

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์และประเมินฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์กลุ่มโคลีนเอสเทอเรสของ

สารประกอบ chromone-2-carboxamido-alkylamines

Synthesis and evaluation of chromone-2-carboxamido-alkylamines

as cholinesterase inhibitors

คณะนักวิจัย

ผศ.ดร.ลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2559

รหัสโครงการ PHA590412S

ชื่อโครงการ

การสังเคราะห์และประเมินฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์กลุ่มโคลีนเอสเทอเรสของ
สารประกอบ chromone-2-carboxamido-alkylamines

คณะนักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร.ลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สารบัญ

	หน้า
รายการตาราง	iv
รายการภาพประกอบ	v
กิตติกรรมประกาศ	vi
บทคัดย่อ	vii
ABSTRACT	vii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	7
การตรวจเอกสาร	7
วิธีการทดลอง	7
การสังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้าง	8
การทดสอบฤทธิ์	26
การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์	27
ผลการทดลองและวิจารณ์	29
การสังเคราะห์สารมัธยันต์และผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ	29
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส	30
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวไทริลโคลีนเอสเทอเรส	30
การหาค่า half maximal inhibitory concentration (IC ₅₀)	32
การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับอันตรกิริยาระหว่างสารหมายเลข 14 และสาร A ต่อ เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส	35
การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์	37
สรุปผลการทดลอง	38
เอกสารอ้างอิง	39
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	42
ภาคผนวก	43

รายการตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 โครงสร้างของสารประกอบที่ทำการสังเคราะห์ในงานวิจัยนี้	6
ตารางที่ 2 ลักษณะ คุณสมบัติทางกายภาพ และ % yield ของสารที่สังเคราะห์ได้ในงานวิจัยนี้	29
ตารางที่ 3 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสและบิวไทริลโคลีนเอสเทอเรส ของอนุพันธ์ chromone-2-carboxamido-alkylamines	31
ตารางที่ 4 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสและบิวไทริลโคลีนเอสเทอเรสของ อนุพันธ์ chromone-2-carboxamido-alkylamines	33

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 การสลาย Acetylcholine โดย Acetylcholinesterase	2
รูปที่ 2 Active site ของ AChE	3
รูปที่ 3 โครงสร้างของ chromone และ Flavonoids	4
รูปที่ 4 AChEIs ที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น flavonoid	4
รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ <i>N</i> -(4-(Ethyl(2-methoxybenzyl)amino)butyl)-5-hydroxy-4-oxo-4 <i>H</i> -chromene-2-carboxamide	5
รูปที่ 6 แนวทางในการสังเคราะห์อนุพันธ์ chromone-2-carboxamido-alkylamine	8
รูปที่ 7 กราฟแสดง %inhibition ต่อ AChE และ BChE ของอนุพันธ์ chromone-2-carboxamido-alkylamines	32
รูปที่ 8 โครงสร้างของสาร A และ สารหมายเลข 14	35
รูปที่ 9 Molecular docking ระหว่างสารหมายเลข 14 (A) และสาร A (B) กับ เอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรส	36
รูปที่ 10 Lineweaver-Burk Plot	38

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2559
รหัสโครงการ PHA590412S

บทคัดย่อ

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่พบมากถึง 30% ของประชากรโลกที่มีอายุเกิน 65 ปี และปัจจุบันมีรายงานว่ามีคนไทยถึง 600,000 คน เป็นโรคอัลไซเมอร์ สาเหตุสำคัญในการเกิดโรคคาดว่าเกี่ยวข้องกับกลไกการลดลงของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน โดยมีเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและเอนไซม์บิวทิลริวโคลีนเอสเทอเรสทำลายสารสื่อประสาทนี้ด้วยกระบวนการย่อยสลายด้วยน้ำ ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เป็นกลุ่มยาหลักที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบัน เช่น โดเนเพซิล, ทาครีนและกาแลนทามีน

ในงานวิจัยนี้ได้มีการออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของโครโมน จำนวน 12 ชนิดโดยใช้สาร *N*-(4-((2-เมทอกซีเบนซิล)เอทิล)อะมิโน)บิวทิล)-5-ไฮดรอกซี-4-ออกโซ-4*H*-โครมין-2-คาร์บอกซาไมด์ (A) และยาโดเนเพซิล เป็นสารต้นแบบ สารที่สังเคราะห์ได้นำไปพิสูจน์โครงสร้าง IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR และ mass spectrometry จากนั้นนำสารไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและเอนไซม์บิวทิลริวโคลีนเอสเทอเรส ตามวิธีการของ Ellman โดยเลือกสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ที่ดีที่สุดมาศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์และศึกษาอันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์และเอนไซม์โดยใช้วิธีการทางคอมพิวเตอร์

อนุพันธ์โครมין-2-คาร์บอกซามิโด-แอลคิลเอมีน (7-18) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและเอนไซม์บิวทิลริวโคลีนเอสเทอเรสมากกว่า 50% ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สารหมายเลข 7-18 แสดงค่า IC₅₀ ในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสอยู่ในระดับนาโนโมลาร์ถึงไมโครโมลาร์ (IC₅₀=0.09-9.16 μM) สามารถยับยั้งได้ดีกว่าเอนไซม์บิวทิลริวโคลีนเอสเทอเรส (IC₅₀=12.09-44.56 μM) จากการศึกษาพบว่าสารหมายเลข 14 (IC₅₀= 0.09±0.02 μM) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสสูงที่สุดและมีความแรงในการออกฤทธิ์ที่สูงกว่ายาทาครีนและจากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์และศึกษาอันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์กับเอนไซม์พบว่า สารหมายเลข 14 มีการยับยั้งในลักษณะไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive)

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is considered as one of the biggest global public burden. An estimate 30% of the world's population over age of 65 are affected by AD. Nowadays, six hundred thousand of Thai people were suffered from this disease. Cause of this disease is proposed to be associated with reduced level of the neurotransmitter acetylcholine (ACh). Cholinesterase, namely acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE), destroy ACh through hydrolysis. Cholinesterase inhibitors (ChEI) portray the main group of drugs currently used for the treatment of AD such as donepezil, tacrine and galanthamine.

In this research, 12 chromone derivatives were designed and synthesized using compound *N*-(4-((2-methoxybenzyl)ethyl)amino)butyl)-5-hydroxy-4-oxo-4*H*-chromene-2-carboxamide (**A**) and donepezil were used as references. Structure of target compounds was characterized with IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectroscopy and mass spectrometry. Cholinesterase inhibitory activity of chromone derivatives (**7-18**) was evaluated using the Ellman's method. In addition, the kinetic study for characterization of AChE inhibition and molecular docking studies demonstrated interactions between enzyme and ligand were evaluated by using computer program.

Chromone derivatives (**7-18**) showed percent inhibition of AChE and BChE higher than 50% at 100 μM. Most of the synthesized compound exhibited potent AChE inhibitory activities at the nanomolar to micromolar range (IC₅₀ 0.09-9.16 μM) and demonstrated weak BChE inhibitory activities at the micromolar range (IC₅₀ 12.09-44.56 μM). Compound **14** was the most potent AChEI, it exerted IC₅₀ in nanomolar range, higher activity than the clinical used drug tacrine. Enzyme kinetic study revealed that compound **14** was uncompetitive inhibitor.