การสังเคราะห์อนุพันธ์โอเซลทามิเวียร์ออกฤทธิ์ยับยั้งอัลไซเมอร์

Synthesis of Oseltamivir Derivatives with Anti-Alzheimer Activity

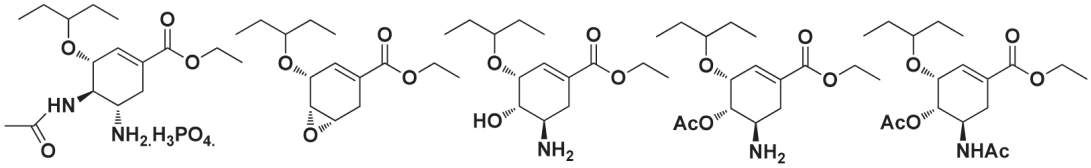
มูฮำหมัด นิยมเดชา * และ ชนิกานต์ เอี่ยมสอาด

Muhammad Niyomdecha * and Chanikarn Eamsaard

บทคัดย่อ

ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Oseltamivir ทั้งหมด 3 ตัว เพื่อเป็นสารตัวใหม่ ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอัลไซเมอร์ โดยเริ่มจากสารตั้งต้น Epoxide 1 ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่ใช้สังเคราะห์ยา Oseltamivir phosphate สารตัวที่ 3 เกิดจากการทำปฏิกิริยาแทนที่แบบ S_N2 (nucleophilic substitution) กับ Epoxide 1 โดยใช้ NaN_3 (Sodium azide) และทำปฏิกิริยา reduction โดยใช้ Zn (Zinc) ตามลำดับ สารตัวที่ 5 เกิดจากการทำปฏิกิริยาแทนที่ แล้วตามด้วยปฏิกิริยา Esterification โดยใช้ Acetic anhydride (เรียกว่า ปฏิกิริยา Acetylation) และทำปฏิกิริยา reduction ตามลำดับ และสารตัวที่ 6 สามารถทำได้ 2 วิธี วิธีที่ 1 เกิดจากการนำสารตัวที่ 3 มาทำปฏิกิริยา Esterification โดยใช้ Acetic anhydride ส่วนวิธีที่ 2 เกิดจากการนำสารตัวที่ 5 มาทำปฏิกิริยา Esterification โดยใช้ Acetic anhydride เช่นเดียวกัน เมื่อได้สารทั้ง 3 ตัวแล้ว จึงนำไปทดสอบฤทธิ์ทางการยับยั้งโรคอัลไซเมอร์ และผลปรากฏว่าสารตัวที่ 3 มีฤทธิ์ยับยั้งโรคอัลไซเมอร์ได้ดีที่สุด (IC_{50} = 91.14 μM) และสามารถยับยั้งได้ถึง 56.99 % เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Galantamine 100.98%

คำสำคัญ: ทามิฟลู โอเซลทามิเวียร์ ฟอสเฟต, อนุพันธ์ของโอเซลทามิเวียร์, ยับยั้งอัลไซเมอร์



Oseltamivir phosphate 1 3 5 6

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ตำบลสนามจันทร์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

Depart of Chemistry, Faculty of Science, Silapakorn University, Sanam Chandra, Muang, Nakhon Pathom 73000, Thailand.

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): momoniyom@yahoo.com

ABSTRACT

Three new derivatives of Oseltamivir were synthesized for anti- Alzheimer activity. The process started by using Epoxide 1 as the mediator to synthesize Oseltamivir phosphate. The compound 3 was from the S_N2 reaction (Nucleophilic substitution) with Epoxide 1 using NaN_3 (Sodium azide) and the reduction reaction using Zn, respectively. The compound 5 was from the S_N2 reaction, the esterification reaction using Acetic anhydride (which was called "Acetylation reaction"), and the reduction reaction using Zn respectively. The compound 6 was from two different methods. The first method was the use of compound 3 in the esterification reaction with Acetic anhydride. The second method was the use of compound 5 in the esterification reaction with Acetic anhydride. After three compounds were synthesized, they were tested for Alzheimer's inhibition. The results of this study showed that the compound 3 exhibited potent anti-Alzheimer activity (IC_{50} = 91.14 μM) with 56.99% when compared to Galantamine 100.98%.

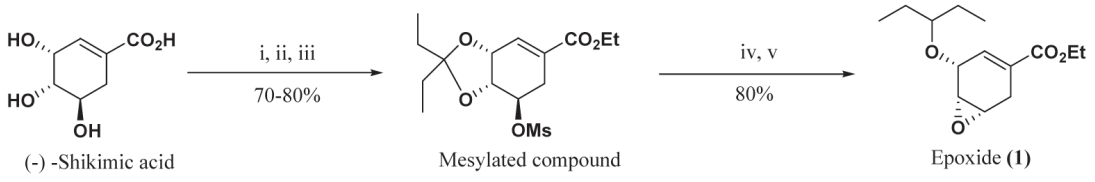
Key words: tamiflu oseltamivir phosphate, oseltamivir derivatives, anti-alzheimer

บทนำ

โรคไข้หวัดนก (bird flu) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่สร้างความสูญเสียในภาคการเกษตรที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ปีก สามารถก่อโรคและคร่าชีวิตผู้คนไปเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะในทวีปเอเชีย องค์การอนามัยโลกคาดว่าหากมีการระบาดใหญ่ของโรคอาจจะทำให้มีผู้เสียชีวิตจำนวนมากดังที่เคยเกิดขึ้นกับการระบาดของไข้หวัดใหญ่ ไข้หวัดนก จากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1 เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงที่สุด (จิตร และคณะ, 2550) แต่ก็สามารถรักษาให้หายขาดได้โดยการให้ยาต้านไวรัส ยาต้านไวรัสที่นิยมใช้ในการรักษา คือ Oseltamivir phosphate หรือมีชื่อทางการค้าว่า Tamiflu ถูกค้นพบราวปี ค.ศ. 1995 และได้มีการเปิดเผยรายละเอียดการสังเคราะห์ในวารสารวิชาการเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1997 (Kim *et al*., 1997) อย่างไรก็ตาม วิธีที่กล่าวถึงนี้มีจำนวนขั้นตอนที่ค่อนข้างยาวและเหมาะกับการสังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีโครงสร้างหลากหลายเพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์มากกว่าการผลิตในปริมาณมากๆ (Kim *et al*., 1998) ต่อมาบริษัท Roche ได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ในระดับอุตสาหกรรมขึ้น โดยใช้สารตั้งต้นซึ่งเป็นสารที่สำคัญจากธรรมชาติ คือ (-)-Shikimic acid

ในกระบวนการสังเคราะห์ Oseltamivir phosphate ที่เริ่มต้นจาก (-)-Shikimic acid จะเปลี่ยนสารตั้งต้นนี้ให้กลายเป็นอินเทอร์มิเดียตสำคัญที่เป็น Epoxide 1 (Federspiel *et al*., 1999) (ภาพที่ 1) และจากสารตัวกลาง Epoxide 1 มีวิธีการที่จะเปลี่ยนให้เป็น Oseltamivir phosphate ที่ใช้เป็นยารักษาโรคไข้หวัดนกต่อไป (Rohloff *et al*., 1998).

โรคอัลซไฮเมอร์ หรือ โรคอัลไซเมอร์ (อังกฤษ: Alzheimer's disease หรือ AD) เป็นภาวะสมองเสื่อมที่พบได้บ่อยที่สุด โรคนี้ค้นพบเมื่อ ค.ศ. 1906 โดยจิตแพทย์ชาวเยอรมันชื่อว่า อาลอยส์ อัลซไฮเมอร์ (Alois Alzheimer) และถูกตั้งชื่อตามท่าน โรคนี้จัดเป็นโรคความเสื่อมที่รักษาไม่หาย และจัดเป็นอาการป่วยระยะสุดท้าย โดยทั่วไปแล้วสามารถวินิจฉัยโรค อัลไซเมอร์ได้ในผู้ป่วยอายุมากกว่า 65 ปี แต่ก็พบโรคอัลไซเมอร์ชนิดหนึ่ง คือ โรคอัลไซเมอร์ชนิดเกิดเร็ว (Early-onset Alzheimer's) ซึ่งเกิดในคนอายุน้อย แต่มีความชุกของโรคน้อยกว่า ประมาณการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2549 มีประชากรราว 26.6 ล้านคนทั่วโลกที่ป่วย เป็นโรคอัลไซเมอร์ และจะเพิ่มขึ้นถึง 4 เท่าใน พ.ศ. 2593 โรคอัลไซเมอร์ถือเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของโลกในปัจจุบัน และจะทวีความสำคัญขึ้นเรื่อยๆ เนื่องมาจากประชากรโลกจะมีอัตราส่วนของผู้สูงอายุเพิ่มขึ้นตามลำดับ และยังก่อให้เกิดผลกระทบอย่างมากทางด้านเศรษฐกิจ ที่จะเป็นภาระทั้งต่อครอบครัว และสังคม การรักษาโรคอัลไซเมอร์นั้นเป็นเรื่องที่ยากเพราะการเกิดโรคดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่ามีกลไกในการเกิดโรคอย่างไร และโรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่ไม่มีทางรักษาให้หายขาดได้และยังพบว่า เมื่อโรคได้เริ่มเกิดขึ้นแล้ว เราไม่มีทางเปลี่ยนทิศทางการดำเนินของโรคได้ เพราะโรคจะเปลี่ยนแปลงไปเรื่อยๆ ดังนั้นเป้าหมายของการรักษาโรคอัลไซเมอร์ คือ การชะลอและยับยั้งการดำเนินของโรคไม่ให้แย่ลง และลดผลกระทบของอาการของโรค การรักษานั้นยาจะต้องให้ในปริมาณเพียงพอที่จะทำให้อาการดีขึ้น โดยไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงและควรให้ออกกฤทธิ์ยาวนานที่สุด ไม่ต้องให้ยาบ่อยและให้ผลการรักษาที่ดี คนไข้ควรได้รับการรักษาแต่เนิ่นๆ ซึ่งอาการ ของโรคอัลไซเมอร์ เช่น อาการหลงลืมไม่สามารถไปยังสถานที่ที่เคยไปเกิดอาการสับสนในสิ่งที่เคยทำ เช่น หมดความสนใจในด้านความคิดการปฏิบัติกิจกรรมในชีวิตประจำวันเปลี่ยนไป (มานิตย์, 2557)



(-) -Shikimic acid Mesylated compound Epoxide **(1)**

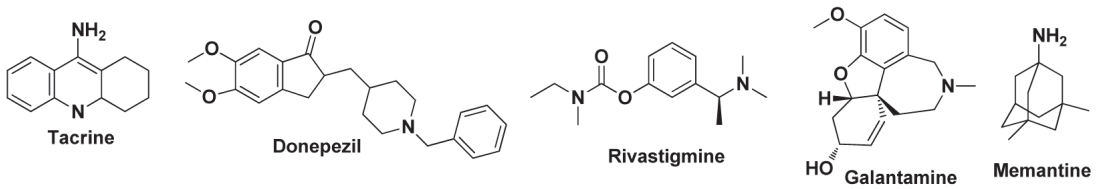
i: $SOCl_2$/EtOH, ii: EtCOEt, TfOH (cat), iii: MsCl/Et_3N, iv: Et_3SiH, $TiCl_4$, v: aq.$NaHCO_3$

ภาพที่ 1 การสังเคราะห์ Epoxide 1

ยาหรือเภสัชภัณฑ์ 5 ชนิดที่ในปัจจุบันได้รับการรับรองโดยหน่วยงานต่างๆ เช่น คณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (FDA) และหน่วยงานด้านยาของยุโรป (EMEA) ในการรักษาอาการทางการรู้ในโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ Tacrine, Donepezil, Rivastigmine, Galantamine และ Memantine (ภาพที่ 2) ในกลุ่มนี้ ยา 3 ชนิด เป็นแอนติโคลีนเอสเทอเรส (Anticholinesterase) และอีก 1 ตัว คือ เมแมนทีน (Memantine) ซึ่งเป็นสารต้านตัวรับเอ็นเอ็มดีเอ (NMDA receptor antagonist) แต่ไม่มียาใดที่มีข้อบ่งชี้ในการชะลอหรือหยุดการดำเนินโรคโรคอัลไซเมอร์ เป็นความผิดปกติที่มีผลโดยตรงต่อสมอง ซึ่งเป็นศูนย์การสื่อสารที่น่ามหัศจรรย์ ในการควบคุมความรู้สึก และการตอบสนองของเรา การสื่อสารที่สำคัญต่างๆ ในร่างกายจะถูกส่งผ่านสมอง โดยมีสารเคมีที่เรียกว่าสารสื่อประสาท (Neurotransmitter) เป็นตัวสื่อสาร สารนี้จะช่วยนำคำสั่งจากสมองไปยังอวัยวะเป้าหมายเพื่อให้เกิดการทำงานขึ้น สำหรับสารสื่อประสาทที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความจำของเราคือ สารอะเซติลโคลีน (Acetylcholine) (ณัฐพงษ์, 2556) ซึ่งนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าสารนี้ช่วยทำให้มนุษย์มีความสามารถในการจำดังนั้นปัญหาที่รุนแรงอาจเกิดขึ้น หากในสมองมีสารนี้ลดน้อยลงมาก จะทำให้เซลล์สมองมีปัญหาในการสื่อสาร และพบว่าผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ มีระดับของสารอะเซติลโคลีนลดลงอย่างมากซึ่งเชื่อว่าเป็นเหตุทำให้ความสามารถในการจำและการใช้เหตุผลของผู้ป่วยลดลงตามไปด้วยปริมาณสารอะเซติลโคลีนนี้ ส่วนหนึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ที่มีชื่อว่าอะเซ-ติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) ซึ่งจะทำหน้าที่ย่อยอะเซติลโคลีน ทำให้สารสื่อประสาทนี้มีปริมาณน้อยลงในสมอง ดังนั้นเป้าหมายสำคัญของการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ คือ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส และการเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาท

ส่วนแทคีน (Tacrine) เป็นยาในกลุ่มแอนติโคลีนเอสเทอเรสตัวแรกที่พบแต่ไม่นิยมใช้เนื่องจากมีผลข้างเคียงมาก ซึ่งแอนติโคลีนเอสเทอเรสที่ได้รับการรับรองในการรักษาอาการโรคอัลไซเมอร์คือ โดเนเพซิล (Donepezil; ชื่อการค้า Aricept), กาแลนทามีน (Galantamine; ชื่อการค้า Razadyne) และไรวาสติกมีน (Rivastigmine; ชื่อการค้า Exelon และ Exelon Patch) ซึ่งมีหลักฐานแสดงประสิทธิผลของยาต่อโรคอัลไซเมอร์ชนิดอ่อนหรือปานกลาง และมีหลักฐานบางส่วนรับรองถึงการใช้ในโรคอัลไซเมอร์ขั้นรุนแรง เฉพาะโดเนเพซิลเท่านั้นที่ได้รับการรับรองในการรักษาภาวะสมองเสื่อมจากอัลไซเมอร์ขั้นรุนแรง การใช้ยาเหล่านี้จะมีความบกพร่องทางการรู้เล็กน้อย (Mild cognitive impairment) ไม่มีประสิทธิผลในการชะลอการเกิดโรคอัลไซเมอร์ที่จะเกิดตามมาภายหลัง ผลข้างเคียงของยาที่พบบ่อยคือคลื่นไส้อาเจียน อันเนื่องจากปริมาณโคลิเนอร์จิกมากเกินไป พบได้ประมาณร้อยละ 10-20 ของผู้ใช้ยา และมีความรุนแรงในระดับน้อยถึงปานกลาง ส่วนผลข้างเคียงที่พบได้น้อยคือ ตะคริว หัวใจเต้นช้า เบื่ออาหาร น้ำหนักลด และเพิ่มการสร้างกรดกระเพาะ

ในปัจจุบันไม่มียาใดที่มีข้อบ่งชี้ในการชะลอหรือหยุดการดำเนินโรคอย่างแท้จริง จึงทำให้มีการวิจัยเพื่อหาสารที่ใช้ยับยั้งตัวใหม่ๆ ที่มีการออกฤทธิ์ที่ดีกว่า และลดต้นทุนในการผลิต ซึ่งได้พบการออกฤทธิ์ยับยั้งโรคอัลไซเมอร์ในอนุพันธ์ของยารักษาโรคไข้หวัดนก (Oseltamivir phosphate) แต่ยังให้ผลที่ไม่ดีนัก ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจในการนำอนุพันธ์ดังกล่าว มาทำการสังเคราะห์และปรับปรุงเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งโรคอัลไซเมอร์ที่ดีขึ้น



ภาพที่ 2 โครงสร้างยาที่ใช้ออกฤทธิ์ยับยั้งโรคอัลไซเมอร์

วิธีการวิจัย

1. ข้อมูลทั่วไป

การวิเคราะห์ ^{1}H-NMR เป็นชนิด 300 MHz และ ^{13}C-NMR เป็นชนิด 75 MHz ของ Bruker ทำการ run สารตัวอย่างโดยเตรียมด้วยตัวทำละลาย $CDCl_3$ วัดในหน่วย (δ, ppm), FTIR ของ Perkin-Elmer GX FT-IR ทำการวัดด้วย NaCl-cell วัดในหน่วย cm^{-1} การหามวลโมเลกุลของสารด้วย Mass spectrometer ชนิด LC-HRMS ของ Bruker Daltonics-microTOF ชนิด ESI-TOF และวิเคราะห์ปฏิกิริยาด้วยการตรวจสอบกับเครื่อง Ultraviolet (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 nm หรือการสเปรย์สาร vanillin ส่วนการแยกสารให้บริสุทธิ์แต่ละขั้นตอนด้วย Column chromatography ใช้ silica gel 60, ขนาด 230-400 mesh และ reagents ต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย เลือกของ Merk, Sigma-Aldrich และ Fluka Co. สำหรับสารที่ใช้ในการทดสอบผลการออกฤทธิ์ยับยั้งอัลไซเมอร์ คือ DTBN (5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid), Acetylthiocholine Iodide และ Galantamine จาก Sigma-Aldrich Co.

2. การสังเคราะห์อนุพันธ์โอเซลทามิเวียร์

การสังเคราะห์ (3*R*, 4*S*, 5*R*)-ethyl 5-azido-4-hydroxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 2

นำ Epoxide 1 (0.3085 g, 1.18 mmol) ละลายใน EtOH 15 ml นำไปทำการกวน (stir) และควบคุมอุณหภูมิที่ 70°C เติม NaN_3 (0.2317 g, 3.54 mmol) และเติม NH_4Cl (0.1275 g, 2.36 mmol) แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลาประมาณ 30 ชม. จากนั้นนำไประเหย EtOH ออกแล้วนำมาสกัดด้วย EtOAc (3x10 ml) กับน้ำ แล้วรวมชั้น organic นำมากำจัดน้ำด้วย anh.Na_2SO_4 แล้วกรอง anh. Na_2SO_4 ออก และระเหยตัวทำละลายออก ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการลง column chromatography โดยใช้ siliga gel และใช้ตัวทำละลายเป็น (Hexane-EtOAc, (5:1))

การสังเคราะห์(3*R*,4*S*,5*R*)-ethyl5-amino-4-hydroxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 3

นำสารหมายเลข 2 (0.2441 g, 0821 mmol) ละลายใน EtOH : H_2O, (4:1) นำไปทำการกวน (stir) ที่อุณหภูมิห้อง เติม NH_4Cl (0.1 g, 2.05 mmol) ลงไป และใช้ Zn เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (0.268 g, 4.105 mmol) stir ต่อไป 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ หยุดปฏิกิริยาด้วยการนำไประเหย EtOH ออกให้มากที่สุด จากนั้นนำมาสกัดด้วย EtOAc (3x10 ml) กับน้ำ แล้วรวมชั้น organic นำมากำจัดน้ำด้วย anh.Na_2SO_4 แล้วกรอง anh.Na_2SO_4 ออก ระเหยตัวทำละลายทำให้บริสุทธิ์ด้วยการลง column chromatography โดยใช้ siliga gel และใช้ตัวทำละลายเป็น (EtOAc-Methanol, (5:1))

การสังเคราะห์ (3*R*, 4*S*, 5*R*)-ethyl 4-acetoxy-5-azido-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 4

