



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์โคเลสเตอเรส จากแหล่งธรรมชาติ และจากการสังเคราะห์

โดย รศ.ดร.กรกนก อิงคนินันท์

รศ. ดร. นันทกา โกรานา

และคณะ

กรกฎาคม 2552

สัญญาเลขที่ RMU4980038

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์โคสิเนสเตอเรส
จากแหล่งธรรมชาติ และจากการสังเคราะห์

รศ.ดร.กรกนก อิงคินันท์

และ รศ. ดร. นันทกา โกรานา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

และคณะ

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส

จากแหล่งธรรมชาติ และจากการสังเคราะห์

กรรณก อิงคินันท์¹ นันทกา โกรานา¹ สุทธาทิพย์ มากมี¹ กนกวรรณ ช้างวิจิตร¹ วัชรินทร์ พัวพัน¹

อนุชิต พลบุรีการ² อัครวิทย์ กาญจนโอภาส³ และ คณิต สุวรรณบริรักษ์⁴

¹ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ. เมือง พิษณุโลก 65000

²ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

³ภาควิชาเภสัชวิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

⁴ศูนย์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตในทะเลและเอนโดไฟท์ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's) เป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมทางประสาท ซึ่งมีผลต่อความจำและพฤติกรรม จากข้อมูลทางระบาดวิทยาคาดการณ์ว่า ในช่วง 2 ทศวรรษข้างหน้าอุบัติการณ์ของโรคจะเพิ่มขึ้นอีกมาก แนวทางการรักษาของโรคที่ได้รับการยอมรับในขณะนี้ คือ การทำให้สารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน (acetylcholine) เพิ่มขึ้นโดยใช้สารต้านอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase; AChE) ในสมอง การวิจัยนี้ มีจุดประสงค์ที่จะหาสารต้าน AChE ใหม่ ๆ โดยทำการสำรวจพืช สิ่งมีชีวิตและจุลินทรีย์ในทะเล โดยใช้วิธีของ Ellman's ในภาค 96 หลุม

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้าน AChE ในสารสกัดจากพืช พบว่าสารสกัดต้นทุ้งฟ้า (*Alstonia macrophylla*) มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ที่สูงโดยแสดงค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 6.76 ± 1.74 mg/ml ผู้วิจัยได้ทำการแยกได้สารกลุ่ม Bisindole alkaloids อันประกอบด้วย macroline 2 units และได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างสารด้วยวิธีทางสเปกโตรสโคปี และวัดฤทธิ์ต้าน AChE โดยเทียบกับ galanthamine โดยสารตัวหนึ่งที่แยกได้ เป็นสารใหม่ที่ไม่เคยมีผู้รายงานมาก่อน

จากการศึกษาพบว่าสิ่งมีชีวิตในทะเลเป็นแหล่งที่ดีของสารต้าน AChE คณะผู้วิจัยได้แยก steroidal alkaloid กลุ่ม stigmastane ชื่อ 4-acetoxy-plakinamine B จากฟองน้ำชื่อ *Corticium* sp. และ แยกสาร alkaloids ชื่อ marinoquinoline A จาก marine gliding bacteria strain TISTR 1741 ซึ่งสารทั้งสองตัวนี้แสดง IC_{50} ในช่วงไมโครโมลาร์

จากการศึกษาที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยพบว่าสารกลุ่ม isoquinoline เป็นสารต้าน AChE ที่มีศักยภาพสำหรับที่จะพัฒนาต่อ ในการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของ isoquinoline กับการเกิดฤทธิ์ต้าน AChE โดยทำการศึกษาอนุพันธ์ reduced form ของ 1-(3,4-dimethoxybenzyl)-6,7-dimethoxyisoquinoline, อนุพันธ์ที่เกิดจากการเปิดวงแหวน และอนุพันธ์อื่นๆ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า dihydroisoquinoline ring และ quaternary isoquinoline ที่มีกลุ่มแทนที่ที่ตำแหน่ง 1 สามารถยับยั้ง AChE จากปลาไหลไฟฟ้าและจากมนุษย์ได้ด้วย IC_{50} ในช่วง 10^{-6} M และ 10^{-5} M ตามลำดับ

Exploration of cholinesterase inhibitors from natural resources and synthetic compounds

Kornkanok Ingkaninan¹, Nantaka Khorana¹, Suthatip Makmee¹, Kanokwan Changwijit¹, Watcharin Puapan¹, Anuchit Plubrukarn², Akkharawit Kanjana-opas³, and Khanit Suwanborirux⁴

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000

² Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Songkhla 90112

³ Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Songkhla 90112

⁴ Center for Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi (BNPME), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a progressive degenerative neurologic disorder resulting in impaired memory and behavior. Epidemiological data indicate a potentially considerable increase in the prevalence of the disease over the next two decades. One of the most promising approaches for treating this disease is to enhance the acetylcholine level in the brain using acetylcholinesterase (AChE) inhibitors. In order to search for new AChE inhibitors, plants along with marine organisms and micro-organisms in Thailand were explored for AChE inhibitory activity using Ellman's colorimetric method in 96-welled microplates.

From the screening of plant extracts, *Alstonia macrophylla* stem extract showed the highest inhibitory activity expressed by the concentration that inhibited 50% of AChE activity (IC_{50} value) of 6.76 ± 1.74 mg/ml. Bisindole alkaloids consisted of two macroline units were obtained from alkaloidal fraction of *A. macrophylla* stem. Their structures were elucidated using spectroscopic methods. The activities on AChE were investigated in comparison with a reference standard, galanthamine. One novel compound was obtained from this study.

The screening of marine organisms and microorganisms collected from Thailand revealed some interesting sources of AChE inhibitors. A new stigmastane-type steroidal alkaloid, 4-acetoxylaklamine B isolated from a sponge, *Corticium* sp. and marinoquinoline A isolated from a marine gliding bacteria strain TISTR 1741 showed a high activity with IC_{50} value in a micromolar range.

Previous studies from our laboratory have shown a few isoquinoline analogs to be potential acetylcholinesterase inhibitors. In the present study we have extended analysis of the structure–activity relationship (SAR) of the isoquinoline ring system as an AChEI. The corresponding reduced form of 1-(3,4-dimethoxybenzyl)-6,7-dimethoxyisoquinoline, ring-opened analog, and related analogs were evaluated for AChE inhibitory activity. Our results showed that the dihydroisoquinoline ring and quaternary isoquinoline with substitution at 1-position displayed IC_{50} in 10^{-6} M range and 10^{-5} M range on AChEs from electric eel and from human recombinant, respectively.

Executive Summary

โครงการ การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจากแหล่งธรรมชาติ

และจากการสังเคราะห์

สัญญาเลขที่ RMU4980038

กรรณก อิงคินันท์ นันทกา โกรานา สุทธาทิพย์ มากมี กนกวรรณ ช้างวิจิตร วัชรินทร์ พัวพัน

อนุชิต พลับปรุงการ อัครวิทย์ กาญจนโอภาส และ คณิต สุวรรณบริรักษ์

สารต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase; AChE) กำลังได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลก เนื่องจากเป็นกลุ่มสารที่อาจนำมาพัฒนาเป็นยาในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของสมอง และมีผลให้สารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน ในสมองมีระดับต่ำลง โครงการนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารที่มีฤทธิ์ในการต้าน AChE จากแหล่งธรรมชาติ โดยมีการคัดเลือกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ทั้งที่เป็นพืช สิ่งมีชีวิตในทะเล จุลินทรีย์ และสารสังเคราะห์มาทดสอบฤทธิ์ เพื่อจะหาสารที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ที่ดี นอกจากนี้ จากการวิจัยที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยได้พบว่าสาร isoquinolines จากพืชสกุล *Stephania* มีฤทธิ์ต้าน AChE ได้ดี ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์สาร อนุพันธ์ของ isoquinolines เพื่อศึกษา SAR และเพื่อให้มีความเข้าใจถึงการออกฤทธิ์และการจับกับเอนไซม์ AChE ดีขึ้น

ผู้วิจัยทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE ในตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในยาอายุวัฒนะ สมุนไพรในวงศ์ Leguminosae, Apocynaceae และ Loganiaceae รวมทั้งตัวอย่างสิ่งมีชีวิต รวมทั้งจุลินทรีย์ จากทะเล ด้วยวิธีของ Ellman โดยใช้ AChE จากปลาไหลไฟฟ้า โดยศึกษาพบตัวอย่างที่ออกฤทธิ์ต้าน AChE สูงมากกว่า 60 % ในพืช 3 ตัวอย่าง ในสิ่งมีชีวิตในทะเล 3 ตัวอย่าง และจากจุลินทรีย์ในทะเล 10 ตัวอย่าง ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้าน AChE จากต้นทุ้งฟ้า (*Alstonia macrophylla* Wall. Ex A. DC.) ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Apocynaceae มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ AChE สูง ได้ทำการแยกสาร indole alkaloids จาก ต้นทุ้งฟ้าได้ 2 ตัว ซึ่งได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโกปีพบว่าสารนั้นคือ macralstonine และสารใหม่อีก 1 ชนิดที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน คณะผู้วิจัยได้สกัดแยกสารต้าน AChE กลุ่ม steroidal alkaloids ชื่อ 4-acetoxy-plakinamine B จากฟองน้ำ *Corticium* sp. และได้แยกหาสารที่ออกฤทธิ์ต้าน AChE จาก gliding bacteria strain TISTR 1741 ได้สาร Marinoquinoline A ซึ่งสารทั้งสองมีค่า IC₅₀ ในการต้าน AChE อยู่ในระดับไมโครโมลาร์ นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้พบร่วมกับกลุ่มวิจัยจากเบลเยียมในการศึกษาสารต้าน AChE จากพืชวงศ์ Menispermaceae ชื่อ *Triclisia sacleuxii* (Pierre) Diels โดยสารดังกล่าวเป็นสารกลุ่ม isoquinoline alkaloids

คณะผู้วิจัยได้ทำการการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ isoquinolines เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ต้าน AChE โดยทดสอบร่วมกับอนุพันธ์บางตัวของสารที่แยกสกัดได้จากธรรมชาติ ผลการศึกษาพบว่าโมเลกุลของ isoquinoline ที่เป็นอนุพันธ์ของ dihydroisoquinoline และ quaternary isoquinoline มีฤทธิ์ในการต้าน AChE ดี แต่ในกรณีของ tetrahydroisoquinoline และ open chain มีฤทธิ์ต่ำ โดยที่อนุพันธ์ของ dihydroisoquinoline ที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งที่ 1 เป็นหมู่ benzyl derivatives ส่งผลในการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ phenyl, cyclohexyl, ethyl, methyl และ hydrogen group ในกลุ่มอนุพันธ์ของ dihydroisoquinoline ที่มีการแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 2 เป็น benzyl และ methylcyclohexyl พบว่ามีฤทธิ์ต่อ AChE จากปลาไหลไฟฟ้าที่ไม่แตกต่างจากโครงสร้างเดียวกันที่มีหมู่แทนที่ในตำแหน่งที่ 1 แต่พบว่าโครงสร้างนี้มีผลต่อ AChE ที่เป็น human recombinant enzyme ต่ำมากเมื่อเทียบกับอนุพันธ์เดียวกันที่มีหมู่แทนที่ในตำแหน่งที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตำแหน่งและชนิดของหมู่แทนที่ในโครงสร้างมีความเฉพาะเจาะจงต่อการเกิด interaction กับเอนไซม์แต่ละชนิด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยพื้นฐานแบบมุ่งเป้าเคมีทางยาการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2549 ขอขอบคุณทุนวิจัยจาก ศูนย์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตในทะเลและเอนโดไฟท์ (BNPME) ขอขอบคุณ รศ. ดร. สุภา หารหนองบัว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำ molecular docking ขอขอบคุณ ศ. ดร. สมศักดิ์ รุจิรวัฒน์ ที่ได้เอื้อเฟื้อสารกลุ่ม isoquinolines บางตัว เพื่อใช้ในการศึกษา ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวรที่ให้การสนับสนุนเวลาและเครื่องมือในการทำวิจัย และ ขอขอบคุณนักวิจัย นักศึกษา และ เจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
Executive summary	iii
กิตติกรรมประกาศ	vi
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีทดลอง	3
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผล	15
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	37
บทที่ 5 เอกสารอ้างอิง	39
บทที่ 6 ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ	41
ภาคผนวก	45

สารบัญรูป

รูปที่ 1	แผนภูมิการสกัดแอลคาลอยด์	6
รูปที่ 2	แผนภูมิแสดงการแยก fraction จาก Crude alkaloidal extract	7
รูปที่ 3	แผนภูมิแสดงการแยกสกัด fraction จาก fraction AMC	10
รูปที่ 4	แผนภูมิแสดงการแยกสกัด fraction จาก fraction AMC20 และ 22	11
รูปที่ 5	แผนภูมิแสดงการแยกสกัด fraction จาก fraction AMC22-13 และ AMC22-24	12
รูปที่ 6	โครงสร้างของสาร 1 (macralstonine)	18
รูปที่ 7	โครงสร้างของ สาร 2	18
รูปที่ 8	สูตรโครงสร้างของสาร 4-acetoxy-plakinamine B (1) และสาร plakinamine B (2)	21
รูปที่ 9	โครงสร้างของ marinoquinoline A	21
รูปที่ 10	โครงสร้างของ bisisoquinoline alkaloids ที่แยกได้จาก <i>Triclisia sacleuxii</i>	22
รูปที่ 11	กระบวนการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ dihydroisoquinoline และ tetrahydroisoquinoline	24
รูปที่ 12	กระบวนการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ tetrahydroisoquinoline ที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งที่ 2	24
รูปที่ 13	แสดงการเปรียบเทียบของ protein structure ของ AChE เริ่มต้น และ protein ที่ถูก docking	35
รูปที่ 14	ผลของการ docking ของ a) SM61 และ b) SM 72	36

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในยาอายุวัฒนะหรือยาบำรุงกำลังที่ใช้ในการศึกษา	3
ตารางที่ 2 ตัวอย่างพืชวงศ์ Leguminosae ที่ใช้ในการศึกษา	4
ตารางที่ 3 ตัวอย่างพืชวงศ์ Apocynaceae และ Loganiaceae ที่ใช้ในการศึกษา	5
ตารางที่ 4ฤทธิ์ต้าน AChE ในสารสกัดพืชที่ใช้ในยาอายุวัฒนะหรือยาบำรุงกำลัง	15
ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้าน AChE ในสารสกัดพืชวงศ์ Leguminosae	16
ตารางที่ 6 แสดงการยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase (%) ของสารสกัดจากส่วนรากของพืช	17
ตารางที่ 7 ค่าการยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase ได้ 50% ของ ใบ ต้น ราก ของทั้งฟ้า	17
ตารางที่ 8 ค่า Chemical shift ของ ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR ของสาร 2 (CDCl_3)	19
ตารางที่ 9 ฤทธิ์ต้าน AChE ในสารสกัด alcohol จาก marine organism	20
ตารางที่ 10 ฤทธิ์ต้าน AChE ของ bisoquinoline alkaloids จาก <i>Triclisia sacleuxii</i>	23
ตารางที่ 11 คุณสมบัติของสารที่สังเคราะห์ได้	25
ตารางที่ 12 ผลการต้าน AChE จาก eel ของสาร Dihydroisoquinoline และ Isoquinoline	30
ตารางที่ 13 ผลการต้าน AChE จาก eel ของสาร Tetrahydroisoquinoline ที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 1	31
ตารางที่ 14 ผลการต้าน AChE จาก eel ของสาร Tetrahydroisoquinoline ที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 2	32
ตารางที่ 15 ผลของตัวอย่างการต้าน AChE จาก eel และ BuChE จาก horse ของงสารสังเคราะห์	33
ตารางที่ 16 ผลในการต้าน AChE จาก human ของตัวอย่างสารสังเคราะห์ของสาร isoquinoline	34
ตารางที่ 17 ผลการ Docking ของสารต่อ AChE pocket (code 1eve.pdb)	35

บทที่ 1

บทนำ

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นโรคที่เป็นความผิดปกติจากการเสื่อมของสมอง (neurodegenerative disorder) พบมากในกลุ่มประชากรผู้สูงอายุ โดยจนถึงปัจจุบันไม่มีวิธีใดที่สามารถรักษาผู้ป่วยโรคนี้ให้หายจากโรคได้โดยเด็ดขาด โรคอัลไซเมอร์นับเป็นโรคที่ทำลายความสามารถในการพึ่งพาตนเองของผู้สูงอายุได้มากที่สุดและกำลังจะเป็นปัญหาทางสุขภาพและทางเศรษฐกิจที่สำคัญ เนื่องจากโลกของเรามีคนสูงอายุเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และโลกต้องแบกภาระคนเป็นโรคนี้หนักขึ้น เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการรักษาแพงเป็นที่สามารถจากโรคหัวใจและมะเร็ง ขณะนี้ในประเทศสหรัฐอเมริกาต้องใช้จ่ายถึงปีละ 100,000 ล้านดอลลาร์เพื่อรักษาอาการอัลไซเมอร์

สาเหตุและพยาธิกำเนิดของโรคอัลไซเมอร์มีสมมุติฐานว่าสามารถเกิดขึ้นมาได้หลายสาเหตุด้วยกัน แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีรายงานการพบความบกพร่องทางระบบ cholinergic ในสมองของผู้ป่วยโรคนี้ และการลดลงของ acetylcholine ในสมองเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับความรุนแรงของความเสื่อมในสมอง ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิประสาทวิทยาในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ (Perry, 1986) ความรู้นี้ได้ก่อให้เกิดแนวทางการรักษาในแง่ประคับประคอง (Palliative therapy) โดยพยายามเสริมการทำงานด้าน cholinergic ในหลายรูปแบบ กลยุทธ์ที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดก็คือ การใช้สารต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) (Enz et al., 1993) ปัจจุบันมียากกลุ่ม AChE inhibitors 4 ชนิดที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกาในการรักษา mild และ moderate Alzheimer's ได้แก่ tacrine donepezil rivastigmine และ galanthamine อย่างไรก็ตามสารต้าน AChE ที่มีการค้นพบมายังมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น tacrine อาจก่อให้เกิดพิษต่อตับ นอกจากนี้ ผู้ป่วยแต่ละรายยังมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อยาแต่ละชนิดแตกต่างกันไป (Scarpini et al., 2003) ดังนั้นการค้นหายาต้าน AChE ใหม่ ๆ ยังเป็นความท้าทาย และเป็นสิ่งที่จำเป็นในสภาวะปัจจุบัน

