รายงานการวิจัย

"สารสำคัญและการประกันคุณภาพอาหารเสริมจากกระชายดำ"

Active Constituents and Quality Assessment of Food Supplements

from *Kaempferia parviflora*

ประจำปีงบประมาณ 2554

หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

คณะผู้วิจัย:

ผศ.ดร. ไพฑูรย์ รัชตะสาคร (หัวหน้าโครงการ)

รศ.ดร. สันติ ทิพยางค์

ผศ.ดร. วรินทร ชวศิริ

ผศ.ดร. พัฒนรา สวัสดี

ผศ.ดร. ปรีชา ภูวไพรศิริศาล

รายงานการวิจัย

"สารสำคัญและการประกันคุณภาพอาหารเสริมจากกระชายดำ"

Active Constituents and Quality Assessment of Food Supplements

from *Kaempferia parviflora*

ประจำปีงบประมาณ 2554

หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

คณะผู้วิจัย:

ผศ.ดร. ไพฑูรย์ รัชตะสาคร (หัวหน้าโครงการ)

รศ.ดร. สันติ ทิพยางค์

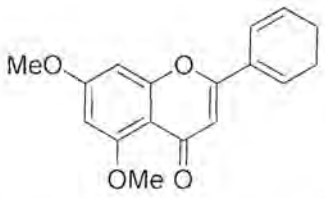
ผศ.ดร. วรินทร ชวศิริ

ผศ.ดร. พัฒนรา สวัสดี

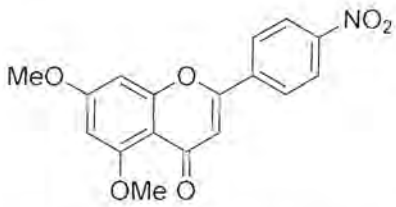
ผศ.ดร. ปรีชา ภูวไพรศิริศาล

บทคัดย่อ

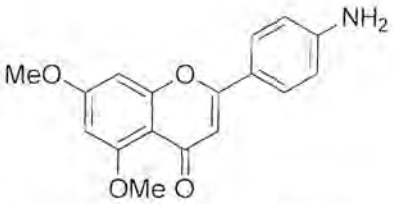
5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวนเป็นสารที่มีรายงานไว้ว่าเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสได้ ซึ่งแยกได้จากกระชายดำ ในงานวิจัยนี้ได้รายงานวิธีการที่ง่ายและไม่ซับซ้อนในการสังเคราะห์สารดังกล่าว นอกจากนี้ ยังได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารนี้อีก 2 ชนิดด้วย โดยได้ทำการสังเคราะ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน-4-ไนโตรฟลาโวน และ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน-4-อะมิโนฟลาโวน โดยปฏิกิริยาแอลดอล, การปิดวงโดยการช่วยเหลือของฮาโลโจนและปฏิกิริยารีดักชั่น แต่อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถที่จะทำสาร 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน-4-อะมิโนฟลาโวน ให้บริสุทธิ์ได้ อนุพันธ์ทั้งสองนี้นำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลและบิวทิริลโคลีนเอสเทอรส ที่สามความเข้มข้น ได้แก่ 0.1, 0.05, และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารทั้งสองนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ต่ำทุกความเข้มข้น



5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน



5,7-ไดเมทอกซี-4-ไนโตรฟลาโวน

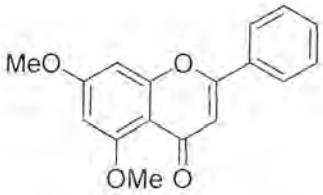


5,7-ไดเมทอกซี-4-อะมิโนฟลาโวน

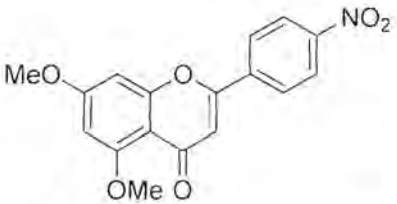
คำสำคัญ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน, 5,7-ไดเมทอกซี-4-ไนโตรฟลาโวน, 5,7-ไดเมทอกซี-4-อะมิโนฟลาโวน, แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรส, บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรส

Abstract

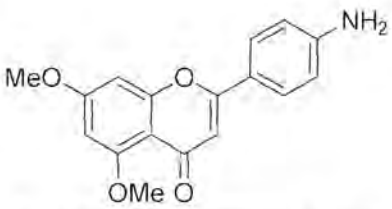
5,7-Dimethoxyflavone was previously reported as an anti-cholinesterase compound and isolated from *Kaempferia parviflora*. This research reported an easy and simple process to synthesize this compound. Moreover, two derivatives of this compound were synthesized and their activities were evaluated. This study was successful in synthesizing 5,7-dimethoxy-4-nitroflavone and 5,7-dimethoxy-4-aminoflavone via Aldol reaction, halogenated-assisted cyclization, and reduction reaction. However, the purification to obtain pure 5,7-dimethoxy-4-aminoflavone was not successful. These two derivatives were investigated for their acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities. The inhibitory assay was measured at three different final concentrations at 0.1, 0.05, and 0.01mg/mL. Both compounds exhibited low inhibition towards both enzymes at all test concentrations.



5,7-dimethoxyflavone



5,7-dimethoxy-4-nitroflavone



5,7-dimethoxy-4-aminoflavone

Keywords: 5,7-Dimethoxyflavone, 5,7-Dimethoxy-4-nitroflavone, 5,7-Dimethoxy-4-aminoflavone, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีส่วนให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน จากแผนงานวิจัย "นวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่" ประจำปีงบประมาณ 2554 ประเภทผลงานวิจัยเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยี ที่ให้การสนับสนุนด้านทุนในการทำวิจัยครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญแผนภาพ	ช
1.บทนำ	
1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	1
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.3 วัตถุประสงค์	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2. เนื้อเรื่อง	3
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	3
2.1.1 การสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน	3
2.1.2 การสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี-ไนโตรฟลาโวน และ 5,7-ไดเมทอกซี- อะมิโนฟลาโวน	5
2.1.2.1 การสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี-ไนโตรฟลาโวน	5
2.1.2.2 การสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี- อะมิโนฟลาโวน	8
2.1.3 การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารสังเคราะห์	9
2.1.4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส	9
2.2 ผลการวิจัย	11
2.2.1 ผลการสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน	11
2.2.2 ผลการสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี- ไนโตรฟลาโวน	12
2.2.3 ผลการสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี- อะมิโนฟลาโวน	15
2.2.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลและบิวทิริลโคลีนเอสเทอเรส	17
3. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	19
4. สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	19
บรรณานุกรม	19

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 อัตราส่วนของสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ต่างๆ ในการสังเคราะห์ 5.7-ไดเมทอกซีฟลาโวน (1) แบบที่ 2	5
2 อัตราส่วนของสารตั้งต้น สารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา และตัวทำละลายต่างๆ ในการสังเคราะห์สารมัธยันตร์ N	6
3 ปริมาณของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการสังเคราะห์ 5.7-ไดเมทอกซี-ไนโตรฟลาโวน	7
4 ผลการทดลองกระบวนการสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน (1) แบบที่ 2 เมื่อปรับเปลี่ยนสัดส่วนรีเอเจนต์ต่างๆ	12
5 ค่าร้อยละผลที่ได้จากการสังเคราะห์สารมัธยันตร์ N	13
6 ค่าร้อยละผลที่ได้จากการสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ 5,7-DM-4-NF	14
7 ค่าเคมิคัลชิฟของ 5,7-DM-4-NF ในตำแหน่งต่าง ๆ	14
8 ค่าเคมิคัลชิฟของ 5,7-DM-4-AF ในตำแหน่งต่าง ๆ	16
9 ผลการยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ 5,7-DM-4-NF	17
10 ผลการยับยั้งเอนไซม์บิวทีริลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ 5,7-DM-4-NF	17
11 ผลการยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสของของผสมระหว่าง 5,7-DM-4-NF และ 5,7-DM-4-AF	18
12 ผลการยับยั้งเอนไซม์บิวทีริลโคลีนเอสเทอเรสของของผสมระหว่าง 5,7-DM-4-NF และ 5,7-DM-4-AF	18

เลขหมู่
เลขทะเบียน 015704
วัน, เดือน, ปี 5 ก.พ. 56

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 โครงสร้างทางเคมี ของ ออร์โท-, เมตา- และ พารา-ไนโตรเบนซาลดีไฮด์	7
2 โปรตรอน เอ็น เอ็ม อาร์ สเปกตรัมของ 5,7-DM-4-NF	15
3 โปรตรอน เอ็น เอ็ม อาร์ สเปกตรัมของของผสมระหว่าง 5,7-DM-4-NF และ 5,7-DM-4-AF	16

สารบัญแผนภาพ

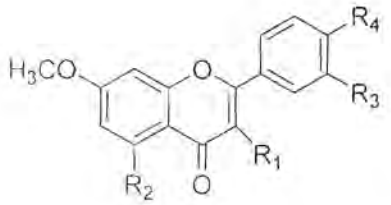
แผนภาพที่	หน้า
1 กระบวนการสังเคราะห์5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน (**1**) แบบที่ 1	4
2 กระบวนการสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน (**1**) แบบที่ 2	4
3 สรุปขั้นตอนการสังเคราะห์ 5, 7-DMNF	7
4 กลไลการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 5, 7-DMNF	8
5 ขั้นตอนการสังเคราะห์ 5, 7-DMAF	9
6 สมการแสดงการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของแอซีทิลไธโอโคลีน	10

บทนำ

1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ในประเทศไทยมีพืชที่เรียกว่ากระชายอยู่ 3 ชนิด คือ กระชายเหลือง กระชายแดงและกระชายดำ กระชายเหลืองและกระชายแดง เป็นพืชจำพวกเดียวกัน แต่เป็นพืชต่างชนิดกันและมีฤทธิ์ทางยาต่างกันเล็กน้อย โดยกระชายแดงจะมีกาบใบสีแดงเข้มกว่ากระชายเหลือง ส่วนกระชายดำเป็นพืชวงศ์ Zingiberaceae เช่นกันแต่อยู่ในสกุลเดียวกับเปราะหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora*

