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 จรัสจรูญพงศ์

และ

ผศ.ดร. อุมาพร ทาไธสง

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง “การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารกลุ่ม 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole”

รหัสโครงการ 2558A10802342
สัญญาเลขที่ 81/2558

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

โดย

ผศ.ดร. จเร จรัสจรูญพงศ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ.ดร. อุมาพร ทาไธสง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน 2559

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการสังเคราะห์สารประกอบ 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ชนิดต่างๆ จากปฏิกิริยา 4 ชนิด ได้แก่ 1) ปฏิกิริยา Fridel-Crafts ของสารประกอบ indole หรือ pyrole กับ methyl orthoformate ภายใต้สภาวะที่มี Bi(OTf)$_3$ 10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 2) ปฏิกิริยา Friedel-Crafts ของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ สารประกอบ indole aldehyde และ *N*,*N*-dimethylaniline ภายใต้สภาวะที่มี Bi(OTf)$_3$ 10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 3) ปฏิกิริยา Friedel-Crafts ของ benzyl[(5-methyl-furan-2-yl)-(4-nitrophenyl)methyl]carbamate กับอนุพันธ์ indole และ pyrrole ชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีไอโอดีน 10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และ 4) ปฏิกิริยา Friedel-Crafts ของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ indole 2-methylfuran และ methyl orthofromate ภายใต้สภาะวะที่มี Bi(OTf)$_3$ 10 mol% โดยได้สารผลิตภัณฑ์กลุ่ม 3-substituted indole 17 ชนิด และอนุพันธ์ของ 2-substituted pyrrole 4 ชนิด จากนั้นนำสารสังเคราะห์ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียเบื้องต้นและจากผลการทดสอบได้เลือกสารสังเครระห์จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Tris-[1H-indol-3-yl] methane (**3a**), Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**) Tris-[5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl] methane (**3f**) และ 3,3´-((5-methyl furan-2-yl) methylene) bis(1H-indole) (**9a**) 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 4 ชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยมีขนาดของ inhibition zone อยู่ในช่วง 7.33±0-11.16 ± 0.4 มิลลิเมตร โดยสาร tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**) มีฤทธิ์ในการยั้บยั้งสูงที่สุด อย่างไรก็ตามพบว่าสารสังเคราะห์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 4 ชนิด

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

ABSTRACT

The aim of this research is the synthesis of 3-substituted indole and 2-substituted pyrrole derivatives from four reactions i.e. 1) Fridel-Crafts reaction of indole or pyrole with methyl orthoformate using Bi(OTf)$_3$ 10 mol% as catalyst 2) three-component Friedel-Crafts reacton of indole aldehyde and *N*,*N*-dimethylaniline using Bi(OTf)$_3$ 10 mol% as catalyst 3) Friedel-Crafts reaction of benzyl[(5-methyl-furan-2-yl)-(4-nitrophenyl)methyl]carbamate with indole and pyrrole derivative using I_2 10 mol% as catalyst and 4) three-component Friedel-Crafts reaction of indole 2-methylfuran and methyl orthofromate using Bi(OTf)$_3$ 10 mol% as catalyst, leading to seventeen 3-substituted indoles and four 2-substituted pyrroles. Then, the synthesized compounds were tested the antibacterial activity. From the results, the four synthesized compound such as tris-[1H-indol-3-yl] methane (**3a**), tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**) tris-[5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl] methane (**3f**) and 3,3´-((5-methyl furan-2-yl) methylene) bis(1H-indole) (**9a**) 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 7.33±0 to 11.16± 0.4 mm. Among all synthesized compounds, the tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**) 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. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 81/2558

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ สุดท้ายขอขอบคุณ นางสาวสุริษา ถึงปัญญา นางสาวสุรีย์พร เรืองแสงทองกุล นางสาวนัตติยา จินตนา นางสาวประภาพร บุญเพ็ง นางสาวอรณิชา ไข่เกษ นางสาวชญามน จันทนา นางสาวนันท์นภัส ชุมศรี นางสาวกรรณิการ์ ละอองทอง นางสาวชุติมา บัณฑิต นางสาวพรพรรณ แย้มทรัพย์และนางสาวณัชวลัญช์ สวัสดิ์อักษรชื่น สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญ

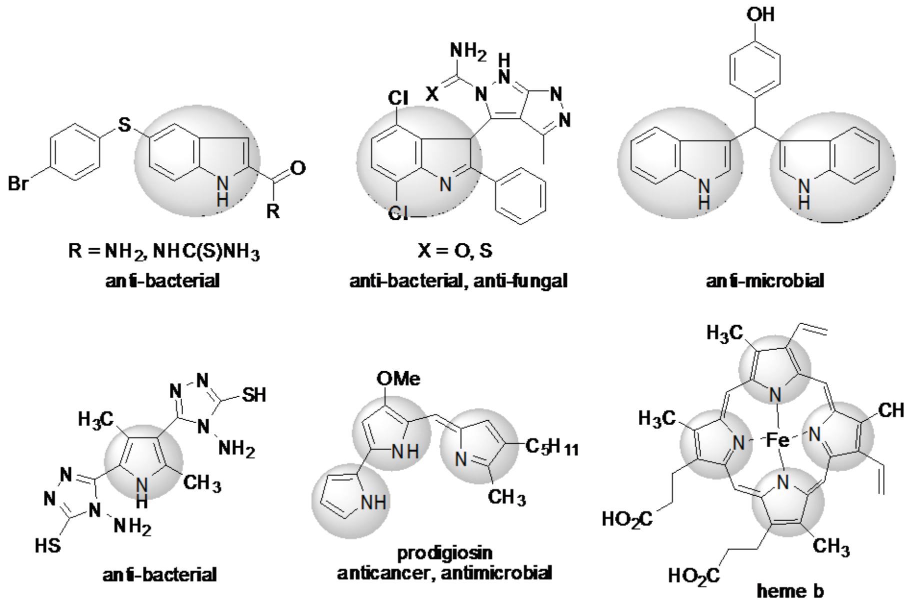
	หน้า
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
กิตติกรรมประกาศ	3
บทที่ 1 บทนำ	5
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	5
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	7
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	8
1.5 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	9
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	17
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	19
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	26
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	58
บรรณานุกรม	61
ผลผลิตของโครงการวิจัย (Output)	62

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 แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยมีกลิ่นแรงส่งผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของอาหารจึงมีข้อจำกัดในการทำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอาหาร นอกจากนี้มีนักวิจัยจำนวนมากสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารชนิดใหม่ๆ ซึ่งไม่มีกลิ่น สำหรับใช้ในการถนอมอาหาร และนำมาใช้กับอาหารได้หลายหลาย เช่น Lauroyl arginate ethyl ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว และ Allyl isothiocyanate เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารชนิดใหม่ๆ ต่อแบคทีเรียก่อโรคผ่านทางอาหารและหรือทำให้อาหารเน่าเสีย จึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ควบคุมจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารและยืดอายุการเก็บรักษา

เมื่อเร็วๆนี้ได้มีรายงานในวารสารทางวิทยาศาสตร์เป็นจำนวนมากพบว่าสารในกลุ่ม 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-micorbial สาร prodigiosin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ 2-substituted pyrrole แยกได้จากแบคทีเรีย Steptomyces 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 ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่มักปนเปื้อนในอาหารและทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* สำหรับใช้ในการถนอมอาหาร และนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ นอกจากนี้ยังสามาถนำสารกลุ่มนี้ไปใช้เป็นยาในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้อีกด้วย

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 ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด
4) หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารกลุ่ม 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ที่สามารถยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory concentration, MIC) และความเข้นข้นต่ำสุดที่สามารถทำลาย (Minimal bactericidal concentration, MBC) เชื้อได้
5) เพื่อผลิตและตีพิมพ์ผลงานวิจัยร่วมกับนิสิตและอาจารย์ในวารสารนานาชาติที่เป็นที่ยอมรับ อีกทั้งยังเป็นการสร้างองค์ความรู้ด้านการทำงานวิจัยให้แก่นิสิต

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 ไตรเมทธิลออร์โธฟอร์เมต เบนซิลอัลกอฮอล์ เป็นต้น

2) วิเคราะห์ พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี

วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิก High Resolution Mass Spectroscopy (HRMS) วิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิก Infrared Spectroscopy (IR) พิสูจน์เอกลักษณ์และยืนยันโครงสร้างสารด้วยเทคนิก Nuclear Magnetic Resonance Specgtroscopy (NMR) ทั้ง ^{1}H-NMR และ ^{13}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 aeroginosa* 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 มาเป็นโครงสร้างหลักเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุด

5) การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารกลุ่ม 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ที่สามารถยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory concentration, MIC) และความเข้นข้นต่ำสุดที่สามารถทำลาย (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 (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537) การทดสอบความไวนั้นมีวิธีการหลัก 2 ประการคือ Dilution method และ Diffusion method

Dilution method (ภัทรชัย กีรติสิน, 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 เป็นการทดสอบโดยใช้อาหารวุ้น เป็นการทดสอบโดยการผสมกันระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น agar medium กับยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบในอัตราส่วน 1 ต่อ 19 (ยา ต่อ agar medium) ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ การทดสอบโดยใช้อาหารวุ้นเป็นการทดสอบที่ให้ผลมาตรฐานเชื่อถือได้ และสามารถใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดได้พร้อมกัน แต่โดยทั่วไปไม่นิยมทำเนื่องจากมีความยุ่งยากและเสียเวลามากในการเตรียมอาหารวุ้นที่ผสมยาในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยเฉพาะหากต้องการทดสอบกับยาหลายชนิด ปัจจุบันจึงนิยมใช้การทดสอบด้วยวิธี broth dilution method มากกว่า

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

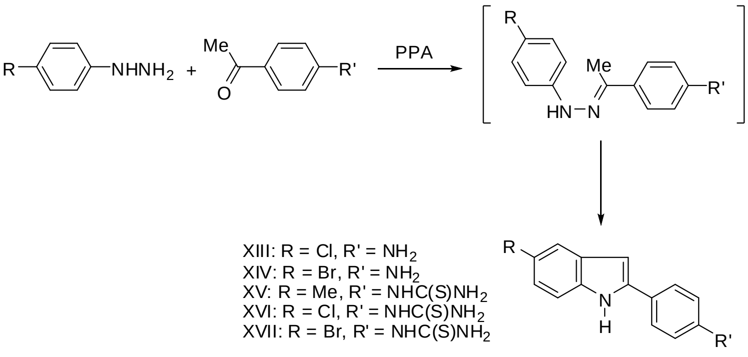
บริเวณอาหารวุ้นที่อยู่รอบแผ่นกระดาษกรองจะมีความเข้มข้นของยาสูง และลดลงตามลำดับในบริเวณที่อยู่ห่างออกไป ในการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion test จะแสดงถึงความสัมพันธ์ของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone รอบๆ disc ยาต้านจุลชีพ ซึ่งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone จะเป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ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

การใช้ยาสมุนไพรเป็นที่รู้จักกันดีว่ามีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลชีพ ซึ่งมีประโยชน์ในการใช้เป็นยารักษาโรคหรือเป็นสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาสมุนไพรต้องใช้ความชำนาญ และสูตรยาเฉพาะตัวของหมอพื้นบ้าน ทำให้ไม่เกิดความสะดวก ไม่แพร่หลาย อีกทั้งไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รองรับว่าสูตรยานั้นจะมีประสิทธิภาพจริงและไม่อันตรายต่อสุขภาพ เนื่องจากในสมุนไพรนั้นประกอบด้วยสารเป็นพันๆชนิด ที่ไม่ได้เกี่ยวกับการรักษาและอาจทำให้เกิดอาการข้างเคียงขึ้นได้ นอกจากนี้อาจจะต้องใช้สมุนไพรเป็นจำนวนมากในการรักษาโรคซึ่งอาจจะมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการรักษา และไม่สะดวกในการพัฒนาเป็นยาหรือใช้เป็นวัตถุดิบต้านเชื้อจุลชีพในอุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นการวิจัยเพื่อสังเคราะห์สารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพที่ดีชนิดใหม่และไม่มีผลข้างเคียงจึงมีความจำเป็น

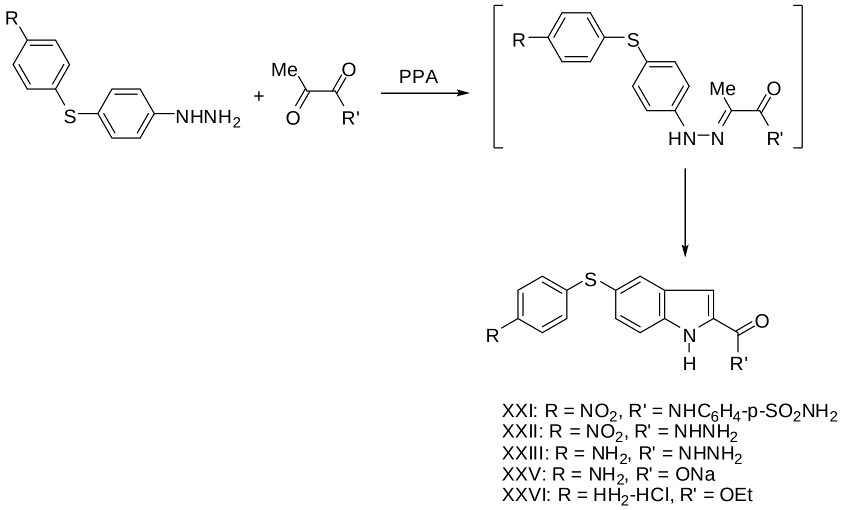
1.5 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

ปัจจุบันพบความถี่ของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสาเหตุหนึ่งมาจากการบริโภคอาหารที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหาร ดังนั้นอุตสาหกรรมอาหารจึงได้พยายามปรับปรุงผลิตภัณฑ์อาหารให้มีความปลอดภัยทางด้านจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียต่างๆ โดยมีการพัฒนาสารเคมีใหม่ๆ เพื่อกำจัดหรือลดจำนวนเชื้อก่อโรคและ/หรือทำให้อาหารเน่าเสีย นอกจากสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ค้นพบจะมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมแล้ว 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



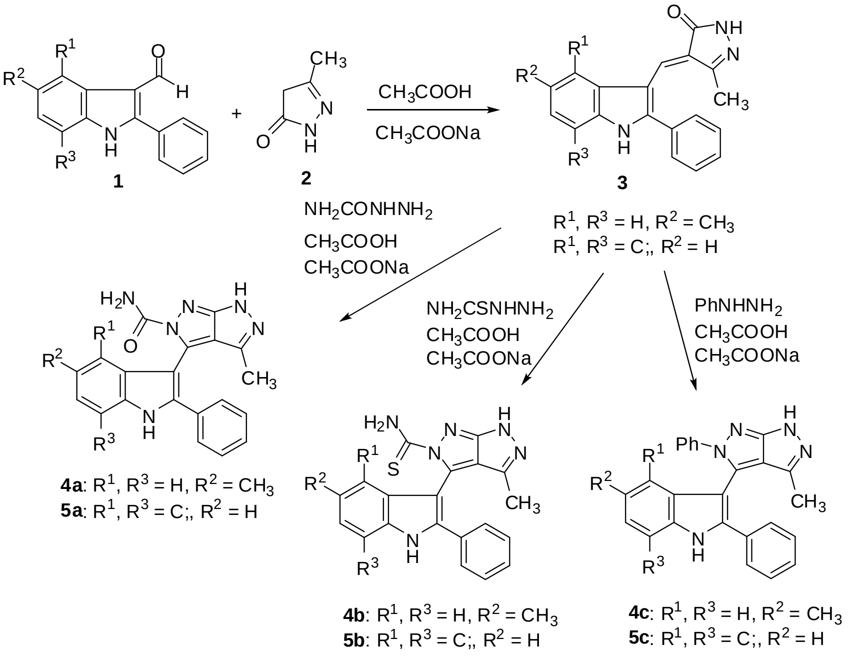
รูปที่ 3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 2,5-disubstituted indole

เมื่อนำสาร 2,5-disubstituted indole **XIII-XVII** ไปทดสอบการต้านเชื้อแบคมีเรีย (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 actitivtiy แบบ in vitro ของสารสังเคราะห์ชนิด 2,5-disubstituted indoles

Compound	Minimum inhibiting concentration, %							
	S. aureus ATCC 6538-p	*Bac. subtilis* ATCC 6633	*E. coli* ATCC 25922	*Pr. vulgaris* ATCC 6898	*Ps. aeruginosa* ATCC 2853	*M. canis* 3/84	*Tr. gypseum* 5/85	*C. albicans* 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



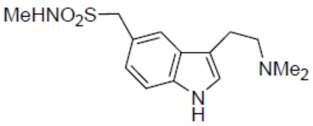
รูปที่ 4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 2,3-disubstituted indole

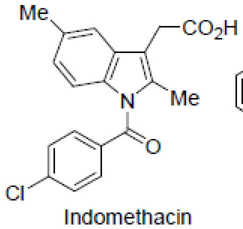
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยเทียบกับยา gentamicin และฤทธิ์การต้านเชื้อราโดยเทียบกับยา nystatin ของสารอนุพันธ์ pyrazolo-pyrazole ที่มี indole เป็นองค์ประกอบ พบว่าสารส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียและเชื้อราใกล้เคียงกับยาที่ใช้เปรียบเทียบ แสดงได้ดังตารางที่ 2

