



การพยายามสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์



โดย
นางสาวจันจิรา จรามรบูรพวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอินทรีย์

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การพยายามสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์

โดย
นางสาวจันจิรา จรามรบูรพวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีอินทรีย์

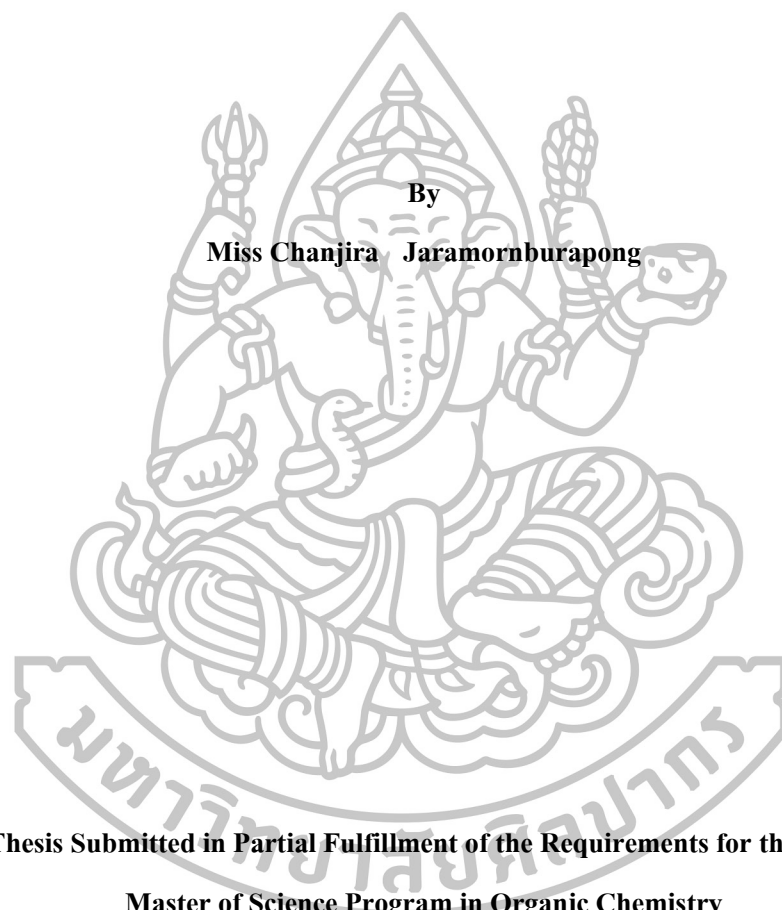
ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ATTEMPTED SYNTHESIS OF IHEYAMINE A AND DERIVATIVES



**By
Miss Chanjira Jaramornburapong**

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

Master of Science Program in Organic Chemistry

Department of Chemistry

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2015

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ การพยายามสังเคราะห์
Iheyamine A และอนุพันธ์ ” เสนอโดย นางสาวจันจิรา จรามบรรพพงศ์ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วยา พุทธวงศ์

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.ภาณุพันธ์ ลิ้มขยาพร)

...../...../.....

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สิริธร สโมสร)

...../...../.....

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วยา พุทธวงศ์)

...../...../.....



56302202 : สาขาวิชาเคมีอินทรีย์

คำสำคัญ : ISATIN/TRYPTAMINE/OXINDOLE/IHEYAMINE A/ฤทธิ์ทางชีวภาพ

จันจิรา จรามรบูรพวงศ์ : การพยายามสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.วยา พุททวงศ์. 103 หน้า.

Iheyamine A เป็นสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติประเภท bis-indole alkaloids ที่ทำการแยกได้จากเห็ดขี้ผึ้ง สปีชีส์ *Polycitrella* sp. ที่พบบริเวณเกาะ Iheya เมือง Okinawa ประเทศญี่ปุ่น ในการศึกษาก่อนหน้าที่ได้รายงานโครงสร้างของ Iheyamine A เป็น polycyclic heteroaromatic compound ที่ประกอบด้วย indole 2 หน่วย เชื่อมด้วยวง 7 เหลี่ยม ซึ่งมีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (P388), เซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) เนื่องจากสารที่แยกได้มีปริมาณน้อย และยังไม่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น ความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านไวรัส ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ รวมถึงความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ จึงทำให้กลุ่มผู้วิจัยสนใจที่จะสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์ เพื่อศึกษาสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเริ่มทำการสังเคราะห์จาก isatin โดยผ่านปฏิกิริยาที่สำคัญคือ *N*-substitution, condensation, reduction และ Pd(II)-catalyzed oxidative cyclization อย่างไรก็ตาม สารที่ได้จากปฏิกิริยานี้มีน้อยมาก จึงไม่สามารถไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น การต้านเซลล์มะเร็ง การต้านแบคทีเรีย การต้านเชื้อรา การยับยั้งอนุมูลอิสระได้ จึงนำสาร oxindole ที่เกิดจากปฏิกิริยา reduction ไปทำการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา พบว่ามีแนวโน้มในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia feacalis* และ *Escherichia Coli* แต่ไม่มีแนวโน้มในการต้านเชื้อรา

ภาควิชาเคมี

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

56302202 : MAJOR : ORGANIC CHEMISTRY

KEY WORD : ISATIN/TRYPYPTAMINE/OXINDOLE/IHEYAMINE A/BIOLOGICAL ACTIVITIES
CHANJIRA JARAMORNBURAPONG : ATTEMPTED SYNTHESIS OF IHEYAMINE A
AND DERIVATIVES. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. WAYA PHUTDHAWONG, Ph.D.. 103 pp.

Iheyamine A is a bis-indole alkaloid natural product which has been isolated from ascidians, *Polycitorella* sp., collected from the island of Iheya, Okinawa, Japan. Previous studies reported the structure of Iheyamine A as polycyclic heteroaromatic compound which indoles 2 units connected with azepine ring and evaluated the anti-tumor activities as moderated activities against leukemia cells (P388), lung cancer cells (A549) and leave colon cancer cells (HT29). However, the amount of separated Iheyamine was tiny to study the other biological activities such as antibacterial, antifungal, antiviral activities, antioxidant activities and other cancer cell lines. Thus, our research group was interested in the synthesis of Iheyamine A and derivatives and evaluated their biological activities. The synthesis was started from isatin via the *N*-substitution, condensation, reductions and Pd(II)-catalyzed oxidative cyclization. However, the product resulted from oxidative cyclization was obtained in poor yield and could not test their biological activities. Therefore, the oxindoles obtained from the reduction were assayed for their antibacterial and antifungal activities. The results showed that the oxindole compounds could inhibit bacteria *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *Salmoella typhimuriem*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* but they had no antifungal activities.



Department of Chemistry

Student's signature

Thesis Advisor's signature

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2015

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วยา พุททวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูง สำหรับความกรุณาที่ให้โอกาส ให้คำปรึกษา ให้ความรู้ และคำแนะนำ รวมไปถึงความช่วยเหลืออันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ และการดำเนินชีวิต ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สิริธร สโมสร อาจารย์กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ ซึ่งทำให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชงชัย เตโชวิศาล และ อาจารย์วิญญู ภักดี เป็นอย่างสูง สำหรับความกรุณาช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา ให้ความรู้ และคำแนะนำในการทดลองด้านการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ที่กรุณาให้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ตลอดจนคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ เป็นอย่างสูงที่ช่วยเหลือเอื้อเฟื้อในด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ เป็นอย่างสูงที่ช่วยเหลือเอื้อเฟื้อในด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ ที่ใช้ในการทดลองด้านการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้องๆ ในห้องวิจัยของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วยา พุททวงศ์ ที่ช่วยให้คำปรึกษาในการแก้ปัญหาทางด้านต่างๆ รวมทั้งให้กำลังใจมาโดยตลอด

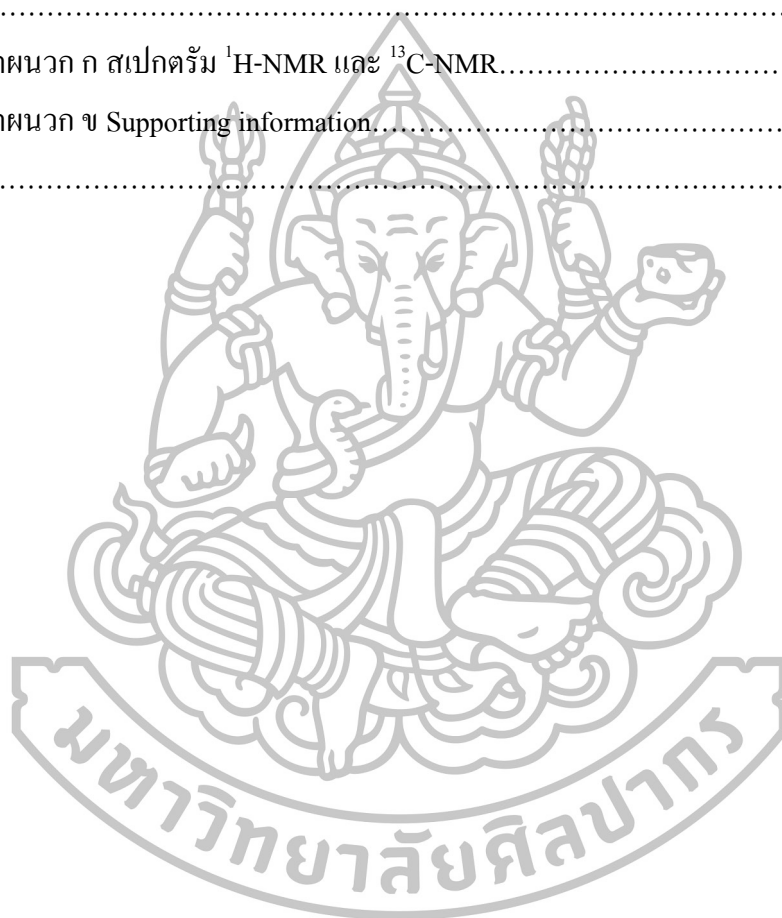
สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องสาว และทุกคนในครอบครัว ที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุน ตลอดจนคำปรึกษาที่ดีในด้านต่างๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

จันจิรา จรามรบูรพงศ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	5
1.3 นิยามศัพท์เฉพาะ.....	5
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	14
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	14
3.2 สารเคมีที่ใช้.....	15
3.3 วิธีการทดลอง.....	17
3.3.1 การสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์.....	17
3.3.1.1 การสังเคราะห์วิธีที่ 1 ของ Iheyamine A และอนุพันธ์.....	17
3.3.1.2 การสังเคราะห์วิธีที่ 2 ของ Iheyamine A และอนุพันธ์.....	28
3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	35
3.3.2.1 การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	35
3.3.2.2 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา.....	36
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง.....	38
4.1 ผลการสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์.....	38
4.1.1 ผลการสังเคราะห์วิธีที่ 1 ของ Iheyamine A และอนุพันธ์.....	39
4.1.2 ผลการสังเคราะห์วิธีที่ 2 ของ Iheyamine A และอนุพันธ์.....	54
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	64

	หน้า
4.2.1 ผลการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย วิธี DPPH.....	64
4.2.2 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา.....	65
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	67
รายการอ้างอิง.....	69
ภาคผนวก.....	72
ภาคผนวก ก สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$	73
ภาคผนวก ข Supporting information.....	100
ประวัติผู้วิจัย.....	103



สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	การสังเคราะห์ของ 3-hydroxy-2-oxindole (5a) ที่สภาวะต่างๆ.....	19
ตารางที่ 2	การสังเคราะห์ของ 3-hydroxy-2-oxindole (5b) ที่สภาวะต่างๆ.....	20
ตารางที่ 3	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (6a) ที่สภาวะต่างๆ.....	21
ตารางที่ 4	การสังเคราะห์ bis-indole (7a) ที่สภาวะต่างๆ.....	23
ตารางที่ 5	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a) ที่สภาวะต่างๆ.....	27
ตารางที่ 6	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5c) และ (5d) ที่สภาวะต่างๆ.....	30
ตารางที่ 7	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a) ที่สภาวะต่างๆ.....	34
ตารางที่ 8	ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxy indolin-2-one (5a).....	41
ตารางที่ 9	ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(5-methoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)- -1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (5b).....	42
ตารางที่ 10	ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin- -1-yl)(phenyl)methanone (6a).	44
ตารางที่ 11	ตำแหน่ง และ chemical shift โครงสร้างของสารที่คาดว่าจะเกิดจากชั้น aqueous phase ของสังเคราะห์ bis-indole (7a) วิธีที่ 2.....	48
ตารางที่ 12	ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)-1 <i>H</i> -indol-1-yl)(phenyl) methanone (7a).....	50
ตารางที่ 13	ผลการสังเคราะห์ tert-butyl 3-((2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy -2-oxoindoline-1-carboxylate (5c).....	55
ตารางที่ 14	ผลการสังเคราะห์ tert-butyl 3-((2-(5-methoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl) amino)-3-hydroxy-2-oxoindoline-1-carboxylate (5d).....	57
ตารางที่ 15	ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxyindolin-2-one (8a).....	62
ตารางที่ 16	ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย.....	66
ตารางที่ 17	ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา.....	66

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	โครงสร้างตัวอย่างของ Protoalkaloid..... 1
ภาพที่ 2	โครงสร้างหลักของ True alkaloids..... 2
ภาพที่ 3	โครงสร้างของ indole, benzene และ pyrrole..... 2
ภาพที่ 4	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอินดิโก..... 3
ภาพที่ 5	โครงสร้างตัวอย่างของ mono indoles..... 3
ภาพที่ 6	โครงสร้างตัวอย่างของ bis-indoles..... 4
ภาพที่ 7	โครงสร้างตัวอย่างของ annulated indoles..... 4
ภาพที่ 8	ส่วนของเพรียงหัวหอม (ascidian) สปีชีส์ <i>Polycitrella</i> sp. (purple)..... 4
ภาพที่ 9	โครงสร้างของ Iheyamine A (1) 5
ภาพที่ 10	การสังเคราะห์ของ Isomeric Iheyamine โดย Bremner, J. B. และคณะ..... 8
ภาพที่ 11	โครงสร้างตัวอย่างของ 3-hydroxy-2-oxindole ที่เป็นสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ..... 9
ภาพที่ 12	การสังเคราะห์ (±)-Convolutamydine A โดย Jnaneshwar, G. K. และ Deshpande, V. H..... 10
ภาพที่ 13	การสังเคราะห์ (±)-Donaxaridine โดย Kawasaki, T. และคณะ 11
ภาพที่ 14	การสังเคราะห์ (±)-Convolutamydine A และ E โดย Kawasaki T. และคณะ..... 11
ภาพที่ 15	การสังเคราะห์ (R)-Convolutamydine B และ E โดย Noriyuki, H. และคณะ.... 12
ภาพที่ 16	การสังเคราะห์ของ (+)-Dioxibrassinin โดย Liu, L. และคณะ..... 12
ภาพที่ 17	การสังเคราะห์ของ Maremycin A-D โดย Yonghua, L. และคณะ..... 13
ภาพที่ 18	การสังเคราะห์วิธีที่ 1 ของ Iheyamine A และอนุพันธ์..... 17
ภาพที่ 19	การสังเคราะห์ของ 3-hydroxy-2-oxindole (5a) และ (5b)..... 18
ภาพที่ 20	การสังเคราะห์ N-benzoyl isatin (3a)..... 18
ภาพที่ 21	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5a) 19
ภาพที่ 22	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5b)..... 20
ภาพที่ 23	การสังเคราะห์ indolinol (6a)..... 20
ภาพที่ 24	การสังเคราะห์ bis-indole (7a) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5a) วิธีที่ 1..... 21
ภาพที่ 25	การสังเคราะห์ bis-indole (7a) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5a) วิธีที่ 2..... 22

	หน้า
ภาพที่ 26	การสังเคราะห์ bis-indole (7a) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5a) วิธีที่ 3..... 23
ภาพที่ 27	การสังเคราะห์ indolinol (6c)..... 24
ภาพที่ 28	การสังเคราะห์ bis-indole (7c) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5b)..... 24
ภาพที่ 29	การสังเคราะห์ bis-indole (7a) จาก indolinol (6a)..... 25
ภาพที่ 30	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5a) วิธีที่ 1..... 25
ภาพที่ 31	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5a) วิธีที่ 2..... 26
ภาพที่ 32	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5a) วิธีที่ 3..... 26
ภาพที่ 33	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5a) วิธีที่ 4..... 27
ภาพที่ 34	การสังเคราะห์วิธีที่ 2 ของ Iheyamine A และอนุพันธ์..... 28
ภาพที่ 35	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5c) และ (5d)..... 28
ภาพที่ 36	การสังเคราะห์ <i>N</i> -Boc isatin (3b)..... 29
ภาพที่ 37	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5c)..... 29
ภาพที่ 38	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5d)..... 30
ภาพที่ 39	การสังเคราะห์ indolinol (6d) 31
ภาพที่ 40	การสังเคราะห์ bis-indole (9a) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5c)..... 31
ภาพที่ 41	การสังเคราะห์ indolinol (6e) 32
ภาพที่ 42	การสังเคราะห์ bis-indole (9b) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5d)..... 32
ภาพที่ 43	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a) วิธีที่ 1..... 33
ภาพที่ 44	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a) วิธีที่ 2..... 34
ภาพที่ 45	การสังเคราะห์ indolinol (10a) 34
ภาพที่ 46	ผลการสังเคราะห์ <i>N</i> -benzoyl isatin (3a)..... 39
ภาพที่ 47	โครงสร้างของ 1-benzoylindoline-2,3-dione (3a)..... 39
ภาพที่ 48	ผลการสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5a)..... 40
ภาพที่ 49	โครงสร้างของ 3-((2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxy indolin-2-one (5a)... 41

	หน้า
ภาพที่ 50	ผลการสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5b)..... 42
ภาพที่ 51	โครงสร้างของ 3-((2-(5-methoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl -3-hydroxyindolin-2-one (5b)..... 43
ภาพที่ 52	ผลการสังเคราะห์ indolinol (6a)..... 44
ภาพที่ 53	โครงสร้างของ (3-((2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin -1-yl)(phenyl)methanone (6a)..... 45
ภาพที่ 54	ผลการสังเคราะห์ bis-indole (7a) วิธีที่ 1..... 46
ภาพที่ 55	ผลการสังเคราะห์ bis-indole (7a) วิธีที่ 2..... 47
ภาพที่ 56	โครงสร้างของสารที่คาดว่าจะเกิดจากชั้น aqueous phase ของการ สังเคราะห์ bis-indole (7a) วิธีที่ 2..... 48
ภาพที่ 57	ผลการสังเคราะห์ bis-indole (7a) วิธีที่ 3..... 49
ภาพที่ 58	โครงสร้างของ 3-((2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzylindoline -2,3-diol (6b) 50
ภาพที่ 59	ผลการสังเคราะห์ indolinol (6c)..... 51
ภาพที่ 60	โครงสร้างของ (2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl) amino)indolin-1-yl)(phenyl)methanone (6c)..... 51
ภาพที่ 61	ผลการสังเคราะห์ bis-indole (7c)..... 52
ภาพที่ 62	ผลการสังเคราะห์ bis-indole (7a) ด้วยปฏิกิริยา dehydration..... 53
ภาพที่ 63	การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a)..... 53
ภาพที่ 64	ผลการสังเคราะห์ <i>N</i> -Boc isatin (3b)..... 54
ภาพที่ 65	โครงสร้างของ tert-butyl 2,3-dioxindoline-1-carboxylate (3b)..... 54
ภาพที่ 66	ผลการสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5c)..... 55
ภาพที่ 67	โครงสร้างของ tert-butyl 3-((2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy -2-oxindoline-1-carboxylate (5c)..... 56
ภาพที่ 68	ผลการสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5d)..... 56
ภาพที่ 69	โครงสร้างของ tert-butyl 3-((2-(5-methoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino) -3-hydroxy-2-oxindoline-1-carboxylate (5d)..... 57
ภาพที่ 70	ผลการสังเคราะห์ indolinol (6d)..... 58

ภาพที่ 71	โครงสร้างของ tert-butyl 3-((2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindoline-1-carboxylate (6d).....	58
ภาพที่ 72	ผลการสังเคราะห์ bis-indole (9a).....	59
ภาพที่ 73	ผลการสังเคราะห์ indolinol (6e).....	60
ภาพที่ 74	โครงสร้างของ tert-butyl 2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-1-carboxylate (6e)	60
ภาพที่ 75	ผลการสังเคราะห์ bis-indole (9b).....	61
ภาพที่ 76	ผลการสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a).....	62
ภาพที่ 77	โครงสร้างของ 3-((2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxyindolin-2-one(8a).....	62
ภาพที่ 78	ผลการสังเคราะห์ indolinol (10a).....	63
ภาพที่ 79	โครงสร้างของ 3-((2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-2,3-diol (10a).....	63
ภาพที่ 80	การหาค่า EC ₅₀ ของ สารมาตรฐาน trolox ด้วยวิธี DPPH	64
ภาพที่ 81	การหาค่า EC ₅₀ ของ 6c ด้วยวิธี DPPH	65
ภาพที่ 82	ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i>	101
ภาพที่ 83	ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i>	101
ภาพที่ 84	ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus fumigatus</i>	101
ภาพที่ 85	ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา <i>Penicillium sp</i>	102
ภาพที่ 86	ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา <i>Rhizopus oligosporus</i>	102

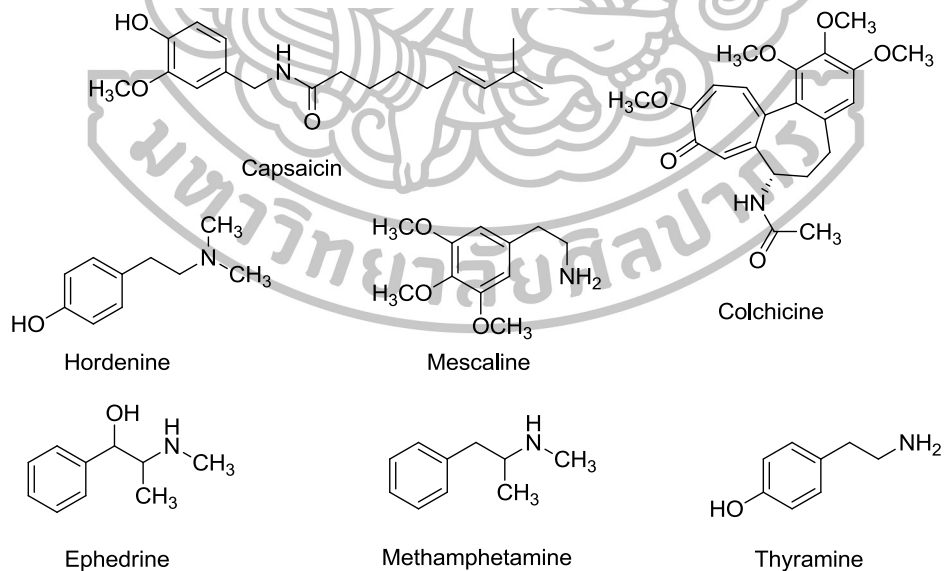
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

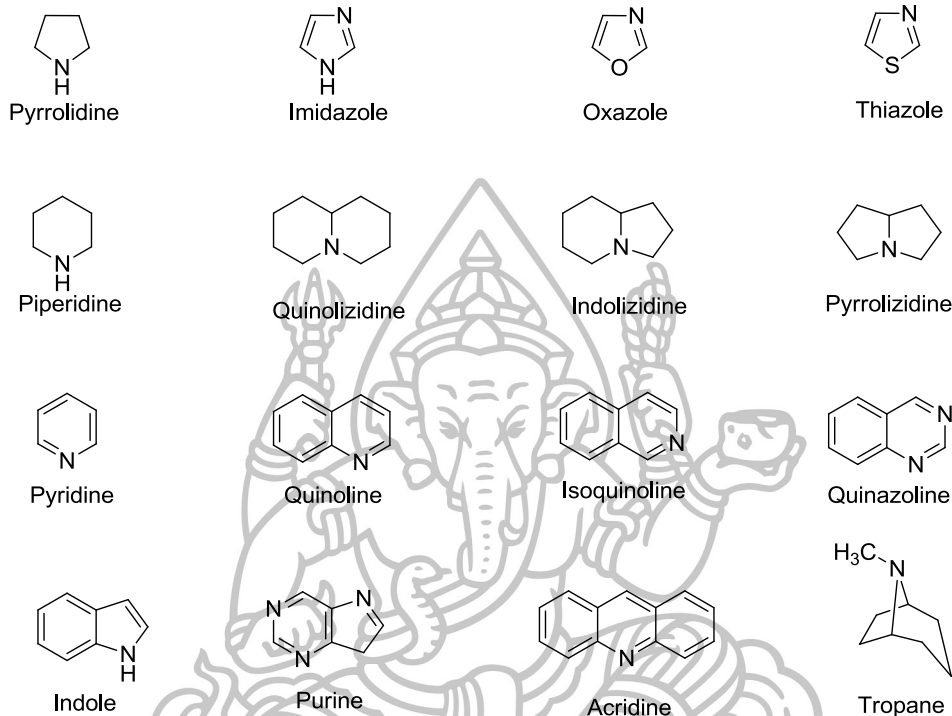
อัลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่พบมากในธรรมชาติ โดยเฉพาะตามส่วนต่างๆของพืชชั้นสูง เช่น เมล็ด ใบ ดอก ผล ราก และลำต้น แต่จะพบได้น้อยในพืชชั้นต่ำ สัตว์ และจุลินทรีย์ อัลคาลอยด์เป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยอะตอมของไนโตรเจน ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นเบส มีความหลากหลายทางโครงสร้างที่โดดเด่น โดยโครงสร้างของอัลคาลอยด์นอกจากมีอะตอมของคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจนแล้ว อาจมีออกซิเจน กำมะถัน และธาตุอื่นๆ เช่น คลอรีน โบรมีน รวมอยู่ด้วย [1] ทำให้สามารถแบ่งอัลคาลอยด์ตามโครงสร้างทางเคมี ได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

Protoalkaloids เป็นอัลคาลอยด์ที่มีไนโตรเจนอยู่นอกวง (non-heterocyclic alkaloids) และเกิดจากกรดอะมิโน เช่น Capsaicin, Colchicine และอนุพันธ์ของ Phenethylamine เช่น Hordenine, Mescaline, Ephedrine, Methamphetamine และ Thyramine เป็นต้น [2]



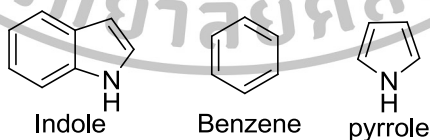
ภาพที่ 1 โครงสร้างตัวอย่างของ Protoalkaloid

True alkaloids เป็นอัลคาลอยด์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนของวง (heterocyclic alkaloids) และเกิดจากกรดอะมิโน ซึ่งอัลคาลอยด์ชนิดนี้จะมีโครงสร้างหลักที่หลากหลาย จึงแบ่งได้หลายประเภท ดังนี้



ภาพที่ 2 โครงสร้างหลักของ True alkaloids

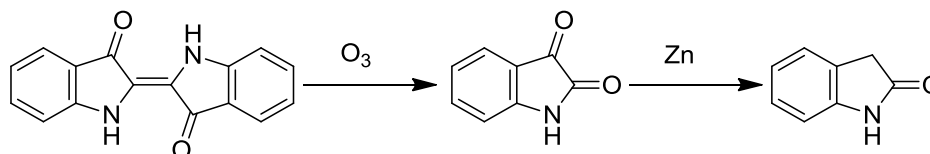
Indoles เป็นสารอินทรีย์ประเภทอัลคาลอยด์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของวง (heterocyclic alkaloids) ที่มีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยวงแหวน 2 วง (bicyclic structure) ของวงแหวนเบนซีน (benzene) 6 เหลี่ยม เชื่อมกับวงแหวนไพโรล (pyrrole) 5 เหลี่ยม ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างของ indole, benzene และ pyrrole

Indole มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า 2, 3-benzopyrrole มีสูตรโมเลกุลคือ C_8H_7N มวลโมเลกุล 117.45 g/mol สามารถสังเคราะห์ได้จากกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) ด้วยเอนไซม์ทริปโตเฟนเนส (tryptophanase) การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของอินโดล เริ่มศึกษาจากสิคราม หรือ

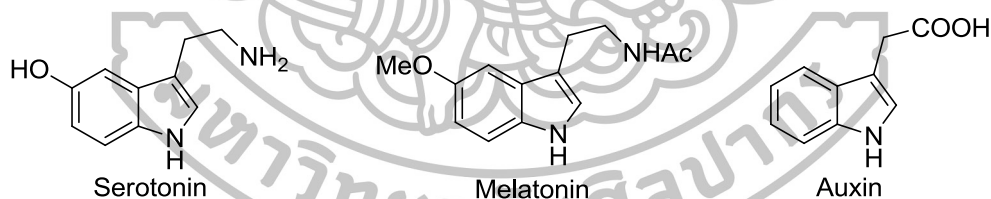
อินดิโก (indigo) ซึ่งเป็นสีชนิดหนึ่งที่ได้จากพืช อินดิโกสามารถเปลี่ยนเป็น ไอซาติน (isatin) ได้ และไอซาตินสามารถเปลี่ยนเป็นออกซิน โคล (oxindole) ได้ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอินดิโก

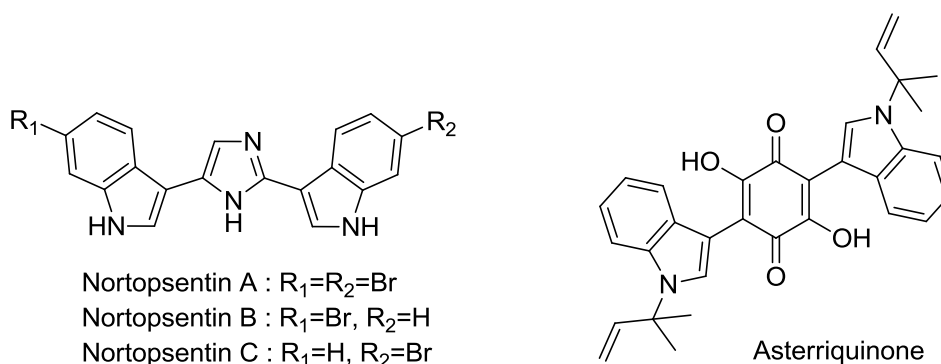
อนุพันธ์ของอินโดลหลายชนิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากพืช เห็ด รา หรือสิ่งมีชีวิตทางทะเล นักวิจัยพบว่าอนุพันธ์ของอินโดลบางชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพ บางชนิดมีความสามารถในการรักษาโรค และถูกพัฒนาเพื่อนำไปใช้เป็นยารักษาโรคในปัจจุบัน และบางชนิดถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของอินโดลชนิดอื่น ๆ อีกมากมาย ดังจะเห็นจากโครงสร้างของสารประกอบอินโดลต่อไปนี้

Mono indoles เป็นสารอินทรีย์ที่มีวงอินโดลเป็นส่วนประกอบภายในโมเลกุลเพียง 1 หน่วย เช่น สารในกลุ่มของ tryptamine derivatives ได้แก่ เซโรโทนิน (serotonin) เป็นสารสื่อประสาทที่ทำหน้าที่ส่งข้อมูลต่างๆ ในสมอง เมลาโทนิน (melatonin) เป็นฮอร์โมนที่ช่วยกระตุ้นการปรับเปลี่ยนนาฬิกาของร่างกาย ออกซิน (auxin) เป็นฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ดังภาพที่ 5



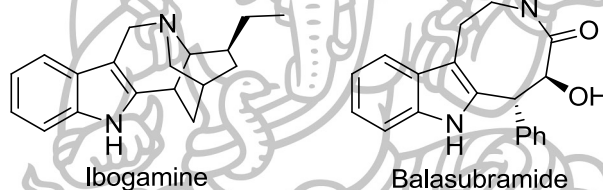
ภาพที่ 5 โครงสร้างตัวอย่างของ mono indoles

Bis-indoles เป็นสารประกอบอินโดลที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงอินโดล 2 หน่วยมาเชื่อมต่อกัน ซึ่งส่งผลให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น เช่น Nortopsentin A-C ที่ทำการแยกได้จากฟองน้ำทะเล *Spongosoroties ruetzleri* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P388 cells (IC₅₀ = 7.6, 7.8, 1.7 μg/mL ตามลำดับ) [3] Asterriquinone ที่ทำการแยกได้จาก *Aspergillus fungi* มีฤทธิ์ในการต้าน Ehrlich carcinoma และ ascites hepatoma AH13 ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P388 cells [4] แสดงโครงสร้างดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 โครงสร้างตัวอย่างของ bis-indoles

Annulated indoles เป็นสารประกอบอินโดลที่มีส่วนของวงอินโดลเชื่อมต่อกับวงอื่นๆ เช่น วง 6 เหลี่ยม วง 7 เหลี่ยม หรือวง 8 เหลี่ยม เช่น Ibogamine และ Balasubramide [5] แสดงโครงสร้างดังภาพที่ 7



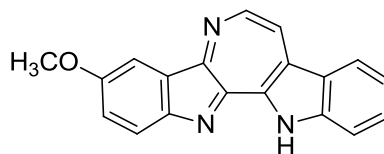
ภาพที่ 7 โครงสร้างตัวอย่างของ annulated indoles

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ให้ความสนใจสารสกัดจากธรรมชาติ Iheyamine A (1) ซึ่งเป็นสารประกอบอัลคาลอยด์ประเภท bis-indole ที่ทำการแยกได้จากเพรียงหัวหอม (ascidian) สปีชีส์ *Polycitorella* sp. (purple) (ภาพที่ 8) ที่พบบริเวณเกาะ Iheya เมือง Okinawa ประเทศญี่ปุ่น



ภาพที่ 8 ส่วนของเพรียงหัวหอม (ascidian) สปีชีส์ *Polycitorella* sp. (purple)

Iheyamine A มีโครงสร้างเป็น polycyclic heteroaromatic ที่ประกอบด้วย indole 2 หน่วย (bis-indole) เชื่อมด้วยวง 7 เหลี่ยม (azepine) แสดงโครงสร้างดังภาพที่ 9 มีการรายงานและยืนยันโครงสร้างในปี 1999 [6]



Iheyamine A

ภาพที่ 9 โครงสร้างของ Iheyamine A (1)

Iheyamine A และอนุพันธ์ ถูกค้นพบว่ามีให้นำมาใช้ประโยชน์มากมายในทางชีวภาพ เช่น มีฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (P388), เซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) [6]

ในปัจจุบันทรัพยากรในท้องทะเลมีจำนวนจำกัด อีกทั้ง Iheyamine A นี้แยกได้ในปริมาณที่น้อย เนื่องจากโครงสร้างและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะทำการสังเคราะห์ Iheyamine A (1) และอนุพันธ์ เพื่อนำไปศึกษาและพัฒนาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อพัฒนาการสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์
- 1.2.2 เพื่อนำ Iheyamine A และอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.3 นิยามศัพท์เฉพาะ

Abs	=	absorbance
anh. Na ₂ SO ₄	=	sodium sulphate anhydrous
Ar	=	argon
(Boc) ₂ O	=	di-tert-butyl dicarbonate
br	=	broad (NMR spectrum)
CH ₂ Cl ₂	=	dichloromethane
CH ₃ COOH	=	acetic acid
CH ₃ CN	=	acetonitrile
°C	=	องศาเซลเซียส
d	=	doublet (NMR spectrum)
dd	=	doublet of doublet (NMR spectrum)

DBU	=	1,8-diazabicycloundec-7-ene
DMAP	=	4-dimethylaminopyridine
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
EtOAc	=	ethyl acetate
EtOH	=	ethanol
Et ₃ N	=	triethylamine
equiv	=	equivalent
g	=	gram
h	=	hour
HCl	=	hydrochloric acid
H ₂ O	=	water
H ₂ SO ₄	=	sulfuric acid
KOH	=	potassium hydroxide
LiAlH ₄	=	lithium aluminium hydride
m	=	multiplet (NMR spectrum)
MeOH	=	methanol
mg/mL	=	milligram per milliliter
µg/µL	=	microgram per microliter
min	=	minute
mL	=	มิลลิลิตร
mmol	=	millimole
MW	=	microwave
NaBH ₄	=	sodium borohydride
NaOH	=	sodium hydroxide
nm	=	nanometer
PLC	=	preparative-layer chromatography
q	=	quartet (NMR spectrum)
rt	=	room temperature
s	=	singlet (NMR spectrum)
t	=	triplet (NMR spectrum)

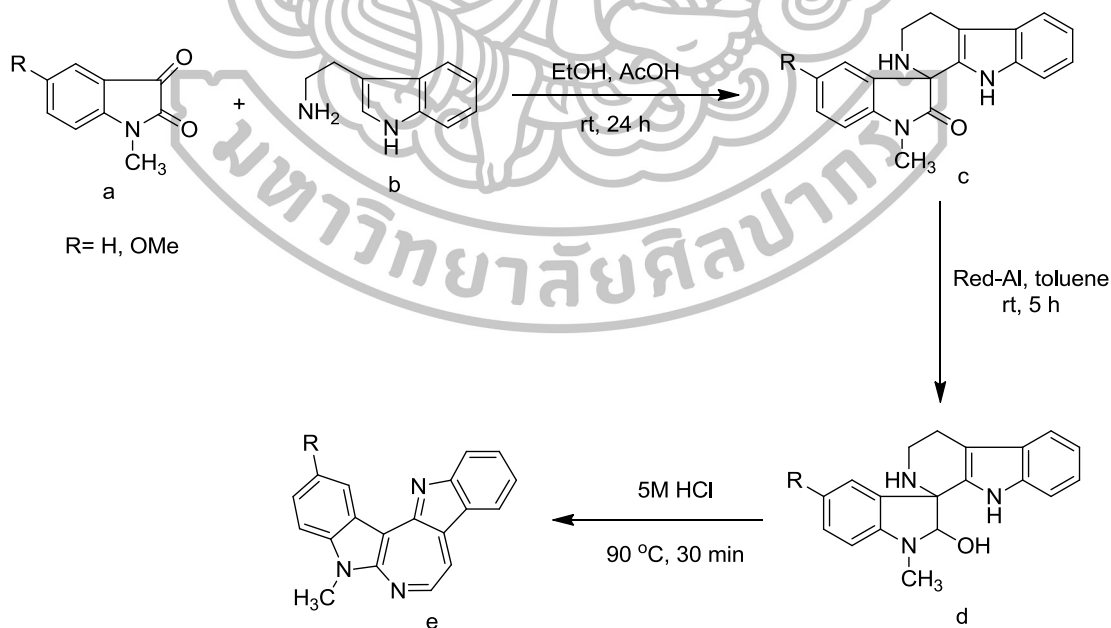
td	=	triplet of doublet (NMR spectrum)
TFA	=	trifluoroacetic acid
THF	=	tetrahydrofuran
TLC	=	thin-layer chromatography
W	=	watt



บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันมีนักวิจัยจำนวนมากที่ได้ให้ความสนใจกับสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติในกลุ่มของ indole alkaloids เนื่องจากสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรมจำนวนมาก ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ให้ความสนใจกับสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่มีโครงสร้างเป็น bis-indole alkaloids คือ Iheyamine A ซึ่งมีฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (P388) เซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) พบว่ามีการรายงานก่อนหน้านี้ ได้มีผู้วิจัยให้ความสนใจและได้เสนอแนวทางการสังเคราะห์ไว้ดังนี้

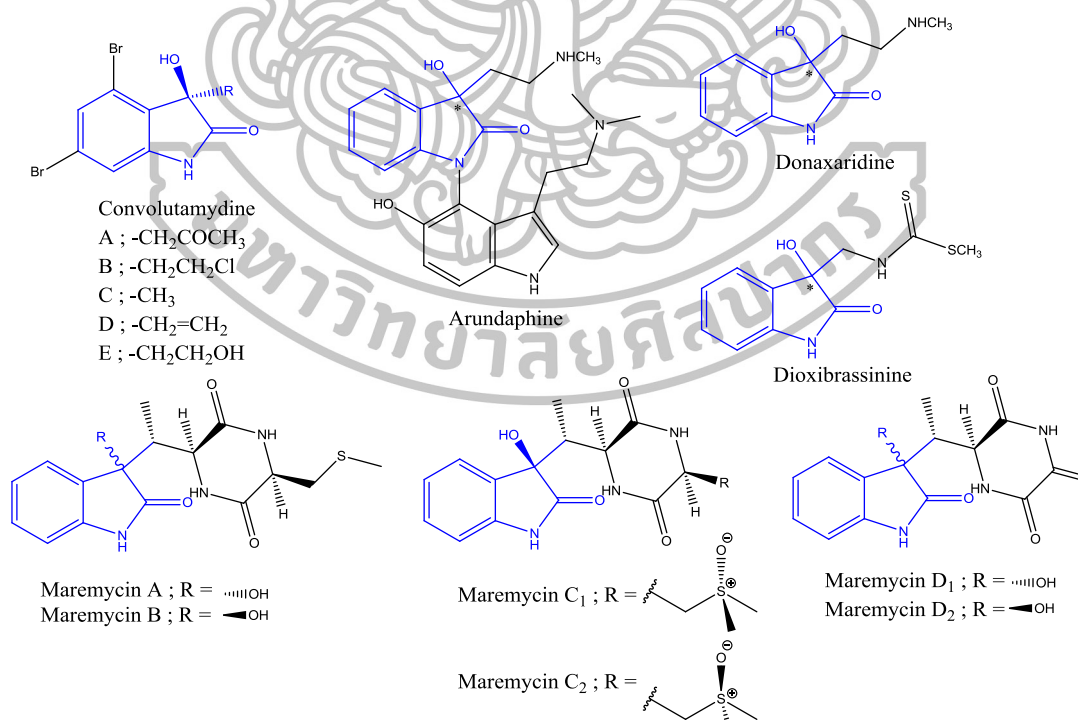
ในปี 2005 Bremner, J. B. และคณะ [7] ได้ทำการสังเคราะห์ Isomeric Iheyamine A ไว้โดยเตรียมจากปฏิกิริยา condensation ระหว่าง isatin (a) และ tryptamine (b) ได้เป็นสารประกอบ spiro indole (c) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา reduction โดยใช้ Red-Al เกิดเป็น indolinol (d) แล้วนำมาทำปฏิกิริยา rearrangement เกิดเป็นสารประกอบ Isomeric Iheyamine A (e) ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 การสังเคราะห์ของ Isomeric Iheyamine โดย Bremner, J. B. และคณะ

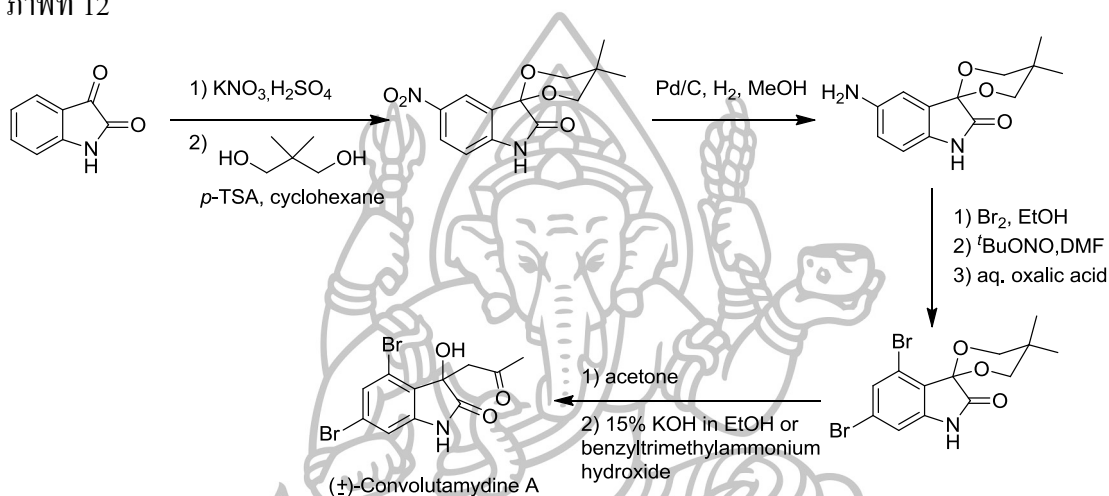
ซึ่งในปัจจุบัน ยังไม่พบการรายงานการสังเคราะห์ Iheyamine A ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์ เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

มีการรายงานก่อนหน้านี้ เกี่ยวกับการแยกสกัดสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติของสารประกอบอินโดลในกลุ่มของ 3-hydroxy-2-oxindole ที่มีการแทนที่ที่ตำแหน่งที่ C-3 ของวง indole ด้วยหมู่แทนที่ต่างๆ (ภาพที่ 11) เช่น Convolutamydine A-E ที่ทำการแยกได้จาก *Amathia convoluta* โดย Yoshiaki, K. และคณะ ในปี 1994 และ 1995 [8,9] Donaxaridine [11] Arundaphine ทำการแยกได้จากราก และไรโซมของ *Arundo donax* L. (Poaceae) ในปี 2004 โดย Khuzhaev, V. U. และคณะ [13] Dioxibrassinine ทำการแยกได้จาก *Pseudomonas cichorii* ที่อยู่ใน Chinese cabbages และ Japanese radishes [14] Maremycin A-B ถูกแยกได้จากฟองน้ำทะเล *Streptomyces* sp. โดย Wiebke, B.B. และคณะ ในปี 1995 [16] และ Maremycin C-F ถูกแยกโดย Tang, Y.Q. และคณะ ในปี 2001 [17] ซึ่งได้มีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น การต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อไวรัส HIV เป็นต้น ทำให้นักวิจัยจำนวนมากสนใจทำการแยกสกัดสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ และเสนอแนวทางในการสังเคราะห์ที่หลากหลาย ดังตัวอย่างต่อไปนี้



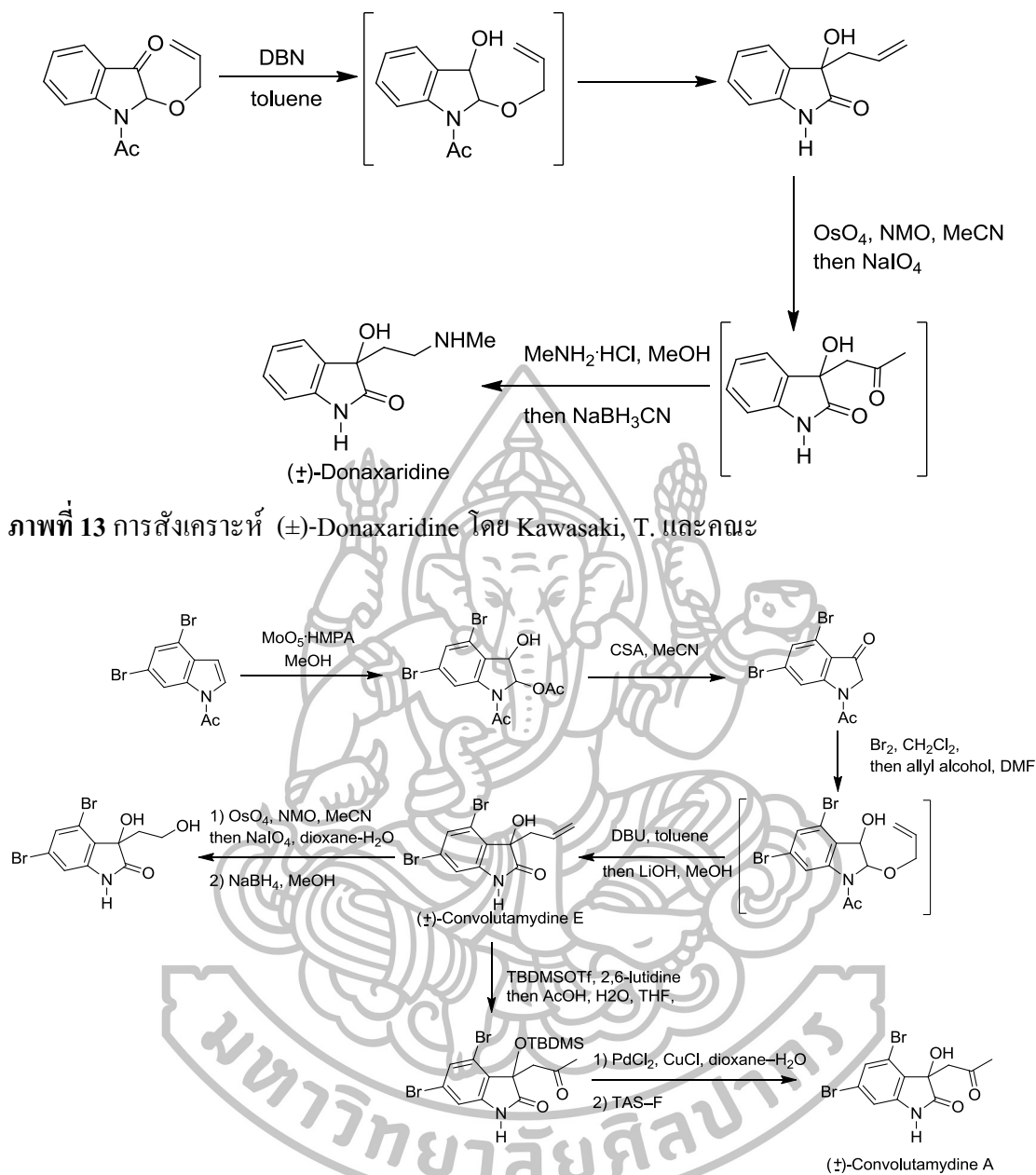
ภาพที่ 11 โครงสร้างตัวอย่างของ 3-hydroxy-2-oxindole ที่เป็นสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ

ในปี 1999 Jnaneshwar, G. K. และ Deshpande, V. H. [10] ได้รายงานแนวทางการสังเคราะห์ของ Convolutamydine A โดยเริ่มต้นจาก isatin ทำปฏิกิริยากับ potassium nitrate ใน sulfuric acid แล้วทำการ protects หมู่ keto ด้วย 2,2-dimethylpropane-1,3-diol เกิดเป็น nitroketal จากนั้น ทำปฏิกิริยา hydrogenation, bromination, deamination, deprotection เกิดเป็น 4,6-dibromoisatin และทำปฏิกิริยา condensation ด้วย acetone โดยใช้เบสเป็น 15% ethanolic KOH หรือ benzyltrimethylammonium hydroxide ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (\pm)-Convolutamydine A แสดงดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 การสังเคราะห์ (\pm)-Convolutamydine A โดย Jnaneshwar, G. K. และ Deshpande, V. H.

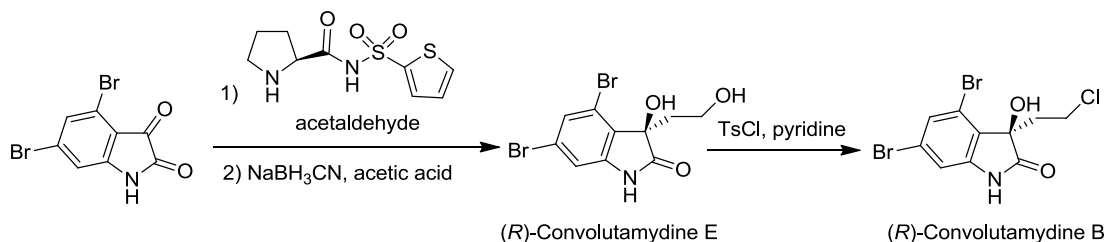
ในปี 2004 Kawasaki, T. และคณะ [11] ได้รายงานแนวทางการสังเคราะห์ของ (\pm)-donaxaridine โดยนำ 2-allyloxyindolin-3-ones มาทำปฏิกิริยาเกิดผ่านปฏิกิริยา enolization–Claisen rearrangement, transformation และ oxidation ด้วย OsO_4 ตามด้วยปฏิกิริยา reductive amination แสดงดังภาพที่ 13 และแนวทางการสังเคราะห์ (\pm)-Convolutamydines A และ E โดยนำ 4,6-dibromoindole ทำปฏิกิริยา oxidation และ demethoxylation เกิดเป็น dibromoketone จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา bromination และ enolization–Claisen rearrangement ด้วย DBU เกิดปฏิกิริยา hydrolysis ด้วย LiOH ได้เป็น allene alcohol แล้วนำมาทำปฏิกิริยา oxidation และ reduction ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (\pm)-Convolutamydine E นำ allyl alcohol มาทำปฏิกิริยา protection alcohol ด้วย TBDMS และ Wacker oxidation จากนั้น deprotection ด้วย tris(dimethylamino)sulfur(trimethyl silyl) difluoride (TAS-F) เกิดผลิตภัณฑ์เป็น (\pm)-Convolutamydine A แสดงดังภาพที่ 14



ภาพที่ 13 การสังเคราะห์ (±)-Donaxaridine โดย Kawasaki, T. และคณะ

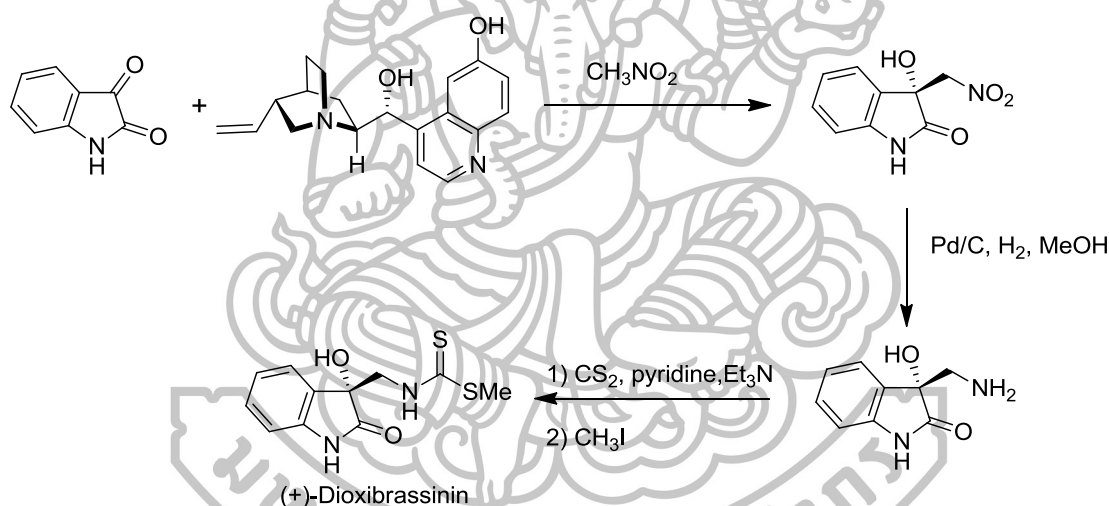
ภาพที่ 14 การสังเคราะห์ (±)-Convolutamydine A และ E โดย Kawasaki, T. และคณะ

ในปี 2009 Noriyuki, H. และคณะ [12] เป็นผู้เริ่มทำการสังเคราะห์แบบ enantioselective synthesis โดยเสนอการสังเคราะห์ของ (*R*)-Convolutamydines B and E เกิดปฏิกิริยา crossed-aldol ของ acetaldehyde ด้วย isatin โดยใช้ chiral catalysts เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นเกิดปฏิกิริยา reduction ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (*R*)-Convolutamydines E แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ TsCl เกิดปฏิกิริยา reduction ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (*R*)-Convolutamydines B แสดงดังภาพที่ 15



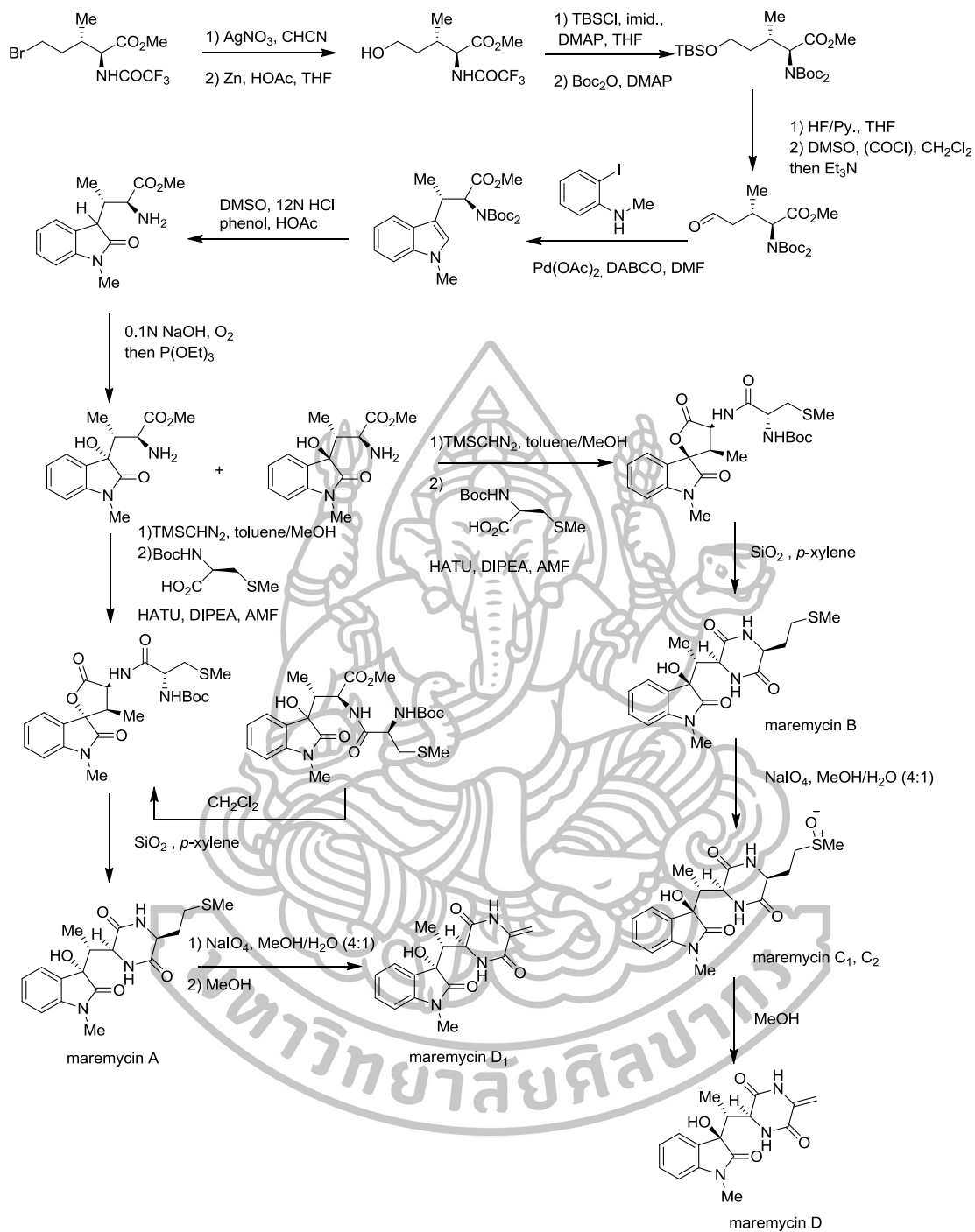
ภาพที่ 15 การสังเคราะห์ (R)-Convolutamydine B และ E โดย Noriyuki, H. และคณะ

ในปี 2011 Liu, L. และคณะ [15] ได้เสนอการสังเคราะห์ของ (+)-Dioxibrassinin โดยเกิด Henry reactions ของ isatins และ nitroalkanes โดยมีสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ cupreine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็นสารประกอบในไตร จากนั้นเกิดปฏิกิริยา hydrogenation, transformation และ intramolecular nucleophilic substitution ทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ (+)-Dioxibrassinin แสดงดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 การสังเคราะห์ (+)-Dioxibrassinin โดย Liu, L. และคณะ

ในปี 2012 Yonghua, L. และคณะ [18] ได้เสนอการสังเคราะห์ของ Maremycin A-D โดยเริ่มต้นการสังเคราะห์จากปฏิกิริยา reduction ของสารประกอบ bromide ด้วย Zn และทำการ protect หมู alcohol และ amine ด้วย TBSCl และ Boc_2O ตามลำดับ จากนั้นทำปฏิกิริยา desilylation ของ TBS และ oxidized โดยใช้ Swern oxidation แล้วทำการ coupling โดยใช้ Pd-catalyzed, oxidation และ deprotect Boc เกิดเป็นสารประกอบ oxindole นำไปสู่การสังเคราะห์ในขั้นต่อไป เพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็น Maremycin A-D ดังแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 17 การสังเคราะห์ของ Maremycin A-D โดย Yonghua, L. และคณะ

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.1.1 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance 300 MHz: Bruker 300
- 3.1.2 เครื่อง UV-visible spectrometer: Perkin Elmer model Lamda 35
- 3.1.3 เครื่อง Mass spectrometer: ESI-FT-ICR (High resolution) Bruker BioAPEX 70e spectrometer
- 3.1.4 เครื่อง Stuart SMP2 melting point apparatus
- 3.1.5 เครื่อง Rotary evaporator: Buchi Rotavapor R-114
- 3.1.6 เครื่อง Vacuum pump: Tokyo Rikakikai Co., Ltd. model A-3S
- 3.1.7 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Mettler Toledo model AB204
- 3.1.8 เครื่อง Ultrasonic Bath : Elmasonic S 30 H
- 3.1.9 เครื่อง Hotplate and stirrer: Heidolph MR 3001
- 3.1.10 Micropipette: Finnpiptette, HH10711 ขนาด 1-10 μ L
- 3.1.11 TLC Silica gel 60 F₂₅₄ aluminium sheet, Merck
- 3.1.12 อุปกรณ์สำหรับเตรียมแผ่น preparative TLC: Desaga Brinkmann
- 3.1.13 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 mm และ 70 mm
- 3.1.14 เครื่องแก้วพื้นฐาน
- 3.1.15 คอลัมน์
- 3.1.16 Sealed tube
- 3.1.17 ชุดกรองแบบลดความดัน
- 3.1.18 Parafilm
- 3.1.19 หลอด และเข็มฉีดยา
- 3.1.20 แท่งแม่เหล็ก
- 3.1.21 Clamp และ Clamp Hold

3.2 สารเคมีที่ใช้

- 3.2.1 Acetonitrile (Lab-Scan)
- 3.2.2 Argon gas (Masser Specialty Gas Co., Ltd.)
- 3.2.3 Benzoyl chloride (Fluka)
- 3.2.4 Benzophenone (Acros)
- 3.2.5 Borane tetrahydrofuran (Fluka)
- 3.2.6 Chloroform-*d* contains 1% v/v of TMS (Sigma-Aldrich)
- 3.2.7 1,8-Diazabicycloundec-7-ene (Fluka)
- 3.2.8 4-Dimethylaminopyridine (Merck)
- 3.2.9 Dichloromethane (distillation)
- 3.2.10 Dimethyl sulfoxide (BDH VWR Analytical)
- 3.2.11 Di-tert-butyl dicarbonate (Fluka)
- 3.2.12 Ethanol (distillation)
- 3.2.13 Ethanol (absolute for analysis) (Merck)
- 3.2.14 Ethylacetate (distillation)
- 3.2.15 Glacial acetic acid (Merck)
- 3.2.16 Hexane (distillation)
- 3.2.17 Hydrochloric acid (S D fined chem limited)
- 3.2.18 Isatin (Fluka)
- 3.2.19 Lithium aluminium hydride
- 3.2.20 5-methoxytryptamine (Fluka)
- 3.2.21 Methanol (distillation)
- 3.2.22 Methanol-*d* (Sigma-Aldrich)
- 3.2.23 Mueller – Hinton agar
- 3.2.24 Nutrient Broth Solution (Himedia)
- 3.2.25 Palladium acetate: (Fluka)
- 3.2.26 Paraffin oil
- 3.2.27 Potassium hydroxide (Fluka)
- 3.2.28 Potato dextrose agar (Daejung)
- 3.2.29 Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) สำหรับ column chromatography (Merck)

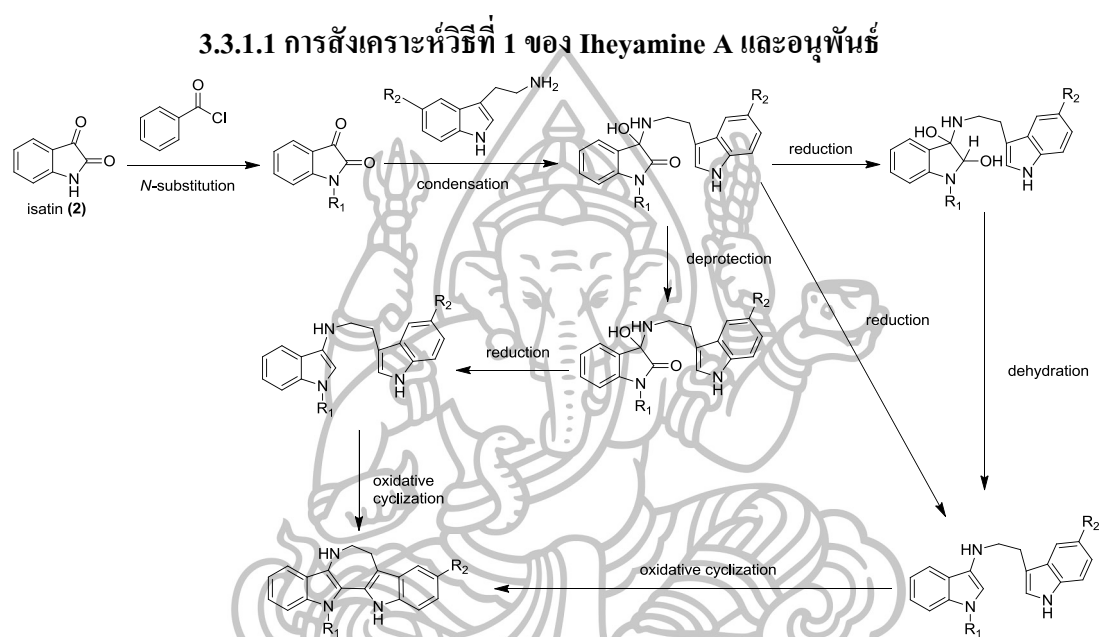
- 3.2.30 Silica gel 60 F₂₅₄ containing gypsum สำหรับ preparative thin layer chromatography (Merck)
- 3.2.31 Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich)
- 3.2.32 Sodium borohydride (Sigma-Aldrich)
- 3.2.33 Sodium chloride
- 3.2.34 Sodium hydroxide (Fluka)
- 3.2.35 Sodium metal (PRS Panreac)
- 3.2.36 Sodium sulfate anhydrous (Sigma-Aldrich)
- 3.2.37 Sulfuric acid (Carlo Erba)
- 3.2.38 Tetrahydrofuran (A.R.) (Lab-scan)
- 3.2.39 Triethylamine (Ridel-de-Haen)
- 3.2.40 Trifluoroacetic acid (Ridel-de-Haen)
- 3.2.41 Tryptamine (Acros)



3.3 วิธีการทดลอง

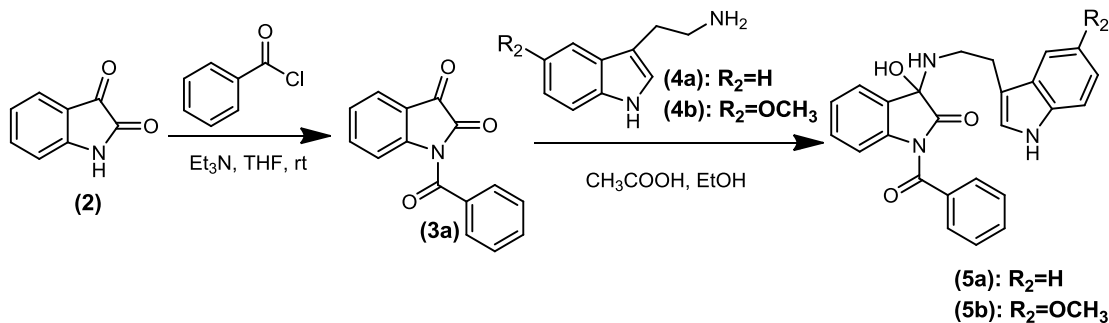
3.3.1 การสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์

ในการสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์ จะเริ่มสังเคราะห์จาก isatin (2) โดยผ่านปฏิกิริยาทั้งหมด 4 ขั้นตอน มีปฏิกิริยาที่สำคัญคือ *N*-substitution, condensation, reduction และ oxidative cyclization โดยผู้วิจัยได้เสนอแนวทางการสังเคราะห์ทั้งหมด 2 แนวทาง ดังต่อไปนี้



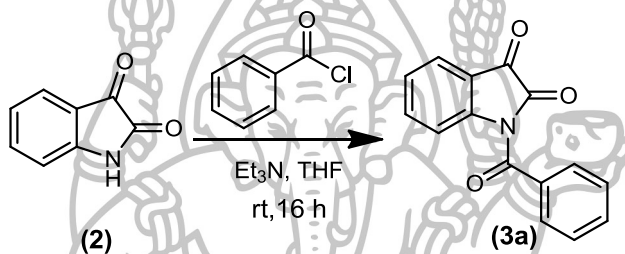
ภาพที่ 18 การสังเคราะห์วิธีที่ 1 ของ Iheyamine A และอนุพันธ์

ผู้วิจัยได้เริ่มทำการสังเคราะห์จาก isatin (2) เกิดปฏิกิริยา *N*-substitution กับ benzoyl chloride โดยมี triethylamine เป็นเบส เกิดเป็น *N*-benzoyl isatin (3a) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา condensation ด้วย tryptamine (4a) และ 5-methoxytryptamine (4b) (ภาพที่ 19) โดยมี glacial acetic acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ 3-hydroxy-2-oxindole (5a) และ (5b) ตามลำดับ ซึ่งผู้วิจัยได้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยา condensation ของ *N*-benzoyl isatin (3a) และ tryptamine (4a) ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน 5 วิธี ดังแสดงในตารางที่ 1 และได้นำสภาวะดังกล่าวมาใช้ในการเกิดปฏิกิริยา condensation ของ *N*-benzoyl isatin (3a) และ 5-methoxytryptamine (4b) ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน 2 วิธี ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 19 การสังเคราะห์ของ 3-hydroxy-2-oxindole (5a) และ (5b)

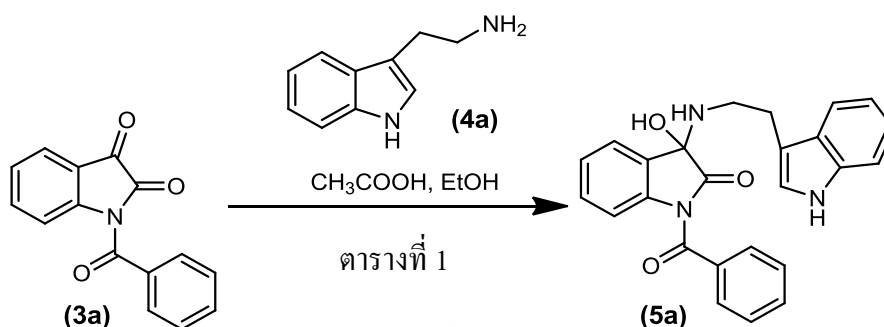
การสังเคราะห์ 1-benzoylindoline-2,3-dione (3a)



ภาพที่ 20 การสังเคราะห์ N-benzoyl isatin (3a)

นำ isatin (2) 2.40 g (16.30 mmol, 1.0 equiv) ใส่ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม dry THF 28.80 mL ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศ Ar กวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลาย Et_3N 2.48 mL (17.78 mmol, 1.1 equiv) กวนเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นค่อยๆเติม benzoyl chloride 2.08 mL (17.93 mmol, 1.1 equiv) กวนที่อุณหภูมิห้อง 16 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) ทำการระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ จากนั้นเติมน้ำ แล้วกรองตะกอนที่ได้แบบลดความดัน ล้างตะกอนด้วย EtOH เพียงเล็กน้อย จะได้ผลิตภัณฑ์ดิบมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกผลึกซ้ำโดยใช้ CH_2Cl_2

การสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (**5a**)



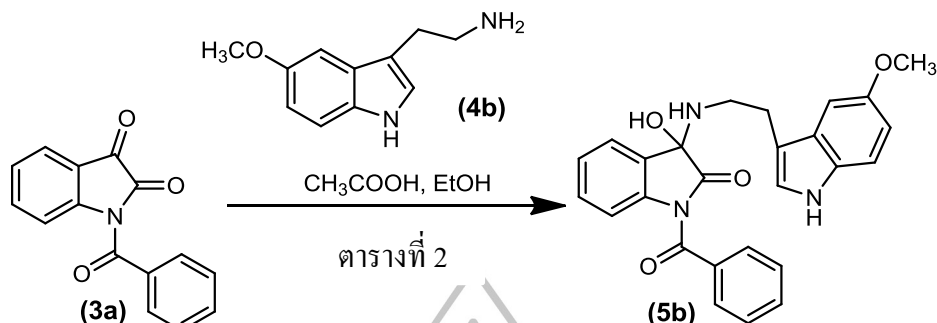
ภาพที่ 21 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**)

นำสาร *N*-benzoyl isatin (**3a**) 0.14 g (0.56 mmol, 1.0 equiv) ใส่ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม ethanol จากนั้นเติม glacial acetic acid 0.02 mL กวนประมาณ 5 นาที เติม tryptamine (**4a**) 0.15 g (0.99 mmol, 1.7 equiv) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาตามสภาวะในตารางที่ 1 จากนั้นเติมน้ำแล้วนำมาสกัดด้วย EtOAc นำชั้น EtOAc กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (4:1) เป็น mobile phase

ตารางที่ 1 การสังเคราะห์ของ 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) ที่สภาวะต่างๆ

วิธีที่	สภาวะของปฏิกิริยา
1	EtOH, CH ₃ COOH, MW 850 W, 16 min
2	EtOH, CH ₃ COOH, reflux, overnight
3	EtOH, CH ₃ COOH, sealed tube, overnight
4	EtOH, CH ₃ COOH, sonicated 50°C, 2 h
5	EtOH, CH ₃ COOH, rt, overnight

การสังเคราะห์ 3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (5b)



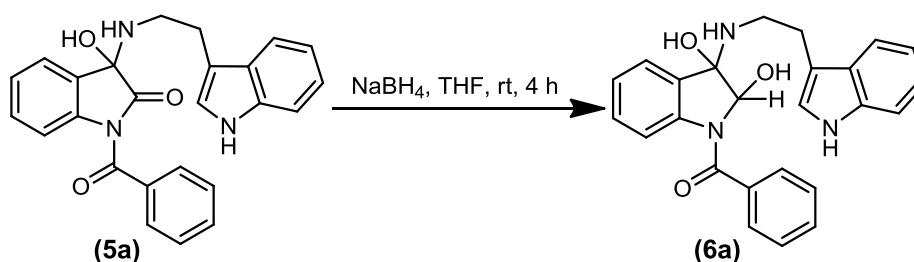
ภาพที่ 22 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5b)

นำสาร *N*-benzoyl isatin (3a) 0.13 g (1.0 equiv) ใส่ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม ethanol จากนั้นเติม glacial acetic acid 0.02 ml กวนประมาณ 5 นาที เติม 5-methoxytryptamine (4b) 0.15 g (1.5 equiv) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วทำปฏิกิริยาตามสภาวะในตารางที่ 2 จากนั้นเติมน้ำ แล้วนำมาสกัดด้วย EtOAc นำชั้น EtOAc กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์สีดิบ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (4:1) เป็น mobile phase

