

การสังเคราะห์และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียของสารอนุพันธ์ของไตรโคทีซี

มณีกานต์ น้ำสอาด^{1*} ประเสริฐ พัฒนาประทีป¹ และ อภิชาติ สุขสำราญ²

บทคัดย่อ

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของไตรโคทีซีเพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย พบว่าสาร 4-*O*-hexanoyl-7 α -hydroxytrichodermol (**3c**) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ที่สูงมากด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.027 nM ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าสารควบคุม ellipticine ประมาณ 11185 เท่า และดีกว่า doxorubicin ประมาณ 4333 เท่า และพบว่าสาร 4-*O*-acetyl trichothecolone (**2a**) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ที่สูงด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.029 μ M จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเบื้องต้นพบว่าหมู่เอสเทอร์ที่ตำแหน่ง 4 และหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 7 ในโครงสร้างของสารอนุพันธ์ของไตรโคทีซีมีความสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และ เซลล์มะเร็งปอด NCI-H187

คำสำคัญ: ไตรโคทีซี สารอนุพันธ์ของไตรโคทีซี ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย การสังเคราะห์

¹ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

²ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: maneekarn@g.swu.ac.th

Synthesis and Cytotoxicity and Antimalarial activity of Trichothecene Derivatives

Maneekarn Namsa-aid^{1*}, Prasert Pattanapruteeb¹,
and Apichart Suksamrarn²

ABSTRACT

A number of trichothecene derivatives were synthesized for cytotoxicity and antimalarial activity study. The results showed that 4-*O*-hexanoyl-7 α -hydroxytrichodermol (**3c**) exhibited the most potent cytotoxicity against KB cells with IC₅₀ value of 0.027 nM. It was 11185- and 4333-fold more active than the standard drugs ellipticine and doxorubicin against KB cells, respectively. 4-*O*-Acetyl trichothecolone (**2a**) showed cytotoxicity against NCI-H187 cells with IC₅₀ value of 0.029 μ M. The preliminary structure-activity relationships (SAR) results indicated that the ester group of C4 and hydroxyl of C7 of trichothecene derivatives played a key role for cytotoxic activity against KB and NCI-H187 cells.

Keywords: trichothecene, trichothecene derivatives, cytotoxicity, antimalarial activity, synthesis

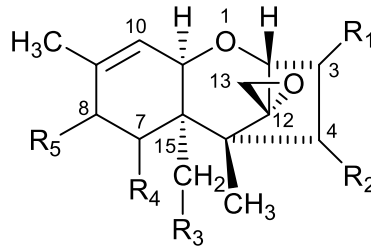
¹Department of Chemistry, Faculty of science, Srinakharinwirot University.

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University.

*Corresponding author, email: maneekarn@g.swu.ac.th

บทนำ

สารประกอบ trichothecenes เป็นสารในกลุ่ม sesquiterpenoids พบในเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *Fusarium*, *Myrotecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* และ *Stachybotrys* [1] มีโครงสร้างดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างของสารประกอบ trichothecenes

โครงสร้างของสารประกอบ trichothecenes มักจะประกอบด้วย 12,13-epoxide พันธะคู่ที่ตำแหน่ง C9-C10 และหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 3, 4, 7, 8 และ 15 นอกจากนี้สารประกอบ trichothecenes หลายชนิดอาจเป็นวง macrocyclic ester โดยเชื่อมต่อวงที่ C-4 และ C-15 เช่น สาร roridins และ สาร verrucarins เป็นต้น ซึ่งสารในกลุ่มนี้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย เช่น มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง [2-8] ทำให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันสมดุล (immunomodulation) [9] มีความเป็นพิษต่อพืช (phytotoxicity) [10-12] มีฤทธิ์ต้านเชื้อราหลายสายพันธุ์ [6, 13-15] และมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย [16-17] เป็นต้น จากงานวิจัยของกลุ่มผู้วิจัยได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากเชื้อราเอนโดไฟต์ KLAR 5 ซึ่งแยกได้จากกิ่งต้นหันท้าง (*Knema Laurina* (Blume) Warb.) [18] พบสารในกลุ่มไตรโคทีซี 8-deoxy trichothecin (1), trichothecolone (2), 7 α -hydroxytrichodermol (3), 7 α -hydroxyscirpene (4) และ trichodermol (5) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่หลากหลายและแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียที่น่าสนใจ ดังแสดงในตาราง 1 และมีรายงานสารอนุพันธ์ของไตรโคทีซีต่อการออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา [16] อย่างไรก็ตามยังไม่พบการรายงานฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง NCI-H187 และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียของสารกลุ่มนี้ยังมีผู้วิจัยไม่มากนัก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารดังกล่าว เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

สาร 1-5 ได้จากการสกัดแยกจากเชื้อราเอนโดไฟต์ KLAR 5 ซึ่งแยกได้จากกิ่งต้นหันท้าง (*Knema Laurina* (Blume) Warb.) โดยใช้วิธีตามที่เคยได้รายงานไว้แล้ว [18] ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น acetone, dichloromethane, ethyl acetate, hexane และ methanol ทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น สำหรับ column chromatography ใช้ silica gel (ขนาด 0.063-0.200 mm และ < 0.063 mm) ของ Merck การบันทึกค่า R_f ของสารใช้แผ่น precoated silica gel 60 GF₂₅₄ และตรวจหาตำแหน่งของสารบน TLC โดยใช้

หลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm และใช้สเปริยรีเอเจนต์ (anisaldehyde agent) การบันทึกข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ใช้เครื่อง Bruker Avance 300 FT-NMR spectrometer ที่ 300 MHz สำหรับ ^1H -NMR และที่ 75 MHz สำหรับ ^{13}C -NMR ตามลำดับ

วิธีทดลอง

การสังเคราะห์สาร 9,10,2',3'-tetrahydro-8-deoxy trichothecin (1a)

เตรียมขวดกันกลมโดยการไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน ใส่แท่งแม่เหล็กและ Pd/C ลงในขวดกันกลมเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นเติมสารละลาย 8-deoxy trichothecin (1) 10 มิลลิกรัม ในเมทานอล และทำปฏิกิริยาภายใต้แก๊สไฮโดรเจน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากการทำปฏิกิริยานำสารละลายมาทำการกรองตัวเร่งปฏิกิริยาออก โดยกรองผ่าน celite ด้วยเครื่องกรองลดความดัน ทำการระเหยตัวทำละลาย จะได้สารสกัดหยาบ แล้วนำไปทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยชะด้วย 10% ethyl acetate/hexane จะได้สาร 9,10,2',3'-tetrahydro-8-deoxy trichothecin (1a) 5.4 มิลลิกรัม และทำการยืนยันโครงสร้างด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

9,10,2',3'-Tetrahydro-8-deoxy trichothecin (1a): ^1H -NMR (CDCl_3): 5.49 (*dd*, $J = 7.8, 3.7$ Hz, 1H); 3.83 (*d*, $J = 5.1$ Hz, 1H); 3.49 (*br s*, 1H); 3.17 (*d*, $J = 4.0$ Hz, 1H); 2.87 (*d*, $J = 4.0$ Hz, 1H); 2.49 (*dd*, $J = 15.3, 7.8$ Hz, 1H); 2.33 (*t*, $J = 7.3$ Hz, 2H); 1.95 (*ddd*, $J = 15.3, 4.4, 3.8$ Hz, 1H); 1.85 (*br dd*, $J = 13.6, 4.0$ Hz, 1H); 1.60-1.71 (*m*, 4H); 1.54 (*m*, 1H); 1.27-1.43 (*m*, 3H); 1.02 (*s*, 3H); 0.96 (*t*, $J = 7.4$ Hz, 3H); 0.88 (*d*, $J = 6.3$ Hz, 3H); 0.69 (*s*, 3H).; ^{13}C -NMR (CDCl_3): 173.6, 79.4, 74.7, 72.7, 65.7, 49.2, 48.5, 40.9, 36.9, 36.4, 35.8, 30.3, 28.6, 26.7, 22.1, 18.5, 17.8, 13.7, 5.7.

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ต่างๆ ของสาร 2-5

การสังเคราะห์ 4-*O*-alkyl และ 4,7-di-*O*-alkyl esters ของ trichothecolone (2), 7 α -hydroxytrichodermol (3), 7 α -hydroxyscirpene (4) และ trichodermol (5) ทำได้โดยการนำสารตั้งต้นมาละลายใน pyridine แล้วเติม acid anhydride ชนิดต่างๆ จากนั้นทำการปั่นกวนปฏิกิริยาไว้ข้ามคืน เมื่อเกิดปฏิกิริยา ทำการเติมน้ำลงไปในสารละลาย แล้วทำการสกัดด้วย ethyl acetate 3 ครั้ง ทำการระเหยตัวทำละลายจะได้สารสกัดหยาบ แล้วนำไปทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยชะด้วย 20% ethyl acetate/hexane จะได้สารผลิตภัณฑ์และทำการยืนยันโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