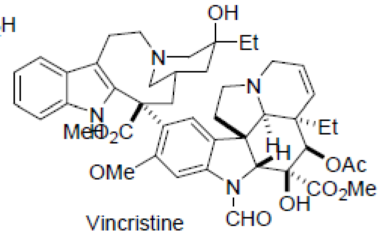
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ anti-bacterial และ anti-fungal actitivtiy แบบ in vitro ของสารสังเคราะห์ชนิด 2,3-disubstituted indole

compound	Conc (μg/Ml) in DMF	Zone of inhibition in mm				
Diameter of well (bore size)-6mm		Antibacterial activity			Anti Fungal Activity	
		S. aureus	*E. coli*	*B. subtilis*	*A. niger*	*C. albicans*
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

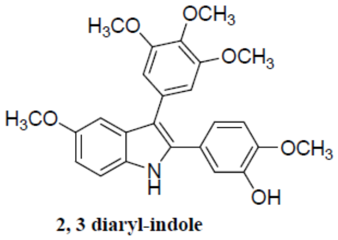
เมื่อเร็วๆ นี้ Kaushik และคณะ (2013) ได้ตีพิมพ์บทความเกี่ยวกับสารประกอบ indole ที่มีฤทธิ์ทางยา พบว่าสารประกอบมีฤทธิ์ทางยามากมายหลายชนิด ตัวอย่างเช่น Sumatripta (**6**) มีฤทธิ์รักษาโรคไมเกรน Indomethacin (**7**) ใช้รักษาโรครูมาตอยต์ซึ่งเป็นโรคข้ออักเสบที่เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันทำลายข้อตัวเอง ทำให้เกิดการอักเสบของข้อ 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) และสามารถใช้รักษาโรคพากินสัน (Therapy for Pakinson’s disease) ดังแสดงในรูปที่ 5

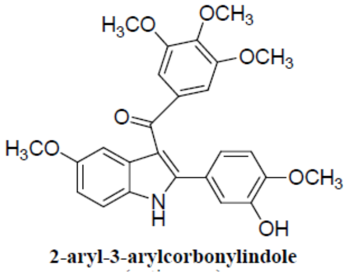


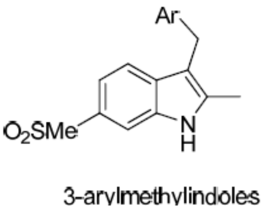




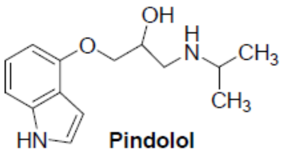
Sumatriptan, **6**	**7**	**8**
Treatment of migraine	Treatment of rheumatoid arthritis	anti-tumor agent



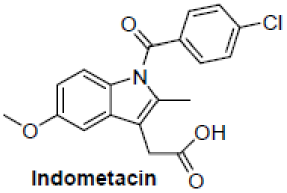


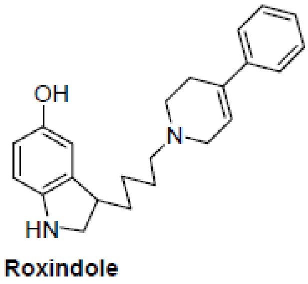


9	10	11
anti-cancer	**anti-cancer**	**Cox-2 inhibitors**



Deravirdine 12	13
anti-HIV drug	anti-hypertensive

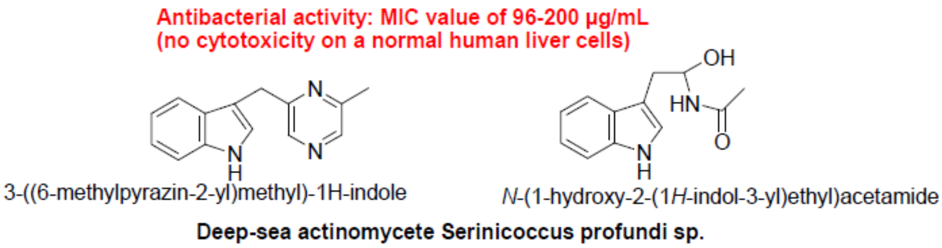




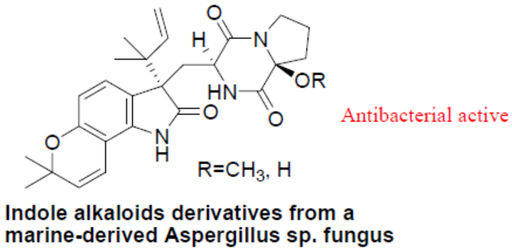
14	15
NASIAD	anti-depressants Therapy for Pakinson’s disease

รูปที่ 5 สารประกอบ indole ที่มีฤทธิ์ทางยาชนิดต่างๆ

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



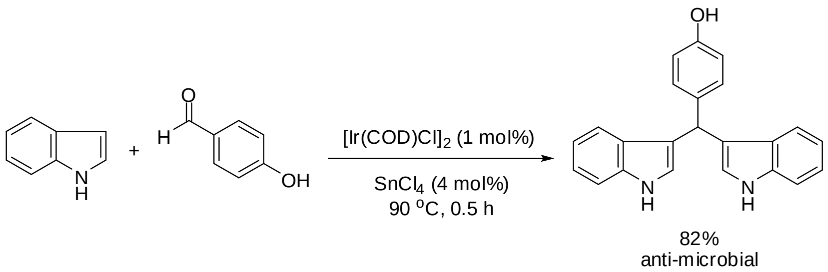
รูปที่ 6 สารประกอบ indole ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเลลึก



รูปที่ 7 สารประกอบ indole ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากราทะเล

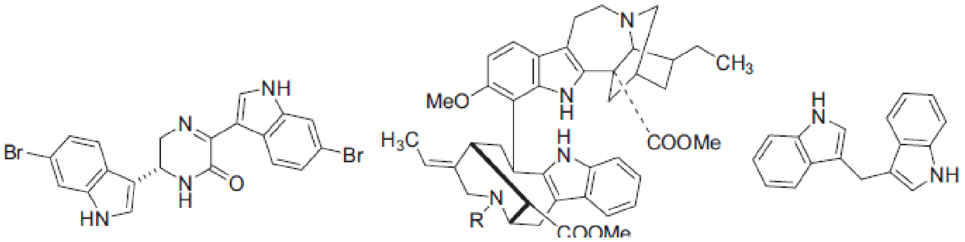
นอกจากสารประกอบ indole ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจแล้ว จากการค้นคว้าเอกสารงานวิจัยยังพบว่าสารประกอบ bis-indole หรือสารประกอบที่มี indole 2 วงในโครงสร้างเดียวกันยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจอีกด้วย ตัวอย่างการสังเคราะห์สารประกอบ bis-indole และฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจมีดังนี้

Roy และคณะ (Podder et.al., 2007) ได้สังเคราะห์สารประกอบ bis-indole จากปฏิกิริยาระหว่าง indole กับ 4-hydroxybenzaldehyde โดยใช้สารประกอบ Ir-Sn เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าได้ bis-indole เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารประกอบที่สังเคราะห์ได้นี้เคยมีรายงานว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (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** ยังสามารถยับยั้งโปรตัวซัวลิชมาเนีย (*Leishmania* parasite) ที่ก่อให้เกิดโรคลิชมาเนียซึ่งส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการโลหิตจางอย่างรุนแรง ตับและม้ามโต **นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบ bis-indoles 17 และ 18 ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่สูงกว่าสารประกอบชนิด monomeric indole หรือสารประกอบที่มีวง indole ในโมเลกุลเพียงวงเดียว** สารประกอบ diindolylmethane (DIM, **19**) ซึ่งเป็นสารต้านมะเร็งที่พบได้ในผักกลุ่ม cruciferous ได้แก่ บร็อคโคลี คะน้า บรัสเซล สเปราท์ (Brussel Sprouts) กะหล่ำปลี ดอกกะหล่ำ

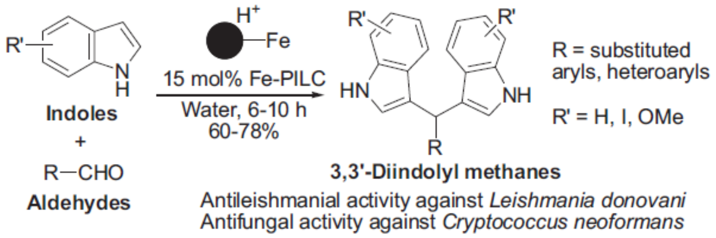


16 **17**: R = CH_3 **19**

18: R = H

รูปที่ 9 สารประกอบ bis-indoles ที่มีฤทธิ์ทางยาชนิดต่างๆ

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

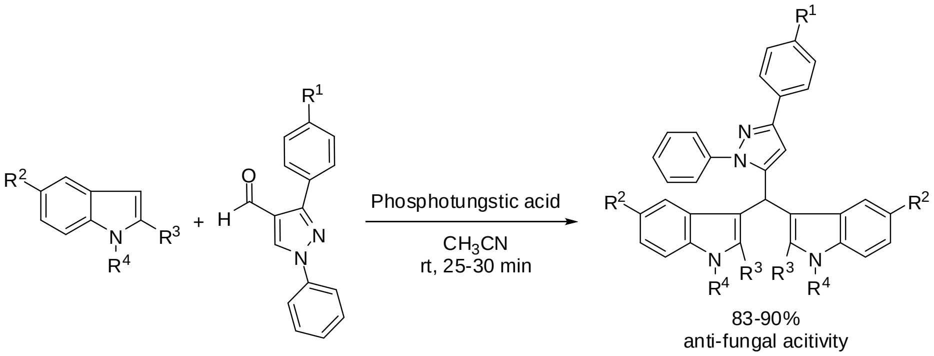


รูปที่ 10 การสังเคราะห์สารประกอบ bis-indole โดยใช้ Fe-PILC เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

Vishwakarma และคณะ ได้นำสารประกอบ bis-indole ที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRS) และ *Mycobacterium intracellulare* พบว่าสารประกอบ 3,3'-diindolylmethanes มีค่า IC_{50} ที่ต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

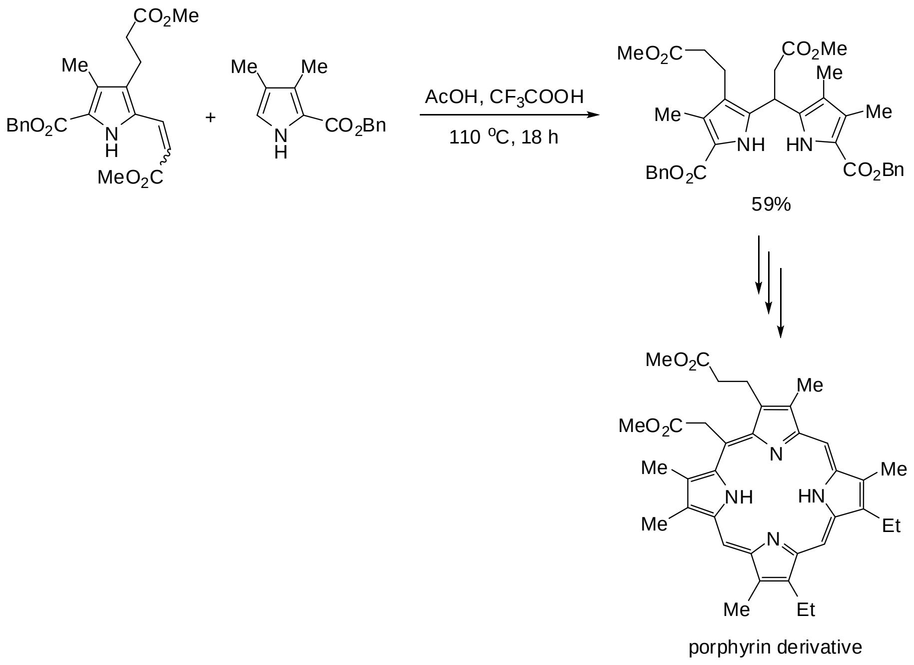
Methicillin-resistant *Staphylo-coccus aureus* (MRS) เท่ากับ 1.89 μM และ 1.15 μM ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับยา Ciprofloxacin ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.39 μM ทั้งสองสายพันธุ์ และยังพบว่าสารประกอบ 3,3'-diindolylmethanes มีค่า IC_{50} ที่ต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium intracellulare* เท่ากับ 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 อีกชนิดหนึ่งที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ตัวอย่างเช่น สารประกอบ pyrazolylbisindole ที่สังเคราะห์ได้จากสารประกอบ indole กับ pyrazolylaldehyde โดยทำปฏิกิริยาในตัวละลาย acetonitrile และใช้ phosphotungstic acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 การสังเคราะห์สารประกอบ pyrazolylbisindoles ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโดยใช้ phosphotungstic acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

สำหรับตัวอย่างสารประกอบ pyrrole ที่สำคัญได้แก่ สารประกอบ porphyrin ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบได้ใน hemoglobin และ chrolophyll ในปี ค.ศ. 1990 Burns และคณะ (1990) ได้สังเคราะห์สารประกอบ unsymmetrical dipyrrolylmethane โดยนำสารประกอบ pyrrole มาทำปฏิกิริยา 1,4-addition หรือ Michael reaction กับสารประกอบ β-pyrryoly-α,β-unsaturated carbonyl compound ในสารละลายกรดอะซิติกและ trifluoroacetic acid ที่อุณหภูมิ 110 °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 ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่มักปนเปื้อนในอาหารและทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ 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 บริษัทยา เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการผลิตอาหารหรือใช้ผลิตเป็นสูตรยาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

4) เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

ประชากรทั่วไปสามารถบริโภคอาหารที่ปลอดเชื้อแบคทีเรีย และสามารถใช้ยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณภาพมากกว่าเดิม และผลข้างเคียงน้อยลง นอกจากนี้ในโครงการวิจัยนี้เมื่อแล้วเสร็จ คาดว่าจะสามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ภายใต้การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาและเป็นโครงงานวิจัยย่อยแก่นิสิตระดับปริญญาตรี

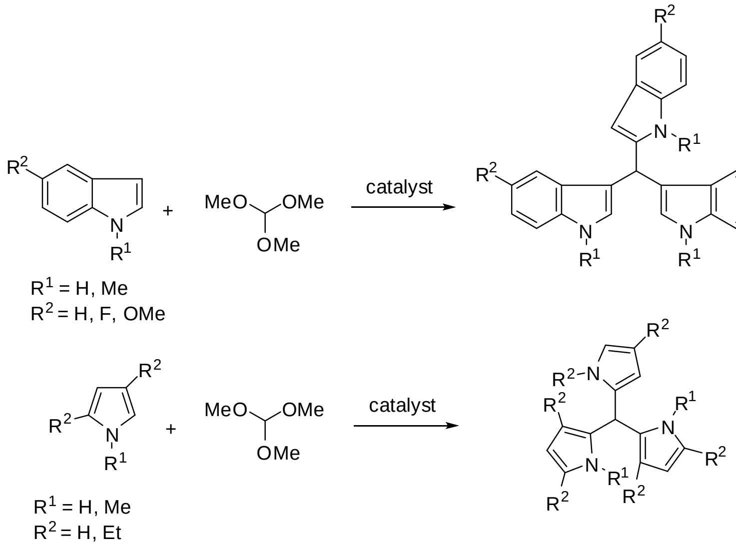
หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ ได้แก่ สถาบันการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านชีวเคมี เภสัชเคมี เช่น คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ในการนำผลการศึกษาไปศึกษาต่อยอด และองค์การเภสัชกรรม หรือหน่วยงาน บริษัทอุตสาหกรรมยา ในการนำไปพัฒนาเป็นสูตรยา โรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารทั้งที่ผลิตเพื่อจำหน่ายภายในประเทศหรือส่งออกไปนอกประเทศ

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

1. การสังเคราะห์สาร 3-substituted indole และ 2-subsituted pyrrole ชนิดต่างๆ

1.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์สาร 3-substituted indole และ 2-subsituted pyrrole ประเภท trisindole และ trispyrrole ชนิดต่างๆ

ในงานวิจัยเริ่มต้นจะสังเคราะห์สาร 3-substituted indole และ 2-subsituted pyrrole โดยใช้สารประกอบ indole กับ pyrrole ทำปฏิกิริยากับ trimethoxy-methane และภายใต้สภาวะที่มีตัวเร่งปฏิกิริยา ดังรูปที่ 13



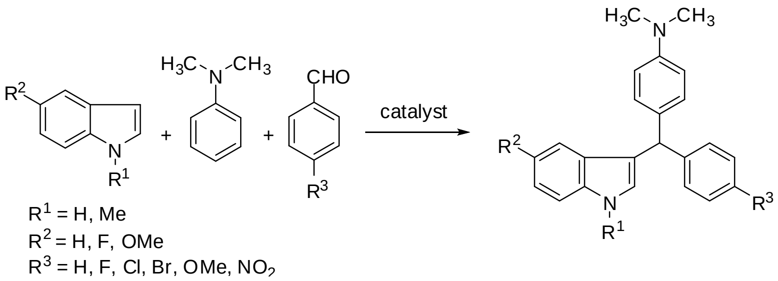
รูปที่ 13 การสังเคราะห์อนุพันธ์สาร 3-substituted indole และ 2-subsituted pyrrole ประเภท trisindole และ trispyrrole ชนิดต่างๆ

