

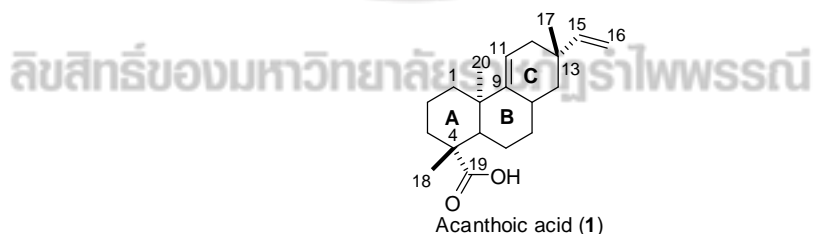
บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะและความสำคัญของต้นเปล้าใหญ่

เปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius* Roxb.) เป็นพืชสมุนไพรไทยในวงศ์ Euphorbiaceae ที่มีสรรพคุณทางเภสัชวิทยาหลากหลาย โดยสามารถใช้ได้ทั้งส่วนใบ ดอก ลูก เปลือก กระพี้ เนื้อไม้ แก่น และราก (วุฒิ, 2540) ต้นเปล้าใหญ่เป็นไม้ขนาดกลางที่สามารถพบกระจายในหลายพื้นที่ของประเทศไทย (Roengsumran *et al.* 1998, 1999a, 2002; Kuptiyanuwat, 1999; Komlaiad, 2003; Pata, 2004; Pudhom *et al.* 2007; Youngsa-ad *et al.*, 2007) จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของต้นเปล้าใหญ่พบว่า เป็นแหล่งของสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ (diterpenoid compounds) ที่มีโครงสร้างหลักแตกต่างกันหลายกลุ่ม เช่น labdane (Roengsumran *et al.*, 1999a, 2001, 2002a; Sommit *et al.*, 2003) kaurane (Sirimongkhon, 2000) cembranoid (Roengsumran *et al.*, 1999b; Pudhom *et al.* 2007) clerodane (Roengsumran *et al.*, 2002b; Youngsa-ad *et al.*, 2007; Pudhom and Sommit, 2011) pimarane (Suwancharoen *et al.*, 2010) halimane (Roengsumran *et al.*, 2004) cleistanthane (Pata, 2004) เป็นต้น โดยพบว่าสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ที่พบบางชนิดที่เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง (Roengsumran *et al.*, 2001, 2002b, 2004; Sommit *et al.*, 2003; Youngsa-ad *et al.*, 2007; Pudhom *et al.* 2007; Pudhom and Sommit, 2011) ยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (Roengsumran *et al.*, 1999b) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Na^+ , K^+ -ATPase (Ngamrojnavanich *et al.*, 2003) เป็นต้น

ในปี 2010 มีรายงานการพบสาร (–)-acanthoic acid (1) ดังภาพที่ 2.1 ซึ่งเป็นสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์กลุ่ม pimarane จากเปลือกลำต้นของต้นเปล้าใหญ่ในพื้นที่จังหวัดราชบุรี ในปริมาณสูงถึงร้อยละ 5.5% yield (Suwancharoen *et al.*, 2010) ซึ่ง acanthoic acid มีรายงานการพบครั้งแรกในส่วนของเปลือกรากของ *Acanthopanax koreanum* Nakai (Araliaceae) แต่พบในปริมาณที่น้อยกว่าในต้นเปล้าใหญ่มากเพียงร้อยละ 0.04% yield (Kim *et al.*, 1988)



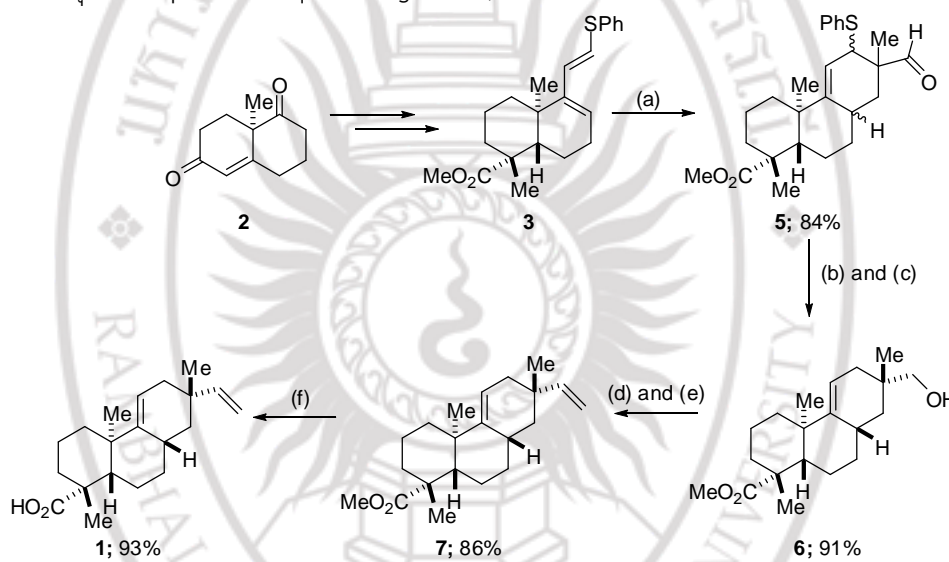
ภาพที่ 2.1 โครงสร้าง (–)-Acanthoic acid 1

ต่อมาพบว่า acanthoic acid มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ดีจึงมีนักวิจัยจำนวนมากสนใจศึกษาการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบแบบต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

cyclooxygenase 2 (COX-2) หรือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide (NO) เป็นต้น (Kim *et al.* 2004; Kang *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร acanthoic acid

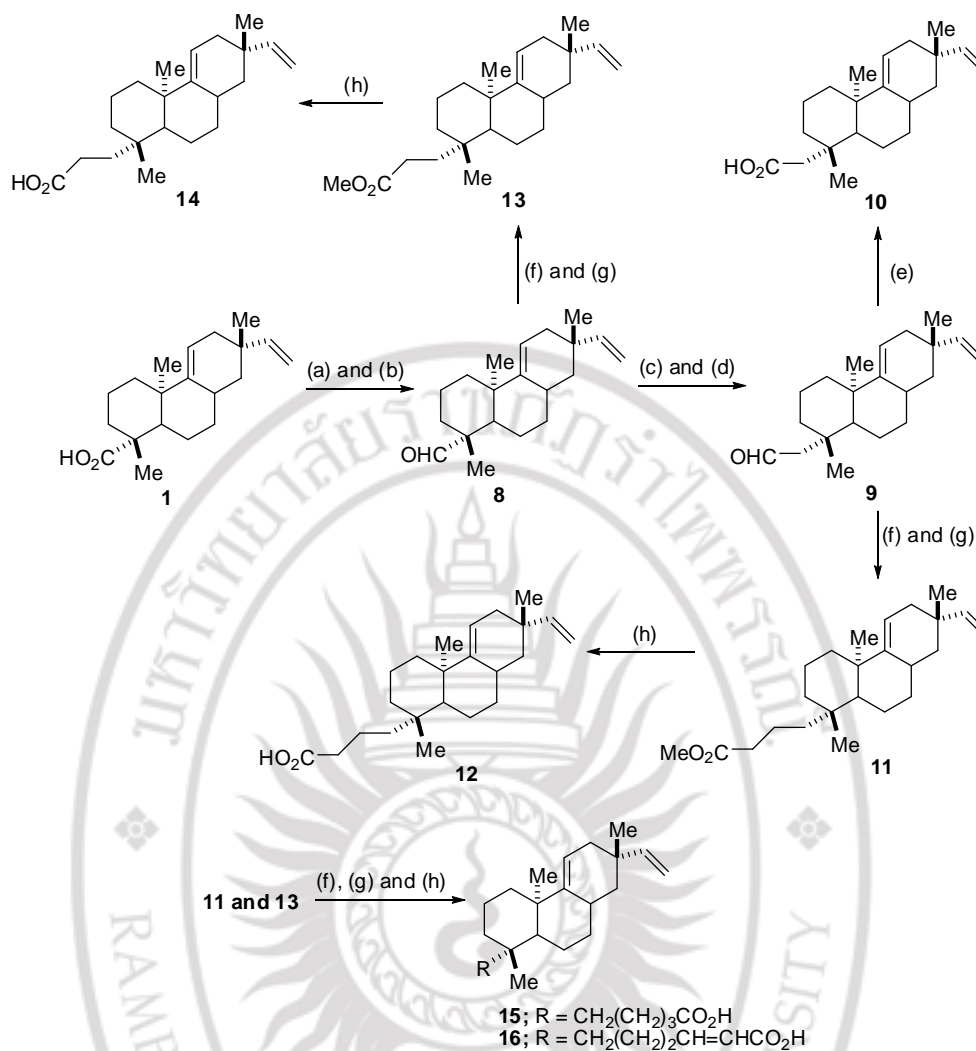
มีรายงานการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร acanthoic acid เพื่อเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น Ling และคณะ (2001) ได้ทำการสังเคราะห์ (–)-acanthoic acid (1) ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ดังภาพที่ 2.2 โดยใช้สารตั้งต้น (–)-Wieland-Miescher ketone (2) สังเคราะห์ผ่านสารมัธยันตร์ (intermediate) (3) จากนั้นทำการสังเคราะห์ ส่วนวง C ของ acanthoic acid โดยปฏิกิริยา Diels-Alder ระหว่าง diene (3) กับ methacrolein (4) ได้สารมัธยันตร์ (5) ทำ functionalization ต่อจะ ให้ (–)-acanthoic acid (1) ที่มีร้อยละผลิตภัณฑ์รวม 9% ซึ่งวิธีการสังเคราะห์ดังกล่าวเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และควบคุมสเตอริโอเคมีได้จึงสามารถนำไปพัฒนาการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่ม diterpene อื่น ๆ ได้ (Ling *et al.*, 2001)



Reagents and conditions: (a) methacrolein (4), SnCl_4 , CH_2Cl_2 , -20 to 0 °C; (b) NaBH_4 , EtOH, 25 °C; (c) Raney Ni, THF, 65 °C, 10 min; (d) Dess-Martin periodinane, CH_2Cl_2 , 25 °C, 30 min; (e) $\text{Ph}_3\text{PCH}_3\text{Br}$, NaHMDS, THF, 25 °C, 18 h; (f) LiBr, DMF, 160 °C, 3 h

ภาพที่ 2.2 การสังเคราะห์ acanthoic acid 1 จาก ketone 2

ในปีเดียวกัน Suh และคณะ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของอนุพันธ์ pimarane diterpene กับฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase 2 (COX-2) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ พบว่าอนุพันธ์สังเคราะห์ 10, 12 และ 14-16 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ได้ดีกว่าสาร acanthoic acid (ภาพที่ 2.3 และตารางที่ 2.1) จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่าการปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่ตำแหน่ง C-4 กับหมู่ carbonyl ของ acanthoic acid ส่งผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 โดยหากเพิ่มความยาวของสายโซ่ carbon ให้อยู่ระหว่าง 1-5 atom จะทำให้อนุพันธ์สังเคราะห์มีฤทธิ์ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ acanthoic acid จากธรรมชาติ (Suh *et al.*, 2001)



Reagents and conditions: (a) LiAlH_4 , ether; (b) TPAP, NMO, CH_2Cl_2 ; (c) Ph_3PCHOMe , THF; (d) PTSA, acetone; (e) AgNO_3 , EtOH; (f) $(\text{EtO})_2\text{P}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, NaH, THF; (g) Mg, MeOH; (h) LiOH, $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (1:1)

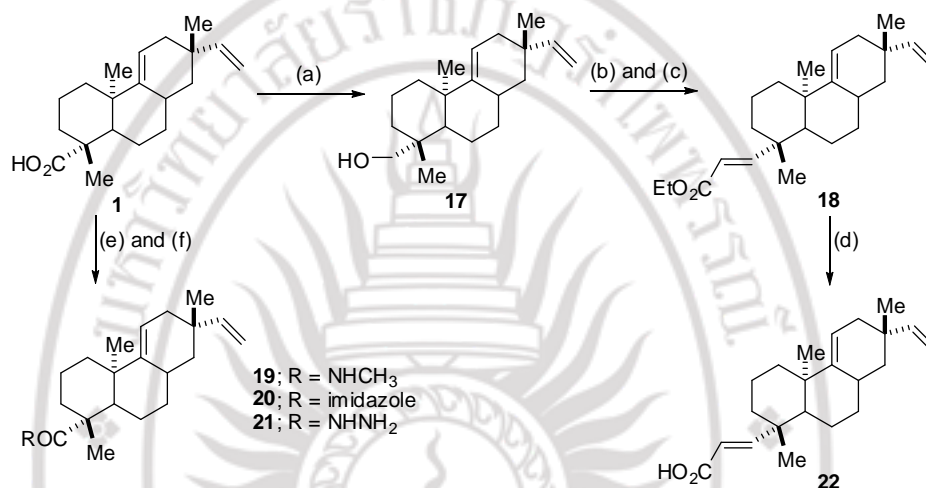
ภาพที่ 2.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ acanthoic acid ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-2

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ของ acanthoic acid และอนุพันธ์สังเคราะห์ 10, 12 และ 14-16

compounds	IC_{50} (μM)
acanthoic acid 1	790.4
10	82.3
12	49.4
14	105.0
15	38.7
16	13.2

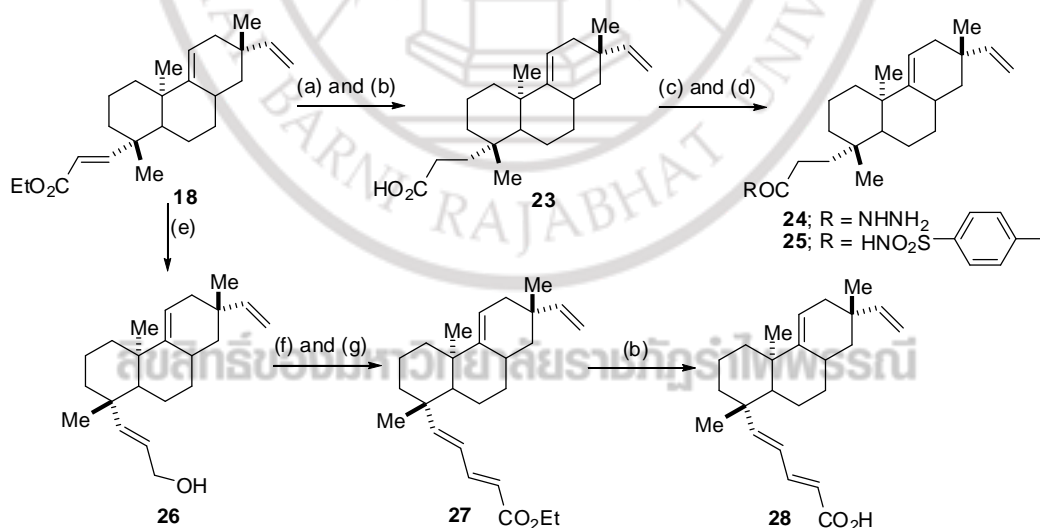
IC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นที่สารมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ 50%

ต่อมา Suh และคณะ (2004) รายงานการสังเคราะห์อนุพันธ์ในกลุ่ม pimarane diterpene กับยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide (NO) และเอนไซม์ COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบ โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ acanthoic acid ที่ตำแหน่ง C-4 ให้เป็นหมู่ต่างๆ ดังภาพที่ 2.4-2.6 พบว่าอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NO โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุพันธ์ **25**, **31** และ **36** ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งได้สูงมากเมื่อเทียบกับอนุพันธ์สังเคราะห์อื่น ๆ โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.2, 8.8 และ 2.3 μ M ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าอนุพันธ์ **28**, **30**, **35** และ **36** สามารถยับยั้งเอนไซม์ COX-2 และ NO ได้ดี ดังตารางที่ 2.2 (Suh *et al.*, 2004)



