



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง “การออกแบบการสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง
โคลีนเอสเตอเรสของอนุพันธ์ทริปทามีนเพื่อใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์”

Design, synthesis and biological evaluation of
tryptamine derivatives as cholinesterase inhibitors for
the treatment of Alzheimer’s disease

โดย

รศ.ดร. จเร จรัสจรรยาพงศ์

และ

ดร. อนันต์ อธิพรชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง “การออกแบบการสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง
โคลีนเอสเตอเรสของอนุพันธ์ทริปทามีนเพื่อใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์”

Design, synthesis and biological evaluation of
tryptamine derivatives as cholinesterase inhibitors for
the treatment of Alzheimer’s disease

โดย

รศ.ดร. จเร จรัสจรรยาพงศ์

และ

ดร. อนันต์ อธิพรชัย

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม 2562

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้ารศ.ดร.จเร.จรัสจรรยาพงศ์.....ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) “การออกแบบการสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งโคลีนเอสเทอเรสของอนุพันธ์ทริปทามีนเพื่อใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์”
(ภาษาอังกฤษ) Design, synthesis and biological evaluation of tryptamine derivatives as cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer’s disease
รหัสโครงการ...256107A1080056...สัญญาเลขที่...112/2561...ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 616,000 บาท (หกแสนหนึ่งหมื่นหกพันบาทถ้วน)
ระยะเวลาดำเนินงาน...1...ปี 11 เดือน (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2560 ถึงวันที่ 19 สิงหาคม พ.ศ. 2562)

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ประสบความสำเร็จในการออกแบบการสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งโคลีนเอสเทอเรสของอนุพันธ์ทริปทามีนเพื่อใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ชนิดต่างๆ จำนวน 27 โครงสร้าง ซึ่งมีกลุ่มอนุพันธ์ทริปทามีนและอินโดล แตกต่างกัน 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) สารกลุ่มอนุพันธ์ tryptamine ที่มีหมู่แทนที่บนวงอินโดลตำแหน่งที่ 5 จำนวน 2 โครงสร้าง (5-hydroxy และ 5-methoxytryptamine) 2) สาร N-(pyrrolidylalkyl)indoles **IV-3a-g** และ N-(piperidylalkyl)indoles **IV-4a-g** รวมจำนวน 14 โครงสร้าง 3) สารกลุ่ม chloroalkyl- และ bromoalkylindole รวมจำนวน 9 โครงสร้าง และ 4) สารกลุ่ม bisindolyl-N-alkyl derivatives รวม 2 โครงสร้าง โดยสารสังเคราะห์ทั้ง 27 โครงสร้าง สามารถสังเคราะห์ด้วยวิธีการที่ง่าย ใช้สภาวะการทดลองที่ไม่รุนแรง ให้อัตราผลผลิตปานกลางถึงสูง นอกจากนี้ได้นำสารอนุพันธ์ทริปทามีนและอินโดล ที่สังเคราะห์ได้จำนวน 27 โครงสร้างไปศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ โดยนำสารที่สังเคราะห์ได้นี้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรส โดยเปรียบเทียบกับยากาแลนทามีน ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบัน พบว่า สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสมากกว่า 70% คือ สามารถยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้อัตรา 73.53 ± 0.30% ขณะที่ยา Galantamine ภายใต้สภาวะที่ศึกษายับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้อัตรา 100.00 อย่างไรก็ตามสาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า และสังเคราะห์ได้ง่ายกว่า ยา Galantamine มาก ดังนั้น สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** สามารถเป็น lead compound ที่ดีชนิดหนึ่งเพื่อนำไปพัฒนาและปรับปรุงโครงสร้างให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้สูงกว่าหรืออยู่ในระดับเดียวกับยา Galantamine และสามารถนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้

คำสำคัญ : โรคอัลไซเมอร์, เอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรส, อนุพันธ์อินโดล, ทริปทามีน

ผลผลิตของโครงการวิจัย

1. กรรณิการ์ ละอองทอง, อนันต์ อธิพรชัย และจเร จรัสจรรยาพงศ์. (2560). การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารประกอบอินโดลเพื่อใช้เป็นสารยับยั้งอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในการรักษาโรคอัลไซเมอร์. ใน *งานประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9”* ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา (นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์).
2. ชญามน จันทนา, กรรณิการ์ ละอองทอง, อนันต์ อธิพรชัย และจเร จรัสจรรยาพงศ์. (2562). การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารประกอบอินโดลเพื่อใช้เป็นสารยับยั้งอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในการรักษาโรคอัลไซเมอร์. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา* (Manuscript in preparation).
3. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ ระดับปริญญาโท 1 คน สาขาเคมี คือ นางสาวชญามน จันทนา และระดับปริญญาตรี สาขาเคมี จำนวน 1 คน คือ นางสาวกรรณิการ์ ละอองทอง

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยที่เสร็จล่าช้ากว่ากำหนดเวลามีปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ 1 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้มีความล่าช้าในการจัดส่ง ประการที่ 2 คือ การปรับปรุงโครงสร้างสารกลุ่ม diheteroarylmethane เพื่อให้ได้โครงสร้างที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงหรือดีกว่ายา Galantamine ต้องมีการทดสอบฤทธิ์และปรับปรุงโครงสร้าง บางครั้งผลการทดลองไม่ได้เป็นไปตามแผนการที่คาดไว้ ทำให้นักวิจัยได้พยายามปรับปรุงโครงสร้างสารจำนวนมาก ถึง 27 โครงสร้าง โดยสารกลุ่ม chloroalkylindole ได้แก่ 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** และสาร 1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5a** มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสมากเป็นอันดับที่ 1 และ 2 ได้แก่ $73.53 \pm 0.30\%$ และ $67.26 \pm 0.37\%$ ตามลำดับ ขณะที่ยา Galantamine ภายใต้สภาวะที่ศึกษายับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ 100.00 อย่างไรก็ตาม สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าและสังเคราะห์ได้ง่ายกว่า ยา Galantamine มาก ดังนั้น สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** สามารถเป็น lead compound ที่ดีชนิดหนึ่งเพื่อนำไปพัฒนาและปรับปรุงโครงสร้างให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรสได้สูงกว่าหรืออยู่ในระดับเดียวกับยา Galantamine และสามารถนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ประสบความสำเร็จในการออกแบบการสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งโคลีนเอสเตอเรสของอนุพันธ์ทริปทามีนเพื่อใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ชนิดต่างๆ จำนวน 27 โครงสร้าง ซึ่งมีกลุ่มอนุพันธ์ทริปทามีนและอินโดล แตกต่างกัน 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) สารกลุ่มอนุพันธ์ tryptamine ที่มีหมู่แทนที่บนวงอินโดลตำแหน่งที่ 5 จำนวน 2 โครงสร้าง (5-hydroxy และ 5-methoxytryptamine) 2) สาร N-(pyrrolidylalkyl)indoles **IV-3a-g** และ N-(piperidylalkyl)indoles **IV-4a-g** รวมจำนวน 14 โครงสร้าง 3) สารกลุ่ม chloroalkyl- และ bromoalkylindole รวมจำนวน 9 โครงสร้าง และ 4) สารกลุ่ม bisindolyl-N-alkyl derivatives รวม 2 โครงสร้าง โดยสารสังเคราะห์ทั้ง 27 โครงสร้าง สามารถสังเคราะห์ด้วยวิธีการที่ง่าย ใช้สภาวะการทดลองที่ไม่รุนแรง ให้ร้อยละผลิตภัณฑ์ปานกลางถึงสูง นอกจากนี้ได้นำสารอนุพันธ์ทริปทามีนและอินโดล ที่สังเคราะห์ได้จำนวน 27 โครงสร้างไปศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ โดยนำสารที่สังเคราะห์ได้นี้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเตอเรส โดยเปรียบเทียบกับยา Galantamine ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบัน พบว่า สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเตอเรสมากกว่า 70% คือ สามารถยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเตอเรสได้ร้อยละ $73.53 \pm 0.30\%$ ขณะที่ยา Galantamine ภายใต้สภาวะที่ศึกษายับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเตอเรสได้ร้อยละ 100.00 อย่างไรก็ตาม สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าและสังเคราะห์ได้ง่ายกว่า ยา Galantamine มาก ดังนั้น สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** สามารถเป็น lead compound ที่ดีชนิดหนึ่งเพื่อนำไปพัฒนาและปรับปรุงโครงสร้างให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเตอเรสได้สูงกว่าหรืออยู่ในระดับเดียวกันกับยา Galantamine และสามารถนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้

คำสำคัญ : โรคอัลไซเมอร์, เอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเตอเรส, อนุพันธ์อินโดล, ทริปทามีน

ABSTRACT

In this research, four groups of the corresponding tryptamines and indoles such as 1) 5-hydroxy as well as 5-methoxytryptamine 2) N-(pyrrolidylalkyl)indoles **IV-3a-g** together with N-(piperidylalkyl)indoles **IV-4a-g** 3) N-chloroalkyl- as well as N-bromoalkylindoles and 4) bisindolyl-N-alkyl derivatives were synthesized by simple methods under mild reaction condition to afford the twenty-seven compounds of tryptamine and indole derivatives in moderate to excellent yields. Furthermore, all synthesized compounds were evaluated acetylcholinesterase inhibitory activity. Acetylcholinesterase is an enzyme that contributes to Alzheimer's disease. The results found that 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** showed promising acetylcholinesterase inhibitory activity with value of $73.53 \pm 0.30\%$. Thus, the compounds **V-5d** would be a lead compound for the development of novel drug for the Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease (AD), Acetylcholinesterase, indole derivatives, tryptamine

กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 112/2561

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ สุดท้ายขอขอบคุณ นางสาวกรรณิการ์ ละอองทอง และ นางสาวชญามน จันทนา สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญเรื่อง

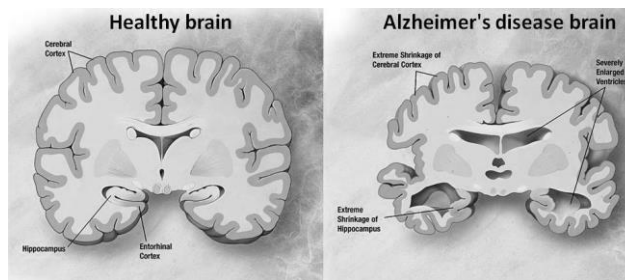
	หน้า
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
กิตติกรรมประกาศ	3
บทที่ 1 บทนำ	5
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	5
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	7
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	7
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	8
1.5 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	13
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	21
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	22
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	33
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	55
บรรณานุกรม	57
ผลผลิตของโครงการวิจัย (Output)	60

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

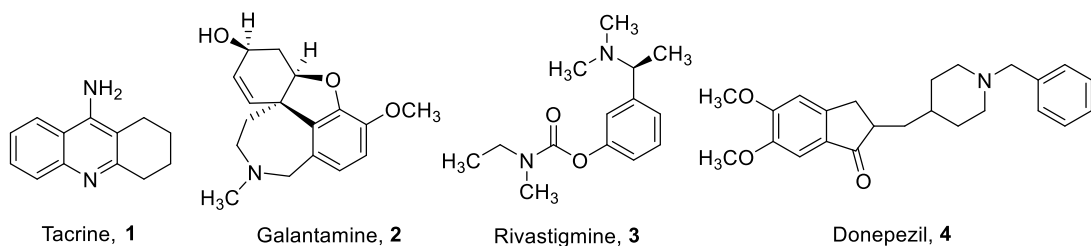
โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease หรือ AD) เป็นหนึ่งในเจ็ดอันดับแรกของโรคที่พบบ่อยในผู้สูงอายุในประเทศไทย ส่วนใหญ่พบได้ตั้งแต่อายุ 60 ปี ขึ้นไป และพบมากขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น ผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์จะ เกิดสภาวะการเสื่อมของสมอง (dementia) ทำให้ผู้ป่วยมีปัญหาสูญเสียความทรงจำ และการเรียนรู้ บางรายอาจรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ สาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เหตุผลหนึ่งที่เกี่ยวข้องให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ คือ การถูกทำลายของสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีน (acetylcholine; ACh) โดยเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase; AChE) และบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส (butyrylcholinesterase; BChE) ส่งผลให้ปริมาณของสารสื่อประสาทในสมองลดลง เมื่อโรคมีการดำเนินการต่อไปจะพบการตายของเซลล์ประสาทในบริเวณสมองส่วนหน้า ทำให้ผู้ป่วยเกิดการสูญเสียความจำในที่สุด (ลือลักษณะ ล้อมลิ้ม และธีรภัทร นวลน้อย, 2554) ภาพเปรียบเทียบระหว่างสมองของคนปกติ และสมองผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 เปรียบเทียบระหว่างสมองของคนปกติ (ซ้าย) และสมองผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (ขวา) ที่มา :

http://archive.cnx.org/resources/90a2c5bea371f121681855ad1bbd372b51ba878b/Figure_35_05_01.jpg

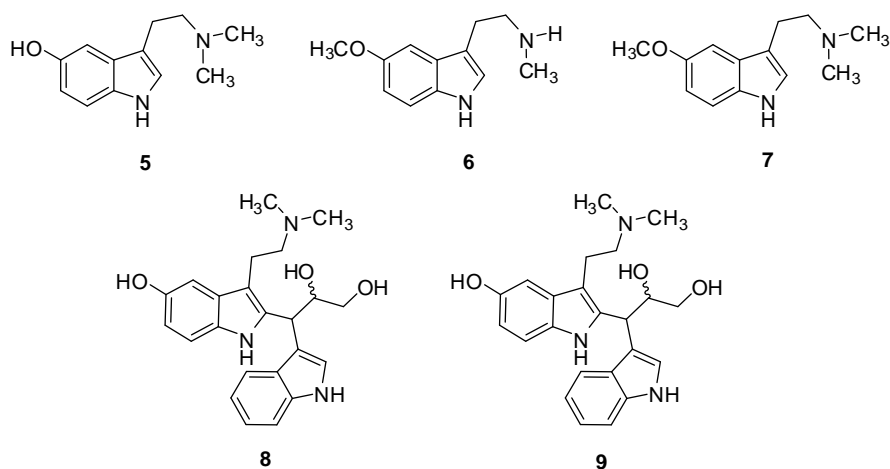
จากปัญหาที่ได้กล่าวมาข้างต้น ทำให้แพทย์และนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแนวทางในการรักษาหรือป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ อย่างไรก็ตาม จนถึงปัจจุบันพบว่าไม่สามารถรักษาโรคอัลไซเมอร์ให้หายขาดได้ ทำได้เพียงการชะลออาการของผู้ป่วยเท่านั้น โดยยาที่ได้รับการรับรองให้ใช้รักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ มี 4 ชนิด ได้แก่ 1) ยา Tacrine 2) ยา Galanthamine 3) ยา Rivastigmine และ 4) ยา Donepezil (รูปที่ 2) โดยยาทั้ง 4 ชนิดทำหน้าที่ไปช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ส่งผลให้ลดการถูกทำลายของสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีน



รูปที่ 2 ยารักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ที่ใช้ในทางคลินิก

อย่างไรก็ตามยาทั้ง 4 ชนิด ส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยอัลไซเมอร์อย่างมาก เช่น ยา galanthamine มีผลข้างเคียงทำให้ผู้ป่วยมีน้ำหนัลดลง ยา rivastigmine ทำให้เกิดอาการเวียนศีรษะ มึนงงได้ และยา donepezil มีอาการข้างเคียงทำให้ผู้ป่วยนอนไม่หลับ (จักรกฤษณ์ สุขยั้ง, 2555) ดังนั้นจึงได้มีความพยายามหาสารชนิดใหม่ๆ ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อนำไปสู่การการค้นพบยาในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น แต่แสดงผลข้างเคียงน้อยหรือไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย

เมื่อเร็ว ๆ นี้ Queiroz และคณะ (2014) ได้ศึกษาการสกัดสารจากเปลือกของต้น *Tetrapteryx mucronata* หรือ Ayahuasca โดยสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล จากนั้นได้นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปแยกสารให้บริสุทธิ์และตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ด้วยเทคนิค HPLC-PDA ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกสารได้ 22 ชนิด โดยเป็นสารใหม่ (new compound) 6 ชนิด และมีสาร 5 ชนิดที่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยมีค่า IC_{50} ต่ำกว่า $15 \mu M$ ซึ่งมีค่าความสามารถในการยับยั้งค่อนข้างดีเมื่อเทียบกับยา Tracine ($IC_{50} = 0.09 \pm 0.02 \mu M$) และยา Galanthamine ($IC_{50} = 2.4 \pm 0.2 \mu M$) ที่ใช้เป็น Positive control เมื่อพิจารณาโครงสร้างสารทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ สาร 5-hydroxy-*N,N*-dimethyltryptamine (bufotenine) (5), 5-methoxy-*N*-methyltryptamine (6), 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine (7), และ สาร dimeric indolic alkaloids ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ Mucronatin A (8) และ Mucronatin B (9) เป็นอนุพันธ์ tryptamine โครงสร้างสาร 5-9 แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 สารอนุพันธ์ tryptamin 5-9 ที่แยกได้จากเปลือกของต้น *Tetrapteryx mucronata* หรือ Ayahuasca และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

แม้ว่าสารอนุพันธ์ tryptamine (สาร 5-9) ที่แยกได้จากเปลือกของต้น *Tetrapteryx mucronata* จะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสค่อนข้างดี แต่พบว่ายังมีฤทธิ์น้อยกว่ายาที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบัน อีกทั้งสาร 5-9 ที่แยกจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้สารในปริมาณที่น้อยมาก ในงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารอนุพันธ์ tryptamine ชนิดต่าง ๆ เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ใกล้เคียงหรือดีกว่ายาในปัจจุบัน และสามารถต่อยอดนำไปพัฒนาเป็น

ยาทางเลือกใหม่ในการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ที่มีประสิทธิภาพทั้งในการรักษาอาการ และชะลอการดำเนินไปของโรคต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) ออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ tryptamine ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิล และบิวทิลิลโคลีนเอสเตอเรส
- 2) ศึกษาผลและตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างของสารอนุพันธ์ tryptamine ที่มีอิทธิพลต่อความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิล และบิวทิลิลโคลีนเอสเตอเรส
- 3) ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารอนุพันธ์ tryptamine ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิล และบิวทิลิลโคลีนเอสเตอเรส เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด และสามารถนำไปสู่การค้นพบยาในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้
- 4) เพื่อผลิตและตีพิมพ์ผลงานวิจัยร่วมกับบัณฑิตและอาจารย์ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor
- 5) เพื่อสร้างและพัฒนานิสิตระดับปริญญาตรีและระดับบัณฑิตศึกษาให้มีศักยภาพในการคิดและทำวิจัยที่เป็นองค์ความรู้ใหม่และสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปต่อยอดให้เกิดประโยชน์ต่อการพัฒนาองค์กรและประเทศชาติได้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1) ออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ tryptamine ชนิดต่าง ๆ

ออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ tryptamine จำนวน 20-25 สาร โดย 1) ใช้สารตั้งต้นเป็น tryptamine ทำปฏิกิริยา methylation, benzylation, acetylation และ carbamoylation โดยทำปฏิกิริยากับ methyl iodide, benzyl bromide, acetic anhydride และ dialkylcarbamic chloride ตามลำดับ 2) ใช้สารตั้งต้นเป็น 5-hydroxytryptamine (serotonin) ทำปฏิกิริยา methylation, benzylation, acetylation และ carbamoylation โดยทำปฏิกิริยากับ methyl iodide, benzyl bromide, acetic anhydride และ dialkylcarbamic chloride ตามลำดับ 3) สังเคราะห์อนุพันธ์ของ tryptamine ชนิดใหม่ โดยใช้สารตั้งต้นเป็นอนุพันธ์ของ indole ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ indole, 5-hydroxyindole, 5-methoxyindole, 5-fluoroindole 6-fluoroindole 5-chloroindole และ 5-bromoindole เป็นต้น ทำปฏิกิริยา alkylation กับสารอนุพันธ์ 2-halo-*N,N*-diakylethanamine ได้แก่ 2-chloro-*N,N*-dimethylethanamine, 1-(2-chloroethyl)pyrrolidine, 1-(2-chloroethyl)pyrrolidine 4) นำสารประกอบ 1-(*N,N*-dialkylaminoethyl)-5-hydroxyindole ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ tryptamine ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 5-hydroxyindole กับสารอนุพันธ์ 2-halo-*N,N*-diakylethanamine มาทำปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่งที่ 5 ของวง indole โดยทำปฏิกิริยา acetylation และ carbamoylation

- 2) วิเคราะห์พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี

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) การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลและบิวทิลิลโคลีนเอสเตอเรส

นำอนุพันธ์ tryptamine ที่ออกแบบและสังเคราะห์ที่ได้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิทิลและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส การยับยั้งเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ถูกวิเคราะห์และติดตามผลด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรีโดยใช้ อะซิทิลไธโอโคลีน ไอโอไดด์ เป็นสารตั้งต้น โดยวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ปรับปรุงมาจากวิธีการของ Ellman (Ellman et. al., 1961) ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยใช้ กาแลนทามีน เป็นสารอ้างอิงมาตรฐาน และทุกๆ การทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง

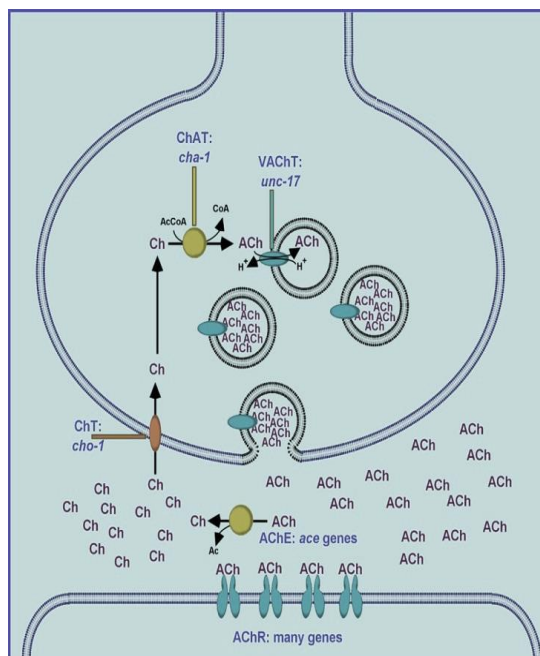
- 4) ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารอนุพันธ์ tryptamine ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิทิลและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซิทิลและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรสของอนุพันธ์ tryptamine ในการดำเนินการต่อไปจะเลือกโครงสร้างที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุด มาเป็นโครงสร้างหลักเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงขึ้นใกล้เคียงหรือดีกว่ายากาแลนทามีน และสามารถนำไปสู่การค้นพบยาในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

