รายงานการวิจัย

เรื่อง

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของคาร์เพสเตอรอลและฤทธิ์ยับยั้งไลเพส

(Synthesis of derivatives of carpesterol and theirs lipase inhibitory activity)

จัดทำโดย

อาจารย์ ดร. จรรยา ชัยเจริญพงศ์

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มีนาคม 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2555 และ 2556

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณวาทินี จันมี สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพบางส่วน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม สำหรับการการวิเคราะห์โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ในงานวิจัยนี้

บทคัดย่อ

อนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอรอล (**13-15**) ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิที่ตำแหน่ง C22 ไปเป็นหมู่ acetyl (**13**) หมู่ benzyl (**14**) และหมู่ benzoyl (**15**) สารเหล่านี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งไลเพสด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพส เท่ากับ 72.60 ± 5.9%, 87.82 ± 3.00% และ 81.26 ± 3.64% ตามลำดับที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml ขณะที่สารคาร์เพสเตอรอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งไลเพสด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพส เท่ากับ 62.3 ± 6.2% ที่ความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้ยังทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของสารที่มีโครงสร้างหลักคล้ายคาร์เพสเตอรอล ได้แก่ stigmasterol, β-sitosterol, campesterol และ cholesterol พบว่าสารทั้งสี่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพสน้อยกว่าสารคาร์เพสเตอรอล อนุพันธ์ของ stigmasterol and cholesterol ถูกสังเคราะห์โดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิที่ตำแหน่ง C3 เป็นหมู่ acetyl (**7** และ **10**), หมู่ benzyl (**8** และ **11**) และหมู่ benzoyl (**9** และ 12) ตามลำดับ อนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด **7-1**2 แสดงฤทธิ์ยับยั้งไลเพสที่มากกว่าสาร stigmasterol และ cholesterol การแทนที่ด้วยหมู่ acetyl หมู่ benzyl และหมู่ benzoyl ที่ตำแหน่ง C3 และ C22 ทำให้สารมีความสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเพสได้สูงขึ้น

Abstract

Derivatives of carpesterol (**13-15**) were synthesized by converting hydroxyl group at C22 to acetyl group (**13**), benzyl group (**14**) and benzoyl group (**15**). They exhibited lipase inhibition activity with %inhibition of lipase as 72.60 ± 5.9%, 87.82 ± 3.00% and 81.26 ± 3.64%, respectively at concentration of 1.25 mg/ml while %inhibition of lipase of carpesterol was 62.3 ± 6.2% at same concentration. Moreover, stigmasterol, β-sitosterol, campesterol and cholesterol were also evaluated for this activity, but they showed weaker lipase inhibition activity than carpesterol. Derivatives of stigmasterol and cholesterol were synthesized by converting hydroxyl group at C3 to acetyl group (**7** and **10**), benzyl group (**8** and **11**), and benzoyl group (**9** and 1**2**), respectivily. All synthesized compounds **7-12** exhibited stronger lipase inhibition activity than stigmasterol and cholesterol. Substitution of acetyl group, benzyl group and benzoyl group on C3 and C22 had ability to induce lipase inhibition activity of studied compounds.

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ช
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
ขอบเขตของโครงการวิจัย	1
ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	1
วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
วิธีดำเนินการวิจัย	6
สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย	6
วิธีการดำเนินการวิจัย	7
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	8
สรุปและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยในขั้นต่อไป	17
บรรณานุกรม	18
ภาคผนวก	19
ประวัติผู้วิจัย	22

สารบัญตาราง

ตารางที่	ชื่อตาราง	หน้า
1	ความสัมพันธ์ของค่าดัชนีมวลกายและความเสี่ยงต่อการเกิดการเจ็บป่วย	2
2	ลักษณะและปริมาณของสารสกัดเอทิลแอซิเตตที่แยกได้	9
3	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพสของสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml	10
4	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพสของอนุพันธ์ของสาร stigmasterol และ cholesterol ที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml	14
5	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพสของอนุพันธ์ของสาร carpesterol ที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml	16

สารบัญรูป

รูปที่	ชื่อรูป	หน้า
1	การย่อยสลายไทรเอซิลกลีเซอรอลด้วยเอนไซม์แพนครีเอทิคไลเพส	3
2	โครงสร้างของออร์ลิสแทต (1-(3-hexyl-4-oxo-oxetan-2-yl) tridecan-2-yl-2-formylamino-4-methyl-pentanoate)	4
3	ลักษณะของต้นและผลมะอึก	5
4	โครงสร้างของคาร์เพสเตอรอล	5
5	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพาราไนโทรฟีนิลปาล์มิเทตและแพนครีเอทิคไลเพส	7
6	สูตรโครงสร้างของสารที่ทดสอบ	9
7	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร stigmasterol (**7**)	10
8	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร stigmasterol (**8**)	11
9	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร stigmasterol (**9**)	11
10	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร cholesterol (**10**)	12
11	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร cholesterol (**11**)	12
12	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร cholesterol (**12**)	13
13	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร carpesterol (**13**)	14
14	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร carpesterol (**14**)	15
15	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร carpesterol (**15**)	15
16	อนุพันธ์ของสาร carpesterol ที่ตำแหน่ง C6	17
17	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **13**	19
18	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **14**	20
19	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **15**	21

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

AcCl	acetyl chloride
BMI	body mass index
BnBr	benzyl bromide
Bz_2O	benzoic anhydride
CH_2Cl_2	dichloromethane
DMAP	pyridine triethylamine
Et_3N	triethylamine
H_2O	น้ำ
HCl	hydrochloric acid
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration (amount of a compound to inhibit biological or biochemical function)
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
mmol	มิลลิโมล
na	no activity
THF	tetrahydrofuran

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคอ้วนจัดเป็นปัญหาหลักทางสาธารณสุขที่พบมากขึ้นในยุคปัจจุบัน คนไทยมีปัญหาเกี่ยวกับโรคอ้วนเนื่องจากพฤติกรรมการบริโภคที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะการนิยมบริโภคอาหารประเภทที่มีแป้ง น้ำตาล และไขมันสูง ทำให้มีน้ำหนักตัวและไขมันสะสมในร่างกายเพิ่มขึ้น การมีน้ำหนักตัวมากเกินไปส่งผลโดยตรงต่อบุคลิกภายนอกและก่อให้เกิดโรคภัยต่างๆ ตามมา ภาวะแทรกซ้อนของโรคอ้วนที่พบได้บ่อย ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด โรคเกี่ยวกับถุงน้ำดี โรคมะเร็งบางชนิด โรคกระดูกเสื่อม โรคเกี่ยวกับตับ เป็นต้น ยาลดความอ้วนที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ ยาออร์ลิสแทต (orlistat) ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเพส ทำให้ไขมันถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายน้อยลง ร่างกายจึงนำไขมันที่เก็บสะสมไว้ออกมาใช้ ส่งผลให้ความอ้วนลดลงได้ แต่ยาออร์ลิสแทตนี้ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ ปัจจุบันยาชนิดนี้มีการควบคุมการใช้เฉพาะในสถานพยาบาลเท่านั้น และยังคงติดตามผลการใช้ยาอยู่ จากรายงานการวิจัยการยับยั้งไลเพสของผลมะอึก พบสารคาร์เพสเตอรอลในผลมะอึกมีฤทธิ์ยับยั้งไลเพส ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 56.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานยาออร์ลิสแทต ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0035 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร งานวิจัยนี้มีแนวความคิดที่จะศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของอนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอรอล โดยการเปลี่ยนหมู่ทำหน้าที่ในสารคาร์เพสเตอรอลและทดสอบความสามารถในการยับยั้งไลเพสอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ เพื่อเปรียบเทียบว่าสามารถยับยั้งไลเพสได้มากกว่าหรือน้อยกว่าสารคาร์เพสเตอรอล ซึ่งจะทำให้ทราบความสัมพันธ์ของหมู่ทำหน้าที่ต่อผลการยับยั้งไลเพสได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) สังเคราะห์อนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอรอล
2) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

สังเคราะห์อนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอรอลโดยเปลี่ยนหมู่ทำหน้าที่ และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมา

ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โรคอ้วนเป็นโรคที่เกิดจากการเสียสมดุลย์ของพลังงานของร่างกาย ผู้ป่วยโรคอ้วนมีลักษณะสำคัญ คือ มีไขมันทั่วร่างกายมากกว่าปกติ สาเหตุของโรคอ้วน ได้แก่ กรรมพันธุ์ โรคของต่อมไร้ท่อ การรับประทานอาหารที่มีแป้งและไขมันมาก การขาดการออกกำลังกาย และการใช้ยาบางชนิดติดต่อกันเป็นเวลานาน โรคอ้วนเป็นสาเหตุของปัญหามากมาย และบางครั้งอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ โรคแทรกซ้อน

ของความอ้วนที่พบบ่อย ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด โรคเกี่ยวกับถุงน้ำดี โรคมะเร็งบางชนิด โรคกระดูกเสื่อม โรคเกี่ยวกับตับ เป็นต้น องค์การอนามัยโลกกำหนดมาตรฐานที่เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าบุคคลอยู่ในภาวะอ้วนหรือไม่ โดยใช้ค่าดัชนีมวลกาย (Body mass index, BMI) ซึ่งคำนวณจากน้ำหนักตัวและส่วนสูง ค่าดัชนีมวลกายในระดับต่างๆ แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงต่อการเกิดการเจ็บป่วย แสดงดังตารางที่ 1

$$\text{ดัชนีมวลกาย} = \frac{\text{น้ำหนักตัว หน่วยกิโลกรัม}}{(\text{ส่วนสูง หน่วยเมตร})^2}$$

* หมายเหตุ การคำนวณวิธีนี้ไม่ใช้กับเด็กที่กำลังเจริญเติบโต สตรีมีครรภ์ และนักกีฬา

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ของค่าดัชนีมวลกายและความเสี่ยงต่อการเกิดการเจ็บป่วย

