



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ด้านการอักเสบจากรากของผักปู้ย่า
และหางนกยูงไทย และจากใบประยงค์

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. นัตรชนก กะรัตย์ และคณะ

เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ด้านการอักเสบจากรากของผักปู้ย่า

และหางนกยูงไทย และจากใบประยงค์

(Chemical constituents and anti-inflammatory activity from the roots of *Caesalpinia mimosoides*

Lamk. and *Caesalpinia pucherrima* and the leaves of *Aglaia odorata* Lour.)

คณะผู้วิจัย

สังกัด

รองศาสตราจารย์ ดร. จัตรชนก กะราลัย

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รองศาสตราจารย์ ชนิตา พงษ์ลิมานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์พรหมมา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รองศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา ติวตระกูล

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการวิจัยตลอดโครงการวิจัย ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. Hoong Kun Fun มหาวิทยาลัย Universiti Sains Malaysia ที่ช่วยเหลือการวิเคราะห์โครงสร้างทาง X-ray crystallography ขอขอบคุณ ดร. เขวภา สุขพรมมา และนางสาวสุพัตรา แก้วทะโร ที่ช่วยเหลือการบันทึกข้อมูล NMR ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กิติเชษฐ์ ศรีดิษฐ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ หอพรรณไม้ สวนพฤกษศาสตร์พระนางเจ้าสิริกิติ์ อ. แม่ริม จ.เชียงใหม่ สำหรับการอนุเคราะห์ตรวจสอบและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของตัวอย่างพืช ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือในการวิจัย

บทคัดย่อ

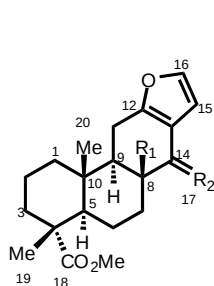
รหัสโครงการ:	BRG5280013
ชื่อโครงการ:	องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ด้านการอักเสบจากรากของผักปู้ย่าและหางนกยูงไทยและจากใบประยงค์
ชื่อนักวิจัย:	รองศาสตราจารย์ ดร. ฉัตรชนก กะราลัย, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Email address:	chatchanok.k@psu.ac.th
ระยะเวลาโครงการ:	15 กรกฎาคม 2552 ถึง 15 กรกฎาคม 2555

การศึกษานำร่องฤทธิ์ด้านการอักเสบนำไปสู่การแยกสารสกัดจากรากผักปู้ย่า หางนกยูงไทย และใบประยงค์สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 69 สาร โดยได้จากรากผักปู้ย่า 18 สาร เป็นสารใหม่ 7 สาร คือ mimosol A-D (**CM1-CM4**) และ mimosol E-G (**CM9-CM11**) และเป็นสารที่มีรายงานมาแล้ว 11 สาร (**CM5-CM8** และ **CM12-CM18**) จากรากหางนกยูงไทย 26 สาร เป็นสารใหม่ 15 สารคือ pulcherrin D-R (**CP1-CP15**) และเป็นสารที่มีรายงานมาแล้ว 11 สาร (**CP16-CP26**) และจากใบประยงค์ 25 สาร เป็นสารใหม่ 5 สารคือ (1*R*,3*S*,7*E*,11*S*,12*R*)-3-hydroperoxydolabella-4(16),7-dien-18-ol (**AO1**), (1*R*,3*E*,7*R*,8*R*,11*S*,12*R*)-7,8-epoxydolabella-3-en-18-ol (**AO2**), 25-methoxy-5 α -dammar-20-en-3 β ,24-diol (**AO6**), 3 β -hydroxy-5 α -dammar-20-en-24,25-acetonide (**AO7**) และ 24(*S*),25-epoxy-5 α -protost-20,25-dien-3-one (**AO8**) และเป็นสารที่มีรายงานมาแล้ว 20 สาร (**AO3-AO5** และ **AO9-AO25**) วิเคราะห์โครงสร้างทั้งหมดด้วยข้อมูล UV, IR, 1D- และ 2D-NMR, MS และ X-ray และสำหรับโครงสร้างของสารประกอบที่เคยมีรายงานได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูล ^1H NMR และเปรียบเทียบกับสารที่ได้มีการรายงานมาแล้ว

นำสารบริสุทธิ์ทั้งหมดทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์ RAW264.7 โดยการยับยั้ง lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดไนตริกออกไซด์ (NO) สาเหตุของการอักเสบ พบว่ามีสารบริสุทธิ์ 24 สารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง NO ที่ดี ซึ่งอยู่ในช่วง IC_{50} 2.1-14.2 μM และนอกจากนี้ ยังแสดงฤทธิ์ที่ดีกว่ายาที่ใช้อยู่คือ indomethacin (IC_{50} = 14.5 μM), L-nitroarginine (L-NA; IC_{50} = 61.8 μM) และ caffeic acid phenylester (CAPE; IC_{50} = 5.6 μM) สาร **CM4**, **CM6**, **CM8** และ **CM12-CM14** ยังได้นำไปทดสอบการต้าน tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ในเซลล์

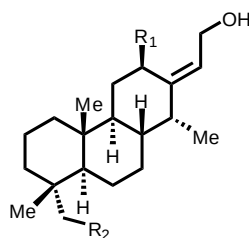
RAW264.7 และนอกจากนี้สาร **AO16**, **AO17** และ **AO21** ยังแสดงฤทธิ์ต้าน prostaglandin E₂ (PGE₂) ด้วยค่า IC₅₀ ที่ดีคือ 2.6, 16.1 และ 23.0 μ M ตามลำดับ

Keywords: *Caesalpinia mimosoides*, *Caesalpinia pulcherrima*, *Aglaia odorata*, anti-inflammatory, cassane diterpenes, dolabellane diterpenoid, dammarane triterpenoid, protostane triterpenoid



CM1: R₁ = OH; R₂ = CH₂

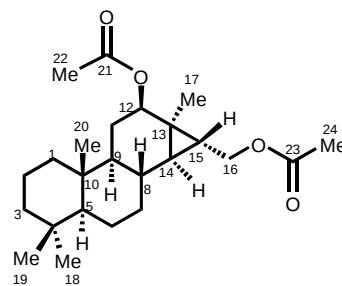
CM7: R₁ = H; R₂ = O



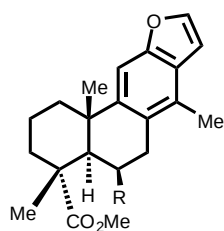
CM2: R₁ = OH; R₂ = H

CM3: R₁ = H; R₂ = OH

CM8: R₁ = H; R₂ = H

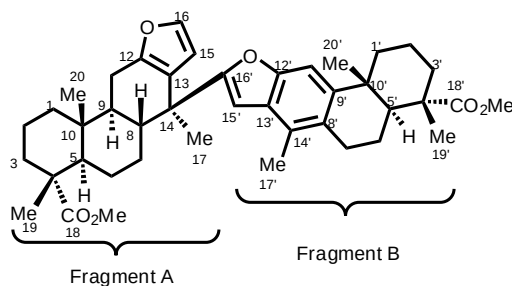


CM4

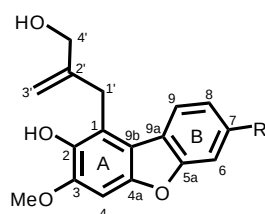


CM5: R = H

CM6: R = OAc

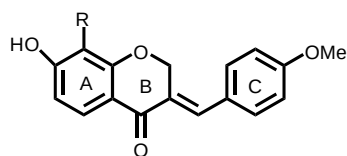


CM9



CM10: R = OH

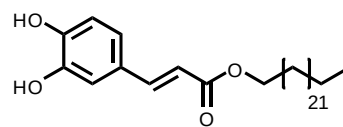
CM11: R = OMe



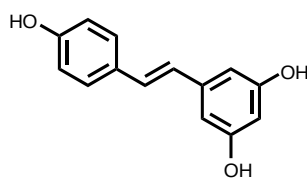
CM12: R = H

CM13: R = OH

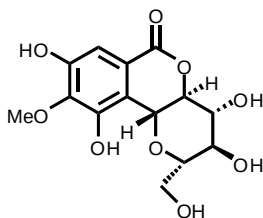
CM14: R = OMe



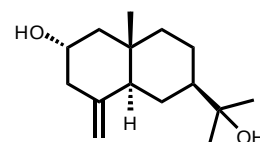
CM15



CM16

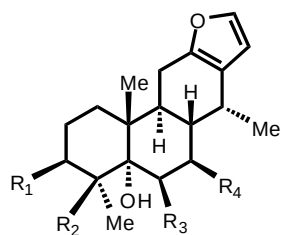
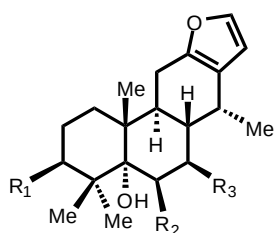


CM17



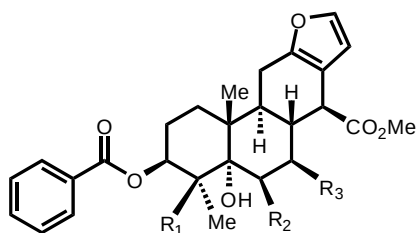
CM18

องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากรากผักปู้ย่า

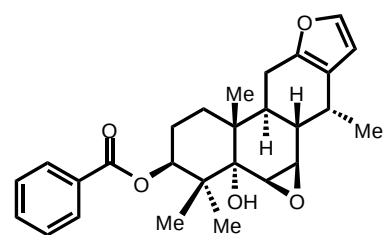


	R ₁	R ₂	R ₃
CP1	H	H	OAc
CP2	H	OH	OAc
CP3	H	OAc	OH
CP4	H	H	OCOPh
CP5	OCOPh	H	H
CP6	H	OCOPh	H
CP7	H	OCOCH ^E =CHPh	H
CP16	H	H	H
CP17	H	OCOPh	OH
CP18	H	OCOCH ^E =CHPh	OH
CP19	H	OH	OCOCH ^E =CHPh
CP20	OCOPh	H	OH

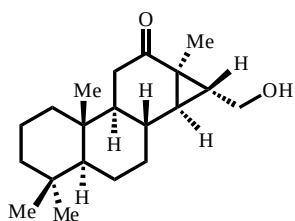
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
CP8	H	CHO	OCOPh	OH
CP9	H	CH ₂ OCOPh	OH	H
CP10	H	CO ₂ H	OCOPh	H
CP11	OCOPh	CO ₂ H	OCOPh	H
CP21	H	CO ₂ H	OCOPh	OCOPh
CP22	OH	CO ₂ H	OCOPh	OCOPh
CP23	OCOPh	CO ₂ H	OCOPh	OAc



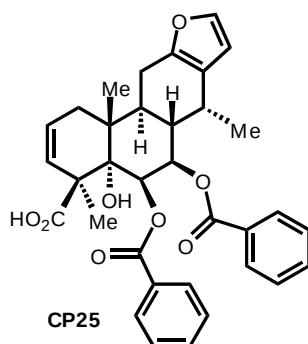
	R ₁	R ₂	R ₃
CP12	Me	OAc	OH
CP13	CH ₂ OAc	OH	OAc
CP24	Me	OH	OAc



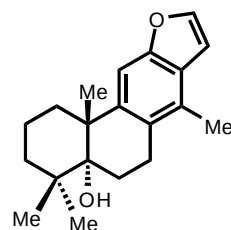
CP14



CP15

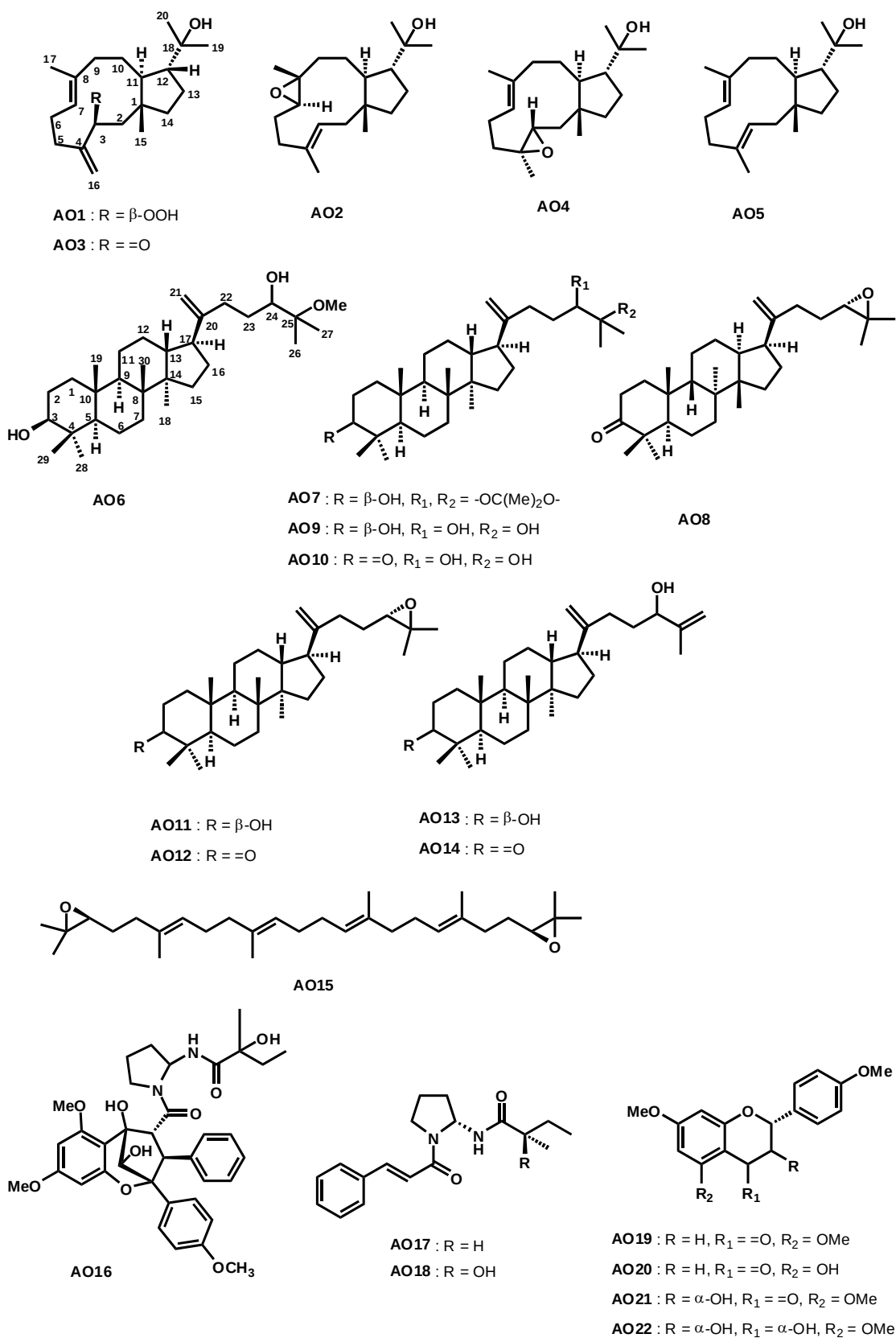


CP25

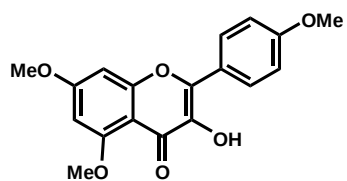


CP26

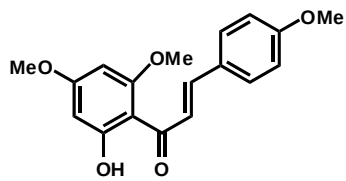
องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากรากหางนกยูงไทย



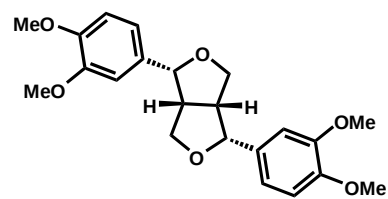
องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากใบประยงค์



AO23



AO24



AO25

องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากใบประยงค์ (ต่อ)

Abstract

Project code: BRG5280013

Project title: Chemical constituents and anti-inflammatory activity from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. and *Caesalpinia pulcherrima* and the leaves of *Aglaia odorata* Lour.

Investigator: Associate Professor Dr. Chatchanok Karalai, Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

Email address: chatchanok.k@psu.ac.th

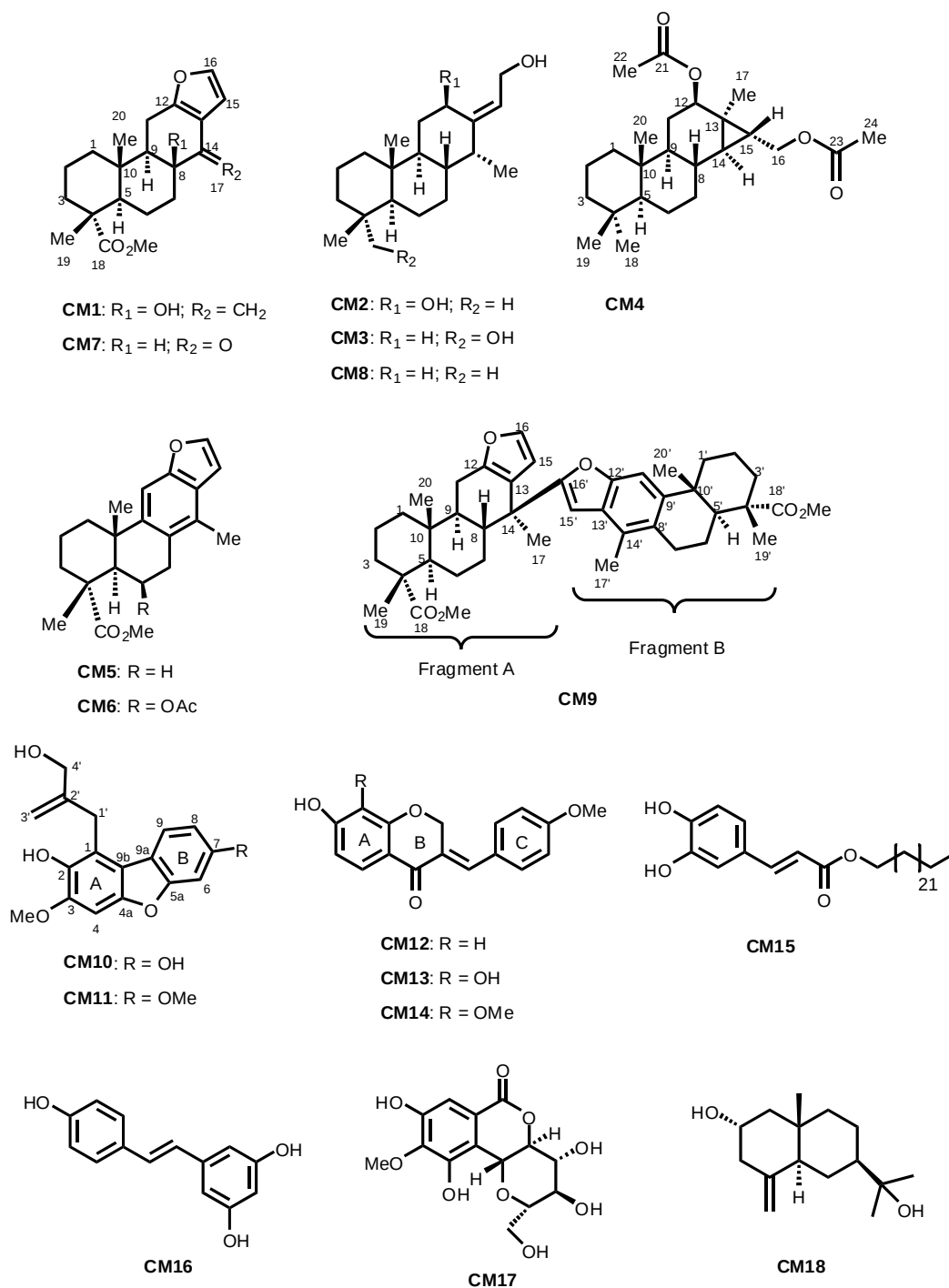
Project period: 15th July 2009 to 15th July 2012

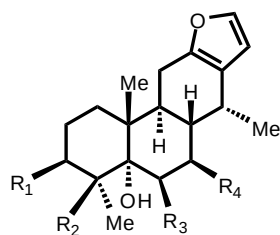
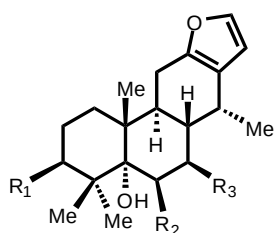
Anti-inflammatory assay-guided separation of extracts from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk., *Caesalpinia pulcherrima* and leaves of *Aglaia odorata* led to isolation of sixty-nine compounds. Eighteen of them were isolated from *C. mimosoides* Lamk. including seven new compounds: mimosol A-D (**CM1-CM4**) and mimosol E-G (**CM9-CM11**) and eleven known compounds (**CM5-CM8** and **CM12-CM18**). Twenty-six diterpenes were purified from *C. pulcherrima* including fifteen new compounds: pulcherrins D-R (**CP1-CP15**) and eleven known compounds (**CP16-CP26**). Twenty-five compounds were isolated from *A. odorata* including five new compounds: (1*R*,3*S*,7*E*,11*S*,12*R*)-3-hydroperoxydolabella-4(16),7-dien-18-ol (**AO1**), (1*R*,3*E*,7*R*,8*R*,11*S*,12*R*)-7,8-epoxydolabella-3-en-18-ol (**AO2**), 25-methoxy-5 α -dammar-20-en-3 β ,24-diol (**AO6**), 3 β -hydroxy-5 α -dammar-20-en-24,25-acetonide (**AO7**) and 24(*S*),25-epoxy-5 α -protost-20,25-dien-3-one (**AO8**) and twenty known compounds (**AO3-AO5** and **AO9-AO25**). Their structures were elucidated by 1D- and 2D-NMR spectral data as well as UV, IR, MS and X-ray crystallographic data and by comparison of the NMR spectroscopic data of the known compounds with those reported in the literature.

The anti-inflammatory activities of all compounds were evaluated as inhibitory activities against lipopolysaccharide (LPS) induced nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cell lines. Twenty-four compounds possessed potent nitric oxide inhibitory activity with IC₅₀ values ranging from 2.1 to 14.2 μ M, these being better than those of the positive control, indomethacin (IC₅₀ = 14.5 μ M), L-nitroarginine (L-NA; IC₅₀ = 61.8 μ M) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE; IC₅₀ = 5.6 μ M). Compounds **CM4**, **CM6**, **CM8**, and **CM12-CM14** were also tested for the inhibitory effect

on LPS-induced tumor necrosis factor- α (TNF- α) release in RAW264.7 cells. In addition, compounds **AO16**, **AO17** and **AO21** exhibited significant activity against prostaglandin E₂ (PGE₂) release with IC₅₀ values of 2.6, 16.1 and 23.0 μ M.

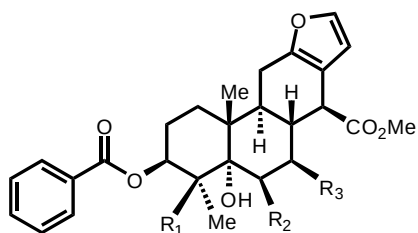
Keywords: *Caesalpinia mimosoides*, *Caesalpinia pulcherrima*, *Aglaia odorata*, anti-inflammatory, cassane diterpenes, dolabellane diterpenoid, dammarane triterpenoid, protostane triterpenoid



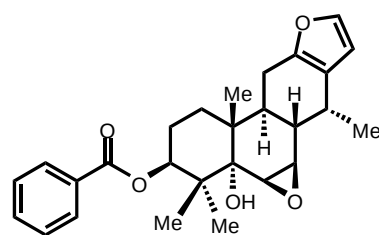


	R ₁	R ₂	R ₃
CP1	H	H	OAc
CP2	H	OH	OAc
CP3	H	OAc	OH
CP4	H	H	OCOPh
CP5	OCOPh	H	H
CP6	H	OCOPh	H
CP7	H	OCOCH ^E =CHPh	H
CP16	H	H	H
CP17	H	OCOPh	OH
CP18	H	OCOCH ^E =CHPh	OH
CP19	H	OH	OCOCH ^E =CHPh
CP20	OCOPh	H	OH

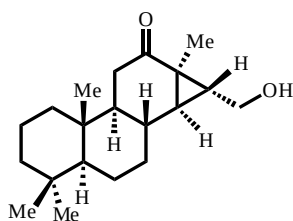
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
CP8	H	CHO	OCOPh	OH
CP9	H	CH ₂ OCOPh	OH	H
CP10	H	CO ₂ H	OCOPh	H
CP11	OCOPh	CO ₂ H	OCOPh	H
CP21	H	CO ₂ H	OCOPh	OCOPh
CP22	OH	CO ₂ H	OCOPh	OCOPh
CP23	OCOPh	CO ₂ H	OCOPh	OAc



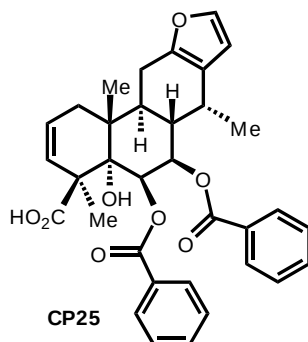
	R ₁	R ₂	R ₃
CP12	Me	OAc	OH
CP13	CH ₂ OAc	OH	OAc
CP24	Me	OH	OAc



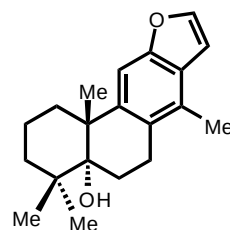
CP14



CP15

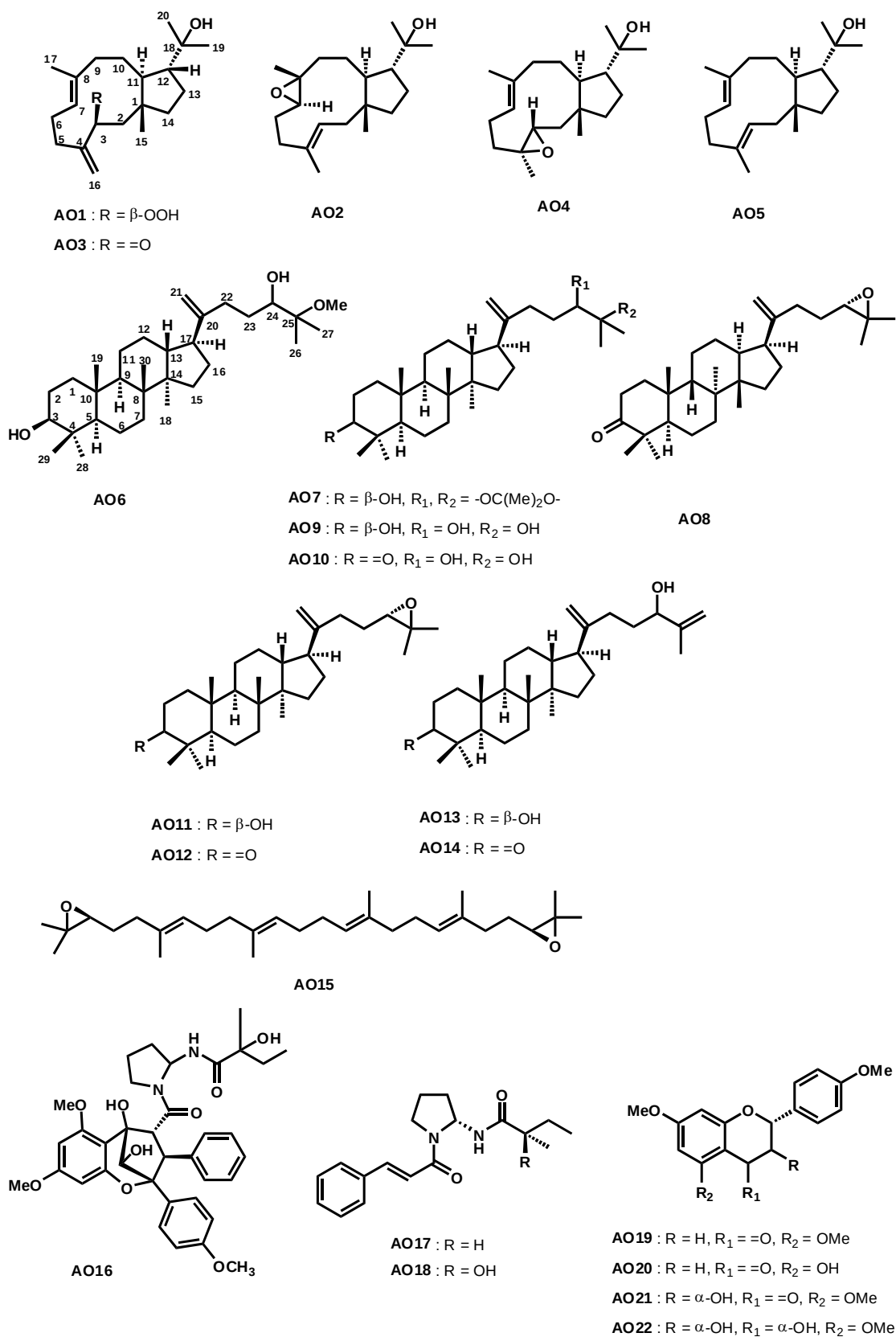


CP25

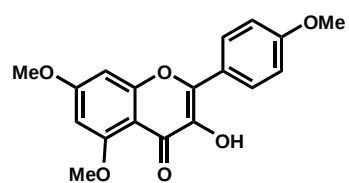


CP26

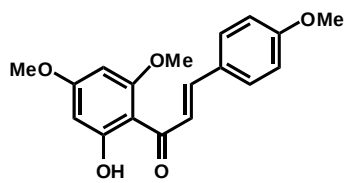
Chemical constituents isolated from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*



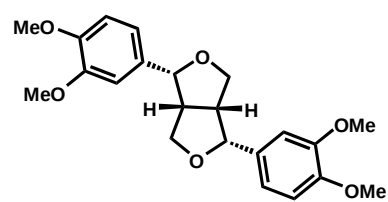
Chemical constituents isolated from the leaves of *Aglaia odorata*



AO23



AO24



AO25

Chemical constituents isolated from the leaves of *Aglaia odorata* (continued)

Executive summary

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีบทบาทสำคัญในการศึกษาเพื่อค้นคว้าหาการรักษาโรคและใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารประกอบเคมีชนิดต่างๆ (partial synthesis) การค้นหาลำดับประเภทย่อยทางเคมีจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาเพื่อให้เกิดการค้นพบตัวยาหรือสารประกอบใหม่ๆ ในอนาคต ดังนั้นจึงมีการวิจัยเพื่อหาลำดับประเภทย่อยสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรค หรือเพื่อสังเคราะห์สารคล้ายคลึง อย่างไรก็ตามการสกัดแยกสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นเพียงการเริ่มต้นในกระบวนการศึกษา เพื่อที่จะค้นพบสาระสำคัญใหม่ๆ เช่น การหาเอกลักษณ์หรือโครงสร้างของสารและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนั้นๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการสังเคราะห์ เกสซ์เคมีและการแพทย์ต่อไป

ฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจคือ ฤทธิ์ด้านการอักเสบซึ่งสำหรับการอักเสบนั้น มีกลไกการเกิดการอักเสบจากการที่ activated macrophages และ eosinophils ผลิต reactive oxygen species เช่น O_2^- , H_2O_2 , HOCl, NO, และ $OH^\cdot$ ซึ่ง oxygen species เหล่านี้จะกระตุ้นให้ macrophages และ eosinophils เคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่เกิดการอักเสบ แล้วกระตุ้นให้มีการหลั่ง cytokines และกระตุ้นการทำงานของ components ที่ใช้ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย มีรายงานว่า reactive oxygens radicals เหล่านี้เหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย และมีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคกระเพาะ โรคตับ โรคไขข้ออักเสบ และ โรคหอบ เป็นต้น

คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสำคัญจากต้นผักปู้ย่า หางนกยูงไทยและประยงค์ อีกทั้งจากการศึกษาวิจัยในระดับนำร่องเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจจากพืชสมุนไพรไทย ผู้วิจัยพบว่า สารสกัดหยาบจากรากผักปู้ย่า รากหางนกยูงไทยและใบประยงค์มีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ดีมาก และจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากรากผักปู้ย่า สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 18 สาร เป็นสารใหม่ 7 สารและเป็นสารที่มีรายงานมาแล้ว 11 สาร จากรากหางนกยูงไทยสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 26 สาร เป็นสารใหม่ 15 สารและเป็นสารที่มีรายงานมาแล้ว 11 สาร และจากใบประยงค์สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 25 สาร เป็นสารใหม่ 5 สาร และเป็นสารที่มีรายงานมาแล้ว 20 สาร ซึ่งสารบริสุทธิ์ส่วนใหญ่ที่แยกได้แสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ดีมาก

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ (ไทย)	iii
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	viii
Executive summary	xiii
สารบัญ	xiv
สารบัญตาราง	xvi
สารบัญรูปภาพ	xviii
สารบัญแผนผัง	xix
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	8
1. การสกัดและการแยกสารจากรากของต้นผักปู้ย่า	8
2. การสกัดและการแยกสารจากรากของต้นหางนกยูงไทย	12
3. การสกัดและการแยกสารจากใบของต้นประยงค์	17
4. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ	21
ผลการทดลอง วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง	23
1. การหาสูตรโครงสร้างของสารจากรากของต้นผักปู้ย่า (<i>C.mimosoides</i>)	23
2. ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสาร CM1-CM18 จากรากของต้นผักปู้ย่า	37
3. การหาสูตรโครงสร้างของสารจากรากของต้นหางนกยูงไทย (<i>C.pulcherrima</i>)	39

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4. ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสาร CP1-CP26 จากรากของต้นหางนกยูงไทย	59
5. การหาสูตรโครงสร้างของสารจากใบของต้นประยงค์ (<i>A.odorata</i>)	61
6. ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสาร AO1- AO25 จากใบของต้นประยงค์	74
สรุปผลการทดลอง	77
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย	78
Output จากโครงการ	84
ภาคผนวก	86
- ผลงานตีพิมพ์	86

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz) ของสาร CM1 และ CM2	27
2	แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร CM3 และ CM4	30
3	แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร CM9	32
4	แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, acetone- d_6) ของสาร CM10 และ CM11	33
5	Inhibitory effects on NO production ของสาร CM1-CM18	38
6	Inhibition on TNF- α production ของสาร CM4, CM6, CM8, และ CM12-CM14	38
7	แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร CP1-CP3	43
8	แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร CP4	45
9	แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร CP5-CP7	48
10	แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร CP8 และ CP9	50
11	แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร CP10 และ CP11	52
12	แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร CP12 และ CP13	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร CP14 และ CP15	58
14	Inhibitory effects on NO production ของสาร CP1–CP26	60
15	แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร AO1 และ AO2	67
16	แสดงข้อมูล ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร AO6–AO8 และ protosta-20,24-dien- 3β -ol	72
17	แสดงข้อมูล ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) ของสาร AO6–AO8 และ protosta-20,24-dien- 3β -ol	73
18	Inhibitory effects on NO production ของสาร AO1–AO25	75
19	Inhibition of PGE_2 production ของสาร AO5, AO6, AO10, AO12, AO14, AO16, AO17 และ AO21	76

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากรากผักปวยล่า	24
2	องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากรากหางนกยูงไทย	40
3	องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากใบประยงค์	62

สารบัญแผนผัง

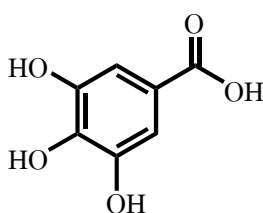
แผนผังที่		หน้า
1	เส้นทางการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ cassane และ cyclopimarane	36
2	เส้นทางการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ dammarane (AO6, AO7 และ AO9–AO14) และ protostane (AO8)	74

บทนำ

การสำรวจเอกสารทางวิทยาศาสตร์ของผักปู้ย่า หางนกยูงไทย และประยงค์

ผักปู้ย่า (*Caesalpinia mimosoides* Lamk.) เป็นไม้เลื้อยลำต้นตั้งตรงหรือพันกับไม้อื่น อยู่ในวงศ์ Leguminosae-Caesalpinioideae มีชื่อเรียกแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น ภาคเหนือเรียก ผักปู้ย่า หานามปู้ย่า ทะเน้าซอญ ภาคกลางเรียก ช้าเลียด ปราจีนบุรี และอุดรธานี เรียก ผักกาดย่าน นครพนม เรียก ผักชะยา เลย เรียก ผักคายา ลำต้นมีหนามแหลม ยอดอ่อนสีน้ำตาลแดง ใบ เป็นใบประกอบแบบขนนก ออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน ก้านใบสีแดง มีหนามแหลมตามกิ่งก้านทั่วไป ใบลักษณะกลมมน สามารถหุบเข้าหากันได้เมื่อสัมผัส ดอก เป็นช่อยาว สีเหลืองบาน ผล เป็นฝัก บวมพอง ขนาดเท่าหัวแม่มือ ภายในมีเมล็ด 2 เมล็ด ใบและช่อดอกมีกลิ่นฉุนรุนแรงคล้ายกลิ่นแมงกะแท้วหรือแมงดา พบทุกภาคของประเทศ ผักปู้ย่าพบขึ้นในแหล่งธรรมชาติบริเวณป่าละเมาะ ป่าเต็งรัง ป่าผสมผลัดใบ และบริเวณชายป่าที่รกร้าง ชอบขึ้นร่วมกับต้นไม้อื่น ยอดอ่อน ใบและดอกใช้รับประทานเป็นผัก ใช้ประโยชน์เป็นพืชสมุนไพร คือดอกและยอดอ่อน มีรสเปรี้ยว ฝาดเผ็ดร้อนกัน จึงมีสรรพคุณบำรุงเลือด แก้วิงเวียน นอกจากนั้นยังพบว่าผักปู้ย่ามีศักยภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ

สกุล *Caesalpinia* พบในประเทศไทย 19 สกุล และมีผู้ศึกษาวิจัยองค์ประกอบทางเคมีในพืชชนิดต่างๆ จากสกุลนี้มาแล้วไม่น้อย อย่างไรก็ตามเฉพาะในกรณีของพืชชนิดนี้ มีรายงานการวิจัยองค์ประกอบทางเคมีเพียงฉบับเดียว เป็นการรายงานโครงสร้างของ gallic acid ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิก (Chanwitheesuk et al., 2007)

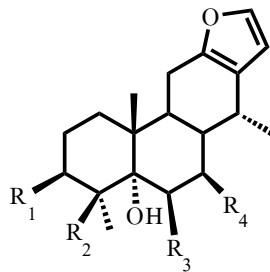


Gallic acid

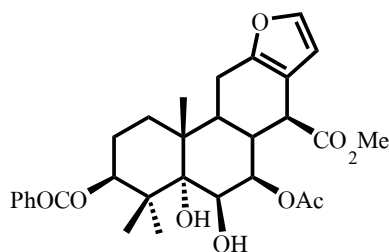
หางนกยูงไทย (*Caesalpinia pulcherrima* SW) อยู่ในวงศ์ Leguminosae-Caesalpinioideae มีชื่อเรียกแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น ภาคกลางเรียก หางนกยูงไทย ภาคเหนือเรียก ชมพอ, พญา, ไม้บุญ, ส้มผ่อ, ส้มพอ แม่ฮ่องสอนเรียก จำพอ, ชำพอ นครราชสีมาเรียก ขวางขอย ลักษณะทั่วไปของหางนกยูงไทยคือ เป็นไม้พุ่มเตี้ยชนิดหนึ่ง สูงประมาณ 1-2.5 เมตร ทรงพุ่มกลม บางต้นมีหนาม แต่บางต้นก็ไม่มี ใบประกอบแบบขนนก สองชั้น ออกสลับ ช่อใบย่อยมีใบย่อย 7-11 คู่ รูปขอบขนาน หรือรูปไข่กลับ ปลายมนหรือเว้า โคนเบี้ยวกว้าง 0.5-1.7 เซนติเมตร ยาว 1-2.5 เซนติเมตร ออกดอกเป็นช่อตาม

ชอกใบและปลายกิ่ง กลีบดอก 5 กลีบ ขนาดไม่เท่ากัน เกสรตัวผู้ 10 ดอก ออกดอกตลอดปี สีของดอกมีหลายสีตามพันธุ์ ได้แก่ เหลือง แดง ส้ม ชมพูแก่ แดงประขาว มีผลเป็นฝักแบนกว้าง 1.5-2 เซนติเมตร ยาว 10-12 เซนติเมตร เมื่อแก่แตกได้ ออกฝักตลอดปี ซึ่งภายในฝักมีเมล็ด 8-10 เมล็ด เมล็ดมีรูปร่างกลม เมื่อแก่มีสีดำแข็ง ประโยชน์ทางสมุนไพร คือ ราก ใช้เป็นยาขับโลหิตระดูสตรี แก้บวม รักษาวัณโรค

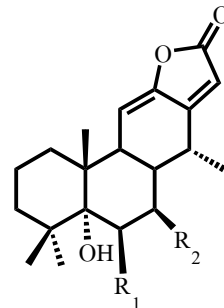
จากการสำรวจข้อมูลทางวิชาการของพืชชนิดนี้ พบว่าต้นหางนกยูงไทยมีองค์ประกอบทางเคมีของสารหลายกลุ่ม ตัวอย่างองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากต้นหางนกยูงไทย แสดงดังนี้ เช่น อนุพันธ์ของสารกลุ่มไดเทอร์พีน ชนิดคาสเซน (cassane) ซึ่งแยกได้จากส่วนลำต้น (Pranithanchai et al., 2009)



$R_1 = H, R_2 = Me, R_3 = OCOPh, R_4 = OCOMe$; Pulcherrin A
 $R_1 = OCOPh, R_2 = Me, R_3 = H, R_4 = OH$; Pulcherrin B

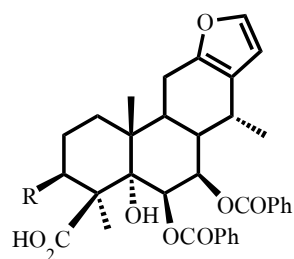


Pulcherrin C

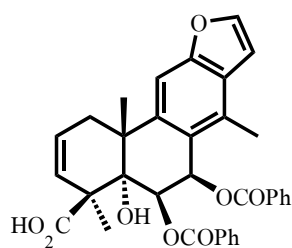


$R_1 = OCOCH=CHPh, R_2 = OH$; Neocaesalpin P
 $R_1 = OCOPh, R_2 = H$; Neocaesalpin Q
 $R_1 = OCOPh, R_2 = OH$; Neocaesalpin R

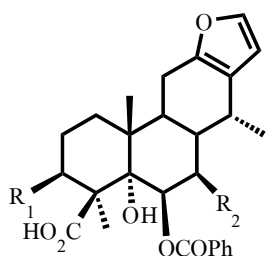
มีรายงานการพบอนุพันธ์ของสารกลุ่มไดเทอร์ปีน ชนิดคาสเซน จากส่วนราก หลายสาร (McPherson et al., 1986; Patil et al., 1997; Promsawan et al., 2003 and Roach et al. 2003)



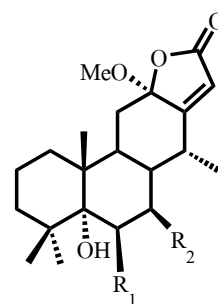
R = OH; Pulcherrimin A
R = H; Pulcherrimin B
R = CO₂ Me; Pulcherrimin D



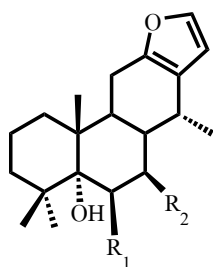
Pulcherrimin B



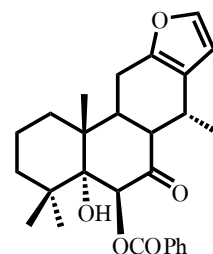
R₁ = OCOPh, R₂ = OCOMe; Pulcherrimin E
R₁ = H, R₂ = OCOMe; Pulcherrimin F



R₁ = R₂ = H; Neocaesalpin E
R₁ = OCOPh, R₂ = OH; Neocaesalpin F
R₁ = OCOCH=CHPh, R₂ = OH; Neocaesalpin G

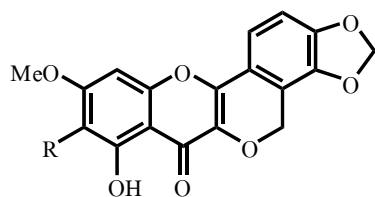


R₁ = R₂ = OH; 6β-Hydroxyisovouacapenol C
R₁ = OH, R₂ = OCOPh; 7β-Acetyl-6β-hydroxyisovouacapenol C
R₁ = OCOPh, R₂ = OCOMe; Isovouacapenol C monoacetate

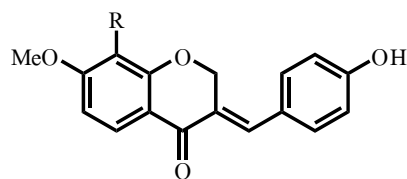


7-Keto-isovouacapenol C

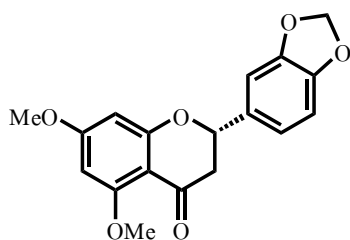
นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบอนุพันธ์ของสารกลุ่มโฮโมไอโซฟลาโวนอยด์ (homoisoflavonoid) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ดังนี้ (McPherson et al., 1983; Srinivas et al., 2003; Zhao et al., 2004; Maheswara et al., 2006 and Das et al. 2009)



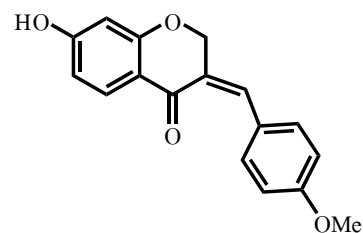
R = H; Pulcherrimin
R = OMe; 6-Methoxypulcherrimin



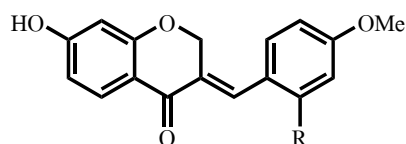
R = H; Bonducellin
R = OMe; 8-Methoxybonducellin



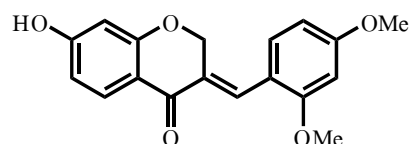
5,7-Dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavanone



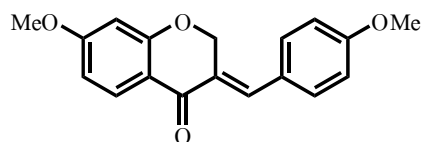
Isobonducellin



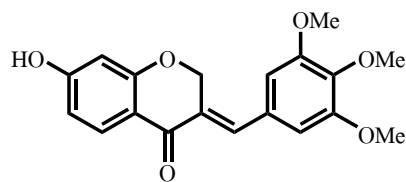
R = H; Dihydrobonducellin
R = OMe; 2'-Methoxydihydrobonducellin



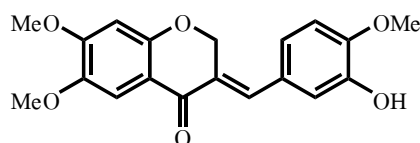
2'-Methoxydihydrobonducellin



(E)-7-Methoxy-3-(4'-methoxybenzylidene)chroman-4-one



(E)-7-Hydroxy-3-(3',4',5'-trimethoxybenzylidene)chroman-4-one



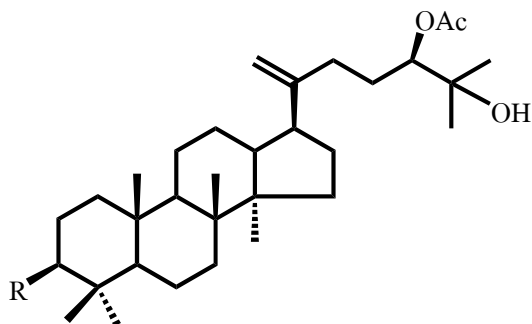
(3E)-2,3-Dihydro-6,7-dimethoxy-3[(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)methylene]-4H-1-benzopyran-4-one

นอกจากนี้ยังมีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น ในส่วนของเนื้อไม้แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และ antioxidant (Pawar et al., 2009) ส่วนของรากแสดงฤทธิ์ต้านวัณโรค (Promsawan et al., 2003) ในส่วนของกิ่ง และaerial parts แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Ragasa et al., 2002 and Srinivas et al., 2003) และฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Kumar et al., 2003 and Rao et al., 2005) เป็นต้น

ประยงค์ (*Aglaia odorata* Lour.) เป็นไม้พุ่มขนาดย่อมถึงใหญ่ อยู่ในวงศ์ Meliaceae รู้จักทั่วไปในชื่อ Chinese rice flower ใบมีสีเขียวเข้มและหนาเป็นมัน เป็นแบบใบรวม กลุ่มใบหนึ่งๆ จะประกอบด้วยใบย่อย 5 ใบ ลักษณะใบโค้งมนปลายแหลม ออกดอกเป็นช่อ ลักษณะดอกเป็นเมื่อดกลมเล็กๆ สีเหลืองคล้ายไขปลาคู ก้านดอกแตกเป็นกิ่งก้านสาขา ในก้านดอกหนึ่งๆ จะมีดอกตั้งแต่ 20-30 ดอก ดอกมีสีเหลือง เกสรดอกเป็นสีขาวเล็กๆ อยู่ภายใน เมื่อดอกบานก็ยังดูเป็นเมื่อดกลม มีขนาด 0.2-0.3 ซม. ดอกมีกลิ่นหอมเย็น ผลเป็นรูปรี ผลสุกมีสีแดง ประเทศไทยพบขึ้นทั่วไป ในต่างประเทศ พบในอินเดียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

สรรพคุณตามตำรายาไทย ก้านใบ แก้ฟกช้ำและแผลฝีหนอง ราก แก้เลือดกำเดา ทำให้อาเจียน ถอนพิษ เบื่อเมา ช่วยให้เจริญอาหาร แก้ผอมแห้ง แก้อาเจียนเป็นโลหิต แก้ไข้ ใบ ช่วยให้เจริญอาหาร แก้ไข้ รักษาการโรค แก้ฟกช้ำ รักษาฝีหนอง ทำให้อาเจียน ถอนพิษเบื่อเมา แก้ประจำเดือนมาก ผิดปกติ ดอก ช่วยเร่งการคลอด แก้เมาค้าง ฟอกปอด ทำให้ตาสว่าง แก้อ่อนดัดกระหาย แก้ไอ แก้แน่นหน้าอก แก้เวียนศีรษะ (บุญยะประภัศร, นันทวัน และโชคชัยเจริญพร, อรนุช 2542)

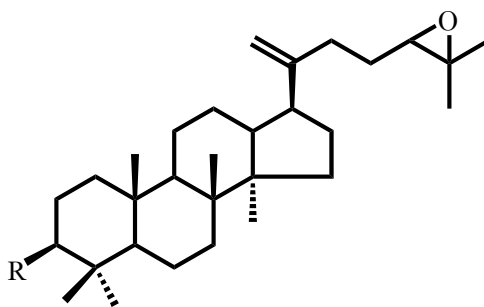
จากการสำรวจข้อมูลทางวิชาการของพืชชนิดนี้ พบว่าต้นประยงค์มีองค์ประกอบทางเคมีของสารหลายกลุ่ม เช่น อนุพันธ์ของสารกลุ่มไดรเทอร์พีน ชนิดดามารน (dammarane) ที่มีลักษณะเฉพาะคือที่โครงสร้างส่วนปลายมีหมู่แทนที่เป็นหมู่อิพอกไซด์ และ/หรือมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไดออกไซด์ (Shiengthong et al., 1965; Boar et al., 1973 and Boar et al., 1977)



R = OH; 3 β -Acetoxyl dammar-20-ene-24(R),25-diol

R = OAc; 3 β ,24(R)-Diacetoxyl dammar-20-ene-25-ol

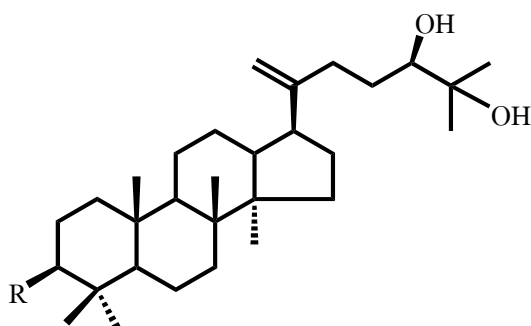
R = =O; 24(R)-Acetoxy-25-hydroxyl dammar-20-ene-3-one



R = OH; 24,25-Epoxydammar-20-ene-3-ol

R = OAc; 3 β -Acetoxy-24,25-epoxydammar-20-ene

R = =O; 24,25-Epoxydammar-20-ene-3-one

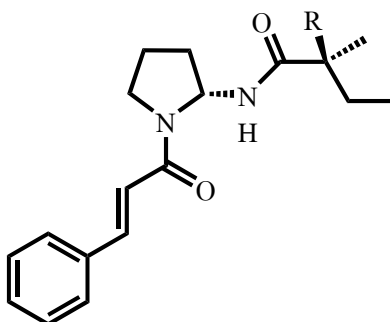


R = OH; Dammar-20-ene-3 β ,24(*R*),25-triol

R = OAc; 3 β -Acetoxydammar-20-ene-24(*R*),25-diol

R = =O; 24(*R*),25-Dihydroxydammar-20-ene-3-one

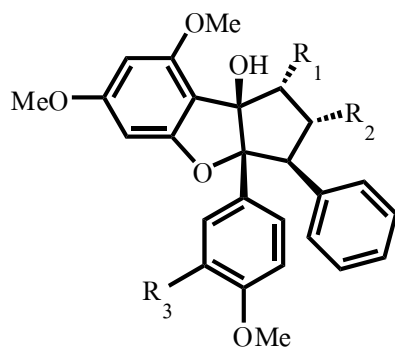
Shiengthong et al., 1979 รายงานการพบ odorine และ (+)-odorinol จากส่วนใบ และในปี ค.ศ. 1982 Hayashi et al., พบ (-)-odorinol ซึ่งแสดงฤทธิ์ ด้านมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด P388 (P-388 lymphotic leukemia) ในหนู



R = H; Odorine

R = OH; (-)-Odorinol

ในปี ค.ศ. 1993 Ishibashi et al. และปี ค.ศ. 1999 Nugroho et al. รายงานการพบอนุพันธ์ของสารกลุ่ม rocaglamide หลายสาร



$R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{CON}(\text{CH}_3)_2, R_3 = \text{OH}$; C-3'-Hydroxyrocaglamide

$R_1 = \text{OCOCH}_3, R_2 = \text{CON}(\text{CH}_3)_2, R_3 = \text{OH}$; C-1-O-Acetyl-3'-hydroxyrocaglamide

$R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{CON}(\text{CH}_3)_2, R_3 = \text{OCH}_3$; C-3'-Methoxyrocaglamide

$R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OCH}_3$; C-3'-Methoxyrocaglaol

$R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{CONHCH}_3, R_3 = \text{OH}$; C-3'-Hydroxydemethylrocaglate

$R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{COOCH}_3, R_3 = \text{OH}$; C-3'-Hydroxymethylrocaglate

$R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{CONH}_2, R_3 = \text{OH}$; C-3'-Hydroxydidemethylrocaglamide

$R_1 = =\text{NOH}, R_2 = \text{COOCH}_3, R_3 = \text{OCH}_3$; C-1-Oxime-C-3'-methoxymethylrocaglate

นอกจากนี้ยังมีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Inana et al., 2001) ต้านเชื้อรา (Engel et al., 2000) ยับยั้งการกินอาหารของแมลง (Ishibashi et al., 1993) ฆ่าตัวอ่อนแมลง (Sinchaisri et al., 1990) และยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase (Tan et al., 1991) เป็นต้น

วิธีการทดลอง

1. การสกัดและการแยกสารจากรากของต้นผักปวยล่า

นำรากผักปวยล่ามาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปตากลมให้แห้ง ได้น้ำหนักแห้งรวม 1.7 กิโลกรัม แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 2 ครั้งๆละ 5 วัน เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดหยาบ CH_2Cl_2 (40.3 g) จากนั้นทำการสกัดซ้ำแต่ใช้ acetone แทน CH_2Cl_2 เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดหยาบ acetone (47.1 g)

นำส่วนสกัดหยาบ CH_2Cl_2 มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (Quick Column Chromatography; QCC) และชะด้วย CH_2Cl_2 แล้วเพิ่มขั้วด้วย acetone และ MeOH ตามลำดับ ได้ 10 fractions (C1-C10)

Fraction C3 (2.41 g) นำมาแยกต่อด้วย QCC และชะด้วย 5% EtOAc-hexane ได้ 5 subfractions (C3a-C3e) subfraction C3b (851.6 mg) เมื่อตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเกิดของแข็ง ล้างของแข็งสีเหลืองด้วย CH_2Cl_2 ได้สาร **CM6** (680.3 mg) และนำส่วนของสารละลายที่ระเหยแห้งแล้ว (160.5 mg) มาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 2% EtOAc-hexane ได้สาร **CM5** (40.6 mg) และ **CM8** (7.2 mg) ส่วน subfraction C3c (793.7 mg) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 5% EtOAc-hexane ได้สาร **CM6** (15.6 mg) และ **CM8** (35.2 mg)

Fraction C5 (6.49 g) นำมาแยกต่อด้วย QCC และชะด้วย hexane จากนั้นทำการไล่ขั้วโดยใช้ EtOAc ได้ 6 subfractions (C5a-C5f) subfraction C5c (793.7 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction C3c แต่ชะด้วย 2% acetone-hexane ได้สาร **CM5** (460.4 mg), **CM9** (10.2 mg) และ **CM1** (50.8 mg) subfraction C5e (742.8 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction C3c แต่ชะด้วย 5% acetone-hexane ได้สาร **CM7** (10.4 mg)

Fraction C7 (1.18 g) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 10% acetone-hexane ได้ 6 subfractions (C7a-C7f) subfraction C7c (350.8 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ fraction C7 แต่ชะด้วย 15% acetone-hexane ให้สาร **CM3** (102.4 mg) **CM2** (7.4 mg) และ **CM4** (7.0 mg) subfraction C7e (110.0 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ fraction C7 แต่ชะด้วย 100% CH_2Cl_2 ให้สาร **CM11** (10.3 mg)

Fraction C9 (3.83 g) นำไปแยกต่อด้วย QCC ในลักษณะที่คล้ายกับ fraction C5 แต่ทำการไล่
ขั้วด้วย acetone ได้ 6 subfractions (C9a-C9f) subfraction C9b (384.7 mg) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเกิด
เป็นของแข็งสีขาว จากนั้นล้างของแข็งด้วย CH_2Cl_2 ให้สาร **CM15** (230.3 mg) subfraction C9d
(793.7 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ fraction C7 แต่จะด้วย
2% acetone- CH_2Cl_2 ให้สาร **CM12** (13.3 mg) subfraction C9e (220.5 mg) นำไปแยกต่อด้วย column
chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ fraction C7 แต่จะด้วย 5% acetone- CH_2Cl_2 ให้สาร **CM13**
(10.3 mg)

นำส่วนสกัดหยาบ acetone (47.1 g) มาแยกด้วย QCC แล้วชะด้วย hexane แล้วเพิ่มขั้วด้วย
 CH_2Cl_2 , acetone และ MeOH ให้ 9 fractions (A1-A9) fraction A3 (1.05 g) นำมาแยกต่อด้วย QCC
และชะด้วย 2% acetone- CH_2Cl_2 ให้สาร **CM14** (35.3 mg)

Fraction A5 (1.33 g) นำไปแยกต่อในลักษณะเดียวกับ fraction A3 ให้ 7 subfractions (A5a-
A5g) subfraction A5c (88.1 mg) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเกิดเป็นของแข็งสีขาว จากนั้นล้างของแข็งด้วย
 CH_2Cl_2 ให้สาร **CM13** (15.3 mg) subfraction A5e (350.0 mg) นำมาแยกต่อด้วย column
chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 4% MeOH- CH_2Cl_2 ให้สาร **CM18** (70.3 mg)
และ **CM16** (51.3 mg) subfraction A5f (80.0 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ใน
ลักษณะที่คล้ายกับ fraction A5e แต่จะด้วย 10% EtOAc- CH_2Cl_2 ให้สาร **CM10** (10.3 mg)

Fraction A7 (235.2) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเกิดเป็นของแข็งสีขาว จากนั้นล้างของแข็งด้วย
MeOH ให้สาร **CM17** (150.3 mg)

Mimosol A (CM1): ของแข็งสีขาว; mp 214-216 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{27} -41.4^\circ$ (*c* 0.76, CHCl_3); UV
(CH_3OH) λ_{max} (log ϵ) 210 (4.95), 235 (4.65) nm; IR (neat) ν_{max} 3429 (O-H), 2930 (C-H), 1718
(C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 344.1997 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4$, 344.1988); ^1H NMR (*acetone-d*₆,
300 MHz) และ ^{13}C NMR (*acetone-d*₆, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 1 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบใน
ธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Mimosol B (CM2): ของแข็งสีขาว; mp 143-145 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{27} -40.6^\circ$ (*c* 0.30, CHCl_3); UV
(CHCl_3) λ_{max} (log ϵ) 225 (3.47) nm; IR (neat) ν_{max} 3397 (O-H), 2928 (C-H) cm^{-1} ; HREIMS: m/z
288.2460 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}$, 288.2453); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) และ ^{13}C NMR
(CDCl_3 , 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 1 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Mimosol C (CM3): ของแข็งสีขาว; mp 102-103 °C; $[\alpha]_D^{27} -37.1^\circ$ (*c* 1.10, CH₃OH); UV (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 223 (3.45) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3364 (O-H), 2930 (C-H) cm⁻¹; HREIMS: *m/z* 306.2545 [M]⁺ (calcd for C₂₀H₃₄O₂, 306.2559); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) และ ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 2 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติแต่เคยมีรายงานการสังเคราะห์มาก่อน