วิธีการทดลองสังเคราะห์สารประกอบ trisindole และ trispyrrole ชนิดต่างๆเป็นดังนี้

เติมสารตั้งต้น pyrrole หรือ indole (1 mmol) และ methyl orthoformate (1 mmol) ตามลำดับ ลงไปในขวดก้นกลมที่มี magnetic stirrer และตัวทำละลาย dichloromethane จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องกวนสาร (stirrer) ที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวเร่งปฏิกิริยา $Bi(OTf)_3$ (10 mol%) ลงไปในสารละลายข้อหนึ่ง กวนสารต่ออีก 30 นาทีลงไปในสารละลายที่อุณหภูมิห้อง และกวนสารต่อไปที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาจนปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ด้วย thin layer chromato-graphy เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายอิ่มตัวของ sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$) 10 mL สกัดผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยกรวยแยกโดยใช้ methylene chloride 2 ครั้ง ครั้งละ 10 mL ล้างส่วนสกัดด้วยน้ำ 10 mL ดึงน้ำออกจากตัวทำละลายด้วย anhydrous sodium sulfate หรือ anhydrous magnesium sulfate กรองและนำตัวทำละลายที่ได้ไปประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วย

เครื่อง rotary evaporator แยก crude product ให้บริสุทธิ์ด้วย column หรือ radial chromatography นำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปหาและยืนยันโครงสร้างด้วย NMR spectroscopy, IR spectroscopy, Mass spectroscopy

1.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์สาร 3-substituted indole ประเภท triarylmethane ที่มี indole อยู่ในโมเลกุล



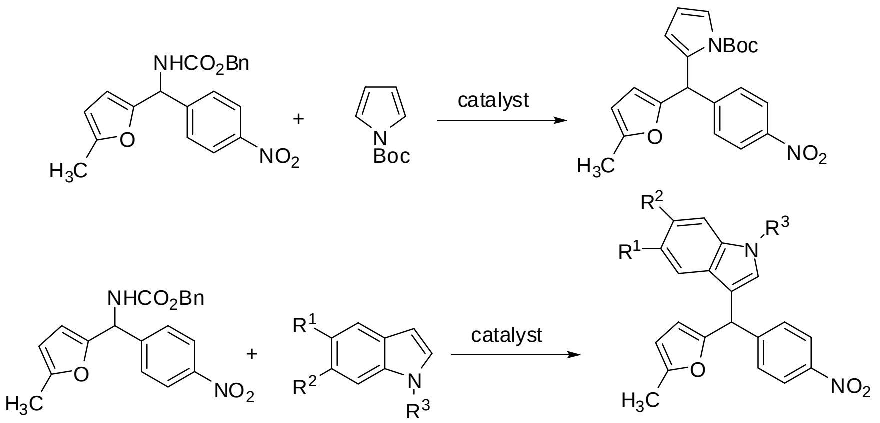
รูปที่ 14 การสังเคราะห์อนุพันธ์สาร 3-substituted indole ประเภท triarylmethane ที่มี indole อยู่ในโมเลกุล

วิธีการทดลองสังเคราะห์สารประกอบ 3-substituted indole ประเภท triarylmethane ที่มี indole อยู่ในโมเลกุล

เติม aldehyde (2.0 mmol), indole (1.0 mmol) และ *N,N*-dimethylaniline (2.0 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลมเติมตัวทำละลาย $ClCH_2CH_2Cl$ 2.0 mL และเติม $Bi(OTf)_3$ 10 mol% นำไป reflux ที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C ภายใต้แก๊สไนโตรเจน และคนสารตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยเปรียบเทียบกับ indole ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดเติมสารละลายอิ่มตัวของ $NaHCO_3$ เพื่อหยุดปฏิกิริยา ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (3×10 mL) ตามด้วยน้ำ (10 mL) และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น CH_2Cl_2 มาเติม Na_2SO_4 anhydrous เพื่อดูดน้ำออก นำไปประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product

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

1.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์สาร 3-substituted indole และ 2-subsituted pyrrole แบบไม่สมมาตรชนิดต่างๆ

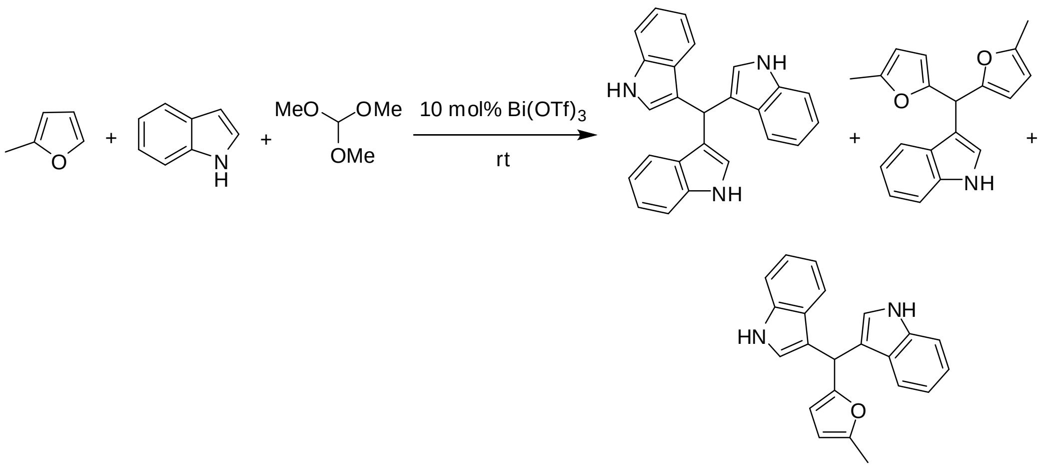


รูปที่ 15 การสังเคราะห์อนุพันธ์สาร 3-substituted indole และ 2-subsituted pyrrole ชนิดต่างๆ

ชั่ง benzyl or *tert*-butyl *N*-diarylmethylcarbamates 0.5 mmol ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 25 mL electron-rich arene 0.5 mmol เติมตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน แล้วเติมไอโอดีน 10 mol% ปิดหลอดทดลองด้วย septum คนสารตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยเปรียบเทียบกับ benzyl *N*-diarylmethylcarbamates ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดเติมสารละลายอิ่มตัวของ $Na_2S_2O_3$ เพื่อกำจัดไอโอดีน ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (3×10 mL) ตามด้วยสารละลายอิ่มตัวของ $NaHCO_3$ (10 mL) ล้างด้วยน้ำ (10 mL) และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น CH_2Cl_2 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 30% EtOAc ใน hexane (ตัวทำละลายละ 50 mL) ตามลำดับ เพื่อแยกสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมา นำ fraction ของผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump

1.4 การสังเคราะห์ 3,3'-((5-methylfuran-2-yl)methylene)bis(1H-indole)



รูปที่ 16 การสังเคราะห์อนุพันธ์สาร 3,3'-((5-methylfuran-2-yl)methylene)bis(1H-indole) จากปฏิกิริยา Fridel-Crafts ของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ 2-methylfuran indole และ methyl orthoformate

วิธีการทดลองสังเคราะห์สารประกอบ 3,3'-((5-methylfuran-2-yl)methylene)bis(1H-indole) เป็นดังนี้

เติมสารตั้งต้น 2-methylfuran (1 mmol) indole (1 mmol) และ methyl orthoformate (1 mmol) ตามลำดับ ลงไปในขวดก้นกลมที่มี magnetic stirrer และตัวทำละลาย dichloromethane จากนั้นกวนสารละลายด้วยเครื่องกวนสาร (stirrer) ที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวเร่งปฏิกิริยา $Bi(OTf)_3$ (10 mol%) ลงไปในสารละลายข้อหนึ่ง กวนสารต่ออีก 30 นาทีลงไปในสารละลายที่อุณหภูมิห้อง และกวนสารต่อไปที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาจนปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ด้วย thin layer chromatography เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายอิ่มตัวของ sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$) 10 mL สกัดผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยกรวยแยกโดยใช้ methylene chloride 2 ครั้ง ครั้งละ 10 mL ล้างส่วนสกัดด้วยน้ำ 10 mL ดึงน้ำออกจากตัวทำละลายด้วย anhydrous sodium sulfate หรือ anhydrous magnesium sulfate กรองและนำตัวทำละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator แยก crude product ให้บริสุทธิ์ด้วย column หรือ radial chromatography นำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปหาและยืนยันโครงสร้างด้วย NMR spectroscopy, IR spectroscopy, Mass spectroscopy

2. การพิสูจน์หาเอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้เพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างที่แท้จริงโดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโคปี ได้แก่ ^{1}H- 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 aeroginosa*

3.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับทดสอบ

เลี้ยงเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีของเชื้อทดสอบประมาณ 5-7 โคโลนี เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย NaCl 0.85% ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1.5×10^{8} CFU/ml (หัวเชื้อสำหรับทดสอบ disc diffusion) จากนั้นดูด 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) เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อทดสอบประมาณ 3-5 โคโลนี เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง

3) ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นเท่ากับMcFarland 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 ระนาบ) 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) ของสารสังเคราะห์ด้วยวิธี broth microdilution (CLSI, 2012b)

3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับทดสอบ

1) เพาะเชื้อทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อทดสอบประมาณ 3-5 โคโลนี เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB บ่มที่อุณหภมิ 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) เติมอาหาร MHB 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ 96 well-plate

2) เติมสารสังเคราะห์ 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) เติมเชื้อที่เตรียมไว้ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร50 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 MICโดยสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (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)

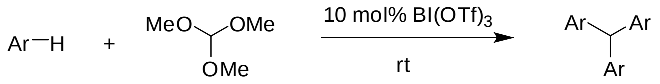
บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ผลการทดลอง

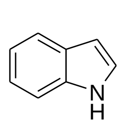
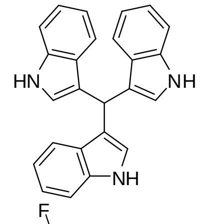
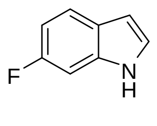
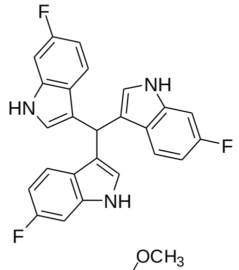
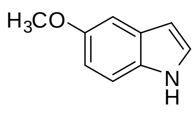
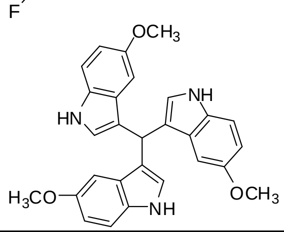
1. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole

ในการศึกษาได้เริ่มต้นสังเคราะห์สาร 3-substituted indole และ 2-subsituted pyrrole ชนิดสมมาตร จากปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ indole หรืออนุพันธ์ pyrrole กับ trimethoxymethane (1 มิลลิโมล) ภายใต้สภาวะที่มี Bi(OTf)$_3$ (10 mol%) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาที่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็น indole 6-fluoroindole และ 5-methoxyindole จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น tris(indol-3yl)methanes **3a-3c** ในร้อยละผลิตภัณฑ์ 81% 62 และ 50% ตามลำดับ ขณะที่เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็น *N*-methylpyrrole, 2-ethylpyrrole และ 2,4-dimethylpyrrole จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น tris(pyrol-2-yl)methane **3d-3f** ในร้อยละผลิตภัณฑ์ 17% >99 และ 66% ตามลำดับ ดังแสดงได้ในตารางที่ 3

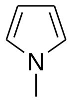
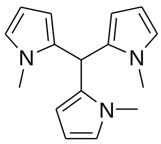
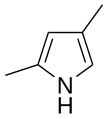
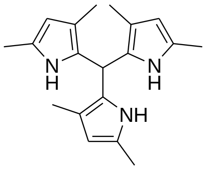
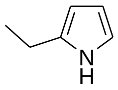
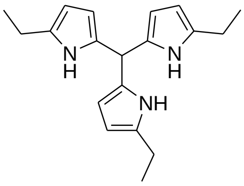
ตารางที่ 3 การสังเคราะห์ 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ชนิดสมมาตรด้วยปฏิกิริยาระหว่างสารอนุพันธ์ indole หรือ pyrrole กับ trimethoxymethane ภายใต้สภาวะที่มี Bi(OTf)$_3$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



1 **2a** **3**

Entry	Ar–H		Time (h)	Products [Yield[b] (%)]		
1		**1a**	1		**3a**	81 [c]
2		**1b**	1		**3b**	62 [c]
3		**1c**	1		**3c**	50 [c]

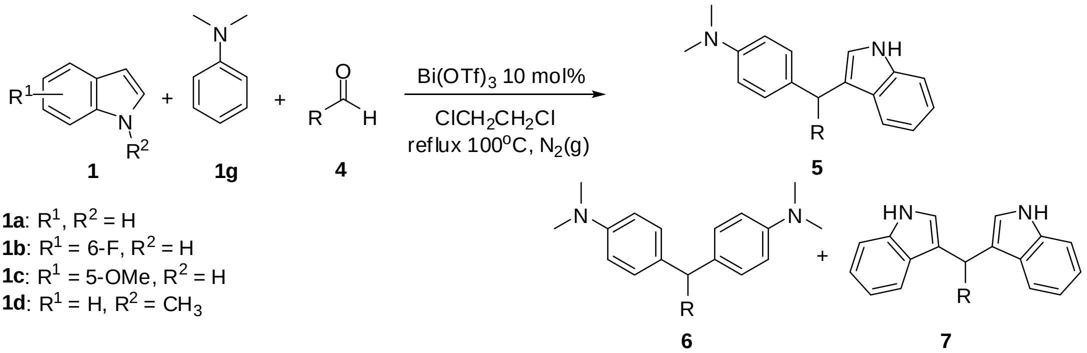
ตารางที่ 3 ผลของนิวคลีโอไฟล์ชนิดต่างๆ ที่เข้าทำปฏิกิริยา Friedel-Crafts alkylation กับ trimethoxy orthoformate (**2a**) ภายใต้สภาวะที่มี Bi(OTf)$_3$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ต่อ)

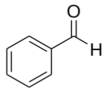
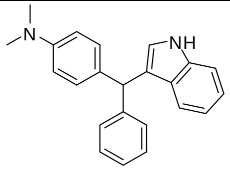
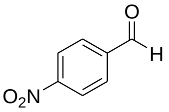
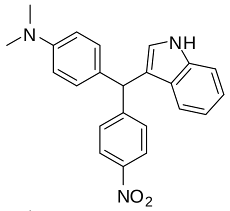
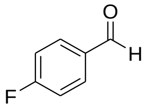
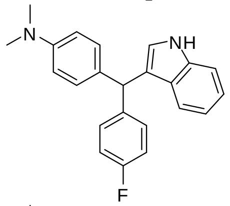
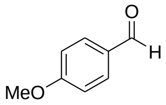
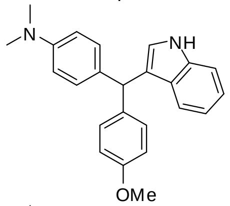
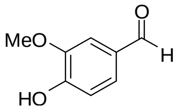
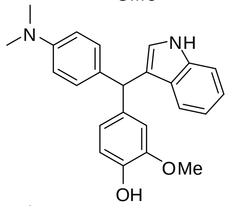
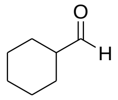
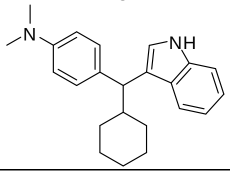
Entry	Ar–H		Time (h)	Products [Yield[b] (%)]		
4		**1d**	1		**3d**	**17** [d]
5		**1e**	**1**		**3e**	>99 [d]
6		**1f**	1		**3f**	66 [d]

[a] Reaction conditions: **1** (1 mmol), **2a** (1 mmol), Bi(OTf)$_3$ (10 mol%), room temperature.
[b] Isolated yields.
[c] The reaction was carried out in CH_2Cl_2 (1 mL) at room temperature.
[d] Ethyl orthoformate was employed instead of methyl orthoformate.

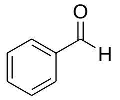
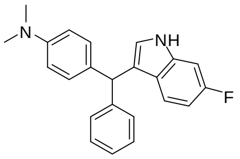
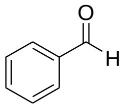
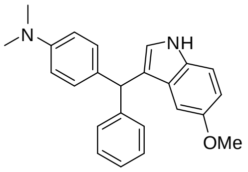
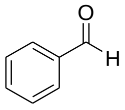
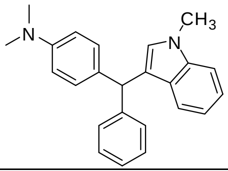
ต่อมา ได้ศึกษาการสังเคราะห์สารประกอบ 3-substituted indole จากปฏิกิริยา aza-Friedel-Crafts แบบขั้นตอนเดียว ของสารตั้งต้น 3 องค์ประกอบ ได้แก่ indole aldehydes และ *N,N*-demethylaniline โดยใช้ Bi(OTf)$_3$ (10 mol%) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น 3-subsituted indole 2 ชนิด คือ 3-diarylmethylindole **5** ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน (condensation) ของ ได้แก่ indole aldehydes และ *N,N*-demethylaniline และ bis(indol-3-yl)arylmethane **6** ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างวง indole 2 โมล ทำปฏิกิริยา bisarylation กับ aldehyde 1 โมล นอกจากผลิตภัณฑ์ 3-substituted indole 2 ชนิดนี้แล้ว ปฏิกิริยาชนิดนี้ยังให้สาร bis(4-N,N-dimethylaminophenyl)arylmethane **7** เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดลองจากการศึกษาผลของอัลดีไฮด์ชนิดต่างๆ ที่เข้าทำปฏิกิริยา aza Friedel-Crafts alkylation กับ indole และ *N,N*-dimethylaniline[a]



Entry	Indole	Aldehyde	time	product (%yield)			
			(h)		**5**	**6**	**7**
1	**1a**		7		**5a** (63)	**6a** (7)	**7a** (28)
2	**1a**		7		**5b** (70)	**6b** (14)[b]	**7b** (22)
3	**1a**		7		**5c** (61)[b]	**6c** (5)	**7c** (21)
4	**1a**		9		**5d** (55)	**6d** (18)	**7d** (16)
5	**1a**		7		**5e** (50)	**6e** (12)	**7e** (23)
6	**1a**		7		**5f** (67)	**6f** (-)[a]	**7f** (20)*

ตารางที่ 4 ผลการทดลองจากการศึกษาผลของอัลดีไฮด์ชนิดต่างๆ ที่เข้าทำปฏิกิริยา aza Friedel-Crafts alkylation กับ indole และ *N,N*-dimethylaniline[a] (ต่อ)

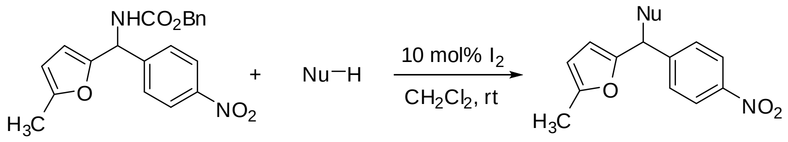
Entry	Indole	Aldehyde	time (h)	product (%yield)	5	6	7
7	**1b**		7		**5g** (45)	**6g** (16)	**7g** (18)[a]
8	**1c**		7		**5h** (53)	**6h** (10)	**7h** (30)
9	**1d**		7		**5i** (54)	**6i** (-)	**7i** (39)

[a] อัตราส่วนสารตั้งต้น aldehyde : indole : *N,N*-dimethylaniline 2 : 1 : 2

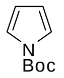
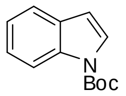
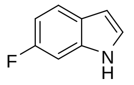
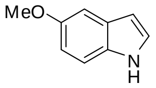
[b] ไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้, - ไม่เกิดผลิตภัณฑ์, * เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ **7f**

ในงานวิจัยได้สังเคราะห์สารประกอบ 3-substituted indole จากปฏิกิริยาระหว่าง benzyl[(5-methyl-furan-2-yl)-(4-nitrophenyl)methyl]carbamate กับ *N*-Boc pyrole, *N*-Boc indole, 5-fluoroindole และ 5-methoxyindole ในตัวทำละลาย dichloromethane โดยใช้ไอโอดีน 10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ **8a-8d ในร้อยละค่อนข้างต่ำถึงปานกลาง** ดังตารางที่ 5

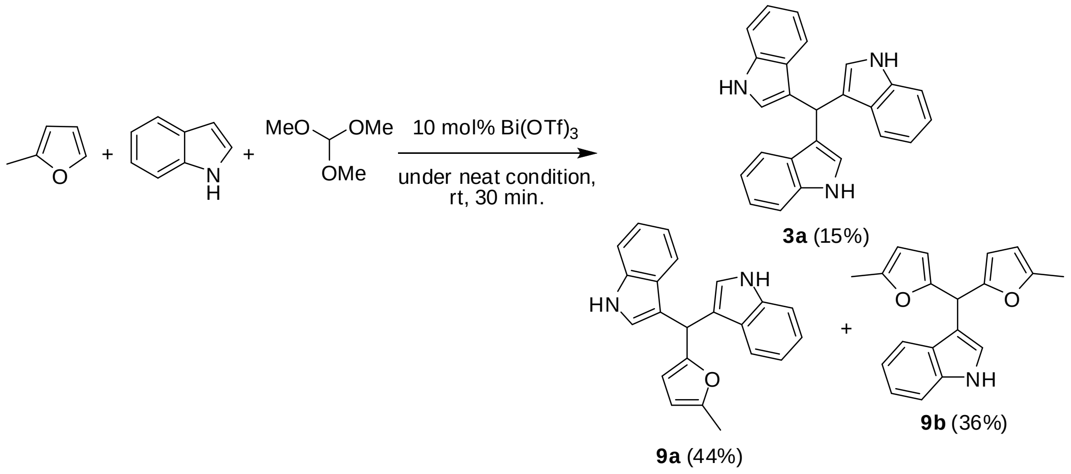
ตารางที่ 5 ผลการทดลองจากการศึกษาผลของนิวคลีโอไฟล์ชนิดต่างๆ ที่เข้าทำปฏิกิริยา Friedel-Crafts alkylation กับ benzyl[(5-methyl-furan-2-yl)-(4-nitrophenyl)methyl]carbamate โดยมีไอโอดีนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



8a-8d

Entry	Nucleophile (Nu-H)	Time (h)	Product **8** (%yield)
1		24	**8a** (28)
2		24	**8b** (8)
3		24	**8c** (54)
4		24	**8d** (50)

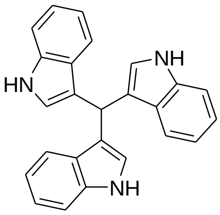
นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้สังเคราะห์สารประกอบ 3,3'-((5-methylfuran-2-yl)methylene)-bis(1H-indole) (**9a**) และสารประกอบ 3-(bis(5-methylfuran-2-yl)methyl)-1H-indole (**9b**) จากปฏิกิริยา Friedel-Crafts ของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ 2-methylfuran indole และ methyl orthoformate ภายใต้สภาวะที่มี Bi(OTf)$_3$ 10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที พบว่า จะได้ผลิตภัณฑ์ 3,3'-((5-methylfuran-2-yl)methylene)bis(1H-indole) (**9a**) 44% 3-(bis(5-methylfuran-2-yl)methyl)-1H-indole (**9b**) 36% และสาร tri(1H-indol-3-yl)methane (**3a**) 15 % ดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 การสังเคราะห์อนุพันธ์สาร 3,3'-((5-methylfuran-2-yl)methylene)bis(1H-indole) จากปฏิกิริยา Fridel-Crafts ของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ 2-methylfuran indole และ methyl orthoformate

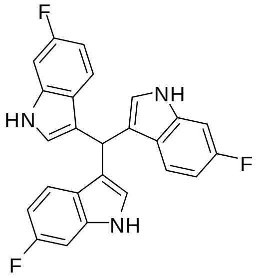
2. การพิสูจน์หาเอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีทาง spectroscopy

โครงสร้างของสารประกอบ tris[3-indolyl]methane (**3a**)



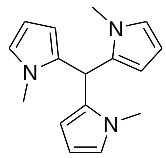
สารประกอบ **3a**: ของแข็งสีส้ม; m.p. 247-249 °C; R_f = 0.38 (4:6 EtOAc/ hexane); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.91 (br s, 3H, 3xN*H*), 7.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H, Ar*H*), 7.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 3H, Ar*H*), 7.19 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, Ar*H*), 7.03 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, Ar*H*), 6.80 (s, 3H, Ar*H*), 6.20 (s, 1H, C*H*Ph); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 136.8 (*C*), 127.2 (*C*), 123.3 (*C*H), 121.7 (*C*H), 120.1 (*C*H), 119.4 (*C*), 119.0 (*C*H), 111.0 (*C*H), 31.2 (C*H*Ph); IR (film): υ_{max} 3409 (N-H), 1705, 1455, 1337, 1217, 1091, 1009, 744 cm^{-1}; HRMS (ESI) calcd for $C_{25}H_{18}N_3$ $[M-H]^+$ 360.1495, found: 360.1503.

โครงสร้างของสารประกอบ tris[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**)



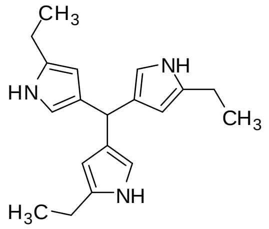
สารประกอบ **3b** ของแข็งสีส้ม; m.p. 203-207 °C; R_f = 0.55 (100% CH_2Cl_2); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.94 (br s, 3H, 3xN*H*), 7.39 (dd, *J* = 8.6 Hz *J* = 5.4 Hz, 3xC*H*), 7.07 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 1.9 Hz, 3H, 3xCH), 6.82-6.77 (m, 6H, 6xCH), 6.07 (s, 1H, C*H*Ph); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 159.6 (*J* = 235.0 Hz, *C*-F), 136.3 (*J* = 12.0 Hz, *C*), 123.3 (*C*), 123.1 (*J* = 3.0 Hz, *C*), 120.3 (*J* = 10.0 Hz, *C*H), 118.8 (*C*H), 107.6 (*J* = 24.0 Hz, *C*H), 97.0 (*J* = 26.0 Hz, CH), 31.0 (C*H*Ph); IR (film): υ_{max} 3415 (N-H), 1706, 1625, 1496, 1456, 1341, 1304, 1213, 1138, 1089, 951, 836, 804, 749 cm^{-1}; HRMS (ESI) calcd for $C_{25}H_{15}F_3N_3$ $[M-H]^+$ 414.1213, found: 414.1214.

โครงสร้างของสารประกอบ tris[2-(1-methylpyrroyl)]methane (**3d**)



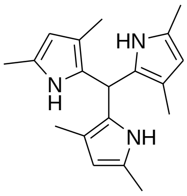
สารประกอบ **3d** ของเหลวสีน้ำตาล; R_f = 0.47 (2:8 EtOAc/hexane); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6.60 (br t, *J* = 2.4 Hz, 3H, 3xC*H*), 6.05 (br t, *J* = 2.4 Hz, 3H, 3xC*H*), 5.58 (br t, *J* = 2.4 Hz, 3H, 3xC*H*), 5.26 (s, 1H, C*H*Ph), 3.44 (s, 9H, 3xCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 131.9 (*C*), 122.0 (*C*H), 108.6 (*C*H), 106.5 (*C*H), 34.6 (*C*HPh), 33.9 (*C*H_3); IR (Nujol-mull): υ_{max} 1722, 1489, 1470, 1299, 1230, 1088, 1053, 771, 706 cm^{-1}; HRMS (ESI) calcd for $C_{16}H_{19}N_3Na$ $[M+Na]^+$ 276.1477, found: 276.1470.

โครงสร้างของสาร tris[2-(5-ethylpyrroyl)]methane (**3e**)



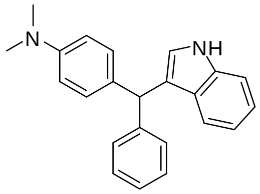
สารประกอบ **3e**: ของแข็งสีน้ำตาล; m.p. 137-141 $^{\circ}$C; R_f = 0.44 (2:8 EtOAc/ hexane); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.75 (br s, 3H, 3xC*H*), 5.94 (br t, 3H, *J* = 2.6 Hz, 3xC*H*), 5.86 (br d, *J* = 2.6 Hz, 3H, 3xC*H*), 5.42 (s, 1H, C*H*Ph), 2.58 (q, *J* = 7.6 Hz, 6H, 3xCH_2), 1.22 (t, *J* = 7.6 Hz, 9H, 3xCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 133.9 (*C*), 130.0 (*C*), 106.4 (*C*H), 104.0 (*C*H), 37.6 (*C*HPh), 20.9 (*C*H_2), 13.5 (*C*H_3); IR (Nujol-mull): $\mathbf{V}_{max}$ 3344 (N-H), 1684, 1579, 1501, 1428, 1375, 1328, 1177, 1032, 1007, 769 cm^{-1}; HRMS (ESI) calcd for $C_{19}H_{24}N_3$ $[M-H]^+$ 294.1963, found: 294.1972.

โครงสร้างของสารประกอบ tris[2-(3,5-dimethylpyrroyl)]methane (**3f**)



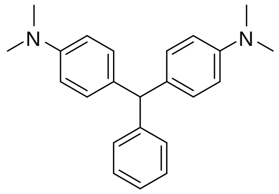
สารประกอบ **3f**: ของเหลวหนืดสีน้ำตาล (A brown solid); R_f = 0.66 (2:8 EtOAc/hexane); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.41 (br s, 3H, 3xN*H*), 5.72 (br d, *J* = 1.9 Hz, 3H, 3xC*H*), 5.42 (s, 1H, C*H*Ph), 2.19 (s, 9H, 3xCH_3), 1.86 (s, 9H, 3xCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 125.7 (*C*), 115.0 (*C*), 108.9 (*C*H), 32.9 (C*H*Ph), 13.4 (*C*H_3), 11.0 (*C*H_3); IR (Nujol-mull): υ_{max} 3363 (N-H), 1691, 1599, 1509, 1456, 1375, 1260, 1147, 952, 750 cm^{-1}; HRMS (ESI) calcd for $C_{19}H_{25}N_3Na$ $[M+Na]^+$ 318.1946, found: 318.1957.

โครงสร้างของสารประกอบ 4-((1*H*-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-*N*,**N**-dimethylaniline (**5a**)



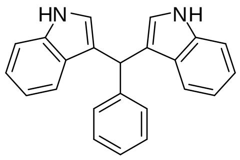
สารประกอบ **5a**: ของแข็งสีม่วง; R_f = 0.37 (1:4 EtOAc/hexane) ; ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.95 (brs, 1H, NH), 7.37 (d, J = 8.1 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.33-7.24 (m, 5H, 5×CH, ของ aromatic), 7.24-7.15 (m, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.12 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.00 (t, J = 7.5 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.70 (d, J = 8.1 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.61 (s, 1H, CH ของ aromatic), 5.61 (s, 1H, CH), 2.94 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 149.05 (C ของ aromatic), 144.69 (C ของ aromatic), 136.71 (C ของ aromatic), 132.17 (C ของ aromatic), 129.54 (2×CH ของ aromatic), 128.92 (2×C ของ aromatic), 128.14 (2×C ของ aromatic), 127.10 (C ของ aromatic), 125.92 (CH ของ aromatic), 123.92 (CH ของ aromatic), 121.93 (CH ของ aromatic), 120.66 (C ของ aromatic), 120.06 (CH ของ aromatic), 119.25 (CH ของ aromatic), 112.58 (CH ของ aromatic), 110.91 (CH ของ aromatic), 47.83 (CH), 40.73 ($N(CH_3)_2$); IR (Film): υ_{max} 3417 (NH), 1614, 1513 และ 1456 (aromatic ring), 947 (NCH_3), 741.83 (CN indole) cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 4,4'-(phenylmethylene)bis(*N*,*N*-dimethylaniline) (**6a**)



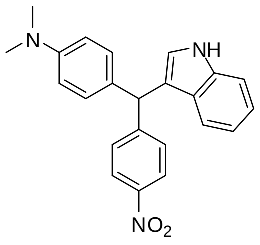
สารประกอบ **6a**: ของเหลวหนืดสีเขียวฟ้า; R_f = 0.56 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.32-7.25 (m, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.23-7.14 (m, 3H, 3×CH ของ aromatic), 7.01 (d, J = 8.6 Hz, 4H, 4×CH ของ aromatic), 6.69 (d, J = 8.6 Hz, 4H, 4×CH ของ aromatic), 5.40 (s, 1H, CH), 2.93 (s, 12H, 2×$N(CH_3)_2$); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 148.94 (2×C ของ aromatic), 145.43 (C ของ aromatic), 132.85 (2×C ของ aromatic), 129.93 (4×CH ของ aromatic), 129.34 (2×CH ของ aromatic), 128.04 (2×CH ของ aromatic), 125.76 (CH ของ aromatic), 112.51 (4×CH ของ aromatic), 54.98 (CH), 40.70 (2×$N(CH_3)_2$); IR (Film): υ_{max} 1614, 1519 และ 1492 (aromatic ring), 947 (NCH_3) cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 3,3'-(phenylmethylene)bis(1*H*-indole) (**7a**)



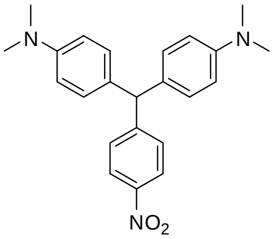
สารประกอบ **7a**: ของแข็งสีส้ม; R_f = 0.27 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.80 (brs, 2H, 2xNH), 7.44 (d, J = 7.7 Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.41-7.29 (m, 5H, 5xCH ของ aromatic), 7.27 (d, J = 7.7 Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.22 (t, J = 7.7 Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.06 (t, J = 7.7 Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.62 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic)5.93 (s, 1H, CH); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : 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): υ_{max} 3414 (NH), 1601, 1493 และ 1456 (aromatic ring), 743 (CN indole) cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 4-((1*H*-indol-3-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-*N*,*N*-dimethylaniline (**5b**)



