

การสังเคราะห์และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ของสารกลุ่มคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต

พิราภรณ์ บุญอ่ำพล และ วันชัย ปลื้มภาณุภัทร

ภาควิชาเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

บทคัดย่อ สารยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสแสดงบทบาทสำคัญในการช่วยรักษาโรคเบาหวานได้เป็นอย่างดี ถึงแม้ว่าการรายงานการสังเคราะห์เหล่านี้ออกมาอย่างต่อเนื่อง แต่การค้นหายับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์มากขึ้นกว่าเดิมยังคงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งสารกลุ่มคูมารินเป็นสารอะโรมาติกที่ประกอบด้วยวงเบนซีนและวงแหวนแอลฟาไพโรนที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของกรดคูมาริน-3-คาร์บอกซิลิกเป็นคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยผลการสังเคราะห์สารกลุ่มคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต จำนวน 8 สาร จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดคูมาริน-3-คาร์บอกซิลิกกับแอลกอฮอล์ พบว่าได้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 17-65% เมื่อนำสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบว่า (-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต เป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งต่อเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.16 ± 1.87 ไมโครโมลาร์ ตามด้วย 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.70 ± 2.66 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นการค้นพบครั้งแรกว่าสารทั้งสองตัวนี้มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ที่ดีกว่าอะคาร์โบส 30-49 เท่า และสามารถพัฒนาต่อยอดเป็นยาสำหรับการรักษาโรคเบาหวานที่มีประสิทธิภาพได้

คำสำคัญ: ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส, คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต, กรดคูมาริน-3-คาร์บอกซิลิก, ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

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

Received: 21 July 2023

Revised: 7 November 2023

Accepted: 15 November 2023

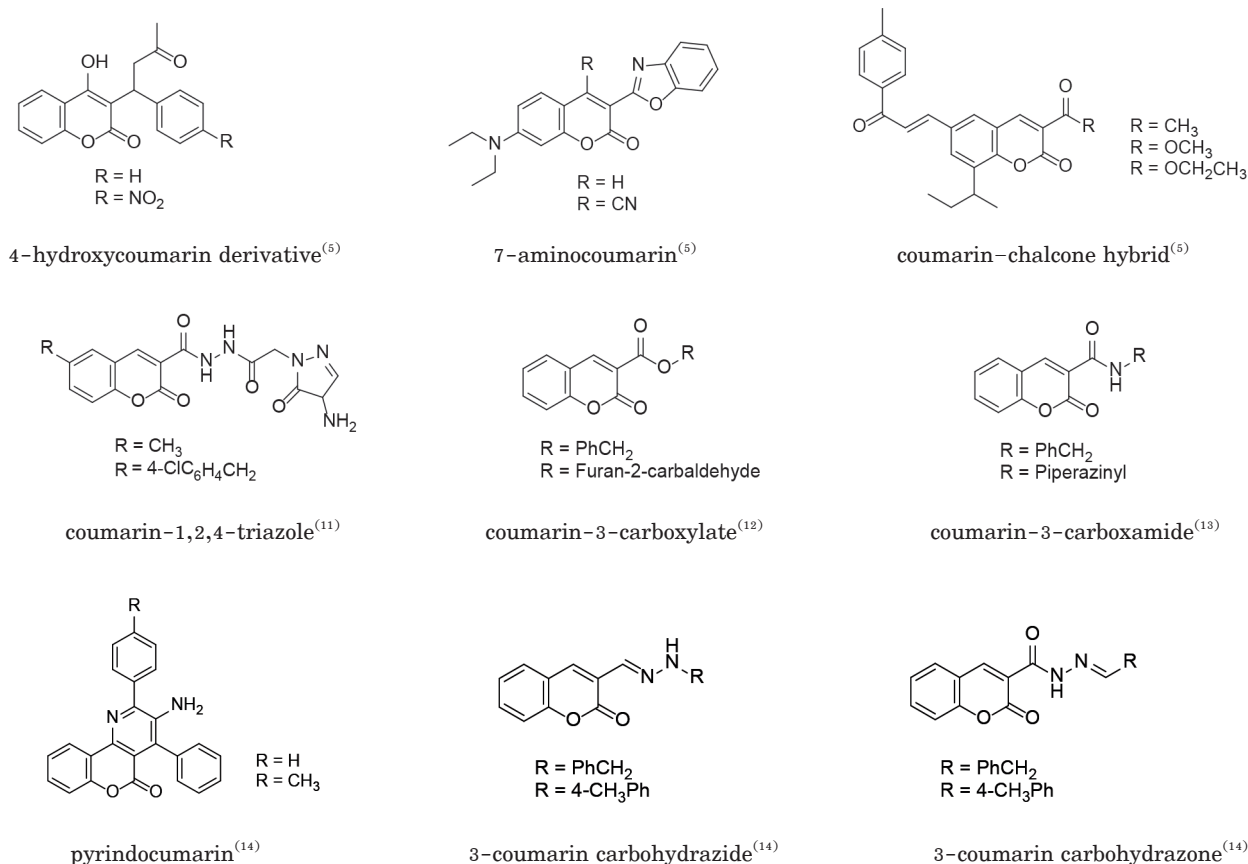
บทนำ

โรคเบาหวาน (diabetes) เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน (insulin) ส่งผลให้เกิดภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดสูงและถูกขับออกทางปัสสาวะ ซึ่งภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดสูง คือสภาวะที่เกิดจากความผิดปกติของร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายได้ ปัจจุบันจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดปัญหาต่อวงการสาธารณสุขทั่วโลกและนำไปสู่การเกิดโรคแทรกซ้อนตามมามากมาย การใช้ยา เช่น อะคาร์โบส (acarbose) และ วอกลิโบส (voglibose) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากสำหรับการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน โดยยาเหล่านี้ช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase) และ แอลฟาอะไมเลส (α -amylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของแป้งไปเป็นน้ำตาลกลูโคส⁽¹⁾ ทำให้การดูดซึมน้ำตาลกลูโคสจากลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือดลดลง จึงสามารถลดภาวะการมีน้ำตาลในเลือดสูงได้⁽²⁾ อย่างไรก็ตาม การศึกษาและพัฒนาการรักษาโรคเบาหวานชนิดใหม่ยังคงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการค้นพบยาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่ายาที่ใช้ในปัจจุบันจะช่วยให้ผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

สารกลุ่มคูมาริน (coumarins) เป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic) ที่มีโครงสร้างแบบไบไซคลิก (bicyclic) ของวงเบนซีนและวงแหวนแอลฟาไพโรน (α -pyrone) พบการรายงานว่ามีสารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ทางชีวภาพทางยา เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย⁽³⁾ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ⁽⁴⁾ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง⁽⁵⁾ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase)⁽⁶⁾ นอกจากนี้มีการนำสารกลุ่ม coumarins ไปใช้ทางด้านเคมีทางการเกษตร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และน้ำหอม⁽⁷⁾ โดยสารกลุ่ม coumarins เหล่านี้พบจากพืชหลายชนิด⁽⁸⁾ หรือจากการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี⁽⁹⁾ ซึ่งโครงสร้างและหมู่แทนที่ของสารกลุ่ม coumarins ที่มีความแตกต่างกันจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ชีวภาพ⁽¹⁰⁾ มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์

สารกลุ่ม coumarins เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมาก เช่น สารกลุ่มคูมาริน-1,2,4-ไตรเอโซล (coumarin-1,2,4-triazole) ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ รวมถึงยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งต่างๆ ได้ เช่น มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม และมะเร็งผิวหนัง⁽¹¹⁾ ในส่วนสารกลุ่มคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (coumarin-3-carboxylate) และคูมาริน-3-คาร์บอกซาไมด์ (coumarin-3-carboxamide) มีการรายงานที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ PTP 1B ที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณผ่านตัวรับอินซูลินได้⁽¹²⁾ นอกจากนี้สารกลุ่ม coumarin-3-carboxamide ยังมีฤทธิ์ในการควบคุมและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้⁽¹³⁾ ซึ่งโครงสร้างของสารสังเคราะห์กลุ่ม coumarins ดังแสดงในภาพที่ 1

ในส่วนของสารกลุ่ม coumarins ต่อการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase พบว่ามีรายงานอย่างต่อเนื่อง เช่น อนุพันธ์ของไพรินโดคูมาริน (pyrindocoumarin derivative), 3-คูมารินคาร์โบไฮไดรไซด์ (3-coumarin carbohydrazide) และ 3-คูมารินคาร์โบไฮไดรโซน (3-coumarin carbohydrazone)⁽¹⁴⁾ (ภาพที่ 1) ซึ่งผลการศึกษาชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารกลุ่มนี้ แต่ยังไม่พบรายงานการนำสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย⁽¹⁵⁾ ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase ด้วยโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่ไม่ได้มีความซับซ้อน จึงสามารถสังเคราะห์ได้ง่ายเพียงขั้นเดียว จากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) โดยใช้กรดคูมาริน-3-คาร์บอกซิลิก (coumarin-3-carboxylic acid) และสารประกอบแอลกอฮอล์ (alcohol) เป็นสารตั้งต้น งานวิจัยที่น่าสนใจที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของ coumarin-3-carboxylic acid เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase โดยผลการศึกษาที่ได้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ สามารถพัฒนาต่อยอดสารกลุ่มนี้ไปเป็นยาสำหรับการรักษาโรคเบาหวานได้ในอนาคต



ภาพที่ 1 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มคูมาริน (coumarins)

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

ยืนยันโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่สังเคราะห์ได้ โดยใช้เทคนิค ^1H และ ^{13}C นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (nuclear magnetic resonance; NMR) ซึ่งละลายสารตัวอย่างในคลอโรฟอร์มดีวเทอเรต (chloroform- d_3 ; CDCl_3) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ดีวเทอเรต (dimethyl sulfoxide- d_6 ; $\text{DMSO}-d_6$) หรืออะซิโตนดีวเทอเรต (acetone- d_6) โดยสเปกตรัมที่ได้ถูกบันทึกบนเครื่อง Bruker 400 MHz AVANCE III HD spectrometer (Karlsruhe, Germany) ที่ความถี่ 400 MHz สำหรับ ^1H NMR และ 100 MHz สำหรับ ^{13}C NMR โดยสัญญาณที่ได้จะแสดงในรูปค่าการเลื่อนทางเคมี (chemical shifts; δ) ที่มีหน่วยเป็น ppm ทำการวิเคราะห์มวลสารชนิดความละเอียดสูง

(high-resolution mass spectrometry; HRMS) ของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่สังเคราะห์ได้ ด้วยเครื่อง Bruker microtof-Q III (Karlsruhe, Germany) โดยใช้โหมด ESI positive ค่าที่ได้จะแสดงในรูปมวลต่อประจุ (m/z) ทำการวัดค่าการหมุนระนาบแสงของสารด้วยเครื่องโพลาไรมิเตอร์ (polarimeter) รุ่น ATAGOTM POLAX-2L (Tokyo, Japan) วัดค่าจุดหลอมเหลวของสารด้วยเครื่องวัดจุดหลอมเหลว (melting point apparatus SMP10) รุ่น Stuart Scientific (Staffordshire, United Kingdom) และระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) (Heidolph, Schwabach, Germany) จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) (SparkTM 10M, Tecan, Switzerland)

สารเคมีและวัสดุ

ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ hexane และ ethyl acetate (Zenith Science, Thailand) ที่เป็นเกรดทางการค้า (commercial grade) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการกลั่นที่จุดเดือดของตัวทำละลายอินทรีย์ก่อนนำมาใช้งานทุกครั้ง เพื่อป้องกันไม่ให้มีสารปนเปื้อนในขั้นตอนการแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ ส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเกรดวิเคราะห์ (analytical reagent grade) ได้แก่ dichloromethane และ dimethyl sulfoxide (Merck, Germany)

สารเคมีสำหรับการสังเคราะห์และการทดสอบฤทธิ์ ได้แก่ coumarin-3-carboxylic acid (Acros, Belgium), methanol (Kemaus, Australia), ethanol (Kemaus, Australia), butanol (Kemaus, Australia), ($\pm$)-s-butanol (Kemaus, Australia), cyclohexanol (Acros, Belgium), (-)-menthol (Fluka, Germany), benzyl alcohol (TCI, Japan), 2-phenylethanol (TCI, Japan), concentrated sulfuric acid (Merck, Germany), triphenylphosphine (TCI, Japan), tribromomethyl phenyl sulfone (TCI, Japan), triethylamine (Sigma-Aldrich, USA), anhydrous sodium sulfate (Qrec, Newzealand) sodium hydrogen carbonate (Kemaus, Australia), เอนไซม์ α -glucosidase (Sigma-Aldrich, USA), 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (TCI, Japan), sodium carbonate (Kemaus, Australia) และ acarbose (TCI, Japan)

การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) ใช้แบบแผ่นอะลูมิเนียมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล (silica gel) 60 F₂₅₄ (Merck, Germany) แยกสารด้วยเทคนิค preparative thin layer chromatography (PTLC) ใช้แบบแผ่นกระจกใส ขนาด ขนาด 20 × 20 เซนติเมตร ที่เคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄

วิธีการสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate

วิธีที่ 1: ชั่งสาร coumarin-3-carboxylic acid ปริมาณ 95.10 มิลลิกรัม (0.5 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ขนาด 25 มิลลิลิตร ทำการปิเปตแอลกอฮอล์ 3 มิลลิลิตร และ concentrated sulfuric acid ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 3 หยด ใส่ลงในขวดก้นกลมตามลำดับ ทำการกวนของผสมที่อุณหภูมิรีฟลักซ์ (reflux) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นการทำปฏิกิริยานำของผสมมาสกัดด้วย dichloromethane และสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (saturated sodium hydrogen carbonate) อัตราส่วน 1:1 นำชั้น dichloromethane มาสกัดด้วยน้ำ อัตราส่วน 1:1 เติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous sodium sulfate) ลงไปในชั้น dichloromethane เพื่อกำจัดน้ำที่ปนเปื้อนออก กรองเพื่อเอาโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate) ที่ใช้แล้วออก และระเหย dichloromethane ออกจากของผสมด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วย TLC และแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค PTLC ที่มีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ผสมระหว่าง hexane ต่อ ethyl acetate (3:1) ได้ coumarin-3-carboxylate ที่ต้องการ

วิธีที่ 2: ชั่ง coumarin-3-carboxylic acid ปริมาณ 95.10 มิลลิกรัม (0.5 มิลลิโมล) และ triphenylphosphine (PPh₃) ปริมาณ 196.7 มิลลิกรัม (0.75 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ขนาด 5 มิลลิลิตร ปิเปตตัวทำละลาย dichloromethane ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ลงในของผสม เติม tribromomethyl phenyl sulfone (Br₃CSO₂Ph) ปริมาณ 196.4 มิลลิกรัม (0.5 มิลลิโมล) ทำการกวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ภายใต้บรรยากาศเฉื่อยของ argon (Ar) จากนั้นปิเปตแอลกอฮอล์ (0.5 มิลลิโมล) และ triethylamine (Et₃N) ปริมาตร 140 ไมโครลิตร (1.0 มิลลิโมล) ลงในของผสมตามลำดับ ทำการกวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นการทำปฏิกิริยานำของผสมที่ได้มาสกัดด้วย dichloromethane ต่อน้ำ อัตราส่วน 1:1 นำชั้น

dichloromethane มาสกัดด้วยน้ำเกลืออิ่มตัว (brine) อีกหนึ่งครั้ง เติมน้ำไฮดรอกไซด์เดียมซัลเฟต (anhydrous sodium sulfate) ลงในชั้น dichloromethane เพื่อกำจัดน้ำที่ปนเปื้อนออก กรองเพื่อเอา sodium sulfate ที่ใช้แล้วออก ทำการระเหย dichloromethane ออกจากของผสม ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วย TLC และแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค PTLC ที่มีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวสารละลายอินทรีย์ผสมระหว่าง hexane ต่อ ethyl acetate (3:1) ได้ coumarin-3-carboxylate ที่ต้องการ

วิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase⁽¹⁶⁾ ของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 8 สาร และเปรียบเทียบกับ coumarin-3-carboxylic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ acarbose เป็นสารมาตรฐาน (positive control) วิธีทดสอบดังนี้ ปิเปตสารมาตรฐาน acarbose หรือสารตัวอย่าง coumarin-3-carboxylate หรือ coumarin-3-carboxylic acid ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1,500 ไมโครโมลาร์ ในสารละลาย 15% dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution) 0.1 โมลาร์ ที่ pH 6.8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate จากนั้นเติมเอนไซม์ α -glucosidase (0.2 ยูนิต/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้ของผสมเข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ทำการเติม 1 โมลาร์ 4-ไนโตรเฟนิล α -D-กลูโคไพราโนไซด์ (4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside; PNPG) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้ของผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.4 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate; Na_2CO_3) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ด้วยใช้เครื่องอ่านไมโครเพลท ทดสอบซ้ำทั้งหมด

5 ครั้ง/สารตัวอย่าง คำนวณค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ด้วยสูตร

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

I คือ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase

Blank คือ การทดสอบที่ใช้ 15% DMSO ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนสารตัวอย่าง

Blank control คือ การทดสอบที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์ α -glucosidase และใช้ 15% DMSO ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนสารตัวอย่าง

Test คือ การทดสอบตามปกติ

Test control คือ การทดสอบที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์ α -glucosidase

นำสาร coumarin-3-carboxylate ที่มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase มากกว่า 65% (ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์) ทดสอบหา IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase โดยทำการศึกษาที่ 9 ความเข้มข้นต่อสารตัวอย่าง (ช่วงของความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ศึกษาอยู่ที่ 0.625 ถึง 160 ไมโครโมลาร์) และใช้โปรแกรม GraphPad Prism 6 ในการคำนวณ⁽¹⁷⁾

ผล

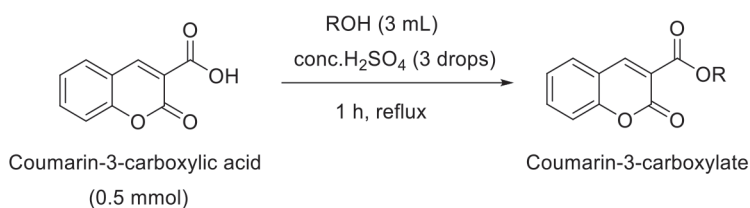
การสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate

จากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ของ coumarin-3-carboxylic acid และแอลกอฮอล์มี 2 วิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ หากเป็นแอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนในโครงสร้างไม่เกิน 6 อะตอม เลือกใช้วิธีการสังเคราะห์ที่ 1 ดังแสดงในภาพที่ 2 เนื่องจากแอลกอฮอล์สามารถใช้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยาได้ มีจุดเดือดไม่สูงมาก และกำจัดออกได้ง่ายในขั้นตอนการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน แต่ถ้าจำนวนคาร์บอนในโครงสร้างเกิน 6 อะตอม เลือกใช้วิธีการสังเคราะห์ที่ 2 ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยผลการสังเคราะห์ coumarin-3-carboxylate ทั้งหมด 8 สาร ที่มีความแตกต่างของโครงสร้างในส่วนแอลกอฮอล์ เช่น คาร์บอนสายโซ่ตรง โซ่กิ่ง และวง จาก

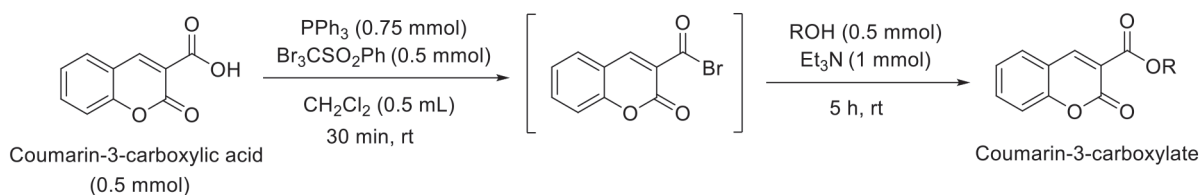
ทั้งสองวิธี พบว่าผลผลิตของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 17-65% ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ด้วยวิธีที่ 1 พบว่าการสังเคราะห์ไฮโดรเจนคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (5) ได้ผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 65% ส่วนการสังเคราะห์เมทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (1), บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (3) และ (±)-เอส-บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (4)

ได้ผลผลิตในช่วง 38-46% ในขณะที่การสังเคราะห์เอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (2) ได้ผลผลิตต่ำที่สุดเท่ากับ 17% ส่วนผลการสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ด้วยวิธีที่ 2 พบว่าได้ผลผลิตของสาร (-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6), เบนซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (7) และ 2-ฟีนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) เท่ากับ 54% 43% และ 29% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 2 การสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate วิธีที่ 1

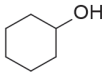
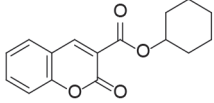
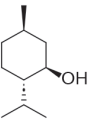
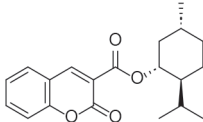
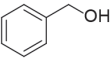
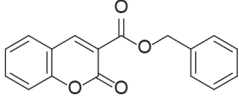
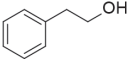
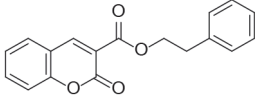


ภาพที่ 3 การสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate วิธีที่ 2

ตารางที่ 1 การสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate

แอลกอฮอล์ ที่ใช้ในปฏิกิริยา	คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต		วิธีการ สังเคราะห์	ผลผลิต (%)
	ชื่อสาร	โครงสร้างทางเคมี		
CH ₃ OH	เมทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (1)		1	46
	เอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (2)		1	17
	บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (3)		1	43
	(±)-เอส-บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (4)		1	38

ตารางที่ 1 การสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate (ต่อ)

แอลกอฮอล์ ที่ใช้ในปฏิกิริยา	คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต		วิธีการ สังเคราะห์	ผลผลิต (%)
	ชื่อสาร	โครงสร้างทางเคมี		
	ไซโคลเฮกซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (5)		1	65
	(-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6)		2	54
	เบนซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (7)		2	43
	2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8)		2	29

จากการวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 8 สาร ด้วยเทคนิค ^1H และ ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) ค่าการตรวจวัดมวลสารชนิดความละเอียดสูง ค่าจุดหลอมเหลว และค่าอุปติคัลโรเทชัน (optical rotation) โดยผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความสอดคล้องกับโครงสร้างของสารและข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง ซึ่งมีเพียง ($\pm$)-เอส-บิวทิลคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (4) และ 2-เฟนิลเอทิลคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) เท่านั้น ที่ไม่สามารถเปรียบเทียบกับข้อมูลจากเอกสารอ้างอิงได้ เนื่องจากเป็นสารใหม่ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน

เมทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (methyl coumarin-3-carboxylate) (1): ของแข็งสีขาว; m.p. $115-116^\circ\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.54 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.60–7.55 (m, 2H, Ar-H), 7.29–7.23 (m, 2H, Ar-H), 3.86 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 163.5 (C=O), 156.6 (C=O), 155.1 (Ar-C), 149.1 (Ar-C), 134.5 (Ar-C), 129.6 (Ar-C), 124.9 (Ar-C), 117.8 (Ar-C), 117.8 (Ar-C), 116.6 (Ar-C), 52.8 (OCH_3). HRMS (ESI) m/z: calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 227.0320, found 227.0321.⁽¹⁸⁾

เอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (ethyl coumarin-3-carboxylate) (2): ของแข็งสีขาว; m.p. $138-140^\circ\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.52 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.57–7.52 (m, 2H, Ar-H), 7.26–7.19 (m, 2H, Ar-H), 4.29 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H, OCH_2), 1.31 (t, $J = 7.8$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 162.8 (C=O), 156.6 (C=O), 155.0 (Ar-C), 148.5 (Ar-C), 134.3 (Ar-C), 129.6 (Ar-C), 124.9 (Ar-C), 118.0 (Ar-C), 117.8 (Ar-C), 116.5 (Ar-C), 61.8 (OCH_2), 14.2 (CH_3). HRMS (ESI) m/z: calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 241.0477, found 241.0487.⁽¹⁸⁾

บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (butyl coumarin-3-carboxylate) (3): ของแข็งไม่มีสี; m.p. $65-66^\circ\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.49 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.66–7.52 (m, 2H, Ar-H), 7.35–7.31 (m, 2H, Ar-H), 4.34 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, OCH_2), 1.75 (qui, $J = 6.6$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 1.53–1.39 (m, 2H, CH_2CH_3), 0.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 163.1 (C=O), 156.6 (C=O), 155.1 (Ar-C), 148.4 (Ar-C), 134.3 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 124.8 (Ar-C), 118.4 (Ar-C), 117.9 (Ar-C), 116.7 (Ar-C),

65.8 (OCH₂), 30.6 (CH₂), 19.1 (CH₂), 13.7 (CH₃). HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₁₄H₁₄NaO₄ [M+Na]⁺: 269.0790, found 269.0822.⁽¹⁹⁾

(±)-เอส-บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต ((±)-*S*-butyl coumarin-3-carboxylate) (4): ของแข็งสีเหลืองอ่อน; m.p. 73–74°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.43 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.64–7.59 (m, 2H, Ar-H), 7.35–7.30 (m, 2H, Ar-H), 5.10 (m, 1H, OCH), 1.81–1.61 (m, 2H, CH₂), 1.34 (d, *J* = 6.24 Hz, 3H, CHCH₃), 0.98 (t, *J* = 7.52 Hz, 3H, CH₂CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 162.6 (C=O), 156.7 (C=O), 155.1 (Ar-C), 147.9 (Ar-C), 134.2 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 124.8 (Ar-C), 118.8 (Ar-C), 117.9 (Ar-C), 116.8 (Ar-C), 74.2 (OCH), 28.8 (CH₂), 19.4 (CH₃), 9.8 (CH₃). HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₁₄H₁₄NaO₄ [M+Na]⁺: 269.0790, found 269.0808.

ไซโคลเฮกซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (cyclohexyl coumarin-3-carboxylate) (5): ของแข็งสีขาว; m.p. 106–107°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.45 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.64–7.60 (m, 2H, Ar-H), 7.34–7.30 (m, 2H, Ar-H), 5.02 (m, 1H, OCH), 1.95 (m, 2H, CH₂), 1.79 (m, 2H, CH₂), 1.59 (m, 2H, CH₂), 1.49–1.24 (m, 4H, CH₂ × 2). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 162.4 (C=O), 155.1 (C=O), 148.0 (Ar-C), 134.2 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 124.8 (Ar-C), 118.8 (Ar-C), 117.9 (Ar-C), 116.7 (Ar-C), 111.2 (Ar-C), 74.3 (OCH), 31.4 (CH₂ × 2), 25.4 (CH₂ × 2), 23.6 (CH₂). HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₁₆H₁₆NaO₄ [M+Na]⁺: 295.0946, found 295.0950.⁽¹⁸⁾

(-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต ((-)-menthyl coumarin-3-carboxylate) (6): ของแข็งสีเหลือง m.p. 139–140°C; [α]_D^{23.7} = -1.20° (*c* = 0.0002, MeOH) ([α]_D³² = -62° (*c* = 0.23, CHCl₃))⁽²⁰⁾, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ 8.47 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.67–7.61 (m, 2H, Ar-H), 7.37–7.28 (m, 2H, Ar-H), 4.96 (m, 1H, OCH), 2.15 (m, 1H, CH), 2.01 (m, 1H, CH), 1.74 (m, 2H, CH₂), 1.57 (m, 2H, CH₂), 1.14 (m, 2H, CH₂), 0.83 (m, 6H, CH₃ × 2), 0.81 (d, *J* = 7.0, 3H, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 162.6 (C=O), 156.6 (C=O), 155.8 (Ar-C), 148.0 (Ar-C), 134.1 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 124.7 (Ar-C), 118.9 (Ar-C), 118.0 (Ar-C), 116.8 (Ar-C), 76.1 (OCH), 47.0 (CH), 40.7 (CH₂), 34.2 (CH₂), 31.5 (CH), 26.2 (CH), 23.3 (CH₂), 22.0 (CH₃), 20.9 (CH₃), 16.2 (CH₃). HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₂₀H₂₄NaO₄ [M+Na]⁺: 351.1572, found 351.1589.⁽²⁰⁾

เบนซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (benzyl coumarin-3-carboxylate) (7): ของแข็งไม่มีสี; m.p. 79–81°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.56 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.67–7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.50–7.47 (m, 2H, Ar-H), 7.42–7.31 (m, 5H, Ar-H), 5.40 (s, 2H, OCH₂), ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 162.7 (C=O), 156.5 (C=O), 155.3 (Ar-C), 148.9 (Ar-C), 135.4 (Ar-C), 134.5 (Ar-C), 129.6 (Ar-C), 128.7 (Ar-C × 2), 128.5 (Ar-C), 128.4 (Ar-C × 2), 124.9 (Ar-C), 118.0 (Ar-C), 117.8 (Ar-C), 116.9 (Ar-C), 67.5 (OCH₂). HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₁₇H₁₂NaO₄ [M+Na]⁺: 303.0633, found 303.0645.⁽¹⁸⁾

2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (phenylethyl coumarin-3-carboxylate) (8): ของแข็งสีเหลือง; m.p. 155–156 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.46 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.69–7.59 (m, 2H, Ar-H), 7.39–7.25 (m, 7H, Ar-H), 4.58 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂), 3.12 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 163.0 (C=O), 156.7 (C=O), 155.2 (Ar-C), 148.8 (Ar-C), 137.5 (Ar-C), 134.4 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 129.1 (Ar-C × 2), 128.6 (Ar-C × 2), 126.7 (Ar-C), 124.9 (Ar-C), 118.1 (Ar-C),

117.9 (Ar-C), 116.8 (Ar-C), 65.4 (OCH₂), 35.0 (CH₂). HRMS (ESI) m/z: calcd for C₁₈H₁₄NaO₄ [M+Na]⁺: 317.0790, found 317.0805.

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ในหลอดทดลองของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate

เมื่อนำสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 8 สาร ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เบื้องต้นที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ พบว่ามีสาร จำนวน 5 สาร ที่มีการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase โดยมีค่าการยับยั้งอยู่ในช่วง 40.6–84.4% ซึ่งมีความสูงกว่า coumarin-3-carboxylic acid ที่เป็นสารตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยสาร coumarin-3-carboxylate ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase สูงที่สุด คือ (-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6) โดยมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เท่ากับ 84.4±4.3% ถัดมาคือ 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) จะมีค่า

การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เท่ากับ 68.1±4.4% ในส่วนของสาร เมทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (1), เบนซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (7) และ เอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (2) มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เท่ากับ 55.4±6.9%, 53.6±9.2% และ 40.6±6.6% ตามลำดับ ในขณะที่ บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (3), (±)-เอส-บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (4) และ ไฮโดรเจนคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (5) ไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ที่ความเข้มข้นนี้

จากการนำสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ มากกว่า 65.0% จำนวน 2 สาร หาค่า IC₅₀ พบว่า (-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6) และ 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 7.16±1.87 และ 11.70±2.66 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ดีกว่าสารมาตรฐาน acarbose ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 350.50±40.37 ไมโครโมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ในหลอดทดลองของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate

สารกลุ่มคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต	การยับยั้ง $\pm$ SD (%) ¹	IC ₅₀ $\pm$ SD (ไมโครโมลาร์)
กรดคูมาริน-3-คาร์บอกซิลิก	4.7±1.7	–
เมทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (1)	55.4±6.9	–
เอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (2)	40.6±6.6	–
บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (3)	0	–
(±)-เอส-บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (4)	0	–
ไฮโดรเจนคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (5)	0	–
(-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6)	84.4±4.3	7.16±1.87
เบนซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (7)	53.6±9.2	–
2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8)	68.1±4.4	11.70±2.66
อะคาร์โบส (acarbose)	15.7±1.2	350.50±40.37

หมายเหตุ: ¹ความเข้มข้นสุดท้ายของ coumarin-3-carboxylate เท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์

วิจารณ์

จากผลการสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate พบว่าผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้อยู่ในช่วงปานกลางถึงต่ำ โดยเฉพาะวิธีการสังเคราะห์ที่ 1 การทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่ง ปฏิกิริยานี้สามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้⁽²¹⁾ ส่งผลให้ปฏิกิริยานี้ไม่สามารถเกิดได้อย่างสมบูรณ์ จึงยังคงเห็นสารตั้งต้นเหลือจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ซึ่งหากต้องการเพิ่มผลผลิตของผลิตภัณฑ์ให้สูงขึ้น อาจทำการศึกษาปัจจัยของภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาต่อไป เช่น ผลของปริมาณตัวทำละลาย ผลของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา หรือผลของชนิดของสารที่ช่วยดูดน้ำในปฏิกิริยา เป็นต้น แต่ข้อดีของการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้ คือไม่ต้องใช้วิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี เช่น PTLC เพราะสารที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์สามารถกำจัดออกได้โดยวิธีการสกัดด้วยเบสหรือระเหยออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ส่วนวิธีการสังเคราะห์ที่ 2 ทำการศึกษาและรายงานเพื่อใช้สังเคราะห์สารกลุ่มไทมิลเอสเทอร์ (thymyl esters)⁽²²⁾ ยังคงให้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ไม่สูงเช่นกัน อาจเป็นเพราะอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาไม่สูงพอหรือเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาน้อยเกินไป ซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นและเวลาที่มากขึ้น อาจทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้นได้⁽²³⁾

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ทั้ง 8 สาร พบว่าสารมีเพียง 5 สาร (สาร 1, 2 และ 6-8) เท่านั้น ที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 100 ไมโครโมลาร์ และแสดงฤทธิ์การยับยั้งที่ดีกว่า coumarin-3-carboxylic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้น แสดงให้เห็นว่าการปรับเปลี่ยนโครงสร้างในส่วน carboxyl group ไปเป็น ester group จะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ให้ดีขึ้นได้ โดยสารที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดคือ (-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6) ซึ่งผลการศึกษาเป็นองค์ความรู้ใหม่ทางด้านการค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า acarbose

ที่เป็นสารมาตรฐานถึง 49 เท่า เมื่อพิจารณาของโครงสร้างทางเคมีของสารนี้ พบว่าส่วนแอลกอฮอล์ คือ menthol ซึ่งเป็นสารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์ (monoterpenoids) ที่มีโครงสร้างหลักเป็นวงไซโคลเฮกซานอล (cyclohexanol) และมีหมู่แทนที่บนวงจำนวนสองหมู่ คือ methyl group และ isopropyl group ซึ่งการที่มีสองหมู่นี้บนวงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้ง α -glucosidase ให้ดีขึ้น เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับสารไซโคลเฮกซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (5) ที่ไม่มีสองหมู่นี้บนวง และการออกฤทธิ์ยับยั้งดีกว่าแอลกอฮอล์ที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นคาร์บอนโซ่ตรงหรือโซ่กิ่ง นอกจากนี้พบว่าหากใส่ phenyl group เข้าไปในโครงสร้างของส่วนแอลกอฮอล์ตรงตำแหน่งปลายของสายโซ่คาร์บอนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้ง α -glucosidase ให้สูงขึ้น เมื่อพิจารณาจากค่าการยับยั้งระหว่างสาร 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) กับเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (2) ที่มีค่าเท่ากับ $68.1 \pm 4.4\%$ และ $40.6 \pm 6.6\%$ ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นถึงบทบาทที่สำคัญของ phenyl group สำหรับการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมี

เมื่อนำสาร (-)-เมนทิล คูมาริน 3-คาร์บอกซิเลต- (6) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.16 ± 1.87 ไมโครโมลาร์ และ 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.70 ± 2.66 ไมโครโมลาร์ ไปเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase กับสารกลุ่ม coumarins ที่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าสารทั้งสองชนิดที่งานวิจัยนี้ได้พัฒนาขึ้นนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ที่สูงกว่า เช่น สารคูมาริน ออกซิมเอสเทอร์ (coumarin oxime esters) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.91 ± 0.25 ไมโครโมลาร์⁽²⁴⁾ สาร 3,7'-บิสคูมารินิลอีเธอร์ (3,7'-biscumarinil ether) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.70 ± 0.80 ไมโครโมลาร์⁽²⁵⁾ และอนุพันธ์ของไพรินโดคูมาริน (pyrindocoumarin derivatives) ที่มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครโมลาร์⁽¹⁵⁾ เมื่อนำสารดังกล่าวทั้งสองชนิดไปเปรียบเทียบกับสารกลุ่มอื่นๆ ที่มีการรายงานฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase

ก่อนหน้านี เช่น สาร 2,4-ไดอะริลเบนโซ[4,5]อิมิดาโซ[1,2- α]ไพริมิดีน (2,4-diarylbenzo[4,5]imidazole[1,2- α]pyrimidine) ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 53.8 ± 0.04 ไมโครโมลาร์⁽²⁶⁾ สารคาร์โบไฮไดรด์-เบนซิมิดาโซล (carbohydrazide-benzimidazole) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 70.6 ± 6.8 ไมโครโมลาร์⁽²⁷⁾ และสารกลุ่ม alkaloid 1,2-ไดเมทอกซีพิเพอรัมเบลแลคแทมซี (1,2-dimethoxy piperumbellactam C) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 98.07 ± 0.44 ไมโครโมลาร์⁽²⁾ พบว่าสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่งานวิจัยนี้ทำการศึกษาและพัฒนาโครงสร้างทางเคมีนั้นมียุทธในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ดีกว่าสารเหล่านี้หลายเท่า

สรุป

จากการศึกษาและปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของ coumarin-3-carboxylic acid ไปเป็น coumarin-3-carboxylate ทั้งหมด 8 สาร โดยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โครงสร้างทางเคมีของสารที่สังเคราะห์ได้มีความสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 1H และ ^{13}C นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ค่าการตรวจวัดมวลสารชนิดความละเอียดสูง และข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง โดยที่ (±)-เอส-บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (4) และ 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) เป็นสารใหม่ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน เมื่อนำสารทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase พบเป็นครั้งแรกว่า (-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6) และ 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ที่ดีกว่าสารมาตรฐาน acarbose ถึง 49 และ 30 เท่าตามลำดับ รวมถึงสารอื่นๆ อีกหลายชนิดที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ โดยผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นองค์ความรู้ใหม่ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของ coumarin-3-carboxylic acid ที่ทำให้ค้นพบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นและสามารถพัฒนาต่อยอดสารออกฤทธิ์สำคัญเหล่านี้ ไปเป็นยาสำหรับการรักษาโรคเบาหวานได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

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

เอกสารอ้างอิง

1. Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 2003; 38(11): 1599-616.
2. Yin Z, Zhang W, Feng F, Zhang Y, Kang W. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Sci Hum Wellness* 2014; 3(3-4): 136-74.
3. Zou J, Liu Y, Guo R, Tang Y, Shi Z, Zhang M, et al. An in vitro coumarin-antibiotic combination treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nat Prod Commun* 2021; 16(1): 1-7.
4. Lee BC, Lee SY, Lee HJ, Sim GS, Kim JH, Kim JH, et al. Anti-oxidative and photo-protective effects of coumarins isolated from *Fraxinus chinensis*. *Arch Pharm Res* 2007; 30(10): 1293-301.
5. Emami S, Dadashpour S. Current developments of coumarin-based anti-cancer agents in medicinal chemistry. *Eur J Med Chem* 2015; 102: 611-30.
6. de Souza LG, Rennã MN, Figueroa-Villar JD. Coumarins as cholinesterase inhibitors: a review. *Chem Biol Interact* 2016; 254: 11-23.
7. Kotthireddy K, Pasula A. Comprehensive review on the applications of coumarin fused with five membered heterocyclics in the field of material chemistry, agrochemistry and pharmacology. *Res J Life Sci Bioinform Pharm Chem Sci* 2018; 4(2): 203-24.

8. Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaides DN. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Curr Pharm Des* 2004; 10(30): 3813-33.
9. Qian H, Sun J. Synthesis of coumarins via [4+2] cyclization of siloxy alkynes and salicylaldehydes. *Synlett* 2021; 32: 207-10.
10. Luchini AC, Rodrigues-Orsi P, Cestari SH, Seito LN, Witaicenis A, Pellizzon CH, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Biol Pharm Bull* 2008; 31(7): 1343-50.
11. Kahveci B, Yilmaz F, Mentese E, Ülker S. Microwave-assisted synthesis of some new coumarin derivatives including 1,2,4-triazol-3-one and investigation of their biological activities. *Chem Heterocycl Compd* 2015; 51(5): 447-56.
12. Sun C, Peng C, Wang J, Wang Q, Liu W, Zhou H, et al. Synthesis of novel coumarin derivatives and in vitro biological evaluation as potential PTP 1B inhibitors. *Heterocycles* 2013; 87(8): 1711-26.
13. Yu X, Teng P, Zhang YL, Xu ZJ, Zhang MZ, Zhang WH. Design, synthesis and antifungal activity evaluation of coumarin-3-carboxamide derivatives. *Fitoterapia* 2018; 127: 387-95.
14. Randelović S, Bipat R. A review of coumarins and coumarin-related compounds for their potential antidiabetic effect. *Clin Med Insights: Endocrinol Diabetes* 2021; 14: 1-9.
15. Adib M, Peytam F, Rahmanian-Jazi M, Mohammadi-Khanaposhtanib M, Mahernia S, Bijanzadeh HR, et al. Design, synthesis, *in vitro* α -glucosidase inhibition, molecular modeling, and kinetic study of novel coumarin fused pyridine derivatives as potent antidiabetic agents. *New J Chem* 2018; 42: 17268-78.
16. Bhatia A, Singh B, Arora R, Arora S. In vitro evaluation of the α -glucosidase inhibitory potential of methanolic extracts of traditionally used antidiabetic plants. *BMC Complement Altern Med* 2019; 19: 74. (9 pages).
17. Devaraj S, Yip YM, Panda P, Ong LL, Wong PWK, Zhang D, et al. Cinnamoyl sucrose esters as alpha glucosidase inhibitors for the treatment of diabetes. *Molecules* 2021; 26(2): 469. (12 pages).
18. Kuang Y, Liu X, Chang L, Wang M, Lin L, Feng X. Catalytic asymmetric conjugate allylation of coumarins. *Org Lett* 2011; 13(15): 3814-7.
19. Singh S, Tripathi KN, Singh RP. Redox activated amines in the organophotoinduced alkylation of coumarins. *Org Biomol Chem* 2022; 20(29): 5716-20.
20. Ichikawa A, Ono H, Harada N. Stereochemical studies of chiral resolving agents, M9PP and H9PP acids. *Chirality* 2004; 16(8): 559-67.
21. Fischer E, Speier A. Darstellung der Ester. *Ber Dtsch Chem Ges* 1895; 28(3): 3252-8.
22. 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.
23. Chaysripongkul S, Pluempunapat 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.
24. Zhang X, Zheng YY, Hu CM, Wu XZ, Lin J, Xiong Z, et al. Synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives containing oxime ester as α -glucosidase inhibitors. *Arab J Chem* 2022; 15(9): 104072. (11 pages).
25. Zhao DG, Zhou AY, Du Z, Zhang Y, Zhang K, Ma YY. Coumarins with α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities from the flower of *Edgeworthia gardneri*. *Fitoterapia* 2015; 107: 122-7.

26. Peytam F, Takalloobanafshi G, Saadattalab T, Norouzbahari M, Emamgholipour Z, Moghimi S, et al. Design, synthesis, molecular docking, and *in vitro* α -glucosidase inhibitory activities of novel 3-amino-2,4-diarylbenzo [4,5] imidazo [1,2-a] pyrimidines against yeast and rat α -glucosidase. Sci Rep 2021; 11: 11911. (18 pages).
27. Azizian H, Pedrood K, Moazzam A, Valizadeh Y, Khavaninzadeh K, Zamani A, et al. Docking study, molecular dynamic, synthesis, anti- α -glucosidase assessment, and ADMET prediction of new benzimidazole-Schiff base derivatives. Sci Rep 2022; 12: 14870. (12 pages).
-

Synthesis and α -Glucosidase Inhibitory Activity of Coumarin-3-Carboxylates

Piraporn Boonumpol and Wanchai Pluempanupat

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

ABSTRACT α -Glucosidase inhibitors represent an important role in the treatment of diabetes. Although many synthetic inhibitors have been reported, novel and more efficient compounds are still necessary to exhibit this activity. Coumarins are aromatic substances composed of fused benzene and α -pyrone rings and display a wide variety of biological activities, especially α -glucosidase inhibitory activity. This research aimed to study the structural modification of coumarin-3-carboxylic acid into coumarin-3-carboxylates to enhance their α -glucosidase inhibitory activity. Eight coumarin-3-carboxylates were successfully synthesized by esterification using coumarin-3-carboxylic acid and alcohols as starting materials. The desired products were obtained in 17–65% yields. All synthesized compounds were examined for their α -glucosidase inhibitory activity. The results found that (–)-menthyl coumarin-3-carboxylate was the most potent inhibitor against α -glucosidase with an IC_{50} of $7.16 \pm 1.87 \mu M$, followed by 2-phenylethyl coumarin-3-carboxylate with an IC_{50} of $11.70 \pm 2.66 \mu M$. Both compounds were first reported to exhibit 30–49 folds activity more efficiently than acarbose and could be further developed into a new potential antidiabetic drug.

Keywords: α -Glucosidase inhibitory activity, Coumarin-3-carboxylates, Coumarin-3-carboxylic acid, Esterification