จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การปรับปรุงโครงสร้างของเคอร์คิวมินให้เป็นสารกรองรังสียูวี

Syntheses of Novel UV Filter through Structural Modification of Curcumin

โดย

ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง

มีนาคม 2549

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การปรับปรุงโครงสร้างของเคอร์คิวมินให้เป็นสารกรองรังสียูวี

Syntheses of Novel UV Filter through Structural Modification of Curcumin

โดย

ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง

มีนาคม 2549

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือและร่วมมือของหลายๆคน ผู้วิจัยขอขอบคุณ นส. รัชนี นนทเบญจวรรณ ซึ่งเป็นนิสิตระดับปริญญาโทของ ภาควิชาเคมี เป็นอย่างยิ่ง และที่ลืมเสียมิได้ก็คือกองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย การปรับปรุงโครงสร้างของเคอร์คิวมินให้เป็นสารกรองรังสียูวี

Syntheses of Novel UV Filter through Structural Modification of Curcumin

ชื่อผู้วิจัยหลัก ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กุมภาพันธ์ 2549

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้สามารถเตรียม 1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione ได้โดยการทำ methylation ด้วยปฏิกิริยาแทนที่บน curcumin โดยโมเลกุล 1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione มีการดูดกลืนแสงในช่วง UV A (λ_{max}= 345 nm) จึงทำให้เป็นสารกรองรังสียูวีเอที่ดี สารที่ได้นี้เป็นของเหลวหนืดสีส้มเหลือง ซึ่งเมื่ออยู่ในตัวทำละลายจะมีสีเหลือง จึงช่วยแก้ปัญหาสีส้มเข้มของ curcumin (ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการในวงการเครื่องสำอาง) ได้ สารผลิตภัณฑ์ที่ได้แสดงสมบัติการละลายในตัวทำละลายต่างๆดีขึ้นกว่า curcumin ด้วย นอกจากนี้ยังสามารถเตรียม 1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione ได้จาก curcumin สาร 1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione นอกจากจะสามารถดูดกลืนแสงในช่วง UVA แล้ว ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียง curcumin ด้วย ทั้ง 1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione และ 1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione มีความเสถียรต่อแสง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title Syntheses of Novel UV Filter through Structural Modification of Curcumin

Name of Investigator Supason Wanichwecharungruang

Year 2006

Abstract

Synthesis of a novel UVA filter, 1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione, could be done by methylation of curcumin via nucleophilic substitution reaction. The obtained 1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione possessed UVA absorption property with maximum absorption at 345 nm. The compound was viscous orange-yellow liquid. This compound could be dissolved in various organic solvents giving yellow solutions. The problem of solubility and deep orange color of curcumin could, therefore, be solved. Another novel UVA filter, 1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione was also prepared from curcumin. This latter compound possessed not only UVA absorption property but also showed similar antioxidant activity to curcumin. Both 1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione and 1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione were photostable.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ **หน้า**

บทที่ 1 สารกรองรังสียูวี และ เคอร์คิวมิน……
1
สารกรองรังสียูวี……. 1
ขมิ้นชัน…….. 2
สารสำคัญในขมิ้นชัน…… 3

บทที่ 2 การทดลอง…… 5
เครื่องมือและอุปกรณ์…… 5
สารเคมี…… 6
วิธีการทดลอง…… 7
แผนผังการดำเนินงานวิจัย…… 8
ตอนที่ 1 สังเคราะห์อนุพันธ์ของ curcumin โดยใช้หมู่แทนที่เป็น metyl iodide……. 8
การเตรียม 1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene
-3,5-dione หรือ tetramethylcurcumin จาก curcumin……. 8
การเตรียม 1,7-bis(4-tertiarybutyldimethylsiloxy-3-methoxyphenyl)
-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ TBDMS-curcumin จาก curcumin
(protection of phenolic groups)…… 9
การแยก TBDMS-curcumin ให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ซิลิกาเจล…… 10
การเตรียม 1,7-bis(4-tertiarybutyldimethylsiloxy-3-methoxyphenyl)-4,4-
dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ dimethyl TBDMS-curcumin จาก
TBDMS-curcumin…… 11
การเตรียม 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-
3,5-dione หรือ dimethylcurcumin (deprotection at the phenolic groups)…… 12
ตอนที่ 2 สังเคราะห์อนุพันธ์ของ curcumin โดยใช้หมู่แทนที่เป็น octyliodide…… 15
การสังเคราะห์ 1,7-bis(4-octhoxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-
dione หรือ dioctylcurcumin จาก curcumin…… 15
การทดสอบการออกฤทธิ์เป็น antioxidant ของ curcumin เทียบกับสารผลิตภัณฑ์..... 17

บทที่ 3 ผลการทดลอง..... 18
เปอร์เซนต์การออกฤทธิ์เป็น antioxidant (%Antioxidant) ของสารที่สังเคราะห์ได้เปรียบเทียบสมบัติต่างๆ ของ curcumin กับผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้..... 18
ลักษณะทางกายภาพ จุดเดือด และจุดหลอมเหลวของ curcumin และอนุพันธ์ของ curcumin ที่สังเคราะห์..... 19
ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของ curcumin และอนุพันธ์ของ curcumin ที่สังเคราะห์..... 20

บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 21
ตอนที่ 1
การสังเคราะห์ 1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene -3,5-dione หรือ tetramethylcurcumin..... 21
การสังเคราะห์ 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ dimethylcurcumin with 2 OH..... 28
ตอนที่ 2
การสังเคราะห์ 1,7-bis(4-octhoxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ dioctylcurcumin..... 40

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... 44

เอกสารอ้างอิง..... 46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ หน้า

ตารางที่ 1 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 17

ตารางที่ 2 สมบัติการละลายของ curcumin และอนุพันธ์ของ curcumin ที่สังเคราะห์ 18

ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพ จุดเดือด และจุดหลอมเหลวของ curcumin และ อนุพันธ์ของ curcumin ที่สังเคราะห์ 19

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของ curcumin และอนุพันธ์ของ curcumin ที่สังเคราะห์ 20

ตารางที่ 5 เปอร์เซนต์การออกฤทธิ์เป็น antioxidant (%Antioxidant) ของสารที่สังเคราะห์ได้ ความเข้มข้น 0.4 mM 20

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ หน้า

รูปที่ 1-1 โครงสร้างของ curcumin ในลักษณะ keto form และ enol form 3

รูปที่ 2-1 เครื่องมือที่ใช้ในการ reflux ปฏิกิริยา nucleophilic substitution ของ methyl iodide กับ curcumin 8

รูปที่ 4.1-A โครมาโทแกรม จาก HPLC ของ ของผสมระหว่าง tetramethyl curcumin และ trimethylcurcumin (ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 240 nm) 25

รูปที่ 4.1-B UV spectrum ของ tetramethylcurcumin ที่ retention time 2.883 min 26

รูปที่ 4.1-C UV spectrum ของ trimethylcurcumin ที่ retention time 6.336 min 27

รูปที่ 4.2-A โครมาโทแกรม จาก HPLC ของ methylcurcumin with 2 OH (ตรวจวัดที่ความยาวคลื่นในช่วง 300 nm) 38

รูปที่ 4.2-B UV Absorption spectrum ของ 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ methylcurcumin with 2 OH 39

รูปที่ 4.3 UV-Visible absorption spectrum ของ dioctylcurcumin ที่ความเข้มข้น 5.79×10^{-6} M 43

บทที่ 1
สารกรองรังสียูวี และ เคอร์คิวมิน

เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปในปัจจุบันว่าแสงแดด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแสงอัลตร้าไวโอเลต สามารถชักนำให้เกิดผลเสียต่างๆต่อร่างกาย อันได้แก่ การทำลายเซลล์โดยตรง (direct cellular damage) และการกดระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immunosuppression) แสงแดดเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้ผิวหยาบกร้านและเหี่ยวย่นเร็วขึ้น สังเกตได้ในผู้สูงอายุจะมีผิวบริเวณที่สัมผัสแสงแดดหยาบกร้านกว่าส่วนผิวในร่มผ้าซึ่งยังคงมีความเรียบเนียนและดูอ่อนเยาว์กว่า ในปัจจุบันงานวิจัยมากมายล้วนยืนยันว่าแสงแดดเป็นสาเหตุของการเกิดอาการแดดเผา การแพ้แสง และมะเร็งผิวหนังอีกด้วย (1-3)

นอกจากผลเสียต่อร่างกายโดยตรงแล้ว แสงอัลตร้าไวโอเลตยังเป็นตัวการในการช่วยเร่งให้เกิดขบวน การ photochemical ต่างๆ อันนำไปสู่ความเสื่อมของวัสดุหรือ ผลิตภัณฑ์ทั้งหลาย อาทิ การซีดจางของสีผ้า การกรอบเปราะของแผ่นพลาสติก เป็นต้น

ในปัจจุบันเครื่องสำอางไม่น้อยที่มีการเติมสารกันแดด หรือสารกรองรังสียูวี (UV-Filter) เพื่อช่วยลดความเข้มของรังสียูวีที่ผ่านไปยังผิวให้น้อยลง โดยสารกรองรังสียูวีนี้จะทำหน้าที่ดูดกลืนแสง หรือทำให้เกิดการสะท้อนของแสงออกไป งานวิจัยมากมายได้แสดงห็เห็นถึงผลดีของการใช้สารกรองรังสียูวี (4-6) การใช้สารกันแดดนั้นนอกจากในเครื่องสำอางแล้ว ยังมีการใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆอีกมากมาย อาทิเช่น น้ำยาซักผ้า น้ำยาปรับผ้านุ่ม และพลาสติกต่างๆ

สารกรองรังสียูวี

การป้องกันไม่ให้ผิวหนังเกิดแดดเผาได้ง่ายจนเกินไป ทำได้โดยการใช้ผลิตภัณฑ์ป้องกันแสงแดดทาผิวหนัง เพื่อลดปริมาณรังสียูวีที่จะมาถึงผิวหนัง โดยกลไกการสะท้อน หรือการดูดกลืนรังสี

<u>การป้องกันโดยการสะท้อน</u> (protection by reflection) โดยการใช้สารที่เป็นตัวสะท้อนแสง ป้องกันไม่ให้รังสียูวีมาถึงผิวหนัง มีสารหลายอย่างที่ทำหน้าที่นี้ เช่น zinc oxide, titanium dioxide, magnesium carbonate, calcium carbonate และ magnesium oxide เป็นต้น อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า สารที่มีอนุภาคเล็กๆ เหล่านี้สามารถผ่านลงสู่ชั้น stratum cornium และ stratum granulosum ได้ ซึ่งอนุภาคบางชนิดเช่น TiO_2 เป็น photocatalyst ที่สามารถทำลาย DNA และ RNA ได้ โดยผ่านทางการเกิด reactive oxygen species (7-9) การ

นำมาประยุกต์ใช้งานจึงต้องมีการเคลือบสารอินทรีย์ไปบนอนุภาคของ TiO_2 อย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการทำวิจัยต่อไปให้เห็นถึงความเสถียรและการเล็ดลอดของอนุภาคที่มีการเคลือบเข้าสู่ชั้นผิวหนัง

<u>การป้องกันโดยการดูดกลืน</u> (protection by ultraviolet absorption) โดยการใช้สารดูดกลืนรังสียูวีไว้ การดูดกลืนรังสียูวีทำให้เกิดการเปลี่ยนของระดับชั้นพลังงานของอิเล็กตรอน (electron shift) และสารจะขึ้นไปอยู่ในสภาวะกระตุ้น (excited state) ซึ่งจะมีระดับพลังงานสูงกว่าเดิม สภาวะ excited state นี้ไม่คงสภาพ เพราะจะค่อยๆ มีการคายพลังงานที่ดูดกลืนออกมาเพื่อกลับมาเป็นสารเดิม และมีระดับพลังงานเท่าเดิม สำหรับกรองรังสียูวีทั้งหลายที่ใช้นั้น พลังงานที่คายจะออกมาอยู่ในรูปของคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่นยาวกว่าเดิม ซึ่งมักอยู่ในช่วงรังสีที่มองเห็นด้วยตา หรือรังสีอินฟาเรดซึ่งไม่เป็นอันตรายกับผิว สารประกอบอินทรีย์จำพวก aromatic, heterocyclic และ conjugated aliphatic มีช่องว่างของชั้นพลังงานของอิเล็กตรอนใกล้เคียงระดับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 290-420 nm ดังนั้นจึงสามารถใช้สารพวกนี้เป็นสารป้องกันแสงแดดได้ดี เพราะสามารถดูดกลืนพลังงานดังกล่าวไว้ได้ ได้มีงานวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า การใช้สารกรองรังสียูวีสามารถป้องกันอันตรายต่างๆ ที่จะเกิดกับผิวได้ เช่น การลดการเกิด mutation ของ DNA การป้องกันการเกิดแดดเผา (ป้องกัน sun burn cell formation) ป้องกันการเปลี่ยนไปของ dermal fibroblast เป็นต้น (10, 11) ปัญหาของสารกรองรังสียูวีในกลุ่มนี้อยู่ที่ความเสถียร การซึมผ่านเข้าสู่ร่างกาย และผลข้างเคียงอื่นๆของสารบางชนิด (12-20)

ขมิ้นชัน

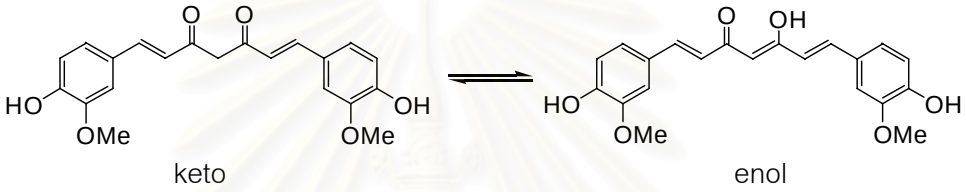
ขมิ้นชันมีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปลูกกันมากในประเทศอินเดีย จีน อินโดนีเซีย ไทย และประเทศในแถบร้อนอื่นๆ

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Curcuma Longa Linn*
ชื่อพ้อง	C. *domestica* Valenton, C. *domestica* Loir
ชื่ออังกฤษ	Termeric, Curcuma, Indian Saffron และ Yellow root
ชื่อท้องถิ่นอื่นๆ	ขมิ้นแกง ขมิ้นหยวก ขี้ขมิ้น ตายอ และสะยอ
วงศ์	Zingiberaceae

ขมิ้นชัน เป็นพืชเก่าที่รู้จักกันมานาน นำมาใช้เป็นประโยชน์ทั้งเป็นเครื่องเทศในการประกอบอาหาร เพื่อเพิ่มรสชาติให้อาหาร และเพื่อให้อาหารดูน่ารับประทาน เนื่องจากขมิ้นชันมีสีเหลืองสดจึงถูกนำมาใช้แต่งสีอาหารต่างๆ เช่น เนย เนยแข็ง มาร์การีน ผงกระหรี่ มัสตาร์ด และอาหารอื่นๆ การใช้ขมิ้นชันในอาหารจะช่วยป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระในอาหาร ป้องกันการเหม็น

หีนของน้ำมันและไขมันเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน หรือเมื่อถูกความร้อน จึงเป็นการถนอมทั้งความสดและคุณค่าทางโภชนาการของอาหารด้วย อีกทั้งยังเป็นสารที่ใช้แต่งสีเครื่องสำอางหลายชนิด และเป็นที่รู้จักกันดีในฐานะของยาสมุนไพรพื้นบ้าน

สารสำคัญในขมิ้นชัน เหง้าขมิ้นมีสารประกอบสำคัญเป็นน้ำมันหอมระเหย มีสารหลายชนิดคือ tumerone, zingiberene, borneol เป็นต้น และในเหง้ายังมีสารสีเหลืองส้มที่ทำให้ขมิ้นมีสีที่เรียกว่า สารกลุ่ม curcuminoidซึ่งมีโครงสร้างเป็น diferuloylmethane และประกอบด้วยสารหลัก 3 ตัว คือ curcumin (รูปที่ 1-1) demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin (21)



รูปที่ 1-1 โครงสร้างของ curcumin ในลักษณะ keto form และ enol form

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ต้านการออกซิเดชันที่ดีมาก (22-24) งานวิจัยต่างๆได้แสดงให้เห็นว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งกระบวนการ peroxidation ของไขมันได้ดี (25-27) โดยได้มีงานวิจัยที่แสดงกลไกการเป็นสารต้านการออกซิเดชันของเคอร์คิวมินไว้มากพอสมควร (28-30) ฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของเคอร์คิวมินอีกประการหนึ่งคือฤทธิ์ลดการอักเสบ (anti-inflammatory) (31,32) นอกจากนี้ฤทธิ์ทางยาอื่นๆของเคอร์คิวมินที่มีผู้รายงานไว้ได้แก่ antithrombotic activity (9) HIV-I integrase inhibition (33) และ anticancer activity (34-36) งานวิจัยทางพิษวิทยาได้แสดงให้เห็นว่าเคอร์คิวมินไม่เป็นพิษแม้มีการให้แก่ร่างกายในปริมาณสูง (37) ด้วยผลการวิจัยต่างๆดังที่กล่าวมานี้ ในปัจจุบันจึงมีการใช้เคอร์คิวมินเป็นอาหารเสริม (preventive medicine) และใช้รักษาโรคต่างๆมากมาย

ด้วยการที่เคอร์คิวมินมีฤทธิ์ต้านการออกซิเดชัน และ ฤทธิ์ลดการอักเสบ ดังนั้นการนำเคอร์คิวมินมาใช้ในเครื่องสำอางจึงน่าจะเป็นประโยชน์และเหมาะสมอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตาม โมเลกุล

เคอร์คิวมินดูดกลืนแสงในช่วงตามองเห็นได้ดีมาก (maximum wavelenght ~ 420 nm, molar absorption coefficient ~ 50,000 $M^{-1}cm^{-1}$) ทำให้ตัวมันมีสีส้มที่เข้มมาก สมบัติการมีสีส้มเข้มนี้ทำให้การใช้งานเคอร์คิวมินในเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ดูแลผิวถูกจำกัด การแก้ปัญหานี้ที่มีผู้จดสิทธิบัตรไว้ (38) และมีการใช้งานกันทั่วไปเป็นการทำ hydrogenation ที่พันธะคู่ที่อยู่ติดกับวงเบนซีนในโครงสร้างของเคอร์คิวมิน ซึ่งทำให้ได้โครงสร้างสารที่ไม่มีการดูดกลืนแสงทั้งในช่วง visible UVA และ UVB โดยการใช้งานสารดังกล่าวมุ่งที่ฤทธิ์การเป็น antioxidant อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยเชื่อว่าการแก้ปัญหาเรื่องสีนี้ยังสามารถทำโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเคอร์คิวมินในลักษณะที่จะทำให้เกิด hypsochromic shifts หรือการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่สั้นลง โดยให้ช่วงการดูดกลืนเข้าไปอยู่ในช่วงยูวี ซึ่งจะทำให้แสงในช่วงตามองเห็นไม่ถูกดูดกลืน ผลคือจะได้โมเลกุลไม่มีสี ที่สามารถดูดกรองรังสียูวี หรือ ได้สารกรองรังสียูวีนั่นเอง งานวิจัยเบื้องต้นที่ผู้วิจัยได้ทำไปแล้วแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการสร้างสารกรองรังสียูวีจากเคอร์คิวมินด้วยหลักการดังกล่าว นอกจากนี้ ดังที่กล่าวมาแล้วว่าเคอร์คิวมินมีสมบัติการต้านการออกซิเดชัน ซึ่งเป็นสมบัติที่ดีและเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้ในเครื่องสำอางอยู่แล้ว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเคอร์คิวมินโดยยังคงรักษาสมบัติทางชีวภาพในแง่การเป็นสารต้านการออกซิเดชันของโมเลกุลไว้ด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

NMR Spectrometer รุ่น AC-F 200 (Bruker-Spectropin) (ความถี่ 200 เฮิร์ต)

เครื่อง FT-IR Nicolet impact 410

Rotary evaporator (BUCHI Heating Bath B-490)

เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า

เครื่องชั่งน้ำหนัก

ขวดก้นกลม 3 คอ ขนาด 100 ml

ขวดก้นกลมขนาด 50, 100 ml

บีกเกอร์ขนาด 25, 50, 150, 250, 500 ml

ขวดวัดปริมาตรขนาด 25, 50, 100 ml

ปิเปตขนาด 5 ml

กระบอกตวงขนาด 10, 100 ml

คอนเดนเซอร์

เทอร์โมมิเตอร์

หลอดทดลองขนาดเล็ก

หลอดหยด

กระจกนาฬิกา

คอลัมน์แยกสาร

จุกยาง

กรวยบุคเนอร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 สารเคมี

2.2.1 สารมาตรฐาน

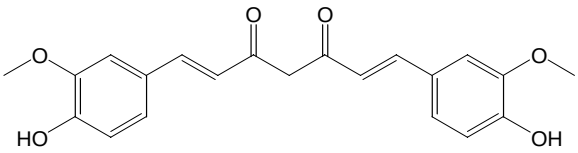
- curcumin 98+%, $C_{21}H_{20}O_2$ (ACROS ORGANIC)
- Potassium carbornate , K_2CO_3 (J.T. Baker, USA)
- Sodium sulphate anhydrous, Na_2SO_4 (Asia Pacific specially Chemicals Limited CAN, Australia)
- Iodomethane, stabilized 99%, CH_3I (ACROS ORGANIC)
- 4-dimethylaminopyridine (DMAP), $C_7H_{10}N_2$ (Merck KgaA, Germany)
- tert-butyldimethyl silyl chloride, (ACROS ORGANIC)
- triethylamine, $(C_2H_5)_3N$ (CARLO ERBA Reagent)
- 2,6-Di-tert-Butyl-4-Methylphenol, DPPH (Merck KgaA, Germany)

2.2.2 ตัวทำละลาย

- Methanol, AR grade (Lab scan, Thailand)
- Acetonitrile, AR grade (Lab scan, Thailand)
- Acetone, AR grade (Lab scan, Thailand)
- Hexane, AR grade (Lab scan, Thailand)
- Ethyl acetate, AR grade (Lab scan, Thailand)
- Diethyl ether, AR grade (Lab scan, Thailand)
- Dichloromethane, AR grade (Lab scan, Thailand)
- Ethanol, AR grade (Lab scan, Thailand)

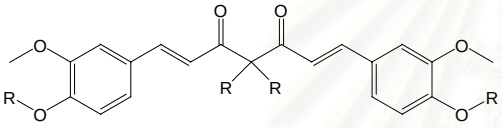
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 วิธีการทดลอง

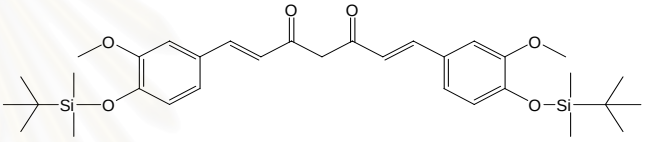


curcumin

RI, K_2CO_3, acetone, 80^oC — TBDMSCl, tetraethylamine, CH_2Cl_2, DMAP, 25^oC

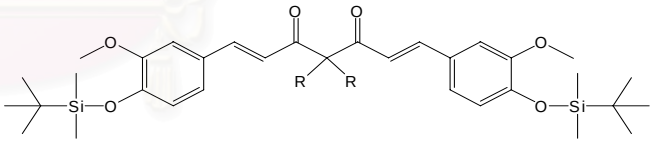


tetraalkyl curcumin



TBDMS-curcumin

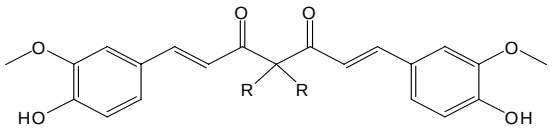
RI, acetone, K_2CO_3, 50^oC



R-TBDMS-curcumin

R = methyl, octyl

CH_3COOH, H_2O, THF, 80^oC



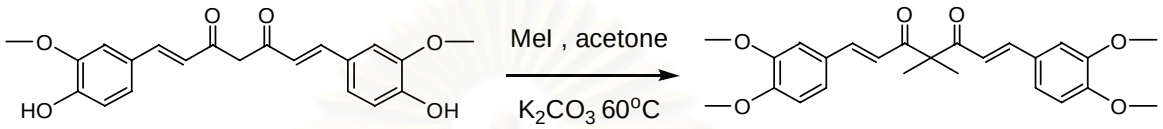
dialkyl curcumin

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนผังการดำเนินงานวิจัย

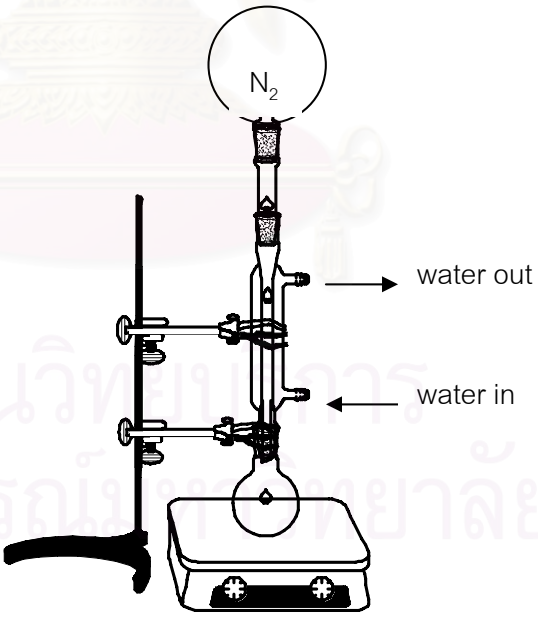
<u>ตอนที่ 1</u> **สังเคราะห์อนุพันธ์ของ** curcumin **โดยใช้หมู่แทนที่เป็น** methyliodide

2.3.1 **การเตรียม** 1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione **หรือ** tetramethylcurcumin **จาก** curcumin



curcumin tetramethylcurcumin

1. ละลาย curcumin 0.5228 g. (1.4192 mmol) ใน acetone จนได้สารละลายใสในขวดก้นกลมขนาด 50 ml
2. เติม K_2CO_3 0.5821 g. (3.623 mmol) ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 ml
3. ตั้งเครื่องมือดังรูป



รูปที่ 2-1 **เครื่องมือที่ใช้ในการ** reflux **ปฏิกิริยา** nucleophilic substitution **ของ** methyl iodide **กับ** curcumin

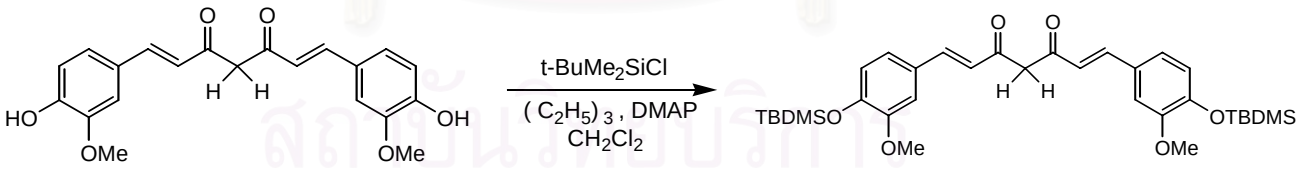
4. ทำการ reflux ที่อุณหภูมิประมาณ 60°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน
5. เมื่ออุณหภูมิคงที่ ค่อยๆ หยด methyliodide 4 ml (64.25 mmol)

6. ปล่อยให้ reflux เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (TLC) โดยใช้ เฟสเคลื่อนที่เป็น dry ethylacetate : dry dichloromethane : dry hexane ในอัตราส่วน 1:1:2
7. นำสารละลายที่ได้ทิ้งให้เย็น แล้วกรอง K_2CO_3 ออกล้างด้วย acetone 5-6 ครั้ง
8. นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator
9. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H NMR, IR และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-800 nm

2.3.2 การหา UV-Vis spectrum ของสารผลิตภัณฑ์

1. เตรียมสารละลายของสารผลิตภัณฑ์ จากข้อ 2.3.1 ใน acetonitrile โดยการชั่งสาร 0.0019 g. ละลายด้วย acetonitrile จนมีปริมาตรเป็น 100 ml
2. นำสารที่เตรียมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200-800 nm โดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrometer

2.3.3 การเตรียม 1,7-bis(4-tertiarybutyldimethylsiloxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ TBDMS-curcumin จาก curcumin (protection of phenolic groups)



curcumin TBDMS-curcumin

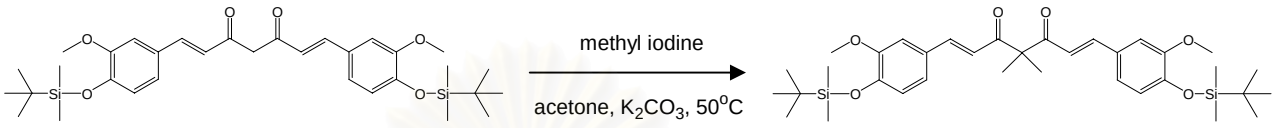
1. ชั่ง curcumin 1.4367 g., 4-dimethylaminopyridine 0.096 g., triethylamine 2.75 ml และ dry dichloromethane 15 ml
2. ใน dropping funnel ใส่ tert-butyldimethyl silyl chloride 1.42 g. ใน dry dichloromethane 5 ml
3. นำสารในข้อ 1 ผสมลงในขวดก้นกลม 3 คอ ใส่ magnetic bar ทำปฏิกิริยาภายใต้ไนโตรเจน

4. คนของผสมในน้ำแข็ง แล้วจึงหยด tert-butyldimethyl silyl chloride ใน dry dichloromethane อย่างช้าๆ เป็นเวลา 10 นาที นำออกจากน้ำแข็ง และทำการ stir ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. ใส่น้ำ DI ขณะที่คนอยู่ จะเกิดการแยกชั้น นำมาใส่กรวยแยกเก็บชั้น organic เอาไว้ จากนั้นนำชั้นน้ำมาสกัดด้วย dry dichloromethane 3 ครั้ง ครั้งละ 5 ml แล้วนำมารวมกับชั้น organic ในตอนแรก
6. นำชั้น organic มากำจัดน้ำออกด้วย anhydrous magnesium sulfate แล้วกรองออก นำไปเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator
7. นำสารจากข้อ 6 ไปผ่าน silica gel column โดยใช้ตัวชะเป็น dry ethylacetate : dry dichloromethane : dry hexane ในอัตราส่วน 1:1:2 และแยกแต่ละ fraction ออกมา

2.3.4 การแยก TBDMS-curcumin ให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ซิลิกาเจล

1. ใช้ silica gel 60 (0.040-0.063 mm) ประมาณ 30 เท่าของสารที่ใช้แยก บรรจุลงในคอลัมน์โดยใช้ตัวชะเป็น dry ethylacetate : dry dichloromethane : dry hexane ในอัตราส่วน 1:1:2
2. ชั่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 2.3.3 มาละลายในสารละลายผสม dry ethylacetate : dry dichloromethane : dry hexane ในอัตราส่วน 1:1:2 จนได้สารละลายใส แล้วนำไปทำการ load ลงใน silica gel column
3. เก็บสารละลายที่แยกได้โดยใช้ขวดรูปชมพู่ โดยเก็บ fraction ละ 50 ml ได้สารละลาย 30 ส่วน
4. ตรวจสอบสารละลายทั้ง 30 ส่วนด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (TLC) โดยใช้ เฟสเคลื่อนที่เป็น dry ethylacetate : dry dichloromethane : dry hexane ในอัตราส่วน 1:1:2
5. จากผลของการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค TLC สามารถแยกสารได้เป็น 2 กลุ่ม
6. นำสารทั้ง 2 กลุ่มไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H NMR

2.3.5 **การเตรียม** 1,7-bis(4-tertiarybutyldimethylsiloxy-3-methoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione **หรือ** dimethyl TBDMS-curcumin **จาก** TBDMS-curcumin

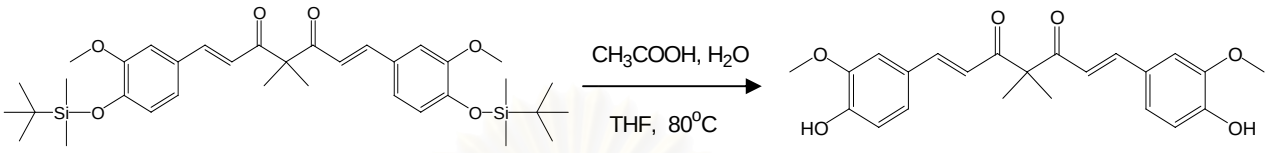


TBDMS-curcumin dimethyl TBDMS-curcumin

1. ชั่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ซึ่งเป็น TBDMS-curcumin ที่ protect หมู่ OH ทั้ง 2 หมู่ (จากข้อ 2.3.4) 0.1036 g มาละลายในตัวทำละลาย acetone จะได้สารละลายใส
2. เติมหมู่แทนที่ methyl iodide 5 ml (ประมาณ 20 เท่าของผลิตภัณฑ์ที่ได้) และใช้เบส K_2CO_3 0.1452 g (ประมาณ 10 เท่าของผลิตภัณฑ์ที่ได้)เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
3. ใส่แมกเนติกบาร์ และนำไปตั้ง reflux ที่อุณหภูมิ 50°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
4. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการกรองเอา K_2CO_3 ออกและระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator
5. ตรวจสอบโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (TLC) สามารถแยกสารได้เป็น 3 กลุ่ม
6. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ซิลิกา และนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H NMR

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.6 การเตรียม 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ dimethylcurcumin (deprotection at the phenolic groups)



dimethyl TBDMS-curcumin dimethyl curcumin

1. ชั่ง dimethyl TBDMS-curcumin จากข้อ 2.3.5 มา 0.1235 g. เติมสารละลายผสมระหว่าง tetrahydrofuran : acetic acid : น้ำ ในอัตราส่วน 1:3:1 จนได้สารละลายใส
2. นำไป reflux ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง
3. ตรวจสอบโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (TLC) สามารถแยกสารได้เป็น 2 กลุ่ม
4. ทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ซิลิกา ใช้ตัวชะเป็น dry ethylacetate : dry dichloromethane : dry hexane ในอัตราส่วน 1:1:2
5. ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator จากนั้นนำสารทั้ง 2 กลุ่มที่ได้ไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H NMR, IR และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-800 nm

2.3.7 การหา UV-Vis spectrum ของสารผลิตภัณฑ์

1. เตรียมสารละลายของ สารผลิตภัณฑ์ ใน acetonitrile ที่ความเข้มข้น 4.314×10^{-5} M เตรียมจาก stock solution โดยการชั่งสารผลิตภัณฑ์ 0.0171 g. ละลายด้วย acetonitrile จนมีปริมาตรเป็น 100 ml
2. ปิเปต stock solution มา 5 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 ml ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile
3. นำสารที่เตรียมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200-800 nm โดยใช้เครื่อง UV-Vis Spectrometer

2.3.8 การแยกผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี HPLC

นำสารผลิตภัณฑ์ จาก 2.3.1 และ 2.3.6 มาทำการแยกด้วย HPLC ดังสภาวะต่อไปนี้

Column: C-18, Lichrosorb RP 18, 5 μm

Detector: photodidode array

Mobile phase: acetonitrile : H_2O = 80 : 20

Detection: scan mode จาก 220-400 nm

Flow rate: 1 ml/min

ทำการวิเคราะห์เพื่อตรวจหา UV absorption spectra และ NMR ของแต่ละองค์ประกอบในสารผลิตภัณฑ์

1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (trimethylcurcumin)

UV: maximum absorption = 350 nm

^{1}H NMR: 2.00 ppm (s, 1H, -(OH)C=C(**CH$_3$**)C(O)-), 1.50 ppm (d, 2H, -C(O)CH(**CH$_3$**)C(O)-), 3.80 ppm (s, 12H, Ph(O**CH$_3$**), 5.40 ppm (s, 0.7 H, -C(O)C**H**(CH3)C(O)-), 6.70 ppm (d, 2H, PhCH=C**H**C(O)-), 6.90 ppm (d, 2H Ar-**H**), 7.08 ppm (s, 2H, Ar-**H**), 7.16 (d, 2H, Ar-**H**), 7.72 ppm (d, 2H, PhC**H**=CHC(O)-) Both keto form and enol were present (keto : enol ~ 4 : 3).

