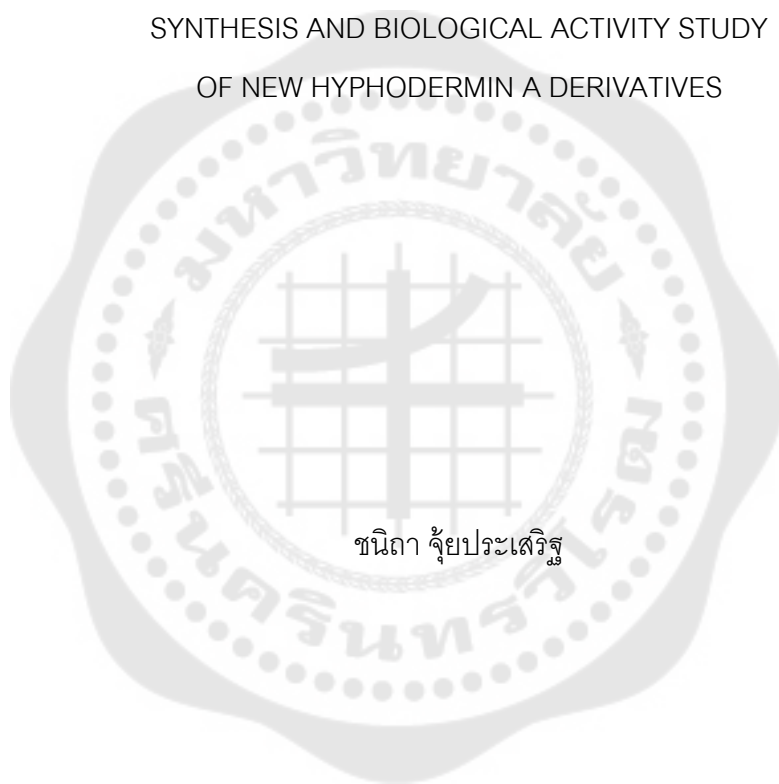




การสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ไฮโฟเดอมีน เอ ชนิดใหม่
SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY STUDY
OF NEW HYPHODERMIN A DERIVATIVES



ชนิศา จุ้ยประเสริฐ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ไฮโฟเดอมีน เอ ชนิดใหม่



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY STUDY
OF NEW HYPHODERMIN A DERIVATIVES



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF EDUCATION
(Chemistry)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญาบัตร

เรื่อง

การสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ไฮโฟเดอมีน เอ ชนิดใหม่

ของ

ชนิศา จุ้ยประเสริฐ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาบัตร

ที่ปรึกษาหลัก

ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนาวรัตน์ อรุณรัதியากร)

(ดร.เกรียงศักดิ์ เลิศประภามงคล)

ที่ปรึกษาร่วม

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพล อภิรติกุล)

(อาจารย์ ดร.อิทธิพล สังเวียนวงศ์)

ชื่อเรื่อง	การสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ไฮโฟเดอมิน เอ ชนิดใหม่
ผู้วิจัย	ชนิธา จั๊ยะประเสริฐ
ปริญญา	การศึกษามหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนารัตน์ อรุณรัตติยากร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐพล อภิรติกุล

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ชนิดใหม่ของสารไฮโฟเดอมิน เอ และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์เหล่านี้ โดยสารตั้งต้นไฮโฟเดอมิน เอ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้แยกได้จากเห็ด *Hyphoderma radula* จากนั้นทำปฏิกิริยากับเอมีน 5 ชนิด ได้แก่ aniline, 4-fluoroaniline, 4-chloroaniline, 4-bromoaniline และ 4-iodoaniline ได้อนุพันธ์ 78 - 82 ตามลำดับ (40 - 94.2 % yields) จากนั้นทำการศึกษาความเป็นไปได้ของอนุพันธ์เหล่านี้ ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไกลโคเจน ฟอสโฟริเลส (GP) ด้วยเทคนิคการทำโมเลกุลลาร์ดีคอกกั๊ระหว่างสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้กับบริเวณควบคุมต่าง ๆ ในเอนไซม์นี้ ได้แก่ บริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site จากผลการศึกษา พบว่าอนุพันธ์เหล่านี้มีค่าพลังงานในการจับกับเอนไซม์ (Binding energy; B.E.) ที่บริเวณ Indole site ดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุพันธ์ 82 ซึ่งให้ค่า B.E. ดีที่สุดทั้งสามบริเวณควบคุม และให้ค่าที่ดีกว่าลิแกนด์เดิมสำหรับบริเวณ Indole site (CP-403,700) นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของอนุพันธ์เหล่านี้ต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด ได้แก่ HepG2, SK-Hep-1 และ A549 ผลการทดสอบ พบว่า อนุพันธ์เหล่านี้แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด SK-Hep-1 มากที่สุด โดยเฉพาะอนุพันธ์ 82 ที่ให้ค่า % survival ของ SK-Hep-1 cell line ที่ 30.5 % ที่ความเข้มข้นสารทดสอบ 20 μ M ดังนั้น ผลจากงานวิจัยนี้ สามารถสังเคราะห์สารชนิดใหม่ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไฮโฟเดอมิน เอ ได้ 5 ชนิด จากการทำโมเลกุลลาร์ดีคอกกั๊ พบว่า อนุพันธ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไฮโฟเดอมิน เอ และ 4-iodoaniline (82) มีแนวโน้มที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP ได้และอนุพันธ์นี้ยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด SK-Hep-1 ในระดับที่น่าสนใจอีกด้วย

คำสำคัญ : ฤทธิ์ทางชีวภาพ, อนุพันธ์ไฮโฟเดอมิน เอ ชนิดใหม่

Title	SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY STUDY OF NEW HYPHODERMIN A DERIVATIVES
Author	CHANITHA JUIPRASERT
Degree	MASTER OF EDUCATION
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Panarat Arunrattiyakorn
Co Advisor	Assistant Professor Dr. Nuttapon Apiratikul

The objectives of this research are the synthesis of new hyphodermin A derivatives and to study their bioactivities. Substrate hyphodermin A was isolated from the culture of *Hyphoderma radula*. Hyphodermin A reacted with 5 amines (aniline, 4-fluoroaniline, 4-chloroaniline, 4-bromoaniline and 4-iodoaniline) to create five new derivatives 78 - 82, respectively (40 - 94.2 % yield). Then, all of the derivatives were studied for their potential to inhibit glycogen phosphorylase (GP), using the molecular docking method. In this study, all of the derivatives were docked on three allosteric sites of GP, which included the Purine site, AMP site and Indole site. The results showed that all of the derivatives had the lowest binding energy at Indole site. This was especially true of compound 82, which had the lowest binding energy to all sites and also lower than that of its own ligand at the Indole site (CP-403,700). Moreover, all derivatives were also evaluated for cytotoxic activity against a three-tumor cell line (HepG2, SK-Hep-1 and A549). All of them showed moderate cytotoxicity against the SK-Hep-1 cell line, of which compound 82 was the most active and had a 30.5 % survival of SK-Hep-1 cell line at 20 μ M of the tested compound. Therefore, in this study we obtained 5 new compounds from the reaction of hyphodermin A and amines. From the molecular docking study, compound 82, the product of the reaction of hyphodermin A and 4-iodoaniline was the most potent GP inhibitor and also possessed moderate cytotoxicity against the SK-Hep-1 cell line.

Keyword : Biological Activity Study, New Hyphodermin A Derivatives

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง ตลอดจนการให้คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ โดยเฉพาะขั้นตอนการทำวิจัย การเขียนปริญญาานิพนธ์ แก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ และการดูแลตลอดในระยะเวลาที่ทำการศึกษาและทำการวิจัยเป็นอย่างดีจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนาร์ตน์ อรุณรัตติยากร อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์หลัก และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐพล อภิตติกุล อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ร่วม ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูง ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยรัตน์ ตรีบัณฑิต ที่ให้ความกรุณาในการมาเป็นประธานในการสอบเค้าโครงปริญญาานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการและเลขานุการในการสอบเค้าโครงปริญญาานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณ ดร.เกรียงศักดิ์ เลิศประภามงคล ที่ให้ความกรุณาในการมาเป็นประธานในการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์และอาจารย์ ดร. อธิพิพล สังเวียนวงศ์ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการสอบเค้าโครงปริญญาานิพนธ์และกรรมการการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำต่าง ๆ ทำให้ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ สถาบัน Tottori Mycological Institute ประเทศญี่ปุ่น สำหรับความอนุเคราะห์เชื้อเห็ด *Hyphoderma radula* และรองศาสตราจารย์รัชก ทองนำ ที่ให้การสนับสนุนสารเคมีสำหรับการสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโฟเดอมิน เอ ชนิดใหม่ในการวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณ Koichi Kato, Maho Yagi-Utsumi, Saeko Yanaka และ Sae Tanaka กลุ่มวิจัย Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS) สถาบัน Institute for Molecular Science (IMS) ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเอื้อเฟื้อสถานที่สารเคมีตลอดจนอุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัย รวมถึงการบันทึก NMR spectrum จนการวิจัยประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.พรทิพย์ บุญศรี ที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษา คำแนะนำ คอยชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการทำ Molecular docking ด้วยความเอาใจใส่อย่างดี ทำให้ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากขึ้น รวมถึงขอขอบคุณนางสาวชาวิณี โทหนองและนายรณกร สิชัยสิทธิ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำในขั้นตอนการทำ Molecular docking มาโดยตลอด

ขอขอบคุณนางสาวกัญยรัตน์ จันทน์แจ้ง มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการบันทึก High resolution mass spectrum และขอขอบคุณนางสาวณฤทธิฟ้า โอนนอก ห้องปฏิบัติการวิจัยชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity)

ขอกราบขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ตลอดจนสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย และขอกราบขอบพระคุณทุน สกว. สำหรับการศึกษางานวิจัยในระดับปริญญาโทของนางสาวชนิธา จุ้ยประเสริฐ ในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงที่ให้ความอนุเคราะห์แก่ผู้วิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำและความเมตตาแก่ผู้วิจัยในการศึกษาหลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิต รวมถึงขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ นิสิตปริญญาเอกและปริญญาโททุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัย รวมถึงคอยให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอดผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความเมตตา กรุณาและขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ท้ายที่สุดนี้คุณค่าและประโยชน์ อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่บิดามารดา ครู อาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ชนิธา จุ้ยประเสริฐ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	4
ความสำคัญของงานวิจัย	4
ขอบเขตของงานวิจัย	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	6
1. สาร Hyphodermins และฤทธิ์ทางชีวภาพ	6
2. การสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermins และฤทธิ์ทางชีวภาพ	9
3. สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase	13
4. การทำโมเลกุลสารดีออกิกระหว่างอนุพันธ์ Hyphodermin A กับเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase	16
5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	30
1. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	30
2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	31

3. วิธีการดำเนินการวิจัย.....	32
1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเห็ด <i>H. radula</i> เพื่อให้ผลิตสาร Hyphodermin A ในปริมาณมาก	32
2. การสกัด แยก ทำบริสุทธิ์และยืนยันโครงสร้างของสาร Hyphodermin A	33
3. การสังเคราะห์ แยก ทำบริสุทธิ์และหาโครงสร้างอนุพันธ์ Hyphodermin A.....	34
4. การทำโมเลกุลลาร์ดีด็อกกิ่งกับเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase	37
5. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	39
บทที่ 4 ผลการศึกษา	40
1. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเห็ด <i>H. radula</i> เพื่อให้ผลิตสาร Hyphodermin A ในปริมาณมาก.....	40
2. ผลการสกัด แยก ทำบริสุทธิ์และยืนยันโครงสร้างสาร Hyphodermin A	41
3. ผลการสังเคราะห์ แยก ทำบริสุทธิ์และหาโครงสร้างอนุพันธ์ Hyphodermin A.....	45
4. ผลการทำโมเลกุลลาร์ดีด็อกกิ่งระหว่างอนุพันธ์ Hyphodermin A กับเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase	57
5. ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	63
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	65
บรรณานุกรม	69
ภาคผนวก.....	75
ประวัติผู้เขียน.....	125

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 โครงสร้างและฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase ของอนุพันธ์ Hyphodermins	2
ตาราง 2 นิวคลีโอไฟล์และตัวทำละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermins.....	11
ตาราง 3 สารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2.....	20
ตาราง 4 สารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับชนิด SK-Hep-1.....	24
ตาราง 5 สารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549.....	26
ตาราง 6 แสดงสถานะที่ใช้ในการแยกและทำบริสุทธิ์สารด้วยเครื่อง Biotage flash chromatography	34
ตาราง 7 ปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพื่อเลือกเอมีนที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ .	35
ตาราง 8 ปริมาณของสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A.....	36
ตาราง 9 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร Hyphodermin A ที่แยกได้จากเห็ด <i>H. radula</i> เทียบกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร Hyphodermin A ที่เคยถูกรายงาน.....	42
ตาราง 10 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz), HSQC และ HMBC ของสาร Hyphodermin A ที่แยกได้จากเห็ด <i>H. radula</i> ในตัวทำละลาย $\text{DMSO-}d_6$	44
ตาราง 11 ผลการแยกและทำบริสุทธิ์อนุพันธ์ของสาร Hyphodermin A 78 – 82	45
ตาราง 12 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz), HSQC และ HMBC ของอนุพันธ์ของสาร Hyphodermin A 78 ในตัวทำละลาย $\text{DMSO-}d_6$	47
ตาราง 13 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz), HSQC และ HMBC ของอนุพันธ์ Hyphodermin A 79 ในตัวทำละลาย $\text{DMSO-}d_6$	50
ตาราง 14 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz), HSQC และ HMBC ของอนุพันธ์ Hyphodermin A 80 ในตัวทำละลาย $\text{DMSO-}d_6$	52

ตาราง 15 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz), HSQC และ HMBC ของอนุพันธ์ Hyphodermin A 81 ในตัวทำละลาย DMSO- d_6	54
ตาราง 16 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz), HSQC และ HMBC ของอนุพันธ์ Hyphodermin A 82 ในตัวทำละลาย DMSO- d_6	57
ตาราง 17 แสดงค่าพลังงานการยึดจับ (B.E.) ของเอนไซม์ GP กับลิแกนด์ต่าง ๆ ในหน่วย kcal/mol	58
ตาราง 18 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด HepG2, SK-Hep-1 และ A54964	



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของสาร Hyphodermin A – D (1 – 4)	1
ภาพประกอบ 2 แสดงลักษณะของเห็ด <i>H. radula</i>	6
ภาพประกอบ 3 การสังเคราะห์สาร anhydride 11 จากสาร diketone 10	7
ภาพประกอบ 4 การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสาร anhydride 11 ได้เป็น Hyphodermin B (2).....	8
ภาพประกอบ 5 การเปลี่ยนสาร diester 12 เป็นสาร enone 13.....	8
ภาพประกอบ 6 การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสาร enone 13 เปลี่ยนเป็นสาร lactol 14.....	8
ภาพประกอบ 7 การสังเคราะห์ Hyphodermin A, C และ D (1, 3 และ 4) จากสาร lactol 14.....	9
ภาพประกอบ 8 การสังเคราะห์สาร Naphthofurantrione 21	10
ภาพประกอบ 9 การทำปฏิกิริยาระหว่างสาร Naphthofurantrione 21 กับนิวคลีโอไฟล์ชนิดต่าง ๆ	11
ภาพประกอบ 10 ปฏิกิริยาการปิดวงของสารประกอบที่ 26 และ 27	12
ภาพประกอบ 11 การทำงานของเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase a และ b (GP _a และ GP _b)	14
ภาพประกอบ 12 โครงสร้างสารที่รายงานว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้ง Glycogen Phosphorylase	16
ภาพประกอบ 13 โครงสร้างของ Riboflavin (36), GSK261(37) และ CP-403,700 (38).....	17
ภาพประกอบ 14 โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (สารประกอบที่ 39 – 41)	19
ภาพประกอบ 15 โครงสร้างของตับที่แสดงถึงส่วนของ Hepatocytes และ Liver sinusoid.....	23
ภาพประกอบ 16 การสกัดอาหารเหลวเลี้ยงเห็ดตัวทำละลาย	41
ภาพประกอบ 17 โครงสร้างของสาร Hyphodermin A ที่แยกได้จากเห็ด <i>H. radula</i>	42
ภาพประกอบ 18 แสดงความสัมพันธ์ HMBC ของสาร Hyphodermin A ที่แยกได้.....	43
ภาพประกอบ 19 อนุพันธ์ Hyphodermin A 78.....	46

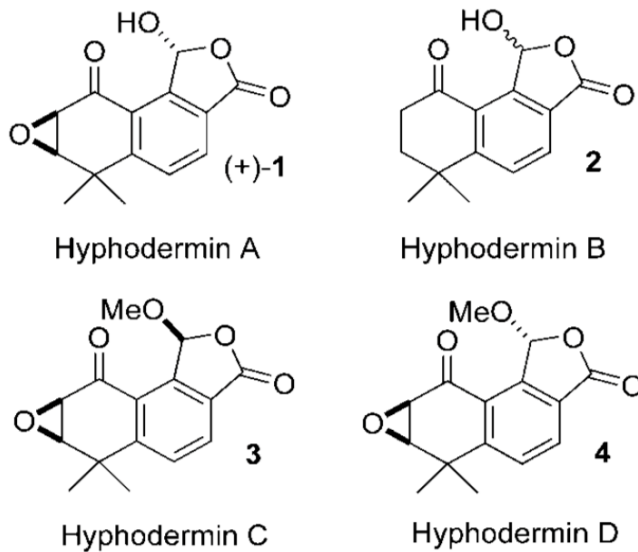
ภาพประกอบ 20 แสดงความสัมพันธ์ HMBC ของอนุพันธ์ Hyphodermin A 78.....	47
ภาพประกอบ 21 อนุพันธ์ Hyphodermin A 79.....	48
ภาพประกอบ 22 แสดงความสัมพันธ์ HMBC ของอนุพันธ์ Hyphodermin A 79.....	49
ภาพประกอบ 23 อนุพันธ์ Hyphodermin A 80.....	51
ภาพประกอบ 24 แสดงความสัมพันธ์ HMBC อนุพันธ์ Hyphodermin A 80.....	52
ภาพประกอบ 25 อนุพันธ์ Hyphodermin A 81.....	53
ภาพประกอบ 26 แสดงความสัมพันธ์ HSQC และ HMBC อนุพันธ์ของสาร Hyphodermin A 81	54
ภาพประกอบ 27 อนุพันธ์ Hyphodermin A 82.....	55
ภาพประกอบ 28 แสดงความสัมพันธ์ HMBC อนุพันธ์ Hyphodermin A 82.....	56
ภาพประกอบ 29 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างลิแกนด์ ภายในโพรงการจับ (ก) Purine site (ข) AMP site (ค) Indole site.....	60
ภาพประกอบ 30 (ก) การจัดวางตัวและ (ข) การเกิดอันตรกิริยาของอนุพันธ์ 82 ในโพรงการจับ Indole site	61

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในปี ค.ศ. 1995 มีรายงานว่ามีการแยกสารกลุ่ม Hyphodermins ได้จากเห็ด *Hyphoderma radula* (หรืออีกชื่อหนึ่งคือ *Basidioradulum radula* (Fr.) Nobles) ซึ่งเป็นเห็ดที่ได้จากต้นเชอร์รี่ป่า ในเมือง Wuppertal ประเทศเยอรมนี เห็ดนี้จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycete (Henkel, Mueller, Schmidt, & Wollweber, 1997) หรือ ปัจจุบันเรียกไฟลัมนี้ว่า Basidiomycota (Hibbett et al., 2007) ซึ่งสารกลุ่ม Hyphodermins ที่แยกได้จากเห็ดนี้มีหลายอนุพันธ์ โดยพบว่ามีสาร Hyphodermin A – D (1 – 4) เป็นอนุพันธ์หลัก และยังพบว่ามีสาร Hyphodermin E – H เป็นสารเมแทบอลิตรี่วมอีกด้วย (Henkel et al., 1997)



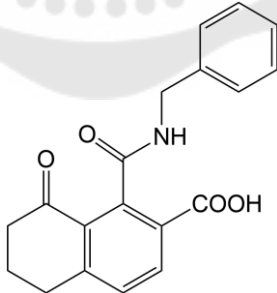
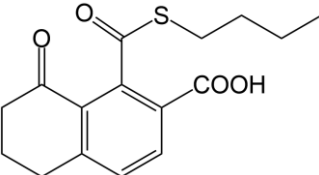
ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของสาร Hyphodermin A – D (1 – 4)

ที่มา: Loughlin, Jenkins, Henderson, Campitelli, and Healy (2008)

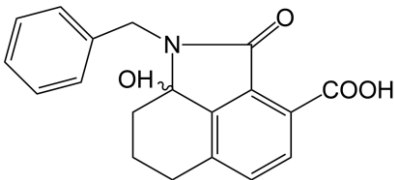
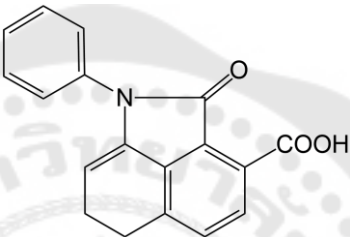
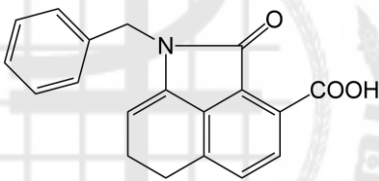
สาร Hyphodermins เป็นอนุพันธ์ของ naphtho[1,2-c]furan-3,9-dione จากการศึกษาด้านชีวภาพ พบว่า สารเหล่านี้มีแนวโน้มในการเป็นยารักษาและป้องกันโรคหอบหืด โรคหลอดลมอักเสบเรื้อรัง รวมถึงโรคหัวใจ และโรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง (Loughlin, Jenkins, et al., 2008) รวมถึงมีรายงานว่าสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการทำงานของ

เอนไซม์ Protein Phosphatase 1 (PP1) และ Protein Phosphatase 2A (PP2A) โดย PP1 เป็นเอนไซม์ที่สำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของไกลโคเจนที่ทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Berg, Tymoczko, Gatto, & Stryer, 2010) ส่วน PP2A เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) การส่งทอดสัญญาณเข้าสู่เซลล์ (signal transduction) และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อทำหน้าที่ที่จำเพาะในร่างกาย (cell differentiation) (Liu, Shen, & Ding, 2003) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์ทางเคมีของอนุพันธ์ Hyphodermins ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง phthalic anhydride กับนิวคลีโอไฟล์ชนิดต่างๆ เช่น alcohols, aliphatic amines และ aromatic amines (Petersson et al., 2007) และต่อมา Wendy A. Loughlin และคณะ นำอนุพันธ์ Hyphodermins ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาระหว่าง phthalic anhydride กับนิวคลีโอไฟล์ชนิดต่างๆ มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งพบว่าอนุพันธ์บางชนิด (สาร 5 – 9) ดังตารางที่ 1 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase (GP) ได้ ในขณะที่ Hyphodermin A, B และ D (1, 2 และ 4) ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้ (ในช่วงความเข้มข้นที่ 0.222 – 22mM) (Loughlin, Pierens, Petersson, Henderson, & Healy, 2008)

ตาราง 1 โครงสร้างและฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase ของอนุพันธ์ Hyphodermins

สารประกอบ	โครงสร้าง	IC ₅₀ (mM)
5		11.7
6		1.3

ตาราง 1 (ต่อ)

สารประกอบ	โครงสร้าง	IC ₅₀ (mM)
7		1.2
8		0.8
9		1.1

ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase ของอนุพันธ์ Hyphodermins บางชนิด ทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดลดลง เนื่องจาก Glycogen Phosphorylase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของไกลโคเจนในตับ โดยทำหน้าที่ในการสลายไกลโคเจนให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ดังนั้น เอนไซม์ชนิดนี้จึงใช้เป็นโมเลกุลเป้าหมายในการรักษาโรคเบาหวานหรือภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) (Loughlin, Pierens, et al., 2008) โดยอาศัยการวิจัยในกลุ่มที่มีกลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase เพื่อลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด (Hampson et al., 2006) เอนไซม์ชนิดนี้จัดเป็นอัลโลสเทอริกเอนไซม์ (allosteric enzyme) ซึ่งมีหลายบริเวณในโมเลกุลที่ตัวควบคุม (ตัวเร่งปฏิกิริยาหรือตัวยับยั้งปฏิกิริยา) สามารถเข้าจับได้ โดยเรียกบริเวณเหล่านี้ว่า binding site และเนื่องจากเอนไซม์นี้มีหลาย binding sites ดังนั้น โครงสร้างของตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ จึงมีโครงสร้างได้หลากหลาย ตามลักษณะของแต่ละ binding site (Schweiker, Loughlin, Lohning, Petersson, & Jenkins, 2014) และจากการศึกษารายงานวิจัย

พบว่า สารในกลุ่ม heterocyclics เป็นสารกลุ่มหนึ่งที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้ สารเหล่านี้ ได้แก่ caffeine (Ekstrom et al., 2002), flavopiridol และอนุพันธ์ (Hampson et al., 2006), อนุพันธ์ของ 3,4-dihydro-2-quinolone (Birch et al., 2007) และสาร 5-chloroindoles (Wright et al., 2005) รวมถึงสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermins (5 – 9) ดังกล่าวข้างต้น จากการศึกษาโครงสร้างสารกับการออกฤทธิ์ พบว่า จากโครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase ได้มีโครงสร้างที่หลากหลาย โดยมีโครงสร้างของวงอะโรมาติก (aromatic) และไนโตรเจนอะตอมเป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล

ด้วยฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายของสารกลุ่ม Hyphodermins รวมถึงอนุพันธ์ของสารเหล่านี้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermins โดยการนำสารอนุพันธ์หลัก คือ Hyphodermin A ที่แยกได้จากเห็ด *H. radula* มาทำปฏิกิริยากับเอมีนชนิดต่าง ๆ เพื่อให้ได้สารอนุพันธ์ชนิดใหม่ จากนั้นทำการศึกษาแนวโน้มของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase โดยการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้ง (Molecular docking) รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ด้วย

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

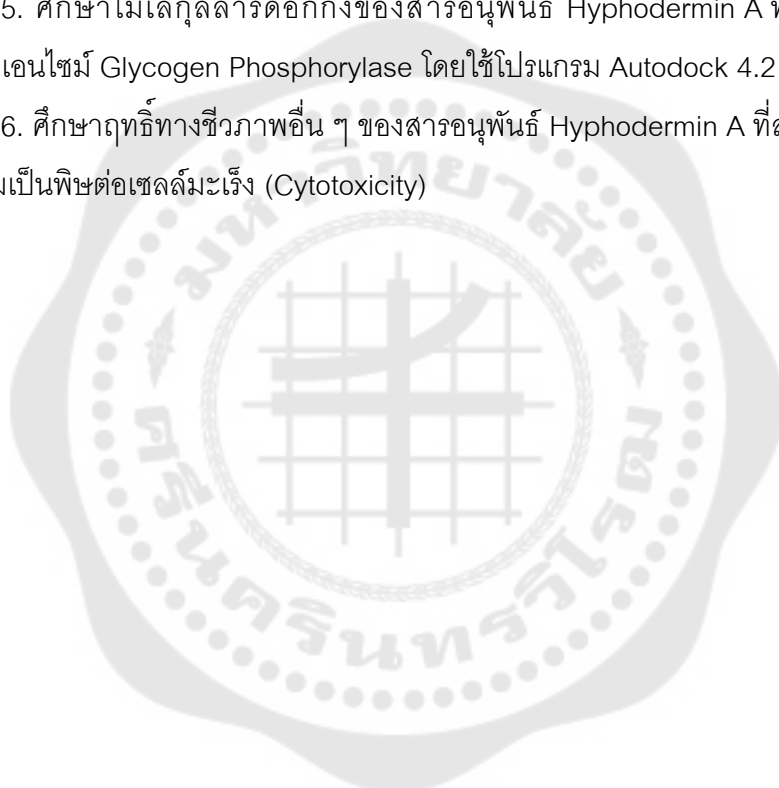
1. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ชนิดใหม่ของสาร Hyphodermin A โดยการทำปฏิกิริยากับเอมีนชนิดต่าง ๆ
2. เพื่อศึกษาแนวโน้มของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase โดยการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้ง
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของสารตั้งต้นและสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้น

ความสำคัญของงานวิจัย

1. ได้อนุพันธ์ชนิดใหม่ของสาร Hyphodermin A
2. ทราบแนวโน้มของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase
3. ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้น เช่น ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Cytotoxicity)

ขอบเขตของงานวิจัย

1. เลี้ยงเห็ด *H. radula* เพื่อเพิ่มปริมาณสาร Hyphodermin A
2. สกัด แยก ทำบริสุทธิ์ สาร Hyphodermin A และยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR spectroscopy และ HRMS spectrometry
3. ทำปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับเอมีนชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม
4. สกัด แยก ทำบริสุทธิ์ สารอนุพันธ์ Hyphodermin A ที่สังเคราะห์ขึ้น และหาโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR spectroscopy และ HRMS spectrometry
5. ศึกษาโมเลกุลลาร์ดีออกกิ่งของสารอนุพันธ์ Hyphodermin A ที่สังเคราะห์ขึ้นต่อการยับยั้งเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase โดยใช้โปรแกรม Autodock 4.2
6. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารอนุพันธ์ Hyphodermin A ที่สังเคราะห์ขึ้น ได้แก่ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Cytotoxicity)



บทที่ 2

บททวนวรรณกรรม

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. สาร Hyphodermins และฤทธิ์ทางชีวภาพ
2. การสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermins และฤทธิ์ทางชีวภาพ
3. สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase
4. การทำโมเลกุลลาร์ดีดอกกิ่งระหว่างอนุพันธ์ Hyphodermin A กับ กับเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase
5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. สาร Hyphodermins และฤทธิ์ทางชีวภาพ

สาร Hyphodermins คือ อนุพันธ์ของสาร naphtho[1,2-c]furan-3,9-dione แยกได้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1995 ซึ่งแยกได้จากเห็ด *H. radula* (Henkel et al., 1997) โดยเห็ดชนิดนี้จัดอยู่ในอาณาจักร Fungi, ไฟลัม Basidiomycota และจัดอยู่ในชั้น Agaricomycetes โดยดอกเห็ดขึ้นรวมเป็นแผ่นทรงกลมอยู่บนเปลือกไม้ เมื่อดอกเห็ดยังมีอายุไม่มากจะเห็นเป็นสีขาว จากนั้นเมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีสีออกเหลืองครีม ดอกเห็ดนี้มีลักษณะคล้ายซีฟัน ดังนั้น บางครั้งจึงเรียกเห็ดนี้ว่า Toothed Crust โดยพื้แผ่ละเอียดสีขาว 1-5 mm ดังภาพประกอบ 2 (Martin & Pamela, 1990)



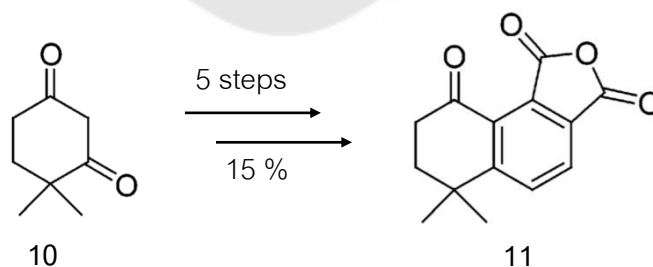
ภาพประกอบ 2 แสดงลักษณะของเห็ด *H. radula*

ที่มา: Nobles (1967)

Henkel Thomas และคณะ รายงานว่าสามารถแยกสารกลุ่ม Hyphodermins ได้จากเห็ด *H. radula* (WP 2184) โดยมีสาร Hyphodermin A – D (1 – 4) เป็นสารเมแทบอลิต์หลักและมี Hyphodermin E – H เป็นสารเมแทบอลิต์ร่วม ซึ่งเห็ดนี้พบได้ตามลำต้นของต้นเชอร์รี่ป่าในเมือง Wuppertal ประเทศเยอรมนี โดยเชื้อของเห็ดนี้ถูกเก็บไว้ใน Brunswick (วันที่ 18 กรกฎาคม ค.ศ. 1995) (Henkel et al., 1997)

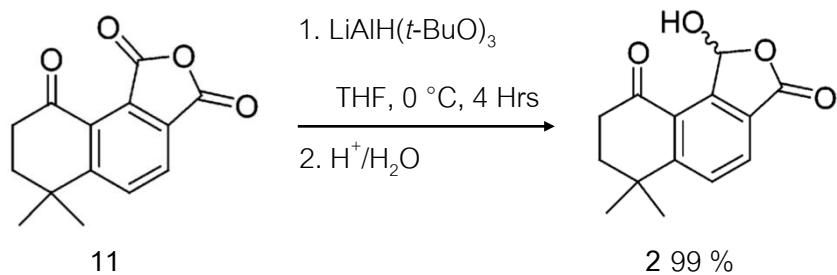
Luke C. Henderson และคณะศึกษาการสังเคราะห์ Hyphodermin B (2) ด้วยวิธีการทางเคมี โดยเริ่มต้นการสังเคราะห์สาร anhydride 11 จากสาร diketone 10 จำนวน 5 ขั้นตอน คิดเป็น 15 % yield ดังภาพประกอบ 3 จากนั้นทำปฏิกิริยาระหว่างสาร anhydride 11 กับตัวรีดิวซ์ $\text{LiAlH}(t\text{-BuO})_3$ ที่ 0°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เกิดปฏิกิริยารีดักชันได้เป็น Hyphodermin B (2) ซึ่งเป็นสารผสมราเซมิก (racemic mixture) คิดเป็น 99 % yield ดังภาพประกอบ 4 (Henderson, Loughlin, Jenkins, Healy, & Campitelli, 2006)

ต่อมา Wendy A. Loughlin และคณะได้ศึกษาการสังเคราะห์ Hyphodermin A, C และ D (1, 3 และ 4) ด้วยวิธีทางเคมีโดยสาร diester 12 เปลี่ยนเป็นสาร enone 13 โดยกระบวนการ α -Bromination-Elimination เพื่อสร้าง anhydride ดังภาพประกอบ 5 จากนั้นหมู่ lactone ของสาร enone 13 จะเกิดรีดักชันเปลี่ยนเป็นหมู่ lactol ของสารประกอบที่ 14 โดยตัวรีดิวซ์ $\text{LiAlH}(t\text{-BuO})_3$ ดังภาพประกอบ 6 หลังจากนั้นสารประกอบที่ 14 ถูกเปลี่ยนเป็น Hyphodermin C และ D (3 และ 4) โดยมีกระบวนการสังเคราะห์ 2 ขั้นตอน และไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการ complex protection-deprotection ในขณะที่การสังเคราะห์ Hyphodermin A (1) ต้องอาศัยการปกป้องหมู่ lactol ของสารประกอบที่ 14 ด้วยตัวรีดิวซ์ Tris(hydroxypropyl)phosphine (THP) เพื่อสร้างวง epoxide โดยมีกระบวนการสังเคราะห์ 3 ขั้นตอนดังภาพประกอบ 7 (Loughlin, Jenkins, et al., 2008)



ภาพประกอบ 3 การสังเคราะห์สาร anhydride 11 จากสาร diketone 10

ที่มา: Loughlin, Jenkins, et al. (2008)



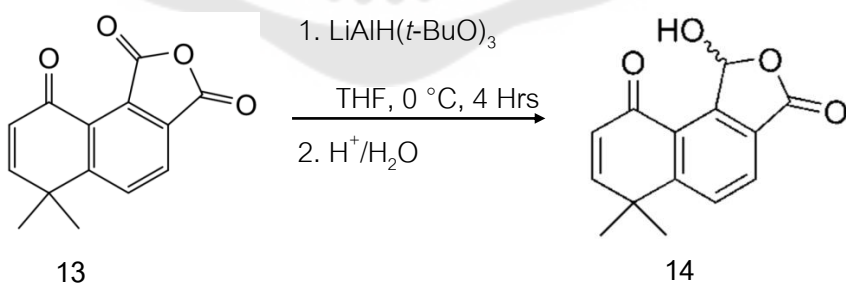
ภาพประกอบ 4 การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสาร anhydride **11** ได้เป็น Hyphodermin B (**2**)

ที่มา: Loughlin, Jenkins, et al. (2008)



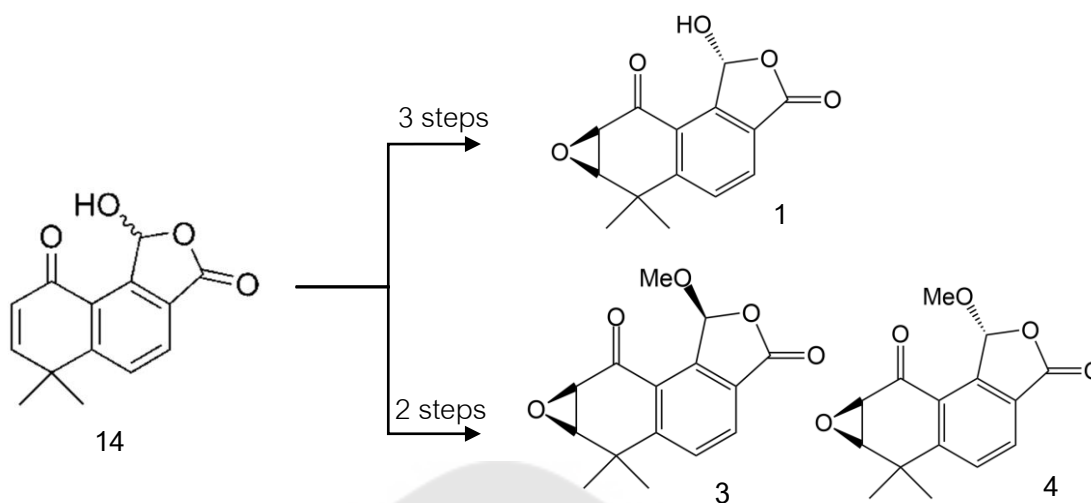
ภาพประกอบ 5 การเปลี่ยนสาร diester **12** เป็นสาร enone **13**

ที่มา: Loughlin, Jenkins, et al. (2008)



ภาพประกอบ 6 การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสาร enone **13** เปลี่ยนเป็นสาร lactol **14**

ที่มา: Loughlin, Jenkins, et al. (2008)



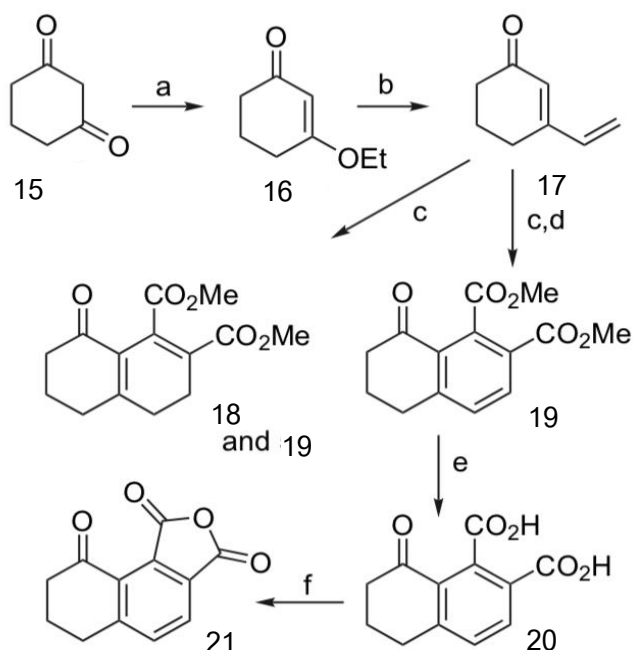
ภาพประกอบ 7 การสังเคราะห์ Hyphodermin A, C และ D (1, 3 และ 4) จากสาร lactol 14

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ มีการรายงานว่าสาร Hyphodermins สามารถยับยั้งเอนไซม์ Protein Phosphatase 1 (PP1) และ Protein Phosphatase 2A (PP2A) ได้ โดยเอนไซม์ PP1 เป็นเอนไซม์ที่สำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของไกลโคเจนที่ทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Berg et al., 2010) ส่วนเอนไซม์ PP2A เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) การส่งทอดสัญญาณเข้าสู่เซลล์ (signal transduction) และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อทำหน้าที่ที่จำเพาะในร่างกาย (cell differentiation) (Liu et al., 2003) และเป็นสารที่มีแนวโน้มในการใช้เป็นยารักษาและป้องกันโรคหอบหืด โรคหลอดเลือดอักเสบชนิดเรื้อรัง โรคหัวใจ รวมถึงโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง เป็นต้น (Loughlin, Jenkins, et al., 2008)

2. การสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermins และฤทธิ์ทางชีวภาพ

Maria J. Petersson และคณะเสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermins เริ่มต้นการเตรียมสาร Naphthofurantrione 21 จาก cyclohexan-1,3-dione 15 โดยมีกระบวนการสังเคราะห์ 5 ขั้นตอน คิดเป็น 27 % yield ของทุกขั้นตอน ดังภาพประกอบ 8 หลังจากนั้นจึงนำสาร Naphthofurantrione 21 มาทำปฏิกิริยากับนิวคลีโอไฟล์ชนิดต่าง ๆ เช่น alcohols, aliphatic amines และ aromatic amines ที่เวลาและตัวทำละลายต่างชนิดกัน ดังตารางที่ 2 ได้อนุพันธ์ Hyphodermins (สารประกอบที่ 22 – 29) ดังภาพประกอบ 9 นอกจากนี้ ยังพบว่า ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง Naphthofurantrione 21 กับ aniline และ benzylamine

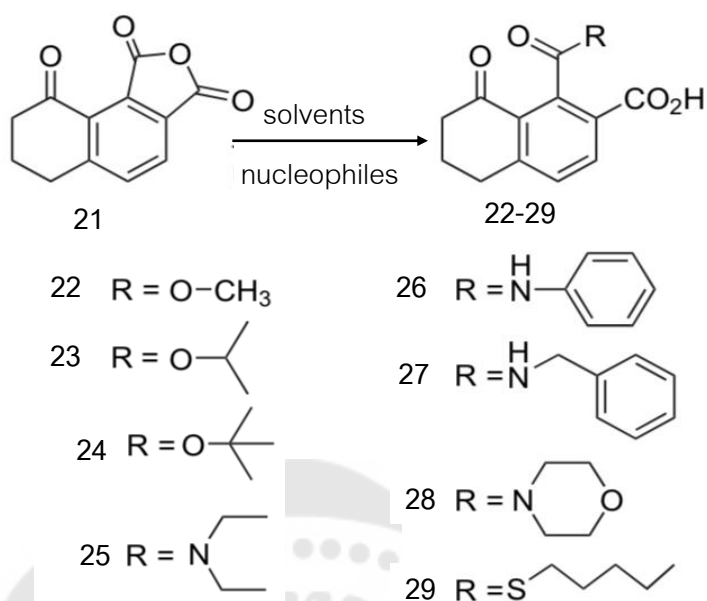
(สารประกอบที่ 26 และ 27 ตามลำดับ) สามารถเกิดการปิดวงได้โดยการหยุดกรดไฮโดรคลอริก เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่ 30 และ 31 ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 10 (Petersson et al., 2007)



(a) ethanol, HCl, rt, 16 h, 96 %; (b) vinyl magnesium bromide, ether, rt, 16 h, 75 %; (c) 1.5 % hydroquinone, dimethyl acetylene dicarboxylate, toluene, reflux, 48 h; (d) Pd/C, acetic acid, reflux, 16 h, 41 %; (e) 10 % NaOH, THF, rt, 4 h, 65 %; (f) acetic anhydride, 50 °C, 16 h, 98 %.