ตารางที่ 2 การสังเคราะห์ของ 3-hydroxy-2-oxindole (5b) ที่สภาวะต่างๆ

วิธีที่	สภาวะของปฏิกิริยา
1	EtOH, CH_3COOH , reflux, overnight
2	EtOH, CH_3COOH , rt, overnight

การสังเคราะห์ (3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl)(phenyl)methanone (6a)



ภาพที่ 23 การสังเคราะห์ indolinol (6a)

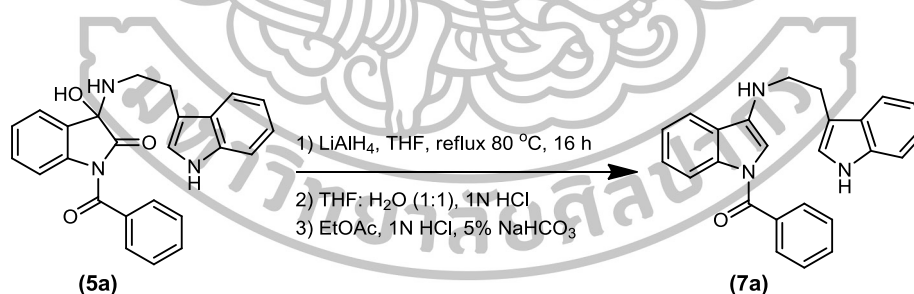
นำสาร 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) 0.13 g (0.31 mmol, 1.0 equiv) ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม THF 10 mL ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศ Ar ทำการกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม NaBH₄ 0.03 g (0.86 mmol, 3.0 equiv) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) แล้วกรองสารละลายแบบลดความดันโดยผ่าน celite แล้วล้างด้วย diethyl ether ประมาณ 100 mL นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (2:1) เป็น mobile phase

ตารางที่ 3 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**6a**) ที่สภาวะต่างๆ

สภาวะของปฏิกิริยา	NaBH ₄ (equiv)
NaBH ₄ , THF, rt, 4 h	2
	2.5
	3

การสังเคราะห์ (3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indol-1-yl)(phenyl)methanone (**7a**)

วิธีที่ 1

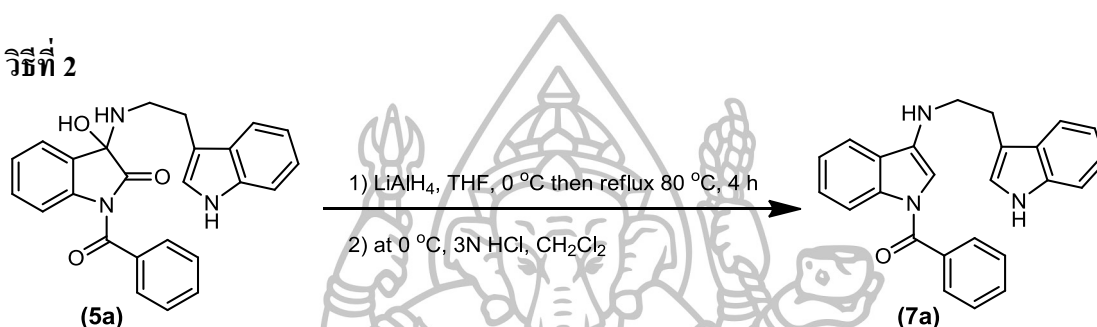


ภาพที่ 24 การสังเคราะห์ bis-indole (**7a**) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) วิธีที่ 1

นำสาร 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) 0.05 g (0.13 mmol, 1.0 equiv) ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม dry THF 5 mL ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศ Ar ทำการกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการเติม LiAlH₄ ตามปริมาณของสภาวะการเกิดปฏิกิริยาในตารางที่ 3 กวนที่อุณหภูมิห้อง จนฟองแก๊ส H₂ ลดลงจากนั้นทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C โดยวิธี reflux เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) หยดปฏิกิริยาด้วย THF:H₂O (1:1)

จนฟองแก๊ส H_2 ลดลง และเติมสารละลาย 1N HCl 15 mL กรองสารละลายแบบลดความดัน แล้วล้างด้วย CH_2Cl_2 และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ จากนั้นละลายด้วย EtOAc แล้วทำการสกัดด้วยสารละลาย 1N HCl (1x20 mL), 5% $NaHCO_3$ (2x20 mL) และน้ำ (1x20 mL) ตามลำดับ จากนั้นนำชั้น EtOAc กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhydrous Na_2SO_4 กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (2:1) เป็น mobile phase

วิธีที่ 2

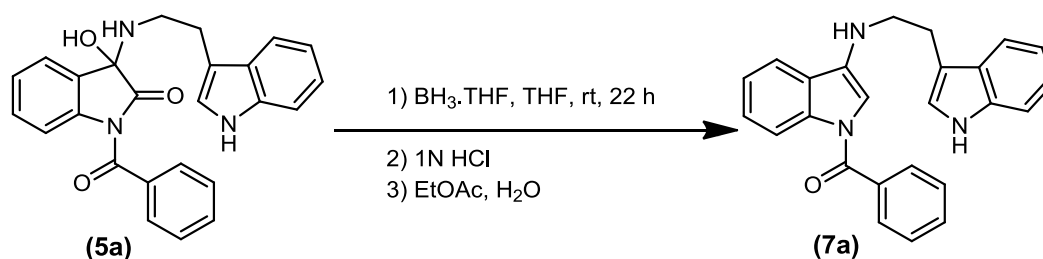


ภาพที่ 25 การสังเคราะห์ bis-indole (7a) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5a) วิธีที่ 2

นำสาร 3-hydroxy-2-oxindole (5a) 0.08 g (0.21 mmol, 1.0 equiv) ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม dry THF 5 mL ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศ Ar ทำการกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปเติมลงขวดก้นกลมที่มี $LiAlH_4$ ตามปริมาณของสภาวะการเกิดปฏิกิริยาในตารางที่ 3 ใน dry THF 5 mL ที่อุณหภูมิ $0\text{ }^\circ\text{C}$ ภายใต้บรรยากาศ Ar จนฟองแก๊ส H_2 ลดลง จากนั้นทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ $80\text{ }^\circ\text{C}$ โดยวิธี reflux เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยค่อยๆหยดสารละลาย 3N HCl 15 mL ที่อุณหภูมิ $0\text{ }^\circ\text{C}$ จนฟองแก๊ส H_2 ลดลง เติมน้ำ 20 mL แล้วนำมาสกัดด้วย CH_2Cl_2 (2x20 mL) นำชั้น CH_2Cl_2 กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhydrous Na_2SO_4 กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (2:1) เป็น mobile phase

นำชั้น aqueous phase ที่ตั้งทิ้งไว้ที่บรรยากาศมาสกัดด้วย EtOAc พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ดิบ เป็นของแข็งสีม่วงทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (1:1) เป็น mobile phase

วิธีที่ 3



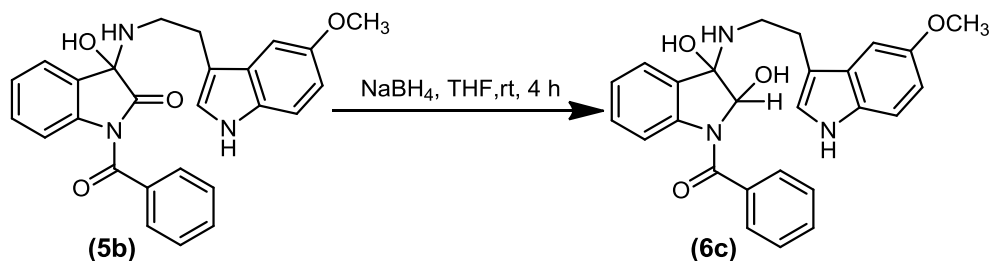
ภาพที่ 26 การสังเคราะห์ bis-indole (7a) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5a) วิธีที่ 3

นำสาร 3-hydroxy-2-oxindole (5a) 0.10 g (0.25 mmol, 1.0 equiv) ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม dry THF 3.5 mL ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศ Ar ทำการกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการเติม $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ 0.07 mL (0.75 mmol, 3.0 equiv) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 22 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) จากนั้นเติมสารละลาย 1N HCl 15 mL แล้วทำการสกัดด้วย EtOAc (2x20 mL) นำชั้น EtOAc มาล้างด้วยน้ำ 15 mL กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (2:1) เป็น mobile phase

ตารางที่ 4 การสังเคราะห์ bis-indole (7a) ที่สภาวะต่างๆ

วิธีที่	สภาวะของปฏิกิริยา	reagent (equiv)
1	1) LiAlH_4 , THF, reflux 80°C , 16 h	7
	2) THF: H_2O (1:1), 1N HCl	10
	3) EtOAc, 1N HCl, 5% NaHCO_3	
2	1) LiAlH_4 , THF, 0°C then reflux 80°C , 4 h	3
	2) at 0°C , 3N HCl, CH_2Cl_2	6
		12
3	1) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, THF, rt, 16 h 2) 1N HCl 3) EtOAc, H_2O	3

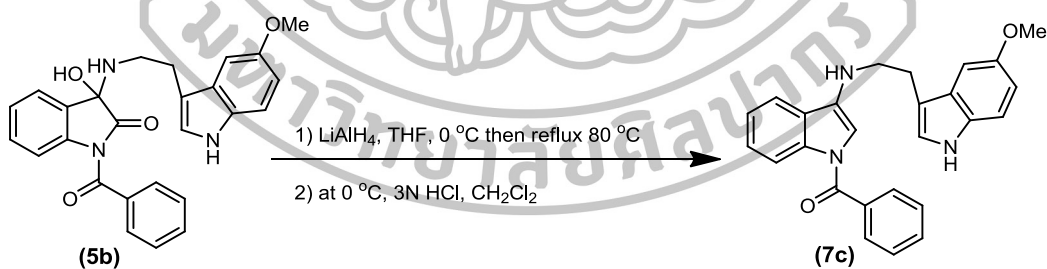
การสังเคราะห์ (2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indolin-1-yl)(phenyl)methanone (6c)



ภาพที่ 27 การสังเคราะห์ indolinol (6c)

นำสาร 3-hydroxy-2-oxindole (5b) 0.02 g (0.06 mmol, 1.0 equiv) ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม THF 5 mL ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศ Ar ทำการกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการเติม NaBH_4 0.01 g (0.18 mmol, 3.0 equiv) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) แล้วกรองสารละลายแบบลดความดันโดยผ่าน celite แล้วล้างด้วย diethyl ether ประมาณ 100 mL นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (2:1) เป็น mobile phase

การสังเคราะห์ 3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indol-1-yl)(phenyl)methanone (7c)

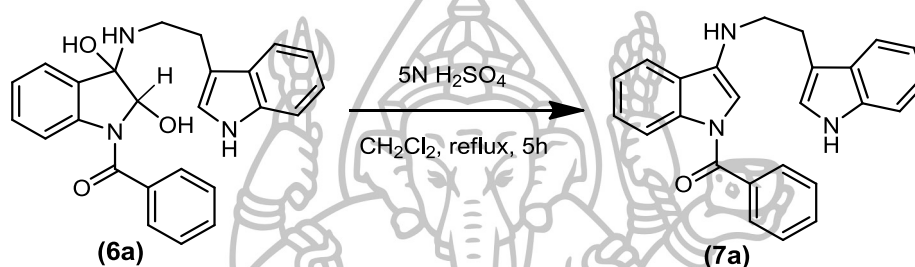


ภาพที่ 28 การสังเคราะห์ bis-indole (7c) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5b)

นำสาร 3-hydroxy-2-oxindole (5b) 0.06 g (0.14 mmol, 1.0 equiv) ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม dry THF 5 mL ที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศ Ar ทำการกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปเติมลงขวดก้นกลมที่มีสารละลาย LiAlH_4 0.03 g (0.83 mmol, 6.0 equiv) ใน dry THF 3.0 mL ที่อุณหภูมิ 0 °C ภายใต้บรรยากาศ Ar จนฟองแก๊ส H_2 ลดลง จากนั้นทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C โดยวิธี reflux เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography

(TLC) จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยค่อยๆหยดสารละลาย 3N HCl 15 mL ที่อุณหภูมิ 0°C จนฟองแก๊ส H₂ ลดลง เติมน้ำ 20 mL แล้วนำมาสกัดด้วย CH₂Cl₂ (2x20 mL) นำชั้น CH₂Cl₂ กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anh. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane: EtOAc (2:1) เป็น mobile phase

การสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indol-1-yl(phenyl)methanone (7a) ด้วยปฏิกิริยา dehydration

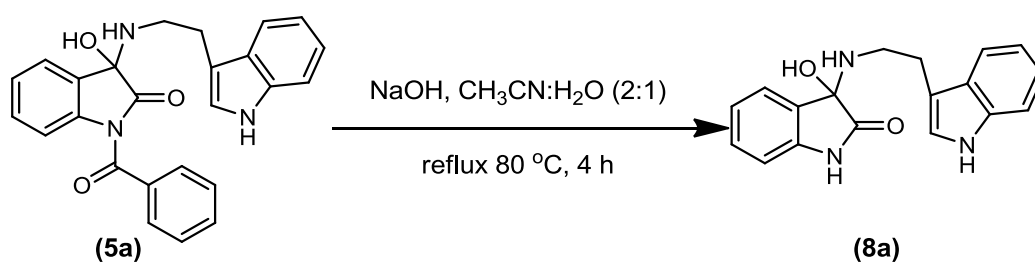


ภาพที่ 29 การสังเคราะห์ bis-indole (7a) จาก indolinol (6a)

นำ indolinol (6a) 0.13 g (0.30 mmol, 1.0 equiv) มาละลายใน CH₂Cl₂ 6 mL และเติม 1N H₂SO₄ 12 mL จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยวิธีการ reflux ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) ที่ให้เอ็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาสกัดด้วยสารละลายอิ่มตัว NaHCO₃ (2x20 mL) และ brine (1x20 mL) ตามลำดับ จากนั้นนำชั้น CH₂Cl₂ กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anh. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ

การสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxyindolin-2-one (8a)

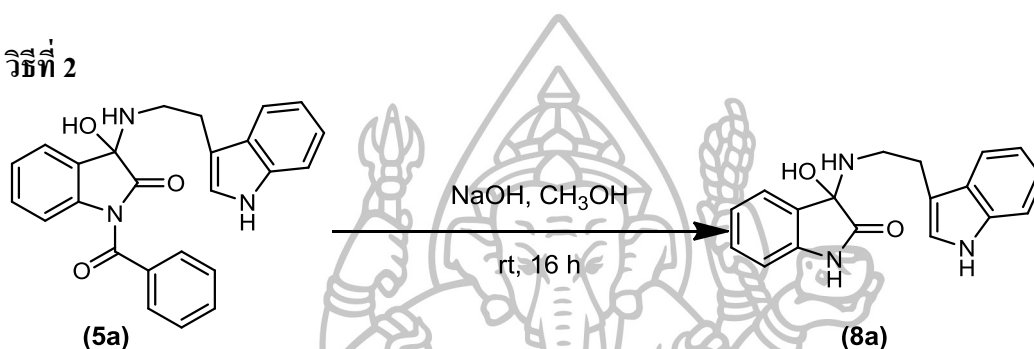
วิธีที่ 1



ภาพที่ 30 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5a) วิธีที่ 1

นำสาร 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) 0.13 g (0.33 mmol, 1.0 equiv) ละลายใน $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (2: 1) 4 mL กวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม NaOH 0.08 g (6.0 equiv) จากนั้นทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ $80\text{ }^\circ\text{C}$ โดยวิธี reflux เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) จากนั้นทำให้เย็น เติม EtOAc 10 mL สกัดด้วยน้ำ (3x10 mL) นำชั้น EtOAc กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย $\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ

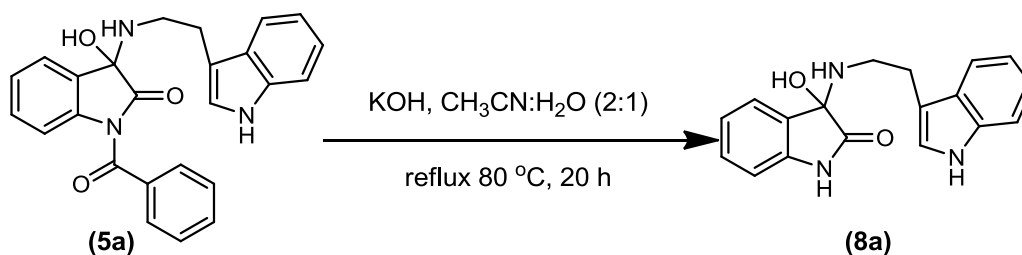
วิธีที่ 2



ภาพที่ 31 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**8a**) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) วิธีที่ 2

นำสารละลายของ 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) 0.09 g (0.24 mmol, 1.0 equiv) ละลายใน methanol 9 mL ทำการกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมลงในสารละลาย NaOH 0.049 g (1.23 mmol, 5.0 equiv) ในน้ำ 0.7 mL จากนั้นทำการกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ จากนั้นเติม EtOAc mL และน้ำ 20 mL แล้วนำมาสกัดด้วย EtOAc (3x10 mL) นำชั้น EtOAc กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย $\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ

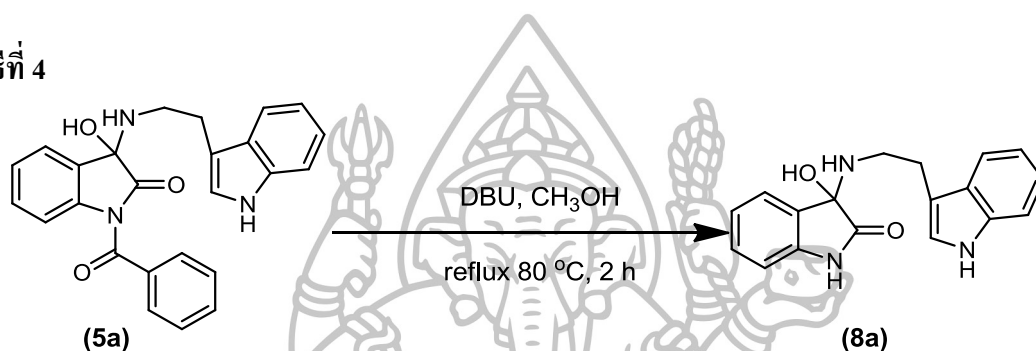
วิธีที่ 3



ภาพที่ 32 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**8a**) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) วิธีที่ 3

นำสาร 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) 0.11 g (0.27 mmol, 1.0 equiv) ละลายใน CH₃CN: H₂O (2: 1) mL ทำการกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม KOH 0.29 g (30.0 equiv) จากนั้นทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C โดยวิธี reflux เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) จากนั้นทำให้เย็น เติม EtOAc 10 mL สกัดด้วยน้ำ (3x10 mL) นำชั้น EtOAc กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anh. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ

วิธีที่ 4



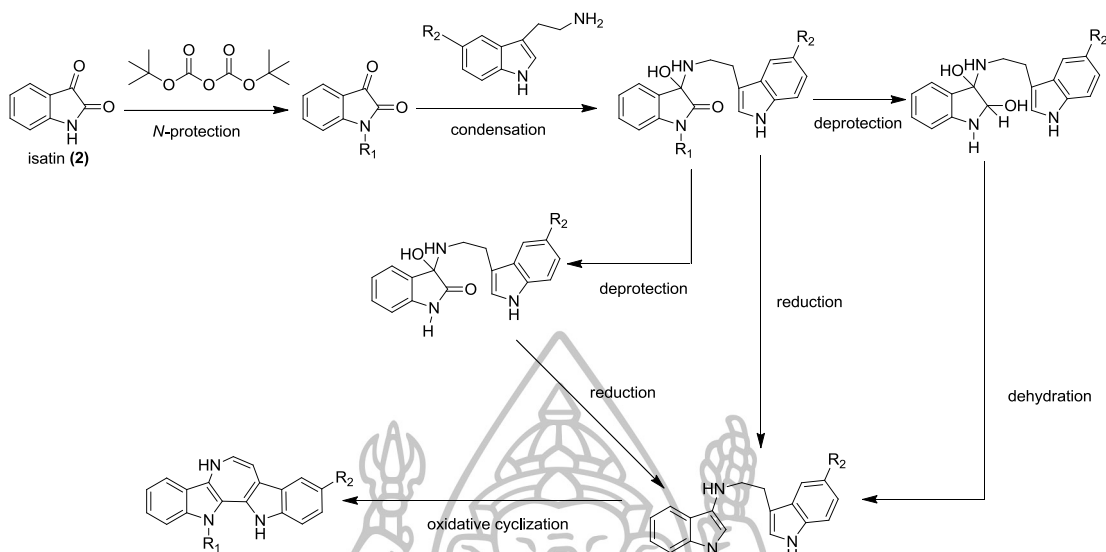
ภาพที่ 33 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**8a**) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) วิธีที่ 4

นำสาร 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) 0.08 g (0.18 mmol, 1.0 equiv) ละลายใน methanol 3 mL ทำการกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติม DBU 0.05mL (0.35 mmol, 2.0 equiv) จากนั้นทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C โดยวิธี reflux เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) จากนั้นทำให้เย็น ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ จากนั้นเติมน้ำ 20 mL แล้วทำการกรองของแข็งที่ได้แบบลดความดัน

ตารางที่ 5 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**8a**) ที่สภาวะต่างๆ

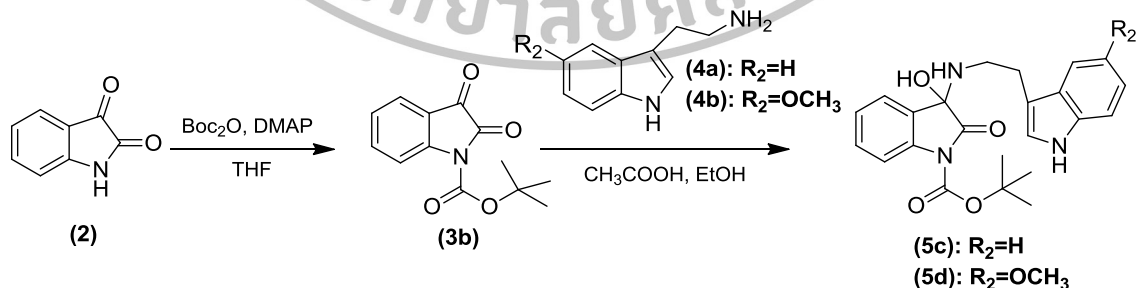
วิธีที่	สภาวะของปฏิกิริยา
1	NaOH, CH ₃ CN:H ₂ O (2:1), reflux 80 °C, 4 h
2	NaOH, CH ₃ OH, reflux 80 °C, 16 h
3	KOH, CH ₃ CN:H ₂ O (2:1), reflux 80 °C, 20 h
4	DBU, CH ₃ OH, reflux 80 °C, 2 h

3.3.1.2 การสังเคราะห์วิธีที่ 2 ของ Iheyamine A และอนุพันธ์



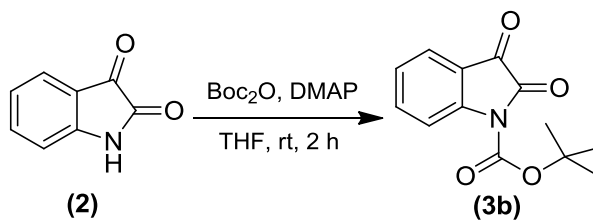
ภาพที่ 34 การสังเคราะห์วิธีที่ 2 ของ Iheyamine A และอนุพันธ์

ผู้วิจัยได้เริ่มทำการสังเคราะห์จาก isatin (2) เกิดปฏิกิริยา *N*-substitution กับ di-tert-butyl dicarbonate (Boc_2O) โดยมี 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็น *N*-Boc isatin (3b) ซึ่งพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ไม่เสถียรจึงนำมาทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปโดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์ [27] นำ *N*-Boc isatin (3b) มาทำปฏิกิริยา condensation กับ tryptamine (4a) และ 5-methoxytryptamine (4b) (ภาพที่ 35) โดยมี glacial acetic acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ 3-hydroxy-2-oxindole (5c) และ (5d) ตามลำดับ ซึ่งผู้วิจัยได้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยา condensation ของ *N*-Boc isatin (3b) ด้วย tryptamine (4a) และ 5-methoxytryptamine (4b) ภายใต้สภาวะการเกิดปฏิกิริยาที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 6 และ 7 ตามลำดับ



ภาพที่ 35 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5c) และ (5d)

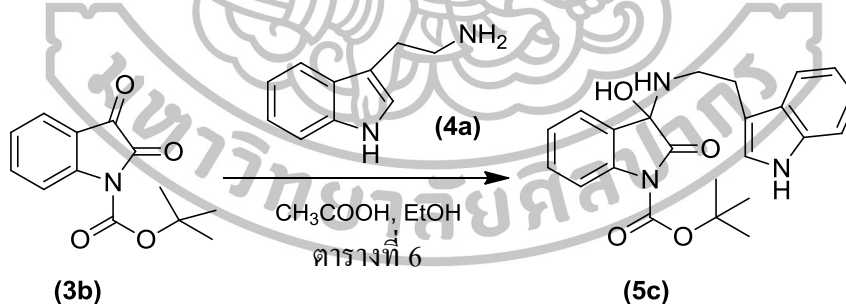
การสังเคราะห์ tert-butyl 2,3-dioxindoline-1-carboxylate (3b)



ภาพที่ 36 การสังเคราะห์ N-Boc isatin (3b)

นำสาร isatin (2) 1.02 g (6.94 mmol, 1.0 equiv) และ 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) 0.08 g (0.69 mmol, 0.1 equiv) ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม dry THF 25 mL ที่อุณหภูมิ 0 °C ภายใต้บรรยากาศ Ar ทำการกวนจนสารผสมเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม Di-tert-butyl dicarbonate (Boc₂O) 1.92 mL (8.35 mmol, 1.2 equiv) ใน dry THF 15 mL ที่อุณหภูมิ 0 °C จากนั้นทำการกวนสารผสมอย่างต่อเนื่อง 15 นาที แล้วเปลี่ยนเป็นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) หยุดปฏิกิริยาค้างน้ำ แล้วนำมาสกัดด้วย CH₂Cl₂ (3x30 mL) นำชั้น CH₂Cl₂ กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anh. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ

การสังเคราะห์ tert-butyl 3-((2-(1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy-2-oxindoline-1-carboxylate (5c)

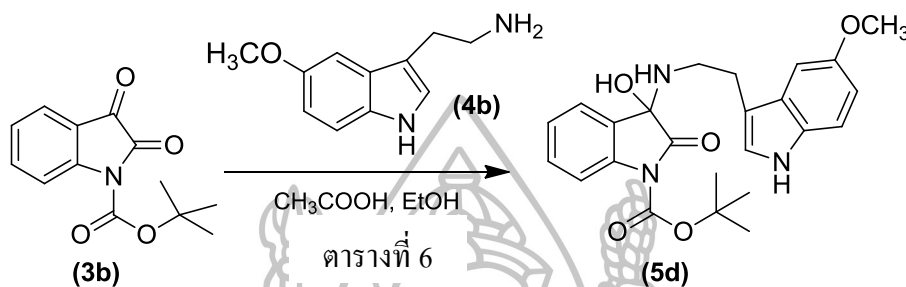


ภาพที่ 37 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5c)

นำสาร N-Boc isatin (3b) 1.36 g (5.51 mmol, 1.0 equiv) ใส่ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม ethanol 20 mL จากนั้นเติม glacial acetic acid 0.10 ml กวนประมาณ 5 นาที เติม tryptamine (4a) 1.32 g (8.26 mmol, 1.5 equiv) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาตามสภาวะในตารางที่ 6 ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) เติมน้ำ 100 mL แล้วนำมาสกัดด้วย EtOAc (4x50 mL) นำชั้น EtOAc กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anh. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำ

ละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography โดยใช้ hexane:EtOAc (4:1) เป็น mobile phase

การสังเคราะห์ tert-butyl 3-hydroxy-3-((2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxindole-1-carboxylate (**5d**)



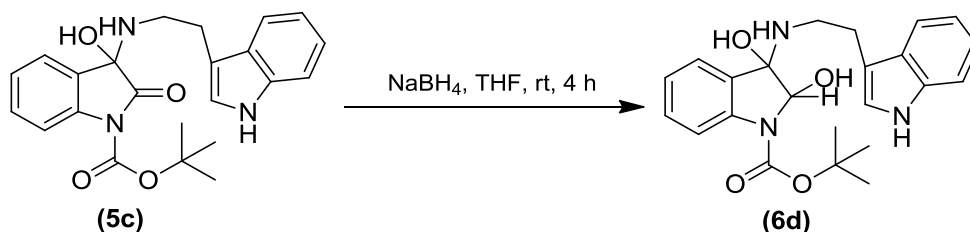
ภาพที่ 38 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**5d**)

นำสาร *N*-Boc isatin (**3b**) 0.53 g (2.14 mmol, 1.0 equiv) ใส่ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม ethanol 20 mL จากนั้นเติม glacial acetic acid 0.04 ml กวนประมาณ 5 นาที เติม 5-methoxy tryptamine (**4b**) 0.37 g (1.95 mmol, 0.9 equiv) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาตามสภาวะในตารางที่ 6 ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) จากนั้นเติมน้ำ 20 mL แล้วนำมาสกัดด้วย EtOAc (4×15 mL) นำชั้น EtOAc กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค column chromatography โดยใช้ hexane:EtOAc (4:1) เป็นสารชะ

ตารางที่ 6 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**5c**) และ (**5d**) ที่สภาวะต่างๆ

วิธีที่	สภาวะของปฏิกิริยา
1	EtOH, CH ₃ COOH, reflux, overnight
2	EtOH, CH ₃ COOH, rt, overnight

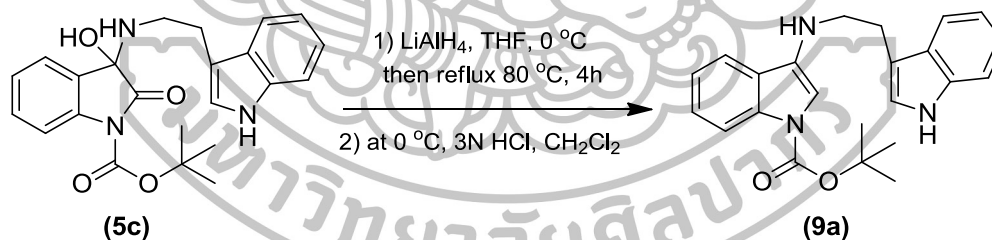
การสังเคราะห์ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindoline-1-carboxylate (6d)



ภาพที่ 39 การสังเคราะห์ indolinol (6d)

นำสาร 3-hydroxy-2-oxindole (5c) 0.22 g (0.53 mmol, 1.0 equiv) ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม THF 8 mL ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศ Ar ทำการกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการเติม NaBH_4 0.08 g (2.10 mmol, 4.0 equiv) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) แล้วกรองสารละลายแบบลดความดันโดยผ่าน celite แล้วล้างด้วย diethyl ether ประมาณ 100 mL นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (2:1) เป็น mobile phase

การสังเคราะห์ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indole-1-carboxylate (9a)

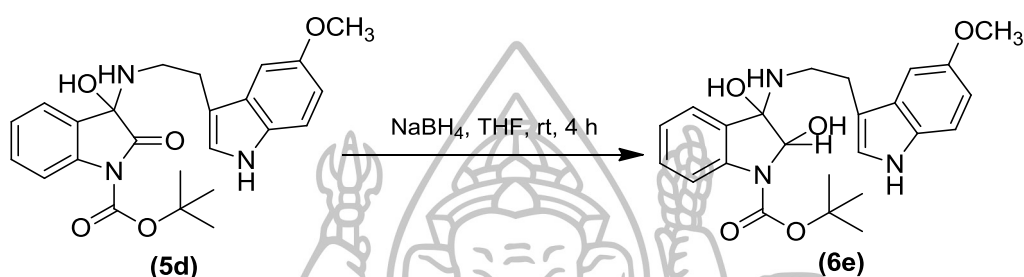


ภาพที่ 40 การสังเคราะห์ bis-indole (9a) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5c)

นำสาร 3-hydroxy-2-oxindole (5c) 0.29 g (0.72 mmol, 1.0 equiv) ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม dry THF 10 mL ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศ Ar ทำการกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปเติมลงขวดก้นกลมที่มี LiAlH_4 0.16 g (4.29 mmol, 6.0 equiv) ใน dry THF 5 mL ที่อุณหภูมิ 0 °C ภายใต้บรรยากาศ Ar จนฟองแก๊ส H_2 ลดลง จากนั้นทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C โดยวิธี reflux เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยค่อยๆหยดสารละลาย 3N HCl 15 mL ที่อุณหภูมิ 0 °C จนฟองแก๊ส H_2 ลดลง เติมน้ำ 20 mL แล้วนำมาสกัดด้วย CH_2Cl_2 (2x20 mL) นำชั้น CH_2Cl_2 กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย

anh. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (2:1) เป็น mobile phase

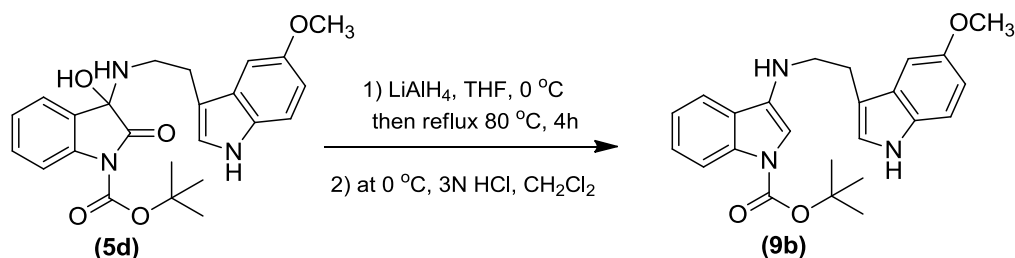
การสังเคราะห์ tert-butyl 2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-1-carboxylate (6e)



ภาพที่ 41 การสังเคราะห์ indolinol (6e)

นำสาร 3-hydroxy-2-oxindole (5d) 0.14 g (0.32 mmol, 1.0 equiv) ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม THF 5 mL ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศ Ar ทำการกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการเติม NaBH₄ 0.05 g (1.29 mmol, 4.0 equiv) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) แล้วกรองสารละลายแบบลดความดันโดยผ่าน celite แล้วล้างด้วย diethyl ether ประมาณ 100 mL นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (2:1) เป็น mobile phase

การสังเคราะห์ tert-butyl 3-hydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxindoline-1-carboxylate (9b)

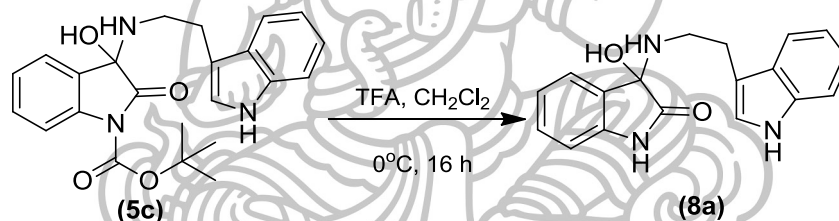


ภาพที่ 42 การสังเคราะห์ bis-indole (9b) จาก 3-hydroxy-2-oxindole (5d)

นำสาร 3-hydroxy-2-oxindole (**5d**) 0.11 g (0.26 mmol, 1.0 equiv) ลงในขวดก้นกลม แล้วเติม dry THF 5 mL ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศ Ar ทำการกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปเติมลงขวดก้นกลมที่มี LiAlH₄ 0.06 g (1.53 mmol, 6.0 equiv) ใน dry THF 5 mL ที่อุณหภูมิ 0 °C ภายใต้บรรยากาศ Ar จนฟองแก๊ส H₂ ลดลง จากนั้นทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C โดยวิธี reflux เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยค่อยๆหยดสารละลาย 3N HCl 15 mL ที่อุณหภูมิ 0 °C จนฟองแก๊ส H₂ ลดลง เติมน้ำ 20 mL แล้วนำมาสกัดด้วย CH₂Cl₂ (2x20 mL) นำชั้น CH₂Cl₂ กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (2:1) เป็น mobile phase

การสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxyindolin-2-one (**8a**)

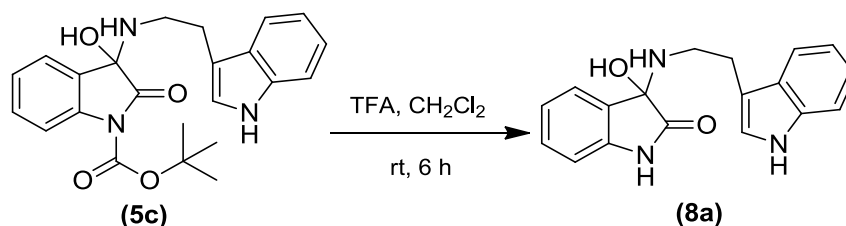
วิธีที่ 1



ภาพที่ 43 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**8a**) วิธีที่ 1

นำ 3-hydroxy-2-oxindole (**5c**) 0.47 g (1.15 mmol, 1.0 equiv) ละลายด้วย CH₂Cl₂ 20 mL ทำการกวนที่อุณหภูมิ 0 °C จากนั้นค่อยๆเติม TFA 7.05 mL (92.12 mmol, 80.0 equiv) แล้วกวนเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) ปล่อยสารละลายเย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง ทำการระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ จากนั้นเติมตัวทำละลาย EtOAc 10 mL นำมาสกัดด้วยสารละลายอิ่มตัว NaHCO₃ (2x20 mL) และ brine (1x20 mL) ตามลำดับ จากนั้นนำชั้น EtOAc กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na₂SO₄ กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (1:1) เป็น mobile phase

