

อนุพันธ์ไอโซอินโดลีน-1,3-ไดโอนของ 1-เบนซิลพิเพอราซีนที่มีฤทธิ์ยับยั้ง
เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส
Isoindoline-1,3-dione Derivatives of 1-benzylpiperazine as
Acetylcholinesterase Inhibitors

จิระพร การะ^{1*} ฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล² และลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม¹

¹ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

²ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

สารยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase inhibitors, AChEIs) เป็นยากลุ่มสำคัญที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบัน ในงานวิจัยนี้ อนุพันธ์ไอโซอินโดลีน-1,3-ไดโอนของ 1-เบนซิลพิเพอราซีนซึ่งมีโครงสร้างคล้าย donepezil ถูกสังเคราะห์และประเมินฤทธิ์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส สารเหล่านี้ให้ค่า % inhibition อยู่ในช่วง 60 - 90% ที่ 100 μ M และแสดงฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส สารที่มีฤทธิ์ดีที่สุดจากการทดสอบ ได้แก่ สารหมายเลข 11 ($IC_{50} = 9.83 \mu$ M) นอกจากนี้ สารที่มีหมู่เชื่อมต่อระหว่างโครงสร้างส่วนไอโซอินโดลีน-1,3-ไดโอนกับวงแหวนพิเพอราซีนด้วยสายโซ่โพรพิลีน ($n=3$) มีความจำเพาะเจาะจงต่ออะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสมากกว่าบิวไทริลโคลีนเอสเทอเรส

คำสำคัญ: สารยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส การสังเคราะห์ ไอโซอินโดลีน-1, 3-ไดโอน

* ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)

**งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
e-mail: pon5210720005@hotmail.com

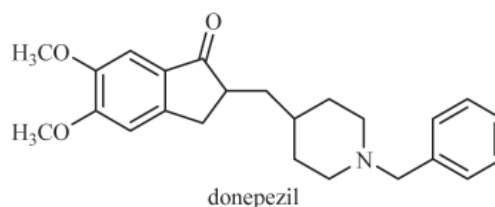
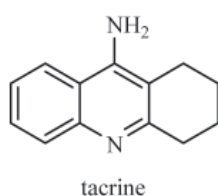
Abstract

Acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) are important agents currently used in the treatment of Alzheimer's disease. In this research, isoindoline-1,3-dione derivatives of 1-benzylpiperazine, structurally related to donepezil, were synthesized and evaluated for their AChE inhibitory activity. These compounds exhibited 60-90 % inhibition at 100 μ M concentration and showed moderate inhibition against AChE. Compound 11 ($IC_{50} = 9.83 \mu$ M) possessed the best AChE inhibitory activity among the tested compounds. Compounds with propylene chain ($n=3$) linking isoindoline-1,3-dione and piperazine moieties showed selectivity to AChE over butyrylcholinesterase (BuChE).

Keywords: acetylcholinesterase inhibitor, synthesis, isoindoline-1,3-dione

บทนำ

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคสมองเสื่อมที่พบในประชากรผู้สูงอายุหลายล้านคนทั่วโลก ผู้ป่วยจะมีการสูญเสียความจำและเกิดการทำลายเนื้อสมองอย่างต่อเนื่อง สาเหตุของการเกิดโรคนี้นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีงานวิจัยบ่งชี้ว่าเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น การเกิด beta amyloid plaques, ความผิดปกติของ tau protein และการทำลายเส้นประสาทโคลีนเนอร์จิกภายในสมองทำให้เกิดการลดลงของอะเซทิลโคลีน (acetylcholine, ACh) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่เกี่ยวข้องกับความจำและการเรียนรู้ (Leo et al, 2006) การรักษาด้วยยาของโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบันเป็นการเพิ่มระดับของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนในสมองโดยใช้ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase inhibitor, AChEI) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ทำลายอะเซทิลโคลีนเป็นผลให้ระดับของอะเซทิลโคลีนในสมองเพิ่มสูงขึ้น ได้แก่ tacrine และ donepezil เป็นต้น (ภาพที่ 1)



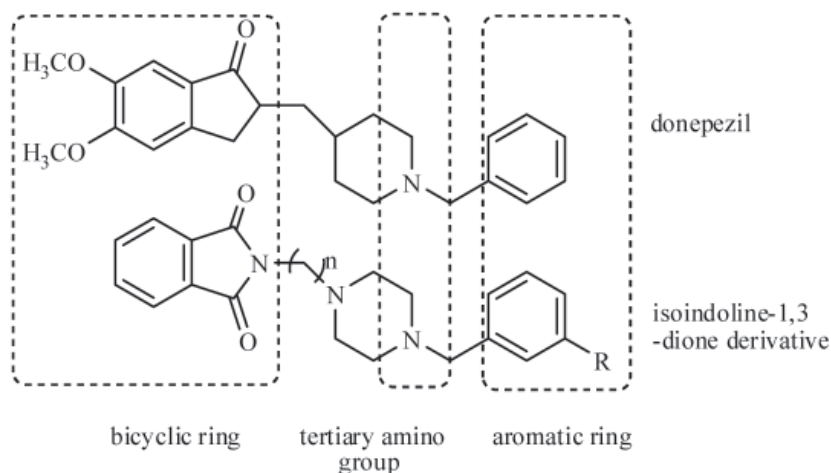
ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของยารักษาโรคอัลไซเมอร์ (Leo et al, 2006)

การศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ได้จาก *Torpedo californica* (TcAChE) พบว่า ตำแหน่งออกฤทธิ์มีลักษณะเป็นช่องที่ลึกและแคบ (gorge) มีความยาวประมาณ 20 Å ประกอบด้วย peripheral anionic site (PAS) ในบริเวณส่วนบน ถัดมาเป็นตำแหน่ง mid gorge และ catalytic anionic site (CAS) ซึ่งเกิดอันตรกิริยากับหมู่ quaternary amino ของอะเซทิลโคลีน ส่วนในบริเวณล่างสุดของช่องเป็นส่วนที่เกิดการตัดพันธะเอสเทอร์ในโครงสร้างของอะเซทิลโคลีน (Houghton et al, 2006)

ในการออกแบบและพัฒนาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสในปัจจุบันจะเน้นไปที่การออกแบบ dual binding site inhibitor ซึ่งสามารถเกิดอันตรกิริยาทั้งกับส่วนของ PAS และ CAS ของเอนไซม์ มีรายงานว่าสารที่สามารถจับกับ PAS ของเอนไซม์สามารถรบกวนการเกิด amyloid plaques จึงลดปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์อีกปัจจัยหนึ่ง (Munoz-Torrero and Camps, 2006)

donepezil ซึ่งเป็นยาที่ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสแบบ dual binding site ประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 3 ส่วน คือ ส่วนของวงแหวน indanone, piperidine และ benzyl ผลจากการศึกษาโครงสร้าง X-ray ของยา donepezil ที่จับอยู่กับ TcAChE พบว่า วงแหวน indanone ของ donepezil เกิด - interaction กับ Trp279 ที่บริเวณ PAS นอกจากนี้ หมู่ tertiary amino ในวงแหวน piperidine เกิดอันตรกิริยาแบบ cation- กับ Phe330 และหมู่ benzyl เกิด - interaction กับ Tyr84 ที่ตำแหน่ง CAS ของอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (Piazzi et al, 2003)

อนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione ของ 1-benzylpiperazine (สารหมายเลข 7 - 12, ตารางที่ 1) เป็นสารมีต้นตอจาก Gabriel synthesis ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งในวิธีการสังเคราะห์สารในงานวิจัยสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสที่กำลังดำเนินการในกลุ่มของผู้วิจัยอยู่ในขณะนี้ แต่เนื่องจากโครงสร้างของสารหมายเลข 7 - 12 คล้ายกับโครงสร้างที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacophore) ของ donepezil กล่าวคือ ประการแรก โครงสร้างในส่วนของวงแหวน isoindoline-1,3-dione ของสารหมายเลข 7 - 12 เป็น bicyclic ring ที่มีลักษณะคล้ายกับวงแหวน indanone ในโครงสร้างของ donepezil ประการต่อมา ส่วนของวงแหวน piperazine ที่ประกอบด้วยหมู่ tertiary amino เช่นเดียวกับในโครงสร้างส่วนวงแหวน piperidine ของ donepezil และประการสุดท้าย ทั้งสารหมายเลข 7 - 12 และ donepezil ต่างก็มีหมู่ aromatic (ภาพที่ 2) จึงคาดว่าสารในกลุ่มนี้น่าจะสามารถเกิดอันตรกิริยาต่อเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ในลักษณะคล้ายคลึงกับยา donepezil และน่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของอนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione ของ 1-benzylpiperazine



ภาพที่ 2 โครงสร้างของ donepezil กับอนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione ของ 1-benzylpiperazine

สำหรับอนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione ของ 1-benzylpiperazine ในงานวิจัยนี้ สารหมายเลข 8, 9, 11, 12 เป็นสารใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานการสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามาก่อน ส่วนสารหมายเลข 7 และ 10 เคยมีการจดสิทธิบัตรเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อแคลเซียมแชนแนล (calcium channel modulator, Choi et al, 2009) และเป็นลิแกนด์ของตัวรับชนิด 5HT_{1A} (Newington et al, 2011) นอกจากนี้ สารหมายเลข 10 ยังเคยมีรายงานว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ใน multiwell plate โดยใช้ไมโครเวฟช่วยเร่งปฏิกิริยา (Maras et al, 2012) อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารหมายเลข 7 และ 10 มาก่อน

จากการศึกษาผลของหมู่แทนที่ต่างๆ บนโครงสร้างของ donepezil ซึ่งเป็นสารต้นแบบของอนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione ของ 1-benzylpiperazine ที่ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่า การเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่บนวงแหวน indanone ของ donepezil มีผลน้อยต่อการเกิดอันตรกิริยากับอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส การแทนที่บนตำแหน่ง meta บนวงแหวน benzyl ด้วยหมู่ให้อิเล็กตรอนให้ฤทธิ์ที่ดีที่สุด นอกจากนี้ ยังพบว่าความยาวของ linker ที่เชื่อมต่อระหว่างวงแหวน indanone กับ piperidine ก็มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสาร (Kryger et al, 1999)

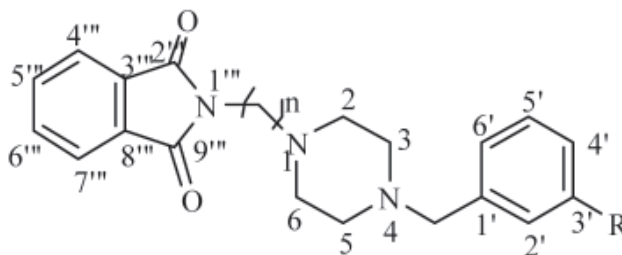
บิวไทริลโคลีนเอสเทอเรส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มโคลีนเอสเทอเรสอีกชนิดหนึ่งที่ทำลายอะเซทิลโคลีน ในสมองของคนปกติพบว่าอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสมีกิจกรรม (activity) สูงกว่า แต่ในสมองของผู้ป่วยอัลไซเมอร์กลับพบว่าในขณะที่ยอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสมีระดับต่ำลงแต่บิวไทริลโคลีนเอสเทอเรสมีระดับคงที่หรือสูงขึ้น อีกทั้งยังสันนิษฐานว่าบิวไทริลโคลีนเอสเทอเรสอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด beta amyloid plaques อีกด้วย (Balasubramanian, 2001)

สารที่สามารถยับยั้งอะเซติลโคลีนเอสเทอเรส หรือ บิวทิลโคลีนเอสเทอเรสได้อย่างจำเพาะเจาะจงจะนำไปสู่ความเข้าใจบทบาทของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในระบบประสาทโคลิเนอร์จิกได้ดียิ่งขึ้น ส่วนสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ก็น่าจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเป็นยารักษาอัลไซเมอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นและมีข้อบ่งใช้ในการรักษาที่หลากหลายขึ้น (Giacobini, 2004) ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะประเมินฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วย

วัตถุประสงค์

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione ของ 1-benzylpiperazine จำนวน 6 ชนิด (สารหมายเลข 7 - 12, ตารางที่ 1) โดยเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่บนตำแหน่ง meta บน phenyl ring (R) ด้วยหมู่ CH_3 หรือ NO_2 และเปลี่ยนแปลงความยาวของ linker ที่มีความยาว (n) 2 - 3 คาร์บอนอะตอม นำสารที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์โครงสร้าง โดยใช้ IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopy และ mass spectrometry และวัดคุณสมบัติทางกายภาพ (จุดหลอมเหลว) จากนั้นนำสารที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยใช้วิธีของ Ellman (Ingkaninan et al, 2003) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ (% inhibition) ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 50% (IC_{50}) และทำการคำนวณค่าความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่อเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสของสารที่สังเคราะห์ได้

ตารางที่ 1 โครงสร้างของอนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้



compound	7	8	9	10	11	12
R	H	CH_3	NO_2	H	CH_3	NO_2
n	2	2	2	3	3	3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

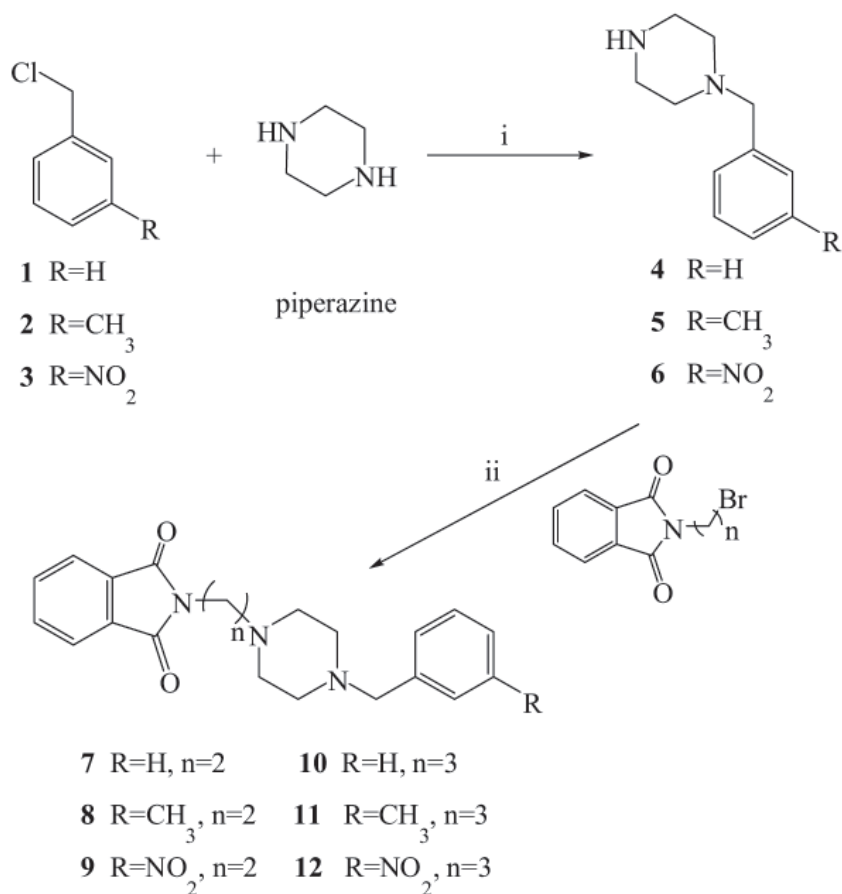
สารเคมีและเอนไซม์

benzylchloride, 3-nitrobenzylchloride, 3-methylbenzylchloride, *N*-(2-bromoethyl) isoindoline-1,3-dione, piperazine, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), acetylthiocholine iodide, butyrylthiocholine iodide, albumin from bovine serum, trizma® base, 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride และ benzyltriethylammonium chloride (TEBAC) (Sigma Aldrich, Singapore), *N*-(3-bromopropyl) isoindoline-1,3-dione (Merck, Germany), sodium sulfate anhydrous และ sodium carbonate (Fischer Scientific, ประเทศไทย) acetonitrile (Duksan, Korea), ethanol และ hydrochloric acid (RCI Labscan, ประเทศไทย), potassium iodide (UNVAR, New Zealand), ethyl acetate, methanol, methylene chloride และ hexane (P.S. Science Chemical, ประเทศไทย) อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส จาก *Electricus erythmatus* และ บิวทิลโคลีนเอสเทอเรสจากซีรัมของม้า (Sigma Aldrich, Singapore)

เครื่องมือที่ใช้สำหรับการศึกษาลักษณะทางกายภาพและวิเคราะห์โครงสร้างสาร ได้แก่ Infrared Spectrophotometer (Perkin Elmer, precisely), Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Varian Unity Inova, 500 MHz), Mass spectrometer (Thermo Finnigan MAT 95XL), Melting Point Apparatus (Mel-TEMP II) เครื่องมือที่ใช้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ ได้แก่ Microplate reader (Biotek PowerWave_x) และ โปรแกรม GraphPad Prism 2.01 32 Bit Executable

วิธีการสังเคราะห์

การสังเคราะห์อนุพันธ์ 7 - 12 ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 3 เริ่มจากการสังเคราะห์อนุพันธ์ 1-benzylpiperazine (สารหมายเลข 4 - 6) โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ benzylchloride (สารหมายเลข 1 - 3) กับ piperazine จากนั้น นำอนุพันธ์ของ 1-benzylpiperazine ทำปฏิกิริยากับ 2-(3-bromopropyl) isoindoline-1,3-dione หรือ 2-(2-bromoethyl) isoindoline-1,3-dione ได้อนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione (สารหมายเลข 7 - 12) ดังรายละเอียดต่อไปนี้



ภาพที่ 3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione: (i) ethanol, 65 °C, 4 hr; (ii) potassium iodide, acetonitrile, sodium carbonate, benzyltriethylammonium chloride, 80 °C, 48 hr

1. วิธีการทั่วไปสำหรับการสังเคราะห์อนุพันธ์ 1- benzylpiperazine (สารหมายเลข 4 - 6, ดัดแปลงจาก Lim et al, 2008)

นำอนุพันธ์ benzylchloride (สารหมายเลข 1 - 3) และ piperazine ในอัตราส่วนโมล 1:4 มาละลายใน ethanol คนให้เข้ากัน ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำสารที่ได้ไปสกัดด้วย 2M hydrochloric acid และ ethyl acetate เก็บชั้นน้ำแล้วนำไปปรับ pH ให้ได้ pH = 14 ด้วย 2M sodium hydroxide นำมาสกัดอีกครั้งด้วย ethyl acetate (2 ครั้งๆ ละ 100 mL) นำชั้น ethyl acetate ไปล้างด้วยน้ำและสารละลายอิ่มตัวของ NaCl จากนั้นกำจัดน้ำที่ยังเหลืออยู่ในชั้น ethyl acetate โดยใช้

anhydrous sodium sulfate แล้วระเหยตัวทำละลายออกจากด้วยเครื่อง rotary evaporator แยกสารที่ต้องการออกจากสารผสมด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และ methylene chloride:methanol (95:5) เป็น mobile phase แล้วทำสารให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกใน methanol

2. วิธีการทั่วไปสำหรับการสังเคราะห์อนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione (สารหมายเลข 7 - 12, ดัดแปลงจาก Haydar et al. 2009)

นำอนุพันธ์ 1-benzylpiperazine (สารหมายเลข 4 - 6), potassium iodide, benzyltriethyl ammonium chloride, sodium carbonate และ 2-(3-bromopropyl) isoindoline-1,3-dione (สำหรับการสังเคราะห์สารหมายเลข 7 - 9) หรือ 2-(2-bromoethyl) isoindoline-1,3-dione (สำหรับการสังเคราะห์สารหมายเลข 10 - 12) ในอัตราส่วนโมลเท่ากับ 2.0:0.5:1.0:1.0:1.0 ตามลำดับ ใส่ในขวดก้นกลม เติม acetonitrile คนให้เข้ากัน จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ ระเหยตัวทำละลายออกจากด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำสาร ที่ได้ไปสกัดด้วย 2M hydrochloric acid และ ethyl acetate เก็บชั้นน้ำแล้วนำไปปรับ pH ให้ได้ pH = 14 ด้วย 2M sodium hydroxide นำมาสกัดอีกครั้งด้วย ethyl acetate (2 ครั้งๆ ละ 100 mL) นำชั้น ethyl acetate ไปล้างด้วยน้ำและสารละลายอิ่มตัวของ NaCl จากนั้นกำจัดน้ำที่ยังเหลืออยู่ในชั้น ethyl acetate โดยใช้ anhydrous sodium sulfate แล้วระเหยตัวทำละลายออกจากด้วยเครื่อง rotary evaporator แยกสารที่ต้องการออกจากสารผสมด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และ ใช้ ethyl acetate : hexane (70:30) เป็น mobile phase แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกใน methanol

สารให้บริสุทธิ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ในทั้งสองขั้นตอนจะถูกนำมาทำให้แห้งโดยเก็บในตู้สุญญากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาชั่งน้ำหนักและคำนวณร้อยละผลผลิต (% yield)

วิธีการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและการวิเคราะห์โครงสร้างสาร

ลักษณะทางกายภาพของสาร เช่น สถานะ สี ได้จากการสังเกตด้วยตาเปล่า การวัดจุดหลอมเหลว ทำโดยใช้เครื่องวัดจุดหลอมเหลวโดยบรรจุสารที่ต้องการทดสอบลงในหลอดคาพิลลารี ให้ความร้อนและสังเกตการหลอมเหลวด้วยตาเปล่า ทำการศึกษาหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างสารโดยใช้ IR spectroscopy โดยเตรียมตัวอย่างในรูปของ KBr pellet สารหมายเลข 4 - 6 ทำการศึกษาโครงสร้างโดยใช้ $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy ส่วนสารหมายเลข 7 - 12 ศึกษาโครงสร้างโดยใช้ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopy โดยใช้ CDCl_3 เป็นตัวทำละลาย และทำการยืนยันน้ำหนักโมเลกุลของสารด้วย mass spectrometry ทั้งแบบ low- และ high resolution

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

การหา % inhibition ในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยวิธีของ Ellman (Ingkaninan et al. 2003) โดยเติมตัวอย่างที่ละลายใน ethanol ความเข้มข้น 100 μM ปริมาตร 25 μL , tris HCl buffer 50 mM ปริมาตร 50 μL , acetylthiocholine iodide (ACTI) 15 mM ปริมาตร 25 μL , dithiobisnitrobenzoate (DTNB) ปริมาตร 125 μL และ electric eel AChE ปริมาตร 25 μL ลงใน 96-well plate นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ทุกๆ 11 วินาทีเป็นเวลา 2 นาทีด้วยเครื่อง microplate reader แต่ละตัวอย่างจะทำการทดสอบ 3 ครั้งโดยใช้ donepezil และ tacrine เป็นสารอ้างอิง จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปกับเวลาโดยใช้โปรแกรม Prism และทำการคำนวณหาค่า velocity ของเอนไซม์ ค่า % inhibition ได้จากการคำนวณโดยใช้สมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{mean velocity ของ blank} - \text{mean velocity ของตัวอย่าง}) \times 100}{\text{mean velocity ของ blank}}$$

การหา %inhibition ของ BuChE ใช้วิธีการเดียวกับ ของ AChE แต่เปลี่ยนชนิดของซับสเตรตเป็น butyrylthiocholine iodide (BuCTI) และใช้เอนไซม์ BuChE จากซีรัมของม้า

สำหรับการหาค่า IC_{50} ในการยับยั้งเอนไซม์ AChE และ BuChE ทำการศึกษาโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างจำนวน 8 ความเข้มข้น (ตั้งแต่ 1500 μM - 0.06 μM) จากนั้น นำไปวัด % inhibition ตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว นำผลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับ $-\log$ (ความเข้มข้นของสารที่นำมาทดสอบ) และหาความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์ได้ 50% (IC_{50}) โดยใช้โปรแกรม Prism

ค่า selectivity ของสารต่อเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{Selectivity for AChE} = \frac{\text{IC}_{50} (\text{BuChE})}{\text{IC}_{50} (\text{AChE})}$$

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสังเคราะห์อนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione ของ 1-benzylpiperazine

อนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione ของ 1-benzylpiperazine จำนวน 6 ชนิด ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน การสังเคราะห์สารหมายเลข 4 - 6 ได้ %yield สูงกว่า 95% เช่นเดียวกับงานวิจัยอ้างอิง (Lim et al, 2008) การสังเคราะห์สารหมายเลข 7 - 12 ได้ %yield ของผลิตภัณฑ์ 50 - 96% เช่นเดียวกับงานวิจัยอ้างอิง (Haydar et al, 2009) การพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค IR, $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopy และการยืนยันน้ำหนักโมเลกุลด้วย mass spectrometry พบว่า สารที่สังเคราะห์ได้เป็นสารที่ต้องการ โดยมีรายละเอียดลักษณะของสารที่สังเคราะห์ได้ จุดหลอมเหลว และข้อมูลการพิสูจน์โครงสร้างแสดงดังต่อไปนี้

1-Benzylpiperazine (สารหมายเลข 4)

ของแข็งสีเหลือง จุดหลอมเหลว $148-150\text{ }^{\circ}\text{C}$; %yield 95.54; IR (cm^{-1} , KBr); 3445 (N-H stretching, amine), 2948 (C-H stretching, aliphatic), 1449 (C=C stretching, aromatic), 1198 (C-N stretching, aliphatic amine), 731, 701 (C-H bending, aromatic); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.29 (5H, m, H-aromatic), 3.50 (2H, s, CH_2 -1'), 2.59-2.38 (8H, m, H_2 -2, 3, 5, 6), 2.12 (1H, s, broad, NH).

1-(3-Methylbenzyl)piperazine (สารหมายเลข 5)

ของแข็งสีเหลืองอ่อน จุดหลอมเหลว $122-124\text{ }^{\circ}\text{C}$; %yield 99.23; IR (cm^{-1} , KBr); 3429 (N-H stretching, amine), 2935 (C-H stretching, aliphatic), 1452 (C=C stretching, aromatic), 1137 (C-N stretching, aliphatic amine), 744, 701 (C-H bending, aromatic); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.10 (4H, m, H-2', 4', 5', 6'), 3.41 (2H, s, CH_2 -1'), 2.84 (4H, t, $J=5.1$, H_2 -2, 6), 2.37 (4H, m, H_2 -3, 5), 2.30 (3H, s, CH_3 -3'), 2.13 (1H, s, NH)

1-(3-Nitrobenzyl)piperazine (สารหมายเลข 6)

ของแข็งสีขาวอ่อน จุดหลอมเหลว $148-150\text{ }^{\circ}\text{C}$; %yield 98.25; IR (cm^{-1} , KBr); 3417 (N-H stretching, amine), 2918 (C-H stretching, aliphatic), 1412 (C=C stretching, aromatic), 1145 (C-N stretching, aliphatic amine), 733, 676 (C-H bending, aromatic); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.15 (1H, s, H-2'), 8.10 (1H, d, $J=8.1$, H-4'), 7.76 (1H, d, $J=7.6$, H-6'), 7.62 (1H, dd, $J=7.9$, 7.8, H-5'), 3.62 (2H, s, CH_2 -1'), 2.91 (4H, m, H_2 -2, 6), 2.50 (4H, m, H_2 -3, 7), 2.36 (1H, s, broad, NH)

2-(2-(4-Benzylpiperazin-1-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (สารหมายเลข 7)

ของแข็งสีเหลือง จุดหลอมเหลว 81-83°C; %yield 50.33; IR (cm⁻¹, KBr): 1771 (C=O stretching, amide), 1711 (C=O stretching, imide), 1438 (C=C stretching, aromatic), 1159 (C-N stretching, aliphatic amine), 719, 698 (C-H bending, aromatic); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.80 (2H, dd, J=5.4, 3.0, H-4''', 7'''), 7.69 (2H, dd, J=5.5, 3.0, H-5''', 6'''), 7.33-7.17 (5H, m, H-aromatic), 3.78 (2H, t, J=6.7, H₂-1''), 3.49, 3.44 (2H, 2s, CH₂-1'), 2.60 (2H, t, J=6.7, H₂-2''), 2.58-2.27 (8H, m, H₂-2, 3, 5, 6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 168.31 (C-2''', 9'''), 138.10 (C-1'), 133.80 (C-4''', 7'''), 132.17 (C-3''', 8'''), 129.19 (C-3', 5'), 128.13 (C-2', 6'), 126.95 (C-4'), 123.14 (C-5''', 6'''), 63.00 (CH₂C-1'), 55.68 (C-1''), 53.04, 53.02 (C-piperazine), 35.28 (C-2''); EI-MS m/z: 349[M]⁺, 189, 173, 146, 91, 77; HR-MS m/z 349.1784 (calcd for C₂₁H₂₃O₂N₃, 349.1785).

2-(2-(4-(3-Methylbenzyl)piperazin-1-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (สารหมายเลข 8)

ของแข็งสีเหลือง จุดหลอมเหลว 82-83°C; %yield 85.75; IR (cm⁻¹, KBr): 1771 (C=O stretching, amide), 1711 (C=O stretching, imide), 1439 (C=C stretching, aromatic), 1161 (C-N stretching, aliphatic amine), 719, 696 (C-H bending, aromatic); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.81 (2H, dd, J=5.4, 3.1, H-4''', 7'''), 7.69 (2H, dd, J=5.4, 3.1, H-5''', 6'''), 7.16 (1H, dd, J=7.5, 7.5, H-5'), 7.09 (1H, s, H-2'), 7.06 (1H, d, J=7.6, H-4'), 7.03 (1H, d, J=7.5, H-6'), 3.79 (2H, t, J=6.7, H₂-1''), 3.41 (2H, s, CH₂-1'), 2.61 (2H, t, J=6.7, H₂-2''), 2.58-2.35 (8H, s, H₂-2, 3, 5, 6), 2.30 (3H, s, CH₃-3'); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 168.32 (C-2''', 9'''), 137.97 (C-1'), 137.74 (C-3'), 133.80 (C-4''', 7'''), 132.19 (C-3''', 8'''), 129.94 (C-2'), 128.01 (C-4'), 127.71 (C-5'), 126.32 (C-6'), 123.15 (C-5''', 6'''), 63.05 (CH₂C-1'), 55.69 (C-1''), 53.10, 53.00 (C-piperazine), 35.30 (C-2''), 21.35 (CH₃C-3'); EI-MS m/z: 363[M]⁺, 203, 174, 160, 105, 78; HR-MS m/z 363.1943 (calcd for C₂₂H₂₅O₂N₃, 363.1941)

2-(2-(4-(3-Nitrobenzyl)piperazin-1-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione (สารหมายเลข 9)

ของแข็งสีขาวอ่อน จุดหลอมเหลว 87-89°C; %yield 73.75; IR (cm⁻¹, KBr): 1769 (C=O stretching, amide), 1710 (C=O stretching, imide), 1436 (C=C stretching, aromatic), 1159 (C-N stretching, aliphatic amine), 718, 686 (C-H bending, aromatic); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.11 (1H, s, H-2'), 8.04 (1H, d, J=9, H-4'), 7.76 (2H, dd, J=5.5, 3.0, H-4''', 7'''), 7.65 (2H, dd, J=5.4, 3.0, H-5''', 6'''), 7.59 (1H, d, J=7.5, H-6'), 7.40 (1H, dd, J=7.9, 7.8, H-5'), 3.74 (2H, t, J=6.6, H₂-1''), 3.48 (2H, s, CH₂-1'), 2.58 (2H, t, J=6.6, H₂-2''), 2.53-2.30 (8H, m, H₂-2, 3, 5, 6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 168.33 (C-2''', 9'''), 148.30 (C-3'), 140.77 (C-1'), 135.00 (C-5'), 133.80 (C-4''', 7'''), 132.16 (C-3''', 8'''), 129.07 (C-6'), 123.72 (C-4'), 123.16 (C-5''', 6'''), 122.13 (C-2'), 61.95 (CH₂C-1'), 55.63 (C-1''), 53.06, 52.92 (C-piperazine), 35.26 (C-2''); EI-MS m/z: 394[M]⁺, 235, 191, 136; HR-MS m/z 394.1634 (calcd for C₂₁H₂₂O₄N₄, 394.1636)

2-(3-(4-Benzylpiperazin-1-yl)propyl)isoindoline-1,3-dione (สารหมายเลข 10)

ของแข็งสีเหลือง จุดหลอมเหลว 80-81 °C; %yield 73.98; IR (cm⁻¹, KBr): 1767 (C=O stretching, amide), 1709 (C=O stretching, imide), 1455 (C=C stretching, aromatic), 1160 (C-N stretching, aliphatic amine), 725, 693 (C-H bending, aromatic); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.79 (2H, dd, J=5.4, 3.0, H-4''', 7'''), 7.68 (2H, dd, J=5.4, 3.0, H-5''', 6'''), 7.30-7.15 (5H, m, H-aromatic), 3.71 (2H, t, J=7.0, H₂-1''), 3.36 (2H, s, CH₂-1'), 2.50-2.15 (8H, m, H₂-2, 3, 5, 6), 2.38 (2H, t, J=7.0, H₂-3''), 1.82 (2H, quin, J=6.9, H₂-2''); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 168.46 (C-2''', 9'''), 137.99 (C-1'), 133.76 (C-4''', 7'''), 132.29 (C-3''', 8'''), 129.18 (C-3', 5'), 128.13 (C-2', 6'), 126.97 (C-4'), 123.12 (C-5''', 6'''), 63.02 (CH₂C-1'), 55.99 (C-1''), 53.05, 52.92 (C-piperazine), 36.63 (C-3''), 25.27 (C-2''); EI-MS m/z: 363[M]⁺, 272, 217, 190, 160, 105, 91; HR-MS m/z 363.1941 (calcd for C₂₂H₂₅O₂N₃, 363.1941).

2-(3-(4-(3-Methylbenzyl)piperazin-1-yl)propyl)isoindoline-1,3-dione (สารหมายเลข 11)

ของแข็งสีเหลืองอ่อน จุดหลอมเหลว 79-80 °C; %yield 96.22; IR (cm⁻¹, KBr): 1770 (C=O stretching, amide), 1710 (C=O stretching, imide), 1445 (C=C stretching, aromatic), 1153 (C-N stretching, aliphatic amine), 717, 697 (C-H bending, aromatic); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.83 (2H, dd, J=5.4, 3.0, H-4''', 7'''), 7.70, (2H, dd, J=5.4, 3.0, H-5''', 6'''), 7.17 (1H, dd, J=7.5, 7.5, H-5'), 7.07 (1H, s, H-2'), 7.05 (1H, d, J=2.0, H-4'), 7.03 (1H, d, J=2.0, H-6'), 3.75 (2H, t, J=7.0, H₂-1''), 3.35 (2H, s, CH₂-1'), 2.41 (2H, t, J=7.0, H₂-3''), 2.32 (11H, s, H₂-2, 3, 5, 6, 3'), 1.85 (2H, quin, J=6.9, H₂-2''); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 168.44 (C-2''', 9'''), 137.79 (C-1'), 137.71 (C-3'), 133.75 (C-4''', 7'''), 132.28 (C-3''', 8'''), 129.98 (C-2'), 128.05 (C-4'), 127.92 (C-5'), 126.37 (C-6'), 123.10 (C-5''', 6'''), 63.03 (CH₂C-1'), 55.97 (C-1''), 53.10, 52.93 (C-piperazine), 36.61 (C-3''), 25.24 (C-2''), 21.37 (CH₃C-3'); EI-MS m/z: 377[M]⁺, 231, 217, 203, 160, 105; HR-MS m/z 377.2098 (calcd for C₂₃H₂₇O₂N₃, 377.2098).

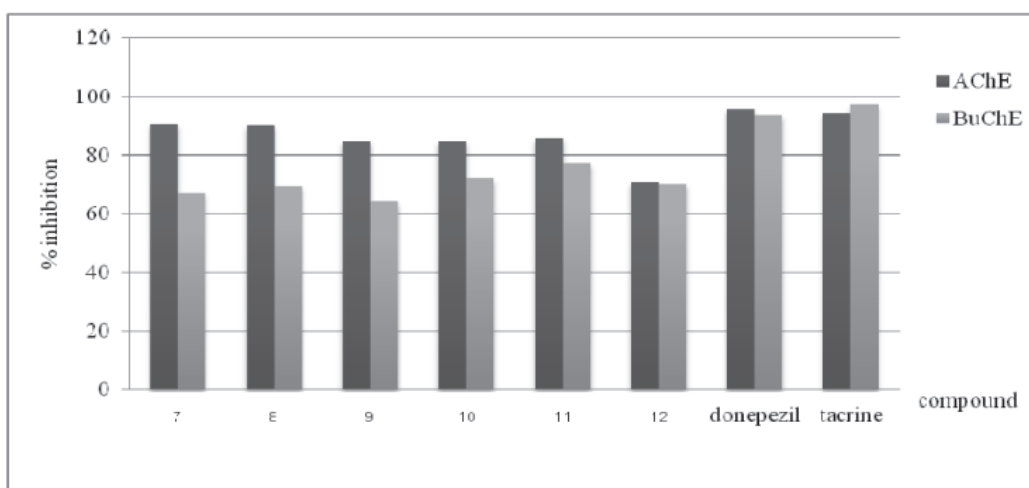
2-(3-(4-(3-Nitrobenzyl)piperazin-1-yl)propyl)isoindoline-1,3-dione (สารหมายเลข 12)

ของแข็งสีเขียวยาวอ่อน จุดหลอมเหลว 78-79 °C; %yield 82.59; IR (cm⁻¹, KBr): 1769 (C=O stretching, amide), 1708 (C=O stretching, imide), 1527 (C=C stretching, aromatic), 1154 (C-N stretching, aliphatic amine), 719, 675 (C-H bending, aromatic); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.14 (1H, s, H-2'), 8.10 (1H, d, J=9.6, H-4'), 7.83 (2H, dd, J=5.4, 3.0, H-4''', 7'''), 7.72 (2H, dd, J=5.4, 3.0, H-5''', 6'''), 7.61 (1H, d, J=7.6, H-6'), 7.46 (1H, dd, J=7.8, H-5'), 3.75 (2H, t, J=7.0, H₂-1''), 3.47 (2H, s, CH₂-1'), 2.60-2.20 (8H, m, H₂-2, 3, 5, 6), 2.42 (2H, t, J=7.0, H₂-3''), 1.85 (2H, quin, J=6.9, H₂-2''); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 168.47 (C-2''', 9'''), 148.29 (C-3'), 140.67 (C-1'), 134.99 (C-5'), 133.79 (C-4''', 7'''), 132.31 (C-3''', 8'''), 129.07 (C-6'), 123.70 (C-4'), 123.14

(C-5''', 6'''), 122.13 (C-2'), 61.98 (CH₂C-1'), 55.95 (C-1''), 52.97, 52.94 (C-piperazine), 35. 36 (C-3''), 25.23 (C-2''); EI-MS m/z: 408[M]⁺, 363, 234, 217, 188, 160, 136, 123; HR-MS m/z 408.1796 (calcd for C₂₂H₂₄O₂N₄, 408.1792).

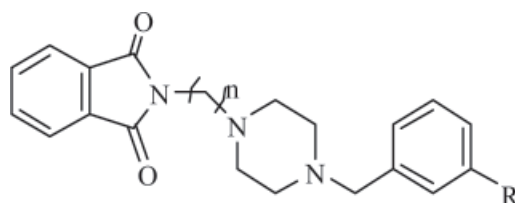
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวไทริลโคลีนเอสเทอเรส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวไทริลโคลีนเอสเทอเรสของสารหมายเลข 7 - 12 เริ่มจากการทดสอบเพื่อคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โดยการหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ (% inhibition) ด้วยวิธีของ Ellman ที่ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 100 μM โดยใช้ donepezil และ tacrine เป็นสารอ้างอิง พบว่า อนุพันธ์ทั้ง 6 ชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองได้โดยมีค่า %inhibition สูงกว่า 60% (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 กราฟแสดง % inhibition ในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) และบิวไทริลโคลีนเอสเทอเรส (BuChE) ของสารหมายเลข 7 - 12 ที่ความเข้มข้น 100 μM

ตารางที่ 2 แสดงฤทธิ์การยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและนิวโทรทรินโคลีนเอสเทอเรสของสาร
หมายเลข 7 - 12



compound	R	n	IC ₅₀ (μM)		Selectivity for AChE ^c
			AChE ^a	BuChE ^b	
7	H	2	18.21 ± 4.97	3.27 ± 0.36	0.18
8	CH ₃	2	12.90 ± 1.44	11.89 ± 3.27	0.92
9	NO ₂	2	13.27 ± 1.51	34.19 ± 2.59	2.58
10	H	3	28.02 ± 3.47	101.58 ± 4.51	3.63
11	CH ₃	3	9.83 ± 0.52	65.45 ± 0.56	6.66
12	NO ₂	3	30.74 ± 5.69	91.02 ± 9.96	2.96
donepezil			0.02 ± 0.005	2.32 ± 0.511	116
tacrine			0.10 ± 0.008	0.01 ± 0.003	0.10

^a 50% inhibitory concentration (means ± SEM of three experiments) of AChE from *Electricus erythmatosus*

^b 50% inhibitory concentration (means ± SEM of three experiments) of BuChE from equine serum

^c Selectivity for AChE = IC₅₀ (BuChE) / IC₅₀ (AChE)

เมื่อทำการประเมินฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสเทียบกับสารอ้างอิงคือ donepezil และ tacrine พบว่า อนุพันธ์ isindoline-1,3-dione ของ 1-benzylpiperazine แสดงฤทธิ์ในระดับปานกลาง (ตารางที่ 2) โดยสารที่มีฤทธิ์แรงที่สุดในกลุ่มนี้ ได้แก่ สารหมายเลข 11 ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 9.83 ± 0.52 μM

สารหมายเลข 7 - 9 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นิวโทรทรินโคลีนเอสเทอเรสในระดับปานกลาง ในขณะที่สารหมายเลข 10 - 12 มีฤทธิ์ต่ำในการยับยั้งนิวโทรทรินโคลีนเอสเทอเรส สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งนิวโทรทรินโคลีนเอสเทอเรสที่แรงที่สุด ได้แก่ สารหมายเลข 7 โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.27 ± 0.36 μM

ความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสแสดงด้วยอัตราส่วนของค่า IC_{50} ในการยับยั้งเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเทอเรสต่อค่า IC_{50} ในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส หากมีค่าสูงแสดงว่าสารนั้นมีความจำเพาะในการยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส จากผลการทดสอบโดยใช้ donepezil ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง (ค่า selectivity เท่ากับ 116) และ tacrine ซึ่งเป็นสารยับยั้งอะเซทิลโคลีนที่มีความจำเพาะเจาะจงต่ำ (ค่า selectivity เท่ากับ 0.10) เป็นสารอ้างอิง พบว่า อนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione ของ 1-benzylpiperazine แสดงความจำเพาะเจาะจงต่ำกว่า donepezil แต่สูงกว่า tacrine โดยพบว่า สารหมายเลข 11 แสดงความจำเพาะเจาะจงต่ออะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสสูงกว่าอนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione ของ 1-benzylpiperazine ชนิดอื่นๆ และสูงกว่า tacrine อยู่ 66.6 เท่า อย่างไรก็ตาม สารนี้ก็ยังมีความจำเพาะเจาะจงต่ออะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสต่ำกว่า donepezil อยู่ 17.4 เท่า นอกจากนี้ ตารางที่ 2 ยังแสดงให้เห็นว่า อนุพันธ์ที่เชื่อมต่อกับโครงสร้างส่วน isoindoline-1,3-dione กับ piperazine ด้วยสายโซ่โพรพิลีน ($n = 3$, สารหมายเลข 10 - 12) มีแนวโน้มที่มีความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสสูงกว่า สารหมายเลข 7 - 9 ซึ่งมีการเชื่อมต่อกับสายโซ่เอทิลีน ($n=2$)