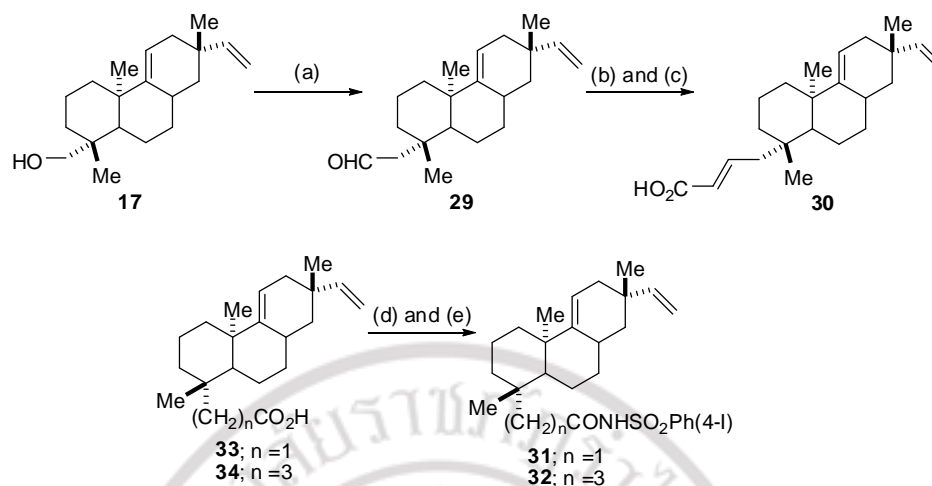
Reagents and conditions: (a) LiAlH₄, THF; (b) TPAP, NMO, CH₂Cl₂; (c) (EtO)₂P(=O)CH₂CO₂Et, NaH, THF; (d) LiOH, H₂O/THF (1:1); (e) (COCl)₂, DMF, CH₂Cl₂; (f) Et₃N, R₂NH or RNH₂

ภาพที่ 2.4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ 17-22



Reagents and conditions: (a) Mg, MeOH; (b) LiOH, H₂O/THF (1:1); (c) (COCl)₂, DMF, CH₂Cl₂; (d) Et₃N, R₂NH; (e) LiAlH₄, THF; (f) TPAP, NMO, CH₂Cl₂; (g) (EtO)₂P(=O)CH₂CO₂Et, NaH, THF

ภาพที่ 2.5 การสังเคราะห์อนุพันธ์ 23-28



Reagents and conditions: (a) TPAP, NMO, CH_2Cl_2 ; (b) $(\text{EtO})_2\text{P}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, NaH, THF; (c) LiOH, $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (1:1); (d) $(\text{COCl})_2$, DMF, CH_2Cl_2 ; (e) 4-iodobenzenesulfonamide, Et_3N

ภาพที่ 2.6 การสังเคราะห์อนุพันธ์ 29-34

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-2 และ NO ของอนุพันธ์ acanthoic acid ที่สังเคราะห์ได้

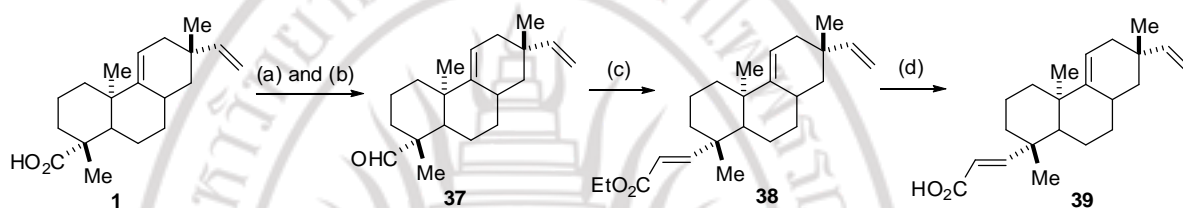
compounds	R	<i>In vitro</i> assay	
		COX-2 inhibition (IC_{50} , μM)	NO inhibition ^a (%)
17	CH_2OH	NA	84.8
19	CONHCH_3	NA	85.3
20	COim^c	NA	99.0
21	CONHNH_2	41.9	3.4
31	$\text{CH}_2\text{CONHSO}_2\text{Ph}(4\text{-I})$	72.2	94.6
25	$(\text{CH}_2)_2\text{CONHSO}_2\text{Ph}(4\text{-I})$	60.7	99.5
22	$\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$	69.7	45.1
30	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$	32.0	77.9
28	$\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCO}_2\text{H}$	26.8	96.5
35	$(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$	37.8	98.2
33	$\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	82.3	NA
23	$(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$	105.0	23.0
34	$(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$	49.4	65.2
36	$(\text{CH}_2)_4\text{CO}_2\text{H}$	38.7	99.0

NA: no activity

อนุพันธ์ 33-36 เตรียมจากงานวิจัยในปี 2001 (Suh *et al.*, 2001)