ภาพประกอบ 8 การสังเคราะห์สาร Naphthofurantrione 21

ที่มา: Petersson et al. (2007)



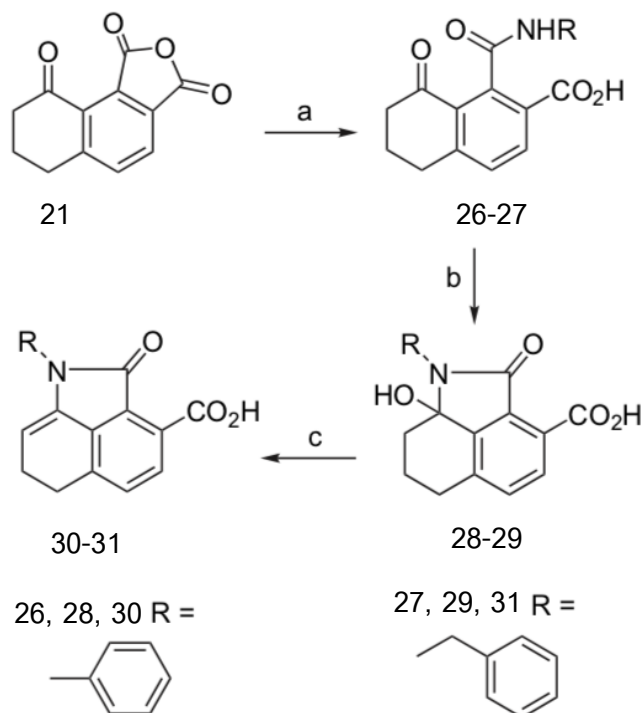
ภาพประกอบ 9 การทำปฏิกิริยาระหว่างสาร Naphthofurantrione 21 กับนิวคลีโอไฟล์ชนิดต่าง ๆ

ที่มา: Petersson et al. (2007)

ตาราง 2 นิวคลีโอไฟล์และตัวทำละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermins

นิวคลีโอไฟล์	ตัวทำละลาย	สภาวะ	ผลิตภัณฑ์	Yield (%)
Methanol	Pyridine in methanol	rt, 16 h, N ₂	22	64
Isopropanol	Pyridine in isopropanol	rt, 16 h, N ₂	23	94
Isopropanol	Pyridine in isopropanol	rt, 16 h, N ₂	23	60
<i>tert</i> -Butanol	Pyridine in <i>tert</i> -butanol	rt, 45 min, N ₂	24	99
Benzylamine	Chloroform	rt, 16 h, N ₂	27	97
Aniline	Chloroform	rt, 15 min, N ₂	26	99
Diethylamine	Ethyl acetate	rt, 2 h, N ₂	25	69
Diethylamine	Ethyl acetate	rt, 16 h, N ₂	25	80
Morpholine	Ethyl acetate	rt, 3 h, N ₂	28	82
1-Pentanethiol	Pyridine in dichloromethane	rt, 16 h, N ₂	29	60

ที่มา: Petersson et al. (2007)



(a) Benzylamine, chloroform (de-acidified) เวลา 45 นาที, **27** 97 %; Aniline, chloroform (de-acidified) เวลา 15 นาที, **26** 99 % (b) Ethyl acetate (de-acidified), เวลา 48 ชม., **29** 99 %; acetone เวลา 48 ชม., **28** 96 %. (c) Two drops of HCl, chloroform เวลา 4 ชม. **31** 72 %; HCl 1 หยด, chloroform เวลา 16 ชม., **30** 78 %.

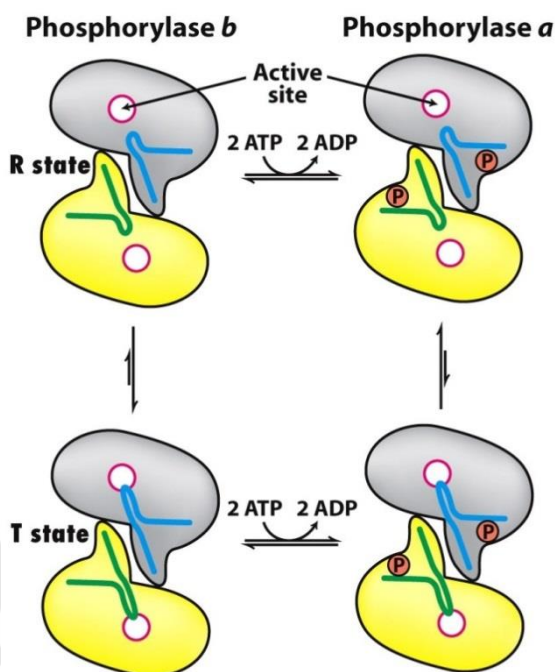
ภาพประกอบ 10 ปฏิกิริยาการปิดวงของสารประกอบที่ 26 และ 27

ที่มา: Petersson et al. (2007)

ต่อมา Wendy A. Loughlin และคณะนำอนุพันธ์ Hyphodermins ดังกล่าวข้างต้นมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase และพบว่า Hyphodermin A, B และ D ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase ในช่วงความเข้มข้นที่ 0.222 – 22 mM ขณะที่อนุพันธ์ของ Hyphodermins บางชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase ที่มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.8 – 1.3 mM ดังตาราง 1 (Loughlin, Pierens, et al., 2008)

3. สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase

Glycogen Phosphorylase (GP) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของไกลโคเจนในตับ เนื่องจากเอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการสลายไกลโคเจนเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยการเติมอนินทรีย์ฟอสเฟต (Pi) ในการสลายพันธะ α -1,4-glycosidic ระหว่างกลูโคสภายในโมเลกุลของไกลโคเจน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Glucose-1-phosphate ลักษณะทั่วไปของเอนไซม์ GP ของมนุษย์ เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 842 เรซิดิวส์ มีมวลโมเลกุล 97.434 kDa และเป็นไดเมอร์ กล่าวคือ เอนไซม์นี้ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย และมี Pyridoxal Phosphophate (PLP) เป็นโคแฟกเตอร์ที่จำเป็นต่อการทำงาน (Palm, Klein, Schinzel, Buehner, & Helmreich, 1990) โดยเอนไซม์นี้สามารถควบคุมได้ทั้งกลไกแบบอัลโลสเตอริกและการเติมหมู่ฟอสเฟต สามารถพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ 2 forms คือ Glycogen Phosphorylase a (GP_a) และ Glycogen Phosphorylase b (GP_b) โดย 2 forms นี้ต่างกันที่ตำแหน่ง Ser-14 โดย GP_a จะเป็น form ของเอนไซม์ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตด้วยกระบวนการ phosphorylation โดยใช้เอนไซม์ Phosphorylase Kinase และเป็นรูปที่ active พบได้ที่ตับ และจะถูกดึงหมู่ฟอสเฟตออกโดยเอนไซม์ Protein Phosphatase 1 (PP1) ให้เปลี่ยนเป็น GP_b ซึ่งอยู่ในรูป inactive ซึ่งพบได้ในกล้ามเนื้อ และทั้ง 2 forms นี้ แบ่งออกเป็น 2 สถานะ คือ สถานะ R และ T (R และ T state) โดย T state จะอยู่ในรูปที่ inactive เนื่องจากมีความสามารถในการจับกับ substrate ได้ต่ำ ในขณะที่ R state อยู่ในรูปที่ active เนื่องจากมีความสามารถในการจับ substrate ได้ค่อนข้างสูง โดย 2 สถานะนี้จะอยู่ในสมดุลซึ่งกันและกัน และโดยทั่วไป GP_a จะอยู่ในรูป active เนื่องจากเกิดสมดุลไปทางสถานะ R มากกว่า ในขณะที่ GP_b อยู่ในรูป inactive เนื่องจากเกิดสมดุลไปทางสถานะ T มากกว่า (Barford, Hu, & Johnson, 1991)



ภาพประกอบ 11 การทำงานของเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase a และ b (GP a และ GP b)

ที่มา: Berg et al. (2010)

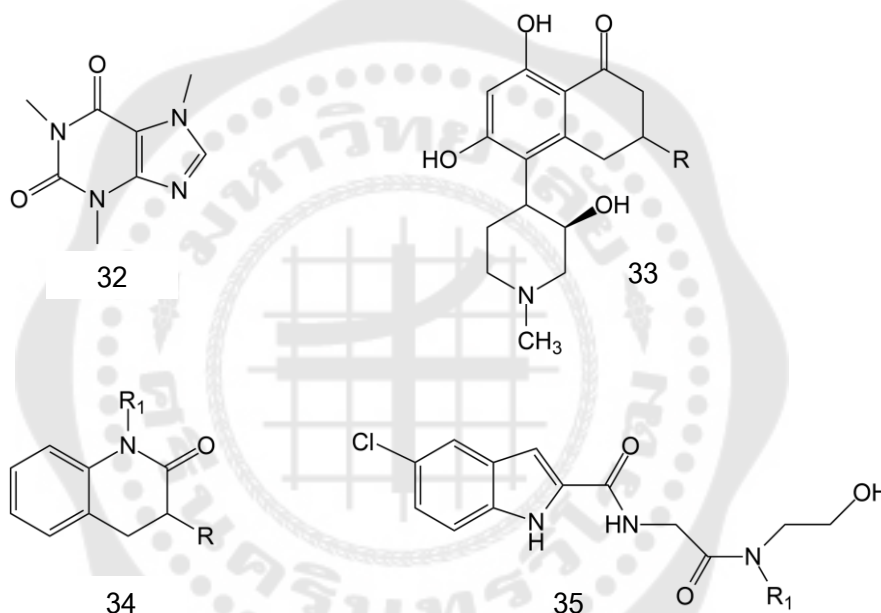
เมตาบอลิซึมของไกลโคเจนเกิดที่สองอวัยวะหลัก คือ ตับและกล้ามเนื้อ ซึ่งในกล้ามเนื้อต้องการใช้กลูโคสเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน ขณะที่ในตับต้องการรักษาสมดุลของความเข้มข้นของกลูโคสโดยรวมของร่างกายให้คงที่ เอนไซม์ GP จัดเป็น isozyme จึงพบเอนไซม์นี้ได้หลายอวัยวะ โดยลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่พบในตับและในกล้ามเนื้อมีความเหมือนกันถึง 90% โดยปกติ GPb ในกล้ามเนื้อจะ active ก็ต่อเมื่อมีความเข้มข้นของ AMP มาก ๆ (สภาวะที่ร่างกายขาดพลังงาน เช่น ขณะออกกำลังกาย) โดย AMP จะจับกับ nucleotide binding site ของเอนไซม์ และทำให้ GPb มีความเสถียรในรูป R state เกิดการสลายไกลโคเจนให้ได้ กลูโคส-1-ฟอสเฟต ขณะที่ ATP จะควบคุมในทิศทางตรงข้าม คือ เมื่อมี ATP มาก ATP จะแย่งกับ AMP ในการจับกับ nucleotide binding site และทำให้ GPb มีความเสถียรในรูป T state จึงไม่มีการสลายไกลโคเจนเพื่อให้ได้พลังงาน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า T และ R state ของ GPb ในกล้ามเนื้อถูกควบคุมด้วยพลังงานภายในเซลล์ รวมถึง glucose-6-phosphate ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมแบบ feedback inhibition ด้วย จะทำให้ phosphorylase a ใน T state ความเสถียรมากกว่า R state

สำหรับการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ GP ในตับนั้นต่างจากในกล้ามเนื้อ เนื่องจากเอนไซม์นี้ในตับจะพบในรูป GP a ที่เปลี่ยนจาก T state เป็น R state เมื่อมีกลูโคสมาจับกับเอนไซม์

นี้ จะทำให้สมดุลเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก R state เป็น T state ทำให้เอนไซม์นี้ไม่ทำงาน ทั้งนี้ เนื่องจากเอนไซม์ GP ในตับทำหน้าที่ในการสลายไกลโคเจนเพื่อเพิ่มระดับของน้ำตาลในเลือดเมื่อ ร่างกายเรามีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ ดังนั้น เมื่อร่างกายได้กลูโคสจากแหล่งอื่น เช่น จากอาหารที่ทานเข้าไป เอนไซม์ GP ในตับจึงไม่จำเป็นต้องทำการสลายไกลโคเจนให้ได้กลูโคส อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ GP ในตับต่างจากเอนไซม์ GP ในกล้ามเนื้อ เอนไซม์ GP ในตับไม่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของ AMP ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ GP ในตับไม่ได้ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของพลังงาน (AMP ATP) นั่นเอง

จากบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์ GP ดังกล่าว จึงทำให้เอนไซม์ชนิดนี้ ถูกใช้เป็นโมเลกุลเป้าหมายในการรักษาภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycaemia) ของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Schweiker et al., 2014) ซึ่งเป็นชนิดที่พบได้ส่วนใหญ่ โดยเบาหวานชนิดนี้มีสาเหตุจากการที่ตับอ่อนไม่สามารถนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ได้ แต่ยังคงสามารถผลิตอินซูลินได้ตามปกติ (Ihmaid, 2018) ปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มีทั้งหมด 14 กลุ่ม แต่มีผู้ป่วยเพียง 36 % เท่านั้นที่สามารถใช้ยาเหล่านี้เพื่อรักษาระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับปกติได้ (Miller, Nguyen, Hu, Lin, & Nguyen, 2014) ดังนั้น ยาที่ใช้ในการรักษาโรคนี้จึงจำเป็นต้องการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพต่อไป ซึ่งยาอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการวิจัยอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ ยาในกลุ่มที่อาศัยกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP โดยการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จัดเป็นอัลโลสเทอริกเอนไซม์ (allosteric enzyme) ซึ่งมีหลายบริเวณในโมเลกุลที่ตัวควบคุม (ตัวเร่งปฏิกิริยาหรือตัวยับยั้งปฏิกิริยา) สามารถเข้าจับได้ โดยเรียกบริเวณเหล่านี้ว่า binding site โดยเอนไซม์ GP ในรูปที่ active เป็น dimer มี 2 subunits โดยแต่ละ subunit ประกอบด้วย 5 binding sites ได้แก่ (1) ตำแหน่ง Ser14 phosphate สำหรับเติมและขจัดหมู่ฟอสเฟต (2) ตำแหน่ง allosteric สำหรับจับกับตัวกระตุ้น AMP และตัวยับยั้ง glucose-1-phosphate (3) ตำแหน่ง catalytic จับกับไกลโคเจนและ glucose-1-phosphate (4) ตำแหน่ง inhibitor สำหรับจับกับโมเลกุลของ purine หรือโมเลกุลที่มีโครงสร้างเป็นวง เช่น adenosine, caffeine, FMN, NADH และ (5) ตำแหน่ง glycogen storage (Johnson, 1992) และเนื่องจากเอนไซม์นี้มีหลาย binding sites ดังนั้น โครงสร้างของตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จึงมีโครงสร้างได้หลากหลาย ตามลักษณะของแต่ละ binding site ตัวอย่างเช่น ตัวยับยั้งแบบอัลโลสเทอริกจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP ที่ตำแหน่ง allosteric ใหม่ (indole) หรือตำแหน่ง allosteric (AMP) โดยทั่วไปมีโครงสร้างเป็น N-heterocycles นอกจากนี้สารประกอบที่มีโครงสร้างเป็น Heterocyclic ยังถูกรายงานว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์นี้ ยกตัวอย่างเช่น caffeine (32)

(Ekstrom et al., 2002), Flavopiridol และอนุพันธ์ของ Flavopiridol (33) (Hampson et al., 2006) จับที่ตำแหน่ง inhibitor, อนุพันธ์ของ 3,4-Dihydro-2-quinolone (34) (Birch et al., 2007) และสาร 5-Chloroindoles (35) (Wright et al., 2005) จับที่ตำแหน่ง allosteric ระหว่างผิวหน้าของ dimer และอนุพันธ์ pyridine ที่จับกับตำแหน่ง allosteric (AMP) รวมถึงสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermins (สาร 5 – 9) ดังตารางที่ 1 และพบว่าจากโครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase จะเห็นได้ว่าโครงสร้างของตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้มีโครงสร้างได้หลากหลาย และโครงสร้างของสารส่วนใหญ่มีวงอะโรมาติก (Aromatic) และไนโตรเจน (Nitrogen) เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล



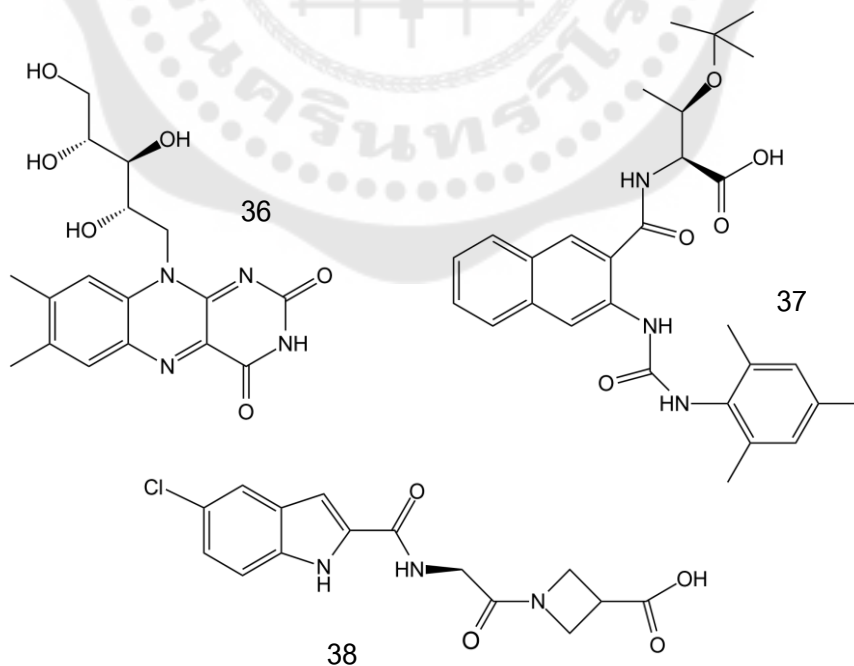
ภาพประกอบ 12 โครงสร้างสารที่รายงานว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้ง Glycogen Phosphorylase

4. การทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งระหว่างอนุพันธ์ Hyphodermin A กับเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase

การทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้ง (Molecular Docking) เป็นหนึ่งในวิธีการค้นหาโมเลกุลใหม่ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีกว่าโครงสร้างของโมเลกุลเดิมที่ได้จากธนาคารฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีน (protein data bank; PDB) หรือที่ได้จากการทดลอง โดยใช้วิธีทางเคมีคอมพิวเตอร์ เพื่อหาอันตรกิริยาที่สำคัญระหว่างตัวยับยั้งเดิมกับตัวยับยั้งใหม่ โดยจะทำให้การออกแบบโมเลกุลของตัวยับยั้งมีประสิทธิภาพมากขึ้น ขั้นตอนการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งเริ่มจากการหาโครงสร้างของโปรตีนจากธนาคารฐานข้อมูล (<https://www.rcsb.org>) จากนั้นนำโมเลกุลของน้ำออกจากโครงสร้างของโปรตีนและเติมไฮโดรเจนอะตอมให้แก่โครงสร้างของโปรตีน จากนั้น

เตรียมโครงสร้างของลิแกนด์โดยการจำลองโครงสร้างสามมิติด้วยโปรแกรม Gaussian view (Duke & O'Leary, 1992) และทำการ optimize โครงสร้างด้วยโปรแกรม Gaussian 09 (Frisch et al., 2016) เพื่อให้ได้โครงสร้างที่มีความเสถียร และทำรีด็อกกิ้ง (Redocking) ด้วยโปรแกรม Autodock 4.2 (Morris et al., 2009) ระหว่างลิแกนด์เดิมกับบริเวณจับเดิมเพื่อคำนวณค่า RMSD (root mean square deviation) ซึ่งเป็นค่าทางสถิติที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่าง 2 โครงสร้าง หรือมากกว่า เพื่อบ่งบอกความน่าเชื่อถือและความเหมาะสมของพารามิเตอร์ที่ใช้ในการทำ โมเลกุลลาร์ดีด็อกกิ้ง ด้วยโปรแกรม Autodock 4.2 ซึ่งรายงานความสามารถในการจับกับเอนไซม์ ของโมเลกุลด้วยค่า B.E. (Binding energy) ซึ่งเป็นค่าพลังงานยึดเหนี่ยวที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้ง กับเอนไซม์ที่ต้องการศึกษา (พรรณราย ศิยะพงษ์, 2556)

การทำงานของเอนไซม์ Glycogen phosphorylase เป็นแบบอัลโลสเทอริกเอนไซม์ (Allosteric enzyme) ซึ่งมีบริเวณจับกับตัวควบคุม (ตัวเร่งปฏิกิริยาหรือตัวยับยั้งปฏิกิริยา) ได้หลายบริเวณ โดยเรียนบริเวณเหล่านี้ว่า บริเวณควบคุม หรือ Binding sites โดยงานวิจัยนี้เลือก บริเวณควบคุมที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการจับกับเอนไซม์ของอนุพันธ์ Hyphodermin A 3 บริเวณควบคุม ได้แก่ บริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site โดยถูกรายงานว่าโมเลกุลของตัวยับยั้ง Riboflavin (36), GSK261(37) และ CP-403,700 (38) จับอย่างจำเพาะตามลำดับ



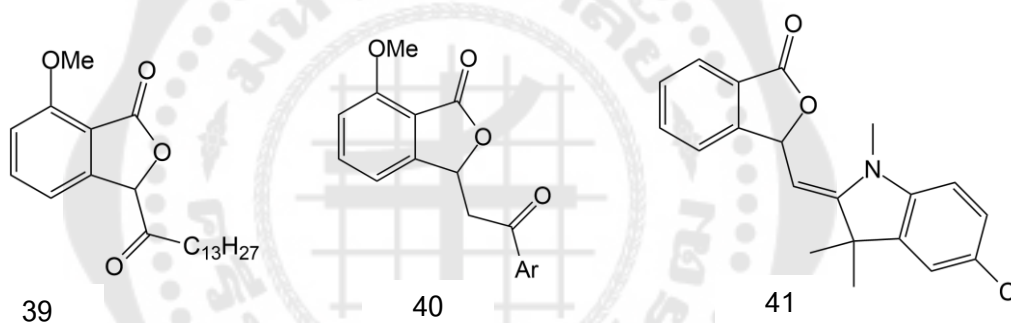
ภาพประกอบ 13 โครงสร้างของ Riboflavin (36), GSK261(37) และ CP-403,700 (38)

เอนไซม์ GP นอกจากถูกควบคุมการทำงานด้วยกระบวนการ phosphorylation ดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังสามารถถูกควบคุมด้วยระบบอัลโลสเทอริก (allosteric control) ด้วย โดยการจับกับตัวเร่งปฏิกิริยาและตัวยับยั้งปฏิกิริยาที่บริเวณควบคุม โดยพบว่าบริเวณ purine site และบริเวณที่จับกับกลูโคสมีบริเวณที่ใกล้ชิดกันการจับกับตัวเร่งปฏิกิริยาและตัวยับยั้งปฏิกิริยาที่บริเวณควบคุม โดยพบว่าบริเวณ purine site และบริเวณที่จับกับกลูโคสมีบริเวณที่ใกล้ชิดกัน ทำให้การทำงานร่วมกันระหว่างโมเลกุลของกลูโคสและตัวยับยั้งปฏิกิริยาที่ purine site สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ โดยทำให้เอนไซม์ในรูปที่ไม่ทำงานมีความเสถียร ซึ่งสามารถป้องกันการเข้าจับของ substrates กับ catalytic site ได้ จากงานวิจัยของ Jennifer L. Ekstrom และคณะรายงานค่า Binding affinity (K_D) ในการจับกับเอนไซม์ Human liver glycogen phosphorylase (HLGP) ที่บริเวณ purine site ของ 18 สารประกอบ โดยการใช้นิยาม biosensor assay ด้วยวิธี SPR assay โดยพบว่า Riboflavin (36) ให้ค่า K_D ที่ดีที่สุด โดยมีค่า $17 \mu\text{M}$ (HLGPa) และ $15 \mu\text{M}$ (HLGPb) (Ekstrom et al., 2002) จากงานวิจัยของ Stephen A. Thomson และคณะ ได้ทำการศึกษาค้นคว้าโครงสร้างของสาร Anthranilimide ต่อการจับกับเอนไซม์ GP ด้วยเทคนิค X-ray crystallographic characterization โดยพบว่าสารในกลุ่มนี้จับกับเอนไซม์ที่บริเวณ AMP site ซึ่งการจับของตัวยับยั้งที่บริเวณนี้ จะจับแบบแข่งขันกับตัวเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ AMP หรือจับเพื่อทำให้เอนไซม์ในรูป Inactive T conformation เสถียร เนื่องจาก AMP site ปรากฏอยู่ที่ dimer interface วางตามแกนของโปรตีนหลักที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนระหว่าง T (inactive) และ R (active) ดังนั้น การจับของโมเลกุลตัวยับยั้งที่ตำแหน่งจะทำให้เกิดการป้องกันการเปลี่ยนกลับไปกลับมา ระหว่าง T และ R state ของเอนไซม์นี้ โดยพบว่าสาร GSK261(37) ถูกรายงานว่ามียุทธศาสตร์ในการยับยั้งเอนไซม์ GPa โดยมีค่า $IC_{50} = 7 \text{ nM}$ (Thomson et al., 2009) จากงานวิจัยของ Virginia L. Rath และคณะทำการศึกษาวงจรควบคุมที่ตัวยับยั้ง indole-2-carboxamides จับกับเอนไซม์ HLGPa ได้แก่ บริเวณ Indole site โดยการเข้าจับของตัวยับยั้งที่บริเวณควบคุมนี้จะทำให้ HLGP ในรูป inactive เสถียร จากการตกผลึกโครงสร้างของสาร CP-403,700 (38) กับเอนไซม์ HLGP ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 45 nM พบว่า side chains ของกรดอะมิโน Arg60, Val64 และ Lys191 ของ HLGPa อยู่ภายในของตัวยับยั้ง โดยทั้ง 5 กรดอะมิโน (38', 40', 53, 57 และ 192) จะเคลื่อนที่เข้ามาล้อมตัวยับยั้งมากขึ้น และมีเพียงพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Arg60 และ Thr38' ของ 2 ซับยูนิตที่ถูกทำลายโดยการจับกับตัวยับยั้ง โดย Thr38' จะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับไนโตรเจนอะตอมของวง indole และ Arg60 สร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำ การเติมเต็มของตัวทำละลายในช่องว่างระหว่าง 2 ซับยูนิตอาจจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการหมุนของ 2 ซับยูนิต (7 องศา) เมื่อ

เอนไซม์นี้ถูกทำงาน ซึ่งจากการทดลองทำให้ทราบว่าตัวยับยั้งจะอยู่ในช่องว่างนี้ ซึ่งจะทำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์นี้ลดลง โดยทำให้เอนไซม์ในรูปแบบ inactive เสถียร (Rath et al., 2000)

5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการสืบค้นงานวิจัยพบว่า สารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง มีโครงสร้างที่หลากหลาย เช่น สาร Isobenzofuranones (39) มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 โดยมีค่า $IC_{50} = 3.24 \mu\text{g/mL}$ (Logrado et al., 2010), สาร 3-(2-aryl-2-oxoethyl) isobenzofuran-1(3H)-ones (40) มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด NALM6 โดยมีค่า $IC_{50} = 5.24 \mu\text{mol/L}$ (da Silva Maia et al., 2016) และสาร Phthalide-fused indolines (41) มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 โดยมีค่า $IC_{50} = 57.7 \mu\text{M}$ (Sheryn, Ninomiya, Koketsu, & Hasbullah, 2019)



ภาพประกอบ 14 โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (สารประกอบที่ 39 – 41)

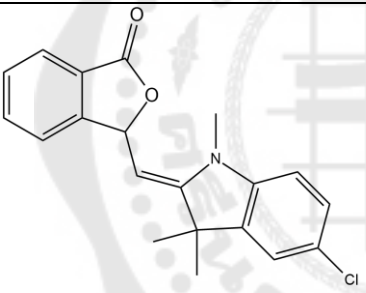
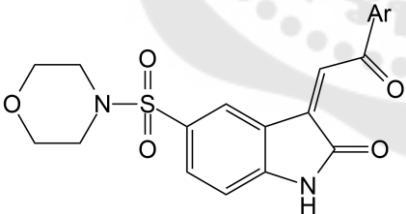
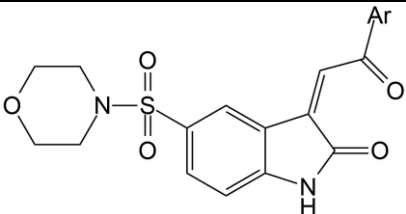
การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT Assay

MTT assay เป็นวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษของสารต่าง ๆ ต่อเซลล์ เพื่อทดสอบว่าสารเหล่านั้นสามารถยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเซลล์ที่ทดสอบได้หรือไม่ โดยใช้สีย้อม (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) โดยหลักการของวิธีการนี้คือการบ่มสารที่ทดสอบในความเข้มข้นต่าง ๆ กับเซลล์ที่ต้องการทดสอบในเวลาที่กำหนด จากนั้นจึงทำบ่มเซลล์นี้ต่อกับ MTT reagent ซึ่งถ้าเซลล์นั้นยังมีชีวิตอยู่ จะสามารถใช้เอนไซม์กลุ่ม (NAD(P)H-dependent cellular oxidoreductase ที่มีอยู่ในไมโทคอนเดรีย เพื่อรีดิวซ์ tetrazolium dye MTT ให้เป็น Formazan ซึ่งเป็นผลึกสีม่วงที่ไม่ละลายน้ำ และจึงติดตามปริมาณของ Formazan ที่เกิดโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ขณะที่เซลล์ที่ตายแล้วไม่มีเอนไซม์ที่จะสามารถทำให้เกิด Formazan ได้ (Van, Kaspers, & Cloos, 2011) ดังนั้น ด้วยวิธีการนี้จึงสามารถใช้ติดตามว่าสารที่ทำการทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเซลล์ที่ทดสอบได้หรือไม่ เพียงใด

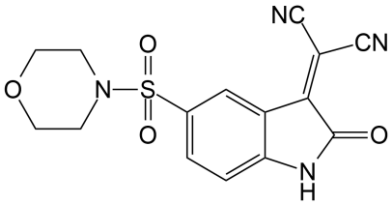
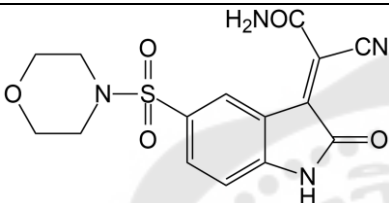
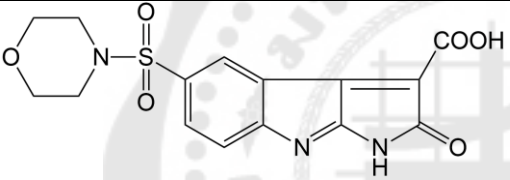
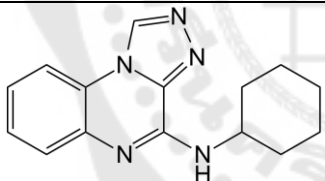
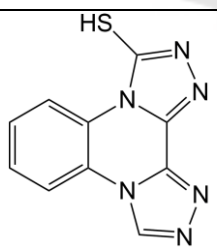
ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และ SK-Hep-1

เซลล์มะเร็งตับ เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้ต่อไปเรื่อย ๆ โดยไม่เข้าสู่การตายของเซลล์ หรือเรียกว่า immortalized cell โดยในปี ค.ศ. 2018 มะเร็งตับถูกรายงานว่าเป็น 1 ใน 6 ลำดับของมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุดในเพศชาย และเป็น 1 ใน 9 ลำดับที่พบได้บ่อยที่สุดในเพศหญิงของประชากรทั่วโลก (Bray et al., 2018) โดยปกติเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เป็นเซลล์มะเร็งที่ถูกใช้ในการศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมของยา ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีอัตราการเพิ่มจำนวนและขนาดของเซลล์ที่สูง เป็นเซลล์ที่เจริญเป็น monolayer รวมกันเป็นกลุ่มเล็ก เจริญสมบูรณ์เป็นขนาดใหญ่จากการกระตุ้นด้วย human growth hormone โดยตัวอย่างของสารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 แสดงดังตาราง 3

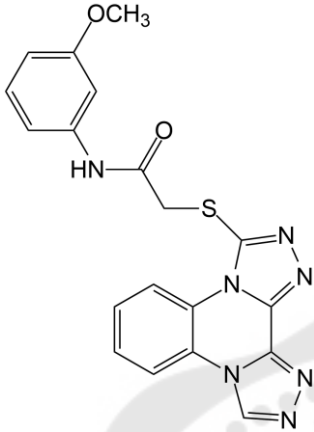
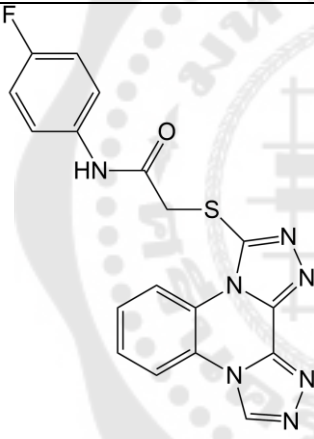
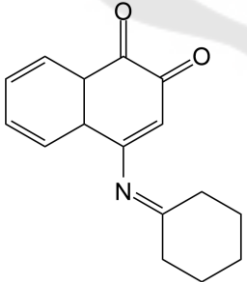
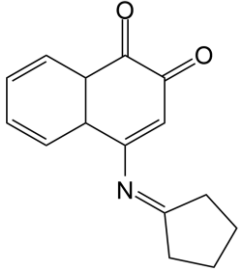
ตาราง 3 สารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2

สารประกอบ	IC ₅₀	เอกสารอ้างอิง
 <p>(41)</p>	57.7 μ M	Sheryn et al. (2019)
 <p>(42); Ar = C₆H₄NHCOCH₃-3</p>	6.09 \pm 0.32 μ M	Sheryn et al. (2019)
 <p>(43); Ar = C₆H₄OCOCH₃-4</p>	4.41 \pm 0.12 μ M	El-Sharief et al. (2019)

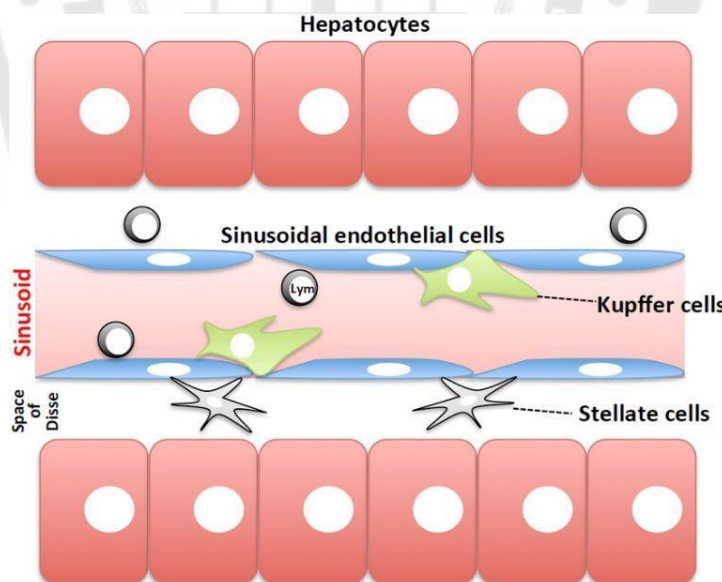
ตาราง 3 (ต่อ)

สารประกอบ	IC ₅₀	เอกสารอ้างอิง
 <p>(44)</p>	6.08 ± 0.34 μM	El-Sharief et al. (2019)
 <p>(45)</p>	5.19 ± 0.14 μM	El-Sharief et al. (2019)
 <p>(46)</p>	3.63 ± 0.07 μM	El-Sharief et al. (2019)
 <p>(47)</p>	0.63 ± 0.06 μM	Ibrahim et al. (2018)
 <p>(48)</p>	0.56 ± 0.04 μM	Ibrahim et al. (2018)

ตาราง 3 (ต่อ)

สารประกอบ	IC ₅₀	เอกสารอ้างอิง
 <p>(49)</p>	0.50 ± 0.04 μM	Ibrahim et al. (2018)
 <p>(50)</p>	0.76 ± 0.06 μM	Ibrahim et al. (2018)
 <p>(51)</p>	7.37 μM	Shukla, Srivastava, Shrivastava, Sodhi, and Kumar (2012)
 <p>(52)</p>	7.77 μM	Shukla et al. (2012)

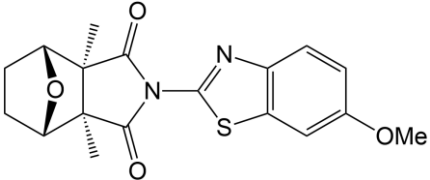
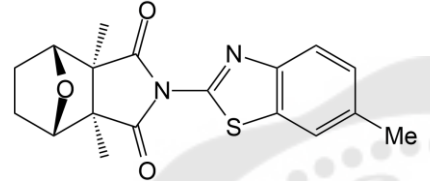
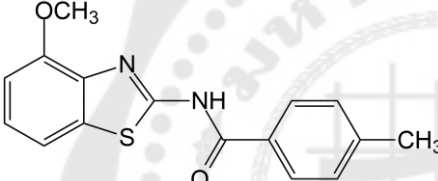
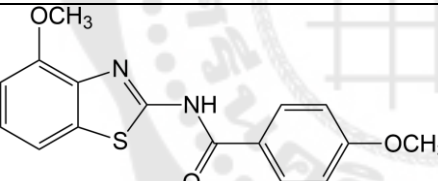
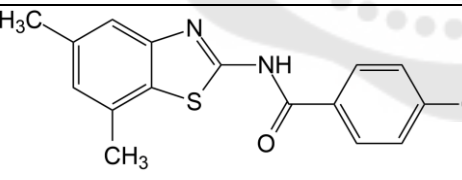
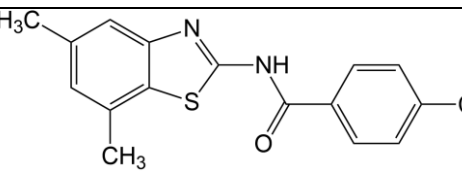
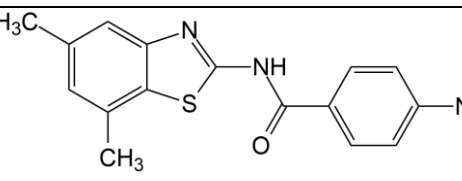
เซลล์มะเร็งตับชนิด SK-Hep-1 เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษามะเร็งตับปฐมภูมิ (hepatocellular carcinoma) และชีววิทยาเกี่ยวกับตับ โดยเซลล์ชนิดนี้จะต่างกับเซลล์ตับปกติ (normal hepatocytes) และเซลล์มะเร็งตับชนิดอื่น ๆ ในเชิงการแสดงออกของยีนส์และระดับของโปรตีน ซึ่งพบว่ามีลักษณะที่สำคัญที่พบ ได้แก่ เซลล์เนื้อเยื่อบุผนังหลอดเลือด (Endothelial-specific makers) และลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ที่บ่งบอกว่า เป็นต้นกำเนิดของเซลล์บุผนังหลอดเลือด (Endothelial origin) ทั้งการแสดงออกของหน้าที่การลำเลียงสารและการสร้างท่อ (tubular) การศึกษาเซลล์นี้กับเซลล์ liver sinusoidal endothelial จะดีกว่าใช้ในการศึกษาของเซลล์มะเร็งตับ SK-Hep1: not hepatocellular carcinoma cells but a cell model for liver sinusoidal endothelial cells (Fanelli & Alex, 2016) โดยเซลล์ Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) สร้างเป็นชั้นกำแพงของผนังหลอดเลือดในตับ (Liver sinusoids) โดยเซลล์นี้พบเพียง 15 – 20 % ของเซลล์ตับ แต่คิดเป็น 3 % ของปริมาตรตับเท่านั้น หนึ่งในบทบาทหน้าที่ของเซลล์นี้ เกี่ยวกับกระบวนการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ และแผลในตับที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการติดเชื้อ (Poisson et al., 2017) โดยตัวอย่างของสารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด SK-Hep-1 แสดงดังตาราง 4



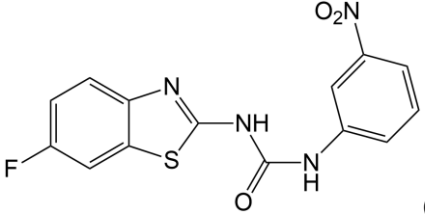
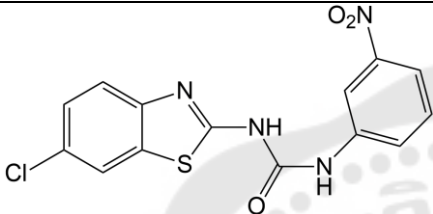
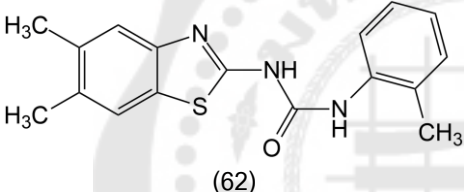
ภาพประกอบ 15 โครงสร้างของตับที่แสดงถึงส่วนของ Hepatocytes และ Liver sinusoid

ที่มา: Alessandra (2018)

ตาราง 4 สารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด SK-Hep-1

สารประกอบ	Cytotoxicity	เอกสารอ้างอิง
 <p>(53)</p>	MTS ₅₀ = 3 – 6 µg/mL	Kok et al. (2007)
 <p>(54)</p>	MTS ₅₀ = 12.5 – 25 µg/mL	Kok et al. (2007)
 <p>(55)</p>	GI ₅₀ = 2.01 µg/mL	Song et al. (2008)
 <p>(56)</p>	GI ₅₀ = 2.11 µg/mL	Song et al. (2008)
 <p>(57)</p>	GI ₅₀ = 1.18 µg/mL	Song et al. (2008)
 <p>(58)</p>	GI ₅₀ = 1.36 µg/mL	Song et al. (2008)
 <p>(59)</p>	GI ₅₀ = 1.74 µg/mL	Song et al. (2008)

ตาราง 4 (ต่อ)

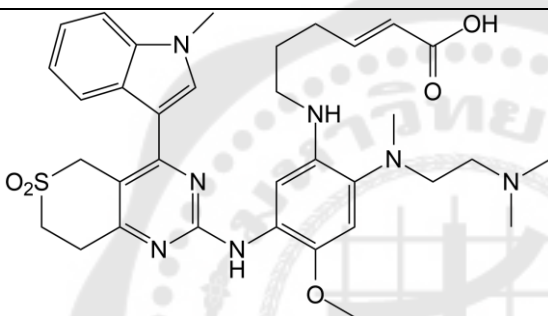
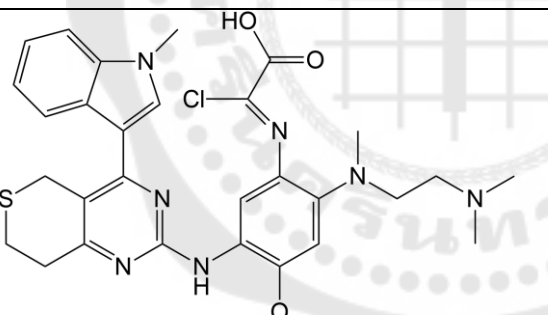
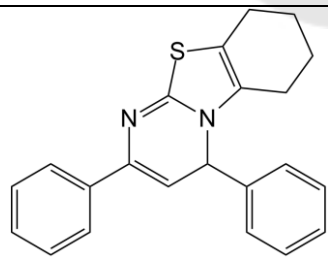
สารประกอบ	Cytotoxicity	เอกสารอ้างอิง
 <p>(60)</p>	$GI_{50} = 1.96 \mu\text{g/mL}$	Song et al. (2008)
 <p>(61)</p>	$GI_{50} = 2.21 \mu\text{g/mL}$	Song et al. (2008)
 <p>(62)</p>	$GI_{50} = 0.18 \mu\text{g/mL}$	Song et al. (2008)

ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549

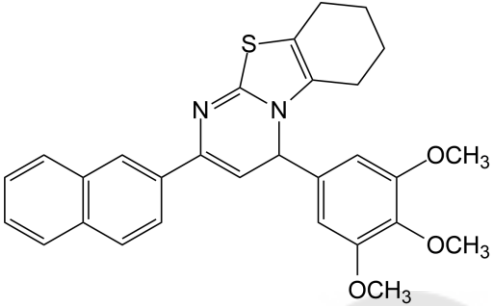
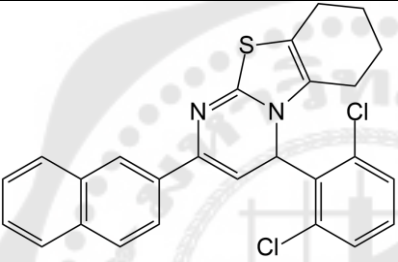
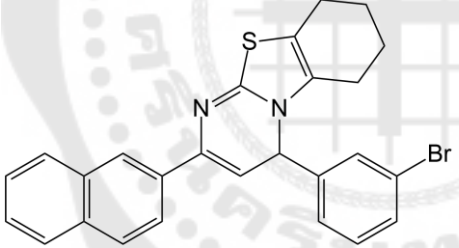
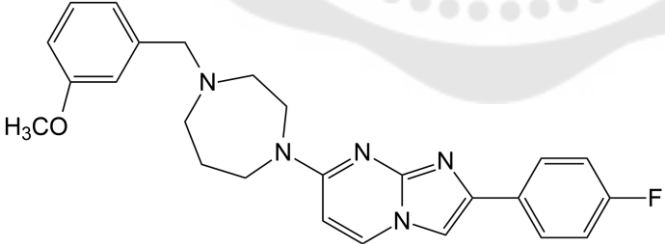
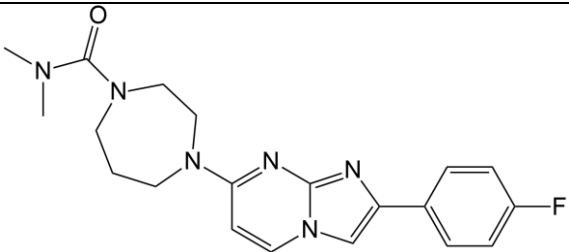
มะเร็งที่เริ่มต้นขึ้นในปอดจะถูกเรียกว่า มะเร็งปอดระดับปฐมภูมิ (primary lung cancer) แต่หากมะเร็งมีการแพร่จากอวัยวะอื่นเข้าสู่ปอดจะเรียกว่า มะเร็งปอดระดับทุติยภูมิ (secondary lung cancer) โดยมะเร็งปอดระดับปฐมภูมิ จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ กลุ่ม SCLC (small cell lung cancer) พบเพียง 15 – 20 % ของผู้ป่วยมะเร็งปอด โดยทั่วไปมีสาเหตุมาจากการสูบบุหรี่เนื้ออกเริ่มต้นขึ้นจากเซลล์ของ neuroendocrine ภายในปอดและกลุ่ม NSCLC (non small cell lung cancer) ซึ่งกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด พบถึง 80 – 85 % ของผู้ป่วยมะเร็งปอด โดยแบ่งมะเร็งกลุ่มนี้ออกเป็น 3 ชนิดหลัก ได้แก่ 1. Adenocarcinoma ซึ่งเป็นชนิดที่พบได้ทั่วไปและเริ่มต้นขึ้นในเซลล์ mucus making gland ภายในทางเดินหายใจชั้นใน ซึ่งเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 จัดอยู่ในกลุ่มนี้, 2. squamous cell carcinoma มะเร็งชนิดนี้พัฒนามาจาก flat cells ซึ่งปกคลุมพื้นผิวของทางเดินหายใจซึ่งเจริญใกล้ศูนย์กลางของปอด และ 3. large cell carcinoma โดยมะเร็งทั้งสามชนิดนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเนื่องจากการรักษาเหมือนกัน

เซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 เป็นเซลล์เยื่อเมือก เป็นเซลล์ต้นแบบสำหรับการศึกษามะเร็งปอดและพัฒนาตัวยาที่ใช้ในการรักษามะเร็ง โดยมีต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อของปอด ซึ่งเป็นเยื่อเมือกที่ตอบสนองต่อการแพร่ของสารต่าง ๆ เช่น น้ำ สารละลายไอออน ผ่านเข้าออกถุงลม (Cancer Research UK, 2020) ตัวอย่างของสารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดนี้ แสดงดังตาราง 5

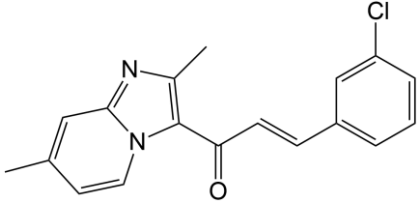
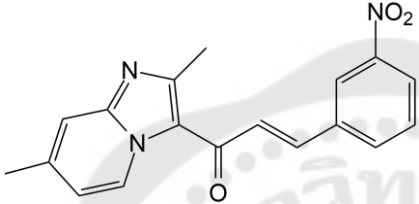
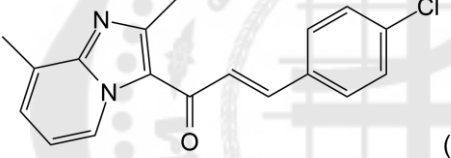
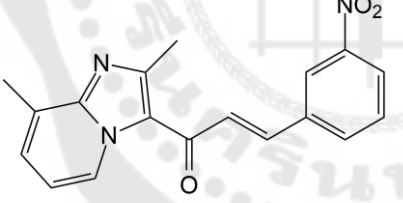
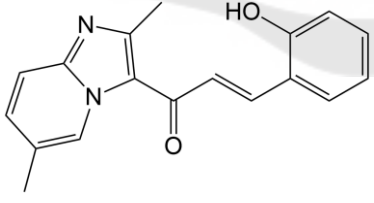
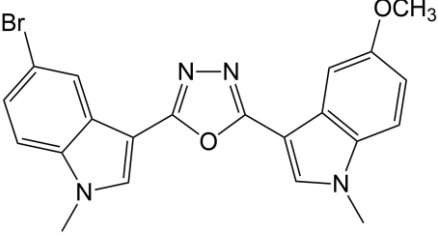
ตาราง 5 สารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549

สารประกอบ	IC ₅₀	เอกสารอ้างอิง
 <p>(63)</p>	0.057 μM	Zhao et al. (2020)
 <p>(64)</p>	0.716 μM	Zhao et al. (2020)
 <p>(65)</p>	9.6 ± 0.4 μM (24hr)	Sekhar et al. (2020)

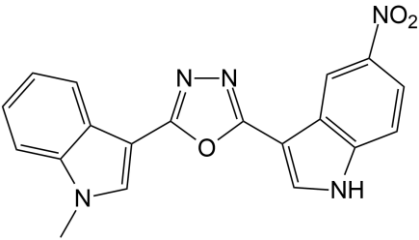
ตาราง 5 (ต่อ)

สารประกอบ	IC ₅₀	เอกสารอ้างอิง
 <p>(66)</p>	5.1 ± 0.3 μM (24hr)	Sekhar et al. (2020)
 <p>(67)</p>	14.3 ± 0.3 μM (24hr)	Sekhar et al. (2020)
 <p>(68)</p>	16.8 ± 0.6 μM (24hr)	Sekhar et al. (2020)
 <p>(69)</p>	4.14 μM	Mantipally et al. (2019)
 <p>(70)</p>	5.98 μM	Mantipally et al. (2019)

ตาราง 5 (ต่อ)

สารประกอบ	IC ₅₀	เอกสารอ้างอิง
 <p>(71)</p>	29.0 ± 0.9 mg/mL	Kuthyala, Nagaraja, Sheik, Hanumanthappa, and Kumar S (2019)
 <p>(72)</p>	7.0 ± 2.1 mg/mL	Kuthyala et al. (2019)
 <p>(73)</p>	9.1 ± 1.2 mg/mL	Kuthyala et al. (2019)
 <p>(74)</p>	32.0 ± 2.2 mg/mL	Kuthyala et al. (2019)
 <p>(75)</p>	35.6 ± 0.8 mg/mL	Kuthyala et al. (2019)
 <p>(76)</p>	24.2 ± 0.89 μM	Sreenivasulu et al. (2020)

ตาราง 5 (ต่อ)

สารประกอบ	IC ₅₀	เอกสารอ้างอิง
 <p>(77)</p>	3.3 ± 0.85 μM	Sreenivasulu et al. (2020)

จากการสืบค้นงานวิจัย พบว่า เมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารส่วนใหญ่ที่มีฤทธิ์
 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเหล่านี้ พบว่ามีลักษณะที่สำคัญ 2 ลักษณะ ที่ทำให้สารประกอบ
 เหล่านี้มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ได้แก่ ความเป็นอะโรมาติก
 (aromatics) และการมีส่วนของหมู่อะมิโนหรือไนโตรเจนบนกลุ่มของ heterocyclic อีกทั้งยังพบว่า
 การแทนที่ของหมู่แฮโลเจนยังทำให้ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น
 เช่นกัน ด้วยลักษณะสำคัญของโครงสร้างที่หลากหลายของสารเหล่านี้ ผู้วิจัยจึงสนใจในการ
 ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร Hyphodermin A และอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยการ
 ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และ SK-Hep-1 และเซลล์มะเร็งปอด
 ชนิด A549 ด้วยวิธี MTT assay (Lirdprapamongkol et al., 2009)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย
3. วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเห็ด *H. radula* เพื่อให้ผลิตสาร Hyphodermin A ในปริมาณมาก

2. การสกัด แยก ทำบริสุทธิ์และยืนยันโครงสร้างของสาร Hyphodermin A

3. การสังเคราะห์ แยก ทำบริสุทธิ์และหาโครงสร้างอนุพันธ์ Hyphodermin A

4. การทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งระหว่างอนุพันธ์ Hyphodermin A กับเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase

5. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. เอมินที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (ammonium sulfate, urea, thioacetate, sulfamic acid, 4-aminophenol, lysine, cysteine, Aniline และอนุพันธ์ ได้แก่ 4-Bromoaniline, 4-Chloroaniline, 4-Fluoroaniline, 4-Iodoaniline)

2. Bacterial agar powder จาก บริษัท Himedia

3. Bacto™ Malt extract จาก บริษัท Difco, BBL / USA

4. Bacto™ Yeast extract จาก บริษัท Difco, BBL / USA

5. Cancer cell line 3 ชนิด ได้แก่ Hep2, SK-Hep-1 และ A549

6. Hydrochloric acid (HCl)

7. *H. radula* จาก สถาบัน Tottori Mycological Institute, Tottori ประเทศญี่ปุ่น

8. Silica gel 60 (0.063 – 0.200 mm) จากบริษัท Merck (Catalogue Number :107734)

9. Sodium hydroxide (NaOH)

10. Sodium phosphate buffer (pH 7.0)

11. Sodium sulfate (Na₂SO₄)

12. Solvents ได้แก่ Acetone และ Methanol

13. Solvents สำหรับ column chromatography ได้แก่ Hexane, Ethyl acetate
14. Solvents สำหรับ HPLC ได้แก่ Acetonitrile (HPLC grade)
15. Solvents สำหรับ NMR ได้แก่ Acetone- d_6 , DMSO- d_6
16. Trifluoroacetic acid (TFA)

2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. pH meter
2. Plastic petri dish
3. คอลัมน์โครมาโทกราฟี
4. เครื่อง Biotage flash chromatography รุ่น ISO-PSF
5. เครื่อง Centrifugal vaporizer EYELA รุ่น CVE-200D
6. เครื่อง Bruker Advance 300, 400 และ 500 MHz FT-NMR spectrometer
7. เครื่อง Ultrasonic degassing cleaner
8. เครื่อง Mass spectrometer
9. เครื่อง Rotary evaporator
10. เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)
11. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)
12. ตู้ปลอดเชื้อ
13. แผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) silica gel 60
14. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำร้อนแรงดันสูง (Autoclave)
15. หลอด Eppendorff ขนาด 1.5 mL microcentrifuge tube
16. หัวเข็มเชื้อ (Inoculation Loop)

3. วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเห็ด *H. radula* เพื่อให้ผลิตสาร Hyphodermin A ในปริมาณมาก

1.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเห็ด

อาหารแข็ง

อาหารสูตร MY medium ใน 1 ลิตรประกอบด้วย malt extract 20 กรัม yeast extract 2 กรัม และปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.6 ด้วยสารละลาย 0.1 M HCl และเติม agar powder 1.5 % (g/mL) ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำร้อนแรงดันสูง (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเทอาหารปริมาตร 20 mL ลงในจานเพาะเชื้อ (plastic petri dish) แต่ละจานรอจนอาหารแข็งตัว เพื่อใช้ทำการศึกษาต่อไป

อาหารเหลว

อาหารสูตร MY medium ใน 1 ลิตรประกอบด้วย malt extract 20 กรัม yeast extract 2 กรัม และปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.6 ด้วยสารละลาย 0.1 M HCl นำอาหารแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ (ขนาด 125 mL) ปริมาตร 25 mL ต่อ 1 ขวด หรือขวดรูปชมพู่ (ขนาด 500 mL) ปริมาตร 125 mL ปิดด้วยจุกสำลีแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำร้อนแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *H. radula*

1.2.1) ศึกษาปัจจัยของสภาวะการให้อากาศในการเลี้ยง

นำเห็ด *H. radula* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว โดยทำการตัดเชื้อเห็ดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณ 5x5 mm² จำนวน 3 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเหลว 25 mL ที่เตรียมไว้ จากนั้นเป็นการศึกษาสภาวะการให้อากาศในการเลี้ยง โดยมีสภาวะการให้อากาศ ดังนี้

1. ใช้เครื่องเขย่าแบบวงกลม (orbital shaker, 125 rpm) เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28 – 32 °C) เป็นเวลา 5 วัน
2. ใช้เครื่องเขย่าแบบไป-กลับ (reciprocal shaker, 125 rpm) เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28 – 32 °C) เป็นเวลา 5 วัน
3. ตั้งบ่มไว้โดยไม่เขย่า เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28 – 32 °C) เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate และตรวจสอบปริมาณสาร Hyphodermin A ในแต่ละสภาวะที่ศึกษา ด้วยเทคนิค TLC

1.2.2) ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยง

เมื่อได้สภาวะการให้อากาศที่เหมาะสมแล้ว เป็นการศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ Hyphodermin A ในปริมาณมาก โดยทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 7, 15, 21 และ 30 วัน ตามลำดับ จากนั้นทำการกรองเอาตัวเซลล์ออก และสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate และตรวจสอบปริมาณสาร Hyphodermin A ในแต่ละสภาวะที่ศึกษาด้วยเทคนิค TLC

2. การสกัด แยก ทำบริสุทธิ์และยืนยันโครงสร้างของสาร Hyphodermin A

2.1 การเตรียมสารสกัดจากเห็ด *H. radula*

จากนั้นเป็นการเพิ่มปริมาณการผลิต โดยนำเห็ด *H. radula* ที่เลี้ยงในอาหารแข็งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ $5 \times 5 \text{ mm}^2$ จำนวน 10 ชิ้น ใส่ลงใน flask ขนาด 500 mL ซึ่งบรรจุอาหาร MY 125 mL ทั้งหมดจำนวน 10 flasks จากนั้นทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะการให้อากาศ และระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 1 เมื่อครบกำหนดเวลาการเลี้ยง นำมากรองเอาส่วนของเชื้อเห็ดออก จากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองได้มาสกัดด้วย ethyl acetate ทำการสกัดสารจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำส่วนของสารสกัดในชั้น ethyl acetate เติม Sodium sulfate anhydrous เพื่อดึงน้ำออกจากสารสกัด และระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ความดันประมาณ 200 mbar ได้เป็นสารสกัดชั้น ethyl acetate จากนั้นเก็บสารสกัดหยาบที่ได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ เพื่อทำการทดลองต่อไป

2.2 การแยกและทำบริสุทธิ์สาร Hyphodermin A

นำสารสกัดหยาบจากเห็ด *H. radula* ในขั้นตอน 2.1 มาแยกและทำบริสุทธิ์สารด้วยเครื่อง Biotage flash chromatography รุ่น ISO-PSF โดยละลายสารสกัดหยาบด้วย Acetone ปริมาณเล็กน้อย จากนั้นใช้ระบบ Normal phase ในการแยกสารรอบแรก โดยการชะด้วยการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane และ ethyl acetate (สภาวะดังตารางที่ 6) หลังจากนั้นรวมสารที่ให้ผลของโครมาโทแกรม เหมือนกันไว้ในกลุ่มสารเดียวกันและระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ความดันประมาณ 200 mbar และตรวจสอบสารในแต่ละกลุ่มด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ เปรียบเทียบกับ $^1\text{H-NMR}$ ของสาร Hyphodermin A หลังจากนั้นนำกลุ่มสารที่มี Hyphodermin A เป็นองค์ประกอบ มาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยระบบแบบ Reverse phase โดยการชะด้วยการลดขั้วของตัวทำละลายผสมระหว่าง acetonitrile และ น้ำ (สภาวะดังตาราง 6) และระเหยตัวทำละลายให้แห้งด้วยเครื่อง centrifugal evaporator ที่อุณหภูมิ $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$

ตาราง 6 แสดงสภาวะที่ใช้ในการแยกและทำบริสุทธิ์สารด้วยเครื่อง Biotage flash chromatography

สภาวะ	Normal phase	Reverse phase
Sample	Crude EtOAc extract	Fraction from normal phase
Cartridge	SNAP Ultra 25g (Silica)	SNAP Ultra C18 12g
Flowrate	25mL/min	12mL/min
Detector	256 และ 280 nm	256 และ 280 nm
Solvents (gradient)	25 – 100 % Ethyl acetate in hexane	15 – 31 % Acetonitrile in water + 0.05 % TFA
Start threshold	20 mAU	40 mAU
Max Fraction Volume	17 mL	10 mL

2.3 ยืนยันโครงสร้างของสาร Hyphodermin A ที่แยกจากเห็ด *H. radula*

นำสารบริสุทธิ์ที่คาดว่าจะเป็็นสาร Hyphodermin A ที่แยกได้ มายืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทาง Spectroscopy ได้แก่ HRMS (High Resolution Mass Spectrometry) รวมทั้ง 1D และ 2D NMR (Nuclear Magnetic Resonance) เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของสาร Hyphodermin A ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Henkel et al., 1997)

3. การสังเคราะห์ แยก ทำบริสุทธิ์และหาโครงสร้างอนุพันธ์ Hyphodermin A

อนุพันธ์ Hyphodermin A สังเคราะห์โดยใช้การทำปฏิกิริยาระหว่างสาร Hyphodermin A และเอมีน (ปริมาณมากเกินพอ) โดยมีขั้นตอน ดังนี้

3.1 การทดสอบเอมีนที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ เริ่มจากการผสมสาร Hyphodermin A และเอมีน ชนิดต่าง ๆ ทั้งหมด 10 ชนิด ในปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 μ L ดังแสดงในตารางที่ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C ติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC

ตาราง 7 ปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพื่อเลือกเอมีนที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์

ปฏิกิริยา	ชนิดเอมีน	ปริมาณสารของเอมีน ในตัวทำละลาย (20 μ L)	ปริมาณสารของ Hyphodermin A ใน methanol (20 μ L)	ปรับปริมาตรด้วย ตัวทำละลาย (60 μ L)
1	Ammonium sulfate (NH_4) ₂ SO ₄	4.00 μ mol ใน 0.1 M NaPi Buffer	0.0770 μ mol	0.1 M NaPi Buffer
2	Urea (NH ₂ CONH ₂)	4.00 μ mol ใน 0.1 M NaPi Buffer	0.0770 μ mol	0.1 M NaPi Buffer
3	Thioacetamide (C ₂ H ₅ NS)	4.00 μ mol ใน 0.1 M NaPi Buffer	0.0770 μ mol	0.1 M NaPi Buffer
4	Sulfamic acid (NH ₂ SO ₃ H)	4.00 μ mol ใน 0.1 M NaPi Buffer	0.0770 μ mol	0.1 M NaPi Buffer
5	Cysteine (C ₃ H ₇ NO ₂ S)	4.00 μ mol ใน 0.1 M NaPi Buffer	0.0770 μ mol	0.1 M NaPi Buffer
6	Aniline (C ₆ H ₅ NH ₂)	4.00 μ mol ใน methanol	0.0770 μ mol	0.1 M NaPi Buffer
7	4-Fluoroaniline (C ₆ H ₆ FN)	0.40 μ mol ใน methanol	0.1077 μ mol	Methanol
8	4-Chloroaniline (C ₆ H ₆ ClN)	0.40 μ mol ใน methanol	0.1077 μ mol	Methanol
9	4-Bromoaniline (C ₆ H ₆ BrN)	0.40 μ mol ใน methanol	0.1077 μ mol	Methanol
10	4-Iodoaniline (C ₆ H ₆ IN)	0.40 μ mol ใน methanol	0.1077 μ mol	Methanol

3.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A

เลือกปฏิกิริยาการสังเคราะห์จากข้อ 3.1 ที่ให้ % yield ของผลิตภัณฑ์ที่ดี เพื่อทำการขยายขนาดปฏิกิริยา โดยผสมสารละลาย Hyphodermin A และเอมีนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ aniline , 4-fluoroaniline, 4-chloroaniline, 4-bromoaniline และ 4-iodoaniline ในขวดก้นกลม ปริมาตรรวมเป็น 10 mL โดยใช้ปริมาณสาร ดังตาราง 8 กวนสารละลายผสมด้วย magnetic

stirrer ปั่นที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C ที่ความดันประมาณ 200 mbar

ตาราง 8 ปริมาณของสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A

ปฏิกิริยา	ชนิดเอมีน	ปริมาณสารของเอมีน ใน methanol (2 mL)	ปริมาณสารของ Hyphodermin A ใน methanol (2 mL)	ปรับปริมาตรด้วย ตัวทำละลาย (6 mL)
1	Aniline (C ₆ H ₅ NH ₂)	0.40 mmol	0.096 mmol	0.1 M NaPi Buffer
2	4-Fluoroaniline (C ₆ H ₄ FN)	0.40 mmol	0.083 mmol	Methanol
3	4-Chloroaniline (C ₆ H ₄ ClN)	0.40 mmol	0.077 mmol	Methanol
4	4-Bromoaniline (C ₆ H ₄ BrN)	0.40 mmol	0.076 mmol	Methanol
5	4-Iodoaniline (C ₆ H ₄ IN)	0.40 mmol	0.076 mmol	Methanol

3.3 การแยกและทำบริสุทธิ์อนุพันธ์ Hyphodermin A

ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาระหว่างสาร Hyphodermin A กับ Aniline

นำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ในขั้นตอน 3.2 มาแยกและทำบริสุทธิ์สารผลิตภัณฑ์ ด้วยเครื่อง Biotage flash chromatography โดยใช้ระบบ Reverse phase (Cartridge : SNAP Ultra C18 30g) ซะคอลัมน์ด้วยการลดหัวของตัวทำละลายผสม acetonitrile และน้ำ (0.05 % TFA) ด้วยอัตราการไหล 25mL/min โดยถูกชะออกมาที่ 60 % acetonitrile จากนั้นรวมสารผลิตภัณฑ์และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C ที่ความดันประมาณ 200 mbar

ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาระหว่างสาร Hyphodermin A กับ 4-Fluoroaniline, 4-Chloroaniline, 4-Bromoaniline และ 4-Iodoaniline

นำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ในขั้นตอน 3.2 มาแยกและทำบริสุทธิ์สารผลิตภัณฑ์ ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ silica gel 60 (0.063 – 0.200 mm) โดยชะคอลัมน์ด้วยการเพิ่มหัวของตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ ethyl acetate ซึ่งผลิตภัณฑ์

ที่เกิดจาก Hyphodermin กับ 4-Fluoroaniline ถูกชะออกมาที่ 30 % hexane ใน ethyl acetate ส่วนผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก Hyphodermin กับ 4-Chloroaniline หรือ 4-Bromoaniline หรือ 4-Iodoaniline ถูกชะออกมาที่ 55 % hexane ใน ethyl acetate จากนั้นรวมสารผลิตภัณฑ์และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C

3.4 การหาโครงสร้างของอนุพันธ์ Hyphodermin A

ศึกษาข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ด้วยเทคนิค HRMS และเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC และ HMBC โดยใช้เครื่อง Bruker Advance 400 และ 500 MHz FT-NMR spectrometer ที่ 400 และ 500 MHz สำหรับ $^1\text{H-NMR}$ spectrum และที่ 100 และ 125 MHz สำหรับ $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ในตัวทำละลาย DMSO- d_6 เพื่อศึกษาโครงสร้างของอนุพันธ์ Hyphodermin A ที่สังเคราะห์

4. การทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งกับเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase

4.1 การเตรียมโครงสร้างของโปรตีน

เตรียมโครงสร้างของโปรตีนโดย download โปรตีนจาก Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) โดยใช้เอนไซม์ Human Liver Glycogen Phosphorylase (HLGP) รหัสโปรตีน 1L5R ซึ่งมีโครงสร้างของสาร Riboflavin (36) เป็นลิแกนด์ที่จับอย่างจำเพาะที่บริเวณ Purine site (Ekstrom et al., 2002) , 3DDS ที่มีโครงสร้างของสาร GSK261 (37) เป็นลิแกนด์ที่จับอย่างจำเพาะที่บริเวณ AMP site (Thomson et al., 2009) และ 1L5Q ซึ่งมีโครงสร้างของสาร CP-403,700 (38) เป็นลิแกนด์ที่จับอย่างจำเพาะที่บริเวณ Indole site (Rath et al., 2000)

4.2 การเตรียมไฟล์โครงสร้างของลิแกนด์

เตรียมโครงสร้างของลิแกนด์ ได้แก่ สารตั้งต้น Hyphodermin A (1) และอนุพันธ์ Hyphodermin A (78 – 82) เตรียมได้จากการจำลองโครงสร้าง 3 มิติด้วยโปรแกรม Gaussian view (Duke & O'Leary, 1992) และทำการ optimize โครงสร้างด้วยโปรแกรม Gaussian 09 (Frisch et al., 2016) โดยใช้ระเบียบวิธี B3LYP/6-31G (d,p) เพื่อให้ได้โครงสร้างที่มีความเสถียรและเตรียมไฟล์โครงสร้างของลิแกนด์เดิม ได้แก่ Riboflavin (36), GSK261 (37) และ CP-403,700 (38) เตรียมได้จากการถอดลิแกนด์ออกจากตัวแทนของเอนไซม์ HLGP ได้แก่ โปรตีนรหัส 1L5R, 3DDS และ 1L5Q ที่บริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site ตามลำดับ จากขั้นตอนการเตรียมโครงสร้างของโปรตีน

4.3 การหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการโมเลกุลลาร์ดีอกกิ่ง

เมื่อเตรียมโครงสร้างของโปรตีนและไฟล์ของลิแกนด์เรียบร้อยแล้ว จากนั้นทำการหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการทำโมเลกุลลาร์ดีอกกิ่ง โดยใช้โปรแกรม AutoDock 4.2 (Morris et al., 2009) ด้วยกระบวนการรีด็อกกิ่ง (Redocking) โดยถอดลิแกนด์เดิม 36, 37 และ 38 ออกจากบริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site ของตัวแทนเอนไซม์ ได้แก่ โปรตีน รหัส 1L5R, 3DDS และ 1L5Q ตามลำดับ จากนั้นดีอกลิแกนด์เดิมกลับไปเข้าที่บริเวณจับเดิมอีกครั้ง จากนั้นพิจารณาค่า RMSD (Root Mean Square Deviation) เพื่อให้ได้พารามิเตอร์ที่ทำให้โครงสร้างของลิแกนด์เดิมเข้าจับกับบริเวณนั้นได้เหมือนเดิม จากผลการทำรีด็อกกิ่ง พบว่าลิแกนด์เดิมเหล่านี้มีค่า RMSD น้อยกว่า 2.0 Å ดังนั้น พารามิเตอร์ที่ใช้เหมาะสมต่อการทำโมเลกุลลาร์ดีอกกิ่งในขั้นตอนต่อไป โดยพารามิเตอร์ดังกล่าว ได้แก่ กว้างกริดขนาด 60X60X60 Å³ ช่องว่างระหว่างกริดเท่ากับ 0.375 Å และกำหนดจำนวนรอบในการรัน จำนวน 150 รอบ

4.4 การทำโมเลกุลลาร์ดีอกกิ่งระหว่างอนุพันธ์ Hyphodermin A กับเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase

นำพารามิเตอร์ที่เหมาะสมจากกระบวนการรีด็อกกิ่งมาใช้ในการทำ Cross docking กับลิแกนด์เดิมที่บริเวณจับอื่นนอกเหนือจากบริเวณจับเดิม ได้แก่ ลิแกนด์ 36 กับบริเวณ AMP site และ Indole site, ลิแกนด์ 37 กับบริเวณ Purine site และ Indole site และลิแกนด์ 38 กับบริเวณ Purine site และ AMP site เพื่อศึกษาความจำเพาะต่อบริเวณจับของลิแกนด์เดิมโดยการเปรียบเทียบค่า B.E. ที่บริเวณจับเดิมกับบริเวณจับอื่นภายในเอนไซม์

จากนั้นใช้พารามิเตอร์ดังกล่าวทำโมเลกุลลาร์ดีอกกิ่งกับ สารตั้งต้น Hyphodermin A และอนุพันธ์ชนิดใหม่ของสาร Hyphodermin A 78 – 82 กับบริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site ด้วยโปรแกรม AutoDock 4.2 จากนั้นพิจารณาค่า B.E. และอันตรกิริยาของสารในแต่ละบริเวณจับ ด้วยโปรแกรม Discovery Studio 4.0 (www.accelrys.com) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ GP นำไปสู่การทำนายแนวโน้มในการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP

5. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay

การทดสอบ ส่งทดสอบที่ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ตามวิธีการทดสอบของ (Lirdprapamongkol et al., 2009) ซึ่งมีวิธีการ ดังนี้

ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ (ชนิด HepG2 และชนิด SK-Hep-1) และเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 โดยเริ่มจากการละลายสารทดสอบ ได้แก่ อนุพันธ์ชนิดใหม่ของสาร Hyphodermin A 78 – 82 ใน DMSO เพื่อเก็บเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution) ไว้ที่อุณหภูมิ - 20 °C โดยปิเปตต์เซลล์มะเร็งลงใน 96-well plates ที่ปริมาตร 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ (ที่ความหนาแน่น 5×10^3 cells/well (เซลล์ A549 และ SK-Hep-1) หรือ 1×10^4 cells/well (เซลล์ HepG2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ humidified atmosphere ของ 5 % CO_2 จากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารทดสอบ 100 μL ลงในหลุมที่มีเซลล์ (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบเท่ากับ 20 μM ใน 0.2 % DMSO) โดยใช้ Doxorubicin (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 μM ใน 0.2 % DMSO) เป็น positive control และบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงดูดของเหลวในแต่ละหลุมออกเพื่อเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร MTT 100 μL (ความเข้มข้นสุดท้ายของ MTT 0.5 mg/mL) แล้วบ่มต่ออีก 2 ชั่วโมงในตู้เพาะเลี้ยง จากนั้นจึงดูดของเหลวออกเพื่อเติม DMSO (100 μL) ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 550 nm หักลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจะถูกคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเห็ด *H. radula* เพื่อให้ผลิตสาร Hyphodermin A ในปริมาณมาก
2. ผลการสกัด แยก ทำบริสุทธิ์และยืนยันโครงสร้างสาร Hyphodermin A
3. ผลการสังเคราะห์ แยก ทำบริสุทธิ์และหาโครงสร้างอนุพันธ์ Hyphodermin A
4. ผลการทำโมเลกุลาร์ดีคอกกิ่งระหว่างอนุพันธ์ Hyphodermin A กับเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase
5. ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

1. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเห็ด *H. radula* เพื่อให้ผลิตสาร Hyphodermin A ในปริมาณมาก

1.1 ผลการศึกษابัจจัยของสภาวะการให้อากาศในการเลี้ยง

จากผลการศึกษาสภาวะการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเห็ด โดยตรวจสอบปริมาณสาร Hyphodermin A ด้วยเทคนิค TLC พบว่า การให้อากาศในการเลี้ยงโดยใช้เครื่องเขย่าแบบไป – กลับ (reciprocal shaker, 125 rpm) โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน และการให้อากาศโดยตั้งบ่มไว้โดยไม่เขย่า เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน เป็นสภาวะการเลี้ยงที่ทำให้เห็ดผลิตสาร Hyphodermin A ได้ปริมาณมากเช่นเดียวกัน ดังนั้น การให้อากาศทั้งสองสภาวะ จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเห็ด *H. radula* เพื่อให้ผลิตสาร Hyphodermin A ในปริมาณมาก ดังนั้น งานวิจัยจึงเลือกสภาวะการให้อากาศในการเลี้ยงแบบตั้งบ่มไว้โดยไม่เขย่า ที่อุณหภูมิห้องเป็นสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเห็ด เนื่องจากงานวิจัยต้องทำการขยายปริมาณการเลี้ยงเห็ดในปริมาณมาก ดังนั้น การให้อากาศแบบบ่มไว้โดยไม่เขย่าจึงเป็นวิธีที่สะดวกต่อการเลี้ยงเห็ดมากกว่าการใช้เครื่องเขย่าแบบไป-กลับ ถึงแม้จะใช้เวลาในการเลี้ยงเห็ดนานกว่าก็ตาม

1.2 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยง

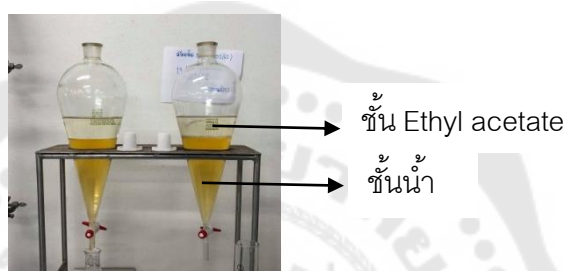
ต่อมาทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเห็ดภายใต้สภาวะการให้อากาศแบบบ่มไว้โดยไม่เขย่า ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7, 15, 21 และ 30 วัน จากนั้นตรวจสอบปริมาณสาร Hyphodermin A ด้วยเทคนิค TLC พบว่า ระยะเวลา 30 วัน เป็นระยะเวลาที่เห็ดผลิตปริมาณสาร Hyphodermin A มากที่สุด ดังนั้น สภาวะการให้อากาศแบบบ่มไว้โดยไม่เขย่า เลี้ยงที่

อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเห็ด *H. radula* เพื่อให้ผลิตสาร hyphodermin ในปริมาณมาก

2. ผลการสกัด แยก ทำบริสุทธิ์และยืนยันโครงสร้างสาร Hyphodermin A

2.1 ผลการเตรียมสารสกัดจากเห็ด *H. radula*

หลังจากเลี้ยงเชื้อเห็ดในอาหารเหลว MY ปริมาตรรวม 1,250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 วัน และทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate เก็บส่วนของสารสกัดในชั้น ethyl acetate (ภาพประกอบ 16) ไประเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดหยาบจากเห็ด *H. radula*หนัก 1.85 กรัม



ภาพประกอบ 16 การสกัดอาหารเหลวเลี้ยงเห็ดตัวทำละลาย

2.2 ผลของการแยกและทำบริสุทธิ์สาร Hyphodermin A

จากการแยกสารสกัดหยาบจากเห็ด *H. radula* น้ำหนักรวม 1.85 กรัม ด้วยระบบ normal phase พบว่า fraction ที่ถูกชะออกมาที่ระบบ 62 % hexane ใน ethyl acetate (719.8 mg) มีสาร Hyphodermin A เป็นองค์ประกอบ จากนั้นจึงทำการ recolumn ด้วยระบบ reverse phase พบว่าสาร Hyphodermin A ที่ถูกชะออกมาที่ระบบ 21 % acetonitrile ในน้ำกลั่น (0.05 % TFA) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 410.7 mg คิดเป็น 22.2 % yield

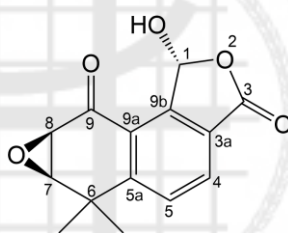
2.3 ผลการยืนยันโครงสร้างของสาร Hyphodermin A ที่แยกจากเห็ด *H. radula*

นำสาร Hyphodermin A ที่แยกได้จากเห็ด *H. radula* มาศึกษาข้อมูลทาง Spectroscopy ด้วยเทคนิค HRMS spectrometry และ NMR spectroscopy ได้ผลดังนี้

สารที่แยกได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.88 บน TLC ในระบบตัวทำละลาย 50 % hexane ใน ethyl acetate จากการวิเคราะห์ด้วย HRMS ESI (+ve) m/z : 283.0583 $[M+Na]^+$ (100 %) (HRMS คำนวณสำหรับ $C_{14}H_{12}O_5Na$ เท่ากับ 283.0577) สอดคล้องกับ Hyphodermin A ที่ได้รายงานไว้ว่า MS ESI (+ve) ที่ $m/z = 278 [M + NH_4]^+$ โดยมีสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{12}O_5$ (Henkel et al., 1997)

จากข้อมูลของ $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , 300 MHz) พบสัญญาณของโปรตอนของวง aromatic จำนวน 2 โปรตอน ที่ δ_{H} 8.00 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz) และ 7.90 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), สัญญาณโปรตอนของหมู่ oxymethine จำนวน 3 โปรตอน ที่ δ_{H} 7.10 (s, 1H), 3.84 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz) และ 3.78 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz), หมู่ methyl 2 หมู่ หมู่ละ 3 โปรตอน ที่ δ_{H} 1.40 (s, 3H) และ 1.76 (s, 3H) และจากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) พบสัญญาณคาร์บอน ดังนี้ δ_{C} 99.9 (C-1), 169.3 (C-3), 128.2 (C-3a), 130.9 (C-4), 131.7 (C-5), 155.9 (C-5a), 38.8 (C-6), 57.2 (C-7), 64.2 (C-8), 195.3 (C-9), 126.9 (C-9a), 149.1 (C-9b), 26.7 (CH_3), 30.9 (CH_3)

ซึ่งค่า chemical shifts นี้ให้ผลสอดคล้องกับค่า chemical shifts ของ สาร Hyphodermin A จากที่รายงานไว้ใน (Henkel et al., 1997) ดังตาราง 9 ส่วนความสัมพันธ์ใน HSQC และ HMBC แสดงดังภาพประกอบ 18 ดังนั้น ด้วยผลจาก HRMS และ NMR จึงยืนยันได้ว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก *H. radula* คือ สาร Hyphodermin A



ภาพประกอบ 17 โครงสร้างของสาร Hyphodermin A ที่แยกได้จากเห็ด *H. radula*

ตาราง 9 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร Hyphodermin A ที่แยกได้จากเห็ด *H. radula* เทียบกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร Hyphodermin A ที่เคยถูกรายงาน

ตำแหน่ง	Hyphodermin A $\delta_{\text{H}}^{\text{n}}$	Hyphodermin A ในการทดลองนี้ $\delta_{\text{H}}^{\text{n}}$	Hyphodermin A $\delta_{\text{C}}^{\text{n}}$	Hyphodermin A ในการทดลองนี้ $\delta_{\text{C}}^{\text{n}}$
1	7.06	7.10 s, 1H	100.0	99.9
2				
3			170.5	169.3
3a			128.5	128.2
4	8.02 (d, $J = 8.5$ Hz)	8.00 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz)	130.2	130.9

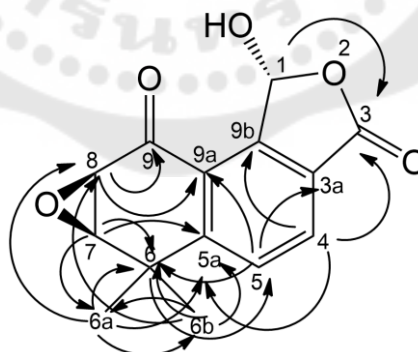
ตาราง 9 (ต่อ)

ตำแหน่ง	Hyphodermin A δ_H^n	Hyphodermin A ในการทดลองนี้ δ_H^a	Hyphodermin A δ_C^n	Hyphodermin A ในการทดลองนี้ δ_C^k
5	7.84 (d, $J = 8.5$ Hz)	7.90 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz)	131.0	131.7
5a			156.5	155.9
6			38.5	38.8
7	3.75 (d, $J = 4.0$ Hz)	3.78 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz)	57.0	57.2
8	3.77 (d, $J = 4.0$ Hz)	3.84 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz)	64.0	64.2
9			195.5	195.3
9a			127.0	126.9
9b			149.0	149.1
CH ₃	1.73	1.76 (s, 3H)	26.0	26.7
CH ₃	1.31	1.40 (s, 3H)	30.0	30.9

ⁿ ที่ 200 – 400 MHz ใน CD₃OD (Henkel et al., 1997)

^a ข้อมูล ¹H-NMR ที่ 300 MHz ใน Acetone-*d*₆

^k ข้อมูล ¹³C-NMR ที่ 100 MHz ใน DMSO-*d*₆



↷ แสดงความสัมพันธ์แบบ HMBC

ภาพประกอบ 18 แสดงความสัมพันธ์ HMBC ของสาร Hyphodermin A ที่แยกได้

ตาราง 10 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz), HSQC และ HMBC ของสาร Hyphodermin A ที่แยกได้จากเห็ด *H. radula* ในตัวทำละลาย DMSO- d_6

