

Artikel Asli/Original Article

Sintesis, Penilaian Biologi dan Kajian Dok Sebatian Auron ke Atas Enzim Xantin Oksidase (Synthesis, Biological Evaluation and Docking Studies of Aurone Derivatives on Xanthine Oxidase Enzyme)

KAMAL RULLAH, SAW PHIN KHYE, ANG SERENE, MOHD FADHLIZIL FASIHI MOHD ALUWI & LAM KOK WAI

ABSTRAK

Perencatan aktiviti xantin oksidase (XO) merupakan satu pendekatan terapeutik yang berkesan dalam rawatan penyakit seperti gout dan hiperurikemia. Selain itu, penggunaan perencat XO juga dapat diluaskan kepada rawatan kecederaan contohnya reperfusi iskemia di pelbagai organ seperti jantung, hati dan buah pinggang. Dalam kajian ini, sebanyak 7 sebatian auron telah disintesis dan diuji ke atas XO dan dibandingkan dengan kawalan positif allopurinol. Sebatian 5e dikenalpasti sebagai sebatian yang paling berpotensi dan mampu merencatkan separuh daripada aktiviti XO pada 33.23 μM diikuti oleh sebatian 5f pada 210.22 μM dan sebatian 5d pada 302.0 μM . Kajian dok molekul telah dijalankan untuk memahami interaksi penting antara auron yang terpilih dengan tapak aktif XO.

Kata kunci: Aurone; xantin oksidase; dok; sintesis; biologi

ABSTRACT

Inhibition of xanthine oxidase (XO) activity is an effective therapeutic approach for the treatment of diseases such as gout and hyperuricemia. Additionally, the use of XO inhibitors can further be extended to injury treatments such as ischemic reperfusion in various organs such as heart, liver and kidney. In this study, 7 aurone compounds were synthesized and tested on XO and compared with the positive control allopurinol. Compound 5e was identified as the most potent compound and was able to inhibit half of XO activity at 33.23 μM followed by compounds 5f and 5d at 210.22 μM and 302.0 μM , respectively. Finally, molecular docking study was conducted to understand the important binding interactions of the selected aurone with the active site of XO.

Keywords: Aurone; xanthine oxidase; docking; synthesis; biology

PENDAHULUAN

Enzim xantin oksidase (XO) wujud dalam bentuk homodimer iaitu setiap subunit mengandungi satu kofaktor molibdopterin, dua pusat [2Fe-2S] spektroskopik berbeza, dan satu kofaktor FAD (Enroth et al. 2000). Ia merupakan enzim yang mampu menjana spesies oksigen reaktif (ROS) dan memainkan peranan penting dalam banyak keadaan patologi seperti gout dan hiperurikemia (Shoji et al. 2004), kecederaan reperfusi iskemia (Granger 1988), strok (Plant et al. 2002; Al-Gonaiah et al. 2009) dan keradangan (Pinamonti et al. 1996). Asid urik ialah hasil daripada metabolisme purin yang dihasilkan oleh enzim XO daripada hipoxantin dan xantin (Pacher et al. 2006). Hiperurikemia berlaku apabila terdapat pembentukan asid urik yang berlebihan dalam darah iaitu kepekatan serum urat melebihi 6.8 mg/dL dalam badan manusia. Kemungkinan besar individu berkenaan akan terdedah kepada penyakit gout; artritis akut gout, gout to fakeus kronik, akut asid urik nefropati dan mononatrium urat gout nefropati (Yu 2007).

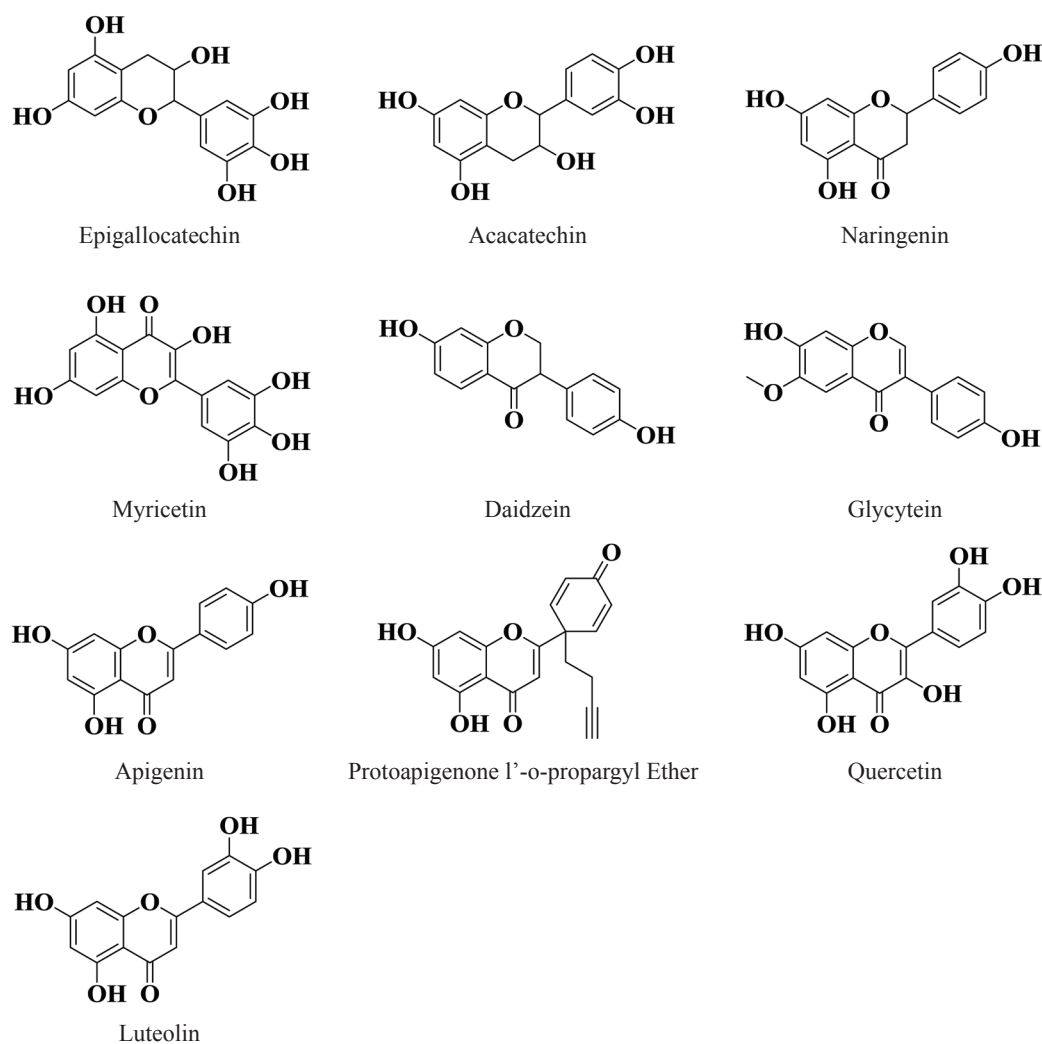
Sehingga hari ini, terdapat dua ubat perencat xantin oksidase yang diluluskan oleh Pentadbiran Makanan dan Dadah (FDA). Di antaranya ialah allopurinol dan diluluskan oleh FDA untuk rawatan gout dan hyperuricemia sejak tahun 1966 (Pea 2005). Walaubagaimanapun, allopurinol boleh menyebabkan reaksi tindak balas kulit yang teruk (SCAR) yang merangkumi sindrom hipersensitiviti dadah, Steven-Johnson dan Toxic Epidermal Necrolysis (Hung et al. 2005). Malah kadar kematian boleh mencecah sehingga 26% sekiranya SCAR berlaku (Arellano & Sacristan 1993). Tambahan pula, majoriti pesakit yang mengalami hipersensitiviti allopurinol ialah orang Asia disebabkan oleh kelaziman HLA-B*5801 gen yang lebih tinggi (Ramasamy et al. 2013). Ini menimbulkan kebimbangan yang serius kerana 97% daripada doktor di Malaysia menetapkan allopurinol untuk rawatan gout kronik (Yeap et al. 2009).

