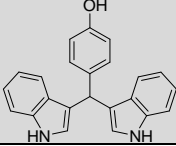
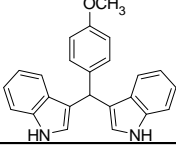
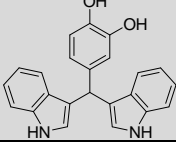
ตารางที่ 6 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของสารสังเคราะห์และยา gentamicin ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อสาร	โครงสร้าง	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (mm)	
			<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
6	3x		8	7
7	3y		7.5	7

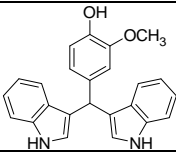
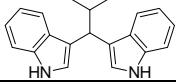
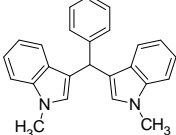
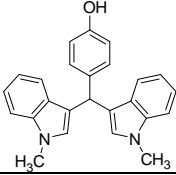
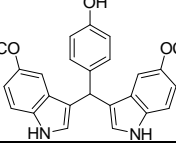
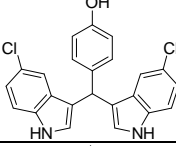
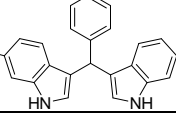
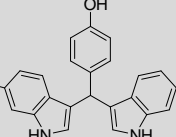
จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นต่อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* ด้วยวิธี disc diffusion ดังตารางที่ 6 พบว่าสารประกอบ 3,3'-bis(indolyl)methanes มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมทั้งสองชนิด โดยสาร 3u มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* ได้ดีที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone มีค่าเท่ากับ 16 มิลลิเมตร นอกจากนี้ในงานวิจัยยังพบว่า ดิสก์บรรจุ DMSO (20 ไมโครลิตร/ดิสก์) ซึ่งใช้เป็น negative control ไม่เกิด inhibition zone

ในการศึกษาต่อไปได้เลือกสารกลุ่ม 3,3'-bis(indolyl)methanes จำนวน 17 ชนิด ไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจำนวน 7 ชนิด โดยเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* TISTR 008 และ *B. cereus* TISTR 687 และเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 4 ชนิด ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. Enteritidis* ATCC 13076 และ *S. Typhimurium* ATCC ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7

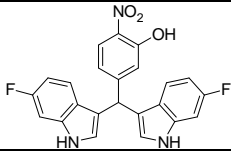
ตารางที่ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของสารสังเคราะห์และยา gentamicin ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

ชื่อสาร	โครงสร้าง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) (มิลลิเมตร) ผลของน้ำแข็ง						
		แบคทีเรียแกรมลบ				แบคทีเรียแกรมบวก		
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	<i>S. Typhimurium</i> ATCC	<i>B. cereus</i> TISTR 687	<i>B. subtilis</i> TISTR 008	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
3a		NZ	NZ	NZ	NZ	8.33±0.58	8.00±0.00	9.67±0.58
3b		NZ	NZ	NZ	NZ	10.67±0.58	9.67±0.58	9.67±0.58
3c		NZ	NZ	NZ	NZ	8.00±0.00	8.00±0.00	9.00±0.00
3d		NZ	NZ	NZ	NZ	7.67±0.58	8.00±0.00	9.00±0.00
3e		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3f		NZ	NZ	NZ	NZ	12.33±0.58	11.33±0.58	14.33±0.58
3g		NZ	NZ	NZ	NZ	7.12±0.58	7.00±0.00	7.67±0.58
3h		NZ	NZ	NZ	NZ	16.50 ± 0.58	15.00 ± 0.00	15.50 ± 0.58

ตารางที่ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของสารสังเคราะห์และยา gentamicin ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion (ต่อ)

ชื่อสาร	โครงสร้าง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) (มิลลิเมตร) ผลของน้ำแข็ง						
		แบคทีเรียแกรมลบ				แบคทีเรียแกรมบวก		
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	<i>S. Typhimurium</i> ATCC	<i>B. cereus</i> TISTR 687	<i>B. subtilis</i> TISTR 008	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
3i		NZ	NZ	NZ	NZ	8.33±0.58	7.00±0.00	10.00±0.00
3j		NZ	NZ	NZ	NZ	11.83±0.58	11.33±0.58	13.50±0.58
3k		NZ	NZ	NZ	NZ	9.33±0.58	11.00±1.00	8.33±0.58
3l		NZ	NZ	NZ	NZ	7.00±0.00	7.00±0.00	NZ
3n		NZ	NZ	NZ	NZ	12.00±0.00	11.00±0.00	9.50±0.58
3q		NZ	NZ	NZ	NZ	11.00±0.58	12.00±0.58	11.50±0.58
3t		NZ	NZ	NZ	NZ	8.67 ± 0.29	9.00 ± 0.00	10.17 ± 0.29
3u		NZ	NZ	NZ	NZ	15.00±0.00	16.33±0.58	16.33±0.58

ตารางที่ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของสารสังเคราะห์และยา gentamicin ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion (ต่อ)