วิธีที่ 2



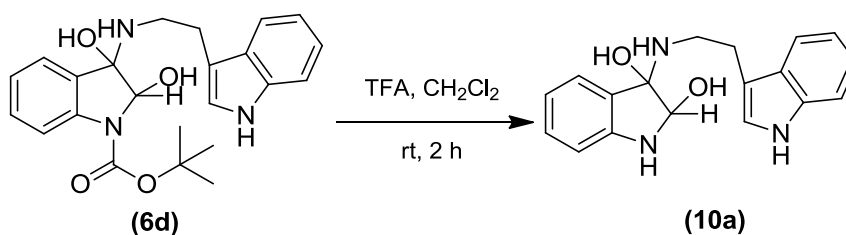
ภาพที่ 44 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a) วิธีที่ 2

นำ 3-hydroxy-2-oxindole (5c) 0.22 g (0.53 mmol, 1.0 equiv) ละลายด้วย CH_2Cl_2 18 mL จากนั้นค่อยๆเติม TFA 1.86 mL (9.53 mmol, 18.0 equiv) กวนเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) จากนั้นค่อยๆหยดสารละลายอิมัลชัน NaHCO_3 (2x20 mL) เพื่อทำการหยุดปฏิกิริยา นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (2x20 mL) และ brine 20 mL นำชั้น CH_2Cl_2 กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhydrous Na_2SO_4 กรอง และระเหยตัวทำละลายออก ภายใต้อากาศดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (1:1) เป็น mobile phase

ตารางที่ 7 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a) ที่สภาวะต่างๆ

วิธีที่	สภาวะของปฏิกิริยา
1	1) TFA, CH_2Cl_2 , 0 °C, 16 h 2) NaHCO_3
2	1) TFA, CH_2Cl_2 , rt, 6 h 2) NaHCO_3

การสังเคราะห์ 3-((2-(1H-indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-2,3-diol (10a)



ภาพที่ 45 การสังเคราะห์ indolinol (10a)

นำ indolinol (**6d**) 0.33 g (0.82 mmol, 1.0 equiv) ละลายด้วย CH_2Cl_2 11 mL จากนั้นค่อยๆ เติม TFA 1.13 mL (14.74 mmol, 18.0 equiv) กวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ติดตามปฏิกิริยาโดย thin layer chromatography (TLC) จากนั้นค่อยๆ หยดสารละลายอิมัลชัน NaHCO_3 (2x20 mL) เพื่อทำการหยุดปฏิกิริยา นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (2x20 mL) และ brine 20 mL นำชั้น CH_2Cl_2 กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรอง และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative-layer chromatography (PLC) โดยใช้ hexane:EtOAc (1:1) เป็น mobile phase จะได้ผลิตภัณฑ์ indolinol (**10a**)

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.3.2.1 การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ทำการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารที่ทำการสังเคราะห์ได้ ได้แก่ **5a-d**, **6a**, **6c-e**, **8a** และ **10a**

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารตัวอย่าง

1. ชั่ง 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 9.8 mg ละลายใน EtOH ใส่ขวดปริมาตร 100 mL ปรับปริมาตรด้วย EtOH และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm
2. สารละลาย Trolox ให้มีความเข้มข้น 0.360-0.0024 mg/mL โดยใช้ EtOH เป็นตัวทำละลาย
3. สารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้ EtOH เป็นตัวทำละลาย

วิธีการทดลอง

เปิดสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่างมา 100 μL ผสมกับสารละลาย DPPH 1900 μL เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำของผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm ด้วยเครื่อง UV-visible spectrometer : Perkin Elmer model Lamda 35 สำหรับหลอดควบคุมใช้ EtOH แทนสารตัวอย่าง และใช้ EtOH เป็น blank

สร้างกราฟของความสัมพันธ์ระหว่าง % remaining DPPH กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง (mg/mL)

โดยที่ $\% \text{ remaining DPPH} = [1 - (\text{Abs sample} / \text{Abs control})] \times 100$

โดยที่ $\text{Abs sample} = \text{Abs control} - \text{Abs ที่วัดได้}$

3.3.2.2 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา

ทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเบื้องต้นของสารที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด คือ **5a-d, 6a-e, 8a** และ **10a** กับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 7 เชื้อ ได้แก่ *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *Salmoella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ส่วนเชื้อราที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 5 เชื้อ ได้แก่ *Penicillium sp.*, *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger*

การเตรียม Mueller – Hinton Agar

1. ชั่ง Mueller – Hinton Agar 38.0 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL ต้มจนได้สารละลายใส
2. นำสารละลายไปทำการ autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที
3. เทใส่ plate (ประมาณครึ่งหนึ่งของความจุ plate) จากนั้นปิดฝา แล้วรอให้เย็น

การเตรียม Nutrient Broth Solution

1. ชั่ง Nutrient Broth 13.0 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL
2. แบ่งเทใส่หลอดแก้ว ประมาณครึ่งหนึ่งของหลอด จากนั้นปิดจุก แล้วนำไป autoclave

การเตรียมแผ่น Disk สารตัวอย่าง (ทำในตู้ปลอดเชื้อ)

1. ทำการเจือจางสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 102.400 $\mu\text{g}/1000 \mu\text{L}$ (102.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย
2. เจือจางสารตัวอย่าง 10 เท่า โดยใช้ micro pipette คูดสารมา 1 ส่วน ละลายใน MeOH 9 ส่วน ในหลอด eppendorf
3. นำสารลงบนแผ่น disk แผ่นละ 500 μg วางไว้ใน plate ที่ sterile รอจนแผ่น disk แห้ง

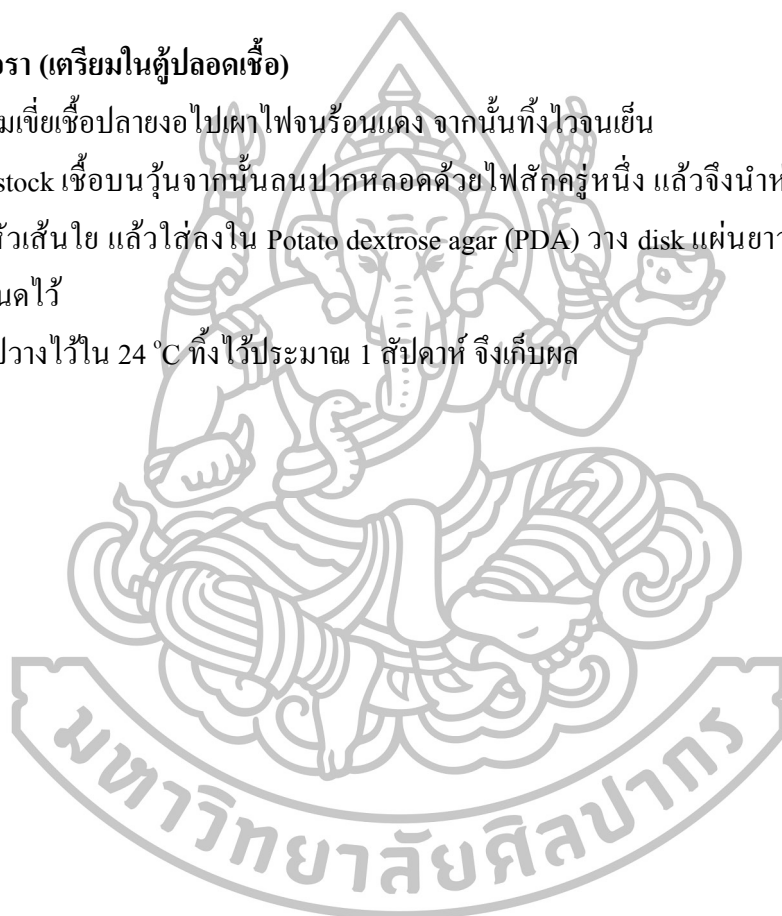
การเตรียมทดสอบเชื้อแบคทีเรีย (ทำในตู้ปลอดเชื้อ)

1. นำห้วงเชื้อเชื้อเผาไฟจนร้อนแดง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น
2. เปิด stock เชื้อบนวุ้นจากนั้นลนปากหลอดด้วยไฟสักครู่หนึ่ง แล้วจึงนำห้วงเชื้อ เชื้อหัวเชื้อ แล้วใส่ลงใน Nutrient Broth solution จากนั้นลนปากหลอด แล้วจึงปิด (ลนไฟทั้งหลอดใส่เชื้อ และหลอดใส่ Nutrient Broth solution ทั้งก่อนและหลังการเปิด-ปิด)
3. นำเชื้อที่ได้ไปใส่เครื่องบ่มแบบเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน (ทำนอกตู้ปลอดเชื้อ)

4. นำเชื้อใน Nutrient Broth solution มา spread บน Media ให้ทั่ว
5. ใช้ forceps คีบแผ่น disk สารตัวอย่างวางลงไปตามตำแหน่งที่กำหนด โดยทำการ sterilize ทุกครั้งที่ทำการวาง โดยจุ่มใน 95% EtOH แล้วนำผ่านเปลวไฟ รอให้เย็น (โดยเทียบกับ tetracycline 30 μg ต่อ disk disk ยา สำหรับเป็น positive control)
6. นำ plate เชื้อไปไว้ในตู้บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเช็คประสิทธิภาพของสาร โดยดูจากเคลิอร์โชนที่เกิดขึ้น

การเตรียมเชื้อรา (เตรียมในตู้ปลอดเชื้อ)

1. นำเข็มเย็บเชื้อปลายงอไปเผาไฟจนร้อนแดง จากนั้นทิ้งไว้จนเย็น
2. เปิด stock เชื้อบนวุ้น จากนั้นคนปากหลอดด้วยไฟสักรูหนึ่ง แล้วจึงนำหัวงอเย็บเชื้อ เข็ม ปลายงอเย็บหัวเส้นใย แล้วใส่ลงใน Potato dextrose agar (PDA) วาง disk แผ่นยาวางลงบน plate ตามจุดที่กำหนดไว้
3. นำไปวางไว้ใน 24 °C ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ จึงเก็บผล



บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้พยายามทำการสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์ โดยพบว่า ผลการทดลองจากแผนการสังเคราะห์แรกสามารถเริ่มทำการสังเคราะห์จาก isatin (2) ทำปฏิกิริยา *N*-alkylation กับ benzoyl chloride เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ *N*-benzoyl isatin (3a) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา condensation ด้วย tryptamine (4a) และ 5-methoxytryptamine (4b) เกิดเป็น oxindole (5a) และ (5b) ตามลำดับ ผู้วิจัยได้ศึกษาปฏิกิริยา reduction ของ oxindole (5a) ด้วย NaBH₄ เกิดเป็น indolinol (6a) จากนั้นได้นำ oxindole (5a) ทำปฏิกิริยา reduction ด้วย LiAlH₄ และ BH₃.THF เพื่อให้เกิดเป็น bis-indole (7a) พบว่าไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากความเกะกะของหมู่ป้องกัน แต่เกิดเป็น indolinol (6a) และ (6b) จึงนำสถานะการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวมาใช้กับการเกิดปฏิกิริยา reduction ของ oxindole (5b) จากนั้นผู้วิจัยจึงนำ indolinol (6a) มาทำปฏิกิริยา dehydration เพื่อกำจัด dihydroxyl แต่พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จ ผู้วิจัยจึงนำ oxindole (5a) มาทำปฏิกิริยา deprotection ด้วย NaOH, KOH หรือ DBU พบว่าไม่สามารถถอดหมู่ป้องกันได้เนื่องจากสารไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อโครงสร้างของ oxindole (5a) ทำให้แผนการสังเคราะห์แรกยังไม่ประสบความสำเร็จ ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนแผนการสังเคราะห์เป็นดังแผนการสังเคราะห์ที่สอง โดยเปลี่ยนจากหมู่ป้องกัน benzoyl group เป็น Boc group

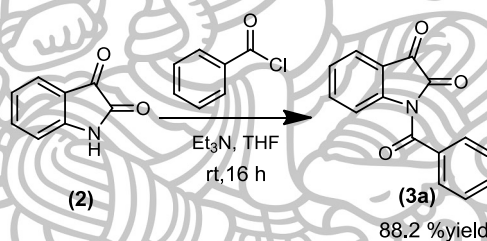
แผนการสังเคราะห์ที่สองได้เริ่มทำการสังเคราะห์จาก isatin (2) ทำปฏิกิริยา *N*-alkylation กับ (Boc)₂O เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ *N*-Boc isatin (3b) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา condensation ด้วย tryptamine (4a) และ 5-methoxytryptamine (4b) เกิดเป็น oxindole (5c) และ (5d) ตามลำดับ จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา reduction ด้วย NaBH₄ เกิดเป็น indolinol (6d) และ indolinol (6e) จากนั้นผู้วิจัยได้ศึกษาปฏิกิริยา reduction ของ oxindole (5c) และ oxindole (5d) ด้วย LiAlH₄ เพื่อให้เกิดเป็น bis-indole (9a) และ bis-indole (9a) แต่พบว่าไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากความเกะกะของหมู่ป้องกัน จึงนำ oxindole (5d) มาทำปฏิกิริยา deprotection ด้วย TFA พบว่าสามารถถอดหมู่ป้องกันได้เกิดเป็น oxindole (5c) และผู้วิจัยได้นำ indolinol (9a) มาทำปฏิกิริยา deprotection ด้วย

TFA โดยใช้สภาวะการเกิดปฏิกิริยาเดียวกับปฏิกิริยา deprotection ของ oxindole (5d) พบว่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของ oxindole (5c) ที่ได้น้อยมากๆ จึงทำให้ปริมาณที่ได้ไม่เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาในขั้นถัดไปและเนื่องด้วยเวลาจำกัด จึงทำให้ผู้วิจัยยังไม่ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์

ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการพิสูจน์ยืนยันโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยใช้เทคนิคต่างๆดังนี้ หากดูหลอมเหลวด้วยเครื่อง Stuart SMP2 melting point apparatus ตรวจสอบ ^1H NMR และ ^{13}C NMR ด้วยเครื่อง Bruker AVANCE 300 spectrometer (300 MHz สำหรับ ^1H NMR และ 75 MHz ^{13}C NMR) ใช้ตัวทำละลาย *d*-methanol และ *d*-chloroform ซึ่งมี tetramethyl silane เป็น internal standard และตรวจสอบมวลโมเลกุลโดย Bruker Daltonics MALDI-TOF/ TOF Mass Spectrometer Autoflex II

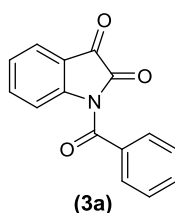
4.1.1 ผลการสังเคราะห์วิธีที่ 1 ของ Iheyamine A และอนุพันธ์

ผลการสังเคราะห์ 1-benzoylindoline-2,3-dione (3a)



ภาพที่ 46 ผลการสังเคราะห์ *N*-benzoyl isatin (3a)

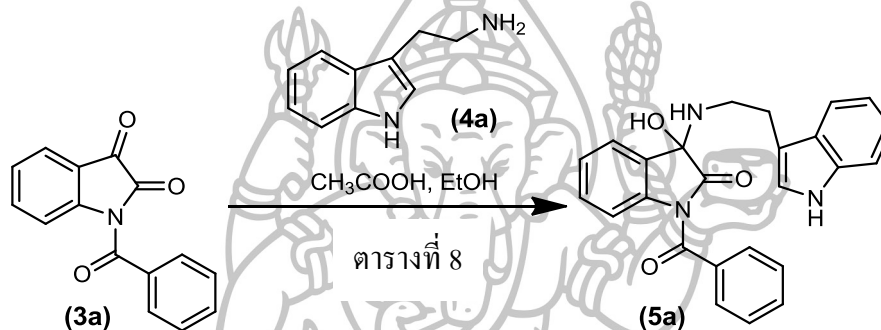
จากการสังเคราะห์ 1-benzoylindoline-2,3-dione (3a) ได้ผลิตภัณฑ์ดิบเป็นของแข็งสีเหลืองทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกผลึกซ้ำ โดยใช้ CH_2Cl_2 จะได้ผลึกของแข็งสีเหลืองของ *N*-benzoyl isatin (3a) 3.61 g (88.2 %yield) จากการตรวจสอบ ^1H -NMR พบว่า สัญญาณที่ช่วง 7-8 ppm มีสัญญาณเพิ่มขึ้น 5 โปรตอนซึ่งเป็นของหมู่ benzoyl และสัญญาณในช่วง aromatic เกิดการ shift ไปที่ downfield เนื่องจากมีหมู่ carbonyl ซึ่งเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน จึงทำให้เกิดการ deshield



ภาพที่ 47 โครงสร้างของ 1-benzoylindoline-2,3-dione (3a)

การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ 1-benzoylindoline-2,3-dione (**3a**) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.02 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.73-7.83 (4H, m, ArH), 7.65 (1H, t, $J = 7.2, 7.5$ Hz, ArH), 7.50 (2H, t, $J = 7.5, 7.8$ Hz, ArH), 7.36 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 179.81, 167.53, 148.35, 138.82, 133.73, 132.27, 129.79, 128.42, 127.82, 125.94, 125.46, 119.25, 117.04; melting point 155.1-157.6 $^\circ\text{C}$

ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (**5a**)

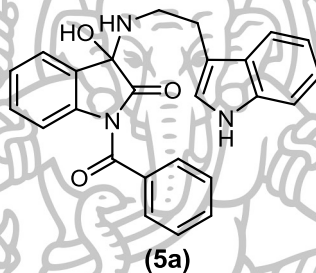


ภาพที่ 48 ผลการสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**)

จากวิธีการสังเคราะห์ทั้งหมด 5 วิธี ของ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (**5a**) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 8 โดยพบว่าวิธีที่ให้ความร้อนด้วยวิธีการ reflux และวิธีการกวนที่อุณหภูมิห้อง จะให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ใกล้เคียงกัน จากการตรวจสอบ ^1H -NMR พบสัญญาณ triplet 2 โปรตอน ที่ 3.11 ppm เป็นของ CH_2 ที่ติดกับ CH_2 และ quartet 2 โปรตอน ที่ 3.79 ppm เป็นของ CH_2 ที่ติดกับ NH จาก tryptamine และ broad 1 โปรตอน ที่ 11.95 ppm ของ OH ที่ตำแหน่ง C-3 ที่เกิดปฏิกิริยา condensation ด้วย tryptamine

ตารางที่ 8 ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (5a)

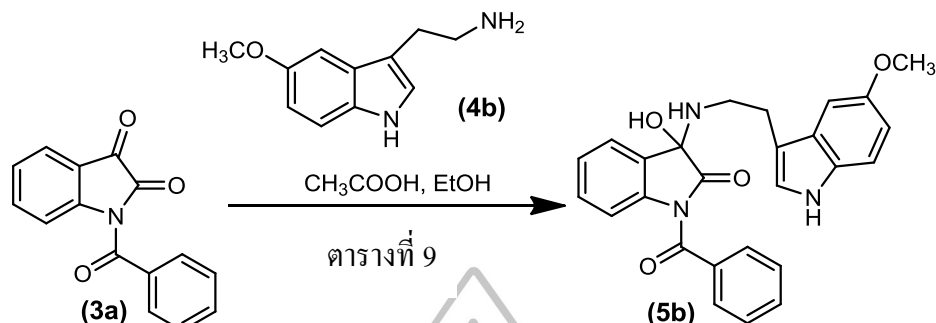
วิธีที่	สถานะของปฏิกิริยา	% yield
1	EtOH, CH ₃ COOH, MW 850 W, 16 min	33.0
2	EtOH, CH ₃ COOH, reflux, overnight	64.8
3	EtOH, CH ₃ COOH, sealed tube, overnight	29.3
4	EtOH, CH ₃ COOH, sonicated 50°C, 2 h	18.6
5	EtOH, CH ₃ COOH, rt, overnight	69.5



ภาพที่ 49 โครงสร้างของ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (5a)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (5a) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้ ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 11.95 (1H, br, OH), 8.91 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, ArH), 8.42 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz), 8.07 (1H, br, NHAr), 8.01 (2H, dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, ArH), 7.70-7.63 (2H, m, ArH), 7.60-7.45 (3H, m, ArH), 7.39 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.25-7.10 (4H, m, ArH), 6.90 (1H, br, NHCH₂), 3.79 (2H, q, *J* = 6.9, 6.6 Hz, CH₂NH), 3.11 (2H, t, *J* = 6.9, 6.6 Hz, CH₂CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 192.61, 166.05, 163.14, 136.78, 136.40, 134.72, 134.68, 134.45, 132.27, 128.92, 127.47, 127.04, 122.81, 122.32, 120.88, 119.60, 119.07, 118.68, 112.02, 111.37, 39.93, 25.17; HR-ESI MS จากการคำนวณ C₂₅H₂₁N₃O₃ (M+Na)⁺ 434.1481 *m/z* จากการทดสอบ 434.1485 *m/z*, melting point 181.8-182.7 °C

ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (5b)

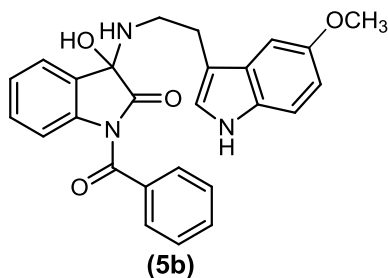


ภาพที่ 50 ผลการสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (5b)

จากวิธีการสังเคราะห์ทั้งหมด 2 วิธี ของ 3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (5b) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่าการให้ความร้อนด้วยวิธี reflux จะให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่มากกว่าการกวนที่อุณหภูมิห้อง จากการตรวจสอบ ¹H-NMR พบสัญญาณ triplet 2 โปรตอน ที่ 3.06 ppm เป็นของ CH₂ ที่ติดกับ CH และ quartet 2 โปรตอน ที่ 3.76 ppm เป็นของ CH₂ ที่ติดกับ NH จาก tryptamine และ singlet 3 โปรตอน ที่ 3.83 ppm ของ OCH₃ และ broad 1 โปรตอน ที่ 11.91 ppm ของ OH ที่ตำแหน่ง C-3 ที่เกิดจากปฏิกิริยา condensation ด้วย 5-methoxytryptamine

ตารางที่ 9 ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (5b)

วิธีที่	สภาวะของปฏิกิริยา	% yield
1	EtOH, CH ₃ COOH, reflux, overnight	56.1
2	EtOH, CH ₃ COOH, rt, overnight	48.2

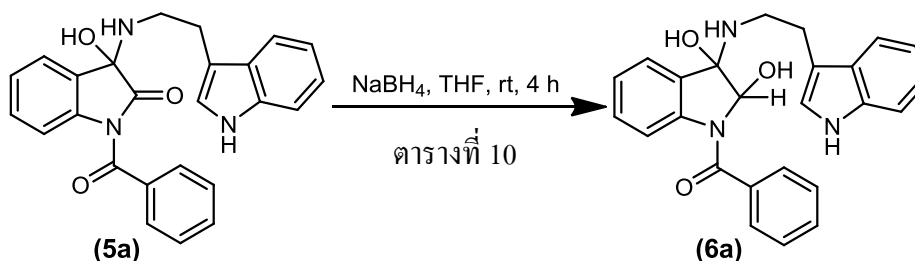


ภาพที่ 51 โครงสร้างของ 3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (**5b**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ 1-benzoyl-3-hydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indolin-2-one (**5b**) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 11.91 (1H, br, OH), 8.85 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, ArH), 8.33 (1H, dd, $J = 1.5, 8.1$ Hz, ArH), 8.09 (1H, br, NH), 7.96 (1H, dd, $J = 6.9, 1.5$ Hz, ArH), 7.61 (1H, td, $J = 7.2, 1.8$ Hz, ArH), 7.56-7.45 (2H, m, ArH), 7.24 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, ArH), 7.10 (1H, td, $J = 7.2, 0.9$ Hz, ArH), 7.06 (1H, s, ArH), 7.05 (1H, s, ArH), 7.00 (1H, br, NHCH_2), 6.86 (1H, dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz, ArH), 3.83 (3H, s, OCH_3), 3.76 (2H, q, $J = 6.9, 6.3$ Hz, CH_2NH), 3.06 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, CH_2CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 192.58, 165.97, 163.08, 154.18, 142.56, 136.80, 134.68, 134.48, 132.23, 131.50, 129.12, 128.88, 127.62, 127.43, 122.96, 122.73, 120.76, 118.87, 112.60, 112.08, 100.45, 55.92, 39.86, 25.14; HR-ESI MS จากการคำนวณ $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 464.1586 m/z จากการทดสอบ 464.1593 m/z , melting point 118.7-120.0 $^\circ\text{C}$

เมื่อผู้วิจัยสามารถสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) และ (**5b**) ได้แล้ว จึงทำการศึกษาปฏิกิริยา reduction ของ 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) ก่อน โดยทำปฏิกิริยา reduction ด้วย NaBH_4 เพื่อให้เกิดเป็น indolinol (**6a**)

ผลการสังเคราะห์ (3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl)(phenyl)methanone (6a)

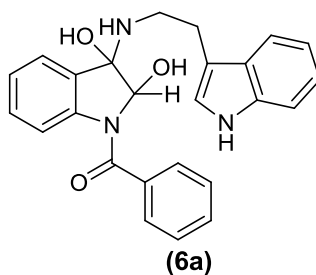


ภาพที่ 52 ผลการสังเคราะห์ indolinol (6a)

จากการสังเคราะห์ (3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl)(phenyl)methanone (6a) ด้วย NaBH_4 ที่สภาวะการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน พบว่าเกิดเป็น (3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl)(phenyl)methanone (6a) ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวตาล โดยมีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าเมื่อใช้ NaBH_4 3.0 equiv จะเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่มากที่สุด จากการตรวจสอบ $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณ singlet 1 โปรตอน ที่ 5.05 ppm ของ CH ที่เกิดจากการ reduce เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 10 ผลการสังเคราะห์ (3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl)(phenyl)methanone (6a)

สภาวะของปฏิกิริยา	NaBH_4 (equiv)	% yield
NaBH_4 , THF, rt, 4 h	2.0	49.1
	2.5	86.4
	3.0	97.4



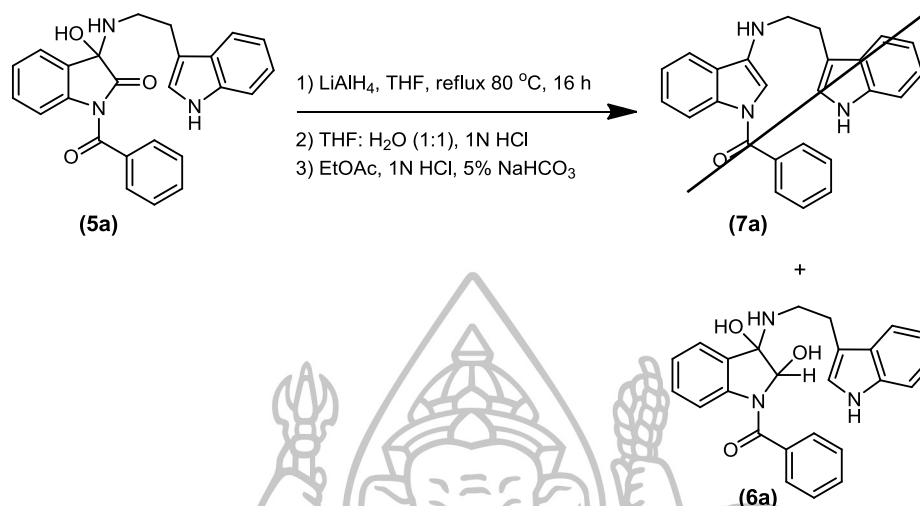
ภาพที่ 53 โครงสร้างของ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl(phenyl)methanone (**6a**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl(phenyl)methanone (**6a**) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.04 (2H, dd, $J = \text{Hz}$, ArH), 7.84 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, ArH), 7.58-7.48 (4H, m, ArH), 7.42 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, ArH), 7.37-7.31 (4H, m, ArH), 6.91 (1H, s, CHNH), 3.60-3.54 (2H, m, CH_2NH), 2.94 (2H, t, $J = 6.9, 6.6$ Hz, CH_2CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 166.62, 136.27, 135.46, 134.05, 132.93, 132.0, 128.82, 128.55, 127.59, 126.01, 125.52, 125.15, 122.22, 122.09, 119.36, 118.60, 112.30, 111.29, 70.03, 39.51, 25.09; HR-ESI MS จากการคำนวณ $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 436.1637 m/z จากการทดสอบ 436.1636 m/z , melting point 177.1-178.2 $^\circ\text{C}$

จากนั้นเมื่อผู้วิจัยได้ทำการศึกษาปฏิกิริยา reduction ของ 3-hydroxy-2-oxindole (5a) โดยทำปฏิกิริยา reduction เพื่อให้ได้เป็น bis-indole (7a) โดยผู้วิจัยได้เสนอวิธีการสังเคราะห์ไว้ทั้งหมด 3 วิธี ภายใต้สภาวะการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน โดยวิธีแรก 3-hydroxy-2-oxindole (5a) จะเกิดปฏิกิริยากับ LiAlH_4 ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นให้ความร้อนด้วยวิธี reflux [19] พบว่าไม่เกิดเป็น bis-indole (7a) แต่เกิดเป็น indolinol (6a) จึงเปลี่ยนวิธีโดยนำ 3-hydroxy-2-oxindole (5a) มาทำปฏิกิริยากับ LiAlH_4 ที่ 0 $^\circ\text{C}$ จากนั้นให้ความร้อนด้วยวิธี reflux [20] พบว่าไม่เกิดเป็น bis-indole (7a) แต่เกิดเป็น indolinol (6a) major product และ (6b) minor product ผู้วิจัยจึงเปลี่ยน reducing agent เป็น Borane tetrahydrofuran ($\text{BH}_3\cdot\text{THF}$) โดยเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง [21] พบว่าไม่เกิดเป็น bis-indole (7a) แต่เกิดเป็น indolinol (6a) เช่นกัน โดยมีผลการสังเคราะห์ดังต่อไปนี้

ผลการสังเคราะห์ (3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indol-1-yl)(phenyl)methanone (7a)

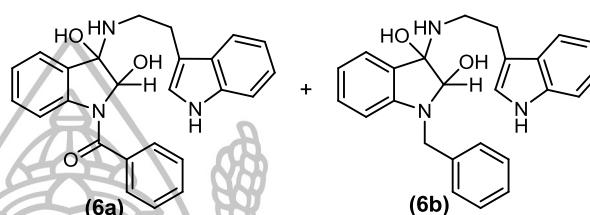
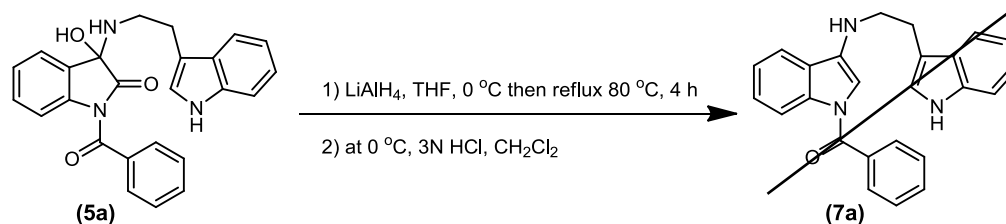
วิธีที่ 1



ภาพที่ 54 ผลการสังเคราะห์ bis-indole (7a) วิธีที่ 1

จากการสังเคราะห์ (3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indol-1-yl)(phenyl)methanone (7a) วิธีที่ 1 ด้วย LiAlH₄ ที่อุณหภูมิห้องแล้วทำการให้ความร้อนด้วยวิธี reflux พบว่าไม่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ 7a เนื่องจากไม่พบ ¹H-NMR ที่ต้องการ แต่เกิดผลิตภัณฑ์เป็น (3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl)(phenyl)methanone (6a) มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล (รายงานในผลการสังเคราะห์ (3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl)(phenyl)methanone (6a)) โดยใช้ LiAlH₄ ในปริมาณที่ต่างกันดังแสดงในตารางที่ 12 เมื่อเพิ่มปริมาณพบว่าให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ใกล้เคียงกัน จากการตรวจสอบ ¹H-NMR พบสัญญาณ singlet 1 โปรตอนที่ 5.16 ppm ของ CH ที่เกิดจากการ reduce ของ carbonyl เพิ่มขึ้น

วิธีที่ 2

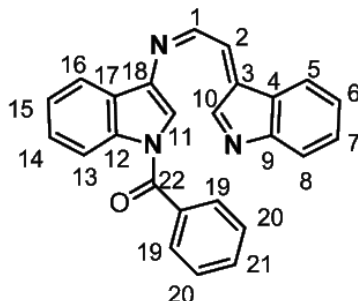


ภาพที่ 55 ผลการสังเคราะห์ bis-indole (7a) วิธีที่ 2

การสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indol-1-yl(phenyl)methanone (7a) วิธีที่ 2 ด้วย LiAlH₄ ที่ 0 °C แล้วทำการให้ความร้อนด้วยวิธี reflux พบว่าไม่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ 7a เนื่องจากไม่พบ ¹H-NMR ที่ต้องการ แต่เกิดผลิตภัณฑ์เป็น 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl(phenyl)methanone (6a) มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล (major product) (รายงานในผลการสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl(phenyl)methanone (6a)) และ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzylindoline-2,3-diol (6b) มีลักษณะเป็นของหนืดสีน้ำตาลแกมเขียว (minor product) เมื่อใช้ LiAlH₄ ในปริมาณที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อใช้ LiAlH₄ แค่ 3.0 equiv. จะเกิดผลิตภัณฑ์แค่ 6a เท่านั้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเป็น 6.0 หรือ 12.0 equiv. จะเกิดผลิตภัณฑ์เป็น 6a และ 6b ที่มีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 12 จากการตรวจสอบ ¹H-NMR ของ 6a (major product) พบสัญญาณ singlet 1 โปรตอน ที่ 5.16 ppm ของ CH ที่เกิดจากการ reduce ของ carbonyl เพิ่มขึ้น และ 6b (minor product) พบสัญญาณ singlet 2 โปรตอน ที่ 4.27 ppm ของ CH₂ ของหมู่ benzyl และ singlet 1 โปรตอน ที่ 5.05 ppm ของ CH ที่เกิดจากการ reduce ของ carbonyl เพิ่มขึ้น

จากการนำขึ้น aqueous phase ที่ตั้งทิ้งไว้ที่บรรยากาศแล้วมีการเปลี่ยนสีเป็นสีม่วง จึงนำมาสกัดด้วย EtOAc พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ดิบเป็นของแข็งสีม่วง ทำให้บริสุทธิ์จะได้ผลิตภัณฑ์ 0.0080 g ที่ยังไม่สามารถยืนยันโครงสร้างได้ชัดเจน เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณที่น้อยมาก ๆ

สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เพียงแค่ว่า $^1\text{H-NMR}$ เท่านั้น โดยมี $^1\text{H-NMR}$ spectrum ดังตารางที่ 12 และ คาดว่าจะมีโครงสร้างของสาร ดังภาพที่ 50

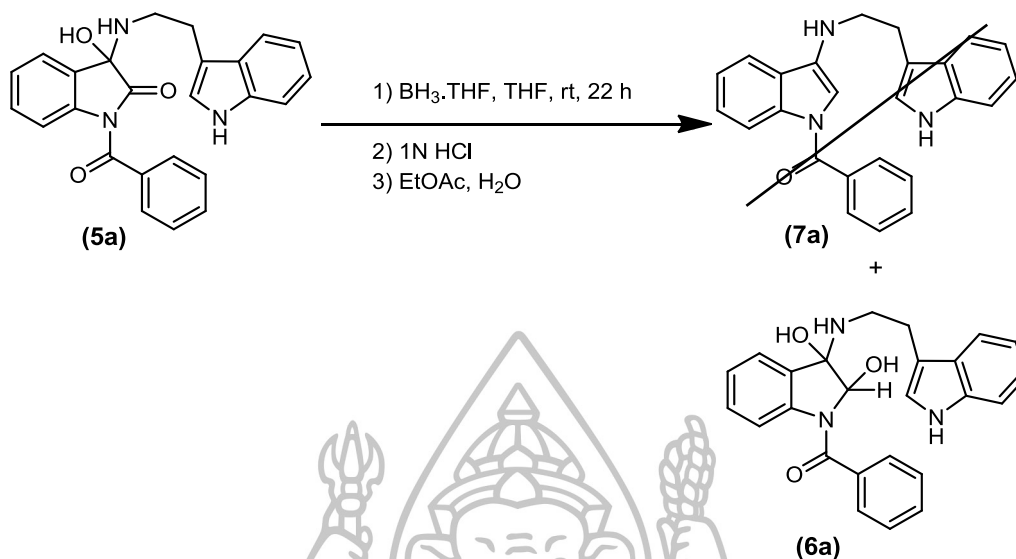


ภาพที่ 56 โครงสร้างของสารที่คาดว่าจะเกิดจากชั้น aqueous phase ของการสังเคราะห์ bis-indole (7a) วิธีที่ 2

ตารางที่ 11 ตำแหน่งและ chemical shift โครงสร้างของสารที่คาดว่าจะเกิดจากชั้น aqueous phase ของสังเคราะห์ bis-indole (7a) วิธีที่ 2

No.	$^1\text{H-NMR}$ [mult. J (Hz)]
1	9.53 (d, 6.6)
2	8.96 (d, 6.6)
16	8.70 (d, 7.8)
13	8.49 (d, 8.4)
5	8.19 (d, 7.8)
8	8.14 (d, 8.4)
6, 7, 14, 15, 20, 21	7.98-7.93(m), 7.73-7.67 (m)
11	7.60 (s)
10	6.91 (s)