การที่ donepezil มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่ออะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสเนื่องมาจากโครงสร้างในส่วนวงแหวน indanone ช่วยในการจับในส่วนของ PAS ในส่วนบนของตำแหน่งออกฤทธิ์ของอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้าง (side chain) เป็น aromatic เป็นจำนวนมาก ซึ่งแตกต่างจากในโครงสร้างส่วน PAS ของเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเทอเรส (Piazzi et al, 2003) การที่สารหมายเลข 10 - 12 มีหมู่เชื่อมต่อกับประกอบด้วย 3 คาร์บอนอะตอม อาจทำให้วงแหวนอะโรมาติกในส่วน isoindoline-1,3-dione เข้าใกล้ตำแหน่งของ PAS มากกว่าเมื่อหมู่เชื่อมต่อมีความยาวเพียง 2 คาร์บอนอะตอม ทำให้สารเหล่านี้แสดงความจำเพาะต่ออะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสสูงกว่าสารหมายเลข 7 - 9 และ tacrine ซึ่งเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนของอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสเฉพาะในส่วน CAS เท่านั้น (Dvir et al, 2002)

ดังนั้น สารหมายเลข 10 - 12 จึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาใช้เป็นสารต้นแบบสำหรับการออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีความยาวของสายโซ่มากขึ้น หรือมีการเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่บน isoindoline-1,3-dione เพื่อนำมาศึกษาผลต่อการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรสต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของอนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione ของ 1-benzylpiperazine จำนวน 6 ชนิด จากการทดสอบพบว่า อนุพันธ์เหล่านี้แสดงฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส นอกจากนี้ ความยาวของสายโซ่คาร์บอนที่เชื่อมต่อกับวงแหวน isoindoline และ piperazine มีผลต่อความจำเพาะในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยอนุพันธ์ที่เชื่อมต่อกับสายโซ่โพรพิลีนแสดงความจำเพาะ

เจาะจงในการยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสสูงกว่าในสารที่มีการเชื่อมต่อด้วยสายโซ่เออีลิน อนุพันธ์ในกลุ่มนี้มีความน่าสนใจที่จะนำมาใช้เป็นสารต้นแบบในการสังเคราะห์อนุพันธ์ isoindoline-1,3-dione ของ 1-benzylpiperazine ชนิดใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์แรงขึ้นสำหรับการพัฒนาเป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไปในอนาคต ตลอดจนนำมาศึกษาารูปแบบของการยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ตลอดจนความสามารถในการยับยั้งการเกิด beta amyloid plaque ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Balasubramanian, A.S. (2001). "Amyloid beta peptide processing, insulin degrading enzyme, and butyrylcholinesterase", *Neurochemical. Research.*, 26(4), 453-456.
- Choi, KI., Nam, G., Kim, HR., Rhim, H., Seo, SH., Kim, YJ., Shin, HS., Kim, DJ., Pae, AN., Chung, HJ., Cho, YS., Choo, H., Roh, EJ., Kang, SB., Shin, KJ., Hahn, HG., Shin, DY., Cheong, CS., Nam, KD., Kang, YK., Lee, J K., Park, WS., Kim, Y., Kim, E-K., Kim, K-S., Chung, H., Keum, GC., Lee, C., Choi, KH. (2009). *Preparation of imidazolylalkylcarbonyl derivatives as calcium channel modulators*. U.S. Appl. Publ. Patent no. 20090325979, Dec 2009.
- Dvir, H., Wong, DM., Harel, M., Barril, X., Orozco, M., Luque, FJ., Muñoz-Torrero, D., Camps, P., Rosenberry, TL., Silman, I., & Sussman, JL. (2003). 3D structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase complexed with huprine X at 2.1 Å resolution: kinetic and molecular dynamic correlates. *Biochemistry*, 41, 2970-2981.
- Giacobini, E. (2004). "Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives", *Pharmacological Research*, 50, 433-440.
- Haydar, S.N., Ghiron, C., Bettinetti, L., Bothmann, H., Comery, T.A., Dunlop, J., Rosa, S.L., Micco, I., Pollastrini, M., Quinn, J., Roncarati, R., Scali, C., Valacchi, M., Varrone, M., & Zanaletti, R. (2009). SAR and biological evaluation of SEN12333/WAY-317538: Novel alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor agonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(14), 5247-5258.
- Houghton, P.J., Ren, Y., & Howes, M.J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Journal of Natural Products*, 23(2), 181-199.

- Ingkaninan, K., Temkitthawon P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., & Thongnoi, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 261-264.
- Kryger, G., Silman, I., & Sussman, J.L. (1999). Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (*Aricept*®): implication for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, 7(3), 297-307.
- Lim, M.J., Murray, C.A., Tronic, T.A., deKrafft, K.E., Ley, A.N., deButts, O.C., Pike, R.D., Lu, H., & Patterson, H.H. (2008). Copper (I) cyanide networks: synthesis, structure, and luminescence behavior. part 2. piperazine ligands and hexamethylenetetramine. *Inorganic Chemistry*, 47(15), 6931-6947.
- Lleo, A., Greenberg, S., & Growdon J. (2006). Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annual Reviews Medicine* 57, 513-533.
- Maras, N., Polanc, S., & Kocevar, M. (2012). Reproducibility across microwave instruments: Preparation of a set of 24 compounds on a multiwell plate under temperature-controlled conditions. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10(6), 1300-1310.
- Munoz-Torrero, D., & Camps P. (2006). Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. *Current Medicinal Chemistry*, 13, 399-422.
- Newington, IM., Wynn, DG., Nairne, RJD., Guilbert, B., Mandal, S., Jinto, J., Varadarajan, S., Rangaswamy, C., Betts, H., Davis, R. (2011). *Piperazine derivatives and radiolabeled analogs as 5HT1A ligands and their preparation and use as imaging agent and in treatment of 5HT1A-associated diseases*. PCT Int. Appl. Patent no. 2011150183, Dec 2011
- Piazzzi, L., Rampa, A., Bisi, A., Gobbi, S., Belluti, F., Cavalli, A., Bartolini, M., Andrisano, V., Valenti, P., & Recanatini, M. (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. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 46(12), 2279-2282.

คณะผู้เขียน**นางสาวจิระพร การะ**

นักศึกษาหลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ ภาควิชาเภสัชเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
e-mail: pon5210720005@hotmail.com

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฉัตรชัย วัฒนากิรมย์สกุล

อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
e-mail: chatchai.w@psu.ac.th

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม

อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
e-mail: luelak.l@psu.ac.th