แหล่งกำเนิดของยาที่มีทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์และจากธรรมชาติ เป็นที่ยอมรับกันว่าธรรมชาติเป็นแหล่งแห่งความหลากหลายทางด้านเคมีและชีวภาพ สารที่สกัดจากพืชหรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายตัว มีความซับซ้อนและแปลกใหม่ทางโครงสร้าง และฤทธิ์ทางชีวภาพ การศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงเสนอโครงร่างเป็นสองส่วนใหญ่ๆ โดยส่วนที่หนึ่งจะเป็นการศึกษาหาสารที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ AChE จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากประเทศไทยรวมทั้ง พืช สิ่งมีชีวิตในทะเล และจุลินทรีย์ โดยเน้นที่พืชที่มีการใช้เป็นยาอายุวัฒนะ เป็นยาบำรุงสมอง บำรุงกำลัง และพืชกลุ่มที่ให้สารพวก isoquinolines เมื่อพบสารสกัดที่มีฤทธิ์น่าสนใจ จะได้ทำการแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ เพื่อนำสารบริสุทธิ์ไปศึกษาต่อไป และการศึกษาในส่วนที่สองจะมุ่งเน้นการศึกษาสารที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยจะมุ่งเน้นการสังเคราะห์สารที่เป็นอนุพันธ์ของ isoquinolines และศึกษา structure activity relationship (SAR) ของสารทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ซึ่งในการศึกษาดังกล่าวจะทำให้มีความเข้าใจในระดับโมเลกุล เช่น ความสำคัญของหมู่แทนที่ ตำแหน่งที่น่าจะจำเป็นต่อการจับกับเอนไซม์ของสารได้ และนำไปสู่การออกแบบสารที่มีฤทธิ์ดีขึ้นต่อไปได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในประเทศไทยเช่น พืช สิ่งมีชีวิตในทะเล และ จุลินทรีย์ ต่อการทดสอบฤทธิ์ต้าน acetylcholinesterase (AChE)
- 2 เพื่อสกัด แยก และ พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในข้อ 1
- 3 เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้ เทียบกับสารออกฤทธิ์ที่เป็นที่รู้จักกันดี
- 4 เพื่อสังเคราะห์สารที่มีหมู่โครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของ isoquinolines
- 5 เพื่อศึกษา SAR ของสารกลุ่ม isoquinolines ที่ได้จากการสังเคราะห์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อให้มีความเข้าใจถึงการออกฤทธิ์และการจับกับเอนไซม์ AChE ดีขึ้น
- 6 เพื่อสังเคราะห์หรือดัดแปลงโครงสร้างสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ต้าน AChE ดี

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. การทดสอบสารสกัดผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแหล่งต่าง ๆ

ตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างจากจังหวัดพิษณุโลก ตัวอย่างพืช เก็บไว้ที่ พิพิธภัณฑ์พืช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, พิพิธภัณฑ์พืช สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ และ พิพิธภัณฑ์พืช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 1-3

ตารางที่ 1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในยาอายุวัฒนะหรือยาบำรุงกำลังที่ใช้ในการศึกษา

	ชื่อพืช	Scientific name	Family	Part used	Collection number
1	กระชายดำ	<i>Kaempferia parviflora</i> Wall. ex Baker	Zingiberaceae	Rhizome	QSBG. 25275
2	กระชายป่า	<i>Boesenbergia rotunda</i> (L.) Mansf.	Zingiberaceae	Rhizome	QSBG. 4152
3	กะดังใบ	<i>Leea indica</i> (Burm.f.) Merr.	Leeaceae	Root	QSBG. 15194
4	กำลังช้างเผือก	<i>Hiptage benghalensis</i> (L.) Kurz	Malpighiaceae	Stem	WP.1896
5	กำลังเสือโคร่ง	<i>Betula alnoides</i> Buch.-Ham. ex G.Don	Betulaceae	Stem bark	WP.1899
6	คันทาดำ	<i>Tacca chantrieri</i> André	Taccaceae	Root	WP.1901
7	ข่าพลู	<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	Piperaceae	Root	WP.1902
8	โตไม่รู้ล้ม	<i>Elephantopus scaber</i> L.	Asteraceae	Whole plant	WP.1895
9	บอระเพ็ด	<i>Tinospora crispa</i> (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson	Menispermaceae	Stem	QSBG. 11325
10	ฝนแสนห่า	<i>Myxopyrum smilacifolium</i> Blume subsp.	Oleaceae	Root	WP.1904
11	มะเขือเจ้าเครือ	<i>Securidaca inappendiculata</i> Hassk.	Polygalaceae	Stem	WP.1897
12	ม้าแม่กำ	<i>Polygala chinensis</i> L.	Polygalaceae	Whole plant	QSBG. 10073
13	ไม้ฝาง	<i>Caesalpinia sappan</i> L.	Caesalpiniaceae	Stem	WP.1903
14	รางแดง	<i>Ventilago denticulata</i> Willd.	Rhamnaceae	Stem	WP.1894
15	ว่านน้ำ	<i>Acorus calamus</i> L.	Araceae	Root	WP.1907

16	สังกรณี	<i>Barleria strigosa</i> Willd.	Acanthaceae	Whole plant	WP.1900
17	โสมไทย	<i>Talinum paniculatum</i> (Jacq.) Gaertn.	Portulacaceae	Rhizome	QSBG. 9524
18	หยาดน้ำค้าง	<i>Drosera burmannii</i> Vahl	Droseraceae	Arial Part	QSBG. 9202
19	ฮ่อสะพายควาย	<i>Berchemia floribunda</i> Wall.	Rhamnaceae	Stem	WP.1893

ตารางที่ 2 ตัวอย่างพืชวงศ์ Leguminosae ที่ใช้ในการศึกษา

No.	ชื่อพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	Collection number
1	กระถินณรงค์	<i>Acacia auriculaeformis</i> A. Cunn.	Sirikul013
2	กระถินบ้าน	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	Sirikul006
3	กาหลง	<i>Bauhinia acuminata</i> L.	Sirikul011
4	ขี้เหล็ก	<i>Senna siamea</i> (Lam.) Irwin & Barneby	Sirikul001
5	คูณ	<i>Cassia fistula</i> L.	Sirikul004
6	แคบ้าน	<i>Sesbania grandiflora</i> (L.) Desv.	Sirikul002
7	จามจุรี	<i>Samanea saman</i> (Jacq.) Merr.	Sirikul005
8	ชงโค	<i>Bauhinia glauca</i> (Wall. Ex Benth.) Benth.	Sirikul009
9	ชะอม	<i>Acacia pennata</i> (L.) Willd. subsp. <i>insuavis</i> (Lace) I.C. Nielsen	Sirikul012
10	ชุมเห็ดเทศ	<i>Senna alata</i> (L.) Roxb.	Sirikul003
11	ต้นหยง	<i>Caesalpinia coriaria</i> (Jacq.) Wild.	Sirikul020
12	ทรงบาดาล	<i>Senna surattensis</i> (Burm.f.) Irwin & Barneby	Sirikul017
13	ทองกวาว	<i>Butea monosperma</i> (Lam.) Tuab.	Sirikul019
14	ฝาง	<i>Caesalpinia sappan</i> L.	Sirikul013
15	มะขาม	<i>Tamarindus indica</i> L.	Sirikul007
16	มะขามเทศ	<i>Pithecellobium dulce</i> (Roxb.) Benth.	Sirikul008
17	ส้มป่อย	<i>Acacia concinna</i> (Wild.) DC.	Sirikul014
18	โสมเหลือง	<i>Saraca thaipingensis</i> Cantley ex Prain	Sirikul018
19	หางนกยูงฝรั่ง	<i>Delonix regia</i> (Bojer ex Hook.) Raf.	Sirikul016
20	อรพิม	<i>Bauhinia Winitii</i> Craib	Sirikul010

ตารางที่ 3 ตัวอย่างพืชวงศ์ Apocynaceae และ Loganiaceae ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	Collection number
1. กันเกรา	<i>Fagraea fragrans</i> Roxb	Loganiaceae	Changwijiit 011
2. ชวนชม	<i>Adenium obesum</i> (Forssk.)	Apocynaceae	Changwijiit 007
3. ชำมะนาด	<i>Vallaris glabra</i> Kuntze.	Apocynaceae	Changwijiit 006
4. ดินเปิดทราย	<i>Cerbera manghas</i> L.	Apocynaceae	Changwijiit 002
5. หูกฟ้า	<i>Alstonia macrophylla</i> Wall.	Apocynaceae	Changwijiit 003
6. บานบุรีเหลือง	<i>Allamanda cathartica</i> L.	Apocynaceae	Changwijiit 004
7. ราชาวดี	<i>Buddleja paniculata</i> Wall.	Loganiaceae	Changwijiit 012
8. ลั่นทม	<i>Plumeria alba</i> L.	Apocynaceae	Changwijiit 010
9. สัตตบรรณ	<i>Alstonia scholaris</i> R.Br.	Apocynaceae	Changwijiit 008
10. แสลงใจ	<i>Strychnos nux-vomica</i> L.	Loganiaceae	Changwijiit 013
11. หนามแดง	<i>Carissa carandas</i> L.	Apocynaceae	Changwijiit 005
12. หอมปี่นัง	<i>Strophanthus gratus</i> Franch.	Apocynaceae	Changwijiit 009

การสกัดพืชเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE

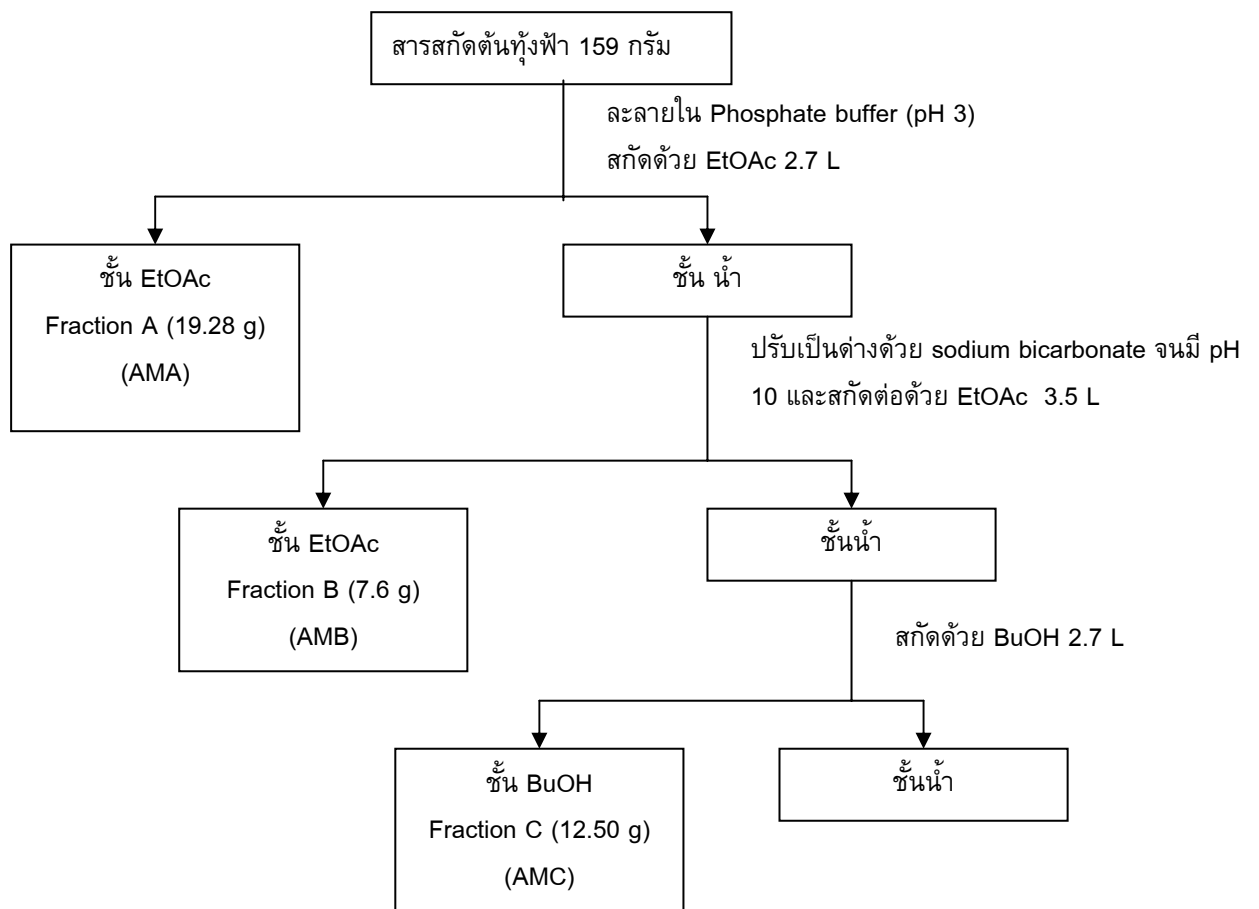
ตัวอย่างพืชถูกทำให้แห้งในตูบที่ 55 °C จากนั้นตัวอย่างแห้งถูกบดและหมักในเอทานอล 95% 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 และ 7 วัน แล้วกรอง สารละลายที่ได้ถูกระเหยให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ก่อนจะนำไปทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE ต่อไป

สารเคมีและวัสดุ

สารตั้งต้นที่เป็นอนุพันธ์ของเอมีน และสารในกลุ่ม acid chloride ต่างๆในการศึกษานี้ได้สั่งซื้อจาก Flika, Aldrich และ Acros ซึ่งทำการใช้สารดังกล่าวเป็นสารตั้งต้นในการศึกษาโดยไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ใดก่อน ตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษาใช้ในรูปแบบของ AR grade ซึ่งทำการสั่งซื้อจากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany) ส่วนของ thin-layer chromatography ใช้ของ Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ on aluminum sheets (Germany)

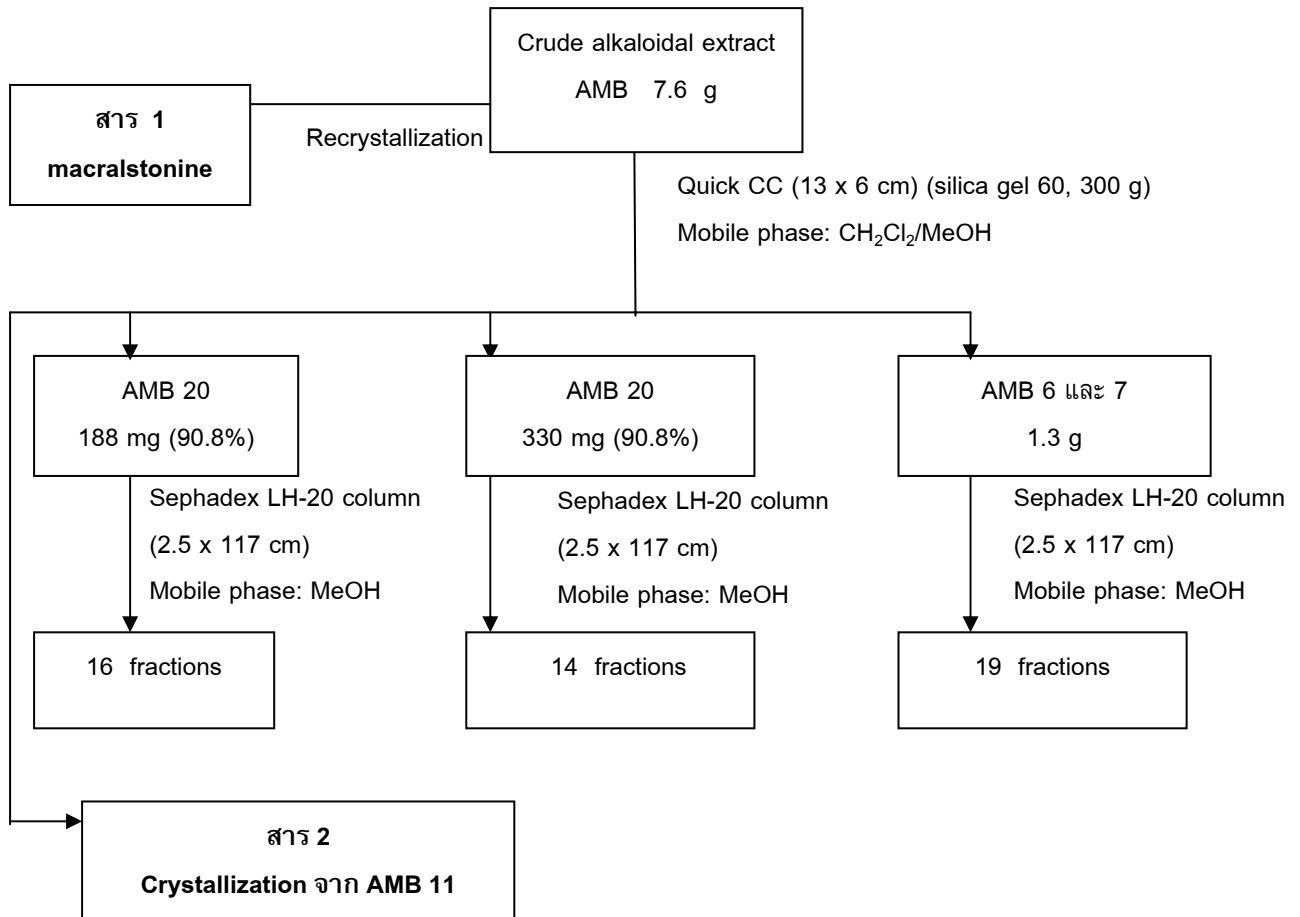
การสกัดแยกสารจากหูกฟ้า

การสกัดแยกพืชทำตาม bioassay guided fractionation ตามที่ระบุไว้ในผลการทดลองและอภิปราย ลำต้นหูกฟ้าถูกทำให้แห้งที่ 55 °C ในตูบจากนั้นตัวอย่างแห้งไปบดและหมักในเอทานอล 95% 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 และ 6 วัน แล้วกรอง สารละลายที่ได้ถูกระเหยให้แห้งภายใต้สุญญากาศ สารสกัดต้นหูกฟ้า (159 g) นำไปละลายใน Phosphate buffer (pH 3) และ สกัดด้วยเอธิลอะซิเตต (EtOAc) ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำชั้น EtOAc ไประเหยแห้งได้ fraction A (19.28 g) ชั้นน้ำถูกทำให้เป็นด่างด้วย sodium bicarbonate จนมี pH 10 และสกัดต่อด้วย EtOAc ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นระเหยชั้น EtOAc ให้แห้งจะได้สารสกัดหยาบแอลคาลอยด์จากต้นหูกฟ้า (fraction B, 7.6 g) ส่วนชั้นน้ำนำไปสกัดกับบิวทานอล (BuOH) ได้สารสกัด BuOH (fraction C, 12.5 g) แผนภูมิการสกัด(รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แผนภูมิการสกัดแอลคาลอยด์