นำสารหมายเลข 2 (0.2526 g, 0.85 mmol) มาละลายใน CH_2Cl_2 5 ml นำไปทำการกวน (stir) ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Ac_2O (0.24 ml, 2.55 mmol) และ Et_3N (0.23 ml, 1.7 mmol) ลงไป โดยใช้ DMAP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (0.02 g, 1.7 mmol) ทำการ stir ต่อไปอีก 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสารเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ นำมาสกัดด้วย EtOAc (3x10 ml) กับน้ำ แล้วรวมชั้น organic และกำจัดน้ำด้วย anh.Na_2SO_4 จากนั้นกรอง anh.Na_2SO_4 ออก และระเหยตัวทำละลายทำให้บริสุทธิ์ด้วยการลง column chromatography โดยใช้ siliga gel และใช้ตัวทำละลายเป็น (Hexane-EtOAc, (1:1))

การสังเคราะห์ (3*R*, 4*S*, 5*R*)-ethyl 4-acetoxy-5-amino-3-(pentan-3-yloxy) cyclohex-1-enecarboxylate 5

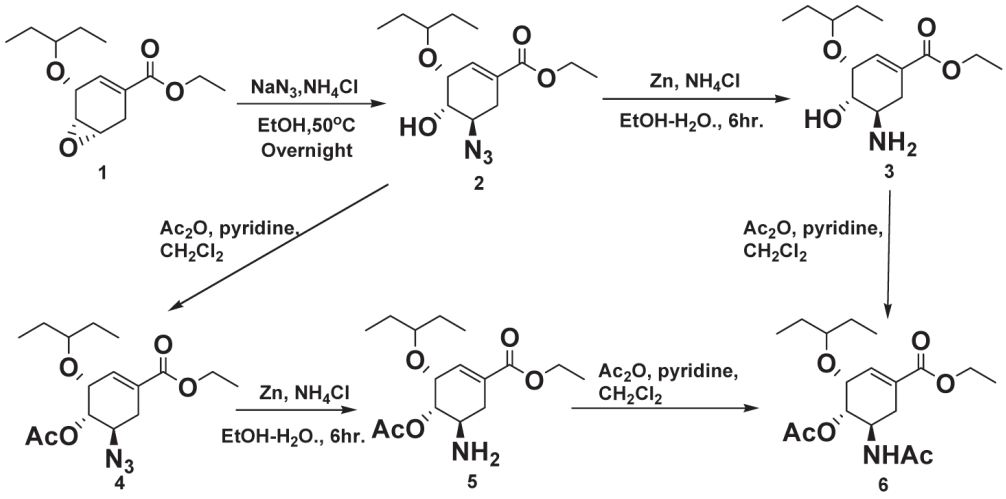
นำสารหมายเลข 4 (0.2565 g, 0.75 mmol) มาละลายใน EtOH : H_2O, (4:1) นำไปทำการกวน (stir) ที่อุณหภูมิห้อง เติม NH_4Cl (0.1 g, 3.78 mmol) ลงไป และใช้ Zn เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (0.25 g, 3.78 mmol) stir ต่อไป 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสารเกิดสมบูรณ์ จากนั้นนำมาสกัดด้วย EtOAc (3x10 ml) กับน้ำ แล้วรวมชั้น organic นำมากำจัดน้ำด้วย anh.Na_2SO_4 จากนั้นกรอง anh.Na_2SO_4 ออก และระเหยตัวทำละลาย ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการลง column chromatography โดยใช้ siliga gel และใช้ตัวทำละลายเป็น (EtOAc)

การสังเคราะห์ (3*R*,4*S*,5*R*)-ethyl 5-acetamido-4-acetoxy-3-(pentan-3-yloxy) cyclohex-1-enecarboxylate 6

นำสารหมายเลข 5 (0.12 g, 0.383 mmol) มาละลายใน CH_2Cl_2 5 ml นำไปทำการกวน (stir) ที่อุณหภูมิห้อง เติม Ac_2O (0.1 ml, 1.149 mmol) ลงไป และเติม Et_3N (0.1 ml , 0.766 mmol) ใช้ DMAP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (0.01 g, 0.0766 mmol) stir ต่อไป 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสารเกิดสมบูรณ์ จากนั้นนำมาสกัดด้วย EtOAc (3x10 ml) กับน้ำ แล้วรวมชั้น organic นำมากำจัดน้ำด้วย anh.Na_2SO_4 จากนั้นกรอง anh.Na_2SO_4 ออก และระเหยตัวทำละลายทำให้บริสุทธิ์ด้วยการลง column chromatography โดยใช้ siliga gel และใช้ตัวทำละลายเป็น (Hexane-EtOAc , (1:1))

3. การทดสอบการออกฤทธิ์การยับยั้งอัลไซเมอร์

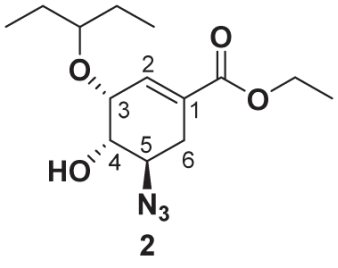
อนุพันธ์ของโอเซลทามิเวียร์ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดจะถูกนำไปทดสอบการยับยั้งการทำงานของ Acetylcholinesterase โดยการเตรียมสารละลาย DTBN 10 nM (3.96mg/ml) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 100 mM ที่ pH = 7-8 โดยมีสารตั้งต้นเป็น Acetylthiocholine Iodide 75 mM (21.67/ml) ในน้ำ แล้วนำไปวัดค่า AChE activity ด้วยวิธีของ Ellman (Ellman *et al*., 1961) และมี Galantamine ถูกใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิงในการทดสอบ



ภาพที่ 3 แนวทางการสังเคราะห์อนุพันธ์โอเซลทามิเวียร์ 3, 5 และ 6

ผลการวิจัยและการวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การสังเคราะห์อนุพันธ์โอเซลทามิเวียร์



2

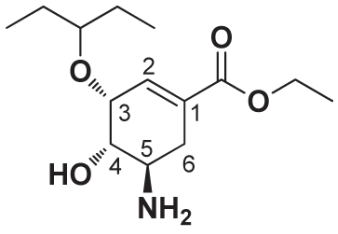
สาร (3*R*, 4*S*, 5*R*)-ethyl 5-azido-4-hydroxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 2

สารมีลักษณะเป็นน้ำมันใสไม่มีสี 2 (0.2773 g, 79%) ค่า Rf chromatogram = 0.69 (Hexane-EtOAc, 5:1) และนำสารที่ได้ไป run ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FTIR และ LC-HRMS ดังนี้

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): (δ, ppm): 0.91 (t, *J*=4.377 Hz, 3H, (-C($CH_2C\underline{H}_3$)), 0.94(t, *J*=4.483 Hz, 3H, (-C($CH_2C\underline{H}_3$)), 1.3(t, *J*=7.13 Hz, 3H, (-O-$CH_2C\underline{H}_3$)), 1.47-1.63(m, 4H, (-C($C\underline{H}_2CH_3)_2$)), 2.26(ddt, J_1=18 Hz, J_2=7.07 Hz, J_3=1.345 Hz, 1H, -$C\underline{H}_2$-), 2.7(br-s, 1H, -OH), 2.84(ddt, J_1=18 Hz, J_2=5.16 Hz, J_3=1.507 Hz, 1H,-$C\underline{H}_2$-), 3.44(quin, *J*=5.809, 1H, (-$C\underline{H}(CH_2CH_3)_2$), 3.77(q, J_1=18 Hz, J_2=4.283 Hz, 1H, (-$C\underline{H}$-OH)), 3.83-3.92(m, 1H, (-$C\underline{H}$-N_3), 4.13(t, *J*=4.124 Hz, 1H, (-$C\underline{H}$-O-), 4.22(q, *J*=7.123 Hz, 2H, (-$C\underline{H}_2CH_3$)), 6.85(m, 1H, (-$C\underline{H}$=C-)); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$) (δ, ppm): 9.52(-C($CH_2\underline{C}H_3)_2$), 9.64(-C($CH_2\underline{C}H_3)_2$), 14.2(-O-$CH_2\underline{C}H_3$), 26.12(-C($\underline{C}H_2CH_3)_2$), 26.50(-C($\underline{C}H_2CH_3)_2$), 28.21(-$\underline{C}H_2$-), 58.8(-$\underline{C}$H-N_3), 61.0(-O-$\underline{C}H_2CH_3$), 70.27(-$\underline{C}$H-O-), 71.11(-$\underline{C}$H-OH), 81.97(-$\underline{C}H(CH_2CH_3)_2$), 130.08(-CH=$\underline{C}$-), 135.11 (-$\underline{C}$H=C-), 165.97(-$\underline{C}$=O); FTIR, cm^{-1}: 3530 (-OH), 2968(C=C-H), 2108(-N_3), 1717(C=O), 1247, 1099, 1053(C-O); LC-HRMS m/z คำนวณ $[M+Na]^+$ $C_{14}H_{23}N_3O_4Na$ = 320.1586 ตรวจพบ 320.1579

ข้อมูลที่สามารถยืนยันโครงสร้าง ที่สังเคราะห์ได้ พบว่า ^{1}H-NMR ที่ δ = 2.7 (br-s, 1H, (-OH)) ได้บ่งบอกถึงตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลเกิดขึ้นจากการเปิดวง epoxide 1 และที่ δ = 3.77 และ 3.83-3.92 ของ 1H ตำแหน่ง 4 และ 5 มีการเลื่อนของค่า δ เมื่อเทียบกับสารตั้งต้นซึ่งตำแหน่ง δ ของ ^{1}H ตำแหน่ง 4 และ 5 มีค่า δ = 3.50 และ FTIR น่าจะเป็นผลที่ยืนยันได้ว่า ที่ 3512 cm^{-1} มีหมู่ไฮดรอซี (-OH), และ cm^{-1} 2108 มีหมู่เอไซด์ ($-N_3$) เกิดขึ้นจริง สุดท้ายเมื่อนำสารไปทำ LC-HRMS m/z คำนวณ $[M+Na]^+$ $C_{14}H_{23}N_3O_4Na$ = 320.1586 ตรวจพบ 320.1579 เป็นการยืนยันว่าเป็นโครงสร้างสารหมายเลข 2 ถูกต้องจริง

สาร (3*R*,4*S*,5*R*)-ethyl 5-amino-4-hydroxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 3



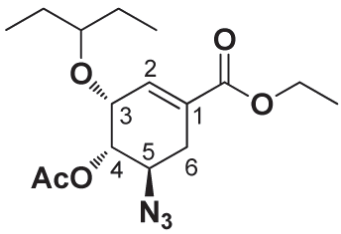
3

สารมีลักษณะเป็นน้ำมันใสไม่มีสี 3 (0.0737 g, 33 %) ค่า Rf chromatogram = 0.23 (EtOAc -Methanol, 5:1) และนำสารที่ได้ไป run ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FTIR และ LC-HRMS ดังนี้

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) (δ, ppm 0.88(t, *J*=7.409 Hz, 3H, (-C($CH_2C\underline{H}_3$)), 0.93(t, *J*=8.18 Hz, 3H, (-C($CH_2C\underline{H}_3$)), 1.30(t, *J*= 7.13 Hz,3H, (-O-$CH_2C\underline{H}_3$)),1.44-1.67(m,4H,(-C($C\underline{H}_2CH_3)_2$)), 2.07(dd, J_1= 17.91 Hz, J_2=8.915 Hz, 1H, (-$C\underline{H}_2$-), 2.86(dd, J_1= 18.107 Hz, J_2=5.362 Hz, 1H, (-$C\underline{H}_2$-), 3.18(q,*J*= 7.2 Hz, 1H,(-$C\underline{H}$-NH_2), 3.45(quin, *J*= 5.773 Hz, 1H, (-$C\underline{H}(CH_2CH_3)_2$), 3.52(dd, J_1= 9.471 Hz, J_2=4.427 Hz, 1H, (-$C\underline{H}$-OH)), 4.12 (t, *J* = 4.426 Hz, 1H, (-$C\underline{H}$-O-)), 4.21(q, *J*= 7.181 Hz 2H,(-O-$C\underline{H}_2CH_3$)), 6.88(m, 1H, (-$C\underline{H}$=C-)); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$) (δ, ppm): 9.52(-C($CH_2\underline{C}H_3)_2$), 9.7(-C($CH_2\underline{C}H_3)_2$), 14.22(-O-$CH_2\underline{C}H_3$), 26.11(-C($\underline{C}H_2CH_3)_2$), 26.26(-C($\underline{C}H_2CH_3)_2$), 32.49(-$\underline{C}H_2$-), 48.46(-$\underline{C}$H-NH_2), 60.87 (-O-$\underline{C}H_2CH_3$), 71.20(-$\underline{C}$H-O-), 73.30(-$\underline{C}$H-OH), 81.82(-$\underline{C}H(CH_2CH_3)_2$), 131.66(-CH=$\underline{C}$-), 134.92(-$\underline{C}$H=C-), 166.52(-$\underline{C}$=O); FTIR, cm^{-1}: 3363(-NH_2), 2966(C=C-H), 1715(C=O), 1250, 1099(C-O)); LC-HRMS m/z คำนวณ $[M+H]^+$ $C_{14}H_{26}NO_4$ = 272.1862 ตรวจพบ 272.1861

ข้อมูลที่สามารถยืนยันโครงสร้าง เนื่องจากพบตำแหน่งของ^{1}H-NMR ที่ δ = 3.77 ถูก shift ไปอยู่ที่ δ = 3.51(m, 1H, (-$C\underline{H}$-NH_2) และที่ δ = 3.83-3.92 ของ 1H ตำแหน่ง 4 ถูก shift ไปอยู่ที่ δ = 3.52(dd, J_1= 9.471 Hz, J_2=4.427 Hz, 1H, (-$C\underline{H}$-OH)) และ FTIR น่าจะเป็นผลที่ยืนยันได้ว่าที่ 3363 เป็นหมู่ (-NH_2) และเมื่อนำสารไปทำ LC-HRMS m/z คำนวณ $[M+H]^+$ $C_{14}H_{26}NO_4$ = 272.1862 ตรวจพบ 272.1861 เป็นการยืนยันว่าเป็นโครงสร้างสารหมายเลข 3 ถูกต้องจริง

สาร (3*R*,4*S*,5*R*)-ethyl 4-acetoxy-5-azido-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 4



4

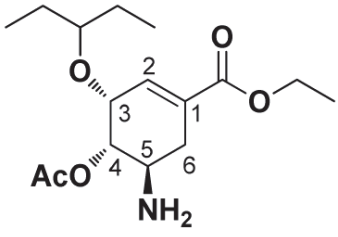
สารมีลักษณะเป็นน้ำมันใสไม่มีสี 4 (0.2565 g, 89%) ค่า Rf chromatogram = 0.24 (Hexane-EtOAc, 4:1) และนำสารที่ได้ไป run ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FTIR และ LC-HRMS ดังนี้

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): (δ, ppm): 0.88 (t, *J*=7.422 Hz, 3H, (-C($CH_2C\underline{H}_3$)), 0.94(t, *J*= 7.428 Hz, 3H, (-C($CH_2C\underline{H}_3$)), 1.31(t, *J*= 7.141 Hz, 3H, (-O-$CH_2C\underline{H}_3$)), 1.45-1.59(m, 4H, (-C($C\underline{H}_2CH_3)_2$)), 2.16(s, 3H, ($C\underline{H}_3$-CO-O-CH-)), 2.25 (ddt, J_1=18.362 Hz, J_2=8.442 Hz, J_3=1.04 Hz, 1H, -$C\underline{H}_2$-), 2.89(dd, J_1=18.404 Hz, J_2=5.858 Hz, 1H,-$C\underline{H}_2$-), 3.29(quin, *J*= 5.748 Hz, 1H, (-$C\underline{H}(CH_2CH_3)_2$)), 4.11(td, J_1=8.707 Hz, J_2=8.707 Hz, J_3=6.044 Hz, 1H, (-$C\underline{H}$-N_3), 4.23(q, *J*= 7.137, 1H, (-O-$C\underline{H}_2CH_3$)), 4.28(t, *J*= 4.202 Hz 1H, (-$C\underline{H}$-O-), 4.98(dd, J_1=9.732 Hz, J_2=3.922 Hz, 1H, (CH_3-CO-O-$C\underline{H}$-)), 6.58(m, 1H, (-$C\underline{H}$=C-)); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$) (δ, ppm): 9.52(-C($CH_2\underline{C}H_3)_2$), 9.90 (-C($CH_2\underline{C}H_3)_2$), 14.21(-O-$CH_2\underline{C}H_3$), 20.98 ($\underline{C}H_3$-CO-O-CH-)), 26.29(-C($\underline{C}H_2CH_3)_2$), 26.40(-C($\underline{C}H_2CH_3)_2$), 29.60(-$\underline{C}H_2$-), 55.72 (-$\underline{C}$H-N_3), 61.09(-O-$\underline{C}H_2CH_3$), 69.49(-$\underline{C}$H-O-), 73.56(CH_3-CO-O-$\underline{C}$H-)), 82.53(-$\underline{C}H(CH_2CH_3)_2$), 129.74(-CH=$\underline{C}$-), 135.29(-$\underline{C}$H=C-), 165.76 (O=$\underline{C}$-$OCH_2CH_3$), 170.42(O=$\underline{C}$-$CH_3$); FTIR, cm^{-1}: 2966(C=C-H), 1250, 1099(C-O), 1743.68 (O=C-CH_3), 2108 (-N_3), 1717(O=C-OCH_2CH_3)); LC-HRMS m/z คำนวณ $[M+Na]^+$ $C_{16}H_{25}N_3O_5$ Na = 362.1692 ตรวจพบ 362.1691

ข้อมูลที่สามารถยืนยันโครงสร้าง เนื่องจากพบตำแหน่งของ ^{1}H NMR ที่ δ = 4.91(s, 3H, ($C\underline{H}_3$-CO-O-) เกิดขึ้นแสดงว่ามีหมู่อะเซตัลเกิดขึ้นจริง และได้ยืนยันด้วย ^{13}C NMR ที่ 73.56 (CH_3-CO-O-$\underline{C}$H-)), 20.98 ($\underline{C}H_3$-CO-O-CH-)), 170.42 (O=$\underline{C}$-CH_3) พร้อมกับข้อมูลของ FTIR, cm^{-1} ที่ 1743.68 (O=C-CH_3), 2108 (-N_3), 1717 (O=C-OCH_2CH_3) ตามลำดับ สุดท้ายทำ LC-HRMS m/z คำนวณ $[M+Na]^+$ $C_{16}H_{25}N_3O_5Na$ = 362.1692 ตรวจพบ 362.1691 เป็นการยืนยันว่าเป็นโครงสร้างสารหมายเลข 4 ถูกต้องจริง

สาร (3*R*,4*S*,5*R*)-ethyl 4-acetoxy-5-amino-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 5

สารมีลักษณะเป็นน้ำมันใส 5 (0.1419 g, 60%) ค่า Rf chromatogram = 0.67 (EtOAc) และนำสารที่ได้ไป run ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FTIR และ LC-HRMS ดังนี้



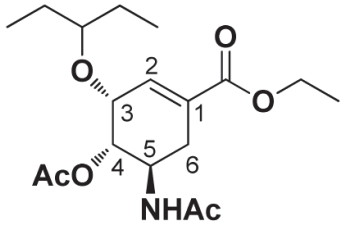
5

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): (δ, ppm): 0.88(t, *J*= 7.464 Hz, 3H, (-C($CH_2C\underline{H}_3$)) , 0.94(t, *J*=7.402 Hz, 3H, (-C($CH_2C\underline{H}_3$)), 1.29(t, *J*= 7.105 Hz, 3H, (-O-$CH_2C\underline{H}_3$)), 1.43-1.65(m, 4H,(-C($C\underline{H}_2CH_3)_2$)), 2.01(s, 3H, ($C\underline{H}_3$-CO-O-CH-)), 2.07(dd, J_1= 17.2825 Hz, J_2=8.015 Hz, 1H, -$C\underline{H}_2$-), 2.88 (br-s, 1H, -NH_2), 3.3(dd, J_1=18.049 Hz, J_2=5.427 Hz, 1H, -$C\underline{H}_2$-), 3.46(quint, *J*= 5.818 Hz, 1H, (-$C\underline{H}(CH_2CH_3)_2$), 3.64(d, *J*=8.192 Hz, 1H, (-$C\underline{H}$-NH_2), 4.07(t, *J*= 4.376 Hz 1H, (-$C\underline{H}$-O-), 4.20(q, *J*= 7.08, 1H, (-O-$C\underline{H}_2CH_3$)), 5.95(d, *J*=6.927 Hz, 1H, (CH_3-CO-O-$C\underline{H}$-)), 6.88(m, 1H, (-$C\underline{H}$=C-)); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$) (δ, ppm): 9.35(-C($CH_2\underline{C}H_3)_2$),

9.63(-C(CH_2<u>C</u>H_3)$_2$), 14.07(-O-CH_2<u>C</u>H_3), 23.07(<u>C</u>H_3-CO-O-CH-)), 26.08(-C(<u>C</u>H_2CH_3)$_2$), 26.45(-C(<u>C</u>H_2CH_3)$_2$), 30.04(-<u>C</u>H_2-), 47.24(-<u>C</u>H-NH_2), 60.86(-O-<u>C</u>H_2CH_3), 70.96(-<u>C</u>H-O-), 71.32(CH_3-CO-O-<u>C</u>H-)), 82.07(-<u>C</u>H(CH_2CH_3)$_2$), 130.95(-CH=<u>C</u>-), 135.22(-<u>C</u>H=C-), 166.19(O=<u>C</u>-OCH_2CH_3), 171.43(O=<u>C</u>-CH_3); FTIR, cm^{-1}: 2965(C=C-H), 1244, 1100(C-O), 3294(-NH_2), 1714(O=C-OCH_2CH_3)); LC-HRMS m/z คำนวณ $[M+Na]^+$ $C_{16}H_{27}NO_5Na$ = 336.1787 ตรวจพบ 336.1781

ข้อมูลที่สามารถยืนยันโครงสร้าง เนื่องจากพบตำแหน่งของ ^{1}H-NMR ที่ δ = 2.88(br-s, 2H, -NH_2), และ FTIR, cm^{-1} ที่ 3294(-NH_2) เป็นการยืนยันถึงการเปลี่ยนจากหมู่เอไซด์ไปเป็นหมู่อะมิโน และเมื่อนำสารไปทำ LC-HRMS m/z คำนวณ $[M+Na]^+$ $C_{16}H_{27}NO_5Na$ = 336.1787 ตรวจพบ 336.1781 เป็นการยืนยันว่าเป็นโครงสร้างสารหมายเลข 5 ถูกต้องจริง

สาร (3*R*,4*S*,5*R*)-ethyl 5-acetamido-4-acetoxy-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate 6



6

สารมีลักษณะเป็นน้ำมันเหลืองอ่อนใส 5 (0.1 g, 81%) ค่า Rf chromatogram = 0.58 (Hexane-EtOAc, 4:1) และนำสารที่ได้ไป run ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FTIR และ LC-HRMS ดังนี้

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): (δ, ppm): 0.88(t, *J*= 7.361 Hz, 3H, (-C(CH_2<u>C</u>H_3)), 0.94(t, *J*=7.329 Hz, 3H, (-C(CH_2<u>C</u>H_3)), 1.29(t, *J*= 7.114 Hz, 3H, (-O-CH_2<u>C</u>H_3)), 1.51(quint, *J*=7.272, 4H, (-C(<u>C</u>H_2CH_3)$_2$)), 1.95(s, 3H, (<u>C</u>H_3-CO-O-CH-)), 2.11(s, 3H, (<u>C</u>H_3-CO-NH-CH-)), 2.15 (dd, J_1= 17.5815 Hz, J_2=8.963 Hz, 1H, (-<u>C</u>H_2-), 2.98 (dd, J_1=18.198 Hz, J_2=5.817 Hz, 1H, -<u>C</u>H_2-), 3.34(quin, *J*= 5.774 Hz, 1H, (-<u>C</u>H(CH_2CH_3)$_2$), 4.17(t, *J*= 4.106 Hz 1H, (-<u>C</u>H-O-), 4.2(q, *J*= 7.057, 1H, (-O-<u>C</u>H_2CH_3)), 4.58(td, J_1=8.707 Hz, J_2=8.707 Hz, J_3=6.044 Hz, 1H, (-<u>C</u>H-NH-), 4.97(dd, J_1= 10.519 Hz, J_2=3.879 Hz, 1H, (CH_3-CO-O-<u>C</u>H-)), 6.04(d, *J*= 8.374 Hz, 1H, (-N<u>H</u>-) , 6.85(m, 1H, (-<u>C</u>H=C-)); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$) (δ, ppm): 9.14(-C(CH_2<u>C</u>H_3)$_2$), 9.75(-C(CH_2<u>C</u>H_3)$_2$), 14.08(-O-CH_2<u>C</u>H_3), 20.90(<u>C</u>H_3-CO-O-CH-)), 23.12(<u>C</u>H_3-CO-NH-CH-)), 26.21(-C(<u>C</u>H_2CH_3)$_2$), 26.40(-C(<u>C</u>H_2CH_3)$_2$), 30.85(-<u>C</u>H_2-), 44.65(-<u>C</u>H-NH-), 60.87(-O-<u>C</u>H_2CH_3), 69.87(-<u>C</u>H-O-), 72.32(CH_3-CO-O-<u>C</u>H-)), 82.55(-<u>C</u>H(CH_2CH_3)$_2$), 130.62(-CH=<u>C</u>-), 135.00(-<u>C</u>H=C-), 165.97 (O=<u>C</u>-OCH_2CH_3), 170.04(-NH-C=O), 171.29 (O=<u>C</u>-CH_3); FTIR, cm^{-1}: 2966(C=C-H), 1242, 1063(C-O), 1740(O=C-CH_3), 3281(-NH), 1716(O=C-OCH_2CH_3)); LC-HRMS m/z คำนวณ $[M+Na]^+$ $C_{18}H_{29}NO_6Na$ = 378.1893 ตรวจพบ 378.1894

ข้อมูลที่สามารถยืนยันโครงสร้าง เนื่องจากพบตำแหน่งของ ^{1}H NMR ที่ δ = 4.97(s, 3H, (C<u>H</u>$_3$-CO-O-) และที่ δ = 4.57(s, 3H, (C<u>H</u>$_3$-CO-NH-) เกิดขึ้นแสดงว่ามีหมู่อะเซติลเกิดขึ้นจริง 2 หมู่ และยังได้ยืนยันด้วย ^{13}C NMR ที่ 20.90 (<u>C</u>H$_3$-CO-O-CH-)), 23.12(<u>C</u>H$_3$-CO-NH-CH-) พร้อมกับข้อมูลของ FTIR, cm^{-1} ที่ ที่ 3281(-NH) ตามลำดับ สุดท้ายทำ LC-HRMS m/z คำนวณ $[M+Na]^+$ $C_{18}H_{29}NO_6Na$ = 378.1893 ตรวจพบ 378.1894 เป็นการยืนยันว่าเป็นโครงสร้างสารหมายเลข 6 ถูกต้องจริง

2. ผลทดสอบการออกฤทธิ์การยับยั้งอัลไซเมอร์

รายงานผลการทดลองเป็นค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความสามรถในการยับยั้งการทำงานของ Acetylcholinesterase ด้วยความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้นกับเอนไซม์ที่เตรียมไว้ สามารถหาได้โดยการนำมาเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Inhibition%) กับความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบ ณ เวลา 15-30 นาที แสดงดัง ตารางที่ 1

จากผลการทดลองของสารที่ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์และได้นำสารไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอัลไซเมอร์นี้ ซึ่งเป็นงานวิจัยที่ยังไม่มีผู้ใดรายงานการทดสอบมาก่อน พบว่าค่าการยับยั้ง (%Inhibition) ของสารตัวที่ 3 มีค่าสูงถึง 56.99% เมื่อเทียบกับ Galantamine คิดเป็น 100% แสดงให้เห็นว่าหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และสเตอริโอเคมีของตำแหน่งที่ 4 ในโครงสร้างของสารตัวที่ 3 นี้เป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญในการทำหน้าที่ยับยั้งการทำงาน Anti-Acetylcholinesterase ดังนั้นผู้วิจัยวางแผนหาวิธียืนยันผลต่อการยับยั้งการทำงาน Anti-Acetylcholinesterase โดยการปรับเปลี่ยนหมู่ต่างๆ ที่นอกเหนือจากหมู่ไฮดรอกซิล เช่น หมู่อะมิโน (-NH_2) หรือหมู่อื่นๆ เพื่อสรุปว่าเกิดจากตำแหน่ง สเตอริโอเคมี หรือชนิดของหมู่ที่ปรับเปลี่ยนต่อไป

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางยา Anti–Acetylcholinesterase Activity

สารตัวที่	ผลการทดสอบฤทธิ์ทางยา (Anti–Acetylcholinesterase Activity)	
	IC_{50} (μM)	%Inhibition
Galantamine	1.45 ± 0.04	100
3	91.14 ± 2.36	56.99
5	inactive	8.49
6	inactive	11.92

สรุปผลการวิจัย

ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Oseltamivir ทั้งหมด 3 ตัว เพื่อเป็นสารตัวใหม่ๆ ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งโรคอัลไซเมอร์ โดยเริ่มจากสารตั้งต้น Epoxide 1 ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่ใช้สังเคราะห์ยา Oseltamivir phosphate สารตัวที่ 3 เกิดจากการทำปฏิกิริยาแทนที่แบบ และทำปฏิกิริยา reduction ตามลำดับ, สารตัวที่ 5 เกิดจากการทำปฏิกิริยาแทนที่แล้วตามด้วยปฏิกิริยา Esterification และทำปฏิกิริยา reduction ตามลำดับ และสารตัวที่ 6 สามารถทำได้ 2 วิธี วิธีที่ 1 เกิดจากการนำสารตัวที่ 3 มาทำปฏิกิริยา Esterification ส่วนวิธีที่ 2 เกิดจากการนำสารตัวที่ 5 มาทำปฏิกิริยา Esterification เมื่อได้สารทั้ง 3 ตัวแล้ว จึงนำไปทดสอบฤทธิ์ทางการยับยั้งโรคอัลไซเมอร์ และผลปรากฏว่าสารตัวที่ 3 มีฤทธิ์ยับยั้งโรคอัลไซเมอร์ได้ดีที่สุด (IC_{50} = 91.14 μM) และ สามารถยับยั้งได้ถึง 56.99 % เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานที่ใช้เป็นยา Galantamine 100.98%

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิจัยสำหรับอาจารย์หลังสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอก จากกองทุนวิจัย และสร้างสรรค์คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และขอขอบคุณ อ.ดร.อนันต์ อธิพรชัย จากภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งอัลไซเมอร์

เอกสารอ้างอิง

จิตร สิทธิอมร, นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย, สมศักดิ์ ภัคภิญโญ, จิโรจ ศศิปรียจันทร์, คณิศักดิ์ อรวีระกุล, ยง ภู่วรรณ, ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ, สันนิภา สุรทัตน์, วิจิตร บรรลุนารา, รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, รัตยา ลือชาพุฒิพร, วิชชุดา ธนกิจเจริญพัฒน์, ภูรี อนันตโชติ, อลงกร อมรศิลป์ และ สุทธิพร จิตต์มิตรภาพ. 2550. **ไข้หวัดนกพลิกสถานการณ์ด้วยความรู้.** พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ณัฐพงษ์ บุญปอง. 2556. แอซิติลโคลีน. **หมวดหมู่วิทยาศาสตร์ อะซีติลโคลีน.** มหาวิทยาลัยมหิดล. แหล่งที่มา: http://www.sahavicha.com/?name=knowledge&file=readknowledge&id=1398, 24 พฤศจิกายน 2556.

มานิตย์ วัชร์ชัยนันท์. 2557. **Managing Alzheimer's Disease.** สารานุกรมเสรี. แหล่งที่มา: http://www.vatchainan2.blogspot.com/2013/01/management-of-alzheimers-disease-2.html, 28 มกราคม 2557.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology** 7: 88-95.

Federspiel, M., Fischer, R., Henning, M., Mair, H.J., Oberhauser, T., Rimmler, G., Albiez, T., Bruhin, J., Estermann, H., Gandert, C., Gockel, V., Gotzo, S., Hoffmann, U., Huber, G., Janatsch, G., Lauper, S., Rockel-Stabler, O., Trussardi, R. and Zwahlen, A. G. 1999. Industrial synthesis of the key precursor in the synthesis of the anti-influenza drug Oseltamivir Phosphate (Ro 64-0796/002, GS-4104-02): Ethyl (3R,4S,5S)-4,5-epoxy-3-(1-ethyl-propoxy)-cyclohex-1-ene-1-carboxylate. **Organic Process Research & Development** 3: 266-274.

Kim, C.U., Lew, W., Williams, M.A., Liu, H., Zhang, L., Swaminathan, S., Bischofberger, N., Chen, M.S., Mendel, D.B., Tai, C.Y., Laver, W.G. and Stevens, R.C. 1997. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: Design, synthesis and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. **Journal of American Chemical Society** 119: 681-690.

Kim, C.U., Lew, W., Williams, M.A., Wu, H., Zhang, L., Chen, X., Escarpe, P.A., Mendel, D.B., Laver, W.G. and Steven, R.C. 1998. Structure-activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry** 41: 2451-2460.

Rohloff, J.C., Kent, K.M., Postich, M.J., Becker, M.W., Chapman, H.H., Kelly, D.E., Lew, W., Louie, M.S., McGee, L.R., Prisbe, E.J., Schultze, L.M., Yu, R.H. and Zhang, L. 1998. Practical total synthesis of the anti-influenza drug GS-4104. **Journal of Organic Chemistry** 63: 4545-4550.