1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (tetramethylcurcumin)

UV: maximum absorption = 280 nm

^{1}H NMR: 1.30 ppm (s, 6H, -C(O)C(C**H$_3$**)$_2$C(O)-), 3.90 ppm (s, 12H, Ph(O**CH$_3$**), 6.70 ppm (d, 2H, PhCH=C**H**C(O)-), 6.90 ppm (d, 2H Ar-**H**), 7.08 ppm (s, 2H, Ar-**H**), 7.16 (d, 2H, Ar-**H**), 7.72 ppm (d, 2H, PhC**H**=CHC(O)-)

1,7-bis(4-tertiarybutyldimethylsiloxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione (TBDMS-curcumin)

^{1}H NMR: 0.00 ppm (s, 12H, -OSi(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), 0.80 ppm (s, 18H, -OSi(CH$_3$)$_2$C(C**H**$_3$)$_3$), 3.75 ppm (s, 6H, PhOC**H**$_3$), 5.70 ppm (s, 2H, -C(O)C**H**$_2$C(O)-), 6.40 ppm (d, 2H, PhCH=C**H**C(O)-), 6.75 ppm (d, 2H, Ar-H), 6.93 ppm (s, 2H, Ar-H), 7.00 ppm (d, 2H, Ar-H), 7.50 ppm (d, 2H, PhC**H**=CHC(O-). Keto form predominated enol form (keto : enol ~ 9 :1).

1,7-bis(4-tertiarybutyldimethylsiloxy-3-methoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (methyl TBDMS-curcumin)

^{1}H NMR: 0.00 ppm (s, 12H, -OSi(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), 0.80 ppm (s, 18H, -OSi(CH$_3$)$_2$C(C**H**$_3$)$_3$), 1.30 ppm (s, 3H, -C(O)CH(C**H**$_3$)C(O)-), 3.69 ppm (s, 6H, PhOC**H**$_3$), 5.90 ppm (s, 1H, -C(O)C**H**(CH3)C(O)-), 6.49 ppm (d, 2H, PhCH=C**H**C(O)-), 6.69 ppm (d, 2H, Ar-H), 6.84 ppm (s, 2H, Ar-H), 6.90 ppm (d, 2H, Ar-H), 7.53 ppm (d, 2H, PhC**H**=CHC(O-)

1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (methylcurcumin with 2 OH)

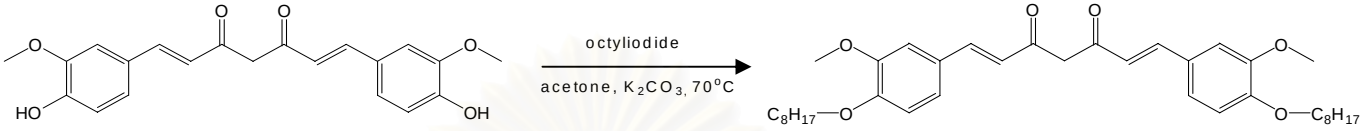
UV: maximum absorption = 330 nm

^{1}H NMR: 1.44 ppm (s, 6H, -C(O)CH(C**H**$_3$) C(O)-), 3.69 ppm (s, 6H, PhOC**H**$_3$), 5.95 ppm (s, 1H, -C(O)C**H**(CH3)C(O)-), 6.68 ppm (d, 2H, PhCH=C**H**C(O)-), 6.92 ppm (d, 2H, Ar-H), 7.05 ppm (s, 2H, Ar-H), 7.15 ppm (d, 2H, Ar-H), 7.71 ppm (d, 2H, PhC**H**=CHC(O-)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ตอนที่ 2</u> **สังเคราะห์อนุพันธ์ของ curcumin โดยใช้หมู่แทนที่เป็น octyliodide**

2.3.9 การสังเคราะห์ 1,7-bis(4-octhoxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ dioctylcurcumin จาก curcumin



curcumin dioctylcurcumin

1. ละลาย curcumin 0.5228 g. (1.4192 mmol) ใน acetone จนได้สารละลายใสในขวดก้นกลมขนาด 50 ml
2. เติม K_2CO_3 0.5821 g. (3.623 mmol) ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 ml
3. ตั้งเครื่องมือดังรูปที่ 6 และทำการ reflux ที่อุณหภูมิประมาณ 80 °C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน
4. เมื่ออุณหภูมิคงที่ ค่อยๆ หยด octyliodide 11 ml (0.609 mol)
5. ปล่อยให้ reflux เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (TLC) โดยใช้ เฟสเคลื่อนที่เป็น dry ethylacetate : dry dichloromethane : dry hexane ในอัตราส่วน 1:1:2
6. นำสารละลายที่ได้ทิ้งให้เย็น แล้วกรอง K_2CO_3 ออกล้างด้วย acetone 5-6 ครั้ง
7. นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator
8. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H NMR, IR และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-800 nm

2.3.10 การหา UV-Vis spectrum ของ dioctylcurcumin

1. เตรียมสารละลายของ dioctylcurcumin จากข้อ 2.3.9 ใน acetonitrile โดยการชั่ง dioctyl curcumin 0.0013 g. ละลายด้วย acetonitrile จนมีปริมาตรเป็น 100 ml
2. นำสารที่เตรียมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200-800 nm โดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrometer

1,7-bis(3,4-diocthoxyphenyl)- 1,6-heptadiene-3,5-dione (diocthylcurcumin)

UV: maximum absorption = 436 nm

^{1}H NMR: 0.9 ppm (m, 6H, $O(CH_2)_7C\mathbf{H}_3$), 1.2-1.5 ppm (br, 10 H, $-O(CH_2)_2(C\mathbf{H}_2)_5CH_3$), 1.9 ppm (m, 4H, $-OCH_2C\mathbf{H}_2-$), 3.95 ppm (s, 6H, $Ph(O\mathbf{CH}_3)$), 4.09 ppm (m, 4H, $Ph(OC\mathbf{H}_2-$), 5.83 ppm (s, 1 H, $-C(O)C\mathbf{H}_2C(O)-$), 6.01 ppm (s, 1 H, -(OH)C=C**H**C(O)-), 6.70 ppm (d, 2H, PhCH=C**H**C(O)-), 6.90 ppm (d, 2H Ar-**H**), 7.08 ppm (s, 2H, Ar-**H**), 7.16 (d, 2H, Ar-**H**), 7.72 ppm (d, 2H, PhC**H**=CHC(O)-)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.11 การทดสอบการออกฤทธิ์เป็น antioxidant ของ curcumin เทียบกับสารผลิตภัณฑ์

1. เตรียมสารละลาย DPPH ใน methanol ให้มีความเข้มข้น 0.5 mM
2. เตรียมสารละลาย curcumin, และสารผลิตภัณฑ์ ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4 mM โดยใช้ตัวทำละลายเป็น ethanol
3. ทำการหยดสารลงใน plate (micro well 96) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

	1	2	3	4
I	0.4 mM curcumin 10 μl + DPPH 95 μl	0.4 mM methyl curcumin with 2 OH 10 μl + DPPH 95 μl	0.4 mM trimethyl curcumin 10 μl + DPPH 95 μl	0.4 mM dioctyl curcumin 10 μl + DPPH 95 μl
II	0.4 mM curcumin 10 μl	0.4 mM methyl curcumin with 2 OH 10 μl	0.4 mM trimethyl curcumin 10 μl	0.4 mM dioctyl curcumin 10 μl
III	ethanol 10 μl + DPPH 95 μl (control)	-	blank	-
IV	0.2 mM curcumin 10 μl + DPPH 95 μl	0.2 mM methyl curcumin with 2 OH 10 μl + DPPH 95 μl	0.2 mM trimethyl curcumin 10 μl + DPPH 95 μl	0.2 mM dioctyl curcumin 10 μl + DPPH 95 μl
V	0.2 mM curcumin 10 μl	0.2 mM methyl curcumin with 2 OH 10 μl	0.2 mM trimethyl 10 μl	0.2 mM dioctyl 10 μl
VI	BHT 10 μl + DPPH 95 μl	-	BHT	-
VII	ethanol10 μl + DPPH 95 μl	-	blank	-

4. ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 nm ทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 30 นาทีโดยใช้เครื่อง microtiter plate Reader

บทที่ 3
ผลการทดลอง

3.1 เปรียบเทียบสมบัติต่างๆ ของ curcumin กับผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้

ตารางที่ 2 สมบัติการละลายของ curcumin และอนุพันธ์ของ curcumin ที่สังเคราะห์

สาร	การละลาย						
	H_2O	EtOH	acetone	EtOAc	CH_2Cl_2	hexane	ether
1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl) -1,6-heptadiene-3,5-dione (curcumin)	-	+++	+++	+	++	-	-
1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (tetramethylcurcumin)	-	+,heat	+++	++	++	+	-
1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (trimethylcurcumin)	-	+,heat	+++	++	++	+	-
1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (methylcurcumin with 2 OH)	-	+++	+++	++	++	+	-
1,7-bis(3,4-dioctylphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (dioctylcurcumin)	-	+,heat	+++	++	++	+	-

กำหนดให้ - คือ ไม่ละลาย
+ คือ ละลายบ้าง (1 mg / 5 mL)
++ คือ ละลายปานกลาง (3 mg / 2 mL)
+++ คือ ละลายดีมาก (5 mg / 1 mL)

ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพ จุดเดือด และจุดหลอมเหลวของ curcumin และอนุพันธ์ของcurcumin ที่สังเคราะห์

	สมบัติต่างๆ		
	สี, ลักษณะ	จุดเดือด	จุดหลอมเหลว
1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl) -1,6-heptadiene-3,5-dione (curcumin)	ของแข็งสีเหลืองอ่อน	-	183°C
1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (tetramethylcurcumin)	ของเหลวหนืดสีส้มเหลือง	355°C (decompose temperature)	-
1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (trimethylcurcumin)	ของเหลวหนืดสีส้ม	>300 °C	-
1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (methylcurcumin with 2 OH)	ของเหลวสีเหลืองอ่อน	>300 °C	-
1,7-bis(3,4-dioctylphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (dioctylcurcumin)	ของแข็งสีเหลืองอ่อน	-	63.9-70.0°C

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของ curcumin และอนุพันธ์ของ curcumin ที่สังเคราะห์

สาร	ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max})
1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl) -1,6-heptadiene-3,5-dione (curcumin)	417 nm
1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (tetramethylcurcumin)	280 nm
1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (trimethylcurcumin)	350 nm
1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (methylcurcumin with 2 OH)	330 nm
1,7-bis(3,4-dioctylphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (dioctylcurcumin)	436 nm

ตารางที่ 5 เปอร์เซนต์การออกฤทธิ์เป็น antioxidant (%Antioxidant) ของสารที่สังเคราะห์ได้ความเข้มข้น 0.4 mM (ตัวเลขที่แสดงหมายความว่า สารสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของปฏิกิริยาที่ทดสอบได้ถึงกี่เปอร์เซนต์)

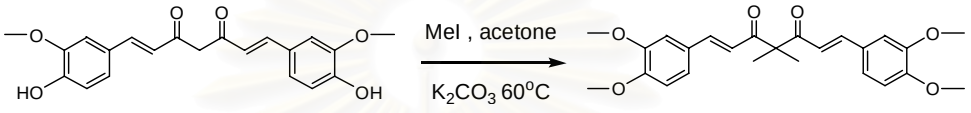
สาร	% Antioxidant
BHT	36.24 %
curcumin	64.84 %
trimethylcurcumin	52.51 %
methylcurcumin with 2 OH	63.74 %
dioctylcurcumin	-49.96* %

*__หมายเหตุ__ ค่าติดลบหมายความว่าสารไม่แสดงการออกฤทธิ์เป็น antioxidant หรือมีค่าเท่ากับ 0

บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

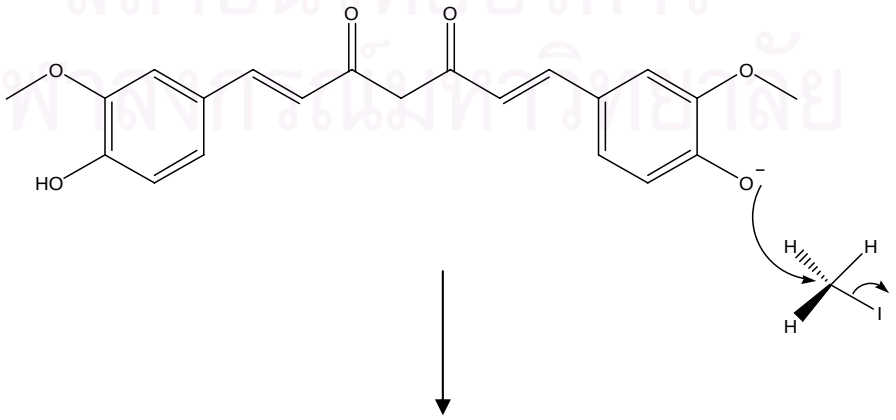
ตอนที่ 1

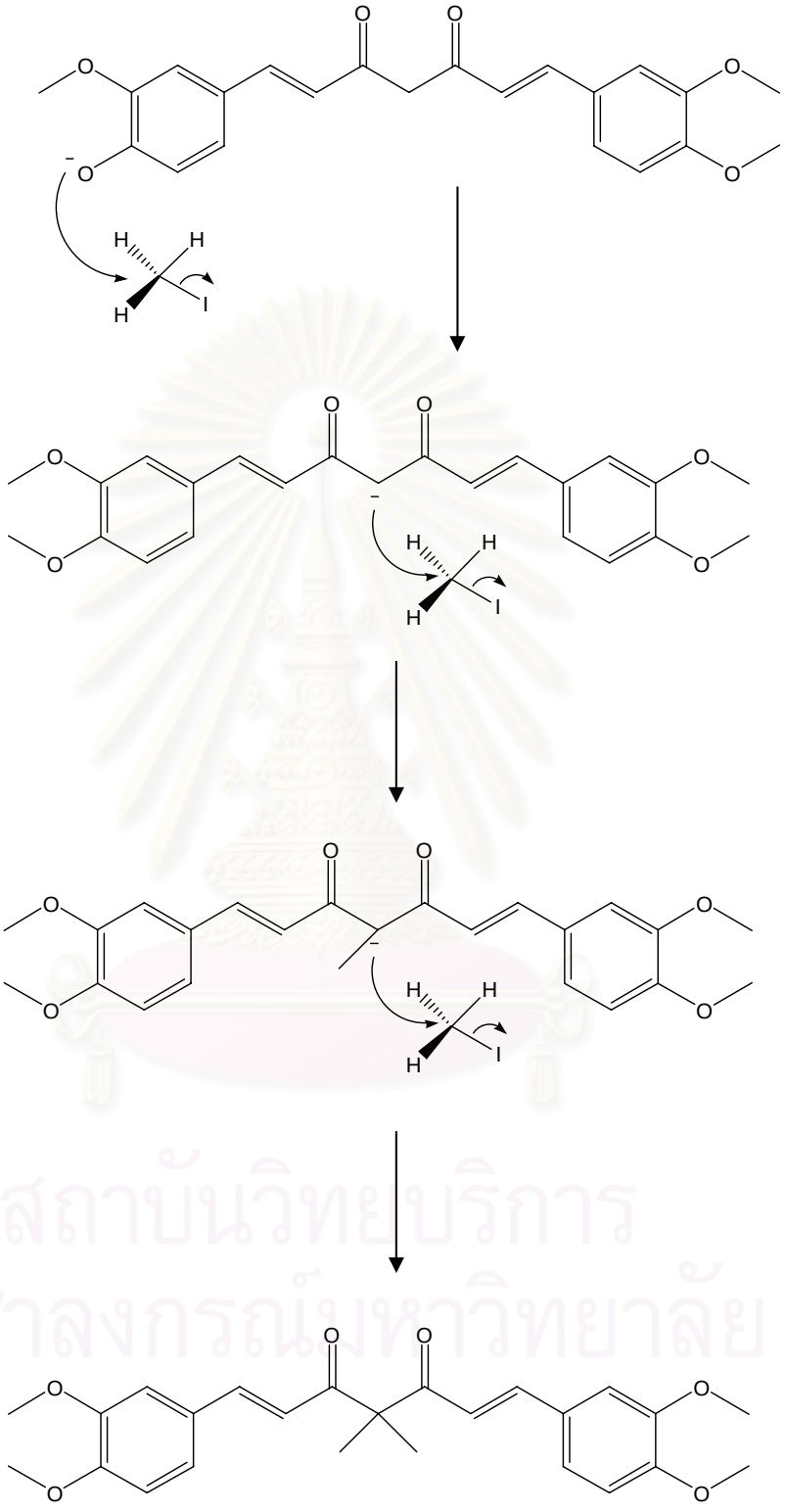
4.1 **การสังเคราะห์** 1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione **หรือ** tetramethyl curcumin



curcumin tetramethyl curcumin

การสังเคราะห์ tetramethyl curcumin ทำโดยปฏิกิริยา nucleophilic substitution โดยใช้ methyliodine เป็นหมู่แทนที่ และใช้ acetone เป็นตัวทำละลายตามสมการข้างต้น ปฏิกิริยานี้เกิดผ่านกลไกแบบ S_N2 โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาจะเกี่ยวข้องกับ nucleophile ซึ่งในที่นี้คือ curcumin ที่ตำแหน่งของ phenolic OH และ β-diketone โดย nucleophile ที่เกิดขึ้นเกิดจาก K_2CO_3 ซึ่งเป็นเบสแก่ เข้ามาดึง H ที่ตำแหน่งดังกล่าว จากนั้น nucleophile เข้าแทนที่หมู่ leaving group (ในที่นี้คือ iodide) บนอะตอมคาร์บอนในด้านตรงข้าม ซึ่งมีผลทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็น inversion configuration เนื่องจากการเข้าแทนที่ของ nucleophile กับการหลุดของ leaving group จะเกิดในเวลาเดียวกันดังรูป





กลไกของปฏิกิริยา nucleophilic substitution **ของ** curcumin **และ** methyl iodide

ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดมีสีส้มหนัก 0.5397 g คิดเป็นร้อยละผลได้เท่ากับ 95.94% เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR (หน้า 13 บทที่ 2) พบว่าสารผลิตภัณฑ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประกอบด้วยสาร 2 ชนิด คือ 1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (trimethylcurcumin) และ 1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (tetramethyl curcumin) ด้วยเหตุนี้จึงได้นำสารผลิตภัณฑ์ (ซึ่งแสดงเพียง 1 จุดบน TLC และผ่านคอลัมน์ซิลิกาแล้ว) ไปทำการแยกด้วย C-18 HPLC ซึ่งปรากฏว่าได้ tetramethylcurcumin ซึ่งแสดง UV-absorption spectrum อยู่ในช่วง UV C (λ_{max}= 280 nm) (รูปที่ 4.1-B) และ trimethylcurcumin ซึ่งแสดง UV ansorption อยู่ในช่วง UV A (λ_{max}= 345 nm) (รูปที่ 4.1-C) โดยในรูปที่ 4.1-A แสดงโครมาโตแกรมของการแยกนี้ โดยจะเห็นว่าด้วยสภาวะที่ทำปฏิกิริยานี้ ทำให้ได้ trimethylcurcumin ในปริมาณใกล้เคียงกับ tetramethylcurcumin อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองบ่งอย่างชัดเจนว่าสารที่เป็น UVA Filter ที่ดีคือ trimethylcurcumin ดังนั้นหากต้องการเตรียม trimethylcurcumin เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และตรวจสอบสมบัติต่างๆต่อไป จึงควรปรับสภาวะการทำปฏิกิริยาให้ได้ trimethylcurcumin เป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยอาจทำโดยการลดปริมาณ methyliodide หรือ ลดเวลาในการทำปฏิกิริยาลง

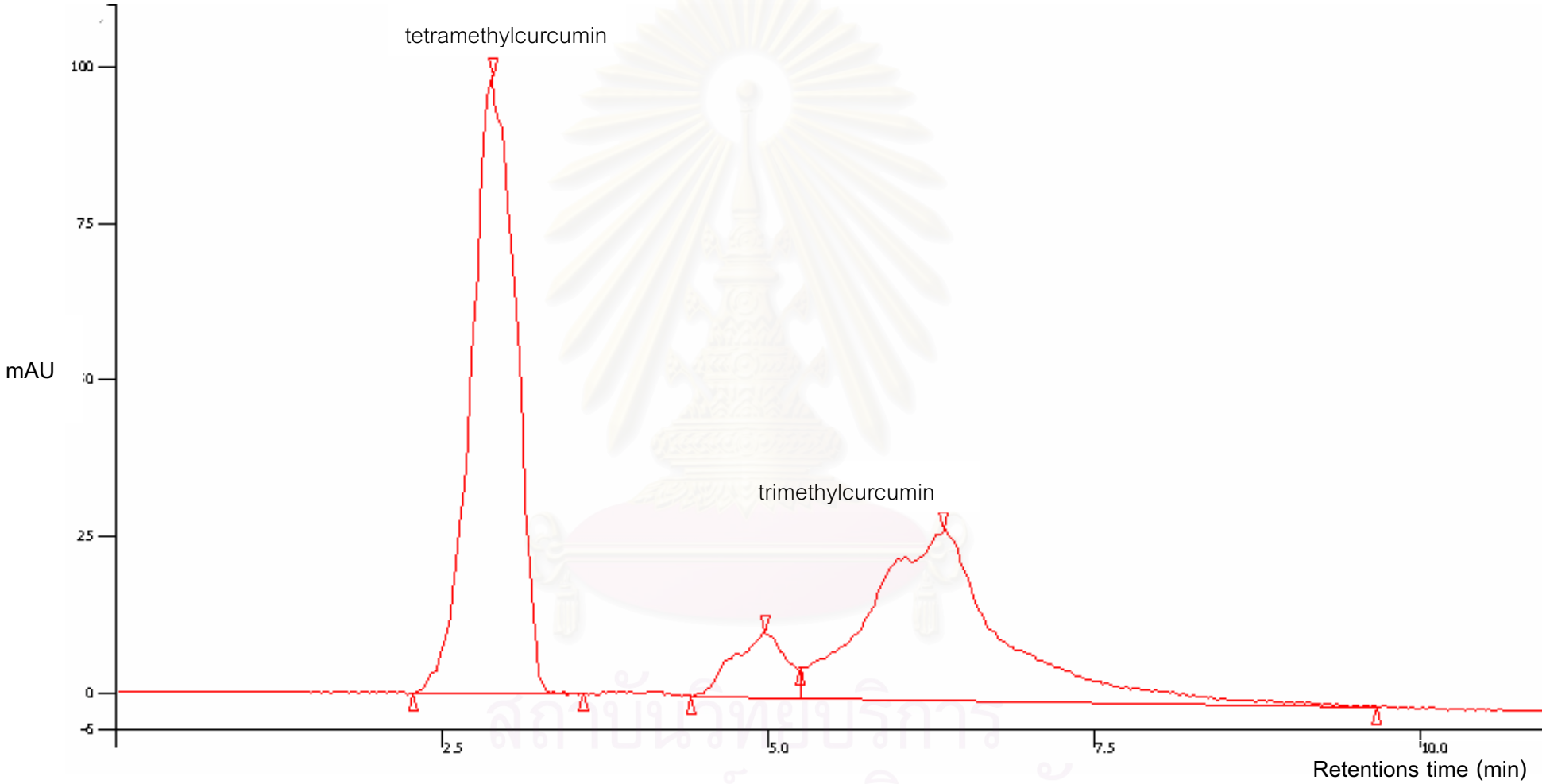
การเกิด hypsochromic shift จาก 417 nm ของ curcumin มาเป็น 280 nm ของ tetramethylcurcumin น่าจะมาจากการแทนที่หมู่ methyl ที่โปรตอนที่อยู่ระหว่างคาร์บอนิลทั้งสอง ทำให้ได้โมเลกุลที่เกิดเป็น enol form ไม่ได้ ผลก็คือ conjugation ของโมเลกุลลดลง ส่งผลให้เกิด hypsochromic shift ของ spectrum การดูดกลืนแสง

การเกิด hypsochromic shift จาก 417 nm ของ curcumin มาเป็น 350 nm ของ trimethylcurcumin น่าจะมาจากการที่ trimethylcurcumin ยังสามารถอยู่ในรูป enol form ได้ แต่การเติมหมู่แทนที่หนึ่งหมู่ลงไปที่ตำแหน่ง β-diketone ส่งผลให้โมเลกุลของ trimethyl curcumin เกิดการบิดจากระนาบเดิมเล็กน้อย เป็นผลให้ conjugate ไม่สามารถเกิดขึ้นในระนาบเดียวกันทั่วทั้งโมเลกุล ทำให้ประสิทธิภาพในการ conjugate ของโมเลกุลลดลงเมื่อเทียบกับโครงสร้างของ curcumin ในรูป enol form ซึ่งมี conjugate อยู่ในระนาบเดียวกันและเกิดขึ้นทั่วทั้งโมเลกุล ดังนั้นจึงสามารถเห็น hypsochromic shift จาก 417 nm มาเป็น 350 nm

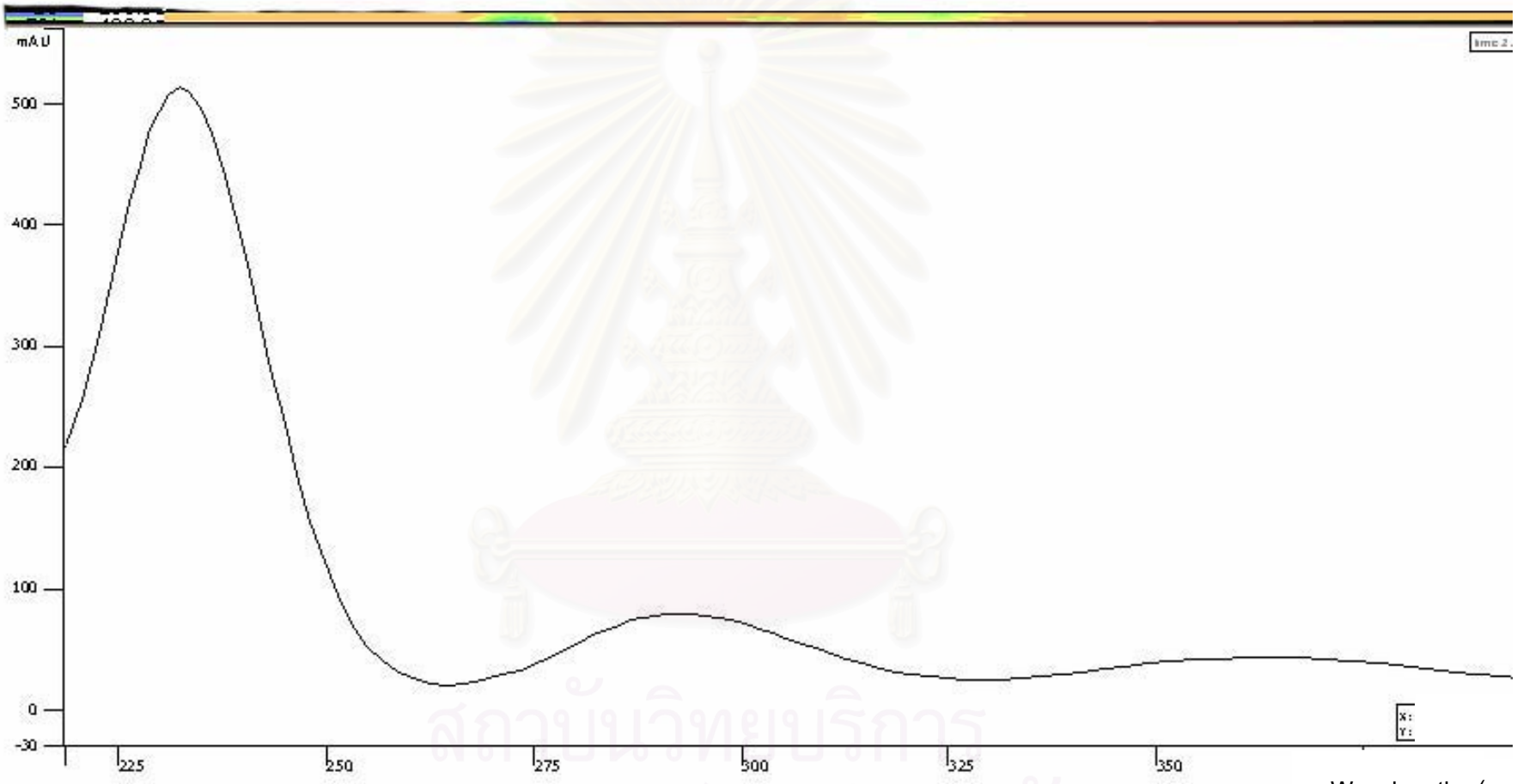
ผลการทดลองนี้แม้ว่าจะไม่เป็นไปตามความคาดหมาย กล่าวคือได้คาดไว้ว่า tetramethylcurcumin จะแสดงสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วง UVA หรือ UVB แต่ผลการทดลองพบว่า trimethylcurcumin กลับเป็นสารที่ดูดกลืนแสงในช่วง UVA ได้ดี แต่การทดลองนี้ก็ได้นำมาสู่การได้สารกรองรังสี UVA ตัวใหม่ ยิ่งไปกว่านี้ trimethylcurcumin นั้นเตรียมได้ง่ายกว่า tetramethylcurcumin ด้วย

สาร trimethylcurcumin ที่ได้นี้มีความเสถียรต่อแสงดีทั้งนี้เพราะ UV absorption spectrum ไม่เปลี่ยนแปลงแม้ว่าจะตั้งทิ้งไว้ให้โดนแสงแดดเป็นระยะเวลาถึง 3 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



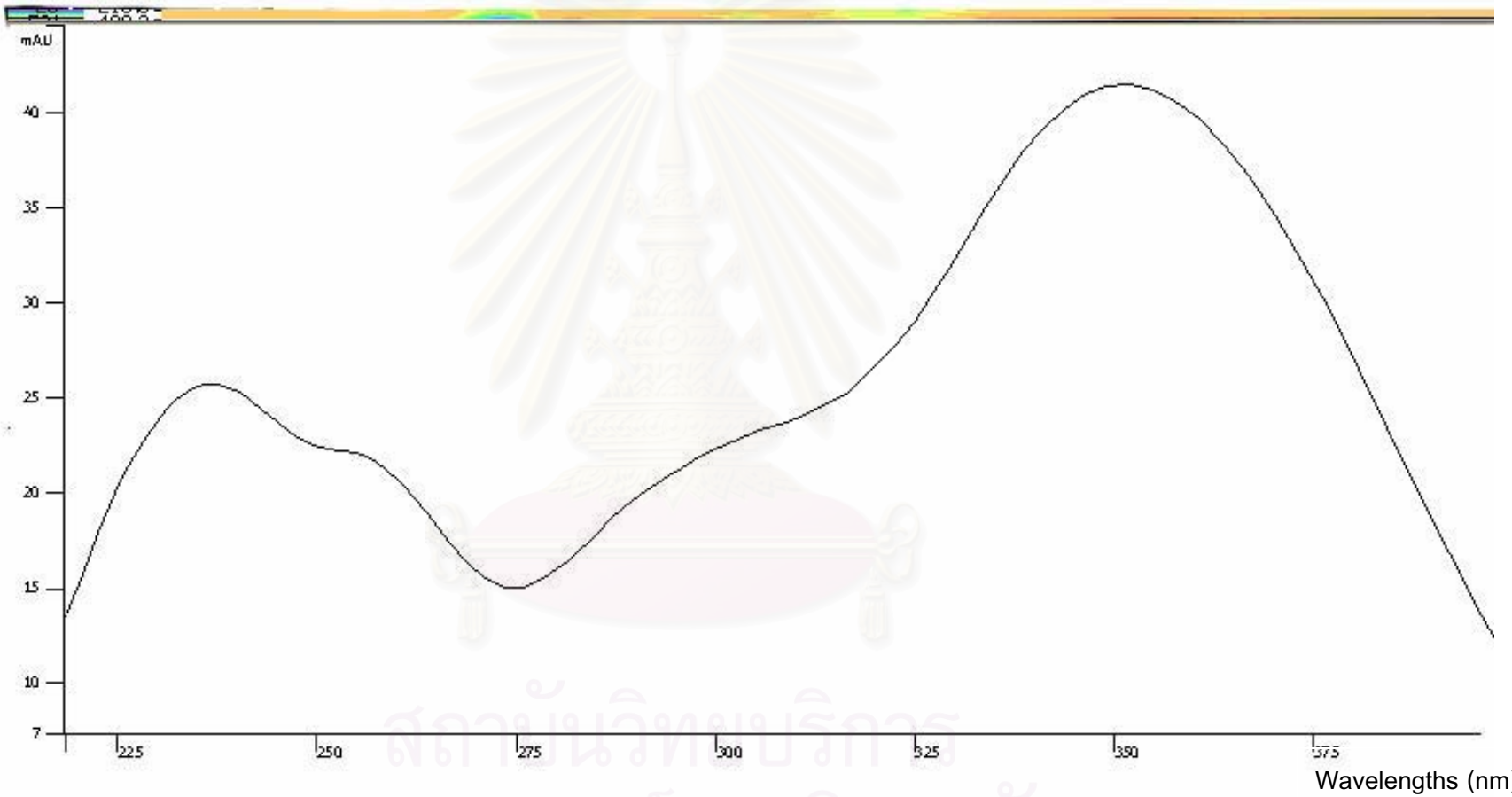
รูปที่ 4.1-A **โครมาโทแกรม จาก HPLC ของ ของผสมระหว่าง** tetramethyl curcumin **และ** trimethylcurcumin **(ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น** 240 nm)



mAU

รูปที่ 4.1-B UV spectrum **ของ** tetramethylcurcumin **ที่** retention time 2.883 min

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

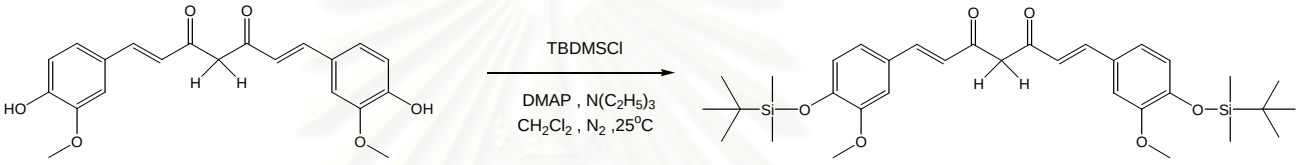


รูปที่ 4.1-C UV spectrum **ของ** trimethylcurcumin **ที่** retention time 6.336 min

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

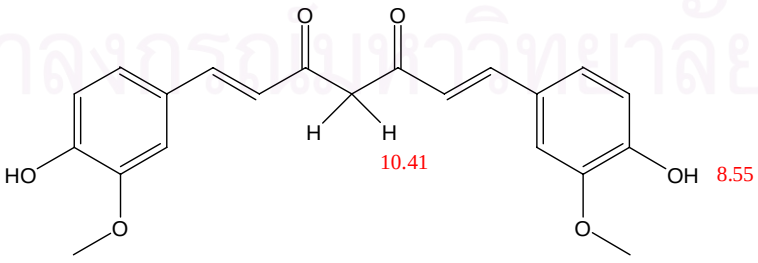
4.2 การสังเคราะห์ 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione **หรือ** dimethylcurcumin with 2 OH

การสังเคราะห์ dimethylcurcumin with 2 OH นั้น ในขั้นแรกจะเป็นการ protect หมู่ OH ของ curcumin ก่อนเพื่อจะได้คงสภาพการออกฤทธิ์เป็น antioxidant ไว้ โดยในขั้นนี้ได้ทำปฏิกิริยา silylation โดยใช้ tert-butyl dimethyl silyl chloride (TBDMSCl) มี DMAP และ triethylamine เป็น catalyst ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นแบบ S_N2 โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมี curcumin ทำหน้าที่เป็น nucleophile เข้าไปแทนที่หมู่ Cl^- ของ TBDMSCl มีสมการการเกิดปฏิกิริยาดังนี้



curcumin TBDMS-curcumin

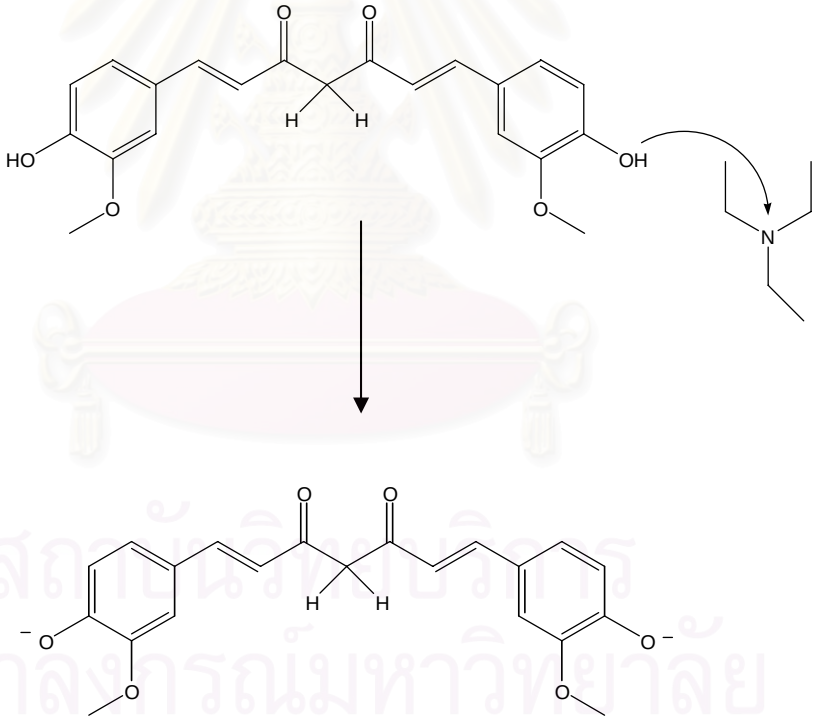
DMAP และ triethylamine ไม่เพียงทำหน้าที่เป็น catalyst แต่ยังเป็นตัวควบคุมให้ปฏิกิริยาการแทนที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งของหมู่ phenolic OH เท่านั้น ซึ่งจะเป็นการควบคุมค่าการแตกตัวของ H ไอออน (pKa) ของ curcumin ซึ่ง H ไอออน ณ ตำแหน่ง phenolic OH จะมีค่า pKa ประมาณ 8.55 และ H ที่ตำแหน่ง β-diketone จะมีค่า pKa ประมาณ 10.41 ดังรูปข้างล่าง ซึ่ง DMAP และ triethylamine เป็นเบสที่มีค่า pH ประมาณ 9.2 จึงมีความสามารถที่จะดึง proton ที่ตำแหน่ง phenolic -OH เท่านั้น เพราะมีความเป็นกรดมากกว่า



ทั้งนี้ปฏิกิริยาควรจะตั้งภายใต้บรรยากาศ N_2 เนื่องจาก H_2O จากบรรยากาศสามารถแตกตัวให้ OH^- ได้ซึ่งจะรบกวนการเกิดปฏิกิริยาได้ดังนี้

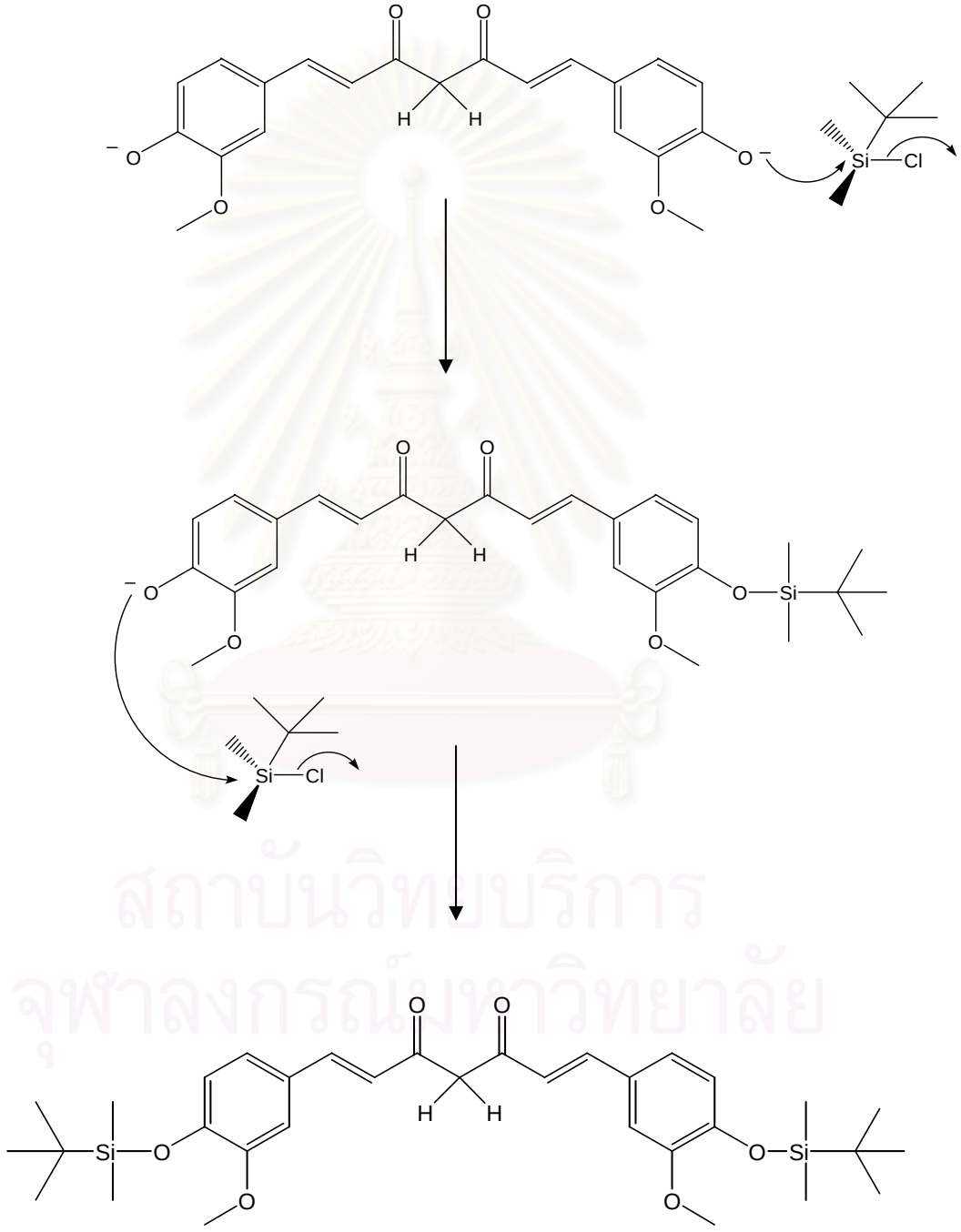
เมื่อพิจารณาจากสมการพบว่า OH^- ที่เกิดขึ้นจะเป็น nucleophile ที่ดีกว่า curcumin เพราะว่ามีขนาดที่เล็กกว่า จึงสามารถไปแย่งการทำปฏิกิริยา silylation กับ curcumin ได้

การเกิด nucleophile ของ curcumin จะมีกลไกดังนี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อได้ nucleophile ดังรูปข้างต้นแล้ว nucleophile นี้จะไปทำปฏิกิริยากับ TBDMSClโดยจะมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังนี้



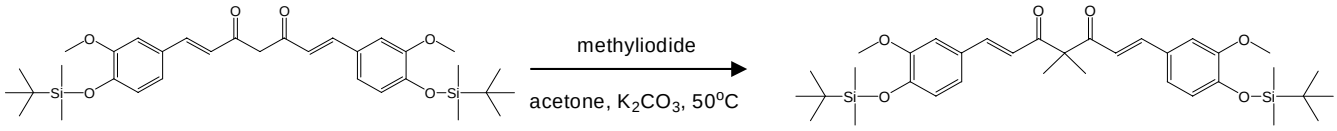
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TBDMS-curcumin ที่สังเคราะห์ได้สามารถทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ซิลิกา มีตัวชะเป็น ethyl acetate : dichloromethane : hexane ในอัตราส่วน 1:1:2 สามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ส่วน ซึ่งส่วนที่ชะออกมาเป็นส่วนแรกคือ curcumin ที่มีการ protect สองหมู่ เนื่องจากเป็นสารที่มีขั้วน้อยที่สุด ตัวที่สองคือ curcumin ที่มีการ protect หนึ่งหมู่ ซึ่งมีขั้วมากกว่าสารตัวแรกที่ออกมา เพราะมีหมู่ OH และ ส่วนสุดท้ายคือ curcumin ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาซึ่งจะมีขั้วมากที่สุดซึ่งเป็นผลมาจากหมู่ OH เช่นกัน

จากการทดลองสามารถพิสูจน์โครงสร้างของ curcumin ที่ protect หมู่ OH (TBDMS-curcumin) ได้ด้วย ^{1}H NMR (หน้า 14 บทที่ 2) เมื่อพิจารณาจาก spectrum ที่ได้ พบว่ามี peak ที่ค่า chemical shift ที่ประมาณ 0 ppm มีสัญญาณที่ขึ้นเป็น singlet ซึ่ง peak นี้เป็น proton ของหมู่ methyl ซึ่งต่อกับ silicon และพบ peak ที่ค่า chemical shift ประมาณ 0.8 ppm มีสัญญาณที่ขึ้นเป็น singlet ซึ่งเป็นของหมู่ tert-butyl ที่ต่อกับ silicon (จะเห็น peak ที่ขึ้นเป็น singlet ใกล้เคียงกับทั้ง 2 peak ดังกล่าวซึ่งคาดว่าจะเป็นของ TBDMSCl ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยา) ซึ่งทั้งสอง peak นี้สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน และเมื่อเทียบอัตราส่วนแล้วพบว่ามีอัตราส่วนเป็น 12 และ 18 proton ตามลำดับ จึงสามารถสรุปได้ว่า เกิดการแทนที่ H ด้วย TBDMS ณ ตำแหน่ง phenolic OH ทั้งสองข้าง นอกจากนี้ยังพบ peak ที่ค่า chemical shift ที่ประมาณ 5.7 ppm มีสัญญาณเป็น singlet ซึ่งพบว่าเป็นตำแหน่ง H ของหมู่ methylene ที่ β-diketone แสดงว่าหมู่ TBDMSCl ไม่ได้แทนที่เข้าไปที่หมู่ methylene ณ.ตำแหน่ง β-diketone

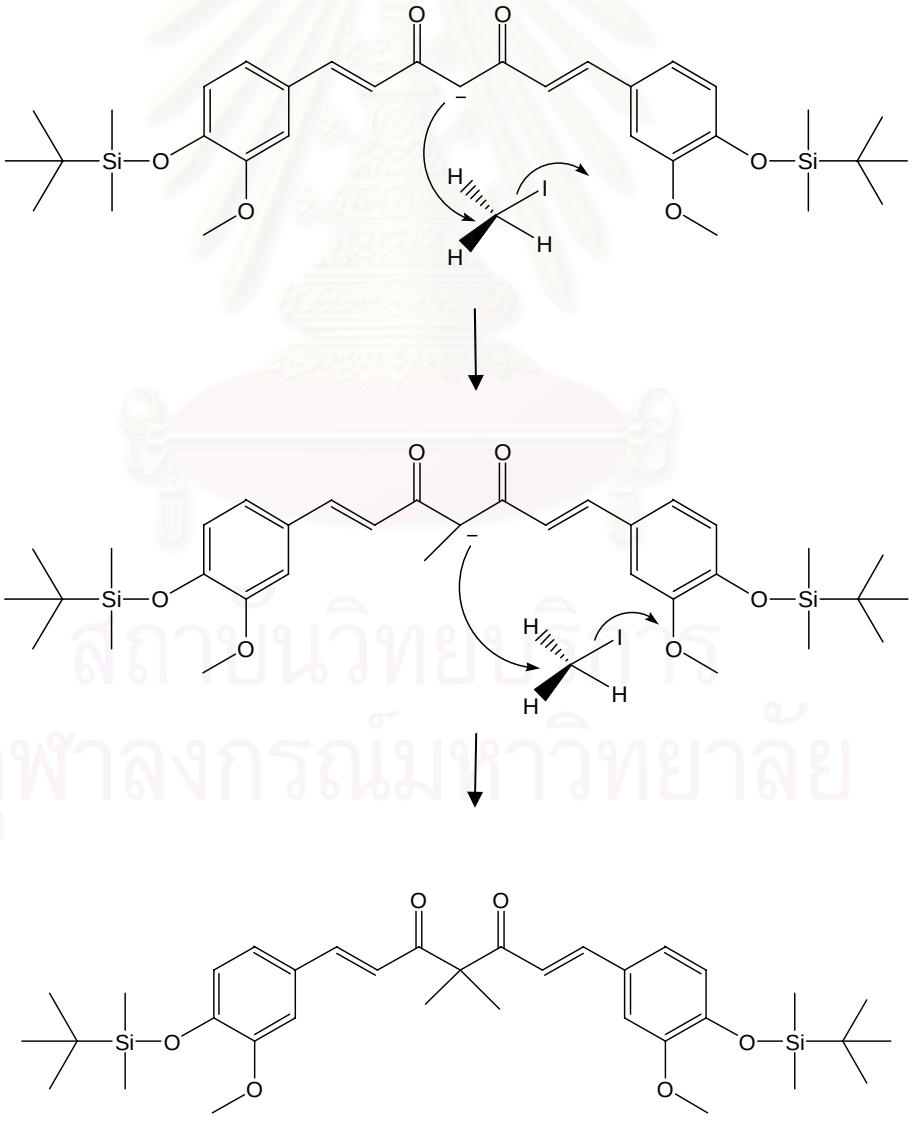
TBDMS-curcumin ที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองเข้มซึ่งสามารถละลายได้ดีใน acetone และ CH_2Cl_2 เมื่อละลายจะให้สีเป็นสีแดงเข้ม สามารถคิดร้อยละของผลได้ (%yield) ภายหลังการทำให้บริสุทธิ์แล้วเท่ากับ 20.23 % สาร TBDMS-curcumin ที่สังเคราะห์ได้นี้ถูกเก็บไว้เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ 1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione และ 1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione ต่อไป

เมื่อทำการเติมหมู่ methyl กับ TBDMS-curcumin โดยใช้ methyliodide จะเกิดปฏิกิริยาแบบ S_N2 ซึ่ง TBDMS-curcumin จะทำหน้าที่เป็น nucleophile (H ที่ตำแหน่ง β-diketone) ในที่นี้ใช้ K_2CO_3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สมการของปฏิกิริยาคือ



TBDMS-curcumin dimethyl TBDMS-curcumin

K_2CO_3 ที่เติมลงไปทำหน้าที่เป็นเบสไปดึง proton ที่หมู่ methylene ระหว่าง ketone ทั้งสอง ทำให้ TBDMS-curcumin เป็น nucleophile ได้ จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาตามสมการข้างต้นได้ และมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาได้ดังนี้

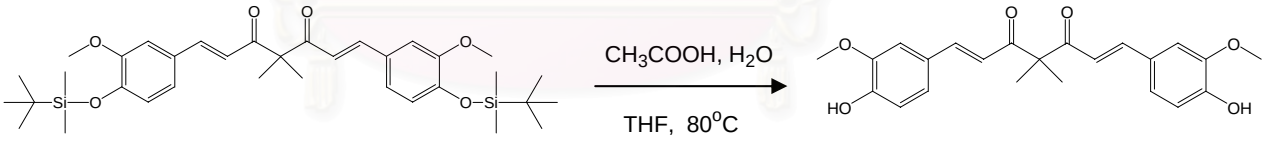


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำสารที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ซิลิกา โดยใช้ตัวชะเป็น ethyl acetate : dichloromethane : hexane ในอัตราส่วน1:1:2 เก็บสารที่ได้นำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR

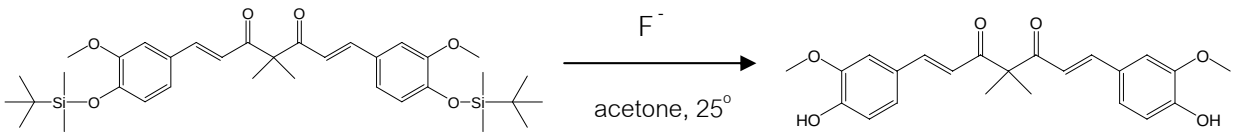
จาก ^{1}H NMR (หน้า 14 บทที่ 2) สามารถพิสูจน์โครงสร้างของสารได้ กล่าวคือปรากฏ resonance ของหมู่ methyl ที่ตำแหน่ง β-diketone ที่ค่า chemical shift ที่ 1.35 ppm อย่างชัดเจนและเมื่อเปรียบเทียบกับ ^{1}H NMR ของ TBDMS-curcumin พบว่าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้นั้นให้ peak ที่ค่า chemical shift ประมาณ 5.9 ppm ซึ่งเป็น peak ของ H ที่ตำแหน่ง β-diketone เล็กลงมากเมื่อเทียบกับก่อนการ methylation จึงสรุปได้ว่าเกิดการแทนที่ของหมู่ methyl ที่โปรตอนที่อยู่ในตำแหน่ง β-diketone จริง โดยการแทนที่มีทั้งเกิดทั้งสองตำแหน่ง และเกิดเพียงหนึ่งตำแหน่ง สารที่สังเคราะห์ได้เป็นของเหลวมีสีเหลืองอ่อน สามารถละลายได้ดีใน acetone สามารถคิดร้อยละของผลได้ (%yield) เท่ากับ 98 % ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ถูกนำไปเอาหมู่ TBDMS ออก (deprotect) ต่อไป

มีงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าหมู่ TBDMS จะไม่เสถียรในตัวทำละลายที่เป็นกรด (oxygen nucleophile) และสารประกอบของ fluoride ผลการวิจัยดังกล่าวสามารถนำมาทำปฏิกิริยา deprotection โดยการทำปฏิกิริยากับ CH_3COOH : tretrahydrofuran : H_2O ในอัตราส่วน 3:1:1 ได้ มี tetrahydrofuran เป็นตัวทำละลาย และมี H_2O เป็น oxygen nucleophile มีสมการดังนี้



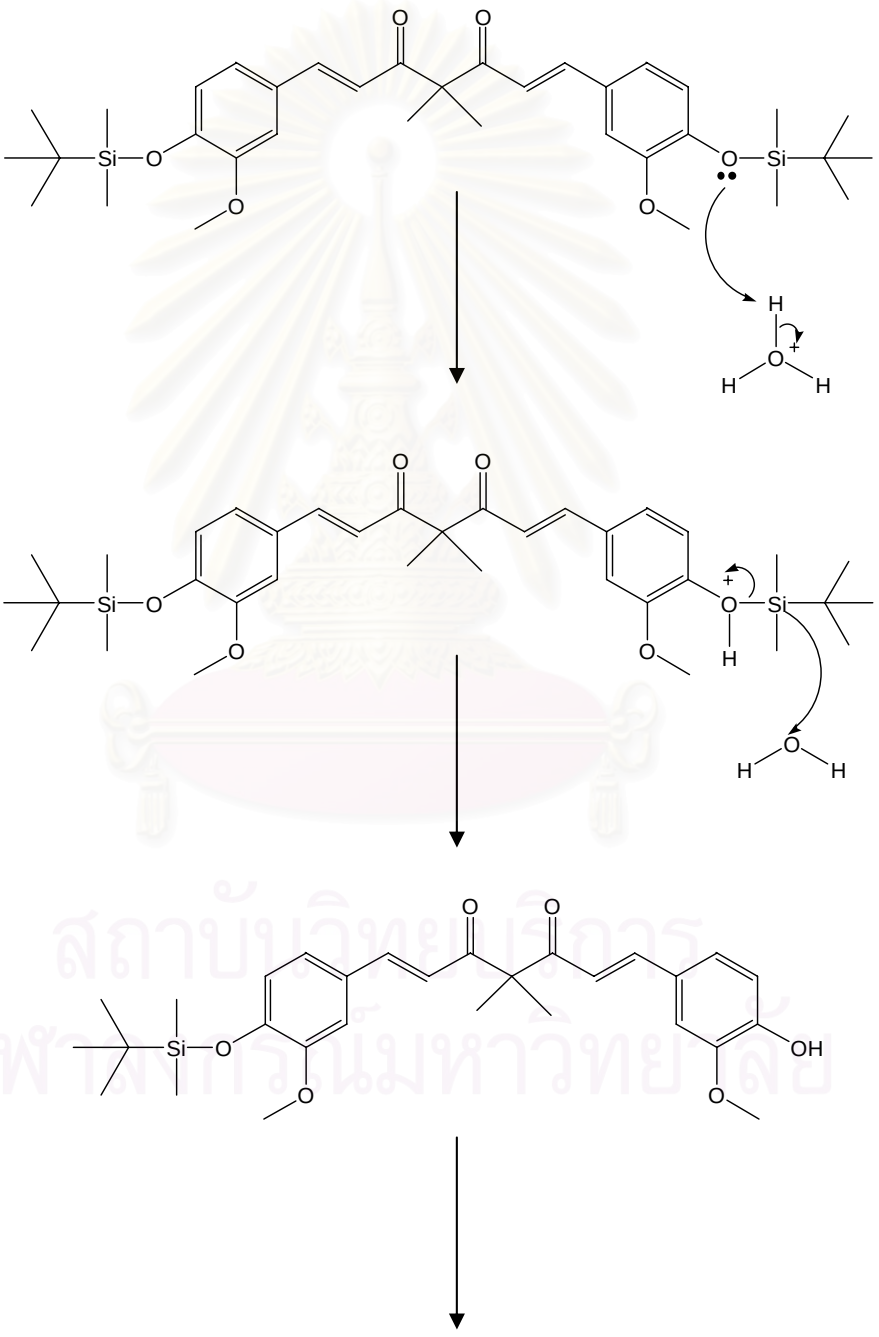
dimethyl TBDMS-curcumin dimethyl curcumin

หรือ

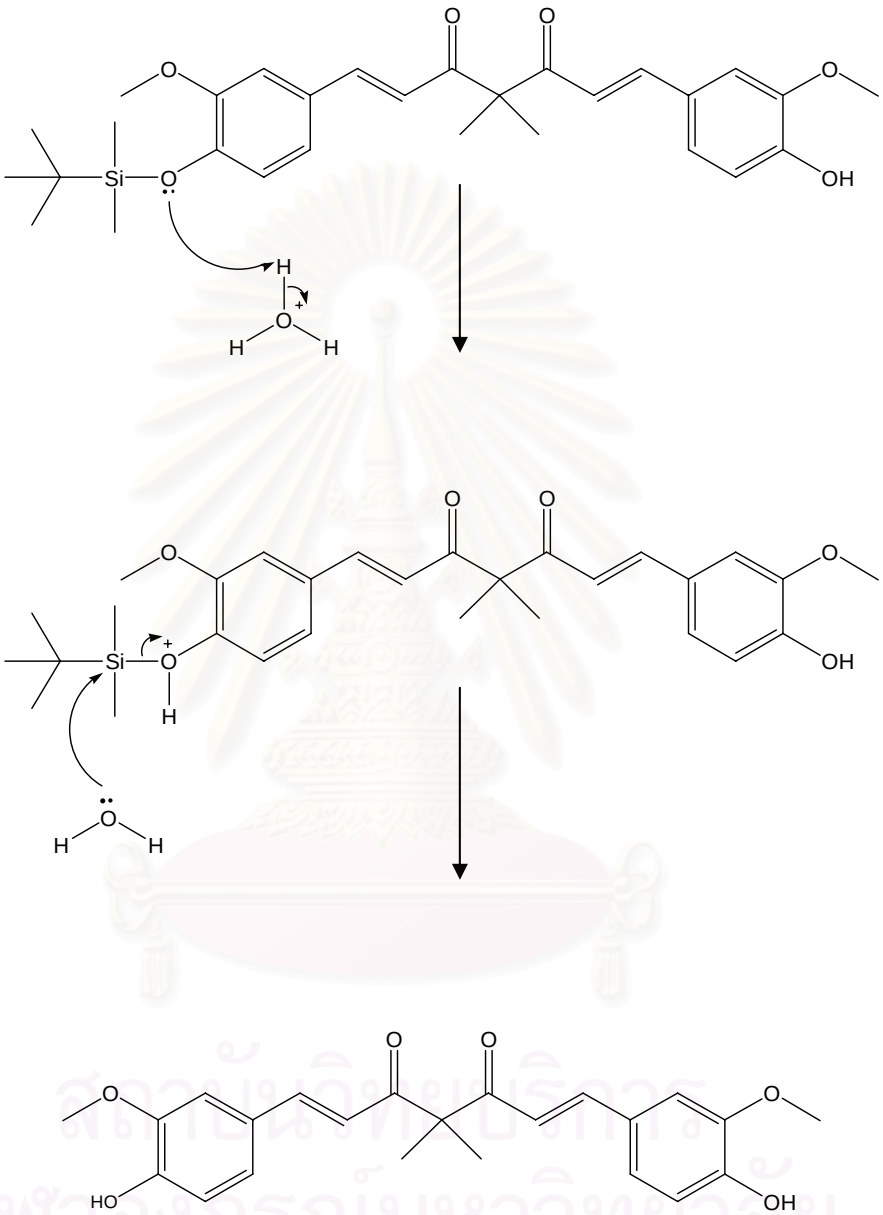


dimethyl TBDMS-curcumin dimethyl curcumin

แต่ในที่นี้พบว่า ปฏิกิริยากับกรดเกิดการ deprotect ได้ดีกว่าจึงเลือกใช้การ deprotection ด้วยกรด ซึ่งมีกลไกดังนี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กลไกของปฏิกิริยาการ deprotection หมู่ TBDMS

เมื่อทำ deprotection TBDMS-dimethyl-curcumin แล้ว ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ซิลิกา พบว่าไม่ปรากฏ peak ของ TBDMS ซึ่งมีค่า chemical shift ที่ประมาณ 0 ppm และ peak ที่ค่า chemical shift ที่ประมาณ 0.8 ppm ซึ่ง peak ทั้งสองนี้เป็น H ของหมู่ methyl และ tert-butyl ที่ต่อกับ silicon ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างจาก ^{1}H NMR พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่

เป็น 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (methyl curcumin with 2 OH) โดยมี 1,7-bis(4-hydroxy-3-dimethoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,6-heptadiene-3,5-dione (dimethylcurcumin with 2 OH) ปนอยู่เล็กน้อย โครมาโตรแกรมจาก HPLC C18 columnในรูปที่ 4.2-A แสดงให้เห็นว่า methylcurcumin with 2 OH (พีคที่ RT = 5.06 min) ที่สังเคราะห์ได้มี dimethylcurcumin with 2 OH (พีคที่ RT = 2.70 min) ปนอยู่เพียงเล็กน้อย เมื่อทำการวิเคราะห์ UV absorption spectra ของ methylcurcumin with 2 OH และ dimethylcurcumin with 2 OH พบว่า methylcurcumin with 2 OH ให้การดูดกลืนในช่วง UVA ที่ดีมาก โดยมีค่าการดูดกลืนสูงสุดอยู่ที่ 330 nm (รูปที่ 4.2-B)

การอธิบายการเกิด hypsochromic shift จาก 417 nm ของ curcumin มาเป็น 330 nm ของ methylcurcumin with 2 OH สามารถทำได้ในทำนองเดียวกับ trimethylcurcumin ดังที่กล่าวมาแล้ว กล่าวคือ เมื่อมีการแทนที่ของหมู่ methyl ลงที่ H หนึ่งตัว ของ methylene ที่อยู่ระหว่าง ketone ทั้งสอง โมเลกุลก็ยังคงสามารถเกิดเป็น enol form ได้ แต่เนื่องจากความเกะกะของหมู่ methyl ทำให้โมเลกุลมีการบิดออกจากระนาบไป ผลคือ conjugation เกิดได้ไม่ดีเท่า curcumin ทำให้เกิด hysochromic shift ดังที่สังเกตเห็น

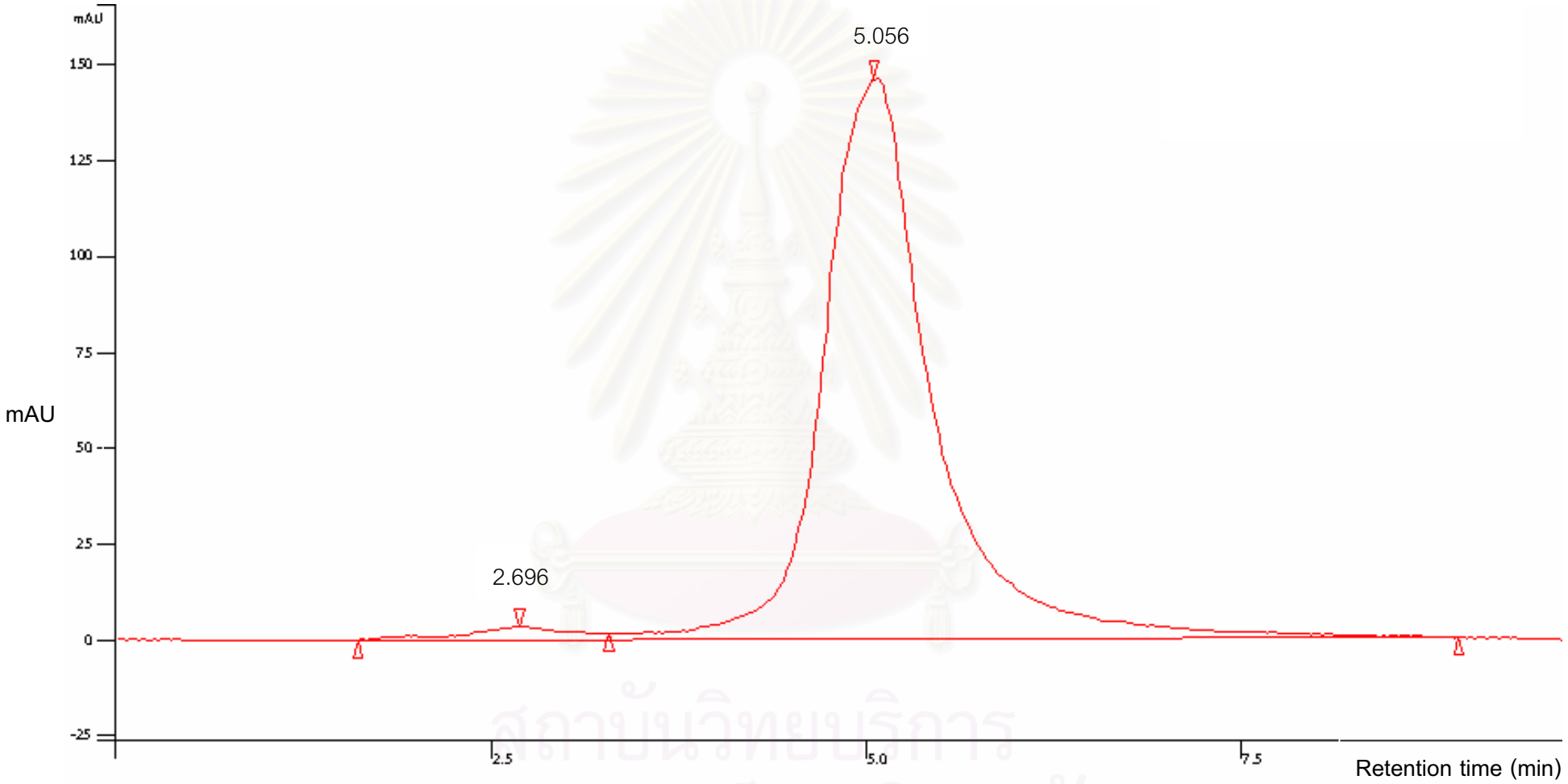
เช่นเดียวกับในกรณีที่ trimethylcurcumin เป็น UVA filter ที่ดี ในขณะที่ tetramethylcurcumin ไม่ดูดกลืนแสง UV ในกรณีนี้ก็ได้คาดหมายว่าการแทนที่โปรตอนทั้งสองตัวที่อยู่ระหว่างหมู่ ketone ทั้งสองซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์เป็น dimethylcurcumin with 2 OH น่าจะส่งผลให้โมเลกุลดูดกลืนแสงในช่วง UV แต่ปรากฏว่า การแทนที่เพียงโปรตอนตัวเดียวซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็น methylcurcumin with 2 OH กลับให้สมบัติที่ต้องการ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในตอนแรกที่เป็นการเตรียม trimethylcurcumin ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันคำอธิบายที่กล่าวไว้ตอนแรกด้วย ที่สำคัญ การเตียม methylcurcumin with 2 OH นั้นทำได้ง่ายกว่า dimethylcurcumin with 2 OH ด้วย

จากการตรวจวัดฤทธิ์ antioxidant ของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ (ตารางที่ 5 ในบทที่ 3) เทียบกับ curcumin พบว่า ทั้ง curcumin และ methylcurcumin with 2 OH สามารถยับยั้งการออกซิเดชันได้ใกล้เคียงกัน (ยับยั้งได้ 64.84% สำหรับ curcumin และยับยั้งได้ 63.74% สำหรับ methylcurcumin with 2 OH) จึงสามารถสรุปได้ว่าการลด conjugate ของโมเลกุลลงมีผลต่อการออกฤทธิ์เป็น antioxidant น้อยมาก และการออกฤทธิ์เป็น antioxidant ที่ลดน้อยลง เป็นผลมาจากการแทนที่หมู่ methyl ลง ณ. ตำแหน่ง methylene ที่ β-diketone เนื่องจากหมู่ methyl เป็นหมู่ให้อิเล็กตรอน จึงไปลดความสเถียรของ free radical anion ที่เกิดขึ้น ที่ตำแหน่ง β-diketone

อย่างไรก็ตาม ด้วยการที่โมเลกุลยังมีหมู่ hydroxyl ถึงสองหมู่ ดังนั้นผลกระทบจากการลดความสามารถในการเกิด free radical anion ที่หมู่ methylene ระหว่าง ketone ทั้งสองจึงน้อยมาก

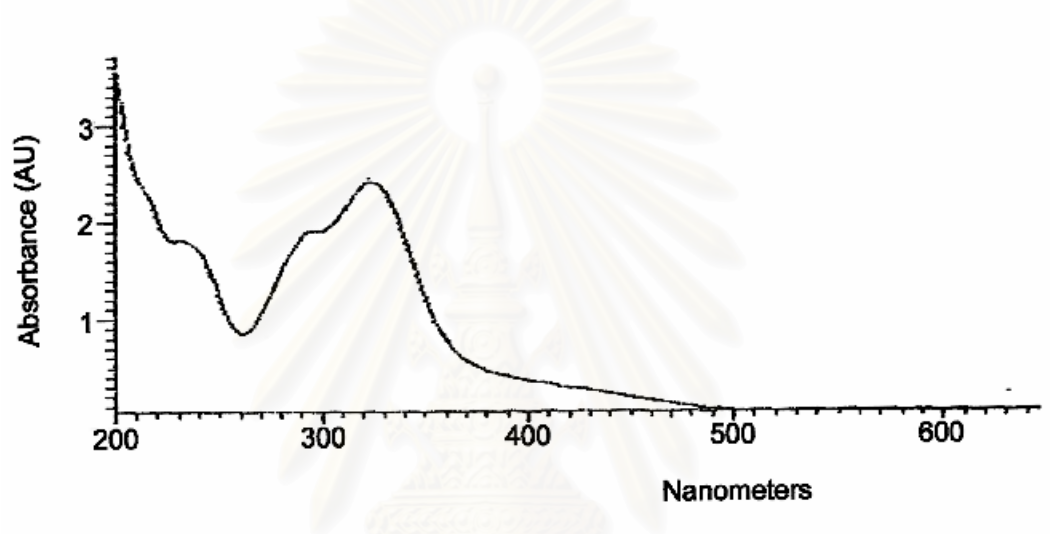
สาร methylcurcumin with 2 OH นี้มีความเสถียรต่อแสงแดดเพราะเมื่อตั้งสารละลายทิ้งไว้กลางแสงแดดเป็นระยะเวลา 3 ชม ปรากฏว่า UV absorption spectrum ยังคงไม่เปลี่ยนแปลง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.2-A โครมาโทแกรม จาก HPLC ของ methylcurcumin with 2 OH (ตรวจวัดที่ความยาวคลื่นในช่วง 300 nm)



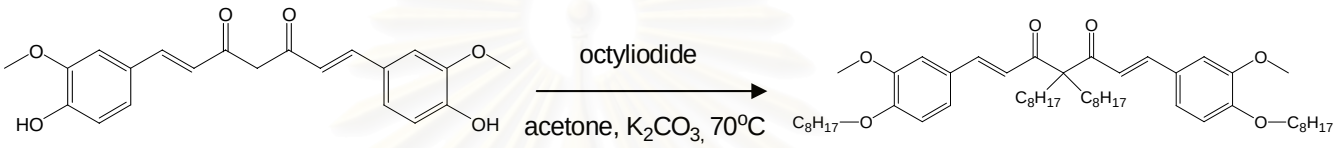
รูปที่ 4.2-B UV Absorption spectrum **ของ** 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione **หรือ** methylcurcumin with 2 OH

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตอนที่ 2

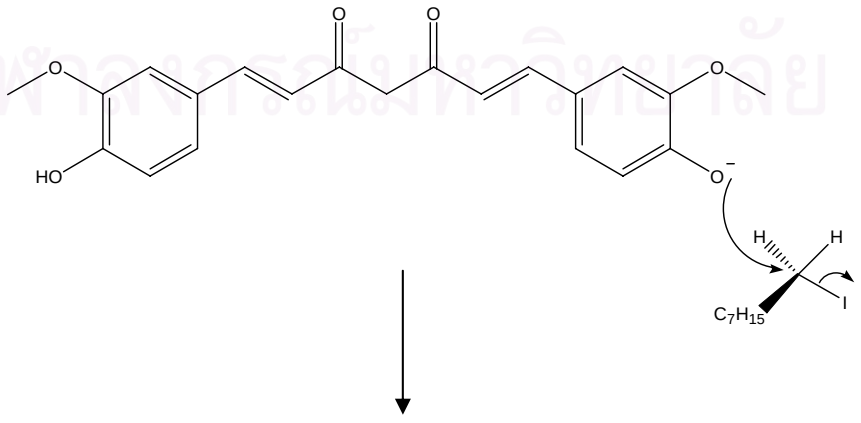
4.3 การสังเคราะห์ 1,7-bis(4-octhoxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ dioctylcurcumin

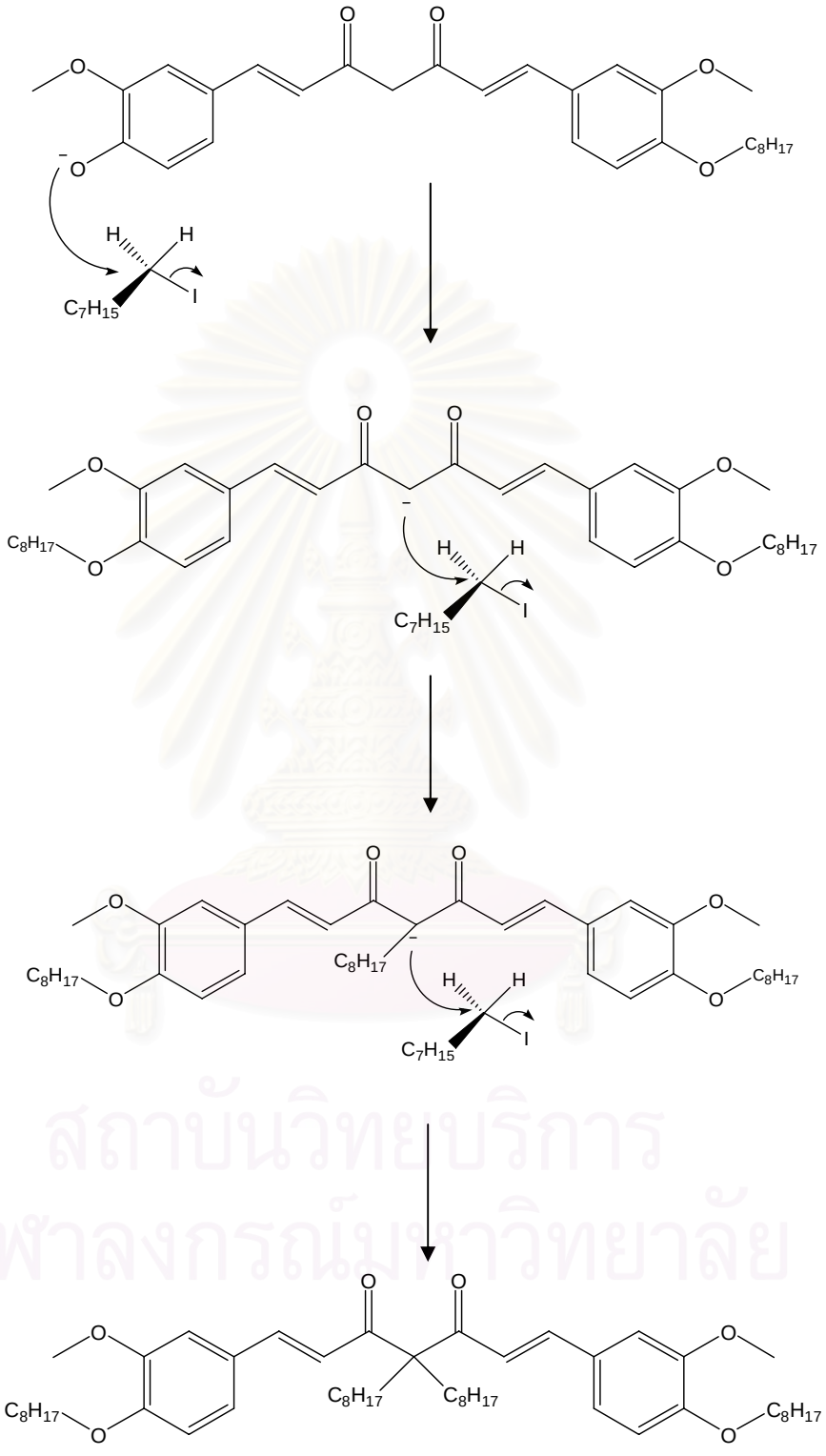
การสังเคราะห์ dioctylcurcumin ทำโดยปฏิกิริยา nucleophilic substitution โดยใช้ octyl iodide เป็นหมู่แทนที่และใช้ acetone เป็นตัวทำละลาย โดยเป็นความพยายามจะสังเคราะห์ 1,7-bis(4-octhoxy-3-methoxyphenyl)-4,4-dioctyl -1,6-heptadiene-3,5-dione (tetraoctylcurcumin) ในเบื้องต้นดังสมการ



curcumin tetraoctyl curcumin

ปฏิกิริยานี้จะเกิดผ่านกลไกแบบ S_N2 โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาจะเกี่ยวข้องกับ nucleophile ซึ่งในที่นี้คือ curcumin ที่ตำแหน่งของ phenolic OH และ β-diketone โดย nucleophile ที่เกิดขึ้นเกิดจาก K_2CO_3 ซึ่งเป็นเบสแก่ เข้ามาดึง H ที่ตำแหน่งดังกล่าว จากนั้น nucleophile จะเข้าแทนที่หมู่ leaving group (ในที่นี้คือ iodide) บนคาร์บอนอะตอมในด้านตรงข้าม ซึ่งมีผลทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็น inversion configuration เนื่องจากการเข้าแทนที่ของ nucleophile กับการหลุดของ leaving group จะเกิดในเวลาเดียวกัน มีกลไกดังรูป





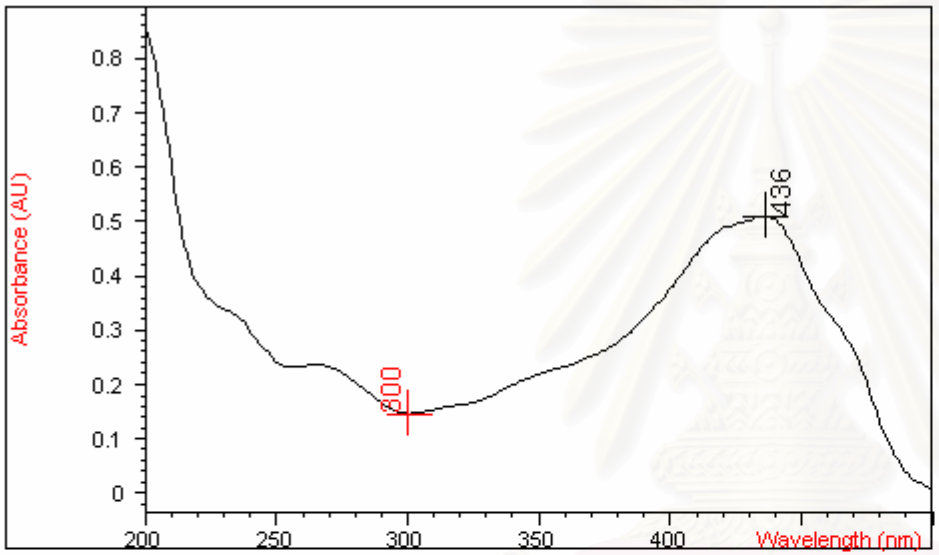
กลไกของปฏิกิริยา nucleophilic substitution **ของ** curcumin **กับ** octyliodide

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อทำปฏิกิริยาการแทนที่แล้วทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกโดยใช้ตัวทำละลายผสม ethanol และ H_2O ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลืองหนัก 0.3630 g คิดเป็นร้อยละผลได้เท่ากับ 32.51% ให้ UV-spectrum ดังแสดงในรูปที่ 4.3 เมื่อไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย ^{1}H NMR spectrum พบว่าผลิตภัณฑ์น่าจะเป็น 1,7-bis(4-octhoxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione (dioctylcurcumin) ซึ่งการวิเคราะห์นี้สอดคล้องกับผล UV-visible absorption spectrum ของสารผลิตภัณฑ์ที่ยังคงการดูดกลืนแสงในช่วง visible และผลจาก COSY, HSQC, HMBC ว่าไม่มีการเกี่ยวข้องกันของโปรตอนและคาร์บอนที่แทนที่ในตำแหน่ง β-diketone ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการเข้าแทนที่ของหมู่ octyl ที่ระหว่างหมู่ ketone ทั้งสองไม่สามารถเกิดได้ภายใต้สภาวะที่ใช้ ทั้งนี้คาดว่ามาจากความเกะกะของหมู่ octyl เอง อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก dioctylcurcumin ที่ได้เป็นของแข็ง ดังนั้นจึงพอจะคาดเดาได้ว่า trioctylcurcumin หรือ tetraoctylcurcumin ก็น่าจะเป็นของแข็ง ด้วยเหตุนี้จึงมิได้พยายามสังเคราะห์ trioctylcurcumin ด้วยวิธีอื่น เพราะสารกรองรังสียูวีที่เป็นของเหลวสามารถนำไปใช้งานได้ง่ายกว่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Overlaid Sample Spectra



Sample/Result Table

#	Name	Peaks(nm)	Abs(AU)	Valleys(nm)	Abs(AU)
1		436.0	0.50871	300.0	0.14591

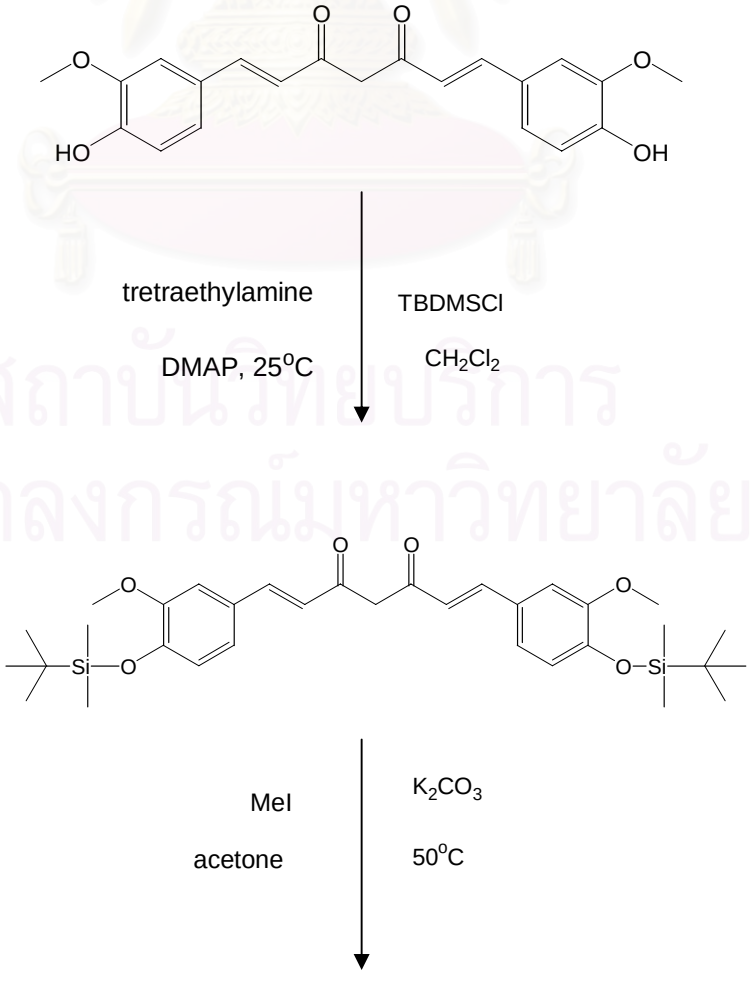
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.3 UV-Visible absorption spectrum **ของ** dioctylcurcumin **ที่ความเข้มข้น** 5.79 x 10^{-6}M

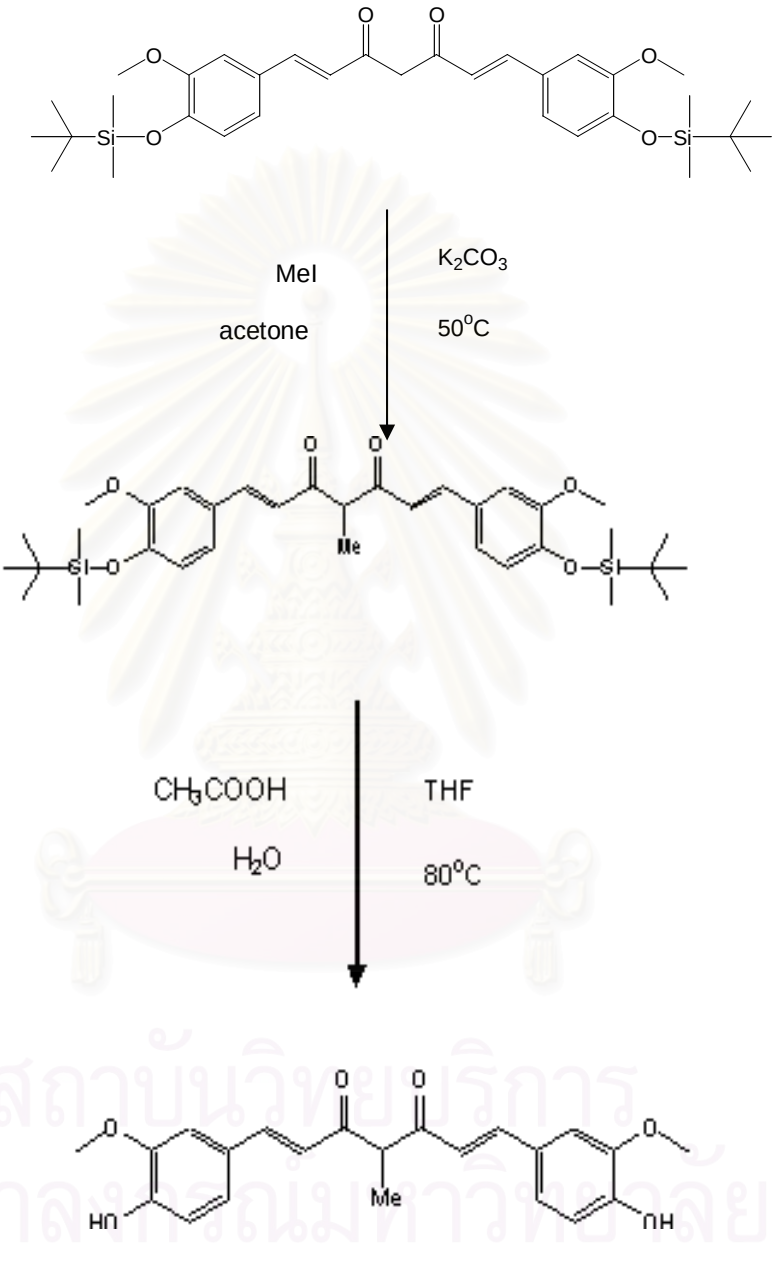
บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้สามารถปรับปรุงสมบัติของ curcumin ให้เป็นสารที่สามารถนำมาใช้ในเครื่องสำอางได้ กล่าวคือในการปรับปรุงโครงสร้างของ curcumin สามารถทำให้โมเลกุลมีการดูดกลืนแสงเปลี่ยนไปจากการดูดกลืนช่วง visible (λ_{max}= 417 nm) ไปเป็นช่วง UV A (λ_{max}= 345 nm) โดยยังคงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารไว้ แต่สามารถเพิ่มสมบัติการดูดกลืนรังสี UV A ให้กับโมเลกุลและช่วยแก้ปัญหาสีส้มเข้ม (ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการในวงการเครื่องสำอาง) ได้ด้วย นอกจากนี้สมบัติการละลายของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็ดีขึ้นด้วย นอกจากนี้สารที่ได้ยังมีความเสถียรต่อแสงด้วย

โดยปฏิกิริยาที่ทำในงานวิจัยนี้แสดงในแผนภาพดังนี้



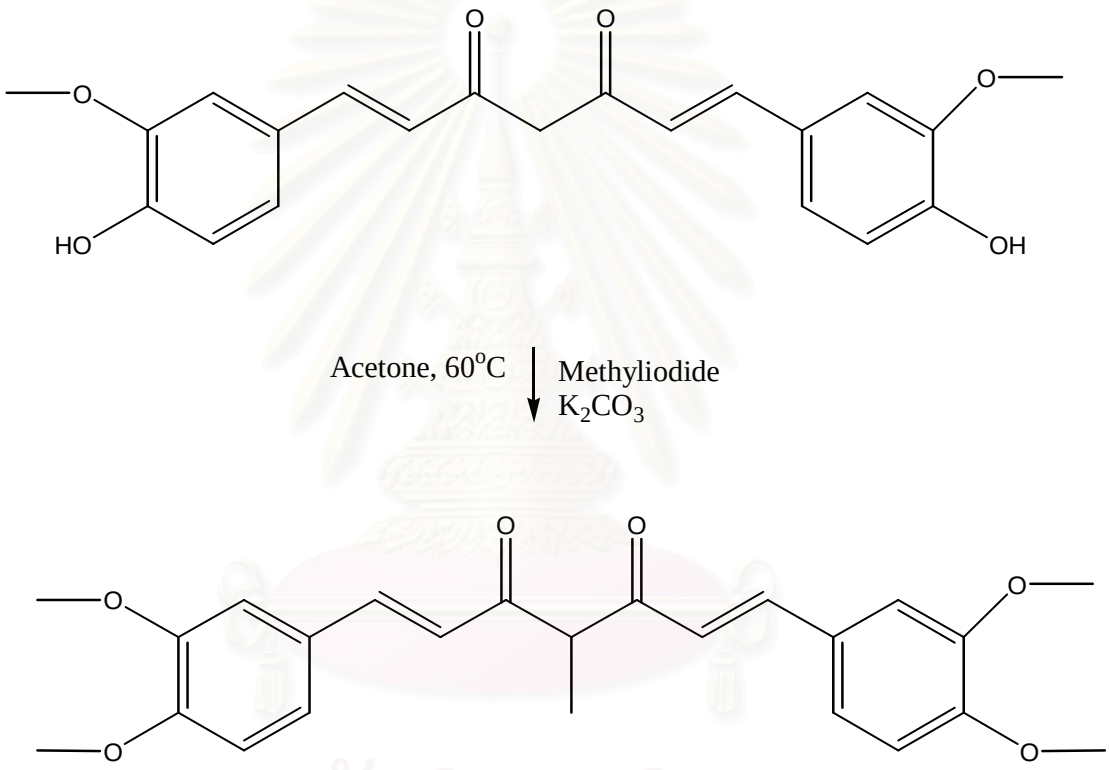
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione **หรือ** methylcurcumin with 2 OH

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยน curcumin ให้เป็นสารกรองรังสียูวีเอได้ โดยพบว่าสาร 1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methyl-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ trimethylcurcumin ที่เตรียมได้จาก curcumin เป็นสารกรองรังสียูวีเอ ที่ดี และมีความเสถียรต่อแสง แผนภาพต่อไปนี้แสดงขั้นตอนการเตรียม trimethylcurcumin จาก curcumin



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Taylor, C. R., R. S. Stern, J. J. Leyden and B. A. Gilchrest (1990) Photoaging/photodamage and photoprotection. *J. Am. Acad. Dermatol.* **22,** 1-15.

2. Taylor, C. R. and A. J. Sober (1996) Sun exposure and skin disease. *Annu. Rev. Med.* **47,** 181-191.

3. Finlay-Jones, J. J. and P. H. Hart (1998) Gamma(c) and the control by IL-4 of human macrophage proinflammatory mediator production. *Mut. Res.* **422,** 155-159.

4. Bernerd,F.; Vioux,C.; Asselineau,D. (2000) Evaluation of the protective effect of sunscreens on in vitro reconstructed human skin exposed to UVB or UVA irradiation. *Photochem.Photobiol.* **71**, 314-320.

5. Bestak,R.; Halliday,G.M. (1996) Sunscreens protect from UV-promoted squamous cell carcinoma in mice chronically irradiated with doses of UV radiation insufficient to cause edema. *Photochem.Photobiol.* **64**, 188-193.

6. Chatterjee,M.L.; Agarwal,R.; Mukhtar,H. (1996) Ultraviolet B radiation-induced DNA lesions in mouse epidermis: an assessment using a novel 32P-postlabelling technique. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **229**, 590-595.

7. Menzel, F., Reinert, T., Vogt, J. And Butz, T. (2004) Investigation of percutaneous uptake of ultrafine TiO2 particles at the high energy ion nanoprobe LIPSON. *Nucl. Instr. And Meth. In Phys. Res.* **219-220**, 82-86.

8. Brezova, V., Gabcova, S., Dvoranova, D. and Stasko, A. (2005) Reactive oxygen species produced upon photoexcitation of sunscreens containing titanium dioxide (an EPR study). *J. Photochem. Photobiol.* **79**, 121-134.

9. Kertesz, Z., Szikszai, Z., Gonteir, E., Moretto, P., Surleve-Bazeille, J.-E., Kiss, B., Juhasz, I., Hundayi, J. and Kiss, K.Z. (2005) Nuclear microprobe study of TiO2-penetration in the epidermis of human skin xenografts. *Nucl. Instrum. Meth. B* **231**, 280-285.

10. Marrot, L., Belaidi, J., Meunier, J., Perez, P. and Agapakis-Causse, C. (1999) “The human melanocyte as a Particular target for UV-A radiation and an endpoint for photoprotection” *Photochem. Photobio.,* **69**, 686-692.

11. Masaki. H., Okano. Yuri. and Sakurai. H. (1999) ”Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGEs) during ultraviolet light A (UV-A) irradiation and a possible mechanism for cell damaging” *BIochem. Biophys. Act.,* **1428**, 45-56.

12. Jiang, R., M. S. Roberts, D. M. Collins and H. A. E. Benson (1999) Absorption of sunscreens across human skin: an evaluation of commercial products for children and adults. *British J. Clinical Pharmacol.* **4,** 635-637.

13. Hany, J. and R. Nagel (1995) Detection of sunscreen agents in human breast-milk. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **91,** 341-345.

14. Hayden, C. G. J., M. S. Roberts and H. A. E. Benson (1997) Systemic absorption of sunscreen after topical application. *The Lancet* **350** (9081) 863-864.

15. Xu, C. and P. Parsons (1999) Cell cycle delay, mitochondrial stress and uptake of hydrophobic cations induced by sunscreens in cultured human cells. *Photochem. Photobiol.* **69,** 611-616.

16. Schlumpf, M., B. Cotton, M. Conscience, V. Haller, B. Steinmann and W. Lichtensteiger (2001) In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ. Health Perspect.* **109,** 239-244.

17. Schreurs, R., P. Lanser, W. Seinen and B. van der Burg (2002) Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay. *Arch. Toxicol.* **76,** 257-261.

18. Pattanaargson, S. and Limphong, P. (2001) Stability of Octyl Methoxycinnamate and Identification of Its Photo-Degradation Product. *Int.J.Cosmet.Sci.* **23**, 151-158.

19. Pattanaargson, S., Munhapol, T., Hirunsupachot, P. and Luangthongaram, P. (2004) Photoisomerization of Octyl Methoxycinnamate *J. Photochem. Photobiol.* **16**, 269-274.

20. Tarras-Wahlberg, N., Stenhagen, G., Larkö, O., Rosén, A., Wennberg, A.-M. and Wennerström, O. (1999) Changes in Ultraviolet Absorption of Sunscreens After Ultraviolet Irradiation. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 547-553.

21. Fetrow, C. W. and Avila, J.R. (1999) "Profressional 's Handbook of complementary & Alternative Medicines" *Springhouse Corporarion,* Pennsylvania, 646-649

22. Ruby A. J., Kuttan G, Babu K. D., Rajasekharan K. N., Kuttan R. (1995) Anti-tumor and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett.* **94**, 79-83.

23. Sreejayan, Rao M. N. (1997) Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J. Pharm.. Pharmacol.* **49**, 105-7.

24. Sharma, O.P. (1976) Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 1811-2.

25. Sreejayan, Rao M. N. (1994) Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 1013-6.

26. Rukkumani R., Sri Balasubashini M., Menon V. P. (2003) Protective effects of curcumin and photo-irradiated curcumin on circulatory lipids and lipid peroxidation products in alcohol and polyunsaturated fatty acid-induced toxicity. *Phytother. Res.* **17**, 925-9.

27. Reddy A. C., Lokesh B. R. (1994) Effect of dietary turmeric (Curcuma longa) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. *Food Chem. Toxicol.* **32**, 279-83.

28. Chainani-Wu N. (2003) Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (Curcuma longa). *J. Altern. Complement Med.* **9**, 161-8. Review.

29. Setlow, R.B., Grist, E. Thompson, K., Woodhead, A.D. (1993) Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6666-6670.

30. Armstrong, B.K., Kricker, A., English, D.R. (1997) Sun exposure and skin cancer. *Australasian J. Dermatol.* **58**, S1-S6.

31. Srimal R. C., Dhawan B. N. (1973) Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *J. Pharm. Pharmacol.* **25**, 447-52.

32. Ammon H. P., Safayhi H., Mack T., Sabieraj J. (1993) Mechanism of antiinflammatory actions of curcumine and boswellic acids. *J. Ethnopharmacol.* **38**, 113-9.

33. Mazumder A., Neamati N., Sunder S., Schulz J., Pertz H., Eich E., Pommier Y. (1997) Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action. *J. Med. Chem.* **40**, 3057-63.

34. Moos P. J., Edes K, Mullally J. E., Fitzpatrick F. A. (2004) Curcumin impairs tumor suppressor p53 function in colon cancer cells. *Carcinogenesis.* Apr 16.

35. Conney A. H. (2003) Enzyme induction and dietary chemicals as approaches to cancer chemoprevention: the Seventh DeWitt S. Goodman Lecture. *Cancer Res.* **63**, 7005-31.

36. Huang M. T., Deschner E. E., Newmark H. L., Wang Z. Y., Ferraro T. A., Conney A. H. (1992) Effect of dietary curcumin and ascorbyl palmitate on azoxymethanol-induced colonic epithelial cell proliferation and focal areas of dysplasia. *Cancer Lett.* **64**, 117-21.

37. Chainani-Wu N. (2003) Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (Curcuma longa). *J. Altern. Complement Med.* **9**, 161-8. Review.

38. Lee, K.-H., Ishida, J., Ohtsu, H., Wang, H.-K.,Itokawa, H., Chang, C. and Shih, C. (2004) US Patent No 6790979B2.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนงานต่อไป

ทำการเตรียม trimethylcurcumin และ methylcurcumin with 2 OH ในปริมาณที่มากพอที่จะทำการศึกษาความเป็นพิษ ของสารในสัตว์ทดลอง และการศึกษาการแพ้ของสารกับผิวหนัง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย