



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ผลของกรดกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์  
ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 เพื่อป้องกันมะเร็งตับ

โดย

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไพฑูรย์ ณรงค์ชัยและคณะ

สิงหาคม 2553

สัญญาเลขที่ DBG5080008

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ผลของกรดกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์  
ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 เพื่อป้องกันมะเร็งตับ

คณะผู้วิจัย

ศ.นพ. ไพฑูรย์ ณรงค์ชัย

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

รศ. สิริพันธ์ ณรงค์ชัย

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

รศ.ดร. กนกพร นิวัฒน์นันท์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผศ.ดร. ไชยวัฒน์ ไชยสุด

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นายเชิดศักดิ์ ใจแข็ง

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## บทคัดย่อ

ได้สังเคราะห์อนุพันธ์กรดคาเฟอิกคือ ethyl caffeate (EAL), octyl caffeate (OAL), benzyl caffeate (BAL), phenethyl caffeate (PAL), caffeic acid ethylamide (EAM), caffeic acid octylamide (OAM), caffeic acid benzylamide (BAM) และ caffeic acid phenethylamide (PAM) เพื่อทดสอบฤทธิ์การป้องกันการเกิดมะเร็งตับโดยศึกษาฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ได้แก่ DPPH, superoxide anion ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิปิดออกซิเดชัน ฤทธิ์ยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงเมื่อเหนี่ยวนำด้วย AAPH และฤทธิ์การเหนี่ยวนำเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferase (UGT), N-acetyltransferase (NAT), quinine reductase (NQO1) และ glutathione-S-transferase (GST) ในเซลล์มะเร็งระดับชนิด Hep G2 ผลการทดลองพบว่าอนุพันธ์ของการคาเฟอิกทั้งหมดมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ และยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มเอไมด์มีฤทธิ์ดีกว่าสารกลุ่มเอสเทอร์ นอกจากนี้การศึกษาดังกล่าวพบว่าอนุพันธ์กรดคาเฟอิกที่มีขนาดเล็กคือ EAM และ EAL สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งตรงกันข้ามกับฤทธิ์การเหนี่ยวนำเอนไซม์ UGT, NAT, NQO1 และ GST ในเซลล์ Hep G2 ที่พบว่าอนุพันธ์กรดคาเฟอิกที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีวงเบนซีนในโมเลกุลเช่น BAL, PAL, OAL มีความสามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 ได้ดีกว่าอนุพันธ์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก และสารอนุพันธ์ในกลุ่มเอสเทอร์มีฤทธิ์ดีกว่าเอไมด์ ดังนั้นอนุพันธ์กรดคาเฟอิกมีสมบัติ กำจัดอนุมูลอิสระ ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน และเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันการมะเร็งตับได้

## ABSTRACT

Ethyl caffeate (EAL), octyl caffeate (OAL), benzyl caffeate (BAL), phenethyl caffeate (PAL), caffeic acid ethylamide (EAM), caffeic acid octylamide (OAM), caffeic acid benzylamide (BAM) and caffeic acid phenethylamide (PAM) were synthesized to study hepatocellular carcinoma chemoprevention properties. DPPH radicals, superoxide anion scavenging, inhibition of AAPH induced red blood cell hemolysis and linoleic oxidation reaction and induction of phase 2 enzymes such as UDP-glucuronosyltransferase (UGT), N-acetyltransferase (NAT), quinone reductase (NQO1) and glutathione-S-transferase (GST) activities in Hep G2 cell were demonstrated in chemoprevention properties. The results shown that all caffeic acid derivatives had ability to scavenge free radicals, inhibited oxidative reactions especially; amide derivatives were more potent than ester derivatives. EAM and EAL were highly scavenging free radicals better than the large caffeic acid derivatives molecules. However, the large molecules that composed of benzene ring in molecules, BAL, PAL and OAL can easily penetrate in Hep G2 cells to induce UGT, NAT, NQO1 and GST enzymes activities. The ester derivatives can induce phase 2 enzyme activities better than amide derivatives. This study show that caffeic acid derivatives can use for liver cancer chemoprevention via free radical scavenging, inhibited oxidation reaction and induced phase 2 enzymes activities pathways.

## Executive Summary

### วัตถุประสงค์โครงการ

1. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดกาเฟอิกในรูปอนุพันธ์เอสเทอร์ และเอไมด์
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างต่อการเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 โดยใช้เนื้อเยื่อมะเร็งตับชนิด Hep G2

โครงการวิจัยนี้มีขอบเขตการศึกษาผลของกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์ในรูปของเอสเทอร์และเอไมด์ในการป้องกันมะเร็งตับโดยศึกษาผลของสารสังเคราะห์ต่อการต้านการเกิดอนุมูลอิสระโดยใช้โมเดล การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ลดการเกิดการออกซิเดชันของไขมันโดยใช้กรดไลโนเลอิก และลดการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย AAPH และศึกษาการเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 ได้แก่ UDP glucuronosyltransferase, glutathione quinone reductase, quinone reductase และ N-acetyltransferase ในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมะเร็งตับชนิด Hep G2 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารอนุพันธ์กรดกาเฟอิกที่สังเคราะห์ขึ้น จากการศึกษาพบว่าอนุพันธ์เอสเทอร์และเอไมด์ของกรดกาเฟอิกนั้นมีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เป็นอย่างดีเมื่อเทียบประสิทธิภาพพบว่าอนุพันธ์เอไมด์นั้นมีความสามารถดีกว่าอนุพันธ์เอสเทอร์ ส่วนฤทธิ์การเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟสที่ 2 นั้นพบว่าอนุพันธ์กรดกาเฟอิกนั้นมีความสามารถในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์เฟส 2 ได้โดยเฉพาะสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มักจะเหนี่ยวนำแอกติวิตีได้ดีกว่าสารที่มีโมเลกุลเล็ก การวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่ากรดกาเฟอิกและอนุพันธ์นั้นสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งตับโดยผ่านกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระ ลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์เฟส 2

## บทนำ

ในปัจจุบันนี้สถิติของอัตราการเกิดมะเร็งและการตายจากโรคมะเร็งของคนทั่วโลกมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ อัตราผู้ป่วยและการตายจากโรคมะเร็งเฉลี่ยทั่วประเทศไทยตามรายงานประจำปีจากกระทรวงสาธารณสุข สถาบันมะเร็งแห่งชาติ และจากโรงพยาบาลต่างๆ พบว่ามีเพิ่มมากขึ้น จนกลายเป็นภาระในการควบคุมป้องกันและการรักษาให้แก่แพทย์ พยาบาล และเจ้าหน้าที่ทางสาธารณสุข แม้ว่ากระทรวงสาธารณสุขเองจะได้มีการขยายงานการควบคุมป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง โดยการเพิ่มสถาบันหรือโรงพยาบาลที่รองรับรักษาผู้ป่วยมะเร็งโดยเฉพาะก็ตาม โรคมะเร็งนั้นก่อให้เกิดการสิ้นเปลืองทรัพยากรและการกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมของประเทศปีละไม่ต่ำกว่าพันล้านบาท

มะเร็งตับเป็นโรคที่มีความสำคัญพบได้บ่อยในประชากรโลก จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก รายงานพบว่าพบมากเป็นอันดับ 5 คิดเป็นร้อยละ 5.6 ของมะเร็งทั้งหมด โดยพบในเพศชายมากกว่าหญิง 2-4 เท่า ในปี พ.ศ. 2543 พบอุบัติการณ์ของผู้ป่วยมะเร็งตับใหม่ทั่วโลกประมาณ 564,000 คนต่อปี ผู้ป่วยส่วนใหญ่ประมาณ 271,500 คนอยู่ในทวีปเอเชีย (จากประเทศจีน 221,000 คน และญี่ปุ่น 33,000 คน) สำหรับในอเมริกาและประเทศในทวีปยุโรปพบประมาณ 11,500 คนและ 50,000 คนตามลำดับและมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากมะเร็งตับทั่วโลกสูงถึง 549,000 คน จากการรายงานของกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยปี พ.ศ. 2542 พบว่าโรคมะเร็งตับเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตและเจ็บป่วยเรื้อรังจากสาเหตุการตายก่อนวัยอันควรเป็นอันดับที่ 4 และเป็นมะเร็งที่พบบ่อยอันดับ 1 ในเพศชายและอันดับ 3 ในเพศหญิงรองจากมะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูกโรคมะเร็งเป็นโรคระบาดเรื้อรังที่ไม่มีการติดต่อระหว่างผู้ป่วยไปยังคนปกติ เป็นโรคที่เกิดเฉพาะบุคคล เพราะว่าเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมในการบริโภค นิสัยส่วนตัว กรรมพันธุ์ การมีอาชีพ และการอยู่อาศัยในสิ่งแวดล้อมที่มีมลภาวะ การเกิดโรคมะเร็งส่วนใหญ่ยอมรับว่าเกิดจากสารเคมีในอาหารและสิ่งแวดล้อมมากกว่าอิทธิพลของพันธุกรรม

ปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็งตับได้แก่โรคตับแข็งจากทุกๆสาเหตุจากการดื่มสุรา และที่เป็นปัญหาสำคัญทั่วโลกคือจากไวรัสตับอักเสบนชนิดบีและซี จากการสำรวจพบว่าประเทศไทย มีประชากรดื่มสุราหรือเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มากเป็นอันดับ 5 ของโลก นอกจากนี้ปัญหาไวรัสตับอักเสบบีเป็นปัญหาสำคัญ พบว่ามีคนไทยเป็นพาหะนำโรคนี้นี้กว่า 6 ล้านคนและมากกว่าครึ่งของเด็กแรกเกิดที่ติดเชื้อจากแม่กลายเป็นพาหะหรือติดเชื้อตับอักเสบรวมทั้ง ทำให้เสียชีวิตจากมะเร็งตับก่อนอายุขัยและนับวันปัญหามะเร็งตับนั้นทวีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นปัจจัยการเกิดมะเร็งตับนั้นมีหลายปัจจัยต่างๆดังที่กล่าวข้างต้นเช่น การเกิดภาวะตับแข็งจากการดื่มสุรา การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดบี สารพิษอะฟลาทอกซิน สารเคมีต่างๆจากการทำงานและสิ่งแวดล้อมที่ก่อให้เกิดมะเร็ง เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่กำจัดสารพิษให้มีสมบัติในการละลายน้ำเพื่อต่อการกำจัดดังนั้นจึงก่อให้เกิดผลข้างเคียงคือมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งได้

โดยทั่วไปโรคมะเร็งไม่สามารถรักษาให้หายได้แต่สามารถป้องกันได้โดยหลีกเลี่ยงการได้รับสัมผัสสารก่อมะเร็งซึ่งเป็นปัจจัยหลักของความเสียหายต่อการเกิดโรคแต่ในความเป็นจริงมนุษย์ไม่สามารถหลีกเลี่ยงการสัมผัสสารก่อมะเร็งได้เนื่องจากสารเหล่านี้เจือปนอยู่กับปัจจัยสิ่งแวดล้อมประกอบกับภาวะความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้นยิ่งทำให้ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคเพิ่มมากขึ้นเป็นทวีคูณดังนั้นการขับสารก่อมะเร็ง สารพิษต่างๆไม่ให้สะสมอยู่ในร่างกายของมนุษย์จึงเป็นอีกหนทางหนึ่งในการป้องกันและลดความเสี่ยงไม่ให้เกิดโรคมะเร็งได้

สารสำคัญในพืช (phytochemistry) เช่น เคอร์คูมิน สารประกอบฟีนอลิก แทนนิน แอนโทไซยานิน มีการรายงานว่าสามารถป้องกันมะเร็งชนิดต่างๆได้และนอกจากนี้พบว่า การปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ที่มาจากธรรมชาตินั้นสามารถทำให้สมบัติ ความสามารถในการออกฤทธิ์ ของสารที่ถูกปรับเปลี่ยนมีสมบัติดีกว่าโครงสร้างเดิม

กรดกาเฟอิกเป็นสารสำคัญพวกฟีนอลิกที่พบในพืชเกือบทุกชนิดมีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุพันธ์ของกรดกาเฟอิกเช่น กรดกาเฟอิกเฟนเอทิลเอสเทอร์ มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ต้านเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย อนุพันธ์กรดกาเฟอิกในกลุ่มเอไมด์มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารตั้งต้นและมีการนำมาใช้เป็น

ส่วนประกอบของเครื่องสำอางจากคุณสมบัติของกรดกาเฟอิกดังกล่าวจึงน่าสนใจนำมาวิจัยต่อยอดเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการวิจัย

กรดกาเฟอิกและอนุพันธ์มีศักยภาพในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน(antioxidant) โดยผ่านหลายกลไกเช่นการขจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเหนียวให้เกิดอนุมูลอิสระ และการเกิดลิปิด เปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) และการเกิดลิปิด ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (lipid hydroperoxide formation) ดังนั้นจึงมีการนำคุณสมบัติต่างๆของกรดกาเฟอิกนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร ด้านการทำลายเนื้อเยื่อในร่างกายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับกระบวนการเกิดโรคหลายโรคเช่นมะเร็ง เบาหวาน หัวใจ อัลไซเมอร์และพาร์คินสัน

Gulcin ( Gulcin; 2006) ได้ทดสอบสมบัติของกรดกาเฟอิกในการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองเช่น สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS, DPPH หา total antioxidant โดยวิธี ferric thiocyanate วัด total reductive capacity โดยใช้ potassium fericyanide reducing method การกำจัด superoxide anion และคุณสมบัติการเป็น metal chelating โดยใช้  $\alpha$ -tocopherol, trolox, BHA,BHT เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ จากการทดลองพบว่ากรดกาเฟอิกที่ความเข้มข้น 10 และ 30 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรนั้นสามารถลดการเกิดลิปิด เปอร์ออกซิเดชันได้ ร้อยละ68.2และร้อยละ75.8 ตามลำดับนอกจากนี้ยังมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup>, DPPH<sup>•</sup> กำจัด superoxide anion มี reducing power และมี metal chelating

Lafay และคณะ(Lafay et al; 2005) ได้ศึกษาผลของกรดกาเฟอิกต่อสภาวะเครียดและระดับของคลอเรสเตอรอล ในเลือดโดยมีการให้เหล็กเกินขนาดในหนูขาวเพศผู้พันธุ์ Wistar rat ในขนาด 50 mg/kg หรือ 2g/kg แล้วให้กรดกาเฟอิกขนาด 6460 mg/kg เป็นเวลา 4 สัปดาห์จากการทดลองพบว่า การให้เหล็กในปริมาณมากนั้นจะก่อให้เกิดภาวะลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในตับหนูซึ่งวัดจากค่า TBARS และมีการเพิ่มของคลอเรสเตอรอลในเลือด เมื่อให้กรดกาเฟอิกแก่หนูพบว่าสามารถป้องกันการเกิดภาวะออกซิเดชันจากการได้รับเหล็กเกินขนาดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยัง

สามารถลดการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับเหล็กขนาดต่ำๆได้นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มหนูที่ได้รับกรดกาเฟอิกนั้นสามารถเพิ่มปริมาณของวิตามินอีในพลาสมาได้และยังช่วยลดภาวะการมีคอเรสเตอรอลในเลือดได้อีกด้วย

Nardini (Nardini et al; 1998) ได้ศึกษาผลของกรดกาเฟอิกในการป้องกันภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ U937 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย t-butylhydroperoxide จากการทดลองพบว่ากรดกาเฟอิกไม่ได้มีความเป็นพิษต่อเซลล์และเมื่อนำมาลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันพบว่าสามารถ ภาวะการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและลดภาวะการขาดกลูตาไทโอนได้ส่วน Kang และคณะได้ทดลองใช้กรดกาเฟอิกป้องกันการทำลายของเซลล์ lung fibroblast ชนิด WI-38 ซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากการทดลองพบว่ากรดกาเฟอิกมีฤทธิ์ในการกำจัด reactive oxygen species ภายในเซลล์กำจัด DPPH และป้องกันการเกิดลิปิด เปอร์ออกซิเดชันได้ กรดกาเฟอิกนั้นช่วยป้องกันอันตรายแก่เซลล์โดยผ่านการกระตุ้น kinase protein นอกจากนี้ยังเพิ่มปริมาณกัมมันตภาพเอนไซม์ (activity) ของเอนไซม์คะตะเลสและเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการทำงานของคะตะเลส

Fiuza และคณะ (Fiuza et al;2004) ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ polyphenolic acid ได้แก่ methyl caffeate propyl caffeate octyl caffeate methyl gallate propyl gallate และ octyl gallate จากนั้นนำมาศึกษาการต้านการแบ่งตัวของเซลล์และความเป็นพิษต่อเซลล์ human cervix adenocarcinoma (HeLa) พบว่าสารสังเคราะห์ทั้งหมดนั้นสามารถต้านการแบ่งตัวของเซลล์ได้ส่วน Son และ lewis(Son et al; 2002) ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดกาเฟอิกในรูปแบบของ เอสเทอร์ และ เอไมด์ แล้วดูความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระและความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากการทดลองพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ N-trans-caffeoyl-L-cysteine methyl ester> N-trans-caffeoyldopamine> N-trans-caffeoyltyramine>N-trans-caffeoyl-β-phenethylamine> trolox c> caffeic acid phenethyl ester>caffeic acid> ferulic acid โดยความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระนั้นขึ้นอยู่กับจำนวนหมู่ ไฮดรอกซิลหรือสารที่ให้อิเล็กทรอนิกส์

Lee และคณะ ( Lee et al; 2005) ได้ทดลองใช้ phenolic acid มาสังเคราะห์อนุพันธ์ จำนวน 14 ชนิดหลังจากนั้นนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ช่องปาก OEC-M1 โดยใช้ MTT และ trypan blue พบว่าสารสังเคราะห์ caffeic acid phenethyl ester (CAPE) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสังเคราะห์ Phenethyl(E)-3-[3-hydroxy-4-methoxyphenyl]-2-propanoate ได้ยับยั้งระยะ G2/M ของเซลล์มะเร็งช่องปาก และคาดว่าสารดังกล่าวอาจสามารถมีประโยชน์ในการรักษามะเร็งทางช่องปากเนื่องจากไม่มีพิษต่อเซลล์ปกติ ส่วน Chen และคณะ (Chen et al; 2001) ได้ทดลองใช้ CAPE ซึ่งเป็นสาระสำคัญที่พบมากในรังผึ้งมาเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL 60 พบว่า CAPE นั้นสามารถเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ CAPE ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งและมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ กระตุ้น cascade -3 หลังจากทดลองแล้ว 4 ชั่วโมง

Ujibe และคณะ ได้สังเคราะห์ octyl caffeate ซึ่งเป็นอนุพันธ์ตัวหนึ่งของกรดคาเฟอิก พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของ human histiolytic lymphoma U937 ซึ่งการตอบสนองนั้นขึ้นกับขนาดและเวลาที่ให้สารสังเคราะห์ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยก่อให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ และมีการหดตัวของโครมาติน

Rajan และคณะ ได้สังเคราะห์และศึกษาอนุพันธ์กลุ่มเอไมด์ของกรดคาเฟอิกในด้านการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยสังเคราะห์กรดคาเฟอิกกับกลุ่มเอมีนพบว่ากลุ่มแอนนิไลด์ ของกรดคาเฟอิกนั้นก่อให้เกิดประสิทธิภาพในการการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและยังพบว่าถ้าใช้อะโรมาติกเอมีนมาสังเคราะห์จะมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่า quercetin

ประเทศไทยนั้นมีความหลากหลายทางชีวภาพและได้เปรียบทางด้านทรัพยากรธรรมชาติ การปรับเปลี่ยนโครงสร้างผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินั้นช่วยให้สมุนไพรและสาระสำคัญในพืชมีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น หากมีการศึกษาอย่างจริงจังและนำมาปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยเฉพาะเพื่อให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ กระตุ้นเอนไซม์เฟส 2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุมูลอิสระ

และสารพิษต่างๆอันก่อเป็นสาเหตุก่อโรคมะเร็งเพิ่มมากขึ้นอันจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเป็น ยารักษาโรค สารเสริมสุขภาพ และเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนา ประเทศต่อไป

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดกาเฟอิกในรูปอนุพันธ์เอสเทอร์ และเอไมด์
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของ กรดกาเฟอิกและอนุพันธ์
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างต่อการเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 โดยใช้เนื้อเยื่อมะเร็ง ตับชนิด Hep G2

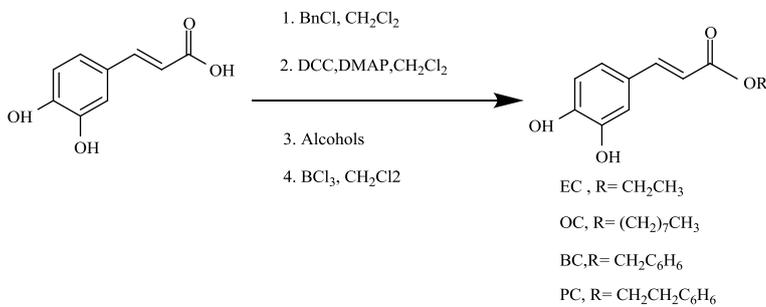
### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ความรู้เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง การป้องกันโรคมะเร็ง ใช้ทางด้านอุตสาหกรรมยาเพื่อผลิต สารที่มีฤทธิ์ในการป้องกันมะเร็ง เพื่อให้คนไทยมีสุขภาพที่แข็งแรงห่างไกลจากโรค เพื่อที่จะลด ค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลผู้ป่วยโรคเรื้อรัง
2. นำสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ที่ดี และเหมาะสมไปศึกษาต่อยอดเพื่อนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ร่วมกับบริษัทเอกชนโดยผลิตเป็นสารเสริมสุขภาพ สารขับสารพิษที่มีฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระ เหนี่ยวนำเอนไซม์ที่ใช้กำจัดสารพิษออกจากร่างกายเพื่อป้องกันมะเร็งอันจะนำรายได้เข้าสู่ประเทศ และเพิ่มความมั่นคงทางเศรษฐกิจของประเทศต่อไป
3. ได้ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการนำสารสังเคราะห์มาพัฒนา นำความรู้มาบูรณาการสห สาขาวิชาด้าน เคมี เกษษวิทยา พืชวิทยา ชีวเคมี เพื่อแก้ไขปัญหาทางด้านสุขภาพของประชาชน และสร้างเครือข่ายวิจัยของมหาวิทยาลัยให้เข้มแข็งเพื่อผลิตผลงานวิจัยที่มีคุณภาพ

## วิธีวิจัย

### 1. การสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดกาเฟอิก

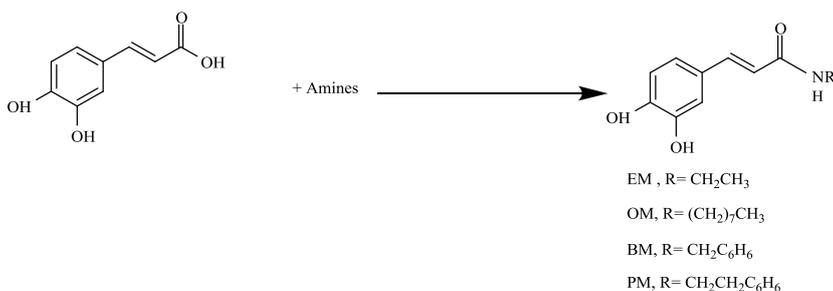
การสังเคราะห์อนุพันธ์ที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ สังเคราะห์โดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเอซิดคลอไรด์ จากนั้นค่อยเปลี่ยนเป็นเอสเทอร์ และใช้ benzotriazol-1-yloxy-tris (dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate (BOP) เป็นสารเชื่อมระหว่างกรดกาเฟอิกและแอลกอฮอล์ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์แล้วนำมาหาโครงสร้างของสารสังเคราะห์โดยใช้ IR NMR และ MS กลไกการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 1



### รูปที่ 1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์กรดกาเฟอิก

### 2. การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของกรดกาเฟอิก

การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์สังเคราะห์โดยใช้ DCC เป็น coupling reagent โดยวิธีหลักๆใน tetrahydrofuran 50°C 7 ชั่วโมง หลังจากนั้นระเหยเอาตัวทำละลายออก จากนั้นทำให้บริสุทธิ์แล้วนำมาหาโครงสร้างของสารสังเคราะห์โดยใช้ IR NMR และ MS กลไกการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 2



### รูปที่ 2 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของกรดกาเฟอิก

### 3. การศึกษาสมบัติของกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์ต่อการกำจัดอนุมูลอิสระ

#### 3.1 การศึกษาการกำจัดอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH)

นำกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์มาละลายในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำมา 0.2 มิลลิลิตรผสมกับ 0.1 มิลลิลิตร 0.16 mM DPPH จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 3 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตรโดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน

#### 3.2 การศึกษาการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงเมื่อเหนี่ยวนำด้วย AAPH

เตรียมเม็ดเลือดแดงโดยเจาะเลือดจากอาสาสมัครไว้ในหลอดเลือดที่กั้นเลือดแข็งตัวนำมาปั่นแยกเม็ดเลือดแดงที่ 2,500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที นำเม็ดเลือดแดงมาล้างอีก 3 ครั้งด้วย PBS บัฟเฟอร์ pH 7.4 จากนั้นนำมาเตรียมสารละลายเม็ดเลือดแดงเข้มข้น 5% (v/v) แบ่งสารละลายเม็ดเลือดแดงมาเติมสารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยละลายในสารละลาย DMSO จากนั้นเติมสารละลาย AAPH บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วคำนวณการยับยั้งร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง

#### 3.3 การศึกษาการยับยั้งการเกิดลิปิด เปอร์ออกซิเดชันโดยใช้กรดไลโนเลอิก

เตรียมสารละลายกรดไลโนเลอิก โดยละลายในบอเรตบัฟเฟอร์ แล้วนำมา 30 ไมโครลิตร เติม 2.81 มิลลิลิตร 0.05 phosphate buffer pH 7.4 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลาย AAPH 40 mM จำนวน 150 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารต้านสังเคราะห์โดยละลายในเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการยับยั้ง

#### 3.4 การศึกษาการกำจัดอนุมูล superoxide anion

Superoxide radicals ถูกสร้างขึ้นในสารละลาย 3 มิลลิลิตร Tris-HCl buffer 16 mM pH 8 ประกอบด้วย 1 มิลลิลิตร 50  $\mu$ M NBT, 1 มิลลิลิตร 78  $\mu$ M NADH และสารละลายที่สังเคราะห์ขึ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นเติม PMS เพื่อเริ่มปฏิกิริยา บ่มต่อที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5

นาที่ แล้วนำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรจากนั้นคำนวณการยับยั้งการเกิด superoxide radical

#### 4. การศึกษาผลของกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 ในเซลล์มะเร็งชนิด Hep G2

##### 4.1 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2

เซลล์ Hep G2 เลี้ยงใน DMEM supplement มี 10% Serum Plus, a serum substitute, penicillin 50 IU/ml และ streptomycin 50µg/ml. นำมาบ่มในตู้บ่มที่มีความชื้นเท่าบรรยากาศ และมี 5% CO<sub>2</sub>, 37 องศาเซลเซียส

##### 4.2 การวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ กลูตาไทโอน รีดักเทส

นำเซลล์ Hep G2 จำนวน  $2 \times 10^6$  เซลล์ มาเติมสารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาด้างเซลล์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS และทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายดีจิโทนิน เข้มข้น 0.8 % (w/v) จากนั้นนำส่วนบนไปหาปริมาณกัมมันตภาพเอนไซม์กลูตาไทโอน รีดักเทส ด้วย 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer

##### 4.3 การศึกษากัมมันตภาพเอนไซม์ UDP glucuronosyl transferase

นำเซลล์ Hep G2 จำนวน  $2 \times 10^6$  เซลล์ มาเติมสารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาด้างเซลล์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS และทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายดีจิโทนิน เข้มข้น 0.8 % (w/v) จากนั้นนำส่วนบนไปหาปริมาณกัมมันตภาพเอนไซม์ UDP glucuronosyl transferase โดยใช้ 1-naphthol เป็นสารตั้งต้นจากนั้นหาปริมาณ 1-naphthol - $\beta$ -D-glucuronide นำไปวัดการดูดกลืนแสง excitation 293 นาโนเมตรและ emission 335 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrofluorometer

#### 4.4 การศึกษากัมมันตภาพเอนไซม์ N-acetyltransferase

นำเซลล์ Hep G2 จำนวน  $5 \times 10^7$  เซลล์ มาเติมสารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดั่งเซลล์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS และทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายดิจิโทนิน เข้มข้น 0.8 % (w/v) จากนั้นนำส่วนบนไปหาปริมาณกัมมันตภาพเอนไซม์ N-acetyltransferase โดยใช้ arylamine เป็นสารตั้งต้น

#### 4.5 การศึกษากัมมันตภาพเอนไซม์ quinine reductase

นำเซลล์ Hep G2 จำนวน  $5 \times 10^7$  เซลล์ มาเติมสารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดั่งเซลล์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS และทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายดิจิโทนิน เข้มข้น 0.8 % (w/v) จากนั้นนำส่วนบนไปหาปริมาณกัมมันตภาพเอนไซม์ quinine reductase โดยวัดจากการเปลี่ยนแปลงของ menadiol เป็น menadiol

### 5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ยร่วมกับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้ ONE WAY ANOVA ตามด้วย BONFERINI ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติน้อยกว่า 0.05 ( $P < 0.05$ )

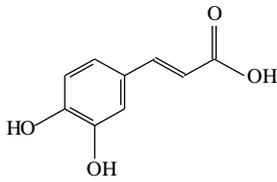
### ผลการวิจัย

**วัตถุประสงค์ที่ 1** เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดกาเฟอิกในรูปอนุพันธ์เอสเทอร์ และเอไมด์

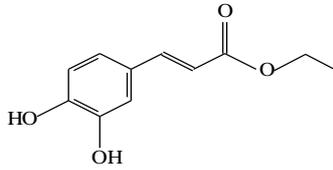
จากการสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์และเอไมด์ของกรดกาเฟอิกลักษณะผลิตภัณฑ์ ร้อยล  
ของผลผลิตที่ได้แสดงดังตารางที่ 1 และสูตรโครงสร้างของผลิตภัณฑ์แสดงดังรูปที่ 3

**ตารางที่ 1** ลักษณะและร้อยละผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์อนุพันธ์กรดกาเฟอิก

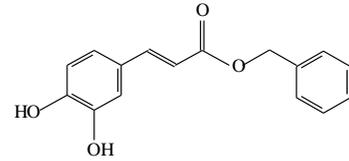
ชื่อสาร	อักษรย่อ	ลักษณะ	ร้อยละผลิตภัณฑ์ที่ สังเคราะห์ได้
Ethyl caffeate	EAL	ผลึกสีขาว	30.40
Octyl caffeate	OAL	ผลึกสีขาว	26.62
Benzyl caffeate	BAL	ผลึกสีขาว	64.63
Phenethyl caffeate	PAL	ผลึกสีขาว	32.46
Caffeic acid ethylamide	EAM	ผลึกสีเหลือง	36.25
Caffeic acid octylamide	OAM	ผลึกสีขาว	30.45
Caffeic acid benzylamide	BAM	ผลึกสีขาว	45.80
Caffeic acid phenethylamide	PAM	ผลึกสีขาวเหลือง	24.60
Caffeic acid	CAF	ผงสีเหลือง	-



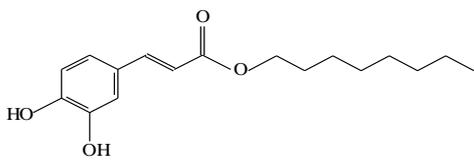
Caffeic acid



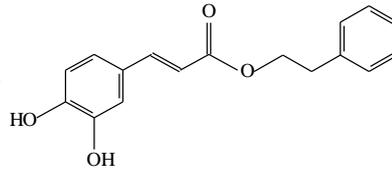
Ethyl caffeate



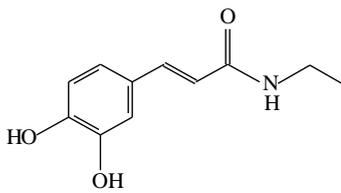
Benzyl caffeate



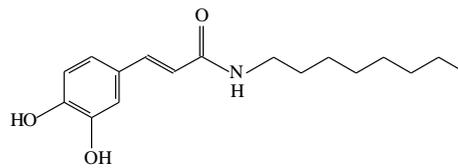
Octyl caffeate



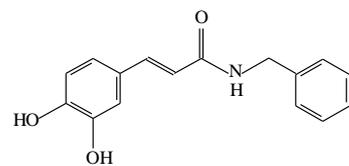
Phenethyl caffeate



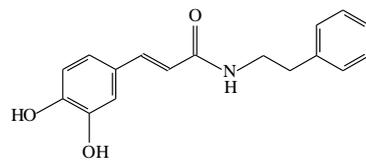
Caffeic acid ethylamide



Caffeic acid octylamide



Caffeic acid benzylamide



Caffeic acid phenethylamide

รูปที่ 3 โครงสร้างอนุพันธ์กรดคาเฟอิก

**จุดประสงค์ที่ 2.** เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ  
ในหลอดทดลองของกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์

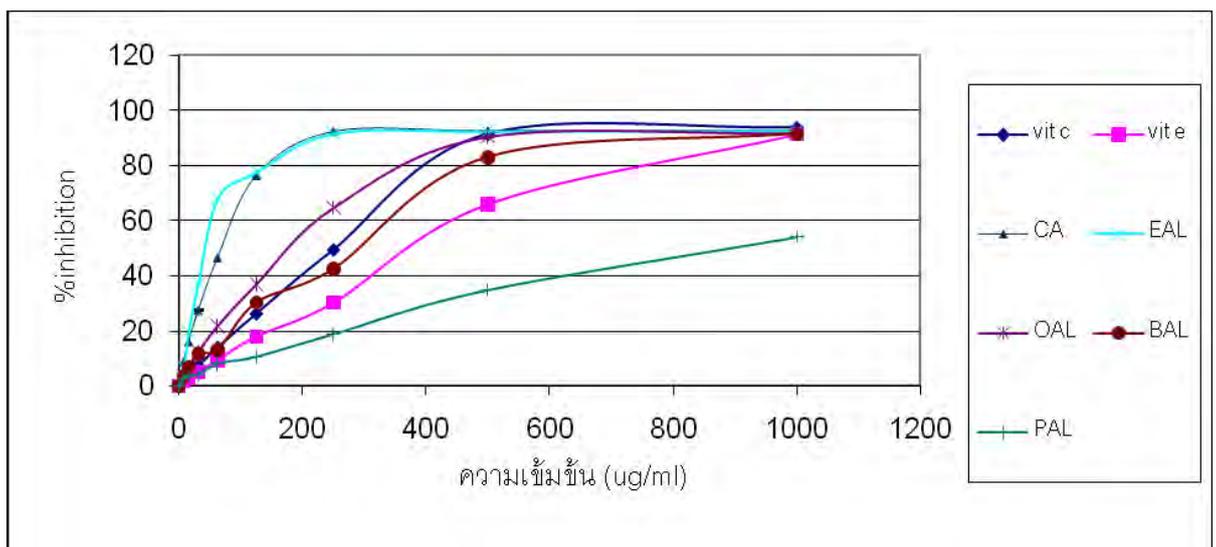
### 2.1 การศึกษาการกำจัดอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH)

ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ DPPH ซึ่งนิยมใช้ศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระทั้งสารสกัด  
จากพืชและสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ต่างๆ โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถลด  
อนุมูล DPPH ที่มีความเสถียรให้เป็น diphenyl-picrylhydrazine ซึ่งมีสีเหลือง วิธีนี้สามารถวัดค่า  
antiradical power ของสารต้านอนุมูลอิสระได้ด้วย จากการทดลองค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูล  
DPPH เป็นไปตามตารางที่ 2 และรูปที่ 4 และ 5 เมื่อเรียงความสามารถในการให้โปรตอนตามค่า  
ความเข้มข้นในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC50) ของ EAM > EAL > กรดกาเฟอิก  
> OAL > BAM > OAM > วิตามิน ซี > BAL > วิตามิน อี > PAL > PAM จากการทดลองจะเห็นได้ว่า  
ความสามารถในการให้โปรตอนของสารอนุพันธ์ที่มีโมเลกุลเล็กจะมีประสิทธิภาพดีกว่าโมเลกุล  
ใหญ่และสารในกลุ่มอนุพันธ์เอไมด์จะมีประสิทธิภาพดีกว่า

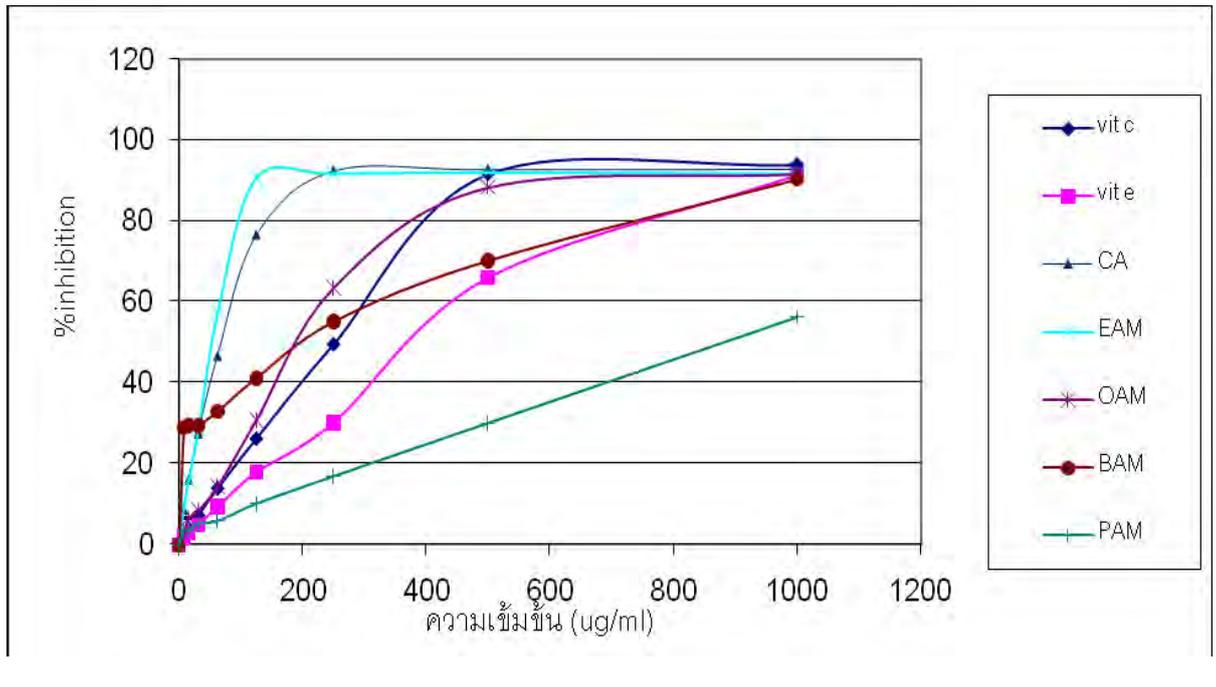
**ตารางที่ 2** แสดงร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH

ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง				
	Caffeic acid	Ethyl caffeate	Octyl caffeate	Benzyl caffeate	Phenethyl caffeate
1000	92.86±0.31	92.56±0.78	91.75±0.63	91.49±0.88	53.91±0.55
500	92.76±0.62	92.43±0.64	90.49±0.63	83.09±0.42	34.69±0.59
250	92.46±0.43	91.60±0.56	64.67±0.78	42.44±0.95	18.68±0.56
125	76.46±0.90	77.53±0.70	36.86±0.59	30.25±0.45	10.49±0.64
62.5	46.56±0.23	68.03±0.82	21.78±0.95	13.03±0.72	8.01±0.27
31.25	27.46±0.83	37.36±0.52	12.27±0.55	11.66±0.64	4.09±0.46
15.625	16.03±0.30	19.76±0.42	6.13±0.71	6.83±0.79	3.55±0.83
7.8125	8.72±0.30	6.78±0.44	3.70±0.86	3.41±0.21	2.80±0.64

ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง					
	Caffeic acid ethylamide	Caffeic acid octylamide	Caffeic acid benzylamide	Caffeic acid phenethylamide	Vitamin C	Vitamin e
1000	91.54±0.31	91.49±0.86	90.22±0.26	56.22±1.04	93.83±0.63	91.23±0.92
500	91.83±0.96	88.18±0.82	70.13±0.93	30.07±0.78	91.50±0.69	65.92±0.27
250	91.54±0.52	63.39±0.53	55.07±0.70	16.90±0.90	49.46±0.56	30.14±0.46
125	90.42±0.47	30.74±0.91	41.15±0.60	10.14±0.13	26.21±0.48	17.89±0.57
62.5	57.46±0.44	14.38±0.52	32.95±0.85	5.87±0.91	13.95±0.86	9.39±0.99
31.25	28.63±0.49	8.43±0.43	29.51±0.92	5.16±0.27	7.33±0.98	5.01±0.96
15.625	15.96±0.86	6.53±0.48	29.42±0.51	3.55±0.22	4.03±0.91	2.95±0.56
7.8125	9.48±0.34	2.64±0.85	28.90±0.59	3.20±0.52	2.42±0.37	1.70±0.85



รูปที่ 4 ร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH ของอนุพันธ์ไฮสเทอร์ของกรดกาเฟอิก



รูปที่ 5 แสดงร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH ของอนุพันธ์เอไมด์กรดกาเฟอิก

## 2.2 การศึกษาการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงเมื่อเหนี่ยวนำด้วย AAPH

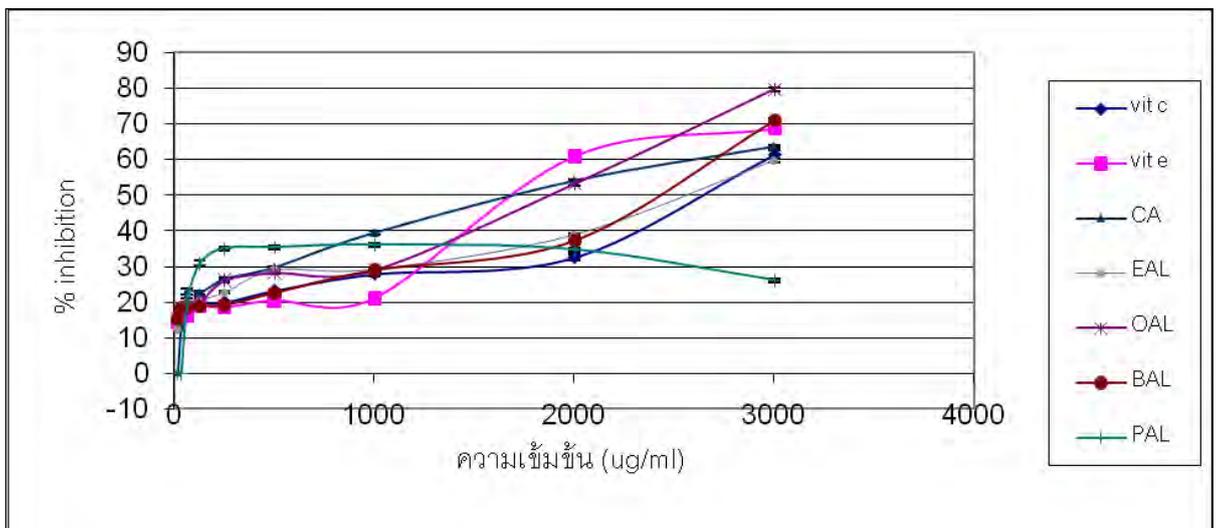
เยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเม็ดเลือดแดงจึงนำมาใช้ศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยศึกษาฤทธิ์การป้องกันความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันจากการเหนี่ยวนำด้วยสารต่างๆเช่นอนุมูล peroxy จาก AAPH สามารถทำปฏิกิริยากับสารพวกกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารพวกลิปิดหรือโปรตีน รบกวนสมดุลเยื่อหุ้มเซลล์จนทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จากการทดลองพบว่าความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสังเคราะห์ ตั้งแต่ 15.625-3000 µg/ml และมีความสัมพันธ์กันแบบ dose response relationship เมื่อเรียงตามค่าการยับยั้งการเกิดที่ร้อยละ 50 (IC50) พบว่า EAM>OAM> วิตามิน ซี> กรดกาเฟอิก> PAL>OAM>BAL>EAL> วิตามิน ซี ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 และรูปที่ 6,7

ตารางที่ 3 แสดงร้อยละการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง

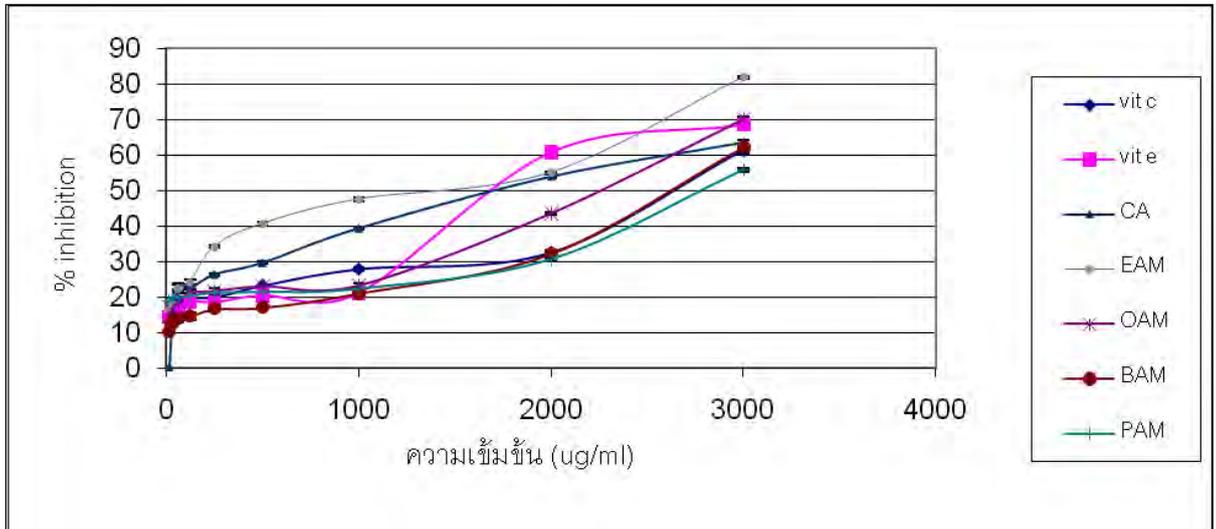
ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง				
	Caffeic acid	Ethyl caffeate	Octyl caffeate	Benzyl caffeate	Phenethyl caffeate
3000	63.69±0.56	59.70±0.24	79.69±0.40	70.92±0.40	69.48±0.24
2000	54.07±0.73	38.92±0.16	53.16±0.56	37.21±0.40	52.90±0.18
1000	39.45±0.51	29.29±0.09	29.03±0.88	28.87±0.42	30.57±0.56
500	29.72±0.37	29.08±0.18	28.18±0.24	22.54±0.33	19.51±0.46
250	26.42±0.33	22.70±0.40	26.10±1.39	19.09±0.80	17.49±0.33
125	22.54±0.92	19.94±0.16	19.88±1.06	18.87±0.40	16.37±0.18
62.5	22.97±0.42	20.68±3.01	18.29±0.58	18.64±0.62	15.10±1.55
31.25	12.92±0.16	15.95±0.58	16.11±1.05	18.29±1.72	13.72±0.89
15.625	0.31±0.07	12.39±2.79	15.31±0.58	15.42±0.24	9.20±0.33

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง					
	Caffeic acid ethylamide	Caffeic acid octylamide	Caffeic acid benzylamide	Caffeic acid phenethylamide	Vitamin C	Vitamin e
3000	81.87±0.18	70.07±0.40	62.25±0.24	55.84±0.89	61.40±0.42	68.53±0.40
2000	55.02±0.32	43.59±0.66	32.22±0.48	30.57±0.33	32.54±0.48	60.87±0.37
1000	47.53±0.97	23.29±0.58	21.05±0.42	22.22±0.93	27.86±0.79	21.16±0.64
500	40.62±0.79	23.02±0.88	17.06±0.49	21.32±0.24	23.18±0.60	20.49±0.70
250	34.18±0.88	21.74±0.49	16.64±0.88	21.05±0.64	19.94±0.58	18.55±0.97
125	24.24±0.64	21.21±1.69	14.57±0.33	20.20±0.56	19.78±0.58	18.82±0.58
62.5	22.54±0.96	18.77±0.49	13.88±0.80	19.88±0.33	18.98±0.70	16.32±0.33
31.25	18.13±1.06	16.53±0.24	12.49±0.66	19.62±0.32	17.97±0.40	15.90±0.46
15.625	16.64±1.03	14.57±1.06	10.21±0.42	18.87±0.51	14.62±1.61	14.51±0.28



รูปที่ 6 ร้อยละการยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงของอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดกาเฟอิก



รูปที่ 7 ร้อยละการยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงของอนุพันธ์เอไมด์ของกรดกาเฟอิก

### 2.3 การศึกษาการยับยั้งการเกิดลิปิด เปอร์ออกซิเดชันโดยใช้กรดไลโนเลอิก

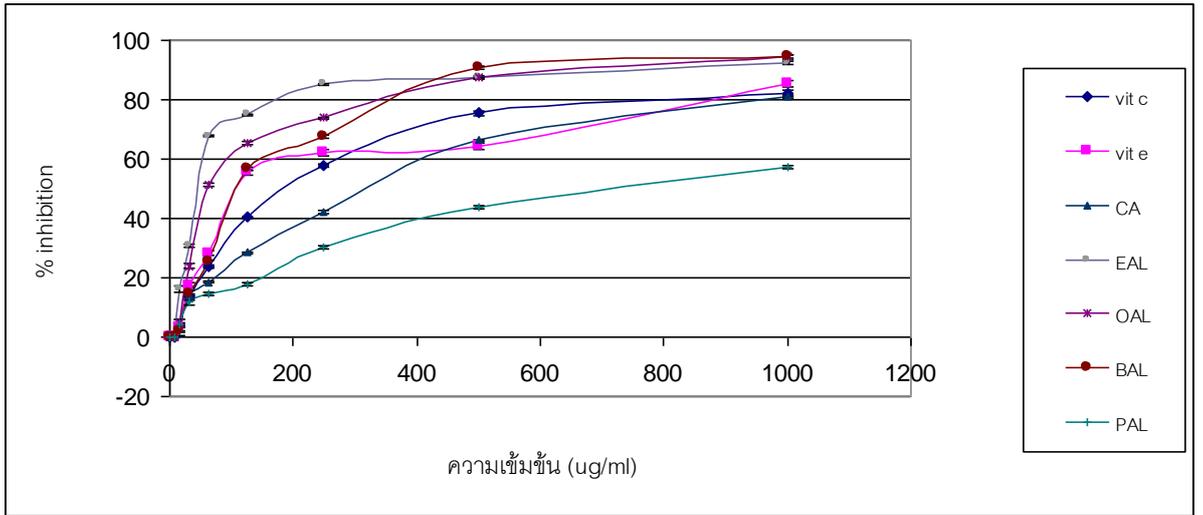
กรดไลโนเลอิกนั้นเป็นกรดไขมันที่พบได้ทั่วไปบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนมากมักนิยมใช้ศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน โดยใช้สารเคมีเหนี่ยวนำเช่น AAPH ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากการทดลองพบว่า EAL>OAL> วิตามิน อี >BAM> EAM>BAL>OAM>วิตามิน ซี> กรดกาเฟอิก > PAM>PAL

ผลแสดงดังตารางที่ 4 และรูปที่ 8,9

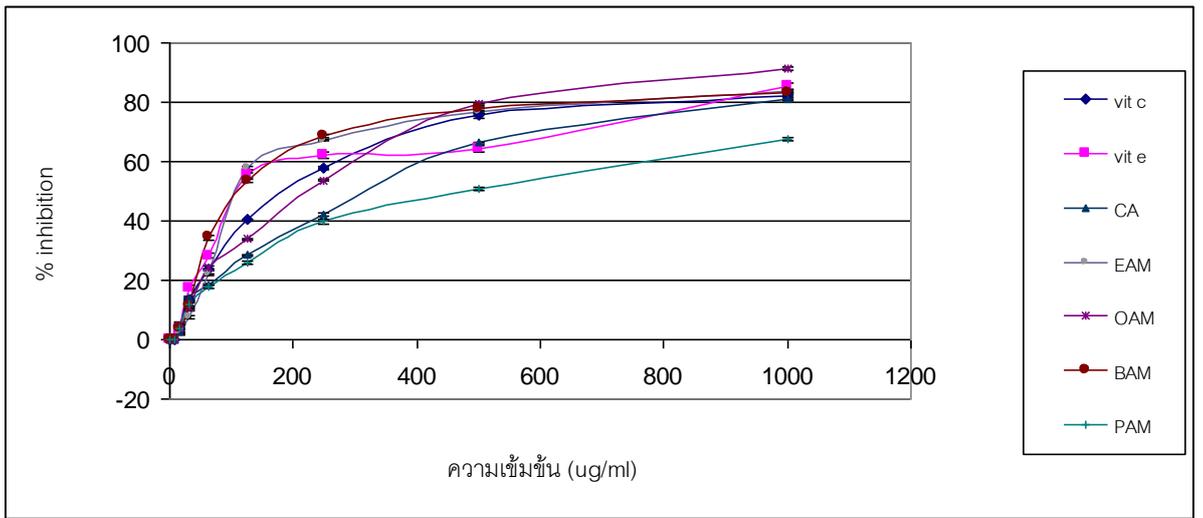
ตารางที่ 4 ร้อยละการยับยั้งการเกิดลิปิด เปอร์ออกซิเดชัน

ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง				
	Caffeic acid	Ethyl caffeate	Octyl caffeate	Benzyl caffeate	Phenethyl caffeate
1000	81.06±1.55	92.29±1.68	94.34±0.98	94.52±0.70	57.38±1.55
500	66.30±0.74	87.65±0.58	87.37±0.98	90.71±0.85	43.55±1.05
250	42.06±1.55	85.14±0.85	73.91±2.13	67.69±0.56	30.27±0.43
125	28.41±2.18	74.93±0.28	65.27±1.32	56.73±15.61	17.92±1.13
62.5	18.48±1.70	67.78±0.58	51.35±0.85	25.35±4.42	14.48±0.84
31.25	14.21±2.93	60.63±1.16	23.86±0.70	14.76±6.42	11.70±0.84
15.625	2.79±0.28	16.43±4.69	4.92±1.81	1.95±1.74	4.46±1.00

ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง					
	Caffeic acid ethylamide	Caffeic acid octylamide	Caffeic acid benzylamide	Caffeic acid phenethylamide	Vitamin C	Vitamin e
1000	83.94±1.43	91.36±2.61	83.19±0.43	67.78±0.58	82.36±0.58	85.42±0.70
500	76.51±1.05	79.20±0.98	77.72±0.56	50.97±0.84	75.49±0.74	64.44±0.78
250	67.22±2.16	53.76±4.88	68.71±0.85	39.74±1.13	58.63±0.58	62.21±1.68
125	57.85±1.8	33.80±1.85	53.39±0.70	25.72±0.85	40.39±0.84	55.52±4.91
62.5	22.01±1.47	24.42±1.77	34.35±1.26	17.64±1.26	23.68±0.84	28.32±1.98
31.25	7.71±1.96	10.77±0.16	11.51±0.70	11.88±0.98	13.46±0.85	17.46±0.98
15.625	2.79±0.28	4.83±0.43	3.99±0.70	3.62±1.06	3.99±0.90	3.16±0.70



รูปที่ 8 ร้อยละการยับยั้งการเกิดลิวติปิดออกซิเดชันกรดไลโนเลอิกด้วยอนุพันธ์แอสเทอร์ของกรดกาเฟอิก



รูปที่ 9 ร้อยละการยับยั้งการเกิดลิวติปิดออกซิเดชันกรดไลโนเลอิกด้วยอนุพันธ์เอไมด์ของกรดกาเฟอิก

## 2.4 การศึกษาการกำจัดอนุมูล superoxide anion

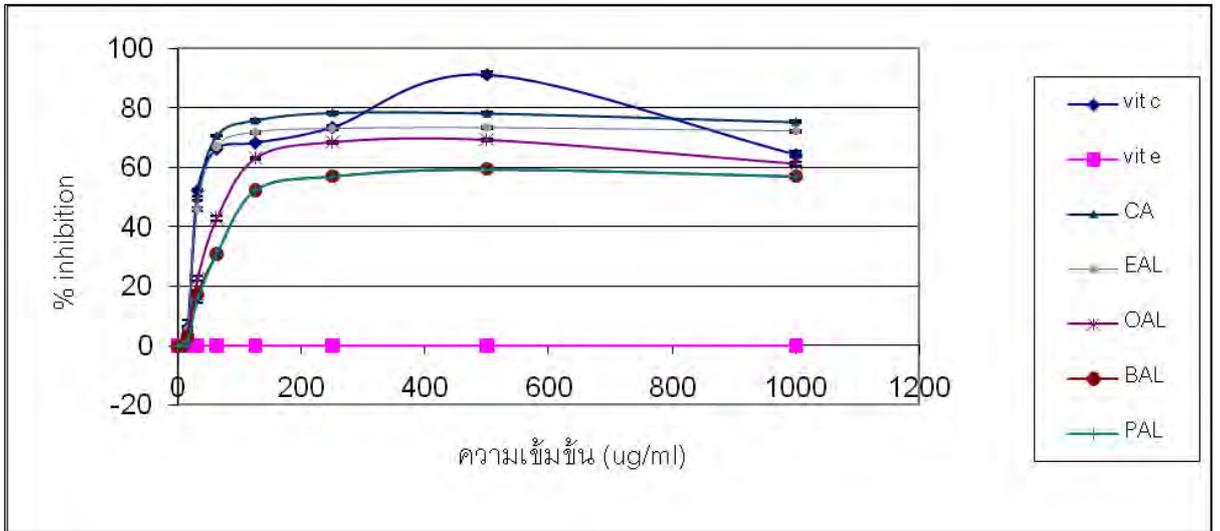
การทดลองนี้ได้ศึกษาการยับยั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์โดยใช้กระบวนการ nonenzymatic จากปฏิกิริยา phenazine methosulfate/NADH/O<sub>2</sub> เป็นตัวสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์และใช้ nitroblue tetrazolium (NBT) เป็นตัววัดปริมาณซูเปอร์ออกไซด์ จากการทดลองพบว่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์โดยใช้กรดกาเฟอิก วิตามินซีและวิตามิน อีเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 พบว่า วิตามิน ซี > กรดกาเฟอิก > EAM > วิตามิน อี > OAL > PAL > BAL > PAM > EAL > BAM > OAM แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าการยับยั้งที่ความเข้มข้นของสาร 125 µg/ml พบว่า EAM > กรดกาเฟอิก > วิตามิน อี > วิตามิน ซี > OAL > BAL, PAL > PAM > EAL > BAM > OAM

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 และรูปที่ 10,11

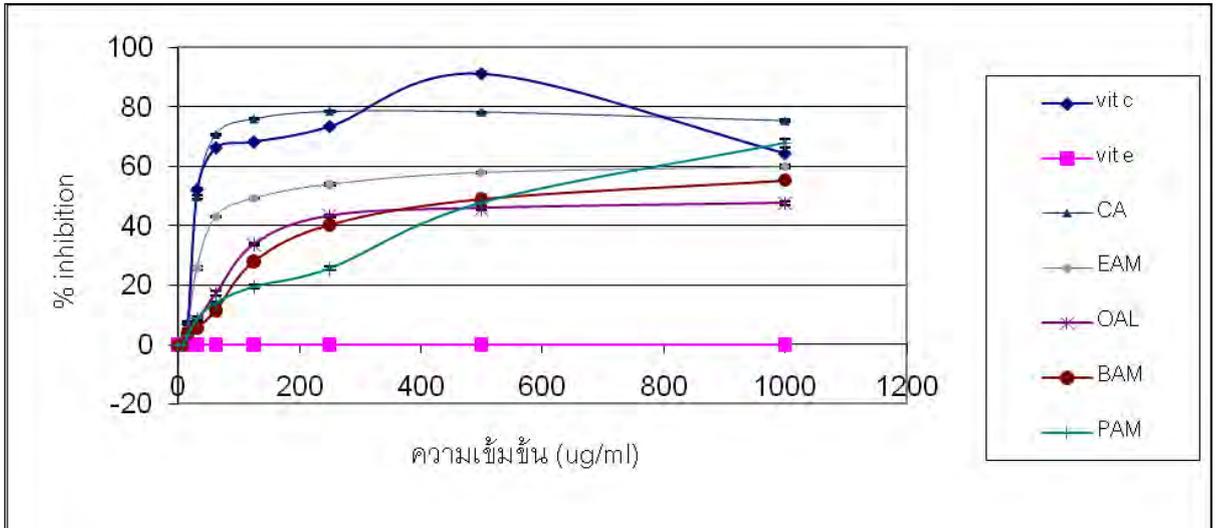
### ตารางที่ 5 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์

ความเข้มข้น µg/ml	ร้อยละการยับยั้ง				
	Caffeic acid	Ethyl caffeate	Octyl caffeate	Benzyl caffeate	Phenethyl caffeate
1000	75.32±0.37	72.22±0.44	61.31±0.21	56.99±0.44	56.99±0.44
500	78.24±0.23	73.34±0.040	69.31±0.37	59.36±0.29	59.35±0.29
250	78.41±0.23	73.07±0.33	68.57±0.21	57.02±0.33	57.02±0.33
125	75.90±0.15	71.86±0.22	63.13±0.23	52.34±0.41	52.34±0.51
62.5	70.66±0.21	66.84±0.26	42.84±0.41	30.99±0.51	30.87±0.55
31.25	49.63±0.55	45.91±0.57	22.61±0.26	17.30±0.47	15.41±0.86
15.625	7.46±0.44	5.39±0.45	4.43±0.74	2.96±0.32	1.37±0.47

ความ เข้มข้น $\mu\text{g/ml}$	ร้อยละการยับยั้ง					
	Caffeic acid ethylamide	Caffeic acid octylamide	Caffeic acid benzylamide	Caffeic acid phenethylamide	Vitamin C	Vitamin e
1000	59.92±0.51	47.61±0.64	55.36±0.44	67.82±1.43	64.47±0.26	16.19±0.46
500	57.94±0.23	45.91±0.70	49.10±0.44	47.76±1.56	91.37±0.46	21.77±0.28
250	53.95±0.25	43.35±0.48	40.45±0.22	25.66±0.71	66.44±0.19	65.18±0.32
125	49.24±0.11	33.84±0.44	28.17±0.18	19.45±0.54	68.42±0.62	70.59±0.14
62.5	43.13±0.26	17.32±0.74	11.72±0.48	14.05±0.36	73.61±0.22	67.74±0.14
31.25	25.58±0.58	8.08±0.77	5.62±0.63	8.86±0.67	52.34±0.22	38.08±0.64
15.625	2.97±0.13	4.95±0.28	3.75±0.26	3.36±0.85	3.85±0.13	15.03±2.69



รูปที่ 10 ร้อยละการยับยั้งอนุผลซูเปอร์ออกไซด์ของอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดกาเฟอิก

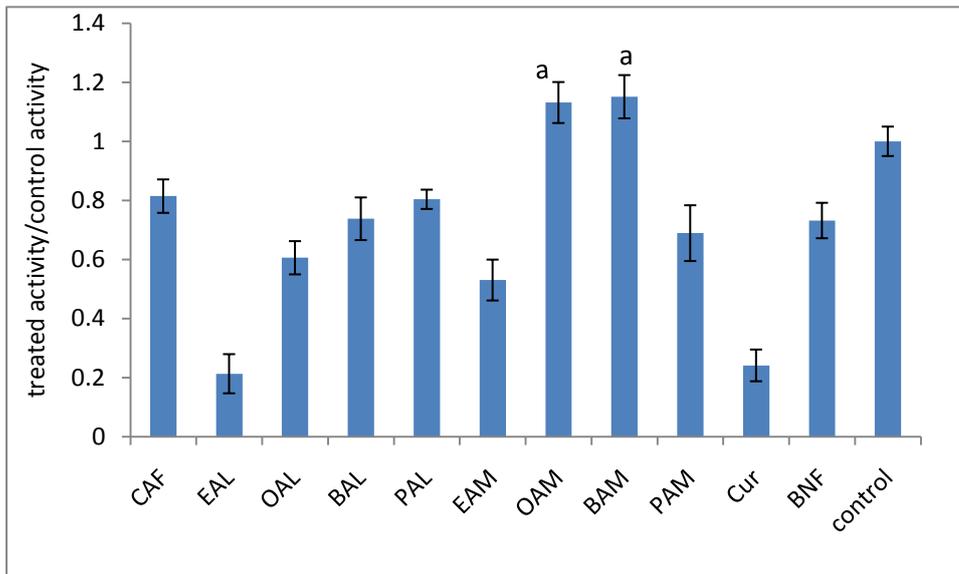


รูปที่ 11 ร้อยละการยับยั้งอนุผลซูเปอร์ออกไซด์ของอนุพันธ์ไฮไมด์ของกรดกาเฟอิก

**วัตถุประสงค์ที่ 3** เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างต่อการเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 โดยใช้เนื้อเยื่อมะเร็งตับชนิด Hep G2

### 3.1 การวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ กลูตาไทโอนรีดักเทส

การศึกษาค้นคว้าของสารสังเคราะห์ต่อการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์กลูตาไทโอนรีดักเทสในเซลล์ Hep G2 ผลแสดงดังรูปที่ 12 จากรูปเป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนแอกติวิตีของเอนไซม์กลูตาไทโอนรีดักเทสในกลุ่มที่ได้รับสารสังเคราะห์เทียบกับกลุ่มควบคุม จากการทดลองพบว่า OAM และ BAM ซึ่งเป็นสารกลุ่มอนุพันธ์เอไมด์มีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์มากที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ จากการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างสารพบว่าอนุพันธ์เอไมด์มีฤทธิ์เหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์มากกว่าอนุพันธ์ในกลุ่มเอสเทอร์และอนุพันธ์ที่มีหมู่ประกอบ (side chain) ยาวจะมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีมากกว่าหมู่ประกอบสายสั้นๆ

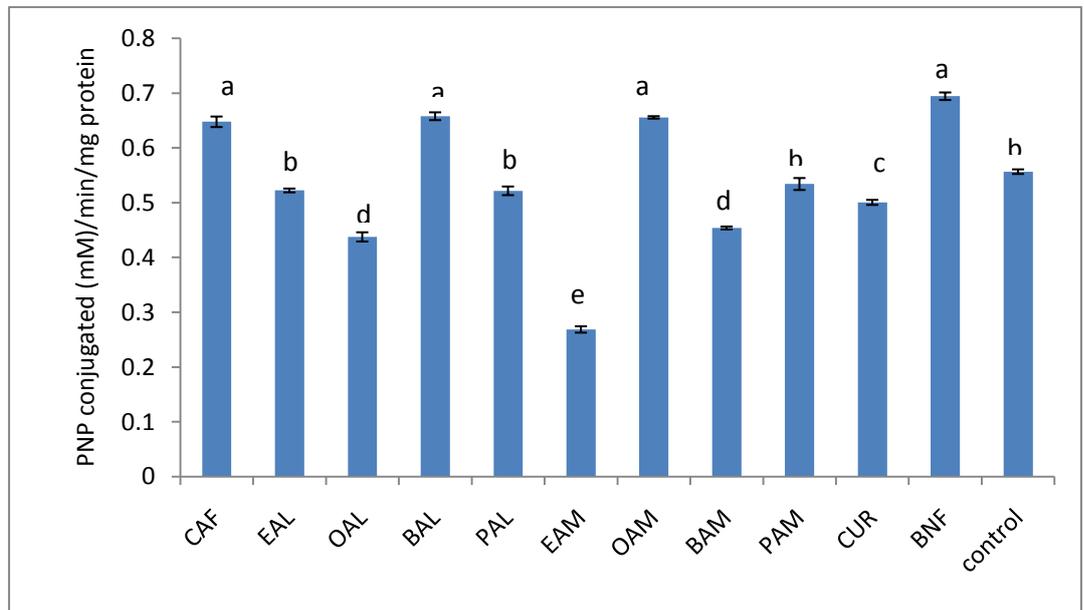


**รูปที่ 12** อัตราส่วนแอกติวิตีของเอนไซม์ glutathione-s- transferase ของกลุ่มทดสอบต่อกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากให้สารสังเคราะห์

### 3.2 การศึกษากัมมันตภาพเอนไซม์ UDP glucuronosyl transferase

UDP-glucuronosyltransferase (UGT) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญยิ่งในเฟส 2 เนื่องจากมีหน้าที่หลักในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย ในการเหนี่ยวนำแอกติวิตี UGT ในเซลล์ Hep G2 ที่ 24 ชั่วโมงผลแสดงดังรูปที่ 14

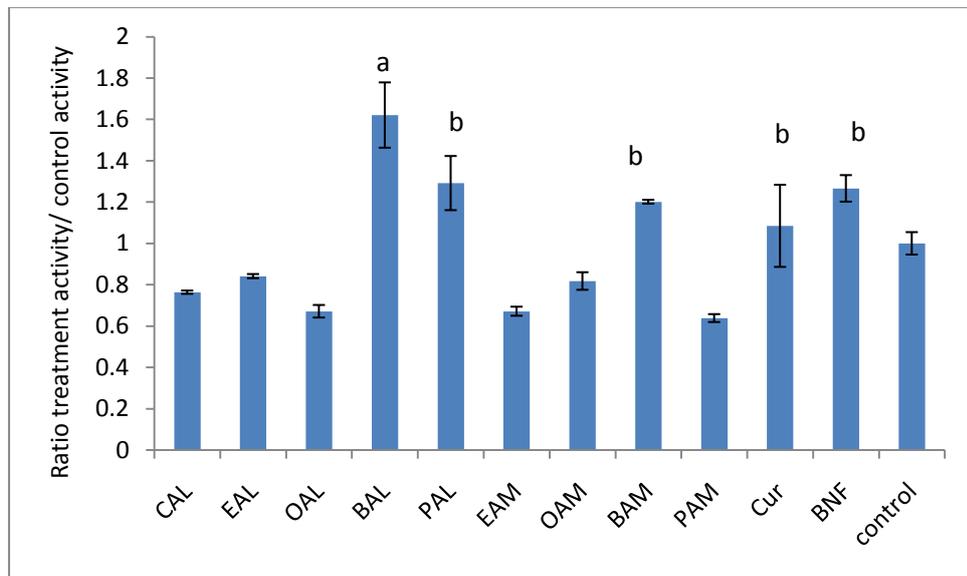
จากผลการทดลองพบว่าสารสังเคราะห์ BAL และ OAM นั้นสารสามารถเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ UGT ได้ดีที่สุดในเมื่อเทียบกับสารอื่นๆ และเมื่อเทียบประสิทธิภาพของสารกลุ่มเอไมด์และเอสเทอร์ต่อการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ UGT พบว่ากลุ่มเอไมด์นั้นจะมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ได้ดีกว่าเอไมด์และสารที่มี side chain ยาวในโมเลกุลจะมีความสามารถในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ได้ดีกว่าสารที่มี side chain สั้น



รูปที่ 13 อัตราส่วนแอกติวิตีของเอนไซม์ UDP- glucuronosyltransferase ของกลุ่มทดสอบต่อกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากให้สารสังเคราะห์

### 3.3 การศึกษากัมมันตภาพเอนไซม์ N-acetyltransferase

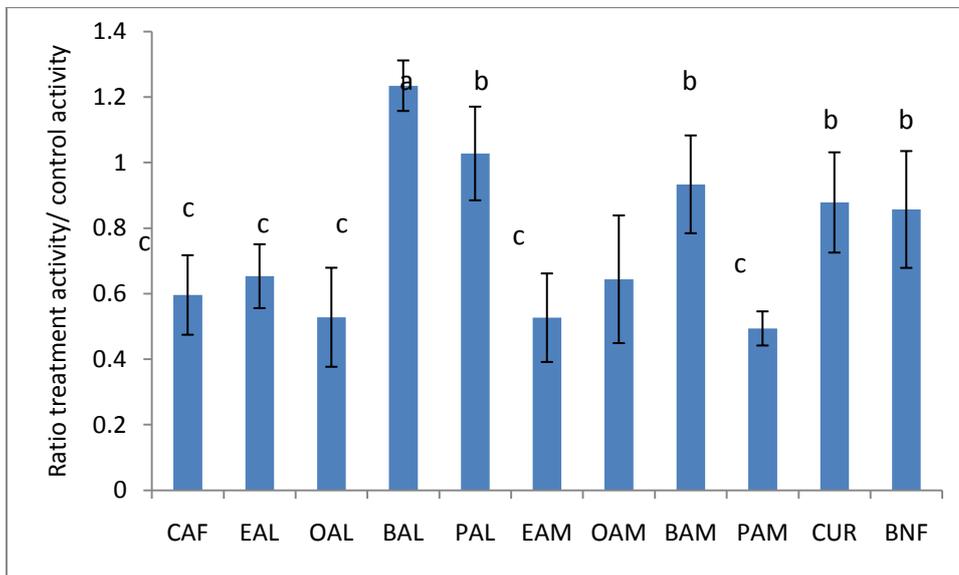
N-acetylation เป็นกลไกที่สำคัญอันหนึ่งในเฟสที่ 2 กระบวนการนี้อาศัยเอนไซม์ N-acetyltransferase (NAT) ในการทำปฏิกิริยา จากการทดสอบสารสังเคราะห์อนุพันธ์กรดกาเฟอิกโดยใช้เซลล์ Hep G2 ผลแสดงดังรูปที่ 14 จากผลการทดลองพบว่า BAL นั้นมีฤทธิ์ในการกระตุ้นแอกติวิตีเอนไซม์ NAT มากที่สุด รองลงมาคือ PAL และ BAM เมื่อพิจารณาโครงสร้างพบว่าสารที่มี side chain ที่มีวงเบนซีนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลมากจะมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ NAT ได้ดีกว่าสารที่มีวงเบนซีนเพียงวงเดียว และเมื่อเปรียบเทียบผลการกระตุ้นระหว่างกลุ่มเอสเทอร์และเอไมด์นั้นพบว่า สารกลุ่มเอสเตอร์นั้นมีความสามารถที่จะเพิ่มแอกติวิตีได้ดีกว่าสารกลุ่ม เอไมด์



รูปที่ 14 อัตราส่วนแอกติวิตีของเอนไซม์ N-acetyltransferase กลุ่มทดสอบต่อกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากให้สารสังเคราะห์

### 3.4 การศึกษากัมมันตภาพเอนไซม์ quinine reductase

เอนไซม์ quinine reductase หรือ DT-diaphorase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหน้าที่ในการป้องกันการเกิดมะเร็งจากการทดลองเมื่อเติมสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์กรดกาเฟอิกในเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงผลดังแสดงในรูปที่ 15 จากผลการวิจัยพบว่าสาร BAL นั้นมีความสามารถมากที่สุดในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ quinine reductase รองลงมาคือ PAL, BAM, CUR และ BNF เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างและฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์พบว่าสารที่มีวงเบนซินเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลมากจะมีฤทธิ์เหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ได้ดีกว่าสารที่มีวงเบนซินเป็นองค์ประกอบน้อย และอนุพันธ์พวกเอสเทอร์นั้นจะมีฤทธิ์เหนี่ยวนำแอกติวิตีมากกว่ากลุ่มเอไมด์



รูปที่ 15 อัตราส่วนแอกติวิตีเอนไซม์ quinine reductase ของกลุ่มทดสอบต่อกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากให้สารสังเคราะห์

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้นมีกลไกการป้องกันการเกิดอันตรายจากสภาวะเครียด โดยใช้กระบวนการต่างๆภายในเซลล์โดยเอนไซม์ในเฟส 2 นั้นมีบทบาทที่สำคัญในการต่อต้านความเป็นพิษจากสารพิษโดยทำหน้าที่ขับออกนอกร่างกายเพื่อไม่ให้สะสมแล้วก่อโทษได้ เอนไซม์เฟส 2 ที่สำคัญได้แก่ UDP- glucuronosyltransferase, glutathione-s-transferase, N-acetyltransferase และ Quinone reductase นอกจากนี้การเร่งกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายนั้นจะเป็นหนทางหนึ่งในการป้องกันโรคอันมีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระเช่น มะเร็ง เบาหวาน โรคหัวใจ เป็นต้น จากการวิจัยพบว่าเมื่อรับประทานผัก และผลไม้สามารถช่วยกำจัดสารอนุมูลอิสระที่มากได้และยังช่วยป้องกันโรคได้อีกทางหนึ่ง เมื่อนำผักผลไม้ต่างๆมาวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ที่สำคัญนั้นพบว่าสารกลุ่มโพลีฟีนอลนั้นเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการช่วยป้องกันโรคได้ โดยเฉพาะกรดกาเฟอิกนั้นมีบทบาทหน้าที่สำคัญในการป้องกันมะเร็ง กำจัดอนุมูลอิสระได้ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารที่ออกฤทธิ์ให้มีฤทธิ์เพิ่มมากขึ้นโดยการวิจัยครั้งนี้ได้สังเคราะห์อนุพันธ์กรดกาเฟอิกในรูปของเอสเทอร์และเอไมด์จากนั้นทำการศึกษาสมบัติของสารสังเคราะห์ที่ได้แก่การกำจัดอนุมูลอิสระในหลอดทดลองคือ DPPH และ superoxide anion ศึกษาการยับยั้งการเกิดลิปิดออกซิเดชันของเม็ดเลือดแดง ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไลโนเลอิกและศึกษาการเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 ได้แก่ glutathione-s- transferase, UDP- glucuronosyltransferase, , N-acetyltransferase และ quinone reductase ในเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2

การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และ superoxide anion นั้นพบว่าอนุพันธ์เอไมด์นั้นมีฤทธิ์กำจัดมากกว่าเอสเทอร์เนื่องจากว่าเอไมด์นั้นภายในโมเลกุลประกอบด้วยไฮโดรเจนอะตอมที่สามารถให้กับอนุมูลอิสระได้ถึง 3 อะตอมเมื่อเทียบกับเอสเทอร์ที่ให้ไฮโดรเจนได้เพียง 2 อะตอมเท่านั้น จากสมบัตินี้เองทำให้ฤทธิ์การป้องกันการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงเมื่อเหนี่ยวนำด้วย AAPH ที่เป็นอนุมูลอิสระสารหนึ่งกลไกการป้องกันการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงนั้นน่าจะมาจากการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ AAPH ทำให้ลดความรุนแรงของการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงได้ กรดไลโนเลอิกนั้นเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีความสำคัญในร่างกายและมัก

ถูกออกซิเดชันได้ง่ายจากอนุมูลอิสระภายในเซลล์หรือร่างกาย ซึ่งในการทดลองนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไลโนเลอิกจากการทดลองพบว่าสารสังเคราะห์อนุพันธ์กลุ่มเอไมด์นั้นสามารถลดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไลโนเลอิกได้ด้วยกลไกเดียวกัน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะโครงสร้างพบว่าอนุพันธ์ที่มีโมเลกุลเล็กๆสามารถกำจัดอนุมูลอิสระต้านปฏิกิริยา ออกซิเดชันได้ดีกว่าสารที่มีโมเลกุลใหญ่และมี side chain ที่ใหญ่ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแรงของการให้อิเล็กตรอนของสารที่มี side chain สั้นนั้นมีความสามารถในการให้ ไฮโดรเจนอะตอมได้ง่ายกว่า

การศึกษาการเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 พบว่าสารที่มี side chain ยาวหรือมีวงเบนซินหลายวงภายในโมเลกุลสารมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เอนไซม์เฟส 2 นั้นมีแอกติวิตีเพิ่มสูงมากกว่าสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กทั้งนี้เนื่องจากโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีความสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีกว่าสารโมเลกุลเล็กจากสมบัติความไม่มีขั้วของสารสังเคราะห์โมเลกุลขนาดใหญ่มากกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก (Ardhaouia et al, 2004)

Nrf-2 เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor) ที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์เฟสที่ 2 โดยผ่านกลไกที่ซับซ้อนภายในเซลล์ในภาวะปกติของร่างกาย Nrf-2 จะจับกับ Keap-1 ในไซโทพลาสซึมทำให้ไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์เฟส 2 แต่เมื่อมีภาวะเครียดหรือได้รับสารที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน สารเหล่านั้นจะทำลายพันธะซัลไฮดริลที่ยึด Nrf-2 และ Keap-1 ไว้ด้วยกันทำให้ Nrf-2 หลุดออกเป็นอิสระจากนั้นโมเลกุลของ Nrf2 ก็จะไปแพร่เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อไปกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เฟส 2 (Surh, 2003) จากการศึกษาของ Wang และคณะ (2010) โดยใช้สาร caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ในการศึกษาครั้งนี้คือสาร PAL กลไกของ PAL นั้นน่าจะไปรบกวนสารประกอบ Nrf-2- Keap 1 ทำให้เพิ่มปริมาณของ Nrf-2 ซึ่งจะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอในส่วนที่เรียกว่า ARE ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการสร้าง mRNA ของเอนไซม์เฟสที่ 2 อนุพันธ์ของกรดคาเฟอิกตัวอื่นๆอาจมีกลไกการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เฟส 2 ในกลไกเดียวกันเพราะเนื่องจากว่าสารเหล่านี้มีโครงสร้างโมเลกุลที่ใกล้เคียงกัน และกลไกเหล่านี้ก็ต้องศึกษาต่อไป (Jaikang and Chaiyasut; 2010)

การศึกษาเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์นั้น การวิจัยนี้สรุปได้ว่าอนุพันธ์ เอสเทอร์และเอไมด์ที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นมีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ยับยั้งปฏิกิริยา ออกซิเดชัน กระตุ้นเอนไซม์เฟส 2 ในเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2 ได้ ซึ่งกลไกเหล่านี้จัดเป็นกลไก พื้นฐานในการป้องกันการเกิดมะเร็งตับได้ ซึ่งจะต้องทำการศึกษาถึงความปลอดภัยของสารแต่ละ ชนิดว่ามีความปลอดภัยมากน้อยเพียงใดในสัตว์ทดลองต่อไป

### เอกสารอ้างอิง

1. Ardhaouia M., Falcimaigneb A., Engassera JM., Moussoub P., Paulyb G., Ghoula M. Enzymatic synthesis o new aromatic and aliphatic esters of flavonoids using Candida Antarctica lipase as biocatalyst. Biocatal. Biotransfor. 2004; 22(4): 253-259.
2. Chen Y., Shiao M., Hsu M., et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. J. Agric. Food. Chem. 2001; 49: 5615-19.
3. Fiuza Sm., Gomes C., Teixeira LJ., et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl,propyl and octyl ester of caffeic acid and gallic acid. Bioorganic Medicinal Chemistry.2004; 12: 3581-9.
4. Gulcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology. 2006; 217: 213-20.
5. Jaikang C. and Chaiyasut C. Caffeic acid and its derivatives as heme oxygenase 1 inducer in Hep G2 cell line. J. Med. Plant. Res. 2010. 4(10). 940-946

6. Kang KA, Lee KH., Zhang R., et al. Caffeic acid protects hydrogen peroxide induced cell damage in WI-38 human lung Fibroblast cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29: 1820-24.
7. Lafay S, Gueux E., Rayssiguier Y., et al. Caffeic acid inhibits oxidative stress and reduces hypercholesterolemia induced by iron overload in rats. *Int Vitm Nutr Res.* 2005; 75 : 119-25.
8. Lee Y., Don M., Hung P., et al. Cytotoxicity of phenolic acid phenyl esters on oral cancer cells. *Cancer Letters.* 2005; 223: 19-25.
9. Nardini M., Pisu P., Gentili V., et al. Effect of caffeic acid on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. *Free radical Biology and Medicine.* 1998; 25:1098-1105.
10. Son S. and Lewis B. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues. Structure activity relationship. *J.Agric. Food. Chem.* 2002; 50: 468-72.
11. Sud'ina GF., Mirloeva OK., Pushkareva MA., et al. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS.* 1993; 329: 21-4.
12. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 3:768-80.
13. Ujibe M., Kanno S., Osanai Y., et al. Octylcaffeate induced apoptosis in human Leukemia U937 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2005; 28: 2338-41.
14. Wang X., Stavchansky S., Kerwin SM., Bowman PD. Structure activity relationships in the cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and fluorinated derivatives: Effects on heme oxygenase 1 induction and antioxidant activities. *Eur. J. Pharmacol.* 2010; 635: 16-22.

## ภาคผนวก

รายละเอียดงานวิจัยที่ส่งเข้าร่วมเสนอผลงานในงาน The 1<sup>st</sup> SFRR-Thai Meeting and International workshop on advance of Free radicals, oxidative stress and their evaluation methods.

December, 2008. Chiang Mai, Thailand

**Free radical scavenging and antioxidative properties of Ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propen amide.**

Churdsak Jaikang<sup>1</sup>, Chaiyavat Chaiyasut<sup>1</sup>, Paitoon Narongchai<sup>2</sup>, Siripun Narongchai<sup>2</sup> and Kanokporn Niwatananun<sup>1</sup>

1 Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai Thailand 50200

2 Department of Forensic Medicine Faculty of Medicine Chiang Mai University, Chiang Mai Thailand 50200

#### **Abstract**

The aim of this study to investigate free radical and antioxidant properties of synthetic Ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propen amide (EAM) using in vitro assay system .EAM was synthesized using PyBOP as a coupling agent. EAM was investigated for the free radical scavenging on 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH●) radical, superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), nitric oxide radical (●NO) as well as the anti-lipoperoxidative capacity on human erythrocytes haemolysis and ferric reducing ability of plasma (FRAP).  $\alpha$ - tocopherol, ascorbic acid and caffeic acid were used as the reference antioxidant compound. The inhibition concentration value (IC 50) of EAM on DPPH●,  $O_2^{\bullet-}$ , and ●NO were 61.32, 44.56, and 45.77  $\mu$ g/ml respectively. EAM could inhibit human erythrocytes heamolysis 47.53 % at concentration 1 mg/ml. The reducing power increased in a dose response relationship. There results suggested that synthetic EAM might be beneficial as a potent antiradical and antioxidant .

## Introduction

Caffeic acid is widely distributed in the plant kingdom and found in coffee beans, olives, properlis, fruits and vegetables. They have attracted much attention and have been studied by many research groups for several properties such as antiviral, anti-inflammatory, antioxidative, immunostimulatory and neuroprotective properties.

The aim of this study to investigate free radical and antioxidant properties of synthetic EAM using *in vitro* assay system.

## Material and Methods

EAM was synthesized by using PyBOP as a coupling agent. The residue was purified using column chromatography and the structure confirmed by FT-IR,  $H^1$ -NMR,  $C^{13}$ -NMR, GC-MS and spectrophotometer.

1,1- Diphenyl 2- picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity was measured according to the method of Blois (1958). Superoxide anion scavenging activity was measured based on the described method by Robak and Gryglewski (1988). Superoxide radicals were generated in nicotinamide adenine dinucleotide, phenazine methosulphate (PMS-NADH) system by oxidation of NADH and assayed by reduction of nitroblue trtrazolium (NBT). Nitric oxide scavenging was measured by generating nitric oxide from sodium nitroprusside and measured by Griess reation. Assess for normal human erythrocyte heamolysis induced by peroxy radicals was according to the procedures described by Yuan et al (2005) The FRAP assay was measured by the change in absorbance at 593 nm. IC 50 were calculated among percent of inhibition with concentration.  $\alpha$ - tocopherol, ascorbic acid and caffeic acid were as the reference standard.

## Statistical analysis

All data are arranged of triplicate analysis. The data were recorded as mean  $\pm$  SD.

## Results and discussions.

The structure of EAM shown in fig.1.

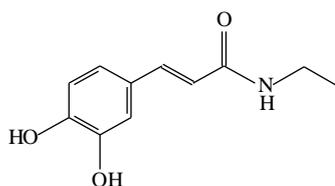


Fig.1. EAM structure

The inhibition concentration values (IC50) of EAM for free radical scavenging are summarized in table 1. The reducing power and free radicals scavenging were increased in a dose response relationship shown in figure 2 and 3. The result clearly indicate EAM exhibits strong antioxidant activity both in scavenging free radicals and antioxidation, as compared to that of the structure-related compound caffeic acid. These *in vitro* results also suggest the possible that EAM could be effectively employed as an ingredient in health or functional food, to alleviate oxidative stress.

Substance/ radicals	DPPH	O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	•NO ( $\mu$ g/ml)	red blood cell heamolysis
EAM	61.32	44.56	45.77	1468.77
Caffeic acid	44.49	36.47	19.15	1879.30
$\alpha$ - tocopherol	267.70	26.06	14.16	1861.48
ascorbic acid	382.98	45.17	66.66	2472.8

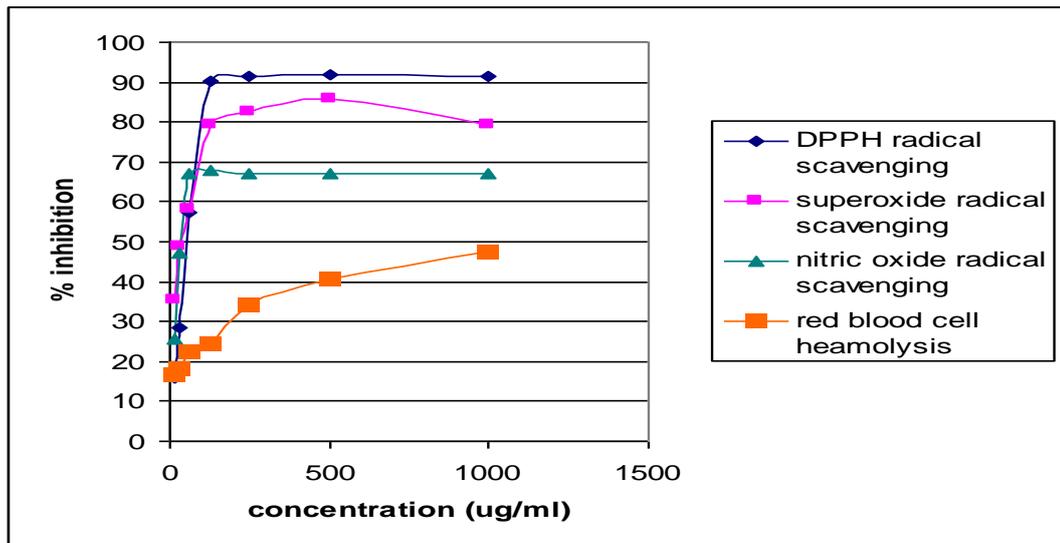


Fig 2. Free radicals scavenging of EAM

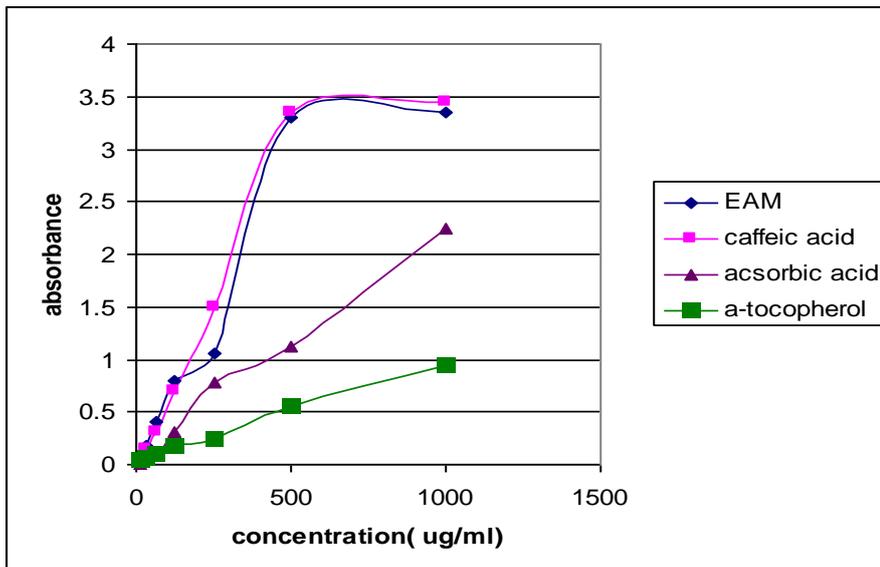


Fig 3. FRAP of EAM and standard references.

**References:**

1. Fiuza SM., Gomes C., Teixeira J., et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure-activity relationship study. Part1: Methyl, propyl and octyl ester of caffeic acid and gallic acid. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. 2004; 12: 3581-9.
2. Son S., and Lewis B. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J. Sgric. Food.Chem.*2002; 50:468-72.
3. Oyaizu M. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 1986; 35: 771-5.
4. Blois MS. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*.1958; 181:1199-1200.
5. Robak J., and Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharm.*1988; 37: 837-41.
6. Yuan X., Wang J.,and Yao H. Antioxidant activity of feruloyl oligosaccharide from wheat bran. *Food Chem.*2005; 90: 759-64.

รายละเอียดงานวิจัยที่ส่งเข้าร่วมเสนอผลงานในงาน The 2 nd International conference on natural products for health and beauty (NATPRO). December 2008. Phayao , Thailand

### Free radical scavenging and antioxidative properties of ethyl caffeate.

Churdsak Jaikang<sup>1</sup>, Chaiyavat Chaiyasut<sup>1</sup>, Paitoon Narongchai<sup>2</sup>, Siripun Narongchai<sup>2</sup> and Kanokporn Niwatananun<sup>1</sup>

1 Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai Thailand 50200

2 Department of Forensic Medicine Faculty of Medicine Chiang Mai University, Chiang Mai Thailand 50200

### Abstract

The aim of this study to investigate free radical and antioxidant properties of synthetic ethyl caffeate using in vitro assay system. Ethylcaffeate was synthesized by esterification among ethanol and caffeic acid. Ethyl caffeate was investigated for the free radical scavenging on 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH●) radical, superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydroxyl radical (OH●), nitric oxide radical (●NO) as well as ferric reducing ability of plasma (FRAP).  $\alpha$ - tocopherol, ascorbic acid and caffeic acid were used as the reference antioxidant compound. The inhibition concentration value (IC 50) of ethyl caffeate on DPPH●,  $O_2^{\bullet-}$ , OH●, and ●NO were 44.88, 144.45, 1.42 and 27.59  $\mu$ g/ml respectively. The reducing power increased in a dose response relationship. There results suggested that synthetic ethyl caffeate might be beneficial as a potent antiradical and antioxidant and can be applied to use in cosmetic and food industry.

## Introduction

Caffeic acid and its derivatives such as ethyl caffeate are widely distributed in the plant kingdom and found in coffee beans, olives, properlis, fruits and vegetables. They have attracted much attention and have been studied by many research groups for several properties such as antiviral, anti-inflammatory, antioxidative, immunostimulatory and neuroprotective properties. The aim of this study to investigate free radical and antioxidant properties of synthetic ethyl caffeate by using *in vitro* assay systems.

## Material and Methods

Ethyl caffeate was synthesized by esterification among ethanol and caffeic acid. The residue was purified using column chromatography and the structure confirmed by FT-IR, H<sup>1</sup>-NMR, C<sup>13</sup>-NMR, GC-MS and spectrophotometer.

1,1- Diphenyl 2- picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity was measured according to the method of Blois (1958). Superoxide anion scavenging activity was measured based on the described method by Robak and Gryglewski (1988). Superoxide radicals were generated in nicotinamide adenine dinucleotide, phenazine methosulphate (PMS-NADH) system by oxidation of NADH and assayed by reduction of nitroblue trtrazolium (NBT). Hydroxyl radical scavenging activity was measured by the compertition between deoxyribose and ethyl caffeate for the hydroxyl radicals generated from the Fe<sup>3+</sup>/ascorbate/EDTA/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. Nitric oxide scavenging was measured by generating nitric oxide from sodium nitroprusside and measured by Griess reation. The reducing power was measured by the method of Oyaizu (1986). IC 50 were calculated among percent of inhibition with concentration. **α**- tocopherol, ascorbic acid and caffeic acid were as the reference standard

### Statistical analysis

All data are arranged of triplicate analysis. The data were recorded as mean  $\pm$  SD.

### Results and discussions.

The structure of ethyl caffeate shown in fig.1.

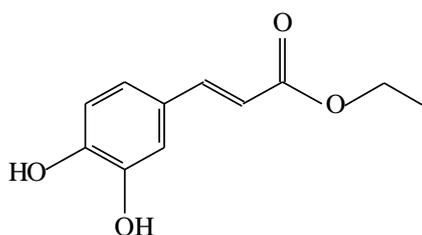


Fig.1. Ethyl caffeate structure

The inhibition concentration values (IC<sub>50</sub>) of ethyl caffeate for free radical scavenging are summarized in table 1. The reducing power and free radicals scavenging were increased in a dose response relationship shown in figure 2 and 3. The result clearly indicate ethyl caffeate exhibits strong antioxidant activity both in scavenging free radicals and antioxidation, as compared to that of the structure-related compound caffeic acid. These *in vitro* results also suggest the possible that ethyl caffeate could be effectively employed as an ingredient in health or functional food, to alleviate oxidative stress.

---

---

---

---

Substance/ radicals	DPPH	O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	OH <sup>•</sup>	.NO (μg/ml)
Ethyl caffeate	44.88	144.45	1.42	27.59
Caffeic acid	44.49	36.47	59.36	19.15
<b>α</b> - tocopherol	267.70	26.06	65.87	14.16
ascorbic acid	382.98	45.17	51.83	66.66

---

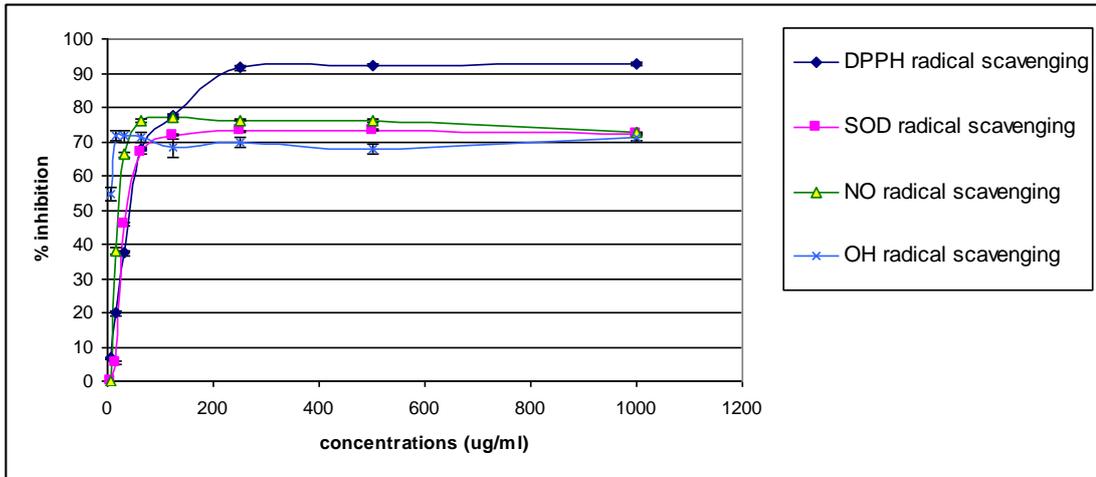


Fig 2. Free radicals scavenging of ethyl caffeate

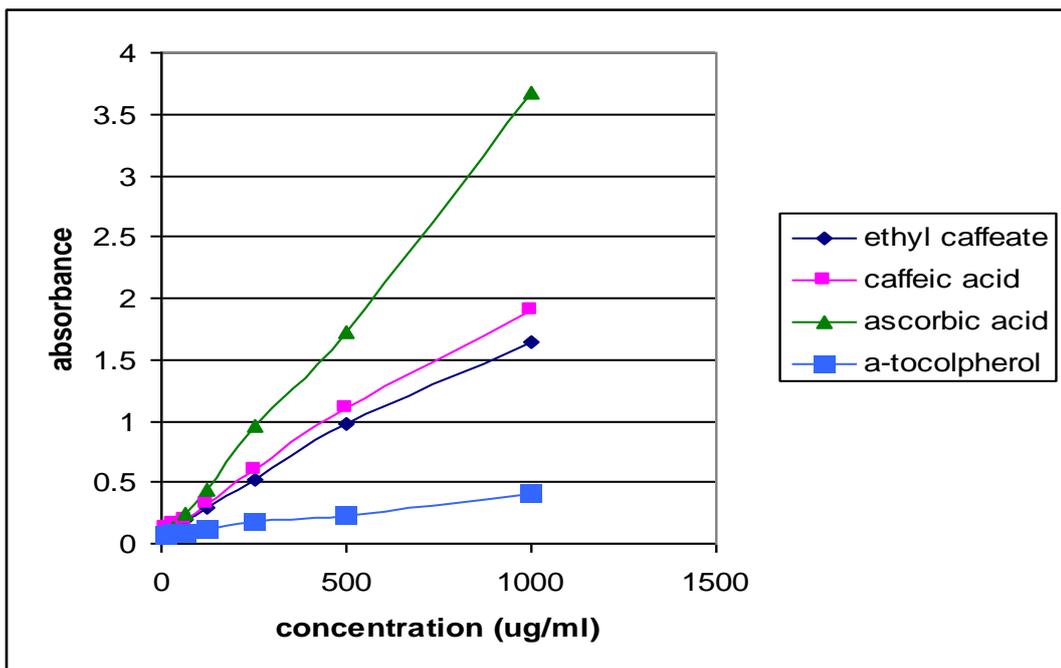


Fig 3. Reducing power of ethyl caffeate and standard references.

**References:**

1. Fiuza SM., Gomes C., Teixeira J., et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure-activity relationship study. Part1: Methyl, propyl and octyl ester of caffeic acid and gallic acid. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. 2004; 12: 3581-9.
2. Son S., and Lewis B. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J. Sgric. Food.Chem.*2002; 50:468-72.
3. Oyaizu M. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 1986; 35: 771-5.
4. Blois MS. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*.1958; 181:1199-1200.
5. Robak J., and Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharm.*1988; 37: 837-41.

Submitted manuscript ส่งไปเพื่อพิจารณาลงตีพิมพ์วารสาร Medicinal Chemistry (Impact factor 2009, 1.642)

**Inhibitory effects of caffeic acid ester analogues on free radicals and human liver microsome CYP1A2 activities**

Churdsak Jaikang<sup>1</sup>, Chaiyavat Chaiyasut<sup>1</sup>, Paitoon Narongchai<sup>2</sup>, Kanokporn Niwatananun<sup>3</sup>, Siripun Narongchai<sup>2</sup> and Winthana Kusirisin<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Thailand

<sup>2</sup>Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand.

<sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Care, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Thailand

<sup>4</sup>Department of Family Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand.

**ABSTRACT**

Ethyl caffeate (EC), octyl caffeate(OC), benzyl caffeate(BC) and phenethyl caffeate(PC) were synthesized and evaluated for scavenging of superoxide anion, nitric oxide radical and 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical(DPPH). Antioxidant activity was investigated with reducing power method. Pooled human liver microsome was used for investigating of effects on cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) catalytic activities by using phenacetin as a substrate. Dixon and Cornish-Bowden plots were used for enzyme kinetic analysis. The EC, OC, BC and PC potentially inhibited superoxide anion, nitric oxide and DPPH radicals. IC 50 values of superoxide anion scavenging of EC, OC, BC and PC were 16.42, 79.83, 123.69, and 123.69  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectively. EC was more potent than OC and BC in term of nitric oxide radical scavenger: IC 50 values of EC, OC and BC were 24.16, 37.34 and 52.64  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. In addition, the IC 50 values of EC, OC, BC and PC on DPPH radical scavenging were 70.00, 184.56, 285.34 and 866.54  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. The IC 50 values of EC, OC, BC and PC on phenacetin *O*-deethylation were 124.98, 111.86, 156.68 and 31.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. Enzyme kinetic showed that type of inhibition mechanism was mixed-type. The result of this study shows that caffeic acid ester analogues potentially scavenge free radicals and inhibit catalytic activity of CYP1A2. This may lead to important implication in prevention of CYP1A2-mediated chemical carcinogenesis.

**Keywords:** caffeic acid ester analogues, cancer chemoprevention, cytochrome P4501A2, enzyme inhibition, ethyl caffeate, free radical scavenging

## INTRODUCTION

Cancer is one of the most frequently found illness and that leading to death. Successful intervention strategies await experimentation. The majority of cancers result from exposure to carcinogenic agents from the environment such as chemicals, radiations and viruses. The elimination or avoiding exposure of environmental carcinogens is a basis of primary cancer prevention [1]. Most of the chemicals are not reactive substances, therefore activation by drug-metabolizing enzymes is required[2]. Cytochrome P450 (CYP) is the major enzymes that can activate procarcinogenic chemicals [3,4]. CYP1A2 is a drug-metabolizing enzyme found in human liver that can activate procarcinogen to carcinogen such as benzo[a]pyrene, heterocyclic amines and aflatoxin B1[5]. Activation of CYP1A2 activity may increase the carcinogenicity from procarcinogenic compound [6]. In various type of cancer chemopreventive agents including natural, synthetic or biological chemical agents, suppression of the expression of procarcinogen activating enzyme leading to inhibition of the initiation stage of chemically- induced carcinogenesis. Many naturally agents have shown chemopreventive and chemotherapeutic properties in variety of bioassay and animal models systems [7,8].

Reactive oxygen species (ROS) and free radicals are important factors in cellular injury and aging process. Under pathological conditions, ROS is over produced and results in oxidative stress. Imbalance between ROS and antioxidant defense mechanisms lead to oxidative modification in cellular membrane or intracellular molecule[9,10]. There are many reports regarding inhibitory effects of phenolic compounds on chemical mutagenesis and carcinogenesis processes [11-13].

Caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid) and its analogues are a naturally phenolic compound, which found in many fruits, vegetables, honeybee and herbs. It has

been reported that caffeic acid and its ester analogues such as caffeic acid phenethyl ester, ethyl caffeate are antimutagenic, anticarcinogenic, anti-inflammatory, tumor-suppressive properties and chemoprotection [14-17]. However, information about the effects of caffeic acid esters on chemoprevention is limited. The aim of this work was to characterize the effect of caffeic acid ester analogues on free radical scavenging and catalytic activity of cytochrome P4501A2 which are the mechanisms for preventing cancer initiation.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Materials**

Caffeic acid, nitroblue tetrazolium salt (NBT), sulphanilamide and phosphoric acid were purchased from MERCK. Ethanol, n-octanol, benzyl alcohol, phenethyl alcohol, DCC, boron trichloride, phenazine methosulphate (PMS), sodium nitroprusside, naphthyl ethyldiamine dihydrochloride, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, ferric chloride, DPPH, NADPH, NADP, NADH, glucose-6-phosphate and glucose-6-phosphate dehydrogenase were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Phenacetin and acetaminophen were obtained from Toxicology Section, Chiang Mai Medical Science Center, Chiang Mai, Thailand. All chemicals were analytical grade.

### **Synthesis of caffeic acid analogues**

Synthesis of caffeic acid ester was modified using method of Lee *et al* [18]. Briefly, caffeic acid was protected selectively at the hydroxyl groups of the aromatic ring by methylation to give the methoxyphenyl compound. The methyl-protected caffeic acid was transformed to the methyl caffeic acid ester by reaction with ethanol; n-octanol, benzyl alcohol and phenethyl alcohol followed by esterification with DCC/, method. Methyl-

caffeic acid esters were demethylated by  $\text{BCl}_3$  cleanly to give caffeic acid ester compounds. Structures of compounds were confirmed using MS, IR,  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$ . The structure of caffeic acid ester analogues are shown in Fig.1. Details of the structure of each caffeic acid ester analogues are shown below.

1. Ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenate, ethyl caffeate, EC

Yield: 60%. Mp: 149-151 °C (colourless powder)

FT-IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr): 3468.75, 3375.05, 2953.12, 2890.62, 1679.69, 1640.62, 1589.06;

$^1\text{H-NMR}$ ( 400 MHz, acetone  $-\text{d}_6$ );  $\delta$ : 8.21 (2H, br s), 7.46 (1H,d,  $J=16.1$  Hz), 7.11 (1H,d,  $J=2.0$  Hz) 7.03 (1H,dd,  $J=2.0, 8.3$  Hz), 6.87 (1H, d,  $J=7.8$  Hz), 6.27 (1H,d,  $J=16.1$  Hz), 4.17 (2H,q,  $J=7.3$  Hz), 1.25 (3H,t,  $J=7.3$  Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$ ; 126.2, 114.6, 144.1 146.6, 114.3, 121.1, 144.25, 114.4, 166.4, 59.3, 13.5 MS  $m/z$ : 208 ( $\text{M}^+$ ), 180(100%), 163, 134, 89, 77

2. Octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenate, n-octyl caffeate, OC

Yield: 45%, mp: 110-111°C (colourless powder)

FT-IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr): 3487.62, 3328.14, 2917.95, 2832.52, 1682.66, 1599.07, 1523.22

$^1\text{H-NMR}$ ( 400 MHz, acetone  $-\text{d}_6$ ); 8.41 (1H,s), 8.13 (1H,s), 7.54 (1H,d,  $J=16.1$  Hz), 7.15 (1H,d,  $J=2.0$  Hz), 7.03 (1H, dd,  $J=2.0, 8.1$  Hz), 6.86 (1H,d,  $J=8.1$  Hz , 6.28 (1H,d,  $J=16.0$  Hz), 4.13(2H,t,  $J=6.7$  Hz), 1.66 (2H,quint,  $J=6.7$  Hz), 1.45-1.14 (10H,m), 0.86 (3H,t,  $J=6.9$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ ; 167.3, 146.7, 145, 144.24, 126.4, 121.2, 114.7, 114.6, 113.4, 63.8, 32, 31.3, 25.6, 24.7, 24, 22.2, 13.5 MS  $m/z$ : 292 ( $\text{M}^+$ ), 193, 180 (100%), 163, 117

3. Phenylmethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenate , benzyl caffeate, BC

Yield: 40% mp 153-155°C colourless powder)

FT-IR  $\nu_{\max}$  (KBr): 3406.25, 3335.92, 1687.50, 1640.62, 1593.75, 1515.63

$^1\text{H-NMR}$ ( 400 MHz, acetone  $-\text{d}_6$ ); d: 8.31 (2H, br s), 7.58 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz), 7.45–7.28 (5H, m), 7.17 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz), 7.07, 7.06(1H, dd,  $J = 2.1, 8.1$  Hz), 6.86 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 6.34 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 5.21 (2H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ ; 167.2, 166.1, 146.8, 146.7, 144.2, 135.8, 128, 126.11, 125.99, 114.6 MS

$m/z$ : 270 ( $\text{M}^+$ , 100%), 179,163, 136, 117.

4. Phenylethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenate ,phenethyl caffeate,PC

Yield: 47% mp 153-155°C colourless powder

FT-IR  $\nu_{\max}$  (KBr): 3439.0, 3317.19, 2909.37, 2851.56, 1632.81, 1601.56, 1531.25,

1054.68  $^1\text{H-NMR}$ ( 400 MHz, acetone  $-\text{d}_6$ ); 7.58 (1H,d,  $J = 15.8$  Hz), 7.26-7.40 (5H, m), 7.06 (1H,d,  $J = 2.1$  Hz), 6.93 (1H,dd,  $J = 2.1, 8.1$  Hz), 6.79 (1H,d,  $J = 8.1$  Hz), 6.30 (1H,d,  $J = 15.8$  Hz) ,5.19 (2H,s), 5.04 (2H,broad)

### Superoxide radicals scavenging

Measurement of superoxide anion scavenging activity of CA and its analogues was measured following the method of Gülçin [19]. Superoxide radicals were generated in PMS-NADH system by oxidation of NADH and assayed by reduction of NBT. The superoxide radicals were generated in 3 ml of Tris-HCl buffer (16mM, pH 8.0) containing 1 ml of NBT (50 $\mu\text{M}$ ) solution, 1 ml NADH (78  $\mu\text{M}$ ) solution and various concentration of CA and its derivatives 100  $\mu\text{l}$ . The reaction was started by adding 1 ml of PMS solution

(10 $\mu$  M) to the mixture. The reaction mixture was incubated at 25 °C for 15 min and absorbance was measured at 560 nm. The percentage of inhibition of superoxide anion generation was calculated.

### **Nitric oxide radicals scavenging**

Nitric oxide scavenging activity was measured following the method of Govindarajan *et al* [20]. Briefly, the assay mixture contained 10 mM sodium nitroprusside in phosphate buffer and CA and its analogues in different concentrations were incubated at 25 °C for 150 min. Then 1.5 ml of the incubation solution was removed and diluted with 1.5 ml of Griess reagent (1% sulphanilamide, 2% phosphoric acid and 0.1% naphthyl ethylene diamine dihydrochloride). The absorbance of the chromophore formed during diazotization of the nitrite with sulphanilamide and subsequent coupling with naphthylethylene diamine was measured at 546 nm.

### **Reducing power**

The reducing power of extracts was determined by the method of Shon *et al* [21]. Different concentrations of extracts were mixed with 2.5 ml of phosphate buffer (200 mM, pH 6.6) and 2.5 ml of 1% potassium ferricyanide. The mixtures were incubated for 20 min at 50 C. After incubation, 2.5 ml of 10% trichloroacetic acid was added to the mixtures, followed by centrifugation at 650  $\times$  g for 10 min. The upper layer was mixed with distilled water and 0.1% ferric chloride, and then the absorbance of the resultant solution was

measured at 700 nm. Increasing of absorbance of the reaction mixture indicates increasing of reducing capacity.

### **DPPH radicals scavenging**

The stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was used for determination of free radical scavenging activity of caffeic acid ester analogues following the method of Banerjee *et al* [22]. Aqueous dilutions of caffeic acid ester analogues were added to 3 ml of 0.004% methanol solution of DPPH. Absorbance at 517 nm was determined after 30 min, and the percentage of inhibition was calculated.

### **Preparation of Human liver microsome**

Human liver samples (n=9) were obtained from donors who died from traffic accident within 4 hours. In accordance with Thai law, the research protocol was approved by Ethical Committee for Human Research, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. Liver microsomes were prepared by different centrifugation using a previously described method of Kusirisin *et al.*[23]. The microsome pellets were kept in Tris buffer pH 7.4 and stored at -80 °C until use. Protein contents were determined by bicinchonic acid (BCA) protein assay kit.

### **Determination of cytochrome P450 1A2 activity**

Phenacetin *O*-deethylation to acetaminophen was used to assess CYP1A2 activity. Incubation mixture of 1 ml contained 0.1 mg microsomal protein, 100 mM potassium phosphate pH7.4, 0.1mM EDTA, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, NADPH generating system (0.5 mM

NADP<sup>+</sup>, 20 mM NADPH, 2 mM glucose-6-phosphate, 1 IU/ml glucose -6-phosphate dehydrogenase), phenacetin (28-1,400 $\mu$ M) and caffeic acid amide analogues (0.025-0.25  $\mu$ g/ml). Reaction was stopped after 60 min by the addition of 200 $\mu$ l cooled methanol and 50  $\mu$ l of caffeine 100 $\mu$ g/ml was added as an internal standard. The mixtures were then centrifuged at 13,000 RPM for 5 min and the supernatant was injected into the analytical high performance liquid chromatography (HPLC). HPLC system consisted of an Agilent 1100 Series high- performance liquid chromatography, Agilent 1100 series diode- array detector. The HPLC pumps, autosampler, column oven, and diode- array system were monitored and controlled using the HP chemstation computer program (Agilent). A wavelength used for the identification of the diode array detector was at 253 nm. Acetaminophen was separated by water C18 column (250 $\times$ 4 mm, 5  $\mu$ m), column oven was set up at 25 $^{\circ}$ C. Isocratic elution was employed with mobile phase consisting of water: methanol: acetonitrile: tetrahydrofuran (55:20:20:5), with flow rate 0.7 ml/ min and the injection volume was 5  $\mu$ l.

### **Study of pharmacokinetic**

Different concentrations of phenacetin, ranging from 0.28 to 2.80 mM, were used in kinetic experiments for phenacetin *O*-deethylation by using human liver microsome as source of CYP1A2 enzyme. The type of the enzyme inhibition was analyzed by Dixon and Cornish-Bowden plots.

### **Statistic analysis**

Data was expressed as mean  $\pm$  S.D. of three values and analysed by one way ANOVA followed by Duncan. *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Superoxide anion radical scavenging

Superoxide is the one electron reduced from the oxygen molecule which produced by activated phagocytes. It is a precursor of hydrogen peroxide, hydroxyl radical and singlet oxygen that have the potential to react with macromolecules and induce tissue damages[24]. In the PMS-NADPH- NBT system, superoxide anion produced from dissolved oxygen from the coupling reaction of PMS-NADPH that reduced NBT. The decrease in absorbance at 560 nm with antioxidants indicates the consumption of superoxide anion in the reaction mixture[25]. Figure 2 shows the ability of caffeic acid ester analogues to inhibit superoxide radical generation when using caffeic acid, ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol as standards. The EC, OC, BC and PC demonstrated a concentration- dependent scavenging ability by neutralizing superoxide radicals with IC<sub>50</sub> values of 16.42, 79.83, 123.69 and 123.69  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. These results clearly indicate that caffeic acid ester analogues are potent scavenger of superoxide radicals in a dose-dependent manner.

### Nitric oxide scavenging

Recent studies have shown that reactive nitrogen intermediates, nitric oxide (NO), play an important role in inflammatory process and carcinogenic process [26]. Figure 3 presents the NO-scavenging effects on tested ester analogues of caffeic acid. All of the derivatives had NO-scavenging activity with dose- response curve in range 15.625 to 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The IC<sub>50</sub> values for NO- scavenging ability were calculated from the linear range to compare the potency of NO-scavenging. The order of potency considering from the IC<sub>50</sub> values was CAF>EC>OC>BC>PC by which the IC 50 value of EC, OC and BC were

24.16, 37.34 and 52.64  $\mu\text{g/ml}$  respectively. IC 50 value of PC was more than 1,000  $\mu\text{g/ml}$  because caffeic acid esters were not stable molecules [14, 17]. The results show that the small molecules of ester analogues of caffeic acid have high potential NO-scavenging due to its hydrophobicity properties.

### **Reducing Power**

The  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  transformation was investigated for measurement of the reducing ability. The reducing capacity of compound is significant indicator of its potential antioxidant activity[27]. Figure 4 shows the reductive capability of ester analogues of caffeic acid compared with ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol. Increasing of absorbance indicates the reducing power of the compounds. As shown in Fig4. The reducing potential of CAF ester analogues increased in a dose-response relationship and exhibited in the following order: ascorbic acid > EC > BC > CAF > OC > tocopherol > PC. It is reported that the antioxidant action is based on the breaking of the free radical chain by donating hydrogen atom or reacting with certain precursors of peroxide to prevent peroxide formation. The data presented here indicate that the marked reducing power of compounds seem to be the result of their antioxidant activity. It is presumed that ester analogues of CAF may act by donating hydrogen atom [14]and reacting with free radicals to convert them to more stable products and terminating the free radical chain reaction.

### **Scavenging of DPPH radical**

Determination of stable nitrogen radical, DPPH, is a simple method for evaluating free radical scavenging activity. DPPH radical can donate an electron or hydrogen radical and then transform to stable molecule. The maximum absorbance of stable DPPH in

ethanol was at 517 nm. Decreasing of the absorbance of DPPH radical causes from antioxidant activity, which results in the radical scavenging by hydrogen donation [28]. Figure 5 shows ability of Caffeic acid ester analogues to scavenge DPPH radical when compared with caffeic acid, ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol as standards. The potency of the scavenging activity of caffeic acid ester analogues on the DPPH radical are as followed: EC > OC > BC > PC with IC 50 values 70.00, 184.56, 285.34 and 866.54  $\mu\text{g/ml}$  respectively. The mechanism of DPPH radical scavenging may occur from 2, 3 double bond of caffeic acid which is the radical-targeting site [29]. This study found that the longer side chain or aromatic ring in side chain are less potent scavenger for DPPH radical than short side chain.

#### **Effects of caffeic acid ester derivatives on CYP1A2 activity**

The inhibition of CYP1A2 activity by ester analogues of caffeic acid was determined using phenacetin as a substrate. The amount of acetaminophen, the reaction product, was measured as the area under the curve by using HPLC. Caffeic acid ester analogues significantly inhibited the phenacetin *O* deethylation reaction. The IC<sub>50</sub> values of EC, OC, BC and PC were 124.98, 111.86, 156.68 and 31.05  $\mu\text{g/ml}$  and the maximal percent of inhibition of phenacetin *O*-deethylation were 77.97%, 43.31%, 55.48% and 78.77% respectively. The PC was the most potent inhibitor of CYP1A2 activity. Normally, CYP1A2 substrates contain planar ring that can fit the narrow and planar active site of the enzyme[5]. The PC structure consists of two benzene rings which can disturb active site of CYP1A2 enzyme. Beltrán-Ramírez and colleagues also reported that PC could decrease the enzyme activity of CYP1A1 and CYP1A2 and reduced carcinogen bioactivation.[30]

Dixon and Cornish-Bowden plots were chosen to study type of kinetic inhibition of each compound. Dixon and Cornish-Bowden plots were obtained by using different phenacetin

concentrations. According to Dixon plot (Fig.6) and Cornish-Bowden plot (Fig. 7), EC, OC, BC and PC showed mixed-inhibition on CYP1A2-mediated phenacetin O-deethylation activity.

Cytochrome P450s are the most important enzyme in the metabolism process of xenobiotics substances. The CYPs are significant source of reactive oxygen species such as superoxide anion and hydrogen peroxide. Inhibition of CYP1A2 activity may reduce carcinogens and free radical generation. Caffeic acid ester analogues possess free radical scavenging property and additionally inhibited procarcinogen activating enzyme that could be successful strategy for cancer chemoprevention. Further study *in vivo* and animal toxicity test need to be explored.

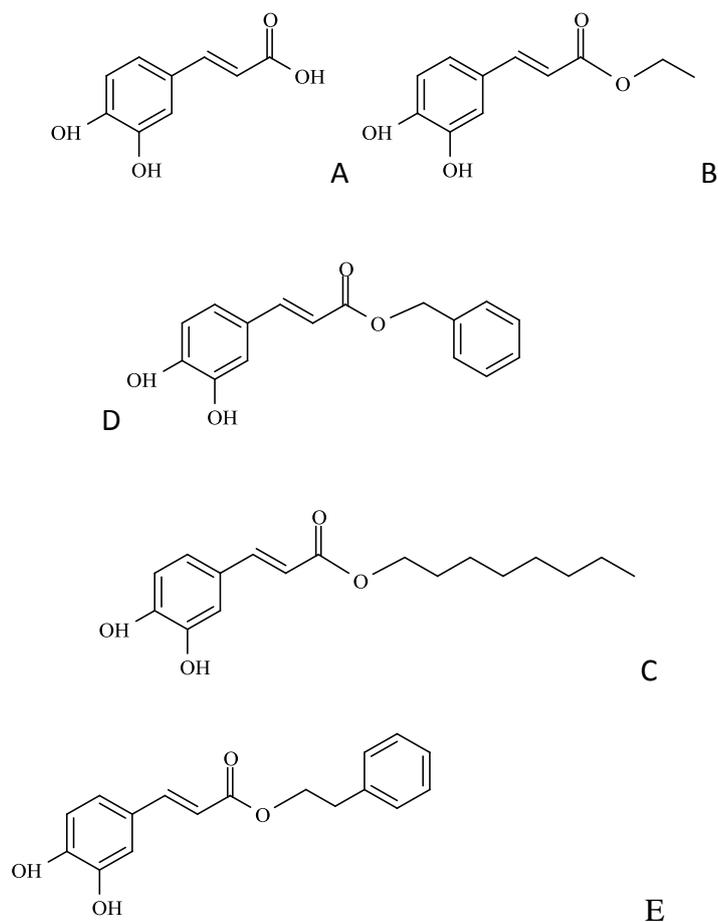
## **CONCLUSION**

EC, OC, BC and PC, caffeic acid esters analogues, were synthesized and evaluated in different free radical scavenging testing system for antioxidant power and inhibition of human liver CYP1A2 catalytic activity. The results show that caffeic acid esters analogues have potential to scavenge superoxide anion, nitric oxide, DPPH radical. Caffeic acid ester analogues possess potential antioxidant property and are potent inhibitors of CYP1A2 activity with mixed-inhibition type. These compounds may play an important role as free radical scavenger and inhibitor of procarcinogen activating enzyme for cancer chemoprevention.

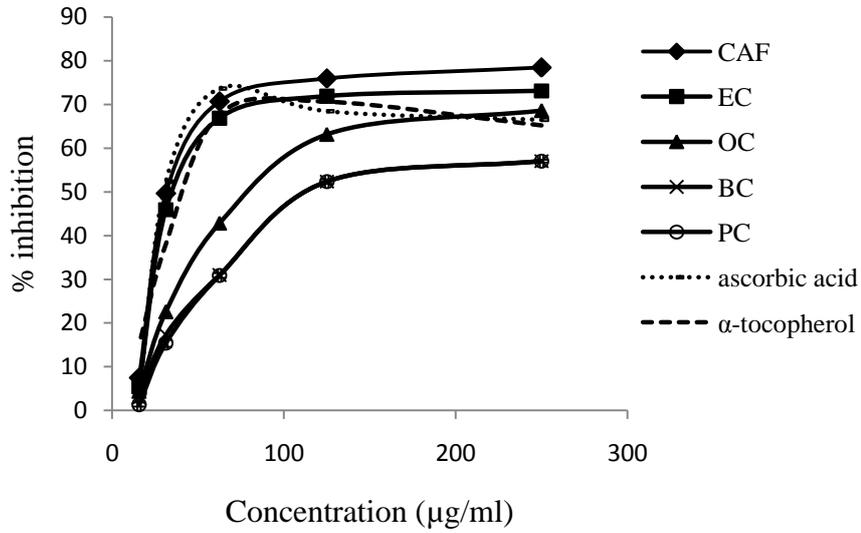
## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This research was supported by the Thailand Research Fund (DBG5080008), the Graduate School and Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Thailand. We are also

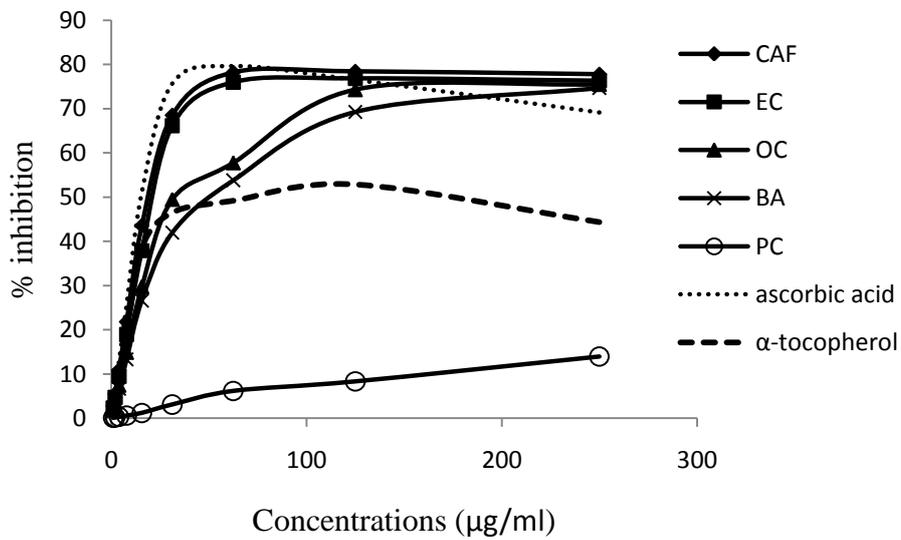
grateful for Toxicology section, Chiang Mai Medical Science Centre, Chiang Mai, Thailand  
for chemical and HPLC instruments.



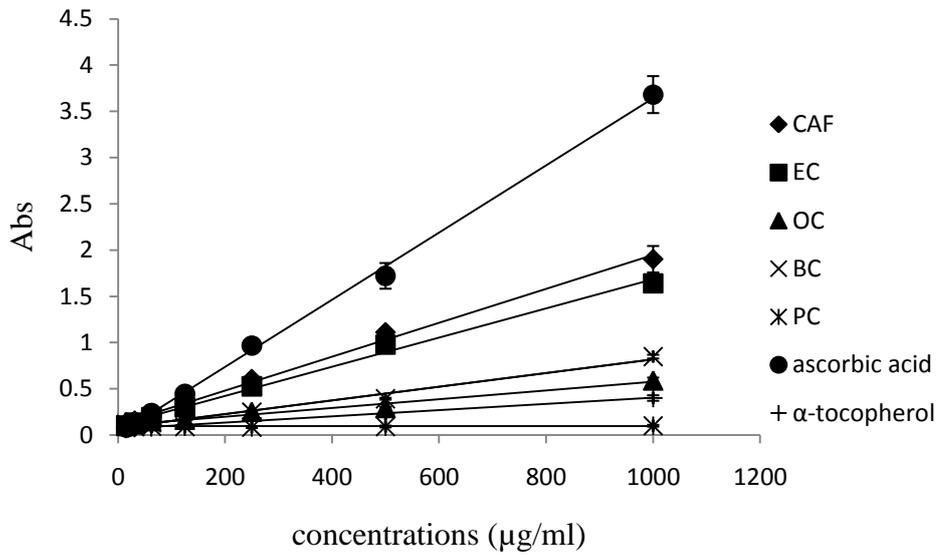
**Fig. (1).** The structure of caffeic acid ester analogues. A= Caffeic acid, B= Ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenoate (EC), C= Octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenoate (OC), D=Phenylmethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenoate (BC), E= Phenylethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenoate (PC)



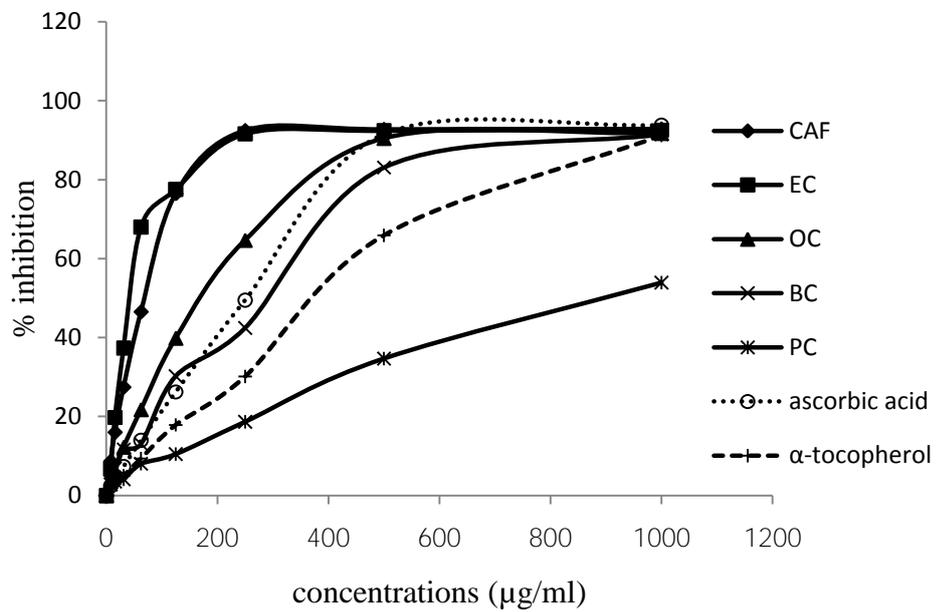
**Fig. (2).** Percent inhibition of caffeic acid esters on scavenging superoxide anion. The data shows the average values. Values are means of triplicate determination.



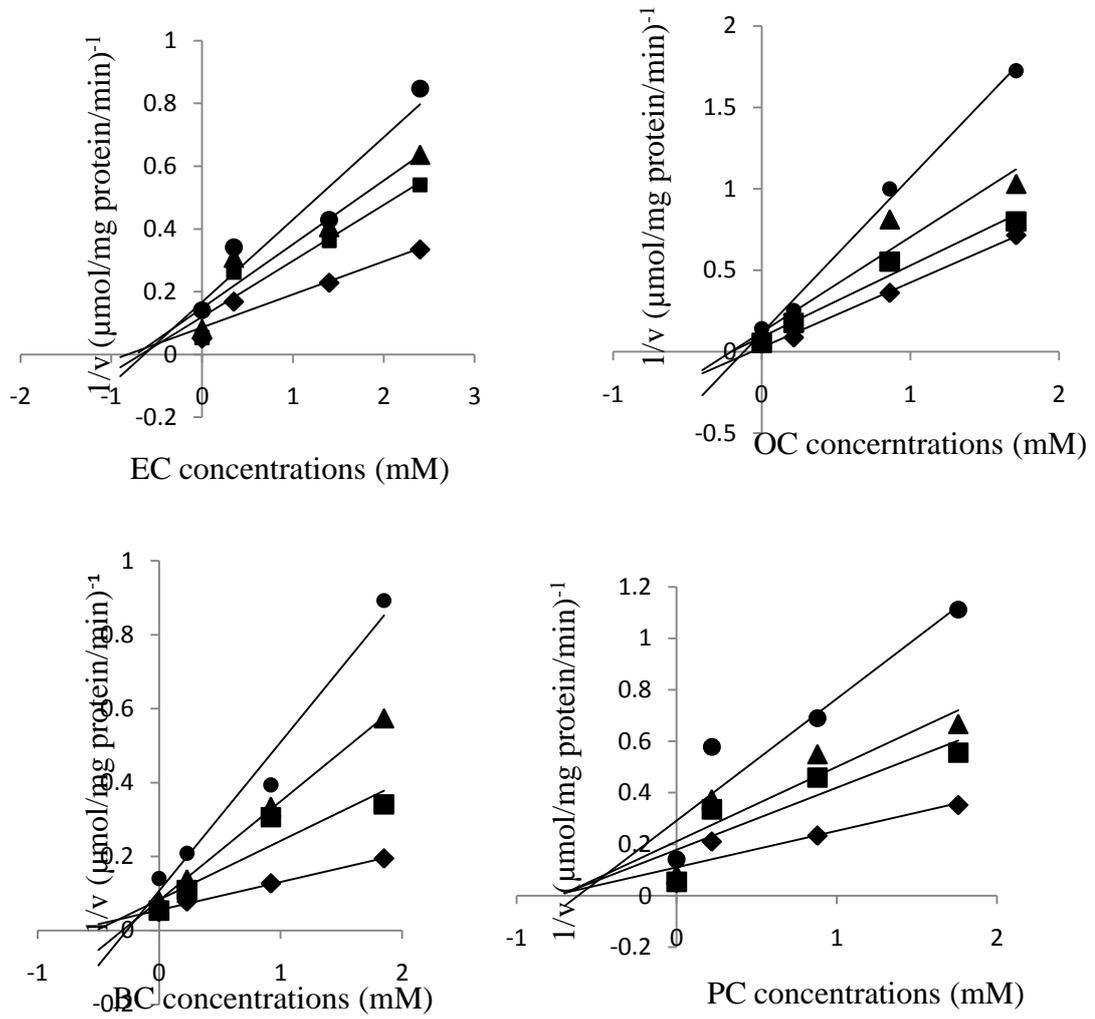
**Fig. (3).** Percent inhibition of caffeic acid esters on nitric oxide scavenging. The data shows the average values. Values are means of triplicate determination.



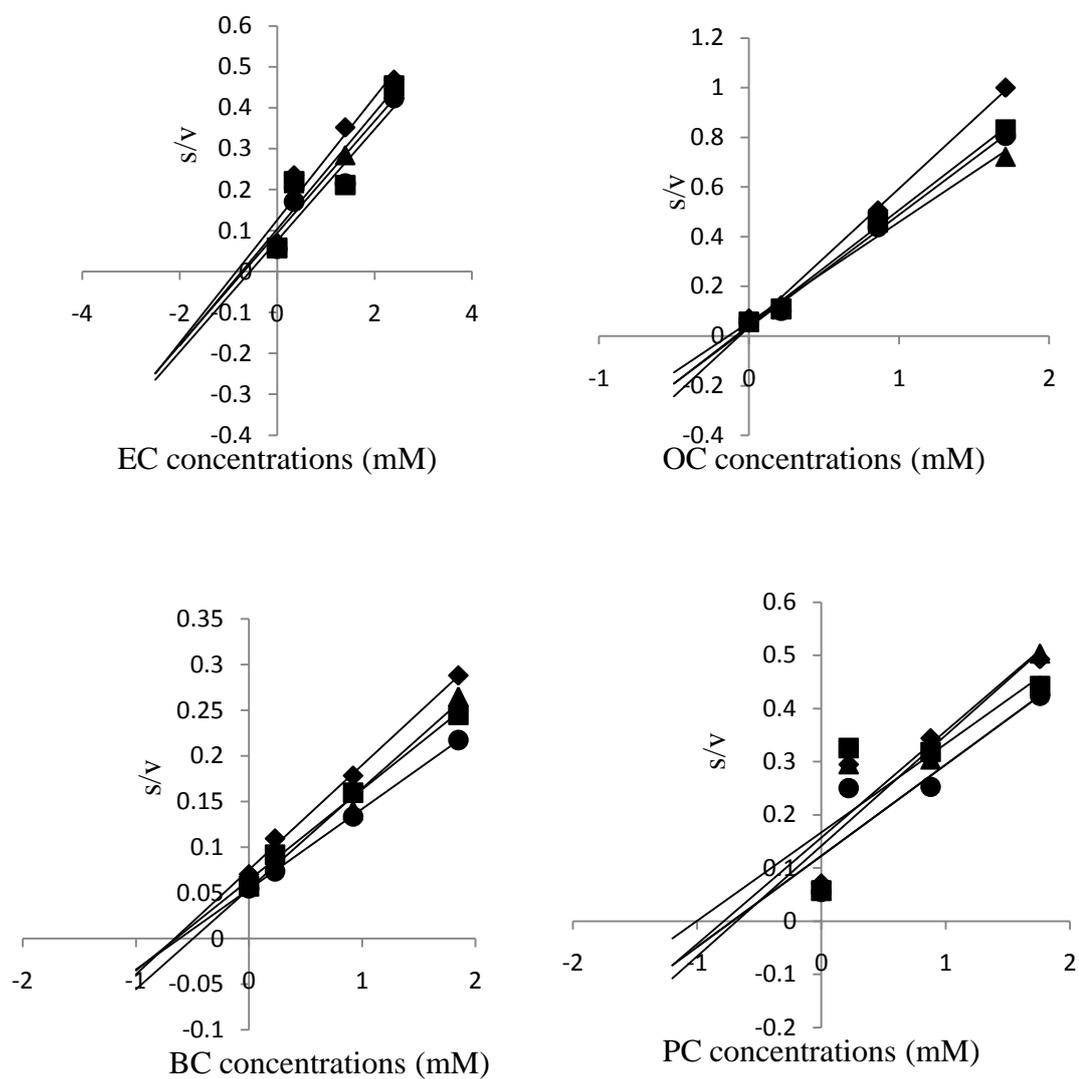
**Fig. (4).** Reducing power of caffeic acid ester. The data shows the average values. Values are means of triplicate determination



**Fig. (5).** DPPH radical scavenging of caffeic acid esters. The data shows the average values. Values are means of triplicate determination.



**Fig. (6).** Dixon plot between  $1/v$  and caffeic acid ester analogues concentrations (mM). Values are average of triplicate determinations.  $\blacklozenge$  = 1.4 mM,  $\blacksquare$  = 0.84 mM,  $\blacktriangle$  = 0.70 mM and  $\bullet$  = 0.50 mM of phenacetin concentrations.



**Fig. (7).** Cornish-Bowden plot between  $s/v$  and caffeic acid ester analogues concentrations (mM). Values are average of triplicate determinations. ◆ = 1.4 mM, ■ = 0.84 mM, ▲ = 0.70 mM and ● = 0.50 mM of phenacetin concentrations.

**REFERENCES**

- [1] Surh, Y. J. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res*, **1999**, *428*, 305-327.
- [2] Hashizume, T.; Yoshitomi, S.; Asahi, S.; Matsumura, S.; Chatani, F.; Oda, H. In vitro micronucleus test in HepG2 transformants expressing a series of human cytochrome P450 isoforms with chemicals requiring metabolic activation. *Mutat Res*, **2009**, *677*, 1-7.
- [3] Cheung, C.; Gonzalez, F.J. Humanized mouse lines and their application for prediction of human drug metabolism and toxicological risk assessment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2008**, *327*, 288-299.
- [4] Bozina, N.; Bradamante, V.; Lovric M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **2009**, *60*, 217-242.
- [5] Wang, B.; Zhou, S.F. Synthetic and natural compounds that interact with human cytochrome P450 1A2 and implications in drug development. *Curr. Med. Chem.*, **2009**, *16*, 4066-4218.
- [6] Zhou, S.F.; Chan, E.; Zhou, Z. W.; Xue, C. C.; Lai, X.; Duan, W. Insights into the structure, function, and regulation of human cytochrome P450 1A2. *Curr. Drug Metab.*, **2009**, *10*, 713-729.

- [7] Gao, S.; Hu, M. Bioavailability challenges associated with development of anti-cancer phenolics. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2010**, *10*, 550-567.
- [8] Jaganathan, S.K.; Mandal, M. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2009**, *2009*, 830616.
- [9] Manda, G.; Nechifor, M.T.; Neagu, T.M. Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. *Curr. Chem. Biol.*, **2009**, *3*, 342-366.
- [10] Choi, K.; Kim, J.; Kim, G.W.; Choi, C. Oxidative Stress-Induced Necrotic Cell Death via Mitochondria-Dependent Burst of Reactive Oxygen Species. *Curr. Neurovasc. Res.*, **2009**, *6*, 213-222.
- [11] Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. Current Understanding of Dietary Polyphenols and their Role in Health and Disease. *Curr. Nutr. Food Sci.*, **2009**, *5*, 249-263.
- [12] Kusirisin, W.; Srichairatanakool, S.; Lerttrakarnnon, P.; Lailerd, N.; Suttajit, M.; Jaikang, C.; Chaiyasut, C. Antioxidative activity, polyphenolic content and anti-glycation effect of some Thai medicinal plants traditionally used in diabetic patients. *Med. Chem.*, **2009**, *5*, 139-147.
- [13] Hirose, M.; Takahashi, S.; Ogawa, K.; Futakuchi, M.; Shirai, T.; Shibutani, M.; Uneyama, C.; Toyoda, K.; Iwata, H. Chemoprevention of heterocyclic amine- induced carcinogenesis by phenolic compounds in rats. *Cancer Lett.*, **1999**, *143*, 173-178.
- [14] Son, S.; Lewis, B.A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J. Agr. Food Chem.*, **2002**, *50*, 468-472

- [15] Jiang, R.W.; Lau, K. M.; Hon, P.M.; Mak, T.C.; Woo, K.S.; Fung, K.P. Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 237-246.
- [16] Uwai, K.; Osanai, Y.; Imaizumi, T.; Kanno, S.; Takeshita M.; Ishikawa, M. Inhibitory effect of the alkyl side chain of caffeic acid analogues on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages. *Bioorgan. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 7795-7803.
- [17] Jaikang, C.; Chaiyasut, C. Caffeic acid and its derivatives as heme oxygenase 1 inducer in Hep G2 cell line. *J. Med. Plants Res.*, **2010**, *4*, 940-946
- [18] Lee, Y.T.; Don, M.J.; Liao, C.H.; Chiou, H.W.; Chen, C.F.; Ho, L.K. Effects of phenolic acid esters and amides on stimulus-induced reactive oxygen species production in human neutrophils. *Clin. Chim. Acta*, **2005**, *352*, 135-141.
- [19] Gŭĭn, I.; Mshvildadze, V.; Gepdiremen, A.; Elias, R. Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* tuber. *Phytomedicine*, **2006**, *13*, 343-351.
- [20] Govindarajan, R.; Vijayakumar, M.; Rao, C.V.; Shirwaikar, A.; Rawat, A.K.; Mehrotra, S.; Pushpangadan, P. Antioxidant potential of *Anogeissus latifolia*. *Biol. Pharm. Bull.*, **2004**, *27*, 1266-1269.
- [21] Shon, M.Y.; Kim, T.H.; Sung, N.J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chem.*, **2003**, *82*, 593-597.
- [22] Banerjee, A.; Dasgupta, N.; De, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem.*, **2005**, *90*, 727-733.

- [23] Kusirisin, W.; Jaikang, C.; Chaiyasut, C.; Narongchai, P. Effect of polyphenolic compounds from *Solanum torvum* on plasma lipid peroxidation, superoxide anion and cytochrome P450 2E1 in human liver microsomes. *Med. Chem.*, **2009**, *5*, 583-588.
- [24] Taubert, D.; T. Breitenbach, A. Lazar, P. Censarek, S. Harlfinger, R. Berkels, W. Klaus and R. Roesen Reaction rate constants of superoxide scavenging by plant antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, **2003**, *35*, 1599-1607.
- [25] Ardestani, A.; Yazdanparast, R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.*, **2007**, *104*, 21-29.
- [26] Yen, G.C.; Lai, H.H.; Chou, H. Y. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. *Food Chem.*, **2001**, *74*, 471-478.
- [27] Hsu, B.; Coupar, I.M.; Ng, K. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chem.*, **2006**, *98*, 317-328.
- [28] Letelier, M.E.; Molina-Berfos, A.; Cortés-Troncoso, J.; Jara-Sandoval, J.; Holst, M. Palma, K.; Montoya, M.; Miranda, D.; González-Lira, V. DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules. *Toxicol. In Vitro*, **2008**, *22*, 279-286.
- [29] Moon, J.H.; Terao, J. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. *J. Agr. Food Chem.*, **1998**, *46*, 5062-5065.
- [30] Beltran-Ramirez, O.; Aleman-Lazarini, L.; Salcido-Neyoy, M.; Hernandez-Garcia, S.; Fattel-Fazenda, S.; Arce-Popoca, E.; Arellanes-Robledo, J.; Garcia-Roman, R.; Vazquez-Vazquez, P.; Sierra-Santoyo, A.; Villa-

Trevino, S. Evidence that the anticarcinogenic effect of caffeic acid phenethyl ester in the resistant hepatocyte model involves modifications of cytochrome P450. *Toxicol. Sci.*, **2008**, *104*, 100-106.

Submitted manuscript ส่งไปเพื่อพิจารณาลงตีพิมพ์ ในวารสาร Food Chemical Toxicology (impact factor 2.114; 2009)

**Inhibition of Procarcinogen activating enzyme CYP1A2 Activity and Free Radical Scavenging of Caffeic acid and its amide analogues**

Churdsak Jaikang<sup>a</sup>, Paitoon Narongchai<sup>b</sup>, Kanokporn Niwatananun<sup>c</sup>, Siripun Narongchai<sup>b</sup>  
and Chaiyavat Chaiyasut<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University,  
Chiang Mai, Thailand 50200

<sup>b</sup> Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang  
Mai, Thailand 50200

<sup>c</sup> Department of Pharmaceutical Care, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang  
Mai, Thailand 50200

**Corresponding author:** Chaiyavat Chaiyasut

Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy,

Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50200

*E-mail address:*chaiyavat@gmail.com.

Tel+66 53 944340; fax; +66 53 894163.

*Key words:* caffeic acid, caffeic acid amide analogues, free radical scavenging, CYP1A2, procarcinogen activating enzyme

**Abstract**

Caffeic acid (CAF) and its amide analogues, ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propen amide (EDPA), octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propen amide (ODPA), phenmethyl-(3',4'-dihydroxyphenyl) propen amide (PMDPA) and phenethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propen amide (PEDPA) were investigated for the inhibition of procarcinogen activating enzyme (CYP1A2), nitric oxide, superoxide anion, DPPH radical and hydroxyl radical scavenging activities. It was found that they inhibited CYP1A2 enzyme by uncompetitive inhibition. Apparent  $K_i$  values of CAF, EDPA, ODPA, PMDPA, PEDPA were 1.34, 0.68, 0.55, 1.77 and 0.53 nM, respectively. Moreover, they potentially scavenged nitric oxide radical with IC<sub>50</sub> values of 19.15, 45.77, 148.97, 59.12 and 79.11  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. The IC<sub>50</sub> values of superoxide anion scavenging were 36.47, 44.56, 728.27, 586.14, and 124.34  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Ability of them to DPPH radical scavenging shown IC<sub>50</sub> values were 74.49, 61.32, 245.11, 241.62 and 878.12  $\mu\text{g/ml}$  and hydroxyl radical scavenging *in vitro* model shown IC<sub>50</sub> values were 4.18, 4.36, 4.60, 4.63 and 4.84 ng/ml, respectively. Overall, caffeic acid and its amide analogues are an *in vitro* inhibitor of human CYP1A2 catalytic activity and free radical generation. They may useful to develop to potential cancer chemopreventive agent that block CYP1A2-mediated chemical carcinogenesis.

## 1. Introduction

Cytochrome P450 (CYP) is important phase I enzymes in the biotransformation of xenobiotics and their subsequent clearance from the body. Among of the different CYP isoform, cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) is constitutively expressed in human liver where it is capable of metabolizing and activating numerous promutagens. Many carcinogens and mutagens are activated by CYPs (Eaton et al., 1995; Guengerich and Shimada, 1991). CYP1A2 is an important enzyme in metabolism of xenobiotics and procarcinogens such as polycyclic aromatic hydrocarbon, nitrosamine, and aromatic and heterocyclic amines (Konstandi et al., 2006; Pavanello et al., 2007; Skupinska et al., 2009). Increasing of CYP1A2 activity can activate procarcinogen metabolism to reactive metabolite and therefore, elevate the risk of carcinogens development (Skupinska et al., 2009). High CYP1A2 activity has been suggested to be a susceptibility factor for lung, bladder and colon cancer where exposure to such compounds has been implicated in the a etiology of the disease (Pavanello et al., 2007). Moreover, The CYPs are also potentially a significant source of reactive oxygen species. Both superoxide anions and hydrogen peroxide can be formed during the metabolism of compounds by CYPs (Karuzina and Archakov, 1994; Puntarulo and Cederbaum, 1998; Stupans et al., 2002). Various natural and synthetic compounds are capable of reducing CYP1-mediated bioactivation of PAHs and thus may protect against carcinogenic potential of these chemicals (Sparfel et al., 2004). CYP1A2 was proposed as a target for cancer chemoprevention (Piton et al., 2005). Therefore, it is important to identify inhibitors of CYP1A2 that could be used to block the initiation stage of chemical carcinogenesis(Androutsopoulos et al., 2010).

Caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid, CAF) and its analogues are found in many agricultural products such as fruits, vegetables, wine, olive oil and coffee. They are usually found as various simple derivatives including amides, esters, sugar esters, and glycosides, and flavonoid- linked derivatives. The CAF and its analogues have been reported to possess wide spectrum biological effects such as antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, antiatherosclerotic, antioxidative, antiproliferative, immunostimulatory, neuroprotective properties (Son and Lewis, 2002) and induce phase 2 enzyme such as heme oxygenase-1 activity (Jaikang and Chaiyasut, 2010). There is widespread agreement that compounds especially from natural sources capable of protecting against ROS mediated damage may have potential applications as antioxidants in prevention and/or curing of diseases. However, synthetic antioxidants are widely used because they are effective and cheaper than natural types (Pinho et al., 2000). There are many researches to study of synthesized of CAF derivatives about antioxidant properties. However, the information of CAF on CYP1A2 catalytic activity is less to observe. Then, we evaluated the effects of caffeic acid and its analogues on CYP1A2 activity *in vitro* using phenacetin as a substrate and pooled human liver microsome as a source of CYP1A2 and studied free radical scavenging property for preventing cancer.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 .Chemicals and apparatus*

Caffeic acid amide analogues were obtained from Health product research Unit Faculty of Pharmacy Chiang Mai University, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, (DPPH), nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), Nitroblue tetrazolium (NBT), phenazine

methosulfate (PMS), dicyclohexyl carbodiimide (DCC), tetrahydrofuran, DMAP, caffeic acid, thiobarbitric acid (TBA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferrozine, nitro blue tetrazolium (NBT) and phenazonium methosulphate (PMS) were purchased from Sigma and Aldrich (St. Louis, MO). Other chemicals and solvents were purchased from Merck chemicals. Potassium ferricyanide, ferrous chloride, ferric chloride, methanol and trichloroacetic acid (TCA) were obtained from E. Merck (Darmstadt, Germany). Butylated hydroxytoluene (BHT), and butylated hydroxyanisole (BHA) were obtained from Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany). All other chemicals and solvents are of analytical grade.

## *2.2. Preparation of Human microsome*

Human liver samples (n=9) were obtained from subjects who died after traffic accident. In accordance with Thai law, Ethical Committee for Human Research was approved from Faculty of Medicine, Chiang Mai University through the Department of Forensic Medicine (protocol No. 06OCT131501). Liver microsomes were prepared by different centrifugation using a previously described method (Kusirisin et al., 2009). The microsome pellets were kept in Tris buffer pH 7.4 and stored at -70 °C until use. Protein contents were determined by bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit using bovine serum albumin as a substrate.

## *2.3. Determination of Human CYP1A2 activity*

Phenacetin *O*-deethylation was used to assess CYP1A2 activity. Incubation mixture of 1 ml contained 0.1 mg microsomal protein, 100 mM potassium phosphate pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, NADPH generating system (0.5 mM NADP<sup>+</sup>, 20 mM NADPH, 2

mM glucose-6-phosphate, 1 IU/ml glucose -6-phosphate dehydrogenase), phenacetin (0.2-2.8 mM) and caffeic acid amide analogues (0.025-0.25 µg/ml). Reaction was stopped after 60 mins by the addition of 200 µl cooled methanol and 50 µl of caffeine 100 µg/ ml was added as an internal standard. The mixtures were centrifuged at 13,000 RPM for 5 mins and the supernatant was filtrated and injected into the analytical high performance liquid chromatography (HPLC). HPLC systems consisted of an Agilent 1100 Series high-performance liquid chromatography, Agilent 1100 series diode- array detector, HPLC pumps, autosampler, column oven, and diode- array which the system were monitored and controlled by the HP chem. station computer program (Agilent). Wavelengths used for the identification of with the diode array detector at 253 nm. Acetaminophen was separated by water C18 column (250×4 mm, 5 µm), column oven was set up at 25°C. Mobile phase consisting of water: methanol: acetonitrile: tetrahydrofuran ( 55:20:20:5), with flow rate 0.7 ml/ min and the injection volume was 5 µl.

#### *2.4. Kinetic analysis of phenacetin O-deethylation in human liver microsome*

Six different concentrations of phenacetin, ranging from 0.28 to 2.80 mM, were used in kinetic experiments for phenacetin O-deethylation by Human liver microsome. Michaelis-Menten parameters for phenacetin O-deethylation were estimated by two enzyme kinetic approach. The results of the inhibition study were analyzed by Cornish-Bowden and Dixon plots to determine type of inhibition and value of the inhibitory constant (K<sub>i</sub>).

#### *2.5. Nitric oxide radical scavenging activity*

Nitric oxide scavenging activity was measured following the method described by (Govindarajan et al., 2004). Briefly, the mixture contained 10 mM sodium nitroprusside in phosphate buffer and CAF and its analogues of different concentration were incubated at 25

°C for 150 min. Then 1.5 ml of the incubation solution were removed and diluted with 1.5 ml of Griess reagent (1% sulphanilamide, 2% phosphoric acid and 0.1% naphthyl ethylene diamine dihydrochloride). The absorbance of the chromophore formed during diazotization of the nitrite with sulphanilamide and subsequent coupling with naphthylethylene diamine was measured at 546 nm.

#### *2.6. Superoxide radical scavenging activity*

Measurement of superoxide anion scavenging activity of CA and its analogues was measured following (Gulcin, 2006). Superoxide radicals are generated in PMS-NADH system by oxidation of NADH and assayed by reduction of NBT. The superoxide radicals were generated in 3 ml of Tris-HCl buffer (16mM, pH 8.0) containing 1 ml of NBT (50µM) solution, 1 ml NADH (78 µM) solution and various concentration of CAF and its derivatives 100 µl. The reaction was started by adding 1 ml of PMS solution (10µ M) to the mixture. The reaction mixture was incubated at 25 °C for 15 min and absorbance was measured at 560 nm. The inhibition percentage of superoxide anion generation was calculated.

#### *2.7. Scavenging of DPPH radical*

The stable DPPH was used for determination of free radical scavenging activity of CAF and its derivatives following the method of (Banerjee *et al.*, 2005). Aqueous dilution of CA and its analogues was added to 3 ml of 0.004% methanol solution of DPPH. Absorbance at 517 nm was determined after 30 mins, and the percent of inhibition was calculated.

### 2.8. Hydroxyl radical scavenging activity

The assay was based on the competition between deoxyribose and test compounds for hydroxyl radical generated by  $\text{Fe}^{3+}$ -ascorbate-EDTA- $\text{H}_2\text{O}_2$  system (Fenton reaction) according to the method of (Halliwell et al., 1987). One millilitre of the final reaction solution consisted of aliquots of various concentrations of CAF and its analogues, 1 mM  $\text{FeCl}_3$ , 1mM EDTA, 20mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1mM L-ascorbic acid, and 30 mM deoxyribose in potassium phosphate buffer pH 7.4. The reaction mixture was incubated for 1 h at 37°C, and further heated in a boiling water bath for 15 mins after addition of 1 ml of 2.8% (w/v) trichloroacetic acid and 1 ml of 1% (w/v) 2-thiobarbituric acid. The color development was measured at 532 nm.

### 2.9. Statistical analysis

Data was expressed as mean  $\pm$  S.D. of five values and analysed by one way ANOVA followed by Duncan. *P* values of less than 0.05 were considered statically significant.

## 3. Results

Caffeic acid amide analogues in this study were ethyl 1-(3', 4'-dihydroxyphenyl) propenamide (EDPA), octyl 1-(3', 4'-dihydroxyphenyl) propenamide (ODPA), phenmethyl 1-(3', 4'-dihydroxyphenyl) propenamide (PMDPA) and phenethyl 1-(3', 4'-dihydroxyphenyl) propenamide (PEDPA) and all structures shown in Fig. 1.

### 3.1. The effects of caffeic acid and its amide derivatives on phenacetin *O*-deethylation in human liver microsome

The mean values of percent inhibition of 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of CAF, EDPA, ODPA, PMDPA and PEDPA when using 1.4  $\mu\text{M}$  of phenacetin were 45.38, 96.65, 81.92, 93.74 and 90.60 respectively. Among the CAF and its derivatives studied, EDPA and PMDPA were

more strongly inhibited phenacetin *O*-deethylation in a concentration-dependent manner. Mean IC<sub>50</sub> values of caffeic acid and its amide analogues were shown in Table 1.

According to characterization of the inhibition kinetic of CYP1A2, which was obtained from Cornish-Bowden (Fig.2) and Dixon plots (Fig.3), all plots indicated that CAF and its amide analogues inhibited phenacetin *O*-deethylation by uncompetitive inhibition. The *K<sub>i</sub>* values of caffeic acid and its analogues were obtained from liner regression. EDPA had the lowest *K<sub>i</sub>* value (0.124  $\mu$ M), whereas *K<sub>i</sub>* value of PEDPA, CAF, ODPa, and PMDPA were 0.143, 1.148, 0.25 and 0.439  $\mu$ M respectively.

### 3.2. Nitric oxide scavenging activity

Nitric oxide (NO) is an important chemical generated by macrophage, endothelial cells, and neurons and is involved in the regulation of various physiological processes. Excess concentration of NO is associated with several diseases. Moreover, NO can react with superoxide to form the peroxynitrite anion, which is a potential strong oxidant that can decompose to hydroxyl radical and nitrous oxide (Awah et al., 2010). Effect of caffeic acid and its amide derivatives were used to inhibit NO released from sodium nitroprusside as shown in Fig. 4. IC<sub>50</sub> scavenging of nitric oxide of CAF, EDPA, ODPa, PMDPA, PEDPA were 19.15, 45.77, 148.97, 59.12 and 79.11  $\mu$ g/ml, respectively.

### 3.3. Superoxide radical scavenging activity

The superoxide radical is a highly toxic radical which generated by biological and photochemical reactions. In the PMS-NADH-NBT system, superoxide anions were derived from dissolved oxygen by the PMS-NADH coupling reaction and could reduce to NBT (Hseu et al., 2008). The percentage inhibition of superoxide radical generation by caffeic

acid and its amide derivatives compared with ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol was shown in Fig. 5. Our results indicated that caffeic acid and its amide derivatives scavenge superoxide radical, which was decreased in the order, CAF>EDPA>PEDPA>PMDPA>ODPA with IC 50 value 36.47, 44.56, 124.34, 586.14 and 728.27 $\mu$ g/ml respectively.

#### *3.4. Scavenging of DPPH radical*

DPPH is a stable nitrogen free radical compound that has been used to determine the free radical-scavenging ability of samples (Su et al., 2008). DPPH colour decreased significantly when exposing hydrogen atom or electron. The DPPH free radical-scavenging activities of caffeic acid, amide derivatives and standards were presented in Fig. 6. The CAF and its amide derivatives showed a variation of IC50 ranging from 61.32 to 878.12  $\mu$ g/ml. The EDPA was found the most powerful DPPH radical scavenging as evidenced by low IC50 values. Their scavenging activity of DPPH radicals decreased in the following order: EDPA> CAF > PMDPA> ODPA > PEDPA with IC 50 value of 61.32, 74.49, 241.62, 245.11, and 878.12  $\mu$ g/ml, respectively.

#### *3.5. Hydroxyl radical scavenging activity*

Hydroxyl radicals are the most reactive and can induce severe damage to the biomolecules. Competition between deoxyribose and the sample against hydroxyl radical generated from the Fe<sup>3+</sup>/ ascorbate/ EDTA/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system was measured for determination of hydroxyl radical scavenging activity. Fig.7. shown the ability of caffeic acid and its amide derivatives at different concentrations to scavenge hydroxyl radical compared with ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol as standards. The IC 50 shown that CAF was the highest hydroxyl

radical inhibition ( 4.18 ng/ ml). Whereas, IC<sub>50</sub> of EDPA, ODPa, PMDPA and PEDPA were 4.36, 4.60, 4.63 and 4.84 ng/ ml, respectively.

#### **4. Discussion**

Caffeic acid and its analogues are widely used as antioxidants. They have been reported to exert a variety of beneficial and harmful effects. This study, we added to the beneficial data by evaluating CAF and its amide analogues for their ability to inhibit activity of procarcinogen activating enzyme (CYP1A2) activity in pooled human liver microsome and free radical scavenging properties. The modulation of CYPs would be important from a clinical point of view, as these enzymes can activate or inactivate xenobiotics, including therapeutic agents (Yoo et al., 2007). Many carcinogens and mutagens are activated by CYPs (Eaton et al., 1995; Guengerich and Shimada, 1991). The CYP1A2 is a primary metabolism of various foods, drugs such as acetaminophen, theophylline, quinolone, mexiletine (Abd El-Aty et al., 2008). CYP1A2 is carcinogen activating enzymes and also can produce free radicals (Kim et al., 2008). Ryu and Chung, (2003) showed that the long term consume of dietary supplement, gingo biloba can induce CYP1A2 activity levels which may increase the incidence of colorectal cancers caused by procarcinogens activated by CYP1A2. Previous studied have shown that hydrocinnamic acid such as chlorogenic acid, caffeic acid and ferrulic acid inhibited CYP1A2 when using methoxyresorufin *O*-demethylation and hamsters liver microsome (Teel and Huynh, 1998). In this study, we demonstrated that CAF and its amide analogues significantly inhibited CYP1A2 enzyme in human liver microsome with low micromolar K<sub>i</sub> values. The type of mechanism inhibition of CYP1A2 was incompetitive inhibition. The results suggested that CAF and its analogues are bind with enzyme substrate complexes which do not change to products. Moreover, CAF and its amide analogues inactivation of CYP1A2 was time- and concentration-

dependent and required NADPH. CYP1A2 enzyme is composed of hydrophobic and aromatic amino acids with polar amino acids for hydrogen bonding being present near the heme centre (Korhonen et al., 2005) and CYP activities are related to substance lipophilicity (Lewis, 2004). It is possible that hydrogen bonding and hydrophobic interaction contribute to the inhibitory activities. The substances which have an *ortho*-or *para*- hydroxyl group can potent inhibit CYP1A2 (Appiah-Opong et al., 2008). The CAF and its amide analogues consisted two hydroxyl groups in *meta* and *para* position and benzene ring especially PMDPA and PEDPA which have two benzene rings. Then, they have high power to inhibit the CYP1A2 activities than CAF that is parent compound. The ODPA has long carbon side chain which cause more lipophilicity than CAF and EDPA. Therefore, the ODPA is more potent CYP 1A2 inhibitor than CAF and EDPA.

Several chemopreventive agents are known as mechanism-based inactivators of CYPs (Chun et al., 2001). CAF and its analogues inhibited CYP1A2 activity which may reduce of procarcinogenic substrate metabolism. Therefore, its modulation can dramatically decrease the compound's toxicity and carcinogenesis. Kuenzig et al., (1984) showed CAF and ferrulic acid could react with nitrite in vitro and blocked the elevation of serum *N*-nitrosodiumthymine levels in rats which play a role in the body's defence against carcinogenesis.

Oxygen activation by CYP can also result in the production of reactive oxygen species (ROS). Superoxide anion radical can be produced from decomposition of the oxygenated CYP complex, while hydrogen peroxide can be formed either from the dismutation of superoxide anion or the decomposition of the peroxy CYP complex. Free radicals are produced by endogenous and exogenous chemicals metabolic processes in

human cells. Oxidative stress, the result of increasing oxidative metabolism, produces ROS such as hydroxyl radical (OH•), superoxide anion radical (O<sub>2</sub>•) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which can damage various substrates including lipid, proteins and nucleic acid and lead to cancer, cardiovascular disease, and related macular degeneration and to aging. Human body has multiple mechanisms especially enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems to protect the cellular molecules against ROS induced damage (Bebianno et al., 2005; Ognjanovic et al., 2010; Sun, 1990). However the innate defense may not be enough for severe or continued oxidative stress. Hence, certain amounts of exogenous antioxidants are constantly required to maintain an adequate level of antioxidants in order to balance the ROS in human body. Antioxidants are vital substances which possess the ability to protect the body from damage caused by free radical induced oxidative stress (Ozsoy et al., 2008). There is an increasing interest in natural antioxidants, e.g. polyphenols, present in medicinal and dietary plants, which might help prevent oxidative damage (Lee et al., 2003; Pacifico et al., 2009; Shaker et al., 2010).

There is widespread agreement that compounds, especially from natural sources capable of protecting against ROS mediated damage, may have potential applications as antioxidants in prevention and/or curing of diseases. However, synthetic antioxidants are widely used because they are effective and cheaper than natural types. This experiment shows that amide analogues of CAF have more potential to scavenge free radicals than CAF due to amide analogues contain three hydrogens that can donate hydrogen to reactive oxygen species but caffeic acid are two hydrogens donating (Son and Lewis, 2002). Then, CAF and amide analogues potentially inhibited procarcinogen activating enzyme and free radical scavenging that could be apply for primary cancer chemoprevention. In the future, toxicity test and side effects should be evaluated.

## **5. Conclusion**

Our results clearly show that the caffeic acid and its amide analogues have high potential to inhibit CYP1A2 using phenacetin as a substrate and human liver microsome as a source of CYP1A2 enzyme. The type of inhibition of CAF and its amide analogues are uncompetitive inhibition. Free radical such as nitric oxide, super oxide radical, hydroxyl radical and DPPH radical were evaluated for the scavenging properties. The CAF and its amide analogues exhibit strong scavenging free radicals properties. From these evidents, the CAF and its amides analogues may use as chemopreventing agents.

## **6. Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

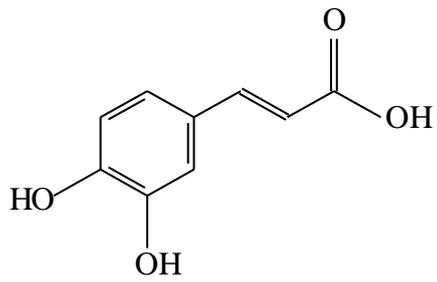
## **Acknowledge ment**

This work was supported by grants from the Thailand Research Fund (DBG5080008), the Graduate School and Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University Thailand. We also thank Toxicology section, Chiang Mai regional Medical Science centre for HPLC instruments and chemicals.

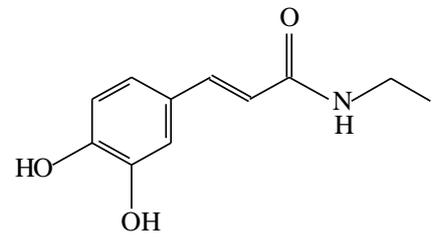
Table. 1 Kinetic parameters of phenacetin O-deethylation.

Substances	* $K_{\max}^{\text{app}}$	* $V_{\max}^{\text{app}}$ ( $\mu\text{g/ml/mg}$ protein/h) <sup>-1</sup>	Ki (nM)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	Type of inhibition
CAF	2.37	2.37	1.34	0.282	Noncompetitive inhibition
EDPA	1.59	20.57	0.68	0.318	Noncompetitive inhibition
ODPA	1.29	31.15	0.55	0.297	Noncompetitive inhibition
PMDPA	3.09	19.57	1.77	0.394	Noncompetitive inhibition
PEDPA	0.41	19.23	0.53	0.253	Noncompetitive inhibition

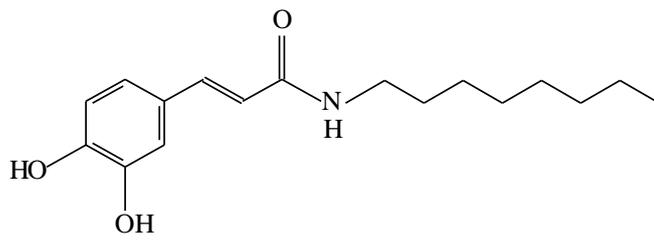
\*Calculation of  $K_{\max}^{\text{app}}$  and  $V_{\max}^{\text{app}}$  used 1.4  $\mu\text{M}$  phenacetin



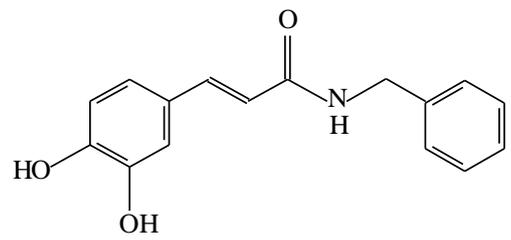
Caffeic acid



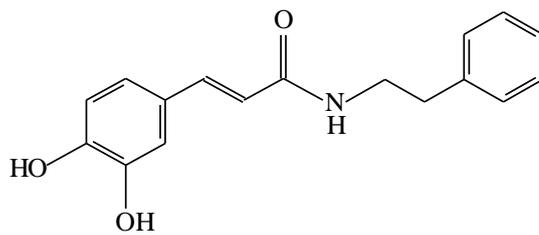
EDPA



ODPD



PMDPA



PEDPA

Figure 1. The structure of caffeic acid and its amide analogues.

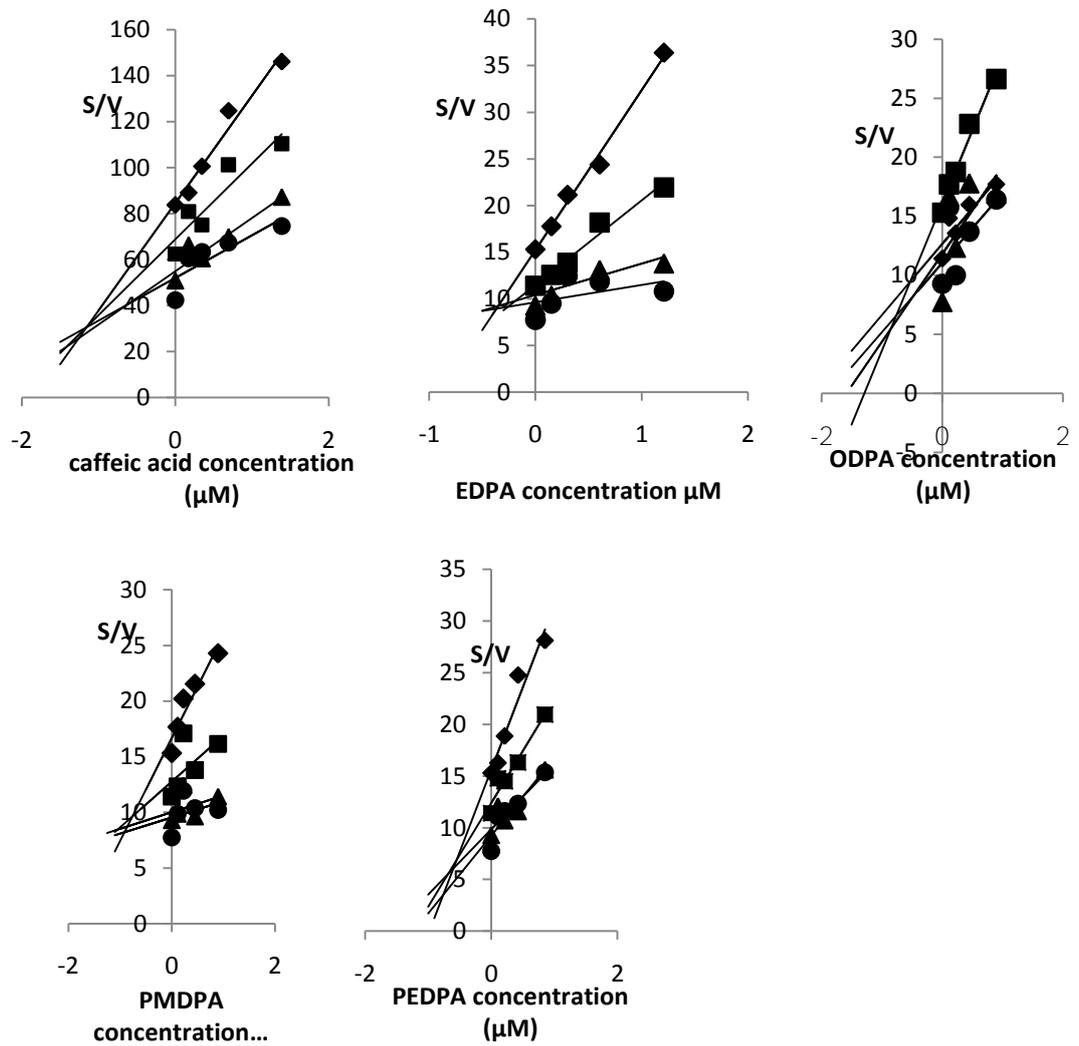


Figure 2 Cornish- Bowden plot of CAF and its derivatives on phenacetin *O*-deethylation when phenacetin concentration were  $\blacklozenge$  2.8 mM,  $\blacksquare$  1.4 mM,  $\blacktriangle$  0.72 mM,  $\bullet$  0.56 mM.

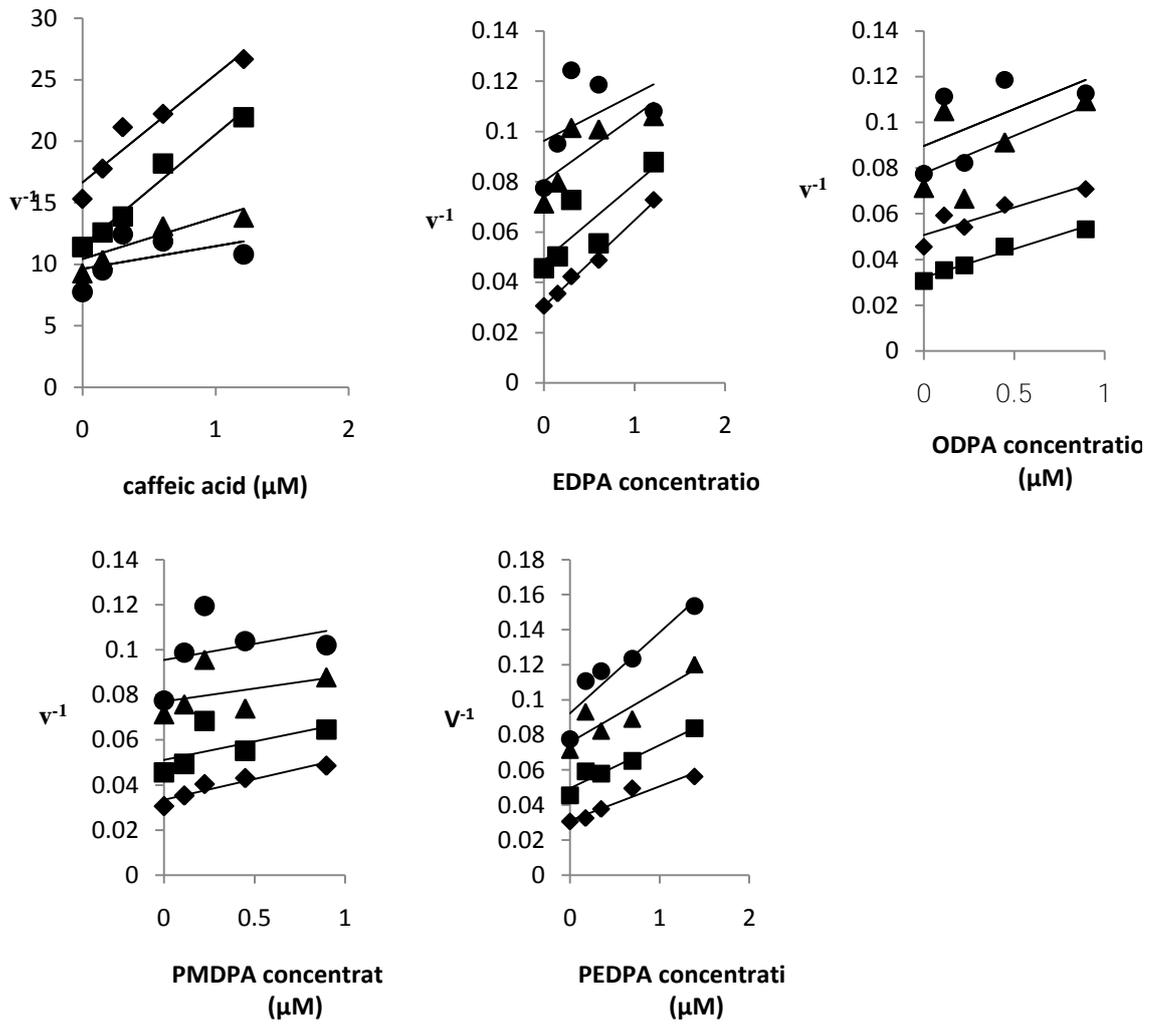


Figure. 3 Dixon plot of caffeic acid and its derivatives on phenacetin *O*-deethylation when phenacetin concentration were  $\blacklozenge$  2.8 mM,  $\blacksquare$  1.4 mM,  $\blacktriangle$  0.72 mM,  $\bullet$  0.56 mM.

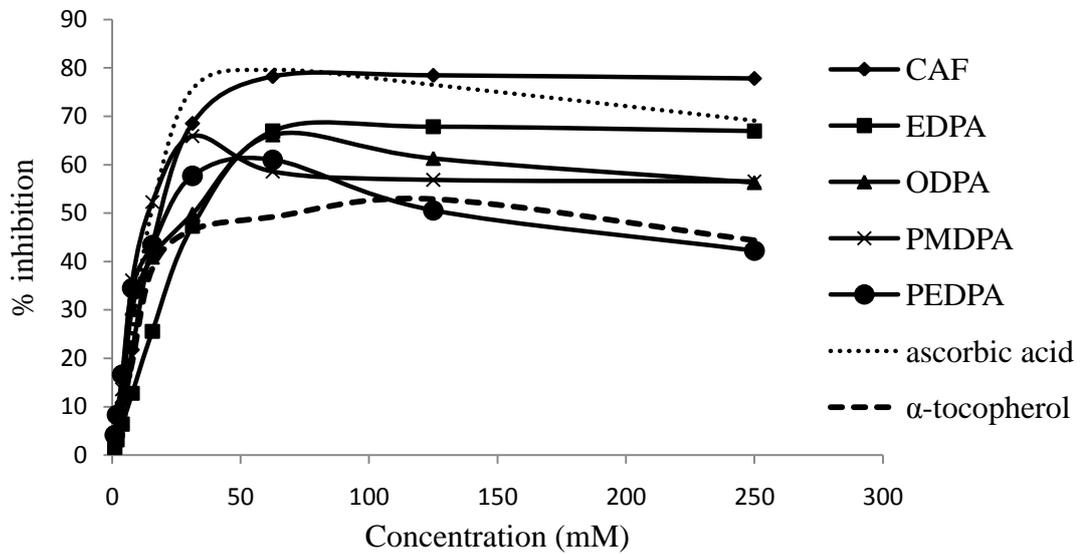


Figure. 4 Percent inhibition of nitric oxide of CAF and its amide analogues.

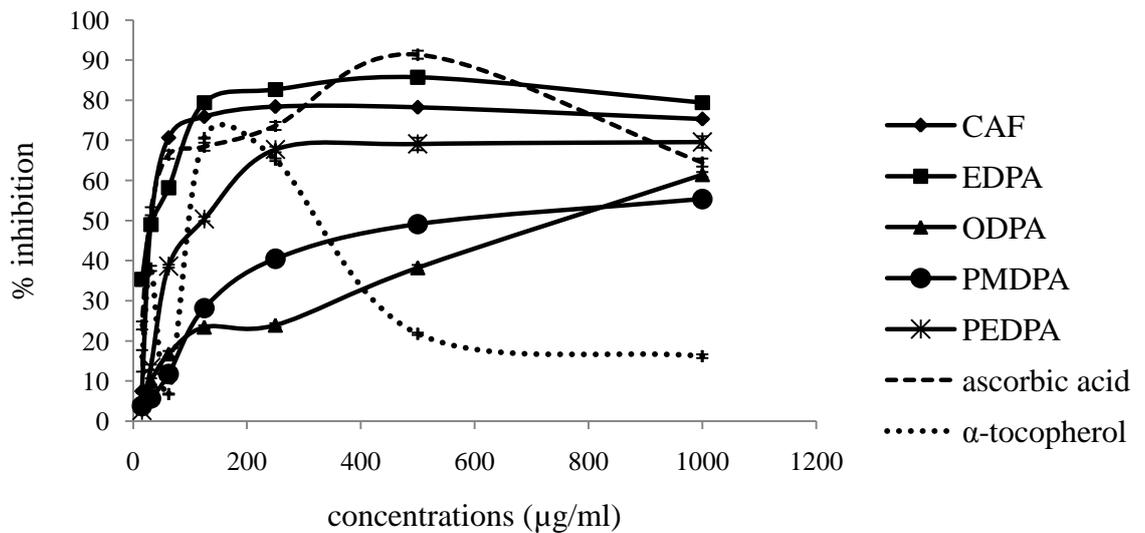


Figure.5 Superoxide radical scavenging activities of CAF and its amide analogues.

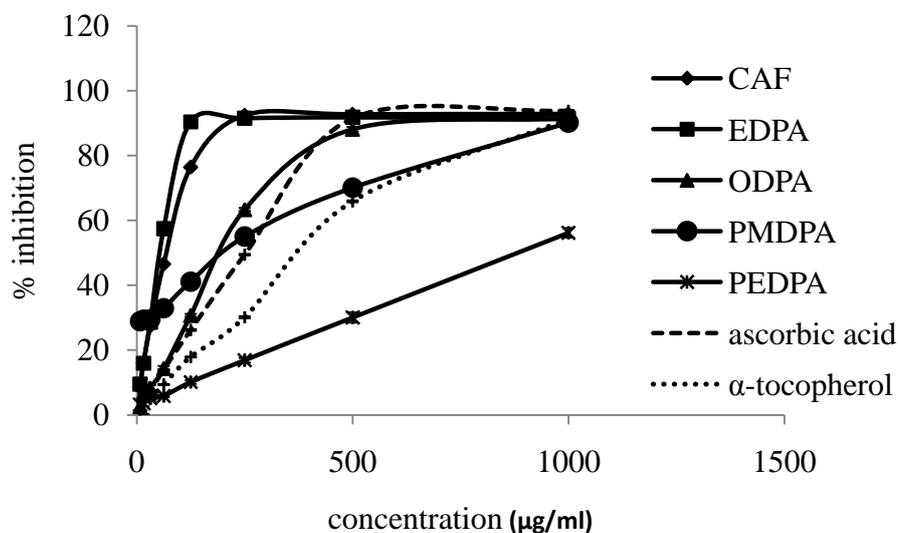


Figure. 6 Percent inhibition of DPPH radical by CAF and its amide analogues.

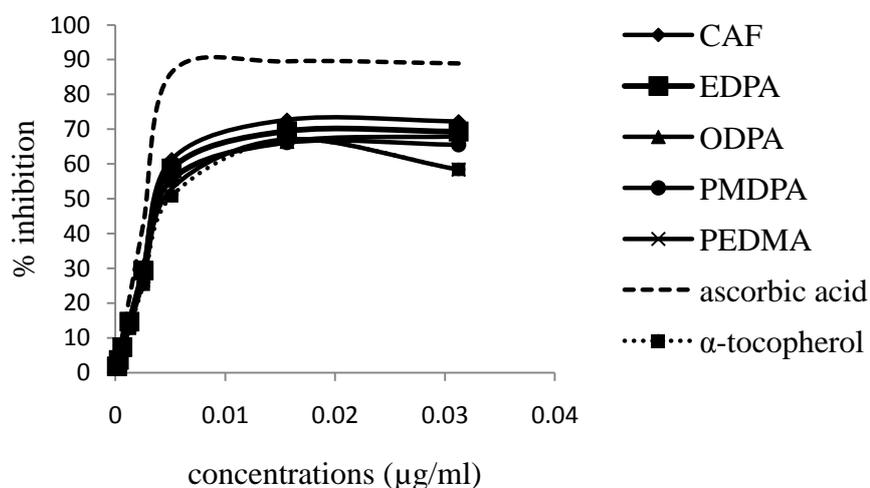


Figure.7 Hydroxyl radical scavenging activities of CAF and its amide analogues.

## References

- Abd El-Aty, A. M., Shah, S. S., Kim, B. M., Choi, J. H., Cho, H. J., Hee, Y., Chang, B. J., Shin, H. C., Lee, K. B., Shimoda, M., Shim, J. H., 2008. In vitro inhibitory potential of decursin and decursinol angelate on the catalytic activity of cytochrome P-450 1A1/2, 2D15, and 3A12 isoforms in canine hepatic microsomes. *Arch Pharm Res* 31, 1425-1435.
- Androustopoulos, V. P., Papakyriakou, A., Vourloumis, D., Tsatsakis, A. M., Spandidos, D. A., 2010. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacology & Therapeutics* 126, 9-20.

- Appiah-Opong, R., de Esch, I., Commandeur, J. N., Andarini, M., Vermeulen, N. P., 2008. Structure-activity relationships for the inhibition of recombinant human cytochromes P450 by curcumin analogues. *Eur J Med Chem* 43, 1621-1631.
- Awah, F. M., Uzoegwu, P. N., Oyugi, J. O., Rutherford, J., Ifeonu, P., Yao, X.-J., Fowke, K. R., Eze, M. O., 2010. Free radical scavenging activity and immunomodulatory effect of *Stachytarpheta angustifolia* leaf extract. *Food Chemistry* 119, 1409-1416.
- Banerjee, A., Dasgupta, N., De, B., 2005. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry* 90, 727-733.
- Bebianno, M. J., Company, R., Serafim, A., Camus, L., Cosson, R. P., Fiala-Mdoni, A., 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquatic Toxicology* 75, 354-373.
- Chun, Y. J., Ryu, S. Y., Jeong, T. C., Kim, M. Y., 2001. Mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A1 by rhapontigenin. *Drug Metab Dispos* 29, 389-393.
- Eaton, D. L., Gallagher, E. P., Bammler, T. K., Kunze, K. L., 1995. Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics* 5, 259-274.
- Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Rao, C. V., Shirwaikar, A., Rawat, A. K., Mehrotra, S., Pushpangadan, P., 2004. Antioxidant potential of *Anogeissus latifolia*. *Biol Pharm Bull* 27, 1266-1269.
- Guengerich, F. P., Shimada, T., 1991. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 4, 391-407.
- Gulcin, I., 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 217, 213-220.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., Aruoma, O. I., 1987. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 165, 215-219.
- Hseu, Y.-C., Chang, W.-H., Chen, C.-S., Liao, J.-W., Huang, C.-J., Lu, F.-J., Chia, Y.-C., Hsu, H.-K., Wu, J.-J., Yang, H.-L., 2008. Antioxidant activities of *Toona sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food and Chemical Toxicology* 46, 105-114.
- Jaikang, C., Chaiyasut, C., 2010. Caffeic acid and its derivatives as heme oxygenase 1 inducer in Hep G2 cell line. *J. Med. Plants Res.* 4, 940-946.
- Karuzina, I. I., Archakov, A. I., 1994. The oxidative inactivation of cytochrome P450 in monooxygenase reactions. *Free Radical Biology and Medicine* 16, 73-97.
- Kim, H. J., Yu, M.-H., Lee, I.-S., 2008. Inhibitory effects of methanol extract of plum (*Prunus salicina* L., cv. 'Soldam') fruits against benzo([alpha])pyrene-induced toxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* 46, 3407-3413.
- Konstandi, M., Kostakis, D., Harkitis, P., Johnson, E. O., Marselos, M., Adamidis, K., Lang, M. A., 2006. Benzo([alpha])pyrene-induced up-regulation of CYP1A2 gene expression: Role of adrenoceptor-linked signaling pathways. *Life Sciences* 79, 331-341.
- Korhonen, L. E., Rahnasto, M., Mahonen, N. J., Wittekindt, C., Poso, A., Juvonen, R. O., Raunio, H., 2005. Predictive three-dimensional quantitative structure-activity relationship of cytochrome P450 1A2 inhibitors. *J Med Chem* 48, 3808-3815.
- Kuenzig, W., Chau, J., Norkus, E., Holowaschenko, H., Newmark, H., Mergens, W., Conney, A. H., 1984. Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis* 5, 309-313.
- Kusirisin, W., Jaikang, C., Chaiyasut, C., Narongchai, P., 2009. Effect of Polyphenolic Compounds from *Solanum torvum* on Plasma Lipid Peroxidation, Superoxide anion and Cytochrome P450 2E1 in Human Liver Microsomes. *Med. Chem.* 5, 583-588.
- Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J. S., Jeong, H. S., Kim, J. H., 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci* 73, 167-179.

- Lewis, D. F., 2004. Quantitative structure-activity relationships (QSARs) for substrates of human cytochromes P450 CYP2 family enzymes. *Toxicol In Vitro* 18, 89-97.
- Ognjanovic, B. I., Markovic, S. D., Šorović, N. Z., Trbojevic, I. S., Stajin, A. S., Saicic, Z. S., 2010. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. *Reproductive Toxicology* 29, 191-197.
- Ozsoy, U., Mutluay, R., Oygur, N., Akbas, H., Sindel, S., Sindel, M., 2008. Effect of denervation and ischemia reperfusion injury on serum nitric oxide levels in rats. *Saudi Med J* 29, 1561-1566.
- Pacifico, S., D'Abrosca, B., Pascarella, M. T., Letizia, M., Uzzo, P., Piscopo, V., Fiorentino, A., 2009. Antioxidant efficacy of iridoid and phenylethanoid glycosides from the medicinal plant *Teucrium chamaedris* in cell-free systems. *Bioorg Med Chem* 17, 6173-6179.
- Pavanello, S., B'Chir, F., Pulliero, A., Saguem, S., Ben Fraj, R., El Aziz Hayouni, A., Clonfero, E., Mastrangelo, G., 2007. Interaction between CYP1A2-T2467DELTA polymorphism and smoking in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 57, 266-272.
- Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Oliveira, M. B. P. P., Ferreira, M. A., 2000. Quantification of synthetic phenolic antioxidants in liver plants. *Food Chemistry* 68, 353-357.
- Piton, A., Le Ferrec, E., Langouet, S., Rauch, C., Petit, E., Le Goff, F., Guillouzo, A., Morel, F., 2005. Oltipraz regulates different categories of genes relevant to chemoprevention in human hepatocytes. *Carcinogenesis* 26, 343-351.
- Puntarulo, S., Cederbaum, A. I., 1998. Production of Reactive Oxygen Species by Microsomes Enriched in Specific Human Cytochrome P450 Enzymes. *Free Radical Biology and Medicine* 24, 1324-1330.
- Ryu, S. D., Chung, W. G., 2003. Induction of the procarcinogen-activating CYP1A2 by a herbal dietary supplement in rats and humans. *Food Chem Toxicol* 41, 861-866.
- Shaker, E., Mahmoud, H., Mnaa, S., 2010. Silymarin, the antioxidant component and *Silybum marianum* extracts prevent liver damage. *Food Chem Toxicol* 48, 803-806.
- Skupinska, K., Misiewicz-Krzeminska, I., Lubelska, K., Kasprzycka-Guttman, T., 2009. The effect of isothiocyanates on CYP1A1 and CYP1A2 activities induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in MCF7 cells. *Toxicology in Vitro* 23, 763-771.
- Son, S., Lewis, B. A., 2002. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J Agric Food Chem* 50, 468-472.
- Sparfel, L., Huc, L., Le Vee, M., Desille, M., Lagadic-Gossmann, D., Fardel, O., 2004. Inhibition of carcinogen-bioactivating cytochrome P450 1 isoforms by amiloride derivatives. *Biochemical Pharmacology* 67, 1711-1719.
- Stupans, I., Kirlich, A., Tuck, K. L., Hayball, P. J., 2002. Comparison of Radical Scavenging Effect, Inhibition of Microsomal Oxygen Free Radical Generation, and Serum Lipoprotein Oxidation of Several Natural Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2464-2469.
- Su, M.-S., Shyu, Y.-T., Chien, P.-J., 2008. Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chemistry* 111, 892-896.
- Sun, Y., 1990. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* 8, 583-599.
- Teel, R. W., Huynh, H., 1998. Modulation by phytochemicals of cytochrome P450-linked enzyme activity. *Cancer Letters* 133, 135-141.
- Yoo, H. H., Lee, M. W., Kim, Y. C., Yun, C. H., Kim, D. H., 2007. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2A6 by decursinol angelate isolated from *Angelica Gigas*. *Drug Metab Dispos* 35, 1759-1765.

รายละเอียดงานวิจัยที่ส่งเข้าร่วมเสนอผลงานในงาน International Society for the Study of Xenobiotics. 3rd Asian Pacific Regional Meeting Understanding Xenobiotics for better Drug Development and therapy. 10-12 May 2009 Bangkok Thailand.

## Inhibitory Effects of Caffeic Acid and Its Amides Derivatives on Human Cytochrome P450 1A2

Churdsak Jaikang<sup>1</sup>, Kanokporn Niwatananun<sup>2</sup>, Siripun Narongchai<sup>3</sup>, Paitoon Narongchai<sup>3</sup> and Chaiyavat Chaiyasut<sup>1</sup>

(1)Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai Thailand, (2) Department of Pharmaceutical Care, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai Thailand,(3) Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai Thailand,

### Abstract

Caffeic acid (CAF) and its analogues are found in fruits, vegetables and coffee bean. Caffeic amide analogues possess antioxidant activity and free radical scavenging potential. The effects of caffeic acid and its amide derivatives on CYP1A2 activity in human liver microsomes using phenacetin as a probe substrate were examined. Ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenamide (EDPA), octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenamide (ODPA), phenmethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenamide (PMDPA) and phenethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenamide (PEDPA) were synthesized by using PyBOP as a coupling agent. The formation of the CYP-specific metabolite following co-incubation with CAF or its amide derivatives were determined to establish  $K_i$  values for this enzyme. The inhibition of CAF and its amide derivatives (EDPA, ODPA, PMDPA, PEDPA) on CYP1A2 according to Dixon and Cornish-Bowden plots were uncompetitive. The inhibitory potency CAF and its amide derivatives on phenacetin *O*-deethylation was comparable with  $K_i$  values of 1.34, 0.68, 0.55, 1.77 and 0.53 nM, respectively. The results indicate that CAF and its amide derivatives exhibit uncompetitive mode of

inhibition on CYP1A2 activity in human liver microsome. This may lead to important implication in prevention of CYP1A2-mediated chemical carcinogenesis.

**Key words:** CYP1A2, Caffeic acid, Caffeic acid amide derivatives, human liver microsome

## **Introduction**

More than 90% of all cancers are related to environmental factor. The majority of carcinogenic chemicals do not produce their biological effects but require metabolic activation before interact with cellular macromolecule. Cytochrome P450 (CYP) is a superfamily of haemoprotein enzymes are carcinogen activating enzymes and produce free radicals. CYP 1A2 is constitutively expressed in human liver where it is capable of metabolizing and activating numerous promutagens and procarcinogens such as 2- acetylaminofluorine, acetanilide, aflatoxin B1, 4-aminobiphenyl and other arylamines. Epidermiolocal studies suggest that consumption of fruits and vegetable can prevent cancer because many phytochemicals present in diets may interfere in several of the steps that lead to the development of malignant tumors, including protecting DNA from oxidative damage, inhibiting carcinogen activation and scavenge free radicals.

Caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid, CAF) and its analogues are found in many agricultural products such as fruits, vegetables, wine, olive oil and coffee. They are usually found as various simple derivatives including amides, esters, sugar esters, and glycosides, and flavonoid- linked derivatives. The CAF and its analogues have been reported to possess wide spectrum biological effects such as antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, antiatherosclerotic, antioxidative, antiproliferative, immunostimulatory and neuroprotective properties. In this study, we evaluated the effects of caffeic acid and its analogues on CYP1A2 activity *in vitro* using phenacetin as a substrate and pooled human liver microsome as a source of CYP1A2.

## Methods

### Synthesis of caffeic acid analogues

Ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenamide (EDPA), octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenamide (ODPA), phenmethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenamide (PMDPA) and phenethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenamide (PEDPA) were synthesized by using PyBOP as a coupling agent. The residue was purified using column chromatography and the structure was confirmed by FT-IR,  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, GC-MS and spectrophotometer.

### Preparation of human liver microsome

Human liver samples were obtained from Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine Chiang Mai University. Liver microsomes were prepared by differential centrifugation using previously described method (Potter *et.al*, 1973). The microsomal pellets were kept in Tris buffer pH 7.4 and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until use. Protein contents were determined by bicinchonnic acid (BCA) protein assay kit using bovine serum albumin as a standard.

### Determination of Human CYP1A2 activity

Phenacetin *O*-deethylation to acetaminophen was used to assess CYP1A2 activity. Incubation mixture of 1 ml contained 0.1 mg microsomal protein, 100 mM potassium phosphate pH7.4, 0.1mM EDTA, 0.4 mM  $\text{MgCl}_2$ , NADPH generating system (0.5 mM  $\text{NADP}^+$ , 20 mM NADPH, 2 mM glucose-6-phosphate, 1 IU/ml glucose -6-phosphate dehydrogenase), phenacetin (28-1,400 $\mu\text{M}$ ) and caffeic acid amide analogues (0.025-0.25  $\mu\text{g/ml}$ ). Reaction was stopped after 60 min by the addition of 200 $\mu\text{l}$  cooled methanol and 50  $\mu\text{l}$  of caffeine 100 $\mu\text{g/ml}$  was added as an internal standard. The mixtures were centrifuged at 13,000 RPM for 5 min and the supernatant was injected into the analytical high performance liquid chromatography (HPLC). HPLC system consisted of an Agilent 1100 Series high-performance liquid chromatography, Agilent 1100 series diode-array detector. The HPLC pumps, autosampler, column oven, and diode-array system were monitored and controlled using the HP chem. station computer program (Agilent). Wavelengths used for the identification of with the diode array detector at 253 nm. Acetaminophen was

separated by water C18 column (250×4 mm, 5 μm), column oven was set up at 25°C. Isocratic elution was employed with mobile phase consisting of water: methanol: acetonitrile:tetrahydrofuran (55:20:20:5), with flow rate 0.7 ml/min and the injection volume was 5 μl.

### **Data analysis**

All incubation for enzyme activity assays were in triplicate. The results of the inhibition study were analyzed by Dixon and Cornish-Bowden plots to determine the type of inhibition and the value of the inhibitory constant ( $K_i$ )

### **Results**

This study was designed to evaluate selected synthesized caffeic acid analogues for their ability to modulate cytochrome P450 1A2 which their structures are shown in figure 1. Characterize of inhibition kinetic patterns of CYP1A2, Cornish-Bowden and Dixon plots were obtained by using different concentrations of substrate. All plots indicated that caffeic acid and its derivatives inhibited phenacetin *O*-deethylation by uncompetitive inhibition. The  $K_i$  values of caffeic acid and its analogues were shown in table 1.

### **Discussion**

This study was designed to evaluate caffeic acid and its analogues for their ability to modulate CYP1A2 activity. In the present study, we demonstrated that caffeic acid and analogues inhibited phenacetin *O*-deethylation, probed CYP1A2 activity. All of the kinetic inhibition of CYP1A2 was uncompetitive. The majority of carcinogenic chemicals do not produce their biological effects but require metabolic activation before interact with cellular macromolecule. Cytochrome P450s (CYP) is carcinogen activating enzymes and produce free radicals. Caffeic acid and its derivatives inhibited CYP1A2 activity which may reduce of procarcinogenic substrate metabolism including aromatic amines, nitrosamines, planar polyaromatic amine and amides. This CYP1A2 isoform is involved in the metabolism of

several xenobiotics, including chemical carcinogen. Therefore, its modulation can dramatically decrease the compound's toxicity and carcinogenesis.

In conclusion, caffeic acid and its amide derivatives are uncompetitive inhibitor of CYP1A2 activity in pooled human microsomes. These findings suggest that caffeic acid and its amide analogues have potential to prevent chemical carcinogenesis.

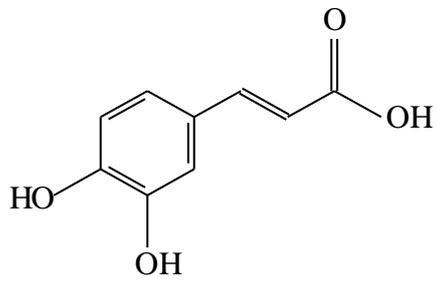
## References

1. Porter, TD., Coon, MJ. (1991). Cytochrome P-450. Multiplicity of isoform, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* 266: 13469-13472.
2. Ryu, SD., Chung, WG. (2003). Induction of procarcinogen-activating CYP1A2 by herbal dietary supplement in rat and humans. *Food Chem Toxicol.* 41:861-866.
3. Potter, WZ., Davis, DC., Mitchell, JR. (1973). Acetaminophen-induced hepatic necrosis: III. Cytochrome P-450 mediated covalent binding in vitro. *J. Pharm. Exp. Ther.* 187:203-210

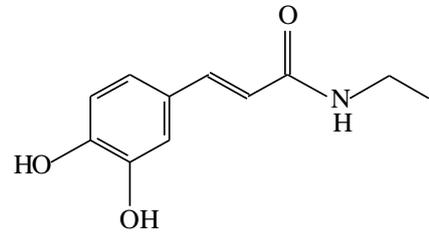
**Table 1**

Type of inhibition and  $K_i$  value of CAF and its derivatives

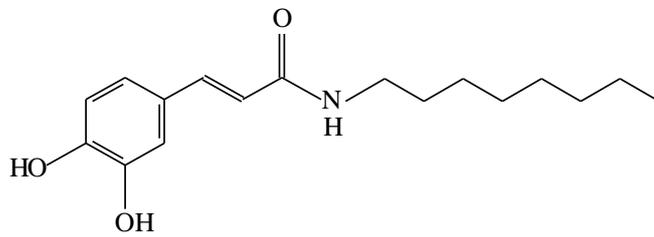
Substances	type of inhibition	$K_i$ (nM)
CAF	uncompetitive	1.34
EDPA	uncompetitive	0.68
ODPA	uncompetitive	0.55
PMDPA	uncompetitive	1.77
PEDPA	uncompetitive	0.53



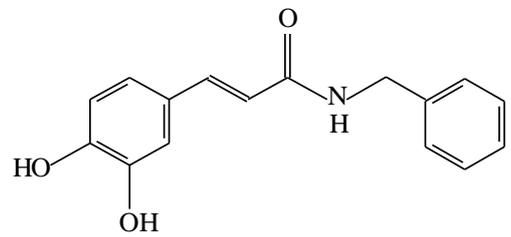
Caffeic acid



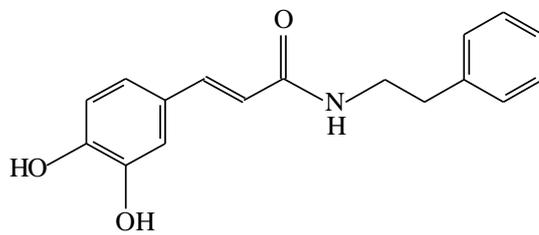
EDPA



ODPD



PMDPA



PEDPA

**Figure 1.** Chemical structures of caffeic and its amide derivatives.

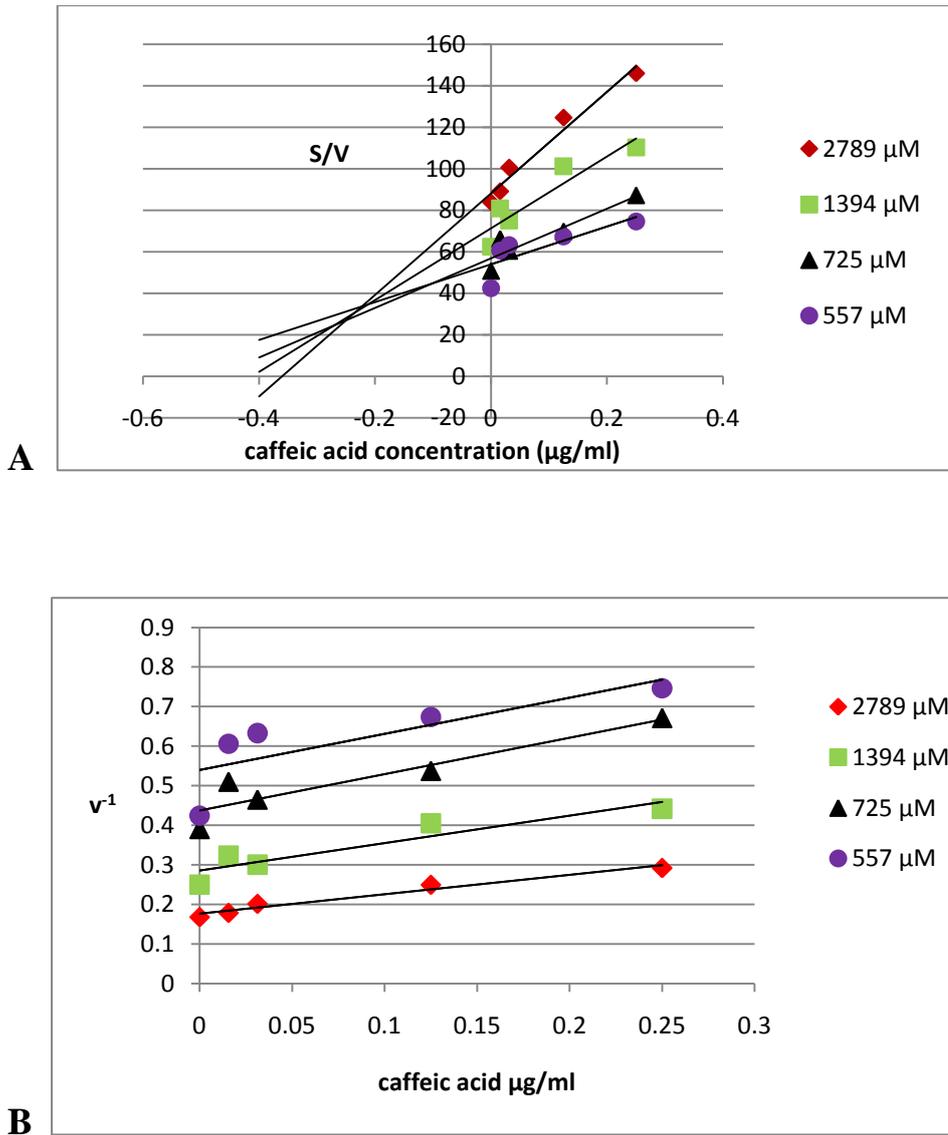


Fig 2. The effect of caffeic acid on phenacetin *O*-deethylation in human liver microsomes (A) Cornish-Bowden plot and (B) Dixon plot

