

การประเมินฤทธิ์ในการต้านชักของเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนโซอิล)  
-1,2,3,4-เทตระไฮโดร-4-เมทิลควิโนลีน



นางสาว สายชล รอดแผ้วพาล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3501-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 21227664

EVALUATION OF ANTICONVULSANT ACTIVITY OF  
N- (*p*-AMINOBENZOYL)-1,2,3,4-TETRAHYDRO-4-METHYLQUINOLINE



Miss Saichol Rodpaewpaln

ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacology(Inter-Department)  
Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-3501-4

Thesis Title Evaluation of Anticonvulsant Activity of N- ( $\rho$ -Aminobenzoyl)  
-1, 2, 3, 4-tetrahydro-4-methylquinoline  
By Miss Saichol Rodpaewpaln  
Field of study Pharmacology  
Thesis Advisor Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.  
Thesis Co-advisor Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.

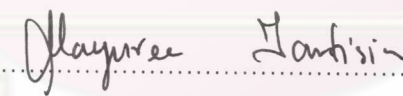
---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

  
..... Dean of Graduate School  
(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE

  
..... Chairman  
(Associate Professor Supatra Srichairat, Ph.D.)

  
..... Thesis Advisor  
(Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)

  
..... Member  
(Assistant Professor Kanokwan Tiloksakulchai, Ph.D.)

  
..... Member  
(Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D.)

  
..... Member  
(Pasarapa Chaiyakul, Ph.D.)

สายชล รอดแผ้วพาล : การประเมินฤทธิ์ในการต้านชักของเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนโซิล)-1,2,3,4-เตตระไฮโดร-4-เมทิลควิโนลีน (Evaluation of anticonvulsant activity of N-(p-aminobenzoyl)-1,2,3,4-tetrahydro-4-methylquinoline) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.มยุรี ตันติสิริระ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.บุญยงค์ ตันติสิริระ, 102 หน้า, ISBN 974-17-3501-4

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ประสงค์ในการศึกษาฤทธิ์ต้านชักของสาร เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนโซิล)-1,2,3,4-เตตระไฮโดร-4-เมทิลควิโนลีน (ซียู-สิบเจ็ด-ศูนย์หก) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ตัวใหม่ของอะเมลโทไลด์ที่สังเคราะห์ขึ้น ในด้านประสิทธิภาพ ความเป็นพิษเฉียบพลัน และพิษต่ออวัยวะระบบประสาทส่วนกลาง ตลอดจนผลต่อปริมาณสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในเปลือกสมองใหญ่ของหนูขาวขณะตื่น โดยวิธีไมโครไดอะลैซิส

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านชักของสารทดสอบทั้งสองในหนูถีบจักรที่ได้รับสารทดสอบในขนาดต่างๆกันพบว่า ซียู-สิบเจ็ด-ศูนย์หก และอะเมลโทไลด์มีฤทธิ์ต้านชักในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชัก โดยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าเท่านั้นแต่ไม่มีฤทธิ์ต้านชักจากการกระตุ้นด้วยสารเพนทีลีนเทระซอลได้ โดยซียู-สิบเจ็ด-ศูนย์หก มีประสิทธิภาพในการต้านชักน้อยกว่าอะเมลโทไลด์ โดยขนาดของสารทดสอบทั้งสองที่สามารถต้านการชักในหนูถีบจักรได้จำนวนครั้งหนึ่ง ( $ED_{50}$ ) เท่ากับ 77.62 และ 1.08 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (มก/กก) น้ำหนักตัว ตามลำดับ สารทดสอบทั้งสองสามารถต้านการชักจากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าได้นานถึง 6 ชั่วโมงหลังจากได้รับสารทดสอบ อย่างไรก็ตามค่า  $ED_{50}$  ก็เพิ่มขึ้นด้วย ในด้านความปลอดภัยเมื่อดูจากค่า  $LD_{50}$  ของซียู-สิบเจ็ด-ศูนย์หก พบว่ามีค่ามากกว่า 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ในขณะที่  $LD_{50}$  ของอะเมลโทไลด์มีค่าเท่ากับ 63 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว และเมื่อพิจารณาจากค่าขอบเขตความปลอดภัยสัมพัทธ์ (Relative safety margin,  $LD_{50} / ED_{50}$ ) ของซียู-สิบเจ็ด-ศูนย์หก และอะเมลโทไลด์ซึ่งมีค่ามากกว่า 13 และ 63 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าซียู-สิบเจ็ด-ศูนย์หกน่าจะเป็นสารที่มีความปลอดภัยมาก ในการทดสอบความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลาง โดยวิธี Rotarod test พบว่า ขนาดของสารทดสอบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางในหนูถีบจักรจำนวนครั้งหนึ่ง ( $TD_{50}$ ) ของซียู-สิบเจ็ด-ศูนย์หก และอะเมลโทไลด์มีค่าเท่ากับ 320 และ 9 มก/กก น้ำหนักตัว ตามลำดับ เมื่อนำค่าดังกล่าวมาคำนวณหาค่าดัชนีปกป้อง (Protective index,  $PI = TD_{50} / ED_{50}$ ) พบว่าอะเมลโทไลด์มีค่าดัชนีปกป้องสูงกว่าซียู-สิบเจ็ด-ศูนย์หก (4 และ 9 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงขนาดของสารทดสอบทั้งสองที่มีผลต่อการรักษา คาดว่าซียู-สิบเจ็ด-ศูนย์หก ในขนาดที่มีฤทธิ์ต้านชักในทางคลินิก น่าจะมีผลต่อความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางน้อยเช่นเดียวกับอะเมลโทไลด์ เมื่อนำสารทดสอบทั้งสองมาศึกษาถึงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในเปลือกสมองใหญ่ของหนูขาวที่เคลื่อนไหวอย่างอิสระโดยวิธีไมโครไดอะลैซิส พบว่าสารทั้งสองไม่มีผลเพิ่มหรือลดปริมาณสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนทั้ง 4 ตัวคือ แอสพาเทท กลูตาเมท กลัยซีนและกาบา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาในครั้งนี้อาจพอสรุปได้ว่าซียู-สิบเจ็ด-ศูนย์หก เป็นอนุพันธ์ของอะเมลโทไลด์ที่ออกฤทธิ์ต้านชักได้ในลักษณะจำเพาะเช่นเดียวกับอะเมลโทไลด์ และน่าจะมีความปลอดภัยในการใช้สูงกว่าอะเมลโทไลด์ สารทั้งสองไม่มีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในเปลือกสมองใหญ่ของหนูขาว ด้วยคุณลักษณะทางเภสัชวิทยาที่คล้ายคลึงกันของสารทั้งสอง อาจพออนุมานได้ว่าสารซียู-สิบเจ็ด-ศูนย์หกน่าจะมีกลไกการออกฤทธิ์ต้านชักไม่แตกต่างจากอะเมลโทไลด์ การปรับปรุงโครงสร้างของซียู-สิบเจ็ด-ศูนย์หก ในลำดับต่อไป อาจนำไปสู่การค้นพบอนุพันธ์ตัวใหม่ของอะเมลโทไลด์ซึ่งมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาที่น่าพึงพอใจ

ภาควิชา เภสัชวิทยา

ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา เภสัชวิทยา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4389104820 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORDS: ANTICONVULSANT / N-(p-AMINO BENZOYL)-1,2,3,4-TETRAHYDRO-4-METHYLQUINOLINE

SAICHOL RODPAEWPALN: ANTICONVULSANT ACTIVITY OF N- (p- AMINO BENZOYL)-1,2,3,4- TETRAHYDRO-4- METHYLQUINOLINE. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF.MAYUREE TANTISIRA,Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC.PROF.BOONYONG TANTISIRA,Ph.D. 102 pp. ISBN 971-4-17-3501-4

The purpose of the present study was to investigate anticonvulsant effect of N- (p-aminobenzoyl)-1,2,3,4-tetrahydro-4-methylquinoline(CU-17-06), a newly synthesized ameltolide analog, with regards to efficacy, lethality, and neurotoxicity. In addition, *in vivo* microdialysis experiments on freely moving rats were also performed in search for the possible effects of CU-17-06 on cortical amino acid neurotransmitters that may underlie its anticonvulsant activity.

CU-17-06 and ameltolide were able to protect the experimental animals exclusively in Maximal Electroshock Seizure (MES) but not in Pentylenetetrazol (PTZ) test. When given by an intraperitoneal route in mice, CU-17-06 was less potent than ameltolide, exhibiting the median effective dose ( $ED_{50}$ ) of 77.62 mg/kg body weight (B.W.) whereas the corresponding value for ameltolide was 1.08 mg/kg B.W. Both compounds exhibited protection against MES at least 6 hours after dosing, however, with an increment of the  $ED_{50}$  values. In term of safety, CU-17-06 seems to be rather safe as indicated by no lethality was observed in the dose up to 1,000 mg/kg B.W. whereas ameltolide demonstrated the  $LD_{50}$  of 63 mg/kg B.W. The median neurotoxic dose ( $TD_{50}$ ) of CU-17-06 established by Rotarod test, was 320 mg/kg B.W. while it was 9 mg/kg B.W. for ameltolide. Consequently the protective index ( $PI = TD_{50} / ED_{50}$ ) of CU-17-06 was less favorable than that of ameltolide (4.16 and 9 respectively), implying that therapeutic dose of CU-17-06 should produce more pronounced motor impairment than that of ameltolide. However both of them seem to be clinically safe. In microdialysis studies, it was found that neither CU-17-06 nor ameltolide was able to exert any significant effects on the level of cortical brain amino acid (aspartate, glutamate, glycine and GABA).

In conclusion, the present studies demonstrated rather similar profile of anticonvulsant activity between CU-17-06 and its parent compound, ameltolide. Therapeutic dose of CU-17-06 or ameltolide was anticipated to produce acceptable neurological unwanted effect. Furthermore, CU-17-06 was rather safe. Based on similarity in pharmacological screening profile and no changes on the level of brain amino acid neurotransmitters was observed after the administration of either CU-17-06 or ameltolide, it is suggestive that these two compounds may possess similar mechanism underlying anticonvulsant activity observed in experimental animals. Further structural modification of CU-17-06 may lead to the discovery of new ameltolide analogs with more favorable pharmacological and toxicological properties.

Department Inter-department of pharmacology Student' signation.....

Field of study Pharmacology

Advisor's signation.....

Academic year 2003

Co-advisor's signation.....

Mayuree Tantisira  
Boonyong Tantisira

## Acknowledgements

I would like to express my sincere gratitude to my advisor; Assoc. Prof. Mayuree Tantisira and my co-advisor, Assoc. Prof. Boonyong Tantisira for their kindly advice, guidance, frank keen interest and constant encouragement though out the research work and preparation of this thesis.

My thanks are also extended to Asst. Prof. Chamnan Patarapanich for synthesis and supplying the test substance (CU-17-06), Miss Taunjai Numthongsakun and Miss Aree Wanasuntronwong for teaching microdialysis technique.

Similarly, I am indebted to all staff members of the Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their valuable helps as well as to all experimental animals for their sacrifice, which bring success to my studies.

Last, but not least, my grateful thanks are extended to my parents whose support, patience and encouragement made everything possible.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## Contents

|   | Page |
|---|------|
| Abstract (Thai).....                            | iv   |
| Abstract (English).....                         | v    |
| Acknowledgements.....                           | vi   |
| Contents.....                                   | vii  |
| List of Tables.....                             | ix   |
| List of Figures.....                            | x    |
| List of Abbreviations.....                      | xii  |
| Chapter   |      |
| I Introduction                                  |      |
| Epilepsy.....                                   | 1    |
| 1. Etiology.....                                | 2    |
| 2. Epileptogenesis.....                         | 3    |
| 3. Classification .....                         | 6    |
| 4. Amino acid neurotransmitter in epilepsy..... | 8    |
| 5. Therapy of epilepsy.....                     | 16   |
| Ameltoide.....                                  | 25   |
| CU-17-06.....                                   | 35   |
| II Material and Methods                         |      |
| Experiment animals.....                         | 37   |
| Chemicals.....                                  | 37   |
| Drug preparations and administrations.....      | 38   |

## Contents (Cont.)

|  |     |
|--|-----|
| Equipments.....  | 38  |
| Experimental methods.....  | 39  |
| Calculation and statistical analysis.....  | 44  |
| III Results  |     |
| Anticonvulsant activity.....   | 45  |
| Toxicity.....  | 46  |
| Effects on some cortical amino acid neurotransmitter level<br>In freely moving rats..... | 47  |
| IV Discussion and conclusions.....   | 67  |
| Reference.....   | 72  |
| Appendices.....  | 79  |
| Vitae.....   | 102 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## List of Tables

| Table   | Page |
|---|------|
| 1. Classification of epilepsy.....  | 7    |
| 2. Minimal neurotoxicity and anticonvulsant potency of intraperitoneal administered ameltolide and some prototype antiepileptic drugs in mice.....  | 28   |
| 3. Minimal neurotoxicity and anticonvulsant potency of orally administered ameltolide and some prototype antiepileptic drugs in mice.....   | 29   |
| 4. Quantitative toxicity profile of intraperitoneally administered ameltolide and some prototype antiepileptic drugs in mice.....   | 30   |
| 5. Safety ratios ( $TD_3/ED_{51}$ ) of ameltolide, PHT, PB, and VPA.....  | 31   |
| 6. Strucure of N- ( <i>p</i> -aminobenzoyl)-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoline to be synthesized.....   | 34   |
| 7. $ED_{50}$ , $TD_{50}$ , $LD_{50}$ , PI ( $TD_{50}/ED_{50}$ ) and relative safety margin ( $LD_{50}/ED_{50}$ ) of an intraperitoneal administration of CU-17-06 and ameltolide in MES and PTZ models..... | 56   |

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## List of Figures

| Figure   | page |
|--|------|
| 1. Structure of GABA <sub>A</sub> receptor .....   | 10   |
| 2. Schematic diagram of glutamate.....   | 15   |
| 3. Structural formula of ameltolide.....   | 26   |
| 4. Structural formula of CU-17-06.....   | 35   |
| 5. Log dose response curves of CU-17-06 (i.p.) against MES in mice at 15, 30, and 60 min pretreated times.....   | 48   |
| 6. Log dose response curves of ameltolide (i.p.) against MES in mice at 15, 30, and 60 min pretreated times..... | 49   |
| 7. Protection against MES exhibited by CU-17-06 and ameltolide at various pretreated times in mice.....          | 50   |
| 8. Comparison of ED <sub>50</sub> at various pretreated times of CU-17-06 and ameltolide (i.p.) in mice.....     | 51   |
| 9. Log dose response curves of acute toxicity (lethality) of ameltolide (i.p.) in mice.....                      | 52   |
| 10. Log dose response curve of neurotoxicity (Rotarod test) exhibited by CU-17-06 (i.p.) in mice.....            | 53   |

## List of Figures (Cont.)

| Figure  | page |
|---|------|
| 11. Log dose response curve of neurotoxicity (Rotarod test) exhibited by ameltolide (i.p.) in mice.....   | 54   |
| 12. Illustration of the LD <sub>50</sub> , TD <sub>50</sub> , and ED <sub>50</sub> elicited by an intraperitoneal administration of CU-17-06 and ameltolide in mice in MES model..... | 55   |
| 13. HPLC chromatogram of (ameltolide) OPA-derivatized amino acids from the rat cerebral cortex .....  | 57   |
| 14. HPLC chromatogram of (CU-17-06) OPA-derivatized amino acids from the rat cerebral cortex .....  | 58   |
| 15. Effect of an intraperitoneal administration of CU-17-06 and ameltolide on the total amount of the rat cortical aspartate levels in the dialysate collected for 3 hours.....       | 59   |
| 16. Effect of an intraperitoneal administration of CU-17-06 and ameltolide on the total amount of the rat cortical glutamate levels in the dialysate collected for 3 hours.....       | 60   |
| 17. Effect of an intraperitoneal administration of CU-17-06 and ameltolide on the total amount of the rat cortical glycine levels in the dialysate collected for 3 hours.....         | 61   |

## List of Figures (Cont.)

| Figure   | page |
|--|------|
| 18. Effect of an intraperitoneal administration of CU-17-06 and ameltolide<br>on the total amount of the rat cortical GABA<br>levels in the dialysate collected for 3 hours..... | 62   |
| 19. Effect of an intraperitoneal administration of CU-17-06 and ameltolide<br>on the rat cortical aspartate levels at various time.....  | 63   |
| 20. Effect of an intraperitoneal administration of CU-17-06 and ameltolide<br>on the rat cortical glutamate levels at various time.....  | 64   |
| 21. Effect of an intraperitoneal administration of CU-17-06 and ameltolide<br>on the rat cortical glycine levels at various time.....  | 65   |
| 22. Effect of an intraperitoneal administration of CU-17-06 and ameltolide<br>on the rat cortical GABA levels at various time.....   | 66   |

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## List of Abbreviations

|                    |   |   |
|--------------------|---|---|
| $\alpha$           | = | Alpha   |
| $\beta$            | = | Beta  |
| $\epsilon$         | = | Epsilon   |
| $\delta$           | = | Delta   |
| $\gamma$           | = | Gamma   |
| $\rho$             | = | Rho   |
| $\mu$              | = | Micro   |
| $\mu\text{g}$      | = | Microgram   |
| $\mu\text{l}$      | = | Microlitre  |
| $\mu\text{m}$      | = | Micrometre  |
| $\mu\text{M}$      | = | Micromolar  |
| %                  | = | Percent   |
| $\text{Ca}^{2+}$   | = | Calcium ion   |
| $\text{Cl}^-$      | = | Chloride ion  |
| $\text{HCO}_3^-$   | = | Hydrogen carbonate ion                                    |
| $\text{Mg}^{2+}$   | = | Magnesium ion   |
| $\text{K}^+$       | = | Potassium ion   |
| $\text{Na}^+$      | = | Sodium ion  |
| aCSF               | = | Artificial cerebrospinal fluid                            |
| a.m.               | = | ante meridian (before noon)                               |
| AMPA               | = | Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionic acid |
| B.W.               | = | Body weight   |
| CNS                | = | Central nervous system                                    |
| cm                 | = | Centimeter  |
| $^{\circ}\text{C}$ | = | Degree Celsius  |

## List of Abbreviations (Cont.)

|                  |   |  |
|------------------|---|--|
| ED <sub>50</sub> | = | Median effective dose                    |
| EEG              | = | Electroencephalogram                     |
| e.g.             | = | Exempli gratia (for example)             |
| et al.           | = | et alii (and other)                      |
| FBM              | = | Felbamate                                |
| GABA             | = | Gamma aminobutyric acid                  |
| GABA-T           | = | Gamma aminobutyric acid<br>transaminase  |
| GAD              | = | Glutamic acid decarboxylase              |
| GBP              | = | Gabapentin                               |
| GHB              | = | Gamma hydroxybutyric acid                |
| GluR             | = | Ionotropic glutamate receptor            |
| GTP              | = | Guanidine triphosphate                   |
| g                | = | gram                                     |
| HPLC             | = | High performance liquid<br>chromatogram  |
| hr               | = | hour                                     |
| 5-HT             | = | 5-hydroxytryptamine                      |
| Hz               | = | Hertz                                    |
| ILAE             | = | International League Against<br>Epilepsy |
| i.p.             | = | Intraperitoneal                          |
| KA               | = | Kainic acid                              |
| Kg               | = | Kilogram                                 |
| L                | = | Litre                                    |
| LD <sub>50</sub> | = | Median lethal dose                       |
| LTG              | = | Lamotrigine                              |
| mA               | = | Miliampare                               |

## List of Abbreviations (Cont.)

|                  |   |  |
|------------------|---|--|
| M                | = | Molar                                  |
| MES              | = | Maximal electroshock                   |
| MGlurR           | = | Metabotropic glutamate receptor        |
| mg               | = | Miligram                               |
| min              | = | Minute                                 |
| ml               | = | Milliliter                             |
| mm               | = | Millimeter                             |
| mM               | = | Millimolar                             |
| NMDA             | = | N-methyl-D-aspartate                   |
| NSS              | = | Normal saline solution                 |
| OPA              | = | Ortho-Phthaldialdehyde                 |
| PEG400           | = | Polyethylene glycol 400                |
| PI               | = | Protective index                       |
| p.m.             | = | post meridian (afternoon)              |
| PTZ              | = | Pentylentetrazole-induced seizure test |
| S.E.M.           | = | Standard error of the mean             |
| sec.             | = | Second                                 |
| SSAD             | = | Succinic semialdehyde                  |
| SSADH            | = | Succinic semialdehyde decarboxylase    |
| TD <sub>50</sub> | = | Median toxic dose                      |
| TGB              | = | Tiagabine                              |
| TPB              | = | Topiramate                             |
| VGB              | = | Vigabatrin                             |
| VPA              | = | Valproic acid                          |