

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคอ้วนจัดเป็นปัญหาหลักทางสาธารณสุขที่พบมากขึ้นในยุคปัจจุบัน คนไทยมีปัญหากเกี่ยวกับโรคอ้วนเนื่องจากพฤติกรรมการบริโภคที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะการนิยมนบริโภคอาหารประเภทที่มีแป้ง น้ำตาล และไขมันสูง ทำให้มีน้ำหนักตัวและไขมันสะสมในร่างกายเพิ่มขึ้น การมีน้ำหนักตัวมากเกินไป ส่งผลโดยตรงต่อบุคลิกภายนอกและก่อให้เกิดโรคร้ายต่างๆ ตามมา ภาวะแทรกซ้อนของโรคอ้วนที่พบได้บ่อย ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด โรคเกี่ยวกับถุงน้ำดี โรคกระเพาะอาหาร โรคกระดูกเสื่อม โรคเกี่ยวกับตับ เป็นต้น ขาดความอ้วนที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ ยาออร์ลิสแตต (orlistat) ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ทำให้ไขมันถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายน้อยลง ร่างกายจึงนำไขมันที่เก็บสะสมไว้ออกมาใช้ ส่งผลให้ความอ้วนลดลงได้ แต่ยาออร์ลิสแตตนี้ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ ปัจจุบันชาชนิคมมีการควบคุมการใช้เฉพาะในสถานพยาบาลเท่านั้น และยังคงติดตามผลการใช้ยาอยู่ จากรายงานการวิจัยการยับยั้งไลเปสของผลมะอึก พบสารคาร์เพสเตอร์อลในผลมะอึกมีฤทธิ์ยับยั้งไลเปส ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 56.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานยาออร์ลิสแตต ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0035 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม งานวิจัยนี้มีแนวความคิดที่จะศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไลเปสของอนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอร์อล โดยการเปลี่ยนหมู่ทำหน้าที่ในสารคาร์เพสเตอร์อลและทดสอบความสามารถในการยับยั้งไลเปสของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ เพื่อเปรียบเทียบว่าสามารถยับยั้งไลเปสได้มากกว่าหรือน้อยกว่าสารคาร์เพสเตอร์อล ซึ่งจะช่วยให้ทราบความสัมพันธ์ของหมู่ทำหน้าที่ต่อผลการยับยั้งไลเปสได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) สังเคราะห์อนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอร์อล
- 2) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเปสของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

สังเคราะห์อนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอร์อลโดยเปลี่ยนหมู่ทำหน้าที่ และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเปสของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมา

ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โรคอ้วนเป็นโรคที่เกิดจากการเสียสมดุลของพลังงานของร่างกาย ผู้ป่วยโรคอ้วนมีลักษณะสำคัญคือ มีไขมันทั่วร่างกายมากกว่าปกติ สาเหตุของโรคอ้วน ได้แก่ กรรมพันธุ์ โรคของต่อมไร้ท่อ การรับประทานอาหารที่มีแป้งและไขมันมาก การขาดการออกกำลังกาย และการใช้ยาบางชนิดติดต่อกันเป็นเวลานาน โรคอ้วนเป็นสาเหตุของปัญหามากมาย และบางครั้งอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ โรคแทรกซ้อน

ของความอ้วนที่พบบ่อย ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด โรคเกี่ยวกับถุงน้ำดี โรคกระเพาะอาหาร โรคกระดูกเสื่อม โรคเกี่ยวกับตับ เป็นต้น องค์การอนามัยโลกกำหนดมาตรฐานที่เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าบุคคลอยู่ในภาวะอ้วนหรือไม่ โดยใช้ค่าดัชนีมวลกาย (Body mass index, BMI) ซึ่งคำนวณจากน้ำหนักตัวและส่วนสูง ค่าดัชนีมวลกายในระดับต่างๆ แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรัง ดังตารางที่ 1

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

* หมายเหตุ การคำนวณวิธีนี้ไม่ใช้กับเด็กที่กำลังเจริญเติบโต สตรีมีครรภ์ และนักกีฬา

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ของค่าดัชนีมวลกายและความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรัง

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

จากตารางข้างต้นจะพบว่าผู้ที่มีน้ำหนักตัวเกิน (ค่า BMI มากกว่า 25) และผู้ที่เป็นโรคอ้วน (ค่า BMI มากกว่า 30) จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรังอย่างมาก หรือกล่าวได้ว่า การมีน้ำหนักตัวเกินหรืออ้วนมีผลต่อระบบการทำงานในร่างกาย ก่อให้เกิดโรคหลายชนิด อัตราการเสียชีวิตของคนที่มีอ้วนมากมีสูงถึง 2-12 เท่า ขึ้นอยู่กับอายุของแต่ละบุคคล

วิธีการรักษาโรคอ้วนที่ดีต้องมีการผสมผสานการรักษาหลายวิธีร่วมกัน คือ การควบคุมอาหาร การออกกำลังกาย การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมที่ไม่เหมาะสม ส่วนการรักษาโดยใช้ยานั้นต้องใช้ในกรณีจำเป็นต่อการรักษาโรคอ้วนจริงๆ ซึ่งควรปรึกษาแพทย์และเภสัชกรก่อนจะเข้ารับการรักษาโรคอ้วน เพราะยาอาจมีผลข้างเคียง โดยเฉพาะต่อผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจ โรคตับ และโรคไต

ยาลดความอ้วน

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

ก. กลุ่มที่ออกฤทธิ์ผ่าน catecholamine pathways ได้แก่ amphetamine, phenmetrazine, amfepramone, phentermine, mazindol, cathine และ phenylpropanolamine ซึ่งยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทซิมพาเทติก

ข. กลุ่มที่ออกฤทธิ์ผ่าน serotonin pathways ได้แก่ fenfluramine และ dexfenfluramine ซึ่งยาในกลุ่มนี้ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทซิมพาเทติก

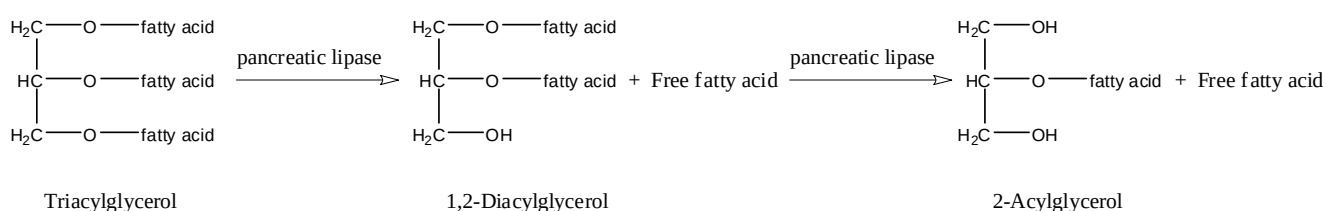
สำหรับยาที่ออกฤทธิ์ที่ทางเดินอาหาร แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

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

ข. สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส (pancreatic lipase inhibitors) เช่น orlistat ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยไขมันให้อยู่ในรูปที่ร่างกายนำไปใช้ได้