ตำแหน่ง	δ_{H}	δ_{C}	HSQC	HMBC
1	6.98 (s, 1H)	99.9	C-1	C-3
2				
3		169.3		
3a		128.2		
4	8.02 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz)	130.9	C-4	C-3, C-5a, C-9b
5	7.87 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz)	131.7	C-5	C-3a, C-6, C-9a
5a		155.9		
6		38.8		
7	3.88 (s, 2H)	57.2	C-7	C-5a, C-6, C-7, C-9, C-9a
8	3.88 (s, 2H)	64.2	C-8	C-5a, C-6, C-7, C-9, C-9a
9		195.3		
9a		126.9		
9b		149.1		
CH ₃	1.67 (s, 3H)	26.7	C-6a	C-5a, C-6, C-6b, C-8
CH ₃	1.30 (s, 3H)	30.9	C-6b	C-5a, C-6, C-6a, C-8

3. ผลการสังเคราะห์ แยก ทำบริสุทธิ์และหาโครงสร้างอนุพันธ์ Hyphodermin A

3.1 ผลการทดสอบเอมีนที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์

จากการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ระหว่างสาร Hyphodermin A กับเอมีนชนิดต่าง ๆ ทั้งหมด 10 ชนิด พบว่าปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดจำนวนของผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน โดยในงานวิจัยนี้เลือกเอมีนที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจากการติดตามปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC โดยเลือกปฏิกิริยาที่สารตั้งต้น Hyphodermin A หายไปและเกิดผลิตภัณฑ์เพียง 1 ชนิด ดังนั้น aniline , 4-fluoroaniline, 4-chloroaniline, 4-bromoaniline และ 4-iodoaniline จึงถูกเลือกใช้เป็นเอมีนในการทำปฏิกิริยากับ Hyphodermin A เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์

3.2 ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A

การสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A ทำปฏิกิริยาโดยนำสาร Hyphodermin A ที่แยกได้จากเห็ด *H. radula* ทำปฏิกิริยากับเอมีน 5 ชนิด ได้แก่ aniline, 4-fluoroaniline, 4-chloroaniline, 4-bromoaniline และ 4-iodoaniline ในปริมาณมากเกินพอ

3.3 ผลการแยกและทำบริสุทธิ์อนุพันธ์ Hyphodermin A

นำปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร Hyphodermin A ระหว่างสารตั้งต้น Hyphodermin A และเอมีนชนิดต่าง ๆ ที่เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ มาระเหยตัวทำละลายให้แห้ง จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย hexane และ ethyl acetate เป็นระบบชะ ได้อนุพันธ์ Hyphodermin A 78 – 82 ดังตาราง 11

ตาราง 11 ผลการแยกและทำบริสุทธิ์อนุพันธ์ของสาร Hyphodermin A 78 – 82

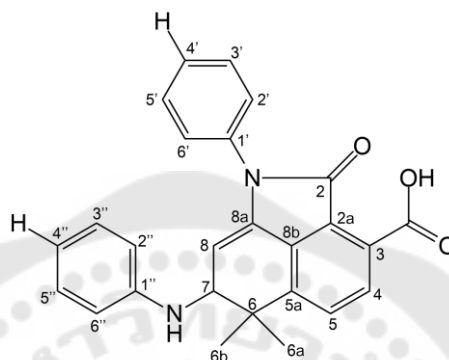
เอมีน	ผลิตภัณฑ์	ระบบตัวชะ	ผลได้ร้อยละ
Aniline	78	60 % Acetonitrile ในน้ำกลั่น (0.05 % TFA)	94.2
4-Fluoroaniline	79	30 % Hexane ใน ethyl acetate	40.3
4-Chloroaniline	80	55 % Hexane ใน ethyl acetate	81.8
4-Bromoaniline	81	55 % Hexane ใน ethyl acetate	73.3
4-Iodoaniline	82	55 % Hexane ใน ethyl acetate	40.0

3.4 ผลการหาโครงสร้างของอนุพันธ์ของสาร Hyphodermin A

นำอนุพันธ์ของสาร Hyphodermin A 78 – 82 ที่สังเคราะห์มาศึกษาข้อมูลทาง Spectroscopy ด้วยเทคนิค HRMS spectrometry และ NMR spectroscopy ได้ผลดังนี้

อนุพันธ์ Hyphodermin A 78

ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ Aniline



ภาพประกอบ 19 อนุพันธ์ Hyphodermin A 78

สารที่แยกได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.14 บน TLC ในระบบตัวทำละลาย 50 % hexane ใน ethyl acetate จากการวิเคราะห์ด้วย HRMS ESI (+ve) m/z : 433.1539 $[M+Na]^+$ (100 %) (HRMS คำนวณสำหรับ $C_{26}H_{22}N_2NaO_3$ เท่ากับ 433.1523)

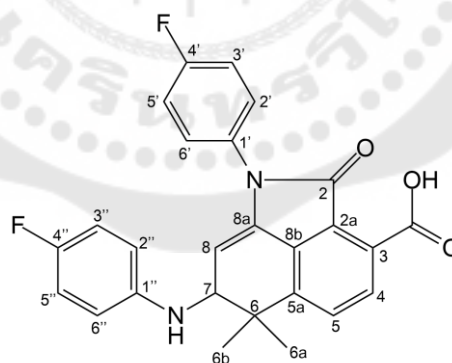
จากข้อมูล 1H -NMR ($DMSO-d_6$, 400 MHz) chemical shift: 1H -NMR spectrum ของอนุพันธ์ 78 ใกล้เคียงกับสารตั้งต้น Hyphodermin A โดยพบสัญญาณโปรตอนของวง aromatic 2 ตำแหน่ง ที่ δ_H 8.30 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H-4) และ 7.81 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H-5) และสัญญาณโปรตอนของหมู่ methyl 2 หมู่ หมู่ละ 3 โปรตอน [δ_H 1.23 (s, 3H) และ 1.44 (s, 3H)], แต่พบว่าสัญญาณโปรตอนของ oxymethine 2 ตำแหน่งของ Hyphodermin A เกิดการเคลื่อนที่ของสัญญาณที่ δ_H 3.78 (d, 2H, $J = 4.2$ Hz) และ 3.84 (d, 2H, $J = 4.2$ Hz) เป็นสัญญาณโปรตอนหมู่ methine ของอนุพันธ์ 78 ที่ δ_H 4.24 (d, 1H, $J = 4.6$ Hz) และหมู่ olefinic ที่ δ_H 5.31 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz) ตามลำดับ เนื่องจากเกิดการเปิดวงของหมู่ epoxide ด้วยการเข้าทำปฏิกิริยาของวงอะโรมาติกของ aniline อีกทั้งยังพบว่าสัญญาณโปรตอนของหมู่ oxymethine ใน Hyphodermin A ที่ δ_H 7.10 (s, 1H) ถูกแทนที่ด้วยสัญญาณของวงอะโรมาติกจากการเข้าทำปฏิกิริยาของ aniline เกิดสัญญาณโปรตอนเพิ่มขึ้นของหมู่ phenyl 2 หมู่ หมู่ละ 5 โปรตอน ที่ δ_H

ตาราง 12 (ต่อ)

ตำแหน่ง	¹ H-NMR	¹³ C-NMR	HSQC	HMBC
6		41.5		
6a	1.23 (s, 3H)	29.2	C-6a	C-5a, C-6, C-6b, C-7
6b	1.42 (s, 3H)	23.3	C-6b	C-5a, C-6, C-6a, C-8
7	4.24 (d, 1H, <i>J</i> = 4.6 Hz)	75.6	C-7	C-6, C-6a, C-6b, C-8a
8	5.31 (d, 1H, <i>J</i> = 4.5 Hz)	109.0	C-8	C-6, C-8a, C-8b
8a		140.6		
8b		132.9		
C ₆ H ₅ N	6.96 (q, 3H, <i>J</i> = 7.1 Hz)	124.5 – 142.3	C ₆ H ₅ N	C ₆ H ₅ N
C ₆ H ₅ N	6.97 (t, 3H, <i>J</i> = 7.0 Hz)	124.5 – 142.3	C ₆ H ₅ N	C ₆ H ₅ N
C ₆ H ₅ N	7.16 (s, 4H)	124.5 – 142.3	C ₆ H ₅ N	C ₆ H ₅ N
COOH		167.9		

อนุพันธ์ Hyphodermin A 79

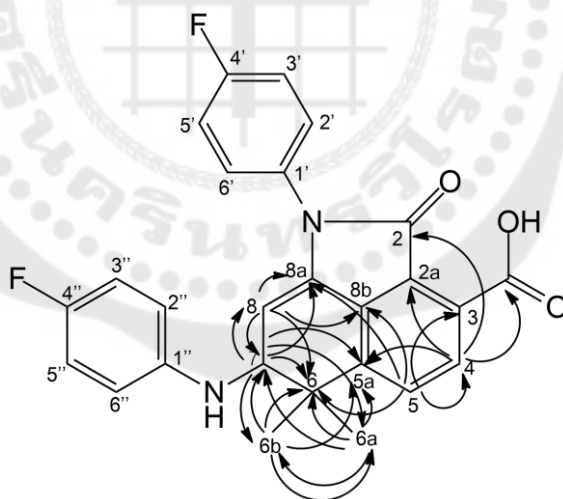
ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Fluoroaniline



ภาพประกอบ 21 อนุพันธ์ Hyphodermin A 79

สารที่แยกได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.14 บน TLC ในระบบตัวทำละลาย 50 % hexane ใน ethyl acetate จากการวิเคราะห์ด้วย HRMS ESI (+ve) m/z : 469.1342 $[M+Na]^+$ (100 %) (Mass คำนวณของสาร C₂₆H₂₀N₂F₂NaO₃ เท่ากับ 469.1334)

จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) พบว่า $^1\text{H-NMR}$ spectrums ของอนุพันธ์ 79 ซึ่งให้สัญญาณที่ใกล้เคียงกับอนุพันธ์ 78 โดยพบสัญญาณโปรตอนของวง aromatic 2 ตำแหน่ง ที่ δ_{H} 8.29 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz) และ 7.80 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), สัญญาณของหมู่ methyl 2 หมู่ หมู่ละ 3 โปรตอน ที่ δ_{H} 1.22 (s, 3H) และ 1.42 (s, 3H), สัญญาณของหมู่ methine ที่ δ_{H} 4.23 (br s, 1H) และหมู่ olefinic ที่ δ_{H} 5.25 (br s, 1H) ยกเว้น สัญญาณโปรตอนของหมู่ fluorophenyl จำนวน 2 หมู่ หมู่ละ 4 โปรตอน ที่ δ_{H} 6.85 (br t, 4H), 7.05 (br s, 2H) และ 7.26 (br d, 2H) เนื่องจากการเข้าทำปฏิกิริยาของ 4-fluoroaniline จำนวน 2 ตำแหน่ง ซึ่งสอดคล้องกับการเข้าทำปฏิกิริยาของ aniline กับ Hyphodermin A ของอนุพันธ์ 78 และจากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz) พบสัญญาณของคาร์บอน ดังนี้ 153.9 (C-2), 126.3 (C-2a), 127.5 (C-3), 135.3 (C-4), 128.7 (C-5), 145.9 (C-5a), 40.0 (C-6), 27.8 (C-6a), 21.9 (C-6b), 74.2 (C-7), 107.0 (C-8), 139.3 (C-8a), 131.4 (C-8b), 115.1 – 160.7 ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NF}$) 166.2 (COOH) และทำการยืนยันโครงสร้างของอนุพันธ์ด้วยการทดลอง HSQC และ HMBC ได้ผลดังตาราง 13 และสามารถเขียนความสัมพันธ์ของโปรตอนและคาร์บอนได้ดังโครงสร้างในภาพประกอบ 22



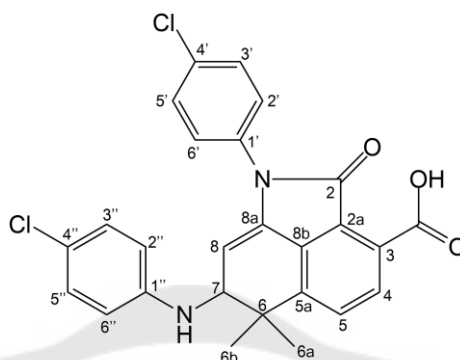
ภาพประกอบ 22 แสดงความสัมพันธ์ HMBC ของอนุพันธ์ Hyphodermin A 79

ตาราง 13 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz), HSQC และ HMBC ของอนุพันธ์ Hyphodermin A 79 ในตัวทำละลาย DMSO- d_6

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	HSQC	HMBC
1				
2		153.9		
2a		126.3		
3		127.5		
4	8.29 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz)	135.3	C-4	C-2, C-2a, C-5a, COOH
5	7.80 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz)	128.7	C-5	C-3, C-4, C-6, C-8a, C-8b
5a		145.9		
6		40.0		
6a	1.22 (s, 3H)	27.8	C-6a	C-5a, C-6, C-6b, C-7
6b	1.42 (s, 3H)	21.9	C-6b	C-5a, C-6, C-6a, C-7
7	4.23 (br s, 1H)	74.2	C-7	C-5a, C-6, C-6a, C-6b, C-8, C-8a
8	5.25 (br s, 1H)	107.0	C-8	C-6, C-7, C-8a, C-8b
8a		139.3		
8b		131.4		
$\text{C}_6\text{H}_4\text{NF}$	6.85 (br t, 3H)	115.1 – 162.6	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NF}$	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NF}$
$\text{C}_6\text{H}_4\text{NF}$	7.05 (br s, 2H)	115.1 – 162.6	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NF}$	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NF}$
$\text{C}_6\text{H}_4\text{NF}$	7.26 (br d, 2H)	115.1 – 162.6		
COOH		166.2		

อนุพันธ์ Hyphodermin A 80

ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Chloroaniline

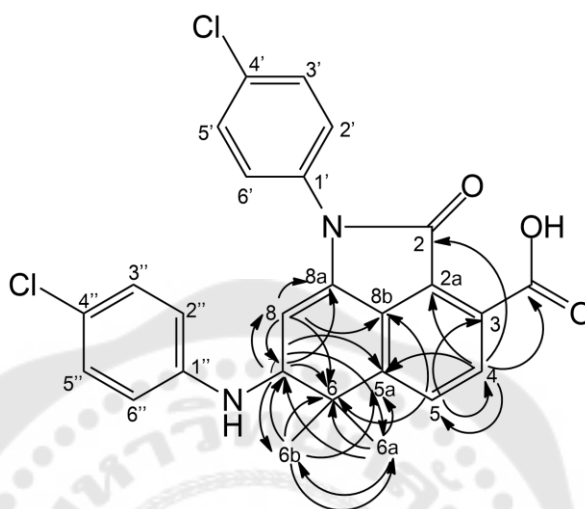


ภาพประกอบ 23 อนุพันธ์ Hyphodermin A 80

สารที่แยกได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.32 บน TLC ในระบบตัวทำละลาย 50 % hexane ใน ethyl acetate จากการวิเคราะห์ด้วย HRMS ESI (+ve) m/z : 501.0745 $[M+Na]^+$ (100 %), 479.0929 $[M+H]^+$ (65 %) (Mass คำนวณของสาร $C_{26}H_{20}N_2Cl_2NaO_3$ เท่ากับ 501.0745 และ $C_{26}H_{21}N_2Cl_2O_3$ เท่ากับ 479.0924)

จากข้อมูล 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) พบว่า 1H -NMR spectrums ของอนุพันธ์ 80 ซึ่งให้สัญญาณที่ใกล้เคียงกับอนุพันธ์ 78 และ 79 โดยพบสัญญาณโปรตอนของวง aromatic 2 ตำแหน่ง ที่ δ_H 8.30 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz) และ 7.81 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), สัญญาณของหมู่ methyl 2 หมู่ หมู่ละ 3 โปรตอน ที่ δ_H 1.22 (s, 3H) และ 1.42 (s, 3H), สัญญาณของหมู่ methine ที่ δ_H 4.23 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz) และหมู่ olefinic ที่ δ_H 5.29 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz) ยกเว้นสัญญาณโปรตอนของหมู่ chlorophenyl จำนวน 2 หมู่ หมู่ละ 4 โปรตอน ที่ δ_H 6.84 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.04 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz) และ 7.26 (br s, 4H) เนื่องจากการเข้าทำปฏิกิริยาของ 4-chloroaniline จำนวน 2 ตำแหน่ง ซึ่งสอดคล้องกับการเข้าทำปฏิกิริยาของ aniline กับ Hyphodermin A ของอนุพันธ์ 78 และจากข้อมูล ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) พบสัญญาณของโปรตอน ดังนี้ 153.7 (C-2), 126.3 (C-2a), 127.1 (C-3), 135.4 (C-4), 128.7 (C-5), 146.1 (C-5a), 40.0 (C-6), 27.8 (C-6a), 21.9 (C-6b), 74.2 (C-7), 107.0 (C-8), 138.9 (C-8a), 131.5 (C-8b), 124.79 – 140.91 (C_6H_4NCl) 166.0 (COOH) และทำการยืนยันโครงสร้างของอนุพันธ์

ด้วยการทดลอง HSQC และ HMBC ได้ผลดังตาราง 14 และสามารถเขียนความสัมพันธ์ของโปรตอนและคาร์บอนได้ดังโครงสร้างในภาพประกอบ 24



ภาพประกอบ 24 แสดงความสัมพันธ์ HMBC อนุพันธ์ Hyphodermin A 80

ตาราง 14 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz), HSQC และ HMBC ของอนุพันธ์ Hyphodermin A 80 ในตัวทำละลาย $\text{DMSO-}d_6$

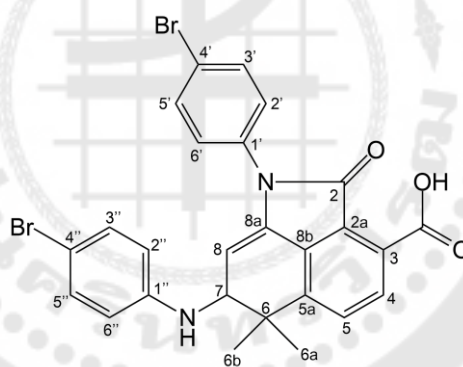
ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	HSQC	HMBC
1				
2		153.7		
2a		126.3		
3		127.1		
4	8.30 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz)	135.4	C-4	C-2, C-2a, C-5, C-5a, COOH
5	7.81 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz)	128.7	C-5	C-3, C-4, C-6, C-8b
5a		146.1		
6		40.0		
6a	1.22 (s, 3H)	27.8	C-6a	C-5a, C-6, C-6b, C-7
6b	1.42 (s, 3H)	21.9	C-6b	C-5a, C-6, C-6a, C-7
7	4.23 (br d, 1H, $J = 4.2$ Hz)	74.2	C-7	C-5a, C-6, C-6a, C-6b, C-8, C-8a

ตาราง 14 (ต่อ)

ตำแหน่ง	¹ H-NMR	¹³ C-NMR	HSQC	HMBC
8	5.31 (d, 1H, <i>J</i> = 4.5 Hz)	107.0	C-8	C-6, C-7, C-8a, C-8b
8a		138.9		
8b		131.5		
C ₆ H ₄ NCl	6.84 (d, 2H, <i>J</i> = 8.5 Hz)	124.8 – 140.9	C ₆ H ₄ NCl	C ₆ H ₄ NCl
C ₆ H ₄ NCl	7.04 (d, 2H, <i>J</i> = 8.5 Hz)	124.8 – 140.9	C ₆ H ₄ NCl	C ₆ H ₄ NCl
C ₆ H ₄ NCl	7.26 (br s, 4H)	124.8 – 140.9	C ₆ H ₄ NCl	C ₆ H ₄ NCl
COOH		166.0		

อนุพันธ์ Hyphodermin A 81

ปฏิกิริยาระหว่างสาร Hyphodermin A กับ 4-Bromoaniline

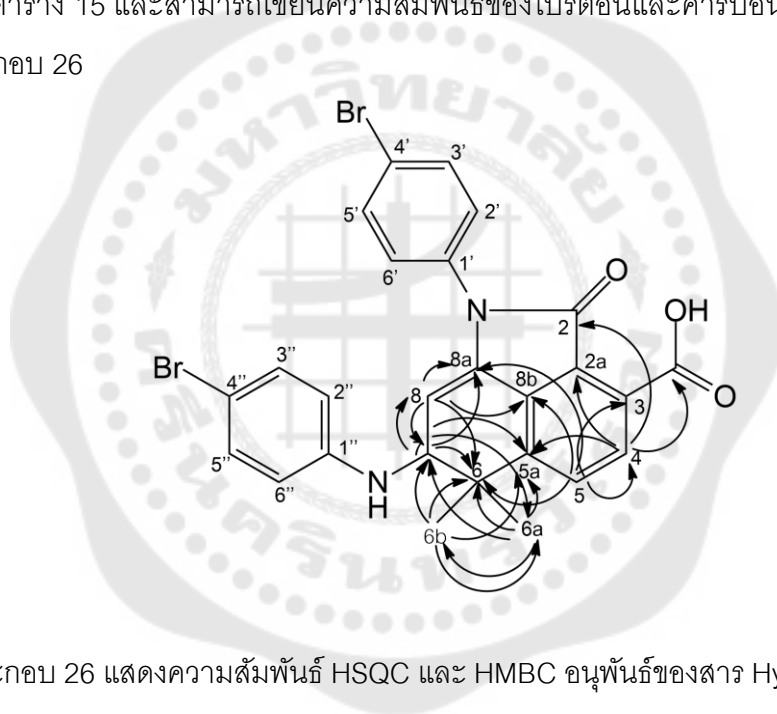


ภาพประกอบ 25 อนุพันธ์ Hyphodermin A 81

สารที่แยกได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.24 บน TLC ในระบบตัวทำละลาย 50 % hexane ใน ethyl acetate จากการวิเคราะห์ด้วย HRMS ESI (+ve) m/z : 588.9717 $[M+Na]^+$ (100 %) (Mass คำนวณของสาร C₂₆H₂₀N₂Br₂NaO₃ เท่ากับ 588.9733)

จากข้อมูล ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) พบว่า ¹H-NMR spectrums ของอนุพันธ์ 81 ซึ่งให้สัญญาณที่ใกล้เคียงกับอนุพันธ์ 78 – 80 โดยพบสัญญาณโปรตอนของวง aromatic 2 ตำแหน่ง ที่ δ_H 8.30 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz) และ 7.81 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz) สัญญาณของหมู่ methyl 2 หมู่ หมู่ละ 3 โปรตอน ที่ δ_H 1.21 (s, 3H) และ 1.41 (s, 3H) และ สัญญาณของ

หมู่ methine ที่ δ_H 4.23 (br s, 1H) และหมู่ olefinic ที่ δ_H 5.31 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz) ยกเว้น สัญญาณโปรตอนของหมู่ bromophenyl จำนวน 2 หมู่ หมู่ละ 4 โปรตอน ที่ δ_H 6.77 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.16 (d, 4H, $J = 8.4$ Hz) และ 7.39 (br s, 2H) เนื่องจากการเข้าทำปฏิกิริยาของ 4-bromoaniline จำนวน 2 ตำแหน่ง ซึ่งสอดคล้องกับการสังเคราะห์ปฏิกิริยาของอนุพันธ์ตัวอื่น และจากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz) พบสัญญาณของคาร์บอน ดังนี้ 153.6 (C-2), 126.3 (C-2a), 127.0 (C-3), 135.4 (C-4), 128.7 (C-5), 146.1 (C-5a), 40.0 (C-6), 27.8 (C-6a), 21.9 (C-6b), 74.1 (C-7), 107.0 (C-8), 138.8 (C-8a), 131.4 (C-8b), 117.4 – 141.3 (C₆H₄NBr) 166.0 (COOH) และทำการยืนยันโครงสร้างของอนุพันธ์ด้วยการทดลอง HSQC และ HMBC ได้ผลดังตาราง 15 และสามารถเขียนความสัมพันธ์ของโปรตอนและคาร์บอนได้ดังโครงสร้างในภาพประกอบ 26



ภาพประกอบ 26 แสดงความสัมพันธ์ HSQC และ HMBC อนุพันธ์ของสาร Hyphodermin A 81

ตาราง 15 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz), HSQC และ HMBC ของอนุพันธ์ Hyphodermin A 81 ในตัวทำละลาย DMSO- d_6

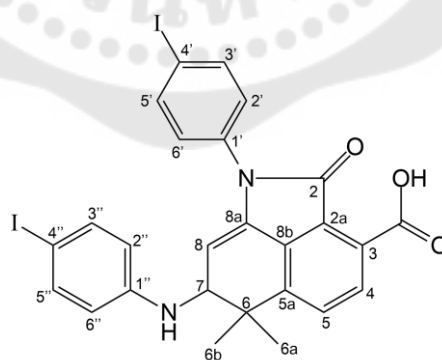
ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	HSQC	HMBC
1				
2		153.6		
2a		126.3		
3		127.0		
4	8.30 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz)	135.4	C-4	C-2, C-2a, C-5a, COOH

ตาราง 15 (ต่อ)

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	HSQC	HMBC
5	7.81 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz)	128.7	C-5	C-3, C-4, C-6, C-8a, C-8b
5a		146.1		
6		40.0		
6a	1.22 (s, 3H)	27.8	C-6a	C-5a, C-6, C-6b, C-7
6b	1.42 (s, 3H)	21.9	C-6b	C-5a, C-6, C-6a, C-7
7	4.23 (br s, 1H)	74.1	C-7	C-5a, C-6, C-6a, C-8, C-8a
8	5.31 (br d, 1H, $J = 3.5$ Hz)	107.0	C-8	C-6, C-7, C-8a, C-8b
8a		138.8		
8b		131.4		
$\text{C}_6\text{H}_4\text{NBr}$	6.77 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz)	117.4 – 141.3	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NBr}$	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NBr}$
$\text{C}_6\text{H}_4\text{NBr}$	7.16 (d, 4H, $J = 8.4$ Hz)	117.4 – 141.3	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NBr}$	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NBr}$
$\text{C}_6\text{H}_4\text{NBr}$	7.39 (br s, 2H)	117.4 – 141.3	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NBr}$	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NBr}$
COOH		166.0		

อนุพันธ์ Hyphodermin A 82

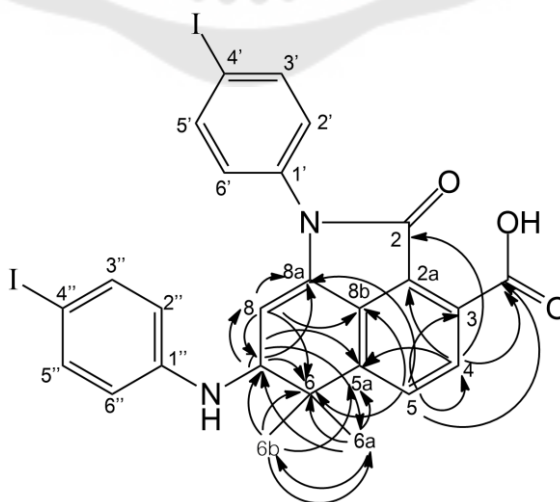
ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Iodoaniline



ภาพประกอบ 27 อนุพันธ์ Hyphodermin A 82

สารที่แยกได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.32 บน TLC ในระบบตัวทำละลาย 50 % hexane ใน ethyl acetate จากการวิเคราะห์ด้วย HRMS ESI (+ve) m/z : 684.9461 $[M+Na]^+$ (100 %) (Mass คำนวณของสาร $C_{26}H_{20}N_2I_2NaO_3$ เท่ากับ 684.9456)

จากข้อมูล 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) พบว่า 1H -NMR spectrums ของอนุพันธ์ 82 ซึ่งให้สัญญาณที่ใกล้เคียงกับอนุพันธ์ 78 – 81 โดยพบสัญญาณโปรตอนของวง aromatic 2 ตำแหน่ง ที่ δ_H 8.29 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz) และ 7.80 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), สัญญาณของหมู่ methyl 2 หมู่ หมู่ละ 3 โปรตอน ที่ δ_H 1.21 (s, 3H) และ 1.42 (s, 3H), สัญญาณของหมู่ methine ที่ δ_H 4.22 (br s, 1H) และสัญญาณของหมู่ olefinic ที่ δ_H 5.32 (d, 1H, $J = 4.6$ Hz) ยกเว้น สัญญาณโปรตอนของหมู่ iodophenyl จำนวน 2 หมู่ หมู่ละ 4 โปรตอน ที่ δ_H 6.60 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 6.94 (br s, 2H), 7.32 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz) และ 7.54 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz) เนื่องจากการเข้าทำปฏิกิริยาของ 4-iodoaniline จำนวน 2 ตำแหน่ง ซึ่งสอดคล้องกับการเข้าทำปฏิกิริยาของ aniline กับ Hyphodermin A ของอนุพันธ์ 78 และจากข้อมูล ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) พบสัญญาณของคาร์บอน ดังนี้ 153.4 (C-2), 126.3 (C-2a), 127.1 (C-3), 135.4 (C-4), 128.7 (C-5), 146.1 (C-5a), 40.0 (C-6), 27.8 (C-6a), 21.9 (C-6b), 74.1 (C-7), 107.0 (C-8), 138.7 (C-8a), 131.5 (C-8b), 89.3 – 141.0 (C_6H_4NI) 166.0 (COOH) และทำการยืนยันโครงสร้างของอนุพันธ์ด้วยการทดลอง HSQC และ HMBC ได้ผลดังตาราง 16 และสามารถเขียนความสัมพันธ์ของโปรตอนและคาร์บอนได้ดังโครงสร้างในภาพประกอบ 28



ภาพประกอบ 28 แสดงความสัมพันธ์ HMBC อนุพันธ์ Hyphodermin A 82

ตาราง 16 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz), HSQC และ HMBC ของอนุพันธ์ Hyphodermin A 82 ในตัวทำละลาย DMSO- d_6

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	HSQC	HMBC
1				
2		153.4		
2a		126.3		
3		127.1		
4	8.29 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz)	135.4	C-4	C-2, C-2a, C-5a, COOH
5	7.80 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz)	128.7	C-5	C-3, C-4, C-6, C-8a, C-8b, C-5a, COOH
5a		146.1		
6		40.0		
6a	1.21 (s, 3H)	27.8	C-6a	C-5a, C-6, C-6b, C-7
6b	1.42 (s, 3H)	21.9	C-6b	C-5a, C-6, C-6a, C-7
7	4.22 (br s, 1H)	74.1	C-7	C-5a, C-6, C-6a, C-8, C-8a
8	5.32 (d, 1H, $J = 4.6$ Hz)	107.0	C-8	C-6, C-7, C-8a, C-8b
8a		138.7		
8b		131.5		
$\text{C}_6\text{H}_4\text{NI}$	6.60 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz)	89.3 – 141.7	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NI}$	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NI}$
$\text{C}_6\text{H}_4\text{NI}$	6.94 (br s, 2H)	89.3 – 141.7	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NI}$	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NI}$
$\text{C}_6\text{H}_4\text{NI}$	7.32 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz)	89.3 – 141.7	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NI}$	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NI}$
$\text{C}_6\text{H}_4\text{NI}$	7.54 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz)	89.3 – 141.7	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NI}$	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NI}$
COOH		166.0		

4. ผลการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้งระหว่างอนุพันธ์ Hyphodermin A กับเอนไซม์ Glycogen Phosphorylase

จากการศึกษาความจำเพาะของลิแกนด์เดิม 36, 37 และ 38 ซึ่งถูกรายงานว่าเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP ที่มีประสิทธิภาพและจำเพาะต่อบริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site ตามลำดับ โดยลิแกนด์เดิม 36 มีค่า K_D 17 μM (HLGPa) และ 7.9 mM (HLGPb) (Ekstrom et al., 2002), ลิแกนด์เดิม 37 มีค่า $IC_{50} = 7$ nM (Thomson et al., 2009) และลิแกนด์เดิม 38 มีค่า $IC_{50} = 45$ nM (Rath et al., 2000) ตามลำดับ จากการทำ cross docking พบว่า ลิ

แกนดัดเดิม 36, 37 และ 38 ให้ค่า B.E. ต่อบริเวณจับเติมได้ดีกว่าบริเวณจับอื่น ๆ โดยมีค่าเท่ากับ -10.34, -14.32 และ -10.57 kcal/mol ที่บริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ลิแกนดัดเดิม 36 – 38 มีความจำเพาะต่อบริเวณจับเติมดังกล่าว ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการทดลองจริง ดังนั้น การศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลลาร์ดีอกกิ้งจึงสามารถนำมาใช้ในการพิจารณาความจำเพาะของสารต่อบริเวณจับของเอนไซม์ได้

ตาราง 17 แสดงค่าพลังงานการยึดจับ (B.E.) ของเอนไซม์ GP กับลิแกนดัดต่าง ๆ ในหน่วย kcal/mol

โมเลกุล	Purine site (RMSD 1.992)	AMP site (RMSD 0.961)	Indole site (RMSD 0.961)
Hyphodermin A	-7.54	-6.67	-7.08
อนุพันธ์ 78	-9.43	-9.11	-9.53
อนุพันธ์ 79	-9.32	-8.85	-9.33
อนุพันธ์ 80	-9.50	-10.02	-10.91
อนุพันธ์ 81	-9.50	-10.48	-11.37
อนุพันธ์ 82	-9.52	-10.97	-11.72
Riboflavin (36)	-10.34*	-8.66	-6.19
GSK261 (37)	-6.81	-14.32*	-7.15
CP 403,700 (38)	-8.27	-9.43	-10.57*

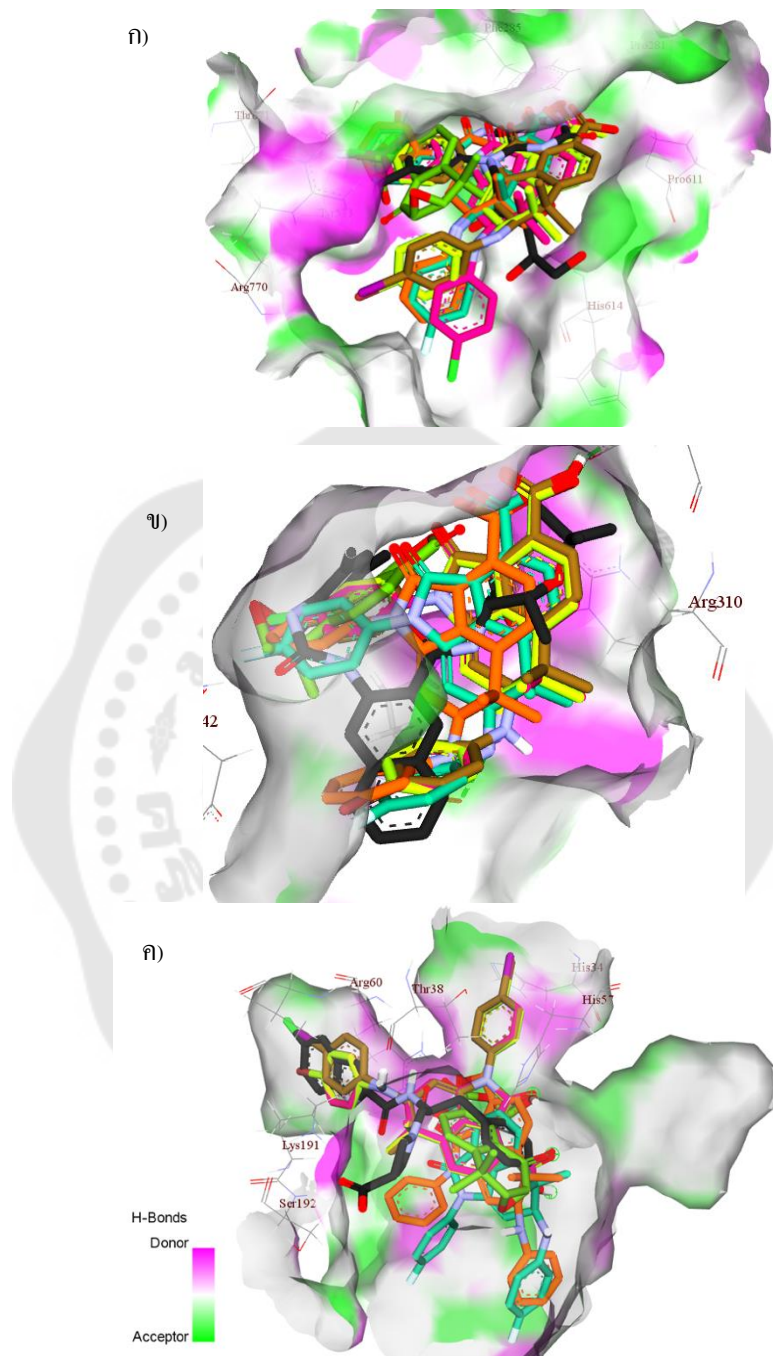
*ลิแกนดัดเดิมที่จับอย่างจำเพาะต่อบริเวณควบคุม

หลังจากนั้นจึงทำโมเลกุลลาร์ดีอกกิ้งกับเอนไซม์ GP ด้วยอนุพันธ์ชนิดใหม่ของสาร Hyphodermin A 78 – 82 ให้ค่า B.E. ดังตาราง 20 ซึ่งให้ค่า B.E. ที่ดีกว่าสารตั้งต้น Hyphodermin A ทั้งสามบริเวณจับ โดยมีค่า B.E. ที่โพรงการจับ Purine site, AMP site และ Indole site เท่ากับ -7.54, -6.57 และ -7.08 kcal/mol ตามลำดับ เนื่องจากโครงสร้างของ Hyphodermin A มีขนาดของโมเลกุลที่เล็กไม่เหมาะสมต่อขนาดของโพรงการจับ ส่งผลให้ค่า B.E. ของสารตั้งต้น Hyphodermin A ต่ำกว่าค่า B.E. ของอนุพันธ์ชนิดใหม่ของสาร Hyphodermin A 78 – 82 ในทุกบริเวณจับ ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Loughlin A. Wendy และคณะ ซึ่งรายงานไว้ว่า สาร Hyphodermin A ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ GP ในช่วงความเข้มข้น 0.22 – 222 mM (Loughlin et al., 2008) จึงสรุปได้ว่าการทำโมเลกุลลาร์ดีอกกิ้ง อนุพันธ์ชนิด

ใหม่ของสาร Hyphodermin A 78 – 82 มีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ GP ได้ดีกว่าสารตั้งต้น Hyphodermin A บ่งชี้ถึงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP ของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีกว่าสารตั้งต้น Hyphodermin A

จากการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่ง พบว่า อนุพันธ์เหล่านี้ สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ GP ได้ทั้ง 3 บริเวณ แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า B.E. ในแต่ละบริเวณจับ พบว่าอนุพันธ์เหล่านี้มีค่า B.E. ที่บริเวณ Indole site อีกรั้งยังพบว่าอนุพันธ์ 80 – 82 ให้ค่า B.E. ที่ดีกว่าลิแกนด์เดิม 38 ที่บริเวณ Indole site อีกด้วย จึงบ่งชี้ได้ว่าอนุพันธ์เหล่านี้มีความเหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ GP ที่บริเวณ Indole site โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุพันธ์ 82 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ GP ได้ดีที่สุด โดยมีค่า B.E. ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับค่า B.E. ของอนุพันธ์อื่น ๆ ในทุกบริเวณจับ จากการพิจารณาการวางตัวของสารตั้งต้น Hyphodermin A และอนุพันธ์ในแต่ละบริเวณจับมีลักษณะแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของโพรงการจับในแต่ละบริเวณ จากการพิจารณาพบว่าโครงสร้างของอนุพันธ์เหล่านี้มีการวางตัวที่คล้ายกันเมื่ออยู่ในโพรงการจับ Purine site และ AMP site ในขณะที่โพรงการจับ Indole site มีการวางตัวของโครงสร้างที่แตกต่างกัน ดังภาพประกอบ 29

เมื่อพิจารณาการวางตัวของอนุพันธ์เหล่านี้ภายในโพรงการจับของบริเวณควบคุมที่ศึกษา พบว่าที่บริเวณ Purine site เกิด Interaction ที่สำคัญ ได้แก่ การสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Asn282 รวมถึงเกิดแรงแบบ Hydrophobic และ Electronic stacking กับกรดอะมิโน Phe285 และ Tyr613 อีกทั้งยังพบว่าอนุพันธ์ 78 – 81 เกิดการสร้างแรงแบบ Pi-anion กับกรดอะมิโน Glu572 ในขณะที่การวางตัวของอนุพันธ์ 82 ทำให้เกิดการสร้างแรงแบบ Pi-sigma กับกรดอะมิโน Glu382 โดยมีความยาวของแรง เท่ากับ 2.59 Å และสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Gly612 และ Asn282 ได้และแข็งแรงกว่าอนุพันธ์ตัวอื่น จึงทำให้อนุพันธ์ 82 เป็นอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ GP ได้ดีที่สุดที่บริเวณนี้ และเมื่อพิจารณาค่า B.E. ของอนุพันธ์ 80 และ 81 พบว่ามีค่าเท่ากัน เนื่องจากมีการจัดวางตัวของโครงสร้างที่ใกล้เคียงกัน ดังภาพประกอบ 29ก

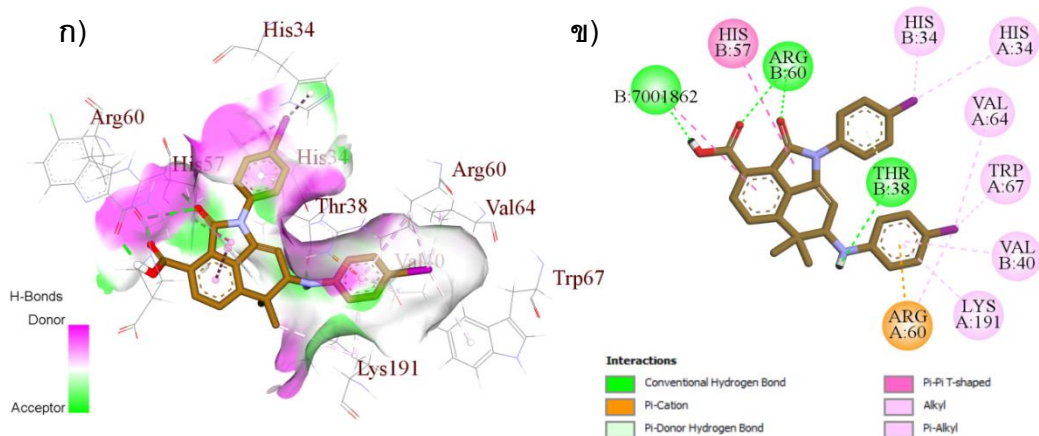


- = สาร 36 – 38 (ภาพ ก-ค)
 = Hyphodermin A
 = สาร 78
 = สาร 79
 = สาร 80
 = สาร 81
 = สาร 82

ภาพประกอบ 29 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างลิแกนด์ ภายในโพรงการจับ

(ก) Purine site (ข) AMP site (ค) Indole site

สำหรับโพรงการจับของ AMP site พบว่า ลิแกนด์เดิม (37) มีความจำเพาะต่อบริเวณจับนี้มาก เนื่องจากให้ค่า B.E. ที่ดีมาก ทั้งนี้เนื่องจากความมีขั้วสำคัญต่อการเกิด Interaction ที่บริเวณนี้ ซึ่งการวางตัวของลิแกนด์เดิม (37) สามารถเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้ากับกรดอะมิโน Arg81 และ Arg310 ได้ จึงทำให้ค่า B.E. ของลิแกนด์นี้มีค่าที่ดีที่สุด บ่งชี้ถึงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มีประสิทธิภาพ โดยพบว่าอนุพันธ์ Hyphodermin A (78 – 82) มีการวางตัวที่ใกล้เคียงกับลิแกนด์เดิม(37) แต่มีความยืดหยุ่นของโครงสร้างน้อยกว่า ดังภาพประกอบที่ 29ข และด้วยความยืดหยุ่นของโครงสร้างลิแกนด์เดิมทำให้ลิแกนด์เดิมเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนจำนวน 8 พันธะ กับกรดอะมิโนที่โพรงการจับนี้ โดยพบว่า Interaction ที่สำคัญของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A ต่อการจับบริเวณนี้ได้แก่ อนุพันธ์ 78 และ 79 สร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Arg242 โดยพบว่าการวางตัวของอนุพันธ์ 78 มีการวางตัวที่ใกล้เคียงกับอนุพันธ์ 80 – 82 มากกว่า อีกทั้งยังเกิดการสร้างแรงแบบ Pi-cation กับกรดอะมิโน Arg193 ทำให้ค่า B.E. ของอนุพันธ์ 78 ดีกว่าอนุพันธ์ 79 แต่อย่างไรก็ตามพบว่าค่า B.E. ของอนุพันธ์ 80 – 82 มีค่าที่ดีกว่าและมีค่าที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากอนุพันธ์ 80 – 82 มีการวางตัวที่ใกล้เคียงกัน ดังภาพประกอบที่ 29ข โดยอนุพันธ์ 80 และ 81 มีการสร้างแรงแบบ Pi-sigma กับกรดอะมิโน Gln71 ที่เหมือนกัน แต่การสร้างแรงของอนุพันธ์ 81 แข็งแรงกว่าอนุพันธ์ 80 รวมถึงอนุพันธ์ 81 เกิดการสร้างแรงแบบ Pi-lon pair กับกรดอะมิโน Gln 71 ดังนั้น ค่า B.E. จึงดีกว่าอนุพันธ์ 80 โดยพบว่า Interaction ของอนุพันธ์ 81 และ 82 เหมือนกัน แต่ความแข็งแรงของพันธะระหว่างกรดอะมิโนบางชนิดของอนุพันธ์ 82 แข็งแรงกว่า จึงทำให้อนุพันธ์ 82 มีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ GP ที่บริเวณนี้ดีที่สุด



ภาพประกอบ 30 (ก) การจัดวางตัวและ (ข) การเกิดอันตรกิริยาของอนุพันธ์ 82
ในโพรงการจับ Indole site

สำหรับบริเวณ Indole site ซึ่งเป็นบริเวณที่อนุพันธ์ Hyphodermin A ทั้ง 5 อนุพันธ์มีความจำเพาะต่อการจับ เนื่องจากภายในโพรงการจับของบริเวณนี้มีทั้งลักษณะของ Hydrophobic และ Hydrophilic ทำให้สารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบวงอะโรมาติกและมีส่วนที่มีขั้วจากไนโตรเจนอะตอมและหมู่แฮโลเจนเกิดความจำเพาะต่อโพรงการจับภายในบริเวณนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุพันธ์ 80 – 82 ที่มีค่า B.E. ดีกว่าลิแกนด์เดิม (38) เนื่องจากมีการวางตัวภายในโพรงการจับที่คล้ายกับลิแกนด์เดิม โดยวงอะโรมาติกของ 3 อนุพันธ์นี้วางตัวในตำแหน่งเดียวกับวง Indole ของลิแกนด์เดิม ดังภาพประกอบที่ 29ค แต่พบว่าวงอะโรมาติกของอนุพันธ์ 82 ซึ่งถูกแทนที่ด้วยอะตอมของไอโอดีน มีการวางตัวที่บิดตัวต่างจากอนุพันธ์ 80 และ 81 เล็กน้อย จึงทำให้เกิด Interaction แบบ Hydrophobic กับกรดอะมิโน Val64 เกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Arg60 ที่แข็งแรงกว่า ส่งผลให้อนุพันธ์ 82 มีค่า B.E. ที่ดีกว่าอนุพันธ์ 80 และ 81 เล็กน้อย ซึ่งเป็น Interaction ที่สำคัญภายในโพรงการจับนี้ อีกทั้งยังมี Interaction ที่สำคัญ ที่ทำให้อนุพันธ์ 80 – 82 จับกับเอนไซม์ GP ได้ดีกว่าอนุพันธ์ 78 และ 79 ได้แก่ การสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Thr38 อีกทั้งยังมีการวางตัวแตกต่างจากลิแกนด์เดิม (38) จึงส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ได้ไม่ดีเท่ากับอนุพันธ์ 80 – 82 โดยพบว่าอนุพันธ์ 82 ให้ค่า B.E. ที่ดีที่สุดที่บริเวณ Indole site เนื่องจากการวางตัวของอนุพันธ์ 82 ภายในโพรงการจับแตกต่างจากอนุพันธ์ตัวอื่นเนื่องจากอนุพันธ์นี้มีการแทนที่ของวงอะโรมาติกด้วยอะตอมของไอโอดีนซึ่งมีขนาดใหญ่ ส่งผลให้การวางตัวของอนุพันธ์ 82 มีการบิดของวงอะโรมาติกมากกว่าตัวอื่น ๆ จึงเกิดการสร้าง Interaction กับกรดอะมิโนภายในโพรงการจับของบริเวณ Indole site ได้แข็งแรงกว่าอนุพันธ์ตัวอื่น ๆ และเนื่องจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Arg60 และการสร้างพันธะแบบ Hydrophobic กับ Val 64 และ Lys191 ซึ่งส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP ได้ เนื่องจากเอนไซม์ GP มีลักษณะเป็น dimer ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ขณะที่เอนไซม์นี้ทำงาน การเติมเต็มของตัวทำลายภายในช่องว่างระหว่าง 2 หน่วยย่อยนี้ ส่งผลให้เกิดการหมุนของแต่ละหน่วยย่อยได้ 7 องศา แต่เมื่อมีกรดอะมิโน Arg60 และ Val 64 สร้างพันธะไฮโดรเจนกับตัวยับยั้งของเอนไซม์ จะเกิดการขัดขวางการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ซึ่งจะส่งผลให้เอนไซม์ GP ในรูป inactive เสถียรมากขึ้น (Rath et al., 2000)

จากการทำ Molecular docking เพื่อพิจารณาค่า B.E. และอันตรกิริยาของอนุพันธ์ชนิดใหม่ของสาร Hyphodermin A 78 – 82 ที่มีต่อเอนไซม์ GP พบว่าอนุพันธ์เหล่านี้สามารถจับกับเอนไซม์ GP ได้ทุกบริเวณจับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ Indole site ซึ่งอนุพันธ์ชนิดใหม่ของสาร

Hyphodermin A มีค่า B.E. ที่ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับลิแกนด์เดิม จึงสามารถทำนายได้ว่า อนุพันธ์ ชนิดใหม่ของสาร Hyphodermin A 78 – 82 สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นตัวยามีกลไกการ ออกฤทธิ์แบบยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP เพื่อใช้ในการรักษาภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง ของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้

5. ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

จากการนำสารตั้งต้น Hyphodermin A และอนุพันธ์ Hyphodermin A ทั้ง 5 อนุพันธ์ มา ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษ (Cytotoxicity) ต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2, SK-Hep-1 และเซลล์มะเร็ง ปอด A549 โดยใช้วิธี MTT assay ที่ความเข้มข้นของสารทดสอบ 20 μM ใน 0.2 % DMSO และใช้ ยา Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 1 μM ใน 0.2 % DMSO เป็น positive control โดยพิจารณาฤทธิ์ ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารทดสอบจาก % Survival หากมีค่าสูงกว่า 90 % ถือว่าสาร ทดสอบไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง หากสารทดสอบมี % Survival สูงกว่า 75 % ถือเป็น สารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษอยู่ในระดับอ่อน หากสารทดสอบที่มีค่า % Survival ต่ำกว่า 50 % ถือเป็น สารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระดับที่น่าสนใจ และหากมีค่า % Survival ต่ำกว่า 25 % ถือเป็นสารที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระดับที่รุนแรง จากผลการทดสอบ พบว่า อนุพันธ์ Hyphodermin A ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสามชนิดอยู่ใน ระดับกลาง (ตาราง 18) และมีฤทธิ์มากกว่าสารตั้งต้น Hyphodermin A โดยพบว่า อนุพันธ์เหล่านี้ แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด SK-Hep-1 มากที่สุด โดยเฉพาะอนุพันธ์ 82 ที่ให้ค่า % survival ของ SK-Hep-1 cell line ที่ 30.5% ซึ่งเป็นฤทธิ์ที่อยู่ในระดับที่น่าสนใจอีกด้วย ซึ่งหาก พิจารณาระหว่างความสัมพันธ์ของโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ พบว่า การแทนที่ของหมู่แฮโลเจนมี ผลต่อความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งที่ดีขึ้น เนื่องจากค่าการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งจากการ ทดสอบด้วยอนุพันธ์ 79 – 82 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่มีการแทนที่อะตอมไฮโดรเจนของวงอะโรมาติกด้วย หมู่แฮโลเจนมีค่าการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งทั้งสามชนิดที่ลดลง และมีแนวโน้มของฤทธิ์ที่มากขึ้น ดังนั้น การแทนที่ด้วยหมู่ F, Cl, Br และ I ส่งผลต่อประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็งทั้งสามชนิดนี้ที่มากขึ้นตามลำดับ

ตาราง 18 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด HepG2, SK-Hep-1 และ A549

Compounds	เซลล์มะเร็งชนิด HepG2		เซลล์มะเร็งชนิด SK-Hep-1		เซลล์มะเร็งชนิด A549	
	% survival	S.D.	% survival	S.D.	% survival	S.D.
Control	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
Hyphodermin A	89.5	10.9	104.4	7.1	101.9	2.1
อนุพันธ์ 78	99.9	2.0	81.4	3.1	90.7	2.9
อนุพันธ์ 79	84.4	7.4	49.1	2.5	86.2	3.1
อนุพันธ์ 80	77.4	4.3	50.5	12.6	80.8	6.7
อนุพันธ์ 81	73.4	6.4	39.9	10.4	66.9	5.4
อนุพันธ์ 82	60.4	6.8	30.5	5.2	48.6	2.5
Doxorubicin	19.1	8.5	4.3	3.5	4.6	0.9

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยนี้เป็นการสังเคราะห์อนุพันธ์ชนิดใหม่ของสาร Hyphodermin A โดยเริ่มจากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเห็ด *H. radula* เพื่อให้ผลิตสาร Hyphodermin A ในปริมาณมาก เพื่อใช้สำหรับเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ โดยจากการศึกษา พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเห็ด ได้แก่ การนำเห็ดที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MY เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสูตร MY ปริมาตร 1,250 มิลลิลิตร แล้วทำการตั้งบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 – 32 °C) ในที่ปราศจากแสงและไม่มีลมพัดเข้าหาอากาศ เป็นเวลา 30 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาในการเลี้ยง กรองส่วนของเชื้อเห็ดออกและนำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ด มาสกัดด้วย ethyl acetate ได้เป็นสารสกัดหยาบจากจากชั้น Ethyl acetate น้ำหนัก 1.85 กรัม จากนั้นนำสารสกัดหยาบนี้ มาแยกและทำบริสุทธิ์สาร Hyphodermin A ด้วยเครื่อง Biotage flash chromatography โดยใช้ระบบ Normal phase (Silica gel column) ทำการชะด้วยการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายผสมระหว่าง Hexane และ Ethyl acetate หลังจากนั้นนำมาทำบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยระบบ Reverse phase (OSD-C18 column) โดยการชะด้วยการลดขั้วของตัวทำละลายผสมระหว่าง Acetonitrile กับน้ำ (โดยมี 0.05% TFA ในตัวทำละลาย) ได้สาร Hyphodermin A บริสุทธิ์ มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 410.7 มิลลิกรัม คิดเป็น 22.2% yield และยืนยันโครงสร้างของสาร Hyphodermin A ด้วยเทคนิค HRMS spectrometry และ NMR spectroscopy จากนั้นนำสาร Hyphodermin A ที่แยกได้มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบเอมีนที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ โดยใช้เอมีนทั้งหมด 10 ชนิดในการทดสอบ ได้แก่ Ammonium sulfate, Urea, Thioacetamide, Sulfamic acid, Cysteine, Aniline, 4- Fluoroaniline, 4- Chloroaniline, 4- Bromoaniline และ 4-Iodoaniline จากผลการทดสอบโดยติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC พบว่า มีเอมีน 5 ชนิด ที่สารตั้งต้น Hyphodermin A หายไปและเกิดผลิตภัณฑ์ 1 ชนิด ได้แก่ Aniline , 4-Fluoroaniline, 4-Chloroaniline, 4-Bromoaniline และ 4-Iodoaniline เอมีนเหล่านี้จึงถูกเลือกนำมาใช้เป็นเอมีนในการทำปฏิกิริยากับ Hyphodermin A เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ จากนั้นจึงทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ โดยทำปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้น Hyphodermin A ที่แยกได้จากเห็ด *H. radula* กับเอมีน 5 ชนิด ได้แก่ Aniline, 4-Fluoroaniline, 4-Chloroaniline, 4-Bromoaniline และ 4-Iodoaniline ในตัวทำละลาย Methanol เกิดสารผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ชนิดใหม่ของสาร Hyphodermin A ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ สาร 78 – 82 ตามลำดับ โดยศึกษาโครงสร้างของอนุพันธ์

ด้วยเทคนิค HRMS spectrometry และ NMR spectroscopy จากนั้นนำสารอนุพันธ์เหล่านี้มาศึกษาแนวโน้มในการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Human Liver Glycogen Phosphorylase (HLGP) ด้วยการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่ง โดยใช้โปรแกรม AutoDock 4.2 (Morris et al., 2009) โดยศึกษาที่บริเวณควบคุม 3 บริเวณของเอนไซม์ ได้แก่ บริเวณ Purine site (PDB ID: 1L5R), AMP site (PDB ID: 3DDS) และ Indole site (PDB ID: 1L5Q) ซึ่งมีโครงสร้างของสาร Riboflavin (36) เป็นลิแกนด์ที่จับอย่างจำเพาะที่บริเวณ Purine site (Ekstrom et al., 2002) , 3DDS ที่มีโครงสร้างของสาร GSK261 (37) เป็นลิแกนด์ที่จับอย่างจำเพาะที่บริเวณ AMP site (Thomson et al., 2009) และ 1L5Q ที่มีโครงสร้างของสาร CP-403,700 (38) เป็นลิแกนด์ที่จับอย่างจำเพาะที่บริเวณ Indole site (Rath et al., 2000) โดยเริ่มจากการหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่ง ด้วยกระบวนการ Redocking พบว่า ลิแกนด์เดิมได้แก่ Riboflavin (36), GSK261 (37) และ CP-403,700 (38) มีค่า RMSD น้อยกว่า 2.0 Å ดังนั้น พารามิเตอร์ที่ใช้เหมาะสมต่อการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งในขั้นตอนต่อไป โดยพารามิเตอร์ดังกล่าว ได้แก่ กล่องกริดขนาด 60X60X60 Å³ ช่องว่างระหว่างกริด เท่ากับ 0.375 Å และกำหนดจำนวนรอบในการรันจำนวน 150 รอบ หลังจากนั้นนำพารามิเตอร์ดังกล่าวมาทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งระหว่างอนุพันธ์ Hyphodermin A กับเอนไซม์ GP พบว่าอนุพันธ์ของสาร Hyphodermin A ทั้ง 5 ชนิดที่สังเคราะห์ขึ้นมีค่า Binding energy ที่ดีกว่าสารตั้งต้น Hyphodermin A แสดงถึงประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ HLGP ได้ดีกว่าสารตั้งต้น Hyphodermin A และพบว่าอนุพันธ์เหล่านี้มีความจำเพาะต่อบริเวณ Indole site มากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุพันธ์ 82 ที่ให้ค่า Binding energy ดีที่สุดในทุกบริเวณจับ อีกทั้งยังให้ค่า Binding energy ที่ดีกว่าลิแกนด์เดิมของบริเวณ Indole site ซึ่งได้แก่ CP-403,700 (IC₅₀ เท่ากับ 45 nM) (Rath et al., 2000) และเมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นทั้ง 5 ชนิด กับประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ HLGP พบว่า หมู่แทนที่ที่เป็นอะตอมของไอโอดีนบนวงอะโรมาติกในอนุพันธ์ 82 ส่งผลต่อประสิทธิภาพการจับกับเอนไซม์ HLGP ได้ดีที่สุด เนื่องจากมีขนาดอะตอมใหญ่ที่สุด ส่งผลต่อความยาวของพันธะระหว่างอนุพันธ์กับกรดอะมิโนภายในโพรงการจับของเอนไซม์ HLGP รวมถึงการวางตัวอย่างจำเพาะภายในโพรงการจับ ทำให้อนุพันธ์ 82 มีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ HLGP ได้ดีที่สุด และเมื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารตั้งต้น Hyphodermin A และอนุพันธ์ชนิดใหม่ของสาร Hyphodermin A ที่สังเคราะห์ขึ้นทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และชนิด SK-Hep-1 และเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 (Cytotoxicity) โดยใช้วิธี MTT assay พบว่า อนุพันธ์ 79 – 82 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสามชนิดอยู่ในระดับปานกลาง อย่างไรก็ตามอนุพันธ์ของ

สาร Hyphodermin A มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ดีกว่าสารตั้งต้น Hyphodermin A จากผลการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า อนุพันธ์เหล่านี้ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด SK-Hep-1 มากที่สุด เนื่องจากให้ค่า % survival ต่ำที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุพันธ์ 82 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้น Hyphodermin A และ 4-Iodoaniline ที่ให้ค่า % survival ของเซลล์มะเร็งชนิด SK-Hep-1 ที่ 30.5% ซึ่งจัดว่ามีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในระดับที่น่าสนใจ และเมื่อพิจารณาระหว่างโครงสร้างของสารกับการออกฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง พบว่า หมู่แทนที่แฮโลเจน ได้แก่ F, Cl, Br และ I บนวงอะโรมาติกส่งผลต่อการออกฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก อนุพันธ์ที่ 79 ที่ไม่มีหมู่แทนที่แฮโลเจนในโครงสร้างแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุดนั่นเองและพบว่าเมื่อหมู่แทนที่เป็น I ให้ประสิทธิภาพความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดีที่สุด

สำหรับงานวิจัยต่อไปในอนาคต กลุ่มผู้วิจัยมีการวางแผนที่จะทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HLGP กับอนุพันธ์ของสาร Hyphodermin A ชนิดใหม่ทั้ง 5 ชนิดที่สังเคราะห์ขึ้น เพื่อเป็นการยืนยันผลจากการทำโมเลกุลลาร์ดีคอกกิ่งในงานวิจัยนี้ รวมถึงสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร Hyphodermin A เพิ่มเติม โดยใช้สาร Hyphodermin A ที่แยกได้จากเห็ด *H. radula* เป็นสารตั้งต้นเพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างสารกับการออกฤทธิ์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นตัวยาคต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ชนิดใหม่ของสาร Hyphodermin A ในงานวิจัยนี้สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ได้ 5 ชนิด ได้แก่ สาร 78 – 82 ซึ่งแตกต่างกันที่หมู่แทนที่บนวงอะโรมาติก ได้แก่ หมู่แฮโลเจน F, Cl, Br และ I ซึ่งพบว่า ให้ผลการออกฤทธิ์ฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน รวมถึงความสามารถในการจับกับเอนไซม์ HLGP ที่แตกต่างกันอีกด้วย ดังนั้น หากมีการเพิ่มความหลากหลายของหมู่แทนที่บนวงอะโรมาติกของอนุพันธ์ Hyphodermin A ให้มีความหลากหลายมากขึ้น โดยการแทนที่ด้วยหมู่ดิงอิลิเล็กตรอนหรือหมู่ให้อิเล็กตรอนชนิดอื่นๆ จะทำให้อนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายมากขึ้น เนื่องจากอนุพันธ์ที่สังเคราะห์มีฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน เมื่อมีหมู่แทนที่ต่างกัน ดังนั้น หากเพิ่มความหลากหลายให้หมู่แทนที่ จะส่งผลให้การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น รวมถึงสามารถศึกษาถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างสารกับการออกฤทธิ์ได้อีกด้วย เพื่อเป็นแนวทางในการออกแบบโครงสร้างสารให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้นต่อไป

2. จากผลของการทำโมเลกุลลาร์ดีออกกิ่งระหว่างอนุพันธ์ Hyphodermin A ชนิดใหม่ กับเอนไซม์ Human Liver Glycogen Phosphorylase ที่บริเวณควบคุม Purine site, AMP site และ Indole site พบว่า อนุพันธ์ Hyphodermin A ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นมีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ Glycogen phosphorylase โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่บริเวณ Indole site ดีได้ ดังนั้นอนุพันธ์เหล่านี้จึงมีแนวโน้มในการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งตัวยับยั้งของเอนไซม์ Glycogen phosphorylase นี้สามารถใช้เป็นยาเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือดในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานแบบที่ 2 ได้ และเพื่อเป็นการยืนยันผลของการทำโมเลกุลลาร์ดีออกกิ่ง จึงควรนำอนุพันธ์เหล่านี้ที่สังเคราะห์ขึ้นไปทดสอบฤทธิ์จริงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Glycogen phosphorylase ในห้องปฏิบัติการต่อไป



บรรณานุกรม

- Alessandra, D. (2018). Liver-on-a-Chip: Beyond the chip design to mimic natural sinusoids. Retrieved from <https://darwin-microfluidics.com/blogs/reviews/liver-on-a-chip-beyond-the-chip-design-to-mimic-natural-sinusoids>
- Barford, D., Hu, S. H., & Johnson, L. N. (1991). Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP. *Journal of Molecular Biology*, 218(1), 233-260. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90887-C](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90887-C)
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2010). *Biochemistry* (edition 7th ed.). New York: W.H. Freeman.
- Birch, A., Kenny, P., Oikonomakos, N., Otterbein, L., Schofield, P., Whittamore, P., & Whalley, D. (2007). Development of potent, orally active 1-substituted-3,4-dihydro-2-quinolone glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, 394-399. doi:[10.1016/j.bmcl.2006.10.037](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.10.037)
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries: Global Cancer Statistics 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68. doi:[10.3322/caac.21492](https://doi.org/10.3322/caac.21492)
- Cancer Research UK. (2020). Types of lung cancer. Retrieved from <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/lung-cancer/stages-types-grades/types>
- da Silva Maia, A. F., Siqueira, R. P., de Oliveira, F. M., Ferreira, J. G., da Silva, S. F., Caiuby, C. A. D., . . . Teixeira, R. R. (2016). Synthesis, molecular properties prediction and cytotoxic screening of 3-(2-aryl-2-oxoethyl)isobenzofuran-1(3H)-ones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(12), 2810-2816. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.065>
- Duke, B. J., & O'Leary, B. (1992). The Gaussian programs as a teaching tool: A case study on molecular hydrogen calculations. *Journal of Chemical Education*, 69(7), 529. doi:[10.1021/ed069p529](https://doi.org/10.1021/ed069p529)

- Ekstrom, J., Pauly, T., Carty, M., Soeller, W., Culp, J., Danley, D., . . . Rath, V. (2002). Structure-Activity Analysis of the Purine Binding Site of Human Liver Glycogen Phosphorylase. *Chemistry & biology*, 9, 915-924. doi:10.1016/S1074-5521(02)00186-2
- El-Sharief, A. M. S., Ammar, Y. A., Belal, A., El-Sharief, M. A. M. S., Mohamed, Y. A., Mehany, A. B. M., . . . Ragab, A. (2019). Design, synthesis, molecular docking and biological activity evaluation of some novel indole derivatives as potent anticancer active agents and apoptosis inducers. *Bioorganic Chemistry*, 85, 399-412. doi:https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.01.016
- Fanelli, & Alex. (2016). liver hepatocellular carcinoma): cell culture. Retrieved from <http://www.hepg2.com/>
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., . . . Fox, D. J. (2016). Gaussian 16 Rev. C.01. Wallingford, CT.
- Hampson, L. J., Arden, C., Agius, L., Ganotidis, M., Kosmopoulou, M. N., Tiraidis, C., . . . Oikonomakos, N. G. (2006). Bioactivity of glycogen phosphorylase inhibitors that bind to the purine nucleoside site. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(23), 7835-7845. doi:https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.07.060
- Henderson, L. C., Loughlin, W. A., Jenkins, I. D., Healy, P. C., & Campitelli, M. R. (2006). Efficient Formal Synthesis of (±)-Hyphodermin B. *The Journal of Organic Chemistry*, 71(6), 2384-2388. doi:10.1021/jo052485l
- Henkel, T., Mueller, H., Schmidt, D., & Wollweber, H. (1997). DE Patent No. DE 19611366 A1.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., . . . Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509-547. doi:https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004
- Ibrahim, M. K., Taghour, M. S., Metwaly, A. M., Belal, A., Mehany, A. B. M., Elhendawy, M. A., . . . Eissa, I. H. (2018). Design, synthesis, molecular modeling and anti-proliferative evaluation of novel quinoxaline derivatives as potential DNA

- intercalators and topoisomerase II inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 155, 117-134. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.004>
- Ihmaid, S. (2018). Exploring the Dual Inhibitory Activity of Novel Anthranilic Acid Derivatives towards α -Glucosidase and Glycogen Phosphorylase Antidiabetic Targets: Design, In Vitro Enzyme Assay, and Docking Studies. *Molecules*, 23, 1304. doi:10.3390/molecules23061304
- Johnson, L. N. (1992). Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *The FASEB Journal*, 6(6), 2274-2282. doi:10.1096/fasebj.6.6.1544539
- Kok, S. H. L., Chui, C. H., Lam, W. S., Chen, J., Lau, F. Y., Wong, R. S. M., . . . Chan, A. S. C. (2007). Synthesis and structure evaluation of a novel cantharimide and its cytotoxicity on SK-Hep-1 hepatoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(5), 1155-1159. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.12.039>
- Kuthyala, S., Nagaraja, G. K., Sheik, S., Hanumanthappa, M., & Kumar S, M. (2019). Synthesis of imidazo [1, 2-a]pyridine-chalcones as potent inhibitors against A549 cell line and their crystal studies. *Journal of Molecular Structure*, 1177, 381-390. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.09.087>
- Lirdprapamongkol, K., Kramb, J.-P., Suthiphongchai, T., Surarit, R., Srisomsap, C., Dannhardt, G., & Svasti, J. (2009). Vanillin Suppresses Metastatic Potential of Human Cancer Cells through PI3K Inhibition and Decreases Angiogenesis in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3055-3063. doi:10.1021/jf803366f
- Liu, W., Shen, Y., & Ding, J. (2003). Protein phosphatase 2A: Its structure, function and activity regulation. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica*, 35, 105-112.
- Logrado, L. P. L., Santos, C. O., Romeiro, L. A. S., Costa, A. M., Ferreira, J. R. O., Cavalcanti, B. C., . . . dos Santos, M. L. (2010). Synthesis and cytotoxicity screening of substituted isobenzofuranones designed from anacardic acids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(8), 3480-3489. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.05.015>

- Loughlin, W. A., Jenkins, I. D., Henderson, L. C., Campitelli, M. R., & Healy, P. C. (2008). Total Synthesis of (±)-Hyphodermins A and D. *The Journal of Organic Chemistry*, 73(9), 3435-3440. doi:10.1021/jo800227p
- Loughlin, W. A., Pierens, G. K., Petersson, M. J., Henderson, L. C., & Healy, P. C. (2008). Evaluation of novel Hyphodermin derivatives as Glycogen Phosphorylase a inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(11), 6172-6178. doi:https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.04.047
- Mantipally, M., Gangireddy, M. R., Gundla, R., Badavath, V. N., Mandha, S. R., & Maddipati, V. C. (2019). Rational design, molecular docking and synthesis of novel homopiperazine linked imidazo[1,2-a]pyrimidine derivatives as potent cytotoxic and antimicrobial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(16), 2248-2253. doi:https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.06.031
- Martin, B., & Pamela, J. (1990). *Fungi Without Gills (Hymenomycetes and Gasteromycetes)* (Edition 1st ed.). London: Chapman and Hall.
- Miller, B., Nguyen, H., Hu, C., Lin, C., & Nguyen, Q. (2014). New and Emerging Drugs and Targets for Type 2 Diabetes: Reviewing the Evidence. *American health & drug benefits*, 7, 452-463.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Computational Chemistry*, 16, 2785-2791.
- Nobles, M. K. (1967). *Conspicuity of Basidiaradulum (Radula) radula and Corticium hydnans* (Edition 2 ed. Vol. 59). United State: Mycological Society of America.
- Palm, D., Klein, H. W., Schinzel, R., Buehner, M., & Helmreich, E. J. M. (1990). The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis. *Biochemistry*, 29(5), 1099-1107. doi:10.1021/bi00457a001
- Petersson, M. J., Marchal, C., Loughlin, W. A., Jenkins, I. D., Healy, P. C., & Almesåker, A. (2007). Unexpected regiospecific reactivity of a substituted phthalic anhydride. *Tetrahedron*, 63(6), 1395-1401. doi:https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.11.090

- Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., & Rautou, P.-E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 66(1), 212-227.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009>
- Rath, V. L., Ammirati, M., Danley, D. E., Ekstrom, J. L., Gibbs, E. M., Hynes, T. R., . . . Hoover, D. J. (2000). Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site. *Chemistry & Biology*, 7(9), 677-682.
doi:[https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00004-1](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00004-1)
- Schweiker, S. S., Loughlin, W. A., Lohning, A. S., Petersson, M. J., & Jenkins, I. D. (2014). Synthesis, screening and docking of small heterocycles as Glycogen Phosphorylase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 584-594.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.063>
- Sekhar, T., Thriveni, P., Venkateswarlu, A., Daveedu, T., Peddanna, K., & Sainath, S. B. (2020). One-pot synthesis of thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives, their cytotoxic evaluation and molecular docking studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 231, 118056.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118056>
- Sheryn, W., Ninomiya, M., Koketsu, M., & Hasbullah, S. A. (2019). In-vitro cytotoxicity of synthesized phthalide-fused indoles and indolines against HL-60 and HepG2 cells. *Arabian Journal of Chemistry*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2019.02.002>
- Shukla, S., Srivastava, R. S., Shrivastava, S. K., Sodhi, A., & Kumar, P. (2012). Synthesis, Molecular docking and Biological evaluation of 4-Cycloalkylidineamino 1, 2-Naphthoquinone Semicarbazones as Anticancer agents. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2, Supplement), S1040-S1046.
doi:[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60358-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60358-X)
- Song, E. Y., Kaur, N., Park, M.-Y., Jin, Y., Lee, K., Kim, G., . . . Han, G. (2008). Synthesis of amide and urea derivatives of benzothiazole as Raf-1 inhibitor. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(7), 1519-1524.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.10.008>

Sreenivasulu, R., Tej, M. B., Jadav, S. S., Sujitha, P., Kumar, C. G., & Raju, R. R. (2020).

Synthesis, anticancer evaluation and molecular docking studies of 2,5-bis(indolyl)-1,3,4-oxadiazoles, Nortopsentin analogues. *Journal of Molecular Structure*, 1208, 127875. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127875>

Thomson, S., Banker, P., Bickett, D., Boucheron, J., Carter, H., Clancy, D., . . . Weiel, J.

(2009). Anthranilimide based glycogen phosphorylase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. Part 3: X-ray crystallographic characterization, core and urea optimization and in vivo efficacy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 1177-1182. doi:10.1016/j.bmcl.2008.12.085

Van, J. M., Kaspers, G., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 731, 237-245. doi:10.1007/978-1-61779-080-5_20

Wright, S. W., Rath, V. L., Genereux, P. E., Hageman, D. L., Levy, C. B., McClure, L. D., . . .

Treadway, J. L. (2005). 5-Chloroindoloyl glycine amide inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, in vitro, in vivo, and X-ray crystallographic characterization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(2), 459-465. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.10.048>

Zhao, B., Zhao, C., Hu, X., Xu, S., Lan, Z., Guo, Y., . . . Zheng, P. (2020). Design, synthesis and 3D-QSAR analysis of novel thiopyranopyrimidine derivatives as potential antitumor agents inhibiting A549 and Hela cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 185, 111809.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111809>

พรรณราย ศิยะพงษ์. (2556). การศึกษาโมเลกุลลาร์ดีออกกิ่งและกลศาสตร์ควอนตัมของควิโนรีดักเตส 2 เป็นเอนไซม์เป้าหมายสำหรับมะเร็งเต้านม. (ปริญญาโท วท.ม. (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต)), บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

High Resolution Mass spectrum ของสารตั้งต้น Hyphodermin A และอนุพันธ์

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

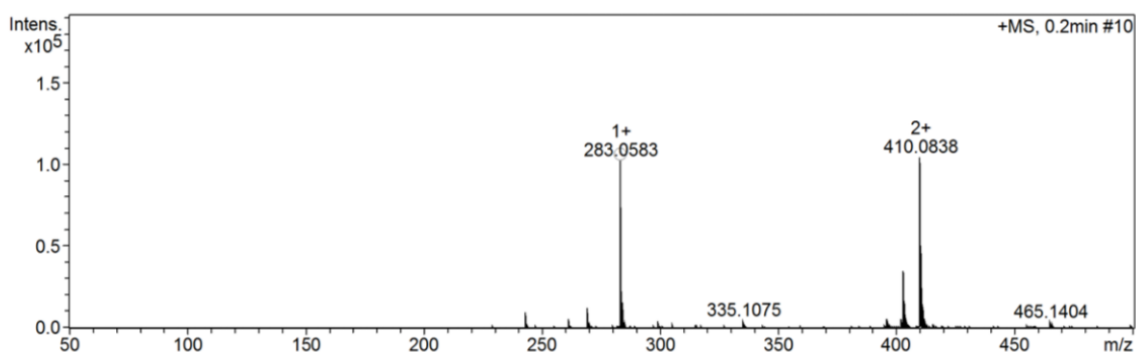
Analysis Name D:\Data\Job\ESI\Job-HRMS 149 (pos).d
 Method tune_wide28-4-60.m
 Sample Name 01
 Comment

Acquisition Date 12/24/2019 6:37:33 PM

Operator RU
 Instrument micrOTOF 8213750.10411

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [mDa]	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdB	N-Rule	e ⁻	Conf	mSigma
283.058283	1	C ₁₄ H ₁₂ NaO ₅	283.057694	0.6	2.1	-1.5	8.5	ok	even		4.1
	2	C ₁₀ H ₈ N ₆ NaO ₃	283.055009	3.3	-11.6	-11.6	9.5	ok	even		12.8
	3	C ₁₅ H ₈ N ₄ NaO	283.059032	0.7	-2.6	2.9	13.5	ok	even		17.1

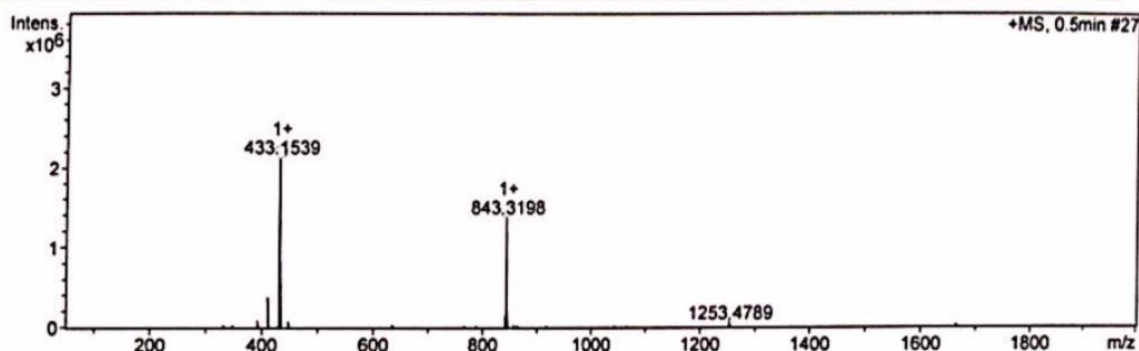
ภาพประกอบ 1 High Resolution Mass spectrum ของสารตั้งต้น Hyphodermin A

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info		Acquisition Date 12/9/2019 5:21:12 PM
Analysis Name	D:\Data\Boon-ek\ESI\BY-HRMS 1180 (pos).d	
Method	tune_wide28-4-60.m	Operator RU
Sample Name	Aniline	Instrument micrOTOF 8213750.10411
Comment		

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	[err] [mDa]	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma
433.153892	1	C28H21N2O3	433.154669	0.8	-1.8	2.3	19.5	ok	even	9.6
	1	C26H22N2NaO3	433.152263	1.6	-3.8	-3.3	16.5	ok	even	5.0
	2	C31H22NaO	433.156286	2.4	-5.5	6.1	20.5	ok	even	21.0
843.319788	1	C53H47O10	843.316374	3.4	-4.0	-3.7	30.5	ok	even	9.8
	2	C46H51O15	843.322247	2.5	-2.9	3.2	21.5	ok	even	35.2
	3	C59H43N2O4	843.321734	1.9	2.3	2.6	39.5	ok	even	37.1
	1	C57H44N2NaO4	843.319329	0.5	0.5	-0.2	36.5	ok	even	25.5
	2	C44H52NaO15	843.319842	0.1	-0.1	0.4	18.5	ok	even	45.4

ภาพประกอบ 2 High Resolution Mass spectrum ของอนุพันธ์ 78
(ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ Aniline)

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

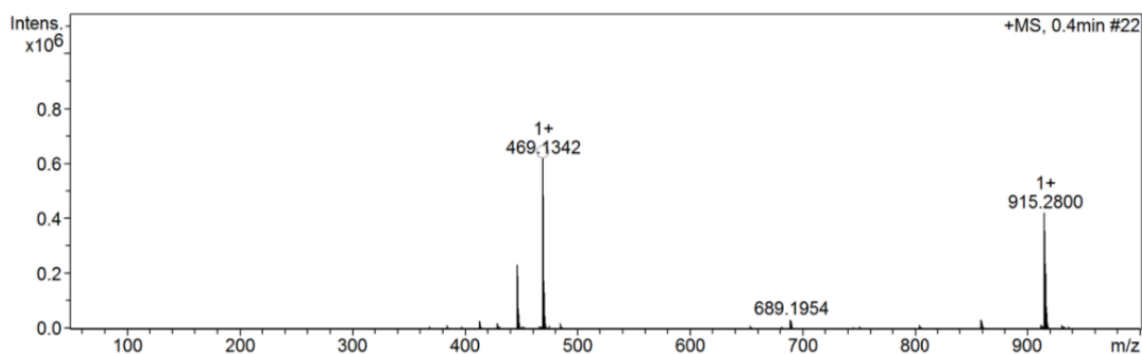
Analysis Name D:\Data\Job\ESI\Job-HRMS 150 (pos).d
 Method tune_wide28-4-60.m
 Sample Name 03
 Comment

Acquisition Date 12/24/2019 6:39:30 PM

Operator RU
 Instrument micrOTOF 8213750.10411

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [mDa]	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻	Conf	mSigma
469.134228	1	C25H22N2NaO6	469.137007	2.8	5.9	6.1	15.5	ok	even		5.6
	2	C26H20F2N2NaO3	469.133420	0.8	1.7	-1.5	16.5	ok	even		8.8
	3	C22H23FN2NaO7	469.138150	3.9	8.4	8.5	11.5	ok	even		12.3
	4	C29H19FN2NaO2	469.132277	2.0	4.2	-3.9	20.5	ok	even		25.2
	5	C19H26NaO12	469.131647	2.6	5.5	-5.2	6.5	ok	even		31.1
	6	C31H20F2NaO	469.137442	3.2	-6.9	7.2	20.5	ok	even		32.3
	7	C32H18N2NaO	469.131134	3.1	6.6	-6.3	24.5	ok	even		41.7
	8	C34H19FNa	469.136300	2.1	-4.4	4.7	24.5	ok	even		48.9

ภาพประกอบ 3 High Resolution Mass spectrum ของอนุพันธ์ 79

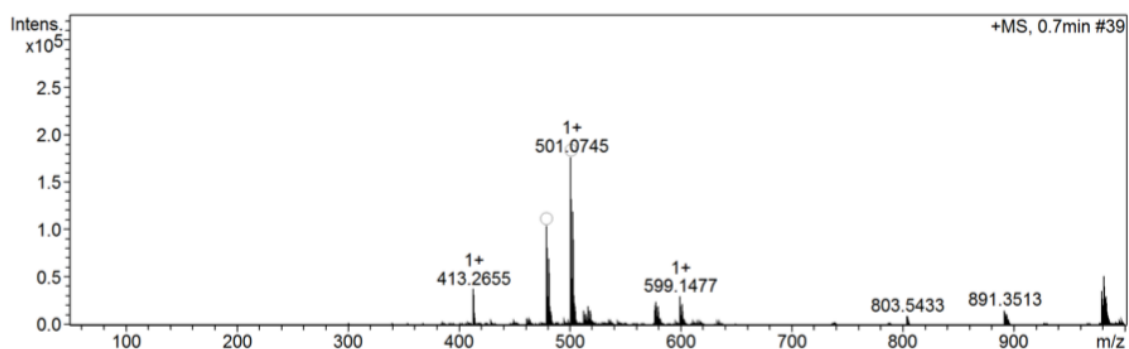
(ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Fluoroaniline)

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info		Acquisition Date 12/24/2019 6:42:08 PM
Analysis Name	D:\Data\Job\ESI\Job-HRMS 151 (pos).d	
Method	tune_wide28-4-60.m	Operator RU
Sample Name	04	Instrument micrOTOF 8213750.10411
Comment		

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [mDa]	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma
479.092922	1	C ₂₆ H ₂₁ Cl ₂ N ₂ O ₃	479.092374	0.5	-1.1	-0.6	16.5	ok	even	9.8
	2	C ₃₁ H ₂₁ Cl ₂ O	479.096397	3.5	-7.3	8.0	20.5	ok	even	27.6
	3	C ₃₂ H ₁₆ ClN ₂ O	479.094567	1.6	-3.4	5.4	25.5	ok	even	142.5
	4	C ₂₆ H ₂₀ ClO ₇	479.089207	3.7	-7.8	-5.9	16.5	ok	even	145.7
	5	C ₁₉ H ₂₄ ClO ₁₂	479.095080	2.2	-4.5	6.1	7.5	ok	even	155.8
	6	C ₁₄ H ₂₄ ClN ₂ O ₁₄	479.091058	1.9	3.9	-2.5	3.5	ok	even	165.5
	7	C ₃₂ H ₁₅ O ₅	479.091400	1.5	-3.2	4.5	25.5	ok	even	312.5
501.074543	8	C ₂₀ H ₁₉ N ₂ O ₁₂	479.093250	0.3	0.7	7.4	12.5	ok	even	321.9
	1	C ₂₆ H ₂₀ Cl ₂ N ₂ NaO ₃	501.074319	0.2	0.4	-1.2	16.5	ok	even	13.3
	2	C ₃₁ H ₂₀ Cl ₂ NaO	501.078341	3.8	7.6	7.0	20.5	ok	even	32.5
	3	C ₃₂ H ₁₅ ClN ₂ NaO	501.076511	2.0	-3.9	4.9	25.5	ok	even	141.8
	4	C ₂₆ H ₁₉ ClNaO ₇	501.071151	3.4	-6.8	-5.8	16.5	ok	even	144.0
	5	C ₁₉ H ₂₃ ClNaO ₁₂	501.077025	2.5	-5.0	5.7	7.5	ok	even	153.0
	6	C ₃₂ H ₁₄ NaO ₅	501.073344	1.2	2.4	4.3	25.5	ok	even	314.0
	7	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ NaO ₁₂	501.075195	0.7	1.3	7.1	12.5	ok	even	322.6

ภาพประกอบ 4 High Resolution Mass spectrum ของอนุพันธ์ 80

(ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Chloroaniline)

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

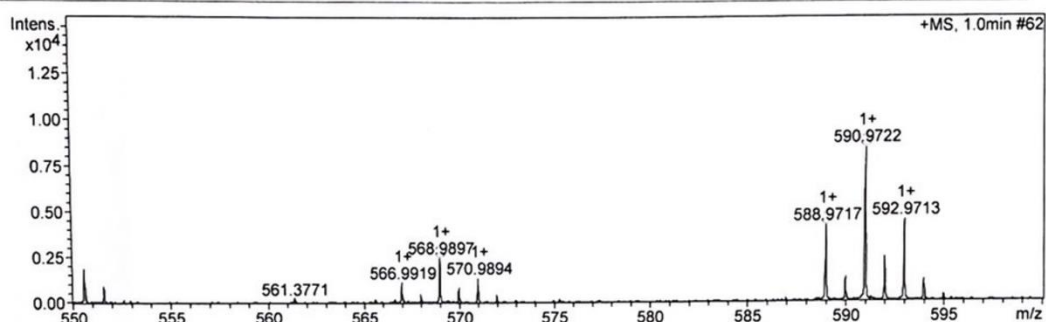
Analysis Name D:\Data\Job\ESI\Job-HRMS 152 (pos).d
 Method tune_wide28-4-60.m
 Sample Name 05
 Comment

Acquisition Date 12/24/2019 6:45:00 PM

Operator RU
 Instrument micrOTOF 8213750.10411

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	[err] [mDa]	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma
568.989705	1	C22H18BrO13	568.992529	2.8	-5.0	4.2	13.5	ok	even	187.3
	2	C24H14BrN2O10	568.982633	7.1	-12.4	-13.2	18.5	ok	even	188.0
	3	C28H14BrN2O7	568.997889	8.2	-14.4	13.6	22.5	ok	even	191.7
	4	C29H14BrO8	568.986656	3.0	-5.4	-6.1	22.5	ok	even	192.4
	5	C35H10BrN2O2	568.992016	2.3	-4.1	3.3	31.5	ok	even	203.9
	6	C36H10BrO3	568.980783	8.9	-15.7	-16.3	31.5	ok	even	204.9
	7	C40H10Br	568.996039	6.3	-11.1	10.5	35.5	ok	even	214.6
	8	C35H5O9	568.992808	3.1	5.5	9.5	33.5	ok	even	248.0
	9	C37HN2O6	568.982912	6.8	11.9	-7.9	38.5	ok	even	248.2
	10	C30H5N2O11	568.988785	0.9	-1.6	2.1	29.5	ok	even	251.8
	11	C28H9O14	568.998681	9.0	15.8	19.5	24.5	ok	even	252.7
	12	C24H9O17	568.983425	6.3	-11.0	-7.4	20.5	ok	even	256.5
	13	C23H9N2O16	568.994659	5.0	8.7	12.1	20.5	ok	even	258.3
	14	C22H23Br2N2O6	568.991737	2.0	-3.6	2.6	11.5	ok	even	331.2
	15	C23H23Br2O7	568.980504	9.2	16.2	-17.0	11.5	ok	even	332.0
	16	C27H23Br2O4	568.995760	6.1	10.6	9.7	15.5	ok	even	334.6
	17	C29H19Br2N2O	568.985864	3.8	-6.8	-7.7	20.5	ok	even	336.6
588.971707	1	C27H20Br2NaO4	588.962054	9.7	-16.4	-20.1	16.5	ok	even	7.7
	2	C26H20Br2N2NaO3	588.973287	1.6	2.7	-1.2	16.5	ok	even	8.9
	3	C31H20Br2NaO	588.977310	5.6	-9.5	5.8	20.5	ok	even	19.1
	4	C26H15BrNaO10	588.974079	2.4	4.0	3.8	18.5	ok	even	282.8
	5	C33H11BrNaO5	588.968206	3.5	5.9	-5.8	27.5	ok	even	283.4
	6	C28H11BrN2NaO7	588.964184	7.5	12.8	-13.0	23.5	ok	even	284.1
	7	C32H11BrN2NaO4	588.979440	7.7	13.1	13.0	27.5	ok	even	284.7
	8	C21H15BrN2NaO12	588.970057	1.7	2.8	-3.4	14.5	ok	even	285.2
	9	C40H7BrNa	588.962333	9.4	15.9	-15.5	36.5	ok	even	286.2
	10	C28H6NaO14	588.964976	6.7	11.4	-6.0	25.5	ok	even	550.3
	11	C32H6NaO11	588.980232	8.5	-14.5	20.2	29.5	ok	even	550.4
	12	C21H10NaO19	588.970849	0.9	-1.5	3.5	16.5	ok	even	550.4
	13	C39H2NaO6	588.974358	2.7	-4.5	10.7	38.5	ok	even	550.6
	14	C27H6N2NaO13	588.976209	4.5	-7.6	12.8	25.5	ok	even	551.5
	15	C34H2N2NaO8	588.970336	1.4	-2.3	3.4	34.5	ok	even	551.5
590.972216	1	C22H17BrNaO13	590.974473	2.3	3.8	2.9	13.5	ok	even	197.2
	2	C29H13BrNaO8	590.968600	3.6	6.1	-7.0	22.5	ok	even	203.7
	3	C35H9BrN2NaO2	590.973960	1.7	3.0	2.1	31.5	ok	even	215.9
	4	C35H4NaO9	590.974752	2.5	4.3	8.0	33.5	ok	even	234.2
	5	C30H4N2NaO11	590.970730	1.5	2.5	1.0	29.5	ok	even	237.0
	6	C22H22Br2N2NaO6	590.973681	1.5	-2.5	1.1	11.5	ok	even	326.5

ภาพประกอบ 5 High Resolution Mass spectrum ของอนุพันธ์ 81

(ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Bromoaniline)

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

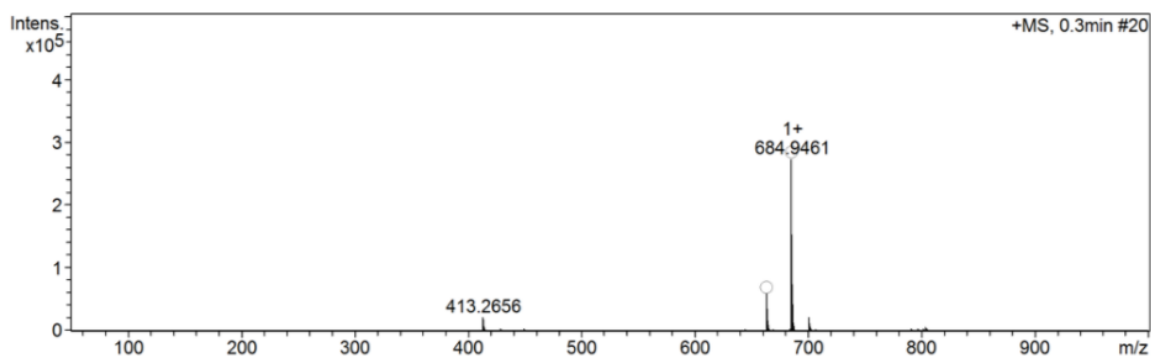
Analysis Name D:\Data\Job\ESI\Job-HRMS 153 (pos).d
 Method tune_wide28-4-60.m
 Sample Name 06
 Comment

Acquisition Date 12/24/2019 6:48:38 PM

Operator RU
 Instrument micrOTOF 8213750.10411

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [mDa]	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻	Conf	mSigma
662.963064	1	C ₂₆ H ₂₁ I ₂ N ₂ O ₃	662.963615	0.6	0.8	0.9	16.5	ok	even		4.9
	2	C ₂₆ H ₁₆ I ₂ O ₁₃	662.963015	0.0	-0.1	0.0	18.5	ok	even		8.2
	3	C ₂₇ H ₇ N ₂ O ₁₉	662.963752	0.7	-1.0	1.1	25.5	ok	even		19.4
	4	C ₃₉ H ₃ O ₁₂	662.961902	1.2	-1.8	-1.6	38.5	ok	even		67.8
	5	C ₃₉ H ₈ I ₂ N ₂ O ₂	662.962502	0.6	0.8	-0.7	36.5	ok	even		74.0
684.946093	1	C ₂₆ H ₂₀ I ₂ N ₂ NaO ₃	684.945559	0.5	-0.8	-0.5	16.5	ok	even		9.9
	2	C ₂₆ H ₁₅ I ₂ NaO ₁₃	684.944959	1.1	-1.7	-1.4	18.5	ok	even		13.6
	3	C ₂₇ H ₆ N ₂ NaO ₁₉	684.945697	0.4	-0.6	-0.3	25.5	ok	even		26.9
	4	C ₃₁ H ₂₀ I ₂ NaO	684.949582	3.5	-5.1	5.4	20.5	ok	even		33.4
	5	C ₃₂ H ₆ NaO ₁₇	684.949719	3.6	-5.3	5.6	29.5	ok	even		48.2
	6	C ₃₉ H ₂ NaO ₁₂	684.943846	2.2	-3.3	-3.0	38.5	ok	even		75.9
	7	C ₃₉ H ₇ I ₂ NaO ₂	684.944446	1.6	-2.4	-2.1	36.5	ok	even		83.1

ภาพประกอบ 6 High Resolution Mass spectrum ของอนุพันธ์ 82

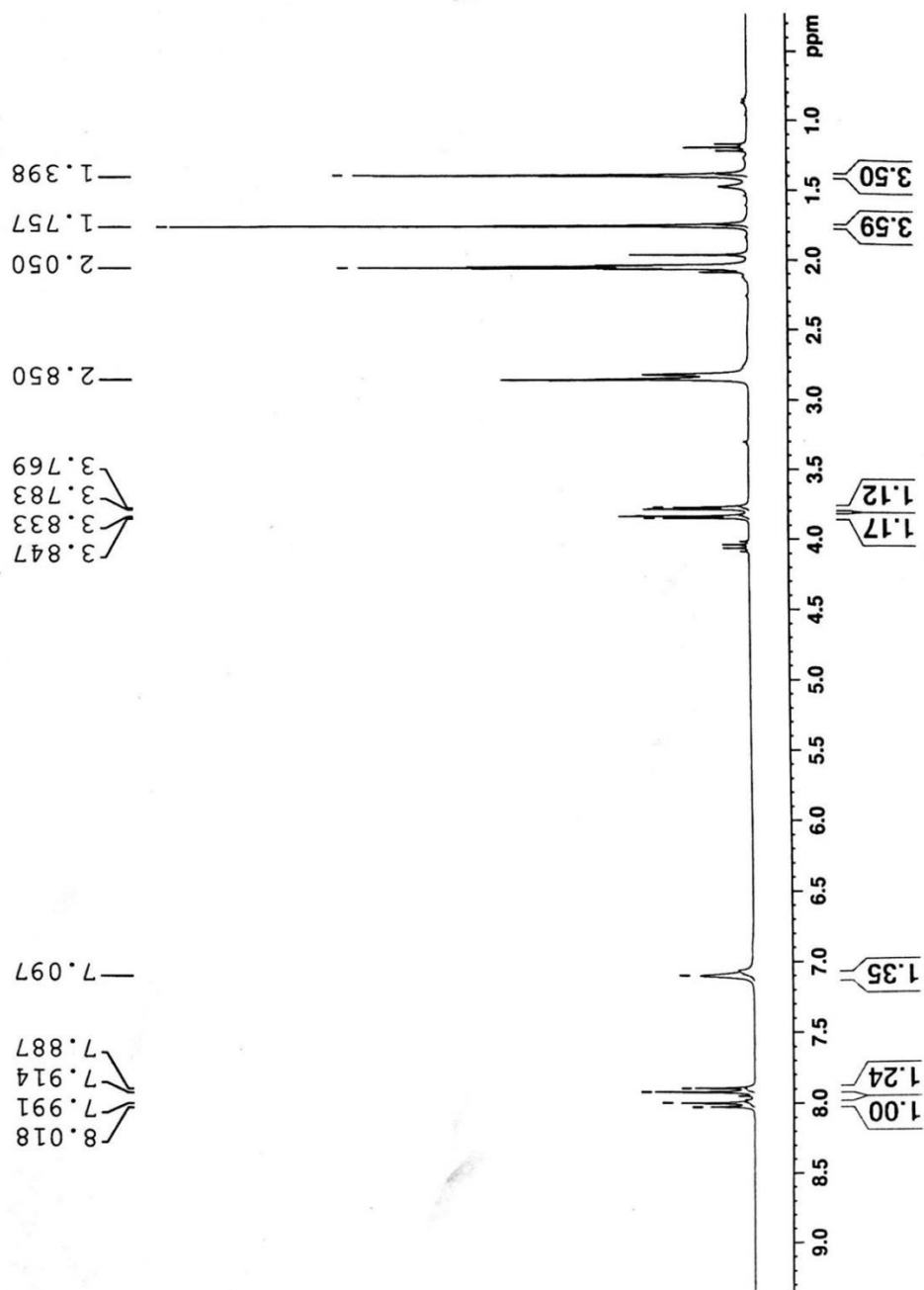
(ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Iodoaniline)



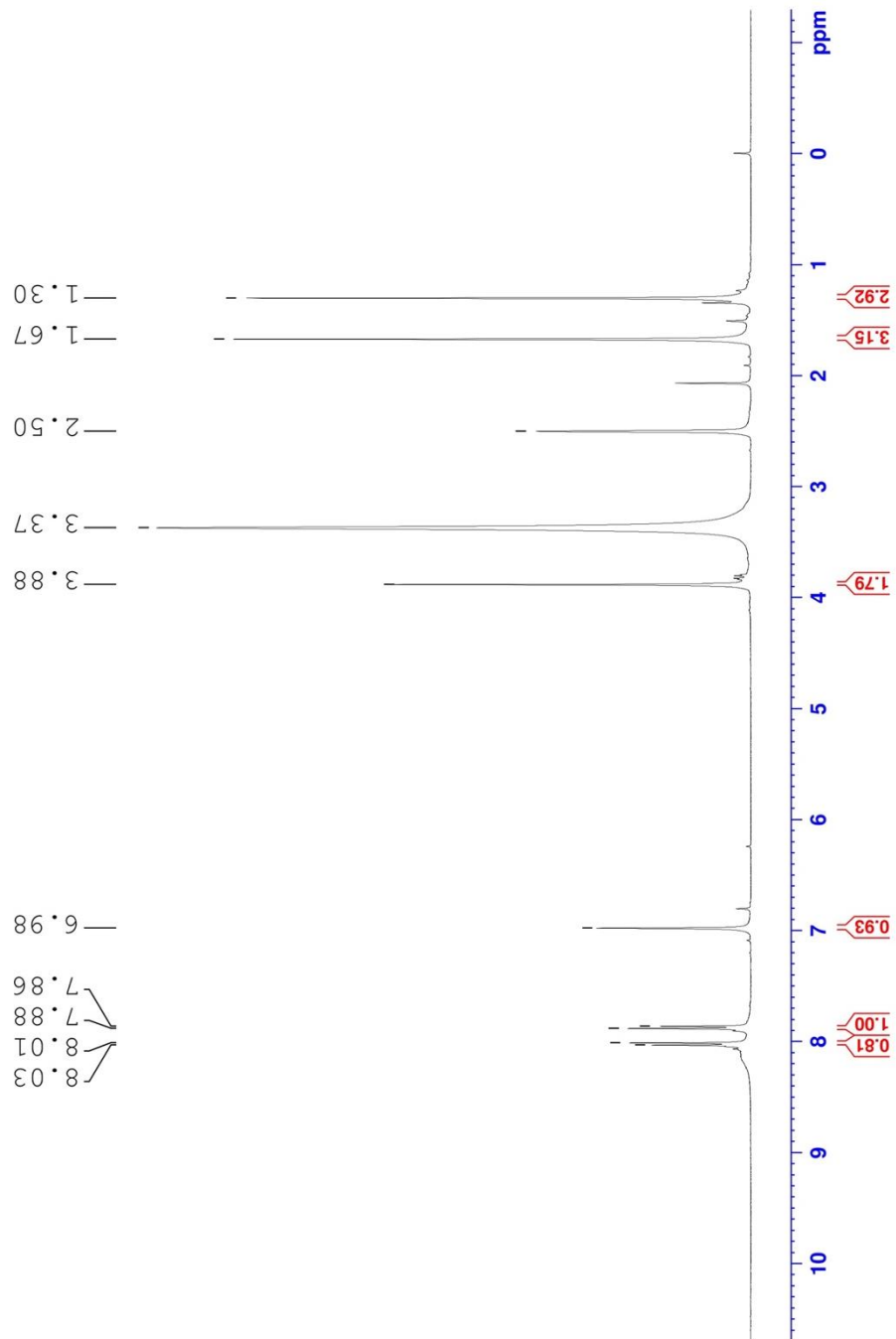
ภาคผนวก ข

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC และ HMBC spectrums

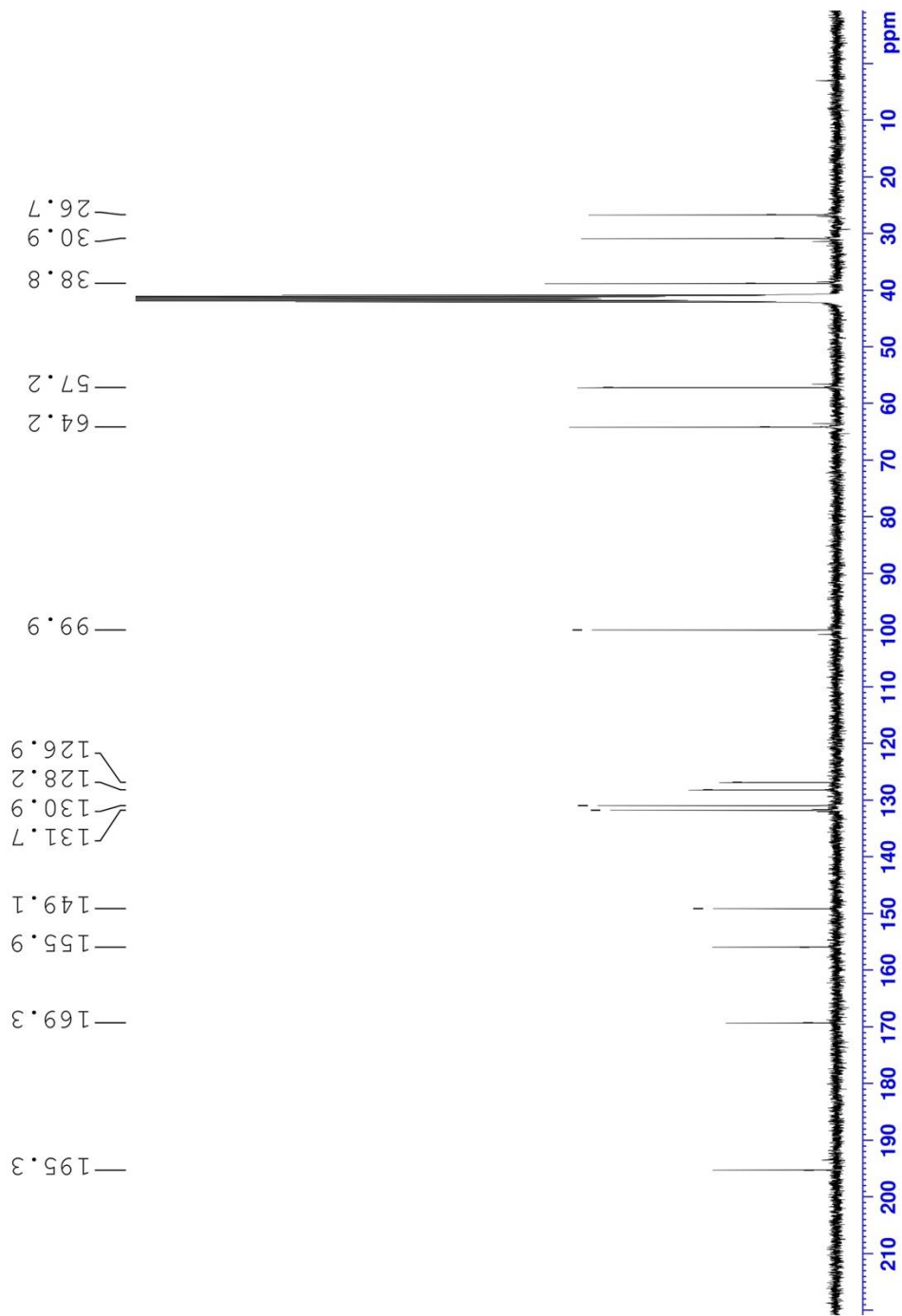
ของสารตั้งต้น Hyphodermin A และอนุพันธ์



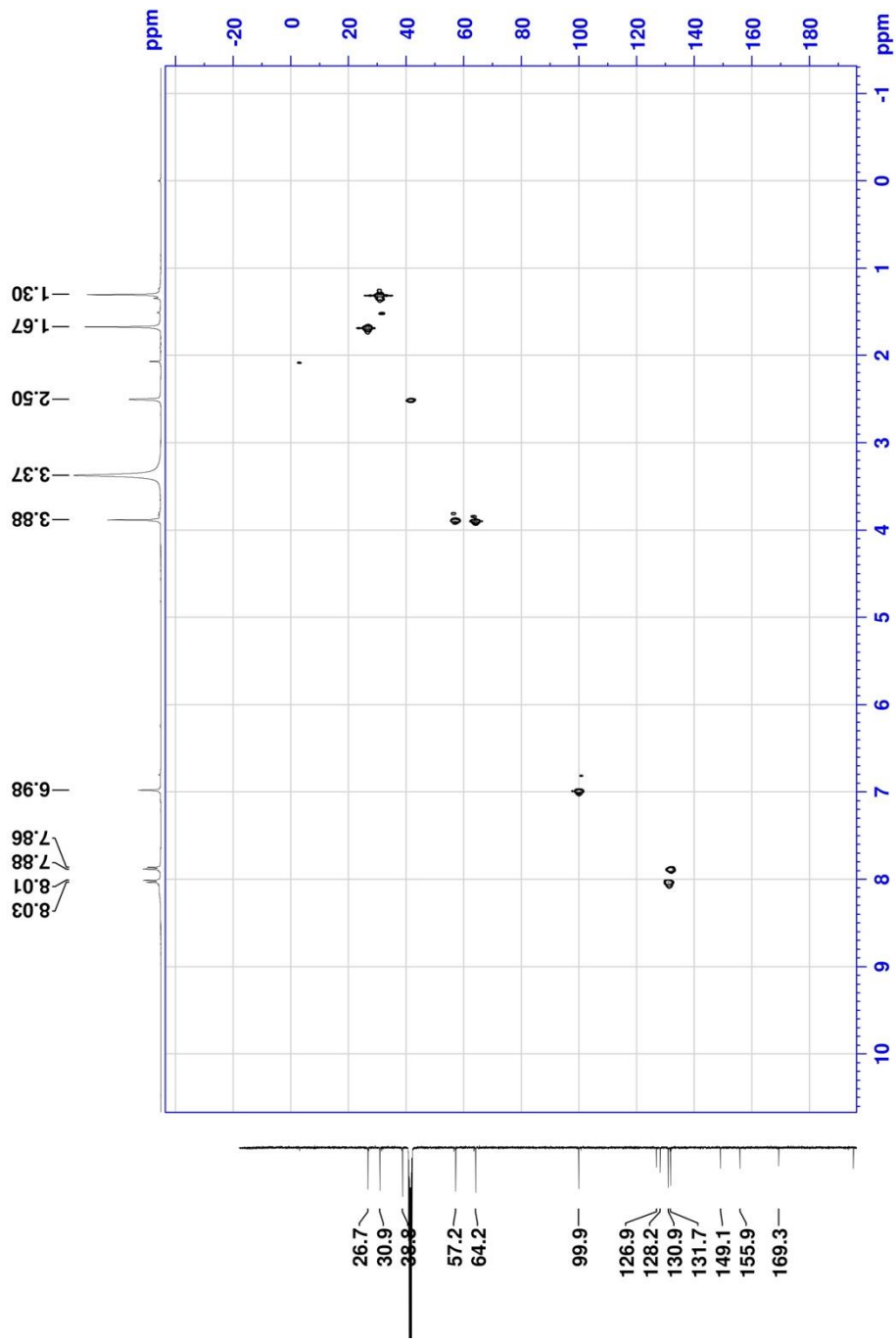
ภาพประกอบ 7 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารตั้งต้น Hyphodermin A ($\text{Acetone-}d_6$, 300 MHz)



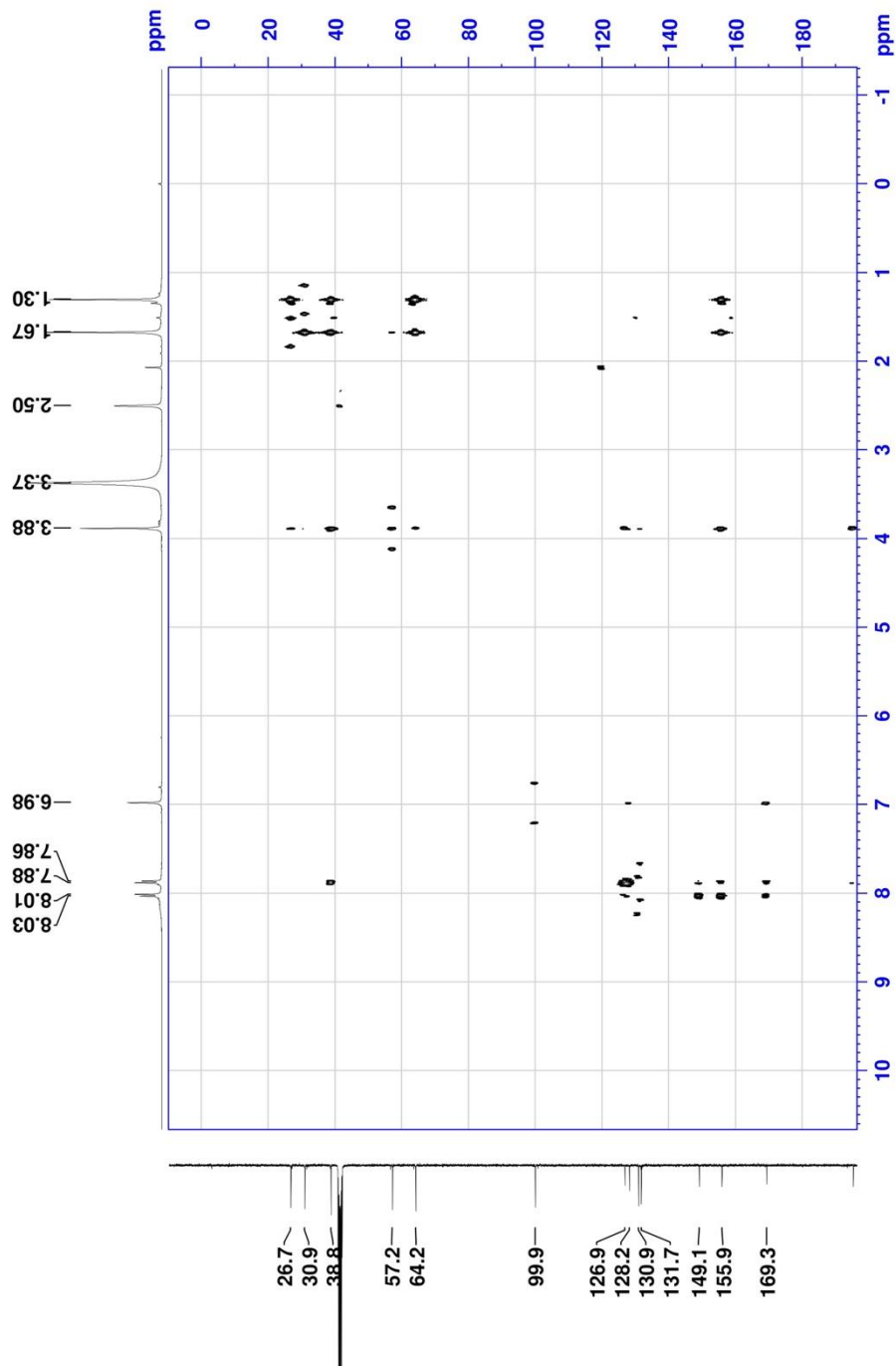
ภาพประกอบ 8 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารตั้งต้น Hyphodermin A (DMSO- d_6 , 400 MHz)



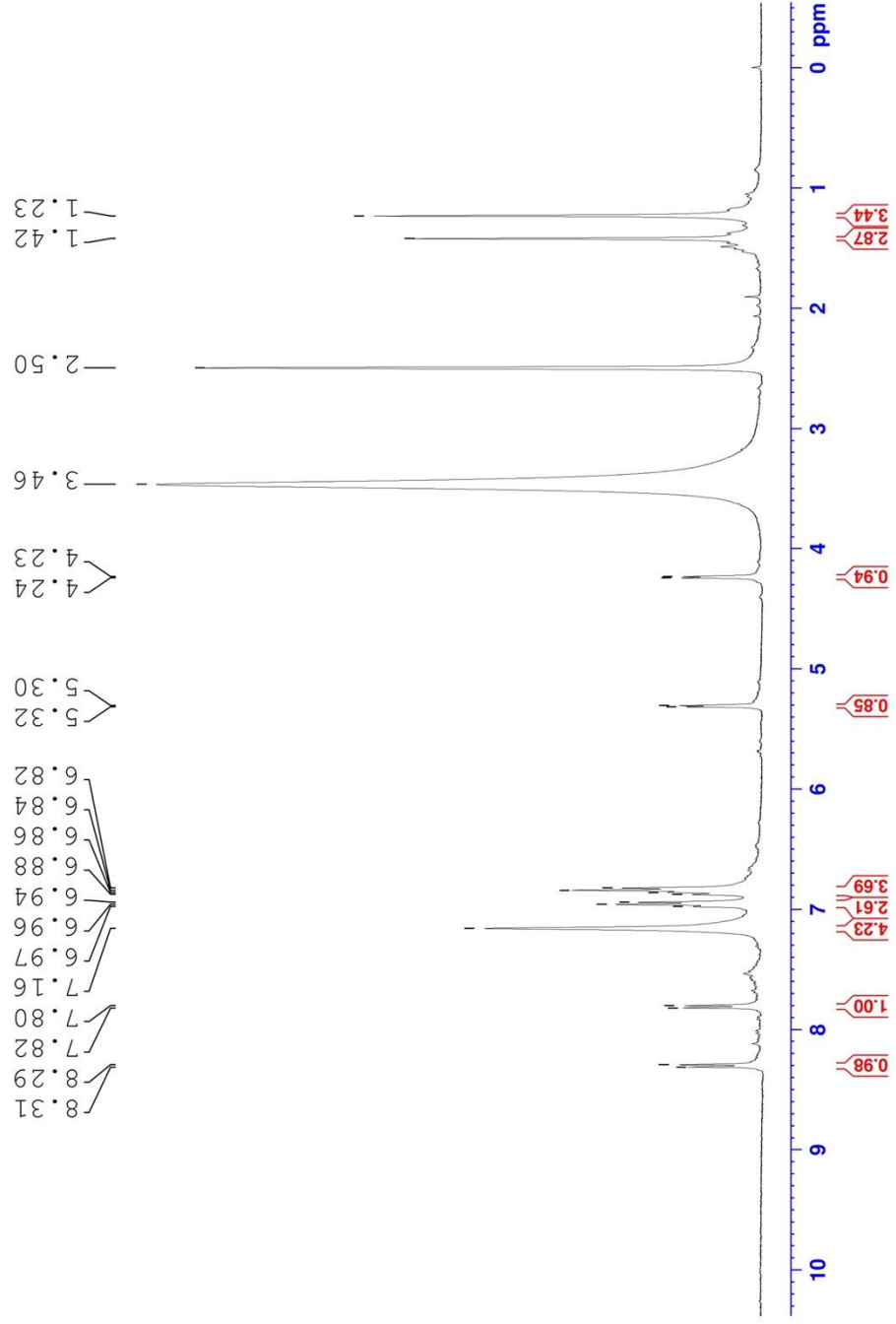
ภาพประกอบ 9 ^{13}C -NMR spectrum ของสารตั้งต้น Hyphodermin A (DMSO- d_6 , 100 MHz)



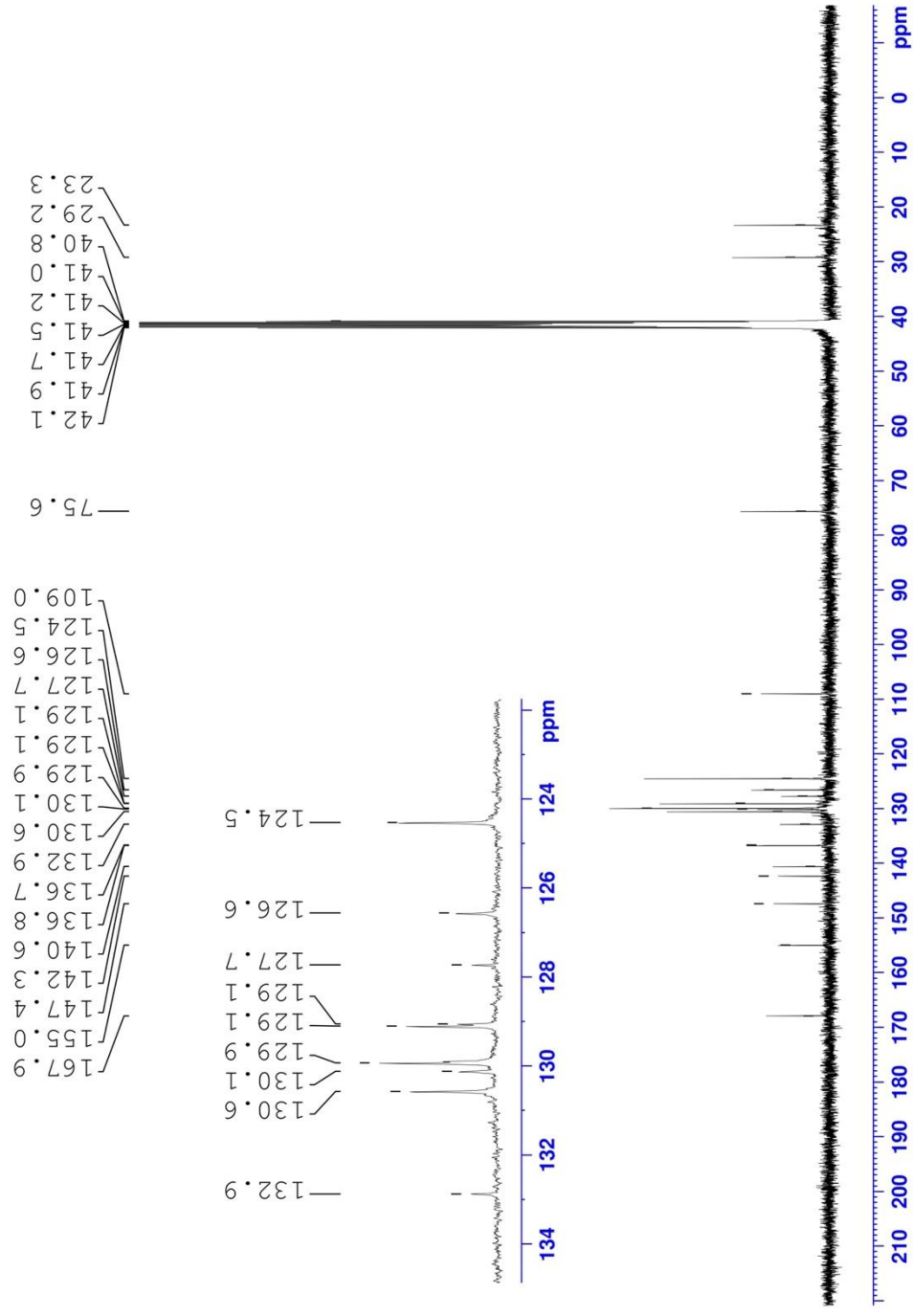
ภาพประกอบ 10 ^{13}C HSQC NMR spectrum ของสารตั้งต้น Hyphodermin A ($\text{DMSO}-d_6$)



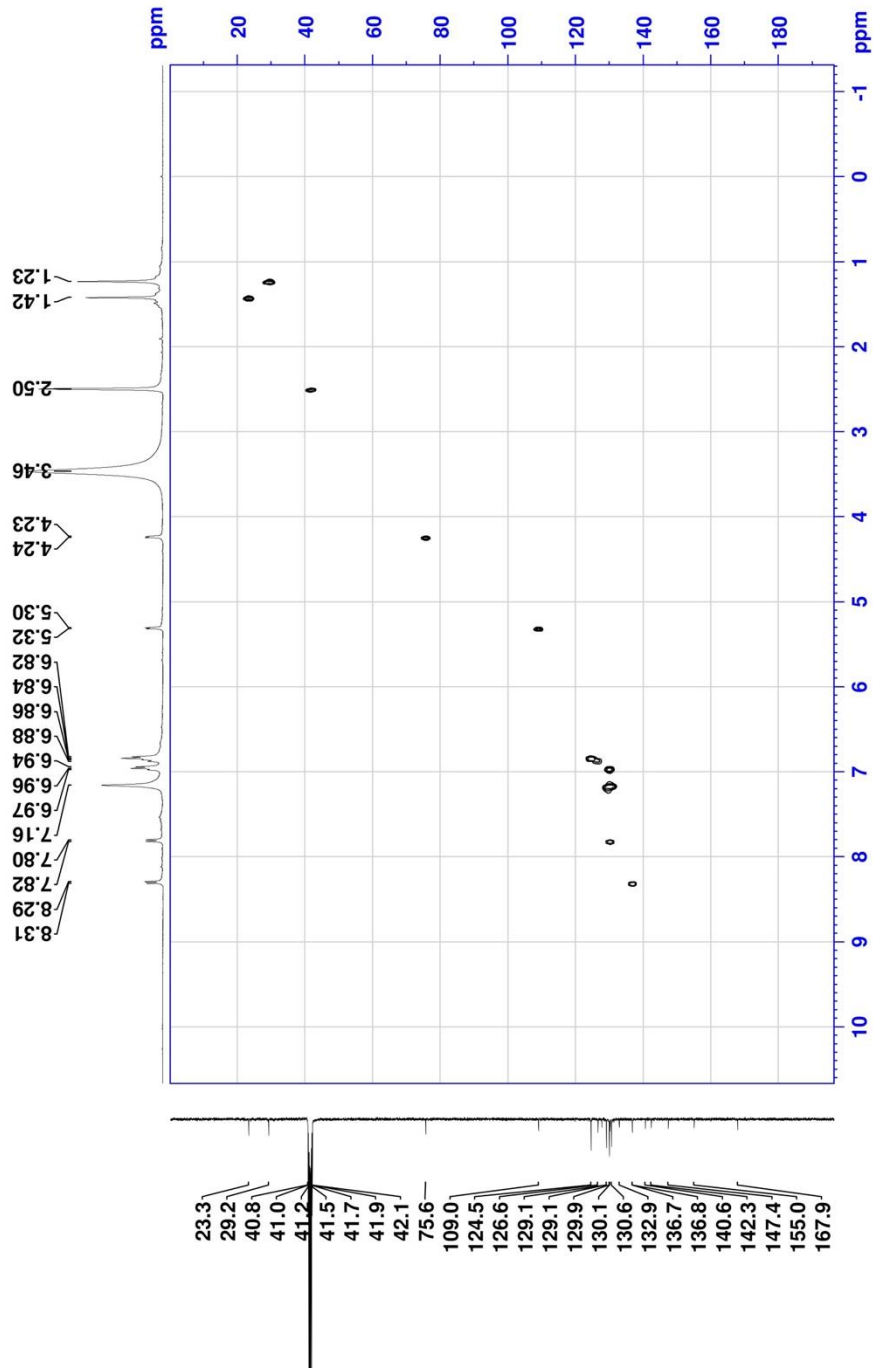
ภาพประกอบ 11 ^1H - ^{13}C HMBC NMR spectrum ของสารตั้งต้น Hyphodermin A ($\text{DMSO-}d_6$)



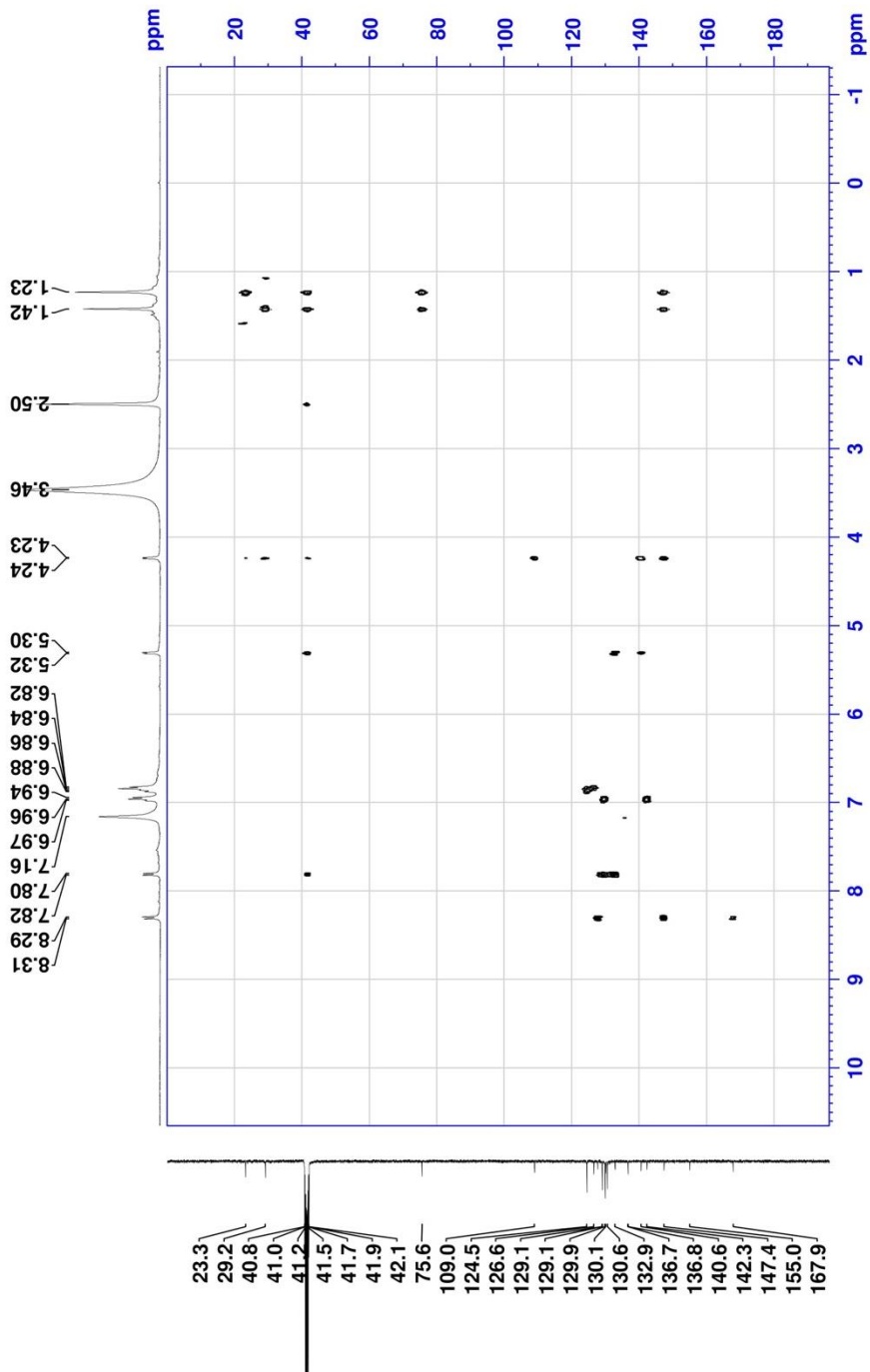
ภาพประกอบ 12 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของอนุพันธ์ 78 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ Aniline) ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz)



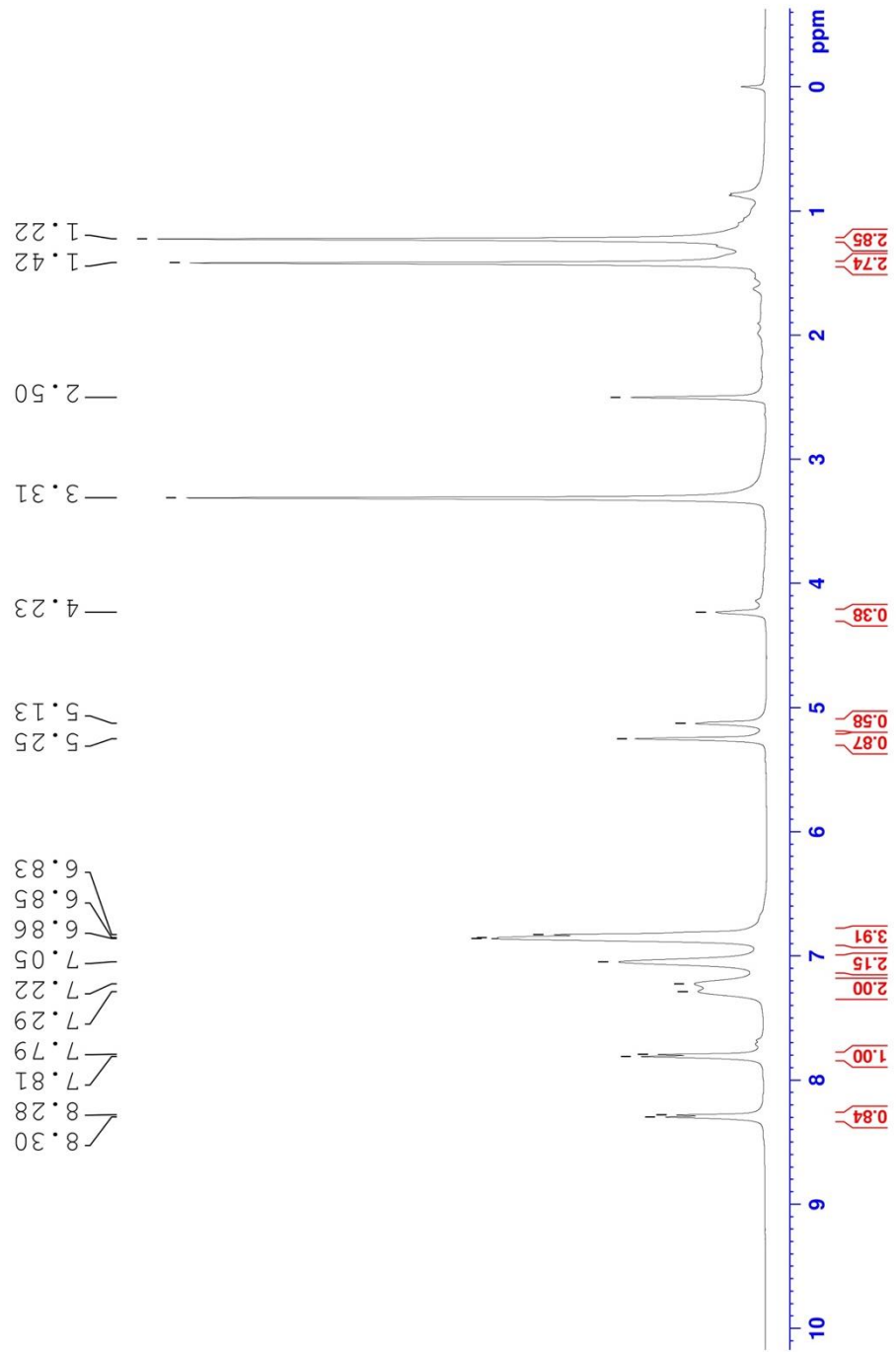
ภาพประกอบ 13 ^{13}C -NMR spectrum ของอนุพันธ์ 78 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ Aniline) ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz)



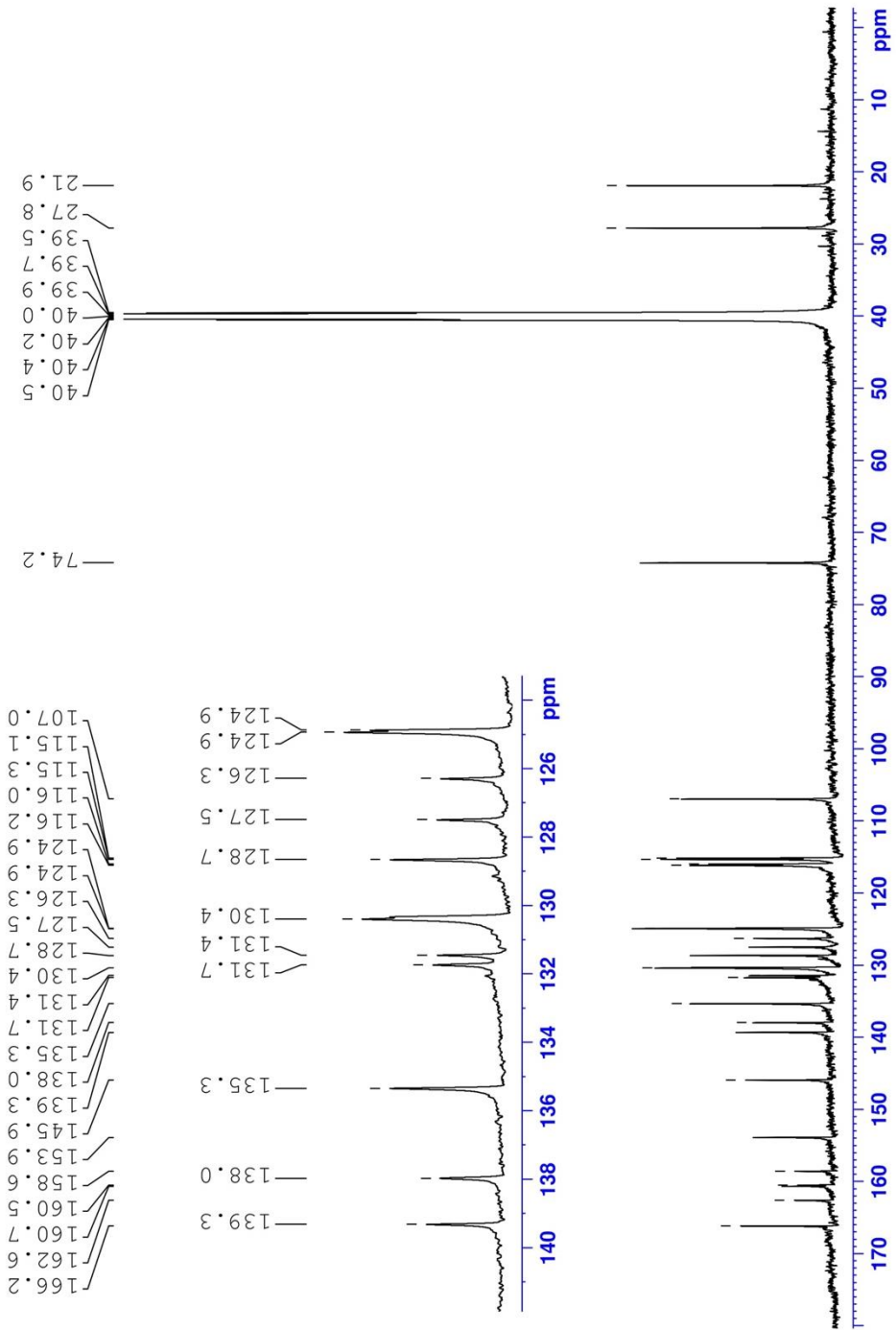
ภาพระกอบ $14 \text{ } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC NMR spectrum ของคณพืชนธ์ 78 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ Aniline) ($\text{DMSO}-d_6$)



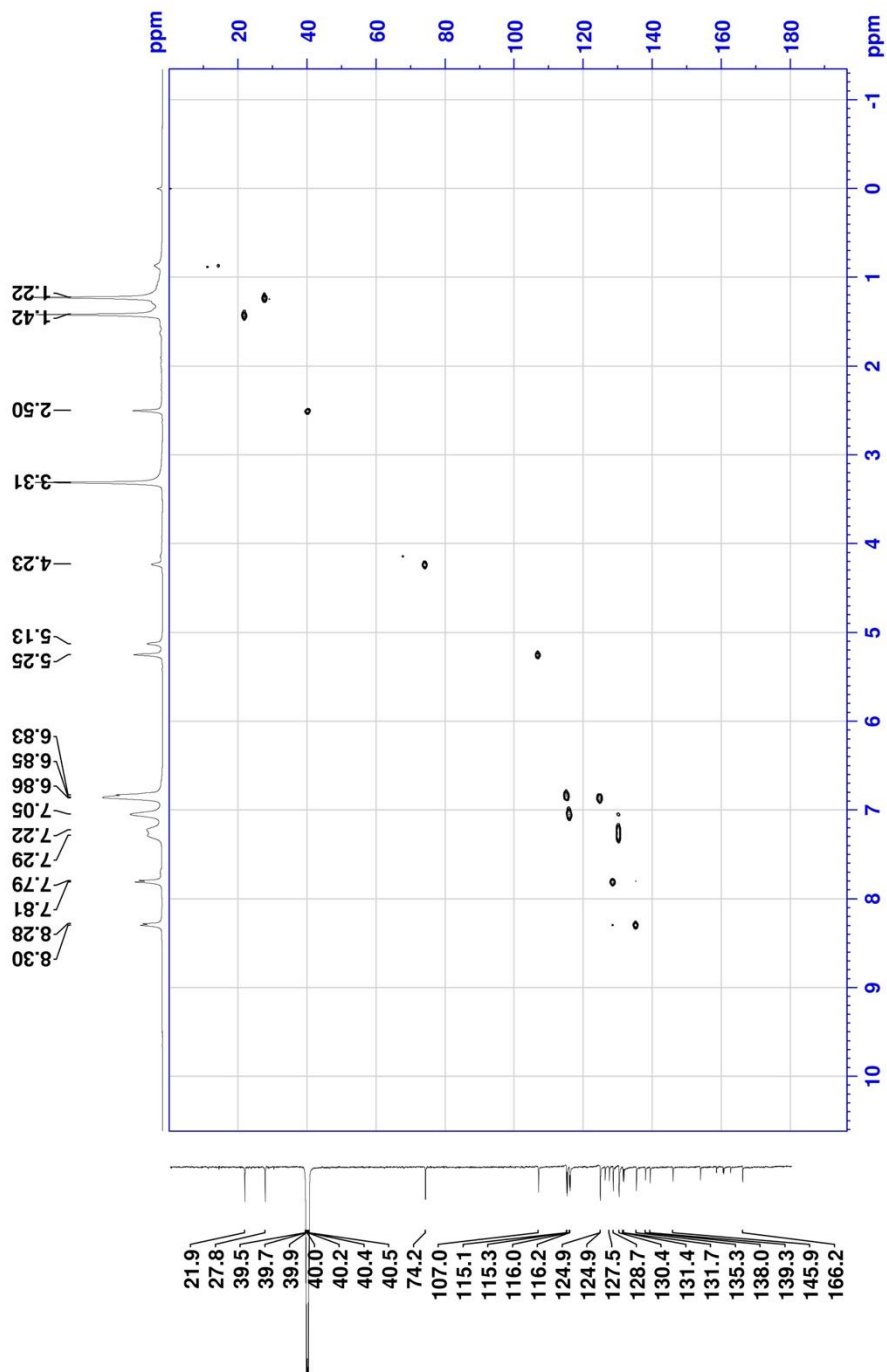
ภาพประกอบที่ 15 $^{15}\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC NMR spectrum ของอนุพันธ์ 78 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ Aniline) ($\text{DMSO}-d_6$)



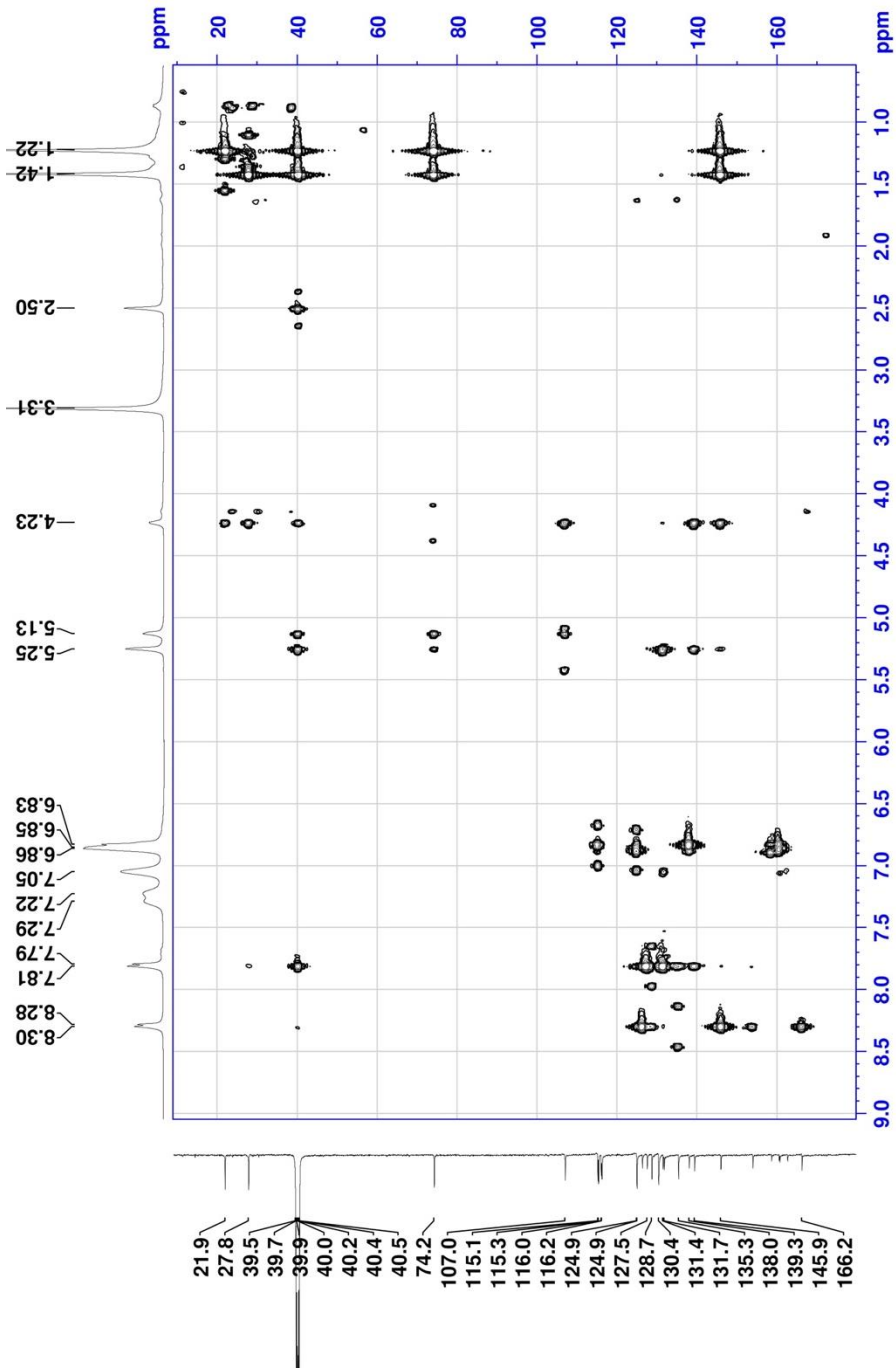
ภาพประกอบ 16 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของอนุพันธ์ 79 (ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Fluoroaniline) ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz)



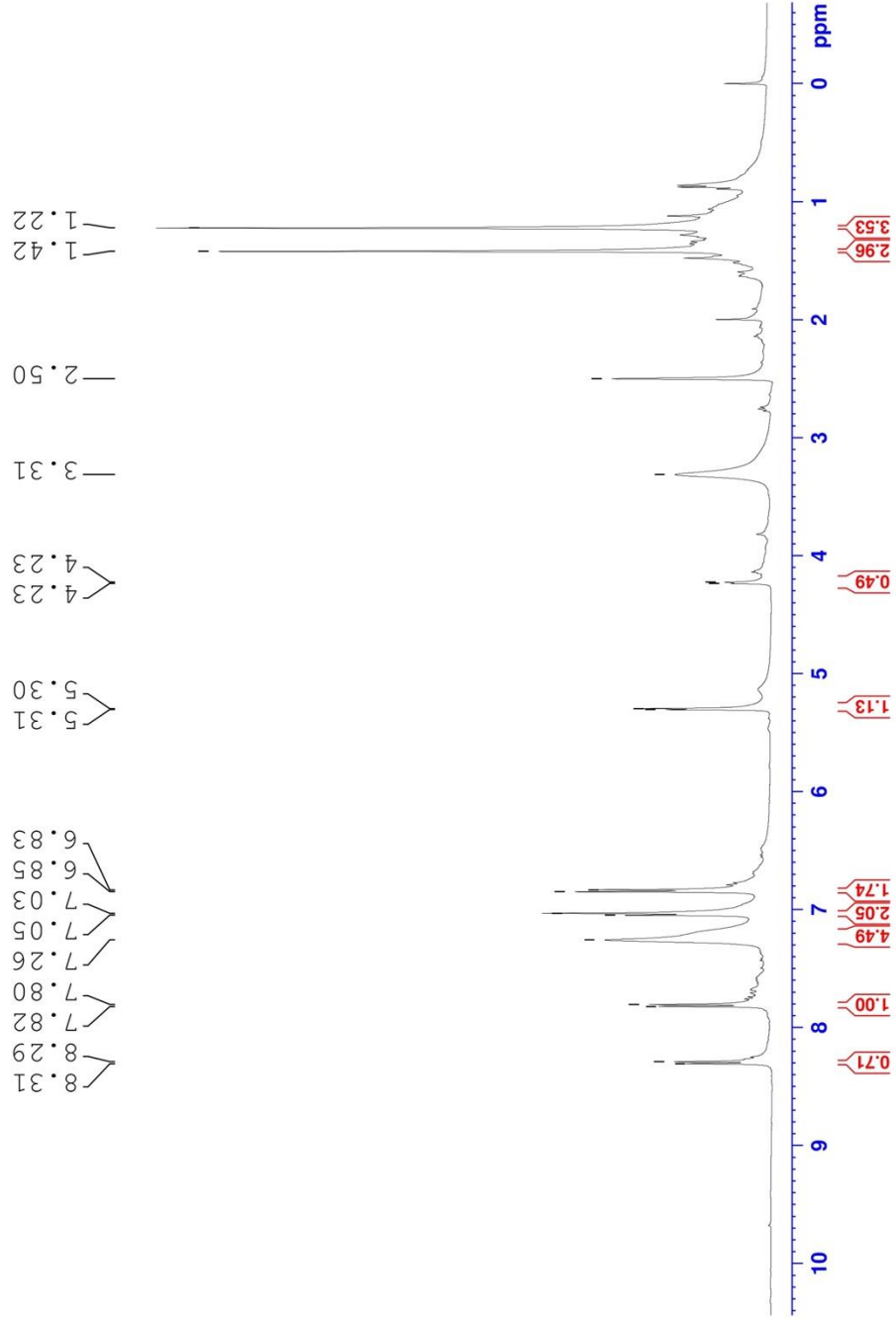
ภาพประกอบ 17 ^{13}C -NMR spectrum ของอนุพันธ์ 79 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Fluoroaniline) ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz)



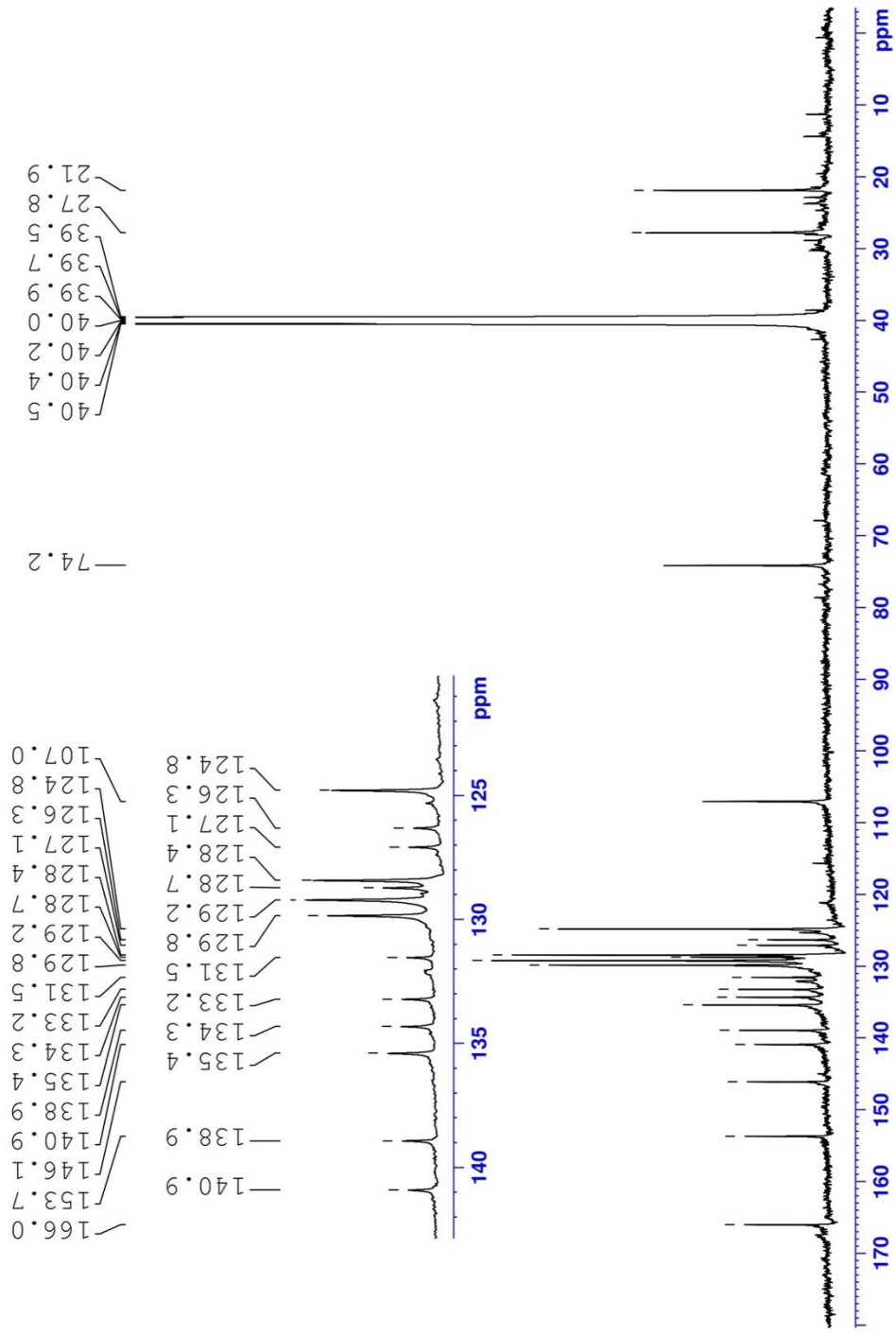
ภาพประกอบ 18 ¹H-¹³C HSQC NMR spectrum ของอนุพันธ์ 79 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Fluoroaniline) (DMSO-d₆)



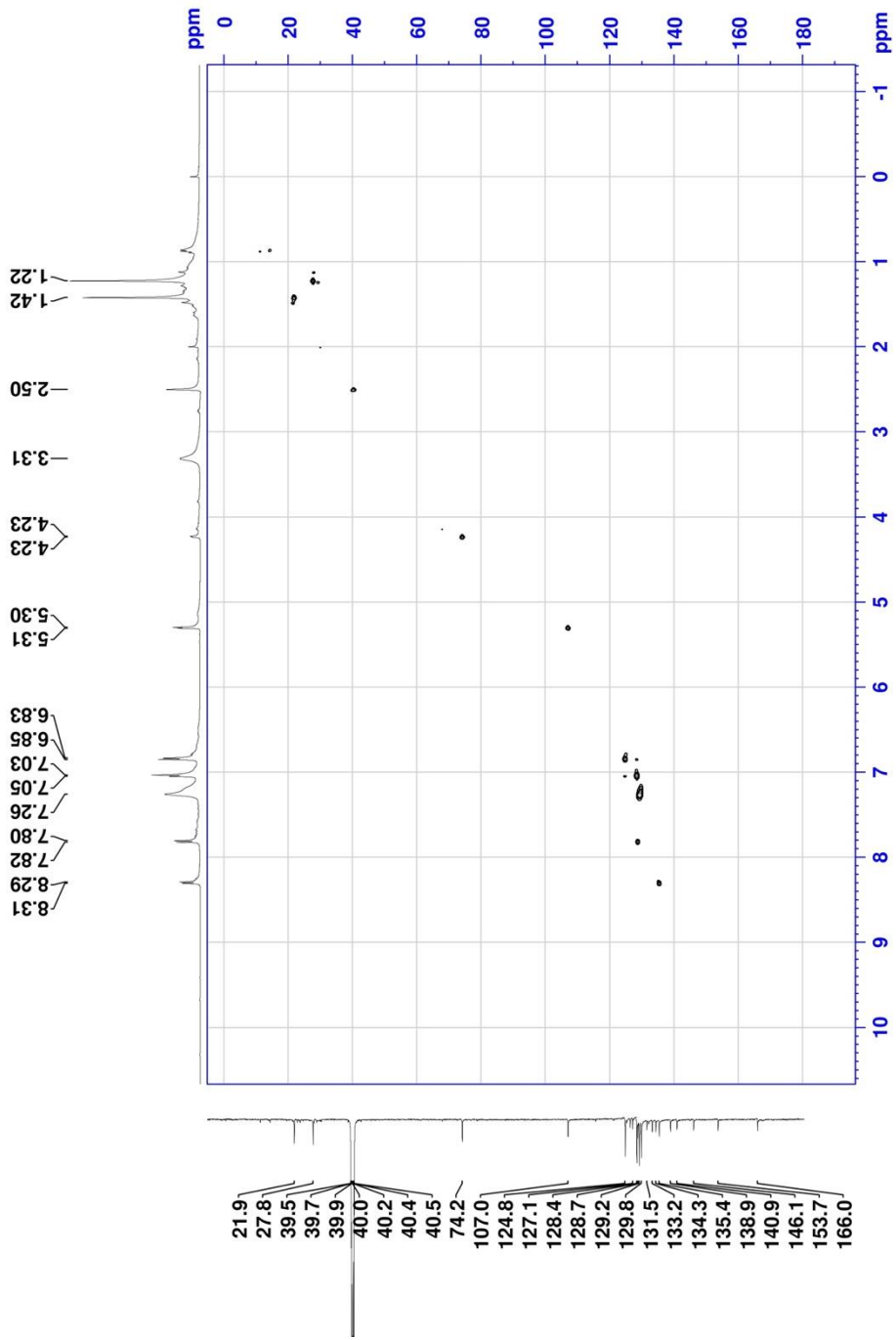
ภาพประกอบ 19 ^1H - ^{13}C HMBBC NMR spectrum ของอนุพันธ์ 79 (ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Fluoroaniline) ($\text{DMSO}-d_6$)



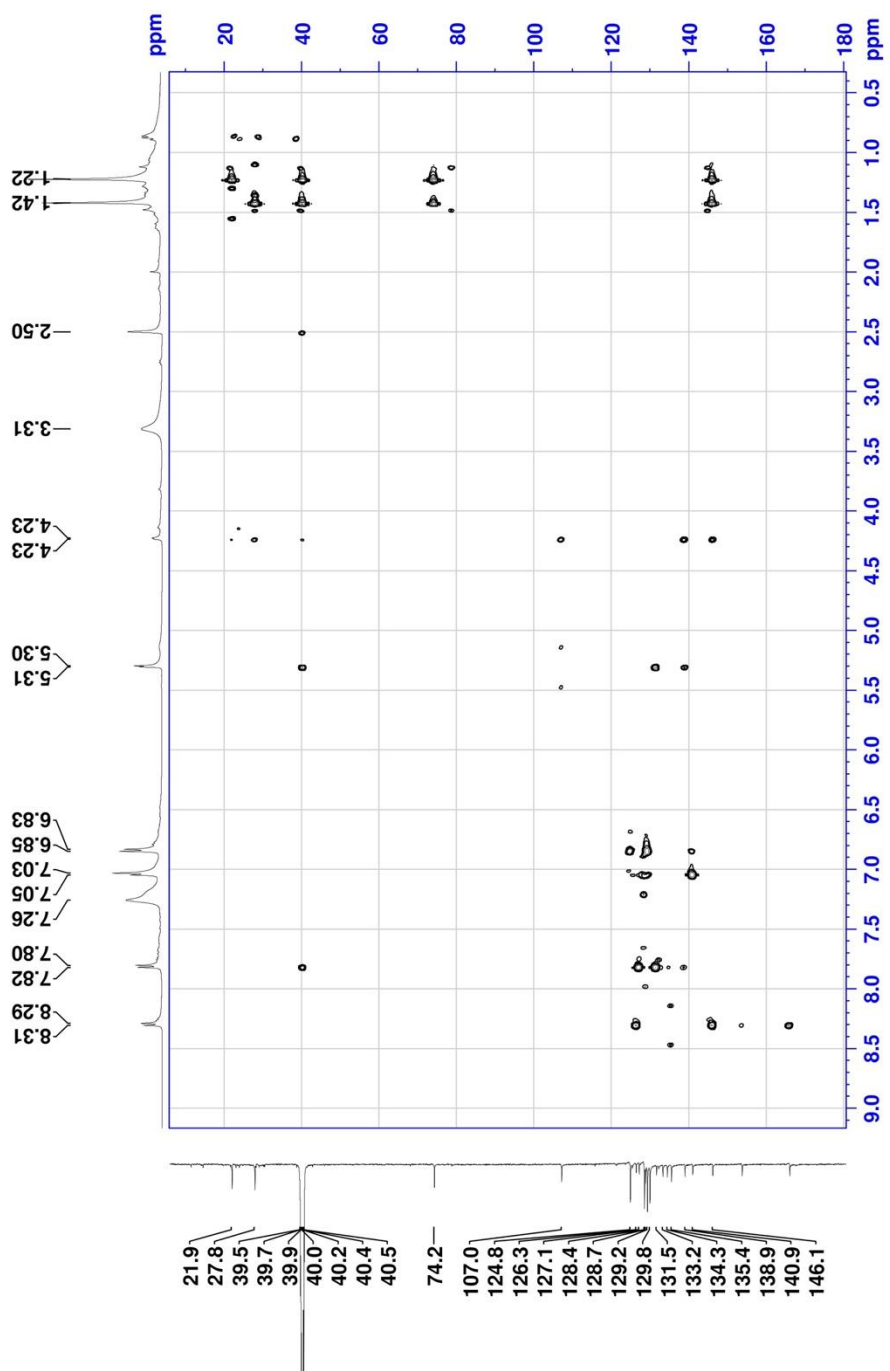
ภาพประกอบ 20 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของซัพเพ้นท์ 80 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Chloroaniline) ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz)



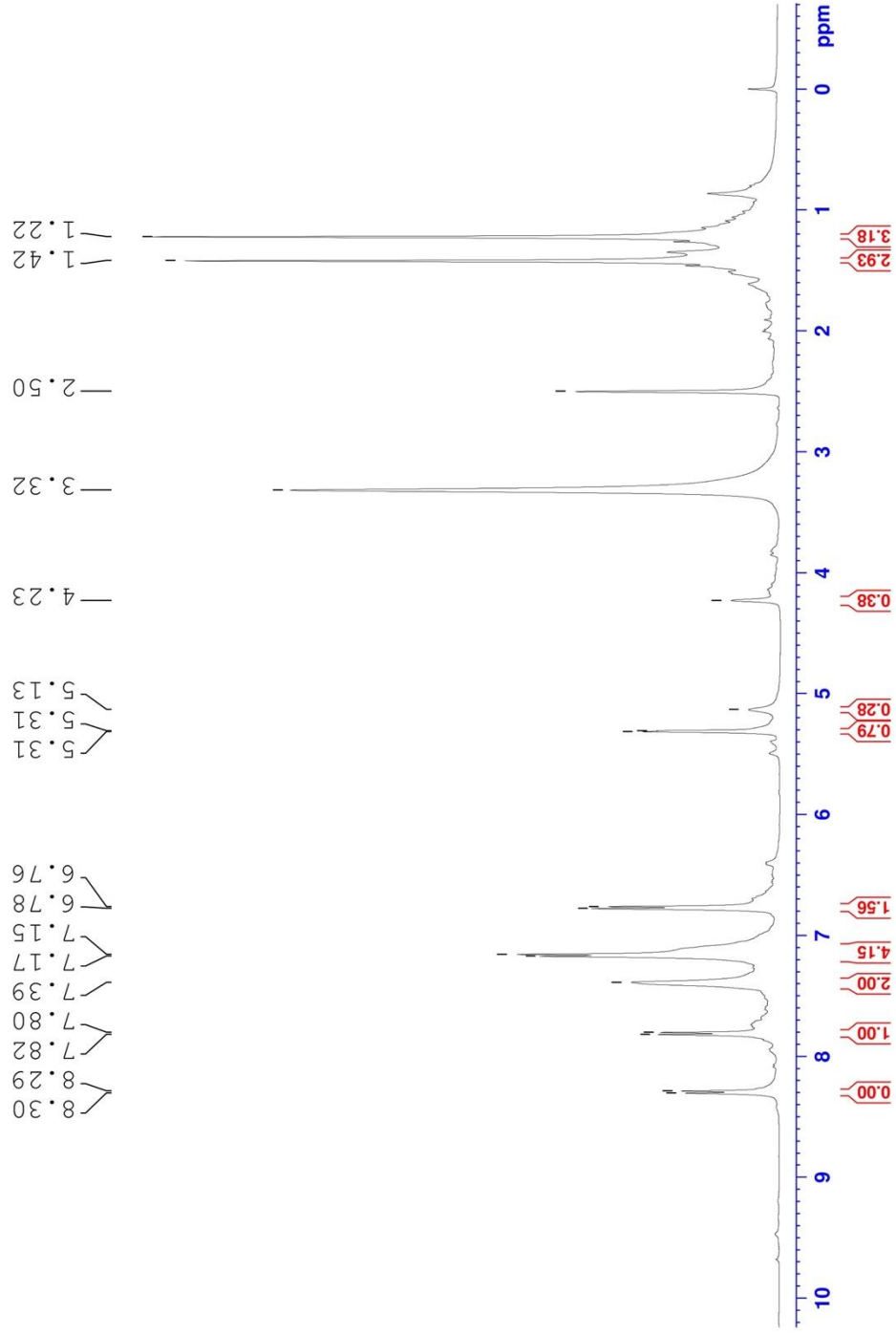
ภาพประกอบที่ 21 ^{13}C -NMR spectrum ของอนุพันธ์ 80 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Chloroaniline) (DMSO- d_6 , 125 MHz)



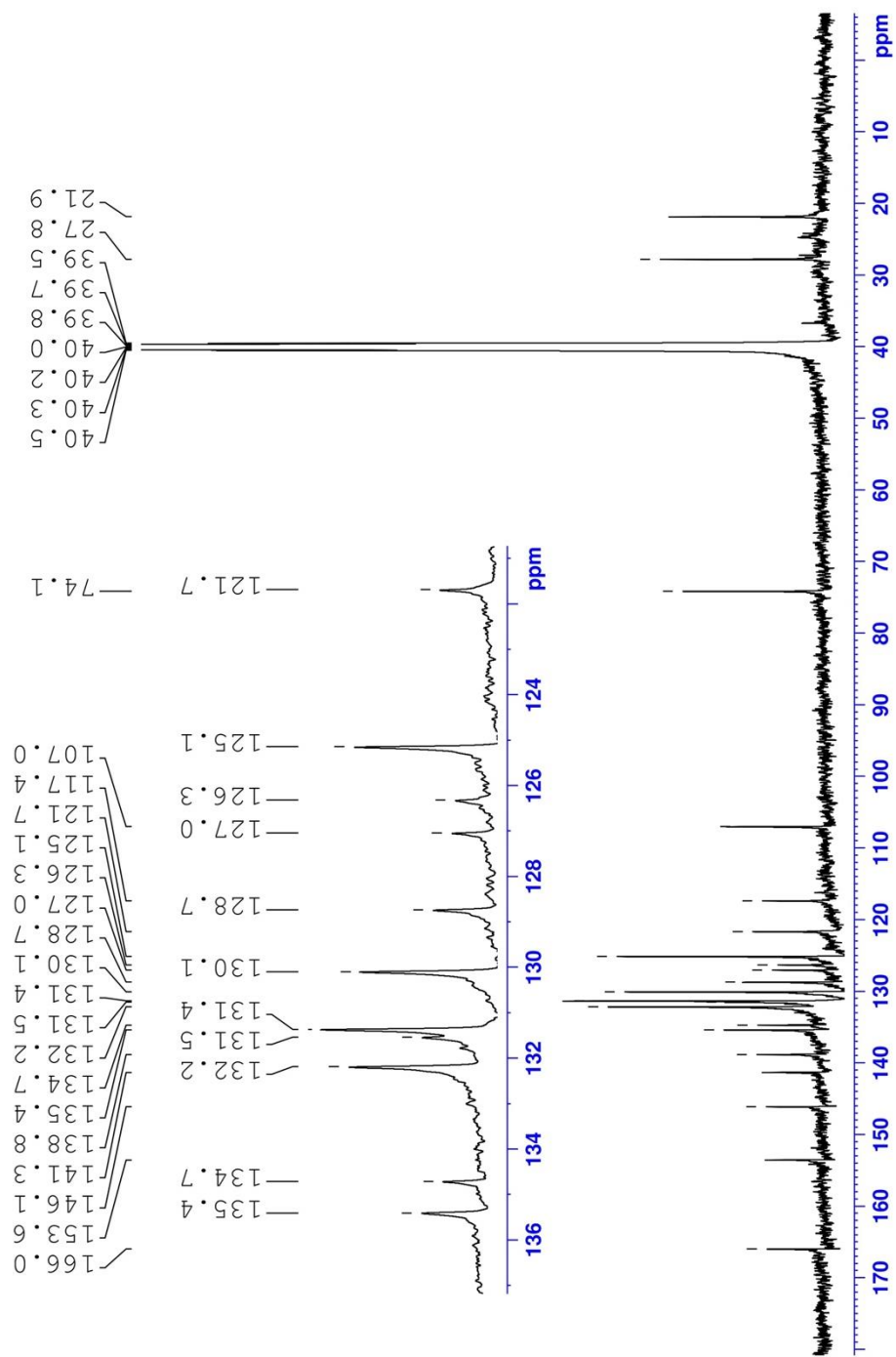
ภาพประกอบ 22 ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum ของอนุพันธ์ 80 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Chloroaniline) (DMSO-d_6)



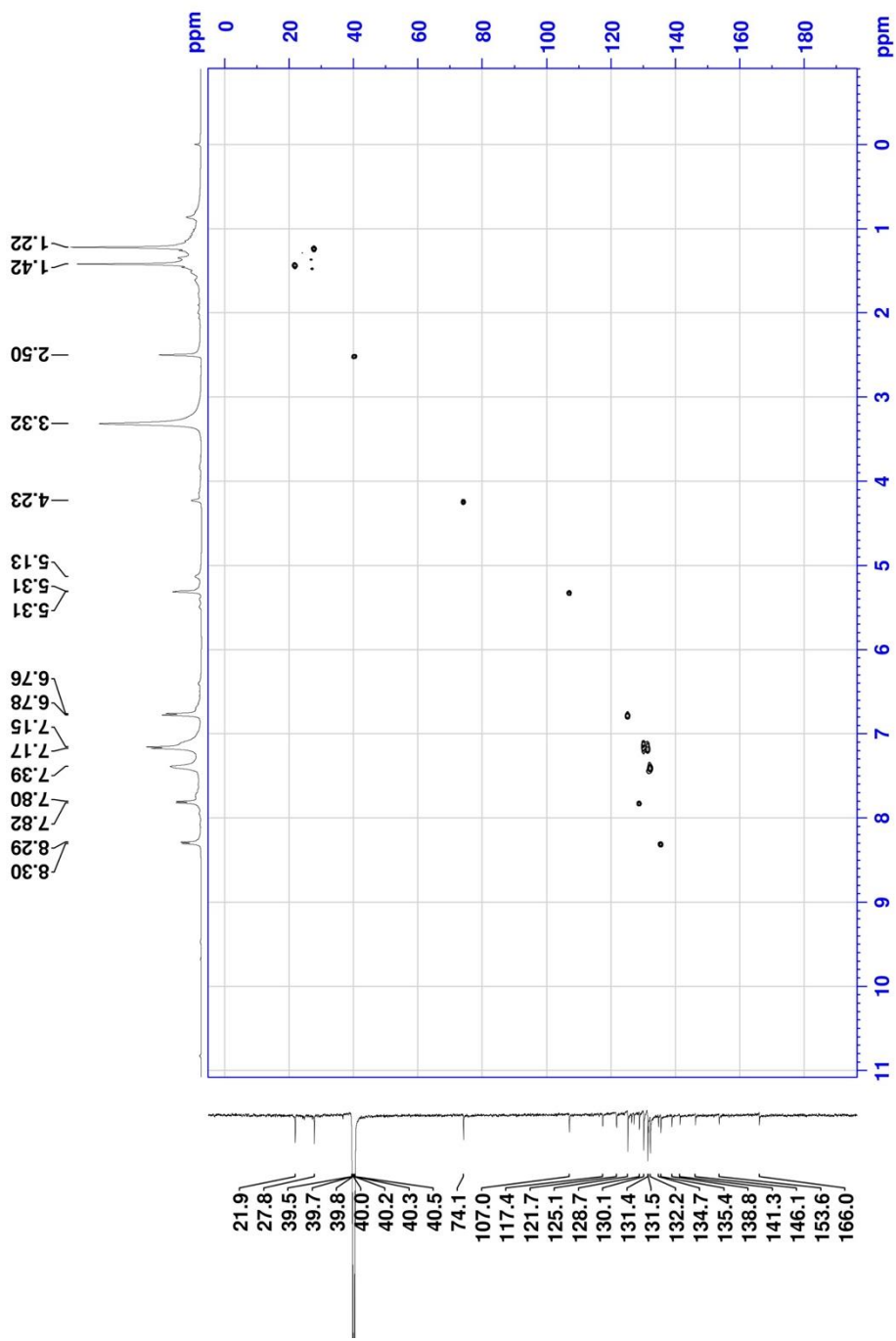
ภาพประกอบ 23 ^1H - ^{13}C HMBNMR spectrum ของอนุพันธ์ 80 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Chloroaniline) ($\text{DMSO-}d_6$)



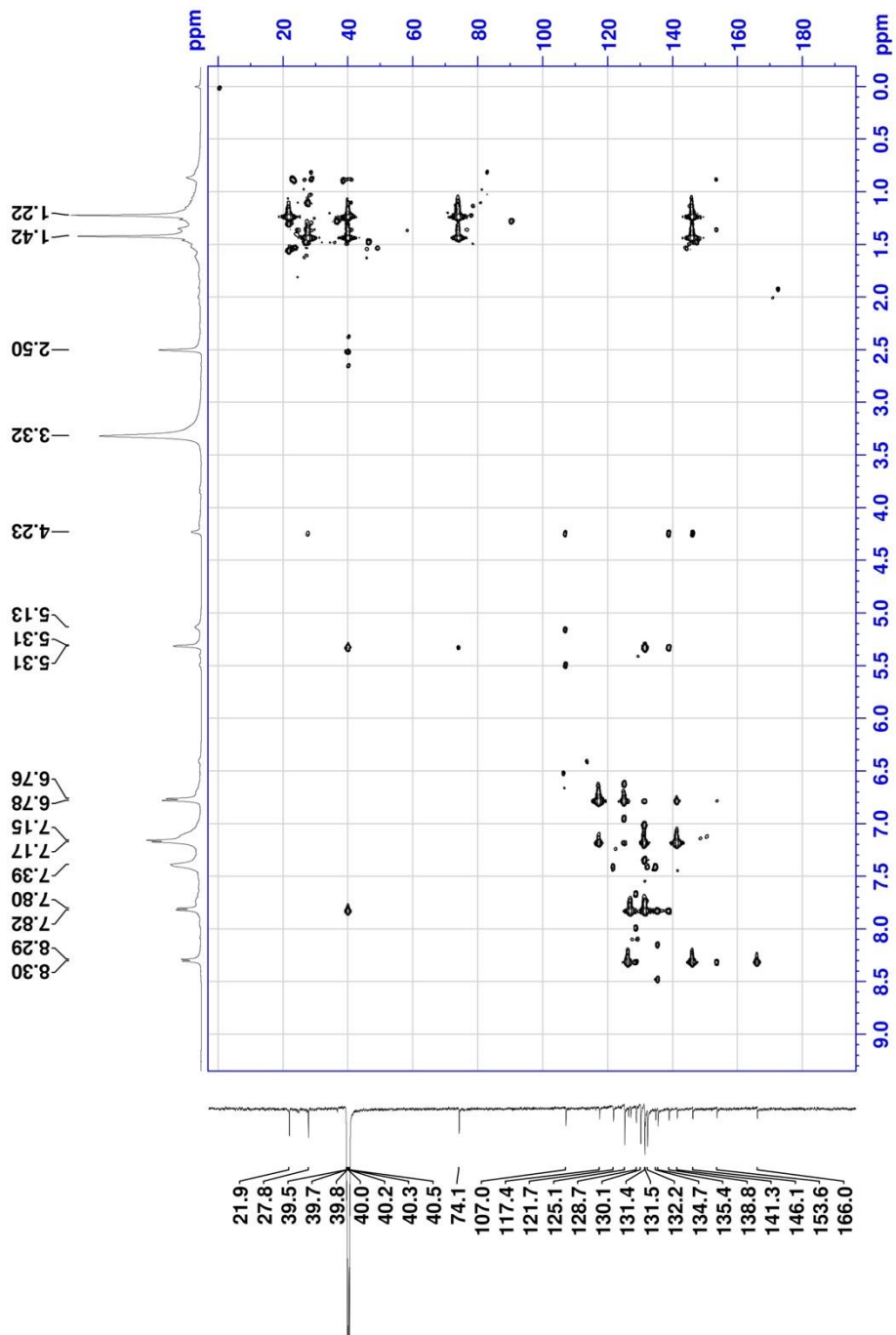
ภาพประกอบ 24 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของอนุพันธ์ 81 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Bromoaniline) ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz)



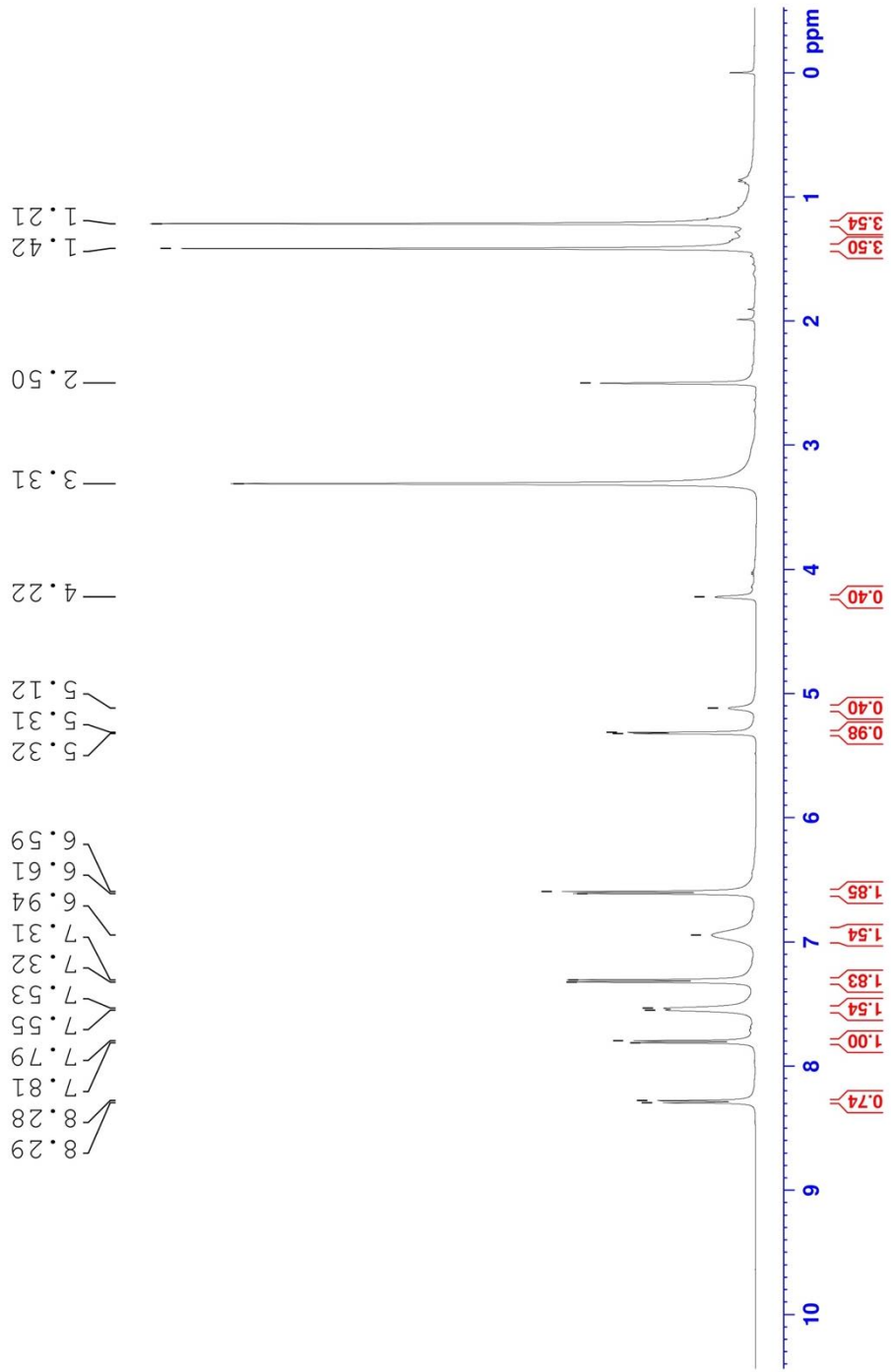
ภาพประกอบ 25 ^{13}C -NMR spectrum ของอนุพันธ์ 81 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Bromoaniline) (DMSO- d_6 , 125 MHz)



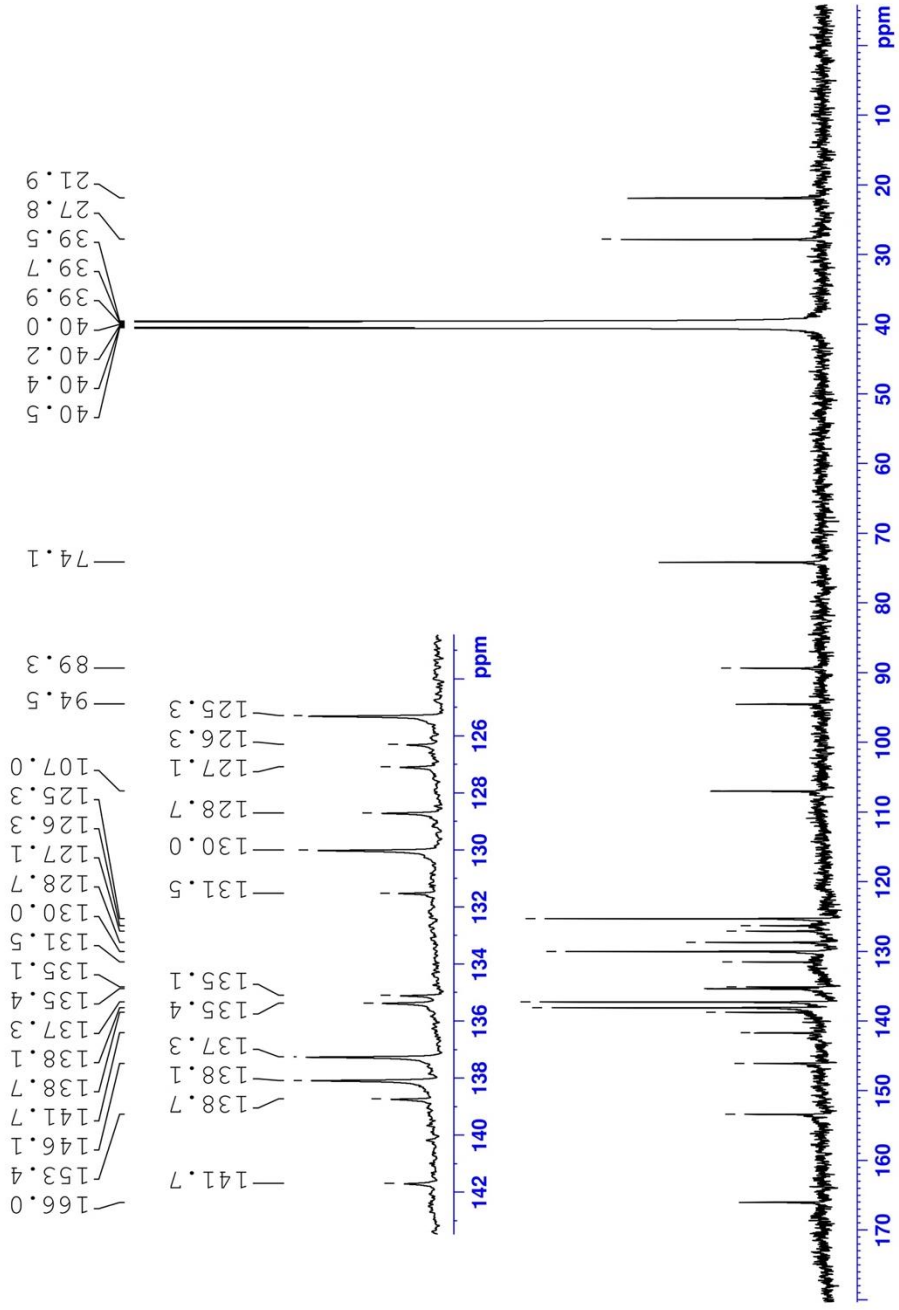
ภาพประกอบ 26 ¹H-¹³C HSQC NMR spectrum ของอนุพันธ์ 81 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Bromoaniline) (DMSO-d₆)



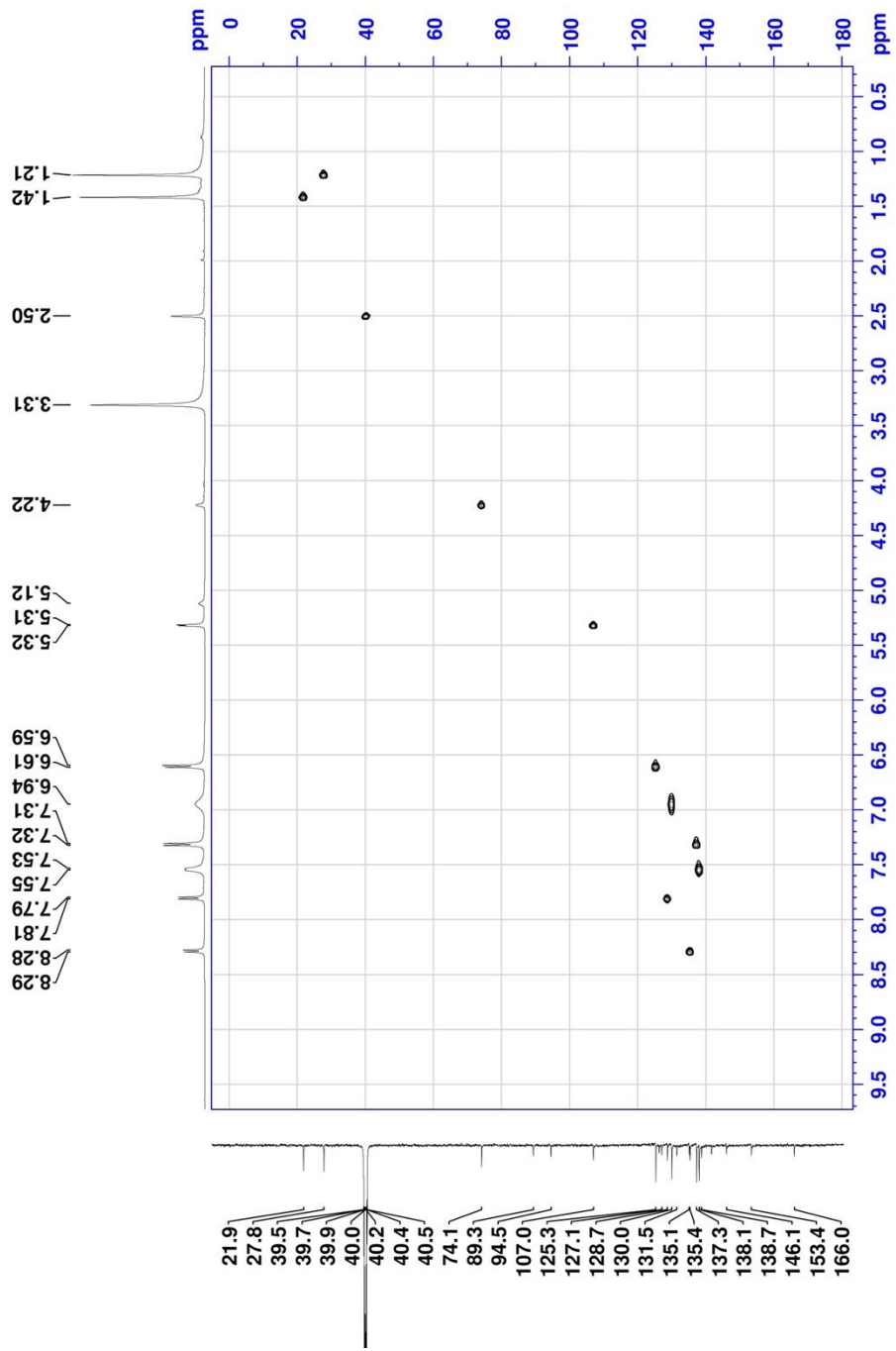
ภาพประกอบ 27 ^1H - ^{13}C HMB NMR spectrum ของอนุพันธ์ 81 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Bromoaniline) ($\text{DMSO}-d_6$)



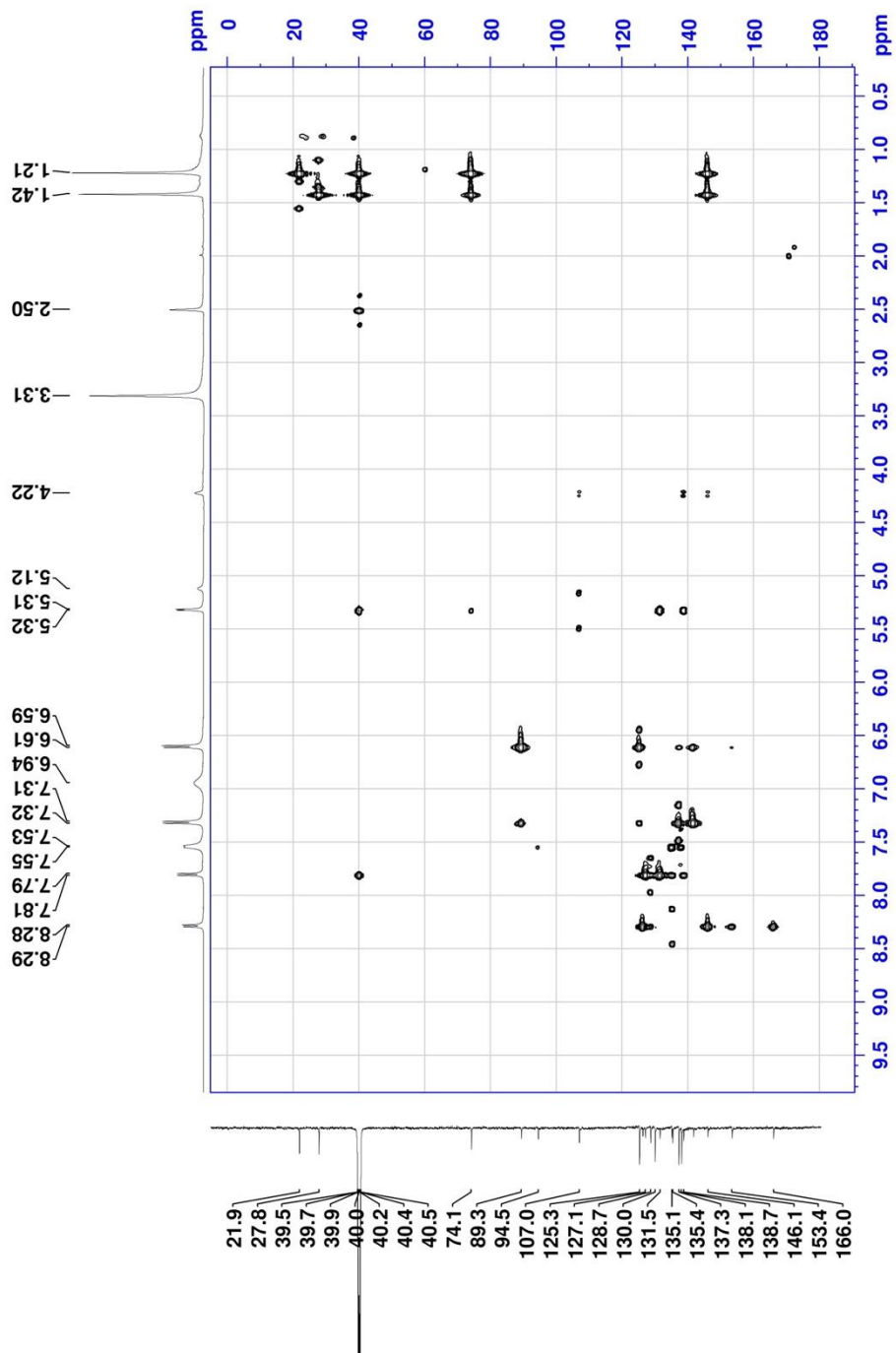
ภาพประกอบ 28 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของอนุพันธ์ 82 (ปฏิบัติการระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Iodoaniline) (DMSO-d_6 , 500 MHz)



ภาพประกอบ 29 ^{13}C -NMR spectrum ของอนุพันธ์ 82 (ปฏิบัติการระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Iodoaniline) ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz)



ภาพประกอบ 30 ¹H-¹³C HSQC NMR spectrum ของอนุพันธ์ 82 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Iodoaniline) (DMSO-d₆)



ภาพประกอบ 31 ^1H - ^{13}C HMBBC NMR spectrum ของอนุพันธ์ 82 (ปฏิกิริยาระหว่าง Hyphodermin A กับ 4-Iodoaniline) ($\text{DMSO}-d_6$)



ภาคผนวก ค

อันตรกิริยาระหว่างอนุพันธ์ Hyphodermin A กับกรดอะมิโน
ของเอนไซม์ Glycogen phosphorylase

ตาราง 1 แสดงอันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์และกรดอะมิโนภายในโพรงการจับ Purine site

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ
อนุพันธ์ 78	A:ASP283:HN	H-bond (con)	2.30
	A:ASN282:OD1	H-bond (con)	2.19
	A:ASN282:HA	Carbon Hydrogen Bond	2.96
	A:HIS571:HE1	Carbon Hydrogen Bond	2.25
	A:GLU382:OE1	Pi-anion	3.83
	A:GLU572:OE2	Pi-anion	2.95
	A:MET615:SD	Pi-Sulfur	5.90
	A:PHE285	Pi-Pi Stacked	3.99
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	3.85
	A:PHE285	Pi-Pi Stacked	4.96
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	3.63
	A:HIS571	Pi-Pi T-shaped	5.01
	A:PHE285	Pi-alkyl	4.82
	A:TYR613	Pi-alkyl	4.72
	A:ALA610	Pi-alkyl	5.11
	A:LEU380	Pi-alkyl	4.64
อนุพันธ์ 79	A:ASP283:HN	H-bond (con)	2.30
	A:ASN282:OD1	H-bond (con)	2.15
	A:ASN282:HA	Carbon	2.30
	A:HIS571:HE1	Carbon	2.28
	A:GLU572:OE1	Fluorine	3.45
	A:GLU382:OE1	Pi-anion	2.30
	A:GLU572:OE2	Pi-anion	3.09
	A:PHE285	Pi-Pi stacking	3.94
	A:TYR573	Pi-Pi stacking	5.34
	A:TYR613	Pi-Pi stacking	3.92

ตาราง 1 (ต่อ)

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ
อนุพันธ์ 79	A:PHE285	Pi-Pi stacking	4.92
	A:TYR613	Pi-Pi stacking	3.58
	A:HIS571	Pi-Pi stacking	4.96
	A:PHE285	Pi-alkyl	4.80
	A:TYR613	Pi-alkyl	4.80
	A:ALA610	Pi-alkyl	5.07
	A:MET615	Pi-alkyl	5.46
	A:LEU380	Pi-alkyl	4.82
อนุพันธ์ 80	A:ASN282:OD1	Conventional Hydrogen Bond	1.88
	A:GLU382:OE1	Pi-Anion	4.19
	A:GLU572:OE2	Pi-Anion	3.92
	A:HIS571:HD1	Pi-Donor Hydrogen Bond	3.23
	A:PHE285	Pi-Pi Stacked	4.08
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	4.37
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	5.00
	A:PHE285	Pi-Pi Stacked	4.45
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	3.50
	A:MET615	Alkyl	3.85
	A:MET764	Alkyl	4.04
	A:LEU380	Alkyl	3.42
	A:PHE285	Pi-Alkyl	5.48
	A:TYR573	Pi-Alkyl	4.25
	A:TYR613	Pi-Alkyl	5.48
	A:PHE771	Pi-Alkyl	4.36
A:ALA610	Pi-Alkyl	5.30	
A:MET615	Pi-Alkyl	5.01	

ตาราง 1 (ต่อ)

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ
อนุพันธ์ 81	A:GLY612:HN	Conventional Hydrogen Bond	2.43
	A:ASN282:OD1	Conventional Hydrogen Bond	2.03
	A:HIS768:O	Halogen (Cl, Br, I)	3.30
	A:GLU382:OE1	Pi-Anion	4.52
	A:GLU572:OE2	Pi-Anion	3.38
	A:PHE285	Pi-Pi Stacked	4.10
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	4.85
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	4.56
	A:PHE285	Pi-Pi Stacked	4.23
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	3.68
	A:MET764	Alkyl	4.83
	A:LEU380	Alkyl	3.76
	A:PHE285	Pi-Alkyl	5.38
	A:TYR573	Pi-Alkyl	4.50
	A:PHE771	Pi-Alkyl	4.48
A:ALA610	Pi-Alkyl	5.44	
อนุพันธ์ 82	A:GLY612:HN	Conventional Hydrogen Bond	2.18
	A:ASN282:OD1	Conventional Hydrogen Bond	2.05
	A:GLY612:HA2	Carbon Hydrogen Bond	3.07
	A:GLU382:OE2	Pi-Anion	4.74
	A:GLU382:HG2	Pi-Sigma	2.59
	A:PHE285	Pi-Pi Stacked	4.01
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	5.36
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	4.29
	A:PHE285	Pi-Pi Stacked	3.89
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	4.05

ตาราง 1 (ต่อ)

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ
อนุพันธ์ 82	A:LEU380	Alkyl	4.01
	A:PHE285	Pi-Alkyl	5.18
	A:HIS571	Pi-Alkyl	5.42
	A:TYR573	Pi-Alkyl	4.59
	A:PHE771	Pi-Alkyl	4.63
	A:ALA610	Pi-Alkyl	5.44
Hyphodermin A	A:GLY612:HN	Conventional Hydrogen Bond	2.18
	A:ASN282:OD1	Conventional Hydrogen Bond	2.05
	A:GLY612:HA2	Carbon Hydrogen Bond	3.07
	A:GLU382:OE2	Pi-Anion	4.74
	A:GLU382:HG2	Pi-Sigma	2.59
	A:PHE285	Pi-Pi Stacked	4.01
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	5.36
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	4.29
	A:PHE285	Pi-Pi Stacked	3.89
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	4.05
	A:LEU380	Alkyl	4.01
	A:PHE285	Pi-Alkyl	5.18
	A:HIS571	Pi-Alkyl	5.42
	A:TYR573	Pi-Alkyl	4.59
	A:PHE771	Pi-Alkyl	4.63
A:ALA610	Pi-Alkyl	5.44	
Riboflavin	A:ASP283:HN	Conventional Hydrogen Bond	2.14
	A:MET615:HN	Conventional Hydrogen Bond	2.11
		Conventional Hydrogen Bond	2.28
	A:ASN282:OD1	Conventional Hydrogen Bond	2.35

ตาราง 1 (ต่อ)

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ
Riboflavin	A:ASP283:O	Conventional Hydrogen Bond	3.04
	A:GLU572:OE2	Conventional Hydrogen Bond	2.23
	A:GLY612:O	Conventional Hydrogen Bond	1.95
	A:GLY612:O	Carbon Hydrogen Bond	2.66
	A:ASN282:HA	Pi-Sigma	3.46
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	3.59
	A:PHE285	Pi-Pi Stacked	4.48
	A:PHE285	Pi-Pi Stacked	4.83
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	3.89
	A:TYR613	Pi-Pi Stacked	4.35
	A:TYR613	Amide-Pi Stacked	5.03
	A:ASN284:C,O;PHE285:N	Amide-Pi Stacked	5.14
	A:GLY612:C,O;TYR613:N	Alkyl	4.22
	A:LEU380	Pi-Alkyl	4.74
	A:HIS571	Pi-Alkyl	4.51
	A:TYR573	Pi-Alkyl	5.33
	A:PHE771	Pi-Alkyl	4.91
	A:PHE771	Pi-Alkyl	3.88

ตาราง 2 แสดงอันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์และกรดอะมิโนภายในโพรงการจับ AMP site

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ
อนุพันธ์ 78	A:ARG242:HH12	Conventional Hydrogen Bond	2.06
	A:ARG242:HH22	Conventional Hydrogen Bond	1.69
		Conventional Hydrogen Bond	1.93
	A:ARG193:NH1	Pi-Cation	4.87
	A:ARG310:NH2	Pi-Cation	4.78
	A:GLN71:HE21	Pi-Donor Hydrogen Bond	2.61
	A:PHE196	Pi-Pi Stacked	5.68
	A:PHE196	Pi-Pi Stacked	5.89
		Pi-Pi Stacked	5.96
	B:VAL45	Alkyl	4.46
	A:TYR75	Pi-Alkyl	5.10
	B:VAL45	Pi-Alkyl	4.66
	A:ILE68	Pi-Alkyl	5.15
อนุพันธ์ 79	A:ARG242:HH22	Conventional Hydrogen Bond	1.72
	B:ASP42:HN	Conventional Hydrogen Bond;Halogen (Fluorine)	2.38
	A:ASP306:OD1	Conventional Hydrogen Bond	2.36
	B:LYS41:HA	Carbon Hydrogen Bond;Halogen (Fluorine)	2.31
	B:VAL40:O	Halogen (Fluorine)	2.73
	B:LYS41:C	Halogen (Fluorine)	3.51
	A:ARG310:NH2	Pi-Cation;Pi-Donor Hydrogen Bond	4.10
	A:GLN71:HE21	Pi-Donor Hydrogen Bond	2.92
	A:ARG310:HE	Pi-Donor Hydrogen Bond	2.87
	A:ARG310	Alkyl	4.06

ตาราง 2 (ต่อ)

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ
อนุพันธ์ 79	A:ARG310	Pi-Alkyl	5.05
	B:VAL45	Pi-Alkyl	5.02
	B:LYS41	Pi-Alkyl	5.21
	B:VAL45	Pi-Alkyl	4.81
อนุพันธ์ 80	A:ARG242:HH12	Conventional Hydrogen Bond	1.69
	A:ARG242:HH22	Conventional Hydrogen Bond	2.24
	A:ARG242:HH22	Conventional Hydrogen Bond	2.63
	A:ASP306:OD1	Conventional Hydrogen Bond	1.77
	A:ARG310:NH2	Pi-Cation	3.98
	A:ARG310:NH2	Pi-Cation	4.53
	A:GLN71:HG2	Pi-Sigma	2.67
	A:PHE196	Pi-Pi Stacked	5.70
	A:ARG310	Alkyl	3.87
	B:VAL45	Alkyl	4.47
	A:ILE68	Alkyl	4.82
	B:VAL40	Alkyl	4.49
	A:TRP67	Pi-Alkyl	4.36
	A:TRP67	Pi-Alkyl	4.64
	A:ARG310	Pi-Alkyl	4.62
	B:VAL45	Pi-Alkyl	4.95
อนุพันธ์ 81	A:ARG242:HH12	Conventional Hydrogen Bond	1.73
	A:ARG242:HH22	Conventional Hydrogen Bond	2.23
	A:ARG242:HH22	Conventional Hydrogen Bond	2.62
	A:ASP306:OD1	Conventional Hydrogen Bond	1.78
	A:ARG310:NH2	Pi-Cation	4.04
	A:ARG310:NH2	Pi-Cation	4.55

ตาราง 2 (ต่อ)

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ	
อนุพันธ์ 81	A:GLN71:HG2	Pi-Sigma	2.63	
	A:PHE196	Pi-Lone Pair	2.98	
	A:PHE196	Pi-Pi Stacked	5.66	
	A:ARG310	Alkyl	3.97	
	B:VAL45	Alkyl	4.46	
	A:ILE68	Alkyl	4.79	
	B:VAL40	Alkyl	4.40	
	A:TRP67	Pi-Alkyl	4.19	
	A:TRP67	Pi-Alkyl	4.48	
	A:ARG310	Pi-Alkyl	4.68	
	B:VAL45	Pi-Alkyl	4.90	
	อนุพันธ์ 82	A:ARG242:HH12	Conventional Hydrogen Bond	1.61
		A:ARG242:HH22	Conventional Hydrogen Bond	2.20
A:ARG242:HH22		Conventional Hydrogen Bond	2.60	
A:ASP306:OD1		Conventional Hydrogen Bond	1.74	
A:ARG310:NH2		Pi-Cation	3.99	
A:ARG310:NH2		Pi-Cation	4.44	
A:PHE196		Pi-Lone Pair	3.00	
A:PHE196		Pi-Pi Stacked	5.52	
A:ARG310		Alkyl	3.72	
B:VAL45		Alkyl	4.52	
A:ILE68		Alkyl	4.67	
B:VAL40		Alkyl	4.60	
A:TRP67		Pi-Alkyl	4.05	
A:TRP67		Pi-Alkyl	4.48	
A:ARG310		Pi-Alkyl	4.68	

ตาราง 2 (ต่อ)

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ	
อนุพันธ์ 82	B:VAL45	Pi-Alkyl	4.98	
Hyphodermin A	A:ARG193:HH22	Conventional Hydrogen Bond	2.05	
	A:THR240:HG1	Conventional Hydrogen Bond	3.05	
	A:ARG242:HH12	Conventional Hydrogen Bond	2.95	
	A:ARG242:HH22	Conventional Hydrogen Bond	2.11	
	A:THR240:OG1	Conventional Hydrogen Bond	2.16	
		Conventional Hydrogen Bond	2.68	
	A:ARG193:NH2	Pi-Cation	4.32	
	A:GLN71:HE21	Pi-Donor Hydrogen Bond	2.87	
	A:ILE68	Alkyl	4.10	
	B:LYS41	Alkyl	4.35	
	B:VAL45	Alkyl	5.34	
	A:ILE68	Alkyl	4.00	
	GSK261	A:ARG81:NH1	Attractive Charge	5.14
		A:ARG310:NH2	Attractive Charge	3.35
A:GLN71:HE21		Conventional Hydrogen Bond	1.86	
A:GLN71:HE22		Conventional Hydrogen Bond	2.38	
A:ARG310:HE		Conventional Hydrogen Bond	1.80	
A:ARG310:HE		Conventional Hydrogen Bond	2.48	
A:ARG310:HH21		Conventional Hydrogen Bond	2.06	
B:ASP42:HN		Conventional Hydrogen Bond	1.92	
B:VAL40:O		Conventional Hydrogen Bond	1.99	
		Conventional Hydrogen Bond	1.82	
B:LYS41:HA		Carbon Hydrogen Bond	2.75	
A:ARG193:NH2		Pi-Cation	3.13	
A:TRP67		Pi-Pi T-shaped	5.22	

ตาราง 2 (ต่อ)

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ
GSK261	A:TRP67	Pi-Pi T-shaped	5.49
	A:GLN71:C,O;GLN7 2:N	Amide-Pi Stacked	4.3
	A:GLN71:C,O;GLN7 2:N	Amide-Pi Stacked	4.17
	B:VAL45	Pi-Alkyl	4.37
	B:VAL45	Pi-Alkyl	5.19



ตาราง 3 แสดงอันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์และกรดอะมิโนภายในโพรงการจับ Indole site

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ
อนุพันธ์ 78	A:HIS57:NE2	Conventional Hydrogen Bond	2.28
	A:ARG60:HH12	Conventional Hydrogen Bond	2.02
	A:ARG60:HH22	Conventional Hydrogen Bond	2.28
	A:HIS57:HD2	Carbon Hydrogen Bond	1.67
	B:GLU190:OE2	Pi-Anion	2.92
	B:7001862:O3	Pi-Anion	2.87
	B:7001862	Pi-Pi Stacked	5.18
	B:7001862	Pi-Pi T-shaped	4.55
	B:PRO188	Alkyl	4.60
	B:PRO188	Alkyl	4.98
	B:7001862	Pi-Alkyl	5.13
	B:HIS57	Pi-Alkyl	5.30
	B:7001862	Pi-Alkyl	5.13
อนุพันธ์ 79	A:ARG60:HH12	Conventional Hydrogen Bond	1.74
	A:ARG60:HH22	Conventional Hydrogen Bond	1.83
	A:ARG160:HH21	Conventional Hydrogen Bond;Halogen (Fluorine)	2.87
	B:ARG160:HH22	Conventional Hydrogen Bond;Halogen (Fluorine)	2.06
	B:ASN187:O	Conventional Hydrogen Bond	2.13
		Conventional Hydrogen Bond	1.82
	A:GLU190:OE2	Halogen (Fluorine)	3.04
	B:GLU190:OE2	Pi-Anion	2.78
	B:7001862:O3	Pi-Anion	3.26
	B:7001862:O3	Pi-Anion	3.84
	B:7001862	Pi-Pi Stacked	5.76

ตาราง 3 (ต่อ)

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ
อนุพันธ์ 79	B:7001862	Pi-Pi T-shaped	4.62
	B:PRO188	Alkyl	4.52
	B:PRO188	Alkyl	5.19
	B:7001862	Pi-Alkyl	4.20
	B:7001862	Pi-Alkyl	4.89
	B:7001862	Pi-Alkyl	5.39
อนุพันธ์ 80	B:ARG60:HH12	Conventional Hydrogen Bond	2.87
	B:ARG60:HH12	Conventional Hydrogen Bond	1.81
	B:ARG60:HH22	Conventional Hydrogen Bond	1.72
	B:THR38:O	Conventional Hydrogen Bond	1.67
	B:7001862:O1	Conventional Hydrogen Bond	1.88
	A:PRO229:HD2	Carbon Hydrogen Bond	2.99
	A:ARG60:NH1	Pi-Cation	3.53
	B:THR38:HG1	Pi-Donor Hydrogen Bond	2.29
	B:HIS57	Pi-Pi T-shaped	4.81
	B:7001862	Pi-Pi T-shaped	5.85
	A:LYS191	Alkyl	4.79
	A:ARG60	Alkyl	4.40
	A:PRO229	Alkyl	3.94
	A:HIS34	Pi-Alkyl	4.23
	A:TRP67	Pi-Alkyl	4.77
	B:HIS34	Pi-Alkyl	4.87
A:ARG60	Pi-Alkyl	5.40	
A:LYS191	Pi-Alkyl	4.06	
B:VAL40	Pi-Alkyl	5.13	
อนุพันธ์ 81	B:ARG60:HH12	Conventional Hydrogen Bond	2.84

ตาราง 3 (ต่อ)

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ
อนุพันธ์ 81	B:ARG60:HH12	Conventional Hydrogen Bond	1.97
	B:ARG60:HH22	Conventional Hydrogen Bond	1.74
	B:THR38:O	Conventional Hydrogen Bond	1.65
	B:7001862:O1	Conventional Hydrogen Bond	1.80
	A:PRO229:HD2	Carbon Hydrogen Bond	2.87
	A:ARG60:NH1	Pi-Cation	3.56
	B:THR38:HG1	Pi-Donor Hydrogen Bond	2.35
	B:HIS57	Pi-Pi T-shaped	4.85
	B:7001862	Pi-Pi T-shaped	5.81
	B:7001862	Pi-Pi T-shaped	5.98
	A:LYS191	Alkyl	4.78
	A:ARG60	Alkyl	4.46
	A:PRO229	Alkyl	3.81
	A:HIS34	Pi-Alkyl	4.31
	A:TRP67	Pi-Alkyl	4.66
	B:HIS34	Pi-Alkyl	4.78
	A:ARG60	Pi-Alkyl	5.44
	A:LYS191	Pi-Alkyl	4.03
B:VAL40	Pi-Alkyl	5.10	
อนุพันธ์ 82	B:ARG60:HH12	Conventional Hydrogen Bond	2.88
	B:ARG60:HH12	Conventional Hydrogen Bond	1.95
	B:ARG60:HH22	Conventional Hydrogen Bond	1.70
	B:THR38:O	Conventional Hydrogen Bond	1.85
	B:7001862:O1	Conventional Hydrogen Bond	1.87
	A:ARG60:NH1	Pi-Cation	3.78
	B:THR38:HG1	Pi-Donor Hydrogen Bond	2.23

ตาราง 3 (ต่อ)

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ
อนุพันธ์ 82	B:HIS57	Pi-Pi T-shaped	4.82
	B:7001862	Pi-Pi T-shaped	5.74
	A:LYS191	Alkyl	4.85
	A:ARG60	Alkyl	4.17
	A:VAL64	Alkyl	5.04
	A:HIS34	Pi-Alkyl	4.39
	A:TRP67	Pi-Alkyl	4.71
	B:HIS34	Pi-Alkyl	4.75
	A:ARG60	Pi-Alkyl	5.37
	A:LYS191	Pi-Alkyl	4.37
	B:VAL40	Pi-Alkyl	4.59
	Hyphodermin A	A:ARG60:HH12	Conventional Hydrogen Bond
A:ARG60:HH22		Conventional Hydrogen Bond	1.73
B:ARG60:HH12		Conventional Hydrogen Bond	2.12
B:HIS57:NE2		Conventional Hydrogen Bond	2.18
		Conventional Hydrogen Bond	2.63
B:PHE53		Pi-Sigma	3.71
B:HIS57		Pi-Pi T-shaped	4.49
B:PRO188		Alkyl	3.60
B:PHE53		Pi-Alkyl	4.15
B:HIS57		Pi-Alkyl	4.42
CP-403,700	A:LYS191:NZ	Attractive Charge	4.42
	B:THR38:O	Conventional Hydrogen Bond	2.23
	A:LYS191:HZ2	Conventional Hydrogen Bond	1.67
		Carbon Hydrogen Bond	3.35
	A:SER192:HB2	Carbon Hydrogen Bond	1.98

ตาราง 3 (ต่อ)

ลิแกนด์	กรดอะมิโน	ชนิดของอันตรกิริยา	ความยาวพันธะ
CP-403,700	A:ARG60:NH1	Pi-Cation	3.37
	B:ARG60:NH1	Pi-Cation	4.24
	B:HIS57	Pi-Pi T-shaped	4.47
	B:LEU39	Alkyl	5.45
	A:ARG60	Alkyl	4.48
	A:LEU63	Alkyl	4.33
	A:VAL64	Alkyl	4.75
	A:PRO229	Alkyl	4.34
	A:LYS191	Pi-Alkyl	4.09
	B:VAL40	Pi-Alkyl	5.23
	A:ARG60	Pi-Alkyl	4.49
	A:LYS191	Pi-Alkyl	4.85
	A:PRO229	Pi-Alkyl	5.47
	B:VAL40	Pi-Alkyl	5.05
	A:TRP67	Pi-Alkyl	4.47
	B:PHE53	Pi-Alkyl	5.16

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ชนิธา จัษฎประเสริฐ
วัน เดือน ปี เกิด	11 ตุลาคม 2537
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษาตอนปลาย วิทยุ-คณิต โรงเรียนเบญจมราชาลัย ในพระบรมราชูปถัมภ์ กรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2560 ปริญญาตรี การศึกษาศาสตร์ สาขาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	53 ซอยประชาราษฎร์ สาย 1 ซอย 1 ถนนประชาราษฎร์ สาย 1 เขตบางซื่อ แขวงบางซื่อ กรุงเทพมหานคร 10800

