

ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีการวิจัยในภาพรวม

1. ออกแบบอนุพันธ์คูมาริน โดยการดัดแปลงความยาวของตัวเชื่อมระหว่างโครงสร้างหลักคูมารินกับหมู่ที่มีคุณสมบัติเป็นด่าง หรือดัดแปลงโครงสร้างโดยเปลี่ยนหมู่ที่มีคุณสมบัติเป็นด่างให้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติที่เปลี่ยนไปกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา
2. วางแผนการสังเคราะห์สารที่ได้ออกแบบขึ้นมา
3. สังเคราะห์โมเลกุลที่ได้ออกแบบ
4. พิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ด้วยเทคนิค spectromet
5. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส และ/หรือเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเตอเรส
6. ทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในเซลล์สมองเพาะเลี้ยง (primary neuronal cultures) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)
7. สรุปและรายงานผลที่ได้รับจากงานวิจัย

หลักการ และแนวคิดในการออกแบบอนุพันธ์คูมาริน

เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase) สามารถพบได้ที่สมอง กล้ามเนื้อ โดยหน้าที่หลักของเอนไซม์นี้ คือ การ hydrolyze acetylcholine ได้อย่างรวดเร็วที่ปลายประสาท cholinergic ซึ่งพบว่าสามารถ hydrolyze acetylcholine ได้เร็วกว่าสารสื่อประสาทชนิดอื่นๆ ส่วนเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเตอเรส (Butyrylcholinesterase) เราจะพบในส่วนของพลาสมา และยังสามารถพบได้ตามอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตับ ลำไส้ หัวใจ และปอด เป็นต้น จัดเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่สำคัญในการ hydrolyze acetylcholine ด้วย หากร่างกายขาดเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเตอเรส (Butyrylcholinesterase) ไปก็จะไม่ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของการทำหน้าที่ใดๆในร่างกาย

ในสมองคนปกติอัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase) ต่อเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเตอเรส (Butyrylcholinesterase) เป็น 99:1 แต่ในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์พบว่ามีระดับและการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase) ลดลง ในขณะที่ระดับและการทำงานของเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเตอเรส (Butyrylcholinesterase) เพิ่มขึ้น ทำให้อัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase) ต่อเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเตอเรส (Butyrylcholinesterase) เป็น 65:35 หรือ 2:1 เนื่องจาก amyloid plaques และ neurofibrillary tangles รวมทั้ง glial cells ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ สามารถ (Acetylcholinesterase) ในการทำลาย acetylcholine ดังนั้นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase) และเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเตอเรส (Butyrylcholinesterase) จึงน่าจะให้ผลในการรักษาอาการของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้ดีกว่ายาที่ยับยั้งเพียงเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase) เพียงอย่างเดียว⁽⁴⁾

ในการศึกษาและออกแบบ Cholinesterase inhibitors มีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงมากมายเช่น molecular volume of the molecule, physicochemical properties และ the geometric properties. X-ray crystal ของ AChE และ BuChE ได้แสดงให้เห็นว่าการเปิดของ gorge size ซึ่งเป็นจุดของเอนไซม์ AChE ที่ acetylcholine จะเข้าจับ

โคลีนเอสเตอเรสสายพันธุ์มนุษย์ของสารอนุพันธุ์คูมาริน

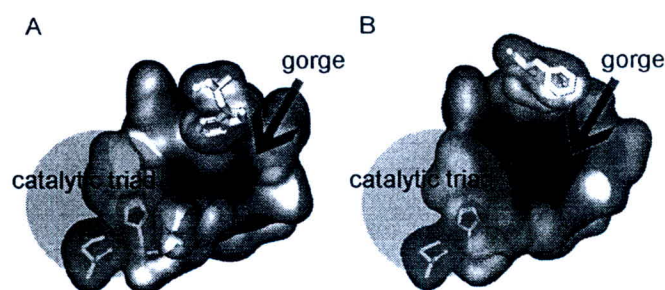
มีความแตกต่างจากของ BuchE ซึ่ง gorge size ของ AChE จะเล็กกว่ามาก(Figure 3-1). นอกจากนั้นยังได้พบว่าขนาดของโมเลกุลมีผลต่อ ChEs inhibitory activity เป็นอย่างมาก หากโมเลกุลมีขนาดใหญ่เช่น 9-anthrylcarbonyl phenothiazine จะมีฤทธิ์ยับยั้ง BuChE แต่ไม่สามารถยับยั้ง AChE.¹⁵

จากข้อมูลในตาราง 2-1, ซึ่งแสดงให้เห็นถึง amino acid residue ของเอนไซม์ ChEซึ่งเป็นจุดสำคัญในการเกิด interaction กับ ligand ต่างๆ amino acid residue Trp279 (AChE) และ Phe278 (BuChE) จะ interacts กับ ligands โดยปฏิกิริยา π - π interaction. ในส่วนของMGS, สามารถแบ่งความแตกต่างของ interaction ระหว่าง amino acid residue ของเอนไซม์ ChE และ ligand ได้เป็นสองชนิดได้แก่ cation- π และ π - π interaction อย่างไรก็ดีตาม amino acid residue Phe330 (AChE) และ Tyr332 (BuChE) จัดเป็น key amino acid สำหรับการเกิด interaction กับ ligand. ในส่วน CS, amino acid residue Trp84 (AChE) และ Phe82 (BuChE) เป็นจุดที่เกิด interaction กับ ligands โดย π - π interaction.

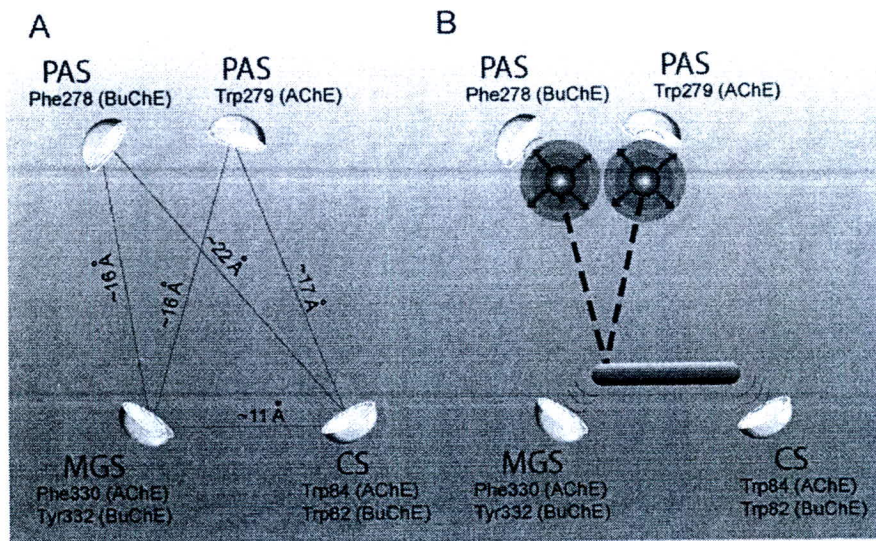
จากที่ได้กล่าวมาเบื้องต้นถึง amino acid residue ของ AChE และ BuChE ที่มีความสำคัญต่อการเกิด interaction กับ ligand ในตำแหน่งต่างๆ เช่น PAS, MSG, and CS การออกแบบยาจะคำนึงถึงระยะห่างระหว่าง amino acid residue เหล่านี้ ซึ่งระยะห่างของ amino acid residue เหล่านี้ได้แสดงใน รูปที่ 10 ซึ่งได้แสดงให้เห็นว่า amino acid ที่ตำแหน่ง PAS และ CS ของเอนไซม์แต่ละชนิด เช่น 17 Å สำหรับ AChE และ 22 Å สำหรับ BuChE. อย่างไรก็ตามระยะห่างจากตำแหน่ง PAS ถึง MGS และระยะห่างจากตำแหน่ง MGS ถึง CS ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกัน (16 Å และ 11 Å, ตามลำดับ). จากผลการศึกษาจึงได้เสนอวิธีการออกแบบ cholinesterase inhibitor ดังนี้

(i) novel inhibitor cholinesterase inhibitor ควรที่จะจับได้ทั้ง acetyl- และ butyrylcholinesterase โดยจับกับ amino acid ที่ตำแหน่ง PAS, CS และ MGS,

(ii) novel inhibitor cholinesterase inhibitor ควร interact กับ amino acid ที่ PAS และ MGS (แต่ไม่ interact กับCS). ซึ่งการในออกแบบต้องคำนึงถึงความสามารถในการที่จะเข้าถึงส่วน base ของ gorge. ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของ molecular volume ในส่วน terminus ของ molecule อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง ดังแสดงในรูปที่ 1



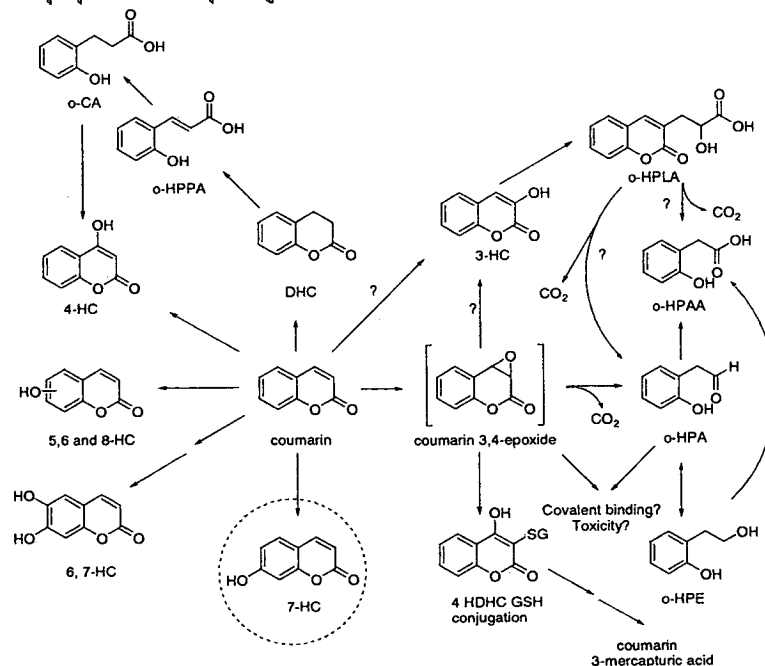
รูปที่ 1. X-ray crystal of both AChE (A) and BuChE (B) showed that the open gorge size which is the entry for acetylcholine of AChE is much smaller than what have found in BuChE



รูป 2. Schematic illustration shows the distances between selected amino acid involved in ligand binding of cholinesterases (A) and proposed design of novel cholinesterase inhibitors which bind non-selectively and interact with amino acid at PAS (B).

จากการศึกษาที่ผ่านมา อนุพันธ์ของ coumarin ได้แสดงถึงความสามารถในการยับยั้ง AChE เช่น AP2238 ซึ่งสามารถยับยั้งเอนไซม์ AChE (IC_{50} 44.5 nM) ดังแสดงในรูป 2-8 และ ยับยั้ง BuChE โดยมี IC_{50} เท่ากับ Figure 2-8 48.9×10^3 nM⁸. จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่า coumarin moiety สามารถจับได้อย่างเหมาะสมกับ binding pocket ของทั้ง AChE และ BuChE. ในการศึกษาเปรียบเทียบกับ donepezil ซึ่งเป็น potent AChEI พบว่า AP2238 มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับกับส่วน dihydroindenone moiety ของ donepezil. ยิ่งไปกว่านั้น ได้มีการศึกษาถึงความปลอดภัยของ coumarin ในมนุษย์ ทั้งทางด้าน metabolims, toxicity และ carcinogenicity

Coumarin จัดเป็นสารจากธรรมชาติ จากการศึกษา mutagenic และ genotoxic พบว่า coumarin ไม่เป็น genotoxic agent และในการศึกษา 7-hydroxycoumarin (a major safe metabolite in human) ได้ถูกเลือกให้เป็น core structure ในการศึกษา และในการศึกษานี้เราได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของ coumarin moiety ของ 7-hydroxycoumarin เทียบกับ coumarin moieties ต่างๆ ของ 3-substituted-7-hydroxycoumarins. และการแทนที่ตำแหน่งที่ 3 ของ 7-hydroxycoumarin อาจส่งผลป้องกันการเกิด 3,4-coumarin epoxide ซึ่งพบว่าเป็น toxic metabolite ที่เกิดขึ้นได้ใน epoxidation pathway (รูปที่ 3.).



รูปที่ 3. Some pathways of coumarin metabolism. The metabolites shown are 3-, 4-, 5-, 6-, 7- and 8-hydroxycoumarin (3-HC, 4-HC, 5-HC, 6-HC, 7-HC and 8-HC), o-hydroxyphenylacetaldehyde (o-HPA), o-hydroxyphenylethanol (o-HPE), o-hydroxyphenylacetic acid (o-HPAA), o-hydroxyphenyllactic acid (o-HPLA), o-hydroxyphenylpropionic acid (o-HPAA), o-coumaric acid (o-CA), dihydrocoumarin (DHC), 6,7 dihydrocoumarin (6,7-diHC) and 4-hydroxydihydrocoumarin-glutathione conjugate (4-HDHC±GSH conjugate).

กระบวนการสังเคราะห์อนุพันธ์ coumarin

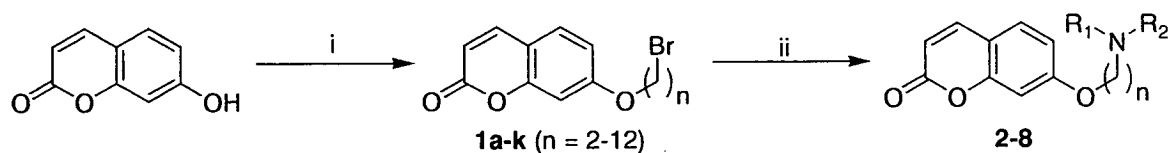
อนุพันธ์ของ coumarin 8 ชนิดได้มีการสังเคราะห์ ดังที่ได้แสดงในรูป 4. โดยที่ใช้ 7-hydroxy coumarin เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์

- 7-hydroxy-2H-chromen-2-one นำมา alkylated กับ dibromoalkanes โดยในปฏิกิริยาได้เติม potassium carbonate เพื่อให้ได้ 7-bromoalkoxy-2H-chromen-2-one (1a-1k).
- จากนั้น 7-bromoalkoxy-2H-chromen-2-one จะถูก treated โดย amines ชนิดต่างๆ ได้แก่ piperidine, pyrrolidine, diethylamine, morpholine, methylpiperazine, isoquinoline และ dimethoxy isoquinoline ใน acetone ซึ่งเติม potassium carbonate เพื่อให้ได้สารเป้าหมาย ดังแสดงในรูป 2a-2k, 3a-3c, 4a-4c, 5a-5c, 6a-6c, 7a-7c, 8a-8c. จากการศึกษพบว่าผลสารเป้าหมายร้อยละ 65-90

อนุพันธ์ coumarin อันดับ 9-11 ถูกสังเคราะห์ ดังแสดงในรูป 5. โดยที่ใช้ aldehyde, o-vanilin เป็นสารเริ่มต้น และทำการ cyclized ให้เป็น carboxylic derivative ซึ่งจะได้อนุพันธ์ coumarin หมายเลข 9 โดยมี % yield ร้อยละ 77 และในการสังเคราะห์ได้มีการใช้ Meldrum's reagent และ ammonium acetate เป็น catalyst,

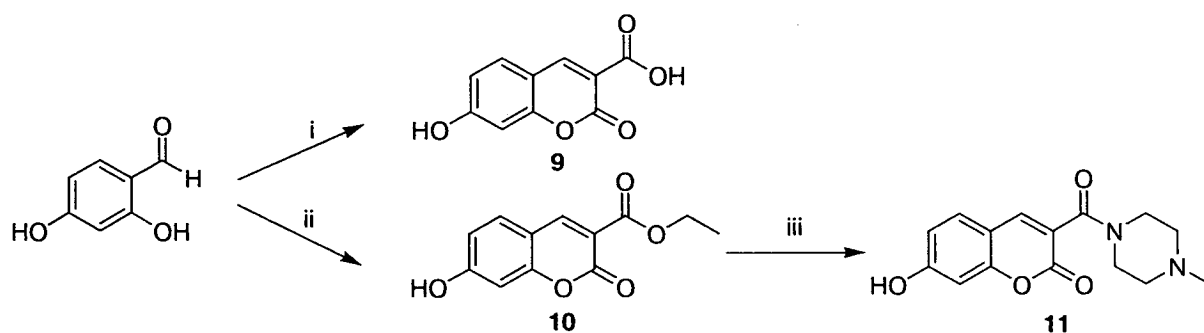
โคลีนเอสเตอเรสสายพันธุ์มนุษย์ของสารอนุพันธ์คูมาริน

จากนั้น *o*-vanilin ถูก cyclized เพื่อให้ได้ ซึ่งจะได้อนุพันธ์ coumarin ที่เป็น ester form หมายเลข 10 โดยมี % yield ร้อยละ 52 โดยใช้ diethyl malonate และ piperidine ถูกใช้เป็น catalyst. ส่วนสารอนุพันธ์ coumarin หมายเลข 11 ถูกสังเคราะห์โดยเปลี่ยน *o*-vanilin ให้เป็น intermediated ester และเปลี่ยนเป็น amide โดยใช้ potassium carbonate เป็น catalyst โดยมี % yield เท่ากับ 55.55%



รูปที่ 4. Synthetic Pathway for coumarin derivatives

Reagents and conditions: (i) $\text{Br}-(\text{CH}_2)_n-\text{Br}$, acetone, K_2CO_3 , Δ , 16 h; (ii) $\text{R}_1-\text{NH}-\text{R}_2$, acetone, K_2CO_3 , Δ .



รูปที่ 5. Synthetic Pathway for 9-11

Reagents and condition: (i) Meldrum's acid, ammonium acetate, Δ , 4 h; (ii) diethyl malonate, piperidine, r.t., 1 h; (iii) *N*-methylpiperazine, K_2CO_3 , Δ , DMF

โคลีนเอสเตอเรสสายพันธุ์มนุษย์ของสารอนุพันธ์คูมาริน

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีต่างได้ถูกสั่งซื้อจาก commercial suppliers ตัวทำละลายที่ใช้อยู่ในกลุ่ม commercial หรือ AR grade. การทดสอบ Thin-layer chromatography ทำโดยใช้ Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ และการทดสอบ column chromatography ทำโดยใช้ Merck Kieselgel 60 (0.063-0.200 mm). การศึกษา Melting points ทำโดยใช้ Buchi apparatus (Buchi535). มีการบันทึก ¹H spectra โดยใช้ Bruker/avance ที่ 400 MHz โดยใช้ residual undeuterated solvent peak เป็นตัวเปรียบเทียบกับ (reference). การทดสอบ Mass spectrometry กระทำโดยใช้เครื่อง Applied Biosystems (API4000).

วิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์ coumarin

7-(2-bromoethoxy)-2H-chromen-2-one (1a). A stirred suspension of 7-hydroxycoumarin (0.5 g, 3.08 mmol), 1,2-dibromoethane (0.87 g, 4.63 mmol), potassium carbonate (2.13, 15.42 mmol) were added in acetone (75 mL) and heated under reflux condition for 16 h. The mixture was filtered through a celite-packed column, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Next, the resulting residue was purified on a silica gel-packed column chromatography (eluted with dichloromethane) to afford the product (1a) as a white solid. ¹H NMR (CDCl₃, δ): 3.67 (t, 2H, J = 6.09 Hz), 4.35 (t, 2H, J = 6.10 Hz), 6.27 (d, 1H, J = 9.49 Hz), 6.81 (d, 1H, J = 2.37), 6.87 (dd, 1H, J = 2.47 and 8.59 Hz), 7.38 (d, 1H, J = 8.60 Hz), 7.64 (d, 1H, J = 9.49 Hz).

7-(3-bromopropoxy)-2H-chromen-2-one (1b). Following the previous procedure for the synthesis for 1a but 7-hydroxycoumarin (0.5 g, 3.08 mmol) and 1,3-dibromopropane (0.93 g, 4.63 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with dichloromethane. ¹H NMR (CDCl₃, δ): 2.24 (m, 2H), 3.41 (t, 2H, J = 6.88 Hz), 4.15 (t, 2H, J = 5.95 Hz), 6.27 (d, 1H, J = 9.49 Hz), 6.81 (d, 1H, J = 2.37), 6.87 (dd, 1H, J = 2.47 and 8.59 Hz), 7.38 (d, 1H, J = 8.60 Hz), 7.64 (d, 1H, J = 9.49 Hz).

7-(4-bromobutoxy)-2H-chromen-2-one (1c). Following the previous procedure for the synthesis for 1a but 7-hydroxycoumarin (10.5 g, 3.08 mmol), 1,4-dibromobutane (0.99 g, 4.63 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with dichloromethane. ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.97–2.01 (m, 2H), 2.05–2.09 (m, 2H), 3.49 (t, 2H, J = 6.54 Hz), 4.05 (t, 2H, J = 6.04 Hz), 6.24 (d, 1H, J = 9.47 Hz), 6.79 (d, 1H, J = 2.34 Hz), 6.82 (dd, 1H, J = 2.38 Hz and 8.54 Hz), 7.36 (d, 1H, J = 8.56 Hz), 7.63 (d, 1H, J = 9.44 Hz).

7-(5-bromopentyloxy)-2H-chromen-2-one (1d). Following the previous procedure for the synthesis for 1a but 7-hydroxycoumarin (10.5 g, 3.08 mmol), 1,5-dibromopentane (0.99 g, 4.63 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with dichloromethane. ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.61–1.66 (m, 2H), 1.82–1.86 (m, 2H), 1.92–1.95 (m, 2H), 3.43 (t, 2H, J = 6.69 Hz), 4.01 (t, 2H, J = 6.30 Hz), 6.22 (d, 1H, J = 9.46 Hz), 6.77 (d, 1H, J = 2.38 Hz), 6.81 (dd, 1H, J = 2.39 Hz and 8.56 Hz), 7.35 (d, 1H, J = 8.59 Hz), 7.62 (d, 1H, J = 9.55 Hz).

7-(6-bromohexyloxy)-2H-chromen-2-one (1e). Following the previous procedure for the synthesis for 1a but 7-hydroxycoumarin (10.5 g, 3.08 mmol), 1,6-dibromohexane (0.99 g, 4.63 mmol) were used. The

product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with dichlorometane. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.51–1.59 (m, 4H), 1.82–1.91 (m, 4H), 3.40 (t, 2H, $J = 6.72$ Hz), 4.01 (t, 2H, $J = 6.35$ Hz), 6.24 (d, 1H, $J = 9.45$ Hz), 6.78 (d, 1H, $J = 2.40$ Hz), 6.82 (dd, 1H, $J = 2.42$ Hz and 8.54 Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.56$ Hz), 7.62 (d, 1H, $J = 9.46$ Hz).

7-(7-bromoheptyloxy)-2H-chromen-2-one (1f). Following the previous procedure for the synthesis for **1a** but 7-hydroxycoumarin (1.44 g, 8.9 mmol), 1,7-dibromoheptane (4.59 g, 17.8 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with dichlorometane. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.41–1.49 (m, 6H), 1.80–1.89 (m, 4H), 3.41 (t, 2H, $J = 6.79$ Hz), 4.00 (t, 2H, $J = 6.45$ Hz), 6.23 (d, 1H, $J = 9.45$ Hz), 6.79 (d, 1H, $J = 2.35$), 6.83 (dd, 1H, $J = 2.31$ and 8.55), 7.35 (d, 1H, $J = 8.56$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 9.44$ Hz).

7-(8-bromooctyloxy)-2H-chromen-2-one (1g). Following the previous procedure for the synthesis for **1a** but 7-hydroxycoumarin (3 g, 18.5 mmol) and 1,8-dibromooctane (15 g, 55.5 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with dichlorometane. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.35–1.67 (m, 8H), 1.79–1.83 (m, 2H), 2.01–2.06 (m, 2H), 3.39 (t, 2H, $J = 6.50$ Hz), 4.00 (t, 2H, $J = 6.45$ Hz), 6.24 (d, 1H, $J = 9.46$ Hz), 6.79 (d, 1H, $J = 1.81$ Hz), 6.83 (dd, 1H, $J = 2.30$ and 8.58 Hz), 7.35 (d, 1H, $J = 8.55$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 9.46$ Hz).

7-(9-bromononyloxy)-2H-chromen-2-one (1h). Following the previous procedure for the synthesis for **1a** but 7-hydroxycoumarin (3.74 g, 23.1 mmol) and 1,9-dibromononane (13.18 g, 46.1 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with dichlorometane. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.33–1.46 (m, 10H), 1.78–1.88 (m, 4H), 3.40 (t, 2H, $J = 6.84$ Hz), 4.00 (t, 2H, $J = 6.51$ Hz), 6.23 (d, 1H, $J = 9.51$ Hz), 6.79 (d, 1H, $J = 1.81$ Hz), 6.83 (dd, 1H, $J = 1.98$ and 8.58 Hz), 7.35 (d, 1H, $J = 8.55$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 9.46$ Hz).

7-(10-bromodecyloxy)-2H-chromen-2-one (1i). Following the previous procedure for the synthesis for **1a** but 7-hydroxycoumarin (0.5 g, 3.08 mmol) and 1,10-dibromodecane (1.39 g, 4.63 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with dichlorometane. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.32–1.37 (m, 8H), 1.41–1.47 (m, 4H), 1.79–1.87 (m, 4H), 3.41 (t, 2H, $J = 6.84$ Hz), 4.01 (t, 2H, $J = 6.51$ Hz), 6.24 (d, 1H, $J = 9.48$ Hz), 6.80 (d, 1H, $J = 2.11$ Hz), 6.83 (dd, 1H, $J = 2.32$ and 8.51 Hz), 7.35 (d, 1H, $J = 8.52$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 9.47$ Hz).

7-(11-bromoundecyloxy)-2H-chromen-2-one (1j). Following the previous procedure for the synthesis for **1a** but 7-hydroxycoumarin (0.5 g, 3.08 mmol) and 1,10-dibromoundecane (1.46 g, 4.63 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with dichlorometane. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.32–1.37 (m, 10H), 1.41–1.47 (m, 4H), 1.79–1.87 (m, 4H), 3.41 (t, 2H, $J = 6.84$ Hz), 4.01 (t, 2H, $J = 6.51$ Hz), 6.24 (d, 1H, $J = 9.48$ Hz), 6.80 (d, 1H, $J = 2.11$ Hz), 6.83 (dd, 1H, $J = 2.32$ and 8.51 Hz), 7.35 (d, 1H, $J = 8.52$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 9.47$ Hz).

7-(12-bromododecyloxy)-2H-chromen-2-one (1k). Following the previous procedure for the synthesis for **1a** but 7-hydroxycoumarin (3.74 g, 23.1 mmol) and 1,9-dibromononane (1.52 g, 4.63 mmol) were

used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with dichloromethane. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.29–1.50 (m, 16H), 1.77–1.88 (m, 4H), 3.42 (t, 2H, $J = 6.85$ Hz), 4.01 (t, 2H, $J = 6.52$ Hz), 6.24 (d, 1H, $J = 9.46$ Hz), 6.79 (d, 1H, $J = 1.93$ Hz), 6.83 (dd, 1H, $J = 2.29$ and 8.55 Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.53$ Hz), 7.64 (d, 1H, $J = 9.48$ Hz).

7-(2-(piperidin-1-yl)ethoxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (2a). A stirred suspension of **1a** (0.2 g, 0.74 mmol), piperidine (0.65 g, 0.74 mmol), and potassium carbonate (0.51 g, 2.95 mmol) were added in acetone (75 mL) and heated under reflux condition for 36 h. The mixture was filtered through a celite-packed column, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **2a** as a white solid (60% yield), mp 208.3–209.9 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.73 (s, 1H), 1.85–1.87 (m, 1H), 1.89–1.90 (m, 2H), 2.23–2.30 (m, 2H), 2.81–2.84 (m, 2H), 3.42–3.45 (m, 2H), 3.67 (s, 1H), 3.68 (s, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.68 (s, 1H), 6.27 (d, 1H, $J = 9.51$ Hz), 6.81 (d, 1H, $J = 2.12$ Hz), 6.87 (dd, 1H, $J = 2.31$ and 8.57 Hz), 7.40 (d, 1H, $J = 8.55$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 9.52$ Hz). MS, m/z : 273.9 $[\text{M}+1]^+$.

7-(3-(piperidin-1-yl)propoxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (2b). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1b** (0.2 g, 0.67 mmol), piperidine (0.57 g, 6.70 mmol), and potassium carbonate (0.46 g, 3.36 mmol) were used. The mixture was filtered through a celite-packed column, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **2b** as a white solid (70% yield), mp 216.2–217.4 °C (dec.). ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.71–2.00 (m, 4), 2.20–2.30 (m, 2H), 3.00–3.10 (m, 2H), 3.33–3.40 (m, 2H), 3.57–3.63 (m, 2H), 4.21–4.30 (m, 2H), 4.82–4.83 (m, 2H), 6.27 (d, 1H, $J = 9.47$ Hz), 6.92 (d, 1H, $J = 2.12$ Hz), 6.84 (m, 1H), 7.54 (d, 1H, $J = 8.50$ Hz), 7.92 (d, 1H, $J = 9.46$ Hz). MS, m/z : 287.8 $[\text{M}+1]^+$.

7-(4-(piperidin-1-yl)butoxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (2c). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1c** (0.2 g, 0.67 mmol), piperidine (0.77 g, 6.73 mmol), and potassium carbonate (0.46 g, 3.36 mmol) were used. The mixture was filtered through a celite-packed column, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **2c** as a white solid (70% yield), mp 216.2–217.4 °C (dec.). ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.40–1.50 (m, 2H), 1.83–1.94 (m, 6H), 2.31–2.34 (m, 2H), 2.61–2.65 (m, 2H), 2.99–3.02 (m, 2H), 3.55–3.57 (m, 2H), 4.07 (t, 2H, $J = 5.92$ Hz), 6.25 (d, 1H, $J = 9.46$ Hz), 6.77 (d, 1H, $J = 2.37$ Hz), 6.82 (dd, 1H, $J = 2.44$ and 8.59 Hz), 7.37 (d, 1H, $J = 8.60$), 7.63 (d, 1H, $J = 9.50$). MS, m/z : 301.9 $[\text{M}+1]^+$.

7-(5-(piperidin-1-yl)pentyl)-2H-chromen-2-one hydrochloride (2d). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1d** (0.2 g, 0.64 mmol), piperidine (0.54 g, 6.43 mmol), and potassium carbonate (0.44 g, 3.21 mmol) were used. The mixture was filtered through a celite-packed column, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **2d** as a white solid (70% yield), mp 160.1–162.3 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.55–1.57 (m, 2H), 1.83–1.90 (m, 6H), 2.00–2.01 (m, 2H), 2.25–2.30 (m, 2H), 2.60–2.63 (m, 2H),

2.92–2.95 (m, 2H), 3.53–3.55 (m, 2H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.09$ Hz), 6.23 (d, 1H, $J = 9.45$ Hz), 6.76 (d, 1H, $J = 2.35$ Hz), 6.82 (dd, 1H $J = 2.43$ and 8.59 Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.61$), 7.63 (d, 1H, $J = 9.49$). MS, m/z : 315.8 $[M+1]^+$.

7-(6-(piperidin-1-yl)hexyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (2e). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1e** (0.2 g, 0.62 mmol), piperidine (0.53 g, 6.22 mmol), and potassium carbonate (0.42 g, 3.08 mmol) were used. The mixture was filtered through a celite-packed column, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **2e** as a white solid (75% yield), mp 153.8–155.1 °C (dec.). ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.41–1.45 (m, 2H), 1.52–1.56 (m, 2H), 1.80–1.96 (m, 8H), 2.30–2.35 (m, 2H), 2.60–2.68 (m, 2H), 2.89–2.93 (m, 2H), 3.50–3.55 (m, 2H), 4.00 (t, 2H, $J = 6.20$ Hz), 6.24 (d, 1H, $J = 9.48$ Hz), 6.77 (d, 1H, $J = 2.30$ Hz), 6.82 (dd, 1H $J = 2.39$ and 8.58 Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.59$), 7.63 (d, 1H, $J = 9.48$). MS, m/z : 329.9 $[M+1]^+$.

7-(7-(piperidin-1-yl)heptyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (2f). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1f** (0.25 g, 0.74 mmol), piperidine (0.63 g, 7.40 mmol), and potassium carbonate (0.51 g, 3.68 mmol) were used. The mixture was filtered through a celite-packed column, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **2f** as a white solid (80% yield), mp 142.8–143.8 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.39–1.41 (m, 6H), 1.77–1.92 (m, 8H), 2.30–2.38 (m, 2H), 2.60–2.68 (m, 2H), 2.89–2.95 (m, 2H), 3.55–3.60 (m, 2H), 4.00 (t, 2H, $J = 6.38$ Hz), 6.23 (d, 1H, $J = 9.47$ Hz), 6.78 (d, 1H, $J = 2.36$ Hz), 6.82 (dd, 1H $J = 2.37$ and 8.58 Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.59$), 7.63 (d, 1H, $J = 9.50$). MS, m/z : 343.7 $[M+1]^+$.

7-(8-(piperidin-1-yl)octyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (2g). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1g** (0.25 g, 0.71 mmol), piperidine (0.81 g, 9.47 mmol), and potassium carbonate (0.51 g, 3.68 mmol) were used. The mixture was filtered through a celite-packed column, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **2g** as a white solid (80% yield), mp 110.7–112.8 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.36–1.45 (m, 8H), 1.70–1.84 (m, 8H), 2.25–2.30 (m, 2H), 2.55–2.60 (m, 2H), 2.87–2.91 (m, 2H), 3.51–3.55 (m, 2H), 4.00 (t, 2H, $J = 6.40$ Hz), 6.23 (d, 1H, $J = 9.44$ Hz), 6.78 (d, 1H, $J = 2.36$ Hz), 6.82 (dd, 1H $J = 2.37$ and 8.58 Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.59$), 7.63 (d, 1H, $J = 9.50$). MS, m/z : 357.9 $[M+1]^+$.

7-(9-(piperidin-1-yl)nonyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (2h). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1h** (0.25 g, 0.68 mmol), piperidine (0.78 g, 9.13 mmol), and potassium carbonate (0.51 g, 3.68 mmol) were used. The mixture was filtered through a celite-packed column, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **2h** as a white solid (80% yield), mp 143.3–144.1 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.34–1.45 (m, 10H), 1.80–1.95 (m, 8H), 2.25–2.30 (m, 2H), 2.55–2.60 (m, 2H), 2.87–2.92 (m, 2H), 3.51–3.55 (m, 2H), 4.00 (t, 2H, $J = 6.49$ Hz), 6.23 (d, 1H, $J = 9.47$ Hz), 6.79 (d, 1H, $J = 2.35$ Hz), 6.82 (dd, 1H $J = 2.37$ and 8.58 Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.58$), 7.63 (d, 1H, $J = 9.50$). MS, m/z : 371.8 $[M+1]^+$.

7-(10-(piperidin-1-yl)decyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (2i). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1i** (0.25 g, 0.66 mmol), piperidine (0.75 g, 8.81 mmol), and potassium carbonate (0.51 g, 3.68 mmol) were used. The mixture was filtered through a celite-packed column, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **2i** as a white solid (80% yield), mp 132.8-134.5 °C. ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.28–1.32 (m, 10H), 1.43–1.46 (m, 2H), 1.78–1.91 (m, 8H), 2.25–2.30 (m, 2H), 2.55–2.58 (m, 2H), 2.87–2.89 (m, 2H), 3.50–3.55 (m, 2H), 4.00 (t, 2H, *J* = 6.50 Hz), 6.23 (d, 1H, *J* = 9.47 Hz), 6.79 (d, 1H, *J* = 2.34 Hz), 6.82 (dd, 1H *J* = 2.39 and 8.57 Hz), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.57), 7.63 (d, 1H, *J* = 9.47). MS, *m/z*: 385.9 [M+1]⁺.

7-(11-(piperidin-1-yl)undecyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (2j). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1j** (0.25 g, 0.63 mmol), piperidine (0.71 g, 8.45 mmol), and potassium carbonate (0.51 g, 3.68 mmol) were used. The mixture was filtered through a celite-packed column, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **2j** as a white solid (80% yield), mp 134.5-135.8 °C. ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.28–1.32 (m, 12H), 1.43–1.45 (m, 2H), 1.78–1.91 (m, 8H), 2.25–2.30 (m, 2H), 2.58–2.60 (m, 2H), 2.87–2.90 (m, 2H), 3.50–3.55 (m, 2H), 4.00 (t, 2H, *J* = 6.53 Hz), 6.23 (d, 1H, *J* = 9.45 Hz), 6.79 (d, 1H, *J* = 2.25 Hz), 6.82 (dd, 1H *J* = 2.44 and 8.56 Hz), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.58), 7.63 (d, 1H, *J* = 9.49). MS, *m/z*: 399.9 [M+1]⁺.

7-(12-(piperidin-1-yl)dodecyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (2k). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1k** (0.25 g, 0.61 mmol), piperidine (0.70 g, 8.17 mmol), and potassium carbonate (0.51 g, 3.68 mmol) were used. The mixture was filtered through a celite-packed column, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **2k** as a white solid (80% yield), mp 145.4-146.7 °C. ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.27–1.32 (m, 12H), 1.36–1.40 (m, 4H), 1.78–1.89 (m, 8H), 2.25–2.30 (m, 2H), 2.55–2.60 (m, 2H), 2.85–2.89 (m, 2H), 3.58–3.60 (m, 2H), 4.00 (t, 2H, *J* = 6.49 Hz), 6.23 (d, 1H, *J* = 9.45 Hz), 6.79 (d, 1H, *J* = 2.33 Hz), 6.82 (dd, 1H *J* = 2.55 and 8.56 Hz), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.56), 7.63 (d, 1H, *J* = 9.43). MS, *m/z*: 413.8 [M+1]⁺.

7-(7-(pyrrolidin-1-yl)heptyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (3a). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1f** (0.20 g, 0.59 mmol), pyrrolidine (0.11 g, 1.77 mmol), and potassium carbonate (0.41 g, 3.00 mmol) were used. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **3a** as a white solid (80% yield), mp 125.4–126.9 °C (dec.). ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.42–1.57 (m, 6H), 1.79–1.82 (m, 2H), 1.90–2.00 (m, 2H), 2.05–2.15 (m, 2H), 2.20–2.30 (m, 2H), 2.70–2.80 (m, 2H), 2.99–3.02 (m, 2H), 3.75–3.85 (m, 2H), 4.01 (t, 2H, *J* = 6.35 Hz), 6.24 (d, 1H, *J* = 9.45 Hz), 6.79 (d, 1H, *J* = 2.23 Hz), 6.84 (dd, 1H, *J* = 2.34 and 8.58 Hz), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.60 Hz), 7.63 (d, 1H, *J* = 9.46 Hz), 12.46 (s, 1H). MS, *m/z*: 329.8 [M+1]⁺.

7-(8-(pyrrolidin-1-yl)octyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (3b). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1g** (0.20 g, 0.57 mmol), pyrrolidine (0.12 g, 1.70 mmol), and potassium carbonate (0.39 g, 2.83 mmol) were used. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **3b** as a white solid (60% yield), mp 85.1–87.6 °C. ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.38–1.78 (m, 8H), 1.78–1.82 (m, 2H), 1.85–1.95 (m, 2H), 2.00–2.10 (m, 2H), 2.25–2.27 (m, 2H), 2.70–2.80 (m, 2H), 2.96–3.00 (m, 2H), 3.78–3.80 (m, 2H), 4.01 (t, 2H, *J* = 6.45 Hz), 6.24 (d, 1H, *J* = 9.46 Hz), 6.79 (d, 1H, *J* = 2.29 Hz), 6.84 (dd, 1H, *J* = 2.41 and 8.59 Hz), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.57 Hz), 7.63 (d, 1H, *J* = 9.46 Hz), 12.46 (s, 1H). MS, *m/z*: 343.7 [M+1]⁺.

7-(9-(pyrrolidin-1-yl)nonyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (3c). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1h** (0.20 g, 0.57 mmol), pyrrolidine (0.12 g, 1.70 mmol), and potassium carbonate (0.39 g, 2.83 mmol) were used. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **6c** as a white solid (85% yield), mp 136.2–137.5 °C (dec.). ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.25–1.55 (m, 10H), 1.78–1.82 (m, 2H), 1.85–1.95 (m, 2H), 2.00–2.10 (m, 2H), 2.25–2.27 (m, 2H), 2.75–2.80 (m, 2H), 2.97–3.00 (m, 2H), 3.78–3.80 (m, 2H), 4.01 (t, 2H, *J* = 6.47 Hz), 6.24 (d, 1H, *J* = 9.47 Hz), 6.79 (d, 1H, *J* = 2.31 Hz), 6.84 (dd, 1H, *J* = 2.40 and 8.58 Hz), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.58 Hz), 7.63 (d, 1H, *J* = 9.50 Hz), 12.46 (s, 1H). MS, *m/z*: 357.9 [M+1]⁺.

7-(7-(diethylamino)heptyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (4a). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1f** (0.15 g, 0.44 mmol), diethylamine (3.54 g, 4.83 mmol), and potassium carbonate (0.41 g, 3.00 mmol) were used. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **4a** as a white solid (65% yield), mp 112.1–115.7 °C. ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.39–1.43 (m, 6H), 1.58 (s, 6H), 1.79–1.84 (m, 4H), 2.93–2.97 (m, 2H), 3.09–3.13 (m, 4H), 4.01 (t, 2H, *J* = 6.38 Hz), 6.24 (d, 1H, *J* = 9.45 Hz), 6.79 (d, 1H, *J* = 2.23 Hz), 6.83 (dd, 1H, *J* = 2.38 and 8.58 Hz), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.57 Hz), 7.63 (d, 1H, *J* = 9.48 Hz). MS, *m/z*: 331.8 [M+1]⁺.

7-(8-(diethylamino)octyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (4b). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1g** (0.2 g, 0.57 mmol), diethylamine (3.54 g, 4.83 mmol), and potassium carbonate (0.39 g, 2.83 mmol) were used. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **4b** as a white solid (55% yield), mp 66.7–67.9 °C. ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.39–1.47 (m, 8H), 1.56 (s, 6H), 1.79–1.84 (m, 4H), 2.93–2.96 (m, 2H), 3.09–3.11 (m, 4H), 4.01 (t, 2H, *J* = 6.41 Hz), 6.24 (d, 1H, *J* = 9.45 Hz), 6.79 (d, 1H, *J* = 1.86 Hz), 6.83 (dd, 1H, *J* = 2.04 and 8.58 Hz), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.55 Hz), 7.63 (d, 1H, *J* = 9.43 Hz). MS, *m/z*: 345.9 [M+1]⁺.

7-(9-(diethylamino)nonyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (4c). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1h** (0.2 g, 0.57 mmol), diethylamine (3.54 g, 4.83 mmol), and potassium carbonate (0.39 g, 3.00 mmol) were used. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **4b** as a white solid (70% yield), mp 81.4–83.4 °C. ¹H NMR (CDCl₃, δ):

1.35–1.46 (m, 10H), 1.58 (s, 6H), 1.79–1.84 (m, 4H), 2.93–2.96 (m, 2H), 3.09–3.12 (m, 4H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.42$ Hz), 6.24 (d, 1H, $J = 9.46$ Hz), 6.79 (d, 1H, $J = 2.17$ Hz), 6.84 (dd, 1H, $J = 2.31$ and 8.56 Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.56$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 9.48$ Hz). MS, m/z : 359.8 $[M+1]^+$.

7-(7-morpholinoheptyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (5a). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1f** (0.20 g, 0.59 mmol), morpholine (0.15 g, 1.77 mmol), and potassium carbonate (0.41 g, 3.00 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with 10% methanol in ethyl acetate (90% yield), mp 149.0–152.7 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.43–1.51 (m, 6H), 1.48–1.50 (m, 2H), 1.50–1.51 (m, 2H), 2.85–2.88 (m, 2H), 2.92–2.95 (m, 2H), 3.42–3.44 (m, 2H), 4.01–4.03 (m, 4H), 4.35–4.40 (m, 2H), 6.25 (d, 1H, $J = 9.46$ Hz), 6.80 (d, 1H, $J = 2.29$ Hz), 6.84 (dd, 1H, $J = 2.39$ and 8.57 Hz), 7.38 (d, 1H, $J = 8.58$ Hz), 7.64 (d, 1H, $J = 9.47$ Hz), 13.14 (s, 1H). MS, m/z : 345.8 $[M+1]^+$.

7-(8-morpholinooctyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (5b). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1g** (0.25 g, 0.71 mmol), morpholine (0.18 g, 2.12 mmol), and potassium carbonate (0.49 g, 3.54 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with 10% methanol in ethyl acetate (85% yield), mp 62.4–63.3 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.38–1.76 (m, 8H), 1.80–1.83 (m, 2H), 1.90–2.00 (m, 2H), 2.83–2.88 (m, 2H), 2.93–2.96 (m, 2H), 3.41–3.44 (m, 2H), 3.94–4.01 (m, 4H), 4.28–4.34 (m, 2H), 6.23 (d, 1H, $J = 9.47$ Hz), 6.78 (d, 1H, $J = 2.25$ Hz), 6.83 (dd, 1H, $J = 2.35$ and 8.58 Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.58$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 9.48$ Hz), 13.14 (s, 1H). MS, m/z : 359.8 $[M+1]^+$.

7-(9-morpholinononyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (5c). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1h** (0.20 g, 0.55 mmol), morpholine (0.14 g, 1.63 mmol), and potassium carbonate (0.38 g, 2.72 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with 10% methanol in ethyl acetate (85% yield), mp 155.8–156.3 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.35–1.56 (m, 10H), 1.78–1.82 (m, 2H), 1.90–2.00 (m, 2H), 2.85–2.90 (m, 2H), 2.93–2.95 (m, 2H), 3.42 (m, 2H), 3.95–4.03 (m, 4H), 4.30–4.40 (m, 2H), 6.24 (d, 1H, $J = 9.47$ Hz), 6.80 (d, 1H, $J = 2.30$ Hz), 6.84 (dd, 1H, $J = 2.40$ and 8.57 Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.57$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 9.46$ Hz), 13.14 (s, 1H). MS, m/z : 373.8 $[M+1]^+$.

7-(7-(4-methylpiperazin-1-yl)heptyloxy)-2H-chromen-2-one 2 hydrochloride (6a). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1f** (0.20 g, 0.59 mmol), methylpiperazine (0.18 g, 1.77 mmol), and potassium carbonate (0.41 g, 3.00 mmol) were used. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **6a** as a white solid (65% yield), mp 233.5–234.8 °C (dec.). ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.90–1.98 (m, 6H), 1.70–1.80 (m, 4H), 2.87 (s, 3H), 3.05–3.10 (m, 2H), 3.50–3.60 (m, 4H), 3.65–3.75 (m, 2H), 3.80–3.90 (m, 2H), 3.95 (t, 2H, $J = 6.35$ Hz), 6.18 (d, 1H, $J = 9.47$ Hz), 6.73 (d, 1H, $J = 2.07$ Hz), 6.78 (dd, 1H, $J = 2.30$ and 8.57 Hz), 7.32 (d, 1H, $J = 8.60$ Hz), 7.61 (d, 1H, $J = 9.47$ Hz). MS, m/z : 358.7 $[M+1]^+$.

7-(8-(4-methylpiperazin-1-yl)octyloxy)-2H-chromen-2-one 2 hydrochloride (6b). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1g** (0.20 g, 0.57 mmol), methylpiperazine (0.15 g, 1.70 mmol), and potassium carbonate (0.39 g, 2.83 mmol) were used. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **6b** as a white solid (60% yeild), mp 229.4–230.3 °C (dec.). ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.33–1.73 (m, 8H), 1.75–1.78 (m, 4H), 2.88 (s, 3H), 3.04–3.07 (m, 2H), 3.53–3.60 (m, 4H), 3.65–3.75 (m, 2H), 3.85–3.90 (m, 2H), 3.96 (t, 2H, *J* = 6.41 Hz), 6.18 (d, 1H, *J* = 9.46 Hz), 6.75 (d, 1H, *J* = 1.89 Hz), 6.78 (dd, 1H, *J* = 2.18 and 8.58 Hz), 7.32 (d, 1H, *J* = 8.54 Hz), 7.61 (d, 1H, *J* = 9.44 Hz). MS, *m/z*: 374.1 [M+1]⁺.

7-(9-(4-methylpiperazin-1-yl)nonyloxy)-2H-chromen-2-one 2 hydrochloride (6c). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1h** (0.25 g, 0.68 mmol), methylpiperazine (0.21g, 2.04 mmol), and potassium carbonate (0.31 g, 2.21 mmol) were used. Purification with acid base extraction and crystallization of the residue from diethyl ether afforded **6c** as a white solid (70% yeild), mp 236.7–239.3 °C (dec.). ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.28–1.39 (m, 10H), 1.73–1.77 (m, 4H), 2.86 (s, 3H), 3.04–3.06 (m, 2H), 3.52–3.60 (m, 4H), 3.67–3.75 (m, 2H), 3.77–3.80 (m, 2H), 3.94 (t, 2H, *J* = 6.43 Hz), 6.17 (d, 1H, *J* = 9.45 Hz), 6.74 (s, 1H), 6.78 (dd, 1H, *J* = 2.24 and 8.58 Hz), 7.31 (d, 1H, *J* = 8.58 Hz), 7.61 (d, 1H, *J* = 9.45 Hz). MS, *m/z*: 387.1 [M+1]⁺.

7-(7-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)heptyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (7a). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1f** (0.3 g, 0.82 mmol), 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (0.10 g, 0.80 mmol), and potassium carbonate (0.41 g, 2.95 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with 10% methanol in ethyl acetate (60% yield), mp 169.2–170.8 °C. ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.40–1.50 (m, 6), 1.80–1.82 (m, 2H), 2.00–2.10 (m, 2H), 2.85–2.99 (m, 1H), 3.02–3.08 (m, 2H), 3.25–3.35 (m, 1H), 3.45–3.55 (m, 1H), 3.65–3.75 (m, 1H), 3.90–3.95 (m, 1H), 4.02 (t, 2H, *J* = 6.20 Hz), 4.60–4.65 (m, 1H), 6.25 (d, 1H, *J* = 9.45 Hz), 6.81 (d, 1H, *J* = 2.56 Hz), 6.85 (dd, 1H, *J* = 2.14 and 8.67 Hz), 7.10–7.12 (m, 1H), 7.20–7.22 (m, 1H), 7.27–7.29 (m, 1H), 7.30–7.32 (m, 1H), 7.38 (d, 1H, *J* = 8.54 Hz), 7.65 (d, 1H, *J* = 9.47), 12.98 (s, 1H). MS, *m/z*: 391.7 [M+1]⁺.

7-(8-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)octyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (7b). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1g** (0.2 g, 0.57 mmol), 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (0.10 g, 0.80 mmol), and potassium carbonate (0.39 g, 2.95 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with 10% methanol in ethyl acetate (65% yield), mp 148.1–151.7 °C. ¹H NMR (CDCl₃, δ): 1.41–1.68 (m, 8H), 1.81 (t, 2H, *J* = 6.77 Hz), 2.00–2.10 (m, 2H), 2.90–2.99 (m, 1H), 3.00–3.10 (m, 2H), 3.25–3.35 (m, 1H), 3.45–3.55 (m, 1H), 3.65–3.75 (m, 1H), 3.90–3.95 (m, 1H), 4.02 (t, 2H, *J* = 5.94 Hz), 4.60–4.63 (m, 1H), 6.25 (d, 1H, *J* = 9.46 Hz), 6.81 (d, 1H, *J* = 2.77 Hz), 6.85 (dd, 1H, *J* = 2.86 and 8.69 Hz), 7.10–12 (m, 1H),

7.20–7.22 (m, 1H), 7.29–7.30 (m, 1H), 7.30–7.32 (m, 1H), 7.38 (d, 1H, $J = 8.54$ Hz), 7.64 (d, 1H, $J = 9.46$ Hz), 12.98 (s, 1H). MS, m/z : 405.9 $[M+1]^+$.

7-(9-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)nonyloxy)-2H-chromen-2-one hydrochloride (7c).

Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1h** (0.25 g, 0.68 mmol), 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (0.10 g, 0.80 mmol), and potassium carbonate (0.47 g, 3.40 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with 10% methanol in ethyl acetate (85% yield), mp 125.6–127.5 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.35–1.45 (m, 10H), 1.80 (t, 2H, $J = 7.89$ Hz), 1.95–2.05 (m, 2H), 2.95–3.00 (m, 1H), 3.03–3.05 (m, 2H), 3.20–3.30 (m, 1H), 3.45–3.50 (m, 1H), 3.60–3.70 (m, 1H), 3.91–3.94 (m, 1H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.47$), 4.58–4.68 (m, 1H), 6.24 (d, 1H, $J = 9.46$ Hz), 6.80 (d, 1H, $J = 2.23$ Hz), 6.83 (dd, 1H, $J = 2.35$ and 8.57 Hz), 7.10 (d, 1H, $J = 6.89$ Hz), 7.21 (d, 1H, $J = 8.26$ Hz), 7.26–7.30 (m, 2H), 7.36 (d, 1H, $J = 8.57$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 9.47$ Hz), 12.98 (s, 1H). MS, m/z : 419.7 $[M+1]^+$.

7-(7-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)heptyloxy)-2H-chromen-2-one

hydrochloride (8a). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1f** (0.2 g, 0.59 mmol), 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (0.14 g, 0.78 mmol), and potassium carbonate (0.41 g, 2.95 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with 10% methanol in ethyl acetate (65% yield), mp 168.2–170.0 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.45–1.58 (m, 6H), 1.79–1.82 (m, 2H), 1.95–2.05 (m, 2H), 2.90–3.00 (m, 1H), 3.05–3.15 (m, 2H), 3.20–3.30 (m, 1H), 3.40–3.50 (m, 1H), 3.60–3.70 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.91–3.94 (m, 1H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.26$ Hz), 4.45–4.55 (m, 1H), 6.24 (d, 1H, $J = 9.46$ Hz), 6.53 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.80 (d, 1H, $J = 2.94$ Hz), 6.84 (dd, 1H, $J = 2.15$ and 8.54 Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.58$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 9.44$ Hz), 12.99 (s, 1H). MS, m/z : 451.6 $[M+1]^+$.

7-(8-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)octyloxy)-2H-chromen-2-one

hydrochloride (8b). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1g** (0.2 g, 0.57 mmol), 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (0.13 g, 0.68 mmol), and potassium carbonate (0.39 g, 2.83 mmol) were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with 10% methanol in ethyl acetate (80% yield), mp 159.6–161.8 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.40–1.55 (m, 8), 1.79–1.82 (m, 2H), 1.95–2.00 (m, 2H), 2.85–2.95 (m, 1H), 3.00–3.10 (m, 2H), 3.20–3.30 (m, 1H), 3.35–3.45 (m, 1H), 3.55–3.65 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.90–3.94 (m, 1H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.38$ Hz), 4.45–4.55 (m, 1H), 6.24 (d, 1H, $J = 9.48$ Hz), 6.52 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.79 (d, 1H, $J = 2.16$ Hz), 6.84 (dd, 1H, $J = 2.39$ and 8.58 Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.57$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 9.48$ Hz), 12.99 (s, 1H). MS, m/z : 465.7 $[M+1]^+$.

7-(9-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)nonyloxy)-2H-chromen-2-one

hydrochloride (8c). Following the previous procedure for the synthesis for **2a** but **1h** (0.3 g, 0.82 mmol), 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (0.19 g, 0.98 mmol), and potassium carbonate (0.56 g, 4.08 mmol)

were used. The product was obtained as a white solid after purification with a silica gel-packed column chromatography and eluted with 10% methanol in ethyl acetate (75% yield), mp 170.6–172.3 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.25–1.54 (m, 10), 1.79–1.82 (m, 2H), 1.95–2.05 (m, 2H), 2.85–2.95 (m, 1H), 3.04–3.06 (m, 2H), 3.20–3.30 (m, 1H), 3.50–3.60 (m, 1H), 3.55–3.65 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.90–3.94 (m, 1H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.46$ Hz), 4.45–4.55 (m, 1H), 6.24 (d, 1H, $J = 9.44$ Hz), 6.52 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.80 (d, 1H, $J = 2.21$ Hz), 6.84 (dd, 1H, $J = 2.40$ and 8.58 Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.59$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 9.49$ Hz), 12.99 (s, 1H). MS, m/z : 479.8 $[\text{M}+1]^+$.

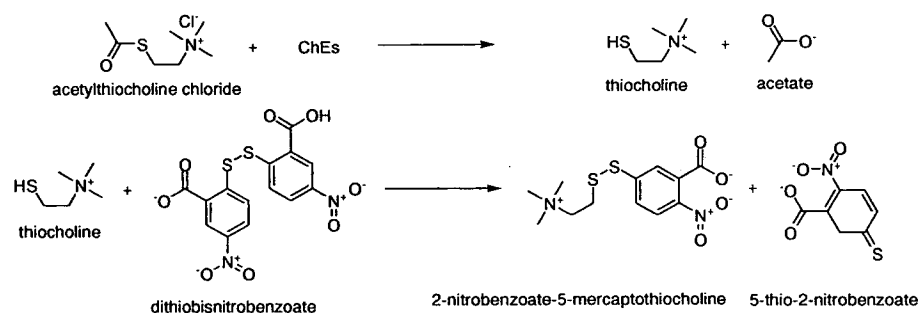
7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (9) 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (7 g, 50.71 mmol) was suspended in water (50 mL). Meldrum's acid (6.9 g, 47.87 mmol) and Ammonium acetate (0.71 g, 9.12 mmol) were added to the suspension. The suspension was stirred at room temperature for 4 h. After that the resulting precipitate was filtered and was added dropwise by acetone to gave 9 as a light pink solid (8 g, 77%), mp > 250, ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 6.68 (d, 1H, $J = 1.68$ Hz), 6.68–6.77 (m, 1H), 7.4 (dd, 1H, $J = 1.28, 8.65$), 8.60 (s, 1H). MS, m/z : 207.2 $[\text{M}+1]^+$

ethyl 7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (10) 2,4-Dihydroxybenzaldehyde (4 g, 28.96 mmol) was added in diethyl malonate (2.8 mL, 28.96 mmol) and then Piperidine (0.2 mol) was added to the mixture. The resulting orange solution was formed and was stirred at room temperature for 1 h. Subsequently, a 10 N hydrochloric acid solution was added dropwise until the solution became acid to an indicator paper. The aforementioned solution was filtered and was wash with water to give 10 as a yellow solid (3.5 g, 52% Yield), mp 159.1–160.1 ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 1.40 (t, 3H, $J = 7.12$ Hz), 4.40 (q, 2H, 7.12 Hz), 6.91 (dd, 1H, $J = 2.27, 8.62$ Hz), 6.96 (d, 1H, $J = 2.13$), 7.4 (d, 1H, $J = 8.66$), 8.54 (s, 1H). MS, m/z : 235.3 $[\text{M}+1]^+$

7-hydroxy-3-(4-methylpiperazine-1-carbonyl)-2H-chromen-2-one(11) The ester derivative 10 (0.2 g, 0.97 mmol) was dissolve in dimethylformamide (15 mL). Potassium carbonate (0.67 g 4.85 mmol) and *N*-methylpiperazine (0.15 g, 1.46 mmol) were added to the aforementioned solution and was heated under reflux condition for 72 h. The resulting solution was concentrated under reduced pressure and the residue was dissolved in diethyl ether (50 mL). The organic solution was extract by 2.5 HCl aqueous solution. Subsequently, the extracted solution was added sodium carbonate until pH was more than 7 and acidic solution were extracted again with dichloromethane (50 mL $\times$ 3). The organic layer was concentrated under reduce pressure and recrystallized in ether to gave 11 as a light yellow solid (1.45 g, 55% yield), mp > 250 ^1H NMR (CDCl_3 , δ): 3.31–3.78 (m, 11H), 6.86 (s, 1H), 6.90 (dd, 1H, $J = 2.27, 8.62$ Hz), 7.54 (d, 1H, $J = 8.66$), 8.13 (s, 1H). MS, m/z : 289.0 $[\text{M}+1]^+$

การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ AChE และ BuChE ของอนุพันธ์ coumarin ทำโดยใช้วิธีของ Ellman.³⁵ โดยการศึกษาใช้ 3.8 mM acetylthiocholine chloride (ATCC) เป็น substrate ของเอนไซม์ ChEs. ATCC จะถูก hydrolysed โดยเอนไซม์เป็น thiocholine และ acetate โดยในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์จาก erythrocyte membrane (AChE) และ plasma (BuChE). Thiocholine ที่ได้จากปฏิกิริยาจะทำปฏิกิริยากับ 3 mM dithiobisnitrobenzoate (DTNB) product จากปฏิกิริยาที่ได้คือ 2-nitrobenzoate-5-mercaptothiocholine และ 5-thio-2-nitrobenzoate ซึ่งมีสีเหลืองดังแสดงในรูปที่ 6. activity ของ ChE จะถูกวัดโดยการเพิ่มของสีเหลืองซึ่งเป็นสีของ product จากปฏิกิริยา และวัดโดย spectrophotometer. ในการศึกษาจะใช้ สารละลาย 50 mM Tris/HCl (pH 7) เป็น negative control and และ neostigmine เป็น positive control



รูปที่ 6. Scheme of Ellman reaction between thiocholine and DTNB, where the thiocholine ion is obtained previously from the hydrolysis of ATCC by either AChE or BuChE.

ค่า half maximum inhibitory activity (IC₅₀) ของสารอนุพันธ์แต่ละตัวจะถูกคำนวณจาก dose-response curve of five โดยใช้ GraphPad™ software ในการคำนวณ.

การแยก Enzyme AChE ในเซลล์เม็ดเลือดแดง และ BuChE ใน plasma จาก Human whole blood

1. เตรียมพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดแดงของเม็ดเลือดแดง โดยการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำของอาสาสมัคร ปริมาณครั้งละ 20 ml จำนวน 1 ครั้ง ทั้งนี้ผู้ทำการวิจัยต้องการเพียงเลือดของอาสาสมัครเท่านั้น และไม่มีการให้อาสาสมัครรับประทานยาหรือรับสารเคมีใดๆเข้าสู่ร่างกายก่อนการเจาะเลือดและตลอดการศึกษา โดยมี

เกณฑ์การคัดเข้า (Inclusion criteria)

1. เป็นอาสาสมัครเพศชายที่มีสุขภาพดีไม่มีโรคประจำตัว
2. มีอายุระหว่าง 20-60 ปี
3. ก่อนการเจาะเลือด 1 สัปดาห์อาสาสมัครจะต้องไม่รับประทานยาที่มีผลต่อเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase; AChE)

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

1. อาสาสมัครพักผ่อนไม่เพียงพอ นอนหลับน้อยกว่า 6 ชั่วโมง ก่อนการเจาะเลือด
2. ดื่มเครื่องดื่มที่มีคาเฟอีน เช่น ชา กาแฟ ก่อนการเจาะเลือดอย่างน้อย 4 ชั่วโมง
- เกณฑ์การให้เลิกจากการศึกษา (Discontinuation) ดังนี้
อาสาสมัคร ไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว สามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา
3. นำเลือดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifugation ที่ความเร็วรอบ 2000 g อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาทีเพื่อทำการแยกพลาสมาออกจากเซลล์ แล้วนำพลาสมามาทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งบิวทิลโคลีนเอสเตอเรส (Butyrylcholinesterase; BuChE)
4. นำส่วนของเซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแยกพลาสมาออกไปแล้วมาทำการล้างเอาสิ่งเจือปนออก โดยเติม 0.9% NaCl ที่เข้มข้นประมาณ 15 นาที 10 ml และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 600 g อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง
5. เติมน้ำละลาย buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.5 ที่เข้มข้นประมาณ 15 นาที 700 μ l ปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 12,000 g นาน 4°C นาน 10 นาที ดูด supernatant ออกทิ้ง แล้วเติม 10 mM Tris-HCl pH 7.5 ปริมาณ 700 μ l ปั่นเหวี่ยงจนกว่าส่วน supernatant จะใส จากนั้นเติม 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 100 μ l/tube แล้วแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อได้ส่วนเซลล์เมมเบรนของเม็ดเลือดแดงมาทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase; AChE)

การทดสอบผลของสารอนุพันธ์ coumarin ต่อ cell viability ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

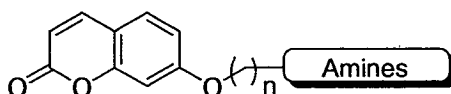
1. เลี้ยง human neuroblastoma cells ใน 96 well plate จำนวนให้ได้ปริมาณ 20,000 cells/well/100 μ l ตาม protocol การเลี้ยงเซลล์ (ยกเว้น wells รอบ plate ให้เติม PBS)
2. เปลี่ยนเป็น medium free serum และ treat ด้วยสารทดสอบ จากนั้น incubate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ใน 5% CO₂ incubator, temp 37°C ก่อนทดสอบ MTT assay
3. เติมน้ำละลาย 0.5% MTT ปริมาตร 10 μ l/well ใน medium โดยขั้นตอนนี้ทำใน laminar air flow
4. เก็บเซลล์ใน 5% CO₂ incubator, temp 37°C เป็นระยะเวลานาน 4 ชั่วโมง
5. ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด (ใช้วิธีการคว่ำ plate)
6. เติมน้ำทำละลาย DMSO-EtOH (DMSO : EtOH = 1:1) ปริมาตร 200 μ l/well
7. incubate ใน 5% CO₂ incubator, temp 37°C ประมาณ 15 นาที หรือจนกว่าจะมองเห็นน้ำเงินละลายจนหมด
8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 nm.

ผลงานวิจัย และการอภิปรายผลงานวิจัย

การศึกษานี้ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบ และสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่คูมาริน โดยมีจุดมุ่งหมายให้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) และ butyrylcholinesterase (BuChE) ผลการสังเคราะห์พบว่าผู้วิจัยได้สารสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่คูมารินจำนวน 29 สาร แบ่งออกเป็น 2a-k, 3a-c, 4a-c, 5a-c, 6a-c, 7a-c และ 8a-c ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 1

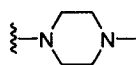
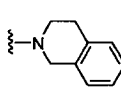
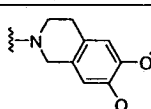
จากนั้นจึงนำสารสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่คูมารินมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยใช้เอนไซม์ที่แยกได้จากเลือด และพลาสมาของอาสาสมัครสุขภาพดี ผลการศึกษาพบว่าสารสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่คูมาริน สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ที่ความเข้มข้นระดับไมโครโมลาร์ ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ใหม่คูมารินในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE, BuChE และ selectivity ratios



No	RKNU	n	Amines	hAChE IC ₅₀ (μM)	hBuChE IC ₅₀ (μM)	Selectivity BuChE/AChE
2a	21	2		3.3	56.6	17.0
2b	22	3		6.0	> 100	N/A
2c	23	4		1.1	29.1	25.7
2d	24	5		1.3	37.0	29.1
2e	25	6		4.1	16.9	4.1
2f	26	7		0.3	15.8	56.4
2g	27	8		0.7	6.8	9.5
2h	28	9		4.1	13.5	3.3
2i	29	10		1.4	25.0	18.1
2j	30	11		14.7	29.5	2.0
2k	31	12		> 100	54.2	N/A

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ใหม่คูมารินในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE, BuChE และ selectivity ratios (ต่อ)

No	RKNU	n	Amines	hAChE	hBuChE	Selectivity	
				IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	BuChE/AChE	
3a	53	7		0.3	8.4	25.5	
3b	54	8		1.9	21.9	11.6	
3c	55	9		2.1	5.3	2.5	
4a	59	7		0.7	> 100	N/A	
4b	60	8		1.6	> 100	N/A	
4c	61	9		2.6	>100	N/A	
5a	50	7		20.9	79.7	3.8	
5b	51	8		4.9	28.6	5.8	
5c	52	9		16.7	> 100	N/A	
6a	56	7		6.7	> 100	N/A	
6b	57	8		5.0	> 100	N/A	
6c	58	9		6.2	> 100	N/A	
7a	47	7		23.8	9.1	0.4	
7b	48	8		7.9	5.5	0.7	
7c	49	9		33.7	69.4	2.1	
8a	44	7		61.0	43.4	0.7	
8b	45	8		21.8	38.6	1.8	
8c	46	9		47.5	39.1	0.8	
Neostigmine				0.8	35.1	43.8	
Galantamine ^a				0.4	18.6	46.5	

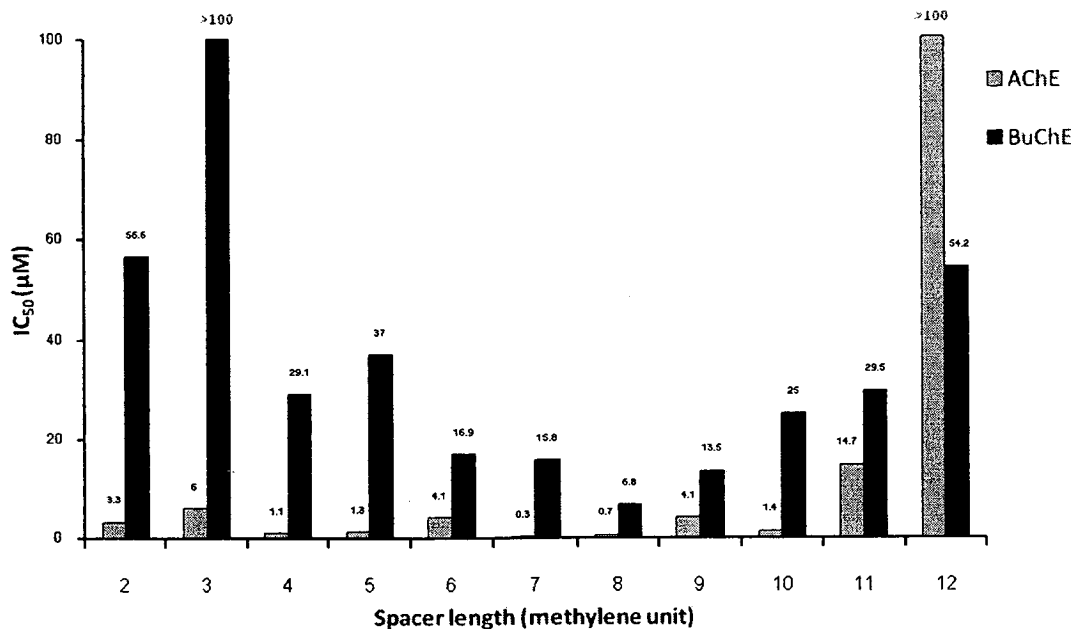
The half maximum inhibitory concentration (μM) of compounds against hAChE or hBuChE were measured using Ellman's method described previously.³⁵

^aIC₅₀ of galanthamine is taken from reference 36.

ผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างสารอนุพันธ์ใหม่คูมารินที่มี spacer length ระหว่างโครงสร้าง 7-hydroxycoumarin และ piperidine อยู่ในช่วง 2 ถึง 7 methylene units (2a-f) (ยกเว้นโครงสร้าง 2b) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้เพิ่มมากขึ้น แสดงดังรูปที่ 7 และพบว่าโครงสร้าง 2f เป็นโครงสร้างที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ได้สูงที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ = 0.3 μM และพบว่าหากเพิ่ม spacer length มากขึ้นกลับทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ได้ลดลง โดยผู้วิจัยพบว่า

สารที่มี methylene unit อยู่ในช่วง 8-12 units เช่น สาร 2g-k จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ได้น้อยกว่าสาร 2f

ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE พบว่าเป็นไปในทางเดียวกับฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และโครงสร้าง 2f ก็ยังคงเป็นโครงสร้างที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE ได้สูงที่สุด โดยมีค่า $IC_{50} = 15.8 \mu M$ และพบว่าหากเพิ่มความยาว spacer length จะทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE ได้เพิ่มมากขึ้นด้วย นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่าโครงสร้าง 2g มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE โดยมีค่า $IC_{50} = 6.8 \mu M$ ในขณะที่หากมีการเพิ่ม spacer length จะพบว่าสารมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE ได้ลดลง



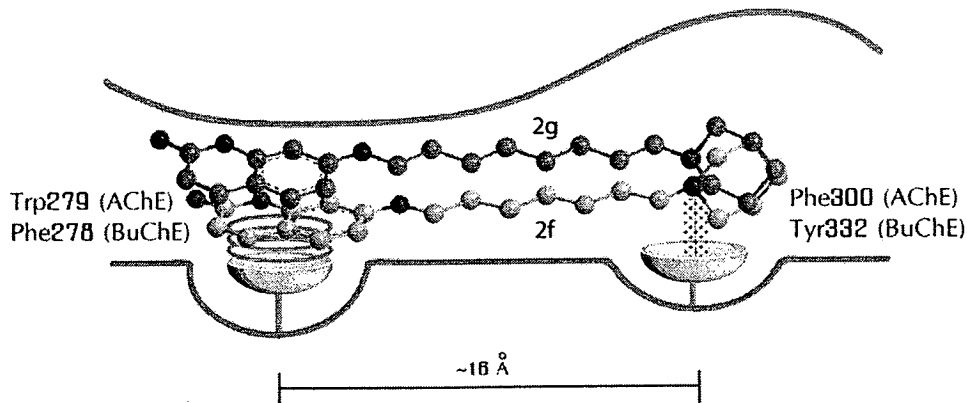
รูปที่ 7. ความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ piperidine ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้ร้อยละ 50 (IC_{50})

หมายเหตุ: โครงสร้างสารที่มี spacer length ระหว่าง 7-hydroxycoumarin และ piperidine อยู่ในช่วง 7-9 methylene unit สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้แรงมากขึ้น

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโครงสร้าง 2f และ 2g มีค่า IC_{50} ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้ต่ำที่สุด ซึ่งโครงสร้างทั้งสองมี spacer length อยู่ในช่วง 7 และ 8 methylene unit ตามลำดับ ผลการวัดระยะห่างโครงสร้าง 2f และ 2g ตั้งแต่ basic nitrogen ถึงโครงสร้างคูมารินโดยใช้ Chem3D software พบว่ามีระยะห่างประมาณ 16-18 Å ซึ่งพบว่าเป็นระยะห่างเท่ากับระยะห่างระหว่าง amino acid ของ peripheral anionic site (PAS) และ mid-Gorge site (MGS) ของเอนไซม์ AChE และ BuChE พอติ ผลการศึกษาดังกล่าวจึง

เป็นข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนสมมติฐานว่าโครงสร้างคูมารินและ amine nitrogen ของโครงสร้าง 2f และ 2g น่าจะสามารถทำปฏิกิริยากับ amino acid ที่บริเวณ PAS และ MGS ของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าโครงสร้างคูมารินของสาร 2f เกิด hydrophobic (π - π) interaction กับ amino acid Trp279 ของเอนไซม์ hAChE หรือ กับ amino acid Phe278 ของเอนไซม์ hBuChE และโครงสร้างคูมารินของสาร 2g เกิด cation- π interaction กับ amino acid Phe300 ของเอนไซม์ hAChE หรือกับ amino acid Tyr332 ของเอนไซม์ hBuChE แสดงดังรูปที่ 8



รูปที่ 8. รูปแสดงการเกิดปฏิกิริยาการจับของโครงสร้าง 2f และ 2g ที่ binding pockets ของเอนไซม์ AChE และ BuChE ตามลำดับ

หากพิจารณาในแง่ความจำเพาะ (selectivity) ต่อการจับกับเอนไซม์ AChE ของสารกลุ่มนี้ (2a-k) พบว่าสาร 2h และ 2j มีฤทธิ์เป็น non-selective มากที่สุด เนื่องจากผลการศึกษาพบว่าสารทั้งสองมีค่า IC_{50} สำหรับเอนไซม์ AChE เป็น 4.1 μ M และ 14.7 μ M และ IC_{50} สำหรับเอนไซม์ BuChE เป็น 13.5 μ M และ 29.5 μ M ตามลำดับ ดังนั้นสารทั้งสองจึงมีความจำเพาะต่อการจับกับเอนไซม์ AChE มากกว่าการจับกับเอนไซม์ BuChE เพียง 2-3 เท่า เท่านั้น โดยที่สาร 2h มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้มากกว่าสาร 2j (รายละเอียดผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 1)

เนื่องจากการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกสาร 2f, 2g และ 2h ที่มี spacer length ระหว่างโครงสร้างคูมารินและ amine ที่ 7, 8, และ 9 methylene unit เป็นสารต้นแบบ โดยสาร 2f และ 2g ถูกเลือกเป็นสารต้นแบบเนื่องจากสารทั้งสองมีฤทธิ์สูงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ในขณะที่ผู้วิจัยเลือกสาร 2h เนื่องจากสารดังกล่าวออกฤทธิ์แบบ non selective จากนั้นผู้วิจัยจึงทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์คูมารินขึ้นใหม่ โดยแทนที่โครงสร้างส่วน piperidine ring ของสาร 2f-h ด้วยหมู่ amine ต่างๆ เช่น pyrrolidine (3a-c), diethylamine (4a-c), morpholine (5a-c), N-methylpiperazine (6a-c), 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (7a-c), และ 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (8a-c) ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการศึกษาพบว่าสารอนุพันธ์ pyrrolidine เช่น สาร 3a-c มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้เทียบเท่ากับสารอนุพันธ์ piperidine (2f-h) สาร 3a ที่มี spacer length 7 methylene unit พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุด จากการทดสอบฤทธิ์พบว่าสาร 3a มีค่า IC_{50} ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE =

0.3 μM และพบว่าค่า IC_{50} ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE เท่ากับสาร 3c โดยมีค่า $\text{IC}_{50} = 8.4 \mu\text{M}$ สำหรับสาร 3a และ $\text{IC}_{50} = 5.3 \mu\text{M}$ สำหรับสาร 3c แต่พบว่าสารนี้ออกฤทธิ์แบบ non selective โดยมีความจำเพาะต่อการยับยั้ง เอนไซม์ AChE ได้มากกว่าเอนไซม์ BuChE ประมาณ 2 เท่า

ผลการแทนที่โครงสร้างส่วน piperidine ของสาร 2f-h ด้วยโครงสร้าง diethylamine ทำให้ได้สาร 4a-c ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE พบว่ามีฤทธิ์แรงในการยับยั้งเอนไซม์ โดยมีค่า $\text{IC}_{50} = 0.7 \mu\text{M}$, $1.6 \mu\text{M}$, และ $2.6 \mu\text{M}$ ตามลำดับ แต่กลับพบว่าสาร 4a-c ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE โดยมีค่า $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าบางครั้งการแทนที่ด้วยโครงสร้างที่พอดี และสามารถจับกับ binding pocket site ของเอนไซม์ได้ ก็อาจไม่ให้ออกฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้เสมอไป ผลการศึกษาดังกล่าวจึงเป็นข้อมูลสำคัญที่ยืนยันได้ว่า binding pocket ที่ MGS ของเอนไซม์ BuChE แคบกว่าของเอนไซม์ AChE มาก แสดงดังรูปที่ 5

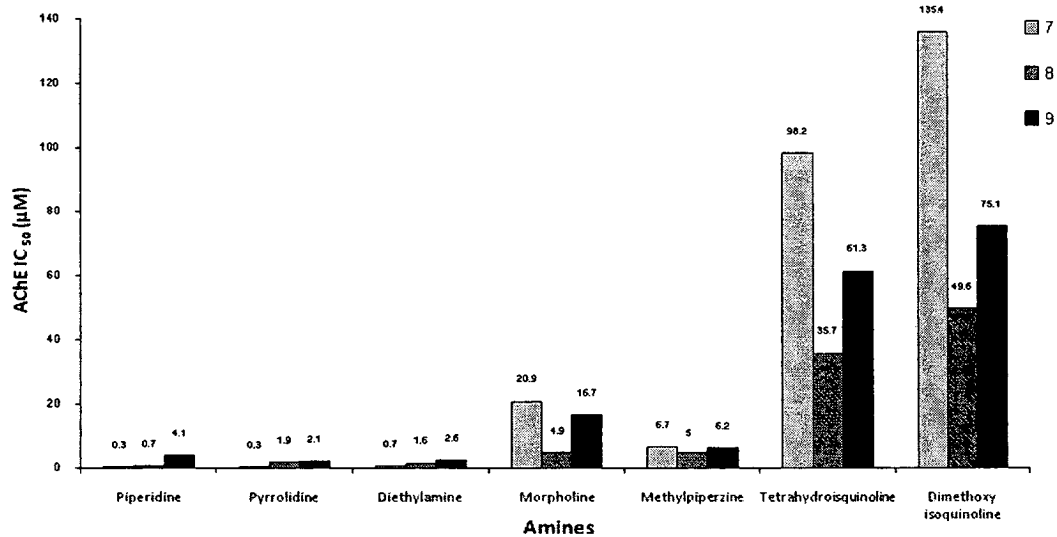
ผลการแทนที่โครงสร้าง piperidine ring ของสาร 2f-h ด้วยโครงสร้าง morpholine และ N-methylpiperazine ทำให้ได้สาร 5a-c และ 6a-c ตามลำดับ ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับสาร piperidine analogs ตัวอื่น และสำหรับสารในกลุ่มนี้ที่แสดงฤทธิ์สูงสุดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE คือ สาร 5b ผลการศึกษาพบว่าสารนี้มีค่า IC_{50} ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE คือ $4.9 \mu\text{M}$ และ $28.6 \mu\text{M}$ ตามลำดับ ผลการศึกษาลงในตารางที่ 1

ผู้วิจัยพบว่าการลด และเพิ่ม spacer length พบในสาร 5a และ 5c ทำให้สารมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้ลดลง และเมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ระหว่างสารอนุพันธ์ piperidine 2f-h และอนุพันธ์ N-methylpiperazine 6a-c พบว่า มีค่า IC_{50} ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE คือ $6.7 \mu\text{M}$, $5.0 \mu\text{M}$ และ $6.2 \mu\text{M}$ ตามลำดับ ในขณะที่พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE โดยมีค่า $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเติมหมู่ basic nitrogen และ methyl group of N-methylpiperazine จะลดฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานโดยเฉพาะเอนไซม์ BuChE ผ่าน steric และ/หรือ electrostatic effects แต่อย่างไรก็ตามสาร 6a-c ยังคงสามารถนำไปใช้เพื่อพัฒนาต่อให้มีความจำเพาะต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ได้

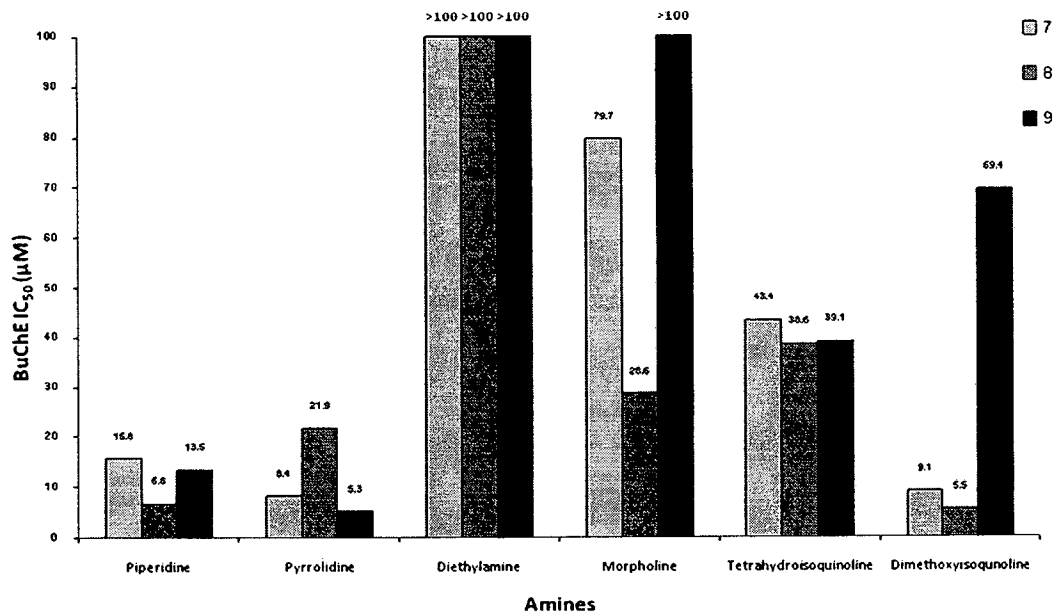
เพื่อให้ได้สารที่มีโครงสร้างเหมาะสมมากยิ่งขึ้นในการจับกับ MGS binding pocket site ของเอนไซม์ AChE และ BuChE ผู้วิจัยจึงศึกษาโดยการแทนที่โครงสร้าง piperidine ring ของสาร 2f-h ด้วยหมู่ amine ที่มี molecular volume ใหญ่ขึ้น ซึ่งประกอบไปด้วย tetrahydroisoquinoline (7a-c) และ dimethoxy tetrahydroisoquinoline (8a-c) ผลการศึกษาพบว่าสาร 7a-c ยังคงแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ piperidine 2f-h พบว่าสาร 7a-b มีฤทธิ์ค่อนข้างต่ำในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE แต่กลับมีฤทธิ์สูงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า binding pocket ที่ MGS ของเอนไซม์ AChE น่าจะมีขนาดเล็กกว่าของเอนไซม์ BuChE และการเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของสาร 7a และ 7b อาจเป็นผลจากการเพิ่ม π - π interaction ระหว่างโครงสร้าง benzene ring ของ tetrahydroisoquinoline และ aromatic amino acid ที่อยู่ใกล้กัน และเป็นที่น่าสนใจว่าสาร 7b ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบ non selective โดยมีค่า IC_{50} ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE คือ $7.9 \mu\text{M}$ และ $5.5 \mu\text{M}$ ตามลำดับ ในขณะที่พบว่าสาร 7a มีความจำเพาะต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} ของการยับยั้งการทำงานของ

โคลีนเอสเตอเรสสายพันธุ์มนุษย์ของสารอนุพันธ์คูมาริน

เอนไซม์ AChE และ BuChE คือ 23.8 μM และ 9.1 μM ตามลำดับ ผลการศึกษาโดยละเอียดแสดงดังตารางที่ 3-1 ซึ่งการเพิ่มขึ้นของความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE ของสาร 7a และ 7b และการลดลงของความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE ของสาร 4a-c เป็นข้อมูลที่สามารถยืนยันได้ว่า binding pocket ที่ MGS มีลักษณะแคบ และลึก (deep-narrow shape) แสดงดังรูปที่ 3-7 อย่างไรก็ตามผลจากการเพิ่ม molecular volume แสดงให้เห็นในสาร 8a-c ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้น้อยกว่าสาร 7a-c ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 9 และ 10



รูป 9. กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสาร 2f-h, 3a-c, 4a-c, 5a-c, 6a-c, 7a-c และ 8a-c สำหรับเอนไซม์ AChE



รูปที่ 10. กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสาร 2f-h, 3a-c, 4a-c, 5a-c, 6a-c, 7a-c และ 8a-c สำหรับเอนไซม์ BuChE

การศึกษานี้มีสมมติฐาน คือ โครงสร้างคูมารินน่าจะสามารถจับกับ PAS ของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้ ดังนั้นการป้องกันไม่ให้โครงสร้างคูมารินเข้าไปในเอนไซม์จึงสามารถทำได้โดยการเพิ่ม molecular volume ของโครงสร้างคูมาริน นอกจากนี้ในการศึกษาดังกล่าวมีการรายงานว่าสารคูมารินสามารถถูก metabolite และเกิดเป็น toxic metabolite คือ 3,4-coumarin epoxide ผ่าน epoxidation pathway ดังนั้นผู้วิจัยจึงออกแบบ และสังเคราะห์โครงสร้าง 3-substituted-7-hydroxycoumarins (9-11) ขึ้น จากนั้นผู้วิจัยจึงนำสารคูมารินส์ที่มีโครงสร้างเป็น 7-hydroxycoumarin และ 3-substituted derivatives มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ที่ความเข้มข้นของสารทดสอบ 1 mM ดังแสดงในตารางที่ 3

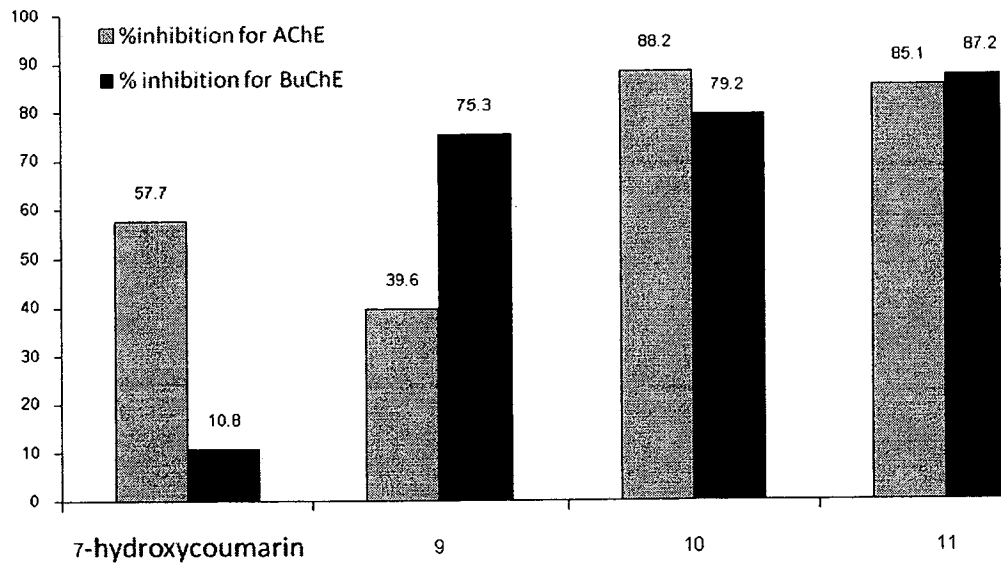
ตารางที่ 3 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสาร 7-hydroxycoumarin และ 3-substituted-7-hydroxycoumarins ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE

No	RKNU	Structure	% Inhibition for hAChE	% Inhibition for hBuChE
9	34		39.6	75.3
10	35		88.2	79.2
11	38		85.1	87.2
7-hydroxycoumarin			57.7	10.8

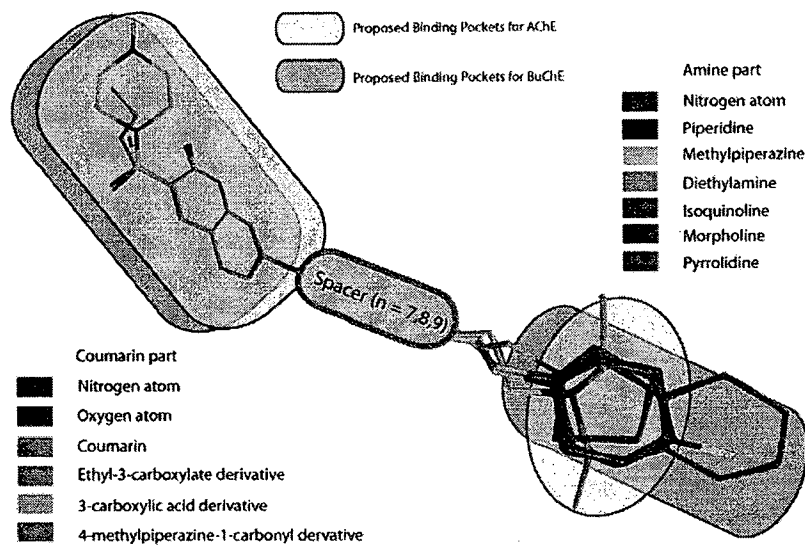
% inhibition of the compounds were measured at concentration of 1 mM using Ellman's method.

ผลการศึกษาพบว่าสาร 7-hydroxycoumarin ที่ความเข้มข้น 1mM มี % inhibition ต่อเอนไซม์ AChE และ BuChE เป็น 57.7 และ 10.8 ตามลำดับ ในขณะที่หากเป็นโครงสร้าง 3-substituted-7-hydroxycoumarin derivatives ยกเว้น 3-carboxylic derivative (9) จะมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE มากกว่า 7-hydroxycoumarin และ 3-carboxylic derivative (9) มีฤทธิ์น้อยในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE โดยมี % inhibition ที่ความเข้มข้น 1 mM เป็น 39.6 และมีฤทธิ์มากขึ้นต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE โดยมี % inhibition ที่ความเข้มข้น 1 mM เป็น 75.3 ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าผลของ acid functionality อาจลดการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสาร 3-carboxylic derivative (9) และ amino acid ที่ PAS binding pocket side ของเอนไซม์ AChE และพบว่าการมี carboxylic group ในโครงสร้างจะช่วยเพิ่มความสามารถในการจับที่ binding pocket site ได้ดีขึ้น อันเป็นผลสืบเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของ molecular volume ผลการศึกษาที่พบข้างต้นตรงกับสิ่งที่พบในการศึกษาอนุพันธ์สาร ethyl ester (10) และ amide (11) โดยสาร 10 และ 11 แสดง % inhibition ต่อเอนไซม์ AChE ที่ความเข้มข้นของสาร 1 mM เป็น 88.2 และ 85.1 ตามลำดับ

ดังนั้นผลการศึกษาข้างต้นจึงเป็นข้อสนับสนุนว่าขนาดของ molecular volume มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาที่ PAS binding site ของทั้งเอนไซม์ AChE และ BuChE และผลดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยศึกษาผลของการแทนที่โครงสร้าง 7-hydroxycoumarin core structure ด้วยสารกลุ่ม ethyl 7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate(10) และ 7-hydroxy-3-(4-methylpiperazine-1-carbonyl)-2H-chromen-2-one (11) ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 11 และ 12

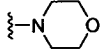
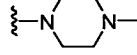
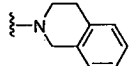
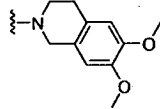


รูปที่ 11 กราฟแสดง %inhibition ของสาร 7-hydroxy coumarin และ 3-substitued derivative ที่ความเข้มข้น 1 mM สำหรับเอนไซม์ AChE และ BuChE



รูปที่ 12 การจับของสารอนุพันธ์ใหม่คูมารินกับ binding pockets site ของเอนไซม์ AChE และ BuChE.

ตารางที่ 4 การทดสอบผลของสารอนุพันธ์ coumarin ต่อ cell viability ในเซลล์ประสาทเพาเจเลีย (neuroblastoma cell)

No	RKNU	n	Amines	IC ₅₀ (M)
3a	53	7		0.03
3b	54	8		0.06
3c	55	9		0.035
4a	59	7		0.018
4b	60	8		0.067
4c	61	9		0.003
5a	50	7		0.078
5b	51	8		0.89
5c	52	9		0.004
6a	56	7		0.013
6b	57	8		0.003
6c	58	9		0.025
7a	47	7		0.004
7b	48	8		0.021
7c	49	9		0.067
8a	44	7		0.005
8b	45	8		0.004
8c	46	9		0.054

จากการศึกษาผลของสารอนุพันธ์ coumarin ต่อ cell viability ในเซลล์ประสาทเพาเจเลีย (neuroblastoma cell) พบว่าค่า IC₅₀ ที่ได้อยู่ในช่วงที่สูงแสดงถึงความปลอดภัยของสารอนุพันธ์คูมาริน เพราะช่วงของการยับยั้ง AChE และ BuChE อยู่ต่ำกว่า IC₅₀ ของ neuroblastoma cell viability มากกว่าพันเท่า