



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ อนุพันธ์เซชาโมลินที่ดัดแปลงไซคลิกอะซิทล: การสังเคราะห์และการ
ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (RSA5880027)

โดย รศ.ดร.ปรีชา ภูวไพโรศิริศาล และคณะ

มิถุนายน 2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ อนุพันธ์เซซามอลินที่ดัดแปลงไซคลิกอะซีทัล: การสังเคราะห์และการ
ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (RSA5880027)

รศ.ดร.ปรีชา ภูวไพโรศิรศาล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยไม่จำเป็นต้องเป็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุนขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุนงบประมาณสำหรับดำเนิน โครงการอนุพันธ์เซชาโมลินที่ ดัดแปลงไซคลิกอะซีทาล: การสังเคราะห์และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (RSA5880027) นอกจากนี้ยัง ขอขอบคุณ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ในการสนับสนุนการดำเนินงานของหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ ธรรมชาติ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA5880027

ชื่อโครงการ: อนุพันธ์เซซาโมลินที่ดัดแปลงไซคลิกอะซิทัล: การสังเคราะห์และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ชื่อนักวิจัย: รศ.ดร.ปรีชา ภูวไพโรศิรศาล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: preecha.p@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี (1 กรกฎาคม 2558-30 มิถุนายน 2561)

เซซาโมลินเป็นสารกลุ่มลิแกนด์หลักที่พบมากในน้ำมันงา เซซาโมลินมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายอย่าง เช่น ป้องกันการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ยับยั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาว และยับยั้งโรคเบาหวาน ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการออกฤทธิ์ ของเซซามินและอนุพันธ์ลิแกนด์ เนื่องจากยังขาดวิธีการสังเคราะห์ที่สามารถสังเคราะห์ สารในกลุ่มของลิแกนด์ได้อย่างหลากหลาย เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ใหม่ที่สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ลิแกนด์ ได้มากกว่า 50 ชนิดโดยใช้เซซาโมลินเป็นสารตั้งต้น เซซาโมลินได้ถูกไฮโดรไลซ์ก่อนเป็นลำดับแรกได้อนุพันธ์เฮมิอะซิทัลที่วงไวกว่าที่มีชื่อว่าซามิน ซึ่งจะถูกทำปฏิกิริยาต่อไปกับนิวคลีโอไฟล์ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ อัลกอฮอล์ (ออกซิเจนนิวคลีโอไฟล์), ไทออล (ซัลเฟอร์นิวคลีโอไฟล์) และฟีนอลิก (คาร์บอนนิวคลีโอไฟล์) ในบรรดาอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดมีเพียงผลิตภัณฑ์ที่มีฟีนอลิกเป็นนิวคลีโอไฟล์เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ต้านการเกิดเบาหวานโดยการยับยั้งอัลฟาไกลูโคซิเดส สิ่งที่น่าสนใจคือ ฤทธิ์การยับยั้งแปรผันตามจำนวนของฟีนอลิกอิสระ ในโครงสร้างผลิตภัณฑ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งการมีหมู่ *ortho*-dihydroxy หรือ catechol วิธีการสังเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในโครงการนี้รวมทั้งความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการออกฤทธิ์ ของอนุพันธ์เซซามินจะช่วยให้ นักวิจัยท่านอื่นสามารถที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างอื่นของอนุพันธ์ลิแกนด์ได้มากขึ้น

คำหลัก: เบาหวาน, อัลฟาไกลูโคซิเดส, ลิแกนด์, งา

Abstract

Project Code: RSA5880027

Project Title: Sesamolin Derivatives Having Modified Cyclic Acetal: Synthesis and Bioactivity Evaluation

Investigator: Associate Professor Preecha Phuwapraisirisan, Department of Chemistry, Chulalongkorn University

E-mail Address: preecha.p@chula.ac.th

Project Period: 3 years (1 July 2015-30 June 2018)

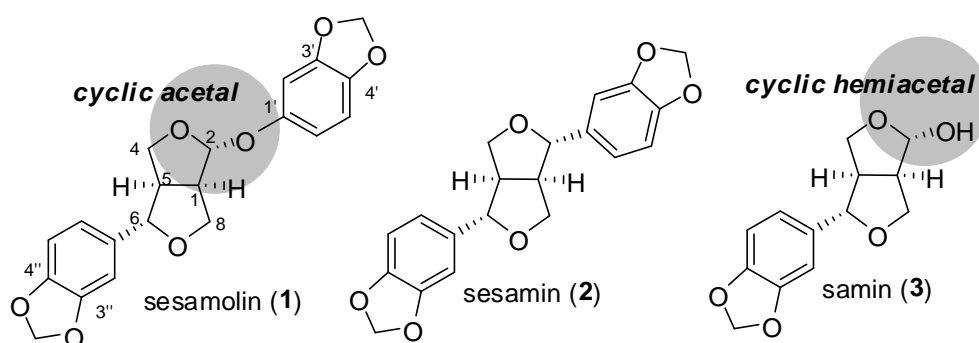
Sesamolin is a major lignan abundantly found in sesame seed oil. It possesses several intriguing biological activities such as preventing oxidative stress, inhibiting leukemia and antidiabetes. To date, there is no report on structure-activity relationship (SAR) of sesamolin and related lignans due to the lack of synthetic methodology that can produce a wide variety of lignans. To address this problem, we developed a new methodology that can generate over 50 lignan derivatives using sesamolin as starting material. Sesamolin was first hydrolyzed to afford a more reactive hemiacetal named samin, which was subsequently coupled with three different nucleophiles, namely alcohols (oxygen nucleophiles), thiols (sulfur nucleophiles) and phenolics (carbon nucleophiles). Of synthesized sesamolin derivatives, only the products having phenolics moiety revealed antidiabetic activity through inhibiting α -glucosidases. Of interest, the inhibitory effect varies with the numbers of free phenolics in product structure, particularly the presence of *ortho*-dihydroxy or catechol residue. The synthetic methodology developed in this project and the insight into SAR of sesamolin derivatives would help researchers to further investigate other biological activities of lignan derivatives.

Keywords: diabetes, α -glucosidase, lignan, sesame

บทนำ

เซซาโมลิน (1, sesamol) เป็นสารสำคัญในกลุ่ม tetrahydrofurfuran lignan และพบมากในน้ำมันงาประมาณ 0.5-1.0 % เซซาโมลิน เป็นที่รู้จักกันดีเนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยสมบัติต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นที่น่าสนใจ เช่น ยับยั้งลูคีเมีย ป้องกันการเกิดการเสื่อมสภาพของหลอดเลือดหัวใจ ภาวะเครียดจากกระบวนการออกซิเดชัน ถึงแม้เซซามินจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจมากมาย แต่จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการออกฤทธิ์ ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่ทำให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์และนำไปสู่การสังเคราะห์สารที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นสาเหตุสำคัญเกิดจากโครงสร้างของเซซาโมลินที่ประกอบด้วย cyclic ether และ dioxymethylene (O-CH₂-O) ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่ค่อนข้างเฉื่อยต่อปฏิกิริยาเคมี ทำให้ยากต่อการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง นอกจากนี้สารที่มีโครงสร้างที่คล้ายกับเซซามูริน เช่น เซซามิน (2, sesamin) ก็มีโครงสร้างดังกล่าวด้วย อย่างไรก็ตามโครงสร้างของเซซาโมลิน ยังมีหมู่ cyclic acetal ซึ่งนับว่ามีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในสภาวะกรดจะเกิดการสูญเสียหมู่อัลกอกซอล เกิด oxocarbenium ion เป็นซึ่งจัดว่าเป็น carbocation ที่เสถียรเป็นพิเศษ ที่สำคัญคือสามารถเกิดปฏิกิริยาการเติมด้วยนิวคลีโอไฟล์ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบคาร์บอนิลอื่น เช่น อัลดีไฮด์ และคีโตน

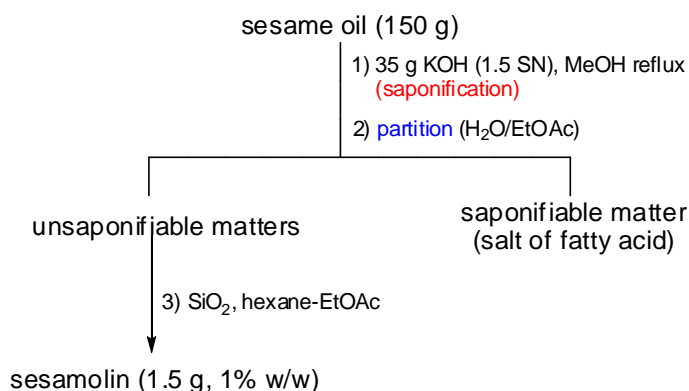
ถ้าอาศัยจุดเด่นดังกล่าวก็จะสามารถสังเคราะห์อนุพันธ์เซซามูรินได้หลากหลายชนิดนอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังเห็นว่าหากเปลี่ยนเซซาโมลินให้เป็น samin (3) จะยังสามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ได้หลากหลายยิ่งขึ้น เนื่องจาก samin (3) มีหมู่ hemiacetal ที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยามากกว่าหากอาศัยหลักการดังกล่าวข้างต้นนี้ ผู้วิจัยคาดว่าจะสามารถสังเคราะห์อนุพันธ์เซซาโมลินที่มีความหลากหลาย ตามชนิดของนิวเคลียร์ไฟล์ที่ใช้ในปฏิกิริยา และเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพก็คาดว่าน่าจะได้ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการออกฤทธิ์ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงโครงสร้างสารกลุ่มนี้ให้มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ดียิ่งขึ้น



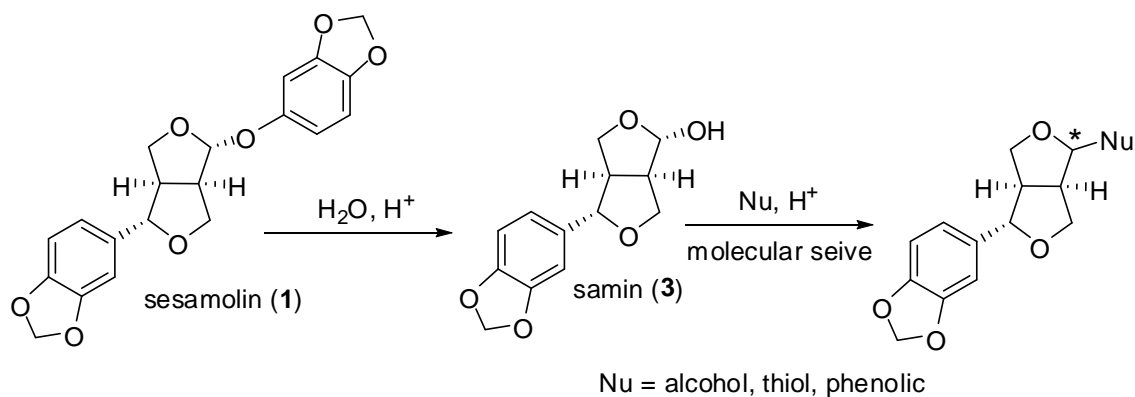
การทดลอง

การดำเนินโครงการแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

- 1) การสกัดแยก sesamol (1) จากน้ำมันงาซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ 1. การกำจัดไขมันที่อยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์และเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันงา (96-99%) ด้วยปฏิกิริยา saponification
2. การแยก sesamol (1) ซึ่งไม่เกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนที่ 1. ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี



- 2) การสังเคราะห์อนุพันธ์เซซาโมลิน โดยมี 2 ขั้นตอนหลักคือ การสังเคราะห์ samini (3) จาก sesamol (1) ที่แยกได้จากน้ำมันงาด้วยปฏิกิริยา hydrolysis และการทำปฏิกิริยาระหว่าง samini (3) กับ nucleophile ที่แตกต่างกัน 3 กลุ่ม alcohols (oxygen nucleophiles), thiols (sulfur nucleophiles) and phenolics (carbon nucleophiles)

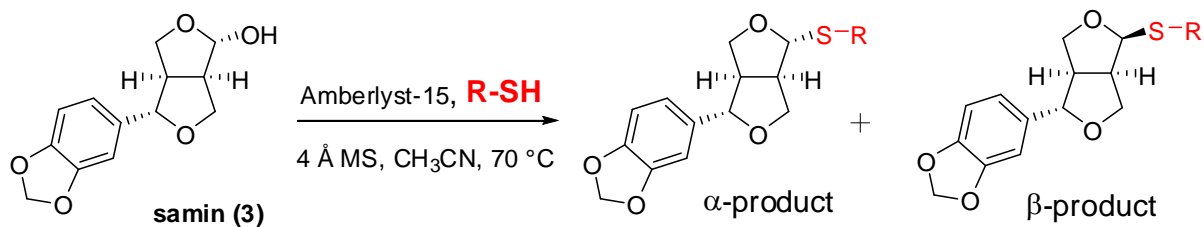


- 3) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งในโครงการนี้จะเป็นการศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง α -glucosidase ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านเบาหวานซึ่งเคยมีรายงานในสารกลุ่ม lignan

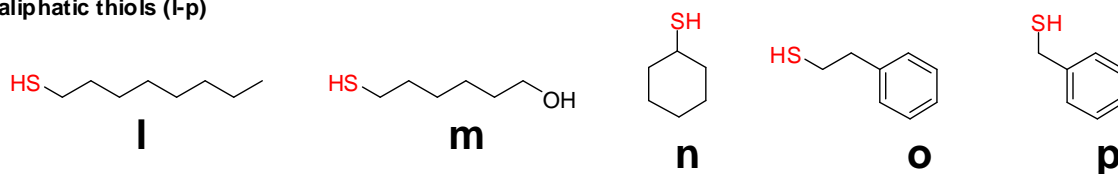
ผลการทดลอง

จากการสังเคราะห์อนุพันธ์เซซาโมลินโดยการทำปฏิกิริยากับ nucleophile ชนิดต่าง ๆ ในที่นี้ จะขอนำเสนออนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ตามชนิดของ nucleophile

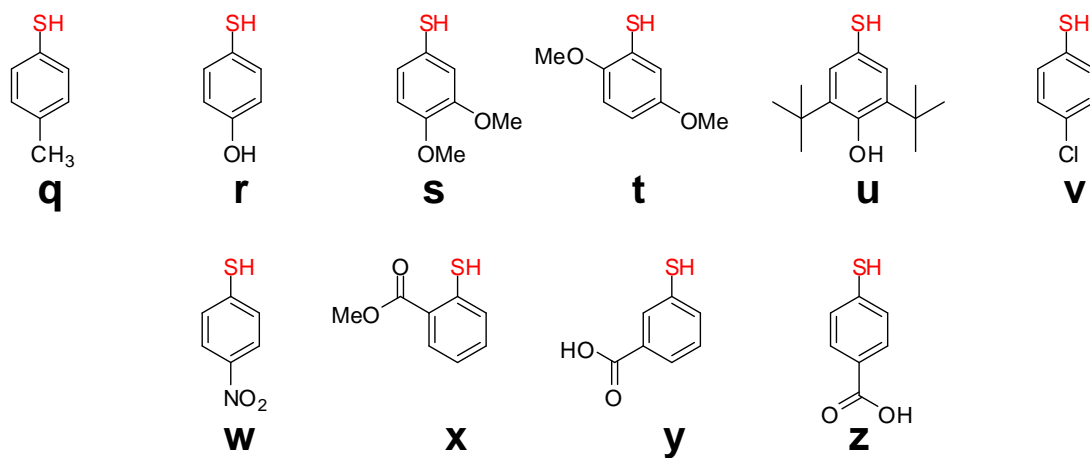
1) อนุพันธ์ที่เกิดจาก sulfur nucleophile



aliphatic thiols (l-p)



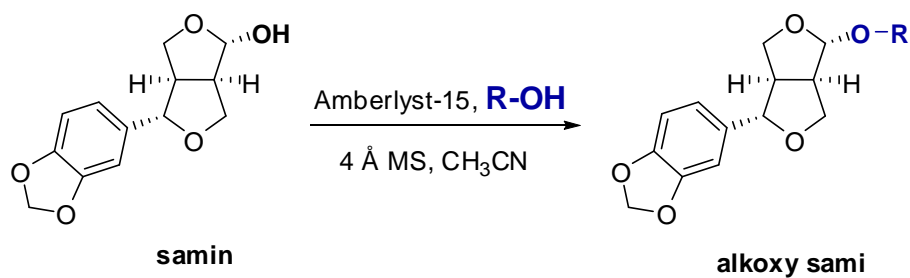
aromatic thiols (q-z)

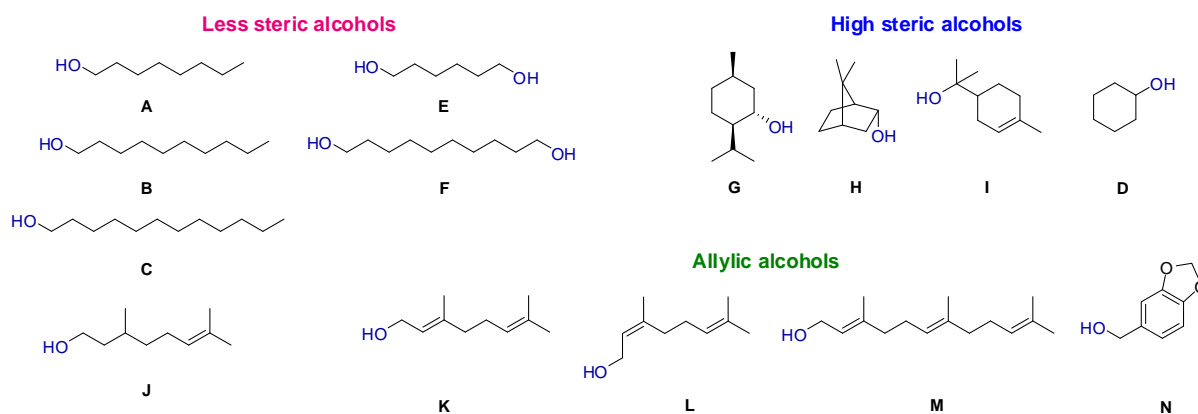


RSH/ArSH	Isolated yield	dr (12 : <i>epi</i> -12)
l	97 %	7 : 1
m	65 %	5 : 1
n	79 %	ND
o	85 %	6 : 1
p	73 %	7 : 1
q	97 %	3 : 1
r	98 %	5 : 1
s	69 %	3 : 1
t	96 %	12 : 1
u	69 %	2 : 1
v	98 %	5 : 1
w	73 %	6 : 1
x	67 %	12 : 1
y	65 %	6 : 1
z	77 %	6 : 1

จากการสังเคราะห์หอนุพันธ์ที่เกิดจาก sulfur nucleophile ได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิดที่มีสมบัติเป็น epimer กัน คือ α -product และ β -product

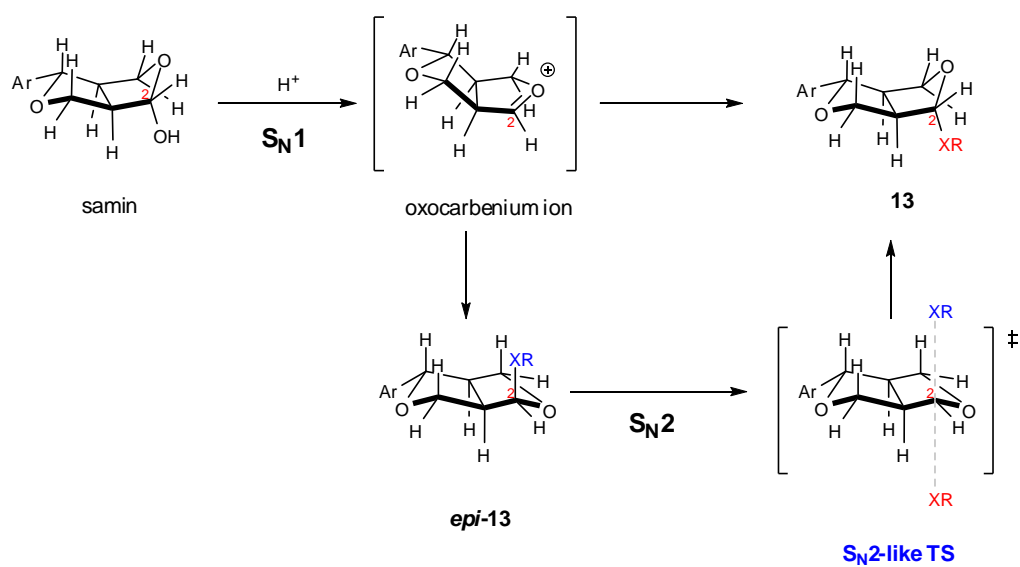
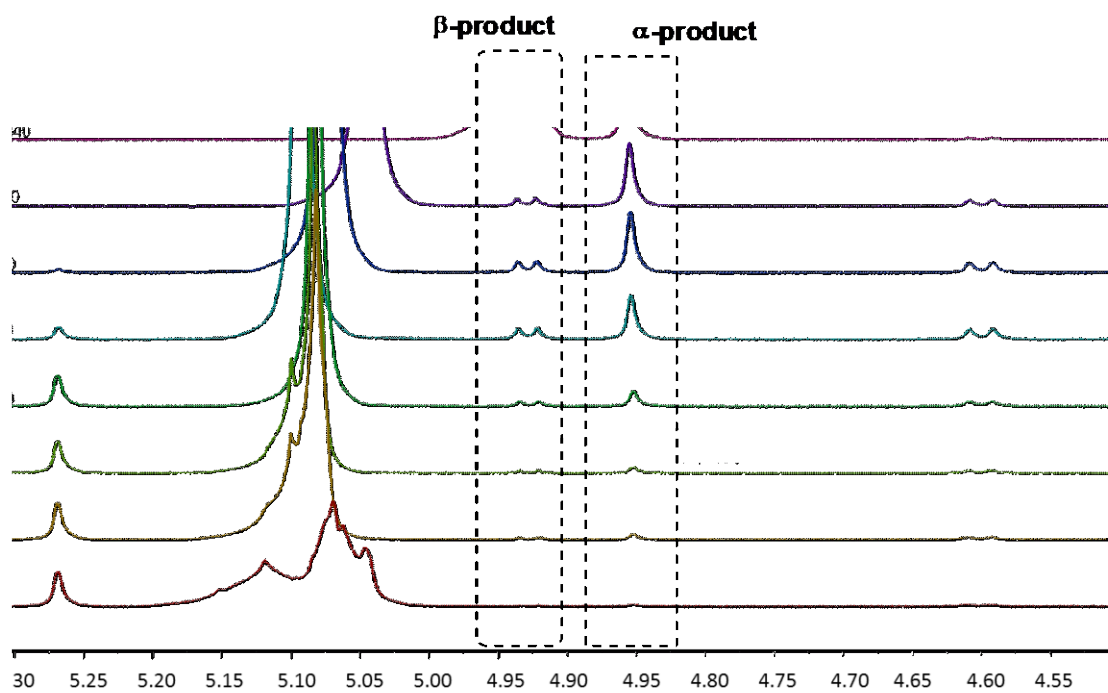
2) หอนุพันธ์ที่เกิดจาก oxygen nucleophile





ROH	Isolated yield
A	78 %
B	97 %
C	95 %
D	93 %
E	96 %
F	94 %
G	95 %
H	75 %
I	81 %
J	88 %
K	69 %
L	82 %
M	84 %
N	45 %*

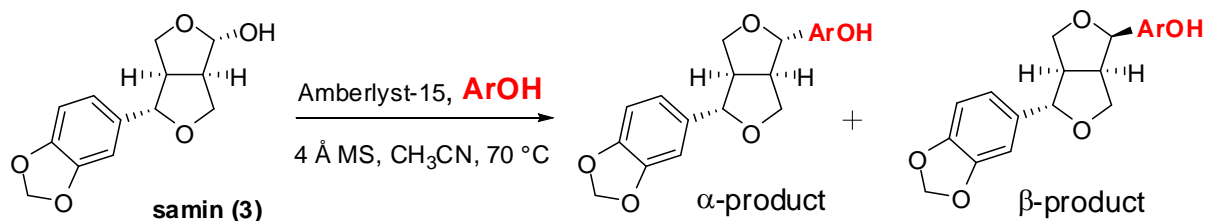
จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ที่เกิดจาก oxygen nucleophile พบว่ามีอัตราส่วน α -product และ β -product แตกต่างกันมาก (dr >25:1) ซึ่งแตกต่างจากกรณีของ sulfur nucleophile ทำให้ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง samini (3) และ oxygen nucleophile โดยการติดตามปฏิกิริยาด้วย NMR และได้เสนอกลไกที่น่าจะเป็นไปได้ ซึ่งพบว่าในช่วงต้นของปฏิกิริยาเกิดทั้ง α -product และ β -product แต่เมื่อเวลาผ่านไป β -product ได้ค่อย ๆ เปลี่ยนเป็น α -product จนหมด ดังนั้นเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจึงมีสัดส่วนของ α -product สูงมาก จนไม่สามารถที่จะแยก β -product ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้



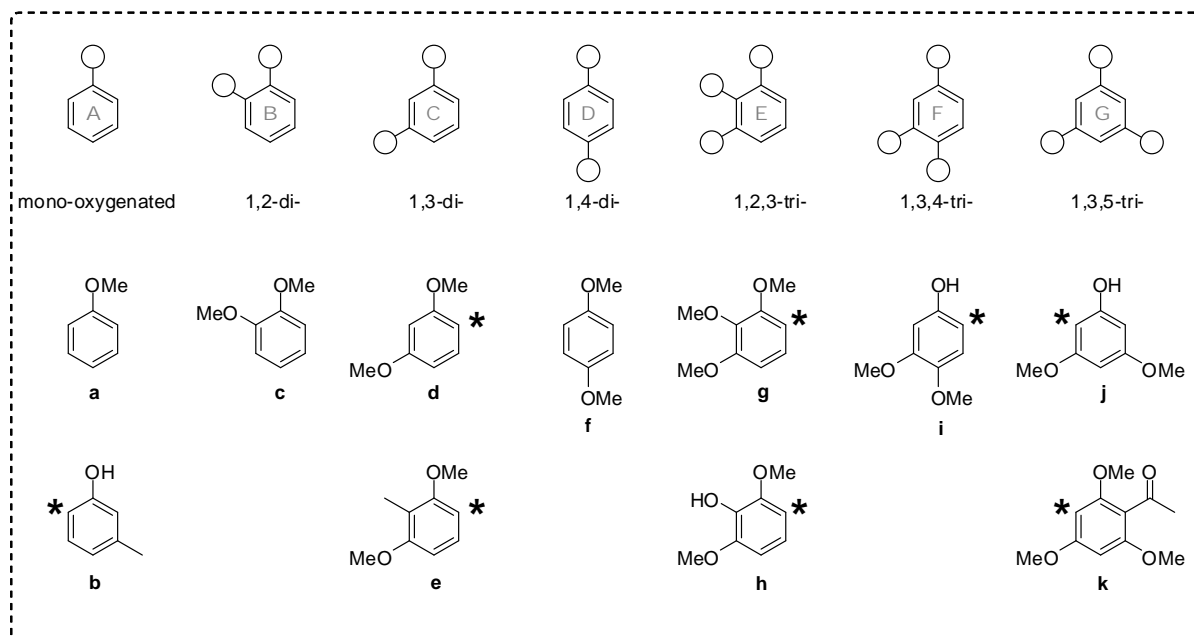
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ที่เกิดจาก sulfur nucleophile และ oxygen nucleophile พบว่าอนุพันธ์ทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง α -glucosidase

3) อนุพันธ์ที่เกิดจาก carbon nucleophile

3.1) อนุพันธ์ที่เกิดจาก simple phenolic

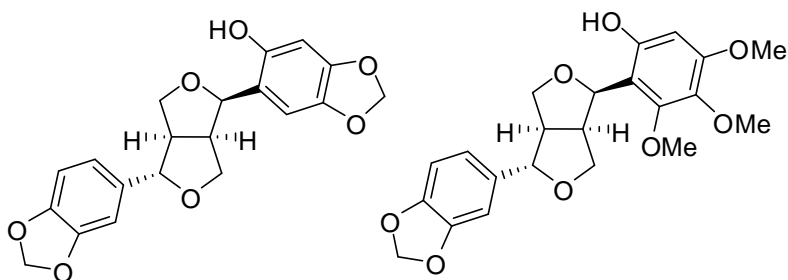


ArOH



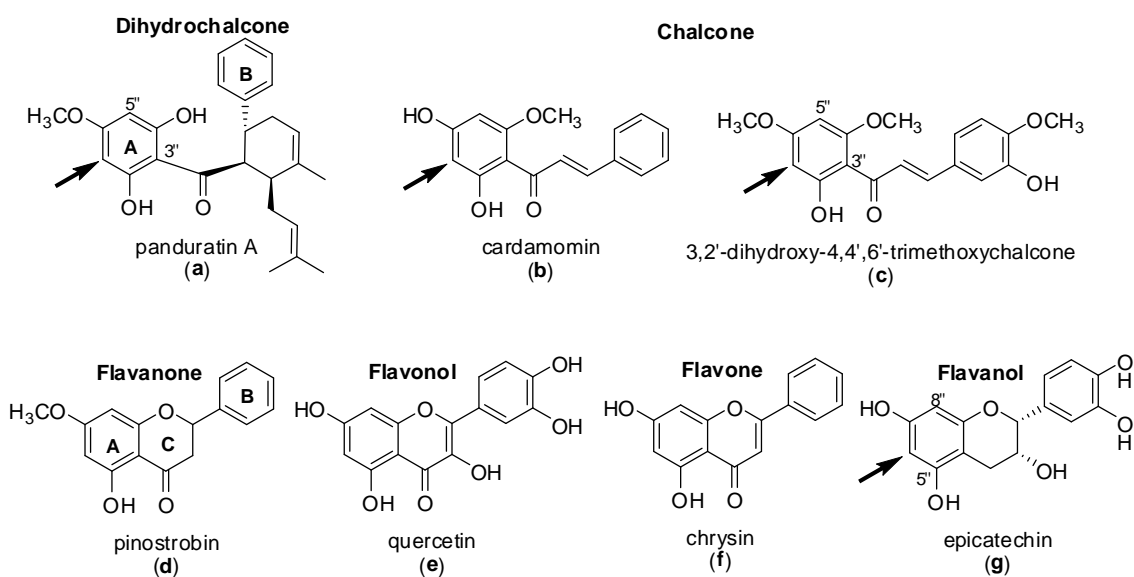
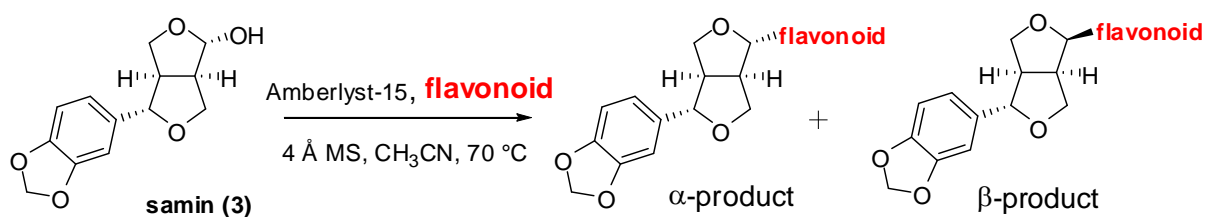
ArOH	Isolated yield (%)	
	α -product	β -product
a	NR	
b	30	15
c	NR	
d	50	45
e	31	42
f	NR	
g	31	22
h	27	37
i	40	45
j	51	47
k	8	6

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าผลิตภัณฑ์ที่มี free hydroxy group มีฤทธิ์ที่ดีกว่ากลุ่มที่ไม่มี free hydroxy group โดยเฉพาะสารที่มีโครงสร้างดังรูป



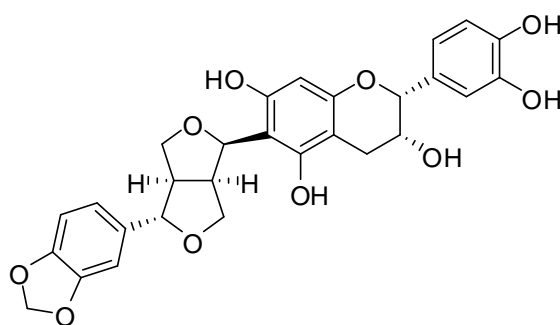
3.2) อนุพันธ์ที่เกิดจาก flavonoid

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่มี free hydroxy group มีฤทธิ์ที่ดีกว่ากลุ่มที่ไม่มี free hydroxy group ทำให้ผู้วิจัยมีแนวคิดในการสังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีหมู่ free hydroxy group มากกว่า 1 หมู่ โดยการใช้ flavonoid เป็น carbon nucleophile แทน simple phenolic ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีชื่อเรียกเฉพาะว่า flavonolignan



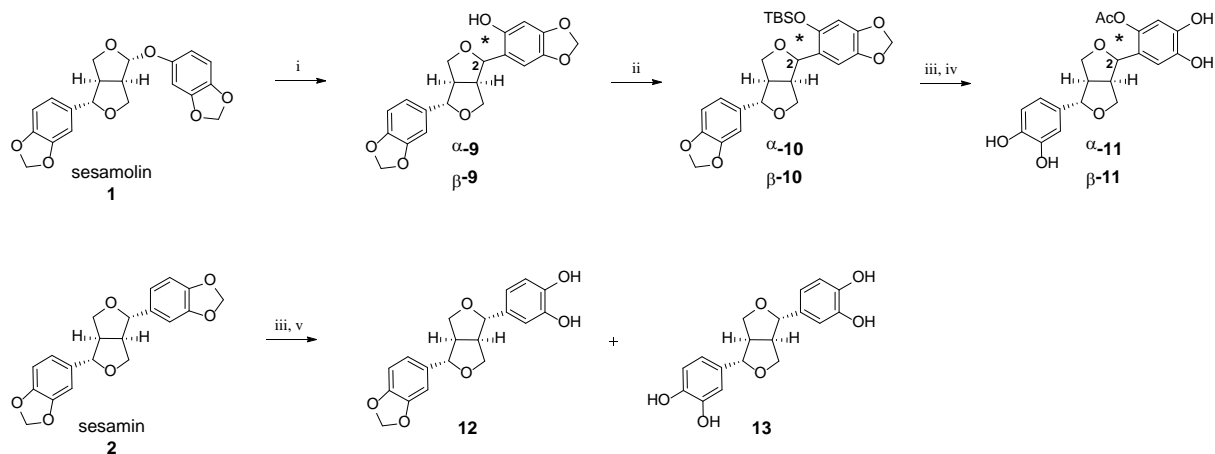
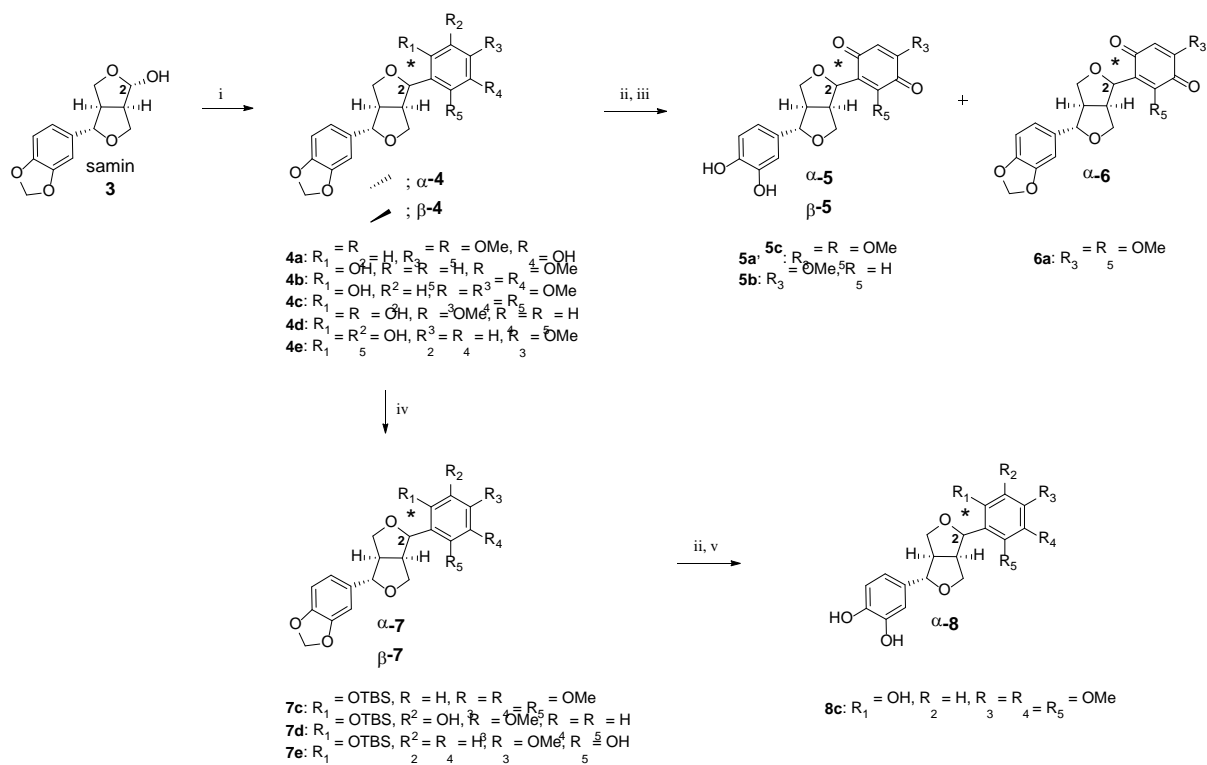
Entry	Isolated product (% Yield)	
	α -product	β -product
1	α -a (33%)	β -a (NI) ^a
2	α -b (40%)	β -b (34%)
3	α -c (75%)	β -c (NI)
4	α -d (NR) ^b	β -d (NR)
5	α -e (NR)	β -e (NR)
6	α -f (NR)	β -f (NR)
7	α -g (NI)	β -g (52%)

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่มี epicatechin เป็น nucleophile ดังรูป มีฤทธิ์ที่ดีที่สุด และยับยั้ง α -glucosidase แบบ mixed inhibition



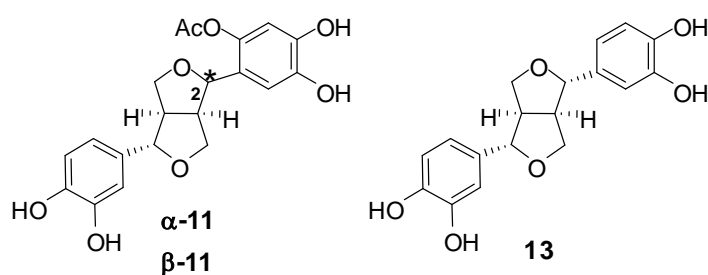
3.3) อนุพันธ์ที่เกิดจาก simple phenolic ตามด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ methylenedihydroxy

อนุพันธ์เซซาโมลินที่มีหมู่ free hydroxy group มากกว่า 1 หมู่ สามารถสังเคราะห์ได้ด้วยแนวทางการออกซิไดส์ methylenedihydroxy นอกเหนือจากแนวทางในข้อ 3.2



Compound	α -Glucosidase inhibitory effect (IC ₅₀ , μ M)		
	Baker's yeast	Maltase	Sucrase
α -4a	700.4 \pm 4.01	>1000	>1000
β -4a	698.1 \pm 3.85	>1000	>1000
α -4b	729.3 \pm 5.21	>1000	>1000
β -4b	715.7 \pm 3.69	>1000	>1000
α -4c	691.6 \pm 2.41	>1000	>1000
β -4c	685.4 \pm 2.11	>1000	>1000
α -4d	32.2 \pm 1.51	150.7 \pm 0.92	180.1 \pm 1.07
β -4d	25.4 \pm 1.44	110.0 \pm 1.12	170.5 \pm 1.68
α -4e	56.4 \pm 1.02	380.3 \pm 3.47	340.4 \pm 1.92
β -4e	42.9 \pm 1.66	260.0 \pm 1.63	230.6 \pm 2.37
α -5a or α -5c	23.4 \pm 1.19	96.5 \pm 1.45	110.2 \pm 1.04
β -5a or β -5c	19.8 \pm 1.87	63.3 \pm 1.62	61.1 \pm 1.77
α -5b	15.9 \pm 1.01	97.0 \pm 1.23	46.6 \pm 1.26
β -5b	14.6 \pm 0.68	47.0 \pm 1.11	33.0 \pm 0.16
α -6a	>1000	>1000	>1000
α -8c	17.8 \pm 1.78	173.6 \pm 3.66	136.4 \pm 3.25
α -9	210.3 \pm 1.21	>1000	>1000
β -9	205.8 \pm 1.09	>1000	>1000
α -11	7.7 \pm 0.62	38.8 \pm 0.99	18.7 \pm 0.33
β -11	5.3 \pm 0.57	25.7 \pm 1.04	12.9 \pm 0.38
12	21.6 \pm 1.37	170.2 \pm 1.89	190.8 \pm 3.69
13	10.0 \pm 0.98	42.6 \pm 1.07	29.2 \pm 1.20
acarbose [®]	147.2 \pm 0.51	1.4 \pm 0.24	3.2 \pm 0.36

จากการวิจัยพบว่าสารที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือผลิตภัณฑ์ที่มี *ortho*-dihydroxy หรือ catechol จำนวน 2 หน่วย โดยมีโครงสร้างดังรูป



บทวิจารณ์

ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีในการสังเคราะห์อนุพันธ์เซซาโมลินด้วยการดัดแปลงหมู่ cyclic acetal ทำให้สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้หลากหลายชนิด ซึ่งเพียงพอสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ (structure-activity relationship) ทำให้ทราบว่า จำนวนหมู่ ortho-dihydroxy หรือ catechol ในโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ ส่งผลให้การออกฤทธิ์ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม ในอนาคตควรมีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น นอกเหนือจากการยับยั้ง α -glucosidase ที่ได้ทดสอบในโครงการนี้ ซึ่งจะทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับการออกฤทธิ์อื่น ๆ อีก

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ที่ได้จากโครงการ

1. Worawalai, W.; Khongchai, P.; Surachaitanawat, N.; Phuwapraisirisan, P. Synthesis of furofuran lignans as antidiabetic agents simultaneously achieved by inhibiting α -glucosidase and free radical. *Archives of Pharmacal Research* **2016**, 39, 1370-1381.
2. Worawalai, W.; Phuwapraisirisan, P. Samin-derived flavonolignans, a new series of antidiabetic agents having dual inhibition against α -glucosidase and free radicals. *Natural Product Research* 2018 (under revision).
3. Worawalai, W.; Surachaitanawat, N.; Phuwapraisirisan, P. Synthesis of O- and S-sesamolins derivatives. (in preparation).
4. Worawalai, W.; Phuwapraisirisan, P. Catechol containing samin: highly potent α -glucosidase inhibitors. (in preparation).