วิธีที่ 3

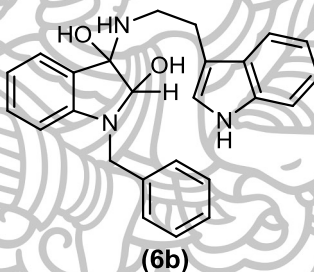


ภาพที่ 57 ผลการสังเคราะห์ bis-indole (7a) วิธีที่ 3

การสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indol-1-yl(phenyl)methanone (7a) วิธีที่ 3 ด้วย $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ พบว่าไม่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ 7a เนื่องจากไม่พบ $^1\text{H-NMR}$ ที่ต้องการ แต่เกิดผลิตภัณฑ์เป็น 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl(phenyl)methanone (6a) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวตาล (รายงานในผลการสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl(phenyl)methanone (6a)) จากการตรวจสอบ $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณ singlet 1 โปรตอน ที่ 5.16 ppm ของ CH ที่เกิดจากการ reduce ของ carbonyl เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 12 ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indol-1-yl)(phenyl)methanone (7a)

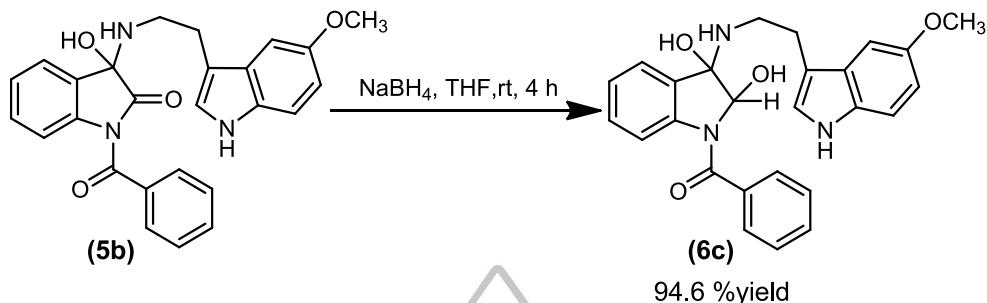
วิธีที่	สถานะของปฏิกิริยา	reagent (equiv)	% yield	
			6a	6b
1	1) LiAlH ₄ , THF, reflux 80 °C, 16 h	7	30.9	no
	2) THF: H ₂ O (1:1), 1N HCl	10	31.8	no
	3) EtOAc, 1N HCl, 5% NaHCO ₃			
2	1) LiAlH ₄ , THF, 0 °C then reflux 80 °C, 4 h	3	52.0	no
	2) at 0 °C, 3N HCl, CH ₂ Cl ₂	6	39.6	20.8
		12	37.4	12.3
3	1) BH ₃ .THF, THF, rt, 16 h 2) 1N HCl 3) EtOAc, H ₂ O	3	18.6	no



ภาพที่ 58 โครงสร้างของ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzylindoline-2,3-diol (6b)

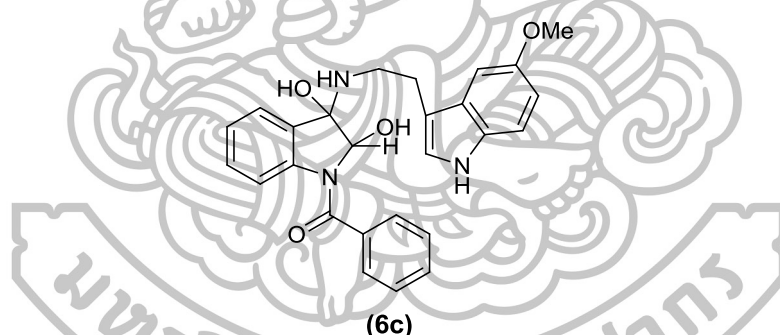
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzylindoline-2,3-diol (6b) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้ ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.90 (1H, br, NH), 7.52 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, ArH), 7.33-7.07 (8H, m, ArH), 6.70-6.60 (3H, m, ArH), 6.07 (1H, br, NHCH₂), 5.05 (1H, s, CHOH), 4.27 (2H, s, CH₂Ar), 3.69-3.42 (2H, m, CH₂NH), 2.99-2.79 (2H, m, CH₂CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 173.01, 145.32, 138.39, 136.36, 130.63, 129.66, 128.62, 127.48, 127.28, 127.11, 124.35, 122.26, 122.13, 119.44, 118.53, 118.45, 113.14, 112.26, 111.30, 72.72, 48.12, 39.73, 25.09; HR-ESI MS จากการคำนวณ C₂₅H₂₅N₃O₂ (M+H)⁺ 400.2025 *m/z* จากการทดสอบ 400.2031 *m/z*

ผลการสังเคราะห์ (2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indolin-1-yl)(phenyl)methanone (**6c**)



ภาพที่ 59 ผลการสังเคราะห์ indolinol (**6c**)

การสังเคราะห์ (2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indolin-1-yl)(phenyl)methanone (**6c**) ด้วย NaBH_4 เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ **6c** ที่มีลักษณะเป็นของแข็งของแข็งสีเหลืองอ่อน 0.0251 g (94.6 % yield) จากการตรวจสอบ $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณ singlet 1 โปรตอน ที่ 4.73 ppm ของ CH ที่เกิดจากการ reduce เพิ่มขึ้น

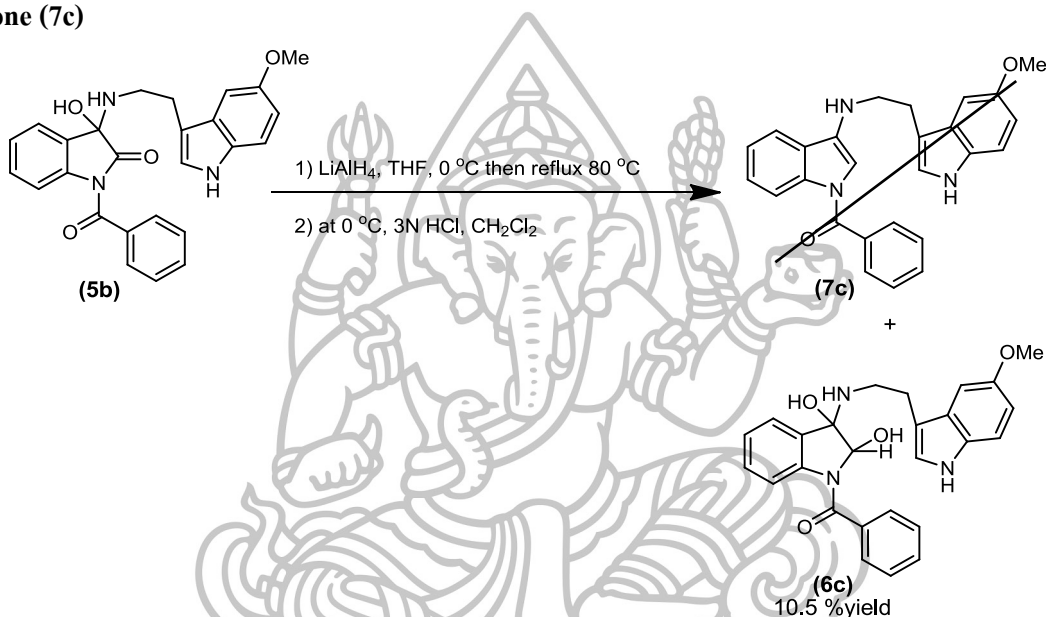


ภาพที่ 60 โครงสร้างของ (2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indolin-1-yl)(phenyl)methanone (**6c**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ (2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indolin-1-yl)(phenyl)methanone (**6c**) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้ $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 10.87 (1H, s, OH), 8.02 (1H, br, ArNH), 7.99 (1H, d, $J = 7.5$), 7.83 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, ArH), 7.56-7.45 (3H, m, ArH), 7.29-7.19 (3H, m, ArH), 7.09 (1H, br, NHCH_2), 6.98-6.80 (4H, m, ArH), 6.63 (1H, s, CHNH), 4.73 (1H, s, CHOH), 3.82 (3H, s, OCH_3), 3.54-3.45 (2H, m, CH_2NH), 2.85 (2H, t, $J = 6.9, 6.3$ Hz, CH_2CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (75

MHz, CDCl₃) δ: 173.51, 166.68, 153.87, 149.64, 135.32, 135.20, 133.92, 133.89, 132.91, 132.10, 131.52, 128.77, 128.40, 127.51, 125.77, 125.00, 124.93, 123.02, 116.02, 111.89, 100.52, 69.77, 55.99, 39.31, 25.00; HR-ESI MS จากกรคำนวณ C₂₆H₂₅N₃O₄ (M+Na)⁺ 466.1743 *m/z* จากการทดสอบ 466.1756 *m/z*; melting point 156.9-158.7 °C

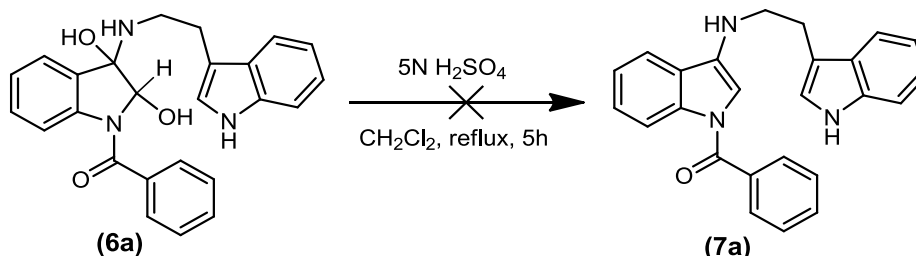
ผลการสังเคราะห์ (3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indol-1-yl)(phenyl)methanone (7c)



ภาพที่ 61 ผลการสังเคราะห์ bis-indole (7c)

การสังเคราะห์ (3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indol-1-yl)(phenyl)methanone (7c) พบว่าไม่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ 7a เนื่องจากไม่พบ ¹H-NMR ที่ต้องการ แต่เกิดเป็น (2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indolin-1-yl)(phenyl)methanone (6c) 0.0065 g (10.5 % yield) ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน (รายงาน ¹H-NMR ในผลการสังเคราะห์ (2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indolin-1-yl)(phenyl)methanone (6c))

การสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indol-1-yl(phenyl)methanone (7a) ด้วย
ปฏิกิริยา dehydration

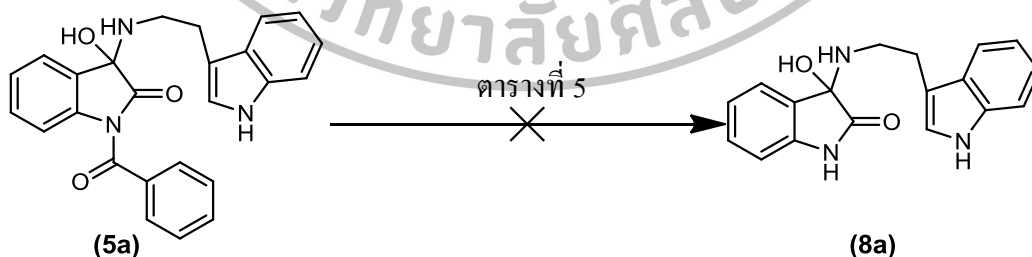


ภาพที่ 62 ผลการสังเคราะห์ bis-indole (7a) ด้วยปฏิกิริยา dehydration

การสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indol-1-yl(phenyl)methanone (7a) เพื่อกำจัด dihydroxyl ของ indolinol (6a) โดยเกิดผ่านปฏิกิริยา dehydration จากการตรวจสอบ ¹H-NMR พบว่าไม่เกิดเป็น 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indol-1-yl(phenyl)methanone (7a) เนื่องจากไม่พบ ¹H-NMR ที่ต้องการ

ผู้วิจัยคาดว่า protecting group บนไนโตรเจนของ oxindole มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา reduction ของ 3-hydroxy-2-oxindole (5a) และ (5b) จึงทำปฏิกิริยา deprotection หมู่ benzoyl บนไนโตรเจนของ oxindole เพื่อให้เกิดเป็น 3-hydroxy-2-oxindole (8a) โดยเริ่มศึกษาปฏิกิริยาโดยนำ 3-hydroxy-2-oxindole (5a) มาทำปฏิกิริยากับ NaOH [23, 24] หรือ KOH [25] หรือ DBU [26] ภายใต้สภาวะการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน 4 วิธี โดยมีผลการสังเคราะห์ดังต่อไปนี้

ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxyindolin-2-one (8a)



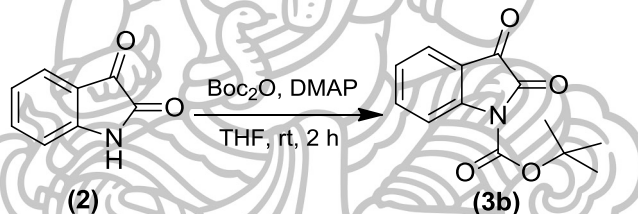
ภาพที่ 63 การสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (8a)

การสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxyindolin-2-one (**8a**) ที่มีวิธีการสังเคราะห์ที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 วิธี โดยมีสภาวะการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกันดังตารางที่ 5 พบว่าไม่เกิดเป็น oxindole (**8a**) ที่ต้องการ จากการตรวจสอบ ¹H-NMR ไม่พบ ¹H-NMR ที่ต้องการ และจากการสังเคราะห์วิธีที่ 2 ใช้ NaOH และ MeOH พบว่าเกิดปฏิกิริยาทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็น tryptamine (**4a**) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์

จากปฏิกิริยา deprotection หมู่ benzoyl ที่สภาวะดังกล่าวข้างต้นนี้ พบว่าไม่สามารถทำให้หมู่ benzoyl บนไนโตรเจนของ 3-hydroxy-2-oxindole (**5a**) หลุดออกได้ ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนวิธีการสังเคราะห์ โดยเปลี่ยน protecting group บนไนโตรเจนของ isatin (**2**) จาก benzoyl group เป็น Boc group ตามแผนการสังเคราะห์ที่ 2

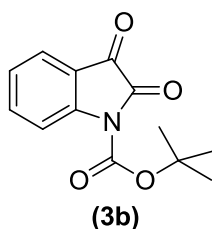
4.1.2 ผลการสังเคราะห์วิธีที่ 2 ของ Iheyamine A และอนุพันธ์

ผลการสังเคราะห์ tert-butyl 2,3-dioxindoline-1-carboxylate (**3b**)



ภาพที่ 64 ผลการสังเคราะห์ *N*-Boc isatin (**3b**)

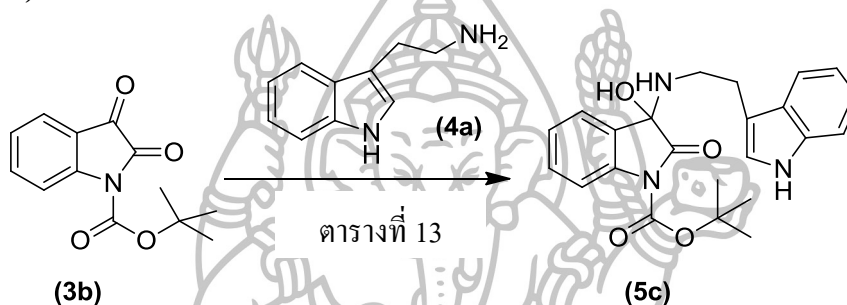
การสังเคราะห์ tert-butyl 2,3-dioxindoline-1-carboxylate (**3b**) ได้ผลิตภัณฑ์ดิบ *N*-Boc isatin (**3b**) 2.09 g มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้เนื่องจากสารไม่เสถียร จากการตรวจสอบ ¹H-NMR พบสัญญาณ singlet 9 โปรตอนที่ 1.57 ppm ซึ่งเป็นของ tert-butyl จากหมู่ Boc และสัญญาณในช่วง aromatic เกิดการ shift ไปที่ downfield เนื่องจากมีหมู่ carbonyl ซึ่งเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน จึงทำให้เกิดการ deshield



ภาพที่ 65 โครงสร้างของ tert-butyl 2,3-dioxindoline-1-carboxylate (**3b**)

การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ โครงสร้างของ tert-butyl 2,3-dioxindoline-1-carboxylate (**3b**) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้ $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.99 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.60-7.67 (2H, m, ArH), 7.20 (1H, t, $J = 7.5, 8.1$ Hz, ArH), 1.57 (9H, s, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 180.20, 155.72, 152.87, 148.34, 138.81, 125.42, 125.26, 118.68, 116.81, 85.60, 28.03; melting point 123.6-125.6 $^\circ\text{C}$

ผลการสังเคราะห์ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy-2-oxindoline-1-carboxylate (**5c**)

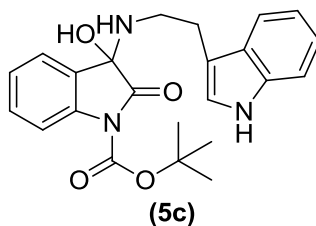


ภาพที่ 66 ผลการสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**5c**)

จากวิธีการสังเคราะห์ทั้ง 2 วิธี ของ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy-2-oxindoline-1-carboxylate (**5c**) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของหนืดสีเหลือง ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 13 โดยพบว่าทำให้ความร้อนด้วยวิธี reflux จะให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่มากกว่าการกวนที่อุณหภูมิห้อง จากการตรวจสอบ $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณ singlet 9 โปรตอน ที่ 1.51 ppm ของ tert-butyl ของหมู่ Boc และ triplet 2 โปรตอน ที่ 3.05 ppm เป็นของ CH_2 ที่ติดกับ CH_2 และ quartet 2 โปรตอน ที่ 3.72 ppm เป็นของ CH_2 ที่ติดกับ NH จาก tryptamine และ broad 1 โปรตอน ที่ 10.22 ppm ของ OH ที่ตำแหน่ง C-3 ที่เกิดจากปฏิกิริยา condensation ด้วย tryptamine

ตารางที่ 13 ผลการสังเคราะห์ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy -2-oxindoline-1-carboxylate (**5c**)

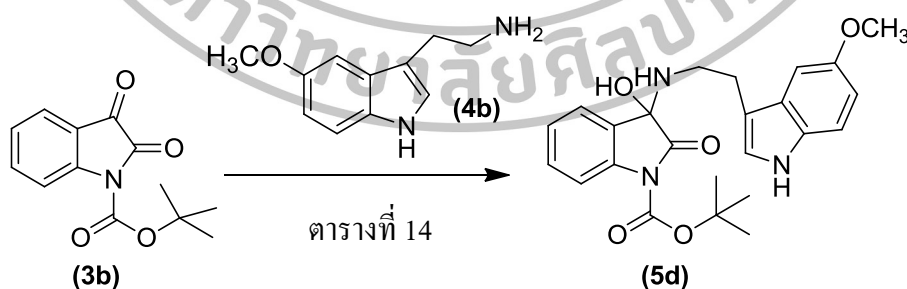
วิธีที่	สถานะของปฏิกิริยา	% yield
1	EtOH, CH_3COOH , reflux, overnight	73.1
2	EtOH, CH_3COOH , rt, overnight	36.0



ภาพที่ 67 โครงสร้างของ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy-2-oxoindoline-1-carboxylate (**5c**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy-2-oxoindoline-1-carboxylate (**5c**) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ ดังนี้ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 10.22 (1H, s, OH), 8.41 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, ArH), 8.26 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, ArH), 8.22 (1H, br, ArNH), 7.60 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, ArH), 7.53 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, ArH), 7.34 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, ArH), 7.09-7.24 (2H, m, ArH), 7.02 (1H, s, CHNH), 6.99 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, ArH), 6.89 (1H, br, NHCH_2), 3.72 (2H, q, $J = 6.3$ Hz, CH_2NH), 3.05 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, CH_2CH_2), 1.51 (9H, s, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 191.95, 163.65, 152.74, 142.92, 136.45, 136.15, 134.18, 127.12, 122.38, 121.99, 121.18, 119.30, 119.02, 118.47, 118.00, 111.88, 111.41, 81.03, 39.76, 28.21, 25.02; HR-ESI MS จากการคำนวณ $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ 430.1743 m/z จากการทดสอบ 430.1743 m/z

ผลการสังเคราะห์ tert-butyl 3-hydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoindoline-1-carboxylate (**5d**)

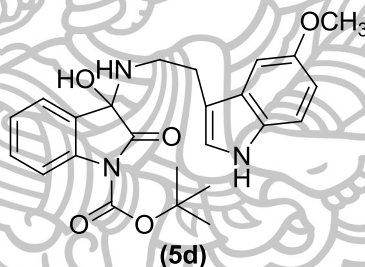


ภาพที่ 68 ผลการสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**5d**)

จากวิธีการสังเคราะห์ทั้งหมด 2 วิธี ของ tert-butyl 3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy-2-oxoindoline-1-carboxylate (**5d**) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของหนืดสีเหลือง ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 14 จากการตรวจสอบ ¹H-NMR พบสัญญาณ singlet 9 โปรตอน ที่ 1.51 ppm ของ tert-butyl ของหมู่ Boc และ triplet 2 โปรตอน ที่ 3.03 ppm เป็นของ CH₂ ที่ติดกับ CH₂ และ quartet 2 โปรตอน ที่ 3.73 ppm เป็นของ CH₂ ที่ติดกับ NH จาก tryptamine และ singlet 3 โปรตอน ที่ 3.85 ppm ของ OCH₃ และ broad 1 โปรตอน ที่ 10.24 ppm ของ OH ที่ตำแหน่ง C-3 ที่เกิดจากปฏิกิริยา condensation ด้วย 5-methoxytryptamine

ตารางที่ 14 ผลการสังเคราะห์ tert-butyl 3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy-2-oxoindoline-1-carboxylate (**5d**)

วิธีที่	สภาวะของปฏิกิริยา	% yield
1	EtOH, CH ₃ COOH, reflux, overnight	37.3
2	EtOH, CH ₃ COOH, rt, overnight	30.2

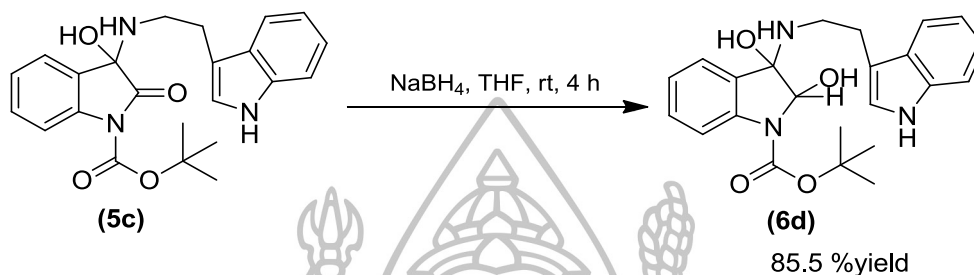


ภาพที่ 69 โครงสร้างของ tert-butyl 3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy-2-oxoindoline-1-carboxylate (**5d**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ tert-butyl 3-hydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoindoline-1-carboxylate (**5d**) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้ ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 10.24 (1H, br, OH), 8.41 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, ArH), 8.28 (1H, d, *J* = 7.8, 1.2 Hz, ArH), 8.14 (1H, br, NHAr), 7.54 (1H, t, *J* = 7.2 Hz, ArH), 7.25 (1H, d, *J* = 9 Hz, ArH), 7.04 (1H, s, CHNH), 7.00 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, ArH), 6.93 (1H, br, NHCH₂), 6.86 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, ArH), 3.85 (3H, s, OCH₃), 3.73 (2H, q, *J* = 6.6 Hz, CH₂NH), 3.03 (2H, t, *J* = 6.9, 6.6 Hz, CH₂CH₂), 1.51 (9H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 191.65, 163.19, 154.14, 152.72, 143.16, 136.32, 134.36, 131.61, 127.56, 123.03, 121.18, 119.12, 118.09,

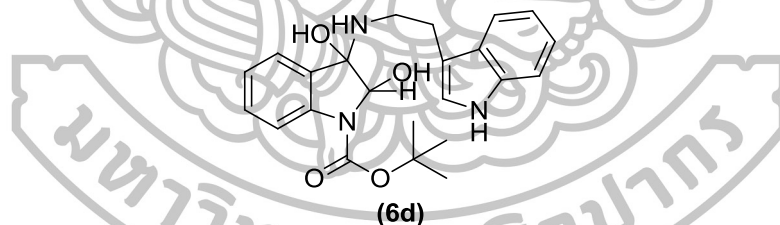
112.54, 112.11, 112.03, 100.46, 81.03, 55.98, 39.73, 28.43, 25.16; HR-ESI MS จากการคำนวณ $C_{24}H_{27}N_3O_5$ (M+Na)⁺ 460.1848 *m/z* จากการทดสอบ 460.1836 *m/z*

ผลการสังเคราะห์ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindoline-1-carboxylate (**6d**)



ภาพที่ 70 ผลการสังเคราะห์ indolinol (**6d**)

จากการสังเคราะห์ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindoline-1-carboxylate (**6d**) ด้วย NaBH_4 เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ **6d** 0.1848 g (85.5 % yield) ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากการตรวจสอบ ¹H-NMR พบสัญญาณ singlet 1 โปรตอน ที่ 4.87 ppm ของ CH ที่เกิดจากการ reduce เพิ่มขึ้น

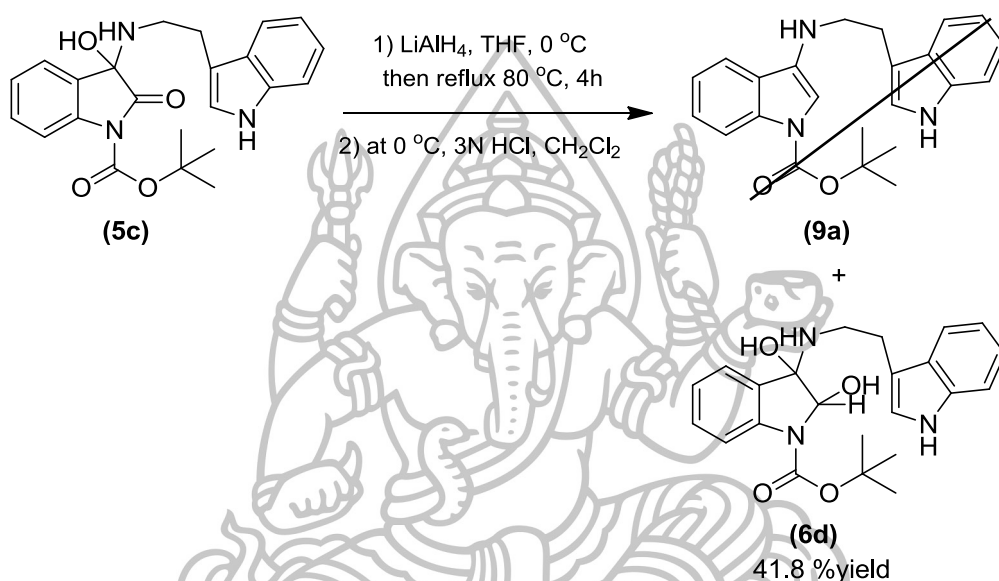


ภาพที่ 71 โครงสร้างของ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindoline-1-carboxylate (**6d**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindoline-1-carboxylate (**6d**) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้ ¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.50 (1H, br, NH), 8.09 (1H, br, OH), 7.66 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.53 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, ArH), 7.33-7.28 (2H, m, ArH), 7.26-7.23 (1H, td, $J = 7.2, 1.2$ Hz, ArH), 7.12-7.01 (2H, m, ArH), 6.81 (1H, s, CHNH), 6.80 (H, br, NHCH_2), 4.87 (1H, s, CHOH), 4.40 (1H, br, CHOH), 3.58-3.45 (2H, m, CH_2NH), 2.98-2.86 (2H, m, CH_2CH_2), 1.51 (9H, s, CH_3);

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 172.99, 136.40, 136.25, 136.09, 136.00, 131.63, 128.63, 127.11, 126.41, 124.44, 123.90, 122.32, 122.16, 119.29, 118.52, 112.25, 111.21, 70.18, 39.48, 28.36, 25.07; HR-ESI MS จากการคำนวณ $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 432.1899 m/z จากการทดสอบ 432.1893 m/z , melting point 154.2-156.7 $^\circ\text{C}$

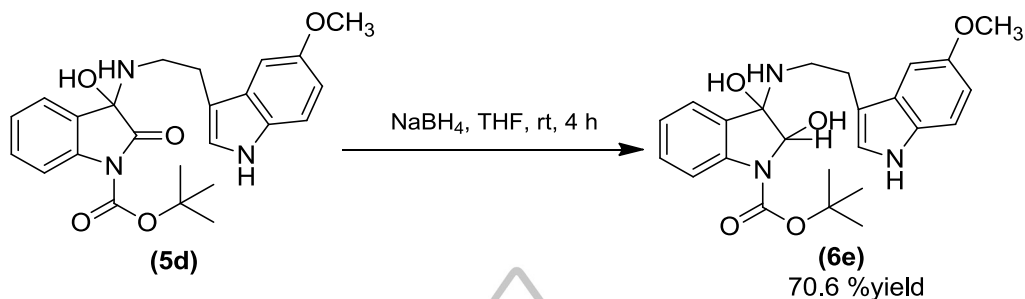
ผลการสังเคราะห์ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indole-1-carboxylate (**9a**)



ภาพที่ 72 ผลการสังเคราะห์ bis-indole (**9a**)

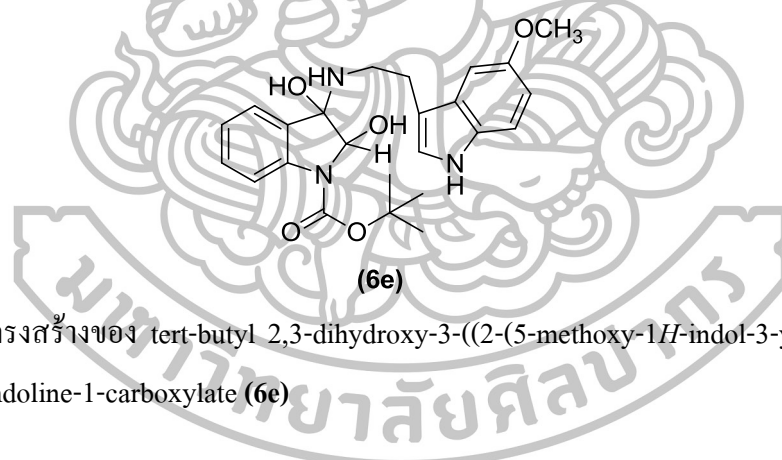
การสังเคราะห์ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1*H*-indole-1-carboxylate (**9a**) พบว่าไม่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ **9a** เนื่องจากไม่พบ $^1\text{H-NMR}$ ที่ต้องการ แต่เกิดเป็น tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindoline-1-carboxylate (**6d**) 0.1224 g (41.8 % yield) ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน (รายงาน $^1\text{H-NMR}$ ในผลการสังเคราะห์ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindoline-1-carboxylate (**6d**))

ผลการสังเคราะห์ tert-butyl 2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-1-carboxylate (**6e**)



ภาพที่ 73 ผลการสังเคราะห์ indolinol (**6e**)

จากการสังเคราะห์ tert-butyl 2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-1-carboxylate (**6e**) ด้วย NaBH_4 เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ **6e** ที่มีลักษณะเป็นของแข็งของแข็งสีเหลืองอ่อน 0.1007 (70.6 % yield) จากการตรวจสอบ $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณ singlet 1 โปรตอน ที่ 4.92 ppm ของ CH ที่เกิดจากการ reduce เพิ่มขึ้น

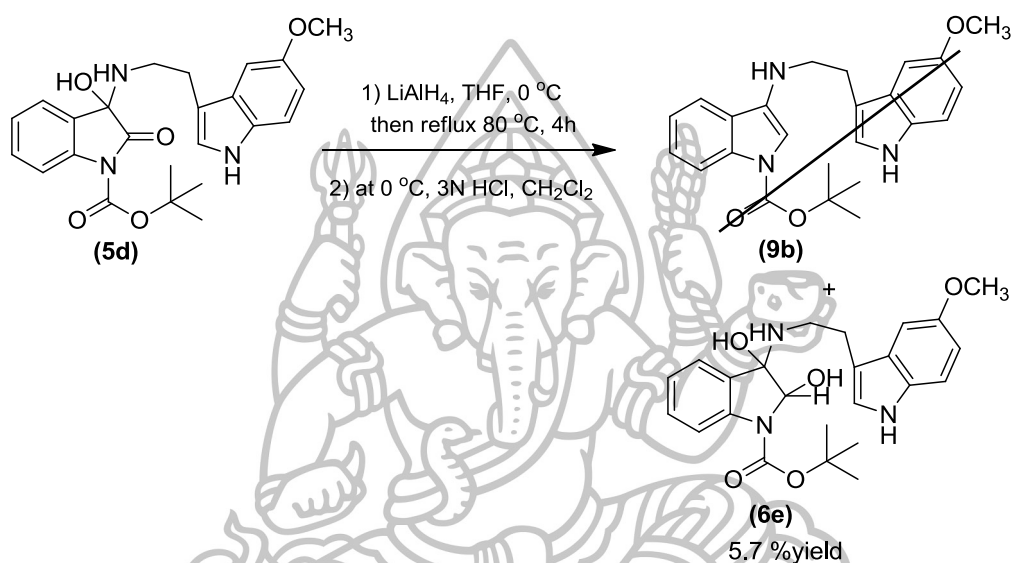


ภาพที่ 74 โครงสร้างของ tert-butyl 2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-1-carboxylate (**6e**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ tert-butyl 2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-1-carboxylate (**6e**) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้ $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.51 (1H, br, OH), 8.10 (1H, br, NH), 7.65 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, ArH), 7.28-7.23 (2H, m, ArH), 7.21 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, ArH), 7.04 (1H, td, $J = 8.4, 0.9$ Hz, ArH), 6.99 (1H, d, $J = 2.4$, ArH), 6.90-6.80 (3H, m, ArH), 4.92 (1H, s, CHOH), 4.55 (1H, br, CHOH), 3.84 (3H, s, OCH_3), 3.58-3.47 (2H, m, CH_2NH), 2.89-2.84 (2H, m, CH_2CH_2), 1.50 (9H, s, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 172.90, 154.43, 154.00, 136.07, 131.53, 131.34, 128.67,

127.55, 126.28, 124.31, 123.48, 123.01, 112.29, 112.06, 111.99, 100.49, 80.61, 70.20, 55.99, 39.38, 28.38, 25.10; HR-ESI MS จากการคำนวณ $C_{24}H_{29}N_3O_5$ $(M+Na)^+$ 462.2005 m/z จากการทดสอบ 462.2003 m/z ; melting point 171.3-172.6 °C

ผลการสังเคราะห์ tert-butyl 3-hydroxy-3-((2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxindoline-1-carboxylate (9b)

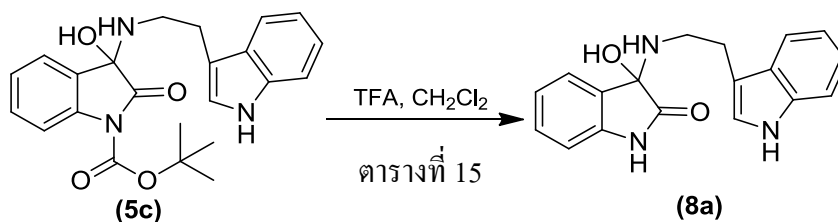


ภาพที่ 75 ผลการสังเคราะห์ bis-indole (9b)

จากการสังเคราะห์ tert-butyl 3-hydroxy-3-((2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl) amino)-2-oxindoline-1-carboxylate (9b) พบว่าไม่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ 9b เนื่องจากไม่พบ ^1H-NMR ที่ต้องการ แต่เกิดเป็น tert-butyl 2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-1-carboxylate (6e) 0.0065 (5.7 % yield) ที่มีลักษณะเป็นของหนืดสีเหลืองอ่อน (รายงาน ^1H-NMR ในผลการสังเคราะห์ tert-butyl 2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl) amino)indoline-1-carboxylate (6e))

ต่อมาผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหุ้ป้องกันที่ไนโตรเจนของวง oxindole ที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา reduction จึงนำ 3-hydroxy-2-oxindole (5c) มาทำปฏิกิริยา deprotection ของ Boc group ที่ไนโตรเจนของวง oxindole เพื่อให้เกิดเป็น 3-hydroxy-2-oxindole (8a) โดยใช้ trifluoroacetic acid (TFA) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา [28,29] ซึ่งมีสภาวะการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน 2 วิธี มีผลการสังเคราะห์ดังนี้

ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxyindolin-2-one (**8a**)

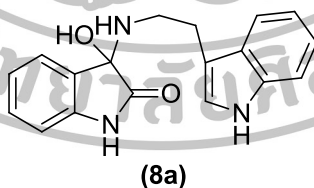


ภาพที่ 76 ผลการสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-oxindole (**8a**)

จากการสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxyindolin-2-one (**8a**) ที่มีสถานะการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน 2 วิธี พบว่าเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง โดยมีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตดังแสดงในตารางที่ 15 จากการตรวจสอบ $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณ singlet 9 โปรตอน ที่ 1.51 ppm ของ tert-butyl ของหมู่ Boc หายไป

ตารางที่ 15 ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxyindolin-2-one (**8a**)

วิธีที่	สถานะของปฏิกิริยา	% yield
1	1) TFA, CH_2Cl_2 , 0°C , 16 h 2) NaHCO_3	11.1
2	1) TFA, CH_2Cl_2 , rt, 6 h 2) NaHCO_3	15.2



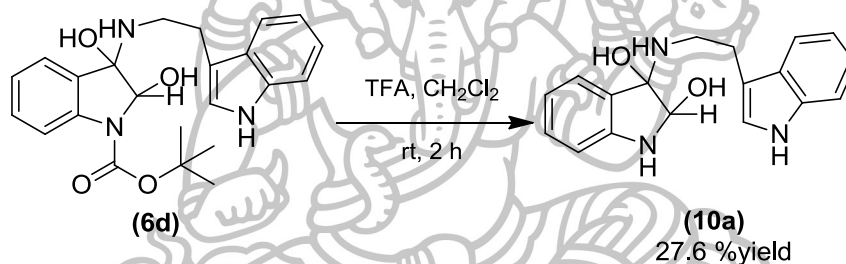
ภาพที่ 77 โครงสร้างของ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxyindolin-2-one (**8a**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxyindolin-2-one (**8a**) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้ $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.65 (1H, br, OH), 8.10 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.55 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, ArH), 7.30 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.21 (1H, td, $J = 9.6, 1.2$ Hz, ArH), 7.11 (1H, t, $J = 7.5, 7.2$ Hz, ArH), 7.03 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, ArH), 7.00 (1H, s, CHNH), 6.57 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, ArH), 6.54 (1H, t, J

=7.5 Hz, ArH), 6.26 (1H, br, NHAr), 3.63 (2H, q, $J = 6.6$ Hz, CH_2NH), 2.99 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, CH_2CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 164.76, 152.33, 136.42, 135.95, 134.15, 127.23, 122.31, 122.16, 122.08, 119.36, 118.59, 116.73, 116.05, 114.30, 12.15, 111.28, 39.51, 25.11; HR-ESI MS จากการคำนวณ $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 330.1218 m/z จากการทดสอบ 330.1202 m/z , melting point 168.8-170.9 $^\circ\text{C}$

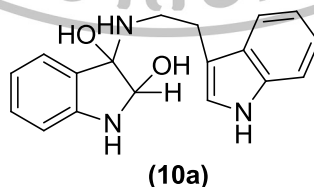
เมื่อผู้วิจัยสามารถถอดหมู่ป้องกันที่ไนโตรเจนของวง oxindole (**5c**) ได้แล้วจึงนำสภาวะการเกิดปฏิกิริยา deprotection วิธีที่ 1 มาใช้ในการทำปฏิกิริยา deprotection ของ indolinol (**6d**) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็น indolinol (**10a**) โดยมีวิธีการสังเคราะห์ดังต่อไปนี้

ผลการสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-2,3-diol (**10a**)



ภาพที่ 78 ผลการสังเคราะห์ indolinol (**10a**)

จากการสังเคราะห์ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-2,3-diol (**10a**) พบว่าเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง 0.0699 g (27.6 % yield) จากการตรวจสอบ ^1H -NMR พบสัญญาณ singlet 9 โปรตอน ที่ 1.51 ppm ของ tert-butyl ของหมู่ Boc หายไป



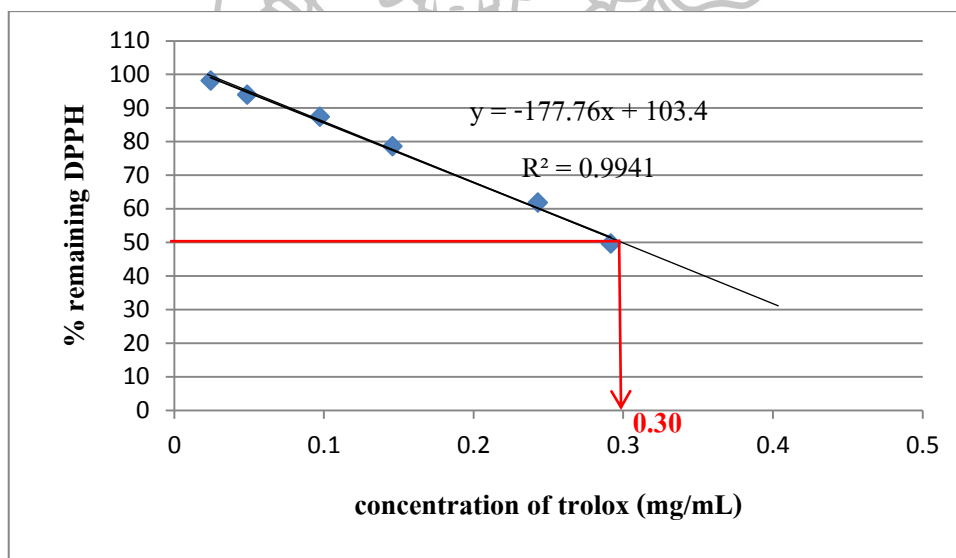
ภาพที่ 79 โครงสร้างของ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-2,3-diol (**10a**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-2,3-diol (**10a**) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.56, (1H, d, $J = 7.8$ Hz, ArH), 7.36 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.21-7.07 (2H, m, ArH), 6.87 (1H,

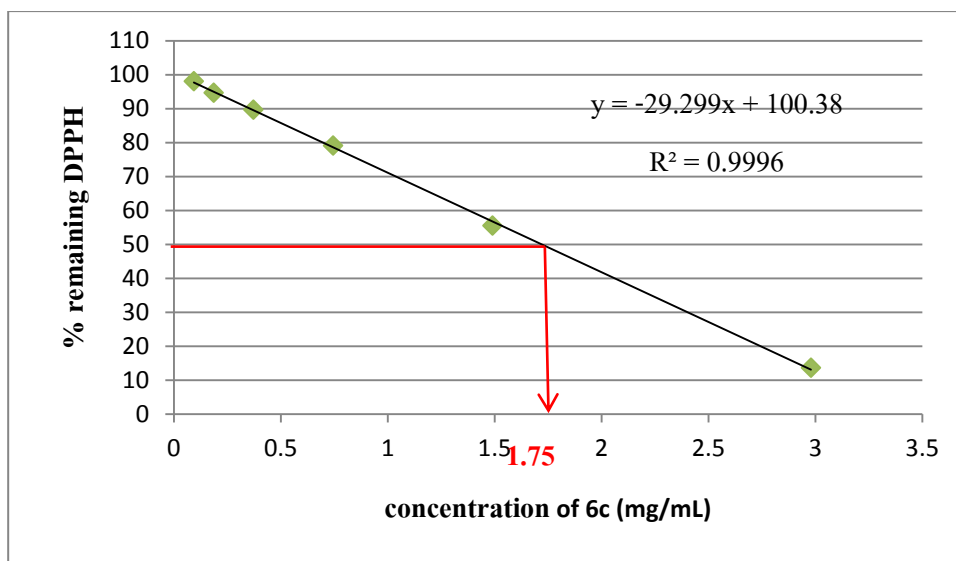
s, CHNH), 6.79 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, ArH), 6.71 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, ArH), 5.15 (1H, s, CHOH), 3.64-3.44 (2H, m, NHCH₂CH₂), 2.96-2.86 (2H, m, CH₂CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 173.07, 144.35, 136.33, 129.13, 127.51, 122.43, 122.28, 122.04, 119.33, 118.58, 117.44, 112.39, 111.31, 71.30, 39.63, 25.11; HR-ESI MS จากการคำนวณ C₁₈H₁₉N₃O₂ (M+H)⁺ 310.1556 *m/z* จากการทดสอบ 310.1558 *m/z*, melting point 179.1-182.3 °C

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.2.1 ผลการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารที่ทำการสังเคราะห์ได้ ได้แก่ **5a-d**, **6a**, **6c-e**, **8a** และ **10a** เทียบกับสารมาตรฐาน trolox พบว่ามีเพียงแค่ **6c** ที่มีแนวโน้มในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แต่ต้องใช้ความเข้มข้นสูง ดังนั้นเมื่อเทียบกับ trolox แล้วพบว่ามีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า ซึ่งมีผลการทดลองดังนี้



ภาพที่ 80 การหาค่า EC₅₀ ของสารมาตรฐาน trolox ด้วยวิธี DPPH



ภาพที่ 81 แสดงการหาค่า EC_{50} ของ 6c ด้วยวิธี DPPH

4.2.2 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา

จากผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า 5a, 6a-d และ 8a มีแนวโน้มในการยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia feacalis* และ *Escherichia Coli* ดังตารางที่ 16 และเมื่อนำสารที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา พบว่าไม่มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อรา เนื่องจากไม่ปรากฏ zone of inhibition เมื่อเทียบกับ disk ยา ดังตารางที่ 17

ตารางที่ 16 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย

compound	Zone of inhibition (mm)						
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus typhi</i>	<i>Staphylococcus typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia feacalis</i>	<i>Escherichia Coli</i>
5a	-	9	-	-	-	-	-
5b	-	-	-	-	-	-	-
5c	-	-	-	-	-	-	-
5d	-	-	-	-	-	-	-
6a	22	9	-	-	-	11	-
6b	-	7	-	-	-	-	-
6c	9	-	-	-	-	17	12
6d	-	11	-	-	-	-	-
8a	-	7	-	-	8	-	-
10a	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 17 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา

compound	Zone of inhibition (mm)				
	<i>aspergillus niger</i>	<i>aspergillus flavus</i>	<i>aspergillus fumigatus</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>
5a	-	-	-	-	-
5b	-	-	-	-	-
5c	-	-	-	-	-
5d	-	-	-	-	-
6a	-	-	-	-	-
6b	-	-	-	-	-
6c	-	-	-	-	-
6d	-	-	-	-	-
8a	-	-	-	-	-
10a	-	-	-	-	-

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

จากแผนการสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์ทั้งสองแผนการทดลองที่มีวิธีการทดลองข้างต้นนี้ พบว่าสามารถนำ isatin (2) ทำปฏิกิริยากับ benzoyl chloride และ di-tert-butyl dicarbonate เกิดเป็น 1-benzoylindoline-2,3-dione (3a) และ tert-butyl 2,3-dioxindoline-1-carboxylate (3b) ตามลำดับ จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปเพื่อให้เกิดเป็น 3-hydroxy-2-oxindole ซึ่งมีการแทนที่ที่ตำแหน่ง C-3 ด้วยสารประกอบ heterocyclic โดยเกิดผ่านปฏิกิริยา condensation กับ tryptamine (4a) หรือ 5-methoxytryptamine (4b) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 4 โครงสร้าง คือ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (5a), 1-benzoyl-3-hydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indolin-2-one (5b), tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy-2-oxindoline-1-carboxylate (5c) และ tert-butyl 3-hydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxindoline-1-carboxylate (5d) ซึ่งสถานะการเกิดปฏิกิริยาที่ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตมากที่สุดคือ การให้ความร้อนด้วยวิธี reflux จากนั้นเมื่อได้ 3-hydroxy-2-oxindole แล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยา reduction ด้วย LiAlH₄ และ BH₃.THF แต่พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาเป็น bis-indole แต่เกิดเป็น indolinol ได้แก่ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl(phenyl)methanone (6a), 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzylindoline-2,3-diol (6b), (2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indolin-1-yl(phenyl)methanone (6c), tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy-2-oxindoline-1-carboxylate (6d) และ tert-butyl 3-hydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxindoline-1-carboxylate (6e) จากนั้นผู้วิจัยได้นำ NaBH₄ มาใช้ในปฏิกิริยา reduction กับ 3-hydroxy-2-oxindole ทั้ง 4 โครงสร้างเพื่อให้ได้เป็น indolinol พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่มากกว่า 70 % เมื่อเทียบกับ LiAlH₄ และ BH₃.THF จากนั้นนำ indolinol ที่ได้มาทำการกำจัดหมู่ hydroxyl โดยการทำปฏิกิริยา dehydration พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จ เมื่อผู้วิจัยพบว่าไม่ประสบความสำเร็จในการทำปฏิกิริยา reduction เพื่อให้เกิดเป็น bis-indole เนื่องจากผลของหมู่ป้องกัน ผู้วิจัยจึงนำ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxy indolin-2-one (5a) มาศึกษาการเกิดปฏิกิริยา deprotection ของ benzoyl group โดยใช้ NaOH, KOH หรือ DBU เป็นเบสก็ตาม พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จ จึงนำ 3-hydroxy-2-oxindole ที่มี

หมู่ป้องกันคือ Boc group ทั้ง 2 โครงสร้างคือ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy-2-oxoindoline-1-carboxylate (**5d**) มาทำปฏิกิริยา deprotection โดยใช้ TFA พบว่าเกิดเป็น 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxyindolin-2-one (**8a**) แต่ได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตในปริมาณที่น้อย จึงไม่สามารถนำมาทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปได้ ผู้วิจัยจึงนำสถานะการทำปฏิกิริยา deprotection ข้างต้นนี้ มาทำปฏิกิริยา deprotection ของ tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy-2-oxoindoline-1-carboxylate (**6d**) พบว่าเกิดเป็น 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indoline-2,3-diol (**10a**) ได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตในปริมาณที่น้อย จึงไม่สามารถนำมาทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปได้เช่นกัน ทำให้ผู้วิจัยยังไม่ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์ Iheyamine A และอนุพันธ์ จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzoyl-3-hydroxyindolin-2-one (**5a**) มีแนวโน้มในการยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus cereus*, 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2,3-dihydroxyindolin-1-yl(phenyl)methanone (**6a**) มีแนวโน้มในการยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* และ *Escherichia feacalis*, 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-benzylindoline-2,3-diol (**6b**) มีแนวโน้มในการยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus cereus*, (2,3-dihydroxy-3-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)indolin-1-yl(phenyl)methanone (**6c**) มีแนวโน้มในการยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Escherichia feacalis*, *Escherichia Coli* และมีแนวโน้มในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ส่วน tert-butyl 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxy-2-oxoindoline-1-carboxylate (**6d**) มีแนวโน้มในการยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus cereus* และ 3-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-hydroxyindolin-2-one (**8a**) มีแนวโน้มในการยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* และจากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อรา พบว่าสารที่สังเคราะห์ได้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium sp.* และ *Rhizopus oligosporus* ได้

รายการอ้างอิง

- [1] Marialuisa, Menna., Ernesto, Fattorusso., and Concetta, Imperatore. (2011) “Alkaloids from Marine Ascidians,” **Molecules** 16 : 8694-8732.
- [2] Broadley, Kenneth J. (2010) “The vascular effects of trace amines and amphetamines,” **Pharmacology and Therapeutics** 125 : 363–375
- [3] Heinz-Herbert, Fiebig. and others (2013) “Synthesis and Antiproliferative Activity of 2,5-bis(3'-Indolyl)pyrroles, Analogues of the Marine Alkaloid Nortopsentin,” **Marine Drugs** 11 : 643-654.
- [4] Akira, Kaji. and others (1998) “Relationship between the structure and cytotoxic activity of asterriquinone, an antitumor metabolite of *Aspergillus terreus*, and its alkyl ether derivatives.,” **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 21 : 945-949.
- [5] Lin, Huang., Li-Xin, Dai., and Shu-Li, You. (2016) “Enantioselective Synthesis of Indole-Annulated Medium-Sized Rings,” **Journal of the American Chemical Society** 138 : 5793-5796.
- [6] Tsutomu, Sasaki., and others (1999) “Theyamines, new cytotoxic bisindole pigments from a colonial ascidian, *Polycitrella* sp.,” **Tetrahedron Letters** 40 : 303-306
- [7] John B, Bremner., Waya, Sengpracha., and Brian W, Skeltonc. (2008) “A Compact Approach to an Isomeric Theyamine A System and X-ray Crystal Structure of 5-Methyl-5*H*-azepino[2,3-*b*:4,5-*b'*]diindole,” **Synthetic Communications** 38, 12 : 1931-1939.
- [8] George R, Pettit. and other (1995) “Convolutamydine A, a Novel Bioactive Hydroxyoxindole Alkaloid from Marine Bryozoan *Amathia convolute*,” **Tetrahedron Letters** 36, 16 : 2783-2784.
- [9] George R, Pettit. and others (1995) “Isolation and Structure of Convolutamydines B ~ D from Marine Bryozoan *Amathia convolute*,” **Tetrahedron** 51, 19 : 5523-5528.
- [10] G. K. Jnaneshwar and V. H. Deshpande (1999) “Synthesis of Convolutamydine A from Isatin,” **Journal of Chemical Research, Synopses** : 632-633
- [11] Tomomi, Kawasaki. and others (2004) “Synthesis of 3-hydroxyindolin-2-one alkaloids, (±)-donaxaridine and (±)-convolutamydines A and E, through enolization–

- Claisen rearrangement of 2-allyloxyindolin-3-ones,” **Tetrahedron** 60 : 3493–3503.
- [12] Noriyuki, Hara. and others (2009) “First Enantioselective Synthesis of (*R*)-Convolutamydine B and E with *N*-(Heteroarenesulfonyl)prolinamides,” **Chemistry - A European Journal** 15 : 6790-6793.
- [13] Khuzhaev, V. U. and others (2004) “Alkaloids from *Arundo donax*. XVII. Structure of the Dimeric Indole Alkaloid Arundaphine,” **Chemistry of Natural Compounds** 40, 3 : 269-272.
- [14] Mitsuo, Takasug. and others (1991) “Brassicinal C and two dioxindoles from cabbage,” **Phytochemistry** 30, 9 : 2915-2917.
- [15] Liu, Lu. and others (2011) “Catalytic Enantioselective Henry Reactions of Isatins: Application in the Concise Synthesis of (*S*)-(-)-Spirobrassinin,” **Chemistry - A European Journal** 17 : 7791-7795.
- [16] Laatsch, Hartmut. and others (1995) “Maremycin A and B, new diketopiperazines from a marine *Streptomyces* sp.,” **Liebigs Annalen** :1291-1294 .
- [17] Xiao-Zhang, Feng. and others (2001) “Maremycins C and D, New Diketopiperazines, and Maremycins E and F, Novel Polycyclic spiro-Indole Metabolites Isolated from *Streptomyces* sp.,” **European Journal of Organic Chemistry** : 261-267.
- [18] Yonghua, Liu., Liangren, Zhang., and Yanxing, Jia. (2012) “Total synthesis of maremycins A, B, C₁/C₂, D₁, and D₂,” **Tetrahedron Letters** 53 : 684-687.
- [19] Barry M, Weichmanl. and others (1988) “Synthesis and Analgesic Activity of Pemedolac(*cis*- 1-Ethyl-1,3,4,9-tetrahydro-4-(phenylmethyl)pyrano[3,4-*b*]indole-1-acetic Acid),” **Journal of Medicinal Chemistry** 31 : 1244-1250.
- [20] Richard M, Soll., Charles, Guinosso., and Andre, Asselin. (1988) “Multigram Preparation of 1,8-Diethyl-7-hydroxy-1,3,4,9-tetrahydropyrano-[3,4-*b*]indole-1-acetic Acid, a Phenolic Metabolite of the Analgesic and Antiinflammatory Agent Etodolac,” **The Journal of Organic Chemistry** 53 : 2844-2847.
- [21] Angelo C, Pinto. and others (2002) “A versatile synthetic methodology for the synthesis of tryptophols,” **Tetrahedron** 58 : 8399-8412.

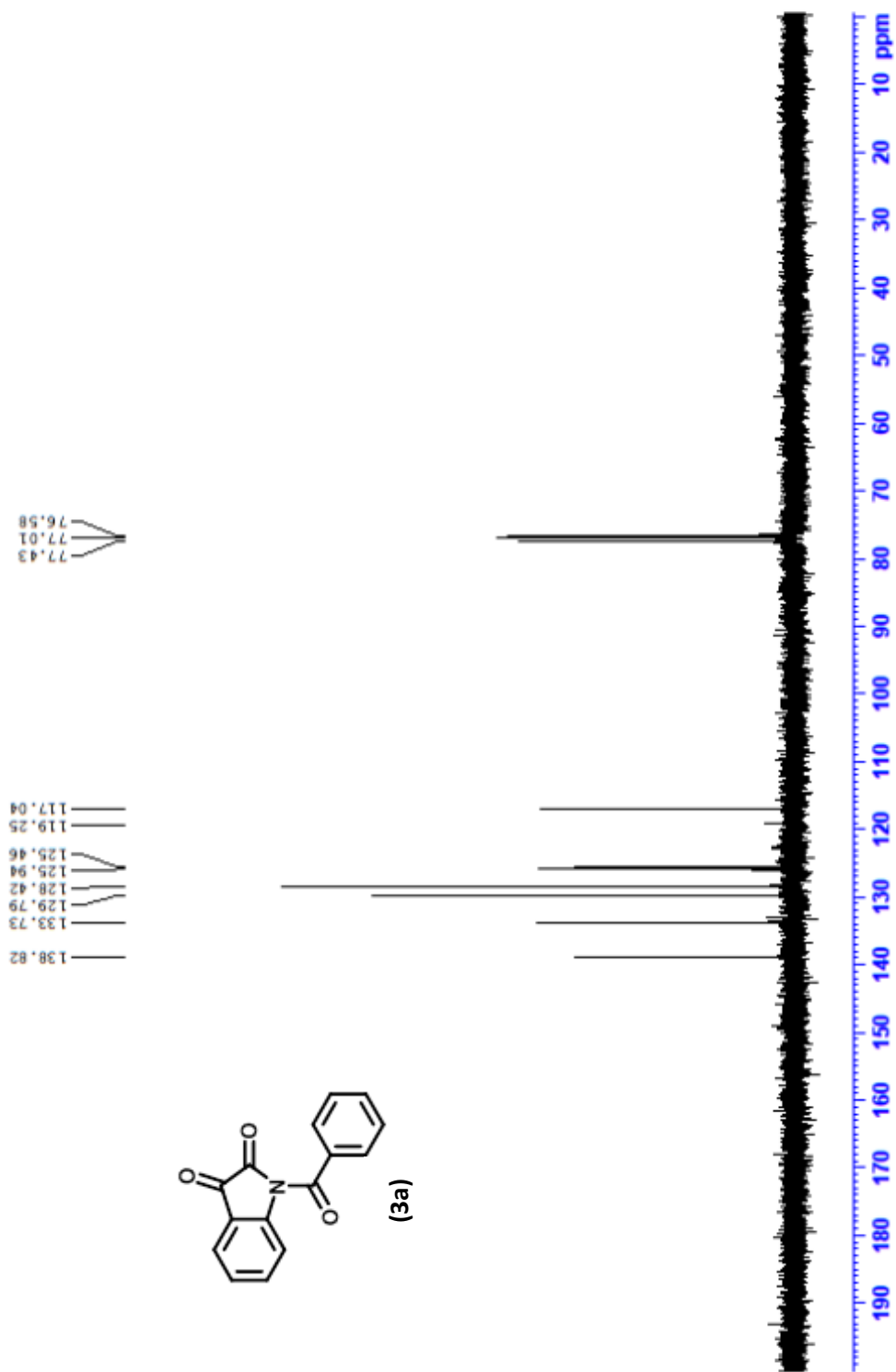
- [22] Yun Mi, Chung., Jeong Mi, Kim., and Jae Nyoun, Kim. (2003) "Facile Synthesis of 1-Aryl-1,2-ethanediols *via* the Reduction of *N*-Substituted Isatins," **Bulletin of the Korean Chemical Society** 24, 1 : 141-143.
- [23] Veeranjanyulu, Lanke., and Kandikere Ramaiah, Prabhu. (2013) "Highly Regioselective C2-Alkenylation of Indoles Using the *N*-Benzoyl Directing Group: An Efficient Ru-Catalyzed Coupling Reaction," **Organic Letters** 15, 11 : 2818-2821.
- [24] Hazel, Dyke., Patrick, G. Steel., and Eric, J. Thomas. (1989) "Cytochalasan Synthesis: Total Synthesis of Cytochalasin G," **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**: 525-528.
- [25] Minyoung, Kim. and others (2014) "Decarboxylative acylation of indolines with α -keto acids under palladium catalysis: a facile strategy for the synthesis of 7-substituted indoles," **Chemical Communications** 50 : 14249-14252.
- [26] Manju, Chakrabarty. and others (2006) "DBU, a highly efficient reagent for the facile regeneration of (hetero)arylamines from their acetamides and benzamides: Influence of solvent, temperature, and microwave irradiation," **Synthetic Communications** 32, 2 : 265-272.
- [27] Chongchong, Hu., Qinglong, Zhang., and You, Huang. (2013) "Phosphine-Catalyzed Rauhut-Currier Domino Reaction: A Facile Strategy for the Construction of Carbocyclic Spirooxindoles Skeletons," **Chemistry An Asian Journal** 8, 9 : 1981-1984.
- [28] Timothy D, Cushing., Juan F, Sanz-Cervera., and Robert M, Williams. (1996) "Stereocontrolled Total Synthesis of (+)-Paraherquamide B," **Journal of The American Chemical Society** 118, 3 : 557-579.
- [29] Xiao-Jiang, Hao. and others (2013) "Formal synthesis of (+)-gliocladin C," **Tetrahedron Letters** 54 : 692-694.

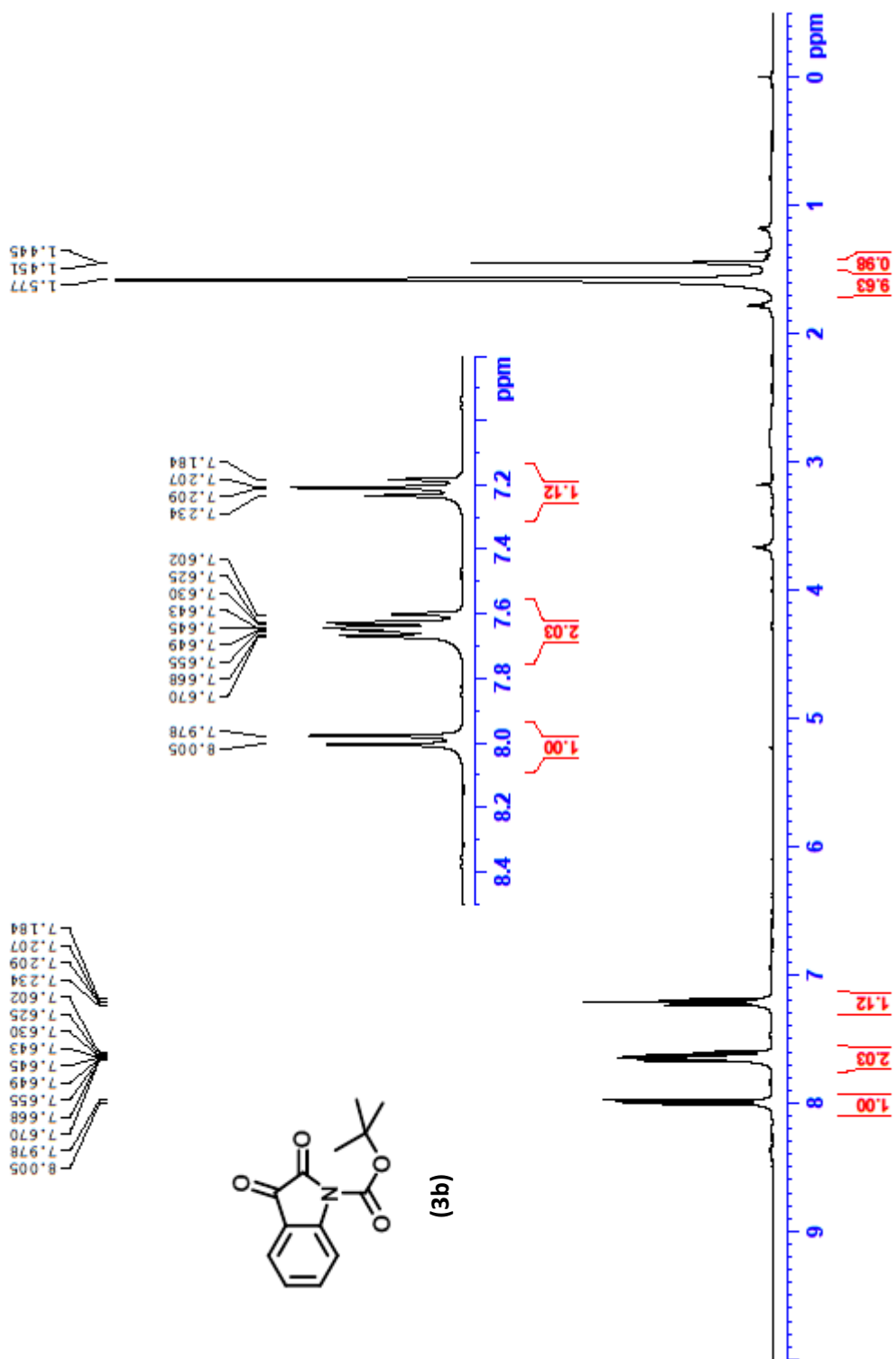


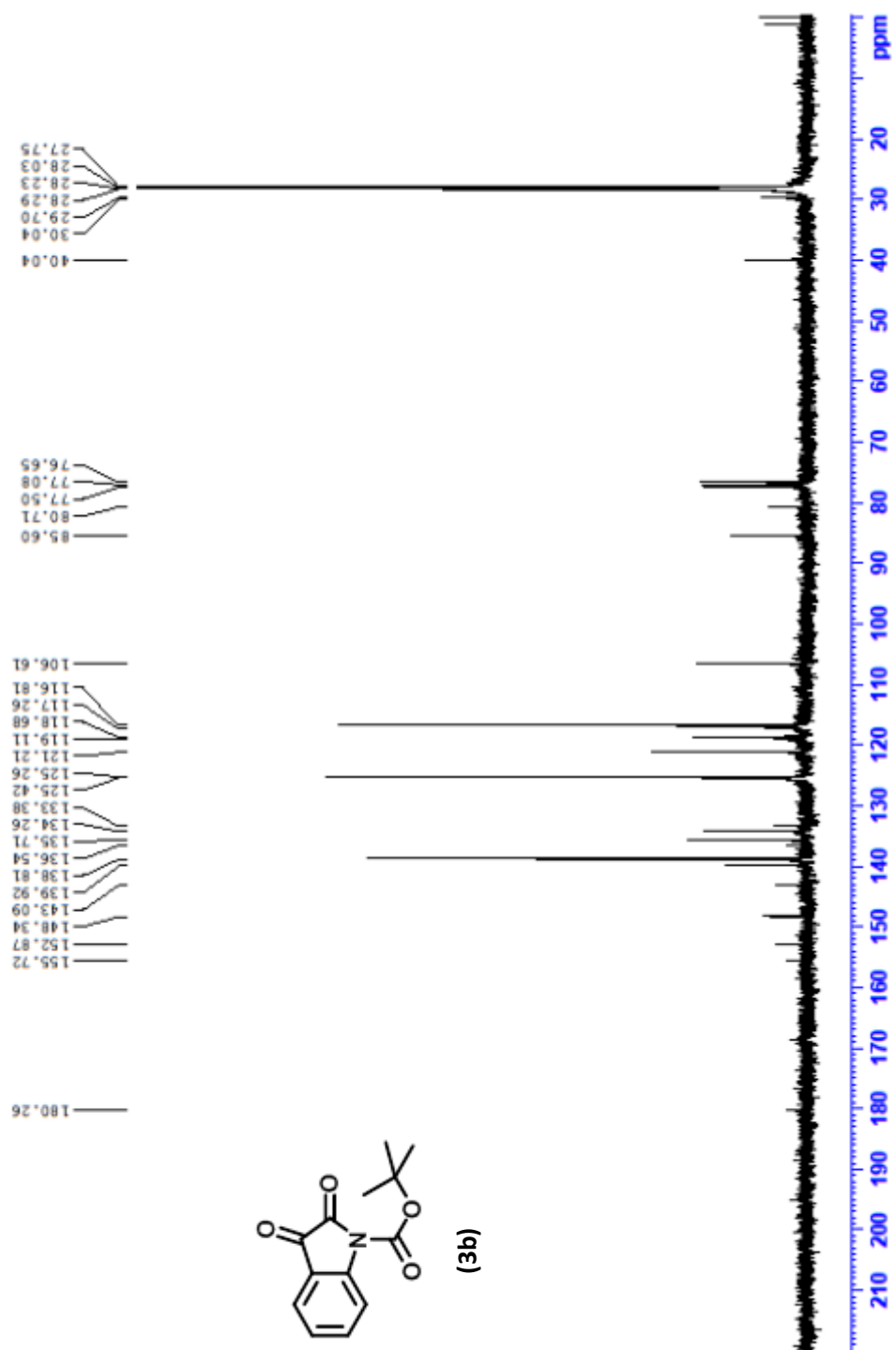


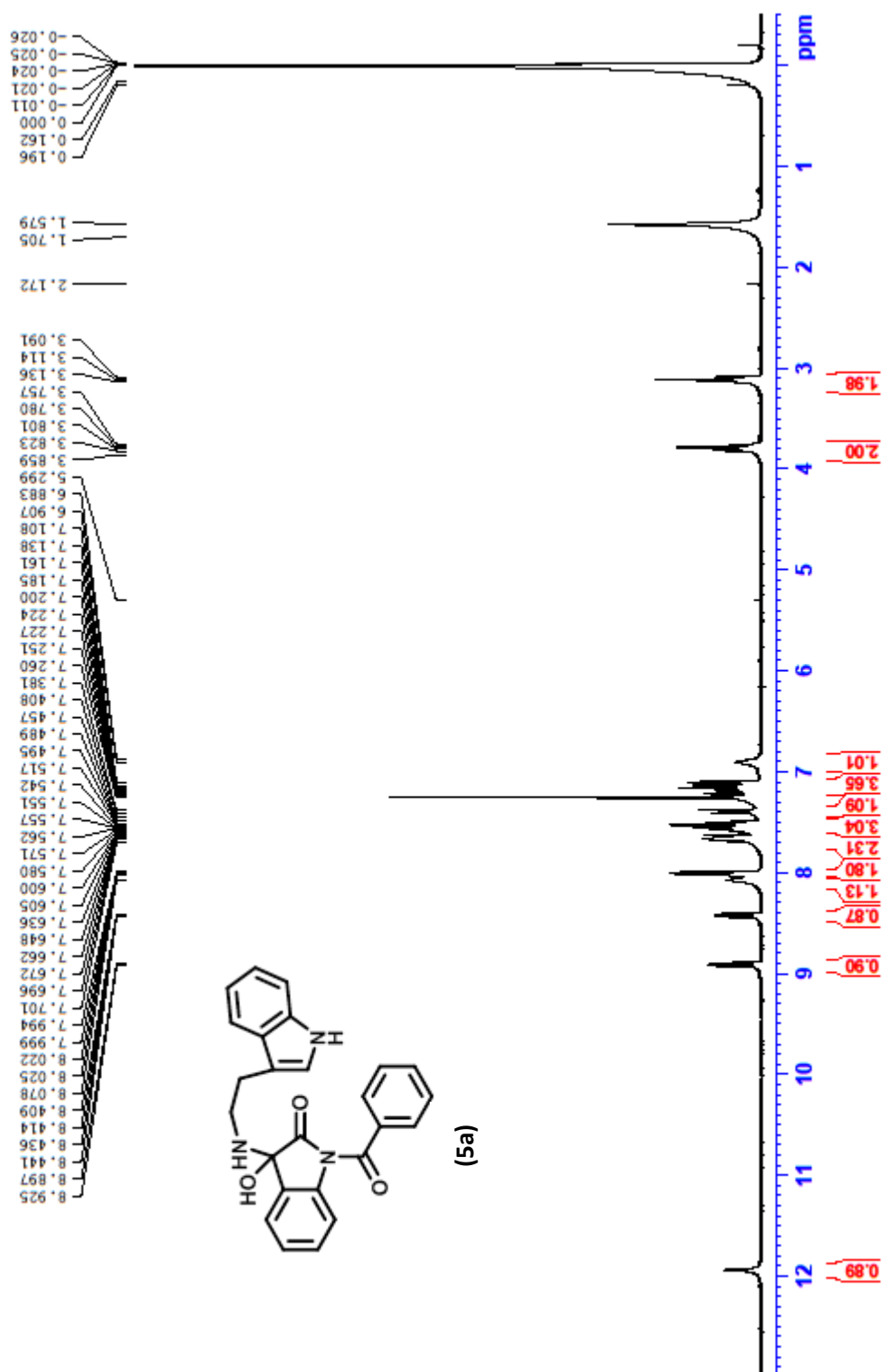
ภาคผนวก ก

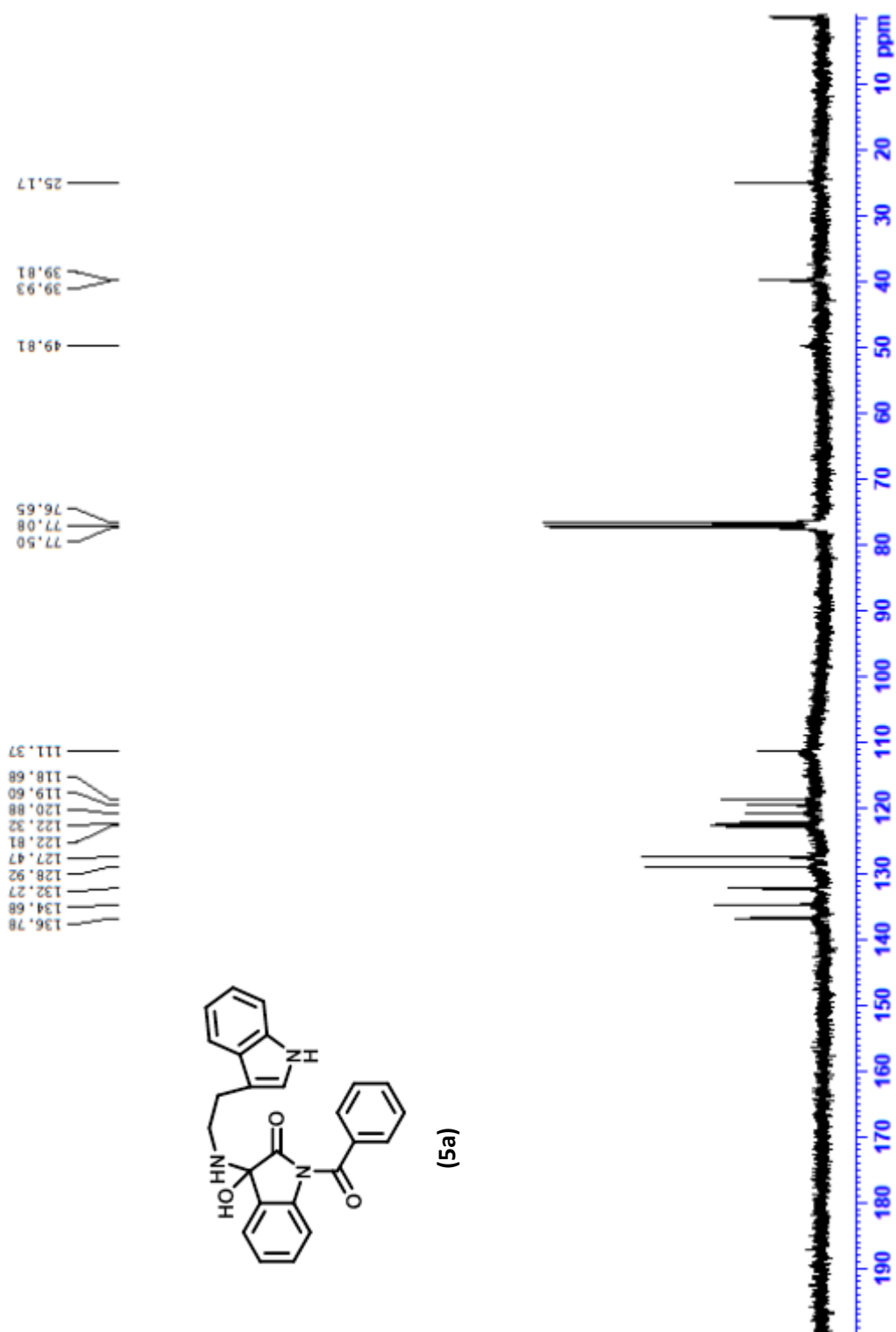
สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$

