



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “สารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส
จากกระชายดำ”

(Acetylcholinesterase inhibition compounds from *Kaempferia parviflora*)

โดย

อาจารย์ ดร. พัฒนรา สวัสดิ์

30 มิถุนายน 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “สารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสจากกระชายดำ”
(Acetylcholinesterase inhibition compounds from *Kaempferia parviflora*)

ผู้วิจัย

อาจารย์ ดร. พัฒรา สวัสดิ์

หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากคณะบุคคลหลายฝ่าย ซึ่งผู้วิจัยขอขอบคุณอย่างยิ่ง ได้แก่ คณาจารย์และนักศึกษาระดับปริญญาโทและเอก หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับคำแนะนำและการช่วยเหลือในด้านต่างๆ ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กรรณก อิงคินันท์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก สำหรับคำแนะนำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสด้วยวิธี Microplate

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจาก โครงการทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ. ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

พัมพรา สวัสดิ์

Abstract

Project Code : MRG4980018

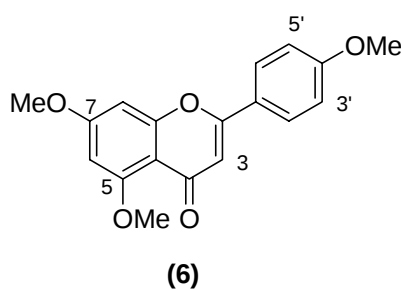
Project Title : Acetylcholinesterase inhibition compounds from *Kaempferia parviflora*

Investigator : Pattara Sawasdee

E-mail address: p_tiew@hotmail.com

Project period : 1 July 2006 - 30 June 2008

According to the extracts of *Kaempferia parviflora* showed the potent acetylcholinesterase inhibitory activity, they were separated and purified to obtain the active constituents by chromatography techniques. Three flavones were afforded from the hexane extract and additional eleven flavones were isolated from the dichloromethane extract. Their structures were completely elucidated based on NMR analysis and compared with literature reports. Moreover, five unnatural flavones were synthesized to investigate the structural activity relationship (SAR) of acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity. The results of AChE inhibition examination showed that compound **6**, 5,7,4'-trimethoxyflavone, had the highest activity (56% inhibition) at concentration 1 mg/mL. It was observed that compounds bearing the 5,7,4'-trimethoxy groups and a free methoxy group at C-3 had a significant inhibitory effect in the concentration tested, but bearing a 5-hydroxyl group reduced the inhibitory potency. On the other hand, flavones bearing a 3'-methoxy or 5'-methoxy did not influence the inhibitory effect.



Keywords: *Kaempferia parviflora*, flavones, acetylcholinesterase

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4980018

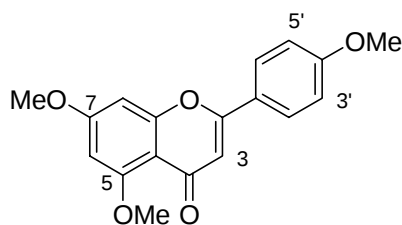
ชื่อโครงการ : สารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสจากกระชายดำ

ชื่อนักวิจัย : อาจารย์ ดร. พัฒรา สวัสดิ์

E-mail address: p_tiew@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2549 – 30 มิถุนายน 2551

สิ่งสกัดจากกระชายดำให้ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสที่น่าสนใจ ดังนั้นจึงได้ทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์เพื่อหาสารออกฤทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารฟลาโวนได้ 3 ชนิดจากสิ่งสกัดเฮกเซน และอีก 11 ชนิดจากสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน วิเคราะห์และพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารด้วยเทคนิคทางเอ็นเอ็มอาร์และเทียบกับเอกสารอ้างอิง นอกจากนี้ยังได้สังเคราะห์ฟลาโวนที่ไม่พบในธรรมชาติอีก 5 ชนิดเพื่อใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ผลการทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวพบว่า สาร (6) คือ 5,7,4'-ไตรเมทอกซีฟลาโวน ให้ฤทธิ์สูงที่สุด (ยับยั้งได้ 56%) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีข้อสังเกตว่าสารที่มีหมู่เมทอกซีที่ตำแหน่ง 5, 7 และ 4' โดยที่ไม่มีหมู่เมทอกซีที่ตำแหน่งที่ 3 จะมีฤทธิ์การยับยั้งที่ดี แต่ถ้ามีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 5 จะทำให้ฤทธิ์ลดลง ในทางกลับกัน ฟลาโวนที่มีหมู่เมทอกซีที่ตำแหน่งที่ 3' หรือ 5' จะไม่มีผลต่อฤทธิ์ดังกล่าวเลย



(6)

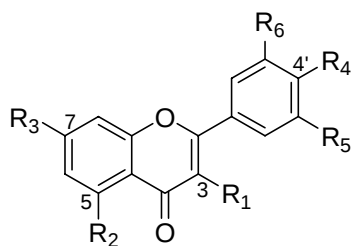
คำหลัก: กระชายดำ, ฟลาโวน, อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

Executive Summary

อัลไซเมอร์ เป็นโรคสมองเสื่อมชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยที่สุดโดยจะมีการเสื่อมของเซลล์สมองทุกส่วนไปแล้วไม่มีวันหาย ผู้ป่วยจะไม่สามารถควบคุมอารมณ์ตัวเอง ไม่สามารถแยกทุกผิด มีปัญหาในเรื่องการใช้ภาษา การประสานงานของกล้ามเนื้อเสียไป ความจำเสื่อม ในระยะท้ายของโรคจะสูญเสียความจำทั้งหมด จำนวนผู้ป่วยด้วยโรคนี้มีจำนวนมากขึ้นทุกปี และภาระในการเฝ้าดูแลรักษาโดยแพทย์ และญาติก็จะต้องมีมากขึ้นด้วย ด้วยเหตุนี้แพทย์ทั่วโลกจึงให้ความสนใจศึกษาและวิจัยโรคอัลไซเมอร์เป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นประเด็นป้องกันหรือรักษา ปัจจุบันยังไม่มียาที่รักษาให้หายขาดได้แต่มียาซึ่งอาจช่วยควบคุมอาการต่างๆ ให้น้อยลงได้ชั่วคราว แต่โรคก็จะดำเนินต่อไปเรื่อยๆ เมื่อถึงระยะที่เป็นมากๆ ยาก็จะไม่ได้ผล สาเหตุของโรคอัลไซเมอร์มีสมมติฐานว่าสามารถเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุด้วยกัน แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โดยสาเหตุที่สำคัญสาเหตุหนึ่งก็คือผู้ป่วยอัลไซเมอร์จะมีปริมาณเซลล์สมองลดลงและสารสื่อประสาท Acetylcholine (ACh) ลดลงด้วย สารสื่อประสาทนี้เป็นตัวเชื่อมโยงคำสั่งต่างๆ ของเซลล์สมองที่ควบคุมด้านความจำ ความคิดอ่านและพฤติกรรมต่างๆ เมื่อ ACh ลดลง จึงทำให้เกิดอาการต่างๆ ของโรคอัลไซเมอร์ ปัจจุบันมียาที่ช่วยเพิ่มปริมาณของ ACh ในสมอง โดยออกฤทธิ์ต้าน Acetylcholinesterase (AChE) ที่ย่อยสลาย ACh คือ AChE inhibitors เช่น tacrine, rivastigmine และ galantamine ยาเหล่านี้จึงช่วยให้ผู้ป่วยอัลไซเมอร์มีอาการดีขึ้นได้ และชะลอการทรุดลงของโรคถ้าได้ใช้ในระยะเริ่มแรก แต่จะไม่ทำให้โรคหายขาด

จากการศึกษาเบื้องต้นของหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสเบื้องต้นกับสิ่งสกัดสมุนไพร 50 ชนิด ด้วยวิธี TLC assay พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรหลายชนิดแสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจ รวมทั้งสิ่งสกัดจากเหง้ากระชายดำ *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker จึงได้เลือกสิ่งสกัดสมุนไพรจากกระชายดำ ศึกษาหาสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

งานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดเหง้ากระชายดำด้วยเมทานอลด้วยเทคนิค Soxhlet extraction จากนั้นนำมาสกัดแบบแบ่งส่วนด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และบิวทานอลอิ่มตัว ตามลำดับ นำสิ่งสกัดเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน ไปแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 14 ชนิดด้วยกัน คือ สารฟลาโวน (1)-(13) และ *p*-methoxycinnamic acid (14) นอกจากนี้ยังทำการสังเคราะห์สารฟลาโวนเพิ่มเติมอีก 5 ชนิด คือ สาร (17), (18), (23), (25) และ (26) นำสารฟลาโวนเหล่านี้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่า สาร (6) คือ 5,7,4'-ไตรเมทอกซีฟลาโวน ให้ฤทธิ์สูงสุด (ยับยั้งได้ 56%) จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารฟลาโวนและฤทธิ์ยับยั้งดังกล่าว พบข้อสังเกตว่าสารที่มีหมู่เมทอกซีที่ตำแหน่ง 5, 7 และ 4' โดยที่ไม่มีหมู่เมทอกซีที่ตำแหน่งที่ 3 จะมีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีกว่า แต่ถ้ามีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 5 จะทำให้ฤทธิ์ลดลง ในทางกลับกัน ฟลาโวนที่มีหมู่เมทอกซีที่ตำแหน่งที่ 3' หรือ 5' จะไม่มีผลต่อฤทธิ์ดังกล่าวเลย



สาร	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	% การยับยั้ง
(1)	OMe	OH	OMe	H	H	H	NA
(2)	H	OH	OMe	H	H	H	NA
(3)	OMe	OH	OMe	OMe	H	H	NA
(4)	OMe	OH	OMe	OMe	OMe	H	NA
(5)	OMe	OMe	OMe	H	H	H	NA
(6)	H	OMe	OMe	OMe	H	H	56
(7)	H	OMe	OMe	H	H	H	47
(8)	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H	15
(9)	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H	15
(10)	H	OH	OMe	OMe	H	H	21
(11)	OMe	OH	OMe	OMe	OH	H	14
(12)	H	OH	OMe	OMe	OMe	H	n.t
(13)	H	OH	OMe	OH	H	H	n.t
(17)	H	H	H	H	H	H	32
(18)	H	H	H	OMe	OMe	OMe	22
(23)	OH	H	H	H	OMe	H	8
(25)	OMe	H	H	H	OMe	H	34
(26)	OCH ₂ Ph	H	H	H	OMe	H	22

หมายเหตุ % การยับยั้งของสารมาตรฐาน (galantamine) คือ 94%

NA = not active (ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง)

n.t = not test (ไม่ได้ทำการทดสอบ)

1. บทนำ

สมองเสื่อม (Dementia) เป็นภาวะที่สมองมีระดับความสามารถในการจัดการวางแผน ดำเนินกิจกรรมต่างๆ ลดลง ทำให้ผู้ป่วยมีปัญหาไม่สามารถเรียนรู้สิ่งใหม่ๆ คิดสิ่งต่างๆ ไม่ออก บุคลิกภาพเปลี่ยนแปลง วิตกกังวล รวมทั้งซึมเศร้า ภาวะสมองเสื่อมนั้นต่างจากความจำเสื่อม (Forgetfulness) โดยมักมีอาการอื่น นอกจากความจำเสื่อมร่วมด้วยโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease, AD) เป็นสาเหตุของสมองเสื่อมที่พบได้บ่อยมักพบในผู้สูงอายุ ทำให้เป็นปัญหาแก่ประเทศไทยที่มีจำนวนผู้สูงอายุมากขึ้น

สถิติที่แพทย์ได้จากการตรวจรักษาโรคอัลไซเมอร์ แสดงให้เห็นว่า 1 ใน 20 ของคนที่มีอายุ 75-84 ปี จะป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์ และ 1 ใน 5 ของคนที่มีอายุเกิน 85 ปี ก็จะเป็นโรคชนิดนี้เช่นกัน ส่วนคนที่อยู่ในวัย 40-70 ปี สถิติการเป็น คือ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศตวรรษก่อนหน้านี้นี้ ประชากรโลกน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์มีอายุเกิน 65 ปี ณ วันนี้ประชากร 7 เปอร์เซ็นต์ มีอายุเกิน 65 ปี และอีก 50 ปี 15-20 เปอร์เซ็นต์ของประชากรโลกจะมีอายุเกิน 65 ปี นั้นหมายความว่า ในอนาคตโลกจะถูกโรคอัลไซเมอร์ คุกคามหนัก เพราะจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคนี้จะมีมากขึ้นทุกปี และการในการเฝ้าดูแลรักษาโดยแพทย์ และญาติก็ต้องมีมากขึ้นด้วย ด้วยเหตุนี้แพทย์ทั่วโลกจึงให้ความสนใจศึกษาและวิจัยโรคอัลไซเมอร์ เป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นประเด็นป้องกันหรือรักษา ปัจจุบันยังไม่มียาที่รักษาให้หายขาดได้แต่มียาซึ่งอาจช่วยควบคุมอาการต่างๆ ให้น้อยลงได้ชั่วคราว แต่โรคก็จะดำเนินต่อไปเรื่อยๆ เมื่อถึงระยะที่เป็นมากๆ ยาก็จะไม่ได้ผล

สาเหตุของโรคอัลไซเมอร์มีสมมติฐานว่าสามารถเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุด้วยกัน แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โดยสาเหตุที่สำคัญสาเหตุหนึ่งก็คือ ผู้ป่วยอัลไซเมอร์จะมีปริมาณเซลล์สมองลดลงและสารสื่อประสาท Acetylcholine (ACh) ลดลงด้วย สารสื่อประสาทนี้เป็นตัวเชื่อมโยงคำสั่งต่างๆ ของเซลล์สมองที่ควบคุมด้านความจำ ความคิดอ่านและพฤติกรรมต่างๆ เมื่อ ACh ลดลง จึงทำให้เกิดอาการต่างๆ ของโรคอัลไซเมอร์ ปัจจุบันมียาที่ช่วยเพิ่มปริมาณของ ACh ในสมอง โดยออกฤทธิ์ต้าน Acetylcholinesterase (AChE) ที่ย่อยสลาย ACh คือ AChE inhibitors เช่น tacrine, rivastigmine และ galantamine ยาเหล่านี้จึงช่วยให้ผู้ป่วยอัลไซเมอร์มีอาการดีขึ้นได้ และชะลอการทรุดลงของโรคถ้าได้ใช้ในระยะเริ่มแรก แต่จะไม่ทำให้โรคหายขาด

ในประเทศไทยถึงแม้ว่า จำนวนผู้ป่วยยังมีไม่มากนัก เมื่อเทียบกับประชากรในโลกตะวันตก แต่ก็ก็นับว่าเป็นปัญหาสำคัญอันหนึ่ง ที่ควรจะหาทางป้องกันไว้ มีสมุนไพรไทยหลายชนิดที่การแพทย์อายุรเวทเชื่อว่า มีสรรพคุณในการกระตุ้นความคิดและฟื้นฟูความจำ เช่น น้ำมันจากเมล็ดกระถางลาย ใบบัวบก ขมิ้นชันและว่านน้ำ นอกจากนี้ ยังมีผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติได้ทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE กับสมุนไพรไทยหลายชนิด^[1] พบว่า สารสกัดจากรากบอระเพ็ดข้าว (*Stephania suberosa* Formann.) และจากรากพุทจีบ (*Tabernaemontana divaricata* (L.) R. Br. Ex Roem. & Schult.) ให้ผลการทดสอบที่ดีมาก (มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้น จะเห็นได้ว่า สมุนไพรไทยหลายชนิดมีศักยภาพในการป้องกันหรือรักษาโรคนี้ได้

จากการศึกษาเบื้องต้นของหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสเบื้องต้นกับสิ่งสกัดสมุนไพร 50 ชนิด ด้วยวิธี TLC

assay พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรหลายชนิดแสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจ รวมทั้งสิ่งสกัดจากเหง้ากระชายดำ *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker จึงได้เลือกสิ่งสกัดสมุนไพรจากกระชายดำ ศึกษาหาสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

ในประเทศไทยมีพืชที่เรียกว่ากระชายอยู่ 3 ชนิด คือกระชาย (เหลือง) กระชายแดงและกระชายดำ กระชายเหลืองและกระชายแดง เป็นพืชจำพวกเดียวกัน แต่เป็นพืชต่างชนิดกันและมีฤทธิ์ทางยาต่างกันเล็กน้อย โดยกระชายแดงจะมีกาบใบสีแดงเข้มกว่ากระชายเหลือง ส่วนกระชายดำเป็นพืชวงศ์ Zingiberaceae เช่นกันแต่อยู่ในสกุลเดียวกับเปราะหอมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora*

กระชายดำ เป็นพืชล้มลุกมีเหง้าใต้ดิน เนื้อในหัวอาจเป็นสีม่วงหม่น หรือสีดำ มีกลิ่นฉุนและแรง เป็นพืชสมุนไพร โดยรากเหง้าใช้เป็นยาขับปัสสาวะ ขับลม แก้ท้องอืดเฟ้อ จากการศึกษาเอกสารอ้างอิงทางวิชาการที่ผ่านมาของกระชายดำ พบว่า องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ ฟลาโวนอยด์^[2-4] ซึ่งสารเหล่านี้ได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย^[3, 5-7] ตัวอย่างเช่น สาร 5,7,4'-trimethoxyflavone และ 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย และยังพบว่าสารฟลาโวนอยด์อื่นๆ แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* และ *Mycobacterium* ได้ด้วย รวมทั้งสารเหล่านี้ไม่พบว่ามีสารใดทำให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบ นอกจากนี้ ยังพบว่า สารสกัดเอทานอลของกระชายดำมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดแดงใหญ่ และการหดเกร็งของลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูขาว และยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดของคน

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 2.1 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำ
- 2.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างของสารและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารอนุพันธ์ฟลาโวนที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำและจากการสังเคราะห์

3. วิธีทดลองและผลการทดลอง

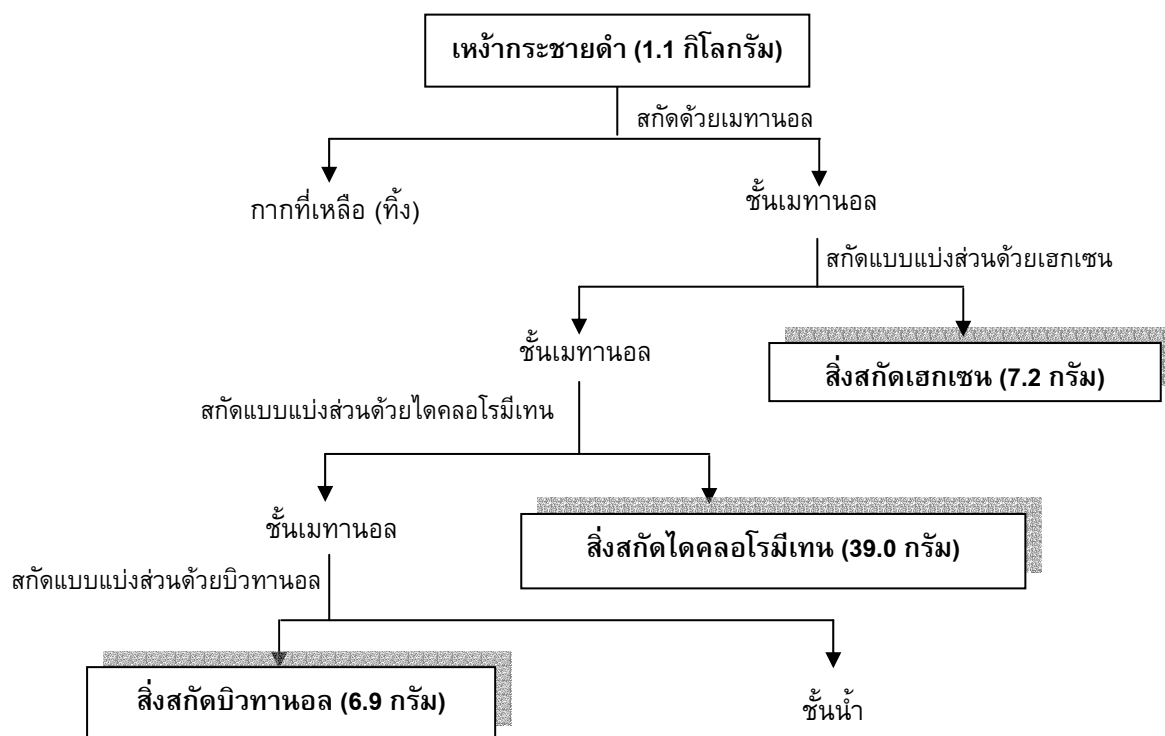
3.1 พืชตัวอย่าง

เหง้ากระชายดำ จังหวัดเลย ซื้อมาจากปากคลองตลาด กรุงเทพฯ เมื่อปี พ.ศ 2549

3.2 การสกัดเหง้ากระชายดำ

นำเหง้ากระชายดำที่แห้งและตัดเป็นชิ้นเล็กๆ จำนวน 1.1 กิโลกรัม มาทำการสกัดด้วยเมทานอล โดยใช้ soxhlet extractor เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นกรองเพื่อแยกกากออก สารละลายที่กรองได้นำไปกลั่นแบบลดความดันเพื่อแยกตัวทำละลายออก นำสิ่งสกัดเมทานอลที่ได้มาทำการสกัดด้วยเฮกเซน นำสิ่งสกัดในชั้นเฮกเซนไปกลั่นแบบลดความดันเพื่อแยกตัวทำละลายออกได้สิ่งสกัดเฮกเซน 7.2 กรัม เติมน้ำชั้นเมทานอลให้มีความเข้มข้นประมาณ 50 % ทำการสกัดต่อกับไดคลอโรมีเทน จากนั้นนำสิ่งสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทนไปกลั่นแบบลดความดันเพื่อแยกตัวทำละลายออก ได้สิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน 39.0 กรัม

และทำการสกัดชั้นเมทานอลด้วยบิวทานอลอิ่มตัว นำสิ่งสกัดในชั้นบิวทานอล ไปกลั่นแบบลดความดัน จะได้สิ่งสกัดบิวทานอล 6.9 กรัม โดยขั้นตอนการสกัดแสดงในแผนภาพที่ 1



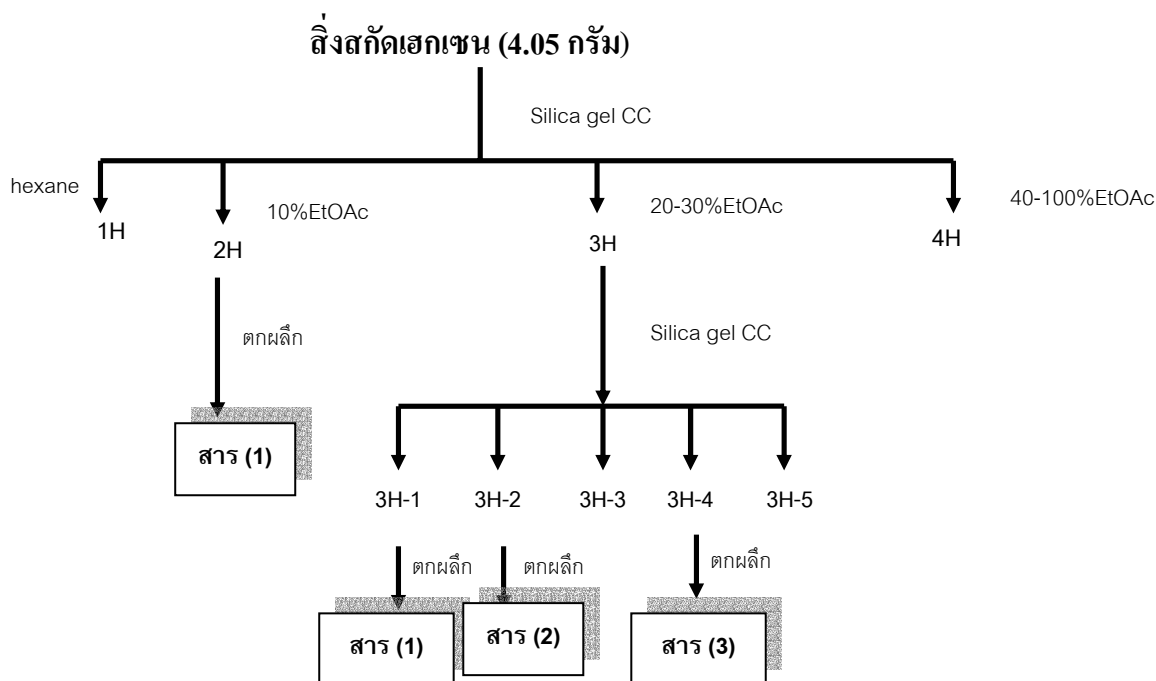
แผนภาพที่ 1 การสกัดเหง้ากระชายดำ

3.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเหง้ากระชายดำ

3.3.1 การแยกสารบริสุทธิ์ในสิ่งสกัดเฮกเซน

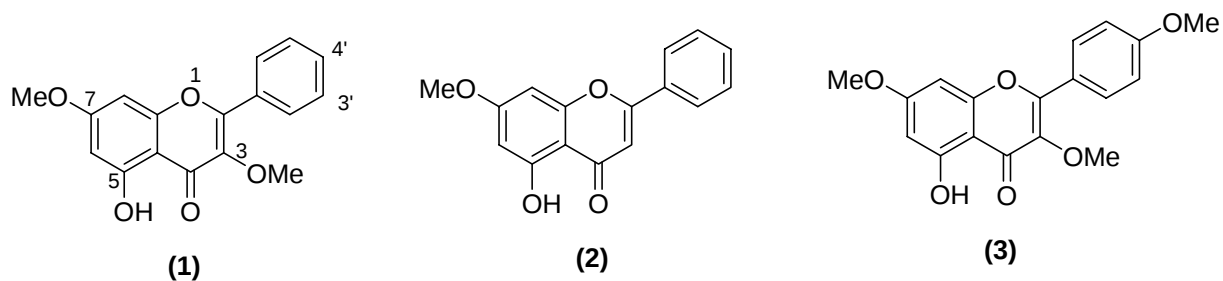
นำสิ่งสกัดเฮกเซนน้ำหนัก 4.05 กรัม มาแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลชนิด 60 G Art.7734 เป็นตัวดูดซับ เริ่มต้นชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน จากนั้นค่อยๆ เพิ่มขั้วตัวทำละลายที่ใช้ชะด้วยเอทิลแอซีเตต นำสารละลายที่ได้มากลั่นลดความดันจะได้ส่วนย่อยทั้งสิ้น 4 ส่วน (ส่วนย่อยที่ 1H-4H) นำส่วนย่อยที่ 2H มาตกผลึกจะได้สารบริสุทธิ์เป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนให้ชื่อว่า สาร (1) และนำส่วนย่อยที่ 3H มาทำการลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำจะได้สารออกมา 5 ส่วนย่อย (ส่วนย่อยที่ 3H-1 ถึง 3H-5) นำส่วนย่อยที่ 3H-1 มาตกผลึกซ้ำได้สารบริสุทธิ์เป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนซึ่งเป็นตัวเดียวกับ สาร (1) จากการตรวจสอบด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟี ส่วนย่อยที่ 3H-2 นำมาตกผลึกจะได้สารบริสุทธิ์เป็นของแข็งสีเหลืองให้ชื่อว่า สาร (2) และส่วนย่อยที่ 3H-4 นำมาตกผลึกได้สารบริสุทธิ์เป็นของแข็งสีเหลืองเข็มให้ชื่อว่า สาร (3) ดังแผนภาพที่ 2

สำหรับส่วนย่อยที่ 1H และ 4H ไม่ได้ทำการแยกสารบริสุทธิ์ต่อ เนื่องจากมีปริมาณสารน้อย



แผนภาพที่ 2 การแยกสารบริสุทธิ์จากสิ่งสกัดเฮกเซนของเหง้ากระชายดำ

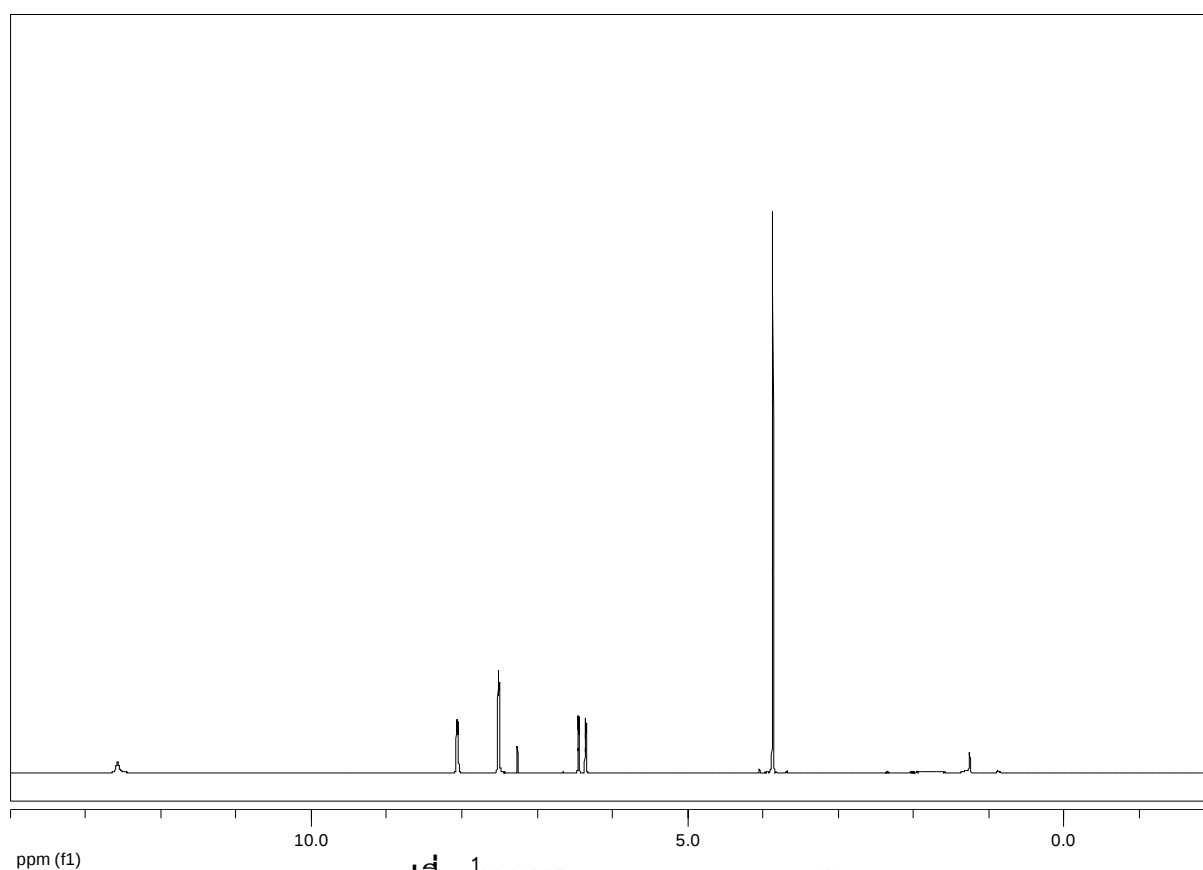
จากแผนภาพที่ 2 สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 3 ชนิด คือ สาร (1) 882.8 มิลลิกรัม, (2) 607.2 มิลลิกรัมและ (3) 669.6 มิลลิกรัม นำไปพิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วย ^1H และ ^{13}C -NMR spectroscopy และนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับรายงานอื่นๆ^[4] ทำให้ทราบว่าสารทั้ง 3 ชนิดนี้ คือ 5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone, 5-hydroxy-7-methoxyflavone, 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone ตามลำดับ ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2, ข้อมูล ^1H -NMR แสดงในตารางที่ 1 และ NMR spectrum แสดงในรูปที่ 3-8



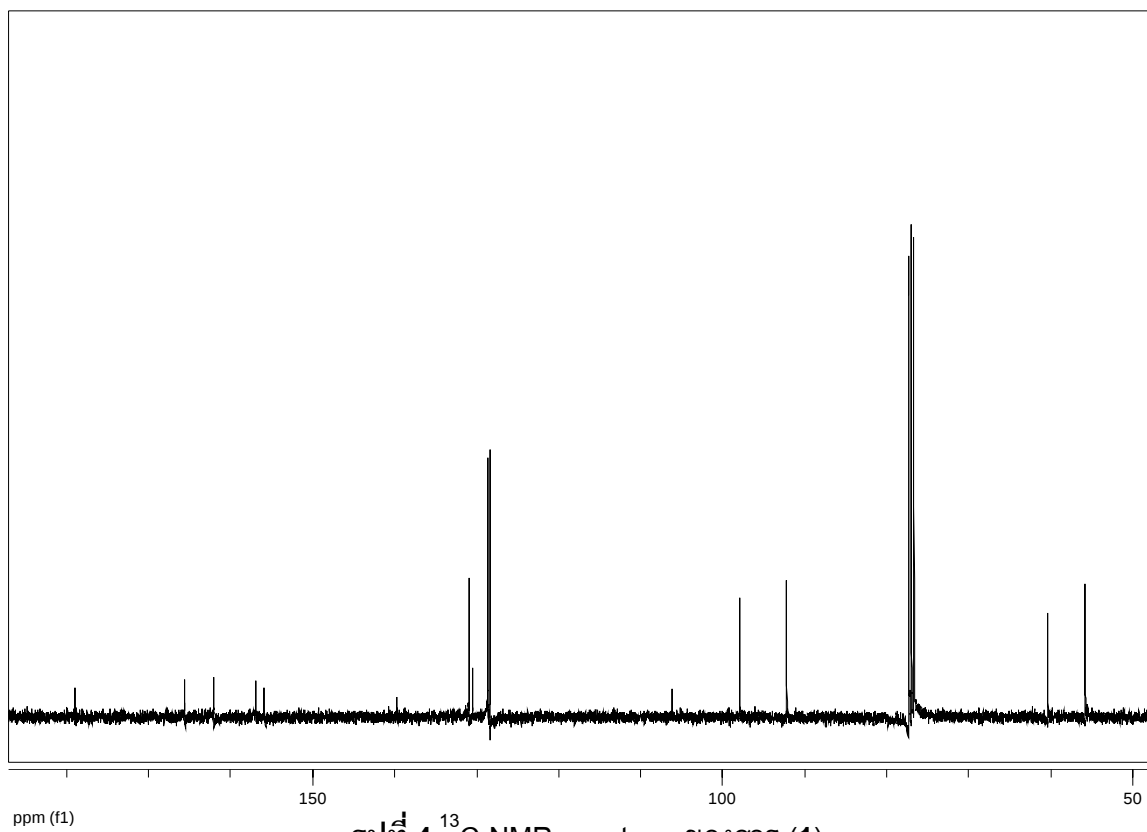
รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของสาร (1)-(3)

ตารางที่ 1 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสาร (1)-(3)

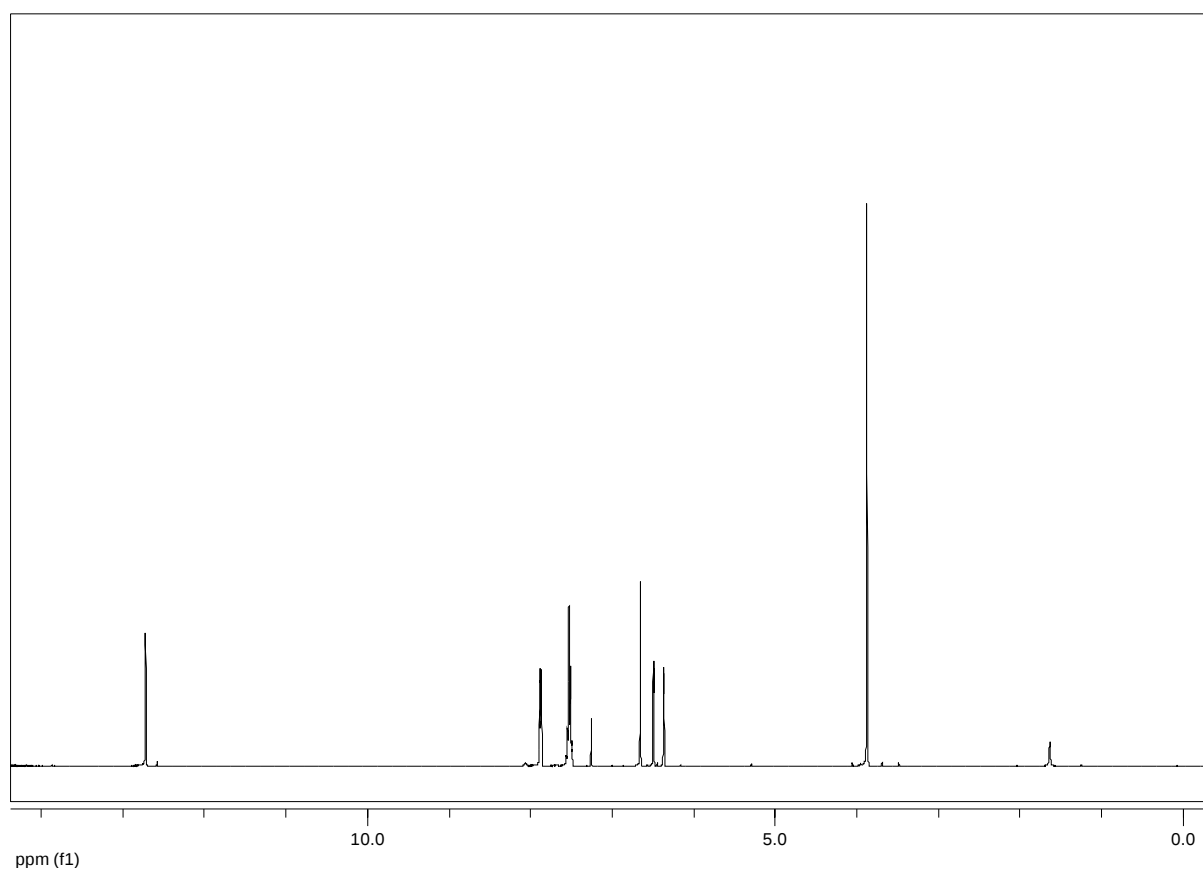
ตำแหน่ง	(1)	(2)	(3)
3	-	6.66, 1H, s	-
6, 8	6.35, 1H, d, $J = 2.0$ Hz 6.45, 1H, d, $J = 2.0$ Hz	6.37, 1H, d, $J = 2.4$ Hz 6.49, 1H, d, $J = 2.0$ Hz	6.35, 1H, d, $J = 2.0$ Hz 6.44, 1H, d, $J = 2.0$ Hz
2',3', 5',6'	7.51, 3H, m	7.53, 3H, m	7.02, 2H, m 8.08, 2H, m
4'	8.06, 2H, m	7.87, 2H, m	-
- OMe	3.87, 6H, s	3.88, 3H, s	3.86, 3H, s 3.88, 3H, s 3.90, 3H, s
- OH	12.58, 1H, s	12.72, 1H, s	12.66, 1H, s



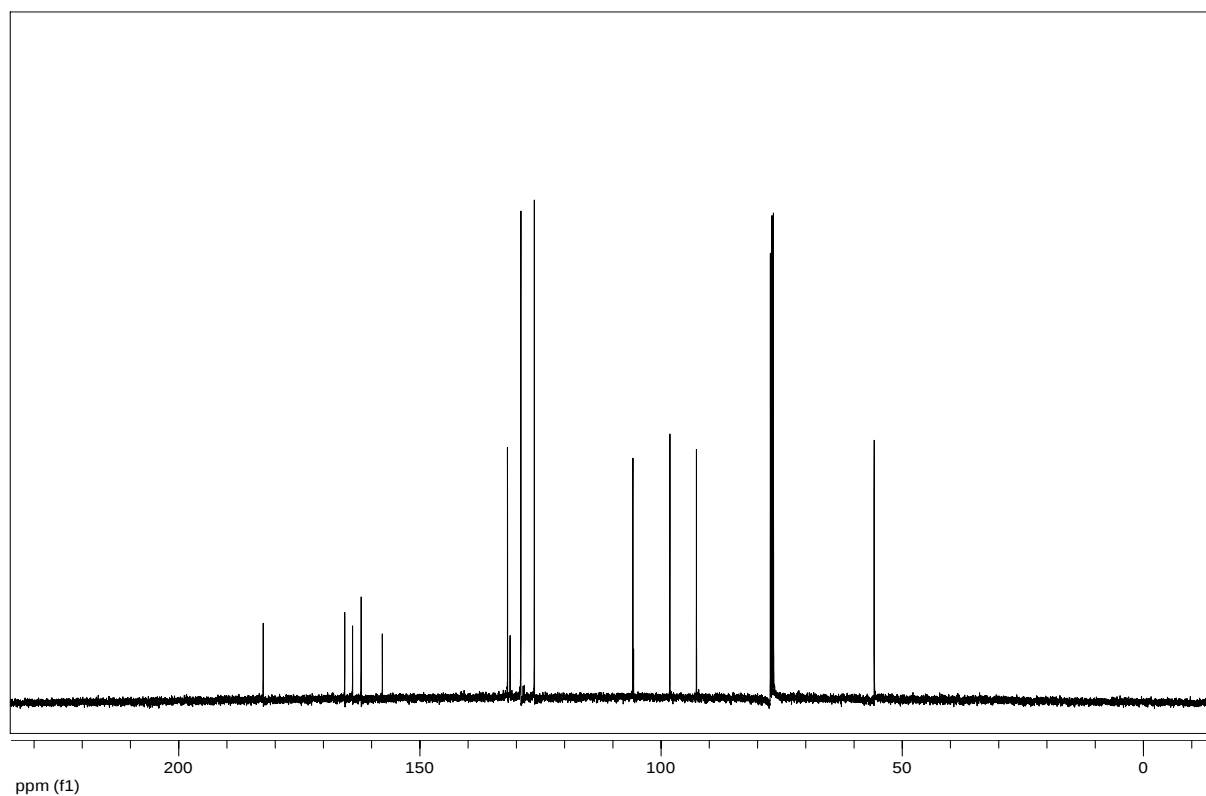
รูปที่ 3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร (1)



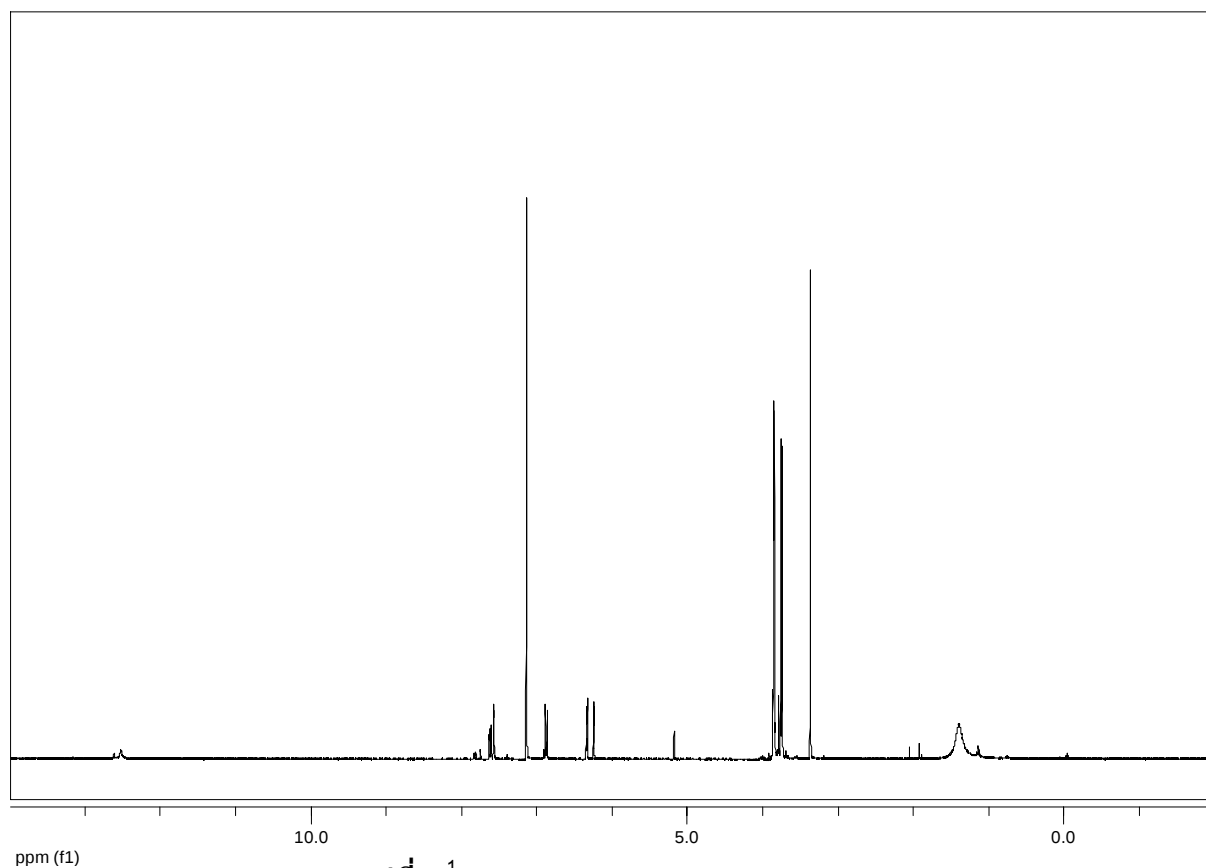
รูปที่ 4 ^{13}C -NMR spectrum ของสาร (1)



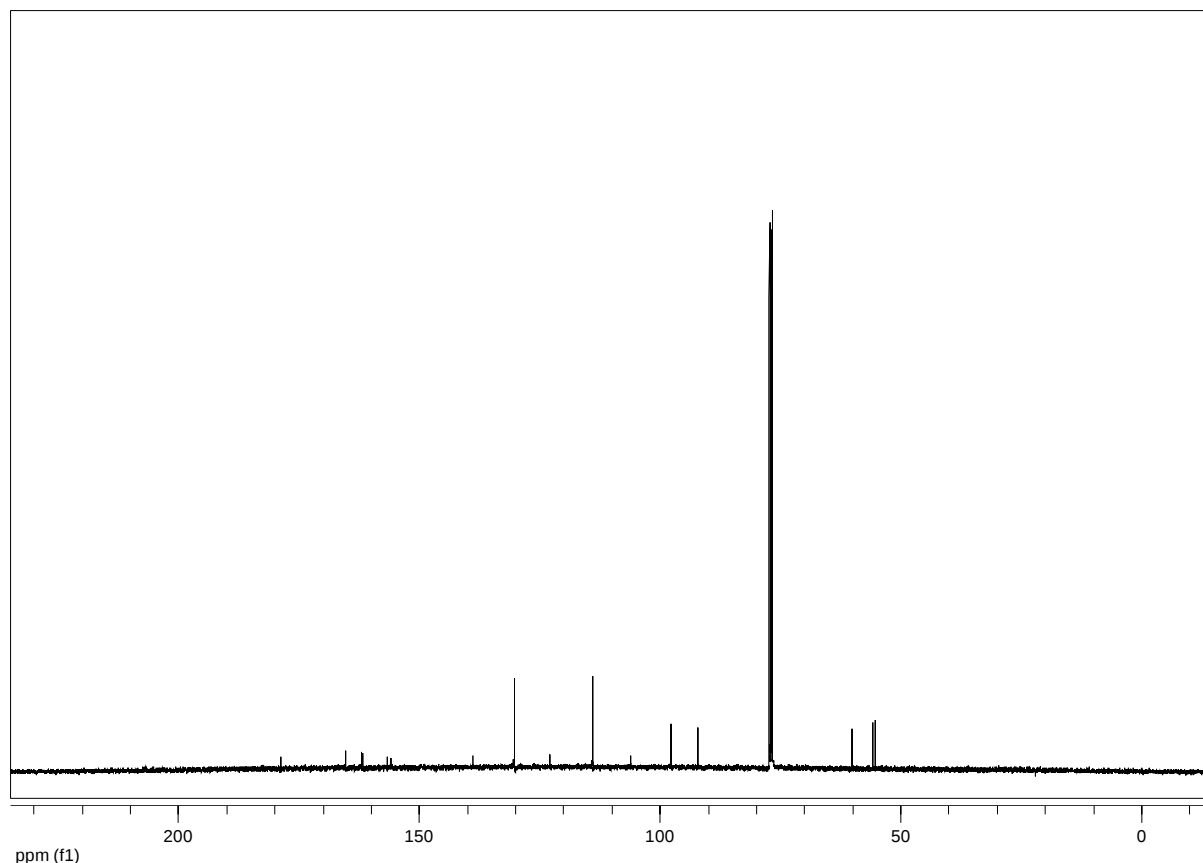
รูปที่ 5 ^1H -NMR spectrum ของสาร (2)



รูปที่ 6 ^{13}C -NMR spectrum ของสาร (2)



รูปที่ 7 ^1H -NMR spectrum ของสาร (3)



รูปที่ 8 ^{13}C -NMR spectrum ของสาร (3)

3.3.2 การแยกสารบริสุทธิ์ในสิ่งสกัดไคคอลโรมีเทน

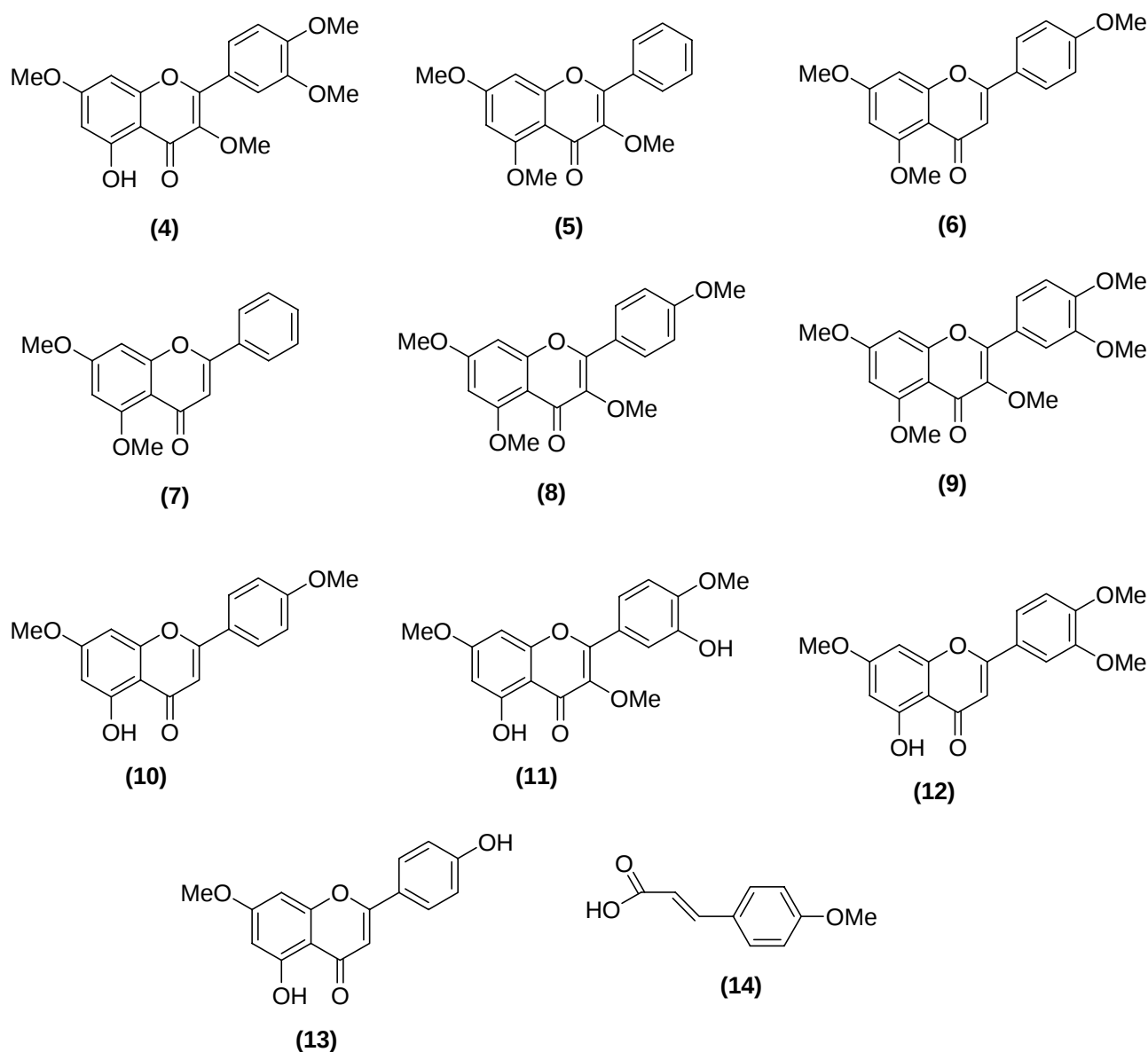
นำสิ่งสกัดไคคอลโรมีเทนหนัก 31.8 กรัม มาแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (Quick-column chromatography) โดยใช้ซินเตอร์กลาสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60 G Art.7731 เป็นตัวดูดซับ เริ่มต้นชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน จากนั้นค่อยๆ เพิ่มขั้วตัวทำละลายด้วยเอทิลแอซิเตทและเมทานอล ตามลำดับ ใช้ตัวทำละลายครั้งละ 500 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มากลั่นลดความดัน แล้วนำส่วนย่อยทั้งหมดที่ได้มาตรวจสอบด้วยทิน-แลร์โครมาโทกราฟีเพื่อรวมส่วนย่อยที่เหมือนกันไว้ด้วยกัน ได้ส่วนย่อยทั้งสิ้น 13 ส่วน (ส่วนย่อย 1C-13C)

จากนั้นทำการแยกส่วนย่อยที่มีจุดสารที่น่าสนใจด้วย ซิลิกาเจล และ/หรือ Sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี หลายๆ ครั้ง สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้อีก 11 ชนิด คือ สาร (4) – (14) ดังแสดงการแยกในแผนภาพที่ 3

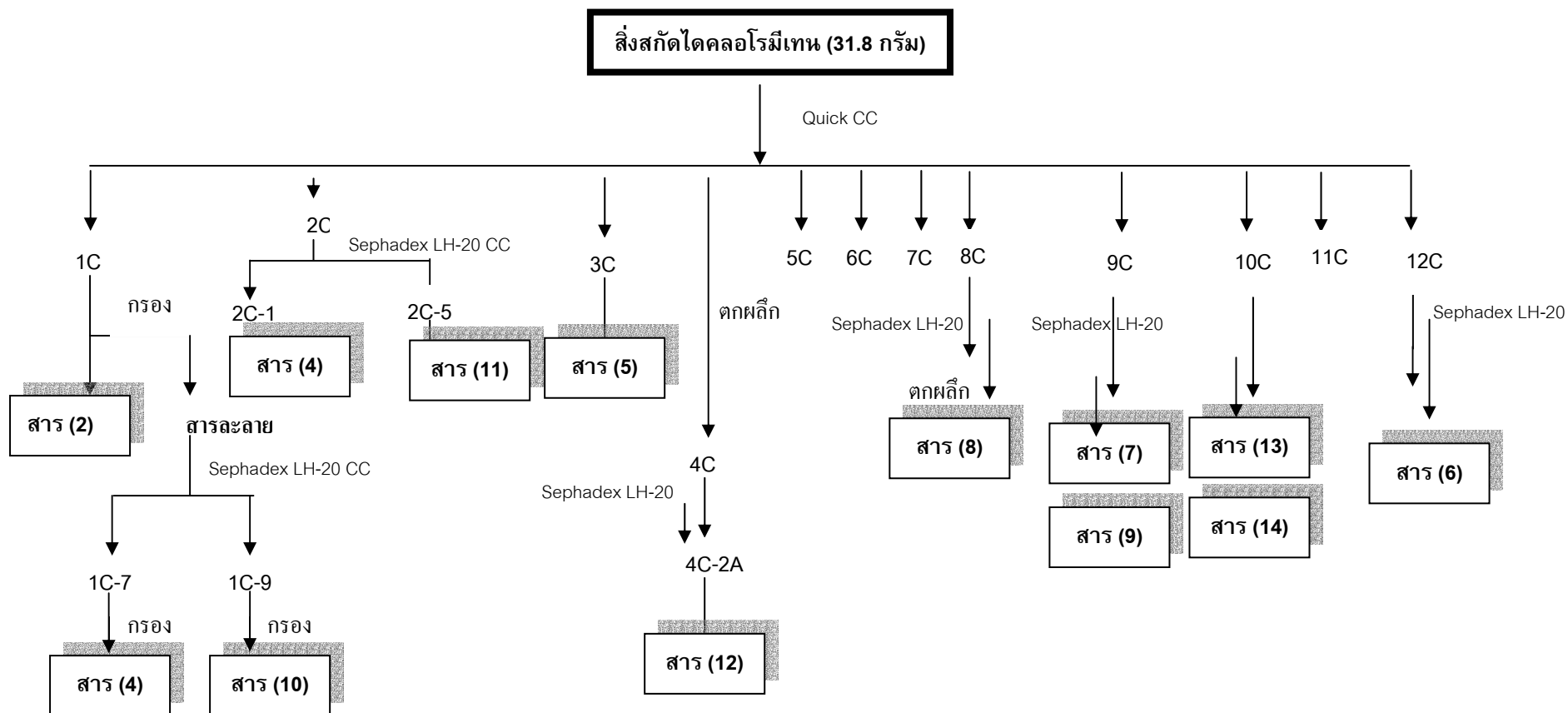
จากแผนภาพที่ 3 สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 11 ชนิด ได้แก่ สาร (4) 12 มิลลิกรัม, (5) 6 มิลลิกรัม, (6) 394.9 มิลลิกรัม, (7) 889.2 มิลลิกรัม, (8) 54.2 มิลลิกรัม, (9) 998.3 มิลลิกรัม, (10) 496.7 มิลลิกรัม, (11) 8 มิลลิกรัม, (12) 5 มิลลิกรัม, (13) 6 มิลลิกรัม, (14) 134.7 มิลลิกรัม จากการพิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วย ^1H และ ^{13}C -NMR spectroscopy พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับข้อมูลกับรายงานอื่นๆ

ทำให้ทราบสูตรโครงสร้างของสาร (4)-(14) คือ 5-hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone ^[4,8], 3,5,7-trimethoxyflavone ^[4,9], 5,7,4'-trimethoxyflavone ^[2,4], 5,7-dimethoxyflavone ^[2,4,9], 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone ^[4,10], 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone ^[4,10], 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone ^[4], 5,3'-dihydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone ^[10], 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxyflavone, 5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavone ^[11] และ *p*-methoxy cinnamic acid ^[12] ตามลำดับ โดยพบว่า สาร (11)-(14) ยังไม่เคยมีรายงานพบในกระชายดำมาก่อน

สูตรโครงสร้างของสาร (4) – (14) แสดงในรูปที่ 9, ข้อมูล ¹H-NMR แสดงในตารางที่ 2-4 และ NMR spectrum แสดงในรูปที่ 10-29



รูปที่ 9 สูตรโครงสร้างของสาร (4)-(14)



แผนภาพที่ 3 แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากสิ่งสกัดไคคลอโรมีเทนของเหง้ากระชายดำ

ตารางที่ 2 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสาร (4)-(7)

ตำแหน่ง	(4)	(5)	(6)	(7)
3	-	-	6.58, 1H, s	6.71, 1H, s
6, 8	6.36, 1H, d, $J = 2.0$ Hz 6.45, 1H, d, $J = 2.0$ Hz	6.33, 1H, d, $J = 2.0$ Hz 6.50, 1H, d, $J = 2.0$ Hz	6.34, 1H, d, $J = 2.4$ Hz 6.53, 1H, d, $J = 2.4$ Hz	6.35, 1H, d, $J = 2.0$ Hz 6.55, 1H, d, $J = 2.0$ Hz
2', 5', 6'	6.99, 1H, d, $J = 8.8$ Hz 7.69, 1H, d, $J = 8.8$ Hz 7.74, 1H, dd, $J = 2.0, 8.8$ Hz	7.48, 3H, m 8.06, 2H, m	6.97, 2H, d, $J = 8.8$ Hz 7.79, 2H, d, $J = 9.2$ Hz	7.47, 3H, m 7.84, 2H, m
3'	-			
4'	-			
- OMe	3.87, 3H, s 3.88, 3H, s 3.97, 3H, s 3.98, 3H, s	3.88, 3H, s 3.89, 3H, s 3.95, 3H, s	3.86, 3H, s 3.89, 3H, s 3.93, 3H, s	3.90, 3H, s 3.93, 3H, s

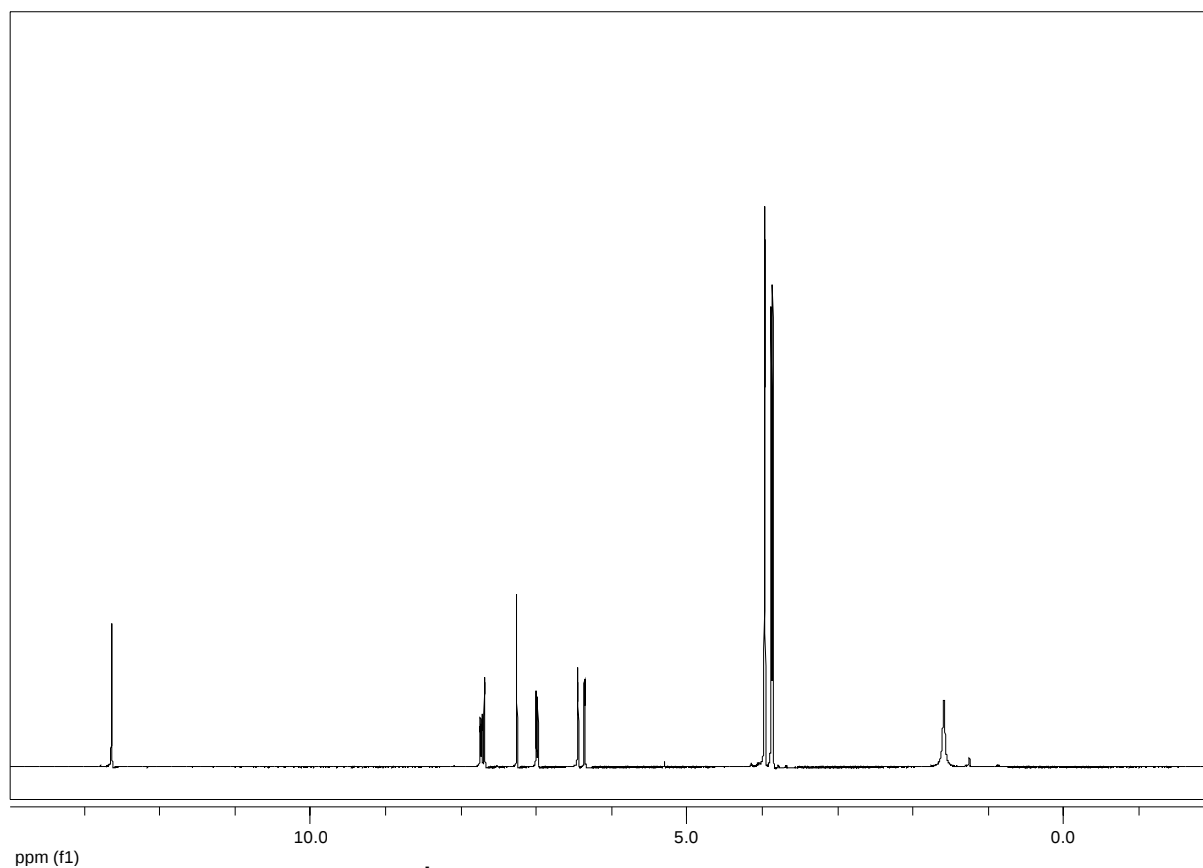
ตารางที่ 3 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสาร (8)-(9) และ (11)

ตำแหน่ง	(8)	(9)	(11)
6, 8	6.34, 1H, br s 6.50, 1H, br s	6.35, 1H, br s 6.51, 1H, br s	6.36, 1H, d, $J = 2.0$ Hz 6.45, 1H, d, $J = 2.0$ Hz
2', 5', 6'	7.00, 2H, d, $J = 8.8$ Hz 8.06, 2H, d, $J = 8.4$ Hz	6.98, 1H, d, $J = 8.4$ Hz 7.70, 1H, s 7.72, 1H, s	6.90, 1H, d, $J = 8.4$ Hz 7.69, 1H, d, $J = 2.0$ Hz 7.66, 1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz
3'		-	-
- OMe	3.87, 3H, s 3.88, 3H, s 3.89, 3H, s 3.96, 3H, s	3.87, 3H, s 3.90, 3H, s 4.00, 9H, s	3.80, 3H, s 3.81, 3H, s 3.92, 3H, s
5-OH	-	-	12.63, 1H, s

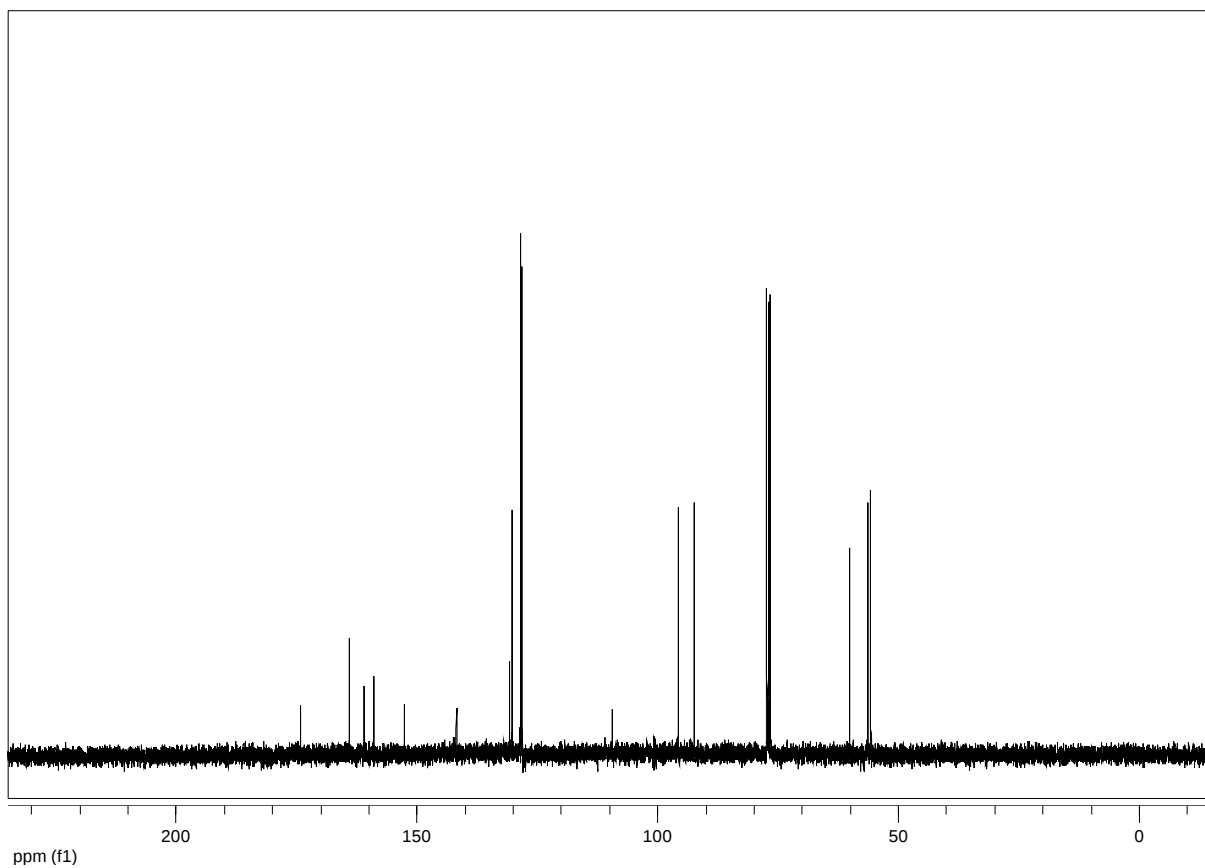
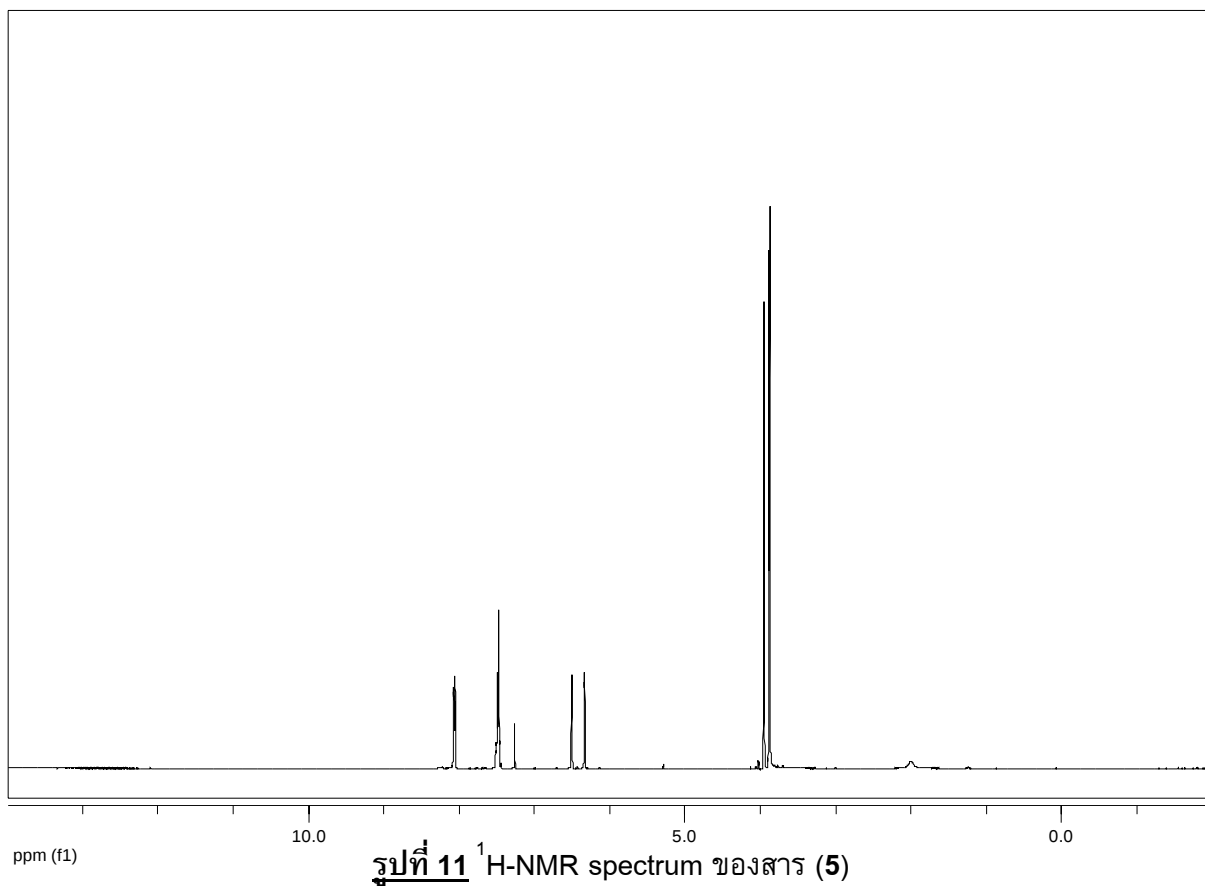
ตารางที่ 4 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสาร (10), (12) และ (13)

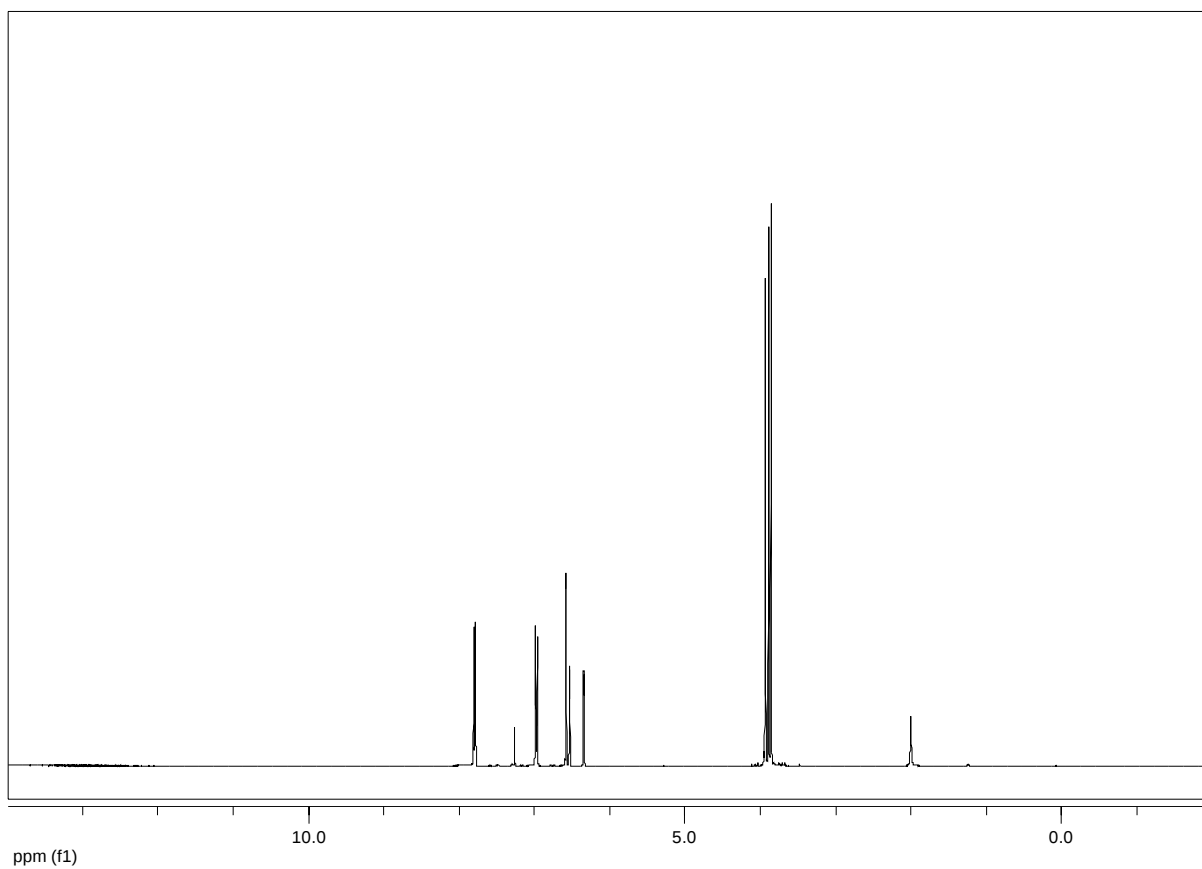
ตำแหน่ง	(10)	(12)	(13)*
3	6.58, 1H, s	5.70, 1H, s	6.50, 1H, s
6, 8	6.36, 1H, d, $J = 2.0$ Hz 6.45, 1H, d, $J = 2.0$ Hz	6.35, 1H, d, $J = 2.4$ Hz 6.44, 1H, d, $J = 2.0$ Hz	6.29, 1H, d, $J = 2.4$ Hz 6.44, 1H, d, $J = 2.4$ Hz
2', 5', 6'	7.01, 2H, d, $J = 9.2$ Hz 7.84, 2H, d, $J = 8.8$ Hz	6.97, 1H, d, $J = 8.8$ Hz 7.69, 1H, d, $J = 2.0$ Hz 7.72, 1H, dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz	6.87, 2H, d, $J = 8.8$ Hz 7.72, 2H, d, $J = 8.8$ Hz
3'			
4'	-		-
- OMe	3.88, 3H, s 3.89, 3H, s	3.86, 3H, s 3.87, 3H, s 4.00, 6H, s	3.82, 3H, s
5-OH	12.81, 1H, s	12.6, 1H, s	-

* $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ เล็กน้อย

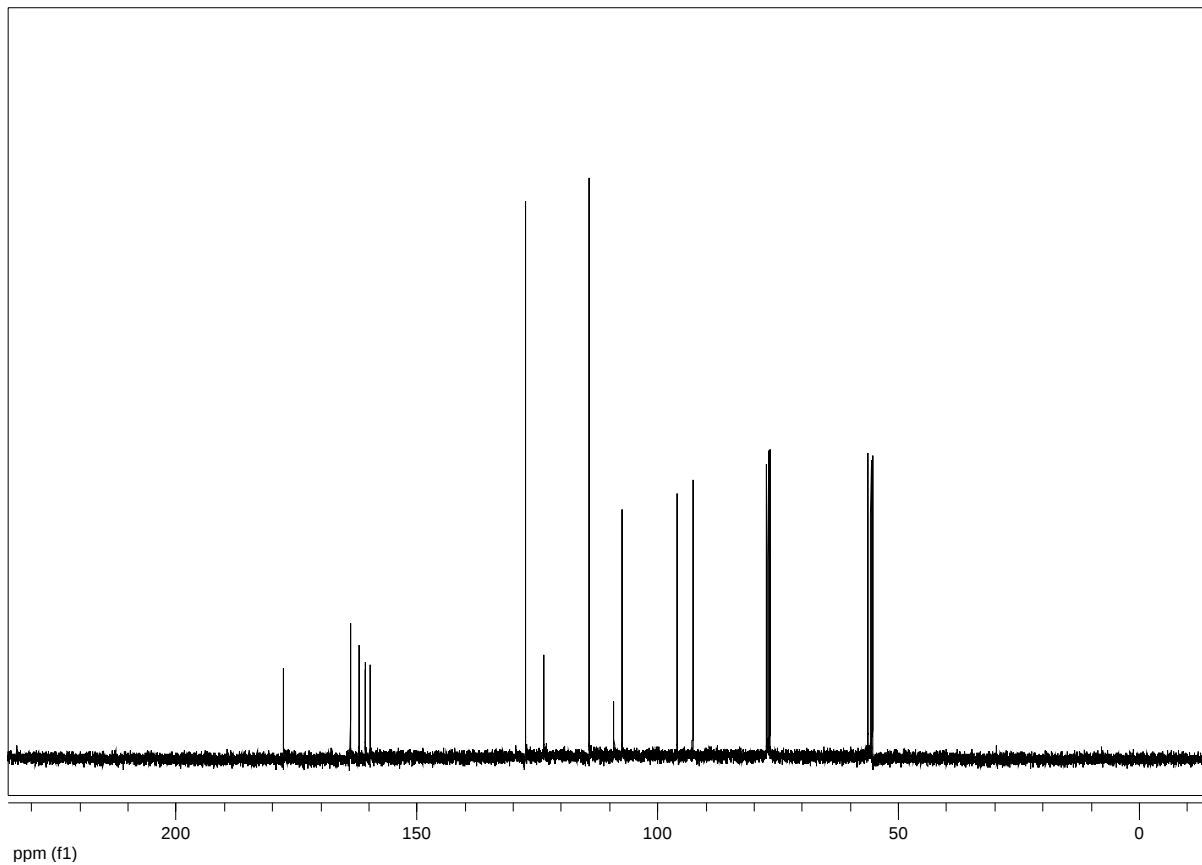


รูปที่ 10 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร (4)

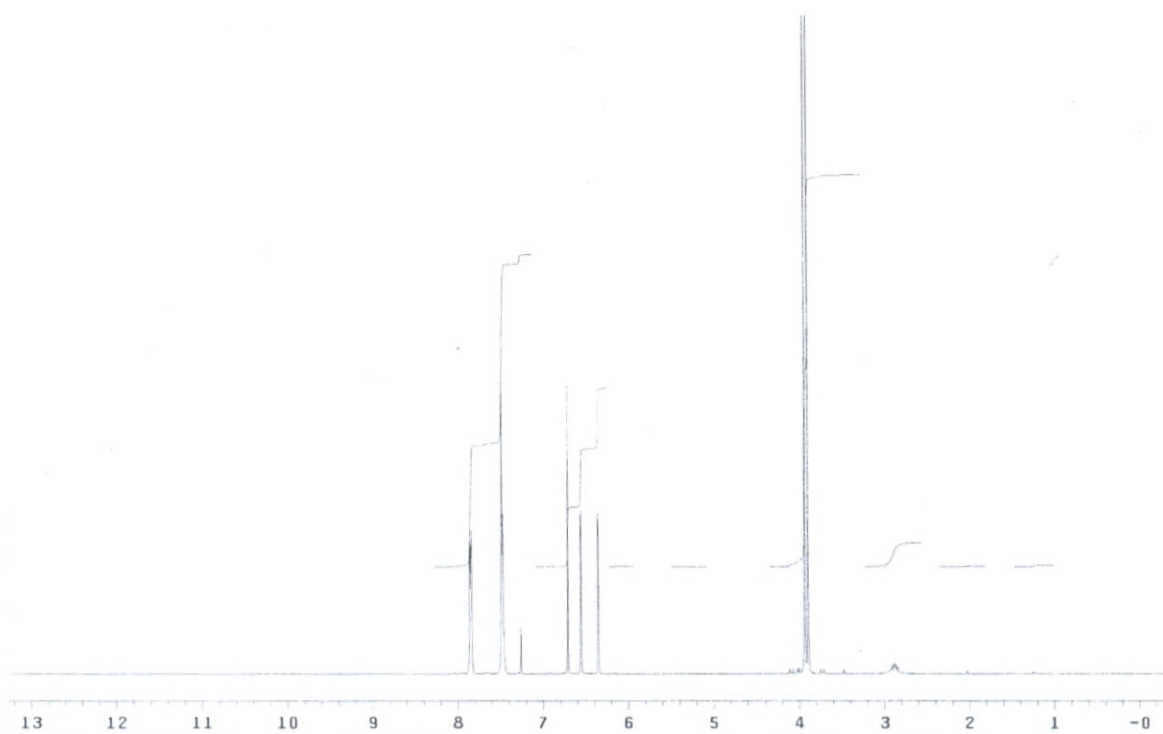




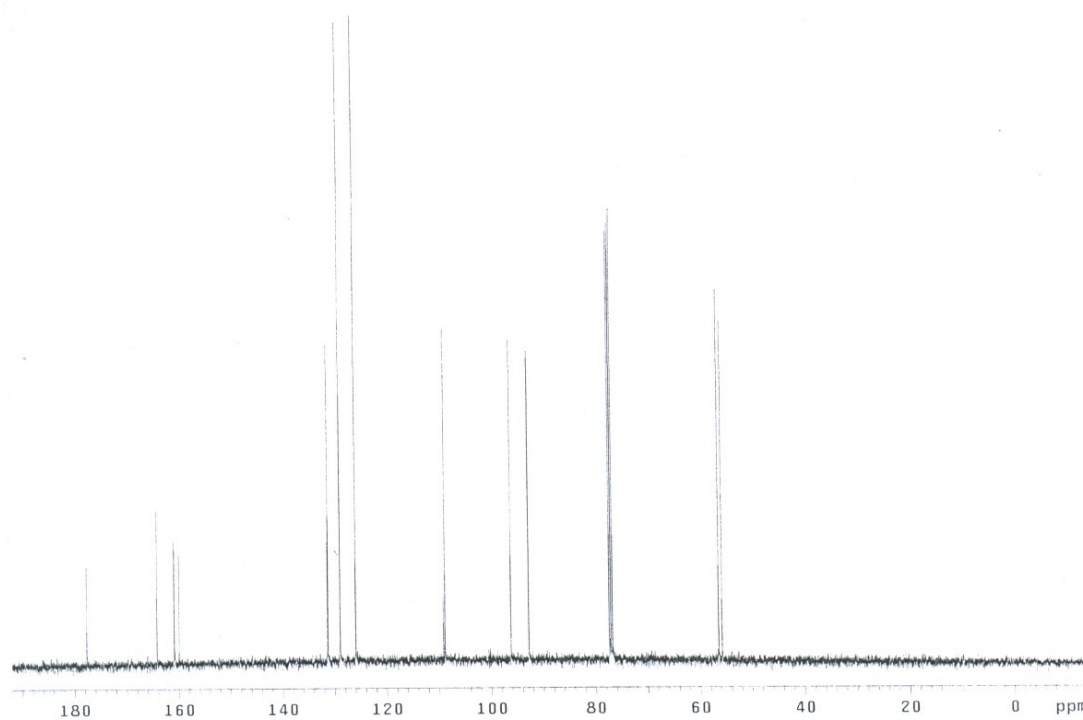
รูปที่ 13 ^1H -NMR spectrum ของสาร (6)



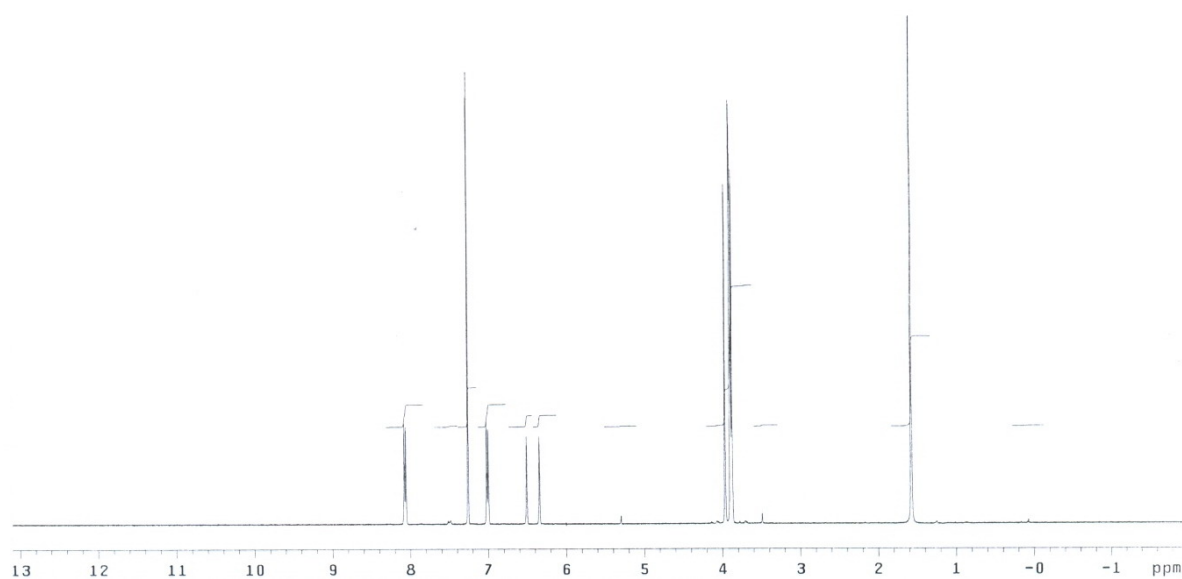
รูปที่ 14 ^{13}C -NMR spectrum ของสาร (6)



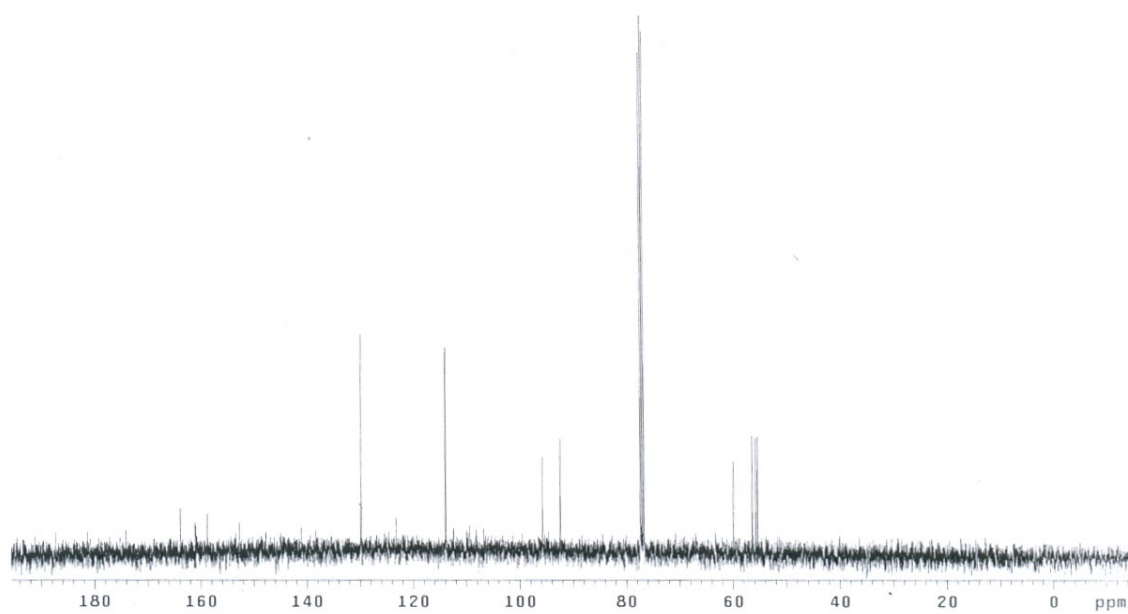
รูปที่ 15 ^1H -NMR spectrum ของสาร (7)



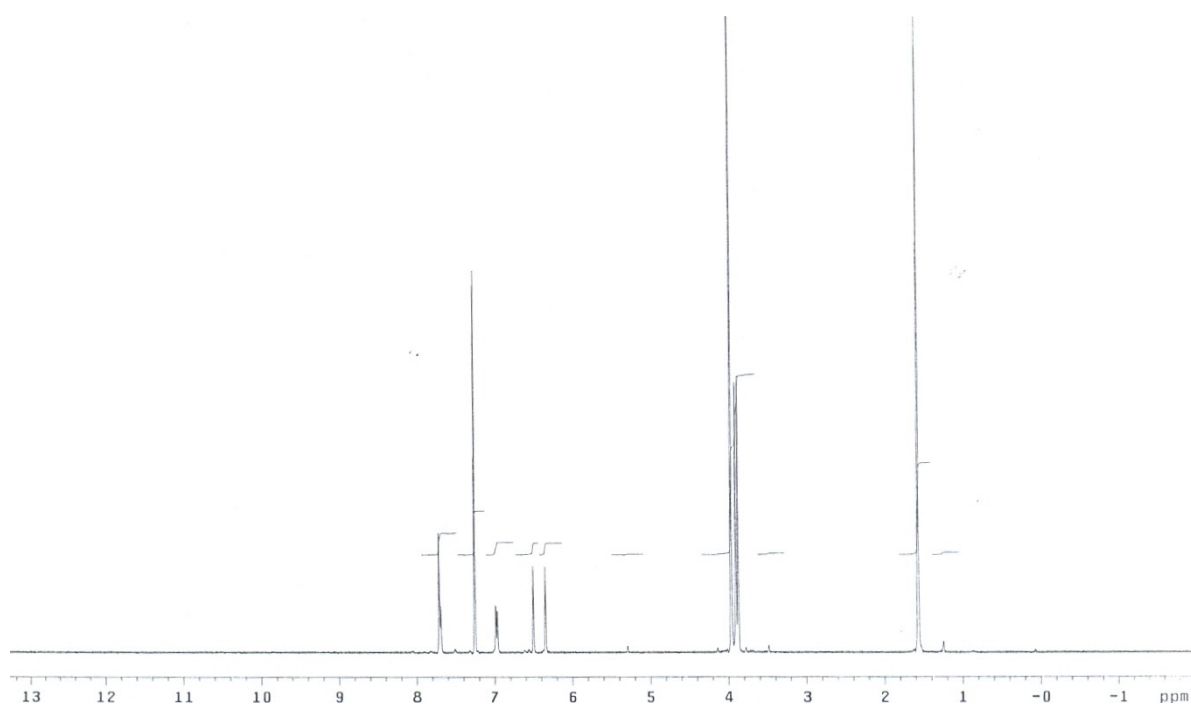
รูปที่ 16 ^{13}C -NMR spectrum ของสาร (7)



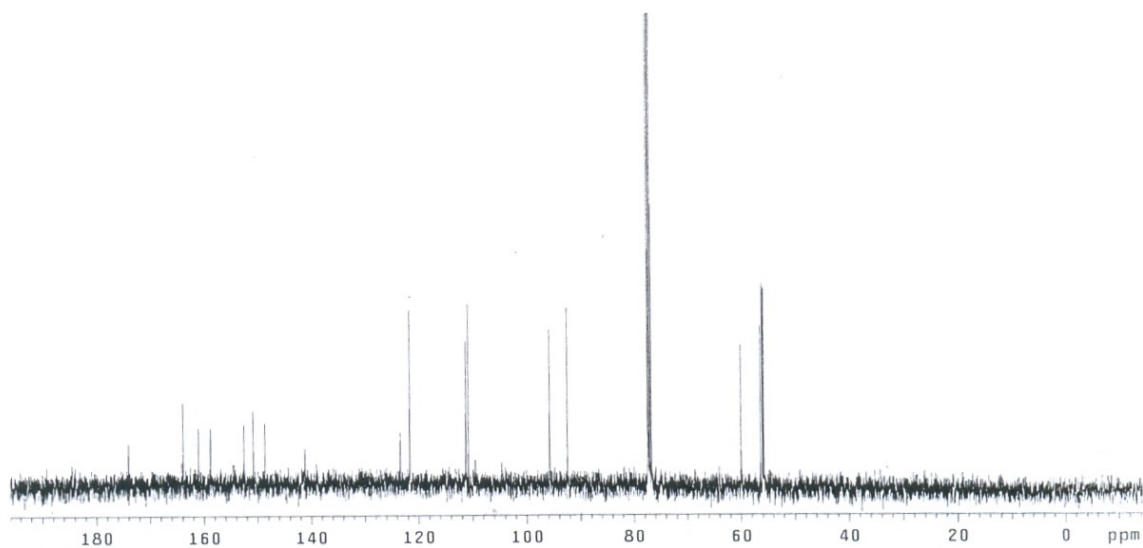
รูปที่ 17 ^1H -NMR spectrum ของสาร (8)



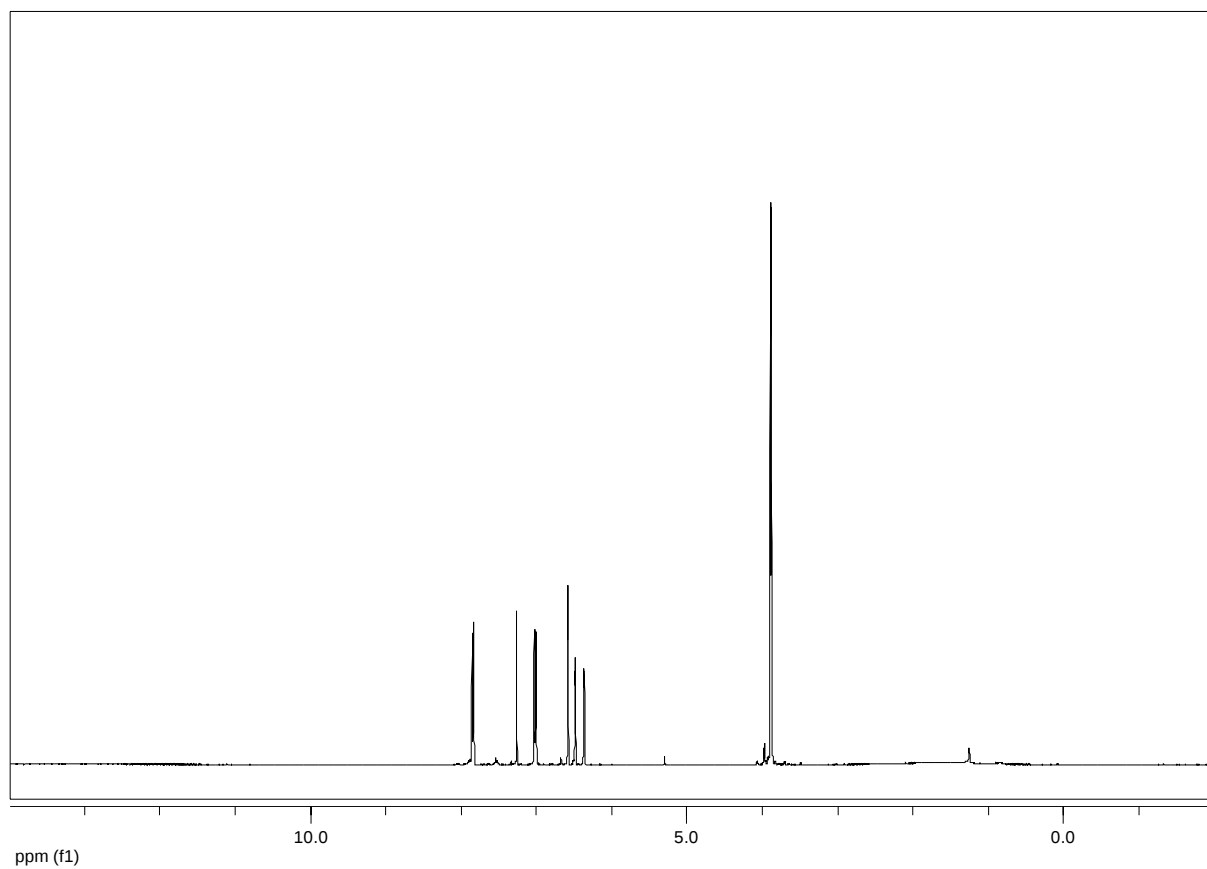
รูปที่ 18 ^{13}C -NMR spectrum ของสาร (8)



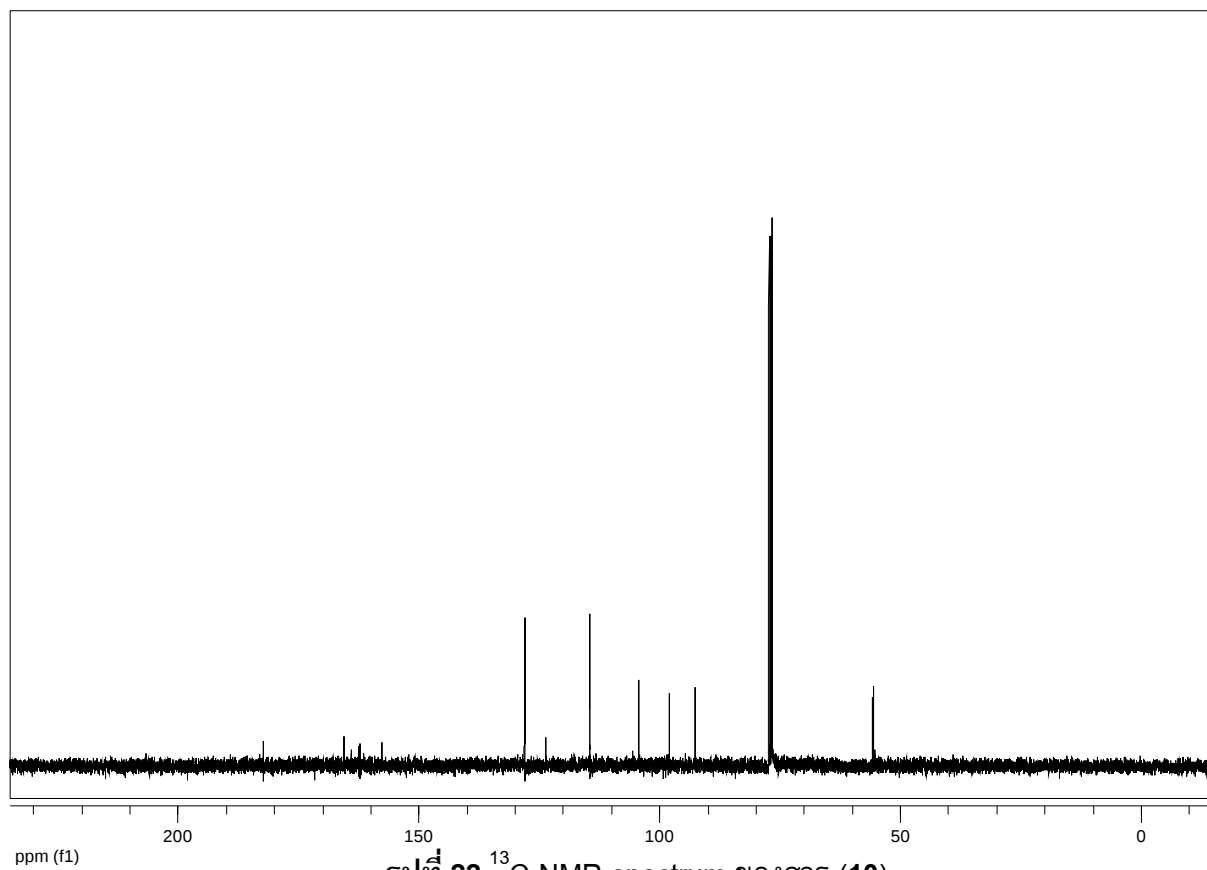
รูปที่ 19 ^1H -NMR spectrum ของสาร (9)



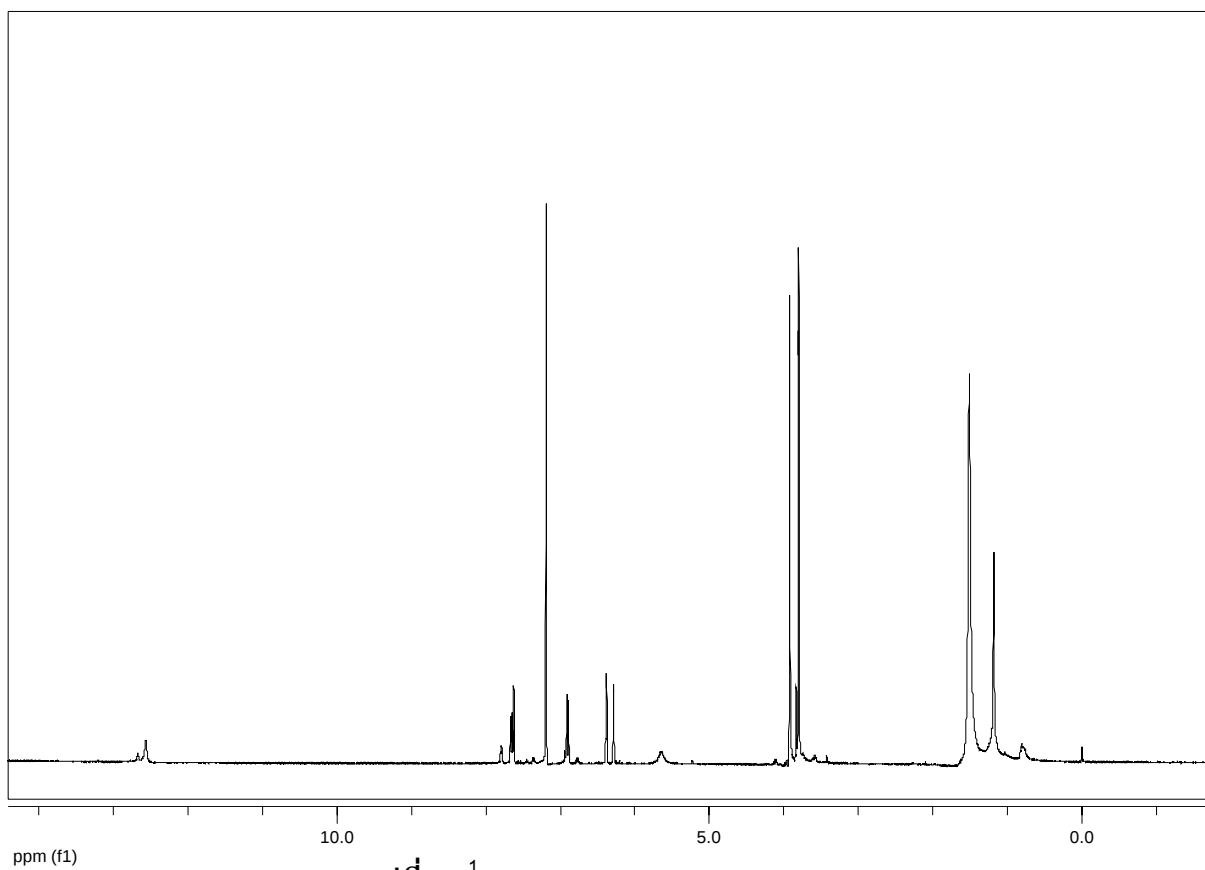
รูปที่ 20 ^{13}C -NMR spectrum ของสาร (9)



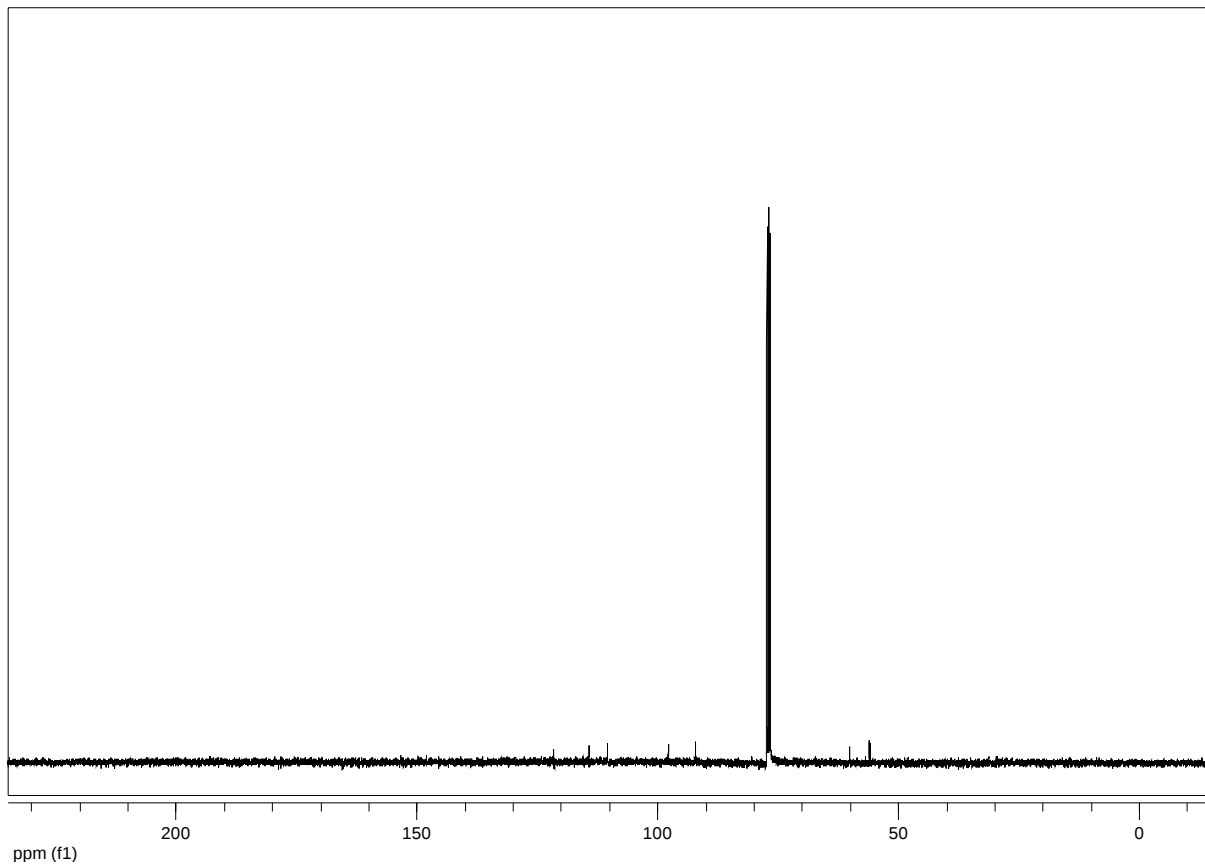
รูปที่ 21 ^1H -NMR spectrum ของสาร (10)



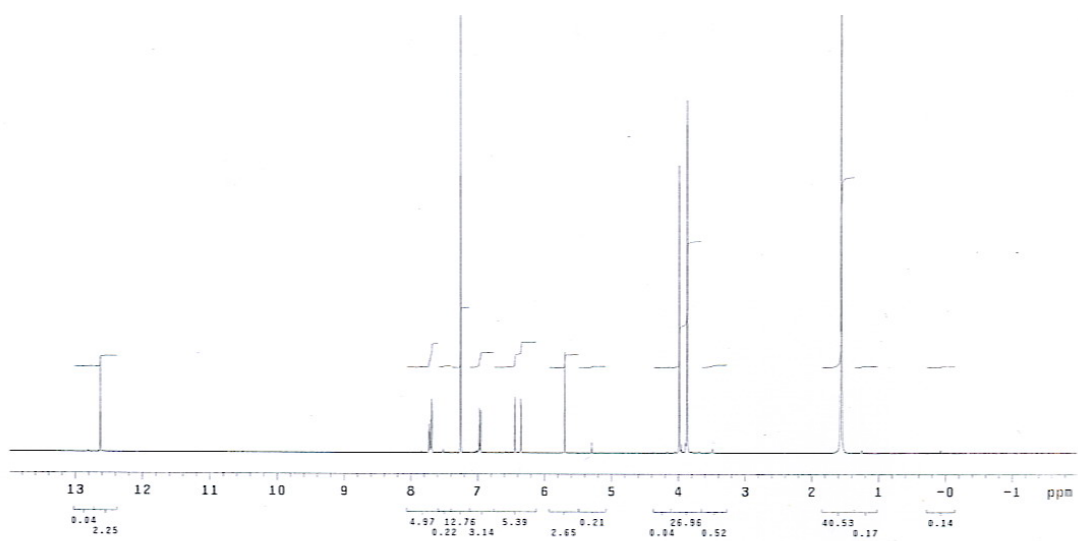
รูปที่ 22 ^{13}C -NMR spectrum ของสาร (10)



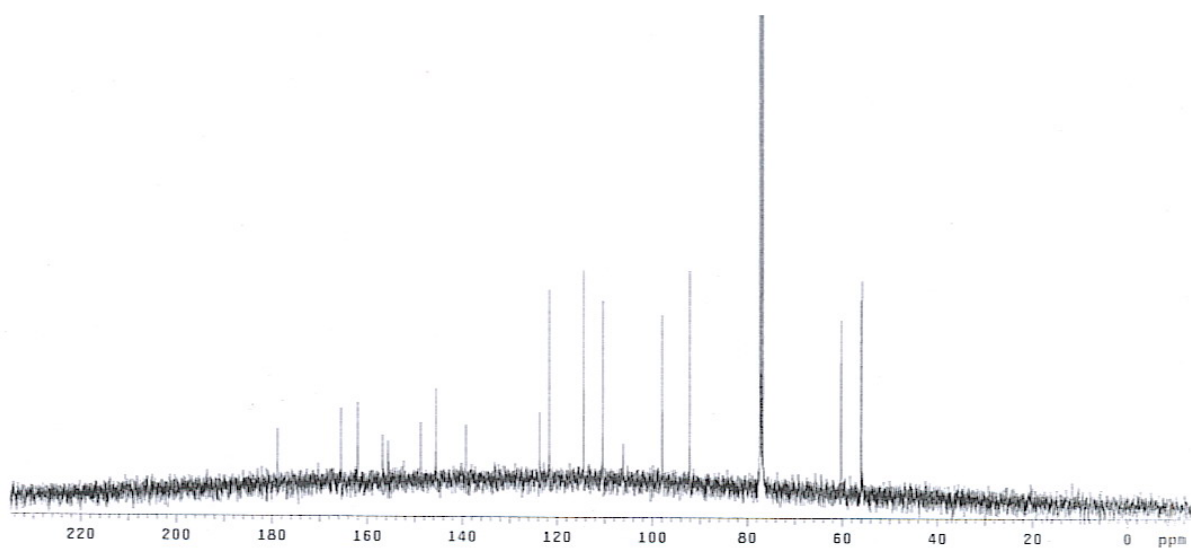
รูปที่ 23 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร (11)



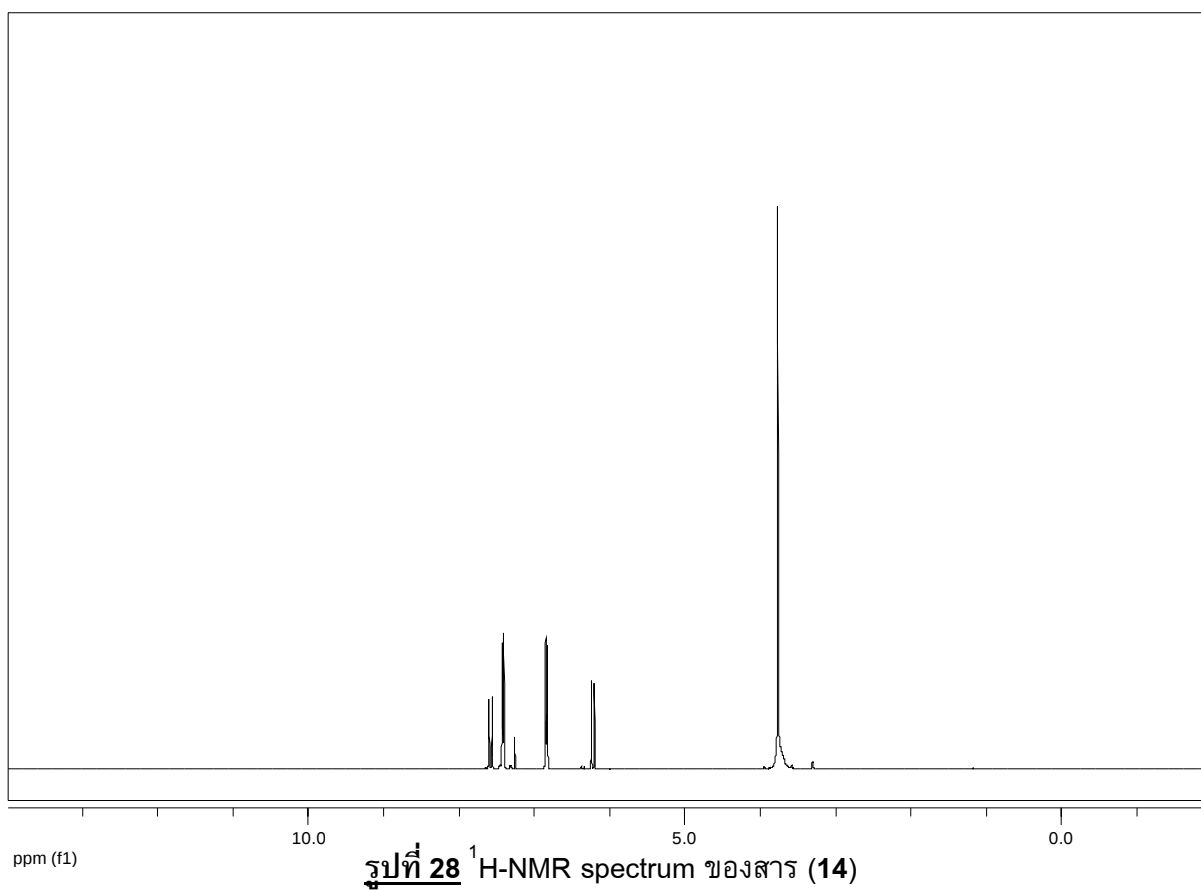
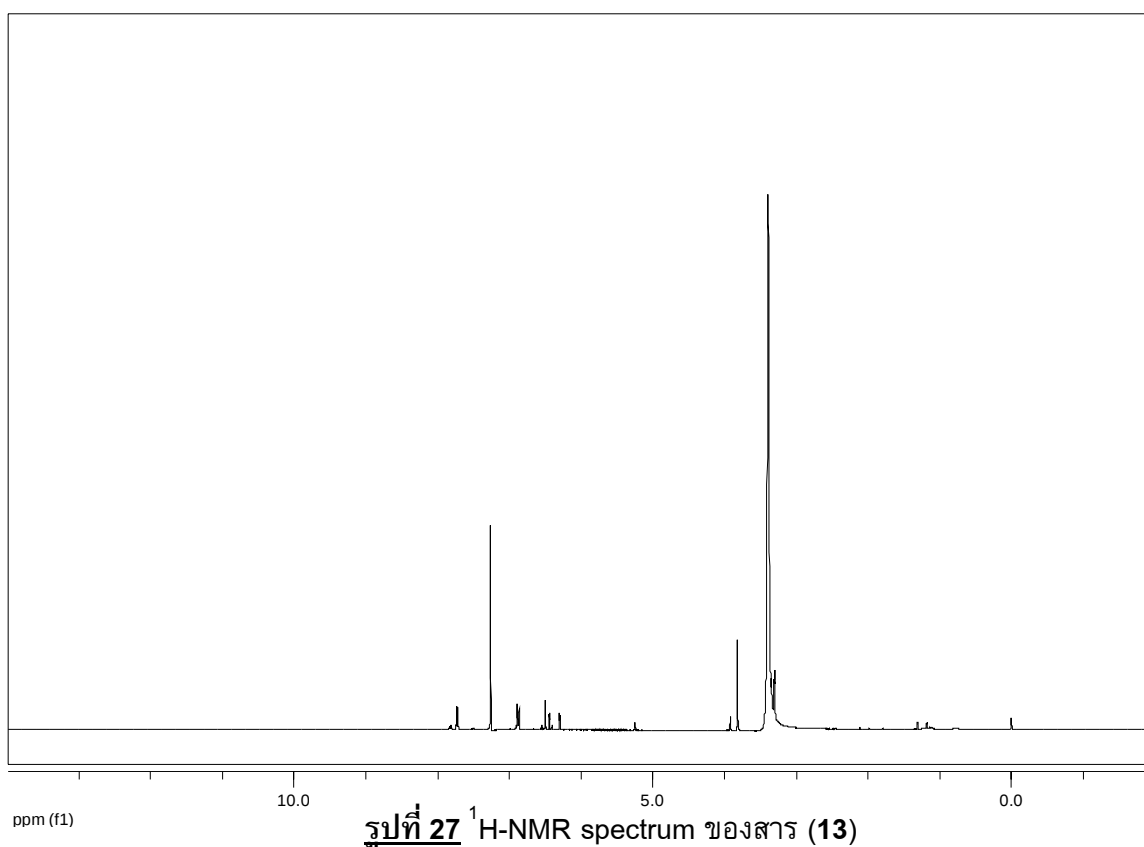
รูปที่ 24 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสาร (11)

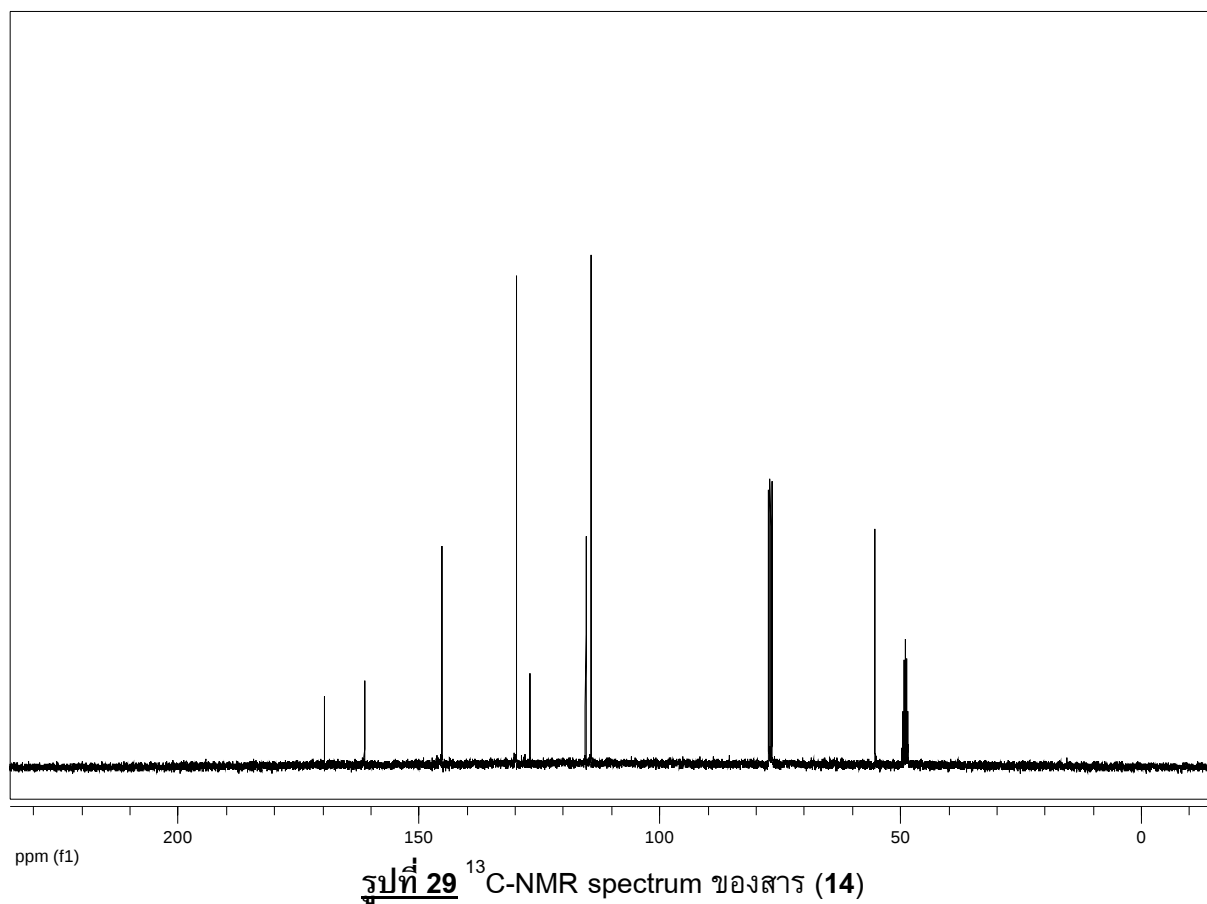


รูปที่ 25 ^1H -NMR spectrum ของสาร (12)



รูปที่ 26 ^{13}C -NMR spectrum ของสาร (12)





ตารางที่ 5 ลักษณะและน้ำหนักของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำ

สาร	ลักษณะสารหรือผลึก	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
(1)	ผลึกรูปเข็มสีเหลือง	882.8
(2)	ของแข็งสีเหลือง	607.2
(3)	ผลึกรูปเข็มสีเหลือง	669.6
(4)	ผลึกรูปเข็มสีเหลือง	12
(5)	ผลึกรูปเข็มไม่มีสี	6
(6)	ของแข็งสีขาว	394.9
(7)	ของแข็งสีขาว	889.2
(8)	ของแข็งสีขาว	54.2
(9)	ของแข็งสีขาว	998.3
(10)	ผลึกรูปเข็มสีเหลือง	496.7
(11)	ของแข็งสีขาว	8
(12)	ของแข็งสีขาว	5
(13)	ของแข็งสีเหลือง	6
(14)	ผลึกรูปเข็มสีขาว	134.7

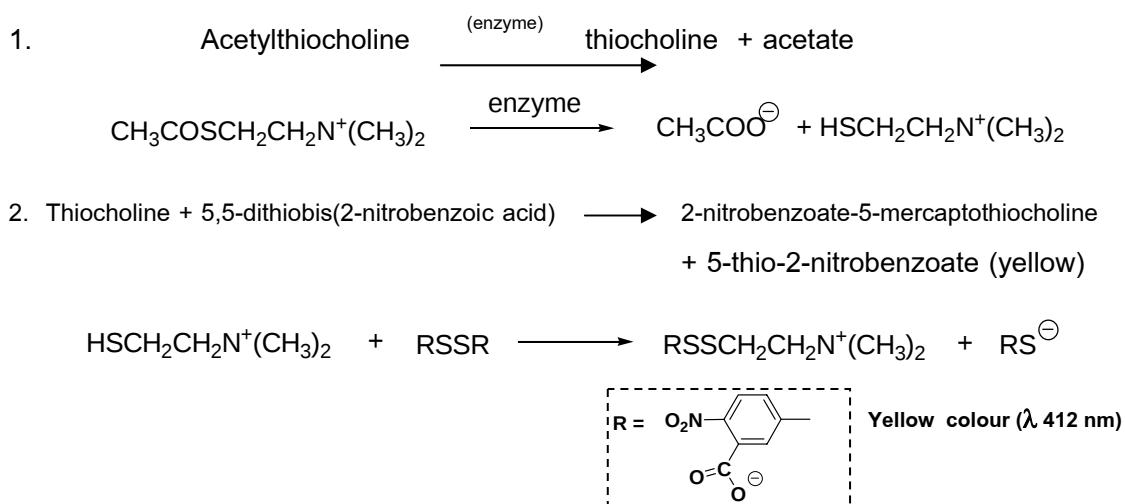
3.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

3.4.1 วิธี TLC-bioautographic method ^[13]

ใช้วิธีตามวารสาร Journal of Ethanopharmacology 2005, 97, 145-149 ซึ่งมีวิธีการทดสอบคร่าวๆ ดังนี้

1. spot สิ่งสกัดหรือสารที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น TLC จากนั้นนำไปจุ่มลงไปในตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารบนแผ่น TLC จากนั้นทำแผ่น TLC ให้แห้งประมาณ 2-4 ชั่วโมง
2. สเปรย์สารละลายผสมระหว่าง 5 mM ATCI และ 5 mM DTNB ลงบนแผ่น TLC
3. ปลอ่ยให้แผ่น TLC แห้งประมาณ 5 นาที จากนั้นสเปรย์สารละลายเอนไซม์ จะเกิดสีเหลืองขึ้นบนแผ่น TLC ภายใน 1-2 นาที
4. ถ้าสารมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส จะไม่เกิดสีเหลือง แต่จะเห็นเป็นจุดสีขาวแทน

ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบนี้ แสดงแผนภาพที่ 4



แผนภาพที่ 4 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

3.4.2 วิธี Microplate method ^[1]

ใช้วิธีตามวารสาร Journal of Ethanopharmacology 2003, 89, 261-264 ดังนี้

1. เติม 3 mM DTNB 125 μL , 15 mM ATCI 25 μL , buffer 50 μL และสารละลายตัวอย่าง 25 μL ลงในหลุม ของ microplate
2. จากนั้นเติม เอนไซม์ 25 μL นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ทุกๆ 5 วินาที เป็นเวลา 2 นาที
3. คำนวณหา enzyme activity และเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยเทียบกับหลุมที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ

3.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

นำสาร (1)-(10) และ (14) มาทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ส่วนสาร (11)- (13) ไม่ได้ทำการทดสอบ เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยมาก พบว่า สาร (6) และ (7) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส เมื่อใช้ปริมาณสาร 10 ไมโครกรัม ดังแสดงในรูปที่ 30

- (1)	- (2)	- (3)	- (4)	
- (5)	+	+	- (8)	- (9)
- (10)	- (14)			Eserine (standard)

+ คือ แสดงฤทธิ์ยับยั้ง
- คือ ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง

รูปที่ 30 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสาร (1)-(10) และ (14)

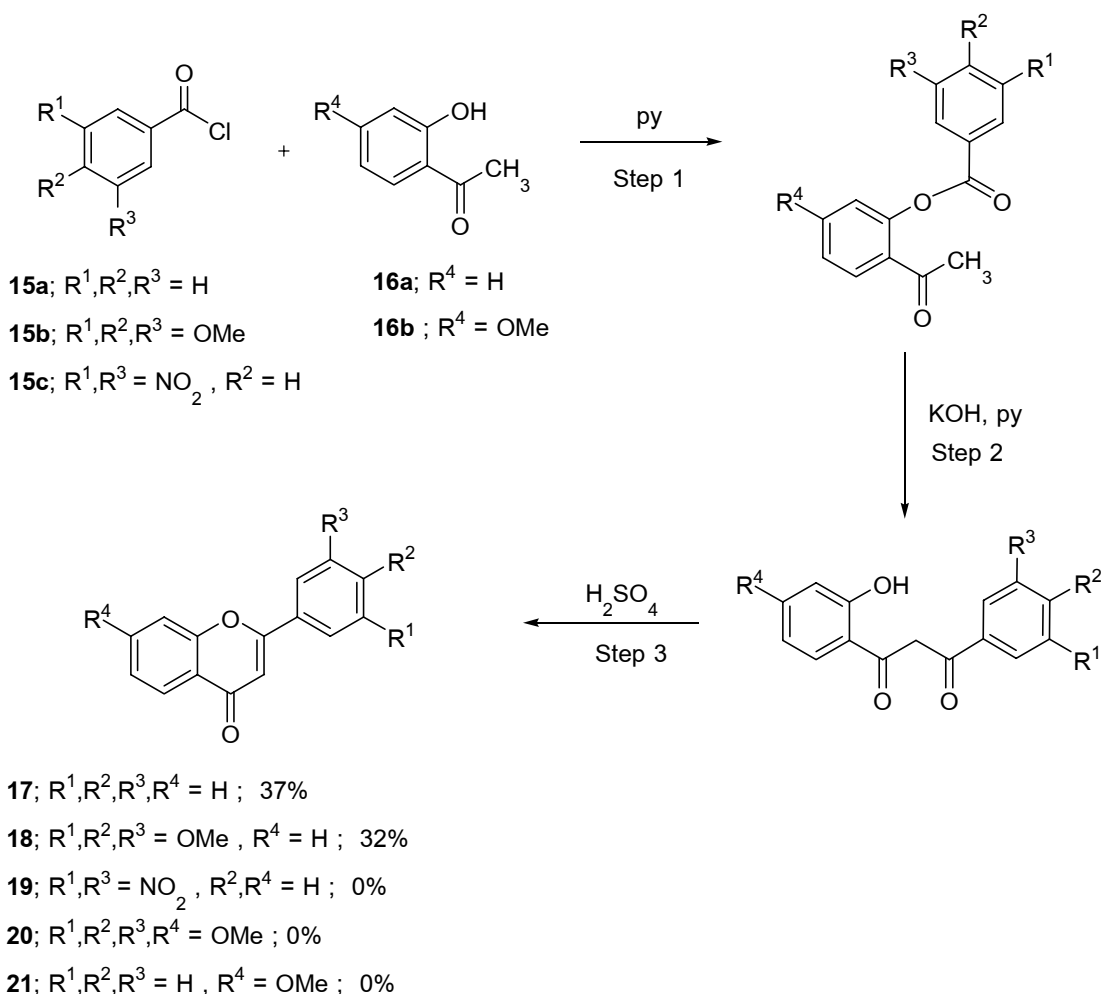
จากการเปรียบเทียบสูตรโครงสร้างของสารที่ออกฤทธิ์ คือ สาร (6) และ (7) กับสารบริสุทธิ์อื่นๆ ที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำ คาดคะเนว่า โครงสร้างที่สำคัญของการออกฤทธิ์ คือ หมู่เมทอกซี 2 หมู่ ในตำแหน่งที่ 5 และ 7 ทั้งนี้ สารที่ออกฤทธิ์ไม่ควรมีหมู่แทนที่ใดๆ ในตำแหน่งที่ 3

ผู้วิจัยจึงได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ฟลาโวนเพิ่มเติม เพื่อพิสูจน์หาส่วนที่สำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

2.6 การสังเคราะห์อนุพันธ์ฟลาโวน

2.6.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ฟลาโวน วิธีที่ 1^[14]

แสดงดังแผนภาพที่ 5



แผนภาพที่ 5 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ฟลาโวนโดยวิธีที่ 1

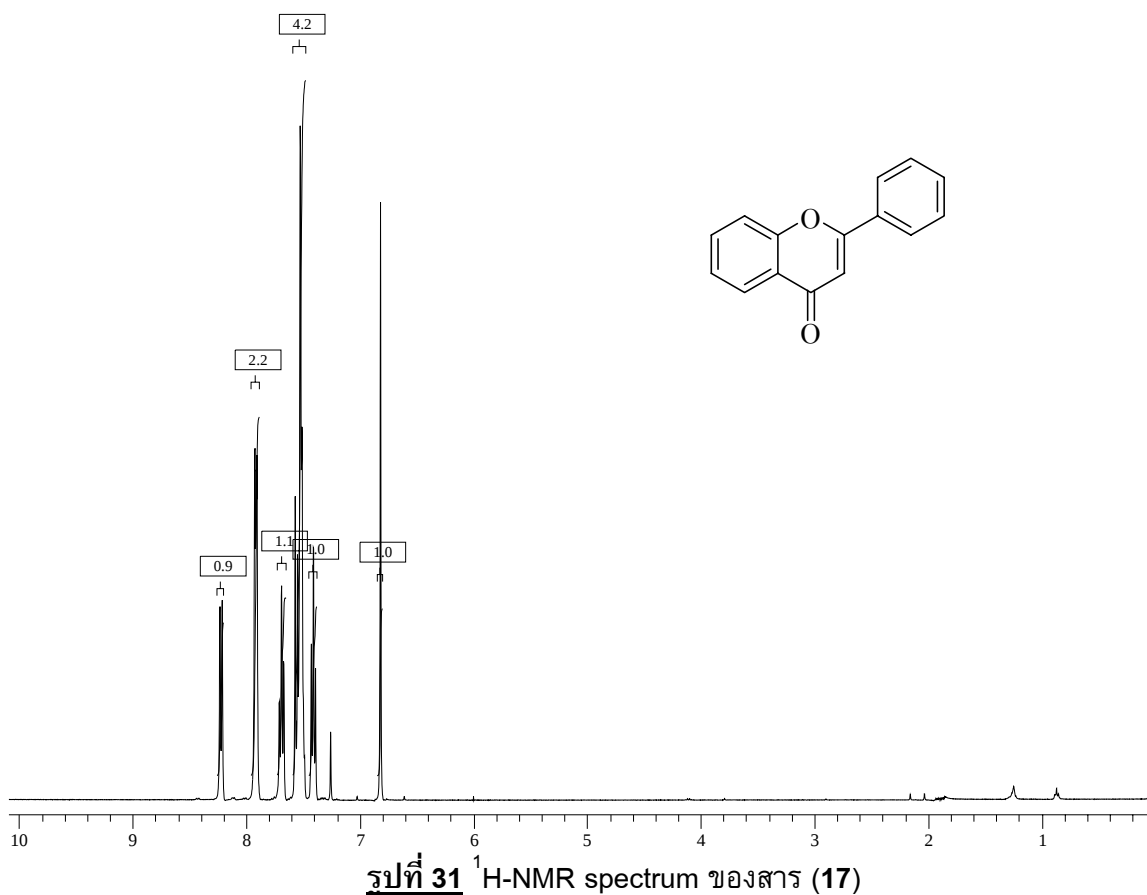
3.6.1.1 การสังเคราะห์ 2-Phenyl-chromen-4-one (17)

ขั้นที่ 1 เติม *o*-hydroxyacetophenone (**16a**) 5 มล. (41.8 มิลลิโมล) และ pyridine 9 มล. ในขวดก้นกลมขนาด 100 มล. นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติม benzoyl chloride (**15a**) 9 มล. คนสารละลายเป็นเวลา 15 นาที เทผลิตภัณฑ์ที่ได้ลงไปใน 5% HCl ได้สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียว นำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 3 ครั้ง ครั้งละ 20 มล. ระเหยตัวทำละลายออก ได้สารเป็นของเหลวสีน้ำตาล นำไปแช่เย็นจะได้เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน ตกผลึกช้าด้วยเมทานอล ได้สารลักษณะเป็นเกล็ดสีขาว น้ำหนัก 6.76 กรัม (67% yield) พิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H-NMR

ขั้นที่ 2 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นที่ 1 น้ำหนัก 5.0 กรัม (20.8 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 100 มล. เติม KOH 1.75 กรัมและ pyridine 20 มล. คนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 10% acetic acid 25 มล. ได้ของแข็งสีเหลืองอ่อน นำไปกรองและตกผลึกด้วย 95% เอทานอล ได้สารผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 3.37 กรัม (67% yield) พิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H-NMR

ขั้นที่ 3 ใส่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นที่ 2 น้ำหนัก 3.0 กรัม (12.5 มิลลิโมล) ในขวดก้นกลมขนาด

100 มล. เติม glacial acetic acid 17 มล. และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.7 มล. คนสารละลายให้เข้ากัน ให้ความร้อนโดยการรีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้สารละลายใส เทสารละลายที่ได้ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำแข็ง 100 กรัม จะได้ตะกอนสีขาว ทำการกรองตะกอนและตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซนและเอทิลอะซีเตต ได้สาร (17) เป็นผลึกสีขาวแวววาว น้ำหนัก 2.28 กรัม (82% yield) จุดหลอมเหลว 99-100 °C และพิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ดังแสดงในรูปที่ 31



δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz) : 6.82 (s, 1H), 7.41 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.52 (m, 4H), 7.69 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 8.22 (d, $J=7.8$ Hz, 1H)

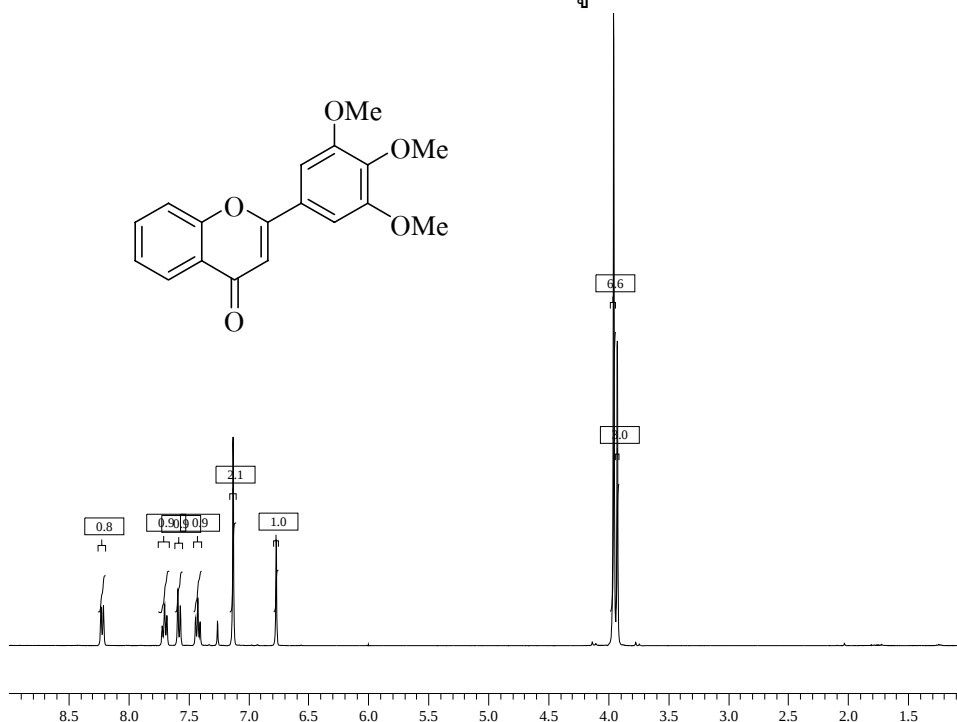
3.6.1.2 การสังเคราะห์ 2-(3,4,5-Trimethoxy-phenyl)-chromen-4-one (18)

ขั้นที่ 1 เติม 3,4,5-Trimethoxy-benzoyl chloride (15b) 5.44 กรัม (23.6 มิลลิโมล) และ pyridine 5 มล. ในขวดก้นกลมขนาด 100 มล. จากนั้นเติม o-hydroxyacetophenone (16a) 3.0 มล. คนสารละลายเป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายลงใน 5% HCl ได้สารที่มีลักษณะเป็นตะกอนสีชมพูม่วง กรองและตกผลึกด้วยเมทานอล ได้ผลึกรูปเข็มสีชมพูอ่อน น้ำหนัก 5.53 กรัม (71% yield) พิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

ขั้นที่ 2 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นที่ 1 น้ำหนัก 4.0 กรัม (12.11 มิลลิโมล) ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 100 มล. เติม KOH 1.01 กรัม และ pyridine 11 มล. คนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 10% acetic acid 25 มล. ได้ของแข็งสีเหลืองอ่อน นำไปกรองและตกผลึกด้วย 95% เอ

ทานอล ได้สารผลึกรูปเข็มสีเหลืองเข้ม น้ำหนัก 2.68 กรัม (67% yield) พิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

ขั้นที่ 3 ใส่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นที่ 2 น้ำหนัก 2.50 กรัม ในขวดกันกลมขนาด 100 มล. เติม glacial acetic acid 10.5 มล. และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.4 มล. คนสารละลายให้เข้ากัน ให้ความร้อนโดยการรีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีส้ม เทสารละลายลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำแข็ง 100 กรัม จะได้ตะกอนสีเหลืองอ่อน กรองตะกอนและนำไปตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซนและเอทิลอะซีเตต ได้สาร (18) สีเหลืองเข้ม น้ำหนัก 1.38 กรัม (67% yield) จุดหลอมเหลว 117-119 °C และพิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ดังแสดงในรูปที่ 32



รูปที่ 32 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร (18)

δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz) = 3.93 (s, 3H), 3.96 (s, 6H), 6.77(s, 1H), 7.13 (s, 2H), 7.42 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.70 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J=8.6$ Hz, 1H)

3.6.1.3 การสังเคราะห์ 2-(3,5-Dinitro-phenyl)-chromen-4-one (19)

ทำการสังเคราะห์ 3 ขั้นตอนเช่นเดียวกัน โดยใช้ dinitrobenzoyl chloride (15c) 5.58 กรัม ลงในขวดกันกลมขนาด 100 มล. เติม o-hydroxyacetophenone (16a) 4.0 มล. และ pyridine 6.4 มล. คนสารละลายเป็นเวลา 15 นาที สารที่ได้เป็นน้ำมันสีเหลืองน้ำตาลจากนั้นนำสารมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต 3 ครั้ง พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำมันละลายได้ค่อนข้างยาก ต้องใช้ปริมาณตัวทำละลายมาก จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก แล้วนำสารที่ได้ไปทำปฏิกิริยาต่อ โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มา 2.28 กรัม เติม pyridine 8.0 มล. และ KOH 0.7 กรัม คนและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที สารเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีดำ และเมื่อนำไปทำการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต พบว่า สารที่ได้ไม่ละลายใน

ethyl acetate จึงไม่สามารถสกัดออกมาได้ และไม่น่าจะเป็นสารที่ต้องการ แต่เป็นผลิตภัณฑ์อื่น วิธีการสังเคราะห์นี้จึงไม่สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ อาจเนื่องจากสารมีความว่องไวน้อยเกินไป

3.6.1.4 การสังเคราะห์ 7-Methoxy-2-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-chromen-4-one (20)

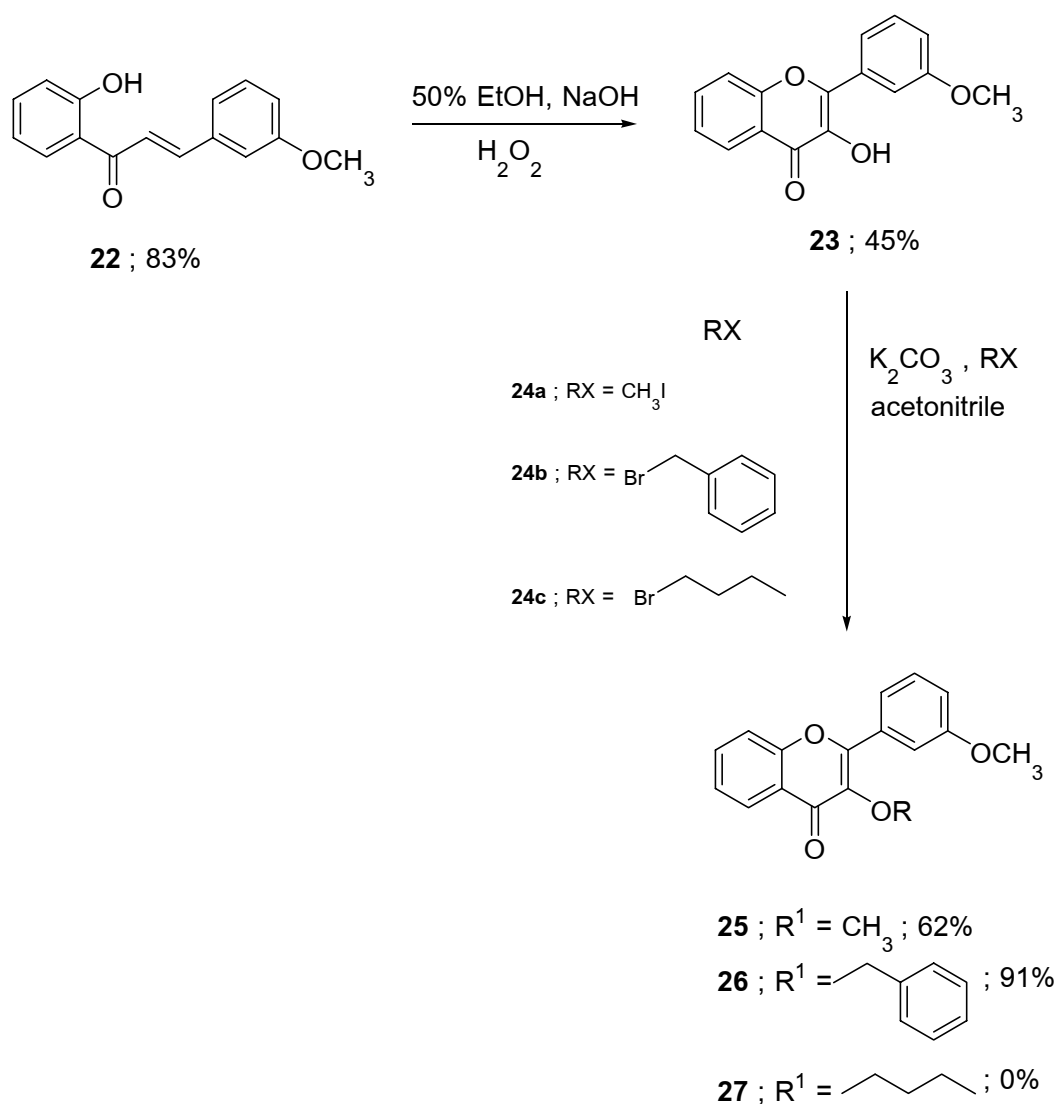
ใส่ 2-hydroxy-4-methoxy-acetophenone (**16b**) 0.45 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 มล. เติม pyridine 2.0 มล. และ 3,4,5 trimethoxybenzoyl chloride (**15b**) 0.63 กรัม คนและตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เทสารลงในกรดเจือจาง 5% HCl ที่เย็นจนอย่างแรงจะได้ของแข็งสีขาว จากนั้นนำไปสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 3 ครั้ง ระเหยตัวทำละลายออก และนำไปทดสอบ TLC พบว่า ยังมีสารตั้งต้นเหลืออยู่มาก จึงทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี นำผลึกที่ได้ไปวิเคราะห์พิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่าสารที่สังเคราะห์ได้มีสัญญาณของสารตั้งต้น คือ **15b** วิธีการสังเคราะห์นี้จึงไม่สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้

3.6.1.5 การสังเคราะห์ 7-Methoxy-2-phenyl-chromen-4-one (21)

ใส่ 2-hydroxy-4-methoxy-acetophenone (**16b**) 0.20 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มล. เติม pyridine 1.0 มล. และ benzoyl chloride (**15a**) 0.138 มล. คนและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต 3 ครั้ง ระเหยตัวทำละลายออก จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเกล็ดของแข็งสีขาวมันวาว นำผลึกที่ได้ไปพิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่า สัญญาณที่ได้ยังไม่ชัดเจนมากเพียงพอ และพบสัญญาณที่ตำแหน่งอื่นๆ มาด้วย แต่ก็จึงนำไปทำปฏิกิริยาต่อ โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มา 0.3243 กรัม เติม KOH 0.1 กรัม และ pyridine 1.2 มล. คนและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทดสอบ TLC พบว่า ยังมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ ทำการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี นำผลึกที่ได้ไปพิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

3.6.2 การสังเคราะห์ฟลาโวน วิธีที่ 2 ^[15]

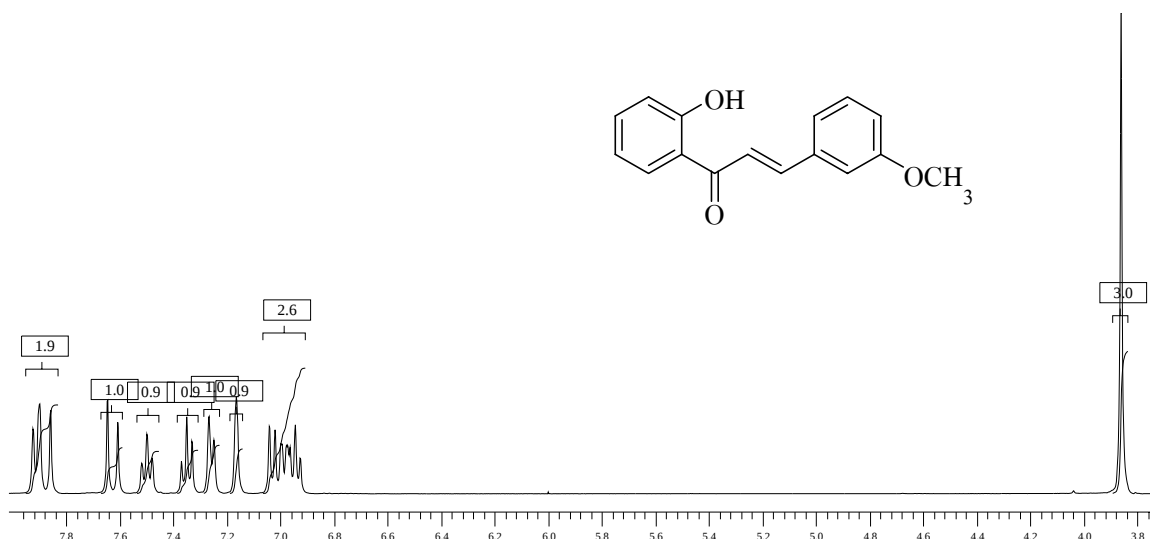
การทำปฏิกิริยาควบแน่นแบบแอลดอลระหว่างอะโรมาติกแอลดีไฮด์ และ 2-ไฮดรอกซีอะซิโตนโนน ซึ่งจะได้ซาลิโคน (**22**) เป็นสารมัธยันตร์ จากนั้นทำปฏิกิริยาออกซิเดทีฟไซโคลเซชัน จะได้อนุพันธ์ฟลาโวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 3 ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็นฟลาโวนต่างชนิดกันด้วยปฏิกิริยาอัลคิลเลชันด้วยอัลคิลเฮไลด์ มีขั้นตอนดังแสดงในแผนภาพที่ 6



แผนภาพที่ 6 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ฟลาโวนโดยวิธีที่ 2

3.6.2.1 การสังเคราะห์ (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(3-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**22**)

ใส่ *o*-hydroxyacetophenone 3.80 กรัม (27.9 มิลลิโมล) มาใส่ในขวดก้นกลมขนาด 100 มล. เติม 3-methoxybenzaldehyde 3.81 กรัม (27.9 มิลลิโมล), เอทานอล 50 มล. และ 50% KOH 10 มล. คนของผสมที่อุณหภูมิห้องประมาณ 18 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์นำมาเติมน้ำแข็งและปรับความเป็นกรดด้วย HCl จากนั้นสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 2 ครั้ง ระเหยตัวทำละลายออก นำไปตกผลึกด้วยเมทานอลได้สาร (**22**) สีเหลืองเข้มวาว น้ำหนัก 5.90 กรัม (83% yield) มีจุดหลอมเหลว 100-101 °C พิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR ดังแสดงในรูปที่ 33

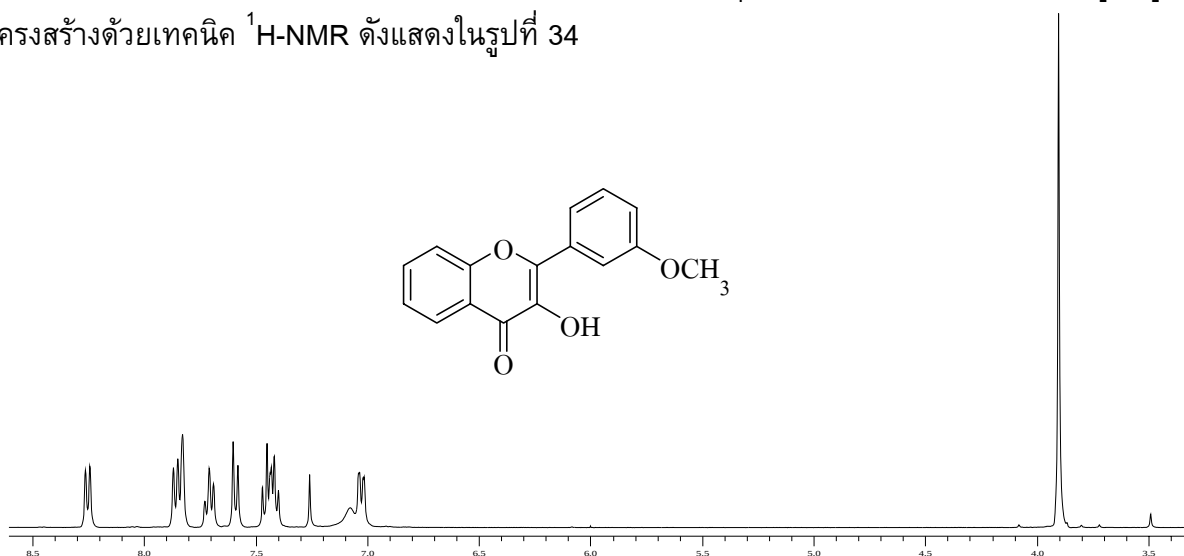


รูปที่ 33 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร (22)

δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz) = 3.86 (s, 3H), 6.99 (m, 3H), 7.17 (s, 1H), 7.23 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 7.35 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.50 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J=14.8$ Hz, 1H), 7.90 (t, $J=10.8$ Hz, 2H)

3.6.2.2 การสังเคราะห์ 3-Hydroxy-2-(3-methoxy-phenyl)-chromen-4-one (23)

ใส่สาร (22) 2.09 กรัม (8.23 มิลลิโมล) ในขวดก้นกลมขนาด 100 มล. เติม 50% เอานอล 42 มล. จากนั้นเติม NaOH 3.69 กรัม และเติม 30% H_2O_2 ที่ละลายจนครบ 6 มล. คนของผสมที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 18 ชั่วโมง ปรับความเป็นกรดด้วย HCl จากนั้นสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ระเหยตัวทำละลาย จากนั้นทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี นำสารที่แยกได้ ตกผลึกด้วยเมทานอล ได้สาร (23) สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 0.99 กรัม (45% yield) มีจุดหลอมเหลว 136-138 °C พิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ดังแสดงในรูปที่ 34

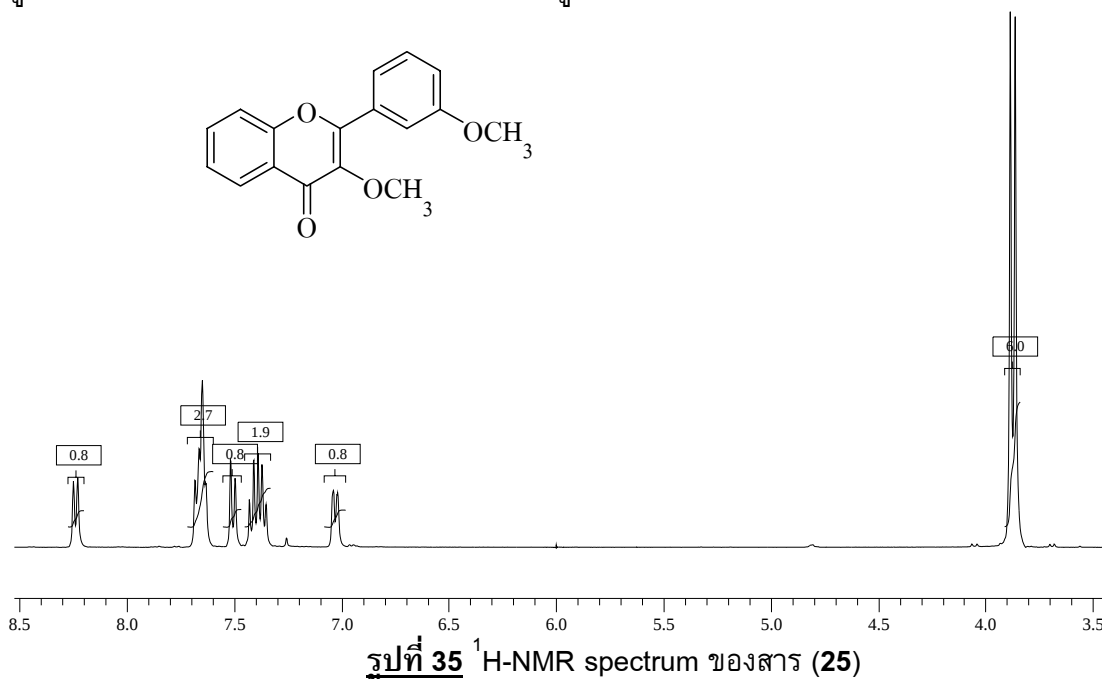


รูปที่ 34 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร (23)

δ_H (CDCl₃, 400 MHz) : 7.00 (m, 1H), 7.17 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.62 (s, 1H), 7.72 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J=7.8$ Hz, 1H)

3.6.2.3 การสังเคราะห์ 3-Methoxy-2-(3-methoxy-phenyl)-chromen-4-one (**25**)

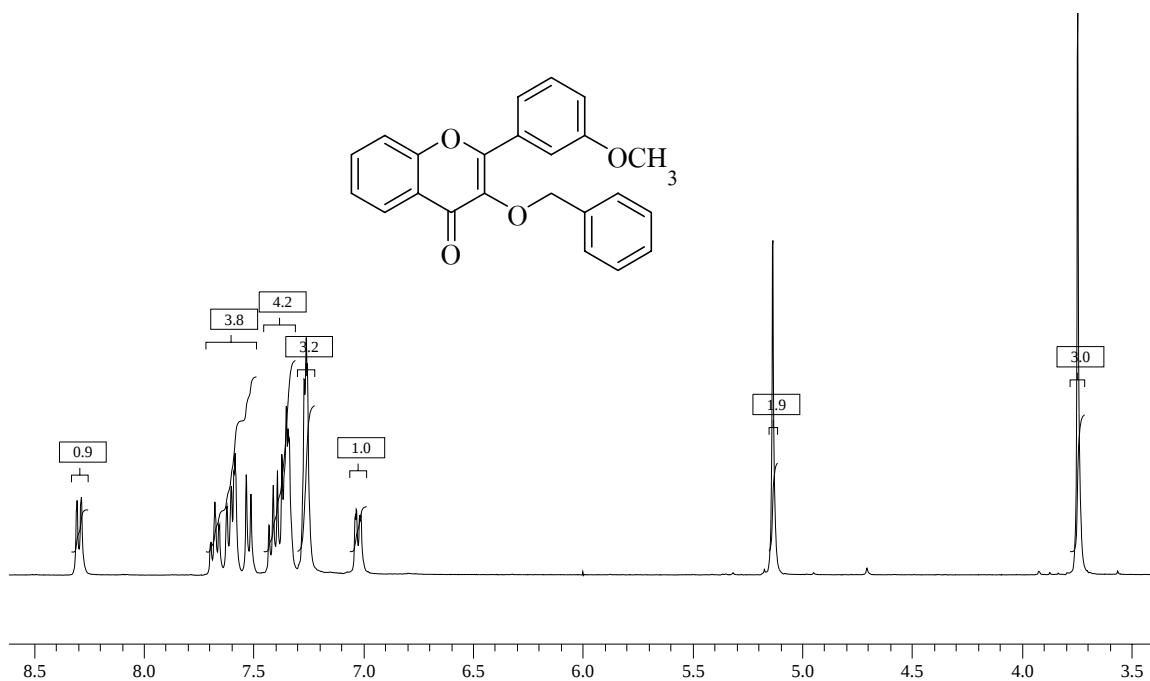
ใส่สาร (**23**) 0.135 กรัม (0.50 มิลลิโมล) ใน sealed tube ขนาด 15 มล. เติม acetonitrile 1.0 มล. จากนั้นเติม K₂CO₃ 0.14 กรัม และ methyl iodide (**24a**) 3 หยด นำไปตั้งในอ่างน้ำมันที่อุณหภูมิประมาณ 80 °C คนและตั้งทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นและสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาทำให้แห้งด้วย Na₂SO₄ กรองและระเหยตัวทำละลาย จากนั้นทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สาร (**25**) สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 0.09 กรัม (62% yield) มีจุดหลอมเหลว 67-69 °C พิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR ดังแสดงในรูปที่ 35



δ_H (CDCl₃, 400 MHz) : 3.85 (s, $J=9.2$ Hz, 3H), 3.88 (s, $J=9.6$ Hz, 3H), 7.03 (s, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.51 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.65 (m, 3H), 8.24 (d, $J=7.8$ Hz, 1H)

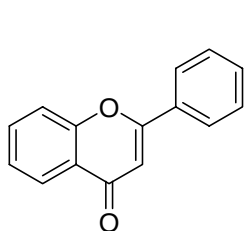
3.6.2.4 การสังเคราะห์ 3-Benzoyloxy-2-(3-methoxy-phenyl)-chromen-4-one (**26**)

ใส่สาร (**23**) 0.1 กรัม (0.37 มิลลิโมล) ใน sealed tube ขนาด 15 มล. เติม acetonitrile 1.0 มล. จากนั้นเติม K₂CO₃ 0.1 กรัม และ benzyl bromide (**24b**) ที่ละลายเจือจาง 0.2 มล. นำไปตั้งในอ่างน้ำมันที่อุณหภูมิประมาณ 80 °C คนและตั้งทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นและสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาทำให้แห้งด้วย Na₂SO₄ กรองและระเหยตัวทำละลาย จากนั้นทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สาร (**26**) สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 0.12 กรัม (912% yield) มีจุดหลอมเหลว 87-89 °C พิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR ดังแสดงในรูปที่ 36

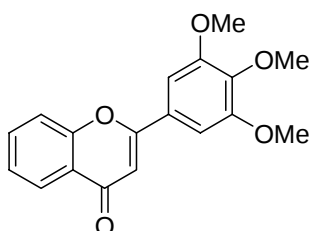


รูปที่ 36 ^1H -NMR spectrum ของสาร (26)

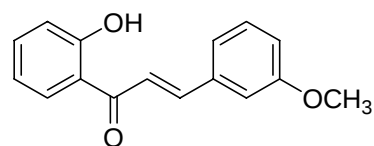
δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz): 3.75 (s, 3H), 5.13 (s, 2H), 7.03 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.26 (m, 3H), 7.38 (m, 4H), 7.59 (m, 4H), 8.29 (d, $J=7.8$ Hz, 1H)



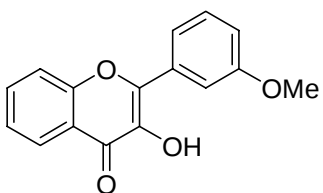
(17)



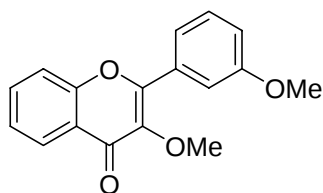
(18)



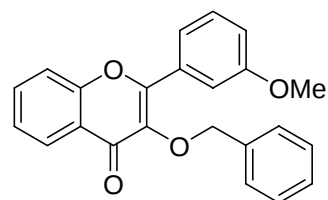
(22)



(23)



(25)



(26)

รูปที่ 37 สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ฟลาโวนที่สังเคราะห์ได้

นำสารที่แยกได้จากกระชายดำ และอนุพันธ์ฟลาโวนที่สังเคราะห์ได้ ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase, AChE) ด้วยวิธี Microplate method ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ด้วยวิธี Microplate method

สาร	% การยับยั้งเอนไซม์ AChE
1	NA
2	NA
3	NA
4	NA
5	NA
6	55.86
7	47.33
8	15.03
9	15.07
10	20.69
11	14.25
17	32.44
18	21.68
23	7.72
25	33.76
26	21.84
Galantamine	93.85

หมายเหตุ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน (galantamine) คือ 1.0 มก./มล.

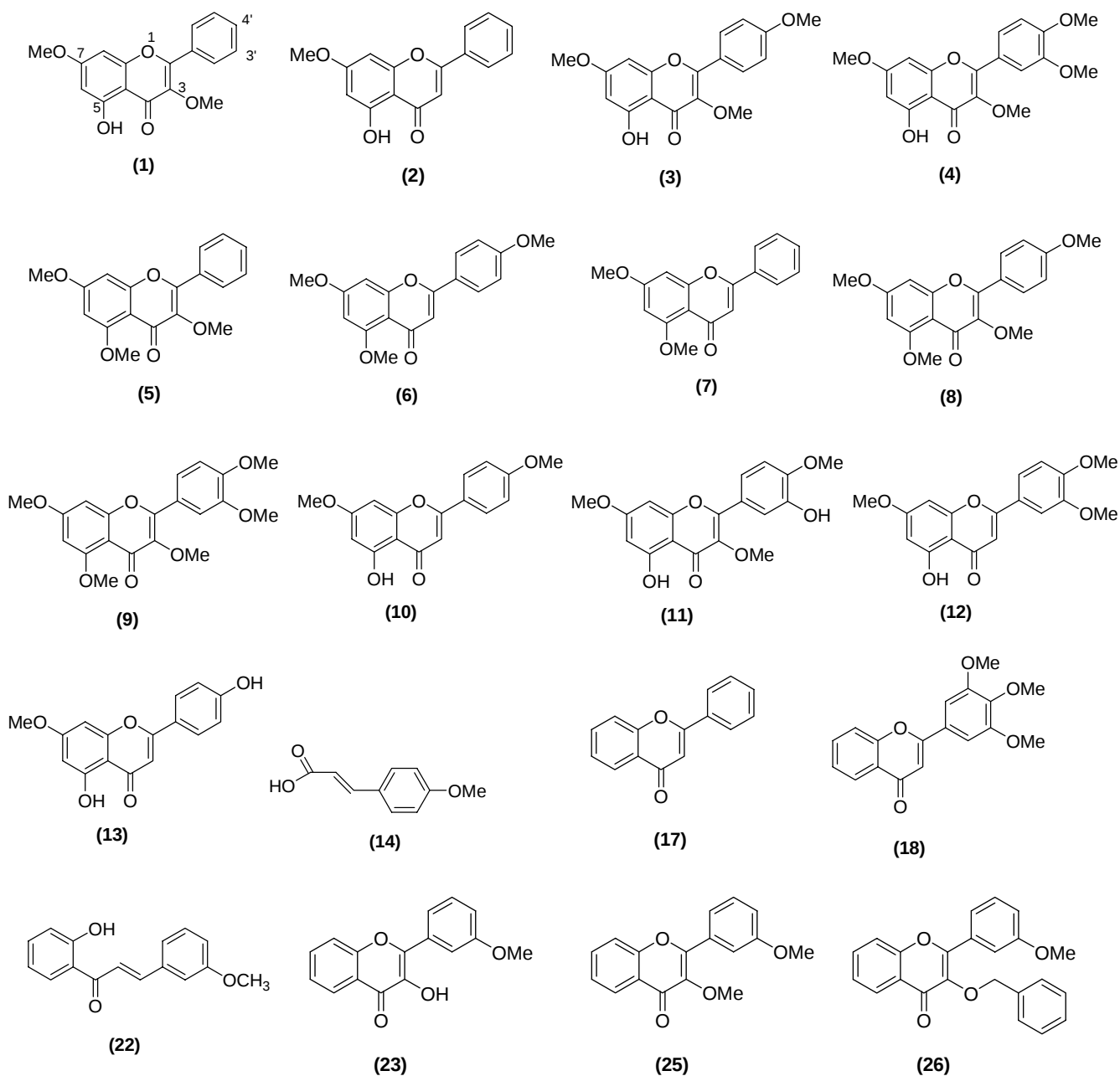
NA = not active (ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง)

n.t = not test (ไม่ได้ทำการทดสอบ)

สารที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด คือ สาร (6) ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำ

4. วิจัยและสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเหง้ากระชายดำ ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 14 ชนิด และสามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ของฟลาโวนได้ 6 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 38 เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่า สารที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด คือ สาร (6) รองลงมา คือ สาร (7), (25) และ (17) ตามลำดับ



รูปที่ 38 สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ฟลาโวนที่แยกจากเหง้ากระชายดำและสังเคราะห์ได้

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารและฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า

1. หมูไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 5 ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งฯ ลดลงอย่างชัดเจน โดยเปรียบเทียบสาร (6) กับสาร (10) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งฯ เท่ากับ 56 และ 21% ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับสาร (7) และสาร (2) เปอร์เซ็นต์การยับยั้งฯ เท่ากับ 47 และ 0% ตามลำดับ
2. หมูเมทอกซีที่ตำแหน่ง 3 ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งฯ ลดลงอย่างชัดเจน โดยเปรียบเทียบสาร (6) กับสาร (8) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งฯ เท่ากับ 56 และ 15% ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับสาร (7) และสาร (5) เปอร์เซ็นต์การยับยั้งฯ เท่ากับ 47 และ 0% ตามลำดับ
3. หมูแทนที่ที่ตำแหน่ง 3' ไม่มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งฯ โดยพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งฯ ของสาร (8), (9) และ (11) มีค่าเท่ากับ 15, 15 และ 14% ตามลำดับ
4. ขนาดของหมูแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 3 มีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งฯ พิจารณาสาร (23), (25) และ (26) มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งฯ เท่ากับ 34, 7 และ 22% ตามลำดับ พบว่า หมูเมทอกซีให้ฤทธิ์ฯ ที่ดีที่สุด โดยเมื่อหมูแทนที่เปลี่ยนเป็นหมูที่มีขนาดเล็กหรือใหญ่กว่าจะให้ค่าการยับยั้งที่น้อยกว่า
5. หมูเมทอกซีที่ตำแหน่ง 5 และ 7 ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งฯ เพิ่มขึ้น พิจารณาเปรียบเทียบระหว่างสาร (17) และ (7) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพิ่มขึ้นจาก 32 เป็น 47% ตามลำดับ
6. หมูเมทอกซีที่ตำแหน่ง 4' ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งฯ เพิ่มขึ้น พิจารณาเปรียบเทียบระหว่างสาร (7) และ (6) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพิ่มขึ้นจาก 47 เป็น 56% ตามลำดับ
7. การเพิ่มหมูแทนที่ที่ตำแหน่ง 5' ไม่ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งฯ เพิ่มขึ้น พิจารณาเปรียบเทียบระหว่างสาร (17) และ (18) และจากสมมติฐานข้อ 3 และ 6 ข้างต้น

จากข้อสรุปความสัมพันธ์ข้างต้น สาร (6) ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำ ยังคงเป็นสารที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสที่ดีที่สุด โดยการเปลี่ยนแปลงหมูแทนที่ในวง A และ C ของอนุพันธ์ฟลาโวน ไม่พบว่า ช่วยเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งฯ ดังกล่าวได้

เอกสารอ้างอิง

1. Ingkaninan, K.; Temkitthawon, P.; Chuenchom, K.; Yuyaem, T.; Thongnoi W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *89*, 261-264.
2. Jaipetch, T.; Reutrakul, V.; Tuntiwachwuttikul, P.; Santisuk, T. Flavonoids in the black rhizomes of *Boesenbergia pandurata*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 625-626.
3. Yenjai, C.; Prasanphen, K.; Daodee, S.; Wongpanich, V.; Kittakoop, P. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia* **2004**, *75*, 89-92.
4. Sutthanut, K.; Sripanidkulchai, B.; Yenjai, C.; Jay, M. Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1143*, 227-233.
5. Rujjanawate, C.; Kanjanapothi, D.; Amornlerdpison, D.; Pojanagaroon, S. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *102*, 120-122.
6. Tewtrakul, S.; Subhadhirasakul, S.; Kummee, S. Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *116*, 191-193.
7. Wattanapitayakul, S. K.; Chularojmontri, L.; Herunsalee, A. Vasorelaxation and antispasmodic effects of *Kaempferia parviflora* ethanolic extract in isolated rat organ studies. *Fitoterapia* **2008**, *79*, 214-216.
8. Li, S.; Lo, C. Y.; Ho, C. T. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) Peel. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4176-4185.
9. Tomlinson-Barber, F. A.; Msonthi, J. D.; Hostettmann, K. Antifungal epicuticular methylated flavonoids from *Helichrysum nitens*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 753-755.
10. Dong, H.; Gou, Y. L.; Cao, S. G.; Chen, S. X.; Sim, K. Y.; Goh, S. H.; Kini, R. M. Eicosenones and methylated flavonols from *Amomum koenigi*. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 899-902.
11. Bosabalidis, A.; Gabrieli, C.; Niopas, I. Flavone aglycones in glandular hairs of *Origanum X Intercedens*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1549-1553.
12. Scalbert, A.; Monties, B.; Lallemand, J. Y.; Guittet, E.; Rolando, C. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1359-1362.
13. Salah, S. M.; Jäger, A. K. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 145-149.
14. Wheeler, T. S. Flavone. *Org. Syntheses Coll.* **1963**, *4*, 478-482.

15. Gobbi, S.; Rampa, A.; Bisi, A.; Belluti, F.; Piazzzi, L.; Valenti, P.; Caputo A.; Zampiron, A.; Carrara, M. Synthesis and Biological Evaluation of 3-Alkoxy Analogues of Flavone-8-acetic Acid. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3662-3669.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ขณะนี้อยู่ในระหว่างเขียน manuscript เพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Ethnopharmacology (Impact factor 1.55) ชื่อเรื่อง "Acetylcholinesterase inhibition compounds from *Kaempferia parviflora*"