ประเภท	ดัชนีมวลกาย	ความเสี่ยงต่อการเกิดการเจ็บป่วย
น้ำหนักตัวต่ำกว่าเกณฑ์	น้อยกว่า 18.5	ต่ำ (เสี่ยงต่อภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ)
น้ำหนักตัวปกติ	18.5 – 24.9	ปกติ
น้ำหนักตัวเกิน	25 – 29.9	เพิ่มกว่าปกติ
โรคอ้วนขั้นที่ 1	30 – 34.9	เพิ่มขึ้นอย่างมาก
โรคอ้วนขั้นที่ 2	35 – 39.9	ต่ำ (เสี่ยงต่อภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ)
โรคอ้วนขั้นที่ 3	40 ขึ้นไป	เพิ่มขึ้นถึงขั้นรุนแรง

จากตารางข้างต้นจะพบว่าผู้ที่มีน้ำหนักตัวเกิน (ค่า BMI มากกว่า 25) และผู้ที่เป็นโรคอ้วน (ค่า BMI มากกว่า 30) จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดการเจ็บป่วยอย่างมาก หรือกล่าวได้ว่าการมีน้ำหนักตัวเกินหรืออ้วนมีผลต่อระบบการทำงานในร่างกาย ก่อให้เกิดโรคหลายชนิด อัตราการเสียชีวิตของคนที่อ้วนมากมีสูงถึง 2-12 เท่า ขึ้นอยู่กับอายุของแต่ละบุคคล

วิธีการรักษาโรคอ้วนที่ดีต้องมีการผสมผสานการรักษาหลายวิธีร่วมกัน คือ การควบคุมอาหาร การออกกำลังกาย การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมที่ไม่เหมาะสม ส่วนการรักษาโดยใช้ยานั้นต้องใช้ในกรณีจำเป็นต่อการรักษาโรคอ้วนจริงๆ ซึ่งควรปรึกษาแพทย์และเภสัชกรก่อนจะใช้ยารักษาโรคอ้วน เพราะยาอาจมีผลข้างเคียง โดยเฉพาะต่อผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจ โรคตับ และโรคไต

ยาลดความอ้วน

ยาลดความอ้วนหรือยาลดน้ำหนักแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ตามตำแหน่งการออกฤทธิ์ของยา ได้แก่ ยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ที่สมอง โดยมีผลต่อศูนย์ควบคุมการรับประทานอาหาร หรือความอยากอาหาร และยาที่ออกฤทธิ์ส่วนนอกสมอง ได้แก่ ยาที่ออกฤทธิ์ที่ทางเดินอาหาร ยาลดความอ้วนซึ่งออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางมีจุดประสงค์เพื่อลดความอยากอาหารหรือทำให้เกิดความรู้สึกอิ่ม โดยเป็นผลมาจากการเพิ่มสารเคมีในสมอง คือ catecholamine และ/หรือ serotonin ซึ่งสารเคมีทั้งสองตัวนี้ออกฤทธิ์ควบคุมความอยากอาหารและอารมณ์ ยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ที่สมองนี้แบ่งออกตามฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

ก. กลุ่มที่ออกฤทธิ์ผ่าน catecholamine pathways ได้แก่ amphetermine, phenmetrazine, amfepramone, phetermine, mazindol, cathine และ phenylpropanolamine ซึ่งยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทซิมพาเธติค

ข. กลุ่มที่ออกฤทธิ์ผ่าน serotonin pathways ได้แก่ fenfluramine และ dexfenfluramine ซึ่งยาในกลุ่มนี้ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทซิมพาเธติค

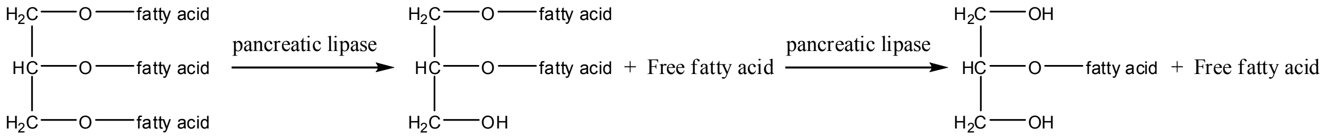
สำหรับยาที่ออกฤทธิ์ที่ทางเดินอาหาร แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

ก. สารที่พองตัวในกระเพาะอาหาร (bulk forming agents) เป็นสารที่ไม่ถูกย่อยสลายให้เป็นพลังงาน ทำให้อิ่มแต่ไม่ให้พลังงาน เช่น glucomannan ซึ่งเป็นแป้งที่เป็นเส้นใยธรรมชาติสกัดจากหัวบุกบางชนิด

ข. สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเพส (pancreatic lipase inhibitors) เช่น orlistat ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเพสจากตับอ่อนซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยไขมันให้อยู่ในรูปที่ร่างกายนำไปใช้ได้

ไลเพส

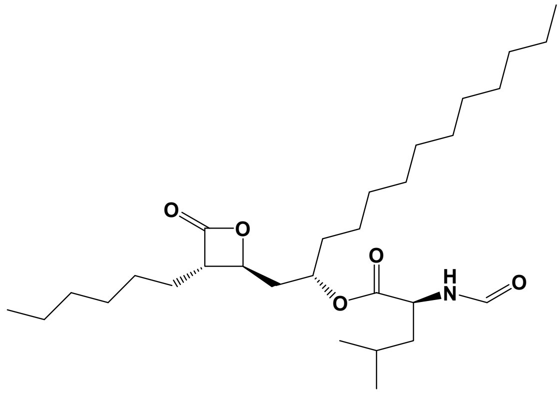
ไลเพส (acylglycerol acylhydrolase, EC3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายของน้ำมันและไขมันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล นอกจากนี้ไลเพสยังเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับในระบบที่มีน้ำน้อยหรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย เอนไซม์นี้สกัดได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย) เอนไซม์ชนิดนี้ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง น้ำยาซักล้าง เชื้อเพลิงชีวภาพ อาหาร เครื่องสำอาง และยา ไลเพสมีหลายชนิด เช่น pancreatic lipase, lipoprotein lipase, hormone sensitive lipase เป็นต้น ในร่างกายมนุษย์มีเอนไซม์ไลเพสที่ผลิตจากตับอ่อน ทำหน้าที่ย่อยสลายไทรเอซิลกลีเซอรอล โดยสลายพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมกรดไขมันกับกลีเซอรอลตรงตำแหน่งที่ 3 และตำแหน่งที่ 1 ตามลำดับ ได้กรดไขมันอิสระ (free fatty acids) 1,2-diacylglycerols และ 2-acylglycerols ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยกรดไขมันอิสระมักอยู่ในรูปของเกลือโซเดียมหรือเกลือโพแทสเซียม



รูปที่ 1 การย่อยสลายไทรเอซิลกลีเซอรอลด้วยเอนไซม์แพนครีเอทิคไลเพส

การยับยั้งการทำงานของไลเพสจะมีผลทำให้ลดการดูดซึมไขมัน และเพิ่มการขับถ่ายของไตรกลีเซอไรด์ในอุจจาระ ทำให้ไขมันในอาหารที่รับประทานเข้าไปไม่ถูกย่อยและไม่สามารถดูดซึมไปใช้ได้ จึงเป็นเหตุให้ร่างกายไม่ได้รับพลังงานจากไขมันเหล่านี้ ออร์ลิสแทต (orlistat) เป็นยาตัวแรกของยาลดความอ้วนในกลุ่มยับยั้งไลเพส หรือเรียกว่า tetrahydrolipstatin มีชื่อทางการค้า คือ Xenical ผลิตโดยบริษัท Roche และมีสูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2 ซึ่งแยกได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces toxytricini* ในปี 1987 โดยปกติอัตราการใช้ยาออร์ลิสแทต คือ วันละ 3 ครั้ง ครั้งละ 120 มิลลิกรัม ก่อนอาหาร กลไกการทำงานของออร์ลิส

แทตคือทำให้ไขมันที่รับประทานเข้าไปประมาณ 1/3 ไม่ถูกดูดซึม และเพิ่มการขับถ่ายของไตรกลีเซอไรด์ในอุจจาระ ทำให้ไขมันในอาหารที่รับประทานเข้าไปไม่ถูกย่อยและไม่สามารถดูดซึมไปใช้ได้ เป็นเหตุให้ร่างกายไม่ได้รับพลังงานจากไขมันเหล่านั้น ร่างกายต้องนำไขมันที่เก็บสะสมไว้ออกมาใช้ จึงทำให้น้ำหนักลดลง อาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ของการใช้ยาที่เด่นชัดเกี่ยวข้องกับการดูดซึมไขมันที่ผิดปกติ (fat malabsorption) ได้แก่ ไม่สามารถกลั้นอุจจาระได้ (faecal urgency) อุจจาระไม่เกาะรวมกัน (loose) มีแก๊สและไขมันขับออกมาด้วย นอกจากนี้ยังอาจมีผลทำให้การดูดซึมวิตามินที่ละลายในไขมันผิดปกติได้ (fat soluble vitamin malabsorption) ฉะนั้นเมื่อใช้ยานี้จึงแนะนำให้รับประทานยาวิตามินรวมอย่างน้อย 2 ชั่วโมงก่อนหรือหลังรับประทานยา ปัจจุบันยาตัวนี้ถูกควบคุมการใช้เฉพาะในสถานพยาบาลเท่านั้น



<u>รูปที่ 2</u> โครงสร้างของออร์ลิสแทต (1-(3-hexyl-4-oxo-oxetan-2-yl) tridecan-2-yl-2-formylamino-4-methyl-pentanoate)

มะอึก

มะอึก หรือทางภาคเหนือเรียกว่า มะเขือปู่ หรือ มะปู่ หรือ มะเขือขน ทางภาคอีสานเรียกว่า หมากอึ หรือทางภาคใต้เรียกว่าลูกอึก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Solanum stramonifolium* Jacq. อยู่ในวงศ์ Solanaceae มะอึกเป็นผักสวนครัวใช้ในการประกอบอาหารได้ทั้งผลอ่อนหรือผลสุก เช่น นำมาทำน้ำพริกมะอึก แกงส้มกับหมูย่าง ใส่ส้มตำหรือแกงเนื้อ เพราะมะอึกให้พลังงาน แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก วิตามินบีหนึ่ง วิตามินบีสอง และวิตามินซีที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย มะอึกเป็นไม้ล้มลุก เป็นพุ่มสูงประมาณ 1-2 เมตร แตกกิ่งก้านสาขาคล้ายกับมะเขือพวง ลำต้นจะมีหนามและขนอ่อนขึ้นทั่วทั้งต้น ใบเดี่ยว รูปไข่กว้าง กว้าง 15-25 เซนติเมตร ยาว 20-30 เซนติเมตร มีสีเขียวหยักเว้าลึกมีหนามแข็งอยู่บนเส้นใบ มีขนทั้งสองด้าน ดอกออกเป็นช่อสีขาว กระจุกที่ซอกใบ กลีบดอกมี 5 กลีบ เกสรเพศผู้สีเหลือง เป็นเส้นรวมเป็นยอดแหลม ผลเป็นทรงกลม ขนาด 1.8-2 เซนติเมตร ผลอ่อนมีสีเขียว ผลสุกมีสีเหลืองอมส้มรสชาติเปรี้ยว ข้างในมีเมล็ดจำนวนมาก มีขนอ่อนขึ้นทั่วผล ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ด มะอึกมีสรรพคุณทางยาหลายอย่าง ดังนี้

ผล : ละลายเสมหะแก้ไอ

ราก : แก้ดีฝ่อ ดีกระตุก ดับพิษร้อนภายใน กัดฟอกเสมหะ กระทุ้งพิษไข้หัวทุกชนิด (อาการไข้ที่ออกตุ่มออกผื่น ตามผิวหนัง เช่น เหือด หีด หัด อีสุกอีใส)

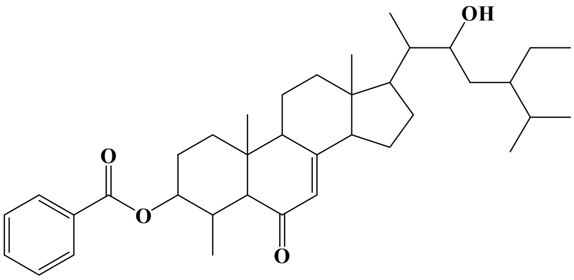
ขน : ของผลมะอึกมาทอดกับไข่ให้เด็กรับประทานเพื่อขับพยาธิได้

ดอก : ช่วยรักษาอาการคัน

เมล็ด - แก้ปวดฟัน (โดยเผาสูดดมควันเข้าไป)

รูปที่ 3 ลักษณะของต้นและผลมะอึก

จากรายงานการวิจัยการยับยั้งไลเพสของผลมะอึก พบสารคาร์เพสเตอรอลในผลมะอึกมีฤทธิ์ยับยั้งไลเพส ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 56.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานยาออร์ลิสแทตที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0035 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4 โครงสร้างของคาร์เพสเตอรอล

กรอบแนวคิดของงานวิจัยนี้คือการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของอนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอรอล โดยการเปลี่ยนหมู่ทำหน้าที่ในสารคาร์เพสเตอรอลและทดสอบว่าอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่นี้มีความสามารถในการยับยั้งไลเพสได้มากหรือน้อยกว่าสารคาร์เพสเตอรอล ซึ่งจะทำให้ทราบความสัมพันธ์ของหมู่ทำหน้าที่ต่อผลการยับยั้งไลเพสได้

วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป

1) สกัดและแยกสารคาร์เพสเตอรอลจากผลมะอึกสำหรับนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุพันธ์
2) สังเคราะห์อนุพันธ์คาร์เพสเตอรอล
3) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของอนุพันธ์คาร์เพสเตอรอล
4) วิเคราะห์ สรุปผล และเขียนรายงานการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

องค์ความรู้ที่จะได้จากงานวิจัยนี้จะทำให้ทราบความสัมพันธ์ของหมู่ทำหน้าที่ต่อฤทธิ์การยับยั้งไลเพส ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับงานวิจัยขั้นประยุกต์ต่อไปสำหรับการนำไปใช้พัฒนายาลดความอ้วน

วิธีการดำเนินการวิจัย

สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย

สารเคมี

1. ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เฮปเทน เฮกเซน เอทิลอะซิเตต เมทานอล เอทานอล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ เตตระไฮโดรฟิวแรน ไดคลอโรมีเทน แอซิโทไนไตรล์
2. เอนไซม์ไลเพส
3. Tris HCl pH 8.5
4. *p*-nitrophenyl palmitate
5. stigmasterol
6. cholesterol
7. β-sitosterol
8. campesterol
9. orlistat
10. acetyl chloride
11. benzyl bromide
12. benzoic anhydride
13. pyridine
14. triethylamine
15. ซิลิกาเจล (no. 7734 E. Merck)
16. มะแว้ง
17. มะอึก

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Silica gel 60 F_{254} E. Merck)
2. เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (vacuum rotary evaporator)
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงยูวี (UV-Vis spectrometer)
4. Nuclear magnetic resonance spectrometer (400 MHz)
5. ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (tissue culture plate 96 well)
6. ออโตปิเปต (autopipette)
7. ตู้อบ (hot air oven)
8. magnetic stirrer
9. เครื่องชั่ง

วิธีการดำเนินการวิจัย

1) ล้างทำความสะอาดผลมะแว้ง ซับให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และบดแบบหยาบหลังอบแห้ง

2) สกัดผลมะแว้งด้วยเมธานอล กรองแยกกากด้วยกระดาษกรอง ระเหยตัวทำละลายออกจากสารละลายที่กรองได้

3) แยกสารสกัดหยาบเมธานอลโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวดูดซับคือซิลิกาเจล (no. 7734 E. Merck) ตัวทำละลายเคลื่อนที่คือสารละลายของเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมธานอล

4) ล้างทำความสะอาดผลมะอึก ซับให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และบดแบบหยาบหลังอบแห้ง

5) สกัดผลมะอึกด้วยเอทิลแอซิเตต กรองแยกกากด้วยกระดาษกรอง ระเหยตัวทำละลายออกจากสารละลายที่กรองได้

6) แยกสารคาร์เพสเตอรอลจากสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวดูดซับคือซิลิกาเจล (no. 7734 E. Merck) ตัวทำละลายเคลื่อนที่คือสารละลายของเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมธานอล

7) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสารคาร์เพสเตอรอลและผลิตขายโดยบริษัทผลิตสารเคมี คือสาร stigmasterol campesterol cholesterol และ β-sitosterol

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพาราไนโทรฟีนิลปาล์มิเทตแสดงดังสมการต่อไปนี้

$$p\text{-Nitrophenyl palmitate} \xrightarrow[\text{Pancreatic lipase}]{H_2O} p\text{-Nitrophenol} + \text{Plamitic acid}$$

<u>รูปที่ 5</u> ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพาราไนโทรฟีนิลปาล์มิเทตและแพนครีเอทิคไลเพส

โดยใช้สารละลายพาราไนโทรฟีนอลที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพาราไนโทรฟีนิลปาล์มิเทตเป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการทำงานของไลเพส

8) สังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร stigmasterol และ cholesterol

9) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของอนุพันธ์ของสาร stigmasterol และ cholesterol ที่สังเคราะห์ได้

10) สังเคราะห์อนุพันธ์ของคาร์เพสเตอรอล

11) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของอนุพันธ์คาร์เพสเตอรอล

12) วิเคราะห์ สรุปผล และเขียนรายงานการวิจัย

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารคาร์เพสเตอรอลจากผลมะแว้ง

1.1) สกัดผลมะแว้งที่อบแห้งแล้ว 5.04 กิโลกรัม ด้วยเมธานอล 6 ลิตร (สกัดซ้ำ 3 ครั้ง) ได้ปริมาณสารสกัดหยาบลักษณะเป็นยางเหนียวสีน้ำตาลดำ 926.74 กรัม คิดเป็น 18.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

1.2) แยกสารสกัดหยาบเมธานอล 47.49 กรัม ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และใช้เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมธานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้สารทั้งหมด 10 แฟรกชั่น สารแฟรกชั่นที่ 4 ที่แยกได้ด้วยการชะของ 20% เอทิลแอซิเตตในเฮกเซนมีสารที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกับสารคาร์เพสเตอรอล จึงนำไปแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีจนได้สารบริสุทธิ์ นำสารนี้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี พบว่าสารนี้ไม่ใช่สารคาร์เพสเตอรอล

1.3) สกัดสารสกัดหยาบเมธานอล 179.96 กรัม ด้วยเอทิลแอซิเตต 200 มิลลิลิตร (สกัดซ้ำ 3 ครั้ง) เนื่องจากสารคาร์เพสเตอรอลละลายได้ดีในตัวทำละลายชนิดนี้ ได้สารสกัดเอทิลแอซิเตต 36.27 กรัม มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล

1.4) แยกสารสกัดเอทิลอะซิเตตด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และใช้เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมธานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้สารทั้งหมด 11 แฟรกชั่น สารที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกับสารคาร์เพสเตอรอลอยู่ในแฟรกชั่นที่ 3 ซึ่งแยกได้จากการชะของ 20% เอทิลแอซิเตตในเฮกเซน นำไปแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีจนได้สารบริสุทธิ์ แล้วนำสารนี้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี พบว่าสารนี้ไม่ใช่สารคาร์เพสเตอรอล

2. ผลการสกัดสารคาร์เพสเตอรอลจากผลมะอึก

2.1) นำผลมะอึกสด 8.51 กิโลกรัม มาบดและอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส ได้ผลมะอึกแห้ง 425.0 กรัม คิดเป็น 4.99 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

2.2) สกัดผลมะอึกที่อบแห้งแล้ว 425.0 กรัม ด้วยเอทิลแอซิเตต 500 มิลลิลิตร (สกัดซ้ำ 3 ครั้ง) ได้ปริมาณสารสกัดหยาบลักษณะเป็นยางเหนียวสีน้ำตาล 55.47 กรัม คิดเป็น 13.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง

2.3) แยกสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตต 55.47 กรัม ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมธานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้สารทั้งหมด 4 แฟรกชั่น ดังแสดงผลในตารางที่ 2 ตรวจสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีพบว่าสารคาร์เพสเตอรอลอยู่ในแฟรกชั่นที่ 2 ซึ่งชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายผสม 50% เอทิลแอซิเตตในเฮกเซน น้ำหนัก 35.01 กรัม คิดเป็น 0.41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของผลมะอึกสด

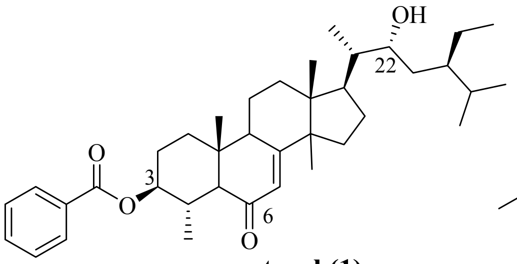
ตารางที่ 2 ลักษณะและปริมาณของสารสกัดเอทิลแอซิเตตที่แยกได้

ลำดับแฟรกชั่น	เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้	ลักษณะสารที่ได้	น้ำหนัก (กรัม)
1	เฮกเซน	ของแข็งสีเหลือง	0.30
2	50% เอทิลแอซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวข้นสีน้ำตาล	35.01
3	เอทิลแอซิเตต	ของเหลวข้นสีน้ำตาลเข้ม	7.72
4	20% เมธานอลในเอทิลแอซิเตต	ยางเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	7.92

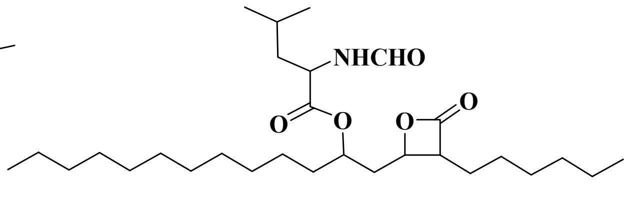
2.4) แยกสารแฟรกชั่นที่ 2 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และใช้เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมธานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้สารทั้งหมด 13 แฟรกชั่น ตรวจสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีพบว่าสารคาร์เพสเตอรอลอยู่ในแฟรกชั่นที่ 4-7 แต่ว่ายังไม่บริสุทธิ์ จึงนำแฟรกชั่นดังกล่าวมาแยกต่อไปอีกจนได้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเดิม สารคาร์เพสเตอรอลบริสุทธิ์ที่ได้หนัก 5.25 กรัม คิดเป็น 9.5% ในปริมาณสารสกัดเอทิลแอซิเตต และคิดเป็น 0.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของผลมะอึกสด

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของสารที่มีโครงสร้างคล้ายสารคาร์เพสเตอรอล

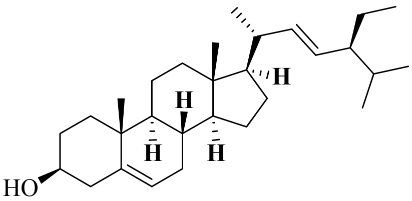
สารที่มีขายในเชิงพาณิชย์และมีโครงสร้างคล้ายสารคาร์เพสเตอรอลที่นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพสเพื่อใช้เป็นแนวทางในการออกแบบหมู่ฟังก์ชันของอนุพันธ์ที่จะสังเคราะห์มี 4 ชนิด คือ stigmasterol, β-sitosterol, campesterol และ cholesterol ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 6 และผลการทดสอบฤทธิ์แสดงในตารางที่ 3



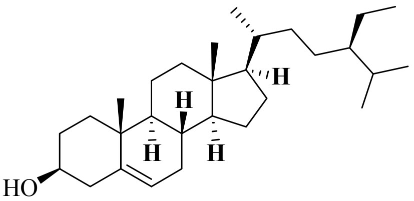
carpesterol (1)



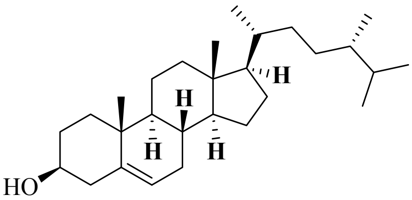
orlistat (2)



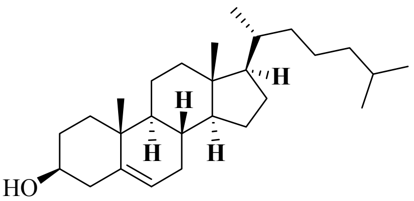
stigmasterol (3)



β-sitosterol (4)



campesterol (5)



cholesterol (6)

รูปที่ 6 สูตรโครงสร้างของสารที่ทดสอบ

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพสของสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml

ชนิดสาร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพส
Carpesterol (**1**)	62.3 ± 6.2
Orlistat (**2**)*	94.37 ± 0.81
Stigmasterol (**3**)	5.63 ± 0.19
β-Sitosterol (**4**)	na**
Campesterol (**5**)	20.56 ± 1.97
Cholesterol (**6**)	25.06 ± 0.52

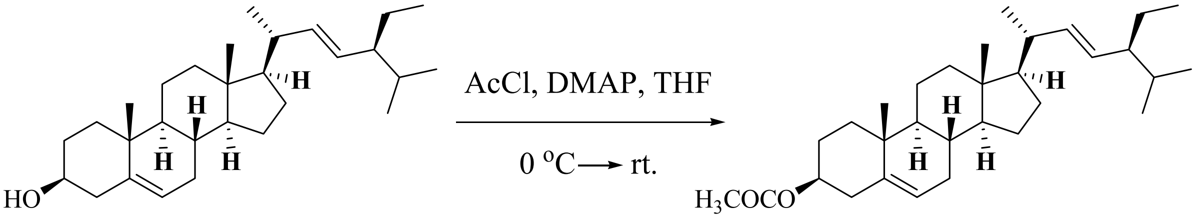
หมายเหตุ * ความเข้มข้น $1x10^{-5}$ mg/ml

** na หมายถึง no activity

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพสในตารางที่ 3 สารทั้งสี่ชนิดที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบทั้ง stigmasterol, β-sitosterol, campesterol และ cholesterol มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพสต่ำกว่าสารคาร์เพสเตอรอล เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของสูตรโครงสร้างของสารทั้งหมด พบว่าสารทั้ง 4 ชนิดมีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C3 แต่ที่ตำแหน่งนี้ของสารคาร์เพสเตอรอลมีหมู่ benzoyl ต่ออยู่ ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าหมู่ไฮดรอกซีและสภาพความมีขั้วต่ำกว่า จึงสันนิษฐานว่าหมู่แทนที่ benzoyl ของตำแหน่ง C3 มีอิทธิพลต่อฤทธิ์การยับยั้งไลเพสที่สูงขึ้น นอกจากนี้ที่ตำแหน่ง C6 หรือวง B ของโครงสร้างหลักของสารสเตียรอยด์ และ C22 ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างกัน อาจมีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งไลเพส ดังนั้นผู้วิจัยได้วางแผนที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของ stigmasterol และ cholesterol เนื่องจากสารทั้งสองชนิดมีราคาไม่สูงมากนักสามารถซื้อหาได้

4. ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร stigmasterol และ cholesterol

4.1 ผลการสังเคราะห์สาร (3*S*,8*S*,9**S**,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-((2*R*,5*S*,*E*)-5-ethyl-6-methylhept-3-en-2-yl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-yl acetate (**7**)



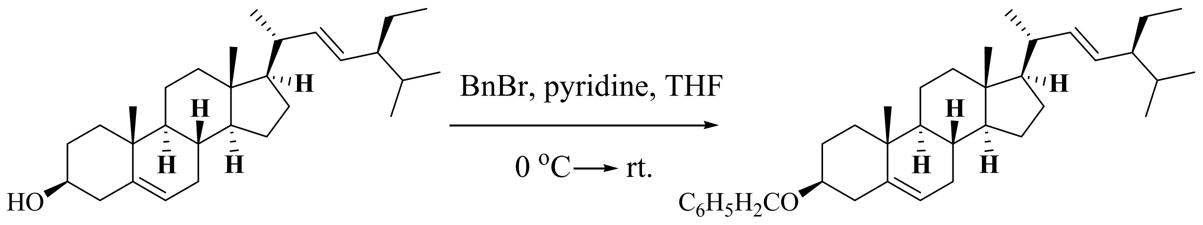
stigmasterol (3) (**7**)

รูปที่ 7 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร stigmasterol (**7**)

สาร stigmasterol 53.8 mg (0.1304 mmol) ละลายในเตตระไฮโดรฟิวแรน (THF) 2 ml เติมสาร pyridine triethylamine (DMAP) 19.1 mg และสาร acetyl chloride (AcCl) 12 μl ทำปฏิกิริยาที่ 0 องศา

เซลเซียสและปรับเป็นอุณหภูมิห้องหลังเริ่มปฏิกิริยา 20 นาที หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด แยกสารทั้งหมดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และชะด้วยสารละลายผสมของเฮปเทน เฮกเซน และเอทิลแอซิเตต ตามลำดับ ได้สาร **7** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 17.4 mg (0.0383 mmol, 29.4%)

4.2 ผลการสังเคราะห์สาร (3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-3-(benzyloxy)-17-((2*R*,5*S*,*E*)-5-ethyl-6-methylhept-3-en-2-yl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthrene (**8**)

