

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine และการออกฤทธิ์เป็นสารต้านแบคทีเรีย
และสารยับยั้งการทำงานของ NorA ปัมในโมเลกุลเดียวกัน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
พฤษภาคม 2552

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine และการออกฤทธิ์เป็นสารต้านแบคทีเรีย
และสารยับยั้งการทำงานของ NorA ปัมในโมเลกุลเดียวกัน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

พฤษภาคม 2552

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine และการออกฤทธิ์เป็นสารต้านแบคทีเรีย
และสารยับยั้งการทำงานของ NorA ปัมป์ในโมเลกุลเดียวกัน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
พฤษภาคม 2552

บงกช ตันวิรัตน์. (2552). การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine และการออกฤทธิ์
เป็นสารต้านแบคทีเรียและสารยับยั้งการทำงานของ NorA ปัมในโมเลกุลเดียวกัน
ปริญญาโท วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
คณะกรรมการควบคุม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริธร สโมสร และอาจารย์ ดร. ประเสริฐ
พัฒนาประทีป.

กลไกการดื้อยาอย่างหนึ่งที่แบคทีเรียใช้ในการกำจัดยาปฏิชีวนะต่างๆออกจากเซลล์คือ
กลไกการใช้โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น efflux pump ในเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* มี NorA
efflux pump ทำหน้าที่กำจัดสารต้านแบคทีเรียและยาชนิดต่างๆที่มีโครงสร้างหลากหลายแตกต่างกัน
ออกจากเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น berberine และ ciprofloxacin มีผลทำให้สารเหล่านั้นหมด
ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในงานวิจัยนี้สารอนุพันธ์ 13-O-substituted
berberine ได้ถูกออกแบบและสังเคราะห์ขึ้น เพื่อให้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ
ของ NorA efflux pump ได้ในโมเลกุลเดียวกัน (dual-action agent) ซึ่งในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์
นี้ ทำได้โดยเตรียม berberine (7) ให้เป็นสารอนุพันธ์ phenol betaine (87) ซึ่งเป็นตัวกลางที่สำคัญ
ในการนำไปทำปฏิกิริยา O-alkylation ต่อกับสารประกอบ alkyl halide ต่างๆ ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์
ตามต้องการ พบว่าสาร 9,10-Dimethoxy-13-(2-naphthylmethylenoxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-
benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (95) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียคู่กับฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ
ของ NorA efflux pump ได้ดีที่สุดของสารในกลุ่มนี้ที่มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ arylmethylhylenoxy และ
hetroarylmethylhylenoxy (94-97) โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสูงกว่าสารตั้งต้น berberine มากกว่า
30 เท่า และนอกจากนี้สารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine ที่มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ alkyloxy และ
arylmethylhylenoxy (88-95) ได้นำมาทดสอบฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติล
โคลีนเอสเตอเรส พบว่าสารอนุพันธ์ทุกตัวมีฤทธิ์ต่ำกว่าสารตั้งต้น berberine 2-20 เท่า

Synthesis of 13-O-Substituted Berberine Derivatives and Their Dual Mode of
Action as Antibacterial Agents and NorA Efflux Pump Inhibitors



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University

May 2009

Bongkot Tanwirat. (2009). *Synthesis of 13-O-Substitued Berberine Derivatives and their Dual Mode of Action as Antibacterial Agents and NorA Efflux Pump Inhibitors.*

Master thesis, M.Sc. (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Asst. Prof. Dr. Siritron Samosorn, Dr. Prasert Pattanapratchee.

One of the main drug resistance mechanisms in bacteria is conferred by efflux pump proteins. The NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*, extrudes a variety of structurally unrelated antibacterials (e.g. berberine, and ciprofloxacin) from bacterial cells, thus compromising their activity. In this context, a series of 13-O-substituted berberine derivatives has been designed and prepared as potential dual-action agent with antibacterial and NorA efflux pump inhibitory activities. The key synthetic precursor was the phenol betaine (**87**) derived from the alkaloid berberine (**7**). O-Alkylation of **87** with the appropriate alkyl halide gave the desired products. One of the dual-action agents, 9,10-dimethoxy-13-(2-naphthylmethylenoxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**95**), was the most active compound in the series of the arylmethylenoxy and heteroarylmethylenoxy substituents (**94-97**) showed over 30-fold higher activity than the parent antibacterial agent berberine. Furthermore, the series of alkoxy and arylmethylenoxy substituents (**82-95**) were tested as acetylcholinesterase inhibitors. They showed 2-to 20-fold lower activity than the parent berberine.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine และการออกฤทธิ์เป็นสารต้านแบคทีเรีย
และสารยับยั้งการทำงานของ NorA ปัมในโมเลกุลเดียวกัน

ของ

บงกช ตันวิรัตน์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่..... เดือน..... พ.ศ. 2552

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ประธาน

..... ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริธร สโมสร)

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ)

..... กรรมการ

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ประเสริฐ พัฒนาประทีป)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริธร สโมสร)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ประเสริฐ พัฒนาประทีป)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจาก คณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริธร สโมสร ประธาน ควบคุมปริญญานิพนธ์ที่ให้โอกาส ให้ความกรุณาดูแล ให้คำแนะนำปรึกษาในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น ในการวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการเขียนปริญญานิพนธ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็น กำลังใจที่สำคัญที่ทำให้ผู้วิจัยรู้สึกรักในงานวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา และกรุณาเป็นประธานกรรมการในการ สอบปากเปล่า ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ประเสริฐ พัฒนาประทีป ที่ให้ความกรุณาเป็น กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล ที่ให้ความกรุณาในการ เป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์และได้รับความอนุเคราะห์ในการบันทึกข้อมูล mass spectra

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ ความเมตตาแก่ผู้วิจัย ในการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเคมี เพื่อนๆ พี่ๆ นิสิตปริญญโททุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

บงกช ตันวิรัตน์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
1.1 สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม isoquinoline alkaloids และฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	1
1.2 ปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรีย.....	4
1.3 กลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย.....	6
1.4 การทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) หรือ AChE.....	9
1.5 การออกแบบสารอนุพันธ์ของ berberine (7).....	10
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	12
ความสำคัญของงานวิจัย.....	12
ขอบเขตของการวิจัย.....	12
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	13
2.1 การออกฤทธิ์ต้านจุลชีพและการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีกับการออกฤทธิ์ของ berberine (7) และ isoquinoline alkaloids อื่นๆที่เกี่ยวข้อง.....	13
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA ปัม ในโมเลกุลเดียวกัน.....	19
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส.....	20
3 วิธีการดำเนินวิจัย.....	23
3.1 วัสดุ และอุปกรณ์เครื่องมือ สารเคมี.....	23
3.2 การสังเคราะห์ของสารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine.....	24
3.3 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์.....	26
3.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส.....	27

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย.....	28
3.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump.....	29
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลจากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	29
4 ผลการทดลอง.....	35
4.1 ข้อมูลทางกายภาพและสเปกโทรสโคปีของสารที่สังเคราะห์.....	35
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump.....	52
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	53
5.1 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ berberine.....	52
5.1.1 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-oxidoberberine (87).....	55
5.1.2 การสังเคราะห์สารประกอบ 9,10,13-Trimethoxy-5,6- dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium iodide (88).....	56
5.1.3 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-Ethoxy- 9,10-dimethoxy- 5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6- a]quinolizinium sulfate (89).....	57
5.1.4 การสังเคราะห์สารประกอบ 9,10-Dimethoxy-13-propyloxy- 5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6- a]quinolizinium bromide (90).....	58
5.1.5 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-Butyloxy-9,10-dimethoxy- 5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6- a]quinolizinium bromide (91).....	58
5.1.6 การสังเคราะห์สารประกอบ 9,10-Dimethoxy-13-pentyloxy- 5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6- a]quinolizinium bromide (92).....	59

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5.1 (ต่อ)	
5.1.7 การสังเคราะห์สารประกอบ 9,10-Dimethoxy-13-hexyloxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (93).....	59
5.1.8 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-Benzylloxy-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (94).....	60
5.1.9 การสังเคราะห์สารประกอบ 9,10-Dimethoxy-13-(2-naphthylmethylenoxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (95).....	60
5.1.10 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-(4-Cyanobenzylloxy)-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (96).....	61
5.1.11 การสังเคราะห์สารประกอบ 9,10-dimethoxy-13-(2-pyridylmethylenoxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo [5,6-a]quinolizinium bromide (97).....	62
5.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	62
5.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส.....	64
5.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ที่ดื้อยา.....	67
5.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump.....	68
5.3 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	70
บรรณานุกรม.....	71
อภิธานศัพท์.....	74
ภาคผนวก.....	76
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	85

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 อนุพันธ์ของสารประกอบ isoquinoline alkaloids.....	20
2 สภาวะของปฏิกิริยา alkylation การทำสารให้บริสุทธิ์ และร้อยละของ ผลิตภัณฑ์.....	30
3 ข้อมูล ^1H NMR ของสารประกอบ 85 86 และ 87	39
4 ข้อมูล ^1H NMR ของสารประกอบ 88 และ 89 เทียบกับสาร berberine (7) บันทึกใน CDCl_3 , CD_3OD ตามลำดับ.....	40
5 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 90 บันทึกใน CDCl_3	41
6 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 91 บันทึกใน CDCl_3	42
7 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 92 บันทึกใน CDCl_3	43
8 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 93 บันทึกใน CDCl_3	45
9 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 94 บันทึกใน CDCl_3	46
10 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 95 บันทึกใน CDCl_3	47
11 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของ สารประกอบ 96 บันทึกใน CDCl_3	49
12 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของ สารประกอบ 97 บันทึกใน CDCl_3	50
13 ผลิตภัณฑ์และร้อยละของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา O-alkylation.....	54
14 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ของสาร berberine (7) 13-hydroxy berberine (86) และสาร 88-95	64
15 ความเข้มข้นต่ำสุดในหน่วย μM ของสาร 7 และ สาร 94-97 ที่มีฤทธิ์ ต้านแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> สายพันธุ์ 8325-4 K1758 และ K2378.....	68

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 สูตรโครงสร้างของ ephedrine (1).....	1
2 สูตรโครงสร้างของ cocaine (2).....	2
3 สูตรโครงสร้างของ nicotine (3).....	2
4 สูตรโครงสร้างของ cinchonine (4).....	3
5 สูตรโครงสร้างของ morphine (5).....	3
6 สูตรโครงสร้างของ tryptophan (6).....	3
7 สูตรโครงสร้างของ berberine (7).....	4
8 ตัวอย่างยาปฏิชีวนะต้านเชื้อแบคทีเรีย.....	5
9 การทำลายยาปฏิชีวนะโดยการใช้เอนไซม์.....	7
10 การจับกันระหว่างกรดอะมิโนที่ปลายสายเปปไทด์ของ peptidoglycan กับ ยา Vancomycin	7
11 การกำจัดยาออกจากเซลล์โดยใช้ efflux pump proteins.....	8
12 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสของอะซิติลโคลีนด้วยเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส.....	9
13 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ 7 8 และ 9.....	10
14 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ 10 และ 11.....	11
15 โครงสร้างและตำแหน่งในโมเลกุลของสารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine (12).....	11
16 แสดงโครงสร้างทั่วไปและตำแหน่งในโมเลกุลของ isoquinoline alkaloids อื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง.....	13
17 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ 7 14 และ 15.....	14
18 สูตรโครงสร้างสารประกอบ 16-25.....	15
19 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ 14 และ 26-44.....	16
20 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ berberine (7) และ tetrahydroberberine (45).....	17
21 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ 46-66.....	18
22 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ 81 และ 82.....	22

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ

หน้า

23	สูตรโครงสร้างของสารประกอบ 83 และ 84	22
24	การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine (88-97).....	25
25	วิธีทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE.....	28
26	การสังเคราะห์สารประกอบ 13-oxidoberberine (87).....	55
27	สูตรโครงสร้างของสาร (7 86 และ 88-97).....	63
28	โครงสร้างของ ethidium bromide.....	69
29	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง fluorescence intensity และ ปริมาณ EtBr ที่สะสมภายในเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป.....	69



บทที่ 1

บทนำ

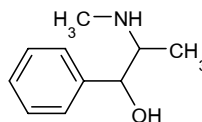
ภูมิหลัง

1.1 สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม isoquinoline alkaloids และฤทธิ์ทางชีวภาพ

อัลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และเชื้อจุลินทรีย์ พบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย อัลคาลอยด์เป็นสารที่มีไนโตรเจนอะตอมเป็นองค์ประกอบอย่างน้อย 1 อะตอม บางชนิดอาจมีไนโตรเจนถึง 5 อะตอม ไนโตรเจนอาจเป็น primary amine (RNH_2) secondary amine (R_2NH) หรือ tertiary amine (R_3N) ซึ่งทำให้อัลคาลอยด์มีคุณสมบัติเป็นเบส เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดจะเกิดเป็นเกลือ quaternary ammonium $[\text{R}_4\text{N}^+\text{X}^-]$ ซึ่งละลายน้ำได้ ในปี ค.ศ. 1805 มีนักวิทยาศาสตร์สามารถแยกอัลคาลอยด์ให้บริสุทธิ์ได้ โดยอัลคาลอยด์ตัวแรกที่แยกออกมาได้ คือ มอร์ฟีน (morphine) ซึ่งเป็นอัลคาลอยด์ที่ได้จากยางและเมล็ดของต้นฝิ่น (*Papaveraceae somniferum*) มอร์ฟีนมีคุณสมบัติในการบรรเทาปวดและทำให้หลับ การแบ่งประเภทของอัลคาลอยด์นิยมแบ่งตามโครงสร้างของนิวเคลียสที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (พงษ์ทิพย์ โกเมศโสภา. 2540: 217) เช่น

1.1.1 Phenylethylamine alkaloids

เป็นอัลคาลอยด์ที่มีนิวเคลียสเป็น phenylethylamine พบในพืชวงศ์ Ephedra เช่น ephedrine (1) สามารถแยกออกจากพืชได้ครั้งแรกในปี ค.ศ 1887 ephedrine มีผลในการขยายช่องตา ต่ำ และเพิ่มความดันโลหิตในเส้นเลือดแดง นอกจากนี้ ยังมีคุณสมบัติทำให้เยื่อจมูกหดตัว ในทางการแพทย์จึงใช้สารละลาย 0.5-1.0% ephedrine พ่นจมูกเพื่อช่วยคลายความกดตันในจมูกและลดอาการคัดจมูก

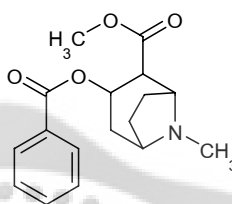


ephedrine (1)

ภาพประกอบ 1 สูตรโครงสร้างของ ephedrine (1)

1.1.2 Pyrrolidine alkaloids

เป็นอัลคาลอยด์ที่มีนิวเคลียสเป็น pyrrolidine พบในใบของต้น *Peruvian coca* เช่น cocaine (2) และยังพบในพืชวงศ์ *Crotalaria* และ *Senecio* ซึ่งมีพิษต่อดับ ทำให้คนพื้นเมืองของหมู่เกาะอินเดียตะวันตกป่วยเป็นโรคตับแข็ง เพราะรับประทานชาจากพืชชนิดนี้เป็นประจำ สำหรับประเทศไทย พืชที่มีพิษต่อดับ เช่น หิงห้อย และหญ้างวงช้าง

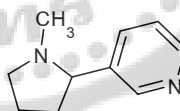


cocaine (2)

ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างของ cocaine (2)

1.1.3 Pyridine and piperidine alkaloids

เป็นอัลคาลอยด์ที่มีนิวเคลียสเป็น pyridine และ piperidine พบในใบยาสูบ เช่น nicotina ซึ่งประกอบด้วยอัลคาลอยด์ชนิดต่าง ๆ ประมาณ 12 ชนิด แต่ที่พบมากที่สุดและเป็นที่รู้จักกันมากที่สุดชนิดหนึ่ง คือ nicotine (3) ซึ่งประมาณ 2-8 % พบในใบยาสูบที่แห้ง เป็นพิษต่อระบบหายใจ และเป็นยาฆ่าแมลง

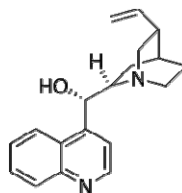


nicotine (3)

ภาพประกอบ 3 สูตรโครงสร้างของ nicotine (3)

1.1.4 Quinoline alkaloids

เป็นอัลคาลอยด์ที่มีนิวเคลียสเป็น quinoline เช่น cinchonine (4) และ quinine เป็นอัลคาลอยด์ที่พบได้จากเปลือกของต้น *Cinchona* ใช้รักษาโรคมาลาเรีย

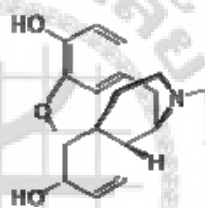


cinchonine (4)

ภาพประกอบ 4 สูตรโครงสร้างของ cinchonine (4)

1.1.5 Phenanthrene alkaloids

เป็นอัลคาลอยด์ที่มีนิวเคลียสเป็น phenanthrene พบได้ในฝิ่น ได้แก่ morphine codeine และ thebaine ในทางการแพทย์ใช้ morphine (5) ที่อยู่ในรูปเกลือซัลเฟต เป็นยาบรรเทาอาการเจ็บปวดและทำให้สงบ โดยจะไปกดระบบประสาทบางส่วนทำให้ง่วงหลับ แต่เป็นยาเสพติดได้

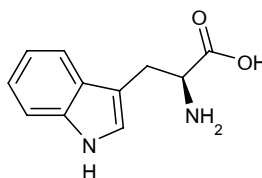


morphine (5)

ภาพประกอบ 5 สูตรโครงสร้างของ morphine (5)

1.1.6 Indole alkaloids

เป็นอัลคาลอยด์ที่มีนิวเคลียสเป็น indole พบได้ ทั้งพืช และ สัตว์ มีส่วนสำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์ประสาท เช่น tryptophan (6)

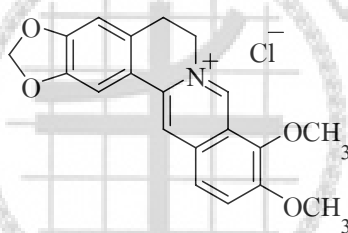


tryptophan (6)

ภาพประกอบ 6 สูตรโครงสร้างของ tryptophan (6)

1.1.7 Isoquinoline alkaloids

เป็นอัลคาลอยด์ที่มีนิวเคลียสเป็น isoquinoline พบในพืชวงศ์ Berberidaceae Menispermaceae Ranunculaceae Papaveraceae Rutaceae Rubiaceae Rhamnaceae Magnoliaceae และ Annonaceae เช่น berberine (7) (Vanerstorom; et al. 1987: 1084-1087) พบมากในประเทศ ญี่ปุ่น จีน และเกาหลี ในญี่ปุ่นมีการนำส่วนต่าง ๆ ของพืชที่มี berberine เป็นส่วนประกอบ มาใช้เป็นยาแผนโบราณในการรักษาโรคต่างๆ เช่น อหิวาตกโรค ท้องเสีย รักษาแผลอักเสบ (Iwasa; et al. 1999: 1077-1083) และในประเทศไทยพบในพืชหลายชนิด เช่น ขมิ้นเครือ (*Arcangelisia flava*) และ เห้ม (*Rhizophoreceae ceriops*) (เต็ม สมิตินันท์; 2544: 62) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยเพิ่มเติมว่า berberine มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลายครอบคลุมถึงการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Iwasa; et al. 1996: 469-478) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Park; et al. 2006: 3913-3916) ฤทธิ์ต้านเชื้อมาเลเรีย (Iwasa; et al. 1999: 1077-1083) และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase หรือ AChE) (Cho; et al. 2006: 2317-2320)

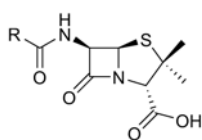


berberine (7)

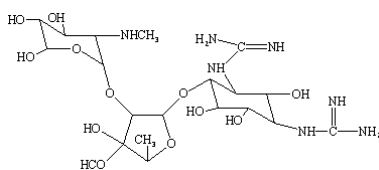
ภาพประกอบ 7 สูตรโครงสร้างของ berberine (7)

1.2 ปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรีย

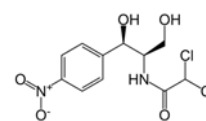
ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบันทำให้ยาหลายชนิดหมดประสิทธิภาพในการรักษา ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียมีการปรับตัวต่อต้านยาโดยวิธีการต่างๆ เพื่อขัดหรือลดประสิทธิภาพของยา ซึ่งตลอดระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนายาปฏิชีวนะเพื่อใช้ต้านแบคทีเรียมาโดยตลอด ยาตัวแรกที่ใช้ในการรักษา คือ ซัลโฟนาไมด์ (sulfonamide) และยังมีตัวอื่นอีกมากมาย เช่น เพนิซิลลิน (penicillin) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ครอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) เตตราซัยคลิน (tetracycline) อิริโทรมัยซิน (erythromycin) แวนโคมัยซิน (vancomycin) เมทิซิลลิน (methicillin) ออมพลีซิลลิน (ampicillin) และ เซฟาโลสปอริน (cephalosporin)



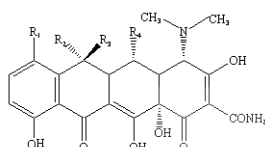
penicillin



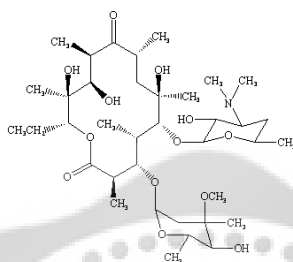
streptomycin



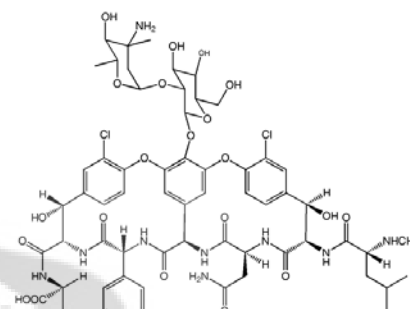
chloramphenicol



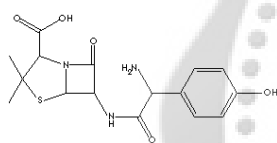
tetracycline



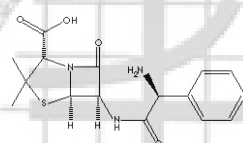
erythromycin



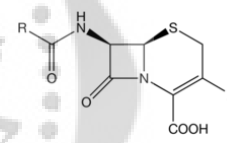
vancomycin



methicillin



ampicillin



cephalosporin

ภาพประกอบ 8 ตัวอย่างยาต้านเชื้อแบคทีเรีย

กลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มหลักดังนี้

1.2.1 ยากลุ่มยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (cell wall synthesis inhibitors)

เซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนที่แตกต่างจากเซลล์ของมนุษย์ คือ ผนังเซลล์ (cell wall) ซึ่งช่วยปกป้องเซลล์จากสิ่งแวดล้อม การสร้างผนังเซลล์จะใช้เอนไซม์ทรานส์เพปทิเดส (transpeptidase) ซึ่งไม่มีในมนุษย์ ดังนั้นการสร้างผนังเซลล์จึงเป็นเป้าหมายหนึ่งในการค้นหาและออกแบบยา การยับยั้งการสร้างผนังเซลล์มีผลทำให้เชื้อถูกทำลายหรือหยุดการเจริญเติบโต (โอภา วัชรคุปต์. 2551; 213-214.)

1.2.2 ยากลุ่มยับยั้งการสร้างโปรตีน (protein synthesis inhibitors)

ตามปกติแบคทีเรียจัดเป็นเซลล์โพรแคริโอตซึ่งมีไรโบโซมที่ใช้ในการสร้างโปรตีนเป็นชนิด 70S ซึ่งเป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาที่ยับยั้งการสร้างโปรตีน ยาแต่ละชนิดออกฤทธิ์ที่ไรโบโซมในส่วนย่อยแตกต่างกันไป (โอภา วัชรคุปต์. 2551; 213-214.)

1.2.3 ยากลุ่มยับยั้งหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane function inhibitors)

สารที่ออกฤทธิ์โดยตรงต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย มีผลต่อการซึมผ่าน ทำให้สารประกอบภายในเซลล์รั่วออกมาภายนอกเซลล์ (โอภา วัชรคุปต์. 2551: 213-214.)

1.2.4 ยากลุ่มยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก (nucleic acid synthesis inhibitors)

ยาในกลุ่มนี้จะจับกับเอนไซม์ของแบคทีเรียที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ DNA มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย (ยุพิน สัมวรินทร์. 2543: 440.)

1.2.5 ยากลุ่มยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึม (antimetabolites)

ยาในกลุ่มนี้จะมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดนิวคลีอิก เช่น rifampin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ DNA-dependent RNA polymerase (ภัทรชัย กীরตสิน. 2549: 136)

จากการค้นพบและพัฒนาต่อต้านแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ ส่งผลให้อัตราการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคติดเชื้อแบคทีเรียลดลงตามลำดับ อย่างไรก็ตาม โรคติดเชื้อจากแบคทีเรียยังคงเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในอันดับต้นๆ เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด สืบเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียได้พัฒนาการดื้อยาขึ้น ตามชนิดของยาต้านแบคทีเรียที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ส่งผลให้การรักษานั้นล้มเหลว

1.3 กลไกการดื้อยาของแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท

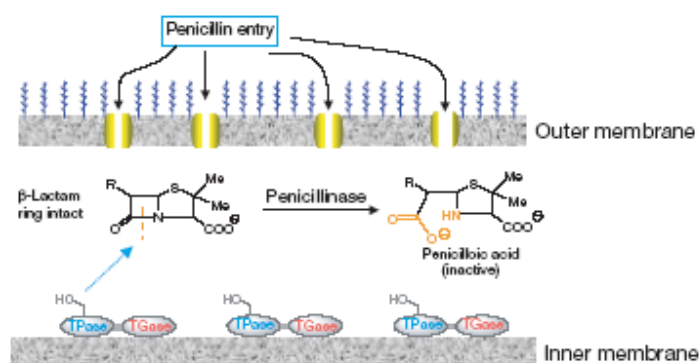
1.3.1 intrinsic resistance หมายถึง เชื้อแบคทีเรียมีการดื้อยาอยู่แล้วตามธรรมชาติ ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อไม่มีเป้าหมายในการออกฤทธิ์ต่อต่อต้านแบคทีเรานั้น หรือเชื้อมีกลไกป้องกันไม่ให้ยาจับกับเป้าหมายในการออกฤทธิ์ได้ ทำให้เชื้อไม่ไวต่อยา

1.3.2 acquired resistance หมายถึง การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นภายหลัง จากเดิมที่เคยไวต่อยานั้นมาก่อน (Luvira V. 2006: 453-459.) ซึ่งแบคทีเรียสามารถพัฒนาพันธุกรรมให้สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะที่กล่าวมาแล้วในข้างต้นเพื่อความอยู่รอด

แบคทีเรียได้พัฒนากลไกการดื้อยาหลายชนิดที่ทำให้ยาต้านแบคทีเรียมากมายไม่สามารถทำอันตรายตัวมันได้ ซึ่งมีกลไกหลัก 5 แบบ ดังนี้คือ

1.3.2.1 การผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ทำลายยา (Production of a drug-destroying enzyme)

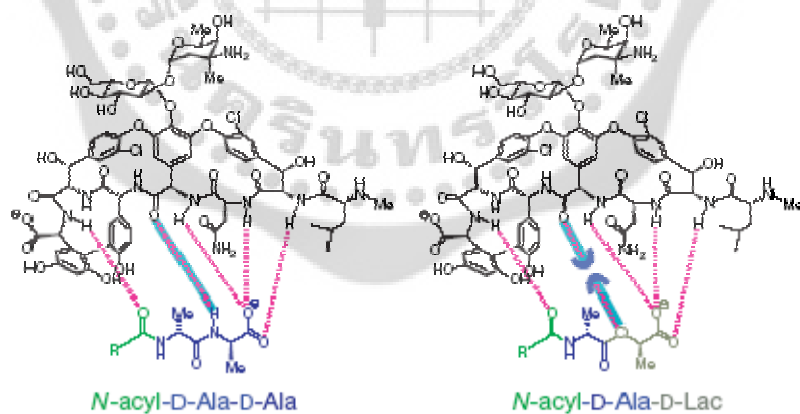
การทำลายยาปฏิชีวนะให้หมดฤทธิ์โดยการใช้เอนไซม์ เช่น การผลิตเอนไซม์ penicillinase ที่สามารถทำลายยาในกลุ่ม penicillin โดยการเปิดวง β -lactam ให้สาร penicilloic acid ซึ่งไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (ภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 การทำลายยาปฏิชีวนะโดยใช้เอนไซม์

1.3.2.2 การปรับเปลี่ยนบริเวณเป้าหมายที่แบคทีเรีย (Bacterial target modification)

การเปลี่ยนแปลงบริเวณที่เป้าหมายของยาทำให้ยาไม่สามารถไปจับที่บริเวณนั้น แล้วออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ เช่น การเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนที่ปลายสายเปปไทด์ของ peptidoglycan จาก D-Ala-D-Ala ซึ่งเป็นเป้าหมายของยา vancomycin ไปเป็น D-Ala-D-Lac มีผลทำให้ความสามารถของ vancomycin ในการจับกับกรดอะมิโนที่ปลายสายเปปไทด์ของ peptidoglycan ลดลงทำให้แบคทีเรียไม่ถูกทำลาย (Walsh C. 2000: 775-781.) (ภาพประกอบ 10)



ภาพประกอบ 10 การจับกันระหว่างกรดอะมิโนที่ปลายสายเปปไทด์ของ peptidoglycan กับยา vancomycin

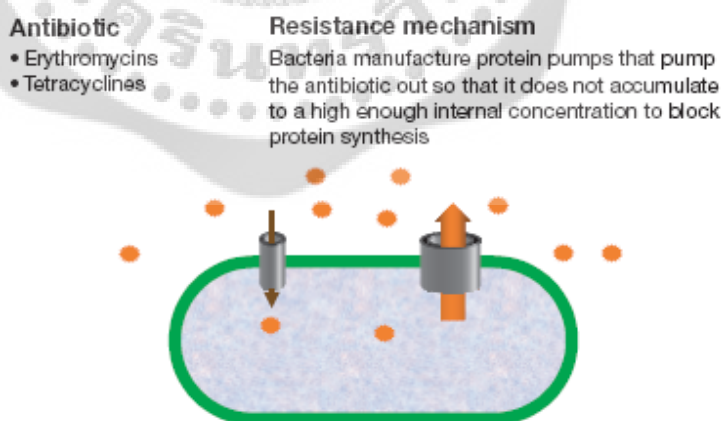
1.3.2.3 การสร้างวิถีทางใหม่ (New pathway for formation of the product of the target enzyme) เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้ขั้นตอนการสร้างสารจำเป็นต่างๆ เพื่อการเจริญเติบโตและการดำรงชีพ

ของแบคทีเรียถูกยาปฏิชีวนะยับยั้ง ตัวอย่างเช่น ยาในกลุ่ม sulfonamides ออกฤทธิ์โดยแย่งกับ *p*-aminobenzoic acid (PABA) ในการจับกับเอนไซม์ dihydrofolate synthetase ของแบคทีเรียเพื่อสังเคราะห์กรดโฟลิก (folic acid) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เบส thymine เพื่อสร้าง DNA ต่อไป แต่เชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม sulfonamides บางชนิดเกิดจากเชื้อสร้าง DNA โดยกรด folic จากภายนอกเซลล์ เพื่อหลีกเลี่ยงขั้นตอนการสังเคราะห์กรดโฟลิกจาก PABA

1.3.2.4 การเพิ่มปริมาณของเป้าหมายที่ยาไปจับ (Overproduction of drug target) เช่น การผลิต PABA ให้เพิ่มมากขึ้น ซึ่ง PABA จะใช้เป็นวัตถุดิบในการสร้างกรดนิวคลีอิกของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ปริมาณยาที่ใช้ในการรักษาปกติไม่สามารถยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียได้ (ยุพิน สัจวะรินทร์. 2543; 440.)

1.3.2.5 การลดปริมาณการสะสมของยาที่ต้านแบคทีเรียภายในเซลล์ (Reducing antibacterial permeability)

เมื่อแบคทีเรียรับยาเข้าสู่เซลล์ ยาจะเข้าไปสะสมภายในเซลล์ จนมีปริมาณมากพอที่จะฆ่าแบคทีเรีย ดังนั้นแบคทีเรียจะสร้างกลไกที่ลดปริมาณยาด้านแบคทีเรียที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ โดยการใช้ efflux pump ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อเมมเบรน (transmembrane protein-based efflux pump) ทำหน้าที่ปั๊มยาออกจากเซลล์ เช่น ยาปฏิชีวนะ erythromycin และ tetracyclines ส่งผลให้ปริมาณยาเหล่านี้ที่สะสมภายในเซลล์มีความเข้มข้นไม่เพียงพอที่จะทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ (ภาพประกอบ 11)



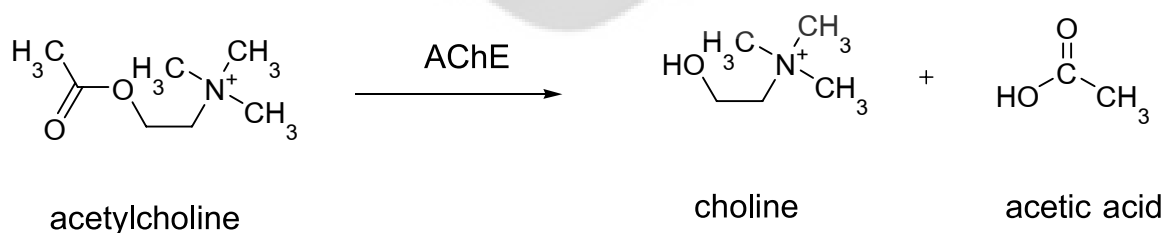
ภาพประกอบ 11 การกำจัดยาออกจากเซลล์โดยใช้ efflux pump proteins

ประเภทของ efflux pump ของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการดื้อยาแบ่งออกเป็น 2 ประเภท จำแนกตามแหล่งพลังงานที่ใช้ในการขับยาออกจากเซลล์ และลำดับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน

1.3.2.5.1 pump ที่ใช้พลังงานจากการสลาย ATP (adenosine triphosphate) ได้แก่ ATP-binding cassette ABC superfamily

1.3.2.5.2 pump ที่ใช้แรงขับเคลื่อนจากปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าซึ่งเกิดจากความแตกต่างระหว่างค่า pH ภายในและภายนอกเซลล์ ได้แก่ Major facilitator superfamily (MFS) Multidrug and toxic compound extrusion family (MATE) Small multidrug resistance family (SMR) และ Resistance-nodulation-cell division family (RND) (Li และ Nikaido. 2004: 159-204.) ตัวอย่างเช่น เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มี NorA pump ที่จัดอยู่ในกลุ่ม MFS

เอนไซม์ AChE เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์สารสื่อประสาทอะซิติลโคลีน (acetylcholine หรือ ACh) ให้เป็นโคลีน (choline) และกรดอะซิติก (acetic acid) (ภาพประกอบ 12)



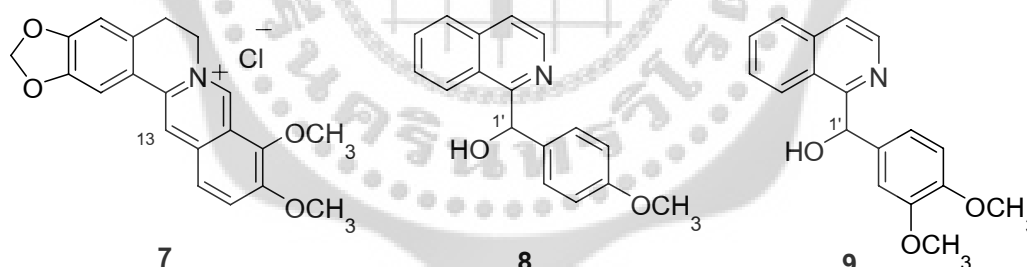
ภาพประกอบ 12 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะซิติกโคลีนด้วยเอนไซม์อะซิติกโคลีนเอสเทอเรส

ในแมลง พบว่า สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ AChE นั้นมีผลทำให้ปริมาณการสะสมของสารสื่อประสาท ACh มีปริมาณมาก ส่งผลให้แมลงเกิดอาการสั่นหรือชัก เป็นอัมพาต และตายได้ในที่สุด

(สมิง เก้าเจริญ. 2528: 216-224.) นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) พบว่าแนวทางหนึ่งที่สามารถใช้รักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้คือ การใช้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE เพื่อช่วยเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาท ACh ที่บริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์ประสาทในสมองของผู้ป่วยให้มากขึ้น (Relman. 1991: 349-352. และ Camps; et al. 2000: 4657-4666.)

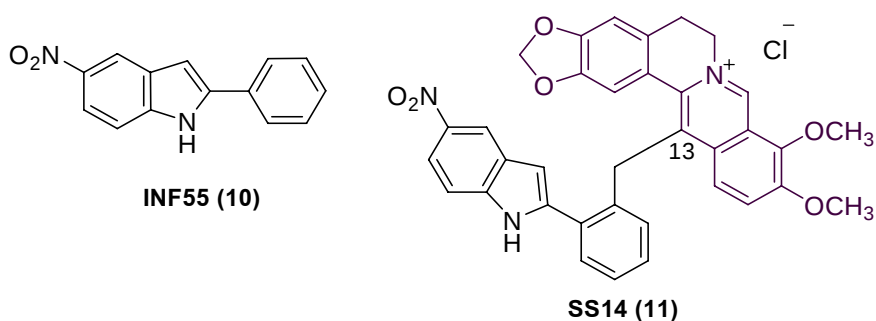
1.5 การออกแบบสารอนุพันธ์ของ berberine (7)

จากความรู้ทางชีวโมเลกุลที่ว่าเอนไซม์ AChE เป็นตัวทำลายสารสื่อประสาท ACh ในแมลงและมีรายงานว่า สารประกอบ **8** และ **9** ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม isoquinoline alkaloids ที่มีหมู่ hydroxy เป็นหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 1' มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ AChE ดีกว่าสารอนุพันธ์อื่นๆ ในกลุ่มเดียวกันที่ไม่มีหมู่ hydroxy เป็นหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งดังกล่าว และพบว่าสาร isoquinoline alkaloids ตัวอื่นๆ ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน เช่น berberine (ภาพประกอบ 13) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากการที่ berberine มี quaternary ammonium ion ในโมเลกุลคล้ายคลึงกับสารสื่อประสาท ACh (Shemeller; et al. 1997: 257-266.) ดังนั้นการนำ berberine มาใช้เป็นสารต้นแบบ (lead compound) ในการสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีให้ได้เป็นสารอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่มีการเติมออกซิเจนอะตอมที่ตำแหน่ง 13 ของ berberine คาดว่าน่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ AChE ที่ดีขึ้น



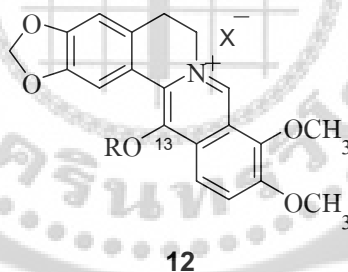
ภาพประกอบ 13 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **7** **8** และ **9**

นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า สาร SS14 (**11**) ซึ่งเป็นสารลูกผสม (hybrid) ของ berberine และ สารยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump INF55 (**10**) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยาโดยมีการผลิต NorA efflux pump มากกว่าสายพันธุ์ปกติ (NorA overexpressing strain) (Ball; et al. 2006: 594-600.)



ภาพประกอบ 14 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **10** และ **11**

ดังนั้นในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ berberine นั้น งานวิจัยนี้จะทำการเติมหมู่ alkoxy (OR) ให้เป็นหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 13 (**12a**) เพื่อช่วยเพิ่มการเกิดพันธะไฮโดรเจนในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารอนุพันธ์ (**12**) กับบริเวณโพรงการจับ (binding site) ของเอนไซม์ AChE และทำการเติมหมู่ arylmethylenoxy (OCH_2Ar) ซึ่งมีโครงสร้างที่ซับซ้อนน้อยกว่าสาร **10** ให้เป็นหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 13 (**12b**) เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านแบคทีเรียและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump



a : R = alkyl, X = bromide, iodide or sulfate

b : R = arylmethylene, X = bromide

ภาพประกอบ 15 โครงสร้างและตำแหน่งในโมเลกุลของสารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine (**12**)

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารหลัก berberine (7) ให้เป็นสารอนุพันธ์ที่มีหมู่ alkoxy และหมู่ arylmethylenoxy เป็นหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งที่ 13
2. เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างของสารประกอบที่ได้จากการสังเคราะห์
3. เพื่อนำสารที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบ
 - 3.1ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส
 - 3.2 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย
 - 3.3 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทำให้ทราบถึงวิธีการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสารและทราบสูตรโครงสร้างของสารที่ปรับเปลี่ยนโครงสร้างแล้ว
2. ทราบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump ของสารที่สังเคราะห์ได้

ขอบเขตของการวิจัย

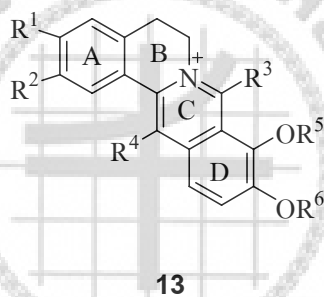
1. ศึกษาการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสารประกอบ berberine โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี เช่น Alkylation และ Oxidation
2. ศึกษาสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีชนิดต่างๆ เช่น เทคนิคทางนิวเคลียสมิกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) และ แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry)
3. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การออกฤทธิ์ด้านจุลชีพและการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีกับการออกฤทธิ์ของ berberine (7) และ isoquinoline alkaloids อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

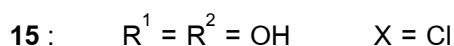
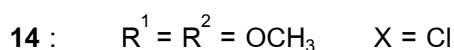
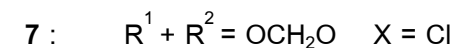
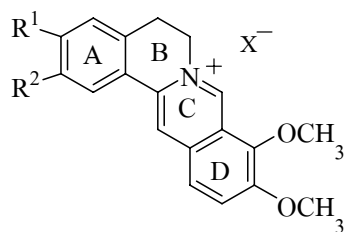
จากการศึกษาวิจัยพบว่าสารในกลุ่ม isoquinoline alkaloids มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย การออกฤทธิ์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงนั้นมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของ isoquinoline alkaloids โดยที่ alkaloids เหล่านี้ประกอบด้วยวง 4 วง คือ วง A B C และ D ซึ่งหมู่แทนที่บนวง A C และ D จะมีผลต่อการออกฤทธิ์ จึงทำให้มีผู้สนใจทำการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่บนวง A C และ D เพื่อศึกษาผลการออกฤทธิ์ของสารเหล่านั้นเทียบกับสารต้นแบบ



ภาพประกอบ 16 แสดงโครงสร้างทั่วไปและตำแหน่งในโมเลกุลของ isoquinoline alkaloids อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 ผลของหมู่แทนที่บนวง A

จากการศึกษาหมู่แทนที่บนวง A ของ isoquinoline alkaloids พบว่าเมื่อหมู่แทนที่ R^1 และ R^2 คือหมู่ methylenedioxy (สาร 7) ให้ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ดีกว่าเมื่อหมู่แทนที่ R^1 และ R^2 คือหมู่ methoxy (14) และหมู่ hydroxy (15) 2-4 เท่า (Iwasa; et al. 1996: 469-478.) นอกจากนี้ สาร 7 ยังมีฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* *Salmonella enteritidis* *Escherichia coli* และเชื้อรา *Candida albicans* ได้ดีกว่า สาร 14 ถึง 2 เท่า (Iwasa; et al. 1998: 748-751.)



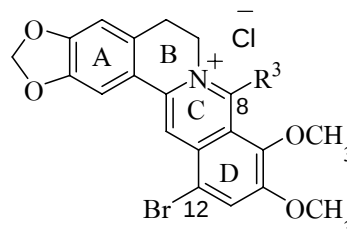
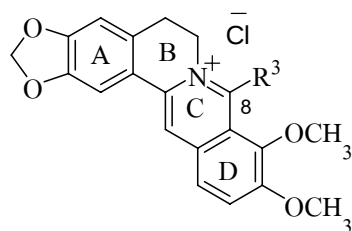
ภาพประกอบ 17 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ 7 14 และ 15

2.1.2 ผลของหมู่แทนที่บนวง C

อิวาสะ และคนอื่นๆ ได้ทำการศึกษาผลของหมู่แทนที่ R^3 และ R^4 และผลของ quaternary ammonium ion บนวง C ต่อการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและมาลาเรีย โดย :

ก. เมื่อหมู่แทนที่ R^3 คือหมู่ alkyl ของ berberine ที่มีจำนวนคาร์บอน 1-4 และ 6 อะตอม (สาร 16-20) พบว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *S. aureus* *B. subtilis* และ *S. enteritidis* เพิ่มขึ้นเมื่อความยาวของหมู่แอลคิล เพิ่มขึ้น จากจำนวนคาร์บอน 1-4 อะตอม โดยที่ 8-butyl berberine (19) มีฤทธิ์สูงสุด สามารถต้านเชื้อ *S. aureus* ที่ค่า minimum inhibitory concentration (MIC) 15.6 $\mu\text{g/ml}$ และ 31.2 $\mu\text{g/ml}$ ต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *S. enteritidis* ตามลำดับ ส่วนสาร 20 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียลดลง (Iwasa; et al. 1998: 1150-1153.)

ข. การเติมอะตอมของโบรมีน บนวง D ของสาร 16-20 ได้เป็นสาร 21-25 มีผลทำให้การออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน โดยที่ 12-bromo-8-hexyl berberine (25) มีฤทธิ์สูงสุดที่ค่า MIC 3.9 $\mu\text{g/ml}$ ต่อเชื้อ *S. aureus* *B. subtilis* และ *S. enteritidis* (Iwasa; et al. 1998: 1150-1153.)



16 : $R^3 = \text{CH}_3$

17 : $R^3 = \text{C}_2\text{H}_5$

18 : $R^3 = \text{C}_3\text{H}_7$

19 : $R^3 = \text{C}_4\text{H}_9$

20 : $R^3 = \text{C}_6\text{H}_{13}$

21 : $R^3 = \text{CH}_3$

22 : $R^3 = \text{C}_2\text{H}_5$

23 : $R^3 = \text{C}_3\text{H}_7$

24 : $R^3 = \text{C}_4\text{H}_9$

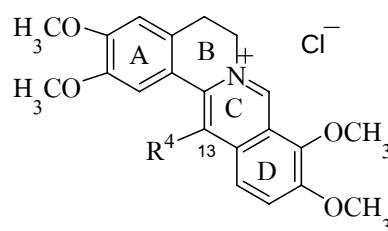
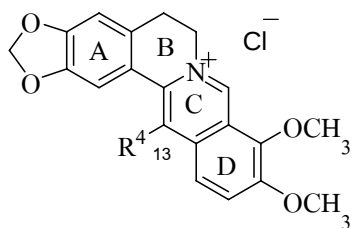
25 : $R^3 = \text{C}_6\text{H}_{13}$

ภาพประกอบ 18 สูตรโครงสร้างสารประกอบ 16-25

ค. เมื่อหมู่แทนที่ R^4 ของ berberine คือหมู่ alkyl ที่มีจำนวนคาร์บอน 1-4 และ 6 อะตอม (สาร 26-30) พบว่า 13-hexyl berberine (30) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงสุดที่ค่า MIC 3.91 $\mu\text{g/ml}$ ต่อเชื้อ *S. aureus* ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่า berberine ถึง 128 เท่า และเมื่อ R^4 ของ palmatine (14) คือหมู่ alkyl ที่มีจำนวนคาร์บอน 1-4 และ 6 อะตอม (สาร 40-44) พบว่า 13-hexyl palmatine (44) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงสุดที่ค่า MIC 7.82 $\mu\text{g/ml}$ ต่อเชื้อ *S. aureus* (Iwasa; et al. 1997: 196-198.)

ง. เมื่อหมู่แทนที่ R^4 ของ berberine คือหมู่ OH OMe OEt OCOOEt และ OCON(Me)₂ (สาร 31-35) พบว่าฤทธิ์ต้านมาลาเรียต่อเชื้อ *Plasmodium falciparum* ลดลงเมื่อเทียบกับ berberine

จ. เมื่อหมู่แทนที่ R^4 ของ berberine คือหมู่ benzyl ที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *para* ทั้งที่เป็นหมู่ให้และดึงอิเล็กตรอน พบว่า ถ้าเป็นหมู่ที่ให้อิเล็กตรอน คือ 13-(4-*tert*-butyl benzyl)berberine (36) และ 13-(4-isopropyl benzyl)berberine (37) มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสูงที่สุดที่ค่า MIC 1 $\mu\text{g/ml}$ ต่อเชื้อ *C. albicans* *C. tropicalis* *C. lusitaniae* *C. krusei* และ *C. neoformans* ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่า 13-(4-trifluoromethyl benzyl)berberine (38) และ 13-(4-trifluoromethoxy benzyl)berberine (39) ซึ่งมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน ถึง 4 เท่า (Park; et al. 2006: 3913-3916.)



26 : $R^4 = \text{CH}_3$

27 : $R^4 = \text{C}_2\text{H}_5$

28 : $R^4 = \text{C}_3\text{H}_7$

29 : $R^4 = \text{C}_4\text{H}_9$

30 : $R^4 = \text{C}_6\text{H}_{13}$

31 : $R^4 = \text{OH}$

32 : $R^4 = \text{OCH}_3$

33 : $R^4 = \text{OC}_2\text{H}_5$

34 : $R^4 = \text{OCOOEt}$

35 : $R^4 = \text{OCON}(\text{Me})_2$

14 : $R^4 = \text{H}$

40 : $R^4 = \text{CH}_3$

41 : $R^4 = \text{C}_2\text{H}_5$

42 : $R^4 = \text{C}_3\text{H}_7$

43 : $R^4 = \text{C}_4\text{H}_9$

44 : $R^4 = \text{C}_6\text{H}_{13}$

36 : $R^4 = (\text{H}_3\text{C})_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2$

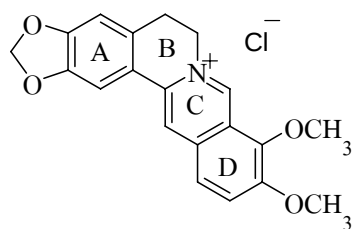
37 : $R^4 = (\text{H}_3\text{C})_2\text{HC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2$

38 : $R^4 = \text{F}_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2$

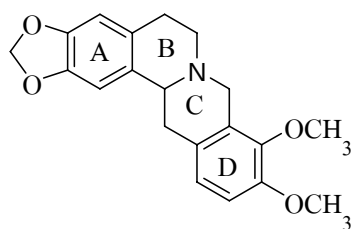
39 : $R^4 = \text{F}_3\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2$

ภาพประกอบ 19 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **14** และ **26-44**

ฉ. การรีดิวซ์ วง C ของสาร **7** ซึ่งเป็นวงอะโรมาติกให้เป็น tetrahydroberberine (**45**) พบว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* ลดลงอย่างมาก (Iwasa; et al. 1996: 469-478.)



(7)

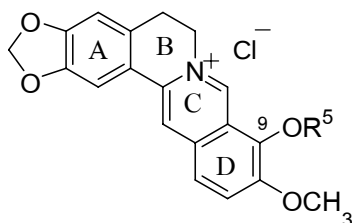


(45)

ภาพประกอบ 20 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ berberine (7) และ tetrahydroberberine (45)

2.1.3 ผลการศึกษาหมู่แทนที่ บนวง D

ชนิดของหมู่แทนที่ที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 มีผลอย่างมากต่อการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่ม berberine alkaloids จากรายงานการวิจัยของ จีอง และคนอื่นๆ (Jeon; et al. 2002: 391-394.) พบว่า การเปลี่ยนหมู่ methoxy ที่ตำแหน่งที่ 9 ของ berberine ให้เป็นหมู่ hydroxy ได้เป็น berberrubine (46) พบว่าสาร 46 มีการออกฤทธิ์ดีกว่าสาร 7 และเมื่อเปลี่ยนหมู่ R⁵ ของสาร 46 ให้เป็นหมู่ alkyl ที่มีจำนวนคาร์บอน 2-18 อะตอม (สาร 47-57) พบว่าสารอนุพันธ์ที่ความยาวของหมู่อัลคิลที่มีจำนวนคาร์บอน 7-11 อะตอม (สาร 51-55) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงกว่าสาร 46 โดยฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงสุดเมื่อมีจำนวนคาร์บอนของหมู่ alkyl ในช่วง 7-11 อะตอม และการออกฤทธิ์ลดลงเมื่อจำนวนคาร์บอนน้อยกว่า 7 อะตอมหรือเกิน 11 อะตอม (สาร 47-50 และ 56-57) ในทำนองเดียวกัน R⁵ ของสาร 46 ให้เป็นหมู่ acyl จำนวนคาร์บอน 2-19 คาร์บอน (สาร 58-66) พบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนคาร์บอน เพิ่มขึ้นถึง 10 อะตอม (สาร 62) และเมื่อจำนวนคาร์บอนมากกว่านั้น (สาร 63-66) พบว่าการออกฤทธิ์จะลดลง (Kim; et al. 2002: 277-281. และ Hong; et al. 2000: 361-363.)



- | | |
|----------------------------------|------------------------------------|
| 46 : $R^5 = H$ | 58 : $R^5 = COCH_3$ |
| 47 : $R^5 = C_2H_5$ | 59 : $R^5 = COC_2H_5$ |
| 48 : $R^5 = CH_2CH_2CH_3$ | 60 : $R^5 = COCH_2CH_2CH_3$ |
| 49 : $R^5 = CH_2(CH_2)_2CH_3$ | 61 : $R^5 = COCH_2(CH_2)_5CH_3$ |
| 50 : $R^5 = CH_2(CH_2)_3CH_3$ | 62 : $R^5 = COCH_2(CH_2)_7CH_3$ |
| 51 : $R^5 = CH_2(CH_2)_5CH_3$ | 63 : $R^5 = COCH_2(CH_2)_9CH_3$ |
| 52 : $R^5 = CH_2(CH_2)_6CH_3$ | 64 : $R^5 = COCH_2(CH_2)_{11}CH_3$ |
| 53 : $R^5 = CH_2(CH_2)_7CH_3$ | 65 : $R^5 = COCH_2(CH_2)_{13}CH_3$ |
| 54 : $R^5 = CH_2(CH_2)_8CH_3$ | 66 : $R^5 = COCH_2(CH_2)_{16}CH_3$ |
| 55 : $R^5 = CH_2(CH_2)_9CH_3$ | |
| 56 : $R^5 = CH_2(CH_2)_{14}CH_3$ | |
| 57 : $R^5 = CH_2(CH_2)_{16}CH_3$ | |

ภาพประกอบ 21 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ 46-66

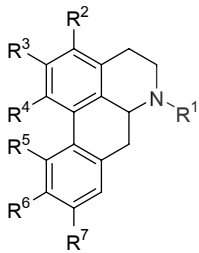
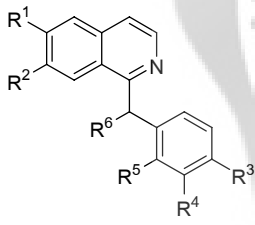
จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีกับการออกฤทธิ์ของ berberine (7) และ isoquinoline alkaloids อื่นๆที่เกี่ยวข้อง พบว่าหมู่ฟังก์ชันที่ช่วยเพิ่มฤทธิ์ต้านจุลชีพประกอบด้วย

- ก. วง A หมู่แทนที่ R^1 และ R^2 ต้องเป็นหมู่ methylenedioxy
- ข. วง C หมู่แทนที่ R^3 และ R^4 ควรมีจำนวนคาร์บอนในช่วง 4-6 คาร์บอน
- ค. วง C ต้องเป็นวง aromatic และไนโตรเจนอะตอมต้องเป็น quaternary ammonium ion
- ง. วง D หมู่แทนที่ R^5 ถ้าเป็นหมู่ alkyl หรือ acyl ควรมีจำนวนคาร์บอนในช่วง 7-11 คาร์บอน และไม่เกิน 10 คาร์บอน ตามลำดับ

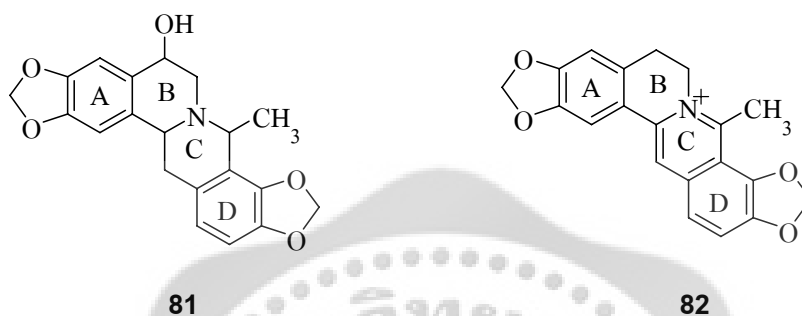
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA ปัมในโมเลกุลเดียวกัน

บอล และคนอื่นๆ (Ball; et al. 2006: 594-600.) ได้ออกแบบโมเลกุลของสารต้านแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่ดื้อยาด้วยกลไก efflux pump โดยการนำ berberine (7) ซึ่งเป็นสารต้านแบคทีเรีย *S. aureus* มีหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของแบคทีเรีย แต่ถูกกำจัดออกจากเซลล์ของแบคทีเรียด้วย NorA efflux pump และนำสาร INF55 (10) (ภาพประกอบ 14 บทที่ 1) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* มาเชื่อมต่อกันด้วยหมู่ methylene (-CH₂-) ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ SS14 (11) ซึ่งเป็นสารต้านแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีกลไกการออกฤทธิ์ 2 ฤทธิ์ในโมเลกุลเดียวกัน โดยด้านหนึ่งของโมเลกุลทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump และเสริมฤทธิ์ให้อีกด้านหนึ่งของโมเลกุลทำหน้าที่ต้านแบคทีเรียโดยไปยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของแบคทีเรานั้น ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสาร 11 พบว่ามีฤทธิ์สูงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อยาด้วยกลไก efflux pump (สายพันธุ์ K2378) ที่ความเข้มข้น 2.1 µg/ml และพบว่ามีฤทธิ์สูงกว่าสารตั้งต้น berberine มากกว่า 200 เท่า นอกจากนี้ได้นำสาร 11 ไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและความเป็นพิษในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) กับพยาธิไส้เดือน *Caenorhabditis elegans* ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Enterococcus faecalis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้พยาธิป่วยและตายในที่สุด (worm curing assay) ผลการทดสอบพบว่าสาร 11 สามารถรักษา *C. elegans* ให้หายป่วยได้และไม่มีความเป็นพิษต่อ *C. elegans* โดยให้ผลการรักษาที่ดีกว่ายาปฏิชีวนะ vancomycin ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

ตาราง 1 (ต่อ)

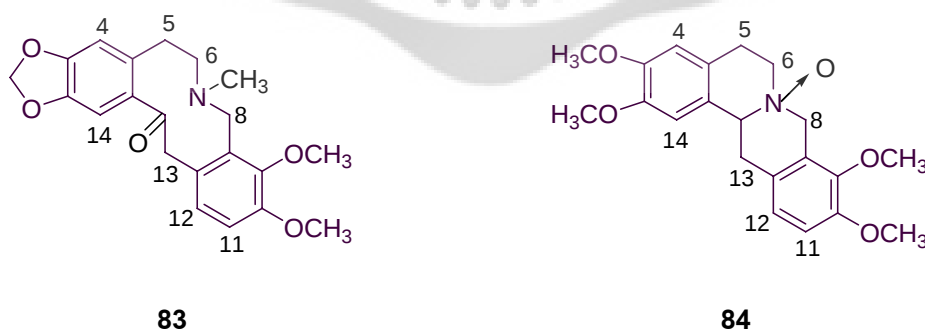
โครงสร้าง	สารประกอบ	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
อนุพันธ์ของ สารประกอบ aporphine								
	74	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
	75	COOCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
อนุพันธ์ของ สารประกอบ isoquinoline								
	8	H	H	OCH ₃	H	H	OH	
	76	H	H	H	H	OCH ₃	OH	
	77	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH	
	9	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	
	78	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	=O	
	79	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	=O	
	80	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	

คูเนสโซวา (Kuznetsova; et al. 2002: 35-39.) ได้ศึกษาการยับยั้งอะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และบิวทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ คือ berberine (**7**) sanguinarine (**81**) และ chelidone (**82**) พบว่าสาร **7** และ สาร **81** มีฤทธิ์ยับยั้งอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส ที่ค่า IC_{50} 0.0005 $\mu\text{g/ml}$, 0.026 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.0008 $\mu\text{g/ml}$, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ



ภาพประกอบ 22 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **81** และ **82**

คิม และคนอื่นๆ (Kim; et al. 2004: 1127-1131.) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ของสารประกอบ isoquinoline alkaloids ที่แยกได้จาก *Corydalis speciosa* ซึ่งประกอบด้วยสารที่ยังไม่เคยมีรายงานโครงสร้าง 2 สารคือ สาร protopine (**83**) และ corynoxidine (**84**) และสารที่เคยมีรายงานโครงสร้างแล้ว 2 สารคือ palmatine (**14**) และ berberine (**7**) โดยทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสาร **7** มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่ค่า IC_{50} 1.11 $\mu\text{g/ml}$



ภาพประกอบ 23 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ **83** และ **84**

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์/เครื่องมือ และสารเคมี

วัสดุและสารเคมี

1. สาร berberine chloride (Fluka: 14050)
2. ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น
3. Acetonitrile (Analytical grade; BDH : 103866x)
4. Aluminium oxide (basic) (Analytical grade; Aldrich : 19,944-3)
5. Anhydrous potassium carbonate (Analytical grade; Riedel-de Haen : 12609)
6. Anhydrous sodium sulfate (Analytical grade; Univar : AF706007)
7. Benzyl chloride (Analytical grade; ACROS organic : 105871000)
8. 1-Bromobutane (Analytical grade; ACROS organic : 106772500)
9. 1-Bromohexane (Analytical grade; Fluka : 17320)
10. 1-Bromopentane (Analytical grade; Fluka : 17920)
11. 1-Bromopropane (Analytical grade; Fluka : 82140)
12. 2-bromomethyl naphthalene (Analytical grade; Fluka : 17617)
13. 2-(bromomethyl)pyridine hydrobromide (Analytical grade; Aldrich : 491047)
14. 4-(bromomethyl)benzonitrile (Analytical grade; Fluka : 17570)
15. Calcium chloride (Analytical grade; Unilab : A960)
16. Celite (Analytical grade; Fluka : 22139)
17. Diethyl sulfate (Analytical grade; Fluka : 32520)
18. Hydrochloric acid 37% (Analytical grade; CARLOERBA : 403872)
19. Iodomethane (Analytical grade; Riedel-de Haen : 03810)
20. Molecular Sieve UOP Type 5A (Analytical grade; Fluka : 69848)
21. Potassium permanganate
22. Pre-coated TLC aluminium sheet of silica gel 60 GF₂₅₄
23. Sodium hydroxide (Analytical grade; MERCK : 6498.1000)
24. สารดูดซับ
Silica gel สำหรับ column chromatography

Silica gel (0.063-0.200mm, Merck : 7734)

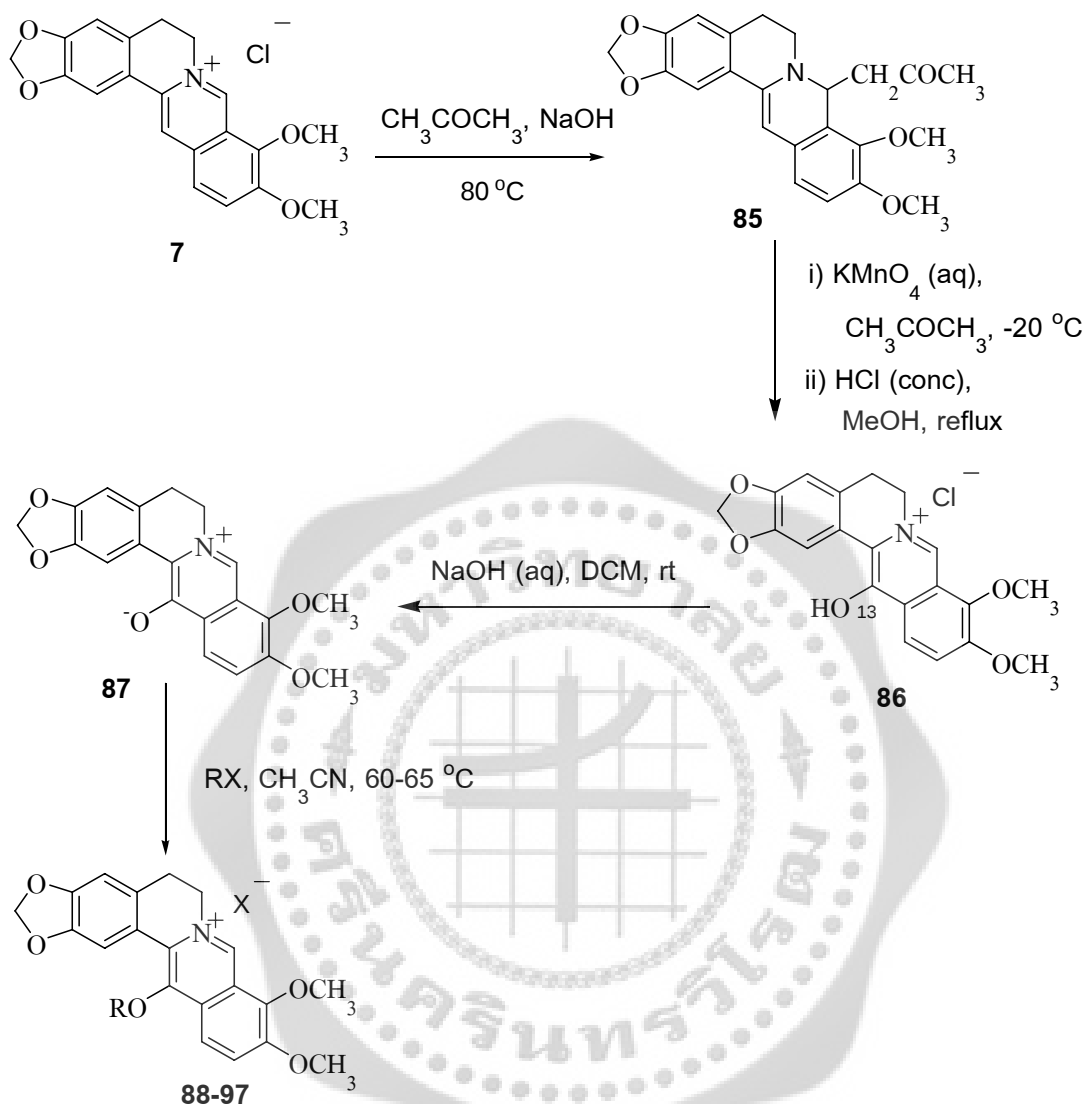
Silica gel (<0.063mm, Merck : 7729)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. หลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm (Spectroline Model CM-10)
2. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin)
3. Nuclear magnetic resonance spectrometer (Bruker AVANCE 300 MHz Varian Unity 300 MHz และ Varian Inova 500 MHz)
4. Rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-114)
5. Mass spectrometer (Micromass Qtof2)

3.2 การสังเคราะห์ของสารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine ทำได้โดยใช้ปฏิกิริยา 4 ขั้นตอน (ภาพประกอบ 24) โดยนำ berberine (7) มาทำปฏิกิริยา Mannich กับ acetone และ sodium hydroxide ได้ สารอนุพันธ์ 8-acetonylhydroberberine (85) จากนั้นทำปฏิกิริยา oxidation ด้วย potassium permanganate ได้สารอนุพันธ์ 13-hydroxyberberine (86) ตามด้วย ปฏิกิริยา deprotonation โดยใช้สารละลาย sodium hydroxide ให้สารอนุพันธ์ berberine phenol betaine (87) ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญ (key precursor) และสุดท้ายนำสาร 87 ไปทำปฏิกิริยา alkylation กับ สารประกอบ alkyl halide ให้เกลือของสารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine (88-97) ตามต้องการ



ภาพประกอบ 24 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine **88-97**

1. ปฏิกริยา Mannich

นำ berberine (7) 5 g (14.70 mmol) เติม acetone 200 ml กวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นค่อยๆ เติม 30% NaOH 100 ml จนกว่าจะได้ pH 11 reflux ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์เติมน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ตกผลึก จากนั้นกรองผลึกและล้างด้วยน้ำเย็น จนกระทั่ง pH ของ filtrate เท่ากับ 7 สุดท้ายล้างผลึกด้วย MeOH ประมาณ 10 ml จะได้ 8-acetyldihydroberberine (85) เป็นของแข็งสีเหลืองสว่างหนัก 4.2 กรัม (72%)

2. ปฏิกริยา Oxidation

นำ 8-acetonyldihydroberberine (**85**) 4.2 g (11.05 mmol) เติม acetone 200 ml กวน ปฏิกริยาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลาย KMnO_4 100 ml (3.16 mmol) ติดตามปฏิกริยาด้วย TLC เมื่อปฏิกริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ กรองตะกอนและล้างตะกอนด้วย acetone นำ ส่วนของ filtrate มาระเหยตัวทำละลายจนแห้ง นำของแข็งที่ได้มาเติม MeOH 30 ml และ hydrochloric acid เข้มข้น 2 ml reflux ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อปฏิกริยาเกิดขึ้น สมบูรณ์ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจะเกิดผลึกขึ้น กรองผลึกและตกผลึกซ้ำ ด้วย 2% EtOH ใน CH_2Cl_2 ล้างผลึกด้วย EtOH ผลึกที่ได้คือ 13-hydroxyberberine (**86**) เป็นของแข็งสีเหลืองเข้มหนัก 2.75 g (71 %)

3. ปฏิกริยา Deprotonation

นำ 13-hydroxyberberine (**86**) 120 mg (0.34 mmol) เติม สารละลาย 5% NaOH 30 ml สกัดด้วย CH_2Cl_2 (15 ml 5 ครั้ง) เติม Na_2SO_4 anhydrous กรอง ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งภายใต้ สูญญากาศ ได้ berberine phenol betaine (**87**) เป็นของแข็งสีเหลืองเข้มหนัก 100 mg (85 %)

4. ปฏิกริยา O-alkylation

นำ berberine phenol betaine (**87**) 100 mg (0.28 mmol) ในขวดกันกลม 2 คอขนาด 50 ml ใส่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน เติม CH_3CN 2 ml กวนปฏิกริยาจนกว่า berberine phenol betaine จะละลายจนหมด เติม alkylating agent (RX) (0.6 mmol) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-20 ชั่วโมง ติดตามปฏิกริยาด้วย TLC เมื่อปฏิกริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ นำมา ระเหยตัวทำละลาย ทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และตกผลึก (ตาราง 2)

3.3 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์

นำสารผลิตภัณฑ์ที่ทำให้บริสุทธิ์ (ความบริสุทธิ์ มากกว่า 95%) มาหาสูตรโครงสร้างโดยวิธีทาง สเปกโตรสโกปีร่วมกับข้อมูลทางกายภาพ และโดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลต่างๆ ของสารกับสารที่มี ผู้รายงานไว้แล้ว ในงานวิจัยนี้บันทึกค่า R_f ของสารบนแผ่น precoated silica gel 60 GF₂₅₄ การหา ตำแหน่งของสารบน TLC ใช้แสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 และ/หรือ 365 nm จะปรากฏเป็นสีแตกต่างกัน การบันทึกจุดหลอมเหลวบันทึกด้วยเครื่อง Griffin รายงานในหน่วย °C การบันทึกข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ใช้เครื่อง Varian Unity และ Bruker AVANCE 300 FT-NMR สเปกโตรมิเตอร์ ที่ 300 MHz สำหรับ ^1H NMR สเปกตรัม และที่ 75 MHz สำหรับ ^{13}C NMR สเปกตรัม เครื่อง Varian Inova

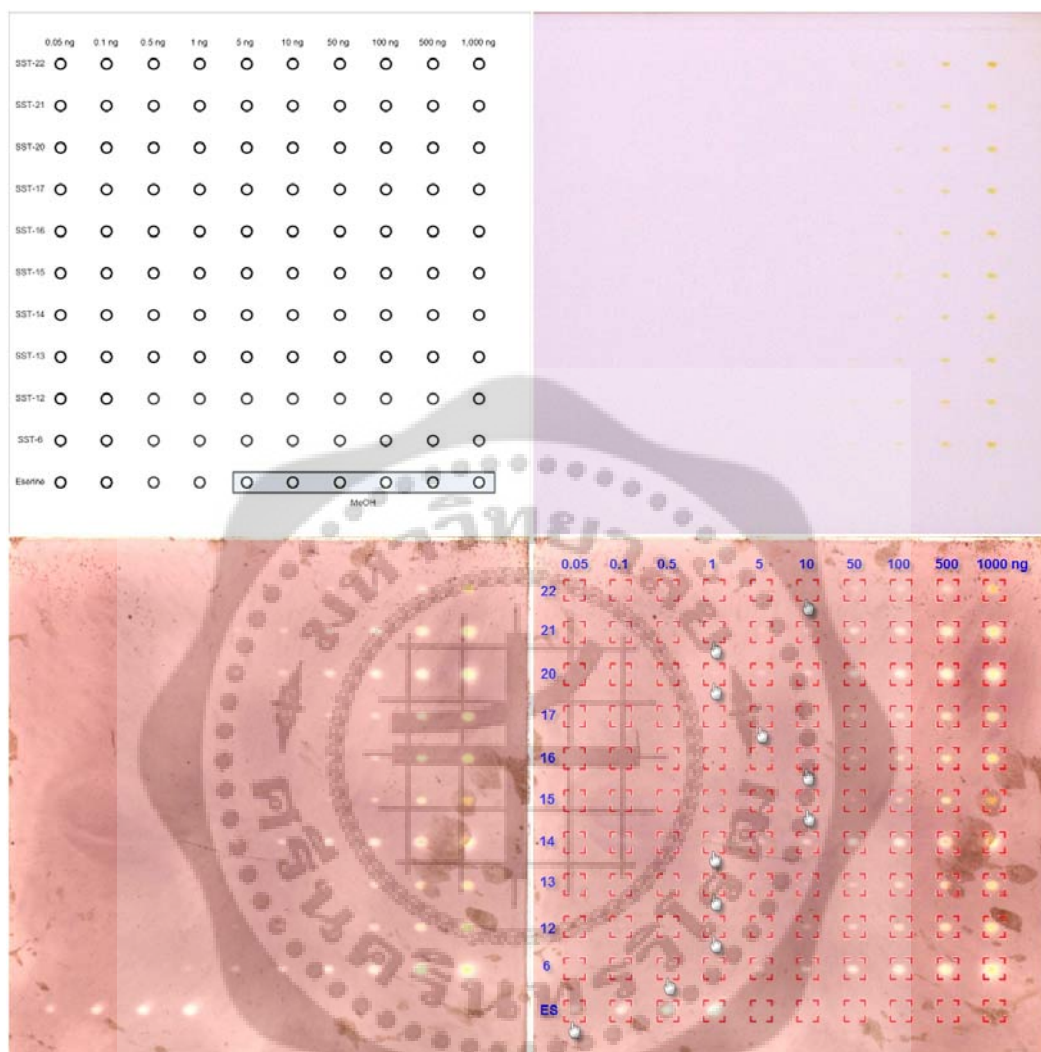
สเปกโตรมิเตอร์ ที่ 500 MHz สำหรับ ^1H NMR สเปกตรัม และที่ 125 MHz สำหรับ ^{13}C NMR สเปกตรัม ตามลำดับ โดยรายงานในหน่วย δ บันทึกในตัวทำละลาย CDCl_3 หรือตัวทำละลายชนิดอื่น ตามที่ระบุในการรายงานข้อมูล โดยใช้ตำแหน่งของสัญญาณตัวทำละลาย CDCl_3 ที่ไม่ถูกตีวเทอเรตที่ δ 7.24 และ 77.00 เป็นจุดอ้างอิงสำหรับ ^1H NMR spectrum และ ^{13}C NMR spectrum ตามลำดับ หรือ TMS ที่ δ 0.00 เป็นจุดอ้างอิง สำหรับ ^1H NMR spectrum และข้อมูลของ ES และ HRES แมสสเปกตรัม บันทึกด้วยเครื่อง Micromass Qtof2 mass spectrometer

3.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส โดย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump โดย Department of Biology and Antimicrobial Discovery Center มหาวิทยาลัย Northeastern ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE

TLC Bioautography was performed using the method described by Hostettmann et al. (Marston; et al. 2002: 51-54.) TLC plates were prepared for bioautography by washing with acetone and then thoroughly dried. Compounds **7**, **86**, **88-95** and eserine, reference compound, were then applied to the plate in varying quantities and sprayed with AChE enzyme stock solution. The plates were incubated at 37°C for 20 min and then sprayed with freshly prepared indicator to give the plate a purple colouration after 1-2 min. A white spot indicates inhibition of AChE by the sample.



ภาพประกอบ 25 วิธีทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

Cells (10^5 ml^{-1}) were inoculated into broth and dispensed at $50 \mu\text{l well}^{-1}$ in 384 well microtitre plates. MICs were determined in triplicate by serial 2-fold dilution of the test compound. The MIC was defined as the concentration of the agent that completely inhibited

cell growth during an 18 h incubation at 37 °C. Growth was assayed with a microtitre plate reader (Spectramax PLUS384; Molecular Devices) by monitoring absorption at 600 nm

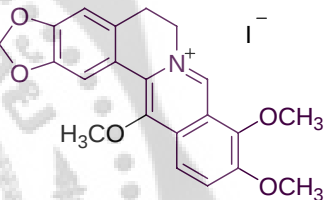
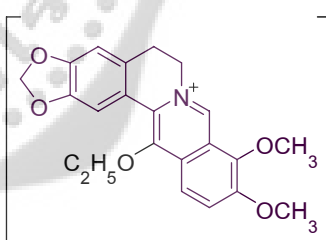
3.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ **NorA efflux pump**

The efflux assay was performed essentially as described previously (Ball; et al. 2006: 594-600.) with minor modifications for the use of ethidium bromide. *S. aureus* NorA overexpressing cells (K2378 NorA++) were grown at 37 °C to an OD ~0.9, pelleted, washed twice with PBS and then resuspended in PBS to an OD~0.8. Cells were then loaded with 3 µM ethidium bromide and 30 µg/ml of reserpine and incubated at 37 °C for 20 min. After washing twice with ice-cold PBS, cells were added to a chilled 96-well flat-bottom black microtiter plate containing ice-cold PBS + 10 mM dextrose at an OD of 0.3 in a total volume of 200 µl. Compounds **7**, **94-97** or **10** were added before cells to give final concentrations of 3 µM. As a negative control (i.e. no ethidium efflux), PBS (without dextrose) containing 30 µg/ml of reserpine was added instead of **10**. Fluorescence was measured with a SpectraMax Gemini XS at excitation/emission wavelengths of 530/600 nm, respectively.

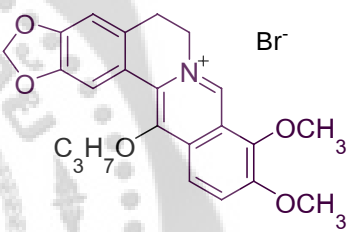
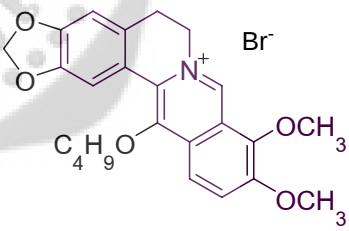
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลจากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอมไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump มาวิเคราะห์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร

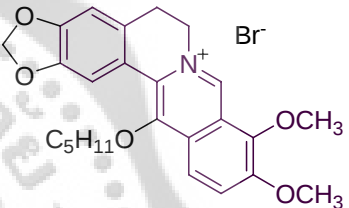
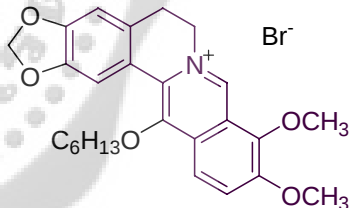
ตาราง 2 สภาวะของปฏิกิริยา alkylation การทำสารให้บริสุทธิ์ และร้อยละของผลิตภัณฑ์

รีเอเจนต์	สภาวะ	การทำสารให้บริสุทธิ์	ผลิตภัณฑ์	น้ำหนักผลิตภัณฑ์ และร้อยละ ผลิตภัณฑ์
Berberine phenol betaine (87) (85 mg, 0.24 mmol) MeI (907 mg, 6.3 mmol) CH ₃ CN (1 ml)	ให้ความร้อนที่ อุณหภูมิ 60-65 °C 20 ชั่วโมง ภายใต้แก๊ส ไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มซ้ำ ทีละ 1% และตก ผลึกด้วย EtOH	 88	44 mg, 50%
Berberine phenol betaine (100 mg, 0.28 mmol) Diethyl sulfate (1171.92 mg, 7.6 mmol) CH ₃ CN (1.5 ml)	ให้ความร้อนที่ อุณหภูมิ 60-65 °C 20 ชั่วโมง ภายใต้แก๊ส ไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มซ้ำ ทีละ 1% และตก ผลึกด้วย EtOH	 89	SO ₄ ⁻ 29 mg, 27%

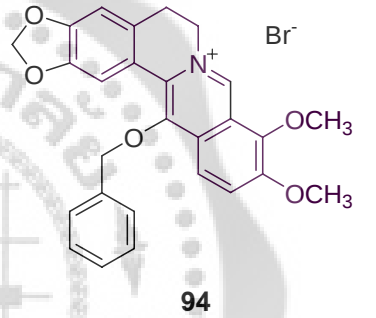
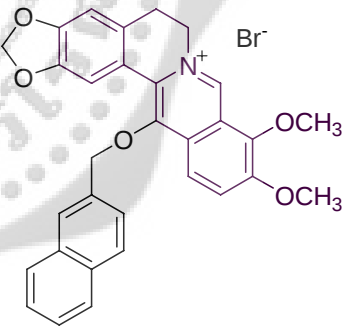
ตาราง 2 (ต่อ)

รีเอเจนต์	สภาวะ	การทำสารให้บริสุทธิ์	ผลิตภัณฑ์	น้ำหนักผลิตภัณฑ์ และร้อยละ ผลิตภัณฑ์
Berberine phenol betaine (65 mg, 0.19 mmol) 1-bromopropane (405.9 mg, 3.3 mmol) CH ₃ CN (1.0 ml)	ให้ความร้อนที่ อุณหภูมิ 60-65 °C 20 ชั่วโมง ภายใต้แก๊ส ไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มขั้นที่ละ 1% และตกผลึกด้วย EtOH	 90	42 mg, 94%
Berberine phenol betaine (30 mg, 0.09 mmol) 1-bromobutane (380.8 mg, 2.78 mmol) CH ₃ CN (1.0 ml)	ให้ความร้อนที่ อุณหภูมิ 60-65 °C 20 ชั่วโมง ภายใต้แก๊ส ไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มขั้นที่ละ 1% และตกผลึกด้วย EtOH	 91	8 mg, 22%

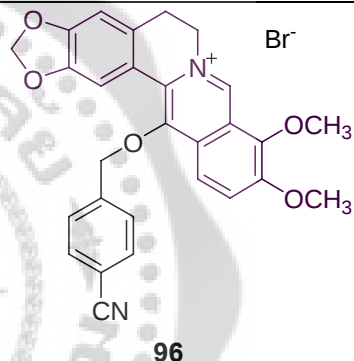
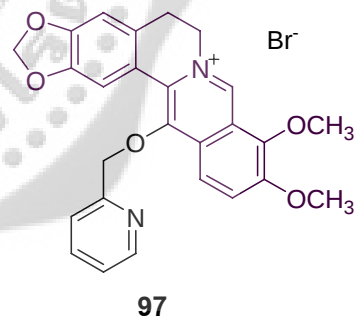
ตาราง 2 (ต่อ)

รีเอเจนต์	สภาวะ	การทำสารให้บริสุทธิ์	ผลิตภัณฑ์	น้ำหนักผลิตภัณฑ์ และร้อยละ ผลิตภัณฑ์
Berberine phenol betaine (25 mg, 0.07 mmol) 1-bromopentane (243.11 mg, 1.61 mmol) CH ₃ CN (1.0 ml)	ให้ความร้อนที่ อุณหภูมิ 60-65 °C 20 ชั่วโมง ภายใต้แก๊ส ไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มซ้ำ ทีละ 1% และตกผลึกด้วย EtOH	 92	13 mg, 45%
Berberine phenol betaine (30 mg, 0.09 mmol) 1-bromohexane (1171.5 mg, 7.11 mmol) CH ₃ CN (1.0 ml)	ให้ความร้อนที่ อุณหภูมิ 60-65 °C 20 ชั่วโมง ภายใต้แก๊ส ไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มซ้ำ ทีละ 1% และตกผลึกด้วย EtOH	 93	16 mg, 33%

ตาราง 2 (ต่อ)

รีเอเจนต์	สภาวะ	การทำสารให้บริสุทธิ์	ผลิตภัณฑ์	น้ำหนักผลิตภัณฑ์ และร้อยละ ผลิตภัณฑ์
Berberine phenol betaine (150 mg, 0.43 mmol) Benzyl bromide (1430 mg, 8.36 mmol) CH ₃ CN (2.0 ml)	ในความร้อนที่ อุณหภูมิ 60-65 °C 5 ชั่วโมง ภายใต้แก๊ส ไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มขั้วทีละ 1% และตก ผลึกด้วย EtOH	 94	43 mg, 29%
Berberine phenol betaine (45mg, 0.13 mmol) 2-(bromomethyl) naphthalene (44.18 mg, 0.2 mmol) CH ₃ CN (1.0 ml)	ในความร้อนที่ อุณหภูมิ 60-65 °C 5 ชั่วโมง ภายใต้แก๊ส ไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มขั้วทีละ 1% และตก ผลึกด้วย EtOH	 95	22 mg, 34%

ตาราง 2 (ต่อ)

รีเอเจนต์	สภาวะ	การทำสารให้บริสุทธิ์	ผลิตภัณฑ์	น้ำหนักผลิตภัณฑ์ และร้อยละ ผลิตภัณฑ์
Berberine phenol betaine (30 mg, 0.09 mmol) 1-(bromomethyl) benzonitrile (15 mg, 0.077mmol) CH ₃ CN (1.0 ml)	ในความร้อนที่ อุณหภูมิ 60-65 °C 5 ชั่วโมง ภายใต้แก๊ส ไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มขั้นที่ละ 1% และตกผลึกด้วย EtOH	 96	17 mg, 40%
Berberine phenol betaine (150 mg, 0.43 mmol) 2-(bromomethyl) pyridine (252.95 mg, 0.288 mmol) CH ₃ CN (2.0 ml)	ในความร้อนที่ อุณหภูมิ 60-65 °C 5 ชั่วโมง ภายใต้แก๊ส ไนโตรเจน	Column chromatography (silica gel ขนาด 0.063-0.200 mm) ใช้ ระบบตัวชะ CH ₂ Cl ₂ จนถึง 5% MeOH ใน CH ₂ Cl ₂ โดยเพิ่มขั้นที่ละ 1% และตกผลึกด้วย EtOH	 97	18 mg, 8%

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ข้อมูลทางกายภาพและสเปกโทรสโกปีของสารที่สังเคราะห์

8-Acetyl dihydroberberine (**85**) (Iwasa; et al. 1998: 748-751.)

ของแข็งสีเหลืองสว่าง (4.2 g, 72%)

R_f 2.7 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

1H NMR ($CDCl_3$) แสดงในตาราง 3

ESMS (+ve) m/z (% rel. intensity) : 393

13-Hydroberberine (**86**) (Iwasa; et al. 1998: 748-751.)

ของแข็งสีเหลืองขุ่น (2.75 g, 71%)

m.p. 179-183 °C R_f 1.4 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

1H NMR ($CDCl_3$) แสดงในตาราง 3

ESMS (+ve) m/z (% rel. intensity) : 352

13-Oxidoberberine (**87**) (Iwasa; et al. 1998: 748-751.)

ของแข็งสีเหลือง (100 mg, 85%)

m.p. 217-224 °C R_f 1.4 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

1H NMR ($CDCl_3$) แสดงในตาราง 3

ESMS (+ve) m/z (% rel. intensity) : 351

9,10,13-Trimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium iodide (**88**) (Iwasa; et al. 1998: 748-751.)

ของแข็งสีเหลืองนวล (44 mg, 50%)

m.p. 142-145 °C (Lit. 134-135 °C) R_f 1.1 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR (CDCl_3) แสดงในตาราง 4

ESMS (+ve) m/z (% rel. intensity) : 366

13-Ethoxy-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[*g*]-1,3-benzodioxolo[5,6-*a*]quinolizinium sulfate (**89**) (Iwasa; et al. 1998: 748-751.)

ของแข็งสีเหลืองนวล (29 mg, 27%)

m.p. 138-141 °C (Lit. 160-162 °C) R_f 1.4 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR (CDCl_3) แสดงในตาราง 4

ESMS (+ve) m/z (% rel. intensity) : 380

9,10-Dimethoxy-13-propyloxy-5,6-dihydrobenzo[*g*]-1,3-benzodioxolo[5,6-*a*]quinolizinium bromide (**90**)

ของแข็งสีเหลืองนวล (42 mg, 94%)

m.p. 175-176 °C R_f 1.2 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC (CDCl_3) แสดงในตาราง 5

HRMS (ES); m/z 394.1654 [M]⁺ (394.1646 คำนวณสำหรับ $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{NO}_5$)

13-Butyloxy-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[*g*]-1,3-benzodioxolo[5,6-*a*]quinolizinium bromide (**91**)

ของแข็งสีเหลืองนวล (8 mg, 22%)

m.p. 172-173 °C R_f 1.6 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC (CDCl_3) แสดงในตาราง 6

HMRS (ES); m/z 408.1811 [M]⁺ (408.1798 คำนวณสำหรับ $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{NO}_5$)

9,10-Dimethoxy-13-pentyloxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**92**)

ของแข็งสีเหลืองนวล (13 mg, 45%)

m.p. 183-187 °C R_f 1.3 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ($CDCl_3$) แสดงในตาราง 7

HRMS (ES); m/z 422.1967 $[M]^+$ (422.1962 คำนวณสำหรับ $C_{25}H_{28}NO_5$)

13-Hexyloxy-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**93**)

ของแข็งสีเหลืองนวล (16 mg, 33%)

m.p. 125-128 °C R_f 1.3 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ($CDCl_3$) แสดงในตาราง 8

HRMS (ES); m/z 436.2124 $[M]^+$ (436.2120 คำนวณสำหรับ $C_{26}H_{30}NO_5$)

13-Benzoyloxy-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**94**)

ของแข็งสีเหลืองนวล (43 mg, 29%)

m.p. 141-143 °C R_f 0.6 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ($CDCl_3$) แสดงในตาราง 9

HRMS (ES); m/z 422.1660 $[M]^+$ (422.1654 คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{24}NO_5$)

9,10-Dimethoxy-13-(2-naphthylmethylenoxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**95**)

ของแข็งสีเหลืองนวล (22 mg, 34%)

m.p. 175-177 °C R_f 1.7 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ($CDCl_3$) แสดงในตาราง 10

HRMS (ES); m/z 492.1825 $[M]^+$ (492.1811 คำนวณสำหรับ $C_{31}H_{26}NO_5$)

13-(4-Cyanobenzyloxy)-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]
quinolizinium bromide (**96**)

ของแข็งสีเหลืองนวล (17 mg, 40%)

m.p. 132-134 °C R_f 1.7 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC (CDCl_3) แสดงในตาราง 11

HRMS (ES); m/z 467.1618 $[\text{M}]^+$ (467.1607 คำนวณสำหรับ $\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5$)

9,10-Dimethoxy-13-(2-pyridylmethyleneoxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]
quinolizinium bromide (**97**)

ของแข็งสีเหลืองนวล (18 mg, 8%)

m.p. 134-136 °C R_f 1.7 (7% MeOH ใน CH_2Cl_2)

^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC (CDCl_3) แสดงในตาราง 12

HRMS (ES); m/z 443.1626 $[\text{M}]^+$ (443.1607 คำนวณสำหรับ $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5$)

ตาราง 3 ข้อมูล ^1H NMR ของสารประกอบ **85** **86** และ **87**

ตำแหน่ง	8-acetonyldihydroberberine (85) บันทึกใน CDCl_3	13-hydroxyberberine (86) ^a บันทึกใน CD_3OD	Phenolbetaine (87) ^a บันทึกใน CDCl_3
2	5.98 (s, 2H)	6.07 (s, 2H)	5.98 (s, 2H)
4 ^b	6.74 (s, 1H)	6.95 (s, 1H)	6.80 (s, 1H)
5	2.61-2.81 (m, 2H)	3.17 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H)	3.07 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H)
6	3.11-3.28 (m, 2H)	4.83 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H)	4.66 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H)
8	5.19 (dd, $J = 6.3, 5.1$ Hz, 1H)	9.39 (s, 1H)	8.66 (s, 1H)
11 ^c	6.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H)	8.06 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)	7.64 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)
12 ^c	6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H)	8.21 (dd, $J = 9.0, 1.0$ Hz, 1H)	8.21 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)
13	6.48 (s, 1H)		
14 ^b	7.23 (s, 1H).	8.01 (s, 1H)	8.37 (s, 1H)
9-OCH ₃	3.75 (s, 3H)	4.18 (s, 3H)	4.05 (s, 3H)
10-OCH ₃	3.75 (s, 3H)	4.11 (s, 3H)	4.03 (s, 3H)
CH ₂ CO	2.91 (dd, $J = 14.7, 4.5$ Hz, 1H) 2.30 (dd, $J = 14.7, 4.5$ Hz, 1H)		
COCH ₃	2.02 (s, 3H)		

^a Iwasa; et al. 1998. 64: 748-751.

^{b,c} สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 4 ข้อมูล ^1H NMR ของสารประกอบ **88** และ **89** เทียบกับสาร berberine (**7**)

ตำแหน่ง	Berberine (7) ^a บันทึกใน CD_3OD	13-methoxy berberine (88) บันทึกใน CDCl_3	13-ethoxy berberine (89) บันทึกใน CDCl_3
2	6.15 (s, 2H)	6.04 (s, 2H)	6.07 (s, 2H)
4 ^a	7.01 (s, 1H)	6.82 (s, 1H)	6.82 (s, 1H)
5	3.30 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H)	3.32 (br s, 2H)	3.27 (br s, 2H)
6	4.95 (br s, 2H)	5.10 (br s, 2H)	5.06 (br s, 2H)
8	9.82 (s, 1H)	9.88 (s, 1H)	9.98 (s, 1H)
11 ^b	8.04 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)	7.97 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)	7.96 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)
12 ^b	8.16 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)	7.79 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)	7.78 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)
13	8.74 (s, 1H)		
14 ^a	7.70 (s, 1H)	7.88 (s, 1H)	7.95 (s, 1H)
9-OCH ₃ ^c	4.25 (s, 3H)	4.25 (s, 3H)	4.28 (s, 3H)
10-OCH ₃ ^c	4.15 (s, 3H)	4.02 (s, 3H)	4.05 (s, 3H)
1'		3.78 (s, 3H)	3.90 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H)
2'			1.23 (t, $J = 14.1$ Hz, 3H)

^a Kim ; et al. 2004. 27(11): 1127-1131.

^{b,c} สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 5 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ **90** บันทึกใน CDCl_3

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	COSY	HMQC	HMBC
2	6.10 (s, 2H)	102.0		C-2	C-3a, C-14a
3a		149.9			
4 ^a	6.85 (s, 1H)	108.4		C-4	C-3a, C-5, C-13b, C-14a
4a		132.1			
5	3.30 (t, $J = 10.5$ Hz, 2H)	28.2	H-6	C-5	C-4, C-4a, C-6, C-13b
6	5.27 (t, $J = 11.1$ Hz, 2H)	57.0	H-5	C-6	C-4a, C-5, C-8, C-13a
8	10.38 (s, 1H)	143.5		C-8	C-6, C-8a, C-9, C-12a, C-13a,
8a		122.9			
9		146.2			
10		151.3			
11 ^b	7.96 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)	125.4	H-12	C-11	C-8a, C-9, C-10
12 ^b	7.77 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H)	117.8	H-11	C-12	C-9, C-10, C-12a
12a		129.8			
13		150.6			
13a		130.8			
13b		118.5			
14 ^a	7.95 (s, 1H)	108.4		C-14	C-3a, C-4a, C-13a, C-13b, C-14a
14a		147.5			
9-OCH ₃ ^c	4.36 (s, 3H)	63.2		9-OCH ₃	C-9
10-OCH ₃ ^c	4.08 (s, 3H)	57.0		10-OCH ₃	C-10
1'	3.80 (t, $J = 13.2$ Hz, 2H)	77.1	H-2'	C-1'	C-2', C-13
2'	1.80-2.00 (m, 2H)	23.5	H-1', H-3'	C-2'	C-1', C-3'
3'	1.10 (t, $J = 14.7$ Hz, 3H)	10.5	H-2'	C-3'	C-1', C-2'

^{a,b,c} สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 6 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ **91** บันทึกใน CDCl_3

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	COSY	HMQC	HMBC
2	6.10 (s, 2H)	102.0		C-2	C-3a, C-14a
3a		149.9			
4 ^a	6.87 (s, 1H)	108.4		C-4	C-3a, C-5, C-13a, C-14a
4a		132.1			
5	3.30 (t, $J = 12.0$ Hz, 2H)	28.2	H-6	C-5	C-4, C-4a, C13b
6	5.28 (t, $J = 12.0$ Hz, 2H)	57.0	H-5	C-6	C-4a, C-5, C-8, C-13a
8	10.38 (s, 1H)	143.4		C-8	C-8a, C-9, C-12a, C-13a
8a		129.8			
9		146.2			
10		151.3			
11 ^b	7.84 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H)	125.4	H-12	C-11	C-8a, C-9, C-10, C-12
12 ^b	7.98 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H)	117.8	H-11	C-12	C-9, C-10, C-11, C-12a
12a		122.9			
13		150.6			
13a		130.8			
13b		118.5			
14 ^a	7.94 (s, 1H)	108.4		C-14	C-3a, C-4a, C-13a, C-13b, C-14a
14a		147.5			
9-OCH ₃ ^c	4.35 (s, 3H)	63.2		9-OCH ₃	C-9
10-OCH ₃ ^c	4.08 (s, 3H)	57.0		10-OCH ₃	C-10
1'	3.84 (t, $J = 13.0$ Hz, 2H)	75.4	H-2'	C-1'	C-2', C-3', C-13
2'	1.75-1.80 (m, 2H)	32.1	H-1', H-3'	C-2'	C-1', C-3', C-4'

ตาราง 6 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	COSY	HMQC	HMBC
3'	1.58 (m, 2H)	19.14	H-2', H-4'	C-3'	C-1', C-2', C-4'
4'	0.986 (t, $J = 15.5$ Hz, 3H)	13.75	H-3'	C-4'	C-2', C-3'

^{a,b,c} สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 7 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ **92** บันทึกใน CDCl_3

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	COSY	HMQC	HMBC
2	6.10 (s, 2H)	102.0		C-2	C-3a, C-14a
3a		149.8			
4 ^a	6.87 (s, 1H)	108.4		C-4	C-3a, C-13b, C-14a
4a		132.0			
5	3.30 (t, $J = 11.5$ Hz, 2H)	28.1	H-6	C-5	C-4, C-4a, C-6, C-13b
6	5.27 (t, $J = 10.5$ Hz, 2H)	57.91	H-5	C-6	C-4a, C-5, C-8, C-13a
8	10.36 (s, 1H)	143.3		C-8	C-6, C-8a, C-9, C-12a, C-13, C-13a, C-10
8a		129.8			
9		146.2			
10		151.2			
11 ^b	7.98 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H)	125.4	H-12	C-11	C-8a, C-9, C-10
12 ^b	7.85 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H)	117.8	H-11	C-12	C-9, C-12a
12a		122.9			
13		150.6			

ตาราง 7 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	COSY	HMQC	HMBC
13a		130.8			
13b		118.4			
14 ^a	7.94 (s, 1H)	108.4		C-14	C-3a, C-4a, C-13a, C-14a
14a		147.5			
9-OCH ₃ ^c	4.38 (s, 3H)	63.1		9-OCH ₃	C-9
10-OCH ₃ ^c	4.09 (s, 3H)	57.0		10-OCH ₃	C-10
1'	3.83 (t, $J = 13.0$ Hz, 2H)	75.8		C-1'	C-2', C-3', C-13
2'	1.80-1.90 (m, 2H)	29.8	H-1', H-3'	C-2'	C-1', C-3', C-4'
3'	1.40-1.60 (m, 2H)	28.0	H-2', H-4'	C-3'	C-1', C-2', C-5'
4'	1.30-1.40 (m, 2H)	22.4	H-3', H-5'	C-4'	C-2', C-3', C-5'
5'	0.95 (t, $J = 14.5$ Hz, 3H)	13.9	H-4'	C-5'	C-3', C-4'

^{a,b,c} สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 8 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ **93** บันทึกใน CDCl_3

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	COSY	HMQC	HMBC
2	6.10 (s, 2H)	102.0		C-2	C-3a, C-14a
3a		149.9			
4 ^a	6.87 (s, 1H)	108.5		C-4	C-3a, C-13b, C-14a
4a		132.0			
5	3.30 (br s, 2H)	28.2	H-6	C-5	C-4, C-4a, C-13b
6	5.27 (br s, 2H)	57.1	H-5	C-6	C-4a, C-5, C-8, C-13a
8	10.36 (s, 1H)	143.3		C-8	C-8a, C-9, C-12a, C-13, C-13a, C-10
8a		123.0			
9		146.2			
10		151.3			
11 ^b	7.81 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H)	125.4	H-12	C-11	C-9, C-10
12 ^b	7.85 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H)	117.9	H-11	C-12	C-9, C-12a
12a		129.9			
13		150.7			
13a		130.7			
13b		118.5			
14 ^a	7.94 (s, 1H)	108.5		C-14	C-3a, C-4a, C-13a, C-14a
14a		147.5			
9-OCH ₃ ^c	4.38 (s, 3H)	63.2		9-OCH ₃	C-9
10-OCH ₃ ^c	4.05 (s, 3H)	57.1		10-OCH ₃	C-10
1'	3.78 (t, $J = 14.0$ Hz, 2H)	75.9	H-2'	C-1'	C-13
2'	1.70-1.90 (m, 2H)	30.1	H-1', H-3'	C-2'	C-1', C-3', C-4'
3'	1.10-1.16 (m, 2H)	25.7	H-2'	C-3'	C-1', C-2', C-5'

ตาราง 8 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	COSY	HMQC	HMBC
4'	1.10-1.16 (m, 2H)	22.5	H-5'	C-4'	C-2', C-5'
5'	1.10-1.16 (m, 2H)	22.6	H-4', H-6'	C-5'	C-2', C-3'
6'	0.88 (t, $J = 12.6$ Hz, 3H)	14.0	H-5'	C-6'	C-4', C-5'

^{a,b,c} สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 9 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ **94** บันทึกใน CDCl_3

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	COSY	HMQC	HMBC
2	6.09 (s, 2H)	102.0		C-2	C-3a, C-14a
3a		149.9			
4 ^a	6.83 (s, 1H)	108.3		C-4	C-5, C-13b
4a		132.2			
5	3.26 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H)	28.1	H-6	C-5	C-4, C-4a, C-6, C-13b
6	5.24 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H)	57.0	H-5	C-6	C-4a, C-5, C-8
8	10.39 (s, 1H)	143.7		C-8	C-8a, C-12a
8a		122.9			
9		146.2			
10		151.2			
11 ^b	7.92 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H)	125.4	H-12	C-11	C-8, C-8a, C-9
12 ^b	7.79 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H)	118.0	H-11	C-12	C-9, C-10, C-12a
12a		129.7			
13		149.8			

ตาราง 9 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	COSY	HMQC	HMBC
13a		131.3			
13b		118.5			
14 ^a	6.83 (s, 1H)	108.9		C-14	C-3a, C-13b, C-14a
14a		147.4			
OCH ₂	4.89 (s, 2H)	77.2		13-OCH ₂	C-1', C-2'
9-OCH ₃ ^c	4.35 (s, 3H)	63.1		9-OCH ₃	C-9
10-OCH ₃ ^c	4.07 (s, 3H)	56.9		10-OCH ₃	C-10
1'		134.4			
2'	7.34-7.37 (m, 2H)	128.8		C-2'	C-1', C-3'
3'	7.27-7.30 (m, 2H)	128.7		C-3'	C-2'
4'	7.34-7.37 (m, 1H)	129.1		C-4'	C-3'

^{a,b,c} สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 10 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ **95** บันทึกใน CDCl₃/CD₃OD

ตำแหน่ง	^1H NMR	^{13}C NMR	COSY	HMQC	HMBC
2	6.02 (s, 2H)	101.9		C-2	C-3a, C-14a
3a		149.8			
4 ^a	6.72 (s, 1H)	108.1		C-4	C-4a, C-14a
4a		132.0			
5	3.17 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H)	27.8	H-6	C-5	C-4a, C-6, C-13b
6	5.08 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H)	57.1	H-5	C-6	C-4a, C-5, C-8
8	10.11 (s, 1H)	143.0		C-8	C-13a, C-8a, C-9, C-12a

ตาราง 10 (ต่อ)

ตำแหน่ง	¹ H	¹³ C	COSY	HMQC	HMBC
8a		122.8			
9		145.8			
10		151.1			
11 ^b	7.81 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H)	125.5	H-12	C-11	C-9, C-10, C-12a
12 ^b	8.00 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H)	118.0	H-11	C-12	C-8a, C-10
12a		129.8			
13		150.0			
13a		131.6			
13b		118.4			
14 ^a	7.92 (s, 1H)	109.0		C-14	C-3a, C-14a
14a		147.2			
OCH ₂	6.00 (s, 1H)	77.7		13-OCH ₂	C-13
9-OCH ₃ ^c	4.32 (s, 3H)	62.8		9-OCH ₃	C-9
10-OCH ₃ ^c	4.07 (s, 3H)	56.9		10-OCH ₃	C-10
1'	7.72 (s, 1H)	128.4		C-1'	C-4a', C-8'
2'		131.8			
3'	7.36 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H)	126.1	H-4'	C-3'	C-4a', C-8a', 13-OCH ₂
4'	7.80-7.88 (m, 1H)	128.4	H-3'	C-4'	C-6', C-8a'
4a'		133.3			
5'	7.48-7.58 (m, 1H)	126.7	H-6'	C-5'	C-4a', C-6', C-7'
6'	7.80-7.88 (m, 1H)	127.6	H-5'	C-6'	C-4a', C-5', C-7'
7'	7.48-7.58 (m, 1H)	126.5	H-8'	C-7'	C-5', C-6', C-8', C-8a'
8'	7.80-7.88 (m, 1H)	128.0	H-7'	C-8'	C-1' , C-4a' , C-8a'
8a'		132.9			

^{a,b,c} สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 11 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ **96** บันทึกใน $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	COSY	HMQC	HMBC
2	6.08 (s, 2H)	102.0		C-2	C-3a, C-14a
3a		150.1			
4 ^a	6.87 (s, 1H)	108.3		C-4	C-3a, C-5, C-13b, C-14a
4a		132.4			
5	3.33 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H)	27.8	H-6	C-5	C-4, C-4a, C-6, C-13b
6	5.05 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H)	57.0	H-5	C-6	C-4a, C-5, C-8, C-13a
8	10.03 (s, 1H)	143.4		C-8	C-6, C-8a, C-9, C-12a, C-13, C-13a
8a		122.8			
9		145.9			
10		151.2			
11 ^b	7.81 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H)	125.5	H-12	C-11	C-9, C-10, C-12, C-12a
12 ^b	7.88 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H)	117.6	H-11	C-12	C-9, C-10, C-11, C-12a, C-13a
12a		129.5			
13		149.7			
13a		131.3			
13b		118.1			
14 ^a	7.83 (s, 1H)	108.4		C-14	C-3a, C-4a, C-14a
14a		147.4			
OCH_2	4.99 (s, 2H)	75.8		13- OCH_2	C-1', C-2'
9- OCH_3^c	4.32 (s, 3H)	62.7		9- OCH_3	C-9
10- OCH_3^c	4.08 (s, 3H)	56.9		10- OCH_3	C-10

ตาราง 11 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	COSY	HMQC	HMBC
1'		140.0			
2'	7.52 (d, $J = 8$ Hz, 1H)	128.8	C-3'	C-2'	C-3', C-4', 13-OCH ₂
3'	7.69 (d, $J = 8$ Hz, 1H)	132.5	C-2'	C-3'	C1', C-2', C-4'
4'		112.6			
CN		118.3			

^{a,b,c} สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ตาราง 12 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ **97** บันทึกใน CDCl₃

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	COSY	HMQC	HMBC
2	6.06 (s, 2H)	102.0		C-2	C-3a, C-14a
3a		149.9			
4 ^a	6.82 (s, 1H)	108.3		C-4	C-3a, C-5, C-13b, C-14a
4a		132.1			
5	3.30 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H)	28.1	H-6	C-5	C-4, C-4a, C-6, C-13b
6	5.24 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H)	57.1	H-5	C-6	C-4a, C-5, C-8, C-13
8	10.34 (s, 1H)	143.7		C-8	C-8a, C-9, C-12a, C-13a
8a		122.8			
9		146.0			
10		151.2			
11 ^b	7.81 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H)	125.5	H-12	C-11	C-9, C-10, C-12, C-12a

ตาราง 12 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^1H	^{13}C	COSY	HMQC	HMBC
12 ^b	8.07 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H)	118.2	H-11	C-12	C-8a, C-9, C-10, C-11, C-13
12a		129.5			
13		149.8			
13a		131.2			
13b		118.3			
14 ^a	7.94 (s, 1H)	108.8		C-14	C-4a, C-13, C-13b, C-14a
14a		147.5			
OCH ₂	5.01 (s, 2H)	76.6		13-OCH ₂	C-1', C-13
9-OCH ₃	4.34 (s, 3H)	63.1		9-OCH ₃	C-9
10-OCH ₃	4.07 (s, 3H)	57.0		10-OCH ₃	C-10
1'		154.2		C-1'	
3'	8.59 (dd, $J = 4.8, 0.9$ Hz, 1H)	149.6	C-4'	C-3'	C-4', C-5'
4'	7.29 (td, $J = 4.8, 0.9$ Hz, 1H)	123.7	C-3'	C-4'	C-6'
5'	7.76 (td, $J = 7.5, 1.8$ Hz, 1H)	137.1	C-6'	C-5'	C-1', C-3'
6'	7.42 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H)	123.1	C-5'	C-6'	C-4', 13-OCH ₂

^{a,b} สัญญาณภายใต้อักษรเดียวกันอาจสลับที่กันได้

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump

สารที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้งหมดจากปฏิกิริยา O-alkylation นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้ :

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และผลการทดสอบฤทธิ์แสดงในตาราง 14

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และผลการทดสอบฤทธิ์แสดงในตาราง 15

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump และผลการทดสอบฤทธิ์แสดงในภาพประกอบ 29

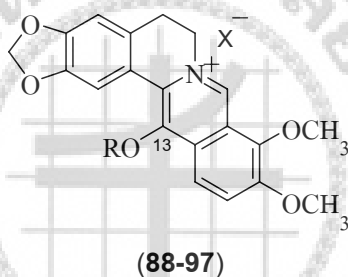


บทที่ 5

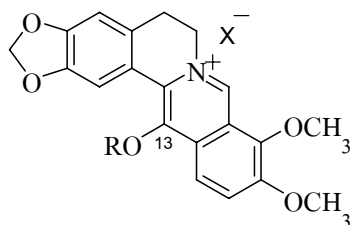
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ ของ berberine (85-97)

จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้ เพื่อสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ berberine (7) ที่มีหมู่ alkoxy เป็นหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 13 โดยที่ความยาวของหมู่อัลคิลเพิ่มขึ้นจากจำนวนคาร์บอน 1-6 อะตอม(88-93) และเปลี่ยนหมู่ alkyl เป็นหมู่ arylmethyl ชนิดต่างๆ (94-97) ซึ่งในการสังเคราะห์นั้น สามารถทำได้โดยเตรียม berberine ให้อยู่ในรูปสารอนุพันธ์ berberine phenol betaine (87) ซึ่งเป็นตัวกลางที่สำคัญในการนำไปทำปฏิกิริยา alkylation กับสาร alkylating ต่างๆ (ภาพประกอบ 24 บทที่ 3) เพื่อให้ได้สารประกอบ 88-97 ในปริมาณร้อยละ 8-94 % (ตาราง 13)



ตาราง 13 ผลิตภัณฑ์และร้อยละของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา O-alkylation

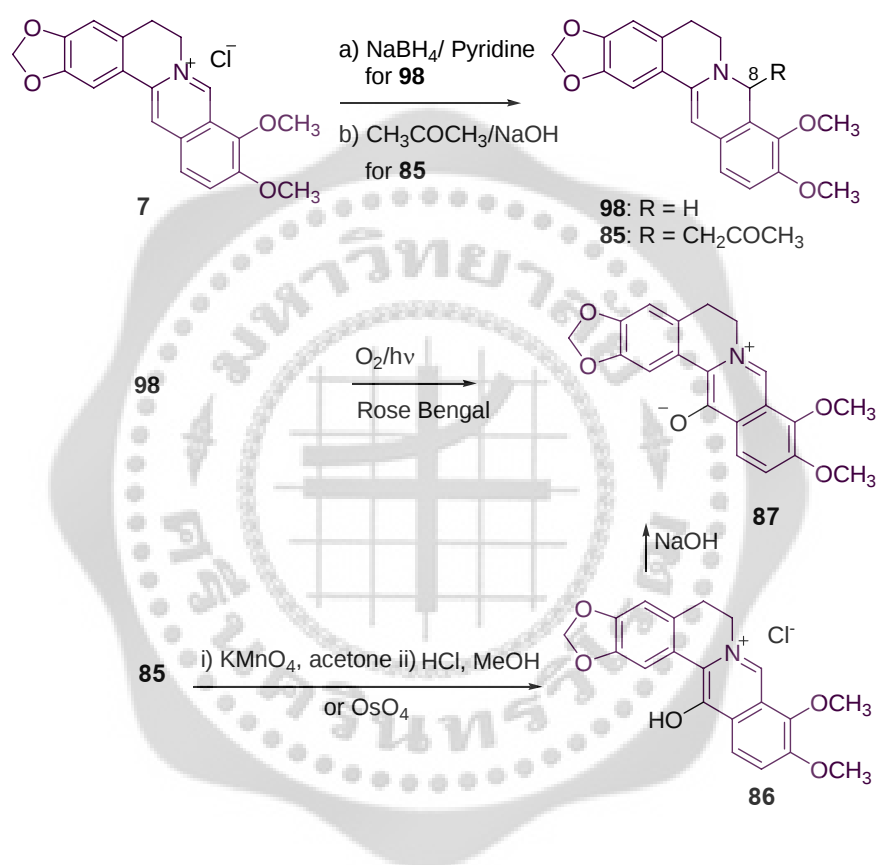


สารผลิตภัณฑ์	R	X	ร้อยละของสาร ผลิตภัณฑ์
88	Methyl	Iodide	50
89	Ethyl	Sulfate	27
90	Propyl	Bromide	94
91	Butyl	Bromide	22
92	Pentyl	Bromide	45
93	Hexyl	Bromide	33
94	Benzyl	Bromide	29
95	2-naphthylmethylenoxy	Bromide	34
96	4-Cyanobenzyl	Bromide	40
97	2-pyridylmethylenoxy	Bromide	8

ในการพิสูจน์โครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ยืนยันโดยใช้ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกโทรสโกปีและเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ เช่น COSY (Correlation spectroscopy) HMQC (Heteronuclear multiple quantum correlation) และ HMBC (Heteronuclear multiple bond correlation) และข้อมูล MS (Mass spectrometry) ซึ่งรายละเอียดในการสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมีดังนี้

5.1.1 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-oxidoberberine (87)

การสังเคราะห์สารประกอบ **87** ได้เคยมีรายงานการเตรียมสารชนิดนี้โดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอนุพันธ์ 8-acetylberberine (**85**) กับรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ เช่น KMnO_4 หรือ OsO_4 ตามด้วยปฏิกิริยา deprotonation ด้วย สารละลาย NaOH หรือใช้ปฏิกิริยา dye-sensitized photo-oxidation ของสาร dihydroberberine (**98**) โดยใช้แสงจากหลอด medium-pressure mercury



ภาพประกอบ 26 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-oxidoberberine (**87**)

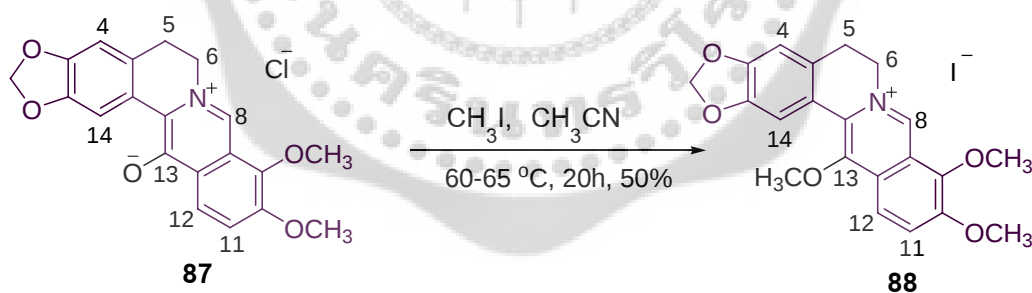
จากข้อมูลดังกล่าว จึงได้ทำการเตรียมสาร **85** โดยนำสาร **7** มาทำปฏิกิริยากับ acetone และ สารละลาย 30% sodium hydroxide กวนสารละลายที่ $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้สารผลิตภัณฑ์ **85** (72%) การยืนยันโครงสร้างของสาร **85** โดยข้อมูล $^1\text{H NMR}$ (ตาราง 3) เทียบกับกับข้อมูลที่เคยมี รายงานไว้แล้ว (Iwasa; et al. 1998: 748-751) พบสัญญาณ singlet ที่ δ 9.80 ที่ตรงกับ H-8 ของสาร ตั้งต้น **7** หายไป แต่พบสัญญาณ doublet of doublet ของ methine proton ที่ δ 5.19 ตรงกับ H-8 ของ สาร **85** แทน นอกจากนี้พบสัญญาณ doublet of doublet ของ methylene proton ที่ δ 2.3 และ

สัญญาณ singlet ของ methyl proton ที่ δ 2.02 ซึ่งตรงกับหมู่ acetoxy ($-\text{CH}_2\text{COCH}_3$) จากนั้นนำสาร **85** ที่ได้มาทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารละลาย potassium permanganate ที่ -20°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้ของแข็งสีเหลืองอ่อน จากนั้นเติมกรด hydrochloric เข้มข้น และ methanol และ reflux ต่อให้ผลึกสีเหลืองส้มของสารผลิตภัณฑ์ **86** (72%) ซึ่งยืนยันโครงสร้างเทียบกับข้อมูลที่เคยมีรายงานมาแล้ว และเทียบกับสารตั้งต้น **85** (ตาราง 3) พบว่าสาร **86** ไม่มีสัญญาณ doublet of doublet ของ H-8 ที่ δ 5.19 และสัญญาณของหมู่ $-\text{CH}_2\text{COCH}_3$ ที่ δ 2.02 และ 2.30 แต่พบสัญญาณ singlet ของ aromatic proton ของ H-8 ที่ δ 9.40 แทน และยืนยันเพิ่มเติมโดยข้อมูล MS(ES) พบสัญญาณของ positive ion $[\text{M}]^+$ ที่ m/z 351.9 ตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของสาร **86**

นำสาร **86** มาเติมสารละลาย 5% sodium hydroxide และสกัดด้วย dichloromethane ให้สารอนุพันธ์ **87** (85%) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง เมื่อเทียบข้อมูล ^1H NMR (ตาราง 3) ของสาร **87** กับสารตั้งต้น **86** พบว่า สัญญาณ singlet ของ H-8 ของสาร **87** ย้ายไปที่ δ 8.66 (upfield shift)

ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการทำปฏิกิริยา O-alkylation ระหว่างสาร **87** กับ สาร alkylating ต่างๆ (RX) โดยการสังเคราะห์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) เมื่อ R คือ หมู่ alkyl ที่มีจำนวนคาร์บอน 1 ถึง 6 อะตอม และ (2) เมื่อ R คือหมู่ arylmethyl heteroarylmethyl และ naphthylmethyl ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

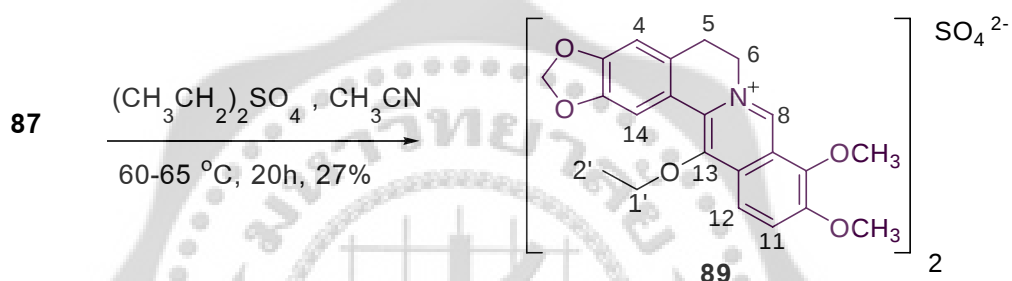
5.1.2 การสังเคราะห์สารประกอบ 9,10,13-Trimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium iodide (**88**)



การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ **88** ทำโดยนำสารอนุพันธ์ phenol betaine **87** มาทำปฏิกิริยากับ methyl iodide โดยมี acetonitrile เป็นตัวทำละลาย ทำการกวนภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ $60-65^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำสารผสมที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยเทคนิค Column chromatography ทำอย่างน้อย 2 ครั้ง นำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วย ethanol ให้สารผลิตภัณฑ์ **88** ตามต้องการ โดยมีร้อยละของผลผลิต 50% การยืนยันโครงสร้างของสาร **88** ทำโดยการวิเคราะห์ข้อมูล NMR spectroscopy และ mass spectrometry เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR ของสาร **88** กับสารตั้ง

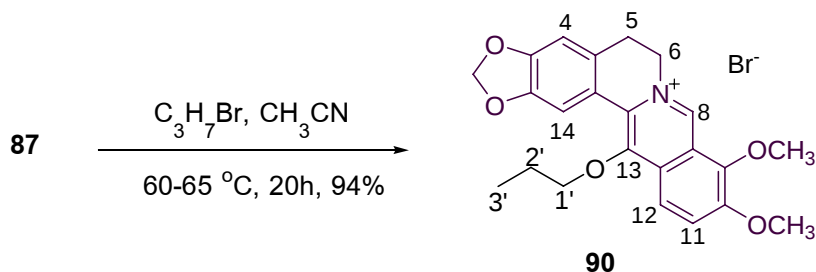
ต้น berberine (7) พบว่ามีข้อมูลคล้ายคลึงกัน (ตาราง 4) แต่แตกต่างกันที่สาร 88 พบสัญญาณ singlet ของ methyl proton ของหมู่ methoxy ที่ δ 3.78 และไม่พบสัญญาณ singlet ของ aromatic proton ของ H-13 ที่ δ 8.74 นอกจากนี้ยืนยันโครงสร้างโดยข้อมูลจาก MS(ES) พบสัญญาณที่ m/z 366 ตรงกับสูตรโมเลกุลของ quaternary ammonium ion ของสารอนุพันธ์ 88

5.1.3 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-Ethoxy-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium sulfate (89)



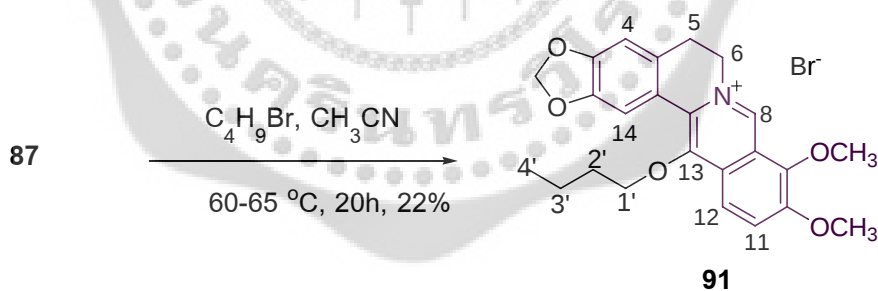
สารอนุพันธ์ 89 เตรียมได้โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับสาร 88 โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารอนุพันธ์ phenol betaine (87) กับสารประกอบ diethyl sulfate ให้สารผลิตภัณฑ์ 89 (27%) การยืนยันโครงสร้างของสาร 89 โดยข้อมูล ^1H NMR (ตาราง 3) พบว่าคล้ายคลึงกับข้อมูลของสาร 7 โดยพบสัญญาณ doublet of doublet ของ methylene proton ที่ δ 3.90 ตรงกับหมู่ $-\text{OCH}_2-$ และพบสัญญาณ triplet ของ methyl proton ที่ δ 1.23 แต่ไม่พบสัญญาณ singlet ของ aromatic proton ของ H-13 ที่ δ 8.74 และยืนยันโครงสร้างโดยข้อมูลจาก MS(ES) พบสัญญาณที่ m/z 380 ตรงกับ positive ion ของสารอนุพันธ์ 89

5.1.4 การสังเคราะห์สารประกอบ 9,10-Dimethoxy-13-propyloxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**90**)



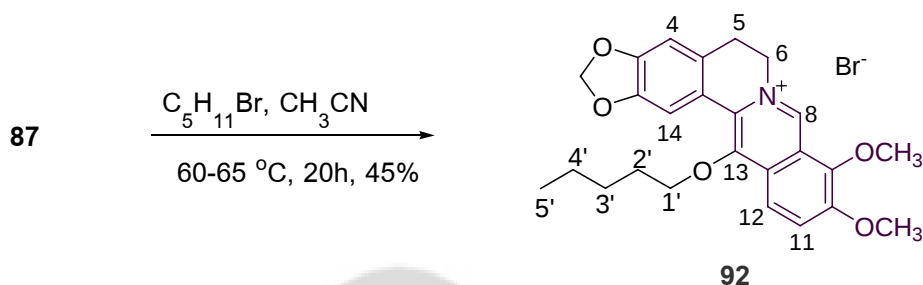
สารอนุพันธ์ **90** เตรียมได้จากสารอนุพันธ์ **87** ทำปฏิกิริยากับ 1-bromopropane ภายใต้สภาวะเดียวกับสาร **89** ให้สารผลิตภัณฑ์ **90** (94%) และมีข้อมูล ^1H NMR (ตาราง 5) คล้ายคลึงกับสาร **89** พบสัญญาณ doublet of doublet ของ methylene proton ที่ δ 1.80-2.00 เพิ่มเติมจากข้อมูลที่พบในสาร **89** จากข้อมูล HRMS(ES) พบสัญญาณที่ m/z 394.1654 ตรงกับ positive ion ของสารอนุพันธ์ **90**

5.1.5 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-Butyloxy-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**91**)



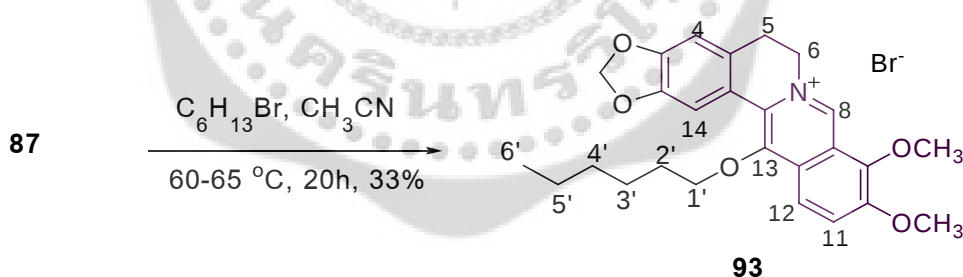
สารอนุพันธ์ **91** เตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาของสาร **87** และ 1-bromobutane ใน acetonitrile ภายใต้สภาวะเดียวกับสาร **90** ให้สารผลิตภัณฑ์ **91** (34%) โดยมีข้อมูล ^1H NMR (ตาราง 6) คล้ายกับสาร **90** และพบสัญญาณเพิ่มเติมคือ สัญญาณ multiplet ของ methylene proton ที่ δ 1.50-1.60 เพิ่มเติมจากข้อมูลที่พบในสาร **90** และจากข้อมูล HRMS(ES) พบสัญญาณที่ m/z 408.1811 ตรงกับ positive ion ของสาร **91**

5.1.6 การสังเคราะห์สารประกอบ 9,10-Dimethoxy-13-pentyloxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**92**)



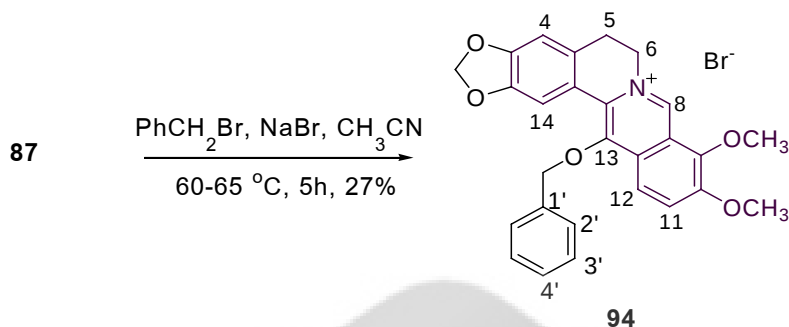
สารอนุพันธ์ **92** เตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร **87** และ 1-bromopentane ใน acetonitrile ภายใต้สภาวะเดียวกับสาร **91** ให้สารผลิตภัณฑ์ **92** (45%) โดยมีข้อมูล ^1H NMR (ตาราง 7) คล้ายกับสาร **91** และพบสัญญาณเพิ่มเติมคือ สัญญาณ multiplet ของ methylene proton ที่ δ 1.30-14.0 และจากข้อมูล HRMS(ES) พบสัญญาณที่ m/z 422.1967 ตรงกับ positive ion ของสาร **92**

5.1.7 การสังเคราะห์สารประกอบ 9,10-Dimethoxy-13-hexyloxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**93**)



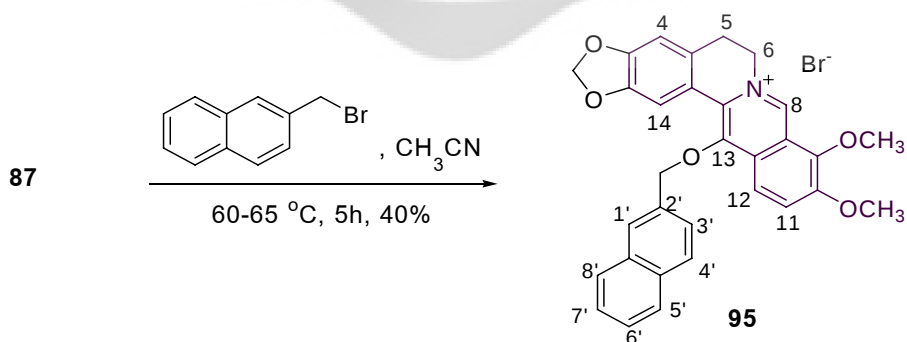
สารอนุพันธ์ **93** เตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่างสาร **87** และ 1-bromohexane ใน acetonitrile ภายใต้สภาวะเดียวกับสาร **92** ให้สารผลิตภัณฑ์ **93** (33%) โดยข้อมูล ^1H NMR (ตาราง 8) คล้ายกับสาร **92** และพบสัญญาณ multiplet ของ methylene proton ที่ δ 1.10-1.16 เพิ่มเติมจากข้อมูลที่พบในสาร **92** และจากข้อมูล HRMS(ES) พบสัญญาณที่ m/z 436.2124 ตรงกับ positive ion ของสาร **93**

5.1.8 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-Benzyloxy-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**94**)



สารอนุพันธ์ **95** เตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่างสาร **87** กับ benzyl bromide ใน acetonitrile ให้สารผลิตภัณฑ์ **94** (29%) โดยข้อมูล ^1H NMR (ตาราง 9) ซึ่งคล้ายคลึงกับ berberine (**7**) แต่แตกต่างกันที่สาร **94** พบสัญญาณ singlet ของ methylene proton ที่ δ 4.89 และพบสัญญาณ multiplet ของ aromatic proton จำนวน 5 proton ที่ δ ในช่วง 7.27-7.30 และ 7.34-7.37 แต่ไม่พบสัญญาณ singlet ของ aromatic proton ของ H-13 ที่ δ 8.45 เมื่อเทียบกับสาร **7** จากข้อมูล HRMS(MS) พบสัญญาณที่ m/z 442.1660 ตรงกับ positive ion ของสาร **94**

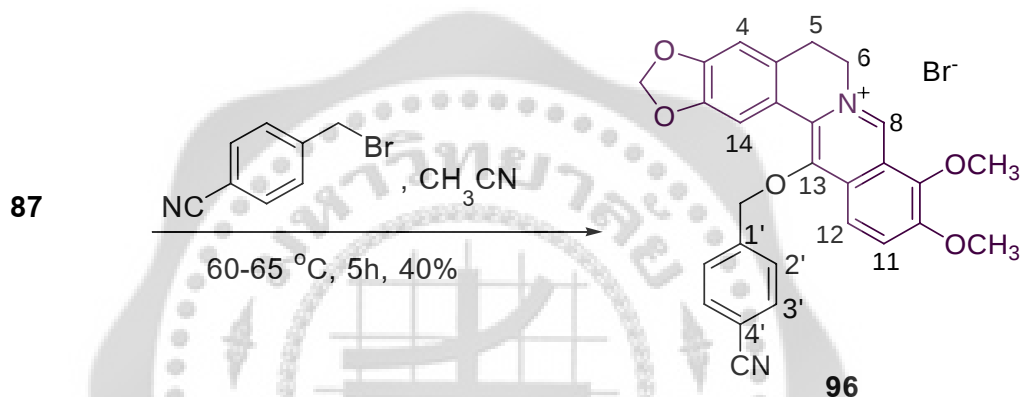
5.1.9 การสังเคราะห์สารประกอบ 9,10-Dimethoxy-13-(2-naphthylmethylenoxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**95**)



สารอนุพันธ์ **95** เตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่างสาร **87** และ 2-(bromomethyl)naphthalene ใน acetonitrile ภายใต้สภาวะเดียวกับการสังเคราะห์สาร **94** ได้สารผลิตภัณฑ์ **95** (34%) โดยมีข้อมูล

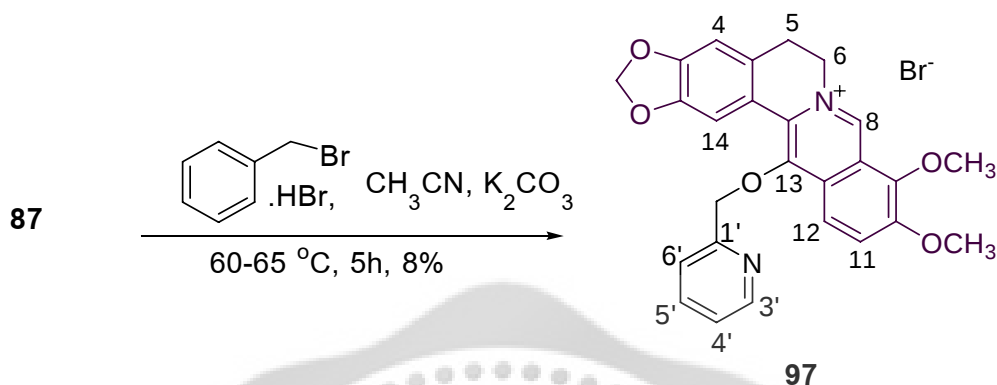
^1H NMR (ตาราง 10) คล้ายคลึงกับสาร **94** พบสัญญาณ singlet ของ methylene proton ที่ 6.00 และสัญญาณ multiplet ของ aromatic proton จำนวน 7 proton ที่ δ ในช่วง 7.36-7.88 และยืนยันเพิ่มเติมโดยข้อมูล HRMS(ES) พบสัญญาณที่ m/z 492.1825 ซึ่งตรงกับ positive ion ของสาร **95**

5.1.10 การสังเคราะห์สารประกอบ 13-(4-Cyanobenzoyloxy)-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[*g*]-1,3-benzodioxolo[5,6-*a*]quinolizinium bromide (**96**)



สารอนุพันธ์ **96** เตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่างสาร **87** และ 1-(bromomethyl)benzonitrile ใน acetonitrile ภายใต้สภาวะเดียวกับการสังเคราะห์สาร **95** โดยมีข้อมูล ^1H NMR (ตาราง 11) คล้ายกับสาร **94** พบสัญญาณ singlet ของ methylene proton ที่ δ 4.99 และพบสัญญาณ doublet ของ aromatic proton จำนวน 4 proton ที่ δ 7.52 และ 7.69 นอกจากนี้ข้อมูล ^{13}C NMR พบสัญญาณของ $\text{C}\equiv\text{N}$ carbon ที่ δ 118.3 และข้อมูลจาก HRMS(ES) พบสัญญาณที่ m/z 467.1618 ตรงกับ positive ion ของสาร **96**

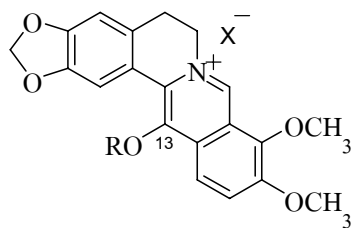
5.1.11 การสังเคราะห์สารประกอบ 9,10-Dimethoxy-13-(2-pyridylmethylenoxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**97**)



สารอนุพันธ์ **97** เตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่างสาร **87** 2-(bromomethyl)pyridine hydrobromide และ potassium carbonate ใน acetonitrile ภายใต้สภาวะเดียวกับการสังเคราะห์สาร **96** ได้สารผลิตภัณฑ์ **97** (8%) โดยมีข้อมูล ^1H NMR (ตาราง 12) คล้ายคลึงกับสาร **94** พบสัญญาณ singlet ของ aromatic proton จำนวน 4 โปรตอน ที่ δ 7.29 7.42 7.76 และ 8.59 ตามลำดับ จากข้อมูล HRMS(ES) พบสัญญาณที่ m/z 443.1626 ตรงกับ positive ion ของสาร **97**

5.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารอนุพันธ์ 13-O-substituted berberine (**88-97**) ที่ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 3 ฤทธิ์ คือ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อยา ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump ในเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยา



7 : R = H X = Cl

86: R = OH X = Cl

88: R = CH₃ X = I

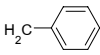
89: R = C₂H₅ X = SO₄²⁻

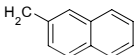
90: R = C₃H₇ X = Br

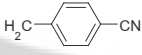
91: R = C₄H₉ X = Br

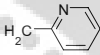
92: R = C₅H₁₁ X = Br

93: R = C₆H₁₃ X = Br

94: R =  X = Br

95: R =  X = Br

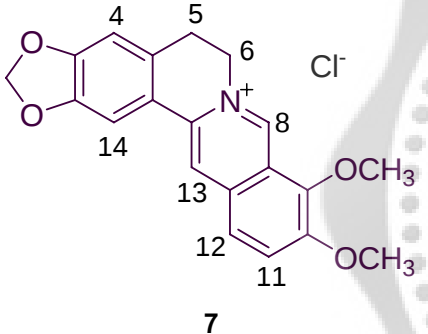
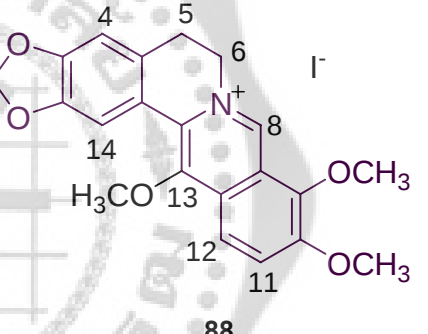
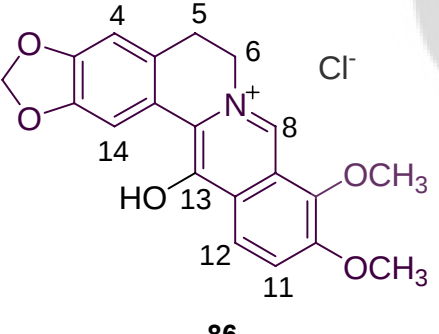
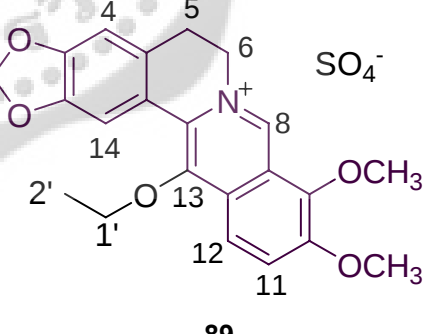
96: R =  X = Br

97: R =  X = Br

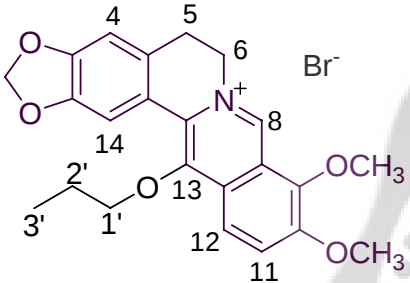
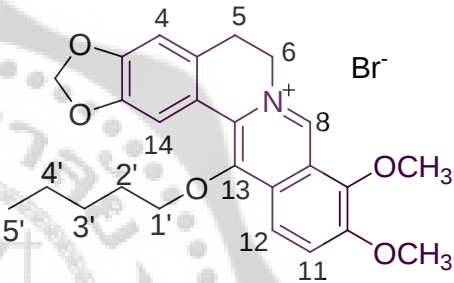
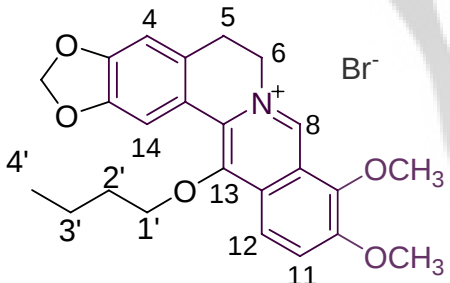
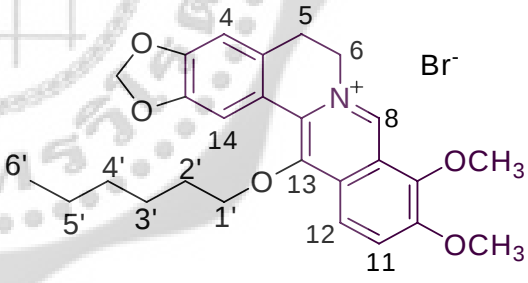
ภาพประกอบ 27 สูตรโครงสร้างของสาร (7 **86** และ **88-97**)

5.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

ตาราง 14 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ของสาร berberine (7) 13-hydroxyberberine (86) และสาร 88- 95

โครงสร้างสาร	MIC (ng/ml)	โครงสร้างสาร	MIC (ng/ml)
 7	0.5	 88	1.0
 86	10.0	 89	1.0

ตาราง 14 (ต่อ)

โครงสร้างสาร	MIC (ng/ml)	โครงสร้างสาร	MIC (ng/ml)
 90	1.0	 92	1.0
 91	1.0	 93	10.0

ตาราง 14 (ต่อ)

โครงสร้างสาร	MIC (ng/ml)	โครงสร้างสาร	MIC (ng/ml)
94	5.0	95	10.0
Eserine	0.05		

จากผลการทดสอบ (ตาราง 14) พบว่า สาร **88-93** ซึ่งมีการแทนที่ H ที่คาร์บอนตำแหน่ง 13 ของสาร **7** ด้วยหมู่ alkoxy ที่หมู่ alkyl มีความยาวของโซ่คาร์บอนจำนวน 1-5 อะตอม พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE ลดลง 2 เท่า เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น **7** แต่มีฤทธิ์เพิ่มขึ้น 10 เท่า เมื่อเทียบกับสาร **86** ซึ่งมีหมู่ hydroxyl เป็นหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 13 ในขณะที่เมื่อความยาวของสายโซ่คาร์บอนของหมู่ alkyl เพิ่มขึ้น 6 อะตอม หรือ เปลี่ยนจากหมู่ alkyl เป็นหมู่ benzyl (**94**) หรือหมู่ naphthylmethyl (**95**) พบว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE ลดลงเช่นเดียวกัน โดยลดลง 10-20 เท่า เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น **7** แต่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ดีพอๆกับสาร **86** จากผลที่ได้แสดงว่าการเติมหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 13 ของ berberine (**7**) มีผลทำให้การออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ลดลงไม่ว่าจะเป็นหมู่แทนที่ขนาดเล็กหรือใหญ่ แสดงว่า หมู่แทนที่ดังกล่าวที่ตำแหน่ง 13 อาจมีผลขัดขวางการเข้าจับระหว่างโพรงการจับของเอนไซม์ และสารอนุพันธ์ **86** หรือ **88-93** และการมีอะตอมของออกซิเจนก็ไม่ช่วยในแง่ของการเพิ่มการเกิดพันธะไฮโดรเจนในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารอนุพันธ์กับเอนไซม์

5.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อยา

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต่อเชื้อแกรมบวก *S. aureus* นั้น สารอนุพันธ์ที่ทำการทดสอบจะทำเฉพาะสาร **94-97** เมื่อ R คือหมู่ aryl มีโครงสร้างเป็นลักษณะแบนราบ ซึ่งอาจช่วยเพิ่มฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสาร **7** ได้โดยการเข้าไปแทรกระหว่างสาย DNA ของแบคทีเรีย (intercalation) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์ DNA ได้ และตายในที่สุด ในการทดสอบนี้เชื้อ *S. aureus* ที่ใช้ทดสอบมี 3 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ปกติ (8325-4) ซึ่งมี NorA efflux pump เป็นปั๊มหลักที่มีมากที่สุดในเซลล์ นอกจากนี้ยังมีปั๊มชนิดอื่นๆ (additional pump) อีกจำนวนเล็กน้อยภายในเซลล์ สายพันธุ์ที่ทำให้กลายพันธุ์ โดยการกำจัด NorA pump ออกไปจากเซลล์ (K1758) และสายพันธุ์ที่ดื้อยา (K2378) โดยมีการแสดงออกของ NorA pump มากกว่าปกติ ทำให้สายพันธุ์นี้สามารถกำจัดสารพิษรวมถึงยาต่างๆ ออกไปจากเซลล์ได้ดีกว่าสายพันธุ์ 8325-4 และ K1758

จากผลการทดสอบ (ตาราง 14) พบว่าสาร **94** และ **95** มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีกว่าสารตั้งต้น **7** อย่างน้อย 3 เท่าถึงมากกว่า 30 เท่า ในขณะที่สารอนุพันธ์ **96** และ **97** ซึ่งมีหมู่แทนที่ที่ดึงอิเล็กตรอน (electron-withdrawing group) บนวงอะโรมาติก มีผลทำให้การออกฤทธิ์ต่ำกว่าสารอนุพันธ์ **94** และ **95** แต่ก็ยังคงดีกว่าสารตั้งต้น **7**

ในกรณีของสาร **94** และ **95** พบว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยา K2378 มีค่า MIC สูงกว่า สายพันธุ์ 8325-4 และ K1758 ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก การทำงานของปั๊มชนิดอื่นๆที่มีในเชื้อ *S. aureus* สามารถขับเอาสาร **94** และ **95** บางส่วนออกมาทำให้ความเข้มข้นของสารทั้งสองที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อมีค่ามากขึ้นเมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ใช้กับสายพันธุ์ K1758 และ 8325-4 ถึง 2-4 เท่า

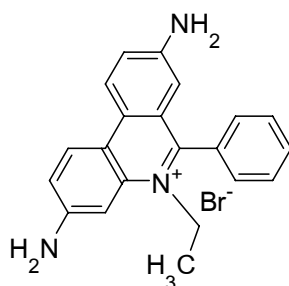
ตาราง 15 ความเข้มข้นต่ำสุดในหน่วย μM ของสาร **7** และ สาร **94-97** ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ 8325-4 สายพันธุ์ K1758 และ สายพันธุ์ K2378

Strain	7	94	Fold change	95	Fold change	96	Fold change	97	Fold change
<i>S. aureus</i> K1758 (ΔnorA)	40	12.0	3	5.5	7	91.4	2-fold less active	191.2	5-fold less active
<i>S. aureus</i> 8325-4 (Wild-type)	325	24.0	14	10.9	30	182.8	2	>191.2	<2
<i>S. aureus</i> K2378 (NorA++)	>650	95.8	7	21.9	>30	>182.8	4	>191.2	>3

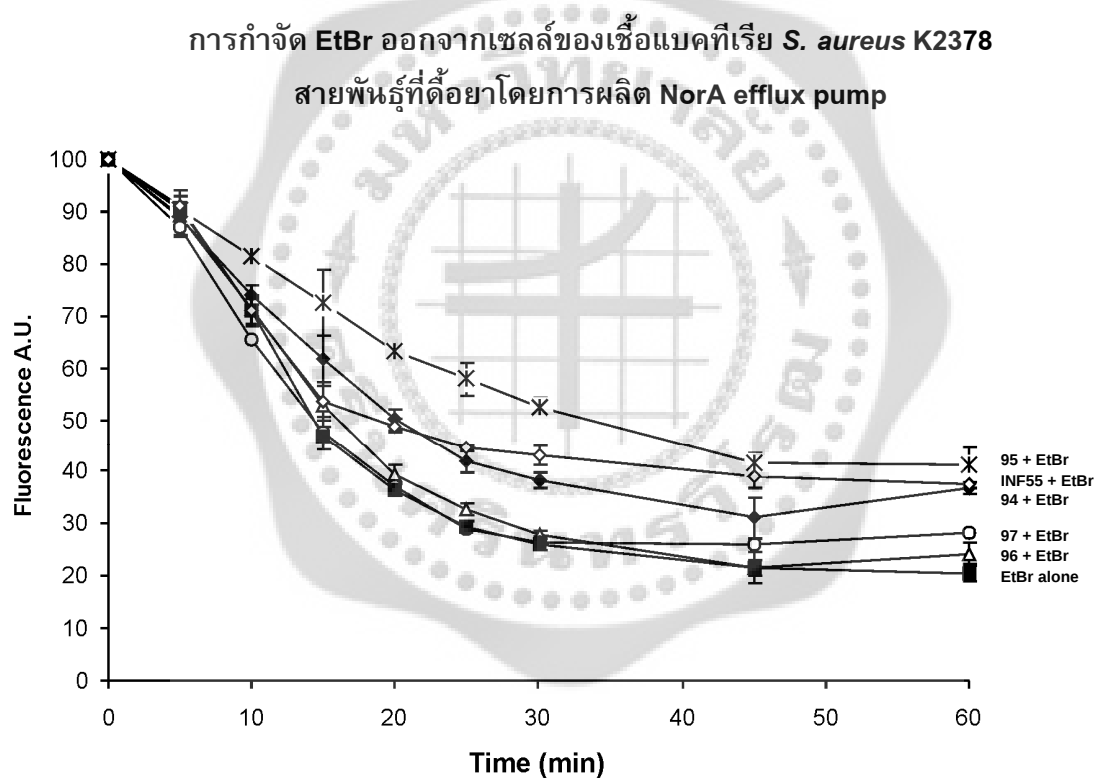
5.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump

เพื่อเป็นการยืนยันว่าสาร **94** และ **95** มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อยา โดยการใช้กลไกของ NorA efflux pump ในการกำจัดยาออกจากเซลล์ จึงได้นำสารอนุพันธ์ **94-97** มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump โดยใช้ efflux assay ของสาร ethidium bromide (EtBr) ต่อเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยา K2378

EtBr เป็นสารต้านแบคทีเรียในกลุ่ม quaternary ammonium salt ซึ่งเป็น substrate ที่ดีของ NorA efflux pump และสามารถให้ fluorescence ได้เมื่ออยู่ภายในเซลล์ของ *S. aureus* เช่นเดียวกับ berberine (**7**) โดยที่ NorA pump สามารถขับเอา EtBr ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ



ภาพประกอบ 28 โครงสร้างของ ethidium bromide



ภาพประกอบ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง fluorescence intensity และ ปริมาณ EtBr ที่สะสมภายในเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป

ข้อมูลแต่ละจุดได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง (■) EtBr (◊) สารผสมของ EtBr และ INF55 (◆) สารผสมของ EtBr และ 94 (x) สารผสมของ EtBr และ 95 (Δ) สารผสมของ EtBr และ 96 (o) สารผสมของ EtBr และ 97

ดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA pump นั้น จะนำสารผสมระหว่างสารที่ทดสอบกับ EtBr มาทำให้สารผสมนั้นสะสมอยู่ในเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อเวลาผ่านไป ถ้าสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA pump จะเห็นปริมาณการสะสมของ EtBr ในสารผสมแต่ละจุดมีมากกว่าปริมาณการสะสม EtBr ในเซลล์ที่ไม่อยู่ในรูปของสารผสม (EtBr alone) โดยการทดสอบนี้จะทำเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน INF55 (10) ซึ่งเป็นสารยับยั้ง NorA pump ที่รู้จักกันดี (Markham; et al. 1999: 2404)

จากกราฟ (ภาพประกอบ 29) พบว่าปริมาณการสะสมของ EtBr ภายในเซลล์ที่อยู่ในรูปสารผสมกับสาร 94 หรือ 95 มีมากกว่าปริมาณการสะสมของ EtBr ที่อยู่ในรูปสารผสมกับสาร 96 หรือ 97 และมากกว่าปริมาณการสะสมของ EtBr ที่ไม่ได้อยู่ในรูปสารผสม แสดงว่า สาร 94 และ 95 มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA pump ได้เช่นเดียวกับสาร INF55 ในขณะที่สาร 96 และ 97 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA pump ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสาร 94-97 (ข้อ 5.2.2)

5.3 สรุปและข้อเสนอแนะ

การเพิ่มหมู่ alkoxy (OR) ที่ตำแหน่ง 13 ของ berberine (7) ให้สารผลิตภัณฑ์ 88-95 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE ต่ำกว่าสารตั้งต้น 7 2-20 เท่า ในทางตรงกันข้าม สารอนุพันธ์ 94-97 สามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยาด้วยการใช้ efflux pump สูงกว่าสารตั้งต้น 7 มากกว่า 3-30 เท่า นอกจากนี้สาร 94 และ 95 ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump ได้ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สาร 95 ซึ่งมีฤทธิ์ 2 ฤทธิ์ในโมเลกุลเดียวกัน (dual action) พบว่า มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่สูงกว่าสารตั้งต้น 7 มากกว่า 30 เท่า และมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NorA efflux pump ที่ดีกว่า INF55 (known NorA pump inhibitor) นอกจากนี้โครงสร้างของสาร 95 เป็นโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน ดังนั้นสาร 95 จึงน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่นำไปใช้เป็นสารต้นแบบในการพัฒนาปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีเพื่อให้ได้สารต้านแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อที่ดื้อยาด้วยกลไก efflux pump ที่มีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น



บรรณานุกรม

- เต็ม สมิตินันท์. (2544). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม 2544. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักงานวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.
- พงษ์ทิพย์ โกเมศโสภา. (2540). เคมีอินทรีย์ 3. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- ภัทรชัย กิริตสิน. (2549). วิทยาการแบคทีเรียทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ยุพิน สัจจวรินทร์. (2543). เภสัชวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สมิง เก้าเจริญ. (2528). การประยุกต์เภสัชจลนศาสตร์ในทางคลินิก. อายุรศาสตร์. กรุงเทพฯ: โอภา วัชรคุปต์, บรรณาธิการ. (2551). เคมีของยา ฉบับ 1. กรุงเทพฯ: พี.เอส.พรินท์.
- Ball, A. R.; et al. (2006). Conjugation berberine to a multidrug resistance pump inhibitor creates an effective antimicrobial. *ACS Chem. Biol.* 1: 594-600.
- (2008). Other recent related work involves a pump inhibitor-fluoroquinolone hybrid. *J. Med. Chem.* 43: 2453-63.
- Cho, K.; et al. (2006). 8-Hydroxydihydrochelerythrine and 8-hydroxydihydrosanguinarine with a potent acetylcholinesterase inhibitory activity from *Chelidonium majus* L.. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 2317-2320.
- Camps, P; et al. (2000). New tacrine-huperzine hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 43: 4657-4666.
- Hong, S.; et al. (2000). Antimicrobial activity of 9-O-acyl-and 9-O-benzoyl-substituted berberubines. *Planta Med.* 66: 361-363.
- Iwasa, K.; et al. (1996). Antibacterial activity and structure-activity relationships of berberine analogs. *Eur. J. Med. Chem.* 31: 469-478.
-(1996). Antimicrobial activity of some 13-alkyl substituted protoberberinium salts. *Planta Med.* 63: 196-198.
-(1998). Structure-activity relationships of protoberberines having antimicrobial activity. *Planta Med.* 64: 748-751.
-(1998). Antimicrobial activity of 8-alkyl- and 8-phenyl-substituted berberines

- and their 12-bromo derivatives. *J. Nat. Prod.* 61: 1150-1153.
- (1998). Antimalarial activity and structure-activity relationships of protoberberine alkaloids. *Eur. J. Med. Chem.* 33: 65-69.
-(1999). Structure-activity relationship of quaternary protoberberine alkaloids having an antimalarial activity. *Eur. J. Med. Chem.* 34: 1077-1083.
- Kim, S.H.; et al. (2002). Antimicrobial activity of 9-O-acyl- and 9-O-alkyl berberrubine derivatives. *Planta Med.* 68: 277-281.
- Kim, D.K.; et al. (2004). Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis speciosa*. *Arch. Pharm. Res.* 27: 1127-1131.
- Kuznetsova, L.P.; et al. (2002). Inhibition of human blood acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by some alkaloids. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 38: 35-39.
- Luvira, V. (2006). Overveiw of antibiotic resistance. *Songkla Med. J.* 24: 453-459.
- Marston, S.; et al. (2002). A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterse and butyrylcholinesterase inhibitor in plants. *Phytochem. Anal.* 12: 51-54.
- Mungkornasawakul, P.; et al. (2004). Phytochemical studies on *Stamona burkili* prain: two new dihydrostemofoline alkaloids. *J. Nat. Prod.* 67: 1740-1743.
- Markham, P.; et al. (1999). Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2404-2408.
- Markmee, S.; et al. (2006). Isoquinoline derivative as potential acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 2170-2172.
- Park, K.; et al. (2006). Synthesis of 13-substituted benzyl berberine and berberrubine derivative as antifungal agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 3913-3916.
- Relman, A.S. (1991). Tacrine as a treatment for alzheimer's dementia. *N. Engl. J. Med.* 324: 349-352.
- Schmeller, T.; et al. (1997). Biochemical activity of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence agent microorganisms and herbivores. *Phytochemistry.* 44: 257-266.
- Vannerstom and Klayman; (1998). Protoberberine alkaloids as antimalarials. *J. Med. Chem.* 31: 1084-1087.

Walsh, C.; et al. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. 406: 775-781.

Xian-Zhi, L. and Hiroshi, N. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. 64: 159-204.





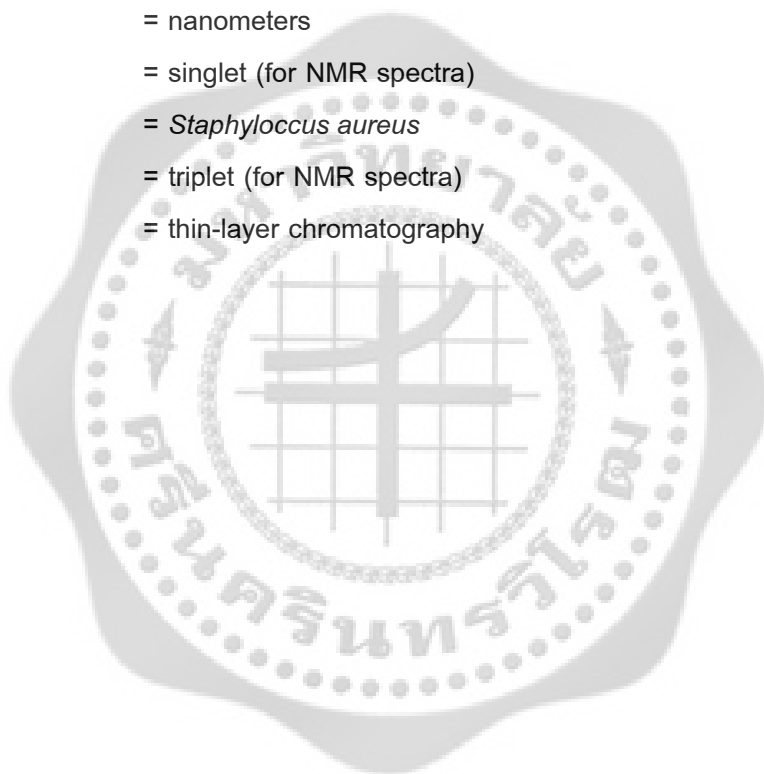


อภิธานศัพท์

ATP	= adenosine triphosphate
β	= beta
br t	= broad triple (for NMR spectra)
CDCl_3	= deuterated chloroform
CD_3OD	= deuterated methanol
CH_2Cl_2	= dichloromethane
CH_3CN	= acetonitrile
$^{\circ}\text{C}$	= degree Celsius
^{13}C NMR	= Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
δ	= chemical shift
d	= doublet (for NMR spectra)
dd	= doublet of doublet (for NMR spectra)
<i>E. coli</i>	= <i>Escherichia coli</i>
EtOH	= ethanol
g	= gram
HCl	= hydrochloric acid
^1H NMR	= Proton Nuclear Magnetic Resonance
HMQC	= Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HMBC	= Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HRMS (ES)	= high resolution electrospray mass spectra
Hz	= hertz
<i>J</i>	= coupling constant
m	= multiplet (for NMR spectra)
$[\text{M}]^+$	= molecular ion
MeOH	= methanol
mg	= milligrams
ng	= nanograms
MIC	= minimum inhibitory concentration

อภิธานศัพท์ (ต่อ)

ml	= milliliters
MDR	= multidrug resistance
m/z	= mass to charge ratio
Na_2SO_4	= sodium sulfate
NMR	= Nuclear magnetic resonance
nm	= nanometers
s	= singlet (for NMR spectra)
<i>S. aureus</i>	= <i>Staphylococcus aureus</i>
t	= triplet (for NMR spectra)
TLC	= thin-layer chromatography





ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวบงกช ตันวิรัตน์
วันเดือนปีเกิด	26 มีนาคม 2524
สถานที่เกิด	อ. เมือง จ. ราชบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	15 หมู่ 3 ต. คุ้งกระถิ่น อ. เมือง จ. ราชบุรี 70000
ตำแหน่งหน้าที่การทำงานในปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2542	มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนราชโบริกานุเคราะห์ จ. ราชบุรี
พ.ศ. 2546	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี) จากมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี
พ.ศ. 2552	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