ชื่อสาร	โครงสร้าง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) (มิลลิเมตร) ผลของน้ำแข็ง						
		แบคทีเรียแกรมลบ				แบคทีเรียแกรมบวก		
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	<i>S. Typhimurium</i> ATCC	<i>B. cereus</i> TISTR 687	<i>B. subtilis</i> TISTR 008	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
3w		NZ	NZ	NZ	NZ	11.00±0.00	10.00±0.00	9.00±0.00
	Gentamicin	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00	20.00±0.00	23.33±0.58	23.00±0.00	23.00±0.00
	DMSO	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

หมายเหตุ; NZ หมายถึง ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

NA หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

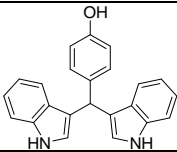
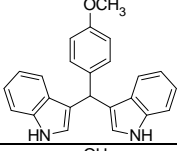
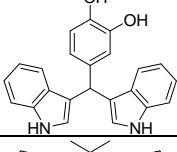
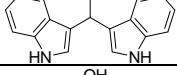
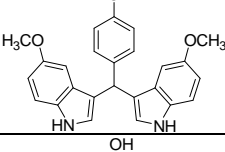
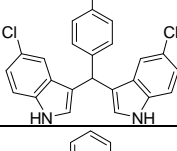
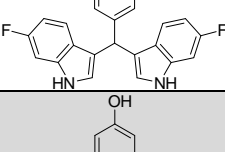
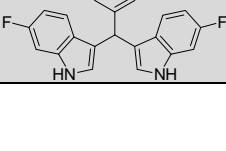
จากผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่า สารกลุ่ม 3,3'-bis(indolyl)methanes ทั้ง 17 ชนิด ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ทำการศึกษากันทั้ง 4 ชนิด แต่สามารถยับยั้ง แบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* TISTR 008 และ *B. cereus* TISTR 687 ได้ปานกลางถึงดี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของแบคทีเรียแกรมบวกทั้งสามชนิด มีค่าอยู่ระหว่าง 7.00-16.33 มิลลิเมตร โดยสาร 3u มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด

3.2 การหาค่า MIC และ MBC ของสารสังเคราะห์ต่อแบคทีเรีย

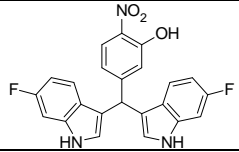
เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียของสารสังเคราะห์ ในงานวิจัยได้เลือกสาร 9 ชนิด ได้แก่ สาร 3f 3g 3h 3j 3n 3q 3t 3u และ 3w มาหาค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรียทดสอบ 7 ชนิด ให้ผลดังตารางที่ 8 และ 9 เมื่อพิจารณาค่า MIC พบว่าสารสังเคราะห์ทั้ง 9 ชนิดมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยสาร 3u มีประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียแกรมบวกสูงที่สุด ซึ่งมีค่า MIC ต่อ *S.aureus*, *B. subtilis* และ *B. cereus* เท่ากับ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือสาร 3j มีค่า MIC อยู่ในช่วง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ค่า MIC และ MBC ของยา gentamicin ซึ่งเป็น positive control แสดงดังตารางที่ 7 ซึ่งพบว่าค่า MIC ของยาต่อแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดอยู่ในช่วง 0.5-2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC ของยาต่อเชื้อทดสอบทุกชนิดอยู่ในช่วง 0.5-4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลการทดลองนี้ยังพบว่าค่า MIC ของยาต่อ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งนอกจากเป็นเชื้อทดสอบแล้วยังใช้เป็น quality control เท่ากับ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และยังพบว่าแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดสามารถเจริญได้ในหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่มี DMSO (growth control) ส่วนหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ไม่ได้เติมเชื้อทดสอบพบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบ (sterility control)

ตารางที่ 8 ค่า MIC และ MBC ของสารสังเคราะห์ และยา Gentamicin ต่อแบคทีเรียแกรมบวกทดสอบ ด้วยวิธี Broth microdilution

ชื่อสาร	โครงสร้าง	<i>B. cereus</i> TISTR 687		<i>B. subtilis</i> TISTR 008		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
		MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
3f		20	160	20	80	20	80
3g		20	80	20	80	20	160
3h		20	80	20	40	10	40
3j		10	40	10	40	10	80
3n		40	80	40	160	40	160
3q		40	80	80	160	20	80
3t		20	80	20	40	20	40
3u		5	80	5	40	5	40

ตารางที่ 8 ค่า MIC และ MBC ของสารสังเคราะห์ และยา Gentamicin ต่อแบคทีเรียแกรมบวกทดสอบด้วยวิธี Broth microdilution (ต่อ)

ชื่อสาร	โครงสร้าง	<i>B. cereus</i> TISTR 687		<i>B. subtilis</i> TISTR 008		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
		MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
3w		40	80	160	320	20	80
	Gentamicin	1	2	0.5	1	1	2

หมายเหตุ; - ความเข้มข้นสูงสุดของสารทดสอบที่ใช้ในการทดลองคือ 320 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ค่า MIC และ MBC ของสารทุกชนิดต่อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ >320

ตารางที่ 9 ค่า MIC และ MBC ของสารสังเคราะห์ และยา Gentamicin ต่อแบคทีเรียแกรมลบทดสอบด้วยวิธี Broth microdilution

ชื่อสาร	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076		<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
3f	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320
3g	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320
3h	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320
3j	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320
3n	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320
3q	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320
3t	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320
3u	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320
3w	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320	>320
Gentamicin	1	2	1	4	1	2	2	4

หมายเหตุ; - ความเข้มข้นสูงสุดของสารทดสอบที่ใช้ในการทดลองคือ 320 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ค่า MIC และ MBC ของสารทุกชนิดต่อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ >320

ตารางที่ 10 ค่า MIC และ MBC ของยา gentamicin ต่อแบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียทดสอบ	ค่า MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ค่า MBC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	2	4
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	1	2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1	4
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.5	1
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	1	2
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.25	0.5

หมายเหตุ : ค่าที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

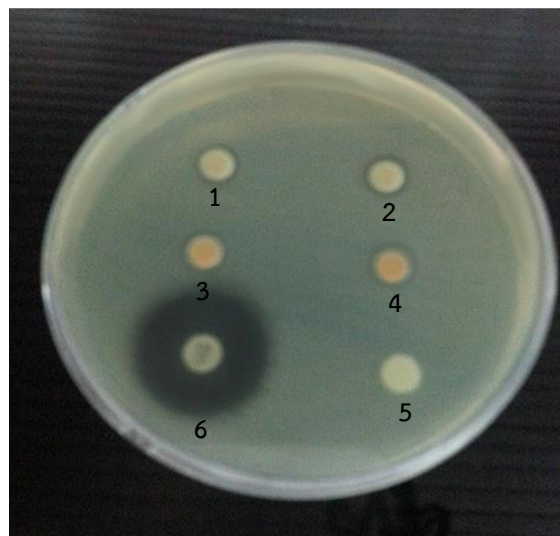
A



B



C



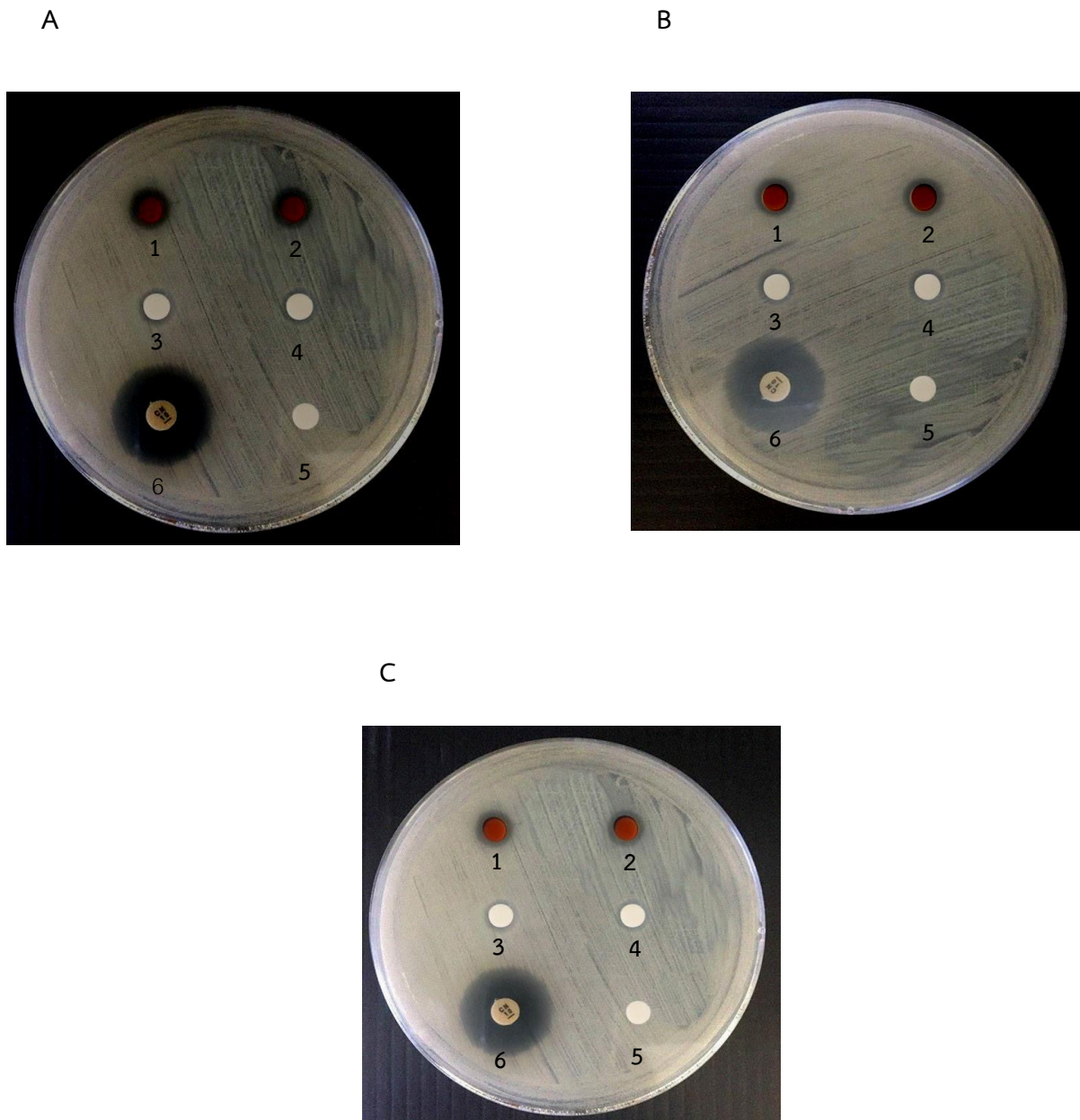
ภาพที่ 1 ลักษณะบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ของสาร NCH 113 และสาร 3q ในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 687 (A) *B. subtilis* TISTR 008 (B) *S. aureus* ATCC 25923 (C) ด้วยวิธี Disc diffusion