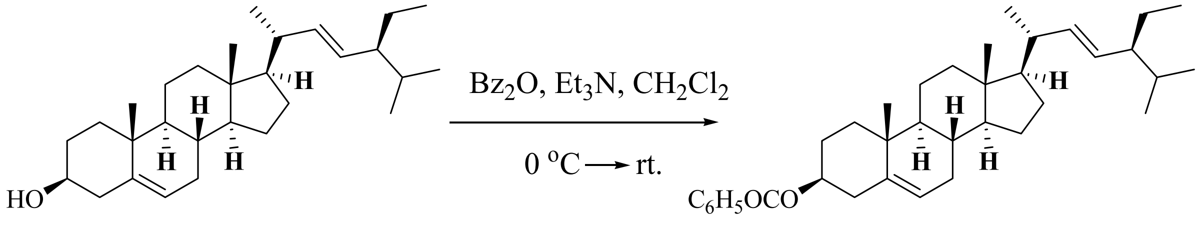


stigmasterol (3) **(8)**

<u>รูปที่ 8</u> ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร stigmasterol (**8**)

สาร stigmasterol 109.4 mg (0.2651 mmol) ละลายในเตตระไฮโดรฟิวแรน (THF) 3 ml เติมสาร pyridine 24 μl และสาร benzyl bromide (BnBr) 24 μl ทำปฏิกิริยาที่ 0 องศาเซลเซียส และปรับเป็นอุณหภูมิห้องหลังเริ่มปฏิกิริยา 20 นาที หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด แยกสารทั้งหมดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และชะด้วยสารละลายผสมของเฮปเทน เฮกเซน และเอทิลแอซิเตต ตามลำดับ ได้สาร **8** เป็นของแข็งสีขาว 22.9 mg (0.0456 mmol, 17.2%)

4.3 ผลการสังเคราะห์สาร (3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-((2*R*,5*S*,*E*)-5-ethyl-6-methylhept-3-en-2-yl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-yl benzoate (**9**)



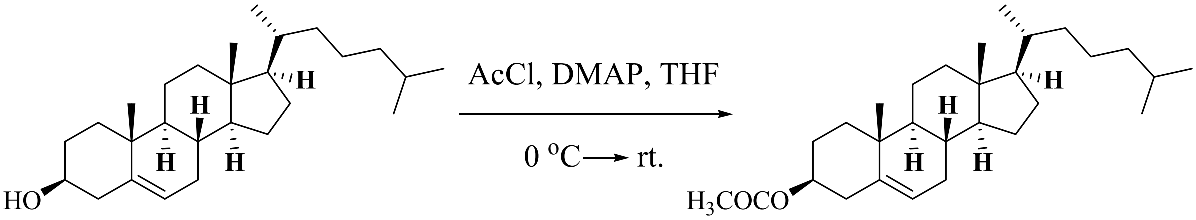
stigmasterol (3) **(9)**

<u>รูปที่ 9</u> ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร stigmasterol (**9**)

สาร stigmasterol 113.9 mg (0.2760 mmol) ละลายในไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) 3 ml เติมสาร triethylamine (Et_3N) 115 μl และสาร benzoic anhydride (Bz_2O) 158 mg ทำปฏิกิริยาที่ 0 องศาเซลเซียส และ

ปรับเป็นอุณหภูมิห้องหลังเริ่มปฏิกิริยา 20 นาที หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด แยกสารทั้งหมดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และชะด้วยสารละลายผสมของเฮปเทน เฮกเซน และเอทิลแอซิเตต ตามลำดับ ได้สาร **9** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 52.5 mg (0.1017 mmol, 36.8%)

4.4 ผลการสังเคราะห์สาร (3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-10,13-dimethyl-17-((*R*)-6-methylheptan-2-yl)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-yl acetate (**10**)

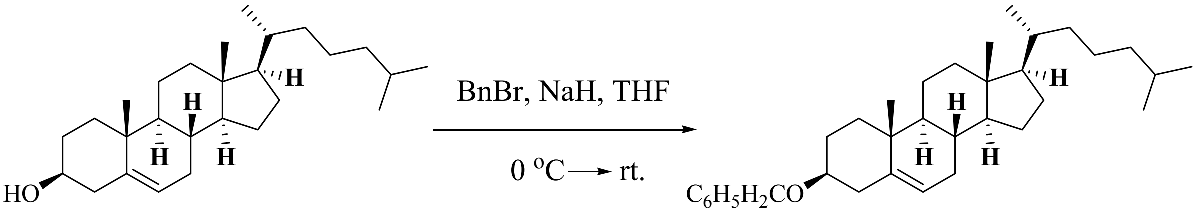


cholesterol (6) **(10)**

รูปที่ 10 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร cholesterol (**10**)

สาร cholesterol 57.0 mg (0.1474 mmol) ละลายในเตตระไฮโดรฟิวแรน (THF) 2 ml เติมสาร pyridine triethylamine (DMAP) 37.9 mg และสาร acetyl chloride (AcCl) 22 μl ทำปฏิกิริยาที่ 0 องศาเซลเซียสและปรับเป็นอุณหภูมิห้องหลังเริ่มปฏิกิริยา 20 นาที หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด แยกสารทั้งหมดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และชะด้วยสารละลายผสมของเฮปเทน เฮกเซน และเอทิลแอซิเตต ตามลำดับ ได้สาร **10** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 13.0 mg (0.0304 mmol, 20.6%)

4.5 ผลการสังเคราะห์สาร (3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)- 3-(benzyloxy)-10,13-dimethyl-17-((*R*)-6-methylheptan-2-yl)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthrene (**11**)



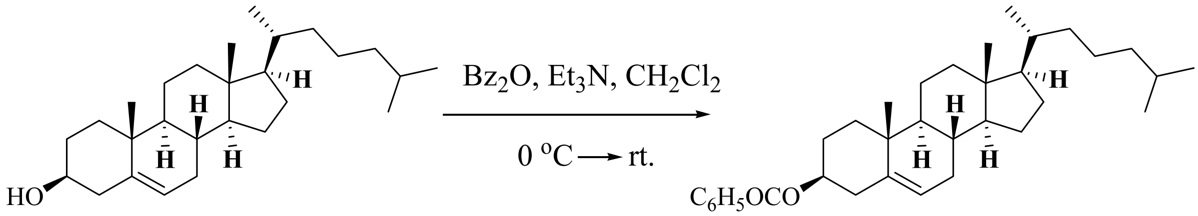
cholesterol (6) **(11)**

รูปที่ 11 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร cholesterol (**11**)

สาร cholesterol 133.6 mg (0.3455 mmol) ละลายในเตตระไฮโดรฟิวแรน (THF) 4 ml เติมสาร pyridine 31 μl และสาร benzyl bromide (BnBr) 49 μl ทำปฏิกิริยาที่ 0 องศาเซลเซียส และปรับเป็นอุณหภูมิห้องหลังเริ่มปฏิกิริยา 20 นาที หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด แยกสารทั้งหมดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรก

ราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และชะด้วยสารละลายผสมของเฮปเทน เฮกเซน และเอทิลแอซิเตต ตามลำดับ ได้สาร **11** เป็นของแข็งสีขาว 12.8 mg (0.0269 mmol, 7.8%)

4.6 ผลการสังเคราะห์สาร (3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-10,13-dimethyl-17-((*R*)-6-methylheptan-2-yl)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-yl benzoate (**12**)



cholesterol (6) **(12)**

<u>รูปที่ 12</u> ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร cholesterol (**12**)

สาร cholesterol 99.3 mg (0.2568 mmol) ละลายในไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) 3 ml เติมสาร triethylamine (Et_3N) 107 μl และสาร benzoic anhydride (Bz_2O) 142.7 mg ทำปฏิกิริยาที่ 0 องศาเซลเซียส และปรับเป็นอุณหภูมิห้องหลังเริ่มปฏิกิริยา 20 นาที หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด แยกสารทั้งหมดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และชะด้วยสารละลายผสมของเฮปเทน เฮกเซน และเอทิลแอซิเตต ตามลำดับ ได้สาร **12** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 27 mg (0.0550 mmol, 21.4%)

5. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของอนุพันธ์ของสาร stigmasterol และ cholesterol (**7-12**)

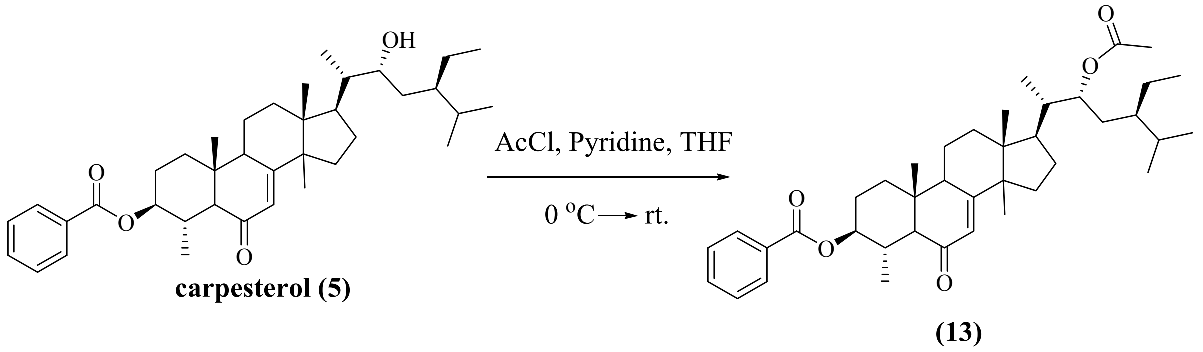
อนุพันธ์ทั้งสามตัวที่สังเคราะห์ขึ้นมาของสาร stigmasterol คือสาร **7-9** แสดงผลการยับยั้งไลเพสที่ 14.43 ± 4.92, 16.48 ± 5.54 และ 17.79 ± 1.01% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่าสาร stigmasterol ที่มีค่าการยับยั้งที่ 5.63 ± 0.19% ส่วนอนุพันธ์ของสาร cholesterol ที่สังเคราะห์ขึ้นมาสามตัวคือสาร **10-12** ให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่าสาร cholesterol เช่นเดียวกัน อนุพันธ์ทั้งหกตัวแสดงฤทธิ์ยับยั้งไลเพสที่สูงกว่าสารตั้งต้นตัวเริ่มต้น ซึ่งแสดงว่าหมู่แทนที่ acetyl, benzyl และ benzoyl ในตำแหน่ง C3 มีผลทำให้สารออกฤทธิ์ยับยั้งไลเพสมากกว่าหมู่ไฮดรอกซีเดิม

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพสของอนุพันธ์ของสาร stigmasterol และ cholesterol ที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml

ชนิดสาร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพส
สาร **7**	14.43 ± 4.92
สาร **8**	16.48 ± 5.54
สาร **9**	17.79 ± 1.01
สาร **10**	28.33 ± 3.81
สาร **11**	30.56 ± 1.97
สาร **12**	28.72 ± 4.25

6. ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร carpesterol

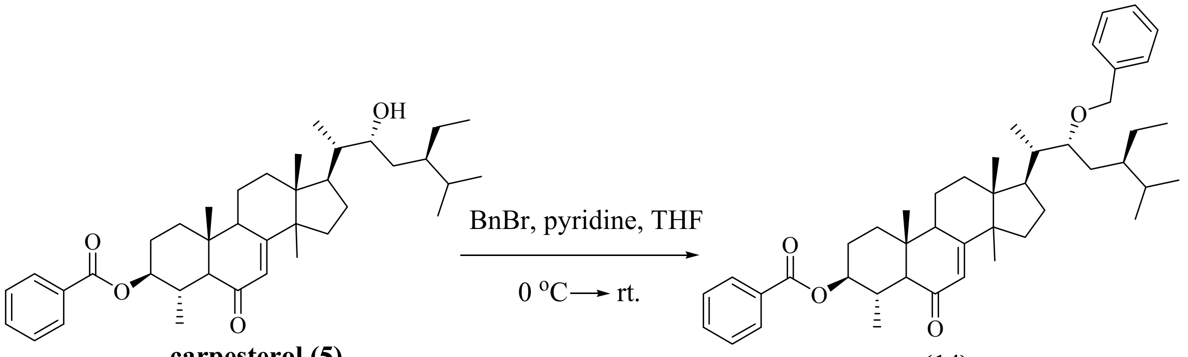
6.1 ผลการสังเคราะห์สาร (3*S*,4*S*,10*R*,13*R*,17*R*)-17-((2*S*,3*R*,5*R*)-3-acetoxy-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl)-4,10,13,14-tetramethyl-6-oxo-2,3,4,5,6,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α] phenanthren-3-yl benzoate (**13**)



รูปที่ 13 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร carpesterol (**13**)

สาร carpesterol 66.7 mg (0.1187 mmol) ละลายในเตตระไฮโดรฟิวแรน (THF) 2 ml เติมสาร pyridine 12 µl และสาร acetyl chloride (AcCl) 12 µl ทำปฏิกิริยาที่ 0 องศาเซลเซียสและปรับเป็นอุณหภูมิห้องหลังเริ่มปฏิกิริยา 20 นาที หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด แยกสารทั้งหมดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และชะด้วยสารละลายผสมของเฮปเทน เฮกเซน และเอทิลแอซิเตต ตามลำดับ ได้สาร **13** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 9.4 mg (0.0156 mmol, 13.1%)

6.2 ผลการสังเคราะห์สาร (3*S*,4*S*,10*R*,13*R*,17*R*)-17-((2*S*,3*R*,5*R*)-3-acetoxy-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl)-4,10,13,14-tetramethyl-6-oxo-2,3,4,5,6,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-yl benzoate (**14**)

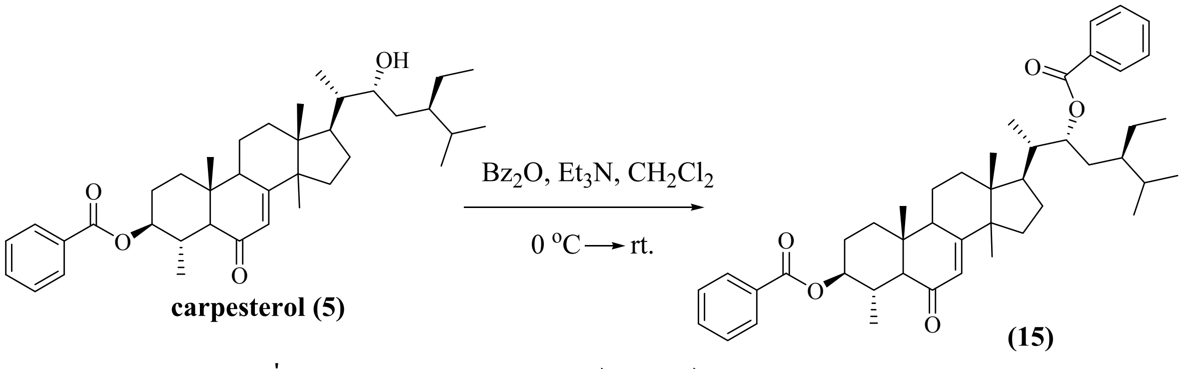


carpesterol (5) **(14)**

รูปที่ 14 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร carpesterol (**14**)

สาร carpesterol 50.7 mg (0.0902 mmol) ละลายในเตตระไฮโดรฟิวแรน (THF) 1 ml เติมสาร pyridine 10 μl และสาร benzyl bromide (BnBr) 14 μl ทำปฏิกิริยาที่ 0 องศาเซลเซียส และปรับเป็นอุณหภูมิห้องหลังเริ่มปฏิกิริยา 20 นาที หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด แยกสารทั้งหมดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และชะด้วยสารละลายผสมของเฮปเทน เฮกเซน และเอทิลแอซิเตต ตามลำดับ ได้สาร **14** เป็นของแข็งสีขาว 32.3 mg (0.0495 mmol, 54.9%)

6.3 ผลการสังเคราะห์สาร (3*S*,4*S*,10*R*,13*R*,17*R*)-17-((2*S*,3*R*,5*R*)-3-acetoxy-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl)-4,10,13,14-tetramethyl-6-oxo-2,3,4,5,6,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-yl benzoate (**15**)



carpesterol (5) **(15)**

รูปที่ 15 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร carpesterol (**15**)

สาร carpesterol 50.4 mg (0.0897 mmol) ละลายในไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) 2 ml เติมสาร triethylamine (Et_3N) 38 μl และสาร benzoic anhydride (Bz_2O) 61.9 mg ทำปฏิกิริยาที่ 0 องศาเซลเซียส และปรับเป็นอุณหภูมิห้องหลังเริ่มปฏิกิริยา 20 นาที หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด แยกสารทั้งหมดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และชะด้วยสารละลายผสมของเฮปเทน เฮกเซน และเอทิลแอซิเตต ตามลำดับ ได้สาร **9** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 57.0 mg (0.0856 mmol, 95.4%)

7. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของอนุพันธ์ของสาร carpesterol (**13-15**)

อนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอรอลทั้งสามสารที่สังเคราะห์ (**13-15**) แสดงค่าการยับยั้งไลเพสที่ 72.60 ± 5.9%, 87.82 ± 3.00% และ 81.26 ± 3.64% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ซึ่งมากกว่าค่ายับยั้งของสารคาร์เพสเตอรอล (62.3 ± 6.2%) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเติมหมู่แทนที่เหล่านี้ลงในสาร stigmasterol และ cholesterol ที่ส่งผลให้อนุพันธ์ของสารทั้งสองมีค่าการยับยั้งที่มากกว่าสารตั้งต้นทั้งสองชนิด แสดงว่าหมู่แทนที่ acetyl, benzyl และ benzoyl ในตำแหน่ง C22 มีผลทำให้ฤทธิ์การยับยั้งสูงขึ้น เช่นเดียวกับในตำแหน่ง C3

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพสของอนุพันธ์ของสาร carpesterol ที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml

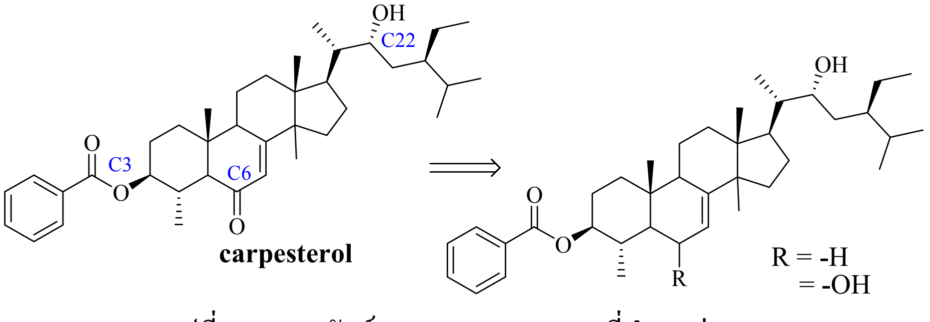
ชนิดสาร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพส
สาร **13**	72.60 ± 5.9
สาร **14**	87.82 ± 3.00
สาร **15**	81.26 ± 3.64

สรุปและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยในขั้นต่อไป

การแยกสารคาร์เพสเตอรอลจากผลมะแว้งเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ในงานวิจัยนี้ไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากสารเป้าหมายซึ่งมีค่า R_f ใกล้เคียงกับสารคาร์เพสเตอรอลมีค่ามวลโมเลกุลจากการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโทรเมตรีไม่ตรงกับมวลโมเลกุลของสารคาร์เพสเตอรอล แหล่งของสารตั้งต้นจึงกลับมาใช้ผลมะอึก สามารถสกัดและแยกสารที่ต้องการจากผลมะอึกและได้สารคาร์เพสเตอรอล 5.25 กรัม (0.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของผลมะอึกสด) อนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอรอลที่สังเคราะห์ในงานวิจัยนี้มี 3 สาร (**13-15**) โดยหมู่ฟังก์ชันที่เปลี่ยนไปในโครงสร้างคือ หมู่ไฮดรอกซิที่ตำแหน่ง C22 ถูกเปลี่ยนไปเป็นหมู่ acetyl (**13**) หมู่ benzyl (**14**) และหมู่ benzoyl (**15**) อนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาแสดงฤทธิ์ยับยั้งไลเพสด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพส เท่ากับ 72.60 ± 5.9%, 87.82 ± 3.00% และ 81.26 ± 3.64% ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml ซึ่งมากกว่าสารคาร์เพสเตอรอลที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไลเพสด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพส เท่ากับ 62.3 ± 6.2% ที่ความเข้มข้นเดียวกัน

นอกจากนี้จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของสารที่มีโครงสร้างหลักคล้ายคาร์เพสเตอรอล คือ สาร สเตียรอยด์ 4 ชนิด ได้แก่ stigmasterol, β-sitosterol, campesterol และ cholesterol พบว่าสารทั้งสี่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพสน้อยกว่าสารคาร์เพสเตอรอล เมื่อเปรียบเทียบจากสูตรโครงสร้างของสาร หมู่ฟังก์ชันที่มีในโมเลกุลเหล่านี้มีความแตกต่างกัน 3 จุดคือ ที่ตำแหน่ง C3 C6 และ C22 (รูปที่ 6) และเมื่อสังเคราะห์อนุพันธ์โดยเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง C3 จากหมู่ไฮดรอกซิเป็นหมู่ acetyl หมู่ benzyl และหมู่ benzoyl อนุพันธ์ทั้งหมดของทั้งสาร stigmasterol และ cholesterol มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพสมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าหมู่แทนที่ทั้งสามชนิดนี้มีอิทธิพลต่อฤทธิ์ยับยั้งไลเพส อาจเนื่องมาจากสภาพขั้วของโมเลกุลที่ลดลงของอนุพันธ์ สภาพขั้วของสารอาจใกล้เคียงกับสภาพขั้วบริเวณกัมมันต์ของเอนไซม์ไลเพสจึงทำให้สามารถเกิดพันธะกันได้อย่างเหมาะสม แต่ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพสจากการทดลองนี้ไม่อาจสรุปได้ว่าหมู่ฟังก์ชันใดมีอิทธิพลมากกว่ากัน

การแปรเปลี่ยนของหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง C3 และ C22 จากหมู่ไฮดรอกซิเป็นหมู่ acetyl หมู่ benzyl และหมู่ benzoyl ทำให้ฤทธิ์การยับยั้งไลเพสเพิ่มขึ้นทั้งอนุพันธ์ของสารคารเพสเตอรอล stigmasterol และ cholesterol ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจถึงการแปรเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง C6 จากคาร์บอนิลเป็นหมู่ฟังก์ชันอื่นที่ทำให้โมเลกุลของคาร์เพสเตอรอลมีสภาพขั้วลดลง ว่าจะมีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งไลเพสอย่างไร (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 อนุพันธ์ของสาร carpesterol ที่ตำแหน่ง C6

บรรณานุกรม

Barbier P, Schneider F. Syntheses of tetrahydrolipstatin and absolute configuration of tetrahydrolipstatin and lipstatin. *Helv Chim Acta.* 1987; **70**: 196–202.

Gargouri Y, Julien R, Sugihara A, Verger R, Sarda L. Inhibition of pancreatic and microbial lipases by proteins. *Biochem Biophys Acta*. 1984; **795**: 326-331.

Han LK, Kimura Y, Kawashima M, Takaku T, Taniyama T, Hayashi T, Zheng YN, Okuda H. Antiobesity effects in rodents of dietary tea saponin, a lipase inhibitor. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; **25**: 1459-1464.

Hatano T, Yamashita A, Hashimoto T, Ito H, Kubo N, Yoshiyama M, Shimura S, Itoh Y, Okuda T, Yoshida T. Flavandimmers with lipase inhibitory activity from *Cassia nomame*. *Phytochemistry* 1997; **46**: 893-900.

He Q, Lv Y, Yao K. Effects of tea polyphenols on the activities of α-amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chem* 2006; **101**: 1178-1182.

Hochuli E, Kupfer E, Maurer R, Meister W, Mercadal Y, Schmidt K. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. II. Chemistry and structure elucidation. *J Antibiot* 1987; **40**: 1086-1091.

Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Fried SK, Raskin I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* 2003; **19**: 876-879.

Slanc P, Doljak B, Mlinaric A, Strukelj B. Screening of wood damaging fungi and macrofungi for inhibitors of pancreatic lipase. *Phytother Res* 2004; **18**: 758-762.

Satouchi K, Hirano K, Fujino O, Ikoma M, Tanaka T, Kitamura K. Lipoxygenase-1 from soybean seed inhibiting the activity of pancreatic lipase. *Biosci Biotecthnol Biochem* 1998; **62**: 1498-1503.

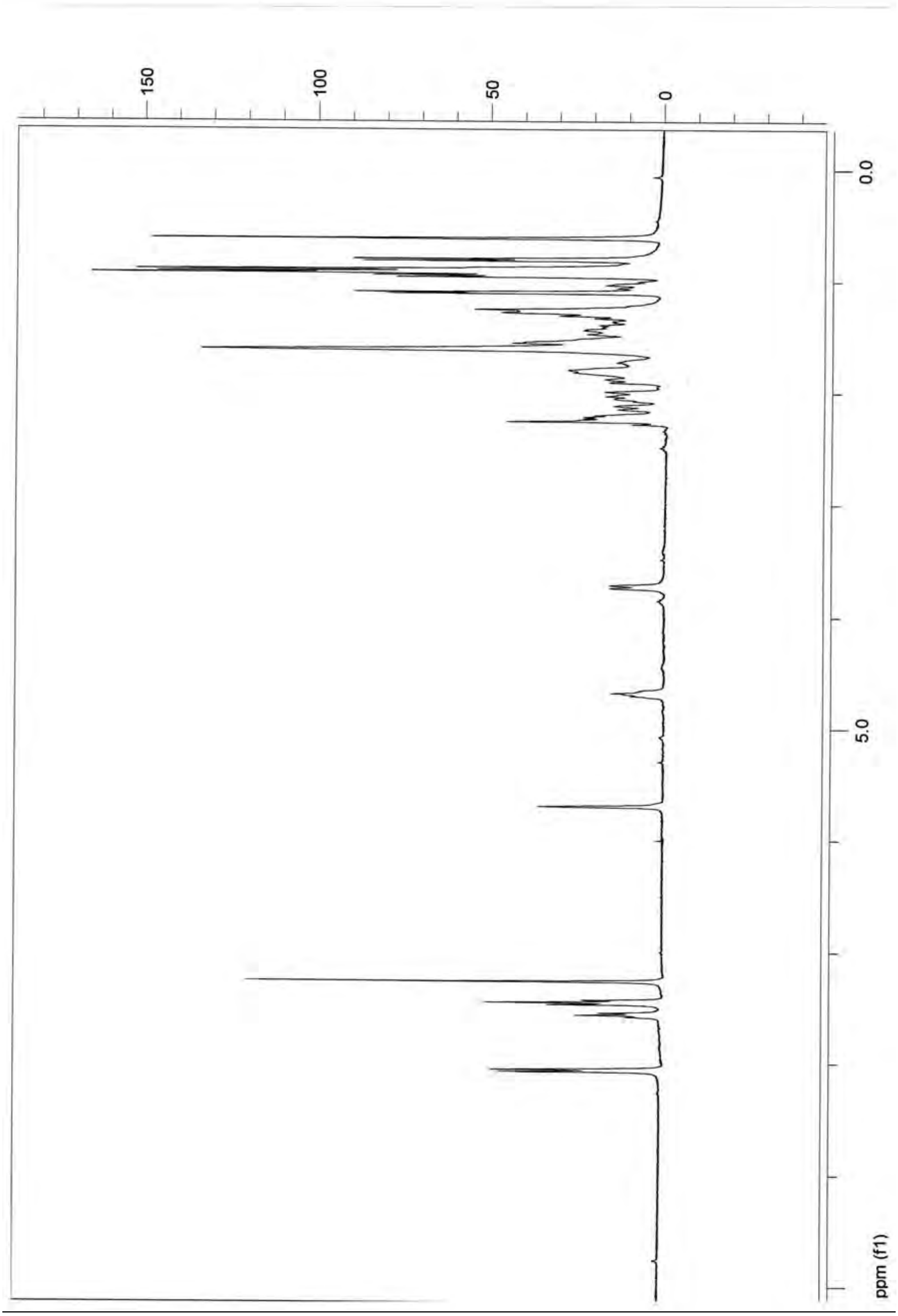
Sharma N, Sharma VK, Seo SY. Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. *Journal of Ethnopharmacol* 2005; **97**: 453-456.

Tani H, Ohishi H, Watanabe K. Wheat flour lipase inhibitor decrease serum lipid levels in male rats. *J Nutr Vitaminol* 1995; **41**: 699-706.

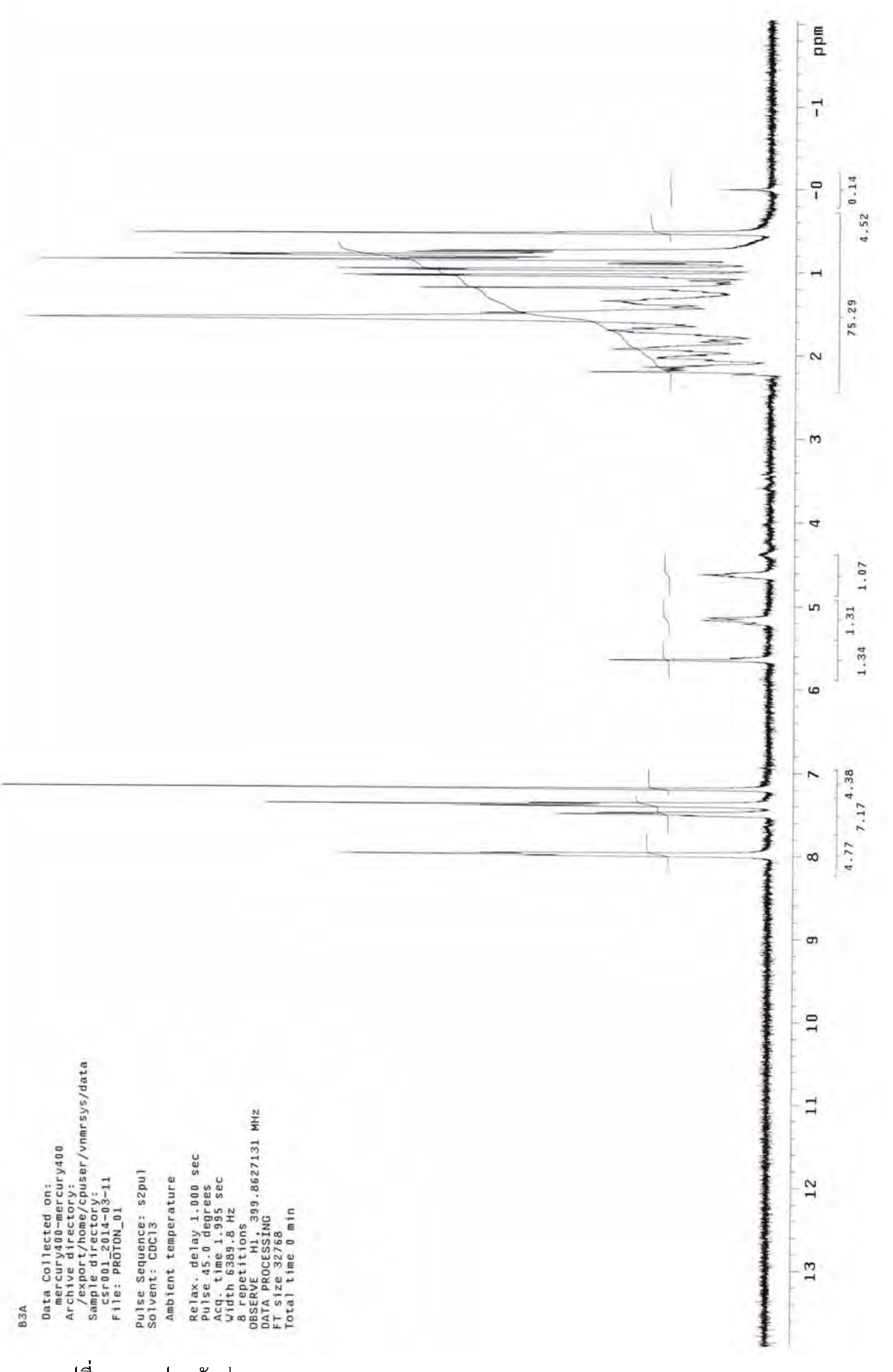
Weibel EK, Hadvary P, Hochuli E, Kupfer E, Lengsfeld H. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot* 1987; **40**: 1081-1085.

Xu BJ, Han LK, Zheng YN, Lee JH, Sung CK. *In vitro* inhibitory effect of triterpenoidal saponins from *Platycodi radix* on pancreatic lipase. *Arch Pharm Res* 2005; **28**: 180-185.

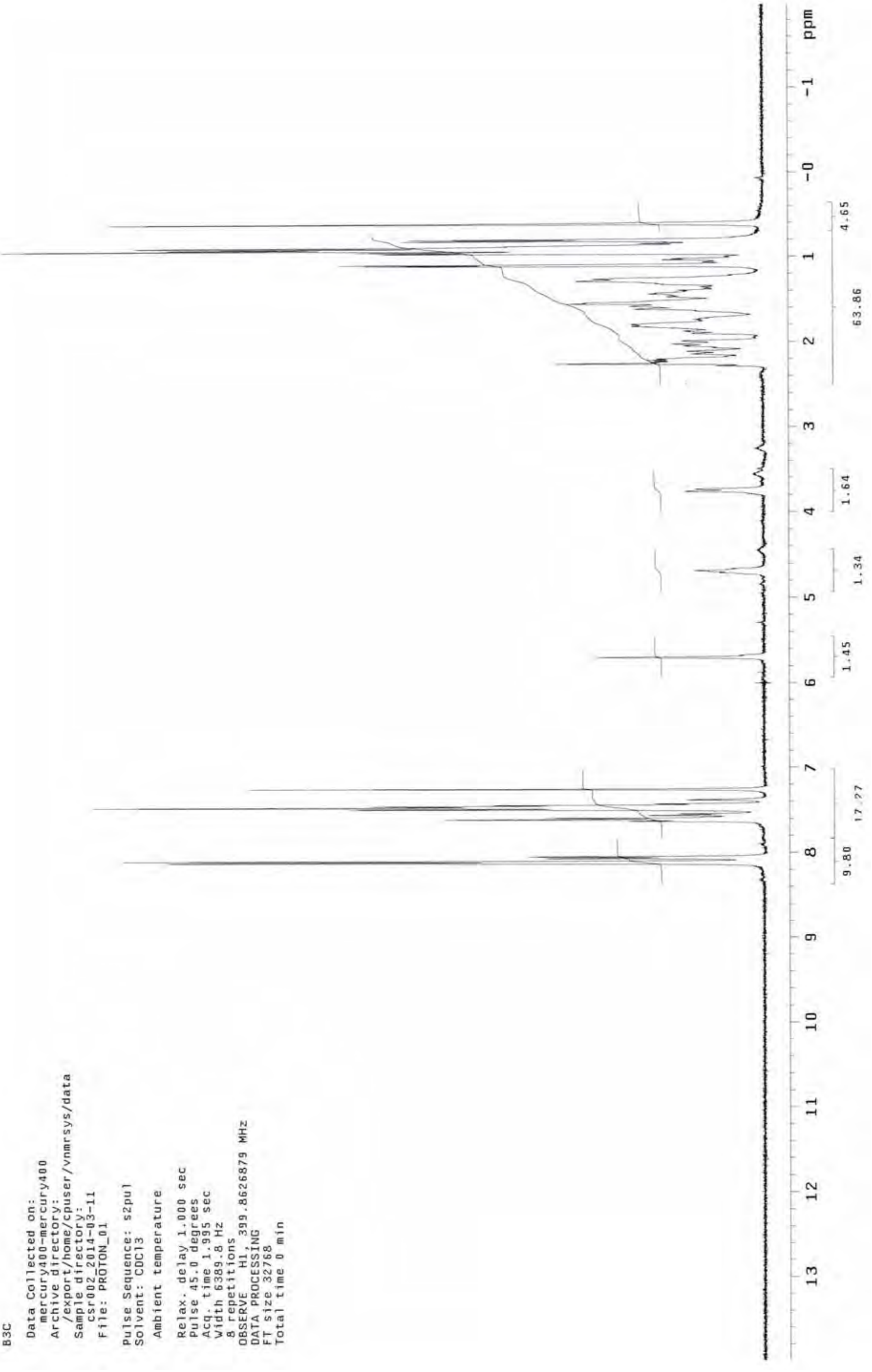
ภาคผนวก



<u>รูปที่ 17</u> สเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **13**



<u>รูปที่</u> 18 สเปกตรัม ¹H NMR ของสาร **14**



<u>รูปที่ 19</u> สเปกตรัม ^{1}H NMR ของสาร **15**

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) อาจารย์ ดร. จรรยา ชัยเจริญพงศ์

   ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ)Chanya Chaicharoenpong, Ph.D.

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 2102 00084 76 6

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

   สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 02-2188073 โทรสาร 02-2533543

   E-mail Chanya.C@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

   พ.ศ. 2546 Ph.D. (Fundamental Science and Technology) Keio University ประเทศญี่ปุ่น

   พ.ศ. 2540 วท. ม. (เคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   พ.ศ. 2537 วท. บ. (เคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, การสังเคราะห์สารอินทรีย์

7. ผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1) Chanmee W., **Chaicharoenpong C**. and Petsom A. Lipase inhibitor from fruits of *Solanum stramonifolium* Jacq. *Food and Nutrition Sciences*. 2013; 4, 554-558.

2) Techaprempreecha S., Khongchareonporn **N., Chaicharoenpong C.,** Aranyakananda P., Chunhabundit S. and Petsom **A**. Nutritional composition of farmed and wild sandworms, *Perinereis nuntia*. *Animal Feed Science and Technology*. **2011**; *169*, 265-269.

3) **Chaicharoenpong C**. and Petsom A. Quantitative thin layer chromatographic analysis of saponins in tea seed meal. *Phytochem Anal*. **2009**; *20*, 253-255.

4) **Chaicharoenpong C.**, Kato K. and Umezawa K. Preparation of radioactively labeled dehydroxymethylepoxyquinomicin, an NF-κB function inhibitor. *Drugs Exp Clin Res*. **2003**; *29*, 1-3.

5) **Chaicharoenpong C.**, Kato K. and Umezawa K. Synthesis and structure-activity relationship of dehydroxymethylepoxyquinomicin analogues as inhibitors of NF-κB functions. *Bioorg Med Chem* **2002**; *10*: 3933-3939.

6) Umezawa K. and **Chaicharoenpong C**. Molecular design and biological activities of NF-κB inhibitors. *Mol Cells* **2002**; *14*: 163-167.

7) Saito Y., Nakamura M., Ohno T., **Chaicharoenpong C.**, Ichikawa E., Yamamura S., Kato K. and Umezawa K. Synthesis of sugar-modified derivatives of the unusual nucleoside oxanosine and its carbocyclic analogs as potential inhibitors of HIV. *J Chem Soc Perk T 1* **2001**; 298-304.

8) Saito Y., Nakamura M., Ohno T., **Chaicharoenpong C.**, Ichikawa E., Yamamura S., Kato K. and Umezawa K. Synthesis of oxanosine and carbocyclic oxanosine derivatives as anti-HIV agent. *J Antibiot*. **2000**; *53*, 309-13.

9) Saito, Y., **Chaicharoenpong, C.**, Ohno, O., Ichikawa, E., Yamamura, S., Kato, K., Nakamura, M., Ohno, T. and Umezawa, K. Synthesis and anti-HIV activity of unusual nucleoside oxanosine derivatives. *Nucleic Acids Symp Ser*. **1999**; *42*, 19-20.