จากผลการสกัดแยกด้วยการ partition ได้สารบริสุทธิ์ตกผลึกมาจาก fraction B คือ สาร 1 และสารบริสุทธิ์ 2 ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงการแยก fraction จาก Crude alkaloidal extract

จากนั้นผู้วิจัย นำสารสกัดหยาบแอลคาลอยด์ (fraction B) มาแยกด้วย quick CC (13 x 6 cm) ใช้ silica gel 60 (300 g, Merck 1.09385.1000) โดยมี mobile phase คือ คลอโรฟอร์ม (CHCl_3) กับเมทานอล (MeOH) โดยค่อยๆเพิ่มอัตราส่วนของ MeOH เก็บตัวอย่างที่ละ 250 ml แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย TLC รวม fraction ที่ให้ผลใน TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ 32 fractions และได้สาร 2 ตกผลึกมาจาก fraction 11 โดยมี mobile phase คือ CHCl_3 -MeOH , 98:2, 2x300 ml) นำแต่ละ fraction ไปทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE พบว่า fraction ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีมีดังนี้ fraction AMB 6 (fr. no.6, CHCl_3 -MeOH, 99:1 ,1x250 ml), AMB 7 (fr. no.7, CHCl_3 -MeOH, 99:1, 1x250 ml), AMB 20 (fr. no.40-44, CHCl_3 -MeOH, 85:15, 5x250 ml) และ AMB 21 (fr. no.45, CHCl_3 -MeOH, 8:2, 1x250 ml) ซึ่งผู้วิจัยได้นำ fraction เหล่านี้มาทำการแยกต่อไป

fraction AMB 6 รวมกับ fraction AMB 7 (1.3 g) ถูกแยกด้วย Sephadex LH-20 CC (2.5 x 117 cm) มี mobile phase เป็น MeOH

fraction AMB 20 (330 mg) ถูกแยกด้วย Sephadex LH-20 CC (2.5 x 117 cm) มี mobile phase เป็น MeOH

fraction AMB 21 (188 mg) ถูกแยกด้วย Sephadex LH-20 CC (2.5 x 117 cm) มี mobile phase เป็น MeOH

นำสารสกัดหยาบ (fraction C) มาแยกด้วย quick CC (13 x 6 cm) ใช้ silica gel 60 (300 g, Merck 1.09385.1000) โดยมี mobile phase คือ CHCl_3 กับ MeOH โดยค่อยๆเพิ่มอัตราส่วนของ MeOH เก็บตัวอย่างที่ละ 250 ml แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย TLC รวม fraction ที่ให้ผลใน TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ 28 fractions นำแต่ละ fraction ไปทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE พบว่า Fraction ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีมีดังนี้ fraction AMC 18 (fr. no.36-40, CHCl_3 -MeOH, 9:1 ,5x250 ml), AMC 19 (fr. no.41-42, CHCl_3 -MeOH, 9:1, 2x250 ml), AMC 20 (fr. no.43-51, CHCl_3 -MeOH, 9:1,9x250 ml), AMC 21 (fr. no.52-55, CHCl_3 -MeOH, 88:12, 5x250 ml) และ AMC 22 (fr. no.56-62, CHCl_3 -MeOH, 85:15, 7x250 ml), ซึ่งผู้วิจัยจะได้นำ fraction เหล่านี้มาทำการแยกต่อไป

fraction AMC 18 (388.5 mg) ถูกแยกด้วย Sephadex LH-20 CC (2.5 x 100 cm) มี mobile phase เป็น MeOH ได้ 22 fractions นำแต่ละ fraction ไปทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE พบว่า fraction ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีมีดังนี้ AMC18-2 ถึง AMC18-8 และ AMC18-9 ถึง AMC18-10 นำ fraction เหล่านี้มาทำการแยกต่อไป

fraction AMC18-2 ถึง AMC18-8 นำมารวมกันได้ 102.0 mg ถูกแยกด้วย silica gel 60 (30 g, Merck 1.09385.1000) โดยมี mobile phase คือ CHCl_3 กับ MeOH โดยค่อยๆเพิ่มอัตราส่วนของ MeOH เก็บตัวอย่างที่ละ 50 ml แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย TLC รวม fraction ที่ให้ผลใน TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ 21 fractions นำแต่ละ fraction มาทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE พบว่า fraction ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีมีดังนี้ AMC18-2-6 จนถึง AMC18-2-17 นำ fraction เหล่านี้มาทำการแยกต่อไป

fraction AMC18-9 และ AMC18-10 นำมารวมกันได้ 136.0 mg ถูกแยกด้วย silica gel 60 (30 g, Merck 1.09385.1000) โดยมี mobile phase คือ CHCl_3 กับ MeOH โดยค่อยๆเพิ่มอัตราส่วนของ MeOH เก็บตัวอย่างที่ละ 30 ml แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย TLC รวม fraction ที่ให้ผลใน TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ 14 fractions นำแต่ละ fraction มาทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE พบว่า fraction ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีมีดังนี้ AMC18-9-5 จนถึง AMC18-9-9 นำ fraction เหล่านี้มาทำการแยกต่อไป

fraction AMC 21 (740.0 mg) ถูกแยกด้วย Sephadex LH-20 CC (2.5 x 100 cm) มี mobile phase เป็น MeOH ได้ 14 fractions นำแต่ละ fraction มาทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE พบว่า fraction ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีมีดังนี้ AMC21-4 จนถึง AMC21-10 ซึ่งผู้วิจัยจะได้นำ fraction เหล่านี้มาทำการแยกต่อไป

fraction AMC 20 (539.0 mg) ถูกแยกด้วย Sephadex LH-20 CC (3.0 x 106 cm) มี mobile phase เป็น MeOH ได้ 24 fractions นำแต่ละ fraction มาทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE พบว่า fraction ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีมีดังนี้ AMC20-12 จนถึง AMC20-15 ซึ่งผู้วิจัยจะได้นำ fraction เหล่านี้มาทำการแยกต่อไป

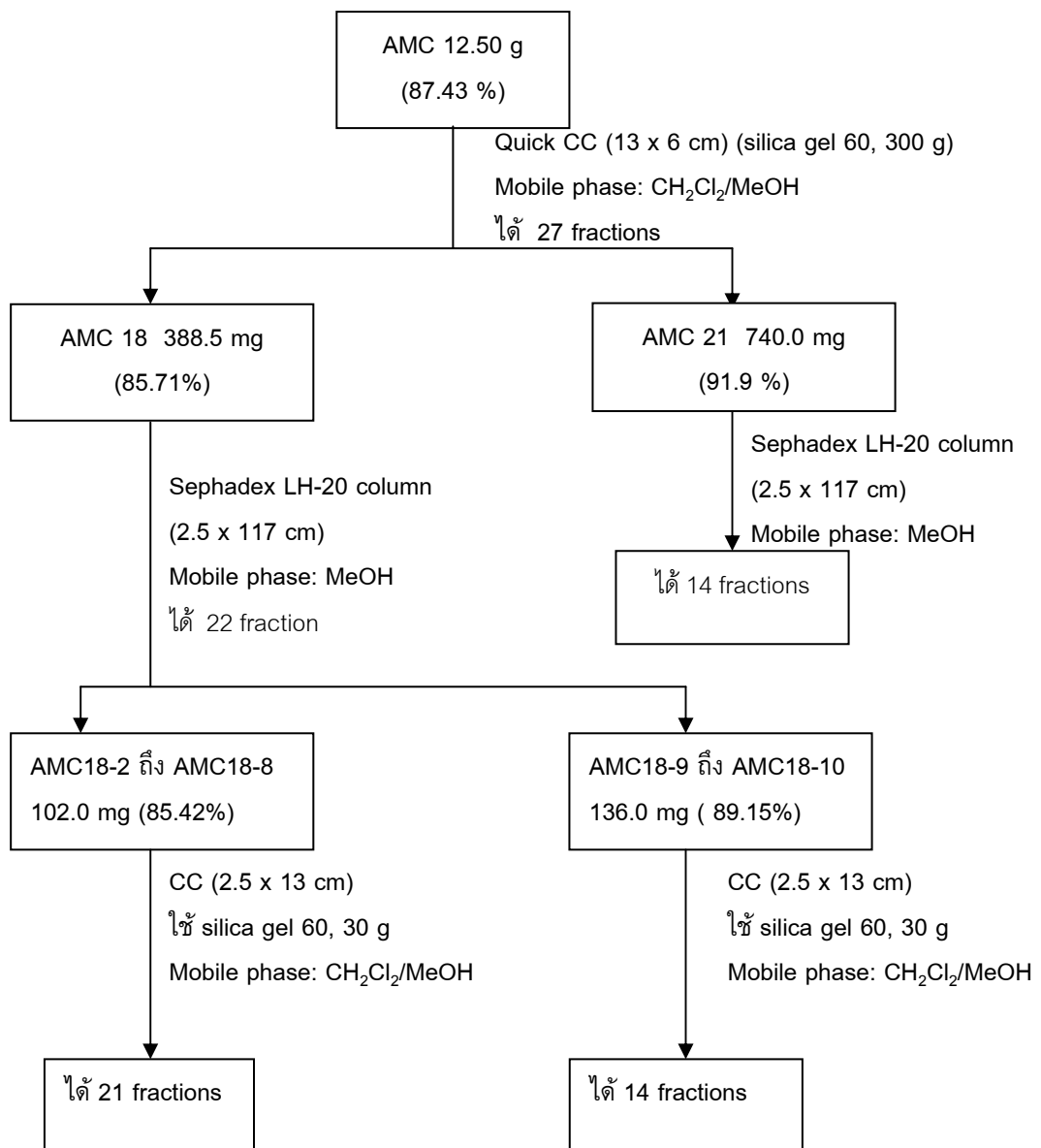
AMC20-12 จนถึง AMC20-15 รวมกันได้ 148.0 mg ถูกแยกด้วย silica gel 60 (30 g, Merck 1.09385.1000) โดยมี mobile phase คือ EtOAc กับ MeOH และ ไดคลอมีเทน (CH_2Cl_2) กับ MeOH โดยค่อยๆเพิ่มอัตราส่วนของ MeOH เก็บตัวอย่างที่ละ 50 ml แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย TLC รวม fraction ที่ให้ผลใน TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ 22 fractions นำแต่ละ fraction มาทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE พบว่า fraction ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีมีดังนี้ AMC20-12-19 จนถึง AMC20-12-20 นำ fraction เหล่านี้มาทำการแยกต่อไป

AMC20-12-19 จนถึง AMC20-12-20 รวมกันได้ 30.0 mg ถูกแยกด้วย silica gel 60 (25 g, Merck 1.09385.1000) โดยมี mobile phase คือ CH_2Cl_2 กับ MeOH โดยค่อยๆเพิ่มอัตราส่วนของ MeOH เก็บตัวอย่างที่ละ 20 ml แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย TLC รวม fraction ที่ให้ผลใน TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ 29 fractions นำแต่ละ fraction มาทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE พบว่า fraction ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีมีดังนี้ AMC20-12-19-8 จนถึง AMC20-12-19-11 นำ fraction เหล่านี้มาทำการแยกต่อไป

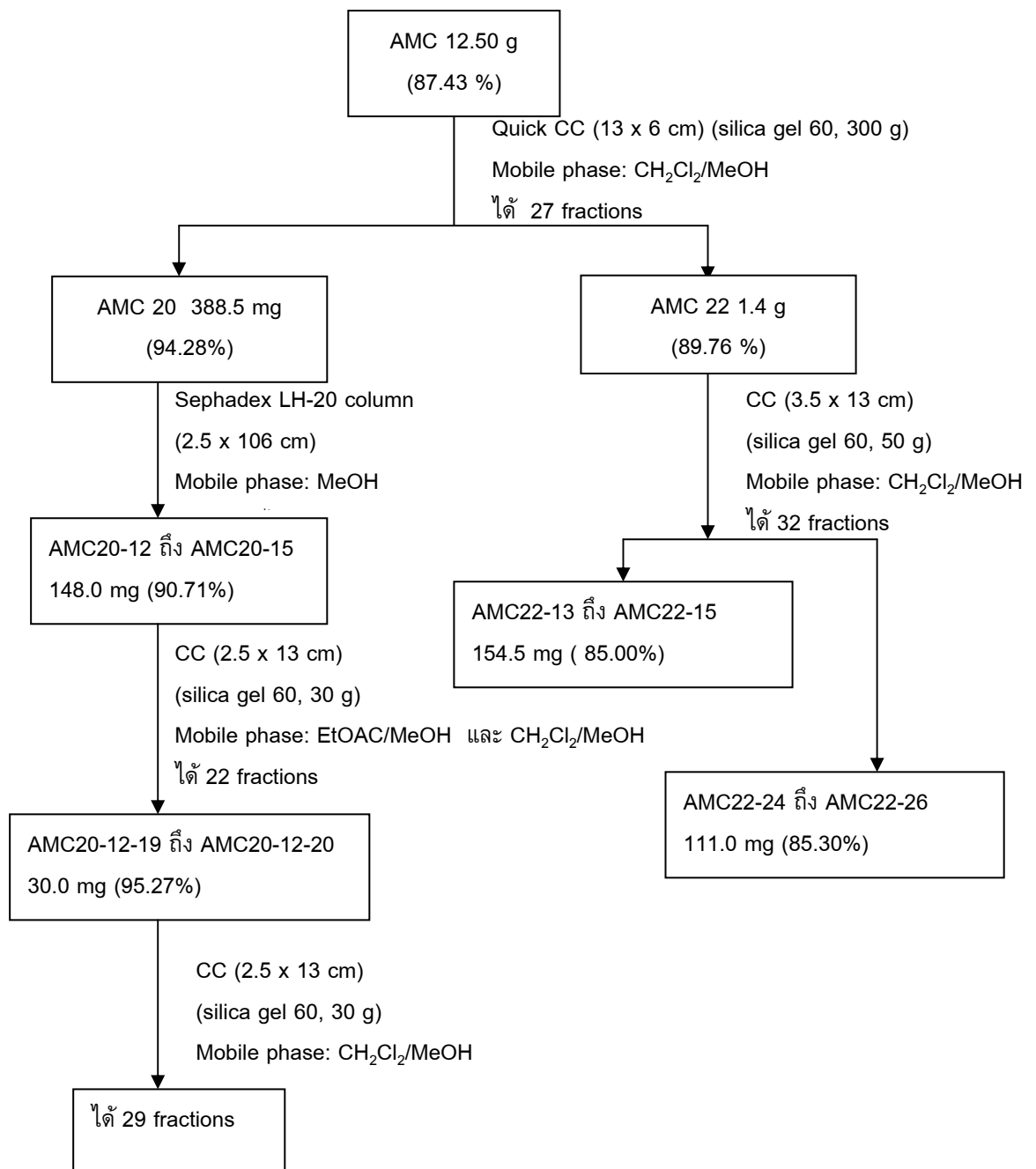
fraction AMC 22 (1.40 g) ถูกแยกด้วย silica gel 60 (50 g, Merck 1.09385.1000) โดยมี mobile phase คือ CH_2Cl_2 กับ MeOH โดยค่อยๆเพิ่มอัตราส่วนของ MeOH เก็บตัวอย่างที่ละ 20 ml แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย TLC รวม fraction ที่ให้ผลใน TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ 32 fractions นำแต่ละ fraction มาทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE พบว่า fraction ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีมีดังนี้ AMC22-13 จนถึง AMC22-15 และ AMC22-24 จนถึง AMC22-26 นำ fraction เหล่านี้มาทำการแยกต่อไป

AMC22-13 จนถึง AMC22-15 รวมกันได้ 154.5 mg ถูกแยกด้วย Sephadex LH-20 CC (2.5 x 80 cm) มี mobile phase เป็น EtOAc:MeOH = 1:1 ได้ 9 fractions นำแต่ละ fraction มาทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE พบว่า fraction ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีมีดังนี้ AMC22-13-3 แต่มีปริมาณน้ำหนักรวมน้อยไม่สามารถนำไปแยกต่อไป

