ตอนที่ 1

อนุพันธ์สเตอรอยดอลอัลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส

1.1. บทนำ

เอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase; AChE, EC 3.1.1.7) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบประสาทโคลิเนอร์จิก ณ บริเวณรอยต่อเซลล์ประสาท (cholinergic synapses) ทั้งในระบบประสาทโคลิเนอร์จิกของสมอง และในระบบประสาท-กล้ามเนื้อ (neuromuscular junctions) โดยทำหน้าที่หลักในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลัยซิสของสารสื่อประสาทอะซีติลโคลีน ซึ่งส่งผลให้สัญญาณประสาทที่กระตุ้นโดยสารสื่อประสาทนี้สิ้นสุด และเซลล์ประสาทหรือเซลล์กล้ามเนื้อที่รอรับสัญญาณนั้นสามารถเตรียมพร้อมต่อการรับสัญญาณรอบถัดไป

เนื่องจากบทบาทของอะซีติลโคลีนในฐานะของสารสื่อประสาทซึ่งมีความสำคัญต่อระบบทางสรีรวิทยาในแทบทุกส่วน ทำให้ AChE เข้ามามีบทบาทในฐานะของเป้าหมายการออกแบบยา โดยเฉพาะในโรคที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับความบกพร่องในระบบประสาทโคลิเนอร์จิกด้วยเช่นกัน ตัวอย่างเช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) พาร์กินสัน (Parkinson's disease) และอาการหนังตาตก (myasthenia gravis) เป็นต้น รวมไปถึงเป็นเป้าหมายของการออกแบบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ซึ่งใช้ในภาคเกษตรกรรม เช่น ยาฆ่าแมลงกลุ่มฟอสเฟต หรือแม้กระทั่งการใช้เป็นอาวุธเคมีในสงคราม

สำหรับการใช้สารยับยั้ง AChE ในผู้ป่วย AD นั้น มีพื้นฐานในการออกแบบยาจากสมมติฐานโคลิเนอร์จิก (cholinergic hypothesis) ซึ่งระบุว่า ความบกพร่องของระบบประสาทโคลิเนอร์จิกในสมอง โดยเฉพาะส่วนที่เกิดจากการขาดสารสื่อประสาทอะซีติลโคลีน เป็นหนึ่งในอาการแสดงของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ และอาจเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดการสร้างคราบอะมัยลอยด์ (amyloid plaque) ซึ่งเป็นหนึ่งในพยาธิสภาพหลักในสมองของผู้ป่วยจากโรค AD ดังนั้น การชดเชยปริมาณของอะซีติลโคลีนซึ่งเป็นสารสื่อประสาทหลักของระบบประสาทโคลิเนอร์จิกจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาโรค AD ที่ใกล้เคียงกับการแก้ไขจากต้นเหตุที่สุด ทั้งนี้ ในปัจจุบัน ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE ที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นโรค AD ได้แก่ donepezil, galantamine และ rivastigmine ส่วน tacrine ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE ชนิดแรกที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้ในผู้ป่วยได้นั้น ถูกเพิกถอนแล้วเนื่องจากผลความเป็นพิษต่อตับ

ถึงแม้หลักการในการรักษาผู้ป่วยโรค AD โดยใช้ยายับยั้ง AChE จะยังคงมีข้อถกเถียงว่า เป็นเพียงการรักษาตามอาการ และผลการรักษาที่ได้โดยส่วนใหญ่ จะมีผลที่ดีอยู่ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ เพียงไม่เกิน 1 ปี เท่านั้น แต่ในทางกลับกัน ก็ยังการรายงานว่า ในผู้ป่วยบางราย การใช้ยายับยั้ง AChE สามารถคงระดับผลการรักษาที่น่าพอใจได้นานกว่า 3 ปี ดังนั้น การพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE จึงยังเป็นหนึ่งในเป้าหมายการออกแบบยาเพื่อใช้ในผู้ป่วย AD รวมถึงการใช้ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องของระบบประสาทโคลิเนอร์จิกในรูปแบบอื่นๆ ทั้งนี้ เพื่อเพิ่มทางเลือกให้แพทย์และบุคลากรด้านสุขภาพในการรักษาและบรรเทาอาการผิดปกติดังกล่าว

สารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เป็นหนึ่งในเป้าหมายของการพัฒนายาและสารใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ทั้งนี้ จนถึงปัจจุบัน มีการรายงานการศึกษาสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวจากพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ จำนวนไม่น้อย ตัวอย่างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE จากธรรมชาติสามารถตรวจสอบได้จากรายงานและบทความปริทรรศน์หลายฉบับ เช่น Houghton and Howes (2005), Viegas et al (2005) และ Elgorashi et al (2006) เป็นต้น

จากผลการศึกษาในระดับการคัดกรองฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังกลุ่มฟองน้ำและเพรียงหัวหอมซึ่งได้จากการสำรวจตัวอย่างในบริเวณรอบเกาะเต่า อ.เกาะพะงัน จ.สุราษฎร์ธานี ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจากตัวอย่างฟองน้ำชนิดหนึ่งในสกุล *Corticium* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับที่ดี (สารสกัดความเข้มข้น 0.1 mg/mL ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 90% และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมากกว่า 90%) จากการศึกษาเพื่อแยกสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในตัวอย่างฟองน้ำดังกล่าว สามารถแยกสารในกลุ่มสเตอรอยดอลอัลคาลอยด์ได้ 1 ชนิด คือ 4-acetoxy plakinamine B (**1**)

1.2. การทดลองและระเบียบวิธีวิจัย

1.2.1. สภาวะการทดลองทั่วไป

ในกรณีที่ไม่มีข้อกำหนดอื่นใด ตัวทำละลายและสารเคมีที่ใช้เพื่อการทดลองตลอดการวิจัยนี้ เป็นตัวทำละลายและสารเคมีระดับเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade) และใช้ในการศึกษาโดยไม่มีการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติมใดๆ ส่วนตัวทำละลายที่ใช้เพื่อการวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีสมรรถภาพสูง (HPLC) เป็นตัวทำละลายในระดับเพื่อ HPLC ซึ่งกรองผ่านเมมเบรนขนาด 230 นาโนเมตร (Millipore) และกำจัดก๊าซโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงก่อนใช้งาน

สเปคโตรมิเตอร์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ประกอบด้วย; Jasco J-180 spectropolarimeter (ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สำหรับการวัดค่าองศาการหมุนระนาบแสงจำเพาะ; Spectronic Genesys 5 spectrophotometer (ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการวัดสเปคตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต-แสงธรรมชาติ (UV); Jasco IR-810 infrared spectrometer (ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการวัดสเปคตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR); Micromass LCT mass spectrometer (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการตรวจวัดแมสสเปคตรัม (MS) ทั้งระดับความไวปกติและความไวสูง; FTNMR Varian Unity Inova 500 spectrometer (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการตรวจวัด เอ็น เอ็ม อาร์ สเปคตรัม (NMR) โดยใช้สัญญาณของตัวทำละลายตามระบุเป็นสัญญาณอ้างอิง

การแยกสกัดโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจล (Scharlau®; ขนาดอนุภาค 230-400 mesh) หรือ เซฟาเด็กซ์ LH-20 (GE Healthcare®) เป็นวัฏภาคอยู่กับที่ปกติ ส่วนโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ทดลองโดยเครื่อง HPLC ของ Water® 600E multisolvent delivery system ประกอบกับ Water® 484 UV detector และ Rheodyne® 7125 injector port

1.2.2. ตัวอย่างฟองน้ำ

ฟองน้ำสกุล *Corticium* (วงศ์ Plakinidae) ที่ใช้ในการวิจัยนี้ เก็บสำรวจจากบริเวณรอบเกาะเต่า จ.สุราษฎร์ธานี (10° 07.6′ เหนือ 99° 48.7′ ตะวันออก) การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน ดำเนินการโดย

ดร.สมชัย บุศราวิช สถาบันวิจัยทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่ง และป่าชายเลน จ.ภูเก็ต ตัวอย่างอ้างอิง (PMBC21360) เก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์ของสถาบันวิจัยทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่ง และป่าชายเลน จ.ภูเก็ต

1.2.3. การแยกสกัด

ตัวอย่างฟองน้ำหลังทำให้แห้งโดยเทคนิกการแช่เยือกแข็ง หนัก 260 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเธน (DCM) และเมธานอล ตามลำดับ ผลจากการคัดกรองขั้นต้น นำไปสู่การคัดเลือกสารสกัดจากชั้นเมธานอลซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง AChE สูงสุดเพื่อการศึกษาขั้นต่อไป

การสกัดแยกประกอบด้วยการแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีต่างๆ ตามลำดับ ดังนี้; คอลัมน์ซิลิกาเจล (10% เมธานอลในเอธิลอะซีเตท); เซฟาเด็กซ์คอลัมน์ (MeOH); C-18 รีเวอร์เฟสคอลัมน์ (40% น้ำในอะซิโตไนไทรล์) และ โครมาโตกราฟีผิวบาง (เมธานอล:อะซีโทน:DCM 1.5:1:7.5) และสามารถแยกสารตัวอย่าง **1** ได้ 1 ชนิด (2.8 มิลลิกรัม)

4-Acetoxy-plakinamine B (1); $[\alpha]_D$ +21.9° (*c* 0.0014, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 242 (4.29) nm; IR (thin film) ν_{max} 3400, 2925, 1740, 1240 cm^{-1}; ^1H และ ^{13}C NMR (C_6D_6, 500 MHz for ^1H) ดูตารางที่ 2; EIMS *m/z* (relative intensity) 508 [M^+] (63), 493 (10), 433 (10), 164 (36), 136 (41); HR-EIMS *m/z* 508.4001 (calcd for $C_{33}H_{52}N_2O_2$ 508.4029).

1.2.4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง AChE ในการวิจัยนี้ ใช้การทดสอบโดย Microplate technique ตามวิธีการทดสอบที่รายงานใน Ingkaninan et al (2006) โดยใช้สารละลายต่างๆ ตามลำดับดังนี้ 5,5′-dithiobis[2-nitrobenzoic acid] (ความเข้มข้น 3 mM) 125 μL; acetylthiocholine iodide (ความเข้มข้น 1.5 mM) 25 μL; Tris-HCl buffer (pH 8.0 ความเข้มข้น 50 μM) 50 μL; สารละลายตัวอย่างใน Tris-HCl buffer ตามความเข้มข้นต่างๆ เพื่อการทดสอบ ปริมาตร 25 μL ต่อ 1 ความเข้มข้น; สารละลายเอนไซม์ AChE จากปลาไหลไฟฟ้า (0.28 U/mL; type VI-S, EC 3.1.1.7; Sigma®) 25 μL ตรวจวัดความเข้มการดูดกลืนแสงของสารละลายสีเหลืองที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรทุก 5 วินาทีเป็นเวลา 2 นาที คำนวณค่าการยับยั้งกิจกรรมและจลนศาสตร์ของเอนไซม์โดยใช้ Prism software และเทียบความแรงการออกฤทธิ์โดยใช้ galantamine เป็นตัวอย่างอ้างอิง

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ทดสอบโดยใช้วิธี sulphorhodamine B assay (Skehan et al, 1990)และใช้เซลล์มะเร็งต่อไปนี้เป็นเซลล์เป้าหมาย; MCF-7 (เซลล์มะเร็งเต้านม), KB (เซลล์มะเร็งช่องปากและหลอดอาหารส่วนต้น), HeLa (เซลล์มะเร็งปากมดลูก) และ HT-29 (เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่) วิธีการทดสอบโดยย่อประกอบด้วยการเตรียมตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงในรูปเซลล์เพาะเลี้ยงที่เรียงตัวแถวเดี่ยวในถาดหลุมขนาด 96 หลุม (จำนวนเซลล์ต่อหลุมประมาณ 2×10^3 เซลล์) เติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในตัวกลางเพาะเลี้ยงตามอ้างถึงในเอกสารอ้างอิง ให้เซลล์ได้สัมผัสสารตัวอย่างเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ล้างตัวกลางที่มีสารละลายตัวอย่างออกและเปลี่ยนเป็นตัวกลางใหม่ เพาะเลี้ยงเซลล์เป้าหมายต่ออีก 72 ชั่วโมง ตรึงเซลล์ด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติก และย้อมสีเซลล์ด้วยสารละลาย sulphorhodamine B ชะสีส่วนที่ติดเซลล์ให้อยู่ในรูปสารละลายและวัดความเข้มของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร แปลผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์จากค่าความเข้มในการดูดกลืนแสงและรายงานผลในรูป IC_{50} โดยใช้ camptothecin เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง

1.3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาวิจัยในระดับปริญญาโทซึ่งผู้วิจัยได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อคัดกรองสารสกัดจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล (เน้นสัตว์ทะเลในกลุ่มฟองน้ำและเพรียงหัวหอม) และได้คัดเลือกสารสกัดจากฟองน้ำชนิดหนึ่งในสกุล *Corticium* เพื่อแยกสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ผู้วิจัยสามารถแยกสกัดสารในกลุ่มสเตอรอยดอลอัลคาลอยด์ได้ 1 ชนิด ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างเป็นดังต่อไปนี้

1.3.1. การแยกสกัดและการวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง

เมื่อใช้การทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง AChE ติดตามกระบวนการแยกสกัดสารเคมีจากฟองน้ำ *Corticium* โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีในการแยกสกัด สามารถแยกสารตัวอย่างได้ 1 ชนิด มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว (น้ำหนักสารตัวอย่างที่แยกได้ 2.8 มิลลิกรัม)

ในการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของตัวอย่าง สามารถสังเกตสัญญาณโมเลกุลที่ *m/z* 508 [M^+] จากแมสสเปคตรัมในเทคนิคอิเล็กตรอนอิมแพคท์ เมื่อประกอบกับการวิเคราะห์ NMR สเปคตรัม (สัญญาณคาร์บอน 33 อะตอมและโปรตอน 51 อะตอม) และจาก MS ความไวสูง (*m/z* 508.4001) ทำให้สามารถเสนอสูตรโมเลกุลเป็น $C_{33}H_{52}N_2O_2$ (ผลคำนวณมวลโมเลกุลเป็น 508.4029) มีค่าสมมูลพันธะคู่เป็น 9 สัมพันธ์กับจำนวนพันธะคู่ 3 พันธะ หมู่คาร์บอนิล 1 พันธะ และจำนวนวงแหวน 5 วง ทั้งนี้ หมู่คาร์บอนิลข้างต้น คาดว่าเป็นหมู่เอสเทอร์ จากที่สามารถสังเกตเห็นสัญญาณใน IR สเปคตรัมที่ 1740 cm^{-1} นอกจากนั้น ยังสามารถสังเกตเห็นการดูดกลืนแสงของหมู่เอมีนปฐมภูมิได้อีก 1 หมู่ที่ 3400 cm^{-1} ด้วย

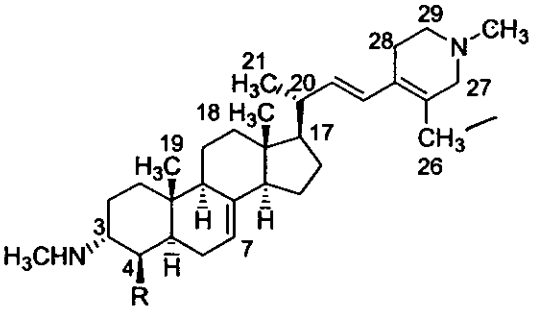
สเปคตรัม NMR ของสารตัวอย่าง 1 (ตารางที่ 2, 500 MHz สำหรับ ^1H, C_6D_6) เป็นสเปคตรัมที่มีลักษณะทั่วไปของสารประกอบสเตอรอยด์ ซึ่งสังเกตได้จากค่าเคมิคัลชิฟต์เฉพาะตัวของหมู่เมธิลที่ตำแหน่ง 18 และ 19 (δ_H 0.64, s, H-18; 1.14, s, H-19; δ_C 12.3, C-18; 15.1, C-19) ร่วมกับสัญญาณของโปรตอนบนคาร์บอนแบบเมธิลีน ซึ่งรวมตัวอยู่ในช่วง 1.0 – 1.5 ppm ของสเปคตรัม ^1H NMR

สัญญาณของหมู่ฟังก์ชั่นที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวของสาร 1 ประกอบด้วยสัญญาณโปรตอนของหมู่โอเลฟินแบบ *E* ที่ δ 5.49 (dd, J = 15.3, 8.9 Hz, H-22) และ 6.54 (d, J = 15.3 Hz, H-23) เมื่อประกอบกับข้อมูลจากการทดลอง HMBC และ ^1H,^1H-COSY ทำให้สามารถสร้างส่วนของสูตรโครงสร้างส่วนของ 4-(1,3-dimethyl)-3,4-didehydropiperidinyl ซึ่งต่ออยู่บนคาร์บอนตำแหน่ง 20 ของโครงสร้างแกนแบบสเตอรอยด์

โดยมีหมู่เมธิลตำแหน่ง 21 ซึ่งสามารถสังเกตสัญญาณโปรตอนได้ที่ δ 1.14 (d, J = 5.8 Hz) ที่ต่ออยู่บนคาร์บอนตำแหน่ง 20 นี้เช่นกัน

หมู่ฟังก์ชั่นที่สำคัญอีก 2 หมู่ที่สังเกตได้จากสเปคตรัม ^{1}H NMR คือสัญญาณของหมู่แทนที่บนคาร์บอนตำแหน่ง 3 และ 4 ทั้งนี้ สำหรับตำแหน่งที่ 3 สัญญาณหลักประกอบด้วยสัญญาณที่ δ 2.62 (br d, J = 2.6 Hz) และที่ δ 2.25 (s) ซึ่งประกอบกันเป็นสัญญาณของหมู่เมธิลอะมิโน ส่วนสัญญาณบนตำแหน่ง 4 ประกอบด้วยสัญญาณที่ δ 5.07 (br s) และ 1.71 (s) ซึ่งเมื่อรวมกับการแปลผลจากสเปคตรัม HMBC ทำให้สามารถประกอบโครงสร้างส่วนของหมู่อะเซทอกซีซึ่งแทนที่บนคาร์บอนตำแหน่ง 4 ได้

การแปลผลของส่วนโครงสร้างแกนตำแหน่งอื่นๆ ใช้การแปลข้อมูลจากสเปคตรัม ^{1}H,^{1}H-COSY และ HMBC ซึ่งให้ได้โครงสร้างของสเตอรอยด์ที่มีแกนเป็นแบบ stigmastane และนำไปสู่ข้อสรุปว่าสูตรโครงสร้างของสาร **1** เป็นสเตอรอยดอลอัลคาลอยด์แบบ stigmastane ที่มีไนโตรเจนแทนที่ที่ตำแหน่ง 3 และ 26 และมีหมู่อะเซทอกซีแทนที่ที่ตำแหน่ง 4 ซึ่งถือเป็นโครงสร้างของสารสมาชิกใหม่ของสเตอรอยดอลอัลคาลอยด์กลุ่ม plakinamine ชื่อ 4-acetoxy-plakinamine B ตามที่แสดง



1 ; R = $OCOCH_3$

2 ; R = H

เนื่องจากปริมาณของสารตัวอย่างที่แยกได้มีน้อยเกินกว่าที่จะสามารถวิเคราะห์สเตอริโอเคมีแบบสัมบูรณ์ได้ การเสนอคอนฟิกิวเรชั่นของสาร **1** ตามที่แสดงข้างล่างเป็นเพียงการเปรียบเทียบกับข้อมูลจากอนุพันธ์ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน และเสนอเป็นคอนฟิกิวเรชั่นแบบสัมพัทธ์ ทั้งนี้ ในส่วนโครงสร้างแกนสเตอรอยด์ ค่าเคมีคัลชิฟต์ของคาร์บอนตำแหน่ง 18 และ 19 (δ 12.3 และ 15.1 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างแกนนี้เป็นวงแหวนสเตอรอยด์ที่ต่อกันแบบ *trans* ตลอดทั้งโครงสร้าง ส่วนหมู่แทนที่บนตำแหน่ง 3 และ 4 วางตัวในตำแหน่ง axial จากค่าคงที่คัปปลิงของโปรตอนที่มีค่าน้อยกว่า 10 Hz ทั้ง 2 ตำแหน่ง การ