1 และ 2 : สาร NCH 113

3 และ 4 : สาร 3q

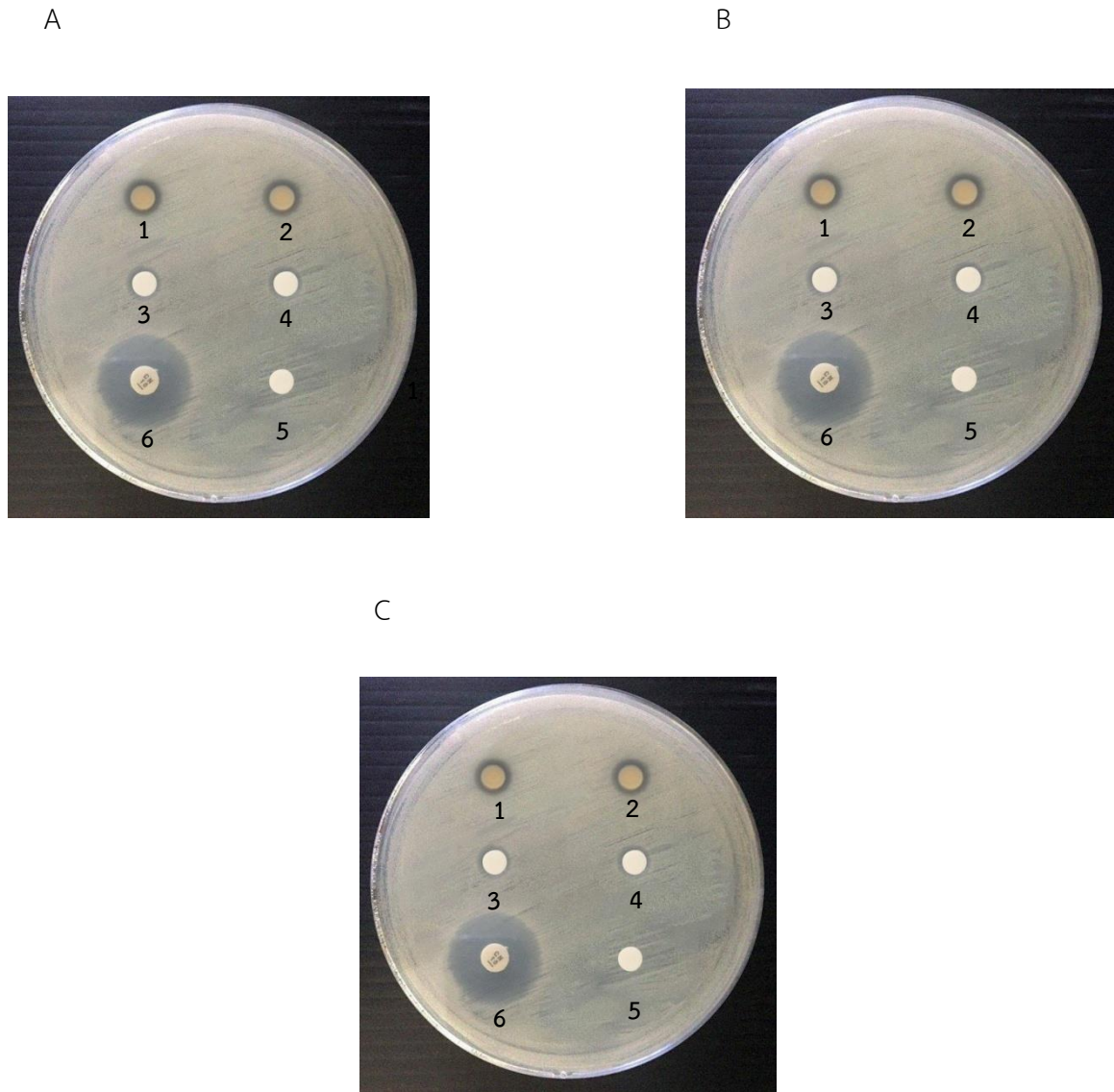
5 : DMSO (Negative control)

6 : ยา Gentamicin (Positive control)