Mimosol D (CM4): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} +24.16^\circ$ (*c* 1.02, CHCl₃); IR (neat) $\nu_{\max}$ 1735 (C=O), 1243 cm⁻¹; HREIMS: *m/z* 390.2780 [M]⁺ (calcd for C₂₄H₃₈O₄, 390.2770); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) และ ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 2 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Taepeenin A (CM5): ของแข็งสีขาว; mp 155-156 °C; $[\alpha]_D^{27} +101.9^\circ$ (*c* 0.77 in CHCl₃); UV (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 253 (3.55), 281 (2.90), 292 (2.87) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$: 2930 (C-H), 1720 (C=O) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Taepeenin D (CM6): ของแข็งสีขาว; mp 116-117 °C; $[\alpha]_D^{27} -41.1^\circ$ (*c* 0.02 in CHCl₃); UV (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 254 (4.79), 281 (4.47), 290 (4.40) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$: 2927 (C-H), 1735 (C=O) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Nortaepeenin A (CM7): $[\alpha]_D^{27} -3.90^\circ$ (*c* 0.58 in CHCl₃); UV (CH₃OH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 253 (4.65) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$: 2927 (C-H), 1728 (C=O) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Taepeenin L (CM8): ของแข็งสีขาว; mp 124-126 °C; $[\alpha]_D^{27} +25.4^\circ$ (*c* 0.67 in CHCl₃); UV (CH₃OH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 243 (3.22) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$: 3359 (O-H), 2935 (C-H) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Mimosol E (CM9): ของแข็งสีขาว; mp 141-142 °C; $[\alpha]_D^{27} +132.8^\circ$ (*c* 0.37, CHCl₃); UV (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 258 (5.28), 283 (4.93), 293 (4.89) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 2929 (C-H), 1720 (C=O) cm⁻¹; HREIMS: *m/z* 654.3948 [M]⁺ (calcd for C₄₂H₅₄O₆, 654.3920); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz), และ ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 3 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Mimosol F (CM10): ของแข็งสีขาว; mp 215-216 °C; UV (CH₃OH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 207 (5.33), 222 (5.35), 250 (5.12), 309 (5.12), 318 (5.11) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3386 (O-H), 2927 (C-H) cm⁻¹; HREIMS: *m/z* 300.1011 [M]⁺ (calcd for C₁₇H₁₆O₅, 300.1007); ¹H NMR (*acetone-d*₆, 300 MHz), และ

^{13}C NMR (*acetone- d_6* , 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 4 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Mimosol G (CM11): ของแข็งสีขาว; mp 152-153 °C; UV (CH_3OH) λ_{max} (log ϵ) 209 (5.28), 222 (5.32), 250 (5.11), 258 (5.08), 308 (5.10), 315 (5.07) nm; IR (neat) ν_{max} 3419 (O-H), 2927 (C-H) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 314.118 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_5$, 314.1154); ^1H NMR (*acetone- d_6* , 300 MHz), และ ^{13}C NMR (*acetone- d_6* , 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 4 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

(*E*)-7-Hydroxy-3-(4-methoxybenzyl)chroman-4-one (CM12): ของแข็งสีเหลือง; mp 178-180 °C; UV (CH_3OH) λ_{max} (log ϵ): 209 (5.43), 232 (5.24), 317 (5.23), 357 (5.29) nm; IR (neat) ν_{max} : 3367 (O-H), 2927 (C-H), 1700 (C=O), 1605 (C=C) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

(*E*)-7,8-Dihydroxy-3-(4-methoxybenzyl)chroman-4-one (CM13): ของแข็งสีเหลือง; mp 191-192 °C; UV (CH_3OH) λ_{max} (log ϵ): 211 (5.62), 350 (5.58) nm; IR (neat) ν_{max} : 3367 (O-H), 2928 (C-H), 1697 (C=O), 1603 (C=C) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

(*E*)-7-hydroxy-8-methoxy-3-(4-methoxybenzyl)chroman-4-one (CM14): ของแข็งสีเหลือง; mp 103-105 °C; UV (CH_3OH) λ_{max} (log ϵ): 210 (5.40), 327 (5.23), 350 (5.24) nm; IR (neat) ν_{max} : 3376 (O-H), 2928 (C-H), 1699 (C=O), 1598 (C=C) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Tetracosyl caffeate (CM15): ของแข็งสีขาว; mp 85-86 °C; UV (CH_3OH) λ_{max} (log ϵ): 205 (5.28), 243 (4.92), 298 (4.98), 330 (5.09) nm; IR (neat) ν_{max} : 3367 (O-H), 2918 (C-H), 1700 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Resveratrol (CM16): ของแข็งสีขาว; mp 250-251 °C; UV (CH_3OH) λ_{max} (log ϵ): 216 (6.17), 305 (6.23), 318 (6.21) nm; IR (neat) ν_{max} : 3360 (O-H), 2925 (C-H), 1607 (C=C) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Bergenin (CM17): ของแข็งสีขาว; mp 154-156 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{27} - 53.1^\circ$ (c 1.71 in CH_3OH); UV (CH_3OH) λ_{max} (log ϵ): 219 (4.48), 275 (5.02), 311 (4.90) nm; IR (neat) ν_{max} : 3381 (O-H), 2925 (C-H), 1699 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

(+)-Pterocarpol (CM18): ของแข็งสีขาว; mp 99-100 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{27} + 45.6^\circ$ (c 0.24 in CH_3OH); IR (neat) ν_{max} : 3365 (O-H), 2934 (C-H) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

2. การสกัดและการแยกสารจากรากของต้นหางนกยูงไทย

นำรากหางนกยูงไทยมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปตากลมให้แห้ง ได้น้ำหนักแห้งรวม 6.3 กิโลกรัม แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 2 ครั้งๆละ 5 วัน เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดหยาบ CH_2Cl_2 (75.3 g) นำส่วนสกัดหยาบ CH_2Cl_2 มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (Quick Column Chromatography; QCC) และชะด้วย hexane แล้วเพิ่มขั้วด้วย EtOAc และ MeOH ได้ 16 fractions (P1–P16)

Fraction P2 (5.9 g) นำมาแยกต่อด้วย QCC และชะด้วย 20% hexane– CH_2Cl_2 ให้สาร **CP26** (90.5 mg), **CP16** (50.2 mg), **CP6** (275.2 mg), **CP7** (90.0 mg) และ **CP5** (28.1 mg) และของผสมสองตัว (158.0 mg) ซึ่งนำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 10% acetone–hexane ให้สาร **CP4** (15.0 mg) และ **CP1** (10.3 mg)

Fraction P4 (10.0 g) เมื่อตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเกิดของแข็งสีขาว ล้างของแข็งด้วย CH_2Cl_2 ได้สาร **CP17** (1.54 g), และนำส่วนของสารละลายระเหยแห้งแล้ว (7.5 g) มาแยกต่อด้วย QCC และชะด้วย hexane และเพิ่มขั้วด้วย CH_2Cl_2 และ EtOAc ตามลำดับ ให้ 6 subfractions (P4a–P4f) subfraction P4c (183.4 mg) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 10% acetone–hexane ให้สาร **CP2** (5.8 mg) subfraction P4d (584.9 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction P4c แต่ชะด้วย 70% CH_2Cl_2 –hexane ให้สาร **CP14** (5.2 mg) และ **CP9** (10.0 mg)

Fraction P6 (624.2 mg) เมื่อตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเกิดของแข็งสีขาว ล้างของแข็งด้วย CH_2Cl_2 ได้สาร **CP18** (138.0 mg)

Fraction P7 (2.9 g) นำมาแยกต่อด้วย QCC และชะด้วย hexane และเพิ่มขั้วด้วย CH_2Cl_2 และ EtOAc ตามลำดับ ให้ 9 subfractions (P7a–P7i) และให้สาร **CP21** (355.0 mg) subfraction P7b (80.0 mg) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 20% acetone–hexane ให้สาร **CP19** (50.0 mg) subfraction P7e (401.4 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction P7b ให้สาร **CP8** (18.2 mg) และ **CP11** (25.0 mg), สาร **CP3** (3.0 mg) สามารถแยกได้จาก subfraction P7f (273.5 mg) ด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction P7b เช่นเดียวกับ subfraction P7g (117.0 mg) ซึ่งจะให้สาร **CP10** (25.0 mg)

Fraction P9 (5.0 g) เมื่อตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเกิดของแข็งสีขาว ล้างของแข็งด้วย CH_2Cl_2 ได้สาร **CP23** (1.14 g), และนำส่วนของสารละลาย (3.8 g) มาแยกต่อด้วย QCC และชะด้วย 30%

EtOAc-CH₂Cl₂ ให้ 5 subfractions (P9a-P9e) subfraction P9c (256.4 mg) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 30% acetone-CH₂Cl₂ ให้สาร **CP20** (70.0 mg)

Fraction P10 (2.9 g) นำมาแยกต่อด้วย QCC และชะด้วย 20% จนถึง 50% CH₂Cl₂-EtOAc ให้ 7 subfractions (P10a-P10g) subfraction P10c (283.2 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction P9c แต่ชะด้วย 40% acetone-CH₂Cl₂ ให้สาร **CP15** (7.0 mg) ในขณะที่สาร **CP25** (13.0 mg) ถูกแยกมาจาก subfraction P10f (124.7 mg) ด้วยลักษณะเดียวกันแต่จะชะด้วย 10% CH₂Cl₂-acetone

Fraction P13 (2.7 g) นำไปแยกต่อในลักษณะที่คล้ายกับ fraction P10 แต่ชะด้วย 20% acetone-CH₂Cl₂ ให้ 6 subfractions (P13a-P13f) subfraction P13c (151.7 mg) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 40% EtOAc-hexane ให้สาร **CP13** (10.0 mg) และสาร **CP24** (90.0 mg) subfraction P13e (197.8 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction P13c แต่ชะด้วย 10% EtOAc-CH₂Cl₂ (1:9, v/v) ให้สาร **CP12** (10.0 mg)

สาร **CP22** (12.5 mg) สามารถแยกได้จาก fraction P15 (941.4 mg) ด้วย QCC แล้วชะด้วย 100% CH₂Cl₂ และเพิ่มขั้วไปจนถึง 30% MeOH-CH₂Cl₂ และจากนั้นนำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 5% EtOAc-CH₂Cl₂

Pulcherrin D (CP1): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +23.7$ (*c* 0.27, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log *E*) 216 (3.88) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3453 (O-H), 2931 (C-H), 1723 (C=O) cm⁻¹; HREIMS: *m/z* 360.2301 [M]⁺ (calcd for C₂₂H₃₂O₄, 360.2301); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz), และ ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 7 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Pulcherrin E (CP2): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +36.1$ (*c* 0.20, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log *E*) 214 (3.84) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3455 (O-H), 2920 (C-H), 1723 (C=O) cm⁻¹; HREIMS: *m/z* 376.2250 [M]⁺ (calcd for C₂₂H₃₂O₅, 376.2250); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz), และ ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 7 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Pulcherrin F (CP3): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +67.4$ (*c* 0.08, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log *E*) 215 (3.78) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3425 (O-H), 2929 (C-H), 1734 (C=O) cm⁻¹; HREIMS: *m/z* 376.2252

$[M]^+$ (calcd for $C_{22}H_{32}O_5$, 376.2250); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz),
ดูได้จากตารางที่ 7 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Pulcherrin G (CP4): ของแข็งสีขาว; mp 126–128 °C; $[\alpha]_D^{25} +57.1$ (c 0.18, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 225 (3.26) nm; IR (neat) ν_{max} 3494 (O–H), 2932 (C–H), 1710 (C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 438.2410 $[M]^+$ (calcd for $C_{27}H_{34}O_5$, 438.2406); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 8 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติแต่มีรายงานการสังเคราะห์มาแล้ว

Pulcherrin H (CP5): ของแข็งสีขาว; mp 195–196 °C; $[\alpha]_D^{25} +106.5$ (c 0.25, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 228 (3.96) nm; IR (neat) ν_{max} 3525 (O–H), 2929 (C–H), 1700 (C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 422.2454 $[M]^+$ (calcd for $C_{27}H_{34}O_4$, 422.2457); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 9 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Pulcherrin I (CP6): ของแข็งสีขาว; mp 131–133 °C; $[\alpha]_D^{25} +28.8$ (c 0.18, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 226 (3.87) nm; IR (neat) ν_{max} 3549 (O–H), 2934 (C–H), 1708 (C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 422.2459 $[M]^+$ (calcd for $C_{27}H_{34}O_4$, 422.2457); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 9 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Pulcherrin J (CP7): ของแข็งสีขาว; mp 135–136 °C; $[\alpha]_D^{25} +52.8$ (c 0.17, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 216 (3.65), 275 (3.67) nm; IR (neat) ν_{max} 3516 (O–H), 2933 (C–H), 1709 (C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 448.2617 $[M]^+$ (calcd for $C_{29}H_{36}O_4$, 448.2614); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 9 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Pulcherrin K (CP8): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +20.3$ (c 0.21, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 225 (3.94) nm; IR (neat) ν_{max} 3471 (O–H), 2935 (C–H), 1710 (C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 452.2198 $[M]^+$ (calcd for $C_{27}H_{32}O_6$, 452.2199); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 10 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Pulcherrin L (CP9): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +64.1$ (c 0.07, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 227 (3.82) nm; IR (neat) ν_{max} 3471 (O–H), 2927 (C–H), 1720 (C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 438.2405

$[M]^+$ (calcd for $C_{27}H_{34}O_5$, 438.2406); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz),
ดูได้จากตารางที่ 10 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Pulcherrin M (CP10): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +19.7$ (c 0.20, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ)
225 (3.90) nm; IR (neat) ν_{max} 3508 (O–H), 2931 (C–H), 1707 (C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 452.2196
 $[M]^+$ (calcd for $C_{27}H_{32}O_6$, 452.2199); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz),
ดูได้จากตารางที่ 11 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Pulcherrin N (CP11): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +23.6$ (c 0.14, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ)
226 (3.96) nm; IR (neat) ν_{max} 3508 (O–H), 2934 (C–H), 1704 (C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 572.2411
 $[M]^+$ (calcd for $C_{34}H_{36}O_8$, 572.2410); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz),
ดูได้จากตารางที่ 11 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Pulcherrin O (CP12): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +26.7$ (c 0.30, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ)
228 (3.98) nm; IR (neat) ν_{max} 3470 (O–H), 2930 (C–H), 1720 (C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 540.2361
 $[M]^+$ (calcd for $C_{30}H_{38}O_9$, 540.2359); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz),
ดูได้จากตารางที่ 12 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Pulcherrin P (CP13): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +54.7$ (c 0.18, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ)
227 (3.89) nm; IR (neat) ν_{max} 3468 (O–H), 2927 (C–H), 1716 (C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 598.2423
 $[M]^+$ (calcd for $C_{32}H_{38}O_{11}$, 598.2414); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75
MHz), ดูได้จากตารางที่ 12 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Pulcherrin Q (CP14): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +48.8$ (c 0.17, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ)
226 (3.92) nm; IR (neat) ν_{max} 3436 (O–H), 2930 (C–H), 1713 (C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 436.2250
 $[M]^+$ (calcd for $C_{27}H_{32}O_5$, 436.2250); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz),
ดูได้จากตารางที่ 13 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Pulcherrin R (CP15): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +83.8$ (c 0.20, $CHCl_3$); IR (neat) ν_{max} 3372 (O–H),
2926 (C–H), 1688 (C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z 304.2405 $[M]^+$ (calcd for $C_{20}H_{32}O_2$, 304.2402); 1H
NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 13 สารนี้ไม่เคยมี
รายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Vouacapen-5 α -ol (CP16): ของแข็งสีขาว; mp 98-100 °C; $[\alpha]_D^{25} +80.9^\circ$ (c 0.26, CHCl₃); (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 225 (3.47) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3574 (O-H), 2931 (C-H) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Isovouacapenol C (CP17): ของแข็งสีขาว; mp 116-118 °C; $[\alpha]_D^{25} +60.0^\circ$ (c 0.28, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 227 (3.37) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3515 (O-H), 2936 (C-H), 1708 (C=O) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

6 β -Cinnamoyl-7 β -hydroxyvouacapen-5 α -ol (CP18): ของแข็งสีขาว; mp 220-222 °C; $[\alpha]_D^{25} +59.9^\circ$ (c 0.13, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 217 (3.63), 273 (3.45) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3458 (O-H), 2932 (C-H), 1704 (C=O) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Pulcherrin A (CP19): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +41.5^\circ$ (c 0.08, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 216 (3.66), 276 (3.53) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3493 (O-H), 2931 (C-H), 1712 (C=O) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Pulcherrin B (CP20): ของแข็งสีขาว; mp 161-163 °C; $[\alpha]_D^{25} +71.5^\circ$ (c 0.21, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 225 (3.52) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3470 (O-H), 2936 (C-H), 1713 (C=O) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Pulcherrimin C (CP21): ของแข็งสีขาว; mp 140-142 °C; $[\alpha]_D^{25} +72.2^\circ$ (c 1.84, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 227 (3.45) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3486 (O-H), 2935 (C-H), 1714 (C=O) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Pulcherrimins A (CP22): ของแข็งสีขาว; mp 193-195 °C; $[\alpha]_D^{25} +78.1^\circ$ (c 0.03, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 228 (3.44) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3483 (O-H), 2932 (C-H), 1711 (C=O) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Pulcherrimin E (CP23): ของแข็งสีขาว; mp 220-221 °C; $[\alpha]_D^{25} +58.5^\circ$ (c 0.11, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 224 (3.43) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3454 (O-H), 2957 (C-H), 1725 (C=O) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Pulcherrin C (CP24): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +73.9^\circ$ (c 0.07, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 228 (3.49) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3534 (O-H), 2932 (C-H), 1721 (C=O) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Pulcherrimin B (CP25): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +177.1^\circ$ (c 0.11, CHCl_3); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 229 (3.57) nm; IR (neat) ν_{max} 3456 (O-H), 2931 (C-H), 1728 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

8,9,11,14-Didehydrovouacapen-5 α -ol (CP26): ของหนืด; $[\alpha]_D^{25} +60.5^\circ$ (c 0.18, CHCl_3); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 218 (3.46), 283 (3.37), 289 (3.30) nm; IR (neat) ν_{max} 3402 (O-H), 2918 (C-H) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

3. การสกัดและการแยกสารจากใบของต้นประยงค์

นำใบประยงค์มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปตากลมให้แห้ง ได้น้ำหนักแห้ง 1.6 กิโลกรัม แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 2 ครั้งๆละ 5 วัน เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดหยาบ CH_2Cl_2 (23.5 g) จากนั้นทำการสกัดซ้ำแต่ใช้ MeOH แทน CH_2Cl_2 เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดหยาบ MeOH (5.2 g) นำส่วนสกัดหยาบ CH_2Cl_2 มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (Quick Column Chromatography; QCC) และชะด้วย hexane แล้วเพิ่มขั้วด้วย EtOAc และ MeOH ได้ 10 fractions (D1–D10)

Fraction D2 (6.03 g) นำมาแยกต่อด้วย QCC และชะด้วย hexane แล้วเพิ่มขั้วด้วย CH_2Cl_2 และ acetone ได้ 10 subfractions (D2a-D2j) subfraction D2b (906.8 mg) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 2% EtOAc–hexane ให้สาร **AO12** (60.1 mg), **AO5** (19.3 mg) และ **AO15** (30.0 mg) subfraction D2d (105.0 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction D2b แต่ชะด้วย 20% CH_2Cl_2 –hexane ให้สาร **AO3** (2.5 mg) subfraction D2f (106.8 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction D2b แต่ชะด้วย 10% acetone–hexane ให้สาร **AO14** (3.1 mg) subfraction D2h (859.3 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction D2b แต่ชะด้วย 20% acetone–hexane ให้สาร **AO2** (40.1 mg) subfraction D2j (231.6 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction D2b แต่ชะด้วย 15% ให้สาร **AO4** (8.5 mg)

Fraction D3 (1.33 g) นำมาแยกต่อด้วย QCC และชะด้วย hexane แล้วเพิ่มขั้วด้วย EtOAc ได้ 7 subfractions (D3a-D3g) และให้สาร **AO8** (7.2 mg), **AO13** (5.1 mg) และ **AO7** (10.0 mg) subfraction D3c (383.7 mg) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ

และชะด้วย 40% acetone-hexane ให้สาร **AO20** (2.5 mg) subfraction D3f (20.6 mg) นำมาแยกต่อด้วย prep. TLC และใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 10% EtOAc-CH₂Cl₂ ให้สาร **AO1** (5.0 mg)

Fraction D4 (1.80 g) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 10% EtOAc-hexane ให้ 6 subfractions (D4a-D4f) และให้สาร **AO12** (40.0 mg) subfraction D4d (1.20 g) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction D4 แต่ชะด้วย 15% acetone-hexane ให้สาร **AO11** (60.0 mg)

Fraction D6 (175.7 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction D4 แต่ชะด้วย 2% MeOH-CH₂Cl₂ ให้ 7 subfractions (D6a-D6g) และให้สาร **AO19** (5.0 mg) และ **AO9** (5.0 mg) subfraction D6d (120.3 mg) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel RP-18 เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 60% MeOH-H₂O ให้สาร **AO25** (15.0 mg) และ **AO10** (10.0 mg)

Fraction D8 (859.3 mg) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 35% EtOAc-hexane ให้ 7 subfractions (D8a-D8g) และให้สาร **AO23** (15.0 mg) และ **AO24** (10.0 mg) subfraction D8c (80.3 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction D8 แต่ชะด้วย 100% CH₂Cl₂ ให้สาร **AO21** (30.5 mg) และเช่นเดียวกัน subfraction D8e (50.2 mg) ให้สาร **AO22** (4.0 mg)

Fraction D10 (231.6 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ในลักษณะที่คล้ายกับ subfraction D8 แต่ชะด้วย 15% acetone-hexane ให้สาร **AO16** (10.3 mg), **AO17** (30.1 mg) และ **AO18** (15.6 mg)

นำส่วนสกัดหยาบ MeOH มาละลายด้วย EtOAc ได้ส่วนที่ละลายกับ EtOAc (3.1 g) จากนั้น นำมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (Quick Column Chromatography; QCC) และชะด้วย hexane แล้วเพิ่มขั้วด้วย EtOAc และ MeOH ได้ 8 fractions (M1-M8) fraction M3 (118.0 mg) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 20% acetone-hexane ให้สาร **AO6** (15.0 mg) fraction M4 (85.2 mg) เมื่อตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เกิดเป็นของแข็งสีขาว จากนั้นล้างของแข็งด้วย acetone ให้สาร **AO9** (20.0 mg) fraction M6 (105.9 mg) เมื่อตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เกิดเป็นของแข็งสีขาว จากนั้นล้างของแข็งด้วย acetone ให้สาร **AO10** (50.0 mg)

(1R,3S,7E,11S,12R)-3-Hydroperoxydolabella-4(16),7-dien-18-ol (AO1): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} +17.0$ (*c* 0.12, CHCl₃); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3434 (O-H), 2959 (C-H) cm⁻¹; HREIMS: *m/z* [M]⁺ 322.2492 (calcd for C₂₀H₃₄O₃, 322.2499); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) และ ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 15 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

(1R,3E,7R,8R,11S,12R)-7,8-Epoxydolabella-3-en-18-ol (AO2): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} -47.4$ (*c* 0.25, CHCl₃); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3430 (O-H), 2963 (C-H) cm⁻¹; HREIMS: *m/z* [M]⁺ 306.2553 (calcd for C₂₀H₃₄O₂, 306.2559); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) และ ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 15 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

(1R,7E,11S,12R)-18-Hydroxydolabella-4(16),7-dien-3-one (AO3): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} +32.1$ (*c* 0.12, CHCl₃); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3419 (O-H), 2917 (C-H), 1725 (C=O) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

(1R,3S,4S,7E,11S,12R)-3,4-Epoxydolabella-7-en-18-ol (AO4): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} -47.3$ (*c* 0.25, CHCl₃); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3452 (O-H), 2962 (C-H) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

(1R,3E,7E,11S,12R)-18-Hydroxydolabella-3,7-dien (AO5): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} -6.0$ (*c* 0.41, CHCl₃); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3469 (O-H), 2927 (C-H) cm⁻¹ เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

25-Methoxy-5 α -dammar-20-en-3 β ,24-diol (AO6): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} +35.5$ (*c* 0.30, CHCl₃); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3433 (O-H), 2931 (C-H) cm⁻¹; HREIMS: *m/z* [M]⁺ 474.4070 (calcd for C₃₁H₅₄O₃, 474.4073); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) และ ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 16 และ 17 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

3 β -Hydroxy-5 α -dammar-20-en-24,25-acetonide (AO7): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} + 22.7$ (*c* 0.50, CHCl₃); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3432 (O-H), 2945 (C-H) cm⁻¹; HREIMS: *m/z* [M]⁺ 500.4224 (calcd for C₃₃H₅₆O₃, 500.4229); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) และ ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 16 และ 17 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

24(S),25-Epoxy-5 α -protost-20,25-dien-3-one (AO8): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} + 80.9$ (*c* 0.43, CHCl₃); IR (neat) $\nu_{\max}$: 2925 (C-H), 1702 (C=O) cm⁻¹; HREIMS: *m/z* [M]⁺ 440.3647 (calcd for C₃₀H₄₈O₂, 440.3649); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) และ ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), ดูได้จากตารางที่ 16 และ 17 สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

5 α -Dammar-20-ene-3 β ,24,25-triol (AO9): ของแข็งสีขาว; mp 170-172 °C; $[\alpha]_D^{25} +16.6^\circ$ (c 1.84, MeOH); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3419 (O-H), 2930 (C-H) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

24(R),25-Dihydroxy-5 α -dammar-20-en-3-one (AO10): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} + 68.5$ (c 0.40, CHCl_3); IR (neat) $\nu_{\max}$: 3441 (O-H), 2951 (C-H), 1702 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Aglaiol (AO11): ของแข็งสีขาว; mp 88-90 °C; $[\alpha]_D^{25} +56.6^\circ$ (c 0.50, CHCl_3); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3417 (O-H), 2945 (C-H) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

24(S),25-Epoxy-5 α -dammar-20-en-3-one (AO12): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} + 72.5$ (c 0.80, CHCl_3); IR (neat) $\nu_{\max}$: 3470 (O-H), 2954 (C-H), 1704 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Dammara-20,25-dien-3 β ,24-diol (AO13): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} +80.9$ (c 0.50, CHCl_3); IR (neat) $\nu_{\max}$: 3428 (O-H), 2933 (C-H) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

24-Hydroxydammara-20,25-dien-3-one (AO14): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} +85.6$ (c 0.30, CHCl_3); IR (neat) $\nu_{\max}$: 3442 (O-H), 2932 (C-H), 1706 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

2,3(S);22(S),23-Dioxidosqualene (AO15): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} +3.0$ (c 0.68, CHCl_3); IR (neat) $\nu_{\max}$: 2959 (C-H) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Aglaxiflorin D (AO16): ของแข็งสีขาว; mp 129-130 °C; $[\alpha]_D^{27} -98.4$ (c 0.50 in CHCl_3); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 206 (4.99), 222 (4.81) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$: 3472 (O-H), 3396 (N-H), 2970 (C-H), 1702 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

(+)-Odorine (AO17): ของแข็งสีขาว; mp 203-204 °C; $[\alpha]_D^{27} +23.5$ (c 0.22 in CHCl_3); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 206 (5.08), 217 (5.09), 281 (5.10) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$: 3280 (N-H), 2963 (C-H), 1724 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

(+)-Odorinol (AO18): ของแข็งสีขาว; mp 149-150 °C; $[\alpha]_D^{27} +6.9$ (c 0.10 in CHCl_3); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 205 (5.16), 218 (5.18), 223 (5.11), 282 (5.28) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$: 3421 (O-H), 3296 (N-H), 2966 (C-H) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Naringenin trimethyl ether (AO19): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} +128.5$ (c 0.07 in CHCl_3); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 211 (5.37), 226 (5.38), 280 (5.15), 316 (4.66), nm; IR (neat) ν_{max} : 2919 (C-H), 1602 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

7,4'-O-Dimethylnaringenin (AO20): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} -19.4$ (c 0.25 in CHCl_3); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 213 (5.23), 223 (5.22), 286 (5.01) nm; IR (neat) ν_{max} : 3431 (O-H), 2918 (C-H), 1620 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

4',5,7-Trimethoxydihydroflavonol (AO21): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} -7.6$ (c 0.35 in CHCl_3); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 227 (5.64), 281 (5.41) nm; IR (neat) ν_{max} : 3440 (O-H), 2925 (C-H), 1674 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

4',5,7-Trimethoxyflavan-3,4-diol (AO22): ของหนืด; $[\alpha]_D^{27} +11.6$ (c 0.40 in CHCl_3); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 214 (5.34), 223 (5.24), 273 (4.39), 280 (4.34) nm; IR (neat) ν_{max} : 3443 (O-H), 2925 (C-H), 1609 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

4',5,7-Tri-O-methylkaempferol (AO23): ของหนืด; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 209 (5.49), 256 (5.39), 308 (5.11), 355 (5.46) nm; IR (neat) ν_{max} : 3315 (O-H), 2916 (C-H), 1612 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Flavokawain-A (AO24): ของหนืด; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 207 (5.18), 363 (5.08) nm; IR (neat) ν_{max} : 3419 (O-H), 2916 (C-H), 1616 (C=O) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

Eudesmin (AO25): ของหนืด; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 211 (5.31), 225 (5.20), 280 (4.34) nm; IR (neat) ν_{max} : 2925 (C-H) cm^{-1} เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการหลั่ง nitric oxide จาก cell macrophages (nitric oxide release inhibitory activity)

เลี้ยง Cell macrophages (RAW264.7) ใน 96 well-plate ที่มี RPMI medium ที่ประกอบด้วย 10% fetal calf serum, penicillin (100 units/ml) และ streptomycin (100 µg/ml) โดย incubate cells ใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที ล้าง cells ด้วย PBS solution เติม RPMI medium ที่ประกอบด้วย 100 µl ของ 300 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) ลงในแต่ละ well เติม test sample ลงไป 100 µl incubate cells ใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณ nitric oxide ที่ cell สร้างขึ้น ที่ความยาวคลื่น 570 nm

การคำนวณ % inhibitory activity on nitric oxide production มีดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

โดยที่ A – C : Nitrite concentration (µM); A : LPS (+), sample (-); B : LPS (+), sample (+); C : LPS (-), sample (-)

หมายเหตุ การคำนวณหาค่า IC₅₀ ใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ Microsoft excel, one way ANOVA และ Dunnette's test

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการหลั่งสาร PGE₂ จาก cell macrophages

เลี้ยง Cell macrophages (RAW264.7) ใน 96 well-plate ที่มี RPMI medium ที่ประกอบด้วย 10% fetal calf serum, penicillin (100 units/ml) และ streptomycin (100 µg/ml) โดย incubate cells ใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที ล้าง cells ด้วย PBS solution เติม RPMI medium ที่ประกอบด้วย 300 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) 100 µl ลงในแต่ละ well เติม test sample ลงไป 100 µl incubate cells ใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดูด supernatant มา 50 µl แล้วทำการวัดปริมาณของ PGE₂ โดยใช้ ELISA test kits สำหรับ PGE₂

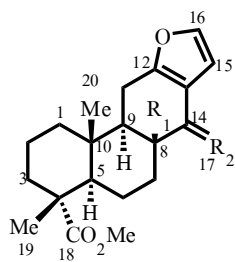
หมายเหตุ การคำนวณหาค่า IC₅₀ ใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ Microsoft excel, one way ANOVA และ Dunnette's test

ผลการทดลอง

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ด้านการอักเสบจากรากผักปู้ย่า รากหางนกยูงไทยและใบประยงค์ พบว่าพืชทั้งสามชนิด แสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบในระดับที่ดีมาก นอกจากนี้ยังสามารถแยกสารจากรากของผักปู้ย่าได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 18 สาร เป็นสารใหม่ 7 สารคือ mimosol A-D (CM1-CM4) และ mimosol E-G (CM9-CM11) และสารที่มีรายงานมาแล้ว 11 สาร (CM5-CM8 และ CM12-CM18) ส่วนสารที่แยกได้จากรากหางนกยูงไทย เป็นสารบริสุทธิ์ประเภท diterpenoid ทั้งหมด 26 สาร เป็นสารใหม่ 15 สารคือ pulcherrin D-R (CP1-CP15) และสารที่มีรายงานมาแล้ว 11 สาร (CP16-CP26) และจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากใบประยงค์ สามารถแยกสาร ให้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 25 สาร เป็นสารใหม่ 5 สารคือ (1R,3S,7E,11S,12R)-3-hydroperoxydolabella-4(16),7-dien-18-ol (AO1), (1R,3E,7R,8R,11S,12R)-7,8-epoxydolabella-3-en-18-ol (AO2), 25-methoxy-5 α -dammar-20-en-3 β ,24-diol (AO6), 3 β -hydroxy-5 α -dammar-20-en-24,25-acetonide (AO7) และ 24(S),25-epoxy-5 α -protost-20,25-dien-3-one (AO8) และสารที่มีรายงานมาแล้ว 20 สาร (AO3-AO5 และ AO9-AO25)

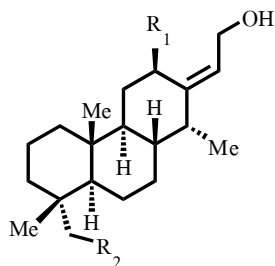
1. การหาสูตรโครงสร้างของสารจากรากของต้นผักปู้ย่า (*C.mimosoides*)

เนื่องจากส่วนสกัดหยาบเมทิลีนคลอไรด์และอะซิโตน จากรากของผักปู้ย่าแสดงฤทธิ์การยับยั้ง nitric oxide (NO) ด้วยค่า IC₅₀ 11.0 และ 21.6 μ g/ml ตามลำดับ ดังนั้นจึงได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัดดังกล่าว สามารถแยกสารบริสุทธิ์ ซึ่งเป็นสารใหม่ในกลุ่มไดเทอร์พีนทั้งหมด 4 สาร คือ mimosol A-D (CM1-CM4), กลุ่มไดเมอร์ไดเทอร์พีน 1 สาร คือ mimosol E (CM9) และสารกลุ่ม dibenzo[b,d]furan 2 สาร คือ mimosol F, G (CM10, CM11) และเป็นสารที่มีรายงานมาแล้ว 11 สาร คือ taepeenin A (CM5), taepeenin D (CM6), nortaepeenin A (CM7) (Cheenpracha et al., 2005), taepeenin L (CM8) (Cheenpracha et al., 2006), (E)-7-hydroxy-3-(4-methoxybenzyl)chroman-4-one (CM12), (E)-7,8-dihydroxy-3-(4-methoxybenzyl)chroman-4-one (CM13), (E)-7-hydroxy-8-methoxy-3-(4-methoxybenzyl)chroman-4-one (CM14) (Chen and Yang, 2007), tetracosyl caffeate (CM15) (Tanaka et al., 1998), resveratrol (CM16) (Miyachi et al., 2006), bergenin (CM17) (Wang et al., 2005) และ (+)-pterocarpol (CM18) (Nasini and Piozzi, 1981), รูปภาพที่ 1



CM1: $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{CH}_2$

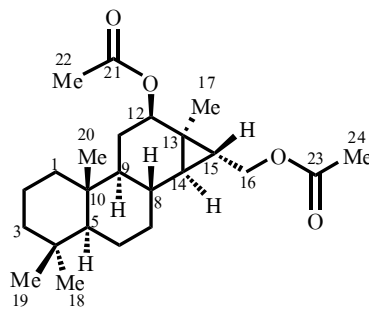
CM7: $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{O}$



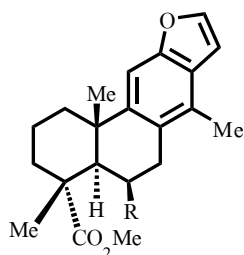
CM2: $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$

CM3: $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$

CM8: $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{H}$

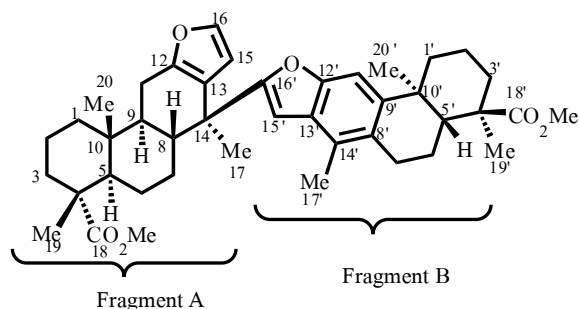


CM4



CM5: $R = \text{H}$

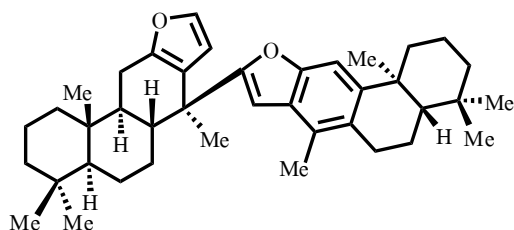
CM6: $R = \text{OAc}$



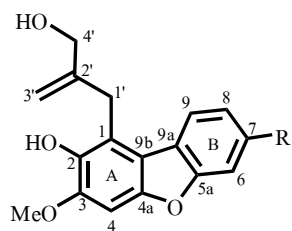
Fragment A

Fragment B

CM9

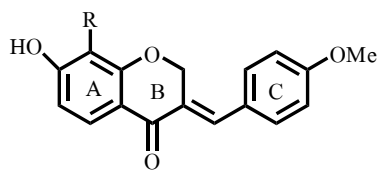


taepenin J (previously isolated from *C. crista*)



CM10: $R = \text{OH}$

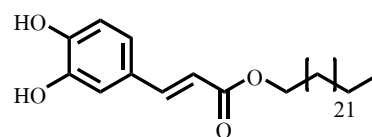
CM11: $R = \text{OMe}$



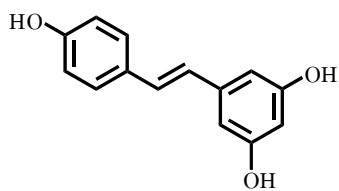
CM12: $R = \text{H}$

CM13: $R = \text{OH}$

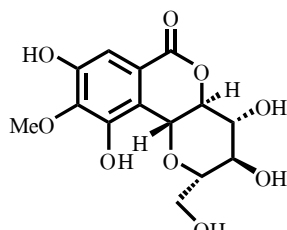
CM14: $R = \text{OMe}$



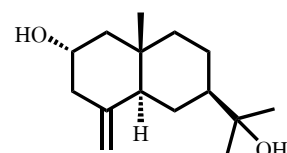
CM15



CM16



CM17

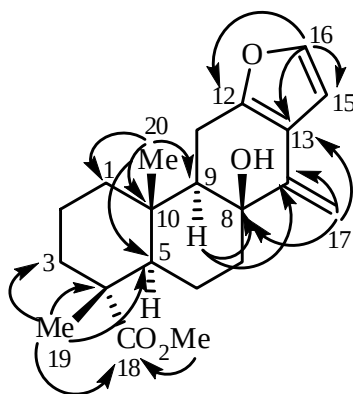


CM18

รูปภาพที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากรากผักปู้ย่า

สาร CM1; mimosol A

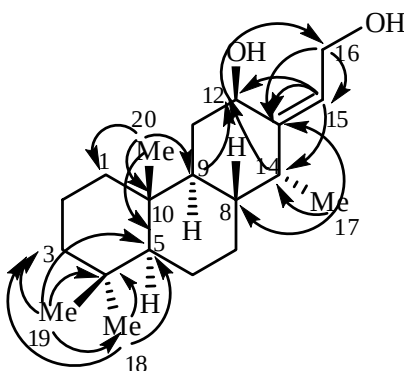
เป็นของแข็งสีขาว สูตรโมเลกุล $C_{21}H_{28}O_4$ (HREIMS) ข้อมูลอินฟราเรดแสดงแถบดูดกลืนของหมู่ไฮดรอกซิล (3429 cm^{-1}) และคาร์บอนิลเอสเทอร์ (1718 cm^{-1}) ข้อมูล UV แสดงแถบดูดกลืนสูงสุดที่ 210 และ 235 nm สารนี้ให้สีชมพูแดงเมื่อทดสอบด้วยเออ์ดัลลิรีเอเจนต์ ซึ่งแสดงว่าเป็นโครงสร้างของวงแหวนฟูราน (Kuroda et al., 2004) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 1) แสดงลักษณะเฉพาะของโครงสร้างของ 2,3-furanocassane (Cheenpracha et al., 2005, 2006; McPherson et al., 1986; Patil et al., 1997; Pranithanchai et al., 2009; Ragsa et al., 2002; Roach et al., 2003; Yodsaoue et al., 2008) สัญญาณที่ δ_{H} 6.53 และ 7.35 (d, $J = 2.1\text{ Hz}$) และ สัญญาณที่ δ_{C} 106.9 (C-15), 118.8 (C-13), 141.3 (C-16) และ 151.7 (C-12) แสดงว่าเป็นวงแหวน 2,3-disubstituted furan ข้อมูล ^{13}C NMR แสดง 21 คาร์บอน ซึ่งรวมทั้ง สัญญาณของ oxyquaternary carbon ซึ่งปรากฏที่ δ_{C} 70.9 (C-8) สัญญาณของพันธะคู่แบบ exocyclic ปรากฏที่ δ_{C} 103.0 (C-17) และ 142.5 (C-14) สัญญาณของเอสเทอร์คาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ_{C} 178.3 (C-18) ข้อมูล ^1H NMR ยังปรากฏพีคของ tertiary methyl 2 กลุ่มที่ δ_{H} 0.62 (Me-20) และ 1.10 (Me-19) และสัญญาณของ OMe 1 หมู่ ที่ δ_{H} 3.65 (OMe-18) ปรากฏสัญญาณของ terminal olefinic methylene โปรตอนที่ δ_{H} 5.11 และ 5.14 (s, 2H-17) ซึ่งแสดง HMBC correlation กับคาร์บอนที่ δ_{C} 70.9 (C-8), 118.8 (C-13), 142.5 (C-14) และ 151.7 (C-12) นอกจากนั้น เมทิลโปรตอนที่ δ_{H} 1.90 ยังแสดง HMBC correlation กับคาร์บอนที่ δ_{C} 13.8 (C-20), 19.1 (C-11), 37.5 (C-7), 38.0 (C-10), 70.9 (C-8), 142.5 (C-14) และ 151.7 (C-12) ข้อมูลนี้ระบุตำแหน่งของ exocyclic double bond ที่ C-14 และ OH ที่ C-8 ตามลำดับ นอกจากนั้นแล้ว เมทิลโปรตอนที่ δ_{H} 0.62 (Me-20) ยังแสดง NOESY cross-peaks กับเมทิลโปรตอนที่ δ_{H} 1.10 (Me-19) และ 2.96 (H_{ax} -11) ซึ่งสอดคล้องกับ trans/anti/trans ring junction (A/B/C) ของโครงสร้างกะเซน บ่งชี้การจัดตัวแบบ β ของ OH-8 ดังนั้น สาร CM1 จึงเป็น 8 β -hydroxy-14(17)-ene-18 α -methoxycarbonyl-18-norvouvapene และตั้งชื่อว่า mimosol A



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร CM1

สาร CM2; mimosol B

มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{32}O[M-H_2O]^+$ ซึ่งได้จากข้อมูลของ molecular ion ที่ m/z 288.2460 (HREIMS) ข้อมูลอินฟราเรดแสดงแถบดูดกลืนของหมู่ไฮดรอกซิลที่ 3397 cm^{-1} ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 1) วิเคราะห์ร่วมกับข้อมูล ^1H - ^1H COSY และ HMQC แสดงรูปแบบสัญญาณคล้ายกับสัญญาณของ taepenin L (CM8) (Cheenpracha et al. 2006) ปรากฏสัญญาณของ tertiary methyl 3 หมู่ ที่ δ_H 0.83 (Me-19), 0.83 (Me-20) และ 0.86 (Me-18) และสัญญาณของเมทิลดัดแปลงที่ δ_H 0.95 ($J = 7.2\text{ Hz}$, Me-17) ข้อมูล NMR ยังแสดงสัญญาณของ olefinic proton ที่ δ_H 5.54 (t, $J = 6.6\text{ Hz}$, H-15) และสัญญาณของ oxymethylene proton ที่ δ_H 4.21 (d, $J = 6.6\text{ Hz}$, 2H-16) ซึ่งเชื่อมต่อกับคาร์บอนที่ δ_C 58.5 สัญญาณของ oxymethine proton ซึ่งปรากฏที่ δ_H 4.43 (dd, $J = 10.2, 4.8\text{ Hz}$, H-12; δ_C 70.7) แสดงค่า J ของการจัดตัวแบบแอกเซียล ข้อมูล ^{13}C NMR (ตารางที่ 1) และ DEPT ระบุ 20 คาร์บอน ซึ่ง 2 คาร์บอน เป็นแบบ sp^2 ปรากฏสัญญาณที่ δ_C 118.8 และ 152.0 จากข้อมูล HMBC พบว่า Me-17 ที่ δ_H 0.95 แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 40.4 (C-8), 45.8 (C-14) และ 152.0 (C-13) นอกจากนั้นยังพบว่า olefinic proton ที่ δ_H 5.54 (H-15) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 45.8 (C-14), 70.7 (C-12) และ 152.0 (C-13) สัญญาณของ oxymethine proton ที่ δ_H 4.43 (H-12) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 37.2 (C-11), 58.5 (C-16), 118.8 (C-15) และ 152.0 (C-13) สัญญาณของ oxymethylene proton ที่ δ_H 4.21 (2H-16) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 118.8 (C-15) และ 152.0 (C-13) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ระบุตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-12 และ หมู่ $=CHCH_2OH$ ที่ C-13 จากข้อมูล NOESY สัญญาณของ oxymethine proton ที่ δ_H 4.43 (H-12) แสดงความสัมพันธ์กับเมทิลโปรตอนที่ δ_H 0.95 (Me-17) ซึ่งยืนยันการจัดตัวแบบแอกเซียล สัญญาณของ olefinic proton ที่ δ_H 5.54 (H-15) แสดงความสัมพันธ์กับเมทิลโปรตอนที่ δ_H 2.27 (H-14) ข้อมูลนี้ระบุว่าพันธะคู่อมีการจัดตัวแบบ *Z* ดังนั้น สาร CM2 คือ 12 β ,16-dihydroxycass-13(15)(*Z*)-ene และตั้งชื่อว่า mimosol B



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร CM2

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz) ของสาร **CM1** และ **CM2** (δ in ppm, multiplicities, J in Hz)

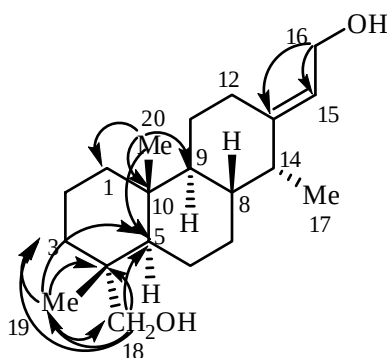
Position	CM1 ^a		CM2 ^b	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	39.0	1.05 m 1.82 m	39.6	0.93 m 1.70 br d (12.6)
2	17.6	1.14 m 1.48 m	18.9	1.38 m 1.56 m
3	36.5	1.50 m 1.75 m	42.1	1.14 dt (12.9, 3.9) 1.43 m
4	47.3	-	33.2	-
5	51.2	1.93 dd (12.3, 2.7)	55.1	0.80 m
6	22.8	1.55 m 1.60 m	21.6	1.27 m 1.58 m
7	37.5	1.62 td (12.9, 3.6) 2.57 dt (12.9, 3.0)	31.0	1.20 m 1.54 m
8	70.9	-	40.4	1.53 m
9	56.4	1.90 br d (7.5)	47.5	1.20 m
10	38.0	-	36.8	-
11 β	19.1	2.96 dd (17.7, 7.5)	37.2	1.23 m
α		2.69 br d (17.7)		1.97 ddd (15.6, 8.1, 4.8)
12	151.7	-	70.7	4.43 dd (10.2, 4.8)
13	118.8	-	152.0	-
14	142.5	-	45.8	2.27 qd (7.2, 4.5)
15	106.9	6.53 d (2.1)	118.8	5.54 t (6.6)
16	141.3	7.35 d (2.1)	58.5	4.21 d (6.6)
17	103.0	5.11 br s 5.14 br s	14.9	0.95 d (7.2)
18	178.3	-	33.6	0.86 s
19	16.2	1.10 s	22.0	0.83 s
20	13.8	0.62 s	14.2	0.83 s
18-OMe	51.2	3.65 s		

^a Spectra were recorded in acetone- d_6 .

^b Spectra were recorded in CDCl_3 .

สาร CM3; mimosol C

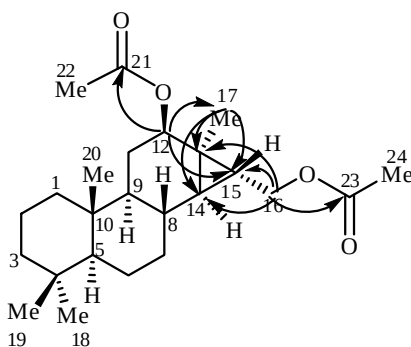
มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{34}O_2$ $[M]^+$ ซึ่งได้จากข้อมูลของ molecular ion ที่ m/z 306.2545 (HREIMS) ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 2) ของสาร **CM3** เปรียบเทียบได้กับสาร **CM2** โดยมีข้อแตกต่างคือ methyl singlet ของสาร **CM2** ที่ δ_H 0.86: δ_C 33.6 (Me-18) และ oxymethine โปรตอน ที่ δ_H 4.43 (H-12) ถูกแทนที่ด้วยสัญญาณของ oxymethylene โปรตอน 2H-18 ที่ δ_H 3.02 และ 3.33 (d, J = 10.8 Hz: δ_C 72.1) และ methylene โปรตอน 2H-12 ที่ δ_H 1.80 และ 2.34 ตามลำดับ ในสาร **CM3** สัญญาณของ oxymethylene โปรตอน ที่ δ_H 3.02 และ 3.33 (2H-18) แสดงความสัมพันธ์ HMBC กับ คาร์บอนที่ δ_C 17.9 (C-19), 35.4 (C-3), 37.6 (C-4) และ 48.3 (C-5) ซึ่งข้อมูลนี้ยืนยันการต่อเชื่อมที่ ตำแหน่ง C-4 กำหนด relative stereochemistry โดยใช้ข้อมูล NOESY ซึ่ง oxymethylene โปรตอน 2H-18 (δ_H 3.02 และ 3.33) แสดงความสัมพันธ์กับโปรตอนที่ δ_H 0.70 (Me-19), 1.08 (H_{ax} -5), 1.20 (H_{eq} -3) และ 1.43 (H_{eq} -6) ซึ่งบ่งชี้การจัดตัวแบบ equatorial ระบุการจัดตัวของพันธะคู่แบบ *E* ด้วย ข้อมูลความสัมพันธ์ของ olefinic proton ที่ δ_H 5.29 (br t, J = 6.9 Hz, H-15) กับ methine โปรตอน ที่ δ_H 2.12 (m, H-14) ดังนั้นสารนี้คือ 16,18-dihydroxycass-13(15)(*E*)-ene และเรียกชื่อว่า mimosol C ถึงแม้ว่าเคยมีรายงานของสารตัวนี้จากการสังเคราะห์ (Leal et al., 2003) อย่างไรก็ตาม รายงานนี้เป็น การรายงานไคเทอร์พีนที่แยกได้ครั้งแรกจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ



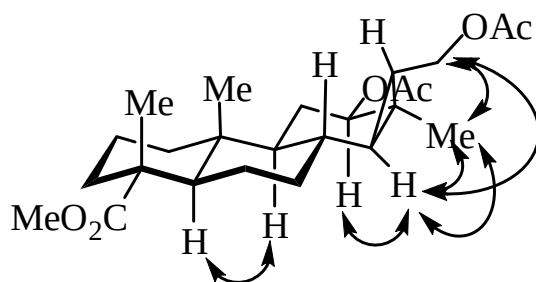
แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CM3**

สาร CM4; mimosol D

สูตรเอมไพริกัลของสารนี้คือ $C_{24}H_{38}O_4$ จาก $[M]^+ m/z$ 390.2780 (HREIMS) ข้อมูลอินฟราเรด แสดงแถบดูดกลืนของหมู่คาร์บอนิลเอสเทอร์ที่ 1735 cm^{-1} ข้อมูล ^{13}C NMR (ตารางที่ 2) วิเคราะห์ ร่วมกับข้อมูล DEPT ระบุ 24 คาร์บอน โดยมีเอสเทอร์คาร์บอนิล 2 คาร์บอนที่ δ_C 171.1 (C-23) และ 171.2 (C-21) oxymethine 1 คาร์บอนที่ δ_C 78.4 (C-12) และ oxymethylene 1 คาร์บอนที่ δ_C 65.2 (C-16) ข้อมูล ^1H NMR (ตารางที่ 2) แสดง สัญญาณของ 6 ซิงเกิลตของอะลิฟาติกเมทิล 4 กลุ่ม ที่ δ_H 0.71 (Me-20), 0.78 (Me-19), 0.84 (Me-18) และ 1.10 (Me-17) และ อะเซทอกซีเมทิล 2 กลุ่มที่ δ_H 2.04 (Me-22: δ_C 21.2) และ 2.06 (Me-24: δ_C 21.1) ข้อมูล ^1H NMR, COSY, HMQC แสดงสัญญาณของวงแหวนไซโคลโพรเพนที่ δ_H 0.46 (dd, $J = 5.1, 1.2\text{ Hz}$, H-14: δ_C 34.0) และ δ_H 1.18 (m, H-15: δ_C 25.5) จากข้อมูล HMBC oxymethine โปรตอน H-12 (δ_H 5.09, dd, $J = 13.2, 6.3\text{ Hz}$; δ_C 78.4) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 19.3 (C-17), 25.4 (C-11), 25.5 (C-15) และ 171.2 (C-21) oxymethylene โปรตอน 2H-16 ที่ δ_H 3.86 (dd, $J = 11.7, 8.4\text{ Hz}$), 4.28 (dd, $J = 11.7, 6.9\text{ Hz}$) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 24.3 (C-13), 25.5 (C-15), 34.0 (C-14) และ 171.1 (C-23) ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่า มี OAc 2 กลุ่ม ที่ C-12 และ C-16 โดยมี C-13, C-14 และ C-15 ประกอบกันเป็นวงแหวนไซโคลโพรเพน ข้อมูลความสัมพันธ์ HMBC ระหว่างเมทิลซิงเกิลตโปรตอน δ_H 1.10 (Me-17) กับคาร์บอนที่ δ_C 24.3 (C-13), 25.5 (C-15), 34.0 (C-14) และ 78.4 (C-12) ยืนยันตำแหน่งของหมู่เมทิลนี้ที่ C-13 โปรตอน H-12 มีค่า $J = 13.2\text{ Hz}$ ซึ่งแสดงการจัดตัวแบบแอกเซียล จากข้อมูล NOESY oxymethine โปรตอน δ_H 5.09 (H-12) แสดงความสัมพันธ์กับเมทิลโปรตอน δ_H 1.10 (Me-17) และ 0.64 (H-9) นอกจากนี้ methine โปรตอน δ_H 0.46 (H-14) แสดงความสัมพันธ์กับเมทิลโปรตอน δ_H 1.10 (Me-17) และ oxymethylene โปรตอน δ_H 3.86, 4.28 (2H-16) แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับ H-15 ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้การจัดตัวแบบ α ของ H-12, H-14 และ Me-17 ดังนั้นต้องเป็นวงแหวนไซโคลโพรเพนที่จัดตัวแบบซิส โดยมีโซ่ข้างเป็น α -acetoxymethyl สาร CM4 คือ 12 β ,16 α -diacetoxymethyl-14 β ,15-cyclopimarane และตั้งชื่อว่า mimosol D



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร CM4



แสดงข้อมูล NOESY บางส่วนของสาร **CM4**

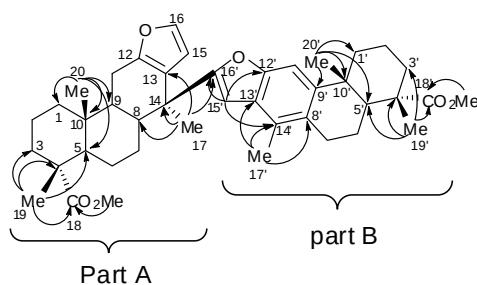
ตารางที่ 2 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร **CM3** และ

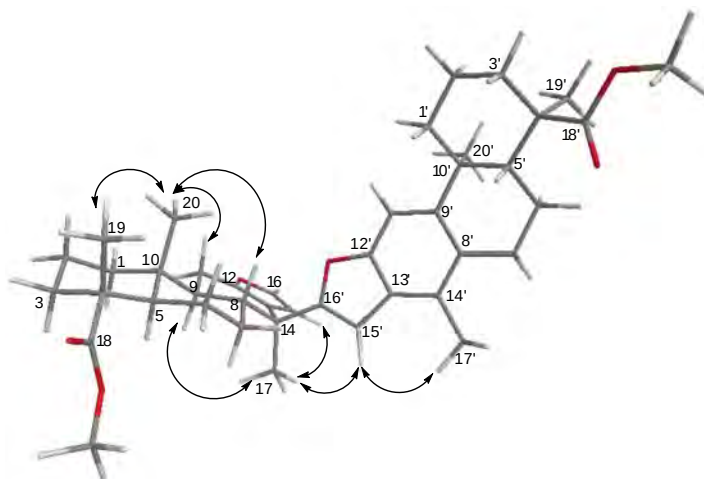
CM4 (δ in ppm, multiplicities, J in Hz)

Position	CM3		CM4	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	39.1	0.87 m 1.63 m	38.6	0.85 m 1.62 m
2	18.2	1.45 m 1.53 m	18.6	1.42 m 1.54 m
3	35.4	1.20 m 1.33 td (12.9, 4.2)	42.1	1.14 m 1.39 m
4	37.6	-	33.2	-
5	48.3	1.08 m	55.0	0.86 m
6	21.4	1.22 m 1.43 m	22.1	1.27 m 1.63 m
7	31.4	1.23 m 1.40 m	35.9	1.19 m 1.92 m
8	40.5	1.49 m	36.2	1.39 m
9	48.3	1.09 m	53.1	0.64 m
10	36.8	-	36.8	-
11 β	26.6	0.87 m	25.4	1.80 m
α		1.71 m		0.62 m
12	23.6	1.80 td (13.5, 4.2) 2.34 dt (13.5, 3.0)	78.4	5.09 dd (13.2, 6.3)
13	149.8	-	24.3	-
14	44.3	2.12 m	34.0	0.46 dd (5.1, 1.2)
15	118.7	5.29 br t (6.9)	25.5	1.18 m
16	58.6	4.04 d (6.9)	65.2	3.86 dd (11.7, 8.4) 4.28 dd (11.7, 6.9)
17	14.1	0.87 d (7.2)	19.3	1.10 s
18	72.1	3.02 d (10.8) 3.33 d (10.8)	33.4	0.84 s
19	17.9	0.70 s	21.6	0.78 s
20	14.7	0.76 s	14.3	0.71 s
21			171.2	-
22			21.2	2.04 s
23			171.1	-
24			21.1	2.06 s

สาร CM9; mimosol E

เป็นของแข็งสีขาว สูตรโมเลกุล $C_{42}H_{54}O_6$ จาก $[M]^+ m/z$ 654.3948 (HREIMS) ข้อมูล UV แสดงแถบดูดกลืนสูงสุดที่ 258, 283 และ 293 nm ซึ่งแสดงว่าเป็นโครงสร้างของเบนโซฟوران (Lyder et al., 1998) ข้อมูลอินฟราเรดแสดงแถบดูดกลืนของหมู่คาร์บอนิลเอสเทอร์ที่ 1720 cm^{-1} ข้อมูล ^{13}C NMR (ตารางที่ 3) วิเคราะห์ร่วมกับข้อมูล DEPT แสดงสัญญาณของ 42 คาร์บอน โดยเป็นสัญญาณของ sp^2 คาร์บอน 12 สัญญาณ ของเมทิลคาร์บอน 4 สัญญาณและควอเตอร์นารีคาร์บอน 8 สัญญาณ ข้อมูล ^1H NMR แสดงสัญญาณของ cassane diterpene 2 ส่วน คือส่วน A และ ส่วน B ข้อมูล ^1H , ^{13}C NMR และ HMBC บ่งชี้โครงสร้างแบบ dimer คล้ายกับโครงสร้างของ taapeenin J ซึ่งเคยแยกได้จาก *C. crista* (Cheenpracha et al., 2006) โดยมีข้อแตกต่างคือ ไม่มีสัญญาณของเมทิลซิงเกิลต 2 หมู่ที่ δ_H 0.95 (Me-18) และ 0.75 (Me-18') ซึ่งพบใน taapeenin J แต่ปรากฏสัญญาณของเมทิลเอสเทอร์ 2 หมู่ที่ δ_H 3.66 (OMe-18) และ 3.57 (OMe-18') ในสาร CM9 นอกจากนั้นยังพบ 2 สัญญาณของเอสเทอร์ คาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ_C 179.2 (C-18) และ 179.1 (C-18') ยืนยันตำแหน่งของเมทิลเอสเทอร์ 2 หมู่ที่ C-4 และ C-4' จากข้อมูล HMBC ดังนี้ ในส่วน A เมทิลเอสเทอร์โปรตอนที่มี δ_H 3.66 (OMe-18) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ_C 179.2 (C-18) ซิงเกิลตเมทิลโปรตอนที่มี δ_H 1.18 (Me-19) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 36.5 (C-3), 47.3 (C-4), 49.1 (C-5) และ คาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ_C 179.2 (C-18) ในส่วน B เมทิลเอสเทอร์โปรตอนที่มี δ_H 3.57 (OMe-18') แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ_C 179.1 (C-18') ซิงเกิลตเมทิลโปรตอนที่มี δ_H 1.29 (Me-19') แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 36.6 (C-3'), 44.3 (C-5'), 47.7 (C-4') และ คาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ_C 179.1 (C-18') ยืนยันการต่อเชื่อมของส่วน A และ ส่วน B ที่ C-14 (ส่วน A) และ C-16' (ส่วน B) ด้วยข้อมูล HMBC โดย เมทิลโปรตอนที่มี δ_H 1.64 (Me-17) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 40.1 (C-14), 44.0 (C-8), 121.9 (C-13) และ 162.2 (C-16') และอะโรเมติกโปรตอนที่มี δ_H 6.12 (H-15') แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 40.1 (C-14) ข้อมูลความสัมพันธ์ NOESY ของอะโรเมติกโปรตอนที่มี δ_H 6.12 (H-15') กับเมทิลโปรตอนที่มี δ_H 1.64 (Me-17) และ 2.28 (Me-17') เมทิลโปรตอนที่มี δ_H 1.90 (H-9) กับเมทิลโปรตอน Me-17 บ่งชี้การจัดตัวแบบ β -equatorial ของ ส่วน B ที่ C-14 ดังนั้น สาร CM9 คือ 14 β -(8'(14'),9'(11')-diene-18' α -methoxycarbonyl-18'-norvouacapen-16'-yl)-18 α -methoxycarbonyl-18-norvouacapene และตั้งชื่อว่า mimosol E