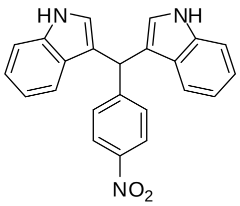
สารประกอบ **5b**: ของแข็งสีเหลืองเทา; R_f = 0.29 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 8.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 8.06 (br s, 1H, NH), 7.42 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.40 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, 1×CH ของ aromatic), 7.24-7.18 (m, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.08 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.02 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.62 (sd, *J* = 1.5 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 5.69 (s, 1H, CH), 2.95 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 152.54 (C ของ aromatic), 149.39 (C ของ aromatic), 146.37 (CNO_2 ของ aromatic), 136.73 (C ของ aromatic), 130.19 (C ของ aromatic), 129.68 (2×CH ของ aromatic), 129.48 (2×CH ของ aromatic), 126.65 (C ของ aromatic), 123.99 (CH ของ aromatic), 123.53 (2×CH ของ aromatic), 122.35 (CH ของ aromatic), 119.66 (CH ของ aromatic), 119.61 (CH ของ aromatic), 19.15 (C ของ aromatic), 1112.59 (2×CH ของ aromatic), 111.17 (CH ของ aromatic), 47.79 (CH), 40.57 ($N(CH_3)_2$); IR (Film): ν_{max} 1612, 1519 และ 1444 (aromatic ring), 1345 (NO_2), 947 (NCH_3) cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 4-((4-(dimethylamino)phenyl)(4-nitrophenyl)methyl)-*N,N*-dimethyl-benzenamine (**6b**)



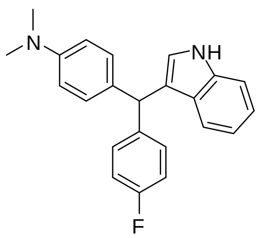
สารประกอบ **6b**: ของแข็งสีเหลือง; R_f =0.47 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 8.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.32 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.97 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 5.47 (s, 1H, CH), 2.95 (s, 12H, $2×N(CH_3)_2$); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 153.5 (C ของ aromatic), 149.2 (2×C ของ aromatic), 146.2 (CNO_2 ของ aromatic), 130.9 (2×C ของ aromatic), 130.1 (2×CH ของ aromatic), 129.8 (4×CH ของ aromatic), 123.4 (2×CH ของ aromatic), 1212.5 (4×CH ของ aromatic), 54.9 (CH), 40.6 ($2×N(CH_3)_2$); IR (Film): υ_{max} 1612, 1519 และ 1444 (aromatic ring), 1345 (NO_2), 947 (NCH_3) cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 4,4'-((4-nitrophenyl)methylene)bis(*N*,*N*-dimethylaniline) (**7b**)



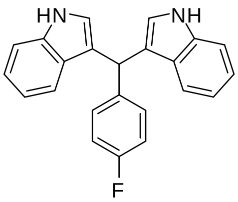
สารประกอบ **7b**: มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีส้ม; R_f = 0.15 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3) : δ 8.17 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, 2×CH ของ aromatic), 8.06 (br s, 2H, 2×NH), 7.53 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, 2×CH ของ aromatic), 7.42 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, 2×CH ของ aromatic), 7.34 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, 2×CH ของ aromatic), 7.23 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, 2×CH ของ aromatic), 7.05 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, 2×CH ของ aromatic), 6.72 (d, 2H, *J* = 1.5 Hz, 2×CH ของ indole), 6.02 (s, 1H, CH); IR (Film): υ_{max} 3414 (NH), 1594, 1515, และ 1456 (aromatic ring) 1417, 1344, 1216, 1096, 742 (CN indole) cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 4-((4-fluorophenyl)(1H-indol-3-yl)methyl)-*N*,*N*-dimethylaniline (**5c**)



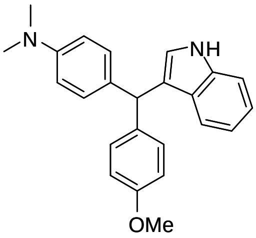
สารประกอบ **5c**: ของแข็งสีม่วง; R_f = 0.33 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.94 (brs, 1H, NH), 7.36 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.31-7.18 (m, 4H, 2×CH, ของ aromatic), 7.13 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.08-6.95 (m, 3H, 3×CH ของ aromatic), 6.74 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.58 (brd, J = 1.2 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 5.62 (s, 1H, CH), 2.97 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 161.3 (d, J = 242 Hz, CF ของ aromatic), 149.1 (C ของ aromatic), 120.6 (C ของ aromatic), 136.7 (C ของ aromatic), 131.9 (C ของ aromatic), 130.3 (2×CH ของ aromatic), 129.4 (2×CH ของ aromatic), 126.9 (C ของ aromatic), 123.9 (CH ของ aromatic), 122.0 (CH ของ aromatic), 120.5 (C ของ aromatic), 120.0 (CH ของ aromatic), 119.3 (CH ของ aromatic), 114.9 (d, J = 21 Hz, 2×CH-CF ของ aromatic), 112.6 (2×CH ของ aromatic), 111.0 (CH ของ aromatic), 47.1 (CH), 40.7 ($N(CH_3)_2$)

โครงสร้างของสารประกอบ 3,3'-((4-fluorophenyl)methylene)bis(1*H*-indole) (**7c**)



สารประกอบ **7c**: ของแข็งส้ม; R_f = 0.23 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.82 (brs, 2H, 2×NH), 7.42 (d, J = 7.7 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.39-7.29 (m, 4H, 4×CH ของ aromatic), 7.23 (t, J = 7.7 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.07 (t, J = 7.7 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.00 (t, J = 8.4 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.61 (sd, J = 1.5 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 5.91 (s, 1H, CH); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 161.4 (d, J = 242 Hz, CF ของ aromatic), 139.7 (2×C ของ aromatic), 136.7 (C ของ aromatic), 130.1 (2×CH ของ aromatic), 126.9 (2×C ของ aromatic), 123.5 (2×CH ของ aromatic), 122.0 (2×CH ของ aromatic), 119.8 (2×CH ของ aromatic), 119.5 (2×C ของ aromatic), 119.3 (2×CH ของ aromatic), 114.9 (d, J = 21 Hz, 2×CH-CF ของ aromatic), 111.1 (2×CH ของ aromatic), 39.4 (CH)

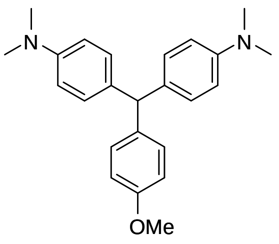
โครงสร้างของสารประกอบ 4-((1H-indol-3-yl)(4-methoxyphenyl)methyl)-*N*,*N*-dimethylaniline (**5d**)



สารประกอบ **5**d: ของแข็งสีม่วงดำ; R_f = 0.26 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.95 (brs, 1H, NH), 7.35 (d, J = 7.8 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.30 (d, J = 7.8 Hz, 1H, CH, ของ aromatic), 7.23-7.16 (m, 3H, 3×CH ของ aromatic), 7.13 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.02 (t, J = 7.8 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.85 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.72 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.59 (sd, 1H, CH ของ aromatic), 5.58 (s, 1H, CH), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 2.95 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 157.8 (C ของ aromatic), 149.0 (C ของ aromatic), 137.0 (C ของ aromatic), 136.7 (C ของ aromatic), 132.6 (C ของ aromatic), 129.8 (2×CH ของ aromatic), 129.4 (2×CH ของ aromatic), 127.0 (C ของ aromatic), 123.9 (CH ของ aromatic), 121.9 (CH ของ aromatic), 120.9 (C ของ aromatic), 120.1

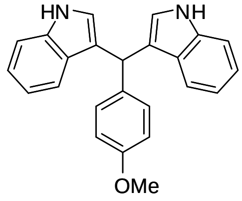
(CH ของ aromatic), 119.2 (CH ของ aromatic), 113.5 (2×CH ของ aromatic), 112.6 (2×CH ของ aromatic), 111.0 (C ของ aromatic), 55.2 (OCH_3), 47.0 (CH), 40.6 ($N(CH_3)_2$)

โครงสร้างของสารประกอบ 4,4'-((4-methoxyphenyl)methylene)bis(*N,N*-dimethylaniline) (**6d**)



สารประกอบ **6d**: ของแข็งสีคล้ำ; R_f = 0.38 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.09 (d, J = 8.6 Hz, 2H, CH ของ aromatic), 7.02 (d, J = 8.7 Hz, 4H, CH ของ aromatic), 6.85 (d, J = 8.6 Hz, 2H, CH ของ aromatic), 6.71 (d, J = 8.7 Hz, 4H, CH ของ aromatic), 5.38 (s, 1H, CH), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 2.95 (s, 12H, 2×$N(CH_3)_2$); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 157.6 (OC ของ aromatic), 148.9 (2×C ของ aromatic), 137.5 (CH ของ aromatic), 133.2 (2×C ของ aromatic), 130.2 (2×CH ของ aromatic), 129.8 (4×CH ของ aromatic), 113.4 (2×CH ของ aromatic), 112.5 (4×CH ของ aromatic), 55.2 (OCH_3), 109.68 (CH ของ aromatic), 101.5 (CH ของ aromatic), 64.9 (NCH), 41.7 (CH ของ cyclohexane), 54.1 (CH), 40.7 (2×$N(CH_3)_2$)

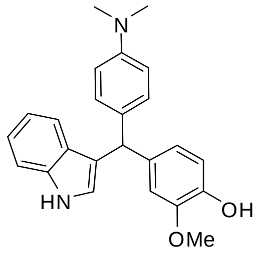
โครงสร้างของสารประกอบ 3,3'-((4-methoxyphenyl)methylene)bis(1*H*-indole) (**7d**)



สารประกอบ **7d**: ของแข็งสีส้มเข้ม; R_f = 0.19 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.89 (brs, 2H, 2×NH), 7.42 (d, J = 7.8 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.37 (d, J = 7.8 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.28 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.20 (t, J = 7.8 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.04 (t, J = 7.8 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.85 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.65 (sd, J = 1.4 Hz, 2H, 2×CH, ของ aromatic), 5.87 (s, 1H, CH), 3.81 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 157.9 (C ของ aromatic), 136.7 (2×C ของ aromatic), 136.2 (C ของ aromatic), 129.6 (2×CH ของ aromatic), 127.0 (2×C ของ aromatic),

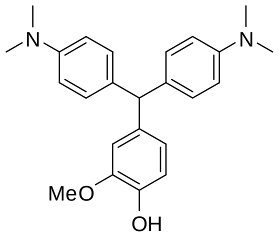
123.8 (2×CH ของ aromatic), 121.8 (2×CH ของ aromatic), 120.0 (2×C ของ aromatic), 119.9 (2×CH ของ aromatic), 119.2 (2×CH ของ aromatic), 113.5 (2×CH ของ aromatic), 111.0 (2×CH ของ aromatic), 55.2 (OCH_3), 39.3 (CH)

โครงสร้างของสารประกอบ 4-((4-(dimethylamino)phenyl)(1H-indol-3-yl)methyl)-2-methoxyphenol (**5e**)



สารประกอบ **5e**: ของแข็งสีม่วง; R_f = 0.10 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.98 (br s, 1H, NH), 7.36 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.28 (t, J = 3.9 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.19–7.12 (m, 3H, 3×CH ของ aromatic), 7.01 (t, J = 7.5 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.82 (t, J = 9.6 Hz, 3H, 3×CH ของ aromatic), 6.70 (t, J = 4.1 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.60 (s, 1H, CH ของ aromatic), 5.53 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH และ OH), 3.78 (d, J = 5.8 Hz, 3H, OCH_3), 2.96 (s, 6H, $NCCH_3)_2$); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 149.1 (C ของ aromatic), 146.6 (2×C ของ aromatic), 144.13 (2×C ของ aromatic), 137.0 (C ของ aromatic), 129.6 (2×CH ของ aromatic), 127.4 (C ของ aromatic), 123.9 (CH ของ aromatic), 122.1 (CH ของ aromatic), 121.9 (CH ของ aromatic), 121.1 (CH ของ aromatic), 120.2 (CH ของ aromatic), 119.4 (CH ของ aromatic), 114.2 (2×CH ของ aromatic), 113.1 (CH ของ aromatic), 112.2 (C ของ aromatic), 111.1 (CH ของ aromatic), 56.1 (OCH_3), 47.8 (CH), 41.0 (2×CH_3); IR (Film): ν_{max} br s (OH), 3413 (NH), 1612, 1513 และ 1456 (aromatic ring), 1269 (C-O-CH_3), 946 (NCH_3), 743 (CN indole) cm^{-1}

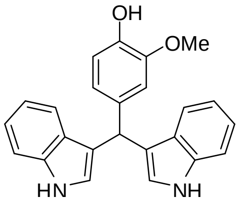
โครงสร้างของสารประกอบ 4-(bis(4-(dimethylamino)phenyl)methyl)-2-methoxyphenol (**6e**)



สารประกอบ **6e**: ของแข็งสีน้ำเงิน; R_f = 0.19 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.29 (s, 1H, CH ของ aromatic), 7.01 (d, J = 8.5 Hz, 4H, 4×CH ของ aromatic), 6.83 (d, J = 8.1 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.73-6.69 (m, 5H, CH ของ aromatic), 6.60 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CH

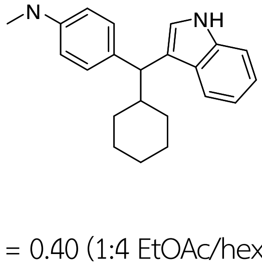
ของ aromatic), 5.51 (s, 1H, OH), 5.33 (s, 1H, CH), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 2.94 (s, 12H, $2\times N(CH_3)_2$); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 149.0 (2×C ของ aromatic), 146.4 (C ของ aromatic), 143.8 (C ของ aromatic), 137.5 (2×C ของ aromatic), 133.5 (C ของ aromatic), 130.0 (4×CH ของ aromatic), 122.2 (CH ของ aromatic), 114.0 (CH ของ aromatic), 112.8 (4×CH ของ aromatic), 112.2 (CH ของ aromatic), 56.0 (OCH_3), 54.8 (CH), 40.9 ($4\times CH_3$); IR (Film): ν_{max} 1612, 1516 และ 1446 (aromatic ring), 1268 (C-O-CH_3) 947(NCH_3) cm^{-1}

โครงสร้างของสารประกอบ 4-(di(1H-indol-3-yl)methyl)-2-methoxyphenol (**7e**)



สารประกอบ **7e**: ของแข็งสีน้ำเงิน; R_f = 0.05 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.22-7.15 (m, 7H, 7×CH ของ aromatic), 6.72 (t, 4×CH ของ aromatic), 3.80 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH), 2.94 (sd, *J* = 2.0 Hz, 12H, $2\times N(CH_3)_2$), 2.62 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH_2), 2.38-2.32 (m, 2H, CH_2); ^{13}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 (2×C ของ aromatic), 122.1 (2×CH ของ aromatic), 121.7 (CH ของ aromatic), 120.3 (2×CH ของ aromatic), 120.1 (2×CH ของ aromatic), 119.4 (2×CH ของ aromatic), 114.3 (CH ของ aromatic), 111.9 (CH ของ aromatic), 111.1 (4×CH ของ aromatic), 56.1 (OCH_3), 40.1 (CH); IR (Film): ν_{max} 3412 (NH), 1610, 1509 และ 1456 (aromatic ring), 1269 (C-O-CH_3), 743 (CN indole) cm^{-1}

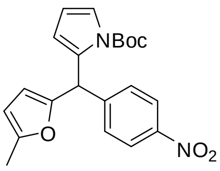
โครงสร้างของสารประกอบ 4-(cyclohexyl(1H-indol-3-yl)methyl)-*N*,*N*-dimethylaniline (**5f**)



สารประกอบ **5f**: ของแข็งใสไม่มีสี; R_f = 0.40 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.94 (brs, 1H, NH), 7.64 (d, J = 7.8 Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.31 (t, J = 7.8 Hz, 1H, CH, ของ aromatic), 7.23 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.16 (t, J = 7.8 Hz, 1H, CH ของ

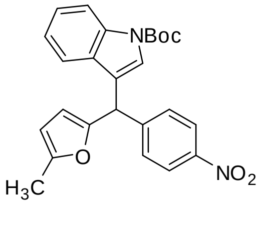
aromatic), 7.12-7.05 (m, 2H, 2×CH ของ aromatic), 6.70 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 3.82 (d, J = 9.7 Hz, 1H, CH), 2.91 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.17-2.05 (m, 1H, CH ของ cyclohexane), 1.78-1.62 (m, 4H, 2×CH_2 ของ cyclohexane), 1.35-1.11 (m, 3H, CH_2, CH ของ cyclohexane), 1.08-0.88 (m, 2H, CH_2 ของ cyclohexane); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 148.7 (C ของ aromatic), 136.2 (C ของ aromatic), 133.2 (C ของ aromatic), 128.9 (2×CH ของ aromatic), 127.7 (C ของ aromatic), 121.6 (CH ของ aromatic), 120.7 (CH ของ aromatic), 120.2 (C ของ aromatic), 119.6 (CH ของ aromatic), 119.0 (CH ของ aromatic), 112.7 (2×CH ของ aromatic), 110.6 (CH ของ aromatic), 48.8 (CH), 42.6 (CH ของ cyclohexane), 40.8 (2×NCH_3), 32.5, 32.1 (2×CH_2 ของ cyclohexane), 26.7 (CH_2 ของ cyclohexane), 26.5, 26.7 (2×CH_2 ของ cyclohexane)