ไลเปส

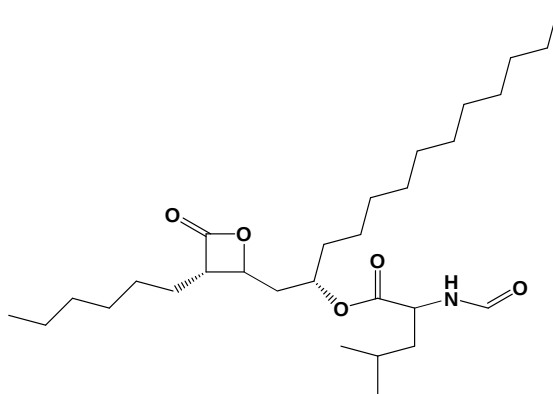
ไลเปส (acylglycerol acylhydrolase, EC3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายของน้ำมันและไขมันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล นอกจากนี้ไลเปสยังเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับในระบบที่มีน้ำน้อยหรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย เอนไซม์นี้สกัดได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (เชอร์รา ยีสต์ และแบคทีเรีย) เอนไซม์ชนิดนี้ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง น้ำยาซักล้าง เชื้อเพลิงชีวภาพ อาหาร เครื่องสำอาง และยา ไลเปสมีหลายชนิด เช่น pancreatic lipase, lipoprotein lipase, hormone sensitive lipase เป็นต้น ในร่างกายมนุษย์มีเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากตับอ่อน ทำหน้าที่ย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอล โดยสลายพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมกรดไขมันกับกลีเซอรอลตรงตำแหน่งที่ 3 และตำแหน่งที่ 1 ตามลำดับ ได้กรดไขมันอิสระ (free fatty acids) 1,2-diacylglycerols และ 2-acylglycerols ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยกรดไขมันอิสระมักอยู่ในรูปของเกลียวโซเดียมหรือเกลียวโพแทสเซียม



รูปที่ 1 การย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลด้วยเอนไซม์แพนกรีเอติกไลเปส

การยับยั้งการทำงานของไลเปสจะมีผลทำให้ลดการดูดซึมไขมัน และเพิ่มการขับถ่ายของไตรกลีเซอไรด์ในอุจจาระ ทำให้ไขมันในอาหารที่รับประทานเข้าไปไม่ถูกย่อยและไม่สามารถดูดซึมไปใช้ได้ จึงเป็นเหตุให้ร่างกายไม่ได้รับพลังงานจากไขมันเหล่านี้ ออร์ลิสแตต (orlistat) เป็นยาตัวแรกของยาลดความอ้วนในกลุ่มยับยั้งไลเปส หรือเรียกว่า tetrahydrolipstatin มีชื่อทางการค้า คือ Xenical ผลิตโดยบริษัท Roche และมีสูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2 ซึ่งแยกได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces toxytricini* ในปี 1987 โดยปกติอัตราการใช้ออร์ลิสแตต คือ วันละ 3 ครั้ง ครั้งละ 120 มิลลิกรัม ก่อนอาหาร กลไกการทำงานของออร์ลิส

แต่คือทำให้ไขมันที่รับประทานเข้าไปประมาณ 1/3 ไม่ถูกดูดซึม และเพิ่มการขับถ่ายของไตรกลีเซอไรด์ ในอุจจาระ ทำให้ไขมันในอาหารที่รับประทานเข้าไปไม่ถูกย่อยและไม่สามารถดูดซึมไปใช้ได้ เป็นเหตุให้ร่างกายไม่ได้รับพลังงานจากไขมันเหล่านั้น ร่างกายต้องนำไขมันที่เก็บสะสมไว้ออกมาใช้ จึงทำให้น้ำหนักลดลง อาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ของการใช้ยาที่เด่นชัดเกี่ยวข้องกับการดูดซึมไขมันที่ผิดปกติ (fat malabsorption) ได้แก่ ไม่สามารถกลืนอุจจาระได้ (faecal urgency) อุจจาระไม่เกาะรวมกัน (loose) มีแก๊ส และไขมันขับออกมาด้วย นอกจากนี้ยังอาจมีผลทำให้การดูดซึมวิตามินที่ละลายในไขมันผิดปกติได้ (fat soluble vitamin malabsorption) ฉะนั้นเมื่อใช้นานจึงแนะนำให้รับประทานวิตามินรวมอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ก่อนหรือหลังรับประทานยา ปัจจุบันยาดังนี้ถูกควบคุมการใช้เฉพาะในสถานพยาบาลเท่านั้น



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

มะอึก

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

ผล : ละลายเสมหะแก้ไอ

ราก : แก้ดีซ่าน ดีกระตุก ขับพิษร้อนภายใน กัดฟอกเสมหะ กระทุ้งพิษไข้หัวทุกชนิด (อาการไข้ที่ออกตุ่มออกผื่น ตามผิวหนัง เช่น เหือด หิด หัด อีสุกอีใส)

ขน : ของผลมะอึกมาทอดกับไข่ให้เด็กรับประทานเพื่อขับพยาธิได้

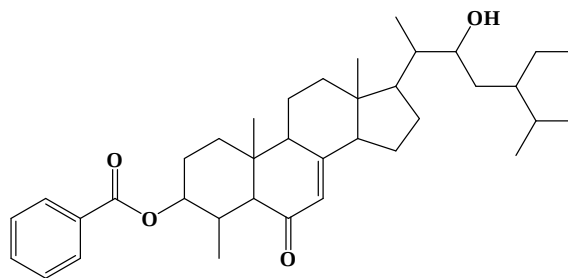
ดอก : ช่วยรักษาอาการคัน

เมล็ด - แก้วพวง (โดยเพาะสุคนธ์วันเข้าไป)



รูปที่ 3 ลักษณะของต้นและผลมะอึก

จากรายงานการวิจัยการยับยั้งไลเปสของผลมะอึก พบสารคาร์เพสเตอร์อลในผลมะอึกมีฤทธิ์ยับยั้งไลเปส ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 56.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานยาออร์ลิสแทตที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0035 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4 โครงสร้างของคาร์เพสเตอร์อล

กรอบแนวคิดของงานวิจัยนี้คือการศึกษากิจกรรมการยับยั้งไลเปสของอนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอร์อล โดยการเปลี่ยนหมู่ทำหน้าที่ในสารคาร์เพสเตอร์อลและทดสอบว่าอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่นี้มีความสามารถในการยับยั้งไลเปสได้มากหรือน้อยกว่าสารคาร์เพสเตอร์อล ซึ่งจะช่วยให้ทราบความสัมพันธ์ของหมู่ทำหน้าที่ต่อผลการยับยั้งไลเปสได้

วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป

- 1) สกัดและแยกสารคาร์เพสเตอร์อลจากผลมะอึกสำหรับนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุพันธ์
- 2) สังเคราะห์อนุพันธ์คาร์เพสเตอร์อล
- 3) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเปสของอนุพันธ์คาร์เพสเตอร์อล
- 4) วิเคราะห์ สรุปผล และเขียนรายงานการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

