

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของซีรัมบอนจากกะทือและฤทธิ์ทางชีวภาพ

Structural Modification of Zerumbone From *Zingiber zerumbet* Smith and Their Biological Activities.

อุไรวรรณ ส่งเสียง (Uraiwan Songsiang)* ดร.ฉวี เย็นใจ (Dr.Chavi Yenjai)**

ดร.จริยา หาญจนวงศ์ (Dr.Chariya Hahnvanawong)*** ดร.ชนกพร เผ่าศิริ (Dr.Chanokbhorn Phaosiri)****

บทคัดย่อ

สารซีรัมบอน (zerumbone, 1) ที่สกัดได้จากเหง้ากะทือ นำมาเป็นสารตั้งต้นในการดัดแปลงโครงสร้างเมื่อทำปฏิกิริยารีดักชันด้วย NaBH_4 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น zerumbol 2 ส่วนการทำปฏิกิริยาของซีรัมบอนกับ MCPBA ได้ผลิตภัณฑ์ epoxide 3 เมื่อนำไปทำปฏิกิริยาการเติมแบบ Michael addition โดยใช้เอมีนต่างๆ พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็น 7, 8 และ 9 ส่วนสารผลิตภัณฑ์เอมีน 4, 5 และ 6 สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาของซีรัมบอนกับ แอมโมเนีย บิวทิลลามีน และ เบนซิลลามีน ตามลำดับ โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน เอไมด์ 10 และ 13 สามารถสังเคราะห์ได้จากการทำปฏิกิริยาของ acetic anhydride ใน pyridine นำสารตัวอย่างทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสาร 3 แสดงฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M214 โดยมีค่า $\text{IC}_{50} = 12.33 \mu\text{g/ml}$ และสาร 5 แสดงฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 และ KKU-M214 โดยมีค่า $\text{IC}_{50} = 10.67$ และ $12.11 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

ABSTRACT

Zerumbone (1), isolated from *Zingiber zerumbet* Smith, was used as the starting material for structural modification. Reduction of zerumbone by using NaBH_4 yielded zerumbol 2. Treatment of zerumbone with MCPBA gave epoxide 3 which was further reacted with various amines affording Michael addition products 7, 8 and 9. Amine derivatives 4, 5 and 6 were obtained by treatment of zerumbone with ammonia, butylamine and benzylamine, respectively, at room temperature for 5 days. Amides 10 and 13 were synthesized by treatment of amines with acetic anhydride in pyridine. Among these substances, epoxide 3 exhibited moderate cytotoxicity against cholangiocarcinoma KKU-M214 cell line with IC_{50} value of $12.33 \mu\text{g/ml}$. Amine 5 showed cytotoxicity against KKU-M213 and KKU-M214 cell lines with IC_{50} values of 10.67 and $12.11 \mu\text{g/ml}$, respectively.

คำสำคัญ : ซีรัมบอน เซสควิเทอปีน กะทือ มะเร็งท่อน้ำดี

Key Words : Zerumbone, Sesquiterpene, *Zingiber zerumbet* smith, Cholangiocarcinoma

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

****ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

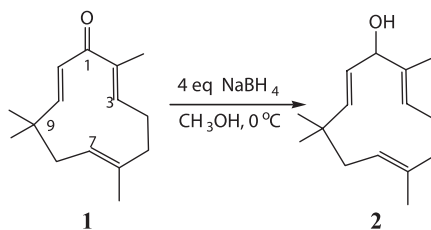
ซีรัมบอน (Zerumbone, **1**) เป็นสารประกอบประเภท cyclic sesquiterpene โดยเป็นสารหลักที่สกัดได้จากเหง้ากะทือ (*Zingiber zerumbet* Smith) เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และหมู่เกาะโอกินาวา ซีรัมบอนแยกได้ครั้งแรกในปี 1960¹ และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีโดยเทคนิค NMR² และ X-ray Crystallography³

