

การสังเคราะห์อนุพันธ์โอเซลทามิเวียร์เพื่อใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส  
(ทำให้ผิวขาว)\*

Synthesis of Oseltamivir derivatives with anti-tyrosinase for making  
whitening skin

มูฮำหมัด นียมเดชา (Muhammad Niyomdecha) \*\*

ดวงพร โลหะวิทยานันท์ (Duangporn Lohawittayanant) \*\*\*

บทคัดย่อ

ปัจจุบันนักวิจัยมีความสนใจในการสังเคราะห์ โอเซลทามิเวียร์ ฟอสเฟต (Oseltamivir phosphate) ซึ่งใช้เป็นยาที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไข้หวัดนกที่ได้ผลเป็นอย่างดี หรือเป็นที่รู้จักกันในชื่อ ทามิฟลู (Tamiflu) งานวิจัยนี้จึงได้มีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของโอเซลทามิเวียร์ขึ้น เพื่อเป็นโอกาสในการค้นพบยาที่รักษาโรคอื่นๆได้อีก โดยทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของโอเซลทามิเวียร์และทดสอบยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase Activity) พบว่าอนุพันธ์ของโอเซลทามิเวียร์ หมายเลข 3, 4 และ 5 สามารถใช้ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่จะทำให้การสังเคราะห์เมลานินน้อยลงจึงส่งผลให้มีผิวขาวขึ้นได้ \*

---

\* การสังเคราะห์อนุพันธ์ของโอเซลทามิเวียร์ เพื่อใช้ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ที่จะทำให้การสังเคราะห์เมลานินน้อยลงจึงส่งผลให้มีผิวขาวขึ้นได้

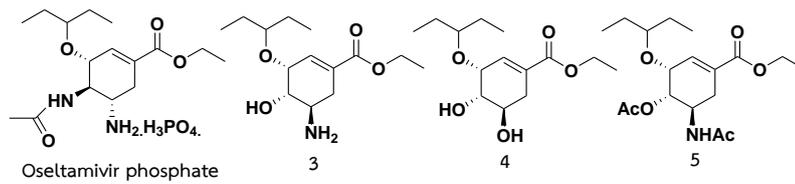
The synthesis of Oseltamivir derivatives for using to inhibit tyrosinase enzyme as related to decrease the synthesis of melanin which can made skin has more whitening.

\*\* ดร. อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

Dr. Department of Chemistry, Faculty of Science Silpakorn university (email: momoniyom@yahoo.com )

\*\*\* นักศึกษาชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยศิลปากร

A fourth-year student Silpakorn university



**คำสำคัญ :** โอเซลทามิเวียร์ ฟอสเฟต อนุพันธ์ของโอเซลทามิเวียร์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

### Abstract

In the present, there are many researches about synthesis of Osetamivir which used to be drug which have well activity to anti-bird flu as well-known name called Tamiflu. In this research, the researcher has been synthesized of Osetamivir derivatives for the purpose of discover new drug to treat other diseases therefore having been synthesized of Osetamivir derivatives 3, 4 and 5 which have been evaluated for Anti-tyrosinase Activity. Osetamivir derivatives can use to inhibit tyrosinase enzyme as related to decrease the synthesis of melanin which can made skin has more whitening.

**Keywords :** Osetamivir phosphate, Osetamivir derivatives, Anti-tyrosinase Activity

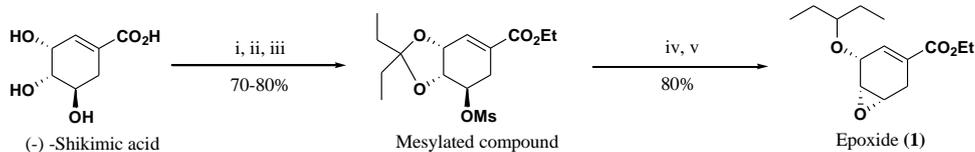
### บทนำ

โรคไข้หวัดนก (bird flu) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่สร้างความสูญเสียในภาคการเกษตรที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ปีก สามารถก่อโรคและคร่าชีวิตผู้คนไปเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะในทวีปเอเชีย องค์การอนามัยโลกคาดว่าหากมีการระบาดใหญ่ของโรค อาจจะทำให้มีผู้เสียชีวิตจำนวนมากดังที่เคยเกิดขึ้นกับการระบาดของไข้หวัดใหญ่ ไข้หวัดนกจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1 เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงที่สุด แต่ก็สามารถรักษาให้หายขาดได้

โดยการให้ยาด้านไวรัส ยาด้านไวรัสที่นิยมใช้ในการรักษา คือ Oseltamivir phosphate หรือมีชื่อทางการค้าว่า Tamiflu

Oseltamivir phosphate ถูกค้นพบราวปี ค.ศ. 1995 และได้มีการเปิดเผยรายละเอียดการสังเคราะห์ในวารสารวิชาการเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1997 อย่างไรก็ตาม วิธีที่กล่าวถึงนี้มีจำนวนขั้นตอนที่ค่อนข้างยาวและเหมาะกับการสังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีโครงสร้างหลากหลายเพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์มากกว่าการผลิตในปริมาณมากๆ ต่อมาบริษัท Roche ได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ในระดับอุตสาหกรรมขึ้น โดยใช้สารตั้งต้นซึ่งเป็นสารที่สำคัญจากธรรมชาติคือ (-)-Shikimic acid

ในกระบวนการสังเคราะห์ Oseltamivir phosphate ที่เริ่มต้นจาก (-)-Shikimic acid<sup>4</sup> จะเปลี่ยนสารตั้งต้นนี้ให้กลายเป็นอินเทอร์มีเดียตสำคัญที่เป็น Epoxide (1) และจากสารตัวกลาง Epoxide (1) มีวิธีการที่ จะเปลี่ยนให้เป็น Oseltamivir phosphate ที่ใช้เป็นยารักษาโรคไข้หวัดนกต่อไป



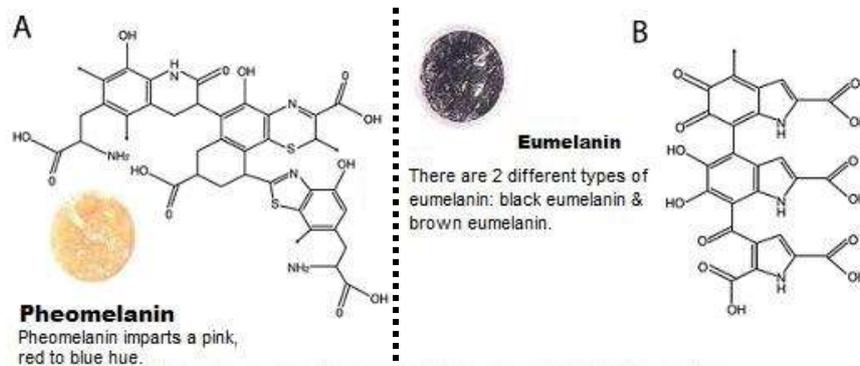
i: SOCl<sub>2</sub>/EtOH, ii: EtCOEt, TfOH (cat), iii: MsCl/Et<sub>3</sub>N, iv: Et<sub>3</sub>SiH, TiCl<sub>4</sub>, v: aq.NaHCO<sub>3</sub>

รูปที่ 1 การสังเคราะห์ Epoxide (1)

สารเมลานิน (Melanin) หรือเม็ดสีสร้างจากเซลล์ผิวหนังที่เรียกว่าเมลานโนไซต์ (Melanocyte) เป็นเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์ระบบประสาทซึ่งแทรกตัวอยู่ในชั้นหนังกำพร้าส่วนล่างสุด โดยเซลล์เมลานโนไซต์หนึ่งเซลล์จะแตกแขนงเป็นร่างแหเล็กๆ ยื่นไปสัมผัสเซลล์ผิวหนังประมาณ 35 เซลล์ เมลานโนไซต์จะสร้างสารเมลานินบรรจุในแคปซูลเรียกว่า เมลานโนโซม (Melanosome) เมื่อสร้างเสร็จจะส่งไปตามร่างแหเข้าสู่เซลล์ผิวหนัง สารเมลานินสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด (ตามรูปที่1<sup>\*</sup>)

<sup>2</sup> <https://ultravioletholocaust.wordpress.com/category/eumelanin-vs-phaemelanin/>

1. พีโอเมลานิน (Pheomelanin ; A) เป็นเซลล์สีเหลืองหรือแดง เพราะ มีเมลานินน้อย
2. ยูเมลานิน (Eumelanin ; B) เป็นเซลล์เม็ดสีเข้ม เพราะ มีเมลานินบรรจุอยู่ในแคปซูลมาก



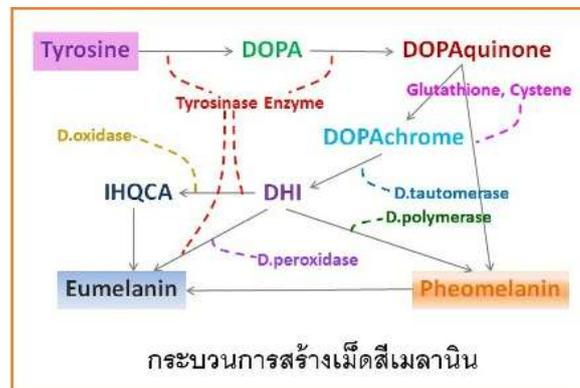
รูปที่ 2

### กระบวนการชีวสังเคราะห์เมลานิน (Melanogenesis)

กระบวนการสังเคราะห์เมลานินในผิวหนังเริ่มจากสารตั้งต้นที่มีในร่างกายคือ ไทโรซีน (tyrosine) ถูกเปลี่ยนให้เป็น dihydroxyphenylalanine (3,4-dihydroxyphenylalanine; L-DOPA) ด้วยเอนไซม์ tyrosine hydroxylase หรือ monophenolase หรือเรียกโดยรวมว่า tyrosinase ซึ่งขั้นตอนแรกนี้จะเป็นขั้นตอนกำหนดปฏิกิริยา เนื่องจากขั้นตอนหลังจากนี้จะสามารถเกิดขึ้นได้เองในสภาวะ pH ของร่างกายปกติ หลังจากที่ tyrosine ถูกเปลี่ยนให้เป็น L-DOPA แล้ว L-DOPA จะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไป เป็น DOPAquinone (3,4-dihydroxyphenylalanine quinone) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสร้าง eumelanin หรือ pheomelanin ต่อไป กรณีที่ร่างกายอยู่ในสภาวะขาดสารประกอบที่มี sulfur (thiol compound) DOPAquinone จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น DOPochrome ด้วย กระบวนการ auto-oxidation หรือ เรียกว่าการเกิด cyclization และมีเอนไซม์ TRP-2 (tyrosinase-related protein 2) หรือ DOPochrome tautomerase กระตุ้นให้ DOPochrome เกิดการ tautomerize ขึ้นต่อไปได้เป็น 5,6-dihydroxyindole (DHI) melanin ซึ่งมีสีดำ หรือ 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) melanin ซึ่งมีสีน้ำตาล ตามลำดับ จากนั้นอาศัยเอนไซม์ TRP-1 (DHICA oxidase) ซึ่งอาจเรียกรวมเป็น tyrosinase ในการเปลี่ยน DHI ไปเป็น indole-5,6-quinone เพื่อนำไปสร้าง eumelanin (brownblack pigment) ต่อไป แต่ในสภาวะที่ร่างกายมี cysteine หรือ กลูตาไธโอน DOPAquinone จะเข้าไป



ดังนั้น แผนภาพเอนไซม์ที่เป็นตัวกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานิน สรุปรูปตามภาพที่ 4<sup>‡</sup> ได้คร่าวๆ ดังนี้



รูปที่ 4

### สารสำคัญที่ทำให้ผิวขาว

ดังที่ทราบแล้วว่าการเกิดสีผิวคือขบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน ดังนั้นการทำให้สีผิวจางลง (skin-lightening) หรือ ผิวขาวขึ้นจึงสามารถทำได้โดยรบกวนขั้นตอนต่างๆในกระบวนการสร้าง เมลานิน โดยทั่วไปกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญที่ทำให้ผิวขาวขึ้นแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

1. กลุ่มยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitor) สารกลุ่มนี้สามารถยับยั้งการสร้าง เมลานิน โดยการยับยั้งเอนไซม์ Tyrosinase

- 1.1 Arbutin พบมากในผลไม้พวกตระกูลเบอร์รี่และลูกแพร์
  - 1.2 Vitamin C (L-ascorbyl acid) และอนุพันธ์
  - 1.3 Licorice (glycyrrhetic acid) สกัดจากชะเอม (Glycyrrhiza glabra)
  - 1.4 Kojic acid เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus*
  - 1.5 Aloesin เป็นสารสกัดจาก Aloe vfs.readfile
2. กลุ่มที่ทำให้เซลล์ผิวหนังชั้นนอกสุดหลุดลอก (exfoliation)
- 2.1 กรดผลไม้ (alpha hydroxyl acid หรือ AHA)
  - 2.2 Butyrate hydroxyanisole, BHA เช่น salicylic acid

<sup>‡</sup> <https://www.chemipan.com/home/images/t1as4k.png>

### 2.3 Retinol (vitamin A) สารชนิดนี้มีฤทธิ์ระคายเคืองผิวหนัง และทำให้ผิวหนังบางลง ดังนั้น

กระทรวงสาธารณสุขจึงประกาศห้ามใช้สารชนิดนี้ในเครื่องสำอาง

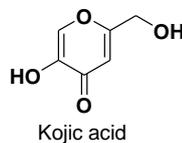
### 3. กลุ่มที่เป็นพวก Inhibitor of Melanosome transfer

#### 3.1 วิตามินบี 3 (Vitamin B3 หรือ Niacinamide)

#### 3.2 Soybean Trypsin Inhibitor (STI)

Kojic acid เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus* มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และเป็น iron chelator ซึ่งธาตุเหล็กในผิวหนังเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ที่ส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บของผิวหนังเมื่อโดนแสง และทำให้ผิวหนังเหี่ยวยุบ ดำคล้ำ เป็นต้น

จากโครงสร้างของ Kojic acid และ Oseltamivir phosphate มีบางตำแหน่งที่มีความคล้ายคลึงกัน และตำแหน่งเหล่านั้นจะเป็นตำแหน่งที่มีการคาดเดาว่าน่าจะมีผลต่อการออกฤทธิ์การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน

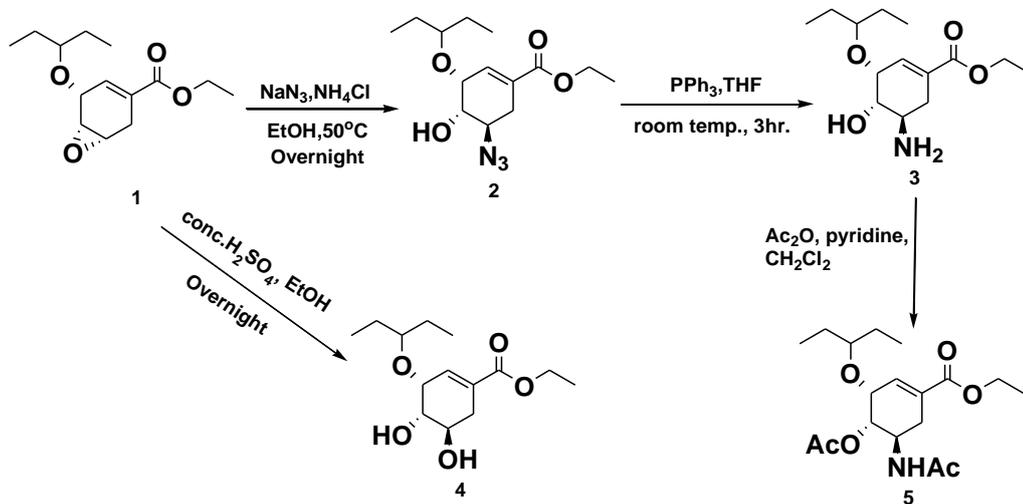


### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

สังเคราะห์สารอนุพันธ์ของโอเซลทามิเวียร์ แล้วนำไปทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในด้านความสามารถที่จะทำให้ผิวขาวขึ้นได้ โดยใช้ Kojic acid เป็นสารเปรียบเทียบ และเพื่อนำไปพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้

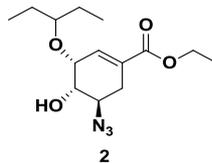
## วิธีการวิจัย

### 1. การสังเคราะห์อนุพันธ์โอเซลทามิเวียร์



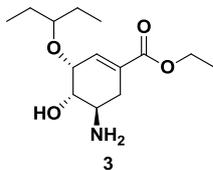
รูปที่ 5 แนวทางการสังเคราะห์อนุพันธ์โอเซลทามิเวียร์

### การสังเคราะห์ (3R,4S,5R)-ethyl 5-azido-4-hydroxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 2



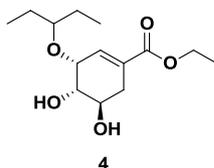
นำ epoxide (1) (0.4892 g, 1.92 mmol, 1eq) ละลายใน EtOH 10 ml นำไปกวนและควบคุมอุณหภูมิที่ 70-80 °C เติม NaN<sub>3</sub> (0.14 g, 2.304 mmol, 1.2eq) และเติม NH<sub>4</sub>Cl (0.10 g, 1.86 mmol) แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 คืน หยุดปฏิกิริยา และนำไประเหย EtOH ออกให้มากที่สุด จากนั้นนำมาสกัดด้วย EtOAc (2x10 ml) รวมชั้น organic กำจัดน้ำด้วย anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> จากนั้นกรอง anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ออกและระเหยตัวทำละลาย จะได้สารมีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาล (0.5314 g, 92.9 %) ค่า R<sub>f</sub> chromatogram = 0.65 (EtOAc : Hexane, 1:1)

การสังเคราะห์ (3*R*,4*S*,5*R*)-ethyl 5-amino-4-hydroxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 3



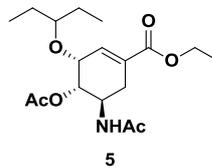
ละลาย (2) (0.5314 g, 1.79 mmol) ละลายใน THF 10ml นำไปกวนและควบคุมอุณหภูมิที่ 0 °C เติม  $\text{Ph}_3\text{P}$  ( 0.4812 g, 1.82 mmol) กวนต่อไปอีก 15 นาทีแล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยานำไประเหย THF ออกให้มากที่สุด จากนั้นละลายสารที่ได้ด้วย EtOAc นำมาสกัดด้วยน้ำ (3x10) รวมชั้น organic กำจัดน้ำด้วย  $\text{anh.Na}_2\text{SO}_4$  จากนั้นกรอง  $\text{anh.Na}_2\text{SO}_4$  ออก และระเหยตัวทำละลาย ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการลง column chromatography โดยใช้ silica gel และใช้ตัวทำละลายเป็น (Methanol: EtOAc, 1:5) จะได้สารมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลือง (0.3351 g, 67.2 %) ค่า  $R_f$  chromatogram = 0.22 (Hexane: EtOAc: Methanol, 3:1:1)

การสังเคราะห์ (3*R*,4*S*,5*R*)-ethyl 4,5-dihydroxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 4



นำ epoxide (1) (0.5164 g, 2.0331 mmol) ละลายใน EtOH 10 ml นำไปกวนที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 ml แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 คืน นำไประเหย EtOH ออกและละลายสาร ด้วย EtOAc จากนั้นนำมาสกัดกับ น้ำ 30 ml และ EtOAc 3x25 ml แล้วรวมชั้น organic นำมากำจัดน้ำด้วย  $\text{anh.Na}_2\text{SO}_4$  จากนั้นกรอง  $\text{anh.Na}_2\text{SO}_4$  ออกและระเหยตัวทำละลาย ขั้นตอนต่อมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการลง column chromatography โดยใช้ silica gel และใช้ตัวทำละลายเป็น (EtOAc : Hexane 1:2) จะได้สารมี ลักษณะเป็นน้ำมันสีใส ไม่มีสี (0.2699 g , 48.81 %) ค่า  $R_f$  chromatogram = 0.31 (EtOAc : Hexane 1:2)

การสังเคราะห์ (3*R*,4*S*,5*R*)-ethyl 5-acetamido-4-acetoxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 5



ละลาย (3) ( 0.3257 g, 1.20 mmol) ด้วย CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10 ml เติม Ac<sub>2</sub>O ( 4 ml, 42.4 mmol) เติม pyridine ( 0.8 ml, 9.93 mmol) กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดด้วยน้ำ (3x10 ml) เก็บชั้น organic ทำให้แห้งด้วย anh.Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> แล้วกรอง anh.Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ออก นำไประเหยตัวทำละลายออก จะได้สารที่มีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาล ( 0.3069 g, 71.9 %) ค่า R<sub>f</sub> chromatogram = 0.44 (EtOAc:Hexene, 1:1)

## 2.การทดสอบการออกฤทธิ์การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน

การทดสอบการออกฤทธิ์การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยใช้วิธี dopachrome 96 well plate เป็นการอาศัยการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้นคือ L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ซึ่งถูกเอนไซม์ไทโรซิเนสเปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาล ซึ่งสารละลายนี้จะดูดกลืนคลื่นแสงที่ 492 nm ถ้าตัวอย่างมีความสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูง ความเข้มข้นของสารละลายสีน้ำตาลก็จะลดลง ซึ่งอาจจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า IC<sub>50</sub> โดยการคำนวณ % การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้จาก

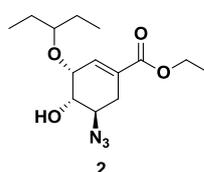
$$\% \text{ tyrosinase inhibition} = (1-B/A) \times 100$$

เมื่อกำหนดให้ A คือเอนไซม์ที่ไม่มีการยับยั้ง และ B คือเอนไซม์ที่ไม่มีการยับยั้ง

โดยมี Kojic acid ถูกใช้เป็นสารมาตรฐาน

## ผลการวิจัย

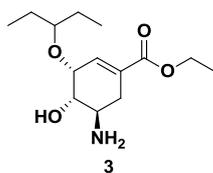
การสังเคราะห์ (3*R*,4*S*,5*R*)-ethyl 5-azido-4-hydroxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 2



$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$ , ppm): 0.90 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H,  $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)$ ), 0.94 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H,  $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)$ ), 1.30 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $(-\text{CH}_2\text{CH}_3)$ ), 1.46-1.65 (m, 4H,  $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)$ ), 2.25 (dd,  $J_1 = 3.6$  Hz,  $J_2 = 3.6$  Hz, 1H,  $(-\text{CH}_2-)$ ), 2.61-2.72 (br-s, 1H,  $(-\text{OH})$ ), 2.83 (dd,  $J_1 = 2.1$  Hz,  $J_2 = 2.1$  Hz, 1H,  $(-\text{CH}_2-)$ ), 3.46 (q,  $J = 6.0$  Hz, 1H,  $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)$ ), 3.71-3.80 (m, 1H,  $(-\text{CH}-\text{N}_3)$ ), 3.87 (q,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $(-\text{CH}-\text{OH})$ ), 4.09-4.15 (m, 1H,  $(-\text{CH}-\text{O}-)$ ), 4.23 (q,  $J = 5.4$  Hz, 2H,  $(-\text{CH}_2\text{CH}_3)$ ), 6.81-6.89 (m, 1H,  $(-\text{CH}=\text{C}-)$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$ , ppm): 9.6 ( $2\times\text{-C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 14.2 ( $(-\text{CH}_2\text{CH}_3)$ ), 26.1 ( $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)$ ), 26.5 ( $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)$ ), 28.2 ( $(-\text{CH}_2-)$ ), 58.9 ( $(-\text{CH}-\text{N}_3)$ ), 61.1 ( $(-\text{CH}_2\text{CH}_3)$ ), 70.3 ( $(-\text{CH}-\text{OH})$ ), 71.0 ( $(-\text{CH}-\text{O}-)$ ), 82.0 ( $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)$ ), 130.1 ( $(-\text{CH}=\text{C}-)$ ), 135.1 ( $(-\text{CH}=\text{C}-)$ ), 166.0 ( $(-\text{C}=\text{O})$ ); FTIR,  $\text{cm}^{-1}$ : 3528 ( $(-\text{OH})$ ), 2968 ( $(\text{C}=\text{C}-\text{H})$ ), 2108 ( $(-\text{N}_3)$ ), 1715 ( $(\text{C}=\text{O})$ ), 1248, 1098, 1055 ( $(\text{C}-\text{O})$ )

ข้อมูลที่ได้สามารถยืนยันโครงสร้าง เนื่องจากพบตำแหน่งของ  $^1\text{H-NMR}$  ที่ 2.61-2.72 (br-s, 1H,  $(-\text{OH})$ ), 3.87 (q,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $(-\text{CH}-\text{OH})$ ), 3.71-3.80 (m, 1H,  $(-\text{CH}-\text{N}_3)$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  ที่ 58.9 ( $(-\text{CH}-\text{N}_3)$ ), 70.3 ( $(-\text{CH}-\text{OH})$ ); FTIR,  $\text{cm}^{-1}$  ที่ 3528 ( $(-\text{OH})$ ), 2108 ( $(-\text{N}_3)$ )

### การสังเคราะห์ (3R,4S,5R)-ethyl 5-amino-4-hydroxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 3



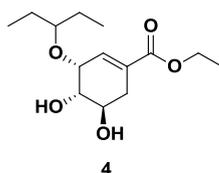
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$ , ppm): 0.89 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H,  $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)$ ), 0.94 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H,  $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)$ ), 1.30 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $(-\text{CH}_2\text{CH}_3)$ ), 1.44-1.62 (m, 4H,  $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)$ ), 2.03 (dd,  $J_1 = 8.7$  Hz,  $J_2 = 8.7$  Hz, 1H,  $(-\text{CH}_2-)$ ), 2.43 (s, 1H,  $(-\text{NH}_2)$ ), 2.43 (s, 1H,  $(-\text{OH})$ ), 2.84 (dd,  $J_1 = 4.5$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz, 1H,  $(-\text{CH}_2-)$ ), 3.15 (q,  $J = 8.7$  Hz, 1H,  $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)$ ), 3.40-3.53 (m, 1H,  $(-\text{CH}-\text{NH}_2)$ ), 4.08-4.15 (m, 1H,  $(-\text{CH}-\text{O}-)$ ), 4.21 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $(-\text{CH}_2\text{CH}_3)$ ), 6.83-6.91 (m, 1H,  $(-\text{CH}=\text{C}-)$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

( $\delta$ , ppm): 9.6 (2x-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.2 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 26.1 (2x-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26.6 (-CH<sub>2</sub>-), 48.4 (-CH-NH<sub>2</sub>), 61.0 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 71.1 (-CH-OH), 72.6 (-CH-O-), 81.9 (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 131.5 (-CH=C-), 135.0 (-CH=C-), 166.4 (-C=O); FTIR, cm<sup>-1</sup>: 3357 (-NH<sub>2</sub>), 2966 (C=C-H), 1715 (C=O), 1250, 1099 (C-O)

ข้อมูลที่ได้สามารถยืนยันโครงสร้าง เนื่องจากพบตำแหน่งของ<sup>1</sup>H-NMR ที่ 3.40-3.53 (m, 1H, (-CH-NH<sub>2</sub>)), 4.08-4.15 (m, 1H, (-CH-O-)); <sup>13</sup>C-NMR ที่ 48.4 (-CH-NH<sub>2</sub>), 71.1 (-CH-OH); FTIR, cm<sup>-1</sup> ที่ 3356 (-NH<sub>2</sub>)

#### การสังเคราะห์ (3R,4S,5R)-ethyl 4,5-dihydroxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate

4

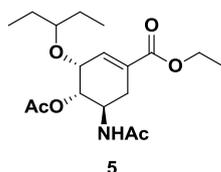


<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) ( $\delta$ ,ppm) : 0.80-1.10 (m, 6H, (-C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)); 1.30 (t, *J*=7.14 Hz, 3H, (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-)); 1.45-1.40 (m, 4H, (-C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)); 2.20 (ddd, *J*<sub>1</sub>=18.07 Hz, *J*<sub>2</sub>=7.85 Hz, *J*<sub>3</sub>=1.09 Hz, 1H, (-CH<sub>2</sub>-)); 2.55 (bs, 2H, (-OH-)); 2.94 (dd, *J*<sub>1</sub>=18.36 Hz, *J*<sub>2</sub>=5.17 Hz, 1H, (-OH-)); 3.46 (quint, *J*=5.69 Hz, 1H, (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)); 3.64 (dd, *J*<sub>1</sub>=8.6 Hz, *J*<sub>2</sub>=4.64 Hz, 1H, (OH-CH-CH-OH)); 3.99 (ddd, *J*<sub>1</sub>=*J*<sub>2</sub>=8.40 Hz, *J*<sub>3</sub>=5.56 Hz, 1H, (-CH<sub>2</sub>-CH-OH)); 4.12-4.35 (m, 1H, (-CH-O), 2H, (-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)); 6.82-6.95 (m, 1H, (-CH=C)); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) ( $\delta$ ,ppm) : 9.22-9.39 (2x-C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 13.90 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 25.94-26.18 (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 30.79 (-CH<sub>2</sub>-), 60.56 (-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 67.03 (-CH<sub>2</sub>-CH-OH), 71.30 (-CH-O), 71.58 (OH-CH-CH-OH), 81.51 (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 130.05 (-CH=C-), 135.21 (CH=C-), 166.37 (-C=O) FTIR, cm<sup>-1</sup> : 3445 (OH), 1713 (C=O)

ข้อมูลที่ได้สามารถยืนยันโครงสร้าง เนื่องจากพบตำแหน่งของ<sup>1</sup>H-NMR 3.64 (dd, *J*<sub>1</sub>=8.6 Hz, *J*<sub>2</sub>=4.64 Hz, 1H, (OH-CH-CH-OH)); 3.99 (ddd, *J*<sub>1</sub>=*J*<sub>2</sub>=8.40 Hz, *J*<sub>3</sub>=5.56 Hz, 1H, (-CH<sub>2</sub>-CH-OH)); 4.12-

4.35 (m, 1H, (-CH-O), 2H, (-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)); <sup>13</sup>C-NMR ที่ 135.21 (CH=C-), 166.37 (-C=O) ; FTIR, cm<sup>-1</sup> : 3445 (OH), 1713 (C=O)

การสังเคราะห์ (3R,4S,5R)-ethyl 5-acetamido-4-acetoxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 5

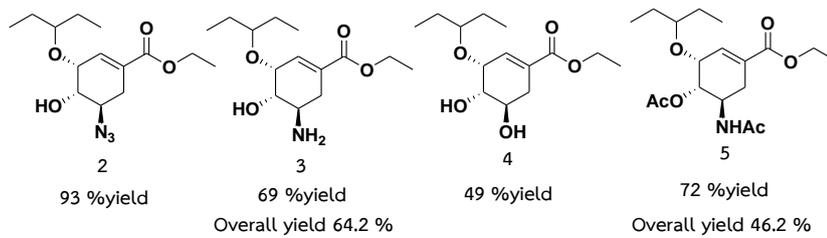


<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)( $\delta$ , ppm): 0.88 (t,  $J$ = 7.5 Hz, 3H, (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.95 (t,  $J$ = 7.5 Hz, 3H, (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.29 (t,  $J$ = 7.2 Hz, 3H, (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), 1.57 (q,  $J$ = 7.2 Hz, 4H, (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)), 1.98 (s, 3H, (-CO)CH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 3H, (-CO)CH<sub>3</sub>), 2.03 (dd,  $J$ = 8.7 Hz,  $J$ = 8.7 Hz, 1H, (-CH<sub>2</sub>-)), 3.02 (dd,  $J$ <sub>1</sub>= 6.0 Hz,  $J$ <sub>2</sub>= 5.7 Hz, 1H, (-CH<sub>2</sub>-)), 3.33 (q,  $J$ = 5.7 Hz, 1H, (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)), 4.12-4.18 (m, 1H, (-CH-O-)), 4.20 (q,  $J$ = 7.2 Hz, 2H, (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), 4.60 (q,  $J$ = 8.4 Hz, 1H, (-CHNHAc)), 4.97 (dd,  $J$ <sub>1</sub>= 3.6 Hz,  $J$ <sub>2</sub>= 12.0 Hz, 1H, (-CH-OAc)), 6.12 (d,  $J$ = 8.4 Hz, 1H, (-NH-(C=O)-CH<sub>3</sub>)), 6.83-6.89 (m, 1H, (-CH=C-)) ; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) ( $\delta$ , ppm): 9.2 (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 9.9 (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.2 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23.1 (-O-(CO)-CH<sub>3</sub>), 25.8 (-NH-(CO)-CH<sub>3</sub>-), 26.4 (2x-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 31.2 (-CH<sub>2</sub>-), 44.9 (-CH-NH-(C=O)-CH<sub>3</sub>), 61.0 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 70.0 (-CH-O-), 72.1 (-CH-O-(C=O)-CH<sub>3</sub>), 82.7 (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 130.7 (-CH=C-), 135.4 (-CH=C-), 166.2 (-C=O), 170.6 (-CH-NH-(C=O)-CH<sub>3</sub>), 171.2 (-CH-O-(C=O)-CH<sub>3</sub>) ; FTIR, cm<sup>-1</sup>: 3286 (-NH), 2968 (C=C-H), 1716 (C=O), 1243, 1062 (C-O)

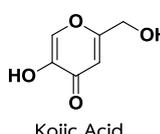
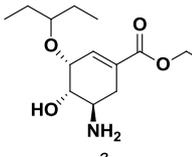
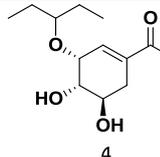
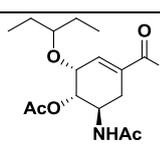
ข้อมูลที่ได้สามารถยืนยันโครงสร้าง เนื่องจากพบตำแหน่งของ <sup>1</sup>H-NMR ที่ 1.98 (s, 3H, (-CO)CH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 3H, (-CO)CH<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C-NMR ที่ 170.6 (-CH-O-(C=O)-CH<sub>3</sub>), 171.2 (-CH-NH-(C=O)-CH<sub>3</sub>) ; FTIR, cm<sup>-1</sup> ที่ 3286 (-NH)

### สรุปผลการวิจัย

จากการสังเคราะห์ อนุพันธ์โอเซลทามิเวียร์ โดยใช้สารตั้งต้นคือ Epoxide (1) ซึ่งพบว่าเกิดปริมาณของผลิตภัณฑ์ขึ้นในแต่ละขั้นตอนดังนี้



และจากการศึกษาความสามารถของอนุพันธ์โอเซลทามิเวียร์ทั้งสามตัวที่ทำการสังเคราะห์ได้ในกรยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้ Kojic acid เป็นสารเปรียบเทียบ ได้ผลการทดลองดังตาราง

สาร	% Inhibition at 1.0 mM
 Kojic Acid	95.09 ± 0.10]
 3	12.06 ± 0.19
 4	13.97 ± 0.19
 5	8.97 ± 0.10

จากการสังเคราะห์อนุพันธ์โอเซลทามิเวียร์ เพื่อใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า อนุพันธ์ของโอเซลทามิเวียร์ หมายเลข 3 และ อนุพันธ์ของโอเซลทามิเวียร์ หมายเลข 4 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ที่ดีกว่า อนุพันธ์ของโอเซลทามิเวียร์ หมายเลข 5 โดยใช้ Kojic acid เป็นสารเปรียบเทียบ ซึ่งผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า อนุพันธ์ โอเซลทามิเวียร์เหล่านี้จะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ใช้เป็นสารทำให้ผิวขาวได้ และเพื่อนำไปพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางต่อไป

#### ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษเปรียบเทียบตำแหน่งไฮดรอกซิลในโครงสร้างว่าเป็นตำแหน่งที่สำคัญในการทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อไป เพื่อพัฒนาโมเลกุลอื่นๆเพิ่มขึ้น

#### เอกสารอ้างอิง

##### ภาษาไทย

จิตร สิทธิอมร, นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย, สมศักดิ์ ภัคภิญโญ, จิโรจ ศศิปรีชญจันทร์, คณิศศักดิ์ อรรวีระกุล, ยง ภูววรรณ, ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ, สันนิภา สุรทัศน์, วิจิตร บรรลุนารา, รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, รัตยา ลือชาพุฒิพร, วิชชุดา ธนกิจเจริญพัฒน์, ภูรี อนันต์โชติ, อลงกร อมรศิลป์, สุทธิพร จิตต์มิตรภาพ. *ใช้หวัดนก.. พลิกสถานการณ์ด้วยความรู้*, พิมพ์ครั้งที่ 1, สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550.

จักรพันธ์ เนรังษี. วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม. 2555, 19 : 9-12.

มานิตา หาญพานิชเจริญ. วารสารศูนย์บริการวิชาการ. 2546, 11 : 19-23.

##### ภาษาต่างประเทศ

Kim, C. U.; Lew, W.; Williams, M. A.; Liu, H.; Zhang, L.; Swaminathan, S.; Bischofberger, N.; Chen, M. S.; Mendel, D. B.; Tai, C. Y.; Laver, W. G.; Stevens, R. C. Influenza Neuraminidase Inhibitors Possessing a Novel Hydrophobic Interaction in the Enzyme Active Site: Design, Synthesis, and Structural Analysis of Carbocyclic Sialic Acid Analogues with Potent Anti-Influenza Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 681-690.

Kim, C. U.; Lew, W.; Williams, M. A.; Wu, H.; Zhang, L.; Chen, X.; Escarpe, P. A.; Mendel, D. B.;

Laver, W. G.; Steven, R. C. Structure-Activity Relationship Studies of Novel Carbocyclic  
Influenza Neuraminidase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2451-2460.

Federspiel, M.; Fischer, R.; Henning, M.; Mair, H-J.; Oberhauser, T.; Rimmmler, G.; Albiez, T.; Bruhin,  
J.; Estermann, H.; Gandert, C.; Gockel, V.; Gotzo, S.; Hoffmann, U.; Huber, G.; Janatsch,  
G.; Lauper, S.; Rockel-Stabler, O.; Trussardi, R.; Zwahlen, A. G. Industrial Synthesis of  
the Key Precursor in the Synthesis of the Anti-influenza Drug OseltamivirPhosphate  
Ro 64-0796/002, GS-4104-02: Ethyl)3R,4S,5S(-4,5-epoxy-3-)1-ethyl-propoxy(-cyclohex-  
1-ene-1-carboxylate. *Org. Process Res. Dev.* **1999**, *3*, 266-274.

Rohloff, J. C.; Kent, K. M.; Postich, M. J.; Becker, M. W.; Chapman, H. H.; Kelly, D. E.; Lew, W.;

Louie, M. S.; McGee, L. R.; Prisbe, E. J.; Schultze, L. M.; Yu, R. H.; Zhang, L. *J. Org.*  
*Chem.* **1998**, *63*, 4545-4550.

---