

บทที่ 1

บทนำ

มะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของทั่วโลกและประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2550 มีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ทั่วโลกมากกว่า 12 ล้านคน โดย 6.7 ล้านคนพบในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา และในปี 2550 นั้น มะเร็งเป็นสาเหตุการตายของประชากรโลก จำนวน 7.6 ล้านคน หรือประมาณ 20,000 คนต่อวัน โดยจำนวน 4.7 ล้านคนนั้นเป็นผู้ป่วยในประเทศกำลังพัฒนา (American Cancer Society, 2007) สำหรับประเทศไทย มะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประเทศ โดยมีแนวโน้มการตายของผู้ป่วยมะเร็งสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (พินิจ, 2549) ซึ่งคาดว่าในปี พ.ศ. 2551 จะมีรายงานผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ถึง 120,000 คน (National Cancer Institute of Thailand, 2007) การรักษา มะเร็งในปัจจุบันมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก แต่ยังไม่ค่อยได้ผลดีนัก โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนาที่มักตรวจพบมะเร็งในระยะท้ายๆ โอกาสการรอดชีวิตจึงมีน้อย ในขณะที่อาการข้างเคียงจากการรักษา โดยเฉพาะจากเคมีบำบัดซึ่งมีความเป็นพิษสูงนั้น ทำให้เกิดอาการข้างเคียงต่ออวัยวะอื่นๆตามมา ซึ่งนอกจากจะมีผลโดยตรงต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยแล้ว ในกรณีที่อาการข้างเคียงรุนแรง จนทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถรับการรักษาต่อได้ จะทำให้ประสิทธิภาพของการรักษาลดลงด้วย ซึ่งในปัจจุบันยาป้องกันอาการพิษจากเคมีบำบัดยังมีน้อย ไม่ครอบคลุมอาการพิษทั้งร่างกาย และมีราคาแพงมาก ตัวอย่างเช่น การใช้ Amifostine ลดอาการพิษที่ไตจากเคมีบำบัด มีค่าใช้จ่ายประมาณ 151,620 บาทต่อคอร์สการรักษา ดังนั้นจึงยังมีความจำเป็นในการพัฒนายาที่สามารถใช้ร่วมกับเคมีบำบัด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษามะเร็งในขณะที่ลดอาการข้างเคียงของเคมีบำบัด และมีราคาไม่แพง

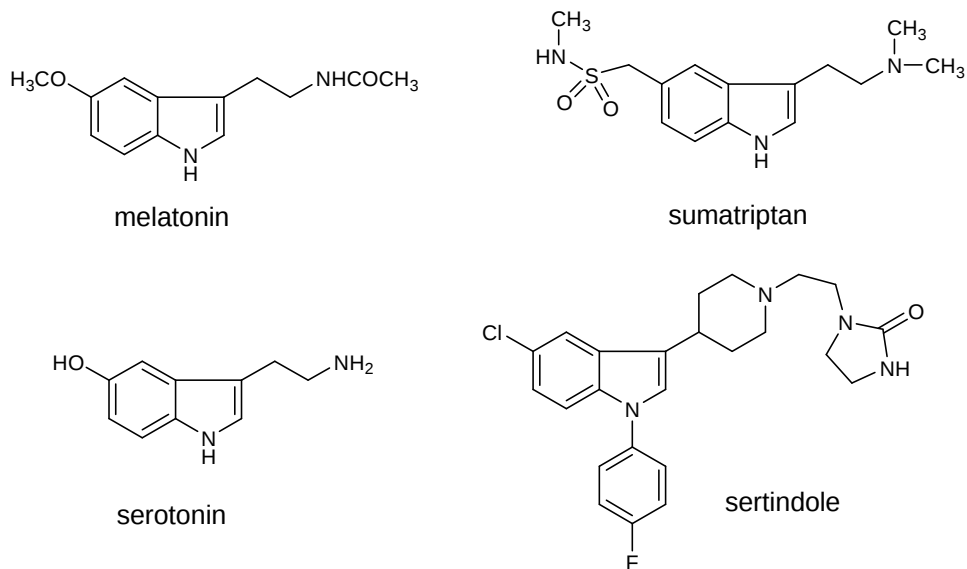
เมลาโทนินเป็นฮอร์โมนระบบประสาทที่มีในร่างกายตามธรรมชาติ สร้างและหลั่งจากต่อมไพเนียลในสมอง ซึ่งถูกกระตุ้นโดยความมืด และยับยั้งโดยแสงสว่าง เมลาโทนินจึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุม และปรับเปลี่ยนวัฏจักรประจำวันของร่างกาย ในปี ค.ศ. 1996 US FDA ได้อนุมัติให้เมลาโทนินเป็นกลุ่ม “orphan drug” สำหรับใช้ในการรักษาความผิดปกติของวัฏจักรการนอนในคนตาบอดที่ไม่มีการรับรู้เกี่ยวกับแสงสว่าง (MICROMEDEX® Healthcare Series) ในขณะที่ประเทศสหรัฐอเมริกา และอีกหลายประเทศ เมลาโทนินยังจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถซื้อได้โดยไม่ต้องมีใบสั่งยาจากแพทย์ สำหรับช่วยให้นอนหลับ และลดอาการเมาเวลาจากการบิน (jet lag) โดยมีข้อมูลยืนยันจากการศึกษาแบบ meta analysis เกี่ยวกับฤทธิ์ของเมลาโทนินในเพิ่มประสิทธิภาพในการนอนหลับ (Brzezinski et al., 2005) และ ช่วยลดอาการ jet lag (Herxheimer and Petrie., 2002) การควบคุมวัฏจักรและระบบการทำงานของร่างกายของเมลาโทนิน ทำให้เมลาโทนินเกี่ยวข้องกับการนอน ระบบสืบพันธุ์ ระบบประสาท ระบบต่อมไร้ท่อ ระบบภูมิคุ้มกัน และระบบการต้านออกซิเดชันของร่างกาย โดยมีรายงานทั้งในหลอดทดลอง และสัตว์ทดลองว่าเมลาโทนินสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และลดการถูกทำลายของเซลล์ได้ (Reiter et al., 1996, 1997; 2000; 2001) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้มีการศึกษาการใช้เมลาโทนินในโรคต่างๆ อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะโรคมะเร็ง ซึ่ง

ข้อมูลการศึกษาทางคลินิกพบว่าผู้ป่วยมะเร็งที่ใช้เมลาโท닌ร่วมกับการรักษามาตรฐานอื่นๆ มีความเสี่ยงในการเสียชีวิตภายใน 1 ปี น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับเมลาโท닌 ร้อยละ 34 (relative risk: 0.66, 95% confidence interval: 0.59 – 0.73) (Mills et al, 2005) ข้อมูลดังกล่าวได้กระตุ้นให้มีการศึกษาการใช้เมลาโท닌ในผู้ป่วยมะเร็งเพิ่มมากขึ้น

เนื่องจากมีรายงานว่าเมลาโท닌มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชัน จึงได้มีการศึกษาผลของเมลาโท닌ในการลดอาการข้างเคียงจากเคมีบำบัด ซึ่งนอกจากจะพบการลดพิษต่ออวัยวะต่างๆ ในสัตว์ทดลองแล้ว (Hara et al., 2001; Xu et al., 2001; Dziegiel et al., 2002) ยังพบผลดังกล่าวในคน โดยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งที่ใช้เมลาโท닌ร่วมด้วยมีรายงาน ของน้ำหนักตัวที่ลดลงมากกว่า 10% ภายในระยะเวลา 3 เดือน น้อยกว่า และพบระดับ Tumor necrosis factor ลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ (Lissoni et al., 1994; 1996) นอกจากนี้ การวิจัยทางคลินิกในผู้ป่วยมะเร็งระยะแพร่กระจายชนิดต่างๆ มากกว่า 500 คน พบว่ากลุ่มที่ให้เมลาโท닌ร่วมกับการรักษาด้วยเคมีบำบัด รังสีรักษา หรือ supportive care มีรายงานอาการข้างเคียงน้อยกว่าในเรื่อง การกดไขกระดูก โดยเฉพาะภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ภาวะผอมแห้ง ภาวะเหนื่อยล้า ภาวะปากอักเสบ พิษต่อระบบประสาทรับรู้สัมผัส พิษต่อหัวใจ และพิษต่อไต (Lissoni et al., 1997; 1999; 2002)

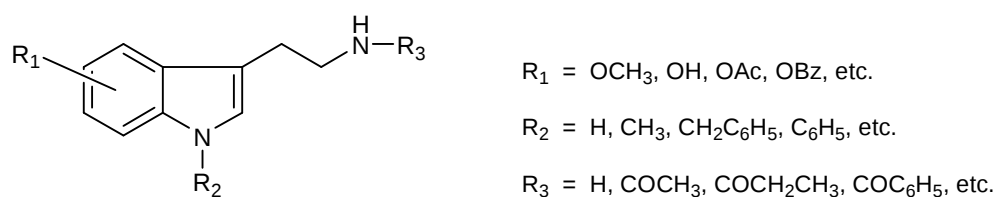
กลไกของเมลาโท닌ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด โดยเชื่อว่เกี่ยวข้องกับการจับที่รีเซพเตอร์ MT_1 and MT_2 ที่มีผลยับยั้ง adenyl cyclase ทำให้ลด lipoic acid uptake และยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ทั้งนี้ยังมีหลักฐานแสดงการเพิ่มการสลายตัวของ calmodulin และการจับกับ nuclear receptor ที่มีผลเปลี่ยนแปลงยีน และนำไปสู่การแบ่งตัวลดลงด้วย ในขณะเดียวกัน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชันนั้น นอกจากจะไปลดพิษของอนุมูลอิสระในการทำลายเซลล์ ซึ่งมีผลลดอาการข้างเคียงจากการรักษาได้แล้ว ยังลดโอกาสของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์มะเร็งได้อีก นอกจากนี้ เมลาโท닌ยังกระตุ้นการสร้างแกมมาอินเตอร์เฟอรอน (gamma interferon) อินเตอร์ลิวคินส์ (interleukins) และเพิ่มการทำงานของไขกระดูกในการสร้างเม็ดเลือดขาว ซึ่งช่วยเสริมภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย (Brzezinski et al., 1997)

ในส่วนของการสร้างเมลาโท닌ต่อการแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็ง ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดเช่นกัน แต่มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของ melatonin ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า การแทนที่หมู่ OCH_3 (เดิมพบในเมลาโท닌) ที่อยู่บน aromatic ring ด้วยหมู่อื่นๆ รวมถึงการเพิ่มหรือลดจำนวนคาร์บอนระหว่างหมู่อินโด และ side chain amine ส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเปลี่ยนแปลงไปทั้งเพิ่มขึ้นและลดลง (Reiter et al., 2003; 2007) ประกอบกับข้อมูลการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่อการจับกับ melatonin receptor โดยอาศัยเทคนิค CoMFA (Morishima et al., 1998) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับข้อมูลข้างต้น อีกทั้งโครงสร้างหลักของเมลาโท닌เป็นสารกลุ่ม tryptamine ซึ่งใกล้เคียงกับยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันหลายตัวได้แก่ serotonin, sumatriptan และ sertindole แสดงดังในรูปที่ 1 เป็นต้น



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ melatonin และสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียง

จากโครงสร้างในรูปที่ 1 จะเห็นถึงความแตกต่างกันที่หมู่แทนที่ที่ aromatic ring หมู่ indole และ side chain ammine ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Reiter, Mor และคณะ ดังที่กล่าวไว้แล้วในข้างต้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารเมลาโทนิน มีความเป็นไปได้สูงที่จะได้อนุพันธ์ใหม่ที่มีฤทธิ์ดีกว่าสารเมลาโทนินต้นแบบ อีกทั้งการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมียังมีการศึกษาน้อยมาก และอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ในข้างต้นยังไม่มีข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ด้านมะเร็ง ส่งผลให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะทำงานวิจัยในครั้งนี้โดยการทำการวิจัยครั้งนี้สนใจที่จะดัดแปลงโครงสร้างที่ตำแหน่งหมู่แทนที่ที่ aromatic ring, หมู่แทนที่ที่ indole N-atom และ ที่ side chain amine ดังแสดงในรูปที่ 2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านมะเร็งในเบื้องต้นของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด เทียบกับเมลาโทนินต้นแบบ ซึ่งเป็นไปตามหลักฐานที่แสดงว่ากลุ่ม methoxy และ amino มีความสำคัญต่อการจับกับตัวรับของเมลาโทนิน และการแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 2 ของ indole ring สามารถเสริมฤทธิ์การจับกับตัวรับของเมลาโทนินได้ดีขึ้น (Suzen, 2007)



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งที่จะทำการดัดแปลงโครงสร้าง เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านมะเร็งในเบื้องต้น

ดังนั้น อนุพันธ์เมลาโทนินที่พัฒนาขึ้น จึงคาดว่าจะมีคุณสมบัติที่มีประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง ในขณะที่มีคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ดีขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนายาเพื่อใช้เสริมฤทธิ์การต้านมะเร็ง และลดอาการข้างเคียงของเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งต่อไป

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

ความสัมพันธ์ของระดับเมลานินกับการเกิดมะเร็งเริ่มมีการศึกษาครั้งแรกในช่วงปี ค.ศ. 1970 พบว่าสารที่สกัดจากต่อมไผเนียลสามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ และมีรายงานว่าในสัตว์ทดลองที่ตัดต่อมไผเนียลออก หรือกลุ่มที่สัมผัสกับแสงไฟในเวลากลางวันซึ่งมีผลทำให้เมลานินหลังลดลงนั้น มีการเติบโตของเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น (Blask, 1984) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่พบในคน โดยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งมีระดับเมลานินในเวลากลางวันต่ำกว่าคนปกติที่มีอายุเท่ากัน (Kos-Kudla et al., 2002; Karasek et al., 2005) และผู้ป่วยที่มีมะเร็งชนิดที่มีความรุนแรง หรือ ขนาดของก้อนมะเร็งที่ใหญ่ มีระดับเมลานินในพลาสมาต่ำกว่ากลุ่มที่มีความรุนแรงของโรคน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (Vijayalaxmi et al., 2002)

ข้อมูลระบาดวิทยายังพบความเสี่ยงการเกิดมะเร็งเพิ่มขึ้นในคนที่ทำงานผลัดกลางคืน โดยเชื่อว่าการสัมผัสแสงในเวลากลางวันทำให้เมลานินหลังลดลง รายงาน meta-analysis จาก 13 การศึกษาพบว่าผู้หญิงที่ทำงานผลัดกลางคืนมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งเต้านมเพิ่มขึ้นร้อยละ 48 โดยพบความเสี่ยงใกล้เคียงกันทั้งในผู้หญิงที่ทำงานเป็นพนักงานต้อนรับบนเครื่องบิน (standardized incidence ratio 1.44; 95% CI 1.26 – 1.65) และที่ทำงานผลัดกลางคืน (relative risk 1.51; 95% CI 1.36 – 1.68) (Megdal et al., 2005) การศึกษาของ Schernhammer และคณะยังพบว่าความเสี่ยงเพิ่มสูงถึงร้อยละ 79 ในผู้หญิงที่ทำงานผลัดกลางคืนมากกว่า 20 ปี (Schernhammer et al., 2006) ในขณะที่การศึกษาในเอเชียและในเพศชาย พบข้อมูลที่สอดคล้องกัน โดยผู้ชายที่ทำงานผลัดกลางคืนมีความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากเพิ่มมากขึ้นถึง 3 เท่า (Kubo et al., 2006)

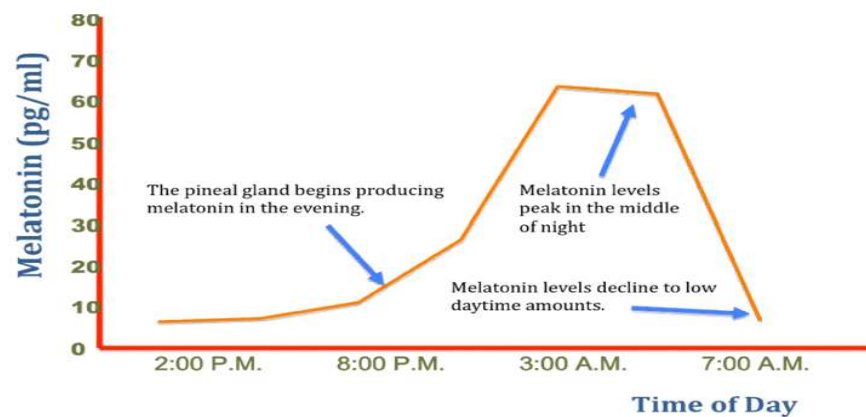
ข้อมูลการใช้เมลานินในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเริ่มมีในช่วงปี 1990s รายงาน meta-analysis จาก 10 การศึกษาทางคลินิกแบบสุ่มและควบคุม (randomized, controlled trial) ที่ใช้เมลานินร่วมกับการรักษามาตรฐานอื่นๆ ในผู้ป่วยมะเร็ง พบว่ากลุ่มที่ได้รับประทานเมลานินขนาด 10 ถึง 40 มิลลิกรัม ตอนกลางวัน มีความเสี่ยงในการเสียชีวิตภายใน 1 ปี น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับเมลานิน ร้อยละ 34 (relative risk: 0.66, 95% confidence interval: 0.59 – 0.73) และไม่พบรายงานอาการข้างเคียงที่รุนแรง (Mills et al, 2005) ทั้งนี้ยังมีข้อจำกัดที่ 10 การศึกษาดังกล่าวไม่ได้ใช้รูปแบบวิจัยแบบปกปิดสองทาง (double-blind trial) อย่างไรก็ตาม การรายงานของ Mills และคณะ ได้กระตุ้นให้มีการศึกษาการใช้เมลานินในผู้ป่วยมะเร็งเพิ่มมากขึ้น จากการตรวจสอบฐานข้อมูลการศึกษาทางคลินิก พบการวิจัยเมลานินในผู้ป่วยมะเร็งที่ลงทะเบียนไว้แล้วถึง 6 การศึกษา และส่วนใหญ่อยู่ในระหว่างเปิดรับอาสาสมัคร (Clinical Trial.gov)

เมลานินซึ่งเป็นฮอร์โมนในร่างกายที่มีรายงานความปลอดภัยสูง (Vijayalaxmi et al., 2002) และมีราคาถูก เนื่องจากการใช้ร่วมกับเคมีบำบัด 6 เดือน จะเพิ่มค่าใช้จ่ายเพียง 100 – 200 บาท ซึ่งเมื่อพิจารณา

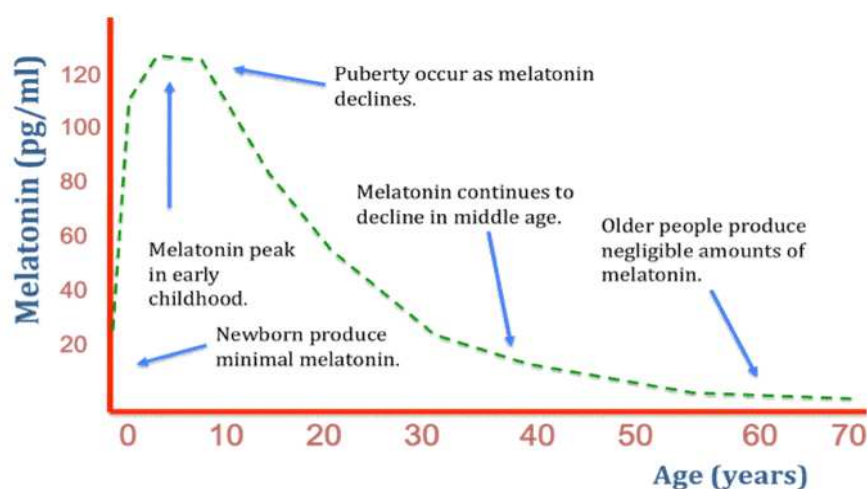
ร่วมกับรายงานการศึกษาอื่นๆ จะเห็นว่าการใช้เมลาโทนิรร่วมกับการรักษาอื่นๆในผู้ป่วยมะเร็ง น่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรักษามะเร็ง ลดอาการข้างเคียงจากเคมีบำบัด และเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยได้

กระบวนการสร้าง melatonin ในร่างกาย

ในร่างกายมนุษย์ Melatonin ถูกสังเคราะห์และคัดหลั่งจาก pineal gland ซึ่งอยู่ภายในส่วนของสมอง โดยการสังเคราะห์และคัดหลั่งนี้จะถูกควบคุมโดยระบบช่วงเวลาและช่วงอายุ (รูปที่ 3-4) ซึ่งพบว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีการสร้าง melatonin สูงในช่วงเวลากลางคืน โดยมีส่วนที่ควบคุมการหลั่ง melatonin คือระบบควบคุมเวลาของร่างกายใน suprachiasmatic nucleus (SCN) ของ hypothalamus โดยพบว่ากระบวนการสังเคราะห์ของ melatonin มีสารตั้งต้นคือ L-Tryptophan ซึ่งจะถูกทำให้เปลี่ยนเป็น serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) และจะผ่านปฏิกิริยา arylalkylamine N-acetyltransferase(AANAT) เกิดเป็น N-acetylserotonin และผ่านปฏิกิริยา hydroxyindoleomethyltransferase ซึ่งจะเปลี่ยน N-acetylserotonin เป็น melatonin (รูปที่ 5)

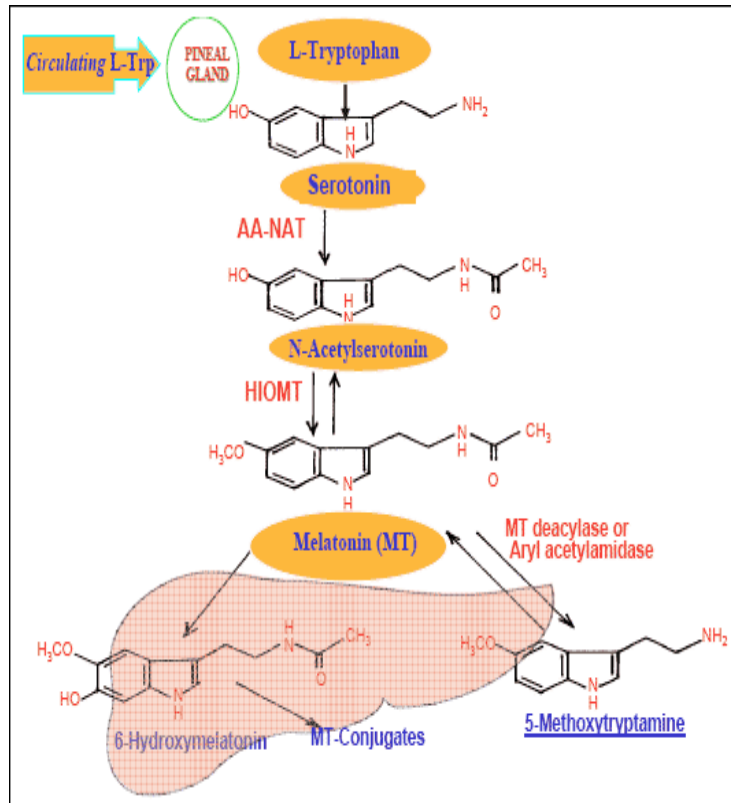


รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของเมลาโทนิรร่วมกับเวลาในช่วงวันของมนุษย์



รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างเมลาโทนิรร่วมกับแต่ละช่วงอายุของมนุษย์

(<http://www.scoliosisjournal.com/content/2/1/6/figure/F4?highres=y>)



รูปที่ 5 แสดงกระบวนการสร้าง melatonin จาก Tryptophan
(http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/s_thipayang/intro.html)

นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ของเมลาโทนินกับการเกิดโรคมะเร็ง (Megdal et al., 2005) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการออกซิเดชัน มีผลทำให้เกิดอันตราย และเป็นจุดเริ่มแรกของการเกิดมะเร็ง (นุจรี 2549, โอภา 2549, Ortega-Gutierrez et al., 2003, Reiter et al., 2003, Li et al., 2005,) โดยสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่ทำหน้าที่ชะลอ หรือป้องกันการเกิดกระบวนการ oxidation ได้ ในวงการแพทย์ยอมรับว่าพยาธิสภาพของการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด หรือโรคมะเร็ง มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย ดังนั้นการทำลายหรือควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระดังกล่าว จะช่วยในการป้องกัน หรือรักษาโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น จากการศึกษาทางระบาดวิทยาจำนวนมากยืนยันถึงการชะลออัตราการเสี่ยงและเพิ่มอัตราการป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง ที่มีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ

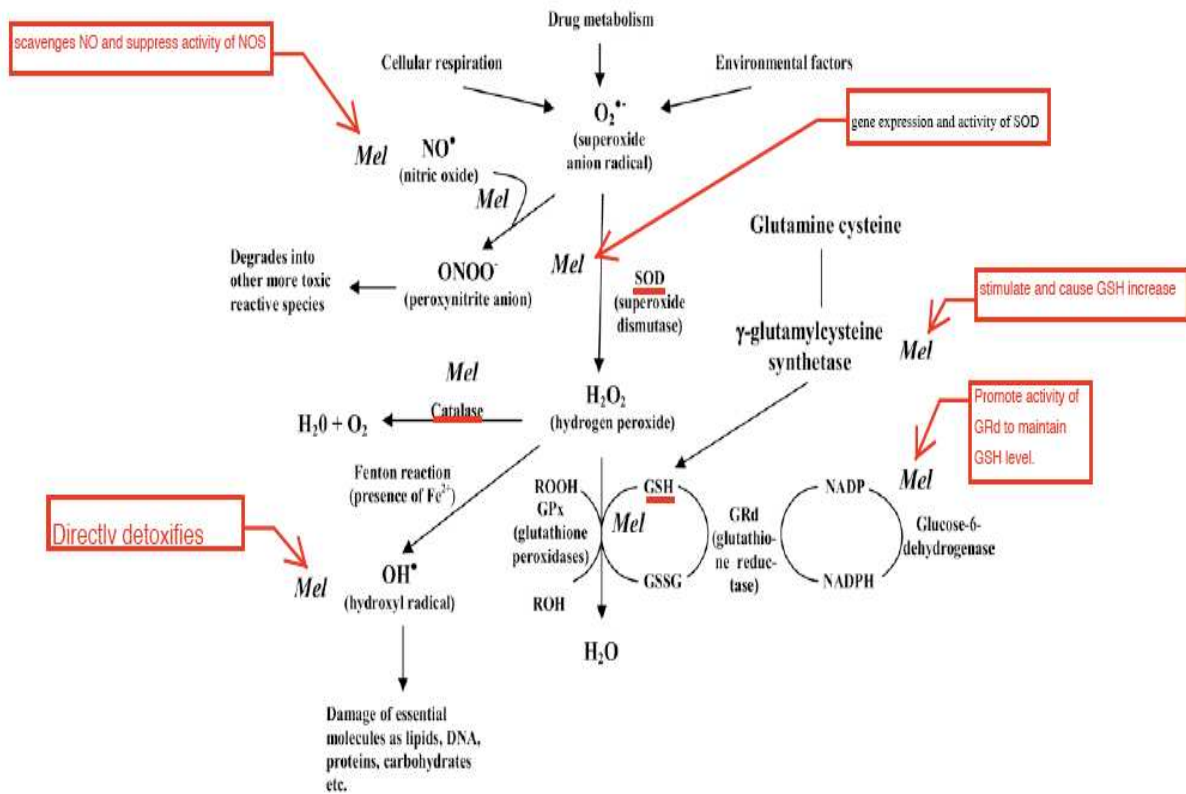
ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ Melatonin

กลไกในการต้านอนุมูลอิสระของ melatonin สามารถแบ่งใหญ่ๆได้เป็น 2 กลไกดังนี้

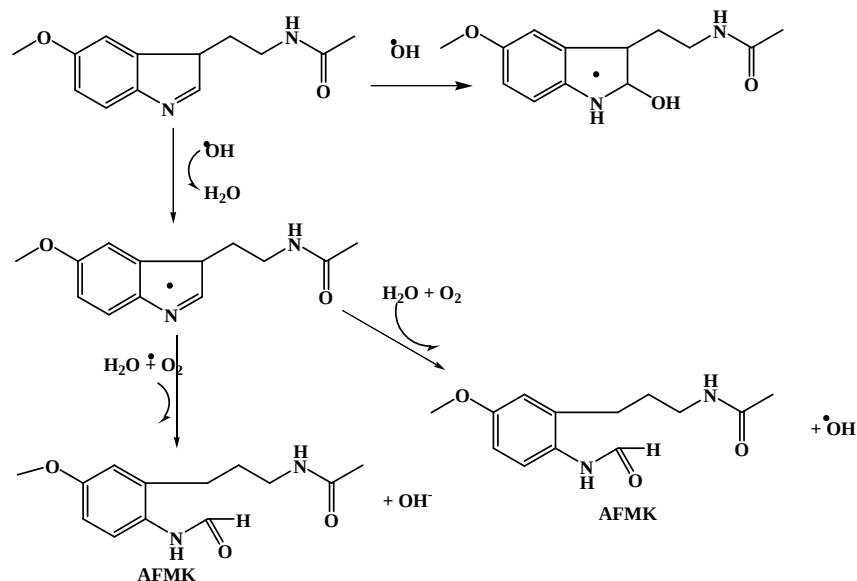
1. Direct Antioxidant Function

จากการศึกษาทดลองในห้องทดลองจำนวนมากได้สรุปว่า melatonin มีความสามารถในการจับและยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยมีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระจำพวก hydroxyl radical ที่สูงกว่า glutathione และ mannitol นอกจากนี้การศึกษาโดยใช้สัตว์ทดลองก็ได้ให้ข้อมูลว่า melatonin มีความเป็น

พืชที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับประสิทธิภาพที่ได้ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่ง Direct Antioxidant Functionนี้ สามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ทั้ง reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species(RNS) ซึ่งมีการคาดการณ์ไว้หลายกลไก (รูปที่ 6) จากนั้นจะถูกทำให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ metabolites คือ N-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) และ N-acetyl-methoxykynuramine (AMK) (รูปที่ 7)



รูปที่ 6 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ antioxidant ของ melatonin (Bülent, 2008)



รูปที่ 7 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของ melatonin แบบ direct mechanism

2.2 Indirect Antioxidant Function

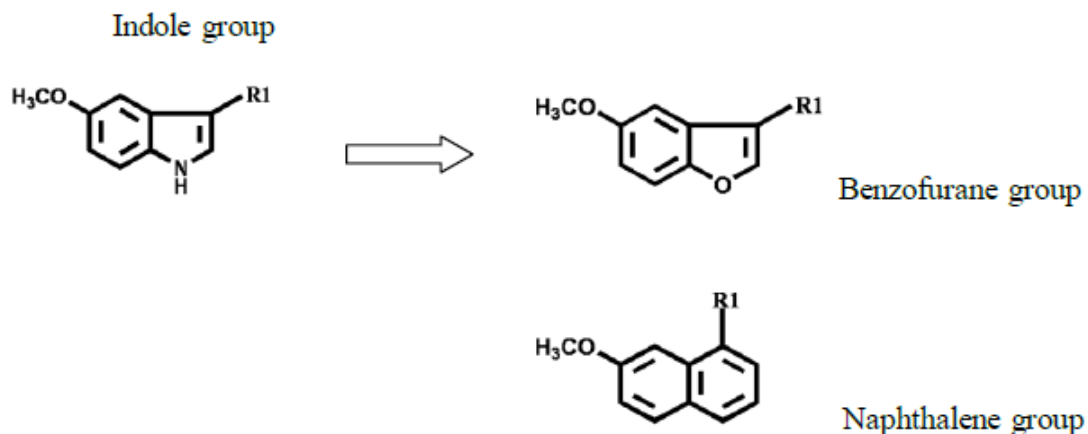
ในหลายๆการศึกษาได้พบว่า การใช้ melatonin ส่งผลให้มีการเพิ่มการทำงานหรือเพิ่มปริมาณของ enzymes ต้านอนุมูลอิสระในร่างกายเช่น superoxide dismutase (SODs), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) และ glutathione reductase (GRd) ซึ่งส่งผลในการป้องกัน oxidative stress จากสารพิษหลายๆชนิดเช่น safrole, paraquat หรือ alloxan ในทางอ้อม

จากรายงานพบว่าหมู่ที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบนโครงสร้างของเมลาโทนิน (Gilbeto et al., 2006, Gozzo et al., 2001) สามารถสรุปได้ดังนี้คือ

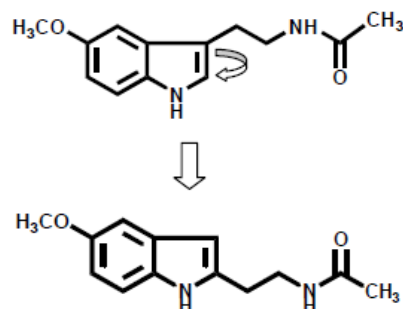
1. หมู่ amide บนโครงสร้างพบว่าเมื่อมีการแทนที่ด้วยหมู่ *tert*-butanoyl หรือ benzoyl ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะไม่เปลี่ยนแปลง หรืออาจเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่หากเปลี่ยนจาก amide เป็น ketone จะทำให้ฤทธิ์ลดลง

2. หมู่ methoxy ตำแหน่งที่ 5 ของวงแหวนอินโด พบว่ามีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ แต่หากเปลี่ยนเป็นหมู่ hydroxy ฤทธิ์จะเพิ่มขึ้น แต่มีบางรายงานที่ทำการทดสอบในสัตว์ ทดลองกลับได้ผลตรงกันข้ามคือฤทธิ์ลดลง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด แต่สามารถสรุปได้เพียงว่า การที่มีหมู่ methoxy ที่ตำแหน่งที่ 5 จะทำให้เมลาโทนินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี

3. indole ring เมื่อเปลี่ยนชนิดวงแหวน เป็น benzofurane หรือ naphthalene จะทำให้ฤทธิ์ลดลง แสดงให้เห็นว่า heterocyclic จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



4. สาย acetyl aminoethyl เมื่อมีการย้ายจากตำแหน่ง C-3 เป็น C-2 พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความสามารถในการจับกับตัวรับเมลาโทนิน (melatonin receptor, MT₁) ลดลง

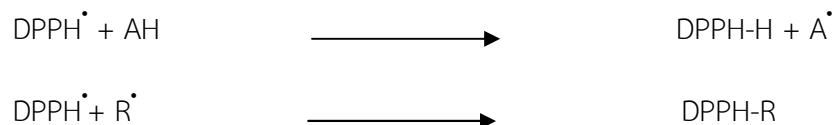


จากรายงานข้างต้นจะเห็นว่าสาร เมลาโทนินมคัยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นการดัดแปลงโครงสร้างที่ *N*-atom บนวงแหวน indole น่าจะมีความเป็นไปได้สูงที่จะได้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีได้ และในการวิจัยครั้งนี้สนใจศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารเมลาโทนิและอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาโดยสนใจศึกษาด้วยวิธี DPPH assay, TBAR assay และ Nitric oxide assay ดังนี้

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็น stable radical ในตัวทำละลาย methanol ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 550 nm โดย DPPH[•] จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R[•]) ได้ดังสมการ



ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC₅₀) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH[•] เหลืออยู่ 50% การศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ในสารตัวอย่างนิยมรายงานเป็นค่า EC₅₀ ทำโดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Remaining DPPH[•] กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน / ตัวอย่าง เพื่อหาค่า EC₅₀ โดยคำนวณ % Remaining DPPH[•] และนอกจากนี้แล้วก็ยังมีการรายงานในรูปของค่า IC₅₀ ด้วย ซึ่งทำโดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibition DPPH[•] กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เพื่อหาค่า IC₅₀ โดย คำนวณ % Inhibition DPPH[•] ดังสมการ :

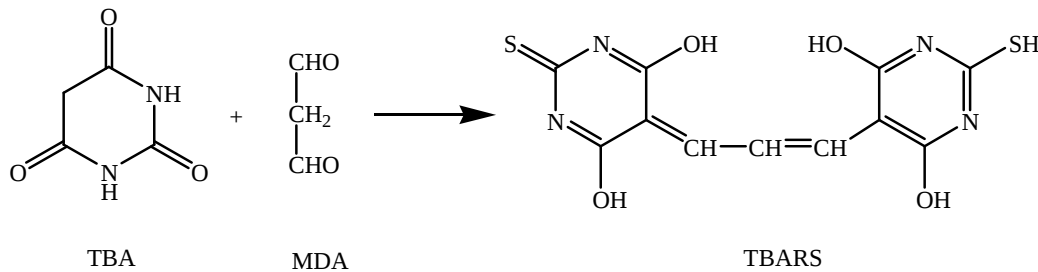
$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{control}}}{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}} \right] \times 100$$

DPPH assay เป็นวิธีที่มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้อง และมี reproducibility สูง แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้วิธีนี้วิเคราะห์ antioxidant activity ของเลือดได้เพราะต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็น alcohol ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนได้

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี lipid peroxidation (TBAR assay)

Lipid peroxidation เป็นขบวนการทำลาย polyunsaturated fatty acids (PUFA) โดยปฏิกิริยา oxidation อย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดการผลิสารประกอบต่างๆ ตามลำดับคือ lipid hydroperoxide, cyclic peroxides, cyclic endoperoxides และผลิตภัณฑ์คือ สารประกอบ ketones และ aldehydes รวมถึง malondialdehyde (MDA) ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ lipid peroxidation เหล่านี้ (รวมทั้ง MDA) สามารถ

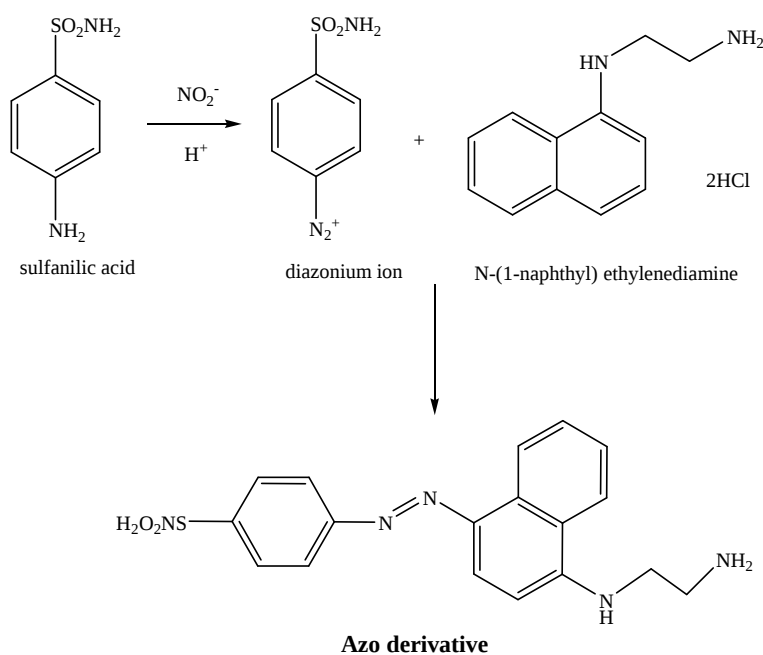
ทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) ในรูปของการรวมตัวเป็น adduct จึงนิยมเรียกการตรวจวัดภาวะ lipid peroxidation โดยวิธีนี้ว่า TBA test และเรียกกลุ่มของสารประกอบที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยานี้รวมกันว่า TBA reactive substance (TBARS) โดยหากตรวจพบ TBARS มากก็เป็นตัวบ่งชี้ว่ามีกระบวนการ lipid peroxidation เกิดขึ้นมากได้



สำหรับการประเมินภาวะ lipid peroxidation ที่เกิดขึ้นในตัวอย่างชีววัตถุ โดยนำตัวอย่างมาทำปฏิกิริยากับ TBA ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรดแก่ (pH3) ที่อุณหภูมิสูง โดยสาร MDA 1 โมเลกุลสามารถทำปฏิกิริยากับ TBA ได้จำนวน 2 โมเลกุล ได้สารประกอบเชิงซ้อนเป็น TBARS (TBA reactive substance) ที่มีสีชมพู และดูดกลืนแสงได้สูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 528-551 nm สามารถนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณได้

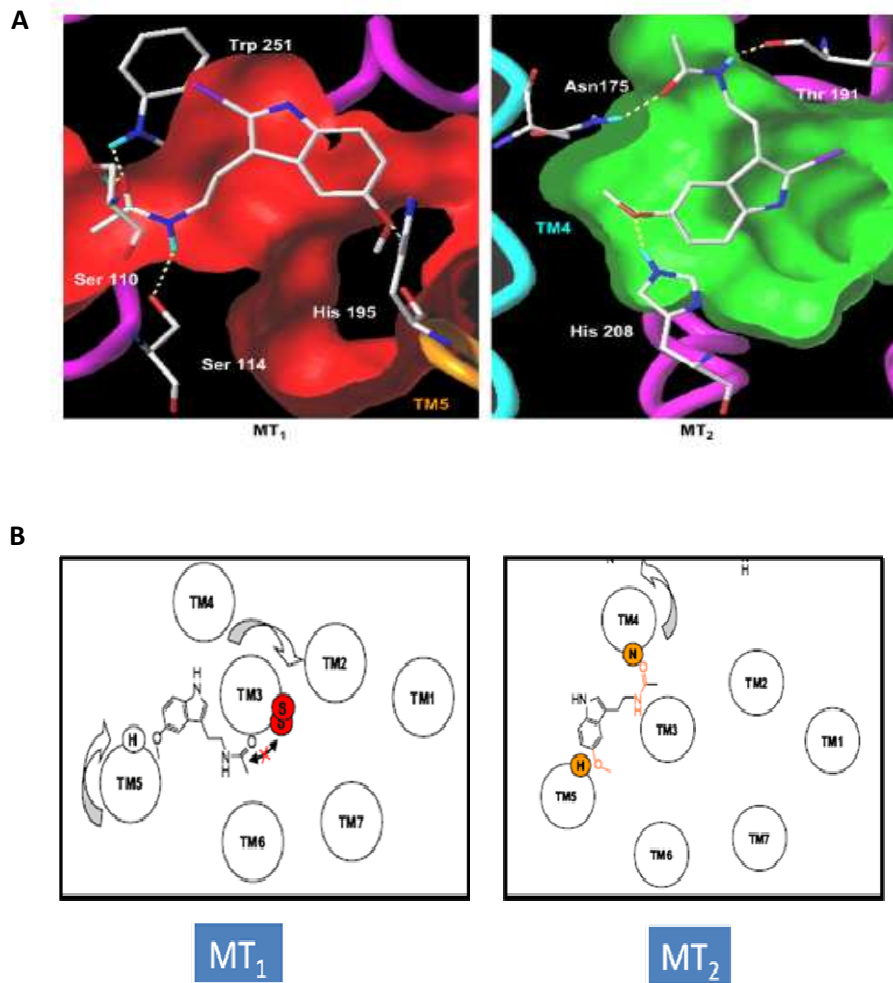
3. การทดสอบ Nitric oxide

Nitric oxide (NO) เป็น radical ที่มีความ reactive ต่ำ ซึ่งเมื่อถูก oxidized จะทำให้อยู่ในรูปของ Nitrite (NO_2^-) เป็นส่วนใหญ่ โดย Sodium nitroprusside สามารถสร้าง NO ขึ้นมาได้ และเราสามารถวัดปริมาณ NO ที่เกิดขึ้นได้ทางอ้อมโดยการเติม Griess reagent [sulfanilic acid + N-(1-naphthyl) ethylenediamine] เพื่อทำปฏิกิริยากับ NO_2^- ทำให้เกิดสารประกอบจำพวก Azo-compound ที่มีสี และวัดการดูดกลืนแสง UV ได้ ดังนี้



กลไกการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของ Melatonin

การออกฤทธิ์ของเมลาโทนินจะทำงานโดยจับกับตัวรับที่อยู่บน membrane ของเซลล์ซึ่งตัวรับเมลาโทนินมี 3 ชนิด คือ MT_1 , MT_2 และ MT_3 โดย ตัวรับชนิดที่ 1 และ 2 พบในมนุษย์ โดยมีแตกต่างกันดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1 ส่วนตัวรับชนิดที่ 3 มีรายงานว่าพบในสัตว์ ดังนั้นในการพัฒนายาต่างๆ ในปัจจุบันจึงสนใจเฉพาะตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 1 (MT_1) และชนิดที่ 2 (MT_2) ซึ่งตัวรับทั้งสองแบบมีลักษณะของโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 8

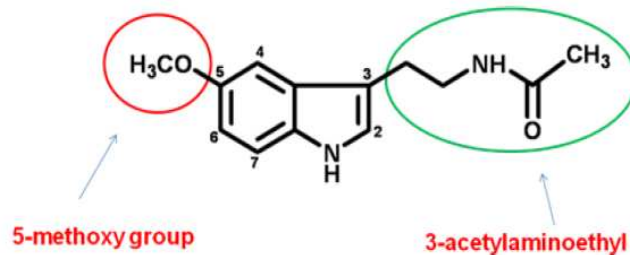


รูปที่ 8 แสดงลักษณะโครงสร้างของตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 1 (MT_1) และชนิดที่ 2 (MT_2)

ตารางที่ 1 แสดงตำแหน่งและหน้าที่ของตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 1 และ 2

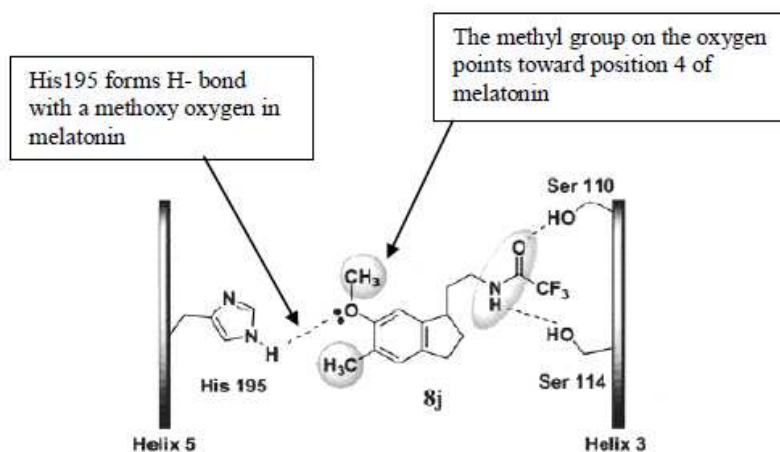
Location	MT ₁	MT ₂	Function
adipocytes	✓	✓	Lowering of GLUT4 mRNA levels and glucose uptake
aorta	✓	✓	Vasodilatation?
breast cancer cell	✓		Inhibition of proliferation in ER α -positive cells
central dopaminergic system	✓		• Modulation of dopamine synthesis and release • Activation of dopamine receptors • Modulation of Cocaine-induced behaviors
cerebellum	✓	✓	Interactions with glutamatergic synapses?
choriocarcinoma	✓		Antiproliferative effects
coronary arteries	✓	✓	• Vasodilatation via MT₂ ? • Vasoconstriction via MT₁ ?
duodenal enterocyte		✓	Stimulation of HCO ₃ ⁻ secretion via neural stimulation
gallbladder epithelial	✓		• Gallbladder contraction? • Modulation of absorptive and/or secretory processes?
granulosa cell	✓	✓	• Increase in LH receptor mRNA levels • Increase in hCG stimulated progesterone levels • Decrease in GnRH-(receptor) levels
hippocampus	✓	✓	• Memory, excitation and inhibition of neuronal activity • Variations in Alzheimer Disease • Enhancement of seizure threshold via depression of GABAA-receptor function?
immune system	✓		Different immunostimulatory effects
kidney	✓		?
myometrium	✓	✓	Modulation of uterine contraction
prostate cancer cell	✓	✓	Antiproliferative effects
retina cell	✓	✓	• Inhibition of stimulation evoked release of dopamine • Modulation of rod phototransduction pathways/photoreceptor functions • Adaptation to low light intensities
SCN	✓		Modulation (entrainment) of circadian rhythms
skin	✓	✓	Antiproliferative effects on cutaneous melanoma cells and normal cell
spermatozoa	✓	✓	Inhibition of sperm motility?
Hypothalamus,pituitary	✓	✓	Inhibition of LH-secretion and ovulation

พบว่าเมลาโทนินออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผ่านตัวรับ MT₁ (Yuan et al., 2002) ส่วนตัวรับ MT₂ จะมีผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดซึ่งมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดมีการคลายตัวและขยายตัว (Ekmekcioglu et al., 2003) สำหรับข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างสารกับการออกฤทธิ์ของเมลาโทนิน (Structure Activity Relationship : SAR) ซึ่งจากรายงานการศึกษาพบว่าส่วนที่จำเป็นในการจับกับตัวรับเมลาโทนิน (melatonin receptor) คือ N-acetyl และ 5-methoxy group (Morot et al., 1998) (รูปที่ 9)

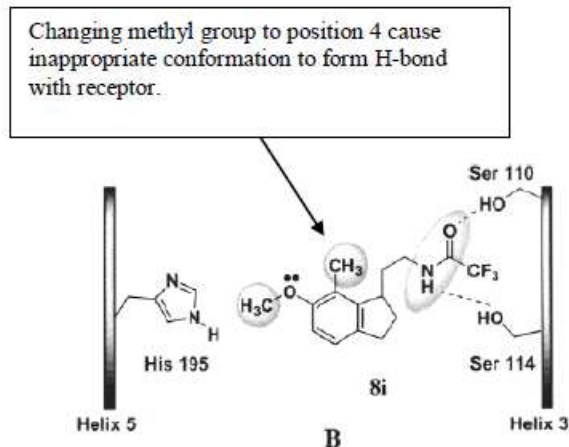


รูปที่ 9 แสดงส่วนที่จำเป็นในการจับกับตัวรับเมลาโทนิน (melatonin receptor)

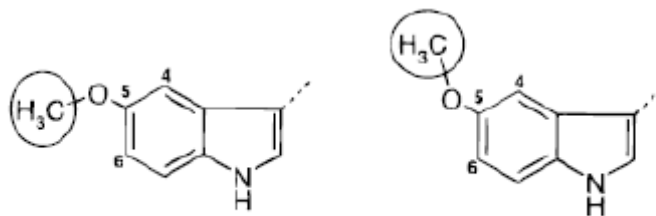
ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า MT₁ receptor เป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของเมลาโทนิน ดังนั้นการศึกษา SAR ต่อฤทธิ์ต้านมะเร็งของเมลาโทนิน จึงมุ่งประเด็นไปที่ความสามารถในการจับกับตัวรับ MT₁ โดยพยายามดัดแปลงโครงสร้างสารให้มีความสามารถในการจับกับ MT₁ สูงขึ้น ซึ่งถ้ามีความสามารถในการจับกับ MT₁ สูงแสดงว่ามีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเพิ่มขึ้นด้วย โดยได้พยายามสร้างสารเลียนแบบโครงสร้างเมลาโทนิน และศึกษาการจับกับ MT₁ (Fukatsu et al. 2002) พบว่า lone pair electron ของ oxygen atom ของ หมู่ methoxy จะเป็นตัวจับกับ MT₁ ดังนั้นการเติมหมู่แทนที่บนวงแหวนเบนซีนที่เป็นหมู่เกาะจะทำให้การจับกับตัวรับลดลง ซึ่งพบว่าหากมีหมู่ methyl ที่ตำแหน่ง 4 จะทำให้ oxygen atom ไม่สามารถจับกับตัวรับได้ แต่หากหมู่ methyl เกาะที่ตำแหน่ง 6 แทนจะทำให้ oxygen atom สามารถจับกับ MT₁ ได้ (รูปที่ 10, 11) นั้นแสดงให้เห็นว่า การจัดเรียงตัว (conformation) ของ methoxy จำเป็นต่อการจับกับ MT₁ (รูปที่ 12)



รูปที่ 10 แสดงการเกาะของหมู่ methyl ที่ตำแหน่งที่ 6 ต่อการจับกับ MT₁

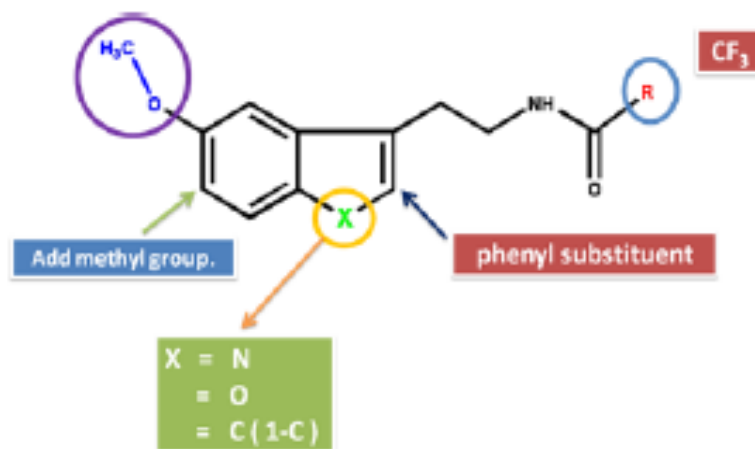


รูปที่ 11 แสดงการเกาะของหมู่ methyl ที่ตำแหน่งที่ 4 ต่อการจับกับ MT₁



รูปที่ 12 แสดงการจัดวางตัวของหมู่ methyl ที่มีผลต่อการจับกับ MT₁

ยังมีรายงานวิจัยพบว่าการเปลี่ยนหมู่ hetero atom บนวงแหวน indole จาก N-atom เป็น O-atom พบว่าสารยังสามารถจับกับ MT₁ ได้ และจับได้แน่นมากขึ้นด้วย ต่อมาได้มีการเติมหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งที่ 2 ด้วยหมู่ phenyl พบว่าได้สารที่สามารถจับกับ MT₁ ได้แน่นมากขึ้น โดยสารดังกล่าวคือ N-(2-phenylbenzofuran-3-yl) ethyl amide และจากที่กล่าวมาทั้งหมดสามารถสรุปหมู่ที่จำเป็นต่อการจับกับ MT₁ ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 แสดงหมู่ที่จำเป็นบนโครงสร้างหลักของเมลาโทนิที่มีผลต่อการจับกับ MT₁

บทที่ 3

การทดลอง

สารเคมี

- Melatonin
- Phosphate buffer pH 7.4 (PBS)
- Potassium chloride
- Ethanol
- Thiobarbituric acid
- สมอหนู
- N-(1-Naphthyl) ethylenediamine
- Hydrochloric acid
- Sodium nitroprusside
- Methanol
- Sulfanilamide
- Ethyl acetate
- น้ำกลั่น
- ผล็ก KBr
- Chloroform

อุปกรณ์ / เครื่องมือ

- auto-pipette
- beaker
- volumetric flask
- 96-well plate
- Erlenmeyer flask
- ซ้อนเขา
- hot bath
- ice bath
- centrifuge tube
- glass tube
- เครื่อง Spectrofluorometer
- เครื่อง UV spectrophotometer
- TLC plate
- เครื่อง Infrared spectrophotometer

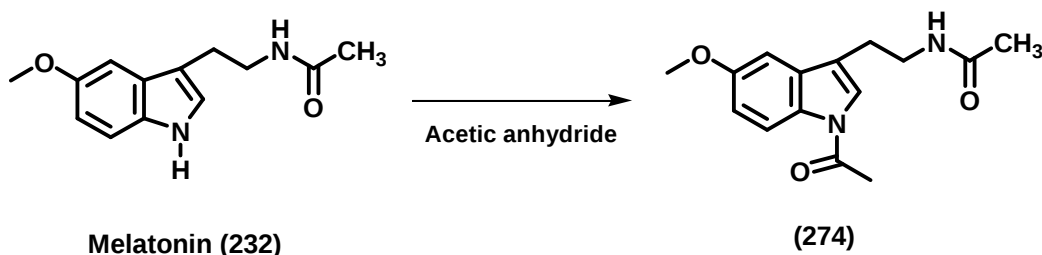
การสังเคราะห์สารอนุพันธ์

มีวิธีการดังนี้ : ชั่งเมลาโทนินใส่ใน round bottom flask และปิดด้วย guard column ที่บรรจุด้วย CaCl_2 เพื่อป้องกันความชื้น หลังจากนั้นจะปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาภายในระบบปิด โดยใช้ แก๊สไนโตรเจนบรรจุในลูกโป่งครอบไว้เหนือ guard column อีกชั้นหนึ่ง จากนั้น นำสารละลาย Pyridine หรือ CH_2Cl_2 1 mL ละลายเมลาโทนินในขวด และนำสารละลายแขนงอ่างน้ำแข็ง จึงค่อยๆเติม Acid chloride ชนิดต่างๆ เป็นเวลามากกว่า 15 นาที จึงตั้งปฏิกิริยาต่อไปที่อุณหภูมิห้อง และทำการตรวจสอบติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยวิธีการ Thin layer chromatography

เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์จะทำการ หยุดปฏิกิริยาด้วยวิธีการ liquid-liquid extraction ระหว่าง น้ำกลั่น 50 mL และ 10% methanol in dichloromethane 50 mL ทำการสกัด 3 ครั้ง เก็บชั้น สารอินทรีย์ไว้ นำไปเติม NaSO_4 anhydrous เพื่อดูดน้ำส่วนเกิน และกำจัด NaSO_4 โดยการกรองด้วย กระดาษกรอง สารจากการกรองจะนำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง rotary evaporator และคำนวณหาน้ำหนักของสารหายาบ หลังจากนั้นจึงนำสารหายาบดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ open column chromatography (CC) ด้วยตัวชะความเข้มข้นต่างๆ โดยจะเริ่มจากสารชะที่มีความเข้มข้นต่ำเช่น 100% hexane สารผสมระหว่าง hexane: ethyl acetate ในอัตราส่วนต่างๆ ,100% ethyl acetate ไปจนถึง methanol ได้สารผลิตภัณฑ์คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ดังแสดงในตารางที่ 2

บางอนุพันธ์อาจมีการเติม 4-dimethylaminopyridine (DMAP) เพื่อเร่งปฏิกิริยา โดยกระบวนการสังเคราะห์ต่างๆ ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น โดยมีรายละเอียดการสังเคราะห์แต่ละอนุพันธ์ดังนี้

1. Acetyl melatonin



แสดงสารและปริมาณที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์

Compound	MW	mmole	Amount/volume
Melatonin	232	0.86 mmole	116 mg
Acetic anhydride		4.3 mmole	410 μL
DMAP		0.43 mmole	52.54 mg
Pyridine			1 mL

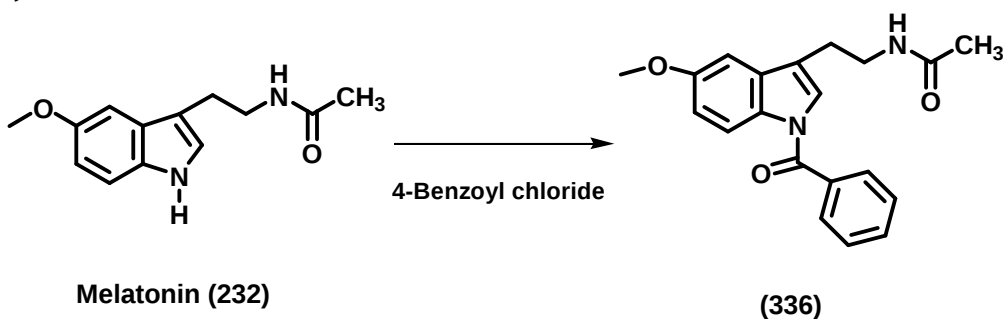
Column Chromatography : Diameter = 2.5 cm, Pack with Silica gel (Fine) 10 g, Load by Hexane 100%

Eluents :

Hexane : Ethylacetate (8:2) : 1-19
 100% Ethylacetate : 20-32
 5% Methanol in Ethylacetate : 33-37
 100% Methanol : 38

Fractions :

9-21 : 175.4 mg
 22-27* : 61mg (product)
 34-37 : 136.4 mg
 38 : 40.9mg

2. Benzoyl melatonin

ตารางแสดงสารและปริมาณที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์

Compound	MW	mmole	Amount/volume
Melatonin	232	0.5	116 mg
Benzoyl chloride	140.57 D = 1.211 g/mL	1 mmole (2 equivalent)	116 μ L
DMAP	122	0.25 mmole	30.5 mg
Pyridine			1 mL

Column Chromatography : Diameter = 2 cm, Pack with Silica gel (Fine) 10 g , Load by Hexane 100%

Eluents :

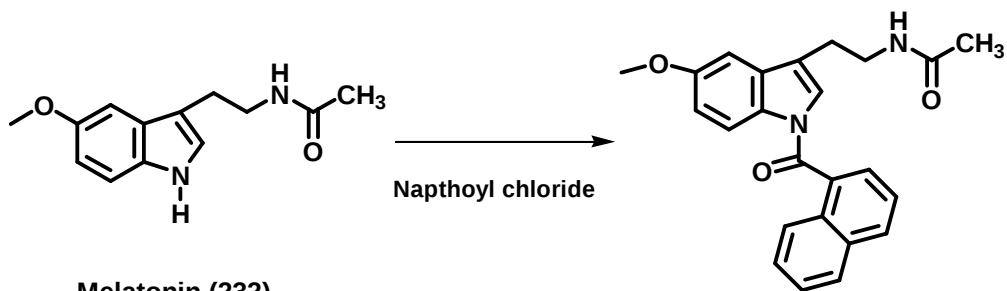
Hexane 100% : 1-5
 Hexane : Ethylacetate (9:1) : 6-35
 Hexane : Ethylacetate (8:2) : 36-55
 Hexane : Ethylacetate (7:3) : 56-60
 Ethylacetate 100% : 61
 Start to detect the sample at flask 40

Flask weight

7-9 : 113.6 mg
 10-16 : 26.3 mg

*17- 21	: 49.8 mg (product)
22-36	: 27.6 mg
37-41	: 12.9 mg
42-45	: 4.7 mg
46-56	: 9.2 mg
57-61	: 58 mg

3. Naphthoyl melatonin



ตารางแสดงสารและปริมาณที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์

Compound	MW	mmole	Amount/volume
Melatonin	232	1.0 mmole	232 mg
2-Naphthoyl chloride	191.63	1.5 mmole	287 mg
DMAP		0.5 mmol	61 mg
Pyridine			1 mL

Column Chromatography : Diameter = 2.5 cm, Pack with Silica gel (Fine) 15 g, Load by Hexane 100%

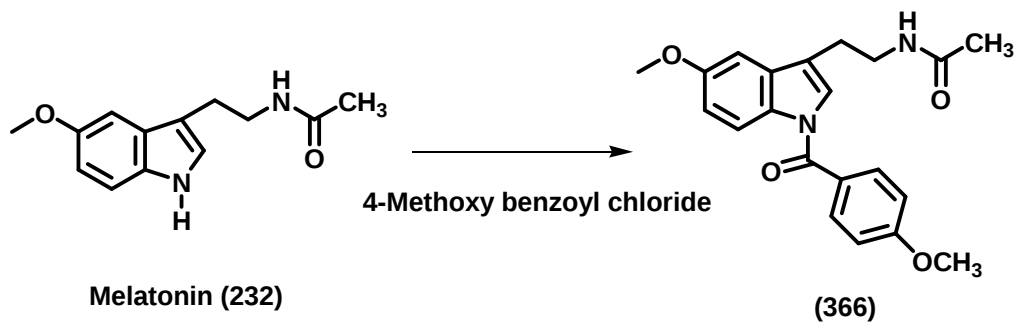
Eluents

Hexane 100%	: 1-9
Hexane : Ethylacetate (9:1)	: 10-29
Hexane : Ethylacetate (7:3)	: 30-34
Hexane : Ethylacetate (1:1)	: 35-40
Ethylacetate 100%	: 41-43
Ethylacetate : MeOH (1:1)	: 44-49

Fractions :

1-11	: 61.9 mg
12-16	: 30.5 mg
*28-34	: 117.8 mg (product)
35-49	: 73.4 mg

4. 4-Methoxy benzoyl melatonin



ตารางแสดงสารและปริมาณที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์

Compound	MW	mmole	Amount/volume
Melatonin	232	0.5	116 mg
4-Methoxy benzoyl chloride	170.6 D = 1.26 g/mL	1 mmole (2 equivalent)	135 mL
DMAP		0.25 mmole (0.5 equivalent)	30.5 mg
Dichloromethane			2 mL

Column Chromatography: Diameter = 2.5 cm, Pack with Silica gel 20 g, Load by Hexane 100%

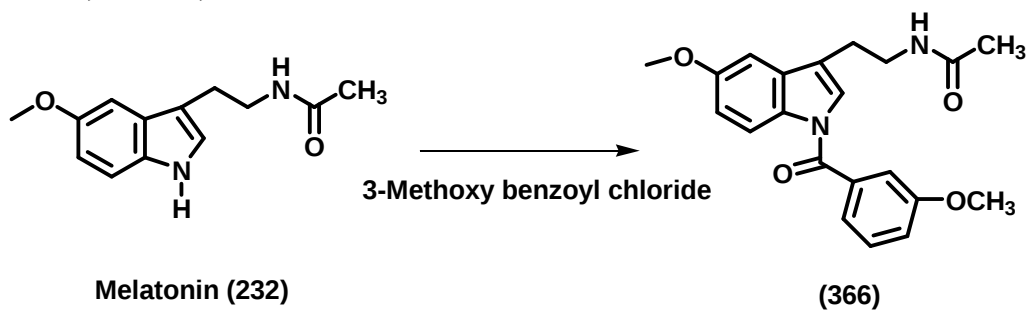
Eluent :

Hexane 100%	: 1-4
Hexane : Ethylacetate (9:1)	: 5-23
Hexane : Ethylacetate (8:2)	: 24-56
Hexane : Ethylacetate (1:1)	: 57-71
Ethylacetate 100%	: 72-95
10% MeOH in Dichloromethane	: 96

Fractions :

1-11	: 16.2 mg
12	: 1.5 mg
13-14	: 2.4 mg
15-31	: 25.6 mg
32-37	: 39.6 mg
38-59	: 53.6 mg
60-72	: 38.6 mg
73-78	: 4.2 mg
79-96	: 70 mg (Melatonin)

5. 3-Methoxy benzoyl melatonin



ตารางแสดงสารและปริมาณที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์

Compound	MW	mmole	Amount/volume
Melatonin	232	0.5	116 mg
3-Methoxy benzoyl chloride	170.6 D = 1.214 g/mL	1 mmole (2 equivalent)	140 μ L
Pyridine			1 mL

Column Chromatography :Diameter = 2.5 cm, Pack with Silica gel (Fine) 20 g, Load by Hexane 100%

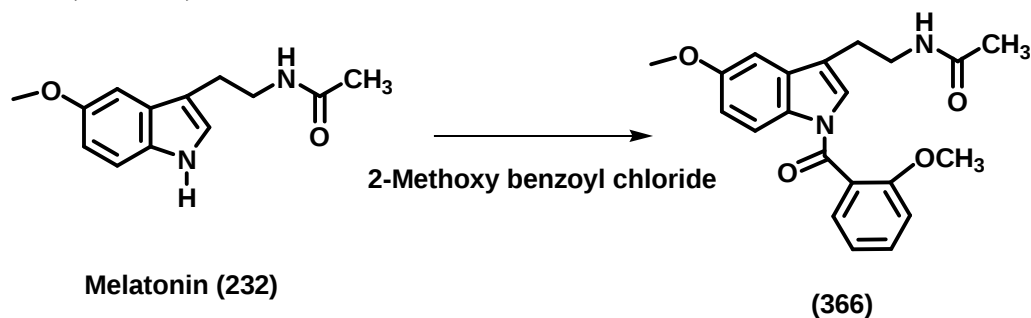
Eluents

Hexane 100%	: 1-14
Hexane : Ethylacetate (9:1)	: 15-30
Hexane : Ethylacetate (8:2)	: 31-49
Hexane : Ethylacetate (1:1)	: 50-76

Fractions :

40-49	: 88.8 mg
50	: 32.8
51-55	: 75.1 mg
56-59	: 79.6 mg
60-69	: 115.8 mg
70	: 25.6 mg
71-74	: 75.4 mg

6. 2-Methoxy benzoyl melatonin



ตารางแสดงสารและปริมาณที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์

Compound	MW	mmole	Amount/volume
Melatonin	232	0.5	116 mg
2-Methoxy benzoyl chloride	170.6 D = 1.57 g/mL	1 mmole (2 equivalent)	108 μ L
Pyridine			1 mL

Column Chromatography :Diameter = 2 cm,Pack with Silica gel 10 g, Load by Hexane 100%

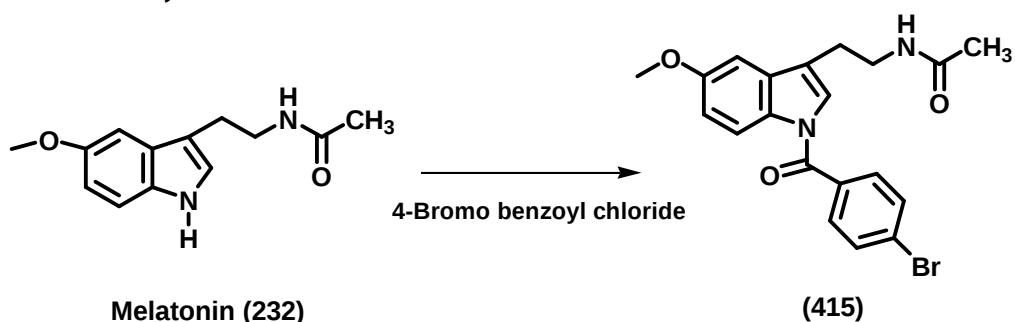
Eluents :

Hexane 100%	: 1-16
Hexane : Ethylacetate (9:1)	: 17-35
Hexane : Ethylacetate (8:2)	: 36-42
Hexane : Ethylacetate (1:1)	: 43-53
Ethylacetate 100%	: 54-55

Fractions :

1-14	: 4.5 mg
15-17	: 1.2 mg
18-26	: 10.8 mg
27-31	: 61.7 mg
32-34	: 75.3 mg
35-49	: 42.6 mg
50-55	: 90.2 mg

7. 4-Bromo benzoyl melatonin



ตารางแสดงสารและปริมาณที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์

Compound	MW	mmole	Amount/volume
Melatonin	232	0.5	116 mg
4-Bromo benzoyl chloride	415	1 mmole (2 equivalent)	219.46 mg
DMAP	122	0.25 mmole	30.5 mg
Dichloromethane			2 mL

Column Chromatography: Diameter = 1.5 cm, Pack with Silica gel (Fine) 10 g, Load by Hexane 100%

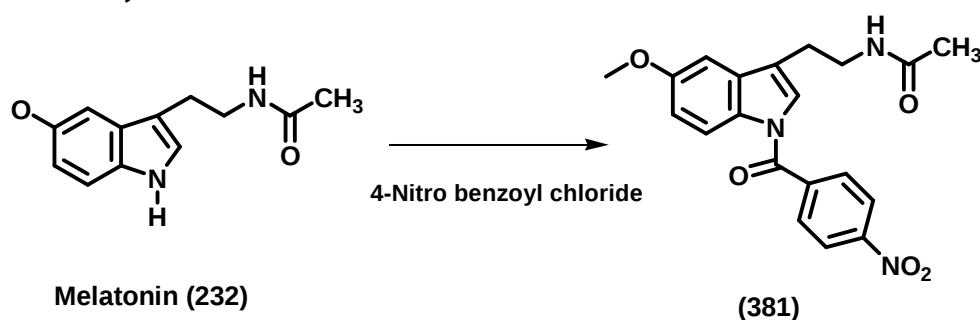
Eluents

Hexane 100% : 1-16
 Hexane : Ethylacetate (9:1) : 17-26
 Hexane : Ethylacetate (8:2) : 27-36
 Hexane : Ethylacetate (1:1) : 37-38

Fractions:

1-16 : 3.3 mg
 17-22 : 0.9 mg
 3-4 : 16.8 mg
 23-26 : 11.8 mg
 * 27-36 : 79.9 mg
 37-38 : 1.8 mg
 37-68 : 91.6 mg
 69 – 73 : 19.6 mg

8. 4-Nitro benzoyl melatonin



ตารางแสดงสารและปริมาณที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์

Compound	MW (g)	mmole	Amount/volume
Melatonin	232	0.5	116 mg
4-Nitro benzoyl chloride	185.56	1 mmole (2 equivalent)	185.56 mg
Pyridine			1 mL

Column Chromatography: Diameter = 2 cm, Pack with Silica gel (Fine) 10 g, Load by Hexane 100%

Eluents:

Hexane 100% : 1-50
 Hexane : Ethylacetate (9:1) : 51-63

Hexane : Ethylacetate (8:2) : 64-81

Hexane : Ethylacetate (7:3) : 82

Fractions:

1-5	: 3.5 mg
6-26	: 2 mg
27-36	: 27.9 mg *
37-72	: 75.3 mg
73-83	: 4.9 mg
84-89	: 39.6 mg

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1. DPPH assay

วิธีการทดลอง

1.1 เตรียม stock สาร DPPH radical ความเข้มข้น 10 mM โดยชั่งสาร 3.94 mg ละลายด้วย methanol 1mL จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 200 μ M โดยปิเปตสารจาก stock 10 mM 100 μ L ปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 5 mL

1.2 เตรียมสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ

1.3 ปิเปตสารแต่ละความเข้มข้น 100 μ L ลงใน 96 wells-plate โดยแต่ละความเข้มข้นจะทำ 5 ซ้ำ, Control ใช้ ethanol 100 μ L, Blank ใช้ ethanol 200 μ L

1.4 ปิเปต 200 μ M DPPH ปริมาตร 100 μ L ลงในแต่ละ wells-plate ยกเว้น blank

1.5 เก็บให้พ้นแสง 30 นาที

1.6 นำไปวัด UV-spectrometer ที่ความยาวคลื่น 550 nm

2. TBAR assay

วิธีการทดลอง

2.1 เตรียม stock ของ melatonin และอนุพันธ์เอไมด์ทุกชนิดของเมลาโทนิน ให้มีความเข้มข้น 40 mM โดยทำการละลายด้วย ethanol (หากไม่ละลายอาจใช้ 10% DMSO ใน ethanol แทน)

2.2 เตรียม ice bath (ทุกขั้นตอนต่อนี้ยกเว้น 2.8, 2.13 และ 2.14 ให้ทำใน ice bath)

2.3 เตรียม tube เท่ากับจำนวนของความเข้มข้นอนุพันธ์เมลาโทนินที่จะทดสอบที่เตรียมไว้ โดยจะทำความเข้มข้นละ 4 tube และเตรียมสำหรับ blank และ negative control อีกอย่างละ 4 tube

2.4 เติมน้ำ PBS 1150 μ L ลงในแต่ละ tube

2.5 เติมน้ำ KCL 600 μ L ลงในแต่ละ tube

2.6 เติมน้ำอนุพันธ์เมลาโทนินที่จะทดสอบปริมาณ 50 μ L ความเข้มข้นละ 4 tube (blank และ negative control ใช้ 50 μ L แทน) และผสมให้เข้ากัน

2.7 เติมสมองหมูที่เติมไว้ในทุกๆ tube tube ละ 200 μL และผสมให้เข้ากัน (เขย่าสมองทุกครั้งก่อนดูด)

2.8 นำ tube ทุก tube ไป incubate พร้อมกับเขย่าที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที (ยกเว้น blank ให้แช่ ice bath ไว้)

2.9 นำ tube ออกมาจาก water bath และเติม HClO_4 500 μL ลงในหลายๆ tube เพื่อตกตะกอนโปรตีน

2.10 นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C 3000 rpm นาน 5 นาที

2.11 ดูดส่วนใสที่ได้ของทุก tube เก็บไว้ tube ละ 1.5 mL

2.12 เติม 0.1% Thiobarbituric acid ปริมาณ 500 μL ลงในทุก tube

2.13 นำไป incubate ใน Hot bath (100 °C) เป็นเวลา 15 นาที พร้อมกับเขย่า

2.14 นำไปวัด fluorescent intensity ที่ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสง 528 nm และคายแสง 551 nm

การเตรียม stock KCl 467 mM

เตรียมโดย ชั่ง Potassium chloride 3.48 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL

การเตรียม stock PBS 4 mM pH 7.4

เตรียมโดย ชั่ง Potassium dihydrogen phosphate 0.54 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 mL ปรับ pH ด้วย NaCl จนได้ pH = 7.4

การเตรียมสมองหมู

สมองหมู บดใน Phosphate buffer pH 7.4 ด้วยอัตราส่วน 2g : 19 mL ภายใน ice-bath

3. Nitric oxide assay

วิธีการทดลอง

3.1 เตรียม stock ของ melatonin และอนุพันธ์เอไมด์ทุกชนิดของเมลาโทนิน ให้มีความเข้มข้น 10 mM โดยทำการละลายด้วย methanol

3.2 เตรียมความเข้มข้นของ melatonin และอนุพันธ์เอไมด์ทุกชนิดของเมลาโทนินจาก stock ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการโดยทำการเจือจางด้วย methanol ให้ได้ปริมาณอย่างละ 500 μL

3.3 เติม 20 μM sodium nitroprusside ปริมาณ 500 μL ลงในสารที่จะทดสอบที่เตรียมไว้ใน 3.2 (blank และ control ใช้ methanol 500 μL + sodium nitroprusside 500 μL)

3.4 Incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องและป้องกันแสงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.5 นำสารที่ incubate แล้ว เติมใส่ micro-plate ความเข้มข้นละ 6 หลุม หลุมละ 100 μL (blank เติมหลุมละ 200 μL)

3.6 ผสม griess reagent 1 และ 2 ผสมให้เข้าด้วย (อัตราส่วน 1 : 1) จากนั้นเติมใส่สารตัวอย่างใน microplate ความเข้มข้นละ 5 หลุม หลุมละ 100 μL (ยกเว้น blank ไม่ต้องเติม)

3.7 เติม PBS 100 μL ในหลุมของสารที่จะทดสอบทุกความเข้มข้น ในหลุมที่ไม่ได้เติม griess reagent

3.8 Incubate ในที่ป้องกันแสงเป็นเวลา 5 นาที

3.9 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm

การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง ผู้วิจัยนำสารที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดส่งทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดย รศ. ดร. นาถธิดา วีระปรียากุล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ รศ.ดร.สหพัฒน์ บัณฑิตรักษ์ คณะเทคนิคการแพทย์ เป็นผู้ทดสอบฤทธิ์ดังกล่าว โดยทำการทดสอบกับเซลล์ leukemia, hepatoma, MOLT4, Jurkat, U937, HepG2 และ Vero cell ด้วยวิธี Neutral red assay โดยดู % ความเป็นพิษต่อเซลล์ดังสมการ

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{untreated cells}} - \text{OD}_{\text{treated cells}}) \times 100}{\text{OD}_{\text{untreated cells}}}$$

และดูผลของเมลาโทนินต่อการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ชนิดต่าง โดยใช้สมการ

$$\% \text{ Apoptotic cell} = (\text{Number of cell of apoptotic nuclei} / \text{Total number of cells}) \times 100$$

บทที่ 4

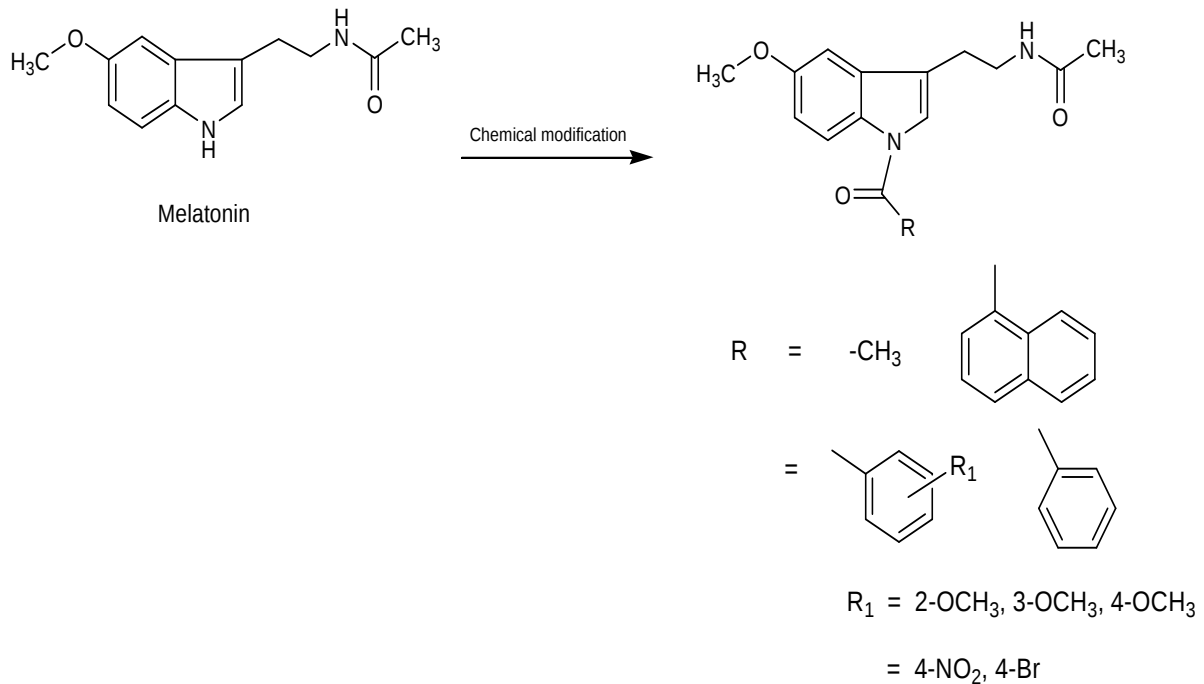
ผลการทดลอง

1. การสังเคราะห์สารอนุพันธ์เมลาโทนิน

การเตรียมอนุพันธ์เมลาโทนินจะทำการดัดแปลงโครงสร้างเมลาโทนินที่หมู่ *N* – atom บนวงแหวน indole ซึ่งจะใช้เมลาโทนินเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ โดยทำปฏิกิริยากับ acid chloride ชนิดต่างๆ ในตัวทำละลาย pyridine หรือ CH_2Cl_2 โดยมี DMAP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้สารผลิตภัณฑ์ทั้งสิ้น 8 อนุพันธ์ ดังแสดงในรูปที่ 14 และตารางที่ 2 พบว่าสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ สามารถสังเคราะห์ได้ค่อนข้างมีปริมาณน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ขบวนการแยกบริสุทธิ์ ด้วย open column chromatography ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากตัวทำละลายที่สามารถแยกได้ดีคือ CHCl_3 แต่มีข้อจำกัดในการสั่งซื้อ เพราะเป็นตัวทำละลายชนิดควบคุมควบคุม และราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงได้เปลี่ยนมาใช้ EtOAc แทน แต่พบว่าความสามารถในการแยกสารไม่ดีเท่าที่ควร ซึ่งจะได้หาสถานะตัวชะที่เหมาะสมในการแยกบริสุทธิ์สารต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงสถานะทางเคมีและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้

Melatonin derivatives	Conditions					% yield
	Acid Cl (equivalents)	Reaction time (h)	CH_2Cl_2	Pyridine (ml)	DMAP (equivalents)	
AcO-MLT	5	24	-	1	0.5	25
Bn-MLT	2	24	-	1	0.5	29
Nap-MLT	1.5	24	-	1	0.5	30
2-OMe-benzoyl-MLT	2	24	-	1	-	33
3-OMe-benzoyl-MLT	2	24	-	1	-	48
4-OMe-benzoyl-MLT	2	24	2	-	0.5	29
4-NO ₂ -benzoyl-MLT	2	24	-	1	0.5	14
4-Br-benzoyl-MLT	2	24	2	-	0.5	38



รูปที่ 14 แสดงโครงสร้างของสารอนุพันธ์ ที่สังเคราะห์ได้

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ melatonin และอนุพันธ์ที่อยู่ในรูป amide ด้วยวิธี DPPH assay TBA assay และ Nitric oxide assay เมื่อใช้ Vitamin E และ Trolox เป็นสารมาตรฐานใน DPPH assay และ TBA assay และ ใช้ Quercetin เป็นสารมาตรฐานใน Nitric oxide assay พบว่าได้ผลดังตารางที่ 3 และในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในครั้งนี้ไม่สามารถทำได้ทุกสารเนื่องจากปริมาณที่มีจำกัด

ผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay พบว่าทั้งเมลานิน และอนุพันธ์ทุกตัวมีฤทธิ์น้อยกว่า Vit E และ trolox แต่เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 1000 μ M พบว่าหากวงแหวนเบนซีนมีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ด้วย -OCH₃ พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าเมลานิน แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธี TBAR assay พบว่าสารที่มีขนาดของวงแหวนใหญ่ขึ้น จะมีฤทธิ์สูงขึ้นและสูงกว่าเมลานิน และ Vit E ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับผลการทดสอบด้วย Nitric oxide assay ที่อนุพันธ์ของ Naphthoyl melatonin ให้ผลดีที่สุด แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าสารเมลานินเองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำอยู่แล้ว ดังนั้นการดัดแปลงโครงสร้างในครั้งนี้จึงทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่ดี เมื่อเทียบกับ Vit E แต่หากจะเปรียบเทียบอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ กับสารตั้งต้นคือเมลานิน จะเห็นว่าสารอนุพันธ์ที่อยู่ในรูปเอไมด์ชนิดต่างๆมีฤทธิ์ดีกว่าสารตั้งต้น ดังตารางที่ 3

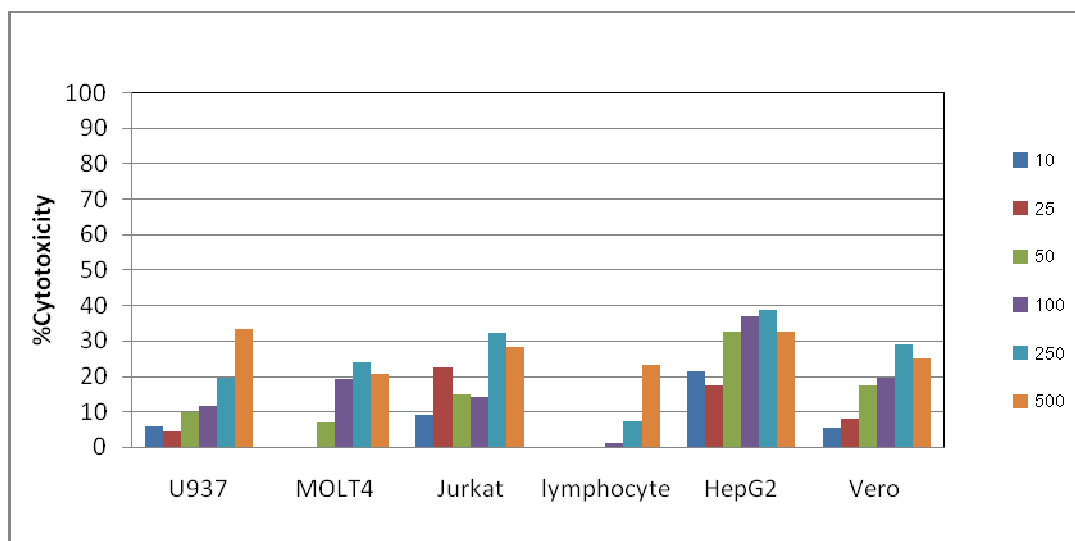
ตารางที่ 3 แสดง % inhibition ของ melatonin และสารอนุพันธ์ด้วยวิธี

Acid Chloride	DPPH assay Inhibition at 1000 μM (%)	TBAR assay (IC_{50} ; μM)	Nitric oxide assay (IC_{50} ; μM)
Melatonin	36.19	>1000	>1000
AcO-MLT	14.74	610	>1000
Bn-MLT	8.82	230	597
Nap-MLT	ND	26	66
2-OMe-benzoyl-MLT	46.15	ND	ND
3-OMe-benzoyl-MLT	34.43	ND	ND
4-OMe-benzoyl-MLT	8	ND	ND
4-NO ₂ -benzoyl-MLT	7	ND	ND
4-Br- benzoyl -MLT	ND	ND	ND
Trolox	$\text{IC}_{50} = 9.01$	ND	ND
Vitamin E	$\text{IC}_{50} = 17.90$	75.95	ND
Quercetin	ND	ND	77

ND = Not detected

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

นำเมลาโทนินและสารอนุพันธ์มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยทำการทดสอบกับเซลล์ leukemia, hepatoma, MOLT4, Jurkat, U937, HepG2 และ Vero cell ด้วยวิธี Neutral red assay โดยได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารต้นแบบเมลาโทนินกับเซลล์ชนิดต่างที่ความเข้มข้น 10 – 500 $\mu\text{g/ml}$ ในการทดสอบครั้งนี้ใช้สาร melphalan เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ดังรูปที่ 15-21 และตารางที่ 4-5 จากการทดลองพบว่า เมลาโทนินที่ความเข้มข้น 2 mM แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระดับปานกลาง (cytotoxicity = 20-33%) เมื่อเปรียบเทียบผลของอนุพันธ์พบว่าอนุพันธ์ที่เป็นหมู่แทนที่ชนิด withdrawing group (>70%) มีฤทธิ์ดีกว่า bulky group และ donating group ที่ความเข้มข้น 1 mM อนุพันธ์ naphthoyl melatonin ให้ผลสูงสุด (100% antiproliferation) ในเซลล์ Jurkat ที่ความเข้มข้น 1 mM และจากผลการทดลองในตารางที่ 4 จะเห็นว่าผลของหมู่แทนที่ชนิด withdrawing group และ bulky group แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ Jurkat และ HepG2 สูงสุด



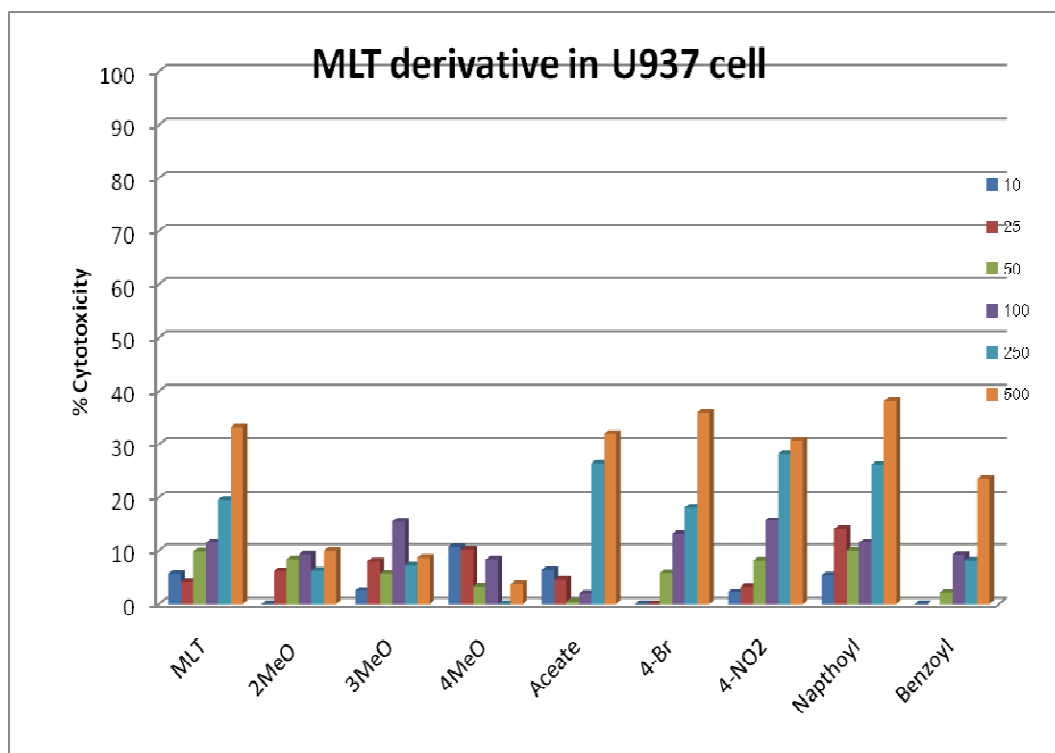
รูปที่ 15 แสดง % cytotoxicity ของเมลาโทนินต่อเซลล์ชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10-500 µg/ml

ตารางที่ 4 แสดง % cytotoxicity และ % apoptosis ของเมลาโทนิน และ Melphalan ในเซลล์ชนิดต่างๆ

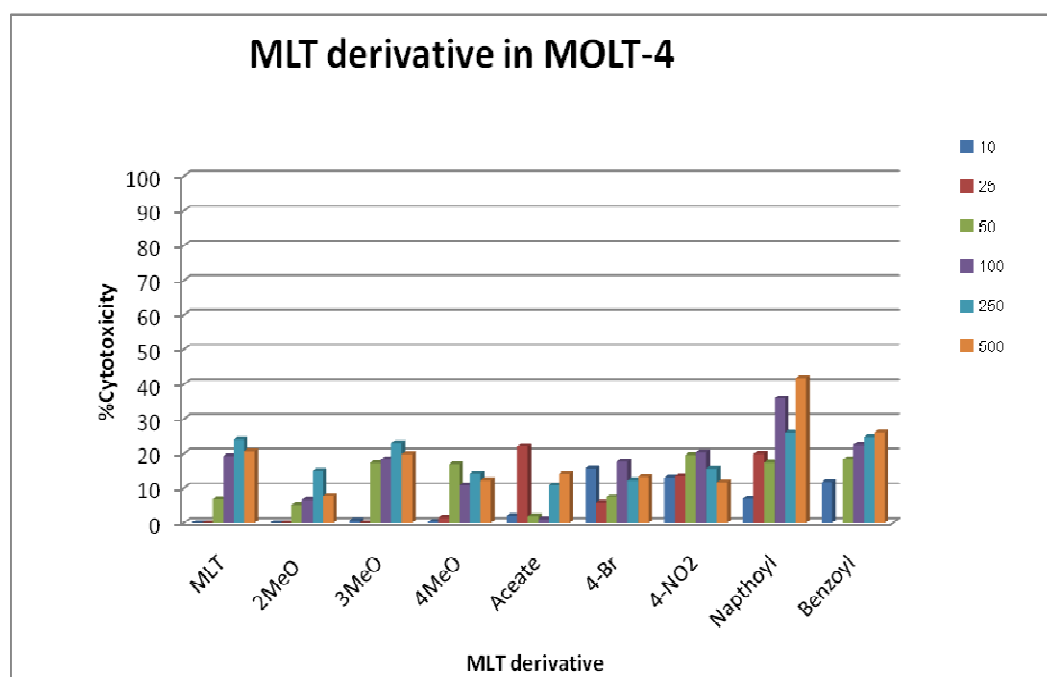
Melatonin at 500 µg/ml	U937	MOLT4	Jurkat	Lymphocyte	HepG2	Vero
% cytotoxicity (based on Neutral red assay)	33	20	28	23	32	24
% Apoptosis induction (based on DAPI staining)	47	29	<10	<10	<10	<10
Melphalan	U937	MOLT4	Jurkat	Lymphocyte	HepG2	Vero
% cytotoxicity (based on Neutral red assay)	17.6 (0.06 mM)	103.8 (0.34 mM)	149.8 (0.501 mM)	207.1	36.6 (0.12 mM)	271.8
% Apoptosis induction (based on DAPI staining)	>70	>70	>70	23	>70	53

ตารางที่ 5 แสดง % cytotoxicity (เทียบกับ Melphalan) ของเมลาโทนินและอนุพันธ์ และ ในเซลล์ชนิดต่างๆ

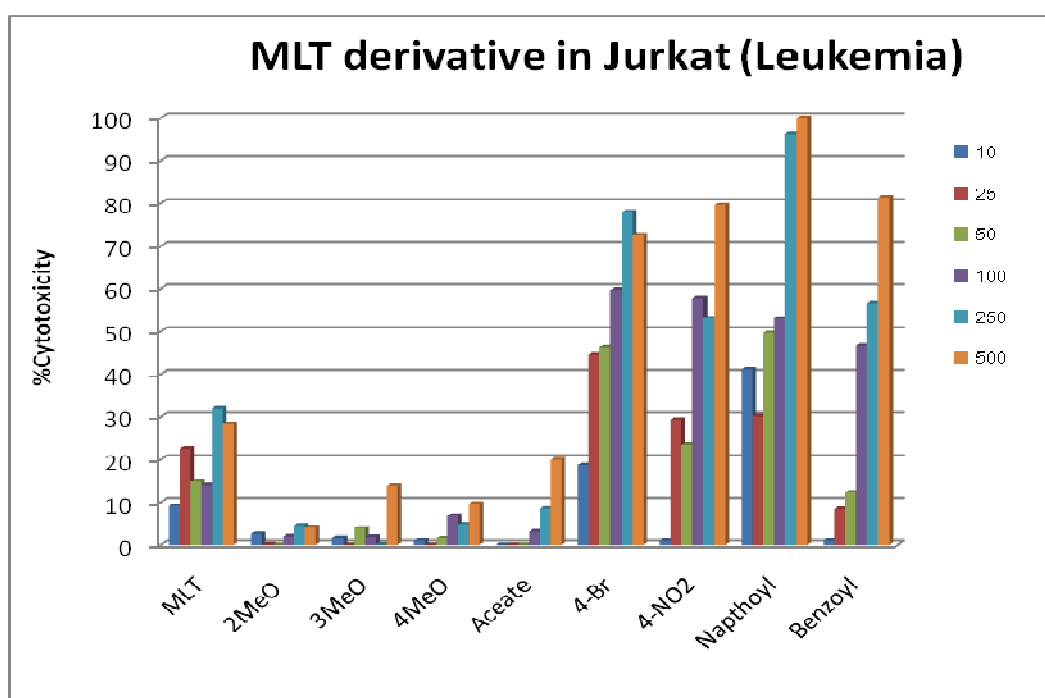
Property	compound	% cytotoxicity					
		U937	MOLT-4	Jurkat	Lymphocyte	HepG2	Vero
	Melatonin (2 mM)	33	20	28	23	32	24
	Acetate-melatonin (1.8 mM)	31.9	14	20	21	54	24
Bulky group	Benzoyl-melatonin (1.4 mM)	23	26	81	34	70	52
	Naphthoyl-melatonin (1.3 mM)	38	42	100	40	60	79
Electron donating group	2-Methoxy benzoyl-melatonin (1.2 mM)	10	8	4	25	36	10
	3-Methoxy benzoyl-melatonin (1.2 mM)	9	20	14	32	52	48
	4-Methoxy benzoyl-melatonin (1.2 mM)	4	12	10	52	11	21
Electron withdrawing group	4-Bromo benzoyl-melatonin (1.2 mM)	36	13	73	31	63	46
	4-Nitro benzoyl-melatonin (1.3 mM)	31	12	80	39	57	68



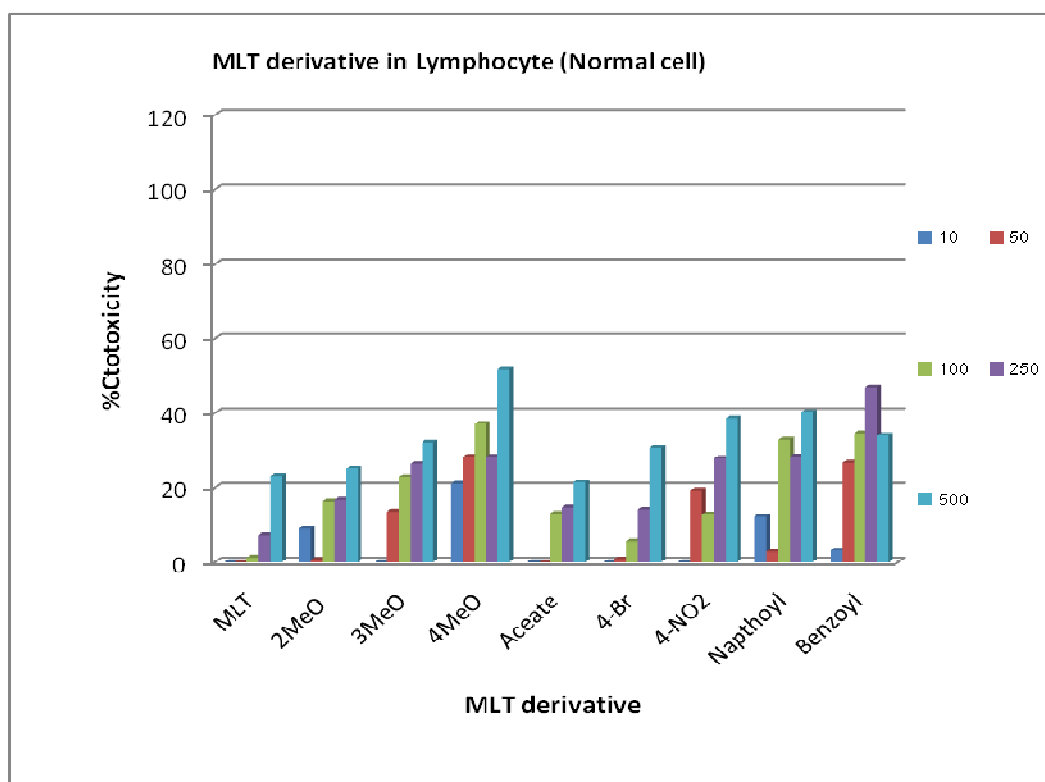
รูปที่ 16 แสดง % cytotoxicity ของเมลาโทนินและอนุพันธ์ ต่อเซลล์ U937 ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10-500 µg/ml



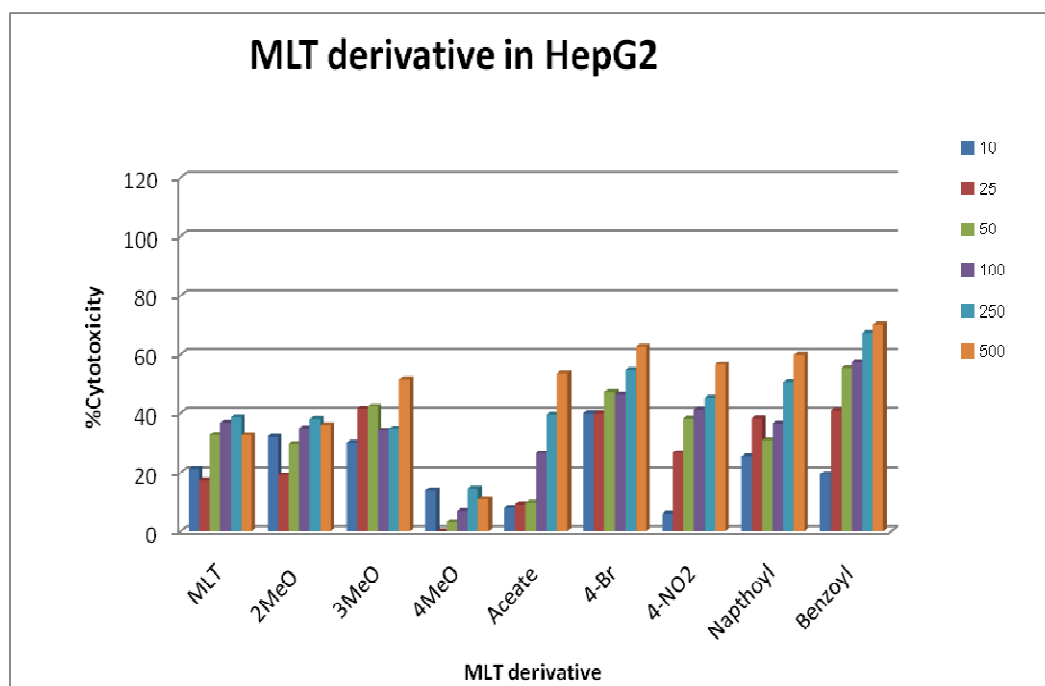
รูปที่ 17 แสดง % cytotoxicity ของเมลาโทนินและอนุพันธ์ ต่อเซลล์ MOLT-4 ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10-500 µg/ml



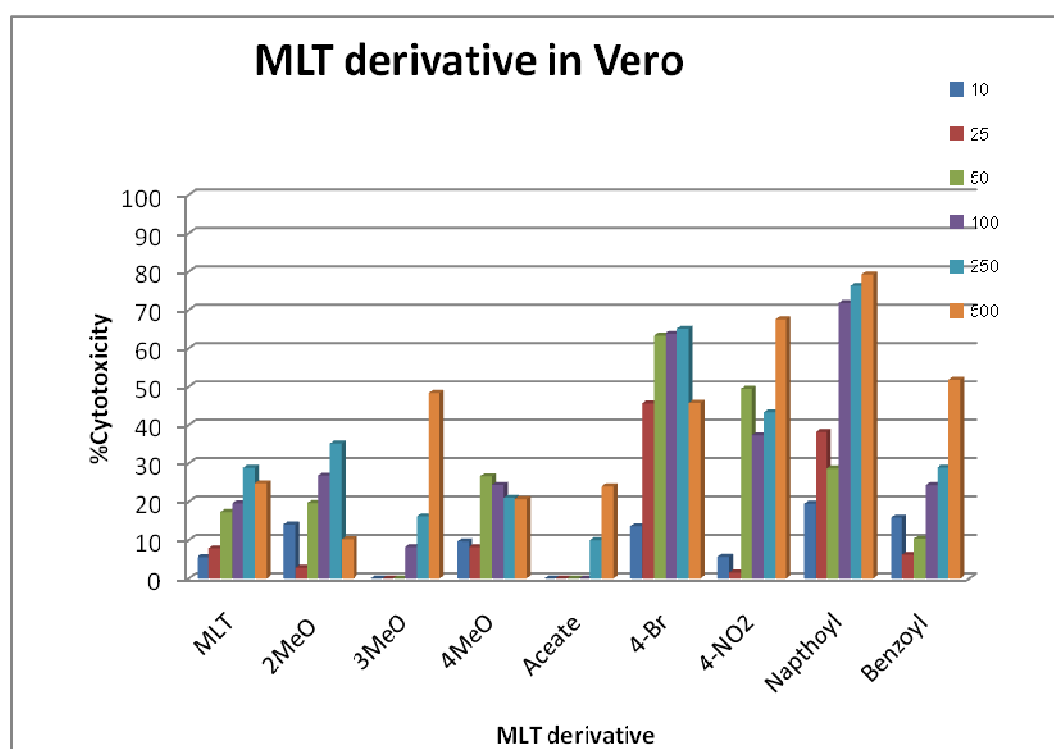
รูปที่ 18 แสดง % cytotoxicity ของเมลาโทนินและอนุพันธ์ ต่อเซลล์ Jurkat ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10-500 µg/ml



รูปที่ 19 แสดง % cytotoxicity ของเมลาโทนินและอนุพันธ์ ต่อเซลล์ Lymphocyte ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10-500 µg/ml



รูปที่ 20 แสดง % cytotoxicity ของเมลาโทนินและอนุพันธ์ ต่อเซลล์ HepG2 ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10-500 µg/ml



รูปที่ 21 แสดง % cytotoxicity ของเมลาโทนินและอนุพันธ์ ต่อเซลล์ Vero ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10-500 µg/ml

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้พบว่า การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี nitric oxide assay นั้น สารที่ให้ฤทธิ์ดีที่สุดคือ Naphthoyl melatonin ($IC_{50} = 66 \mu M$) และ Benzoyl melatonin ($IC_{50} = 597 \mu M$) เมื่อใช้ Quercetin ($IC_{50} = 77 \mu M$) เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งวิธี nitric oxide assay นั้น แสดงให้เห็นว่า สารมีความไวต่อ Nitric oxide ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระจำพวก RNS โดย nitric oxide นั้น จะมีบทบาทมากในร่างกายมนุษย์หลายอย่าง ซึ่งจะเห็นได้ชัดในระบบภูมิคุ้มกัน และการส่งกระแสประสาท ดังนั้น Naphthoyl melatonin ที่แสดงฤทธิ์ดีในการทดลองด้วยวิธี nitric oxide assay อาจจะนำมาพัฒนาเป็นยาที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและระบบการส่งกระแสประสาทต่อไปได้

TBAR assay นั้นพบว่าสารที่ให้ฤทธิ์ดีคือ Naphthoyl melatonin ($IC_{50} = 26 \mu M$) และ Benzoyl melatonin ($IC_{50} = 237 \mu M$) และ Melatonin acetate ($IC_{50} = 615 \mu M$) โดยใช้ Vitamin E เป็นสารมาตรฐาน ($IC_{50} = 53$) ซึ่งกระบวนการเกิด Lipid peroxidation นั้นส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นจากการที่ polyunsaturated fatty acids ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระจำพวก ROS โดย ROS นี้จะเกิดขึ้นมากในกระบวนการหายใจ และอวัยวะที่มีการใช้ O_2 ปริมาณสูง เช่น สมอง ปอด ตับ เป็นต้น ดังนั้น Naphthoyl melatonin ที่แสดงฤทธิ์ดีในการทดลองด้วยวิธี TBA assay จึงอาจจะนำมาพัฒนาเป็นยาที่มีฤทธิ์ Neuroprotective เพื่อป้องกันโรคทางระบบประสาท หรือ เป็นยาที่ป้องกันการเกิดมะเร็งในอวัยวะที่มีการใช้ oxygen สูงได้

จากผลการทดลองการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TBA assay และ Nitric oxide assay แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ว่า การเติมหมู่แทนที่เข้าไปในตำแหน่งที่ Nitrogen ของวง indole ส่งผลต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของอนุพันธ์นั้นๆ โดยหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่จะส่งผลให้มีฤทธิ์ที่ดี จากการทดลองพบว่า Naphthoyl melatonin มีฤทธิ์ที่ดีกว่า Benzoyl melatonin และ Melatonin acetate ตามลำดับ ดังนั้น หากต้องการที่จะพัฒนาอนุพันธ์ของ melatonin ที่อยู่ในรูปของ amide ต่อ ควรจะเติมหมู่แทนที่ที่เป็นวง aromatic ขนาดใหญ่ไปยังตำแหน่ง Nitrogen ที่วง indole ซึ่งมีแนวโน้มในการก่อให้เกิดฤทธิ์ที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ

ผลของเมลาโทนินและอนุพันธ์ในการต้านเซลล์มะเร็งพบว่า อนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาเมื่อเตรียมให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ amide และเมื่อหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นโดยการเตรียมให้อยู่ในรูป benzene ring และ naphthalene พบว่าสารสามารถแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้สูงขึ้น โดยเฉพาะต่อเซลล์ Jurkat และ HepG2 และพบว่า การแทนที่ที่วงแหวน benzene ด้วย withdrawing group จะให้ฤทธิ์ดีขึ้นเช่นกัน ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ในเบื้องต้นว่า การเตรียมสารให้อยู่ในรูป amide และมีหมู่แทนที่ที่เป็น bulky group และหากเป็นวงแหวน benzene ควรจะมีหมู่แทนที่ที่เป็น withdrawing group

จากการศึกษาผลของเมลาโทนินและอนุพันธ์ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ให้ผลเป็นไปในแนวทางเดียวกันคือ หมู่ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น ดังนั้นเพื่อยืนยันผลการทดลองดังกล่าวควรจะสังเคราะห์สารอนุพันธ์เพิ่มเติม อีกทั้งควรจะมีการเปลี่ยนชนิดของวงแหวนด้วยหมู่ heterocyclic ชนิดต่างๆ เพราะมีรายงานว่าหมู่ heterocyclic ต่างชนิดสามารถจับกับ MT_1 ได้แตกต่างกันออกไป แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้นี้จับกับ MT_1 ได้หรือไม่ และจับได้ดีกว่าสารต้นแบบคือเมลาโทนินหรือไม่เช่นกัน ดังนั้นเพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเมลาโทนินต่อฤทธิ์การต้านมะเร็ง จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องกลไกการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ต่างๆ ต่อ MT_1 ต่อไป

ผลลัพธ์ของโครงการวิจัย

ในการทำวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยสามารถสังเคราะห์สารอนุพันธ์เมลาโทนินได้ 8 อนุพันธ์ ซึ่งอนุพันธ์ต่างๆ ที่สังเคราะห์ได้ ได้มีการนำไปศึกษาฤทธิ์ต่างๆ มากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็งในเชิงลึก ฤทธิ์ต้านอักเสบทั้งในเซลล์ และสัตว์ทดลอง ผลต่อระบบประสาท ที่เกี่ยวข้องกับระบบความจำและการเรียนรู้ ผลต่อการเพิ่มแขนงประสาทและการปกป้องเซลล์ประสาท โดยมีผลลัพธ์ของโครงการดังนี้

1. ผลิตนักศึกษาบัณฑิตศึกษา ดังนี้

1.1 สามารถผลิตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จบการศึกษาแล้ว 1 คน คือ นางสาว กาญจนา แซ่อิง ภายใต้วិทยานิพนธ์เรื่อง ผลของสารอนุพันธ์เมลาโทนินต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ การเกิด apoptosis และการสร้าง TNF-alpha ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HepG2 และ Chang liver โดยผู้วิจัยได้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา

1.2 กำลังศึกษาระดับ ปริญญาโทชั้นปีที่ 2 หนึ่งคน โดยศึกษาผลของอนุพันธ์เมลาโทนินต่อฤทธิ์ต้านอักเสบทั้งในเซลล์ และสัตว์ทดลอง

2. ผลงานที่มีการเผยแพร่ระดับนานาชาติ บางส่วน (ภาคผนวกที่ 2)

2.1 Yothawathorn Pariyawongsakul and Ploenthip Puthongking. Melatonin and its derivatives as an antioxidative agents. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009, 15-18 Oct., Fukuoka, Japan.

2.2 Weerapreeyakul N, Puthongking P, Machana S, Barusrux S Structure and antiproliferation relationship of melatonin and its analogs. 21st Meeting of the European Association for Cancer Research, 2010 26-29 June, 725. Norway : EORTC, ECCO, EACR, EUSOMA, ESO, 2010

2.3 Karnjana Sae-Ung, Acharawan Topark-Ngarm, Ploenthip Puthongking and Pramote Mahakunakorn. Cytotoxicity of melatonin and derivatives on human liver cell lines. The 4th Sino-thai international conference. 2010, 11-13 July., Khon Kaen, Thailand. (full proceeding)

เอกสารอ้างอิง

1. นุจรี ประทีปวนิช จอห์นส. 2549. การใช้เมลาโทนินในผู้ป่วยมะเร็ง. กรุงเทพฯ. หน้า 665-672
2. พินิจ ฟ้าอำนวยผล, ณรงค์ กษิติประดิษฐ์, อรพิน ทรัพย์สิน. อัตราตายเดือนมกราคม ถึง ตุลาคม พศ. 2549. สถานการณ์สุขภาพประเทศไทย 2549;19(2):1-6.
3. โอภา วัชรคุปต์. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ. พี. เอช. พรินท์ 190 หน้า.
4. Ahmed HH, Mannaa F, Elmegeed GA, Doss SH. Cardioprotective activity of melatonin and its novel synthesized derivatives on doxorubicin-induced cardiotoxicity. Bioorg Med Chem 2005; 13:1847-57.
5. Aydin G, Ozcelik N, Cicek E, Soyoz M. Histopathologic changes in liver and renal tissues induced by Ochratoxin A and melatonin in rats. Hum Exp Toxicol 2003; 22:383-91.
6. Balli E, Mete UO, Tuli A, Tap O, Kaya M. Effect of melatonin on the cardiotoxicity of doxorubicin. Histol Histopathol 2004; 19:1101-8.
7. Blask, D E. The Pineal: An Oncostatic Gland? Comprehensive Endocrinology Ed. Martini, Luciano. New York: Raven Press; pp. 253-284.
8. Brzezinski, A. Melatonin in humans. Cochrane Database Syst Rev N Engl J Med 1997; 336:186-95
9. Brzezinski A, Vangel MG, Wurtman RJ, Norrie G, Zhdanova I, Ben-Shushan A, et al. Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis. Sleep Medicine Reviews. 2005; 9: 41–50.
10. Clinical Trial.gov. <http://clinicaltrials.gov/ct2/home>, Access on 25 Aug 2008
11. DeMuro RL, Nafziger AN, Blask DE, Menhinick AM and Bertino JS. The Absolute Bioavailability of Oral Melatonin. Clin. Pharmacolog. 2000; 40:781-784.
12. Dziegiel P, Jethon Z, Suder E et al. Role of exogenous melatonin in reducing the cardiotoxic effect of daunorubicin and doxorubicin in the rat. Exp Toxicol Pathol 2002; 53:433-9.
13. Dziegiel P, Suder E, Surowiak P et al. Role of exogenous melatonin in reducing the nephrotoxic effect of daunorubicin and doxorubicin in the rat. J Pineal Res 2002; 33:95-100.
14. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. Biomed Pharmacother. 2006; 60(3): p.97-108.

15. Fukatsu K, Uchikawa O, Kawada M, Yamano T, Yamashita M, Kato K, et al. Synthesis of a novel series of benzocycloalkene derivatives as melatonin receptor agonists. **J Med Chem.** 2002; 45(19): 4212-21.
16. Gilberto, S. Giuseppe, D. Annalida , B. Giorgio, T. Federica, V. et al. Synthesis, antioxidant activity and structure–activity relationships for a new series of 2-(N-cylaminoethyl)indoles with melatonin-like cytoprotective activity. **J. Pineal Res.** 2006; 40: 259–269.
17. Gozzo A, Lesieur D, Duriez P, Fruchart JC, Teissier E. Structure-activity relationships in a series of melatonin analogues with the low-density lipoprotein oxidation model. **Free Radic Biol Med.** 1999; 26(11-12): 1538-43.
18. Hara M, Yoshida M, Nishijima H, et al. Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **J Pineal Res** 2001; 30:129-38.
19. Herxheimer A, Petrie KJ. Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. **Cochrane Database Syst Rev** 2002; 2:CD001520
20. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yegen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. **J Pineal Res** 2003; 34:282-7
21. Karasek M, Kowalski AJ, Suzin J, Zylinska K, Swietoslawski J. Serum melatonin circadian profiles in women suffering from cervical cancer. **J Pineal Res** 2005; 39:73-6
22. Kim C, Kim N, Joo H et al. Modulation by melatonin of the cardiotoxic and antitumor activities of adriamycin. **J Cardiovasc Pharmacol** 2005; 46:200-10.
23. Kocak G, Erbil KM, Ozdemir I et al. The protective effect of melatonin on adriamycin-induced acute cardiac injury. **Can J Cardiol** 2003; 19:535-41.
24. Kos-Kudla, B, Ostrowska Z, Kozlowski A, Marek B, Ciesielska-Kopacz N, Kudla M, et al. Circadian rhythm of melatonin in patients with colorectal carcinoma. **Neuro Endocrinol Lett.** 2002; 23:239-42
25. Kovacs J, Brodnrr W, Kirchlechner V, Arif T, and Waldhauser F. Measurement of Urinary Melatonin: A Useful Tool for Monitoring Serum Melatonin after Its Oral Administration. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 2000; 85:666-670.
26. Kubo T, Ozasa K, Mikami K, Wakai K, Fujino Y, Watanabe Y et al. Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers: findings from the Japan collaborative cohort study. **Am J Epidemiol.** 2006;164:549-55.

27. Levin RD, Daehler MA, Grutsch JF, et al. Circadian function in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2005;93:1202-1208.
28. Li, G., Li, L., and Yin, D. A novel observation: melatonin's interaction with malondialdehyde. *Neuroendocrinology Letter*. 2005, 1(26), 61-66.
29. Lissoni P, Barni S, Tancini G *et al*. Role of the pineal gland in the control of macrophage functions and its possible implication in cancer: a study of interactions between tumor necrosis factor-alpha and the pineal hormone melatonin. *J Biol Regul Homeost Agents* 1994; 8:126-9.
30. Lissoni P, Paolorossi F, Tancini G *et al*. Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? *Eur J Cancer* 1996; 32A:1340-3.
31. Lissoni P, Tancini G, Barni S *et al*. Treatment of cancer chemotherapy-induced toxicity with the pineal hormone melatonin. *Support Care Cancer* 1997; 5:126-9.
32. Lissoni P, Barni S, Mandala M *et al*. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer* 1999; 35:1688-92.
33. Lissoni P. Is there a role for melatonin in supportive care? *Support Care Cancer* 2002; 10:110-6.
34. Liu X, Chen Z, Chua CC *et al*. Melatonin as an effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H254-63.
35. Megdal SP, Kroenke CH, Laden F, Pukkala E, Schernhammer ES. Night work and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2023-32
36. Mills E, Wu P, Seely D, Guyatt G. Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *J Pineal Res* 2005; 39:360-6.
37. Montilla P, Tunez I, Munoz MC, Lopez A, Soria JV. Hyperlipidemic nephropathy induced by adriamycin: effect of melatonin administration. *Nephron* 1997; 76:345-50.
38. Morishima I, Matsui H, Mukawa H *et al*. Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protects against adriamycin cardiomyopathy in rats. *Life Sci* 1998; 63:511-21.
39. Marot C, Chavatte P, Morin-Allory L, Viaud MC, Guillaumet G, Renard P, *et al*. Pharmacophoric search and 3D-QSAR comparative molecular field analysis studies on agonists of melatonin sheep receptors. *J Med Chem*. 1998; 41(23): 4453-65.

40. Ortega-Gutierrez, S., Garcia, J.J., Martinez-Ballarín, E., Reiter, R.J., Millan-Plana, S., Robinson, M., and Acuna-Castroviejo, D. Melatonin improves deferoxamine antioxidant activity in protecting against lipid peroxidation caused by hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *Neuroscience Letters*. 2002, 323, 55-59.
41. Ratanatharathorn V et al. Quality of Life, Functional Assessment of Cancer Therapy-General. *J Med Assoc Thai* 2001; 84:1430-1442.
42. Reiter RJ. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol* 1996; 134:412-20.
43. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 939:200-15.
44. Reiter RJ, Tan DX, Acuna-Castroviejo D, et al: Melatonin: Mechanisms and actions as an antioxidant. *Curr Topics Biophys* 2000; 24:171-183.
45. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J. and Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implication in human. *Acta Biochemical Polonica* 2003: 50:1129-1146.
46. Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ. and Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochemical Polonica* 2007: 54:1-9.
47. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997; 60:2255-71.
48. Sahna E, Parlakpınar H, Ozer MK, Ozturk F, Ozugurlu F, Acet A. Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: role of physiological concentrations. *J Pineal Res* 2003; 35:257-61.
49. Schernhammer, ES; Kroenke, CH; Laden, F, and Hankinson SE. Night work and risk of breast cancer. *Epidemiology*. 2006; 17:108-111
50. Semak I, Korik E, Antonova M, Wortsman J, Slominski A. Metabolism of melatonin by cytochrome P450s in rat liver mitochondria and microsomes. *J Pineal Res*. In press (2008)
51. Sener G, Satioglu H, Kabasakal L et al. The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundam Clin Pharmacol* 2000; 14:553-60.

52. Sener G, Sehirli O, Yegen BC, Cetinel S, Gedik N, Sakarcan A. Melatonin attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats. *J Pineal Res* 2004; 37:17-25.
53. Suzen S. Antioxidant activities of synthetic indole derivatives and possible activity mechanisms. *Top Heterocycl Chem* 2007; 11: 145-78.
54. Vale'rie, W. Sophie, D.P. Philippe, C. Jean, B..A. Vale'rie, A. Nicolas, J.P., et al. Synthesis and Structure–Affinity–Activity Relationships of Novel Benzofuran Derivatives as MT2 Melatonin Receptor Selective Ligands. **J. Med. Chem.** 2002; 45: 2788-2800
55. Vijayalaxmi CRT, Reiter R.J. and Herman TS. Melatonin: From Basic Research to Cancer Treatment Clinics. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 2575-2601.
56. Wahab MH, Akoul ES, Abdel-Aziz AA. Modulatory effects of melatonin and vitamin E on doxorubicin-induced cardiotoxicity in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Tumori* 2000; 86:157-62.
57. Walhauser F. Bioavailability of oral melatojin in humans. *Neuroendocrinology.* 1984;39:307
58. Xu MF, Tang PL, Qian ZM, Ashraf M. Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals. *Life Sci* 2001; 68:889-901.
59. Xu M, Ashraf M. Melatonin protection against lethal myocyte injury induced by doxorubicin as reflected by effects on mitochondrial membrane potential. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:75-9.
60. Yuan L, Collins AR, Dai J, Dubocovich ML, Hill SM. MT(1) melatonin receptor overexpression enhances the growth suppressive effect of melatonin in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 192(1-2): 147-56.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล นางสาวเพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง
2. ตำแหน่งวิชาการ อาจารย์ ระดับ 7
3. สถานที่ทำงาน ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ต. ในเมือง อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002
4. วัน เดือน ปี เกิด 22 พฤษภาคม 2517
5. ประวัติการศึกษา

ภ.บ.	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	พ.ศ. 2541
ภ.ม. (เภสัชเคมี)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2545
ปร.ด. (เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2549

6. ผลงานทางวิชาการ

งานวิจัยระดับนานาชาติ

1. **Puthongking P.**, Patarapanich C., Amnuoypol S., Suwanborirux K., Kubo A., and Saito N. Chemistry of Ecteinascidins. Part 2. Preparation of 6'-O-Acyl Derivatives of stable Ecteinascidin and Evaluation of Antitumor Activity. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, 54(7), 1010-1016.
2. Shiozaki T, Fukai M, Hermawati E, Juliawaty L, Syah Y, Hakim E, **Puthongking P**, Suzuki T, Kinoshita K, Takahashi K, Koyama K. Anti-angiogenic effect of **α**-mangostin. *J Nat Med.* 2012, 66(3).
3. Yothawathorn Pariyawongsakul, Chamnam Pattarapanich, Chantana Boonyarut and **Ploenthip Puthongking**. Synthesis and evaluation of anticonvulsant activity of 6,8-dimethoxy-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in PTZ-induced seizure model in mice. *Open Journal of Medicinal Chemistry.* 2012, 2(3). (September; accepted)

งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Oral presentation

1. **Puthongking P**, Tadtong S, Jantakoon P, Promsakha Na Sakonnakhon J, Mari T, Saito N and Boonyarat C. Neuroprotective effect of Nordentatin and its derivatives on Cultured P19-Derived Neurons and Memory Deficit Induced by Scopolamine. The second medicinal chemistry seminar of JSPS Asia-Africa Sciences Platform Program. 2010, 19-21 Oct., pp.25. New Delhi, India.

Poster presentation (Full proceeding)

1. Sae-Ung K, Topark-Ngarm A, **Puthongking P**, Mahakunakorn P. cytotoxicity of melatonin and derivatives on human liver cell lines. The 4th Sino-Thai International Conference “Traditional Medicine and Research and Development in Pharmacy Related Area”, 2010 11-13 July, Khon Kaen, Thailand.

Poster presentation

1. Pariyawongsakul Y, Pattarapanich C, Boonyarat C, and **Puthongking P**. **Anticonvulsant effect of 1(4-chlorophenyl)-6,8-dimethoxy-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline** in PTZ-induced seizure model. 8th AFMC international medicinal chemistry symposium. 2011. 29 Nov.-2 Dec. Tokyo, Japan.
2. **Bootchan T**. Sae-Ung K, Mahakunakorn P and **Puthongking P**. **Cytotoxicity of carbazole alkaloid** from Thai medicinal plant *Clausena harmandiana* on human liver carcinoma (HepG2) cell line. 8th AFMC international medicinal chemistry symposium. 2011. 29 Nov.-2 Dec. Tokyo, Japan.
3. Jantakoon P, Tadtong S, Sakanasakornakorn J P N and **Puthongking P**. Biological effect of nordentatin and Heptaphylline on culture P-19 derives neuron. 8th AFMC international medicinal chemistry symposium. 2011. 29 Nov.-2 Dec. Tokyo, Japan.
4. Sae-Ung K, **Puthongking P**, Topark-Ngarm A, Mahakunakorn P. Induction of apoptosis with melatonin and its derivatives on human liver carcinoma (HepG2) cell line. neuron. 8th AFMC international medicinal chemistry symposium. 2011. 29 Nov.-2 Dec. Tokyo, Japan.
5. Sukano W, Khuathan N, Laohawiroongool P, Puthongking P, Reubroycharoen P, and Boonyarat C. effect of melatonin derivative on improvement of memory deficit

induced by scopolamine in mice. 8th AFMC international medicinal chemistry symposium. 2011. 29 Nov.-2 Dec. Tokyo, Japan.

6. **Puthongking P**, Jantakoon P, Bootchan T, Mari T, Yokoya M, Saito N, and Patarapanich C. Antilipid peroxidation of bioactive compound and derivatives from Thai medicinal plant *Clausena harmandiana*. The 9th Joint seminar Natural medicinal research for the next decade. 2010. 8-9 Dec. Bangkok, Thailand.
7. Mari T, **Puthongking P**, Yokoya M and Saito N. Preparation and biological activities of nordentatin derivatives. The 9th Joint seminar Natural medicinal research for the next decade. 2010, 8-9 Dec. Bangkok, Thailand.
8. Pangkrung W, Pipatwacharadate, Anorach R. and **Puthongking P**. Polyphenolic antioxidant activity and HPLC fingerprint analysis from *Chrysophyllum cainito*. International conference on Folk and Herb Medicine. 2010. 25-27 Nov. Udiapur, India.
9. Noytong S. and Puthongking P. Antilipidperoxidation activity of carbazole alkaloids and its derivatives from Thai medicinal plant *Clausena harmandiana*. International conference on Folk and Herb Medicine. 2010. 25-27 Nov. Udiapur, India.
10. Weerapreeyakul N, **Puthongking P**, Machana S, Barusrux S Structure and antiproliferation relationship of melatonin and its analogs. 21st Meeting of the European Association dor Cancer Research, 2010. 26-29 June, 725. Norway.
11. Pariyawongsakul Y. and **Puthongking P**. Melatonin and its derivatives as an antioxidative agents. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009, 15-18 Oct., Fukuoka, Japan.
12. **Puthongking P.**, Patarapanich C., Saito E., Saito N., and Suwanborirux K. "Selective N-Demethylation by using Cerium (IV) Ammonium Nitrate (CAN)" The Sixth Princess Chulabhorn International Sciences Congress, 2007. 25-29 Nov, Bangkok, Thailand.
13. **Puthongking P.**, Wangboonsakul J., and Boonyarat C., "Study of Antioxidant Activity from the Root Bark of *Clausena Harmandiana*" The 1st Seminar on Bioactive Natural products from Marine Organisms and Endophytic Fungi and the JSPS 2nd medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa science Platform Program, 2007, 25-28 Oct., Phuket, Thailand.
14. **Puthongking P.**, Patarapanich C., Amnuoyopol S., Suwanborirux K., Kubo A., and Saito N. "Preparation of 6'-O-acyl derivatives of the stable ecteinascidin and evaluation of cytotoxicity" The 7th NRCT-JSPS joint seminar recent advances in natural product research and its application, 2006, 1-4 Dec, Toyama, Japan.
15. **Puthongking P.**, Patarapanich C., Kubo A., Saito N., Suwanborirux K., and Rojsitthisak P. "Characterization and Determination of Ecteinascidins-DNA Adducts by MALDI-TOF

MS and HPLC" ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products, 2006, 23-28 July., Kyoto, Japan.

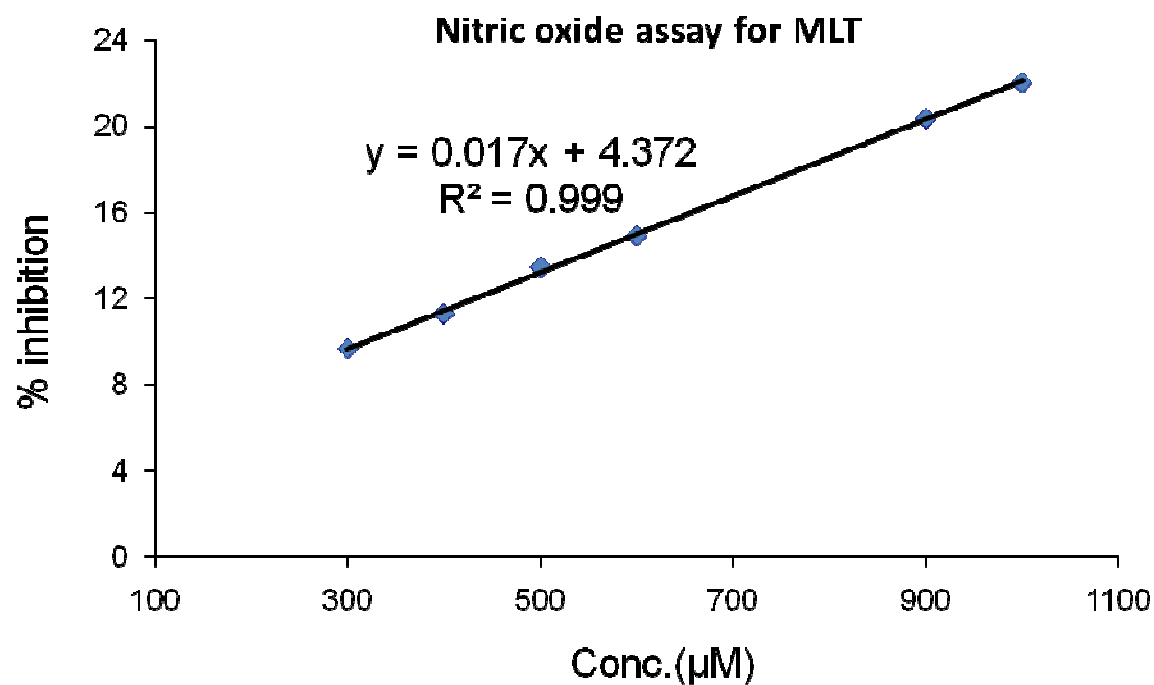
16. Patarapanich C., **Puthongking P.**, Jianmongkol S., Suksaard T., Pummangura S., Saito N., and Kubo A. "Synthesis and antispasmodic activity of 3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives" The 19th Annual Research Meeting in Pharmaceutical Sciences. 2002, 4 Dec., Bangkok, Thailand.
17. Patarapanich C., **Puthongking P.**, Pummangura S., Saito N. and Kubo A. "Synthesis of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives through cyclization of *N,O*-acetals" The 5th NRCT-JSPS joint seminar (Natural Medicine), 2000, 15-17 Nov., Bangkok, Thailand.

งานประชุมวิชาการระดับชาติ

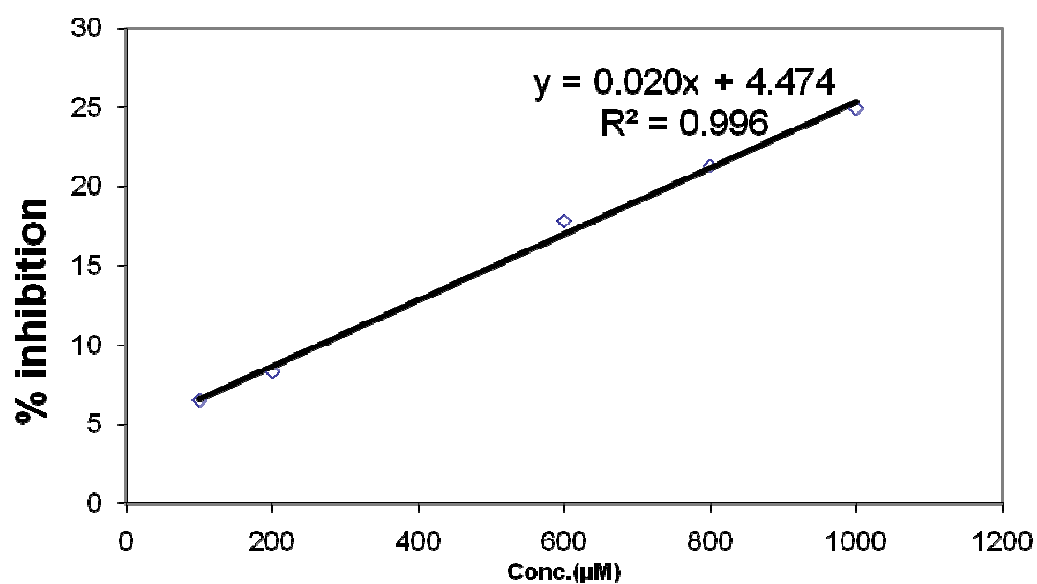
1. C Pipatwatcharadate, P Mahakunakorn, **P Puthongking**. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Melatonin and its Derivatives. The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 "Pharmacy Profession in Harmony" 2555, 11-12 ก.พ. หน้า 252(OP-PS-012-KKU).
2. P Ruangrit, **P Phuthongking**, P Mahakunakorn. Efficiency of Side-dishes Vegetable on Antioxidant Activities. The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 "Pharmacy Profession in Harmony". 2555, 11-12 ก.พ. หน้า 253(OP-PS-017-KKU).

ภาคผนวก 1

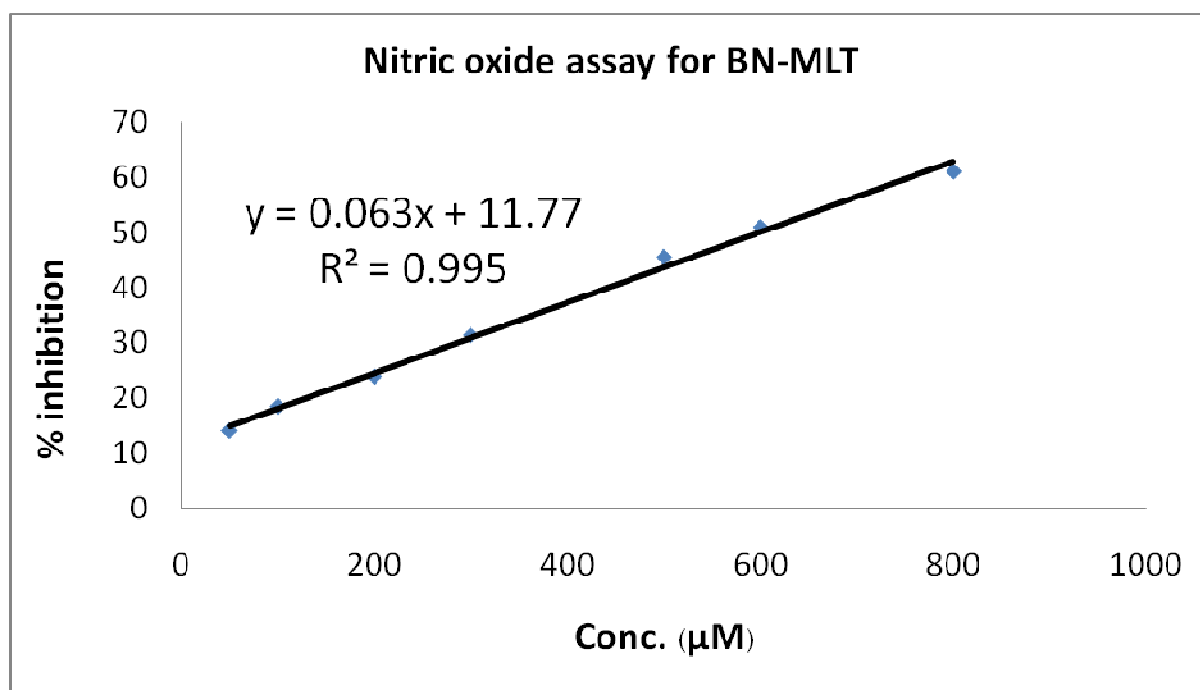
ผลการทดลอง Nitric oxide assay



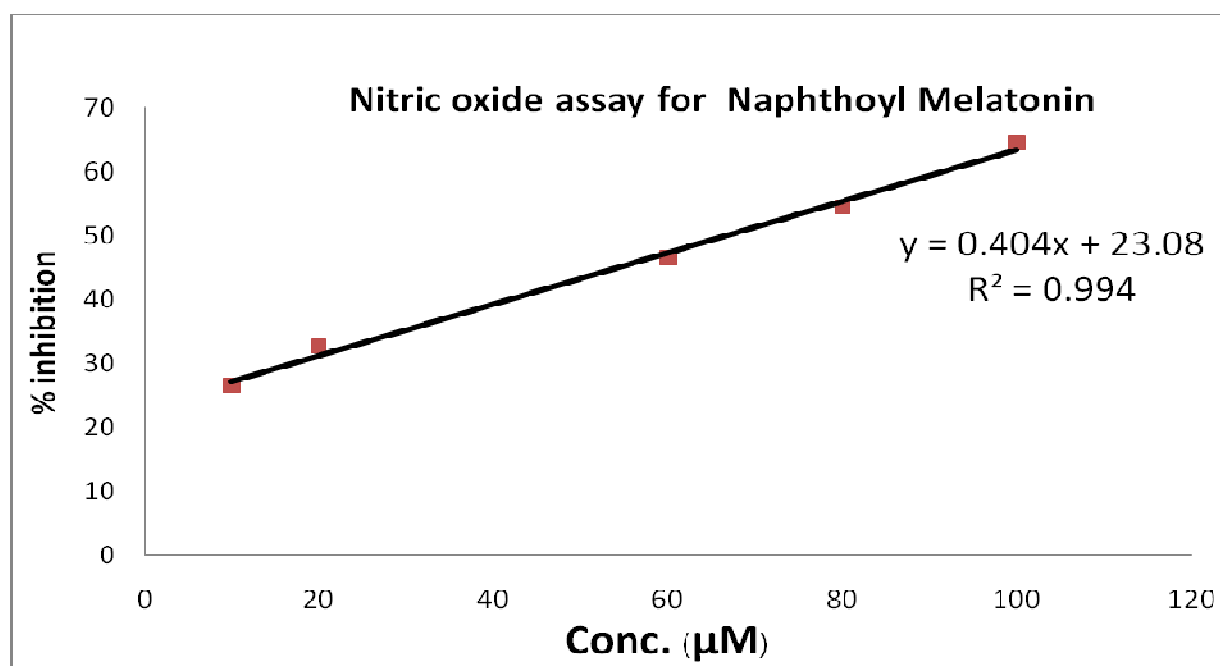
รูปที่ 22 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของ melatonin จาก nitric oxide assay



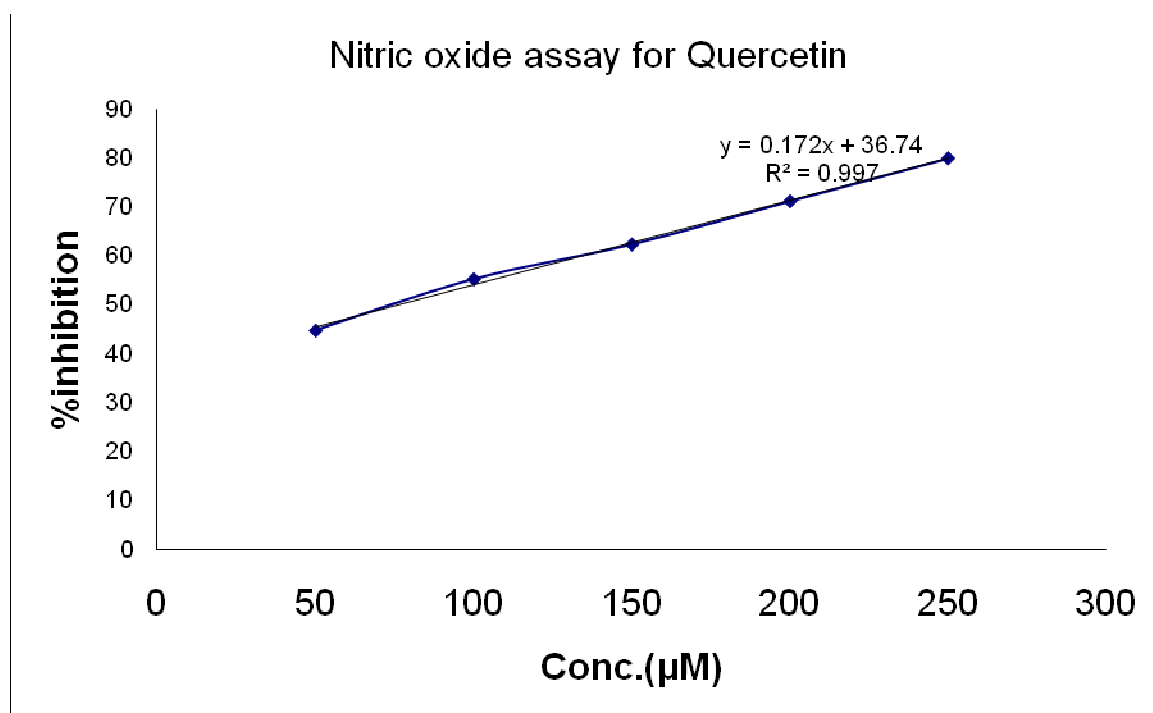
รูปที่ 23 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของ melatonin acetate จาก nitric oxide assay



รูปที่ 24 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของ benzoyl melatonin จาก nitric oxide assay

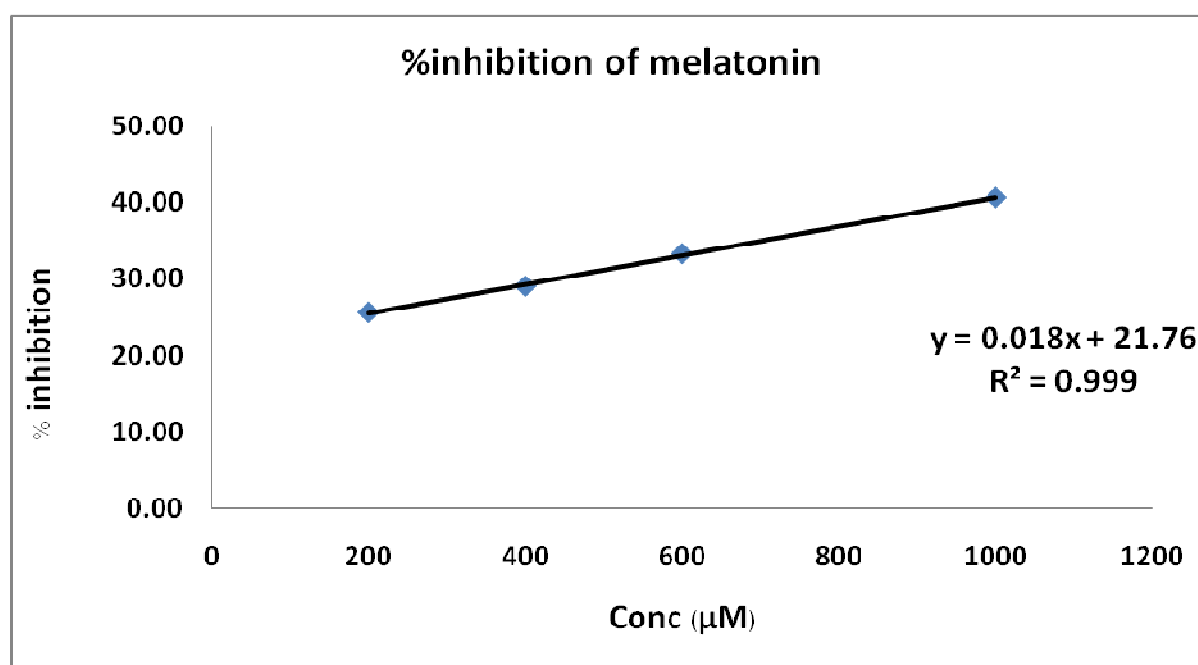


รูปที่ 25 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของ naphthoyl melatonin จาก nitric oxide assay

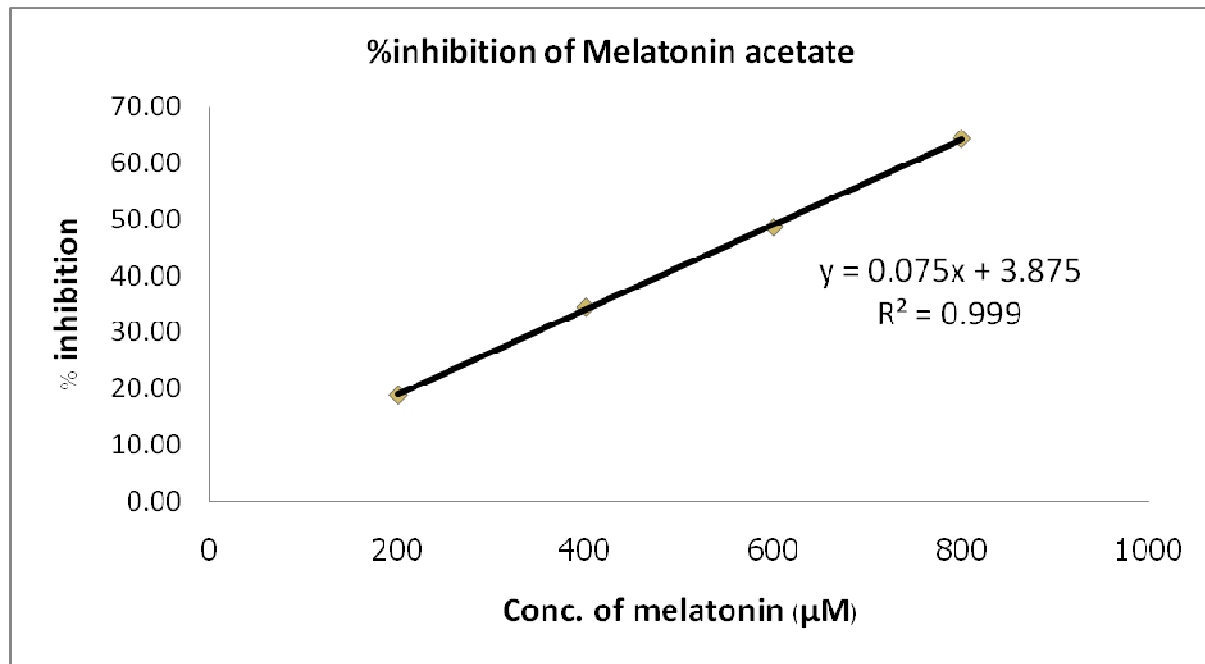


รูปที่ 26 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของ Quercetin จาก nitric oxide assay

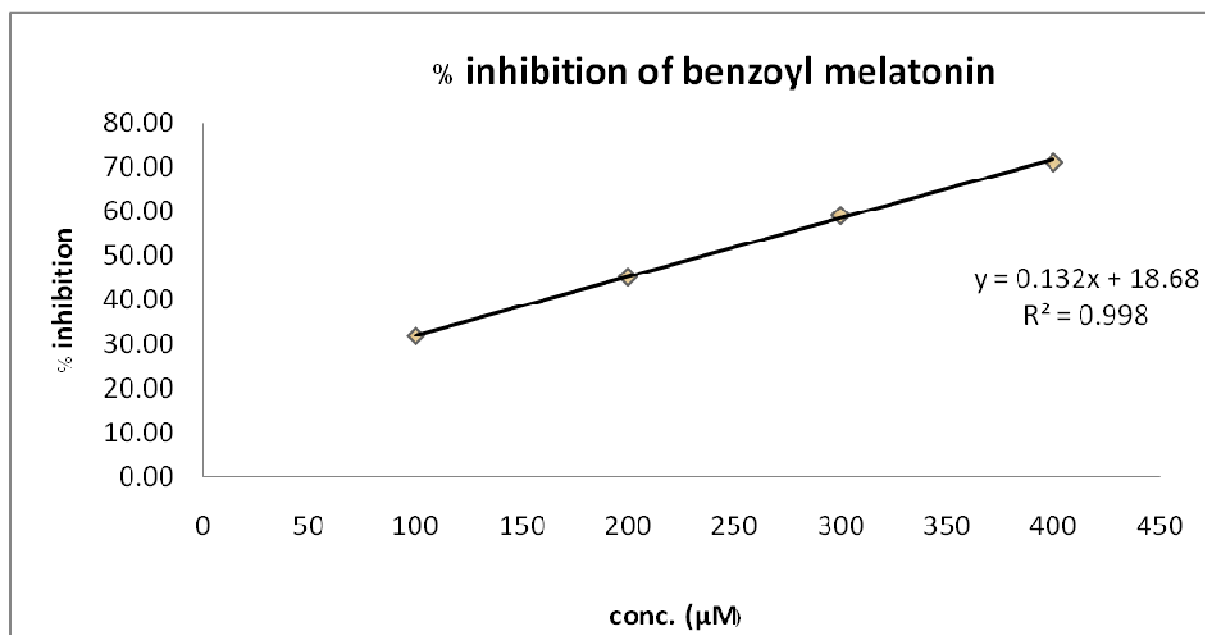
กราฟผลการทดลอง TBAR assay



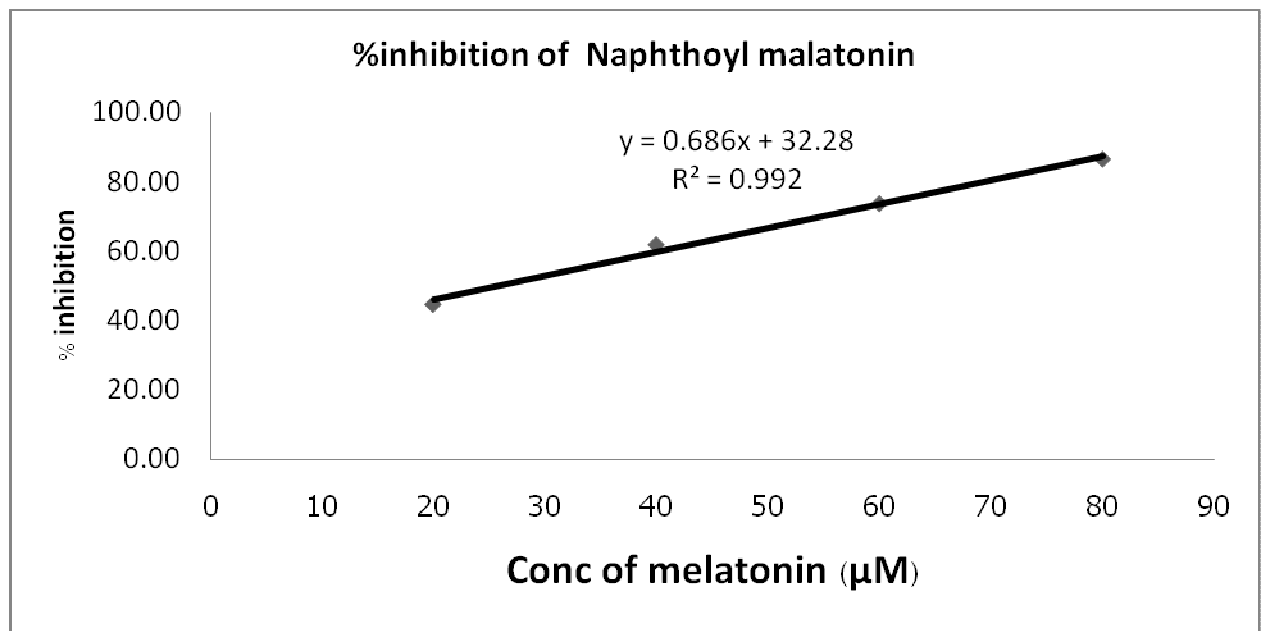
รูปที่ 27 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของ melatonin จาก TBAR assay



รูปที่ 28 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของ melatonin acetate จาก TBAR assay



รูปที่ 29 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของ benzoyl melatonin จาก TBAR assay



รูปที่ 30 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของ naphthoyl melatonin จาก TBAR assay

ภาคผนวก 2