เมื่อนำซีรัมบอนมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า เป็นพิษต่อเซลล์ BC, KB, NCI-H187 และ Vero cell โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 6.06, 5.28, 4.16 และ 2.98 µg/ml ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าว บ่งชี้ว่าซีรัมบอนเป็นสารที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นสารฆ่ามะเร็ง แต่เนื่องจากว่าสารนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell) ทำให้เป็นข้อจำกัดในการที่จะใช้ได้จริง ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์ เช่น รีดักชัน ออกซิเดชัน และแอมิเนชัน เพื่อให้ได้สารอนุพันธ์ใหม่ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง แต่เป็นพิษน้อยต่อเซลล์ปกติ ซึ่งจะประโยชน์อย่างมากต่อการลดผลข้างเคียงในการรักษาโรคมะเร็ง

วิธีการวิจัย

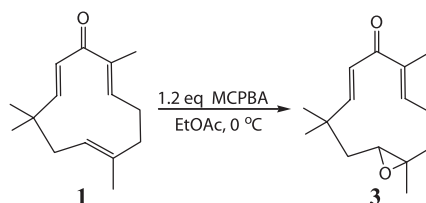
1. การสังเคราะห์ zerumbol (2)

นำสาร zerumbone (503 mg, 2.30 mmol) ลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ละลายในตัวทำละลายเมทานอล แล้วเติม NaBH₄ (348 mg, 9.2 mmol) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 10% HCl สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต นำสารละลายที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (10% EtOAc:hexane) จะได้ zerumbol 2 (284 mg, 56%) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว (สาร 1: R_f = 0.43 ใน 10% EtOAc:hexane, mp 66–67 °C สาร 2: R_f = 0.48 ใน 10% EtOAc:hexane, mp 72–73 °C)



2. การสังเคราะห์ epoxide 3

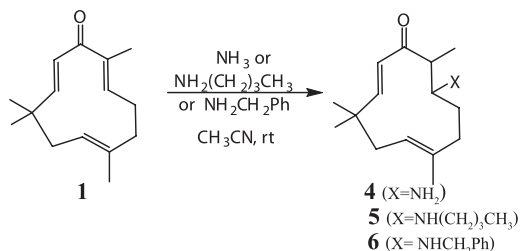
ละลายสาร zerumbone (39 mg, 0.18 mmol) ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต แล้วเติมสาร MCPBA (meta-chloroperoxybenzoic acid) (37.4 mg, 0.22 mmol) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำเย็น สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค PLC (20% EtOAc:hexane) ได้สาร epoxide 3 (41 mg, 97%) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว (R_f = 0.28 ใน 20% EtOAc:hexane, mp 84–85 °C)



3. การสังเคราะห์ amines 4, 5 และ 6

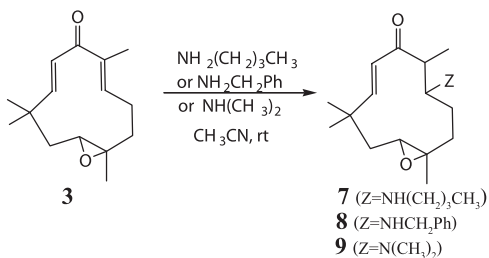
ละลายสาร zerumbone (50 mg, 0.23 mmol) ในตัวทำละลายอะซิโตนไนไตรล์ ที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำแอมโมเนีย ที่มากเกินไปจำนวน 2.0 ml ตั้งไว้เป็นเวลา 5 วัน หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำเย็น สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค PLC (10% MeOH:EtOAc) ได้เป็น amine 4 (32 mg, 56%) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จากนั้นเปลี่ยนเอมีนจากแอมโมเนียเป็น บิวทิลามีน หรือ เบนซิลลามีน ที่มากเกินไปจำนวน 4.0 ml ได้เป็น amines 5 (62 mg, 93%) และ 6 (51 mg, 68%) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง (สาร 4: R_f = 0.68 ใน 10% MeOH:EtOAc, mp 90–91 °C; สาร 5: R_f = 0.53

ใน 10% MeOH:CH₂Cl₂ และสาร 6 R_f = 0.30
ใน 25% EtOAc:hexane)



4. การสังเคราะห์ amine epoxides 7, 8 และ 9

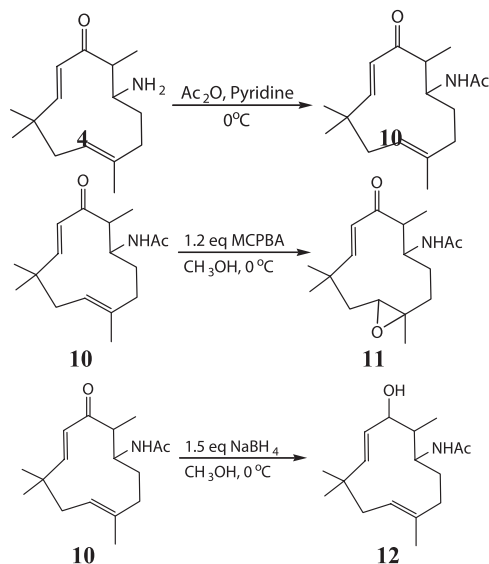
สาร epoxide 3 (50 mg, 0.21 mmol) ละลายในตัวทำละลายอะซีโตนไนโตรส เดิมบิวทิลลามีนจำนวน 3.0 ml ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำเย็น สกัดด้วยเอทิลอะซีเตต ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค PLC (40% EtOAc:hexane) ได้เป็นสารประกอบ amine epoxide 7 (10 mg, 15%) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง จากนั้นเปลี่ยนเอมีนจากบิวทิลลามีนเป็นเบนซิลลามีนหรือไดเมทิลลามีน ได้เป็นสารประกอบ amine epoxides 8 (12.9 mg, 18%) และ 9 (28.2 mg, 48%) ตามลำดับ มีลักษณะเป็นของแข็ง (สาร 7 R_f = 0.25 ใน 40% EtOAc:hexane, mp 76–77 °C; สาร 8 R_f = 0.50 ใน 25% EtOAc:hexane, mp 80–81 °C และ สาร 9: R_f = 0.20 ใน 5% MeOH:EtOAc, mp 104–105 °C)



5. การสังเคราะห์ amides 10, 11 และ 12

นำ amine 4 (78 mg, 0.34 mmol) มาทำปฏิกิริยา acetylation โดยการเติมแอซิดแอนไฮไดรด์ 1.0 ml และไพรีดีน 1.0 ml ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ

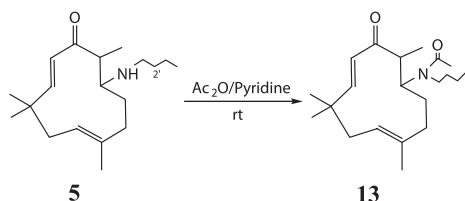
0 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมงได้เป็น amide 10 (46 mg, 59%) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน แบ่งสารที่ได้เป็นสองส่วน นำสารส่วนที่หนึ่ง (22.7 mg, 0.08 mmol) ทำปฏิกิริยากับ MCPBA (20.8 mg, 0.12 mmol) ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ epoxide 11 (15.6 mg, 66%) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว และนำสารส่วนที่สอง (22.9 mg, 0.10 mmol) ทำปฏิกิริยารีดักชันด้วย NaBH₄ (5.8 mg, 0.15 mmol) ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 10 % HCl สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต นำสารที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (100% EtOAc) ได้เป็น alcohol 12 (11.2 mg, 54%) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว (สาร 10: R_f = 0.68 ใน 100% EtOAc, mp 199–200 °C; สาร 11: R_f = 0.20 ใน 70% EtOAc:hexane, mp 205–206 °C; สาร 12: R_f = 0.60 ใน 100% EtOAc, mp 93–94 °C)



6. การสังเคราะห์ amide 13

นำ amine 5 (35 mg, 0.12 mmol) มาละลายด้วยไพรีดีน แล้วเติมแอซิดแอนไฮไดรด์

1.0 ml ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำเย็น สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต นำสารที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค PLC (50% EtOAc:hexane) ได้เป็น amide 13 (34 mg, 85%) ลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน ($R_f = 0.75$ ใน 50% EtOAc:hexane, mp 72–73 °C)



การทดสอบฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีนำซีรัมโบนและอนุพันธ์มาทดสอบฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100, KKU-M139, KKU-M156, KKU-M213 และ KKU-M214 ด้วยวิธี colorimetric method⁴ โดยมี Ellipticine เป็นสารมาตรฐาน

ตาราง 1 การทดสอบฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของสารตัวอย่าง 1–13 และ Ellipticine

สารตัวอย่าง	IC ₅₀ (μg/ml)				
	KKU-100	KKU-M139	KKU-M156	KKU-M213	KKU-M214
1	NR	NR	NR	NR	NR
3	NR	NR	NR	NR	12.33±0.91
5	NR	NR	NR	10.67±0.19	12.11±0.17
8	NR	NR	NR	NR	NR
9	NR	NR	NR	NR	NR
10	NR	NR	NR	NR	NR
11	NR	NR	NR	NR	NR
12	NR	NR	NR	NR	NR
13	NR	NR	NR	NR	NR
Ellipticine	6.21±0.05	1.11±0.07	2.3±0.41	0.40±0.02	0.25±0.006

หมายเหตุ สารอื่นๆอยู่ระหว่างรอผลการทดสอบ

วิเคราะห์ผลการทดลอง

จากการสังเคราะห์เพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างของซีรัมโบนโดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์ได้สารผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 12 ชนิด โดยปฏิกิริยาแรกเป็นการเปลี่ยนหมู่คีโตนของซีรัมโบนไปเป็นหมู่อัลกอฮอล์โดยใช้ NaBH₄ เป็นตัวรีดิวซ์ ซึ่งจะทำปฏิกิริยาเฉพาะหมู่คีโตนเท่านั้น

นอกจากนี้ยังสามารถที่จะปรับเปลี่ยนโครงสร้างของซีรัมโบน ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้ MCPBA ซึ่งป็นตัวออกซิไดซ์ที่ชอบทำปฏิกิริยากับพันธะคู่ที่อุดมไปด้วยอิเล็กตรอน (C6–C7) ได้สาร epoxide 3

สารเอมีน 4, 5 และ 6 สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาของซีรัมโบนกับแอมโมเนีย, บิวทิล

ลามีน และเบนซิลลามีน ตามลำดับ เป็นปฏิกิริยาการเติมแบบ Michael addition จากการทดลองพบว่านิวคลีโอไฟล์ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง C10 ได้เนื่องจากความเกะกะของหมู่เมทิลสองหมู่ที่ตำแหน่ง C9

Epoxide 3 นำมาเป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาการเติมแบบ Michael addition โดยใช้เอมีนปฐมภูมิ (บิวทิลลามีน และ เบนซิลลามีน) เอมีนทุติยภูมิ (ไดเมทิลลามีน) ได้สารผลิตภัณฑ์ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ อธิบายเหตุผลได้เช่นเดียวกับสารผลิตภัณฑ์เอมีนในข้างต้น

สารเอมีน 4 ทำปฏิกิริยา acetylation ได้เป็นเอ-ไมด์ 10 นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำปฏิกิริยากับ MCPBA ได้เป็นepoxide 11 นอกจากนี้เอไมด์ 10 สามารถเปลี่ยนเป็นอัลกอฮอล์ 12 ได้โดยการรีดิวซ์ด้วย NaBH_4

นำซีรัมโบนและสารอนุพันธ์ที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบว่าซีรัมโบน (1) ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เมื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างเป็น epoxide 3 มีฤทธิ์ดีขึ้นโดยเป็นพิษต่อเซลล์ KKKU-M214 มีค่า $\text{IC}_{50} = 12.33 \mu\text{g/ml}$ เมื่อเติมหมู่บิวทิลลามีนที่ตำแหน่ง C3 ของซีรัมโบนได้สารเอมีน 5 มีฤทธิ์ดีขึ้นโดยเฉพาะกับเซลล์ KKKU-M213 และ KKKU-M214 มีค่า $\text{IC}_{50} = 10.67$ และ $12.11 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

สาร 8 และ 9 เป็นอนุพันธ์เอมีนที่มีความเป็นขั้วต่ำพบว่าไม่มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เช่นเดียวกับสารประกอบเอไมด์ 10-13 จากข้อมูลดังกล่าวอาจอธิบายได้ว่าสารที่มีขั้วสูงหรือสารที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้จะมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ดีกว่าสารที่มีขั้วต่ำหรือสารที่ไม่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ แต่อย่างไรก็ดีควรจะต้องมีการศึกษากลไกที่แท้จริงในการฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของสารเหล่านี้ เพื่อหาเหตุผลที่ถูกต้องอันจะนำไปสู่การพัฒนาสารเหล่านี้ให้มีฤทธิ์ที่เพิ่มขึ้นและอาจพัฒนาต่อไปให้เป็นยาในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองเตรียมอนุพันธ์ของซีรัมโบนโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีอินทรีย์ เช่น รีดักชันด้วย NaBH_4 ได้เป็นสารประเภทอัลกอฮอล์, ทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยใช้ MCPBA⁶⁻⁷ ได้เป็นสารประเภท epoxide และ ปฏิกิริยาเอมี-เนชัน⁸ โดยการเข้าทำปฏิกิริยาของแอมโมเนีย เอมีนปฐมภูมิ เช่น บิวทิลลามีน เบนซิลลามีน และเอมีนทุติยภูมิ เช่น ได-เมทิลลามีน ได้สารประกอบเอมีน

ปฏิกิริยาของซีรัมโบนกับเอมีน และ ปฏิกิริยาของ epoxide กับเอมีน เป็นปฏิกิริยาการเติมแบบ Michael addition เกิดปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงที่ตำแหน่ง C2 และ C3 เป็นสารผลิตภัณฑ์หลัก เมื่อนำอนุพันธ์เอมีนปฐมภูมิทำปฏิกิริยา acetylation ได้เป็นเอไมด์ 10 และ 13 สำหรับเอ-ไมด์ 10 นำมาเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันเป็น epoxide 11 โดยใช้ MCPBA และเปลี่ยนเป็นอัลกอฮอล์ 12 โดยการรีดิวซ์ด้วย NaBH_4

นำสารอนุพันธ์ทั้งหมดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์กับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบว่าอนุพันธ์ที่มีขั้วสูง เช่น epoxide 3 และ amine 5 มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ดีขึ้นกว่าซีรัมโบน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมทางเคมี:โครงการพัฒนาระบบทฤษฎีและการวิจัยทางเคมีที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Dev, S. 1960. Sesquiterpenes. XVI. Zerumbone, a monocyclic sesquiterpene ketone. *Tetrahedron*. 8, 171-180.
- Dev, S., Anderson, J.E., Cormier, V., Damodaran, N.P., Roberts, J.D. 1968. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. The conformational mobility of humulene and zerumbone. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 1246-1248.

- Hall, SR., Nimgirawath, S., Raston, CL., Sittatrakul, A., Thadaniti, S., Thirasasana, N., White, AH. 1981. Crystal structure of zerumbone [(E,E,E)-2,6,9,9-tetramethycyclo- undeca-2,6,10-trien-1-one]. 34, 2243-2247.
- Kitayama, T., Yamamoto, K., Utsumi, R., Takatani, M., Hill, RK., Kawai, Y., Sawada, S., Okamoto, T. 2001. Chemistry of zerumbone 2. Regulation of ring bond cleavage and unique antibacterial activities of zerumbone derivatives. Bioscience, biotechnology and biochemistry. 65, 2193-2199.
- Kitayama, T., Yokoi, T., Kawai, Y., Hill, R.K., Morita, M., Okamoto, T., Yamamoto, Y., Fokin, V.V., Sharpless, K.B., Sawada, S. 2003. The chemistry of zerumbone Part 5. Structural transformation of the dimethylamine derivatives. Tetrahedron. 59, 4857-4866.
- Kitayama, T., Furuya, A., Moriyama C., Masuda, T., Fushimi, S., Yonekura, Y., Kubo, H., Kawai, Y., Sawada, S. 2006. Elucidation of the Sharpless epoxidation of zerumbol. Tetrahedron: Asymmetry. 17, 2311-2316.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, JT., Bokesch, H., Kenny, S., Boyd, MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer drug screening. J. Natl. Cancer Inst. 82, 1107-1112.
- Yamamoto, K., Kitayama, T., Minagawa, S., Watanabe, T., Sawada, S., Okamoto, T., Utsumi, R. 2001. Antibacterial agents that inhibit histidine protein kinase YycG of *Bacillus subtilis*. Bioscience, biotechnology and biochemistry. 65, 2306-2310.