บทที่ 5
อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

1. การแยกสารเคอร์คิวมินอยด์

สารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ประกอบด้วยเคอร์คิวมิน (1) ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (2) และบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (3) จากบริษัทเครื่องหอมไทยจีน (Thai-China Flavours and Fragrances, TCFF) นำมาแยกสารเคอร์คิวมินอยด์ออกจากกันให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดหยาบ และตัวชะเป็นไดคลอโรมีเทนในการเตรียมคอลัมน์และชะสาร 1 ออกมาก่อนเกือบหมด จากนั้นจึงใช้ตัวชะเป็นตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเมทานอล โดยค่อย ๆ เพิ่มความมีขั้วจะได้สาร 2 และ 3 ออกมาตามลำดับ สารเคอร์คิวมินอยด์ทั้งสามชนิดที่แยกได้ตรวจสอบโครงสร้างโดยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปีและแมสสเปกโตรสโกปี พบว่าสอดคล้องกับสารที่เคยรายงานแล้ว

2. การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์

ได้ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์ทั้งสามชนิดโดยวิธีทางเคมีได้แอนาลอกทั้งหมด 16 ชนิด ซึ่งแบ่งแต่ละกลุ่มออกเป็นดังนี้

1. ดีเมทิลแอนาลอกของสาร 1 และ 2 โดยนำสาร 1 ทำปฏิกิริยาดีเมทิเลชันด้วยโบรอนไตรโบรไมด์ได้สารที่ถูกกำจัดหมู่เมทิลออกไปหนึ่งหมู่เป็นสาร 31 และสองหมู่เป็นสาร 32 ส่วนสาร 2 ทำปฏิกิริยาในทำนองเดียวกันได้สาร 33 สารที่สังเคราะห์ได้มีสภาพความมีขั้วมากกว่าสารตั้งต้นและมีการพิสูจน์โครงสร้างเรียบร้อยแล้ว
2. แอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์ที่มีเฮตเทอโรอะตอมอยู่ในโมเลกุลโดยนำสาร 1, 2 และ 3 มาทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซิลามีนไฮโดรคลอไรด์ ได้สาร 34, 35a+35b และ 36 ตามลำดับ สารที่สังเคราะห์ได้มีการพิสูจน์โครงสร้างเรียบร้อยแล้ว
3. อัลคิลอีเทอร์แอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์ โดยสาร 1 ทำปฏิกิริยากับ 1,5-ไดโบรโมเพนเทน ได้สาร 37 และ 38 ในทำนองเดียวกันได้เตรียมสารโบรโมเพนทิลสาร 2 ได้สาร 39, 40 และ 41 ส่วนโบรโมเพนทิลแอนาลอก 42 และ 43 เตรียมได้จากสาร 3 สารที่สังเคราะห์ได้มีการพิสูจน์โครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี ดังแสดงในบทที่ 4
4. พิริดิเนียมแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์ ซึ่งเป็นการเตรียมอนุพันธ์ที่มีความมีขั้วสูงสามารถละลายได้ในน้ำ โดยนำสาร 38 ทำปฏิกิริยากับพิริดีน ได้สาร 44 ส่วนสาร 41

และ **43** ทำปฏิกิริยาในทำนองเดียวกัน ได้สาร **45** และ **46** ตามลำดับสารที่สังเคราะห์ได้มีการพิสูจน์โครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีดังแสดงในบทที่ 4

2. ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของเคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอก

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 6 ชนิดแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1) แบคทีเรีย Gram-positive ประกอบด้วย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA) และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 2) แบคทีเรีย Gram-negative ประกอบด้วย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PA) และ *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC) 3) ยีสต์ ประกอบด้วย *Candida albicans* NCPF 3153 (CA) และ *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113 (CN) สารมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทั้งสามกลุ่มคือ vancomycin, gentamicin และ amphotericin B ตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเคอร์คิวมินอยด์ดังแสดงในตารางที่ 1 จะเห็นว่าสารเคอร์คิวมินอยด์ **1-3** แสดงฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทุกชนิดได้ต่ำมากหรืออาจกล่าวได้ว่าแทบไม่มีฤทธิ์ (ค่า MIC อยู่ในช่วง 200 ถึง >200 μg/ml) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่ควรนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้มาพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพในการต้านจุลินทรีย์ แอนาลอกชนิดแรกที่ปรับเปลี่ยนคือ การกำจัดหมู่เมทิลที่วงเบนซีนของสาร **1** ออกไปหนึ่งหมู่ได้สาร **31** พบว่าแสดงฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้ในระดับต่ำใกล้เคียงกับสาร **1** ยกเว้น MRSA ที่แสดงฤทธิ์ได้สูงกว่าสาร **1** มากกว่าสองเท่า (มีค่า MIC ที่ 128 μg/ml) แต่มีฤทธิ์ในการฆ่า MRSA ในระดับต่ำ (ค่า MBC >200 μg/ml) และเมื่อกำจัดหมู่เมทิลของสาร **1** ออกไปหมดได้สาร **32** แสดงฤทธิ์ต้าน MRSA และ CN ที่ MIC 200 μg/ml เพิ่มขึ้นเล็กน้อยไม่ต่างกับสาร **1** ส่วนเชื้ออื่นให้ผลลบ นั้นคือแสดงค่า MIC ที่มากกว่า 200 μg/ml การกำจัดหมู่เมทิลสาร **2** ได้สาร **33** พบว่าแสดงฤทธิ์ในการต้าน SA, MRSA และ CN มากกว่าสาร **2** มากว่าสองเท่า แต่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทั้งสามชนิดในระดับต่ำเช่นเดียวกันกับสาร **31** แสดงว่าการเพิ่มความมีขั้วให้กับสารเคอร์คิวมินอยด์และหมู่ไฮดรอกซีอิสระที่วงเบนซีนมีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์แต่ยังเห็นผลที่ไม่ชัดเจน แอนาลอกต่อมาเป็นการปรับเปลี่ยนที่หมู่คาร์บอนิลของสาร **1**, **2**, และ **3** ให้เป็นเคอร์คิวมินอยด์ไอซอกซาโซล **34**, สารผสม **35a+35b** และ **36** ตามลำดับพบว่าสาร **34** และ **36** แสดงฤทธิ์ไม่ต่างจากสารตั้งต้น ส่วนไอซอกซาโซน **35a+35b** แสดงฤทธิ์ในการต้าน SA, MRSA และ CN มากกว่าสาร **2** มากกว่า 6, 3 และ 2 เท่าตามลำดับ (มีค่า MIC ที่ 32, 64 และ 128 μg/ml) แต่ยังมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทั้งสามชนิดในระดับต่ำ เพื่อให้ผลการทดสอบที่ชัดเจนถึงความมีขั้วของเคอร์คิวมินอยด์และหมู่ไฮดรอกซีอิสระที่วงเบนซีน จึงเตรียมอัลคิลอีเทอร์แอนาลอกของสารเคอร์คิวมินอยด์ซึ่งเป็น

การลดความมีขั้วลง จากงานวิจัยของ Singh และคณะ (2010) ได้ทำการปรับเปลี่ยนที่หมู่ไฮดรอกซีของสาร **1** โดยทำปฏิกิริยากับกรดไขมันได้แอนาลอกอัลคิลเอสเทอร์ซึ่งมีความมีขั้วต่ำ พบว่าแสดงฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียได้สูงมากกว่าสาร **1** ซึ่งได้อธิบายว่าอาจมีบางส่วนของโครงสร้างที่คล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงเตรียมอนุพันธ์ของเคอร์คิวมินอยด์ที่มีขั้วต่ำโดยทำปฏิกิริยากับ 1,5-dibromopentane ได้อนุพันธ์ **37-43** พบว่าแอนาลอกเหล่านี้ไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทุกชนิด อาจเกิดจากสาเหตุเรื่องการละลายในขณะทดลอง เนื่องจากเป็นสารที่มีขั้วต่ำละลายได้น้อยและไม่ละลายน้ำจึงไม่ถูกสะสมในเซลล์ หรือมีโครงสร้างที่แตกต่างจากผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ และสารเหล่านี้มีการสร้างพันธะระหว่างหมู่ไฮดรอกซีกับหมู่โบรโมเพนทิลเป็นพันธะอีเทอร์ ซึ่งจะถูกตัดได้ยากเมื่อเทียบกับพันธะเอสเทอร์ในขณะที่สารเข้าสู่เซลล์ แสดงว่าความมีขั้วและหมู่ที่เข้ามาต่อกับหมู่ไฮดรอกซีของสาร **1-3** น่าจะมีผลต่อการแสดงฤทธิ์ จึงนำสาร **38**, **41** และ **43** มาเตรียมให้เป็นอนุพันธ์เกลือพิริดิเนียม **44**, **45** และ **46** ตามลำดับ ซึ่งเป็นสารที่มีความมีขั้วสูงสามารถละลายได้ในน้ำ พบว่าแสดงฤทธิ์ในการต้าน จุลินทรีย์ได้อย่างน่าสนใจคือ สาร **44** แสดงค่า MIC ที่ช่วง 64 ถึง >200 μg/ml โดยฤทธิ์ในการต้าน SA มากกว่าสาร **1** มากกว่าสามเท่า และ MRSA, EC, CN มากกว่าสาร **1** มากกว่าสองเท่า สาร **45** แสดงฤทธิ์ในการต้าน SA, MRSA และ CN แสดงค่า MIC ที่ 64 μg/ml ซึ่งมากกว่าสาร **2** มากกว่าสามเท่า สาร **44** และ **45** ยังคงแสดงฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อดังกล่าวได้ในระดับต่ำ ส่วนสาร **46** แสดงฤทธิ์ในการต้าน SA, MRSA และ CA ที่ค่า MIC 8, 8 และ 32 μg/ml ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าสาร **3** มากกว่า 25 และ 6 เท่า และยังแสดงฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทั้งสามชนิดที่ค่า MBC 32, 128 และ 64 μg/ml ตามลำดับ แต่ไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อ PA, EC และ CN แสดงว่าความมีขั้วและหมู่แคตไอออนิคของพิริดิเนียมมีนัยสำคัญต่อการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ng และคณะ (2007) ที่ได้สังเคราะห์สารกลุ่ม bis(pyridinium)alkanes พบว่าสารหลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้านราได้ในระดับที่ค่อนข้างสูง และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแอนาลอกพิริดินียมทั้งสามชนิด **44-46** พบว่าเมื่อหมู่เมทอกซีที่วงเบนซีนลดลงส่งผลให้มีแนวโน้มในการแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น

อย่างไรก็ตามแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดนั้น ยังแสดงฤทธิ์ได้ต่ำกว่ายามาตรฐานทั้งสามชนิด แต่จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นความรู้พื้นฐานที่สามารถนำไปออกแบบการสังเคราะห์แอนาลอกอื่น ๆ เพื่อเพิ่มฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ให้สูงขึ้นใกล้เคียงกับยามาตรฐานหรือสูงกว่า เช่น ทดลองปรับเปลี่ยนความยาวสายโซ่คาร์บอนของหมู่อัลคิล หรือปรับเปลี่ยนอนุพันธ์ของพิริดีน เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถแยกสารผสมเคอร์คิวมินอยด์ออกจากกันได้เป็นสาร เคอร์คิวมิน (**1**) ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (**2**) และบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (**3**)
2. สามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์ทั้งสามชนิดได้แอนาลอกทั้งหมด 16 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มคือ 1) ดีเมทิลแอนาลอก **31-33** 2) ไอซอกซาโซลแอนาลอก **34-36** 3) โบรโมเพนทิลอีเทอร์แอนาลอก **37-43** 4) พิริดิเนียมแอนาลอก **44-46** โดยสารทุกชนิดได้พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีเรียบร้อยแล้ว
3. เมื่อนำเคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอกที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 6 ชนิด พบว่าสารกลุ่มที่ 1 ดีเมทิลแอนาลอก แสดงฤทธิ์ได้ใกล้เคียงหรือสูงกว่าสารตั้งต้นเล็กน้อย ยกเว้นสาร **33** ที่แสดงฤทธิ์ต้าน MRSA ได้สูงกว่าสารตั้งต้น มากกว่า 3 เท่า สารกลุ่มที่ 2 ไอซอกซาโซลแอนาลอก แสดงฤทธิ์ได้ใกล้เคียงหรือสูงกว่าสารตั้งต้นเล็กน้อย ยกเว้นสารผสม **35a+35b** ที่แสดงฤทธิ์ต้าน SA ได้สูงกว่าสารตั้งต้น มากกว่า 6 เท่า สารกลุ่มที่ 3 โบรโมเพนทิลอีเทอร์แอนาลอก ไม่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทุกชนิด และสารกลุ่มที่ 4 พิริดิเนียมแอนาลอก แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Gram positive (SA และ MRSA) ซึ่งแสดงค่า MIC ที่ช่วง 8 - 128 μg/ml นอกจากนี้สาร **46** ยังสามารถแสดงฤทธิ์ในการฆ่าจุลินทรีย์ได้ด้วย ซึ่งแสดงค่า MBC และ MFC ที่ช่วง 32 - 128 μg/ml สารเคอร์คิวมินอยด์และแอนาลอกที่สังเคราะห์ได้เหล่านี้แสดงฤทธิ์ได้ต่ำกว่ายามาตรฐาน
4. ได้แนวทางการออกแบบการสังเคราะห์เคอร์คิวมินอยด์เพื่อพัฒนาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ให้สูงขึ้น