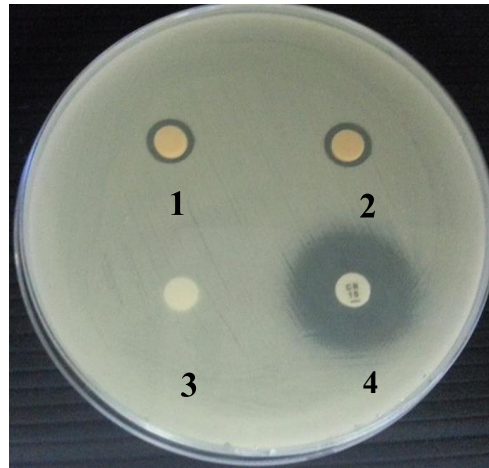
ภาพที่ 2 ลักษณะบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ของสาร NCH 113 และ OK81-2-1 ในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 687 (A) *B. subtilis* TISTR 008 (B) *S. aureus* ATCC 25923 (C) ด้วยวิธี Disc diffusion

- 1 และ 2 : สาร 3h
- 3 และ 4 : สาร NCH 117
- 5 : DMSO (Negative control)
- 6 : ยา Gentamicin (Positive control)



ภาพที่ 3 ลักษณะบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ของสาร NCH 113 และ OK81-2-1 ในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 687 (A) *B. subtilis* TISTR 008 (B) *S. aureus* ATCC 25923 (C) ด้วยวิธี Disc diffusion

- 1 และ 2 : สาร 3n
- 3 และ 4 : สาร 3w
- 5 : DMSO (Negative control)
- 6 : ยา Gentamicin (Positive control)



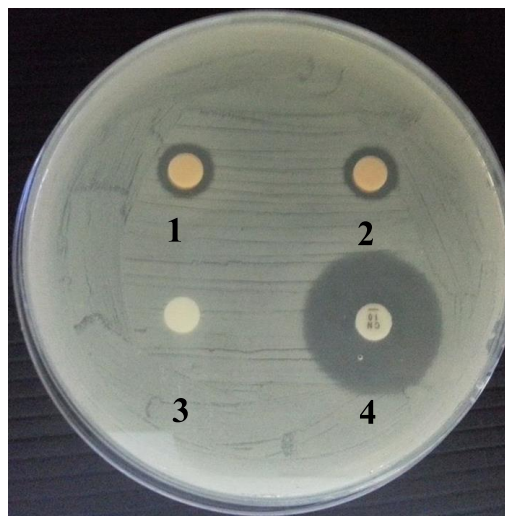
ภาพที่ 11 ลักษณะบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ของสารทดสอบในการยับยั้ง

S. aureus ATCC 25923 ด้วยวิธี Disc diffusion

1 และ 2 คือสาร 3,3'-(phenylmethylene)bis(6-fluoro-1H-indole) (3t)

3 คือ DMSO (Negative control)

4 คือยา Gentamicin (Positive control)



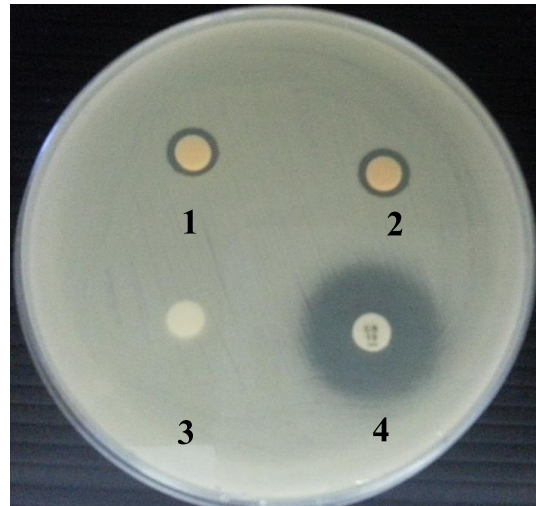
ภาพที่ 12 ลักษณะบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ของสารทดสอบในการยับยั้ง

B. subtilis TISTR 008 ด้วยวิธี Disc diffusion

1 และ 2 คือสาร 3,3'-(phenylmethylene)bis(6-fluoro-1H-indole) (3t)

3 คือ DMSO (Negative control)

4 คือยา Gentamicin (Positive control)



ภาพที่ 13 ลักษณะบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ของสารทดสอบในการยับยั้ง

B. cereus TISTR 687 ด้วยวิธี Disc diffusion

1 และ 2 คือสาร 3,3'-(phenylmethylene)bis(6-fluoro-1H-indole) (3t)

3 คือ DMSO (Negative control)

4 คือยา Gentamicin (Positive control)

จากผลการทดสอบ disc diffusion พบว่าสารทดสอบทั้ง 25 ชนิดสามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้ ปัจจัยที่อาจมีผลต่อขนาด inhibition zone ได้แก่ ชนิดของสารทดสอบ ความเข้มข้นของสารทดสอบ ปริมาณของเชื้อทดสอบ ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ และระยะเวลาการวางดิสก์ ผลการทดลองนี้พบว่าดิสก์ที่บรรจุ DMSO (negative control) ไม่เกิด inhibition zone แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบเป็นฤทธิ์ของสารสังเคราะห์ ไม่ใช่ฤทธิ์ของตัวทำละลาย ส่วนดิสก์ยา gentamicin (positive control) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบทั้งหมด ซึ่งยา gentamicin มีกลไกการออกฤทธิ์คือ จะไปยับยั้งการสร้างโปรตีน โดยจะไปจับกับ 30S ribosomal subunit ส่งผลให้กระบวนการ translation เสียไป (ศิริลักษณ์ อนันต์ณัฐศิริ และเพลินจันทร์ เซษจุไซตศักดิ์, 2549) ส่วนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของดิสก์ยา gentamicin 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ ต่อ *E.coli* ATCC 25922 ซึ่งใช้เป็น quality control ของระบบการทดสอบ พบว่ามีค่าเท่ากับ 20.67 ± 0.58 มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องตามมาตรฐาน CLSI (2012) ได้กำหนดขนาด inhibition zone ของยา gentamicin ต่อเชื้อดังกล่าวไว้อยู่ในช่วง 19-26 มิลลิเมตร ทำให้เห็นว่าการทดสอบในขั้นตอนนี้มีความน่าเชื่อถือ

การทดสอบ disc diffusion เป็นวิธีการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพเชิงคุณภาพ มีข้อจำกัดคือไม่ทราบระดับความไวและการต่อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียอย่างแท้จริง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองต่อโดยการทดสอบความไวด้วยการเจือจางสารในอาหารเหลว (broth dilution) ซึ่งเป็นการวัดค่าเชิงปริมาณ เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสังเคราะห์จากค่า MIC ต่อแบคทีเรียแกรมบวก 9 ชนิดพบว่าสาร 3U ประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อพิจารณาค่า MIC และค่า MBC ของสารทดสอบต่อ *B. cereus*, *B. subtilis* และ *S. aureus* พบว่ามีค่าต่างกันเกิน 4 เท่า แสดงว่าสารต้านจุลินทรีย์มีฤทธิ์แบบยับยั้ง (bacteriostatic) (Pankey & Sabath, 2004) ซึ่งถ้าหากค่า MIC และ MBC เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน (ค่า MBC/MIC เท่ากับ 1-2) แสดงว่าสารทดสอบมีฤทธิ์แบบฆ่า (bactericidal) แต่ถ้ามีค่า MIC และ MBC แตกต่างกันไม่เกิน 4 เท่า แสดงว่าสารต้านจุลินทรีย์มีฤทธิ์แบบทำลาย (Pankey & Sabath, 2004) เมื่อพิจารณาค่า MIC และผลการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion จะเห็นว่าสารทดสอบมีแนวโน้มสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Daly *et al.* (2011) โดยพบว่าสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของ 3,3'-bis(indolyl)methanes ยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกที่นำมาทดสอบ ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุมาจากลักษณะของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะประกอบด้วยชั้นของ peptidoglycan อย่างเดียว ส่วนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ มีชั้น outer membrane ล้อมรอบชั้นของ peptidoglycan ซึ่งชั้น outer membrane ทำหน้าที่คัดเลือกสารผ่านเข้าไปภายในเซลล์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2553) ทำให้สารผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นความแตกต่างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ จึงน่าจะส่งผลต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารทดสอบ อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่าอนุพันธ์ของสาร pyrazolo-pyrazole ซึ่งมี indole เป็นส่วนประกอบ (Rao, Reddy & Sreeramulu, 2011) อนุพันธ์ของสาร chromeno[4,3-b]pyrroles, indolizino[6,7-b]indoles (Arumugam, Raghunathan, Almansour & Karama, 2012) และสาร Diethyl 3,5-

dimethyl-1H-pyrrole-2,4-dicarb-oxylate (Idhayadhulla *et al.*, 2012) และอนุพันธ์ของสาร trifluoromethyl-substituted hexahydropyrimidine มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Zohdi, Reteb & Elnagdy, 2011) แสดงว่าสารดังกล่าวออกฤทธิ์กว้างในการยับยั้งจุลินทรีย์ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของโครงสร้างและคุณสมบัติของสารแต่ละชนิด

จากผลการหาค่า MIC ของยา gentamicin ต่อ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งใช้เป็น quality control ของการทดลองนี้ พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับค่ามาตรฐานของ CLSI (2012) ได้ระบุว่าค่า MIC ต่อ *E. coli* ATCC 25922 อยู่ในช่วง 0.25-1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงว่าผลการหาค่า MIC ของการทดลองนี้มีความน่าเชื่อถือ

จากผลการศึกษาพบว่าสารสังเคราะห์ที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ชนิดใหม่ดังกล่าว ดังนั้นควรจะมีการศึกษาในอนาคตเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำสารเคมิดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร และทางด้านการแพทย์ต่อไปในอนาคตได้

