

สารอนุพันธ์เบนซิลและเบนโซอิลของเคอร์คูมิน ในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ฮิสโตนดีอะซิติเลส

Benzyl and Benzoyl Derivatives of Curcumin as Histone Deacetylase Inhibitors

อภิชาติ มีพรหม (Apichat Meeprom)* ละออ สมสกีสิทธิ์ (La-or Somkakeesit)**

ดร.ธนเศรษฐ์ เสนาวงศ์ (Dr.Thanaset Senawong)*** ดร.ชนกพร เผ่าศรี (Dr.Chanokbhorn Phaosiri)****

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ คือ เพื่อสกัดแยกสารเคอร์คูมินจากขมิ้นชัน ทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้อยู่ในรูปสารอนุพันธ์ และนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์ฮิสโตนดีอะซิติเลส มีการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ จากผลการทดลองพบว่าสามารถสกัดแยกสารหลักจากขมิ้นชันได้ 2 สาร ได้แก่ เคอร์คูมิน (1) และ บิสดิเมทอกซีเคอร์คูมิน (2) การตรวจสอบความบริสุทธิ์ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารเคอร์คูมิน โดยใช้ปฏิกิริยาเบนซิลเลชันและปฏิกิริยาเบนโซอิลเลชัน สามารถสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของเคอร์คูมินได้ 4 สาร ได้แก่ สาร 3, 4, 5 และ 6 เมื่อนำสารอนุพันธ์ทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์ฮิสโตนดีอะซิติเลสเปรียบเทียบกับสารเคอร์คูมิน พบว่าสาร 3 และ 4 มีค่าการคงอยู่ของเอนไซม์ฮิสโตนดีอะซิติเลส เท่ากับ $17 \pm 0.32\%$ และ $20 \pm 1.21\%$ ตามลำดับ ในขณะที่เคอร์คูมิน (1) มีค่าการคงอยู่ $33 \pm 0.25\%$ สารอนุพันธ์ทั้งสองสารสามารถเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ฮิสโตนดีอะซิติเลสที่ดีกว่าสารตั้งต้นที่เป็นเคอร์คูมิน (1)

ABSTRACT

The objectives of this study were to isolate curcumin (1) from turmeric, modify curcumin into derivatives and test biological activity of the curcumin derivatives as histone deacetylase inhibitors. Column chromatography technique was used to purify the compounds. Two major compounds from turmeric were isolated as curcumin (1) and bisdemethoxycurcumin (2). Verification of the purity was carried out by the thin layer chromatography technique. The structural modifications of curcumin (1) by benzylation and benzoylation reactions were performed to provide four derivatives of curcumin (3, 4, 5 and 6). All the derivatives were tested as histone deacetylase inhibitors in comparison with curcumin (1). The compounds 3 and 4 showed histone deacetylase remaining values of $17 \pm 0.32\%$ and $20 \pm 1.21\%$, respectively, whereas curcumin (1) had the remaining value of $33 \pm 0.25\%$. Both derivatives acted as better histone deacetylase inhibitors than the lead compound, curcumin (1).

คำสำคัญ: เคอร์คูมิน สารอนุพันธ์ เอนไซม์ฮิสโตนดีอะซิติเลส

Keywords: Curcumin, Derivatives, Histone deacetylase

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสำหรับครู คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**นักศึกษา หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

****ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

โรคมะเร็งเกิดจากความผิดปกติของเซลล์ภายในอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย โดยเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์ จึงทำให้เซลล์ที่มีความผิดปกติสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว (มะเร็งวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย, 2552) สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ร่างกาย คือ การทำงานที่ไม่สมดุลกันของเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ฮิสโตนดีอะซีทิลเลส (histone deacetylase, HDACs) และเอนไซม์ฮิสโตนอะซีทิลทรานส์เฟอเรส (histone acetyltransferases, HATs) โดยพบว่า ในกรณีที่ร่างกายมีการทำงานของ HDACs มากเกินไปจะทำให้ HDACs ไปดึงหมู่อะซีทิล (acetyl group) ออกจากโปรตีนฮิสโตน (histone) ทำให้สายดีเอ็นเอเกิดการรัดตัวแน่นกับโปรตีนฮิสโตนจึงไม่เกิดการคลายตัว ส่งผลให้ transcription factor ไม่สามารถเข้าไปจับกับสายของดีเอ็นเอและไม่เกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) ได้ซึ่งกระบวนการถอดรหัสของเซลล์นี้ มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์ (cell cycle) และกระบวนการเซลล์เดี่ยวแตกตายเอง (apoptosis) (You et al., 2014) จากสาเหตุที่กล่าวมาข้างต้น การทำงานของ HDACs ที่ผิดปกติจึงเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่น่าสู่การเป็นโรคมะเร็งที่สุดในการศึกษาเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ฮิสโตนดีอะซีทิลเลส (histone deacetylase inhibitors, HDACIs) สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ short chain fatty acid, hydroxamic acid, benzamides, cyclic peptides และกลุ่มอื่นๆ อย่างไรก็ตามสารยับยั้งที่ได้จากการสังเคราะห์อาจส่งผลข้างเคียงต่อร่างกายได้ ดังนั้นการเลือกใช้สารยับยั้งที่มีผลข้างเคียงน้อยหรือสารที่ได้จากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ (Liu et al., 2006)

ขมิ้นชัน (turmeric) เป็นพืชที่คนไทยนิยมใช้เป็นยาสมุนไพรมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน โดยส่วนใหญ่จะนำส่วนเหง้ามาใช้ทำเป็นยาพื้นบ้านในการรักษาโรค (Suksamrarn et al., 2010) ด้วยสรรพคุณของขมิ้นชันที่มีอย่างหลากหลายทำให้นักวิจัยทั่วโลกมีความสนใจที่จะศึกษาสารสกัดที่ได้จากขมิ้นชัน ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่มของสารเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) และมีความไม่เป็นพิษ (non-toxic) จึงนำสู่การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) (Kumboonma et al., 2019) ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) (Peret-Almeida et al., 2005) ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) (Edwards et al., 2017) ฤทธิ์ในการต้านโรคอัลไซเมอร์ (anti-Alzheimer's disease) (Narlawar et al., 2008) และฤทธิ์ในการต้านโรคมะเร็ง (anticancer activity) (Panahi et al., 2014) อย่างไรก็ตามสารผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากขมิ้นชัน ถึงแม้จะมีข้อดีและสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย แต่ยังมีข้อด้อยในเรื่องการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย และการถูกขับออกโดยผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมที่ค่อนข้างรวดเร็ว รวมถึงมีฤทธิ์ทางยาที่ยังไม่ดีเท่าที่ควรจึงนำสู่การพัฒนาและปรับเปลี่ยนโครงสร้างในรูปสารอนุพันธ์ (derivatives) เพื่อปรับปรุงข้อด้อยของสารเหล่านี้

ในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาการแยกสารเคอร์คูมินจากขมิ้นชัน และการปรับเปลี่ยนโครงสร้างในรูปสารอนุพันธ์จากเคอร์คูมิน เพื่อใช้ในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ฮิสโตนดีอะซีทิลเลส และเพื่อเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่ต้องการศึกษาในการผลิตยาในการยับยั้งโรคมะเร็งต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อสกัดและแยกสารเคอร์คูมินจากขมิ้นชัน
2. เพื่อศึกษาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารเคอร์คูมิน
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ของเคอร์คูมิน ในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ฮิสโตนดีอะซีทิลเลส

วิธีการวิจัย

เครื่องมือและสารเคมี

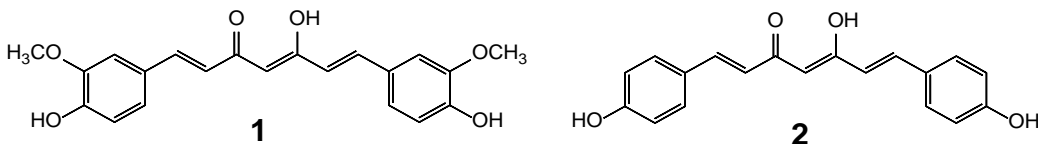
สารเคมีที่ใช้ในการทดลองซื้อได้จากบริษัท Sigma-Aldrich, Merck, Fisher Scientific และ Carlo Erba ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาหรือสารบริสุทธิ์ สามารถแยกได้โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ซึ่งใช้ซิลิกาเจล (silica gel) 60 (Merck) ที่มีความละเอียด 230 – 400 mesh เป็นตัวดูดซับ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography, TLC) และนำไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยเครื่องมือทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ เครื่อง NMR รุ่น Bruker AM 400 และเครื่อง IR รุ่น Nicolet 5DXB FT-IR spectrophotometer

การสกัดสารจากขมิ้นชัน

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ซื้อผงขมิ้นชันแห้งจากตลาด อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น จำนวน 1 กิโลกรัม นำมาบรรจุลงในถุงผ้าขาวบางและทำการแช่สกัด โดยนำผงขมิ้นชันที่บรรจุในถุงผ้าขาวบางใส่ลงในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทเติมตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนจนท่วมประมาณ 1 ลิตร ทำการคนให้เข้ากันและแช่สกัดทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน ในระหว่างการแช่สกัดต้องมีการคนให้ตัวทำละลายสามารถละลายสารจากผงขมิ้นชันออกมาให้ได้ปริมาณมากที่สุด เมื่อครบ 3 วันทำการกรองสารละลายเพื่อแยกกากออกแล้วนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ทำให้ได้ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน จากนั้นนำกากที่เหลือมาทำการแช่สกัดด้วยตัวทำละลายอีก 2 ครั้ง ทำให้ได้ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจำนวน 75.5 กรัม คิดเป็นร้อยละผลได้ เท่ากับ 7.75 เปอร์เซ็นต์

การแยกสารให้บริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน

ทำการแบ่งจากส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนมาจำนวน 20 กรัม เพื่อทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับหรือวัสดุภาคหนึ่ง และใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะหรือวัสดุภาคเคลื่อนที่ ทำการเก็บสารละลายตัวอย่างให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยขวดรูปชมพู่แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และตรวจสอบสารละลายที่ได้ด้วยซิลิกาเจลแบบแผ่นบาง ทำการรวม fraction ที่เหมือนกันเข้าด้วยกันจะได้สารบริสุทธิ์ที่เป็นสารผลิตภัณฑ์หลัก (major product) คือ สารเคอร์คูมิน (curcumin) (1) จำนวน 3.33 กรัม คิดเป็นร้อยละผลได้ เท่ากับ 16.65 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ในอัตราส่วน 95:5 และ 90:10 ตามลำดับ ทำเช่นเดียวกันกับวิธีแยกสารเคอร์คูมินจะได้สารบริสุทธิ์ที่เป็นสารผลิตภัณฑ์รอง (minor product) 1 สาร คือ บีสดีเมทอกซีเคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin) (2) จำนวน 0.82 กรัม คิดเป็นร้อยละผลได้ เท่ากับ 4.07 เปอร์เซ็นต์ และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ส่งพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR, ¹³C-NMR และ FTIR ต่อไป



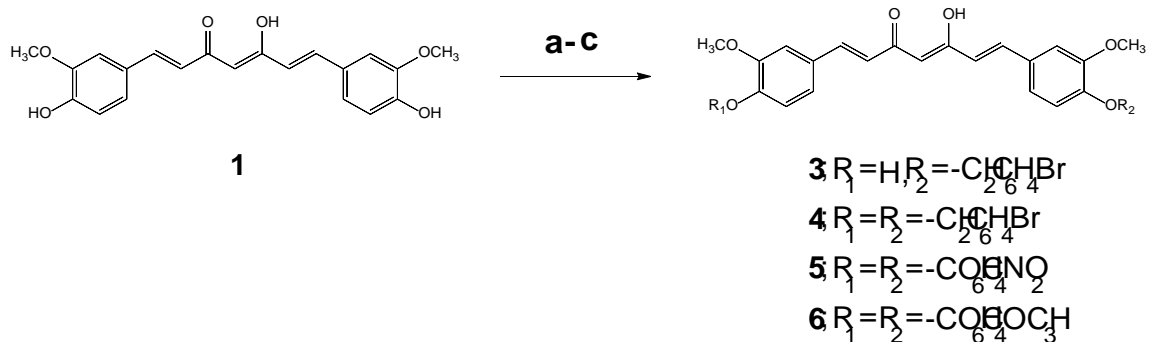
ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารเคอร์คูมินและบีสดีเมทอกซีเคอร์คูมิน

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารเคอร์คูมิน

1. ปฏิกิริยาเบนซิลเลชัน (benzylation reaction) ของสารเคอร์คูมินด้วย 4-โบรโมเบนซิล โบรไมด์ ($\text{BrC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{Br}$) ซึ่งสารเคอร์คูมิน จำนวน 0.250 กรัม (0.678 มิลลิโมล) บรรจุลงในขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเติมสารโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) จำนวน 0.187 กรัม (1.356 มิลลิโมล) นำไปปั่นด้วยเครื่องกวนสารด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสาร 4-โบรโมเบนซิล โบรไมด์ จำนวน 0.338 กรัม (1.356 มิลลิโมล) ลงในขวดก้นกลม ให้ความร้อนที่ 90°C (reflux) ติดตามปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC ด้วยระบบ เฮกเซน: เอทิลอะซิเตต (7:3) เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ จึงทำการหยุดปฏิกิริยา (work up) ด้วยการเติมน้ำกลั่นและสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) จำนวน 3 ครั้ง ในกรวยแยก ทำการรวมแต่ละส่วนสกัดเข้าด้วยกัน เติมสารโซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส (Na_2SO_4 anhydrous) เพื่อดูดความชื้นที่ปนอยู่ในสารละลาย จากนั้นระเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ นำไปแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และส่งพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค FTIR, $^1\text{H-NMR}$, และ $^{13}\text{C-NMR}$ ต่อไป

2. ปฏิกิริยาเบนโซอิลเลชัน (benzoylation reaction) ของสารเคอร์คูมินด้วย 4-ไนโตรเบนโซอิล คลอไรด์ ($\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COCl}$) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เหมือนกับปฏิกิริยาเบนซิลเลชัน ของสารเคอร์คูมิน ด้วย 4-โบรโมเบนซิล โบรไมด์ แต่เปลี่ยนรีเอเจนต์ เป็นสาร 4-ไนโตรเบนโซอิล คลอไรด์ จำนวน 0.252 กรัม (1.356 มิลลิโมล) และใช้สารไตรเอทิลลามีน ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$, TEA) ปริมาตร 0.190 มิลลิลิตร (1.356 มิลลิโมล) แทนสารโพแทสเซียมคาร์บอเนตตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

3. ปฏิกิริยาเบนโซอิลเลชัน (benzoylation reaction) ของสารเคอร์คูมินด้วย 4-เมทอกซีเบนโซอิล คลอไรด์ ($\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{COCl}$) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เหมือนกับปฏิกิริยาเบนโซอิลเลชัน ของสารเคอร์คูมิน ด้วย 4-ไนโตรเบนโซอิล คลอไรด์ แต่เปลี่ยนรีเอเจนต์ เป็นสาร 4-เมทอกซีเบนโซอิล คลอไรด์ ปริมาตร 1.835 มิลลิลิตร (1.356 มิลลิโมล)



ภาพที่ 2 โครงสร้าง 3 – 4 a) ปฏิกิริยาเบนซิลเลชันของเคอร์คูมิน ด้วย 4-โบรโมเบนซิล โบรไมด์, K_2CO_3 , reflux, โครงสร้าง 5 b) ปฏิกิริยาเบนโซอิลเลชันของเคอร์คูมิน ด้วย 4-ไนโตรเบนโซอิล คลอไรด์, TEA, อุณหภูมิห้อง, โครงสร้าง 6 c) ปฏิกิริยาเบนโซอิลเลชันของเคอร์คูมิน ด้วย 4-เมทอกซีเบนโซอิล คลอไรด์, TEA, อุณหภูมิห้อง

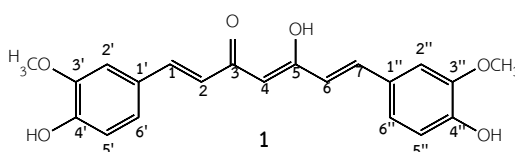
การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ฮีสโทนดีอะซีทิลเลส

ปิเปต สารบัฟเฟอร์ (buffer) เอนไซม์ฮีสโทนดีอะซีทิลเลส และสารยับยั้งเอนไซม์ฮีสโทนดีอะซีทิลเลส ปริมาตร 19, 1 และ 5 ไมโครลิตร ตามลำดับ ใส่ลงไปในแต่ละช่องเรียงตามลำดับ และนำไปบ่ม (incubate) ที่ 37°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาเติมสารตั้งต้น (substrate) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในแต่ละช่อง นำไปบ่ม ที่ 37°C เป็นเวลา

15 นาที เติม developer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในแต่ละช่อง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดด้วยเครื่อง Fluorescence Spectrometer ที่ emission 340 nm และ excitation 460 nm แล้วนำผลที่ได้มาหาเปอร์เซ็นต์การคงอยู่ของเอนไซม์ฮิสโตนดีอะซิติลเลส (% HDAC remaining) (Itoh Y *et al.*, 2016)

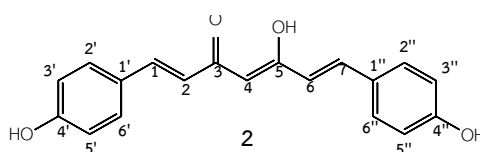
ผลการวิจัย

การสกัดสารจากขมิ้นชันโดยทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์จากขมิ้นชันได้ 2 สาร ได้แก่ สารเคอร์คูมิน (1) และ บีสตีเมทอกซีเคอร์คูมิน (2) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC ในระบบ 1% เมทานอล: ไดคลอโรมีเทน แสดงค่า R_f เท่ากับ 0.55, 0.35 ตามลำดับ แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค FTIR, $^1\text{H-NMR}$, และ $^{13}\text{C-NMR}$ ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 3 โครงสร้างของสารเคอร์คูมิน

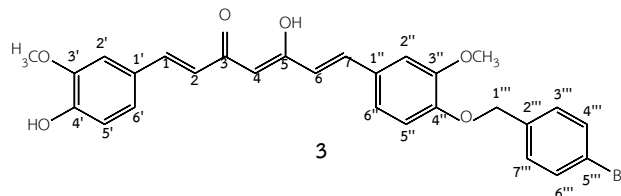
(1*E*,4*Z*,6*E*)-5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,4,6-trien-3-one (1); (3.33 g, 17%); R_f = 0.55 (1% MeOH in CH_2Cl_2) IR (neat) ν_{max} 3277 (OH), 1606 (C=O), 1505 (Ar), 1425 (Ar), 1263 (C-O) cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.50 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 7.01 (m, 4H), 6.81 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.41 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 5.76 (s, 1H), 3.86 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 182.96 (C-3 & C-5), 148.43 (C-3' & C-3''), 147.45 (C-4' & C-4''), 140.78 (C-1 & C-7), 127.23 (C-1' & C-1''), 122.84 (C-6' & C-6''), 121.23 (C-2 & C-6), 115.20 (C-5' & C-5''), 110.14 (C-2' & C-2''), 101.04 (C-4), 55.75 (2OCH₃).



ภาพที่ 4 โครงสร้างของสารบีสตีเมทอกซีเคอร์คูมิน

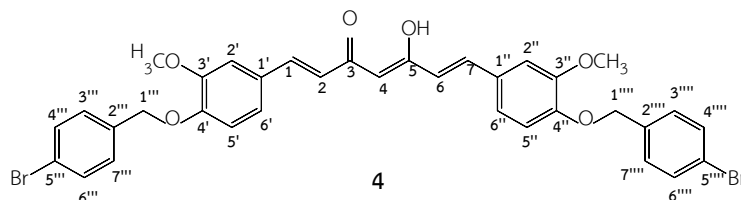
(1*E*,4*Z*,6*E*)-5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)hepta-1,4,6-trien-3-one (2); (0.82 g, 4%); R_f = 0.35 (1% MeOH in CH_2Cl_2) IR (neat) ν_{max} 3221 (OH), 1559 (C=O), 1515 (Ar), 1432 (Ar), 1234 (C-O) cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.55 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 6.80 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 6.56 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 5.90 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 183.38 (C-3 & C-5), 159.63 (C-4' & C-4''), 140.41 (C-1 & C-7), 129.72 (C-2', C-2'', C-6' & C-6''), 126.58 (C-1' & C-1''), 120.56 (C-2 & C-6), 115.46 (C-3' & C-3''), 100.46 (C-4).

การศึกษาปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารเคอร์คูมินโดยใช้ปฏิกิริยาเบนซิลเลชันและปฏิกิริยาเบนโซอิลเลชันสามารถสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของเคอร์คูมินได้ 4 สาร ได้แก่ สาร 3, 4, 5 และ 6 แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค FTIR, ¹H-NMR, และ ¹³C-NMR ดังต่อไปนี้



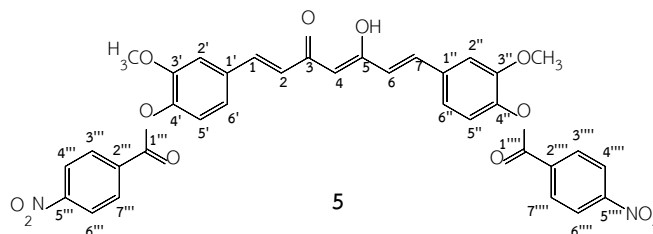
ภาพที่ 5 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ของเคอร์คูมิน 3

(1E,4Z,6E)-7-(4-((4-Bromobenzyl)oxy)-3-methoxyphenyl)-5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,4,6-trien-3-one (**3**); (115 mg, 32%); $R_f = 0.50$ (hexane: ethylacetate 7:3) IR (neat) ν_{\max} 3230 (OH), 1575 (C=O), 1515 (Ar), 1440 (Ar), 1261 (C-O) cm^{-1} . ¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.57 (d, $J = 15.8$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.10 - 7.02 (m, 4H), 6.91 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 15.8$ Hz, 2H), 5.79 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 3.91 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 183.7 (C-3), 182.9 (C-5), 149.9 (C-3'), 149.8 (C-3''), 148.0 (C-4''), 146.9 (C-4'), 140.8 (C-1), 140.2 (C-7), 135.7 (C-2'''), 131.8 (C-4'''' & 6'''), 129.0 (C-3'''' & 7'''), 128.8 (C-1'''), 127.6 (C-1'), 123.0 (C-2), 122.3 (C-6'' & C-6'), 122.03 (C-5'''), 121.7 (C-6), 114.9 (C-5''), 113.6 (C-5'), 110.5 (C-2''), 109.8 (C-2'), 101.4 (C-4), 70.2 (C-1'''), 56.1 (OCH₃), 56.0 (OCH₃). HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}+2\text{H}]^+$ calcd for 561.0889, found 561.0717.



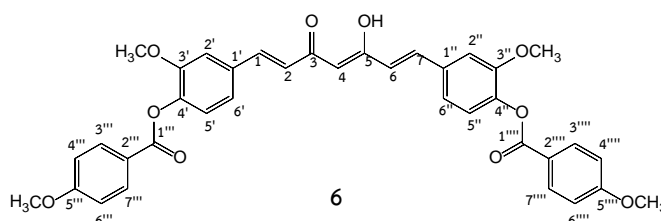
ภาพที่ 6 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ของเคอร์คูมิน 4

(1E,4Z,6E)-5-Hydroxy-1,7-bis(3-methoxy-4-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)hepta-1,4,6-trien-3-one (**4**); (98 mg, 21%); $R_f = 0.70$ (hexane: ethylacetate 7:3) IR (neat) ν_{\max} 3235 (OH), 1586 (C=O), 1527 (Ar), 1451 (Ar), 1258 (C-O) cm^{-1} . ¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.58 (d, $J = 15.6$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 8.4$ Hz, 4H), 7.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 4H), 7.05 - 7.08 (m, 4H), 6.84 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.48 (d, $J = 15.8$ Hz, 2H), 5.80 (s, 1H), 5.13 (s, 4H), 3.93 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 183.3 (C-3 & C-5), 150.0 (C-3' & C-3''), 149.9 (C-4' & C-4''), 140.4 (C-1 & C-7), 135.7 (C-2'''' & C-2'''''), 131.9 (C-4''''', C-4''''', C-6'''' & C-6'''''), 129.0 (C-3''''', C-3''''', C-7'''' & C-7'''''), 128.8 (C-1' & C-1''), 122.4 (C-2, C-6, C-6' & C-6''), 122.1 (C-4'''' & C-4'''''), 113.7 (C-5' & C-5''), 110.6 (C-2' & C-2''), 101.5 (C-4), 70.3 (C-1'''' & C-1'''''), 56.0 (2OCH₃). HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}+2\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{30}\text{Br}_2\text{O}_6$ 729.0463, found 729.0337.



ภาพที่ 7 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ของเคอร์คูมิน 5

((1E,3Z,6E)-3-Hydroxy-5-oxohepta-1,3,6-triene-1,7-diy)bis(2-methoxy-4,1-phenylene)bis(4-nitrobenzoate) (5); (156 mg, 35%); (hexane: ethylacetate 7:3) IR (neat) ν_{\max} 3238 (OH), 1592 (C=O), 1535 (Ar), 1462 (Ar), 1256 (C-O) cm^{-1} . ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 8.43 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 8.37 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 7.70 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.61 (s, 2H), 7.41 – 7.38 (m, 4H), 7.06 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 6.23 (s, 1H), 3.86 (s, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 183.3 (C-3 & C-5), 162.5 (C-1''' & C-1''''), 151.3 (C-5''' & C-5''''), 150.5 (C-3' & C-3''), 140.9 (C-1 & C-7), 140.0 (C-4' & C-4''), 134.5 (C-2''' & C-2''''), 133.9 (C-1' & C-1''), 131.7 (C-3''', C-3''''', C-7''' & C-7'''''), 125.2 (C-2 & C-6), 124.2 (C-4''', C-4''''', C-6''' & C-6'''''), 123.6 (C-5' & C-5''), 121.7 (C-6', C-6''), 112.2 (C-2', C-2''), 102.2 (C-4), 56.4 (2OCH₃).



ภาพที่ 8 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ของเคอร์คูมิน 6

((1E,3Z,6E)-3-Hydroxy-5-oxohepta-1,3,6-triene-1,7-diy)bis(2-methoxy-4,1-phenylene)bis(4-methoxybenzoate) (6); (236 mg, 55%); (hexane: ethylacetate 7:3) IR (neat) ν_{\max} 3225 (OH), 1587 (C=O), 1528 (Ar), 1450 (Ar), 1248 (C-O) cm^{-1} . ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 8.07 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 7.68 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.56 (s, 2H), 7.39 – 7.28 (m, 4H), 7.12 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 7.03 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 6.22 (s, 1H), 3.87 (s, 6H), 3.83 (s, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 183.9 (C-3 & C-5), 164.5 (C-1''' & C-1''''), 164.2 (C-5''' & C-5''''), 152.0 (C-3' & C-3''), 141.8 (C-4' & C-4''), 140.6 (C-1 & C-7), 134.4 (C-1' & C-1''), 132.8 (C-3''', C-3''''', C-7''' & C-7'''''), 125.3 (C-5', C-5''), 124.3 (C-2, C-6), 122.2 (C-2''' & C-2''''), 121.0 (C-6' & C-6''), 115.0 (C-4''', C-6''', C-4'''' & C-6''''), 112.7 (C-2' & C-2''), 102.5 (C-4), 56.7 (2OCH₃), 56.3 (2OCH₃).

การศึกษากฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์เคอร์คูมินในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ฮีสโทนดีอะซีทิลเลสแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การคงอยู่ของเอนไซม์ฮีสโทนดีอะซีทิลเลส (% HDAC remaining) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลเปอร์เซ็นต์การคงอยู่ของเอนไซม์ฮีสโทนดีอะซีทิลเลสของเคอร์คูมินและสารอนุพันธ์เคอร์คูมินที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

Inhibitors	HDAC inhibition test	
	Reading	% HDAC remaining*
No inhibitor	11743.20	100 ± 0.00
DMSO	7009.99	59 ± 0.36
TSA	1521.52	13 ± 0.26
1	3876.00	33 ± 0.25
3	1982.45	17 ± 0.32
4	2393.82	20 ± 1.21
5	5994.40	51 ± 0.17**
6	6097.56	52 ± 0.68**

หมายเหตุ: * % HDAC remaining = (reading sample/reading No inhibitor) x 100

** ตกตะกอนเมื่อเติมเอนไซม์

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการสกัดสารจากขมิ้นชันสามารถแยกสารจากขมิ้นชันได้ 2 สาร ได้แก่ เคอร์คูมิน เป็นสารผลิตภัณฑ์หลัก และ บีสดีเมทอกซีเคอร์คูมิน เป็นสารผลิตภัณฑ์รอง ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง ในระบบ 1% เมทานอล: ไดคลอโรมีเทน แสดงค่า R_f เท่ากับ 0.55 และ 0.35 ตามลำดับ และทำการศึกษการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารเคอร์คูมิน โดยการสังเคราะห์ให้อยู่ในรูปสารอนุพันธ์ของเคอร์คูมินด้วยปฏิกิริยาเบนซิลเลชันและปฏิกิริยาเบนโซอิลเลชัน สามารถสังเคราะห์สารอนุพันธ์ได้ 4 สาร ได้แก่ สาร 3, 4, 5 และ 6 ด้วยร้อยละผลได้เท่ากับ 32%, 21%, 35% และ 55% ตามลำดับ เมื่อนำสารอนุพันธ์ทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์ฮีสโทนดีอะซีทิลเลส พบว่าสาร 3 และ 4 มีเปอร์เซ็นต์การคงอยู่ของเอนไซม์ฮีสโทนดีอะซีทิลเลสน้อยกว่าสารเคอร์คูมิน ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งสรุปได้ว่าสาร 3 และ 4 มีแนวโน้มที่จะเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ฮีสโทนดีอะซีทิลเลสที่ดีกว่าสารเคอร์คูมิน ในขณะที่สาร 5 และ 6 มีเปอร์เซ็นต์การคงอยู่ของเอนไซม์ฮีสโทนดีอะซีทิลเลสที่สูงกว่าสารเคอร์คูมิน และเกิดการตกตะกอนขณะทดสอบ ดังนั้นสารอนุพันธ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเบนซิลเลชันของเคอร์คูมิน จึงมีความเหมาะสมที่จะได้รับการพัฒนาไปเป็นยาต้านมะเร็งได้ดีกว่าสารอนุพันธ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเบนโซอิลเลชัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และสาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการตลอดการศึกษาในครั้งนี้ ขอขอบคุณคุณกิตติศักดิ์ ภูผาสีหิธี สำหรับข้อมูล NMR

เอกสารอ้างอิง

- มะเร็งวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย. ทำความรู้จักกับโรคมะเร็งกันเถอะ. พิมพ์ครั้งที่ 1. American Cancer Society และ Pfizer Foundation; 2552.
- Edwards RL, Luis PB, Varuzza PV, Joseph AL, Presley SH, Chaturvedi R, Schneider C. The anti-inflammatory activity of curcumin is mediated by its oxidative metabolites. *The Journal of Biological Chemistry* 2017; 292(52): 21243-21252.
- Itoh Y, Suzuki M, Matsui T, Ota Y, Hui Z, Tsubaki K, Suzuki T. False HDAC Inhibition by Aurone Compound. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2016; 64, 1124–1128.
- Kumboonma P, Senawong T, Saenglee S, Senawong G, Somsakeesit L, Yenjai C, Phaosiri C. New histone deacetylase inhibitors and anticancer agent from *Curcuma longa*. *Medicinal Chemistry Research* 2019; 28: 1773-1782.
- Liu T, Kuljaca S, Tee A, et al. Histone deacetylase inhibitor : multifunctional anticancer agents. *Cancer Treatment Reviews* 2006; 32(3): 157-165.
- Narlawar R, Pickhardt M, Leuchtenberger S, Baumann K, Krause S, Dyrks T, Weggen S, Mandelkow E, Schmidt B. Curcumin-derived pyrazole and isoxazole: Swiss army knives or blunt tools for Alzheimer's disease? *ChemMedChem* 2008; 3: 2719-2728.
- Panahi Y, Saadat A, Beiraghdar F, Nouzari SMH, Jalalian HR, Sahebkar A. Antioxidant effects of bioavailability-enhanced curcuminoids in patients with solid tumors: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Journal of Functional Foods* 2014; 6: 615–622.
- Peret-Almeida L, Cherubino APF, Alves RJ, Dufossé L, Glória MBA. (2005). Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Research International* 2005; 38: 1039–1044.
- Suksamrarn A, Changtam C, De Koning HP, Ibrahim H, Sajid S, Gould MK. Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010; 45: 941-956.
- You T, Chen K, Wang FH, Li PH, Li LYZH, Ni KH, Zheng ZQ. Design, synthesis, and biological evaluation of hydroxycinnamimide salicylic and hybrids as histone deacetylase inhibitors. *Chinese Chemical Letters* 2014; 25: 474-478.