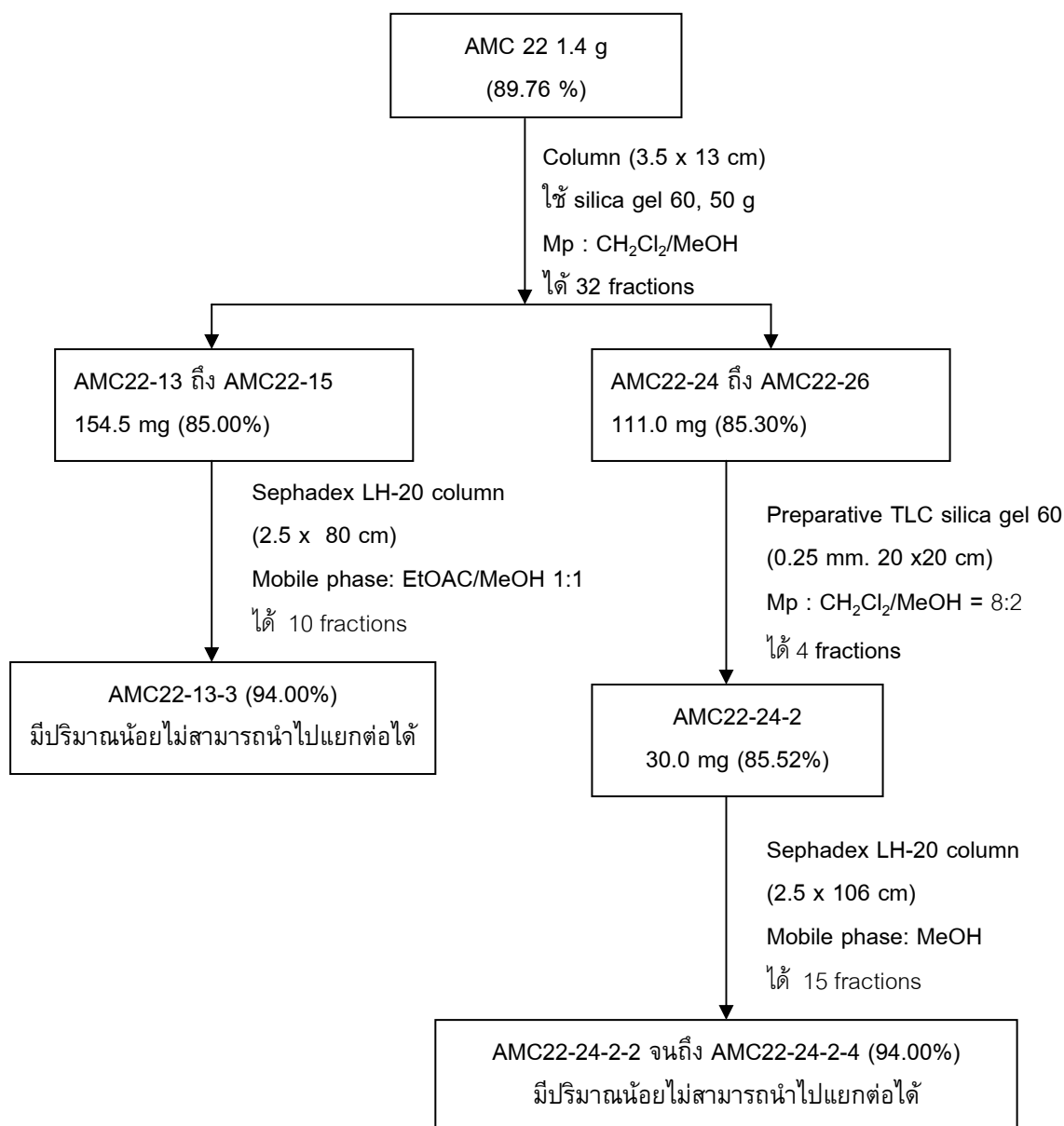
AMC22-24 จนถึง AMC22-26 รวมกันได้ 111.0 mg ถูกแยกด้วย Preparative TLC silica gel 60 (0.25 mm, Merck 1.07747.1000) โดยมี mobile phase คือ CH_2Cl_2 กับ MeOH 8 : 2 แยกได้ทั้งหมด 4 fractions ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีคือ AMC22-24-2 (30.0 mg) ถูกแยกด้วย Sephadex LH-20 CC (2.5 x 96 cm) มี mobile phase เป็น MeOH ได้ 15 fractions นำแต่ละ fraction มาทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE พบว่า fraction ที่ให้ฤทธิ์ที่ดีมีดังนี้ AMC22-24-2-2 จนถึง AMC22-24-2-4 แต่มีปริมาณน้ำหนักรวมน้อยไม่สามารถนำไปแยกต่อไป



รูปที่ 3 แผนภูมิแสดงการแยกสกัด fraction จาก fraction AMC18 และ 21



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงการแยกสกัด fraction จาก fraction AMC20 และ 22



รูปที่ 5 แผนภูมิแสดงการแยกสกัด fraction จาก AMC22-13 และ AMC22-24

การทดลองทางสเปกโตรสโกปี

การวัด optical rotations ทำโดยใช้เครื่อง Perkin Elmer 341 Polarimeter. การวัดจุดหลอมเหลวทำการโดยใช้เครื่องของ Buchi capillary melting point apparatus (Buchi535) การวัด UV spectra บันทึกโดย Varian CARY 1E spectrometer การวัด ^1H , ^{13}C , DEPT, ^1H - ^1H COSY, NOESY, HMQC และ HMBC NMR ทำโดยเครื่อง Bruker av400 NMR spectrometer ที่ 400 MHz สำหรับ proton และ 100 MHz สำหรับ carbon. การวัด ESITOFMS ทำโดยเครื่อง Micromass LCT mass spectrometer

สาร 1 $C_{43}H_{52}N_4O_5$ (Macralstonine) จาก MS พบ molecular peak ที่ 644 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.53 (1H, s, H-21), 7.51 (1H, br d, $J = 6.43$ Hz, H-9'), 7.30 (1H, br d, $J = 8.17$ Hz, H-12'), 7.21 (1H, t, $J = 7.96$ Hz, H-11'), 7.12 (1H, t, $J = 7.87$ Hz, H-10'), 6.90 (1H, s, H-9), 4.41 (1H, t, $J = 11.7$ Hz, H-17), 4.37 (1H, t, $J = 11.7$ Hz, H-17'), 4.19 (1H, m, H-17), 4.13 (1H, m, H-17'), 4.00 (1H, br s, H-3'), 3.92 (3H, s, 11-OCH₃), 3.79 (1H, br s, H-3), 3.59 (3H, s, N_a'-CH₃), 3.56 (3H, s, N_a-CH₃), 3.16 (1H, dd, $J = 16.52, 6.99$ Hz, H-6'), 3.07 (1H, m, H-21'), 3.03 (1H, m, H-5), 2.99 (1H, m, H-5'), 2.60 (1H, m, H-6), 2.55 (1H, m, H-15), 2.42 (1H, m, H-21'), 2.39 (1H, m, H-14'), 2.36 (3H, s, N_b'-CH₃), 2.34 (1H, m, H-6'), 2.25 (3H, s, N_b-CH₃), 2.14 (1H, m, H-6), 2.09 (3H, s, 18-CH₃), 2.04 (1H, m, H-14), 2.00 (1H, m, H-15'), 1.90 (1H, m, H-20'), 1.85-1.82 (2H, m, H-16 and H-16'), 1.77 (1H, m, H-14), 1.66 (3H, s, 18'-CH₃), 1.44 (1H, br dd, $J = 12.8, 3.5$ Hz, H-14')

รายละเอียดของ spectral data ของสาร 2 ($C_{43}H_{50}N_4O_4$) แสดงไว้ในผลการทดลองและอภิปรายผล

การทดสอบฤทธิ์ต้านอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

สารเคมี

Acetylthiocholine iodide (ATCI), AChE, bovine serum albumin (BSA), 5, 5' dithiobis[2-nitrobenzoic acid] (DTNB), และ galanthamine ซื้อจาก Sigma (St. Louis, MO) ตัวทำละลายทุกตัว (analytical-reagent grade) ซื้อจาก Merck (Darmstadt, Germany) บัฟเฟอร์ที่ใช้ในทุกการทดลอง ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นอย่างอื่นคือ 50 mM Tris-HCl pH 8.0 เอนไซม์ AChE ที่ใช้ในการทดลองเป็นเอนไซม์จากปลาไหลไฟฟ้า (type VI-S lyophilized powder, 480 U/mg solid, 530 U/mg protein) และเอนไซม์ Human recombinant เอนไซม์ถูกเตรียมให้เป็น stock solution 1130 U/ml ในบัฟเฟอร์ และเก็บไว้ที่ $-80^\circ C$ เมื่อจะทำการทดลองให้ทำให้เจือจางในบัฟเฟอร์ที่มี 0.1% BSA สารละลาย DTNB เตรียมโดยละลายในบัฟเฟอร์ที่มี 0.1 M NaCl และ 0.02 M $MgCl_2$. สาร ATCI ละลายใน deionized water

การทดสอบฤทธิ์ต้านอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสโดยผ่านไมโครเพลท

การทดสอบฤทธิ์ต้านอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสโดยผ่านไมโครเพลท ทำตามที่พัฒนาโดย Ellman และคณะ (1961) และที่ดัดแปลงโดยคณะผู้วิจัยในภายหลัง (Ingkaninan et al., 2003) กล่าวโดยย่อคือ ใส่สารละลายดังต่อไปนี้ลงใน well ของ 96-well microplate

-3 mM DTNB 125 μ l

-15 mM ATCI 25 μ l

-Tris buffer pH 7.4 50 μ l

-ตัวอย่างที่ละลายในบัฟเฟอร์ (ในกรณีที่ตัวอย่างละลายไม่ดีในบัฟเฟอร์ อาจใช้ MeOH ช่วยละลายก่อนได้แต่ความเข้มข้นสุดท้ายของ MeOH ต้องไม่เกิน 10 %) 25 μ l

-0.28 U/ml AChE 25 μ l

นำ microplate ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 405 nm ทุก 5 วินาทีเป็นเวลา 2 นาที โดยใช้เครื่อง CERES UV 900C microplate reader (Bio-Tek instrument, USA) enzyme activity คำนวณจากการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงต่อเวลา คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์จาก enzyme activity ของตัวอย่างเทียบกับ blank (ซึ่งใช้บัฟเฟอร์แทนตัวอย่าง) ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คำนวณจาก $100 - \% \text{enzyme activity}$ ค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ยับยั้งเอนไซม์ได้ 50 % (IC_{50}) หาได้จากการนำตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ที่ละลายในบัฟเฟอร์มาหาค่า % enzyme activity แล้วคำนวณค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ยับยั้งเอนไซม์ได้ 50 % จากโปรแกรม Prism (Graph Pad Inc, Sa Diego, USA) ทุกการทดลองทำ 3 ครั้ง แสดงค่าด้วยค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การทดสอบฤทธิ์ต้านอะเซติลโคลีนเอสเตอเรสโดยผ่าน Thin layer chromatography

การทดสอบฤทธิ์ต้านอะเซติลโคลีนเอสเตอเรสโดยผ่าน Thin layer chromatography ทำตามวิธีที่พัฒนาโดย Rhee และคณะ (2001) ใช้ 2.5 mm silica gel plate F254 no. 5554 (Merck, Darmstadt, Germany) เป็น stationary phase apply สารที่ความเข้มข้นประมาณ 5 mg/ml ลงบน plate เมื่อแยกสารด้วย mobile phase ที่ต้องการแล้ว ทำให้ TLC แห้ง และ sprayed ด้วย 30 mM ATCI ตามด้วย 20 mM DTNB แล้วปล่อยให้ plate แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาทีจากนั้น spray ด้วย 10.17 U/ml AChE ทิ้งไว้ 20 นาที สังเกตสีที่เกิดขึ้น จะเห็น plate เป็นสีเหลือง และถ้ามี spot ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง AChE ตรงจุดนั้นจะเปลี่ยนเป็นไม่มีสี ผลบน TLC ที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับ การ spray ด้วย reagent อื่นๆ เช่น anisaldehyde และ dragendorff reagents

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. การทดสอบสารสกัดผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแหล่งต่าง ๆ

1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE ในสารสกัดจากพืช

ในการศึกษาปีที่ 1 ได้มีการคัดเลือกพืชที่ใช้ในยาอายุวัฒนะหรือยาบำรุงกำลัง มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE (ตารางที่ 4) จำนวน 19 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัด 2 ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้าน AChE มากกว่า 60 % ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml คือสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระชายดำและโสมไทย แต่ค่าที่ได้ก็ยังจัดอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำ (mild activity) เมื่อเทียบกับผลการวิจัยที่ผ่านมาที่สารต้าน AChE ที่มีฤทธิ์สูงในระดับ micromolar จะแยกได้จากสารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ต้าน AChE มากกว่า 90% (Ingkaninan et al., 2003, Ingkaninan et al., 2006a,b, Sriprang et al., 2006)

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ต้าน AChE ในสารสกัดพืชที่ใช้ในยาอายุวัฒนะหรือยาบำรุงกำลัง ทดสอบโดย Ellman assay ทาง 96- well microplate ใช้ความเข้มข้นสารสกัดที่ 0.1 mg/ml (n = 3)

	ชื่อพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	% AChE inhibition	SD
1	กระชายดำ	<i>Kaempferia parviflora</i> Wall. ex. Baker.	rhizome	64.14	1.46
2	กระชายป่า	<i>Boesenbergia rotunda</i> (L.) Manst.	rhizome	19.94	4.84
3	กะดังใบ	<i>Leea indica</i> Burm.f. Merr.	root	44.01	13.60
4	กำลังช้างเผือก	<i>Hiptage benghalensis</i> (Linn.) Kurz	stem	26.88	8.40
5	กำลังเสือโคร่ง	<i>Betula alnoides</i> Buch.-Ham ex D.Don	Stembark	24.45	4.49
6	ค่างคาวดำ	<i>Tacca chantrieri</i> Andre	root	11.12	6.69
7	ข้าวปลู	<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	root	12.54	4.66
8	โตไม่รู้ล้ม	<i>Elephantopus scaber</i> L.	whole	6.54	11.33
9	บอระเพ็ด	<i>Tinospora crispa</i> (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson	stem	40.10	13.43
10	ฝนแสนห่า	<i>Myxopyrum smilacifolium</i> (Wall.) Blume	root	12.27	6.92
11	มะเขือเจ้าเครือ	<i>Securidaca inappendiculata</i> Hassk.	stem	0.85	1.47
12	ม้าแม่กำ	<i>Polygala chinensis</i> .	whole	0.00	0.00
13	ไม้ฝาง	<i>Caesalpinia sappan</i> L.	heartwood	15.93	5.17
14	รางแดง	<i>Ventilago denticulata</i> Willd.	stem	8.42	7.30
15	ว่านน้ำ	<i>Acorus calamus</i> . L.	root	11.81	6.46
16	สังกรณี	<i>Barleria strigosa</i> Willd.	whole	5.05	8.74
17	โสมไทย	<i>Talinum paniculatum</i> (Jacq.) Gaertn.	rhizome	67.96	4.81
18	หยาดน้ำค้าง	<i>Drosera burmanii</i>	aerial part	20.54	6.23
19	ฮ่อสะพายควาย	<i>Berchemia floribunda</i> Wall.	stem	22.16	8.12

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE ในพืชวงศ์ Leguminosae จำนวน 20 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างมีฤทธิ์ต้าน AChE ไม่เกิน 30 % ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ซึ่งไม่อยู่ในระดับที่ควรศึกษาต่อ (ตารางที่ 5) จะเห็นได้ว่า พืชจากวงศ์ Leguminosae ซึ่งมีสารจำพวก anthraquinones และ flavonoids เป็นสารประกอบที่พบมากไม่มีสารต้าน AChE อยู่ แต่การเก็บตัวอย่างที่มีการใช้ทางพื้นบ้าน ในแง่ยาอายุวัฒนะและยาบำรุงกำลัง มีโอกาสที่จะพบฤทธิ์ต้าน AChE มากกว่า

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้าน AChE ในสารสกัดพืชวงศ์ Leguminosae ทดสอบโดย Ellman assay ทาง 96- well microplate ใช้ความเข้มข้นสารสกัดที่ 0.1 mg/ml (n = 3)

No.	ชื่อพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	% AChE inhibition	SD
1	กระถินณรงค์	<i>Acacia auriculaeformis</i>	phylloids	2.38	4.12
2	กระถินบ้าน	<i>Leucaena leucocephala</i>	leaf	0.00	0.00
3	กาหลง	<i>Bauhinia acuminata</i>	leaf	0.04	0.06
4	ขี้เหล็ก	<i>Senna siamea</i>	leaf	0.00	0.00
5	คูน	<i>Cassia fistula</i>	leaf	3.05	5.28
6	แคบ้าน	<i>Sesbania grandiflora</i>	leaf	0.00	0.00
7	จามจุรี	<i>Samanea saman</i>	leaf	28.29	20.60
8	ชงโค	<i>Bauhinia glauca</i>	leaf	0.00	0.00
9	ชะอม	<i>Acacia pennata</i>	leaf	3.10	5.36
10	ชุมเห็ดเทศ	<i>Senna alata</i>	leaf	7.93	4.15
11	ต้นหยง	<i>Caesalpinia coriaria</i>	leaf	0.00	0.00
12	ทรงบาดาล	<i>Senna surattensis</i>	leaf	3.60	6.23
13	ทองกวาว	<i>Butea monosperma</i>	leaf	5.28	9.14
14	ฝาง	<i>Caesalpinia sappan</i>	leaf	6.89	5.97
15	มะขาม	<i>Tamarindus indica</i>	leaf	4.06	7.04
16	มะขามเทศ	<i>Pithecellobium dulce</i>	leaf	0.00	0.00
17	ส้มป่อย	<i>Acacia concinna</i>	leaf	4.45	4.96
18	โสมเห็ดลือ	<i>Saraca thaipingensis</i>	leaf	0.00	0.00
19	หางนกยูงฝรั่ง	<i>Delonix regia</i>	leaf	3.87	6.71
20	อรพิม	<i>Bauhinia Winitii</i>	leaf	8.40	8.50

ในการศึกษาปีที่ 2 ผู้วิจัยได้หากลุ่มพืชที่น่าสนใจใหม่ๆ เพื่อเป็นแหล่งของสารต้าน AChE ที่น่าสนใจ ในงานวิจัยที่ผ่านมา ผู้วิจัย พบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากรากพุตจีบ (*Tabernaemontana divaricata* (L.) R.

