



การพยายามสังเคราะห์และการศึกษาการยับยั้งเซลล์มะเร็งของอนุพันธ์ของ cannabidiol และ
limonene



โดย
นางสาวเบญจมาศ เรืองโรจน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การพยายามสังเคราะห์และการศึกษาการยับยั้งเซลล์มะเร็งของอนุพันธ์ของ cannabidiol
และ limonene



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

ATTEMPTED SYNTHESIS AND ANTICANCER ACTIVITIES EVALUATION OF
CANNABIDIOL AND LIMONENE DERIVATIVES



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (CHEMISTRY)
Department of CHEMISTRY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2022
Copyright of Silpakorn University

61317202 : เคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

คำสำคัญ : กัญชา, cannabidiol, อนุพันธ์ของ cannabidiol, limonene, อนุพันธ์ของ limonene, ยับยั้งเซลล์มะเร็ง, ฤทธิ์ทางชีวภาพ

นางสาว เบญจมาศ เรื่องโรจน์: การพยายามสังเคราะห์และการศึกษาการยับยั้งเซลล์มะเร็งของอนุพันธ์ของ cannabidiol และ limonene อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วยา พุทธรวงค์

ปัจจุบันกัญชา (*Cannabis indica* (*Cannabis sativa* forma indica)) ได้รับความสนใจอย่างมากจากภาครัฐและประชาชน จากความต้องการอย่างยิ่งของผู้ป่วยที่มีความคาดหวังต่อการนำมาเป็นยารักษาโรค และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อการส่งออก โดยจากรายงานก่อนหน้านี้มีการสกัดและแยกสารประกอบในกัญชา โดยพบว่าสารประกอบที่น่าสนใจในกัญชา ได้แก่ กลุ่ม cannabidiol ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ลดอาการเจ็บปวด ลดการอักเสบของแผล ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ลดอาการชักเกร็ง ลดอาการคลื่นไส้ และไม่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท ดังนั้นจึงเป็นที่สนใจต่อนักเภสัชเคมี (medicinal chemists) ที่จะพัฒนาโครงสร้างโมเลกุลในกลุ่มของ cannabidiol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ และสามารถพัฒนาต่อไปเป็นยาในอนาคตได้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ CBD และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ CBD โดยการทำปฏิกิริยา epoxidation ในตำแหน่งพันธะคู่ที่วงไซโคลเฮกซีน จากนั้นทำการพยายามเปิดวง epoxide ด้วยนิวคลีโอไฟล์หลายชนิดเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ไม่ประสบความสำเร็จ

สารประกอบลิโมนีน จัดเป็นสารประเภทเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) และอยู่ในกลุ่มโมโนเทอร์พีน (monoterpenes) สามารถพบได้ในพืชตระกูลส้ม เช่น ส้ม มะนาว เป็นต้น ซึ่งจะอยู่บริเวณผิวเปลือก โดยจะพบอยู่ในรูปของดี-ลิโมนีน (D-limonene) และนิยมนำมาใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งกลิ่นรส (flavoring agent) ในอุตสาหกรรมอาหารหรือนำมาใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น แชมพู โลชั่น สบู่ เป็นต้น ลิโมนีนเป็นสารที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางเนื่องจากประโยชน์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แบคทีเรีย และต้านการอักเสบ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของลิโมนีนและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของลิโมนีนโดยการเตรียม limonene oxide เริ่มจากการทำปฏิกิริยา epoxidation จาก (+)-limonene จากนั้นทำการเปิดวง epoxide ด้วยนิวคลีโอไฟล์หลายชนิดในการสังเคราะห์ให้เกิดเป็นอนุพันธ์ของลิโมนีนเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อไป

61317202 : Major (CHEMISTRY)

Keyword : Cannabis, cannabidiol, cannabidiol derivatives, limonene, limonene derivatives, anticancer activity, biological activities

MISS BENJAMART RUANGROTE : ATTEMPTED SYNTHESIS AND ANTICANCER ACTIVITIES EVALUATION OF CANNABIDIOL AND LIMONENE DERIVATIVES THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR WAYA PHUTDHAWONG, Ph.D.

Cannabis has received a lot of attention from the government and the public due to the expectation of patients for being used as a medicine and product development for export. As previously reported, one of the important compounds found in cannabis was the cannabidiol (CBD), which possessed a wide range of biologically active effects, such as reducing pain, antioxidant, anti-inflammatory, anti-tumoral, anti-convulsant and non-psychoactive. It is therefore lead to the attention of medical chemists to develop a molecular structure in the cannabidiol family to enhance its effect and can be further developed as a drug in the future. In this research, CBD derivatives were synthesized to form the epoxide ring at the double bond site at the cyclohexene ring. The epoxide ring opening was attempted with various nucleophiles prior to evaluate their biological activities. However, this was unsuccessful.

Limonene is classified as a terpenoid belonging to the monoterpene category and can be found on the rind surface in citrus fruits such as oranges and lemons. In nature, limonene is found in the D-limonene form and commonly uses as a flavoring agent in the food industry and cosmetic products. Limonene has wide range of biological benefits including antimicrobial, antibacteria and anti-inflammatory activities. Thus, in this research, limonene derivatives have been prepared and extensively investigated for their biological activities. Epoxidation of (+)-limonene to form limonene oxide followed by epoxide ring opening with various nucleophiles to form the limonene derivatives. Then, these derivatives were further investigated for their biological activities.

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วยา พุทธรังค์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงสำหรับความกรุณาที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความรู้ และความช่วยเหลืออันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์นี้ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. มูฮำหมัด นิยมเดชา ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.วีรชัย พุทธรังค์ อาจารย์กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย เตโชวิศาล เป็นอย่างสูงสำหรับความกรุณาช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และความรู้ในการทดลองด้านการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และขอขอบพระคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ เป็นอย่างสูงที่ช่วยเหลือเอื้อเฟื้อในด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองด้านการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตนภา ศิริรักษ์ เป็นอย่างสูงสำหรับความกรุณาช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และความรู้ในด้าน Molecular docking

ขอขอบพระคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

ขอขอบคุณกลุ่มงานวิจัย Phutdhawong's organic synthesis research group ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจตลอดช่วงเวลาที่ทำงานวิจัย สุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัว ที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุน ตลอดจนคำปรึกษาที่ดีในด้านต่างๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

นางสาว เบญจมาศ เรืองโรจน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	14
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	15
2.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ CBD (1).....	15
2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของลิโมนีน (limonene) (36).....	20
2.3 แผนการสังเคราะห์.....	36
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	38
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	38
3.2 สารเคมี.....	38
3.3 วิธีการทดลอง.....	39
3.3.1 การสังเคราะห์วิธีที่ 1 ของอนุพันธ์ cannabidiol.....	40
3.3.2 การสังเคราะห์วิธีที่ 2 ของอนุพันธ์ cannabidiol.....	44
3.3.3 การสังเคราะห์วิธีที่ 3 ของอนุพันธ์ cannabidiol.....	48
3.3.4 การสังเคราะห์ของอนุพันธ์ limonene (36).....	56

3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	71
3.4.1 ทดสอบการต้านเซลล์มะเร็งของอนุพันธ์ limonene โดยวิธี MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide]	71
3.4.2 การศึกษาความสามารถในการต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity)	71
3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแบบเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic antibacterial assay).....	73
3.5 การศึกษาโมเลกุลาร์ด็อกกิงของอนุพันธ์ limonene ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA gyrase B ATPbinding domain จาก <i>E. coli</i> (PDB: 2GFP) และ <i>S. aureus</i> (PDB: 2GFP)	73
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	74
ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่อนุพันธ์ของ limonene สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC)	85
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	99
รายการอ้างอิง.....	102
ภาคผนวก.....	106
สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$	106
ประวัติผู้เขียน.....	134

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของ (+)-limonene (36) และ Ciprofloxacin (37).....	9
ตารางที่ 2 แสดงค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของ limonene (36) และ Levofloxacin Hydrochloride (38).....	10
ตารางที่ 3 แสดงฤทธิ์ยับยั้ง 5-lipoxygenase และสารประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยของพืช Helichrysum odoratissimum, Heteropyxis natalensis และ Lippia javanica.....	11
ตารางที่ 4 แสดงไอโซเมอร์ของ limonene 1,2-diols (1-hydroxydihydrocarveols) (94) [40]..	23
ตารางที่ 5 ปฏิกิริยารีดักชันระหว่าง lithium aluminum hydride กับ (+)-cis- และ (+)-trans-limonene 1,2-oxide [40]	27
ตารางที่ 6 อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ pyrolysis จาก 1-acetoxy-2-hydroxy-8-p-menthenes [40]	30
ตารางที่ 7 แสดงอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ pyrolysis จาก 1-acetoxy-2-hydroxy-p-menthenes [40].....	31
ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบ ¹ H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ กับ ¹ H chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ (131) ที่สังเคราะห์ได้.....	75
ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบ ¹ H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ กับ ¹ H chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ (132) ที่สังเคราะห์ได้.....	76
ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบ ¹ H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ กับ ¹ H chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ (136) ที่สังเคราะห์ได้.....	77
ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบ ¹ H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ กับ ¹ H chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ (137) ที่สังเคราะห์ได้.....	78
ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบ ¹ H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ กับ ¹ H chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ (138) ที่สังเคราะห์ได้.....	79

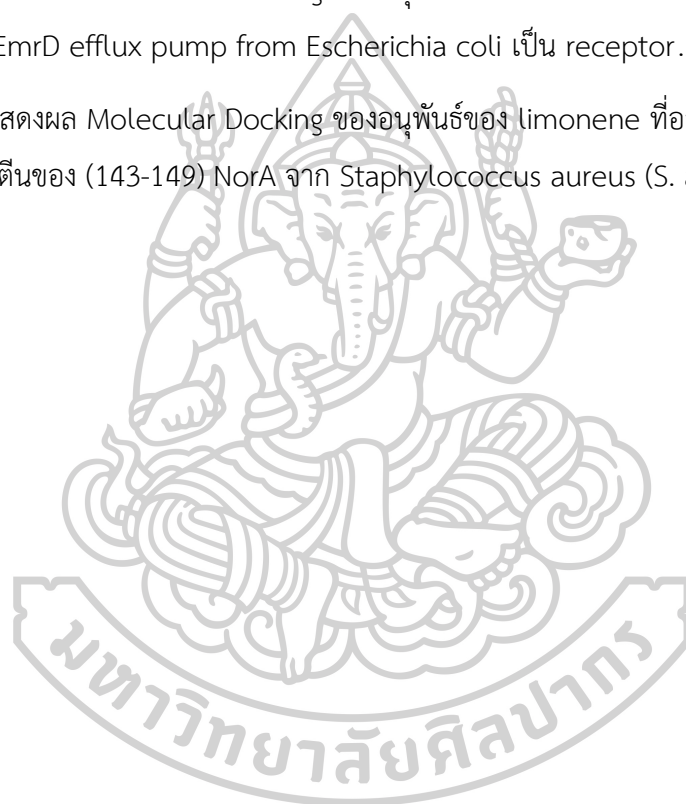
ตารางที่ 13 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่อนุพันธ์ของ limonene สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) 86

ตารางที่ 14 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) ต่อเชื้อ MRSA ที่แยกได้ (Sp2, Sp3, RI, T2) ของอนุพันธ์ limonene..... 89

ตารางที่ 15 แสดงค่าผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแบบเสริมฤทธิ์กันของอนุพันธ์ limonene ที่มี Ciprofloxacin ต่อ MRSA Sp3 90

ตารางที่ 16 แสดงผล Molecular Docking ของอนุพันธ์ของ limonene ที่ออกแบบใหม่ (143-149) โดยมีโปรตีน EmrD efflux pump from Escherichia coli เป็น receptor 91

ตารางที่ 17 แสดงผล Molecular Docking ของอนุพันธ์ของ limonene ที่ออกแบบใหม่ ในโครงสร้างโปรตีนของ (143-149) NorA จาก Staphylococcus aureus (S. aureus) 95



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของ Phytocannabinoids	1
ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างของ Endocannabinoids.....	2
ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของ Synthetic Cannabinoids	3
ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของ CBD	6
ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างของ (+)-limonene (36).....	8
ภาพที่ 6 โครงสร้างของ Ciprofloxacin (37)	9
ภาพที่ 7 โครงสร้างของ Levofloxacin Hydrochloride (38).....	10
ภาพที่ 8 แสดงผลการทดสอบการทำงานของปอด.....	12
ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของ (+)-limonene (36)	13
ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างของ Pentamidine (46).....	13
ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของ (+)-limonene (36)	14
ภาพที่ 12 แสดงการสังเคราะห์ Halogenated (-)-CBD derivatives โดย Yamamoto และคณะ [34].....	15
ภาพที่ 13 แสดงการสังเคราะห์ 7-hydroxy-CBD (65) โดย Tchilibon and Mechoulam [35]... 16	
ภาพที่ 14 แสดงการสังเคราะห์ CBD-7-oic-acid (66) โดย Mechoulam and Hanus [36].....	17
ภาพที่ 15 แสดงการสังเคราะห์ hydroxyquinone-CBD (67) โดย Natalya และคณะ [37].....	17
ภาพที่ 16 แสดงการสังเคราะห์ 4'-fluoro-cannabidiol (68) โดย Breuer และคณะ [6]	18
ภาพที่ 17 แสดงการสังเคราะห์ 10-fluoro-cannabidioldiacetate (71) โดย Breuer และคณะ [6]	18
ภาพที่ 18 แสดงการสังเคราะห์ (-)-8,9-dihydro-7-fluoro-CBD (78) โดย Breuer และคณะ [6]..	19
ภาพที่ 19 แสดงการทำปฏิกิริยาของ ketone (82) และ aldehyde (83) จาก limonene oxide (79) [38, 39]	20

ภาพที่ 20 แสดงโครงสร้างของ β -hydroxy ketone (85), unsaturated aldehyde (86), unsaturated ketone (87), 2-cycloheptenone (88) [38, 39]	21
ภาพที่ 21 แสดงโครงสร้างของ limonene (36), (+)-cis-limonene-1,2-oxide (92), (+)-trans-limonene-1,2-oxide (93) [40]	22
ภาพที่ 22 แสดงโครงสร้างของ 1-hydroxydihydrocarveol (94), 1-Hydroxyneodihydrocarveol (95), 1-hydroxyisodihydrocarveol (96), 1-hydroxyneoisodihydrocarveol (80) [40]	23
ภาพที่ 23 แสดงการสังเคราะห์ของ (+)-cis-limonene 1,2-oxide (92) และ (+)-trans-limonene 1,2-oxide (93) [40].....	24
ภาพที่ 24 แสดงการทำปฏิกิริยากับ dimethylamine และ lithium aluminum hydride ของ (+)-cis-limonene-1,2-oxide (92) และ (+)-trans-limonene-1,2-oxide (93) [40]	26
ภาพที่ 25 แสดงการทำปฏิกิริยาของ acetic acid, sodium acetate กับ (+)-cis- และ (+)-trans-limonene 1,2-oxide [40]	28
ภาพที่ 26 แสดงกลไกการทำปฏิกิริยาระหว่าง acetic acid, sodium acetate กับ (+)-trans-limonene 1,2-oxide (93) [40].....	29
ภาพที่ 27 แสดงปฏิกิริยา Pyrolysis ของ Hydroxy acetate mixture [40].....	30
ภาพที่ 28 แสดงการทำปฏิกิริยา hydrogenation ของ cis,trans-carveols [40].....	33
ภาพที่ 29 แสดงโครงสร้างของ D-(+)-isopropylsuccinic acid (118a) [40].....	33
ภาพที่ 30 แสดง Stereoselective epoxidation ของ (R)-(+)-limonene (36) โดยใช้ NBS เป็น bromination source [41].....	34
ภาพที่ 31 แสดงปฏิกิริยา Epoxidation ของ (R)-(+)-limonene และ cyclic carbonate synthesis โดยใช้ CO ₂ cycloaddition [41].....	35
ภาพที่ 32 กลไกการทำปฏิกิริยาของ cyclic carbonate synthesis จาก tri-substituted epoxide	35
ภาพที่ 33 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ CBD (1).....	36
ภาพที่ 34 แผนภาพสังเคราะห์อนุพันธ์ของ (+)-limonene (36).....	37
ภาพที่ 35 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ CBD (1) แผนการสังเคราะห์ที่ 1	40

ภาพที่ 36 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ CBD (1) แผนการสังเคราะห์ที่ 2	44
ภาพที่ 37 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ CBD (1) แผนการสังเคราะห์ที่ 3	49
ภาพที่ 38 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ (+)-limonene (36).....	56
ภาพที่ 39 Pyrolysis ของ (5R)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexyl acetate (40).....	60
ภาพที่ 40 แสดงผลของ MIC (Minimum inhibitory concentrations) ในการยับยั้งเชื้อ Staphylococcus aureus.....	87
ภาพที่ 41 แสดงผลของ MIC (Minimum inhibitory concentrations) ในการยับยั้งเชื้อ Bacillus cereus.....	87
ภาพที่ 42 แสดงผลของ MIC (Minimum inhibitory concentrations) ในการยับยั้งเชื้อ Bacillus subtilis.....	88
ภาพที่ 43 แสดงผลของ MIC (Minimum inhibitory concentrations) ในการยับยั้งเชื้อ Escherichia coli.....	88
ภาพที่ 44 แสดงผลของ MIC (Minimum inhibitory concentrations) ในการยับยั้งเชื้อ Salmonella typhimurium	89
ภาพที่ 45 แสดงภาพการซ้อนทับของ (143)(blue), (144)(purple), (140)(cyan), (145)(green), (146)(orange), (147)(pink), (142)(red), (148)(yellow) และ (149)(light blue) กับ 2GFP	92
ภาพที่ 46 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (140) และ 2GFP	92
ภาพที่ 47 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (145) และ 2GFP	93
ภาพที่ 48 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (147) และ 2GFP	93
ภาพที่ 49 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (148) และ 2GFP	94
ภาพที่ 50 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (149) และ 2GFP	94
ภาพที่ 51 แสดงภาพการซ้อนทับของ (143)(blue), (144)(purple), (140)(cyan), (145)(green), (146)(orange), (147)(pink), (142)(red), (148)(yellow) และ (149)(light blue) กับ S. aureus NorA model.....	96
ภาพที่ 52 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (140) และ S. aureus NorA model..	96

ภาพที่ 53 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (145) และ *S. aureus* NorA model.. 97

ภาพที่ 54 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (146) และ *S. aureus* NorA model.. 97

ภาพที่ 55 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (149) และ *S. aureus* NorA model.. 98

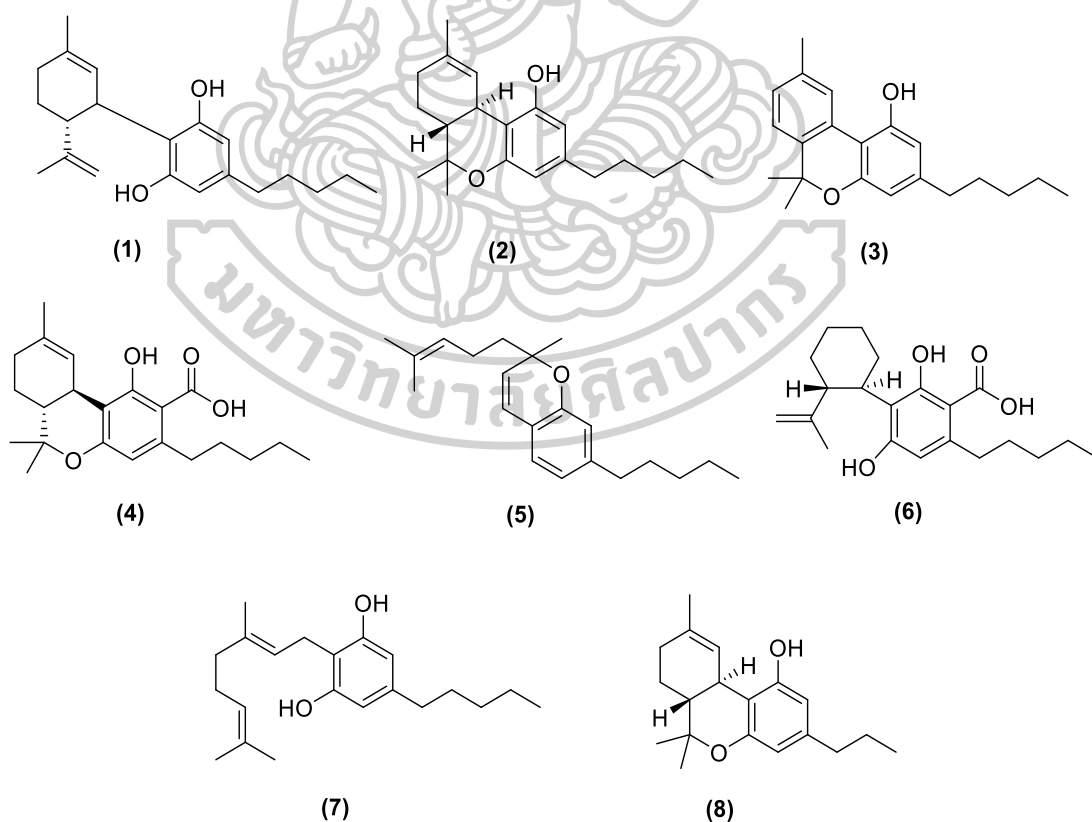


บทที่ 1

บทนำ

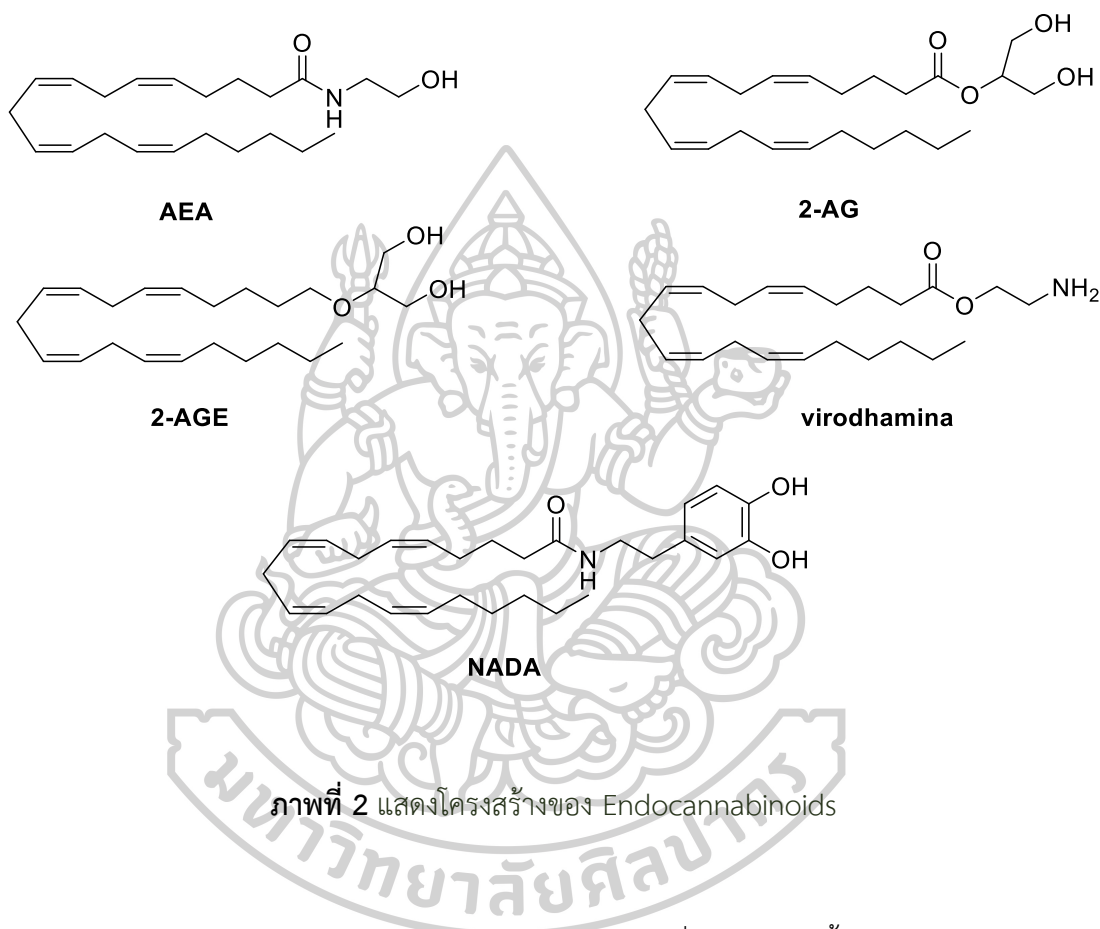
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

Cannabinoids เป็นสารที่มีความสำคัญกลุ่มหนึ่งที่สกัดได้จากพืชกัญชา ในปัจจุบันถูกค้นพบมากกว่า 140 ชนิด แบ่งสารในกลุ่มนี้ออกเป็น 3 กลุ่มหลัก คือ Phytocannabinoids พบได้ในพืชพวกกัญชาเท่านั้น ยกตัวอย่างเช่น Cannabidiol (CBD) (1), Tetrahydrocannabinol (THC) (2), Cannabinol (CBN) (3), Tetrahydrocannabinolic acid (THCA) (4), Cannabichromene (CBC) (5), Cannabidiolic acid (CBDA) (6), Cannabigerol (CBG) (7), Tetrahydrocannabivarin (THCV) (8) (ภาพที่ 1)

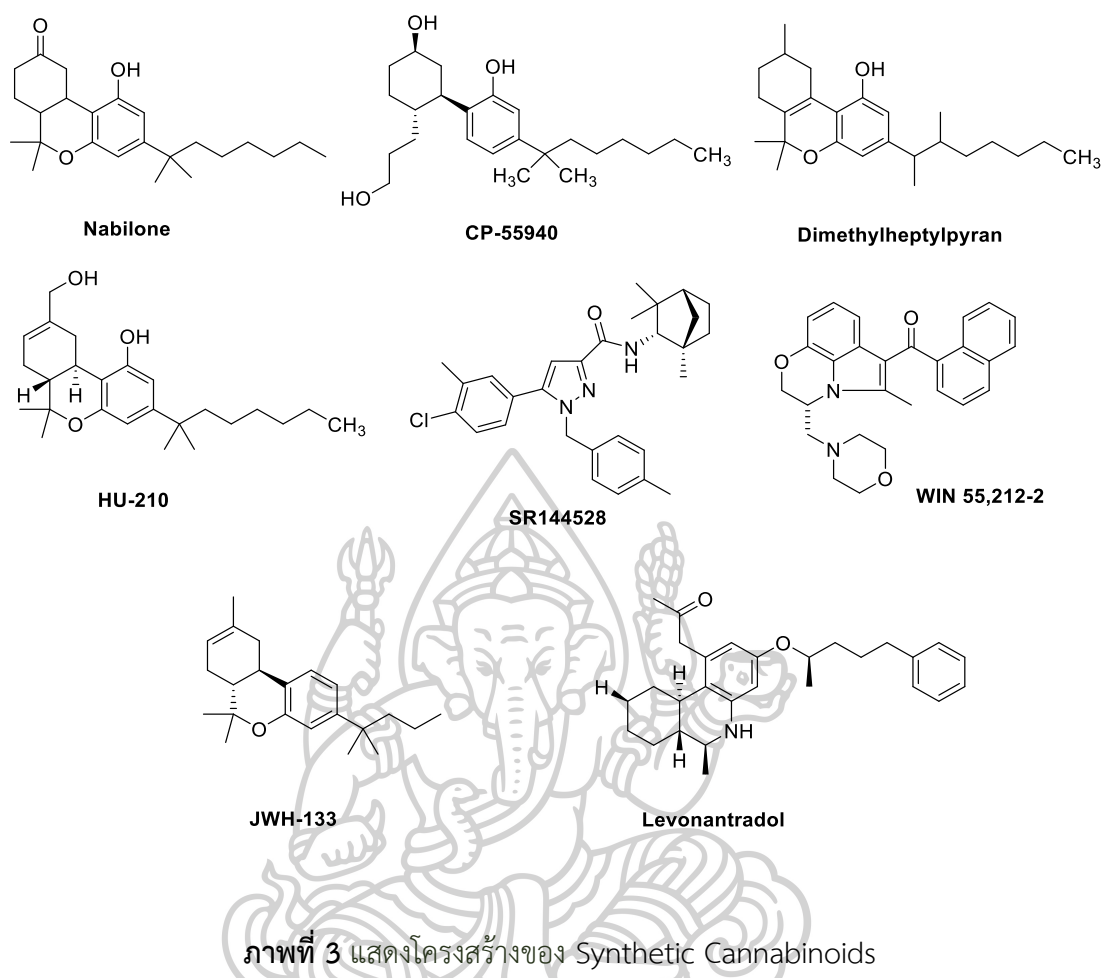


ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของ Phytocannabinoids

กลุ่มต่อมา คือ Endocannabinoids ที่ร่างกายมนุษย์สร้างได้เอง แต่มีปริมาณน้อยมาก ในปัจจุบันนี้นักวิทยาศาสตร์ค้นพบ endocannabinoids เพียง 5 ตัวเท่านั้น ได้แก่ Anandamide (N-arachidonyl ethanolamide, AEA) (9), 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (10), 2-Arachidonyl glyceryl ether (2-AGE, Noladin ether) (11), O-arachidonylethanolamine (virodhamina) (12), N-arachidonoyl-dopamine (NADA) (13) (ภาพที่ 2)



และกลุ่มสุดท้าย คือ Synthetic Cannabinoids ที่สังเคราะห์ขึ้นมาเอง ตัวอย่าง เช่น Nabilone (14), CP-55940 (15), Dimethylheptylpyran (16), HU-210 (17), SR144528 (18), WIN 55,212-2 (19), JWH-133 (20), Levonantradol (Nantrodolum) (21) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของ Synthetic Cannabinoids

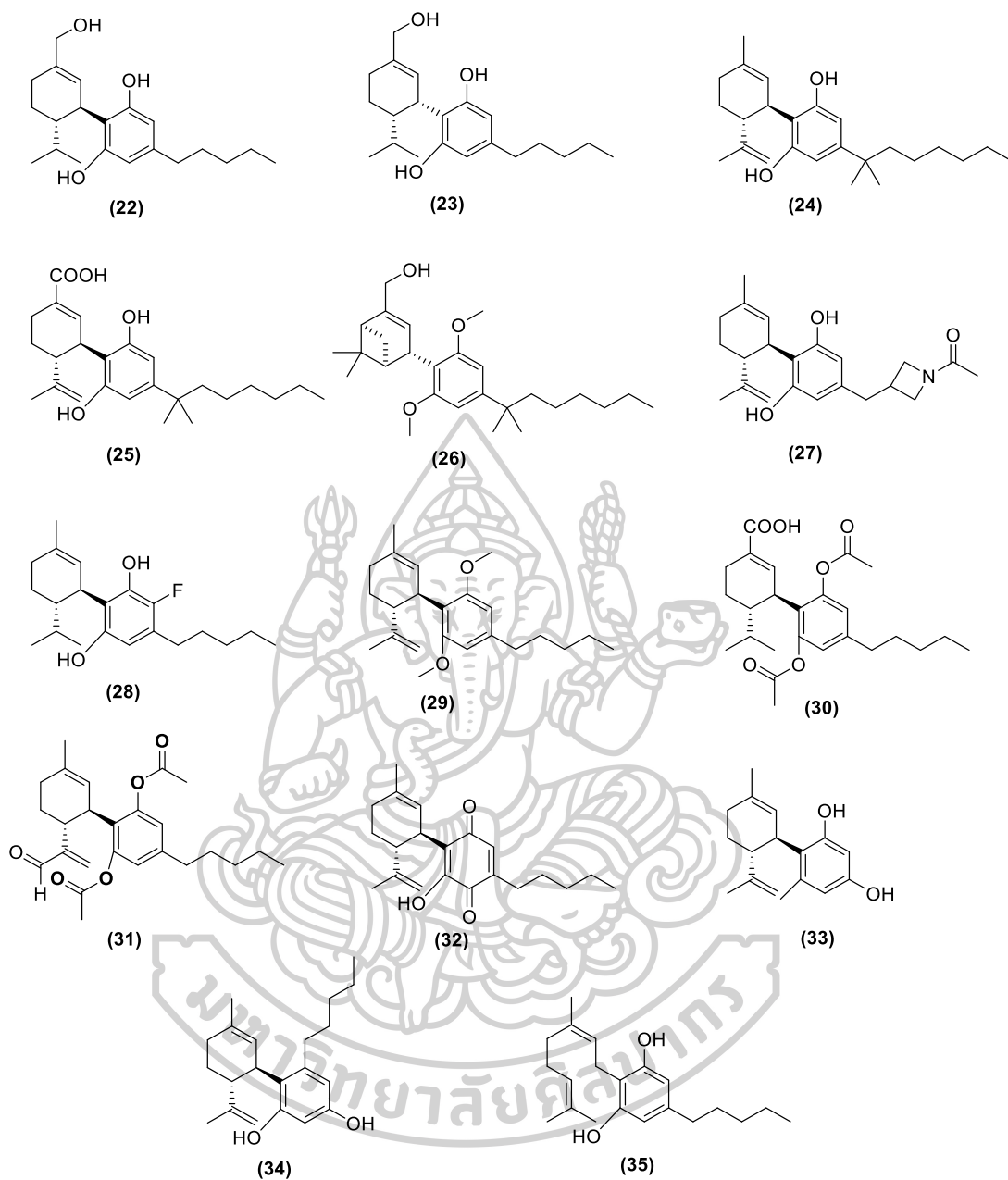
โดยสาร cannabinoids ที่มีการศึกษาวิจัยนำไปใช้มากที่สุดพบว่ามีอยู่ 2 ชนิด คือ Cannabidiol (CBD) และ Tetrahydrocannabinol (THC) ซึ่งสาร THC เป็น psychoactive compound ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท ซึ่งส่วนใหญ่จะจับกับ cannabinoid receptors คือ CB₁ และ CB₂ โดย CB₁ จะพบมากที่ระบบประสาทส่วนกลาง (Central nerve system) มีความสัมพันธ์กับการตัดสินใจ ความจำ ความเข้าใจ อารมณ์ การรับรู้ความปวดและการเคลื่อนไหว ซึ่งส่งผลที่ทำให้เกิดการกระตุ้นประสาท (psychotropic effect) ในขณะที่ CB₂ receptors จะพบที่เนื้อเยื่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Immune system) และระบบประสาทส่วนปลาย ม้าม ทอนซิล ต่อมไทมัส กระจกตา ผิวหนัง และเลือด monocyte, macrophages, B-cells และ T-cells ดังนั้นจึงมีผลต่อความอยากอาหาร การย่อยอาหาร อารมณ์ ความรู้สึก ความจำ การเรียนรู้ และพฤติกรรม เนื่องจากโครงสร้างของสาร THC เลียนแบบการทำงานของสาร anandamide ที่ใช้ในการสื่อสารระหว่างเซลล์สมองในระบบประสาท จึงไปจับกับตัวรับ cannabinoid จึงทำให้เซลล์สมองถูกกระตุ้นให้ทำงานผิดปกติ มีผลต่อการพัฒนาในการคิดและเรียนรู้พร้อมกับไม่สามารถทำงานที่ซับซ้อนได้ หากใช้

ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้สมองหยุดสร้างสารเคมีที่ทำให้รู้สึกดีและทำให้รู้สึกหงุดหงิดง่ายเวลาไม่ได้ใช้ นอกจากนี้ยังรบกวนการทรงตัว ทำให้สมดุลเสียไป และยังลดการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น การเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อไม่ดี จึงเป็นเหตุผลที่คณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษ กำหนดให้มีปริมาณสาร THC ในใบและช่อดอก ไม่เกินร้อยละ 1.0 ต่อน้ำหนักแห้ง ส่วน CBD มีความสามารถในการจับกับ CB₁ และ CB₂ receptors แบบโดยตรงได้เพียงเล็กน้อย แต่มีลักษณะเป็น negative allosteric modulator กับ CB₁ receptor ซึ่งส่งผลกับการทำงานกับ receptors อื่น ๆ โดยสาร CBD จะจับบริเวณที่เรียกว่า Allosteric Modulators ทำให้ตัวรับ CB₁ มีการปรับเปลี่ยนรูปร่าง ทำให้บริเวณที่เรียกว่า Partial Agonists ซึ่งเป็นบริเวณที่สาร THC เข้าไปจับ เปลี่ยนไป สาร THC จึงเข้าไปจับไม่ได้ ทำให้ฤทธิ์ของสาร THC โดยเฉพาะฤทธิ์ที่ส่งผลกระทบต่อร่างกาย เกิดขึ้นไม่ได้เต็มที่ ทำให้สามารถลดอาการปวด อาการอักเสบ ด้านอาการเมาเคลิ้ม และไม่มีผลต่ออาการทางจิตประสาท และลดความกังวลได้ ซึ่ง CBD (cannabidiol) เป็นสารจากธรรมชาติที่มีอยู่ในพืชวงศ์ Cannabaceae เช่น กัญชา และกัญชง พบว่าจะอยู่หนาแน่นที่สุดในช่อดอกของต้นเพศเมีย โดยถูกแยกและหาโครงสร้างตั้งแต่ปี 1940 Roger Adams และ Alexander Todd แยก CBD ได้ประมาณ 0.5-3% จาก *Mexican marijuana* และ *Indian charas* ตามลำดับ ในปัจจุบันมีการพัฒนาสายพันธุ์กัญชาให้มี CBD มากถึง 25% และ THC ต่ำไม่เกิน 0.3% ทำให้ในปี 2018 องค์การอาหาร และยา สหรัฐอเมริกาหรือย่อว่า FDA ได้อนุมัติการใช้ CBD เป็นยาในการรักษาโรคลมชัก โดยมีชื่อทางการค้าคือ Epidiolex (มีเพียง CBD เท่านั้น) หากมี THC ผสมจะใช้ชื่อ Sativex ทั้งนี้ CBD ยังคงเป็นที่น่าสนใจเนื่องจากพบรายงานว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นอีกเช่น antiepileptic (กันชัก) hypoxia-ischemia (โรคสมองขาดออกซิเจนและเลือดไปเลี้ยง) antipsychotic (ยารักษาโรคจิต) anti-inflammatory (ยับยั้งด้านการอักเสบ) anti-asthmatic (ป้องกันโรคหืด) และ antitumor properties (ยับยั้งเนื้องอก)

อนุพันธ์ของ CBD พบว่ามีประโยชน์อย่างมากในด้านชีวภาพ โดยตำแหน่งที่มีการออกฤทธิ์ และเกิดการทำปฏิกิริยา ดังนี้ การทำปฏิกิริยา hydrogenation ที่พันธะคู่ปลายสาย และทำปฏิกิริยา Riley oxidation ด้วย SeO₂ ที่ตำแหน่ง allylic ได้เป็น (+)-dihydro-7-hydroxy-CBD HU-446 (22) และ HU-465 (23) มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ [1] การแทนที่ของ pentyl chain ด้วย 1',1'-dimethylheptyl (DMH) lipophilic alkyl chain ได้แก่ (-)-DMH-CBD (24) ได้แสดงคุณสมบัติต้านการอักเสบและต้านการแพร่กระจายในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิดมัยอีลอยด์ [2] HU-320 (25) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและกดภูมิคุ้มกัน [3] HU-308 (26) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ยาแก้ปวด สารป้องกันประสาท หรือต้านเนื้องอก [4] การปรับเปลี่ยนที่ตำแหน่ง C4'-Alkyl Chain ได้แก่ KLS-13019 (27) มีฤทธิ์ป้องกันความเสียหายต่อเซลล์ประสาท hippocampus [5] ที่ตำแหน่งวง

แหวนฟินอล มีการแทนที่ด้วยฟลูออรีน ได้แก่ HUF-101 (28) มีฤทธิ์ในการระงับความวิตกกังวล ยา
กล่อมประสาท ยารักษาโรคจิตและยากันชัก [6] ที่ตำแหน่งไฮดรอกซิล มีการทำปฏิกิริยา
acetylations และ alkylations ได้แก่ CBDD (29) สารประกอบนี้ไม่ได้เป็นเพียงต้นแบบที่มี
ศักยภาพสำหรับการรักษาหลอดเลือด แต่ยังเป็นเครื่องมือทางเภสัชวิทยาเพื่อศึกษากลไกของการ
ควบคุมน้ำหนักตัว [7] HU-444 (30) ได้แสดงคุณสมบัติด้านการอักเสบ ในหลอดทดลอง และใน
ร่างกาย ในหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้มีอาการข้ออักเสบ โดยการฉีดสารคอลลาเจนที่กระตุ้นระบบ
ภูมิคุ้มกัน [8] CBD-aldehyde-diacetate (31) มีการออกฤทธิ์ของยากันชักในร่างกาย [9] อนุพันธ์
Quinone ของ CBD ได้แก่ HU-331 (32) มีประสิทธิภาพมากในการลดการเจริญเติบโตของ
เซลล์มะเร็งลำไส้ [10] และการทำปฏิกิริยาต่างๆที่ตำแหน่งวงแหวนฟินอล ได้แก่ HT-29 Abn-CBD
(33) มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด [11] ต้านเชื้อแบคทีเรีย [12] ยารักษาโรคเบาหวาน [13] สารต้านอาการ
ลำไส้ใหญ่บวม [14] O-1602 (34) ฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูเมาส์ที่มีตับอ่อนอักเสบเฉียบพลันที่เกิด
จากเชรุลิน [15] โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง [16] โรคที่เกิดจากการเผาผลาญอาหาร
ของร่างกายที่ผิดปกติไป ทำให้เกิดปัญหาเรื่องความดันโลหิตสูง เบาหวาน และไขมันสูง [17] CBG
(35) แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย [12] ฤทธิ์คล้ายยากล่อมประสาท [18] และต้านการ
อักเสบสำหรับโรคลำไส้ [19] (ภาพที่ 4)



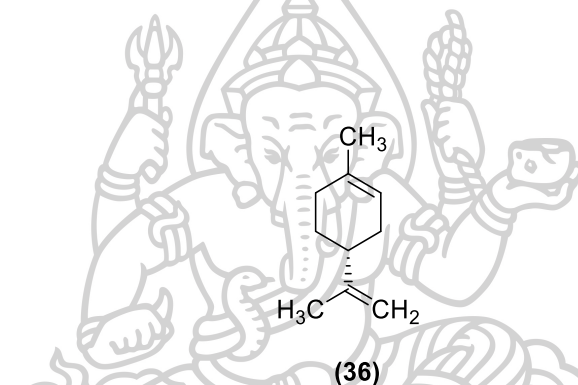


ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของ CBD

จะเห็นได้ว่าตำแหน่งที่มีการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์ CBD มีดังที่กล่าวมาข้างต้น มีโครงสร้างและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของ CBD เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ งานวิจัยในครั้งนี้ได้วางแนวทางการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cannabidiol โดยคาดว่าจะได้จาก ปฏิกิริยา Methylation โดยเริ่มจาก CBD ถูกแปลงเป็น dimethyl ether ซึ่งทำปฏิกิริยากับ 3-chloroperbenzoic acid เพื่อได้เป็น epoxide ผ่านปฏิกิริยา Epoxidation จากนั้นทำปฏิกิริยา Epoxide ring opening โดยใช้ nucleophile และทำการวิเคราะห์โครงสร้างและสมบัติทางกายภาพของ ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี และนำอนุพันธ์ของ cannabidiol ไปทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ



Limonene (36) จัดเป็นสารประเภทเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) มีจำนวนคาร์บอน 10 คาร์บอนจึงจัดอยู่ในกลุ่มโมโนเทอร์พีน (monoterpenes) ซึ่งในโครงสร้างมีพันธะคู่ 2 ตำแหน่ง โดยอยู่ตำแหน่งปลายโครงสร้างและตำแหน่งบนวง cyclohexene (ภาพที่ 5) สามารถพบได้ในพืชตระกูลส้ม เช่น ส้ม มะนาว ส้มแมนดาริน มะนาว และเกรปฟรุต เป็นต้น ซึ่งจะอยู่ในรูปน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้บริเวณผิวเปลือก โดยจะพบอยู่ในรูปของ ดี-ลิมอนีน (D-limonene) และนิยมนำมาใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งกลิ่นรส (flavoring agent) ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น น้ำผลไม้ น้ำอัดลม ขนมอบ ไอศกรีม พุดดิ้ง เป็นต้น หรือนำมาใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์สุขอนามัยอื่น ๆ ด้วย เช่น แชมพู โลชั่น สบู่ เป็นต้น นอกจากนี้ยังถือว่าเป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษค่อนข้างต่ำ จึงนำมาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในรูปแบบแคปซูลและของเหลว

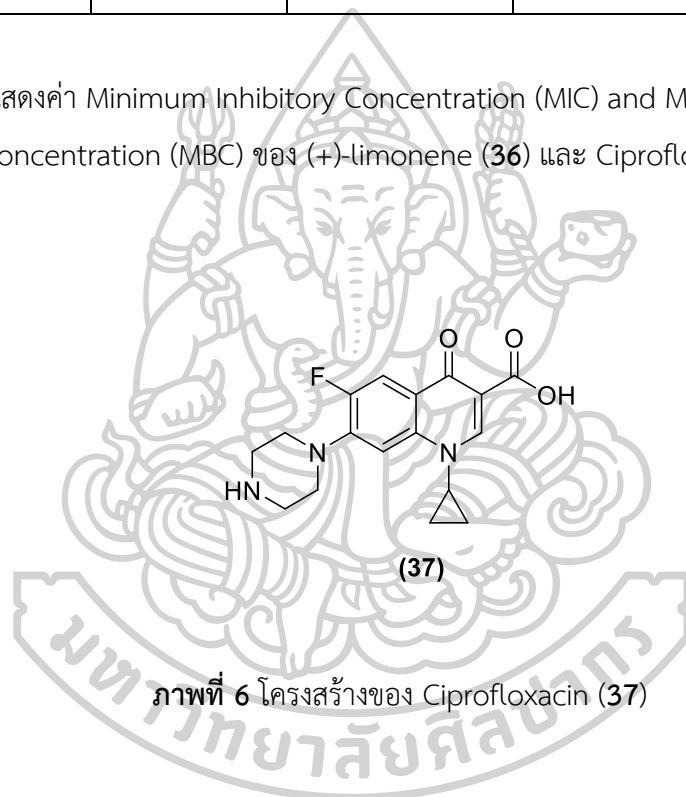


ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างของ (+)-limonene (36)

ปัจจุบัน Limonene (36) ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางเนื่องจากประโยชน์ทางชีวภาพที่หลากหลาย จากความต้องการอย่างยิ่งของผู้ป่วยที่มีความคาดหวังต่อการนำมาเป็นยารักษาโรค จากงานวิจัยของคุณ Ze-Hua Li และคณะ [20] พบว่า (+)-Limonene (36) ฤทธิ์ต้านจุลชีพและต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยมีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของ (+)-limonene (36) เทียบกับ Ciprofloxacin (37) โดยแสดงค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) (ตารางที่ 1)

Microorganisms	MIC (mg/mL)		MBC (mg/mL)	
	(+)-limonene	Ciprofloxacin	(+)-limonene	Ciprofloxacin
<i>B. subtilis</i>	1.25	0.001	1.25	0.001
<i>S. aureus</i>	0.625	0.001	1.25	0.001
<i>M. luteus</i>	2.5	0.001	5	0.001
<i>E. Coli</i>	1.25	0.001	1.25	0.002

ตารางที่ 1 แสดงค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของ (+)-limonene (36) และ Ciprofloxacin (37)



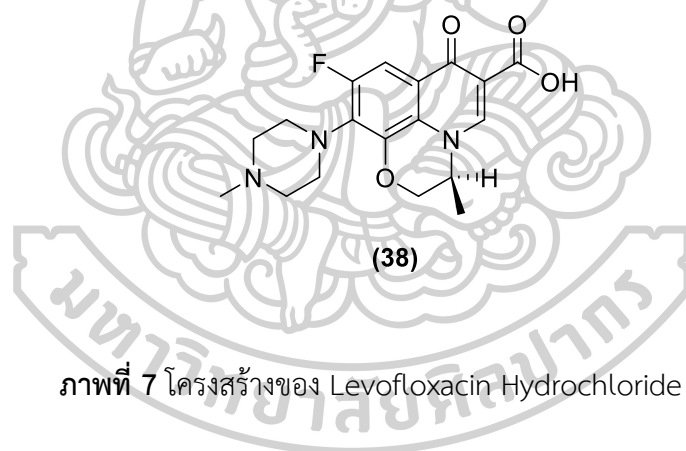
ภาพที่ 6 โครงสร้างของ Ciprofloxacin (37)

นอกจากนี้ในงานวิจัยของคุณ Yingjie Han และคณะ [21] มีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ของ limonene (36) เทียบกับ Levofloxacin Hydrochloride (38) โดยแสดงเป็นค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (ตารางที่ 2)

Treatment	Concentration of Drugs (mL/L)								
		0.3125	0.625	1.25	2.5	5	10	20	40
Limonene		+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
Levofloxacin Hydrochloride		+++	-	-	-	-	-	-	-
Sterile water	+++								
20% Ethanol	+++								

“+++”, a large number of colonies; ++, more colonies; “+”, a medium number of colonies; “-”, no colonies.