4-*O*-acetyl trichothecolone (2a): ^1H -NMR (CDCl_3): 6.50 (*dd*, $J = 5.8, 1.4$ Hz, 1H); 5.53 (*dd*, $J = 7.8, 3.7$ Hz, 1H); 3.94 (*d*, $J = 5.2$ Hz, 2H); 3.16 (*d*, $J = 3.9$ Hz, 1H); 2.90 (*m*, 1H); 2.87 (*d*, $J = 3.6$ Hz, 1H); 2.63 (*dd*, $J = 15.8, 7.7$ Hz, 1H); 2.31 (*dd*, $J = 15.3, 1.3$ Hz, 1H); 2.11 (*s*, 3H); 2.07 (*m*, 1H); 1.85 (*s*, 3H); 1.07 (*s*, 3H); 0.73 (*s*, 3H).; ^{13}C -NMR (CDCl_3): 198.8, 171.0, 138.2, 137.1, 79.6, 73.9, 70.1, 65.5, 48.9, 47.5, 43.7, 42.1, 36.8, 21.1, 18.5, 15.4, 5.6.

4-*O*-propanoyltrichothecolone (**2b**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 6.50 (*br d*, $J = 5.6$ Hz, 1H); 5.55 (*dd*, $J = 7.8, 3.7$ Hz, 1H); 3.94 (*d*, $J = 5.6$ Hz, 1H); 3.93 (*d*, $J = 5.1$ Hz, 1H); 3.16 (*d*, $J = 3.9$ Hz, 1H); 2.90 (*d*, $J = 15.3$ Hz, 1H); 2.87 (*d*, $J = 3.8$ Hz, 1H); 2.63 (*dd*, $J = 15.6, 7.8$ Hz, 1H); 2.39 (*q*, $J = 7.6$ Hz, 2H); 2.31 (*d*, $J = 15.3$ Hz, 1H); 2.09 (*ddd*, $J = 15.6, 5.1, 3.7$ Hz, 1H); 1.85 (*s*, 3H); 1.17 (*t*, $J = 7.6$ Hz, 3H); 1.08 (*s*, 3H); 0.73 (*s*, 3H).; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 198.8, 174.2, 138.2, 137.1, 79.6, 73.7, 70.1, 65.4, 49.0, 47.5, 43.7, 42.1, 36.9, 27.7, 18.4, 15.4, 9.1, 5.6.

4-*O*-hexanoyltrichothecolone (**2c**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 6.50 (*dd*, $J = 5.7, 1.5$ Hz, 1H); 5.54 (*dd*, $J = 8.9, 3.7$ Hz, 1H); 3.95 (*d*, $J = 5.6$ Hz, 1H); 3.93 (*d*, $J = 5.1$ Hz, 1H); 3.16 (*d*, $J = 4.0$ Hz, 1H); 2.90 (*d*, $J = 15.5$ Hz, 1H); 2.87 (*d*, $J = 4.0$ Hz, 1H); 2.63 (*dd*, $J = 15.7, 8.0$ Hz, 1H); 2.36 (*t*, $J = 7.5$ Hz, 2H); 2.31 (*d*, $J = 15.5$ Hz, 1H); 2.08 (*ddd*, $J = 15.7, 5.1, 3.7$ Hz, 1H); 1.85 (*s*, 3H); 1.64 (*m*, 2H); 1.33 (*m*, 4H); 1.08 (*s*, 3H); 0.91 (*t*, $J = 6.8$ Hz, 3H); 0.72 (*s*, 3H).; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 198.8, 174.2, 138.2, 137.1, 79.6, 73.7, 70.1, 65.4, 49.0, 47.5, 43.7, 42.1, 36.9, 34.3, 31.3, 24.6, 22.3, 18.5, 15.4, 13.9, 5.7.

4,7-di-*O*-acetyltrichodermol (**3a**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 5.54 (*m*, 2H); 5.40 (*br s*, 1H); 3.86 (*d*, $J = 4.7$ Hz, 1H); 3.78 (*d*, $J = 5.1$ Hz, 1H); 3.15 (*d*, $J = 3.3$ Hz, 1H); 2.72 (*d*, $J = 3.3$ Hz, 1H); 2.50 (*m*, 2H); 2.11 (*s*, 3H); 2.08 (*s*, 3H); 1.89-2.06 (*m*, 2H); 1.72 (*s*, 3H); 1.11 (*s*, 3H); 0.85 (*s*, 3H).; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 171.0 (2C), 138.1, 118.2, 79.7, 75.3, 72.7, 71.4, 65.1, 49.4, 47.3, 43.8, 36.7, 34.5, 22.4, 21.6, 21.1, 11.8, 7.8.

4-*O*-acetyl-7 α -hydroxytrichodermol (**3b**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 5.55 (*dd*, $J = 8.0, 4.1$ Hz, 1H); 5.38 (*br d*, $J = 5.4$ Hz, 1H); 4.47 (*dd*, $J = 9.9, 6.0$ Hz, 1H); 3.87 (*d*, $J = 4.8$ Hz, 1H); 3.76 (*d*, $J = 5.4$ Hz, 1H); 3.15 (*br s*, 2H); 2.48 (*dd*, $J = 15.2, 8.0$ Hz, 1H); 2.26 (*dd*, $J = 17.3, 6.0$ Hz, 1H); 2.11 (*s*, 3H); 1.98-2.06 (*m*, 2H); 1.73 (*s*, 3H); 1.01 (*s*, 3H); 0.97 (*s*, 3H).; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 171.0, 138.6, 118.8, 79.8, 75.4, 73.0, 68.4, 65.3, 49.6, 47.3, 44.9, 39.5, 36.8, 22.5, 21.1, 10.4, 8.1.

4-*O*-hexanoyl-7 α -hydroxytrichodermol (**3c**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 5.56 (*dd*, $J = 7.9, 4.1$ Hz, 1H); 5.38 (*br s*, 1H); 4.49 (*dd*, $J = 10.1, 5.8$ Hz, 1H); 3.87 (*d*, $J = 4.9$ Hz, 1H); 3.78 (*d*, $J = 5.7$ Hz, 1H); 3.15 (*br s*, 2H); 2.49 (*dd*, $J = 15.2, 8.0$ Hz, 1H); 2.36 (*m*, 2H); 2.27 (*dd*, $J = 17.5, 6.0$ Hz, 1H); 2.00 (*m*, 2H); 1.73 (*s*, 3H); 1.65 (*m*, 2H); 1.34 (*m*, 4H); 1.01 (*s*, 3H); 0.99 (*s*, 3H); 0.91 (*s*, 3H).; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 174.0, 138.6, 118.8, 79.8, 75.2, 73.0, 68.5, 65.3, 49.6, 47.3, 44.9, 39.5, 36.8, 34.4, 31.3, 31.2, 24.5, 22.3, 13.9, 10.4, 8.2.

7 α -*O*-acetyl scirpene (**4a**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 5.55 (*dd*, $J = 9.6, 6.3$ Hz, 1H); 5.40 (*m*, 1H); 3.87 (*d*, $J = 5.4$ Hz, 1H); 3.76 (*d*, $J = 4.8$ Hz, 1H); 3.18 (*d*, $J = 3.6$ Hz, 1H); 2.78 (*d*, $J = 3.9$ Hz, 1H); 2.50 (*dd*, $J = 17.4, 6.3$ Hz, 1H); 2.21 (*m*, 1H); 1.84-2.11 (*m*, 3H); 1.72 (*s*, 3H); 1.60 (*s*, 3H); 1.54 (*dd*, $J = 13.2, 4.5$ Hz, 1H); 0.98 (*s*, 3H); 0.94 (*s*, 3H).; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 170.1, 137.7, 119.0, 80.8, 72.9, 72.1, 66.0, 48.7, 45.9, 43.3, 34.7, 34.5, 26.5, 22.4, 21.6, 14.5, 11.7.

7 α -*O*-propanoylscirpene (**4b**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 5.58 (*dd*, $J = 9.6, 6.2$ Hz, 1H); 5.41 (*br s*, 1H); 3.88 (*d*, $J = 5.7$ Hz, 1H); 3.77 (*d*, $J = 4.7$ Hz, 1H); 3.19 (*d*, $J = 3.7$ Hz, 1H); 2.77 (*d*, $J = 3.7$ Hz, 1H); 2.50 (*dd*, $J = 16.9, 6.3$ Hz, 1H); 2.33 (*m*, 2H); 2.20 (*m*, 1H); 1.85-2.05 (*m*, 3H); 1.72 (*s*, 3H); 1.56 (*m*, 1H); 1.17 (*t*, $J = 7.6$ Hz, 3H); 0.98 (*s*, 3H); 0.93 (*s*, 3H).; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 174.0, 137.8, 118.9, 80.9, 72.9, 71.9, 66.0, 48.7, 45.9, 43.3, 34.7, 34.5, 28.3, 26.5, 22.5, 14.6, 11.7, 9.0.