Br. Ex Roem. & Schult.) มีฤทธิ์ต้าน AChE สูง และเมื่อทำการแยกหา AChE inhibitors พบว่าสารกลุ่ม indole alkaloids 2 ชนิดคือ 19,20-dihydrotabernamine และ 19,20-dihydroervahanine A มีฤทธิ์ต้าน AChE สูงกว่าสารมาตรฐาน galanthamine (Ingkaninan et al., 2006b) ทำให้ผู้วิจัย มีความสนใจที่จะค้นหา screen หาสารต้าน AChE จากพืชสมุนไพรที่มี indole alkaloids เป็นองค์ประกอบต่อไป

ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างพืชทั้งหมด 12 ชนิดในวงศ์ Apocynaceae 9 ชนิด และ วงศ์ Loganiaceae 3 ชนิด จากจังหวัดพิษณุโลก และทำการ screen เบื้องต้น ดังแสดงผลการทดลองไว้ในตารางที่ 6 จากการศึกษพบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากรากทั้งฟ้า (*Alstonia macrophylla* Wall. Ex A. DC.) ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Apocynaceae มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ AChE อย่างสมบูรณ์ ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ซึ่งสูงกว่าพืชอีก 11 ชนิดที่นำมาศึกษาด้วย คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาศารสกัดจากส่วนใบ ต้น และรากของทั้งฟ้า (ตารางที่ 7) พบว่าส่วนต้นมีฤทธิ์สูงที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ได้ 50% (IC_{50}) ที่ $6.67 \pm 1.74 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งถือว่าเป็นฤทธิ์ที่สูงเทียบเท่ากับสารสกัดพุดจิบ นอกจากนี้ จากการสืบค้นงานวิจัยพบว่ายังไม่มีการรายงานฤทธิ์ต้าน AChE ของทั้งฟ้ารวมทั้งพืชในตระกูล *Alstonia* มาก่อน องค์ประกอบของต้นและรากของทั้งฟ้าเป็นสารพวก indole alkaloids (Kam, et al., 1999 และ Kaewpradub และ Houghton, 1997)

ตารางที่ 6 แสดงการยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase (%) ของสารสกัดจากส่วนรากของพืช 12 ชนิดที่ ความเข้มข้น 0.1 mg/ml (n=3)

ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	การยับยั้ง AChE (%)
1. ก้นเกรา	<i>Fagraea fragrans</i> Roxb	Loganiaceae	10.17±2.86
2. ตีนเป็ดทราย	<i>Cerbera manghas</i> L.	Apocynaceae	9.11±4.90
3. ทั้งฟ้า	<i>Alstonia macrophylla</i> Wall.	Apocynaceae	93.27±4.09
4. ราชาวดี	<i>Buddleja paniculata</i> Wall.	Loganiaceae	15.62±8.2*
5. บานบุรีเหลือง	<i>Allamanda cathartica</i> L.	Apocynaceae	31.49±6.87
6. หนามแดง	<i>Carissa carandas</i> L.	Apocynaceae	4.08±7.73
7. แผลงใจ	<i>Strychnos nux-vomica</i> L.	Loganiaceae	10.97±4.32
8. ชำมะนาด	<i>Vallis glabra</i> Kuntze.	Apocynaceae	16.08±2.88
9. ชวนชม	<i>Adenium obesum</i> (Forssk.)	Apocynaceae	5.96±5.19
10. สัตตบรรณ	<i>Alstonia scholaris</i> R.Br.	Apocynaceae	27.37±6.02*
11. ลั่นทม	<i>Plumeria alba</i> L.	Apocynaceae	6.45±6.47*
12. หอมปิ่น	<i>Strophanthus gratus</i> Franch.	Apocynaceae	0.55±0.96*

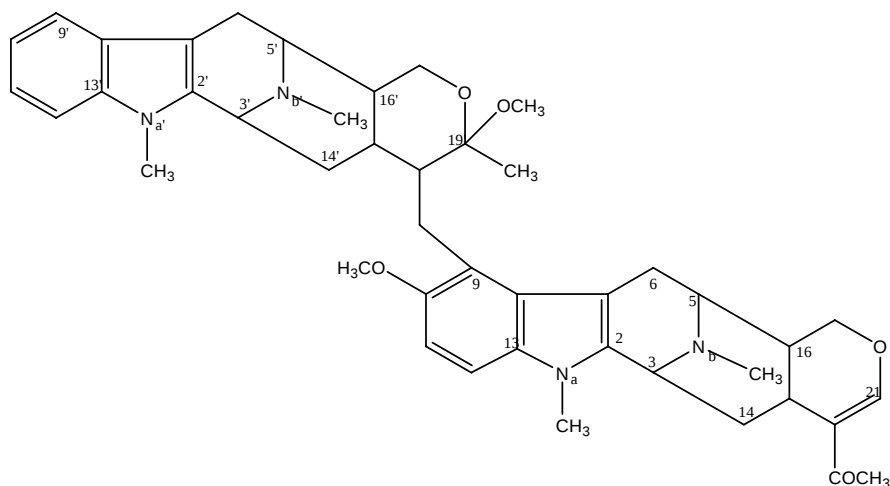
หมายเหตุ * (n=6)

ตารางที่ 7 ค่าการยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase ได้ 50% ของ ใบ ต้น ราก ของทั้งฟ้า (n=3)

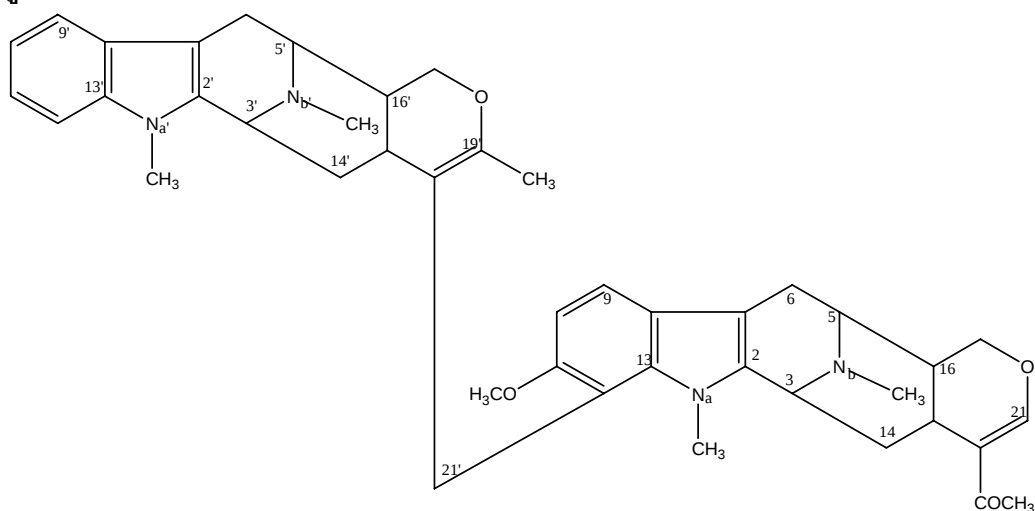
ส่วนที่นำมาทดสอบ	ค่าการยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase ที่ 50% (mg/ml)
ใบ	มากกว่า 100
ต้น	6.76±1.74
ราก	8.06±1.57

จากนั้น ผู้วิจัยได้ทำการแยกสารกลุ่ม alkaloids ออกจากทั้งฟ้า โดยใช้วิธี acid base extraction จากผลการสกัดแยกด้วยการ partition ได้สารบริสุทธิ์ตกผลึกมาจาก fraction B คือ สาร 1 และสาร 2 ดังแสดงในรูปที่ 6-7 และทำการสกัดแยก fraction B ไปพร้อม ๆ กับการตรวจวัดฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE พบว่า fraction ต่าง ๆ ที่ถูกแยกมาจาก fraction B นั้น fraction ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE นั้นมีปริมาณน้อยมาก ไม่สามารถสกัดแยกต่อไปได้อีก คณะผู้วิจัยจึงทำการสกัดแยก fraction C ต่อไปดังแสดงในส่วนวิธีการทดลอง เป็นที่น่าเสียดายที่ในขณะนี้ ผู้วิจัยยังไม่สามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ต้าน AChE ที่อยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ได้

สาร 1 ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกใน $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ สาร 1 นั้นใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปี จาก MS แสดงว่าสารมีมวลโมเลกุล 644 มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{43}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_5$ สันนิษฐานจาก ^1H NMR และ ^{13}C NMR spectra ใช้เทคนิค ^1H - ^1H COSY เข้าช่วย พบว่าสารนี้คือ macralstonine (รูปที่ 6) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม bisindole alkaloid ซึ่งมีรายงานมาแล้วว่าพบสารนี้อยู่ใน *A. macrophylla* และการพิสูจน์เอกลักษณ์สาร 2 ใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปี จาก MS แสดงว่าสารมีมวลโมเลกุล 686 มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{43}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_4$ สันนิษฐานจาก ^1H NMR และ ^{13}C NMR spectra (ตารางที่ 8) ใช้เทคนิค ^1H - ^1H COSY เข้าช่วย พบว่าสารนี้เป็นสารใหม่ที่ยังไม่เคยตรวจพบมาก่อน (รูปที่ 7) น่าเสียดายว่า สารทั้งสองตัวไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE ขณะนี้ ผู้วิจัยกำลังแยกหาสารออกฤทธิ์ต้าน AChE จาก fraction C ต่อไป



รูปที่ 6 โครงสร้างของสาร 1 (macralstonine)



รูปที่ 7 โครงสร้างของ สาร 2

ตารางที่ 8 ค่า Chemical shift ของ ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR ของสาร 2 (CDCl_3)

	^{13}C -NMR (ppm)	^1H -NMR (ppm)
2	132.8	-
3	54.1	3.79 (br s)
5	54.8	3.06 (d, 6.7 Hz)
6	22.9	3.13 (t, 5.5 Hz), 2.33 (br s)
7	105.5	-
8	121.9	-
9	115.8	6.99 (d, 8.5 Hz)
10	105.1	6.08 (d, 8.5 Hz)
11	153.9	-
12	110.4	-
13	137.3	-
14	32.4	1.98 (m), 1.75 (m)
15	22.7	2.55 (m)
16	38.9	1.85 (m)
17	67.9	4.42 (t, 7.2 Hz), 4.17 (dd, 11.0, 2.6 Hz)
18-CH ₃	25.1	2.11 (s)
19	195.1	-
20	121.3	-
21	157.3	7.52 (s)
N _a -CH ₃	31.4	3.72 (s)
N _b -CH ₃	42.1	2.33 (s)
11-OCH ₃	56.0	2.95 (s)
2'	133.8	-
3'	53.7	3.69 (br s)
5'	55.4	2.99 (d, 6.7)
6'	22.8	3.18 (t, 5.5 Hz), 2.29 (d, 4.3 Hz)
7'	105.8	-
8'	126.5	-
9'	117.6	7.33 (d, 7.7 Hz)
10'	118.3	7.01 (td, 8.0, 1.7 Hz)
11'	120.1	7.16 (t, 8.1 Hz)
12'	108.9	7.15 (br s)
13'	136.9	-
14'	32.7	1.79 (m), 0.89 (m)
5'	26.1	1.60 (m)
16'	40.8	1.86 (m)

	¹³ C-NMR (ppm)	¹ H-NMR (ppm)
17'	66.3	4.42 (t, 7.2 Hz), 3.95 (dd, 11.0, 2.6 Hz)
18'-CH ₃	16.8	1.83 (s)
19'	144.1	-
20'	108.4	-
21'	25.6	3.67 (br s)
N _a '-CH ₃	28.2	2.83 (s)
N _b '-CH ₃	41.8	2.25 (s)

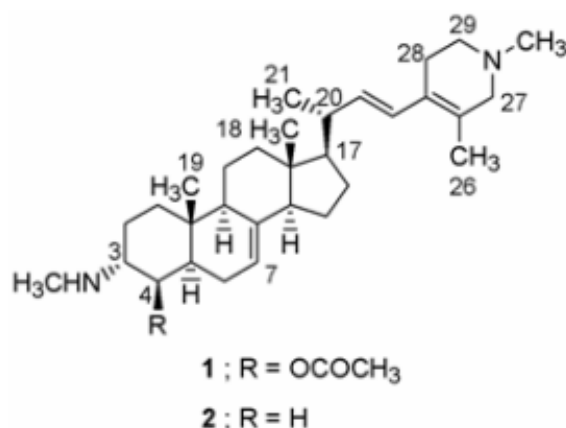
1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE ในสารสกัดจาก marine organism

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE ในสารสกัดจาก marine organism ที่เก็บโดยผศ. ดร. อนุชิต พลับพลาการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และคณะ ที่จังหวัดกระบี่ จำนวน 17 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัด 3 ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้าน AChE มากกว่า 80 % ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ฤทธิ์ต้าน AChE ในสารสกัด alcohol จาก marine organism ที่เก็บตัวอย่างได้จากจังหวัดกระบี่ ทดสอบโดย Ellman assay ผ่านทาง 96- well microplate ใช้ความเข้มข้นสารสกัดที่ 0.1 mg/ml (n = 3)

รหัสของสาร	สถานที่เก็บ	Identification	% AChE inhibition	SD
AP07-001-01	เกาะห้าเหนือ	-	13.33	9.17
AP07-002-01	เกาะห้าเหนือ	-	11.57	5.76
AP07-003-01	เกาะห้าเหนือ	-	43.21	1.11
AP07-004-01	เกาะห้าเหนือ	-	1.89	1.09
AP07-005-01	เกาะห้าเหนือ	-	11.22	5.22
AP07-006-01	เกาะห้าเหนือ	-	25.71	4.62
AP07-007-01	เกาะห้าเหนือ	-	6.48	5.61
AP07-008-01	เกาะห้าเหนือ	-	13.44	5.43
AP07-009-02	เกาะห้าเหนือ	-	10.25	4.82
AP07-010-02	เกาะห้าเหนือ	-	84.71	0.90
AP07-011-02	เกาะห้าเหนือ	-	6.9	3.09
AP07-012-03	เกาะห้าใหญ่	-	11.07	8.44
AP07-013-03	เกาะห้าใหญ่	-	3.07	2.80
AP07-014-03	เกาะห้าใหญ่	-	2.02	3.50
AP07-015-03	เกาะห้าใหญ่	<i>Corticium</i> sp.	92.04	2.72
AP07-016-04	เกาะห้าใหญ่	-	14.21	2.41
AP07-017-04	เกาะห้าใหญ่	-	100	0

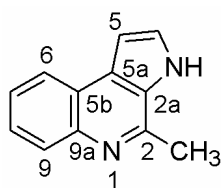
ต่อมา คณะผู้วิจัยโดย รุสนีย์ เล่งเจ๊ะ และคณะ (Langjae et al., 2007) ได้ทำการแยกสกัดสารต้าน AChE จากฟองน้ำ *Corticium* sp. (AP07-015-03) ได้สารกลุ่ม steroidal alkaloids ชื่อ 4-acetoxy-plakinamine B (รูปที่ 8) ซึ่งมีฤทธิ์ต้าน AChE ได้อยู่ในระดับสูง คือมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ (IC₅₀) เท่ากับ $3.75 \pm 1.69 \mu\text{M}$ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน galanthamine ซึ่งมี IC₅₀ เท่ากับ $0.59 \pm 0.14 \mu\text{M}$ พบว่าฤทธิ์ต้าน AChE ของ 4-acetoxy-plakinamine B ต่ำกว่า galanthamine ประมาณ 6 เท่า



รูปที่ 8 สูตรโครงสร้างของสาร 4-acetoxy-plakinamine B (1) และสาร plakinamine B (2)

1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE ในสารสกัดจาก marine microorganism

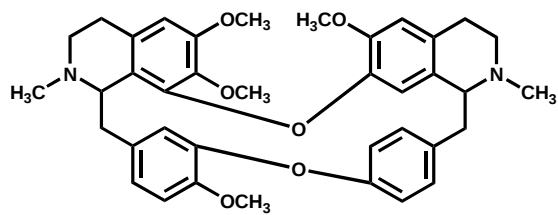
ทางผู้ร่วมวิจัย ดร. อัครวิทย์ กาญจนโอภาส คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้ส่งสารสกัดจาก gliding bacteria strain TISTR 1741 มาทำการตรวจฤทธิ์ต้าน AChE และพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้าน AChE ดี โดยพบว่าสารออกฤทธิ์คือ marinoquinoline A ซึ่งมี IC₅₀ เท่ากับ $4.9 \pm 0.9 \mu\text{M}$ (Sangnoi et al., 2008)



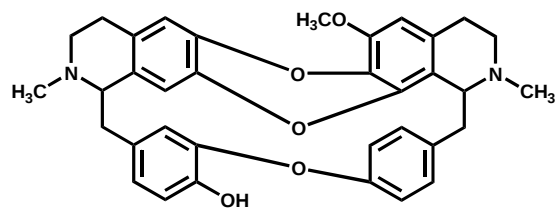
รูปที่ 9 โครงสร้างของ marinoquinoline A

1.4 การทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE ใน *Triclisia saclexii*

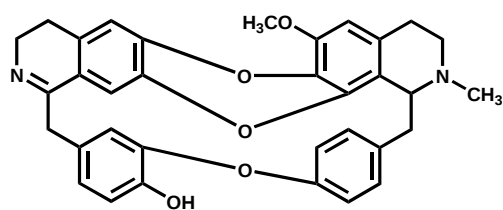
คณะผู้วิจัยได้ร่วมมือกับกลุ่มนักวิจัยจาก Free University of Brussels (ULB) Belgium ในการทำการศึกษาสารต้าน AChE จากพืชวงศ์ Menispermaceae, *Triclisia saclexii* (Pierre) Diels. จากการทดลองพบว่า จากสารกลุ่ม bisisoquinoline alkaloids 5 ตัวที่แยกได้จากพืชนี้ (รูปที่ 10) สาร Lindoldhamine มีฤทธิ์ต้าน AChE ดีที่สุดคือมี IC₅₀ เท่ากับ 3.52 ซึ่งมากกว่าค่า IC₅₀ ของ galanthamine ประมาณ 6 เท่า ส่วน alkaloids อีก 4 ตัวที่เหลือ ไม่มีฤทธิ์ในระดับที่น่าสนใจ (ตารางที่ 10) (Murebwayire et al., 2009)



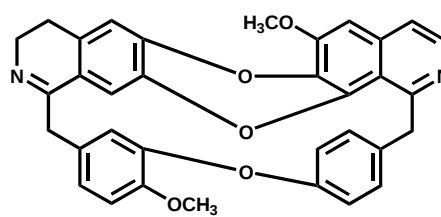
(1)
Phaeanthine



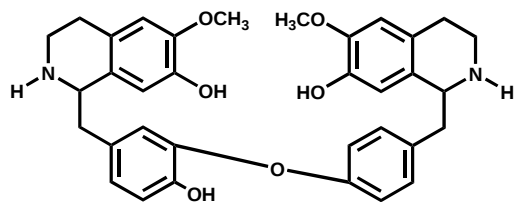
(2)
N-Methylapateline



(3)
1,2-Dehydroapateline



(4)
Gasabiimine



(5)
Lindoldhamine

รูปที่ 10 โครงสร้างของ bisisoquinoline alkaloids ที่แยกได้จาก *Triclisia sacleuxii* (Pierre) Diels.

ตารางที่ 10ฤทธิ์ต้าน AChE ของ bisisoquinoline alkaloids จาก *Triclisia sacleuxii*

Compound	% Inhibition at 100 µg/ml ^(a)	IC ₅₀ (µM) ^(a)
Lindoldhamine	88.9 ± 1.0	3.52 ± 0.82
Phaeanthine	72.5 ± 4.2	n.d. ^(b)
N – methylapateline	30.7 ± 4.5	n.d.
1,2-dehydroapateline	15.9 ± 2.9	n.d.
Gasabiimine	13.4 ± 7.2	n.d.
Galanthamine (reference compound)	~ 100	0.53 ± 0.10

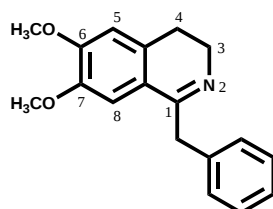
^(a) Average ± SD from 3 experiments performed in triplicate

^(b) n.d. : not determined

2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ isoquinolines และการศึกษา SAR

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ isoquinolines และการศึกษา SAR

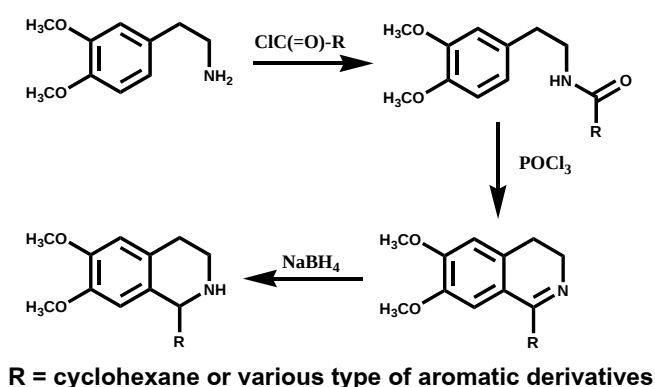
จากสมมุติฐานในการทดลองนี้คาดว่าสารที่มีโครงสร้างเป็นไอโซควิโนลิโนน่าจะมีผลในการเป็นสารต้าน AChE ได้ดี จากการทำ literature review พบว่าสารที่มีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของไอโซควิโนลิโนหลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้าน AChE และการมีหมู่แทนที่ในโมเลกุลที่ต่างกันส่งผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้ง AChE (Ogino, T. et al, 1997; Ingkaninan, K. et al, 2006; Markmee, S. et al, 2006) นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาขั้นต้น (preliminary study) ของสารที่มีโครงสร้างเป็น isoquinoline ring ในการต้านเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรส ผลที่ได้จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโมเลกุลของไอโซควิโนลิโนที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 1 ที่มีฤทธิ์ดีที่สุด ได้แก่ หมู่แทนที่ที่เป็น benzyl group เมื่อเทียบกับการแทนที่ด้วยหมู่ hydrogen, methyl และ phenyl group และอนุพันธ์ของสารที่มีโครงสร้างเป็น 1-benzyl-dihydroisoquinoline เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้าน AChE ดีที่สุดในกลุ่มนี้ ส่วนโมเลกุลที่มีการ reduction ที่พันธะคู่ของ 1-benzyl-dihydroisoquinoline ทำให้ได้อนุพันธ์ของ 1-benzyl-tetrahydroisoquinoline ซึ่งไม่มีฤทธิ์ต่อ AChE (inactive)



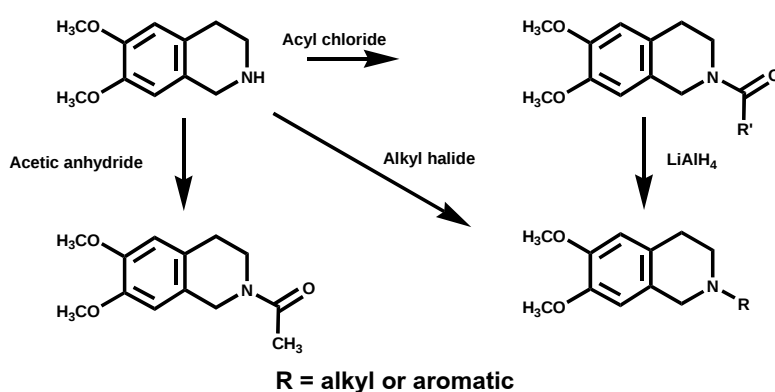
6,7-Dimethoxy-dihydroisoquinoline

ในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นให้เกิดความเข้าใจของสารในโครงสร้างของ isoquinoline โดยการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไอโซควิโนลิโนเพิ่มขึ้น โดยมีการใช้สาร 6,7-dimethoxy-dihydroisoquinoline เป็น prototype และ

การศึกษาในระยะแรกนี้ได้มุ่งเน้นการศึกษาถึงผลของหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 1 เพิ่มขึ้น เพื่อดูถึงผลของ electronicity, hydrophobicity และ steric ต่อความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE สารที่ได้ในการศึกษาถูกสังเคราะห์โดยผ่านกระบวนการตามรูปที่ 11 สารที่สังเคราะห์ได้ทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยการสกัด, ตกผลึก หรือใช้ column chromatography หลังจากนั้นสารสังเคราะห์จะมีการตรวจสอบเอกลักษณ์โดยใช้ IR, NMR, และ/หรือ MS จนแน่ใจว่ามีโครงสร้างดังที่กำหนดไว้ หลังจากนั้นสารจะถูกนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพในการต้านเอนไซม์ AChE (Ellman, G.L. et al, 1961) นอกจากนี้ยังมีการสังเคราะห์สารในกลุ่ม tetrahydroisoquinoline ที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ตำแหน่งที่ 2 เพิ่มขึ้น เพื่อเป็นการศึกษาถึงผลของหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งที่ 2 เพิ่มเติม วิธีการสังเคราะห์สารที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 12



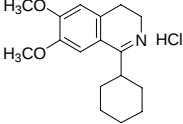
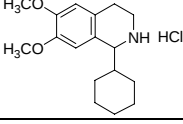
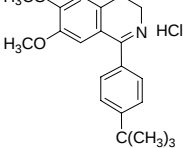
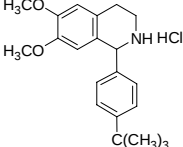
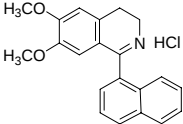
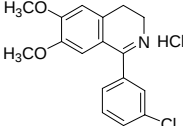
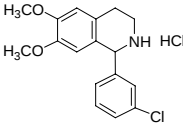
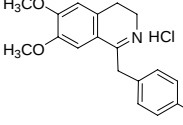
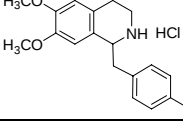
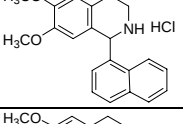
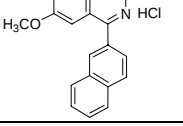
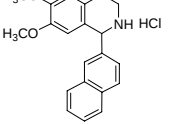
รูปที่ 11 กระบวนการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ dihydroisoquinoline และ tetrahydroisoquinoline

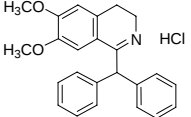
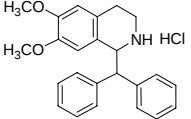
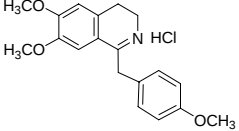
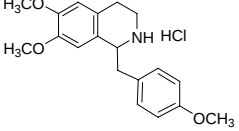
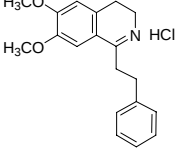
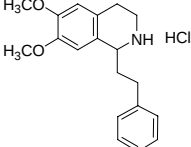
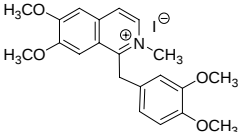
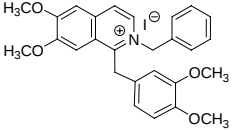
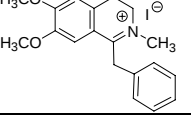
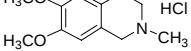
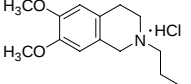
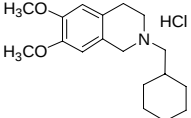
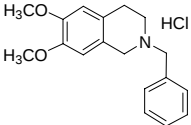
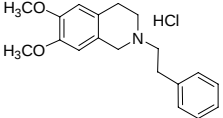


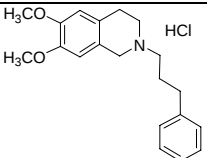
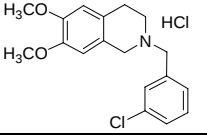
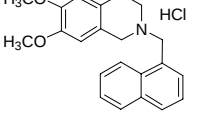
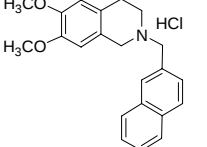
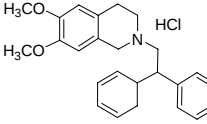
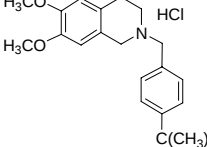
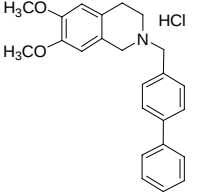
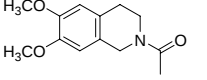
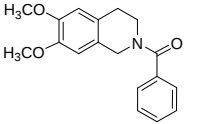
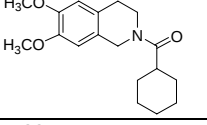
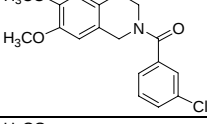
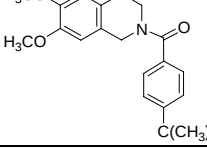
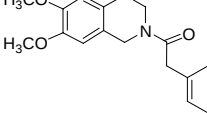
รูปที่ 12 กระบวนการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ tetrahydroisoquinoline ที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งที่ 2

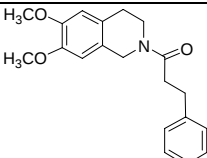
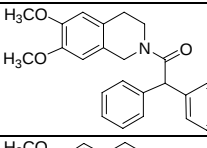
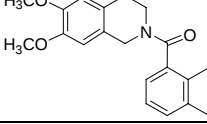
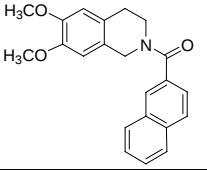
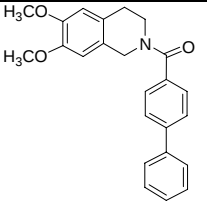
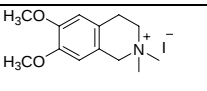
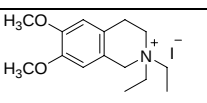
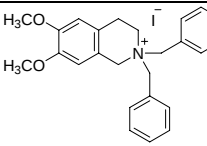
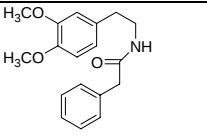
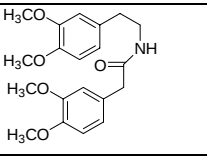
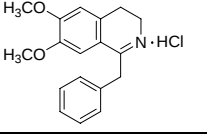
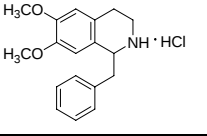
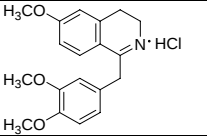
คุณสมบัติของสารที่สังเคราะห์ได้ดังแสดงในตารางที่ 11 และผลของการทดสอบฤทธิ์ในการต้าน AChE จากปลาไหล ดังแสดงในตารางที่ 12-14, ผลของสารต่อ BuChE ดังแสดงในตารางที่ 15 และผลในการต้าน AChE จากคนดังแสดงในตารางที่ 16

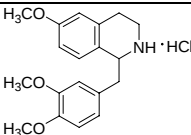
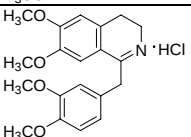
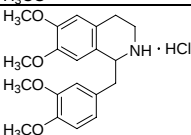
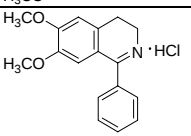
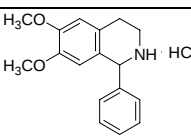
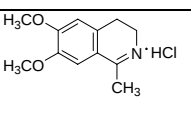
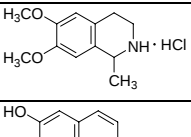
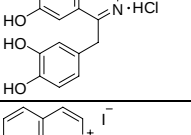
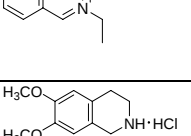
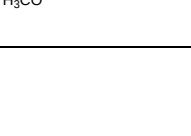
ตารางที่ 11 คุณสมบัติของสารที่สังเคราะห์ได้

Code	Structure	Formula	MW of salt (MW of free base)	Appearance	% Yield*	mp. (°C)
SM205		C ₁₇ H ₂₄ ClNO ₂	309.83 (273.37)	Yellow powder	66	187.0-189.9
SM206		C ₁₇ H ₂₆ ClNO ₂	311.85 (275.39)	White powder	80	>208
SM198		C ₂₁ H ₂₆ ClNO ₂	359.89 (323.43)	Yellow powder	92	>202
SM199		C ₂₁ H ₂₈ ClNO ₂	361.91 (325.44)	Yellow powder	36	161.2-163.5
SM211		C ₂₁ H ₂₀ ClNO ₂	353.84 (317.38)	Yellow powder	22	201-202
SM183		C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂	338.23 (301.77)	Pale yellow powder	89	194.4-195.1
SM184		C ₁₇ H ₁₉ Cl ₂ NO ₂	340.24 (303.78)	White powder	90	>219
SM189		C ₁₈ H ₁₉ Cl ₂ NO ₂	352.25 (315.79)	Pale yellow powder	64	189.2-190.6
SM190		C ₁₈ H ₂₁ Cl ₂ NO ₂	354.27 (317.81)	Yellow powder	66	166.9-169.7
SM212		C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₂	355.86 (319.40)	White powder	84	213.2-215.0
SM180		C ₂₀ H ₂₁ ClNO ₂	353.84(317.38)	Pale yellow powder	95	200-202
SM182		C ₂₁ H ₂₂ ClNO 2	355.86 (319.40)	White powder	82	>220

SM179		$C_{24}H_{24}ClNO_2$	393.91 (357.44)	Pale yellow powder	96	145.0-147.5
SM181		$C_{24}H_{26}ClNO_2$	395.92 (359.46)	Yellow powder	95	167.5-169.5
SM186		$C_{19}H_{22}ClNO_3$	347.84 (311.37)	Pale yellow powder	58	208.2-210.2
SM195		$C_{19}H_{24}ClNO_3$	349.85 (313.39)	White powder	64	182.2-183.5
SM193		$C_{19}H_{22}ClNO_2$	331.84 (295.38)	Pale yellow powder	88	163.4-165.1
SM194		$C_{19}H_{24}ClNO_2$	333.85 (297.39)	White powder	89	174.1-175.9
SM83		$C_{21}H_{24}INO_4$	481.32	Yellow powder	45	188.0-188.4
SM150		$C_{27}H_{28}INO_4$	557.42	Yellow powder	89	62.95
SM89		$C_{19}H_{22}INO_2$	423.29	Yellow powder	24	175.5-179.2
SM259		$C_{12}H_{18}ClNO_2$	243.10	white powder	61	69.6-72.7
SM128		$C_{14}H_{22}ClNO_2$	271.13	white powder	20	205.0-207.5
SM245		$C_{18}H_{28}ClNO_2$	325.18	white powder	83	224.2-227.5
SM248 SM127		$C_{18}H_{22}ClNO_2$	319.13	white powder	50	222.7-224.1
SM257		$C_{19}H_{24}ClNO_2$	333.15	white powder	52	222.6-224.9

SM258		$C_{20}H_{26}ClNO_2$	347.17	white powder	45	218.0-220.7
SM247		$C_{18}H_{21}Cl_2NO_2$	353.09	white powder	52	226.8-228.2
SM233		$C_{22}H_{24}ClNO_2$	369.15	white powder	40	197.6-200.5
SM228		$C_{22}H_{24}ClNO_2$	369.15	white powder	70	225.9-228.2
SM243		$C_{25}H_{30}ClNO_2$	411.20	white powder	40	129.5-133.4
SM236		$C_{22}H_{30}ClNO_2$	375.20	white powder	90	233.4-236.6
SM241		$C_{24}H_{26}ClNO_2$	395.17	white powder	84	223.8-227.5
SM136		$C_{13}H_{17}INO_3$	235.12	Pale Yellow powder	81	104.0-104.8
SM169		$C_{18}H_{19}NO_3$	297.14	white powder	36	110.3-111.9
SM244		$C_{18}H_{25}NO_3$	303.19	white powder	31	100.5-101.3
SM174		$C_{18}H_{18}ClNO_3$	331.10	white powder	45	128.6-129.1
SM196		$C_{22}H_{27}NO_3$	353.20	white powder	67	142.7-143.8
SM252		$C_{19}H_{21}NO_3$	311.15	white powder	50	117.0-119.0