โครงสร้างของสารประกอบ *tert*-butyl 2-((5-methylfuran-2-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-1H-pyrrole-1-carboxylate (**8a**)



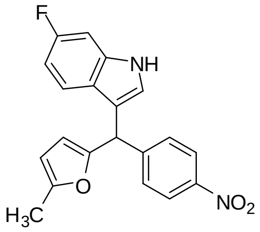
สารประกอบ **8a**: ของเหลวหนืดสีเหลืองใส; R_f = 0.68 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.17 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, 2×CH ของวง nitrophenyl), 7.34 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, 2×CH ของวง nitrophenyl), 7.29 (1H, m, CH ของวง pyrrole), 6.17 (1H, s, CH ของวง pyrrole), 6.14 (1H, t, *J* = 3.2 Hz, CH ของวง pyrrole), 5.90 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, CH ของวง furan), 5.79 (1H, s, CH), 5.71 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, CH ของวง furan), 2.27 (3H, s, CH_3), 1.46 (9H, s, 3×CH_3); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 152.7 (C=O), 151.6 (C), 148.8 (C), 148.6 (C), 146.6 (C), 133.3 (C), 129.4 (CH), 123.3 (CH), 122.2 (C), 114.5 (CH), 109.8 (CH), 108.7 (CH), 106.0 (CH), 83.9 (C), 44.0 (C), 27.7 (3×CH_3), 13.5 (CH_3)

โครงสร้างของสารประกอบ *tert*-butyl 3-((5-methylfuran-2-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-1H-indole-1-carboxylate (**8b**)



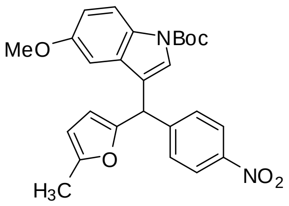
สารประกอบ **8b**: ของเหลวหนืดสีเหลือง; R_f = 0.62 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.20 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, 2×CH ของวง nitrophenyl), 8.12 (1H, brd, *J* = 6.4 Hz, CH ของวง indole), 7.48 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, 2×CH ของวง nitrophenyl), 7.33 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, CH ของวง indole), 7.27 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, CH ของวง indole), 7.17 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, CH ของวง indole), 5.93 (1H, brd, *J* = 3.2 Hz, CH ของวง furan), 5.92 (1H, brd, *J* = 3.2 Hz, CH ของวง furan), 5.64 (1H, s, CH), 2.29 (3H, s, CH_3), 1.68 (9H, s, 3×CH_3); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 152.0 (C=O), 151.8 (C), 148.3 (C), 148.9 (C), 129.3 (C), 124.6 (2×CH), 123.8 (C), 122.6 (C), 120.4 (2×CH), 119.5 (2×CH), 115.3 (2×CH), 109.0 (CH), 106.2 (CH), 84.0 (C), 42.2 (CH), 28.1 (3×CH_3), 13.6 (CH_3)

โครงสร้างของสารประกอบ 6-fluoro-3-((5-methylfuran-2-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-1H-indole (**8c**)



สารประกอบ **8c**: ของเหลวหนืดสีเหลือง; R_f = 0.62 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.18 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, 2×CH), 8.13 (1H, br s, NH), 7.46 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, 2×CH), 7.23 (1H, dd, *J* = 5.3, 8.7 Hz, CH), 7.08 (1H, dd, *J* = 9.5, 2.1 Hz, CH), 6.83 (1H, td, *J* = 8.4, 1.9 Hz, CH), 6.81 (1H,br s, CH), 5.92 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, CH ของ furan), 5.88 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, CH ของ furan), 5.68 (1H, s, CH), 2.28 (3H, s, CH_3)

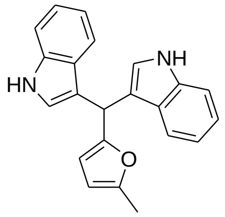
โครงสร้างของสารประกอบ 5-methoxy-3-((5-methylfuran-2-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-1H-indole (**8d**)



สารประกอบ **8d**: ของเหลวหนืดสีเหลือง; R_f = 0.62 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.18 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, 2×CH), 8.03 (1H, br s, NH), 7.47 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, 2×CH),

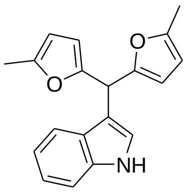
7.29 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, CH), 6.87 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, CH), 6.81 (1H, br s, CH), 6.76 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, CH), 5.92 (1H, br s, CH ของ furan), 5.90 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, CH ของ furan), 5.67 (1H, s, CH), 3.76 (3H, s, OCH_3), 2.28 (3H, s, CH_3 ของ furan); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 154.1 (C), 153.1 (C), 151.8 (C), 149.8 (C), 146.7 (C), 131.6 (C), 129.3 (2×CH), 126.8 (C), 124.0 (CH), 123.6 (2×CH), 115.8 (C), 112.4 (CH), 112.0 (CH), 108.7 (CH), 106.2 (CH), 101.3 (CH), 55.8 (OCH_3), 42.5 (CH), 13.6 (CH_3)

โครงสร้างของสารประกอบ bis-[3-(indolyl)-2-(5-methylfuryl)]methane (**9a**)



สารประกอบ **9a**: ของเหลวหนืดสีน้ำตาม; R_f = 0.38 (1:4 EtOAc/hexane); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.98 (br s, 2H, 2xN*H*), 7.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, Ar*H*), 7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar*H*), 7.19 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar*H*), 7.06 (t, *J* = 7.4 Hz, Ar*H*), 5.90 (br d, *J* = 7.9 Hz, 2xC*H*, 1xC*H*Ph), 2.28 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 155.4 (*C*), 150.9 (*C*), 136.8 (*C*), 127.1 (*C*), 123.4 (*C*H), 122.1 (*C*H), 120.1 (*C*H), 119.5 (*C*H), 117.7 (*C*), 111.4 (*C*H), 107.6 (*C*H), 106.3 (*C*H), 34.4 (C*H*Ph), 14.0 (CH_3); IR (Nujol-mull): $\mathbf{V}_{max}$ 3412 (N-H), 1698, 1605, 1456, 1336, 1261, 1215, 1093, 1016, 959, 746 cm^{-1}; HRMS (ESI) calcd for $C_{22}H_{17}N_2O$ $[M-H]^+$ 326.1414, found: 326.1415.

โครงสร้างของสารประกอบ bis-[3-(indolyl)-2-(5-methylfuryl)]methane (**9b**)



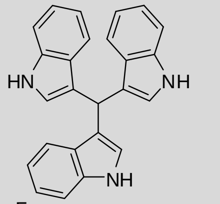
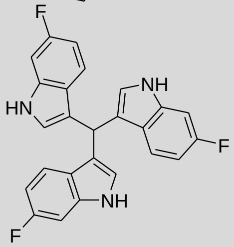
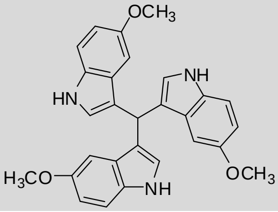
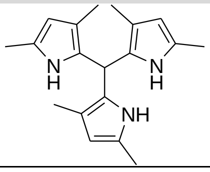
สารประกอบ **9b**: ของเหลวหนืดสีเหลือง; R_f = 0.56 (3:7 EtOAc/hexane); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.02 (br s, 1H, N*H*), 7.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar*H*), 7.37 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar*H*), 7.21 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar*H*), 7.10 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar*H*), 7.01 (s, 1H, Ar*H*), 5.97 (br d, *J* = 2.7 Hz, 2xC*H*), 5.92 (br d, *J* = 2.7 Hz, 2xC*H*), 5.65 (s, 1H, C*H*Ph), 2.29 (s, 6H, 2xCH_3); ^{13}C NMR (100

MHz, $CDCl_3$): δ 153.3 (*C*), 151.3 (*C*), 136.7 (*C*), 126.8 (*C*), 123.2 (*C*H), 122.3 (*C*H), 119.8 (*C*H), 119.7 (*C*H), 115.4 (*C*), 111.4 (*C*H), 107.7 (*C*H), 106.4 (*C*H), 37.0 (C*H*Ph), 13.9 (*C*H_3); IR (Nujol-mull): $\mathbf{v}_{max}$ 3416 (N-H), 1713, 1613, 1560, 1512, 1456, 1420, 1338, 1218, 1096, 1021, 950, 779, 743 cm^{-1}; HRMS (ESI) calcd for $C_{19}H_{17}NO_2Na$ $[M+Na]^+$ 314.1157, found: 314.1151.

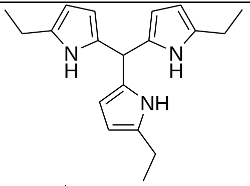
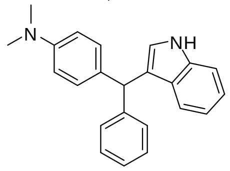
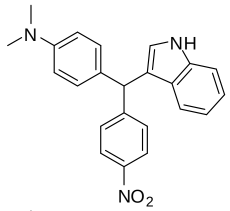
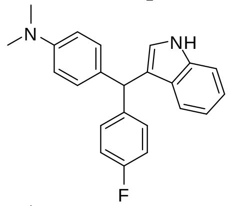
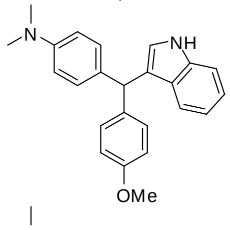
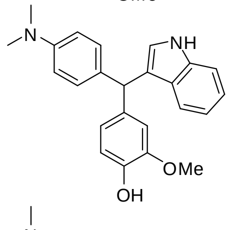
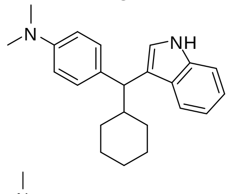
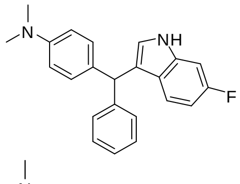
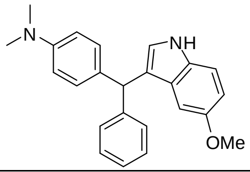
3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสังเคราะห์

เมื่อนำสารสังเคราะห์ จำนวน 14 ชนิด (ยกเว้น ไม่ได้นำสาร **3d** ไปทดสอบเนื่องจากสังเคราะห์สารได้ปริมาณน้อย) มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นต่อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ด้วยวิธี disc diffusion ให้ผลดังตารางที่ 6 ซึ่งพบว่าสารทดสอบกลุ่ม trisindoylmethane ทั้ง 3 ชนิด **3a-3c** และสารกลุ่ม trispyrrolylmethane **3f** สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 2 ชนิดได้ ขณะที่สารกลุ่ม trispyrrolylmethane **3e** มีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้แต่ไม่ยับยั้ง *Bacillus subtilis* เมื่อนำสารประกอบ triarylmethane ที่มีวงอินโดลเพียงวงเดียวภายในโครงสร้าง พบว่า สารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* 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

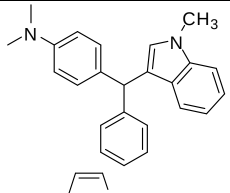
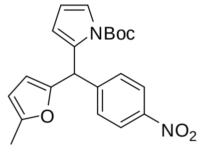
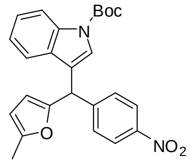
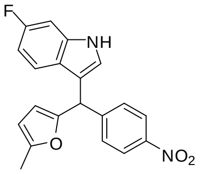
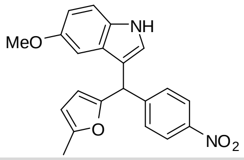
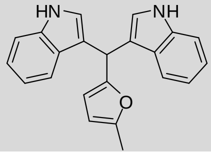
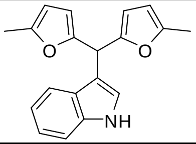
ตารางที่ 6 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของสารสังเคราะห์และยา gentamicin ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

ลำดับ	ชื่อสาร	โครงสร้าง	**เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (mm)**	
			B. subtilis	***S. aureus***
1	**3a**		7.5	9.5
2	**3b**		10.5	10.5
3	**3c**		10	10.5
4	**3e**		-	9

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

ลำดับ	ชื่อสาร	โครงสร้าง	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (mm)	
			B. subtilis	*S. aureus*
5	**3f**		7	8
6	**5a**		11	-
7	**5b**		-	-
8	**5c**		11	-
9	**5d**		-	-
10	**5e**		9.5	-
11	**5f**		-	-
12	**5g**		-	-
13	**5h**		-	-

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

ลำดับ	ชื่อสาร	โครงสร้าง	**เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (mm)**	
			B. subtilis	***S. aureus***
14	**5i**		-	-
15	**8a**		-	-
16	**8b**		7	7
17	**8c**		7	10
18	**8d**		7	7
19	**9a**		9	10
20	**9b**		NA	NA

หมายเหตุ : NZ หมายถึง ไม่มี inhibition zone NA หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นต่อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ด้วยวิธี disc diffusion ดังตารางที่ 6 พบว่าสารประกอบ tris(3-indolyl)methanes **3a** **3b** และ **3c** ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีอนุพันธ์ของวงอินโดล 3 วง เกาะอยู่บน methane carbon ตำแหน่งเดียวกัน มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้ดี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone มีค่าเท่ากับ 7.5-10.5 mm และ 9.5-10.5 mm ตามลำดับ ขณะที่สารประกอบ tris(2-pyrroyl)methanes **3e** และ **3f** มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ

Staphylococcus aureus ได้ดีน้อยกว่า สารประกอบ tris(3-indolyl)methanes **3a 3b** และ **3c** ขณะที่สารกลุ่ม 3-(diaryl)methylindoles **5a-5i** ซึ่งเป็นสารกลุ่ม triarylmethane ที่มีวง indole ภายในโครงสร้างเพียง 1 วง พบว่ามีเพียงสาร **5a 5c** และ **5e** เท่านั้นที่พบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ได้ดีเพียงชนิดเดียว แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิด *Staphylococcus aureus* ขณะที่สารกลุ่ม triarylmethane ที่มีอนุพันธ์ของวง pyrrole หรือ indole 1 วง มีอนุพันธ์ของวง furan 1 วง และวง 4-nitrophenyl 1 วง ได้แก่ สาร **8a-d** พบว่าสาร **8a** ซึ่งเป็นสารประกอบชนิด 2-substituted pyrole ที่ไม่มีวง indole เป็นส่วนประกอบ ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งสองชนิด (*Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*) อย่างไรก็ตามเมื่อแทนที่วง pyrole ด้วย indole (สาร **8b-8d**) พบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งสองชนิด *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ปานกลาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone มีค่าเท่ากับ 7 mm และ 7-10 mm ตามลำดับ นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้สังเคราะห์สารประกอบ 3-substituted indole **9a** ที่ในโครงสร้างมีวง indole 2 วง และอนุพันธ์ของวง furan 1 วง พบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งสองชนิด *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* เพิ่มขึ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone มีค่าเท่ากับ 9 mm และ 10 mm ตามลำดับ ในงานวิจัยได้สังเคราะห์สาร 3-substituted indole **9b** ด้วยแต่ไม่ได้นำไปทดสอบเนื่องจากโครงสร้างมีวง indole เพียงวงเดียว ผู้วิจัยจึงคาดว่าน่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งน้อยกว่าโครงสร้างสารที่มีวง indole 2 วงและ 3 วง นอกจากนี้ในงานวิจัยยังพบว่า ดิสก์บรรจุ DMSO (20 ไมโครลิตร/ดิสก์) ซึ่งใช้เป็น negative control ไม่เกิด inhibition zone

3.2 **การหาค่า MIC และ MBC ของสารสังเคราะห์ต่อแบคทีเรีย**

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียของสารสังเคราะห์ ในงานวิจัยได้เลือกสาร 4 ชนิด ได้แก่ สาร **3a 3b 3f** และ **9a** มาหาค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรียทดสอบ 7 ชนิด ให้ผลดังตารางที่ 2 เมื่อพิจารณาค่า MIC พบว่าสารสังเคราะห์ทั้ง 4 ชนิดมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยสาร Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**) มีประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียแกรมบวกสูงที่สุด ซึ่งมีค่า MIC ต่อ *S.aureus*, *B. subtilis* และ *B. cereus* เท่ากับ 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือสาร 3,3´-((5-methyl furan-2-yl) methylene) bis(1H-indole) (**9a**) มีค่า MIC อยู่ในช่วง 5-40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสาร Tris-[5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl] methane (**3f**) และ Tris-[1H-indol-3-yl] methane (**3a**) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกต่ำที่สุด มีค่า MIC อยู่ในช่วง 625-2500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อพิจารณาความไวของแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 3 ชนิดต่อสาร Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**) พบว่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดมีความไวเท่ากัน ส่วน *B. subtilis* และ *B. cereus* มีความไวต่อ 3,3´-((5-methyl furan-2-yl) methylene) bis(1H-indole) (**9a**), Tris-[5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl] methane (**3f**) และ Tris-[1H-indol-3-yl] methane (**3a**) เท่ากัน และพบว่าค่า MBC ของสารสังเคราะห์แต่ละชนิดต่อแบคทีเรียแกรมบวกพบว่ามีค่าเท่ากับและใกล้เคียงค่า MIC (แตกต่างจากค่า MIC ไม่เกิน 2 เท่า)