7 α -*O*-hexanoylscirpene (**4c**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 5.57 (*dd*, $J = 9.4, 6.3$ Hz, 1H); 5.41 (*br s*, 1H); 3.87 (*d*, $J = 5.3$ Hz, 1H); 3.77 (*d*, $J = 4.6$ Hz, 1H); 3.18 (*d*, $J = 3.6$ Hz, 1H); 2.77 (*d*, $J = 3.4$ Hz, 1H); 2.50 (*dd*, $J = 17.4, 6.3$ Hz, 1H); 2.32 (*m*, 2H); 2.21 (*m*, 1H); 2.04 (*m*, 1H); 1.87 (*m*, 2H); 1.71 (*s*, 3H); 1.52-1.66 (*m*, 3H); 1.27-1.33 (*m*, 7H); 0.97 (*s*, 3H); 0.93 (*s*, 3H).; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 172.9, 137.8, 118.9, 80.8, 72.9, 71.8, 66.0, 48.7, 45.9, 43.3, 34.7, 34.5, 31.3, 29.7, 26.5, 24.4, 22.5, 22.3, 14.6, 13.9, 11.8.

4-*O*-acetyl trichodermol (**5a**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 5.58 (*dd*, $J = 7.8, 3.6$ Hz, 1H); 5.42 (*br s*, 1H); 3.84 (*d*, $J = 5.1$ Hz, 1H); 3.62 (*d*, $J = 5.4$ Hz, 1H); 3.14 (*d*, $J = 4.2$ Hz, 1H); 2.85 (*d*, $J = 4.2$ Hz, 1H); 2.55 (*dd*, $J = 15.3, 7.8$ Hz, 1H); 2.10 (*s*, 3H); 1.98-2.05 (*m*, 4H); 1.73 (*s*, 3H); 1.45 (*m*, 1H); 0.95 (*s*, 3H); 0.73 (*s*, 3H).; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 174.4, 140.2, 118.6, 79.2, 75.1, 70.5, 65.5, 49.0, 47.9, 40.5, 36.7, 28.0, 24.5, 23.2, 21.1, 16.0, 5.8.

4-*O*-propanoyl trichodermol (**5b**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 5.59 (*dd*, $J = 7.8, 3.6$ Hz, 1H); 5.42 (*m*, 1H); 3.84 (*d*, $J = 5.2$ Hz, 1H); 3.62 (*d*, $J = 5.4$ Hz, 1H); 3.14 (*d*, $J = 4.0$ Hz, 1H); 2.84 (*d*, $J = 4.0$ Hz, 1H); 2.55 (*dd*, $J = 15.4, 7.8$ Hz, 1H); 2.38 (*q*, $J = 7.6$ Hz, 2H); 1.91-2.03 (*m*, 4H); 1.73 (*s*, 3H); 1.43 (*m*, 1H); 1.16 (*t*, $J = 7.6$ Hz, 3H); 0.95 (*s*, 3H); 0.72 (*s*, 3H).; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 174.4, 140.2, 118.6, 79.2, 74.9, 70.5, 65.5, 49.0, 47.9, 40.5, 36.7, 28.0, 27.8, 24.5, 23.3, 16.0, 9.2, 5.8.

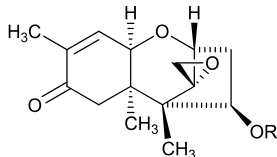
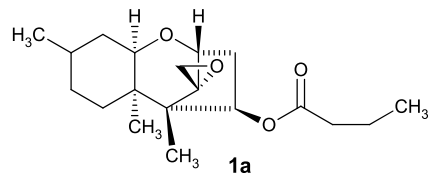
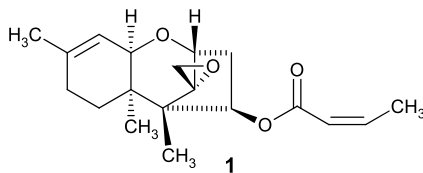
4-*O*-hexanoyl trichodermol (**5c**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 5.59 (*dd*, $J = 7.8, 3.6$ Hz, 1H); 5.41 (*m*, 1H); 3.84 (*d*, $J = 5.2$ Hz, 1H); 3.62 (*d*, $J = 5.1$ Hz, 1H); 3.14 (*d*, $J = 4.0$ Hz, 1H); 2.84 (*d*, $J = 4.0$ Hz, 1H); 2.55 (*dd*, $J = 15.0, 7.9$ Hz, 1H); 2.37 (*m*, 2H); 1.99 (*m*, 4H); 1.63-1.73 (*m*, 6H); 1.34 (*m*, 7H); 0.95 (*s*, 3H); 0.93 (*s*, 3H).; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 179.8, 140.2, 118.6, 79.2, 74.9, 70.6, 65.6, 49.0, 47.9, 40.5, 36.7, 34.4, 34.0, 31.3, 28.0, 24.6, 23.3, 22.3, 16.0, 13.9, 5.9.