SM253		$C_{20}H_{23}INO_3$	325.17	white powder	47	67.8-68.4
SM172		$C_{25}H_{25}NO_3$	387.18	white powder	40	134.5-136.0
SM209		$C_{22}H_{21}NO_3$	347.15	white powder	44	138.5-139.2
SM171		$C_{22}H_{21}NO_3$	347.15	white powder	70	136.2-139.7
SM213		$C_{24}H_{23}NO_3$	373.17	white powder	71	150.0-151.5
SM134		$C_{13}H_{20}INO_2$	349.05	Yellow powder	60	234.0-236.8
SM129		$C_{15}H_{24}INO_2$	377.09	Pale Yellow powder	71	187.0-187.6
SM145		$C_{25}H_{28}INO_2$	501.12	Yellow powder	20	189.0-192.4
SM25		$C_{18}H_{21}NO_3$	299.15	White powder	95	108.0-108.5
SM28		$C_{20}H_{25}NO_5$	359.17	Light yellow powder	74	120.4-122.1
SM62		$C_{18}H_{20}ClNO_2$	317.81	pale yellow crystal	71.49	163-167.9
SM65		$C_{18}H_{22}ClNO_2$	319.83	white crystal	58.10	176.7-177.2
SM69		$C_{19}H_{22}ClNO_3$	347.84	yellow needle	69.99	185.4-187.0

SM70		$C_{19}H_{24}ClNO_3$	349.85	white crystal	45.65	196.6-198.2
SM71		$C_{20}H_{24}ClNO_4$	377.86	yellow crystal	95.10	196.9-202
SM72		$C_{20}H_{26}ClNO_4$	379.88	white crystal	69.12	207.6-209.4
SM75		$C_{17}H_{18}ClNO_2$	303.78	pale yellow crystal	84.99	200.5-201.7
SM76		$C_{17}H_{20}ClNO_2$	305.8	white crystal	56.93	253.3-257.3
SM79		$C_{12}H_{16}ClNO_2$	241.71	Pale yellow crystal	92.58	192.3-192.9
SM80		$C_{12}H_{18}ClNO_2$	243.73	White crystal	51.55	189-190.6
SM123		$C_{16}H_{14}ClNO_4$	319.06	White solid	20.0	>235
SM153		$C_{11}H_{11}IN$	285.1	Yellow powder	62.95	146.5-147.8
T21		$C_{11}H_{16}ClNO_2$	229.7	Commercially available		

ตารางที่ 12 ผลในการต้าน AChE จาก eel ของสารสังเคราะห์ของสารในกลุ่ม Dihydroisoquinoline และ Isoquinoline

Code	% inhibition on AChE		IC ₅₀ (μM)
	[10 ⁻⁴] M	[10 ⁻⁵] M	
SM205	82.5±1.7	35.9±1.4	21.1±2.7
SM198	62.1±0.8	23.0±1.7	107.2±31.0
SM211	40.1±0.4	8.4±1.1	78.9±10.8 (Max. inhibition = 70%)
SM183	45.7±1.1	8.0±0.5	167.4±15.0
SM189	78.9±0.6	44.1±4.2	13.0±1.7
SM180	56.3±4.5	24.9±4.0	79.8±20.1
SM179	56.3±4.5	17.6±3.3	100.9±29.9
SM186	76.0±1.5	49.2±4.8	6.5±0.1
SM193	79.0±2.3	35.1±1.4	16.2±1.3 (Max. inhibition = 90-92%)
SM83	93.4±1.8	61.7±1.5	5.7±0.6
SM150	84.7±6.9	57.3±2.1	9.0±2.1
SM89	81.8±2.5	46.6±6.3	10.8±2.2
SM62	79.1±3.9	47.8±3.9	8.6±0.9
SM71	85.1±3.1	46.8±2.3	7.0±1.4
SM153	79.2±6.3	46.9±9.0	13.5±5.0
Gаланthamine			0.6±0.1

ตารางที่ 13 ผลในการต้าน AChE จาก eel ของสารสังเคราะห์ของสารในกลุ่ม Tetrahydroisoquinoline ที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 1

Code	% inhibition on AChE		IC ₅₀ (μM)
	[10 ⁻⁴] M	[10 ⁻⁵] M	
SM206	30.6±2.1	5.2±4.6	ND
SM199	30.0±0.7	8.3±2.3	ND
SM184	14.3±2.1	-4.1±4.6	ND
SM190	22.4±0.7	1.1±3.4	ND
SM212	24.1±2.5	10.7±2.3	ND
SM182	17.8±1.8	-1.0±2.1	ND
SM181	17.8±1.0	2.7±2.5	ND
SM195	24.8±4.6	0.6±6.1	ND
SM194	28.4±1.8	2.8±1.3	ND
SM65	21.7±4.1	7.4±3.3	ND
T21	20.2±2.3	3.7±0.5	ND
Gаланthamine			0.6±0.1

ND = not determine

ตารางที่ 14 ผลในการต้าน AChE จาก eel ของสารสังเคราะห์ของสารในกลุ่ม Tetrahydroisoquinoline ที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งที่ 2

Code	% inhibition on AChE		IC ₅₀ (μM)
	[10 ⁻⁴] M	[10 ⁻⁵] M	
SM259	16.7 ± 1.4	4.2 ± 0.6	548.5 ± 40.2 (max. inhibition = 80%)
SM128	32.7 ± 2.9	7.9 ± 2.7	ND
SM245	82.2 ± 1.3	56.0 ± 1.7	6.4 ± 0.1
SM248 (=SM127)	91.7 ± 0.6	53.0 ± 2.5	8.4±1.0
SM257	51.5 ± 0.2	7.3 ± 1.4	101.7±4.6
SM258	52.0 ± 1.3	11.8 ± 1.0	108.4±8.8
SM247	88.5 ± 2.6	40.0 ± 3.7	11.9±1.7
SM233	17.0 ± 1.4	10.8 ± 1.7	ND
SM228	4.0 ± 0.6	-1.5 ± 2.2	ND
SM243	71.0 ± 3.1	21.0 ± 3.2	37.2±1.8
SM236	35.8 ± 2.0	5.8 ± 1.4	319.7±27.4
SM241	5.0 ± 1.0	3.0 ± 2.1	ND
SM136	15.7 ± 0.4	1.5 ± 0.5	ND
SM169	1.5 ± 2.2	-4.5 ± 4.6	ND
SM244	15.0 ± 0.3	0.2 ± 1.6	ND
SM174	33.4 ± 4.8	12.5 ± 1.2	ND
SM196	6.7 ± 2.8	-6.5 ± 1.6	ND
SM252	11.6 ± 0.8	1.1 ± 1.2	ND
SM253	11.2 ± 1.9	0.3 ± 2.4	ND
SM172	14.2 ± 4.6	-8.0 ± 1.2	ND
SM209	17.4 ± 4.1	8.8 ± 0.9	ND
SM171	17.6 ± 0.8	-3.7 ± 4.4	ND
SM213	34.5 ± 1.7	1.2 ± 4.0	ND
SM134	23.4 ± 0.5	4.2 ± 1.7	ND
SM129	23.8 ± 4.3	-2.3 ± 2.0	ND
SM145	70.0 ± 4.3	25.2 ± 4.2	36.3±5.7
Galanthamine			0.6±0.1

ND = not determine

ตารางที่ 15 ผลของตัวอย่างการต้าน AChE จาก eel และ BuChE จาก horse ของตัวอย่างสารสังเคราะห์ในแต่ละกลุ่ม

Code	% inhibition			
	AChE		BuChE	
	[10 ⁻⁴]	[10 ⁻⁵]	[10 ⁻⁴]	[10 ⁻⁵]
amide				
SM25	8.9 ± 3.4	5.7 ± 1.8	8.0 ± 2.2	3.2 ± 3.275
SM28	5.7 ± 5.1	5.9 ± 4.3	1.7 ± 2.8	-0.1 ± 3.2
Dihydroisoquinoline				
SM62	84.6 ± 2.1	53.2 ± 5.2	43.6 ± 2.1	8.3 ± 3.6
SM65	21.7 ± 4.1	7.4 ± 3.3	50.4 ± 5.3	11.3 ± 2.3
SM69	84.4 ± 0.8	47.7 ± 5.4	35.7 ± 2.6	6.6 ± 2.2
SM71	85.1 ± 3.1	46.8 ± 2.3	18.0 ± 4.2	-6.6 ± 3.2
SM75	55.7 ± 4.8	13.6 ± 3.5	27.7 ± 5.6	6.4 ± 1.7
SM79	82.2 ± 3.4	41.2 ± 6.0	1.3 ± 3.3	-3.2 ± 7.4
tetradihydroisoquinoline				
SM70	40.6 ± 1.6	11.1 ± 3.9	12.8 ± 3.3	2.8 ± 5.4
SM72	29.9 ± 5.4	9.0 ± 3.2	17.4 ± 15.1	5.2 ± 7.6
SM76	12.5 ± 5.6	4.2 ± 2.0	12.6 ± 3.3	0.0 ± 8.1
SM80	6.6 ± 2.7	2.9 ± 2.5	1.5 ± 0.6	-0.5 ± 7.8
SM127	89.2 ± 1.8	43.8 ± 4.0	-176.5 ± 28.6	nd
SM128	32.7 ± 5.0	7.9 ± 4.7	-89.7 ± 11.9	nd
SM136	15.7 ± 0.7	1.5 ± 0.9	29.4 ± 9.4	nd
T21	20.2 ± 2.3	3.7 ± 0.5	-138.2 ± 25.3	nd
Isoquinoline and quaternary derivatives				
SM83	93.4 ± 2.0	61.7 ± 1.5	-155.7 ± 32.6	nd
SM89	81.8 ± 2.5	46.6 ± 6.3	-163.6 ± 32.0	nd
SM123	21.8 ± 1.1	1.5 ± 1.1	-159.6 ± 41.0	nd
SM129	23.8 ± 7.4	-2.3 ± 2.0	-50.0 ± 12.2	nd
SM134	23.4 ± 0.8	4.2 ± 1.7	-19.2 ± 1.6	nd
SM136	15.7 ± 0.7	1.5 ± 0.9	29.4 ± 9.4	nd
SM145	84.5 ± 1.9	31.7 ± 0.6	-273.9 ± 117.3	nd
SM150	73.2 ± 1.5	37.2 ± 4.7	4.3 ± 45.2	nd
SM153	97.5 ± 1.9	50.4 ± 1.5	-126.2 ± 95.5	nd

ตารางที่ 16 ผลการต้าน AChE จาก human ของตัวอย่างสารสังเคราะห์ของอนุพันธ์ isoquinoline (N =3)

Code	IC ₅₀ (μM) for eAChE	IC ₅₀ (μM) for hAChE
SM62	8.6 ± 0.9	63.5 ± 13.6
SM69	7.3 ± 0.6	35.9 ± 2.1
SM71	7.0 ± 1.4	< 500
SM89	10.8 ± 2.2	99.1 ± 30.3
SM83	4.9 ± 1.2	53.6 ± 20.9
SM150	9.0 ± 2.1	21.2 ± 1.1
SM186	6.5 ± 0.1	39.1 ± 2.1 ^a
SM245	6.4 ± 0.1	211.2 ± 81.2
SM248	8.4 ± 1.0	< 500

a = การทดลอง N = 2

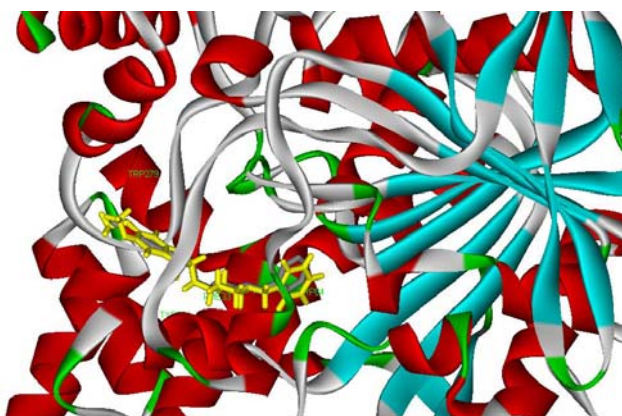
การศึกษา molecular docking

จากการศึกษาโดยความร่วมมือกับ รศ. ดร. สุภา หารหนองบัว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยการใช้โปรแกรม AUTODOCK 3.0 และใช้ crystal structure code 1eve.pdb จาก protein data bank (www.pdb.org) ตัวอย่างสารในกลุ่มของ dihydroisoquinoline (lead compound) ได้แก่ SM62 และ SM71 ได้ถูกใช้เพื่อเป็น model ในการศึกษาครั้งนี้ โดยจะทำการเตรียม model ของสารที่ทดสอบโดยให้ SYBYL v. 7.0 และมีการใช้สาร donepezil เพื่อเป็นสารมาตรฐานในการตรวจสอบประสิทธิภาพของ protein model ที่ใช้ในการศึกษา

สำหรับโปรตีนของ AChE เฉพาะส่วนของ polar hydrogen atoms จะยังคงถูก assign ประจุไว้ตามวิธีการของ Kollman United-Atom ส่วนของโมเลกุลน้ำใน AChE binding site จะถูกเอาออก Atomic salvation parameters ถูกใส่ให้โปรตีนโดยใช้ ADDSOL utility และ grid maps รอบๆ protein binding site ถูกคำนวณโดยใช้ AUTOGRID 3.0 และมีการเลือกจุดศูนย์กลางจาก ligand เป็น 80_/80_/80 points และมี grid spacing = 0.375Å

สำหรับ ligands จะมีการเพิ่มส่วนของไฮโดรเจนอะตอมและเพิ่มประจุโดยใช้ Gasteiger Huckel charges ส่วนของ rotational bond จะถูกระบุโดยใช้ AutoTors program แต่ละโมเลกุลจะถูกคำนวณโดยทำ 100 docking orientations โดยให้มีค่า root-mean-square positional deviation = 1.0 Å°.

การเปรียบเทียบระหว่าง Protein model ที่ใช้ในการศึกษาเริ่มต้น (original model) และ protein model ที่ถูกทำการ docking กับ donepezil ดังแสดงในรูปที่ 13 พบว่าโครงสร้างของโปรตีนทั้งสอง สามารถซ้อนทับกันได้อย่างมีนัยสำคัญที่บริเวณ active site ค่า RMSD และค่า free energy binding ของ denepzil และ AChE มีค่าเป็น 0.94 Å และ -11.18 kcal/mol ตามลำดับ จากนั้นจึงได้มีการนำเอา protein model มาทำการศึกษาการ docking ของ SM62 และ SM71 ซึ่งพบว่าข้อมูลที่ได้มีค่า docking energy สอดคล้องกับค่า IC₅₀ ของสาร ดังแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 14



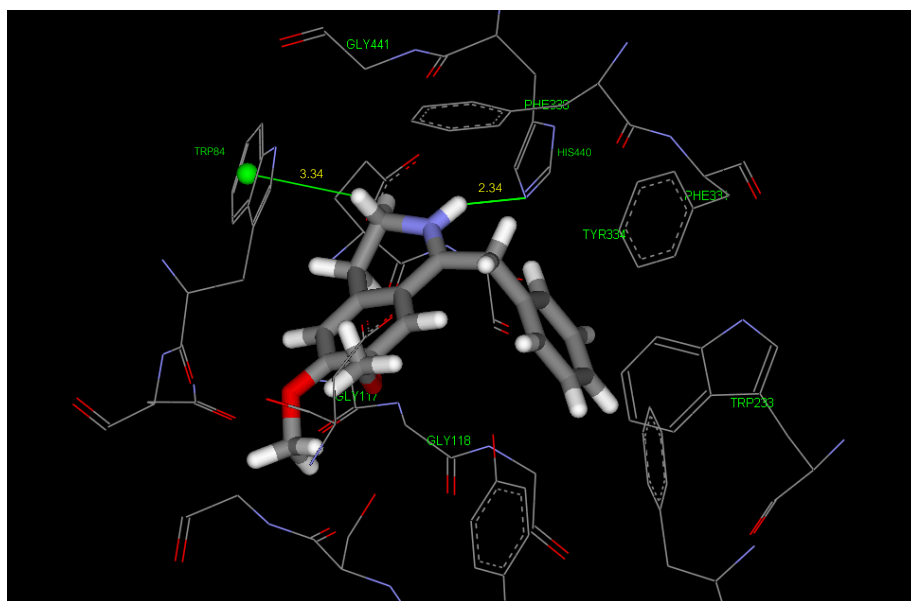
รูปที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบของ protein structure ของ AChE เริ่มต้น (สีเทา) และ protein ที่ถูก docking ด้วย donepezil คำนวณโดยใช้โปรแกรม Autodock 3

ตารางที่ 17 ผลการ Docking ของสารต่อ AChE pocket (code 1eve.pdb)

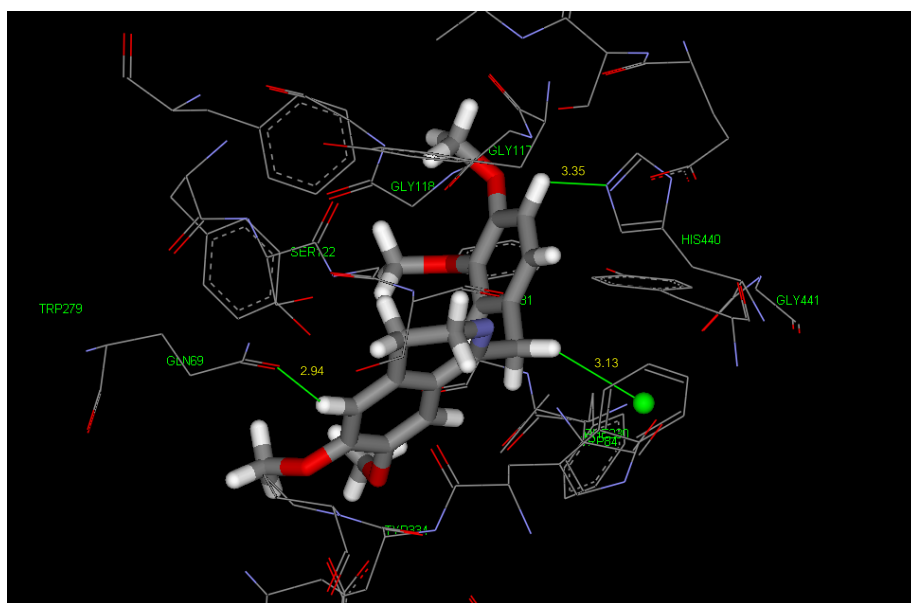
Inhibitors	IC ₅₀ (μM)	Estimated Dock Energy (kcal/mol)
Donepezil	0.025*	-11.18
SM62	8.6±0.9	-12.87
SM71	7.0 ±1.4	-13.79

* ข้อมูลจาก Shen et al. 2009

ทั้งสาร SM62 และ SM71 แสดงการ interaction ที่ดีมากกับ protein structure โดยที่สาร SM62 มี interaction ที่สำคัญ คือ เกิด H-bond กับ HIS440 ในระยะทางที่เท่ากับ 2.34 Å ซึ่งถือว่าเป็น interaction ที่แรงมาก และยังมีการทำ interaction แบบ H-pi กับ TRP84 ในระยะทางที่เท่ากับ 3.35 Å (รูปที่ 14a) ส่วน SM71 มี interaction อ่อนกว่า SM62 มี H-bond กับ HIS440 เช่นกันแต่ระยะทางของ H-bond ระหว่าง H atom ของ SM71 กับ N ของวงแหวน imidazole ของ HIS 440 มีค่าเท่ากับ 3.35 ซึ่งจัดเป็น H-bond ที่ไม่ค่อยแรงนัก อย่างไรก็ตามพบ H-pi interaction ระหว่าง H ของ SM71 กับ aromatic ring ของ TRP84 นอกจากนี้ ยังพบ H-bond ที่ตำแหน่ง GLN69 ด้วย ซึ่งมีขนาดปานกลาง จึงทำให้การ bind ของ SM71 กับ amino acid ใน AChE pocket มีค่าที่ดี



(a)



(b)

รูปที่ 14 ผลของการ docking ของ a) SM61 และ b) SM 72

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

1. ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้าน AChE จากพืชในตระกูล Apocynaceae และ Loganiaceae พบว่าสารสกัดจากต้นทุ้งฟ้า (*Alstonia macrophylla* Wall. Ex A. DC.) ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Apocynaceae มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ AChE สูง ได้ทำการแยกสาร indole alkaloids จาก ต้นทุ้งฟ้าได้ 2 ตัว คือ macralstonine และสารใหม่ 1 ตัว

2. ผู้วิจัยได้ร่วมมือกับนักวิจัยกลุ่มต่างๆในการศึกษาสารต้าน AChE จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ พบสารต้าน AChE กลุ่ม steroidal alkaloids ชื่อ 4-acetoxy-plakinamine B จากฟองน้ำ *Corticium* sp. สาร Marinoquinoline A จาก gliding bacteria strain TISTR 1741 ได้ สาร bisisoquinoline alkaloid, Lindoldhamine จากพืชวงศ์ Menispermaceae, *Triclisia sacleuxii* (Pierre) Diels ซึ่งสารทั้งสามมีค่า IC_{50} ในการต้าน AChE อยู่ในระดับไมโครโมลาร์

3. จากการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างของ isoquinoline และหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งที่ 1 ในระยะแรกนี้สามารถสรุปได้บางส่วนดังนี้

- หมู่แทนที่ที่ตำแหน่งที่ 1 ที่ดีที่สุดของสารในกลุ่ม dihydroisoquinoline คือ benzyl group (ดีกว่า phenyl ethyl group) และจากข้อมูลที่ทำการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การแทนที่ด้วย benzyl group ดีกว่าการแทนที่ด้วย methyl และ phenyl ตำแหน่งของ benzene ring และ C-1 ของ isoquinoline ring ควรอยู่ห่างกัน 1 คาร์บอน การมีหมู่แทนที่ที่ C-1 ด้วย cyclohexyl group พบว่าฤทธิ์น้อยกว่าหมู่ benzyl ประมาณ 3-4 เท่า
- การเติมหมู่แทนที่ที่ benzyl group ด้วย electron donating group หรือ electron withdrawing group มีผลต่อฤทธิ์ในการต้าน AChE ไม่แตกต่างจาก benzyl group
- การเพิ่ม steric group ที่ หมู่แทนที่ที่ตำแหน่งที่ 1 ทำให้ฤทธิ์ในการต้าน AChE ลดลง แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลมีความต้องการ steric group ที่ตำแหน่งที่ 1 แต่มีความจำกัดในระดับหนึ่ง
- การเพิ่มหมู่ methyl group ที่ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 2 ไม่มีผลต่อฤทธิ์ในการต้าน AChE ในกลุ่มอนุพันธ์ของ dihydroisoquinoline ส่วนอนุพันธ์ของ isoquinoline การเพิ่มหมู่ methyl หรือ benzyl ที่ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 2 มีผลทำให้ฤทธิ์ดีขึ้นประมาณ 2-4 เท่า (จาก papaverine มีค่า $IC_{50} = 24 \mu M$)
- สารในกลุ่ม tetrahydroisoquinoline มีผลในการต้าน AChE ต่ำ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโมเลกุลมี conformation ที่ไม่เหมาะสมกับการจับกับเอนไซม์
- ในการเปลี่ยนหมู่แทนที่จาก 1-substituted-tetrahydroisoquinoline ไปเป็น 2-substituted-tetrahydroisoquinoline พบว่าผลในการต้าน AChE เพิ่มสูงขึ้นมาก โดยฤทธิ์ที่ได้เทียบเท่ากับฤทธิ์ของหมู่แทนที่ชนิดเดียวกันกับ 1-substituted-dihydroisoquinoline และพบว่าปัจจัยต่างๆของหมู่แทนที่ก็เป็นไปในทำนองเดียวกันกับ 1-substituted-dihydroisoquinoline
- แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้โมเลกุลแบบ 1-substituted-dihydroisoquinoline และ 2-substituted-tetrahydroisoquinoline อาจมีผลทำให้การจับกับเอนไซม์ AChE จับใน binding pocket เดียวกัน อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาต่อไปโดยอาศัย molecular modeling

- สารที่เป็นอนุพันธ์ของ amide, dihydroisoquinoline, tetrahydroisoquinoline, isoquinoline และ quaternary derivatives ทุกๆกลุ่มไม่มีฤทธิ์ต่อ BChE ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ของไอโซควิโนลีนมี selectivity ต่อ AChE ดี
- นอกจากนี้สารยังคงมีผลในการยับยั้งการทำงานของ AChE จากคนได้ โดยผลในการออกฤทธิ์ยับยั้งต่อ hAChE มีค่าน้อยกว่าผลต่อ eAChE จะเห็นได้ว่าสาร isoquinoline ที่มีหมู่แทนที่ที่ N-2 จะมีผลทำให้ฤทธิ์ต่อ hAChE หดไป ส่วนผลต่อโครงสร้างของ isoquinoline และ dihydroisoquinoline ยังคงมีฤทธิ์อยู่ในระดับ 10^{-5} M
- จากการศึกษา molecular modeling จะเห็นว่าโครงสร้างของอนุพันธ์ isoquinoline สามารถจับกับ AChE ได้ดี และสามารถเกิด interaction ได้ที่ binding pocket เดียวกับ donepezil

บทที่ 5
เอกสารอ้างอิง

- Ellman, G.L., Lourtney, D.K., Andres, V., Gmelin, G. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, 7: 88-95.
- Enz, A., Amstutz, R., Boddeke, H., et al. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. *Prog. Brain Res.* 1993, 98: 431-445.
- Ingkaninan, K.; Phengpa, P.; Yuenyongsawad, S.; Khorana, N. Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. *J. Pharm. Pharmacol.* 2006a, 58: 695-700.
- Ingkaninan, K., Changwijita, K., Suwanborirux, K. Vobasinyl-Iboga Bisindole Alkaloids, Potent Acetylcholinesterase Inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2006b, 58: 847-852.
- 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.
- Kaewpradub, N., Houghton, P. J. Indole alkaloids from *Alstonia macrophylla*. *Phytochemistry.* 1997, 46: 757-762.
- Kam, T. S., Iek, I., Choo, Y. Alkaloids from the stem-bark of *Alstonia macrophylla*. *Phytochemistry.* 1999, 51: 839-844.
- Langjae, R., Bussarawit, S., Yuenyongsawad, S., Ingkaninan, K., Plubrukarn, A. Acetylcholinesterase-inhibiting steroidal alkaloid from the sponge *Corticium* sp. *Steroids.* 2007, 72: 682-685.
- Markmee, S., Ruchirawat, S., Prachyawarakorn, V., Ingkaninan, K., Khorana, N. Isoquinoline derivatives as potential acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16: 2170-2172.
- Murebwayire, S., Ingkaninan, K., Changwijit, K., Frédéricich, M., Duez, P.. *Triclisia sacleuxii* (Pierre) Diels (Menispermaceae), a potential source of acetylcholinesterase inhibitors. *J. Pharm. Pharmacol.* 2009, 61: 103-107.
- Ogino, T., Yamaguchi, T., Sato, T., Sasaki, H., Sugama, K., Okada, M., Maruno, M. Studies on inhibitory activity against acetylcholinesterase of new bisbenzylisoquinoline alkaloid and its related compounds. *Heterocycles.* 1997, 45: 2253-2260.
- Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G., Tominson, B.E. Changes in brain cholinesterase in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol. Appl. Neurobio* 1978, 4, 273-277.
- Rhee, I.K., van de Meent, M., Ingkaninan, K., Verpoorte, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining *J. Chromatogr A.* 2001, 915: 217-223.
- Sangnoi, Y., Sakulkeo, O., Yuenyongsawad, S., Kanjana-opas, A., Ingkaninan, K., Plubrukarn, A., Suwanborirux, K. Acetylcholinesterase-inhibiting activity of pyrrole derivatives from a novel marine gliding bacterium, *Rapidiatrix thailandica*. *Mar. Drugs.* 2008, 578-86.

- Scarpini, E., Scheltens, P., Feldman, H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *The Lancet Neurology*. 2003, 2: 539-547.
- Shen, Y., Zhang, J., Sheng, R., Dong, X., He, Q., Yang, B., Hu, Y. Synthesis and biological evaluation of novel flavonoid derivatives as dual binding acetylcholinesterase inhibitors. *J Enzym Inhib Med Ch*. 2009, 24: 372-380.
- Sriprang, S., Khorana, N., Ingkaninan, K. Acetylcholinesterase Inhibitor from *Stephania suberosa* Forman. *NU Science Journal*. 2006, 3: 1-11.

บทที่ 6
ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์

ผลงานหลัก

- 1 Khorana, N. Markmee, S., Ingkaninan, K., Ruchirawat, S., Kitbunnadaj, R, Pullagurla, M.R.(2008)
Evaluation of a new lead for acetylcholinesterase inhibition. *Med. Chem. Res.* 18: 231-241.

ผลงานที่เกิดจากการทำวิจัยร่วม

1. Langjae, R., Bussarawit, S., Yuenyongsawad, S., Ingkaninan, K., Plubrukarn, A. (2007)
Acetylcholinesterase-inhibiting steroidal alkaloid from the sponge *Corticium* sp. *Steroids*. 72: 682-685.
2. Sangnoi Y, Sakulkeo O, Yuenyongsawad S, Kanjana-opas A, Ingkaninan K, Plubrukarn A, Suwanborirux K. (2008) Acetylcholinesterase-inhibiting activity of pyrrole derivatives from a novel marine gliding bacterium, *Rapidithrix thailandica*. *Mar Drugs*. 578-86.
3. Murebwayire S, Ingkaninan K, Changwijit K, Frédérich M, Duez P. (2009) *Triclisia sacleuxii* (Pierre) Diels (Menispermaceae), a potential source of acetylcholinesterase inhibitors. *J Pharm Pharmacol*. 61:103-7.

2. การนำเสนอผลงานในที่ประชุมทางวิชาการ

1. ชื่อเรื่อง: 1-Benzylisoquinoline Derivatives As Potent Acetylcholinesterase Inhibitors

ผู้วิจัย: Sutthatip Markmee, Kornkanok Ingkaninan, Reungwit Kitbunnadaj, Somsak Ruchirawat, and Nantaka Khorana

รูปแบบการนำเสนอ: โปสเตอร์

ชื่อการประชุม / สถานที่: 21st Congress of Federation of Asian Pharmaceutical Associations (FAPA), Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan

วันที่: 18-21 พฤศจิกายน พ.ศ. 2549

2. ชื่อเรื่อง: Acetylcholinesterase (AChE) inhibitor from some Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies

ผู้วิจัย: Kornkanok Ingkaninan, Nantaka Khorana, Sarin Sriprang, Kanokwan Changwijit, Preeda Phengpa, Prapapan Temkitthawon, Kanchanaporn Chuenchom, Thitaree Yuyaem, Warawit Thongnoi, Sutthatip Markmee, Supreeya Yuenyongsawad, Khanit Suwanborirux, Siriporn Chattipakorn

รูปแบบการนำเสนอ: บรรยาย

ชื่อการประชุม / สถานที่: JSPS-NRCT Core University Program on Natural Medicine in Pharmaceutical Sciences; The seventh Joint Seminar: Recent Advances in Natural Products Research and Its Application ณ Toyama, Japan

วันที่: 1-4 ธันวาคม พ.ศ. 2549

3. ชื่อเรื่อง: Investigation of acetylcholinesterase inhibitors from Thai biodiversities

ผู้วิจัย: Kornkanok Ingkaninan et al.

ชื่อการประชุม: Joint Symposium IOCD – ISDNP เรื่อง NATURAL PRODUCTS: UNLIMITED RESOURCES FOR THE DEVELOPMENT OF DRUGS, COSMETICS AND FOOD

สถานที่-วัน: เมือง Kasane ประเทศ Botswana ระหว่างวันที่ 25 -29 กุมภาพันธ์ 2551

รูปแบบการนำเสนอ: บรรยาย

4. ชื่อเรื่อง: Exploration of acetylcholinesterase inhibitors from Thai biodiversity

ผู้วิจัย: Kornkanok Ingkaninan et al.

ชื่อการประชุม: The 1st Seminar of Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi and the JSPS 2nd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Science Platform Program จัดโดย Center for Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi (BNPME) and the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS)

สถานที่-วัน: จังหวัดภูเก็ต ระหว่างวันที่ 25-28 ตุลาคม 2550

รูปแบบการนำเสนอ: บรรยาย

5. ชื่อเรื่อง: Evaluation of a new lead for acetylcholinesterase inhibitor

ผู้วิจัย: N. Khorana, S. Markmee, S. Ruchirawat, Vilailak Prachyawarakorn and K. Ingkaninan

ชื่อการประชุม: The 1st Seminar of Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi and the JSPS 2nd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Science Platform Program จัดโดย Center for Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi (BNPME) and the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS)

สถานที่-วัน: จังหวัดภูเก็ต ระหว่างวันที่ 25-28 ตุลาคม 2550

รูปแบบการนำเสนอ: โปสเตอร์

6. ชื่อเรื่อง: In vitro screening for acetylcholinesterase inhibitory of some plants belonging to Apocynaceae and Loganiaceae

ผู้วิจัย: Kanokwan Changwichit, Watcharin Puapan, Kornkanok Ingkaninan

ชื่อการประชุม: The 1st Seminar of Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi and the JSPS 2nd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Science Platform Program จัดโดย Center for Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi (BNPME) and the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS)

สถานที่-วัน: จังหวัดภูเก็ต ระหว่างวันที่ 25-28 ตุลาคม 2550

รูปแบบการนำเสนอ: โปสเตอร์

7. ชื่อเรื่อง: Exploration of leads for degenerative syndromes from Thai biodiversity

ผู้วิจัย: Kornkanok Ingkaninan et al.

ชื่อการประชุม: Chinese- Thai joint workshop for natural product and drug discovery

สถานที่-วัน: เมืองเฉินตู ประเทศจีน ระหว่างวันที่ 15-19 กันยายน 2551

รูปแบบการนำเสนอ: บรรยาย

8 ชื่อเรื่อง: Thai rejuvenating agents as potential sources of drugs

ผู้วิจัย: Kornkanok Ingkaninan et al.

ชื่อการประชุม: The 8 th NRCT-JSPS Joint Seminar: Innovation Research in Natural Products for Sustainable Development

สถานที่-วัน: คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างวันที่ 3-4 กุมภาพันธ์ 2552

รูปแบบการนำเสนอ: บรรยาย

9. ชื่อเรื่อง: Acetylcholinesterase inhibitory activity of some plants belonging to Apocynaceae and Loganiaceae

ผู้วิจัย: Kanokwan Changwichit, Nantaka Khorana, Niwat Kaewpradab and Kornkanok Ingkaninan

ชื่อการประชุม: 2nd International Conference on Natural Products for Health and Beauty

สถานที่-วัน: มหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา ระหว่างวันที่ 17-19 ธันวาคม 2551

รูปแบบการนำเสนอ: โปสเตอร์

10. ชื่อเรื่อง: Investigation for Acetylcholinesterase Inhibitors from *Alstonia macrophylla* Stem

ผู้วิจัย: Kanokwan Changwichit, Nantaka Khorana, Khanit Suwanborirux and Kornkanok Ingkaninan

ชื่อการประชุม: The International Congress for innovation in Chemistry; Perch Conference VI

สถานที่-วัน: โรงแรมจอมเทียนบีช พัทยา ระหว่างวันที่ 3-6 พฤษภาคม 2552

รูปแบบการนำเสนอ: โปสเตอร์

3. นิสิตบัณฑิตศึกษา

1. ดร. สุทธาทิพย์ มากมี สำเร็จการศึกษาลัทธิสุตตวิยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปี 2550

ชื่อวิทยานิพนธ์ "Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Isoquinoline derivatives as Acetylcholinesterase Inhibitors"

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รศ. ดร. นันทกา โกรนา

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ. ดร. กรกนก อิงคินันท์, ศ. ดร. สมศักดิ์ รุจิวัฒน์ และ ผศ. ดร. เรืองวิทย์ กิจบรรณาเดช

2. นส. กนกวรรณ ช้างวิจิตร กำลังศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สาขา เกษษเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ชื่อวิทยานิพนธ์ “Investigation for acetylcholinesterase inhibitors from *Alstonia macrophylla*”อาจารย์ที่

ปรึกษาหลัก รศ. ดร. กรรณก อิงคินันท์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ. ดร. นันทกา ไกรนา และ อ. ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์