กระชายดำ เป็นพืชล้มลุกมีเหง้าใต้ดิน เนื้อในเหง้าอาจเป็นสีม่วงหม่นหรือสีดำ มีกลิ่นฉุนและแรง เป็นพืชสมุนไพร โดยเหง้าใช้เป็นยาขับปัสสาวะ ขับลม แก้ท้องอืดเฟ้อ จากการศึกษาเอกสารอ้างอิงทางวิชาการที่ผ่านมาของกระชายดำ[1,2,3] พบว่า องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ ฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารเหล่านี้ได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า 5,7-dimethoxyflavone มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflamatory activity) เทียบได้กับยามาตรฐานหลายชนิด เช่น แอสไพริน ไฮโดรคอร์ติโซน สาร 5,7,4′-trimethoxyflavone และ 5,7,3′,4′-tetramethoxyflavone แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย และยังพบว่าสารฟลาโวนอยด์อื่นๆ แสดงฤทธ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* และ Mycobacterium ได้ด้วย แต่สารเหล่านี้ไม่พบว่ามีสารใดทำให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบ[4] นอกจากนี้ ยังพบว่า สารสกัดเอทานอลของกระชายดำมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดแดงใหญ่ และการหดเกร็งของลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูขาว[5] และยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดของคน



Compound	R_1	R_2	R_3	R_4
1	OCH_3	OH	H	H
2	H	OH	H	H
3	OCH_3	OH	H	OCH_3
4	H	OH	H	OCH_3
5	OCH_3	OH	OCH_3	OCH_3

จากผลการวิจัยฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอเซทิลและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสของสารบริสุทธิ์จากเหง้ากระชายดำ พบว่า สารที่มีฤทธิ์ดีที่สุด คือ สาร 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน โดยแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวได้ร้อยละ 42.6 และ 84.6 ตามลำดับ

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นซึ่งอุดมไปด้วยพืชพันธุ์นานาชนิด บางชนิดเป็นสมุนไพรสามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคหรือใช้เป็นอาหารเสริมได้ จากการศึกษาเบื้องต้นของหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสเบื้องต้นกับสิ่งสกัดสมุนไพร 50 ชนิด ด้วยวิธี TLC assay[6,7] พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรหลายชนิดแสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจ รวมทั้งสิ่งสกัดจากเหง้ากระชายดำ

Kaempferia parviflora Wall. Ex Baker จึงได้เลือกสิ่งสกัดสมุนไพรจากกระชายดำ ศึกษาหาสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ เป็นโรคที่พบบ่อยในกลุ่มโรคผิดปกติของสมอง "dementia" ที่มีการถดถอยหน้าที่ของสมอง ไม่สามารถจดจำเหตุการณ์ที่ผ่านมาได้ ความจำเสื่อม มีปฏิกิริยาตอบสนองแปลกๆ หรือไม่สามารถควบคุมอารมณ์ตนเองได้ มักพบในกลุ่มคนสูงอายุ คนที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ จะมีการสูญเสียพื้นที่ของสมองในส่วนของการควบคุมความคิด ความจำและการเรียบเรียงภาษาพูด และไม่สามารถปฏิบัติงานได้ตามปกติ

สถิติที่แพทย์ได้จากการตรวจรักษาโรคอัลไซเมอร์ แสดงให้เห็นว่า 1 ใน 20 ของคนที่มีอายุ 75-84 ปี จะป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์ และ 1 ใน 5 ของคนที่มีอายุเกิน 85 ปี ก็จะเป็นโรคชนิดนี้เช่นกัน ส่วนคนที่อยู่ในวัย 40-70 ปี สถิติการเป็น คือ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศตวรรษก่อนหน้านี้ประชากรโลกน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์มีอายุเกิน 65 ปี ณ วันนี้ประชากร 7 เปอร์เซ็นต์ มีอายุเกิน 65 ปี และอีก 50 ปี 15-20 เปอร์เซ็นต์ของประชากรโลกจะมีอายุเกิน 65 ปี นั่นหมายความว่า ในอนาคตโลกจะถูกโรคอัลไซเมอร์คุกคามหนัก เพราะจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคนี้จะมีมากขึ้นทุกปี และภาระในการเฝ้าดูแลรักษาโดยแพทย์ และญาติก็จะต้องมีมากขึ้นด้วย ด้วยเหตุนี้แพทย์ทั่วโลกจึงให้ความสนใจศึกษาและวิจัยโรคอัลไซเมอร์เป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะในประเด็นป้องกันหรือรักษา ปัจจุบันยังไม่มียาที่รักษาให้หายขาดแต่มียาซึ่งอาจช่วยควบคุมอาการต่างๆ ให้น้อยลงได้ชั่วคราว แต่โรคก็จะดำเนินต่อไปเรื่อยๆ เมื่อถึงระยะที่เป็นมากๆ ยาก็จะไม่ได้ผล

สาเหตุของโรคอัลไซเมอร์มีสมมติฐานว่าสามารถเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุด้วยกัน แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โดยสาเหตุที่สำคัญสาเหตุหนึ่งก็คือ ผู้ป่วยอัลไซเมอร์จะมีปริมาณเซลล์สมองลดลงและสารสื่อประสาท Acetylcholine (ACh) ลดลงด้วย สารสื่อประสาทนี้เป็นตัวเชื่อมโยงคำสั่งต่างๆ ของเซลล์สมองที่ควบคุมด้านความจำ ความคิดอ่านและพฤติกรรมต่างๆ เมื่อ ACh ลดลงจึงทำให้เกิดอาการต่างๆ ของโรคอัลไซเมอร์ ปัจจุบันมียาที่ช่วยเพิ่มปริมาณของ Ach ในสมองโดยออกฤทธิ์ต้าน Acetylcho-linesterase (AChE) ที่ย่อยสลาย ACh คือ AChE inhibitors เช่น tacrine, rivastigmine และ galantamine[8,9] ยาเหล่านี้จึงช่วยให้ผู้ป่วยอัลไซเมอร์มีอาการดีขึ้นได้ และชะลอการทรุดลงของโรคถ้าได้ใช้ในระยะเริ่มแรก แต่จะไม่ทำให้โรคหายขาด

เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส หรือ (acetylcholine acetylhydrolase (EC 3.1.1.7) มีความจำเพาะเจาะจงต่ออะเซทิลโคลีน และเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสหรือ (acylcholine acylhydrolase (EC 3.1.1.8) หรือ pseudocholinesterase ที่มีความจำเพาะต่อบิวทิริลโคลีน (butyrylcholine) หน้าที่หลักของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส คือ ไฮโดรไลซ์อะเซทิลโคลีนอย่างรวดเร็วที่ cholinenergic synapses ส่วนหน้าที่ของบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสยังไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจากไม่พบสารตั้งต้นจำเพาะจากธรรมชาติ (specific natural substrate) ของเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส ถึงแม้ว่าเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสจะไฮโดรไลซ์อะเซทิลโคลีนได้เช่นกัน มีความเชื่อว่าเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสทำหน้าที่เป็น scavenging enzyme ในการทำลายพิษของสารประกอบจากธรรมชาติ อย่างไรก็ตามเอนไซม์บิวทิวริลโคลีนเอสเตอเรสมีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนเอนไซม์อะ

เซทิลโคลีนเอสเตอเรส แต่จะแตกต่างกันในเรื่องของ substrate inhibition กล่าวคือ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยสารตั้งต้นที่มากเกินพอ จะเกิดกับเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสเท่านั้น มีการอธิบายถึงการตอบสนองที่แตกต่างกันของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิวริลโคลีนเอสเตอเรสต่อ substrate ที่มากเกินพอ Rosenberry (1975) เสนอว่า rate-limiting step ของกระบวนการเร่ง คือขั้นตอนการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนที่จับกันอย่างเหมาะสม (induce fit complex) และกลไกของ substrate inhibition อาจสืบเนื่องมาจากการรบกวนที่ขั้นตอนนี้ นอกจากนี้เชื่อว่าการ deacetylate ของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสถูกทำให้ช้าลงจากการที่มีอะเซทิลโคลีนตัวที่สองไปจับกับ anionic site ของ acyl enzyme[10]

จากที่กล่าวมาแล้วว่า สาร 5,7-dimethoxyflavone ที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวได้ดีที่สุด ดังนั้นในรายงานวิจัยฉบับนี้ จึงสนใจที่จะทำการสังเคราะห์สารนี้ขึ้น เพื่อใช้ประโยชน์ด้านอาหารเสริมต่อไป เนื่องจากการแยกสารนี้จากเหง้ากระชายดำจะมีความยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการหาวิธีสังเคราะห์ที่ง่ายและได้สารดังกล่าวในปริมาณที่สูง นอกจากนี้ยังได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของสารดังกล่าวด้วยเพื่อดูว่ามีฤทธิ์ที่ดีขึ้นหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์

สังเคราะห์ของอนุพันธ์ฟลาโวน เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส

1.4 ขอบเขตการวิจัย

สังเคราะห์สาร 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน และอนุพันธ์ต่างๆ จากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอเซทิลและบิวทิริลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อดูโครงสร้างสำคัญที่มีต่อฤทธิ์ยับยั้งดังกล่าว

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้อนุพันธ์ฟลาโวนชนิดต่างๆ ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี
2. เผยแพร่ผลงานเกี่ยวกับสารสำคัญให้กับกลุ่มอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอาหารเสริมจากกระชายดำ

2. เนื้อเรื่อง

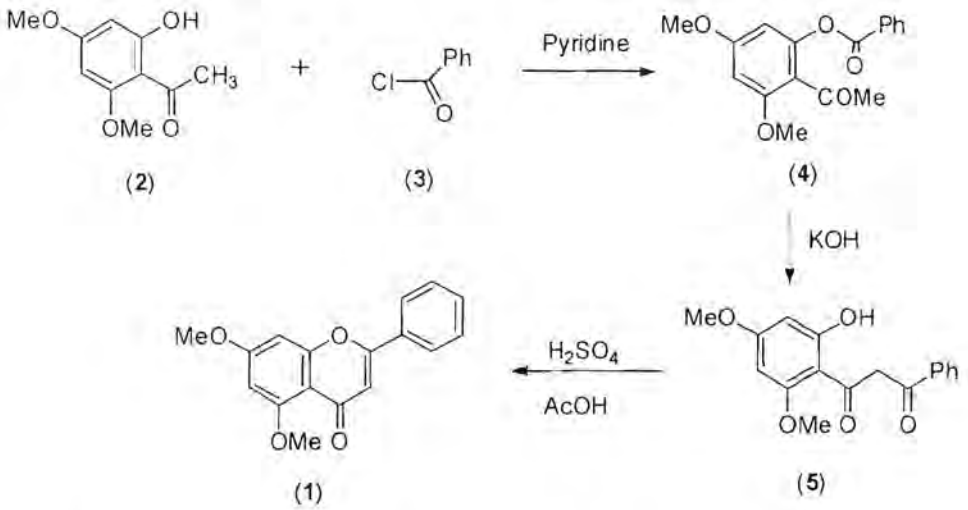
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1.1 การสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน (1)

กระบวนการสังเคราะห์แบบที่ 1

เริ่มต้นจาก 4′,6′-dimethoxyacetophenone (2) ทำปฏิกิริยากับ benzoyl chloride (3) ในภาวะที่เป็นเบส จะได้เอสเทอร์ (4) ซึ่งเมื่อนำไปให้ความร้อนในภาวะที่มี Potassium hydroxide

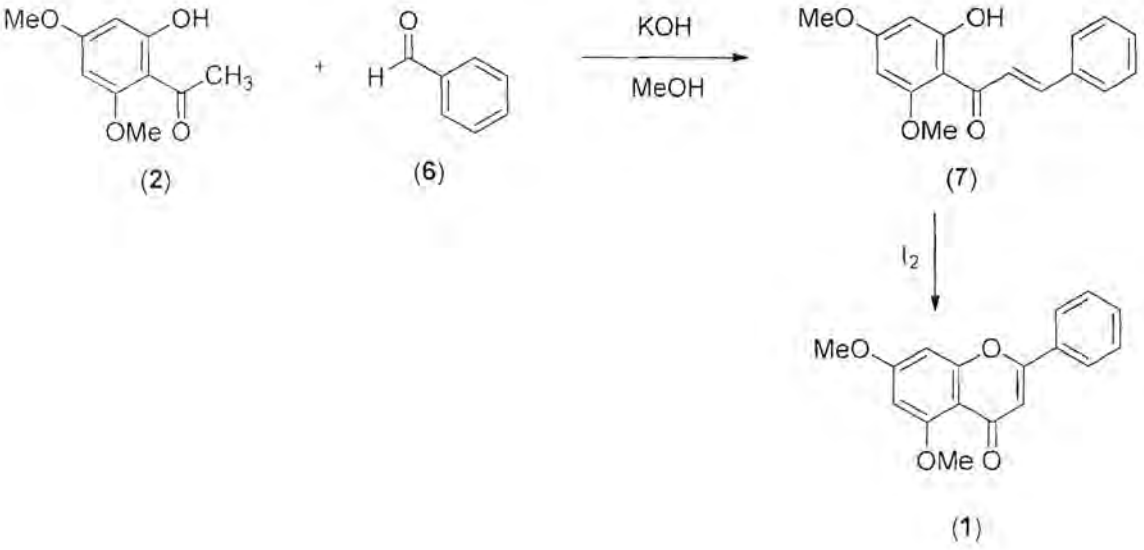
จะเกิดปฏิกิริยา acyl rearrangement ได้เป็น 1,3-diketone (**5**) และเมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริก จะเกิดปฏิกิริยา cyclization-dehydration ได้เป็นฟลาโวน (**1**) ตามต้องการ ดังแสดงในแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 1 กระบวนการสังเคราะห์5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน (**1**) แบบที่ 1

<u>กระบวนการสังเคราะห์แบบที่ 2</u>

นำ 4′,6′-dimethoxyacetophenone (**2**) ทำปฏิกิริยา Aldol condensation กับ benzaldehyde (**6**) ในสภาวะที่มี KOH เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นนำ crude chalcone (**7**) ที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับไอโอดีนใน dimethyl sulfoxide (DMSO) จะได้เป็นฟลาโวน (**1**) ตามต้องการ ดังแสดงในแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน (**1**) แบบที่ 2

อัตราส่วนของสาร (**2**), (**6**) และรีเอเจนต์ต่างๆ (Exp B-D) แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ต่างๆ ในการสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน (**1**) แบบที่ 2

Exp.	First step			Second step		
	[**2**] (1.05 eq.)	KOH	[**6**] (eq.)	I_2 (eq.)	DMSO (mL)	Conc. (M)
A	500 mg	4 eq.	1	0.1	50 mL.	0.5
B	500 mg	8 eq.	1	0.1	50 mL.	0.5
C	1000 mg	10 eq.	1	0.1	50 mL.	0.1
D	1000 mg	18 eq.	1	0.1	50 mL.	0.1

2.1.2 การสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี-ไนโตรฟลาโวน และ 5,7-ไดเมทอกซี-อะมิโนฟลาโวน

การสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี-ไนโตรฟลาโวน และ 5,7-ไดเมทอกซี-อะมิโนฟลาโวน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน จะใช้วิธีการดัดแปลงการสังเคราะห์ของ Dao[11]

2.1.2 1 การสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี-ไนโตรฟลาโวน

การสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี-ไนโตรฟลาโวน (5,7-dimethoxynitroflavone; 5,7-DMNF) จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกจะเป็นปฏิกิริยาแอลดอลคอนเดนเซชัน (Aldol condensation) โดยทำปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้น 4',6'-ไดเมทอกซี-2'- ไฮดรอกซีแอซีโทฟีโนน (**S_1**) และ ไนโตรเบนซาลดีไฮด์ (**S_2**) โดยละลายในเมทานอล และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) หลังจากนั้นนำของผสมไปคนด้วยเครื่องคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และสังเกตปริมาณของสารตั้งต้นที่ลดลงไป จากการทดสอบบนโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง เมื่อปฏิกิริยาดำเนินสิ้นสุดแล้ว นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไประเหยแห้ง และสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซีเทต และกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สกัดได้ล้างด้วยน้ำแล น้ำเกลือเข้มข้น ก่อนทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟต กรอง และระเหยให้แห้ง จะได้สารมัธยันตร์ (intermediate) ของปฏิกิริยา ซึ่งก็คือ สาร **N**

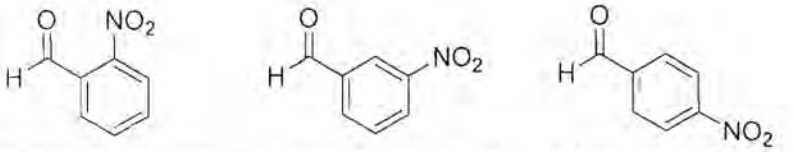
สารตั้งต้นเบนซาลดีไฮด์ที่ใช้ในปฏิกิริยานี้จะแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ ออร์โธ เมตา และพารา (*o*-, *m*- and *p*-**S_2**) (รูปที่ 3) ในการทดลองได้ปรับเปลี่ยนปริมาณของสารตั้งต้น สารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา และตัวทำละลาย เพื่อหาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อัตราส่วนของสารตั้งต้น สารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา และตัวทำละลายต่างๆ ในการสังเคราะห์สารมัธยันตร์ N

ที่	S_1 (ก.)	S_2 (ก.)			KOH (ก.)	อัตราส่วน S_1:S_2:KOH (equivalent)	เมทานอล (มล.)
		o-	*m-*	*p-*			
N1	0.10	0.07	-	-	0.49	1.05:1.00:18	5
N2	0.10	-	0.07	-			
N3	0.10	-	-	0.07			
N4	0.10	-	0.085	-	0.57	1.0:1.1:20	5
N5	0.10	-	-	0.085			
N6	0.10	-	0.085	-	0.57	1.0:1.1:20	9
N7	0.10	-	-	0.085			
N8	1.0	-	0.85	-	5.70	1.0:1.1:20	90
N9	1.0	-	-	0.85			

ในขั้นตอนที่ 2 จะเป็นการทำปฏิกิริยาแฮโลจีเนชัน โดยนำสารมัธยันตร์ N จากขั้นก่อนหน้า มาทำปฏิกิริยากับไอโอดีน และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ด้วยวิธีรีฟลักซ์ อุณหภูมิ 100-120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่มีผลต่อปริมาณสารผลิตภัณฑ์ แสดงดังตาราง 3 หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยา นำขวดสารผลิตภัณฑ์ไปแช่ในน้ำ และเทลงในน้ำแข็ง นาซ่ของผสมไปสกัดด้วยตัวทาล่ะลายเอทิลแอซีเทต ก่ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟต กรอง และระเหยให้แห้ง จะได้ของผสมผลิตภัณฑ์ ซึ่งในไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิล แอซีเทต และเฮกเซน เป็นตัวชะ ให้ได้ผลิตภัณฑ์ 5, 7-DMNF

สรุปขั้นตอนการสังเคราะห์ 5, 7-DMNF แสดงในแผนภาพที่ 3 และกลไกปฏิกิริยาแสดงในแผนภาพที่ 4

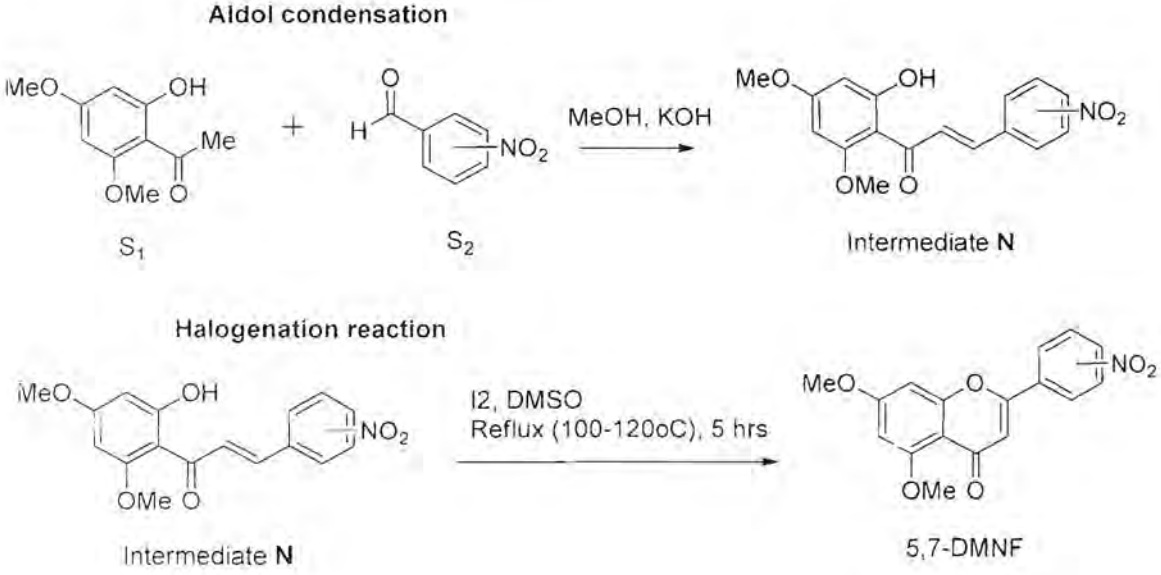


o-nitrobenzaldehyde m-nitrobenzaldehyde p-nitrobenzaldehyde

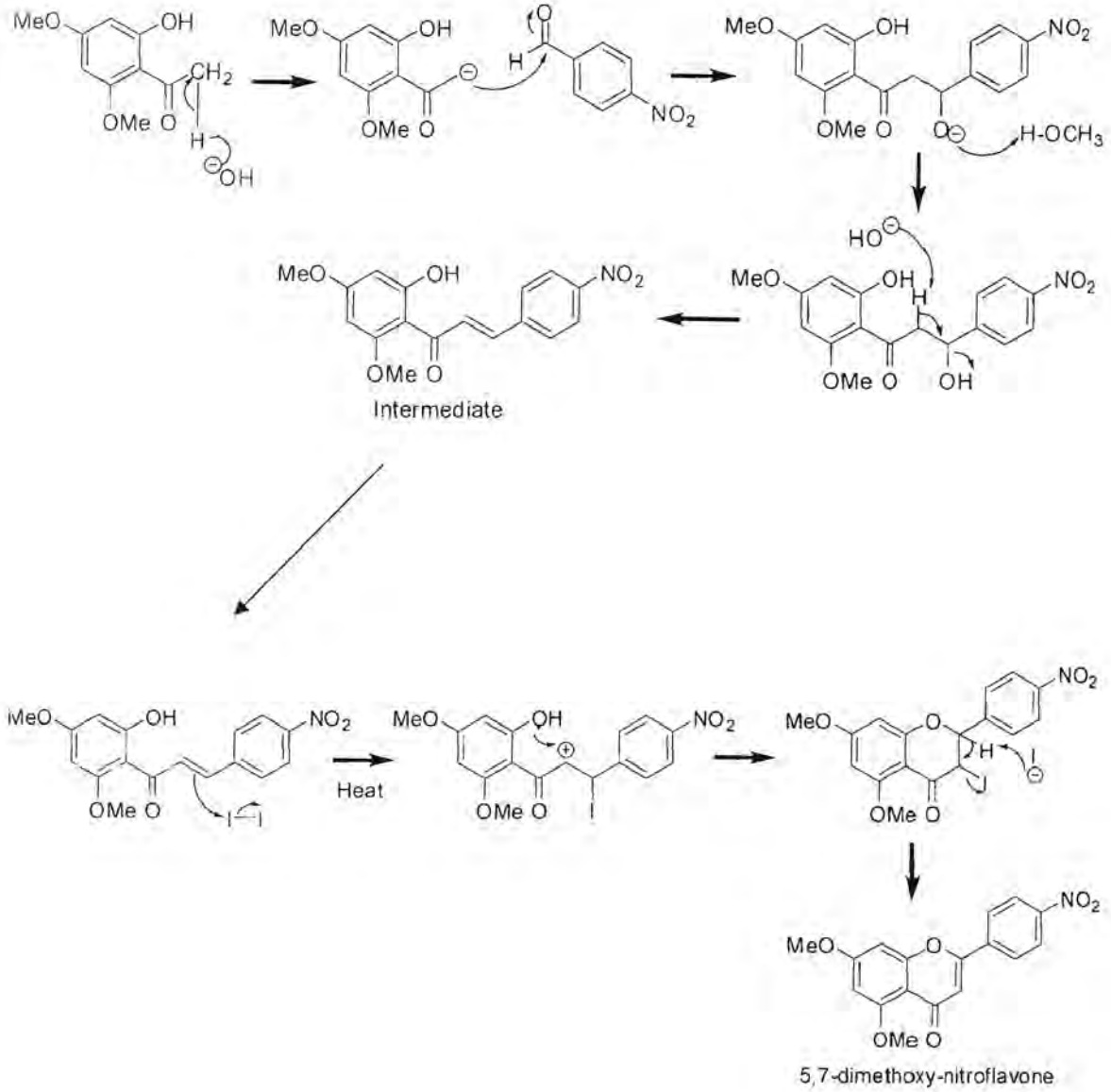
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมี ของ ออร์โท-, เมตา- และ พารา-ไนโตรเบนซาลดีไฮด์

ตารางที่ 3 ปริมาณของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี-ไนโตรฟลาโวน

ที่	S_1 (ก.)	S_2 (ก.)		KOH (ก.)	เมทานอล (มล.)	DMSO (มล.)
		m-	*p*-			
N10	0.10	0.085	-	0.57	9	9
N11	0.10	-	0.085			
N12	0.10	0.085	-	0.57	9	10
N13	0.10	-	0.085			
N14	1.0	0.85	-	5.70	90	100
N15	1.0	-	0.85			



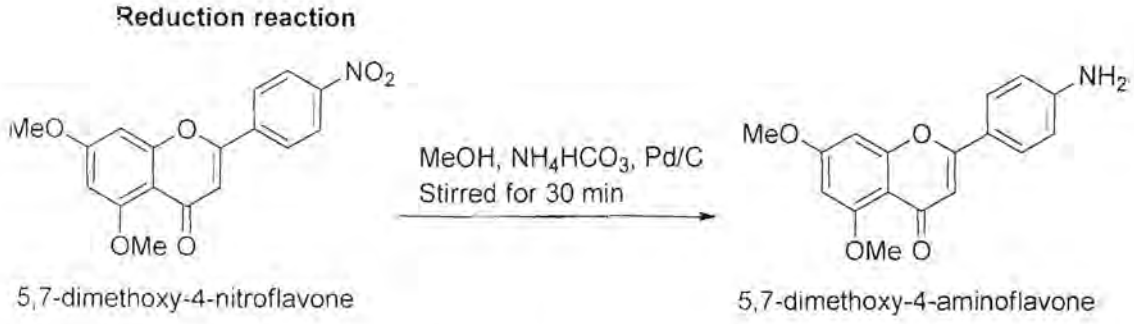
แผนภาพที่ 3 สรุปขั้นตอนการสังเคราะห์ 5, 7-DMNF



แผนภาพที่ 4 กลไลการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 5, 7-DMNF

2.1.2.2 การสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี-อะมิโนฟลาโวน

การสังเคราะห์ 5,7-DMAF จะเริ่มจากนำ 5,7-DMNF ที่ได้จาก 2.1.2.1 (0.07 กรัม) มาเติมผสมกับพาลาเดียมซึ่งใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (10% palladium on activated charcoal; Pd/C) และแอมโมเนียมฟอร์เมต (0.27 กรัม) ละลายในเมทานอล (7 มล.) นำของผสมไปคนให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และสังเกตปริมาณของสารตั้งต้นที่ลดลงไป จากการทดสอบบนโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง เมื่อปฏิกิริยาดำเนินสิ้นสุดแล้ว นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซีเตทและน้ำ นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สกัดได้ทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟต กรอง และระเหยให้แห้ง จะได้สารผลิตภัณฑ์จาก 5,7-DMAF จากปฏิกิริยารีดักชันของหมู่ไนโตรเป็นอะมิโนของ 5,7-DMNF (แสดงสมการการเกิดปฏิกิริยาดังแผนภาพที่ 5)



แผนภาพที่ 5 ขั้นตอนการสังเคราะห์ 5, 7-DMAF

2.1.3 การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารสังเคราะห์

สารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาในหัวข้อ 2.1.2.1 (5, 7-DMNF) และ 2.1.2.2 (5, 7-DMAF) นำไปพิสูจน์ทราบโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีทางสเปกโทสโกปีโดยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทเมตรี การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อนำไปทดสอบจะละลายสารตัวอย่างในคลอโรฟอร์มชนิดที่ปราศจากน้ำและแทนที่ด้วยดิวทีเรียม ในหลอดแก้วเฉพาะที่ใช้สำหรับเครื่องมือชนิดนี้ นำสารตัวอย่างไปทดสอบโดยใช้เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทมิเตอร์ Varian รุ่น Mercury+ 400 ที่ความถี่ 400 เมกะเฮิร์ต สปกตรัมที่ได้จากการทดสอบนำไปวิเคราะห์ด้วยชุดคำสั่ง MestReMova

2.1.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) และบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส (BChE) จะใช้วิธีประยุกต์ของแอลแมน (Ellman's method) โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของแอซีทิลไธโอโคลีนและเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส ได้ไธโอโคลีนซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาต่อไปกับ 5,5-ไดไธโอบิส-2-ไนโตรเบนโซอิก แอสิด หรือสารละลายแอลแมน (Ellman reagent) ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-ไธโอ-2-ไนโตรเบนโซเอต ซึ่งมีสีเหลือง หากสารสังเคราะห์ที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว จะทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้างต้นขึ้น

<u>สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ</u>

เอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase; AChE) จากปลาไหลไฟฟ้า (Type-VI-S lypophilized powder, EC 3.1.1.7)

เอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรส (butyrylcholinesterase; BChE) จากซีรัมของม้า (lypophilized powder EC 3.1.1.8)

แอซีทิลไธโอโคลีน ไอโอไดด์ (acetylthiocholine iodide; ATCI) และ บิวทิริลไธโอโคลีนไอโอไดด์ (butyrylthiocholine iodide; BTCI)

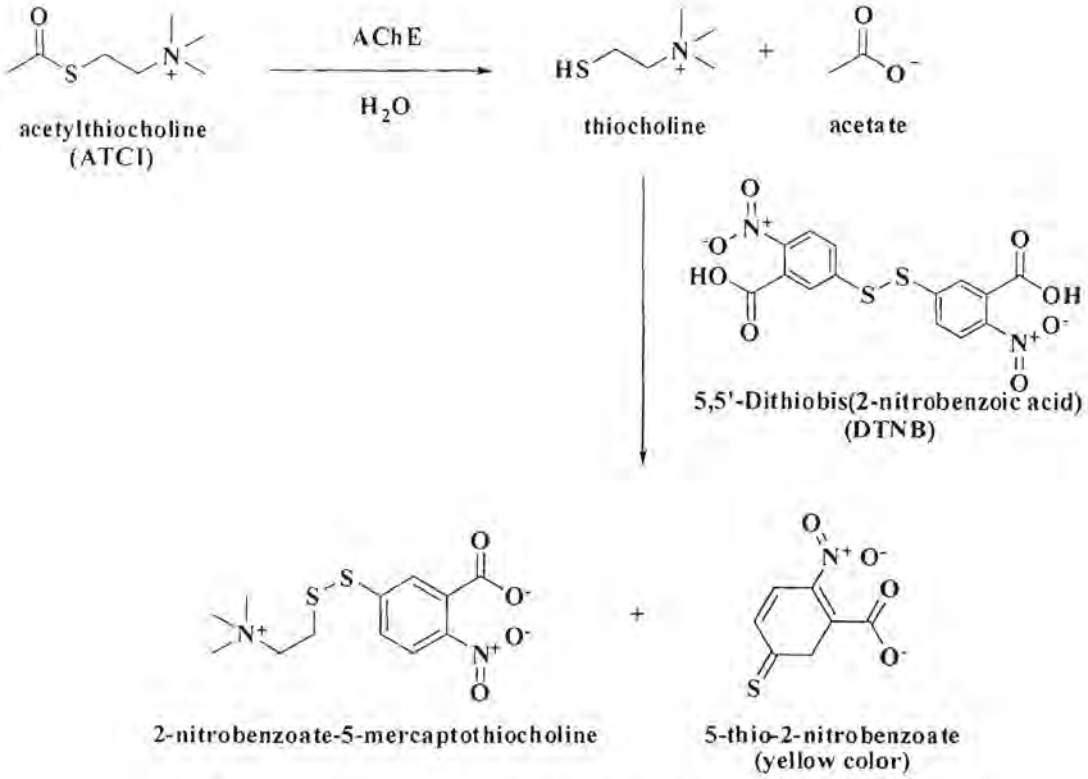
5,5-ไดไธโอบิส-2-ไนโตรเบนโซอิก แอสิด (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid; DTNB)

สารมาตรฐานกาแลนทามีน (galantamine) และสารมาตรฐานอีเซอรีน (eserine) จากบริษัท Sigma (St. Louis, MO, USA)

อัลบูมิน จากซีรัมของวัว (BSA) จากบริษัท Fluka chemical

ทริส-(ไฮดรอกซีเมทิล)-อะมิโนมีเทน (*Tris*-(hydroxymethyl)-aminomethane; *Tris*-HCl) จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany).

ตัวทำละลายอินทรีย์ (ใช้ชนิดสำหรับอุตสาหกรรมโดยนำมากลั่นให้บริสุทธิ์อีกครั้งก่อนใช้งาน ยกเว้นชนิดสำหรับงานวิเคราะห์ AR Grade)



แผนภาพที่ 6 สมการแสดงการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของแอซีทิลไธโอโคลีน

การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบ

สารละลายบัฟเฟอร์

- สารละลายบัฟเฟอร์ A (ความเข้มข้น *Tris*-HCl 50 มิลลิโมลาร์, pH = 8)

-สารละลายบัฟเฟอร์ B (ความเข้มข้น *Tris*-HCl 50 มิลลิโมลาร์, pH = 8 และเติม bovine serum albumin ความเข้มข้น 0.1%)

-สารละลายบัฟเฟอร์ C (ความเข้มข้น *Tris*-HCl 50 มิลลิโมลาร์, pH = 8 และเติม โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride; NaCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต (magnesium chloride hexahydrate; $MgCl_2.6H_2O$) ความเข้มข้น0.2 มิลลิโมลาร์

สารละลายเอนไซม์

เอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (AChE และ BChE) ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ A ให้เป็นสารละลายเอนไซม์เข้มข้น 1130 ยูนิต/มล. และนำมาเจือจางก่อนใช้งานด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ B ให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.3 ยูนิต/มล.

สารละลายสับสเตรท (Substrate)

แอซีทิลไธโอโคลีน ไอโอไดด์ (ATCI) และ บิวทิริลไธโอโคลีน ไอโอไดด์ (BTCI) ละลายในน้ำ MilliQ ให้มีความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์

สารละลายแอลแมน

5,5-ไดไธโอบิส-2-ไนโตรเบนโซอิก แอสิด (DTNB) ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ C ให้มีความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์

สารตัวอย่างและสารมาตรฐาน (Sample and Standard Compound)

สารตัวอย่างและสารมาตรฐานละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ A ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 1 มก./มล. โดยให้มีเมทานอลเป็นตัวทำละลายได้ไม่เกินร้อยละ 10

การทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธีไมโครเพลท (microplate assay)

จากการพัฒนาทางสเปกโทรโฟโตเมทริก ทำให้สามารถวัดค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส ด้วยวิธีไมโครเพลทซึ่งมีวิธีการทดสอบ ดังนี้

1. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ A 50 ไมโครลิตร, สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐานที่ละลายในเมทานอล ซึ่งถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ A ให้ได้ความเข้มข้น 1 มก./มล. ปริมาตร 25 ไมโครลิตร, สารละลายสับสเตรทแล้วแต่ชนิดที่จะทดสอบ 25 ไมโครลิตร และสารละลายแอลแมน ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร125 ไมโครลิตร ลงในหลุมของไมโครเพลท

2. เติมเอนไซม์แล้วแต่ชนิดที่จะทดสอบ 25 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ทุก ๆ 5 วินาที เป็นเวลา 2 นาที ด้วยเครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ Sunrise™

3. ทำแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง แล้วคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้ง จากค่าอัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยา (Velocity; V) เทียบกับหลุมที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่าง โดยใช้สมการ

$$\% \text{ inhibition} = \left(\frac{V_{blank} - V_{sample}}{V_{blank}} \right) \times 100$$

เมื่อ % inhibition คือ ค่าร้อยละการยับยั้ง

V_{blank} คือ ค่าอัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาของการทดสอบที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่าง

V_{sample} คือ ค่าอัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาของการทดสอบของสารตัวอย่าง

2.2 ผลการวิจัย

2.2.1 ผลการสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน

สังเคราะห์ด้วยกระบวนการที่ 1

จากการทดลองโดยเริ่มต้นจากสาร (**2**) 100 มิลลิกรัม พบว่าปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 1 เกิดได้ช้ามาก แม้ว่าจะมีการเติม 4-diaminomethylpyridine เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วก็ตาม โดยจะได้เอสเทอร์ (4) ประมาณ 20-30% หลังการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี และเมื่อนำไป

ทำปฏิกิริยากับ KOH ภายใต้ความร้อน จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของผสมที่ยากแก่การแยก และเมื่อนำของผสมดังกล่าวไปทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริก ไม่พบว่ามีสัญญาณของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการใน NMR spectrum ของ crude reaction mixture จึงสรุปได้ว่ากระบวนการแบบที่ 1 นี้ไม่สามารถใช้ในการสังเคราะห์สารที่ต้องการได้

สังเคราะห์ด้วยกระบวนการที่ 2

ทำการสังเคราะห์โดยใช้กระบวนการที่ 2 นี้ ตามสัดส่วนที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 นั้น ได้ผลการสังเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่ากระบวนการสังเคราะห์จะให้ผลิตภัณฑ์ปริมาณสูงเมื่อเพิ่มปริมาณโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในขั้นตอนที่ 1 และใช้ความเข้มข้นของ chalcone (**7**) ที่ต่ำสำหรับการสังเคราะห์ในขั้นตอนที่ 2

ตารางที่ 4 ผลการทดลองกระบวนการสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน (**1**) แบบที่ 2 เมื่อปรับเปลี่ยนสัดส่วนรีเอเจนต์ต่างๆ

Exp.	First step			Second step			Overall yield (%)
	[**2**] (1.05 eq.)	KOH	[**6**] (eq.)	I_2 (eq.)	DMSO (mL)	Conc. (M)	
A	500 mg	4 eq.	1	0.1	50 mL.	0.5	36
B	500 mg	8 eq.	1	0.1	50 mL.	0.5	45
C	1000 mg	10 eq.	1	0.1	50 mL.	0.1	63
D	1000 mg	18 eq.	1	0.1	50 mL.	0.1	73

2.2.2 ผลการสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี-ไนโตรฟลาโวน

การสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี-ไนโตรฟลาโวน ให้ผลการสังเคราะห์ในแต่ละครั้งดังตารางที่ 5 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ครั้งที่ N1 ตกตะกอนออกมาเป็นของแข็งสีขาว ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ครั้งที่ N2 และ N3 เป็นตะกอนสีเหลืองส้มผสมอยู่ในของเหลวสีน้ำตาลเข้ม จากการทดสอบสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้ง 3 นี้ พบว่า ตะกอนจากการสังเคราะห์ครั้งที่ 1 ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ซึ่งสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ในขั้นตอนนี้ควรมีสีเหลือง ดังนั้นการสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี-ไนโตรฟลาโวน โดยเริ่มต้นจาก ออร์โทเบนซาลดีไฮด์ จึงไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ไม่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ขั้นต่อไปได้ ซึ่งน่าจะเกิดจากความเกะกะ (steric hindrance) ของหมู่ไนโตร ทำให้ขัดขวางสารตั้งต้นที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับไนโตรเบนซาลดีไฮด์

ตารางที่ 5 ค่าร้อยละผลที่ได้จากการสังเคราะห์สารมัธยันตร์ N

ที่	S_1 (ก.)	S_2 (ก.)			KOH (ก.)	อัตราส่วน S_1:S_2:KOH (equivalent)	เมทานอล (มล.)	ร้อยละผลได้ (%yield) สารมัธยันตร์ N
		o-	*m*-	*p*-				
N1	0.10	0.07	-	-	0.49	1.05:1.00:18	5	-
N2	0.10	-	0.07	-				99.7
N3	0.10	-	-	0.07				105.0
N4	0.10	-	0.085	-	0.57	1.0:1.1:20	5	99.9
N5	0.10	-	-	0.085				96.8
N6	0.10	-	0.085	-	0.57	1.0:1.1:20	9	101.5
N7	0.10	-	-	0.085				104.3
N8	1.0	-	0.85	-	5.70	1.0:1.1:20	90	80.6
N9	1.0	-	-	0.85				94.1

นอกจากนั้นเมื่อนำของผสมของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ครั้งที่ N2 และ N3 ไปทดสอบบนโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง พบว่า มีจุดสารของผลิตภัณฑ์พลอยได้ (byproduct) จำนวนหลายจุด จึงศึกษาอัตราส่วนของสารตั้งต้น S_1 and S_2 พบว่า ถ้าหากปริมาณอัตราส่วนของสารตั้งต้นในหน่วย equivalent ของ S_2 มากกว่า S_1 (การสังเคราะห์ครั้งที่ 4 และ 5) ร้อยละผลที่ได้ของสารผลิตภัณฑ์ไม่แตกต่างกับการสังเคราะห์ในครั้งที่ N2 และ N3 แต่เมื่อนำของผสมของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ครั้งที่ N4 และ N5 ไปทดสอบบนโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง พบว่า มีจุดสารของผลิตภัณฑ์พลอยได้จำนวนน้อยกว่า และมีความเข้มของสารผลิตภัณฑ์ N มากกว่า

นอกจากนั้นถ้าหากเพิ่มปริมาณของเมทานอล ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายในการสังเคราะห์ (การสังเคราะห์ครั้งที่ N6 และ N7) จะพบว่า ผลที่ปรากฏบนโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางชัดเจนและแสดงให้เห็นว่ามีผลิตภัณฑ์พลอยได้น้อยกว่า และยังพบว่าการเพิ่มปริมาณของสารตั้งต้นและสารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยาทั้งระบบในการสังเคราะห์ครั้งที่ N6 และ N7 ให้ร้อยละผลที่ได้ของสารผลิตภัณฑ์สูงเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ในครั้งที่ N8 และ N9

ในขั้นตอนที่ 2 จะนำสารมัธยันตร์ N ไปทำปฏิกิริยาต่อ โดยเลือกใช้อัตราส่วนในหน่วย equivalent ระหว่างสารตั้งต้น และสารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา คือ 1.0:1.1:20 ผลิตภัณฑ์ 5,7-DMNF ที่ได้จากขั้นตอนนี้นำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ผลการทดลองในขั้นนี้แสดงไว้ในตารางที่ 6

เนื่องจากการสังเคราะห์ขั้นที่ 2 ในครั้งที่ N10 และ N11 มีร้อยละผลที่ได้ต่ำ จึงศึกษาการเพิ่มปริมาณของตัวทำละลาย DMSO กับการเพิ่มปริมาณสารผลิตภัณฑ์ พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณ

ของตัวทำละลาย DMSOในการสังเคราะห์ขั้นที่ 2 ในครั้งที่ N12 และ N13 ปริมาณร้อยละผลที่ได้ของสารผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นจากเกือบ 2 เท่า จากครั้งก่อนหน้า ยิ่งไปกว่านั้น หากและยังพบว่าการเพิ่มปริมาณของสารตั้งต้นและสารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยาทั้งระบบ ในการสังเคราะห์ครั้งที่ N14 และ N15 ก็ยังให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูง สังเกตจากร้อยละผลที่ได้ของสารผลิตภัณฑ์ที่มากกว่าร้อยละ 60

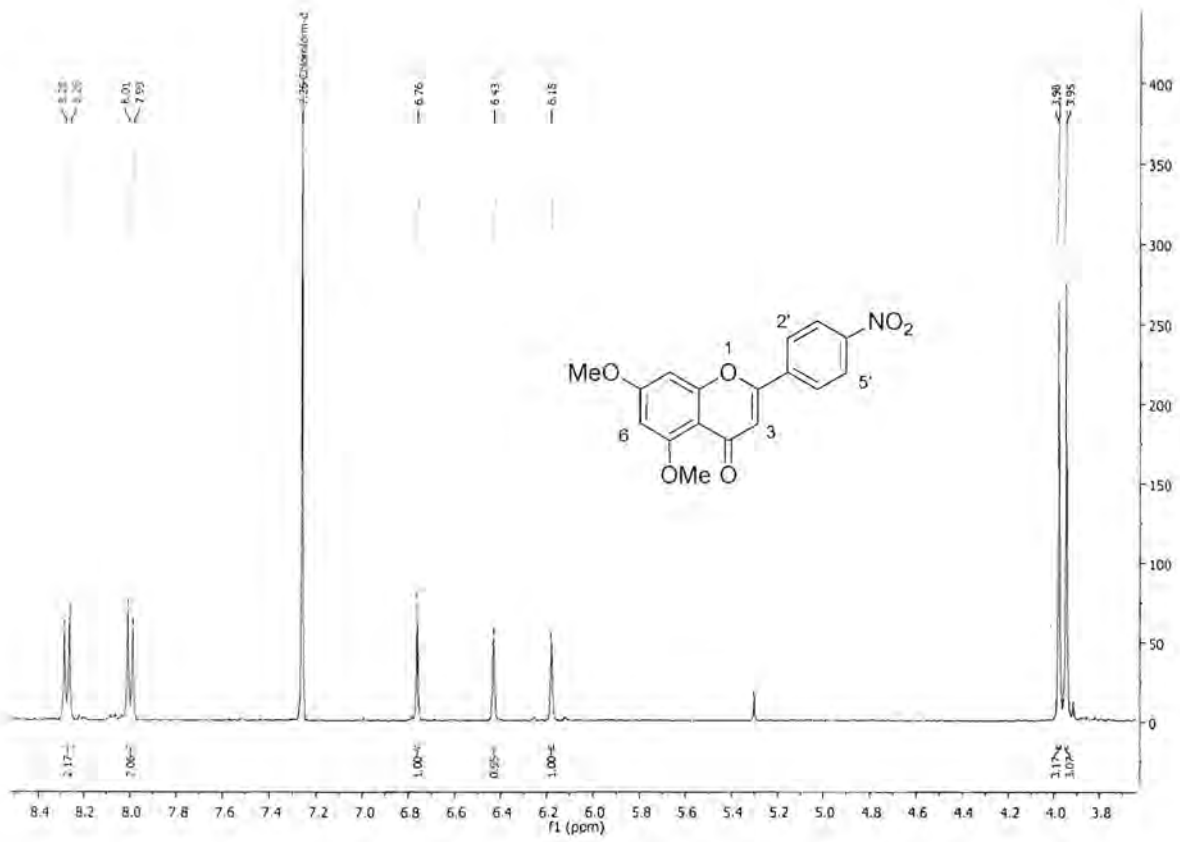
สารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ คือ 5,7-ไดเมทอกซี-3-ไนโตรฟลาโวน (5,7-DM-3-NF) และ 5,7-ไดเมทอกซี-4-ไนโตรฟลาโวน (5,7-DM-4-NF) เมื่อนำไปพิสูจน์ทราบโครงสร้างทางเคมีของสารด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี (^{1}H-NMR) พบว่าสารผลิตภัณฑ์ 5,7-DM-3-NF ที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ มีสารอื่นปนอยู่ และไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จึงไม่สามารถนำ 5,7-DM-3-NF ไปใช้ในการสังเคราะห์ขั้นต่อไปได้ สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ 5,7-DM-4-NF แสดงในรูปที่ 2 และแสดงข้อมูลไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ค่าร้อยละผลที่ได้จากการสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ 5,7-DM-4-NF

ที่	S_1 (ก.)	S_2 (ก.)		KOH (ก.)	เมทานอล (มล.)	DMSO (มล.)	ร้อยละผลได้ (%yield) 5,7-DMNFs
		m-	*p-*				
N10	0.10	0.085	-	0.57	9	9	39.2
N11	0.10	-	0.085				27.3
N12	0.10	0.085	-	0.57	9	10	63.5
N13	0.10	-	0.085				50.6
N14	1.0	0.85	-	5.70	90	100	65.6
N15	1.0	-	0.85				61.4

ตารางที่ 7 ค่าเคมิคัลชิฟของ 5,7-DM-4-NF ในตำแหน่งต่าง ๆ

ตำแหน่ง	δ_H (mult., int., *J* in Hz)
3	6.76 (s, 1H)
6	6.17 (s, 1H)
8	6.43 (s, 1H)
2′, 3′ 5′, 6′	8.00 (d,2H, J = 8.0 Hz) 8.27 (d, 2H, J = 8.8 Hz)
5-OMe, 7-OMe	3.95 (s, 3H), 3.98 (s, 3H)



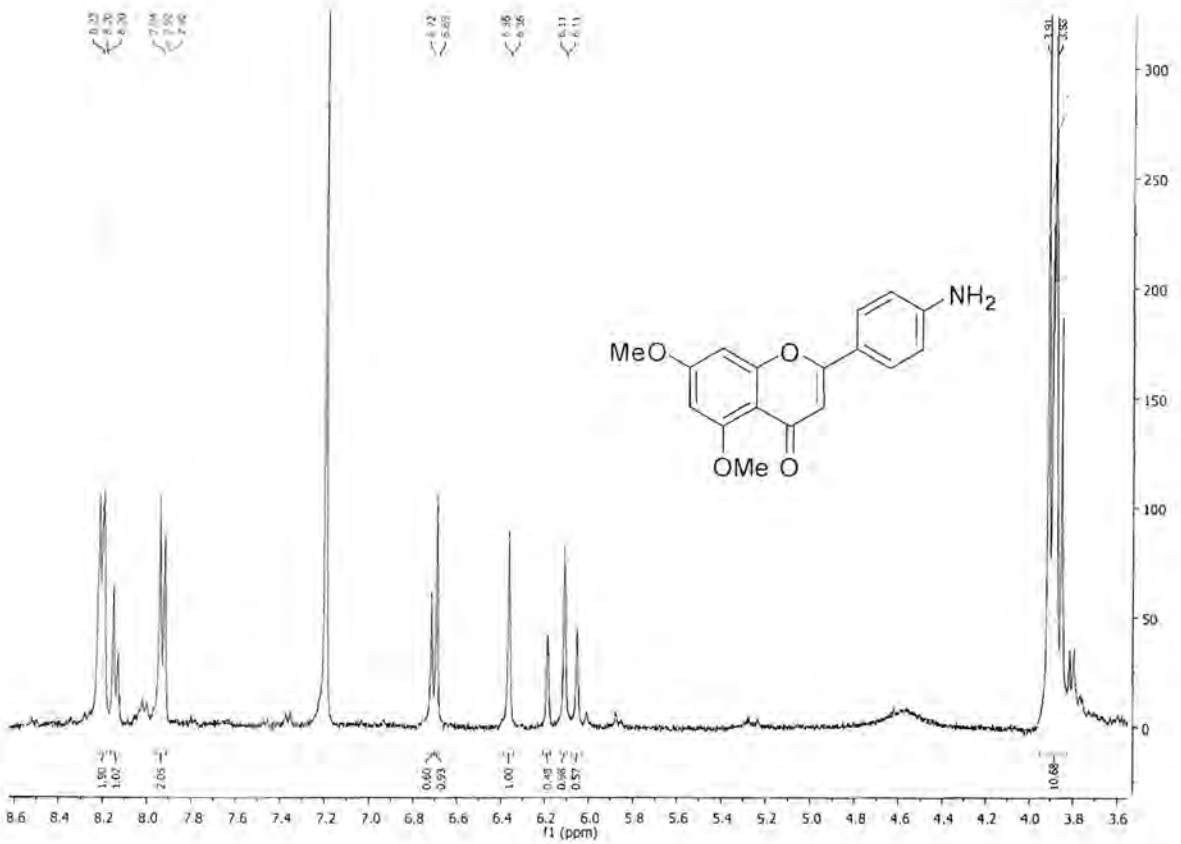
รูปที่ 2 โปรตรอน เอ็น เอ็ม อาร์ สเปกตรัมของ 5,7-DM-4-NF

2.2.3 ผลการสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซี-อะมิโนฟลาโวน

จากผลการทดลองข้างต้น สามารถนำ 5,7-DM-4-NF ซึ่งทำให้บริสุทธิ์แล้วเท่านั้น ไปสังเคราะห์ต่อให้เป็น 5,7-ไดเมทอกซี-4-อะมิโนฟลาโวน (5,7-DM-4-AF) ในขั้นตอนต่อไปได้ ซึ่งผลการสังเคราะห์ได้สารผลิตภัณฑ์ 0.0692 กรัม คิดเป็นค่าร้อยละผลที่ได้ ร้อยละ 108.81 (ยังไม่ได้ทำสารให้บริสุทธิ์) และแสดงข้อมูลทางสเปกโทเมตรีแสดงดังรูปที่ 3

จากสเปกตรัมในรูปที่ 3 จะเห็นว่าเป็นของผสมระหว่าง 5,7-DM-4-NF และ5,7-DM-4-AF ผู้วิจัยได้พยายามทำสาร 5,7-DM-4-AF ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีหลายครั้ง แต่ไม่สามารถทำสารให้บริสุทธิ์ได้ โดยข้อมูลโปรตรอน เอ็น เอ็ม อาร์ ของ 5,7-DM-4-AF แสดงไว้ในตารางที่ 8

±26787342



รูปที่ 3 โปรตรอน เอ็น เอ็ม อาร์ สเปกตรัมของของผสมระหว่าง 5,7-DM-4-NF และ 5,7-DM-4-AF

ตารางที่ 8 ค่าเคมิคัลชิฟของ 5,7-DM-4-AF ในตำแหน่งต่าง ๆ

ตำแหน่ง	δ_H (mult., int., *J* in Hz)
3	6.70 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H)
6	6.11 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H)
8	6.36 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H)
2′, 3′ 5′, 6′	7.93 (t, *J* = 8.4 Hz 2H) 8.20 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H)
5-OMe, 7-OMe	3.91 (s, 3H), 3.86 (s, 3H)

2.2.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส

ในงานวิจัยนี้ได้นำสารสังเคราะห์ 5,7-DM-4-NF และ ของผสมระหว่าง 5,7-DM-4-NF และ 5,7-DM-4-AF มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นของสารสังเคราะห์ต่าง ๆ กัน คือ 0.1, 0.05 และ 0.01 มก./มล. โดยที่แต่ละความเข้มข้นทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 9-12

ตารางที่ 9 ผลการยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ 5,7-DM-4-NF

ครั้งที่	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นสุดท้ายต่าง ๆ (มก./มล.)		
	0.1	**0.05**	**0.01**
1	28.42	15.79	25.79
2	19.37	-0.52	10
3	8.95	13.68	2.11
ค่าเฉลี่ย	18.94	9.65	12.63
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	9.75	8.87	12.06

ตารางที่ 10 ผลการยับยั้งเอนไซม์บิวทีริลโคลีนเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ 5,7-DM-4-NF

ครั้งที่	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นสุดท้ายต่าง ๆ (มก./มล.)		
	0.1	**0.05**	**0.01**
1	27.46	24.98	21.57
2	8.76	38.62	19.01
3	10.45	53.11	21.57
ค่าเฉลี่ย	15.56	38.90	20.72
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	10.34	14.07	1.48

ตารางที่ 11 ผลการยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสของของผสมระหว่าง 5,7-DM-4-NF และ 5,7-DM-4-AF

ครั้งที่	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นสุดท้ายต่าง ๆ (มก./มล.)		
	0.1	**0.05**	**0.01**
1	22.63	14.74	-9.47
2	6.84	0.53	3.68
3	7.37	1.05	4.73
ค่าเฉลี่ย	12.28	5.44	-0.35
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	8.97	8.06	7.92

ตารางที่ 12 ผลการยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรสของของผสมระหว่าง 5,7-DM-4-NF และ 5,7-DM-4-AF

ครั้งที่	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นสุดท้ายต่าง ๆ (มก./มล.)		
	0.1	**0.05**	**0.01**
1	21.57	19.01	10.49
2	17.31	30.01	13.90
3	15.60	24.13	19.01
ค่าเฉลี่ย	18.16	24.41	14.46
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	3.07	5.55	4.29

จากผลการทดสอบจะพบว่าสารสังเคราะห์ทั้งสองนี้ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 มก./มล. มีค่าการยับยั้งที่ต่ำต่อเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสทั้งสองชนิด เนื่องมากจากสภาพการละลายต่ำ แ เมื่อความเข้มข้นสุดท้ายของสารสังเคราะห์ลดลงถึง 0.05 มก./มล. สารสังเคราะห์ทั้งสองแสดงการยับยั้งได้ดีขึ้น แสดงว่า การละลายเป็นปัญหาสำคัญในการแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ของสารที่ใช้ทดสอบ

3. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สามารถสังเคราะห์ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน ได้ด้วยขั้นตอนที่ง่ายและรีเอเจนต์ราคาไม่แพง สามารถใช้วิธีนี้ในการได้มาซึ่งสารดังกล่าว เพื่อพัฒนาเป็นอาหารเสริมต่อไป แทนการแยกจากเหง้ากระชายดำ ซึ่งมีความยุ่งยากมากกว่า

นอกจากนี้ได้ทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวน 2 ชนิด ได้แก่ 5,7-ไดเมทอกซี-4-ไนโตรฟลาโวน และ 5,7-ไดเมทอกซี-4-อะมิโนฟลาโวน แต่สารชนิดหลังนี้ไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ อย่างไรก็ตาม สารสังเคราะห์ทั้งสองนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสได้ต่ำ แสดงว่า หมู่ไนโตร และหมู่อะมิโนบนตำแหน่งพารา ของ 5,7-ไดเมทอกซีฟลาโวนไม่มีผลในการเพิ่มการยับยั้งบนเอนไซม์แต่อย่างใด

ในการศึกษาครั้งนี้แม้จะพบว่าอนุพันธ์ของ 5,7-ไดเมทอกซี-ฟลาโวนที่มีหมู่ไนโตร และอะมิโนในตำแหน่งพารา- จะให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสไม่ดีเท่าที่ควร แต่ในทางกลับกันอนุพันธ์ของสารประกอบนี้ในตำแหน่ง เมตา- และ ออร์โท- อาจจะแสดงการยับยั้งที่สูงกว่าได้ ซึ่งควรประยุกต์การสังเคราะห์วิธีอื่น ๆ เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารที่มีตำแหน่งดังกล่าวต่อไป อาทิ วิธีของวีลเลอร์ (Wheeler's method)

4. สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

ในการศึกษาครั้งนี้แม้จะพบว่าอนุพันธ์ของ 5,7-ไดเมทอกซี-ฟลาโวนที่มีหมู่ไนโตร และอะมิโนในตำแหน่งพารา- จะให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสไม่ดีเท่าที่ควร แต่ในทางกลับกันอนุพันธ์ของสารประกอบนี้ในตำแหน่ง เมตา- และ ออร์โท- อาจจะแสดงการยับยั้งที่สูงกว่าได้ ซึ่งควรประยุกต์การสังเคราะห์วิธีอื่น ๆ เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารที่มีตำแหน่งดังกล่าวต่อไป อาทิ วิธีของวีลเลอร์ (Wheeler's method)

บรรณานุกรม

1. Jaipetch, T.; Reutrakul, V.; Tuntiwachwuttikul, P. and Santisuk, T. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 625-626.
2. Sutthanut, K.; Sripanidkulchai, B.; Yenjai, C. and Jay. *J Chromatogr A* **2007**, *1143*, 227-233.
3. Ruijjanawate, C.; Kanjanapothi, D.; Amornlerdpison, D. and Pojanagaroon, S. *J. Ethnopharmacol* **2005**, *102*, 120-122.
4. Yenchai, C.; Prasanphen, K.; Doodee, S.; Wongpanich, V. and Kittakoop, P. *Fitoterapia* **2004**, *75*, 89-92.

5 Wattanapitayakul, S.K., Chularojmaontri, L.: Herunsalee, A. Charuchongkdwongse, S. and Chansuvanich, N. *Fitoterapia* **2008**, 214-216.

6. Ellman, G. L.; Coutney, K. D.; Valentino, C.; Zarzuelo, A. Jr. and Feathertone, R. M., *Biochem Pharmacol* **1961**, *7*, 88-95.

7. Rhee, K.; Meent, M.; Ingkaninan, K. and Verpoorte, R. *J Chromatogr A* **2001**, *915*, 217-223.

8. Fulton, B. and Benfield, P. *Drugs Aging* **1996**, *9*, 60-65.

9. Zarotsky, V.; Sramek, J.J. and Cutler, N.R. *Journal of Health-System Pharmacist* **2003**, *60*, 446-452.

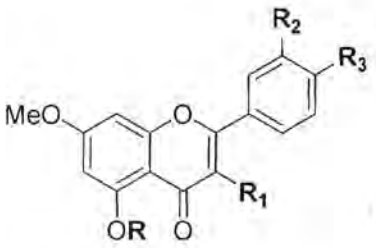
10. Krupka, R.M., *Biochemistry* 1963, 2,76-82

11. Dao, T. T.; Chi, Y. A.; Kim, H. P.; Kim, S.; Park, H. *Arch Pharm Res* **2003**, *5*, 345-350.

<u>สรุปผลงานวิจัย โครงการ "สาระสำคัญและการประกันคุณภาพอาหารเสริมจากกระชายดำ" 4 ปี</u>

<u>ส่วนที่ 1</u> การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส เพื่อใช้ป้องกันและ/หรือรักษาโรคอัลไซเมอร์

สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้จากเหง้ากระชายดำจำนวน 10 ชนิด โดยมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1 เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอซิทิลโคลีนเอสเทอเรส พบว่า สาร 6 มีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุด คือ 47.1% รองลงมา คือ สาร 7 มีค่ายับยั้ง 42.6% ส่วนสารอื่นๆ มีค่ายับยั้งต่ำกว่า 30% ส่วนฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรส พบว่า สาร 7 มีฤทธิ์สูงที่สุด คือ 84.6% ตามด้วย สาร **6** (46.2%), **10** (22.8%), **8** (17.9%) และ **9** (16.5%) ตามลำดับ โดยสารมาตรฐานกาแลนทามีนมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองนี้ประมาณ 95% ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



1: R, R_2, R_3 = H; R_1 = OMe
2: R, R_1, R_2, R_3 = H
3: R, R_2, = H; R_1, R_3= OMe
4: R = H; R_1, R_2, R_3 = OMe
5: R = Me; R_1 = OMe; R_2, R_3 = H
6: R = Me; R_3 = OMe; R_1, R_2 = H
7: R = Me; R_1, R_2, R_3 = H
8: R = Me; R_1, R_3 = OMe; R_2 = H
9: R = Me; R_1, R_2, R_3 = OMe
10: R, R_1, R_2 = H; R_3= OMe

รูปที่ 1 โครงสร้างของฟลาโวนที่แยกได้ **(1-10)**

ส่วนที่ 2 การแปรรูปกระชายดำผง

จากการศึกษาในส่วนที่ 1 ทำให้ทราบว่า สาร **6** และ **7** เป็นสารที่มีปริมาณมากในสิ่งสกัดจากกระชายดำ และนอกจากนี้ ยังเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่างด้วย ดังนั้น ในงานวิจัยส่วนนี้ได้ศึกษาการแปรรูปกระชายดำผง โดยวิธีการทำให้แห้งแบบแช่เข็ง (freeze-dry) โดยสกัดกระชายดำด้วย 100% น้ำ 1% 5% และ 50% เมทานอล-น้ำ (วิธี 1-4) แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร **6**และ**7**ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่า วิธี 1 (สกัดด้วย 100% น้ำ) ไม่มีสาร **6** และ **7** ส่วน วิธี 2 (สกัดด้วย 1% เมทานอล-น้ำ) มีปริมาณสาร 7 เท่ากับ 69.3 มิลลิกรัมต่อกรัมของกระชายผงแห้งแบบแช่เข็ง วิธี 3 (สกัดด้วย 5% เมทานอล-น้ำ) มีปริมาณสาร 7 เท่ากับ 98.4 มิลลิกรัมต่อกรัมของกระชายผงแห้งแบบแช่เข็ง และวิธี 4 (สกัดด้วย 50% เมทานอล-น้ำ) มีปริมาณสาร 7 เท่ากับ 245.3 มิลลิกรัมต่อกรัมของกระชายผงแห้งแบบแช่เข็ง

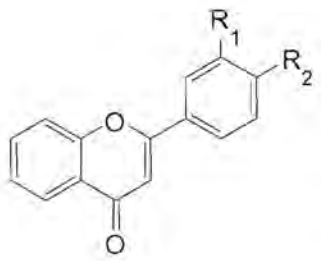
ถึงแม้วิธี 4 (สกัดด้วย 50% เมทานอล-น้ำ) จะมีปริมาณสาร 7 มากกว่า แต่อย่างไรก็ตามจะดูดความชื้นเมื่อวางทิ้งไว้

จากงานวิจัยในส่วนนี้ ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะดังนี้

1. การแปรรูปกระชายดำผง โดยวิธีการทำให้แห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry) เมื่อทำการวิเคราะห์หาสารสำคัญ จะพบเฉพาะสาร 7 ในปริมาณค่อนข้างน้อย ซึ่งสารสำคัญนี้จะควบคุมปริมาณในผลิตภัณฑ์ได้ยากในทางปฏิบัติ อาจทำได้โดยการเติมสารดังกล่าวนี้ลงไปในผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่ต้องการ นอกจากนี้ในปฏิบัติจริงอาจใช้เอทานอลสกัดแทนเมทานอลได้ แต่เนื่องจากเป็นการศึกษาเบื้องต้น จึงใช้เมทานอลเพราะระเหยได้ง่ายกว่าเอทานอล และสามารถกำจัดตัวทำละลายออกได้ง่ายกว่า
2. ควรมีการปรับปรุงวิธีการแปรรูปและวิเคราะห์สารสำคัญในกระชายดำผงให้หลากหลายขึ้น เช่น การทำให้แห้งแบบพ่นฝอย (spray-dry)

ส่วนที่ 3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร 7 เพื่อปรับปรุงฤทธิ์ยับยั้งโคลีนเอสเทอเรส

3.1 สังเคราะห์อนุพันธ์ของฟลาโวนในกลุ่มไนโตรฟลาโวน (สาร **1-2s**) อะมิโนฟลาโวน (สาร **3-4s**) และเอไมด์ฟลาโวน (สาร **5-6s**)



1s, R_1 = -NO_2
2s, R_2 = -NO_2
3s, R_1 = -NH_2
4s, R_2 = -NH_2
5s, R_1 = -NH(CO)CH_3
6s, R_2 = -NH(CO)CH_3

รูปที่ 2 โครงสร้างของอนุพันธ์ฟลาโวนสังเคราะห์ (สาร **1-6s**)

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ของสารที่สังเคราะห์ได้ (1-6s) พบว่า ค่า% การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสาร **1s** (3'-nitroflavone) จะให้ % การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสสูงสุด เท่ากับ 72.58% ส่วนฤทธิ์

ยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส พบว่าสาร 5s (3'-acetamidoflavone) จะให้ % การยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสสูงสุด เท่ากับ 69.45% ดังตารางที่ 1

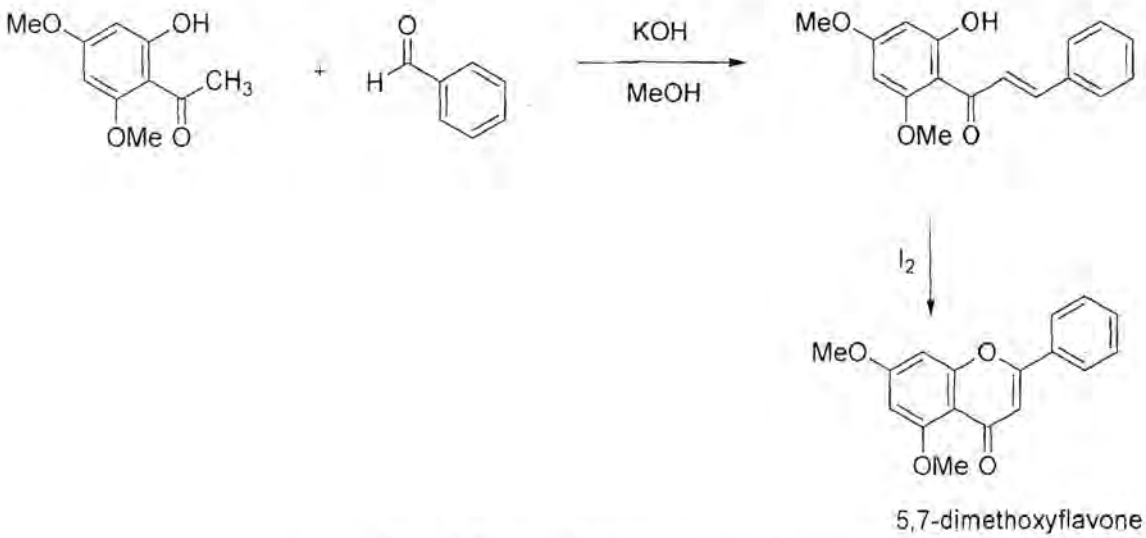
ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสของอนุพันธ์ฟลาโวนสังเคราะห์ (สาร **1**-6s)

สาร	% ยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส	% ยับยั้งบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส
1s	72.58	67.74
2s	62.25	25.00
3s	70.87	63.24
4s	15.13	63.67
5s	21.75	69.45
6s	56.14	64.98
Eserine (Standard)	91.91	98.09

3.2 สังเคราะห์สาร 7 และอนุพันธ์

เนื่องจากสาร 7 (5,7-dimethoxyflavone) เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรสได้ดีที่สุด และยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆที่น่าสนใจอีกด้วย ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้หาวิธีการสังเคราะห์สารนี้ แทนการแยกจากธรรมชาติ เพื่อลดขั้นตอนและความยุ่งยากในการที่จะใช้สาร 7 เป็นอาหารเสริมหรือด้านอื่นๆต่อไป

จากผลการทดลองสามารถสังเคราะห์สาร 7 ด้วยวิธีการดังแสดงในแผนภาพที่ 1



5,7-dimethoxyflavone

แผนภาพที่ 1 การสังเคราะห์ 5,7-dimethoxyflavone

นอกจากนี้ยังได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร 7 ด้วย แต่เนื่องจากการแยกสารให้บริสุทธิ์ทำได้ยาก จึงได้อนุพันธ์ที่ทำให้บริสุทธิ์ได้เพียง 1 ชนิดเท่านั้น คือ 5,7-dimethoxy-4-nitroflavone และของผสมระหว่าง 5,7-dimethoxy-4-nitroflavone และ 5,7-dimethoxy-4-aminoflavone ซึ่งสารทั้งสองนี้ให้ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสที่ต่ำกว่า 5,7-dimethoxyflavone