ตารางที่ 2 แสดงค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของ limonene (36) และ Levofloxacin Hydrochloride (38)



ภาพที่ 7 โครงสร้างของ Levofloxacin Hydrochloride (38)

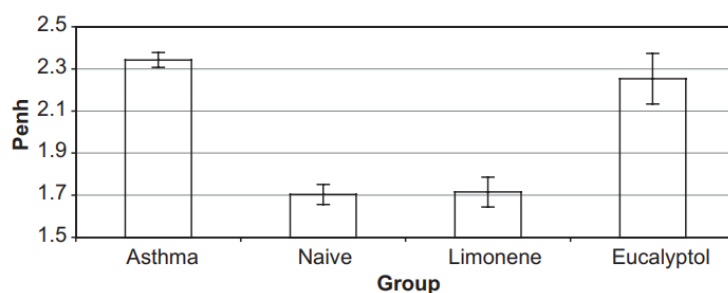
งานวิจัยของคุณ Frum และ Viljoen [22] พบว่า Limonene (36) มีคุณสมบัติต้านการอักเสบ สามารถสกัดได้จากพืช *Helichrysum odoratissimum* โดยมีฤทธิ์ยับยั้ง 5-lipoxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ ที่ทำให้เกิดอาการปวดและอาการไข้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 35.9 ppm (ตารางที่ 3)

Species / compound	Locality	IC ₅₀ (ppm) ^a	Major compounds ^b
<i>Hel. Odoratissimum</i> (Asteraceae)	Amatola Mountains (Eastern Cape)	35.90 (6.10) ^c	Limonene (19.6%) 1,8-cineole (17.1%) α -pinene (8.3%) β -caryophyllene (9.3%)
<i>Het. natalensis</i> (Heteropyxidaceae)	Cullinan (Gauteng)	46.63 (1.09) ^c	limonene (24.4%) 1,8-cineole (21.2%) linalool (10.0%) β -pinene (7.1%)
<i>L. javanica</i> (Verbenaceae)	Melville Koppies (Gauteng)	74.26 (1.54) ^c	linalool (65.2%) (Z)- β -ocimene (13.0%) (E)- β - ocimene (6.2%) β -caryophyllene (3.6%)
NDGA		5 (0.50) ^d	

^a 5-lipoxygenase inhibitory activity; ^b value in brackets reflects percentage amounts of compounds identified; ^c value in brackets reflects standard error of data points fitted to obtain a sigmoidal curve; ^d value in brackets reflects standard deviation (n = 3)

ตารางที่ 3 แสดงฤทธิ์ยับยั้ง 5-lipoxygenase และสารประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยของพืช
Helichrysum odoratissimum, *Heteropyxis natalensis* และ *Lippia javanica*

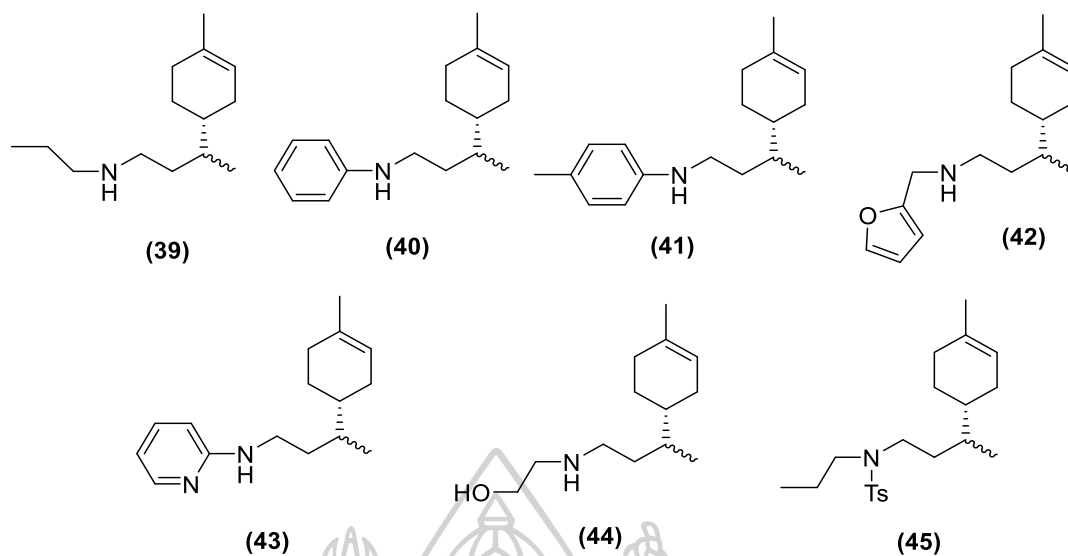
งานวิจัยของคุณ Keinan และคณะ [23] พบว่า Limonene (36) มีฤทธิ์ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ ทำให้เยื่อหุ้มปอดอิมมัตว ปกป้องเซลล์ปอดจากไอโซนภายนอกหรือไอโซนภายในร่างกาย ตลอดจนสารออกซิไดซ์อื่นๆ ซึ่งการหายใจเอา Limonene (36) เข้าไปช่วยป้องกันการอุดตันของหลอดลมได้ (ภาพที่ 8)



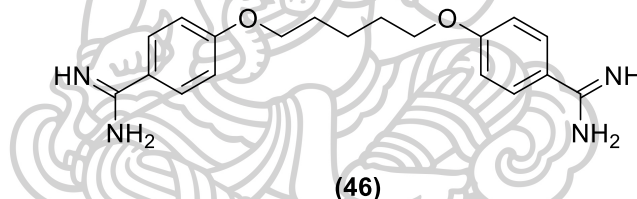
ภาพที่ 8 แสดงผลการทดสอบการทำงานของปอด

และในหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า Limonene (36) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม ผีวหนึ่ง ปอด และกระเพาะอาหารของสัตว์ฟันแทะ [24] [25] [26] [27] [28] [29] มีรายงานเพิ่มเติมว่า Limonene (36) ช่วยลดการเกิดความผิดปกติของเซลล์ลำไส้ใหญ่ (aberrant crypt foci) หลังได้รับสารก่อมะเร็ง azoxymethane ในหนู หลังจากให้ Limonene (36) 0.5% ในน้ำดื่ม เช่นเดียวกับโมโนเทอร์พีนที่ผ่านการทดสอบอื่นๆ [30] และ Limonene (36) ยังเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 และ HL60 อีกด้วย [31]

อนุพันธ์ของ (+)-Limonene (36) พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้ง Leishmania (Viannia) braziliensis ชนิด promastigote โดยแสดงค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่า pentamidine [32] (ภาพที่ 9)

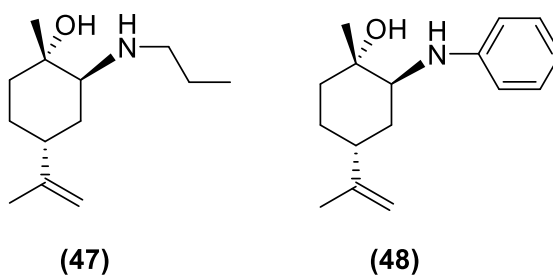


ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของ (+)-limonene (36)



ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างของ Pentamidine (46)

อนุพันธ์ของ (+)-Limonene (36) ได้จากการทำปฏิกิริยา hydroxylation ของพันธะคู่ทั้งสองทำให้โครงสร้างของ (+)-Limonene (36) สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ได้ จึงมีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ (+)-Limonene (36) โดยใช้ *N*-alkyl amine และ *N*-aryl amine ผ่าน limonene oxide ซึ่งให้ร้อยละผลได้ดี และได้มีการนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่ามีอนุพันธ์สองชนิดคือ (47) และ (48) มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Leishmania (Viannia) braziliensis* ชนิด promastigote ด้วยค่า LD₅₀ เท่ากับ $0.71 \pm 0.095 \mu\text{M}$ และ $0.408 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ตามลำดับ [33] (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของ (+)-limonene (36)

ด้วยเหตุผลเหล่านี้ผู้วิจัยจึงสนใจสังเคราะห์อนุพันธ์ของ (+)-Limonene (36) โดยการแทนที่พันธะคู่บนไซโคลเฮกซีนด้วยอีพอกไซด์ หลังจากนั้นจึงมีการใช้นิวคลีโอไฟล์หลายชนิดเพื่อทำการเปิดวงแหวนอีพอกไซด์ให้ได้ อนุพันธ์ของ (+)-Limonene (36) เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

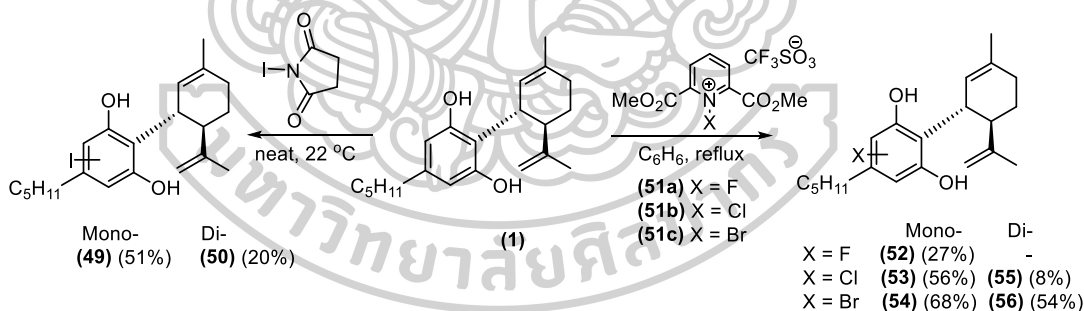
- 1.) ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cannabidiol (CBD) (1)
- 2.) ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ (+)-Limonene (36)
- 3.) ทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโมเลกุลของอนุพันธ์ cannabidiol (CBD) (1) ที่สังเคราะห์ได้
- 4.) ทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโมเลกุลของอนุพันธ์ (+)-Limonene (36) ที่สังเคราะห์ได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ CBD (1)

ในปี 1999 Yamamoto และคณะ [34] ได้ทำการสังเคราะห์ halogenated (-)-CBD derivatives (**49-56**) เริ่มจากการทำปฏิกิริยา halogenation ของ (-)-CBD (**1**) ด้วย *N*-halopyridinium triflates ได้เป็นสารผสมของ mono- และ di-substituted CBD derivatives จากโครงสร้างที่สังเคราะห์ได้ข้างต้น พบว่า mono-fluorinated (-)-CBD (**52**) มีประสิทธิภาพในการระงับปวด (antinociceptive effects) ได้ดีกว่า (-)-CBD (**1**) อีกทั้ง mono-iodinated (-)-CBD (**49**), mono-chlorinated (-)-CBD (**53**), mono-brominated (-)-CBD (**54**) สามารถยี้ระยะเวลาการนอนหลับของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้นอนหลับด้วยยา pentobarbital ขนาด 10 mg./kg. นอกจากนี้ mono-brominated (-)-CBD (**54**) ยังสามารถต้านการชัก (anticonvulsant effects) ที่เหนี่ยวนำโดยสารเคมีและไฟฟ้าในหนูซึ่งเหนี่ยวนำให้หนูชักด้วยยา pentylenetetrazol (PTZ) (ED₅₀ เท่ากับ 44 mg./kg.) (ภาพที่ 12)

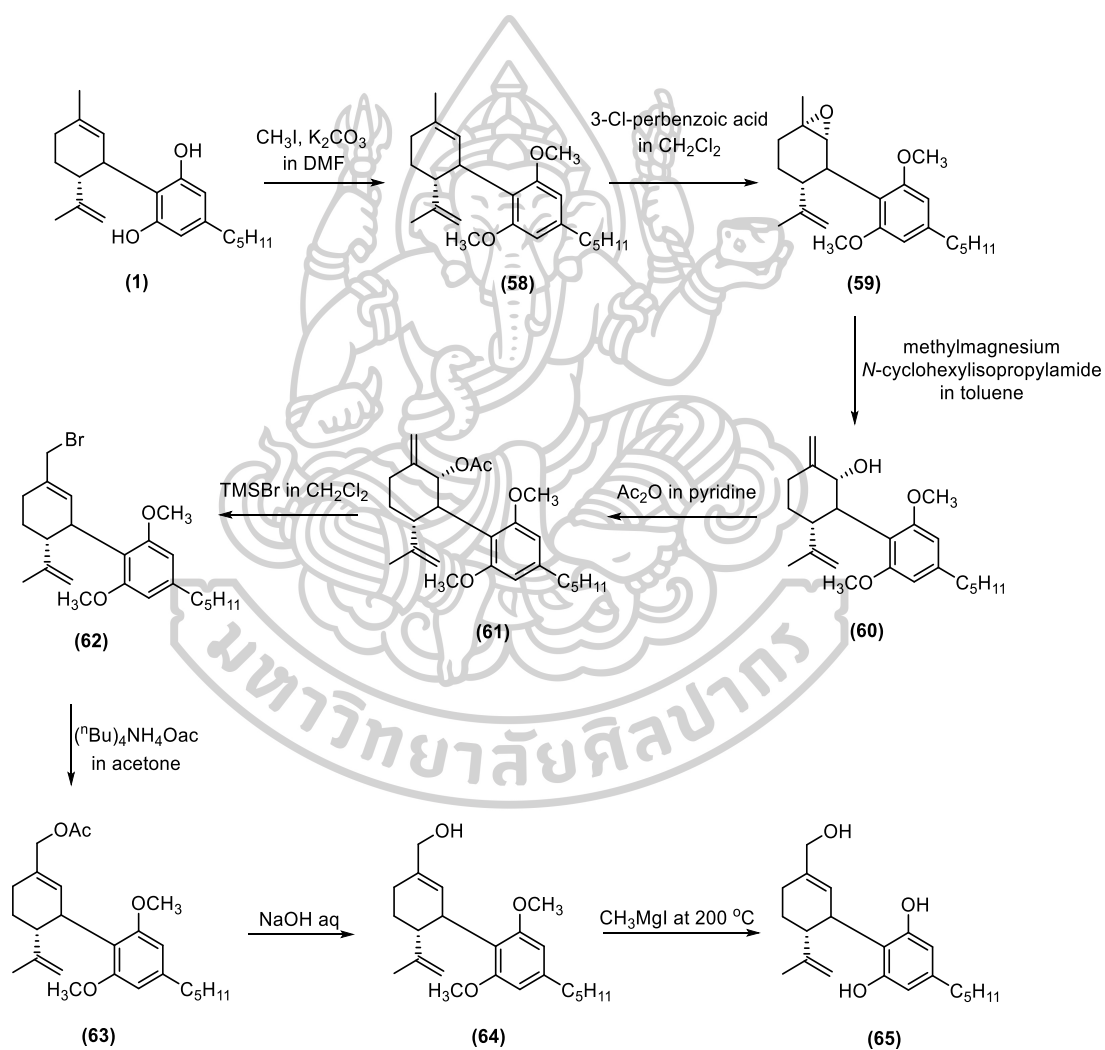


ภาพที่ 12 แสดงการสังเคราะห์ Halogenated (-)-CBD derivatives โดย Yamamoto และคณะ

[34]

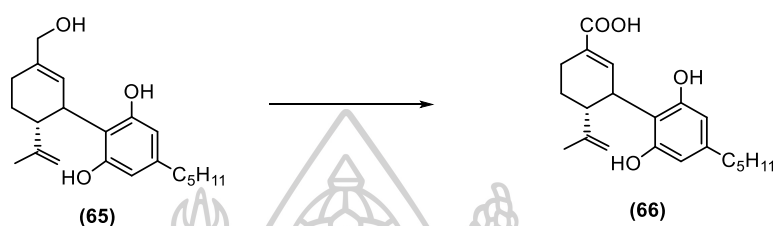
ในปี 2000 Tchilibon and Mechoulam [35] ได้ทำการสังเคราะห์ 7-hydroxy-CBD (**65**) โดยเริ่มจาก CBD (**1**) ถูกแปลงเป็น dimethyl ether (**58**) ซึ่งทำปฏิกิริยากับ 3-chloroperbenzoic acid เพื่อได้เป็น epoxide (**59**) ผ่านปฏิกิริยา epoxidation ซึ่งเป็นปฏิกิริยา electrophilic เกิดขึ้นโดยเฉพาะกับ double bond ของวงแหวนมากกว่าใน terminal olefinic group เนื่องจากความหนาแน่นของอิเล็กตรอนใน terminal olefinic group ต่ำกว่า จากนั้นเปิดวงแหวนด้วย

methylmagnesium *N*-cyclohexylisopropyl amide ใน toluene ได้สารประกอบ (60) การใช้ methyl ether เป็น protecting group นั้นจำเป็นสำหรับการเปิดวงแหวนของ epoxide จากนั้นทำปฏิกิริยา acetylation ของสารประกอบ (61) ได้สารประกอบ (62) และนำไปทำปฏิกิริยากับ tertbutyldimethylsilyl bromide (TMSBr) ได้ allylic bromide (63) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น allylic acetate acetate (64) ด้วย tetrabutylammonium acetate สุดท้ายกำจัด ether blocking groups โดยการให้ความร้อนด้วย methylmagnesium iodide ที่อุณหภูมิ 200 °C ซึ่งทำให้ได้ 7-hydroxycannabidiol (65) (ภาพที่ 13)



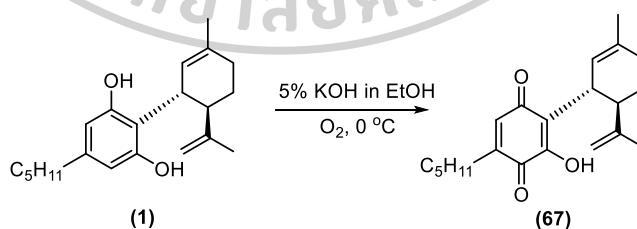
ภาพที่ 13 แสดงการสังเคราะห์ 7-hydroxy-CBD (65) โดย Tchilibon and Mechoulam [35]

ในปี 2002 Mechoulam and Hanus [36] ได้ทำการสังเคราะห์ CBD-7-oic-acid (**66**) โดยเริ่มทำการสังเคราะห์จาก 7-hydroxycannabidiol (**65**) ทำการ protect phenolic groups จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา Oxidation ที่ตำแหน่ง allylic alcohol ได้เป็น CBD-7-oic-acid (**66**) (ภาพที่ 14)



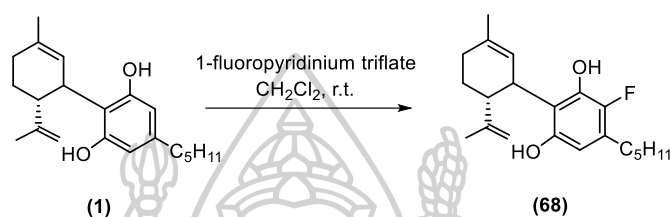
ภาพที่ 14 แสดงการสังเคราะห์ CBD-7-oic-acid (**66**) โดย Mechoulam and Hanus [36]

ในปี 2004 Natalya และคณะ [37] ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ (-)-CBD (**1**) โดยทำปฏิกิริยา Oxidation กับ (-)-CBD (**1**) ได้เป็น hydroxyquinone-CBD (**67**) ซึ่งมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพสูงในการลดการเจริญเติบโตของมะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (human colon carcinoma HT-29 cells) และ quinone moiety นี้ พบว่ามีความจำเป็นสำหรับ anti-proliferative activity ต่อด้านเซลล์มะเร็งที่หลากหลาย (ภาพที่ 15)



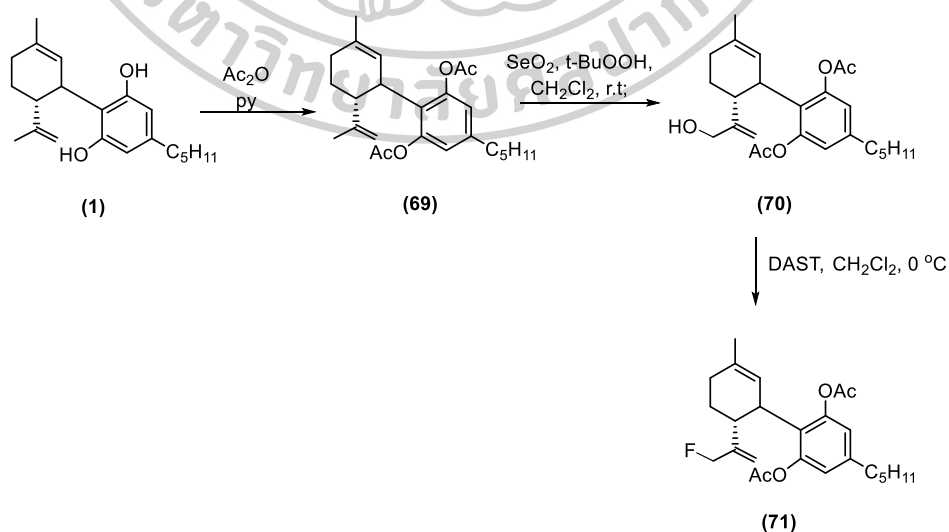
ภาพที่ 15 แสดงการสังเคราะห์ hydroxyquinone-CBD (**67**) โดย Natalya และคณะ [37]

ในปี 2016 Breuer และคณะ[6] ยังได้ทำการสังเคราะห์ fluorine halogenated CBD derivatives ดังนี้ 4'-fluoro-cannabidiol (**68**), 10-fluoro-cannabidioldiacetate (**71**), (-)-8,9-dihydro-7-fluoro-CBD (**78**) โดยที่ 4'-fluoro-cannabidiol (**68**) มีการสังเคราะห์เริ่มจาก CBD (**1**) ทำปฏิกิริยากับ 1-fluoropyridinium triflate ใน CH_2Cl_2 ที่อุณหภูมิห้อง ได้เป็น 4'-fluoro-cannabidiol (**68**) เป็นของแข็ง ซึ่งมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในด้านความวิตกกังวล (anxiolytic) ด้านซึมเศร้า (antidepressant) และ ด้านอาการทางจิต (antipsychotic) ได้ดีกว่า (-)-CBD (ภาพที่ 16)



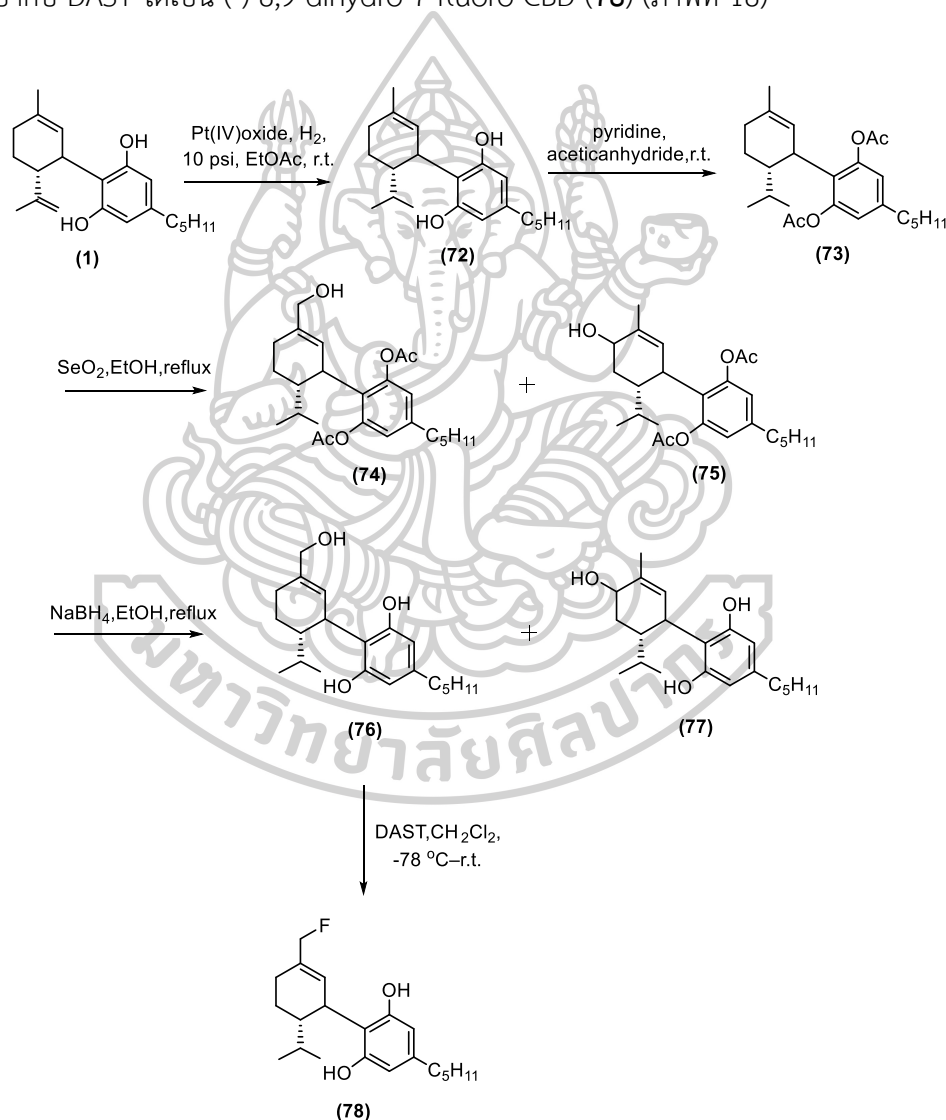
ภาพที่ 16 แสดงการสังเคราะห์ 4'-fluoro-cannabidiol (**68**) โดย Breuer และคณะ [6]

ต่อมา 10-fluoro-cannabidioldiacetate (**71**) มีการสังเคราะห์เริ่มจาก (-)-CBD (**1**) ทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride ใน pyridine ได้เป็น cannabidiol diacetate (**69**) จากนั้นทำปฏิกิริยากับ SeO_2 และ *t*-BuOOH ใน CH_2Cl_2 ได้เป็น 10-hydroxy-cannabidiol-diacetate (**70**) และสุดท้ายทำปฏิกิริยากับ DAST ได้เป็น 10-fluoro-cannabidioldiacetate (**71**) (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 แสดงการสังเคราะห์ 10-fluoro-cannabidioldiacetate (**71**) โดย Breuer และคณะ [6]

และต่อมา (-)-8,9-dihydro-7-fluoro-CBD (**78**) ได้ถูกสังเคราะห์จาก (-)-CBD (**1**) ทำปฏิกิริยา hydrogenation โดยมี Pt_2O เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้เป็น (-)-8,9-Dihydro-CBD (**72**) จากนั้นนำไปใส่หมู่ป้องกันไฮดรอกซิลด้วย acetic anhydride ได้เป็น (-)-8,9-Dihydro-CBD-diacetate (**73**) จากนั้นทำปฏิกิริยาออกซิดชันด้วย selenium oxide ได้เป็นสารผสม (-)-8,9-Dihydro-7-hydroxy-CBD-diacetate (**74**) และ (-)-8,9-dihydro-6-hydroxy-CBD-diacetate (**75**) จากนั้นถอดหมู่ป้องกันของสารผสมโดยละลายใน ethanol และ NaBH_4 ได้เป็น (-)-8,9-Dihydro-7-hydroxy-CBD (**76**) และ (-)-8,9-dihydro-6-hydroxy-CBD (**77**) และเมื่อนำ (**76**) มาปฏิกิริยากับ DAST ได้เป็น (-)-8,9-dihydro-7-fluoro-CBD (**78**) (ภาพที่ 18)



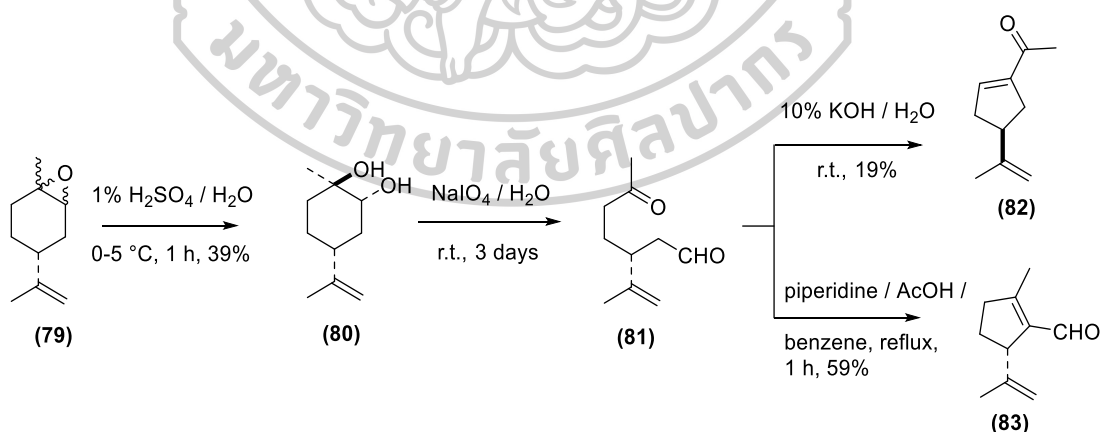
ภาพที่ 18 แสดงการสังเคราะห์ (-)-8,9-dihydro-7-fluoro-CBD (**78**) โดย Breuer และคณะ [6]

2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของลิโมนีน (limonene) (36)

ในปี 1959 Wolinsky และคณะ [38] [39] ได้เตรียมคีโตน (82) และอัลดีไฮด์ (83) จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้จาก Spanish *Eucalyptus globulus* เป็นครั้งแรก ซึ่งเป็นเป็นตัวอย่างที่สำคัญในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติหลายชนิด โดยเริ่มต้นจาก limonene oxide (79) อีกทั้ง keto-aldehyde ซึ่งเป็นตัวกลางในแนวทาง Wolinsky ยังถูกนำมาใช้ในการศึกษา asymmetric cyclization และ chemoselective reduction (ภาพที่ 19)

มีการอธิบายการสังเคราะห์ 1-acetyl-4-isopropenyl-1-cyclopentene (87) จาก limonene monoxide (79) สารนี้พิสูจน์แล้วว่าเหมือนกันกับคีโตนที่แยกได้จาก Spanish *Eucalyptus globulus* ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการแก้ไขโครงสร้างที่ยอมรับก่อนหน้านี้ของคีโตนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ

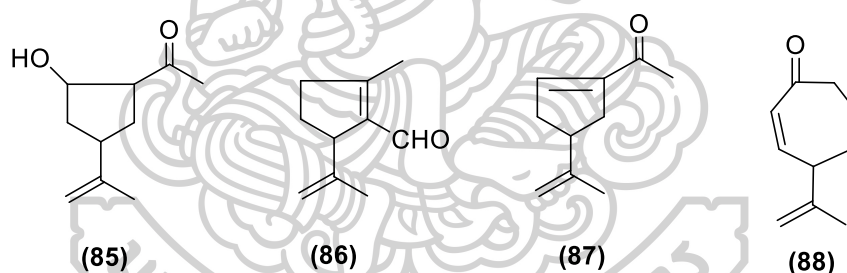
วิธีการของสังเคราะห์เริ่มต้นด้วยการทำปฏิกิริยา acid-catalyzed hydrolysis ของ limonene monoxide (79) จากนั้นเกิดการ Cleavage ของ diol (80) โดยทำปฏิกิริยากับ sodium metaperiodate (NaIO_4) ได้เป็น keto-aldehyde (81) ตามที่ระบุโดยสเปกตรัมอินฟราเรดของน้ำมันที่ได้ ความยาวคลื่นของพันธะ C=O ของแอลดีไฮด์ เท่ากับ 3.7 microns ความยาวคลื่นของพันธะ C=O ของคาร์บอนิล เท่ากับ 5.8 microns และ ความยาวคลื่นของพันธะ terminal methylene เท่ากับ 6.08 และ 11.25 microns (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 แสดงการทำปฏิกิริยาของ ketone (82) และ aldehyde (83) จาก limonene oxide (79) [38, 39]

คาดว่า การ cyclization ของ keto-aldehyde (81) จะนำไปสู่ unsaturated aldehyde (86) หรือ unsaturated ketone (87) อย่างไรก็ตามเมื่อ ethereal solution ของ crude (81) ถูกเขย่าเป็นเวลา 30 นาทีด้วย dilute potassium hydroxide พบว่าถูกแยกออกมาได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวไม่มีสี ซึ่งแสดงค่า b.p. 66-68 ° (1.5 mm.) การตรวจสอบสเปกตรัมอินฟราเรดของสารนี้บ่งชี้ว่ามีกลุ่ม ความยาวคลื่นของ conjugated carbonyl เท่ากับ 6.02 และ 6.18 microns และความยาวคลื่นกลุ่ม terminal methylene เท่ากับ 11.25 microns แต่ไม่มี band ที่ 3.7 microns ของความยาวคลื่นของพันธะ C=O ของแอลดีไฮด์ แสดงว่าเป็น unsaturated ketone (87) การดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น เท่ากับ 239 m μ .

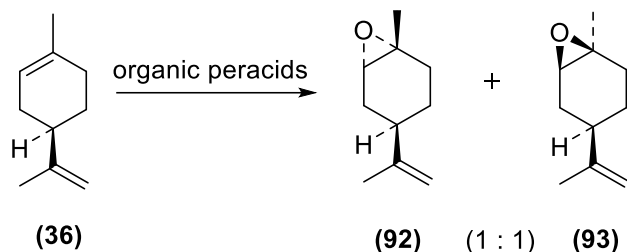
นอกจากนี้ ยังได้ของเหลวชนิดที่สองซึ่งมีการเดือดที่สูงกว่า คีโตน (87) อย่างเห็นได้ชัดจากการทำปฏิกิริยาของ keto-aldehyde ด้วย dilute alkali สารนี้มีการดูดกลืนในอินฟราเรดที่ 2.75, 2.85, 5.80, 6.05 และ 11.25 μ ของ hydroxyl, saturated carbonyl และ terminal methylene ตามลำดับ ในการกวน ethereal solution ของสารนี้ด้วย alkali ได้เป็น unsaturated ketone (87) ดังนั้นของเหลวที่มีจุดเดือดสูงกว่า จึงเป็น β -hydroxy ketone (85)



ภาพที่ 20 แสดงโครงสร้างของ β -hydroxy ketone (85), unsaturated aldehyde (86), unsaturated ketone (87), 2-cycloheptenone (88) [38, 39]

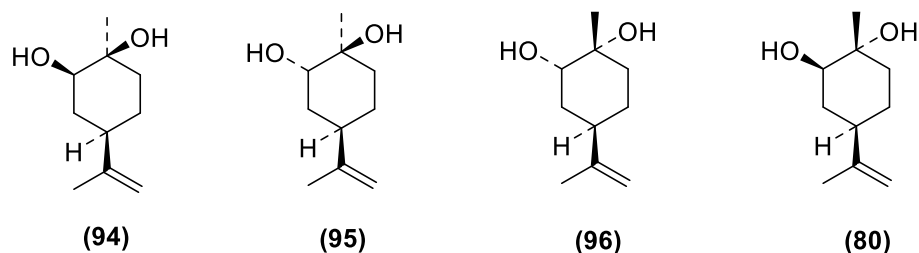
ในปี 1965 Royals and Leffingwell [40] ศึกษาปฏิกิริยา Epoxidation ของ alkyl-substituted monocyclic cyclohexenes (36) โดยทั่วไปคาดว่าให้ epoxides ซึ่งส่วนใหญ่ *trans* กับ alkyl substituents อย่างไรก็ตาม จากการตรวจสอบของแบบจำลองของ 4-alkylcyclohexenes ไม่ได้ระบุชัดว่าด้านหนึ่งมี hindered มากกว่าอีกด้านหนึ่ง ดังนั้นสารผสมที่มีปริมาณเท่ากันที่ใกล้เคียงกันของ epoxide จึงเป็นไปได้ ตัวอย่างเช่น ในกรณีของปฏิกิริยา

epoxidation ของ limonene (36) กับ organic peracids จะได้ส่วนผสม 1 : 1 ของ epoxide ทั้งสองชนิด [40] (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 แสดงโครงสร้างของ limonene (36), (+)-cis-limonene-1,2-oxide (92), (+)-trans-limonene-1,2-oxide (93) [40]

การศึกษาเกี่ยวกับ limonene 1,2-oxides คือการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ epoxidation เพิ่มเติม และการศึกษาที่ epoxide hydrated เพื่อผลิต limonene 1,2-diol ที่แตกต่างจาก limonene 1,2-diol ที่เตรียมจาก α -terpineol โดย permanganate oxidation ทั้งนี้ Stereochemistry ของทั้งสอง glycol ถูกกำหนดโดยงานของ Blumann และ Wood [43] และตีความอย่างถูกต้องโดย Schmidt ผู้กำหนด stereochemistry ของ diol ที่ได้มาจาก limonene 1,2-oxide เป็น 1-hydroxyneodihydrocarveol (95) และจาก α -terpineol เป็น 1-hydroxydihydrocarveol (94) โดยที่ 1-Hydroxyneodihydrocarveol (95) เป็น diol ที่คาดหวังจากทั้ง *cis*- และ *trans*-limonene 1,2-oxides ถ้ากลุ่ม isopropenyl ยึด ring conformation และกฎ Fürst-Plattner ของ diaxial opening มีอิทธิพลมากกว่า oxirane opening เมื่อเร็ว ๆ นี้ Newhall ได้แยกไอโซเมอร์ที่สาม ซึ่ง 1-hydroxyneoisodihydrocarveol (80) เป็นผลิตภัณฑ์ minor hydration ของ (+)-*trans*-limonene 1,2-oxide (93) ทั้งนี้ 1-hydroxyisodihydrocarveol (96) ไม่ได้ถูกแยกออก ไอโซเมอร์ทั้งสี่ได้ถูกเตรียมขึ้นแล้ว สำหรับระบบการตั้งชื่อและการกำหนดรูปแบบ alcohol เหล่านี้ ได้จัดทำตารางไอโซเมอร์ของ 1-hydroxydihydrocarveols (94) (ภาพที่ 22) (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 22 แสดงโครงสร้างของ 1-hydroxydihydrocarveol (**94**),
 1-Hydroxyneodihydrocarveol (**95**), 1-hydroxyisodihydrocarveol (**96**),
 1-hydroxyneoisodihydrocarveol (**80**) [40]

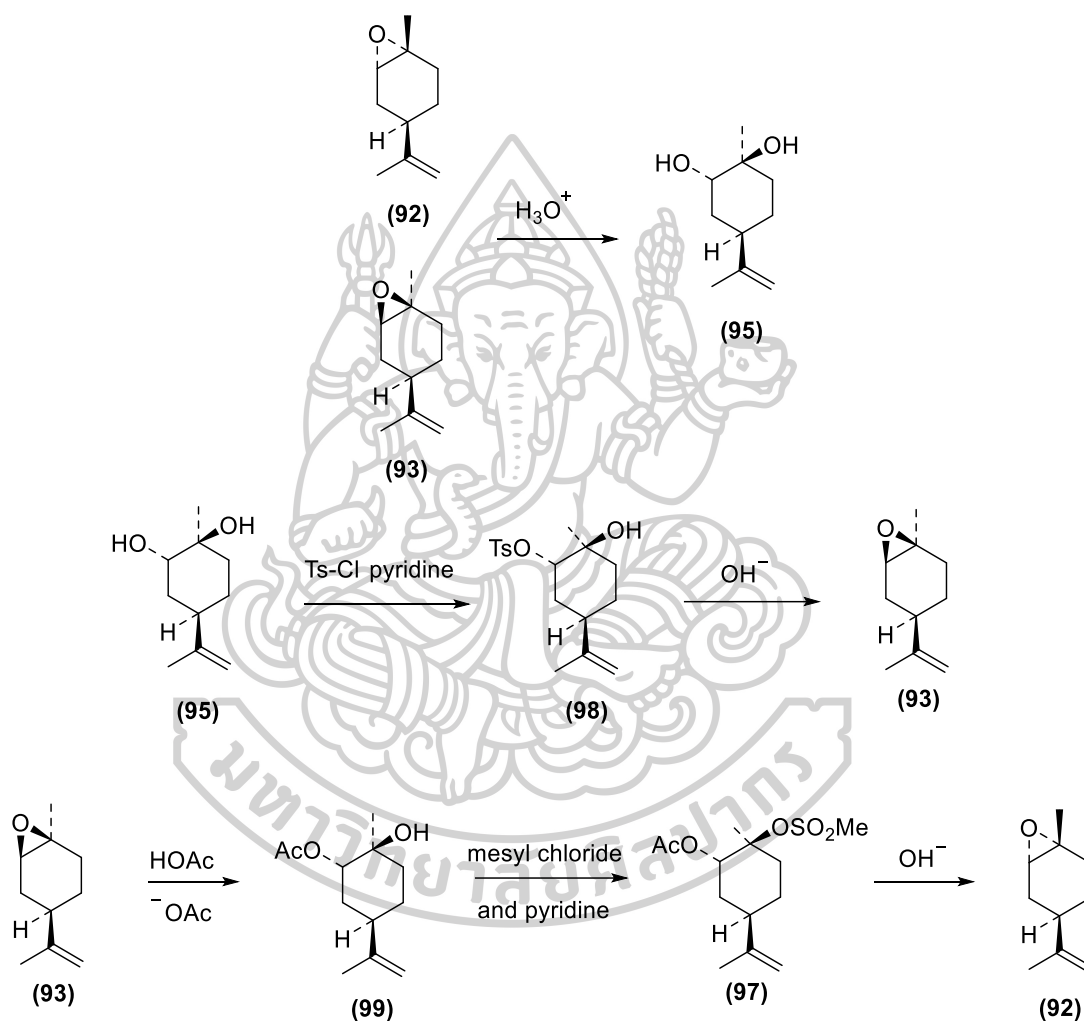
1-Hydroxydihydrocarveols			
[α] _D , ^a			
Compound	Mp, °C	deg	Ref
(+)-1-Hydroxydihydrocarveol (94)	71-72	+25	16
(±)-1-Hydroxydihydrocarveol (95)	63-64	±0	16
(+)-1-Hydroxyneodihydrocarveol (95) ^b	72-73	+55	16
(-)-1-Hydroxyneodihydrocarveol (95)	70-72	-43	16
(±)-1-Hydroxyneodihydrocarveol (95)	60-61	±0	16
(+)-1-Hydroxyneoisodihydrocarveol (80)	65-66	+28	20

^a Specific rotations were obtained in acetone solution. ^b The value for this rotation was obtained in this work.

ตารางที่ 4 แสดงไอโซเมอร์ของ limonene 1,2-diols (1-hydroxydihydrocarveols) (**94**) [40]

(+)-*cis*-limonene 1,2-oxide (**92**) และ (+)-*trans*-limonene 1,2-oxide (**93**) ทำปฏิกิริยาเปิดวง epoxide ด้วยกรด ได้เป็น (+)-1-hydroxyneodihydrocarveol (**95**) จากนั้นทำปฏิกิริยา tosylation ได้เป็น (+)-1-hydroxyneodihydrocarveol tosylate (**98**)

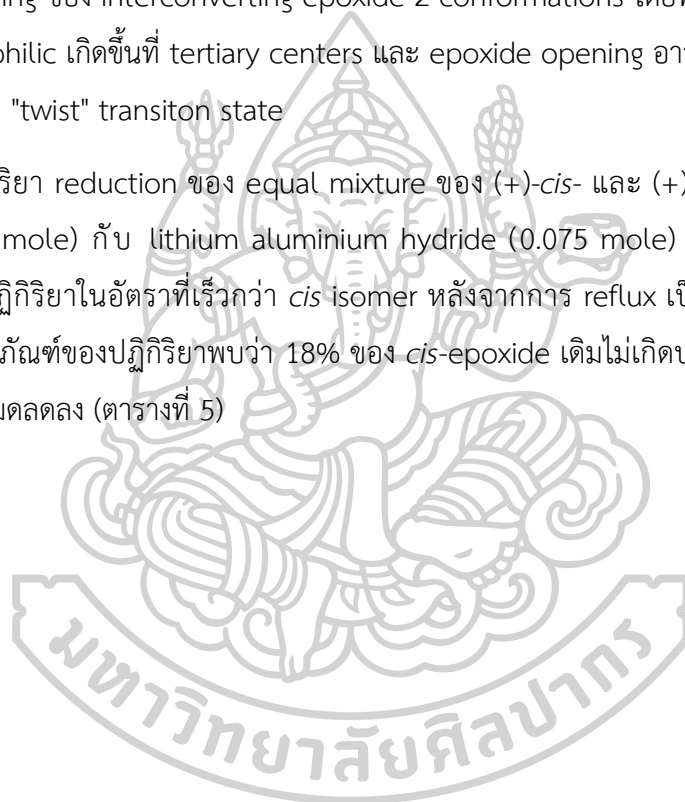
(+)-*cis*-limonene 1,2-oxide (**92**) เตรียมจากการทำปฏิกิริยาของเบสกับ (-)-1-mesyln neodihydrocarveyl acetate (**97**) หลังจากนั้นก็มีรายงานการเตรียม stereospecific ของ epoxides เหล่านี้โดยการทำให้ pyrolysis ของ quaternary ammonium iodide derivatives สามกลุ่มที่ได้มาจาก amino alcohols ที่ได้จาก mixed epoxides (ภาพที่ 23)

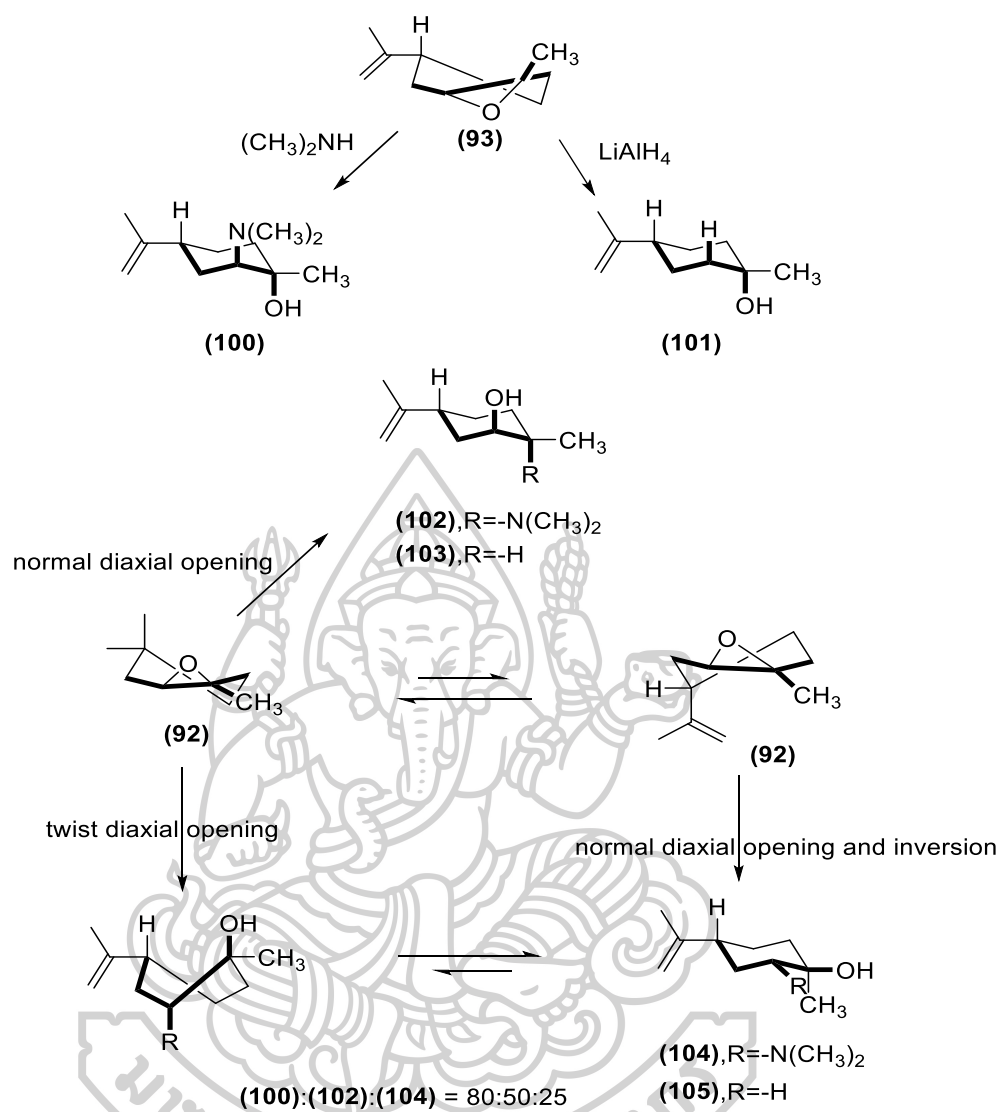


ภาพที่ 23 แสดงการสังเคราะห์ของ (+)-*cis*-limonene 1,2-oxide (**92**) และ (+)-*trans*-limonene 1,2-oxide (**93**) [40]

(+)-*trans*-limonene 1,2-oxide (**93**) ที่ทำปฏิกิริยากับ methylamine ได้เป็น (+)-1-hydroxy-N,N-dimethylneodihydrocarveylamine (**100**) ในขณะที่ mixture ของ (+)-*cis*-limonene 1,2-oxide (**92**) และ(+)-*trans*-limonene 1,2-oxide (**93**) ได้ mixture ของ (+)-1-hydroxy-N,N-dimethylaminoneodihydrocarveylamine (**100**), (+)-1-N,N-dimethylaminoneo-dihydrocarveol (**102**) และ(-)-1-hydroxy-N,N-dimethylneoisodihydrocarveylamine (**104**) ในอัตราส่วน 80:50:25 (ภาพที่ 24) การ formation ของไอโซเมอร์ที่เป็นไปได้สองชนิดจาก (+)-*cis*-limonene 1,2-oxide (**92**) ได้รับการหา diaxial opening ของ interconverting epoxide 2 conformations โดยพิจารณาถึงการ attack ของ nucleophilic เกิดขึ้นที่ tertiary centers และ epoxide opening อาจเกิดขึ้นผ่าน diaxial opening ของ "twist" transition state

ปฏิกิริยา reduction ของ equal mixture ของ (+)-*cis*- และ (+)-*trans*-limonene 1,2-oxide (0.31 mole) กับ lithium aluminium hydride (0.075 mole) ใน ether โดย *trans* isomer ทำปฏิกิริยาในอัตราที่เร็วกว่า *cis* isomer หลังจากการ reflux เป็นเวลา 36 ชั่วโมง การวิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาพบว่า 18% ของ *cis*-epoxide เดิมไม่เกิดปฏิกิริยาในขณะที่ *trans* isomer ทั้งหมดลดลง (ตารางที่ 5)





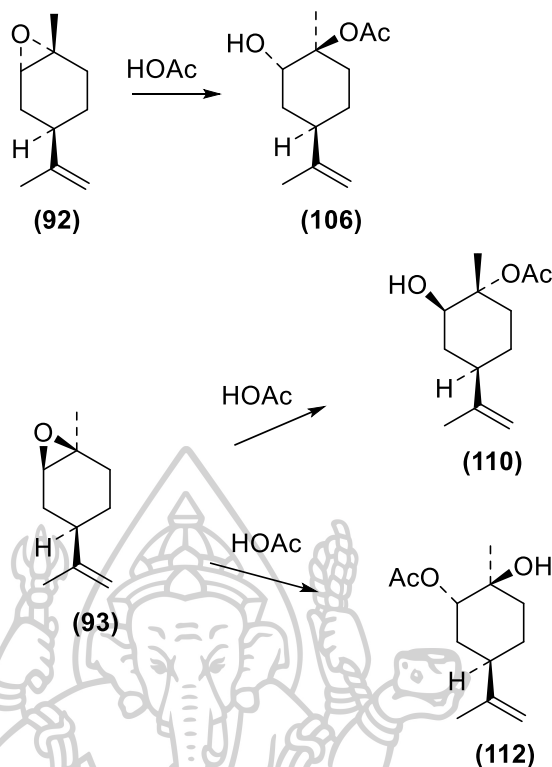
ภาพที่ 24 แสดงการทำปฏิกิริยากับ dimethylamine และ lithium aluminum hydride ของ (+)-*cis*-limonene-1,2-oxide (**92**) และ (+)-*trans*-limonene-1,2-oxide (**93**) [40]

LITHIUM ALUMINUM HYDRIDE REDUCTION OF A 1: 1 MIXTURE OF (+)- <i>Cis</i> - AND (+)- <i>Trans</i> -LIMONENE 1,2-OXIDE ^a				
Bp, °C				
Product	% ^b	(mm)	n ²³ D	[α] ²³ D,deg
<i>cis</i> -Limonene 1,2-oxide (92)	9	85-90(10)	1.4650	+38.50
<i>trans</i> - β -Terpineol (101)	48	100(10)	1.4740	+0.02
<i>cis</i> - β -Terpineol (104)	5	104.5(10)	1.4763	-
Neo-dihydrocarveol (103)	29	107(8)	1.4784	+29.60
Unidentified products (two)	9	108-111(9)	-	-

^a[α]²⁵D +59.2°. ^bAnalysis by vpc.

ตารางที่ 5 ปฏิกริยารีดักชันระหว่าง lithium aluminum hydride กับ (+)-*cis*- และ (+)-*trans*-limonene 1,2-oxide [40]

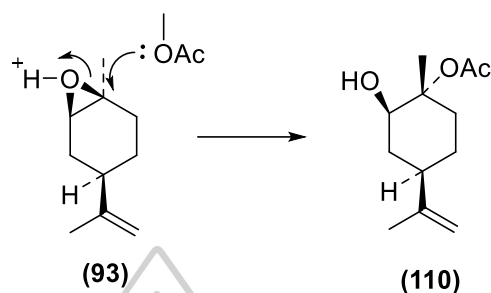
ในการตรวจสอบการกระทำของ acetic acid sodium acetate บน (+)-limonene 1,2-oxide พบว่า (+)-*cis*-limonene 1,2-oxide (**92**) ได้เป็น hydroxyacetate ที่ประกอบด้วย (+)-1-acetoxyneodihydrocarveol (**106**) ในขณะที่ (+)-*trans*-limonene 1,2-oxide (**93**) ให้ mixture ของ (+)-1-hydroxyneodihydrocarveyl acetate (**112**) และ 1-acetoxyneoisodihydrocarveol (**110**) ในอัตราส่วน 9 : 1 (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 แสดงการทำปฏิกิริยาของ acetic acid, sodium acetate กับ (+)-cis- และ (+)-trans-limonene 1,2-oxide [40]

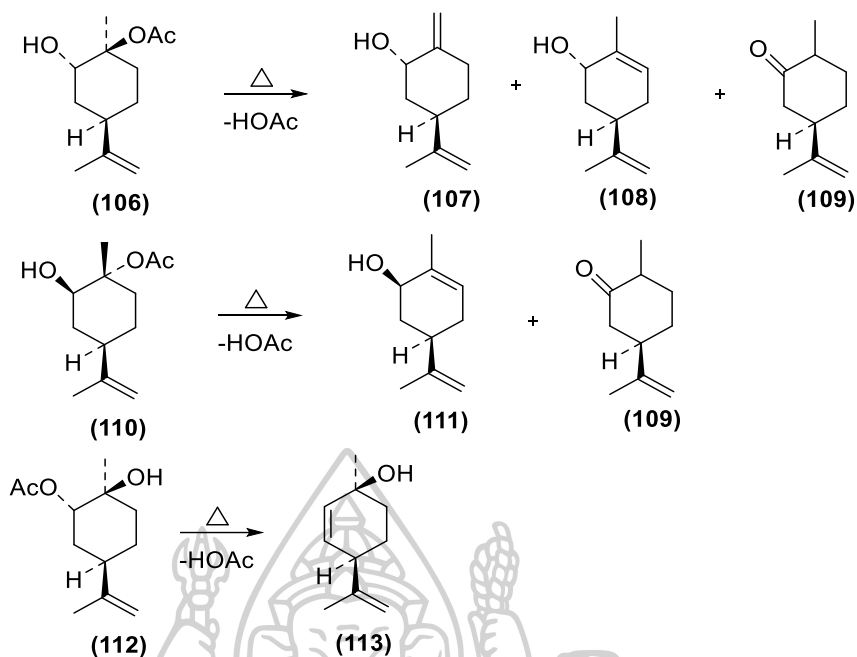
โดยสรุป เป็นที่แน่ชัดว่า [40] ทั้งการ attack ด้วย nucleophilic และ acidic บน limonene 1,2-oxide (และ carvomenthene oxides) ซึ่ง Furst-Plattner rule ของ diaxial opening จะทำนาย predominant product ในกรณีของ nucleophilic attack จะเห็นผลกระทบจาก primary steric สำหรับ cis isomer ซึ่ง diaxial opening เกี่ยวข้องกับการ attack ที่ tertiary carbon atom (เมื่อ isopropenyl คือ equatorial) ไม่มี steric effect ในกรณีที่ถูก attack โดย acidic reagent และถูกแทนที่ด้วย effect อื่นในกรณีของ trans-1,4-dialkylcyclohexene 1,2-epoxides ซึ่งเป็นไปไม่ได้ที่จะหาเหตุผลในการ formation ของ minor product (110) จาก trans-limonene 1,2-oxide (93) (และ saturated analog จาก 115) บนพื้นฐานของ steric effect ดังนั้นปฏิกิริยาสำหรับการ formation ของ (110) อธิบายได้ดีที่สุดโดยการ formation ของ partial positive charge บนอะตอมของ tertiary carbon ปฏิกิริยาที่เข้าใกล้กลไก S_N1 ในกรณีของ acidic reagent บน trans-limonene 1,2-oxide (93) จะ "abnormal" (effective diequatorial

opening) คือ minor (ประมาณ 10%) เทียบกับ “normal” (diaxial opening) S_N2 reaction (ประมาณ 90%) (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 แสดงกลไกการทำปฏิกิริยาระหว่าง acetic acid, sodium acetate กับ (+)-*trans*-limonene 1,2-oxide (93) [40]

ปฏิกิริยา Pyrolysis ของ Hydroxy acetate mixture ได้จาก mixture ของ (+)-*cis*- และ (+)-*trans*-limonene 1,2-oxides ในผลผลิต 90% อยู่ภายใต้ vapor phase pyrolysis ที่อุณหภูมิที่แปรผัน ระหว่าง 370 ถึง 396° 1-acetoxy-2-hydroxy-8-p-menthenes (106 และ 110) ได้รับการทำ pyrolysis อย่างสมบูรณ์ใน โดยที่ (+)-1-Acetoxyneodihydrocarveol (106) ได้ mixture ของ (+)-1(7)-p-menthadien-*trans*-2-ol(*trans*-isocarveol) (107) , (-)-*trans*-carveol (108)) และไอโซเมอร์ (+)-dihydrocarvones (109) ในขณะที่ 1-acetoxyneoisodihydrocarveol (110) ได้ (-)-*cis*-carveol (111) และไอโซเมอร์ (+)-dihydrocarvones (109) ผลลัพธ์ของ pyrolysis (ตารางที่ 6) ได้ผลลัพธ์ที่คล้ายคลึงกันสำหรับ hydroxyacetates ใน carvomenthene series (ตารางที่ 7) Pyrolysis ของ (+)-1-hydroxyneodihydrocarveol acetate (112) ที่ให้ (+)-2,8-p-menthadien-*trans*-1-ol (113) (ภาพที่ 27)



ภาพที่ 27 แสดงปฏิกิริยา Pyrolysis ของ Hydroxy acetate mixture [40]

RATIO OF PYROLYSIS PRODUCTS FROM THE 1-ACETOXY-2-HYDROXY-8- <i>p</i> -MENTHENES ^a				
Temp. °C	% of (+)-dihydro-carvone (109) ^b	% of (+)- <i>trans</i> -iso-carveol (107)	% of (+)- <i>trans</i> -carveol (108)	% of (+)- <i>cis</i> -carveol (111)
370	16.7	40.7	38.8	3.8
296	20.4	41.4	35.2	3.0
436 ^c	26.6	35.7	34.6	3.1
450 ^{c,d}	26.8	22.1	16.7	2.4

^a % analysis by vpc. ^b Total of dihydrocarvone and isodihydrocarvone. ^c Neglecting pyrolysis of 2-acetoxy-1-hydroxy-8-*p*-menthene. ^d 31% of mixed hydrocarbons and other low-boiling products present.

ตารางที่ 6 อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ pyrolysis จาก 1-acetoxy-2-hydroxy-8-*p*-menthenes [40]

RATIO OF PYROLYSIS PRODUCT FORM THE 1-ACETOXY-2-HYDROXY- <i>p</i> -MENTHANES ^a				
Temp. °C	% of (+)-carvo- menthone ^b	% of (+)- <i>trans</i> - isocarvo- tanacetol	% of (-)- <i>trans</i> - carvotan- acetol	% of (-)- <i>cis</i> - carvotan-acetol
375 ^c	29.6	30.0	36.6	3.8
392 ^d	27.7	30.3	38.5	3.5
400 ^d	29.4	31.2	36.2	3.2

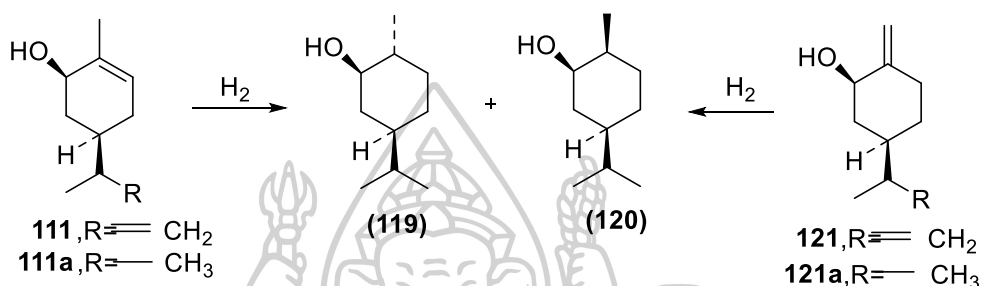
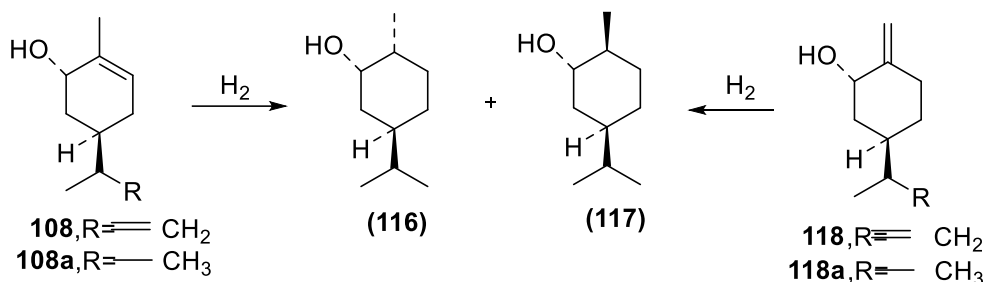
^a % analysis by vpc. ^b Total of carvomenthone and isocarvomenthone. ^c Ratio is from hydroxyacetate pyrolyzed, as incomplete pyrolysis occurred. ^d Neglecting pyrolysis of Z-acetoxy-1-hydroxy-*p*-menthane which occurred to a small extent.

ตารางที่ 7 แสดงอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ pyrolysis จาก 1-acetoxy-2-hydroxy-*p*-menthenes [40]

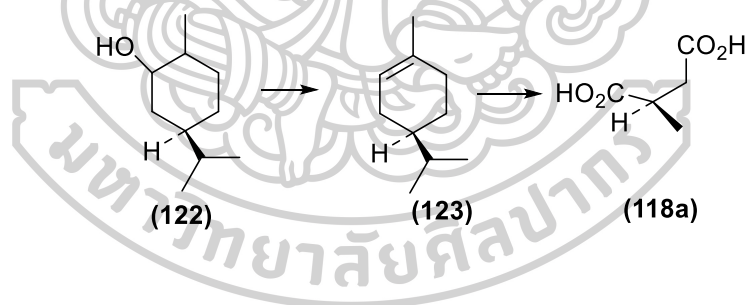
การเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก acetate pyrolysis กับผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก pyrolysis ของ N oxides ของ *N,N*-dimethylamino alcohol นั้นน่าสนใจ โดยอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ pyrolysis แตกต่างกันมาก โดยเฉพาะใน acetate pyrolyses พบผลิตภัณฑ์ ketonic เท่านั้น

(+)-*trans*-isocarveol [1,7(8)-*p*-menthadien-*trans*-2-ol] (**107**) ที่ผลิตขึ้นใน pyrolysis ของ (**106**) ถูกระบุว่าเป็นไอโซเมอร์เดียวกันซึ่งก่อนหน้านี้ได้รับการกำหนดค่า *cis* configuration โดย Naves และ Grampoloff ของการทำ hydrogenation เป็น isocarvomenthol ด้วย authentic sample ของ carveols, isocarveols และ carvotanacetols ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งได้รับ stereospecifically จาก epoxides ของ known configuration จึงเป็นไปได้ที่จะดำเนินการกับปัญหาที่สงสัยการกำหนดโครงสร้างของ iso- และ neoisocarvomenthol เนื่องจาก hydrogenation โดยทั่วไปเกิดขึ้นที่ olefinic linkage และไม่พบ epimerization ของ hydroxyl group ใน hydrogenation ใน menthol series ที่สอดคล้องกัน โดยถือว่า ถ้าแต่ละไอโซเมอร์ให้ผลิตภัณฑ์เพียงสองผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับ hydrogenation และไม่พบการ epimerization หรือการ rearrangement ที่ตรวจพบได้ในกรณีใด ๆ ที่ศึกษา ก็จะสามารถกำหนดโครงสร้างของ carvomenthols ได้อย่างแน่นอน ผลการศึกษานี้ยืนยันงานก่อนหน้าของ Johnston และ Read และ configurational assignments ของ Simonsen และ Owen *trans*-carveols (**107**, **108**)

และ *trans*-carvotanacetols (**118a**, **108a**) ให้เฉพาะ neocarvomenthol (**116**) และ isocarvomenthol (**117**) (hydroxyl group *trans* กับ isopropyl group) ในขณะที่ *cis*-carveol (**111**) และ *cis*-carvotanacetols (**111a**, **49a**) ให้เฉพาะ carvomenthol (**119**) และ neoisocarvomenthol (**120**) (hydroxyl group *cis* to isopropyl;) โดยงานครั้งก่อน ซึ่งจะย้อนกลับ configurations ของ iso- และ neoisocarvomenthol อาศัยการแยก alcohol เป็นผลิตภัณฑ์เด่นจากปฏิกิริยาของ nitrous acid กับ isocarvomenthylamines อย่างไรก็ตาม เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าโครงสร้างของ isocarvomenthylamine (และ isocarvomenthol) มีความสมดุลและมีอยู่ในปริมาณที่เท่ากัน ดังนั้นจึงเห็นได้ชัดว่าการกำหนด configurations ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก nitrous acid กับ isocarvomenthylamines ไม่ถูกต้องเมื่อโครงสร้างเคลื่อนที่ได้ ความคลาดเคลื่อนที่คล้ายคลึงกันเกิดขึ้นใน relative esterification rates เมื่อต้องรับมือกับ mobile systems ที่สำคัญข้อสรุปเดียวกันนี้ยังบรรลุถึงพื้นฐานของหลักฐานทางสเปกตรัมและทางเคมีที่เป็นอิสระเมื่อเร็ว ๆ นี้ แม้ว่าจะผ่านไปแล้วยังนับสิบปีนับตั้งแต่รายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับความคลาดเคลื่อนในการกำหนดค่า configurations การตรวจสอบล่าสุดของ configurations ของ carvomenthols และสารประกอบที่เกี่ยวข้องโดย Schroeter และ Eliel ให้คำแนะนำในการแก้ไขความไม่ถูกต้องที่เกิดขึ้นจาก configurations ที่ไม่ถูกต้องของ Bose โดยการกำหนดค่า absolute configurations ของ carvomenthols ถูกกำหนดดังต่อไปนี้บนพื้นฐานของการกำหนดค่าที่แน่นอนของ (+)-limonene (**36**) [และ (+)-carvomenthene, (**119**)] : D-(-)-carvomenthol (1*S*,2*R*,4*R*) (**119**), D-(+)-neocarvomenthol (1*S*,2*S*,4*R*) (**116**), D-(+)-isocarvomenthol (1*R*,2*S*,4*R*) (**117**) และ D-(+)-neoisocarvomenthol (1*R*,2*R*,4*R*) (**120**) carvomenthols ทั้งสี่นี้ถูกกำหนดให้กับ D-series โดยรับอะตอม 4-คาร์บอนของระบบ *p*-menthane เป็นคาร์บอนอ้างอิงและเชื่อมโยง center ของ asymmetry กับ D-(+)-isopropylsuccinic acid (**117a**) (ภาพที่ 28,29)



ภาพที่ 28 แสดงการทำปฏิกิริยา hydrogenation ของ cis,trans-carveols [40]

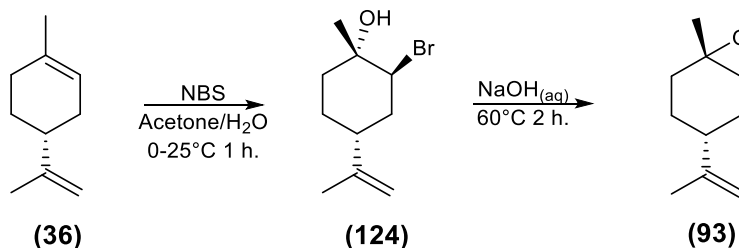


ภาพที่ 29 แสดงโครงสร้างของ D-(+)-isopropylsuccinic acid (118a) [40]

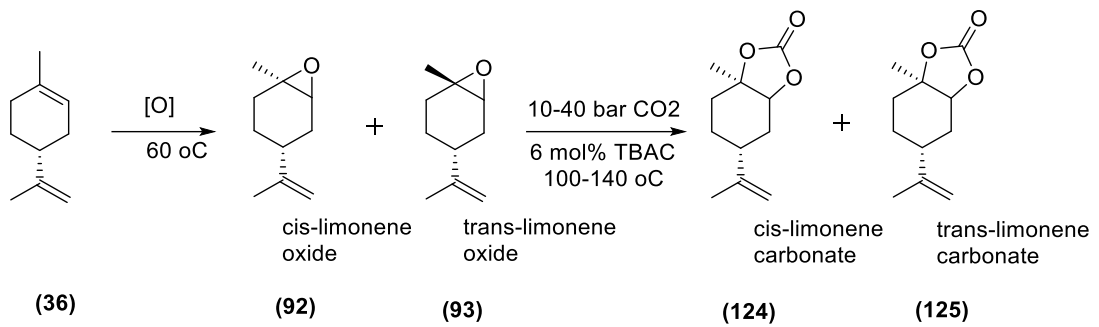
การกำหนดค่าและการกำหนดรูปแบบใน monocyclic terpene series คือความแม่นยำ ซึ่งวิธีการคำนวณการหมุนของโมเลกุลของ Brewster อาจนำไปใช้กับกรณีต่างๆ นอกจากการยืนยัน configurations ของ carvomenthols ตามที่กำหนดไว้ข้างต้นแล้ว กฎของ Brewster ยังทำนายว่า carvotanacetol, $[\alpha]_D +100^\circ$ ที่ได้จากการปฏิกิริยา Ponndorf reduction ของ (+)-carvotanacetone และแตกต่างจาก cis-carvotanacetol (**111a**), $[\alpha]_D +56.5$ อยู่ใน fact ตัวอย่างที่ไม่บริสุทธิ์ ซึ่ง carvotanacetol ที่ไม่บริสุทธิ์นี้ถูกตั้งสมมติฐานว่ามีจุดหลอมเหลวที่คงที่ 1:1

ของ mixture ของ *cis*- และ *trans*-*p*-nitrobenzoate สิ่งนี้ได้รับการยืนยันในงานนี้โดยการแยก (-)-*trans*-carvotanacetol (**108a**), $[\alpha]_D - 164^\circ$ ซึ่งได้ 3,5-dinitrobenzoate ที่แตกต่างจากที่รายงานสำหรับ (+)-carvotanacetol ที่แยกได้ก่อนหน้านี้

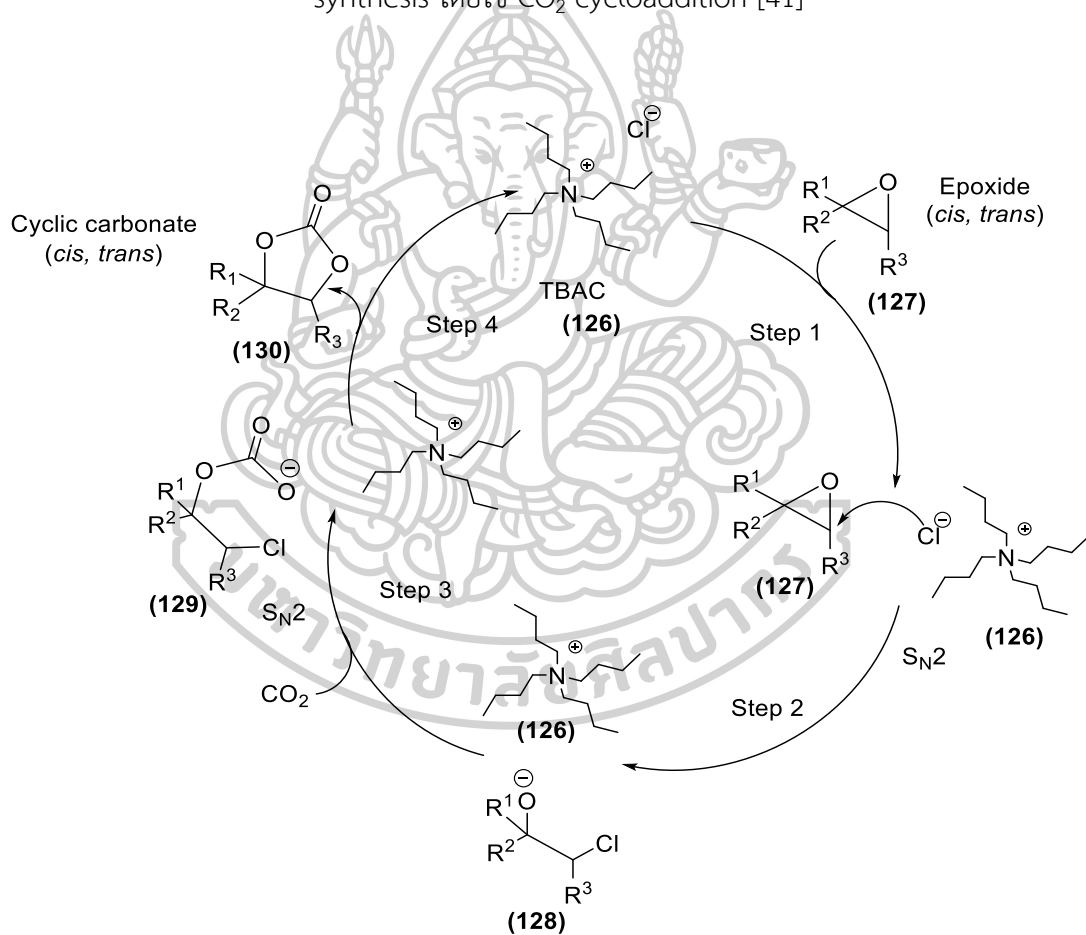
ในปี 2019 Rehman และคณะ [41] ได้คำนึงถึงประโยชน์จาก CO₂ และ biomass ซึ่งเป็นพลังงานหมุนเวียนในผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมกระบวนการทางเคมี และได้นำ Limonene ซึ่งเป็นเทอร์พีนไม่อิ่มตัวที่สกัดได้จากเปลือกของผลไม้รสเปรี้ยว เป็นส่วนประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด และของเสียในระหว่างการเก็บเกี่ยวและการผลิตน้ำส้มคั้น มาผลิต bio-based epoxides ในปี 2556 การผลิตลิโมนีนทั่วโลกอยู่ที่ประมาณ 70,000 ตัน ซึ่งค่อยๆ เพิ่มขึ้นทุกปี CO₂ มีราคาไม่แพง ปลอดภัย และไม่ติดไฟ สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียนที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมสำหรับการสังเคราะห์สารอินทรีย์ ในบรรดาวิธีการต่างๆ ในการใช้ประโยชน์จาก CO₂ การทำ cycloaddition ของ epoxide และ CO₂ มีแนวโน้มอย่างมากในแง่ของ "green chemistry" โดยที่ Cyclic carbonate ที่มีวง 5 เหลี่ยมมีการใช้งานที่หลากหลาย เช่น polar aprotic solvent อิเล็กโทรไลต์ในแบตเตอรี่ Li-ion โมโนเมอร์สำหรับการสังเคราะห์โพลีคาร์บอนเนต และโพลียูรีเทน สารตัวกลางสำหรับการผลิตยาและสารเคมีอื่นๆ อีกมาก การก่อตัวของคาร์บอนเนตแบบวัฏจักรจากอีพอกไซด์และ CO₂ เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตที่เป็นอันตรายน้อยกว่าเนื่องจากประกอบด้วย CO₂ เป็นแหล่งวัตถุดิบ C1 แทนที่จะเป็นฟอสฟีนที่เป็นพิษสูงและมีฤทธิ์กัดกร่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การสังเคราะห์ไซคลิกคาร์บอนเนตจากลิโมนีนมีความน่าสนใจอย่างมาก เนื่องจากเป็นโมโนเมอร์ที่หมุนเวียนได้ทางชีวภาพสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพอย่างเต็มรูปแบบ เช่น โพลียูรีเทนที่ไม่ใช่ไอโซไซยาเนต (NIPU) ซึ่งมีศักยภาพในการใช้งานเป็นวัสดุเทอร์โมเซต อีลาสโตเมอร์ หรือเทอร์โมพลาสติก (ภาพที่ 31,32)



ภาพที่ 30 แสดง Stereoselective epoxidation ของ (R)-(+)-limonene (**36**) โดยใช้ NBS เป็น bromination source [41]



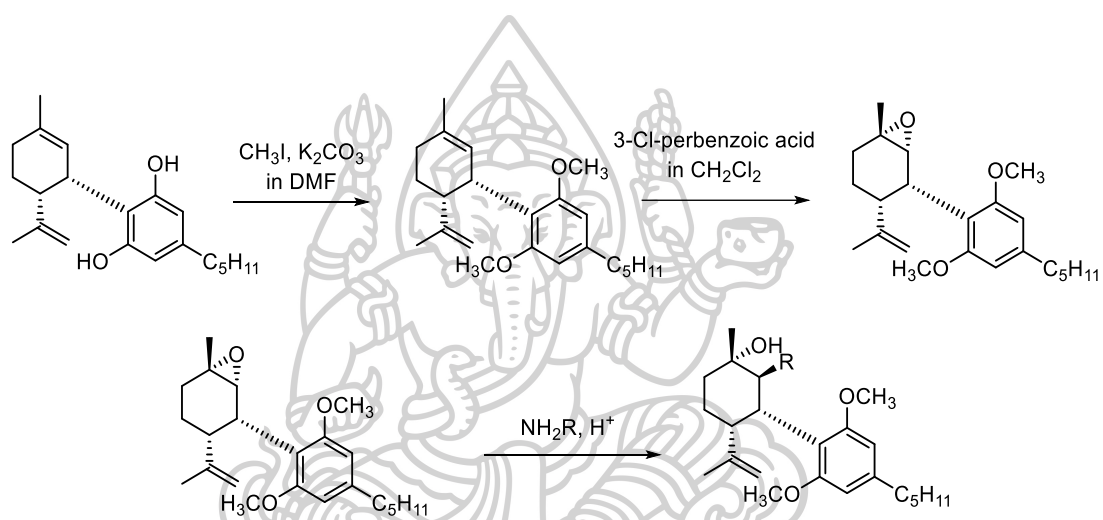
ภาพที่ 31 แสดงปฏิกิริยา Epoxidation ของ (R)-(+)-limonene และ cyclic carbonate synthesis โดยใช้ CO_2 cycloaddition [41]



ภาพที่ 32 กลไกการทำปฏิกิริยาของ cyclic carbonate synthesis จาก tri-substituted epoxide และ CO_2 [41] [41]

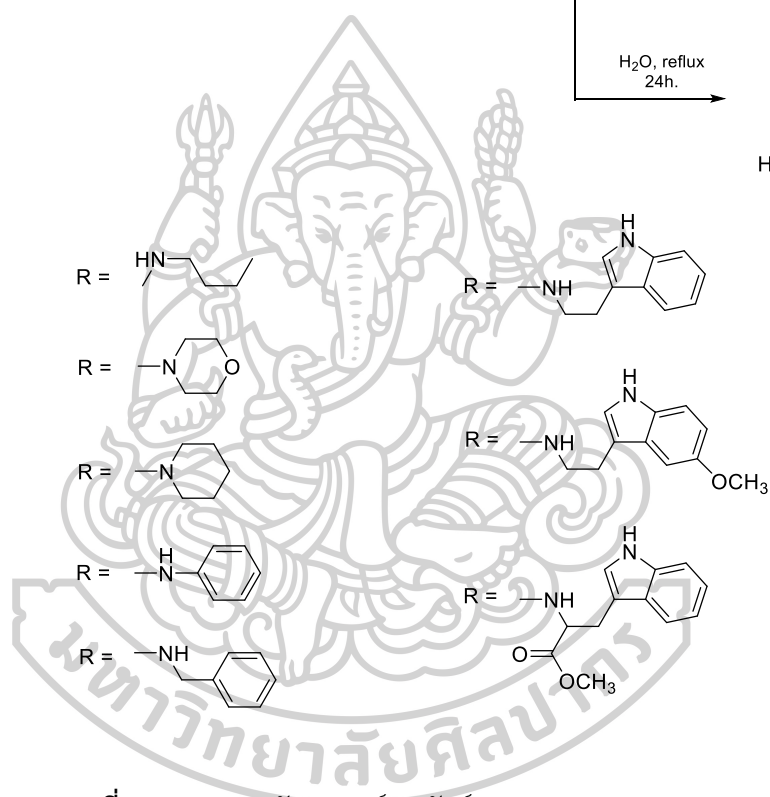
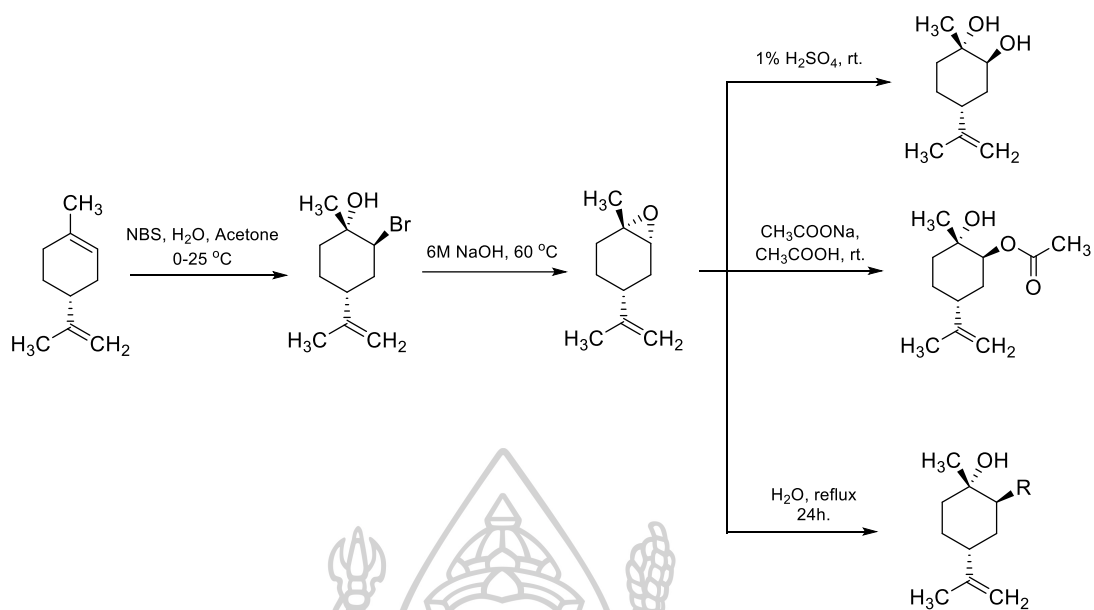
2.3 แผนการสังเคราะห์

งานวิจัยในครั้งนี้ได้วางแนวทางการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cannabidiol โดยคาดว่าจะได้จาก ปฏิกิริยา Methylation โดยเริ่มจาก CBD (1) ถูกแปลงเป็น dimethyl ether ซึ่งทำปฏิกิริยากับ 3-chloroperbenzoic acid เพื่อได้เป็น epoxide ผ่านปฏิกิริยา Epoxidation จากนั้นทำปฏิกิริยา Epoxide ring opening โดยใช้ nucleophile และทำการวิเคราะห์โครงสร้างและสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี และนำอนุพันธ์ของ cannabidiol ไปทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (ภาพที่ 33)



ภาพที่ 33 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ CBD (1)

งานวิจัยนี้เป็นการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ (+)-Limonene (36) โดยเริ่มการสังเคราะห์ (+)-limonene oxide โดยผ่านปฏิกิริยา bromination จาก (+)-Limonene (36) แล้วเติม NaOH เพื่อให้ได้ (+)-limonene oxide จากนั้นจะทำการเปิดวง epoxide ด้วยนิวคลีโอไฟล์ต่างชนิดเพื่อให้ได้อนุพันธ์ของ (+)-Limonene (36) แสดงผังแผนการสังเคราะห์ (ภาพที่ 34)



ภาพที่ 34 แผนภาพสังเคราะห์อนุพันธ์ของ (+)-limonene (36)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.1.1 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry Bruker AVANCE 300 MHz NMR วัดในสารละลาย chloroform-d โดยมี Tetramethylsilane เป็นสารอ้างอิงภายใน
- 3.1.2 เครื่อง Rotary evaporator: Buchi Rotavapor R-114
- 3.1.3 เครื่อง Vacuum pump: Tokyo Rikakikai Co., Ltd. model A-3S
- 3.1.4 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Mettler Toledo model AB204
- 3.1.5 เครื่อง Hotplate and stirrer: Heidolph MR 3001
- 3.1.6 เครื่อง Ultrasonic Bath: Elmasonic S 30 H
- 3.1.7 อุปกรณ์สำหรับเตรียมแผ่น preparative TLC: Desaga Brinkmann
- 3.1.8 TLC Silica gel 60 F254 aluminium sheet, Merck
- 3.1.9 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 mm และ 70 mm
- 3.1.10 เครื่องแก้วพื้นฐาน
- 3.1.11 คอลัมน์
- 3.1.12 ชุดกรองแบบลดความดัน
- 3.1.13 หลอดฉีดยา และเข็มฉีดยา
- 3.1.14 แท่งแม่เหล็ก
- 3.1.15 Sealed tube
- 3.1.16 Parafilm
- 3.1.17 สำลี
- 3.1.18 Clamp และ Clamp Hold

3.2 สารเคมี

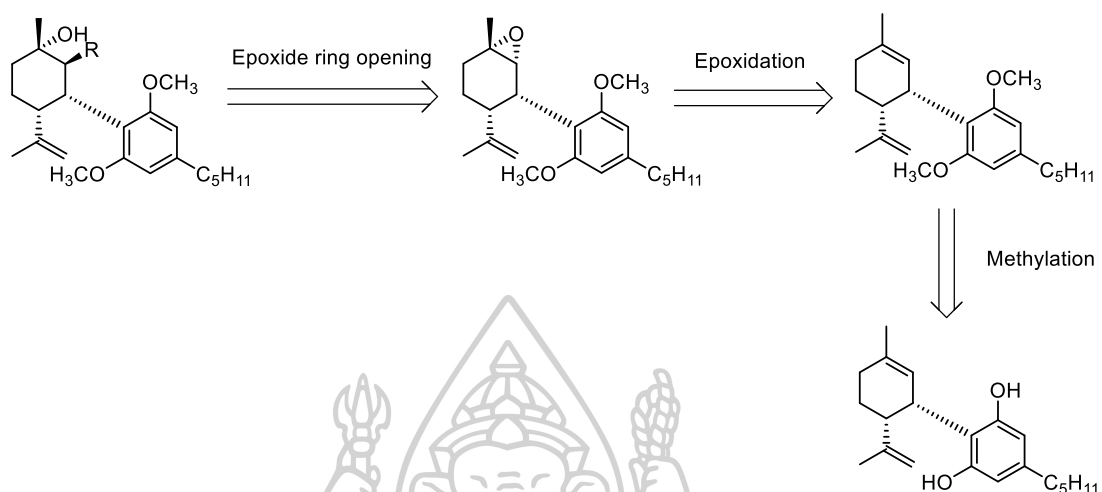
- 3.2.1 Acetic acid (Lab-scan)
- 3.2.2 Acetone (distillation)
- 3.2.3 Aluminium chloride (Riedel-de-Haen)
- 3.2.4 Dichloromethane (distillation)
- 3.2.5 Ethylacetate (distillation)

- 3.2.6 Ethanol (distillation)
- 3.2.7 Hexane (distillation)
- 3.2.8 (+)-limonene (Fluka)
- 3.2.9 Methanol (distillation)
- 3.2.10 *N*-bromosuccinimide (NBS) (Sigma-Aldrich)
- 3.2.11 Potassium hydrogen sulfate (BDH)
- 3.2.12 Paraffin oil
- 3.2.13 sodium acetate (LOBALChemie)
- 3.2.14 Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich)
- 3.2.15 Sodium hydroxide (Sigma-Aldrich)
- 3.2.16 Sodium sulfate anhydrous (Sigma-Aldrich)
- 3.2.17 Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) สำหรับ column chromatography (Merck)
- 3.2.18 Silica gel 60 F254 containing gypsum สำหรับ preparative thin layer chromatography (Merck)
- 3.2.29 Sulfuric acid (QReC)
- 3.2.20 Tryptamine (ALDRICH Chemistry)
- 3.3.21 5-methoxy tryptamine (Sigma-Aldrich)
- 3.3.22 *n*-Butylamine (BDH)
- 3.3.23 Aniline (Fluka)
- 3.3.24 Morpholine (Fluka)
- 3.3.25 Benzylamine (BDH)
- 3.3.26 Tryptophan (Sigma-Aldrich)
- 3.3.27 Piperidine (Fluka)

3.3 วิธีการทดลอง

ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cannabidiol โดยเริ่มสังเคราะห์จาก cannabidiol (1) ผู้วิจัยได้เสนอแนวทางการสังเคราะห์ดังต่อไปนี้

3.3.1 การสังเคราะห์วิธีที่ 1 ของอนุพันธ์ cannabidiol

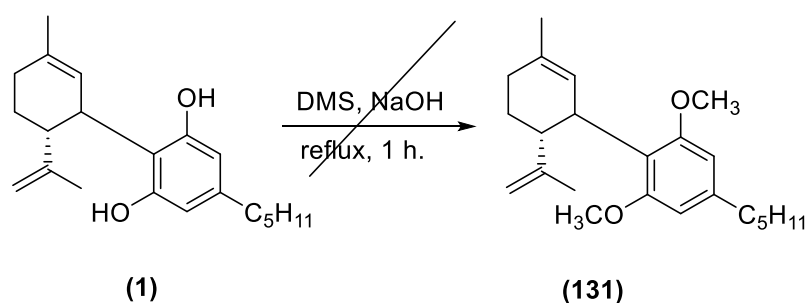


ภาพที่ 35 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ CBD (1) แผนการสังเคราะห์ที่ 1

นำ cannabidiol (1) มาทำปฏิกิริยา Methylation ได้เป็น dimethyl ether จากนั้นทำปฏิกิริยากับ 3-chloroperbenzoic acid เพื่อได้เป็น epoxide ผ่านปฏิกิริยา Epoxidation จากนั้นทำปฏิกิริยา Epoxide ring opening โดยใช้ nucleophile ต่างๆ

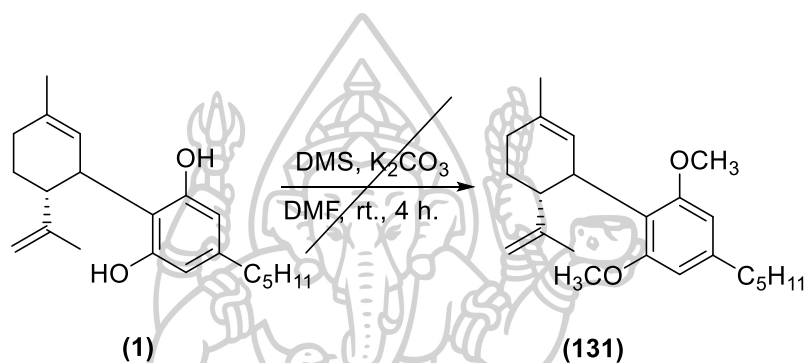
การพยายามสังเคราะห์ (2*R*)-2',6'-dimethoxy-5-methyl-4'-pentyl-2-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1,1'-biphenyl (131)

วิธีที่ 1



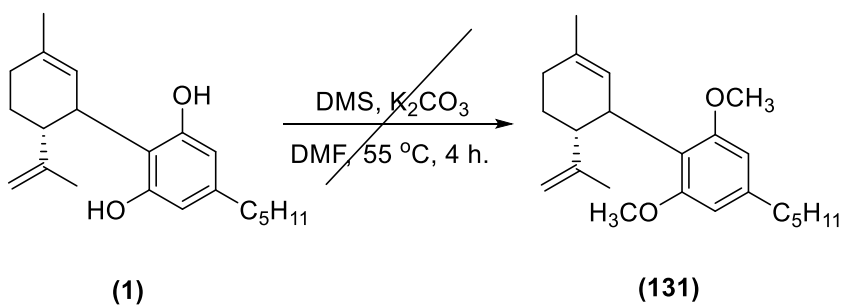
นำ cannabidiol 100 mg ใส่ลงในขวดก้นกลม เติมสารละลาย NaOH 0.04 g ในน้ำ 0.2 ml ลงใน cannabidiol อย่างช้าๆ และกวนของผสมด้วย magnetic bar เติม DMS 0.2 ml อย่างช้าๆ reflux ของผสมโดยคุมอุณหภูมิในช่วง 100-200 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane 3x20 mL นำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

วิธีที่ 2



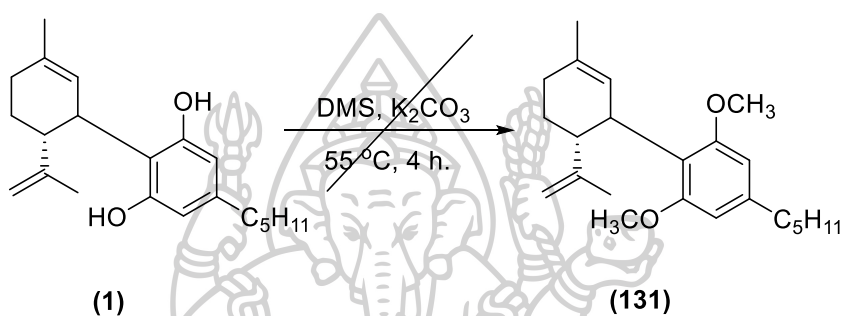
นำ cannabidiol 100 mg ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม DMF 1.83 ml K₂CO₃ 0.25 g และ DMS 0.1 ml ลงใน cannabidiol กวนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

วิธีที่ 3



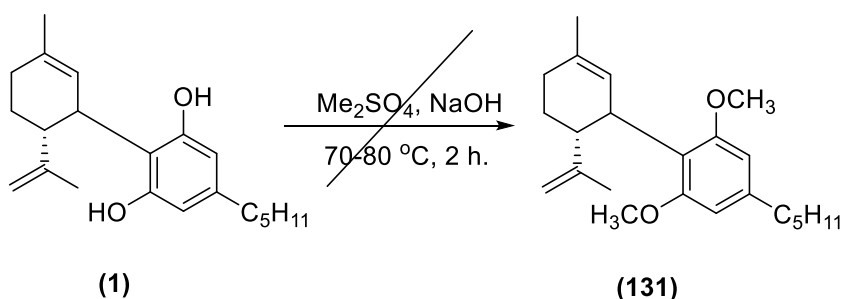
นำ cannabidiol 100 mg ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม DMF 1.83 ml K_2CO_3 0.25 g และ DMS 0.1 ml ลงใน cannabidiol กวนของผสมและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous ($anh.Na_2SO_4$) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ^1H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

วิธีที่ 4



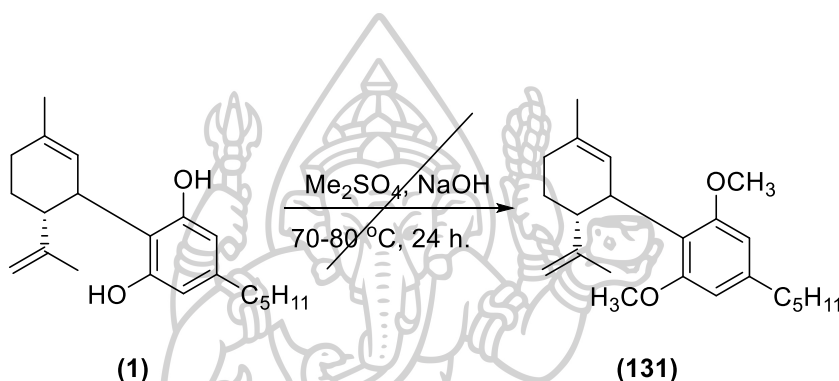
นำ cannabidiol 100 mg ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม K_2CO_3 0.25 g และ DMS 0.1 ml ลงใน cannabidiol กวนของผสมและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous ($anh.Na_2SO_4$) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ^1H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

วิธีที่ 5



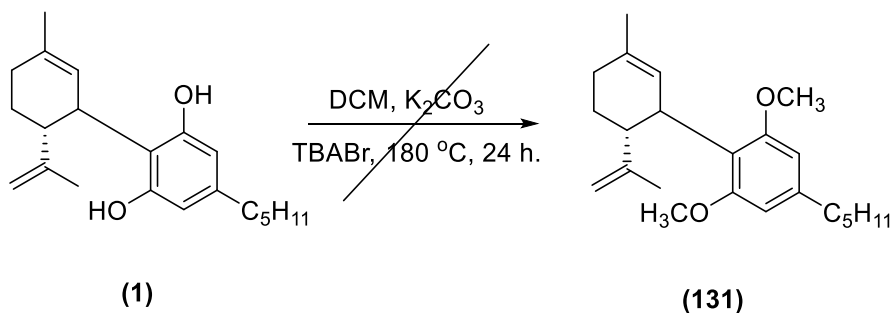
นำ cannabidiol 100 mg ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม NaOH 10.5 g ในน้ำ 150 ml ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 10 °C จากนั้นเติม dimethyl sulfate ซ้ำๆ กวนของผสมและให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 70-80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองแล้วล้างเบสด้วย 10% NaOH และนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

วิธีที่ 6



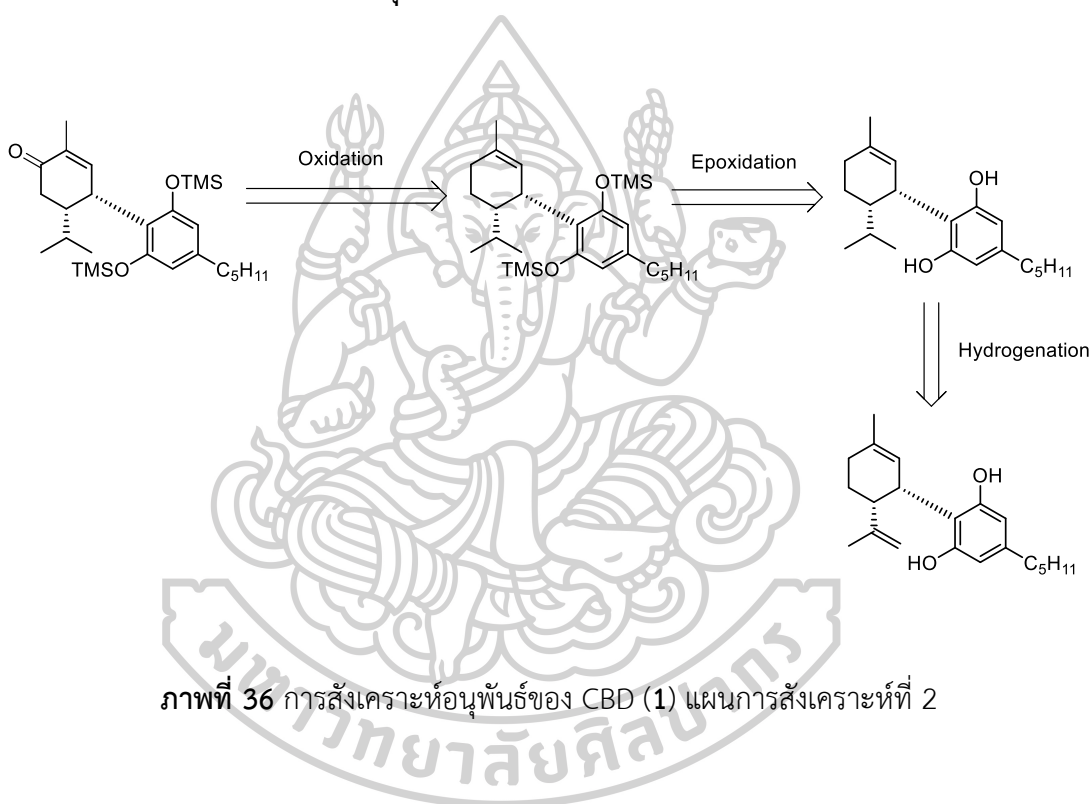
นำ cannabidiol 100 mg ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม NaOH 10.5 g ในน้ำ 150 ml ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 10 °C จากนั้นเติม dimethyl sulfate ซ้ำๆ กวนของผสมและให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 70-80 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองแล้วล้างเบสด้วย 10% NaOH และนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

วิธีที่ 7



นำ cannabidiol 100 mg ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม K_2CO_3 0.09 g TBABr 0.15 g และ DMC 2 ml ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองแล้วล้างเบสด้วย 10% NaOH และนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous ($\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

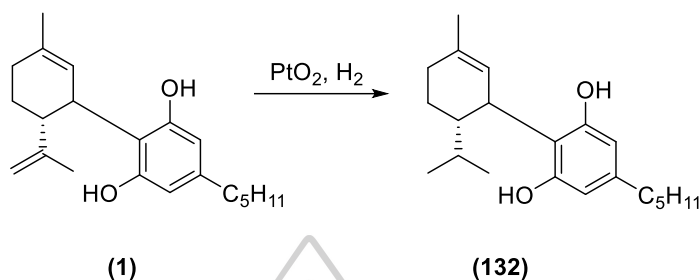
3.3.2 การสังเคราะห์วิธีที่ 2 ของอนุพันธ์ cannabidiol



ภาพที่ 36 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ CBD (1) แผนการสังเคราะห์ที่ 2

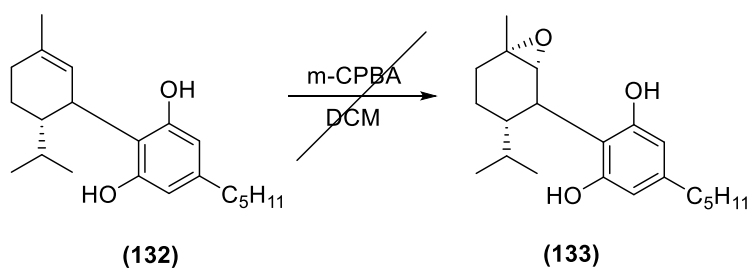
จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ cannabidiol ในแผนการที่ 1 นั้นไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากไม่มี reagent ที่สามารถสังเคราะห์ (2*R*)-2',6'-dimethoxy-5-methyl-4'-pentyl-2-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1,1'-biphenyl ได้ ทำให้ผู้วิจัยเปลี่ยนแนวทางในการสังเคราะห์ ซึ่งผู้วิจัยจะนำ cannabidiol ไปทำปฏิกิริยา Hydrogenation และ Oxidation เพื่อให้ได้อนุพันธ์ของ cannabidiol

การสังเคราะห์ (2'*S*)-2'-isopropyl-5'-methyl-4-pentyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-2,6-diol (132)



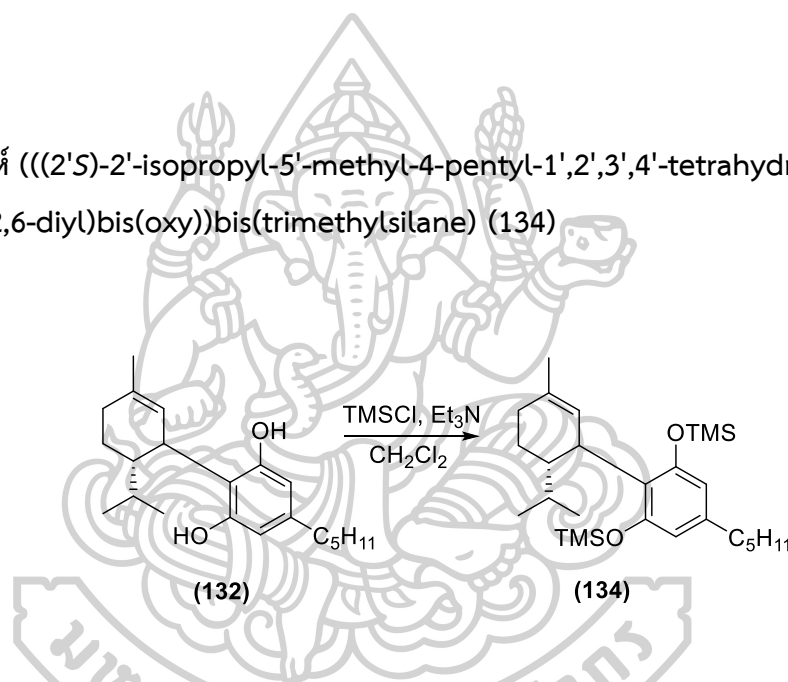
นำ cannabidiol 100 mg (0.32 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม 10% PtO₂ 10 mg และ ethyl acetate 10 ml และกวนของผสมด้วย magnetic bar ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไฮโดรเจน เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอา Pt ออกแล้วนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography (silica gel, 97:3 Hexane:EtOAc) จะได้ (2'*S*)-2'-isopropyl-5'-methyl-4-pentyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-2,6-diol (132) 60 mg (58 %); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.20 (2H, br s, Ar), 5.51 (1H, s, olefin), 3.75-3.92 (1H, d, J=9.8 Hz, CH-benzyl), 2.33-2.52 (2H, t, J=6.6 Hz, benzyl), 2.14-2.26 (1H, m, CH ring), 2.00-2.14 (2H, m, CH₂ allyl), 1.81 (1H, m, CH(CH₃)₂), 1.76 (3H, s, CH₃ allyl), 1.50-1.67 (4H, m), 1.24-1.45 (4H, m), 0.79-0.93 (6H, m, CH(CH₃)₂), (3H, terminal CH₃) ppm

การพยายามสังเคราะห์ 2-((1*R*,3*S*,6*S*)-3-isopropyl-6-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-yl)-5-pentylbenzene-1,3-diol (133)



นำ 3-Chloro-perbenzoic acid (70% pure 0.073 g, 0.42 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม CH_2Cl_2 3 ml ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0°C จากนั้นนำ H-CBD (100 mg, 0.32 mmol) ที่ละลายใน CH_2Cl_2 1 ml มาใส่อย่างช้าๆ กวนของผสมด้วย magnetic bar ที่อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous ($\text{anh.Na}_2\text{SO}_4$) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography (silica gel, 1:1 Hexane:EtOAc) จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ คาดว่าต้องทำการ protect phenol ก่อน

การสังเคราะห์ (((2'S)-2'-isopropyl-5'-methyl-4-pentyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-2,6-diyl)bis(oxy))bis(trimethylsilane) (134)

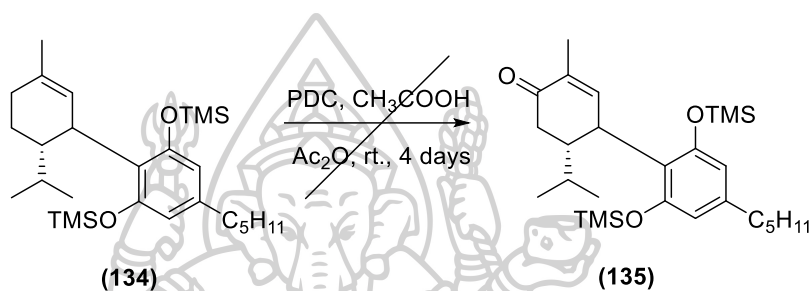


นำ H-cannabidiol 1g (3.16 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายใน dichloromethane 150 ml เติม triethylamine 85 ml กวนสารผสมที่อุณหภูมิ -10°C จากนั้นเติม TMSCl 5 ml กวนต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase มาสกัดกับ acetic acid แล้วทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous ($\text{anh.Na}_2\text{SO}_4$) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography (silica gel, pure hexane) จะได้ (((2'S)-2'-isopropyl-5'-methyl-4-pentyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-2,6-diyl)bis(oxy))bis(trimethylsilane) (134) 700 mg (48 %) ; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6.24 (2H, br s, Ar), 5.17 (1H, s, olefin), 3.62-3.78 (1H, d, $J=8.9$ Hz, CH-benzyl), 2.36-2.52 (2H, t, $J=7.8$ Hz, benzyl), 2.04-2.15 (1H, m, CH ring), 1.87-2.03 (2H, m, CH₂ allyl), 1.67-1.82 (1H, m, CH(CH₃)₂), 1.64 (3H, s, CH₃ allyl),

1.34-1.61 (4H, m), 1.22-1.33 (4H, m), 0.72-0.93 (6H, m, CH(CH₃)₂), (3H, terminal CH₃)
0.24 (18H, s, ((CH₃)₃Si)₂) ppm

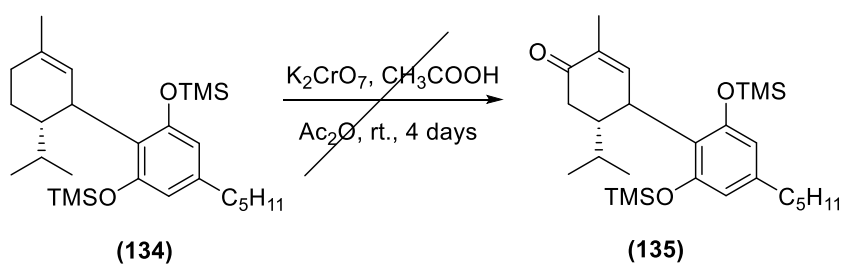
การพยายามสังเคราะห์ (2S)-2-isopropyl-5-methyl-4'-pentyl-2',6'-
bis(trimethylsilyloxy)-2,3-dihydro-[1,1'-biphenyl]-4(1H)-one (135)

วิธีที่ 1



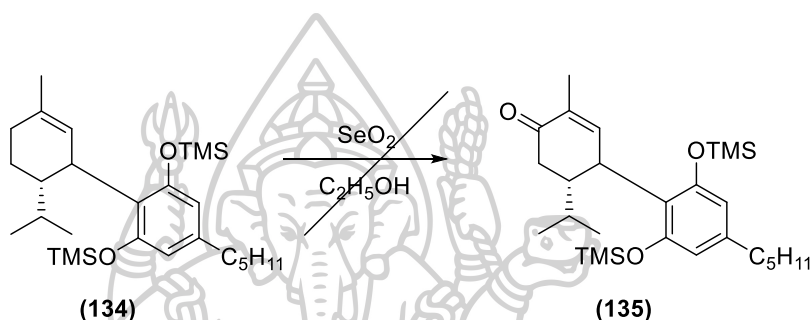
นำ cannabidiol di-TMS 0.05 g (0.0138 mol) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายใน acetic acid 0.2 ml (0.315 mol) และ acetic anhydride 0.1 ml (0.095 mol) จากนั้นเติม Potassium dichromate 0.05 g (0.03 mol) กวนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase มาล้างด้วย 10% NaOH และทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออก ภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

วิธีที่ 2



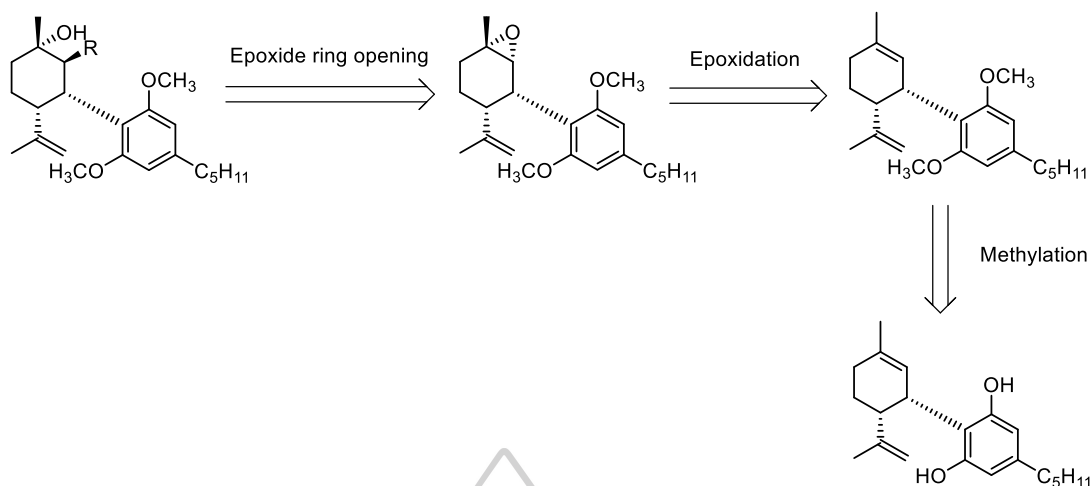
นำ cannabidiol di-TMS 30 mg (0.0138 mol) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายใน acetic acid 0.86 ml และ acetic anhydride 0.43 ml จากนั้นเติม Potassium chromate 0.02 g กวนของผสมที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase มาล้างด้วย 10% NaOH และทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

วิธีที่ 3



นำ cannabidiol di-TMS 50 mg (1.69 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายใน ethanol 5 ml จากนั้นเติม selenium dioxide 36 mg ตั้ง reflux เป็นเวลา 7 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase มาทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

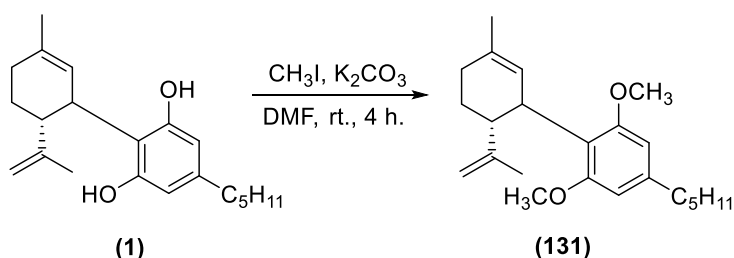
3.3.3 การสังเคราะห์วิธีที่ 3 ของอนุพันธ์ cannabidiol



ภาพที่ 37 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ CBD (1) แผนการสังเคราะห์ที่ 3

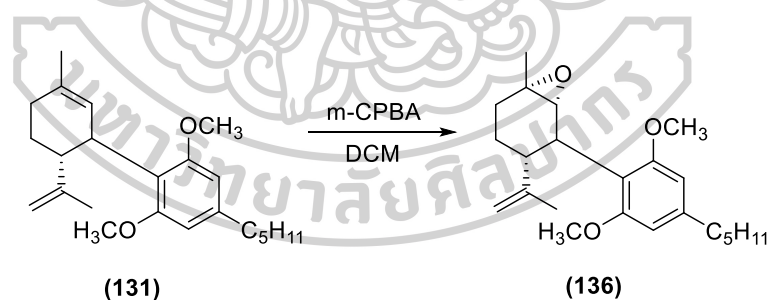
จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ cannabidiol ในแผนการที่ 2 นั้นไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากไม่มี reagent ที่สามารถทำปฏิกิริยา oxidation เพื่อสังเคราะห์ (2*S*)-2-isopropyl-5-methyl-4'-pentyl-2',6'-bis(trimethylsilyloxy)-2,3-dihydro-[1,1'-biphenyl]-4(1*H*)-one (135) ได้ ทำให้ผู้วิจัยกลับไปทำตามแนวทางในการสังเคราะห์วิธี 1 ซึ่งผู้วิจัยจะนำ cannabidiol ไปทำปฏิกิริยา Methylation และ Epoxidation จากนั้นทำการเปิดวง epoxide nucleophile ต่างๆ เพื่อให้ได้อนุพันธ์ของ cannabidiol

การสังเคราะห์ (2*R*)-2',6'-dimethoxy-5-methyl-4'-pentyl-2-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1,1'-biphenyl (131)



นำ cannabidiol 5 g ใส่ลงในขวดก้นกลม มาละลายใน DMF 90 ml จากนั้นเติม K_2CO_3 12.25 g และ CH_3I 4 ml ลงไป และกวนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะได้สารละลายสีเหลือง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane 3x20 mL นำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous ($anh.Na_2SO_4$) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography (silica gel, 99:1 Hexane:EtOAc) จะได้ (2*R*)-2',6'-dimethoxy-5-methyl-4'-pentyl-2-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1,1'-biphenyl (**131**) 4.05 g (71 %) ; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.33 (2H, s, Ar), 5.20 (1H, s, olefin), 4.37-4.48 (2H, d, $J=6$ Hz), 3.92-4.07 (1H, m, benzyl), 3.72 (6H, s, OCH_3), 2.80-2.99 (1H, td, $J=10.6, 4.7$ Hz, allyl), 2.46-2.58 (2H, t, $J=7.6$ Hz, benzyl), 2.05-2.29 (1H, m), 1.88-2.05 (1H, m), 1.72-1.79 (1H, m), 1.66 (3H, s, allyl CH_3), 1.59 (3H, s, CH_3 at prop-1-en-2-yl group), 1.57 (3H, br s), 1.22-1.38 (4H, m), 0.83-0.95 (3H, t, $J=6.8$ Hz, terminal CH_3) ppm

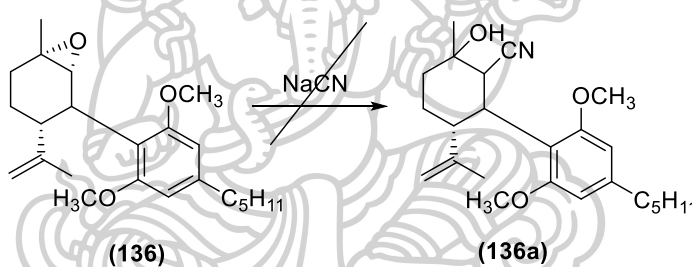
การสังเคราะห์ (1*S*,4*R*,6*R*)-5-(2,6-dimethoxy-4-pentylphenyl)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**136**)



นำ 3-Chloro-perbenzoic acid 2.5 g (14.5 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม ละลายใน dichloromethane 100 ml ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0 °C จากนั้นนำ dimethoxy-CBD 3.4 g (9.94 mmol) ที่ละลายใน dichloromethane 10 ml มาใส่อย่างช้าๆ กวนของผสมด้วย magnetic bar ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous ($anh.Na_2SO_4$) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย column

chromatography (silica gel, 90:10 Hexane:EtOAc) จะได้ (1*S*,4*R*,6*R*)-5-(2,6-dimethoxy-4-pentylphenyl)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**136**) 1.6 g (45 %) ; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.25-6.39 (2H, d, J=8.1 Hz, Ar), 4.37 (1H, s, olefin), 4.17 (1H, s, olefin), 3.80 (3H, s, OCH₃), 3.70 (3H, s, OCH₃), 3.54-3.64 (1H, d, J=10.8, Hz, H on epoxide ring), 2.46-2.62 (2H, t, J=8 Hz, benzyl), 2.19-2.35 (1H, m), 1.97-2.10 (1H, m), 1.77-1.91 (1H, m), 1.58-1.65 (6H, m), 1.28-1.45 (9H, m), 0.86-0.94 (3H, t, J=6.8 Hz, terminal CH₃).

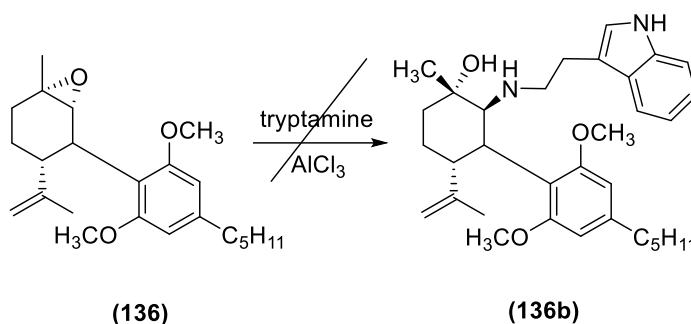
การพยายามเปิดวง epoxide ด้วย nucleophile ต่างๆ เพื่อให้ได้อนุพันธ์ของ cannabidiol
การพยายามสังเคราะห์ (5*R*)-6-(2,6-dimethoxy-4-pentylphenyl)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexane-1-carbonitrile (**136a**)



นำ cannabidiol epoxide 100 mg (0.28 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม เต็ม sodium cyanide 0.02 g และน้ำกลั่น 2 ml กวนของผสมที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase มาทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

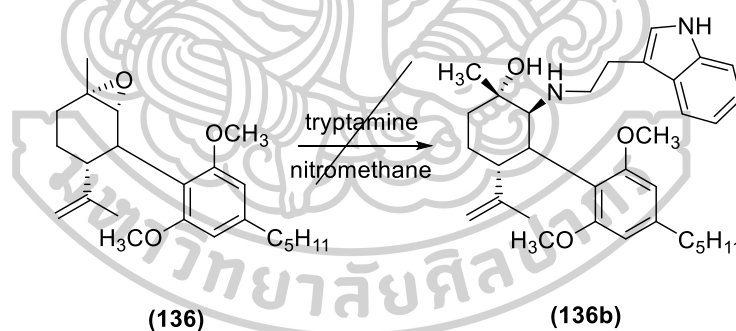
การพยายามสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-3-(2,6-dimethoxy-4-pentylphenyl)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (**136b**)

วิธีที่ 1



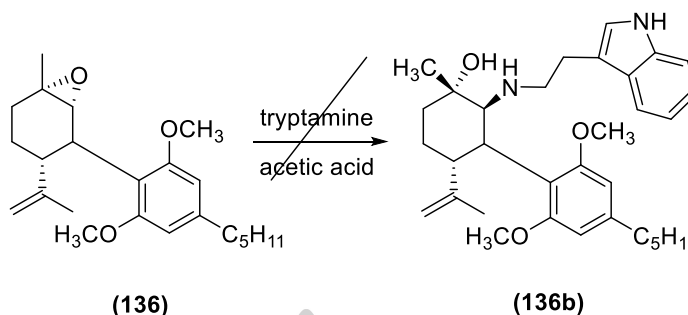
นำ cannabidiol epoxide 100 mg (0.28 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม Aluminium chloride 0.01 g (0.028 mmol) น้ำกลั่น 1 ml และ tryptamine 0.05 g (0.31 mmol) กวนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase มาทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

วิธีที่ 2



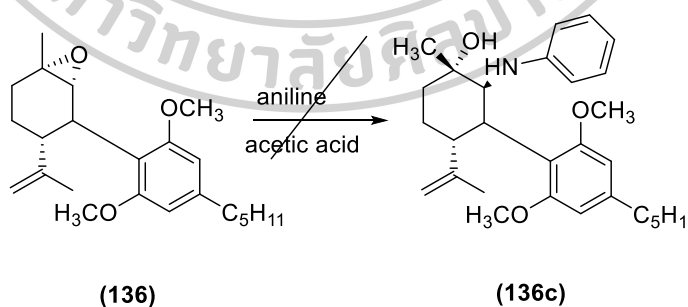
นำ cannabidiol epoxide 50 mg (0.14 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม nitromethane 0.23 ml (4.34 mmol) และ tryptamine 0.07 g (0.42 mmol) กวนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase มาทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

วิธีที่ 3



นำ cannabidiol epoxide 100 mg (0.28 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม tryptamine 0.36 g (2.24 mmol) และ acetic acid 0.1 ml กวนของผสมที่อุณหภูมิ 150 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase มาทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

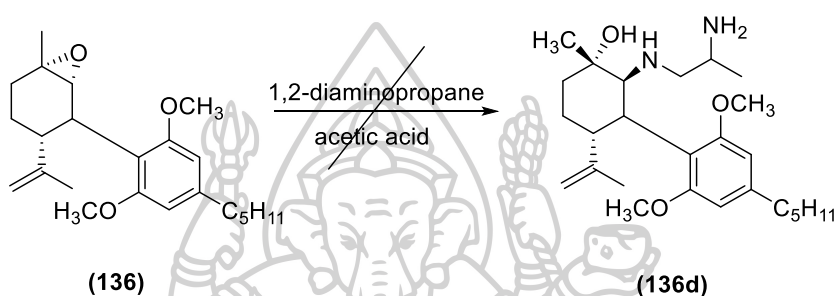
การพยายามสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-3-(2,6-dimethoxy-4-pentylphenyl)-1-methyl-2-(phenylamino)-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (136c)



นำ cannabidiol epoxide 100 mg (0.28 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม aniline 0.2 ml (2.24 mmol) และ acetic acid 0.1 ml กวนของผสมที่อุณหภูมิ 150 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase มาทำให้แห้ง

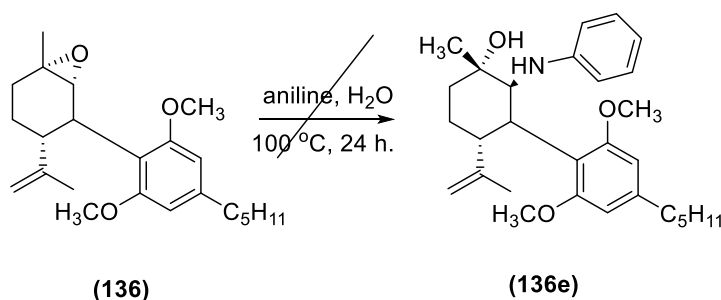
ด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

การพยายามสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-((2-aminopropyl)amino)-3-(2,6-dimethoxy-4-pentylphenyl)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (136d)



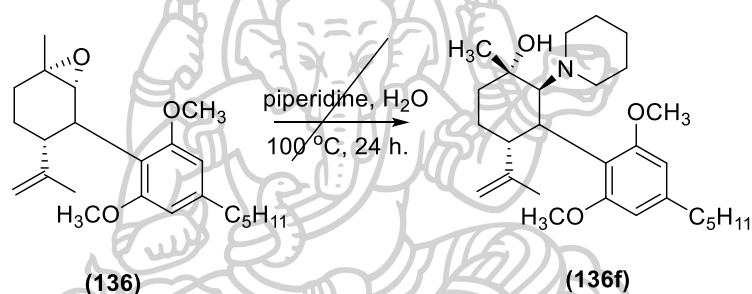
นำ cannabidiol epoxide 100 mg (0.28 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม เต็ม 1,2-diaminopropane 0.2 ml (2.24 mmol) และ acetic acid 0.1 ml กวนของผสมที่อุณหภูมิ 150 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase มาทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

การพยายามสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-3-(2,6-dimethoxy-4-pentylphenyl)-1-methyl-2-(phenylamino)-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (136e)



นำ cannabidiol epoxide 50 mg (0.14 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม aniline 0.1 ml (0.4 mmol) และน้ำกลั่น 0.1 ml กวนของผสมที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำขึ้น organic phase มาทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

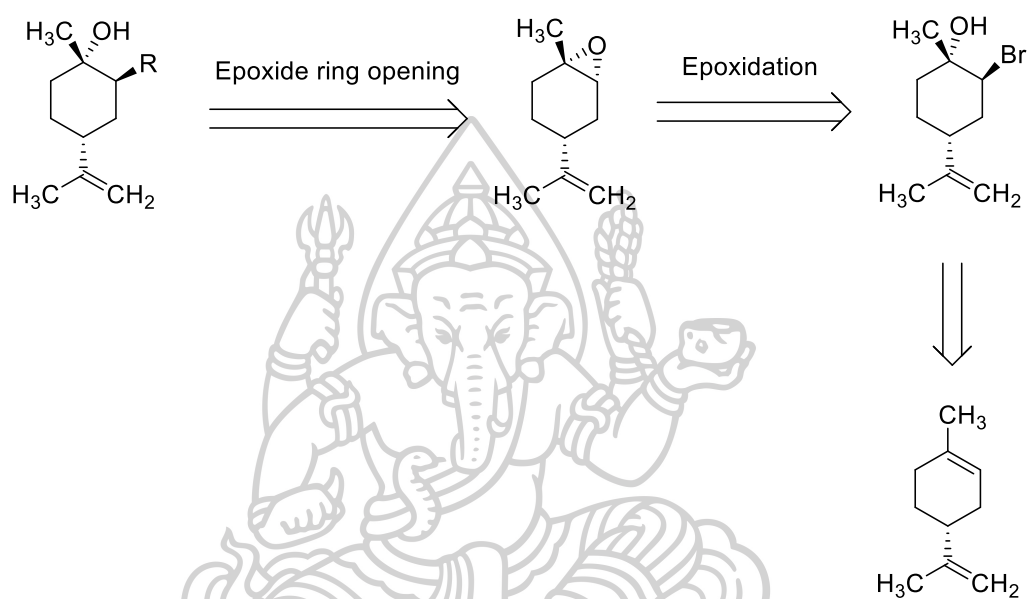
การพยายามสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-3-(2,6-dimethoxy-4-pentylphenyl)-1-methyl-2-(piperidin-1-yl)-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (136f)



นำ cannabidiol epoxide 50 mg (0.14 mmol) ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม piperidine 0.1 ml (0.4 mmol) และน้ำกลั่น 0.1 ml กวนของผสมที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำขึ้น organic phase มาทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศ จากข้อมูล ¹H-NMR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

3.3.4 การสังเคราะห์ของอนุพันธ์ limonene (36)

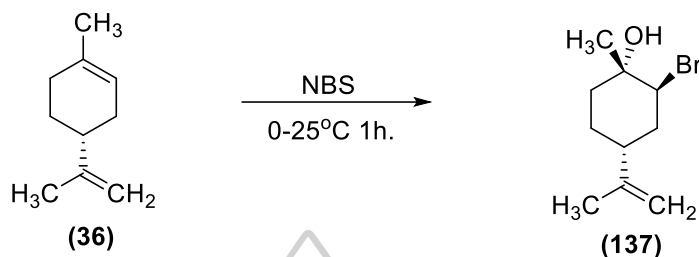
ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ limonene (36) โดยเริ่มสังเคราะห์จาก limonene (36) ผู้วิจัยได้เสนอแนวทางการสังเคราะห์ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 38 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ (+)-limonene (36)

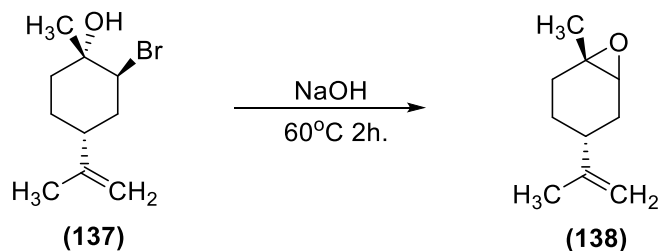
นำ limonene มาทำปฏิกิริยากับ NBS จากนั้นทำปฏิกิริยากับเบส เพื่อได้เป็น epoxide ผ่านปฏิกิริยา Epoxidation จากนั้นทำปฏิกิริยา Epoxide ring opening โดยใช้ nucleophile ต่างๆ

การสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-bromo-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (137)



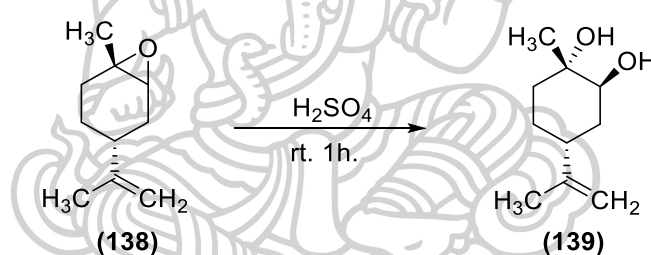
นำ (+)-limonene (36) 5.00 mL (26.97 mmol) ใส่ขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 100 ml เติม Acetone 20 ml และ H₂O 4 mL นำไปกวนที่อุณหภูมิ 0-25 °C จากนั้นค่อย ๆ เติม *N*-bromosuccinimide (NBS) 6.3 g (0.034 mol, 6.0 eq.) กวนต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้สารละลายสีเหลือง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane 3x20 mL นำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลาย ออกจากใต้ความดันบรรยากาศต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography (silica gel, 95:5 Hexane:EtOAc) จะได้ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-bromo-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (137) 3.77 g (60 %) ; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.22-1.41 (m, 1H), 1.43 (s, 3H) 1.74 (s, 3H) 1.75-2.04 (m, 4H) 2.22-2.31 (m, 1H) 2.45-2.5 (m, 1H) 4.20 (t, J = 2.7 Hz, 1H) และ 4.76 (d, J = 6.5 Hz, 2H) ppm

การสังเคราะห์ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (138)



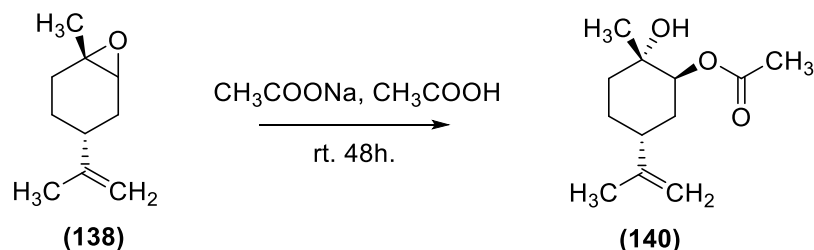
นำ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-bromo-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (**137**) 3.00 g (12.88 mmol) ใส่ขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 100 mL เติม 6M NaOH 9 mL นำไปกวนที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที จะได้สารละลายสีเหลือง จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane 3x20 mL นำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography (silica gel, 97:3 Hexane:EtOAc) จะได้ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**138**) 1.05 g (54 %); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.32 (s, 3H) 1.34-1.42 (m, 2H) 1.67 (s, 3H) 1.69-1.75 (m, 2H) 1.83-1.89 (m, 1H) 1.99-2.07 (m, 2H) 3.00 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H) และ 4.67 (s, 2H) ppm

การสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexane-1,2-diol (**139**)



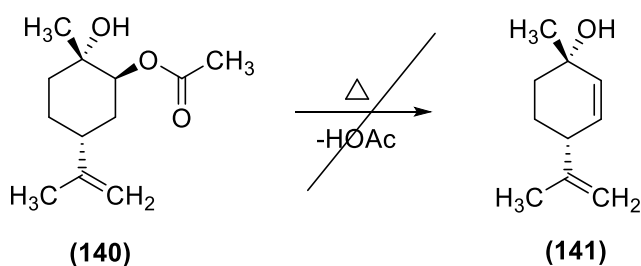
นำ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**138**) 100 mg (0.658 mmol) ในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 25 ml เติม 1% H₂SO₄ 2 mL ลงไป กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายอิ่มตัว sodium hydrogen carbonate (sat. NaHCO₃) ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane 3x20 ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative thin layer chromatography (silica gel, 1:1 Hexane:EtOAc) ได้ (1*S*,2*S*,4*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexane-1,2-diol (**139**) 30 mg (27 %); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.27 (s, 3H), 1.46-1.60 (m, 3H), 1.68-1.71 (m, 1H), 1.73 (s, 3H), 1.75-1.83 (m, 1H), 1.85-2.06 (m, 1H), 2.14-2.37 (m, 1H), 3.64 (t, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.73 (s, 2H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) 21.1 (CH₃), 26.2 (CH₂), 26.5 (CH₃), 33.7 (CH₂), 34.0 (CH₂), 37.5 (CH), 71.4 (C), 73.9 (CH), 109.0 (CH₂), 149.3 (C) ppm

การสังเคราะห์ (5*R*)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexyl acetate (140)

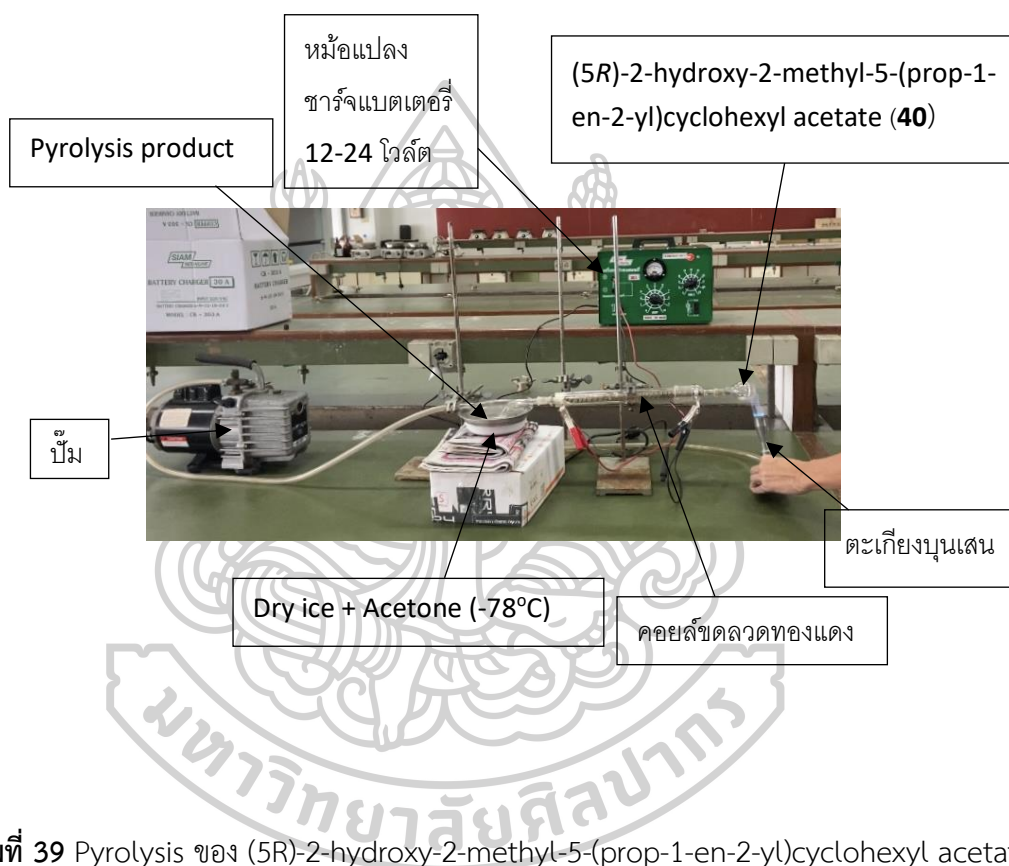


นำ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**138**) 100 mg (0.658 mmol) ในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 25 mL เติม conc. CH_3COOH 2 mL ลงไป จากนั้นค่อย ๆ เติม CH_3COONa 0.3 g (3.66 mmol, 5.6 eq.) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายอิมตัว sodium hydrogen carbonate (sat. NaHCO_3) ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous ($\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative thin layer chromatography (silica gel, 1:1 Hexane:EtOAc) ได้ (5*R*)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexyl acetate (**140**) 0.0124 g (8.88 %) ; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.19 (s, 3H) 1.54-1.65 (m, 5H) 1.72 (s, 3H) 1.85-2.01 (m, 1H) 2.08 (s, 3H) 2.10-2.17 (m, 1H) 4.72 (s, 2H) และ 4.82 (s, 1H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) 20.9 (CH_3), 21.3 (CH_3), 26.1 (CH_2), 27.0 (CH_3), 31.0 (CH_2), 34.4 (CH_2), 38.1 (CH), 69.8 (C), 75.4 (CH), 109.1 (CH_2), 149.1 (C), 170.4 (C) ppm

การพยายามสังเคราะห์ (1*S*,4*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-2-en-1-ol (141)



นำ (5R)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexyl acetate (**140**) มาทำปฏิกิริยา flash vacuum pyrolysis (fvp) ที่อุณหภูมิ 300-400 °C ภายใต้สุญญากาศดังแสดง (ภาพที่ 39) โดยการนำ (5R)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexyl acetate (**140**) มาให้ความร้อนด้วยตะเกียงเบนเสน จนสลายตัวกลายเป็นควัน จากนั้นควันจะเข้าไปในคอยล์ขดลวดทองแดง ทำให้เกิดการ pyrolyzed ขึ้นที่อุณหภูมิที่เหมาะสม แล้วควบแน่นอย่างรวดเร็ว พบว่าได้สารตั้งต้น ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

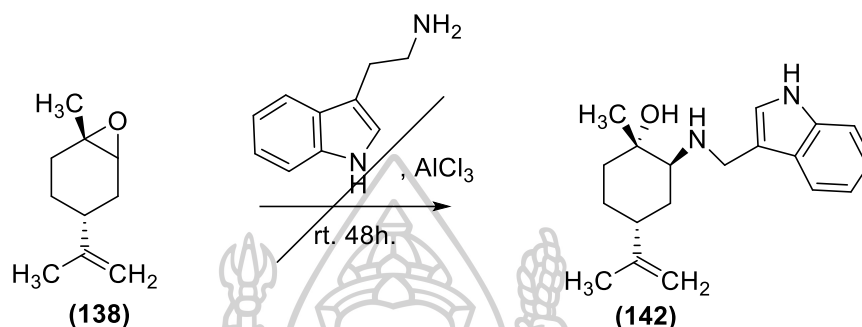


ภาพที่ 39 Pyrolysis ของ (5R)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexyl acetate

(40)

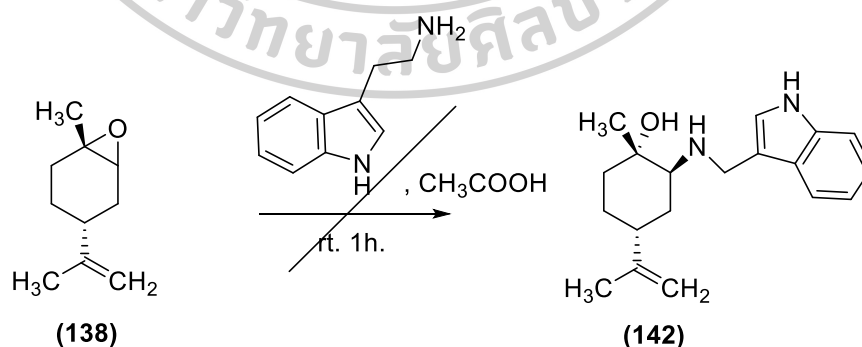
การพยายามสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-(((1*H*-indol-3-yl)methyl)amino)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (142)

วิธีที่ 1



นำ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**138**) 100 mg (0.658 mmol) ในขวดก้นกลม (round bottom flask) 25 ml จากนั้นเติม Tryptamine 116 mg (0.724 mmol, 1.1 eq.) จากนั้นเติม AlCl_3 8.75 mg (0.0658 mmol, 10mol%) และเติม H_2O mL จากนั้นกวนสารที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าไม่เกิดผลิตภัณฑ์และไม่สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้

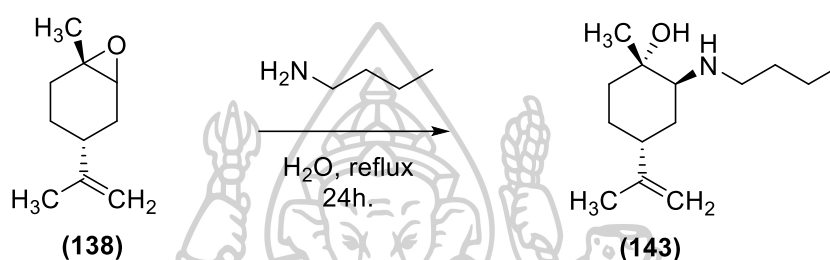
วิธีที่ 2



นำ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**138**) 100 mg (0.658 mmol) ในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 25 ml จากนั้นเติม Tryptamine 0.842 g (5.26 mmol, 8 eq.) จากนั้นเติม conc. CH_3COOH 0.15 mL (2.63 mmol,

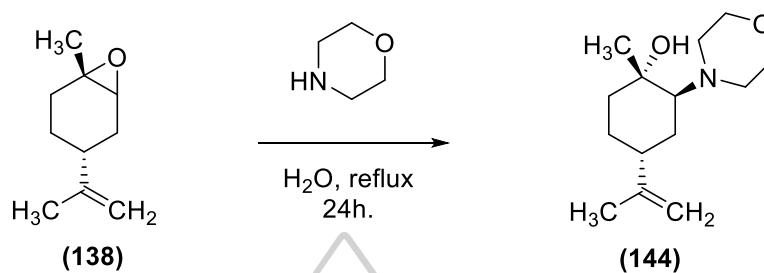
4 eq.) จากนั้นกวนสารที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสารตั้งต้นเกิดการสลายตัว ทำให้ไม่เกิดผลิตภัณฑ์และไม่สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้

การสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-(butylamino)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (143)



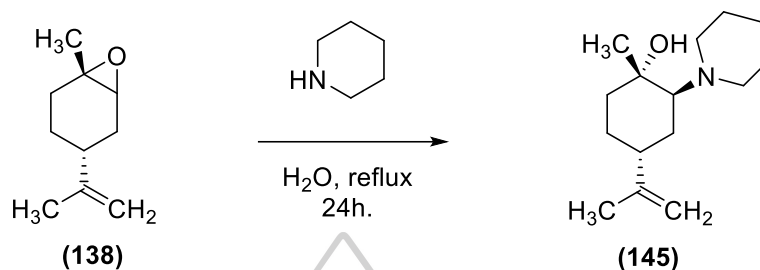
นำ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (138) 200 mg (1.32 mmol) ในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 50 mL เติม n-Butylamine 0.4 mL (3.78 mmol) ลงไป และเติม H₂O 0.04 mL รีฟลักซ์สารละลายผสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายอิ่มตัว sodium hydrogen carbonate (sat. NaHCO₃) ปริมาตร 10 mL จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) mL จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh. Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative thin layer chromatography (silica gel, 1:1 Hexane:EtOAc) ได้ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-(butylamino)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (143) 0.1411 g 48 % ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.86-0.96 (t, J = 9 Hz, 3H) 1.20 (s, 3H) 1.26-1.43 (m, 2H) 1.44-1.50 (m, 2H) 1.51-1.58 (m, 2H) 1.59-1.64 (m, 1H) 1.65-1.71 (m, 1H) 1.74 (s, 3H) 1.86-2.07 (m, 2H) 2.23 (br s, 1H) 2.40-2.57 (m, 2H) 2.68-2.84 (m, 1H) 4.78 (s, 2H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) 14.0 (CH₃), 20.5 (CH₂), 21.7 (CH₃), 24.7 (CH₃), 26.0 (CH₂), 30.2 (CH₂), 32.4 (CH₂), 34.6 (CH₂), 38.0 (CH), 47.9 (CH₂), 61.9 (CH), 72.1 (C), 109.5 (CH₂) 148.4 (C) ppm

การสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-1-methyl-2-morpholino-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol
(144)



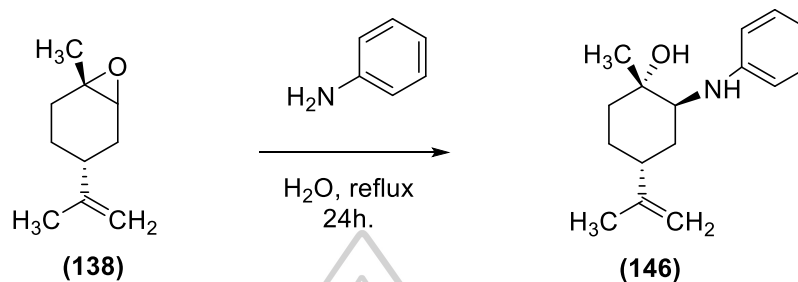
นำ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**138**) 200 mg (1.32 mmol) ในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 50 mL เติม Morpholine 0.4 mL (3.78 mmol) ลงไป และเติม H₂O 0.04 mL รีฟลักซ์สารละลายผสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายอิ่มตัว sodium hydrogen carbonate (sat. NaHCO₃) ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative thin layer chromatography (silica gel, 1:1 Hexane:EtOAc) ได้ (1*S*,2*S*,4*R*)-1-methyl-2-morpholino-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (**144**) 0.0987 g 33 % ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.22 (s, 3H) 1.47-1.58 (m, 4H) 1.75 (s, 3H) 1.90-1.99 (d, 1H) 2.06-2.14 (d, 1H) 2.46-2.57 (m, 4H) 2.64 (m, 2H) 3.71 (m, 4H) 4.85 (s, 1H) 4.95 (s, 1H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) 22.3 (CH₃), 22.5 (CH₃), 24.5 (CH₂), 24.9 (CH₂), 35.7 (CH₂), 38.9 (CH), 52.0 (CH₂), 67.4 (CH₂), 67.5 (CH), 72.8 (C), 111.1 (CH₂) 145.4 (C) ppm

การสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-1-methyl-2-(piperidin-1-yl)-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (145)