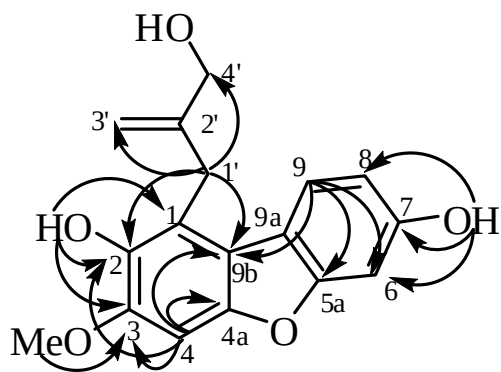
แสดงข้อมูล NOESY บางส่วนของสาร **CM9**

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร **CM9** (δ in ppm, multiplicities, J in Hz)

Position	CM9A		Position	CM9B	
	δ_{C}	δ_{H}		δ_{H}	δ_{C}
1	38.0	1.08-1.12 m 1.76-1.80 m	1'	38.9	1.48-1.55 m 2.20-2.35 m
2	17.9	1.50-1.62 m 1.72-1.82 m	2'	18.7	1.62-1.70 m 1.72-1.82 m
3	36.5	1.75-1.80 m 1.82-1.90 m	3'	36.6	1.44-1.58 m 1.60-1.68 m
4	47.3	-	4'	47.7	-
5	49.1	1.61 m	5'	44.3	2.26 m
6	23.9	1.28-1.31 m 1.45-1.51 m	6'	21.9	1.50-1.60 m 1.62-1.78 m
7	28.3	1.97-2.02 m 2.04-2.08 m	7'	27.5	2.80-2.97 m 2.60-2.72 m
8	44.0	1.65 m	8'	127.4	-
9	47.7	1.90 m	9'	146.1	-
10	37.4	-	10'	37.7	-
11	21.8	2.49 dd (15.3, 10.2) 2.79 dd (15.3, 7.2)	11'	104.3	7.23 s
12	150.1	-	12'	153.4	-
13	121.9	-	13'	126.5	-
14	40.1	-	14'	127.1	-
15	108.5	6.08 d (1.8)	15'	102.4	6.12 s
16	140.7	7.23 br s	16'	162.2	-
17	24.7	1.64 s	17'	15.9	2.28 s
18	179.2	-	18'	179.1	-
19	17.0	1.18 s	19'	16.6	1.29 s
20	14.5	0.94 s	20'	25.5	1.28 s
18-OMe	51.9	3.66 s	18'-OMe	51.9	3.57 s

สาร CM10; mimosol F

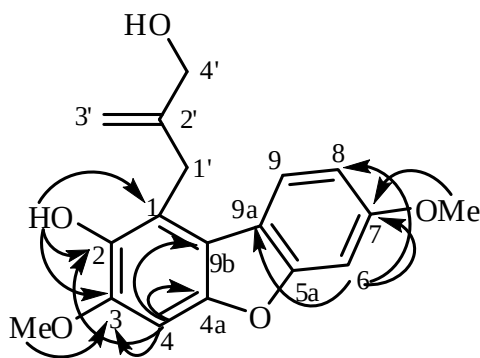
มีสูตรโมเลกุล $C_{17}H_{16}O_5$ $[M]^+$ ซึ่งได้จากข้อมูลของ molecular ion ที่ m/z 300.1011 (HREIMS) ข้อมูล UV แสดงแถบดูดกลืนสูงสุดที่ 207, 222, 250, 309 และ 318 nm ข้อมูลอินฟราเรด แสดงแถบดูดกลืนของหมู่ไฮดรอกซิลที่ 3386 cm^{-1} ข้อมูล ^{13}C NMR (ตารางที่ 4) และ DEPT แสดง 17 คาร์บอนของ 12 อะโรเมติกคาร์บอนซึ่งแยกเป็น 4 คาร์บอนที่มีโปรตอน (δ_c 93.4, 97.9, 110.9 และ 122.2) และอีก 8 คาร์บอนที่ไม่มีโปรตอน โดย 5 คาร์บอนต่อกับออกซิเจน (δ_c 140.9, 146.5, 149.6, 156.3 และ 157.6) อีก 3 คาร์บอนไม่ต่อกับออกซิเจน (δ_c 116.2, 117.1 และ 117.9) นอกจากนั้นยังพบสัญญาณที่สนามต่ำ 2 สัญญาณที่ δ_c 108.4 และ 147.0 ซึ่งเป็นสัญญาณของ disubstituted double bond ข้อมูลเหล่านี้ระบุว่าเป็นสัญญาณของวงแหวนไคเบนโซฟิวรานที่ประกอบด้วย 12 อะโรเมติกคาร์บอนและ 1 ออกซิเจนอะตอม และสอดคล้องกับ 10 degree of unsaturation ที่คำนวณได้ ข้อมูล ^1H NMR (ตารางที่ 4) แสดงสัญญาณที่สนามต่ำ 2 ชุด ชุดที่หนึ่งปรากฏสัญญาณ ที่ δ_H 7.14 (1H, s, H-4) บ่งชี้ว่าเป็นสัญญาณของ 1,2,3,5,6-pentasubstituted benzene ring (ring A) ส่วนอีกชุดหนึ่งปรากฏสัญญาณที่ δ_H 6.81 (1H, dd, $J = 7.8, 2.1$ Hz, H-8), 6.97 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6) และ 7.76 (1H, d, $J = 7.8$, Hz, H-9) ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นสัญญาณของ 1,2,4-trisubstituted benzene ring (ring B) นอกจากนี้ ข้อมูล HMBC ยังระบุ biphenyl linkage ระหว่าง C-9a และ C-9b ต่อเชื่อมกันเป็นโครงฟิวราน (Qu et al., 2007) โดย อะโรเมติกโปรตอน H-9 ที่ δ_H 7.76 แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_c 97.9 (C-6), 110.9 (C-8), 116.2 (C-9b) และ 157.6 (C-5a) ส่วนอะโรเมติกโปรตอน H-4 ที่ δ_H 7.14 แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_c 116.2 (C-9b), 140.9 (C-2), 146.5 (C-3) และ 149.6 (C-4a) นอกจากนั้นแล้วเมทิลีนโปรตอน ที่ δ_H 3.87 (2H-1') ยังแสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_c 65.3 (C-4'), 108.4 (C-3'), 116.2 (C-9b), 117.9 (C-1), 140.9 (C-2) และ 147.0 (C-2') ซึ่งบ่งชี้ตำแหน่งของเมทิลีนโปรตอนที่ C-1 ข้อมูล HMBC ยังระบุตำแหน่งหมู่เมทอกซิลที่ C-3 เนื่องจากสัญญาณที่ δ_H 3.96 แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_c 146.5 (C-3) ข้อมูล COSY ของ terminal olefinic methylene โปรตอนที่ δ_H 4.53, 4.99 (m, 2H-3': δ_c 108.4) แสดงความสัมพันธ์กับเมทิลีนโปรตอนที่ δ_H 3.87 (br s, 2H-1': δ_c 29.6) และ oxymethylene โปรตอนที่ δ_H 4.22 (br s, 2H-4': δ_c 65.3) ข้อมูล NOESY ยังแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเมทอกซิลโปรตอนและอะโรเมติกโปรตอน H-4 (δ_H 7.14, s) ระหว่าง เมทิลีนโปรตอน 2H-1' (δ_H 3.87) และอะโรเมติกโปรตอน H-9 (δ_H 7.76) ดังนั้น สาร CM10 คือ 1-(2-(hydroxymethyl)allyl)-3-methoxydibenzo[b,d]furan-2,7-diol และตั้งชื่อว่า mimosol F



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CM10**

สาร **CM11**; mimosol G

มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}O_5$ $[M]^+$ ซึ่งได้จากข้อมูลของ molecular ion ที่ m/z 314.118 (HREIMS) มีค่าแมสสูงกว่าสาร **CM10** 14 หน่วย แสดงว่ามีหมู่เมทิลเพิ่มมา 1 หมู่ ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 4) ของสาร **CM11** คล้ายกับสาร **CM10** โดยมีข้อแตกต่างคือ มีหมู่เมทอกซิลเพิ่มมา 1 หมู่ สัญญาณปรากฏที่ δ_H 3.87 (s) ในสาร **CM11** โดยข้อมูล HMBC แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 158.7 (C-7) และข้อมูล NOESY แสดงความสัมพันธ์กับโปรตอนที่มี δ_H 6.88 (dd, $J=7.8, 2.4$ Hz, H-8) และ 7.12 (d, $J=2.4$ Hz, H-6) ซึ่งบ่งชี้ตำแหน่งของหมู่เมทอกซิล (OMe) ที่ C-7 ดังนั้น สาร **CM11** คือ 1-(2-(hydroxymethyl)allyl)-3,7-dimethoxydibenzo[b,d]furan-2-ol และตั้งชื่อว่า mimosol G



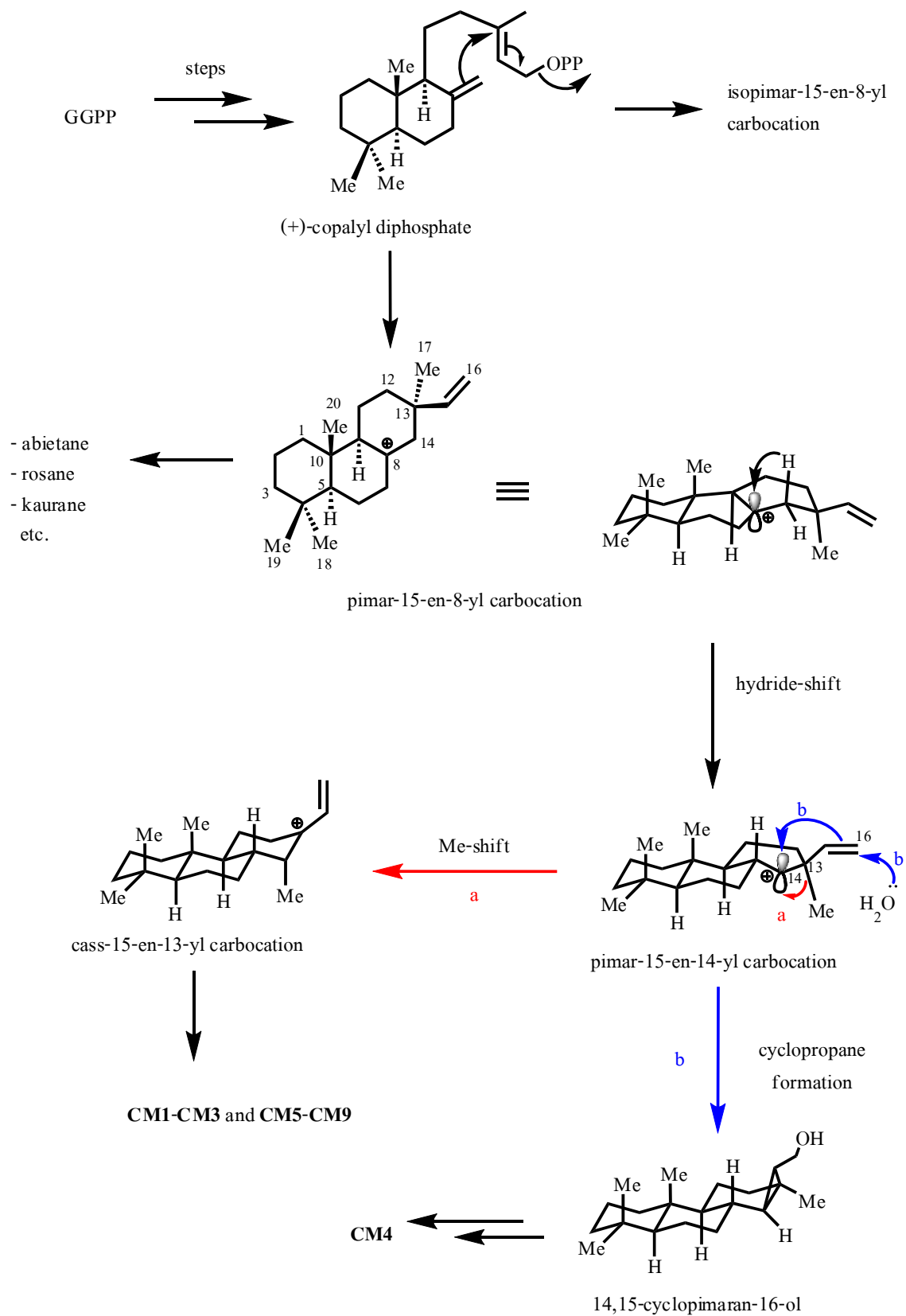
แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CM11**

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, acetone- d_6) ของสาร **CM10**

และ **CM11** (δ in ppm, multiplicities, J in Hz)

Position	CM10		CM11	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	117.9	-	118.0	-
2	140.9	-	141.1	-
3	146.5	-	146.8	-
4	93.4	7.14 s	93.4	7.17 s
4a	149.6	-	149.8	-
5a	157.6	-	157.5	-
6	97.9	6.97 d (2.1)	96.2	7.12 d (2.4)
7	156.3	-	158.7	-
8	110.9	6.81 dd (7.8, 2.1)	110.2	6.88 dd (7.8, 2.4)
9	122.2	7.76 d (7.8)	122.1	7.83 d (7.8)
9a	117.1	-	118.0	-
9b	116.2	-	116.0	-
1'	29.6	3.87 br s	29.6	3.88 br s
2'	147.0	-	147.0	-
3'	108.4	4.53 m	108.4	4.52 m
		4.99 m		5.00 sext (1.8)
4'	65.3	4.22 br s	65.3	4.22 br s
3-OMe	55.9	3.96 s	55.9	3.97 s
7-OMe			55.1	3.87 s
2-OH		8.71 s		7.42 s
7-OH		7.37 s		

โครงสร้างแบบ tricyclic diterpene ของสาร **CM1-CM9** มีที่มาจาก pimar-15-en-8-yl carbocation intermediate ซึ่งเกิดมาจากการปิดวงของ (+)-copalyl diphosphate (Devon and Scott, 1972; Ravn et al., 2002) ดังแสดงในแผนผังที่ 1 hydride shift จาก C-14 $\rightarrow$ C-8 ของ pimar-15-en-8-yl carbocation เพื่อเกิดเป็น 15-en-14-yl-carbocation ตามด้วย 13 $\rightarrow$ 14 methyl shift (pathway a) เกิดเป็น cass-15-en-13-yl carbocation ซึ่งจะให้เกิด cassane-type diterpene (**CM1-CM3**, **CM5-CM9**) โดยมี ring junction แบบ trans/anti/trans (A/B/C) แต่ถ้าเกิดการเติมน้ำที่ C-16 double bond ของ homoallylic cation (pimar-15-en-14-yl carbocation) ตามด้วยการปิดวง (pathway b) จะเกิดเป็น 14,15-cyclopimarran-16-ol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ mimosol D (**CM4**)



แผนผังที่ 1. เส้นทางการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ cassane และ cyclopimarane

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสาร CM1-CM18 จากรากของต้นผักปวยล่า

เนื่องจากส่วนสกัดหยาบเมทิลีนคลอไรด์และอะซีโตนแสดงฤทธิ์ดีต่อ LPS-induced NO production ใน RAW264.7 cell lines ด้วยค่า IC_{50} 11.0 และ 21.6 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำสารที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบ ผลทดสอบดังแสดงในตารางที่ 5 สาร **CM4** ($IC_{50} = 3.0 \mu\text{M}$) แสดงฤทธิ์ดีที่สุด ตามด้วยสาร **CM13**, **CM12**, **CM14**, **CM8** และ **CM6** ($IC_{50} = 3.9, 4.4, 5.6, 7.1$ และ $8.2 \mu\text{M}$) ตามลำดับ สารตัวอื่นๆ แสดงฤทธิ์ปานกลางและอ่อน อย่างไรก็ตาม สารเกือบทุกตัวแสดงฤทธิ์ดีกว่าฤทธิ์ของ NO synthase inhibitor (Teutrakul et al., 2009) (L-nitroarginine (L-NA), $IC_{50} = 61.8 \mu\text{M}$) ยกเว้นสาร **CM17** จะแสดงฤทธิ์ที่อ่อนกว่า ($IC_{50} = 80.3 \mu\text{M}$) สาร **CM4**, **CM12**, **CM13** ยังแสดงฤทธิ์ดีกว่า caffeic acid phenylester (CAPE) ($IC_{50} = 5.6 \mu\text{M}$) มีข้อเสนอแนะสำหรับ ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ด้านการอักเสบ ดังนี้

(ก) หมู่อะเซทอกซิลบนโมเลกุลทำให้ฤทธิ์ดีขึ้น โดยพิจารณาจากสาร **CM6** ซึ่งมีหมู่อะเซทอกซิล แสดงฤทธิ์ดีมาก ($IC_{50} = 8.2 \mu\text{M}$) เมื่อเปรียบเทียบกับสาร **CM5** ซึ่งมีฤทธิ์อ่อนกว่ามาก ($IC_{50} = 56.8 \mu\text{M}$)

(ข) หมู่แทนที่เป็นไฮดรอกซิล 1 หมู่ดีกว่า 2 หมู่ ดังแสดงในสาร **CM8** ($IC_{50} = 7.1 \mu\text{M}$) เปรียบเทียบกับสาร **CM2** และสาร **CM3** ($IC_{50} = 19.3$ และ $15.4 \mu\text{M}$) ผลการทดสอบนี้ยังบ่งชี้ว่า การมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งอื่นๆที่ไม่ใช่ C-16 ยังทำให้ฤทธิ์ลดลง

สาร **CM4**, **CM6**, **CM8**, **CM12** และ **CM14** ยังถูกนำไปทดสอบผลด้าน LPS induced $\text{TNF-}\alpha$ release ในเซลล์ RAW264.7 ผลทดสอบแสดงว่า สาร **CM4** และ **CM12** แสดงฤทธิ์ดีมากด้วยค่า $IC_{50} = 6.5$ และ $9.5 \mu\text{M}$ ตามลำดับ ส่วนสาร **CM6**, **CM8**, **CM13** และ **CM14** แสดงฤทธิ์ปานกลาง ด้วยค่า $IC_{50} = 38.8, 35.2, 11.4$ และ $14.6 \mu\text{M}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ผลการทดลองแสดงว่า สาร **CM4** แสดงฤทธิ์ที่ดีมากต่อทั้ง NO และ $\text{TNF-}\alpha$ release

ตารางที่ 5 Inhibitory effects on NO production ของสาร **CM1-CM18**

สาร	% Inhibition at various concentrations (μM)						IC ₅₀ (μM)
	0	1	3	10	30	100	
CM1	0.0 ± 6.9	-	-	36.7 ± 3.3**	68.4 ± 2.1**	99.8 ± 2.3**	15.9
CM2	0.0 ± 5.6	-	-	35.3 ± 2.8**	54.0 ± 2.9**	101.9 ± 2.3**	19.3
CM3	0.0 ± 5.6	-	-	32.8 ± 2.3**	78.1 ± 4.4**	99.4 ± 3.2 ^{b**}	15.4
CM4	0.0 ± 5.6	19.4 ± 3.1	49.3 ± 2.5**	83.7 ± 0.9**	89.3 ± 3.1 ^{b**}	100.2 ± 2.5 ^{b**}	3.0
CM5	0.0 ± 9.6	-	-	5.1 ± 1.2	25.6 ± 2.4	68.9 ± 2.6**	56.8
CM6	0.0 ± 9.6	-	25.0 ± 2.3*	60.4 ± 4.1**	75.8 ± 2.5**	100.3 ± 3.5 ^{b**}	8.2
CM7	0.0 ± 6.9	-	-	40.5 ± 3.6**	75.0 ± 2.1**	98.1 ± 3.3**	13.2
CM8	0.0 ± 6.9	-	27.1 ± 4.4*	51.9 ± 2.9**	98.0 ± 3.5 ^{b**}	100.0 ± 1.9 ^{b**}	7.1
CM9	0.0 ± 4.2	-	-	23.3 ± 2.1**	60.9 ± 2.0**	94.3 ± 3.5**	22.8
CM10	0.0 ± 4.4	-	-	31.2 ± 1.2	49.6 ± 3.7 **	81.0 ± 3.6**	25.9
CM11	0.0 ± 4.4	-	-	4.8 ± 2.9	28.5 ± 2.5*	67.0 ± 4.4**	57.2
CM12	0.0 ± 4.9	-	39.5 ± 2.4*	71.0 ± 3.8**	95.0 ± 1.7**	99.4 ± 3.4 ^{b**}	4.4
CM13	0.0 ± 4.9	-	43.4 ± 2.1**	72.1 ± 2.0**	97.5 ± 2.5**	100.5 ± 2.4 ^{b**}	3.9
CM14	0.0 ± 4.4	-	35.4 ± 2.5*	63.0 ± 0.7**	85.8 ± 1.5**	101.7 ± 3.0**	5.6
CM15	0.0 ± 4.9	-	-	22.0 ± 3.1**	68.5 ± 2.2 ^{b**}	99.7 ± 2.1 ^{b**}	20.8
CM16	0.0 ± 4.2	-	-	28.4 ± 3.1	60.2 ± 1.5**	94.6 ± 2.3**	21.1
CM17	0.0 ± 4.2	-	-	2.4 ± 1.5	22.3 ± 2.6**	56.2 ± 3.9**	83.0
CM18	0.0 ± 3.5	-	-	15.4 ± 1.8	42.8 ± 2.6**	91.8 ± 2.0**	31.0
L-NA	0.0 ± 9.9		11.7 ± 4.6	20.2 ± 5.9	34.7 ± 1.8 *	71.6 ± 2.6**	61.8
CAPE	0.0 ± 9.9		30.7 ± 3.2*	68.6 ± 3.4**	98.7 ± 1.2 ^{b**}	98.9 ± 2.1 ^{b**}	5.6

ตารางที่ 6 Inhibition on TNF-α production ของสาร **CM4, CM6, CM8, และ CM12-CM14**

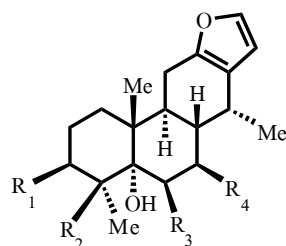
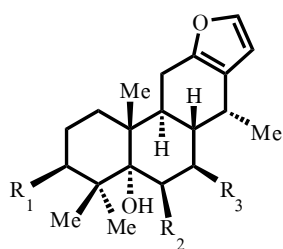
สาร	% Inhibition at various concentrations (μM)					IC ₅₀ (μM)
	0	3	10	30	100	
CM4	0.0 ± 5.7	36.6 ± 0.7	60.0 ± 1.0**	71.2 ± 0.9**	95.2 ± 1.5 ^{b**}	6.5
CM6	0.0 ± 5.7	-	21.2 ± 1.4	37.7 ± 2.0*	75.3 ± 2.1**	38.8
CM8	0.0 ± 5.7	-	8.2 ± 1.0**	42.3 ± 1.0**	86.7 ± 1.8**	35.2
CM12	0.0 ± 5.6	-	50.0 ± 3.3**	72.1 ± 2.4**	95.4 ± 1.2 ^{b**}	9.5
CM13	0.0 ± 5.6	-	48.5 ± 2.5**	68.5 ± 1.5**	99.7 ± 0.9 ^{b**}	11.4
CM14	0.0 ± 5.7	-	43.6 ± 2.3**	62.1 ± 2.0**	98.4 ± 2.8 ^{b**}	14.6

^aEach value represents mean ± S.E.M. of four determinations.

^bCytotoxic effect was observed, Statistical significance, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

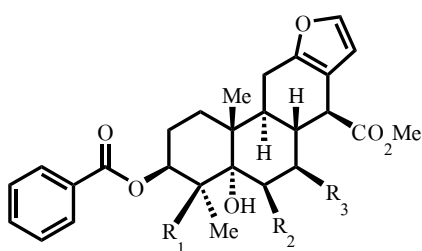
3. การหาสูตรโครงสร้างของสารจากรากของต้นหางนกยูงไทย (*C.pulcherrima*)

สารที่แยกได้จากรากของหางนกยูงไทยเป็นสารกลุ่มไดเทอร์พีน ซึ่งเป็นสารใหม่ 15 สาร คือ pulcherrin D-R (**CP1–CP15**) และเป็นสารที่มีรายงานมาแล้ว 11 สาร คือ vouacapen-5 α -ol (**CP16**) (McPherson et al., 1986), isovouacapenol C (**CP17**) (Ragasa et al., 2002), 6 β -cinnamoyl-7 β -hydroxyvouacapen-5 α -ol (**CP18**) (McPherson et al., 1986), pulcherrin A (**CP19**) (Pranithanchai et al., 2009), pulcherrin B (**CP20**) (Pranithanchai et al., 2009), pulcherrimin C (**CP21**) (Patil et al., 1997), pulcherrimin A (**CP22**) (Patil et al., 1997), pulcherrimin E (**CP23**) (Roach et al., 2003), pulcherrin C (**CP24**) (Pranithanchai et al., 2009), pulcherrimin B (**CP25**) (Patil et al., 1997) และ 8,9,11,14-didehydrovouacapen-5 α -ol (**CP26**) (McPherson et al., 1986) ซึ่งสารดังกล่าวได้เปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีกับสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว ส่วนสาร **CP1–CP14** แสดงลักษณะเฉพาะของ 2,3-disubstituted furan เนื่องจากเมื่อนำสารดังกล่าวไปทดสอบกับ Ehrlich รีเอเจนต์ (Kuroda et al., 2004) จะให้ spot สีแดงอมชมพูบนแผ่น TLC และจากข้อมูลของ IR สเปกตรัมสารใหม่ทั้งหมดยังแสดงแถบการยืดของหมู่คาร์บอนิลเอสเทอร์ซึ่งอยู่ในช่วง 1700–1777 cm^{-1} และหมู่ hydroxyl (3549–3425 cm^{-1}) อีกด้วย

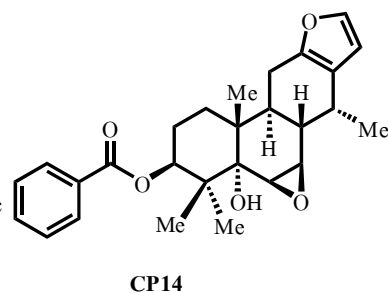


	R ₁	R ₂	R ₃
CP1	H	H	OAc
CP2	H	OH	OAc
CP3	H	OAc	OH
CP4	H	H	OCOPh
CP5	OCOPh	H	H
CP6	H	OCOPh	H
CP7	H	<i>E</i> -OCOCH=CHPh	H
CP16	H	H	H
CP17	H	OCOPh	OH
CP18	H	<i>E</i> -OCOCH=CHPh	OH
CP19	H	OH	<i>E</i> -OCOCH=CHPh
CP20	OCOPh	H	OH

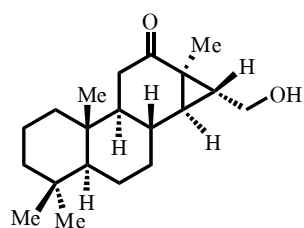
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
CP8	H	CHO	OCOPh	OH
CP9	H	CH ₂ OCOPh	OH	H
CP10	H	CO ₂ H	OCOPh	H
CP11	OCOPh	CO ₂ H	OCOPh	H
CP21	H	CO ₂ H	OCOPh	OCOPh
CP22	OH	CO ₂ H	OCOPh	OCOPh
CP23	OCOPh	CO ₂ H	OCOPh	OAc



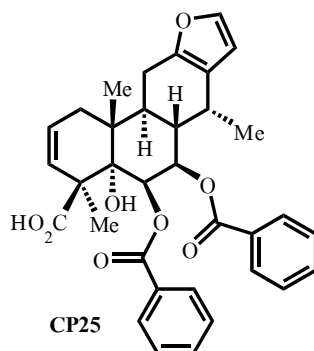
	R ₁	R ₂	R ₃
CP12	Me	OAc	OH
CP13	CH ₂ OAc	OH	OAc
CP24	Me	OH	OAc



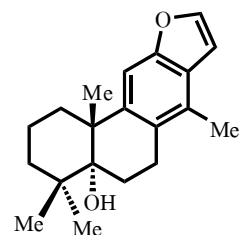
CP14



CP15



CP25

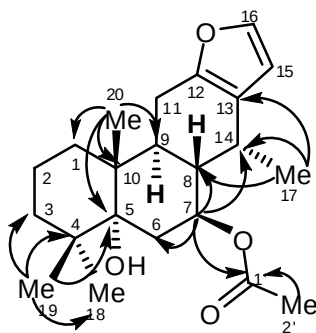


CP26

รูปภาพที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากรากหางนกยูงไทย

สาร CP1; Pulcherrin D

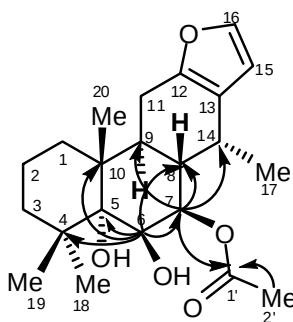
มีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{32}O_4$ ($[M]^+$ m/z 360.2301) (HREIMS) ข้อมูลอินฟราเรดแสดงแถบดูดกลืนของหมู่ไฮดรอกซิล (3453 cm^{-1}) และคาร์บอนิลเอสเทอร์ (1723 cm^{-1}) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 7) แสดงลักษณะเฉพาะของโครงสร้าง 2,3-furanocassane ข้อมูล ^1H NMR แสดงสัญญาณของ 4 singlet ของ aliphatic methyl 3 หมู่ที่ δ_H 0.89 (Me-18), 1.00 (Me-19), 1.04 (Me-20) และ หมู่ acetoxymethyl ที่ δ_H 2.00 (OCOCH_3) นอกจากนั้นยังพบสัญญาณเป็น ดัฟเลตของ หมู่ secondary methyl ที่ δ_H 0.94 ($J = 6.9\text{ Hz}$, Me-17) ปรากฏสัญญาณของวงแหวน 2,3-disubstituted furan ที่ δ_H 6.12, 7.16 (d, $J = 1.8\text{ Hz}$, H-15, H-16 ตามลำดับ) ข้อมูล ^{13}C NMR แสดงสัญญาณของ 22 คาร์บอน ซึ่งรวมทั้งสัญญาณของเอสเทอร์คาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ_C 170.7 (OCOCH_3) สัญญาณของ oxymethine โปรตอนปรากฏที่ δ_H 5.22 (td, $J = 11.1, 6.0\text{ Hz}$, H-7: δ_C 72.3) ซึ่งค่า J บ่งชี้การจัดตัวแบบ axial นอกจากนั้น oxymethine โปรตอนนี้ยังแสดงความสัมพันธ์ HMBC กับคาร์บอนที่ δ_C 27.6 (C-14), 31.5 (C-6), 39.8 (C-8) และ 170.7 (OCOCH_3) แสดงว่าหมู่ OAc ต่อที่ C-7 ข้อมูล NOESY แสดงความสัมพันธ์ ระหว่าง oxymethine โปรตอน ที่ δ_H 5.22 (H-7) กับโปรตอน ที่ δ_H 0.94 (Me-17), 2.01 (H-6 α), 2.42-2.48 (H-9) ทำให้ทราบว่าโปรตอนเหล่านี้จัดตัวอยู่ด้านเดียวกันของโมเลกุล หมู่ไฮดรอกซิลเชื่อมต่อที่ C-5 (δ_C 77.9) และจัดตัวแบบ α โดยพิจารณาจากเส้นทางการสังเคราะห์ทางชีวภาพและเปรียบเทียบข้อมูลกับสาร furanoditerpene ที่เคยแยกได้จากต้นไม้ชนิดเดียวกันนี้ (McPherson et al., 1986, Patil et al., 1997, Ragasa et al., 2002, Promsawan et al., 2003, Pranithanchai et al., 2009, Che et al., 1986, Das et al., 2010, Ragasa et al., 2003) ดังนั้น สาร CP1 คือ 7 β -acetoxylvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin D



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร CP1

สาร CP2; Pulcherrin E

มีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{32}O_5$ ($[M]^+$ m/z 376.2250) (HREIMS) ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 7) ของสาร **CP2** ใกล้เคียงกับของสาร **CP1** โดยมีข้อแตกต่างคือสัญญาณของ methylene โปรตอนที่มี δ_H 1.64 และ 2.01 (2H-6) ในสาร **CP1** ถูกแทนที่ในสาร **CP2** ด้วยสัญญาณของ oxymethine โปรตอนที่มี δ_H 4.15 (d, $J = 3.9$ Hz; δ_C 71.3) ซึ่ง oxymethine โปรตอนนี้ยังแสดงความสัมพันธ์ HMBC กับคาร์บอนที่มี δ_C 35.0 (C-8), 39.3 (C-4), 40.6 (C-10), 74.8 (C-7) และ 77.7 (C-5) บ่งชี้การต่อเชื่อมที่ตำแหน่ง C-6 และยังระบุการจัดตัวแบบ α ซึ่งได้จากข้อมูลความสัมพันธ์ NOESY ระหว่าง Me-18 (δ_H 0.95) และ H-7 (δ_H 5.38) รวมทั้ง ค่า J แบบ vicinal ซึ่งเป็นค่าที่เล็ก ($J_{7ax,6eq} = 3.9$ Hz) ดังนั้นสาร **CP2** คือ 6 β -hydroxy-7 β -acetoxylvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin E

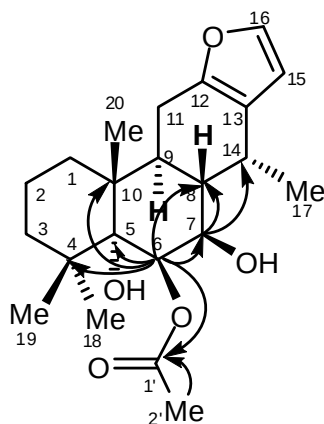


แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP2**

สาร CP3; Pulcherrin F

มีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{32}O_5$ เช่นเดียวกับสาร **CP2** ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 7) ของสาร **CP3** ใกล้เคียงกับของสาร **CP2** โดยมีความแตกต่างที่ค่า chemical shift ของตำแหน่ง 6 และ 7 โดย oxymethine โปรตอน H-6 ของสาร **CP3** ปรากฏสัญญาณที่ δ_H 5.48 (δ_C 73.4) ซึ่งปรากฏที่สนามต่ำกว่าของสาร **CP2** (δ_H 4.15; δ_C 71.3) เนื่องจากผล deshielding ของหมู่ OAc นอกจากนั้นแล้ว H-7 ของสาร **CP3** ยังปรากฏสัญญาณที่ δ_H 4.31 (δ_C 69.1) ซึ่งปรากฏที่สนามสูงกว่าของสาร **CP2** (δ_H 5.38; δ_C 74.8) ข้อมูล HMBC แสดงความสัมพันธ์ ระหว่าง oxymethine โปรตอนที่มี δ_H 5.48 (H-6) กับคาร์บอนที่มี δ_C 37.7 (C-8), 39.1 (C-4), 41.2 (C-10), 69.1 (C-7), 77.2 (C-5) และ 171.4 (OCOCH₃) และระหว่าง oxymethine โปรตอนที่มี δ_H 4.31 (H-7) กับคาร์บอนที่มี δ_C 27.3 (C-14), 37.7 (C-8) และ 73.4 (C-6) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ระบุตำแหน่งของหมู่ OAc ที่ C-6 และหมู่ OH ที่ C-7 ตามลำดับ ความสัมพันธ์

NOESY ของ H6/H7/H9 และ H7/H6/H17 ยืนยันการจัดตัวแบบ α ของ H-6 และ H-7 ดังนั้นสาร **CP3** คือ 6 β -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin F



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP3**

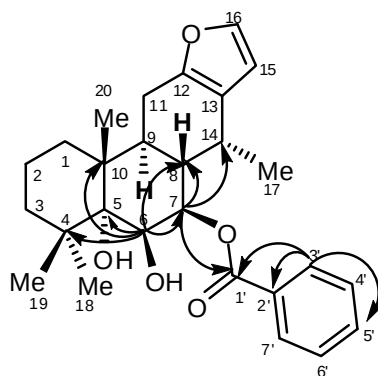
ตารางที่ 7 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร **CP1–CP3** (δ

in ppm, multiplicities, J in Hz)

Position	CP1		CP2		CP3	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	32.3	1.30-1.35 m 1.37-1.42 m	35.2	1.26-1.30 m 1.42-1.46 m	35.0	1.41-1.45 m 1.48-1.51 m
2	18.1	1.49-1.53 m 1.55-1.59 m	18.1	1.34-1.40 m 1.61-1.65 m	18.0	1.45-1.48 m 1.67-1.71 m
3 α	35.8	1.11 br d (8.4)	37.5	1.05-1.10 m	37.8	1.13-1.18 m
3 β		1.55-1.60 m		1.54-1.58 m		1.63-1.67 m
4	38.5	-	39.3	-	39.1	-
5	77.9	-	77.7	-	77.2	-
6 α	31.5	2.01 dd (12.9, 6.0)	71.3	4.15 d (3.9)	73.4	5.48 d (4.2)
6 β		1.64 dd (12.9, 11.1)				
7 α	72.3	5.22 td (11.1, 6.0)	74.8	5.38 dd (11.4, 3.9)	69.1	4.31 dd (10.8, 4.2)
8	39.8	1.87 td (11.1, 4.8)	35.0	2.09-2.13 m	37.7	1.93 ddd (12.0, 10.8, 5.1)
9	36.8	2.42-2.48 m	37.2	2.41-2.44 m	37.1	2.36 br dd (12.0, 8.7)
10	40.9	-	40.6	-	41.2	-
11	22.4	2.30-2.34 m 2.44-2.49 m	21.7	2.39-2.42 m 2.44-2.47 m	21.6	2.44-2.49 m 2.50-2.53 m
12	149.3	-	149.4	-	149.2	-
13	121.8	-	121.6	-	121.9	-
14	27.6	2.75 qd (6.9, 4.8)	27.8	2.72 qd (6.9, 5.1)	27.3	3.02 qd (6.9, 5.1)
15	109.6	6.12 d (1.8)	109.5	6.12 d (2.1)	109.7	6.21 d (1.8)
16	140.5	7.16 d (1.8)	140.5	7.16 d (2.1)	140.5	7.23 d (1.8)
17	17.1	0.94 d (6.9)	17.3	0.92 d (6.9)	17.1	1.07 d (6.9)
18	28.0	0.89 s	27.6	0.95 s	27.7	1.04 s
19	24.7	1.00 s	25.5	1.38 s	25.3	1.21 s
20	17.4	1.04 s	17.2	1.29 s	17.0	1.34 s
OCOCH ₃	170.7	-	170.1	-	171.4	-
OCOCH ₃	21.3	2.00 s	21.2	2.08 s	21.7	2.12 s

สาร CP4; Pulcherrin G

มีสูตรโมเลกุล $C_{27}H_{34}O_5$ ($[M]^+$ m/z 438.2410) (HREIMS) ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 8) ของสาร **CP4** คล้ายกับสาร **CP2** โดยมีข้อแตกต่างคือ หมู่ acetoxy ที่ δ_H 2.08 ในสาร **CP2** ถูกแทนที่ในสาร **CP4** ด้วยหมู่ benzoyloxy ซึ่งปรากฏสัญญาณที่ δ_H 7.40 (br t, $J = 7.5$ Hz: H-4', H-6'), 7.53 (tt, $J = 7.5, 1.2$ Hz: H-5') และ 8.02 (br d, $J = 7.5$ Hz, H-3', H-7') ยืนยันข้อมูลด้วย HMBC ซึ่ง oxymethine โปรตอน ที่ δ_H 5.62 (dd, $J = 10.8, 3.9$ Hz, H-7) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 27.7 (C-14), 35.2 (C-8) และ 165.6 (C-1') โปรตอน H-6 ที่ δ_H 4.31 แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 35.2 (C-8), 39.3 (C-4), 40.7 (C-10), 75.6 (C-7) และ 77.8 (C-5) ซึ่งโปรตอนตัวนี้มีค่า vicinal coupling constant เป็นค่าเล็ก ($J_{6eq,7ax} = 3.9$ Hz) ซึ่งบ่งชี้การจัดตัวแบบ equatorial แต่ H-7 เป็น axial โปรตอน เนื่องจากมีค่า vicinal coupling constant เป็นค่าใหญ่ ($J_{7ax,8ax} = 10.8$ Hz) ยืนยันข้อมูลด้วยความสัมพันธ์ NOESY ของ H-7 กับ Me-17, H-9 และ H-6 ดังนั้น สาร **CP4** คือ 6 β -hydroxy-7 β -benzoyloxyvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin G นับเป็นครั้งแรกที่แยกสารนี้ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ในอดีตเคยได้สารนี้จากการสังเคราะห์บางส่วน (partial synthesis) (Roach et al., 2003)



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP4**

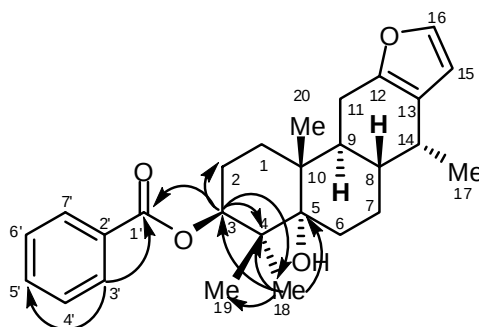
ตารางที่ 8 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร **CP4** (δ in ppm, multiplicities, J in Hz)

Position	CP4		CP4 (from synthesis)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	35.2	1.31-1.36 m 1.47-1.52 m	35.2	1.38 m 1.54 m
2	18.2	1.40-1.44 m 1.60-1.66 m	18.2	1.50 m 1.74 m
3 α	37.5	1.08-1.12 m	37.5	1.16 m
β		1.60-1.65 m		1.65 m
4	39.3	-	39.3	-
5	77.8	-	77.8	-
6 α	71.4	4.31 d (3.9)	71.5	4.38 d (3.8)
7 α	75.6	5.62 dd (10.8, 3.9)	75.5	5.71 dd (11.4, 3.8)
8	35.2	2.33 ddd (12.0, 10.8, 4.8)	35.3	2.42 td (11.4, 5.0)
9	37.3	2.47-2.50 m	37.3	2.51 m
10	40.7	-	40.7	-
11	21.8	2.46-2.50 m	21.8	2.56 m
12	149.5	-	149.5	-
13	121.6	-	121.6	-
14	27.7	2.82 qd (6.9, 4.8)	27.7	2.89 dq (7.0, 5.0)
15	109.5	6.10 d (1.8)	109.5	6.17 d (1.9)
16	140.6	7.16 d (1.8)	140.6	7.23 d (1.9)
17	17.4	0.94 d (6.9)	17.4	1.02 d (7.0)
18	27.8	0.96 s	17.3	1.41 s
19	25.5	1.39 s	27.8	1.04 s
20	17.3	1.34 s	25.5	1.47 s
1'	165.6	-	165.6	-
2'	130.0	-	130.0	-
3'/7'	129.7	8.02 br d (7.5)	129.7	8.01 dd (8.4, 1.3)
4'/6'	128.6	7.40 br t (7.5)	128.6	7.48 dd (8.4, 8.4)
5'	133.3	7.53 tt (7.5, 1.2)	133.3	7.60 tm (8.4)

สาร CP5; Pulcherrin H

มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_4$ (HREIMS) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 9) ของสาร **CP5** เทียบได้กับสาร **CP1** โดยมีข้อแตกต่างคือ หมู่ acetoxyl ในสาร **CP1** ถูกแทนที่ในสาร **CP5** ด้วยหมู่ benzoyloxy ซึ่งปรากฏสัญญาณที่ δ_{H} 7.37 (t, $J = 7.2$ Hz: H-4', H-6'), 7.48 (tt, $J = 7.2, 1.5$ Hz: H-5') และ 7.98 (dt, $J = 7.2, 1.5$ Hz: H-3', H-7') ข้อมูล HMBC แสดงความสัมพันธ์ของ oxymethine โปรตอนที่ δ_{H} 5.29 (H-3) กับคาร์บอนที่ δ_{C} 19.6 (C-19), 23.1 (C-18), 23.8 (C-2), 43.5 (C-4) และ 166.2 (C-1') ซึ่งระบุตำแหน่งโปรตอนตัวนี้ที่ C-3 นอกจากนี้แล้วค่า vicinal coupling constant ซึ่งเป็นค่าใหญ่และเล็ก ($J_{3\text{ax},2\text{ax}} = 11.4$ Hz, $J_{3\text{ax},2\text{eq}} = 4.8$ Hz) ยังระบุ relative stereochemistry ว่าเป็นแบบ axial ข้อมูล NOESY แสดงความสัมพันธ์ของ benzoyloxy โปรตอนที่ δ_{H} 7.98 (H-3', H-7') กับเมทิล

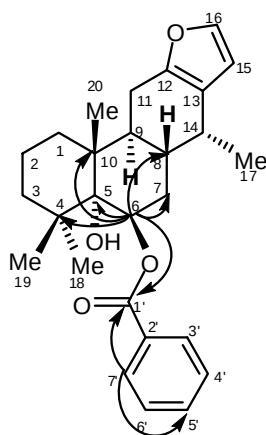
โปรตอนที่มี δ_H 1.17 (Me-19) ซึ่งยืนยันการจัดตัวแบบ equatorial ของหมู่ Me นี้ ดังนั้น สาร **CP5** คือ 3 β -benzoyloxyvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin H



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP5**

สาร **CP6**; Pulcherrin I

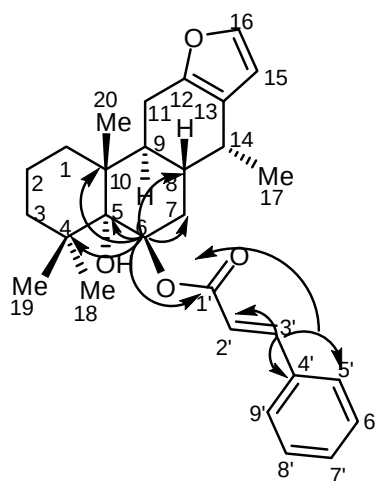
มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_4$ ($[\text{M}]^+$ m/z 422.2459) (HREIMS) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 9) ของสาร **CP6** คล้ายกับสาร **CP5** โดยมีข้อแตกต่างอยู่ที่ตำแหน่งของ หมู่ benzoyloxy ซึ่งในสาร **CP6** อยู่ที่ C-6 แต่ในสาร **CP5** อยู่ที่ C-3 ยืนยันด้วยข้อมูล HMBC ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของโปรตอนที่มี δ_H 5.47 (H-6) กับคาร์บอนที่มี δ_C 30.7 (C-8), 31.6 (C-7), 39.0 (C-4), 41.3 (C-10) และ 76.4 (C-5) และคาร์บอนิลคาร์บอนของหมู่ benzoyloxy ที่มี δ_C 165.8 (C-1') นอกจากนี้แล้วค่า vicinal coupling constant ซึ่งเป็นค่าเล็ก ($J_{6\text{eq},7\text{ax}} = 2.7 \text{ Hz}$, $J_{6\text{eq},7\text{eq}} = 2.7 \text{ Hz}$) ยังระบุ relative stereochemistry ของ H-6 ว่าเป็นแบบ equatorial ข้อมูล NOESY แสดงความสัมพันธ์ของ oxymethine โปรตอนที่มี δ_H 5.47 (H-6) กับเมทิลโปรตอนที่มี δ_H 0.93 (Me-18) และอะโรมาติกโปรตอนที่มี δ_H 7.95 (H-3', H-7') แสดงความสัมพันธ์กับเมทิลโปรตอนที่มี δ_H 1.44 (Me-20) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ ยืนยันการจัดตัวแบบ β ของหมู่ benzoyloxy ดังนั้น สาร **CP6** คือ 6 β -benzoyloxyvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin I



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP6**

สาร **CP7**; **Pulcherrin J**

มีสูตรโมเลกุล $C_{29}H_{36}O_4$ ($[M]^+$ m/z 448.2617) (HREIMS) ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 9) ของสาร **CP7** คล้ายกับสาร **CP6** โดยมีข้อแตกต่างคือหมู่ benzoyloxy ในสาร **CP6** ซึ่งปรากฏสัญญาณที่ δ_H 7.33 (br t, $J = 7.2$ Hz: H-4', H-6'), 7.45 (br t, $J = 7.2$, Hz: H-5') และ 7.95 (br d, $J = 7.2$ Hz: H-3', H-7') ถูกแทนที่ในสาร **CP7** ด้วยหมู่ *trans*-cinnamoyloxy ซึ่งปรากฏสัญญาณที่ δ_H 6.33 และ 7.60 (d, $J = 15.9$ Hz: H-2', H-3' ตามลำดับ) และ 7.28-7.46 (m, H-5'-H-9') ข้อมูล HMBC แสดงความสัมพันธ์ของโปรตอนที่มี δ_H 5.31 (H-6) กับคาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ_C 166.0 (C-1') ซึ่งระบุตำแหน่งของหมู่ *trans*-cinnamoyloxy ที่ C-6 ดังนั้น สาร **CP7** คือ 6 β -cinnamoyloxyvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin J



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP7**

ตารางที่ 9 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร **CP5–CP7** (δ

in ppm, multiplicities, J in Hz)

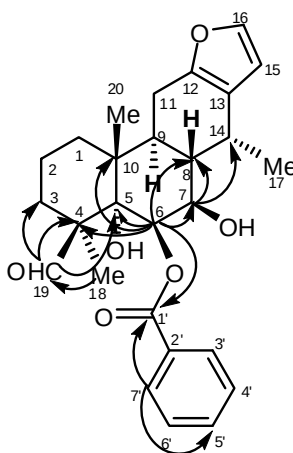
Position	CP5		CP6		CP7	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	31.2	1.40 td (8.4, 2.7) 1.70-1.77 m	34.9	1.34-1.40 m 1.50-1.56 m	34.8	1.31-1.40 m 1.45-1.54 m
2	23.8	1.73-1.77 m 1.80-1.87 m	18.3	1.38-1.44 m 1.60-1.68 m	18.2	1.35-1.43 m 1.60-1.70 m
3 α B	77.8	5.29 dd (11.4, 4.8)	38.1	1.02 br d (8.4) 1.60-1.68 m	38.1	1.05 br d (9.3) 1.61-1.68 m
4	43.5	-	39.0	-	39.0	-
5	78.6	-	76.4	-	76.3	-
6 α B	26.1	1.55 br d (12.0) 1.80-1.90 m	72.8	5.47 t (2.7)	72.3	5.31 dd (3.0, 2.4)
7 α B	24.1	1.42-1.50 m 1.67-1.73 m	31.6	1.53 ddd (14.4, 3.9, 2.7) 2.23 td (14.4, 2.7)	31.5	1.50 dt (13.8, 2.4) 2.18 td (13.8, 3.0)
8	34.3	1.70-1.76 m	30.7	1.91-2.05 m	30.6	1.91-2.04 m
9	37.6	2.27-2.31 m	38.0	2.30-2.40 m	38.0	2.26-2.44 m
10	41.0	-	41.3	-	41.4	-
11	22.4	2.29-2.35 m 2.41-2.45 m	21.9	2.31-2.38 m 2.39-2.47 m	21.8	2.31-2.39 m 2.39-2.49 m
12	149.4	-	149.5	-	149.5	-
13	122.6	-	122.4	-	122.4	-
14	31.3	2.55 qd (6.9, 3.9)	31.2	2.40-2.49 m	31.1	2.44-2.54 m
15	109.5	6.11 d (1.5)	109.5	6.06 d (1.8)	109.5	6.09 d (1.8)
16	140.4	7.15 d (1.5)	140.4	7.11 d (1.8)	140.4	7.14 d (1.8)
17	17.5	0.95 d (6.9)	17.6	0.90 d (7.2)	17.6	0.92 d (6.6)
18	23.1	0.97 s	27.8	0.93 s	27.7	0.94 s
19	19.6	1.17 s	26.0	1.13 s	25.9	1.17 s
20	17.2	1.05 s	17.2	1.44 s	16.9	1.37 s
1'	166.2	-	165.8	-	166.0	-
2'	131.0	-	130.6	-	118.6	6.33 d (15.9)
3' ^a	129.5	7.98 dt (7.2, 1.5)	129.7	7.95 br d (7.2)	145.2	7.60 d (15.9)
4' ^a	128.3	7.37 t (7.2)	128.6	7.33 br t (7.2)	134.3	-
5' ^b	132.7	7.48 tt (7.2, 1.5)	133.1	7.45 br t (7.2)	128.6	7.42-7.46 m
6' ^b					129.7	7.28-7.30 m
7'					130.4	7.28-7.30 m

^a สาร **CP5–CP6**: 3' = 7' และ 4' = 6'. ^b สาร **CP7**: 5' = 9' และ 6' = 8'.

สาร **CP8**; **Pulcherrin K**

มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_6$ ($[\text{M}]^+ m/z$ 452.2198) (HREIMS) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 10) ของสาร **CP8** คล้ายกับสาร **CP6** โดยมีข้อแตกต่างคือ สัญญาณ ^1H NMR ของสาร **CP6** ที่ δ_{H} 1.33 (Me-19) และสัญญาณของ methylene โปรตอน ที่ δ_{H} 1.53 (ddd, $J = 14.4, 3.9, 2.7$ Hz, H_{eq} -7) และ 2.33 (td, $J = 14.4, 2.7$ Hz, H_{ax} -7) ถูกแทนที่ในสาร **CP8** ด้วย aldehyde โปรตอนซึ่งปรากฏสัญญาณที่ δ_{H} 9.65 (d, $J = 1.2$ Hz, H-19) และ oxymethine โปรตอน ซึ่งปรากฏสัญญาณที่ δ_{H} 4.33 (dd, $J = 11.1, 4.2$ Hz, H-7) ตามลำดับ ข้อมูล HMBC แสดงความสัมพันธ์ของ oxymethine โปรตอน ที่ δ_{H} 4.33 (H-7) กับคาร์บอนที่ δ_{C} 27.2 (C-14), 37.7 (C-8) และ 73.8 (C-6) แสดงความสัมพันธ์ของ

aldehyde โปรตอนที่มี δ_H 9.65 (H-19) กับคาร์บอนที่มี δ_C 29.1 (C-3), 55.8 (C-4) และ 78.6 (C-5) แสดงความสัมพันธ์ของ เมทิลโปรตอนที่มี δ_H 1.10 (Me-18) กับคาร์บอนที่มี δ_C 29.1 (C-3), 55.8 (C-4), 78.6 (C-5) และ 202.3 (C-19) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ระบุการเชื่อมต่อของหมู่ OH ที่ C-7 และหมู่ aldehyde ที่ C-4 ข้อมูล NOESY ยังแสดงความสัมพันธ์ของ aldehyde โปรตอนที่มี δ_H 9.65 (H-19) กับเมทิลโปรตอนที่มี δ_H 1.18 (Me-20) ซึ่งระบุการจัดตัวแบบ β ของ หมู่ aldehyde นอกจากนั้นแล้ว ค่า vicinal coupling constant ของ H-7 ซึ่งเป็นค่าใหญ่และค่าเล็ก ($J_{7ax,8ax} = 11.1$ Hz, $J_{7ax,6eq} = 4.2$ Hz) และความสัมพันธ์ NOESY กับ H-6, H-9 และ Me-17 ยังระบุการจัดตัวแบบ α -axial ของ H-7 ดังนั้น สาร **CP8** คือ 6 β -benzoyloxy-7 β -hydroxy-19-formylvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin K

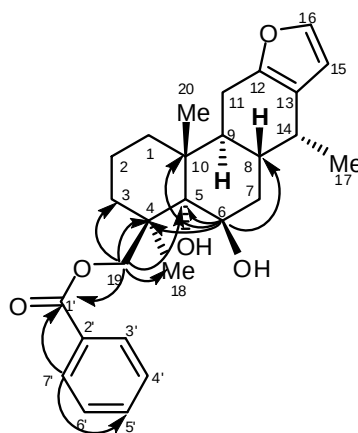


แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP8**

สาร **CP9**; Pulcherrin L

มีสูตรโมเลกุล $C_{27}H_{34}O_5$ ($[M]^+$ m/z 438.2405) (HREIMS) ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 10) ของสาร **CP9** เปรียบเทียบกับสาร **CP6** โดยมีข้อแตกต่างคือ สัญญาณ 1H NMR ของหมู่เมทิลในสาร **CP6** ที่ δ_H 1.13 (Me-19) ถูกแทนที่ในสาร **CP9** ด้วยสัญญาณของ oxymethylene โปรตอนที่มี δ_H 4.88 และ 5.01 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H-19) นอกจากนั้นแล้ว oxymethine โปรตอน H-6 ในสาร **CP9** ยังปรากฏสัญญาณที่ δ_H 4.17 (t, $J = 3.6$ Hz) ซึ่งเป็นสนามที่สูงกว่าของสาร **CP6** (δ_H 5.47, t, $J = 2.7$ Hz) ข้อมูลนี้แสดงว่ามีหมู่ OH ที่ C-6 ของสาร **CP9** แทนที่จะเป็นหมู่ benzoyloxy ดังเช่นสาร **CP6** ข้อมูล HMBC แสดงความสัมพันธ์ของ oxymethylene โปรตอนที่มี δ_H 4.88 และ 5.01 (2H-19) กับคาร์บอนที่มี δ_C 20.8 (C-18), 31.8 (C-3), 44.0 (C-4), 76.7 (C-5) และ 166.6 (C-1') แสดงว่าหมู่ benzoyloxy เชื่อมต่อที่ C-19 ข้อมูล NOESY ยังแสดงความสัมพันธ์ของ oxymethylene โปรตอนที่มี δ_H 4.88 และ 5.01 (2H-19) กับเมทิลโปรตอนที่มี δ_H 1.31 (Me-20) แสดงความสัมพันธ์ของ oxymethine โปรตอนที่มี δ_H 4.17 (H-6) กับเมทิลโปรตอนที่มี δ_H 1.11 (Me-18) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ระบุการจัดตัวของ

oxymethylene โปรตอนแบบ β และการจัดตัวของ H-6 แบบ α ตามลำดับ ดังนั้น สาร **CP9** คือ 6 β -hydroxy-19-benzoyloxyvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin L



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP9**

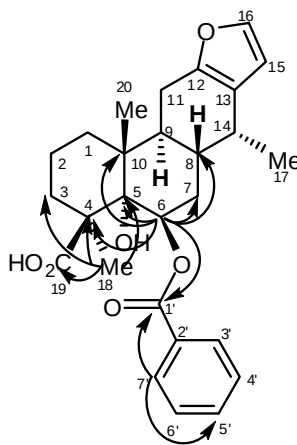
ตารางที่ 10 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร **CP8** และ

CP9 (δ in ppm, multiplicities, J in Hz)

Position	CP8		CP9	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	34.2	1.45-1.49 m 1.51-1.55 m	34.6	1.30-1.36 m 1.40-1.44 m
2	17.8	1.40-1.50 m 1.60-1.70 m	17.9	1.43-1.47 m 1.65-1.70 m
3	29.1	1.35-1.45 m 1.85-1.95 m	31.8	1.44-1.52 m 1.58-1.70 m
4	55.8	-	44.0	-
5	78.6	-	76.7	-
6	73.8	5.92 d (4.2)	71.0	4.17 t (3.6)
7	69.0	4.33 dd (11.1, 4.2)	35.4	1.38-1.44 m 2.19 dt (13.5, 3.6)
8	37.7	1.99 td (11.1, 5.1)	29.8	2.03-2.12 m
9	36.7	2.20-2.33 m	38.6	2.20-2.34 m
10	41.2	-	41.1	-
11	22.2	2.42-2.61 m	21.9	2.36-2.46 m
12	148.8	-	149.4	-
13	121.8	-	122.5	-
14	27.2	2.96 qd (6.9, 5.1)	31.2	2.54 qd (7.2, 5.4)
15	109.6	6.12 d (1.8)	109.5	6.12 d (1.8)
16	140.7	7.17 d (1.8)	140.4	7.16 d (1.8)
17	17.0	0.97 d (6.9)	17.7	0.94 d (7.2)
18	19.1	1.10 s	20.8	1.11 s
19	202.3	9.65 d (1.2)	68.2	4.88 d (11.4) 5.01 d (11.4)
20	17.0	1.18 s	16.2	1.31 s
1'	167.3	-	166.6	-
2'	129.2	-	130.5	-
3'/7'	129.9	7.92 br d (7.2)	129.5	7.97 br d (7.5)
4'/6'	128.8	7.38 t (7.2)	128.5	7.38 t (7.5)
5'	133.8	7.52 br t (7.2)	132.9	7.55 br t (7.5)

สาร CP10; Pulcherrin M

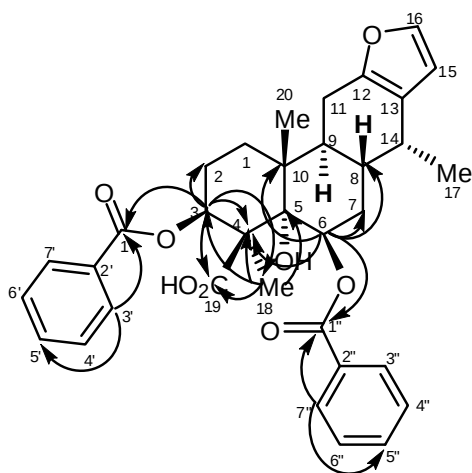
มีสูตรโมเลกุล $C_{27}H_{32}O_6$ ($[M]^+$ m/z 452.2196) (HREIMS) ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 11) ของสาร **CP10** คล้ายกับสาร **CP6** โดยมีข้อแตกต่างคือ สัญญาณ 1H NMR ของหมู่เมทิลในสาร **CP6** ที่ δ_H 1.13 (Me-19, δ_C 26.0) ไม่ปรากฏในสาร **CP10** แต่พบสัญญาณของ carboxyl คาร์บอนที่ δ_C 181.9 แทน ยืนยันด้วยข้อมูล HMBC ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของเมทิลโปรตอน ที่ δ_H 0.97 (Me-18) กับคาร์บอนที่ δ_C 34.1 (C-3), 48.4 (C-4), 76.5 (C-5) และ 181.9 (C-19) นอกจากนั้น ข้อมูล NOESY ยังระบุ relative stereochemistry โดย Me-18 (δ_H 0.97) แสดงความสัมพันธ์กับโปรตอน ที่ δ_H 5.45 (H-6) ส่วน benzoyloxy โปรตอน H-3', H-7' ที่ δ_H 7.84 แสดงความสัมพันธ์กับ Me-20 ที่ δ_H 1.32 ดังนั้น สาร **CP10** คือ 6 β -benzoyloxy-19-carboxyvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin M