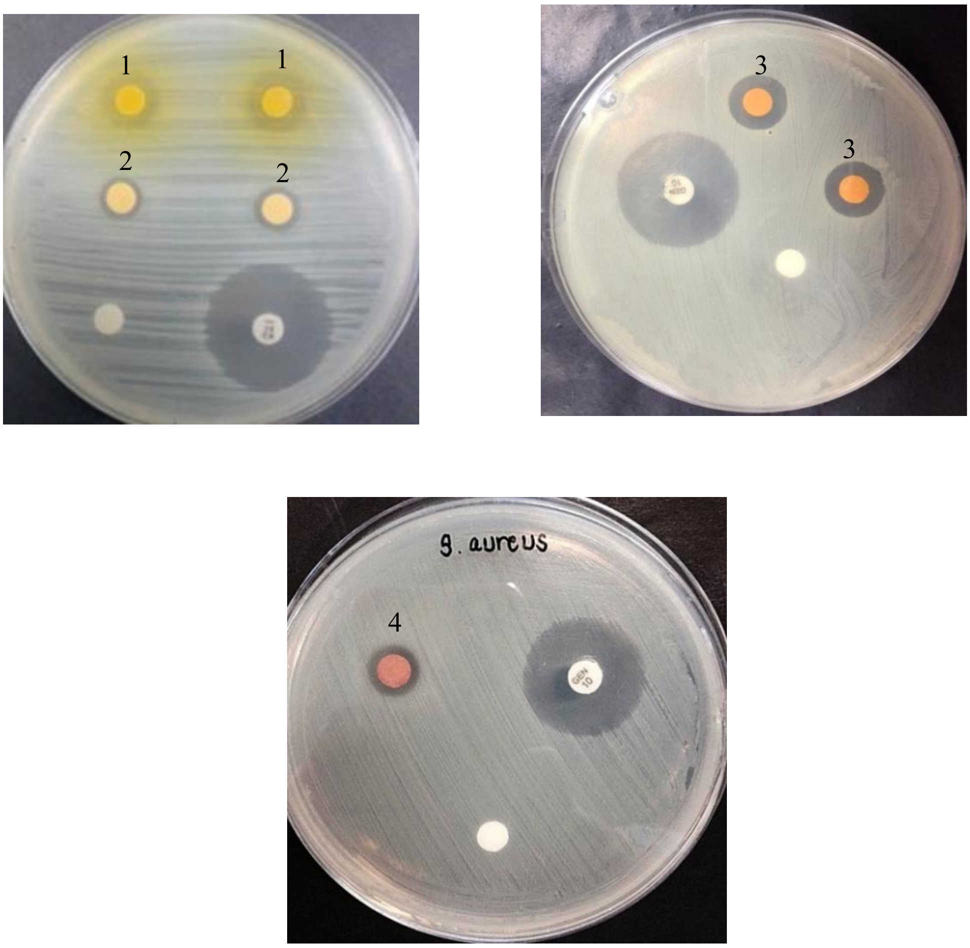
ค่า MIC และ MBC ของยา gentamicin ซึ่งเป็น positive control แสดงดังตารางที่ 7 ซึ่งพบว่าค่า MIC ของยาต่อแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดอยู่ในช่วง 0.25-2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC ของยาต่อเชื้อทดสอบทุกชนิดอยู่ในช่วง 0.5-4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลการทดลองนี้ยังพบว่าค่า MIC ของยาต่อ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งนอกจากเป็นเชื้อทดสอบแล้วยังใช้เป็น quality control เท่ากับ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และยังพบว่าแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดสามารถเจริญได้ในหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่มี DMSO (growth control) ส่วนหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ไม่ได้เติมเชื้อทดสอบพบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบ (sterility control)

ตารางที่ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของสารสังเคราะห์และยา gentamicin ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

แบคทีเรียทดสอบ	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (มิลลิเมตร)±SD*					
	สาร **3a** (400 μg/ดิสก์)	สาร **3b** (200 μg/ดิสก์)	สาร **9a** (400 μg/ดิสก์)	สาร **3f** (400 μg/ดิสก์)	ดิสก์ยา gentamicin (10 μg/ดิสก์)	DMSO (20 μl/ดิสก์)
S. Typhimurium ATCC 14028	NZ	NZ	NZ	NZ	21.33±0.58	NZ
S. Enteritidis ATCC 13076	NZ	NZ	NZ	NZ	22.00±0.00	NZ
E. coli ATCC 25922	NZ	NZ	NZ	NZ	20.67±0.58	NZ
P. aeruginosa ATCC 27853	NZ	NZ	NZ	NZ	22.67±0.58	NZ
S. aureus ATCC 25923	9.16 ± 0.4	11±0.6	10.00±0.00	8.83 ± 0.4	21.67±0.58	NZ
B. cereus ATCC 11778	10 ± 0	11±0	9.67±0.58	11.16 ± 0.4	21.00±0.00	NZ
B. subtilis ATCC 6633	7.66±0.4	11±0	9.33±0.58	7.33±0	23.33±0.58	NZ

หมายเหตุ : NZ หมายถึง ไม่มี inhibition zone

: ค่าที่ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง



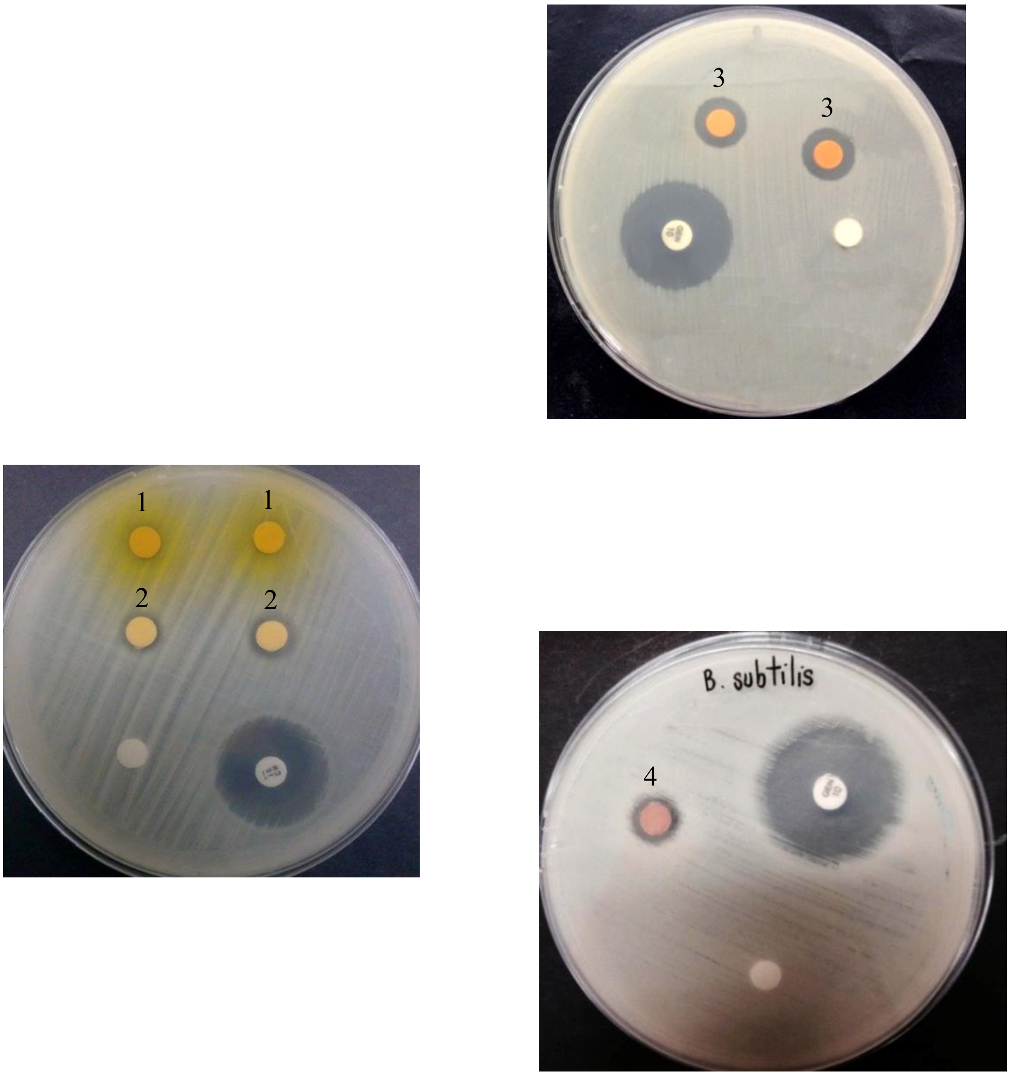
ภาพที่ 18 ลักษณะ inhibition zone ของสารสังเคราะห์ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 จากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

1 : Tris-[5-ethyl-1H-pyrrole-2-yl] methane (**3f**)

2 : Tris-[1H-indole-3-yl] methane (**3a**)

3 : Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**)

4 : 3,3´-((5-methyl furan-2-yl) methylene) bis(1H-indole) (**9a**)



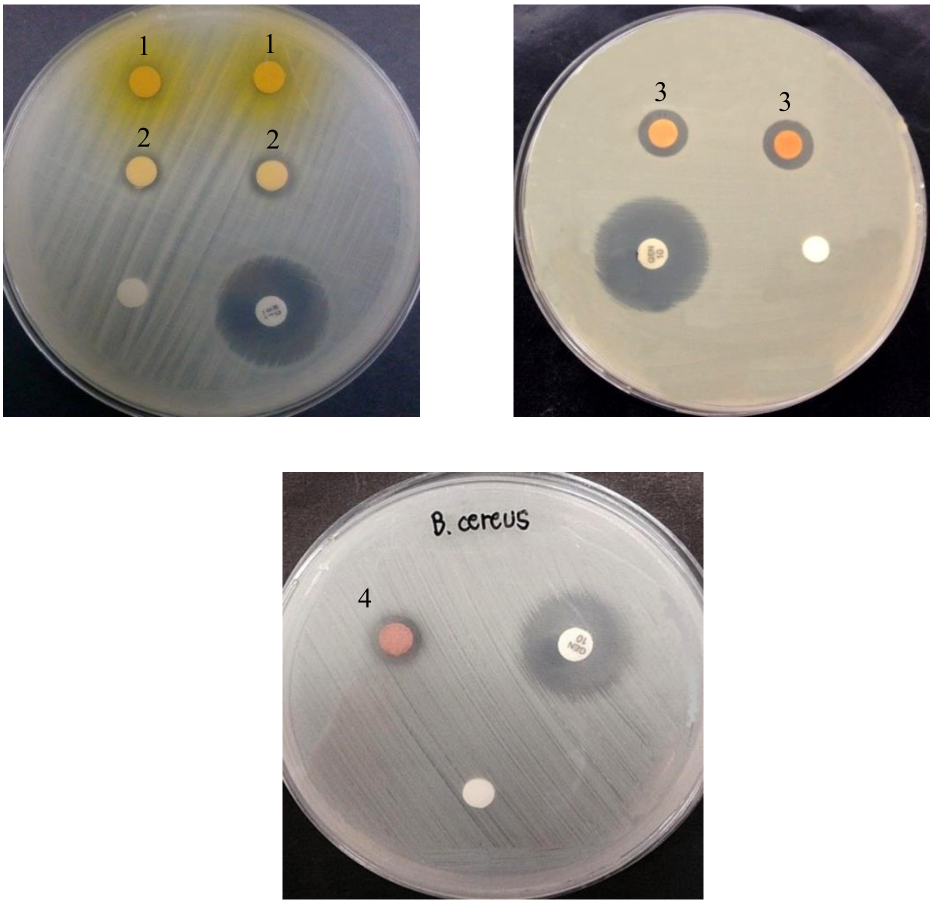
ภาพที่ 19 ลักษณะ inhibition zone ของสารสังเคราะห์ในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ATCC 6633 จากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

1 : Tris-[5-ethyl-1H-pyrrole-2-yl] methane (**3f**)

2 : Tris-[1H-indole-3-yl] methane (**3a**)

3 : Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**)

4 : 3,3´-((5-methyl furan-2-yl) methylene) bis(1H-indole) (**9a**)



ภาพที่ 20 ลักษณะ inhibition zone ของสารสังเคราะห์ในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ATCC 11778 จากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

1 : Tris-[5-ethyl-1H-pyrrole-2-yl] methane (**3f**)

2 : Tris-[1H-indole-3-yl] methane (**3a**)

3 : Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**)

4 : 3,3´-((5-methyl furan-2-yl) methylene) bis(1H-indole) (**9a**)

ตารางที่ 8 ค่า MIC และ MBC ของสารสังเคราะห์ต่อแบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียทดสอบ	สาร **3a**		สาร **3b**		สาร **3f**		สาร **9a** (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)*	
	ค่า MIC (μglml)	ค่า MBC (μglml)	ค่า MIC (μglml)	ค่า MBC (μglml)	ค่า MIC (μglml)	ค่า MBC (μglml)	ค่า MIC (μglml)	ค่า MBC (μglml)
S. Typhimurium ATCC 14028	> 5000	> 5000	>160	>160	> 5000	> 5000	>160	>160
S. Enteritidis ATCC 13076	> 5000	> 5000	>160	>160	> 5000	> 5000	>160	>160
E. coli ATCC 25922	> 5000	> 5000	>160	>160	> 5000	> 5000	>160	>160
P. aeruginosa ATCC 27853	> 5000	> 5000	>160	>160	> 5000	> 5000	>160	>160
S. aureus ATCC 25923	625	625	2.5	2.5	625	625	5	5
B. cereus ATCC 11778	2500	5000	2.5	5	2500	2500	40	40
B. subtilis ATCC 6633	2500	5000	2.5	5	2500	2500	40	40

หมายเหตุ : ค่าที่ได้จากการทดลอง 3 ครั้

ตารางที่ 9 ค่า MIC และ MBC ของยา gentamicin ต่อแบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียทดสอบ	ค่า MIC (μglml)	ค่า MBC (μglml)
S. Typhimurium ATCC 14028	2	4
S. Enteritidis ATCC 13076	1	2
E. coli ATCC 25922	1	2
P. aeruginosa ATCC 27853	1	4
S. aureus ATCC 25923	0.5	1
B. cereus ATCC 11778	1	2
B. subtilis ATCC 6633	0.25	0.5

หมายเหตุ : ค่าที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

อภิปรายผลการทดลอง

สารเคมีตามธรรมชาติมีประโยชน์ต่อการดำเนินชีวิตของมนุษย์ในด้านต่างๆ อย่างไรก็ตามสารเคมีเหล่านี้ยังนำมาสังเคราะห์เพื่อหาสารชนิดใหม่ซึ่งให้คุณสมบัติพิเศษแตกต่างกันไป สามารถนำไปเพิ่มประสิทธิภาพให้กับวัตถุ และพัฒนาเพื่อใช้ในการวิจัยขั้นสูงต่อไปได้ ดังนั้นในปัจจุบันการสังเคราะห์สารเคมีใหม่ๆ จึงมีความจำเป็นมากขึ้น เพื่อรองรับความต้องการของมนุษย์ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และในขณะเดียวกันการพัฒนาสารเคมีเหล่านี้ยังเป็นส่วนสำคัญในการสร้างความก้าวหน้าให้กับวงการวิทยาศาสตร์อีกทางด้วย มีนักวิจัยบางกลุ่มได้สังเคราะห์สารเคมีชนิดใหม่ๆ ขึ้นมาแล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารชนิดใหม่บางชนิดมีฤทธิ์ต้านไวรัส (Mibu, Yokomizo, Uyeda & Sumoto, 2005) ต้านเนื้องอก (Lewis & Goland, 1952) ต้านวัณโรค (Parai, Panda, Chaturvedi, Manju & Sinha, 2008) และต้านเชื้อรา (Podder, Choudhury, Roy & Roy, 2007) เป็นต้น สารกลุ่ม Triarylmethanes ที่มีวง indole และ pyrrole เป็นส่วนประกอบ เป็นสารสังเคราะห์อีกกลุ่มหนึ่งที่ได้รับความสนใจ ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันตามโครงสร้างที่เปลี่ยนไป จึงมีนักวิจัยบางกลุ่มสนใจสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารกลุ่มนี้ขึ้นมา งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ 3-substituted indoles และ 2-substituted pyrrole จำนวน 21 ชนิด และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้น จากนั้นได้เลือกสารสังเคราะห์ 4 ชนิด ได้แก่ (1) Tris-[1H-indol-3-yl] methane (3-substituted indole) (**3a**) ซึ่งมี indole 3 วงเป็นส่วนประกอบของโมเลกุล (2) Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**) ซึ่งมี indole อยู่ในโครงสร้างเดียวกัน 3 วง และมีฟลูออรีนเป็นหมู่แทนที่โปรตอน (3) สาร 3,3´-((5-methyl furan-2-yl) methylene) bis(1H-indole) (**9a**) ซึ่งมี indole อยู่ในโครงสร้างเดียวกัน 2 วง และมี 2-methylfuran และ (4) Tris-[5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl] methane (2-substituted pyrrole) (**3f**) ซึ่งมี pyrrole 3 วงเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. cereus*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าสารอนุพันธ์ของ indole สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิดรวมทั้งเชื้อรา โดยพบว่าอนุพันธ์ของสาร 2-aryl-5-substituted indole มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *B. subtilis, E. coli*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Micrococcus canis*, *Tricophyton gypseum* และ *Candida albicans* (Chikvaidze *et al*., 1998) อนุพันธ์ของ 2,3-disubtituted indoles สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* และ *C. albicans* ได้ (Daly *et al*., 2011) อนุพันธ์ของ pyrazolo-pyrazole ที่มี indole เป็นส่วนประกอบของโมเลกุลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *E.coli*, *B. subtilis*, *Aspergillus niger* และ *C. albicans* (Rao, Reddy & Sreeramulu, 2011) สาร topsentin และ hamacanthin บางชนิด ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ bis(indole) alkaloids สามารถยับยั้งการเจริญของ *E.coli*, *P. valgaris*, *S.* Typhimurium, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *S. sureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *C. albicans* และ *Aspergilus fumigatus* (Oh *et al*., 2006) สารกลุ่ม indolizino[6,7-b] indole สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Klepsiella pneumonia*, *Fusarium oxysporum* และ *Macrophomena phaseolina* ได้ (Arumgam, Raghunathan, Almansour & Karama, 2012) นอกจากสารสังเคราะห์กลุ่ม 3-

substituted indoles แล้วยังมีสารสังเคราะห์กลุ่ม2-substituted pyrrole เช่นสาร prodigiosin ซึ่งในธรรมชาติเป็นรงควัตถุสีแดง (red pigment) ที่ผลิตจาก *Serratia marcescens* หลายสายพันธุ์ และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น เช่น *Vibrio psychroerythrus* และ *Hahella chejuensis* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้แก่ *Verticillium dahlia* และ *Rhizoctonia solani* (Berg, 2000) และสาร Diethyl 3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2,4-dicarb-oxylate มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Bacillus* และ *Micrococcus luteus* (Idhayadhulla *et al*., 2012) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของ Triarylmethanes ซึ่งเป็นสารที่มี pyrrole และ indole เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ อีกทั้งยังมีสารอนุพันธุ์อื่นๆ มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เหมือนกัน เช่น สารอนุพันธ์ของ trifluoromethyl-substituted hexahydropyrimidine บางชนิด สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *Bacillus turingiensis* (Zohdi, Reteb & Elnagdy, 2011)

สารในกลุ่ม 3-substituted indoles นอกจากมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราแล้วยังมีรายงานว่าสารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางยา เช่น Sumatripta ใช้รักษาโรคไมแกรน Indomethacin ใช้รักษาโรครูมาตอยต์ Vincristine เป็นสารยับยั้งเนื้องอก สาร 2,3-diarylindole ใช้รักษาโรคมะเร็ง สาร 3-arylmethylindole มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็นต้น (Kaushik *et al*., 2013)

จากผลการทดสอบ disc diffusion พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิดสามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้ ปัจจัยที่อาจมีผลต่อขนาด inhibition zone ได้แก่ชนิดของสารทดสอบ ความเข้มข้นของสารทดสอบ ปริมาณของเชื้อทดสอบ ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาการวางดิสก์ ผลการทดลองนี้พบว่าดิสก์ที่บรรจุ DMSO (negative control) ไม่เกิด inhibition zone แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบเป็นฤทธิ์ของสารสังเคราะห์ไม่ใช่ฤทธิ์ของตัวทำละลาย ส่วนดิสก์ยา gentamicin (positive control) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบทั้งหมด ซึ่งยา gentamicin มีกลไกการออกฤทธิ์คือ จะไปยับยั้งการสร้างโปรตีน โดยจะไปจับกับ 30S ribosomal subunit ส่งผลให้กระบวนการ translation เสียไป (ศิริลักษณ์ อนันต์ณัฐศิริ และเพลินจันทร์ เชษฐ์โชติศักดิ์, 2549) ส่วนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของดิสก์ยา gentamicin 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ ต่อ *E.coli* ATCC 25922 ซึ่งใช้เป็น quality control ของระบบการทดสอบ พบว่ามีค่าเท่ากับ 20.67±0.58 มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องตามมาตราฐาน CLSI (2012) ได้กำหนดขนาด inhibition zone ของยา gentamicin ต่อเชื้อดังกล่าวไว้อยู่ในช่วง 19-26 มิลลิเมตร ทำให้เห็นว่าการทดสอบในขั้นตอนนี้มีความน่าเชื่อถือ

การทดสอบ disc diffusion เป็นวิธีการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพเชิงคุณภาพ มีข้อจำกัดคือไม่ทราบระดับความไวและการดื้อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียอย่างแท้จริง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองต่อโดยการทดสอบความไวด้วยการเจือจางสารในอาหารเหลว (broth dilution) ซึ่งเป็นการวัดค่าเชิงปริมาณ เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสังเคราะห์จากค่า MIC ต่อแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิดพบว่าประสิทธิภาพของสาร Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**) > สาร 3,3´-((5-methyl furan-2-yl) methylene) bis(1H-indole) (**9a**) > สาร Tris-[5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl] methane (2-substituted pyrrole) (**3f**) = สาร Tris-[1H-indol-3-yl] methane (**3a**) เมื่อ

พิจารณาค่า MIC และค่า MBC ของสารทดสอบต่อ *B. cereus*, *B. subtilis* และ *S. aureus* พบว่ามีค่าเท่ากันและใกล้เคียงกัน (ค่า MBC/MIC เท่ากับ 1-2) แสดงว่าสารทดสอบมีฤทธิ์แบบฆ่า (bactericidal) ซึ่งถ้าหากค่า MIC และ MBC แตกต่างกันไม่เกิน 4 เท่า แสดงว่าสารต้านจุลินทรีย์มีฤทธิ์แบบทำลาย แต่ถ้ามีค่าต่างกันเกิน 4 เท่า แสดงว่าสารต้านจุลินทรีย์มีฤทธิ์แบบยับยั้ง (bacteriostatic) (Pankey & Sabath, 2004) เมื่อพิจารณาค่า MIC และผลการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion จะเห็นว่าสารทดสอบมีแนวโน้มสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Daly *et al*. (2011) โดยพบว่าสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของ 2,3-disubstituted indoles 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 ซึ่งสอดคล้องกับค่ามาตราฐานของ CLSI (2012) ได้ระบุว่าค่า MIC ต่อ *E.coli* ATCC 25922 อยู่ในช่วง 0.25-1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงว่าผลการหาค่า MIC ของการทดลองนี้มีความน่าเชื่อถือ

จากผลการศึกษานี้พบว่าสารสังเคราะห์ที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ชนิดใหม่ดังกล่าว ดังนั้นควรจะมีการศึกษาในอนาคตเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำสารเคมีดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร และทางด้านการแพทย์ต่อไปในอนาคตได้

บทที่ 4
สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์สารประกอบ 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ชนิดต่างๆ จากปฏิกิริยา 4 ชนิด ได้แก่ 1) ปฏิกิริยา Fridel-Crafts ของสารประกอบ indole หรือ pyrole กับ methyl orthoformate ภายใต้สภาวะที่มี Bi(OTf)$_3$ 10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 2) ปฏิกิริยา Friedel-Crafts ของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ สารประกอบ indole aldehyde และ *N,N*-dimethylaniline ภายใต้สภาวะที่มี Bi(OTf)$_3$ 10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในตัวทำละลาย dichloroethane ที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C 3) ปฏิกิริยา Friedel-Crafts ของ benzyl[(5-methyl-furan-2-yl)-(4-nitrophenyl)methyl]carbamate กับอนุพันธ์ indole และ pyrrole ชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีไอโอดีน 10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และ 4) ปฏิกิริยา Friedel-Crafts ของสารตั้งต้นสามองค์ประกอบ ได้แก่ indole 2-methylfuran และ methyl orthofromate ภายใต้สภาะวะที่มี Bi(OTf)$_3$ 10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง โดยได้สารผลิตภัณฑ์ที่เป็นอนุพันธ์ของ 3-substituted indole 17 ชนิด และอนุพันธ์ของ 2-substituted pyrrole 4 ชนิด จากนั้นนำสารที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสังเคราะห์ 20 ชนิด (ไม่ได้นำสารไปทดสอบ 1 ชนิดเนื่องจากมีปริมาณน้อย) ต่อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารประกอบ tris(3-indolyl)methanes **3a** **3b** และ **3c** ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีอนุพันธ์ของวงอินโดล 3 วง เกาะอยู่บน methane carbon ตำแหน่งเดียวกัน มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone มีค่าเท่ากับ 7.5-10.5 mm และ 9.5-10.5 mm ตามลำดับ ขณะที่สารประกอบ tris(2-pyrroyl)methanes **3e** และ **3f** มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีน้อยกว่า สารประกอบ tris(3-indolyl)methanes **3a** **3b** และ **3c** นอกจากนี้สารกลุ่ม 3-(diaryl)methylindoles **5a-5i** ซึ่งเป็นสารกลุ่ม triarylmethane ที่มีวง indole ภายในโครงสร้างเพียง 1 วง พบว่ามีเพียงสาร **5a** **5c** และ **5e** เท่านั้นที่พบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ได้ดีเพียงชนิดเดียว แต่ไม่มีฤทิ์ต้านแบคทีเรียชนิด *Staphylococcus aureus* ขณะที่สารกลุ่ม triarylmethane ที่มีอนุพันธ์ของวง pyrrole หรือ indole 1 วง มีอนุพันธ์ของวง furan 1 วง และวง 4-nitrophenyl 1 วง ได้แก่ สาร **8a-d** พบว่าสาร **8a** ซึ่งเป็นสารประกอบชนิด 2-substituted pyrole ที่ไม่มีวง indole เป็นส่วนประกอบ ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งสองชนิด (*Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*) อย่างไรก็ตามเมื่อแทนที่วง pyrole ด้วย indole (สาร **8b-8d**) พบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งสองชนิด *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ปานกลาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone มีค่าเท่ากับ 7 mm และ 7-10 mm ตามลำดับ นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้สังเคราะห์สารประกอบ 3-substituted indole **9a** ที่ในโครงสร้างมีวง indole 2 วง และอนุพันธ์ของวง furan 1 วง พบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งสองชนิด *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*

เพิ่มขึ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone มีค่าเท่ากับ 9 mm และ 10 mm ตามลำดับ จากนั้นได้เลือกสารจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Tris-[1H-indol-3-yl] methane (**3a**) (400 ไมโครกรัม/ดิสก์), Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**) (200 ไมโครกรัม/ดิสก์) Tris-[5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl] methane (**3f**) (400 ไมโครกรัม/ดิสก์), และ 3,3´-((5-methyl furan-2-yl) methylene) bis(1H-indole) (**9a**) (400 ไมโครกรัม/ดิสก์) 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 4 ชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยมีขนาดของ inhibition zone อยู่ในช่วง 7.33±0-11.16 ± 0.4 มิลลิเมตร แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารสังเคราะห์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 4 ชนิด ที่นำมาทดสอบได้ ส่วนขนาด inhibition zone ของยา gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ ต่อเชื้อทดสอบทุกชนิดอยู่ในช่วง 20.67±0.58-23.33±0.58 มิลลิเมตร เมื่อนำสารสังเคราะห์มาหาค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรียทดสอบทั้งหมด ด้วยวิธี broth microdilution สามารถเรียงลำดับประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียแกรมบวกจากสูงไปต่ำได้ดังนี้ Tris-[3-indolyl]-6-fluoromethane (**3b**) > 3,3´-((5-methyl furan-2-yl) methylene) bis(1H-indole) (**9a**) > Tris-[5-ethyl-1H-pyrrol-2-yl] methane (**3f**) = Tris-[1H-indol-3-yl] methane (**3a**) ส่วนแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 4 ชนิด ดื้อต่อสารทดสอบมากที่สุด ค่า MIC และ MBC ของยา gentamicin ต่อเชื้อทดสอบอยู่ในช่วง 0.25-2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 0.5-4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ การทำวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

งานวิจัยที่เสร็จล่าช้ากว่ากำหนดเวลามีปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ 1 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้มีความล่าช้าในการจัดส่ง ประการที่ 2 คือ เครื่องมือ Nuclear Magnetic Spectrometry (NMR) ที่ใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาและหาโครงสร้างสารของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ เสียประมาณ 5-6 เดือน (ประมาณเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2558 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2558 เนื่องจากติดขั้นตอนการขออนุมัติซ่อมจากภาควิชาเคมี เพราะค่าซ่อมและค่าดูแลรักษาเครื่องมีราคาแพง โดยในการนี้ข้าพเจ้าก็ได้แก้ปัญหาโดยการส่งสารไปวิเคราะห์ที่หน่วยงานภายนอก แต่ก็ต้องใช้ระยะเวลาดำเนินการค่อนข้างนาน ทำให้การยืนยันโครงสร้างสารสังเคราะห์เป็นไปด้วยความล่าช้า สำหรับปัญหาที่เกิดขึ้นนี้ไม่เพียงแต่ทุนวิจัยเรื่องนี้ แต่เกิดขึ้นกับทุนวิจัยของคณะวิทยาศาสตร์เกือบทุกเรื่องที่เกี่ยวข้องกับการยืนยันโครงสร้างสารด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Spectrometry (NMR) ผู้ทำวิจัยจึงใคร่ขอความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยสนับสนุนหรือจัดหางบประมาณในการจัดซื้อหรือซ่อมแซมเครื่องมือขนาดใหญ่ที่สำคัญในการทำวิจัยแต่มีราคาแพง ตลอดจนสนับสนุนงบประมาณในการดูแลรักษาเครื่องมือให้ใช้งานได้ในสภาพดี

ในการทำวิจัยในปีที่ 1 (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558) สามารถสังเคราะห์สาร 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole ชนิดต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิ 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) จะดำเนินการสังเคราะห์สารกลุ่ม 1,1-di(3-indolyl)arylmethanes โดยประกอบด้วยวงฟีนอลในโครงสร้าง เนื่องจากการศึกษาในปีที่ 1 พบว่า สารกลุ่ม 1,1-di(3-indolyl)arylmethanes ที่มีวงฟีนอลจะมีฤทธิ์ในการยั้บยั้งแบคทีเรียได้ดี เพื่อปรับปรุงพัฒนาหาสารสังเคราะห์ที่สามารถมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้สูงขึ้น และเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำสารเคมีดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร และทางด้านการแพทย์ต่อไปในอนาคตได้

บรรณานุกรม

ภัทรชัย กีรติสิน. (2549). *ตำราวิทยาทางการแพทย์.* กรุงเทพฯ: คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล 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 (Outpu / Outcome)

1. Onnicha Khaikate, Umaporn Thathaisong and Jaray Jaratjaroonphong. Synthesis and anti-bacterial activity of 3-substituted indole และ 2-substituted pyrrole derivatives. (Manuscript in preparation).
2. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ ระดับปริญญาโท 1 คน สาขาเคมี คือ นางสาวสุรีย์พร เรืองแสงทองกุล และระดับปริญญาตรี สาขาเคมี จำนวน 6 คน คือ นางสาวนัตติยา จินตนา นางสาวประภาพร บุญเพ็ง นางสาวอรณิชา ไข่เกษ นางสาวชุติมา บัณฑิต นางสาวพรพรรณ แย้มทรัพย์และนางสาวณัชวลัญช์ สวัสดิ์อักษรชื่น

รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 2558A10802342 สัญญาเลขที่ 81/2558

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 จรัสจรูญพงศ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557 ถึงวันที่ 9 กันยายน พ.ศ. 2559

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 11 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50 %) 440,000 บาท เมื่อวันที่ 15 ธันวาคม พ.ศ. 2557

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

งวดที่ 3 (10 %) 88,000 บาท เมื่อวันที่

รวม 880,000 บาท

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณ ที่ตั้งไว้	งบประมาณ ที่ใช้จริง	จำนวนเงิน คงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	150,000 บาท	150,000 บาท	- บาท
2. ค่าจ้าง	126,000 บาท	126,000 บาท	- บาท
3. ค่าวัสดุ	444,000 บาท	444,000 บาท	- บาท
4. ค่าใช้สอย	72,000 บาท	72,000 บาท	- บาท
5. ค่าครุภัณฑ์	- บาท	- บาท	- บาท
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ ได้แก่ ค่าสาธารณูปโภค โดยสนับสนุนให้มหาวิทยาลัยเป็นจำนวน 10 %	88,000 บาท	88,000 บาท	- บาท
รวม	880,000 บาท	880,000 บาท	- บาท

(...)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน