



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง “การสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้าง  
สารไดเฮทเทอโรเอริลเอริลมีเทนและอนุพันธ์ในการใช้เป็น  
สารยับยั้งโคสทินเอสเทอเรสเพื่อใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์”

โดย

ผศ.ดร. จเร จรัสจรรยาพงศ์

และ

ดร. อนันต์ อธิพรชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559  
มหาวิทยาลัยบูรพา

## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง “การสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้าง  
สารไดไฮดรอกซีโพรเอริลเอริลมีเทนและอนุพันธ์ในการใช้เป็น  
สารยับยั้งโคลีนเอสเตอเรสเพื่อใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์”

โดย

ผศ.ดร. จเร จรัสจรรยาพงศ์

และ

ดร. อนันต์ อธิพรชัย

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## บทคัดย่อ

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะการเสื่อมของสมอง พบมากในผู้ที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป และมีแนวโน้มที่จำนวนผู้ป่วยมากขึ้นเรื่อยๆ แต่อย่างไรก็ตามยาในปัจจุบันเป็นเพียงยาที่ชะลออาการของโรคเท่านั้น ในงานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์สารกลุ่ม diheteroarylarylmethanes จำนวน 5 กลุ่ม ได้แก่ 1,1-di(5-methylfuryl)-arylmethanes (**3a-t**), 1,1-di(5-ethylthienyl)phenylmethane (**4**), 1,1-di-(pyrrolyl)arylmethanes (**5a-c**), และ di(3-indoly)methanes แบบสมมาตร (**6a-x**) ด้วยปฏิกิริยา bisarylation แบบขั้นตอนเดียวของสารตั้งต้นคือ 2-methylfuran, 2-ethylthiophene, pyrrole, 2-ethylpyrrole หรือ indole กับ aldehyde ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง โดยใช้  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  (10 mol%),  $\text{I}_2$  (10 mol%) หรือ  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (15 mol %) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ทำให้ได้ diheteroarylarylmethanes เป็นผลิตภัณฑ์จำนวน 48 โครงสร้าง ในร้อยละปานกลางถึงสูงมาก นอกจากนี้ในงานวิจัยได้สังเคราะห์สาร 3,3'-di(indoly)methanes แบบไม่สมมาตร (**7a-d**) เพิ่มเติมอีก 4 ชนิด ด้วยปฏิกิริยาแทนที่วงอินโดลของสาร 3,3'-di(indoly)methanes แบบสมมาตร จากนั้นได้นำสารสังเคราะห์ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอสซิติลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ พบว่าสาร di(3-indoly)-4-hydroxyphenylmethane (**6e**) di(3-indoyl)(2,4-difluorophenyl)-methane (**6i**) และ 4-(di(5-bromo-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**6p**) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอสซิติลโคลีนเอสเทอเรสมากกว่า 70% คือ สามารถยับยั้งเอนไซม์แอสซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ  $73.11 \pm 0.11$ ,  $70.07 \pm 0.64$  และ  $70.71 \pm 0.83$  ตามลำดับ ดังนั้นสามารถใช้สาร di(indoly)methanes (**6**) เป็น Lead compound เพื่อนำไปพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไป

**คำสำคัญ :** โรคอัลไซเมอร์, เอนไซม์แอสซิติลโคลีนเอสเทอเรส, diheteroarylarylmethanes, di(indoly)methane

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is cause of demetia, most AD patient are over 60 years old and tend to have more patients. However, the drug is currently the only drug that slowed the disease's symptoms and side effects. In this research, five groups of diheteroarylarylmethanes i.e. 1,1-di(5-methylfuryl)arylmethanes (**3a-t**), 1,1-di(5-ethylthienyl)phenylmethane (**4**), 1,1-di(pyrrolyl)arylmethanes (**5a-c**) and symmetrical di(3-indolyl)methanes (**6a-x**) were synthesized *via* one-pot, bisarylation of 2-methylfuran, 2-ethylthiophene, pyrrole, 2-ethylpyrrole or indole with a variety of aldehyde under mild conditions in the presence of Bi(OTf)<sub>3</sub> (10 mol%), I<sub>2</sub> (10 mol%) or FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O (15 mol %) as catalyst at room temperature to afford the forty-eight compounds of diheteroarylarylmethanes as products in moderate to excellent yields. Moreover, four compounds of unsymmetrical di(3-indolyl)methanes (**7a-d**) were also synthesized *via* transindolylolation of symmetrical di(3-indolyl)methanes with different indole ring. Then, all synthesized compounds were evaluated acetylcholinesterase inhibitory activity. Acetylcholinesterase is an enzyme that contributes to Alzheimer's disease. The results found that the di(3-indolyl)-4-hydroxyphenylmethane (**6e**) di(3-indolyl)(2,4-difluorophenyl)-methane (**6i**) และ 4-(di(5-bromo-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**6p**) showed promising acetylcholinesterase inhibitory activity with value of 73.11±0.11, 70.07±0.64 and 70.71±0.83, respectively. Thus, the di(indolyl)methanes (**6**) would be a lead compound for the development of novel drug for the Alzheimer's disease.

**Keywords:** Alzheimer's disease (AD), Acetylcholinesterase, Diheteroarylarylmethanes, 1,1-Di(indolyl)methane

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 65/2559

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ สุดท้ายขอขอบคุณ นางสาวสุริษา ถึงปัญญา นางสาวสุรีย์พร เรืองแสงทองกุล นางสาวนัตติยา จินตนา นางสาวประภาพร บุญเพ็ง นางสาวอรณิชา ไช้เกษ นางสาวชฎามน จันทนา นางสาวนันทน์ภัส ชุมศรี และนางสาวกรรณิการ์ ละอองทอง สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
กิตติกรรมประกาศ	3
บทที่ 1 บทนำ	5
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	5
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	6
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	7
1.5 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	11
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	19
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	20
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	25
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	51
บรรณานุกรม	54
ผลผลิตของโครงการวิจัย (Output)	57

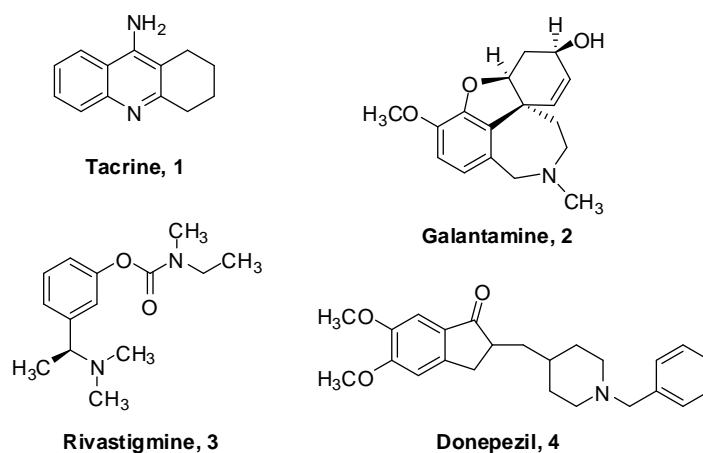
# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease หรือ AD) เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะการเสื่อมของสมอง (dementia) พบมากในผู้ที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป โดยอาการจะดำเนินไปอย่างช้าๆ เริ่มจากมีอาการหลงลืม พฤติกรรม บุคลิกและอารมณ์เปลี่ยนไป สูญเสียความสามารถในการเรียนรู้ และการดำรงชีวิตประจำวัน บางรายอาจรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ คือปริมาณของแอสีทิลโคลีน (acetylcholine; ACh) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทลดลง เนื่องจากถูกทำลายด้วยเอนไซม์แอสีทิลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase; AChE) และบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส (butyrylcholinesterase; BChE) ด้วยเหตุนี้แพทย์และนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจึงให้ความสนใจ ทำการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์เป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นประเด็นการป้องกันหรือการรักษา โดยยาที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบันมีเพียงไม่กี่ชนิด และเป็นการชะลออาการเท่านั้น ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ รวมทั้งยังมีอาการข้างเคียงของยาอีกด้วย

ในปัจจุบันยากลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (Cholinesterase inhibitors หรือ ChE-Is) ที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลกให้ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์มี 4 ชนิด ได้แก่ tacrine galanthamine rivastigmine และ donepezil (รูปที่ 1) สำหรับการศึกษาทางคลินิก ของยาพบว่า ยาในกลุ่มนี้ทุกตัวโดยภาพรวมแล้ว ให้ผลดีกว่ายากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตาม ยาดังกล่าวยังส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยอย่างมาก เช่น ยา galanthamine มีผลข้างเคียงทำให้ผู้ป่วยมีน้ำหนักรลดลง ยา donepezil มีอาการข้างเคียงทำให้ผู้ป่วยนอนไม่หลับ ยา rivastigmine ทำให้เกิดอาการเวียนศีรษะ มึนงงได้ (จักรกฤษณ์ สุขยั้ง, 2555) ดังนั้นจึงได้มีการพยายามหาสารชนิดใหม่ๆ ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอสีทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อนำไปสู่การค้นพบยาในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไป



รูปที่ 1 Acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) ที่ใช้ในทางคลินิก

จากความสำคัญและที่มาของปัญหาข้างต้น ในงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารกลุ่ม diheteroarylarylmethanes ในการใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (ChE-Is) ซึ่งในการศึกษาขั้นเบื้องต้นพบว่าสารกลุ่มนี้บางตัวมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase inhibitors หรือ AChEI) ได้ จึงมีความเป็นไปได้ว่าจะพบสารกลุ่มใหม่ที่เป็นทางเลือกในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ที่มีประสิทธิภาพทั้งในการรักษาอาการ และชะลอการดำเนินไปของโรคต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) สังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร diheteroarylarylmethanes ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิล และบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส
- 2) ศึกษาผลและตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างของสาร diheteroarylarylmethanes ที่มีอิทธิพลต่อความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอซีทิล และบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส
- 3) ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร diheteroarylarylmethanes ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิล และบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ดีที่สุด และสามารถนำไปสู่การค้นพบยาในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้
- 4) เพื่อผลิตและตีพิมพ์ผลงานวิจัยร่วมกับนิสิตและอาจารย์ในวารสารนานาชาติที่เป็นที่ยอมรับ อีกทั้งยังเป็นการสร้างองค์ความรู้ด้านการทำงานวิจัยให้แก่ นิสิต

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1) การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร diheteroarylarylmethanes

สังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร diheteroarylarylmethanes จำนวน 20-25 สาร โดยใช้สารตั้งต้นเฮเทอโรอะโรมาติก ที่มีอะตอมออกซิเจน ซัลเฟอร์และไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น furan 2-methylfuran 2-ethylfuran 1-furanylmethanol thiophene 2-methylthiophene pyrrole 2-ethylpyrrole และ indole ทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์ชนิดอะโรมาติกที่มีหมู่แทนที่บนวงเบนซีนชนิดต่างๆ เช่น ฟลูออรีน โบรมีน คลอรีน ไนโตร เมทอกซี ไฮดรอกซี

- 2) วิเคราะห์ พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี

วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค High Resolution Mass Spectroscopy (HRMS) วิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Infrared Spectroscopy (IR) พิสูจน์เอกลักษณ์และยืนยันโครงสร้างสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) ทั้ง  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$



### 3) การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส

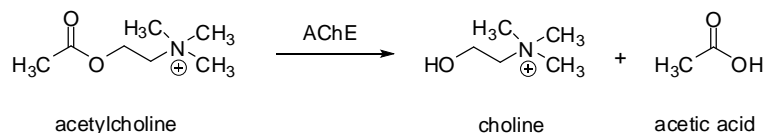
นำอนุพันธ์ของสาร diheteroarylarylmethanes ที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส ถูกวิเคราะห์และติดตามผลด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรีโดยใช้ อะซีทิลไธโอโคลีน ไอโอไดด์ เป็นสารตั้งต้น โดยวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ปรับปรุงมาจากวิธีการของ Ellman (Ellman et. al., 1961) ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยใช้ กาแลนทามีน เป็นสารอ้างอิงมาตรฐาน และทุกๆ การทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง

### 4) ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร diheteroarylarylmethanes ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิล และบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรสของอนุพันธ์สาร diheteroarylarylmethanes ในการดำเนินการต่อไปจะเลือกโครงสร้างที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุด มาเป็นโครงสร้างหลักเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงขึ้นใกล้เคียงหรือดีกว่ายา กาแลนทามีน และสามารถนำไปสู่การค้นพบยาในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้

## 1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase, AChE) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม serine hydrolase ทำหน้าที่สลาย acetylcholine (ACh) ที่ synaptic cleft ได้ผลิตภัณฑ์ คือ choline และ acetic acid (รูปที่ 2)

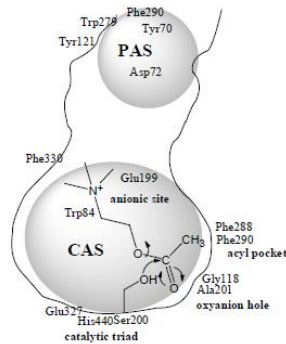


รูปที่ 2 การสลาย Acetylcholinesterase (ACh) ด้วยเอนไซม์ AChE

จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) จาก *Torpedo californica* (TcAChE) ด้วยเทคนิค x-ray crystallography พบว่า active site ของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) มีลักษณะเป็นช่องที่แคบและลึก โดยมีความลึก 20 Å และส่วนที่แคบที่สุดมีขนาด 4.5 Å พื้นผิวภายในประกอบด้วย aromatic residues หลายชนิด ได้แก่ Trp84 และ Phe 330 ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ catalytic anionic site (CAS) ในบริเวณส่วนล่างของช่องแคบ ส่วน Tyr70, Tyr121 และ Trp279 เป็นส่วนประกอบของ peripheral anionic site (PAS) ซึ่งอยู่บริเวณปากช่องแคบ (Sussman et.al., 1991)

อะซีทิลโคลีน (ACh) จับกับเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ในบริเวณ CAS ของเอนไซม์ โดยหมู่ quaternary ammonium จะเกิด cation- $\pi$  interaction กับ Trp84 ที่ anionic subsite หมู่ acetyl ของ ACh จะจับในส่วน “acyl pocket” ซึ่งมี Phe288 และ Phe290 เป็นองค์ประกอบ ปฏิกริยา

hydrolysis ของ ACh เกิดโดยหมู่ hydroxyl ของ Ser200 เข้าทำปฏิกิริยากับ ester carbonyl ของ ACh ส่วน “oxyanion hole” ทำหน้าที่ในการ stabilize transition state ดังแสดงในรูปที่ 3

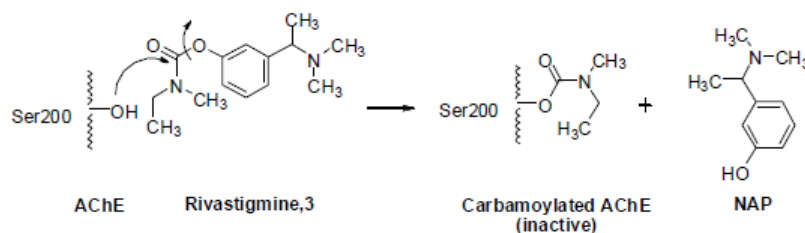


รูปที่ 3 ภาพจำลอง active site gorge ของ TcAChE

การยับยั้ง AChE จะทำให้สารสื่อประสาท ACh ในบริเวณ synapse มีระดับสูงขึ้น acetylcholinesterase inhibitor (AChEI) ที่มีประโยชน์ในการรักษาโรค ได้แก่ สารที่ยับยั้ง AChE แบบผันกลับได้ (reversible inhibitor) ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ classic และ nonclassic AChEI

classic AChEI หมายถึง สารที่เป็น substrate ของ AChE ซึ่งเมื่อสร้างพันธะโควาเลนต์กับ เอนไซม์แล้วได้ผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างคงตัว ทำให้ AChE ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ พันธะดังกล่าวสามารถถูกย่อยสลายได้อย่างช้า ๆ ทำให้สามารถ regenerate เอนไซม์กลับมาในรูปที่ทำงานได้ ยากลุ่มนี้มักมีโครงสร้างทางเคมีเป็น arylcarbamate เช่น rivastigmine เป็นต้น (Fifer, E. K., 2008)

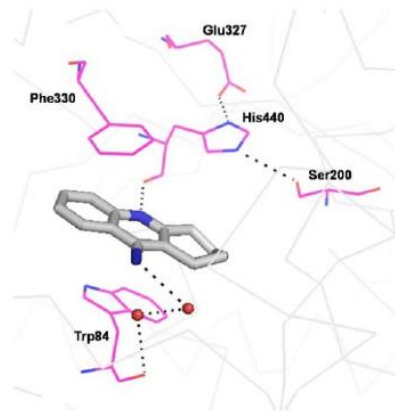
ยา rivastigmine ยับยั้ง AChE โดยการจับในบริเวณ CAS ของเอนไซม์ โดยหมู่ amine ในรูปที่มีประจุบวกจะเกิดอันตรกิริยากับ anionic subsite ทำให้หมู่ carbamate เข้าใกล้กับตำแหน่งของ Ser200 แล้วเกิดปฏิกิริยา carbamylation ขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาดังกล่าว คือ (-)-S-3-[(1-dimethyl-amino)ethyl]phenol (NAP) ยังคงมี affinity ต่อ active site ของเอนไซม์ ทำให้เกิดการยับยั้ง AChE ต่อไปเป็นเวลานาน นอกจากนี้ จากการศึกษาใน TcAChE พบว่าหลังจาก Ser200 ถูกเติมหมู่ carbamate แล้ว His440 จะเคลื่อนออกจาก Glu327 จึงทำให้เกิดการทำลายระบบของ catalytic triad เป็นสาเหตุให้กระบวนการ reactivate เอนไซม์เกิดขึ้นได้ช้าลง (Bar-On et.al., 2002)