Ubat alternatif yang lain ialah febuxostat yang telah diluluskan pada tahun 2009 oleh FDA Amerika. Walaupun febuxostat dapat mengurangkan tahap asid urik kurang daripada 6 mg/dL dalam serum manusia, tiada bukti

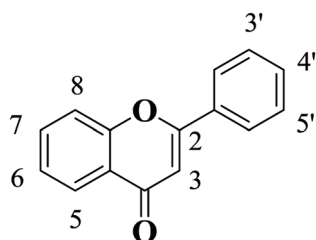
yang menunjukkan bahawa penggunaan febuxostat akan memberi hasil klinikal yang lebih berkesan berbanding dengan allopurinol (Faruque et al. 2013). Selain itu, harga ubat febuxostat (USD 158.88/bulan) adalah jauh lebih mahal daripada allopurinol (USD 17.45/bulan). Oleh itu, febuxostat tidak sesuai digunakan untuk rawatan penyakit gout kronik secara rutin.

Beberapa kajian telah menunjukkan bahawa flavonoid seperti quercetin ($IC_{50} = 0.44 \mu M$) dan luteolin ($IC_{50} = 0.96 \mu M$) (Nagao et al. 1999) merencat aktiviti XO secara *in vitro*. Justeru itu, sebatian-sebatian ini amat penting kepada pembangunan perencat klinikal XO yang berguna

pada masa hadapan. Hasil kajian tersebut mendapati kumpulan hidroksil pada C-5 dan C-7 memainkan peranan penting dalam perencatan XO (Yan et al. 2013). Selain itu, epikalokatekin ($IC_{50} = 36 \mu M$), akakatekin ($IC_{50} = 27 \mu M$), naringenin ($IC_{50} = 22 \mu M$), mirisetin ($IC_{50} = 26 \mu M$), daidzein ($IC_{50} = 23 \mu M$) dan glisitin ($IC_{50} = 12 \mu M$) turut menghalang pembentukan asid urik daripada enzim XO (Umamaheswari et al. 2013). Khususnya, kedua-dua sebatian apigenin ($IC_{50} = 3.25 \mu M$) dan protoapigenon 1'-*o*-propargil eter ($IC_{50} = 3.61 \mu M$) adalah lebih aktif berbanding dengan allopurinol yang mempunyai nilai IC_{50} 8.72 μM (Hunyadi et al. 2013).



RAJAH 1. Pelbagai flavonoid semula jadi yang merencat aktiviti XO



RAJAH 2. Struktur kimia asas dan penomboran atom karbon flavonoid

Auron tergolong dalam satu subkelas flavonoid yang jarang dijumpai dalam alam semula jadi. Auron biasanya berwarna kuning terang dan wujud di tumbuh-tumbuhan yang berbunga seperti snapdragon (*Antirrhinum majus*). Kajian menunjukkan bahawa auron mempamerkan pelbagai aktiviti biologi yang penting seperti anti-kanser (Huang et al. 2007), anti-radang (Shin et al. 2011) dan anti-tirosinase (Narsinghani et al. 2013). Dalam kajian ini, sebanyak 7 sebatian auron telah disintesis dan diuji ke atas XO dan dibandingkan dengan kawalan positif allopurinol.

BAHAN DAN KAEDAH

SINTESIS

Pelarut dan reagen dibeli daripada pembekal komersial (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, United States), Merck (Kenilworth, New Jersey, United States) dan Acros Organics (Waltham, Massachusetts, United States)) dan digunakan tanpa penulenan lanjut. Dalam proses penulenan sebatian, gel silika (Merck, 230-400 mesh) digunakan untuk kromatografi kilat. Hasil tindak balas dipantau dengan plat kromatografi lapisan nipis (TLC) pra-bersalut gel silika dan dilihat di bawah lampu UV (Thermo Scientific™ Pierce™ UVP 3UV Ultraviolet Lamp; 252 nm, 302 nm dan 365 nm). Spektra Resonan Magnetik Nuklear (NMR) diperolehi daripada Bruker Ultra-ShieldPlus 500 MHz atau Bruker Ascend® 600 MHz spektrometer dengan 5 mm BBO prob dan mikroasil berasaskan CapNMR probe, dilengkapi dengan 24 posisi auto-sampler. Jisim spektrometer beresolusi tinggi (HR-MS) diperolehi daripada suntikan terus ESI-MS menggunakan Daltonic Bruker microTOF-Q (Bruker-Germany) dengan pengionan elektrosembur (ESI) dalam mod positif.

PROSEDUR AM BAGI SINTESIS SEBATIAN KALKUN 4A-4G

Larutan KOH (40%, 15 mL) ditambah ke dalam larutan EtOH mutlak (30 mL) yang mengandungi terbitan asetofenon (10 mmol) dan benzaldehid (10 mmol) yang sesuai. Campuran tersebut disonifikasi selama 1 jam diikuti dengan pengacauan selama 12 jam pada suhu bilik. Larutan merah gelap yang terbentuk kemudiannya diasidifikasi dengan 250 mL HCl (2 M). Akhir sekali, sebatian tersebut dituliskan samada dengan kromatografi kilat dengan *n*-heksana/EtOAc (kecerunan 20-70% EtOAc) atau penghabluran semula dalam EtOH mutlak.

Sebatian 4a Pepejal kuning; hasil 97%; takat lebur 120-121°C. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 13.50 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 15.5, 8.0 Hz, 3H), 7.26 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 6.53-6.49 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 2.43 (s, 3H). ¹³C-NMR (126 MHz, Kloroform-*d*) δ 191.97, 166.69, 166.17, 144.51, 141.25, 132.11, 131.21, 129.75, 128.58, 119.31, 114.18, 107.67,

101.11, 55.58, 21.53. ESI-HRMS: (C₁₇H₁₆O₃) nilai dihitung [M + Na⁺] 291.0997, nilai analisis 291.0984.

Sebatian 4b Pepejal kuning; hasil 95%; takat lebur 157-159°C. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 13.56 (s, 1H), 7.87 (t, 2H), 7.46 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.27 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.51 (dd, *J* = 11.5, 2.5 Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.88 (s, 3H). ¹³C-NMR (126 MHz, Kloroform-*d*) δ 191.95, 166.81, 166.24, 151.79, 149.50, 144.72, 131.26, 127.99, 123.44, 118.23, 114.31, 111.38, 110.51, 107.78, 101.23, 77.16, 56.17, 55.71. ESI-HRMS: (C₁₈H₁₈O₃) nilai dihitung [M + Na⁺] 337.1052, nilai analisis 337.1078.

Sebatian 4c Pepejal kuning; hasil 96%; takat lebur 137-139°C. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 13.29 (s, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.52-6.45 (m, 2H), 3.87 (s, 3H). ¹³C-NMR (151 MHz, Kloroform-*d*) δ 191.29, 166.99, 166.68, 141.59, 135.02, 134.65, 133.53, 131.38, 131.14, 129.90, 127.75, 122.18, 114.10, 108.16, 101.27, 55.81. ESI-HRMS: (C₁₆H₁₂Cl₂O₃) nilai dihitung [M + H] 323.0243, nilai analisis 323.0277.

Sebatian 4d Pepejal kuning; hasil 69%; takat lebur 145-146°C. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 13.50 (s, 1H), 8.09-8.00 (m, 2H), 7.87 (ddt, *J* = 5.1, 8.6, 14.5 Hz, 4H), 7.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.58 – 7.49 (m, 2H), 6.51 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 6.49 (s, 1H), 3.87 (s, 3H). ¹³C-NMR (151 MHz, Kloroform-*d*) δ 191.78, 166.76, 166.25, 144.48, 134.44, 133.38, 132.30, 131.26, 130.77, 128.77, 128.70, 127.82, 127.47, 126.82, 123.71, 120.44, 114.18, 107.79, 101.11, 55.61. ESI-HRMS: (C₂₀H₁₆O₃) nilai dihitung [M + H] 305.1179, nilai analisis 305.1124.

Sebatian 4e Kristal jarum kuning; hasil 65%; takat lebur 119-120°C. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 13.46 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.56 (t, 3H), 7.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.47 (s, 1H), 5.31 (t, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.29 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.76 (s, 3H). ¹³C-NMR (126 MHz, Kloroform-*d*) δ 192.05, 165.54, 164.36, 144.24, 141.27, 133.14, 132.41, 129.90, 128.66, 122.43, 121.79, 119.76, 113.58, 99.53, 55.86, 28.15, 25.91, 21.69, 18.00. ESI-HRMS: (C₂₂H₂₄O₃) nilai dihitung [M + H] 337.1804, nilai analisis 337.1811.

Sebatian 4f Kristal jarum kuning pucat; hasil 60%; takat lebur 132-133°C. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 13.51 (s, 1H, 2-OH), 7.85 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, H-9), 7.62 (s, 1H, H-1), 7.45 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, H-8), 7.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-11), 7.19 (s, 1H, H-15), 6.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-12), 6.47 (s, 1H, H-4), 5.32 (t, 1H, H-19), 3.99 (s, 3H, -OCH₃), 3.97 (s, 3H, -OCH₃), 3.90 (s, 3H, -OCH₃), 3.29 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-20), 1.80 (s, 3H, H-16), 1.76 (s, 3H, H-17). ¹³C-NMR (126 MHz, Kloroform-*d*) δ 191.83

(-OH), 165.51, 164.26, 151.68, 149.47, 144.23, 133.18, 129.71, 128.12, 123.35, 122.41, 121.62, 118.52, 113.54, 111.39, 110.38, 99.51, 56.17 (-OCH₃), 56.08 (-OCH₃), 55.85 (-OCH₃), 27.99 (-CH₃), 25.90 27.99 (-CH₃), 17.98. ESI-HRMS: (C₂₃H₂₆O₃) nilai dihitung [M + H] 383.1859, nilai analisis 383.1856.

Sebatian 4g Minyak kuning likat; hasil 49%. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 13.47 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.56 – 7.50 (m, 3H), 7.25 – 7.20 (m, 2H), 6.45 (s, 1H), 5.31 (q, *J* = 8.0, 8.6 Hz, 1H), 5.15 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.27 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.20 – 2.10 (m, 4H), 1.73 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.59 (s, 3H). ¹³C-NMR (151 MHz, Kloroform-*d*) δ 202.51, 165.39, 164.22, 144.13, 141.08, 137.05, 132.19, 131.55, 130.65, 129.73, 128.52, 124.13, 121.93, 121.79, 121.52, 119.48, 113.37, 99.31, 55.70, 39.84, 27.65, 27.21, 26.87, 25.70, 21.55, 17.70, 16.20. ESI-HRMS: (C₂₇H₃₂O₃) nilai dihitung [M + H] 405.2431, nilai analisis 405.2451.

PROSEDUR AM BAGI SINTESIS SEBATIAN AURON

Sebatian kalkun yang disintesis (2 mmol) ditambah dengan 3 mmol larutan merkuri asetat (Hg (OAc)₂) dalam DMSO (10 mL) pada suhu bilik. Campuran dikacau selama 6 jam pada suhu 160°C. Kemudiannya, campuran tindak balas dituangkan ke dalam air-ais sejuk dan diasidifikasikan dengan 2 M 100 mL HCl. Mendakan pepejal samada ditapis atau diekstrak dengan diklorometana atau etil asetat. Ekstrak tersebut dikeringkan dengan magnesium sulfat kontang dan disejatkan. Akhirnya, sebatian tersebut dituliskan samada dengan kromatografi kilat dengan *n*-heksana/EtOAc (kecerunan 20-70% EtOAc) atau penghabluran semula dalam EtOH mutlak.

Sebatian 5a Kristal jarum kuning pucat; hasil 27%; takat lebur 156-157°C. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 7.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.84 (s, 1H), 6.80 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.43 (s, 3H). ¹³C-NMR (126 MHz, Kloroform-*d*) δ 183.02, 168.47, 167.36, 147.49, 140.11, 131.35, 129.68, 129.64, 125.78, 115.04, 112.15, 112.08, 96.66, 56.01, 21.58. ESI-HRMS: (C₁₇H₁₄O₃) nilai dihitung [M + H] 267.1022, nilai analisis 267.1018.

Sebatian 5b Pepejal kuning; hasil 22%; takat lebur 186-188°C. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.78 (dd, *J* = 10.5, 2.1 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.95 (s, 3H). ¹³C-NMR (126 MHz, Kloroform-*d*) δ 182.94, 168.34, 167.38, 150.84, 149.26, 147.02, 125.91, 125.79, 125.59, 115.31, 113.96, 112.55, 112.15, 111.43, 96.79, 56.17, 56.15, 56.11. ESI-HRMS: (C₁₈H₁₆O₃) nilai dihitung [M + H] 313.1077, nilai analisis 313.1098.

Sebatian 5c Pepejal putih; hasil 25%; takat lebur 168-170°C. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 8.00 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.64 (dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J* = 2.1, 8.5 Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 3.94 (s, 3H). ¹³C-NMR (151 MHz, Kloroform-*d*) δ 182.61, 168.60, 167.75, 148.43, 133.47, 133.07, 132.48, 132.35, 130.75, 130.23, 126.00, 114.48, 112.56, 108.87, 96.77, 56.14. ESI-HRMS: (C₁₆H₁₀Cl₂O₃) nilai dihitung [M + H] 321.0087, nilai analisis 321.0106.

Sebatian 5d Pepejal kuning; hasil 42%; takat lebur 175-177°C. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 8.31 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.55 – 7.50 (m, 2H), 6.99 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, Kloroform-*d*) δ 182.98, 168.58, 167.46, 148.06, 133.61, 133.37, 131.95, 130.08, 128.68, 128.49, 127.73, 127.64, 127.33, 126.57, 125.88, 114.94, 112.23, 112.10, 96.74, 56.07. ESI-HRMS: (C₂₀H₁₄O₃) nilai dihitung [M + H] 303.1023, nilai analisis 303.1001.

Sebatian 5e Pepejal kuning pucat; hasil 33%; takat lebur 149-150°C. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 7.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 5.32 (t, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.31 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 1.79 (s, 3H), 1.71 (s, 3H). ¹³C-NMR (126 MHz, Kloroform-*d*) δ 167.76, 165.45, 147.79, 140.10, 133.94, 131.45, 129.99, 129.76, 127.16, 124.31, 121.38, 114.23, 111.96, 100.16, 94.40, 56.23, 28.17, 26.00, 21.73, 17.87. ESI-HRMS: (C₂₂H₂₂O₃) nilai dihitung [M + H] 335.1648, nilai analisis 335.1654.

Sebatian 5f Pepejal kuning pucat; hasil 44%; takat lebur 151-152°C. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 7.57 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 5.32 (t, 1H), 4.00 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.31 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.79 (s, 3H), 1.71 (s, 3H). ¹³C-NMR (126 MHz, Kloroform-*d*) δ 183.24, 167.50, 165.33, 150.74, 149.24, 147.16, 133.96, 127.16, 125.75, 125.70, 124.28, 121.36, 114.32, 113.96, 112.19, 111.41, 94.30, 56.24, 56.18, 56.11, 28.16, 26.00, 17.86. ESI-HRMS: (C₂₃H₂₄O₃) nilai dihitung [M + H] 381.1703, nilai analisis 381.1703.

Sebatian 5g Minyak kuning likat; hasil 11%. ¹H-NMR (500 MHz, Kloroform-*d*) δ 7.79 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.80 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 5.29 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.11 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.29 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.13 – 2.08 (m, 2H), 2.08 – 2.03 (m, 2H), 1.69 (s, 6H), 1.60 (s, 3H). ¹³C-NMR (151 MHz, Kloroform-*d*) δ 183.25, 167.58, 165.29, 147.60, 139.94, 137.31, 131.29, 129.60, 126.99, 124.14, 121.79, 121.08, 114.04, 111.76, 94.24, 56.08, 39.77, 31.93, 27.96, 26.60, 26.58, 25.71, 25.69,

23.57, 21.59, 17.73, 16.09. ESI-HRMS: (C₂₇H₃₀O₃) nilai dihitung [M + H] 403.2275, nilai analisis 403.2298.

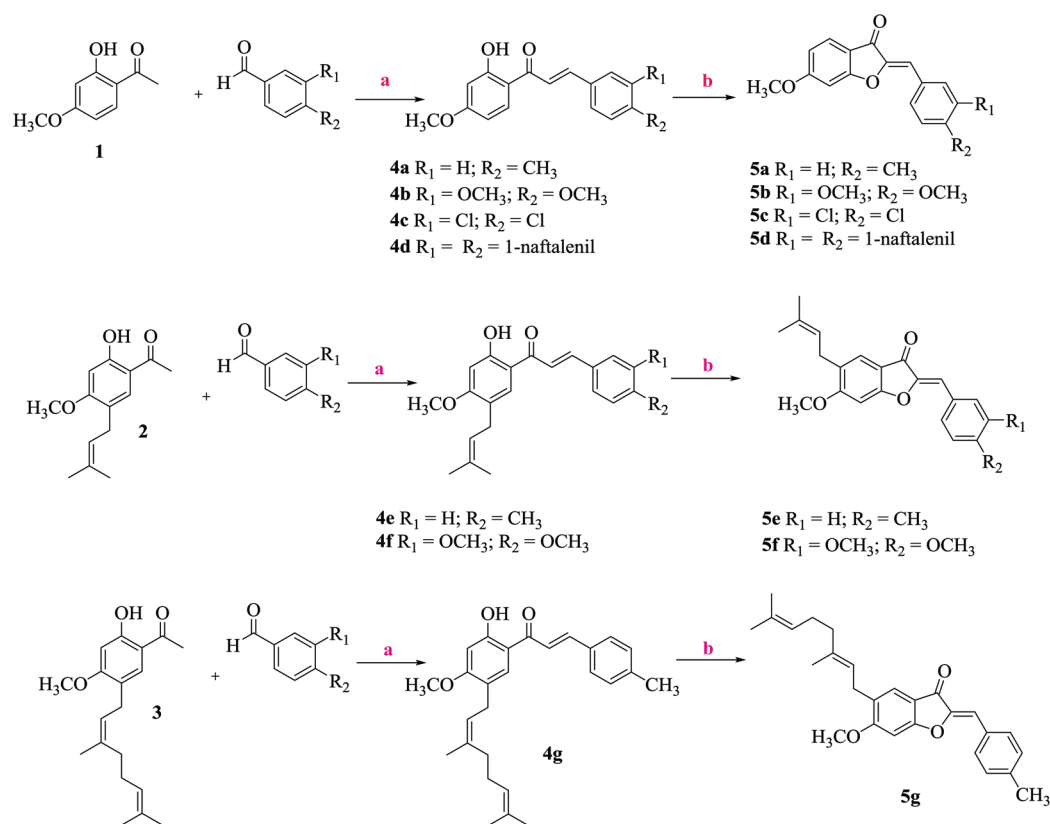
BIOLOGI

Asai Perencatan XO Aktiviti enzim dilakukan secara spektrofotometri dengan mengukur pembentukan asid urik daripada substrat xantin pada 295 nm (Pauff & Hille 2009; Chu et al. 2014). Asai tersebut mengandungi 200 µL campuran tindak balas iaitu 78 µL ialah larutan penampapan KH₂PO₄ (50 mM, pH 7.5), 2 µL sampel sebatian (100 µM/perigi), 100 µL substrat (200 µM or 400 µM/perigi) dan 20 µL enzim XO. Dua µL allopurinol (100 µM/perigi) digunakan sebagai rujukan piawai. Untuk sebatian yang kurang larut dalam DMSO, ia dipanaskan dalam rendaman air selama 5-10 minit. Campuran asai kemudiannya dieram selama 15 minit pada suhu 25°C. Selain itu, kawalan eksperimen dilakukan tanpa kehadiran sebarang perencat dalam campuran tindak balas. Keseluruhan langkah di atas diulangi dan bacaan diambil sebanyak tiga kali. Sebatian yang aktif akan diasai dengan kepekatan berlainan untuk memperoleh nilai IC₅₀.

Asai Kinetik XO Analisis plot Lineweaver-Burk dijalankan untuk menentukan sifat perencatan sebatian dan dibandingkan dengan kawalan positif, allopurinol. Kajian kinetik dijalankan dengan kehadiran atau tanpa kehadiran sebatian 5f atau 5g dengan kepekatan substrat xantin yang berbeza. Hasil analisis Lineweaver-Burk plot

akan menentukan cara perencatan enzim oleh sebatian yang diuji. Halaju awal untuk pemeriksaan fotometri dinyatakan sebagai kadar keserapan pada 295 nm setiap 10 saat dalam asai selama 10 minit (Umamaheswari et al. 2013; Chu et al. 2014).

Simulasi Dok Struktur 3D kristal enzim XO (PDB ID 3NVY (2.0 Å)) diperolehi daripada RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org.pdb>). Atom hidrogen ditambahkan kepada struktur kristal protein diikuti dengan penyingkiran molekul kristal air. Selain itu, gelung protein yang hilang akan ditambah dan diikuti dengan pengenalan CHARMM forcefield serta penetapan keadaan protonasi protein. Kesemua proses tersebut dijalankan dengan perisian Accelrys Software, Discovery Studio Modeling Environment, Release 3.1, Accelrys Software, San Diego, California, USA, 2013. Tapak pengikatan ligan dikenalpasti berdasarkan kedudukan asal ligan kristal kuersetin terikat dan kajian literatur. Sebatian auron yang aktif kemudiannya didok kepada tapak ikatan protein dan keseluruhan proses dijalankan berdasarkan protokol cDOCKER. Pelbagai konformasi akan dijanakan untuk ligan yang dikaji dalam tapak aktif melalui kaedah dinamik molekul bersuhu tinggi. Setiap ligan akan dipanaskan pada suhu 700 K dalam 2000 langkah dan kemudiannya disejukkan ke suhu 300 K. Akhirnya konformasi ligan yang mempunyai nilai tenaga ikatan -cDOCKER tertinggi akan dipilih untuk analisis seterusnya.



SKIM 1. Sintesis sebatian auron. Reagen dan keadaan tindak balas: (a) KOH 40% w/v, EtOH mutlak, (i) sonifikasi selama 1 jam pada suhu 40°C (ii) pengacauan pada suhu bilik selama 17 jam. (b) Hg(OAc)₂, DMSO, dipanaskan pada suhu 160°C selama 6 jam.

KIMIA

Sebatian 4a-d berjaya diperolehi hasil tindak balas pemeluwapan Claisen-Schmidt di antara gandingan 2'-hidroksi-4'-metoksi-asetofenon (4.5) dengan benzaldehid komersial dalam kehadiran bes KOH. Secara keseluruhannya, hasil pembentukan sebatian 4a-d adalah tinggi. Faktor utama pembentukan hasil yang tinggi ini adalah keadaan sintesis yang optimum di bawah penyinaran ultrabunyi pada suhu 40°C (Li et al. 2002). Penyediaan auron kemudiannya diperolehi hasil refluks sebatian 4a-d dengan kehadiran Hg(OAc)₂ dalam pelarut DMSO. Tindak balas kimia ini juga dikenali sebagai pensiklikan oksidatif. Produk terakhir (sebatian 5a-d) berjaya diperolehi hasil penulenan dengan kromatografi kilat atau penghabluran semula dalam EtOH mutlak walaupun peratusan hasil pembentukan kurang memuaskan di antara 22-42%. Pengenalan kumpulan prenil atau geranil ke dalam sebatian auron 5e, 5f dan 5g dilakukan dengan penghasilan sebatian 2 atau 3 melalui kaedah yang dijelaskan sebelum ini (Rullah et al. 2014). Hasil peratusan pembentukan produk akhir adalah setara dengan sebatian auron tanpa kehadiran kumpulan prenil dan geranil.

Sebanyak 14 sebatian kalkun dan auron telah disintesis dan disaring ke atas aktiviti XO. Berdasarkan keputusan saringan awal yang diringkaskan dalam Jadual 1, hanya terdapat 3 sebatian auron yang aktif terhadap XO pada 400 µM. Kesemua sebatian kalkun adalah tidak aktif. Ketiga-tiga sebatian auron yang aktif dan allopurinol kemudiannya dicerakin pada kepekatan yang berbeza untuk penentuan nilai IC₅₀ masing-masing. Allopurinol sebagai perencat positif kepada eksperimen tersebut mencatatkan nilai IC₅₀ tertinggi iaitu 3.38 µM. Nilai ini adalah setara dengan keputusan yang dilaporkan dalam kajian sebelum ini iaitu di antara 0.2 dan 50 µM (Pacher et al. 2006). Sebatian 5e mencatatkan perencatan tertinggi dengan nilai IC₅₀ 33.2 µM berbanding dengan sebatian 5f (210.2 µM) dan 5d (302.0 µM). Ini menandakan bahawa kehadiran kumpulan sterik seperti dimetoksi adalah kurang baik terhadap aktiviti perencatan manakala kehadiran kumpulan prenil sebaliknya memberi kesan yang positif pada aktiviti perencatan. Walaupun sebatian-sebatian auron ini kurang aktif berbanding allopurinol, penemuan ini masih menarik perhatian kami memandangkan hanya segelintir kajian sahaja yang melaporkan potensi auron sebagai agen perencat XO (Muzychka et al.).

JADUAL 1. Peratusan perencatan yang disaring pada 400 µM dan nilai IC₅₀ untuk sebatian yang disintesis ke atas aktiviti perencatan XO.

Sebatian	Peratusan perencatan pada 400 µM	IC ₅₀ (µM)
5a	t.a.	-
5b	t.a.	-
5c	t.a.	-
5d	> 50	302.0
5e	> 90	33.2
5f	> 50	210.2
5g	t.a.	-
Allopurinol*	> 90	3.38

t.a. tidak aktif; *kawalan positif untuk eksperimen

Kajian kinetik ke atas sebatian 5f dan 5d mendapati mod perencatan kedua-dua sebatian ini ialah jenis campuran. Pemetaan plot Lineweaver-Burk menunjukkan garisan yang tidak bersilang pada paksi-x atau paksi-y tetapi sebaliknya bersilang di tengah kuadran 1 graf. Ini jelas menunjukkan bahawa kedua-dua sebatian 5f dan 5d ialah perencat bercampur-jenis. Tambahan pula, apabila kepekatan sebatian 5f dan 5d meningkat, V_{max} menunjukkan trend menurun (ciri-ciri perencat yang tidak kompetitif) manakala K_m meningkat (ciri-ciri perencat kompetitif). Melalui data tersebut, sebatian 5f dan 5d jelas mempamerkan ciri-ciri mod perencatan kompetitif dan tidak kompetitif. Di antara jenis perencat XO bercampur-jenis yang dilaporkan sebelum ini ialah 4'-hidroksiasetofenon (4-HAP) dan epikatekin-(4β, 8)galat-epikatekin (B2-3'-O-galat) yang diasingkan daripada akar kering *Rhodiola crenulata* (Chu

et al. 2014). Selain itu, kedua-dua flavonoid morin dan galagin turut mempamerkan sifat perencatan yang sama (Van Hoorn et al. 2002). Jenis mod perencatan bagi sebatian 5e akan dilaporkan dalam kajian seterusnya.

Ini adalah berbeza dengan allopurinol yang bertindak sebagai perencat XO yang kompetitif (Van Hoorn et al. 2002; Yan et al. 2013). Kajian sebelum ini turut menyatakan bahawa sifat perencatan allopurinol bergantung kepada kepekatan yang digunakan. Contohnya Pacher et al. melaporkan bahawa allopurinol ialah perencat yang kompetitif pada kepekatan rendah dan pada kepekatan yang tinggi, ia bertindak sebagai perencat yang tidak kompetitif (Pacher et al. 2006). Selain itu, Hiroto et al. turut membuktikan bahawa terdapat perbezaan dalam interaksi perencat dengan XO enzim daripada sumber yang berbeza. Dalam kajian tersebut, aktiviti perencatan febuxostat adalah

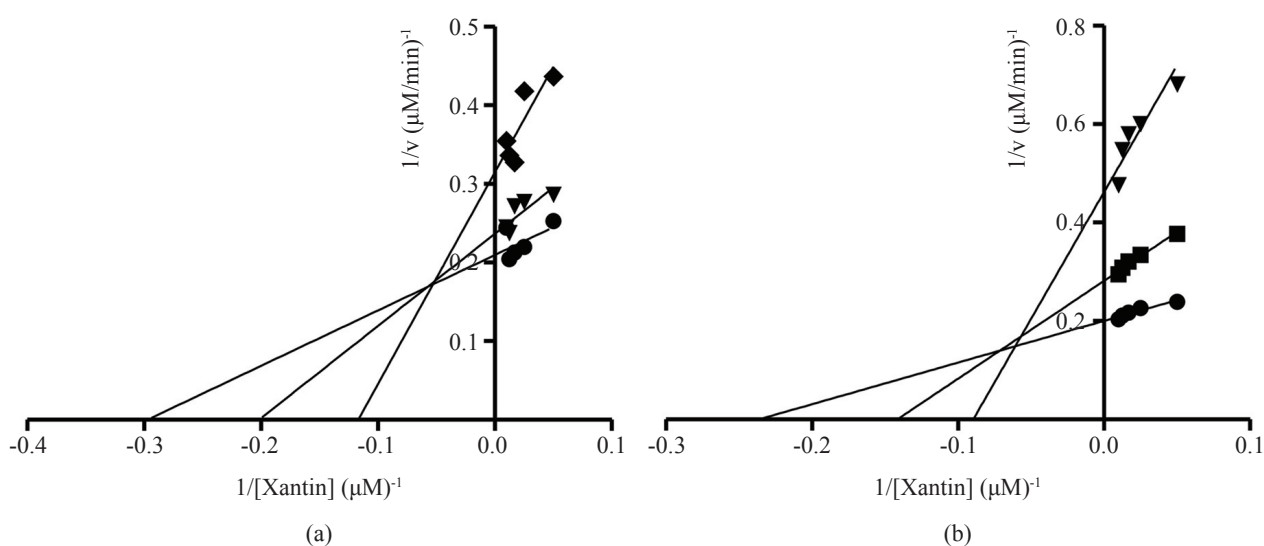
kurang dalam XO spesies bakteri berbanding mamalia. Tambahan pula, kandungan xantin oksidase dari haiwan yang berlainan adalah berbeza (Godber et al. 2005).

DOK MOLEKUL

Kajian dok molekul adalah penting dalam ramalan aktiviti ligan berdasarkan cara interaksi, tenaga ikatan serta hubungan sterik di antara ligan dengan reseptor. Lazimnya, ketepatan ramalan ikatan di antara ligan dengan reseptor disahkan dengan perbandingan nilai RMSD (root mean square deviation) ligan asal dengan ligan asal yang didok semula ke dalam struktur protein kristal. Dalam kajian ini, nilai RMSD di antara ligan asal yang diperolehi daripada protein (PDB ID 3NVY) dengan ligan quercetin yang didok semula adalah kurang daripada 2 Å. Ini menyokong penggunaan perisian cDOCKER dalam ramalan interaksi di antara sebatian 5e dengan XO. Rajah 3(a) menunjukkan ramalan simulasi dok interaksi pengikatan sebatian 5e di saluran tapak aktif xantin oksidase. Struktur kristal kompleks bovine xantin oksidoreduktase dengan (b) febuxostat (PDB ID 1N5X) (Okamoto et al. 2003)

dan (c) quercetin (PDB ID 3NVY) (Cao et al. 2014) yang dilaporkan.

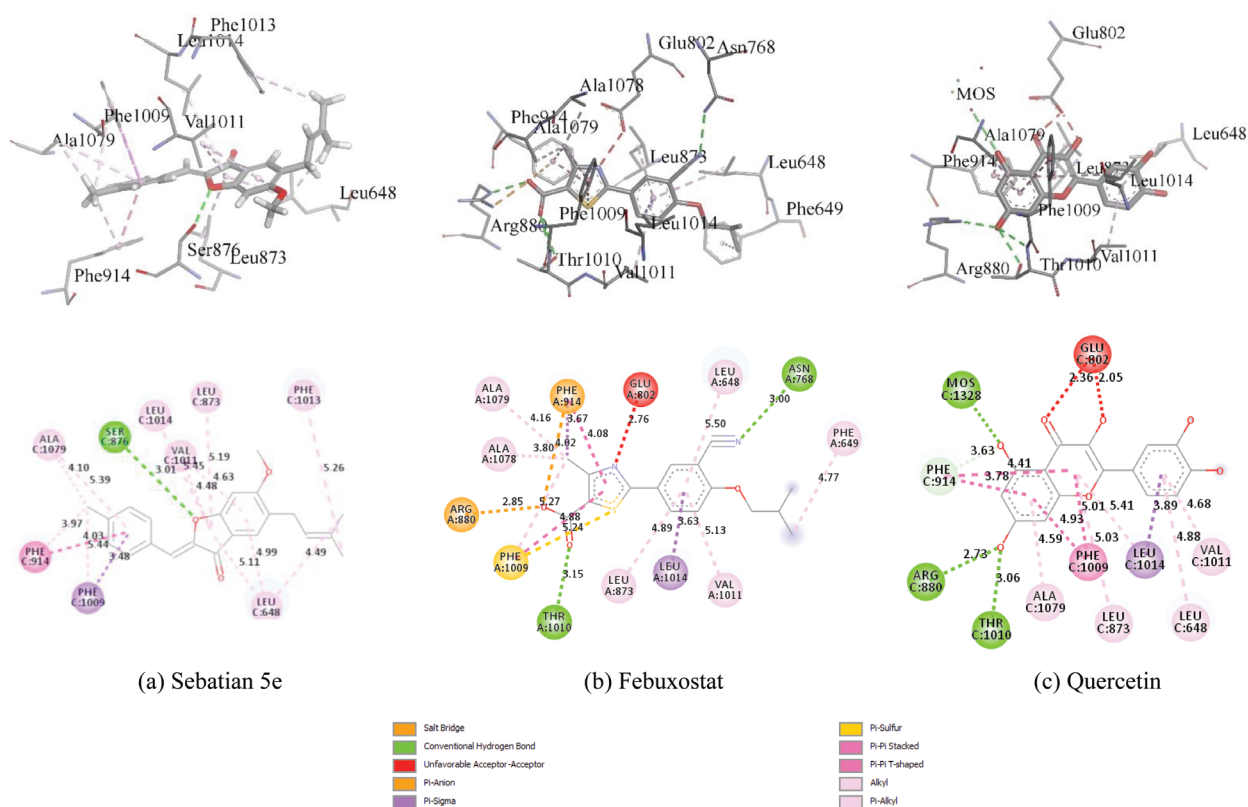
Secara amnya, sebatian 5e mengikat pada saluran utama yang bersambung kepada kofaktor Mo-pterin justeru menghalang substrat daripada mendekati tapak aktif untuk tindak balas katalisis seterusnya. Daripada keputusan dok yang diperolehi, sebatian tersebut hanya membentuk satu ikatan hidrogen dengan residu amino acid Ser876 melalui atom oksigen gelang auron (Rajah 3(a)) berbanding dengan kristal ligan febuxostat dan kuersetin. Febuxostat mengikat pada tapak aktif XO dengan membentuk ikatan hidrogen dengan kedua-dua residu amino acid Asn768 dan Thr1010 melalui kumpulan siano dan karboksilat (Rajah 3(b)) manakala kuersetin pula dengan Arg880 dan Thr1010 melalui kumpulan hidroksi pada gelang fenil (Rajah 3(c)). Walau bagaimanapun, tiada ikatan yang diperhatikan di antara sebatian 5e dengan ion molibdenum. Ini jelas berbeza dengan mekanisme perencatan yang ditunjukkan oleh alloxantin yang membentuk ikatan Mo-N secara langsung dengan pusat molibdenum (Okamoto et al. 2008).



RAJAH 3. Plot Lineweaver-Burk untuk kepekatan yang berbeza bagi (a) sebatian 5d dan (b) 5f ke atas aktiviti XO. 2(a) ●: 0 µM; ▼: 100 µM; ◆: 200 µM; 2 (b) ●: 0 µM; ■: 10 µM; ▼: 100 µM.

Di antara faktor penting lain yang menyumbang kepada aktiviti perencatan sebatian 5e ialah ikatan van der Waals. Ini jelas kelihatan apabila kedua-dua gelang fenil dan benzopiran sebatian tersebut terlibat dengan interaksi van der Waals dengan residu amino acid di persekitaran tapak aktif XO. Di antaranya, cincin metilfenil sebatian 5e diapit di antara kedua-dua residu amino acid Phe914 and Phe1009 melalui interaksi aromatik-aromatik ($\pi-\pi$ dan $\pi-\delta$ dalam kes ini) (Rajah 3(a)). Susunan yang sama turut diperhatikan dalam struktur kristal kompleks kuersetin dengan XO (Rajah 3(b)). Interaksi sedemikian dikenalpasti memainkan peranan penting dalam menstabilkan kedudukan substrat yang mempunyai kumpulan aromatik

(Burley & Petsko 1985). Selain itu, gelang benzopiran sebatian 5e turut berinteraksi dengan residu amino acid Leu873 dan Leu1014 melalui interaksi hidrofobik. Kami perlu menekankan bahawa sebatian 5a iaitu analog kepada sebatian 5e tanpa kehadiran kumpulan prenil adalah tidak aktif dalam hasil saringan awal. Ini mungkin dapat diperjelaskan bahawa kehadiran kumpulan prenil dalam gelang benzopiran memainkan peranan yang amat penting dalam perencatan XO. Kemungkinan besar, ia mengarah susunan dan orientasi gelang fenil dan benzopiran sebatian 5e supaya berada keadaan yang optimum di dalam saluran tapak aktif XO. Tambahan pula, aktiviti perencatan hilang secara mendadak apabila kumpulan prenil digantikan



RAJAH 4. Sebatian 5e, febuxostat dan quercetin sepertimana dijelaskan dalam teks

dengan kumpulan yang lebih besar dan sterik seperti geranil dalam sebatian 5g.

KESIMPULAN

Daripada 14 sebatian organik yang disintesis, hanya tiga sebatian auron yang menunjukkan aktiviti perencatan ke atas XO. Sebatian 5e khususnya mempamerkan keputusan yang menarik dengan nilai IC_{50} 33.2 μ M berbanding dengan perencat positif allopurinol iaitu 3.38 μ M. Hasil simulasi dok juga mendapati bahawa kumpulan berfungsi seperti gelang fenil, benzopiran dan kumpulan prenil memainkan peranan yang amat penting dalam perencatan. Untuk mendapatkan gambaran yang lebih jelas dari segi struktur hubungan aktiviti, kami menyarankan lebih banyak analog berdasarkan struktur 5e disintesis dan dikaji dari segi *in vitro* dan *in vivo*. Akhir sekali, keputusan daripada kajian ini jelas menunjukkan bahawa auron yang mengandungi kumpulan prenil berpotensi untuk dibangunkan sebagai perencat XO yang berkesan.

PENGHARGAAN

Hasil kajian ini dibiayai oleh MOSTI Sciencefund 02-01-02-SF0804 dan KPT Skim Geran Penyelidikan Fundamental (FRGS) (FRGS/2/2014/ST01/UKM/02/3).

RUJUKAN

- Al-Gonaiah, M., Smith, R. A. & Stone, T. W. 2009. Xanthine oxidase-induced neuronal death via the oxidation of NADH: Prevention by micromolar EDTA. *Brain Research* 1280: 33-42.
- Arellano, F. & Sacristan, J. A. 1993. Allopurinol hypersensitivity syndrome: a review. *Annals of Pharmacotherapy* 27(3): 337-343.
- Burley, S. K. & Petsko, G. A. 1985. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science* 229(4708): 23-28.
- Cao, H., Pauff, J. M. & Hille, R. 2014. X-ray crystal structure of a xanthine oxidase complex with the flavonoid inhibitor quercetin. *Journal of Natural Products* 77(7): 1693-1699.
- Chu, Y. H., Chen, C. J., Wu, S. H. & Hsieh, J. F. 2014. Inhibition of xanthine oxidase by rhodiola crenulata extracts and their phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(17): 3742-3749.
- Enroth, C., Eger, B. T., Okamoto, K., Nishino, T. & Pai, E. F. 2000. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(20): 10723-10728.
- Faruque, L. I., Ehteshami-Afshar, A., Wiebe, N., Tjosvold, L., Homik, J. & Tonelli, M. 2013. A systematic review and meta-analysis on the safety and efficacy of febuxostat versus allopurinol in chronic gout. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 43(3): 367-375.

- Godber, B. L. J., Schwarz, G., Mendel, R. R., Lowe, D. J., Bray, R. C., Eisenthal, R. & Harrison, R. 2005. Molecular characterization of human xanthine oxidoreductase: the enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-sulphur centres. *The Biochemical Journal* 388(Pt 2): 501-8.
- Granger, D. N. 1988. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *The American Journal of Physiology* 255(6 Pt 2): H1269-H1275.
- Hung, S. I., Chung, W.-H., Liou, L. B., Chu, C. C., Lin, M., Huang, H. P. and Lin, Y. L. 2005. HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(11): 4134-4139.
- Hunyadi, A., Martins, A., Danko, B., Chuang, D. W., Trouillas, P., Chang, F. R. & Wu, Y. C. 2013. Discovery of the first non-planar flavonoid that can strongly inhibit xanthine oxidase: Protoapigenone 1'-O-propargyl ether. *Tetrahedron Letters* 54(48): 6529-6532.
- Muzychka, O. V., Kobzar, O. L., Popova, A. V., Frasinuk, M. S. & Vovk, A. I. 2017. Carboxylated aurone derivatives as potent inhibitors of xanthine oxidase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 25(14): 3606-3613.
- Okamoto, K., Eger, B. T., Nishino, T., Kondo, S., Pai, E. F. & Nishino, T. 2003. An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase: Crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 278(3): 1848-1855.
- Okamoto, K., Eger, B. T., Nishino, T., Pai, E. F. & Nishino, T. 2008. Mechanism of inhibition of xanthine oxidoreductase by allopurinol: Crystal structure of reduced bovine milk xanthine oxidoreductase bound with oxipurinol. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 27: 888-893.
- Pacher, P. 2006. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological Reviews* 58(1): 87-114.
- Pauff, J. M. & Hille, R. 2009. Inhibition studies of bovine xanthine oxidase by luteolin, silibinin, quercetin, and curcumin. *Journal of Natural Products* 72(4): 725-731.
- Pea, F. 2004. Pharmacology of drugs for hyperuricemia. *Hyperuricemic Syndromes: Pathophysiology and Therapy* 147: 35-46.
- Pinamonti, S., Muzzoli, M., Chicca, M. C., Papi, Ravenna, F., Fabbri, L. M. & Ciaccia. 1996. Xanthine oxidase activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Free Radical Biology & Medicine* 21(2): 147-155.
- Plant, L. D., Kemp, P. J., Peers, C., Henderson, Z. & Pearson, H. A. 2002. Hypoxic depolarization of cerebellar granule neurons by specific inhibition of TASK-1. *Stroke* 33(9): 2324-2328.
- Pluim, H. J., Van Deuren, M. & Wetzels, J. F. M. 1998. The allopurinol hypersensitivity syndrome. *Netherlands Journal of Medicine* 52(3): 107-110.
- Ramasamy, S. N., Korb-Wells, C. S., Kannangara, D. R. W., Smith, M. W. H., Wang, N., Roberts, D. M. & Graham, G. G. 2013. Allopurinol hypersensitivity: A systematic review of all published cases. *Drug Safety* 1950-2012.
- Rullah, K., Mohd Aluwi, M. F. F., Yamin, B. M., Abdul Bahari, M. N., Wei, L. S., Ahmad, S. & Abas, F. 2014. Inhibition of prostaglandin E2 production by synthetic minor prenylated chalcones and flavonoids: Synthesis, biological activity, crystal structure, and in silico evaluation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 24(16): 3826-3834.
- Shoji, A., Yamanaka, H. & Kamatani, N. 2004. A retrospective study of the relationship between serum urate level and recurrent attacks of gouty arthritis: evidence for reduction of recurrent gouty arthritis with antihyperuricemic therapy. *Arthritis & Rheumatism* 51(3): 321-25.
- Umamaheswari, M., Madeswaran, A. & Asokkumar, K. 2013. Virtual screening analysis and in-vitro xanthine oxidase inhibitory activity of some commercially available flavonoids. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12(3): 317-323.
- Van Hoorn, D. E. C., Nijveldt, R. J., Van Leeuwen, P. A. M., Hofman, Z., M'Rabet, L., De Bont, D. B. A. & Van Norren, K. 2002. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology* 451(2): 111-118.
- Yan, J., Zhang, G., Hu, Y. & Ma, Y. 2013. Effect of luteolin on xanthine oxidase: inhibition kinetics and interaction mechanism merging with docking simulation. *Food Chemistry* 141(4): 3766-3773.
- Yeap, S. S., Goh, E. M. L. & Gun, S. C. 2009. A survey on the management of gout in Malaysia. *International Journal of Rheumatic Diseases* 12(4): 329-335.
- Yu, K.-H. 2007. Febuxostat: A novel non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase for the treatment of hyperuricemia in gout. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 1(1): 69-75.

Lam Kok Wai
Drug and Herbal Research Centre
Faculty of Pharmacy
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur, Malaysia

Kamal Rullah
Mohd Fadhilzil Fasihi Mohd Aluwi
Nanotechnology and Catalysis Research Center (NANOCAT)
University of Malaya
50603 Kuala Lumpur, Malaysia

Pengarang untuk dihubungi: Lam Kok Wai
Email: david_lam@ukm.edu.my

Tel: +603 9289 7031
Faks: +603 2698 3271

Diterima: Jun 2017
Diterima untuk diterbitkan: Disember 2017