อะซิทิลโคลีน (Acetylcholine, ACh) เป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญของระบบประสาท มีหน้าที่เกี่ยวกับการเรียนรู้และความจำ ควบคุมการเคลื่อนไหวต่าง ๆ ของร่างกาย การกระตุ้นและยับยั้งระบบประสาทซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของตัวรับสัญญาณ

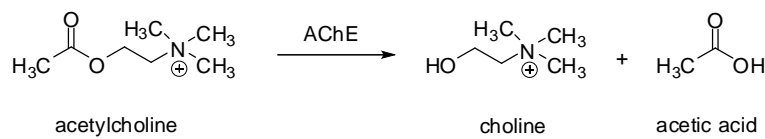
เอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase, AChE) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Serine hydrolase อยู่บริเวณผิวของรอยต่อของไซแนปส์ (รูปที่ 4) ทำหน้าที่สลายอะซิทิลโคลีน (ACh) ที่หลั่งออกมาจากปลายประสาทบริเวณ synaptic cleft ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ผลิตภัณฑ์ คือ Choline และ Acetic acid (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 แสดงบริเวณที่มีเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

ที่มา : http://www.wormbook.org/chapters/www_acetylcholine/cholinefig1.jpg

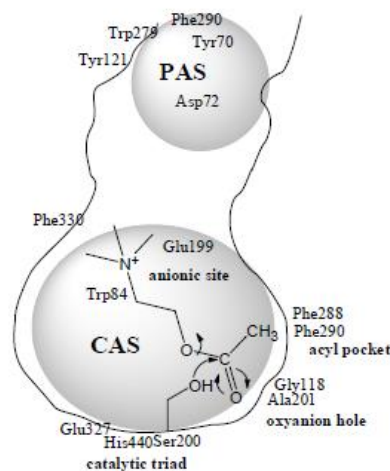
<http://www.atsdr.cdc.gov/csem/cholinesterase/images/acetylcholinesterase.png>



รูปที่ 5 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะซีทิลโคลีน (ACh) ด้วยเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE)

ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงเชื่อว่าแนวทางหนึ่งในการรักษาโรคอัลไซเมอร์จะต้องยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสเพื่อลดการสลายตัวของอะซีทิลโคลีนในสมองซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญของระบบประสาท ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเรียนรู้และความจำดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

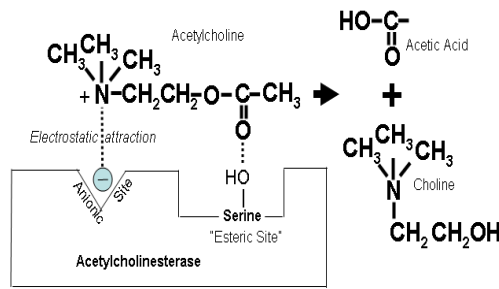
ในปี ค.ศ. 1991 Sussman และคณะ (1991) ได้ศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) จาก *Torpedo californica* (TcAChE) ด้วยเทคนิค x-ray crystallography จากการศึกษา Sussman และคณะ พบว่า Active site ของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) มีลักษณะเป็นช่องที่แคบและลึก โดยมีความลึก 20 Å และส่วนที่แคบที่สุดมีขนาด 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 (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ภาพจำลอง active site gorge ของ TcAChE

เอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) จะมี Active site 2 ตำแหน่ง คือ Anionic site กับ Esteric site เมื่ออะซีทิลโคลีน (ACh) จับกับเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ในบริเวณ CAS ของเอนไซม์ หมู่ Quaternary ammonium ของอะซีทิลโคลีนจะเกิด cation- π interaction กับ Trp84 ที่ Anionic site ขณะที่หมู่ Acetyl ของอะซีทิลโคลีนจะจับในส่วน “Acyl pocket” หรือ Esteric site ซึ่งมี Phe288 และ Phe290 เป็นองค์ประกอบ ปฏิกิริยา Hydrolysis ของอะซีทิลโคลีน เกิดโดยหมู่ Hydroxyl ของ Ser200

เข้าทำปฏิกิริยากับ Ester carbonyl ของอะซีทิลโคลีน ส่วน “Oxyanion hole” ทำหน้าที่ในการ Stabilize transition state ในรูปที่ 6 และ 7

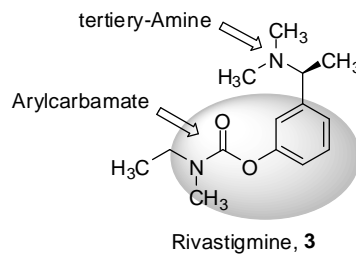


รูปที่ 7 แสดงการจับกันของอะซีทิลโคลีน (ACh) กับ Active site ของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE)

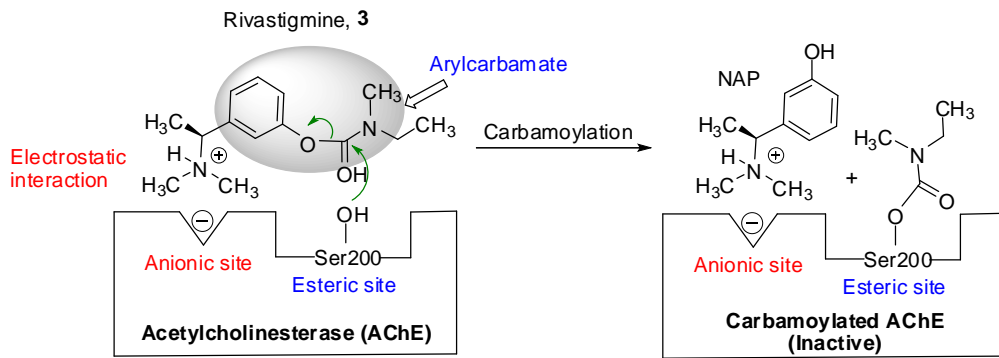
สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase inhibitor หรือ AChEI) จะทำให้สารสื่อประสาทอะซีทิลโคลีนในบริเวณ synapse มีระดับสูงขึ้น สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChEI) ที่มีประโยชน์และสามารถใช้ในการรักษาโรค ได้แก่ สารยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสแบบผันกลับได้ (reversible inhibitor) ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ Classic และ Nonclassic Acetylcholinesterase inhibitor

1) Classic Acetylcholinesterase inhibitor

Classic Acetylcholinesterase inhibitor หมายถึง สารที่เป็น substrate ของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส เมื่อสร้างพันธะโควาเลนต์กับเอนไซม์แล้วได้ผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างคงตัว ทำให้เอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสไม่สามารถทำหน้าที่ได้ อย่างไรก็ตามพันธะดังกล่าวสามารถถูกย่อยสลายได้อย่างช้า ๆ ทำให้สามารถเปลี่ยนเอนไซม์กลับมาในรูปที่ทำงานได้ ยากลุ่มนี้มีก็มีโครงสร้างทางเคมีเป็น Arylcarbamate (Ar-OC(=O)NR₂) เช่น ยา Rivastigmine เป็นต้น (Fifer, E. K., 2008)



ยา Rivastigmine ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสได้โดยการจับในบริเวณ CAS ของเอนไซม์ โดยหมู่ Amine ในรูปที่มีประจุบวกจะเกิดอันตรกิริยากับ Anionic site ทำให้หมู่ Carbamate เข้าใกล้กับตำแหน่งของ Ser200 ที่ตำแหน่ง Esteric site แล้วเกิดปฏิกิริยา Carbamylation ขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 8 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาดังกล่าว คือ (-)-S-3-[(1-dimethylamino)ethyl]phenol (NAP) ยังคงมี affinity ต่อ active site ของเอนไซม์ ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่อไปเป็นเวลานาน นอกจากนี้ จากการศึกษาใน TcAChE พบว่าหลังจาก Ser200 ถูกเติมหมู่ carbamate แล้ว His440 จะเคลื่อนออกจาก Glu327 จึงทำให้เกิดการทำลายระบบของ catalytic triad เป็นสาเหตุให้กระบวนการ reactivate เอนไซม์เกิดขึ้นได้ช้าลง (Bar-On et.al., 2002)

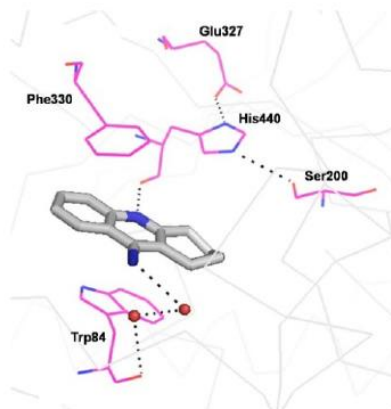


รูปที่ 8 การออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE ของ rivastigmine

2) Nonclassic Acetylcholinesterase inhibitor

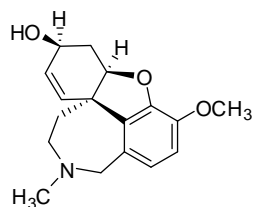
Nonclassic Acetylcholinesterase inhibitor หมายถึง สารที่จับกับเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยมี affinity สูงกว่าอะซีทิลโคลีนแต่ไม่เกิดปฏิกิริยาสร้างพันธะโควาเลนต์กับเอนไซม์ (Fifer, E. K., 2008) สารกลุ่มนี้แบ่งได้เป็นสองประเภท ได้แก่ Nonclassic Acetylcholinesterase inhibitor ที่มี affinity ต่อ CAS และ Nonclassic Acetylcholinesterase inhibitor ที่เป็น dual binding site inhibitors

สารกลุ่ม Nonclassic Acetylcholinesterase inhibitor ที่มี affinity ต่อ CAS ได้แก่ Tacrine และ Galanthamine สารเหล่านี้จับกับเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสเฉพาะในบริเวณ CAS จึงขัดขวางอะซีทิลโคลีนไม่ให้เข้ามายังบริเวณ Active site ได้ Tacrine ได้รับการรับรองให้ใช้รักษาอัลไซเมอร์เป็นชนิดแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1993 แต่ปัจจุบันถูกนำมาใช้น้อยลงเนื่องจากมีพิษต่อดับ Tacrine เกิด stacking interaction กับ Trp84 และ Phe330 ที่ Anionic site ของ active site ของ TcAChE nitrogen บนวงแหวน เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ carbonyl oxygen ของ His-440 (3.1 Å) ส่วน Amino nitrogen สร้าง hydrogen bond กับโมเลกุลของน้ำ ดังรูปที่ 9 (Harel et.al., 1993)



รูปที่ 9 โครงสร้างผลึกใน 3 มิติของสารเชิงซ้อนระหว่าง Tacrine กับเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (Tacrine-AChE complex)

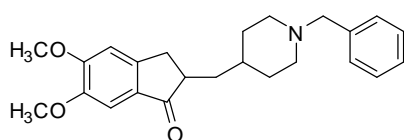
(-)-Galantamine เป็นอัลคาลอยด์จาก *Galanthus nivalis* ซึ่งนอกจากมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสแล้ว ยังสามารถกระตุ้น nicotinic Ach receptor (nAChR) ทั้งที่ pre- และ post-synaptic พบว่ายาเกิดอันตรกิริยาที่ choline-binding site (Trp84) และ Acyl pocket หรือ Esteric site (Phe288, Phe290) ของ TcAChE (Greenblatt et.al., 1991)



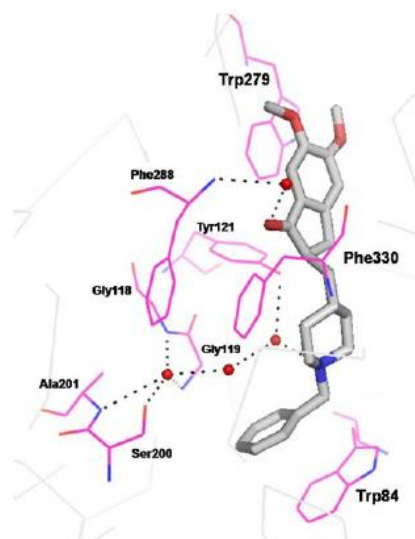
Galantamine, 2

Nonclassic Acetylcholinesterase inhibitor ที่เป็น Dual binding site inhibitors หมายถึง สารที่สามารถจับได้ทั้งในบริเวณ CAS และ PAS ของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส โดยทั่วไปสารในกลุ่มนี้จะมีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่า Nonclassic Acetylcholinesterase inhibitor 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- π interaction กับ Phe330 ในช่วงกลางของ active site gorge อีกด้วย ดังรูปที่ 10 (Kryger et.al., 1998)



Donepezil, 4



รูปที่ 10 โครงสร้างผลึกใน 3 มิติของสารเชิงซ้อนระหว่าง Donepezil กับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (TcAChE-*Donepezil* complex, PDB code 1EVE)

นอกจากนี้ยา Donepezil เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสชนิดแรก ที่พบว่าสามารถยับยั้ง A β aggregation (Bartolini et al., 2003) การที่ยาจับกับ peripheral anionic site ของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสทำให้ยามีความจำเพาะ (selectivity) ต่อเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสมากกว่าเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเทอเรส (Butyrylcholinesterase, BuChE) ทั้งนี้ สามารถอธิบายได้ว่าการจับกันระหว่าง Donepezil กับสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส จะอาศัย π - π interaction กับ Trp279 ที่บริเวณ PAS ของ AChE แต่ BuChE ไม่มี Aromatic residue ที่ PAS และตำแหน่งออกฤทธิ์ของ BuChE มีลักษณะเป็นช่องที่มีขนาดใหญ่กว่าเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสทำให้ไม่เอื้อต่อการจับกับ Donepezil (Saxena et al., 2003)

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นว่าในปัจจุบันยากลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส ที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลกให้ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์มี 4 ชนิด ได้แก่ Galanthamine Tacrine Donepezil และ Rivastigmine สำหรับการศึกษาด้านคลินิก ของยาพบว่า ยาในกลุ่มนี้ทุกตัวโดยภาพรวมแล้ว ให้ผลดีกว่ายากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตาม ยาดังกล่าวยังส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยอย่างมาก

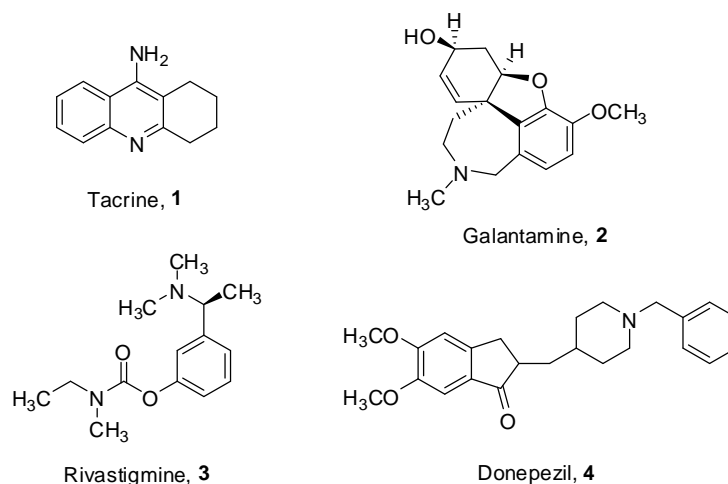
เมื่อเร็ว ๆ นี้ Queiroz และคณะ (2014) ได้สกัดสารจากเปลือกของต้น *Tetrapterys mucronata* หรือ Ayahuasca โดยสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล จากนั้นได้นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปแยกสารให้บริสุทธิ์และตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ด้วยเทคนิค HPLC-PDA ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกสารได้ 22 ชนิด และมีสาร 5 ชนิดที่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยมีค่า IC₅₀ ต่ำกว่า 15 μ M ซึ่งมีค่าความสามารถในการยับยั้งค่อนข้างดีเมื่อเทียบกับยา Tacrine (IC₅₀ = 0.09 \pm 0.02 μ M) และยา Galanthamine (IC₅₀ = 2.4 \pm 0.2 μ M) ที่ใช้เป็น Positive control เมื่อพิจารณาโครงสร้างสารทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ สาร 5-hydroxy-*N,N*-dimethyltryptamine (bufotenine) (5), 5-methoxy-*N*-methyltryptamine (6), 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine (7), และ สาร dimeric indolic alkaloids ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ Mucronatin A (8) และ Mucronatin B (9) เป็นอนุพันธ์ tryptamine

แม้ว่าอนุพันธ์ tryptamine ที่แยกได้จากเปลือกของต้น *Tetrapterys mucronata* จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ค่อนข้างดี แต่สารอนุพันธ์ tryptamine ที่ได้มีปริมาณน้อย ในงานวิจัยนี้จึงสนใจออกแบบการสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารอนุพันธ์ tryptamine เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในระดับใกล้เคียงหรือดีกว่ายา Galanthamine ซึ่งจะนำไปสู่การการค้นพบยาในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไป

1.5 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

ปัจจุบันประเทศไทยมีผู้ป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์จำนวนมาก โดยเฉพาะผู้สูงอายุ และพบมากขึ้นตามอายุที่มากขึ้น ผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จะเกิดภาวะการเสื่อมของสมอง ทำให้สูญเสียความทรงจำและการเรียนรู้ บางรายอาจรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ คือ การถูกทำลายของสารสื่อประสาท อะซิติลโคลีน (acetylcholine; ACh) โดยเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase; AChE) และบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส (butyrylcholinesterase; BChE) ส่งผลให้ปริมาณของสารสื่อประสาทในสมองลดลง เมื่อโรครมีการดำเนินการต่อไปจะพบการตายของเซลล์ประสาทในบริเวณสมองส่วนหน้า ทำให้ผู้ป่วยเกิดการสูญเสียความจำในที่สุด (ลีอลักษณ์ ล้อมลิ้ม และธีรภัทร นวลน้อย, 2554)

จนถึงปัจจุบันพบว่าไม่สามารถรักษาโรคอัลไซเมอร์ให้หายขาดได้ ทำได้เพียงการชะลออาการของผู้ป่วยเท่านั้น โดยยาที่ได้รับการรับรองให้ใช้รักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ มี 4 ชนิด ได้แก่ 1) ยา tacrine 2) ยา galanthamine 3) ยา rivastigmine และ 4) ยา donepezil (รูปที่ 11) โดยยาทั้ง 4 ชนิดทำหน้าที่ไปช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรส ส่งผลให้ลดการถูกทำลายของสารสื่อประสาทอะซีทิลโคลีน



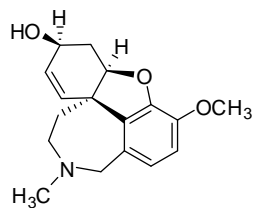
รูปที่ 11 ยารักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ที่ใช้ในทางคลินิก

อย่างไรก็ตามยาทั้ง 4 ชนิด ส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยอัลไซเมอร์อย่างมาก เช่น ยา Galanthamine มีผลข้างเคียงทำให้ผู้ป่วยมีน้ำหนักรลดลง ยา Rivastigmine ทำให้เกิดอาการเวียนศีรษะ มึนงงได้ และยา Donepezil มีอาการข้างเคียงทำให้ผู้ป่วยนอนไม่หลับ (จักรกฤษณ์ สุขยิ่ง, 2555) ดังนั้นจึงได้มีความพยายามหาสารชนิดใหม่ๆ ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิลโคลีนเอสเตอเรส เพื่อนำไปสู่การการค้นพบยาในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น แต่แสดงผลข้างเคียงน้อยหรือไม่แสดงผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย

ด้วยเหตุนี้จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกสนใจหาสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสได้ดีกว่าหรือพอ ๆ กับยาทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในปัจจุบัน แต่ไม่มีผลข้างเคียงหรือมีผลข้างเคียงน้อย โดยแนวทางที่นักวิทยาศาสตร์สนใจแบ่งได้เป็น 2 แนวทาง ได้แก่ การแยกสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส และการสังเคราะห์สารหรือปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ตัวอย่างแสดงได้ดังนี้

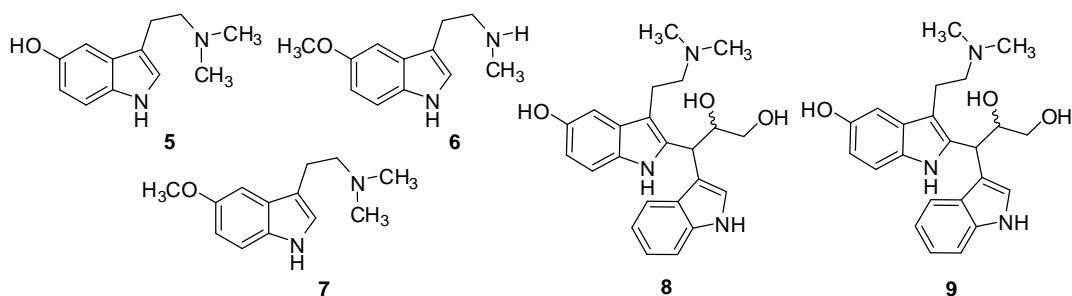
1. ตัวอย่างสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส

สารสกัดจากธรรมชาติที่ปัจจุบันใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ (-)-Galantamine ซึ่งเป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ที่สกัดแยกได้จาก *Galanthus nivalis* นอกจากนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสแล้ว ยังสามารถกระตุ้น nicotinic Ach receptor (nAChR) ทั้งที่ pre- และ post-synaptic พบว่ายาเกิดอันตรกิริยาที่ choline-binding site (Trp84) และ Acyl pocket หรือ Esteric site (Phe288, Phe290) ของ TcAChE (Greenblatt et.al., 1991)



Galantamine, 2

เมื่อเร็ว ๆ นี้ ได้มีนักวิจัยจากประเทศบราซิลและประเทศสวิตเซอร์แลนด์ (Queiroz และคณะ, 2014) ได้ศึกษาการสกัดสารจากเปลือกของต้น *Tetrapterys mucronata* หรือ Ayahuasca ซึ่งพบได้ในประเทศบราซิล โดยนำเปลือกของต้น *Tetrapterys mucronata* มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล จากนั้นได้นำสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเอทานอลที่ได้ไปแยกสารให้บริสุทธิ์และตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ด้วยเทคนิค HPLC-PDA ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกสารได้ 22 ชนิด โดยเป็นสารใหม่ (new compound) 6 ชนิด และมีสาร 5 ชนิด ได้แก่ สาร 5-hydroxy-*N,N*-dimethyltryptamine (bufotenine) (5), 5-methoxy-*N*-methyltryptamine (6), 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine (7), และสาร dimeric indolic alkaloids ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ Mucronatin A (8) และ Mucronatin B (9) (รูปที่ 12) ที่พบว่ามียุทธียับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยมีค่า IC_{50} ต่ำกว่า $15 \mu M$ ซึ่งมีค่าความสามารถในการยับยั้งค่อนข้างดีเมื่อเทียบกับยา Tracine ($IC_{50} = 0.09 \pm 0.02 \mu M$) และยา Galanthamine ($IC_{50} = 2.4 \pm 0.2 \mu M$) ที่ใช้เป็น Positive control เมื่อพิจารณาโครงสร้างสารทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เป็นอนุพันธ์ tryptamine โครงสร้างสาร 5-9 แสดงดังตารางที่ 1



รูปที่ 12 สารอนุพันธ์ tryptamin 5-9 ที่แยกได้จากเปลือกของต้น *Tetrapterys mucronata* หรือ Ayahuasca และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

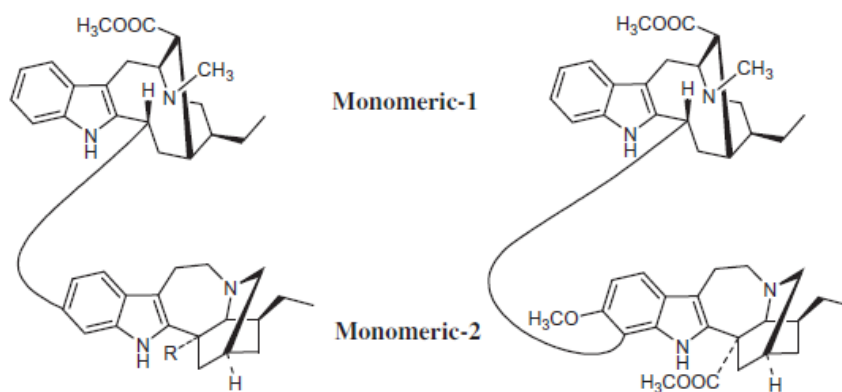
ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่สกัดจากเปลือกต้น Tetrapteryx mucronata

สารที่แยกได้จากธรรมชาติ	IC ₅₀ (μM) ^a
5	11.4 ± 0.2
6	12.5 ± 0.3
7	14.0 ± 0.2
8	11.7 ± 0.4
9	12.7 ± 0.3
Galanthamine ^b	2.4 ± 0.2
Tacrine ^b	0.09 ± 0.02

^a means ± standard deviations obtained from three independent experiments

^b Positive control

ในปี ค.ศ. 2006 Ingkaninan และคณะ (2006) ประสบความสำเร็จในการแยกสารประกอบ monomeric และ bis-indole จากส่วนสกัดของพืช *T. divaricate* จากนั้นเมื่อนำสารไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสาร 19,20-Dihydrotabernamine (**10**) และ 19,20-dihydroervahanine A (**11**) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ดีมาก โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 227 ± 154 และ 71 ± 13 nM ตามลำดับ นอกจากนี้ได้แยกสาร Tabernaelegantine A (**12**) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสาร **10** และ **11** แต่สาร **12** ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส จากผลการทดลองดังกล่าวผู้วิจัยสรุปว่าหมู่แทนที่บนตำแหน่ง ของวงอินโดลที่เหมาะสมจะส่งผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส



10, R = H (IC₅₀ for AChE = 227 ± 154 nM)

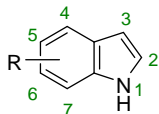
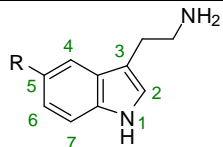
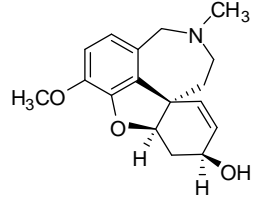
12, R = H

11, R = COOCH₃ (IC₅₀ for AChE = 71 ± 13 nM)

ในปี ค.ศ. 2012 Khorana และคณะ (2012) ซึ่งเป็นกลุ่มวิจัยเดียวกันกับ Ingkaninan ได้นำสารประกอบ indole ชนิดต่าง ๆ รวมทั้ง 5-methoxytryptamine และ 5-hydroxytryptamine (serotonin) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญในระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) ของสัตว์ มาทดสอบฤทธิ์

ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ผลการศึกษาพบว่า สารประกอบ indole ที่ไม่มีหมู่ ethylamine ที่ตำแหน่ง 3 ของวง indole จะมีฤทธิ์ยับยั้งต่ำถึงปานกลาง (% Inhibition = 4.26 ± 2.41 ถึง 36.82 ± 5.59 %) ขณะที่เมื่อมีหมู่ ethylamine ที่ตำแหน่ง 3 ของวง Indole ซึ่งก็คืออนุพันธ์ของ Tryptamine พบว่า เมื่อมีหมู่ Methoxy ที่ตำแหน่ง 5 ของ Tryptamine จะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส เพียง 7.19 ± 3.02 % แต่เมื่อนำ Serotonin ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซี (OH) ที่ตำแหน่งที่ 5 ของวง Tryptamine มาทดสอบพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสเพิ่มขึ้นถึง 62.59 ± 3.74 % (ในการทดลองใช้ Galantamine เป็น Positive control มีฤทธิ์ยับยั้งเท่ากับ 100.00 ± 0.00 %) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase ของสารประกอบ Indole ที่ความเข้มข้น 10^{-4} M

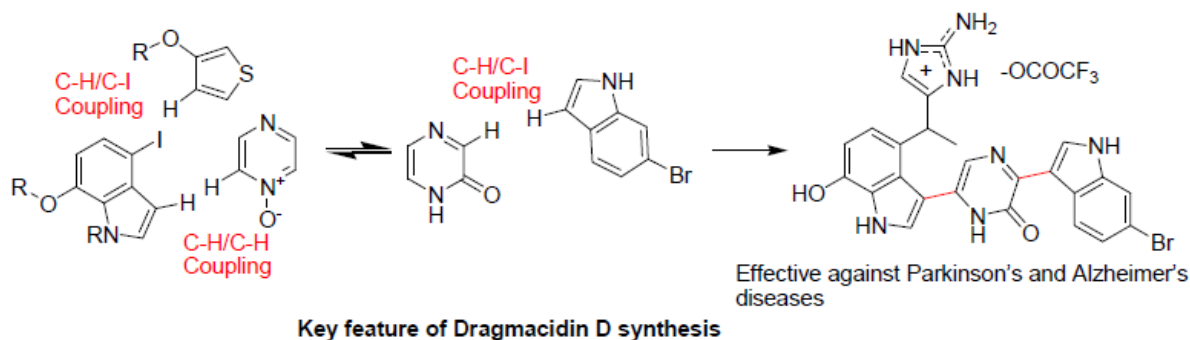
สารประกอบ Indole	R	% Inhibition (\pm SD)
	4-OCH ₃	9.24 ± 4.03
	5-OCH ₃	4.26 ± 2.41
	6-OCH ₃	11.41 ± 2.20
	7-OCH ₃	8.17 ± 3.07
	4-COOH	$36.82 \pm 5.59^*$
	5-COOH	$29.05 \pm 3.86^*$
	6-COOH	$28.50 \pm 4.42^*$
	7-COOH	$23.35 \pm 7.62^*$
	4-OH	19.04 ± 5.87
	5-OH	7.33 ± 4.10
	5-OCH ₃	7.19 ± 3.02
	5-OH	62.59 ± 3.74
 Galantamine, 2	-	$100.00 \pm 0.00^{**}$

* = % Inhibition at concentration 6.2×10^{-4} M

** = % Inhibition at concentration 3.4×10^{-4} M; $IC_{50} = 0.60 \pm 0.01 \mu$ M

2. ตัวอย่างสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส

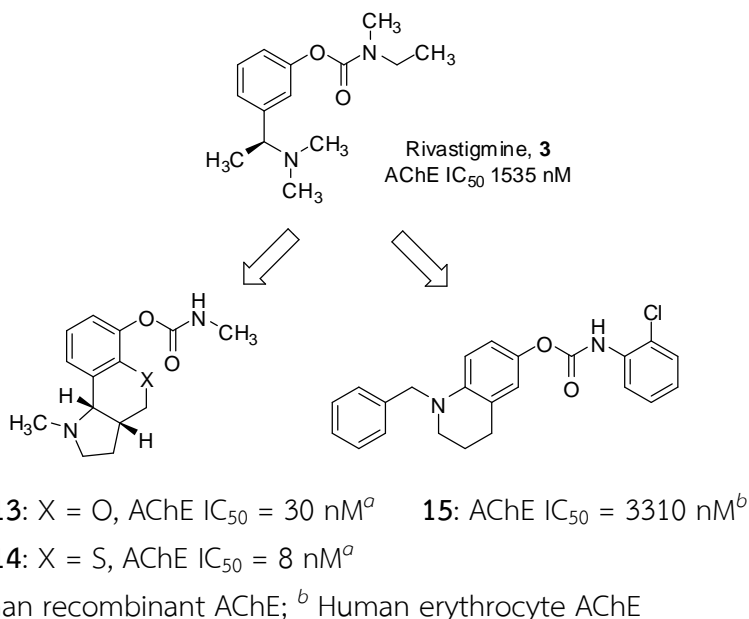
เมื่อปี ค.ศ. 2011 Mandal และคณะ (2011) ได้สังเคราะห์สาร Dragmacidine-D แบบ Enantioselective โดย Dragmacidine-D เป็นสารที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล โครงสร้างประกอบด้วยพันธะระหว่าง Indole กับ Azine (2 Indole-azine bonds) สาร Dragmacidine-D เคยมีการรายงานว่ามีฤทธิ์ในการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ พาร์กินสัน (Parkinson's disease) และโรคฮันติงตัน (Huntington's disease) ซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรมโรคหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสื่อมของระบบประสาท ส่งผลต่อการควบคุมประสานงานของกล้ามเนื้อ ทำให้สติปัญญาเสื่อมถอย และนำไปสู่ภาวะสมองเสื่อมได้ Mandal และคณะได้สังเคราะห์ Dragmacidine-D โดยใช้ปฏิกิริยา C-H coupling reaction โดยใช้สารตั้งต้น 3 ชนิด หนึ่งในนั้นเป็นสารประกอบ 4-Iodo-7-hydroxyindole วิธีการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 การสังเคราะห์ Dragmacidine-D แบบ Enantioselective

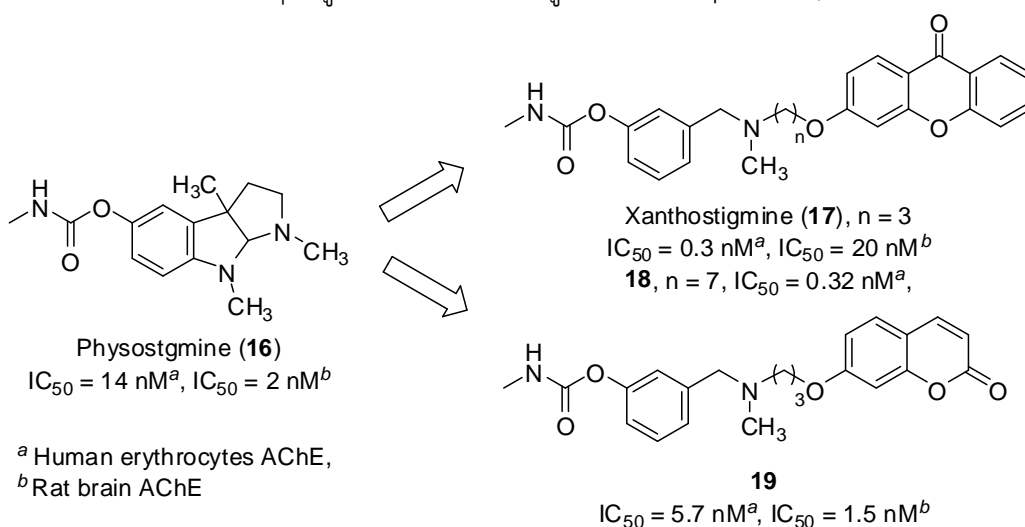
แนวทางการออกแบบสารที่เกี่ยวข้องกับสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (AChEI) ใหม่ ๆ สำหรับใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ในช่วง 10 ปีมานี้ นอกเหนือจากความพยายามในการออกแบบสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสที่มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงขึ้นแล้ว ยังมีแนวคิดในการออกแบบสารซึ่งในหนึ่งโมเลกุลมีฤทธิ์ต่อเป้าหมายอื่นที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิดโรคหรืออาการอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกันกับโรค 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 การเชื่อมต่อระหว่างสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (AChEI) กับสารที่มีฤทธิ์ต้านกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับสรีรวิทยาของการเกิดโรค หรือการทำอนุพันธ์ลูกผสม (hybrid molecule) โดยอนุพันธ์ลูกผสม หมายถึง สารที่ได้จากการนำ pharmacophore ของสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกันตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปมารวมกันเป็นโมเลกุลใหม่ โดยมุ่งหวังให้สารใหม่ที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเช่นเดียวกับสารต้นแบบ (Muñoz-Torrero, D., and Camps, P., 2006, Cavalli et.al., 2008)

ตัวอย่างเช่น การพัฒนาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (AChEI) จาก Rivastigmine (3) ได้แก่ การทำ Conformationally restricted analog เช่น Tricyclic analog 13 และ 14 ซึ่งมีความแรงในการยับยั้ง human recombinant AChE สูงขึ้น (Bolognesi et.al., 2001 and Bolognesi et.al., 2004) นอกจากนี้ยังมีอนุพันธ์ 15 ซึ่งให้ผลเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และเพิ่มระดับ ACh ในสมอง ดังรูปที่ 13 (Chaudhaery et.al., 2010)



รูปที่ 13 สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (AChEI) ที่ปรับปรุงโครงสร้างมาจากยา Rivastigmine

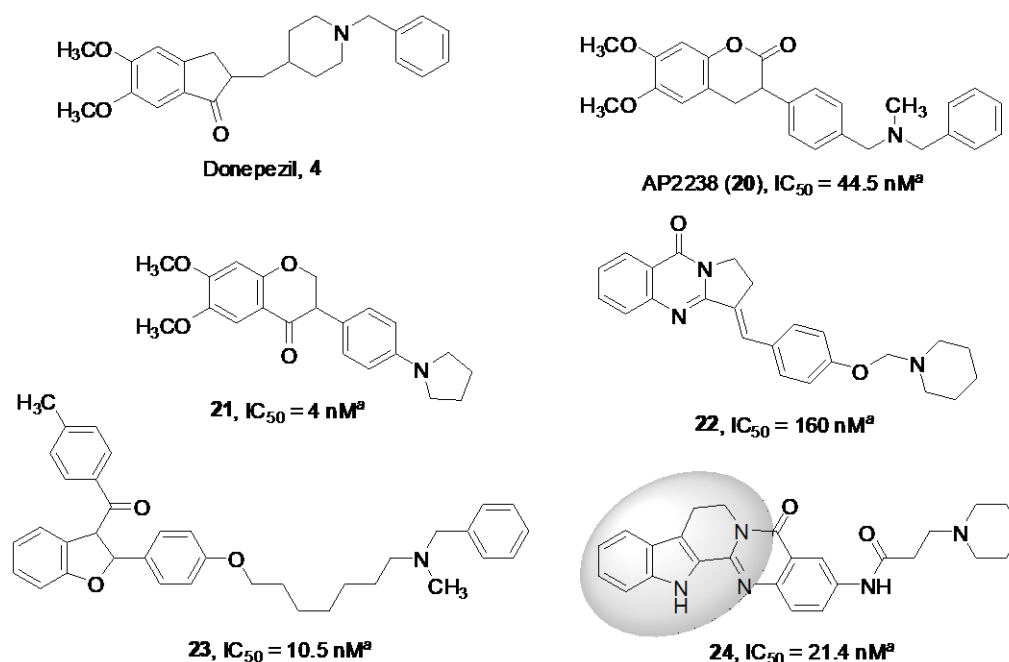
ตัวอย่างอื่น ๆ เช่น เมื่อพิจารณาจากยาต้นแบบ คือ Physostigmine (**16**) มีการออกแบบ Dual binding site inhibitor โดยการเชื่อมต่อโครงสร้าง Aryl carbamate กับ Xanthone ด้วย Linker ที่มีความยาวต่าง ๆ ได้สาร Xanthostigmine (**17**) ซึ่งมีความแรงในการยับยั้ง Human AChE สูงกว่า Physostigmine 46 เท่า Molecular modeling แสดงให้เห็นว่า หมู่ Carbamate อยู่ในบริเวณ Active site ของ TcAChE และเกิดอันตรกิริยากับ Catalytic triad 29 การเพิ่มความยาวของ Linker สามารถเพิ่มการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง Heterocyclic moiety กับบริเวณ PAS ได้อนุพันธ์ **18** ซึ่งมีความยาวของ Alkoxy chain n = 7 มีความแรงในการออกฤทธิ์ และความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้ง AChE สูงกว่า Physostigmine นอกจากนี้ การใช้ Heterocyclic ring อื่น เช่น Coumarin มาแทนที่ Xanthone พบว่า สาร **19** มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่ายาต้นแบบ ดังรูปที่ 14 (Rampa et.al., 2001)



รูปที่ 14 แนวทางการออกแบบอนุพันธ์ Physostigmine (**16**) เพื่อใช้เป็น สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (AChEI)

ในปี ค.ศ. 2003 Piazzini และคณะ (2003) ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของยา Donepezil และเมื่อพิจารณาผลการทดลองจาก Structure activities relationship (SAR) ของอนุพันธ์ Donepezil พบว่า หมู่ Benzylamino จำเป็นต่อการจับที่ CAS และ Indanone ring จะช่วยการจับที่ PAS เนื่องจากในบริเวณส่วนกลางของ Binding site gorge ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็น aromatic จึงมีการออกแบบอนุพันธ์ที่มีหมู่ Phenyl บน spacer เพื่อเพิ่มอันตรกิริยากับส่วนกลางของ gorge ได้อนุพันธ์ คือ AP2238 (20) ซึ่งมีความแรงในการออกฤทธิ์ในระดับนาโนโมลาร์ จากการทำ Docking simulation บนโครงสร้างของ Human AChE พบว่าหมู่ Phenyl บน Spacer ช่วยเพิ่มการจับกับเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) โดยเกิด π - π stacking กับ Tyr341 และ OH- π interaction กับ Tyr124 AP2238 มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อ AChE และสามารถยับยั้ง AChE-induced A β -aggregation ได้อีกด้วย (Piazzini et.al., 2003)

อนุพันธ์อื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติเป็น Dual binding site AChEI ที่เกิดอันตรกิริยากับ mid gorge ได้แก่ อนุพันธ์ flavonoids (21) อนุพันธ์ isaindigotone (22) อนุพันธ์ benzofuran (23) และอนุพันธ์ rutaecarpine (24) ซึ่งมีส่วนของ tryptamine อยู่ในโมเลกุล ดังรูปที่ 15



^a Recombinant human AChE; ^b Rat brain AChE; ^c Electric eel AChE

รูปที่ 15 AP2238 และอนุพันธ์ของ Donepezil

จากการค้นคว้าในเอกสารอ้างอิงต่าง ๆ พบว่าสารจากธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสกลุ่มหนึ่งที่ที่น่าสนใจ คือ มีวง Indole หรือ Tryptamine (3-(2-aminoethyl)indole) เป็นส่วนประกอบ อย่างไรก็ตามการศึกษาการสังเคราะห์และปรับปรุงโครงสร้างอนุพันธ์ tryptamine และ indole ชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสสำหรับใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ ยังมีรายงานอยู่น้อย งานวิจัยของเราจึงสนใจศึกษาการออกแบบการสังเคราะห์ดังกล่าว

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ด้านวิชาการ ด้านนโยบาย ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ ด้านสังคมและชุมชน รวมถึงการเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1) เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

การออกแบบการสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารอนุพันธ์ Tryptamine ในการใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (ChE-Is) เป็นองค์ความรู้ใหม่ในด้านการค้นพบสารกลุ่มใหม่ที่สามารถใช้เป็นยารักษาอัลไซเมอร์ ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้จะเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้ และมีความเป็นไปได้ที่จะนำองค์ความรู้ที่ได้ไปต่อยอดเพื่อนำไปสู่การพบสารกลุ่มใหม่ ที่เป็นทางเลือกในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ที่มีประสิทธิภาพทั้งในการรักษาอาการ และชะลอการดำเนินไปของโรคต่อไปในอนาคต

2) บริการความรู้แก่ประชาชน

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการค้นพบสารอนุพันธ์ Tryptamine ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิติลและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส และเป็นพื้นฐานองค์ความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอด และผลิตเป็นยารักษาอัลไซเมอร์ชนิดใหม่ได้ และสามารถให้ความรู้ความเข้าใจแก่ประชาชนทั่วไปโดยทำการเผยแพร่ผ่านสื่อต่างๆ เช่น รายการวิทยุเพื่อประชาชน และวารสารต่างๆ

3) บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ และนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

อนุพันธ์ของสารอนุพันธ์ Tryptamine ที่สังเคราะห์ได้อาจจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิติลและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ดีในระดับเดียวกันหรือสูงกว่ายาแกแลนทามีน แต่มีผลข้างเคียงลดลงหรือไม่มีผลข้างเคียง ทำให้สามารถใช้สารกลุ่มนี้เป็นยาทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ หลังจากจดสิทธิบัตรแล้วสามารถให้ข้อมูลแก่ภาคธุรกิจได้แก่ องค์กรเภสัชกรรม หรือ บริษัทยา เพื่อนำไปผลิตเป็นสูตรยาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

4) เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

ประชากรทั่วไปของประเทศไทยโดยเฉพาะผู้สูงอายุที่มีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคอัลไซเมอร์มาก จะสามารถได้ใช้ยาที่มีคุณภาพมากกว่าเดิม และผลข้างเคียงน้อยลง นอกจากนี้ในโครงการวิจัยนี้เมื่อแล้วเสร็จคาดว่าจะสามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ภายใต้การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาและเป็นโครงการวิจัยย่อยแก่นิสิตระดับปริญญาตรี

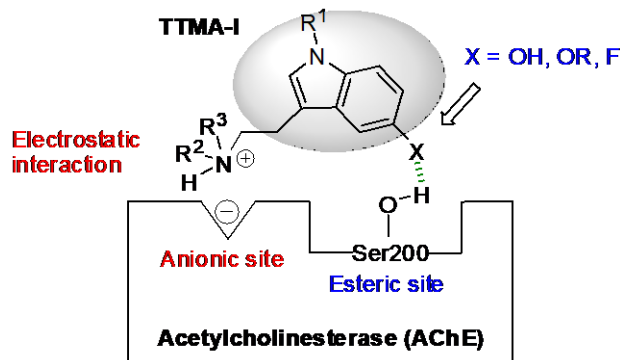
หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ได้แก่ สถาบันการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านชีวเคมี เภสัชเคมี เช่น คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ในการนำผลการศึกษาไปศึกษาต่อยอด และองค์การเภสัชกรรม หรือหน่วยงาน บริษัทอุตสาหกรรมยา ในการนำไปพัฒนาเป็นสูตรยา

บทที่ 2 วิธีการทดลอง

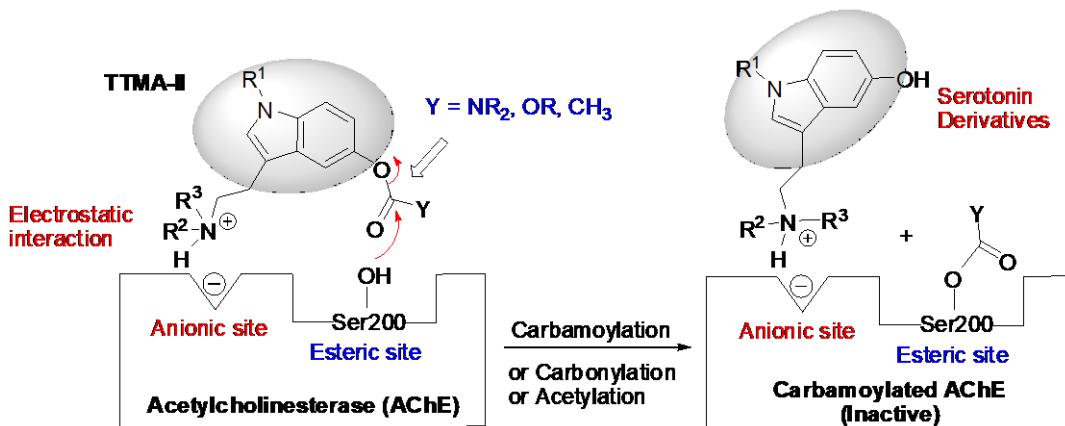
วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ส่วน

กิจกรรมส่วนที่ 1 ออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine ชนิดต่าง ๆ

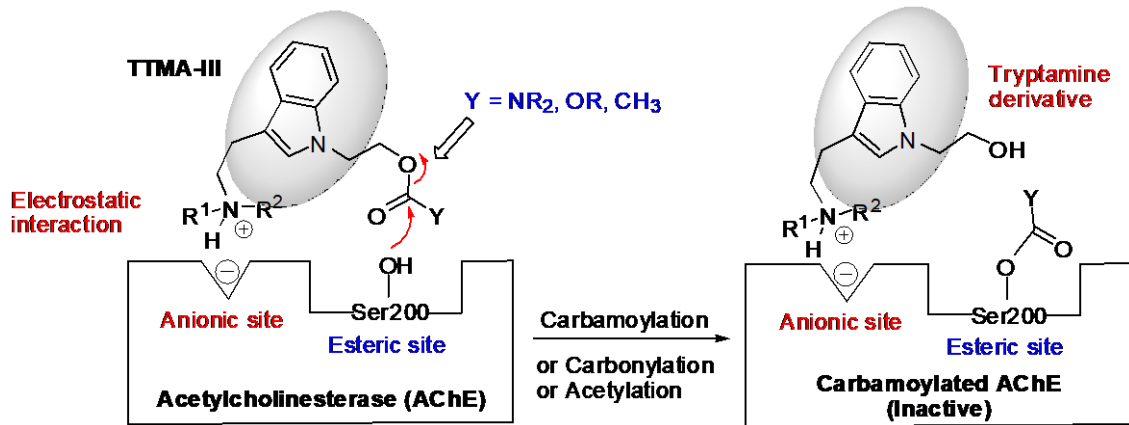
จากข้อมูลที่มีรายงานในงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า อนุพันธ์ของ Tryptamine ที่พบในธรรมชาติมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) ได้ค่อนข้างดีเมื่อเทียบกับยา Galantamine อย่างไรก็ตามสารที่ได้จากธรรมชาติดังกล่าวมีปริมาณน้อย และการสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine เพื่อปรับปรุงโครงสร้างเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ดีกว่าหรือเทียบเท่ากับยา Galantamine เพื่อใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ยังไม่มีเคยรายงาน ในงานวิจัยนี้จึงสนใจออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine 4 กลุ่ม (TTMA-I, TTMA-II, TTMA-III, TTMA-IV และ TTMA-V) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยปรับเปลี่ยนโครงสร้างบริเวณหมู่ Amino ของ Tryptamine และอนุพันธ์ เพื่อให้สามารถจับกับตำแหน่ง Anionic site ของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ดีขึ้น และปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยเพิ่มหมู่ Carbamate, หมู่ Carbonate, หมู่ Acetyl, หมู่ Hydroxy, หมู่ Methoxy และหมู่ Halogen เพื่อจับกับตำแหน่ง Esteric site ของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ดีขึ้น ดังรูปที่ 16-18



รูปที่ 16 การออกแบบสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog I (TTMA-I) เพื่อยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

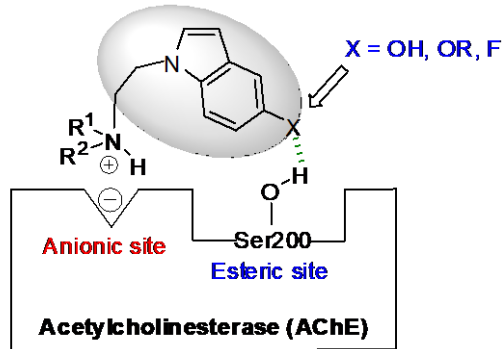


รูปที่ 17 การออกแบบสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog II (TTMA-II) เพื่อยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

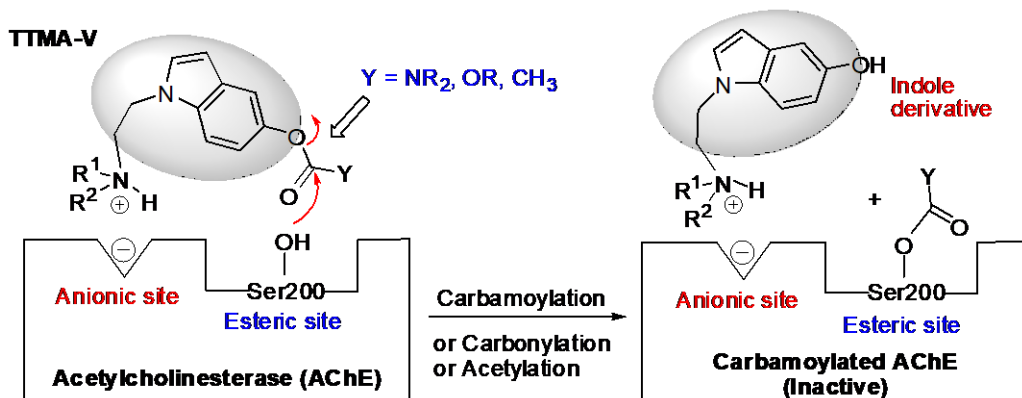


รูปที่ 18 การออกแบบสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog III (TTMA-III) เพื่อยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส

TTMA-IV



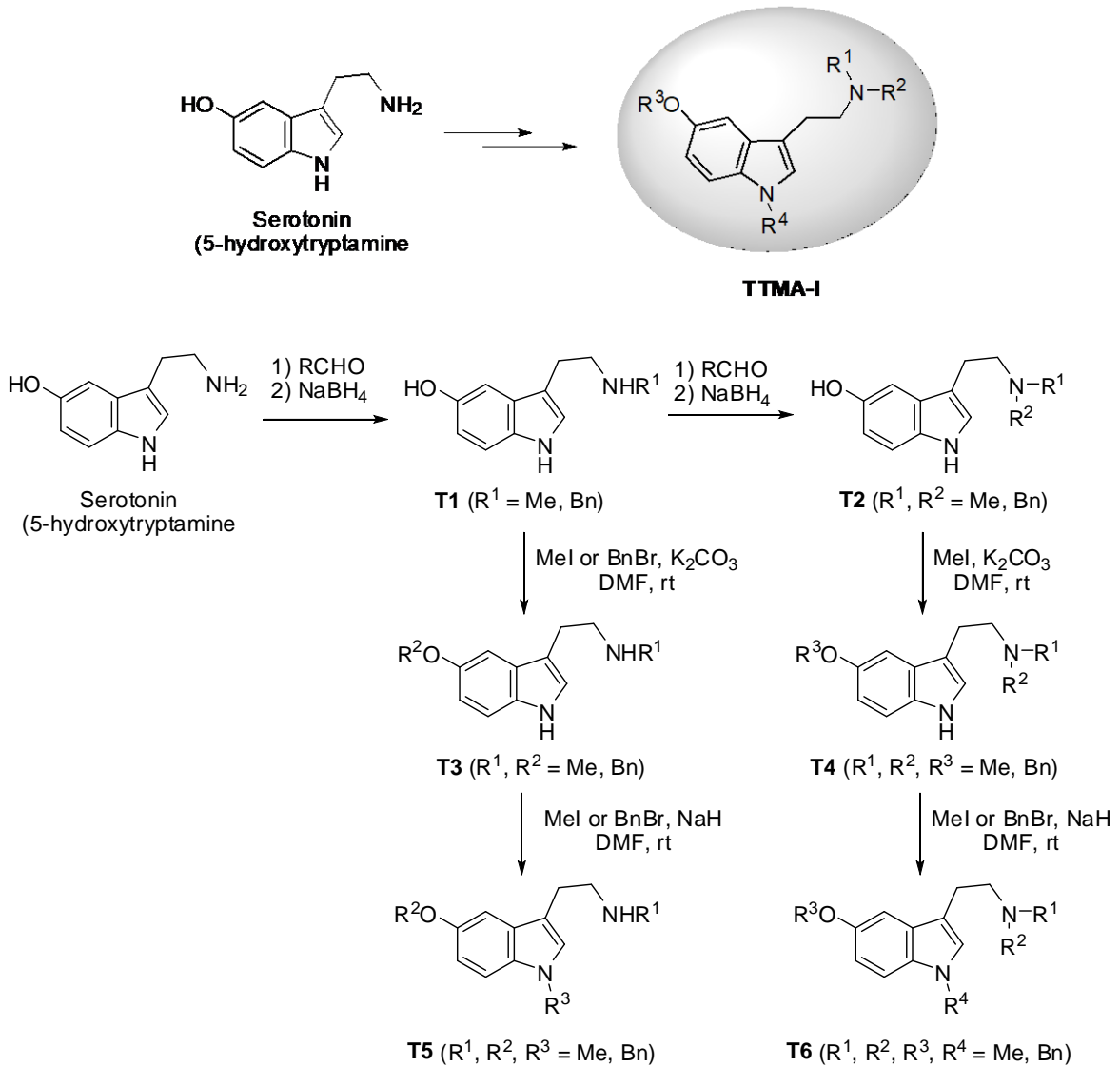
รูปที่ 19 การออกแบบสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog I (TTMA-IV) เพื่อยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส



รูปที่ 20 การออกแบบสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog V (TTMA-V) เพื่อยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส

กิจกรรมส่วนที่ 1.1 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างอนุพันธ์ Tryptamine TTMA-I

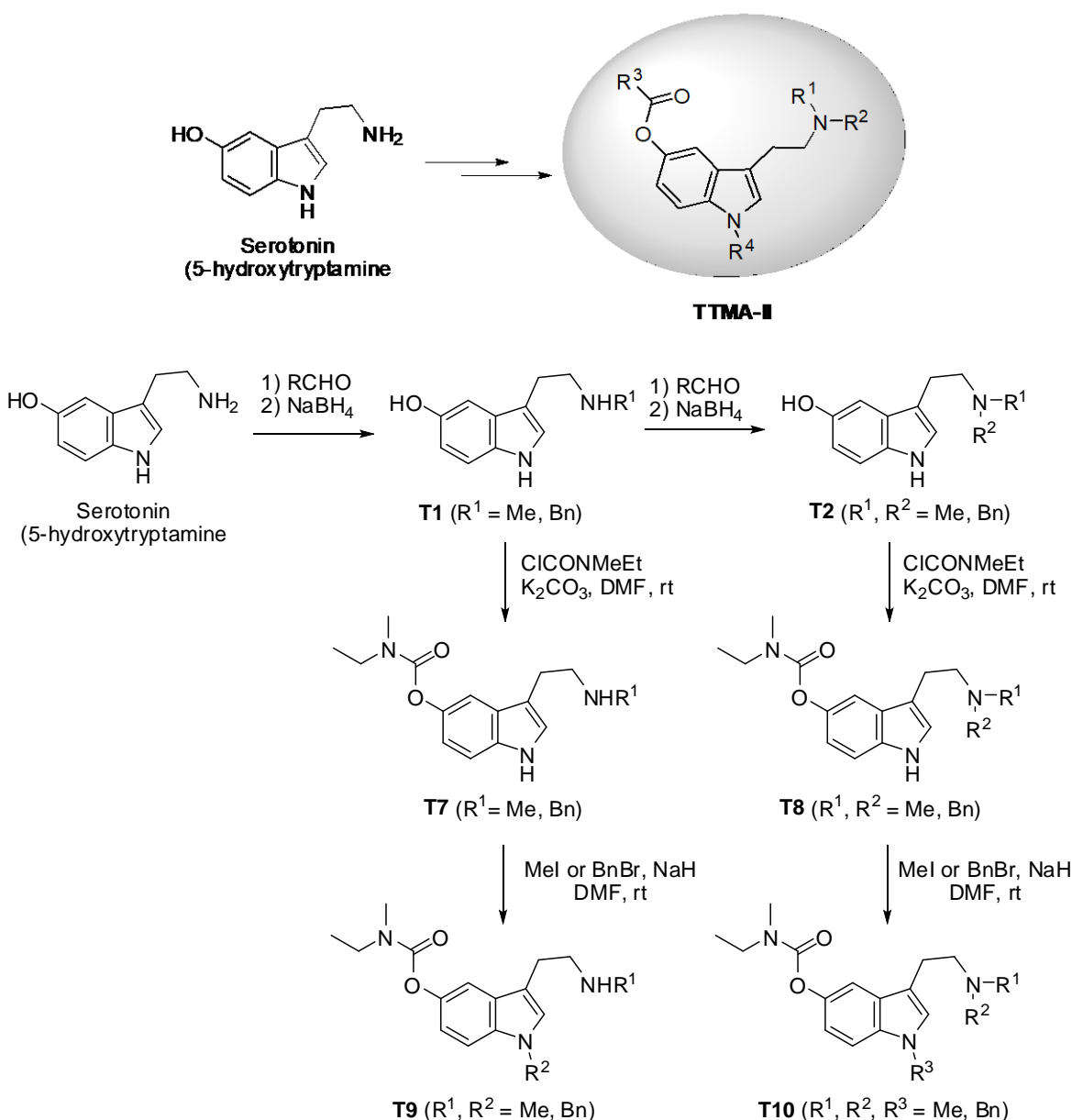
การสังเคราะห์อนุพันธ์ TTMA-I ตามที่ได้ออกแบบไว้ เริ่มต้นจะใช้สารตั้งต้นเป็น Serotonin (5-Hydroxytryptamine) ซึ่งมีขาย จากนั้นทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างบริเวณหมู่ Amino โดยทำปฏิกิริยากับ Aldehyde ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Formaldehyde, Benzaldehyde เป็นต้น ได้เป็น Imine จากนั้นทำปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยน Imine ให้เป็น Amine ด้วย Sodium borohydride ได้เป็นสาร T1 ถ้านำสาร T1 มาทำปฏิกิริยากับ Aldehyde ตามด้วยปฏิกิริยารีดักชันอีกครั้งหนึ่งจะได้เป็นสาร T2 จากนั้นทำปฏิกิริยา Selective O-Alkylation สาร T1 และ T2 ด้วย Methyl iodide หรือ Benzyl bromide ภายใต้สภาวะเบสของ Potassium carbonate ในตัวทำละลาย N,N-Dimethylformamide (DMF) ได้สาร T3 และ T4 ตามลำดับ จากนั้นถ้าทำปฏิกิริยา N-Alkylation ตรงไนโตรเจนตำแหน่งที่ 1 ของวง Indole โดยใช้ Sodium hydride เป็นเบส และใช้ Methyl iodide หรือ Benzyl bromide เป็น Alkylating agent จะได้สาร T5 และ T6 เป็นผลิตภัณฑ์ ตามลำดับ ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog TTMA-I ชนิดต่าง ๆ

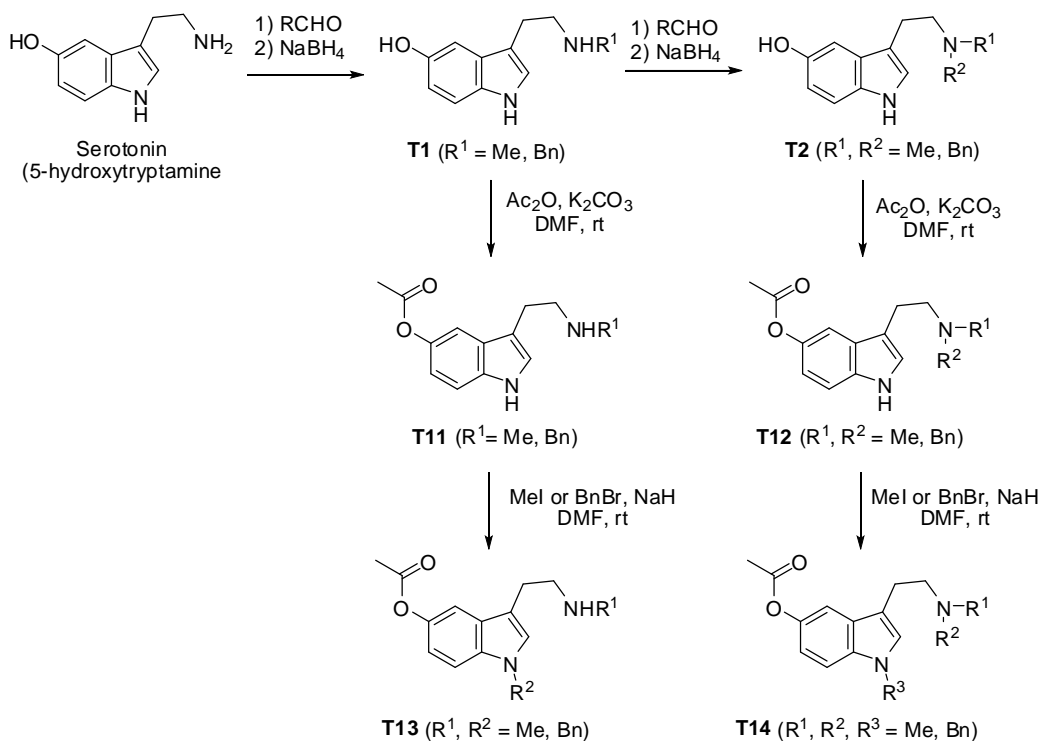
กิจกรรมส่วนที่ 1.2 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างอนุพันธ์ Tryptamine TTMA-II

การสังเคราะห์อนุพันธ์ TTMA-II ตามที่ได้ออกแบบไว้ เริ่มต้นจะใช้สารตั้งต้นเป็น Serotonin (5-Hydroxytryptamine) จากนั้นทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างบริเวณหมู่ Amino โดยทำปฏิกิริยากับ Aldehyde ได้เป็น Imine จากนั้นทำปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยน Imine ให้เป็น Amine ด้วย Sodium borohydride ได้เป็นสาร T1 ถ้านำสาร T1 มาทำปฏิกิริยากับ Aldehyde ตามด้วยปฏิกิริยารีดักชันอีกครั้งหนึ่งจะได้เป็นสาร T2 จากนั้นทำปฏิกิริยา Selective O-Carbamylation สาร T1 และ T2 ด้วย Ethyl(methyl)carbamic chloride ภายใต้สภาวะเบสของ Potassium carbonate ในตัวทำละลาย DMF ได้สาร T7 และ T8 ตามลำดับ จากนั้นถ้าทำปฏิกิริยา N-Alkylation ตรงไนโตรเจนตำแหน่งที่ 1 ของวง Indole โดยใช้ Sodium hydride เป็นเบส และใช้ Methyl iodide หรือ Benzyl bromide เป็น Alkylating agent จะได้สาร T9 และ T10 เป็นผลิตภัณฑ์ ตามลำดับ ดังรูปที่ 22



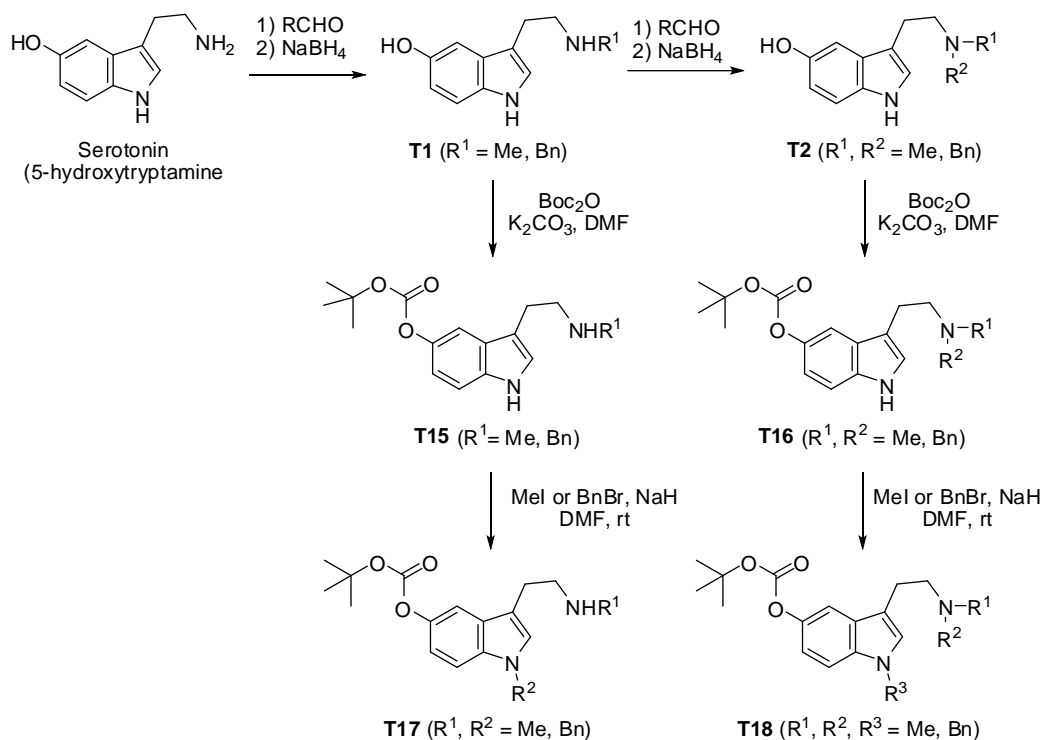
รูปที่ 22 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog TTMA-II ชนิดต่าง ๆ

ในทำนองเดียวกันถ้านำ สาร T1 และ T2 มาทำปฏิกิริยา Acetylation จะได้สาร T11 และ T12 ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยา N-Alkylation ตรงไนโตรเจนตำแหน่งที่ 1 ของวง Indole จะได้สารผลิตภัณฑ์ T13 และ T14 ตามลำดับ ดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog TTMA-II ชนิดต่าง ๆ

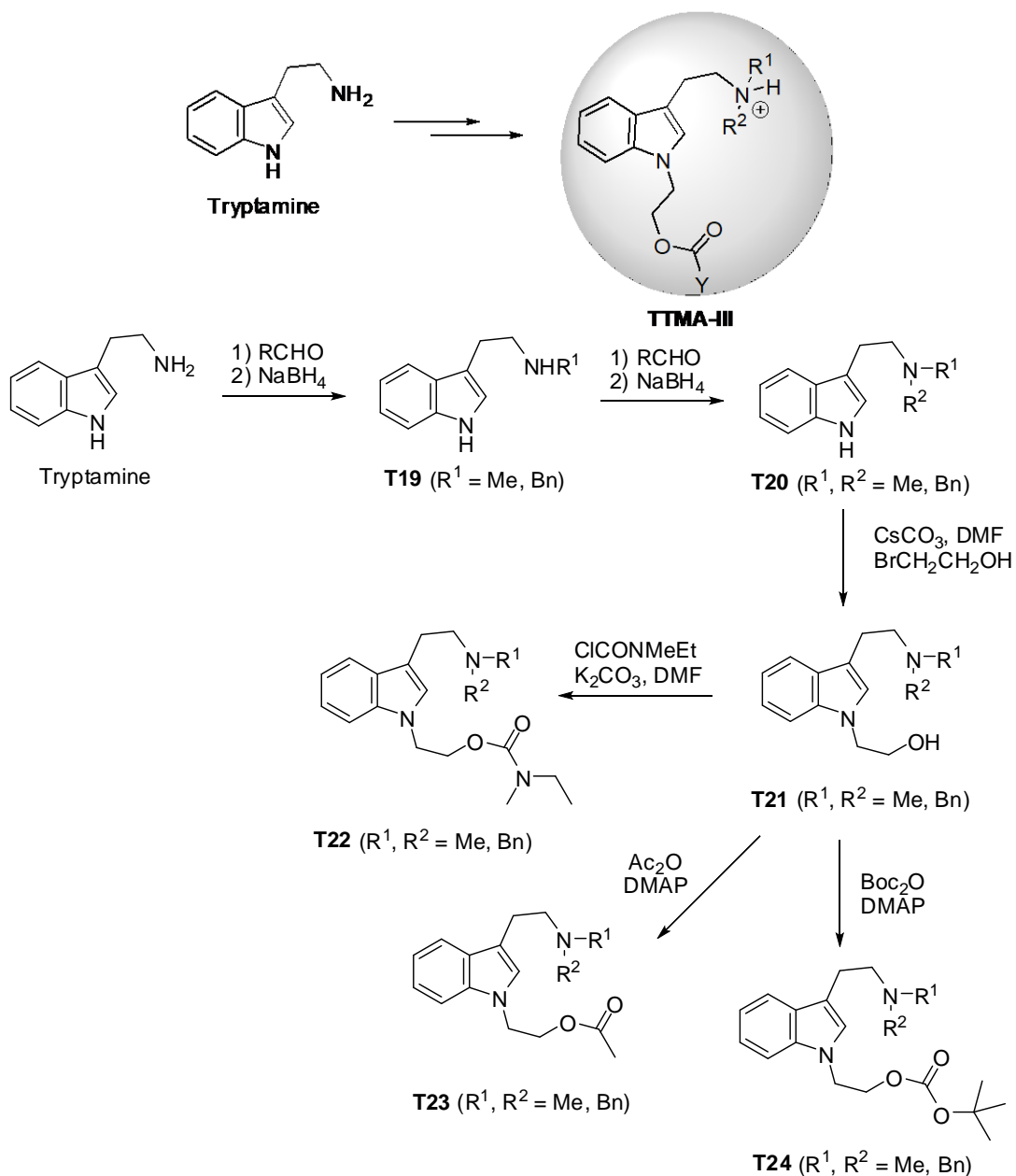
นอกจากนี้ ถ้านำ สาร T1 และ T2 มาทำปฏิกิริยากับ Boc₂O จะได้สาร T15 และ T16 ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยา N-Alkylation ตรงไนโตรเจนตำแหน่งที่ 1 ของวง Indole จะได้สารผลิตภัณฑ์ T17 และ T18 ตามลำดับ ดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog TTMA-II ชนิดต่าง ๆ

กิจกรรมส่วนที่ 1.3 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างอนุพันธ์ Tryptamine TTMA-III

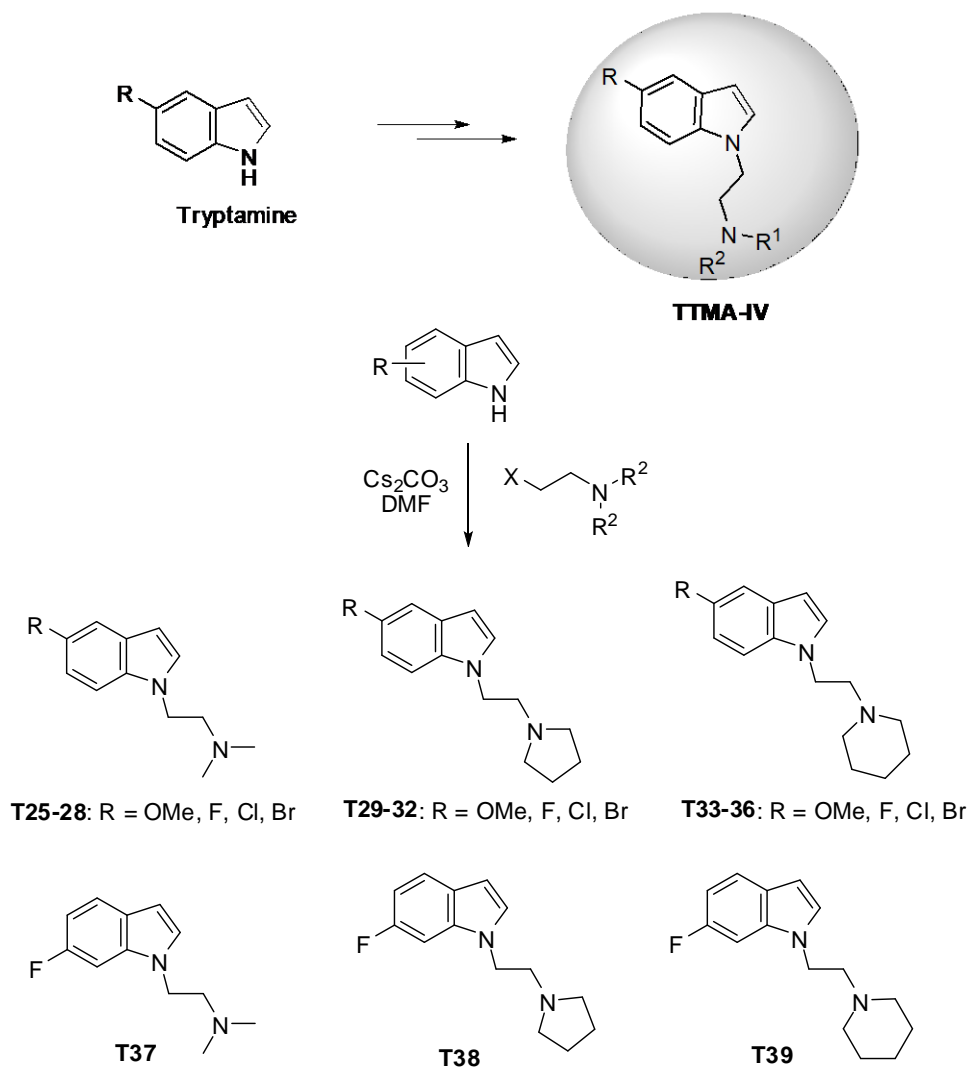
การสังเคราะห์อนุพันธ์ TTMA-III ตามที่ได้ออกแบบไว้ เริ่มต้นจะใช้สารตั้งต้นเป็น Tryptamine จากนั้นทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างบริเวณหมู่ Amino โดยทำปฏิกิริยากับ Aldehyde ได้เป็น Imine จากนั้นทำปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยน Imine ให้เป็น Amine ด้วย Sodium borohydride ได้เป็นสาร T19 ถ้านำสาร T19 มาทำปฏิกิริยากับ Aldehyde ตามด้วยปฏิกิริยารีดักชันอีกครั้งหนึ่งจะได้เป็นสาร T20 จากนั้นทำปฏิกิริยา N-Alkylation ที่ตำแหน่งที่ 1 ของวง Indole โดยทำปฏิกิริยากับ Cesium carbonate ในตัวทำละลาย DMF ตามด้วย 2-Bromoethanol จะได้สาร T21 ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ Ethyl(methyl)carbamic chloride, Acetic anhydride และ Boc_2O จะได้สาร T22, T23 และ T24 เป็นผลิตภัณฑ์ตามลำดับ ดังรูปที่ 25



รูปที่ 25 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog TTMA-III ชนิดต่าง ๆ

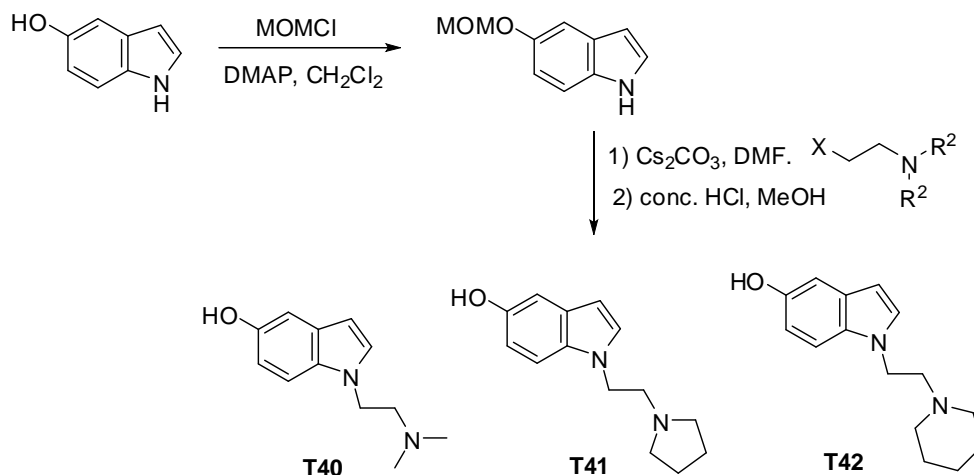
กิจกรรมส่วนที่ 1.4 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างอนุพันธ์ Tryptamine TTMA-IV

การสังเคราะห์อนุพันธ์ TTMA-IV ตามที่ได้ออกแบบไว้ ทำได้โดยนำสารประกอบ Indole ที่มีหมู่แทนที่ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Indole, 5-Methoxyindole, 5-Fluoroindole 6-Fluoroindole 5-Chloroindole และ 5-Bromoindole เป็นต้น ทำปฏิกิริยา N-Alkylation กับสารอนุพันธ์ 2-Halo-N,N-diakylethanamine โดยใช้ Cesium carbonate เป็นเบส ทำในตัวทำละลาย DMF และใช้ Alkylating agent เป็น 2-Chloro-N,N-dimethylethanamine, 1-(2-Chloroethyl)pyrrolidine, 1-(2-Chloroethyl)pyrrolidine ซึ่งที่คาดว่าจะได้รับแสดงดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog TTMA-IV ชนิดต่าง ๆ

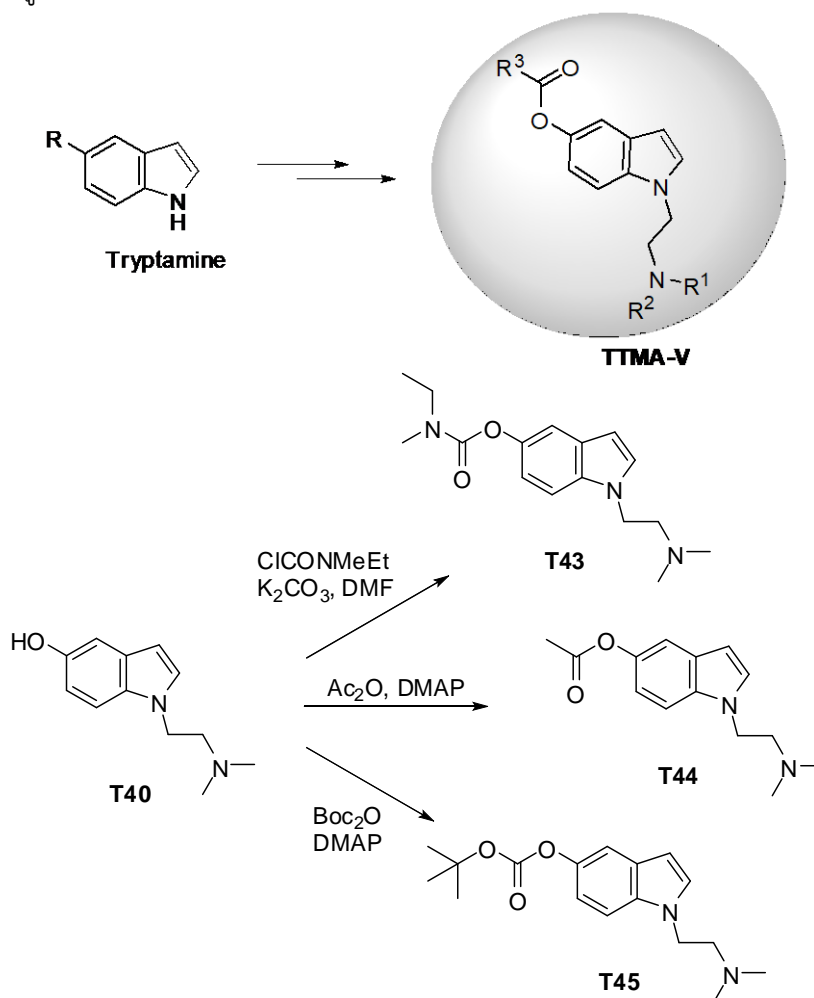
ในกรณีสังเคราะห์อนุพันธ์ TTMA-IV ที่มีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 5 ของวง Indole เริ่มต้นจะใช้สารตั้งต้นเป็น 5-Hydroxyindole จากนั้นป้องกันหมู่ไฮดรอกซี โดยทำปฏิกิริยากับ MOMCl (Methoxymethyl chloride) จากนั้นทำปฏิกิริยา N-Alkylation และทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริก เพื่อเอาหมู่ MOM ออก ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ TTMA-IV T40-T42 ดังรูปที่ 27

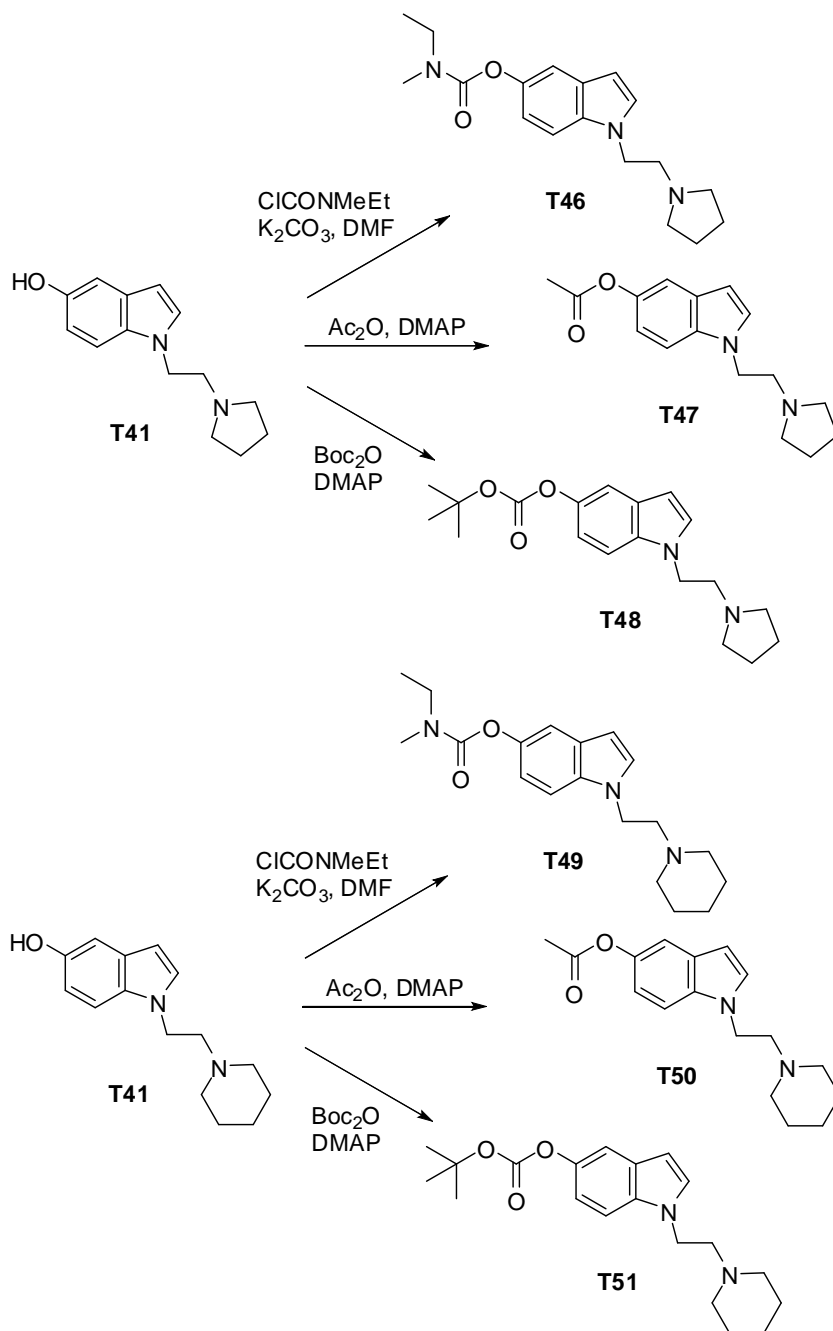


รูปที่ 27 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog TTMA-IV ชนิดต่าง ๆ

กิจกรรมส่วนที่ 1.5 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างอนุพันธ์ Tryptamine TTMA-V

การสังเคราะห์อนุพันธ์ TTMA-V ตามที่ได้ออกแบบไว้ ทำได้โดยนำอนุพันธ์ T40-42 มาทำปฏิกิริยากับ Ethyl(methyl)carbamic chloride, Acetic anhydride และ Boc₂O จะได้สาร T43-51 เป็นผลิตภัณฑ์ ดังรูปที่ 28





รูปที่ 28 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog TTMA-V ชนิดต่าง ๆ

กิจกรรมส่วนที่ 2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้เพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างที่แท้จริงโดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ ^1H - และ ^{13}C -NMR spectroscopy IR spectroscopy High Resolution Mass spectroscopy และ อื่นๆ

กิจกรรมส่วนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารที่สังเคราะห์ได้

การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส 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 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (0.2 U/mL) และ 20 มิลลิลิตรของสารตัวอย่างที่ละลายใน 80% เมทานอล จากนั้นบ่มสารผสมดังกล่าวเป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายเติม 20 มิลลิลิตรของสารละลายผสม 5 มิลลิโมลาร์ สารละลาย 5,5'-ไดไธโอบิซ[2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด] ที่มีโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) อยู่ 0.1% และ 5 มิลลิโมลาร์ สารละลายอะซีทิลไธโอโคลีน ไอโอไดด์ ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiter plate reader (Sunrise, Tecan) ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยใช้ กาแลนทามีน เป็นสารอ้างอิงมาตรฐาน และทุกๆ การทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง

กิจกรรมส่วนที่ 4 ปรับเปลี่ยนโครงสร้างอนุพันธ์ tryptamine ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิล และบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรสของอนุพันธ์ tryptamine ที่ได้จากกิจกรรมส่วนที่ 3 ในการดำเนินการต่อไปจะเลือกโครงสร้างที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุดมาเป็นโครงสร้างหลักเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงขึ้นใกล้เคียงหรือดีกว่า ยากาแลนทามีนแต่ไม่มีฤทธิ์ข้างเคียง

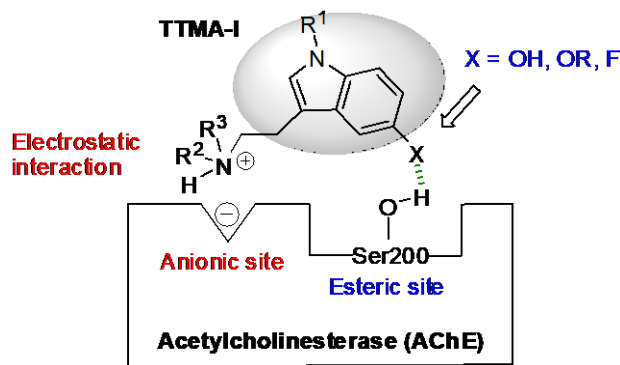
บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

กิจกรรมส่วนที่ 1 ออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine ชนิดต่าง ๆ การดำเนินงานได้ออกแบบในการสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine 4 ชนิดต่างๆ ดังนี้

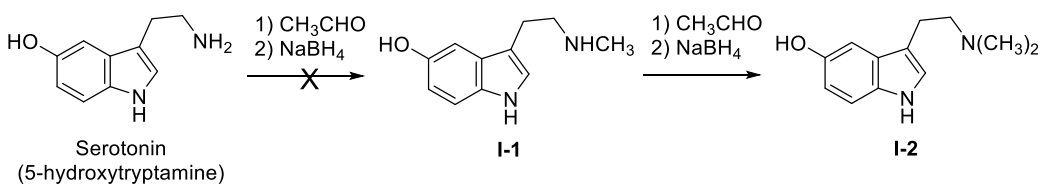
1.1 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างอนุพันธ์ Tryptamine TTMA-I

การสังเคราะห์อนุพันธ์ TTMA-I ตามที่ได้ออกแบบไว้ เริ่มต้นจะใช้สารตั้งต้นเป็น Serotonin (5-Hydroxytryptamine) ซึ่งมีขาย จากนั้นทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างบริเวณหมู่ Amino เป็นหมู่แทนที่ชนิดต่างๆ ดังรูปที่ 29



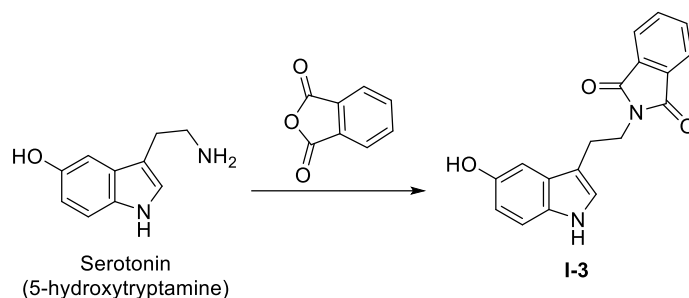
รูปที่ 29 การออกแบบสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog I (TTMA-I) เพื่อยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส

เริ่มต้นทำการทดลองโดยนำ Serotonin (5-Hydroxytryptamine) มาทำปฏิกิริยากับ acetaldehyde ได้เป็น Imine จากนั้นทำปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยน Imine ให้เป็น Amine ด้วย Sodium borohydride พบว่าไม่เกิดผลิตภัณฑ์ I-1 จึงไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไปเป็นสาร I-2 ดังรูปที่ 30



รูปที่ 30 การสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog I-1

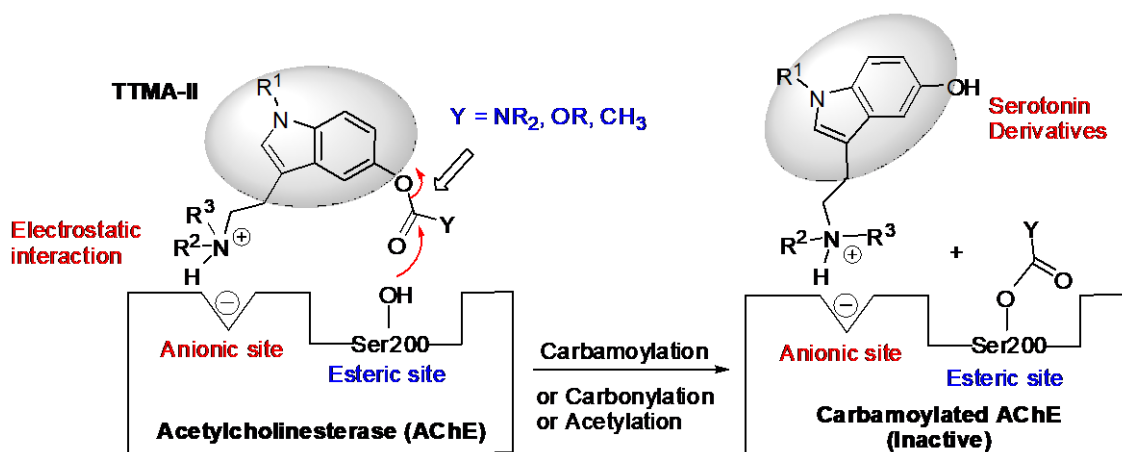
จากนั้นได้นำ Serotonin (5-Hydroxytryptamine) ทำปฏิกิริยากับ Phthalic anhydride พบว่า ได้เป็นอนุพันธ์ Tryptamine analog I-3 ในร้อยละที่สูง ดังรูปที่ 31



รูปที่ 31 การสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog I-3

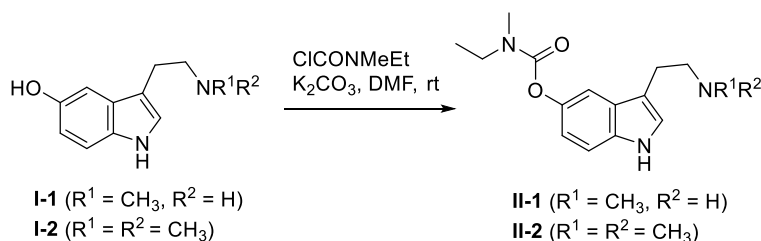
1.2 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างอนุพันธ์ Tryptamine TTMA-II

การสังเคราะห์อนุพันธ์ TTMA-II ตามที่ได้ออกแบบไว้ เริ่มต้นจะใช้สารตั้งต้นเป็นอนุพันธ์ Tryptamine analog I-1 และ I-2 โดยทำปฏิกิริยา Selective O-Carbamylation ด้วย Ethyl-(methyl)carbamic chloride ภายใต้สภาวะเบสของ Potassium carbonate ในตัวทำละลาย DMF ได้สาร II-1 และ II-2 ตามลำดับ ดังรูปที่ 32 และ 33 อย่างไรก็ตามเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์สาร I-1 และ I-2 ได้ จึงไม่สามารถสังเคราะห์สาร II-1 และ II-2



รูปที่ 32 การออกแบบสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog II (TTMA-II)

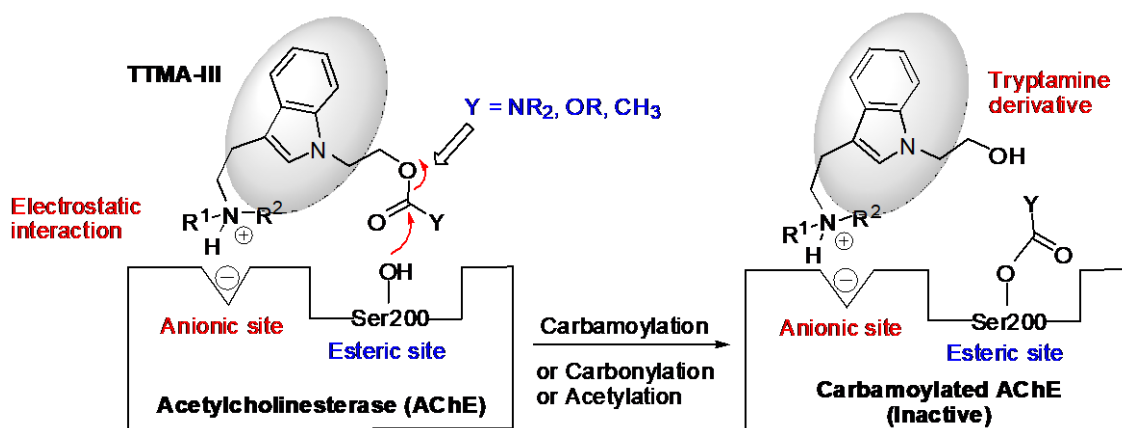
เพื่อยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส



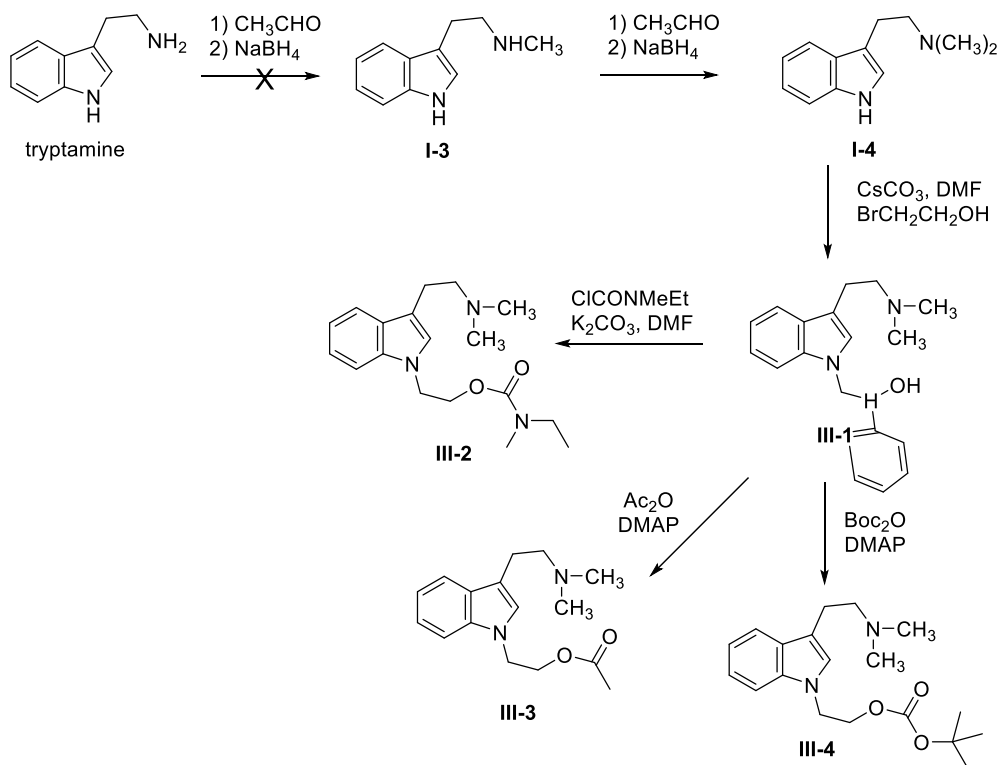
รูปที่ 33 การสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog II-1 และ II-2

1.3 การออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine กลุ่ม TTMA-III

การสังเคราะห์อนุพันธ์ TTMA-III ตามที่ได้ออกแบบไว้ เริ่มต้นจะใช้สารตั้งต้นเป็นอนุพันธ์ Tryptamine analog I-4 โดยทำปฏิกิริยา N-alkylation ของวงอินโดล 2-bromoethanol ในสภาวะเบสของ Cs₂CO₃ ได้เป็นสาร III-1 จากนั้นทำปฏิกิริยา O-carbamoylation หรือ esterification หรือ O-carbonation ได้เป็นสาร III-2-4 ตามลำดับ ดังรูป 34 และ 35 อย่างไรก็ตามเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์สาร I-3 และ I-4 ได้ จึงไม่สามารถสังเคราะห์สาร III-2-4



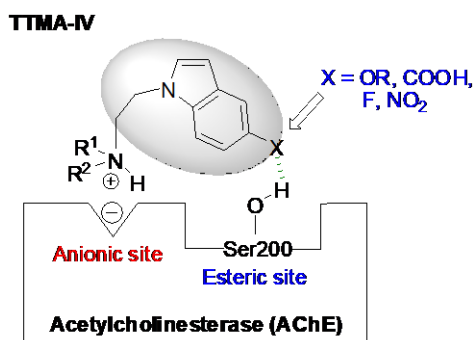
รูปที่ 34 การออกแบบสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog III (TTMA-III) เพื่อยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส



รูปที่ 35 การสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog III-1-4

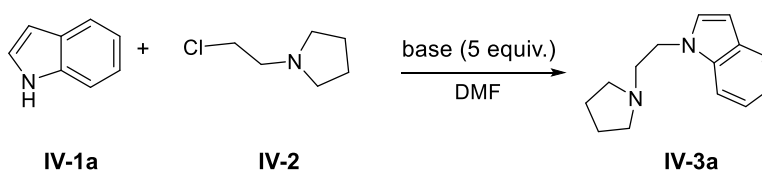
1.4 การออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine กลุ่ม TTMA-IV

เริ่มต้นได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine กลุ่ม TTMA-IV (ดังรูปที่ 36) ด้วยปฏิกิริยา Regioselective N-alkylation ของ indole กับ 1-(2-chloroethyl)pyrrolidine hydrochloride ในตัวทำละลาย N,N-dimethylformamide (DMF) ภายใต้ภาวะเบส ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3



รูปที่ 36 การออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog I (TTMA-IV) เพื่อยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

ตารางที่ 3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Regioselective N-alkylation ของ Indole

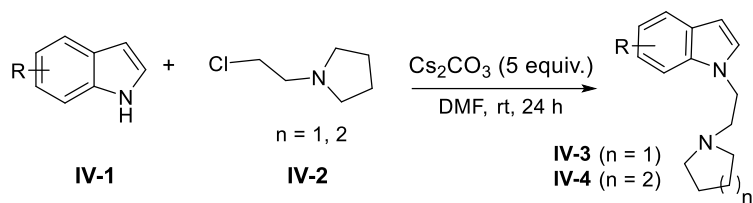


Entry	Base (5 eq.)	Solvent	Temp. (°C)	Time (h)	Yield (%)
1	K ₂ CO ₃	DMF	rt	24	Trace
2	Cs ₂ CO ₃	DMF)	rt	24	80
3	NaH	DMF (dry	rt	3	75

จากผลการหาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมในการสังเคราะห์สาร TTMA-IV ด้วยปฏิกิริยา Regioselective N-alkylation ของ indole กับ 1-(2-chloroethyl)pyrrolidine hydrochloride ในตัวทำละลาย DMF ภายใต้เบส 3 ชนิด ได้แก่ K₂CO₃ ซึ่งเป็นเบสอ่อน พบว่าได้ผลผลิตก้นที่น้อยมาก เมื่อเพิ่มความแรงของเบสชนิด carbonate โดยใช้ Cs₂CO₃ และทำปฏิกิริยาใน DMF พบว่า เมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลผลิตก้นที่อนุพันธ์อินโดล IV-3a ร้อยละ 80 จากนั้นเมื่อเปลี่ยนชนิดของเบสเป็น sodium hydride ในตัวทำละลาย DMF ที่ปราศจากน้ำ พบว่าได้ผลผลิตก้นที่ร้อยละ 75 ซึ่งลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเบส Cs₂CO₃ แต่ใช้ระยะเวลาสั้นลงเพียง 3 ชั่วโมง

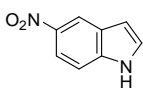
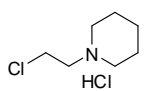
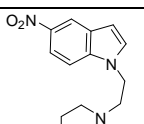
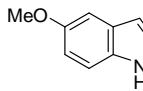
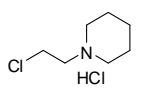
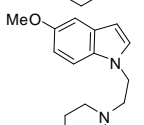
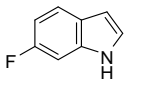
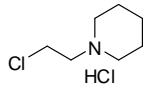
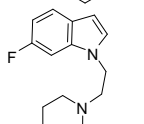
ในขั้นตอนต่อมาได้เลือกสภาวะการทดลองในตารางที่ 3 entry 2 คือทำปฏิกิริยา N-alkylation ของอินโดลโดยใช้เบสเป็น Cs₂CO₃ ในตัวทำละลาย DMF เป็นสภาวะการทดลองที่เหมาะสมเพื่อสังเคราะห์สาร TTMA-IV จำนวน 12 โครงสร้าง โดยโครงสร้างและร้อยละของผลผลิตก้นที่แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การสังเคราะห์สาร TTMA-IV ด้วยปฏิกิริยา N-alkylation ของอินโดล



Entry	IV-1	IV-2	IV-3/4	Yield (%)
1				IV-3a 80
2				IV-3b >99
3				IV-3c 98
4				IV-3d 99
5				IV-3e >99
6				IV-3f 87
7				IV-4a 73
8				IV-4b >99
9				IV-4c 66

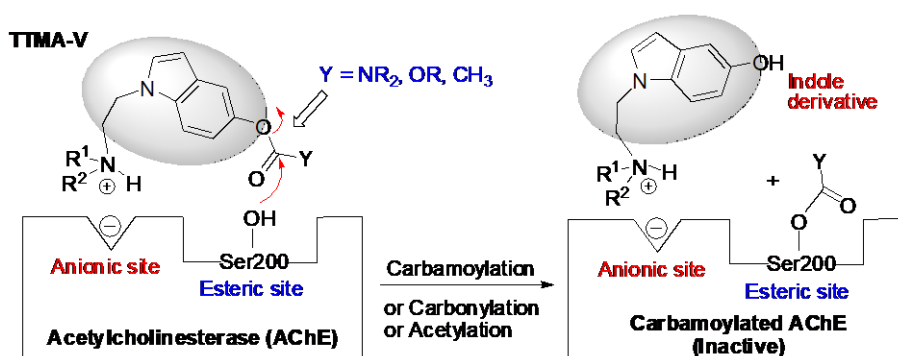
ตารางที่ 4 การสังเคราะห์สาร TTMA-IV ด้วยปฏิกิริยา N-alkylation ของอินโดล (ต่อ)

Entry	IV-1	IV-2	IV-3/4	Yield (%)
10				IV-4d 98
11				IV-4e 55
12				IV-4f 71

จากผลการทดลองในตารางที่ 4 พบว่าเมื่อนำอนุพันธ์อินโดลมาทำปฏิกิริยา N-alkylation ด้วย 1-(2-chloroethyl)pyrrolidine hydrochloride หรือ 1-(2-chloroethyl)piperidine hydrochloride ของโดยใช้เบสเป็น Cs₂CO₃ ในตัวทำละลาย DMF ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าได้ผลผลิตภัณฑ์ปานกลางถึงสูง (55 ถึง >99 %)

1.5 การออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine กลุ่ม TTMA-V

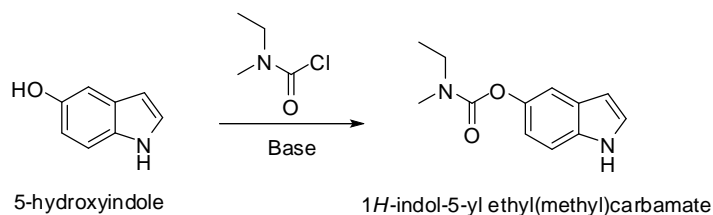
ในลำดับต่อมาได้ออกแบบสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine กลุ่ม TTMA-V ดังรูปที่ 37 ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับ Tryptamine กลุ่ม TTMA-IV แต่ปรับเปลี่ยนโครงสร้างตรงหมู่แทนที่ตำแหน่งที่ 5 ของวงอินโดล โดยเพิ่มหมู่ carbamate เนื่องจากเคยมีรายงานว่าโครงสร้างสารที่มีหมู่คาร์บอนเตออยู่ในโมเลกุลจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสสูง



รูปที่ 37 การออกแบบสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine analog V (TTMA-V) เพื่อยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

การออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ Tryptamine กลุ่ม TTMA-V ได้เริ่มต้นจากนำสาร 5-hydroxyindole ทำปฏิกิริยากับ N-ethyl-N-methylcarbamoyl chloride ภายใต้เบสชนิดต่าง ๆ เพื่อให้ได้สาร 1H-indol-5-yl ethyl(methyl)carbamate ในปริมาณที่สูง ตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลของเบสต่อการเกิดปฏิกิริยา O-carbamoylation ของ 5-hydroxyindole

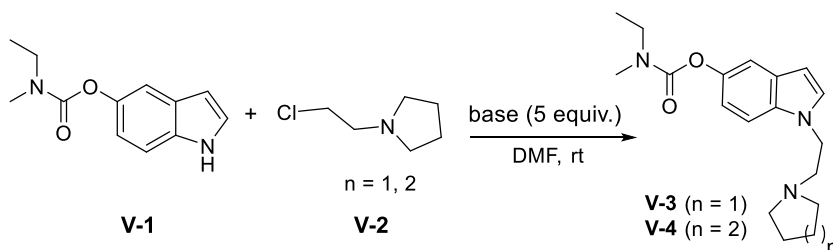


Entry	Base (5 eq)	Solvent	Temp. (°C)	Time (h)	Yield (%)
1	K ₂ CO ₃	EtOAc	rt	24	72
2	Cs ₂ CO ₃	EtOAc	rt	2.5	95

จากผลการทดลองในตารางที่ 5 พบว่าถ้าใช้ K₂CO₃ เป็นเบสจะได้ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 72 แต่ต้องใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาถึง 24 ชั่วโมง ขณะที่ถ้าเปลี่ยนชนิดเบสเป็น Cs₂CO₃ ซึ่งเป็นเบสที่แรงกว่า K₂CO₃ พบว่า จะได้ผลิตภัณฑ์เพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ 92 และใช้เวลาเพียง 30 นาที ดังนั้น Cs₂CO₃ เป็นเบสที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา O-carbamoylation ของ 5-hydroxyindole

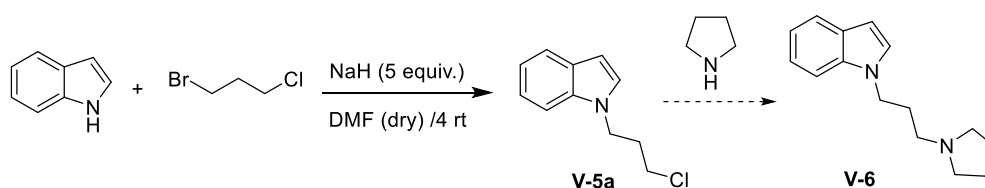
ในลำดับต่อมาได้นำสาร 1H-indol-5-yl ethyl(methyl)carbamate ที่สังเคราะห์ได้ไปทำปฏิกิริยา N-alkylation ด้วย N-(2-chloroethyl)pyrrolidine hydrochloride และ N-(2-chloroethyl)piperidine hydrochloride ภายใต้สภาวะเบส sodium hydride และ Cs₂CO₃ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การสังเคราะห์สาร 1H-indol-5-yl ethyl(methyl)carbamate



Entry	V-2	Base (5 eq.), Time (h)	V-3	Yield (%)
1	<chem>ClCCN1CCCC1</chem> HCl	NaH, 4 h	<chem>CCN(C)C(=O)Oc1ccc2c(c1)c[nH]2CN1CCCC1</chem>	V-3a 80
2	<chem>ClCCN1CCCC1</chem> HCl	Cs ₂ CO ₃ , 24 h	<chem>CCN(C)C(=O)Oc1ccc2c(c1)c[nH]2CN1CCCC1</chem>	V-3a 66
3	<chem>ClCCN1CCCCC1</chem> HCl	NaH, 4 h	<chem>CCN(C)C(=O)Oc1ccc2c(c1)c[nH]2CN1CCCCC1</chem>	V-4a >99

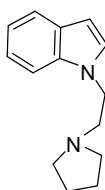
นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้สังเคราะห์อนุพันธ์อินโดล V-5 ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาต่อไปเป็นอินโดล V-6 (ดังรูปที่ 38)



รูปที่ 38 การออกแบบสังเคราะห์อนุพันธ์อินโดล 5 และ 6 เพื่อยับยั้งเอนไซม์อะซิทีลโคลีนเอสเตอเรส

กิจกรรมส่วนที่ 2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้เพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างที่แท้จริงโดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ ^1H - และ ^{13}C -NMR spectroscopy IR spectroscopy High Resolution Mass spectroscopy และ อื่นๆ

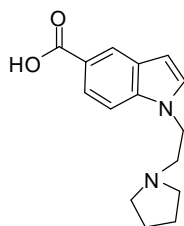


IV-3a

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.68 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.42 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.26 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.19 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.16 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.54 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 4.33 (t, $J = 7.5$ HZ, 2H, 2XCH), 2.94 (t, $J = 7.5$ HZ, 2H, 2XCH), 2.61 (t, $J = 5.7$ HZ, 4H, 4XCH ของวง pyrrolidine), 1.84 (brm, 4H, 4XCH ของวง pyrrolidine)

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) : δ ^{13}C -NMR (100 H_z, CDCl_3): δ 135.9 (C ของวง aromatic), 128.7 (C ของวง aromatic), 128.1 (C ของวง aromatic), 122.1 (C ของวง aromatic), 121.6 (C ของวง aromatic), 120.0 (C ของวง aromatic), 109.3 (C ของวง aromatic), 101.4 (C ของวง aromatic), 55.0 (CH_2), 54.4 (2X CH_2 ของวง pyrrolidine), 45.5 (CH_2), 23.5 (2X CH_2 ของวง pyrrolidine)

IR (Film): ν_{max} 3054, 2963, 2875, 2795, 1683, 1612, 1512, 1482, 1464, 1351, 740, 426 cm^{-1}

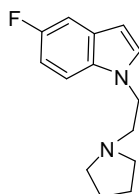


IV-3b

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.56 (s, 1H, CH ของ aromatic), 8.44 (brs, 1H, CH ของ aromatic), 7.93 (d, $J = 8.7$ Hz, CH ของ aromatic), 7.33 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.67 (brs, 1H, CH ของ aromatic), 4.52 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 2XCH), 2.95 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 2XCH), 2.70 (brs, 4H, 4XCH ของวง pyrrolidine), 1.76 (brs, 4H, 4XCH ของวง pyrrolidine)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ $^{13}\text{C-NMR}$ (100 Hz, CDCl_3): δ 139.0 (C ของวง aromatic), 127.6 (C ของวง aromatic), 126.3 (C ของวง aromatic), 123.2 (C ของ aromatic), 122.4 (C ของวง aromatic), 111.8 (C ของวง aromatic), 103.0 (C ของวง aromatic), 79.7 (C ของวง aromatic), 63.8 (CH_2), 54.5 (2X CH_2 ของวง pyrrolidine), 52.1 (CH_2), 23.7 (2X CH_2 ของวง pyrrolidine)

IR (Film): ν_{max} 3326, 3225, 2955, 2805, 1705, 1615, 1578, 1436, 1330, 1303, 1244, 1185, 1085, 758 cm^{-1}

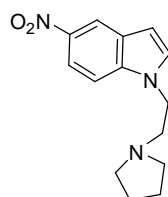


IV-3c

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.31-7.27 (brm, 2H, CH ของ aromatic), 7.27 (d, $J = 2.16$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.97 (ddd, , $J = 9.0, 9.0, 1.6$ Hz, 1H CH ของ aromatic), 6.46 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 4.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 2XCH), 2.92 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 2XCH), 2.59 (brs, 4H, 4XCH ของวง pyrrolidine), 1.82 (brs, 4H, 4XCH ของวง pyrrolidine)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ $^{13}\text{C-NMR}$ (100 Hz, CDCl_3): δ 157.8 ($J = 233.0$ Hz, C_F ของวง aromatic), 132.6 (C ของวง aromatic), 129.6 (C ของวง aromatic), 128.8 ($J = 9.9$ Hz, C_F ของวง aromatic), 110.5 ($J = 26.2$ Hz, C_F ของวง aromatic), 110.0 ($J = 5.5$ Hz, C_F ของวง aromatic), 105.6 ($J = 23.1$ Hz, C_F ของวง aromatic), 101.2 (C ของวง aromatic), 55.7 (CH_2), 54.4 (2X CH_2 ของวง pyrrolidine), 45.9 (CH_2), 23.5 (2X CH_2 ของวง pyrrolidine)

IR (Film): ν_{max} 3103, 2962, 2929, 2798, 1623, 1579, 1488, 1450, 1229, 1134, 1116, 1089, 1022, 949, 795, 719 cm^{-1}

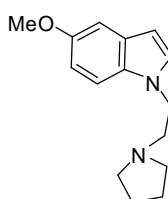


IV-3d

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.53 (s, 1H, CH ของ aromatic), 8.07 (brd, 1H, CH ของ aromatic), 7.37 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.32 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.64 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 4.32 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H, 2XCH), 2.92 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, 2XCH), 2.58 (brs, 4H, 4XCH ของวง pyrrolidine), 1.78 (brs, 4H, 4XCH ของวง pyrrolidine)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : 138.9 (C ของวง aromatic), 131.3 (C ของวง aromatic), 118.3 (2XCH ของวง aromatic), 117.2 (C ของ aromatic), 109.2 (C ของวง aromatic), 104.1 (C ของวง aromatic), 68.6 (C ของวง aromatic), 55.6 (CH_2), 54.4 (2X CH_2 ของวง pyrrolidine), 46.2 (CH_2), 23.5 (2X CH_2 ของวง pyrrolidine)

IR (Film): ν_{max} 2957, 2799, 1611, 1513, 1479, 1332, 1068, 891, 743 cm^{-1}

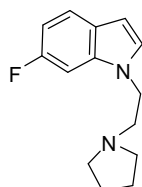


IV-3e

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.29 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.13 (dd, $J = 6.5, 2.6$, 2H, 2XCH, CH ของ aromatic), 6.92 (dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.45 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 4.27 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 2.90 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 2.59 (brs, 4H, 4XCH ของวง pyrrolidine), 1.82 (brs, 4H, 4XCH ของวง pyrrolidine)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 154.0 (C ของวง aromatic), 131.3 (C ของวง aromatic), 129.0 (C ของวง aromatic), 128.5 (C ของวง aromatic), 111.9 (C ของวง aromatic), 110.0 (C ของวง aromatic), 102.7 (C ของวง aromatic), 100.8 (C ของวง aromatic), 56.0 (OCH_3), 55.8 (CH_2), 54.3 (2X CH_2 ของวง pyrrolidine), 45.9 (CH_2), 23.5 (2X CH_2 ของวง pyrrolidine)

IR (Film): ν_{max} 2934, 2795, 1622, 1576, 1489, 1449, 1349, 1238, 1151, 1032, 796, 716 cm^{-1}

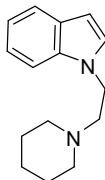


IV-3f

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.55 (dd, $J = 8.6, 5.42$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 7.15 (d, $J = 3.08$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 7.08 (dd, $J = 9.92, 1.64$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 6.91 (ddd, $J = 9.3, 8.9, 2.2$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 6.50 (d, $J = 3.05$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 4.23 (t, $J = 7.32$ Hz, 2H, 2 \times CH), 2.89 (t, $J = 7.32$ Hz, 2H, 2 \times CH), 2.59 (brs, 4H, 4 \times CH ของวง pyrrolidine), 1.83 (brs, 4H, 4 \times CH ของวง pyrrolidine)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 159.8 ($J = 235.7$ Hz, C_F ของวง aromatic), 136.1 (C ของวง aromatic), 128.6 ($J = 3.4$ Hz, C_F ของวง aromatic), 125.1 (C ของวง aromatic), 121.7 ($J = 10.1$ Hz, C_F ของวง aromatic), 108.1 ($J = 24.4$ Hz, C_F ของวง aromatic), 101.5 (C ของวง aromatic), 95.8 ($J = 26.1$ Hz, C_F ของวง aromatic), 55.5 (CH_2), 54.3 (2 \times CH_2 ของวง pyrrolidine), 45.8 (CH_2), 23.5 (2 \times CH_2 ของวง pyrrolidine)

IR (Film): ν_{max} 2958, 2788, 1621, 1508, 1488, 1470, 1331, 1247, 1173, 948, 823, 801 cm^{-1}

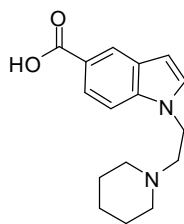


IV-4a

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.67(d, $J = 7.8$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 7.41 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 7.25 (ddd, $J = 7.6, 7.6, 0.8$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 7.18-7.13 (m, 2H, CH ของวง aromatic), 6.53 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 4.30 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.75 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.51 (brs, 4H, 4 \times CH ของวง piperidine), 1.65 (q, $J = 5.5$ Hz, 4H, 4 \times CH ของวง piperidine), 1.51 (brt, 2H, 2 \times CH ของวง piperidine)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 136.0 (C ของวง aromatic), 128.6 (C ของวง aromatic), 128.0 (C ของวง aromatic), 121.5 (C ของวง aromatic), 121.0 (C ของวง aromatic), 119.4 (C ของวง aromatic), 109.3 (C ของวง aromatic), 101.2 (C ของวง aromatic), 58.5 (CH_2), 54.9 (2 \times CH_2 ของวง piperidine), 44.1 (CH_2), 25.9 (2 \times CH_2 ของวง piperidine), 24.2 (CH_2 ของวง piperidine)

IR (Film): ν_{max} 3354, 2922, 2851, 1655, 1634, 1464, 1316, 739 cm^{-1}

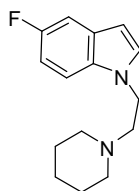


IV-4b

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 10.02 (s, 1H, COOH), 8.68 (s, 1H, CH ของ aromatic), 8.42 (brs, 1H, CH ของ aromatic), 7.92 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 7.30 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 6.65 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, CH ของ aromatic), 4.50 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, 2XCH), 2.82 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, 2XCH), 2.57 (brs, 4H, 4XCH ของวง piperidine), 1.76 (brs, 4H, 4XCH ของวง piperidine), 1.63 (brt, $J = 5.5$ Hz, 2H, 2XCH ของวง piperidine)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ $^{13}\text{C-NMR}$ (100 Hz, CDCl_3): δ 139.0 (C ของวง aromatic), 127.6 (C ของวง aromatic), 126.3 (C ของวง aromatic), 123.2 (C ของวง aromatic), 122.4 (C ของวง aromatic), 111.8 (C ของวง aromatic), 103.0 (C ของวง aromatic), 79.7 (C ของวง aromatic), 62.4 (C ของวง aromatic), 57.5 (CH_2), 54.7 (2X CH_2 ของวง piperidine), 54.4 (CH_2) 26.1 (2X CH_2 ของวง piperidine), 24.4 (CH_2 ของวง piperidine)

IR (Film): ν_{max} 3167, 3127, 2936, 1705, 1615, 1437, 1352, 1332, 1303, 1264, 1184, 1097, 757 cm^{-1}

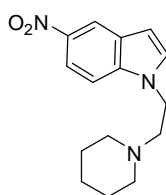


IV-4c

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.31-7.29 (m, 2H, CH ของวง aromatic), 7.21 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 6.99 (ddd, $J = 9.0, 9.0, 2.2$ Hz, 1H , CH ของวง aromatic), 6.47 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 4.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.73 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.48 (brs, 4H, 4XCH ของวง piperidine), 1.64 (m, 4H, 4XCH ของวง piperidine), 1.49 (brd, $J = 4.9$ Hz, 2H, 2XCH ของวง piperidine)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 157.8 ($J = 232.3$ Hz, C_F ของวง aromatic), 132.7 (C ของวง aromatic), 129.7 (C ของวง aromatic), 128.7 ($J = 10.3$ Hz, C_F ของวง aromatic), 109.9 ($J = 3.6$ Hz, C_F ของวง aromatic), 109.7 ($J = 20.2$ Hz, C_F ของวง aromatic), 105.6 ($J = 23.2$ Hz, C_F ของวง aromatic), 101.1 (C ของวง aromatic), 58.5 (CH_2), 54.9 (2X CH_2 ของวง piperidine), 44.5 (CH_2), 25.9 (2X CH_2 ของวง piperidine), 24.2 (CH_2 ของวง piperidine)

IR (Film): ν_{max} 2935, 2803, 1623, 1578, 1488, 1450, 1358, 1229, 1125, 948, 793, 750, 717 cm^{-1}

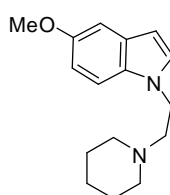


IV-4d

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.56 (s, 1H, CH ของวง aromatic), 8.10 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 7.39 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H , CH ของวง aromatic), 7.33 (d, $J = 2.8$ Hz , 1H, CH ของวง aromatic), 6.66 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 4.30 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.73 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.47 (drs, 4H, 4XCH ของวง piperidine), 1.60 (brt, $J = 5.1$ Hz, 4H, 4XCH ของวง piperidine), 1.46 (brd, $J = 4.6$ Hz, 2H, 2XCH ของวง piperidine)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 131.4 (C ของวง aromatic), 127.7 (C ของวง aromatic), 118.2 (2XCH ของวง aromatic), 117.2 (C ของวง aromatic), 109.2 (C ของวง aromatic), 104.0 (C ของวง aromatic), 68.6 (C ของวง aromatic), 58.5 (CH_2), 54.9 ($2\times\text{CH}_2$ ของวง aromatic), 44.8 (CH_2), 25.9 ($2\times\text{CH}_2$ ของวง piperidine), 24.1 (CH_2 ของวง piperidin)

IR (Film): ν_{max} 3099, 2935, 2852, 1611, 1515, 1479, 1333, 1068, 896, 743 cm^{-1}

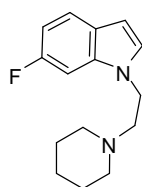


IV-4e

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.28 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 7.12 (dd, $J = 9.2, 2.2$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 7.06 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H , CH ของวง aromatic), 6.98-6.88 (m, 1H, CH ของวง aromatic), 6.43 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 4.24 (dt, $J = 7.3, 5.9$ Hz, 2H), 3.87 (brd, $J = 2.5$ Hz, 3H, OCH_3), 2.81 (dt, $J = 7.3, 5.9$ Hz, 2H), 2.51 (brd, 4H, 4XCH ของวง piperidine), 1.48 (brd, 4H, 4XCH ของวง piperidine), 1.28 (brs, 2H, 2XCH ของวง piperidine)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 154.0 (C ของวง aromatic), 131.3 (C ของวง aromatic), 128.6 (C ของวง aromatic), 113.2 (C ของวง aromatic), 111.8 (C ของวง aromatic), 107.9 (C ของวง aromatic), 102.6 (C ของวง aromatic), 102.6 (C ของวง aromatic), 100.7 (C ของวง aromatic), 58.6 (CH_2), 55.9 (OCH_3), 44.4 ($2\times\text{CH}_2$ ของวง piperidine), 25.9 ($2\times\text{CH}_2$ ของวง piperidine), 24.2 (CH_2 ของวง piperidine)

IR (Film): ν_{max} 2935, 2851, 2830, 1735, 1621, 1489, 1474, 1269, 1239, 1150, 1120, 1031, 718 cm^{-1}

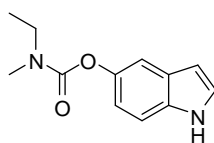


IV-4f

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.55 (dd, $J = 7.9, 5.5$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 7.15 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 7.08 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H , CH ของวง aromatic), 6.90 (ddd, $J = 8.1, 2.0$ Hz 2H, CH ของวง aromatic), 6.50 (brt, $J = 1.4$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 4.23 (brt, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.73 (brt, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.49 (brs, 4H, 4XCH ของวง piperidine), 1.64 (brt, $J = 5.1$ Hz, 4H, 4XCH ของวง piperidine), 1.49 (brd, $J = 4.6$ Hz, 2H, 2XCH ของวง piperidine)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 159.8 ($J = 235.7$ Hz, C_F ของวง aromatic), 136.0 (C ของวง aromatic), 128.5 ($J = 3.5$ Hz, C_F ของวง aromatic), 125.0 (C ของวง aromatic), 121.6 ($J = 10.1$ Hz, C_F ของวง aromatic), 108.0 ($J = 24.5$ Hz, C_F ของวง aromatic), 101.4 (C ของวง aromatic), 95.7 ($J = 26.1$ Hz, C_F ของวง aromatic), 58.4 (CH_2), 54.9 ($2\times\text{CH}_2$ ของวง piperidine), 44.4 (CH_2), 25.9 ($2\times\text{CH}_2$ ของวง piperidine), 24.2 (CH_2 ของวง piperidine)

IR (Film): ν_{max} 2935, 2850, 1621, 1512, 1488, 1470, 1330, 1169, 1121, 948, 823, 711 cm^{-1}

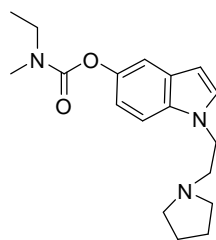


V-I

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.31 (s, 1H, H ของ NH), 7.36 (s, 1H, CH ของวง aromatic), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H , CH ของวง aromatic), 7.18 (brs, 1H , CH ของวง aromatic), 6.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 6.51 (brs, 1H), 3.50 (q, 2H), 3.08 (brd, 3H), 1.23 (t, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 145.1 ($\text{C}=\text{O}$), 133.5 (C ของวง aromatic), 128.1 (C ของวง aromatic), 125.4 (C ของวง aromatic), 119.1 (C ของวง aromatic), 116.5 (C ของวง aromatic), 12.8 (C ของวง aromatic), 111.3 (C ของวง aromatic), 102.6 (C ของวง aromatic), 44.1 ($2\times\text{CH}_2$), 33.8 (CH_3), 12.5 (CH_3)

IR (Film): ν_{max} 3316, 2974, 1698, 1581, 1471, 1452, 1401, 1343, 1285, 1173, 1088, 959, 758, 726 cm^{-1}

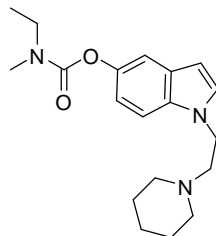


V-3g

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.32 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 7.28 (s, 1H, CH ของวง aromatic), 7.17 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H , CH ของวง aromatic), 6.98 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 6.45 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 4.29 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.48 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.07 (brd, 3H), 2.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.59 (brs, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 162.3 ($\text{C}=\text{O}$), 144.9 (C ของวง aromatic), 133.6 (C ของวง aromatic), 129.1 (C ของวง aromatic), 128.6 (C ของวง aromatic), 115.9 (C ของวง aromatic), 112.9 (C ของวง aromatic), 109.4 (C ของวง aromatic), 101.1 (C ของวง aromatic), 58.5 (CH_2), 54.7 ($2\times\text{CH}_2$ ของวง pyrrolidine), 44.3 (CH_2), 43.9 (CH_2), 36.1 (CH_3), 25.9 ($2\times\text{CH}_2$ ของวง pyrrolidine), 24.2 ($2\times\text{CH}_2$ ของวง pyrrolidine 13.2 (CH_3)

IR (Film): \mathbf{V}_{max} 2934, 2852, 1716, 1513, 1471, 1451, 1398, 1304, 1284, 1222, 1166, 959, 717 cm^{-1}



V-4g

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.25 (s, 1H, CH ของวง aromatic), 7.21 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 7.04 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H , CH ของวง aromatic), 6.88 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 6.33 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, CH ของวง aromatic), 4.07 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.34 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.93 (brd, 3H), 2.54 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.31 (brs, 4H), 1.49 (brt, $J = 5.2$ Hz, 4H), 1.34 (brd, $J = 4.4$ Hz, 2H), 1.13 (m, 3H)

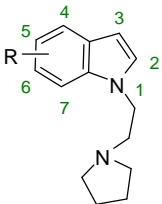
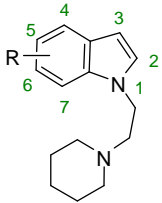
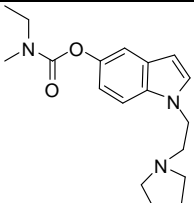
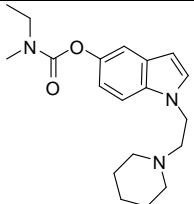
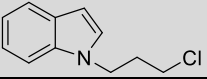
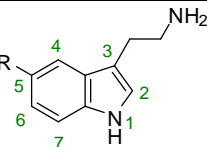
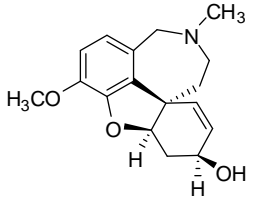
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 145.0 ($\text{C}=\text{O}$), 133.7 (C ของวง aromatic), 129.0 (C ของวง aromatic), 128.7 (C ของวง aromatic), 119.1 (C ของวง aromatic), 116.1 (C ของวง aromatic), 113.1 (C ของวง aromatic), 109.4 (C ของวง aromatic), 101.3 (C ของวง aromatic), 58.5 (CH_2), 54.3 ($2\times\text{CH}_2$ ของวง piperidine), 46.0 (CH_2), 44.0 (CH_2), 33.8 (CH_3), 23.5 ($2\times\text{CH}_2$ ของวง piperidine), 13.3 (CH_3)

IR (Film): \mathbf{V}_{max} 2967, 2933, 2796, 1716, 1620, 1475, 1451, 1305, 1286, 1223, 1167, 1088, 959, 755, 718 cm^{-1}

กิจกรรมส่วนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารที่สังเคราะห์ได้

หลังจากที่ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์สารกลุ่มอนุพันธ์ Tryptamine analog TTMA-IV และ TTMA-V ชนิดต่าง ๆ จำนวน 15 ชนิด ในงานวิจัยต่อไปได้นำสารทั้ง 15 ชนิดนี้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase ของสารอนุพันธ์ Tryptamine analog TTMA-IV และ TTMA-V ชนิดต่าง ๆ

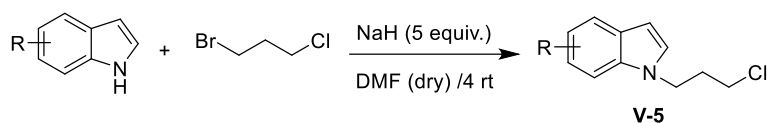
สารประกอบ Indole	R		% Inhibition (\pm SD)
	H	IV-3a	ND
	5-COOH	IV-3b	63.2 \pm 2.25
	5-F	IV-3c	31.60 \pm 0.33
	5-NO ₂	IV-3d	8.66 \pm 0.22
	5-OCH ₃	IV-3e	14.39 \pm 0.41
	6-F	IV-3f	ND
	H	IV-4a	31.57 \pm 0.17
	5-COOH	IV-4b	57.63 \pm 0.23
	5-F	IV-4c	50.09 \pm 0.61
	5-NO ₂	IV-4d	54.84 \pm 0.38
	5-OCH ₃	IV-4e	ND
	6-F	IV-4f	39.58 \pm 0.18
	-	V-3g	51.45 \pm 2.69
	-	V-4g	22.95 \pm 0.35
	-	V-4a	67.26 \pm 0.37
	5-OCH ₃	5-Methoxytryptamine	7.19 \pm 3.02
	5-OH	Serotonin	62.59 \pm 3.74
 Galantamine, 2	-	Galantamine, 2	100.00 \pm 0.00 ^{**}

จากผลการทดลองในตารางที่ พบว่าสารกลุ่มอนุพันธ์ Tryptamine analog TTMA-IV และ TTMA-V ที่สังเคราะห์ได้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส ต่ำถึงปานกลาง ซึ่งงานวิจัยต่อไปจะสังเคราะห์อนุพันธ์โดยดูจากกลุ่มวิจัยที่เคยมีการศึกษาและรายงานก่อนหน้านี้

กิจกรรมส่วนที่ 4 ปรับเปลี่ยนโครงสร้างอนุพันธ์ tryptamine ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด

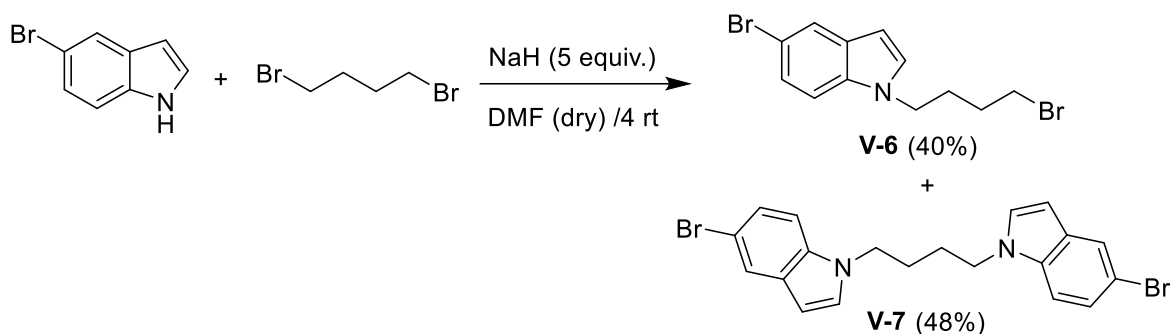
จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสของอนุพันธ์ tryptamine ที่ได้จากกิจกรรมส่วนที่ 3 ในการดำเนินการต่อไปจะเลือกโครงสร้างที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุด มาเป็นโครงสร้างหลักเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงขึ้นใกล้เคียงหรือดีกว่ายาแกแลนทามีนแต่ไม่มีฤทธิ์ข้างเคียง โดยผลการทดลองในกิจกรรมส่วนที่ 3 พบว่า สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส สูงสุด ได้แก่ N-(3-chloropropyl)indole (**V-4a**) โดยมีฤทธิ์ยับยั้ง เท่ากับ 67.26 ± 0.37 ในงานวิจัยต่อไป จึงได้ปรับปรุงโครงสร้างของสาร N-(3-chloropropyl)indole (**V-4a**) โดยการเพิ่มหมู่แทนที่ของอินโดลที่ตำแหน่ง 5 และ 6 โดยการนำอนุพันธ์อินโดลชนิดต่าง ๆ ทำปฏิกิริยากับ 1-bromo-3-chloropropane ภายในสภาวะเบสของ sodium hydride (5 equivalent) ในตัวทำละลาย DMF ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การสังเคราะห์สาร TTMA-IV ด้วยปฏิกิริยา N-alkylation ของอินโดล



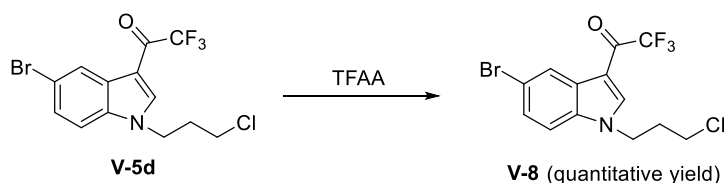
Entry	Indoles	dihaloalkane	V-5	Yield (%)
1				V-5a 95
2				V-5b 70
3				V-5c 91
4				V-5d 92
5				V-5e 86
6				V-5f 73
7				V-5g 80
8				V-6 40

จากผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่า เมื่อนำอนุพันธ์ของ indole ทำปฏิกิริยากับ 1-bromo-3-chloropropane ภายใต้สภาวะเบสของ Sodium hydride ใน DMF ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นอนุพันธ์ของ N-(3-chloropropyl)indole ในร้อยละที่สูง ขณะที่ถ้า นำ 5-bromoindole ทำปฏิกิริยากับ 1,4-dibromobutane ภายใต้สภาวะเดียวกัน จะได้ N-(4-bromobutyl)-5-bromoindole ในร้อยละปานกลาง เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงได้แก่ 1,4-bis(5-bromo-1H-indol-1-yl)butane **V-7** (30%) ดังรูปที่ 39



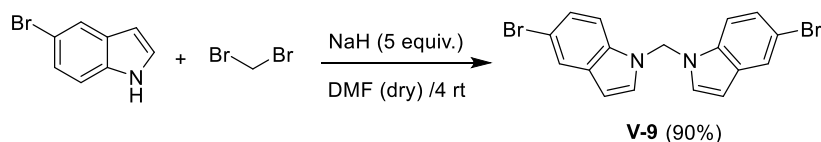
รูปที่ 39 การสังเคราะห์อนุพันธ์อินโดล **V-6**

นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้นำสาร **V-5d** ทำปฏิกิริยา trifluoroacetylation ได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็น 1-(5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indol-3-yl)-2,2,2-trifluoroethan-1-one **V-8** ในปริมาณที่สูง ดังรูปที่ 40



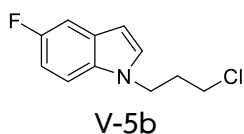
รูปที่ 40 การสังเคราะห์อนุพันธ์อินโดล **V-8**

ในการทดลองยังได้สังเคราะห์สารประกอบ bis(5-bromo-1H-indol-1-yl)methane **V-9** โดยนำสาร 5-bromoindole ทำปฏิกิริยากับ dibromomethane ภายใต้เบส Sodium hydride ในตัวทำละลาย DMF ดังรูปที่ 41

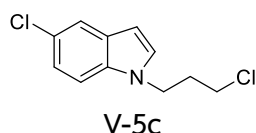


รูปที่ 41 การสังเคราะห์อนุพันธ์อินโดล **V-9**

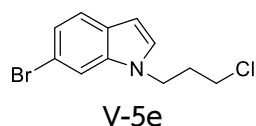
ในขั้นต่อมาได้นำสารที่สังเคราะห์ที่ได้ไปยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้



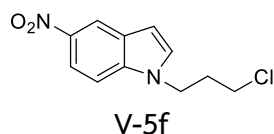
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.34-7.26 (m, 2H, ArH), 7.19 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, ArH), 6.99 (td, $J = 9.0, 2.4$ Hz, 1H, ArH), 6.48 (dd, $J = 3.1, 1.0$ Hz, 1H, ArH), 4.35 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2), 3.46 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2), 2.32-2.25 (m, 2H, CH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 157.91 (C-F, $J^1_{\text{CF}} = 232$ Hz), 132.56 (C), 129.60 (CH), 128.94 (C-C-C-F, $J^3_{\text{CF}} = 10$ Hz), 110.08 (CH-C-F, $J^2_{\text{CF}} = 28$ Hz), 109.83 (CH), 105.77 (CH-C-F, $J^2_{\text{CF}} = 23$ Hz), 101.52 (CH-C-C-F, $J^3_{\text{CF}} = 5$ Hz), 43.11 (CH_2), 41.78 (CH_2), 32.63 (CH_2)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.61 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, ArH), 7.31 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, ArH), 7.21-7.15 (m, 2H, ArH), 6.47 (dd, $J = 3.1, 1.0$ Hz, 1H, ArH), 4.35 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2), 3.46 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2), 2.33-2.24 (m, 2H, CH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 134.36 (C), 129.71 (C), 129.35 (CH), 125.30 (C), 121.99 (CH), 120.45 (CH), 110.33 (CH), 101.30 (CH), 43.05 (CH_2), 41.74 (CH_2), 32.62 (CH_2)

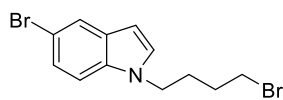


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.54 (s, 1H ArH), 7.51 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.24 (dd, $J = 8.4, 1.7$ Hz, 1H, ArH), 7.13 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, ArH), 6.50 (dd, $J = 3.2, 1.0$ Hz, 1H, ArH), 4.32 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2), 3.47 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2), 2.34-2.24 (m, 2H, CH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 136.69 (C), 128.77 (CH), 127.57 (C), 122.83 (CH), 122.33 (CH), 115.35 (C), 112.32 (CH), 101.83 (CH), 43.01 (CH_2), 41.71 (CH_2), 32.45 (CH_2)



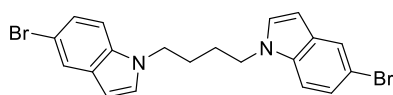
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.62 (d, $J = 2.17$ Hz, 1H, ArH), 8.15 (dd, $J = 9.0, 2.2$ Hz, 1H, ArH), 7.43 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 7.31 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, ArH), 6.73 (dd, $J = 3.2, 1.0$

Hz, 1H, ArH) 4.29 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH₂), 3.48 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH₂), 2.35-2.28 (m, 2H, CH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) : δ 141.75 (C), 138.77 (C), 131.10 (CH), 127.83 (C), 118.33 (CH) 117.44 (CH), 109.17 (CH), 104.44 (CH), 43.32 (CH₂), 41.42 (CH₂), 32.54 (CH₂)



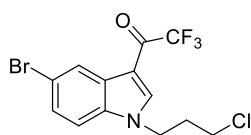
V-6

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.77 (s, 1H ArH) 7.32 (dd, $J = 10.5, 1.9$ Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, ArH), 7.11 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, ArH), 6.46 (dd, $J = 3.1, 1.0$ Hz, 1H, ArH), 4.16 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH₂), 3.39 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH₂), 2.10-1.98 (m, 2H, CH₂), 1.91-1.80 (m, 2H, CH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) : δ 134.63 (C), 130.33 (C), 128.86 (CH), 124.39 (CH), 112.71 (C) 115.35 (C), 110.81 (CH), 101.02 (CH), 45.72 (CH₂), 32.99 (CH₂), 29.92 (CH₂), 28.82



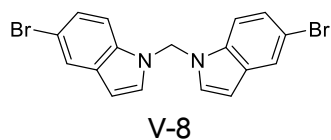
V-7

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.77 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H, ArH), 7.32-7.26 (m, 2H, ArH), 7.14 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH), 7.11 (d, $J = 3.1$ Hz, 2H, ArH), 6.44 (dd, $J = 3.1, 1.0$ Hz, 2H, ArH) 4.05 (t, $J = 6.2$ Hz, 4H, 2xCH₂), 1.87-1.76 (m, 4H, 2xCH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) : δ 134.53 (2xC), 130.28 (2xC), 128.75 (2xCH), 124.42 (2xCH), 123.55 (2xCH), 112.73 (2xC), 110.65 (2xCH), 101.02 (2xCH), 46.05 (2xCH₂), 27.61 (2xCH₂)



V-8

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.60 (s, 1H ArH) 7.98 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, ArH), 7.52 (dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 1H, ArH), 7.35 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, ArH), 4.47 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, CH₂), 3.53 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, CH₂), 2.43-2.34 (m, 2H, CH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) : δ 174.71 (C-C-F, $J^2_{CF} = 33$ Hz), 137.91 (C-C-C-F, $J^3_{CF} = 4$ Hz), 135.18 (CH) 128.58 (C), 127.88 (CH), 125.46 (CH-C-C-C-F, $J^4_{CF} = 6$ Hz), 117.86 (C), 116.83 (C-F, $J^1_{CF} = 290$ Hz), 111.59 (CH), 109.30 (C-C-C-C-F, $J^4_{CF} = 3$ Hz), 44.41 (CH₂), 41.00 (CH₂), 31.94 (CH₂)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 7.76 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, ArH), 7.33 (dd, $J = 8.7, 1.8$ Hz, 1H, ArH), 7.27 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, ArH), 6.51 (dd, $J = 3.3, 1.0$ Hz, 1H, ArH) 6.32 (s, 1H, CH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 134.39 (2xC), 130.76 (2xC), 128.01 (2xCH), 125.48 (2xCH), 123.95 (2xCH), 113.80 (2xC), 110.51 (2xCH), 103.17 (2xCH), 56.72 (CH)

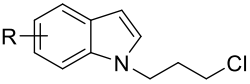
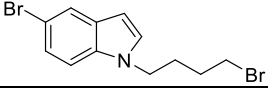
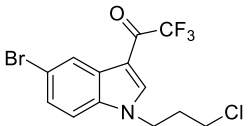
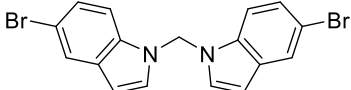
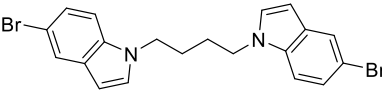
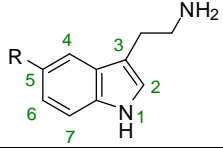
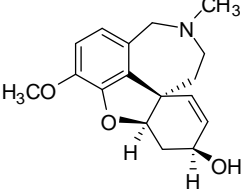
ในงานวิจัยต่อมาได้นำสารที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase ของสารอนุพันธ์ Tryptamine analog TTMA-IV และ TTMA-V ชนิดต่าง ๆ

สารประกอบ Indole	R		% Inhibition (\pm SD)
	H	IV-3a	ND
	5-COOH	IV-3b	63.2 \pm 2.25
	5-F	IV-3c	31.60 \pm 0.33
	5-NO ₂	IV-3d	8.66 \pm 0.22
	5-OCH ₃	IV-3e	14.39 \pm 0.41
	6-F	IV-3f	ND
	H	IV-4a	31.57 \pm 0.17
	5-COOH	IV-4b	57.63 \pm 0.23
	5-F	IV-4c	50.09 \pm 0.61
	5-NO ₂	IV-4d	54.84 \pm 0.38
	5-OCH ₃	IV-4e	ND
	6-F	IV-4f	39.58 \pm 0.18
	-	IV-3g	51.45 \pm 2.69
	-	IV-4g	22.95 \pm 0.35

ND = Not determine

ตารางที่ 8 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase ของสารอนุพันธ์ Tryptamine analog TTMA-IV และ TTMA-V ชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

สารประกอบ Indole	R		% Inhibition (\pm SD)
	H	V-5a	67.26 \pm 0.37
	5-F	V-5b	22.52 \pm 0.41
	5-Cl	V-5c	13.11 \pm 0.50
	5-Br	V-5d	73.53 \pm 0.30
	6-Br	V-5e	30.47 \pm 0.28
	5-NO ₂	V-5f	28.84 \pm 0.43
	5-COOH	V-5g	7.44 \pm 0.10
		V-6	32.97 \pm 0.25
		V-8	8.98 \pm 0.25
		V-9	15.78 \pm 0.33
		V-7	3.86 \pm 0.28
	5-OCH ₃	5-Methoxytryptamine	7.19 \pm 3.02
	5-OH	Serotonin	62.59 \pm 3.74
 Galantamine, 2	-	Galantamine, 2	100.00 \pm 0.00**

ND = Not determine

ผลการทดลองในตารางที่ 8 พบว่าสาร V-5d มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase ได้ถึง 73.53 \pm 0.30 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole V-5d สามารถเป็น lead compound ที่ดีชนิดหนึ่งเพื่อนำไปพัฒนาและปรับปรุงโครงสร้างให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่สูงกว่าหรืออยู่ในระดับเดียวกันกับยา Galantamine และสามารถนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ประสบความสำเร็จในการออกแบบการสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งโคลีนเอสเทอเรสของอนุพันธ์ทริปทามีนเพื่อใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ชนิดต่างๆ จำนวน 27 โครงสร้าง ซึ่งมีกลุ่มอนุพันธ์ทริปทามีนและอินโดล แตกต่างกัน 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) สารกลุ่มอนุพันธ์ tryptamine ที่มีหมู่แทนที่บนวงอินโดลตำแหน่งที่ 5 จำนวน 2 โครงสร้าง (5-hydroxy และ 5-methoxytryptamine) 2) สาร N-(pyrrolidylalkyl)indoles **IV-3a-g** และ N-(piperidylalkyl)indoles **IV-4a-g** รวมจำนวน 14 โครงสร้าง 3) สารกลุ่ม chloroalkyl- และ bromoalkylindole รวมจำนวน 9 โครงสร้าง และ 4) สารกลุ่ม bisindolyl-N-alkyl derivatives รวม 2 โครงสร้าง โดยสารสังเคราะห์ทั้ง 27 โครงสร้าง สามารถสังเคราะห์ด้วยวิธีการที่ง่าย ใช้สภาวะการทดลองที่ไม่รุนแรง ให้ร้อยละผลิตภัณฑ์ปานกลางถึงสูง นอกจากนี้ได้นำสารอนุพันธ์ทริปทามีนและอินโดล ที่สังเคราะห์ได้จำนวน 27 โครงสร้างไปศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ โดยนำสารที่สังเคราะห์ได้นี้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซีทิโคลีนเอสเทอเรส โดยเปรียบเทียบกับยา Galantamine ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบัน พบว่า สารกลุ่มที่ 1 5-hydroxytryptamine มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิโคลีนเอสเทอเรส เท่ากับ $62.59 \pm 3.74\%$ ซึ่งสูงกว่าสาร 5-methoxytryptamine มาก ซึ่งสาร 5-methoxytryptamine มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิโคลีนเอสเทอเรส เพียง $7.19 \pm 3.02\%$ แสดงว่า หมู่ hydroxyl บนวงอินโดลตำแหน่งที่ 5 มีผลทำให้ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอซีทิโคลีนเอสเทอเรสได้ดี สาร N-(pyrrolidylalkyl)indoles **IV-3a-g** และ N-(piperidylalkyl)indoles **IV-4a-g** รวมจำนวน 14 โครงสร้าง มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิโคลีนเอสเทอเรส มากกว่าร้อยละ 50 4 โครงสร้าง ได้แก่ **IV-3b** และ **IV-3b-d** โดยสาร **IV-3b** และ **IV-4b** เป็นสารประกอบอินโดลที่มีหมู่แทนที่ตำแหน่งที่ 5 เป็น carboxylic acid (COOH) เหมือนกัน แตกต่างกันที่สาร **IV-3b** มีหมู่ N-pyrrolidylethyl ต่ออยู่กับวงอินโดล แต่สาร **IV-4b** มีหมู่ N-piperidylalkyl ต่ออยู่กับวงอินโดล โดยสาร **IV-3b** มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอซีทิโคลีนเอสเทอเรส เท่ากับ $63.2 \pm 2.25\%$ ซึ่งสูงกว่าสาร **IV-3b-d** นอกจากนี้พบว่า สารกลุ่ม chloroalkylindole ได้แก่ 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** และสาร 1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5a** มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอซีทิโคลีนเอสเทอเรสมากเป็นอันดับที่ 1 และ 2 ได้แก่ $73.53 \pm 0.30\%$ และ $67.26 \pm 0.37\%$ ตามลำดับ ขณะที่ยา Galantamine ภายใต้สภาวะที่ศึกษายับยั้งเอนไซม์แอซีทิโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ 100.00 อย่างไรก็ตาม สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าและสังเคราะห์ได้ง่ายกว่า ยา Galantamine มาก ดังนั้น สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** สามารถเป็น lead compound ที่ดีชนิดหนึ่งเพื่อนำไปพัฒนาและปรับปรุงโครงสร้างให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิโคลีนเอสเทอเรสได้สูงกว่าหรืออยู่ในระดับเดียวกันกับยา Galantamine และสามารถนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้

ข้อเสนอแนะ การทำวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

งานวิจัยที่เสร็จล่าช้ากว่ากำหนดเวลามีปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ 1 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้มีความล่าช้าในการจัดส่ง ประการที่ 2 คือ การปรับปรุงโครงสร้างสารกลุ่ม diheteroarylmethane เพื่อให้ได้โครงสร้างที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงหรือดีกว่ายา Galantamine ต้องมีการทดสอบฤทธิ์และปรับปรุงโครงสร้าง บางครั้งผลการทดลองไม่ได้เป็นไปตามแผนการที่คาดไว้ ทำให้นักวิจัยได้พยายามปรับปรุงโครงสร้างสารจำนวนมาก ถึง 27 โครงสร้าง โดยสารกลุ่ม chloroalkylindole ได้แก่ 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** และสาร 1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5a** มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอซิติโคลีนเอสเทอเรสมากเป็นอันดับที่ 1 และ 2 ได้แก่ $73.53 \pm 0.30\%$ และ $67.26 \pm 0.37\%$ ตามลำดับ ขณะที่ยา Galantamine ภายใต้อาหารที่ศึกษายับยั้งเอนไซม์แอซิติโคลีนเอสเทอเรสได้ร้อยละ 100.00 อย่างไรก็ตามสาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าและสังเคราะห์ได้ง่ายกว่า ยา Galantamine มาก ดังนั้น สาร 5-bromo-1-(3-chloropropyl)-1H-indole **V-5d** สามารถเป็น lead compound ที่ดีชนิดหนึ่งเพื่อนำไปพัฒนาและปรับปรุงโครงสร้างให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิติโคลีนเอสเทอเรสได้สูงกว่าหรืออยู่ในระดับเดียวกับยา Galantamine และสามารถนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้

บรรณานุกรม

- จักรกฤษณ์ สุขยิ่ง, โรคสมองเสื่อม.ใน: มาโนช หล่อตระกูล, ปราโมทย์ สุคนิษฐ์, บรรณาธิการ, จิตเวชศาสตร์
รามาชิปดี. กรุงเทพมหานคร: สวีชาญการพิมพ์: 2555. หน้า 80-94.
- ปานบดี เอกะจัมปะกะ, นิธิศ วัฒนมะโน. รายงานสถานการณ์สภาวะสุขภาพและพฤติกรรมสุขภาพผู้สูงอายุ
ไทย, *สถานการณ์สุขภาพไทย* 2552; 4: 1-32.
- ลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม, ธีรภัทร นวลน้อย. 2554. แนวทางใหม่ในการพัฒนาสารยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส
เพื่อรักษาโรคอัลไซเมอร์, *Thai Pharm. Health Sci. J.* 6: 157-173.
- Adrsersen, A., Kjøbye, 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.
Hexahydrochromeno-[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 (Huperines): 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 acetylcholine-esterase 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.
- Ingkaninan, K., Changwijit, K., Suwanborirux, K. (2006). Vobasinyl-Iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *J. Pharm. Pharmacol.* 58: 847-852.
- Khorana, N., Changwichit, K., Ingkaninan, K., Utsintong, M. (2012). Prospective Acetylcholinesterase inhibitory activity of indole and its analogs. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 22: 2885-2888.
- 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.
- Queiroz, M. M. F., Queiroz, E. F., Zeraik, M. L., Ebrahimi, S. N., Marcourt, L., Cuendet, M.,

- Castro-Gamboa, I., Hamburger, M., Bolzani, V. da. S. and Wolfender, J.-L. 2014. Chemical composition of the bark of *Tetrapterys mucronata* and identification of acetylcholinesterase inhibitory constituents. *J. Nat. Prod.* 77: 650-656.
- Querfurth, H. W. and LaFerla F. M. 2010. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362: 329-344.
- Piazzzi, 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 β -amyloid aggregation: A dual function lead for Alzheimer's disease therapy. *J. Med. Chem.* 46: 2279-2282.
- Rampa, A., Piazzzi, L., Belluti, F., et al. 2001. Acetylcholinesterase inhibitors: SAR and kinetic studies on ω -[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., Imura, 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., Frolov, F., et al. 1991. Atomic structure of Acetylcholinesterase form *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.
- Wen, H., Wang, L., Xu, L., Hao, Z., Shao, C.-L., Wang, C.-Y., and Xiao, J. 2015. Fluorinated alcohol-mediated S_N1 -type reaction of indoyl alcohols with diverse nucleophiles. *Adv. Synth. Catal.* 357: 4023-4030.
- http://archive.cnx.org/resources/90a2c5bea371f121681855ad1bbd372b51ba878b/Figure_35_05_01.jpg

ผลผลิตของโครงการวิจัย

1. ภรณ์กานต์ ละอองทอง, อนันต์ อธิพรชัย และจเร จรัสจรรยาพงศ์. (2560). การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารประกอบอินโดลเพื่อใช้เป็นสารยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในการรักษาโรคอัลไซเมอร์. ใน งานประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9” ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา (นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์).
2. ชญามน จันทนา, ภรณ์กานต์ ละอองทอง, อนันต์ อธิพรชัย และจเร จรัสจรรยาพงศ์. (2562). การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารประกอบอินโดลเพื่อใช้เป็นสารยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในการรักษาโรคอัลไซเมอร์. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา (Manuscript in preparation).
3. ผู้ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ ระดับปริญญาโท 1 คน สาขาเคมี คือ นางสาวชญามน จันทนา และระดับปริญญาตรี สาขาเคมี จำนวน 1 คน คือ นางสาวภรณ์กานต์ ละอองทอง