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

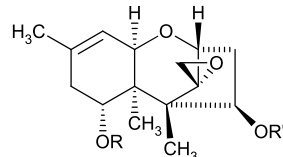
การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) ใช้สาร dihydroartemisinin เป็นสารมาตรฐาน และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) และเซลล์ปกติ (Vero cells) โดยใช้สาร ellipticine และ doxorubicin เป็นสารมาตรฐาน ได้ส่งสารที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ผลการทดลอง

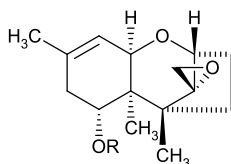
ปฏิกิริยา hydrogenation ของสาร 8-deoxy trichothecin (**1**) ภายใต้แคตาลีซิสไฮโดรเจนและ Pd/C ได้สาร 9,10,2',3' tetrahydro-8-deoxy trichothecin (**1a**) และปฏิกิริยา acylation ของ trichothecolone (**2**), 7 α -hydroxytrichodermol (**3**), 7 α -hydroxyscirpene (**4**) และ trichodermol (**5**) กับ acylating agent ชนิดต่างๆ และ pyridine โดยทำการปั่นกวนปฏิกิริยาไว้ข้ามคืน เมื่อนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และทำการยืนยันโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าได้สารอนุพันธ์ 12 ชนิด ได้แก่ 4-*O*-acetyl trichothecolone (**2a**), 4-*O*-propanoyltrichothecolone (**2b**), 4-*O*-hexanoyltrichothecolone (**2c**), 4,7-di-*O*-acetyltrichodermol (**3a**), 4-*O*-acetyl-7 α -hydroxytrichodermol (**3b**), 4-*O*-hexanoyl-7 α -hydroxytrichodermol (**3c**), 7 α -*O*-acetyl scirpene (**4a**), 7 α -*O*-propanoylscirpene (**4b**), 7 α -*O*-hexanoylscirpene (**4c**), 4-*O*-acetyl trichodermol (**5a**), 4-*O*-propanoyl trichodermol (**5b**), และ 4-*O*-hexanoyl trichodermol (**5c**) มีโครงสร้างดังรูปที่ 2 แล้วนำสารที่สังเคราะห์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรีย และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) และเซลล์ปกติ (Vero cells) ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 1



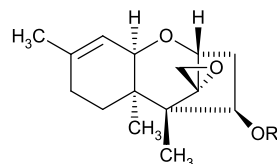
- (**2**) R = H
 (**2a**) R = COCH₃
 (**2b**) R = COCH₂CH₃
 (**2c**) R = CO(CH₂)₄CH₃



- (**3**) R = H; R' = H
 (**3a**) R = COCH₃; R' = COCH₃
 (**3b**) R = H; R' = COCH₃
 (**3c**) R = H; R' = CO(CH₂)₄CH₃



- (**4**) R = H
 (**4a**) R = COCH₃
 (**4b**) R = COCH₂CH₃
 (**4c**) R = CO(CH₂)₄CH₃



- (**5**) R = H
 (**5a**) R = COCH₃
 (**5b**) R = COCH₂CH₃
 (**5c**) R = CO(CH₂)₄CH₃

รูปที่ 2 โครงสร้างสาร **1-5**, **1a**, **2a-2c**, **3a-3c**, **4a-4c** และ **5a-5c**

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรีย และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) และเซลล์ปกติ (Vero cells) ของสาร 1-5 และสารอนุพันธ์ 1a, 2a-2c, 3a-3c, 4a-4c, และ 5a-5c

Compounds	Antimalarial activity, IC ₅₀ (μM)	Cytotoxicity, IC ₅₀ (μM)				
		KB (Human epidermoid carcinoma in the mouth)	SI ^a	NCI-H187 (Human small cell lung cancer cells)	SI ^b	Vero cell
1	4.491	0.239	18.26	0.565	7.73	4.365
1a	inactive	15.85	1.05	2.51	6.61	16.59
2	17.180	7.453	2.82	9.042	2.31	21.000
2a	0.74	0.003	710	0.029	73.45	2.13
2b	0.964	0.874	1.97	0.112	15.375	1.722
2c	7.61	4.28	4.06	2.65	6.56	17.38
3	inactive	103.74	0.97	96.31	1.04	100.36
3a	inactive	Inactive	-	inactive	-	nontoxic
3b	6.19	0.003	4886.67	3.21	4.57	14.66
3c	0.57	0.000027	139259.25	0.063	59.68	3.76
4	inactive	4.634	5.47	14.38	1.76	25.37
4a	inactive	Inactive	-	inactive	-	nontoxic
4b	inactive	Inactive	-	inactive	-	nontoxic
4c	inactive	106.12	0.72	75.44	1.01	75.96
5	7.151	0.020	343.5	0.843	8.15	6.87
5a	0.893	0.027	74.85	0.075	26.95	2.021
5b	1.319	0.003	387.33	0.082	14.17	1.162
5c	9.154	2.554	5.38	2.755	4.99	13.75
dihydroartemisinin	0.0045	-	-	-	-	-
ellipticine	-	0.302	3.37	0.438	2.32	1.018
doxorubicine	-	0.117	-	0.053	-	-

SI^a = IC₅₀ ของสารในเซลล์ปกติ/IC₅₀ ของสารในเซลล์มะเร็งช่องปาก

SI^b = IC₅₀ ของสารในเซลล์ปกติ/IC₅₀ ของสารในเซลล์มะเร็งปอด

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรีย และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) และเซลล์ปกติ (Vero cells) ของสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ พบว่าเมื่อนำสาร 8-deoxy trichothecin (**1**) มาทำปฏิกิริยา hydrogenation ทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรีย และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลดลง แสดงว่าพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 9, 10, 2' และ 3' มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ และเมื่อทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์เอสเทอร์ต่างๆ ของสาร **2** และ สาร **3** พบว่าสารอนุพันธ์ **2a-2c**, **3b** และ **3c** แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรีย และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ดีกว่าสารตั้งต้น โดยเมื่อเปรียบเทียบสาร **2a-2c** ที่ทำการปรับเปลี่ยนจำนวนคาร์บอนของหมู่แอลคิล ทำให้ทราบว่าเมื่อจำนวนคาร์บอนเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรีย และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกลับลดลง ในขณะที่สาร **3a-3c** พบว่าเมื่อจำนวนคาร์บอนเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรีย และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งสาร **2a 3b** และ **3c** แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ที่สูงมากด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 3, 3 และ 0.027 nM ตามลำดับ และมีค่า selectivity index ที่สูง ด้วยค่า 710, 4886.67 และ 139259.25 ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าสารมาตรฐาน (ellipticine และ doxorubicine) แสดงว่าหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่ง 8 ของสาร **2** มีความสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรียและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่หมู่เอสเทอร์ที่ตำแหน่ง 7 ของสาร **3** ส่งผลให้สาร **3a** ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรียและไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ส่วนอนุพันธ์เอสเทอร์ของสาร **4** พบว่าส่งผลให้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรียและไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ยกเว้นสาร **4c** แสดงว่าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 4 มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มไตรโคทีซี ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของสาร **5** พบว่าสารอนุพันธ์ **5a** และ **5b** แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรียและมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ดีกว่าสารตั้งต้น โดยเฉพาะสาร **5b** แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง KB ที่สูงมากด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 3 nM และมีค่า selectivity index ที่สูง เท่ากับ 387.33 สำหรับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) พบว่าสารอนุพันธ์เอสเทอร์ของสาร **2**, **3** และ **5** แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ที่สูงกว่าสารตั้งต้น ยกเว้นสาร **3a** และ **5c** โดยสาร **2a** แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ที่สูงด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.029 μ M และมีค่า selectivity index เท่ากับ 73.45 ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่าสาร doxorubicine

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของไตรโคทีซี **1-5** แล้วทำการยืนยันโครงสร้างสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สามารถทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ได้ทั้งหมด 13 ชนิด และได้นำสารอนุพันธ์ดังกล่าวไปทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรียและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) และเซลล์ปกติ (Vero cells) พบว่าสารส่วนใหญ่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรียที่ดีกว่าสารตั้งต้น ยกเว้นสาร **1a** และ **5c** แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ในการยับยั้งมาลาเรียยังอ่อนกว่าสารอ้างอิง และพบว่าสาร **2a 3b 3c** และ **5b** แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ที่สูงมากด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 3, 3, 0.027 และ 3 nM ตามลำดับ และสาร **2a** แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ที่สูงด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ

0.029 μM ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่าสาร doxorubicine ดังนั้นหมู่เอสเตอร์ที่ตำแหน่ง 4 และหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 7 ในโครงสร้างของสารอนุพันธ์ของไตรโคทีซีมีความสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเงินทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2555 (รหัสโครงการ 133/2555) และขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์เพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

1. Ueno, Y. 1980. Trichothecene Mycotoxins Mycology, Chemistry, and Toxicology. *Advances in Nutritional Research*. Springer US. p. 301-353.
2. Amagata, T., Rath, C., Rigot, J. F., Tarlov, N., Tenney, K., Valeriote, F. A., and Crews, P. 2003. Structures and Cytotoxic Properties of Trichoverroids and Their Macrolide Analogues Produced by Saltwater Culture of *Myrothecium verrucaria*. *Journal of Medicinal Chemistry*. 46(20): 4342-4350.
3. Wang, L. W., Xu, B. G., Wang, J. Y., Su, Z. Z., Lin, F. C., Zhang, C. L., and Kubicek, C. P. 2012. Bioactive Metabolites from Phoma Species, an Endophytic Fungus from the Chinese Medicinal Plant *Arisaema erubescens*. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 93(3): 1231-1239.
4. Konishi, K., Iida, A., Tokuda, H., Kaneko, M., Nishino, H., Tomioka, K., and Kumeda, Y. 2003. Cancer Preventive Potential of Trichothecenes from *Trichothecium roseum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 11(12): 2511-2518.
5. Wang, Y., Li, Z. H., Liu, J. K., Zhang, L., Dong, Z. J., Li, G. T., and Li, Y. 2015. Identification and Cytotoxic Activities of Two New Trichothecenes and a New Cuparane-Type Sesquiterpenoid from the Cultures of the Mushroom *Engleromyces goetzii*. *Natural Products and Bioprospecting*. 5(1): 47-53.
6. de Carvalho, M. P., Weich, H., and Abraham, W. R. 2016. Macrocyclic Trichothecenes as Antifungal and Anticancer Compounds. *Current Medicinal Chemistry*. 23(1): 23-35.
7. Li, J., Ren, J., Bao, L., Jin, T., Wang, W., Pei, Y., Liu, X., and Li, E. 2016. Trichodermites A-F, New Cytotoxic Trichothecenes from the Plant Pathogenic Fungus *Trichoderma* sp. *Helvetica Chimica Acta*. 99(1): 63-69.
8. Loukaci, A., Kayser, O., Bindseil, K.-U., Siems, K., Frevert, J., and Abreu, P. M. 2000. New Trichothecenes Isolated from *Holarrhena floribunda*. *Journal of Natural Products*. 63(1): 52-56.

9. Bondy, G. S., and Pestka, J. J. 2000. Immunomodulation by Fungal Toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*. 3: 109-143.
10. Abbas, H. K., Johnson, B. B., Shier, W. T., Tak, H., Jarvis, B. B., and Boyette, C. D. 2002. Phytotoxicity and Mammalian Cytotoxicity of Macrocyclic Trichothecene Mycotoxins from *Myrothecium verrucaria*. *Phytochemistry*. 59(3): 309-313.
11. Shimada, A., Takeuchi, S., Kusano, M., Fujioka, S., and Kimura, Y. 2004. Roridin A and Verrucaridin A, Inhibitors of Pollen Development in *Arabidopsis thaliana*, Produced by *Cylindrocarpon* sp. *Plant Science*. 166(5): 1307-1312.
12. Andolfi, A.; Boari, A.; Evidente, A.; Vurro, M. 2005. Metabolites Inhibiting Germination of *Orobanche ramosa* Seeds Produced by *Myrothecium verrucaria* and *Fusarium compactum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(5): 1598-1603.
13. Sugawara, T., Tanaka, A., Nagai, K., Suzuki, K., and Okada, G. 1997. New Members of the Trichothecene Family. *The Journal of Antibiotics*. 50(9):778-780.
14. Zheng, M., Yao, T. T., Xu, X. J., Cheng, J. L., Zhao, J. H., and Zhu, G. N. 2014. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Trichodermin Derivatives as Antifungal Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 24(15): 3565-3568.
15. Cheng, J. L., Zhou, Y., Zhao, J. H., Zhang, C., and Lin, F. C. 2010. Synthesis and Antifungal Activity of Trichodermin Derivatives. *Chinese Chemical Letters*. 21(9): 1037-1040.
16. Isaka, M., Punya, J., Lertwerawat, Y., Tanticharoen, M., and Thebtaranonth, Y. 1999. Antimalarial Activity of Macrocyclic Trichothecenes Isolated from the Fungus *Myrothecium verrucaria*. *Journal of Natural Products*. 62(2): 329-331.
17. Waterman, C., Calcul, L., Mutka, T., Kyle, D. E., Pearce, C. J., and Baker, B. J. 2014. A Potent Antimalarial Trichothecene from Hyphomycete Species. *Tetrahedron Letters*. 55(29): 3989-3991.
18. Chinworrungsee, M., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Chuailua, P., and Suksamrarn, A. 2008. Cytotoxic Activities of Trichothecenes Isolated from an Endophytic Fungus Belonging to Order Hypocreales. *Archives of Pharmacal Research*. 31(5): 611-616.

ได้รับบทความวันที่ 20 เมษายน 2559

ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 19 พฤษภาคม 2559