องค์ความรู้ที่จะได้จากงานวิจัยนี้จะช่วยให้ทราบความสัมพันธ์ของหมู่ทำหน้าที่ต่อฤทธิ์การยับยั้งไลเปส ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับงานวิจัยขั้นประยุกต์ต่อไปสำหรับการนำไปใช้พัฒนาขาลดความอ้วน

วิธีการดำเนินการวิจัย

สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย

สารเคมี

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

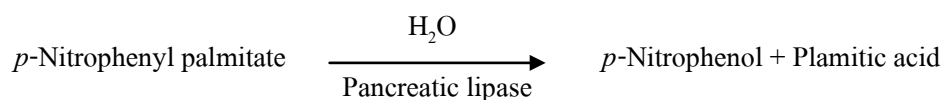
วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Silica gel 60 F₂₅₄ E. Merck)
2. เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (vacuum rotary evaporator)
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงยูวี (UV-Vis spectrometer)
4. Nuclear magnetic resonance spectrometer (400 MHz)
5. ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (tissue culture plate 96 well)
6. ออโตปิเปต (autopipette)
7. ตู้อบ (hot air oven)
8. magnetic stirrer
9. เครื่องชั่ง

วิธีการดำเนินการวิจัย

- 1) ล้างทำความสะอาดผลมะแว้ง ซับให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และบดแบบหยาบหลังอบแห้ง
- 2) สกัดผลมะแว้งด้วยเมธานอล กรองแยกกากด้วยกระดาษกรอง ระเหยตัวทำละลายออกจากสารละลายที่กรองได้
- 3) แยกสารสกัดหยาบเมธานอลโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวดูดซับคือซิลิกาเจล (no. 7734 E. Merck) ตัวทำละลายเคลื่อนที่คือสารละลายของเฮกเซน เอทิลเอซิเตต และเมธานอล
- 4) ล้างทำความสะอาดผลมะแว้งอีก ซับให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และบดแบบหยาบหลังอบแห้ง
- 5) สกัดผลมะแว้งอีกด้วยเอทิลเอซิเตต กรองแยกกากด้วยกระดาษกรอง ระเหยตัวทำละลายออกจากสารละลายที่กรองได้
- 6) แยกสารคาร์เพสเตอร์อลจากสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตตโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวดูดซับคือซิลิกาเจล (no. 7734 E. Merck) ตัวทำละลายเคลื่อนที่คือสารละลายของเฮกเซน เอทิลเอซิเตต และเมธานอล
- 7) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเปสของสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสารคาร์เพสเตอร์อลและผลิตขายโดยบริษัทผลิตสารเคมี คือสาร stigmasterol campesterol cholesterol และ β -sitosterol

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพาราไนโตรฟีนิลปาล์มิเตตแสดงดังสมการต่อไปนี้



รูปที่ 5 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพาราไนโตรฟีนิลปาล์มิเตตและแพนกรีเอติกไลเปส

โดยใช้สารละลายพาราไนโตรฟีนอลที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพาราไนโตรฟีนิลปาล์มิเตตเป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการทำงานของไลเปส

- 8) สังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร stigmasterol และ cholesterol
- 9) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเปสของอนุพันธ์ของสาร stigmasterol และ cholesterol ที่สังเคราะห์ได้
- 10) สังเคราะห์อนุพันธ์ของคาร์เพสเตอร์อล
- 11) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเปสของอนุพันธ์คาร์เพสเตอร์อล
- 12) วิเคราะห์ สรุปผล และเขียนรายงานการวิจัย

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารคาร์เพสเตอร์อลจากผลมะแว้ง

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

1.2) แยกสารสกัดหยาบเมธานอล 47.49 กรัม ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และใช้เฮกเซน เอทิลเอซิเตต และเมธานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้สารทั้งหมด 10 แฟรงก์ชัน สารแฟรงก์ชันที่ 4 ที่แยกได้ด้วยการชะของ 20% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซนมีสารที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกับสารคาร์เพสเตอร์อล จึงนำไปแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีจนได้สารบริสุทธิ์ นำสารนี้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี พบว่าสารนี้ไม่ใช่สารคาร์เพสเตอร์อล

1.3) สกัดสารสกัดหยาบเมธานอล 179.96 กรัม ด้วยเอทิลเอซิเตต 200 มิลลิลิตร (สกัดซ้ำ 3 ครั้ง) เนื่องจากสารคาร์เพสเตอร์อลละลายได้ดีในตัวทำละลายชนิดนี้ ได้สารสกัดเอทิลเอซิเตต 36.27 กรัม มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล

1.4) แยกสารสกัดเอทิลเอซิเตตด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และใช้เฮกเซน เอทิลเอซิเตต และเมธานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้สารทั้งหมด 11 แฟรงก์ชัน สารที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกับสารคาร์เพสเตอร์อลอยู่ในแฟรงก์ชันที่ 3 ซึ่งแยกได้จากการชะของ 20% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซน นำไปแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีจนได้สารบริสุทธิ์ แล้วนำสารนี้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี พบว่าสารนี้ไม่ใช่สารคาร์เพสเตอร์อล

2. ผลการสกัดสารคาร์เพสเตอร์อลจากผลมะอึก

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

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

2.3) แยกสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตต 55.47 กรัม ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เฮกเซน เอทิลเอซิเตต และเมธานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้สารทั้งหมด 4 แฟรงก์ชัน ดังแสดงผลในตารางที่ 2 ตรวจสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีพบว่าสารคาร์เพสเตอร์อลอยู่ในแฟรงก์ชันที่ 2 ซึ่งชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายผสม 50% เอทิลเอซิเตตในเฮกเซน น้ำหนัก 35.01 กรัม คิดเป็น 0.41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของผลมะอึกสด

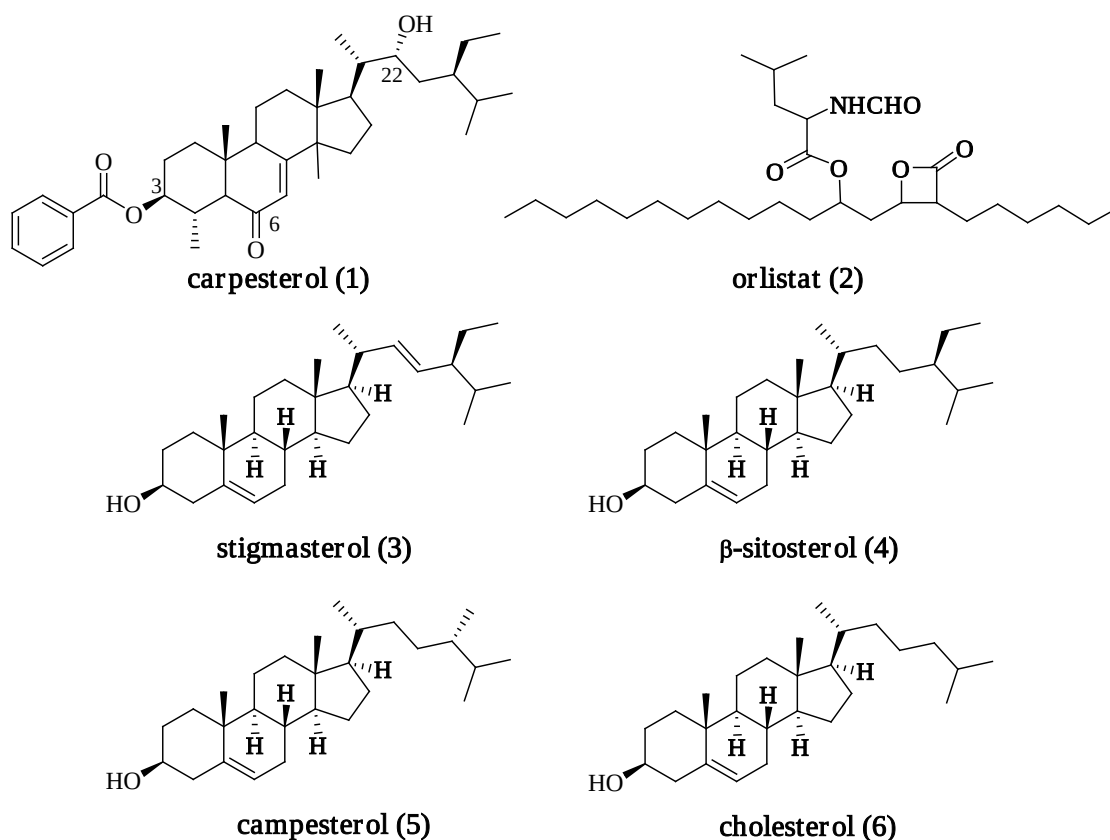
ตารางที่ 2 ลักษณะและปริมาณของสารสกัดเอทิลเอซิเตดที่แยกได้

ลำดับแฟรกชัน	เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้	ลักษณะสารที่ได้	น้ำหนัก (กรัม)
1	เฮกเซน	ของแข็งสีเหลือง	0.30
2	50% เอทิลเอซิเตดในเฮกเซน	ของเหลวชั้นสีน้ำตาล	35.01
3	เอทิลเอซิเตด	ของเหลวชั้นสีน้ำตาลเข้ม	7.72
4	20% เมทานอลในเอทิลเอซิเตด	ยางเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	7.92

2.4) แยกสารแฟรกชันที่ 2 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และใช้เฮกเซน เอทิลเอซิเตด และเมทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้สารทั้งหมด 13 แฟรกชัน ตรวจสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีพบว่าสารคาร์เพสเตอร์อลอยู่ในแฟรกชันที่ 4-7 แต่ยังไม่บริสุทธิ์ จึงนำแฟรกชันดังกล่าวมาแยกต่อไปอีกจนได้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเดิม สารคาร์เพสเตอร์อลบริสุทธิ์ที่ได้หนัก 5.25 กรัม คิดเป็น 9.5% ในปริมาณสารสกัดเอทิลเอซิเตด และคิดเป็น 0.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของผลมะอึกสด

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเปสของสารที่มีโครงสร้างคล้ายสารคาร์เพสเตอร์อล

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



รูปที่ 6 สูตรโครงสร้างของสารที่ทดสอบ

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเปสของสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml

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

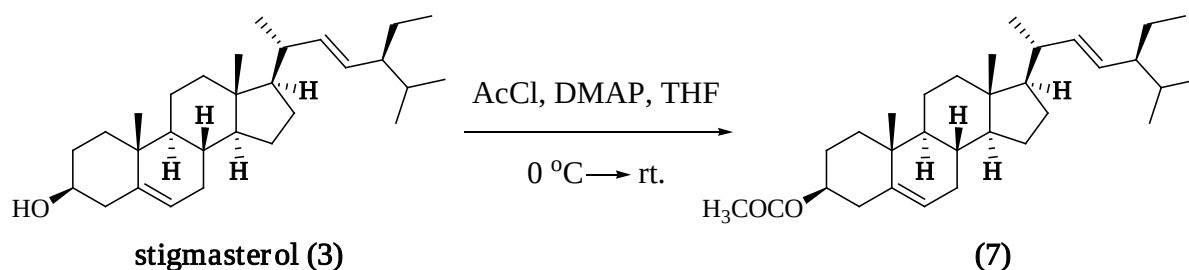
หมายเหตุ * ความเข้มข้น 1×10^{-5} mg/ml

** na หมายถึง no activity

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเปสในตารางที่ 3 สารทั้งสี่ชนิดที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบกับ stigmasterol, β-sitosterol, campesterol และ cholesterol มีฤทธิ์ยับยั้งไลเปสต่ำกว่าสารคาร์เพสเตอร์อล เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของสูตรโครงสร้างของสารทั้งหมด พบว่าสารทั้ง 4 ชนิดมีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C3 แต่ที่ตำแหน่งนี้ของสารคาร์เพสเตอร์อลมีหมู่ benzoyl ต่ออยู่ ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าหมู่ไฮดรอกซีและสภาพความมีขั้วต่ำกว่า จึงสันนิษฐานว่าหมู่แทนที่ benzoyl ของตำแหน่ง C3 มีอิทธิพลต่อฤทธิ์การยับยั้งไลเปสที่สูงขึ้น นอกจากนี้ที่ตำแหน่ง C6 หรือวง B ของโครงสร้างหลักของสารสเตียรอยด์ และ C22 ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างกัน อาจมีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งไลเปส ดังนั้นผู้วิจัยได้วางแผนที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของ stigmasterol และ cholesterol เนื่องจากสารทั้งสองชนิดมีราคาไม่สูงมากนักสามารถซื้อหาได้

4. ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร stigmasterol และ cholesterol

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

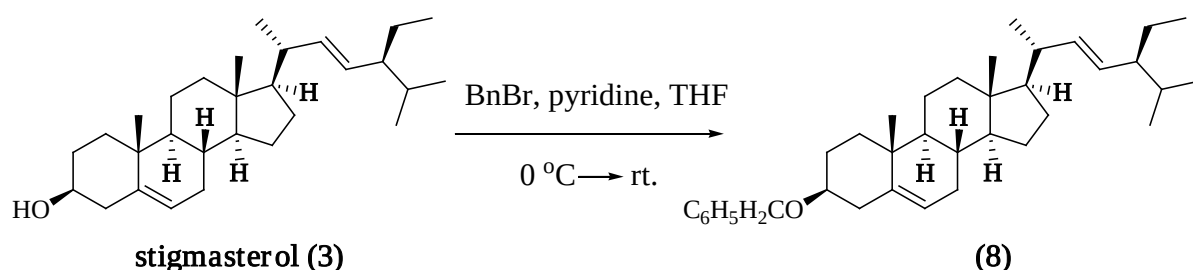


รูปที่ 7 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร stigmasterol (7)

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

เซลเซียสและปรับเป็นอุณหภูมิห้องหลังเริ่มปฏิกิริยา 20 นาที หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด แยกสารทั้งหมดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และชะด้วยสารละลายผสมของเฮกเซน เฮกเซน และเอทิลเอซิเตต ตามลำดับ ได้สาร 7 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 17.4 mg (0.0383 mmol, 29.4%)

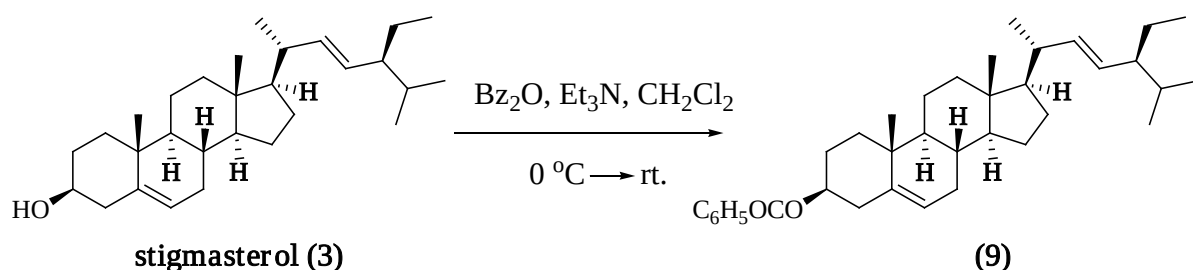
4.2 ผลการสังเคราะห์สาร (3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-3-(benzyloxy)-17-((2*R*,5*S*,*E*)-5-ethyl-6-methylhept-3-en-2-yl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthrene (8)



รูปที่ 8 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร stigmasterol (8)

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

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

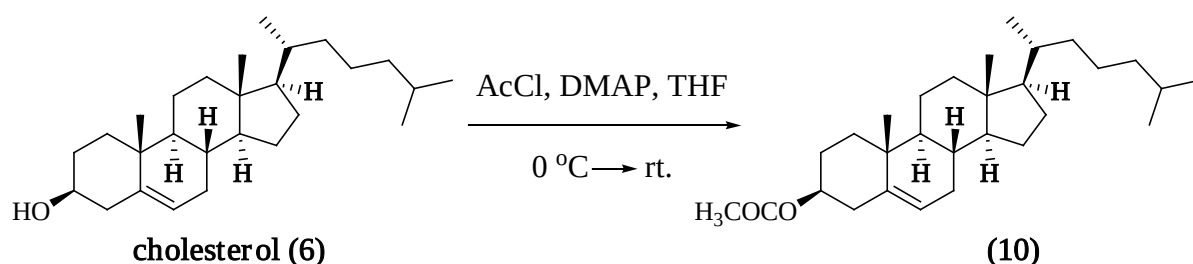


รูปที่ 9 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร stigmasterol (9)

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

และปรับเป็นอุณหภูมิห้องหลังเริ่มปฏิกิริยา 20 นาที หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด แยกสารทั้งหมดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และชะด้วยสารละลายผสมของเฮปแทน เฮกเซน และเอทิลเอซิเตต ตามลำดับ ได้สาร **9** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 52.5 mg (0.1017 mmol, 36.8%)

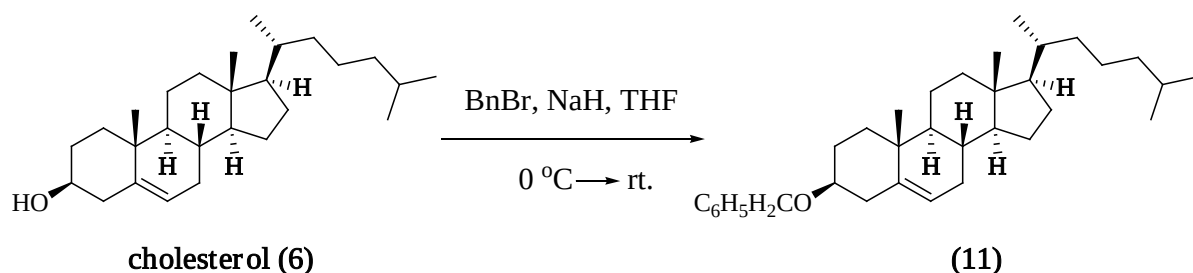
4.4 ผลการสังเคราะห์สาร (3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-10,13-dimethyl-17-((*R*)-6-methylheptan-2-yl)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-yl acetate (**10**)



รูปที่ 10 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร cholesterol (**10**)

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

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

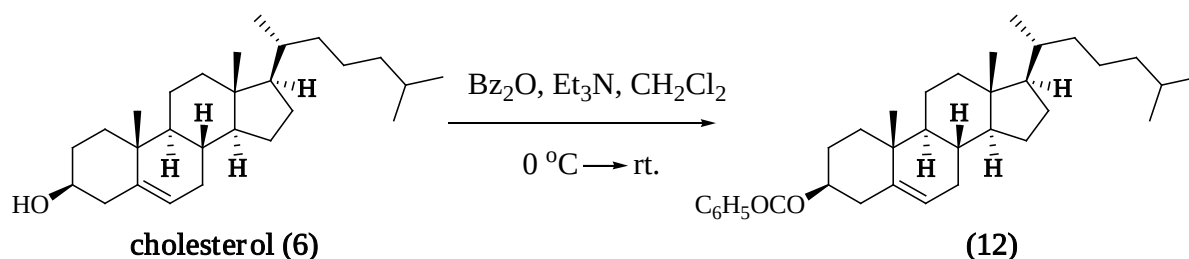


รูปที่ 11 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร cholesterol (**11**)

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

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

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



รูปที่ 12 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร cholesterol (**12**)

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

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

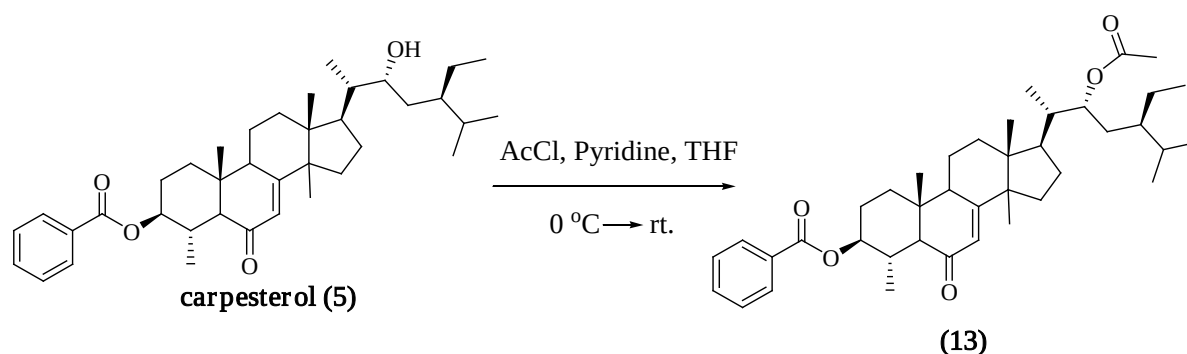
อนุพันธ์ทั้งสามตัวที่สังเคราะห์ขึ้นมาจากสาร stigmasterol คือสาร **7-9** แสดงผลการยับยั้งไลเปสที่ 14.43 ± 4.92 , 16.48 ± 5.54 และ $17.79 \pm 1.01\%$ ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่าสาร stigmasterol ที่มีค่าการยับยั้งที่ $5.63 \pm 0.19\%$ ส่วนอนุพันธ์ของสาร cholesterol ที่สังเคราะห์ขึ้นมาสามตัวคือสาร **10-12** ให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่าสาร cholesterol เช่นเดียวกัน อนุพันธ์ทั้งหกตัวแสดงฤทธิ์ยับยั้งไลเปสที่สูงกว่าสารตั้งต้นตัวเริ่มต้น ซึ่งแสดงว่าหมู่แทนที่ acetyl, benzyl และ benzoyl ในตำแหน่ง C3 มีผลทำให้สารออกฤทธิ์ยับยั้งไลเปสมากกว่าหมู่ไฮดรอกซีเดิม

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเปสของอนุพันธ์ของสาร stigmasterol และ cholesterol ที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml

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

6. ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร carpesterol

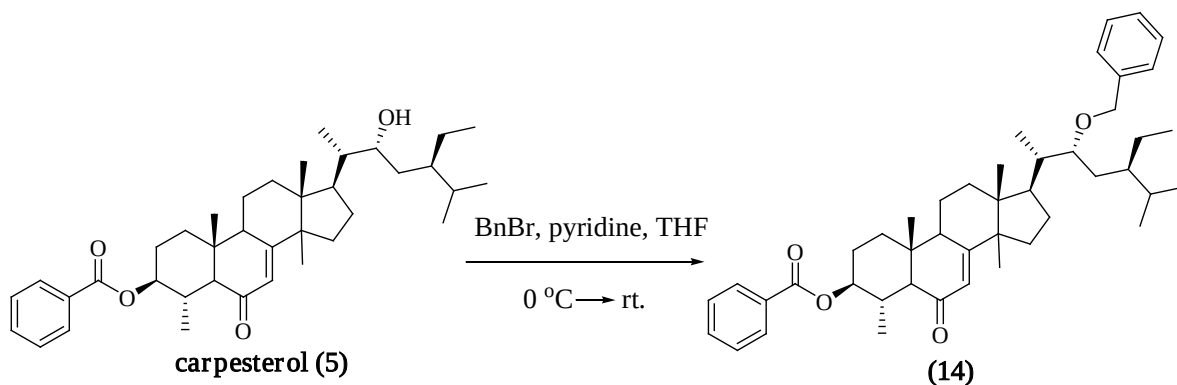
6.1 ผลการสังเคราะห์สาร (3*S*,4*S*,10*R*,13*R*,17*R*)-17-((2*S*,3*R*,5*R*)-3-acetoxy-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl)-4,10,13,14-tetramethyl-6-oxo-2,3,4,5,6,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-yl benzoate (**13**)



รูปที่ 13 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร carpesterol (**13**)

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

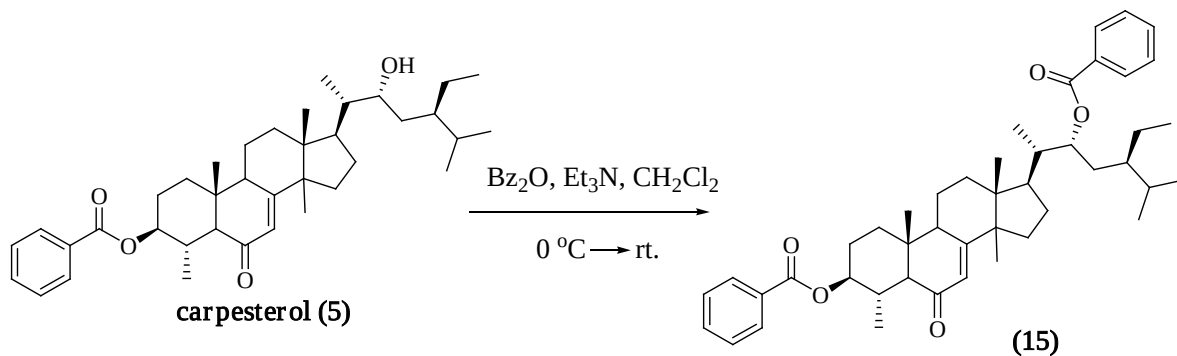
6.2 ผลการสังเคราะห์สาร (3*S*,4*S*,10*R*,13*R*,17*R*)-17-((2*S*,3*R*,5*R*)-3-acetoxy-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl)-4,10,13,14-tetramethyl-6-oxo-2,3,4,5,6,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-yl benzoate (**14**)



รูปที่ 14 ปฏิกริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร carpesterol (14)

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

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



รูปที่ 15 ปฏิกริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร carpesterol (15)

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

7. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเปสของอนุพันธ์ของสาร carpesterol (13-15)

อนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอร์อลทั้งสามสารที่สังเคราะห์ (13-15) แสดงค่าการยับยั้งไลเปสที่ $72.60 \pm 5.9\%$, $87.82 \pm 3.00\%$ และ $81.26 \pm 3.64\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ซึ่งมากกว่าค่ายับยั้งของสารคาร์เพสเตอร์อล ($62.3 \pm 6.2\%$) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเติมหมู่แทนที่เหล่านี้ลงในสาร stigmasterol และ cholesterol ที่ส่งผลให้อนุพันธ์ของสารทั้งสองมีค่าการยับยั้งที่มากกว่าสารตั้งต้นทั้งสองชนิด แสดงว่าหมู่แทนที่ acetyl, benzyl และ benzoyl ในตำแหน่ง C22 มีผลทำให้ฤทธิ์การยับยั้งสูงขึ้น เช่นเดียวกับในตำแหน่ง C3

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเปสของอนุพันธ์ของสาร carpesterol ที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml

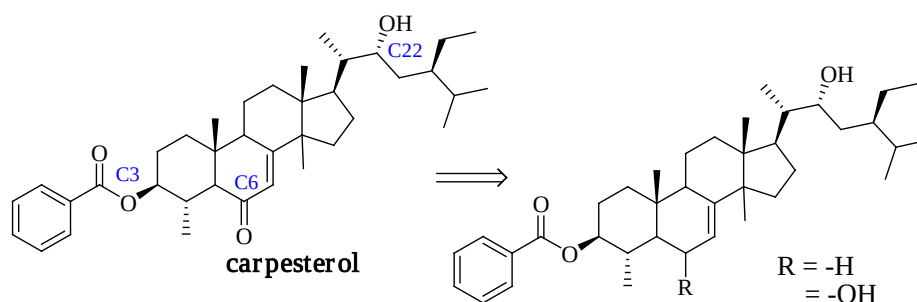
ชนิดสาร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเปส
สาร 13	72.60 ± 5.9
สาร 14	87.82 ± 3.00
สาร 15	81.26 ± 3.64

สรุปและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยในขั้นต่อไป

การแยกสารคาร์เพสเตอร์จากผลมะแว้งเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ในงานวิจัยนี้ ไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากสารเป้าหมายซึ่งมีค่า R_f ใกล้เคียงกับสารคาร์เพสเตอร์มีค่ามวลโมเลกุลจากการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโตรเมตรีไม่ตรงกับมวลโมเลกุลของสารคาร์เพสเตอร์ แหล่งของสารตั้งต้นจึงกลับมาใช้ผลมะอีก สามารถสกัดและแยกสารที่ต้องการจากผลมะอีกและได้สารคาร์เพสเตอร์ 5.25 กรัม (0.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของผลมะอีกสด) อนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอร์ที่สังเคราะห์ในงานวิจัยนี้มี 3 สาร (13-15) โดยหมู่ฟังก์ชันที่เปลี่ยนไปในโครงสร้างคือ หมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C22 ถูกเปลี่ยนไปเป็น หมู่ acetyl (13) หมู่ benzyl (14) และหมู่ benzoyl (15) อนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาแสดงฤทธิ์ยับยั้งไลเปสด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเปส เท่ากับ $72.60 \pm 5.9\%$, $87.82 \pm 3.00\%$ และ $81.26 \pm 3.64\%$ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml ซึ่งมากกว่าสารคาร์เพสเตอร์ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไลเปสด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเปส เท่ากับ $62.3 \pm 6.2\%$ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน

นอกจากนี้จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเปสของสารที่มีโครงสร้างหลักคล้ายคาร์เพสเตอร์ คือ สาร สเตียรอยด์ 4 ชนิด ได้แก่ stigmasterol, β -sitosterol, campesterol และ cholesterol พบว่าสารทั้งสี่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเปสน้อยกว่าสารคาร์เพสเตอร์ เมื่อเปรียบเทียบจากสูตรโครงสร้างของสาร หมู่ฟังก์ชันที่มีในโมเลกุลเหล่านี้มีความแตกต่างกัน 3 จุดคือ ที่ตำแหน่ง C3 C6 และ C22 (รูปที่ 6) และเมื่อสังเคราะห์อนุพันธ์โดยเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง C3 จากหมู่ไฮดรอกซีเป็นหมู่ acetyl หมู่ benzyl และหมู่ benzoyl อนุพันธ์ทั้งหมดของทั้งสาร stigmasterol และ cholesterol มีฤทธิ์ยับยั้งไลเปสมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าหมู่แทนที่ทั้งสามชนิดนี้มีอิทธิพลต่อฤทธิ์ยับยั้งไลเปส อาจเนื่องมาจากสภาพขั้วของโมเลกุลที่ลดลงของอนุพันธ์ สภาพขั้วของสารอาจใกล้เคียงกับสภาพขั้วบริเวณกัมมันต์ของเอนไซม์ไลเปสจึงทำให้สามารถเกิดพันธะกันได้เหมาะสม แต่ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเปสจากการทดลองนี้ไม่อาจสรุปได้ว่าหมู่ฟังก์ชันใดมีอิทธิพลมากกว่ากัน

การแปรเปลี่ยนของหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง C3 และ C22 จากหมู่ไฮดรอกซีเป็นหมู่ acetyl หมู่ benzyl และหมู่ benzoyl ทำให้ฤทธิ์การยับยั้งไลเปสเพิ่มขึ้นทั้งอนุพันธ์ของสารคาร์เพสเตอร์ stigmasterol และ cholesterol ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจถึงการแปรเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง C6 จากคาร์บอนิลเป็นหมู่ฟังก์ชันอื่นที่ทำให้โมเลกุลของคาร์เพสเตอร์มีสภาพขั้วลดลง จะมีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งไลเปสอย่างไร (รูปที่ 16)

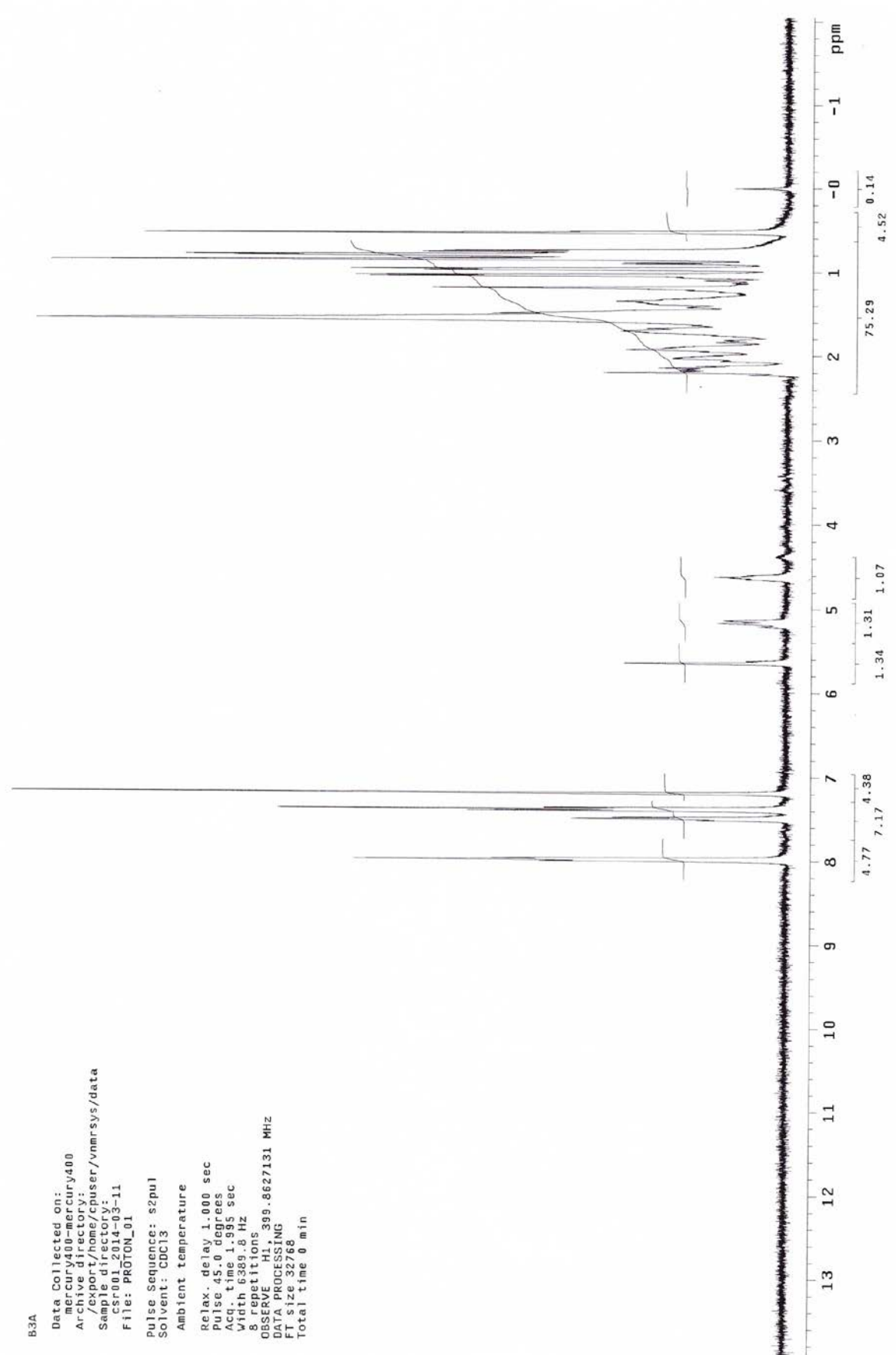


รูปที่ 16 อนุพันธ์ของสาร carpesterol ที่ตำแหน่ง C6

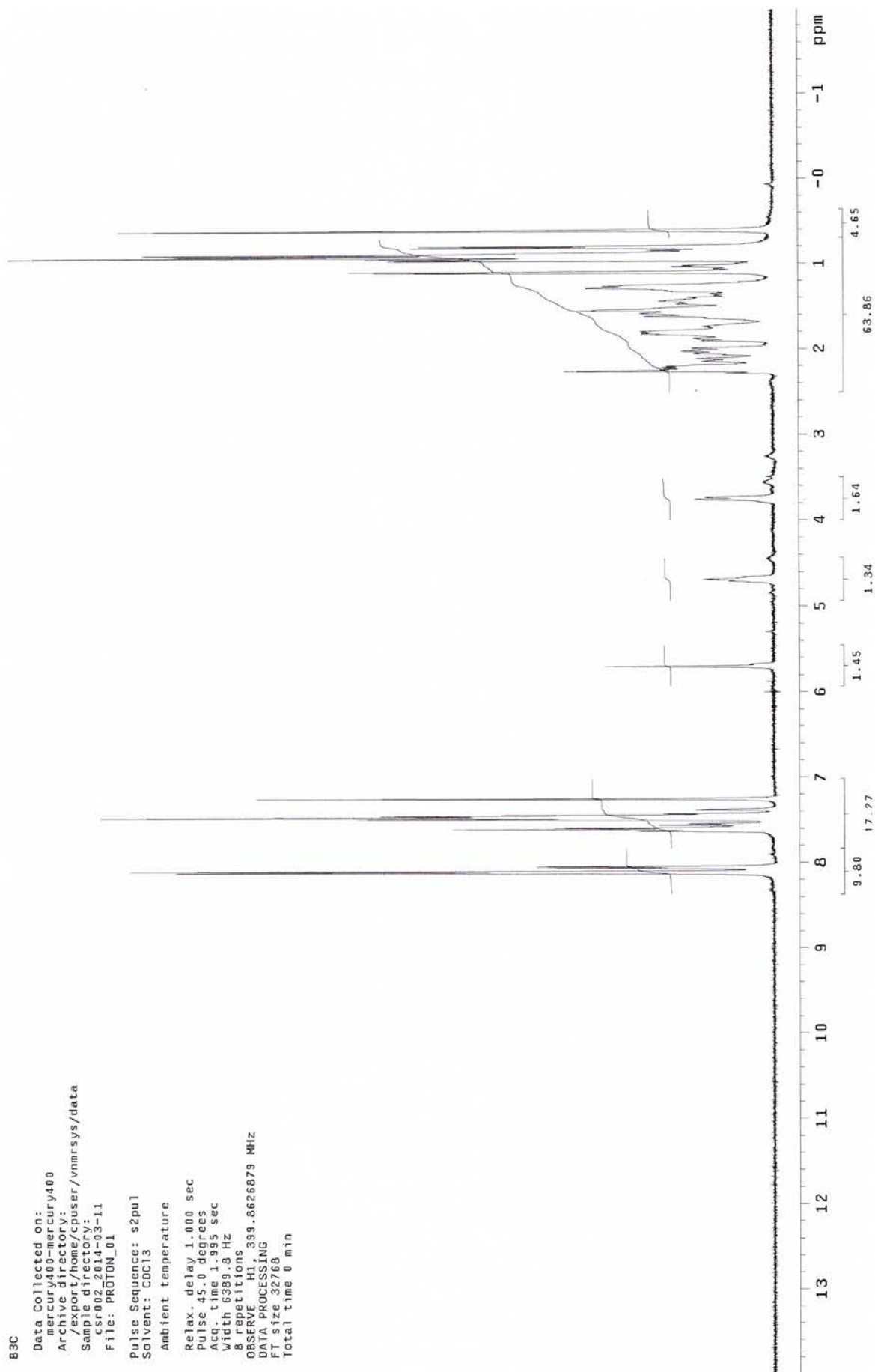
บรรณานุกรม

- Barbier P, Schneider F. Syntheses of tetrahydrolipstatin and absolute configuration of tetrahydrolipstatin and lipstatin. *Helv Chim Acta*. 1987; **70**: 196–202.
- Gargouri Y, Julien R, Sugihara A, Verger R, Sarda L. Inhibition of pancreatic and microbial lipases by proteins. *Biochem Biophys Acta*. 1984; **795**: 326-331.
- Han LK, Kimura Y, Kawashima M, Takaku T, Taniyama T, Hayashi T, Zheng YN, Okuda H. Antiobesity effects in rodents of dietary tea saponin, a lipase inhibitor. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; **25**: 1459-1464.
- Hatano T, Yamashita A, Hashimoto T, Ito H, Kubo N, Yoshiyama M, Shimura S, Itoh Y, Okuda T, Yoshida T. Flavandimmers with lipase inhibitory activity from *Cassia nomame*. *Phytochemistry* 1997; **46**: 893-900.
- He Q, Lv Y, Yao K. Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chem* 2006; **101**: 1178-1182.
- Hochuli E, Kupfer E, Maurer R, Meister W, Mercadal Y, Schmidt K. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. II. Chemistry and structure elucidation. *J Antibiot* 1987; **40**: 1086-1091.
- Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Fried SK, Raskin I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* 2003; **19**: 876-879.
- Slanc P, Doljak B, Mlinaric A, Strukelj B. Screening of wood damaging fungi and macrofungi for inhibitors of pancreatic lipase. *Phytother Res* 2004; **18**: 758-762.
- Satouchi K, Hirano K, Fujino O, Ikoma M, Tanaka T, Kitamura K. Lipoxxygenase-1 from soybean seed inhibiting the activity of pancreatic lipase. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998; **62**: 1498-1503.
- Sharma N, Sharma VK, Seo SY. Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. *Journal of Ethnopharmacol* 2005; **97**: 453-456.
- Tani H, Ohishi H, Watanabe K. Wheat flour lipase inhibitor decrease serum lipid levels in male rats. *J Nutr Vitaminol* 1995; **41**: 699-706.
- Weibel EK, Hadvary P, Hochuli E, Kupfer E, Lengsfeld H. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot* 1987; **40**: 1081-1085.
- Xu BJ, Han LK, Zheng YN, Lee JH, Sung CK. *In vitro* inhibitory effect of triterpenoidal saponins from *Platycodi radix* on pancreatic lipase. *Arch Pharm Res* 2005; **28**: 180-185.

19



รูปที่ 18 สเปกตรัม ¹H NMR ของสาร 14



รูปที่ 19 สเปกตรัม ¹H NMR ของสาร 15

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) อาจารย์ ดร. จรรยา ชัยเจริญพงศ์
ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Chanya Chaicharoenpong, Ph.D.
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 2102 00084 76 6
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2188073 โทรสาร 02-2533543

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

5. ประวัติการศึกษา

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

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

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

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, การสังเคราะห์สารอินทรีย์

7. ผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

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

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

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

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

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

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

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

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

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