

### บทที่ 3

#### ผลและอภิปรายผลการศึกษา

การสังเคราะห์อนุพันธ์ PABA ในรูปของอนุพันธ์เอไมด์และเอมีนสามารถสังเคราะห์ได้โดยใช้ปฏิกิริยาใช้ปฏิกิริยาอัลคิลเลชันและเอไมด์ฟอร์มชันโดยใช้ THF เป็นตัวทำละลายและเกิดที่อุณหภูมิห้อง ส่วนปฏิกิริยาในการสังเคราะห์กลุ่มอิมไมด์นั้นได้ทำตามขั้นตอนของ Jose Correa-Basurto และคณะ โดยทำการปฏิกิริยาภายใต้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส หลังจากทำการสังเคราะห์แล้วทำการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีการสกัด คอลัมน์โครมาโตกราฟี และการตกผลึก จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารโดยใช้เครื่อง  $^1\text{H-NMR}$  (ดังแสดงในตารางที่ 3-1) พร้อมทั้งคำนวณหา % yield และหาจุดหลอมเหลวของสาร (ดังแสดงในตารางที่ 3-2)

ตารางที่ 3-1 แสดงผลการผล  $^1\text{H-NMR}$  spectrum

1a		1b		2a	
Node	Shift	Node	Shift	Node	Shift
NH	10.3	CH <sub>2</sub>	2.79	OH	12.8
CH	7.6	CH <sub>2</sub>	2.79	NH	10.7
CH	7.8	CH	7.39	CH	7.7
CH	7.6	CH	8.03	CH	7.9
CH	7.8	CH	7.39	CH	7.7
CH <sub>2</sub>	2.59	CH	8.03	CH	7.9
CH <sub>2</sub>	2.53			H	6.3
				H	6.4

ตารางที่ 3-1 แสดงผลการผล  $^1\text{H}$  NMR spectrum (ต่อ)

2b		3a		3b	
Node	Shift	Node	Shift	Node	Shift
CH	7.6	OH	13.29	CH	7.5
CH	7.9	OH	13.0	CH	7.5
CH	7.6	NH	11.0	CH	7.7
CH	7.9	CH	7.8	CH	7.7
H	5.9	CH	7.7	CH	7.8
H	6.3	CH	7.6	CH	7.8
		CH	7.6	CH	8.0
		CH	7.5	CH	8.0
		CH	7.5		
		CH	7.9		
		CH	7.9		
4a		5a		6a	
Node	Shift	Node	Shift	Node	Shift
OH	12.7	CH	6.7	NH	7.4
NH	10.2	CH	7.7	CH3	6.0
CH	7.6	CH	6.7	H	2.3
CH	7.8	CH	7.7	H	2.3
CH	7.6	CH3	3.7		
CH	7.8	CH3	3.7		
CH3	2.0	CH3	3.7		

ตารางที่ 3-2 แสดง %yield และจุดหลอมเหลวของสาร

Compounds	% yield	Melting point (°C)
1a	86.63	> 220
1b	53.73	> 220
2a	61.45	217 – 218
2b	81.25	217
3a	89.20	> 220
3b	79.92	> 220
4a	38.29	> 220
5a	56.09	98 - 100
6a	10.41	123 - 124

จากนั้นสารที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง AChE โดยใช้วิธีที่มีการประยุกต์มาจากวิธีของ Ellman อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่าสารกลุ่มอนุพันธ์ของพABA ที่สังเคราะห์ได้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง AChE โดยมีร้อยละในการยับยั้ง AChE อยู่ในช่วง 17.07-42.8% และ 3.18-16.3% ที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  M ตามลำดับ ส่วนสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ ได้แก่ *p*-aminobenzoic acid, phthalate anhydride, succinic anhydride และ maleic anhydride มีความสามารถในการยับยั้ง AChE เท่ากับ 0% ที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  M (ตารางที่ 3-3) จะเห็นได้ว่าค่าในการยับยั้ง AChE มีค่าค่อนข้างต่ำต่างไปจากการศึกษาของ Jose Correa-Basurto และคณะ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีที่ใช้ในการทดสอบมีการใช้ AChE จาก Electric eel (*EeAChE*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างออกไป ทำให้ฤทธิ์ต่ออนุพันธ์ของพABA ต่ำ ด้วยสมมติฐานข้างต้น ผู้ทำการวิจัยจึงได้ทำการทดสอบกับ AChE จากมนุษย์ (*HuAChE*) เพื่อศึกษาถึงผลของความแตกต่างของสายพันธุ์ของ AChE ที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ PABA พบว่า ร้อยละในการยับยั้ง *EeAChE* และ *HuAChE* ที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  มีความแตกต่างกันประมาณ 0.12 – 19.94% (ตารางที่ 3-4) ผลการทดลองที่ได้ยังคงมีความแตกต่างจากที่มีการรายงานไว้ ดังนั้นผลของสายพันธุ์ไม่น่าจะเป็นปัจจัยรบกวนที่สำคัญต่อการออกฤทธิ์ เนื่องจากบริเวณ active site มีความคล้ายคลึงกัน (high identity)



ตารางที่ 3-3 แสดง % inhibition ของสารที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  M และ  $10^{-4}$  M

Compound	% Inhibition $10^{-3}$ M	% Inhibition $10^{-4}$ M
1a	29.70	9.00
1b	26.09	8.82
2a	26.34	4.36
2b	22.01	9.83
3a	24.73	3.18
3b	17.07	5.09
4a	28.64	6.18
5a	31.98	16.3
6a	42.8	ND
7a	ND	ND
PABA	0	ND
Phthalate anhydride	0	ND
Succinic anhydride	0	ND
Maleic anhydride	0	ND

ND = not determined

ตารางที่ 3-4 แสดงการเปรียบเทียบผลในการยับยั้งของสารต่อเอนไซม์ AChE ต่างชนิดกัน

ที่ความเข้มข้น  $10^{-4}$  M

Compound	% Inhibition $10^{-4}$ M EeAChE	% Inhibition $10^{-4}$ M HuAChE
2a	26.34	33.09
2b	22.02	21.90
3a	24.77	28.90
3b	17.07	37.01
7a	ND	41.58

นอกจากนี้รายงานของ Jose Correa-Basurto และคณะ ได้กล่าวว่าฤทธิ์ในการยับยั้งของสารในกลุ่มนี้มีความไวต่อชนิดของบัฟเฟอร์ และความเป็นกรด-ด่างในการทดลองสูงซึ่ง pH ของ buffer ที่เหมาะสมในการนำมาทดสอบฤทธิ์ของสารในกลุ่มนี้คือ pH 9 จากข้างมูลข้างต้นผู้ทำการศึกษาจึงได้ทำศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งของอนุพันธ์พาทาโดยใช้ pH ของ buffer เป็น 8 และ 9 พบว่าการใช้ pH buffer 9 สารมีความสามารถในการยับยั้ง AChE ไม่แตกต่างจากการใช้ buffer pH 8 มากนักโดยให้ผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างกันประมาณ 2.33-9.23% ดังแสดงในตารางที่ 3-5 ดังนั้น ผลของ pH buffer นั้นอาจจะยังไม่ใช่ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ในการทดลองนี้

อีกปัจจัยหนึ่งที่น่าสนใจคือผลต่อการที่สารมีผลในการยับยั้ง AChE ต่ำ คือความสามารถในการละลายของสารทดสอบในตัวทำละลายที่ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง AChE ด้วยวิธีที่ประยุกต์จากวิธีของ Ellman นั้นใช้ methanol เป็น co-solvent กับบัฟเฟอร์ซึ่งสารอนุพันธ์ PABA มีความสามารถในการละลายใน methanol ได้น้อย ซึ่งการละลายของสารอาจมีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงได้ทำการศึกษาถึงผลของ co-solvent ที่ใช้ต่อความสามารถในการยับยั้ง AChE โดยทำการเปลี่ยนแปลง co-solvent จาก methanol เป็น DMSO ซึ่งสามารถละลายสารอนุพันธ์ PABA ได้ดี พบว่า ผลการทดลองแตกต่างกันอย่างชัดเจนโดยมีร้อยละในการยับยั้ง AChE ที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  M ดีกว่า methanol อยู่ในช่วง 19.53- 48.25% (ตารางที่ 3-6) อย่างไรก็ตาม DMSO เป็นตัวทำละลายที่มีผลทำให้เกิด false positive ได้สูงและในการทดลองนี้ได้ทำการเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวทำละลายเพียงชนิดเดียวแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการละลายของสารมีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มอนุพันธ์ของพาบามา นอกจากนี้แล้วอาจจะมียุปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มนี้อีกหลายปัจจัย ดังนั้นวิธีการทดสอบฤทธิ์ที่เหมาะสมของสารในกลุ่มอนุพันธ์ของพาบามา ยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สำหรับการศึกษถึงความสัมพันธ์ระหว่างอนุพันธ์ของพาบามาต่อฤทธิ์ในการยับยั้ง AChE ผู้ทำการวิจัยไม่สามารถสรุปข้อมูลได้ชัดเจนเนื่องจากวิธีการทดสอบฤทธิ์ยังคงต้องการปรับเปลี่ยนให้เหมาะสม แต่อาจกล่าวได้ว่าการเติมหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่ ณ ตำแหน่งเอมีนของพาบามาจะได้สารที่ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้นกว่าสารตั้งต้น จากข้อมูลที่แสดงไว้ในตารางที่ 3-3

ตารางที่ 3-5 แสดงการเปรียบเทียบผลของ buffer pH 8.0 และ pH 9.0 ที่ความเข้มข้น  $10^{-4}$  M ต่อการยับยั้ง เอ็นไซม์ AChE

Compound	% Inhibition at $10^{-4}$ M buffer pH 8.0	% Inhibition at $10^{-4}$ M buffer pH 9.0
1a	9.00	18.99
1b	8.82	14.11
2a	4.36	13.59
2b	9.83	12.16
3a	3.18	ND
3b	5.09	ND
4a	6.18	ND
5a	16.3	ND
6a	ND	ND
7a	ND	12.53

ตารางที่ 3-6 แสดงการเปรียบเทียบผลในการยับยั้งของสารต่อเอนไซม์ AChE โดยใช้ co-solvent ต่างชนิดกัน (methanol, DMSO) ที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  M

Compound	% Inhibition at $10^{-3}$ M	
	Methanol	DMSO
1a-meta	ND	57.76
1a	29.70	65.01
1b	26.09	61.25
2a	26.34	60.14
2b	22.01	59.89
3a	24.73	64.81
3b	17.07	65.32
4a	28.64	68.74
5a	31.98	62.52
6a	42.80	62.33
PABA	0	ND
Phthalate anhydride	0	ND
Succinic anhydride	0	ND
Maleic anhydride	0	ND