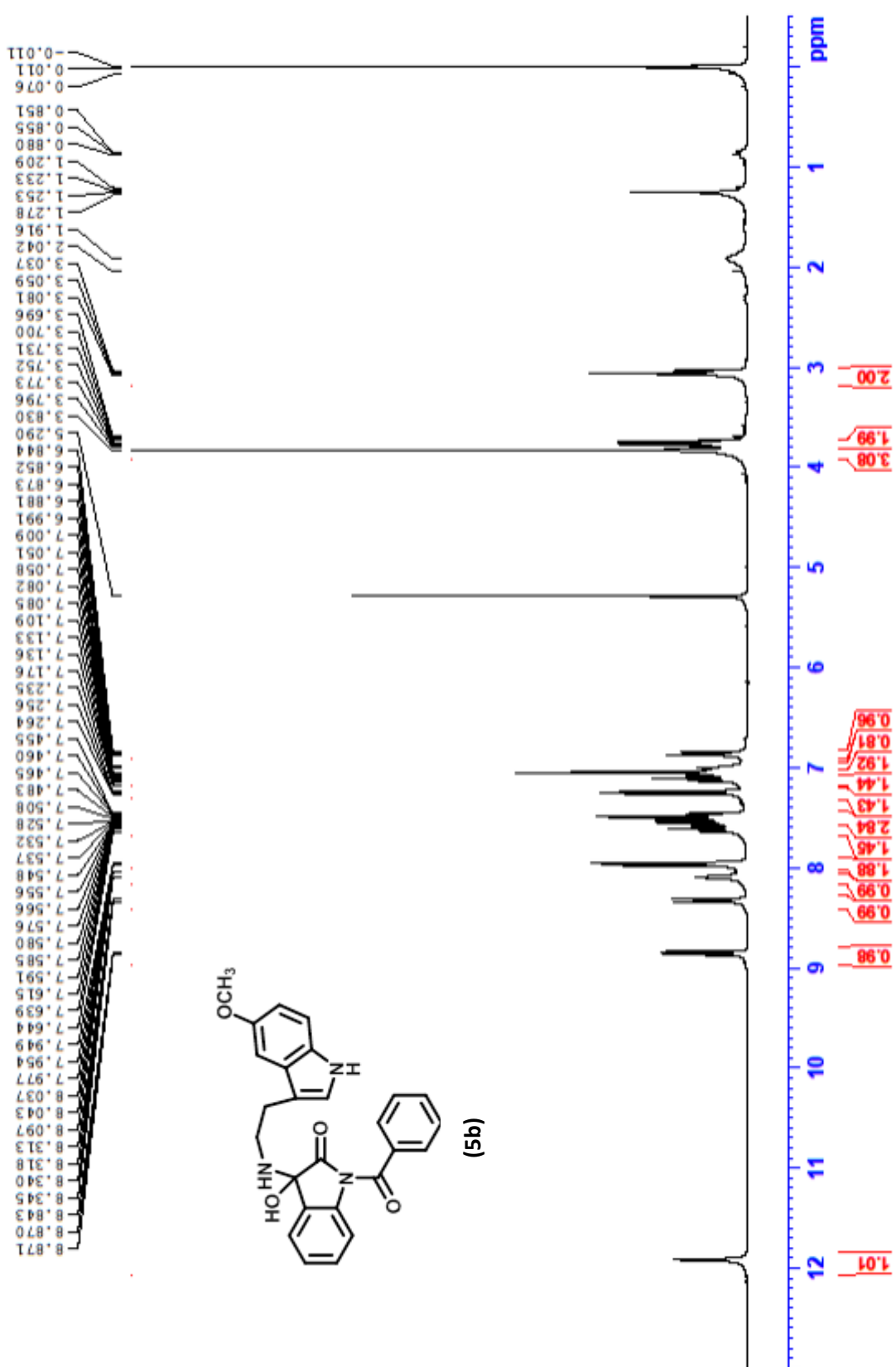


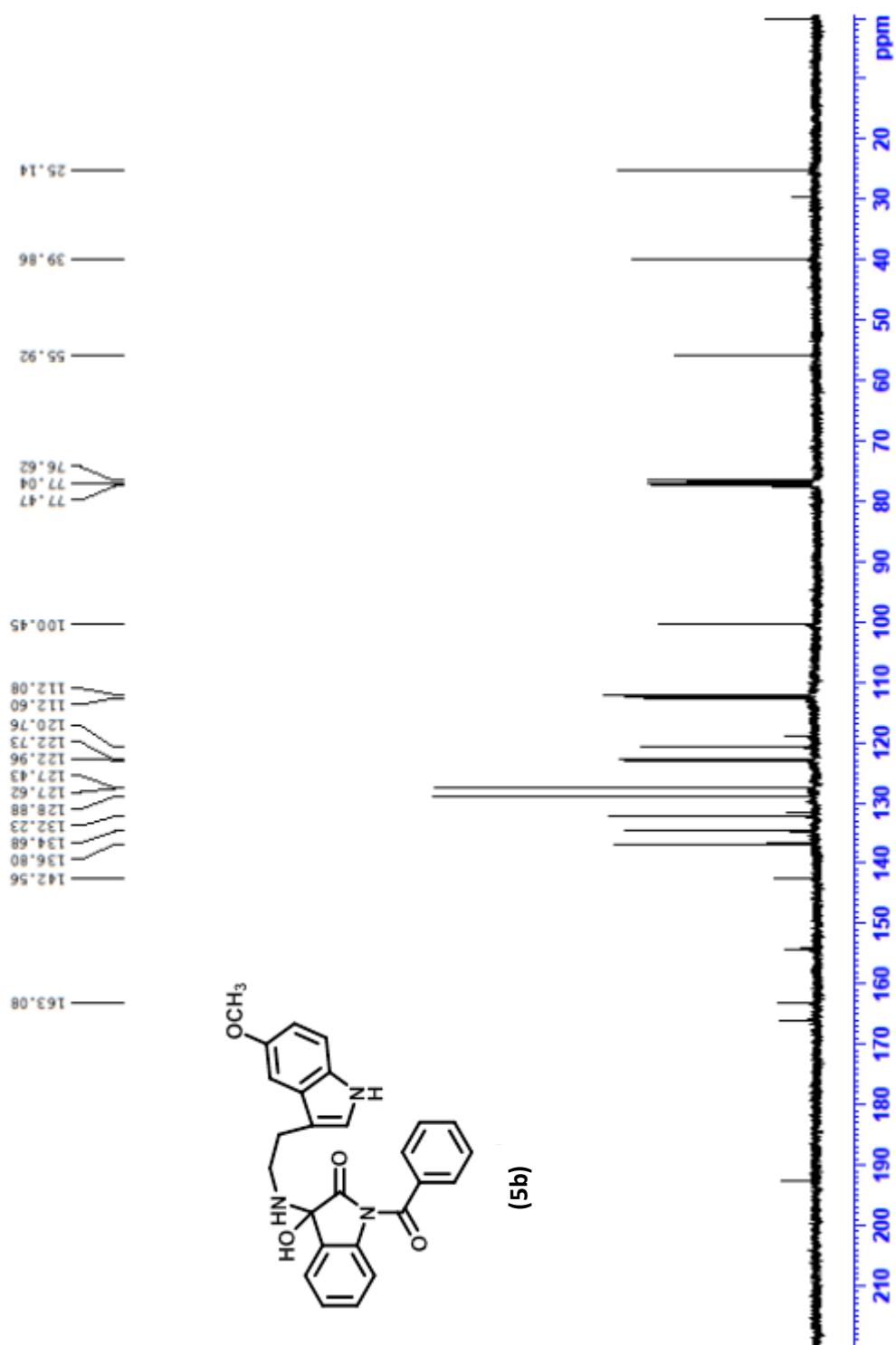


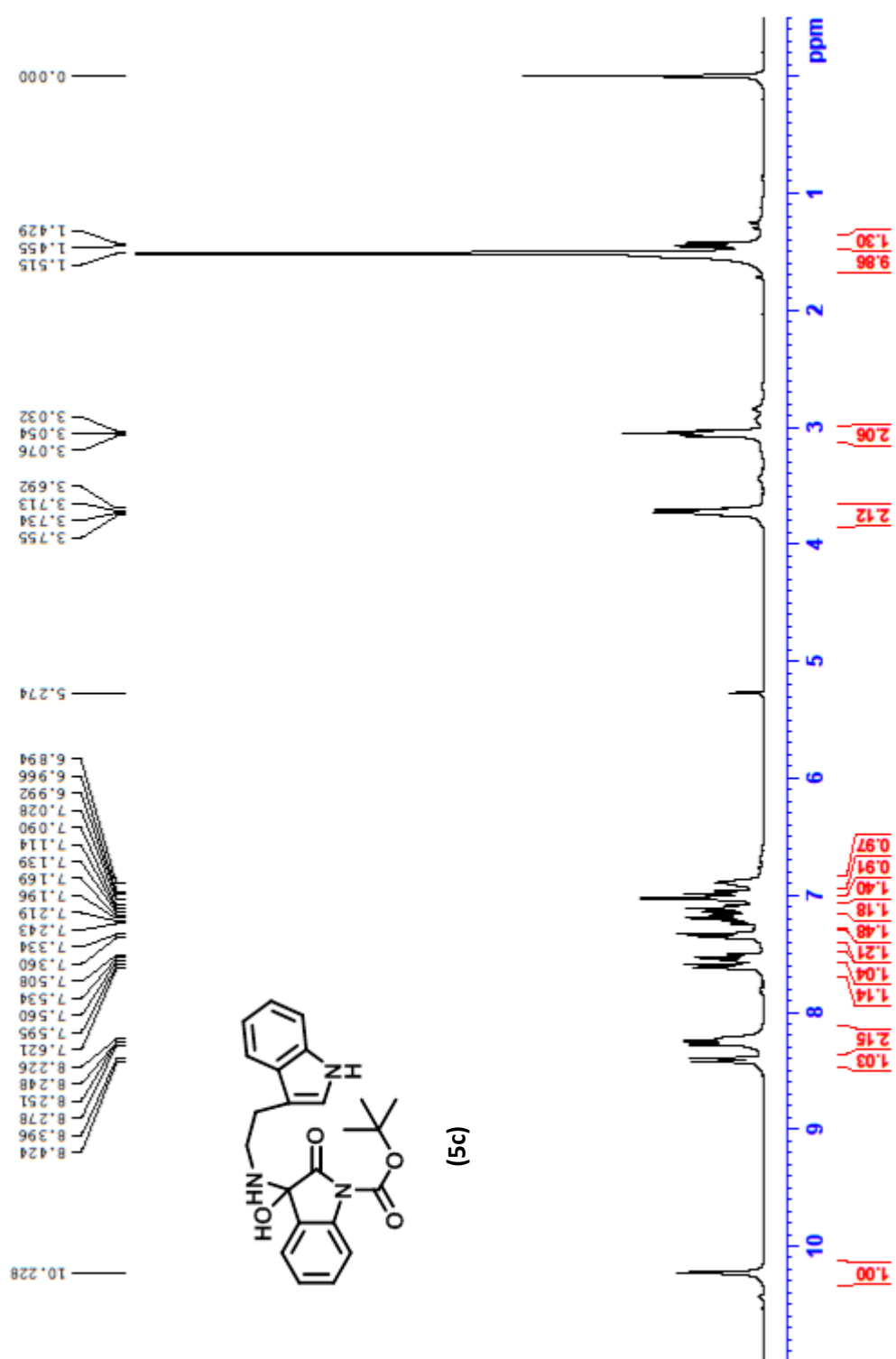


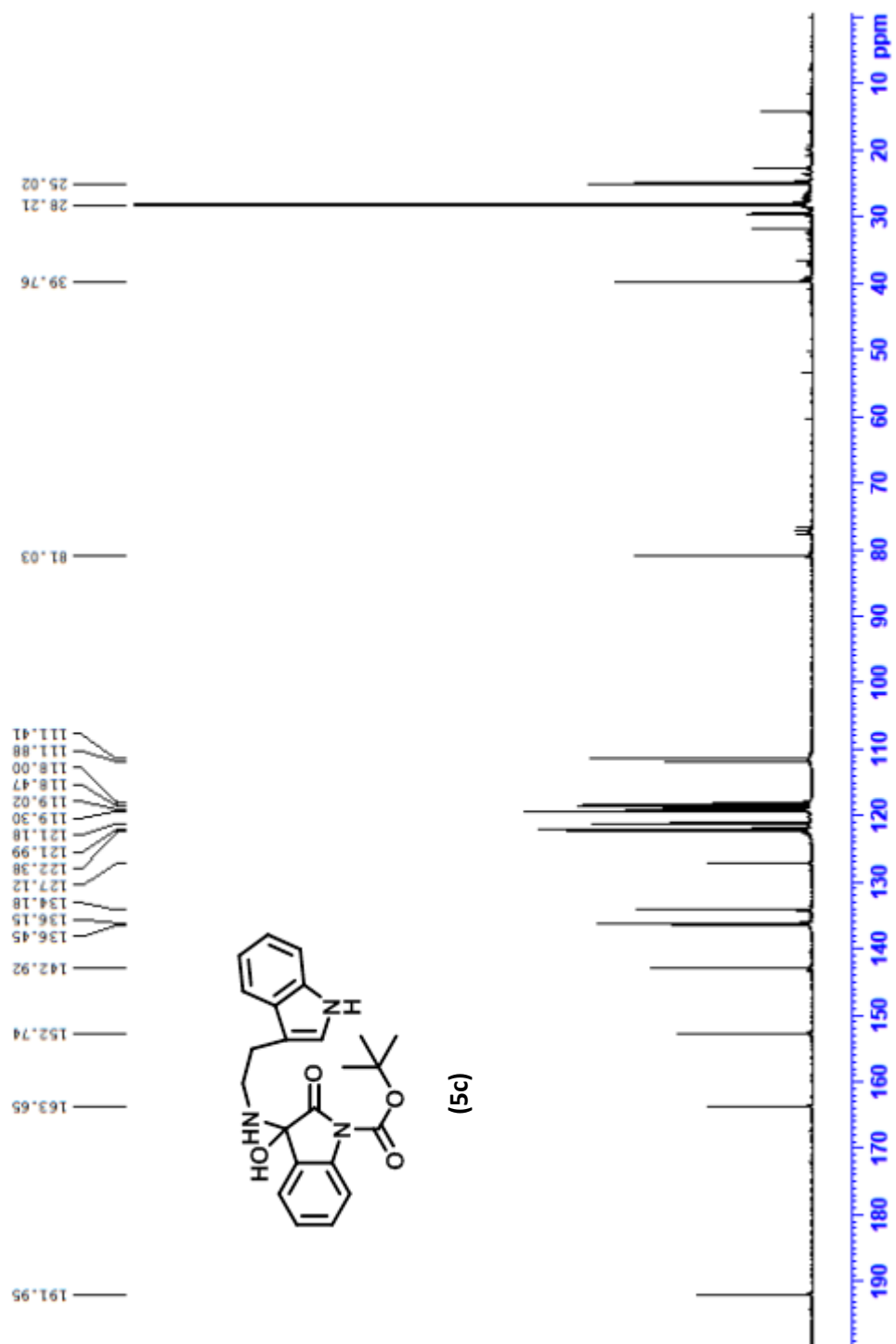


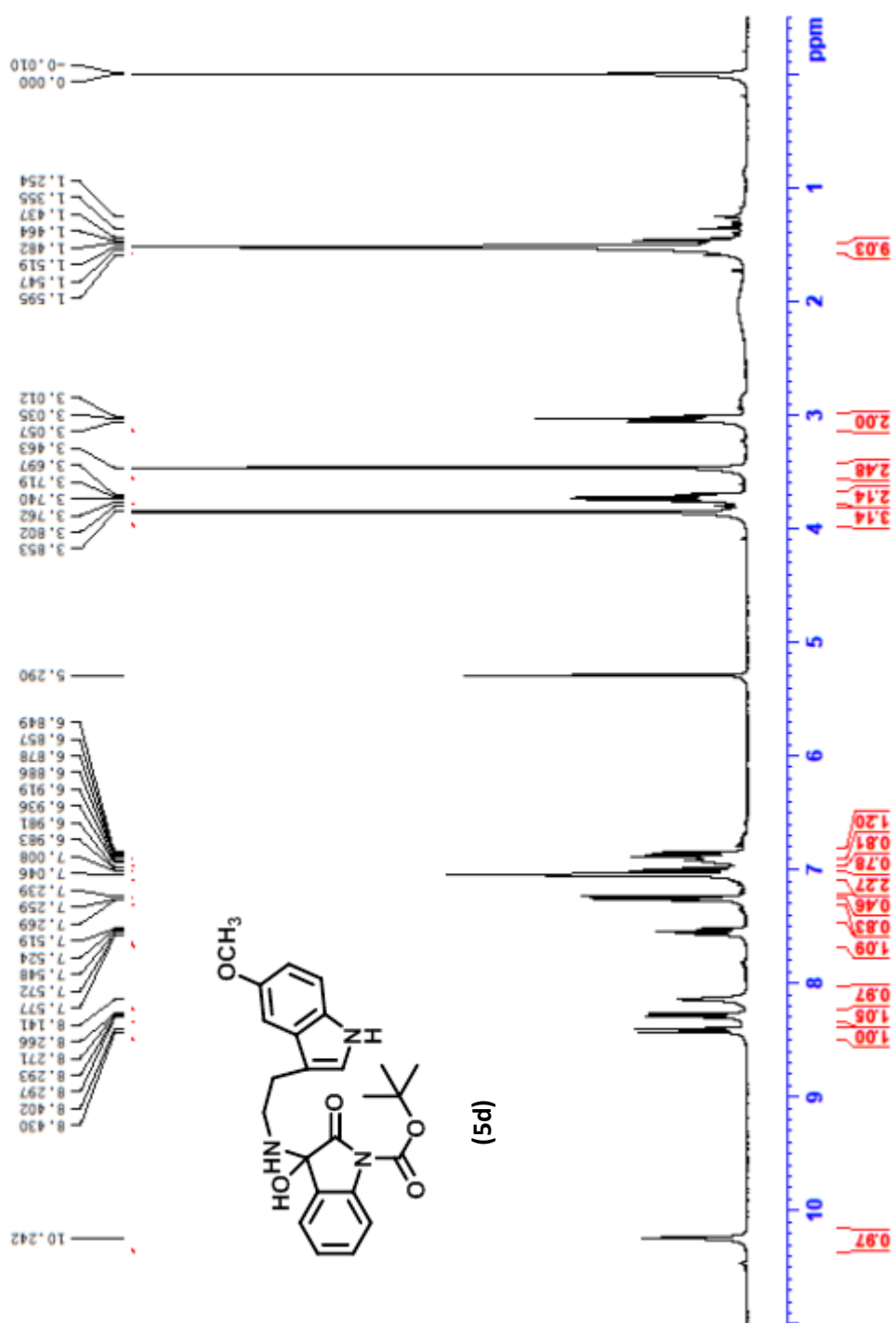


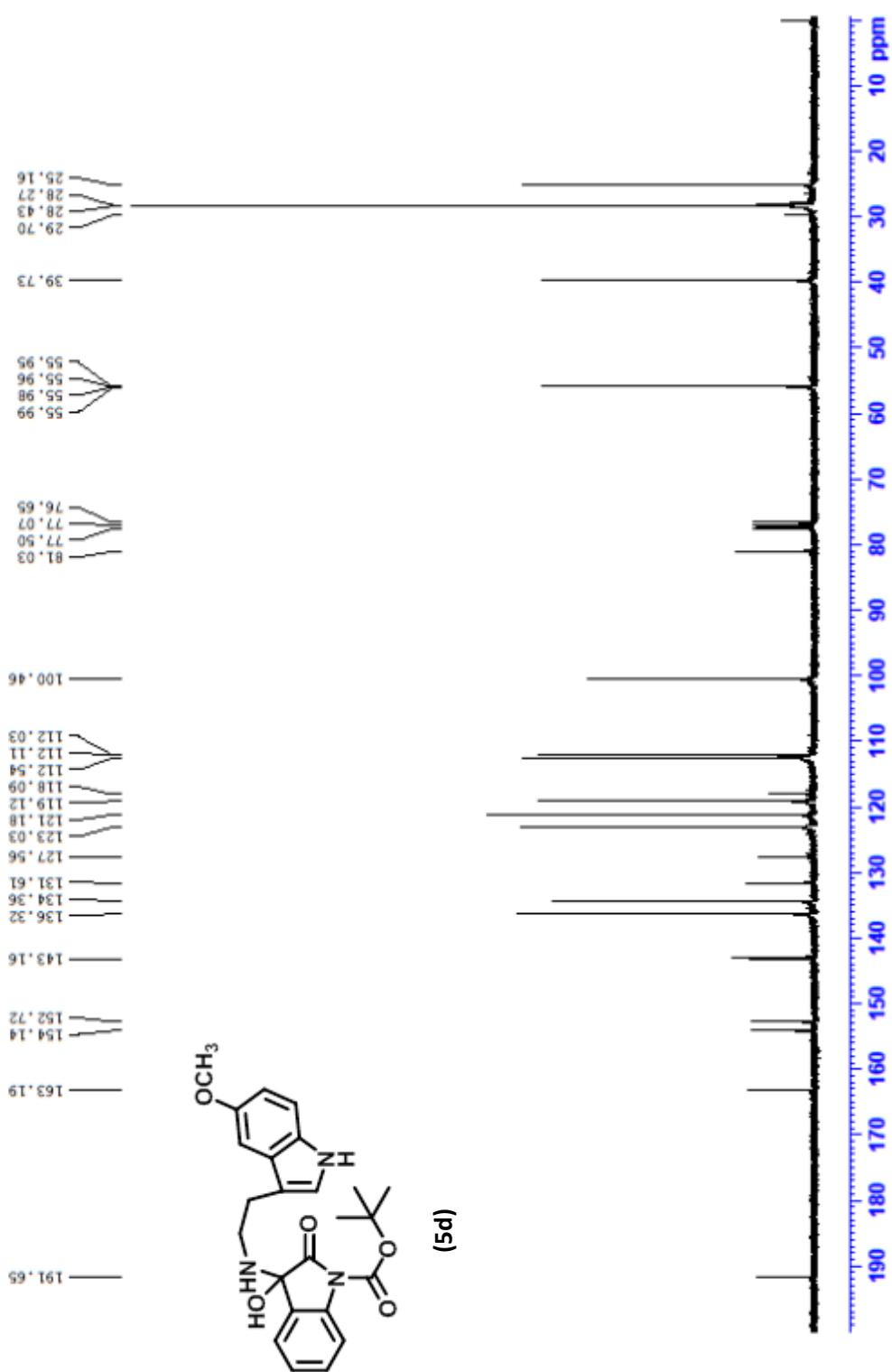


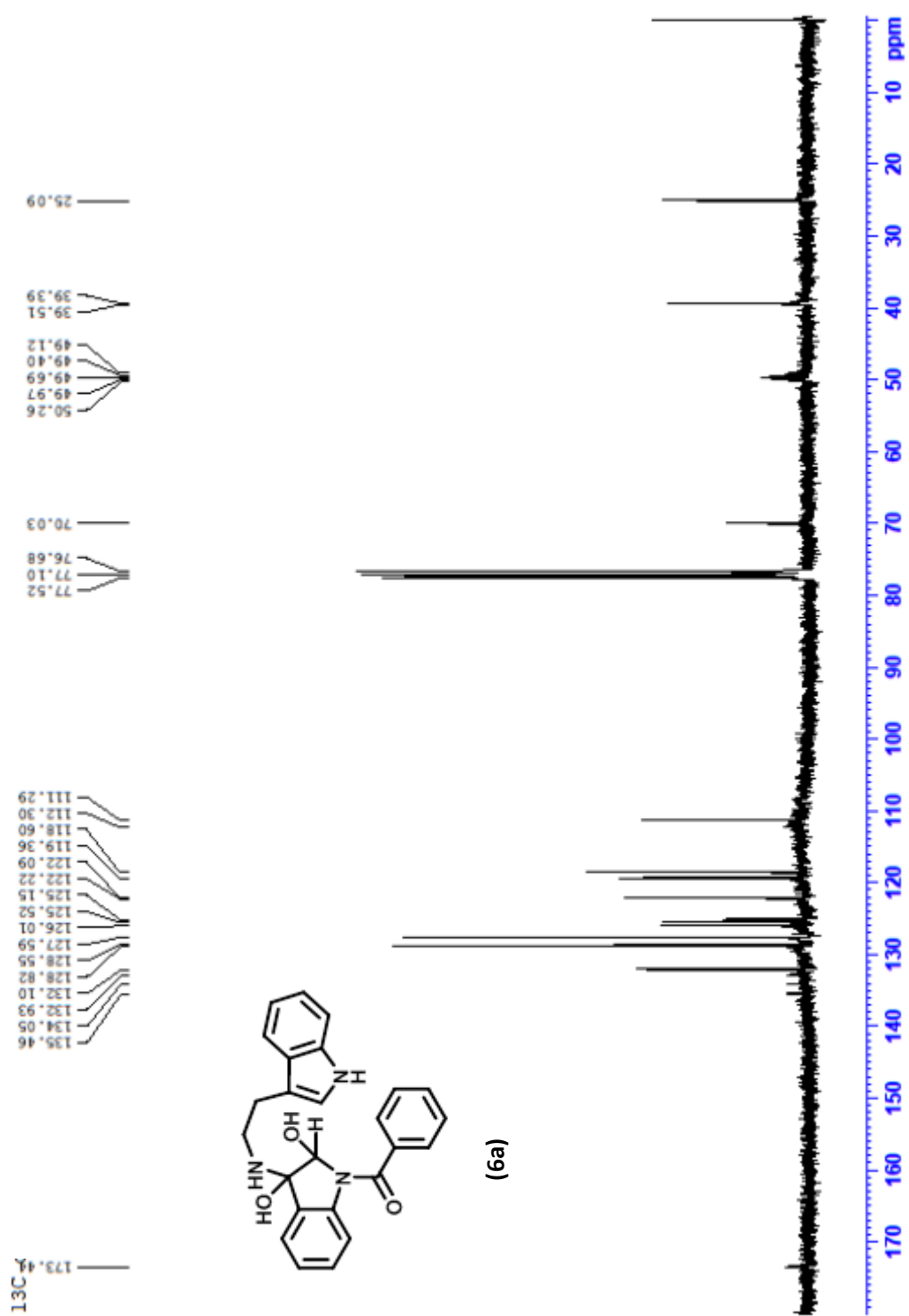


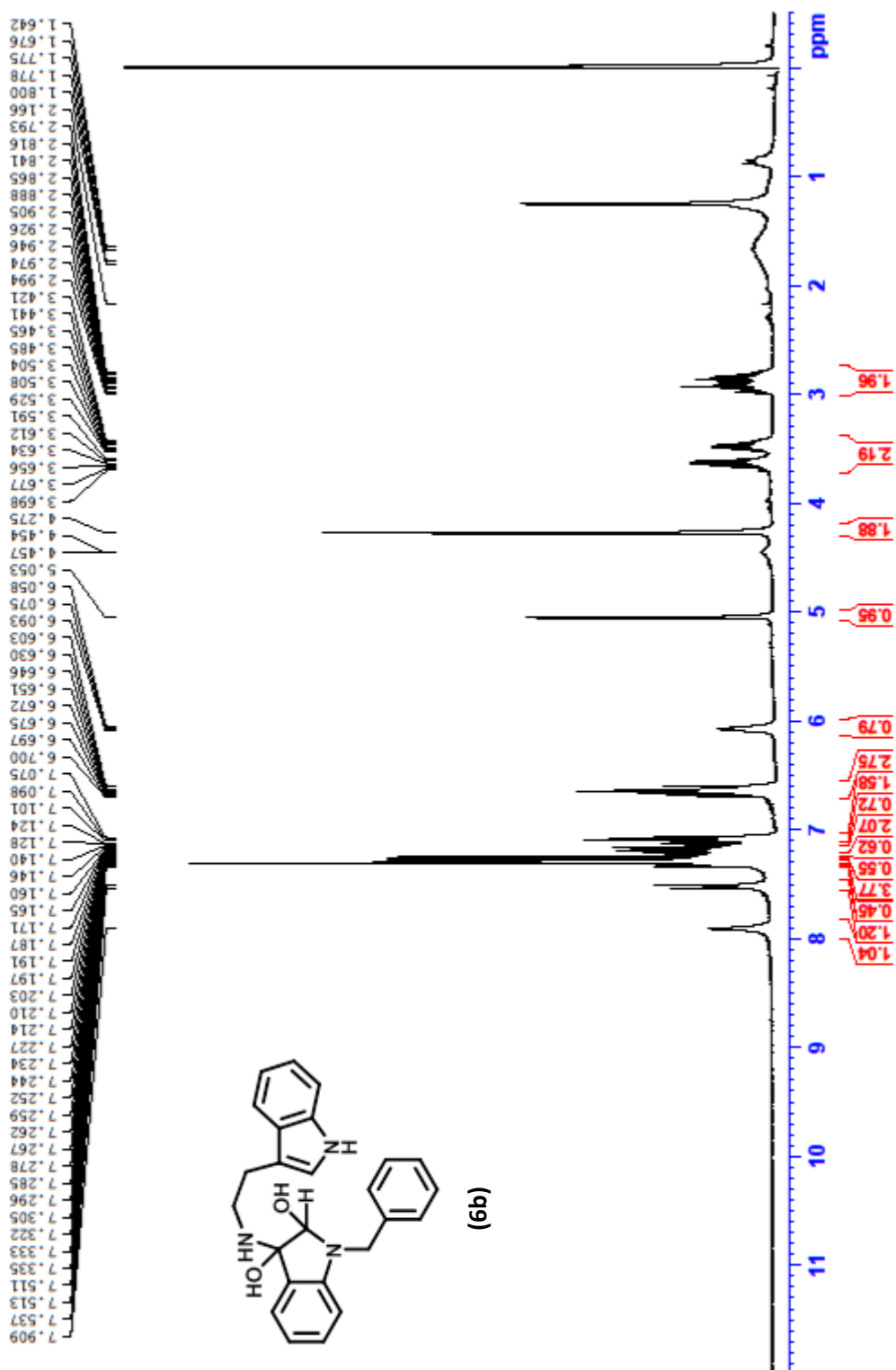


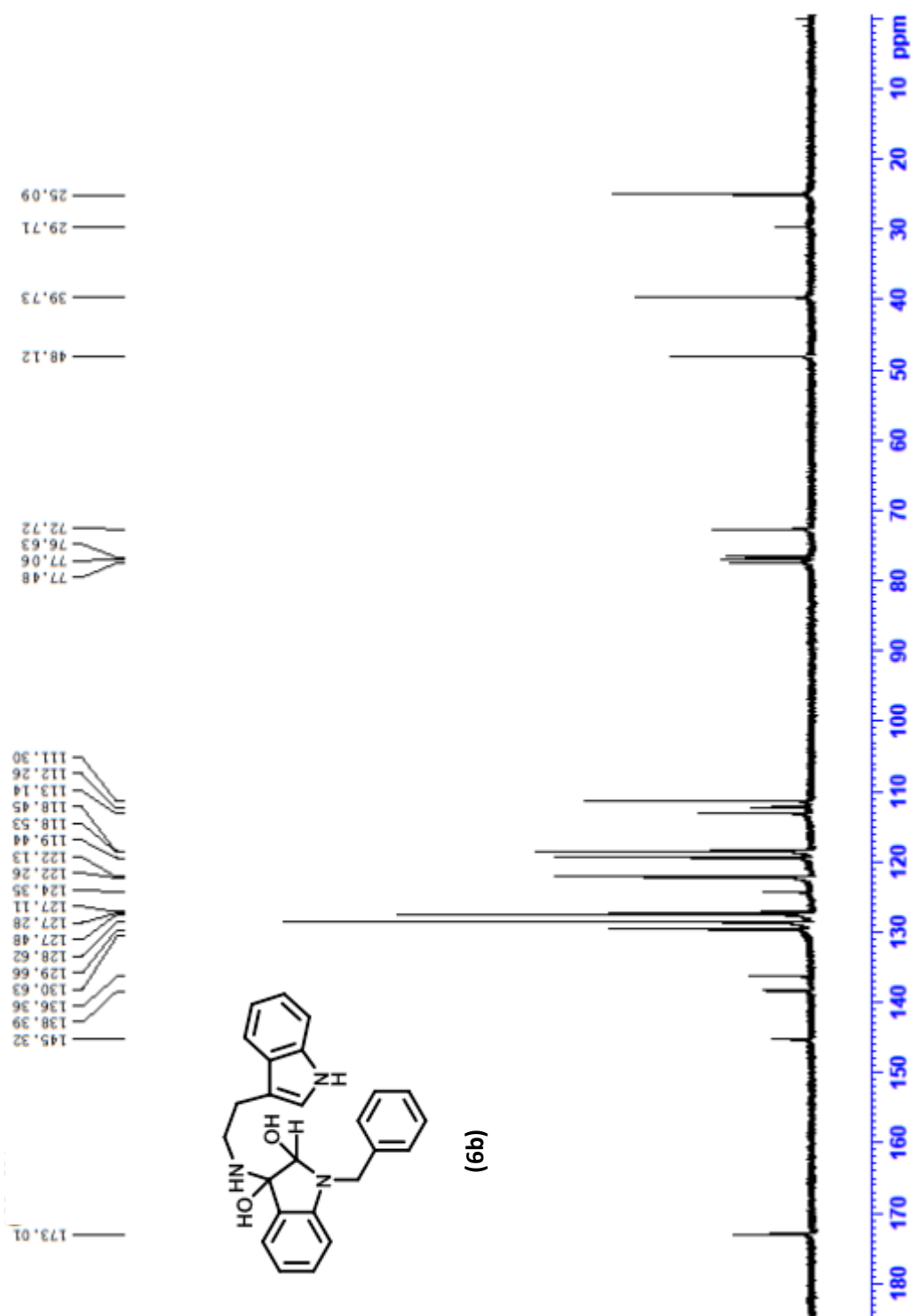


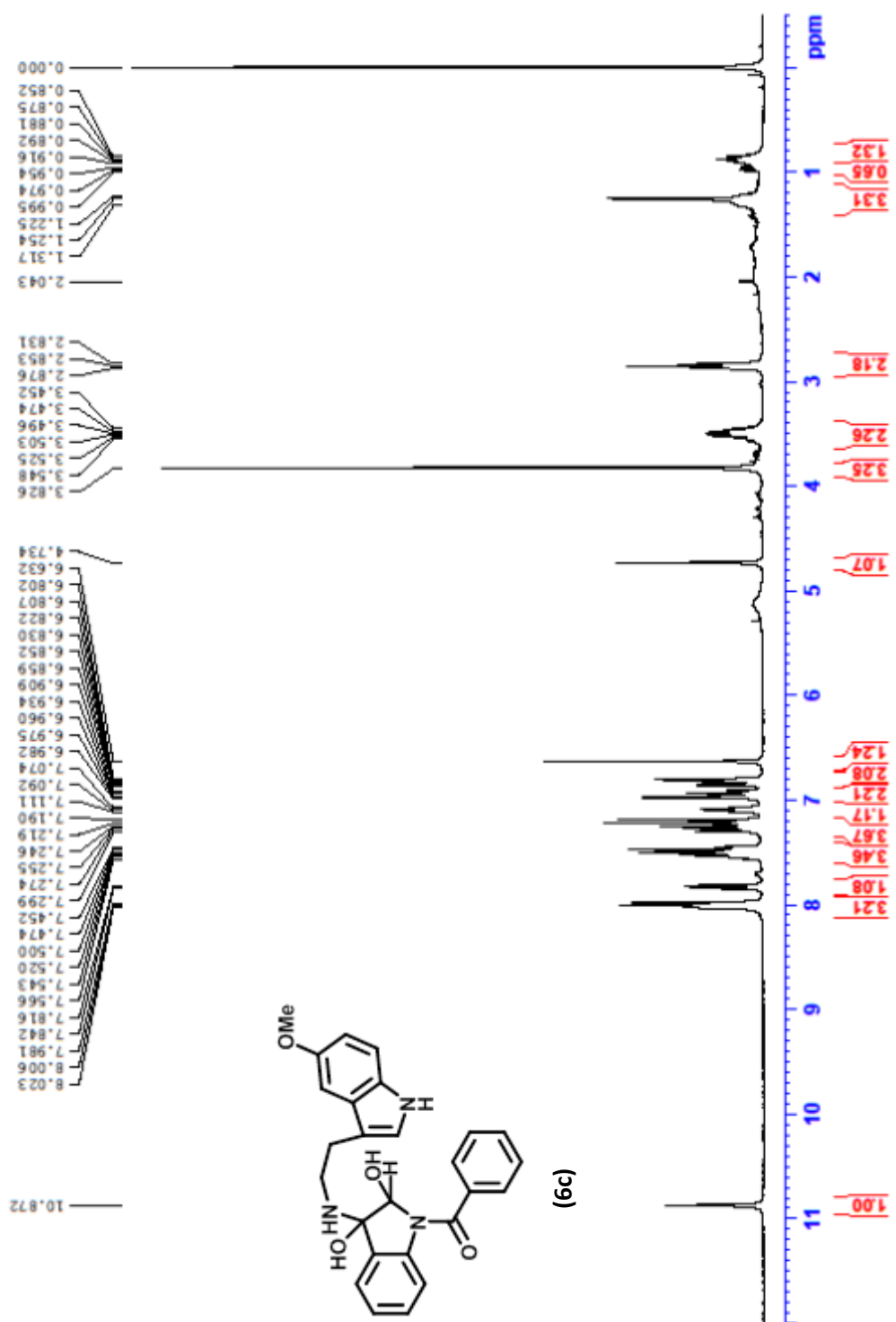


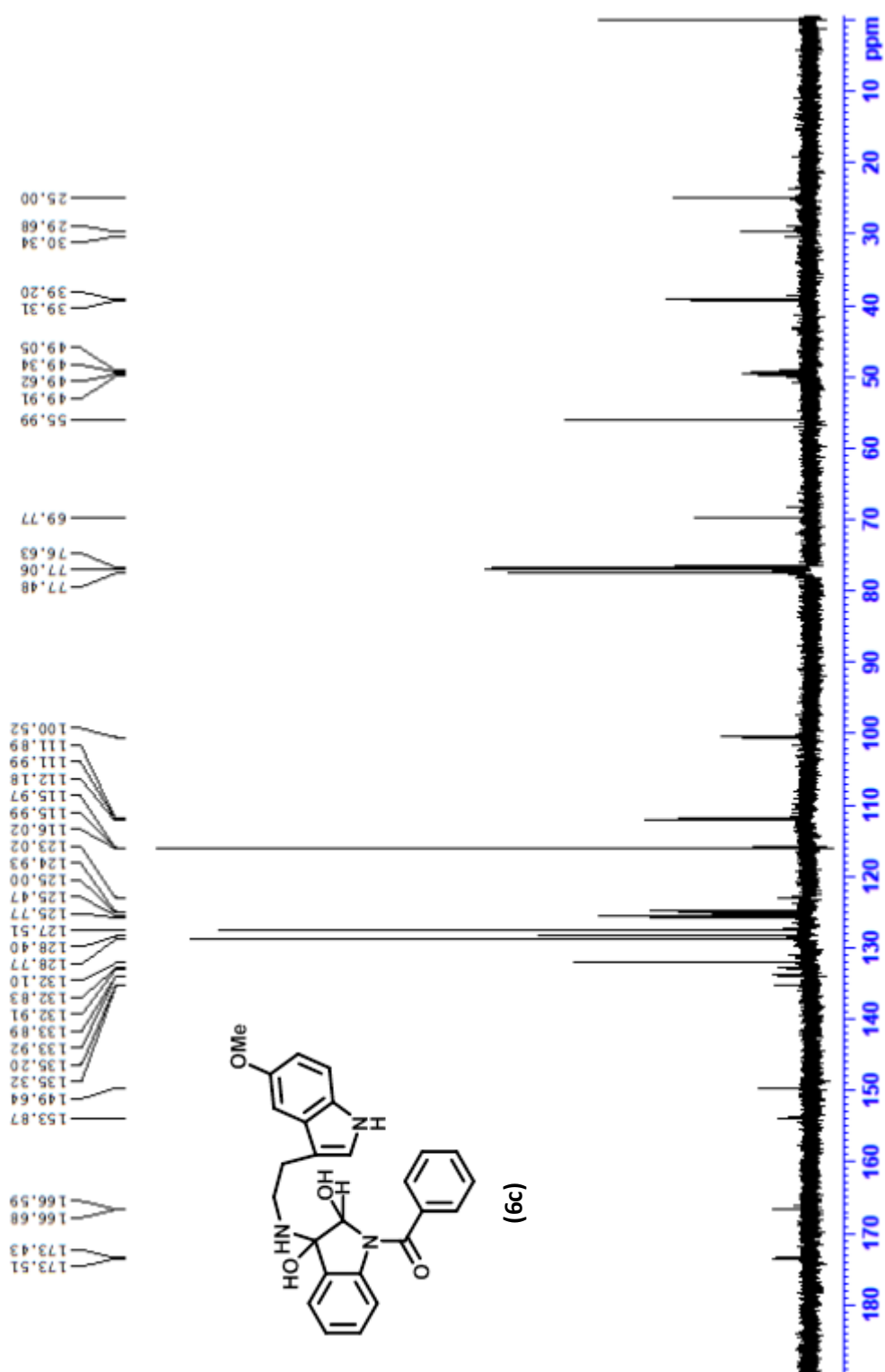


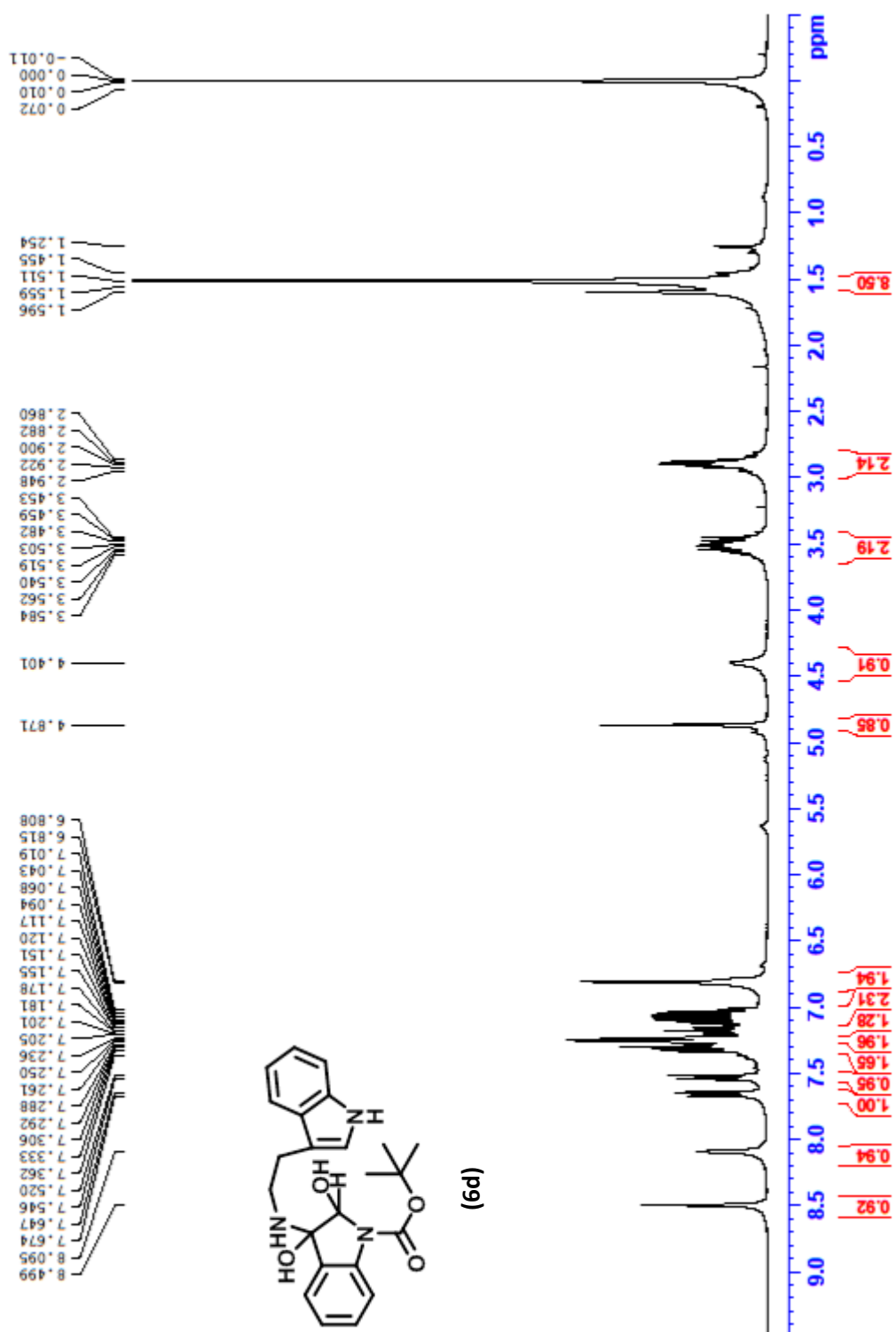


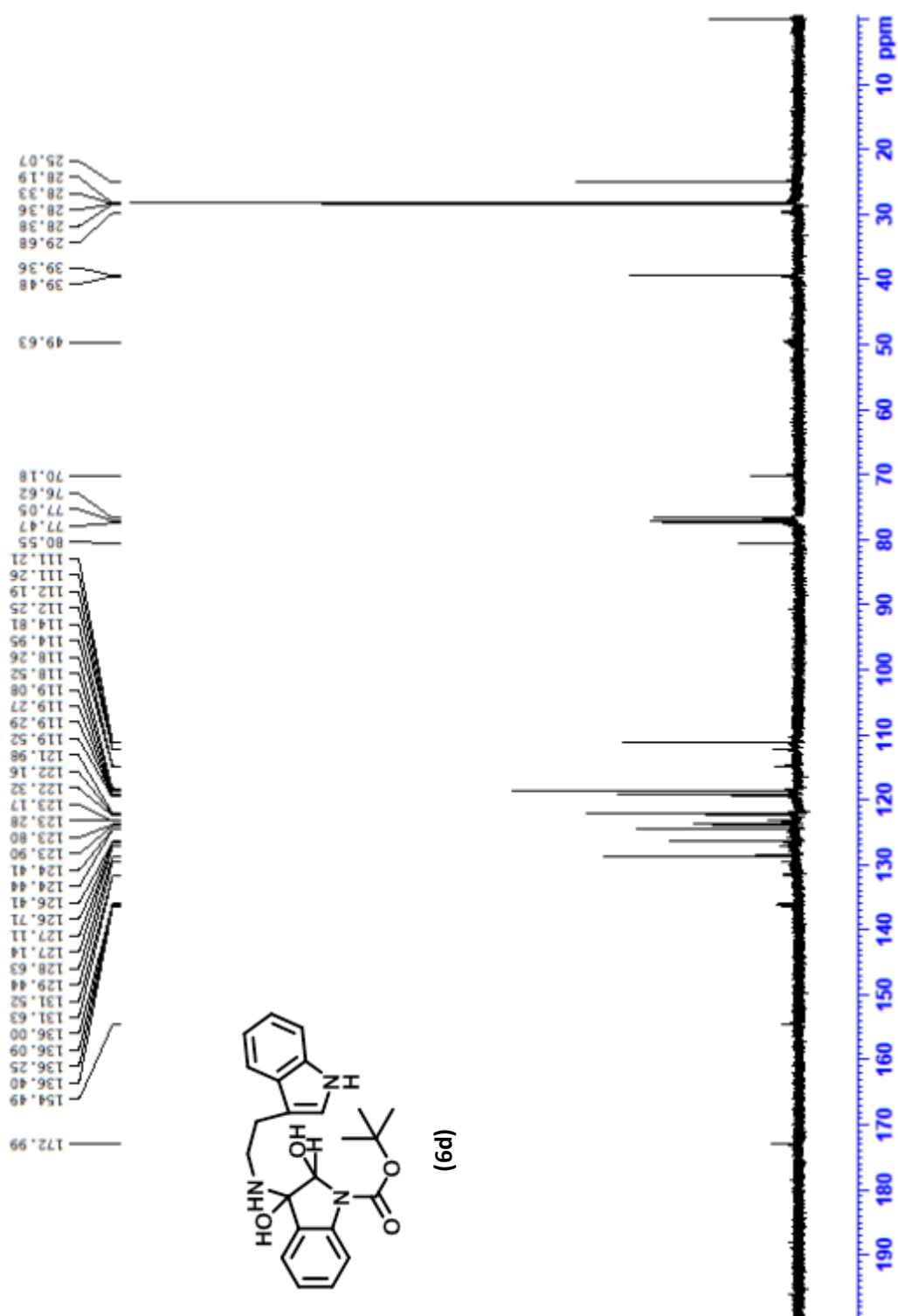


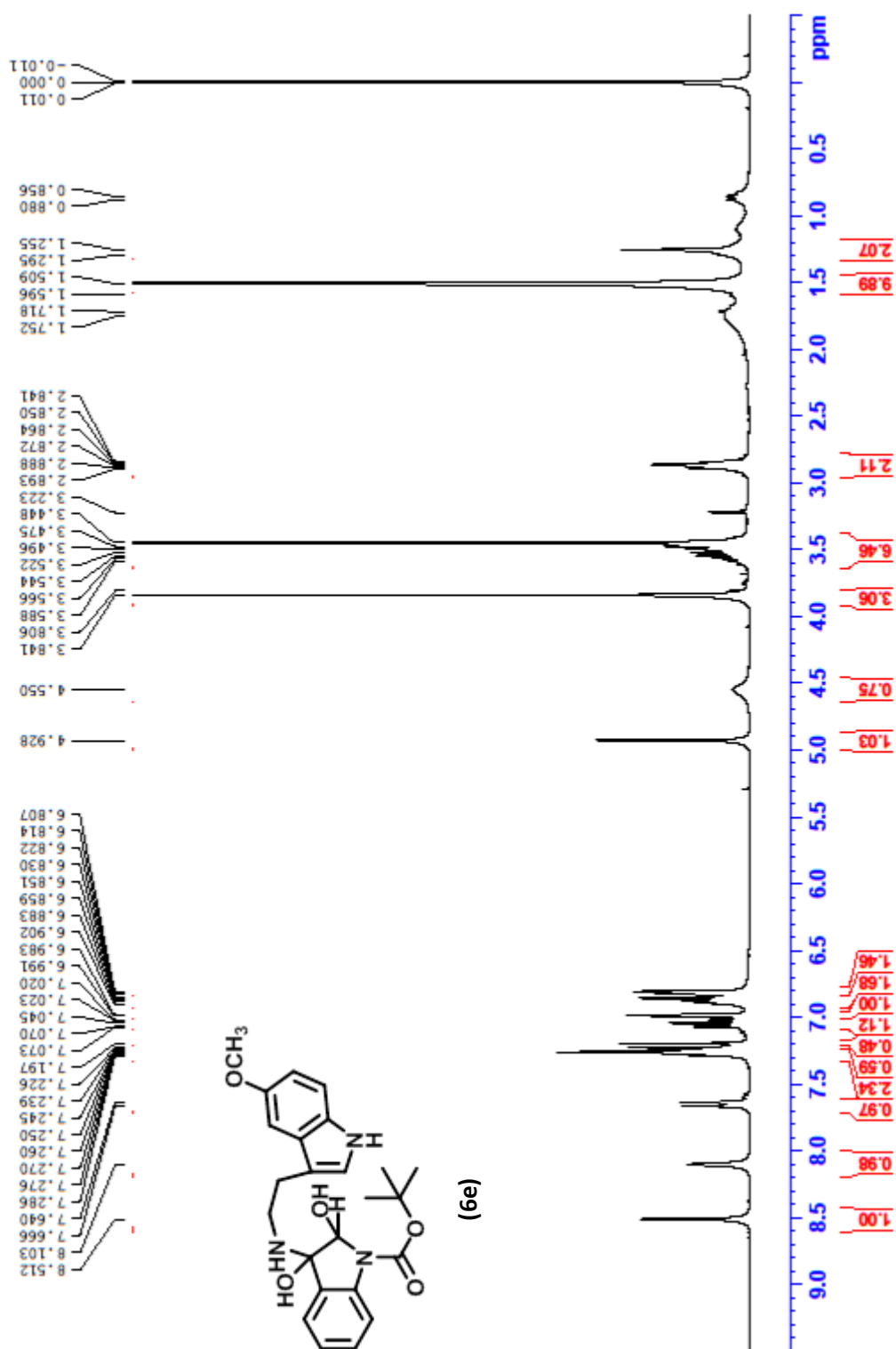


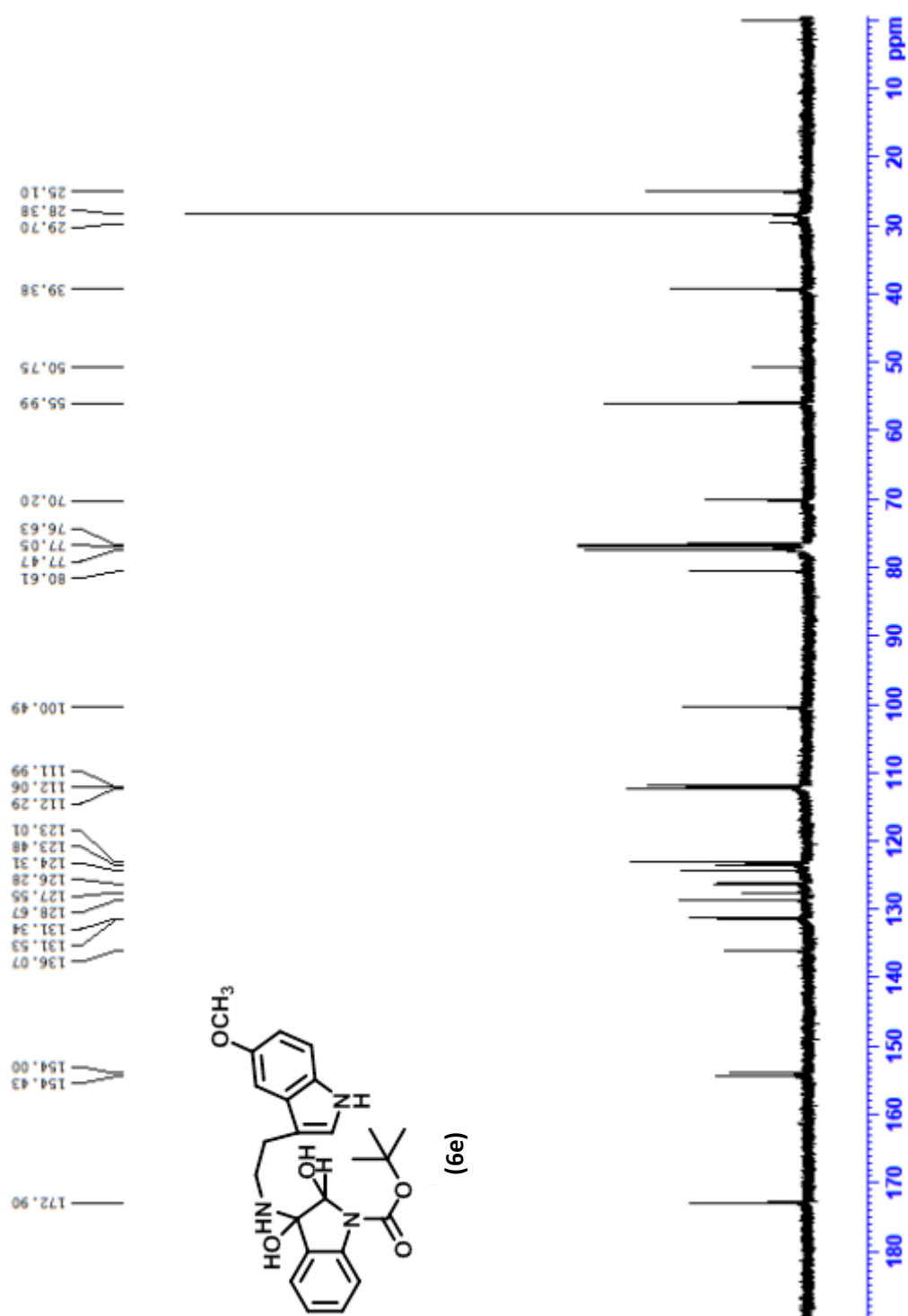


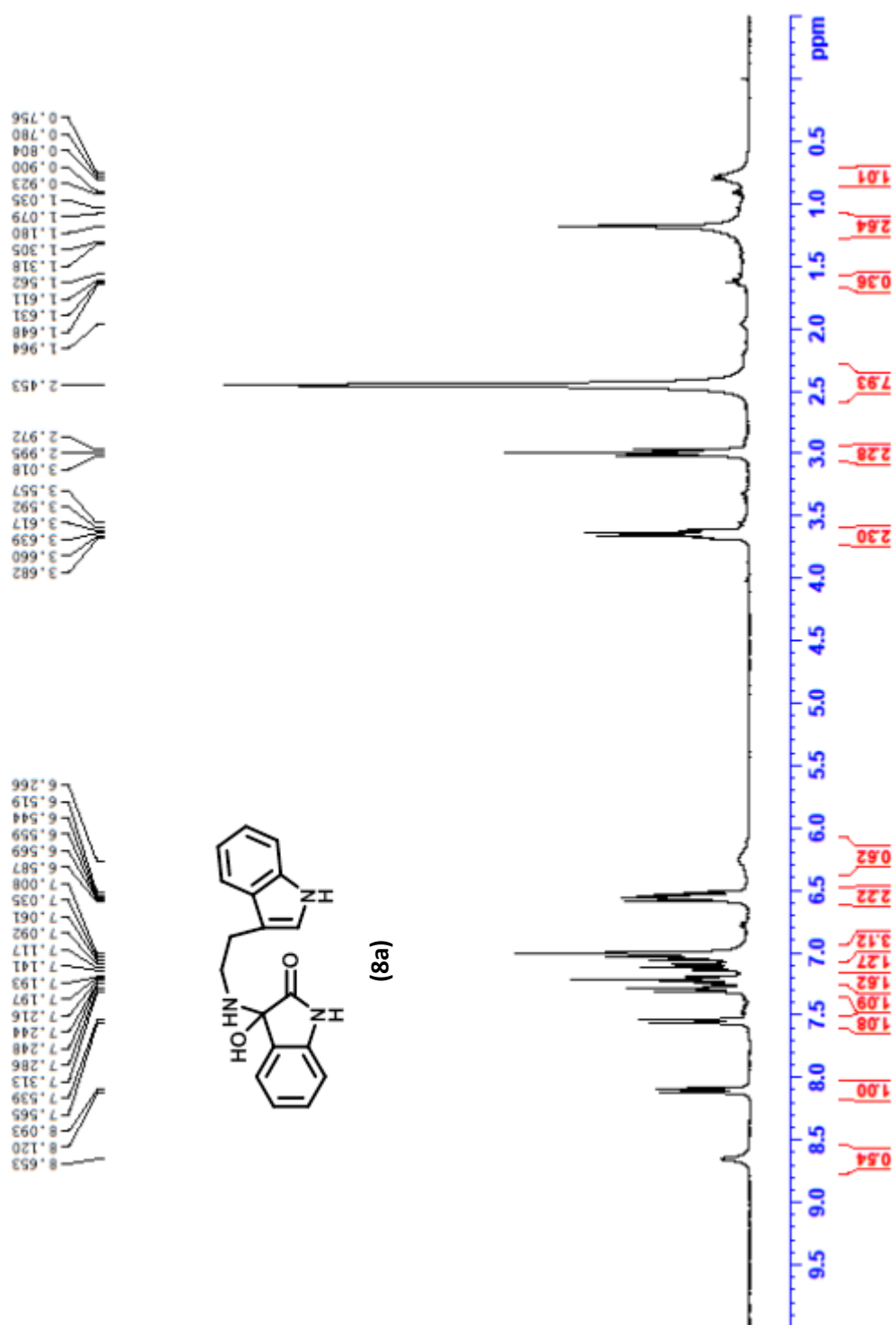


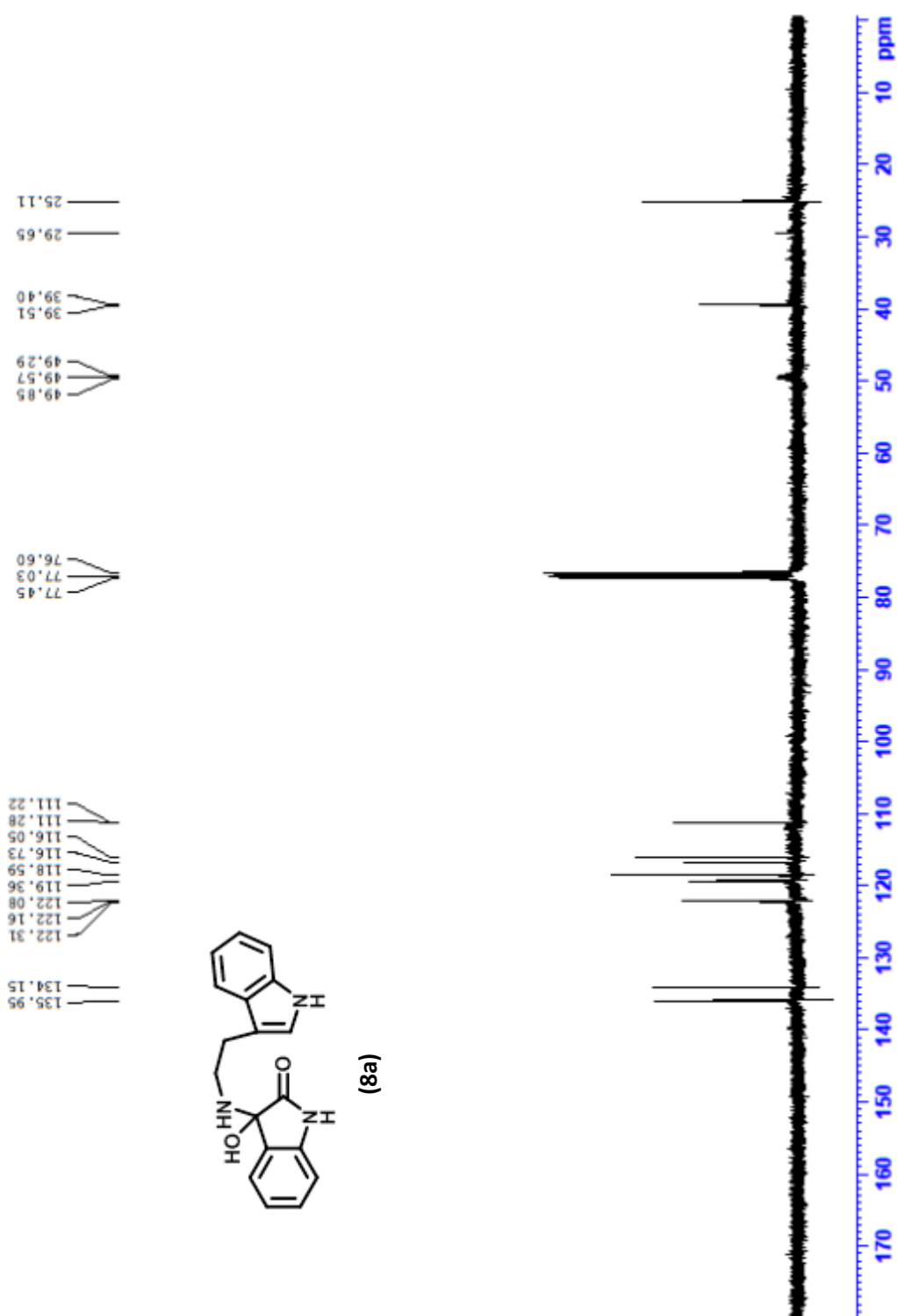


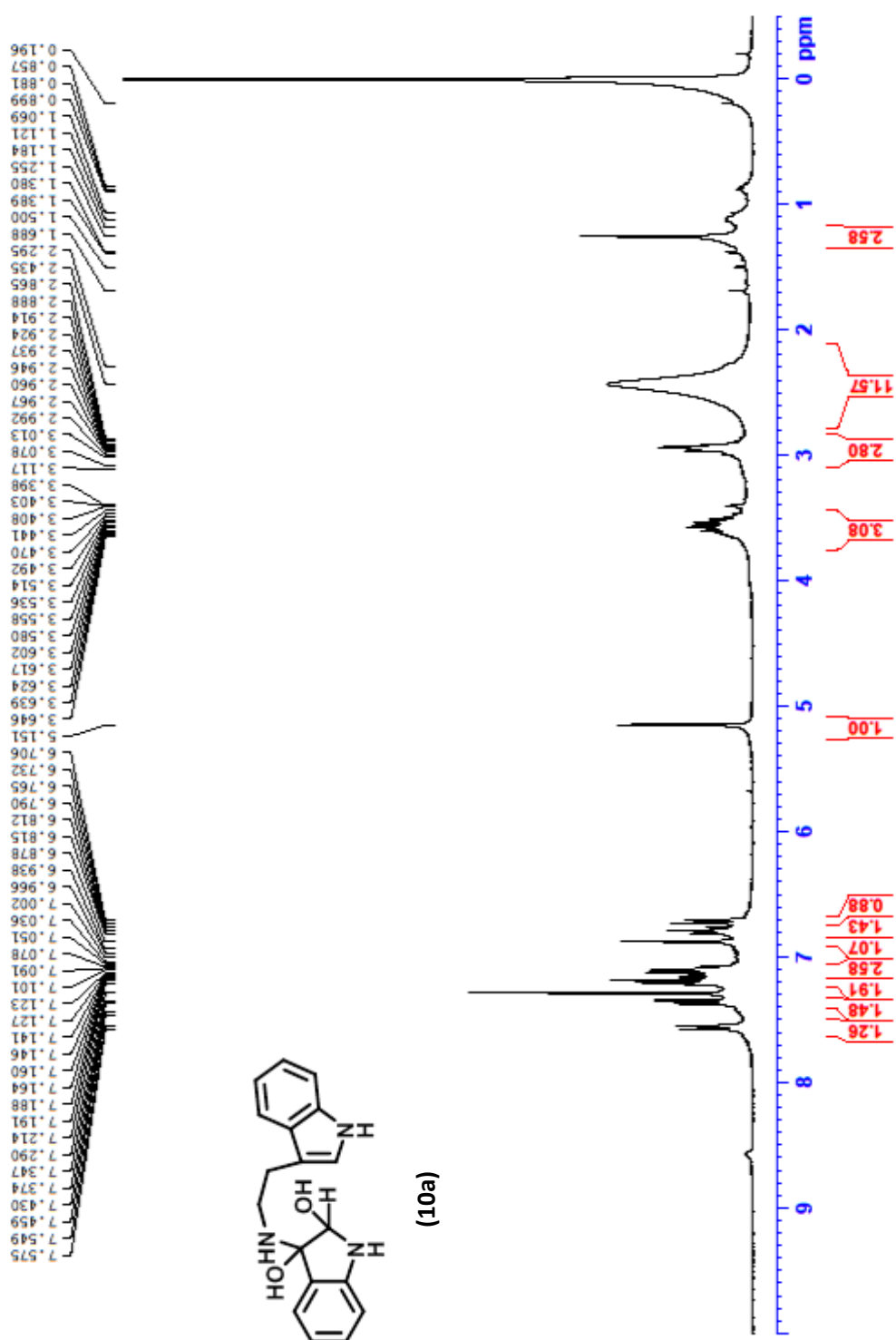


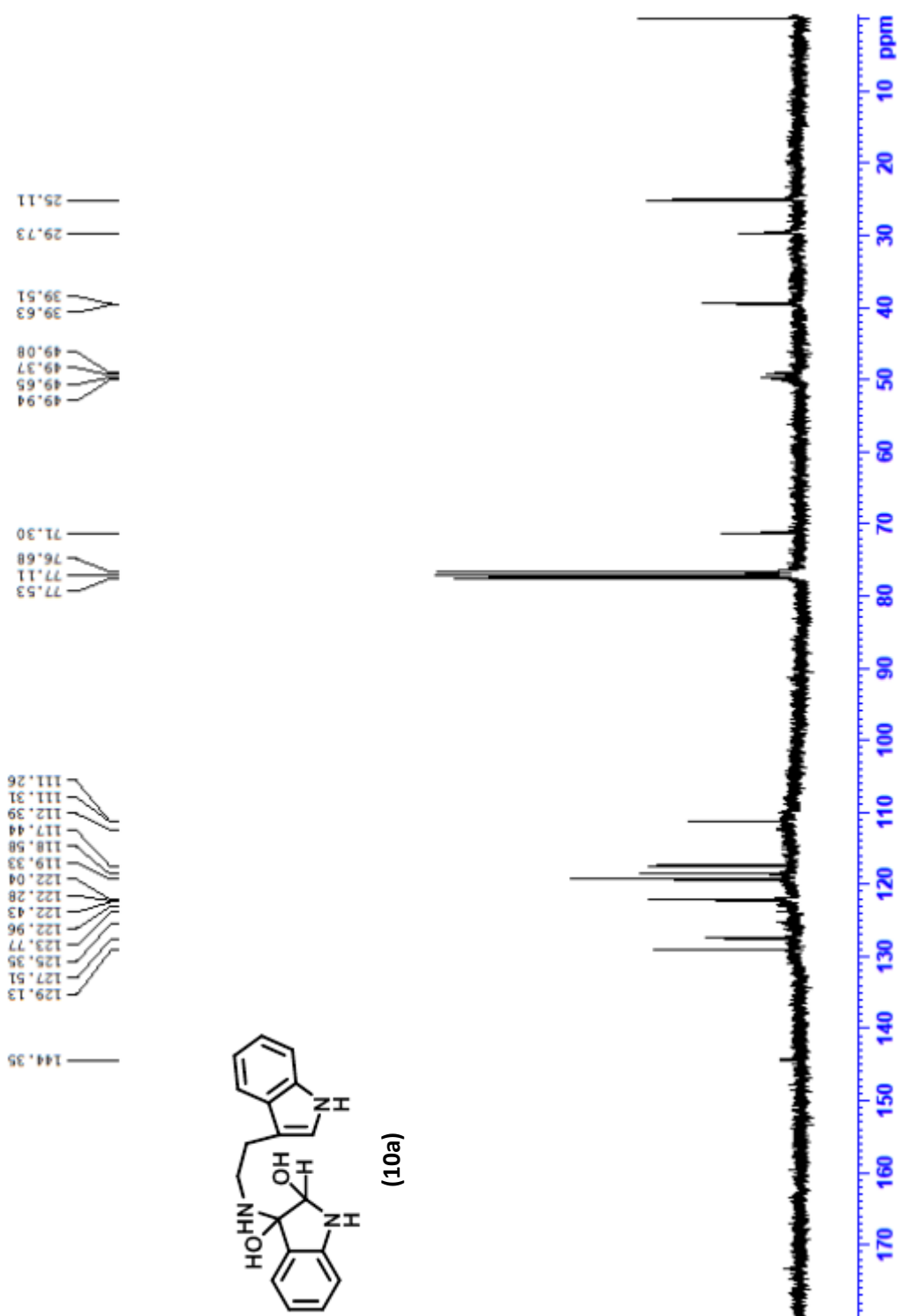








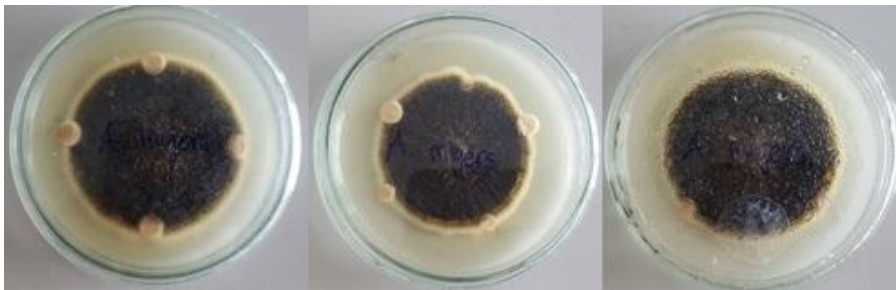






ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา

Aspergillus niger



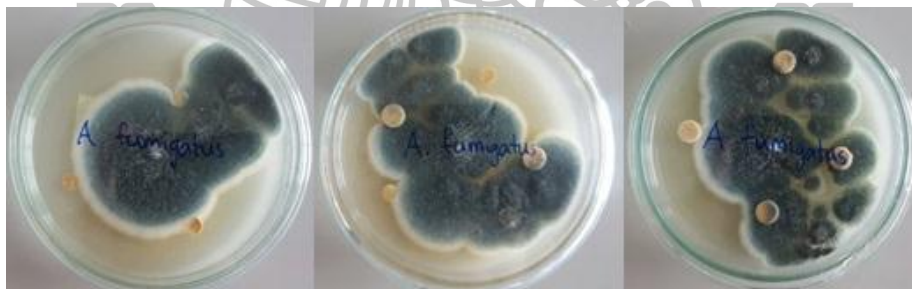
ภาพที่ 82 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger*

Aspergillus flavus



ภาพที่ 83 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus*

Aspergillus fumigatus



ภาพที่ 84 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus fumigatus*

Penicillium sp.



ภาพที่ 85 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Penicillium* sp.

Rhizopus oligosporus



ภาพที่ 86 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Rhizopus oligosporus*



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวจันจิรา จรามรบูรพงศ์
ที่อยู่	72-74 ถนนประชานิยม ตำบลบ้านโป่ง อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี 70110
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2555	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
พ.ศ. 2556	ศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