บทที่ 4

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์สารประกอบ 3,3'-bis(indoyl)methanes 25 ชนิด จากปฏิกิริยา Fridel-Crafts ของสารประกอบ indole กับ aldehyde ชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มี $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 15 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในตัวทำละลาย methanol acetonitrile หรือ nitromethane ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งวิธีการสังเคราะห์เป็นวิธีการที่ง่ายและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม จากนั้นนำสารที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียเบื้องต้น ต่อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารประกอบ ทั้ง 25 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ปานกลางถึงสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone มีค่าเท่ากับ 7-16 mm โดยสาร 4-(bis(6-fluoro-1H-indol-3-yl)methyl)phenol **3u** ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีอนุพันธ์ของวง 6-fluoroindole 2 วง และวง 4-hydroxyphenyl ต่ออยู่บน methane carbon ตำแหน่งเดียวกัน มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone มีค่าเท่ากับ 16 mm

จากนั้นได้เลือกสารกลุ่ม 3,3'-bis(indoyl)methanes จำนวน 17 ชนิด ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคผ่านทางอาหารและทำให้อาหารเน่าเสียบางชนิด จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ด้วยวิธี disc diffusion พบว่า สารสังเคราะห์ทั้ง 17 ชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยมีขนาดของ inhibition zone อยู่ในช่วง 7.00 ± 0.00 - 16.33 ± 0.58 มิลลิเมตร แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารสังเคราะห์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 4 ชนิด ที่นำมาทดสอบได้ ส่วนขนาด inhibition zone ของยา gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ ต่อเชื้อทดสอบทุกชนิดอยู่ในช่วง 20.67 ± 0.58 - 23.33 ± 0.58 มิลลิเมตร จากนั้นได้เลือกสารสังเคราะห์จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ สาร **3f 3g 3h 3j 3n 3q 3t 3u** และ **3w** มาหาค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรียทดสอบ 7 ชนิด เมื่อพิจารณาค่า MIC พบว่าสารสังเคราะห์ทั้ง 9 ชนิดมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยสาร 4-(bis(6-fluoro-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3u**) มีประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียแกรมบวกสูงที่สุด ซึ่งมีค่า MIC ต่อ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *B. cereus* เท่ากับ 5 ไมโครกรัม/มิลลิตร รองลงมาคือสาร 3,3'-(2-methylpropane-1,1-diyl)bis(1H-indole) (**3j**) มีค่า MIC อยู่ในช่วง 10 ไมโครกรัม/มิลลิตร เมื่อพิจารณาค่า MIC และค่า MBC ของสารทดสอบต่อ *B. cereus*, *B. subtilis* และ *S. aureus* พบว่ามีค่าต่างกันเกิน 4 เท่า แสดงว่าสารต้านจุลินทรีย์มีฤทธิ์แบบยับยั้ง (bacteriostatic) (Pankey & Sabath,

2004) ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าสารสังเคราะห์ทั้ง 9 ชนิด ตี้อต่อสารทดสอบมากที่สุด ค่า MIC และ MBC ของยา gentamicin ต่อเชื้อทดสอบอยู่ในช่วง 0.25-2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 0.5-4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ การทำวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

งานวิจัยที่เสร็จแล้วข้ากว่ากำหนดเวลามีปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ 1 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ ส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้มีความล่าช้าในการจัดส่ง ประการที่ 2 คือ เครื่องมือ Nuclear Magnetic Spectrometry (NMR) ที่ใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาและหาโครงสร้างสารของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มีช่วงเวลาที่ใช้งานไม่ได้และต้องปิดซ่อมแซมหรือเติมแก๊สไนโตรเจนหรือฮีเลียมเป็นบางครั้ง

ในการทำวิจัยในปีที่ 1 (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558) สามารถสังเคราะห์สาร 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ชนิดต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ภายใต้สภาวะการทดลองที่ไม่รุนแรงและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และเมื่อนำสารสังเคราะห์ไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคผ่านทางอาหารและทำให้อาหารเน่าเสียบางชนิด จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสังเคราะห์กลุ่ม 3-substituted indole สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีกว่าสารสังเคราะห์กลุ่ม 2-substituted pyrrole โดยสาร Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**) มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุดโดยมีขนาดของ inhibition zone อยู่ประมาณ 11.16 ± 0.4 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตาม ในปีที่ 2 (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559) ได้ดำเนินการปรับปรุงโครงสร้างสารโดยสังเคราะห์สารกลุ่ม 3,3'-bis(indolyl)methanes จำนวน 25 ชนิด โดยประกอบด้วยวงฟีนอลในโครงสร้าง เนื่องจากการศึกษาในปีที่ 1 พบว่า สารกลุ่ม 1,1-di(3-indolyl)arylmethanes ที่มีวงฟีนอลจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี พบว่า สารสังเคราะห์ทั้ง 25 ชนิด มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยสาร 4-(bis(6-fluoro-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**3u**) มีประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียแกรมบวกสูงที่สุด ซึ่งมีค่า MIC ต่อ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *B. cereus* เท่ากับ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือสาร 3,3'-(2-methylpropane-1,1-diyl)bis(1H-indole) (**3j**) มีค่า MIC อยู่ในช่วง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อพิจารณาค่า MIC และค่า MBC ของสารทดสอบต่อ *B. cereus*, *B. subtilis* และ *S. aureus* พบว่ามีค่าต่างกันเกิน 4 เท่า แสดงว่าสารต้านจุลินทรีย์มีฤทธิ์แบบยับยั้ง (bacteriostatic) (Pankey & Sabath, 2004) ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าสารสังเคราะห์ตี้อต่อสารทดสอบมากที่สุด ข้อมูลจากงานวิจัยนี้มีประโยชน์เพื่อปรับปรุงพัฒนาหาสารสังเคราะห์ที่สามารถมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้สูงขึ้น และเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำสารเคมีดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร และทางด้านการแพทย์ต่อไปในอนาคตได้

บรรณานุกรม

- ภัทรชัย กীরตสิน. (2549). *ตำราวิทยาทางการแพทย์*. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.
- Bandgar, B. P., Shaikh, K. A. (2003) Molecular iodine-catalyzed efficient and highly rapid synthesis of bis(indolyl)methanes under mild conditions. *Tetrahedron Lett.* 44, 1959-1961.
- Bharate, S. B., Bharate, J. B., Khan, S. I., Tekwani, B. L., Jacob, M. R., et.al. (2013) Discovery of 3,30-diindolylmethanes as potent antileishmanial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* 63, 435-443.
- Burns, D. H.; Smith. K. M. (1990) meso-Substituted dipyrromethanes from vinylogous aromatic Heterocycles and their utilization to the synthesis of meso-functionalized porphyrins. *J. Chem. Res. (S)* 178-179.
- Chikvaidze, I. Sh., Megrelishvili, N. Sh., Samsoniya, Sh. A., Suvorov, N. N., Gus'kova, T. A., Radkevich, T. P. and Baklanova, O. V. (1998) New indole derivatives: synthesis and antibacterial activity. *Pharm. Chem. J.* 32, 29-32.
- Deutsches Institute fur Normung. (2000). Medical microbiology; susceptibility testing of pathogens. Part 8: Microdilution-general method specific requirements. Tentative Guideline DIN 58940-8. Berlin, Germany.
- Kaushik, N. K., Kaushik, N., Attri, P., 1, Kumar, N., Kim, C. H., Verma, A. K., Choi, E. H. (2013) Biomedical Importance of Indoles. *Molecules* 18, 6620-6662.
- Podder, S., Choudhury, J., Roy, U. K., Roy, S. (2007) Dual-reagent catalysis within Ir-Sn domain: Highly selective alkylation of arenes and heteroarenes with aromatic aldehydes. *J. Org. Chem.* 72, 3100-3103.
- Rao, R. M., Reddy, G. N. Sreeramulu, J. (2011) Synthesis of some new pyrazolo-pyrazole derivatives containing indoles with antimicrobial activity. *Der Pharm. Chem.* 3, 301-309.
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., Howard-Jones, A. R. (2006) Biological formation of pyrroles: Nature's logic and enzymatic machinery. *Nat. Prod. Rep.* 23, 517-531.

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Output / Outcome)

1. Onnicha Khaikate, Chayamon Chantana, Umaporn Thathaisong and Jaray Jaratjaroonphong. Green synthesis and anti-bacterial activity of some novel 3,3'-bis(indolyl)arylmethanes. (Manuscript in preparation).
2. Nuttiya Jintana, Chayamon Chantana, Umaporn Thathaisong and Jaray Jaratjaroonphong. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ catalyzed-triple arylation of alkyl orthoformate: the facile synthesis and anti-bacterial activity of some novel symmetrical tris(aryl)- and tris(heteroaryl)methanes. (Manuscript in preparation).
3. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ ระดับปริญญาโท 2 คน สาขาเคมี คือ นางสาวสุรีย์พร เรืองแสงทองกุล และ นางสาวชฎามน จันทนา และระดับปริญญาตรี สาขาเคมี จำนวน 7 คน คือ นางสาวนัตติยา จินตนา นางสาวประภาพร บุญเพ็ง นางสาวอรณิชา ไช้เกษ นางสาวชุติมา บัณฑิต นางสาวพรพรรณ แยมทรัพย์นางสาวณัชวัลย์ สวัสดิ์อักษรชื่น และนางสาวนิศาชล จันทร์ครุฑ

รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก)...2559A10802053.....สัญญาเลขที่...99/2559.....

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารกลุ่ม 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole

(ภาษาอังกฤษ) Synthesis and anti-bacterial activity of 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole derivatives

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร. จเร จรวัสจรรณพพงศ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึงวันที่ 6 กันยายน พ.ศ. 2560

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 11 เดือน

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50 %) 440,000 บาท เมื่อวันที่ 18 มกราคม พ.ศ. 2559

งวดที่ 2 (40 %) 352,000 บาท เมื่อวันที่ 5 กันยายน พ.ศ. 2558

งวดที่ 3 (10 %) 88,000 บาท เมื่อวันที่

รวม 880,000 บาท

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณ ที่ตั้งไว้	งบประมาณ ที่ใช้จริง	จำนวนเงิน คงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	79,000 บาท	79,000 บาท	- บาท
2. ค่าจ้าง	143,500 บาท	143,500 บาท	- บาท
3. ค่าวัสดุ	494,500 บาท	494,500 บาท	- บาท
4. ค่าใช้สอย	75,000 บาท	75,000 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