ตารางที่ 2. ค่าเคมิคัลชิฟต์ของโปรตอนและคาร์บอนของสาร **1** (C_6D_6; 500 MHz สำหรับโปรตอน)[n]

position	^{1}H (mult)	^{13}C (mult)	position	^{1}H (mult)	^{13}C (mult)
1	1.44 (m; 2H)	32.1 (CH_2)	18	0.64 (s; 3H)	12.3 (CH_3)
2	1.32 (m; 2H)	28.7 (CH_2)	19	1.14 (s; 3H)	15.1 (CH_3)
3	2.62 (br d, J = 2.6 Hz)	58.0 (CH)	20	2.18 (m)	41.6 (CH)
4	5.07 (br s)	74.0 (CH)	21	1.14 (d, J = 5.8 Hz; 3H)	21.3 (CH_3)
5	1.20 (m)	38.9 (CH)	22	5.49	134.6 (CH)
6	1.72 (m); 2.12 (m)	25.8 (CH_2)		(dd, J = 15.3, 8.9 Hz)	
7	5.29 (br s)	118.4 (CH)	23	6.54 (d, J = 15.3 Hz)	125.6 (CH)
8	-	139.6 (C)	24	-	126.3 (C)
9	1.74 (m)	50.8 (CH)	25	-	127.5 (C)
10	-	34.5 (C)	26	1.61 (s; 3H)	16.4 (CH_3)
11	1.50 (m); 1.86 (m)	23.3 (CH_2)	27	2.75 (br s; 2H)	60.7 (CH_2)
12	1.97 (m; 2H)	39.7 (CH_2)	28	2.37 (br s; 2H)	27.0 (CH_2)
13	-	43.6 (C)	29	2.41 (m); 2.44 (m)	52.6 (CH_2)
14	1.81 (m)	55.4 (CH)	*N*-CH_3-3	2.19 (s; 3H)	45.7 (CH_3)
15[b]	1.39 (m; 2H)	22.5 (CH_2)	*N*-CH_3-27	2.25 (s; 3H)	34.9 (CH_3)
16[b]	1.50 (m; 2H)	21.3 (CH_2)	$COCH_3$-4	-	169.6 (C)
17	1.25 (m)	56.2 (CH)	$CO\mathit{CH}_3$-4	1.71 (s; 3H)	20.8 (CH_3)

หมายเหตุ [n] หากไม่มีการระบุอื่นใด สัญญาณตามที่แสดงเป็นสัญญาณที่เทียบเท่ากับ 1 โปรตอนหรือ 1 คาร์บอนตามกำหนด

[b] ค่าเคมิคัลชิฟต์อาจสลับกัน

เสนอดอนฟิกิวเรชั่นในตำแหน่งที่เหลือเมื่อเทียบกับค่าเคมิคัลชิฟต์ของ plakinamine B (2; Rosser and Faulkner, 1984) คาดว่า สารทั้ง 2 ชนิดมีดอนฟิกิวเรชั่นสัมพัทธ์ที่ตรงกัน

1.3.2. ฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ของสาร **1** สามารถวิเคราะห์ค่า IC_{50} ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ และค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของสาร **1** ได้แก่ค่า V_{max} และ K_m ได้ตามที่แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3. ฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ของสาร **1**

จลนศาสตร์การยับยั้ง AChE	V_{max} (dmA.min^{-1})	K_m (μM)	IC_{50} (μM)
เมื่อไม่มีสารยับยั้งเอนไซม์	107.9±4.0	750.0±173.5	-
เมื่อมีสาร **1**	47.8±0.3[n]	3678.0±419.2[n]	3.75±1.69
เมื่อมี galantamine	-	-	0.59±0.14

หมายเหตุ [n] เมื่อเพิ่มสาร **1** เป็น 7.0 μM

ผลของสาร **1** ต่อการทำงานของเอนไซม์ AChE เป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ไม่ขึ้นกับเวลา (ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์คงที่เมื่อเวลาผ่านไปนานกว่า 60 นาที) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สาร **1** ยับยั้งเอนไซม์แบบผันกลับได้ และเมื่อวิเคราะห์จลนศาสตร์ของเอนไซม์โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้ง พบว่า ค่า V_{max} ของเอนไซม์ลดลงในขณะที่ค่า K_m เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของสาร **1** (ตารางที่ 3) แสดงว่าสารตัวอย่างยับยั้งเอนไซม์ด้วยกลไกการแย่งจับแบบผสม (mixed-competitive inhibition; ผลการยับยั้งร่วมกันระหว่าง non-competitive และ competitive inhibition)

สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบพบว่า สารตัวอย่างมีค่าเสมือนไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ใช้เป็นเป้าหมายในการทดสอบ (ค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์ต่ำกว่า 50% ที่ระดับความเข้มข้น 200 mg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษา)