

การสังเคราะห์และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ สารกลุ่มโมนิเทอร์ฟีนอยด์เอสเทอร์

ศศิธร บุปผาทานิ และ วันชัย ปลื้มภาณุภัทร

ภาควิชาเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

บทคัดย่อ โโมนิเทอร์ฟีนอยด์เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพในการช่วยลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยหนึ่งในแนวทางการพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์เพิ่มขึ้นจากสารกลุ่มนี้ คือการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของโมนิเทอร์ฟีนอยด์เป็นโมนิเทอร์ฟีนอยด์เอสเทอร์ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมนิเทอร์ฟีนอยด์เอสเทอร์ โดยมีกรดโคจิกเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกด้วยวิธีโดปาโครม เริ่มจากทำการสังเคราะห์โมนิเทอร์ฟีนอยด์เอสเทอร์ ทั้งหมด 10 ชนิด จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดทรานส์-ซินนามิกกับ โโมนิเทอร์ฟีนอยด์ที่แตกต่างกัน โดยใช้ไตรเฟนิลฟอสฟีนและคาร์บอนเตตระโบรไมด์เป็นรีเอเจนต์ พบว่าได้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 5-64% นำโมนิเทอร์ฟีนอยด์เอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าฮิโนกิไทออลซินนามेटเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.58 ± 0.09 ไมโครโมลาร์ ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าฮิโนกิไทออลซินนามेटเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพมากกว่า กรดโคจิก 9 เท่า สารนี้จึงมีศักยภาพต่อการพัฒนาไปเป็นสารทำให้ผิวกระจ่างใสชนิดใหม่สำหรับใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางได้

คำสำคัญ: ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, โโมนิเทอร์ฟีนอยด์เอสเทอร์, กรดทรานส์-ซินนามิก, โโมนิเทอร์ฟีนอยด์, ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

Corresponding author E-mail: fsciwcp@ku.ac.th

Received: 11 July 2023

Revised: 7 November 2023

Accepted: 16 November 2023

บทนำ

เมลานิน (melanin) หรือเม็ดสีผิวเป็นรงควัตถุทางธรรมชาติที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งสีดำ สีน้ำตาล และสีเหลือง ซึ่งมีหน้าที่ช่วยป้องกันรังสีจากแสงแดด โดยเมลานินอยู่ในเมลานोไซมขนาดใหญ่และสามารถดูดซับแสงแดดที่มีความเข้มในระดับรังสี UV ได้ เมลา닌มีชีวสังเคราะห์มาจากไทโรซีน (tyrosine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นในร่างกาย โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) จะเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) เปลี่ยนไทโรซีนเป็นแอล-โดปา (L-Dopa) จากนั้นโดปาจะถูกออกซิไดส์เป็นโดปาคิวโนน (dopaquinone) ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เกิดการสังเคราะห์ต่อกลายเป็นเมลานินและส่งผ่านไปยังเซลล์เคราตินไซต์ (keratinocytes) ก่อนเคลื่อนสู่ผิวชั้นบนของหนังกำพร้าทำให้ผิวมีสีที่เข้มขึ้น ดังนั้นหากเอนไซม์ไทโรซิเนสทำงานมากเกินไปจะส่งผลให้เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานินมากขึ้น ทำให้สีผิวหมองคล้ำขึ้น หรือเกิดความผิดปกติของสีผิวได้⁽¹⁾ ด้วยเหตุนี้อุตสาหกรรมเครื่องสำอางในปัจจุบันจึงมีการนำสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมาใช้เพื่อช่วยเพิ่มความกระจ่างใสให้แก่ผิว เช่น กรดโคจิก (kojic acid) และอาร์บูติน (arbutin)⁽²⁾

ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน^(1,3) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 60-70 กิโลดาลตัน ภายในโครงสร้างประกอบด้วยคอปเปอร์ (copper) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ให้แก่ไทโรซีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนในร่างกายเพื่อสังเคราะห์เป็นแอล-โดปา และเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนไปเป็นโดปาคิวโนน⁽¹⁾ ปัจจัยสำคัญเกี่ยวกับการสร้างเม็ดสีเมลานิน คือเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ใช้ทดลองสกัดได้จากเห็ดแชมปิยอง (*Agaricus bisporus*)⁽⁴⁾ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเอนไซม์ในมนุษย์ ทำให้ปัจจุบันตลาดยาอาหารเสริม และเครื่องสำอางให้ความสำคัญกับสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้เป็นอย่างมาก เนื่องจากส่งผลต่อการสร้างเม็ดสีเมลานินที่ลดลง ทั้งนี้กลไกการควบคุมให้ร่างกายมีการสร้างเม็ดสีเมลานินที่ลดลง ได้แก่ 1) การยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไทโรซิเนส

ซึ่งมีผลต่อการถอดรหัส mRNA 2) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส TRP-1, TRP-2 และ/หรือเพอรอกซิเดส (peroxidase) 3) การเร่งการผลิตเซลล์ผิวหนัง 4) การยับยั้งการขนส่งเมลานินไซม 5) การยับยั้งกระบวนการอักเสบ และ 6) การดักจับอนุมูลอิสระ⁽⁵⁾ ทำให้ตลาดเครื่องสำอางมุ่งเน้นการนำสารที่มีคุณสมบัติเหล่านี้ไปใช้กับผลิตภัณฑ์เพื่อผิวกระจ่างใสหรือผลิตภัณฑ์ลดฝ้ากระทำให้สีผิวสม่ำเสมอ เนื่องจากเห็นผลได้เร็วและมีประสิทธิภาพในลดการสร้างเม็ดสีที่ผิวหนัง

กระบวนการผลิตเม็ดสีเมลานินในผิวหนัง เกิดจากเอนไซม์ไทโรซิเนสกระตุ้นให้ไทโรซีนเปลี่ยนเป็นโดปาและโดปาคิวโนน ตามลำดับ จากนั้นสารโดปาคิวโนนจะเปลี่ยนเป็นโดปาโครม (dopachrome) โดยกระบวนการออกซิเดชัน (autoxidation) ในกระบวนการผลิตยูเมลานิน (eumelanin) โดปาโครมจะเปลี่ยนเป็น 5,6-ไดไฮดรอกซีอินโดล (5,6-dihydroxyindole) หรือ 5,6-ไดไฮดรอกซีอินโดล-2-คาร์บอกซิลิกเอซิด (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid; DHICA) โดยเอนไซม์โดปาโครมเทาโทเมอเรส (dopachrome tautomerase) หรือ TRP-2 จากนั้น DHICA ที่ได้จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ DHICA oxidase หรือ TRP-1 ได้อินโดล-5,6-ควิโนนคาร์บอกซิลิกเอซิด (indole 5,6-quinone carboxylic acid) ซึ่งทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) ได้เป็นยูเมลานิน ซึ่งมีสีน้ำตาล-ดำ ส่วนการผลิตฟีโอเมลานิน (pheomelanin) กรดอะมิโน (amino acid) กลูตาไธโอน (glutathione) หรือ ซีสเตอีน (cysteine) จะทำปฏิกิริยากับโดปาคิวโนนได้เป็นกลูตาไธโอนโดปา (glutathione-dopa) หรือ ซีสเตอีนโดปา (cysteinyl-dopa) ทำให้เกิดเม็ดสีฟีโอเมลานิน ซึ่งมีสีแดง-เหลือง ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อควบคุมการสร้างเม็ดสีเมลานินนิยมใช้วิธีโดปาโครม เนื่องจากเป็นวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี (spectrophotometry)⁽⁶⁾ ที่มีความสะดวกและรวดเร็ว วิธีการนี้ใช้แอล-โดปาเป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไทโรซิเนสเปลี่ยนเป็นโดปาโครม

(ผ่านโดปาคิวโนน) ซึ่งเป็นสารที่มีสีและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร หากสารที่ศึกษามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจะส่งผลให้แอล-โดปาไม่ถูกเปลี่ยนเป็นโดปาคิวโรน

ปัจจุบันมีการพบสารประกอบหลายชนิดจากแหล่งธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น กรดทรานส์-ซินนามิก (*trans*-cinnamic acid) เป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ได้จากน้ำมันของอบเชย พบว่ามีความสามารถในการลดการสร้างเม็ดสีเมลานินและส่งผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลานิน^(4,7) โมนเทอร์พีนอยด์ (monoterpenoid) เช่น ไทมอล (thymol) เป็นส่วนประกอบหลักของต้นไทม์ และคาร์วาครอล (carvacrol) เป็นส่วนประกอบหลักในน้ำมันออริกานู พบการรายงานว่าที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 500 ไมโครโมลาร์ ไทมอลและคาร์วาครอลสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เท่ากับ 29.4% และ 35.7% ตามลำดับ⁽⁸⁾ ในปี ค.ศ. 2002 มีการนำสารฮิโนกิไทออลซินนามेट (hinokitiol cinnamate) ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากการรวมกันระหว่างกรดทรานส์-ซินนามิก และฮิโนกิไทออล (hinokitiol) โดยใช้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเบื้องต้นที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ พบว่าสารนี้มีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 57.5%⁽⁹⁾ และในปี ค.ศ. 2018 มีการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของไทมิลซินนามेट (thymyl cinnamate) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ พบว่ามีการยับยั้งไทโรซิเนส 40%⁽¹⁰⁾ ซึ่งผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารกลุ่มโมนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มาจาก การสังเคราะห์ระหว่างกรดทรานส์-ซินนามิก และโมนเทอร์พีนอยด์มีความน่าสนใจที่จะศึกษาและพัฒนาต่อ เพื่อค้นหาโครงสร้างโมนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์อื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพิ่มมากขึ้น

สารกลุ่มโมนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดคาร์บอกซิลิกและโมนเทอร์พีนอยด์ โดยใช้รีเอเจนต์ (reagent) ผสมระหว่างไตรเฟนิลฟอสฟีน

(triphenylphosphine; PPh₃) และฮาโลจีนิงเอเจนต์ (halogenating agent) เช่น ไตรคลอโรอะเซตามิด (trichloroacetamide; Cl₃CCONH₂)⁽¹¹⁾ หรือ ไตรคลอโรอะซิโทไนไตรล์ (trichloroacetonitrile; Cl₃CCN)⁽¹²⁾ ซึ่งผลิตภัณฑ์เอสเทอร์ที่ได้จะมีผลผลิตที่สูง และปฏิกิริยาเกิดได้ภายใต้ภาวะที่ไม่รุนแรงและเป็นกลาง การเปลี่ยนฮาโลจีนิงเอเจนต์ที่มีองค์ประกอบของคลอรีน (chlorine) เป็นโบรมีน (bromine) จะช่วยทำให้รีเอเจนต์มีประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้น⁽¹³⁾ เนื่องจากโบรมีนเป็นอะตอมที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยามากกว่าคลอรีน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสังเคราะห์โมนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดทรานส์-ซินนามิกและโมนเทอร์พีนอยด์ที่มีโครงสร้างที่หลากหลาย โดยใช้รีเอเจนต์ผสมระหว่างไตรเฟนิลฟอสฟีนและฮาโลจีนิงเอเจนต์ที่มีโบรมีนเป็นองค์ประกอบ นำสารที่สังเคราะห์ได้ไปศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อเป็นองค์ความรู้ใหม่ และเป็นแนวทางการพัฒนาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ที่สามารถใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางได้ต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

สารกลุ่มโมนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้งหมด วิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค ¹H และ ¹³C นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (nuclear magnetic resonance; NMR) ด้วยเครื่อง Bruker 400 MHz AVANCE III HD spectrometer (Bruker, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) ที่ความถี่ 400 MHz สำหรับ ¹H และ 100 MHz สำหรับ ¹³C ค่าการเลื่อนทางเคมี (chemical shifts; δ) ที่ได้จะถูกแสดงในหน่วย ppm ค่าคงตัวการคู่ควบ (coupling constants; J) ที่ได้จะถูกแสดงในหน่วย Hz และใช้ CDCl₃ เป็นตัวทำละลายสารที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด การตรวจวัดมวลสารชนิดความละเอียดสูง (high-resolution mass spectrometry; HRMS) มาจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Bruker microtof-Q III

(Karlsruhe, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) โดยใช้ ESI positive mode ค่าที่ได้แสดงในรูปมวลต่อประจุ (mass/charge: m/z) ค่าจุดหลอมเหลวถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดจุดหลอมเหลว (melting point apparatus SMP10, Stuart Scientific, สหราชอาณาจักร) ค่าออปติคอลโรเทชัน (optical rotation) ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องโพลาริมิเตอร์ (polarimeter) (ATGO™ POLAX-2L, ATAGO, ญี่ปุ่น) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและข้อมูลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader, Spark™ 10M, Tecan, สวิตเซอร์แลนด์)

สารเคมี

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเกรดทางการค้า ได้แก่ เฮกเซน (hexane) และเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (Zenith science CO., LTD., ประเทศไทย) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการกลั่นก่อนนำมาใช้งาน ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเกรดวิเคราะห์ ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ ได้แก่ กรดทรานส์-ซินนามิก (*trans*-cinnamic acid) (Fluka, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), ไทริเฟนิลฟอสฟีน (triphenylphosphine) (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), คาร์บอนเตตระโบรไมด์ (carbontetra-bromide) (Acros, เบลเยียม), ไทริเอทิลามีน (triethylamine) (Acros, เบลเยียม), ไทมอล (thymol) (TCI, ญี่ปุ่น), คาร์วาครอล (carvacrol) (TCI, ญี่ปุ่น), ยูจีนอล (eugenol) (TCI, ญี่ปุ่น), ฮิโนกิติโอล (hinokitiol) (TCI, ญี่ปุ่น), (-)-เมนทอล ((-)-menthol) (Fluka, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), (-)-คาร์วีโอล ((-)-carveol) (Aldrich, สหรัฐอเมริกา), (S)-(-)-เพอริลลิล แอลกอฮอล์ ((S)-(-)-perillyl alcohol) (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา), (±)-เมอทีนอล (myrtenol)

(Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา), (-)-บอร์นีโอล ((-)-borneol) (TCI, ญี่ปุ่น), เจอรานีโอล (geraneol) (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา), กรดโคจิก (kojic acid) (TCI, ญี่ปุ่น), แอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate anhydrous; anhydrous Na₂SO₄) (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต (di-potassium hydrogen phosphate trihydrate, K₂HPO₄•3H₂O) (Sigma-Aldrich, แคนาดา), โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate; KH₂PO₄) (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), แอล-โดปา (L-Dopa) (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา) และเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase, EC 1.14.18.1 from mushroom) (TCI, ญี่ปุ่น)

โครมาโทกราฟี

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ได้แก่ thin layer chromatography (TLC) ใช้ silica gel F254 บนแผ่นอะลูมิเนียม (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) และ preparative thin layer chromatography (PTLC) ใช้ silica gel 60 PF₂₅₄ บนแผ่นแก้ว ขนาด 20 ซม. × 20 ซม. (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

การสังเคราะห์สารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์

นำกรดทรานส์-ซินนามิก 0.5 มิลลิโมล และ ไทริเฟนิลฟอสฟีน (PPh₃) 1.0 มิลลิโมล เทใส่ลงในขวดก้นกลม ขนาด 5 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนแบบปราศจากน้ำ (dry dichloromethane; CH₂Cl₂) ลงไป 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมคาร์บอนเตตระโบรไมด์ (CBr₄) 1.0 มิลลิโมล ลงไปในของผสม ทำการกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศเฉื่อยของอาร์กอน (argon; Ar) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนเทอร์พีนอยด์ 0.5 มิลลิโมล และไทริเอทิลามีน (Et₃N) 1.0 มิลลิโมล ลงในของผสม กวนปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นการทำปฏิกิริยา นำของผสมที่ได้มา

สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนต่อน้ำ ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำชั้นไดคลอโรมีเทนมาสกัดด้วยน้ำเกลืออิ่มตัว (brine) อีกหนึ่งครั้ง แล้วกำจัดน้ำที่ปนเปื้อนในไดคลอโรมีเทนออกโดยการเติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต ทำการกรองเพื่อเอาโซเดียมซัลเฟตออก นำสารละลายที่เหลือไประเหยไดคลอโรมีเทนออกด้วยวิธีลดความดันแบบระบบสุญญากาศจนของผสมที่ได้ปราศจากไดคลอโรมีเทน นำของผสมนี้วิเคราะห์สารที่มีอยู่ โดยใช้เทคนิค TLC และแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค PTLC จะได้สารโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่ต้องการ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

นำสารโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเบื้องต้นที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ (เนื่องจากมีข้อจำกัดของปริมาณสารที่มีอยู่) โดยใช้วิธีโดปาโครม (dopachrome method) เปรียบเทียบกับกรดโคจิก ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) โดยผสมสารตัวอย่างโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ (ละลายใน 5% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ที่ pH 6.8) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ที่ pH 6.8 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในไมโครเวลเพลท 96 หลุม (96-well plate) จากนั้นเติมเอนไซม์ไทโรซิเนส (100 units/มิลลิลิตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 0.3 มิลลิโมลาร์ แอล-โดปา ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นสารตั้งต้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลทและทำการทดสอบซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง/สารตัวอย่าง คำนวณหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ด้วยสูตร

$$I (\%) = \frac{[(\text{Blank} - \text{Blank control}) - (\text{Test} - \text{Test control})]}{(\text{Blank} - \text{Blank control})} \times 100\%$$

I คือ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Blank คือ การทดสอบที่ใช้ 5% DMSO ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนสารตัวอย่าง

Blank control คือ การทดสอบที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์ไทโรซิเนส และใช้ 5% DMSO ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนสารตัวอย่าง Test คือ การทดสอบตามปกติ

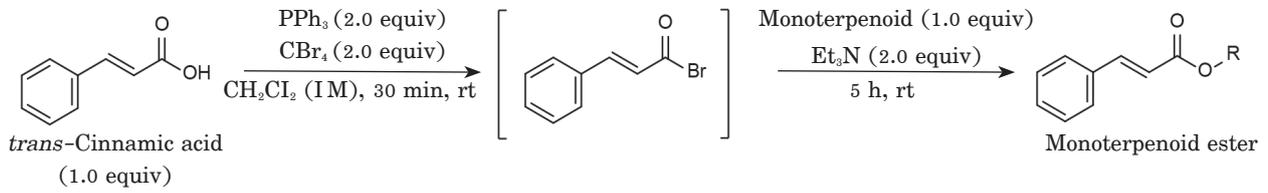
Test control คือ การทดสอบที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์ไทโรซิเนส

นำโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่า 70% (ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์) ทดสอบหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50}) โดยทำการศึกษาที่ 9 ความเข้มข้น/สาร และใช้โปรแกรม GraphPad Prism 6 ในการคำนวณ⁽¹⁴⁾ หากโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ชนิดใดมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยกว่า 50% (ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์) จะระบุว่าค่า IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครโมลาร์

ผล

การสังเคราะห์โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์

จากการสังเคราะห์โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์โดยเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างโมโนเทอร์พีนอยด์และกรดทรานส์-ซินนามิก โดยใช้ไตรเฟนิลฟอสฟีน (PPH_3) และคาร์บอนเตตระโบรไมด์ (CBr_4) เป็นรีเอเจนต์ ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าผลผลิตของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 5-64% ซึ่ง (-)-คาร์วิลซินนามेट (6) มีผลผลิตต่ำสุด และคาร์วาคริลซินนามेट (2) มีผลผลิตสูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มีผลผลิตในช่วงสูง ได้แก่ คาร์วาคริลซินนามेट (2), ฮิโนกิไท-ออลซินนามेट (4), ไทมิลซินนามेट (1), (-)-เมนทิลซินนามेट (5), ยูจีนิลซินนามेट (3) และ (-)-บอร์นิลซินนามेट (9) โดยมีค่าผลผลิตเท่ากับ 64%, 61%, 57%, 54%, 51% และ 50% ตามลำดับ กลุ่มอนุพันธ์โมโนเทอร์พีนอยด์ที่มีผลผลิตในช่วงปานกลาง ได้แก่ (±)-เมทินิลซินนามेट (8) และเจอร์วานิลซินนามेट (10) โดยมีค่าผลผลิตเท่ากับ 26% และ 25% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มอนุพันธ์โมโนเทอร์พีนอยด์ที่มีผลผลิตในช่วงต่ำ ได้แก่ (S)-(-)-เพอร์ลิลซินนามेट (7) และ (-)-คาร์วิลซินนามेट (6) โดยมีค่าผลผลิตเท่ากับ 15% และ 5% ตามลำดับ



ภาพที่ 1 การสังเคราะห์โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ โดยใช้กรดทรานส์-ซินนามิกและโมโนเทอร์พีนอยด์เป็นสารตั้งต้น

ตารางที่ 1 ผลการสังเคราะห์โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์

โมโนเทอร์พีนอยด์		โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์		ผลผลิต (%)
ชื่อสาร	โครงสร้างทางเคมี	ชื่อสาร	โครงสร้างทางเคมี	
โทมอล		โทมิลซินนามเมต (1)		57
คาร์วาครอล		คาร์วาคริลซินนามเมต (2)		64
ยูจีนอล		ยูจีนิลซินนามเมต (3)		51
อีโนกิไทออล		อีโนกิไทออลซินนามเมต (4)		61
(-)-เมนทอล		(-)-เมนทิลซินนามเมต (5)		54
(-)-คาร์วีวอล		(-)-คาร์วิลซินนามเมต (6)		5
(S)-(-)-เพอร์ลิลแอลกอฮอล์		(S)-(-)-เพอร์ลิลซินนามเมต (7)		15
(±)-เมอทีนอล		(±)-เมอทีนิลซินนามเมต (8)		26
(-)-บอร์นียอล		(-)-บอร์นียิลซินนามเมต (9)		50
เจอร์ยานียอล		เจอร์ยานิลซินนามเมต (10)		25

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างสารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้งหมด วิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค ^1H และ ^{13}C นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ค่าจุดหลอมเหลว ค่าออกบิตคอลลโรเทชัน และค่าการตรวจวัดมวลสารชนิดความละเอียดสูงได้ผลการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

ไทมิลซินนามेट (thymyl cinnamate) (1): ผลึกสีขาว; mp 71–72 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.93 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.69–7.60 (m, 2H, Ar-H), 7.51–7.43 (m, 2H, Ar-H), 7.29 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.09 (dd, $J = 7.9, 1.8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.96–6.91 (m, 1H, Ar-H), 6.71 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 3.08 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H, CH), 2.38 (s, 3H, CH_3), 1.26 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, $\text{CH}_3 \times 2$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 165.7 (C=O), 148.0 (C=C), 146.5 (Ar-C), 137.2 (Ar-C), 136.6 (Ar-C), 134.2 (Ar-C), 130.7 (Ar-C), 129.0 (Ar-C $\times 2$), 128.3 (Ar-C $\times 2$), 127.2 (Ar-C), 126.5 (Ar-C), 122.8 (Ar-C), 117.3 (C=C), 27.2 (CH), 23.1 ($\text{CH}_3 \times 2$), 20.9 (CH_3). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NaO}_2$ 303.1361 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), found 303.1356.⁽¹³⁾

คาร์วาคริลซินนามेट (carvacryl cinnamate) (2): ผลึกสีขาว; mp 60–62 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.92 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.69–7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.50–7.39 (m, 2H, Ar-H), 7.20 (dd, $J = 7.8, 0.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.07 (dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.98 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.70 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 2.92 (sept, $J = 6.9$ Hz, 1H, CH), 2.21 (s, 3H, CH_3), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, $\text{CH}_3 \times 2$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 165.3 (C=O), 149.4 (Ar-C), 148.1 (C=C), 146.5 (Ar-C), 134.3 (Ar-C), 131.0 (Ar-C), 130.7 (Ar-C), 129.1 (Ar-C $\times 2$), 128.4 (Ar-C $\times 2$), 127.4 (Ar-C), 124.2 (Ar-C), 119.9 (Ar-C), 117.3 (C=C), 33.7 (CH), 24.0 ($\text{CH}_3 \times 2$), 15.9 (CH_3). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{NaO}_2$ 303.1361 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), found 303.1359.

ยูจีนิลซินนามेट (eugenyl cinnamate) (3): ผลึกสีเหลืองอ่อน; mp 86–87 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.89 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.66–7.55 (m, 2H, Ar-H), 7.48–7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.05 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ar-H), 6.87–6.78 (m, 2H, Ar-H), 6.69 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 6.00 (ddt, $J = 16.8, 10.0, 6.7$ Hz, 1H, CH=CH₂), 5.19–5.06 (m, 2H, CH=CH₂), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.41 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 165.2 (C=O), 151.1 (Ar-C), 146.5 (C=C), 139.0 (Ar-C), 138.1 (C=C), 137.1 (Ar-C), 134.3 (Ar-C), 130.6 (Ar-C), 129.0 (Ar-C $\times 2$), 128.3 (Ar-C $\times 2$), 122.7 (Ar-C), 120.8 (Ar-C), 117.1 (C=C), 116.2 (C=C), 112.8 (Ar-C), 55.9 (OCH_3), 40.2 (CH_2). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{NaO}_3$ 317.1154 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), found 317.1142.⁽¹⁵⁾

ฮิโนกิตอลซินนามेट (hinokitiol cinnamate) (4): ผลึกสีน้ำตาล; mp 70–72 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.87 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.56 (dd, $J = 6.7, 2.9$ Hz, 2H, Ar-H), 7.40 (p, $J = 3.7$ Hz, 3H, Ar-H), 7.21 (s, 1H, Ar-H), 7.17 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.07 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H, Ar-H), 6.96 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, Ar-H), 6.66 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 2.80 (sept, $J = 6.9$ Hz, 1H, CH), 1.24 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, $\text{CH}_3 \times 2$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 164.1 (C=O), 160.2 (C=O), 147.3 (C=C), 145.9 (Ar-C), 137.4 (Ar-C), 134.4 (Ar-C), 134.2 (Ar-C), 130.8 (Ar-C), 130.8 (Ar-C), 129.0 (Ar-C $\times 2$), 128.9 (Ar-C), 128.4 (Ar-C $\times 2$), 128.2 (Ar-C), 116.6 (C=C), 38.4 (CH), 22.9 ($\text{CH}_3 \times 2$). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{NaO}_3$ 317.1154 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), found 317.1167.⁽⁹⁾

(-)-เมนทิลซินนามेट ((-)-menthyl cinnamate) (5): ของเหลวหนืดใสไม่มีสี; $[\alpha]_{\text{D}}^{32.0} = -124.91^\circ$ (c = 0.0002, MeOH) ($[\alpha]_{\text{D}}^{200} = -59.29^\circ$; (c = 1.06,

CHCl₃)⁽¹⁶⁾, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.58–7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.43–7.32 (m, 3H, Ar-H), 6.44 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 4.83 (m, 1H, OCH), 2.12–2.02 (m, 1H, CH), 2.01–1.85 (m, 1H, CH), 1.77–1.66 (m, 2H, CH₂), 1.61–1.40 (m, 2H, CH₂), 1.08 (m, 2H, CH₂), 0.98–0.83 (m, 6H, CH₃ × 2), 0.80 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.6 (C=O), 144.4 (C=C), 134.6 (Ar-C), 130.2 (Ar-C), 128.9 (Ar-C × 2), 128.0 (Ar-C × 2), 118.8 (C=C), 74.3 (CH), 47.2 (CH), 41.1 (CH₂), 34.3 (CH₂), 31.4 (CH), 26.4 (CH), 23.6 (CH₂), 22.1 (CH₃), 20.8 (CH₃), 16.5 (CH₃). HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₆NaO₂ 309.1830 ([M+Na]⁺), found 309.1860.⁽¹⁷⁾

(-)-คาร์วิลซินนามेट ((-)-carvyl cinnamate) (6): ของเหลวหนืดใสไม่มีสี; $[\alpha]_D^{26.7} = -159.89^\circ$ (*c* = 0.0002, MeOH), ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.57–7.50 (m, 2H, Ar-H), 7.38 (m, 3H, Ar-H), 6.47 (dd, *J* = 16.0, 4.5 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 5.68–5.55 (m, 2H, C=CH, OCH), 4.74 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H, C=CH₂), 2.38–2.22 (m, 1H, CH), 2.19–2.08 (m, 1H, CH), 2.08–1.94 (m, 1H, CH), 1.77–1.58 (m, 6H, CH₃ × 2), 1.62–1.50 (m, 1H, CH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.9 (C=O), 148.3 (C=C), 144.8 (C=C), 134.0 (Ar-C), 133.1 (C=C), 130.3 (Ar-C), 128.9 (Ar-C × 2), 128.1 (Ar-C × 2), 126.0 (C=C), 118.4 (C=C), 109.4 (C=C), 73.3 (OCH), 40.3 (CH), 34.1 (CH₂), 30.8 (CH₂), 20.5 (CH₃), 18.9 (CH₃). HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₂NaO₂ 305.1517 ([M+Na]⁺), found 305.1509.

(S)-(-)-เพอริลลิลซินนามेट ((S)-(-)-perillylcinnamate)(7): ของเหลวหนืดใสไม่มีสี; $[\alpha]_D^{25.4} = -89.94^\circ$ (*c* = 0.0002, MeOH), ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.70 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.59–7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.48–7.29 (m, 3H, Ar-H), 6.47 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 5.82 (dp, *J* = 4.4, 1.6 Hz, 1H, C=CH),

4.73 (dt, *J* = 4.1, 1.3 Hz, 2H, C=CH₂), 2.24–2.16 (m, 4H, CH₂ × 2), 2.00 (m, 1H, CH), 1.87 (m, 1H, CH), 1.75 (s, 3H, CH₃), 1.60–1.45 (m, 1H, CH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.9 (C=O), 149.6 (C=C), 144.8 (C=C), 134.5 (Ar-C), 132.7 (C=C), 130.3 (Ar-C), 128.9 (Ar-C × 2), 128.1 (Ar-C × 2), 125.9 (C=C), 118.1 (C=C), 108.8 (C=C), 68.5 (OCH₂), 40.9 (CH), 30.5 (CH₂), 27.4 (CH₂), 26.5 (CH₂), 20.8 (CH₃). HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₂NaO₂ 305.1517 ([M+Na]⁺), found 305.1513.⁽¹⁸⁾

(±)-เมอทีนิลซินนามेट ((±)-myrtenyl cinnamate)(8): ของเหลวหนืดใสไม่มีสี; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.69 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.57–7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.44–7.34 (m, 3H, Ar-H), 6.45 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-C=CH), 5.62 (m, 1H, C=CH), 4.66–4.51 (m, 2H, OCH₂), 2.47–2.21 (m, 3H, CH, CH₂), 2.26–2.07 (m, 2H, CH₂), 1.30 (s, 3H, CH₃), 1.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH), 0.86 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.9 (C=O), 144.7 (C=C), 143.1 (C=C), 134.5 (Ar-C), 130.3 (Ar-C), 128.9 (Ar-C × 2), 128.1 (Ar-C × 2), 121.5 (C=C), 118.2 (C=C), 67.1 (OCH₂), 43.6 (CH), 40.8 (CH), 38.1 (C), 31.5 (CH₂), 31.3 (CH₂), 26.2 (CH₃), 21.1 (CH₃). HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₂NaO₂ 305.1517 ([M+Na]⁺), found 305.1504.⁽¹⁹⁾

(-)-บอร์นิลซินนามेट ((-)-bornyl cinnamate)(9): ของเหลวหนืดใสไม่มีสี; $[\alpha]_D^{24.3} = -154.89^\circ$ (*c* = 0.0002, MeOH), ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.59–7.50 (m, 2H, Ar-H), 7.38 (m, 3H, Ar-H), 6.48 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 5.02 (ddd, *J* = 10.0, 3.5, 2.1 Hz, 1H, OCH), 2.42 (dddd, *J* = 13.6, 9.9, 4.7, 3.3 Hz, 1H, CH), 2.05 (ddd, *J* = 12.1, 9.1, 4.4 Hz, 1H, CH), 1.78 (tt, *J* = 12.1, 4.3 Hz, 1H, CH), 1.71 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H, CH), 1.42–1.23 (m, 2H, CH₂), 1.07 (dd, *J* = 13.8, 3.5 Hz, 1H, CH), 0.95 (s, 3H, CH₃),

0.89 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, $\text{CH}_3 \times 2$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 167.4 (C=O), 144.2 (C=C), 134.6 (Ar-C), 130.2 (Ar-C), 128.9 (Ar-C $\times 2$), 128.1 (Ar-C $\times 2$), 118.8 (C=C), 80.0 (OCH), 49.0 (C), 47.9 (C), 45.0 (CH), 36.9 (CH_2), 28.1 (CH_2), 27.3 (CH_2), 19.8 (CH_3), 18.9 (CH_3), 13.6 (CH_3). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NaO}_2$ 307.1674 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), found 307.1661.⁽²⁰⁾

เจอร์รานิลซินนามेट (geranyl cinnamate) (10): ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.70 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.57–7.47 (m, 2H, Ar-H), 7.38 (m, 3H, Ar-H), 6.46 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 5.43 (td, $J = 7.1, 1.3$ Hz, 1H, C=CH), 5.10 (tt, $J = 6.8, 1.4$ Hz, 1H, C=CH), 4.74 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2), 2.19–2.01 (m, 4H, $\text{CH}_2 \times 2$), 1.75 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.69 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.61 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 167.0 (C=O), 144.7 (C=C), 142.4 (C=C), 134.5 (Ar-C), 131.9 (C=C), 130.2 (Ar-C), 128.9 (Ar-C $\times 2$), 128.1 (Ar-C $\times 2$), 123.8 (C=C), 118.4 (C=C), 118.3 (C=C), 61.5 (OCH_2), 39.6 (CH_2), 26.3 (CH_2), 25.7 (CH_3), 17.7 (CH_3), 16.5 (CH_3). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NaO}_2$ 307.1674 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), found 307.1661.⁽²¹⁾

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเบื้องต้นที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ของสารโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ จำนวน 10 สาร พบว่าค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ในช่วง 29.60–97.34% โดยสารโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่า 70% มีดังนี้ (-)-คาร์วิลซินนามेट (6), ไทมิลซินนามेट (1), (S)-(-)-เพอร์ลิลซินนามेट (7), คาร์วาคริลซินนามेट (2), (-)-บอร์นิลซินนามेट (9), (\pm)-เมอทีนิลซินนามेट (8), ยูจีนิลซินนามेट (3) และอีโนกิไทออลซินนามेट (4) โดยมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 70.51%, 74.50%, 75.93%, 81.92%, 85.42%, 88.16%, 90.05% และ 97.34% ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 2

เมื่อนำสารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงมากกว่า 70% ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ จำนวน 8 สารหาค่า IC_{50} ดังแสดงในตารางที่ 2 ผลการทดสอบพบว่าอีโนกิไทออลซินนามेट (4) เป็นสารที่มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด (1.58 ± 0.09 ไมโครโมลาร์) และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวกกรดโคจิก (14.06 ± 0.91 ไมโครโมลาร์) ในขณะที่สารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์อีก จำนวน 7 สารมีค่า IC_{50} สูงกว่ากรดโคจิก

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์

โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์	การยับยั้ง \pm SD (%) ¹	$\text{IC}_{50} \pm$ SD (μM)
ไทมิลซินนามेट (1)	74.50 \pm 5.68	56.50 \pm 8.95
คาร์วาคริลซินนามेट (2)	81.92 \pm 8.52	44.88 \pm 6.05
ยูจีนิลซินนามेट (3)	90.05 \pm 4.51	28.02 \pm 9.53
อีโนกิไทออลซินนามेट (4)	97.34 \pm 0.14	1.58 \pm 0.09
(-)-เมอทีนิลซินนามेट (5)	45.15 \pm 2.44	> 100
(-)-คาร์วิลซินนามेट (6)	70.51 \pm 0.33	40.76 \pm 4.12
(S)-(-)-เพอร์ลิลซินนามेट (7)	75.93 \pm 1.99	44.82 \pm 18.3
(\pm)-เมอทีนิลซินนามेट (8)	88.16 \pm 5.66	37.15 \pm 7.37
(-)-บอร์นิลซินนามेट (9)	85.42 \pm 5.45	25.22 \pm 5.68
เจอร์รานิลซินนามेट (10)	29.60 \pm 1.20	> 100
กรดโคจิก	85.74 \pm 0.40	14.06 \pm 0.91

หมายเหตุ: ¹ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

วิจารณ์

จากผลการสังเคราะห์สารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ผ่านปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างโมโนเทอร์พีนอยด์และกรดทรานส์-ซินนามิก พบว่าเมื่อชนิดของโมโนเทอร์พีนอยด์เป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compounds) ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการจะมีค่าผลผลิตสูงไปจนถึงปานกลาง เช่น ยูจีนิลซินนามเมต (3), ไทมิลซินนามเมต (1), ฮิโนกิไทออลซินนามเมต (4) และ คาร์วาคริลซินนามเมต (2) โดยมีค่าผลผลิตเท่ากับ 51%, 57%, 61% และ 64% ตามลำดับ ซึ่งโมโนเทอร์พีนอยด์เป็นสารประกอบอะโรมาติกจะเป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) จึงมีความเป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ที่ไม่ดี มีผลมาจากความสามารถในการเกิดเรโซแนนซ์ (resonance) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลและวงอะโรมาติกได้⁽¹³⁾ ในขณะที่ชนิดของโมโนเทอร์พีนอยด์เป็นสารประกอบอะลิฟาติก (aliphatic compounds) มีค่าผลผลิตปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ เช่น (±)-เมอทีนิลซินนามเมต (8), เจอรานิลซินนามเมต (10), (S)-(-)-เพอร์ลิลซินนามเมต (7) และ (-)-คาร์วิลซินนามเมต (6) โดยมีค่าผลผลิตเท่ากับ 26%, 25%, 15% และ 5% ตามลำดับ อาจเป็นไปได้ว่าโมโนเทอร์พีนอยด์เหล่านี้มีความเสถียรต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่เป็นอะโรมาติกจึงสามารถสลายตัวได้ง่าย รวมถึงมีความว่องไวต่อรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจนเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง (side reactions) และเกิดสารชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ เช่น เกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชัน (bromination) หรือปฏิกิริยาการขจัด (elimination) โดยเปลี่ยนโมโนเทอร์พีนอยด์เป็นแอลคิล โบรมไนด์ (alkyl bromides) หรือแอลคีน (alkenes) ตามลำดับ⁽¹¹⁾ ส่งผลให้ผลผลิตมีค่าต่ำ อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์สารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์เพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นต่อไปในอนาคต

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ ด้วยวิธีโดปาโครมเปรียบเทียบกับกรดโคจิกซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกพบว่าฮิโนกิไทออลซินนามเมต (4) มีประสิทธิภาพ

ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ชนิดอื่น ๆ เมื่อพิจารณาโครงสร้างของฮิโนกิไทออลซินนามเมต (4) พบว่ามีส่วนที่คล้ายกับส่วนแอลฟา-ไฮดรอกซีคาร์บอนิล (α -hydroxy carbonyl) ของกรดโคจิก ในขณะที่โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์อื่น ๆ ไม่มีส่วนนี้ อาจเป็นส่วนสำคัญในการช่วยออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ถึงแม้ว่าจะมีผลงานวิจัยก่อนหน้านี้กล่าวถึงสารชนิดนี้⁽⁹⁾ แต่งานวิจัยดังกล่าวเป็นการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเบื้องต้นที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์เท่านั้น ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยครั้งนี้ที่มีการศึกษาเปรียบเทียบกับโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มีความหลากหลาย รวมถึงการรายงานค่า IC_{50} ของฮิโนกิไทออลซินนามเมต (4) ที่ชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารชนิดนี้ดีกว่ากรดโคจิกประมาณ 9 เท่า

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ พบว่าการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีจากกรดทรานส์-ซินนามิกเป็นเอสเทอร์ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Sheng Z. และคณะ⁽¹⁰⁾ ที่ได้รายงานการสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดทรานส์-ซินนามิก เพื่อทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าผลิตภัณฑ์เอสเทอร์เป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งดีกว่ากรดทรานส์-ซินนามิก เช่น กรดทรานส์-ซินนามิก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 209.5 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่โทมอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5,925.0 ไมโครโมลาร์ แต่เมื่อทำการสังเคราะห์เป็นไทมิลซินนามเมต พบว่ามีค่า IC_{50} ที่ต่ำลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการปรับเปลี่ยนโครงสร้างในงานวิจัยนี้มีแนวโน้มช่วยให้การออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีขึ้น ซึ่งอาจมีเหตุผลจากการที่อะตอมออกซิเจน จากส่วนของโมโนเทอร์พีนอยด์สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) กับบริเวณเร่งของเอนไซม์ ส่งผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสลดลง หรือสามารถจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ไทโรซิเนส ส่งผลให้โครงสร้างเกิดความไม่เป็นระเบียบ จึงทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสมี

ความสามารถในการทำงานลดลง⁽²²⁾ นอกจากนี้ ผลการศึกษาของ Takahashi T. และคณะ⁽²³⁾ ช่วยสนับสนุนผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เพิ่มขึ้นของสารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มาจากกรดทรานส์-ซินนามิก เนื่องจากผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของตำแหน่งพันธะคู่ C=C ที่ต่อกับหมู่คาร์บอนิลของสารอนุพันธ์ของกรดทรานส์-ซินนามิก โดยสารที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งนี้จะออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีกว่าสารที่ไม่มีพันธะคู่

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์กับสารกลุ่มอื่นๆ ที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ เช่น ผลการวิจัยของ Uchida R. และคณะ⁽²⁴⁾ พบว่า 2-ไฮดรอกซีไทโรซอล (2-hydroxytyrosol; 2-HT) ที่แยกได้จากเชื้อราสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 13.0 ไมโครโมลาร์ และผลการวิจัยของ Song S. และคณะ⁽²⁵⁾ รายงานว่าสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นไอโซสเตอร์ (isostere) ในสารเรสเวอราทรอล (resveratrol) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 16.52 ไมโครโมลาร์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ โดยเฉพาะฮิโนกิโทอลซินนามेट (4) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีกว่า

สรุป

จากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์จำนวน 10 สาร โดยมีกรดโคจิกเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก พบว่าฮิโนกิโทอลซินนามेट (4) มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.58±0.09 ไมโครโมลาร์ ทั้งนี้ความคงตัวของสารนี้ต่อการนำไปใช้งานเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องทำการศึกษาต่อไป เพื่อสนับสนุนให้เห็นว่าสารนี้เป็นสารทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจในการพัฒนาต่อยอด สำหรับใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์บำรุงผิวเพื่อช่วยเพิ่มความกระจ่างใสให้แก่ผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม; ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนสำหรับการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Bae-Harboe YS, Park HY. Tyrosinase: a central regulatory protein for cutaneous pigmentation. *J Invest Dermatol* 2012; 132(12): 2678-80.
2. Wang W, Gao Y, Wang W, Zhang J, Yin J, Le T, et al. Kojic acid showed consistent inhibitory activity on tyrosinase from mushroom and in cultured B16F10 cells compared with arbutins. *Antioxidants* 2022; 11(3): 502. (14 pages).
3. Zolghadri S, Bahrami A, Hassan Khan MT, Munoz-Munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2019; 34(1): 279-309.
4. Shi Y, Chen QX, Wang Q, Song KK, Qiu L. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Food Chem* 2005; 92(4): 707-12.
5. Sarkar R, Chugh S, Garg VK. Newer and upcoming therapies for melasma. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2012; 78(4): 417-28.
6. Manosroi A, Manosroi J. Free radical scavenging and tyrosinase inhibition activity of aromatic volatile oil from Thai medicinal plants for cosmetic uses. *Acta Hort* 2005; 680: 97-100.
7. Cui Y, Hu YH, Yu F, Zheng J, Chen LS, Chen QX, et al. Inhibition kinetics and molecular simulation of p-substituted cinnamic acid derivatives on tyrosinase. *Int J Biol Macromol* 2017; 95: 1289-97.

8. Brotzman N, Xu Y, Graybill A, Cocolas A, Ressler A, Seeram NP, et al. Synthesis and tyrosinase inhibitory activities of 4-oxobutanoate derivatives of carvacrol and thymol. *Bioorg Med Chem Lett* 2019; 29(1):56-8.
9. Furuya T, Matsuura Y, Takahara S. New hinokitiol derivative and skin care preparation containing the same. Application No. JP2002371039A. Osaka, Japan: Patent Application Publication; 2002.
10. Sheng Z, Ge S, Xu X, Zhang Y, Wu P, Zhang K, et al. Design, synthesis and evaluation of cinnamic acid ester derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors. *Med Chem Commun* 2018; 9(5): 853-61.
11. Pluempanupat W, Chavasiri W. An efficient method for chlorination of alcohols using $\text{PPh}_3/\text{Cl}_3\text{CCONH}_2$. *Tetrahedron Lett* 2006; 47(38): 6821-3.
12. Chaysripongkul S, Pluempanupat W, Jang DO, Chavasiri W. Application of $\text{Cl}_3\text{CCONH}_2/\text{PPh}_3$ towards the synthesis of bioactive amides. *Bull Korean Chem Soc* 2009; 30(9): 2066-70.
13. Tharamak S, Yooboon T, Pengsook A, Ratwatthananon A, Kumrungsee N, Bullangpoti V, et al. Synthesis of thymyl esters and their insecticidal activity against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci* 2020; 76(3): 928-35.
14. Mutschlechner B, Rainer B, Schwaiger S, Stuppner H. Tyrosinase inhibitors from the aerial parts of *Wulfenia carinthiaca* Jacq. *Chem Biodivers* 2018; 15(4): e1800014. (8 pages).
15. Alni A, Fauzia SE, Mujahidin D. Synthesis of eugenyl cinnamate from clove oil (*Syzygium aromaticum*) via bromination-dehydrobromination methods. *Pure App Chem Res* 2019; 8(2): 140-6.
16. Huang C, Li J, Wang J, Zheng Q, Li Z, Tu T. Hydrogen-bond-assisted transition-metal-free catalytic transformation of amides to esters. *Sci China Chem* 2021; 64(1): 66-71.
17. Kumar A, Singh SP, Chhokar SS. Antimicrobial activity of the major isolates of mentha oil and derivatives of menthol. *Anal Chem Lett* 2011; 1(1): 70-85.
18. Gonçalves RO, Farias IF, Silva MF, Pessoa CÓ, Zocolo GJ, Zampieri D, et al. Preparation, spectral characterization and anticancer potential of cinnamic esters. *J Braz Chem Soc* 2021; 32: 1931-42.
19. Chen W, Jie W, Jin-Hua G, Lian-Bao Y. Alpha-pinene derivative and preparation method and application thereof. Application No. CN105481857A. Guangdong, China: Guangdong Pharmaceutical University; 2016.
20. Wu D, Nair MG, DeWitt DL. Novel compounds from *Piper methysticum* Forst (Kava Kava) roots and their effect on cyclooxygenase enzyme. *J Agric Food Chem* 2002; 50(4): 701-5.
21. Zanetti M, Carniel TK, Valério A, Oliveira JV, Oliveira DD, Araújo PH, et al. Synthesis of geranyl cinnamate by lipase-catalyzed reaction and its evaluation as an antimicrobial agent. *J Chem Technol Biotechnol* 2017; 92(1): 115-21.
22. Alam N, Yoon KN, Cha YJ, Kim JH, Lee KR, Lee TS. Appraisal of the antioxidant, phenolic compounds concentration, xanthine oxidase and tyrosinase inhibitory activities of *Pleurotus salmoneostramineus*. *Afr J Agric Res* 2011; 6(6): 1555-63.
23. Takahashi T, Miyazawa M. Tyrosinase inhibitory activities of cinnamic acid analogues. *Pharmazie* 2010; 65(12): 913-8.
24. Uchida R, Ishikawa S, Tomoda H. Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. *Acta Pharm Sin B* 2014; 4(2): 141-5.
25. Song S, Lee H, Jin Y, Ha YM, Bae S, Chung HY, et al. Syntheses of hydroxy substituted 2-phenyl-naphthalenes as inhibitors of tyrosinase. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17(2): 461-4.



Synthesis and Tyrosinase Inhibitory Activity of Monoterpenoid Esters

Sasithorn Buppatano and Wanchai Pluempanupat

Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

ABSTRACT Monoterpenoids are recognized as potent tyrosinase inhibitors to reduce the production of melanin. The structural modification of monoterpenoids into monoterpenoid esters is a potential approach for developing novel tyrosinase inhibitors that enhance the activity more effectively. This study aimed at assessing the potential tyrosinase inhibitory activity of monoterpenoid esters compared to kojic acid as a positive control using the dopachrome method. Ten monoterpenoid esters were synthesized by esterification of *trans*-cinnamic acid with monoterpenoids using triphenylphosphine and carbontetra-bromide as reagents. The desired products were obtained in 5–64% yields. All synthesized monoterpenoid esters were further examined for their tyrosinase inhibitory activity. The results found that hinokitiol cinnamate was the most potent inhibitor of tyrosinase, with an IC_{50} value of $1.58 \pm 0.09 \mu\text{M}$. These results indicated that hinokitiol cinnamate could represent tyrosinase inhibitor 9-fold more efficiently than kojic acid. Notably, this compound has the potential for the development of a new skin whitening agent for use in cosmetic ingredients.

Keywords: Tyrosinase inhibitory activity, Monoterpenoid esters, *trans*-Cinnamic acid, Monoterpenoids, Esterification