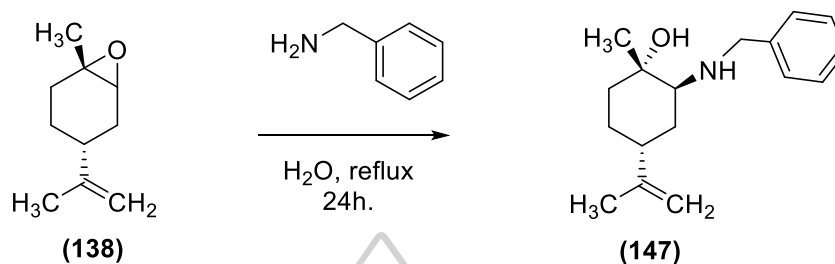
นำ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (138) 200 mg (1.32 mmol) ในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 50 mL เติม piperidine 0.4 mL (3.78 mmol) ลงไป และเติม H₂O 0.04 mL รีฟลักซ์สารละลายผสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายอิมิตัว sodium hydrogen carbonate (sat. NaHCO₃) ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative thin layer chromatography (silica gel, 1: 1 Hexane: EtOAc) ได้ (1*S*,2*S*,4*R*)-1-methyl-2-(piperidin-1-yl)-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (145) 0.0933 g 30 % ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.21 (s, 3H) 1.33-1.47 (m, 2H) 1.48-1.70 (m, 8H) 1.74 (s, 3H) 1.86-2.00 (m, 1H) 2.01-2.15 (m, 1H) 2.34-2.52 (m, 4H) 2.62-2.79 (m, 2H) 4.85 (s, 1H) 4.93 (s, 1H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) 22.0 (CH₃), 22.5 (CH₃), 24.4 (CH₂), 24.6 (CH₂), 25.0 (CH₂), 26.7 (CH₂), 35.9 (CH₂), 39.1 (CH), 53.1 (CH₂), 67.9 (CH), 72.5 (C) 111.0 (CH₂) 145.5 (C) ppm

การสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-1-methyl-2-(phenylamino)-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (146)



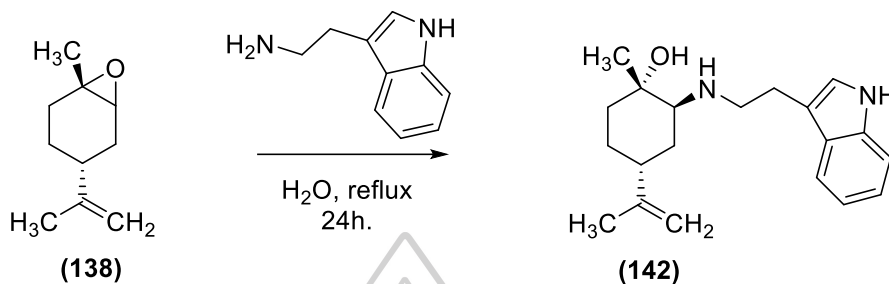
นำ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**138**) 200 mg (1.32 mmol) ในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 50 mL เติม aniline 0.4 mL (3.78 mmol) ลงไป และเติม H₂O 0.04 mL รีฟลักซ์สารละลายผสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายอิ่มตัว sodium hydrogen carbonate (sat. NaHCO₃) ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh. Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative thin layer chromatography (silica gel, 1:1 Hexane: EtOAc) ได้ ((1*S*,2*S*,4*R*)-1-methyl-2-(phenylamino)-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (**146**) 0.0747 g 23 % ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.30 (s, 3H) 1.42-1.90 (m, 3H) 1.92-2.05 (m, 2H) 2.13 (s, 1H) 3.57 (s, 1H) 4.78 (s, 1H) 6.61-6.72 (m, 3H) 7.14-7.32 (m, 2H); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) 21.3 (CH₃), 26.0 (CH₂), 26.8 (CH₃), 31.1 (CH₂), 34.5 (CH₂), 38.3 (CH), 57.2 (CH), 71.9 (C), 109.4 (CH₂), 113.4 (CH), 117.4 (CH) 129.3 (CH) 147.6 (C) 148.5 (C) ppm

การสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-(benzylamino)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (**147**)



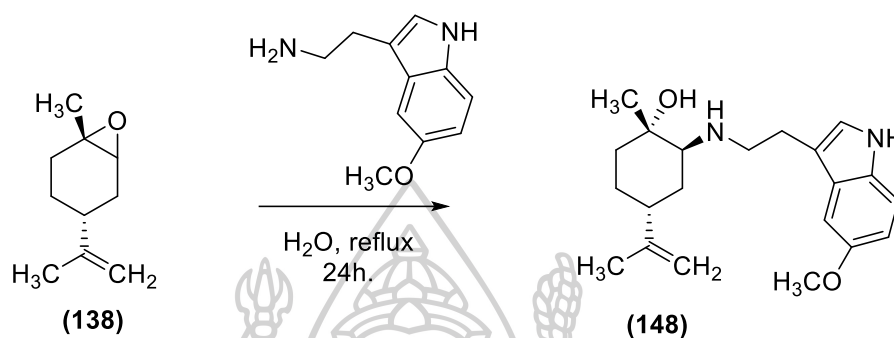
นำ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**138**) 200 mg (1.32 mmol) ในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 50 mL เติม Benzylamine 0.4 mL (3.78 mmol) ลงไป และเติม H₂O 0.04 mL รีฟลักซ์สารละลายผสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายอิ่มตัว sodium hydrogen carbonate (sat. NaHCO₃) ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh. Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative thin layer chromatography (silica gel, 1:1 Hexane:EtOAc) ได้ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-(benzylamino)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (**147**) 0.0455 g 14 % ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.22 (s, 3H) 1.49-1.63 (m, 2H) 1.64-1.71 (m, 1H) 1.72 (s, 3H) 1.76-1.79 (m, 2H) 1.80-2.07 (m, 1H) 2.18-2.30 (m, 1H) 2.51-2.70 (m, 1H) 3.56-3.82 (m, 1H) 3.83-4.00 (m, 1H) 4.76 (s, 2H) 7.20-7.40 (m, 5H); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) 21.5 (CH₃), 25.3 (CH₃), 26.0 (CH₂), 29.9 (CH₂), 34.5 (CH₂), 37.9 (CH), 52.0 (CH₂), 61.2 (CH), 72.1 (C), 109.4 (CH₂), 127.1 (CH), 128.2 (CH) 128.4 (CH) 140.3 (C) 148.6 (C) ppm

การสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (**142**)



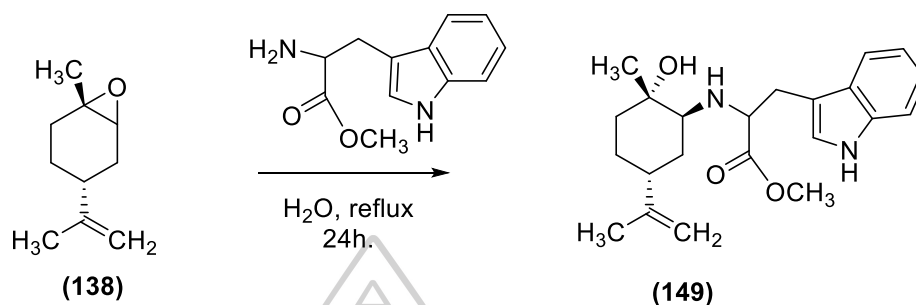
นำ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**138**) 200 mg (1.32 mmol) ในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 50 mL เติม Tryptamine 0.6 g (3.78 mmol) ลงไป และเติม H₂O 0.04 mL รีฟลักซ์สารละลายผสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายอิมิตัว sodium hydrogen carbonate (sat. NaHCO₃) ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh. Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative thin layer chromatography (silica gel, 1:1 Hexane:EtOAc) ได้ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (**142**) 0.0287 g 7 % ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.14 (s, 3H) 1.23-1.29 (m, 1H) 1.47-1.55 (m, 1H) 1.61-1.67 (m, 1H) 1.68 (s, 3H) 1.89-2.02 (m, 1H) 2.12-2.07 (m, 2H) 2.54-2.64 (m, 1H) 2.51-2.70 (m, 1H) 2.80-2.90 (m, 1H) 2.92-3.02 (m, 2H) 3.06-3.17 (m, 1H) 4.75 (s, 2H) 7.00-7.64 (m, 5H) 8.19 (br s, 1H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) 21.7 (CH₃), 24.4 (CH₃), 25.8 (CH₂), 25.9 (CH₂), 30.0 (CH₂), 34.7 (CH₂), 38.3 (CH), 48.2 (CH₂), 62.0 (CH), 72.2 (C) 109.6 (CH₂) 111.2 (CH) 113.7 (CH) 118.8 (CH) 119.2 (CH) 122.0 (CH) 136.4 (C) 148.2 (C) 161.3 (C) ppm; HRESI-MS: calcd for C₂₀H₂₈NO₂ [M+H]⁺ : 313.2274, found: 313.2273

การสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (148)

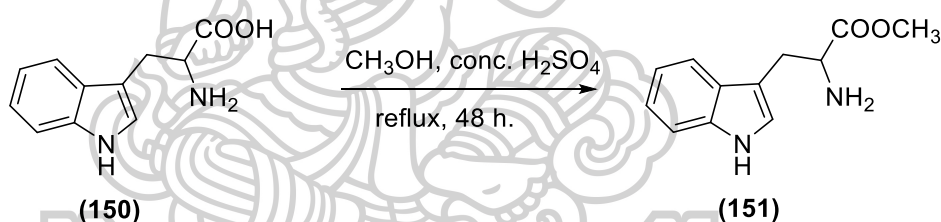


นำ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**138**) 200 mg (1.32 mmol) ในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 50 mL เติม 5-methoxy tryptamine 0.7 g (3.78 mmol) ลงไป และเติม H₂O 0.04 mL รีฟลักซ์สารละลายผสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายอิ่มตัว sodium hydrogen carbonate (sat. NaHCO₃) ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh.Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative thin layer chromatography (silica gel, 1:1 Hexane:EtOAc) ได้ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (**148**) 0.1036 g 23 % ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.12 (s, 3H) 1.20-1.32 (m, 2H) 1.43-1.54 (m, 2H) 1.68 (s, 3H) 1.88-2.07 (m, 2H) 2.09-2.19 (m, 1H) 2.50-2.60 (m, 1H) 2.72-2.86 (m, 1H) 2.87-2.99 (m, 2H) 3.00-3.16 (m, 1H) 3.84 (s, 3H) 4.74 (s, 2H) 6.77-7.27 (m, 5H) 8.32 (br s, 1H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) 21.6 (CH₃), 24.8 (CH₃), 26.0 (CH₂), 29.7 (CH₂), 30.2 (CH₂), 34.6 (CH₂), 37.9 (CH), 48.2 (CH₂), 55.9 (CH₃), 61.9 (CH) 72.2 (C) 100.7 (CH) 109.4 (CH₂) 111.9 (CH) 112.1 (CH) 113.5 (CH) 122.8 (CH) 127.8 (C) 131.6 (C) 148.4 (C) 153.8 (C) ppm; HRESI-MS: calcd for C₂₀H₃₀N₂O₂ [M+H]⁺ : 343.2380, found: 343.2379

การสังเคราะห์ methyl ((1*S*,2*S*,5*R*)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexyl)tryptophanate (149)

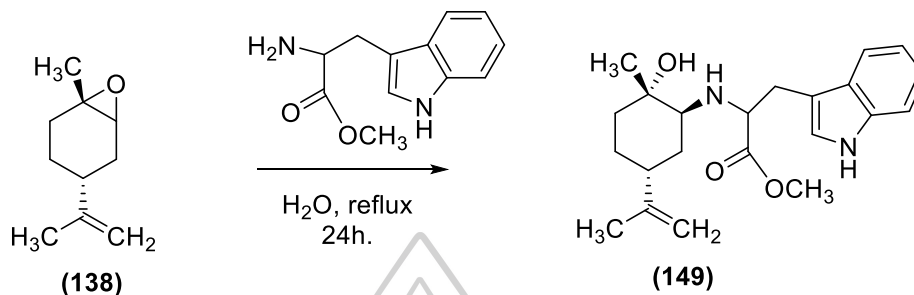


วิธีการเตรียม methyl 2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propanoate (151)



นำ tryptophan (169) (0.67 g, 3.2 mmol) มาละลายใน MeOH (20 mL) จากนั้นค่อยๆ หยด conc. H₂SO₄ (0.4 mL) และให้ความร้อนภายใต้บรรยากาศก๊าซอาร์กอน (Ar) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายอิ่มตัว NaHCO₃ จนกระทั่งสารละลายไม่เกิดฟอง นำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วย CH₂Cl₂ (3x30 mL) นำชั้น CH₂Cl₂ ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh. Na₂SO₄) ทำการกรอง และนำไประเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ จะได้ methyl 2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propanoate (151) เป็นของหนืดสีน้ำตาล 0.67 g, 94% yield; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.75 (br, 2H), 3.03 (dd, J = 7.7, 14.4 Hz, 1H), 3.27 (dd, J = 4.7, 14.4 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.83 (dd, J = 4.7, 7.7 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.10 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.17 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.64 (br, NH)

การสังเคราะห์ methyl ((1*S*,2*S*,5*R*)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexyl)tryptophanate (149)



นำ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (138) 200 mg (1.32 mmol) ในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 50 mL เติม tryptophan methoxy 0.8 g (3.78 mmol) ลงไป และเติม H₂O 0.04 mL รีฟลักซ์สารละลายผสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายอิ่มตัว sodium hydrogen carbonate (sat. NaHCO₃) ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane (3x20) ml จากนั้นนำชั้น organic phase ทำให้แห้งด้วย sodium sulphate anhydrous (anh. Na₂SO₄) กรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันบรรยากาศต่ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative thin layer chromatography (silica gel, 1:1 Hexane:EtOAc) ได้ methyl ((1*S*,2*S*,5*R*)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexyl)tryptophanate (149) 0.0358 g 7 % ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.03 (s, 3H) 1.20-1.34 (m, 1H) 1.38-1.55 (m, 2H) 1.57-1.66 (m, 1H) 1.68 (s, 3H) 1.71-1.80 (m, 1H) 1.82-1.92 (m, 1H) 2.09-2.27 (m, 1H) 2.29-2.47 (m, 1H) 2.98-3.08 (m, 1H) 3.09-3.19 (m, 1H) 3.56-3.63 (m, 1H) 3.64 (s, 3H) 4.72 (s, 1H) 6.99-7.68 (m, 5H) 8.12 (br s, 1H) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) 21.5 (CH₃), 24.9 (CH₃), 25.8 (CH₂), 29.9 (CH₂), 32.0 (CH₂), 34.2 (CH₂), 38.2 (CH), 51.9 (CH₃), 62.1 (CH), 62.9 (CH) 72.5 (C) 109.5 (CH₂) 111.2 (CH) 111.6 (CH) 118.8 (CH) 119.4 (CH) 122.1 (CH) 122.8 (CH) 127.5 (C) 136.1 (C) 148.3 (C) 176.6 (C) ppm; HRESI-MS: calcd for C₂₀H₂₀N₂O₃ [M+H]⁺ : 371.2329, found: 371.2328

3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.4.1 ทดสอบการต้านเซลล์มะเร็งของอนุพันธ์ limonene โดยวิธี MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide]

การทดสอบฤทธิ์ของอนุพันธ์ของ limonene ต่อการยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa, cervix carcinoma cell) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG-2, human liver carcinoma) โดยวิธี MTT [3-(3,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetra-zolium bromide)] assay [60] ใช้ acridine orange เป็น positive control เลี้ยงเซลล์มะเร็งในอาหาร Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) +10% fetal bovine serum ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO₂ ให้มีความหนาแน่น 1x10⁵ cells/mL ใน 96-well microplate ด้วยสารแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 µg/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารใหม่ และเติม 400 µg/mL MTT solution ปริมาตร 100 µL บ่มที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ถ่ายอาหารออก และเติม DMSO 100 µL/well การเกิดสี formazan จะวัดโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วย ELISA reader ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้ว คำนวณหาค่า IC₅₀ พร้อมทั้ง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต (% survival)

$$\% \text{survival} = \frac{\text{Test} - \text{Blank}}{\text{Reference} - \text{Blank}} \times 100$$

เมื่อ % survival = เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต

Test = ค่าความดูดกลืนแสงของหลุมทดสอบ

Blank = ค่าความดูดกลืนแสงของหลุมที่มี DMSO 20 %

Reference = ค่าความดูดกลืนแสงของหลุมที่เซลล์รอด 100%

3.4.2 การศึกษาความสามารถในการต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity)

ผู้วิจัยทำการศึกษาความสามารถในการต้านแบคทีเรียของอนุพันธ์ limonene โดยทำการทดสอบหาบริเวณที่เชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญเติบโต เพื่อตรวจสอบว่าสารชนิดใดบ้างที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ จากนั้นทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (Minimal inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี microbroth dilution method ซึ่งทำการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus*

aureus, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium*

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

1. ขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (streak plate) แบบ four-way cross streak แล้วบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อที่มีปริมาณมากกระจายออกจนแยกเป็นโคโลนี (colony) เดียว
2. เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแล้วนำมาใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth 5 ml นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ปรับปริมาณเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland (1×10^5 CFU/ml)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC)

1. เจือจางสารที่ต้องการทดสอบด้วยตัวทำละลาย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 10,240 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (stock solution) ถ่าย stock solution 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรก ซึ่งมีอาหาร 190 ไมโครลิตร
2. ทำ doubling dilutions โดยถ่ายสารละลายจากหลุมแรก 100 ไมโครลิตร ลงหลุมที่ 2 ไปเรื่อยๆ จนถึงหลุมที่ 11 โดยเว้นหลุมที่ 12 ไว้เป็น control ซึ่งจะมีแต่ nutrient broth ที่มีส่วนผสม 10% glucose , 5% DMSO และเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเท่านั้น
3. โดยจะได้ความเข้มข้นของสารจากหลุมแรกจนถึงหลุมที่ 11 ดังนี้ 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 1 และ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทุกหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร และใช้ Chloramphenicol เป็น positive control นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

อ่านค่าจากการสังเกตความขุ่นที่เปลี่ยนไป (จากขุ่นเป็นใส) โดยหลุมสุดท้ายที่มีลักษณะใสจะเป็นหลุมที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้

3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแบบเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic antibacterial assay)

MRSA แยกได้จากตัวอย่างหนองของผู้ป่วยในโรงพยาบาลนครปฐม (Taechowisan et al., 2018) ตรวจพบการดื้อยาของสายพันธุ์นี้โดยวิธี cefoxitin paper method ของ American Association of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014)

เตรียมอาหาร Mueller-Hinton broth + 4% NaCl ลงใน 96 well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ระบุระดับความเข้มข้นของแต่ละหลุม ดังนี้ 128, 64, 32, 16 และ 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะ Ciprofloxacin ที่ความเข้มข้น 256 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นใส่ลงในหลุมแรกปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยถ่ายสารละลายจากหลุมแรกลงหลุมที่ 2 ไปเรื่อยๆ และให้ดูดสารละลายในหลุมสุดท้ายทิ้งไป 100 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารอนุพันธ์ limonene ที่ความเข้มข้น 16, 32, 64, 128 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เตรียมเชื้อ MRSA Sp3 ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standards (จำนวนเชื้อ 10^5 CFU/mL) ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ใส่เชื้อลงไปทุกหลุม (ยกเว้น negative control) โดยเชื้อในแต่ละหลุมจะมีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 10^5 CFU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง อ่านค่า MIC จากหลุมที่มีความเข้มข้นของยาดำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (หรือหลุมสุดท้ายที่อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง)

3.5 การศึกษาโมเลกุลาร์ด็อกกิงของอนุพันธ์ limonene ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA gyrase B ATPbinding domain จาก *E. coli* (PDB: 2GFP) และ *S. aureus* (PDB: 2GFP)

1. การเตรียมเอนไซม์ DNA gyrase B ATPbinding domain จาก *E. coli* และ *S. aureus* ดาวน์โหลดโครงสร้างของเอนไซม์ DNA gyrase B ATPbinding domain จาก *E. coli* และ *S. aureus* เป็นโปรตีนจากธนาคารฐานข้อมูลโครงสร้างโปรตีน (Protein data bank) รหัส 2GFP

2. การเตรียมลิแกนด์ (อนุพันธ์ limonene)

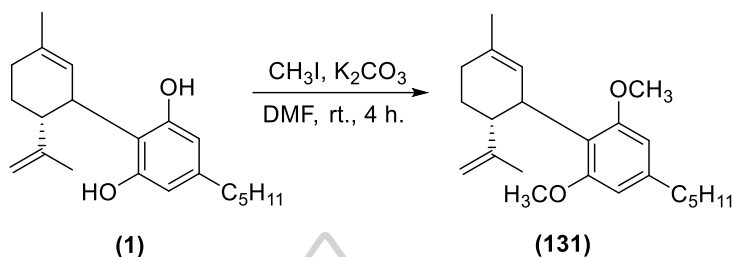
โดยใช้โปรแกรม chem3D จัดโครงสร้างให้อยู่ในลักษณะพลังงานที่ต่ำที่สุดแล้วปรับนามสกุลไฟล์ให้เป็น pdb

3. การทำโมเลกุลาร์ด็อกกิง

โดยใช้โปรแกรม autodock vina กำหนดให้ลิแกนด์ และเอนไซม์มีการยึดจับ ($\Delta G_{\text{binding}}$) มีค่าต่ำที่สุด

บทที่ 4

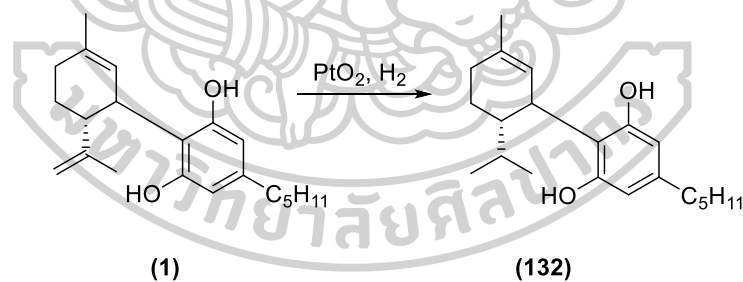
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง



จากแผนการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cannabidiol (1) ผู้วิจัยเริ่มทำการทดลองจากการสังเคราะห์ (2*R*)-2',6'-dimethoxy-5-methyl-4'-pentyl-2-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1,1'-biphenyl (131) จากปฏิกิริยา methylation ของ cannabidiol (1) โดยที่เบส K_2CO_3 ไปดึงโปรตอนที่มี OH ได้เป็น phenoxide anion ซึ่งเป็นนิวคลีโอไฟล์ ในการทำปฏิกิริยา $\text{S}_{\text{N}}2$ substitution กับ methyl iodide และได้ผลิตภัณฑ์ (2*R*)-2',6'-dimethoxy-5-methyl-4'-pentyl-2-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1,1'-biphenyl (131) 71 % ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก $^1\text{H-NMR}$ โดยจะปรากฏ singlet peak 6 โปรตอนที่มีหมู่ methoxy ที่ δ 3.72 ppm และสามารถเทียบ chemical shift ของพีคอื่นๆได้จากผลสเปกตรัมที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ดังแสดงในตารางที่ 8

^1H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงาน ก่อนหน้านี้ (ppm)	^1H chemical shift ของสเปกตรัมของสาร ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ (ppm)
0.89-0.94 (3H, t, J=6.8 Hz, terminal CH_3)	0.83-0.95 (3H, t, J=6.8 Hz, terminal CH_3)
1.57 (3H, s, CH_3 at prop-1-en-2-yl group)	1.59 (3H, s, CH_3 at prop-1-en-2-yl group)
1.68 (3H, s, allyl CH_3)	1.66 (3H, s, allyl CH_3)
2.57-2.71 (2H, t, J=7.5 Hz, benzyl)	2.46-2.58 (2H, t, J=7.6 Hz, benzyl)
3.74 (6H, s, OCH_3)	3.72 (6H, s, OCH_3)
4.44-4.46 (2H, d, J=7.2 Hz)	4.37-4.48 (2H, d, J=6 Hz)
5.22 (1H, s, olefin)	5.20 (1H, s, olefin)
6.34 (2H, s, Ar)	6.33 (2H, s, Ar)

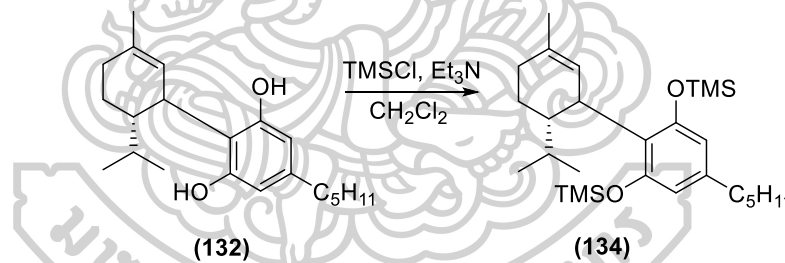
ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบ ^1H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ กับ ^1H chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ (131) ที่สังเคราะห์ได้



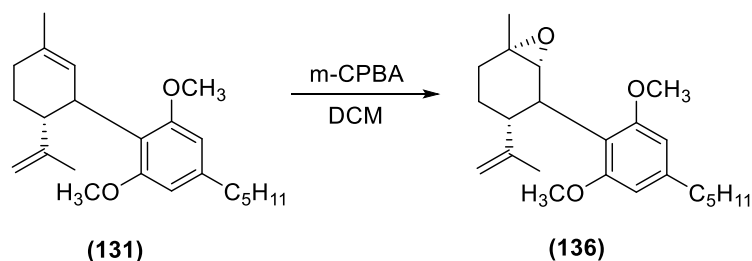
จากนั้น cannabidiol (1) ทำปฏิกิริยา hydrogenation ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (2'S)-2'-isopropyl-5'-methyl-4-pentyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-2,6-diol (132) 58 % ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก $^1\text{H-NMR}$ โดยจะปรากฏ multiplet peak 6 โปรตอนของ $2\times\text{CH}_3\text{CH}$ ที่ δ 0.79-0.93 และสามารถเทียบ chemical shift ของพีคอื่นๆได้จากผลสเปกตรัมที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ดังแสดงในตารางที่ 9

¹ H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (ppm)	¹ H chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ (ppm)
0.84-0.93 (6H, s, CH(CH ₃) ₂), (3H, t, terminal CH ₃)	0.79-0.93 (6H, m, CH(CH ₃) ₂), (3H, t, terminal CH ₃) ppm
1.77 (3H, s, CH ₃ allyl)	1.76 (3H, s, CH ₃ allyl)
1.81 (1H, m, CH(CH ₃) ₂)	1.81 (1H, m, CH(CH ₃) ₂)
5.53 (1H, s, olefin)	5.51 (1H, s, olefin)
6.21 (1H, br s, Ar), 6.13 (1H, s, Ar)	6.20 (2H, br s, Ar)

ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบ¹H-chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ กับ ¹H-chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ (132) ที่สังเคราะห์ได้



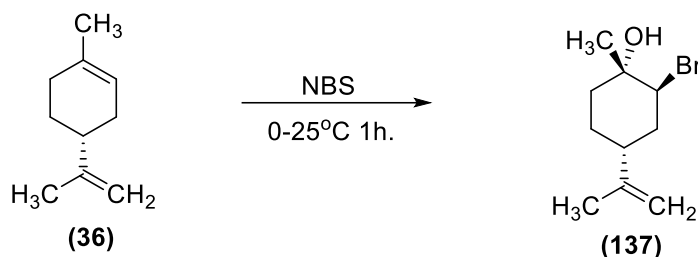
จากนั้น (1*S*,2*S*,4*R*)-2-bromo-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (132) ทำการ protect phenol ด้วย TMSCl ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (((2'*S*)-2'-isopropyl-5'-methyl-4-pentyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-2,6-diyl)bis(oxy))bis(trimethylsilane) (134) (54 %) โดยที่เบส Et₃N ไปดึงโปรตอนที่ OH ได้เป็น phenoxide anion ซึ่งเป็นนิวคลีโอไฟล์ ในการทำปฏิกิริยา S_N2 substitution กับ TMSCl และได้ผลิตภัณฑ์ (((2'*S*)-2'-isopropyl-5'-methyl-4-pentyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-2,6-diyl)bis(oxy))bis(trimethylsilane) (134) 48 % ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR โดยจะปรากฏ singlet peak 18 โปรตอน หมู่ 2x(CH₃)₃Si ที่ δ 0.24 ppm และยังปรากฏ multiplet peak 6 โปรตอนของ 2xCH₃CH ที่ δ 0.72-0.93 ppm



จากนั้น (2*R*)-2',6'-dimethoxy-5-methyl-4'-pentyl-2-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1,1'-biphenyl (**131**) ทำปฏิกิริยากับ m-CPBA โดยเข้าทำปฏิกิริยาที่ alkene เกิดเป็นวง epoxide ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (1*S*,4*R*,6*R*)-5-(2,6-dimethoxy-4-pentylphenyl)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**136**) 45 % เพื่อเป็น intermediate ในการสังเคราะห์โดยการเปิดวง epoxide ด้วยนิวคลีโอไฟล์ชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR โดยจะปรากฏ doublet peak 1 โปรตอนของโปรตอนที่อยู่บนวง epoxide ที่ δ 3.54-3.64 ppm และ singlet peak 2 โปรตอนของพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ δ 4.17 และ 4.37 ppm ตามลำดับ และสามารถเทียบ chemical shift ของพีคอื่นๆได้จากผลสเปกตรัมที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ดังแสดงในตารางที่ 10

¹ H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (ppm)	¹ H chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ (ppm)
0.89-0.94 (3H, t, J=6.8 Hz, terminal CH ₃)	0.86-0.94 (3H, t, J=6.8 Hz, terminal CH ₃)
1.31 (3H, s, CH ₃ at prop-1-en-2-yl group)	1.28 (3H, s, CH ₃ at prop-1-en-2-yl group)
1.58 (3H, s, allyl CH ₃)	1.60 (3H, s, allyl CH ₃)
2.52-2.57 (2H, t, J=7.5 Hz, benzyl)	2.46-2.62 (2H, t, J=7.6 Hz, benzyl)
3.57- 3.61 (1H, d, J=12.2, Hz, H on epoxide ring)	3.54-3.64 (1H, d, J=10.8, Hz, H on epoxide ring)
3.71 (3H, s, OCH ₃), 3.80 (3H, s, OCH ₃)	3.70 (3H, s, OCH ₃), 3.80 (3H, s, OCH ₃)
4.16 (1H, s, olefin), 4.37 (1H, s, olefin)	4.17 (1H, s, olefin), 4.37 (1H, s, olefin)
6.32-6.35 (2H, d, J=7.7 Hz, Ar)	6.25-6.39 (2H, d, J=8.1 Hz, Ar)

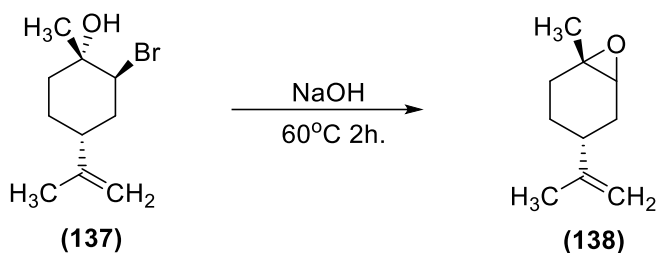
ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบ ¹H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ กับ ¹H chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ (**136**) ที่สังเคราะห์ได้



จากแผนการสังเคราะห์ที่อนุพันธ์ของ (+)-limonene (36) ผู้วิจัยเริ่มทำการทดลองจากการสังเคราะห์ (1S,2S,4R)-2-bromo-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (137) จากปฏิกิริยา bromination ของ (+)-limonene (36) โดยทำปฏิกิริยากับ *N*-bromosuccinimide (NBS) ที่อุณหภูมิ 0-25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดย *N*-bromosuccinimide (NBS) เข้าทำปฏิกิริยากับ (+)-limonene ที่ตำแหน่ง trisubstituted alkene ผ่าน brominium bridge intermediat จากนั้น H₂O เข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่หนึ่ง *N*-bromosuccinimide (NBS) มาดึงโปรตอนกลับคืนที่ตำแหน่ง Nitrogen เหลือเป็น Succinimide และได้ผลิตภัณฑ์ (1S,2S,4R)-2-bromo-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (137) (60 %) ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR โดยจะปรากฏ singlet peak 1 โปรตอนที่อยู่ตำแหน่งพันธะคู่ที่เกิดปฏิกิริยาเกิดการ shift มาที่ δ 4.20 ppm และสามารถเทียบ chemical shift ของที่อื่นๆได้จากผลสเปกตรัมที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ดังแสดงในตารางที่ 11

¹ H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (ppm)	¹ H chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ (ppm)
1.16 (s, 3H)	1.43 (s, 3H)
1.76 (s, 3H)	1.74 (s, 3H)
4.16 (s, 1H)	4.20 (s, 1H)
4.80 (s, 2H)	4.76 (s, 2H)

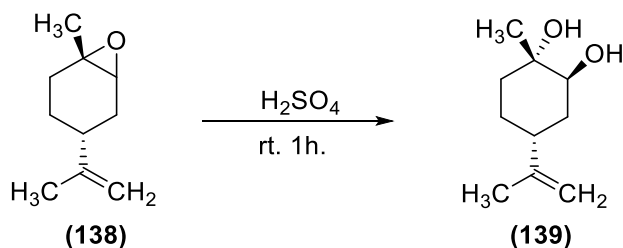
ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบ ¹H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ กับ ¹H chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ (137) ที่สังเคราะห์ได้



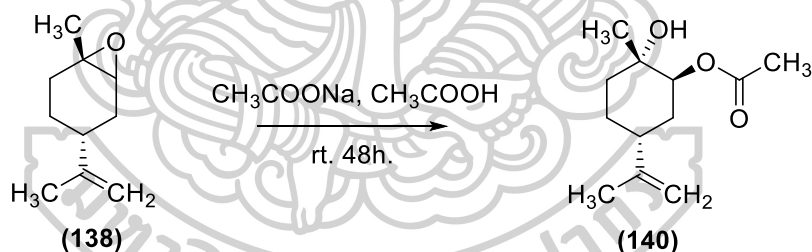
จากนั้น (1*S*,2*S*,4*R*)-2-bromo-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (**137**) ทำปฏิกิริยากับ NaOH โดยในสถานะเบส oxygen เป็นประจุลบเข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง ทำให้ Bromine หลุดออกไป เกิดเป็นวง epoxide ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**138**) 54 % เพื่อเป็น intermediate ในการสังเคราะห์โดยการเปิดวง epoxide ด้วยนิวคลีโอไฟล์ชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR โดยจะปรากฏ doublet peak 1 โปรตอนของโปรตอนที่อยู่บนวง epoxide และ singlet peak 2 โปรตอนของพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ δ 3.00 และ 4.67 ตามลำดับ และสามารถเทียบ chemical shift ของพีคอื่นๆได้จากผลสเปกตรัมที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ที่ตั้งแสดงในตารางที่ 12

¹ H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (ppm)	¹ H chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ (ppm)
1.26 (s, 3H)	1.32 (s, 3H)
1.66 (s, 3H)	1.67 (s, 3H)
2.80 (d, <i>J</i> = 4.5 Hz, 1H)	3.00 (d, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H)
4.66 (s, 2H)	4.67 (s, 2H)

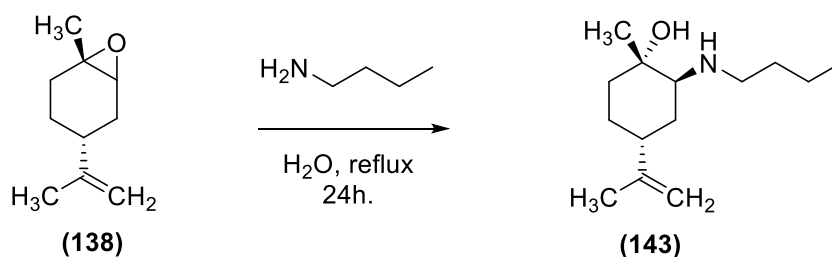
ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบ ¹H chemical shift ของสเปกตรัมที่มีรายงานก่อนหน้านี้ กับ ¹H chemical shift ของสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ (**138**) ที่สังเคราะห์ได้



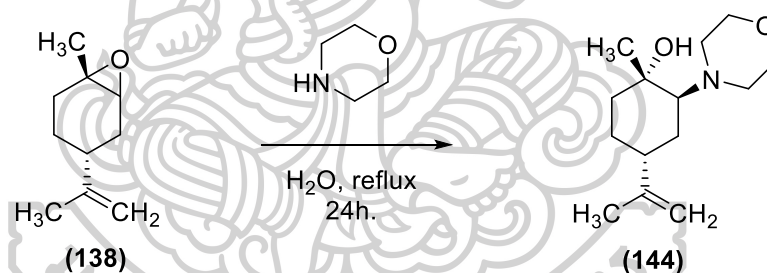
ทำ การ เป็ ด วง epoxide จาก (1S,4R,6R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0] heptane (138) ด้วยนิวคลีโอไฟล์ โดยเริ่มจากการเปิดวง epoxide ด้วยการทำปฏิกิริยากับกรด H₂SO₄ โดย oxygen ที่ตำแหน่งบนวง epoxide ทำให้ oxygen ที่ตำแหน่งนั้นเป็นประจุบวก จากนั้น H₂O จะเข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (1S,2S,4R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexane-1,2-diol (139) (27 %) สามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR ซึ่งจะปรากฏ triplet peak 1 โปรตอนของ CH ที่อยู่ติดกับหมู่ hydroxyl ที่เกิดจากการเปิดวง epoxide ที่ δ 3.65 ppm และพบสัญญาณโปรตอนตำแหน่งพันธะคู่โดยปรากฏ singlet peak 2 โปรตอนของ CH₂ ที่ 4.74 ppm



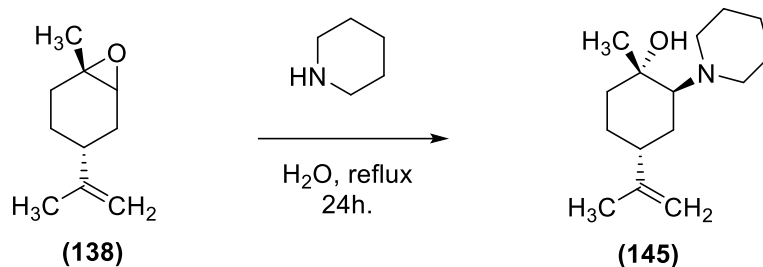
ทำ การ เป็ ด วง epoxide ของ (1S,4R,6R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (138) ด้วย CH₃COONa โดย oxygen บนวง epoxide ได้รับโปรตอนจากกรดทำให้เกิดประจุบวก ซึ่งจะมีความเป็น electrophile เพิ่มขึ้น จากนั้น CH₃COO⁻ ซึ่งมีความเป็น Nucleophile เข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (5R)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexyl acetate (140) 8.88 % สามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR ซึ่งจะปรากฏ singlet peak 1 โปรตอนของ CH ที่อยู่ติดกับหมู่ carbonyl ที่เกิดจากการเปิดวง epoxide ด้วย CH₃COONa ที่ δ 4.82 ppm และพบสัญญาณโปรตอนตำแหน่งพันธะคู่โดยปรากฏ singlet peak 2 โปรตอนของ CH₂ ที่ 4.72 ppm และพบสัญญาณโปรตอนตำแหน่งที่อยู่บนหมู่แทนที่ acetate โดยปรากฏ singlet peak 3 โปรตอนของ CH₃ ที่ 2.08 ppm



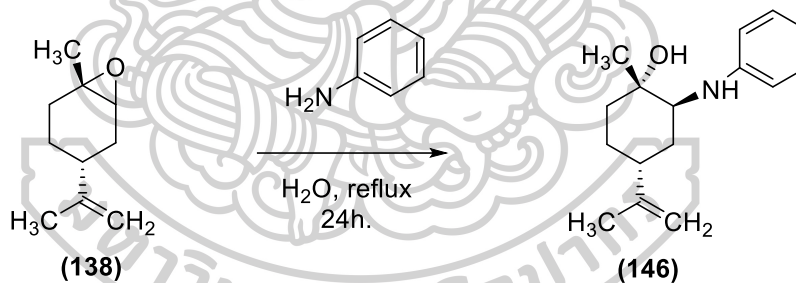
ทำ การ เปิด วง epoxide ของ (1S,4R,6R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (138) ด้วย n-Butylamine โดย oxygen บนวง epoxide ได้รับโปรตอนจาก H₂O จากนั้น NH ของ Morpholine เข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง เปิดวง epoxide ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (1S,2S,4R)-2-(butylamino)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (143) 48 % สามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR ซึ่งจะปรากฏ singlet peak 2 โปรตอนของ CH₂ ตำแหน่งพันธะคู่ ที่ 4.78 ppm และพบสัญญาณโปรตอนตำแหน่งที่อยู่บนหมู่แทนที่ n-Butylamine โดยปรากฏ singlet peak 3 โปรตอนของ CH₃ ที่ 1.74 ppm



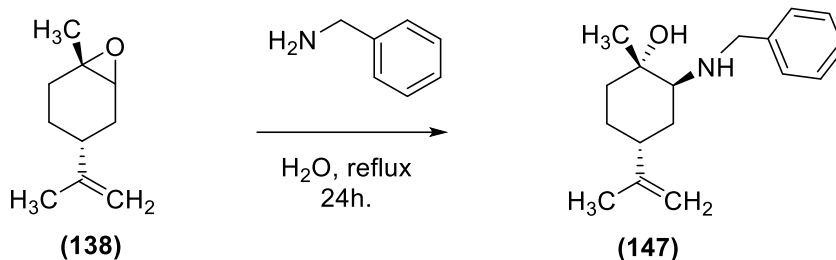
ทำ การ เปิด วง epoxide ของ (1S,4R,6R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (3) ด้วย Morpholine โดย oxygen บนวง epoxide ได้รับโปรตอนจาก H₂O จากนั้น NH ของ Morpholine เข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง เปิดวง epoxide ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (1S,2S,4R)-1-methyl-2-morpholino-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (144) 33 % สามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR ซึ่งจะปรากฏ multiplet peak 4 โปรตอนของ 2×CH₂N ที่ δ 2.46-2.57 ppm และพบสัญญาณ 4 โปรตอนของ 2×CH₂O ที่ δ 3.71 ppm



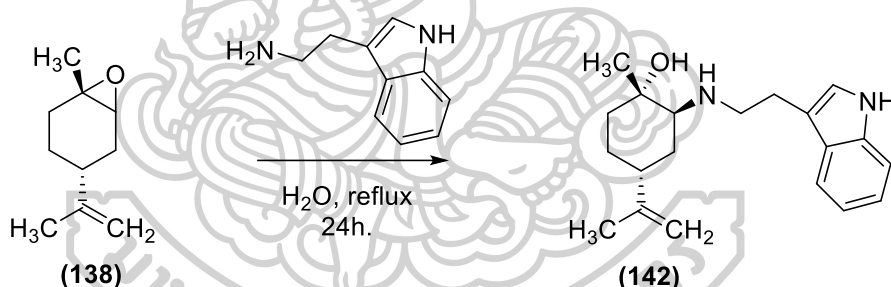
ทำการเปิดวง epoxide ของ (1S,4R,6R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-oxabicyclo[4.1.0]heptane (138) ด้วย Piperidine โดย oxygen บนวง epoxide ได้รับโปรตอนจาก H₂O จากนั้น NH ของ Piperidine เข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง เปิดวง epoxide ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (1S,2S,4R)-1-methyl-2-(piperidin-1-yl)-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (145) 30 % สามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR ซึ่งจะปรากฏ multiplet peak 6 โปรตอนบนวง Piperidine ที่ δ 1.33-1.70 ppm และ พบสัญญาณ multiplet peak 4 โปรตอนบนวง Piperidine ที่ δ 1.86-2.79 ppm



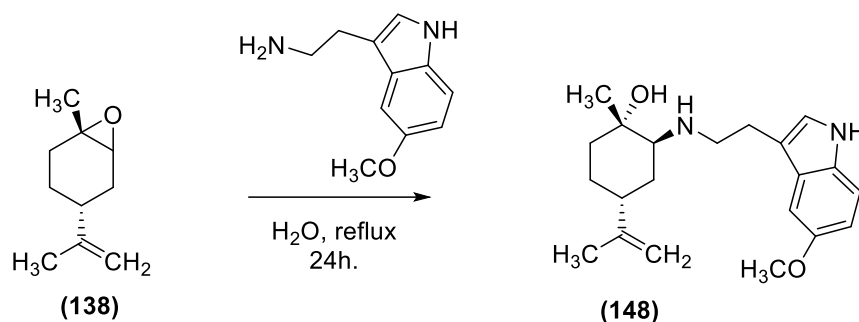
ทำการเปิดวง epoxide ของ (1S,4R,6R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-oxabicyclo[4.1.0]heptane (3) ด้วย Aniline โดย oxygen บนวง epoxide ได้รับโปรตอนจาก H₂O จากนั้น NH₂ ของ Aniline เข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง เปิดวง epoxide ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ((1S,2S,4R)-1-methyl-2-(phenylamino)-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (146) 23 % สามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR ซึ่งจะปรากฏ singlet peak 1 โปรตอนของ NH ที่ติดอยู่กับวงอะโรมาติก ที่เกิดจากการเปิดวง epoxide ที่ δ 3.53 ppm และพบสัญญาณโปรตอนตำแหน่งพันธะคู่โดยปรากฏ singlet peak 2 โปรตอนของ CH₂ ที่ 4.75



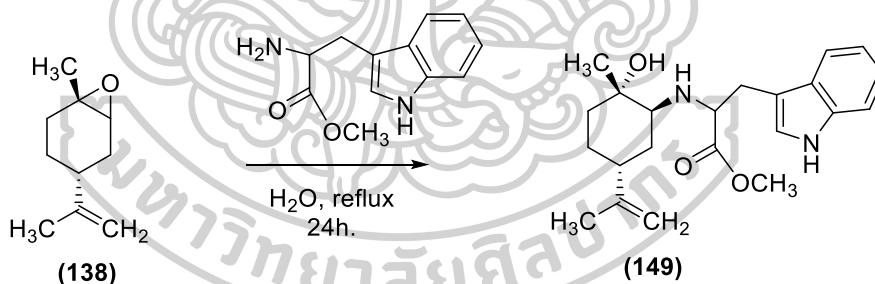
ทำการเปิดวง epoxide ของ (1S,4R,6R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-oxabicyclo[4.1.0]heptane (3) ด้วย Benzylamine โดย oxygen บนวง epoxide ได้รับโปรตอนจาก H₂O จากนั้น NH₂ ของ Benzylamine เข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง เปิดวง epoxide ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (1S,2S,4R)-2-(benzylamino)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (147) 14 % สามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR ซึ่งจะปรากฏ multiplet peak 5 โปรตอนบนวง aromatic ที่ δ 7.20-7.40 ppm



ทำการเปิดวง epoxide ของ (1S,4R,6R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-oxabicyclo[4.1.0]heptane (3) ด้วย Tryptamine โดย oxygen บนวง epoxide ได้รับโปรตอนจาก H₂O จากนั้น NH₂ ของ Tryptamine เข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง เปิดวง epoxide ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (1S,2S,4R)-2-((2-(1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (142) 7 % สามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR ซึ่งจะปรากฏ multiplet peak 6 โปรตอนบนวง indole ที่ δ 7.00-8.19 ppm



ทำการเปิดวง epoxide ของ (1S,4R,6R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-oxabicyclo[4.1.0]heptane (3) ด้วย 5-methoxy tryptamine โดย oxygen บนวง epoxide ได้รับโปรตอนจาก H₂O จากนั้น NH₂ ของ 5-methoxy tryptamine เข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง เปิดวง epoxide ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (1S,2S,4R)-2-((2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (148) 23 % สามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR ซึ่งจะปรากฏ multiplet peak 6 โปรตอนบนวง indole ที่ δ 6.77-8.32 ppm และพบสัญญาณโปรตอนตำแหน่งที่อยู่บนหมู่ methoxy โดยปรากฏ singlet peak 3 โปรตอนของ CH₃ ที่ 3.84 ppm



ทำการเปิดวง epoxide ของ (1S,4R,6R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-oxabicyclo[4.1.0]heptane (3) ด้วย tryptophan methoxy โดย oxygen บนวง epoxide ได้รับโปรตอนจาก H₂O จากนั้น NH₂ ของ tryptophan methoxy เข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง เปิดวง epoxide ได้ผลิตภัณฑ์เป็น methyl ((1S,2S,5R)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexyl)tryptophanate (149) 7 % สามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H-NMR ซึ่งจะปรากฏ multiplet peak 6 โปรตอนบนวง indole ที่ δ 6.99-8.12 ppm และพบสัญญาณโปรตอนตำแหน่งที่อยู่บนหมู่ methyl ester โดยปรากฏ singlet peak 3 โปรตอนของ CH₃ ที่ 3.64 ppm

ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่อนุพันธ์ของ limonene สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC)

สารประกอบ	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>B. cereus</i>
(143)	Nd	nd	512	nd	nd
(144)	Nd	nd	nd	nd	nd
(140)	Nd	nd	nd	nd	nd
(145)	512	nd	512	nd	512
(146)	Nd	nd	nd	nd	256
(139)	Nd	nd	nd	nd	nd
(147)	512	512	512	nd	nd

(142)	Nd	nd	nd	nd	512
(148)	128	512	nd	nd	512
(149)	Nd	nd	nd	nd	nd
chloramphenicol	31.25	≤1.9	≤1.9	≤1.9	3.9

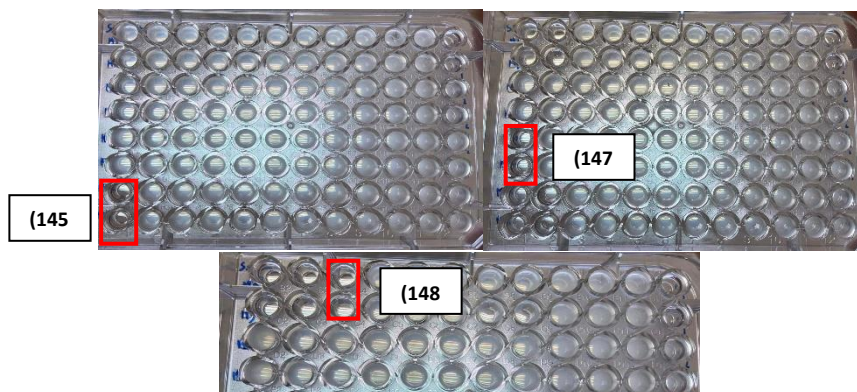
Nd; not detect

ตารางที่ 13 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่อนุพันธ์ของ limonene สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC)

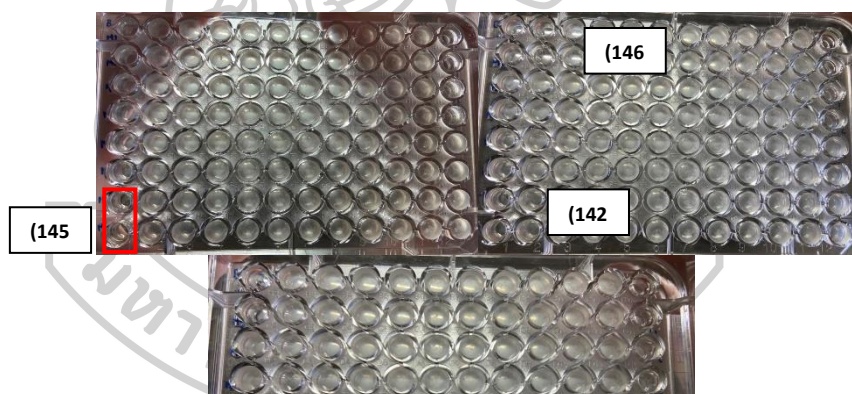
ในการทดสอบการต้านเซลล์มะเร็งของอนุพันธ์ของ limonene ที่สังเคราะห์ได้นั้น ผู้วิจัยจะนำไปจะทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดได้แก่ HepG2 Hela MDA และทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ LLC แต่เซลล์ตายเนื่องมาจากเกิด contaminate bacteria จึงไม่สามารถทดสอบได้

เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการต้านแบคทีเรียของอนุพันธ์ limonene ซึ่งทำการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* พบว่า (143) สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) เท่ากับ 512 µg/ml (145) สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* มีค่า MIC เท่ากับ 512 µg/ml (146) สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* มีค่า MIC เท่ากับ 256 µg/ml (147) สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* มีค่า MIC เท่ากับ 512 µg/ml (142) สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* มีค่า MIC เท่ากับ 512 µg/ml (148) สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* มีค่า MIC เท่ากับ 512 µg/ml, 128 µg/ml, 512 µg/ml ซึ่ง พบว่าอนุพันธ์ limonene ไม่สามารถ

ยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* และให้ฤทธิ์ไม่ดีในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด เมื่อเทียบกับยาที่ใช้ทดสอบ chloramphenicol



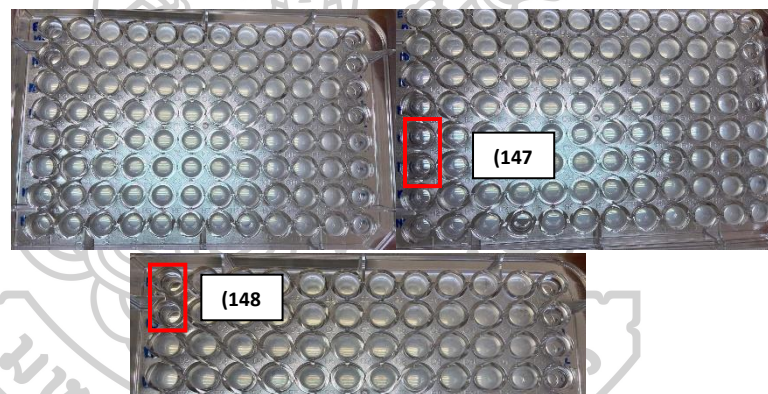
ภาพที่ 40 แสดงผลของ MIC (Minimum inhibitory concentrations) ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*



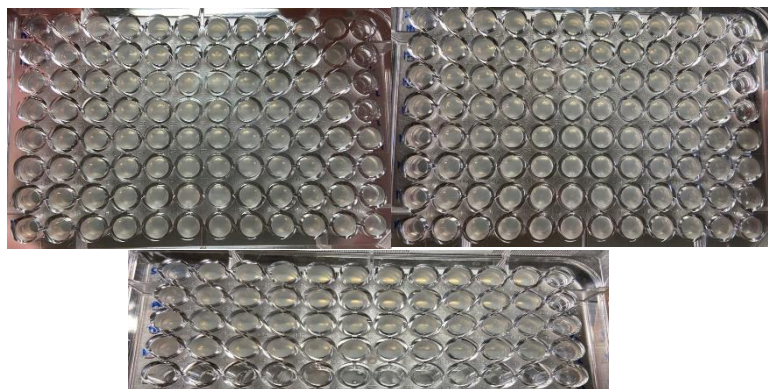
ภาพที่ 41 แสดงผลของ MIC (Minimum inhibitory concentrations) ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus*



ภาพที่ 42 แสดงผลของ MIC (Minimum inhibitory concentrations) ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*



ภาพที่ 43 แสดงผลของ MIC (Minimum inhibitory concentrations) ในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*



ภาพที่ 44 แสดงผลของ MIC (Minimum inhibitory concentrations) ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium*

ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) ต่อเชื้อ MRSA ที่แยกได้ (Sp2 Sp3 RI T2) ของอนุพันธ์ limonene

Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$) against MRSA isolates			
	Sp2	Sp3	RI	T2
(143)	64	64	128	128
(144)	>128	>128	>128	>128
(140)	128	128	128	128
(145)	64	64	64	64
(146)	32	32	32	32
(139)	>128	>128	>128	>128
(147)	64	64	64	64
(142)	16	16	16	16
(148)	16	16	16	16
(149)	>128	>128	>128	>128
Gentamicin	8	8	>128	>128
Chloramphenicol	8	8	16	16

ตารางที่ 14 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) ต่อเชื้อ MRSA ที่แยกได้ (Sp2, Sp3, RI, T2) ของอนุพันธ์ limonene

ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอนุพันธ์ limonene ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยวิธี broth microditiion เพื่อคัดกรองเชื้อ MRSA โดยเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (Sp2, Sp3) มีค่า MIC ต่ำ (143) ที่ประมาณ 64 µg/ml โดยเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (RI, T2) จะมีค่า MIC ต่ำ (143) ที่ประมาณ 128 µg/ml นอกจากนี้ เชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (Sp2, Sp3, RI, T2) จะมีค่า MIC ต่ำ (144), (139), (149) ที่ประมาณ >128 µg/ml มีค่า MIC ต่ำ (140) ที่ประมาณ 128 µg/ml มีค่า MIC ต่ำ (145), (147) ที่ประมาณ 64 µg/ml และมีค่า MIC ต่ำ (146) ที่ประมาณ 32 µg/ml มีค่า MIC ต่ำ (142), (148) ที่ประมาณ 16 µg/ml และให้ฤทธิ์ไม่ดีในการยับยั้งเชื้อ MRSA เมื่อเทียบกับยาที่ใช้ทดสอบ Gentamicin และ chloramphenicol

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแบบเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic antibacterial assay)

Compounds (µg/ml)	Ciprofloxacin (µg/ml)				
	0	16	32	64	128
(143)	64	64	64	64	32
(144)	>128	64	32	16	16
(140)	128	64	32	32	32
(145)	64	32	16	16	16
(146)	32	32	16	16	16
(139)	>128	>128	>128	>128	>128
(147)	64	32	16	16	16
(142)	16	16	16	16	16
(148)	16	16	16	16	16
(149)	>128	64	32	16	16

*MRSA; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Sp3 (clinical isolate): genotype; mecA positive, norA positive.

ตารางที่ 15 แสดงค่าผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแบบเสริมฤทธิ์กันของอนุพันธ์ limonene ที่มี Ciprofloxacin ต่อ MRSA Sp3

สารประกอบที่สังเคราะห์ขึ้นได้รับการทดสอบเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกับ MRSA Sp3 ผลการศึกษาพบว่า MIC ของ Ciprofloxacin ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเติมอนุพันธ์ limonene

ผลลัพธ์นี้แสดงให้เห็นว่า sensitivity ของ MRSA Sp3 ต่อ Ciprofloxacin ดีขึ้น การทดลองแต่ละครั้ง ทำซ้ำสามครั้ง (ตารางที่ 15) (145) และ (147) กระตุ้นผลเสริมฤทธิ์กันอย่างมีนัยสำคัญกับ Ciprofloxacin ในการต่อต้านเชื้อ MRSA Sp3 ดังนั้น MIC ของ Ciprofloxacin สามารถลดลงจาก 256 µg/ml เป็น 32 µg/ml เมื่อรวมกับ (145) และ (147) ที่ความเข้มข้น 16 µg/ml

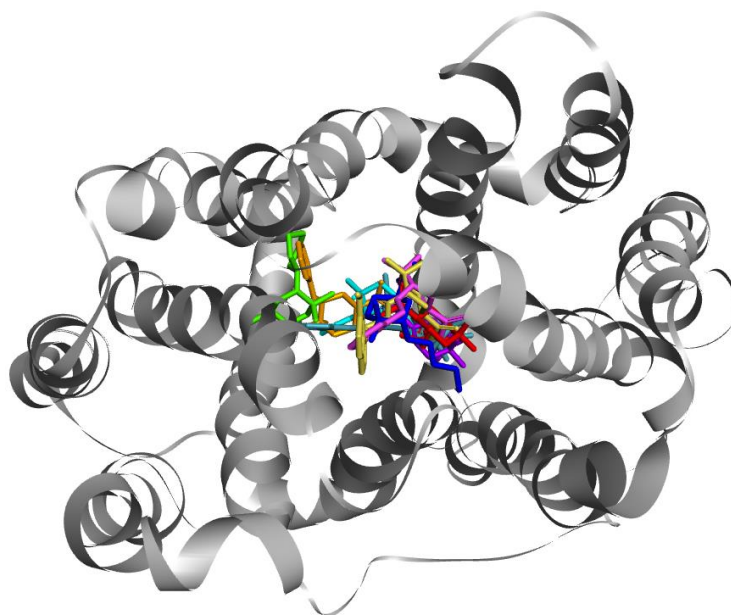
ผล Molecular Docking

1.The protein EmrD efflux pump from Escherichia coli (PDB ID: 2GFP)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จาก Molecular Docking ของอนุพันธ์ของ limonene ที่ ออกแบบใหม่ (143-149) โดยมีโปรตีน EmrD efflux pump from Escherichia coli เป็น receptor พบว่า มียาเพียง 9 ชนิดที่สามารถเข้าจับในที่อยู่โปรตีนได้ คือ (143), (144), (140), (145), (146), (147), (142), (148), (149) ดังแสดงในภาพที่ 44 โดยจะมี (139) ที่ไม่สามารถเข้าจับ ในบริเวณ active site นอกจากนี้ (149) มีค่า binding energy น้อยที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ -93.20 kcal/mol และมี ARG118 เป็น Amino acid residue ที่เกิด H-Bond

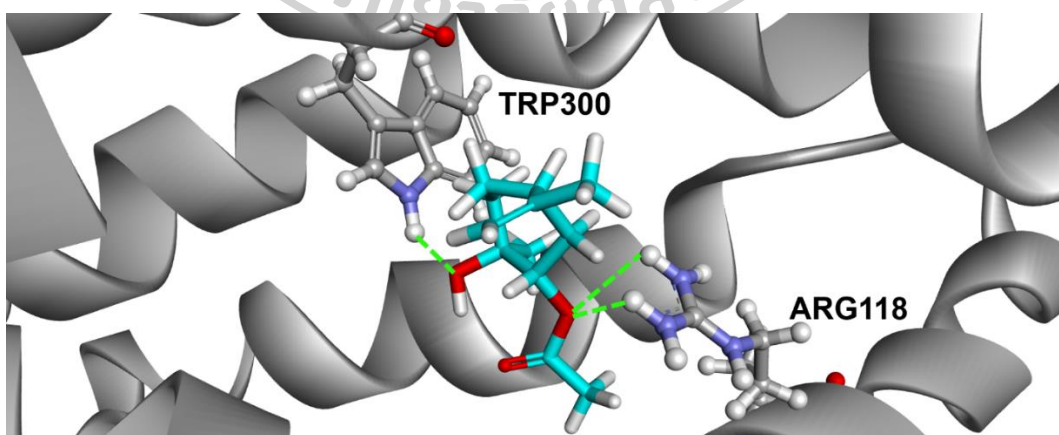
Compound	Binding energy (kcal/mol)	Amino acid residues	Hydrogen bond length (Å)
(143)	-70.69	-	-
(144)	-72.16	-	-
(140)	-67.89	ARG118, TRP300	2.73,2.19,2.38
(145)	-70.42	GLN24	2.42
(146)	-78.21	-	-
(139)	-	-	-
(147)	-79.83	VAL296	2.48
(142)	-85.74	-	-
(148)	-91.22	GLU227	2.28
(149)	-93.20	ARG118	1.89,2.01

ตารางที่ 16 แสดงผล Molecular Docking ของอนุพันธ์ของ limonene ที่ออกแบบใหม่ (143-149) โดยมีโปรตีน EmrD efflux pump from Escherichia coli เป็น receptor



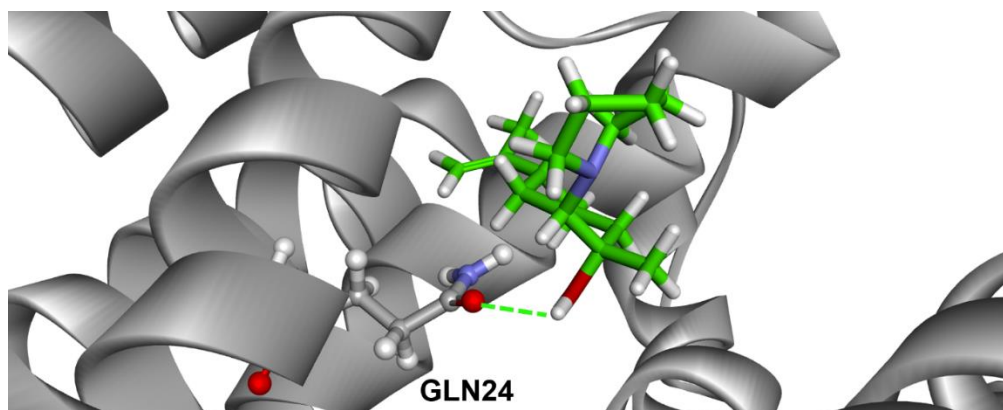
ภาพที่ 45 แสดงภาพการซ้อนทับของ (143)(blue), (144)(purple), (140)(cyan), (145)(green), (146)(orange), (147)(pink), (142)(red), (148)(yellow) และ (149)(light blue) กับ 2GFP

จากการนำผลที่ได้จาก Molecular docking มาพิจารณาลักษณะโครงสร้างที่เกิดระหว่างตัวยับยั้งที่ได้ออกแบบไว้ทั้ง 9 ตัวกับโปรตีน EmrD efflux pump from Escherichia coli ที่มีรหัสโครงสร้างโปรตีน 2GFP เพื่อหาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนกับตัวยับยั้งในบริเวณโพรงดังกล่าว พบข้อมูลดังต่อไปนี้



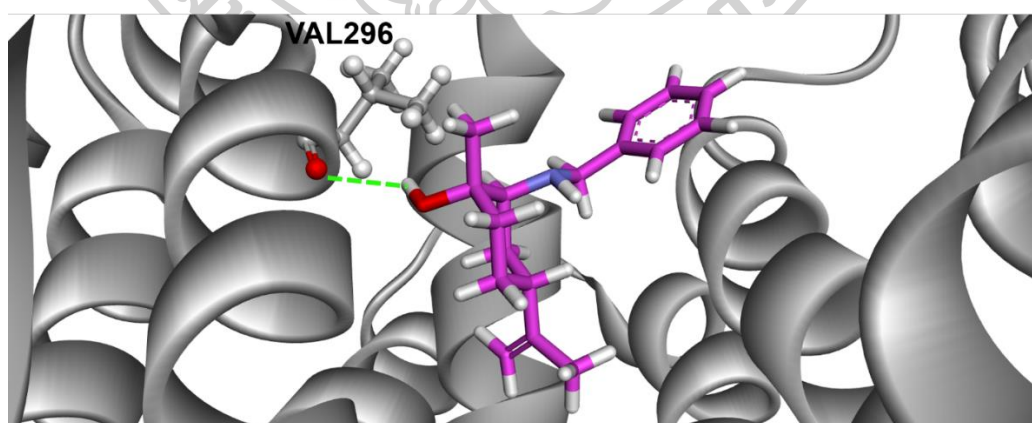
ภาพที่ 46 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (140) และ 2GFP

จากที่แสดงดังภาพที่ 46 พบว่ามีการเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างออกซิเจนที่หมู่เอสเทอร์กับหมู่อะมิโนของ ARG118:HH12 และ ARG118:HH22 ซึ่งมี Hydrogen bond length เท่ากับ 2.73 Å และ 2.19 Å ตามลำดับ และ หมู่ hydroxyl กับ หมู่อะมิโนของ TRP300:H ซึ่งมี Hydrogen bond length เท่ากับ 2.38 Å



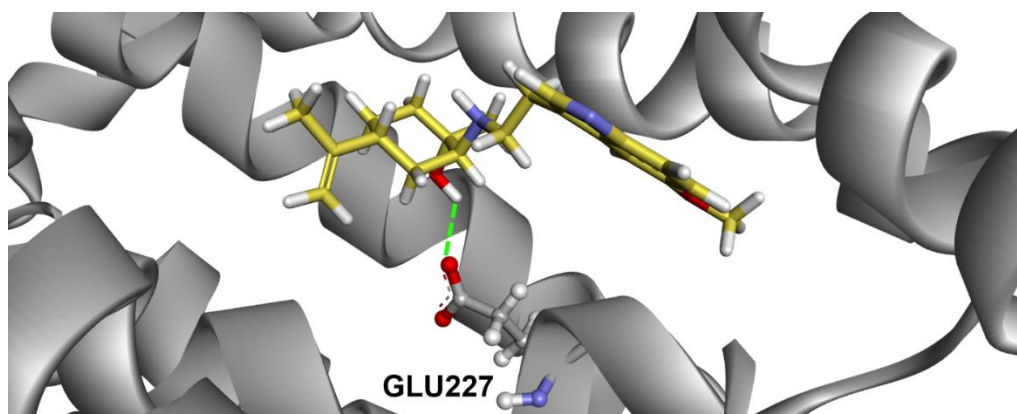
ภาพที่ 47 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (145) และ 2GFP

จากที่แสดงดังภาพที่ 47 พบว่ามีการเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ hydroxyl กับ หมู่อะมิโนของ GLN24:O ซึ่งมี Hydrogen bond length เท่ากับ 2.42 Å

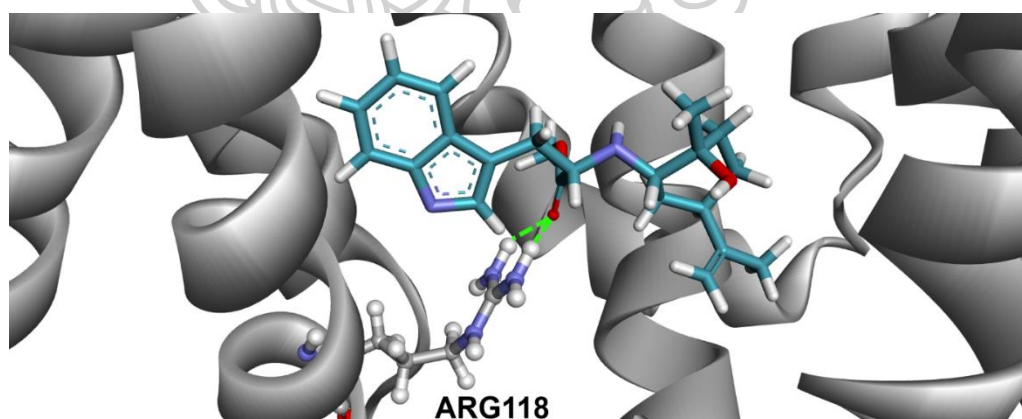


ภาพที่ 48 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (147) และ 2GFP

จากที่แสดงดังภาพที่ 48 พบว่ามีการเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ hydroxyl กับ หมู่อะมิโนของ VAL296:O ซึ่งมี Hydrogen bond length เท่ากับ 2.48 Å



ภาพที่ 49 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (148) และ 2GFP จากที่แสดงดังภาพที่ 49 พบว่ามีการเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ hydroxyl กับ หมู่อะมิโนของ GLU227:O ซึ่งมี Hydrogen bond length เท่ากับ 2.28 Å



ภาพที่ 50 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (149) และ 2GFP จากที่แสดงดังภาพที่ 50 พบว่ามีการเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ carbonyl กับ หมู่อะมิโนของ ARG118:HH12 และ ARG118:HH22 ซึ่งมี Hydrogen bond length เท่ากับ 1.89 Å และ 2.01 Å ตามลำดับ

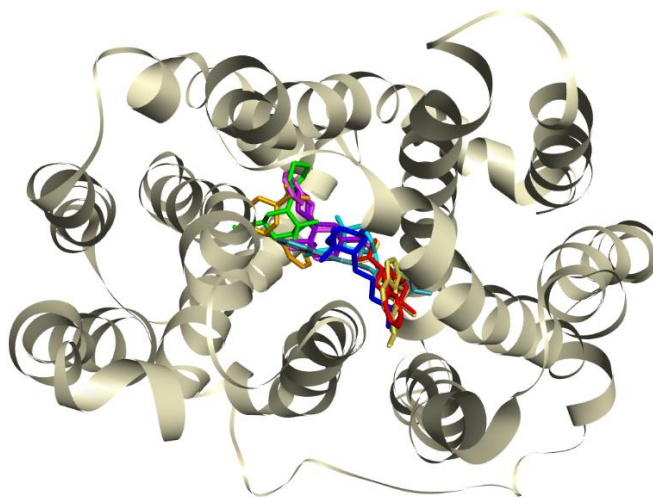
สำหรับโครงสร้างอีก 4 โครงสร้าง คือ (143), (144), (146) และ (142) ไม่มีการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ 2GPF แต่มีการเกิดแรงแวนเดอร์วาลส์กับกรดอะมิโนที่สำคัญคือ GLN24, TYR52, ARG118, ILE217, PHE249 และ TRP300

2.The model of NorA from Staphylococcus aureus (S. aureus)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จาก Molecular Docking ของ (143-149) ในโครงสร้างโปรตีนของ NorA จาก Staphylococcus aureus (S. aureus) ซึ่งได้โปรตีนต้นแบบมาจากโปรตีนที่มีรหัส PBD คือ 2GFP ซึ่งไม่มียาในโครงสร้างผลึก พบว่ามีอนุพันธ์ของ limonene เพียง 9 โครงสร้างที่สามารถเข้าจับในที่อยู่ในโปรตีนได้พอดี คือ (143), (144), (140), (145), (146), (147), (142), (148), (149) ดังแสดงในภาพที่ 50 และมีเพียงโครงสร้าง (139) ที่ไม่สามารถเข้าจับในบริเวณ active site นอกจากนี้ ยังพบว่า (148) มีค่า binding energy น้อยที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ -94.13 kcal/mol โดยเกิดการเกิดอันตรกิริยาเกิดแบบใช้แรงแวนเดอร์วาลส์กับโครงสร้างโปรตีน

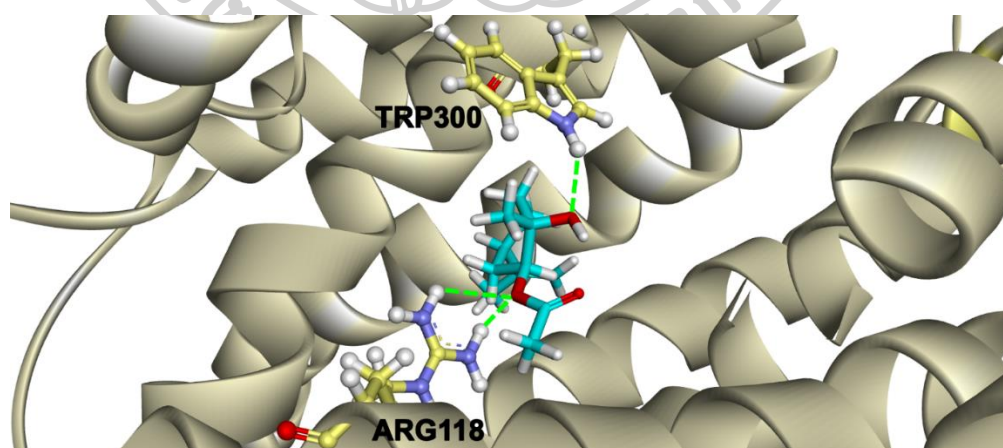
Compound	Binding energy (kcal/mol)	Amino acid residues	Hydrogen bond length (Å)
(143)	-70.70	-	-
(144)	-70.91	-	-
(140)	-67.90	ARG118, TRP300	2.74,2.20,2.38
(145)	-70.43	GLN24	2.42
(146)	-82.11	MET139	2.03
(139)	-	-	-
(147)	-81.14	-	-
(142)	-92.58	-	-
(148)	-94.13	-	-
(149)	-93.00	ARG118	1.89,2.02

ตารางที่ 17 แสดงผล Molecular Docking ของอนุพันธ์ของ limonene ที่ออกแบบใหม่ ในโครงสร้างโปรตีนของ (143-149) NorA จาก Staphylococcus aureus (S. aureus)



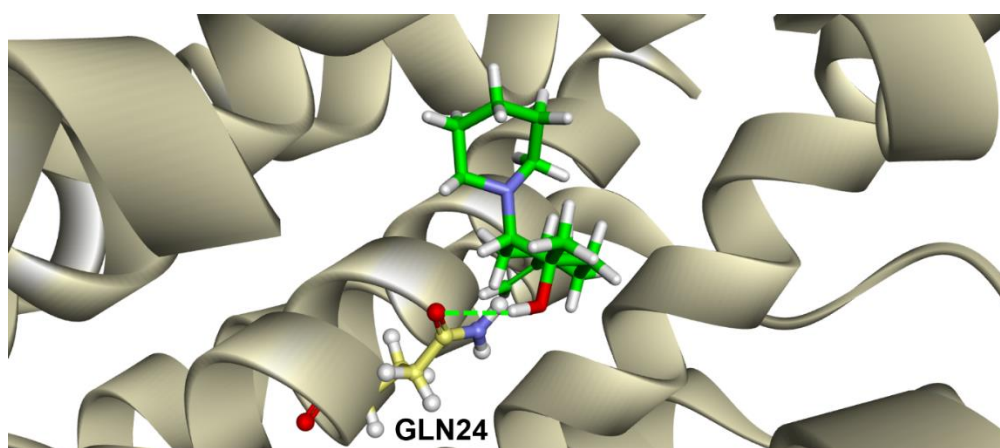
ภาพที่ 51 แสดงภาพการซ้อนทับของ (143)(blue), (144)(purple), (140)(cyan), (145)(green), (146)(orange), (147)(pink), (142)(red), (148)(yellow) และ (149)(light blue) กับ *S. aureus* NorA model

จากการนำผลที่ได้จาก Molecular docking มาพิจารณาลักษณะโครงสร้างที่เกิดระหว่างตัวยับยั้งที่ได้ออกแบบไว้ทั้ง 9 ตัวกับโปรตีน *S. aureus* NorA model ที่มีโครงสร้างต้นแบบคือโปรตีน EmrD efflux pump from *Escherichia coli* (PDB ID :2GFP) เพื่อหาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนกับตัวยับยั้งในบริเวณโพรงดังกล่าว พบข้อมูลดังต่อไปนี้

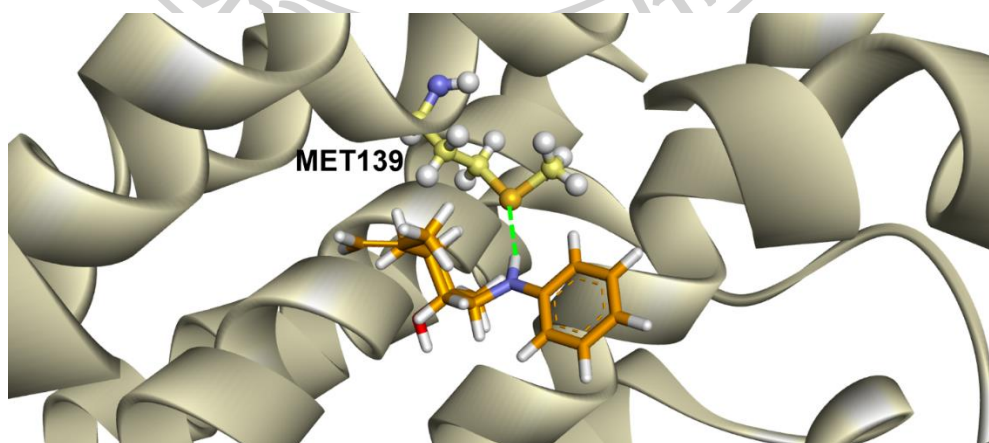


ภาพที่ 52 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (140) และ *S. aureus* NorA model

จากที่แสดงดังภาพที่ 52 พบว่ามีการเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างออกซิเจนที่หมู่เอสเทอร์กับหมู่อะมิโนของ ARG118:HH12 และ ARG118:HH22 ซึ่งมี Hydrogen bond length เท่ากับ 2.74 Å และ 2.20 Å ตามลำดับ และ หมู่ hydroxyl กับ หมู่อะมิโนของ TRP300:H ซึ่งมี Hydrogen bond length เท่ากับ 2.38 Å

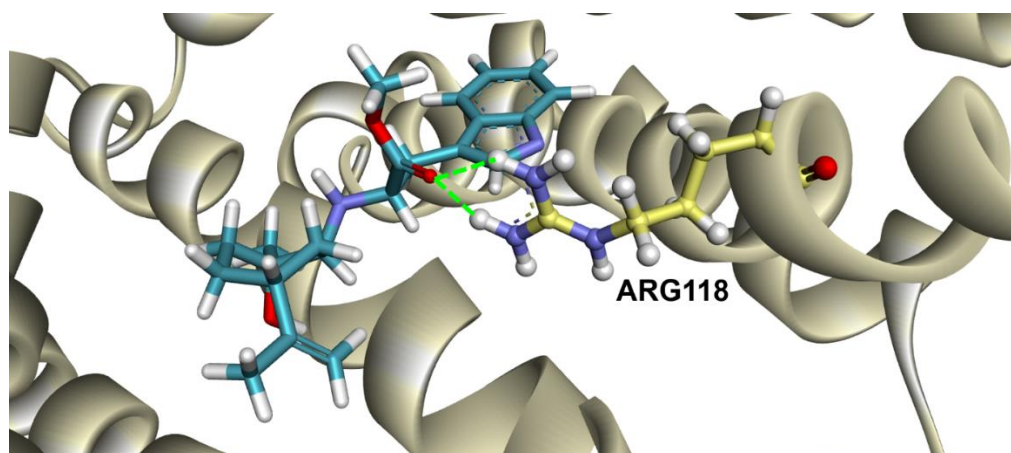


ภาพที่ 53 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (145) และ *S. aureus* NorA model จากที่แสดงดังภาพที่ 53 พบว่ามีการเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ hydroxyl กับ หมู่อะมิโนของ GLN24:O ซึ่งมี Hydrogen bond length เท่ากับ 2.42 Å



ภาพที่ 54 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (146) และ *S. aureus* NorA model

จากที่แสดงดังภาพที่ 54 พบว่ามีการเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างไฮโดรเจนอะตอมที่อยู่บนไนโตรเจน กับ หมู่อะมิโนของ MET139:S ซึ่งมี Hydrogen bond length เท่ากับ 2.03 Å



ภาพที่ 55 การเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง (149) และ *S. aureus* NorA model

จากที่แสดงดังภาพที่ 55 พบว่ามีการเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ carbonyl กับ หมู่อะมิโนของ ARG118:HH12 และ ARG118:HH22 ซึ่งมี Hydrogen bond length เท่ากับ 1.89 Å และ 2.02 Å ตามลำดับ

สำหรับโครงสร้างอีก 5 โครงสร้าง คือ (143), (144), (147), (142) และ (148) ไม่มีการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ *S. aureus* NorA model แต่มีการเกิดแรงแวนเดอร์วาลส์กับกรดอะมิโนที่สำคัญ คือ GLN24, TYR52, ARG118, ILE217, PHE249 และ TRP300

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พยายามสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cannabidiol (1) ในแผนการสังเคราะห์ที่ 1 นั้น เริ่มทำการสังเคราะห์จากการนำ cannabidiol (1) มาทำปฏิกิริยา Methylation เพื่อทำการ protect หมู่ hydroxy ด้วย reagent ต่างๆ แต่พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาที่ต้องการ ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ (2*R*)-2',6'-dimethoxy-5-methyl-4'-pentyl-2-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1,1'-biphenyl (131) จึงไม่สามารถนำไปทำปฏิกิริยา Epoxidation ต่อได้

ในแผนการสังเคราะห์ที่ 2 ผู้วิจัยต้องการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cannabidiol (1) โดยเริ่มต้นการสังเคราะห์นำ cannabidiol (1) ไปทำปฏิกิริยา Hydrogenation จะให้ (2'*S*)-2'-isopropyl-5'-methyl-4'-pentyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-2,6-diol (132) 58 % จากนั้นจะทำปฏิกิริยา Epoxidation กับ 3-Chloro-perbenzoic acid แต่ไม่เกิดปฏิกิริยา จึงคาดว่าต้องทำการ protect หมู่ hydroxy ก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำ (2'*S*)-2'-isopropyl-5'-methyl-4'-pentyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-2,6-diol (132) มาทำปฏิกิริยากับ TMSCl ได้เป็น (((2'*S*)-2'-isopropyl-5'-methyl-4'-pentyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-2,6-diol)bis(oxy))bis(trimethylsilane) (134) 48 % และนำมาทำปฏิกิริยา Oxidation พบว่าสารตั้งต้นเกิดการสลายตัว ไม่เกิดปฏิกิริยาที่ต้องการ

ในแผนการสังเคราะห์ที่ 3 ผู้วิจัยนำ cannabidiol ไปทำปฏิกิริยา Methylation ตามแนวทางในการสังเคราะห์วิธี 1 แต่ใช้ CH₃I ในการทำปฏิกิริยา จะได้ (2*R*)-2',6'-dimethoxy-5-methyl-4'-pentyl-2-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1,1'-biphenyl (131) 71 % จากนั้นทำปฏิกิริยา Epoxidation กับ *m*-CPBA เกิดเป็นวง epoxide จะได้ (1*S*,4*R*,6*R*)-5-(2,6-dimethoxy-4-pentylphenyl)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (136) 45 % เพื่อนำมาเป็น intermediate ในการสังเคราะห์โดยการเปิดวง epoxide ด้วยนิวคลีโอไฟล์ชนิดต่างๆ แต่พบว่าไม่เกิดการเปิดวง epoxide เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ (+)-limonene (36) โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ (1*S*,2*S*,4*R*)-2-bromo-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexan-1-ol (137) ผ่านปฏิกิริยา bromination จากนั้นเติม NaOH เข้าไปทำปฏิกิริยาต่อได้ผลิตภัณฑ์เป็น (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (138) จากนั้นทำการเปิดวง epoxide ด้วยนิวคลีโอไฟล์ โดยใช้ปฏิกิริยา hydroxylation เพื่อให้ได้อนุพันธ์ของ (+)-limonene (36) เมื่อทำปฏิกิริยากับ 1% H₂SO₄ พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์เป็น (1*S*,2*S*,4*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-

yl)cyclohexane-1,2-diol (**139**) 8.75% และเมื่อทำปฏิกิริยากับ CH_3COONa พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ เป็น (5*R*)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexyl acetate (**140**) 2.88% แต่เมื่อนำ (5*R*)-2-hydroxy-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohexyl acetate (**140**) มาทำ pyrolysis ต่อพบว่าไม่เกิดผลิตภัณฑ์ และเมื่อทำการเปิดวง epoxide ของ (1*S*,4*R*,6*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane (**142**) ด้วยกรดอะมิโน โดยใช้กรดอะมิโน Tryptamine ในการทำปฏิกิริยา 2 สภาวะ พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาทั้ง 2 สภาวะ ผู้วิจัยจึงทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ (+)-limonene (**36**) ในสภาวะอื่น โดยเริ่มต้นการสังเคราะห์จาก (1*S*,2*S*,4*R*)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohexane-1,2-diol (**139**)) มาทำการเปิดวง epoxide ด้วย amine ต่างๆ โดยใช้ H_2O และ reflux เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้อนุพันธ์ของ (+)-limonene (**36**) ปริมาณ 7-48 %

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ผู้วิจัยจะนำไปจะทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด ได้แก่ HepG2 Hela MDA และทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ LLC แต่เซลล์ตายเนื่องมาจากเกิด contaminate bacteria ทำให้ไม่สามารถทดสอบได้ จึงทำการศึกษาความสามารถในการต้านแบคทีเรียของอนุพันธ์ limonene ซึ่งทำการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* พบว่า (**148**) สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC 128 $\mu\text{g/ml}$ แต่ยังไม่ดีในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด เมื่อเทียบกับยาที่ใช้ทดสอบ chloramphenicol

ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอนุพันธ์ limonene ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยวิธี broth microditiion เพื่อคัดกรองเชื้อ MRSA โดยเชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (Sp2, Sp3) มีค่า MIC ต่อ (**142**), (**148**) ที่ประมาณ 16 $\mu\text{g/ml}$ แต่ให้ฤทธิ์ไม่ดีในการยับยั้งเชื้อ MRSA เมื่อเทียบกับยาที่ใช้ทดสอบ Gentamicin และ chloramphenicol นอกจากนี้เชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย (RI, T2) มีค่า MIC ต่อ (**142**), (**148**) ที่ประมาณ 16 $\mu\text{g/ml}$ และให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ MRSA ดีกว่ายาที่ใช้ทดสอบ Gentamicin

อนุพันธ์ของ (+)-limonene (**36**) ที่สังเคราะห์ขึ้นได้รับการทดสอบเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกับ MRSA Sp3 พบว่า MIC ของ Ciprofloxacin ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเติมอนุพันธ์ ของ (+)-limonene (**36**) แสดงให้เห็นว่า sensitivity ของ MRSA Sp3 ต่อ Ciprofloxacin ดีขึ้น โดยที่ (**145**) และ (**147**) กระตุ้นผลเสริมฤทธิ์กันอย่างมีนัยสำคัญกับ Ciprofloxacin ในการต่อต้านเชื้อ MRSA Sp3 ดังนั้น MIC ของ Ciprofloxacin สามารถลดลงจาก 256 $\mu\text{g/ml}$ เป็น 32 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อรวมกับ (**145**) และ (**147**) ที่ความเข้มข้น 16 $\mu\text{g/ml}$

จากโครงสร้างอนุพันธ์ limonene ที่ออกแบบใหม่ทั้ง 10 โครงสร้าง สำหรับโปรตีน EmrD efflux pump from *Escherichia coli* พบว่า โครงสร้างที่ดีที่สุด คือ (**149**) เนื่องจากมี ค่า binding

energy น้อยที่สุด เท่ากับ -93.20 kcal/mol และพบว่า มี Amino acid residue ที่สำคัญ คือ ARG118 ส่วนโปรตีน NorA จาก *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ซึ่งได้โปรตีนต้นแบบมาจากโปรตีนที่มีรหัส PBD คือ 2GFP พบว่า โครงสร้างที่ดีที่สุด คือ (148) มีค่า binding energy น้อยที่สุด เท่ากับ -94.13 kcal/mol โดยการเกิดอันตรกิริยาเกิดแบบใช้แรงแวนเดอร์วาลส์กับโครงสร้างโปรตีน โดยมีกรดอะมิโนที่สำคัญคือ ILE217



รายการอ้างอิง

1. Kozela, E., et al., *HU-446 and HU-465, Derivatives of the Non-psychoactive Cannabinoid Cannabidiol, Decrease the Activation of Encephalitogenic T Cells*. *Chemical biology & drug design*, 2016. **87**(1): p. 143-153.
2. Leite, R., et al., *Anticonvulsant effects of the (-) and (+) isomers of cannabidiol and their dimethylheptyl homologs*. *Pharmacology*, 1982. **24**(3): p. 141-146.
3. Mechoulam, R., N. Lander, and J. Zahalka, *Synthesis of the individual, pharmacologically distinct, enantiomers of a tetrahydrocannabinol derivative*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1990. **1**(5): p. 315-318.
4. Hanuš, L., et al., *HU-308: a specific agonist for CB2, a peripheral cannabinoid receptor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(25): p. 14228-14233.
5. Kinney, W.A., et al., *Discovery of KLS-13019, a cannabidiol-derived neuroprotective agent, with improved potency, safety, and permeability*. *ACS medicinal chemistry letters*, 2016. **7**(4): p. 424-428.
6. Breuer, A., et al., *Fluorinated cannabidiol derivatives: enhancement of activity in mice models predictive of anxiolytic, antidepressant and antipsychotic effects*. *PLoS One*, 2016. **11**(7): p. e0158779.
7. Takeda, S., et al., *Cannabidiol-2', 6'-dimethyl ether, a cannabidiol derivative, is a highly potent and selective 15-lipoxygenase inhibitor*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2009. **37**(8): p. 1733-1737.
8. Haj, C.G., et al., *HU-444, a novel, potent anti-inflammatory, nonpsychotropic cannabinoid*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2015. **355**(1): p. 66-75.
9. Carlini, E.A., R. Mechoulam, and N. Lander, *Anticonvulsant activity of four oxygenated cannabidiol derivatives*. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 1975. **12**(1): p. 1-15.
10. Mechoulam, R., Z. Ben-Zvi, and Y. Gaoni, *Hashish—XIII: On the nature of the beam test*. *Tetrahedron*, 1968. **24**(16): p. 5615-5624.

11. Razdan, R.K., H.C. Dalzell, and G.R. Handrick, *Hashish. X. Simple one-step synthesis of (-)- DELTA. 1-tetrahydrocannabinol (THC) from p-mentha-2, 8-dien-1-ol and olivetol*. Journal of the American Chemical Society, 1974. **96**(18): p. 5860-5865.
12. Appendino, G., et al., *Antibacterial cannabinoids from Cannabis sativa: a structure– activity study*. Journal of natural products, 2008. **71**(8): p. 1427-1430.
13. McKillop, A.M., et al., *Metabolic effects of orally administered small-molecule agonists of GPR55 and GPR119 in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic and incretin-receptor-knockout mice*. Diabetologia, 2016. **59**(12): p. 2674-2685.
14. Krohn, R.M., et al., *Abnormal cannabidiol attenuates experimental colitis in mice, promotes wound healing and inhibits neutrophil recruitment*. Journal of inflammation, 2016. **13**(1): p. 1-11.
15. Johns, D., et al., *The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects*. British journal of pharmacology, 2007. **152**(5): p. 825-831.
16. C Ashton, J., *The atypical cannabinoid O-1602: targets, actions, and the central nervous system*. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents), 2012. **12**(3): p. 233-239.
17. Romero-Zerbo, S.Y., et al., *A role for the putative cannabinoid receptor GPR55 in the islets of Langerhans*. Journal of endocrinology, 2011. **211**(2): p. 177.
18. El-Alfy, A.T., et al., *Antidepressant-like effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from Cannabis sativa L*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2010. **95**(4): p. 434-442.
19. Borrelli, F., et al., *Beneficial effect of the non-psychoactive plant cannabinoid cannabigerol on experimental inflammatory bowel disease*. Biochemical pharmacology, 2013. **85**(9): p. 1306-1316.
20. Li, Z.-H., et al., *Antibacterial activity and mechanisms of essential oil from Citrus medica L. var. sarcodactylis*. Molecules, 2019. **24**(8): p. 1577.

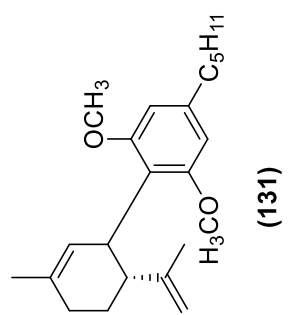
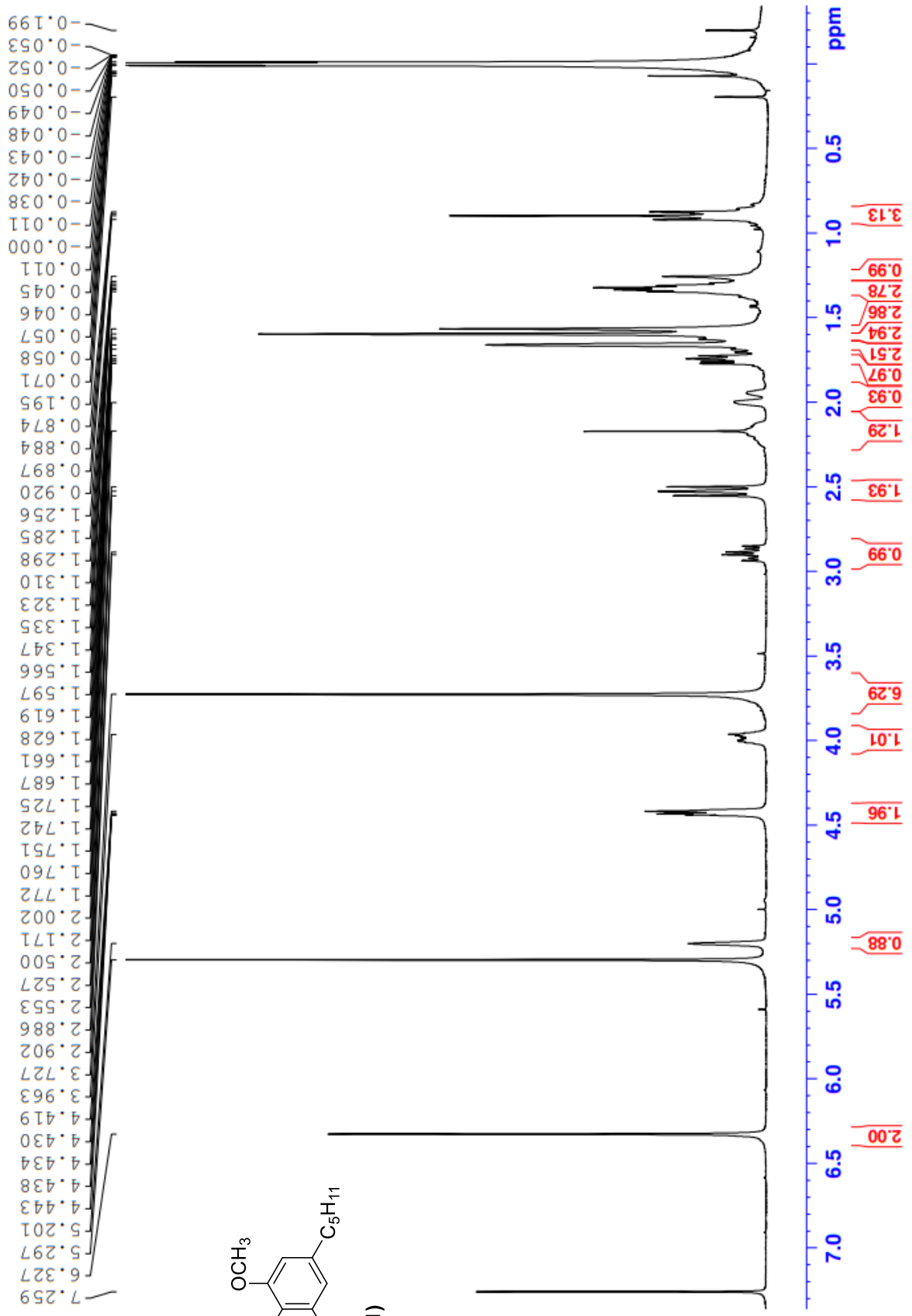
21. Han, Y., Z. Sun, and W. Chen, *Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against Listeria monocytogenes*. *Molecules*, 2019. **25**(1): p. 33.
22. Vuuren, S.v. and A.M. Viljoen, *Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1, 8-cineole alone and in combination*. *Flavour and fragrance journal*, 2007. **22**(6): p. 540-544.
23. Keinan, E., et al., *Natural ozone scavenger prevents asthma in sensitized rats*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2005. **13**(2): p. 557-562.
24. Elson, C.E., et al., *Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 1988. **9**(2): p. 331-332.
25. Wattenberg, L., *Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents*. *Cancer Research*, 1983. **43**(5 Suppl): p. 2448s-2453s.
26. Elegbede, J.A., et al., *Regression of rat primary mammary tumors following dietary d-limonene*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1986. **76**(2): p. 323-325.
27. Maltzman, T.H., et al., *The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by d-limonene and orange oil*. *Carcinogenesis*, 1989. **10**(4): p. 781-783.
28. Dietrich, D.R. and J.A. Swenberg, *The presence of α_2 -globulin is necessary for d-limonene promotion of male rat kidney tumors*. *Cancer research*, 1991. **51**(13): p. 3512-3521.
29. Haag, J.D., M.J. Lindstrom, and M.N. Gould, *Limonene-induced regression of mammary carcinomas*. *Cancer research*, 1992. **52**(14): p. 4021-4026.
30. Kawamori, T., et al., *Inhibitory effects of d-limonene on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats*. *Carcinogenesis*, 1996. **17**(2): p. 369-372.
31. Ji, J., et al., *RETRACTED ARTICLE: Induction of apoptosis by d-limonene is mediated by a caspase-dependent mitochondrial death pathway in human leukemia cells*. *Leukemia & lymphoma*, 2006. **47**(12): p. 2617-2624.
32. Graebin, C.S., et al., *Synthesis and in vitro activity of limonene derivatives*

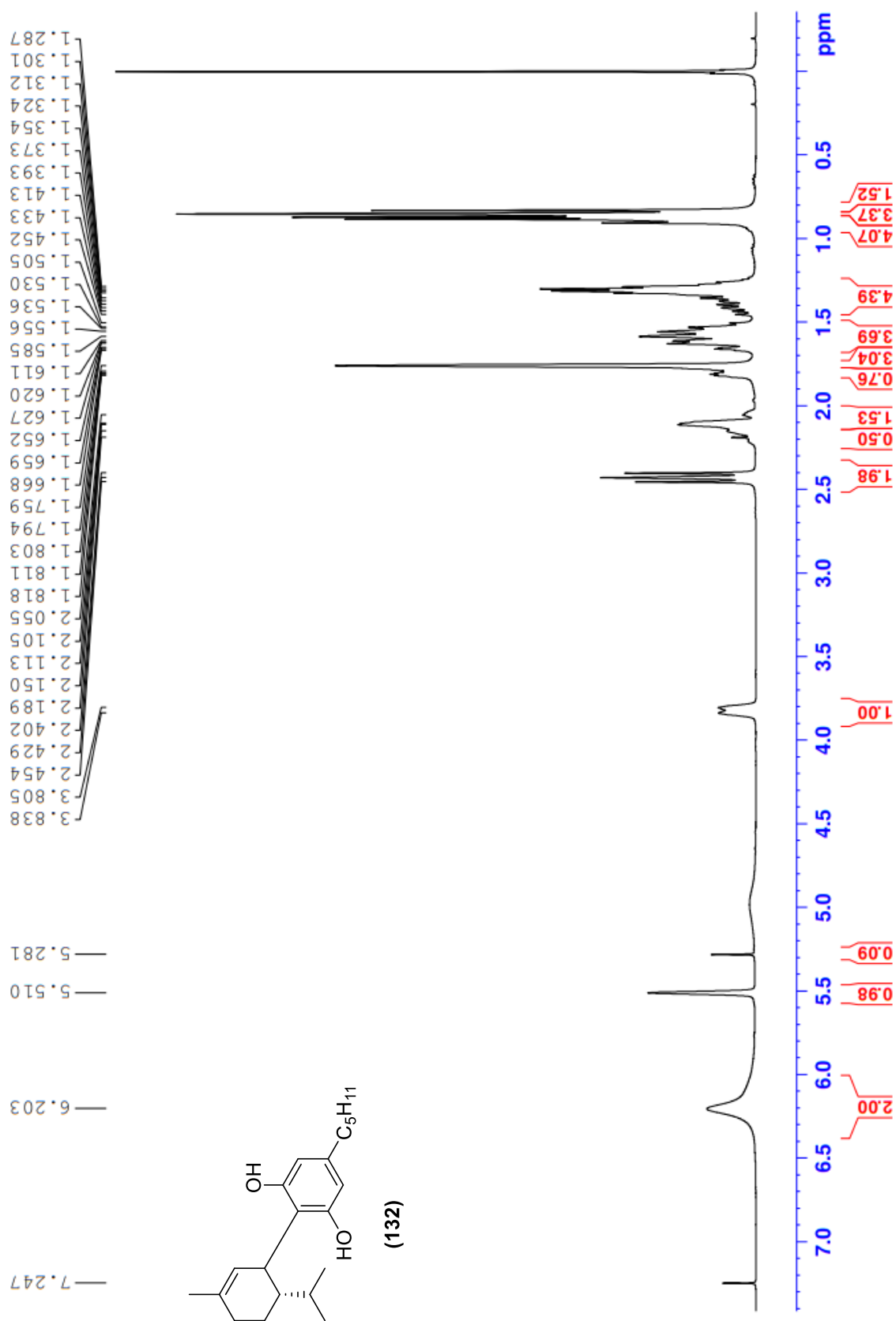
- against Leishmania and Trypanosoma*. European journal of medicinal chemistry, 2010. **45**(4): p. 1524-1528.
33. Ferrarini, S.R., et al., *Synthesis of limonene β -amino alcohol derivatives in support of new antileishmanial therapies*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2008. **103**: p. 773-777.
 34. Usami, N., et al., *Synthesis and pharmacological evaluation in mice of halogenated cannabidiol derivatives*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 1999. **47**(11): p. 1641-1645.
 35. Tchilibon, S. and R. Mechoulam, *Synthesis of a primary metabolite of cannabidiol*. Organic Letters, 2000. **2**(21): p. 3301-3303.
 36. Mechoulam, R. and L. Hanuš, *Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects*. Chemistry and physics of lipids, 2002. **121**(1-2): p. 35-43.
 37. Kogan, N.M., et al., *Synthesis and antitumor activity of quinonoid derivatives of cannabinoids*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**(15): p. 3800-3806.
 38. Wolinsky, J. and W. Barker, *The synthesis of 1-acetyl-4-isopropenyl-1-cyclopentene*. Journal of the American Chemical Society, 1960. **82**(3): p. 636-638.
 39. Castro, F.d.L., et al., *A Novel synthesis of 1-Acetyl-4-Isopropenyl-1-Cyclopentene by chemoselective cyclization of 4-Methyl-3-(Oxobutyl)-4-Pentenal: an important intermediate for natural product synthesis*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 1999. **10**: p. 112-116.
 40. Royals, E.E. and J.C. Leffingwell, *Reactions of the limonene 1, 2-oxides. I. The stereospecific reactions of the (+)-cis- and (+)-trans-limonene 1, 2-oxides*. The Journal of Organic Chemistry, 1966. **31**(6): p. 1937-1944.
 41. Rehman, A., et al., *Highly selective, sustainable synthesis of limonene cyclic carbonate from bio-based limonene oxide and CO₂: A kinetic study*. Journal of CO₂ Utilization, 2019. **29**: p. 126-133.

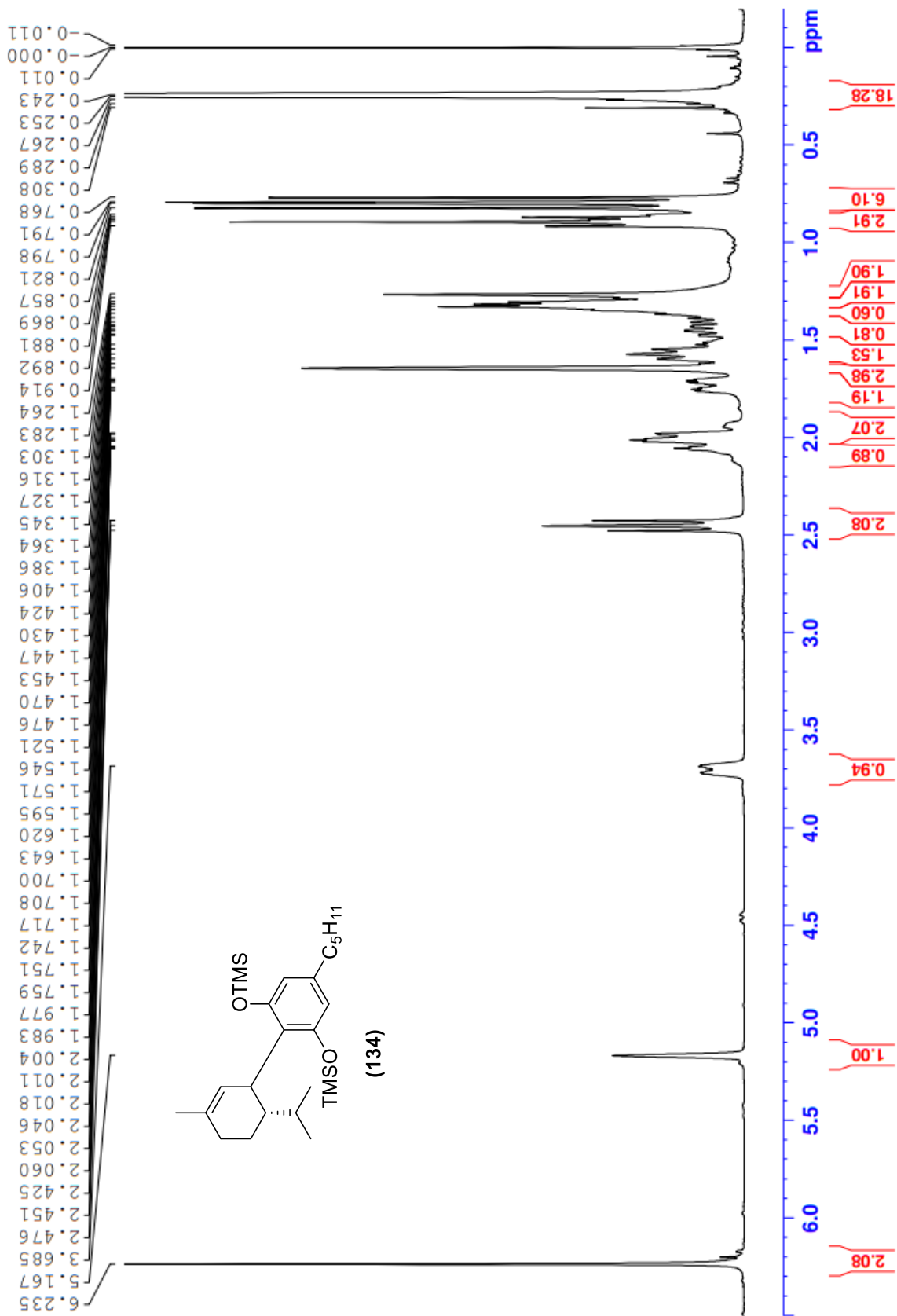


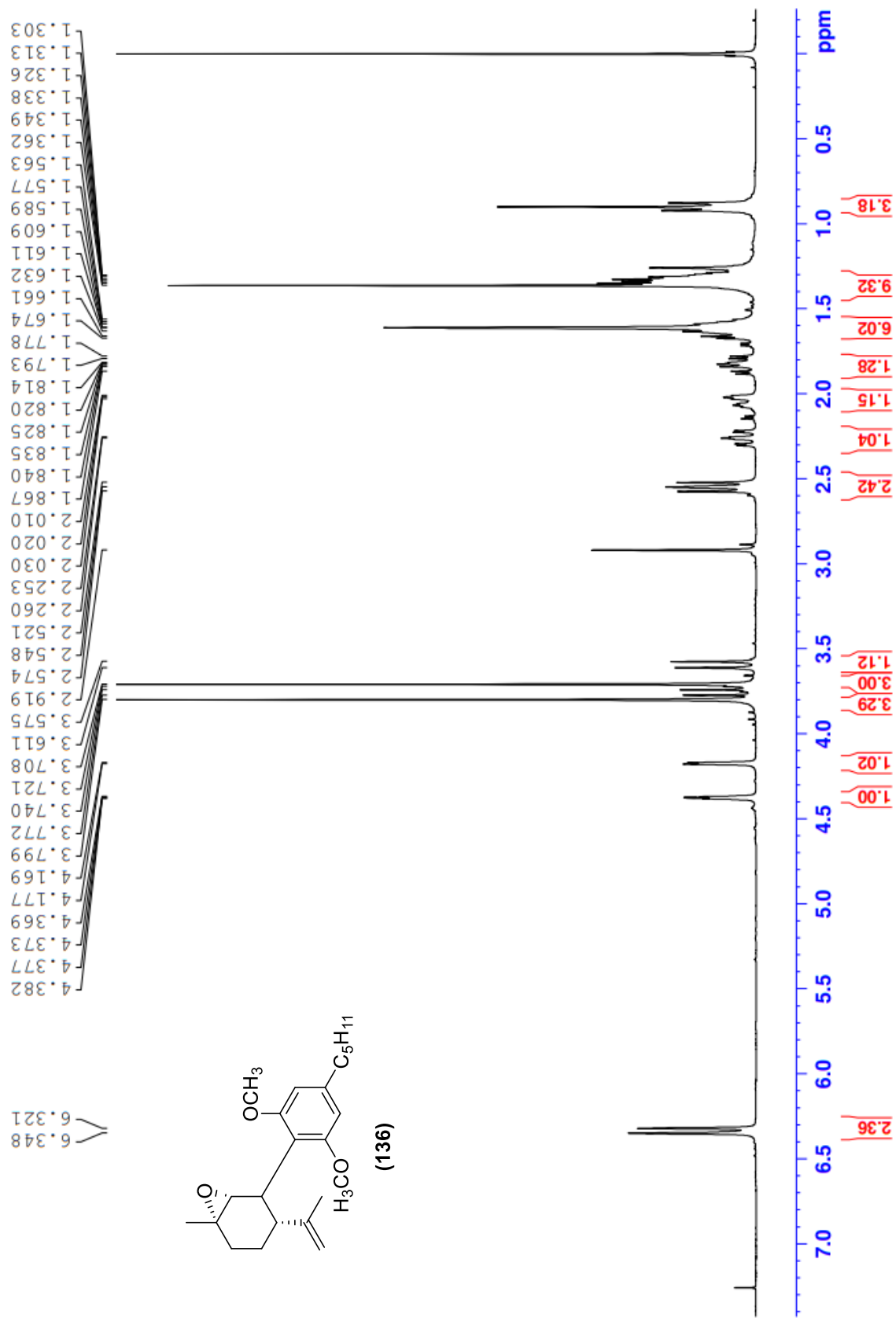
ภาคผนวก

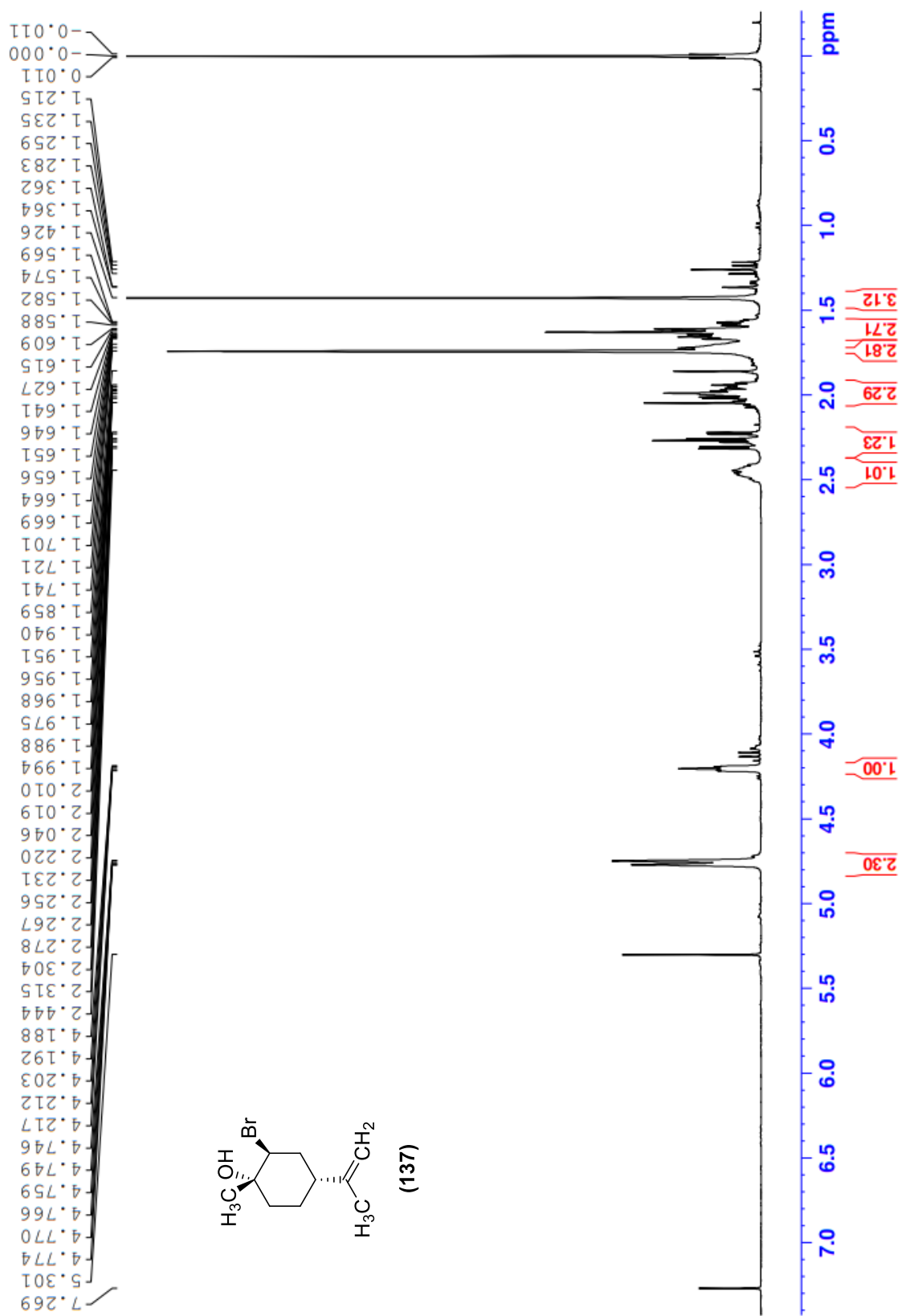
สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$

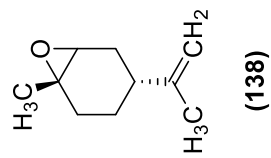
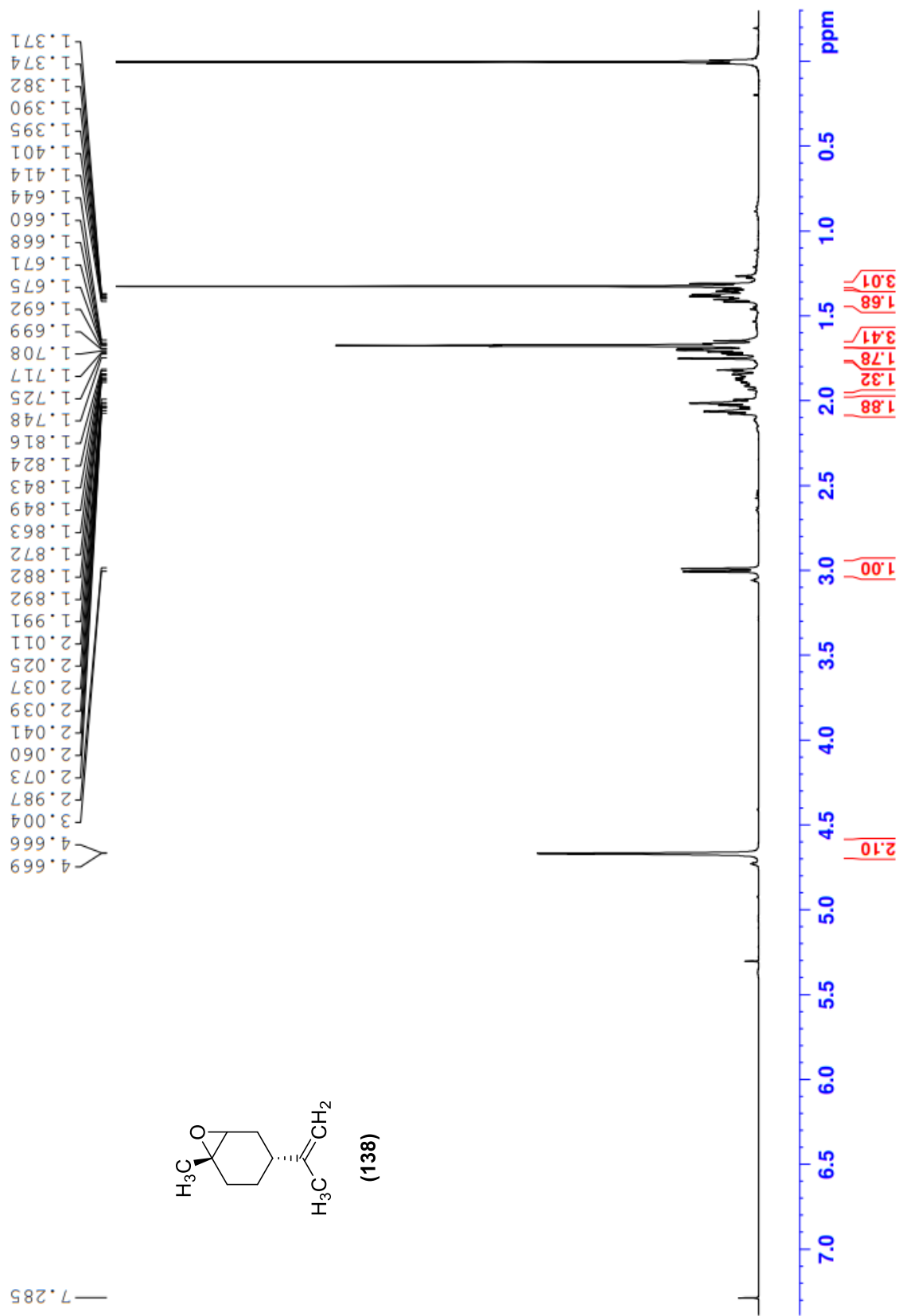




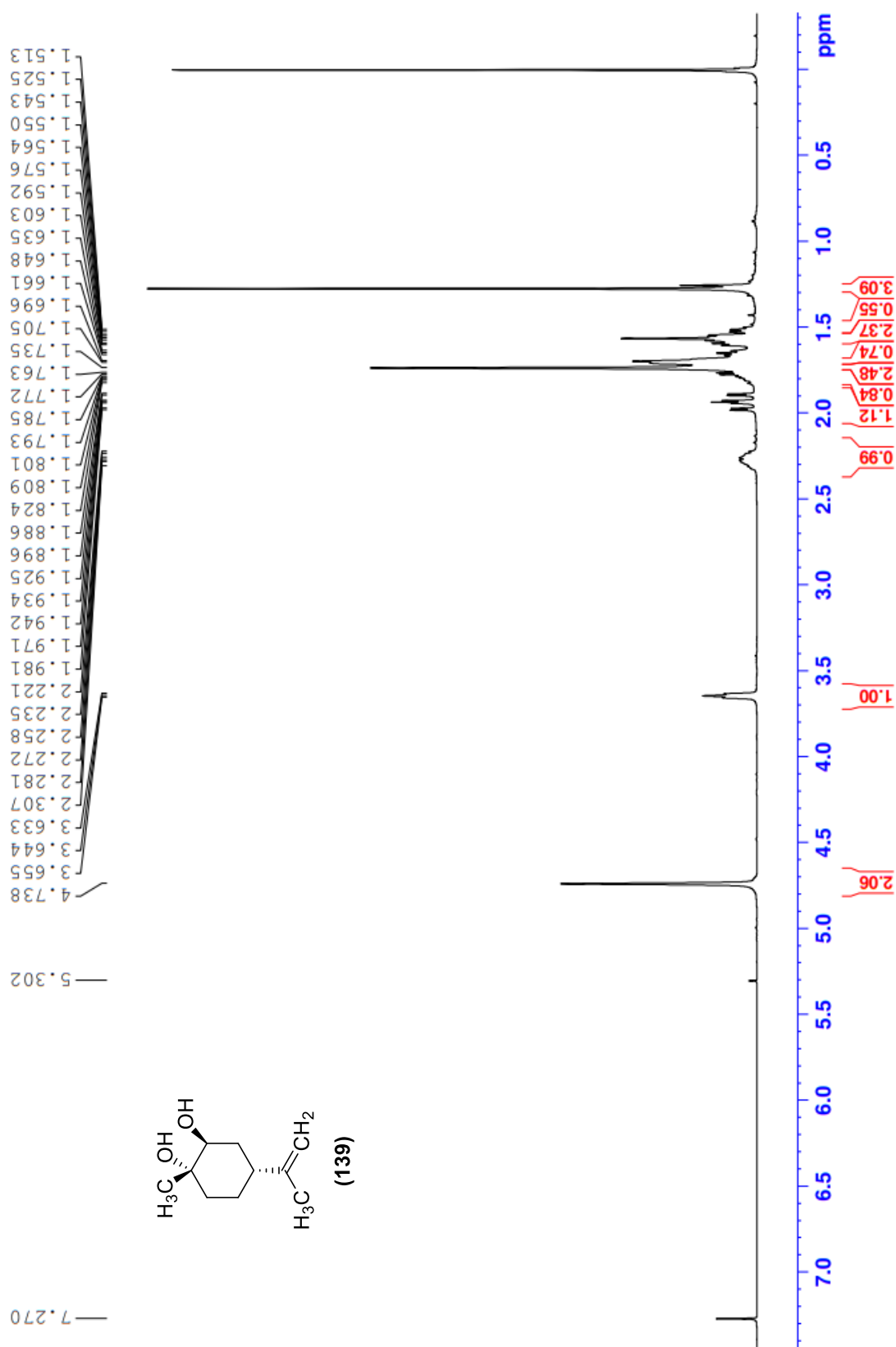


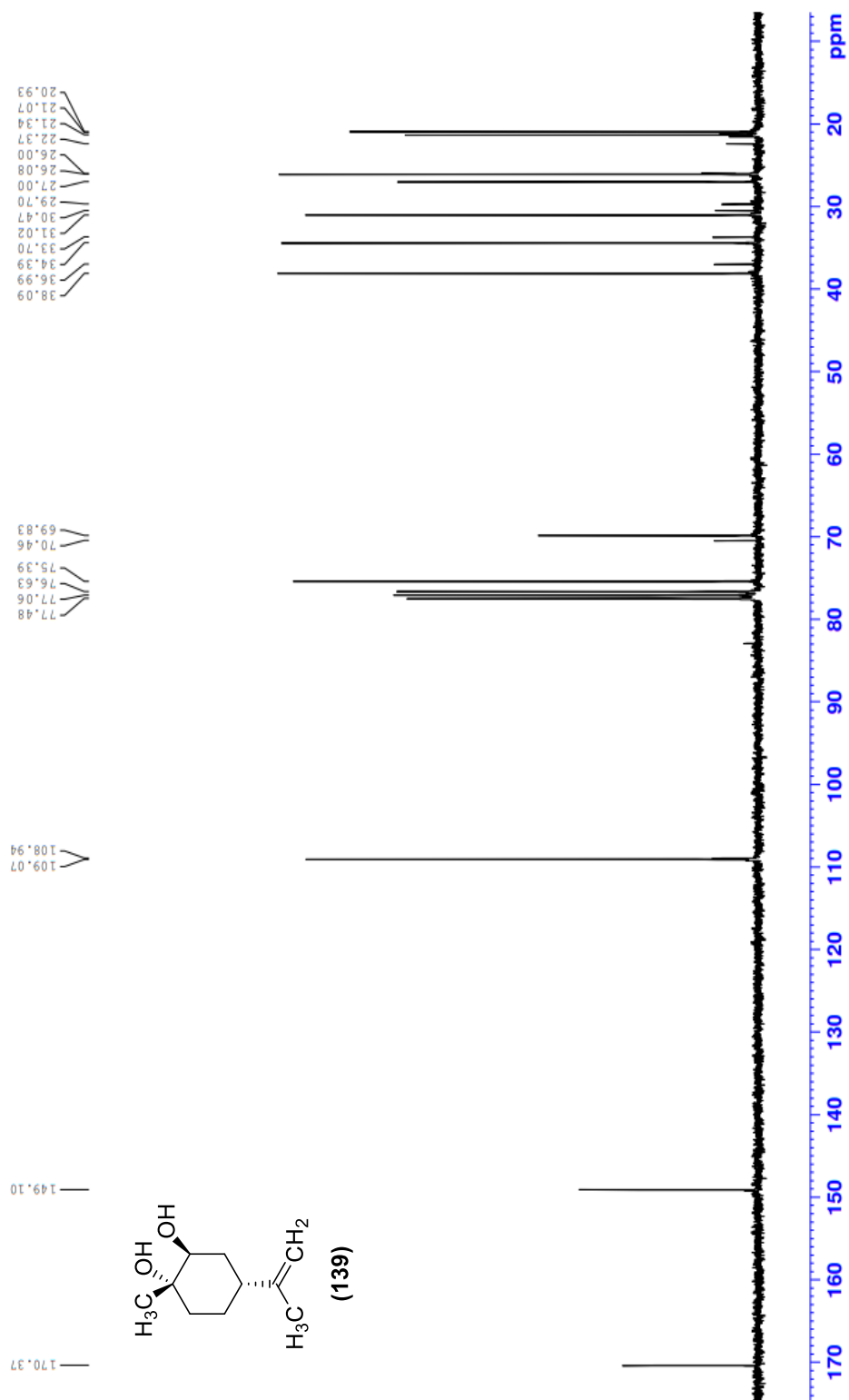


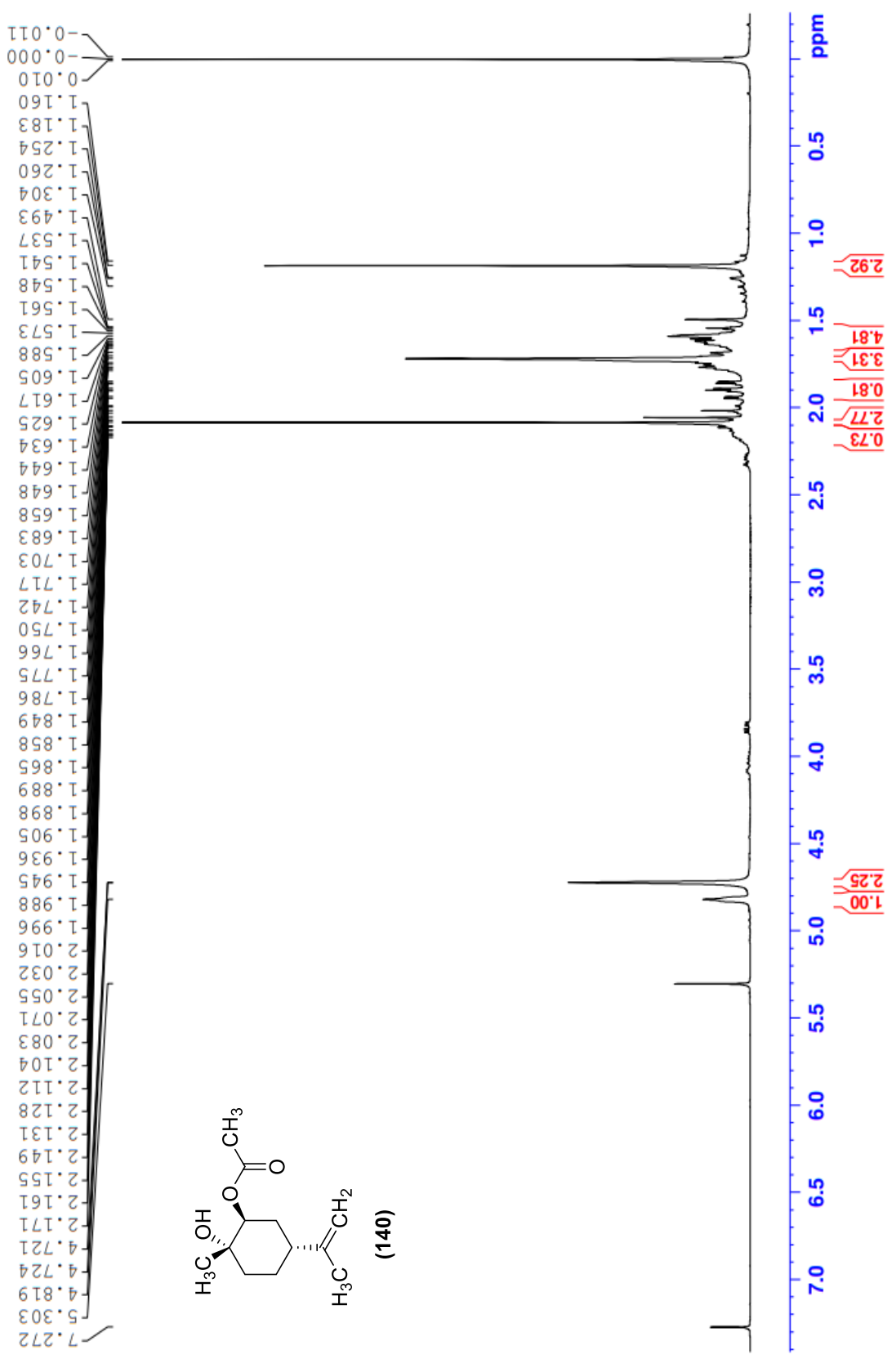


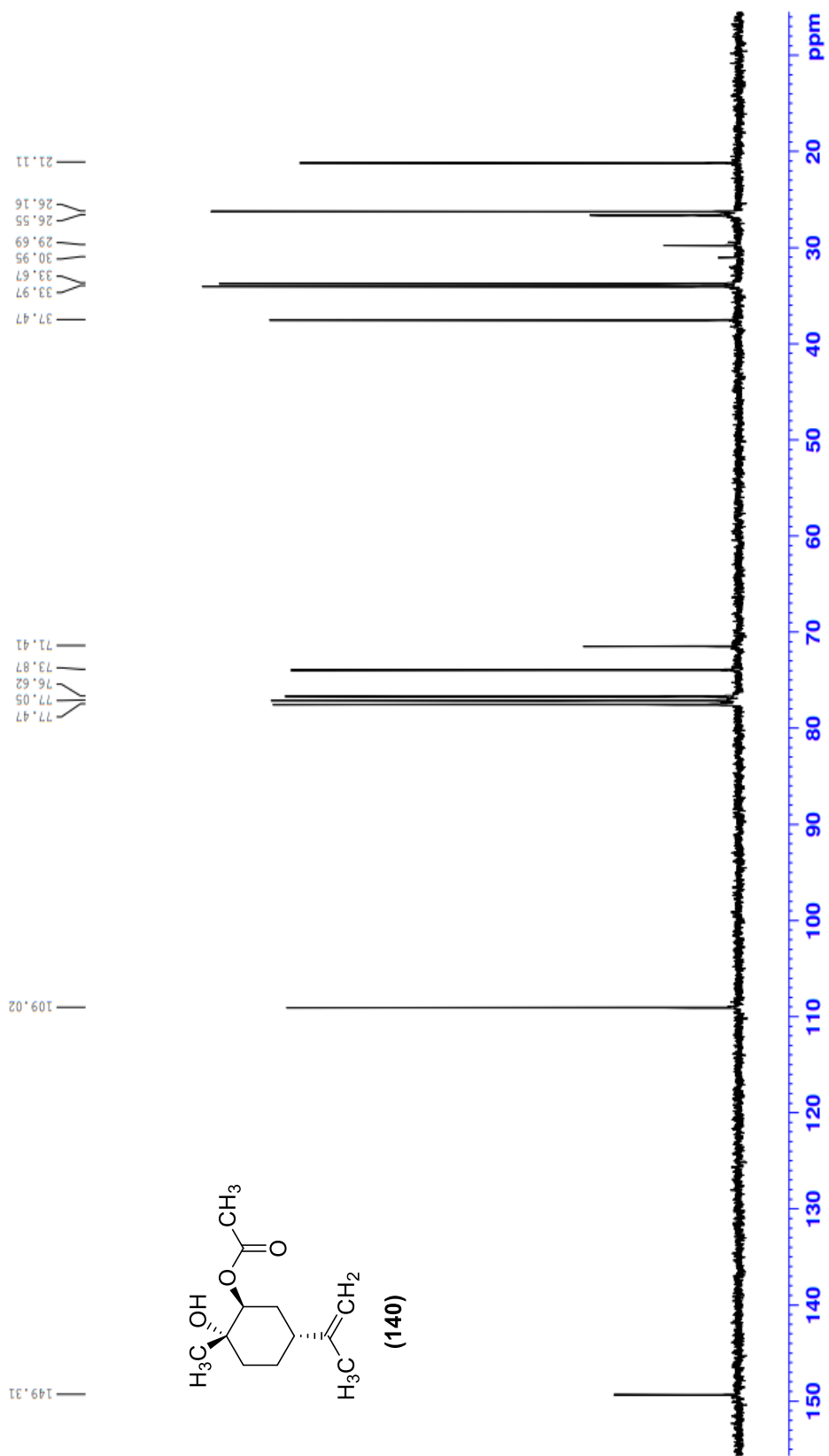


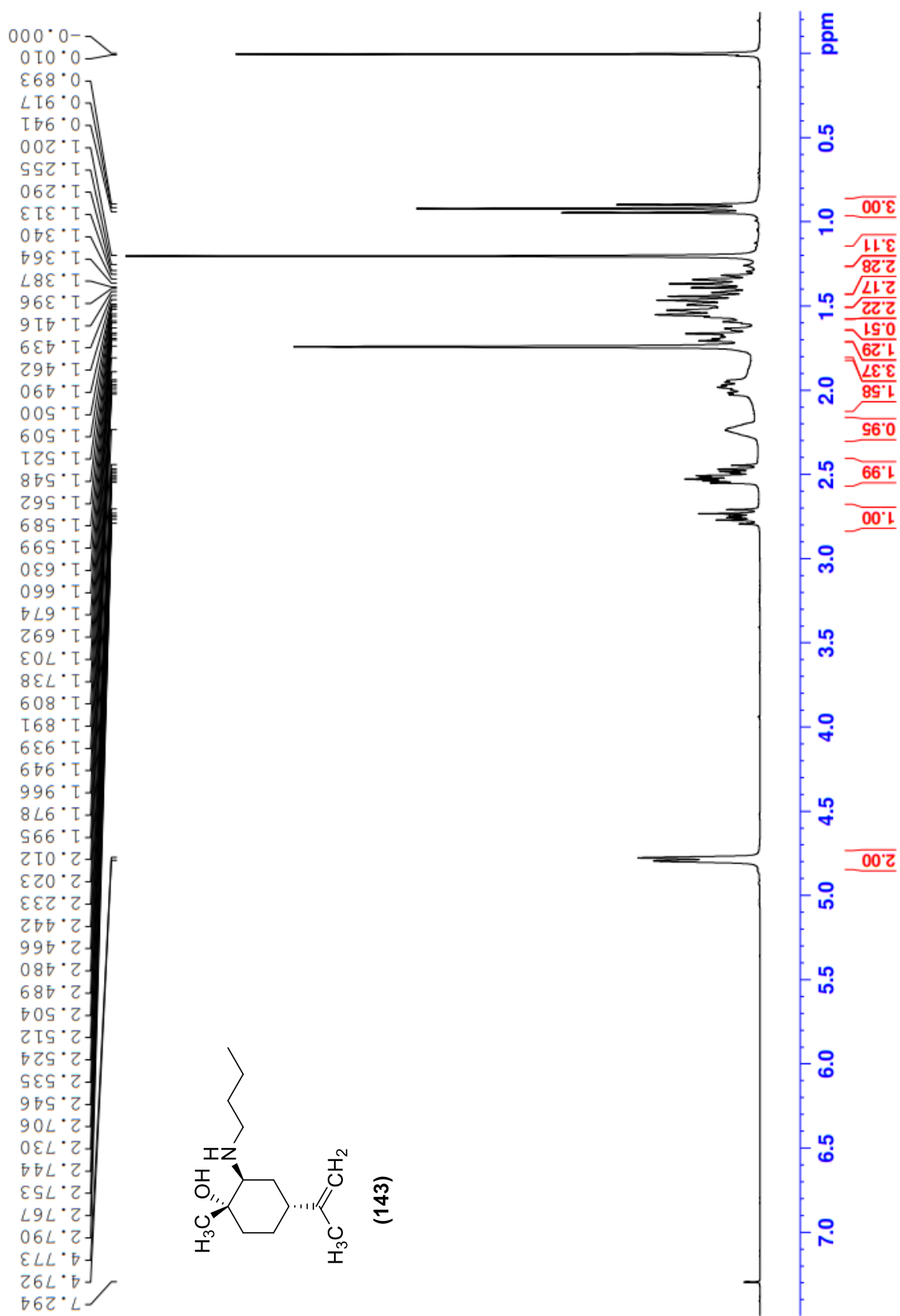
7.285

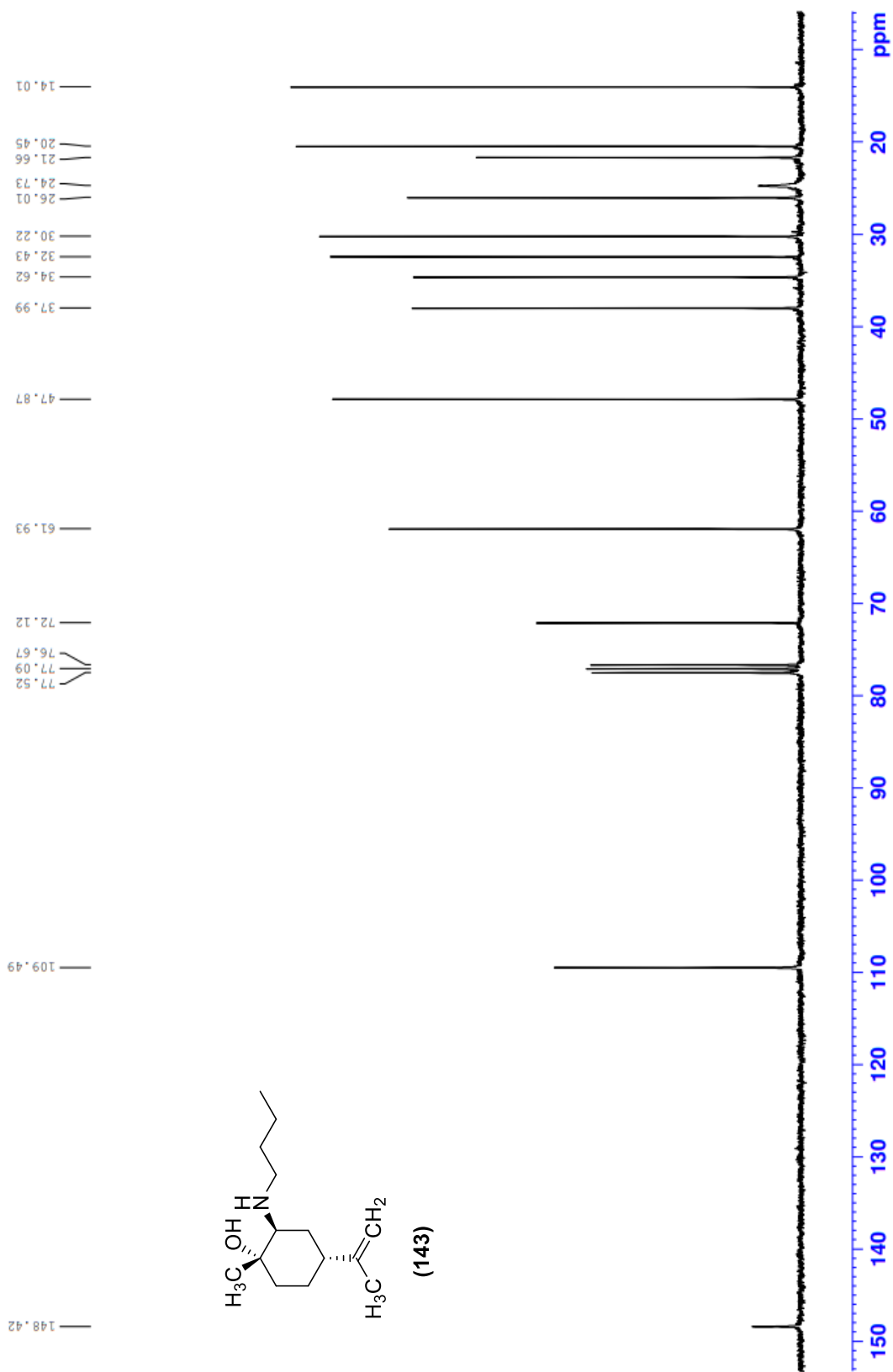


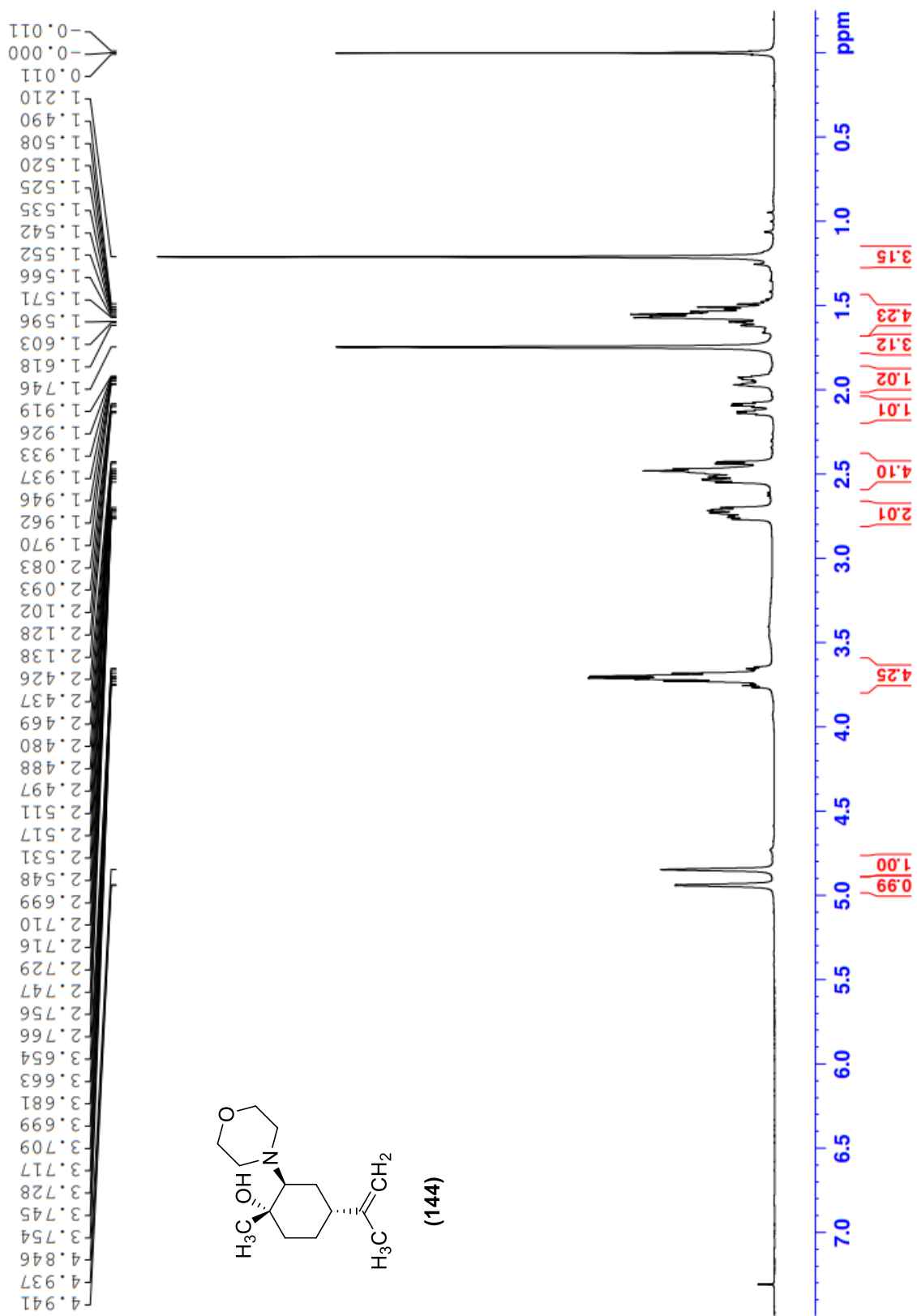


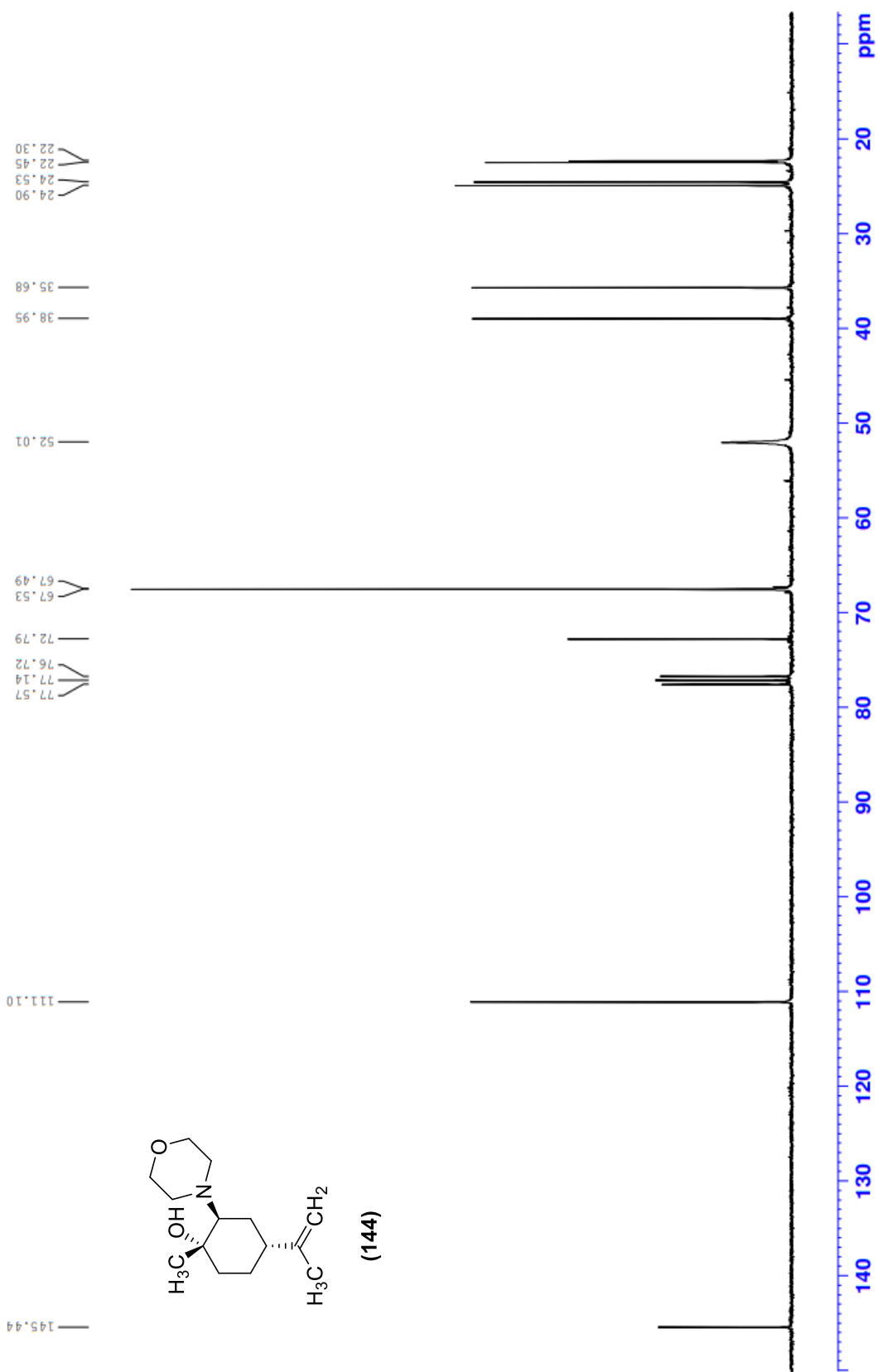


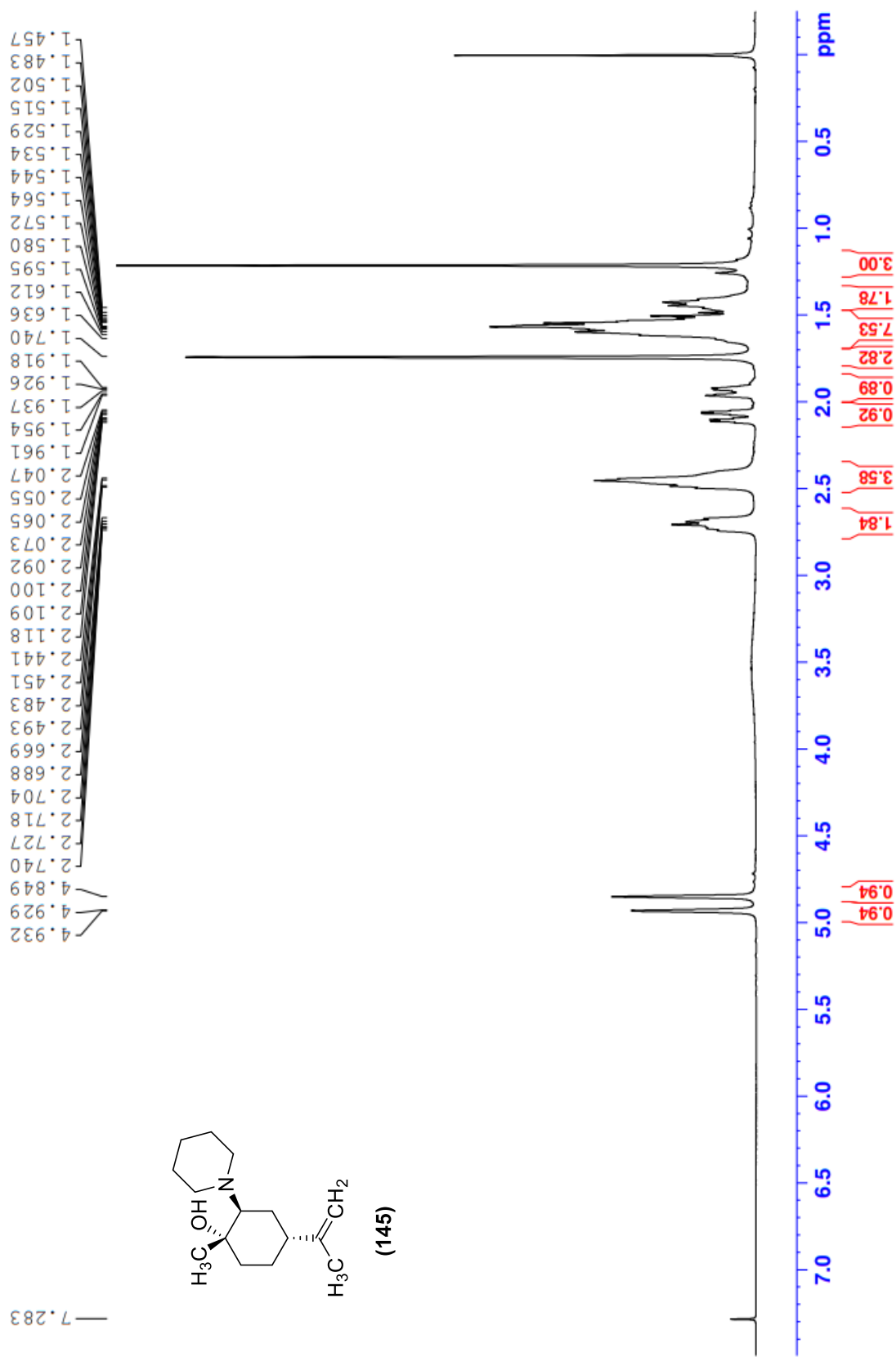


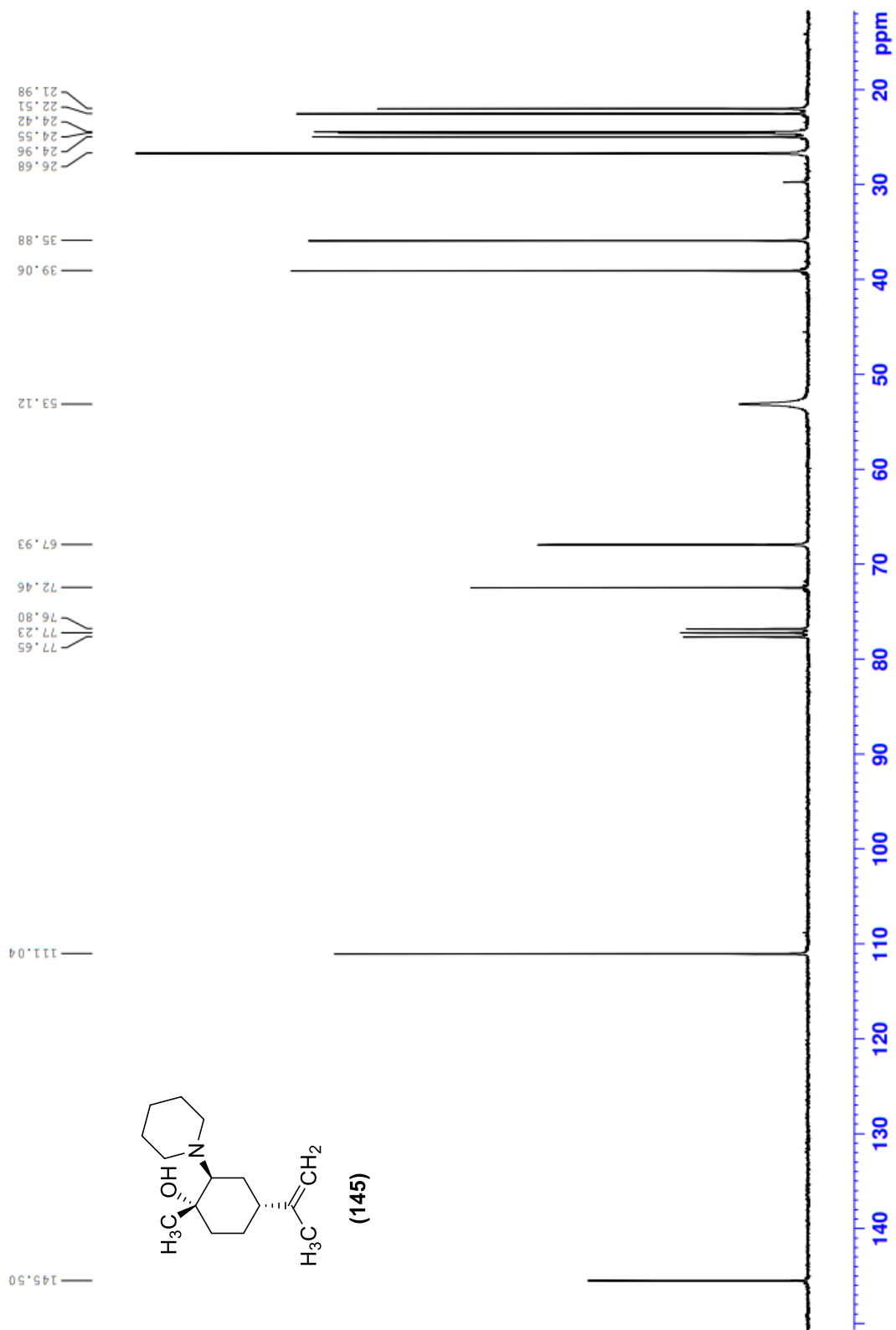


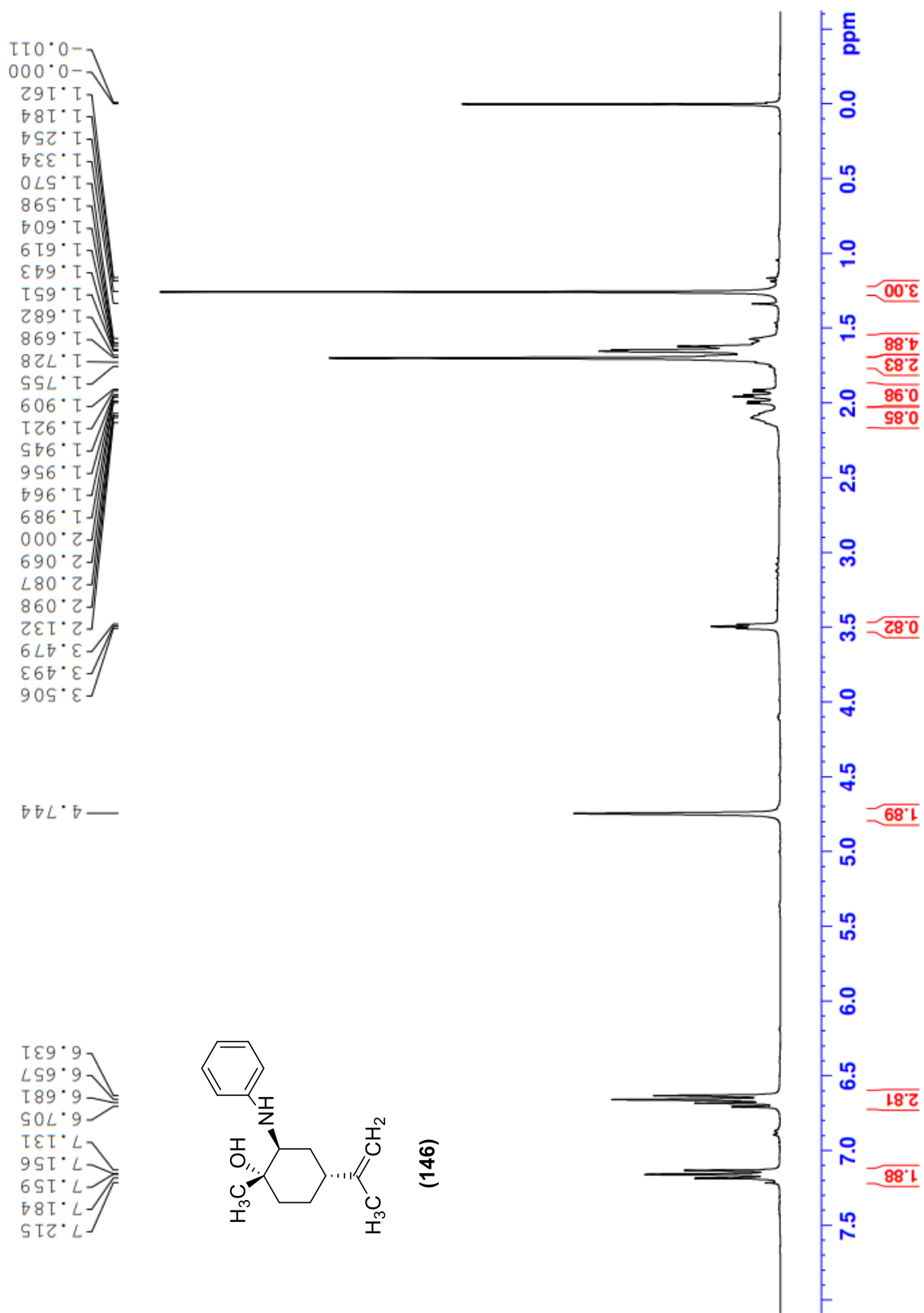


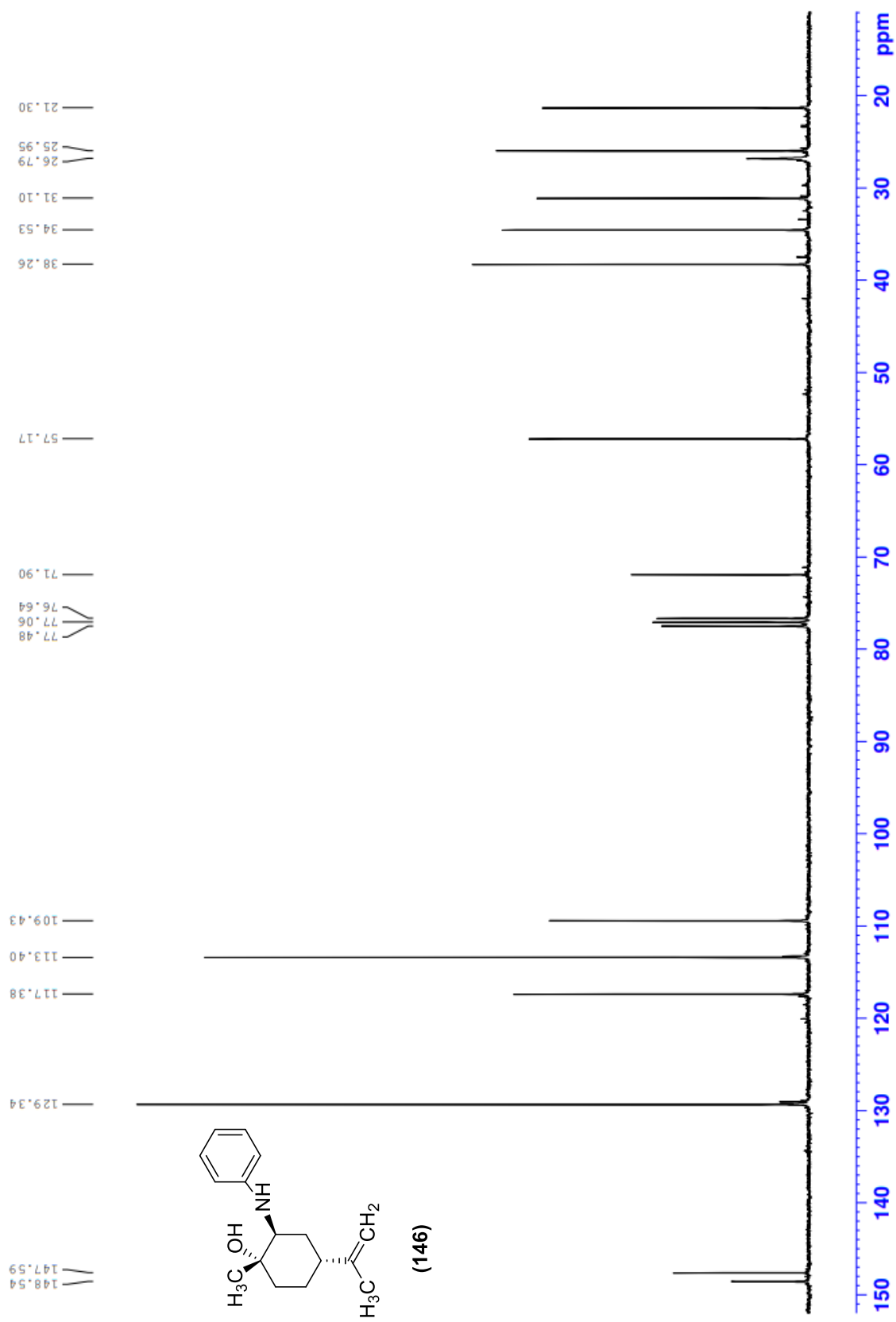


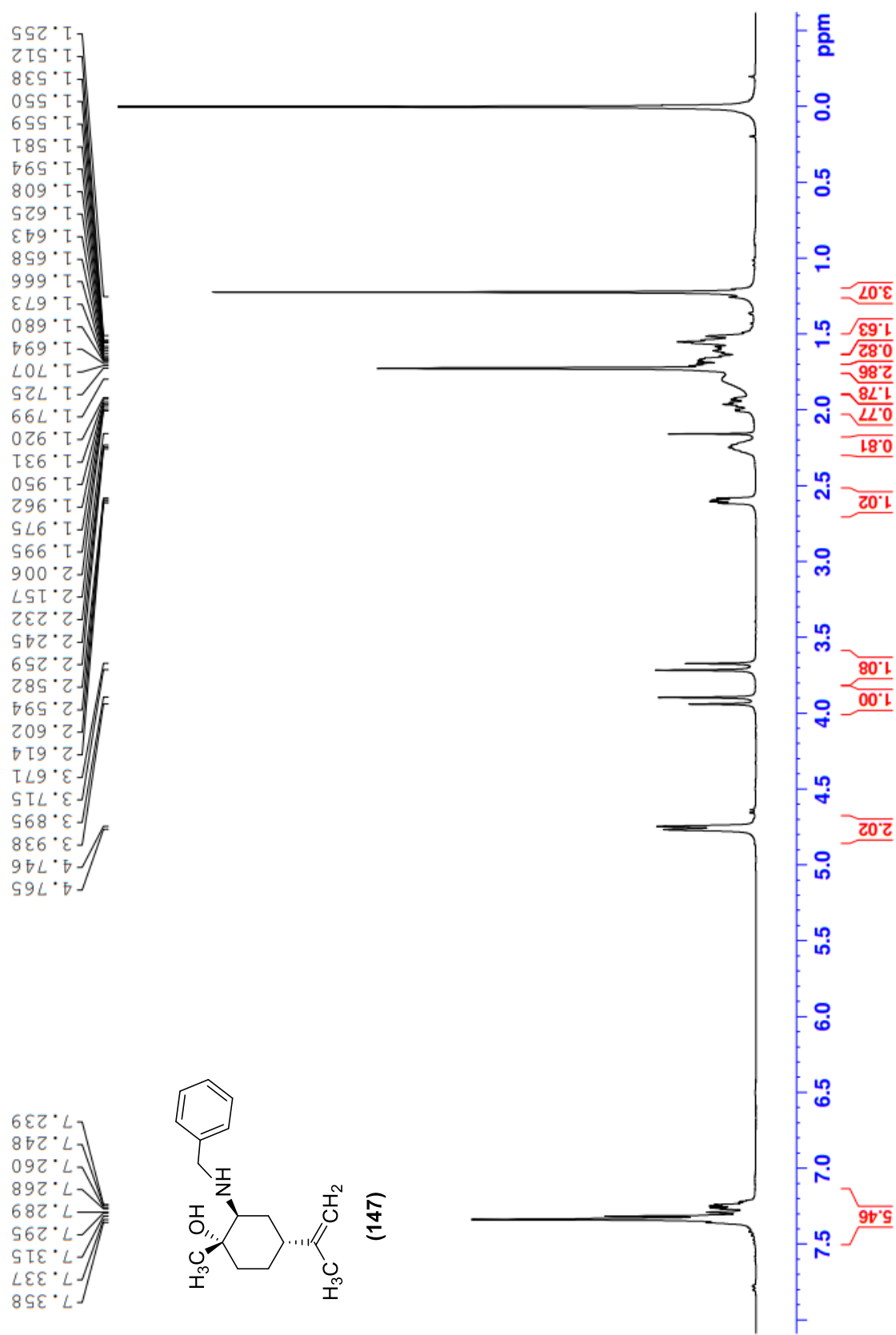


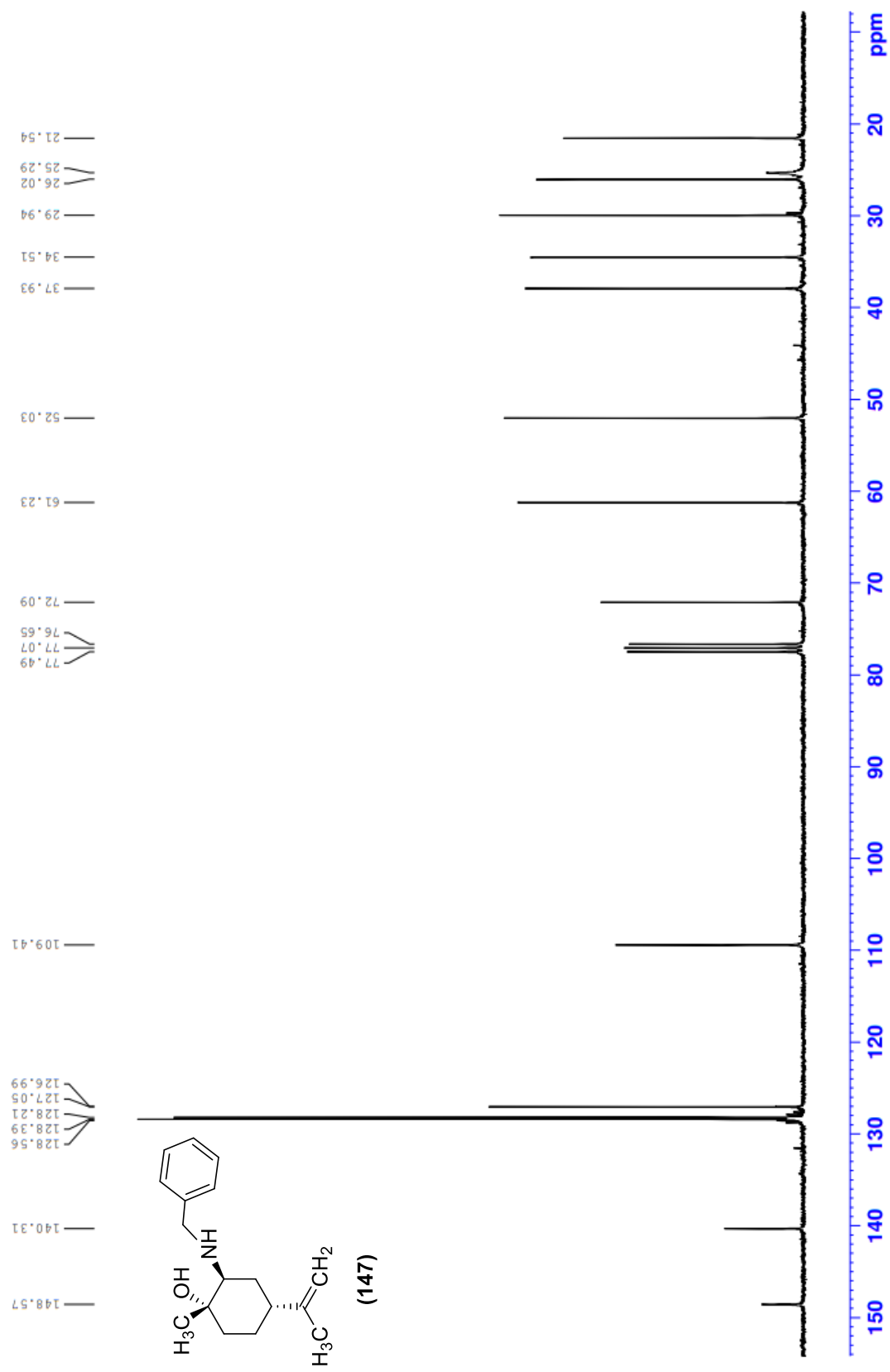


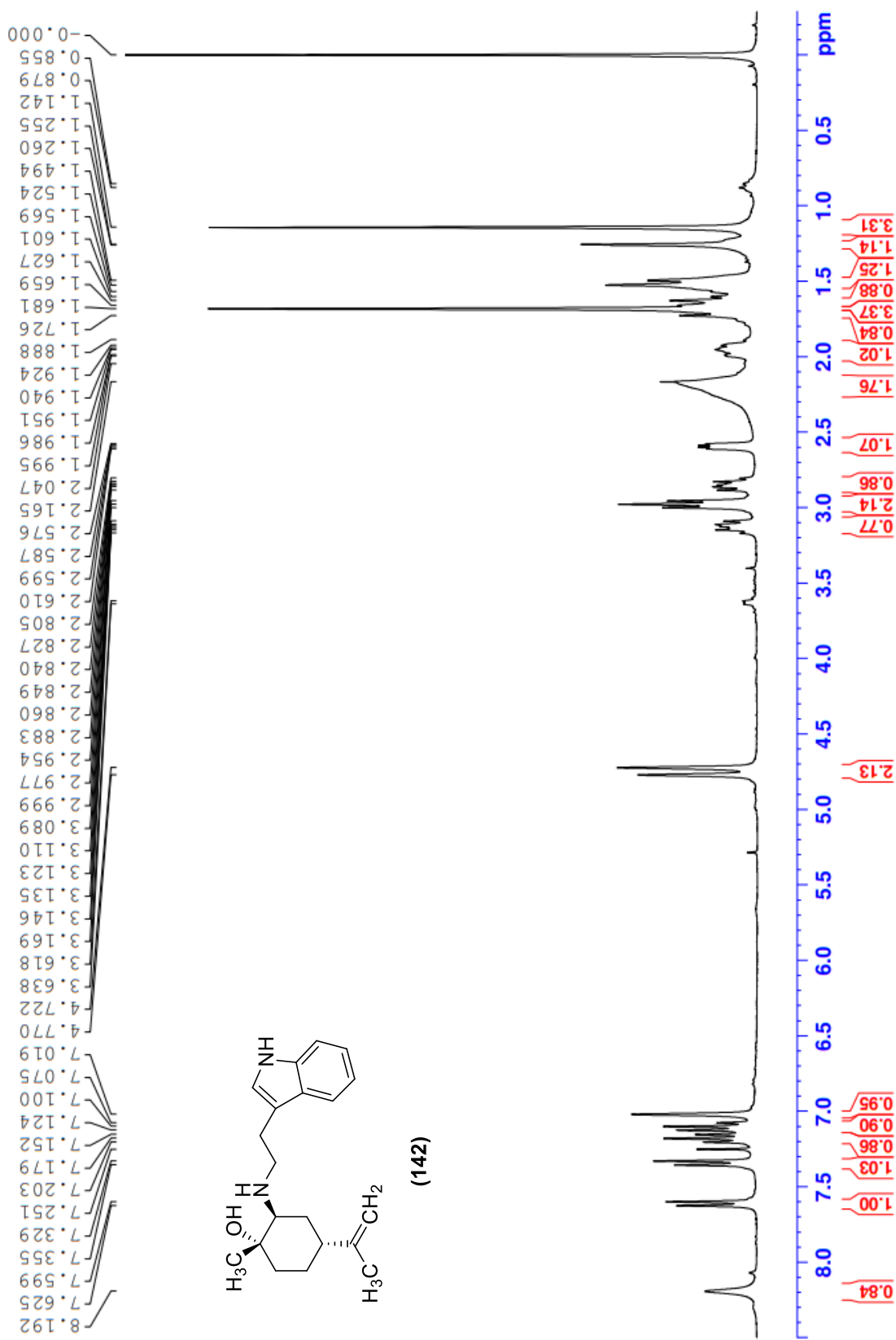


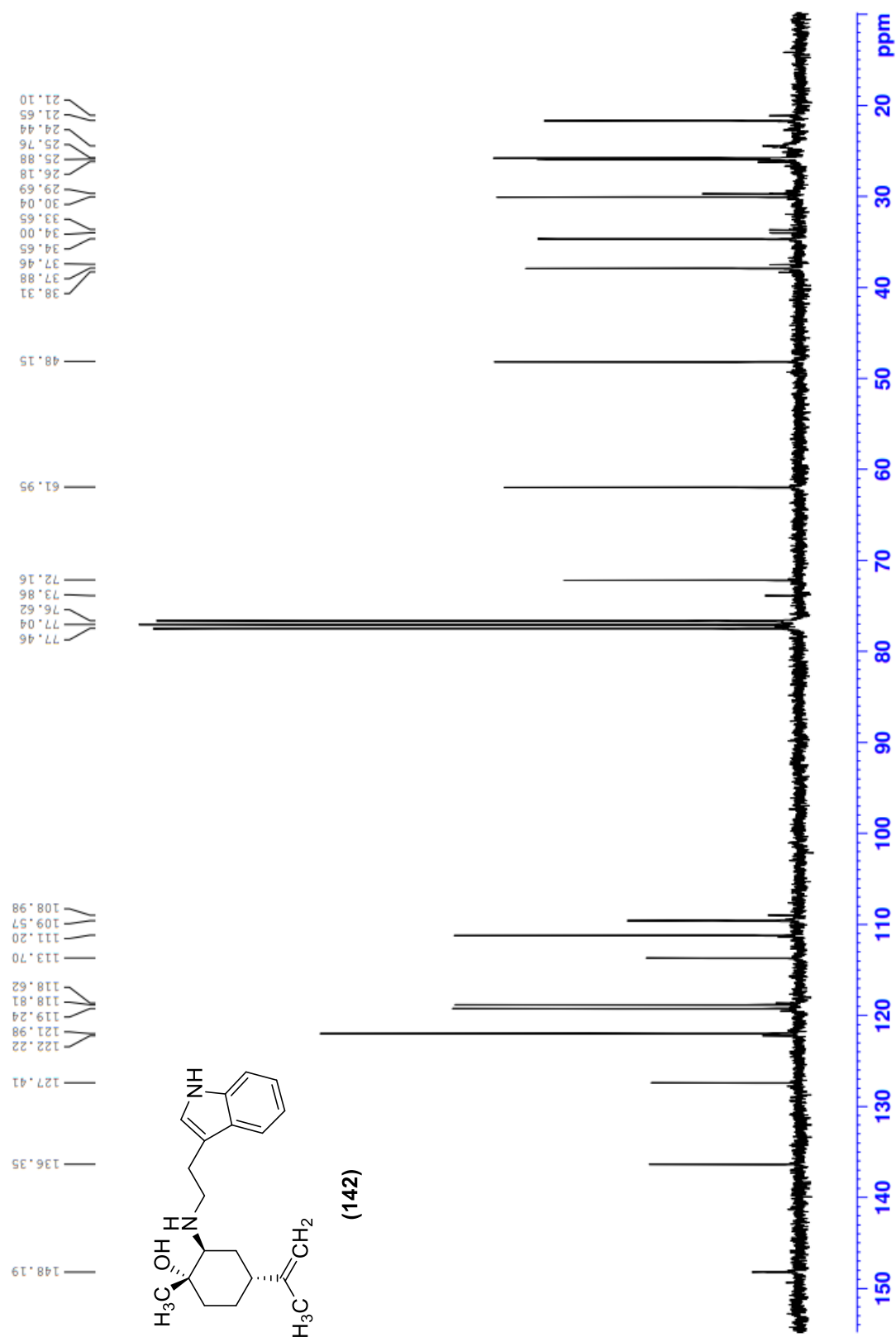


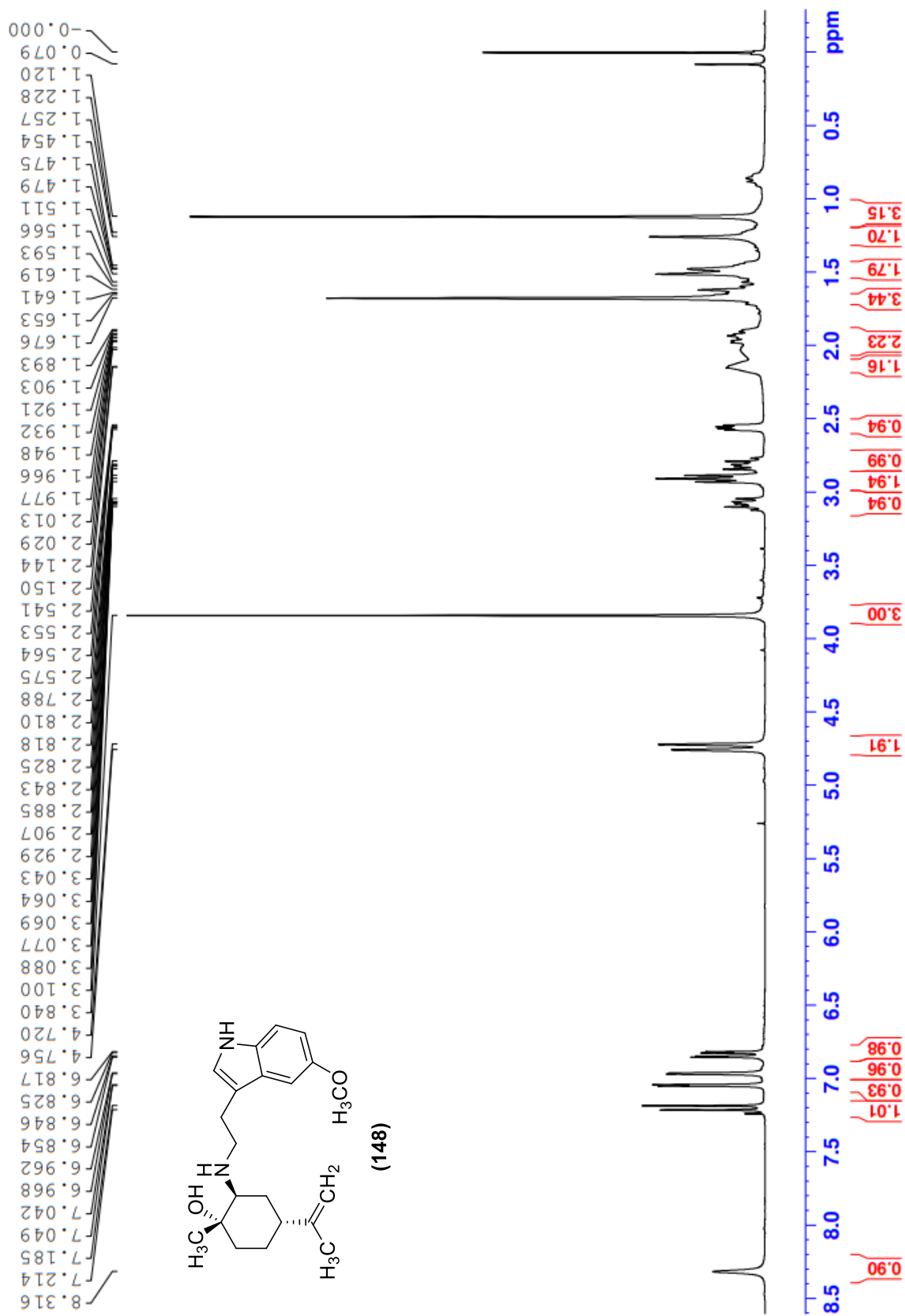


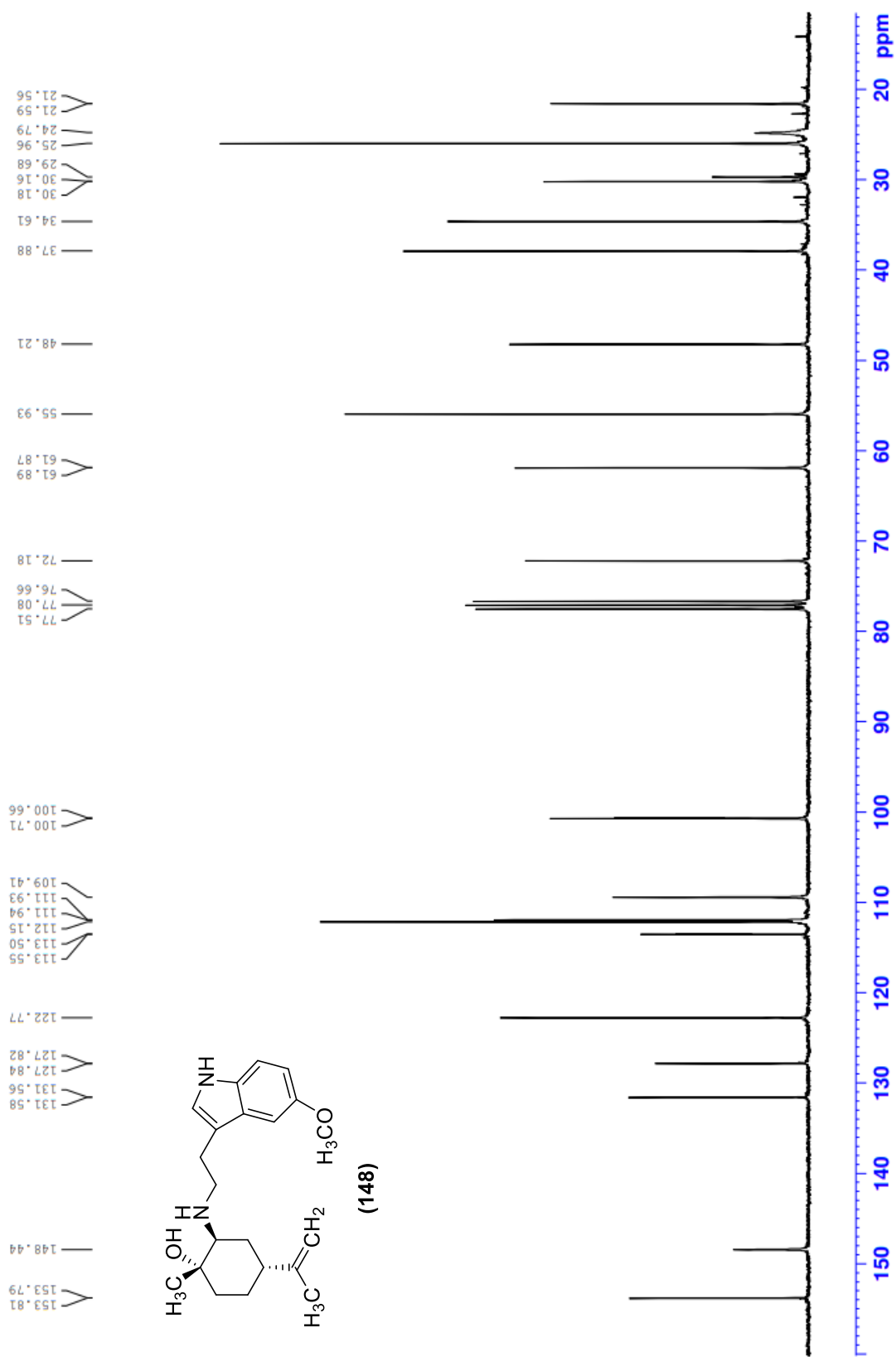


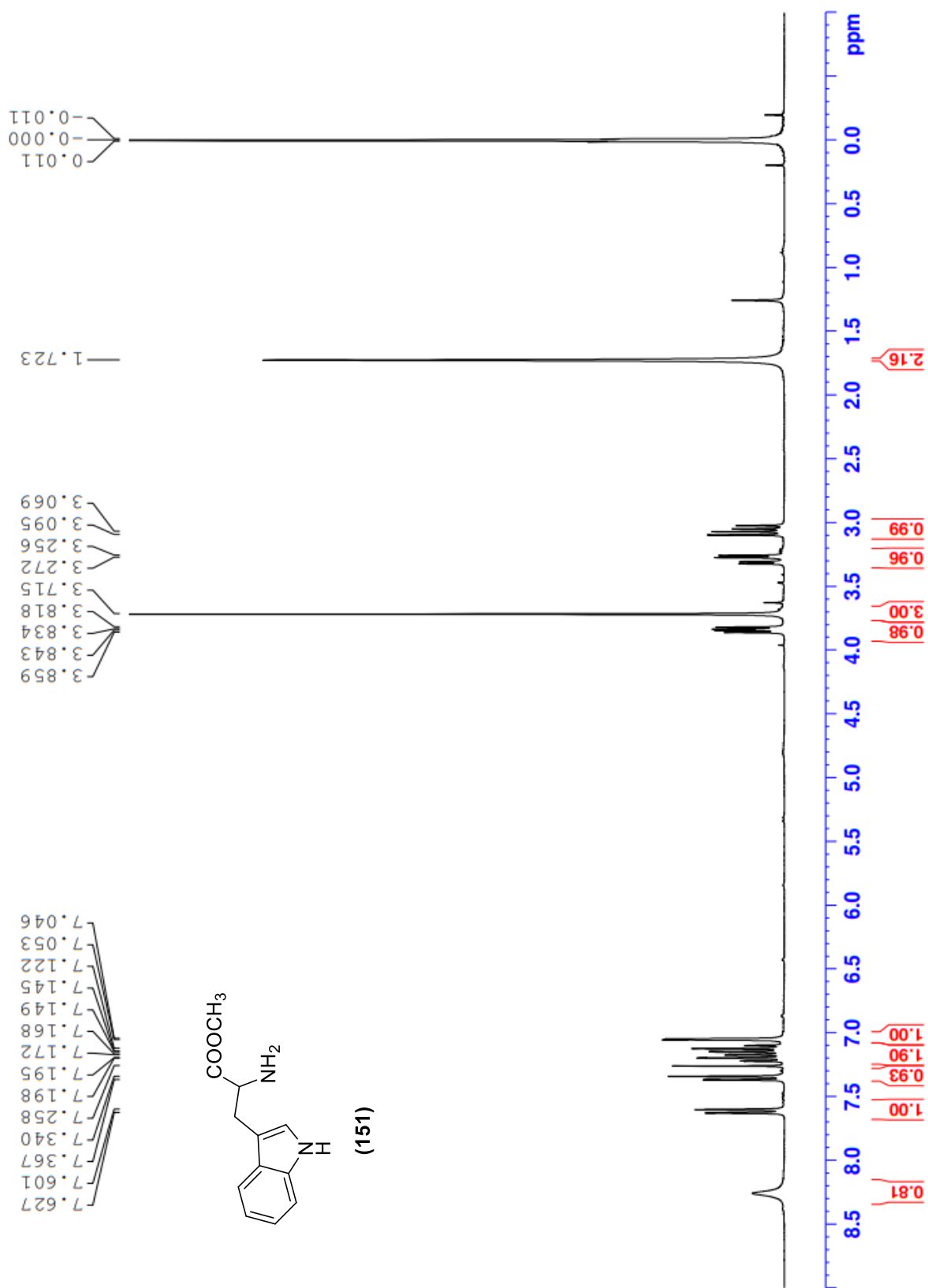


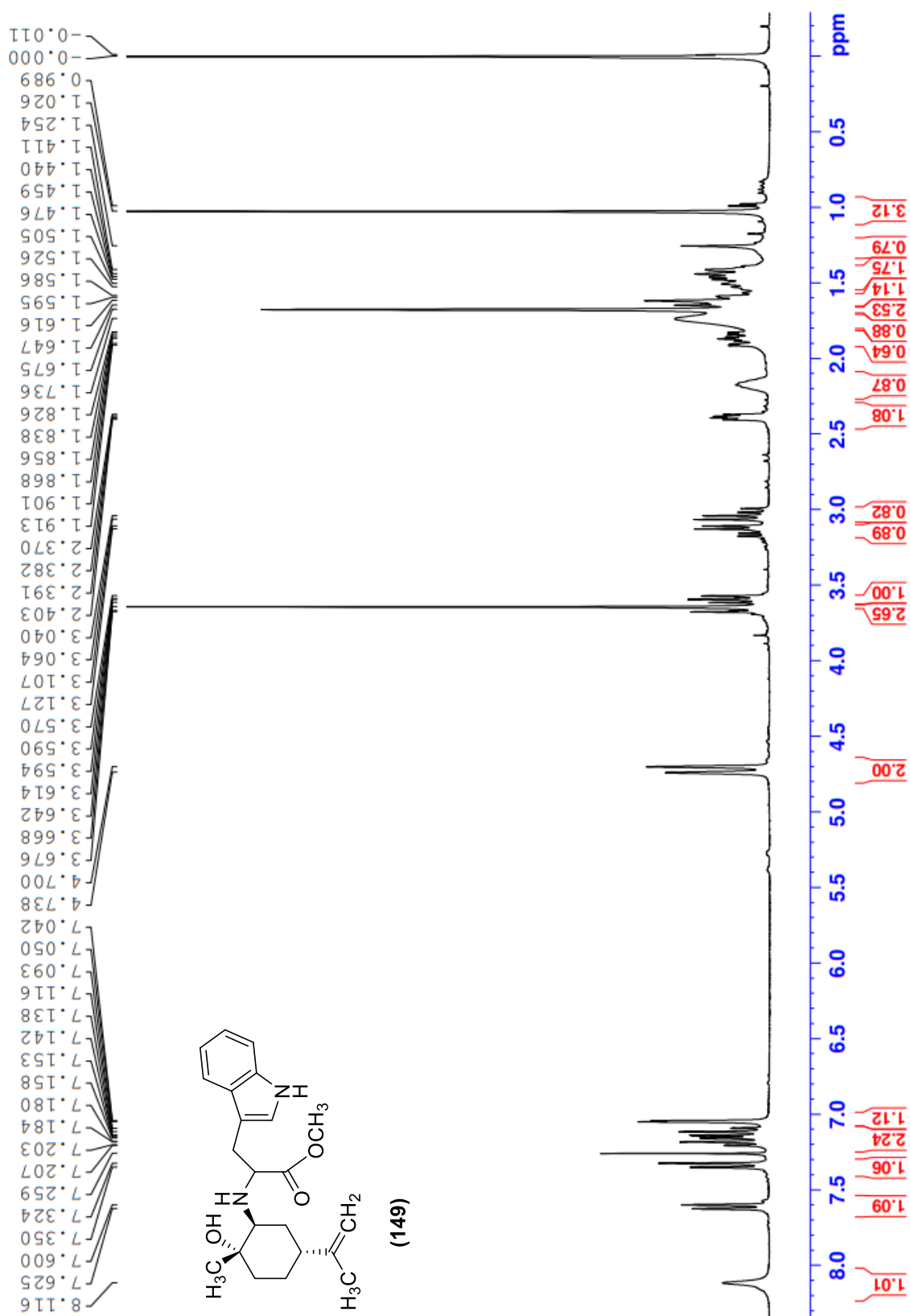


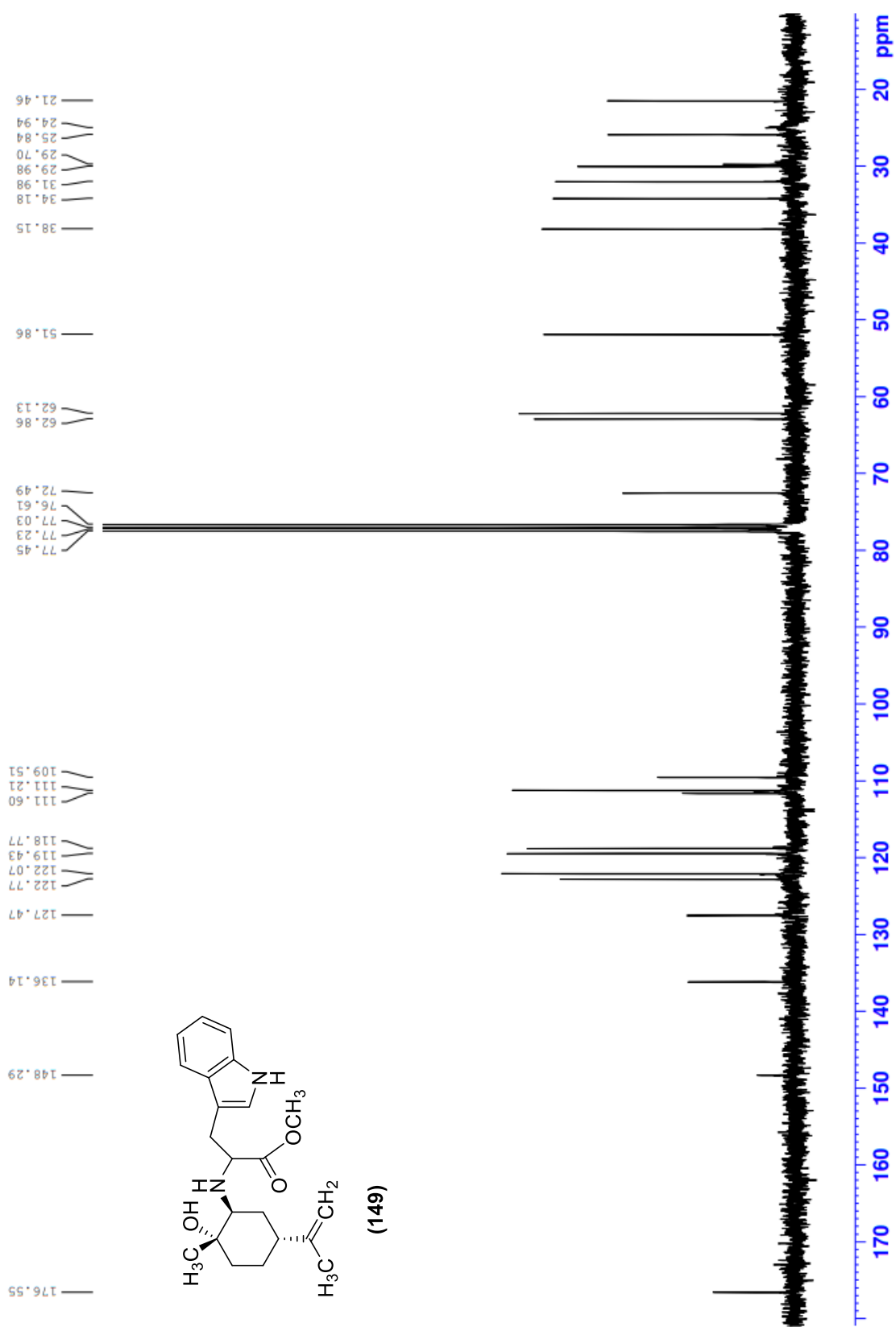












ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	เบญจมาศ เรืองโรจน์
วัน เดือน ปี เกิด	1 ตุลาคม 2539
สถานที่เกิด	ราชบุรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	45 หมู่ 10 ซอยสบายใจ ตำบลเกาะหลัก อำเภอเมืองประจวบคีรีขันธ์ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