รูปที่ 4 การออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE ของ rivastigmine

nonclassic AChEI หมายถึง ยาที่จับกับ AChE โดยมี affinity สูงกว่า ACh แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาสร้างพันธะโควาเลนต์กับเอนไซม์ (Fifer, E. K., 2008) สารกลุ่มนี้แบ่งได้เป็นสองประเภท ได้แก่ Nonclassic AChEI ที่มี affinity ต่อ CAS และ Nonclassic AChEI ที่เป็น dual binding site inhibitors

สารกลุ่ม Nonclassic AChEI ที่มี affinity ต่อ CAS ได้แก่ tacrine และ galanthamine สารเหล่านี้จับกับ AChE เฉพาะในบริเวณ CAS จึงขัดขวาง Ach ไม่ให้เข้ามายังบริเวณ active site ได้ tacrine ได้รับการรับรองให้ใช้รักษาอัลไซเมอร์เป็นชนิดแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1993 แต่ปัจจุบันถูกนำมาใช้น้อยลงเนื่องจากมีพิษต่อตับ tacrine เกิด stacking interaction กับ Trp84 และ Phe330 ที่ “anionic” subsite ของ active site ของ TcAChE nitrogen บนวงแหวน เกิด hydrogen bond กับ carbonyl oxygen ของ His-440 (3.1 Å) ส่วน amino nitrogen สร้าง hydrogen bond กับโมเลกุลของน้ำ ดังรูปที่ 5 (Harel et.al., 1993)



รูปที่ 5 3D crystal structure ของ Tacrine-AChE complex (PDB code 1ACJ)

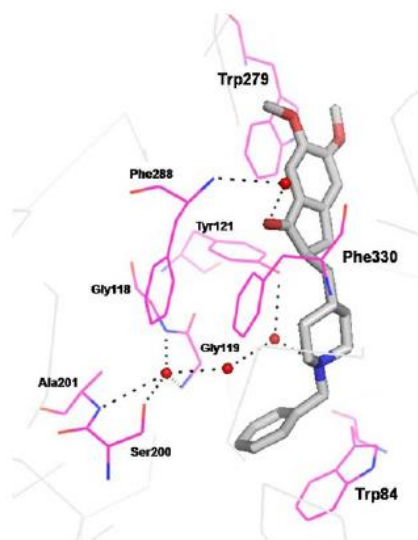
(-)-galantamine เป็นอัลคาลอยด์จาก *Galanthus nivalis* ซึ่งนอกจากมีฤทธิ์ AChEI แล้ว ยังสามารถกระตุ้น nicotinic Ach receptor (nAChR) ทั้งที่ pre- และ post-synaptic พบว่ายาเกิดอันตรกิริยาที่ choline-binding site (Trp84) และ acyl pocket (Phe288, Phe290) ของ TcAChE (Greenblatt et.al., 1991)

Nonclassic AChEI ที่เป็น dual binding site inhibitors “dual binding site inhibitors” หมายถึง สารที่สามารถจับได้ทั้งในบริเวณ CAS และ PAS ของ AChE โดยทั่วไปสารในกลุ่มนี้จะมีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่า AChEI ที่ยับยั้งเฉพาะบริเวณ CAS เพียงตำแหน่งเดียว (Muñoz-Torrero et.al., 2006)

สารชนิดแรกที่ถูกค้นพบว่าเป็น dual binding site inhibitor ได้แก่ donepezil (Sugimoto et.al., 1995) donepezil เกิดอันตรกิริยากับ TcAChE โดยมี aromatic stacking interaction ระหว่าง N-benzylpiperidine moiety กับ indole ring ของ Trp84 ที่ anionic subsite และ มีอันตรกิริยาระหว่าง indanone moiety ของ donepezil กับ indole ring ของ Trp279 ที่ PAS นอกจากนี้

piperidine nitrogen ของ donepezil ยังเกิด cation- $\pi$  interaction กับ Phe330 ในช่วงกลางของ active site gorge อีกด้วย ดังรูปที่ 6 (Kryger et.al., 1998)

donepezil เป็น AChEI ชนิดแรก que พบว่าสามารถยับยั้ง  $A\beta$  aggregation (Bartolini et.al., 2003) การที่ยาจับกับ peripheral anionic site ของ AChE ทำให้ยา มีความจำเพาะ(selectivity) ต่อ AChE มากกว่า butyrylcholinesterase (BuChE) ทั้งนี้ สามารถอธิบายได้ว่าการจับระหว่าง donepezil กับ AChE อาศัย  $\pi$ - $\pi$  interaction กับ Trp279 ที่บริเวณ PAS ของ AChE แต่ BuChE ไม่มี aromatic residue ที่ PAS และตำแหน่งออกฤทธิ์ของ BuChE มีลักษณะเป็นช่องที่มีขนาดใหญ่กว่าของ AChE ทำให้ไม่เอื้อต่อการจับกับ donepezil (Saxena et.al., 2003)



รูปที่ 6 3D crystal structure ของ TcAChE-donepezil complex (PDB code 1EVE)

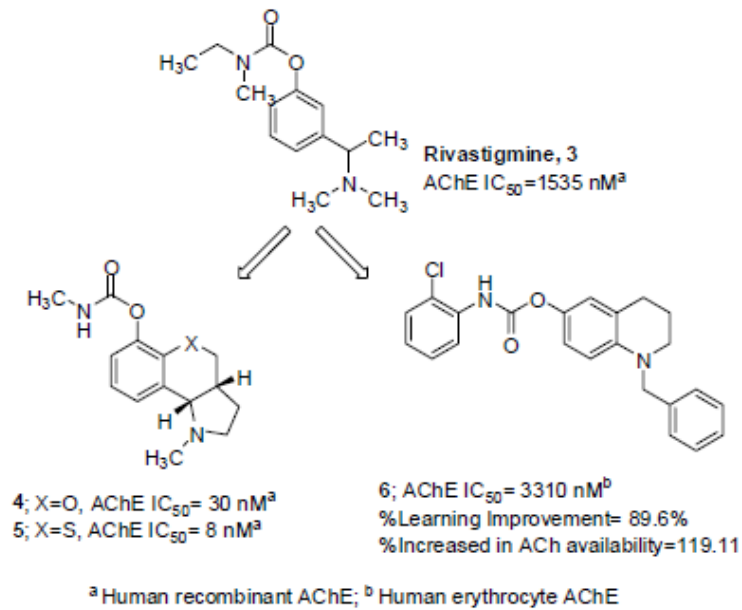
จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นว่าในปัจจุบันยากลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (Cholinesterase inhibitors หรือ ChE-Is) ที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลกให้ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์มี 4 ชนิด ได้แก่ galanthamine tacrine donepezil และ rivastigmine สำหรับการศึกษาดังกล่าว พบว่า ยาในกลุ่มนี้ทุกตัวโดยภาพรวมแล้ว ให้ผลดีกว่ายากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตาม ยาดังกล่าวยังส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยอย่างมาก ดังนั้นในกลุ่มวิจัยจึงมีความพยายามสังเคราะห์สารกลุ่มใหม่ๆ ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส และจากผลการศึกษาเบื้องต้น พบว่าสารกลุ่ม diheteroarylarylmethanes มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ในระดับดี ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารกลุ่ม diheteroarylarylmethanes เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสในระดับใกล้เคียงหรือดีกว่ายา galanthamine ซึ่งจะนำไปสู่การค้นพบยาในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไป

### 1.5 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

แนวทางการออกแบบสารที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase inhibitors หรือ AChEI) ใหม่ ๆ สำหรับใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ในช่วง 10 ปีมานี้ นอกเหนือจากความพยายามในการออกแบบ AChEI ที่มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงขึ้นแล้ว ยังมีแนวคิดในการออกแบบสารซึ่งในหนึ่งโมเลกุลมีฤทธิ์ต่อเป้าหมายอื่นที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิดโรค หรืออาการอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับโรค เช่น ฤทธิ์ monooxidase inhibitor (MAOI), serotonin transporter (SERT) inhibitors, calcium channel blockers, NO-donor, NMDA receptor antagonists, BACE1 inhibitor เป็นต้น สารที่มีแบบแผนในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่างในโมเลกุลเดียวเหล่านี้ เรียกว่า multi-target-directed ligands (MTDLs) โดยแนวทางการออกแบบ MTDL ได้แก่ การเชื่อมต่อระหว่าง AChEI กับสารที่มีฤทธิ์ต้านกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับสรีรวิทยาของการเกิดโรค หรือการทำอนุพันธ์ลูกผสม (hybrid molecule) โดยอนุพันธ์ลูกผสม หมายถึง สารที่ได้จากการนำ pharmacophore ของสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกันตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปมารวมกันเป็นโมเลกุลใหม่ โดยมุ่งหวังให้สารใหม่ที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเช่นเดียวกับสารต้นแบบ (Muñoz-Torrero, D., and Camps, P., 2006, Cavalli et.al., 2008)

AChEI ที่ออกฤทธิ์เป็น dual binding site inhibitors สามารถยับยั้งการเกิด  $A\beta$  aggregation และบริเวณ peripheral anionic site (PAS) ของ AChE มีบทบาทโดยตรงต่อการเกิด  $A\beta$  aggregation (Silman, I. and Sussman, J. L., 2005) จึงสามารถจัด AChEI ที่เป็น dual binding site inhibitors ว่าเป็น MTDL ได้เช่นกัน ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาสาร AChEI ตามแนวทางหลัก ๆ 3 แนวทาง ได้แก่ การพัฒนา AChEI ที่มี affinity ต่อ catalytic anionic site (CAS) การพัฒนา dual binding site inhibitors และ multitarget-directed ligands (MTDLs) ตัวอย่างของการพัฒนา AChEI แสดงดังรายละเอียดต่อไปนี้

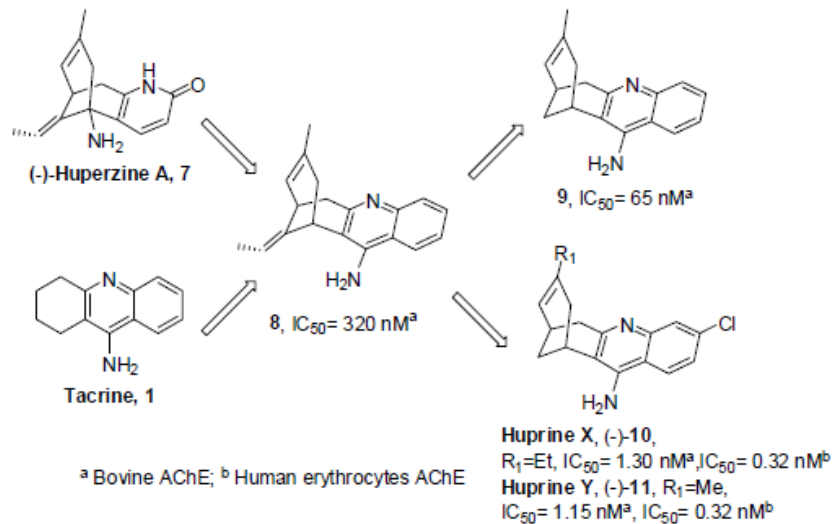
การพัฒนา AChEI จาก rivastigmine (3) ได้แก่ การทำ conformationally restricted analog เช่น tricyclic analog 4 และ 5 ซึ่งมีความแรงในการยับยั้ง human recombinant AChE สูงขึ้น (Bolognesi et.al., 2001 and Bolognesi et.al., 2004) นอกจากนี้ยังมีอนุพันธ์ 6 ซึ่งให้ผลเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และเพิ่มระดับ ACh ในสมอง ดังรูปที่ 7 (Chaudhaery et.al., 2010)



รูปที่ 7 Conformationally restricted analogs ของ rivastigmine

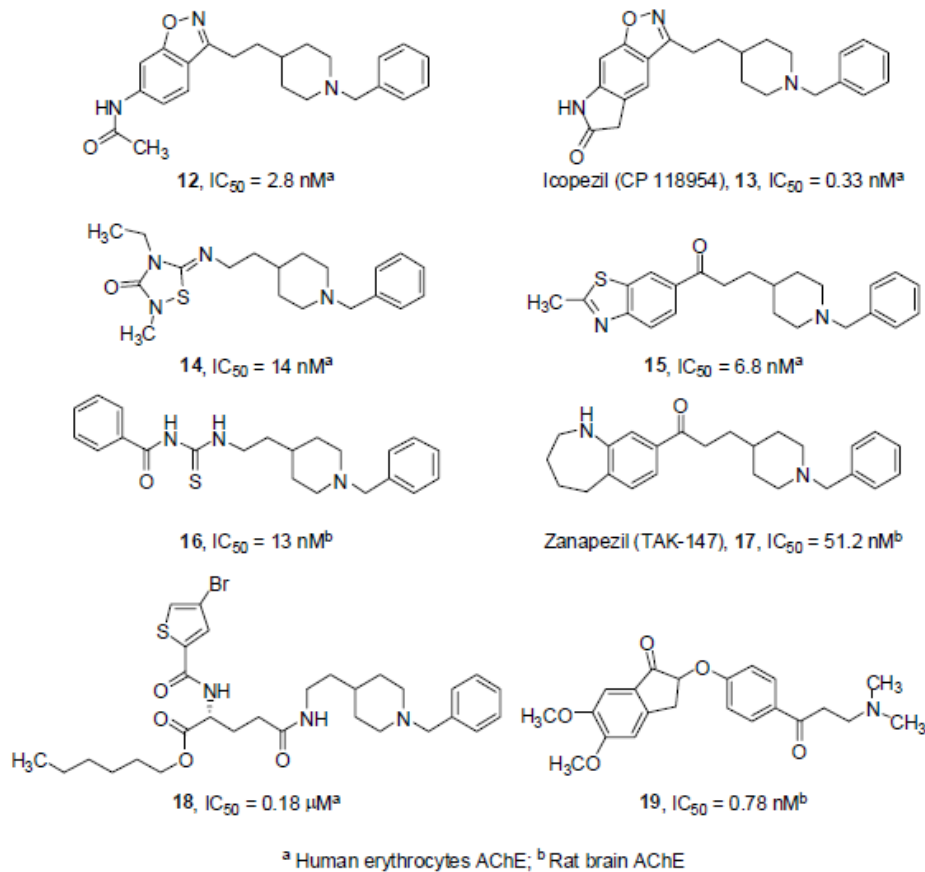
(-)-huperzine A (7) เป็นอัลคาลอยด์จาก *Huperzia serrata* เป็น AChEI ที่มีฤทธิ์แรง มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อ AChE ออกฤทธิ์ได้นานและมีฤทธิ์ neuroprotective มีการสังเคราะห์ tacrinehuperzine A hybrid โดยใช้ส่วน 4-aminoquinoline ในโครงสร้างของ tacrine กับวงแหวน carbobicyclic ของ huperzine A เรียกสารกลุ่มดังกล่าวว่า “Huprines” พบว่าสาร 8 มีความแรงในการออกฤทธิ์ต่ำกว่า tacrine และ huperzine A ในขณะที่ hybrid 9 มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่า tacrine และ huperzine A เป็น 2 เท่า และ 1.1 เท่า ตามลำดับ ดังรูปที่ 8 (Badia et.al., 1998)

การเติม Cl หรือ F หรือ CH<sub>3</sub> บนตำแหน่ง 1 และ/ หรือ 3 ทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์แรงขึ้น เช่น huprine X (10) และ huprine Y (11) ซึ่งมีความแรงของการออกฤทธิ์ยับยั้ง human AChE สูงกว่า tacrine และ (-)-huperzine A ถึง 600 และ 800 เท่า ตามลำดับ (Camps, P. and Muñoz-Torrero, D., 2001)



รูปที่ 8 แนวทางการออกแบบ tacrine-huperzine hybrids

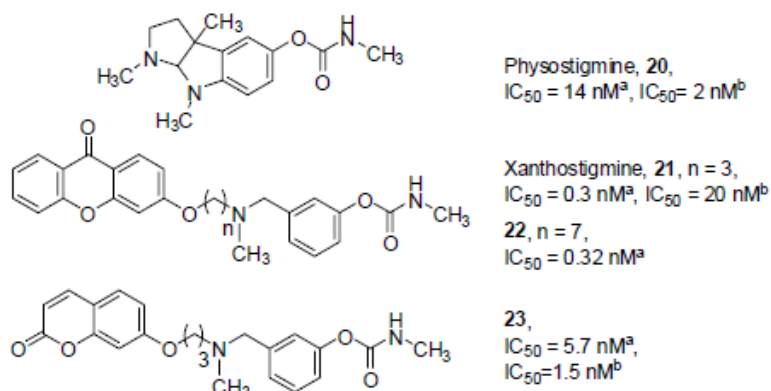
donepezil (4) ถูกใช้เป็นสารต้นแบบสำหรับพัฒนาอนุพันธ์ใหม่ ๆ ออกมาอีกหลายชนิด ได้แก่ อนุพันธ์ *N*-benzylpiperidines โดยมีการแทนที่ indanone ring ด้วย benzisoxazole (12) (Villalobos et.al., 1994) และ conformational restricted analogue (13, icopezil, CP118954) (Villalobos et.al., 1995) การแทนที่ indanone ring ด้วย heterocyclic ring อื่นๆ ทำให้ได้อนุพันธ์เช่น 1,2,4-thiadiazolidinone ring (14) thiazole ring (15) aroylthiourea moiety (16) tetrahydrobenzazepine (17, zanapezil, TAK-147)26 และอนุพันธ์ที่ได้จาก glutamic acid (18) นอกจากนี้ ยังมีอนุพันธ์ของ indanone ได้แก่ สาร 19 (รูปที่ 9) อนุพันธ์เหล่านี้ ล้วนแล้วแต่มีความแรงในการออกฤทธิ์ในระดับนาโนโมลาร์ มีความจำเพาะเจาะจงต่อ AChE สูงกว่า BuChE และสามารถยับยั้งการเกิด A $\beta$  aggregation



### รูปที่ 9 อนุพันธ์ของ donepezil

จากยาต้นแบบ คือ physostigmine (20) มีการออกแบบ dual binding site inhibitor โดยการเชื่อมต่อโครงสร้าง aryl carbamate กับ xanthone ด้วย linker ที่มีความยาวต่าง ๆ ได้สาร xanthostigmine (21) ซึ่งมีความแรงในการยับยั้ง human AChE สูงกว่า physostigmine 46 เท่า molecular modeling แสดงให้เห็นว่า หมู่ carbamate อยู่ในบริเวณ active site ของ TcAChE และเกิดอันตรกิริยากับ catalytic triad<sup>29</sup> การเพิ่มความยาวของ linker สามารถเพิ่มการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง heterocyclic moiety กับบริเวณ PAS ได้อนุพันธ์ 22 ซึ่งมีความยาวของ alkoxy chain  $n = 7$  มีความแรงในการออกฤทธิ์ และความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้ง AChE สูงกว่า physostigmine นอกจากนี้ การใช้ heterocyclic ring อื่น เช่น coumarin มาแทนที่ xanthone พบว่าสาร 23 มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่ายาต้นแบบ ดังรูปที่ 10 (Rampa et.al., 2001)



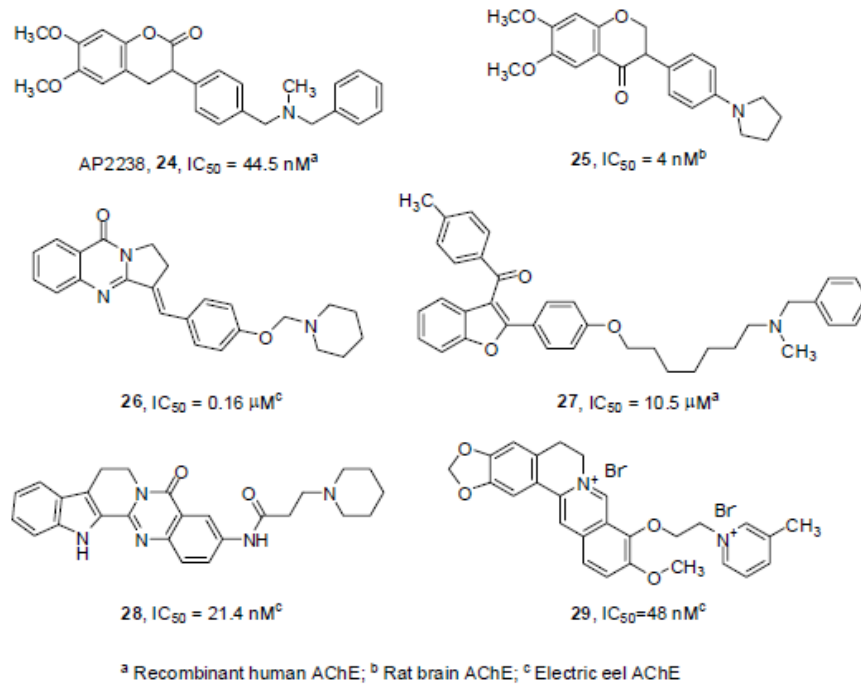


<sup>a</sup> Human erythrocytes AChE; <sup>b</sup> Rat brain AChE

### รูปที่ 10 แนวทางการออกแบบอนุพันธ์ physostigmine

จาก structure activities relationship (SAR) ของอนุพันธ์ donepezil พบว่า หมู่ benzylamino จำเป็นต่อการจับที่ CAS และ indanone ring จะช่วยการจับที่ PAS เนื่องจากในบริเวณ ส่วนกลางของ binding site gorge ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็น aromatic จึงมีการออกแบบอนุพันธ์ที่มี หมู่ phenyl บน spacer เพื่อเพิ่มอันตรกิริยากับส่วนกลางของ gorge ได้อนุพันธ์ คือ AP2238 (**24**) ซึ่งมีความแรงในการออกฤทธิ์ในระดับนาโนโมลาร์ จากการทำให้ docking simulation บนโครงสร้างของ human AChE พบว่าหมู่ phenyl บน spacer ช่วยเพิ่มการจับกับ AChE โดยเกิด  $\pi$ - $\pi$  stacking กับ Tyr341 และ OH- $\pi$  interaction กับ Tyr124 AP2238 มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อ AChE และสามารถยับยั้ง AChE-induced  $A\beta$ -aggregation ได้อีกด้วย (Piazzi et al., 2003)

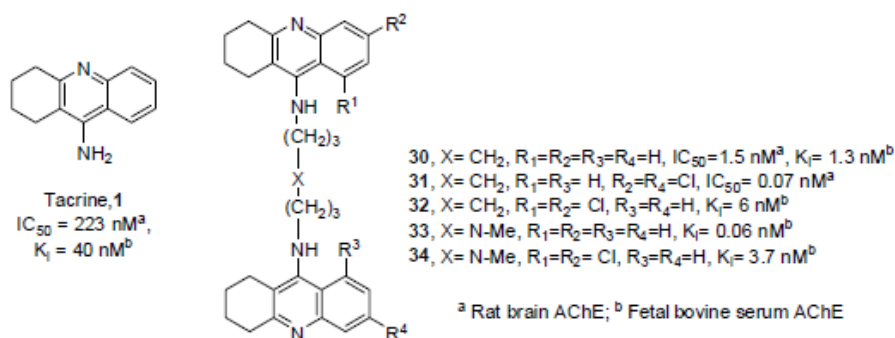
อนุพันธ์อื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติเป็น dual binding site AChEI ที่เกิดอันตรกิริยากับ mid gorge ได้แก่ อนุพันธ์ flavonoids (**25**) อนุพันธ์ isaindigotone (**26**) อนุพันธ์ benzofuran (**27**) อนุพันธ์ rutaecarpine (**28**) อนุพันธ์ berberine (**29**) (รูปที่ 11)



### รูปที่ 11 AP2238 และอนุพันธ์

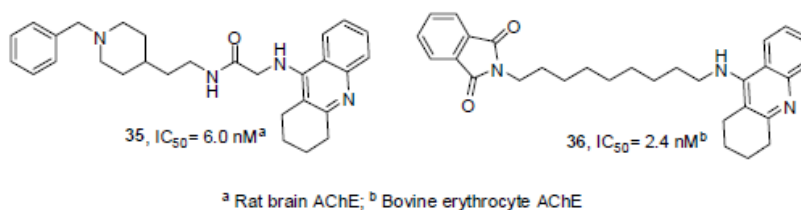
นอกจากการจับที่ CAS ซึ่งเป็น high affinity site แล้ว tacrine (1) ยังมี affinity อย่างอ่อนกับ amino acid หลายชนิดในบริเวณ PAS อีกด้วย dimer ของ tacrine ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วย linker ที่มีความยาวเหมาะสมน่าจะสามารถจับกับ AChE ในบริเวณ binding site ทั้งสองพร้อมกัน ซึ่งจะทำได้สารที่มีความแรงและความจำเพาะต่อการยับยั้งเอนไซม์สูงขึ้น นอกจากนี้ การเชื่อมต่อลิแกนด์ทั้งสองเข้าด้วยกันจะทำให้ลดการสูญเสีย entropy ที่อาจเกิดในระหว่างการจับอย่างอิสระของลิแกนด์เดี่ยวจำนวน 2 โมเลกุลได้ จึงน่าจะทำให้สารในรูป dimer มี affinity ในการจับ AChE สูงขึ้น bis-ligand ส่วนใหญ่ มี potency สูงกว่าลิแกนด์เดี่ยวที่เป็นต้นแบบ

bis(7)-tacrine (30) มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงที่สุด โดยฤทธิ์แรงกว่า tacrine ถึง 149 เท่า และมี selectivity ต่อ AChE สูงกว่า tacrine 250 เท่า ในทำนองเดียวกัน dimer ของอนุพันธ์ tacrine เช่น สาร 31-34 ก็มีฤทธิ์ระดับนาโนโมลาร์ ดังรูปที่ 12 (Carlier et.al., 1999)



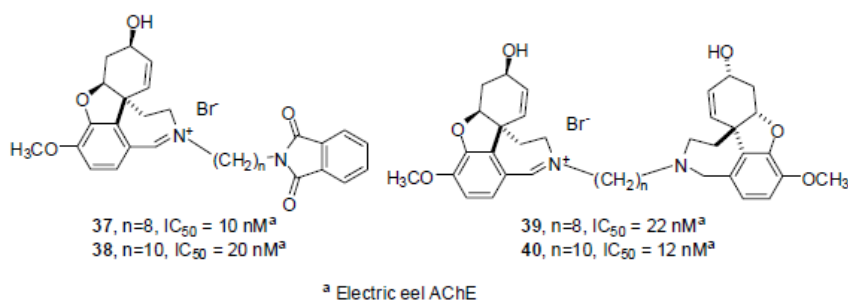
### รูปที่ 12 Tacrine dimers

การเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของ tacrine กับ *N*-benzylpiperidine moiety ของ donepezil (สาร 35) ได้สารที่มีความแรงต่ำกว่า donepezil เล็กน้อย แต่มีความแรงสูงกว่า tacrine 37 เท่า และ มี selectivity สูงกว่า tacrine 31 เท่า 39 นอกจากนี้ สาร 36 ซึ่งได้จากการเปลี่ยน indanone ring ของ donepezil เป็น phthalimide ก็พบว่าสารเป็น dual binding site inhibitor ที่มีฤทธิ์แรงเช่นเดียวกัน ดังรูปที่ 13 (Alonso et.al., 2005)



รูปที่ 13 Tacrine-donepezil heterodimers

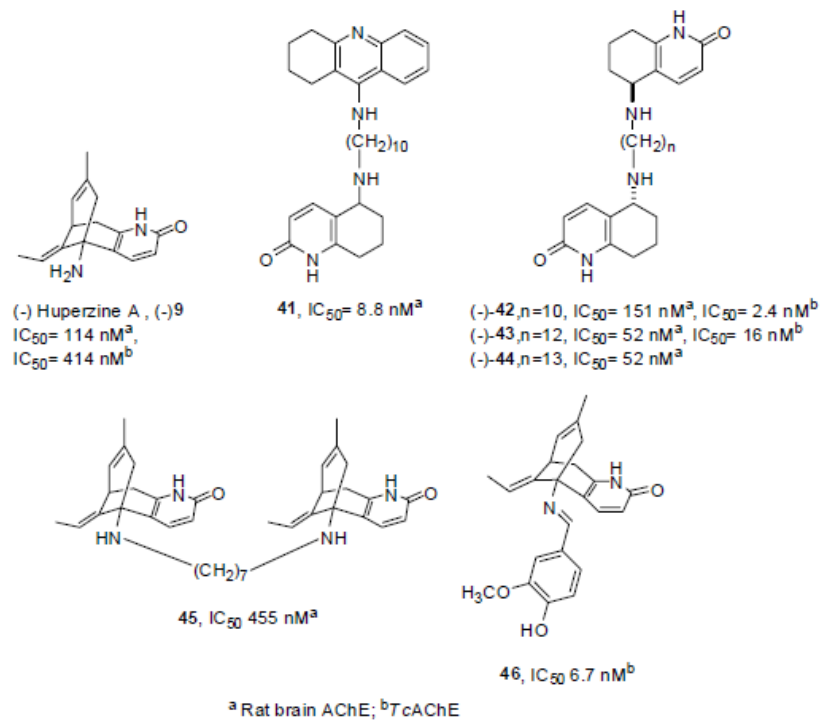
homo and heterodimers ของ galantamine (2) (สาร 37-40) (Guillou et.al., 2000) มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่า galantamine 16-36 เท่า (รูปที่ 14) สารที่มีหมู่ iminium ในโครงสร้างจะมีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่าสารที่ไม่มีประจุ คาดว่าเนื่องมาจากหมู่ iminium สามารถเกิด cation- $\pi$  interactions กับวงแหวน aromatic ของ amino acid residues ภายใน gorge ของ AChE อย่างไรก็ตาม การมีประจุบวกถาวรบนโครงสร้างของสารอาจขัดขวางการดูดซึมเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางจึงอาจเป็นข้อจำกัดในการพัฒนาสารในกลุ่มนี้ไปเป็นยาต้านอัลไซเมอร์ต่อไป



รูปที่ 14 Galantamine-based bis ligands

เนื่องจาก huperzine A (7) มีราคาแพง และมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ในการสังเคราะห์ dimer จึงมีการตัดทอนโครงสร้างเหลือเพียงส่วนของ 5-amino-5,6,7,8-tetrahydro-2(1*H*)-quinolinone fragment ที่เรียกว่า “hupyridone” แม้ว่า hupyridone มีความแรงต่ำในการยับยั้ง AChE แต่การทำ dimer ของสารนี้ กับ tacrine โดยเชื่อมต่อกันด้วย decamethylene chain ทำให้ได้สารที่มีความแรงในการยับยั้ง

AChE สูงขึ้น เช่น สาร **41** มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่า (-)-huperzine A และ tacrine 13 และ 25 เท่าตามลำดับ ดังรูปที่ 15 (Carlier et.al., 1999b)



รูปที่ 15 Huperzine A – based bis-ligands

ความแรงในการออกฤทธิ์ของ huperzine homodimers สัมพันธ์กับความยาวของ linker แต่ความยาวของ linker ที่เหมาะสมในการยับยั้ง rat brain AChE กับ TcAChE มีค่าแตกต่างกัน โดยพบว่า dimer (-)-**42** มีความแรงในการยับยั้ง rat brain AChE ต่ำกว่า (-)-huperzine A เล็กน้อย ในขณะที่ (-)-**43** และ (-)-**44** มีความแรงในการยับยั้ง rat brain AChE สูงกว่า (-)-huperzine A ประมาณ 2 เท่า และสูงกว่า huperzine ถึง 10000 เท่า ในทางตรงกันข้าม สาร (-)-**42** มีความแรงในการยับยั้ง TcAChE สูงกว่าสาร (-)-**43** และ (-)-huperzine A ประมาณ 7 เท่า และ 170 เท่า ตามลำดับ ความแตกต่างของความแรงในการออกฤทธิ์อธิบายได้ว่า เนื่องมาจากความแตกต่างของ AChE ในแต่ละสปีชีส์ เช่น rat AChE จะมีขนาดของ gorge ที่เล็กกว่าของ *Torpedo californica*<sup>44</sup> อย่างไรก็ดี การทำ homodimer ของ huperzine A เช่น สารหมายเลข **45** ทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ต่ำกว่า (-)-huperzine A ในรูป monomer ถึง 6 เท่า อนุพันธ์อื่นๆของ huperzine A ได้แก่ schiff base ของ huperzine A (**46**)

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

### 1) เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

การสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารกลุ่ม diheteroarylaryl-methanes ในการใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (ChE-Is) เป็นองค์ความรู้ใหม่ในด้านการค้นพบสารกลุ่มใหม่ที่สามารถใช้เป็นยารักษาอัลไซเมอร์ ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้จะเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้ และมีความเป็นไปได้ที่จะนำองค์ความรู้ที่ได้ไปต่อยอดเพื่อนำไปสู่การพบสารกลุ่มใหม่ ที่เป็นทางเลือกในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ที่มีประสิทธิภาพทั้งในการรักษาอาการ และชะลอการดำเนินไปของโรคต่อไปในอนาคต

### 2) บริการความรู้แก่ประชาชน

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการค้นพบสารกลุ่ม diheteroarylaryl-methanes ซึ่งเป็นสารกลุ่มใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส และเป็นพื้นฐานองค์ความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอดและผลิตเป็นยารักษาอัลไซเมอร์ชนิดใหม่ได้ และสามารถให้ความรู้ความเข้าใจแก่ประชาชนทั่วไปโดยทำการเผยแพร่ผ่านสื่อต่างๆ เช่น รายการวิทยุเพื่อประชาชน และวารสารต่างๆ

### 3) บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ และนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

อนุพันธ์ของสาร diheteroarylaryl-methanes ที่สังเคราะห์ได้อาจจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ดีในระดับเดียวกันหรือสูงกว่ายาแกแลนทามีน แต่มีผลข้างเคียงลดลงหรือไม่ มีผลข้างเคียง ทำให้สามารถใช้สารกลุ่มนี้เป็นยาทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ หลังจากจดสิทธิบัตรแล้วสามารถให้ข้อมูลแก่ภาคธุรกิจได้แก่ องค์กรเภสัชกรรม หรือ บริษัทยา เพื่อนำไปผลิตเป็นสูตรยาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

### 4) เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

ประชากรทั่วไปของประเทศไทยโดยเฉพาะผู้สูงอายุที่มีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคอัลไซเมอร์มาก จะสามารถได้ใช้ยาที่มีคุณภาพมากกว่าเดิม และผลข้างเคียงน้อยลง นอกจากนี้ในโครงการวิจัยนี้เมื่อแล้วเสร็จคาดว่าจะสามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ภายใต้การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาและเป็นโครงการวิจัยย่อยแก่นิสิตระดับปริญญาตรี

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ได้แก่ สถาบันการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านชีวเคมี เภสัชเคมี เช่น คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ในการนำผลการศึกษาไปศึกษาต่อยอด และองค์การเภสัชกรรม หรือ หน่วยงาน บริษัทอุตสาหกรรมยา ในการนำไปพัฒนาเป็นสูตรยา

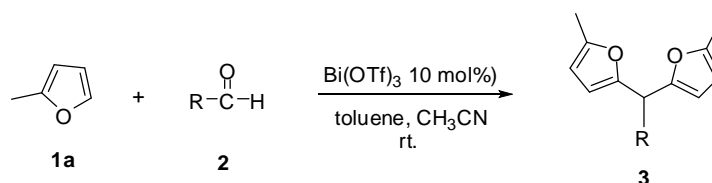
## บทที่ 2

### วิธีการทดลอง

#### 1. การสังเคราะห์สาร diheteroaryl(methanes) ชนิดต่างๆ

##### 1.1 การสังเคราะห์ difuryl(methanes) ชนิดต่างๆ

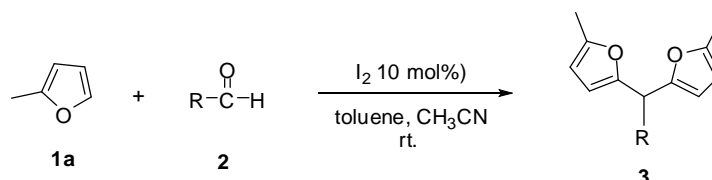
##### General procedure A



ซึ่ง 2-Methylfuran (**1a**) (2.0 mmol) และ Aldehyde (1.0 mmol) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลาย Toluene (1.00 mL) (ในบางกรณีสารตั้งต้นไม่ละลาย จะเติม Acetonitrile 0.5 mL เพื่อช่วยในการละลาย) จากนั้นเติม  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  10 mol% ปิดหลอดทดลองด้วย septum คนสารตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยเปรียบเทียบกับ Aldehyde ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายอิ่มตัวของ  $\text{NaHCO}_3$  ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย EtOAc ( $3 \times 10$  mL) ตามด้วย น้ำ (10 mL) และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น EtOAc มาทำให้แห้งด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydrous นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product

นำ crude product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค radial chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย Hexane (50 mL) ตามด้วย 5%, 10%, 20% และ 70% EtOAc ใน Hexane ตามลำดับ เพื่อแยกสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมา นำ fraction ของผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump

##### General procedure B

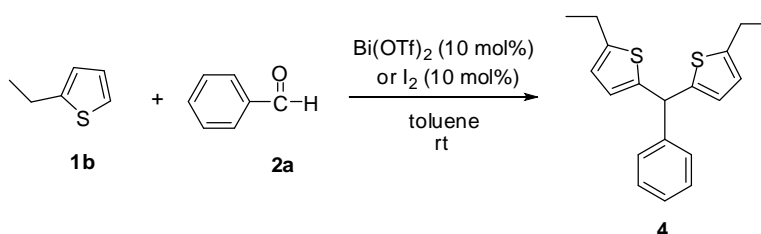


ซึ่ง 2-Methylfuran (**1a**) 0.18 g (2.0 mmol) และ Aldehyde (1.0 mmol) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลาย Toluene (1.00 mL) (ในบางกรณีสารตั้งต้นไม่ละลาย จะเติม Acetonitrile 0.5 mL เพื่อช่วยในการละลาย) จากนั้นเติมไอโอดีน 10 mol% ปิดหลอดทดลองด้วย septum คนสาร

ตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยเปรียบเทียบกับ Aldehyde ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดเติมสารละลายอิมตัวของ  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  เพื่อกำจัดไอโอดีน ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย EtOAc ( $3 \times 10$  mL) ตามด้วยสารละลายอิมตัวของ  $\text{NaHCO}_3$  (10 mL) น้ำ (10 mL) และสารละลายอิมตัวของ NaCl (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น EtOAc มาทำให้แห้งด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydrous นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product

นำ crude product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค radial chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย Hexane (50 mL) ตามด้วย 5%, 10%, 20% และ 70% EtOAc ใน Hexane ตามลำดับ เพื่อแยกสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมา นำ fraction ของผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump

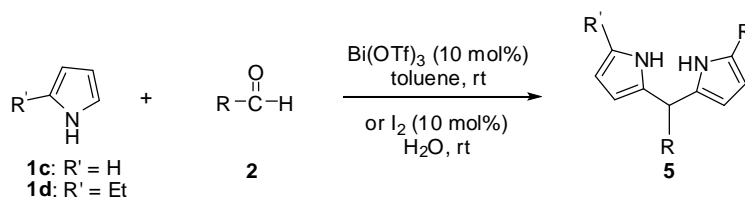
## 1.2 การสังเคราะห์ dithienylarylmethanes ชนิดต่างๆ



ซึ่ง 2-Methylthiophene (**1b**) (2.0 mmol) และ Benzaldehyde (1.0 mmol) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลาย Toluene (1.00 mL) จากนั้นเติมไอโอดีน 10 mol% ปิดหลอดทดลองด้วย septum คนสารตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยเปรียบเทียบกับ Benzaldehyde ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดเติมสารละลายอิมตัวของ  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  เพื่อกำจัดไอโอดีน ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย EtOAc ( $3 \times 10$  mL) ตามด้วยสารละลายอิมตัวของ  $\text{NaHCO}_3$  (10 mL) น้ำ (10 mL) และสารละลายอิมตัวของ NaCl (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น EtOAc มาทำให้แห้งด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydrous นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product

นำ crude product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค radial chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย Hexane (50 mL) ตามด้วย 5%, 10%, 20% และ 70% EtOAc ใน Hexane ตามลำดับ เพื่อแยกสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมา นำ fraction ของผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump

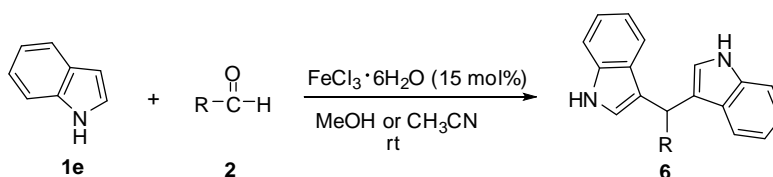
### 1.3 การสังเคราะห์ dipyrrolylarylmethanes ชนิดต่างๆ



ซึ่ง Pyrrole (**1c**) (2.0 mmol) หรือ 2-Ethylpyrrole (2.0 mmol) และ Aldehyde (1.0 mmol) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลาย toluene (1.00 mL) จากนั้นเติม Bi(OTf)<sub>3</sub> 10 mol% (หรือเติมตัวทำละลาย H<sub>2</sub>O (1.00 mL) จากนั้นเติมไอโอดีน 10 mol%) ปิดหลอดทดลองด้วย septum คนสารตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยเปรียบเทียบกับ Aldehyde ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดเติมสารละลายอิมตัวของ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> เพื่อกำจัดไอโอดีน ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย EtOAc (3×10 mL) ตามด้วยสารละลายอิมตัวของ NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) น้ำ (10 mL) และสารละลายอิมตัวของ NaCl (10 mL) ตามลำดับ นำชั้น EtOAc มาทำให้แห้งด้วย Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydrous นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product

นำ crude product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค radial chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย Hexane (50 mL) ตามด้วย 5%, 10%, 20% และ 70% EtOAc ใน Hexane ตามลำดับ เพื่อแยกสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมา นำ fraction ของผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump

### 1.4 การสังเคราะห์ diindolylarylmethanes ชนิดต่างๆ



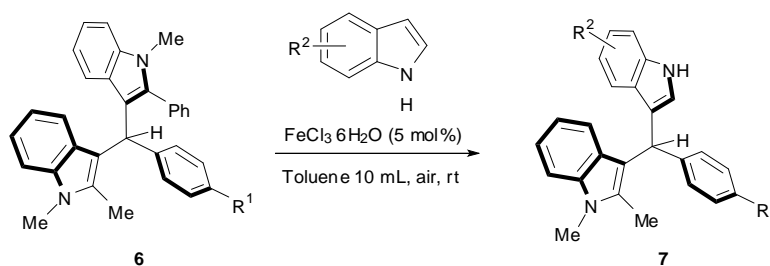
ซึ่ง Indole (**1e**) (2.0 mmol) และ Aldehyde (1.0 mmol) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลาย CH<sub>3</sub>CN (10.00 mL) (ในบางกรณีที่สารตั้งต้นไม่ละลายใน CH<sub>3</sub>CN จะเปลี่ยนไปใช้ MeOH เป็นตัวทำละลาย) จากนั้นเติม FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 15 mol% ปิดหลอดทดลองด้วย septum คนสารตลอดเวลาด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยเปรียบเทียบกับ Aldehyde ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายอิมตัวของ NaHCO<sub>3</sub> ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย EtOAc (3×10 mL) ตามด้วย น้ำ (10 mL) และสารละลายอิมตัวของ NaCl (10 mL)



ตามลำดับ นำขึ้น EtOAc มาทำให้แห้งด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydrous นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product

นำ crude product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค radial chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย Hexane (50 mL) ตามด้วย 5%, 10%, 20% และ 70% EtOAc ใน Hexane ตามลำดับ เพื่อแยกสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมา นำ fraction ของผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump

### 1.5 การสังเคราะห์ diindolylmethanes แบบไม่สมมาตรชนิดต่างๆ



#### General procedure

ซึ่ง diindolylmethanes (**6**) (0.5 mmol), ซึ่งอนุพันธ์ indole (0.5 mmol) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 50 mL เติมตัวทำละลาย toluene 10.00 mL ปิดขวดก้นกลมด้วย septum คนเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5 mol% ใส่ขวดก้นกลมปิดขวดก้นกลมด้วย septum คนให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดเติมสารละลายอิ่มตัวของ  $\text{NaHCO}_3$  ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate (2x20 mL) ตามด้วย น้ำ (10 mL) และสารละลายอิ่มตัวของ  $\text{NaCl}$  (10 mL) ตามลำดับ นำขึ้น Ethyl acetate มาทำให้แห้งด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydrous นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ crude product

## 2. การพิสูจน์หาเอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้เพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างที่แท้จริงโดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ <sup>1</sup>H- และ <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy IR spectroscopy High Resolution Mass spectroscopy และ อื่นๆ

## 3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส

การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรส ถูกวิเคราะห์และติดตามผลด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรีโดยใช้ อะซีทิลไธโอโคลีน ไอโอไดด์ เป็นสารตั้งต้น โดยวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ปรับปรุงมาจากวิธีการของ Ellman (Ellman et. al., 1961) การทดลองจะใช้ถาดหลุมชนิด 96 หลุม โดยเริ่มแรกใส่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 140 มิลลิลิตร ตามด้วย 20 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ โคลิเนสเทอเรส (0.2 U/mL) และ 20 มิลลิลิตรของสารตัวอย่างที่ละลายใน 80% เมทานอล จากนั้นบ่มสารผสมดังกล่าวเป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายเติม 20 มิลลิลิตรของสารละลายผสม 5 มิลลิโมลาร์ สารละลาย 5,5'-ไดโรโอปิซ[2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด] ที่มีโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) อยู่ 0.1% และ 5 มิลลิโมลาร์ สารละลายอะซีทิลโคลิเนส ไอโอดัด ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiter plate reader (Sunrise, Tecan) ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลิเนสเทอเรส โดยใช้ กาแลนทามีน เป็นสารอ้างอิงมาตรฐาน และทุกๆ การทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง

#### 4 ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร diheteroarylarylmethanes ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิทิล และบิวทิลริล โคลิเนสเทอเรส เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอซิทิลและบิวทิลริลโคลิเนสเทอเรสของอนุพันธ์สาร diheteroarylarylmethanes ที่ได้จากกิจกรรมส่วนที่ 3 ในการดำเนินการต่อไปจะเลือกโครงสร้างที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุด มาเป็นโครงสร้างหลักเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงขึ้น ใกล้เคียงหรือดีกว่ายา กาแลนทามีนแต่ไม่มีฤทธิ์ข้างเคียง

### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

เนื่องจากโครงการวิจัยดังกล่าวเป็นโครงการวิจัยต่อเนื่อง 2 ปี โดยในปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 (1 ตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2559) เป็นโครงการวิจัยปีที่ 2 ซึ่งการดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ส่วน

**กิจกรรมส่วนที่ 1** การสังเคราะห์สาร diheteroarylmethanes ชนิดต่างๆ

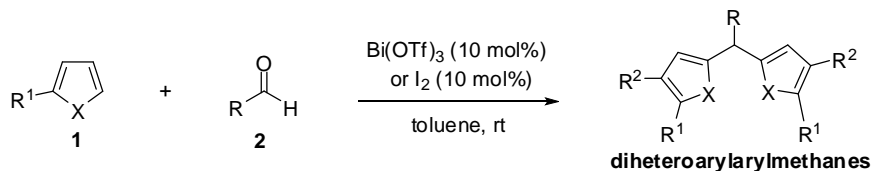
**กิจกรรมส่วนที่ 2** การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้

**กิจกรรมส่วนที่ 3** การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส

**กิจกรรมส่วนที่ 4** ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร diheteroarylmethanes ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิทิล และบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด

โดยในปีที่ 1 (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558) ทีมวิจัยได้ประสบความสำเร็จในการสารกลุ่ม diheteroarylmethanes จำนวน 4 กลุ่ม ได้แก่ 1,1-di(5-methylfuryl)-arylmethanes **3a-t**, 1,1-di(5-ethylthienyl)phenylmethane **4**, 1,1-di-(pyr-rolyl)arylmethanes **5a-c** และ 1,1-di(3-indolyl)arylmethanes (**6a-e**) ด้วยปฏิกิริยา bisarylation แบบขั้นตอนเดียวของสารตั้งต้นคือ 2-methylfuran, 2-ethylthiophene, pyrrole, 2-ethylpyrrole หรือ indole กับ aldehyde ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง โดยใช้  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  (10 mol%),  $\text{I}_2$  (10 mol%) หรือ  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (15 mol %) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ทำให้ได้ diheteroarylmethanes เป็นผลิตภัณฑ์จำนวน 29 โครงสร้าง ในร้อยละปานกลางถึงสูงมาก พิสูจน์โครงสร้างสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี จากนั้นได้นำสารสังเคราะห์ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้ปริมาณของแอซิทิลโคลีน (acetylcholine; ACh) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทลดลง ทำให้เป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 การสังเคราะห์และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ 1,1-di(5-methylfuryl)-arylmethanes **3a-t**, 1,1-di(5-ethylthienyl)phenylmethane **4** และ 1,1-di(pyrrolyl)aryl-methanes **5a-c**



**1a:** X = O, R<sup>1</sup> = Me R = alkyl, aryl, CO<sub>2</sub>Et

**1b:** X = S, R<sup>1</sup> = Et

**1c:** X = NH, R<sup>1</sup> = H, Et

**3a-t** (X = O, R<sup>1</sup> = Me, 17 to >99% yields)

**4** (X = S, R<sup>1</sup> = Et, 95 to 99% yields)

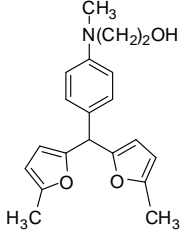
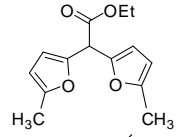
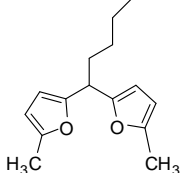
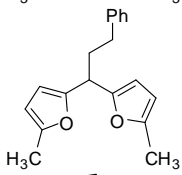
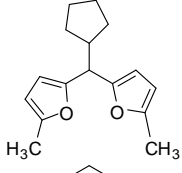
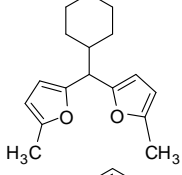
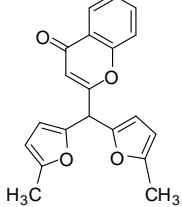
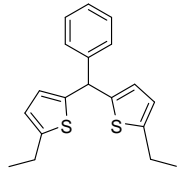
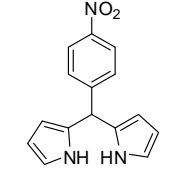
**5a-c:** X = NH, R<sup>1</sup> = H, Et, 60-89% yields)

Entry	Structure	Compounds	% Inhibition of anti-acetylcholinesterase
1		<b>3a</b>	11.03±0.10
2		<b>3b</b>	6.23±0.09
3		<b>3c</b>	4.29±0.13
4		<b>3d</b>	3.91±0.05
5		<b>3e</b>	3.20±0.15
6		<b>3f</b>	5.30±0.13

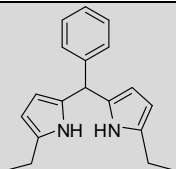
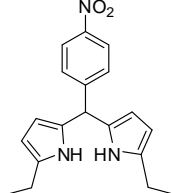
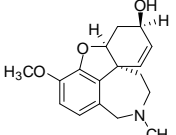
**ตารางที่ 1** การสังเคราะห์และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ 1,1-di(5-methylfuryl)-arylmethanes **3a-t**, 1,1-di(5-ethylthienyl)phenylmethane **4** และ 1,1-di(pyrrolyl)aryl-methanes **5a-c** (ต่อ)

Entry	Structure	Compounds	% Inhibition of anti-acetylcholinesterase
7		<b>3g</b>	6.23±0.10
8		<b>3h</b>	4.94±0.12
9		<b>3i</b>	17.40±0.16
10		<b>3j</b>	4.04±0.05
11		<b>3k</b>	6.65±0.05
12		<b>3l</b>	0.99±0.03
13		<b>3m</b>	8.52±0.10

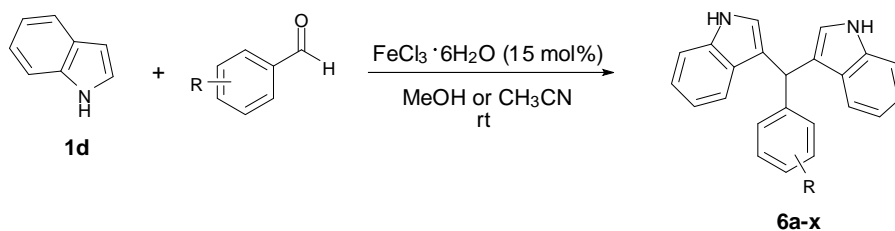
**ตารางที่ 1** การสังเคราะห์และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ 1,1-di(5-methylfuryl)-arylmethanes **3a-t**, 1,1-di(5-ethylthienyl)phenylmethane **4** และ 1,1-di(pyrrolyl)aryl-methanes **5a-c** (ต่อ)

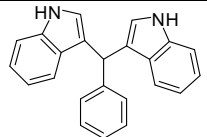
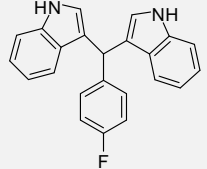
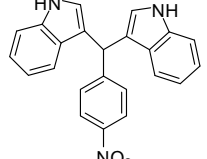
Entry	Structure	Compounds	% Inhibition of anti-acetylcholinesterase
14		<b>3n</b>	10.21±0.11
15		<b>3o</b>	10.57±0.05
16		<b>3p</b>	0.28±0.12
17		<b>3q</b>	3.04±0.13
18		<b>3r</b>	12.84±0.74
19		<b>3s</b>	4.53±0.14
20		<b>3t</b>	insoluble
21		<b>4</b>	10.84±0.17
22		<b>5a</b>	13.48±0.10

ตารางที่ 1 การสังเคราะห์และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ 1,1-di(5-methylfuryl)-arylmethanes **3a-t**, 1,1-di(5-ethylthienyl)phenylmethane **4** และ 1,1-di(pyrrolyl)aryl-methanes **5a-c** (ต่อ)

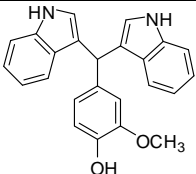
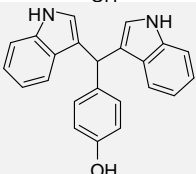
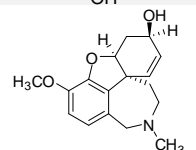
Entry	Structure	Compounds	% Inhibition of anti-acetylcholinesterase
23		<b>5b</b>	47.58±0.06
24		<b>5c</b>	10.74±0.19
25		Galantamine	100.98

ตารางที่ 2 การสังเคราะห์และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ 1,1-di(3-indolyl)aryl-methanes **6a-e**



Entry	Structure	Compounds	% Inhibition of anti-acetylcholinesterase
1		<b>6a</b>	0.65±0.14
2		<b>6b</b>	51.60±0.08
3		<b>6c</b>	0.20±0.08

**ตารางที่ 2** การสังเคราะห์และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ 1,1-di(3-indolyl)aryl-methanes **6a-e** (ต่อ)

Entry	Structure	Compounds	% Inhibition of anti-actylcholinesterase
4		<b>6d</b>	15.98±0.16
5		<b>6e</b>	73.11±0.11
25		Galantamine	100.98

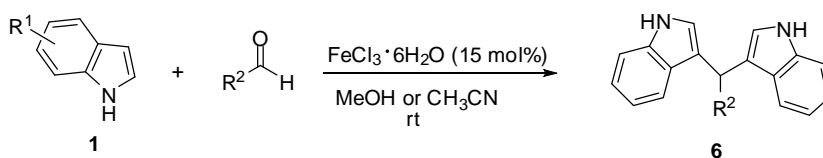
จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารกลุ่ม diheteroaryl-methanes ทั้ง 4 กลุ่ม ที่ออกแบบสังเคราะห์ขึ้นมา ได้แก่ กลุ่มที่ 1 สารอนุพันธ์ 1,1-di(5-methylfuryl)-arylmethanes **3a-t**, กลุ่มที่ 2 สารอนุพันธ์ 1,1-di(5-ethylthienyl)phenylmethane **4**, กลุ่มที่ 3 สารอนุพันธ์ 1,1-di(pyr-roly)arylmethanes **5a-c** และกลุ่มที่ 4 สารอนุพันธ์ 1,1-di(3-indolyl)-arylmethanes (**6a-e**) พบว่าสารกลุ่มที่ 4 ได้แก่ bis(3-indolyl)-4-hydroxyphenylmethane (**6e**) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสถึง 73.11±0.11 % ดังนั้น สาร bis(3-indolyl)-4-hydroxyphenylmethane (**6e**) น่าจะมีศักยภาพเป็น Lead compound เพื่อนำไปพัฒนาหรือปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ดีขึ้นได้ ในงานวิจัยปีที่ 2 จึงได้ปรับปรุงโครงสร้างสาร diheteroarylarylmethanes กลุ่มที่ 4 สารอนุพันธ์ 1,1-di(3-indolyl)-arylmethanes ชนิดต่างๆ ซึ่งจัดเป็นกิจกรรมที่ 4 ในแผนงานวิจัย

#### **กิจกรรมส่วนที่ 4** ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร diheteroarylarylmethanes ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิล และบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด

จากผลการศึกษาในปีที่ 1 พบว่าสารกลุ่มที่ 4 ได้แก่ bis(3-indolyl)-4-hydroxyphenylmethane (**6e**) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสถึง 73.11±0.11 % (**6e**) ในงานวิจัยปีที่ 2 จึงได้ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารกลุ่มที่ 4 เพื่อจุดมุ่งหวังที่จะพบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสที่สูงขึ้น โดยสังเคราะห์จากปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ indole (2 มิลลิโมล) กับ aldehyde ชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (15 mol%) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาในตัวทำละลาย MeOH,  $\text{CH}_3\text{CN}$  หรือ  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้ผลการทดลองแสดงดังในตารางที่ 3

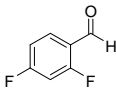
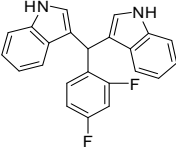
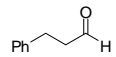
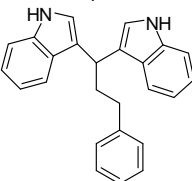
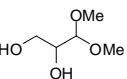
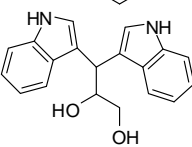
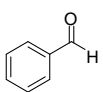
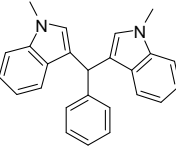
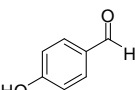
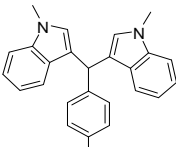
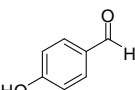
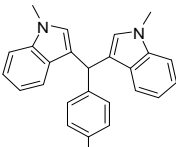
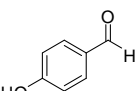
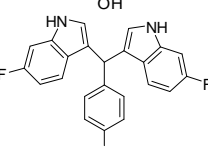
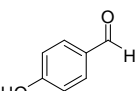
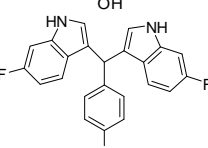
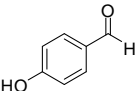
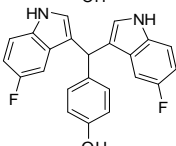
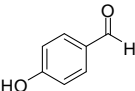
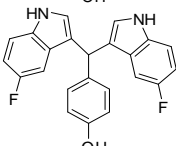
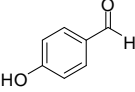
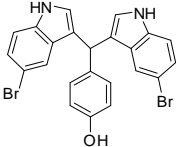
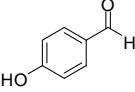
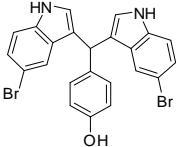
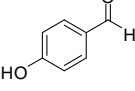
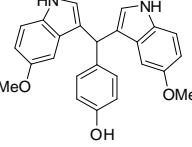
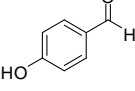
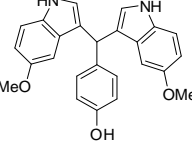
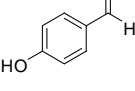
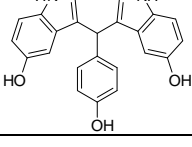


**ตารางที่ 3** การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร dihteteroarylmethanes กลุ่มที่ 4 ได้แก่ 3,3'-bis(indoyl)-methanes ชนิดต่างๆ ด้วยปฏิกิริยาระหว่างสารอนุพันธ์ indole กับ aldehyde ภายใต้สภาวะที่มี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

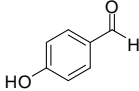
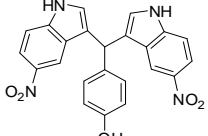
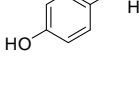
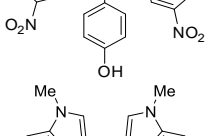
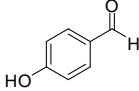
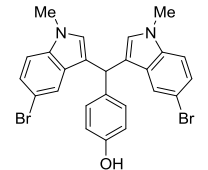
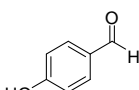
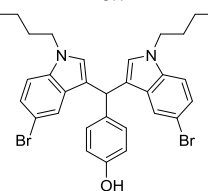
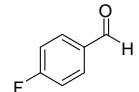
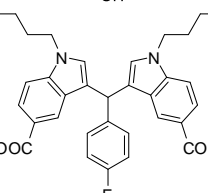
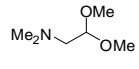
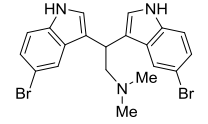
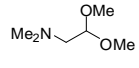
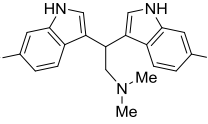


Entry	Aldehydes 2	Solvent	Time (min)	Products 6	%Yield	
1	2a	MeOH	10		6a	47
2	2a	$\text{CH}_3\text{CN}$	30		6a	>99
3	2b	MeOH	10		6b	8
4	2b	$\text{CH}_3\text{CN}$	10		6b	>99
5	2c	$\text{CH}_3\text{CN}$	30		6c	>99
6	2e	MeOH	30		6e	>99
7	2e	$\text{CH}_3\text{CN}$	24h		6e	72
8	2d	MeOH	10		6d	>99
9	2f	MeOH	30		6f	>99
10	2g	MeOH	60		6g	>99
11	2h	MeOH	30		6h	82
12	2h	$\text{CH}_3\text{CN}$	10		6h	84

**ตารางที่ 3** การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร dihteteroarylmethanes กลุ่มที่ 4 ได้แก่ 3,3'-bis(indoyl)-methanes ชนิดต่างๆ ด้วยปฏิกิริยาระหว่างสารอนุพันธ์ indole กับ aldehyde ภายใต้สภาวะที่มี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ต่อ)

Entry	Aldehydes 2	Solvent	Time (min)	Products 6	%Yield	
13		2i	$\text{CH}_3\text{CN}$	10		6i >99
14		2j	$\text{CH}_3\text{CN}$	60		6j 88
15		2k	$\text{CH}_3\text{CN}$	3h		6k 52 <sup>a</sup>
16		2a	$\text{CH}_3\text{CN}$	30		6l 96
17		2e	MeOH	60		6m 98
18		2e	$\text{CH}_3\text{CN}$	40		6m 98
19		2e	MeOH	240		6n 99
20		2e	$\text{CH}_3\text{CN}$	48h		6n 60
21		2e	MeOH	90		6o 89
22		2e	$\text{CH}_3\text{CN}$	48h		6o 25
23		2e	MeOH	6.5h		6p 96
24		2e	$\text{CH}_3\text{CN}$	48h		6p 75
25		2e	MeOH	10		6q >99
26		2e	$\text{CH}_3\text{CN}$	18h		6q 12
27		2e	MeOH	24h		6r 60

**ตารางที่ 3** การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร dihteteroarylmethanes กลุ่มที่ 4 ได้แก่ 3,3'-bis(indoyl)-methanes ชนิดต่างๆ ด้วยปฏิกิริยาระหว่างสารอนุพันธ์ indole กับ aldehydde ภายใต้สภาวะที่มี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ต่อ)

Entry	Aldehydes 2	Solvent	Time (min)	Products 6	%Yield		
28		2e	MeOH	48h		6s	35
29		2e	$\text{CH}_3\text{CN}$	48h		6s	45
30		2e	MeOH	60		6t	74
31		2e	MeOH	60		6u	74
32		2b	MeOH	60		6v	35
33		2l	DCE	12h		6w	52 <sup>b</sup>
34		2l	DCE	12h		6x	59 <sup>b</sup>

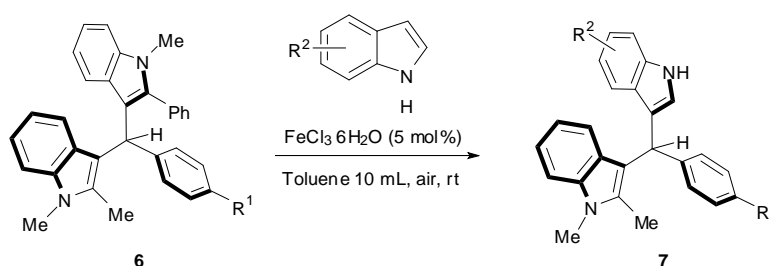
<sup>a</sup> สังเคราะห์โดยเติม D,L-glyceraldehyde diethyl acetal (0.5 mmol),  $\text{CH}_3\text{CN}$  (10 mL) และ  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 mol% ที่อุณหภูมิห้อง ตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลายอนุพันธ์อินโดล (1 mmol) และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

<sup>b</sup> สังเคราะห์โดยเติม (Dimethylamine)acetaldehyde dimethyl acetal (1 mmol),  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$  หรือ DCE (5 mL) และ  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$  (1.1 mmol) ที่อุณหภูมิ 0 °C ตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลายอนุพันธ์อินโดล (2 mmol) ในตัวทำละลาย  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$  (5 mL) ที่อุณหภูมิ 0 °C และค่อยๆ ทิ้งให้อุณหภูมิปฏิกิริยาเท่ากับอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

จากผลการทดลองในตารางที่ 3 จะเห็นว่าปฏิกิริยาของ indole กับ aromatic aldehyde ชนิดต่างๆ ทั้งที่มีหมู่ดึงอิเล็กตรอนและหมู่ให้อิเล็กตรอนต่ออยู่กับวงเบนซีนที่ตำแหน่ง para ของอัลดีไฮด์ ภายใต้สภาวะการทดลองที่มี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ในกรณีที่ aromatic aldehyde ไม่มีหมู่ไฮดรอกซี (OH) ปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีในตัวทำละลาย  $\text{CH}_3\text{CN}$  ขณะที่ถ้า aromatic aldehyde มีหมู่ไฮดรอกซี (OH) เกาะอยู่ในโมเลกุล ปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีในตัวทำละลาย MeOH

ทั้งนี้สามารถอธิบายได้ด้วยความสามารถในการละลาย ถ้าสารตั้งต้นที่นำมาทำปฏิกิริยาละลายได้ดีก็จะเกิดปฏิกิริยาได้ดี โดยในการทดลองสามารถได้ผลิตภัณฑ์เป็น 1,1-di(3-indolyl)arylmethanes **6a-x** ในเปอร์เซ็นต์ปานกลางถึงสูง (35 ถึง >99%)

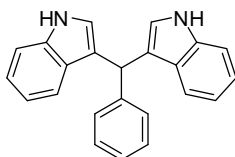
**ตารางที่ 4** การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร dihteteroarylmethanes กลุ่มที่ 5 ได้แก่ 3,3'-bis(indolyl)-methanes แบบไม่สมมาตรชนิดต่างๆ ด้วยปฏิกิริยาระหว่างสารอนุพันธ์ 3,3'-bis(indolyl)methanes แบบสมมาตรกับ aldehyde ภายใต้สภาวะที่มี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



Entry	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Time (min)	Products <b>6</b>	%Yield
1	H	OH	60		7a 69
2	OH	OH	60		7b 67
3	F	OH	60		7c 82
4	H	COOH	120		7d 62

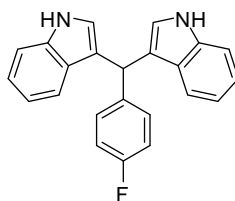
จากผลการทดลองในตารางที่ 4 จะเห็นว่าปฏิกิริยาของ indole กับ diindolylmethanes **6** ชนิดต่างๆ ทั้งที่มีหมู่ให้อิเล็กตรอน (OH) และหมู่ดึงอิเล็กตรอน (F) ต่ออยู่กับวงเบนซีนที่ตำแหน่ง para ภายใต้สภาวะการทดลองที่มี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ได้ผลิตภัณฑ์เป็น diindolylmethanes แบบไม่สมมาตร **7a-d** ในเปอร์เซ็นต์ปานกลางถึงสูง (62 ถึง 82%)

**กิจกรรมส่วนที่ 2** การพิสูจน์หาเอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีทาง spectroscopy  
โครงสร้างของสารประกอบ 3,3'-(phenylmethylene)bis(1*H*-indole) (**6a**)



สารประกอบ **6a**: ของแข็งสีส้ม;  $R_f = 0.27$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.80 (brs, 2H, 2xNH), 7.44 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.41-7.29 (m, 5H, 5xCH ของ aromatic), 7.27 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.22 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.06 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.62 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic) 5.93 (s, 1H, CH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  144.3 (C ของ aromatic), 136.9 (2xC ของ aromatic), 129.0 (2xCH ของ aromatic), 128.5 (CH ของ aromatic), 127.3 (2xC ของ aromatic), 126.4 (2xC ของ aromatic), 123.9 (2xCH ของ aromatic), 122.2 (2xCH ของ aromatic), 120.2 (2xCH ของ aromatic), 119.8 (2xCH ของ aromatic), 119.5 (2xCH ของ aromatic), 111.4 (2xCH ของ aromatic), 40.5 (CH); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  3414 (NH), 1601, 1493 และ 1456 (aromatic ring), 743 (CN indole)  $\text{cm}^{-1}$

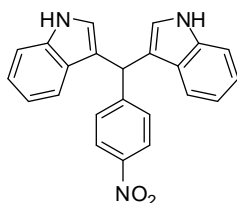
โครงสร้างของสารประกอบ 3,3'-((4-fluorophenyl)methylene)bis(1*H*-indole) (**6b**)



สารประกอบ **6b**: ของแข็งสีส้ม;  $R_f = 0.23$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.82 (brs, 2H, 2xNH), 7.42 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.39-7.29 (m, 4H, 4xCH ของ aromatic), 7.23 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.07 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.00 (t,  $J = 8.4$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.61 (sd,  $J = 1.5$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 5.91 (s, 1H, CH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  161.4 (d,  $J = 242$  Hz, CF ของ aromatic), 139.7 (2xC ของ aromatic), 136.7 (C ของ aromatic), 130.1 (2xCH ของ aromatic), 126.9 (2xC ของ aromatic), 123.5 (2xCH ของ aromatic), 122.0 (2xCH ของ aromatic), 119.8

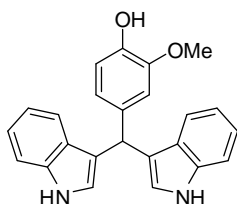
(2×CH ของ aromatic), 119.5 (2×C ของ aromatic), 119.3 (2×CH ของ aromatic), 114.9 (d,  $J = 21$  Hz, 2×CH-CF ของ aromatic), 111.1 (2×CH ของ aromatic), 39.4 (CH)

โครงสร้างของสารประกอบ 4,4'-((4-nitrophenyl)methylene)bis(*N,N*-dimethylaniline) (**6c**)



สารประกอบ **6c**: มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีส้ม;  $R_f = 0.15$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.17 (d, 2H,  $J = 8.7$  Hz, 2×CH ของ aromatic), 8.06 (br s, 2H, 2×NH), 7.53 (d, 2H,  $J = 8.7$  Hz, 2×CH ของ aromatic), 7.42 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz, 2×CH ของ aromatic), 7.34 (d, 2H,  $J = 7.4$  Hz, 2×CH ของ aromatic), 7.23 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz, 2×CH ของ aromatic), 7.05 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz, 2×CH ของ aromatic), 6.72 (d, 2H,  $J = 1.5$  Hz, 2×CH ของ indole), 6.02 (s, 1H, CH); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  3414 (NH), 1594, 1515, และ 1456 (aromatic ring) 1417, 1344, 1216, 1096, 742 (CN indole)  $\text{cm}^{-1}$

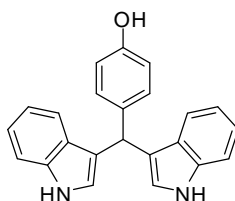
โครงสร้างของสารประกอบ 4-(di(1H-indol-3-yl)methyl)-2-methoxyphenol (**6d**)



สารประกอบ **6d**: ของแข็งสีน้ำตาลเงิน;  $R_f = 0.05$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, 2×CH ของ aromatic), 7.22-7.15 (m, 7H, 7×CH ของ aromatic), 6.72 (t, 4×CH ของ aromatic), 3.80 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, CH), 2.94 (sd,  $J = 2.0$  Hz, 12H, 2×N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.62 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.38-2.32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  146.6 (C ของ aromatic), 144.2 (C ของ aromatic), 137.0 (C ของ aromatic), 136.4 (C ของ aromatic), 127.4 (C ของ aromatic), 123.6 (2×C ของ aromatic), 122.1 (2×CH ของ aromatic), 121.7 (CH ของ aromatic), 120.3 (2×CH ของ aromatic), 120.1 (2×CH ของ aromatic), 119.4 (2×CH ของ aromatic), 114.3 (CH ของ aromatic), 111.9 (CH ของ aromatic), 111.1 (4×CH ของ aromatic),

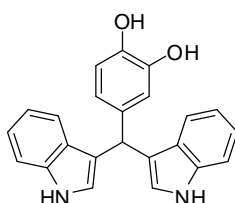
56.1 (OCH<sub>3</sub>), 40.1 (CH); IR (Film):  $\nu_{\max}$  3412 (NH), 1610, 1509 และ 1456 (aromatic ring), 1269 (C-O-CH<sub>3</sub>), 743 (CN indole) cm<sup>-1</sup>

โครงสร้างของสารประกอบ bis(3-indolyl)-4-hydroxyphenylmethane (**6e**)



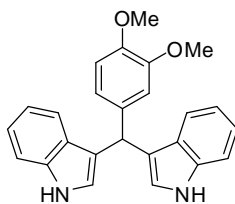
สารประกอบ **6e**: ของแข็งสีส้ม; m.p. 103-107 °C; R<sub>f</sub> = 0.31 (4:6 EtOAc/hexane); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.92 (br s, 2H, 2xNH), 7.39 (dd, *J* = 13.4 Hz, *J* = 8.1 Hz, 4H, ArH), 7.23-7.17 (m, 4H, ArH), 7.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, ArH), 6.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH), 6.67 (s, 2H, ArH), 5.85 (s, 1H, CHPh), 4.73 (br s, 1H, OH); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  153.7 (C), 136.6 (C), 136.3 (C), 129.7 (CH), 127.0 (C), 123.6 (CH), 121.8 (CH), 119.9 (CH), 119.8 (C), 119.1 (CH), 115.0 (CH), 111.1 (CH), 39.3 (CHPh); IR (Nujol-mull):  $\nu_{\max}$  3410 (N-H), 1698, 1611, 1509, 1456, 1416, 1337, 1217, 1169, 1093, 1010, 786, 745 cm<sup>-1</sup>; Compound is literature known, see: [Oclarit, J. M.; Ohta, S.; Kamimura, K.; Yamaoka, Y.; Shimizu, T.; Ikegami, S. (1994). *Nat. Prod. Lett.*, 4, 309.]

โครงสร้างของสารประกอบ 4-(di(1H-indol-3-yl)methyl)benzene-1,2-diol (**6f**)



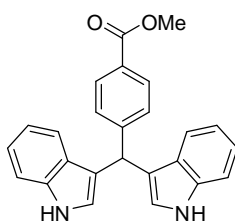
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.94 (brs, 2H, 2xNH), 7.39 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.01 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.81-6.79 (m, 3H, 3xCH ของ aromatic), 6.66 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 5.78 (s, 1H, CH); IR (Film):  $\nu_{\max}$  3411, 1698, 1608, 1513, 1456, 1418, 1338, 1279, 1218, 1189, 1094, 745 cm<sup>-1</sup>

โครงสร้างของสารประกอบ 3,3'-[(3,4-dimethoxyphenyl)methylene]bis(1H-indole) (**6g**)



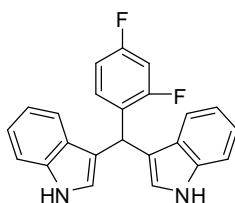
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO) :  $\delta$  10.80 (s, 2H, 2xNH), 7.36 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.32 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.04 (t,  $J = 8.0$  Hz, 3H, 3xCH ของ aromatic), 6.90-6.84 (m, 6H, 6xCH ของ aromatic), 5.79 (s, 1H, CH), 3.71 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.66 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  3410, 1592, 1509, 1456, 1417, 1338, 1265, 1248, 1137, 1093, 1025, 743  $\text{cm}^{-1}$

โครงสร้างของสารประกอบ methyl 4-(di(1H-indol-3-yl)methyl)benzoate (**6h**)



IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  3350 (NH), 1719 (C=O), 1609, 1519 และ 1457 (aromatic ring), 1281 (C-O- $\text{CH}_3$ ), 747 (CN indole)  $\text{cm}^{-1}$

โครงสร้างของสารประกอบ 3,3'-[(2,4-difluorophenyl)methylene]bis(1H-indole) (**6i**)

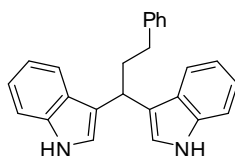


$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.80 (brs, 0.82H, 2xNH), 7.42 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.37 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.23-7.14 (m, 3H, 3xCH ของ aromatic), 7.06 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.88 (t,  $J = 9.0$  Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.75 (t,  $J = 9.0$  Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.68 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic) 6.20 (s,



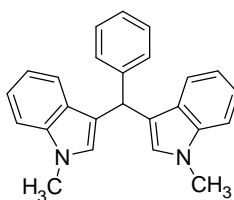
1H, CH); IR (Film):  $\nu_{\max}$  3414, 1618, 1605, 1499, 1456, 1420, 1338, 1278, 1137, 1092, 743  $\text{cm}^{-1}$

โครงสร้างของสารประกอบ 3,3'-(3-phenylpropane-1,1-diyl)bis(1H-indole) (6j)

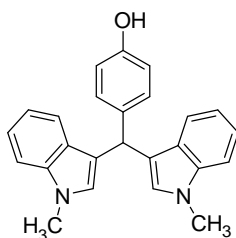


ของแข็งสีน้ำตาล; m.p. 159-163 °C;  $R_f = 0.38$  (3:7 EtOAc/ hexane);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.96 (br s, 2H, 2xNH), 7.57 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, ArH), 7.37 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, ArH), 7.32-7.28 (m, 2H, ArH), 7.22-7.16 (m, 5H, ArH), 7.07-7.04 (m, 4H, ArH), 4.54 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2.76 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2.58 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  142.9, 136.9, 128.9, 128.6, 127.4, 126.0, 122.1, 121.8, 120.4, 120.0, 119.4, 111.4, 37.7, 34.8, 33.8; IR (Nujol-mull):  $\nu_{\max}$  3416 (N-H), 1495, 1456, 1419, 1337, 1221, 1094, 1011, 742, 701  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  373.1681, found 373.1681.

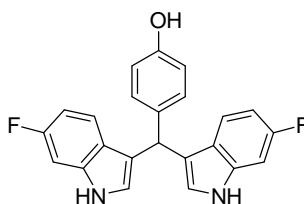
โครงสร้างของสารประกอบ 3,3'-(phenylmethylene)bis(1-methyl-1H-indole) (6l)



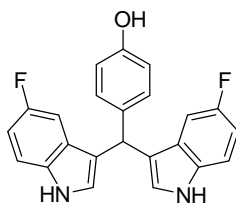
ของแข็งสีส้ม;  $R_f = 0.59$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.44-7.35 (m, 4H, 4XCH ของ aromatic), 7.35-7.27 (m, 4H, 4XCH ของ aromatic), 7.23 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H, 3XCH ของ aromatic), 7.03 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H, 2XCH ของ aromatic), 6.56 (s, 2H, 2XCH, ของ aromatic), 5.91 (s, 1H, CH), 3.71 (s, 6H, 2XNCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  144.4 (C ของ aromatic), 137.4 (2XC ของ aromatic), 128.7 (2XCH ของ aromatic), 128.2 (2XCH ของ aromatic), 127.4 (2XC ของ aromatic), 126.0 (CH ของ aromatic), 121.4 (2XCH ของ aromatic), 120.0 (2XCH ของ aromatic), 118.6 (2XCH ของ aromatic), 118.2 (2XC ของ aromatic), 109.0 (2XCH, 2XCH ของ aromatic), 40.1 (CH), 32.6 (2XNCH<sub>3</sub>)

โครงสร้างของสารประกอบ 4-(bis(1-methyl-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**6m**)

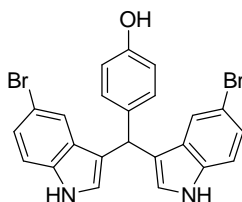
ของแข็งสีชมพู;  $R_f = 0.23$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.42-7.33 (m, 4H, 4XCH ของ aromatic), 7.32-7.25 (m, 4H, 4XCH ของ aromatic), 7.23 (t,  $J = 7.7$  Hz, 3H, 3XCH ของ aromatic), 7.02 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, 2XCH ของ aromatic), 6.56 (s, 2H, 2XCH, ของ aromatic), 5.91 (s, 1H, CH), 3.71 (s, 6H, 2XNCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO) :  $\delta$  155.8 (C ของ aromatic), 137.5 (2XC ของ aromatic), 135.5 (C ของ aromatic), 129.6 (2XCH ของ aromatic), 128.2 (2XC ของ aromatic), 127.5 (2XCH ของ aromatic), 121.4 (2XCH ของ aromatic), 119.8 (2XCH ของ aromatic), 118.7 (2XCH ของ aromatic), 118.5 (2XCH ของ aromatic), 115.3 (2XC ของ aromatic), 110.0 (2XCH, ของ aromatic), 39.1 (CH), 32.7 (2XNCH<sub>3</sub>); IR (Film):  $\mathbf{V}_{\max}$  3400, 2929, 1612, 1509, 1471, 1370, 1328, 1227, 1155, 1118, 740  $\text{cm}^{-1}$

โครงสร้างของสารประกอบ\_4-(bis(6-fluoro-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**6n**)

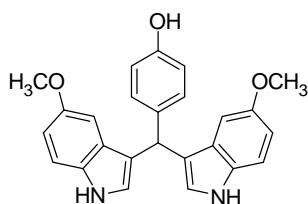
ของแข็งสีส้มแดง  $R_f = 0.10$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  7.87 (brs, 0.19H (H บางส่วนเกิดการ exchange กับ  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 2xNH), 7.19 (dd,  $J = 8.6, 5.4$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.12 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.03 (d,  $J = 10.0$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.72 (t,  $J = 8.5$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.66 (t,  $J = 9.2$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.61 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 5.70 (s, 1H, CH); IR (Film):  $\mathbf{V}_{\max}$  3422, 1626, 1509, 1455, 1342, 1138, 805  $\text{cm}^{-1}$

โครงสร้างของสารประกอบ 4-(bis(5-fluoro-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**6o**)

ของแข็งสีน้ำตาลแดง;  $R_f = 0.08$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  7.89 (brs, 0.05H (H บางส่วนเกิดการ exchange กับ  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $2\times\text{NH}$ ), 7.29 (dd,  $J = 8.7, 4.4$  Hz, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของ aromatic), 7.14 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของ aromatic), 6.89-6.80 (m, 4H,  $4\times\text{CH}$  ของ aromatic), 6.74 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของ aromatic), 6.72 (s, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของ aromatic), 5.65 (s, 1H, CH); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  3425, 1628, 1612, 1582, 1509, 1484, 1452, 1239, 1214, 1168, 1092, 801  $\text{cm}^{-1}$

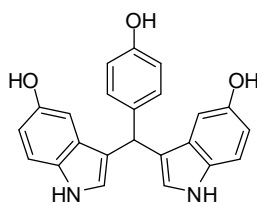
โครงสร้างของสารประกอบ 4-(bis(5-bromo-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**6p**)

ของแข็งสีแดงเลือดหมู  $R_f = 0.08$  (1:4 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  7.37 (s, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของ aromatic), 7.27 (brd,  $J = 8.4$  Hz, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของ aromatic), 7.16-7.10 (m, 4H,  $4\times\text{CH}$  ของ aromatic), 6.75 (brd,  $J = 6.3$  Hz, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของ aromatic), 6.67 (s, 2H,  $2\times\text{CH}$  ของ aromatic), 5.65 (s, 1H, CH); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  3426, 1698, 1611, 1509, 1456, 1319, 1214, 1169, 1095, 798  $\text{cm}^{-1}$

โครงสร้างของสารประกอบ 4-(bis(5-methoxy-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**6q**)

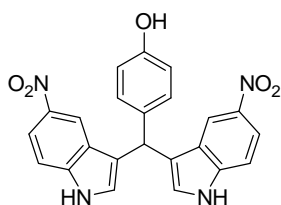
ของแข็งสีน้ำตาลแดง;  $R_f = 0.17$  (3:7 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  7.84 (brs, 0.19H (H บางส่วนเกิดการ exchange กับ  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), NH), 7.73 (brs, 0.18H (H บางส่วนเกิดการ exchange กับ  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), NH) 7.21 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.15 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.76-6.71 (m, 6H, 6xCH ของ aromatic), 6.64 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 5.67 (s, 1H, CH), 3.61 (s, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  3410, 1582, 1509, 1483, 1209, 1170, 1092  $\text{cm}^{-1}$

โครงสร้างของสารประกอบ 3,3'-((4-hydroxyphenyl)methylene)bis(1H-indol-5-ol) (**6r**)



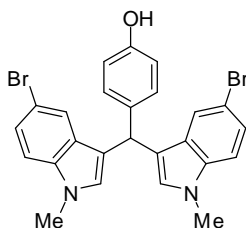
ของแข็งสีน้ำตาลแดง;  $R_f = 0.15$  (3:7 EtOAc/hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) :  $\delta$  10.42 (s, 2H, 2xNH), 9.12 (s, 1H, OH), 8.46 (s, 2H, 2xOH), 7.19-7.05 (m, 4H, 4xCH ของ aromatic), 6.71-6.53 (m, 8H, 8xCH ของ aromatic), 5.44 (s, 1H, CH)

โครงสร้างของสารประกอบ 4-(bis(5-nitro-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**6s**)



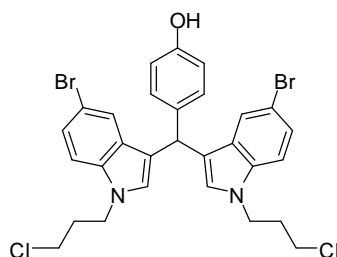
ของแข็งสีส้ม  $R_f = 0.30$  (5% MeOH ใน  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}$ ) :  $\delta$  9.29 (brs, 1H, OH)\*, 8.30 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.98 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.54 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.18 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.10 (s, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.72 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.06 (s, 1H, CH); IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  3370, 1735, 1509, 1471, 1327, 1093  $\text{cm}^{-1}$

โครงสร้างของสารประกอบ 4-(bis(5-bromo-1-methyl-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**6t**)



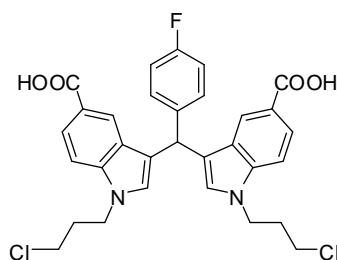
ของแข็งสีแดง  $R_f = 0.12$  (5% EtOAc ใน Hexane 6 รอบ) mp 134-150 °C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.46-6.48 (m, 12H, 12xCH ของ aromatic), 5.67 (s, 1H, CH), 3.66 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub> ของ aromatic)

โครงสร้างของสารประกอบ 4-(bis(5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indol-3-yl)methyl)phenol (**6u**)



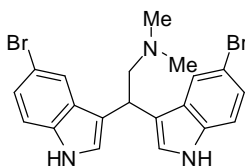
ของแข็งสีแดง  $R_f = 0.09$  (10% EtOAc ใน Hexane 4 รอบ) mp 94- 102 °C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.42-6.55 (m, 12H, 12xCH ของ aromatic), 5.66 (s, J 1H, CH), 4.2 (t, J = 1.5 4H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.40 (t, J = 5.8, 4H, CH<sub>2</sub>-Cl), 2.19 (m, J = 5.9, 4H, 2x (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>))

โครงสร้างของสารประกอบ 3,3'-((4-fluorophenyl)methylene)bis(1-(3-chloropropyl)-1H-indole-5-carboxylic acid) (**6v**)



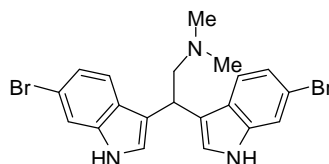
ของเหลวหนืดสีส้มน้ำตาล  $R_f = 0.69$  (50 % EtOAc ใน Hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  8.24 (s, 2H, OH), 8.07-6.76 (m, 12H, 12xCH ของ aromatic), 5.94 (s, 1H, CH ), 4.40 (t, J = 4.2, 4H, 2xNCH<sub>2</sub>), 3.61 (t, J = 3.0, 4H, 2xCH<sub>2</sub>-Cl), 2.19 (m, J = 3.4, 4H, 2xCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)

โครงสร้างของสารประกอบ 2,2-bis(5-bromo-1H-indol-3-yl)-N,N-dimethylethanamine (**6w**)



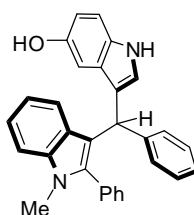
ของแข็งสีแดง  $R_f = 0.69$  (50 % EtOAc ใน Hexane); mp 110-125 °C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  8.37 (s, 2H, 2xNH ของ aromatic ) 7.64-6.95 (m, 8H, 8xCH ของ aromatic), 4.63 (t,  $J = 7.6$ , 1H, CH), 3.03 (d,  $J = 7.6$ , 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.39 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ )

โครงสร้างของสารประกอบ 2,2-bis(6-bromo-1H-indol-3-yl)-N,N-dimethylethanamine (**6x**)



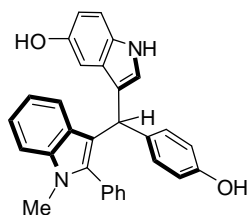
ของแข็งสีแดง  $R_f = 0.57$  (50 % EtOAc ใน Hexane); mp 116-122 °C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  8.37 (s, 2H, 2xNH ของ aromatic ) 7.38-6.91 (m, 8H, 8xCH ของ aromatic), 4.68 (t,  $J = 7.5$ , 1H, CH), 3.04 (d,  $J = 7.5$ , 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.34 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ )

โครงสร้างของสารประกอบ 3-((1-methyl-2-phenyl-1H-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-1H-indol-5-ol (**7a**)



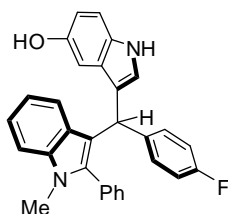
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) :  $\delta$  10.53 (s, 1H, NH), 8.46 (s, 1H, OH), 7.59-7.38 (m, 6H, 6xCH ของ aromatic), 7.30-7.20 (m, 3H, 3xCH ของ aromatic), 7.19-7.08 (m, 5H, 5xCH ของ aromatic), 6.86 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H, 1xCH ของ aromatic) 6.64 (s, 1H, CH ของ aromatic) 6.56 (brd,  $J = 6.9$  Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.28 (s, 1H, CH ของ aromatic) 5.49 (s, 1H, CH) 3.62 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ )

โครงสร้างของสารประกอบ 3-((4-hydroxyphenyl)(1-methyl-2-phenyl-1H-indol-3-yl)methyl)-1H-indol-5-ol (7b)



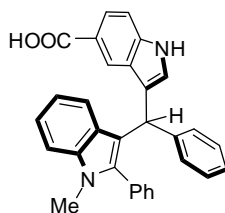
$^1\text{H-NMR}$  of (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) :  $\delta$  10.44 (s, 1H, NH), 9.11 (s, 1H, OH), 8.42 (s, 1H, OH), 7.57-7.34 (m, 6H, 6xCH ของ aromatic), 7.21 (d, 1H, CH ของ aromatic), 7.14-7.03 (m, 2H, 2xCH ของ aromatic), 6.91 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic) 6.83 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H, CH ของ aromatic) 6.65-6.57 (m, 3H, 3xCH ของ aromatic), 6.51 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, CH ของ aromatic) 6.24 (s, 1H, CH ของ aromatic) 5.35 (s, 1H, CH) 3.59 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ )

โครงสร้างของสารประกอบ 3-((4-fluorophenyl)(1-methyl-2-phenyl-1H-indol-3-yl)methyl)-1H-indol-5-ol (7c)



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.83 (s, 1H, NH), 7.49-7.42-7.34 (m, 3H, 3xCH ของ aromatic), 7.38-7.30 (m, 4H, 4xCH ของ aromatic), 7.25-7.14 (m, 4H, 4xCH ของ aromatic), 6.94 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 1xCH ของ aromatic) 6.87 (t,  $J = 8.7$  Hz, 2H, 2xCH ของ aromatic) 6.81 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, 1xCH ของ aromatic), 6.73 (dd,  $J = 8.6, 2.3$  Hz, 1H, CH ของ aromatic) 6.47 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H 1xH ของ aromatic) 5.63 (s, 1H, CH) 3.63 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ )

โครงสร้างของสารประกอบ 3-((1-methyl-2-phenyl-1H-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-1H-indole-5-carboxylic acid (7d)

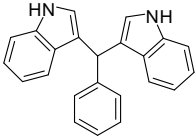
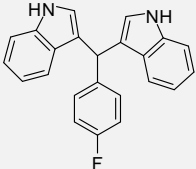
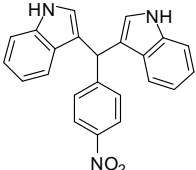
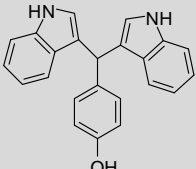


$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) :  $\delta$  12.28 (brs, 1H, COOH), 11.19 (s, 1H, NH), 7.70-7.62 (brs, 2H, 2xCH ของ aromatic), 7.58-7.37 (m, 7H, 7xCH ของ aromatic), 7.29-7.08 (m, 7H, 7xCH ของ aromatic), 6.86 (brs, 2H, 2xCH ของ aromatic) 5.63 (s, 1H, CH) 3.59 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ )

**กิจกรรมส่วนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสของสาร Dihteteroaryl-methanes** กลุ่มที่ 4 ได้แก่ 3,3'-bis(indoyl)methanes ชนิดต่างๆ

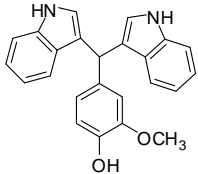
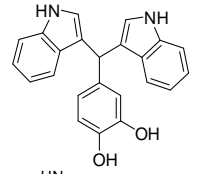
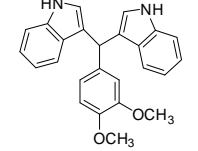
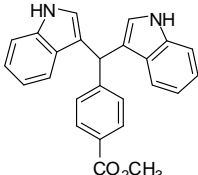
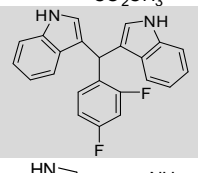
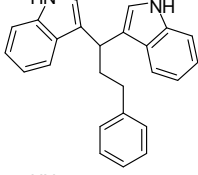
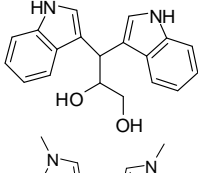
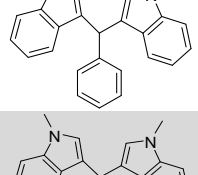
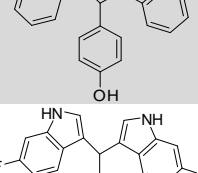
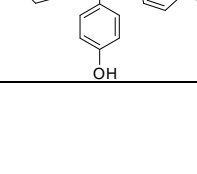
เพื่อศึกษาการปรับปรุงโครงสร้างสารสังเคราะห์กลุ่ม dihteteroarylmethanes และอนุพันธ์ ให้มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส ที่ดีขึ้น ในงานวิจัยปีที่ 2 จึงได้ นำข้อมูลจากผลการศึกษาในปีที่ 1 ที่พบว่าสารกลุ่มที่ 4 ได้แก่ 3,3'-bis(indoyl)methanes **6e** มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสในระดับดี (% Inhibition of anti-actylcholinesterase เท่ากับ  $73.11 \pm 0.11\%$ ) โดยทำการสังเคราะห์สารกลุ่มที่ 4 ได้แก่ 3,3'-bis(indoyl)methanes ที่มีหมู่แทนที่ชนิดต่างๆ จำนวน 24 โครงสร้าง ได้แก่ สาร **6a-x** และสังเคราะห์สารกลุ่มที่ 5 ซึ่งเป็นสาร 3,3'-bis(indoyl)methanes คล้ายกลุ่มที่ 4 แต่โครงสร้างมีวงอินโดล 2 วง ที่ไม่เหมือนกัน จำนวน 4 โครงสร้าง ได้แก่ สาร **7a-d** จากนั้นนำสารที่สังเคราะห์ได้ (สาร **6a-x** และ สาร **7a-d**) ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรส โดยเปรียบเทียบกับยาแกแลนทามีน ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบัน พบว่าได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6

**ตารางที่ 5** ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ Dihteteroaryl-methanes กลุ่มที่ 4 ได้แก่ 3,3'-bis(indoyl)methanes ชนิดต่างๆ

Entry	Structure	Compounds	% Inhibition of actylcholinesterase
1		<b>6a</b>	$0.65 \pm 0.14$
2		<b>6b</b>	$51.60 \pm 0.08$
3		<b>6c</b>	$0.20 \pm 0.08$
4		<b>6e</b>	$73.11 \pm 0.11$



ตารางที่ 5 ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ Diheteroaryl-methanes กลุ่มที่ 4 ได้แก่ 3,3'-bis(indolyl)methanes ชนิดต่างๆ (ต่อ)

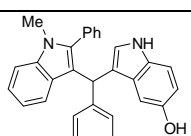
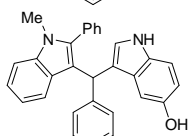
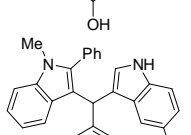
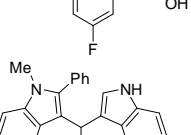
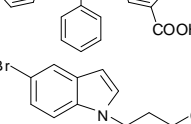
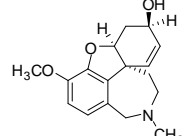
Entry	Structure	Compounds	% Inhibition of acetylcholinesterase
5		6d	15.98±0.16
6		6f	43.06±0.83
7		6g	10.95±0.24
8		6h	16.93±0.17
9		6i	70.07±0.64
10		6j	11.76±0.08
11		6k	1.17 ± 0.54
12		6l	29.76±0.37
13		6m	69.18±0.57
14		6n	59.34±0.33

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ Diheteroaryl-methanes กลุ่มที่ 4 ได้แก่ 3,3'-bis(indolyl)methanes ชนิดต่างๆ (ต่อ)

Entry	Structure	Compounds	% Inhibition of acetylcholinesterase
15		6o	65.41±0.87
16		6p	70.71±0.83
17		6q	32.46±0.33
18		6r	32.39 ± 0.19
19		6s	0.81±0.14
20		6t	0.40 ± 0.21
21		6u	38.82 ± 0.29
22		6v	9.27 ± 0.15
23		6w	36.42 ± 0.06
24		6x	53.92 ± 0.25
25		Galantamine	100.98

ผลการทดลองในตารางที่ 5 พบว่าสารสังเคราะห์ diindolylmethane แบบสมมาตร **6e 6i** และ **6p** มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสมากกว่า 70% คือ สามารถยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ 73.11±0.11, 70.07±0.64 และ 70.71±0.83 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามฤทธิ์การยับยั้งยังมีค่าน้อยกว่ายา Galantamine ในงานวิจัยต่อไปจึงได้ปรับปรุงโครงสร้างของสารประกอบ diindolylmethane แบบไม่สมมาตร **7a-d** เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้สูงกว่าหรืออยู่ในระดับเดียวกับกับยา Galantamine ดังแสดงในตารางที่ 6

**ตารางที่ 6** ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ Dihteteroaryl-methanes กลุ่มที่ 4 ได้แก่ 3,3'-diindolylmethane แบบไม่สมมาตร ชนิดต่างๆ

Entry	Structure	Compounds	% Inhibition of acetylcholinesterase
1		<b>7a</b>	48.69 ± 0.13
2		<b>7b</b>	11.83 ± 0.28
3		<b>7c</b>	57.95 ± 0.26
4		<b>7d</b>	33.66 ± 0.32
5		5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole	<b>73.53 ± 0.30</b>
6		Galantamine	100.98

ผลการทดลองในตารางที่ 6 พบว่าสารสังเคราะห์ diindolylmethane แบบไม่สมมาตร **7a-7d** มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสต่ำถึงปานกลาง ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารกลุ่มนี้มีโครงสร้างขนาดใหญ่ทำให้อาจจะเข้าไปจับกับเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสไม่ได้ จึงมีฤทธิ์การยับยั้งไม่ดี เพื่อทดสอบสมมุติฐานนี้ในงานวิจัยจึงได้สังเคราะห์สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole ซึ่งโครงสร้างมีขนาดเล็กประกอบด้วยวงอินโดลเพียงวงเดียว พบว่าสาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole สามารถยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ **73.53 ± 0.30** ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารกลุ่ม 3,3'-

diindolylmethane **6e** **6i** และ **6p** (สามารถยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ  $73.11 \pm 0.11$ ,  $70.07 \pm 0.64$  และ  $70.71 \pm 0.83$  ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามสาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าและสังเคราะห์ได้ง่ายกว่า

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์สารประกอบ diheteroarylmethanes ชนิดต่างๆ จำนวน 52 โครงสร้าง ซึ่งมีกลุ่ม heteroatom แตกต่างกัน 5 กลุ่ม ได้แก่ 1) สารกลุ่มอนุพันธ์ 1,1-di(5-methylfuryl)-arylmethanes **3a-t** จำนวน 20 โครงสร้าง สังเคราะห์จากปฏิกิริยา Bisarylation ระหว่าง 2-methylfuran กับ aldehyde ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่มี  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิห้อง และภายใต้สภาวะที่มีไอโอดีน 10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิห้อง 2) สาร bis[2-(5-ethylthienyl)]phenylmethane (**4**) จำนวน 1 โครงสร้างจากปฏิกิริยา bisarylation ของ 2-ethylthiophene กับ benzaldehyde ภายใต้สภาวะที่มี  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิห้อง และภายใต้สภาวะที่มีไอโอดีน 10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิห้อง 3) สารกลุ่มอนุพันธ์ 1,1-di(pyrrolyl)aryl-methanes (**5a-c**) จำนวน 3 โครงสร้าง จากปฏิกิริยา bisarylation ของ pyrrole หรือ 2-ethylpyrrole กับ benzaldehyde หรือ 4-nitrobenzaldehyde ภายใต้สภาวะที่มี  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายโทลูอีนที่อุณหภูมิห้อง และภายใต้สภาวะที่มีไอโอดีน 2.5-10 mol% เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยใช้เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง 4) สารกลุ่มอนุพันธ์ 1,1-di(3-indolyl)aryl-methanes (**6a-x**) ซึ่งเป็นสาร 1,1-bis(indolyl)methane แบบสมมาตร จำนวน 24 โครงสร้าง ซึ่งสังเคราะห์เพิ่มเติมในปีที่ 2 จากปฏิกิริยา bisarylation ระหว่าง indole กับ aldehyde ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่มี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  15 mol% ในตัวทำละลาย MeOH หรือ  $\text{CH}_3\text{CN}$  ที่อุณหภูมิห้อง และ 5) สาร 1,1-bis(indolyl)methane แบบไม่สมมาตร (**7a-d**) จำนวน 4 โครงสร้าง ซึ่งสังเคราะห์จากปฏิกิริยาการแทนที่ indole ของสารตั้งต้น 1,1-bis(indolyl)methane แบบสมมาตร ด้วย indole ชนิดใหม่ ภายใต้สภาวะที่มี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5 mol% ในตัวทำละลาย toluene ที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้น ในงานวิจัยนี้สามารถสังเคราะห์สารอนุพันธ์ diheteroarylmethanes ทั้งหมดจำนวน 52 โครงสร้าง ได้ในร้อยละผลผลิตปานกลางถึงสูง โดยใช้สภาวะการทดลองที่ไม่รุนแรงและตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีราคาถูกและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ได้นำสารอนุพันธ์ diheteroarylmethanes ที่สังเคราะห์ได้จำนวน 52 โครงสร้างไปศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ โดยนำสารที่สังเคราะห์ได้นี้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรส โดยเปรียบเทียบกับ ยากาแลนทามีน ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบัน พบว่า สารกลุ่ม 1,1-di(5-methylfuryl)arylmethanes **3a-t** จำนวน 20 โครงสร้าง ซึ่งในโครงสร้างประกอบด้วยวง heteroaromatic ชนิด furan ซึ่งมีออกซิเจนอะตอมเป็นองค์ประกอบ 2 วง ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสในระดับน้อยมาก โดยโครงสร้างสาร **3i** สามารถยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้สูงสุดเพียงร้อยละ  $17.40 \pm 0.16$  จากนั้นเมื่อเปลี่ยนชนิดของ heteroatom จากวง furan เป็นวง thiophene ซึ่งมีอะตอมซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ สาร bis[2-(5-ethylthienyl)]phenylmethane

(4) ซึ่งพบว่ายังคงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสในระดับน้อยมาก คือ สามารถยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสได้เพียงร้อยละ  $10.84 \pm 0.17$  จากนั้นได้เปลี่ยนชนิดของ heteroatom เป็นวงที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งคล้ายกับยา Galantamine เริ่มต้นได้สังเคราะห์สารกลุ่ม 1,1-di(3-indolyl)arylmethanes (**3a-c**) ซึ่งในโครงสร้างประกอบด้วยวง pyrrole พบว่า สาร bis[2-(5-ethyl-pyrrolyl)]phenylmethane (**5b**) ซึ่งเกิดจากวง 5-ethylpyrrole 2 วง กับ phenyl 1 วงต่ออยู่บนคาร์บอนอะตอมเดียวกัน สามารถยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละปานกลาง ( $47.58 \pm 0.06$ %) ขณะที่เมื่อมีหมู่ nitro ที่ตำแหน่ง para ของวง phenyl ได้แก่ โครงสร้าง **5a** และ **5c** พบว่าส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสลดลงเหลือเพียงร้อยละ  $13.48 \pm 0.10$  และ  $10.74 \pm 0.19$  ตามลำดับ สารกลุ่มที่ 4 ได้แก่ สาร 3,3'-bis(indolyl)methane แบบสมมาตร (**6a-x**) ซึ่งมีวง indole เป็นส่วนประกอบเนื่องจากสารกลุ่ม indole พบได้ในสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างมาก พบว่าสารสังเคราะห์ 3,3'-bis(indolyl)methane แบบสมมาตร **6e 6i** และ **6p** มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสมากกว่า 70% คือ สามารถยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ  $73.11 \pm 0.11$ ,  $70.07 \pm 0.64$  และ  $70.71 \pm 0.83$  ตามลำดับ ขณะที่ยา Galantamine ภายใต้สภาวะที่ศึกษายับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ 100.98 ในงานวิจัยต่อไปจึงได้ปรับปรุงโครงสร้างของสารประกอบ 3,3'-bis(indolyl)methane แบบไม่สมมาตร (**7a-d**) เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์พบว่าสาร **7a-7d** มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสต่ำถึงปานกลาง ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารกลุ่มนี้มีโครงสร้างขนาดใหญ่ทำให้อาจจะเข้าไปจับกับเอนไซม์อะสติลโคลีนได้ไม่ดี จึงมีฤทธิ์การยับยั้งไม่ดี เพื่อทดสอบสมมุติฐานนี้ ในงานวิจัยจึงได้สังเคราะห์สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole ซึ่งโครงสร้างมีขนาดเล็ก ประกอบด้วยวงอินโดลเพียงวงเดียว พบว่าสาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole สามารถยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ  $73.53 \pm 0.30$  ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารกลุ่ม 3,3'-diindolylmethane **6e 6i** และ **6p** (สามารถยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ  $73.11 \pm 0.11$ ,  $70.07 \pm 0.64$  และ  $70.71 \pm 0.83$  ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามสาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าและสังเคราะห์ได้ง่ายกว่า ดังนั้น สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole สามารถเป็น lead compound ที่ดีชนิดหนึ่งเพื่อนำไปพัฒนาและปรับปรุงโครงสร้างให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสได้สูงกว่าหรืออยู่ในระดับเดียวกันกับยา Galantamine และสามารถนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้

#### ข้อเสนอแนะ การทำวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

งานวิจัยที่เสร็จแล้วข้ากว่ากำหนดเวลามีปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ 1 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้มีความล่าช้าในการจัดส่ง ประการที่ 2 คือ การปรับปรุงโครงสร้างสารกลุ่ม diheteroarylmethane เพื่อให้ได้โครงสร้างที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงหรือดีกว่ายา Galantamine ต้องมีการทดสอบฤทธิ์และปรับปรุงโครงสร้าง บางครั้งผลการทดลองไม่ได้เป็นไปตามแผนการที่คาดไว้ ทำให้นักวิจัยได้พยายามปรับปรุงโครงสร้างสารจำนวนมาก ถึง 52 โครงสร้าง โดยโครงสร้างสารกลุ่ม diheteroarylmethane กลุ่ม 3,3'-bis(indolyl)methane แบบสมมาตร **6e 6i** และ **6p** มีฤทธิ์ยับยั้ง

เอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสมากกว่า 70% คือ สามารถยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ  $73.11 \pm 0.11$ ,  $70.07 \pm 0.64$  และ  $70.71 \pm 0.83$  ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในระดับดี อย่างไรก็ตามพบว่าการปรับปรุงโครงสร้างไม่สามารถทำให้ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสสูงขึ้นมากกว่า 80% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของสารที่มีขนาดใหญ่เกินไป อาจจะทำให้เกิดความเกะกะในการเข้าไปยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรส ในการศึกษาจึงพบว่า 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole สามารถยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ  $73.53 \pm 0.30$  ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารกลุ่ม 3,3'-diindolylmethane **6e** **6i** และ **6p** อย่างไรก็ตามสาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าและสังเคราะห์ได้ง่ายกว่า ดังนั้น สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole สามารถเป็น lead compound ที่ดีชนิดหนึ่งเพื่อนำไปพัฒนาและปรับปรุงโครงสร้างให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสได้สูงกว่าหรืออยู่ในระดับเดียวกันกับยา Galantamine และสามารถนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้

## บรรณานุกรม

- จักรกฤษณ์ สุขยิ่ง. โรคสมองเสื่อม.ใน: มาโนช หล่อตระกูล, ปราโมทย์ สุคนิษฐ์, บรรณาธิการ, จิตเวชศาสตร์  
รามธิบดี. กรุงเทพมหานคร: สวีชาญการพิมพ์: 2555. หน้า 80-94.
- ปานบดี เอกะจัมปกะ, นิธิศ วัฒนมะโน. รายงานสถานการณ์สภาวะสุขภาพและพฤติกรรมสุขภาพผู้สูงอายุ  
ไทย, *สถานการณ์สุขภาพไทย* 2552; 4: 1-32.
- Adersen, A., Kjølbbye, A., Dall, O. and Jäger, A. K. 2007, Acetyl-cholinesterase and  
butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort. *J.  
Ethnopharmacol.* **113**: 179-182.
- Alonso, D., Dorronsoro, I., Rubio, L., et al. 2005. Donepezil-tacrine hybrid related  
derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 6588-  
6597.
- Badia, A., Baños, J. E., Camps, P., et al. 1998. Synthesis and evaluation of tacrine-  
huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the  
treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* 6: 427-440.
- Bar-On, P., Millard, C. B., Harel, M., et al. 2002. Kinetic and structural studies on the  
interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. *Biochemistry*  
41: 3555-3564.
- Bolognesi, M. L., Andrisano, V., Bartolini, M., Minarini, A. and Rosini, M. 2001. Hexahydro-  
chromeno[4,3-*b*]pyrrole derivatives as acetyl-cholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.*  
44: 105-109.
- Bolognesi, M. L., Bartolini, M., Cavalli, A., et al. 2004. Design, synthesis, and biological  
evaluation of conformationally restricted rivastigmine analogues. *J. Med. Chem.* 47:  
5945-5952.
- Bartolini, M., Bertuccci, C., Cavrini, V., Andrisano, V. 2003. Beta-amyloid aggregation induced  
by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem. Pharmacol.* 65: 407-416.
- Brookmeyer, R., Gray S. and Kawas C. 1998. "Projections of Alzheimer's disease in the  
United States and the public health impact of delaying disease onset". *Am. J. Public  
Health* 88 (9): 1337-42.
- Brookmeyer, R., Johnson E., Ziegler-Graham K. and Arrighi M. H. 2007. "Forecasting the  
global burden of Alzheimer's disease". *Alzheimer's and Dementia* 3 (3): 186-91.
- Camps, P. and Muñoz-Torrero, D. 2001. Tacrine-huperzine A hybrids (Huprines): A new  
class of highly potent and selective acetylcholinesterase inhibitors of interest for the  
treatment of Alzheimer's disease. *Mini Rev. Med. Chem.* 1: 163-174.



- Carlier, P. R., Han, Y. F., Chow, E. S. H., et al. 1999a. Evaluation of short-tether bis-THA AChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 351-357.
- Carlier, P. R., Du, D. M., Han, Y., Liu, J., Pang, Y. P. 1999b. Potent, easily synthesized huperzine A-tacrine hybrid acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 2335-2338.
- Cavalli, A., Bolognesi, M. L., Minarini, A., et al. 2008. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J. Med. Chem.* 51: 347-372.
- Chaudhaery, S. S., Roy, K. K., Shakya, N., et al. 2010. Novel carbamates as orally active acetylcholinesterase inhibitors found to improve scopolamine-Induced Cognition Impairment: Pharmacophore-Based Virtual screening, synthesis, and pharmacology. *J. Med. Chem.* 53: 6490-6505.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. A. 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- Fifer, E. K. 2008. Drugs affecting cholinergic neurotransmission. In: Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito SW (eds.). Foye's principles of medicinal chemistry, 6th ed. Philadelphia. Wolters Kluwer-Lippincott Williams & Wilkins, pp.361-391.
- Greenblatt, H. M., Kryger, G., Lewis, T., Silman, I., Sussman, J. L. 1999. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galantamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Letters* 463; 321-326.
- Guilliou, C., Mary, A., Renko, D. Z., Gras, E., Thal, C. 2000. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationships of alkylene linked bis-galanthamine and galanthaminegalanthaminium salts. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 637-639.
- Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., et al. 1993. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90; 9031-9035.
- Kryger, G., Silman, I. and Sussman, J. L. 1998. Three-dimensional structure of a complex of E2020 with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *J. Physiol. Paris* 92: 191-194.
- Muñoz-Torrero, D. and Camps, P. 2006. Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. *Curr Med Chem* 13: 399-422.
- Querfurth, H. W. and LaFerla F. M. 2010. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362: 329-344.
- Piazzini, L., Rampa, A., Bisi, A., et al. 2003. 3-(4-[[Benzyl(methyl)amino]-methyl]-phenyl)-6,7-

- dimethoxy-2H-2-chromenone (AP2238) inhibits both acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced  $\beta$ -amyloid aggregation: A dual function lead for Alzheimer's disease therapy. *J. Med. Chem.* 46: 2279-2282.
- Rampa, A., Piazzini, L., Belluti, F., et al. 2001. Acetylcholinesterase inhibitors: SAR and kinetic studies on  $\omega$ -[N-Methyl-N-(3-alkyl-carbamoyloxyphenyl)methyl]aminoalkoxyaryl Derivatives. *J. Med. Chem.* 44: 3810-3820.
- Saxena, A., Fedorko, J. M., Vinayaka, C. R., et al. 2003. Aromatic amino acid residues at the active and peripheral anionic sites control the binding of E2020 (Aricept®) to cholinesterases. *Eur. J. Biochem.* 270: 4447-4458.
- Silman, I. and Sussman, J. L. 2005. Acetylcholinesterase: 'Classical' and 'nonclassical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 5: 293-302.
- Sugimoto, H., Iimura, Y., Yamanishi, Y., Yamatsu, K. 1995. Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-oxoindan-2-yl)methyl]piperidine hydrochloride and related Compounds. *J. Med. Chem.* 38: 4821-4829.
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., et al. 1991. Atomic structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253: 872-879.
- Tiraboschi, P., Hansen, L.A., Thal, L. J. and Corey-Bloom J. 2004. "The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD". *Neurology* 62 (11): 1984-9.
- Villalobos, A., Blake, J.F., Biggers, C.K., et al. 1994. Novel benzisoxazole derivatives as potent and selective inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.* 37: 2721-2734.
- Villalobos, A., Butler, T. W., Chapin, D. S., et al. 1995. 5,7-Dihydro-3-[2-[1-(phenylmethyl)-4-piperidinyl]ethyl]-6H-pyrrolo[3,2-f]-1,2-benzisoxazol-6-one: A potent and centrally-selective inhibitor of acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.* 38: 2802-2808.

## ผลผลิตของโครงการวิจัย

1. อรณิชา ไข่เกษ, อนันต์ อธิพรชัย และจเร จรัสจรรยาพงศ์. (2559). การสังเคราะห์สารกลุ่ม bis-(indolyl)arylmethanes ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอสีทิลโคลีนเอสเทอเรสเพื่อใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ ด้วยวิธีการสะอาด. ใน งานประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8” (หน้า 2-7). พะเยา: มหาวิทยาลัยพะเยา.
2. Onnicha Khaikate, Anan Athipornchai and Jaray Jaratjaroonphong. Synthesis and evaluation of 3,3'-bis(indolyl)arylmethane derivatives as cholinesterase Inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. (Manuscript in preparation).
3. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ ระดับปริญญาโท 1 คน สาขาเคมี คือ นางสาวสุรีย์พร เรืองแสงทองกุล และระดับปริญญาตรี สาขาเคมี จำนวน 4 คน คือ นางสาวนัตติยา จันทนา นางสาวประภาพร บุญเพ็ง นางสาวอรณิชา ไข่เกษ และนางสาวชฎามน จันทนา

## รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก).....2559A10802056.....สัญญาเลขที่.....65/2559.....

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) “การสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารไดเฮเทอโรอิลเอริลมีเทนและอนุพันธ์ในการใช้เป็นสารยับยั้งโคลีนเอสเทอเรสเพื่อใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์”

(ภาษาอังกฤษ) Synthesis and Biological Evaluation of Diheteroarylmethanes and Related analogs as Cholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer’s Disease

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร. จเร จรวัสจรรณพพงศ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึงวันที่ 1 กันยายน พ.ศ. 2561

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี 11 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558

### รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50 %) 418,000 บาท เมื่อวันที่ 18 มกราคม พ.ศ. 2559

งวดที่ 2 (40 %) 334,400 บาท เมื่อวันที่ 5 กันยายน พ.ศ. 2558

งวดที่ 3 (10 %) 83,600 บาท เมื่อวันที่

รวม 836,000 บาท

### รายจ่าย

รายการ	งบประมาณ ที่ตั้งไว้	งบประมาณ ที่ใช้จริง	จำนวนเงิน คงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	75,000 บาท	75,000 บาท	- บาท
2. ค่าจ้าง	134,000 บาท	134,000 บาท	- บาท
3. ค่าวัสดุ	453,400 บาท	453,400 บาท	- บาท
4. ค่าใช้สอย	90,000 บาท	90,000 บาท	- บาท
5. ค่าครุภัณฑ์	- บาท	- บาท	- บาท
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ ได้แก่ ค่าสาธารณูปโภค โดย สนับสนุนให้มหาวิทยาลัยเป็นจำนวน 10 %	83,600 บาท	83,600 บาท	- บาท
รวม	836,000 บาท	836,000 บาท	- บาท

(.....)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

## ภาคผนวก