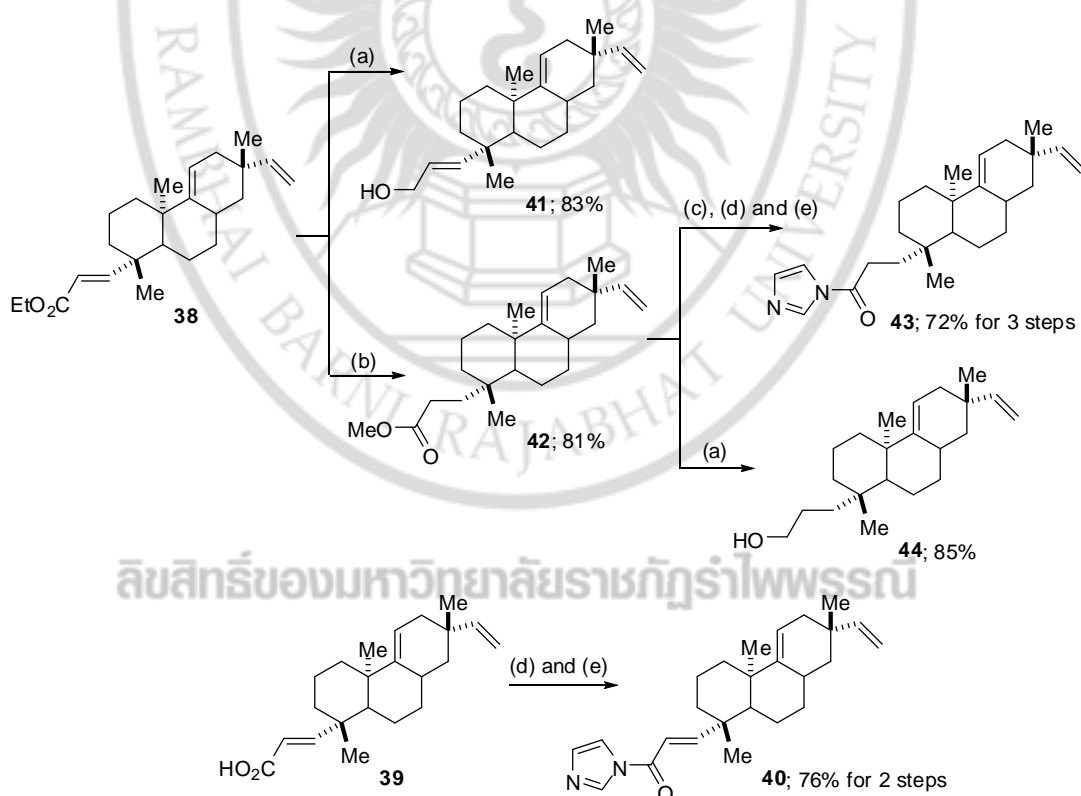
^a NO inhibition ตรวจสอบที่ความเข้มข้น $40 \mu\text{M}$

ในปีถัดมากลุ่มวิจัยของ Suh ได้รายงานการสังเคราะห์อนุพันธ์ acanthoic acid เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้ง nitric oxide (NO) โดยทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่ตำแหน่ง C-4 ของ acanthoic acid ดังภาพที่ 2.7 และ 2.8 พบว่าอนุพันธ์สังเคราะห์ **40-41** และ **43-44** แสดงฤทธิ์ได้ดีกว่าอนุพันธ์สังเคราะห์อื่นๆ มีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 0.05-19.4 μM นั้นแสดงว่าหากทำการเพิ่มความยาวของสาย carbon จากตำแหน่ง C-4 มา 2 atom จะทำให้ฤทธิ์เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอนุพันธ์สังเคราะห์ **41** และ **44** ที่ปลายสายเป็นหมู่ alcohol กับอนุพันธ์สังเคราะห์ **40** และ **43** ที่เป็นหมู่ amide แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ที่มีหมู่ alcohol นั้นจะมีฤทธิ์ดีกว่าหมู่ amide โดยอนุพันธ์ใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้น คือ สาร **41** นั้นแสดงฤทธิ์ยับยั้ง nitric oxide (NO) ได้ดีที่สุดและมีค่า IC₅₀ 0.05 μM (Lee, Min, & Suh, 2005)



Reagents and conditions: (a) LiAlH₄, THF, 85%; (b) TPAP, NMO, CH₂Cl₂, 95%;
 (c) (EtO)₂P(=O)CH₂CO₂Et, NaH, THF, 78%; (d) LiOH, MeOH, 96%

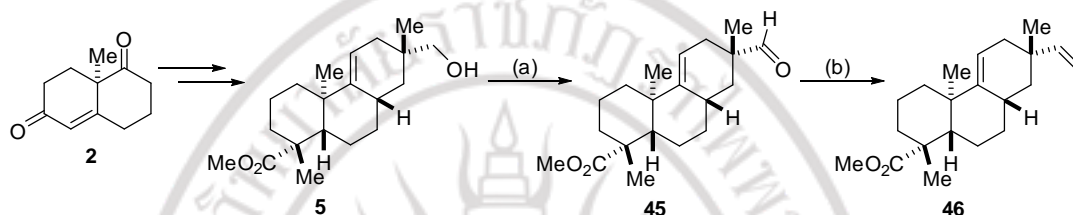
ภาพที่ 2.7 การสังเคราะห์อนุพันธ์ **37-39**



Reagents and conditions: (a) LiAlH₄, THF; (b) Mg, MeOH; (c) LiOH, MeOH; (d) (COCl)₂, DMF, CH₂Cl₂; (e) imidazole, Et₃N

ภาพที่ 2.8 การสังเคราะห์อนุพันธ์ **40-44**

นอกจากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ COX-2 และ NO แล้วยังมีรายงานการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ acanthoic acid ตัวอย่างเช่น กลุ่มวิจัยของ Lam ได้ศึกษาอนุพันธ์สังเคราะห์ในกลุ่ม diterpene ต่อการยับยั้ง TNF- α ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบ พบว่าอนุพันธ์สังเคราะห์ **46** ที่เตรียมผ่าน alcohols **5** ดังภาพที่ 2.9 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ acanthoic acid แสดงฤทธิ์ยับยั้ง TNF- α ได้ถึง 99% ($IC_{50} = 0.7 \mu\text{g/ml}$) ซึ่งให้ผลดีกว่าสาร acanthoic acid ต้นแบบที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง TNF- α ได้เพียง 34% ($IC_{50} = 3.5 \mu\text{g/ml}$) ดังนั้นอนุพันธ์สังเคราะห์ **46** อาจนำไปศึกษาเป็นสารต้นแบบเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านการอักเสบต่อไป (Lam *et al.*, 2003)



Reagents and conditions: (a) Dess-Martin [O], CH_2Cl_2 , 0°C , 3 h, 95%; (b) $\text{Ph}_3\text{PCH}_3\text{Br}$, NaHMDS, THF, 25°C , 18 h, 86%
ภาพที่ 2.9 การสังเคราะห์อนุพันธ์ **46**

จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่ามีนักวิจัยหลายท่านนำ acanthoic acid ไปปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ที่ดีกว่าเดิม ทั้งนี้เพื่อเป็นการค้นหาสารใหม่ ๆ ที่จะนำไปเป็นต้นแบบในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่าง ๆ เพื่อรักษาผู้ป่วยที่นับวันยิ่งมีมากขึ้น ตลอดจนพบว่ามีฤทธิ์ที่ดีอยู่ในปัจจุบันเพิ่มมากขึ้นด้วย

นอกจาก acanthoic acid จะเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีแล้ว ยังมีรายงานว่า acanthoic acid สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย โดย Kim และคณะ (2012) พบว่า acanthoic acid สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60 human promyelocyticleukaemia cells) ได้ดี และเนื่องจากรายงานการพบ acanthoic acid ปริมาณมากจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ ซึ่งเป็นสมุนไพรที่พบในท้องถิ่นไทย และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดี ทั้งนี้รวมถึงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งที่เป็นมหันตภัยร้ายคร่าชีวิตผู้คนเป็นอันดับต้น ๆ ในแต่ละปี ดังกล่าวข้างต้น

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำสาร acanthoic acid ที่สกัดได้จากต้นเปล้าใหญ่มาปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเพื่อค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสาร acanthoic acid จากธรรมชาติเพื่อนำไปสู่การใช้เป็นสารต้นแบบในการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งในอนาคตได้