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP10**

สาร CP11; Pulcherrin N

มีสูตรโมเลกุล $C_{34}H_{36}O_8$ ($[M]^+$ m/z 572.2411) (HREIMS) ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 11) ของสาร **CP11** คล้ายกับสาร **CP10** โดยมีข้อแตกต่างคือพบสัญญาณของ monosubstituted benzene ring เพิ่มขึ้นในสาร **CP11** โดยปรากฏสัญญาณที่ δ_H 7.18-7.85 และพบสัญญาณของ oxymethine โปรตอน ที่ δ_H 5.28 (dd, J = 12.0, 4.5 Hz, H-3; δ_C 77.7) ข้อมูล HMBC แสดงความสัมพันธ์ของ oxymethine โปรตอน H-3 กับคาร์บอนที่ δ_C 19.9 (C-18), 24.3 (C-2), 53.3 (C-4), 166.1 (C-1') และ 177.4 (C-19) ซึ่งยืนยันตำแหน่งของ หมู่ benzoyloxy ที่ C-3 นอกจากนั้นแล้ว ค่า vicinal coupling constant ของ H-3 ซึ่งเป็นค่าใหญ่และค่าเล็ก ($J_{3ax,2ax}$ = 12.0 Hz, $J_{3ax,2eq}$ = 4.5 Hz) และความสัมพันธ์ NOESY กับ Me-18 (δ_H 1.22) ยังระบุการจัดตัวแบบ α -axial ของ H-3 ดังนั้น สาร **CP11** คือ 3 β ,6 β -dibenzoyloxy-19-carboxyvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin N



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP11**

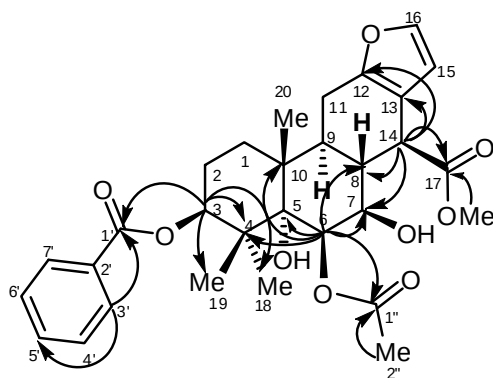
ตารางที่ 11 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร **CP10** และ

CP11 (δ in ppm, multiplicities, J in Hz)

Position	CP10		CP11	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	34.7	1.45-1.50 m 1.70-1.75 m	33.1	1.52-1.60 m 1.86-1.92 m
2	18.7	1.40-1.44 m 1.62-1.66 m	24.3	1.80-1.86 m 2.50-2.58 m
3	34.1	1.35-1.40 m 1.75 br d (13.8)	77.7	5.28 dd (12.0, 4.5)
4	48.4	-	53.3	-
5	76.5	-	78.5	-
6	70.7	5.45 t (2.7)	70.9	5.57 br s
7	30.8	1.58 dt (14.1, 2.7) 2.11-2.18 m	30.4	1.60-1.74 m 2.15-2.23 m
8	30.7	1.92-2.04 m	30.5	2.04 br t (11.4)
9	38.0	2.11-2.25 m	37.8	2.35 td (11.4, 8.7)
10	41.7	-	41.8	-
11	22.2	2.34-2.56 m	22.2	2.40-2.60 m
12	149.3	-	149.1	-
13	122.2	-	122.2	-
14	31.0	2.41-2.53 m	30.9	2.44-2.55 m
15	109.5	6.08 d (1.5)	109.5	6.10 d (1.8)
16	140.5	7.13 d (1.5)	140.6	7.16 d (1.8)
17	17.5	0.92 d (6.9)	17.6	0.94 d (6.9)
18	24.2	0.97 s	19.9	1.22 s
19	181.9	-	177.4	-
20	17.6	1.32 s	16.7	1.55 s
1'	165.7	-	166.1	-
2'	130.6	-	130.1	-
3'/7'	129.5	7.84 br d (7.2)	129.6	7.85 d (7.5)
4'/6'	128.4	7.32 t (7.2)	128.3	7.27 t (7.5)
5'	132.8	7.43 tt (7.2, 1.2)	133.2	7.36 br t (7.5)
1''			165.8	-
2''			130.2	-
3''/7''			129.4	7.85 d (7.5)
4''/6''			128.5	7.18 t (7.5)
5''			133.1	7.43 br t (7.5)

สาร CP12; Pulcherrin O

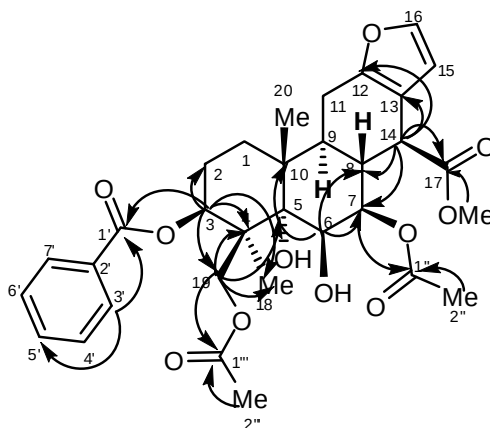
มีสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{38}O_9$ (HREIMS) ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 12) ของสาร **CP12** เปรียบเทียบได้กับสาร **CP3** โดยมีข้อแตกต่างคือพบสัญญาณที่เพิ่มมาของ oxymethine โปรตอนที่ δ_H 5.24 (H-3: δ_C 76.7) และสัญญาณของหมู่ benzoyloxy ที่ δ_H 7.37-7.95 (δ_C 128.4, 129.5, 130.6, 133.0 และ 166.1) โดยหมู่ benzoyloxy ต่อเชื่อมที่ C-3 ซึ่งยืนยันได้จากข้อมูล HMBC ของ H-3 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 19.2 (C-19), 22.7 (C-18), 43.9 (C-4) และ 166.1 (C-1') นอกจากนี้สัญญาณของเมทิลด์ฟเลตในสาร **CP3** ที่ δ_H 1.07 (Me-17: δ_C 17.1) ถูกแทนที่ในสาร **CP12** ด้วยสัญญาณซิงเกิลตของเมทิลเอสเทอร์ที่ C-17 โดยปรากฏสัญญาณที่ δ_H 3.68 (δ_C 52.2) และเอสเทอร์คาร์บอนิลที่ δ_C 175.9 ใช้ข้อมูล HMBC ระบุตำแหน่งของหมู่ CO_2Me โดย methine โปรตอน H-14 ที่ δ_H 3.38 แสดงความสัมพันธ์กับเอสเทอร์คาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ_C 175.9 ค่า vicinal coupling constant ของ H-3 ซึ่งเป็นค่าใหญ่ ($J_{3ax,2ax} = 10.8$ Hz) และ H-14 ($J_{14ax,8ax} = 8.4$ Hz) ยังระบุ การจัดตัวแบบ α -axial ของ H-3 และ H-14 ข้อมูล NOESY แสดงความสัมพันธ์ของไฮดรอกซิลโปรตอน C-5 (δ_H 2.01) กับ H-3, H-6, H-7, H-9 และ Me-18 และยังแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง methine โปรตอน H-14 ที่ δ_H 3.38 กับ H-7, H-9 แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับ H-8 ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ระบุการจัดตัวของหมู่ benzoyloxy และ CO_2Me ว่าเป็นแบบ β ดังนั้น สาร **CP12** คือ 3 β -benzoyloxy-6 β -acetoxo-7 β -hydroxy-14 β -methoxycarbonylvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin O



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP12**

สาร CP13; Pulcherrin P

มีสูตรโมเลกุล $C_{32}H_{38}O_{11}$ ($[M]^+ m/z$ 598.2423) (HREIMS) ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 12) ของสาร **CP13** คล้ายกับสาร **CP12** โดยมีข้อแตกต่างคือสัญญาณซึ่งเกิดของหมู่เมทิลที่ δ_H 1.26 (Me-19) ในสาร **CP12** ถูกแทนที่ในสาร **CP13** ด้วยสัญญาณของ oxymethylene โปรตอน ซึ่งปรากฏสัญญาณที่ δ_H 4.63, 5.39 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H-19) และสัญญาณของหมู่ acetyl ซึ่งปรากฏที่ δ_H 1.98 (δ_C 21.0, 171.6) ยืนยันตำแหน่งด้วยข้อมูล HMBC ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง oxymethylene โปรตอนที่ δ_H 4.63 และ 5.39 กับคาร์บอนที่ δ_C 15.2 (C-18), 48.2 (C-4), 76.7 (C-3), 79.0 (C-5) และ 171.6 (OCOCH₃) นอกจากนั้นแล้วยังพบความสัมพันธ์ระหว่าง oxymethine โปรตอนที่ δ_H 5.19 (H-7) กับคาร์บอนที่ δ_C 34.3 (C-8), 45.4 (C-14) และ 170.7 (OCOCH₃) และพบความสัมพันธ์ระหว่าง oxymethine โปรตอนที่ δ_H 4.16 (H-6) กับคาร์บอนที่ δ_C 34.3 (C-8), 40.9 (C-10), 78.2 (C-7) และ 79.0 (C-5) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ตำแหน่งของหมู่ OAc ที่ C-7 และหมู่ OH ที่ C-6 ระบุ relative stereochemistry ด้วยข้อมูล NOESY โดย oxymethylene โปรตอน (2H-19) แสดงความสัมพันธ์กับเมทิลโปรตอนที่ δ_H 1.35 (Me-20) ดังนั้น สาร **CP13** คือ 3 β -benzoyloxy-6 β -hydroxy-7 β ,19-diacetoxy-14 β -methoxycarbonylvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin P



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP13**

ตารางที่ 12 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร **CP12** และ

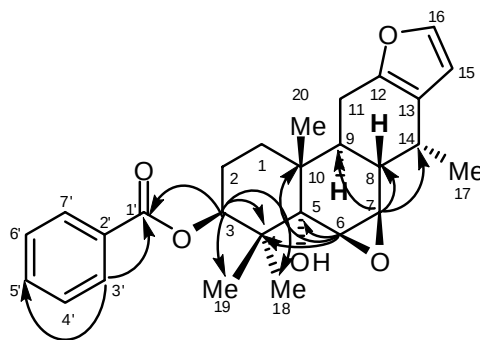
CP13 (δ in ppm, multiplicities, J in Hz)

Position	CP12		CP13	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	32.6	1.42-1.49 m 1.73-1.82 m	32.3	1.37-1.45 m 1.74-1.86 m
2	23.9	1.73-1.78 m 1.82-1.89 m	23.9	1.75-1.83 m
3	76.7	5.24 dd (10.8, 5.7)	76.7	5.31 dd (10.8, 4.8)
4	43.9	-	48.2	-
5	78.8	-	79.0	-
6	73.4	5.42 d (4.2)	71.3	4.16 d (3.3)
7	74.0	4.05 dd (10.2, 4.2)	78.2	5.19 dd (11.1, 3.3)
8	37.6	3.38 ddd (10.5, 9.9, 8.1)	34.3	2.76 ddd (11.1, 9.0, 8.4)
9	41.2	2.24-2.35 m	41.5	2.32 ddd (9.0, 7.5, 4.8)
10	41.1	-	40.9	-
11	21.5	2.44-2.54 m	21.4	2.47-2.55 m
12	150.7	-	150.5	-
13	113.1	-	112.8	-
14	45.6	3.38 d (8.1)	45.4	3.29 d (8.4)
15	108.8	6.13 d (1.8)	108.3	6.07 d (1.8)
16	141.2	7.17 d (1.8)	144.4	7.17 d (1.8)
17	175.9	-	174.6	-
18	22.7	1.03 s	15.2	1.06 s
19	19.2	1.26 s	64.0	4.63 d (12.0) 5.39 d (12.0)
20	16.5	1.40 s	15.7	1.35 s
OCH ₃	52.2	3.68 s	52.1	3.68 s
O $\overline{\text{C}}$ OCH ₃	170.8	-	170.7	-
O $\overline{\text{C}}$ OCH ₃	21.7	2.10 s	21.0	2.00 s
19- O $\overline{\text{C}}$ OCH ₃	-	-	171.6	-
19- O $\overline{\text{C}}$ OCH ₃	-	-	21.0	1.98 s
1'	166.1	-	166.1	-
2'	130.6	-	130.4	-
3'/7'	129.5	7.95 br d (7.2)	129.7	8.03 br d (7.8)
4'/6'	128.4	7.37 t (7.2)	128.3	7.38 t (7.8)
5'	133.0	7.92 tt (7.2, 2.1)	133.0	7.50 br t (7.8)
5-OH	-	2.01 br s	-	2.21 s

สาร CP14; Pulcherrin Q

มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_5$ ($[\text{M}]^+$ m/z 436.2250) (HREIMS) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 13) ของสาร **CP14** คล้ายกับสาร **CP5** โดยมีข้อแตกต่างคือพบสัญญาณของวงแหวน 1,2-disubstituted epoxide ซึ่งปรากฏเป็นสัญญาณของ 2 oxymethine โปรตอนที่ δ_{H} 3.25, 3.01 (d, $J = 4.2$ Hz; δ_{C} 55.0, 54.0 ตามลำดับ) ในสาร **CP14** แทนที่จะพบสัญญาณของ methylene โปรตอน 2 ชุด ตามที่พบในสาร **CP5** ซึ่งระบุได้ว่าสัญญาณที่ δ_{H} 3.25 คือสัญญาณของ oxymethine โปรตอน H-6 เนื่องจากมีความสัมพันธ์ HMBC กับคาร์บอนที่ δ_{C} 39.1 (C-10), 43.1 (C-4), 54.0 (C-7) และ 77.2 (C-5) ส่วนอีก

โปรตอนคือ H-7 ที่ δ_H 3.01 เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_C 31.0 (C-14), 35.3 (C-9), 35.6 (C-8) และ 55.0 (C-6) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ยังบ่งชี้ว่าวงแหวน epoxide เกิดระหว่าง C-6 และ C-7 ระบุ relative stereochemistry ด้วยข้อมูล coupling constant และ NOESY โดย พบว่า H-6 และ H-7 มี J ค่าใหญ่ ($J = 4.2$ Hz) ซึ่งบ่งชี้ว่าวงแหวน epoxide จัดตัวแบบ *cis* ข้อมูล NOESY พบว่า oxymethine โปรตอนที่ δ_H 3.25 (H-6) แสดงความสัมพันธ์กับเมทิลโปรตอนที่ δ_H 1.16 (Me-18) และ 3.01 (H-7) ส่วน oxymethine โปรตอนที่ δ_H 3.01 (H-7) แสดงความสัมพันธ์กับเมทิลโปรตอนที่ δ_H 1.11 (Me-17) แสดงว่าวงแหวน epoxide จัดตัวแบบ β ดังนั้น สาร **CP14** คือ 3 β -benzoyloxy-6 β ,7 β -epoxyvouacapen-5 α -ol และเรียกชื่อว่า pulcherrin Q

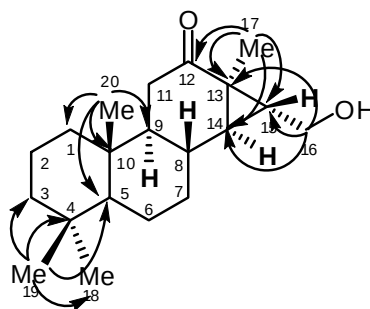


แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP14**

สาร **CP15; Pulcherrin R**

มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{32}O_2$ ($[M]^+$ m/z 304.2405) (HREIMS) ข้อมูล ^{13}C NMR และ DEPT (ตารางที่ 13) ของสาร **CP15** แสดงสัญญาณของ 20 คาร์บอน ซึ่งรวมทั้งคาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ_C 211.8 (C-12) และ oxymethylene คาร์บอนที่ δ_C 62.3 (C-16) ข้อมูล 1H NMR (ตาราง 13) แสดงสัญญาณของ aliphatic methyl 4 หมู่ ที่ δ_H 0.71 (Me-20), 0.73 (Me-19), 0.78 (Me-18) และ 1.17 (Me-17) และสัญญาณของ oxymethylene โปรตอนที่ δ_H 3.47 (dd, $J = 11.7, 8.1$ Hz, H-16) และ 3.73 (dd, $J = 11.7, 5.7$ Hz, H-16) ข้อมูล 1H NMR, COSY, HMQC ยังระบุวงแหวน cyclopropane ซึ่งปรากฏ 2 สัญญาณที่ δ_H 0.94 (dd, $J = 5.7, 1.5$ Hz, H-14; δ_C 38.5) และ 1.37-1.45 (m, H-15; δ_C 37.3) ยืนยันโครงสร้างด้วยข้อมูล HMBC ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหมู่เมทิลที่ δ_H 1.17 (Me-17) กับคาร์บอนที่ δ_C 33.4 (C-13), 37.3 (C-15), 38.5 (C-14) และ 211.8 (C-12) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง oxymethylene โปรตอนที่ δ_H 3.47, 3.73 (2H-16) กับคาร์บอนที่ δ_C 33.4 (C-13), 37.3 (C-15) และ 38.5 (C-14) ข้อมูลเหล่านี้ระบุว่าหมู่ carbonyl ที่ C-12 และหมู่ OH ที่ C-16 นอกจากนั้นยังระบุว่า วงแหวน cyclopropane เกิดจากการเชื่อมต่อของ C-13, C-14 และ C-15 ข้อมูล NOESY แสดง

ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนที่มี δ_H 1.79 (t, $J = 14.1$ Hz, H_{ax} -11) กับโปรตอนที่มี δ_H 0.71 (Me-20), 1.37-1.45 (H-15) และ 1.55-1.65 (H-8) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง methine โปรตอนที่มี δ_H 0.94 (H-14) กับเมทิลโปรตอนที่มี δ_H 1.17 (Me-17), 1.04 (H-9) และ oxymethylene โปรตอนที่มี δ_H 3.47, 3.73 (2H-16) แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับ H-15 ซึ่งข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้การจัดตัวแบบ α ของ H-14, Me-17, 2H-16 นั่นคือวงแหวน cyclopropane จัดตัวแบบ *cis* โดยมีโซ่ข้างเป็นหมู่ α -hydroxymethyl เส้นทางการสังเคราะห์ทางชีวภาพจากโครง pimarane ระบุ stereochemistry (Yodsaoue et al., 2010) ดังนั้นสาร **CP15** คือ 13,14,15-cyclopropane-12-oxo-16-hydroxypimarane และเรียกชื่อว่า pulcherrin R



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **CP15**

ตารางที่ 13 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร **CP14** และ

CP15 (δ in ppm, multiplicities, J in Hz)^a

Position	CP14		CP15	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	31.7	1.25-1.30 m 1.70-1.77 m	38.1	0.74-0.84 m 1.45-1.53 m
2	23.7	1.71-1.79 m 1.84-1.94 m	18.6	1.33-1.40 m 1.43-1.53 m
3	76.9	5.23 dd (11.7, 4.5)	42.0	0.98-1.10 m 1.26-1.38 m
4	43.1	-	33.2	-
5	77.2	-	54.6	0.80 dd (10.8, 2.7)
6	55.0	3.25 d (4.2)	22.0	1.16-1.23 m 1.55-1.63 m
7	54.0	3.01 d (4.2)	35.2	1.15-1.23 m 1.94-2.23 m
8	35.6	2.21-2.26 m	36.9	1.55-1.65 m
9	35.3	2.24-2.38 m	56.9	1.04 td (14.1, 2.1)
10	39.1	-	37.3	-
11	23.6	2.25-2.31 m 2.38-2.44 m	36.4	1.79 t (14.1) 2.13 dd (14.1, 2.1)
12	149.8	-	211.8	-
13	122.1	-	33.4	-
14	31.0	2.90 qd (6.9, 5.4)	38.5	0.94 dd (5.7, 1.5)
15	109.3	6.15 d (1.8)	37.3	1.37-1.45 m
16	141.0	7.17 d (1.8)	62.3	3.47 dd (11.7, 8.1) 3.73 dd (11.7, 5.7)
17	17.1	1.11 d (6.9)	14.1	1.17 s
18	23.2	1.16 s	33.4	0.78 s
19	19.6	1.34 s	21.5	0.73 s
20	16.4	1.24 s	14.1	0.71 s
1'	166.2	-		
2'	130.8	-		
3'/7'	129.6	8.00 br d (7.5)		
4'/6'	128.4	7.39 t (7.5)		
5'	132.9	7.51 tt (7.5, 1.5)		

สาร furanoditerpene ที่แยกได้ทุกตัวมีสเตอริโอเคมีคล้ายกัน คือ วงแหวนหกเหลี่ยม 3 วง (A,B,C) ต่อเชื่อมกันแบบ trans/anti/trans คอนฟิกูเรชันของ H-8, Me-20 และ Me-19 เป็นแบบ β แต่คอนฟิกูเรชันของ H-9, Me-17, Me-18 และ OH-5 เป็นแบบ α แต่เมื่อมีหมู่แทนที่ คอนฟิกูเรชันของ H-3, H-6 และ H-7 เป็นแบบ α

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสาร CP1-CP26 จากรากของต้นหางนกยูงไทย

ส่วนสกัดหยาบเมทิลินคลอไรด์จากรากของหางนกยูงไทยแสดงฤทธิ์ด้าน nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cell lines ด้วยค่า IC_{50} 6.1 $\mu\text{g/ml}$ แยกได้สารบริสุทธิ์ diterpene จำนวน 26 สาร (CP1-CP26) โครงสร้างดังแสดงในรูปภาพที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ (ตารางที่ 14) แสดงว่าสาร CP14 ออกฤทธิ์ดีที่สุดด้วยค่า IC_{50} 2.9 μM ส่วนสาร CP8, CP9, CP11-CP15 และ CP17-CP26 แสดงฤทธิ์รองลงมาด้วยค่า IC_{50} ในช่วง 3.4-12.5 μM ซึ่งเป็นค่าที่ดีกว่า positive control, indomethacin (IC_{50} = 14.5 μM) ส่วนสารอื่นๆแสดงฤทธิ์อ่อน พบว่าสาร CP18 (IC_{50} = 5.3 μM) และสาร CP17 (IC_{50} = 8.2 μM) แสดงฤทธิ์ดีกว่าสาร CP3 มาก (IC_{50} = 59.7 μM) บ่งชี้ว่าหมู่ cinnamoyloxy และ benzoyloxy ที่ C-6 ช่วยเพิ่มฤทธิ์ดีกว่าหมู่ acetoxo นอกจากนี้ยังพบว่า การแทนที่ของหมู่ benzoyloxy ที่ C-3 (CP11, IC_{50} = 4.2 μM) และ ที่ C-7 (CP23, IC_{50} = 6.0 μM) ช่วยเพิ่มฤทธิ์เมื่อเปรียบเทียบกับสาร CP10 (IC_{50} = 26.7 μM) และออกซิเดชันของสาร CP10 ที่ตำแหน่ง C-19 มีผลเพิ่มฤทธิ์เป็น 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสาร CP6 (IC_{50} = 47.5 μM)

ตารางที่ 14 Inhibitory effects on NO production^a ของสาร CP1–CP26.

No	% Inhibition at various concentrations (μM)						IC ₅₀ (μM)
	0	1	3	10	30	100	
CP1	0.0 ± 2.0	-	-	13.7 ± 1.6	32.1 ± 2.0**	70.8 ± 2.2**	48.5
CP2	0.0 ± 2.0	-	-	9.9 ± 3.4	37.3 ± 3.1**	71.2 ± 1.9**	46.1
CP3	0.0 ± 2.0	-	-	-0.5 ± 3.6	24.1 ± 3.1**	67.9 ± 4.1**	59.7
CP4	0.0 ± 8.6	-	-	36.8 ± 1.1**	39.0 ± 1.9**	79.4 ± 1.2**	43.2
CP5	0.0 ± 2.3	-	-	25.2 ± 1.7**	44.2 ± 2.4**	45.1 ± 2.2 ^b **	>100
CP6	0.0 ± 2.3	-	-	8.3 ± 1.5	33.0 ± 1.3**	72.8 ± 1.4 ^b **	47.5
CP7	0.0 ± 2.3	-	-	17.5 ± 2.4	47.6 ± 2.9**	71.8 ± 2.0 ^b **	37.4
CP8	0.0 ± 4.8	-	-	53.2 ± 3.1**	67.0 ± 2.1**	104.3 ± 1.8 ^b **	10.2
CP9	0.0 ± 4.8	-	-	57.9 ± 2.6**	82.4 ± 1.9**	104.3 ± 2.0 ^b **	6.4
CP10	0.0 ± 2.0	-	-	15.6 ± 2.1	69.8 ± 2.0**	76.4 ± 2.0 ^b **	26.7
CP11	0.0 ± 4.8	27.3 ± 2.1	34.8 ± 2.0*	71.0 ± 3.8**	95.0 ± 1.7**	99.4 ± 3.4 ^b **	4.2
CP12	0.0 ± 8.2	-	38.3 ± 2.6*	78.0 ± 4.2**	97.8 ± 4.9 ^b **	105.4 ± 1.9 ^b **	4.2
CP13	0.0 ± 8.2	-	42.6 ± 1.8**	77.4 ± 3.3**	101.1 ± 5.0**	104.8 ± 4.8 ^b **	3.4
CP14	0.0 ± 8.2	-	49.7 ± 2.4**	81.2 ± 4.1**	103.8 ± 4.7**	104.9 ± 5.4 ^b **	2.9
CP15	0.0 ± 8.2	-	32.8 ± 2.1*	67.7 ± 4.6**	98.4 ± 3.8**	100.5 ± 4.6 ^b **	5.4
CP16	0.0 ± 2.3	-	-	9.7 ± 2.0	35.9 ± 2.7**	67.5 ± 0.9 ^b **	50.7
CP17	0.0 ± 8.6	-	29.6 ± 1.8	55.6 ± 1.3**	71.7 ± 4.2**	104.5 ± 1.6 ^b **	8.2
CP18	0.0 ± 8.6	-	38.5 ± 2.1*	60.1 ± 0.4**	88.3 ± 0.9**	104.0 ± 0.9 ^b **	5.3
CP19	0.0 ± 8.6	-	-	46.2 ± 1.9**	68.6 ± 3.1**	105.4 ± 1.0 ^b **	12.5
CP20	0.0 ± 4.8	-	-	52.4 ± 2.3**	76.8 ± 2.5**	97.9 ± 5.0 ^b **	8.4
CP21	0.0 ± 9.3	-2.3 ± 2.8	2.3 ± 2.0	100.0 ± 1.5 ^b **	102.0 ± 5.2 ^b **	108.7 ± 1.8 ^b **	6.0
CP22	0.0 ± 9.3	-	36.2 ± 2.2*	64.7 ± 0.5**	100.0 ± 2.0**	106.0 ± 5.2 ^b **	5.2
CP23	0.0 ± 9.3	2.3 ± 3.2	13.0 ± 1.3	102.2 ± 4.2 ^b **	103.8 ± 5.0 ^b **	108.7 ± 1.5 ^b **	5.6
CP24	0.0 ± 9.3	-	28.2 ± 2.5	56.5 ± 4.3**	103.3 ± 2.7**	109.2 ± 2.9 ^b **	6.5
CP25	0.0 ± 8.2	-	39.5 ± 2.2*	71.5 ± 3.3**	105.4 ± 2.2**	105.9 ± 3.1 ^b **	4.4
CP26	0.0 ± 8.2	-	35.4 ± 2.4*	58.1 ± 3.7**	71.0 ± 2.7**	100.0 ± 3.2**	7.0
Indomethacin	0.0 ± 4.2	-	15.5 ± 1.7	36.4 ± 2.3**	60.9 ± 3.7**	104.5 ± 1.7**	14.5

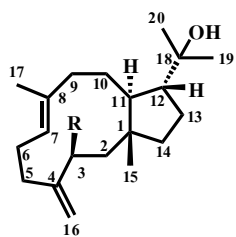
^aEach value represents mean ± S.E.M. of four determinations,

Statistical significance, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,

^bCytotoxic effect was observed.

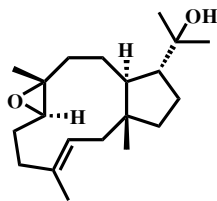
5. การหาสูตรโครงสร้างของสารจากใบของต้นประยงค์ (*A. odorata*)

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากใบของประยงค์สามารถแยกสารใหม่ได้ 5 สาร ซึ่งเป็นสารกลุ่ม dolabellane diterpenoids 2 สาร (AO1 และ AO2), เป็นสารกลุ่ม dammarane triterpenoids 2 สาร (AO6 และ AO7), และเป็นสารกลุ่ม protostane triterpenoid 1 สาร (AO8) และนอกจากนี้ยังพบสารที่เคยรายงานมาแล้วจำนวน 20 สาร คือ (1*R*,7*E*,11*S*,12*R*)-18-hydroxydolabella-4(16),7-dien-3-one (AO3) (Cai et al., 2010), (1*R*,3*S*,4*S*,7*E*,11*S*,12*R*)-3,4-epoxydolabella-7-en-18-ol (AO4) (Cai et al., 2010), (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*,12*R*)-18-hydroxydolabella-3,7-dien (AO5) (Amico et al., 1981), 5 α -dammar-20-ene-3 β ,24,25-triol (AO9) (Shiengthong et al., 1974; Boar and Damps 1977), 24(*R*),25-dihydroxy-5 α -dammar-20-en-3-one (AO10) (Boar and Damps 1977), aglaiol (AO11) (Akihisa et al., 1997; Shiengthong et al., 1965, 1974; Boar and Damps 1973, 1977), 24(*S*),25-epoxy-5 α -dammar-20-en-3-one (AO12) (Boar and Damps 1977), dammara-20,25-dien-3 β ,24-diol (AO13) (De Pascual Teresa et al., 1986), 24-hydroxydammara-20,25-dien-3-one (AO14) (Inada et al., 1993), 2,3(*S*);22(*S*),23-dioxidosqualene (AO15) (D'Accolti et al., 2005), aglaxiflorin D (AO16) (Xu et al., 2000), (+)-odorine (AO17) (Shiengthong et al., 1979; Babidge et al., 1980), (+)-odorinol (AO18) (Shiengthong et al., 1979; Babidge et al., 1980), naringenin trimethyl ether (AO19) (Seidel et al., 2000), 7,4'-*O*-dimethylnaringenin (AO20) (Oyama and Kondo 2004), 4',5,7-trimethoxydihydroflavonol (AO21) (Islam and Tahara 2000; Takahashi et al., 1988), 4',5,7-trimethoxyflavan-3,4-diol (AO22) (Takahashi et al., 1988), 4',5,7-tri-*O*-methylkaempferol (AO23) (Smith et al., 2007), flavokawain-A (AO24) (Seidel et al., 2000), และ eudesmin (AO25) (Miyazawa et al., 1995) ซึ่งสารเหล่านี้ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีกับข้อมูลที่เคยรายงานมาแล้ว

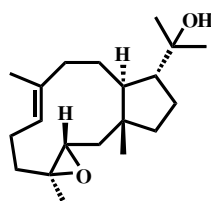


AO1 : R = b-OH

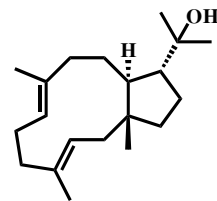
AO3 : R = =O



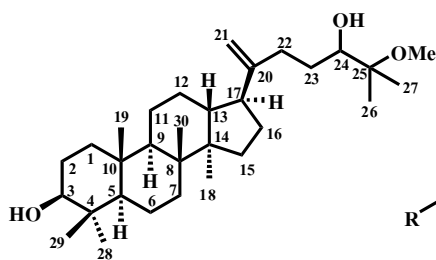
AO2



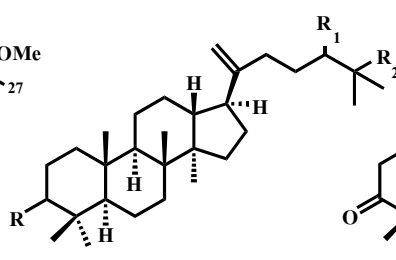
AO4



AO5



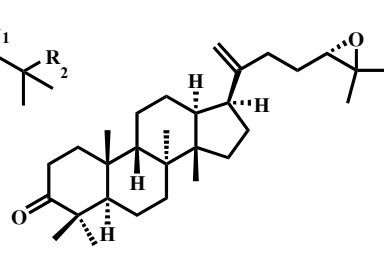
AO6



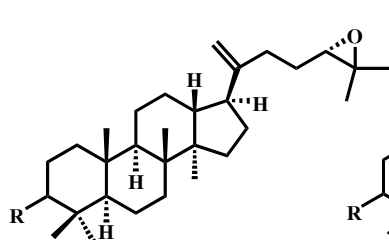
AO7 : R = b-OH, R₁, R₂ = -OC(Me)₂O-

AO9 : R = b-OH, R₁ = OH, R₂ = OH

AO10 : R = =O, R₁ = OH, R₂ = OH

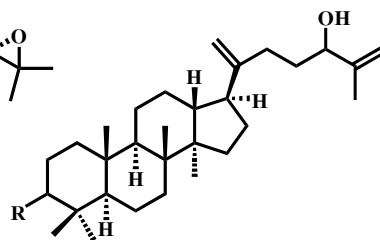


AO8



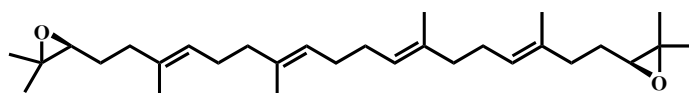
AO11 : R = b-OH

AO12 : R = =O

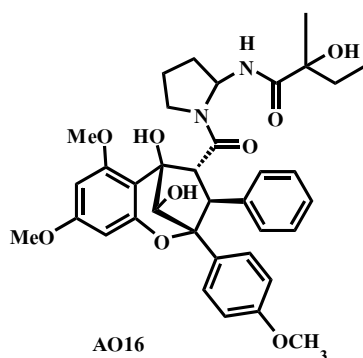


AO13 : R = b-OH

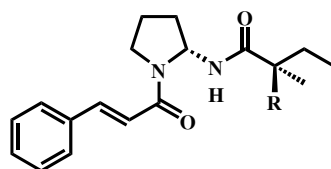
AO14 : R = =O



AO15

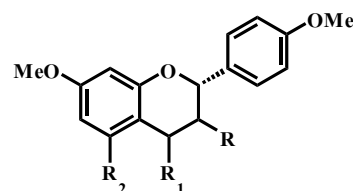


AO16



AO17 : R = H

AO18 : R = OH



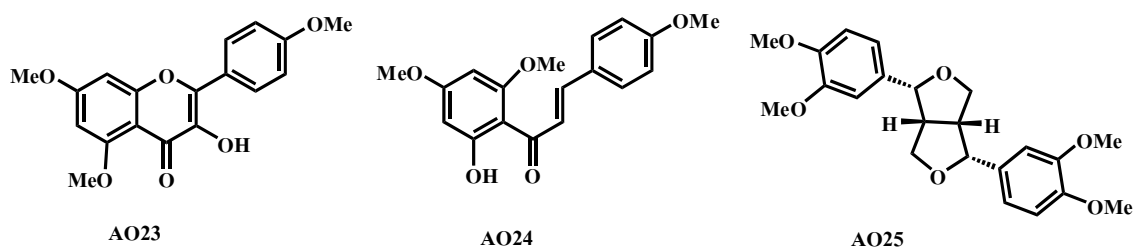
AO19 : R = H, R₁ = =O, R₂ = OMe

AO20 : R = H, R₁ = =O, R₂ = OH

AO21 : R = a-OH, R₁ = =O, R₂ = OMe

AO22 : R = a-OH, R₁ = a-OH, R₂ = OMe

รูปภาพที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากใบประยงค์

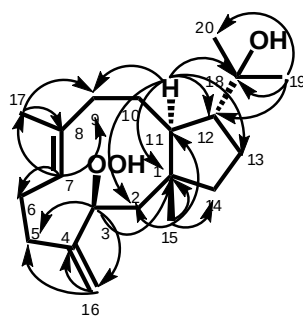


รูปภาพที่ 3 (ต่อ) องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากใบประยงค์

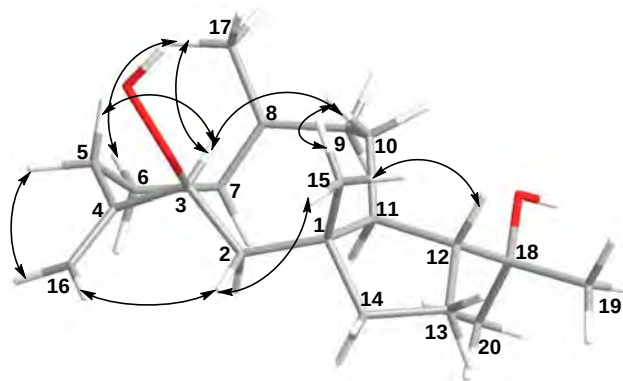
สาร AO1; (1R,3S,7E,11S,12R)-3-Hydroperoxydolabella-4(16),7-dien-18-ol

เป็นสารหนืด มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{34}O_3$ ($[M]^+$ m/z 322.2492) (HREIMS) ข้อมูลอินฟราเรด แสดงแถบดูดกลืนของหมู่ไฮดรอกซิล (3434 cm^{-1}) เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 15) กับสาร AO3 และ AO4 ที่เคยมีรายงานแล้ว ทำให้ทราบว่าสาร AO1 คือสารกลุ่ม dollabellen-18-ol (Cai et al, 2010) ข้อมูล ^{13}C NMR (ตารางที่ 15) วิเคราะห์ร่วมกับข้อมูล DEPT ระบุนุ คาร์บอน โดยรวมทั้งสัญญาณของ 4 เมทิลคาร์บอน ที่ δ_c 16.2 (C-17), 23.6 (C-15), 26.1 (C-19) และ 29.9 (C-20) สัญญาณของ 2 คาร์บอนของ exocyclic double bond ที่ δ_c 113.8 (C-16), 153.8 (C-4) สัญญาณของ 2 คาร์บอนของ trisubstituted endocyclic double bond ที่ δ_c 125.6 (C-7), 135.0 (C-8) นอกจากนั้นแล้วยังพบสัญญาณของ 2 oxygenated คาร์บอนที่ δ_c 74.4 (C-18), 84.7 (C-3) ซึ่งค่า chemical shift บ่งชี้การต่อเชื่อมกับหมู่ hydroxyl และ hydroperoxyl ตามลำดับ และยังคงคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{34}O_3$ ข้อมูล ^1H NMR ของสาร AO1 คล้ายกับข้อมูลของสาร (1R,7E,11S,12R)-18-hydroxydolabella-4(16),7-dien-3-one (AO3) โดยมีข้อแตกต่างคือ สาร AO3 ปรากฏสัญญาณของ keto carbon ที่ δ_c 204.2 (C-3) แต่สาร AO1 ปรากฏสัญญาณของ peroxy carbon ที่ δ_c 84.7 ซึ่งยังปรากฏสัญญาณของ peroxy methine โปรตอน ที่ δ_H 4.22 (br d, $J = 8.4\text{ Hz}$, H-3) ข้อมูล ^1H NMR ยังแสดงสัญญาณของ 3 olefinic โปรตอน ซึ่งโปรตอน 2 ตัวเป็น terminal olefinic methylene โปรตอนที่ δ_H 5.07, 5.09 (s, 2H-16: δ_c 113.8) ส่วนโปรตอนตัวที่ 3 เป็น trisubstituted olefin ที่ δ_H 5.17 (br d, $J = 8.7\text{ Hz}$, H-7: δ_c 125.6) ซึ่งโปรตอนตัวนี้ยังแสดงความสัมพันธ์ COSY กับ methylene โปรตอนที่ δ_H 2.13, 2.17 (2H-6) ส่วน peroxy methine โปรตอน H-3 ที่ δ_H 4.22 แสดงความสัมพันธ์ COSY กับ methylene โปรตอนที่ δ_H 1.25, 1.35 (2H-2) และแสดงความสัมพันธ์ HMBC กับคาร์บอนที่ δ_c 38.6 (C-5), 39.5 (C-2), 44.4 (C-1), 113.8 (C-16) และ 153.8 (C-4) ในขณะที่ methylene โปรตอนที่ δ_H 5.07, 5.09 (2H-16) แสดงความสัมพันธ์ HMBC กับคาร์บอนที่ δ_c 38.6 (C-5), 84.7 (C-3) และ 153.8 (C-4) และเมทิลโปรตอนที่ δ_H 0.70 (s, Me-15) แสดงความสัมพันธ์ HMBC กับคาร์บอนที่ δ_c 36.3 (C-14), 39.5 (C-2), 44.4 (C-1) และ 44.7 (C-11) ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ตำแหน่งของหมู่ hydroperoxyl ที่ C-3 และ exocyclic double bond ที่ C-4 ส่วน relative stereochemistry ของหมู่ hydroperoxyl วิเคราะห์จาก

ข้อมูล NOESY โดย oxymethine โปรตอน H-3 ที่ δ_H 4.22 แสดงความสัมพันธ์กับโปรตอนที่ δ_H 1.49 (Me-17), 1.42 (H-10) เนื่องจาก trans annular interaction ของโปรตอนเหล่านี้ใน medium-sized ring เมทิลโปรตอนที่ δ_H 0.80 (Me-15) แสดงความสัมพันธ์กับโปรตอนที่ δ_H 1.35 (H_β -2), 1.35, 1.42 (2H-10) และ 1.80 (H-12) แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับ H-11 ในขณะที่ olefinic methylene โปรตอนที่ δ_H 5.09 (H_β -16) แสดงความสัมพันธ์กับโปรตอนที่ δ_H 1.35 (H_β -2), ส่วนโปรตอนอีกตัวที่ δ_H 5.07 (H_α -16) แสดงความสัมพันธ์กับโปรตอนที่ δ_H 2.46 (H_α -5) ข้อมูลเหล่านี้ระบุว่ามี hydroperoxyl อยู่ด้านเดียวกับ Me-15 และ H-12 และยังระบุ trans-fusion ของ 2 วงแหวนของ ระบบ dollabellane bicyclic แสดงว่ามี hydroperoxyl บิดตัวออกจากวงแหวน (outer hydroperoxide) ข้อมูล NOESY ยังระบุการจัดตัวของ trisubstituted double bond ว่าเป็นแบบ *E* เนื่องจากมีความสัมพันธ์ระหว่าง vinyl methyl โปรตอนที่ δ_H 1.49 (Me-17) กับโปรตอน H-6 แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับ olefinic โปรตอน H-7 และเนื่องจากพบว่า absolute configuration ที่ C-1, C-11, C-12 ของสารกลุ่ม dollabellane ที่แยกได้จากพืชชนิดเดียวกันนี้เป็นแบบ 1*R*, 11*S*, 12*R* (Cai et al, 2005a, 2010) ดังนั้นสาร **AO1** คือ (1*R*,3*S*,7*E*,11*S*,12*R*)-3-hydroperoxydollabella-4(16),7-dien-18-ol



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **AO1**

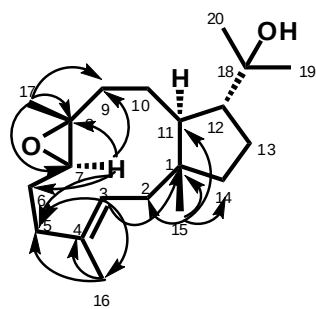


แสดงข้อมูล NOESY บางส่วนของสาร **AO1**

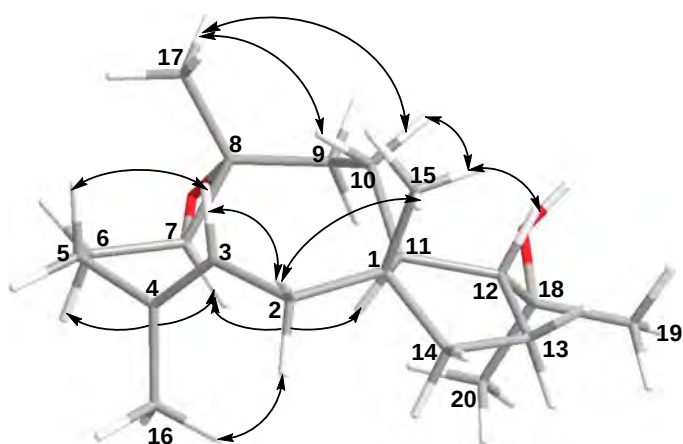
สาร AO2; (1R,3E,7R,8R,11S,12R)-7,8-Epoxydolabella-3-en-18-ol

เป็นสารหนืด มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{34}O_2$ ($[M]^+$ m/z 306.2553) (HREIMS) ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นกลุ่ม diterpene ข้อมูลอินฟราเรดแสดงแถบดูดกลืนของหมู่ไฮดรอกซิล (3430 cm^{-1}) ข้อมูล ^{13}C NMR (ตารางที่ 15) วิเคราะห์ร่วมกับข้อมูล DEPT ระบุ 20 คาร์บอน โดยรวมทั้งสัญญาณของ 2 olefinic คาร์บอนที่ δ_{C} 122.4 (C-3), 133.7 (C-4) และสัญญาณของ 3 oxygenated คาร์บอน ที่ δ_{C} 62.8 (C-8), 64.5 (C-7) และ 73.3 (C-18) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 15) แสดงรูปแบบสัญญาณคล้ายกับของ (1R,3S,4S,7E,11S,12R)-3,4-epoxydolabella-7-en-18-ol (AO4) (Cai et al., 2010) โดยมีข้อแตกต่างที่ตำแหน่งของ trisubstituted olefin และ methyl epoxide ซึ่งระบุตำแหน่งในสาร AO2 ด้วยข้อมูลดังนี้ olefinic โปรตอนที่ δ_{H} 5.16 (t, $J = 6.3\text{ Hz}$, H-3: δ_{C} 122.4) แสดงความสัมพันธ์ COSY กับโปรตอนที่ δ_{H} 1.98, 2.01 (2H-2) และแสดงความสัมพันธ์ HMBC กับคาร์บอนที่ δ_{C} 16.1 (C-16), 36.8 (C-5) และ 45.1 (C-1) เมทิลโปรตอนที่ δ_{H} 0.84 (Me-15) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอน ที่ δ_{C} 36.6 (C-2), 37.2 (C-14), 45.1 (C-1) และ 45.2 (C-11) ส่วน vinyl methyl โปรตอนที่ δ_{H} 1.62 (Me-16) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_{C} 36.8 (C-5), 122.4 (C-3) และ 133.7 (C-4) ดังนั้นยืนยันตำแหน่งของพันธะคู่ว่าอยู่ระหว่าง C-3 และ C-4 โดยมีหมู่เมทิลต่อที่ตำแหน่ง C-4 สัญญาณของ oxymethine โปรตอนที่ δ_{H} 2.74 (dd, $J = 10.5, 1.8\text{ Hz}$, H-7: δ_{C} 64.5) แสดงความสัมพันธ์ COSY กับโปรตอนที่ δ_{H} 1.45, 2.06 (2H-6) และแสดงความสัมพันธ์ HMBC กับคาร์บอนที่ δ_{C} 25.5 (C-6), 36.8 (C-5), 39.0 (C-9) และ 62.8 (C-8) ในขณะที่เมทิลโปรตอนที่ δ_{H} 1.19 (Me-17) แสดงความสัมพันธ์ HMBC กับคาร์บอนที่ δ_{C} 39.0 (C-9), 62.8 (C-8) และ 64.5 (C-7) ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้โครงสร้างของ 7,8-epoxide ที่มีหมู่เมทิลที่ C-8

Relative stereochemistry ของ epoxide ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูล NOESY โดย epoxymethine โปรตอน ที่ δ_{H} 2.74 (H-7) แสดงความสัมพันธ์กับโปรตอนที่ δ_{H} 1.52 (H-11) แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับ Me-15 ดังนั้น H-11 และ H-7 จัดตัวอยู่ด้านเดียวของโมเลกุล (*trans*-annular proton, outer epoxide) นอกจากนั้นยังพบความสัมพันธ์ NOESY ระหว่างเมทิลโปรตอน ที่ δ_{H} 1.19 (Me-17) กับ methylene โปรตอน ที่ δ_{H} 1.73 และ 1.80 (2H-10) ระหว่างเมทิลโปรตอน ที่ δ_{H} 0.84 (Me-15) กับโปรตอน ที่ δ_{H} 1.79, (H-12), 1.73, 1.89 (2H-10) และ 1.98 (H $_{\beta}$ -2) ระหว่าง olefinic โปรตอน ที่ δ_{H} 5.16 (H-3) กับโปรตอน ที่ δ_{H} 1.55 (H $_{\beta}$ -5), 1.98 (H $_{\beta}$ -2) ข้อมูลเหล่านี้ระบุ H-3, Me-15, Me-17 และ H-12 อยู่ด้านเดียวกันของโมเลกุลที่บิดเบี้ยว (puckered molecule) นอกจากนั้นยังระบุพันธะคู่ C3/4 ว่าเป็น *E* configuration เนื่องจากความสัมพันธ์ NOESY ระหว่างเมทิลโปรตอน ที่ δ_{H} 1.62 (Me-16) กับ methylene โปรตอน ที่ δ_{H} 2.01 (H $_{\alpha}$ -2) แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับโปรตอน ที่ δ_{H} 5.16 (H-3) และยังพบสารนี้เกิดร่วมกับสาร dolabellane diterpenoids อื่นๆ (AO3-AO5) ดังนั้น สาร AO2 คือ (1R,3E,7R,8R,11S,12R)-7,8-epoxydolabella-3-en-18-ol



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร AO2



แสดงข้อมูล NOESY บางส่วนของสาร AO2

ตารางที่ 15 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (300 และ 75 MHz, CDCl_3) ของสาร **AO1** และ **AO2** (δ in ppm, multiplicities, J in Hz).

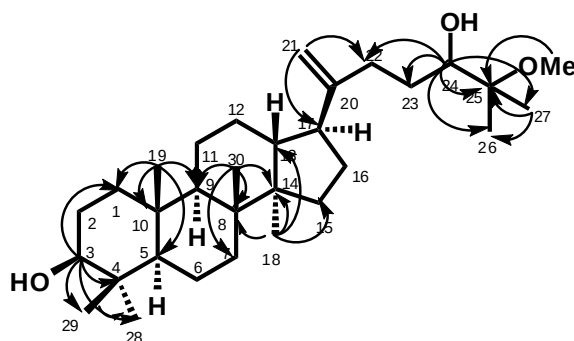
Position	AO1		AO2	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	44.4	-	45.1	-
2 α	39.5	1.25 m	36.6	2.01 m
β		1.35 m		1.98 m
3	84.7	4.22 br d (8.4)	122.4	5.16 t (6.3)
4	153.8	-	133.7	-
5 α	38.6	2.46 dd (8.1, 3.9)	36.8	1.25 m
β		2.10 m		1.55 m
6	30.6	2.13 m	25.5	1.45 m
		2.17 m		2.06 m
7	125.6	5.17 br d (8.7)	64.5	2.74 dd (10.5, 1.8)
8	135.0	-	62.8	-
9	40.0	1.25 m	39.0	1.44 m
		1.90 m		1.97 m
10	27.7	1.35 m	25.9	1.73 m
		1.42 m		1.80 m
11	44.7	1.50 m	45.2	1.52 m
12	57.2	1.80 m	57.1	1.79 m
13	25.8	1.68 m	24.7	1.28 m
		1.73 m		1.36 m
14	36.3	1.18 m	37.2	2.02 m
		1.64 m		2.28 m
15	23.6	0.70 s	22.8	0.84 s
16a	113.8	5.07 s	16.1	1.62 s
β		5.09 s		
17	16.2	1.49 s	17.1	1.19 s
18	74.4	-	73.3	-
19	26.1	1.18 s	24.9	1.16 s
20	29.9	1.19 s	31.9	1.19 s

สาร **AO6-AO8** เป็นกลุ่ม triterpene เนื่องจากให้สีม่วงกับการทดสอบ vanillin ใน sulfuric acid ข้อมูล IR, ^1H และ ^{13}C NMR ของสาร **AO6** และสาร **AO7** ระบุว่าเป็น tetracyclic triterpene ที่มีโครงสร้างคล้ายกับ dammar-20-ene-3 β ,24,25-triol (**AO9**)

สาร **AO6**; 25-Methoxy-5 α -dammar-20-en-3 β ,24-diol

มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{O}_3$ ($[\text{M}]^+$ m/z 474.4070) (HREIMS) ข้อมูลอินฟราเรดแสดงแถบดูดกลืนของหมู่ไฮดรอกซิล (3433 cm^{-1}) ข้อมูล ^1H NMR (ตารางที่ 16) แสดงสัญญาณของ 7 tertiary methyl โปรตอน ที่ δ_{H} 0.77 (Me-29), 0.84 (Me-19), 0.87 (Me-30), 0.98 (Me-18, Me-28), 1.10 (Me-27) และ 1.36 (Me-26) รวมทั้งสัญญาณของ terminal olefinic methylene โปรตอน ที่ δ_{H} 4.71 และ 4.76 (br s, 2H-21) ข้อมูล ^{13}C NMR (ตารางที่ 17) วิเคราะห์ร่วมกับข้อมูล DEPT ระบุ 31 คาร์บอน โดยรวมทั้งสัญญาณของ exo-olefinic คาร์บอนที่ δ_{C} 107.5 (C-21) และ 153.3 (C-20) และสัญญาณของ 4 ออกซีคาร์บอนที่ δ_{C} 49.0 (OMe), 76.4 (C-24), 77.5 (C-25) และ 79.0 (C-3) นอกจากนั้นแล้วยังพบสัญญาณของหมู่ methoxyl ที่ δ_{H} 3.23 (s, δ_{C} 49.0, 25-OMe) และสัญญาณของ 2 oxymethine โปรตอน ที่ δ_{H} 3.20 (dd, $J = 11.4, 5.7\text{ Hz}$, H-3: δ_{C} 79.0) และ ที่ δ_{H} 3.47 (dd, $J = 9.9, 2.4\text{ Hz}$, H-24: δ_{C} 76.4) ข้อมูล HMBC ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง oxymethine โปรตอน ที่ δ_{H} 3.20 (H-3) กับ คาร์บอนที่ δ_{C} 15.4 (C-29), 28.0 (C-28) และ 39.1 (C-4) ระบุการต่อเชื่อมที่ C-3 ส่วน oxymethine โปรตอน ที่ δ_{H} 3.47 (H-24) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_{C} 18.9 (C-27), 20.8 (C-26), 31.3 (C-22) และ 77.5 (C-25) นอกจากนั้นหมู่ methoxyl ที่ δ_{H} 3.23 ยังแสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_{C} 77.5 (C-25) ข้อมูลเหล่านี้แสดงว่าหมู่ OH ต่อเชื่อมที่ C-24 และหมู่ OMe ที่ C-25 ค่า vicinal coupling constant ของ H-3 ซึ่งเป็นค่าใหญ่และค่าเล็ก ($J_{3\text{ax},2\text{eq}} = 5.7\text{ Hz}$, $J_{3\text{ax},2\text{ax}} = 11.4\text{ Hz}$) แสดงว่า H-3 มีการจัดตัวแบบ axial ดังนั้นสาร **AO6** คือ 25-methoxy-5 α -dammar-20-en-3 β ,24-diol

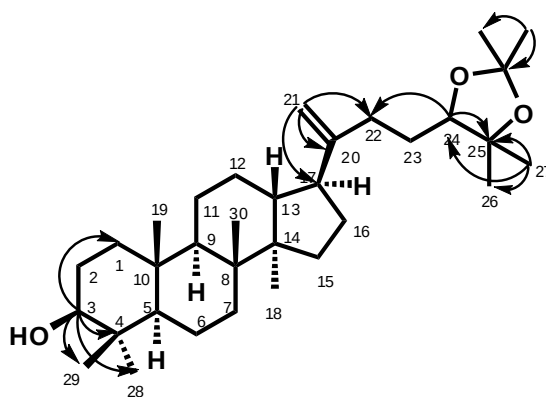
ทำการทดลองโดยเลียนแบบขั้นตอนการสกัดแยกสาร เพื่อที่จะพิสูจน์ว่า สาร **AO6** เป็น artefact ซึ่งได้จาก acid-catalyzed methanolysis ที่ C-25 ของวงแหวน epoxide จากสาร **AO11** หรือมาจาก สาร **AO13** เกิดปฏิกิริยา nucleophilic addition กับ methanol ซึ่งทำได้โดยนำสาร **AO11** และสาร **AO13** แต่ละสารไปละลายใน $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (0.5:9.5, v/v) หลังจากนั้นผสมสารละลายกับซิลิกาเจลและกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน แล้วระเหยตัวทำละลายออกและนำไปหาข้อมูล ^1H NMR ผลการทดลองพบเฉพาะสเปกตรัมของ สาร **AO11** และสาร **AO13** โดยไม่พบสัญญาณของสาร **AO6** ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าสาร **AO6** คือสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้จากต้นไม้



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **AO6**

สาร AO7; 3 β -Hydroxy-5 α -dammar-20-en-24,25-acetonide

มีสูตรโมเลกุล $C_{33}H_{56}O_3$ ($[M]^+$ m/z 550.4224) (HREIMS) ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 16 และ 17) เปรียบเทียบได้กับสาร **AO6** โดยมีข้อแตกต่างคือ สาร **AO7** แสดงสัญญาณของ acetonide (isopropylidene) โดยแสดงสัญญาณของ เมทิลโปรตอน เพิ่มมาอีก 2 หมู่ ที่ δ_H 1.27 (s, Me-3') และ 1.36 (s, Me-2') และพบสัญญาณคาร์บอนที่ δ_C 26.9 (C-3'), 28.6 (C-2'), 106.5 (C-1') แทนที่สัญญาณของหมู่ OMe ดังที่พบในสาร **AO6** ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ทำให้สามารถระบุตำแหน่งของหมู่ acetonide ที่ C-24, C-25 ดังนั้น สาร **AO7** คือ 3 β -hydroxy-5 α -dammar-20-en-24,25-acetonide



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **AO7**

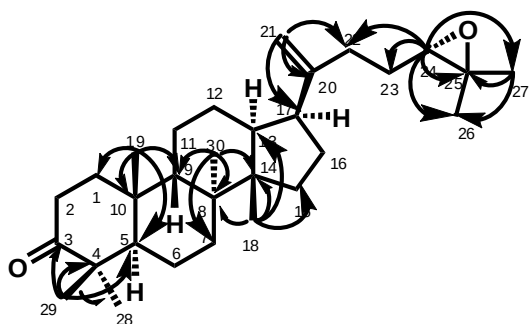
สาร AO8; 24(S),25-Epoxy-5 α -protost-20,25-dien-3-one

มีสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{48}O_2$ ($[M]^+$ m/z 440.3647) (HREIMS) ข้อมูลอินฟราเรดแสดงแถบดูดกลืนของหมู่คาร์บอนิล (1702 cm^{-1}) ข้อมูล NMR เปรียบเทียบได้กับข้อมูลของ 24(S),25-epoxy-5 α -dammar-20-dien-3-one (**AO12**) โดยสาร **AO8** มีโครงสร้างเป็น tetracyclic protostane แต่สาร **AO12** เป็น dammarane สามารถบอกความแตกต่างของทั้งสองโครงสร้าง โดยพิจารณาจากการ

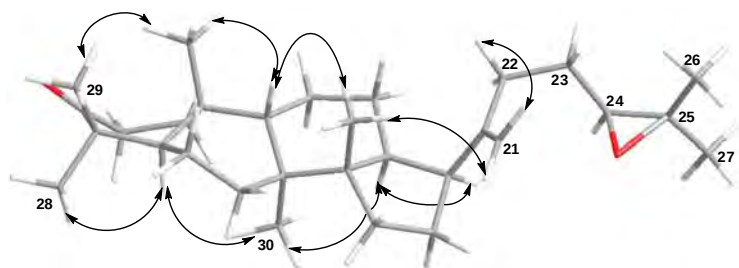
เปรียบเทียบค่า carbon chemical shift ที่ C-1, C-5, C-9 และ C-17 ซึ่งค่าของ protostane ต่ำกว่าของ dammarane ประมาณ 5-10 ppm นอกจากนั้นยังพบว่าค่า carbon chemical shift ที่ C-19 ของ protostane สูงกว่าของ dammarane ประมาณ 6-8 ppm (Wu et al., 2005; Lodeiro et al., 2009; Mitsuguchi et al., 2009) พบว่าค่า carbon chemical shift ของสาร AO8 เหมือนของสาร protosta-20,24-dien-3 β -ol (Wu et al., 2006) จากข้อมูล ^1H NMR (ตารางที่ 16) แสดงสัญญาณของเมทิลซึ่งเกิด 7 หมู่ที่ δ_{H} 0.69 (Me-19), 0.80 (Me-18), 0.96 (Me-29), 0.99 (Me-28), 1.08 (Me-30), 1.18 (Me-27) และ 1.23 (Me-26) และยังพบสัญญาณโปรตอน 2 สัญญาณที่สนามต่ำที่ δ_{H} 4.84 และ 4.88 (s, 2H-21: δ_{C} 109.6) ซึ่งเป็นสัญญาณของ olefinic methylene โปรตอน สัญญาณของ oxymethine โปรตอนที่ δ_{H} 2.65 (t, $J = 6.3$ Hz) และสัญญาณของคาร์บอนที่ δ_{C} 64.2, 58.5 บ่งชี้ว่าเป็นโครงสร้างของวงแหวน trisubstituted epoxide ซึ่งสูตรโมเลกุล $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$ ยังสอดคล้องกับโครงสร้างของคีโตนและอีพอกไซด์ และพบสัญญาณของ keto carbon ที่ δ_{C} 220.4 ข้อมูล HMBC แสดงความสัมพันธ์ของเมทิลโปรตอนที่ δ_{H} 0.99 (Me-28) กับคาร์บอนที่ δ_{C} 19.6 (C-29), 47.1 (C-4), 47.1 (C-5) และ 220.4 (C-3) ซึ่งข้อมูลนี้แสดงว่า C-3 คือ keto carbon ระบุโซ่ข้างต่อที่ C-17 เนื่องจากความสัมพันธ์ HMBC ระหว่าง methine โปรตอนที่ δ_{H} 2.57 (m, H-17) กับคาร์บอนที่ δ_{C} 27.7 (C-16), 35.3 (C-22), 44.5 (C-13), 50.5 (C-14), 109.6 (C-21) และ 151.0 (C-20) และ terminal olefinic methylene โปรตอนที่ δ_{H} 4.84, 4.88 (2H-21) กับคาร์บอนที่ δ_{C} 35.3 (C-22), 43.7 (C-17) และ 151.0 (C-20) นอกจากนั้น oxymethine โปรตอนที่ δ_{H} 2.65 (H-24) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_{C} 24.9 (C-26), 27.9 (C-23), 35.3 (C-22) และ 58.5 (C-25) และเมทิลโปรตอนที่ δ_{H} 1.18 (Me-27) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ_{C} 24.9 (C-26), 58.5 (C-25) และ 64.2 (C-24) ซึ่งข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าวงแหวน methylepoxide เกิดระหว่าง C-24 และ C-25

ระบุ relative stereochemistry จากข้อมูล NOESY โดย methine โปรตอน H-5 ที่ δ_{H} 2.07 แสดงความสัมพันธ์กับเมทิลโปรตอนที่ δ_{H} 0.99 (Me-28) และ 1.08 (Me-30) ส่วน methine โปรตอน H-13 ที่ δ_{H} 1.95 แสดงความสัมพันธ์กับเมทิลโปรตอนที่ δ_{H} 1.08 (Me-30) และ 2.57 (H-17) ข้อมูลเหล่านี้ระบุว่า H-5, H-13, H-17, Me-30 และ Me-28 อยู่ด้านเดียวกันของโมเลกุล นอกจากนั้นแล้ว เมทิลโปรตอนที่ δ_{H} 0.69 (Me-19) ยังแสดงความสัมพันธ์กับโปรตอนที่ δ_{H} 0.96 (Me-29) และ 1.44 (H-9) เมทิลโปรตอนที่ δ_{H} 0.80 (Me-18) แสดงความสัมพันธ์กับโปรตอนที่ δ_{H} 1.44 (H-9) และ olefinic โปรตอนที่ δ_{H} 4.84 (H_b-21) แสดงความสัมพันธ์กับโปรตอนที่ δ_{H} 2.09 (H-22) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ยืนยันว่า H-9, Me-18, Me-19 และ Me-29 อยู่ด้านเดียวกันของโมเลกุล นั่นคือวงแหวน A-B-C จัดตัวแบบ trans/syn/trans สเตอริโอเคมีของ C-24 ของ epoxide ควรเป็น 24S configuration เช่นเดียวกับสาร AO12 (24S) จากการเปรียบเทียบค่า carbon chemical shift ที่ C-23 ถึง C-27 (ตารางที่ 17) ที่ผ่านมาสารที่แยกได้จาก *A. odorata* จะเป็น 24S epoxide ซึ่งจะสังเคราะห์ทางชีวภาพได้จาก

2,3(*S*);22(*S*),23-diepoxysqualene, **AO15** (Xu et al., 2004; Cai et al., 2005b) ดังนั้น สาร **AO8** คือ 24(*S*),25-epoxy-5 α -protost-20,25-dien-3-one



แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **AO8**



แสดงข้อมูล NOESY บางส่วนของสาร **AO8**

ตารางที่ 16 แสดงข้อมูล ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของสาร **AO6–AO8** และ protosta-20,24-dien-3 β -ol (δ in ppm, multiplicities, J in Hz)

Position	AO6	AO7	AO8	protosta-20,24-dien-3 β -ol
1	0.93 m, 1.73 m	0.95 m, 1.66 m	1.38 m, 2.01 m	1.37 d (2), 1.38 d (3.5)
2	1.37 m, 1.55 m	1.06 m, 1.50 m	2.20 m, 2.58 m	1.52 m, 1.68 d (4.6)
3	3.20 dd (11.4, 5.7)	3.13 dd (10.8, 5.4)	-	3.22 dd (11.7, 5.0)
4	-	-	-	-
5	0.74 dd (11.4, 5.4)	0.66 dd (11.4, 1.8)	2.07 m	1.43 d (10.3)
6	1.41 m, 1.58 m	1.38 m, 1.51 m	1.32 m, 1.38 m	1.19-1.18 m, 1.49 m
7	1.27 m, 1.54 m	1.22 m, 1.49 m	1.12 m, 1.93 m	1.18-1.17 m, 1.92 m
8	-	-	-	-
9	1.31 m	1.24 dd (6.3, 3.0)	1.44 m	1.44 t (14.1)
10	-	-	-	-
11	1.28 m, 1.56 m	1.03 m, 1.05 m	1.22 m, 1.41 m	1.20-1.19 m, 1.46 m
12	1.33 m, 1.58 m	1.02 m, 1.47 m	1.18 m, 1.69 m	1.16-1.14 m
13	1.67 m	1.61 m	1.95 m	1.97 d (3.6)
14	-	-	-	-
15	1.12 m, 1.63 m	1.03 m, 1.54 m	1.20 m, 1.41 m	1.17-1.16 m, 1.42 d (3.3)
16	1.38 m, 1.89 m	1.81 m, 1.88 m	1.73 m, 1.77 m	1.75 m
17	2.20 m	2.11 m	2.57 m	2.60 dt (9.2, 8.8)
18	0.98 s	0.91 s	0.80 s	0.82 s
19	0.84 s	0.78 s	0.69 s	0.87 s
20	-	-	-	-
21a	4.71 br s	4.65 br s	4.84 s	4.86 s
B	4.76 br s	4.71 br s	4.88 s	4.88 s
22	2.04 m, 2.32 m	1.94 m, 2.15 m	2.09 m, 2.18 m	1.95 m, 2.10 m
23	1.58 m, 1.70 m	1.52 m, 1.60 m	1.49 m, 1.69 m	1.91 m, 2.04 m
24	3.47 dd (9.9, 2.4)	3.64 dd (9.0, 3.3)	2.65 t (6.3)	5.08 m
25	-	-	-	-
26	1.36 s	1.18 s	1.23 s	1.66 s
27	1.10 s	1.04 s	1.18 s	1.58 s
28	0.98 s	0.91 s	0.99 s	0.76 s
29	0.77 s	0.71 s	0.96 s	0.96 s
30	0.87 s	0.80 s	1.08 s	1.07 s
1'		-		
2'		1.36 s		
3'		1.27 s		
25-OMe	3.23 s			

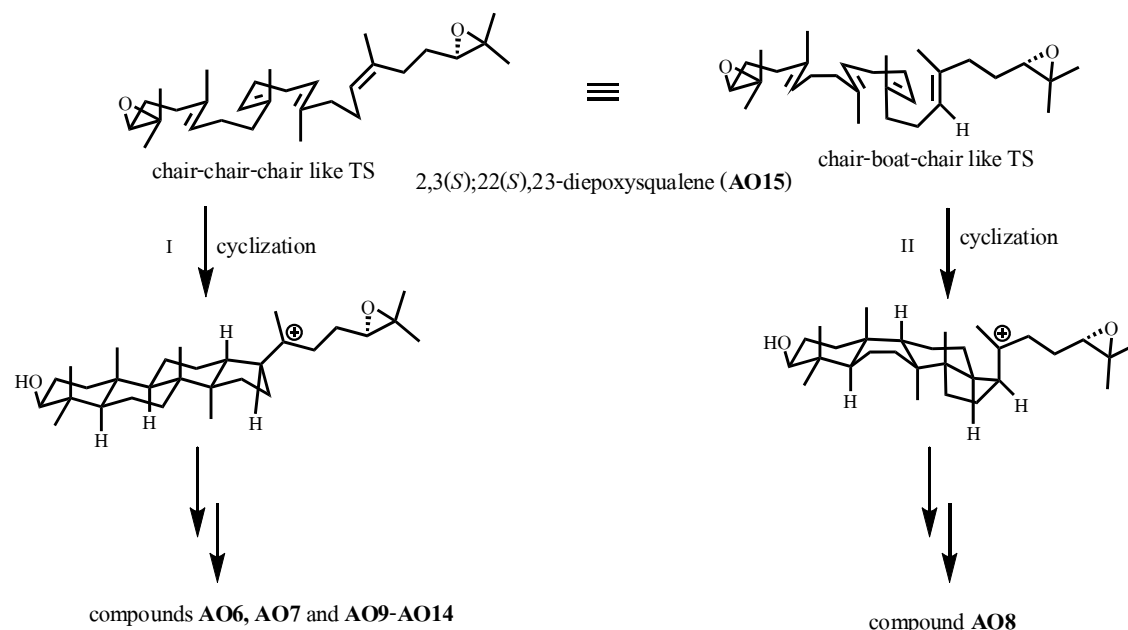
ตารางที่ 17 แสดงข้อมูล ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) ของสาร **AO6–AO8** และ protosta-20,24-dien-3 β -ol (δ in ppm, multiplicities, J in Hz)

Position	AO6	AO7	AO8	protosta-20,24-dien-3 β -ol
1	39.0	39.1	31.3	32.88
2	29.7	27.4	33.7	29.11
3	79.0	79.0	220.4	79.33
4	39.1	38.9	47.1	39.15
5	55.9	55.9	47.1	47.66
6	18.3	18.3	20.1	18.57
7	35.5	35.4	34.1	34.81
8	40.5	40.5	40.1	39.95
9	50.9	50.9	43.3	45.68
10	37.2	37.2	36.1	36.81
11	21.3	21.3	22.7	23.09
12	25.0	25.0	24.9	25.14
13	45.6	45.6	44.5	44.52
14	49.5	49.5	50.5	50.67
15	31.4	31.4	33.3	33.35
16	29.1	29.2	27.7	27.65
17	48.1	47.9	43.7	43.88
18	15.7	15.7	17.3	17.48
19	16.2	16.2	23.3	22.38
20	153.0	152.4	151.0	152.04
21	107.5	107.8	109.6	108.78
22	31.3	31.4	35.3	38.62
23	27.4	28.2	27.9	27.30
24	76.4	82.8	64.2	124.36
25	77.5	80.1	58.5	131.43
26	20.8	26.1	24.9	25.70
27	18.9	22.9	18.8	17.69
28	28.0	28.0	29.4	16.10
29	15.4	15.4	19.6	29.08
30	16.0	15.9	21.6	21.98
1'		106.5		
2'		28.6		
3'		26.9		
25-OMe	49.0			

เส้นทางการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ protostane และ dammarane triterpene (แผนผังที่ 2) ตั้งต้นมาจาก 2,3(*S*);22(*S*),23-diepoxysqualene (**AO15**) โดยเกิดได้ 2 เส้นทาง คือ

1. จากการปัดวงผ่าน chair/chair/chair conformation ของวงแหวน A/B/C ซึ่งจะเกิดเป็น trans/anti/trans ring junction (A/B/C) ของ dammarane triterpene (Xu et al., 2004; Cai et al., 2005b)

2. จากการปัดวงผ่าน chair/boat/chair conformation ของวงแหวน A/B/C ซึ่งจะเกิดเป็น trans/syn/trans ring junction (A/B/C) ของ protostane triterpene



แผนผังที่ 2. เส้นทางการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ dammaranes (AO6, AO7 และ AO9-AO14) และ protostane (AO8)

6. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสาร AO1-AO25 จากใบของต้นประยงค์

พบว่าส่วนสกัดหยาบเมทานอลแสดงฤทธิ์ inhibitory activity against LPS-induced NO production ใน RAW264.7 cell lines โดยมีค่า IC_{50} 5.2 $\mu\text{g/ml}$ ดังนั้นจึงนำสารทุกตัวที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 18 สาร AO16, AO21 และ AO10 แสดงฤทธิ์ดีมาก ด้วยค่า IC_{50} = 2.1, 3.0 และ 3.1 μM ตามลำดับ ฤทธิ์รองลงมาคือสาร AO14, AO6, AO5, AO17, AO19, AO7 และ AO11 (IC_{50} 5.5-14.2 μM) ซึ่งสารทุกตัวมีค่า IC_{50} ดีกว่ายาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน (indomethacin IC_{50} = 14.5 μM) สารอื่นๆนอกจากนี้แสดงฤทธิ์ปานกลางถึงอ่อน ความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่อฤทธิ์ต้านการอักเสบของ dolabellane triterpene (AO1-AO5) สรุปได้คือออกซิเจน 1 ตัว ดีกว่ามีออกซิเจน 2 หรือ 3 ตัวในโมเลกุลดังแสดงในสาร AO5 (IC_{50} 7.9 μM) เปรียบเทียบกับสาร AO1, AO2, AO3 และ AO4 (IC_{50} = 38.1, 22.3, 41.3 และ 20.4 μM) ตามลำดับ ในส่วนของ tetracyclic triterpene (AO6-AO14) สรุปข้อมูลได้ดังนี้ ก) หมู่ keto ที่ C-3 จำเป็นต่อฤทธิ์ที่ดี สาร AO10, AO12, AO14 แสดงฤทธิ์ที่ดี (IC_{50} = 3.1, 9.1, 5.5 μM) ตามลำดับ แต่สาร AO9, AO11, AO13 ที่มีหมู่ OH ที่ C-3 แสดงฤทธิ์อ่อนกว่า (IC_{50} = 16.8, 14.2, 17.9 μM) ตามลำดับ ในส่วนของ

aminopyrrolidine (**AO17**, **AO18**) พบว่าสาร **AO18** ($IC_{50} = 50.2 \mu M$) ซึ่งมีหมู่ OH ในโมเลกุล มีผลทำให้ฤทธิ์ลดลงอย่างมาก (**AO17**, $IC_{50} = 8.6 \mu M$) นอกจากนั้นยังได้นำสาร **AO5**, **AO6**, **AO10**, **AO12**, **AO14**, **AO16**, **AO17** และ **AO21** ไปทดสอบฤทธิ์ต้าน PGE_2 ที่เหนี่ยวนำจาก LPS ในเซลล์ต้นแบบ RAW264.7 ผลการทดสอบพบว่าสาร **AO16** แสดงฤทธิ์ดีมากที่สุดด้วยค่า $IC_{50} = 2.6 \mu M$ ในขณะที่สาร **AO17**, **AO21** แสดงฤทธิ์ปานกลางด้วยค่า $IC_{50} = 23.0, 16.1 \mu M$ ตามลำดับ (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 18 Inhibitory effects on NO production^a ของสาร **AO1-AO25**

Compounds	% Inhibition at various concentrations (μM)						IC_{50} (μM)
	0	1	3	10	30	100	
AO1	0.0 ± 5.0	-	-	7.7 ± 4.6	15.1 ± 4.2	$101.8 \pm 1.6^{**}$	38.1
AO2	0.0 ± 5.0	-	-	16.3 ± 3.8	$69.9 \pm 1.8^{**}$	$99.1 \pm 2.0^{b**}$	22.3
AO3	0.0 ± 5.0	-	-	8.2 ± 3.6	16.4 ± 3.0	$93.3 \pm 1.5^{**}$	41.3
AO4	0.0 ± 5.0	-	-	$28.7 \pm 3.3^*$	$61.0 \pm 2.0^{**}$	$98.5 \pm 2.5^{**}$	20.4
AO5	0.0 ± 5.0	-	-	$53.2 \pm 1.3^{**}$	$80.5 \pm 2.9^{**}$	$101.5 \pm 1.1^{b**}$	7.9
AO6	0.0 ± 6.8	-	-	$53.5 \pm 2.8^{**}$	$83.0 \pm 1.5^{**}$	$97.5 \pm 1.8^{b**}$	7.1
AO7	0.0 ± 6.8	-	-	$42.6 \pm 5.1^*$	$76.2 \pm 0.9^{**}$	$87.1 \pm 1.3^{b**}$	11.7
AO8	0.0 ± 4.2	-	-	$25.0 \pm 1.7^*$	$35.9 \pm 1.4^{**}$	$77.6 \pm 1.4^{**}$	53.2
AO9	0.0 ± 6.8	-	-	$33.7 \pm 2.3^{**}$	$68.8 \pm 3.0^{**}$	$101.8 \pm 1.5^{b**}$	16.8
AO10	0.0 ± 6.8	-	$46.2 \pm 2.6^{**}$	$70.6 \pm 3.0^{**}$	$90.4 \pm 3.2^{b**}$	$101.8 \pm 2.9^{b**}$	3.1
AO11	0.0 ± 1.8	-	-	$35.5 \pm 3.6^{**}$	$79.1 \pm 3.4^{**}$	$85.5 \pm 4.5^{b**}$	14.2
AO12	0.0 ± 6.8	-	-	$50.4 \pm 1.3^{**}$	$77.0 \pm 3.4^{**}$	$97.2 \pm 0.6^{b**}$	9.1
AO13	0.0 ± 6.8	-	-	$40.4 \pm 2.7^{**}$	$55.3 \pm 3.2^{**}$	$89.5 \pm 2.9^{**}$	17.9
AO14	0.0 ± 5.0	-	$37.5 \pm 2.7^*$	$62.1 \pm 2.3^{**}$	$80.1 \pm 4.3^{**}$	$97.5 \pm 2.1^{b**}$	5.5
AO15	0.0 ± 1.8	-	-	$20.9 \pm 3.1^*$	$55.1 \pm 3.7^{**}$	$75.2 \pm 6.0^{b**}$	30.5
AO16	0.0 ± 4.9	29.3 ± 2.6	$58.4 \pm 3.1^{**}$	$92.3 \pm 4.5^{**}$	$94.0 \pm 4.0^{b**}$	$94.5 \pm 1.1^{b**}$	2.1
AO17	0.0 ± 4.9	-	-	$44.4 \pm 2.0^{**}$	$94.9 \pm 3.0^{**}$	$97.5 \pm 2.3^{**}$	8.6
AO18	0.0 ± 4.9	-	-	14.5 ± 5.7	$35.9 \pm 4.4^{**}$	$66.8 \pm 2.6^{b**}$	50.2
AO19	0.0 ± 4.9	-	-	$43.6 \pm 2.7^{**}$	$93.6 \pm 3.8^{**}$	$99.7 \pm 3.3^{**}$	9.3
AO20	0.0 ± 4.9	-	-	-9.2 ± 5.3	21.4 ± 4.6	$95.4 \pm 1.3^{b**}$	42.3
AO21	0.0 ± 4.9	22.2 ± 1.8	$48.9 \pm 2.4^{**}$	$84.6 \pm 2.7^{**}$	$100.0 \pm 4.4^{**}$	$105.2 \pm 0.8^{b**}$	3.0
AO22	0.0 ± 1.8	-	-	14.1 ± 3.9	$25.2 \pm 4.3^{**}$	$83.4 \pm 2.1^{**}$	41.9
AO23	0.0 ± 1.8	-	-	$36.3 \pm 2.9^{**}$	$44.0 \pm 6.7^{**}$	$73.8 \pm 4.8^{**}$	28.5
AO24	0.0 ± 1.8	-	-	$36.3 \pm 5.3^{**}$	$71.8 \pm 3.7^{**}$	$94.5 \pm 3.4^{**}$	15.4
AO25	0.0 ± 1.8	-	-	22.6 ± 7.6	$72.6 \pm 2.7^{**}$	$101.2 \pm 3.7^{b**}$	19.7
Indomethacin	0.0 ± 4.2	-	15.5 ± 1.7	$36.4 \pm 2.3^{**}$	$60.9 \pm 3.7^{**}$	$104.5 \pm 1.7^{**}$	14.5

(-) = not determined

^aEach value represents mean $\pm$ S.E.M. of four determinations.

Statistical significance, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

^bCytotoxic effect was observed.

ตารางที่ 19 Inhibition of PGE₂ production^a ของสาร **AO5, AO6, AO10, AO12, AO14, AO16, AO17 และ AO21**

Compounds	% Inhibition at various concentrations (μM)					IC ₅₀ (μM)
	0	3	10	30	100	
AO5	0.0 ± 2.3	-	-	-	27.8 ± 1.2**	>100
AO6	0.0 ± 1.6	-	-	-	29.9 ± 1.1**	>100
AO10	0.0 ± 2.3	-	-	-	19.3 ± 1.0**	>100
AO12	0.0 ± 2.3	-	-	-	48.7 ± 0.5**	>100
AO14	0.0 ± 2.3	-	-	-	49.5 ± 1.4**	>100
AO16	0.0 ± 1.6	49.5 ± 2.1**	57.0 ± 0.2**	58.1 ± 0.7**	59.5 ± 0.3**	2.6
AO17	0.0 ± 1.6	-	47.5 ± 1.3**	50.3 ± 1.4**	55.2 ± 0.5**	23.0
AO21	0.0 ± 1.6	-	46.5 ± 1.8**	55.2 ± 1.4**	58.2 ± 0.8**	16.1
	% Inhibition at various concentrations (μM)					
	0	0.1	0.3	1	3	
Indomethacin	0.0 ± 2.0	38.4 ± 0.4**	48.7 ± 0.6**	52.7 ± 0.2**	74.6 ± 0.2**	0.4

(-) = not determined

^aEach value represents mean ± S.E.M. of four determinations.

Statistical significance, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานำร่องฤทธิ์ด้านการอักเสบนำไปสู่การแยกสารสกัดจากรากผักปู้ย่า หางนกยูงไทย และใบประยงค์สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 69 สาร โดยได้จากรากผักปู้ย่า 18 สาร เป็นสารใหม่ 7 สาร คือ mimosol A-D (**CM1-CM4**) และ mimosol E-G (**CM9-CM11**) และเป็นสารที่มีรายงานมาแล้ว 11 สาร (**CM5-CM8** และ **CM12-CM18**) จากรากหางนกยูงไทย 26 สาร เป็นสารใหม่ 15 สารคือ pulcherrin D-R (**CP1-CP15**) และเป็นสารที่มีรายงานมาแล้ว 11 สาร (**CP16-CP26**) และจากใบประยงค์ 25 สาร เป็นสารใหม่ 5 สารคือ (1*R*,3*S*,7*E*,11*S*,12*R*)-3-hydroperoxydolabella-4(16),7-dien-18-ol (**AO1**), (1*R*,3*E*,7*R*,8*R*,11*S*,12*R*)-7,8-epoxydolabella-3-en-18-ol (**AO2**), 25-methoxy-5 α -dammar-20-en-3 β ,24-diol (**AO6**), 3 β -hydroxy-5 α -dammar-20-en-24,25-acetonide (**AO7**) และ 24(*S*),25-epoxy-5 α -protost-20,25-dien-3-one (**AO8**) และเป็นสารที่มีรายงานมาแล้ว 20 สาร (**AO3-AO5** และ **AO9-AO25**) เมื่อนำสารบริสุทธิ์ทั้งหมดทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์ RAW264.7 โดยการยับยั้ง LPS พบว่ามีสารบริสุทธิ์ 24 สารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง NO ที่ดี ซึ่งอยู่ในช่วง IC₅₀ 2.1-14.2 μ M และนอกจากนี้ยังแสดงฤทธิ์ที่ดีกว่ายาที่ใช้ยู่คือ indomethacin (IC₅₀ = 14.5 μ M), L-NA (IC₅₀ = 61.8 μ M) และ CAPE (IC₅₀ = 5.6 μ M) สาร **CM4**, **CM6**, **CM8** และ **CM12-CM14** ยังได้นำไปทดสอบการต้าน TNF- α ในเซลล์ RAW264.7 และนอกจากนี้สาร **AO16**, **AO17** และ **AO21** ยังแสดงฤทธิ์ต้าน PGE₂ ในค่า IC₅₀ ที่ดีคือ 2.6, 16.1 และ 23.0 μ M ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

บุญยะประภัศร, นันทวัน และ โชคชัยเจริญพร, อรุณช สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (2) บริษัทประชาชน จำกัด พิมพ์ครั้งที่ 1 2542 หน้า 559-562.

Akihisa, T., Yasukawa, K., Kimura, Y., Takase, S., Yamanouchi, S., Tamura, T. 1997. Triterpene alcohols from camellia and sasanqua oils and their anti-inflammatory effects. Chem. Pharm. Bull. 45, 2016–2023.

Amico, V., Currenti, R., Oriente, G., Piattelli, M., Tringali, C. 1981. 18-Hydroxy-3,7-dolabelladiene from the brown alga, *Dictyota dichotoma*. Phytochemistry 20, 848–849.

Babidge, P.J., Massy–Westropp, R.A., Pyne, S.G., Shienghong, D., Ungphakorn, A., Veerachat, G. 1980. The synthesis and stereochemistry of odorine. Aust. J. Chem. 33, 1841–1845.

Boar, R.B. and Damps, K. 1973. Configuration of aglaiol, a (24*S*)-24,25-Epoxy triterpene. J. C. S. Chem. Com. 4, 115-16.

Boar, R.B and Damps, K. 1977. Triterpenoids of *Aglaiia odorata*. Configuration of trisubstituted epoxides. J. C. S. Perkin I. 5, 510-512.

Cai, X.-H., Luo, X.-D., Zhou, J., Hao, X.-J. 2005a. Compound representatives of a new type of triterpenoid from *Aglaiia odorata*. Org. Lett. 7, 2877-2879.

Cai, X.-H., Luo, X.-D., Zhou, J., Hao, X.-J. 2005b. Dolabellane diterpenoids from the higher plant *Aglaiia odorata*. Helv. Chim Acta 88, 2938–2943.

Cai, X.-H., Wang, Y.-Y., Zhao, P.-J., Li, Y., Luo, X.-D. 2010. Dolabellane diterpenoids from *Aglaiia odorata*. Phytochemistry 71, 1020–1024.

Chanwitheesuk, A., Teerawutgulr, A., Rakariyatham, N. 2005. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. Food Chem. 92, 491-497.

Chanwitheesuk, A., Teerawutgulr, A., Kilburn, J.D., Rakariyatham, N. 2007. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. Food Chem. 100, 1044-1048.

Cheenpracha, S., Srisuwan, R., Karalai, C., Ponglimanont, C., Chantrapromma, S., Chantrapromma, K., Fun, H.-K., Anjum, S., Atta-ur-Rahma. 2005. New diterpenoids from stems and roots of *Caesalpinia crista*. *Tetrahedron* 61, 8656-8662.

Cheenpracha, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., Chantrapromma, K., Laphookhieo, S. 2006. Cassane-type diterpenes from the seeds of *Caesalpinia crista*. *Helv. Chim. Acta.* 89, 1062-1066.

Chen, P., Yang, J.-S. 2007. Flavonol galactoside caffeate ester and homoisoflavones from *Caesalpinia millettii* HOOK. *et* ARN. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 655-657.

D'Accolti, L., Annese, C., Fusco C. 2005. Direct regio- and stereoselective synthesis of squalene 2,3;22,23-dioxide using dioxiranes. *Tetrahedron Lett.* 46, 8459-8462.

Delahaye, P. and Verzele, M. 1983. Analysis of gallic, digallic and trigallic acids in tannic acids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 265, 363-367.

De Pascual Teresa, J., Bellido, I.S., Gonzalez M.S., Vicente S. 1986. Tetracyclic triterpenes and nerolidol derivatives from *Santolina oblongifolia*. *Phytochemistry* 25, 185-190.

Devon, T.K., Scott, A.I. 1972. Handbook of naturally occurring compounds, vol. II. Terpenes, Academic Press, New York and London, p. 186.

Engelmeier, D., Hadacek, F., Pacher, T., Vajrodaya, S., Greger, H. 2000. Cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia* species with pronounced antifungal activity against rice blast fungus (*Pyricularia grisea*). *J. Agric. Food Chem.* 48, 1400-1404.

Hayashi, N., Lee, K.H., Hall, I.H., McPhail, A.T., Huan-Chang, H. 1982. Antitumor agents. Part 58. Structure and stereochemistry of (-)-odorinol, an antileukemic diamide from *Aglaia odorata*. *Phytochemistry* 21, 2371-3

Inada, A., Nishino, H., Kuchide, M., Takayasu, J., Mukainaka, T., Nobukuni, Y., Okuda, M., Tokuda, H. 2001. Cancer chemopreventive activity of odorine and odorinol from *Aglaia odorata*. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 1282-1285.

Inada, A., Somekawa, M., Murata, H., Nakanishi, T., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A., Darnaedi, D., Murata, J. 1993. Phytochemical studies on meliaceous plants. VIII. Structures and

inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation of triterpenoids from leaves of *Chisocheton macrophyllus* King. Chem. Pharm. Bull. 41, 617–619.

Ishibashi, F., Satasook, C., Isman, M. B., Towers, G.H.N. 1993. Insecticidal 1H-cyclopentatetrahydro[b]benzofurans from *Aglaia odorata*. Phytochemistry 32, 307-10.

Islam, M.T., Tahara, S. 2000. Dihydroflavonols from *Lannea coromandelica*. Phytochemistry 54, 901–907.

Janprasert, J., Satasook, C., Sukumalanand, P., Champagne, D.E., Isman, M.B., Wiriyachitra, P., Towers, G.H.N. 1992. Rocaglamide, a natural benzofuran insecticide from *Aglaia odorata*. Phytochemistry 32, 67-69.

Leal, R.S., Lima, M.A.S., Silveira, E.R. 2003. Cassane diterpenes from *Plathymania reticulata*. J. Braz. Chem. Soc. 14, 120-125.

Kuroda, C., Ueshino, T., Nagano, H. 2004. Ehrlich's reaction of furanoeremophilanes. Bull. Chem. Soc. Jpn., 77, 1737–1740.

Lodeiro, S., Xiong, Q., Wilson, W.K., Ivanova, Y., Smith, M.L., May, G.S., Matsuda, S.P. 2009. Protostadienol biosynthesis and metabolism in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. Org. Lett. 11, 1241–1244.

McPherson, D.D., Che, C.T., Cordell, G.A., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., Fong, H.H.S. 1986. Diterpenoids from *Caesalpinia pulcherrima*. Phytochemistry 25, 167-170.

Mitsuguchi, H., Seshime, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Kushiro, T. 2009. Biosynthesis of steroidal antibiotic fusidanes: functional analysis of oxidosqualene cyclase and subsequent tailoring enzymes from *Aspergillus fumigatus*. J. Am. Chem. Soc. 131, 6402–6411.

Miyazawa, M., Kasahara, H., Kameoka, H. 1995. Biotransformation of lignans: metabolism of (+)-eudesmin and (+)-magnolin in *Spodoptera litura*. Phytochemistry 39, 1027–1030.

Miyaichi, Y., Nunomura, N., Kawata, Y., Kizu, H., Tomimori, T., Watanabe, T., Takano, A., Malla, K.J. 2006. Studies on Nepalese crude drugs. XXVIII. Chemical constituents of Bhote

Khair, the underground parts of *Eskemukerjea megacarpum* HARA, Chem. Pharm. Bull. 54, 136-138.

Nasini, G., Piozzi, F. 1981. Pterocarpol and triterpenes from *Daemonorops draco*. Phytochemistry 20, 514-516.

Nugroho, B.W., Edrada, R.A., Wray, V., Witte, L., Bringmann, G., Gehling, M. and Proksch, P. 1999. Insecticidal rocaglamide derivatives and related compounds from *Aglaia odorata* (Meliaceae). Phytochemistry 51, 367-376.

Ohse, T., Ohba, S., Yamamoto, T., Koyano, T. and Umezawa, K. 1996. Cyclopentabenzofuran lignan protein synthesis inhibitors from *Aglaia odorata*. J. Nat. Prod. 59, 650-652.

Oyama, K., Kondo, T. 2004. Total synthesis of flavocommelin, a component of the blue supramolecular pigment from *Commelina communis*, on the basis of direct 6-C-glycosylation of flavan. J. Org. Chem. 69, 5240-5246.

Patil, A.D., Freyer, A.J., Webb, R.L., Zuber, G., Reichwein, R., Bean, M.F., Faucette, L., Johnson, R.K. 1997. Pulcherrimins A-D, novel diterpene dibenzoates from *Caesalpinia pulcherrima* with selective activity against DNA repair-deficient yeast mutants. Tetrahedron 53, 1583-1592.

Pranithanchai, W., Karalai, C., Ponglimanont, C., Subhadhirasakul, S., Chantrapromma, K. 2009. Cassane diterpenoids from the stem of *Caesalpinia pulcherrima*. Phytochemistry 70, 300-304.

Qu, J., Xie, C., Guo, H., Yu, W., Lou, H. 2007. Antifungal dibenzofuran bis(bibenzyl)s from the liverwort *Asterella angusta*. Phytochemistry 68, 1767-1774.

Ragasa, C.Y., Hofileña, J.G., Rideout, J.A. 2002. New furanoid diterpenes from *Caesalpinia pulcherrima*. J. Nat. Prod. 65, 1107-1110.

Roach, J.S., McLean, S., Reynolds, W.F., Tinto, W.F. 2003. Cassane diterpenoids of *Caesalpinia pulcherrima*. J. Nat. Prod. 66, 1378-1381.

Seidel, V., Bailleul, F., Waterman, P.G. 2000. (*Rel*)-1 β ,2 α -di-(2,4-dihydroxy-6-methoxybenzoyl)-3 β ,4 α -di-(4-methoxyphenyl)-cyclobutane and other flavonoids from the aerial parts of *Goniiothalamus gardneri* and *Goniiothalamus thwaitesii*. *Phytochemistry* 55, 439–446.

Shiengthong, D., Kokpol, U., Karntiang, P., Massy-Westropp, R.A. 1974. Triterpenoid constituents of Thai medicinal plants–II: isomeric aglatriols and aglaiondiol. *Tetrahedron* 30, 2211–2215.

Shiengthong, D., Ungphakorn, A., Lewis, D. E., Massy-Westropp, R. A. 1979. Constituents of Thai medicinal plants. IV. New nitrogenous compounds odorine and odorinol. *Tetrahedron Lett.* 24, 2247-50.

Shiengthong, D., Verasarn, A., NaNonggai-Suwanrath, P., Warnhoff, E. W. 1965. Constituents of Thai medicinal plants. I. Aglaiol. *Tetrahedron* 21, 917-24.

Sinchaissri, N., Roongsook, D., Chungsamarnyart, N. 1990. Efficacies of plant crude-extracts on the diamondback moth larvae. *Kasetsart J. (Nat. Sci. Supple)* 24, 49-53.

Smith, J.A., Maloney, D.J., Hecht, S.M., Lannigan, D.A. 2007. Structural basis for the activity of the RSK-specific inhibitor, SL0101. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 5018–5034.

Tan, G.T., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., Hughes, S.H. 1991. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *J. Nat. prod.* 54, 143-154.

Takahashi, H., Li, S., Harigaya, Y., Onda, M. 1988. Heterocycles. XXII. Stereoselective synthesis of (+)-aromadendrin trimethyl ether and its enantiomer, and their reduction. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 1877–1881.

Tanaka, T., Ohyama, M., Inuma, M., Shirataki, Y., Komatsu, M., Burandt, C.L. 1998. Isoflavonoids from *Sophora secundiflora*, *S. arizonica* and *S. gypsophila*. *Phytochemistry* 48, 1187-1193.

Tewtrakul, S., Cheenpracha, S., Karalai, C. 2009. Nitric oxide inhibitory principles from *Derris trifoliata* stems. *Phytomedicine* 16, 568-572.

Udenigwe, C.C., Ata, A., Samarasekera, R. 2007. Glutathione *S*-transferase inhibiting chemical constituents of *Caesalpinia bonduc*. Chem. Pharm. Bull. 55, 442-445.

Wang, D., Zhu, H.-T., Zhang, Y.-J., Yang, C.-R. 2005. A carbon-carbon-coupled dimeric bergenin derivative biotransformed by *Pleurotus ostreatus*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 15, 4073-4075.

Wu, T.-K., Liu, Y.-T., Chang, C.-H. 2005. Histidine residue at position 234 of oxidosqualene-lanosterol cyclase from *Saccharomyces cerevisiae* simultaneously influences cyclization, rearrangement, and deprotonation reactions. ChemBioChem. 6, 1177-1181.

Wu, T.-K., Liu, Y.-T., Chang, C.-H., Yu, M.-T., Wang, H.-J. 2006. Site-saturated mutagenesis of histidine 234 of *Saccharomyces cerevisiae* oxidosqualene-lanosterol cyclase demonstrates dual functions in cyclization and rearrangement reactions. J. Am. Chem. Soc. 128, 6414-6419.

Xu, R., Fazio, G.C., Matsuda, S.P.T. 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. Phytochemistry 65, 261-291.

Xu, Y.-J., Wu, X.-H., Tan, B.K.H., Lai, Y.-H., Vittal, J.J., Imiyabir, Z., Madani, L., Khozirah, K.S., Goh, S.H. 2000. Flavonol-cinnamate cycloadducts and diamide derivatives from *Aglaia laxiflora*. J. Nat. Prod. 63, 473-476.

Yodsaoue, O., Cheenpracha, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., Chantrapromma, S., Fun, H.-K., Kanjana-opas, A. 2008. Phanginin A-K diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia sappan* Linn. Phytochemistry 69, 1242-1249.

Yodsaoue, O., Karalai, C., Ponglimanont, C., Tewtrakul, S., Chantrapromma, S. 2010. Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. Phytochemistry 71, 1756-1764.

Output ที่ได้รับจากโครงการ

1. ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

1.1 Yodsaoue, O., **Karalai, C.**, Ponglimanont, C., Tewtrakul, S. and Chantrapromma, S. Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Phytochemistry*, 2010, 71, 1756–1764.

1.2 Fun, H.-K., Yodsaoue, O., **Karalai, C.** and Chantrapromma, S. Absolute configuration of isovouacapenol C. *Acta Cryst.*, 2010. E66, o2059–o2060.

1.3 Fun, H.-K., Yodsaoue, O., Chantrapromma, S. and **Karalai, C.** Absolute configuration of vouacapen-5 β -ol. *Acta Cryst.*, 2010. E66, o2166–o2167.

1.4 Fun, H.-K., Chantrapromma, S., Yodsaoue, O. and **Karalai, C.** Absolute configuration of odorine. *Acta Cryst.*, 2010. E66, o2437–o2438.

1.5 Yodsaoue, O., **Karalai, C.**, Ponglimanont, C., Tewtrakul, S. and Chantrapromma, S. Pulcherrins D–R, potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*. *Tetrahedron*, 2011. 67, 6838–6846.

1.6 Yodsaoue, O., Sonprasit, J., **Karalai, C.**, Ponglimanont, C., Tewtrakul, S. and Chantrapromma, S. Diterpenoids and triterpenoids with potential anti-inflammatory activity from the leaves of *Aglaia odorata*. *Phytochemistry*, 2012. 76, 83–91.

2. ผลงานที่ได้ เสนอผลงานต่อที่ประชุมวิชาการ

2.1 **Karalai, C.**, Yodsaoue, O., Ponglimanont, C., Tewtrakul, S. and Chantrapromma, S. Minosols A–G from the roots of *Caesalpinia minosoides* Lamk. งานประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 10, วันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (นำเสนอแบบโปสเตอร์)

2.2 **Karalai, C.**, Ponglimanont, C., Tewtrakul, S., Chantrapromma, S. and Yodsaoue, O. Anti-inflammatory constituents from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk., *Caesalpinia pulcherrima* and leaves of *Aglaia odorata*. งานประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 12, วันที่ 10-12 ตุลาคม 2555 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (นำเสนอแบบปากเปล่า)

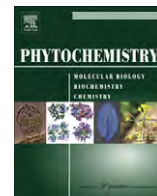
3. การผลิตบัณฑิต

ทุนวิจัยนี้มีส่วนเชื่อมโยงกับโครงการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ของ น.ส. อรพรรณ ยอดสะอี นักศึกษาระดับปริญญาตรีบัณฑิต สาขา เคมีอินทรีย์ (รหัสนักศึกษา 5110230011)

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์

1. Yodsaoue, O., **Karalai, C.**, Ponglimanont, C., Tewtrakul, S. and Chantrapromma, S. Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Phytochemistry*, 2010, 71, 1756–1764.
2. Fun, H.-K., Yodsaoue, O., **Karalai, C.** and Chantrapromma, S. Absolute configuration of isovouacapenol C. *Acta Cryst.*, 2010. E66, o2059–o2060.
3. Fun, H.-K., Yodsaoue, O., Chantrapromma, S. and **Karalai, C.** Absolute configuration of vouacapen-5 β -ol. *Acta Cryst.*, 2010. E66, o2166–o2167.
4. Fun, H.-K., Chantrapromma, S., Yodsaoue, O. and **Karalai, C.** Absolute configuration of odorine. *Acta Cryst.*, 2010. E66, o2437–o2438.
5. Yodsaoue, O., **Karalai, C.**, Ponglimanont, C., Tewtrakul, S. and Chantrapromma, S. Pulcherrins D–R, potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*. *Tetrahedron*, 2011. 67, 6838–6846.
6. Yodsaoue, O., Sonprasit, J., **Karalai, C.**, Ponglimanont, C., Tewtrakul, S. and Chantrapromma, S. Diterpenoids and triterpenoids with potential anti-inflammatory activity from the leaves of *Aglaia odorata*. *Phytochemistry*, 2012. 76, 83–91.



Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk.

Orapun Yodsaoe^a, Chatchanok Karalai^{a,*}, Chanita Ponglimanont^a, Supinya Tewtrakul^b, Suchada Chantrapromma^a

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand

^b Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2009

Received in revised form 24 March 2010

Available online 23 July 2010

Keywords:

Caesalpinia mimosoides Lamk.

Leguminosae

Anti-inflammatory

Furanocassane

Mimosols A–G

ABSTRACT

Anti-inflammatory assay-guided separation of extracts from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. led to isolation of seven compounds: four diterpenes (**1–4**), a dimer (**9**), and two dibenzo[b,d]furans (**10, 11**) together with eleven known compounds. Their structures were elucidated by 1D- and 2D-NMR techniques as well as UV, IR, mass spectral data and comparison with literature values. The anti-inflammatory activities of all compounds were evaluated for inhibitory activities against lipopolysaccharide (LPS) induced nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cell lines. Compounds **4**, **6**, **8**, and **12–14** were also tested for the inhibitory effect on LPS-induced tumor necrosis factor- α (TNF- α) release in RAW264.7 cells. The results indicated that **4** possessed potent inhibitory activity for both tests with IC₅₀ values of 3.0 and 6.5 μ M, respectively.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Caesalpinia mimosoides Lamk. (Leguminosae–Caesalpinioideae) has many local Thai names, such as PuYa (North) and Cha-Luead (Central). It is an erect or climbing shrub distributed in old clearings, scrub areas, and mixed deciduous forests in northern and north-eastern Thailand. The young shoots and leaves are locally consumed as fresh vegetables and appetizers. The young shoots and flowers have also been used as a carminative and to relieve dizziness and fainting. This plant has been reported to exhibit antimicrobial (Chanwitheesuk et al., 2007) and antioxidant activities (Chanwitheesuk et al., 2005). Plants from several *Caesalpinia* species with diverse biological activities have been studied by several workers (Dickson et al., 2007; Kalauni et al., 2006; Linn et al., 2005; Promsawan et al., 2003; Pudhom et al., 2007). Our previous chemical investigations of *C. crista* (Cheenpracha et al., 2005, 2006), *C. pulcherrima* (Pranithanchai et al., 2009) and *C. sappan* (Yodsaoe et al., 2008) established the presence of several cassane-type diterpenoids. As a continuation of our studies on this genus, we report herein the isolation and structural elucidation of seven compounds, four diterpenes, a diterpene dimer and two dibenzo[b,d]furans along with 11 known compounds from the roots of *C. mimosoides*. In addition, their anti-inflammatory activities are discussed.

2. Results and discussion

The air-dried roots of *C. mimosoides* were extracted with CH₂Cl₂ and acetone successively. The crude CH₂Cl₂ and acetone extracts showed potent NO inhibitory activity with IC₅₀ values of 11.0 and 21.6 μ g/ml, respectively. Further separation and purification led to the isolation of four diterpenes, named mimosol A–D (**1–4**), a dimer, named mimosol E (**9**) and two dibenzo[b,d]furans, named mimosol F, G (**10, 11**). The known compounds were identified by analysis of their spectroscopic data and comparison with literature data to be taepeenin A (**5**), taepeenin D (**6**), nortaepeenin A (**7**) (Cheenpracha et al., 2005), taepeenin L (**8**) (Cheenpracha et al., 2006), (*E*)-7-hydroxy-3-(4-methoxybenzyl)chroman-4-one (**12**), (*E*)-7,8-dihydroxy-3-(4-methoxybenzyl)chroman-4-one (**13**), (*E*)-7-hydroxy-8-methoxy-3-(4-methoxybenzyl)chroman-4-one (**14**) (Chen and Yang, 2007), tetracosyl caffeate (**15**) (Tanaka et al., 1998), resveratrol (**16**) (Miyaichi et al., 2006), bergenin (**17**) (Wang et al., 2005) and (+)-pterocarpol (**18**) (Nasini and Piozzi, 1981), see Fig. 1.

Compound **1** was obtained as a white solid and has the molecular formula C₂₁H₂₈O₄ as determined by HREIMS. The IR spectrum exhibited absorptions for hydroxyl (3429 cm^{−1}) and carbonyl ester (1718 cm^{−1}) functional groups. The UV spectrum had absorption bands at λ_{max} 210 and 235 nm. In addition, compound **1** gave a red–pink color on Ehrlich test indicating a furan chromophore (Kuroda et al., 2004). The ¹H and ¹³C NMR (Table 1) spectroscopic data of **1** showed characteristics of a 2,3-furanocassane framework (Cheenpracha et al., 2005, 2006; McPherson et al., 1986; Patil et al.,

* Corresponding author. Tel.: +66 7428 8444; fax: +66 7421 2918.

E-mail addresses: chatchanok.k@psu.ac.th, chatchanok_k@yahoo.com (C. Karalai).

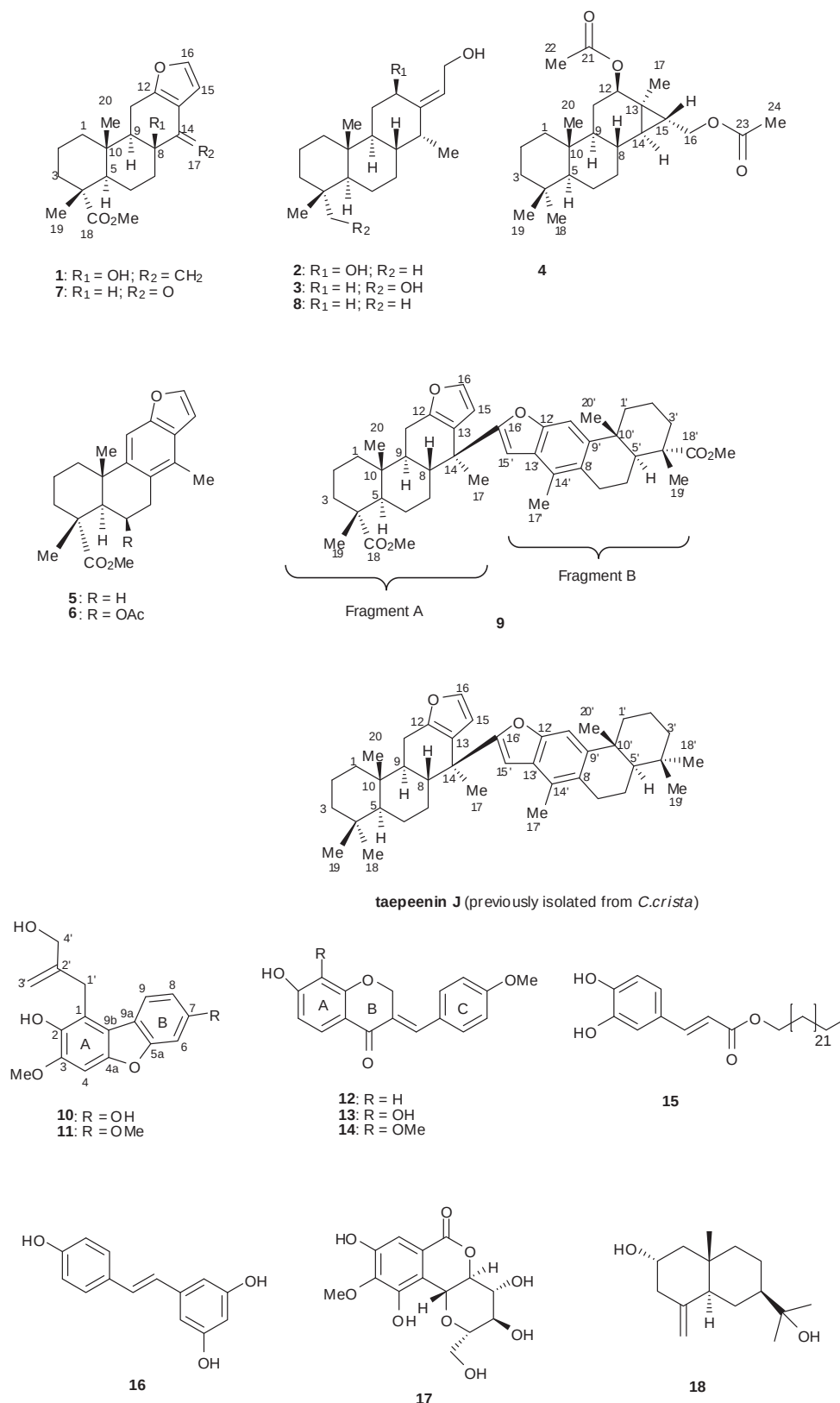


Fig. 1. Mimosols A–G (1–4 and 9–11), new natural products, and compounds 5–8 and 12–18 as previously known.

1997; Pranithanchai et al., 2009; Ragasa et al., 2002; Roach et al., 2003; Yodsaoue et al., 2008). The presence of a 2,3-disubstituted furan ring was deduced from the resonances at δ_{H} 6.53 and 7.35 (each d, $J = 2.1$ Hz) and δ_{C} 106.9 (C-15), 118.8 (C-13), 141.3 (C-

16) and 151.7 (C-12). The ^{13}C NMR spectroscopic data displayed 21 carbons including those of an oxyquaternary carbon at δ 70.9 (C-8), an exocyclic double bond at δ 103.0 (C-17) and 142.5 (C-14), and an ester carbonyl carbon at δ 178.3 (C-18). The ^1H

Table 1¹H and ¹³C NMR (300 MHz) spectroscopic data of compounds **1–4** (δ in ppm, multiplicities, *J* in Hz).

Position	1^a		2^b		3^b		4^b	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	39.0	1.05 m 1.82 m	39.6	0.93 m 1.70 br d (12.6)	39.1	0.87 m 1.63 m	38.6	0.85 m 1.62 m
2	17.6	1.14 m 1.48 m	18.9	1.38 m 1.56 m	18.2	1.45 m 1.53 m	18.6	1.42 m 1.54 m
3	36.5	1.50 m 1.75 m	42.1	1.14 dt (12.9, 3.9) 1.43 m	35.4	1.20 m 1.33 td (12.9, 4.2)	42.1	1.14 m 1.39 m
4	47.3	–	33.2	–	37.6	–	33.2	–
5	51.2	1.93 dd (12.3, 2.7)	55.1	0.80 m	48.3	1.08 m	55.0	0.86 m
6	22.8	1.55 m 1.60 m	21.6	1.27 m 1.58 m	21.4	1.22 m 1.43 m	22.1	1.27 m 1.63 m
7	37.5	1.62 td (12.9, 3.6) 2.57 dt (12.9, 3.0)	31.0	1.20 m 1.54 m	31.4	1.23 m 1.40 m	35.9	1.19 m 1.92 m
8	70.9	–	40.4	1.53 m	40.5	1.49 m	36.2	1.39 m
9	56.4	1.90 br d (7.5)	47.5	1.20 m	48.3	1.09 m	53.1	0.64 m
10	38.0	–	36.8	–	36.8	–	36.8	–
11 β	19.1	2.96 dd (17.7, 7.5)	37.2	1.23 m	26.6	0.87 m	25.4	1.80 m
α		2.69 br d (17.7)		1.97 ddd (15.6, 8.1, 4.8)		1.71 m		0.62 m
12	151.7	–	70.7	4.43 dd (10.2, 4.8)	23.6	1.80 td (13.5, 4.2) 2.34 dt (13.5, 3.0)	78.4	5.09 dd (13.2, 6.3)
13	118.8	–	152.0	–	149.8	–	24.3	–
14	142.5	–	45.8	2.27 qd (7.2, 4.5)	44.3	2.12 m	34.0	0.46 dd (5.1, 1.2)
15	106.9	6.53 d (2.1)	118.8	5.54 t (6.6)	118.7	5.29 br t (6.9)	25.5	1.18 m
16	141.3	7.35 d (2.1)	58.5	4.21 d (6.6)	58.6	4.04 d (6.9)	65.2	3.86 dd (11.7, 8.4) 4.28 dd (11.7, 6.9)
17	103.0	5.11 br s 5.14 br s	14.9	0.95 d (7.2)	14.1	0.87 d (7.2)	19.3	1.10 s
18	178.3	–	33.6	0.86 s	72.1	3.02 d (10.8) 3.33 d (10.8)	33.4	0.84 s
19	16.2	1.10 s	22.0	0.83 s	17.9	0.70 s	21.6	0.78 s
20	13.8	0.62 s	14.2	0.83 s	14.7	0.76 s	14.3	0.71 s
21							171.2	–
22							21.2	2.04 s
23							171.1	–
24							21.1	2.06 s
18-OMe	51.2	3.65 s						

Assignments were based on HMQC, HMBC and COSY experiments.

^a Spectra were recorded in acetone-*d*₆.^b Spectra were recorded in CDCl₃.

NMR spectroscopic data displayed peaks for two tertiary methyl groups at δ 0.62 (Me-20) and 1.10 (Me-19), and a OMe at δ 3.65 (OMe-18). The signals of terminal olefinic methylene protons at δ 5.11 and 5.14 (each s, 2H-17) whose HMBC correlations with the carbons at δ 70.9 (C-8), 118.8 (C-13), 142.5 (C-14) and 151.7 (C-12) together with that of the methine proton at δ 1.90 (d, *J* = 7.5 Hz, H-9) with the carbons at δ 13.8 (C-20), 19.1 (C-11), 37.5 (C-7), 38.0 (C-10), 70.9 (C-8), 142.5 (C-14) and 151.7 (C-12), suggested the location of the exocyclic double bond at C-14 and OH at C-8, respectively. In addition, the methyl protons at δ 0.62 (Me-20) showed NOESY crosspeaks with the methyl protons at δ 1.10 (Me-19) and 2.96 (H_{ax}-11) which was in agreement with the trans/anti/trans ring junction (A/B/C) of a cassane framework, suggesting a β -orientation of OH-8. Therefore, **1** was determined to be 8 β -hydroxy-14(17)-ene-18 α -methoxycarbonyl-18-norvouacapene and was named as mimosol A.

Compound **2** was assigned a molecular formula C₂₀H₃₂O [M-H₂O]⁺ on the basis of a molecular ion at *m/z* 288.2460 by HREIMS. Its IR spectrum displayed a hydroxyl stretching at 3397 cm⁻¹. The ¹H and ¹³C NMR spectra (Table 1), analyzed by the aid of ¹H-¹H COSY and HMQC experiments, showed patterns similar to those of taapeenin L (**8**) (Cheenpracha et al., 2006). The signals of three tertiary methyl groups at δ_H 0.83 (Me-19), 0.83 (Me-20) and 0.86 (Me-18), and a Me doublet at δ_H 0.95 (d, *J* = 7.2 Hz, Me-17) were displayed. The ¹H NMR spectroscopic data showed the presence of an olefinic proton at δ 5.54 (t, *J* = 6.6 Hz,

H-15) and oxymethylene protons at δ 4.21 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H-16) connected to a carbon at δ_C 58.5. An oxymethine proton at δ_H 4.43 (dd, *J* = 10.2, 4.8 Hz, H-12: δ_C 70.7) displayed *J* values consistent with an axial orientation. The ¹³C NMR spectrum (Table 1) and DEPT experiments displayed 20 carbons, two of these were sp² carbons at δ 118.8 and 152.0. From the HMBC experiments, the Me-17 at δ 0.95 showed long-range correlations to the carbons at δ 40.4 (C-8), 45.8 (C-14) and 152.0 (C-13). An olefinic proton at δ 5.54 (H-15) also showed long-range correlations to the carbons at δ 45.8 (C-14), 70.7 (C-12) and 152.0 (C-13). An oxymethine proton at δ 4.43 (H-12) gave a cross-peak with the carbons at δ 37.2 (C-11), 58.5 (C-16), 118.8 (C-15) and 152.0 (C-13) and oxymethylene protons at δ 4.21 (2H-16) with the carbons at δ 118.8 (C-15) and 152.0 (C-13). These results suggested that a hydroxyl group was located at C-12 and the =CHCH₂OH substituent was at C-13. From the NOESY cross-peak, the oxymethine proton at δ 4.43 (H-12) showed a cross-peak with the methyl protons at δ 0.95 (Me-17) confirming their axial orientations. An olefinic proton at δ 5.54 (H-15) displayed a cross-peak with a methine proton at δ 2.27 (H-14), thus indicating a *Z*-configuration of the double bond. Therefore, **2** was elucidated as 12 β ,16-dihydroxycass-13(15)(*Z*)-ene and was named as mimosol B.

The molecular formula of compound **3** was found to be C₂₀H₃₄O₂ ([M]⁺, *m/z* 306.2545), by HREIMS. The ¹H and ¹³C (Table 1) NMR spectroscopic data of **3** were comparable with those of **2**, except that a methyl singlet at δ_H 0.86: δ_C 33.6 (Me-18) and an oxymethine proton at δ_H 4.43 (H-12) in **2** were replaced by

oxymethylene protons 2H-18 at δ_H 3.02 and 3.33 (each d, $J = 10.8$ Hz; δ_C 72.1) and methylene protons 2H-12 at δ 1.80 and 2.34, respectively in **3**. The oxymethylene protons at δ 3.02 and 3.33 (2H-18) showed HMBC correlations with the carbons at δ 17.9 (C-19), 35.4 (C-3), 37.6 (C-4) and 48.3 (C-5), confirming their attachment at C-4. The relative stereochemistry of **3** was assigned by NOESY experiment in which the oxymethylene protons 2H-18 (δ 3.02, 3.33) showed cross-peaks with δ 0.70 (Me-19), 1.08 (H_{ax} -5), 1.20 (H_{eq} -3) and 1.43 (H_{eq} -6), indicating an equatorial orientation. A Z-configuration of the double bond was suggested by a cross-peak of an olefinic proton at δ 5.29 (br t, $J = 6.9$ Hz, H-15) with a methine proton at δ 2.12 (m, H-14). Therefore, compound **3** was assigned as 16,18-dihydroxycass-13(15)(Z)-ene and was named as mimosol C. Although **3** was previously reported as a product of semi-synthesis (Leal et al., 2003), this work establishes the diterpene as a bona fide natural product.

The empirical formula of compound **4** was deduced as $C_{24}H_{38}O_4$ from an exact mass measurement ($[M]^+ m/z$ 390.2780) by HREIMS. The carbonyl ester functionality was deduced from the IR absorption at 1735 cm^{-1} . The ^{13}C NMR (Table 1) and DEPT spectra exhibited peaks for 24 carbons; two of these were ester carbonyls at δ 171.1 (C-23) and 171.2 (C-21), an oxymethine at δ 78.4 (C-12) and an oxymethylene carbon at δ 65.2 (C-16). The ^1H NMR spectroscopic data (Table 1) showed six singlet signals of four aliphatic methyl groups at δ 0.71 (Me-20), 0.78 (Me-19), 0.84 (Me-18) and 1.10 (Me-17) and two acetoxy methyl groups at δ 2.04 (Me-22; δ_C 21.2) and 2.06 (Me-24; δ_C 21.1). The presence of a cyclopropane ring was deduced from the ^1H NMR, COSY and HMQC spectra that exhibited two signals at δ_H 0.46 (dd, $J = 5.1, 1.2$ Hz, H-14; δ_C 34.0) and 1.18 (m, H-15; δ_C 25.5). From the HMBC experiments, the oxymethine proton H-12 (δ_H 5.09, dd, $J = 13.2, 6.3$ Hz; δ_C 78.4) showed long-range correlations to the carbons at δ 19.3 (C-17), 25.4 (C-11), 25.5 (C-15) and 171.2 (C-21). The oxymethylene protons 2H-16 at δ 3.86 (dd, $J = 11.7, 8.4$ Hz) and 4.28 (dd, $J = 11.7, 6.9$ Hz) showed long-range correlations to the carbons at δ 24.3 (C-13), 25.5 (C-15), 34.0 (C-14) and 171.1 (C-23). These data suggested that two OAc groups were attached at C-12 and C-16, whereas C-13, C-14 and C-15 formed a cyclopropane ring. The observed HMBC correlations between a singlet methyl group at δ 1.10 (Me-17) with the carbons at δ 24.3 (C-13), 25.5 (C-15), 34.0 (C-14) and 78.4 (C-12), confirmed its location at C-13. The large J value for H-12 ($J = 13.2$ Hz) indicated its axial orientation. In the NOESY spectrum (Fig. 2), the oxymethine proton at δ 5.09 (H-12) correlated with the methyl protons at δ 1.10 (Me-17) and 0.64 (H-9) and a methine proton at δ 0.46 (H-14) displayed a cross-peak with the methyl protons at δ 1.10 (Me-17) and oxymethylene protons at δ 3.86 and 4.28 (2H-16) but no correlation with H-15. These data supported α -orientations of H-12, H-14, and Me-17, hence suggesting a *cis* cyclopropyl ring with an α -acetoxymethyl side chain. Thus, **4** was assigned as 12 β ,16 α -diacetoxyl-14 β ,15-cyclopimarane and was named as mimosol D.

Compound **9** was isolated as a white solid. It showed $[M]^+$ at m/z 654.3948 ($C_{42}H_{54}O_6$) in the HREIMS spectrum. The UV spectrum ($\lambda_{\max}$ 258, 283 and 293 nm) suggested the presence of a benzofuran chromophore (Lyder et al., 1998). The IR spectrum of **9** displayed the absorbance of a carbonyl ester (1720 cm^{-1})

group. The ^{13}C NMR (Table 2) and DEPT spectroscopic data displayed 42 carbons; twelve of these were sp^2 carbons attributable to four methine and eight quaternary carbons. The ^1H NMR data (Table 2) showed two fragments, A and B, both being cassane-type diterpenes. The ^1H and ^{13}C NMR and HMBC data established the dimeric structure of compound **9** that was closely related to taepeenin J previously isolated from *C. crista* (Cheenpracha et al., 2006). The differences were shown as the disappearance of two methyl singlets at δ_H 0.95 (Me-18) and 0.75 (Me-18') in taepeenin J and the appearance of two methyl ester at δ_H 3.66 (OMe-18) and 3.57 (OMe-18') in **9**, together with the presence of two ester carbonyl carbons at δ_C 179.2 (C-18) and 179.1 (C-18'). The locations of two methyl ester groups at C-4 and C-4' were confirmed by their HMBC correlations: in fragment A, the methyl ester protons at δ 3.66 (OMe-18) correlated with the carbonyl carbon at δ 179.2 (C-18) and a singlet methyl at δ 1.18 (Me-19) correlated with the carbons at δ 36.5 (C-3), 47.3 (C-4), 49.1 (C-5) and the carbonyl carbon at δ 179.2 (C-18); in fragment B, methyl ester protons at δ 3.57 (OMe-18') correlated with the carbonyl carbon at δ 179.1 (C-18') and a singlet methyl at δ 1.29 (Me-19') correlated with the carbons at δ 36.6 (C-3'), 44.3 (C-5'), 47.7 (C-4') and the carbonyl carbon at δ 179.1 (C-18'). The connectivity between the two fragments at C-14 (fragment A) and C-16' (fragment B) was supported by HMBC correlations (Fig. 3A). The methyl group protons at δ 1.64 (Me-17) exhibited cross-peaks with the carbons at δ 40.1 (C-14), 44.0 (C-8), 121.9 (C-13) and 162.2 (C-16'), whereas an aromatic proton at δ 6.12 (H-15') correlated with the carbon at δ 40.1 (C-14). The NOESY cross-peaks (Fig. 3B) of the aromatic proton at δ 6.12 (H-15') with the methyl protons at δ 1.64 (Me-17) and 2.28 (Me-17') and a methine proton at δ 1.90 (H-9) with the methyl protons (Me-17) supported the β -equatorial orientation of fragment B at C-14. Thus, **9** was deduced to be 14 β -(8'(14'),9'(11'))-diene-18' α -methoxycarbonyl-18'-norvouacapen-16'-yl)-18 α -methoxycarbonyl-18-norvouacapene and was named as mimosol E.

Table 2

^1H and ^{13}C NMR (300 MHz) spectroscopic data of compound **9** in CDCl_3 (δ in ppm, multiplicities, J in Hz).

Position	9A		Position	9B	
	δ_C	δ_H		δ_C	δ_H
1	38.0	1.08–1.12 m 1.76–1.80 m	1'	38.9	1.48–1.55 m 2.20–2.35 m
2	17.9	1.50–1.62 m 1.72–1.82 m	2'	18.7	1.62–1.70 m 1.72–1.82 m
3	36.5	1.75–1.80 m 1.82–1.90 m	3'	36.6	1.44–1.58 m 1.60–1.68 m
4	47.3	–	4'	47.7	–
5	49.1	1.61 m	5'	44.3	2.26 m
6	23.9	1.28–1.31 m 1.45–1.51 m	6'	21.9	1.50–1.60 m 1.62–1.78 m
7	28.3	1.97–2.02 m 2.04–2.08 m	7'	27.5	2.80–2.97 m 2.60–2.72 m
8	44.0	1.65 m	8'	127.4	–
9	47.7	1.90 m	9'	146.1	–
10	37.4	–	10'	37.7	–
11	21.8	2.49 dd (15.3, 10.2) 2.79 dd (15.3, 7.2)	11'	104.3	7.23 s
12	150.1	–	12'	153.4	–
13	121.9	–	13'	126.5	–
14	40.1	–	14'	127.1	–
15	108.5	6.08 d (1.8)	15'	102.4	6.12 s
16	140.7	7.23 br s	16'	162.2	–
17	24.7	1.64 s	17'	15.9	2.28 s
18	179.2	–	18'	179.1	–
19	17.0	1.18 s	19'	16.6	1.29 s
20	14.5	0.94 s	20'	25.5	1.28 s
18-OMe	51.9	3.66 s	18'-OMe	51.9	3.57 s

Assignments were based on HMQC, HMBC and COSY experiments.

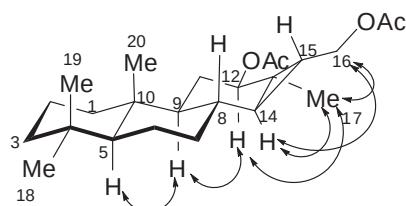


Fig. 2. Important NOESY cross-peaks of mimosol D (**4**).

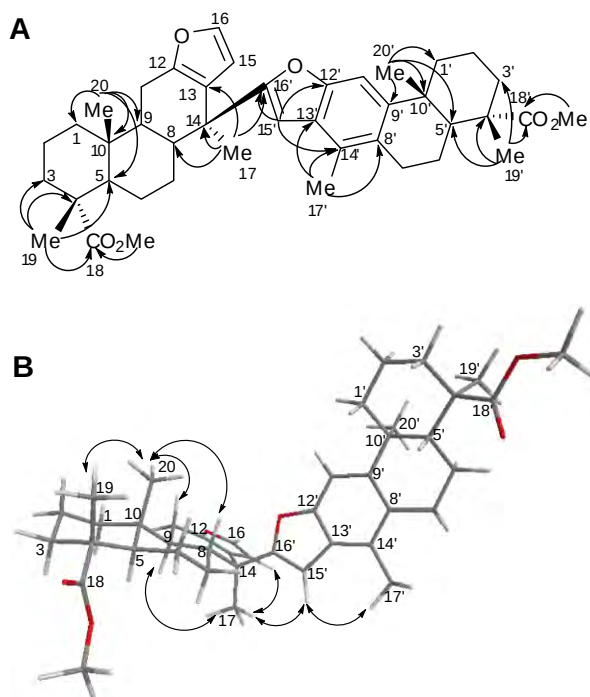


Fig. 3. (A) Major HMBC correlations and (B) important NOESY cross-peaks of mimosol E (9).

The molecular formula of **10** was established as $C_{17}H_{16}O_5$ ($[M]^+$, m/z 300.1011), based on the HREIMS mass spectrum. The UV spectrum showed absorption maxima at λ_{max} 207, 222, 250, 309 and 318 nm. The IR spectrum displayed the absorbance of hydroxyl stretching frequency (3386 cm^{-1}). The ^{13}C NMR (Table 3) and DEPT spectroscopic data showed 17 carbons, suggesting twelve aromatic carbons identified as four protonated (δ 93.4, 97.9, 110.9, 122.2), and eight non-protonated, of which five oxygenated (δ 140.9, 146.5, 149.6, 156.3, 157.6) and three non-oxygenated (δ 116.2, 117.1, 117.9) carbons. Two low-field signals at δ 108.4 and 147.0 representing two carbons of disubstituted double bonds were observed. These data allowed the formulation of a dibenzofuran ring which contained twelve aromatic carbons and an oxygen atom, whose structure was consistent with 10 degrees of unsaturation calculated for this compound. The ^1H NMR spectrum (Table 3) displayed the presence of two sets of downfield resonances. One of them was shown at δ 7.14 (1H, s, H-4) suggesting the presence of a 1,2,3,5,6-pentasubstituted benzene ring (ring A) and another as the proton resonances at δ 6.81 (1H, dd, $J = 7.8, 2.1\text{ Hz}$, H-8), 6.97 (1H, d, $J = 2.1\text{ Hz}$, H-6) and 7.76 (1H, d, $J = 7.8\text{ Hz}$, H-9) indicating the presence of a 1,2,4-trisubstituted benzene ring (ring B). The presence of a biphenyl linkage between C-9a and C-9b (forming a furan skeleton) (Qu et al., 2007) was determined by the HMBC correlation (Fig. 4), in which an aromatic proton H-9 at δ 7.76 showed correlations with the carbons at δ 97.9 (C-6), 110.9 (C-8), 116.2 (C-9b) and 157.6 (C-5a) whereas an aromatic proton H-4 (δ 7.14) showed correlations with the carbons at δ 116.2 (C-9b), 140.9 (C-2), 146.5 (C-3) and 149.6 (C-4a). In addition, the methylene protons at δ 3.87 (2H-1') showed HMBC correlations with the carbons at δ 65.3 (C-4'), 108.4 (C-3'), 116.2 (C-9b), 117.9 (C-1), 140.9 (C-2) and 147.0 (C-2'), suggesting its location at C-1. A methoxyl group (δ 3.96) was assigned at C-3 due to its HMBC correlation to the carbons at δ 146.5 (C-3). The signals of the terminal olefinic methylene protons at δ_H 4.53 and 4.99 (each m, 2H-3': δ_C 108.4) exhibited a COSY cross-peak with the methylene protons at δ 3.87 (br s, 2H-1': δ_C 29.6) and oxymethylene protons at δ

Table 3

^1H and ^{13}C NMR (300 MHz) spectroscopic data of compounds **10** and **11** in acetone- d_6 (δ in ppm, multiplicities, J in Hz).

Position	10		11	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	117.9	–	118.0	–
2	140.9	–	141.1	–
3	146.5	–	146.8	–
4	93.4	7.14 s	93.4	7.17 s
4a	149.6	–	149.8	–
5a	157.6	–	157.5	–
6	97.9	6.97 d (2.1)	96.2	7.12 d (2.4)
7	156.3	–	158.7	–
8	110.9	6.81 dd (7.8, 2.1)	110.2	6.88 dd (7.8, 2.4)
9	122.2	7.76 d (7.8)	122.1	7.83 d (7.8)
9a	117.1	–	118.0	–
9b	116.2	–	116.0	–
1'	29.6	3.87 br s	29.6	3.88 br s
2'	147.0	–	147.0	–
3'	108.4	4.53 m	108.4	4.52 m
		4.99 m		5.00 sext (1.8)
4'	65.3	4.22 br s	65.3	4.22 br s
3-OMe	55.9	3.96 s	55.9	3.97 s
7-OMe			55.1	3.87 s
2-OH		8.71 s		7.42 s
7-OH		7.37 s		

Assignments were based on HMQC, HMBC and COSY experiments.

4.22 (br s, 2H-4': δ_C 65.3). Moreover, NOESY cross-peaks were observed between the methoxyl protons and the aromatic proton H-4 (δ 7.14, s) and between methylene protons 2H-1' (δ 3.87) and the aromatic proton H-9 (δ 7.76). Therefore, **10** was elucidated as 1-(2-(hydroxymethyl)allyl)-3-methoxydibenzo[b,d]furan-2,7-diol and was named as mimosol F.

Compound **11** had a molecular formula $C_{18}H_{18}O_5$, ($[M]^+$ m/z 314.118), based on HREIMS which was 14 mass units more than that of **10**, suggesting the addition of a methyl group. The ^1H and ^{13}C NMR spectra (Table 3) of **11** displayed characteristics similar to those of **10**, except for the presence of an additional methoxyl group at δ_H 3.87 (s) in **11** whose HMBC correlation with the carbon at δ 158.7 (C-7) and NOESY cross-peak with the protons at δ 6.88 (dd, $J = 7.8, 2.4\text{ Hz}$, H-8) and 7.12 (d, $J = 2.4\text{ Hz}$, H-6) suggested the location of an OMe group at C-7. Thus, **11** was deduced to be 1-(2-(hydroxymethyl)allyl)-3,7-dimethoxydibenzo[b,d]furan-2-ol and was named as mimosol G.

The tricyclic diterpene structures of compounds **1–9** could be derived from common pimar-15-en-8-yl carbocation intermediate generated by cyclization of (+)-copalyl diphosphate (Devon and Scott, 1972; Ravn et al., 2002) as shown in Scheme 1. The 14 $\rightarrow$ 8 hydride shift of pimar-15-en-8-yl carbocation to form a pimar-15-en-14-yl carbocation followed by 13 $\rightarrow$ 14 methyl shift (pathway a) results in cass-15-en-13-yl carbocation which will give rise

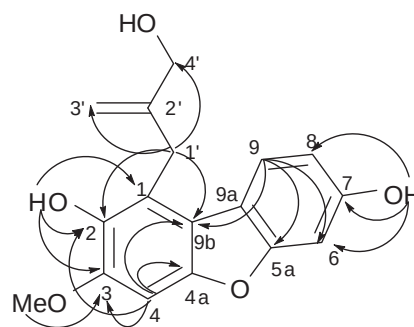
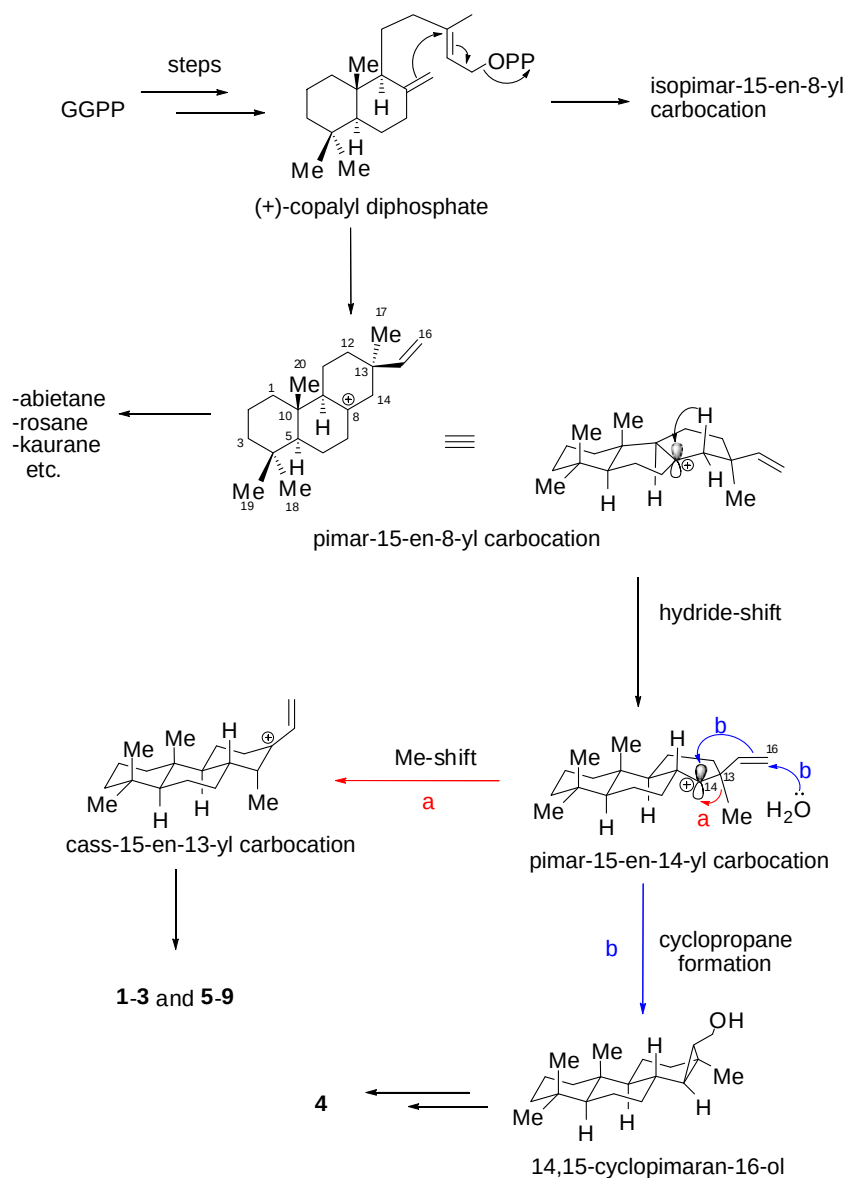


Fig. 4. Major HMBC correlations of mimosol F (10).



Scheme 1. Plausible biosynthesis pathway of cassane and cyclopimarane diterpenes.

to a cassane-type diterpenes (**1–3** and **5–9**) with the trans/anti/trans ring junction (A/B/C). On the other hand the addition of water to C-16 double bond of a homoallylic cation (pimar-15-en-14-yl carbocation) concomitant with ring closure (pathway b) results in 14,15-cyclopimarane-16-ol, a precursor of **4**.

The CH_2Cl_2 and acetone extracts exhibited potent inhibitory activity against LPS-induced NO production in RAW264.7 cell lines with IC_{50} values of 11.0 and 21.6 $\mu\text{g/ml}$, respectively (Table 4).

Therefore all isolated compounds were evaluated for their anti-NO activity whose results were shown in Table 5. Compound **4** ($\text{IC}_{50} = 3.0 \mu\text{M}$) possessed the highest activity, followed by compounds **13**, **12**, **14**, **8** and **6** ($\text{IC}_{50} = 3.9, 4.4, 5.6, 7.1$ and $8.2 \mu\text{M}$, respectively), whereas other compounds exhibited moderate and mild activities. The inhibitory activities of all compounds were much stronger than that of NO synthase inhibitor (Tewtrakul et al., 2009) (L-nitroarginine (L-NA), $\text{IC}_{50} = 61.8 \mu\text{M}$) except

Table 4

Inhibitory activity against LPS-induced NO production^a of crude extracts from the roots of *C. mimosoides*.

The crude extracts	% Inhibition at various concentrations ($\mu\text{g/ml}$)					IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
	0	3	10	30	100	
The crude CH_2Cl_2 extract	0.0 ± 3.8	–	$46.5 \pm 3.0^{**}$	$70.2 \pm 0.8^{**}$	$85.6 \pm 3.3^{**}$	11.0
The crude acetone extract	0.0 ± 3.8	–	$36.8 \pm 4.5^*$	$54.2 \pm 3.3^{**}$	$78.6 \pm 3.8^{**}$	21.6
L-Nitroarginine (L-NA)	0.0 ± 9.9	11.7 ± 4.6	20.2 ± 5.9	$34.7 \pm 1.8^*$	$71.6 \pm 2.6^{**}$	61.8
Caffeic acid phenethylster (CAPE)	0.0 ± 9.9	30.7 ± 3.2	$68.6 \pm 3.4^{b,**}$	$98.7 \pm 1.2^{b,**}$	$98.9 \pm 2.1^{b,**}$	5.6

Statistical significance, $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$.

^a Each value represents mean $\pm$ S.E.M. of four determinations.

^b Cytotoxic effect was observed.

Table 5
Inhibitory effects on NO production^a of compounds **1–18** from *C. mimosoides*.

Compounds	% Inhibition at various concentrations (μM)						IC ₅₀ (μM)
	0	1	3	10	30	100	
1	0.0 ± 6.9	–	–	36.7 ± 3.3**	68.4 ± 2.1**	99.8 ± 2.3**	15.9
2	0.0 ± 5.6	–	–	35.3 ± 2.8**	54.0 ± 2.9**	101.9 ± 2.3**	19.3
3	0.0 ± 5.6	–	–	32.8 ± 2.3**	78.1 ± 4.4**	99.4 ± 3.2 ^{b,**}	15.4
4	0.0 ± 5.6	19.4 ± 3.1	49.3 ± 2.5**	83.7 ± 0.9**	89.3 ± 3.1 ^{b,**}	100.2 ± 2.5 ^{b,**}	3.0
5	0.0 ± 9.6	–	–	5.1 ± 1.2	25.6 ± 2.4	68.9 ± 2.6**	56.8
6	0.0 ± 9.6	–	25.0 ± 2.3*	60.4 ± 4.1**	75.8 ± 2.5**	100.3 ± 3.5 ^{b,**}	8.2
7	0.0 ± 6.9	–	–	40.5 ± 3.6**	75.0 ± 2.1**	98.1 ± 3.3**	13.2
8	0.0 ± 6.9	–	27.1 ± 4.4*	51.9 ± 2.9**	98.0 ± 3.5 ^{b,**}	100.0 ± 1.9 ^{b,**}	7.1
9	0.0 ± 4.2	–	–	23.3 ± 2.1**	60.9 ± 2.0**	94.3 ± 3.5**	22.8
10	0.0 ± 4.4	–	–	31.2 ± 1.2	49.6 ± 3.7**	81.0 ± 3.6**	25.9
11	0.0 ± 4.4	–	–	4.8 ± 2.9	28.5 ± 2.5*	67.0 ± 4.4**	57.2
12	0.0 ± 4.9	–	39.5 ± 2.4*	71.0 ± 3.8**	95.0 ± 1.7**	99.4 ± 3.4 ^{b,**}	4.4
13	0.0 ± 4.9	–	43.4 ± 2.1**	72.1 ± 2.0**	97.5 ± 2.5**	100.5 ± 2.4 ^{b,**}	3.9
14	0.0 ± 4.4	–	35.4 ± 2.5*	63.0 ± 0.7**	85.8 ± 1.5**	101.7 ± 3.0**	5.6
15	0.0 ± 4.9	–	–	22.0 ± 3.1**	68.5 ± 2.2 ^{b,**}	99.7 ± 2.1 ^{b,**}	20.8
16	0.0 ± 4.2	–	–	28.4 ± 3.1	60.2 ± 1.5**	94.6 ± 2.3**	21.1
17	0.0 ± 4.2	–	–	2.4 ± 1.5	22.3 ± 2.6**	56.2 ± 3.9**	83.0
18	0.0 ± 3.5	–	–	15.4 ± 1.8	42.8 ± 2.6**	91.8 ± 2.0**	31.0
L-Nitroarginine (L-NA)	0.0 ± 9.9	–	11.7 ± 4.6	20.2 ± 5.9	34.7 ± 1.8*	71.6 ± 2.6**	61.8
Caffeic acid phenethylster (CAPE)	0.0 ± 9.9	–	30.7 ± 3.2*	68.6 ± 3.4**	98.7 ± 1.2 ^{b,**}	98.9 ± 2.1 ^{b,**}	5.6

Statistical significance, **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

^a Each value represents mean ± S.E.M. of four determinations.

^b Cytotoxic effect was observed.

Table 6
Inhibition on TNF-α production^a of compounds **4, 6, 8, and 12–14** isolated from *C. mimosoides*.

Compounds	% Inhibition at various concentrations (μM)					IC ₅₀ (μM)
	0	3	10	30	100	
4	0.0 ± 5.7	36.6 ± 0.7	60.0 ± 1.0**	71.2 ± 0.9**	95.2 ± 1.5 ^{b,**}	6.5
6	0.0 ± 5.7	–	21.2 ± 1.4	37.7 ± 2.0*	75.3 ± 2.1**	38.8
8	0.0 ± 5.7	–	8.2 ± 1.0**	42.3 ± 1.0**	86.7 ± 1.8**	35.2
12	0.0 ± 5.6	–	50.0 ± 3.3**	72.1 ± 2.4**	95.4 ± 1.2 ^{b,**}	9.5
13	0.0 ± 5.6	–	48.5 ± 2.5**	68.5 ± 1.5**	99.7 ± 0.9 ^{b,**}	11.4
14	0.0 ± 5.7	–	43.6 ± 2.3**	62.1 ± 2.0**	98.4 ± 2.8 ^{b,**}	14.6

Statistical significance, **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

^a Each value represents mean ± S.E.M. of four determinations.

^b Cytotoxic effect was observed.

compound **17** showed a weaker activity (IC₅₀ = 83.0 μM). Compounds **4**, **12** and **13** also showed higher inhibitory activity than caffeic acid phenethylster (CAPE) (IC₅₀ = 5.6 μM). Structure–activity relationships of these classes of diterpenes (**1–9**) for anti-inflammatory activity are suggested as follows: (i) the acetoxyl group on the molecule was necessary for increasing the activity; compound **6** with the acetoxyl group was strongly active (IC₅₀ = 8.2 μM), whereas compound **5** was much less active (IC₅₀ = 56.8 μM). (ii) one hydroxyl substituent gave higher activity than two hydroxyls as shown in compound **8** (IC₅₀ = 7.1 μM) vs. compounds **2** and **3** (IC₅₀ = 19.3 and 15.4 μM), respectively. This result implied that a hydroxyl substitution at other positions besides C-16 decreased the activity. Compounds **4**, **6**, **8** and **12–14** were also tested for the inhibitory effect on LPS-induced TNF-α release in RAW264.7 cells. The results established that **4** and **12** possessed the most potent activity against TNF-α release with IC₅₀ values of 6.5 and 9.5 μM, respectively, whereas **6**, **8**, **13** and **14** exhibited moderate activity with IC₅₀ values of 38.8, 35.2, 11.4 and 14.6 μM, respectively (Table 6). From the present study, compound **4** was a compound that showed strong inhibition on both NO and TNF-α releases.

2.1. Concluding remarks

The phytochemical investigation of *C. mimosoides* led to the isolation of four diterpenes, named mimosol A–D (**1–4**), a dimer,

named mimosol E (**9**) and two dibenzo[b,d]furans, named mimosol F, G (**10**, **11**) together with eleven known compounds. It is interesting to note that in compound **4**, a cyclopropane ring was formed at ring C whose structure should be derived from pimarane skeleton and in compound **1** an OH was found at C-8. Both types of structure were first isolated from this species. All compounds were evaluated for their anti-NO activity, of which all compounds exhibited much stronger activity than that of NO synthase inhibitor (L-NA, IC₅₀ = 61.8 μM) except compound **17** which showed weaker activity. The compound **4** exhibited potent inhibitory activity against LPS-induced NO production in RAW264.7 cell lines and TNF-α release with IC₅₀ values of 3.0 and 6.5 μM, respectively.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Melting points were determined on the Fisher–John melting point apparatus. The optical rotation [α]_D values were determined with a JASCO P-1020 polarimeter, whereas IR spectra were measured with a Perkin–Elmer FTS FT-IR spectrophotometer. The UV spectra were measured with a UV-160A spectrophotometer (Shimadzu) and principal bands ($\lambda_{\max}$) were recorded as wavelengths (nm) and log ϵ in CH₃OH and CHCl₃ solution. The ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded using 300 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield™ spectrometers in CDCl₃ or acetone-*d*₆ solution. Chemical

shifts are recorded in parts per million (δ) with tetramethylsilane (TMS) as an internal reference. Vacuum Liquid Chromatography (VLC) (Coll and Bowden 1986) and column chromatography (CC) were carried out on silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) and silica gel 100 (Merck), respectively.

3.2. Plant material

The roots of *C. mimosoides* Lamk. were collected from Khonkaen province, north-eastern part of Thailand in October 2006. Botanical identification was achieved through comparison with a voucher specimen number QBG33200 in the herbarium collection of Queen Sirikit Garden, Mae Rim District, Chiang Mai, Thailand.

3.3. Extraction and Isolation

The air-dried roots (1.7 kg) of *C. mimosoides* were extracted with CH₂Cl₂ and acetone successively (each 2 × 10 L, for 5 days) at room temperature. The crude extracts were evaporated under reduced pressure to afford brownish CH₂Cl₂ (40.3 g) and acetone (47.1 g) extracts, respectively. The crude CH₂Cl₂ extract was further separated by VLC, eluting with hexane as eluent and increasing polarities with CH₂Cl₂, acetone and MeOH, respectively to give ten fractions (C1–C10). Fraction C3 (2.41 g) was subjected to VLC with EtOAc–hexane (1:19, v/v) to afford five subfractions (C3a–C3e). Subfraction C3b (851.6 mg) was recrystallized with CH₂Cl₂ to give **6** (680.3 mg) and the mother liquor (160.5 mg) which was further subjected to CC using EtOAc–hexane (1:49, v/v) to give **5** (40.6 mg) and **8** (7.2 mg). Subfraction C3c (793.7 mg) was separated by CC eluting with EtOAc–hexane (1:19, v/v) to give **6** (15.6 mg) and **8** (35.2 mg). Fraction C5 (6.49 g) was subjected to VLC using hexane as eluent and increasing polarity with EtOAc to afford six subfractions (C5a–C5f). Subfraction C5c (793.7 mg) was separated by CC with acetone–hexane (1:49, v/v) to give **5** (460.4 mg), **9** (10.2 mg) and **1** (50.8 mg). Subfraction C5e (742.8 mg) was purified by CC with acetone–hexane (1:19, v/v) to give **7** (10.4 mg). Fraction C7 (1.18 g) was subjected to CC with acetone–hexane (1:9, v/v) to afford six subfractions (C7a–C7f). Subfraction C7c (350.8 mg) was purified by CC with acetone–hexane (3:17, v/v) to give **3** (102.4 mg), **2** (7.4 mg) and **4** (7.0 mg). Subfraction C7e (110.0 mg) was separated by CC with CH₂Cl₂ to give **11** (10.3 mg). Fraction C9 (3.83 g) was subjected to VLC using hexane as eluent and increasing polarity with acetone to afford six subfractions (C9a–C9f). Subfraction C9-b (384.7 mg) was recrystallized with CH₂Cl₂ to give **15** (230.3 mg). Subfraction C9d was purified by CC with acetone–CH₂Cl₂ (1:49, v/v) to give **12** (13.3 mg). Subfraction C9e (220.5 mg) was separated by CC with acetone–CH₂Cl₂ (1:19, v/v) to give **13** (10.3 mg).

The crude acetone (47.1 g) extract was fractionated by VLC eluting with hexane as eluent and increasing polarity with CH₂Cl₂, acetone and MeOH successively to give eight fractions (A1–A8). Fraction A3 (1.05 g) was subjected to VLC with acetone–CH₂Cl₂ (1:49, v/v) to give **14** (35.3 mg). Fraction A5 (1.33 g) was separated by VLC with acetone–CH₂Cl₂ (1:49, v/v) to afford eleven subfractions (A5a–A5g). Subfraction A5c (88.1 mg) was recrystallized with CH₂Cl₂ to give **13** (15.3 mg). Subfraction A5e (350.0 mg) was purified by CC with MeOH–CH₂Cl₂ (1:24, v/v) to afford **18** (70.3 mg) and **16** (51.3 mg). Subfraction A5f (80.0 mg) was separated by CC with EtOAc–CH₂Cl₂ (1:9, v/v) to give **10** (10.3 mg). Fraction A7 (235.2) was recrystallized with MeOH to give **17** (150.3 mg).

3.3.1. Mimosol A (**1**)

White solid; mp 214–216 °C; $[\alpha]_D^{27}$ –41.4 (c 0.76, CHCl₃); UV (CH₃OH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 210 (4.95), 235 (4.65) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3429 (O–H), 2930 (C–H), 1718 (C=O) cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR

(acetone-*d*₆, 300 MHz), see Table 1; HREIMS: *m/z* 344.1997 [M]⁺ (calcd. for C₂₁H₂₈O₄, 344.1988).

3.3.2. Mimosol B (**2**)

White solid; mp 143–145 °C; $[\alpha]_D^{27}$ –40.6 (c 0.30, CHCl₃); UV (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 225 (3.47) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3397 (O–H), 2928 (C–H) cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 1; HREIMS: *m/z* 288.2460 [M–H₂O]⁺ (calcd. for C₂₀H₃₂O₄, 288.2453).

3.3.3. Mimosol C (**3**)

White solid; mp 102–103 °C; $[\alpha]_D^{27}$ –37.1 (c 1.10, CH₃OH); UV (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 223 (3.45) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3364 (O–H), 2930 (C–H) cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 1; HREIMS: *m/z* 306.2545 [M]⁺ (calcd. for C₂₀H₃₄O₂, 306.2559). The physical and spectral data of **3** from the synthesis (Leal et al., 2003): colorless needle; mp 122–125 °C; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3400, 2970, 2890, 1660, 1480, 1400, 1060 cm^{–1}; ¹H NMR (CDCl₃, 60 MHz) 5.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.03 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.20 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 3.00 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 0.93 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.77 (s, 3H).

3.3.4. Mimosol D (**4**)

Viscous oil; $[\alpha]_D^{27}$ +24.16 (c 1.02, CHCl₃); IR (neat) $\nu_{\max}$ 1735 (C=O), 1243 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 1; HREIMS: *m/z* 390.2780 [M]⁺ (calcd. for C₂₄H₃₈O₄, 390.2770).

3.3.5. Mimosol E (**9**)

White solid; mp 141–142 °C; $[\alpha]_D^{27}$ +132.8 (c 0.37, CHCl₃); UV (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 258 (5.28), 283 (4.93), 293 (4.89) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 2929 (C–H), 1720 (C=O) cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 2; HREIMS: *m/z* 654.3948 [M]⁺ (calcd. for C₄₂H₅₄O₆, 654.3920).

3.3.6. Mimosol F (**10**)

White solid; mp 215–216 °C; UV (CH₃OH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 207 (5.33), 222 (5.35), 250 (5.12), 309 (5.12), 318 (5.11) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3386 (O–H), 2927 (C–H) cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR (acetone-*d*₆, 300 MHz), see Table 3; HREIMS: *m/z* 300.1011 [M]⁺ (calcd for C₁₇H₁₆O₅, 300.1007).

3.3.7. Mimosol G (**11**)

White solid; mp 152–153 °C; UV (CH₃OH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 209 (5.28), 222 (5.32), 250 (5.11), 258 (5.08), 308 (5.10), 315 (5.07) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3419 (O–H), 2927 (C–H) cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR (acetone-*d*₆, 300 MHz), see Table 3; HREIMS: *m/z* 314.118 [M]⁺ (calcd for C₁₈H₁₈O₅, 314.1154).

3.4. Anti-inflammatory activity assay

3.4.1. Inhibitory effects of compounds on NO production from RAW264.7 cells

Inhibitory effects on NO production by murine macrophage-like RAW264.7 cells were evaluated using a modified method from that previously reported (Banskota et al., 2003). Briefly, the RAW264.7 cell line [purchased from Cell Lines Service (CLS)] was cultured in Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) medium supplemented with 0.1% sodium bicarbonate and 2 mM glutamine, penicillin G (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml) and 10% fetal calf serum (FCS). The cells were harvested with trypsin–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and diluted to a suspension in a fresh medium. The cells were seeded in 96-well plates with 1 × 10⁵ cells/well and allowed to adhere for 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After that the medium was replaced with a fresh medium containing 200 µg/ml of LPS together with the test samples at various concentrations and was then incubated for 48 h.

NO production was determined by measuring the accumulation of nitrite in the culture supernatant using the Griess reagent. Cytotoxicity was determined using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) colorimetric method. Briefly, after 48 h incubation with the test samples, MTT solution (10 μ l, 5 mg/ml in phosphate buffer saline (PBS)) was added to the wells. After 4 h incubation, the medium was removed, and isopropanol containing 0.04 M HCl was then added to dissolve the formazan production in the cells. The optical density of the formazan solution was measured with a microplate reader at 570 nm. The test compounds were considered to be cytotoxic when the optical density of the sample-treated group was less than 80% of that in the control (vehicle-treated) group. L-NA and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) were used as positive controls. The stock solution of each test sample was dissolved in DMSO, and the solution was added to the medium RPMI (final DMSO is 1%). Inhibition (%) was calculated using the following equation and IC₅₀ values were determined graphically ($n = 4$):

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

NO₂⁻ concentration (μ M) [A: LPS (+), sample (-); B: LPS (+), sample(+); C: LPS (-), sample (-)].

3.4.2. Inhibitory effects of compounds on LPS-induced TNF- α release from RAW264.7 cells

Briefly, the RAW264.7 cell line was cultured in RPMI medium supplemented with 0.1% sodium bicarbonate and 2 mM glutamine, penicillin G (100 units/ml), streptomycin (100 μ g/ml) and 10% FCS. The cells were harvested with trypsin–EDTA and diluted to a suspension in a fresh medium. The cells were seeded in 96-well plates with 1.0×10^5 cells/well and allowed to adhere for 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After that the medium was replaced with a fresh medium containing 200 μ g/ml of LPS together with the test samples at various concentrations and was then incubated for 48 h. The supernatant was transferred into 96-well ELISA plate and then TNF- α concentrations were determined using commercial ELISA kit. The test samples were dissolved in DMSO, and the solution was added to RPMI. The inhibition on TNF- α production was calculated and IC₅₀ values were determined graphically.

3.5. Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ standard error means (S.E.M) of four determinations at each concentration for each sample. The IC₅₀ values were calculated using the Microsoft Excel program. Statistical significance was calculated by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's test.

Acknowledgments

O. Yodsaoe thanks the Office of the Higher Education Commission, Thailand for supporting by grant fund under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Joint Ph.D. Program Thai Doctoral degree for this research. We thank the Thailand Research Fund (BRG5280013) for financial support and the Graduate School, Prince of Songkla University for partial support. O.Y. thanks Dr. Yaowapa Sukpondma for the NMR measurement.

References

- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Nguyen, N.T., Awale, S., Nobukawa, T., Kadota, S., 2003. DPPH radical scavenging and nitric oxide inhibitory activities of the constituents from the wood of *Taxus yunnanensis*. *Planta Med.* 69, 500–505.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Rakariyatham, N., 2005. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chem.* 92, 491–497.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J.D., Rakariyatham, N., 2007. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chem.* 100, 1044–1048.
- Cheenpracha, S., Srisuwan, R., Karalai, C., Ponglimanont, C., Chantapromma, S., Chantapromma, K., Fun, H.-K., Anjum, S., Atta-ur-Rahman, 2005. New diterpenes from stems and roots of *Caesalpinia crista*. *Tetrahedron* 61, 8656–8662.
- Cheenpracha, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., Chantapromma, K., Laphookhieo, S., 2006. Cassane-type diterpenes from the seeds of *Caesalpinia crista*. *Helv. Chim. Acta.* 89, 1062–1066.
- Chen, P., Yang, J.-S., 2007. Flavonol galactoside caffeate ester and homoisoflavones from *Caesalpinia millettii* HOOK. *et ARN. Chem. Pharm. Bull.* 55, 655–657.
- Coll, J.C., Bowden, B.F., 1986. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *J. Nat. Prod.* 49, 934–936.
- Devon, T.K., Scott, A.I., 1972. Handbook of naturally occurring compounds. Terpenes, vol. II. Academic Press, New York and London. p. 186.
- Dickson, R.A., Houghton, P.J., Hylands, P.J., 2007. Antibacterial and antioxidant cassane diterpenoids from *Caesalpinia benthamiana*. *Phytochemistry* 68, 1436–1441.
- Kalauni, S.K., Awale, S., Tezuka, Y., Banskota, A.H., Linn, T.Z., Asih, P.B.S., Syafruddin, D., Kadota, S., 2006. Antimalarial activity of cassane- and norcassane-type diterpenes from *Caesalpinia crista* and their structure-activity relationship. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1050–1052.
- Kuroda, C., Ueshino, T., Nagano, H., 2004. Ehrlich's reaction of furanoterpenes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 77, 1737–1740.
- Leal, R.S., Lima, M.A.S., Silveira, E.R., 2003. Cassane diterpenes from *Plathymenia reticulata*. *J. Braz. Chem. Soc.* 14, 120–125.
- Linn, T.Z., Awale, S., Tezuka, Y., Banskota, A.H., Kalauni, S.K., Attamimi, F., Ueda, J., Asih, P.B.S., Syafruddin, D., Tanaka, K., Kadota, S., 2005. Cassane- and norcassane-type diterpenes from *Caesalpinia crista* of Indonesia and their antimalarial activity against the growth of *Plasmodium falciparum*. *J. Nat. Prod.* 68, 706–710.
- Lyder, D.L., Peter, S.R., Tinto, W.F., Bissada, S.M., McLean, S., Reynolds, W.F., 1998. Minor cassane diterpenoids of *Caesalpinia bonduc*. *J. Nat. Prod.* 61, 1462–1465.
- McPherson, D.D., Che, C.T., Cordell, G.A., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., Fong, H.H.S., 1986. Diterpenoids from *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochemistry* 25, 167–170.
- Miyachi, Y., Nunomura, N., Kawata, Y., Kizu, H., Tomimori, T., Watanabe, T., Takano, A., Malla, K.J., 2006. Studies on Nepalese crude drugs. XXVIII. Chemical constituents of Bhote Khair, the underground parts of *Eskemukerjea megacarpum* HARA. *Chem. Pharm. Bull.* 54, 136–138.
- Nasini, G., Piozzi, F., 1981. Pterocarpol and triterpenes from *Daemonorops draco*. *Phytochemistry* 20, 514–516.
- Patil, A.D., Freyer, A.J., Webb, R.L., Zuber, G., Reichwein, R., Bean, M.F., Faucette, L., Johnson, R.K., 1997. Pulcherrimins A–D, novel diterpene dibenzoates from *Caesalpinia pulcherrima* with selective activity against DNA repair-deficient yeast mutants. *Tetrahedron* 53, 1583–1592.
- Pranithanchai, W., Karalai, C., Ponglimanont, C., Subhadhirasakul, S., Chantapromma, K., 2009. Cassane diterpenoids from the stem of *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochemistry* 70, 300–304.
- Promsawan, N., Kittakoop, P., Boonphong, S., Nongkunsarn, P., 2003. Antitubercular cassane furanoditerpenoids from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*. *Planta Med.* 69, 776–777.
- Pudhom, K., Sommit, D., Suwankitti, N., Petsom, A., 2007. Cassane furanoditerpenoids from the seed kernels of *Caesalpinia bonduc* from Thailand. *J. Nat. Prod.* 70, 1542–1544.
- Qu, J., Xie, C., Guo, H., Yu, W., Lou, H., 2007. Antifungal dibenzofuran bis(biphenyl)s from the liverwort *Asterella angusta*. *Phytochemistry* 68, 1767–1774.
- Ragasa, C.Y., Hoflana, J.G., Rideout, J.A., 2002. New furanoid diterpenes from *Caesalpinia pulcherrima*. *J. Nat. Prod.* 65, 1107–1110.
- Ravn, M.M., Peters, R.J., Coates, R.M., Croteau, R., 2002. Mechanism of abietadiene synthase catalysis: stereochemistry and stabilization of the cryptic pimarenyl carbocation intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 6998–7006.
- Roach, J.S., McLean, S., Reynolds, W.F., Tinto, W.F., 2003. Cassane diterpenoids of *Caesalpinia pulcherrima*. *J. Nat. Prod.* 66, 1378–1381.
- Tanaka, T., Ohyama, M., Iinuma, M., Shirataki, Y., Komatsu, M., Burandt, C.L., 1998. Isoflavonoids from *Sophora secundiflora*, *S. arizonica* and *S. gypsophila*. *Phytochemistry* 48, 1187–1193.
- Tewtrakul, S., Cheenpracha, S., Karalai, C., 2009. Nitric oxide inhibitory principles from *Derris trifoliata* stems. *Phytomedicine* 16, 568–572.
- Wang, D., Zhu, H.-T., Zhang, Y.-J., Yang, C.-R., 2005. A carbon–carbon-coupled dimeric bergenin derivative biotransformed by *Pleurotus ostreatus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 4073–4075.
- Yodsaoe, O., Cheenpracha, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., Chantapromma, S., Fun, H.-K., Kanjana-Opas, A., 2008. Phanginin A–K, diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia sappan* Linn. *Phytochemistry* 69, 1242–1249.

Absolute configuration of isovouacapenol C

Hoong-Kun Fun,^{a,*} Orapun Yodsaoe,^b Chatchanok Karalai^b and Suchada Chantrapromma^c

^aX-ray Crystallography Unit, School of Physics, Universiti Sains Malaysia, 11800 USM, Penang, Malaysia, ^bDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand, and ^cCrystal Materials Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand
Correspondence e-mail: hkfun@usm.my

Received 11 July 2010; accepted 14 July 2010

Key indicators: single-crystal X-ray study; $T = 100$ K; mean $\sigma(\text{C}-\text{C}) = 0.003$ Å; R factor = 0.031; wR factor = 0.077; data-to-parameter ratio = 11.5.

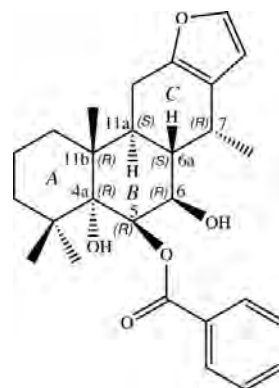
The title compound, $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_5$ [systematic name: (4a*R*,5*R*,6*R*,6a*S*,7*R*,11a*S*,11b*R*)-4a,6-dihydroxy-4,4,7,11b-tetramethyl-1,2,3,4,4a,5,6,6a,7,11,11a,11b-dodecahydrophenanthro[3,2-*b*]-furan-5-yl benzoate], is a cassane furanoditerpene, which was isolated from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*. The three cyclohexane rings are *trans* fused: two of these are in chair conformations with the third in a twisted half-chair conformation, whereas the furan ring is almost planar (r.m.s. deviation = 0.003 Å). An intramolecular C—H $\cdots$ O interaction generates an *S*(6) ring. The absolute configurations of the stereogenic centres at positions 4a, 5, 6, 6a, 7, 11a and 11b are *R*, *R*, *R*, *S*, *R*, *S* and *R*, respectively. In the crystal, molecules are linked into infinite chains along [010] by O—H $\cdots$ O hydrogen bonds. C $\cdots$ O [3.306 (2)–3.347 (2) Å] short contacts and C—H $\cdots$ π interactions also occur.

Related literature

For ring conformations, see: Cremer & Pople (1975). For bond-length data, see: Allen *et al.* (1987). For background to plants in Caesalpiniaceae, cassane furanoditerpenes and their activities, see: Che *et al.* (1986); Jiang *et al.* (2001); Patil *et al.* (1997); Promsawan *et al.* (2003); Ragasa *et al.* (2002); Smitinand & Larson (2001); Tewtrakul *et al.* (2003). For related structures, see: Jiang *et al.* (2001). For the stability of the temperature controller used in the data collection, see Cosier & Glazer (1986).

* Thomson Reuters ResearcherID: A-3561-2009.

§ Additional correspondence author, e-mail: suchada.c@psu.ac.th. Thomson Reuters ResearcherID: A-5085-2009.



Experimental

Crystal data

$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_5$
 $M_r = 438.54$
 Monoclinic, $P2_1$
 $a = 11.6236$ (7) Å
 $b = 8.0871$ (5) Å
 $c = 12.4193$ (7) Å
 $\beta = 98.194$ (3)°
 $V = 1155.51$ (12) Å³
 $Z = 2$
 Cu $K\alpha$ radiation
 $\mu = 0.69$ mm⁻¹
 $T = 100$ K
 $0.40 \times 0.26 \times 0.16$ mm

Data collection

Bruker APEX DUO CCD diffractometer
 Absorption correction: multi-scan (SADABS; Bruker, 2009)
 $T_{\min} = 0.772$, $T_{\max} = 0.896$
 23749 measured reflections
 3328 independent reflections
 3237 reflections with $I > 2\sigma(I)$
 $R_{\text{int}} = 0.037$

Refinement

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.031$
 $wR(F^2) = 0.077$
 $S = 1.05$
 3328 reflections
 289 parameters
 1 restraint
 H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement
 $\Delta\rho_{\max} = 0.26$ e Å⁻³
 $\Delta\rho_{\min} = -0.26$ e Å⁻³
 Absolute structure: Flack (1983), 1365 Friedel pairs
 Flack parameter: 0.07 (17)

Table 1

Hydrogen-bond geometry (Å, °).

Cg1 is the centroid of the C12–C16/O1 ring.

$D-H\cdots A$	$D-H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$D-H\cdots A$
O5—H1O5 $\cdots$ O1 ⁱ	0.85 (2)	2.27 (3)	2.9814 (19)	141 (2)
C19—H19C $\cdots$ O3	0.96	2.37	3.052 (2)	128
C3—H3A $\cdots$ Cg1 ⁱⁱ	0.97	2.86	3.805 (2)	166

Symmetry codes: (i) $x, y - 1, z$; (ii) $-x + 2, y - \frac{1}{2}, -z + 2$.

Data collection: APEX2 (Bruker, 2009); cell refinement: SAINT (Bruker, 2009); data reduction: SAINT; program(s) used to solve structure: SHELXTL (Sheldrick, 2008); program(s) used to refine structure: SHELXTL; molecular graphics: SHELXTL; software used to prepare material for publication: SHELXTL and PLATON (Spek, 2009).

OY thanks the Office of the Higher Education Commission, Thailand, for financial support by a grant fund under the program "Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Joint PhD Program Thai Doctoral Degree".

The authors thank the Thailand Research Fund (BRG5280013) and the Prince of Songkla University for financial support. They also thank Universiti Sains Malaysia for the Research University Golden Goose grant No. 1001/PFIZIK/811012.

Supplementary data and figures for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: HB5551).

References

- Allen, F. H., Kennard, O., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G. & Taylor, R. (1987). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, pp. S1–S19.
- Bruker (2009). *APEX2*, *SAINT* and *SADABS*. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Che, C. T., McPherson, D. D., Cordell, G. A. & Fong, H. H. (1986). *J. Nat. Prod.* **49**, 561–566.
- Cosier, J. & Glazer, A. M. (1986). *J. Appl. Cryst.* **19**, 105–107.
- Cremer, D. & Pople, J. A. (1975). *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1354–1358.
- Flack, H. D. (1983). *Acta Cryst. A* **39**, 876–881.
- Jiang, R.-W., Ma, S.-C., But, P. P.-H. & Mak, T. C. W. (2001). *J. Nat. Prod.* **64**, 1266–1272.
- Patil, A. D., Freyer, A. J., Webb, R. L., Zuber, G., Reichwein, R., Bean, M. F., Faucette, L. & Johnson, R. K. (1997). *Tetrahedron*, **53**, 1583–1592.
- Promsawan, N., Kittakoop, P., Boonphong, S. & Nongkunsarn, P. (2003). *Planta Med.* **69**, 776–777.
- Ragasa, C. Y., Hofilena, J. G. & Rideout, J. A. (2002). *J. Nat. Prod.* **65**, 1107–1110.
- Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst. A* **64**, 112–122.
- Smitinand, T. & Larson, K. (2001). *Flora of Thailand*, p. 94. Bangkok: ASRCT Press.
- Spek, A. L. (2009). *Acta Cryst. D* **65**, 148–155.
- Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S. & Rattanasuwan, P. (2003). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **25**, 509–514.

supplementary materials

Acta Cryst. (2010). E66, o2059-o2060 [doi:10.1107/S1600536810028023]

Absolute configuration of isovouacapenol C

H.-K. Fun, O. Yodsaoue, C. Karalai and S. Chantrapromma

Comment

The plants in Caesalpiniaceae are rich sources of cassane furanoditerpenes. The extracts from plants in this family have been found to possess bioactivities such as antiviral (Jiang *et al.*, 2001), antitumor (Che *et al.*, 1986) and HIV-1 protease inhibitory (Tewtrakul *et al.*, 2003) properties. *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz, locally known as "Hang Nok Yung Thai" (Smitinand & Larson, 2001) is a large perennial shrub or small tree that is widely distributed in tropical areas. The plant has been used for ornamental (Smitinand & Larson, 2001), abortifacient and emmenagogue purposes. Isolated compounds from *C. pulcherrima* exhibits potential fertility regulating, antitumor (Che *et al.*, 1986), antibacterial, antifungal (Ragasa *et al.*, 2002) and anti-tubercular activities (Promsawan *et al.*, 2003). These compounds are also active against DNA repair-deficient yeast mutant (Patil *et al.*, 1997). In the course of our research of chemical constituents and bioactive compounds from the roots of *C. pulcherrima* which were collected from Songkhla province in the southern part of Thailand, the title cassane furanoditerpene (I), also known as isovouacapenol C (Ragasa *et al.*, 2002) or 6 β -cinnamoyl-7 β -hydroxyvouacapen-5 α -ol (Promsawan *et al.*, 2003), was isolated. The previous reports showed that (I) exhibits moderate antimicrobial (Ragasa *et al.*, 2002) and cytotoxic activities (Promsawan *et al.*, 2003). The absolute configuration of (I) was determined by making use of the anomalous scattering of Cu K α X-radiation with the Flack parameter being refined to 0.07 (17). We report herein the crystal structure of (I).

Fig. 1 shows that the molecule of (I) is constructed from the fusion of three cyclohexane rings and a furan ring. The three cyclohexane rings are *trans*-fused. Two cyclohexane rings *A* and *B* are in standard chair conformations whereas ring *C* adopts twisted half-chair conformation with the puckered C8 and C9 atoms having the maximum deviation of -0.306 (1) and 0.280 (2) Å, respectively from the best plane of the remaining four atoms (C11–C14) and with the puckering parameters $Q = 0.4532$ (17) Å and $\theta = 47.1$ (2)° and $\varphi = 23.0$ (3)° (Cremer & Pople, 1975). The furan ring (C12/C13/C15/C16/O1) is planar (*rms* 0.001 (2) Å). Atoms of the benzoate moiety (C21–C27/O3/O4) lie on the same plane with the *rms* 0.009 (2) Å. The orientation of the benzoate group is described by the torsion angles C21–O3–C6–C5 = 136.98 (16)° and C21–O3–C6–C7 = -99.22 (17)°. The bond angles around C12 and C13 atoms are indicative of sp^2 hybridization for these atoms and the bond length of 1.344 (3) Å confirmed the C12=C13 bond. The bond distances in (I) are within normal ranges (Allen *et al.*, 1987) and comparable with the related structures which are caesalmin C, D, E, F and G (Jiang *et al.*, 2001). The absolute configuration at positions 4a, 5, 6, 6a, 7, 11a and 11b of the isovouacapenol C or atoms C5, C6, C7, C8, C14, C9 and C10 were *R,R,R,S,R,S,R* configurations.

The crystal packing of (I) is stabilized by intermolecular O—H $\cdots$ O hydrogen bonds (Table 1). The molecules are linked into infinite one dimensional chains along the [010] through O5—H1O5 $\cdots$ O1 hydrogen bond (Fig. 2 and Table 1). C $\cdots$ O [3.306 (2)–3.347 (2) Å] short contacts and C—H $\cdots$ π interactions were also observed (Table 1); Cg₁ is the centroid of the C12/C13/C15/C16/O1 ring.

Experimental

The air-dried roots of *C. pulcherrima* (6.3 kg) were extracted with CH₂Cl₂ (2 x 2.5 L) for 5 days at room temperature. The combined extracts were concentrated under reduced pressure to afford a dark brownish extract (75.3 g) which was further purified by quick column chromatography (QCC) over silica gel using hexane as eluent and increasing polarity with EtOAc and MeOH to afford 16 fractions (F1-F16). Fraction F4 was then concentrated under reduced pressure to yield the title compound as white solid (10.0 g). Colorless block-shaped single crystals of the compound (I) were recrystallized from CH₂Cl₂ by the slow evaporation of the solvent at room temperature after several days, Mp. 389–391 K.

Refinement

Hydroxy H atoms were located from the difference map and refined isotropically. The remaining H atoms were placed in calculated positions with (C—H) = 0.98 for CH, 0.97 for CH₂ and 0.96 Å for CH₃ atoms. The U_{iso} values were constrained to be 1.5 U_{eq} of the carrier atom for methyl H atoms and 1.2 U_{eq} for the remaining H atoms. A rotating group model was used for the methyl groups. The highest residual electron density peak is located at 0.81 Å from C24 and the deepest hole is located at 0.45 Å from H24A. 1365 Friedel pairs were used to determine the absolute configuration.

Figures

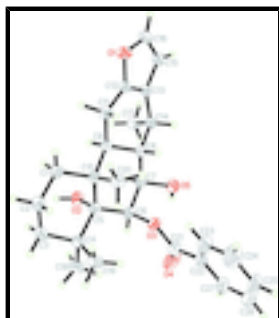


Fig. 1. The structure of (I), showing 50% probability displacement ellipsoids.

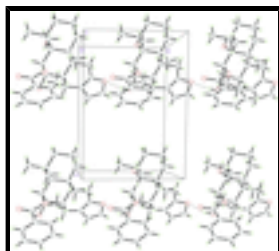


Fig. 2. The crystal packing of (I) viewed along the *c* axis, showing one dimensional chains along [010]. Hydrogen bonds are shown as dashed lines.

(4a*R*,5*R*,6*R*,6a*S*,7*R*,11a*S*,11b*R*)- 4a,6-dihydroxy-4,4,7,11b-tetramethyl-1,2,3,4,4a,5,6,6a,7,11,11a,11b- do-decahydrophenanthro[3,2-*b*]furan-5-yl benzoate

Crystal data

C₂₇H₃₄O₅

M_r = 438.54

Monoclinic, $P2_1$

$F(000)$ = 472

D_x = 1.260 Mg m⁻³

Melting point = 389–391 K

Hall symbol: P 2₁b

$a = 11.6236$ (7) Å

$b = 8.0871$ (5) Å

$c = 12.4193$ (7) Å

$\beta = 98.194$ (3)°

$V = 1155.51$ (12) Å³

$Z = 2$

Cu $K\alpha$ radiation, $\lambda = 1.54178$ Å

Cell parameters from 3328 reflections

$\theta = 3.6\text{--}63.0^\circ$

$\mu = 0.69$ mm⁻¹

$T = 100$ K

Block, colorless

$0.40 \times 0.26 \times 0.16$ mm

Data collection

Bruker APEX DUO CCD
diffractometer

Radiation source: sealed tube

graphite

φ and ω scans

Absorption correction: multi-scan
(*SADABS*; Bruker, 2009)

$T_{\min} = 0.772$, $T_{\max} = 0.896$

23749 measured reflections

3328 independent reflections

3237 reflections with $I > 2\sigma(I)$

$R_{\text{int}} = 0.037$

$\theta_{\max} = 63.0^\circ$, $\theta_{\min} = 3.6^\circ$

$h = -13 \rightarrow 13$

$k = -9 \rightarrow 7$

$l = -14 \rightarrow 13$

Refinement

Refinement on F^2

Least-squares matrix: full

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.031$

$wR(F^2) = 0.077$

$S = 1.05$

3328 reflections

289 parameters

1 restraint

Primary atom site location: structure-invariant direct
methods

Secondary atom site location: difference Fourier map

Hydrogen site location: inferred from neighbouring
sites

H atoms treated by a mixture of independent and
constrained refinement

$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0405P)^2 + 0.2626P]$

where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$

$(\Delta/\sigma)_{\max} = 0.001$

$\Delta\rho_{\max} = 0.26$ e Å⁻³

$\Delta\rho_{\min} = -0.26$ e Å⁻³

Absolute structure: Flack (1983), 1365 Friedel pairs

Flack parameter: 0.07 (17)

Special details

Experimental. The crystal was placed in the cold stream of an Oxford Cryosystems Cobra open-flow nitrogen cryostat (Cosier & Glazer, 1986) operating at 100.0 (1) K.

Geometry. All esds (except the esd in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell esds are taken into account individually in the estimation of esds in distances, angles and torsion angles; correlations between esds in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell esds is used for estimating esds involving l.s. planes.

Refinement. Refinement of F^2 against ALL reflections. The weighted R-factor wR and goodness of fit S are based on F^2 , conventional R-factors R are based on F , with F set to zero for negative F^2 . The threshold expression of $F^2 > 2\sigma(F^2)$ is used only for calculat-

ing R-factors(gt) etc. and is not relevant to the choice of reflections for refinement. R-factors based on F^2 are statistically about twice as large as those based on F , and R- factors based on ALL data will be even larger.

Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2$)

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	$U_{\text{iso}}^*/U_{\text{eq}}$
O1	0.72763 (10)	0.79601 (16)	0.98396 (10)	0.0293 (3)
O2	1.00416 (11)	0.14126 (17)	0.87430 (10)	0.0289 (3)
H1O2	1.074 (2)	0.170 (3)	0.8862 (19)	0.053 (8)*
O3	0.77060 (10)	0.12442 (16)	0.64968 (9)	0.0277 (3)
O4	0.73247 (15)	−0.1497 (2)	0.63427 (14)	0.0558 (5)
O5	0.65515 (11)	0.06283 (18)	0.82285 (11)	0.0305 (3)
H1O5	0.666 (2)	−0.039 (4)	0.839 (2)	0.064 (9)*
C1	1.05196 (15)	0.4722 (2)	0.79744 (15)	0.0294 (4)
H1A	1.0406	0.5910	0.7942	0.035*
H1B	1.0862	0.4444	0.8711	0.035*
C2	1.13691 (16)	0.4242 (3)	0.71969 (17)	0.0366 (5)
H2A	1.1075	0.4634	0.6472	0.044*
H2B	1.2111	0.4775	0.7426	0.044*
C3	1.15455 (16)	0.2376 (3)	0.71644 (17)	0.0362 (5)
H3A	1.1915	0.2007	0.7873	0.043*
H3B	1.2066	0.2125	0.6642	0.043*
C4	1.04021 (15)	0.1404 (3)	0.68549 (15)	0.0290 (4)
C5	0.95342 (15)	0.1960 (2)	0.76622 (14)	0.0248 (4)
C6	0.83929 (14)	0.0968 (2)	0.75469 (14)	0.0246 (4)
H6A	0.8589	−0.0210	0.7607	0.030*
C7	0.76787 (14)	0.1395 (2)	0.84429 (13)	0.0241 (4)
H7A	0.8081	0.0951	0.9129	0.029*
C8	0.74771 (14)	0.3233 (2)	0.85970 (14)	0.0218 (4)
H8A	0.6980	0.3625	0.7943	0.026*
C9	0.86259 (14)	0.4231 (2)	0.86921 (14)	0.0225 (4)
H9A	0.9111	0.3876	0.9363	0.027*
C10	0.93235 (15)	0.3867 (2)	0.77260 (14)	0.0239 (4)
C11	0.84125 (15)	0.6107 (2)	0.87951 (15)	0.0274 (4)
H11A	0.9126	0.6649	0.9112	0.033*
H11B	0.8171	0.6578	0.8080	0.033*
C12	0.74973 (14)	0.6380 (2)	0.94925 (14)	0.0251 (4)
C13	0.67533 (14)	0.5290 (2)	0.98321 (15)	0.0237 (4)
C14	0.67929 (15)	0.3493 (2)	0.95730 (14)	0.0250 (4)
H14A	0.5992	0.3129	0.9341	0.030*
C15	0.60120 (15)	0.6225 (2)	1.04398 (14)	0.0288 (4)
H15A	0.5411	0.5813	1.0783	0.035*
C16	0.63540 (16)	0.7802 (3)	1.04160 (16)	0.0313 (4)
H16A	0.6015	0.8674	1.0744	0.038*
C17	0.72635 (18)	0.2509 (2)	1.05976 (15)	0.0336 (5)
H17A	0.6865	0.2843	1.1188	0.050*
H17B	0.8080	0.2718	1.0785	0.050*
H17C	0.7139	0.1350	1.0461	0.050*

C18	1.06580 (18)	−0.0460 (3)	0.69936 (17)	0.0389 (5)
H18A	1.1315	−0.0740	0.6641	0.058*
H18B	0.9992	−0.1080	0.6672	0.058*
H18C	1.0826	−0.0720	0.7754	0.058*
C19	1.00152 (17)	0.1669 (3)	0.56272 (15)	0.0369 (5)
H19A	1.0538	0.1099	0.5223	0.055*
H19B	1.0024	0.2830	0.5465	0.055*
H19C	0.9243	0.1245	0.5430	0.055*
C20	0.86451 (16)	0.4592 (2)	0.66677 (14)	0.0273 (4)
H20A	0.8826	0.5745	0.6617	0.041*
H20B	0.7826	0.4463	0.6678	0.041*
H20C	0.8863	0.4017	0.6051	0.041*
C21	0.72050 (17)	−0.0116 (3)	0.59848 (17)	0.0360 (5)
C22	0.65118 (16)	0.0302 (3)	0.49182 (17)	0.0376 (5)
C23	0.63903 (19)	0.1895 (3)	0.45270 (17)	0.0479 (6)
H23A	0.6747	0.2767	0.4935	0.058*
C24	0.5734 (2)	0.2196 (4)	0.35231 (19)	0.0622 (5)
H24A	0.5638	0.3268	0.3255	0.075*
C25	0.5217 (2)	0.0850 (4)	0.2917 (2)	0.0622 (5)
H25A	0.4782	0.1041	0.2240	0.075*
C26	0.5340 (2)	−0.0717 (4)	0.33011 (19)	0.0622 (5)
H26A	0.4992	−0.1592	0.2891	0.075*
C27	0.59853 (17)	−0.1005 (3)	0.43053 (18)	0.0481 (6)
H27A	0.6069	−0.2078	0.4574	0.058*

Atomic displacement parameters ($\text{\AA}^2$)

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{12}	U^{13}	U^{23}
O1	0.0331 (6)	0.0197 (7)	0.0365 (7)	−0.0005 (5)	0.0095 (5)	−0.0016 (5)
O2	0.0268 (7)	0.0338 (8)	0.0243 (6)	0.0014 (6)	−0.0022 (5)	0.0040 (6)
O3	0.0287 (6)	0.0291 (7)	0.0236 (6)	−0.0015 (5)	−0.0019 (5)	−0.0036 (5)
O4	0.0678 (11)	0.0314 (11)	0.0606 (10)	−0.0050 (8)	−0.0172 (8)	−0.0079 (8)
O5	0.0286 (7)	0.0240 (8)	0.0393 (8)	−0.0063 (5)	0.0060 (6)	0.0004 (6)
C1	0.0276 (9)	0.0312 (12)	0.0305 (10)	−0.0040 (8)	0.0079 (8)	−0.0014 (8)
C2	0.0291 (9)	0.0439 (14)	0.0392 (12)	−0.0084 (9)	0.0130 (8)	−0.0051 (9)
C3	0.0263 (9)	0.0469 (14)	0.0369 (11)	0.0003 (9)	0.0097 (8)	−0.0052 (9)
C4	0.0288 (9)	0.0301 (11)	0.0288 (9)	0.0044 (8)	0.0065 (7)	−0.0029 (8)
C5	0.0248 (9)	0.0301 (11)	0.0185 (9)	0.0028 (7)	−0.0005 (7)	0.0022 (7)
C6	0.0281 (9)	0.0213 (11)	0.0232 (9)	−0.0003 (7)	−0.0010 (7)	−0.0006 (7)
C7	0.0243 (8)	0.0217 (10)	0.0252 (9)	−0.0029 (7)	−0.0002 (7)	0.0013 (8)
C8	0.0229 (8)	0.0207 (10)	0.0218 (9)	0.0000 (7)	0.0026 (7)	0.0023 (7)
C9	0.0234 (8)	0.0242 (10)	0.0194 (8)	−0.0011 (7)	0.0016 (6)	0.0020 (7)
C10	0.0251 (9)	0.0263 (11)	0.0211 (9)	−0.0026 (7)	0.0058 (7)	0.0006 (7)
C11	0.0306 (9)	0.0247 (11)	0.0281 (9)	−0.0065 (8)	0.0092 (7)	0.0004 (8)
C12	0.0266 (9)	0.0224 (10)	0.0257 (9)	0.0011 (8)	0.0016 (7)	0.0002 (8)
C13	0.0220 (9)	0.0233 (11)	0.0255 (9)	0.0016 (7)	0.0027 (7)	0.0019 (7)
C14	0.0220 (8)	0.0250 (11)	0.0282 (9)	−0.0036 (7)	0.0043 (7)	0.0006 (8)
C15	0.0246 (8)	0.0290 (12)	0.0337 (10)	0.0013 (8)	0.0074 (7)	0.0017 (8)

supplementary materials

C16	0.0300 (9)	0.0266 (12)	0.0393 (11)	0.0047 (8)	0.0117 (8)	−0.0020 (8)
C17	0.0486 (11)	0.0251 (12)	0.0291 (10)	0.0025 (8)	0.0127 (9)	0.0047 (8)
C18	0.0398 (11)	0.0367 (13)	0.0405 (12)	0.0101 (9)	0.0069 (9)	−0.0042 (9)
C19	0.0415 (11)	0.0432 (14)	0.0281 (10)	0.0028 (9)	0.0129 (8)	−0.0046 (9)
C20	0.0358 (10)	0.0246 (11)	0.0228 (9)	−0.0011 (8)	0.0088 (7)	0.0029 (7)
C21	0.0319 (10)	0.0379 (14)	0.0370 (11)	−0.0010 (9)	0.0011 (8)	−0.0091 (10)
C22	0.0247 (9)	0.0591 (16)	0.0285 (10)	0.0002 (9)	0.0020 (8)	−0.0113 (10)
C23	0.0408 (12)	0.0675 (19)	0.0327 (12)	0.0012 (11)	−0.0042 (9)	−0.0043 (11)
C24	0.0404 (7)	0.1039 (14)	0.0392 (8)	0.0010 (8)	−0.0052 (6)	−0.0099 (8)
C25	0.0404 (7)	0.1039 (14)	0.0392 (8)	0.0010 (8)	−0.0052 (6)	−0.0099 (8)
C26	0.0404 (7)	0.1039 (14)	0.0392 (8)	0.0010 (8)	−0.0052 (6)	−0.0099 (8)
C27	0.0267 (10)	0.0698 (18)	0.0466 (13)	−0.0034 (10)	0.0011 (9)	−0.0195 (12)

Geometric parameters (Å, °)

O1—C16	1.377 (2)	C11—C12	1.481 (2)
O1—C12	1.384 (2)	C11—H11A	0.9700
O2—C5	1.456 (2)	C11—H11B	0.9700
O2—H1O2	0.84 (3)	C12—C13	1.344 (3)
O3—C21	1.359 (2)	C13—C15	1.438 (3)
O3—C6	1.446 (2)	C13—C14	1.490 (3)
O4—C21	1.203 (3)	C14—C17	1.534 (3)
O5—C7	1.440 (2)	C14—H14A	0.9800
O5—H1O5	0.85 (3)	C15—C16	1.338 (3)
C1—C2	1.526 (2)	C15—H15A	0.9300
C1—C10	1.544 (2)	C16—H16A	0.9300
C1—H1A	0.9700	C17—H17A	0.9600
C1—H1B	0.9700	C17—H17B	0.9600
C2—C3	1.524 (3)	C17—H17C	0.9600
C2—H2A	0.9700	C18—H18A	0.9600
C2—H2B	0.9700	C18—H18B	0.9600
C3—C4	1.545 (3)	C18—H18C	0.9600
C3—H3A	0.9700	C19—H19A	0.9600
C3—H3B	0.9700	C19—H19B	0.9600
C4—C18	1.541 (3)	C19—H19C	0.9600
C4—C19	1.542 (3)	C20—H20A	0.9600
C4—C5	1.586 (2)	C20—H20B	0.9600
C5—C6	1.539 (2)	C20—H20C	0.9600
C5—C10	1.565 (3)	C21—C22	1.488 (3)
C6—C7	1.520 (2)	C22—C23	1.377 (3)
C6—H6A	0.9800	C22—C27	1.392 (3)
C7—C8	1.522 (3)	C23—C24	1.387 (3)
C7—H7A	0.9800	C23—H23A	0.9300
C8—C9	1.550 (2)	C24—C25	1.409 (4)
C8—C14	1.556 (2)	C24—H24A	0.9300
C8—H8A	0.9800	C25—C26	1.355 (4)
C9—C11	1.546 (3)	C25—H25A	0.9300
C9—C10	1.569 (2)	C26—C27	1.381 (3)
C9—H9A	0.9800	C26—H26A	0.9300

C10—C20	1.548 (2)	C27—H27A	0.9300
C16—O1—C12	105.61 (14)	C12—C11—H11B	109.8
C5—O2—H1O2	109.4 (17)	C9—C11—H11B	109.8
C21—O3—C6	116.21 (15)	H11A—C11—H11B	108.2
C7—O5—H1O5	105.5 (18)	C13—C12—O1	110.58 (15)
C2—C1—C10	113.90 (15)	C13—C12—C11	129.30 (17)
C2—C1—H1A	108.8	O1—C12—C11	120.04 (15)
C10—C1—H1A	108.8	C12—C13—C15	106.26 (16)
C2—C1—H1B	108.8	C12—C13—C14	122.06 (16)
C10—C1—H1B	108.8	C15—C13—C14	131.68 (16)
H1A—C1—H1B	107.7	C13—C14—C17	110.19 (15)
C3—C2—C1	111.70 (17)	C13—C14—C8	109.57 (14)
C3—C2—H2A	109.3	C17—C14—C8	114.49 (15)
C1—C2—H2A	109.3	C13—C14—H14A	107.4
C3—C2—H2B	109.3	C17—C14—H14A	107.4
C1—C2—H2B	109.3	C8—C14—H14A	107.4
H2A—C2—H2B	107.9	C16—C15—C13	106.71 (16)
C2—C3—C4	113.34 (16)	C16—C15—H15A	126.6
C2—C3—H3A	108.9	C13—C15—H15A	126.6
C4—C3—H3A	108.9	C15—C16—O1	110.84 (16)
C2—C3—H3B	108.9	C15—C16—H16A	124.6
C4—C3—H3B	108.9	O1—C16—H16A	124.6
H3A—C3—H3B	107.7	C14—C17—H17A	109.5
C18—C4—C19	105.75 (16)	C14—C17—H17B	109.5
C18—C4—C3	108.93 (16)	H17A—C17—H17B	109.5
C19—C4—C3	107.13 (16)	C14—C17—H17C	109.5
C18—C4—C5	109.68 (16)	H17A—C17—H17C	109.5
C19—C4—C5	117.61 (15)	H17B—C17—H17C	109.5
C3—C4—C5	107.49 (15)	C4—C18—H18A	109.5
O2—C5—C6	99.09 (14)	C4—C18—H18B	109.5
O2—C5—C10	107.37 (14)	H18A—C18—H18B	109.5
C6—C5—C10	112.28 (14)	C4—C18—H18C	109.5
O2—C5—C4	106.62 (13)	H18A—C18—H18C	109.5
C6—C5—C4	114.27 (15)	H18B—C18—H18C	109.5
C10—C5—C4	115.46 (15)	C4—C19—H19A	109.5
O3—C6—C7	109.65 (13)	C4—C19—H19B	109.5
O3—C6—C5	111.17 (14)	H19A—C19—H19B	109.5
C7—C6—C5	111.53 (14)	C4—C19—H19C	109.5
O3—C6—H6A	108.1	H19A—C19—H19C	109.5
C7—C6—H6A	108.1	H19B—C19—H19C	109.5
C5—C6—H6A	108.1	C10—C20—H20A	109.5
O5—C7—C6	110.15 (14)	C10—C20—H20B	109.5
O5—C7—C8	106.96 (14)	H20A—C20—H20B	109.5
C6—C7—C8	115.08 (14)	C10—C20—H20C	109.5
O5—C7—H7A	108.1	H20A—C20—H20C	109.5
C6—C7—H7A	108.1	H20B—C20—H20C	109.5
C8—C7—H7A	108.1	O4—C21—O3	124.00 (18)
C7—C8—C9	111.82 (13)	O4—C21—C22	124.02 (19)
C7—C8—C14	109.57 (14)	O3—C21—C22	111.97 (19)

supplementary materials

C9—C8—C14	113.63 (13)	C23—C22—C27	120.2 (2)
C7—C8—H8A	107.2	C23—C22—C21	122.82 (19)
C9—C8—H8A	107.2	C27—C22—C21	117.0 (2)
C14—C8—H8A	107.2	C22—C23—C24	119.8 (2)
C11—C9—C8	111.75 (14)	C22—C23—H23A	120.1
C11—C9—C10	110.75 (14)	C24—C23—H23A	120.1
C8—C9—C10	112.18 (14)	C23—C24—C25	118.9 (3)
C11—C9—H9A	107.3	C23—C24—H24A	120.6
C8—C9—H9A	107.3	C25—C24—H24A	120.6
C10—C9—H9A	107.3	C26—C25—C24	121.3 (2)
C1—C10—C20	109.58 (15)	C26—C25—H25A	119.4
C1—C10—C5	107.96 (14)	C24—C25—H25A	119.4
C20—C10—C5	113.24 (15)	C25—C26—C27	119.5 (3)
C1—C10—C9	108.18 (14)	C25—C26—H26A	120.2
C20—C10—C9	108.77 (14)	C27—C26—H26A	120.2
C5—C10—C9	108.99 (14)	C26—C27—C22	120.4 (3)
C12—C11—C9	109.39 (14)	C26—C27—H27A	119.8
C12—C11—H11A	109.8	C22—C27—H27A	119.8
C9—C11—H11A	109.8		
C10—C1—C2—C3	−55.8 (2)	C6—C5—C10—C9	56.19 (18)
C1—C2—C3—C4	56.5 (2)	C4—C5—C10—C9	−170.43 (13)
C2—C3—C4—C18	−172.61 (16)	C11—C9—C10—C1	62.08 (18)
C2—C3—C4—C19	73.4 (2)	C8—C9—C10—C1	−172.31 (14)
C2—C3—C4—C5	−53.8 (2)	C11—C9—C10—C20	−56.87 (18)
C18—C4—C5—O2	52.99 (19)	C8—C9—C10—C20	68.74 (18)
C19—C4—C5—O2	173.81 (17)	C11—C9—C10—C5	179.23 (13)
C3—C4—C5—O2	−65.30 (19)	C8—C9—C10—C5	−55.16 (18)
C18—C4—C5—C6	−55.39 (19)	C8—C9—C11—C12	38.72 (19)
C19—C4—C5—C6	65.4 (2)	C10—C9—C11—C12	164.58 (13)
C3—C4—C5—C6	−173.68 (15)	C16—O1—C12—C13	0.04 (18)
C18—C4—C5—C10	172.14 (15)	C16—O1—C12—C11	177.07 (15)
C19—C4—C5—C10	−67.0 (2)	C9—C11—C12—C13	−13.3 (3)
C3—C4—C5—C10	53.85 (19)	C9—C11—C12—O1	170.25 (14)
C21—O3—C6—C7	−99.22 (17)	O1—C12—C13—C15	−0.31 (19)
C21—O3—C6—C5	136.98 (16)	C11—C12—C13—C15	−176.98 (17)
O2—C5—C6—O3	−178.22 (14)	O1—C12—C13—C14	179.95 (15)
C10—C5—C6—O3	68.69 (18)	C11—C12—C13—C14	3.3 (3)
C4—C5—C6—O3	−65.27 (18)	C12—C13—C14—C17	108.18 (19)
O2—C5—C6—C7	59.06 (17)	C15—C13—C14—C17	−71.5 (2)
C10—C5—C6—C7	−54.03 (19)	C12—C13—C14—C8	−18.7 (2)
C4—C5—C6—C7	172.01 (15)	C15—C13—C14—C8	161.67 (17)
O3—C6—C7—O5	48.39 (19)	C7—C8—C14—C13	171.36 (14)
C5—C6—C7—O5	171.97 (14)	C9—C8—C14—C13	45.48 (19)
O3—C6—C7—C8	−72.59 (18)	C7—C8—C14—C17	47.00 (19)
C5—C6—C7—C8	50.99 (19)	C9—C8—C14—C17	−78.89 (19)
O5—C7—C8—C9	−172.92 (13)	C12—C13—C15—C16	0.5 (2)
C6—C7—C8—C9	−50.21 (18)	C14—C13—C15—C16	−179.83 (19)
O5—C7—C8—C14	60.18 (16)	C13—C15—C16—O1	−0.4 (2)
C6—C7—C8—C14	−177.12 (13)	C12—O1—C16—C15	0.3 (2)

C7—C8—C9—C11	177.36 (14)	C6—O3—C21—O4	−1.7 (3)
C14—C8—C9—C11	−57.96 (18)	C6—O3—C21—C22	179.54 (14)
C7—C8—C9—C10	52.30 (18)	O4—C21—C22—C23	−179.9 (2)
C14—C8—C9—C10	176.98 (14)	O3—C21—C22—C23	−1.1 (3)
C2—C1—C10—C20	−71.1 (2)	O4—C21—C22—C27	−0.6 (3)
C2—C1—C10—C5	52.7 (2)	O3—C21—C22—C27	178.17 (17)
C2—C1—C10—C9	170.49 (16)	C27—C22—C23—C24	0.5 (3)
O2—C5—C10—C1	65.60 (17)	C21—C22—C23—C24	179.76 (19)
C6—C5—C10—C1	173.47 (14)	C22—C23—C24—C25	−0.8 (3)
C4—C5—C10—C1	−53.14 (18)	C23—C24—C25—C26	0.6 (4)
O2—C5—C10—C20	−172.90 (13)	C24—C25—C26—C27	0.0 (4)
C6—C5—C10—C20	−65.02 (18)	C25—C26—C27—C22	−0.3 (3)
C4—C5—C10—C20	68.36 (18)	C23—C22—C27—C26	0.1 (3)
O2—C5—C10—C9	−51.69 (17)	C21—C22—C27—C26	−179.21 (19)

Hydrogen-bond geometry (Å, °)

Cg1 is the centroid of the C12—C16/O1 ring.

<i>D</i> —H $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> —H	H $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> —H $\cdots$ <i>A</i>
O5—H1O5 $\cdots$ O1 ⁱ	0.85 (2)	2.27 (3)	2.9814 (19)	141 (2)
C19—H19C $\cdots$ O3	0.96	2.37	3.052 (2)	128
C3—H3A $\cdots$ Cg1 ⁱⁱ	0.97	2.86	3.805 (2)	166

Symmetry codes: (i) *x*, *y*−1, *z*; (ii) −*x*+2, *y*−1/2, −*z*+2.

Fig. 1

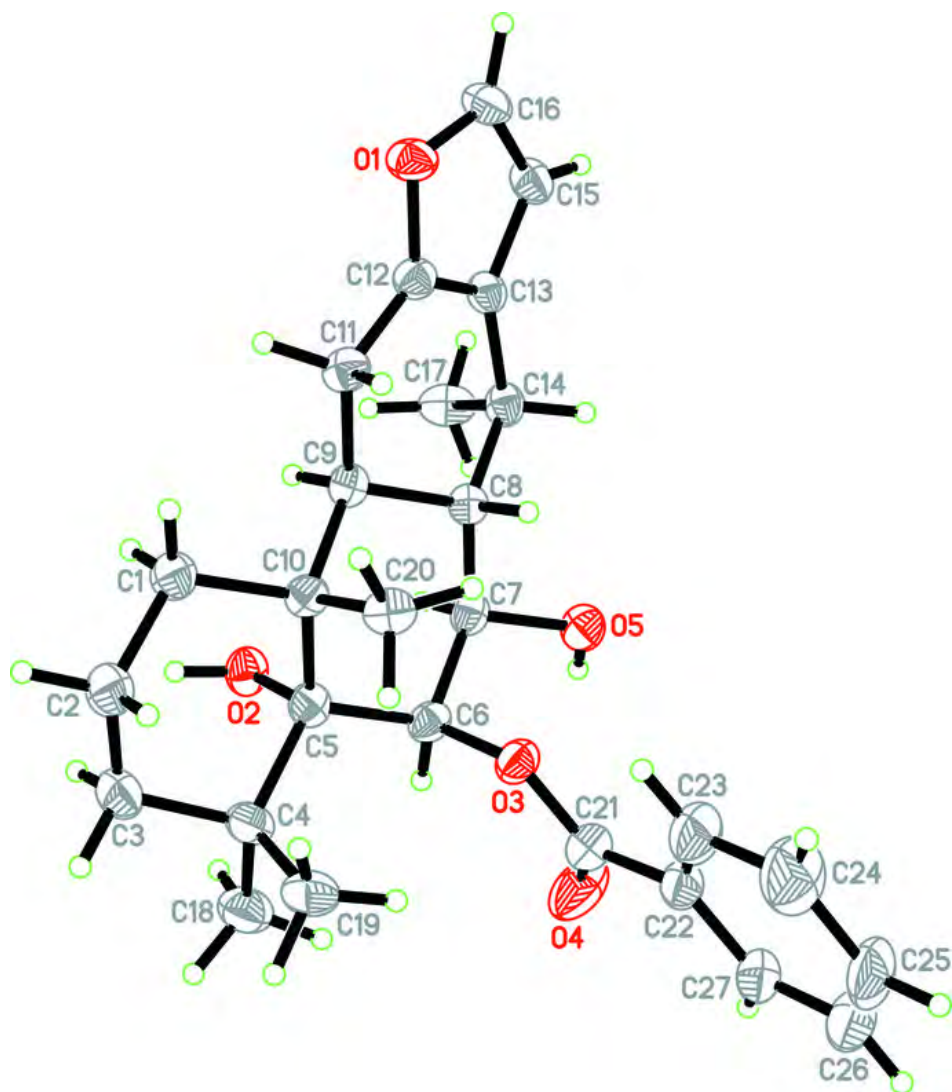
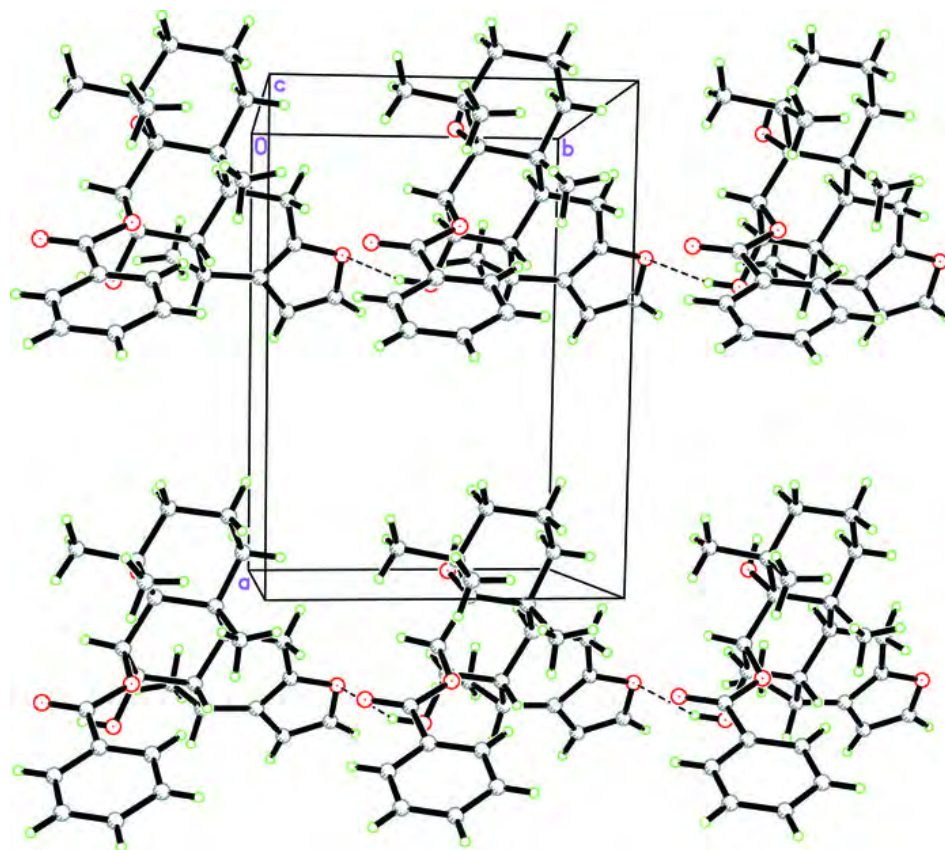


Fig. 2



Absolute configuration of vouacapen-5 α -ol

Hoong-Kun Fun,^{a,*} Orapun Yodsaoe,^b Suchada Chantrapromma^c§ and Chatchanok Karalai^b

^aX-ray Crystallography Unit, School of Physics, Universiti Sains Malaysia, 11800 USM, Penang, Malaysia, ^bDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand, and ^cCrystal Materials Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand
Correspondence e-mail: hkfun@usm.my

Received 22 July 2010; accepted 25 July 2010

Key indicators: single-crystal X-ray study; $T = 100$ K; mean $\sigma(\text{C}-\text{C}) = 0.002$ Å; R factor = 0.027; wR factor = 0.088; data-to-parameter ratio = 13.9.

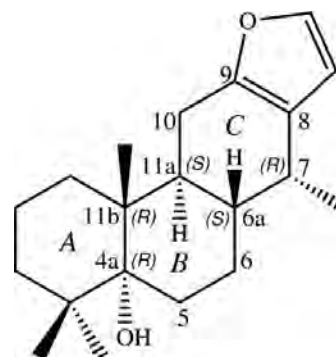
The title compound, $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$, {systematic name: (4a*R*,6a*S*,7*R*,11a*S*,11b*R*)-4,4,7,11b-tetramethyl-1,2,3,4,4a,5,6,6a,7,11,11a,11b-dodecahydrophenanthro[3,2-*b*]furan-4a-ol}, is a cassane furanoditerpene which was isolated from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*. The absolute configurations at positions 4a, 6a, 7, 11a and 11b are *R*, *S*, *R*, *S* and *R*, respectively. The molecule has four-fused rings consisting of three cyclohexane rings and one furan ring. The three cyclohexane rings are *trans*-fused. Two cyclohexane rings are in chair conformations, while the third is in an envelope conformation. In the crystal structure, the molecules are linked by intermolecular $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ hydrogen bonds into a zigzag chain along the *a* axis. A short $\text{O}\cdots\text{O}$ contact [3.0398 (14) Å] is also present.

Related literature

For ring conformations, see: Cremer & Pople (1975). For bond-length data, see: Allen *et al.* (1987). For background to cassane furanoditerpenes and their biological activities, see: Che *et al.* (1986); Jiang *et al.* (2001); McPherson *et al.* (1986); Promsawan *et al.* (2003); Ragasa *et al.* (2002); Smitinand & Larson (2001); Tewtrakul *et al.* (2003). For related structures, see: Fun *et al.* (2010); Jiang *et al.* (2001). For the stability of the temperature controller used in the data collection, see: Cosier & Glazer (1986).

* Thomson Reuters ResearcherID: A-3561-2009.

§ Additional correspondence author, e-mail: suchada.c@psu.ac.th. Thomson Reuters ResearcherID: A-5085-2009.



Experimental

Crystal data

$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$
 $M_r = 302.44$
Orthorhombic, $P2_12_12_1$
 $a = 6.7367$ (2) Å
 $b = 12.7818$ (3) Å
 $c = 19.3472$ (5) Å

$V = 1665.93$ (8) Å³
 $Z = 4$
Cu $K\alpha$ radiation
 $\mu = 0.58$ mm⁻¹
 $T = 100$ K
0.29 × 0.22 × 0.17 mm

Data collection

Bruker APEX DUO CCD area-detector diffractometer
Absorption correction: multi-scan (SADABS; Bruker, 2009)
 $T_{\min} = 0.851$, $T_{\max} = 0.908$

30751 measured reflections
2880 independent reflections
2856 reflections with $I > 2\sigma(I)$
 $R_{\text{int}} = 0.028$

Refinement

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.027$
 $wR(F^2) = 0.088$
 $S = 1.16$
2880 reflections
207 parameters
H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement

$\Delta\rho_{\max} = 0.21$ e Å⁻³
 $\Delta\rho_{\min} = -0.25$ e Å⁻³
Absolute structure: Flack (1983), 1202 Friedel pairs
Flack parameter: 0.0 (2)

Table 1

Hydrogen-bond geometry (Å, °).

$D-\text{H}\cdots A$	$D-\text{H}$	$\text{H}\cdots A$	$D\cdots A$	$D-\text{H}\cdots A$
$\text{O2}-\text{H1O2}\cdots\text{O1}^i$	0.854 (19)	2.246 (19)	3.0398 (14)	154.7 (18)

Symmetry code: (i) $x - \frac{1}{2}, -y + \frac{3}{2}, -z$.

Data collection: APEX2 (Bruker, 2009); cell refinement: SAINT (Bruker, 2009); data reduction: SAINT; program(s) used to solve structure: SHELXTL (Sheldrick, 2008); program(s) used to refine structure: SHELXTL; molecular graphics: SHELXTL; software used to prepare material for publication: SHELXTL and PLATON (Spek, 2009).

OY thanks the Office of the Higher Education Commission, Thailand, for financial support by a grant fund under the program "Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Joint PhD Program Thai Doctoral Degree". The authors thank the Thailand Research Fund (BRG5280013) and Prince of Songkla University for financial support. The authors also thank Universiti Sains Malaysia for

the Research University Golden Goose grant No. 1001/PFIZIK/811012.

Supplementary data and figures for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: IS2581).

References

- Allen, F. H., Kennard, O., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G. & Taylor, R. (1987). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, pp. S1–19.
- Bruker (2009). *APEX2*, *SAINT* and *SADABS*. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Che, C. T., McPherson, D. D., Cordell, G. A. & Fong, H. H. (1986). *J. Nat. Prod.* **49**, 561–566.
- Cosier, J. & Glazer, A. M. (1986). *J. Appl. Cryst.* **19**, 105–107.
- Cremer, D. & Pople, J. A. (1975). *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1354–1358.
- Flack, H. D. (1983). *Acta Cryst.* **A39**, 876–881.
- Fun, H.-K., Yodsaoue, O., Karalai, C. & Chantapromma, S. (2010). *Acta Cryst.* **E66**, o2059–o2060.
- Jiang, R.-W., Ma, S.-C., But, P. P.-H. & Mak, T. C. W. (2001). *J. Nat. Prod.* **64**, 1266–1272.
- McPherson, D. D., Che, C. T., Cordell, G. A., Soejarto, D. D., Pezzuto, J. M. & Fong, H. H. S. (1986). *Phytochemistry*, **25**, 167–170.
- Promsawan, N., Kittakoo, P., Boonphong, S. & Nongkunsarn, P. (2003). *Planta Med.* **69**, 776–777.
- Ragasa, C. Y., Hofilena, J. G. & Rideout, J. A. (2002). *J. Nat. Prod.* **65**, 1107–1110.
- Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst.* **A64**, 112–122.
- Smitinand, T. & Larson, K. (2001). *Flora of Thailand*. Bangkok: ASRCT Press.
- Spek, A. L. (2009). *Acta Cryst.* **D65**, 148–155.
- Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S. & Rattanasuwan, P. (2003). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **25**, 509–514.

supplementary materials

Acta Cryst. (2010). E66, o2166-o2167 [doi:10.1107/S1600536810029557]

Absolute configuration of vouacapen-5 α -ol

H.-K. Fun, O. Yodsaoue, S. Chantrapromma and C. Karalai

Comment

Cassane furanoditerpenes have been found from the plants in the family *Caesalpiniaceae*. The isolated compounds from plants in this family have been reported to show various of bioactivities such as antitumor (Che *et al.*, 1986), antifungal (Ragasa *et al.*, 2002), anti-tubercular (Promsawan *et al.*, 2003), antiviral (Jiang *et al.*, 2001) and HIV-1 protease inhibitory (Tewtrakul *et al.*, 2003) activities. During the course of our research on bioactive compounds from natural-occurring sources, the title cassane furanoditerpene (I) which known as vouacapen-5 α -ol (McPherson *et al.*, 1986) was isolated from *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz, a small tree which has been used as ornamental (Smitinand & Larson, 2001), abortifacient and emmenagogue purposes. We previously reported the absolute configuration of a cassane furanoditerpene namely isovouacapenol C (Fun *et al.*, 2010) which was isolated from the same plant. Herein the absolute configuration of another cassane furanoditerpene was determined by making use of the anomalous scattering of Cu K α radiation with the Flack parameter being refined to 0.0 (2) and its crystal structure is reported.

The molecule of the title compound (Fig. 1) is constructed from the fusion of three cyclohexane rings and a furan ring. The three cyclohexane rings which have different conformations are *trans*-fused. Two cyclohexane rings *A* and *B* are in chair conformations whereas the third (ring *C*) adopts an envelope conformation with the puckered C8 atom having the maximum deviation of 0.3012 (14) Å from the best plane of the remaining five atoms (C9/C11–C14) and with the puckering parameters $Q = 0.4287$ (14) Å and $\theta = 49.88$ (19)° and $\phi = 5.6$ (3)° (Cremer & Pople, 1975). The furan ring (C12/C13/C15/C16/O1) is planar (*rms* 0.0023 (2) Å). The bond distances in (I) are within normal ranges (Allen *et al.*, 1987) and comparable with the related structures which are caesalmin C, D, E, F and G (Jiang *et al.*, 2001) and isovouacapenol C (Fun *et al.*, 2010). The absolute configurations at positions 4a, 6a, 7, 11a and 11b of the vouacapen-5 α -ol or atoms C5, C8, C14, C9 and C10 are *R,S,R,S,R* configurations.

The crystal packing of (I) is stabilized by intermolecular O—H $\cdots$ O hydrogen bonds (Table 1). The molecules are linked into infinite one dimensional chains along the [100] through O2—H1O2 $\cdots$ O1 hydrogen bonds (Fig. 2 and Table 1). O $\cdots$ O [3.0398 (14) Å; symmetry codes $-1/2+x$, $3/2-y$, $-z$ and $1/2+x$, $3/2-y$, $-z$] short contacts were observed.

Experimental

The air-dried roots of *C. pulcherrima* (6.3 kg) were extracted with CH₂Cl₂ (2 $\times$ 2.5 L) for 5 days at room temperature. The combined extracts were concentrated under reduced pressure to afford a dark brownish extract (75.3 g) which was further purified by quick column chromatography (QCC) over silica gel using hexane as eluent and increasing polarity with EtOAc and MeOH to afford 16 fractions (F1-F16). Fraction F2 (5.9 g) was further purified by QCC with hexane-CH₂Cl₂ (1:4), yielding the title compound as white solid (50.2 g). Colorless block-shaped single crystals of the title compound suitable for *x*-ray structure determination were recrystallized from CH₂Cl₂ by the slow evaporation of the solvent at room temperature after several days (m.p. 371–373 K).

Refinement

Hydroxy H atoms were located in a difference map and refined isotropically. The remaining H atoms were placed in calculated positions with (C—H) = 0.98 for CH, 0.97 for CH₂ and 0.96 Å for CH₃ atoms. The $U_{\text{iso}}(\text{H})$ values were constrained to be $1.5U_{\text{eq}}$ of the carrier atom for methyl H atoms and $1.2U_{\text{eq}}$ for the remaining H atoms. A rotating group model was used for the methyl groups. The highest residual electron density peak is located at 0.73 Å from C4 and the deepest hole is located at 1.32 Å from C17. 1202 Friedel pairs were used to determine the absolute configuration.

Figures

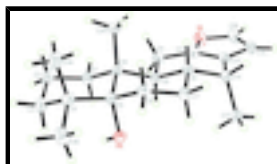


Fig. 1. The structure of (I), showing 50% probability displacement ellipsoids and the atom-numbering scheme.

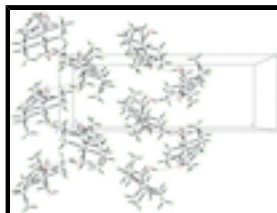


Fig. 2. The crystal packing of (I) viewed along the *b* axis, showing one dimensional chains along the [100]. O—H...O hydrogen bonds are shown as dashed lines.

(4a*R*,6a*S*,7*R*,11a*S*,11b*R*)-4,4,7,11b-tetramethyl-1,2,3,4,4a,5,6,6a,7,11,11a,11b-dodecahydrophenanthro[3,2-*b*]furan-4a-ol

Crystal data

$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$	$D_x = 1.206 \text{ Mg m}^{-3}$
$M_r = 302.44$	Melting point = 371–373 K
Orthorhombic, $P2_12_12_1$	Cu $K\alpha$ radiation, $\lambda = 1.54178 \text{ Å}$
Hall symbol: P 2ac 2ab	Cell parameters from 2880 reflections
$a = 6.7367 (2) \text{ Å}$	$\theta = 4.6\text{--}66.0^\circ$
$b = 12.7818 (3) \text{ Å}$	$\mu = 0.58 \text{ mm}^{-1}$
$c = 19.3472 (5) \text{ Å}$	$T = 100 \text{ K}$
$V = 1665.93 (8) \text{ Å}^3$	Block, colorless
$Z = 4$	$0.29 \times 0.22 \times 0.17 \text{ mm}$
$F(000) = 664$	

Data collection

Bruker APEX DUO CCD area-detector diffractometer	2880 independent reflections
Radiation source: sealed tube graphite	2856 reflections with $I > 2\sigma(I)$
φ and ω scans	$R_{\text{int}} = 0.028$
	$\theta_{\text{max}} = 66.0^\circ$, $\theta_{\text{min}} = 4.6^\circ$

Absorption correction: multi-scan
(*SADABS*; Bruker, 2009)

$T_{\min} = 0.851$, $T_{\max} = 0.908$

30751 measured reflections

$h = -7 \rightarrow 7$

$k = -15 \rightarrow 15$

$l = -22 \rightarrow 22$

Refinement

Refinement on F^2

Least-squares matrix: full

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.027$

$wR(F^2) = 0.088$

$S = 1.16$

2880 reflections

207 parameters

0 restraints

Primary atom site location: structure-invariant direct methods

Secondary atom site location: difference Fourier map

Hydrogen site location: inferred from neighbouring sites

H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement

$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0545P)^2 + 0.2119P]$

where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$

$(\Delta/\sigma)_{\max} = 0.001$

$\Delta\rho_{\max} = 0.21 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$

$\Delta\rho_{\min} = -0.25 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$

Absolute structure: Flack (1983), 1202 Friedel pairs

Flack parameter: 0.0 (2)

Special details

Experimental. The crystal was placed in the cold stream of an Oxford Cryosystems Cobra open-flow nitrogen cryostat (Cosier & Glazer, 1986) operating at 100.0 (1) K.

Geometry. All esds (except the esd in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell esds are taken into account individually in the estimation of esds in distances, angles and torsion angles; correlations between esds in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell esds is used for estimating esds involving l.s. planes.

Refinement. Refinement of F^2 against ALL reflections. The weighted R-factor wR and goodness of fit S are based on F^2 , conventional R-factors R are based on F , with F set to zero for negative F^2 . The threshold expression of $F^2 > 2\sigma(F^2)$ is used only for calculating R-factors(gt) etc. and is not relevant to the choice of reflections for refinement. R-factors based on F^2 are statistically about twice as large as those based on F , and R-factors based on ALL data will be even larger.

Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2$)

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	$U_{\text{iso}}^*/U_{\text{eq}}$
O1	1.03886 (16)	0.52792 (8)	0.07346 (5)	0.0334 (2)
O2	0.57276 (13)	0.96871 (7)	0.08320 (5)	0.0258 (2)
C1	0.9773 (2)	0.93648 (11)	0.02533 (7)	0.0275 (3)
H1A	1.0886	0.8924	0.0127	0.033*
H1B	0.8677	0.9195	−0.0052	0.033*
C2	1.0353 (2)	1.05118 (11)	0.01446 (8)	0.0328 (3)
H2A	1.1552	1.0662	0.0404	0.039*
H2B	1.0636	1.0628	−0.0341	0.039*
C3	0.8709 (2)	1.12537 (11)	0.03751 (8)	0.0304 (3)
H3A	0.7575	1.1163	0.0072	0.036*

supplementary materials

H3B	0.9172	1.1968	0.0323	0.036*
C4	0.8027 (2)	1.10897 (11)	0.11288 (7)	0.0273 (3)
C5	0.7496 (2)	0.98994 (10)	0.12352 (7)	0.0235 (3)
C6	0.6857 (2)	0.96538 (11)	0.19790 (7)	0.0265 (3)
H6A	0.7961	0.9786	0.2289	0.032*
H6B	0.5779	1.0116	0.2109	0.032*
C7	0.6185 (2)	0.85208 (11)	0.20597 (7)	0.0264 (3)
H7A	0.4932	0.8434	0.1819	0.032*
H7B	0.5948	0.8385	0.2546	0.032*
C8	0.76551 (19)	0.77021 (11)	0.17865 (6)	0.0235 (3)
H8A	0.8849	0.7742	0.2075	0.028*
C9	0.8275 (2)	0.79830 (10)	0.10381 (6)	0.0231 (3)
H9A	0.7059	0.7988	0.0760	0.028*
C10	0.91614 (19)	0.91155 (10)	0.10034 (7)	0.0233 (3)
C11	0.9692 (2)	0.71734 (11)	0.07021 (7)	0.0295 (3)
H11A	0.9471	0.7157	0.0207	0.035*
H11B	1.1058	0.7381	0.0783	0.035*
C12	0.9355 (2)	0.61239 (11)	0.09923 (7)	0.0274 (3)
C13	0.8133 (2)	0.58241 (11)	0.15075 (7)	0.0261 (3)
C14	0.6792 (2)	0.65857 (11)	0.18679 (6)	0.0249 (3)
H14A	0.6797	0.6413	0.2362	0.030*
C15	0.8399 (2)	0.47142 (12)	0.15815 (7)	0.0316 (3)
H15A	0.7751	0.4278	0.1893	0.038*
C16	0.9764 (3)	0.44313 (11)	0.11136 (7)	0.0349 (3)
H16A	1.0227	0.3752	0.1053	0.042*
C17	0.4653 (2)	0.64563 (12)	0.16019 (7)	0.0301 (3)
H17A	0.4312	0.5727	0.1595	0.045*
H17B	0.4555	0.6738	0.1143	0.045*
H17C	0.3758	0.6824	0.1902	0.045*
C18	0.6175 (2)	1.17717 (12)	0.12459 (8)	0.0370 (4)
H18A	0.6459	1.2480	0.1113	0.056*
H18B	0.5815	1.1753	0.1726	0.056*
H18C	0.5097	1.1508	0.0972	0.056*
C19	0.9636 (3)	1.14968 (12)	0.16241 (8)	0.0376 (4)
H19A	0.9689	1.2246	0.1600	0.056*
H19B	1.0900	1.1211	0.1494	0.056*
H19C	0.9324	1.1287	0.2088	0.056*
C20	1.1033 (2)	0.91693 (12)	0.14665 (8)	0.0308 (3)
H20A	1.1679	0.8500	0.1470	0.046*
H20B	1.0654	0.9354	0.1929	0.046*
H20C	1.1928	0.9688	0.1288	0.046*
H1O2	0.602 (3)	0.9757 (14)	0.0405 (10)	0.038 (5)*

Atomic displacement parameters ($\text{\AA}^2$)

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{12}	U^{13}	U^{23}
O1	0.0389 (6)	0.0318 (5)	0.0295 (5)	0.0068 (5)	0.0075 (4)	0.0007 (4)
O2	0.0193 (5)	0.0341 (5)	0.0239 (5)	−0.0007 (4)	−0.0017 (4)	0.0012 (4)

C1	0.0247 (7)	0.0333 (7)	0.0245 (7)	−0.0005 (6)	0.0057 (5)	0.0007 (5)
C2	0.0313 (8)	0.0389 (8)	0.0283 (7)	−0.0058 (6)	0.0075 (6)	0.0034 (6)
C3	0.0345 (8)	0.0288 (7)	0.0278 (7)	−0.0061 (6)	0.0020 (6)	0.0016 (5)
C4	0.0290 (7)	0.0296 (7)	0.0232 (7)	−0.0039 (6)	0.0000 (6)	−0.0007 (5)
C5	0.0192 (6)	0.0302 (7)	0.0212 (6)	−0.0002 (5)	0.0002 (5)	0.0000 (5)
C6	0.0258 (6)	0.0328 (7)	0.0210 (6)	0.0017 (6)	0.0025 (5)	−0.0028 (5)
C7	0.0242 (6)	0.0342 (7)	0.0207 (6)	0.0013 (6)	0.0058 (5)	0.0015 (5)
C8	0.0195 (6)	0.0324 (7)	0.0184 (6)	0.0010 (6)	−0.0001 (5)	0.0016 (5)
C9	0.0192 (6)	0.0306 (7)	0.0196 (6)	0.0015 (5)	0.0015 (5)	0.0009 (5)
C10	0.0184 (6)	0.0299 (7)	0.0216 (6)	−0.0009 (5)	0.0005 (5)	0.0004 (5)
C11	0.0285 (7)	0.0334 (7)	0.0267 (7)	0.0032 (6)	0.0075 (6)	0.0019 (6)
C12	0.0284 (7)	0.0314 (7)	0.0224 (7)	0.0064 (6)	0.0001 (5)	−0.0029 (5)
C13	0.0265 (7)	0.0306 (7)	0.0213 (6)	−0.0006 (5)	−0.0032 (5)	0.0011 (5)
C14	0.0248 (6)	0.0330 (7)	0.0169 (6)	−0.0005 (6)	0.0019 (5)	0.0020 (5)
C15	0.0380 (8)	0.0323 (7)	0.0244 (7)	−0.0020 (7)	−0.0005 (6)	0.0029 (6)
C16	0.0480 (9)	0.0277 (7)	0.0290 (7)	0.0059 (7)	0.0004 (7)	0.0022 (6)
C17	0.0267 (7)	0.0376 (7)	0.0260 (7)	−0.0036 (6)	0.0012 (6)	0.0025 (6)
C18	0.0438 (9)	0.0311 (7)	0.0363 (8)	0.0042 (7)	0.0063 (7)	−0.0006 (6)
C19	0.0437 (9)	0.0375 (8)	0.0315 (8)	−0.0123 (7)	−0.0046 (7)	−0.0035 (6)
C20	0.0191 (6)	0.0412 (8)	0.0321 (7)	−0.0023 (6)	−0.0034 (6)	0.0025 (6)

Geometric parameters (Å, °)

O1—C16	1.3745 (17)	C9—C11	1.5507 (18)
O1—C12	1.3780 (16)	C9—C10	1.5673 (18)
O2—C5	1.4494 (16)	C9—H9A	0.9800
O2—H1O2	0.85 (2)	C10—C20	1.5486 (18)
C1—C2	1.5319 (19)	C11—C12	1.4719 (19)
C1—C10	1.5417 (18)	C11—H11A	0.9700
C1—H1A	0.9700	C11—H11B	0.9700
C1—H1B	0.9700	C12—C13	1.348 (2)
C2—C3	1.525 (2)	C13—C15	1.437 (2)
C2—H2A	0.9700	C13—C14	1.5001 (19)
C2—H2B	0.9700	C14—C17	1.5388 (19)
C3—C4	1.5432 (19)	C14—H14A	0.9800
C3—H3A	0.9700	C15—C16	1.340 (2)
C3—H3B	0.9700	C15—H15A	0.9300
C4—C19	1.538 (2)	C16—H16A	0.9300
C4—C18	1.538 (2)	C17—H17A	0.9600
C4—C5	1.5764 (19)	C17—H17B	0.9600
C5—C6	1.5345 (18)	C17—H17C	0.9600
C5—C10	1.5699 (18)	C18—H18A	0.9600
C6—C7	1.525 (2)	C18—H18B	0.9600
C6—H6A	0.9700	C18—H18C	0.9600
C6—H6B	0.9700	C19—H19A	0.9600
C7—C8	1.5347 (18)	C19—H19B	0.9600
C7—H7A	0.9700	C19—H19C	0.9600
C7—H7B	0.9700	C20—H20A	0.9600
C8—C14	1.5489 (19)	C20—H20B	0.9600

supplementary materials

C8—C9	1.5493 (17)	C20—H20C	0.9600
C8—H8A	0.9800		
C16—O1—C12	105.67 (11)	C10—C9—H9A	106.8
C5—O2—H1O2	108.0 (13)	C1—C10—C20	108.54 (11)
C2—C1—C10	113.28 (11)	C1—C10—C9	109.45 (10)
C2—C1—H1A	108.9	C20—C10—C9	109.06 (11)
C10—C1—H1A	108.9	C1—C10—C5	109.14 (10)
C2—C1—H1B	108.9	C20—C10—C5	112.86 (11)
C10—C1—H1B	108.9	C9—C10—C5	107.75 (10)
H1A—C1—H1B	107.7	C12—C11—C9	110.69 (11)
C3—C2—C1	111.68 (11)	C12—C11—H11A	109.5
C3—C2—H2A	109.3	C9—C11—H11A	109.5
C1—C2—H2A	109.3	C12—C11—H11B	109.5
C3—C2—H2B	109.3	C9—C11—H11B	109.5
C1—C2—H2B	109.3	H11A—C11—H11B	108.1
H2A—C2—H2B	107.9	C13—C12—O1	110.69 (12)
C2—C3—C4	114.09 (12)	C13—C12—C11	129.43 (12)
C2—C3—H3A	108.7	O1—C12—C11	119.88 (12)
C4—C3—H3A	108.7	C12—C13—C15	106.14 (13)
C2—C3—H3B	108.7	C12—C13—C14	121.80 (12)
C4—C3—H3B	108.7	C15—C13—C14	132.02 (13)
H3A—C3—H3B	107.6	C13—C14—C17	109.80 (11)
C19—C4—C18	106.74 (12)	C13—C14—C8	108.93 (11)
C19—C4—C3	109.45 (12)	C17—C14—C8	114.61 (11)
C18—C4—C3	107.68 (12)	C13—C14—H14A	107.8
C19—C4—C5	113.90 (11)	C17—C14—H14A	107.8
C18—C4—C5	110.10 (11)	C8—C14—H14A	107.8
C3—C4—C5	108.79 (11)	C16—C15—C13	106.54 (13)
O2—C5—C6	103.66 (10)	C16—C15—H15A	126.7
O2—C5—C10	108.31 (10)	C13—C15—H15A	126.7
C6—C5—C10	109.74 (10)	C15—C16—O1	110.95 (13)
O2—C5—C4	107.27 (10)	C15—C16—H16A	124.5
C6—C5—C4	112.55 (11)	O1—C16—H16A	124.5
C10—C5—C4	114.61 (10)	C14—C17—H17A	109.5
C7—C6—C5	111.92 (11)	C14—C17—H17B	109.5
C7—C6—H6A	109.2	H17A—C17—H17B	109.5
C5—C6—H6A	109.2	C14—C17—H17C	109.5
C7—C6—H6B	109.2	H17A—C17—H17C	109.5
C5—C6—H6B	109.2	H17B—C17—H17C	109.5
H6A—C6—H6B	107.9	C4—C18—H18A	109.5
C6—C7—C8	114.87 (11)	C4—C18—H18B	109.5
C6—C7—H7A	108.5	H18A—C18—H18B	109.5
C8—C7—H7A	108.5	C4—C18—H18C	109.5
C6—C7—H7B	108.5	H18A—C18—H18C	109.5
C8—C7—H7B	108.5	H18B—C18—H18C	109.5
H7A—C7—H7B	107.5	C4—C19—H19A	109.5
C7—C8—C14	110.54 (11)	C4—C19—H19B	109.5
C7—C8—C9	109.74 (11)	H19A—C19—H19B	109.5
C14—C8—C9	114.19 (11)	C4—C19—H19C	109.5

C7—C8—H8A	107.4	H19A—C19—H19C	109.5
C14—C8—H8A	107.4	H19B—C19—H19C	109.5
C9—C8—H8A	107.4	C10—C20—H20A	109.5
C8—C9—C11	113.77 (11)	C10—C20—H20B	109.5
C8—C9—C10	110.90 (10)	H20A—C20—H20B	109.5
C11—C9—C10	111.33 (10)	C10—C20—H20C	109.5
C8—C9—H9A	106.8	H20A—C20—H20C	109.5
C11—C9—H9A	106.8	H20B—C20—H20C	109.5
C10—C1—C2—C3	−55.24 (17)	C11—C9—C10—C5	170.45 (11)
C1—C2—C3—C4	55.00 (16)	O2—C5—C10—C1	66.93 (13)
C2—C3—C4—C19	72.73 (15)	C6—C5—C10—C1	179.45 (11)
C2—C3—C4—C18	−171.60 (12)	C4—C5—C10—C1	−52.77 (14)
C2—C3—C4—C5	−52.30 (15)	O2—C5—C10—C20	−172.30 (10)
C19—C4—C5—O2	169.30 (11)	C6—C5—C10—C20	−59.78 (14)
C18—C4—C5—O2	49.46 (14)	C4—C5—C10—C20	68.00 (14)
C3—C4—C5—O2	−68.32 (13)	O2—C5—C10—C9	−51.83 (13)
C19—C4—C5—C6	55.92 (15)	C6—C5—C10—C9	60.69 (13)
C18—C4—C5—C6	−63.92 (15)	C4—C5—C10—C9	−171.54 (10)
C3—C4—C5—C6	178.30 (11)	C8—C9—C11—C12	28.58 (16)
C19—C4—C5—C10	−70.41 (15)	C10—C9—C11—C12	154.78 (11)
C18—C4—C5—C10	169.75 (11)	C16—O1—C12—C13	−0.18 (16)
C3—C4—C5—C10	51.97 (14)	C16—O1—C12—C11	179.32 (13)
O2—C5—C6—C7	59.70 (13)	C9—C11—C12—C13	−4.3 (2)
C10—C5—C6—C7	−55.82 (14)	C9—C11—C12—O1	176.33 (12)
C4—C5—C6—C7	175.28 (11)	O1—C12—C13—C15	−0.23 (16)
C5—C6—C7—C8	51.72 (15)	C11—C12—C13—C15	−179.67 (15)
C6—C7—C8—C14	−177.79 (11)	O1—C12—C13—C14	−178.36 (11)
C6—C7—C8—C9	−50.97 (15)	C11—C12—C13—C14	2.2 (2)
C7—C8—C9—C11	−177.42 (11)	C12—C13—C14—C17	102.74 (15)
C14—C8—C9—C11	−52.68 (15)	C15—C13—C14—C17	−74.84 (18)
C7—C8—C9—C10	56.15 (14)	C12—C13—C14—C8	−23.52 (17)
C14—C8—C9—C10	−179.10 (10)	C15—C13—C14—C8	158.90 (14)
C2—C1—C10—C20	−70.08 (15)	C7—C8—C14—C13	172.14 (10)
C2—C1—C10—C9	171.00 (11)	C9—C8—C14—C13	47.82 (14)
C2—C1—C10—C5	53.30 (15)	C7—C8—C14—C17	48.70 (14)
C8—C9—C10—C1	179.65 (11)	C9—C8—C14—C17	−75.62 (14)
C11—C9—C10—C1	51.88 (14)	C12—C13—C15—C16	0.56 (17)
C8—C9—C10—C20	61.04 (13)	C14—C13—C15—C16	178.42 (14)
C11—C9—C10—C20	−66.72 (13)	C13—C15—C16—O1	−0.70 (17)
C8—C9—C10—C5	−61.79 (13)	C12—O1—C16—C15	0.56 (17)

Hydrogen-bond geometry (Å, °)

<i>D</i> —H $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> —H	H $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> —H $\cdots$ <i>A</i>
O2—H1O2 $\cdots$ O1 ⁱ	0.854 (19)	2.246 (19)	3.0398 (14)	154.7 (18)

Symmetry codes: (i) $x-1/2, -y+3/2, -z$.

Fig. 1

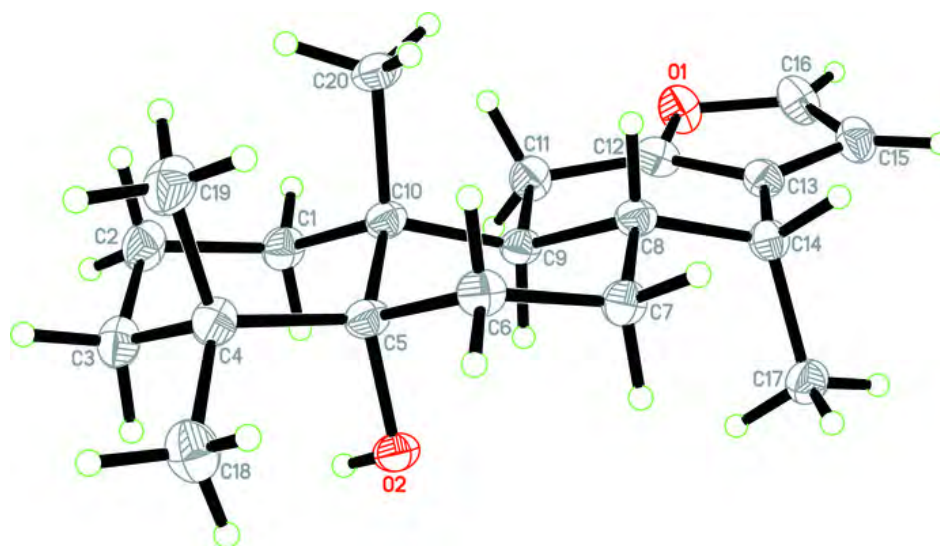
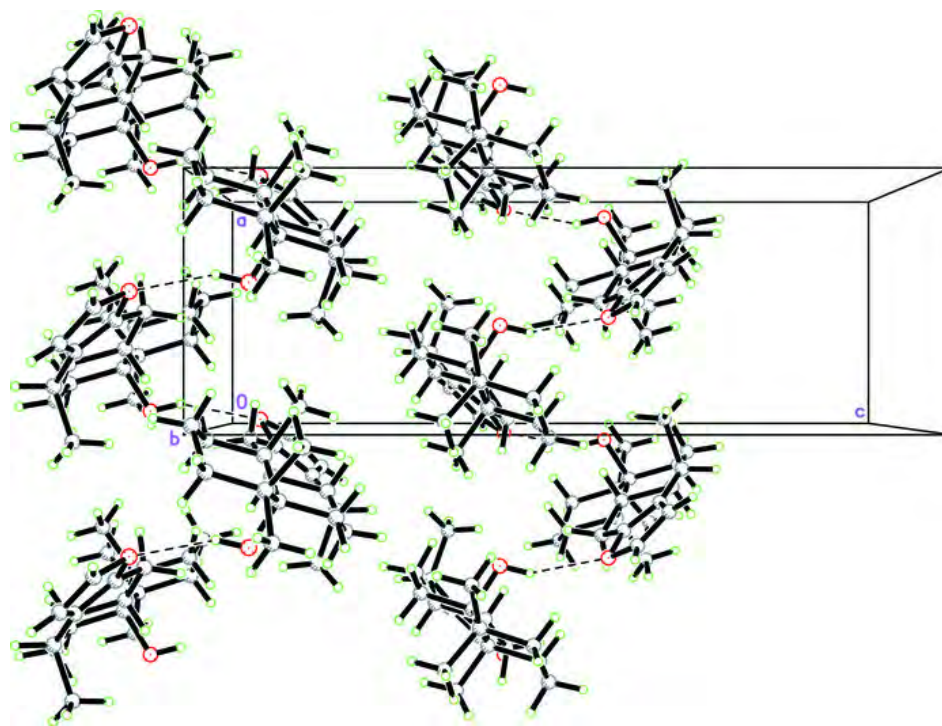


Fig. 2



Absolute configuration of odorine

Hoong-Kun Fun,^{a,*} Suchada Chantrapromma,^{b,§} Orapun Yodsauae^c and Chatchanok Karalai^c

^aX-ray Crystallography Unit, School of Physics, Universiti Sains Malaysia, 11800 USM, Penang, Malaysia, ^bCrystal Materials Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand, and ^cDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand
Correspondence e-mail: hkfun@usm.my

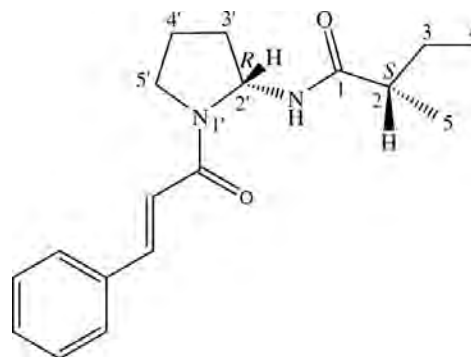
Received 16 August 2010; accepted 25 August 2010

Key indicators: single-crystal X-ray study; $T = 100$ K; mean $\sigma(\text{C}-\text{C}) = 0.002$ Å; R factor = 0.033; wR factor = 0.096; data-to-parameter ratio = 12.8.

The title compound, known as odorine or roxburghiline {systematic name: (*S*)-*N*-[(*R*)-1-cinnamoylpyrrolidin-2-yl]-2-methylbutanamide}, $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$, is a nitrogenous compound isolated from the leaves of *Aglaia odorata*. The absolute configuration was determined by refinement of the Flack parameter with data collected using Cu $K\alpha$ radiation showing positions 2 and 2' to be *S* and *R*, respectively. The pyrrolidine ring adopts an envelope conformation. In the crystal, molecules are linked into chains along [010] by intermolecular $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ hydrogen bonds.

Related literature

For ring conformations, see: Cremer & Pople (1975). For standard bond-length data, see: Allen *et al.* (1987). For background to the *Aglaia* plants and their biological activity, see: Brader *et al.* (1998); Cui *et al.* (1997); Engelmeier *et al.* (2000); Hayashi *et al.* (1982); Inada *et al.* (2001); Nugroho *et al.* (1999); Purushothaman *et al.* 1979); Saifah *et al.* (1993); Shienghthong *et al.* (1979). For related structures, see: Babidge *et al.* (1980); Dumontet *et al.* (1996); Hayashi *et al.* (1982). For the stability of the temperature controller used in the data collection, see Cosier & Glazer (1986).



Experimental

Crystal data

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$
 $M_r = 300.39$
Monoclinic, $C2$
 $a = 18.8909$ (3) Å
 $b = 6.8398$ (1) Å
 $c = 13.4174$ (2) Å
 $\beta = 107.054$ (1)°

$V = 1657.43$ (4) Å³
 $Z = 4$
Cu $K\alpha$ radiation
 $\mu = 0.63$ mm⁻¹
 $T = 100$ K
 $0.57 \times 0.16 \times 0.13$ mm

Data collection

Bruker APEXII DUO CCD area-detector diffractometer
Absorption correction: multi-scan (SADABS; Bruker, 2009)
 $T_{\min} = 0.718$, $T_{\max} = 0.924$

10656 measured reflections
2625 independent reflections
2606 reflections with $I > 2\sigma(I)$
 $R_{\text{int}} = 0.042$

Refinement

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.033$
 $wR(F^2) = 0.096$
 $S = 1.16$
2625 reflections
205 parameters
1 restraint

H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement
 $\Delta\rho_{\max} = 0.21$ e Å⁻³
 $\Delta\rho_{\min} = -0.27$ e Å⁻³
Absolute structure: Flack (1983), 1036 Friedel pairs
Flack parameter: 0.03 (18)

Table 1

Hydrogen-bond geometry (Å, °).

$D-\text{H}\cdots A$	$D-\text{H}$	$\text{H}\cdots A$	$D\cdots A$	$D-\text{H}\cdots A$
$\text{N2}-\text{H1N2}\cdots\text{O1}^i$	0.81 (2)	2.09 (2)	2.8789 (16)	163 (2)

Symmetry code: (i) $-x + \frac{3}{2}, y - \frac{1}{2}, -z + 1$.

Data collection: APEX2 (Bruker, 2009); cell refinement: SAINT (Bruker, 2009); data reduction: SAINT; program(s) used to solve structure: SHELXTL (Sheldrick, 2008); program(s) used to refine structure: SHELXTL; molecular graphics: SHELXTL; software used to prepare material for publication: SHELXTL and PLATON (Spek, 2009).

OY thanks the Office of the Higher Education Commission, Thailand, for support by grant funding under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Joint PhD Program Thai Doctoral degree. The authors thank the Thailand Research Fund (BRG5280013) and Prince of Songkla University for financial support. The authors also

* Thomson Reuters ResearcherID: A-3561-2009.

§ Additional correspondence author, e-mail: suchada.c@psu.ac.th. Thomson Reuters ResearcherID: A-5085-2009.

thank Universiti Sains Malaysia for the Research University Golden Goose grant No. 1001/PFIZIK/811012.

Supplementary data and figures for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: LH5122).

References

- Allen, F. H., Kennard, O., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G. & Taylor, R. (1987). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, pp. S1–19.
- Babidge, P. J., Massy-Westropp, R. A., Pyne, S. G., Shiengthong, D., Ungphakorn, A. & Veerachat, G. (1980). *Aust. J. Chem.* **33**, 1841–1845.
- Brader, G., Vajrodaya, S., Greger, H., Bacher, M., Kalchhauser, H. & Hofer, O. (1998). *J. Nat. Prod.* **61**, 1482–1490.
- Bruker (2009). *APEX2, SAINT and SADABS*. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Cosier, J. & Glazer, A. M. (1986). *J. Appl. Cryst.* **19**, 105–107.
- Cremer, D. & Pople, J. A. (1975). *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1354–1358.
- Cui, B., Chai, H., Santisuk, T., Reutrakul, V., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M. & Kinghorn, A. D. (1997). *Tetrahedron*, **53**, 17625–17632.
- Dumontet, V., Thoison, O., Omobuwajo, O. R., Martin, M. T., Perromat, G., Chiaroni, A., Riche, C., Païs, M. & Sévenet, T. (1996). *Tetrahedron*, **52**, 6931–6942.
- Engelmeier, D., Hadacek, F., Pacher, T., Vajrodaya, S. & Harald, G. (2000). *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1400–1404.
- Flack, H. D. (1983). *Acta Cryst.* **A39**, 876–881.
- Hayashi, N., Lee, K.-H., Hall, I. H., McPhail, A. T. & Huan-Chang, H. (1982). *Phytochemistry*, **21**, 2371–2373.
- Inada, A., Nishino, H., Kuchide, M., Takayasu, J., Mukainaka, T., Nobukuni, Y., Okuda, M. & Tokuda, H. (2001). *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 1282–1285.
- Nugroho, B. W., Edradaa, R. A., Wrayb, V., Wittec, L., Bringmann, G., Gehlinge, M. & Prokscha, P. (1999). *Phytochemistry*, **51**, 367–376.
- Purushothaman, K. K., Sarada, A., Connolly, J. D. & Akinniyi, J. A. (1979). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, pp. 3171–3179.
- Saifah, E., Puripattanavong, J., Likhitwitayawuid, K., Cordell, G. A., Chai, H. & Pezzuto, J. M. (1993). *J. Nat. Prod.* **56**, 473–477.
- Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst.* **A64**, 112–122.
- Shiengthong, D., Ungphakorn, A., Lewis, D. E. & Massy-Westropp, R. A. (1979). *Tetrahedron Lett.* **24**, 2247–2250.
- Spek, A. L. (2009). *Acta Cryst.* **D65**, 148–155.

supplementary materials

Acta Cryst. (2010). E66, o2437-o2438 [doi:10.1107/S1600536810034227]

Absolute configuration of odorine

H.-K. Fun, S. Chantrapromma, O. Yodsaoue and C. Karalai

Comment

Several species of the genus *Aglaia* of the family Meliaceae are of ethnomedicinal values and have insecticidal (Brader *et al.*, 1998), antifungal (Engelmeier *et al.*, 2000) and cytotoxic (Saifah *et al.*, 1993; Cui *et al.*, 1997) activities. These interesting activities have prompted us to screen for further bioactive compounds from *Aglaia odorata*. *Aglaia odorata* known locally in Thai as "Pra-yong" or "Hom-glai" is a small tree occurring primarily in South-East Asia. The leaves and roots of this plant have been used in local folk medicine as a heart stimulant, febrifuge and to retrieve toxin by causing vomiting. The isolated compounds from this plant also show interesting biological activities such as anticancer (Inada *et al.*, 2001), insecticidal (Nugroho *et al.*, 1999) and anti-leukemic (Hayashi *et al.*, 1982) activities. In the course of our research of chemical constituents and bioactive compounds from the leaves of *A. odorata* which were collected from Songkhla province in the southern part of Thailand, the title aminopyrrolidine odorine (I), also known as odorine (Shiengthong *et al.*, 1979) or roxburghiline or *N*-cinnamoyl-2-(2-methylbutanoylamino)pyrrolidine (Purushothaman *et al.*, 1979) was isolated. The previous report showed that (I) possesses cancer-chemopreventive activity (Inada *et al.*, 2001). The absolute configuration of (I) was determined by making use of the anomalous scattering of Cu K α X-radiation with the Flack parameter being refined to 0.03 (18). We report herein the crystal structure of (I).

Fig. 1 shows that the molecule of (I) possesses a 2-aminopyrrolidine ring linked by two amide functions to 2-methylbutyric acid and cinnamic acid. The pyrrolidine ring adopts an envelope conformation with the puckered C12 atom having a deviation of 0.223 (1) Å and with the puckering parameters $Q = 0.3522$ (15) Å and $\theta = 281.3$ (2)° (Cremer & Pople, 1975). Atoms of the cinnamoyl (C1–C9/O1) moiety essentially lie on the same plane (*r.m.s.* 0.0216 (1) Å) with a max. deviation of 0.0583 (1) Å for atom O1. Atoms C13, C14, C15, N2 and O2 lie on the same plane (*r.m.s.* 0.0216 (1) Å). The mean plane through C13/C14/C15/N2/O2 makes the dihedral angle of 88.80 (7)° with the mean plane through the cinnamoyl moiety. The 2-methylbutanamide chain at C13 is pseudo-axial with the C14–N2–C13–C12 torsion angle = 125.55 (13)°. The orientation of the butyl group is described by the torsion angle C14–C15–C17–C18 = 68.78 (18)°. The bond distances in (I) are within normal ranges (Allen *et al.*, 1987) and comparable with the related structures which are odorinol (Hayashi *et al.*, 1982) and forbaglin A (Dumontet *et al.*, 1996). The absolute configuration at atoms C15 and C13 or positions 2 and 2' of the odorine are *S,R* configurations which agree with the previous stereochemistry of odorine (Babidge *et al.*, 1980).

In the crystal packing of (I) (Fig. 2), the molecules are linked into chains along [010] through N2—H1N2...O1ⁱ hydrogen bonds (Fig. 2 and Table 1).

Experimental

Ground-dried leaves of *A. odorata* (53.70 g) were extracted with CH₂Cl₂ and CH₃OH (each of 2 x 2 L) for a duration of 3 days at room temperature. The solvents were evaporated under reduced pressure to afford CH₂Cl₂ (23.50 g) and CH₃OH (5.23 g) crude extracts, respectively. The CH₂Cl₂ crude extract (23.50 g) was further purified by quick column chromatography (QCC) over silica gel using hexane as eluent and increasing polarity with EtOAc and CH₃OH to afford 10 fractions (F1–F10).

Fraction F10 (231.6 mg) was further separated by column chromatography with acetone-hexane (3:7), yielding the title compound as white solid (15.6 mg). Colorless needle-shaped single crystals of the title compound suitable for *x*-ray structure determination were recrystallized from CH₂Cl₂ by the slow evaporation of the solvent at room temperature after several days, Mp. 476–478 K.

Refinement

The amide H atom was located in a difference map and refined isotropically. The remaining H atoms were placed in calculated positions with (C—H) = 0.98 for CH, 0.97 for CH₂ and 0.96 Å for CH₃ atoms. The U_{iso} values were constrained to be 1.5 U_{eq} of the carrier atom for methyl H atoms and 1.2 U_{eq} for the remaining H atoms. A rotating group model was used for the methyl groups. The highest residual electron density peak is located at 0.73 Å from C6 and the deepest hole is located at 0.71 Å from C9. 1036 Friedel pairs were used to determine the absolute configuration.

Figures

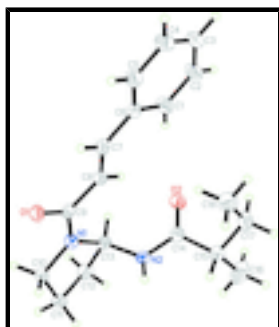


Fig. 1. The molecular structure of (I), showing 50% probability displacement ellipsoids and the atom-numbering scheme.

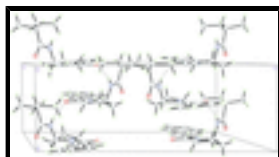


Fig. 2. The crystal packing of (I) viewed approximately along the *c* axis, showing one dimensional chains along [0 1 0]. N—H...O hydrogen bonds are shown as dashed lines.

(*S*)-*N*-[(*R*)-1-cinnamoylpyrrolidin-2-yl]-2-methylbutanamide

Crystal data

C₁₈H₂₄N₂O₂

M_r = 300.39

Monoclinic, *C*2

Hall symbol: C 2y

a = 18.8909 (3) Å

b = 6.8398 (1) Å

c = 13.4174 (2) Å

β = 107.054 (1)°

V = 1657.43 (4) Å³

Z = 4

F(000) = 648

D_x = 1.204 Mg m^{−3}

Melting point = 476–478 K

Cu *K*α radiation, λ = 1.54178 Å

Cell parameters from 2625 reflections

θ = 6.8–67.4°

μ = 0.63 mm^{−1}

T = 100 K

Needle, colorless

0.57 × 0.16 × 0.13 mm

Data collection

Bruker APEXII DUO CCD area-detector diffractometer	2625 independent reflections
Radiation source: sealed tube graphite	2606 reflections with $I > 2\sigma(I)$
φ and ω scans	$R_{\text{int}} = 0.042$
Absorption correction: multi-scan (SADABS; Bruker, 2009)	$\theta_{\text{max}} = 67.4^\circ$, $\theta_{\text{min}} = 6.8^\circ$
$T_{\text{min}} = 0.718$, $T_{\text{max}} = 0.924$	$h = -22 \rightarrow 22$
10656 measured reflections	$k = -7 \rightarrow 6$
	$l = -16 \rightarrow 16$

Refinement

Refinement on F^2	Secondary atom site location: difference Fourier map
Least-squares matrix: full	Hydrogen site location: inferred from neighbouring sites
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.033$	H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement
$wR(F^2) = 0.096$	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0595P)^2 + 0.2381P]$
$S = 1.16$	where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
2625 reflections	$(\Delta/\sigma)_{\text{max}} = 0.001$
205 parameters	$\Delta\rho_{\text{max}} = 0.21 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$
1 restraint	$\Delta\rho_{\text{min}} = -0.27 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$
Primary atom site location: structure-invariant direct methods	Absolute structure: Flack (1983), 1036 Friedel pairs
	Flack parameter: 0.03 (18)

Special details

Experimental. The crystal was placed in the cold stream of an Oxford Cryosystems Cobra open-flow nitrogen cryostat (Cosier & Glazer, 1986) operating at 100.0 (1) K.

Geometry. All esds (except the esd in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell esds are taken into account individually in the estimation of esds in distances, angles and torsion angles; correlations between esds in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell esds is used for estimating esds involving l.s. planes.

Refinement. Refinement of F^2 against ALL reflections. The weighted R-factor wR and goodness of fit S are based on F^2 , conventional R-factors R are based on F , with F set to zero for negative F^2 . The threshold expression of $F^2 > 2\sigma(F^2)$ is used only for calculating R-factors(gt) etc. and is not relevant to the choice of reflections for refinement. R-factors based on F^2 are statistically about twice as large as those based on F , and R-factors based on ALL data will be even larger.

Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2$)

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	$U_{\text{iso}}^*/U_{\text{eq}}$
O1	0.68617 (5)	0.99471 (16)	0.55658 (7)	0.0243 (2)
O2	0.97777 (6)	0.88734 (17)	0.73395 (8)	0.0315 (3)

supplementary materials

N1	0.79446 (6)	0.99195 (19)	0.51776 (8)	0.0218 (2)
H1N2	0.8859 (10)	0.691 (3)	0.5433 (14)	0.030 (5)*
N2	0.90244 (6)	0.78710 (19)	0.57796 (9)	0.0217 (3)
C1	0.87323 (8)	0.9894 (3)	0.92951 (11)	0.0299 (3)
H1A	0.9038	1.0059	0.8870	0.036*
C2	0.90374 (8)	0.9818 (3)	1.03621 (11)	0.0348 (4)
H2A	0.9548	0.9923	1.0651	0.042*
C3	0.85882 (8)	0.9585 (3)	1.10083 (11)	0.0325 (4)
H3A	0.8797	0.9538	1.1728	0.039*
C4	0.78306 (9)	0.9425 (3)	1.05783 (11)	0.0337 (4)
H4A	0.7528	0.9273	1.1008	0.040*
C5	0.75221 (8)	0.9490 (2)	0.95025 (11)	0.0285 (3)
H5A	0.7012	0.9376	0.9217	0.034*
C6	0.79653 (7)	0.9725 (2)	0.88465 (10)	0.0233 (3)
C7	0.76210 (7)	0.9768 (2)	0.77145 (10)	0.0236 (3)
H7A	0.7107	0.9679	0.7481	0.028*
C8	0.79691 (7)	0.9920 (2)	0.69898 (9)	0.0219 (3)
H8A	0.8483	1.0019	0.7190	0.026*
C9	0.75502 (7)	0.9936 (2)	0.58677 (9)	0.0207 (3)
C10	0.75678 (7)	0.9890 (2)	0.40514 (9)	0.0233 (3)
H10A	0.7308	1.1109	0.3826	0.028*
H10B	0.7217	0.8819	0.3871	0.028*
C11	0.81922 (8)	0.9613 (2)	0.35579 (10)	0.0275 (3)
H11A	0.8097	1.0348	0.2914	0.033*
H11B	0.8253	0.8243	0.3414	0.033*
C12	0.88773 (8)	1.0396 (2)	0.43814 (11)	0.0276 (3)
H12A	0.9325	0.9808	0.4303	0.033*
H12B	0.8912	1.1805	0.4329	0.033*
C13	0.87590 (7)	0.9813 (2)	0.54206 (10)	0.0222 (3)
H13A	0.8990	1.0781	0.5956	0.027*
C14	0.95055 (7)	0.7544 (2)	0.67329 (11)	0.0237 (3)
C15	0.97075 (8)	0.5412 (2)	0.69919 (11)	0.0293 (3)
H15A	0.9332	0.4576	0.6527	0.035*
C16	1.04558 (10)	0.5039 (3)	0.67983 (16)	0.0512 (5)
H16A	1.0413	0.5272	0.6077	0.077*
H16B	1.0603	0.3708	0.6971	0.077*
H16C	1.0821	0.5903	0.7225	0.077*
C17	0.97552 (9)	0.4934 (3)	0.81232 (12)	0.0356 (4)
H17A	0.9971	0.3644	0.8290	0.043*
H17B	1.0085	0.5865	0.8576	0.043*
C18	0.90143 (10)	0.4977 (3)	0.83531 (12)	0.0406 (4)
H18A	0.9089	0.4729	0.9081	0.061*
H18B	0.8696	0.3990	0.7948	0.061*
H18C	0.8790	0.6238	0.8176	0.061*

Atomic displacement parameters ($\text{\AA}^2$)

U^{11}

U^{22}

U^{33}

U^{12}

U^{13}

U^{23}

O1	0.0229 (5)	0.0260 (6)	0.0230 (4)	0.0040 (4)	0.0051 (3)	0.0031 (4)
O2	0.0301 (5)	0.0298 (6)	0.0277 (5)	−0.0005 (4)	−0.0025 (4)	−0.0062 (5)
N1	0.0222 (5)	0.0231 (6)	0.0193 (5)	0.0013 (5)	0.0045 (4)	0.0013 (5)
N2	0.0225 (5)	0.0209 (7)	0.0202 (6)	−0.0006 (5)	0.0039 (4)	−0.0046 (5)
C1	0.0277 (7)	0.0399 (9)	0.0226 (6)	0.0012 (7)	0.0080 (5)	0.0015 (7)
C2	0.0269 (7)	0.0507 (10)	0.0245 (7)	0.0036 (7)	0.0038 (5)	−0.0006 (8)
C3	0.0384 (8)	0.0390 (10)	0.0180 (6)	0.0045 (7)	0.0050 (5)	0.0014 (6)
C4	0.0379 (8)	0.0409 (11)	0.0253 (7)	0.0019 (7)	0.0137 (6)	0.0029 (6)
C5	0.0263 (7)	0.0324 (9)	0.0264 (7)	0.0017 (6)	0.0074 (5)	0.0016 (6)
C6	0.0268 (6)	0.0209 (8)	0.0217 (6)	0.0049 (6)	0.0063 (5)	0.0022 (6)
C7	0.0234 (6)	0.0214 (7)	0.0246 (7)	0.0038 (6)	0.0048 (5)	0.0019 (6)
C8	0.0228 (6)	0.0194 (7)	0.0215 (6)	0.0031 (6)	0.0032 (5)	0.0014 (6)
C9	0.0239 (6)	0.0153 (7)	0.0221 (6)	0.0031 (6)	0.0053 (5)	0.0014 (6)
C10	0.0275 (6)	0.0218 (7)	0.0187 (6)	0.0032 (6)	0.0037 (5)	0.0011 (6)
C11	0.0354 (7)	0.0280 (8)	0.0201 (6)	0.0028 (6)	0.0098 (5)	0.0017 (6)
C12	0.0304 (7)	0.0277 (8)	0.0276 (7)	−0.0002 (6)	0.0132 (5)	0.0028 (6)
C13	0.0219 (6)	0.0214 (7)	0.0234 (6)	−0.0015 (5)	0.0070 (5)	−0.0018 (6)
C14	0.0174 (6)	0.0291 (9)	0.0244 (7)	0.0013 (5)	0.0058 (5)	−0.0013 (6)
C15	0.0278 (7)	0.0293 (9)	0.0290 (7)	0.0059 (6)	0.0058 (6)	−0.0003 (6)
C16	0.0451 (9)	0.0479 (13)	0.0675 (12)	0.0202 (9)	0.0274 (9)	0.0085 (10)
C17	0.0397 (8)	0.0319 (9)	0.0304 (7)	0.0055 (7)	0.0027 (6)	0.0066 (7)
C18	0.0535 (9)	0.0358 (10)	0.0347 (8)	0.0013 (8)	0.0163 (7)	0.0039 (8)

Geometric parameters (Å, °)

O1—C9	1.2437 (16)	C10—C11	1.5243 (18)
O2—C14	1.2280 (19)	C10—H10A	0.9700
N1—C9	1.3480 (17)	C10—H10B	0.9700
N1—C10	1.4695 (15)	C11—C12	1.531 (2)
N1—C13	1.4780 (16)	C11—H11A	0.9700
N2—C14	1.3529 (17)	C11—H11B	0.9700
N2—C13	1.451 (2)	C12—C13	1.5284 (18)
N2—H1N2	0.81 (2)	C12—H12A	0.9700
C1—C2	1.3787 (19)	C12—H12B	0.9700
C1—C6	1.401 (2)	C13—H13A	0.9800
C1—H1A	0.9300	C14—C15	1.522 (2)
C2—C3	1.389 (2)	C15—C17	1.529 (2)
C2—H2A	0.9300	C15—C16	1.532 (2)
C3—C4	1.382 (2)	C15—H15A	0.9800
C3—H3A	0.9300	C16—H16A	0.9600
C4—C5	1.3898 (19)	C16—H16B	0.9600
C4—H4A	0.9300	C16—H16C	0.9600
C5—C6	1.3907 (19)	C17—C18	1.519 (2)
C5—H5A	0.9300	C17—H17A	0.9700
C6—C7	1.4667 (17)	C17—H17B	0.9700
C7—C8	1.3282 (18)	C18—H18A	0.9600
C7—H7A	0.9300	C18—H18B	0.9600
C8—C9	1.4813 (17)	C18—H18C	0.9600
C8—H8A	0.9300		

supplementary materials

C9—N1—C10	120.52 (10)	C10—C11—H11B	111.0
C9—N1—C13	126.73 (10)	C12—C11—H11B	111.0
C10—N1—C13	112.65 (10)	H11A—C11—H11B	109.0
C14—N2—C13	122.40 (12)	C13—C12—C11	104.37 (11)
C14—N2—H1N2	116.5 (13)	C13—C12—H12A	110.9
C13—N2—H1N2	120.9 (13)	C11—C12—H12A	110.9
C2—C1—C6	120.50 (13)	C13—C12—H12B	110.9
C2—C1—H1A	119.7	C11—C12—H12B	110.9
C6—C1—H1A	119.7	H12A—C12—H12B	108.9
C1—C2—C3	120.45 (13)	N2—C13—N1	110.75 (11)
C1—C2—H2A	119.8	N2—C13—C12	114.38 (12)
C3—C2—H2A	119.8	N1—C13—C12	101.95 (10)
C4—C3—C2	119.75 (13)	N2—C13—H13A	109.8
C4—C3—H3A	120.1	N1—C13—H13A	109.8
C2—C3—H3A	120.1	C12—C13—H13A	109.8
C3—C4—C5	119.91 (14)	O2—C14—N2	122.61 (14)
C3—C4—H4A	120.0	O2—C14—C15	122.00 (12)
C5—C4—H4A	120.0	N2—C14—C15	115.36 (12)
C4—C5—C6	120.94 (13)	C14—C15—C17	111.68 (13)
C4—C5—H5A	119.5	C14—C15—C16	107.63 (14)
C6—C5—H5A	119.5	C17—C15—C16	110.13 (13)
C5—C6—C1	118.44 (12)	C14—C15—H15A	109.1
C5—C6—C7	119.43 (12)	C17—C15—H15A	109.1
C1—C6—C7	122.13 (12)	C16—C15—H15A	109.1
C8—C7—C6	126.53 (12)	C15—C16—H16A	109.5
C8—C7—H7A	116.7	C15—C16—H16B	109.5
C6—C7—H7A	116.7	H16A—C16—H16B	109.5
C7—C8—C9	120.87 (11)	C15—C16—H16C	109.5
C7—C8—H8A	119.6	H16A—C16—H16C	109.5
C9—C8—H8A	119.6	H16B—C16—H16C	109.5
O1—C9—N1	120.81 (11)	C18—C17—C15	114.07 (12)
O1—C9—C8	121.80 (11)	C18—C17—H17A	108.7
N1—C9—C8	117.39 (11)	C15—C17—H17A	108.7
N1—C10—C11	104.19 (10)	C18—C17—H17B	108.7
N1—C10—H10A	110.9	C15—C17—H17B	108.7
C11—C10—H10A	110.9	H17A—C17—H17B	107.6
N1—C10—H10B	110.9	C17—C18—H18A	109.5
C11—C10—H10B	110.9	C17—C18—H18B	109.5
H10A—C10—H10B	108.9	H18A—C18—H18B	109.5
C10—C11—C12	103.95 (11)	C17—C18—H18C	109.5
C10—C11—H11A	111.0	H18A—C18—H18C	109.5
C12—C11—H11A	111.0	H18B—C18—H18C	109.5
C6—C1—C2—C3	−0.4 (3)	N1—C10—C11—C12	−24.24 (15)
C1—C2—C3—C4	0.2 (3)	C10—C11—C12—C13	35.81 (15)
C2—C3—C4—C5	0.2 (3)	C14—N2—C13—N1	−119.95 (13)
C3—C4—C5—C6	−0.3 (3)	C14—N2—C13—C12	125.55 (13)
C4—C5—C6—C1	0.0 (2)	C9—N1—C13—N2	72.51 (17)
C4—C5—C6—C7	179.40 (15)	C10—N1—C13—N2	−103.96 (13)
C2—C1—C6—C5	0.4 (3)	C9—N1—C13—C12	−165.39 (14)

C2—C1—C6—C7	−179.02 (17)	C10—N1—C13—C12	18.14 (16)
C5—C6—C7—C8	−177.81 (15)	C11—C12—C13—N2	86.96 (14)
C1—C6—C7—C8	1.6 (3)	C11—C12—C13—N1	−32.61 (14)
C6—C7—C8—C9	179.71 (14)	C13—N2—C14—O2	−3.6 (2)
C10—N1—C9—O1	−0.7 (2)	C13—N2—C14—C15	178.31 (11)
C13—N1—C9—O1	−176.95 (14)	O2—C14—C15—C17	41.89 (18)
C10—N1—C9—C8	178.64 (13)	N2—C14—C15—C17	−139.99 (13)
C13—N1—C9—C8	2.4 (2)	O2—C14—C15—C16	−79.11 (18)
C7—C8—C9—O1	5.1 (2)	N2—C14—C15—C16	99.01 (15)
C7—C8—C9—N1	−174.23 (14)	C14—C15—C17—C18	68.78 (18)
C9—N1—C10—C11	−172.93 (12)	C16—C15—C17—C18	−171.68 (16)
C13—N1—C10—C11	3.78 (17)		

Hydrogen-bond geometry (Å, °)

<i>D</i> —H $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> —H	H $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> —H $\cdots$ <i>A</i>
N2—H1N2 $\cdots$ O1 ⁱ	0.81 (2)	2.09 (2)	2.8789 (16)	163 (2)

Symmetry codes: (i) $-x+3/2, y-1/2, -z+1$.

Fig. 1

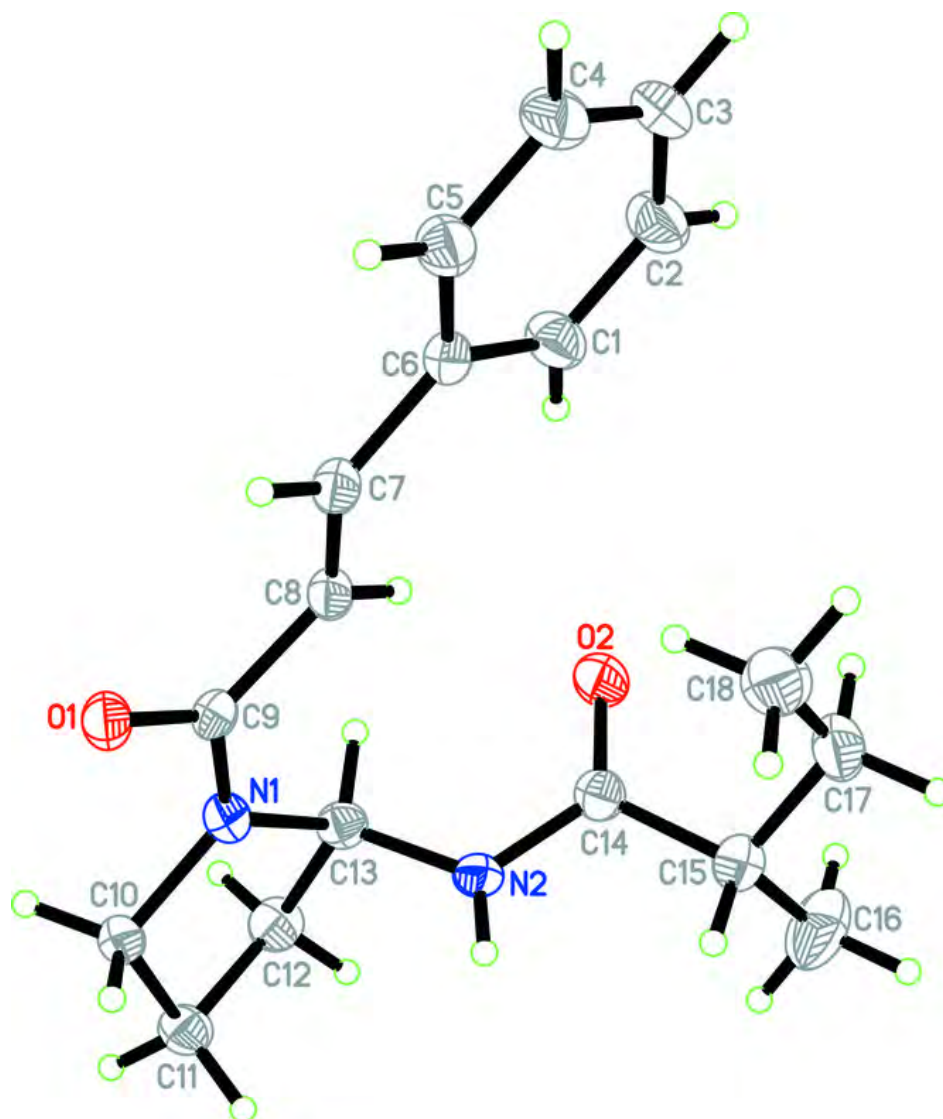
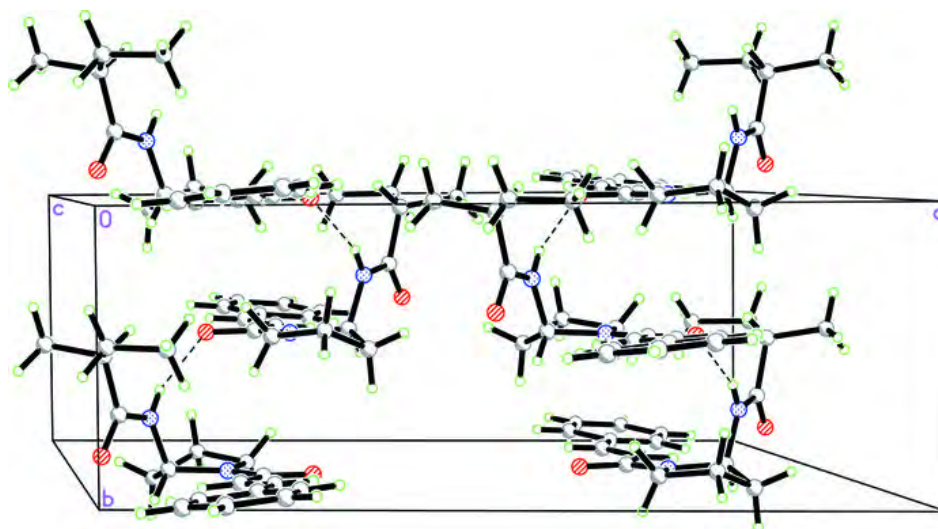


Fig. 2





Pulcherrins D–R, potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*

Orapun Yodsaoe^a, Chatchanok Karalai^{a,*}, Chanita Ponglimanont^a, Supinya Tewtrakul^b, Suchada Chantrapromma^a

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand

^b Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2011

Received in revised form 13 June 2011

Accepted 24 June 2011

Available online 30 June 2011

Keywords:

Caesalpinia pulcherrima

Anti-inflammatory

Cassane-type diterpenes

Pulcherrins D–R

ABSTRACT

Bioactivity-guided isolation and purification of the dichloromethane extract from the roots of *Caesalpinia pulcherrima* yielded 15 new cassane-type diterpenes, named pulcherrins D–R (**1–15**) together with eight known compounds. The structures of the new metabolites were determined on the basis of spectroscopic analyses including 1D- and 2D-NMR and mass spectroscopy. The anti-inflammatory activity of isolated compounds was investigated with the lipopolysaccharide (LPS)-induced murine macrophage RAW 264.7 cell lines. Compounds **8**, **9**, **11–15**, and **17–23** showed potent NO inhibitory activity.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Caesalpinia pulcherrima (L.) Swartz, locally known as ‘Hang Nok Yung Thai’,¹ is a large perennial shrub or small tree, that is, widely distributed in tropical areas and has been used as an ornamental plant.¹ As regards its biological activities, *C. pulcherrima* exhibits cytotoxic,^{2,3} antitubercular,³ antibacterial,⁴ and antifungal activities⁴ and is also active against DNA repair-deficient yeast mutant.⁵ A preliminary screening of the bioactivity of the crude extract from the roots of *C. pulcherrima* has shown strong inhibition of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cell lines. Nitric oxide (NO) is one of the inflammatory mediators causing inflammation in many organs. In the preceding paper, our group have isolated pulcherrins A–C and neocaesalpins P–R from the stems of *C. pulcherrima*.⁶ As a continuation of our study, we now report the isolation and structure elucidation of 15 new cassane-type diterpenes, and their anti-inflammatory activity observed with LPS-induced RAW 264.7 cell lines as well. This is the first report of the NO inhibitory activity of the isolated diterpenes from *C. pulcherrima*.

2. Results and discussion

The CH₂Cl₂ extract from the roots of *C. pulcherrima* was subjected to vacuum liquid chromatography (VLC)⁷ and column

chromatography over silica gel to afford 15 new diterpenes (**1–15**) together with eight known compounds (**16–23**). The known compounds were identified as vouacapen-5 α -ol (**16**),² 6 β -cinnamoyl-7 β -hydroxyvouacapen-5 α -ol (**17**),² isovouacapenol C (**18**),⁴ pulcherrimin C (**19**),⁵ pulcherrimin A (**20**),⁵ pulcherrimin E (**21**),⁸ pulcherrimin B (**22**),⁵ and 8,9,11,14-didehydrovouacapen-5 α -ol (**23**)² by comparison of their spectroscopic data with those reported in the literatures and comparison with the authentic samples. Compounds **1–14** showed characteristic of the 2,3-disubstituted furan by the Ehrlich reagent⁹ and the UV absorptions.¹⁰ The IR spectrum of all new compounds showed the presence of as ester carbonyl (1700–1777 cm^{−1}) and hydroxyl (3549–3425 cm^{−1}) functionalities.

Pulcherrin D (**1**) had the molecular formula C₂₂H₃₂O₄ ([M]⁺ *m/z* 360.2301) based on HREIMS. The presence of a 2,3-furanocassane framework was inferred from the ¹H and ¹³C NMR spectral data (Table 1). The ¹H NMR spectrum showed four singlet signals of three aliphatic methyl groups at δ 0.89 (Me-18), 1.00 (Me-19), and 1.04 (Me-20) and an acetoxy methyl group at δ 2.00 (OCOCH₃) and a doublet signal of a secondary methyl group at δ 0.94 (*J*=6.9 Hz, Me-17). The signal of a 2,3-disubstituted furan ring was evident from resonances at δ 6.12 and 7.16 (each d, *J*=1.8 Hz, H-15 and H-16, respectively). The ¹³C NMR spectroscopic data displayed 22 carbons including those of an ester carbonyl carbon at δ 170.7 (OCOCH₃). An oxymethine proton was displayed at δ 5.22 (td, *J*=11.1, 6.0 Hz, H-7; δ _C 72.3) whose coupling constants suggested its axial orientation. This proton also showed HMBC correlations to

* Corresponding author. Tel.: +66 7428 8444; fax: +66 7455 8841; e-mail addresses: chatchanok.k@psu.ac.th, chatchanok_k@yahoo.com (C. Karalai).

Table 1¹H and ¹³C NMR (300 and 75 MHz, CDCl₃) spectroscopic data of compounds **1–3** in CDCl₃ (δ in ppm, multiplicities, *J* in Hz)^a

Position	1		2		3	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	32.3	1.30–1.35 m 1.37–1.42 m	35.2	1.26–1.30 m 1.42–1.46 m	35.0	1.41–1.45 m 1.48–1.51 m
2	18.1	1.49–1.53 m 1.55–1.59 m	18.1	1.34–1.40 m 1.61–1.65 m	18.0	1.45–1.48 m 1.67–1.71 m
3 α	35.8	1.11 br d (8.4)	37.5	1.05–1.10 m	37.8	1.13–1.18 m
β		1.55–1.60 m		1.54–1.58 m		1.63–1.67 m
4	38.5	—	39.3	—	39.1	—
5	77.9	—	77.7	—	77.2	—
6 α	31.5	2.01 dd (12.9, 6.0)	71.3	4.15 d (3.9)	73.4	5.48 d (4.2)
β		1.64 dd (12.9, 11.1)				
7 α	72.3	5.22 td (11.1, 6.0)	74.8	5.38 dd (11.4, 3.9)	69.1	4.31 dd (10.8, 4.2)
8	39.8	1.87 td (11.1, 4.8)	35.0	2.09–2.13 m	37.7	1.93 ddd (12.0, 10.8, 5.1)
9	36.8	2.42–2.48 m	37.2	2.41–2.44 m	37.1	2.36 br dd (12.0, 8.7)
10	40.9	—	40.6	—	41.2	—
11	22.4	2.30–2.34 m 2.44–2.49 m	21.7	2.39–2.42 m 2.44–2.47 m	21.6	2.44–2.49 m 2.50–2.53 m
12	149.3	—	149.4	—	149.2	—
13	121.8	—	121.6	—	121.9	—
14	27.6	2.75 qd (6.9, 4.8)	27.8	2.72 qd (6.9, 5.1)	27.3	3.02 qd (6.9, 5.1)
15	109.6	6.12 d (1.8)	109.5	6.12 d (2.1)	109.7	6.21 d (1.8)
16	140.5	7.16 d (1.8)	140.5	7.16 d (2.1)	140.5	7.23 d (1.8)
17	17.1	0.94 d (6.9)	17.3	0.92 d (6.9)	17.1	1.07 d (6.9)
18	28.0	0.89 s	27.6	0.95 s	27.7	1.04 s
19	24.7	1.00 s	25.5	1.38 s	25.3	1.21 s
20	17.4	1.04 s	17.2	1.29 s	17.0	1.34 s
OCOCH ₃	170.7	—	170.1	—	171.4	—
OCOCH ₃	21.3	2.00 s	21.2	2.08 s	21.7	2.12 s

^a Assignments were based on HMQC, HMBC, and COSY experiments.

the carbons at δ 27.6 (C-14), 31.5 (C-6), 39.8 (C-8), and 170.7 (OCOCH₃), which suggested the location of the OAc group at C-7. In the NOESY spectrum, the correlations between the oxymethine proton at δ 5.22 (H-7) and the protons at δ 0.94 (Me-17), 2.01 (H-6 α), and 2.42–2.48 (H-9) placed them on the same side of the molecule. An OH group was placed at C-5 (δ 77.9) and assumed to be α -oriented by biogenetic pathway and comparison with the previously isolated furanoditerpenoids from this plant.^{2–6,8,11,12} From these data, **1** was deduced to be 7 β -acetoxylvouacapen-5 α -ol and named as pulcherrin D.

Pulcherrin E (**2**) had the molecular formula C₂₂H₃₂O₅ ([M]⁺ *m/z* 376.2250) inferred from HREIMS. The ¹H and ¹³C NMR spectral data (Table 1) of **2** were closely related to those of **1**. The only difference was found as replacement of the methylene protons at δ 1.64 and 2.01 (2H-6) in **1** with an oxymethine proton at δ 4.15 (d, *J*=3.9 Hz; δ_C 71.3) in **2**. The HMBC correlations of the latter proton with the carbons at δ 35.0 (C-8), 39.3 (C-4), 40.6 (C-10), 74.8 (C-7), and 77.7 (C-5) suggested its location at C-6 whose α -orientation was suggested by its NOESY cross-peaks with Me-18 (δ 0.95) and H-7 (δ 5.38) and the small vicinal coupling constants (*J*_{7ax,6eq}=3.9 Hz). Therefore, **2** was 6 β -hydroxy-7 β -acetoxylvouacapen-5 α -ol and was named as pulcherrin E.

Pulcherrin F (**3**) had the same molecular formula C₂₂H₃₂O₅ as **2**. The ¹H and ¹³C NMR spectral data (Table 1) of **3** were closely related to those of **2**, which differed only in the chemical shifts of positions 6 and 7. The oxymethine proton H-6 of **3** appeared at δ_H 5.48 (δ_C 73.4) more downfield than that of **2** (δ_H 4.15; δ_C 71.3) as a result of the deshielding effect of the OAc group while H-7 of **3** resonanced at δ_H 4.31 (δ_C 69.1), higher field than that of **2** (δ_H 5.38; δ_C 74.8). The HMBC correlations of an oxymethine proton at δ 5.48 (H-6) with the carbons at δ 37.7 (C-8), 39.1 (C-4), 41.2 (C-10), 69.1 (C-7), 77.2 (C-5), and 171.4 (OCOCH₃) and of an oxymethine proton at δ 4.31 (H-7) with the carbons at δ 27.3 (C-14), 37.7 (C-8), and 73.4 (C-6) confirmed the locations of the OAc group at C-6 and OH at C-7, respectively. The NOESY cross-peaks of H-6/H-7/H-9 and H-7/H-6/H-

17 confirmed the α -orientations of H-6 and H-7. Thus, **3** was assigned to be 6 β -acetoxyl-7 β -hydroxylvouacapen-5 α -ol and was named as pulcherrin F.

The molecular weight of pulcherrin G (**4**), C₂₇H₃₄O₅, was assigned at *m/z* 438.2410 [M]⁺ by HREIMS. The NMR spectra (Table 2) of **4** displayed characteristic similar to those of **2** except for the replacement of an acetoxy group at δ 2.08 in **2** with a benzoyloxy group at δ 7.40 (br t, *J*=7.5 Hz; H-4', H-6'), 7.53 (tt, *J*=7.5, 1.2 Hz; H-5'), and 8.02 (br d, *J*=7.5 Hz; H-3', H-7') in **4**. This evidence was confirmed by HMBC correlations of an oxymethine proton at δ 5.62 (dd, *J*=10.8, 3.9 Hz; H-7) to the carbons at δ 27.7 (C-14), 35.2 (C-8), and 165.6 (C-1'), and of H-6 (δ 4.31) with the carbons at δ 35.2 (C-8), 39.3 (C-4), 40.7 (C-10), 75.6 (C-7), and 77.8 (C-5). An oxymethine proton H-6 was deduced to be equatorially oriented by a small vicinal coupling constant (*J*_{6eq,7ax}=3.9 Hz), whereas H-7 was an axial proton by the large vicinal coupling constant (*J*_{7ax,8ax}=10.8 Hz). It was further supported by NOESY cross-peaks of H-7 with Me-17, H-9, and H-6. Thus, **4** was assigned to be 6 β -hydroxy-7 β -benzoyloxyvouacapen-5 α -ol and was named as pulcherrin G. This compound was first isolated from natural product, however it was previously obtained from the partial synthesis.⁸

Pulcherrin H (**5**) had the molecular formula C₂₇H₃₄O₄ by HREIMS. The ¹H and ¹³C NMR spectra (Table 2) were comparable to those of **1** except that the signals of an acetoxy group in **1** was replaced by those of a benzoyloxy group in **5** shown as the resonances at δ 7.37 (t, *J*=7.2 Hz; H-4', H-6'), 7.48 (tt, *J*=7.2, 1.5 Hz; H-5'), and 7.98 (dt, *J*=7.2, 1.5 Hz; H-3', H-7'). The correlations of an oxymethine proton at δ 5.29 (H-3) with the carbons at δ 19.6 (C-19), 23.1 (C-18), 23.8 (C-2), 43.5 (C-4), and 166.2 (C-1') in the HMBC spectrum placed the benzoyloxy group at C-3. The relative stereochemistry of H-3 was assigned to be axially oriented by the large and small vicinal coupling constants (*J*_{3ax,2ax}=11.4 Hz, *J*_{3ax,2eq}=4.8 Hz). In the NOESY spectrum, the benzoyloxy protons at δ 7.98 (H-3', H-7') displayed a cross-peak with the methyl protons at δ 1.17 (Me-19), confirming the β -orientation of the benzoyloxy

Table 2¹H and ¹³C NMR (300 and 75 MHz, CDCl₃) spectroscopic data of compounds **4–7** in CDCl₃ (δ in ppm, multiplicities, J in Hz)^a

Position	4		5		6		7		4 (from synthesis)	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
1	35.2	1.31–1.36 m 1.47–1.52 m	31.2	1.40 td (8.4, 2.7) 1.70–1.77 m	34.9	1.34–1.40 m 1.50–1.56 m	34.8	1.31–1.40 m 1.45–1.54 m	35.2	1.38 m 1.54 m
2	18.2	1.40–1.44 m 1.60–1.66 m	23.8	1.73–1.77 m 1.80–1.87 m	18.3	1.38–1.44 m 1.60–1.68 m	18.2	1.35–1.43 m 1.60–1.70 m	18.2	1.50 m 1.74 m
3α	37.5	1.08–1.12 m	77.8	5.29 dd (11.4, 4.8)	38.1	1.02 br d (8.4) 1.60–1.68 m	38.1	1.05 br d (9.3) 1.61–1.68 m	37.5	1.16 m 1.65 m
β	—	1.60–1.65 m	—	—	—	—	—	—	—	—
4	39.3	—	43.5	—	39.0	—	39.0	—	39.3	—
5	77.8	—	78.6	—	76.4	—	76.3	—	77.8	—
6α	71.4	4.31 d (3.9)	26.1	1.55 br d (12.0) 1.80–1.90 m	72.8	5.47 t (2.7)	72.3	5.31 dd (3.0, 2.4)	71.5	4.38 d (3.8)
β	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7α	75.6	5.62 dd (10.8, 3.9)	24.1	1.42–1.50 m 1.67–1.73 m	31.6	1.53 ddd (14.4, 3.9, 2.7) 2.23 td (14.4, 2.7)	31.5	1.50 dt (13.8, 2.4) 2.18 td (13.8, 3.0)	75.5	5.71 dd (11.4, 3.8)
β	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	35.2	2.33 ddd (12.0, 10.8, 4.8)	34.3	1.70–1.76 m	30.7	1.91–2.05 m	30.6	1.91–2.04 m	35.3	2.42 td (11.4, 5.0)
9	37.3	2.47–2.50 m	37.6	2.27–2.31 m	38.0	2.30–2.40 m	38.0	2.26–2.44 m	37.3	2.51 m
10	40.7	—	41.0	—	41.3	—	41.4	—	40.7	—
11	21.8	2.46–2.50 m	22.4	2.29–2.35 m 2.41–2.45 m	21.9	2.31–2.38 m 2.39–2.47 m	21.8	2.31–2.39 m 2.39–2.49 m	21.8	2.56 m
12	149.5	—	149.4	—	149.5	—	149.5	—	149.5	—
13	121.6	—	122.6	—	122.4	—	122.4	—	121.6	—
14	27.7	2.82 qd (6.9, 4.8)	31.3	2.55 qd (6.9, 3.9)	31.2	2.40–2.49 m	31.1	2.44–2.54 m	27.7	2.89 dq (7.0, 5.0)
15	109.5	6.10 d (1.8)	109.5	6.11 d (1.5)	109.5	6.06 d (1.8)	109.5	6.09 d (1.8)	109.5	6.17 d (1.9)
16	140.6	7.16 d (1.8)	140.4	7.15 d (1.5)	140.4	7.11 d (1.8)	140.4	7.14 d (1.8)	140.6	7.23 d (1.9)
17	17.4	0.94 d (6.9)	17.5	0.95 d (6.9)	17.6	0.90 d (7.2)	17.6	0.92 d (6.6)	17.4	1.02 d (7.0)
18	27.8	0.96 s	23.1	0.97 s	27.8	0.93 s	27.7	0.94 s	17.3	1.41 s
19	25.5	1.39 s	19.6	1.17 s	26.0	1.13 s	25.9	1.17 s	27.8	1.04 s
20	17.3	1.34 s	17.2	1.05 s	17.2	1.44 s	16.9	1.37 s	25.5	1.47 s
1'	165.6	—	166.2	—	165.8	—	166.0	—	165.6	—
2'	130.0	—	131.0	—	130.6	—	118.6	6.33 d (15.9)	130.0	—
3' ^b	129.7	8.02 br d (7.5)	129.5	7.98 dt (7.2, 1.5)	129.7	7.95 br d (7.2)	145.2	7.60 d (15.9)	129.7	8.01 dd (8.4, 1.3)
4' ^b	128.6	7.40 br t (7.5)	128.3	7.37 t (7.2)	128.6	7.33 br t (7.2)	134.3	—	128.6	7.48 dd (8.4, 8.4)
5' ^c	133.3	7.53 tt (7.5, 1.2)	132.7	7.48 tt (7.2, 1.5)	133.1	7.45 br t (7.2)	128.6	7.42–7.46 m	133.3	7.60 tm (8.4)
6' ^c	—	—	—	—	—	—	129.7	7.28–7.30 m	—	—
7'	—	—	—	—	—	—	130.4	7.28–7.30 m	—	—

^a Assignments were based on HMQC, HMBC, and COSY experiments.^b Compounds **4–6**: 3' = 7' and 4' = 6'.^c Compound **7**: 5' = 9' and 6' = 8'.

group. Thus, **5** was assigned to be 3β-benzoyloxyvouacapen-5α-ol and was named as pulcherrin H.

Pulcherrin I (**6**) showed the molecular ion peak at *m/z* 422.2459 [M]⁺ by HREIMS corresponding to a molecular formula of C₂₇H₃₄O₄. The ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data (Table 2) were closely related to those of **5** except for the arrangement of a benzoyloxy group whose location in **6** was at C-6, whereas that of **5** at C-3. The observed HMBC correlations of a proton at δ 5.47 (H-6) with the carbons at δ 30.7 (C-8), 31.6 (C-7), 39.0 (C-4), 41.3 (C-10), 76.4 (C-5), and the carbonyl carbon of a benzoyloxy group at δ 165.8 (C-1') supported the assignment. The small vicinal coupling constants (*J*_{6eq,7ax} = 2.7 Hz and *J*_{6eq,7eq} = 2.7 Hz) suggested the relative stereochemistry of H-6 to be equatorially oriented. In the NOESY spectrum, an oxymethine proton at δ 5.47 (H-6) showed cross-peaks with the methyl protons at δ 0.93 (Me-18) and the aromatic protons at δ 7.95 (H-3', H-7') correlated with the methyl protons at δ 1.44 (Me-20), confirming a β-orientation of a benzoyloxy group. Thus, **6** was assigned to be 6β-benzoyloxyvouacapen-5α-ol and was named as pulcherrin I.

Pulcherrin J (**7**) showed the molecular formula C₂₉H₃₆O₄ ([M]⁺ *m/z* 448.2617) by HREIMS. The ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data (Table 2) were closely related to those of **6** except for the replacement of a benzoyloxy group at δ 7.33 (br t, *J* = 7.2 Hz; H-4', H-6'), 7.45 (br t, *J* = 7.2 Hz; H-5'), and 7.95 (br d, *J* = 7.2 Hz; H-3', H-7') in **6** with a *trans*-cinnamoyloxy moiety in **7** at δ 6.33 and 7.60 (each d, *J* = 15.9 Hz, H-2' and H-3', respectively) and 7.28–7.46 (m, H-5' to H-9'). The HMBC correlation of H-6 (δ 5.31) to the carbonyl carbon of the cinnamoyloxy group at δ 166.0 (C-1') suggested the location of the *trans*-

cinnamoyloxy side chain at C-6. Thus, **7** was assigned to be 6β-cinnamoyloxyvouacapen-5α-ol and was named as pulcherrin J.

Pulcherrin K (**8**) had the molecular formula C₂₇H₃₂O₆ ([M]⁺ *m/z* 452.2198), based on HREIMS. The ¹H and ¹³C NMR spectral data (Table 3) were related to those of **6**. The major differences were the replacement of the ¹H NMR signals of Me-19 at δ 1.13 and the methylene protons at δ 1.53 (ddd, *J* = 14.4, 3.9, 2.7 Hz; H_{eq}-7) and 2.23 (td, *J* = 14.4, 2.7 Hz; H_{ax}-7) of **6** with an aldehydic proton at δ 9.65 (d, *J* = 1.2 Hz; H-19) and an oxymethine proton at δ 4.33 (dd, *J* = 11.1, 4.2 Hz; H-7), respectively in **7**. The HMBC correlation of an oxymethine proton at δ 4.33 (H-7) with the carbons at δ 27.2 (C-14), 37.7 (C-8), and 73.8 (C-6), of an aldehydic proton at δ 9.65 (H-19) with the carbons at δ 29.1 (C-3), 55.8 (C-4), and 78.6 (C-5) and of the methyl protons at δ 1.10 (Me-18) with the carbons at δ 29.1 (C-3), 55.8 (C-4), 78.6 (C-5), and 202.3 (C-19) confirmed the attachments of an OH and an aldehyde groups at C-7 and C-4, respectively. In the NOESY spectrum, the aldehydic proton at δ 9.65 (H-19) displayed a cross-peak with the methyl protons at δ 1.18 (Me-20) indicating a β-orientation. The large and small coupling constants (*J*_{7ax,8ax} = 11.1 Hz, *J*_{7ax,6eq} = 4.2 Hz) of H-7 and its NOESY cross-peaks with H-6, H-9, and Me-17 confirmed an α-axial orientation. Thus, **8** was deduced to be 6β-benzoyloxy-7β-hydroxy-19-formylvouacapen-5α-ol and was named as pulcherrin K.

Pulcherrin L (**9**) was deduced as C₂₇H₃₄O₅ from an exact mass measurement ([M]⁺ *m/z* 438.2405) by HREIMS. The ¹H and ¹³C NMR spectral data (Table 3) of **9** were comparable to those of **6**. The difference was shown as the replacement of a singlet methyl at δ 1.13 (Me-19) in **6** with an oxymethylene proton signals at δ 4.88

Table 3¹H and ¹³C NMR (300 and 75 MHz, CDCl₃) spectroscopic data of compounds **8–11** in CDCl₃ (δ in ppm, multiplicities, *J* in Hz)^a

Position	8		9		10		11	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	34.2	1.45–1.49 m 1.51–1.55 m	34.6	1.30–1.36 m 1.40–1.44 m	34.7	1.45–1.50 m 1.70–1.75 m	33.1	1.52–1.60 m 1.86–1.92 m
2	17.8	1.40–1.50 m 1.60–1.70 m	17.9	1.43–1.47 m 1.65–1.70 m	18.7	1.40–1.44 m 1.62–1.66 m	24.3	1.80–1.86 m 2.50–2.58 m
3	29.1	1.35–1.45 m 1.85–1.95 m	31.8	1.44–1.52 m 1.58–1.70 m	34.1	1.35–1.40 m 1.75 br d (13.8)	77.7	5.28 dd (12.0, 4.5)
4	55.8	—	44.0	—	48.4	—	53.3	—
5	78.6	—	76.7	—	76.5	—	78.5	—
6	73.8	5.92 d (4.2)	71.0	4.17 t (3.6)	70.7	5.45 t (2.7)	70.9	5.57 br s
7	69.0	4.33 dd (11.1, 4.2)	35.4	1.38–1.44 m 2.19 dt (13.5, 3.6)	30.8	1.58 dt (14.1, 2.7) 2.11–2.18 m	30.4	1.60–1.74 m 2.15–2.23 m
8	37.7	1.99 td (11.1, 5.1)	29.8	2.03–2.12 m	30.7	1.92–2.04 m	30.5	2.04 br t (11.4)
9	36.7	2.20–2.33 m	38.6	2.20–2.34 m	38.0	2.11–2.25 m	37.8	2.35 td (11.4, 8.7)
10	41.2	—	41.1	—	41.7	—	41.8	—
11	22.2	2.42–2.61 m	21.9	2.36–2.46 m	22.2	2.34–2.56 m	22.2	2.40–2.60 m
12	148.8	—	149.4	—	149.3	—	149.1	—
13	121.8	—	122.5	—	122.2	—	122.2	—
14	27.2	2.96 qd (6.9, 5.1)	31.2	2.54 qd (7.2, 5.4)	31.0	2.41–2.53 m	30.9	2.44–2.55 m
15	109.6	6.12 d (1.8)	109.5	6.12 d (1.8)	109.5	6.08 d (1.5)	109.5	6.10 d (1.8)
16	140.7	7.17 d (1.8)	140.4	7.16 d (1.8)	140.5	7.13 d (1.5)	140.6	7.16 d (1.8)
17	17.0	0.97 d (6.9)	17.7	0.94 d (7.2)	17.5	0.92 d (6.9)	17.6	0.94 d (6.9)
18	19.1	1.10 s	20.8	1.11 s	24.2	0.97 s	19.9	1.22 s
19	202.3	9.65 d (1.2)	68.2	4.88 d (11.4) 5.01 d (11.4)	181.9	—	177.4	—
20	17.0	1.18 s	16.2	1.31 s	17.6	1.32 s	16.7	1.55 s
1'	167.3	—	166.6	—	165.7	—	166.1	—
2'	129.2	—	130.5	—	130.6	—	130.1	—
3'/7'	129.9	7.92 d (7.2)	129.5	7.97 br d (7.5)	129.5	7.84 br d (7.2)	129.6	7.85 d (7.5)
4'/6'	128.8	7.38 t (7.2)	128.5	7.38 t (7.5)	128.4	7.32 t (7.2)	128.3	7.27 t (7.5)
5'	133.8	7.52 br t (7.2)	132.9	7.55 br t (7.5)	132.8	7.43 tt (7.2, 1.2)	133.2	7.36 br t (7.5)
1"	—	—	—	—	—	—	165.8	—
2"	—	—	—	—	—	—	130.2	—
3"/7"	—	—	—	—	—	—	129.4	7.85 d (7.5)
4"/6"	—	—	—	—	—	—	128.5	7.18 t (7.5)
5"	—	—	—	—	—	—	133.1	7.43 br t (7.5)

^a Assignments were based on HMQC, HMBC, and COSY experiments.

and 5.01 (each d, *J*=11.4 Hz; 2H-19) in **9**. In addition the oxymethine proton H-6 in **9** appeared at δ 4.17 (t, *J*=3.6 Hz), more highfield than that of **6** (δ 5.47, t, *J*=2.7 Hz) indicating the OH group at C-6 instead of a benzoyloxy group as in **6**. The HMBC correlations of the oxymethylene proton signals at δ 4.88 and 5.01 (2H-19) with the carbons at δ 20.8 (C-18), 31.8 (C-3), 44.0 (C-4), 76.7 (C-5), and 166.6 (C-1') suggested the attachment of a benzoyloxy group at C-19. In the NOESY spectrum, the cross-peaks of the oxymethylene protons at δ 4.88 and 5.01 (2H-19) with the methyl protons at δ 1.31 (Me-20), and of an oxymethine proton at δ 4.17 (H-6) with the methyl protons at δ 1.11 (Me-18) indicated an oxymethylene protons to be β -oriented and H-6 as α -oriented, respectively. Therefore, **9** was assigned as 6 β -hydroxy-19-benzoyloxyvouacapen-5 α -ol and was named as pulcherrin L.

Pulcherrin M (**10**) showed the molecular ion [M]⁺ at *m/z* 452.2196 by HREIMS spectrum in agreement with the formula C₂₇H₃₂O₆. The ¹H and ¹³C NMR spectral data (Table 3) of **10** showed characteristics similar to those of **6** except for the disappearance of a methyl singlet at δ_H 1.13 (Me-19; δ_C 26.0) and the appearance of a carboxyl carbon at δ_C 181.9 in **10**. This finding was supported by HMBC spectrum in which the methyl protons at δ 0.97 (Me-18) were correlated with the carbons at δ 34.1 (C-3), 48.4 (C-4), 76.5 (C-5), and 181.9 (C-19). The relative stereochemistry of **10** was assigned by NOESY experiment, in which Me-18 (δ 0.97) showed a cross-peak with δ 5.45 (H-6), whereas the benzoyloxy protons H-3'/H-7' (δ 7.84) with δ 1.32 (Me-20). Therefore, **10** was assigned as 6 β -benzoyloxy-19-carboxyvouacapen-5 α -ol and was named as pulcherrin M.

The molecular weight of pulcherrin N (**11**), C₃₄H₃₆O₈ ([M]⁺ was assigned at *m/z* 572.2411) by HREIMS. The NMR spectroscopic data

(Table 3) of **11** displayed similarities with pulcherrin M (**10**) except for the presence of an additional monosubstituted benzene ring in the range δ 7.18–7.85 and an oxymethine proton at δ 5.28 (dd, *J*=12.0, 4.5 Hz; H-3) in **11**. The latter proton was attached to the oxymethine carbon at δ 77.7 in the HMQC spectrum and showed HMBC correlations to the carbons at δ 19.9 (C-18), 24.3 (C-2), 53.3 (C-4) 166.1 (C-1'), and 177.4 (C-19), confirming the location of a benzoyloxy group at C-3. The stereochemistry of H-3 as α -axial oriented was determined from the results of the large and small coupling constants (*J*_{3ax,2ax}=12.0 Hz, *J*_{3ax,2eq}=4.5 Hz) and by the observed cross-peak with Me-18 (δ 1.22) in the NOESY experiment. Thus, **11** was 3 β ,6 β -dibenzoyloxy-19-carboxyvouacapen-5 α -ol and was named as pulcherrin N.

Pulcherrin O (**12**) with the molecular formula C₃₀H₃₈O₉ by HERIMS showed comparable ¹H and ¹³C NMR spectral data (Table 4) with those of **3** except for the appearance of the additional signals of an oxymethine proton at δ_H 5.24 (H-3; δ_C 76.7) and a benzoyloxy group (δ_H 7.37–7.95; δ_C 128.4, 129.5, 130.6, 133.0, 166.1) in **12** whose location of the latter at C-3 was supported by the HMBC correlations of H-3 with the carbons at δ 19.2 (C-19), 22.7 (C-18), 43.9 (C-4), and 166.1 (C-1'). In addition the methyl doublet at δ_H 1.07 (Me-17; δ_C 17.1) in **3** was replaced with a singlet signal of a methyl ester at C-17 (δ_H 3.68; δ_C 52.2) and an ester carbonyl at δ_C 175.9 in **12**. The location of a CO₂Me group was confirmed by HMBC spectrum, in which the methine proton H-14 (δ 3.38) showed the correlations with the ester carbonyl carbon at δ 175.9. The large vicinal coupling constant of H-3 (*J*_{3ax,2ax}=10.8 Hz) and H-14 (*J*_{14ax,8ax}=8.4 Hz) suggested the relative stereochemistry of H-3 and H-14 to be α -axially oriented. In the NOESY spectrum, the hydroxyl

Table 4¹H and ¹³C NMR (300 and 75 MHz, CDCl₃) spectroscopic data of compounds **12**–**15** in CDCl₃ (δ in ppm, multiplicities, *J* in Hz)^a

Position	12		13		14		15	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	32.6	1.42–1.49 m 1.73–1.82 m	32.3	1.37–1.45 m 1.74–1.86 m	31.7	1.25–1.30 m 1.70–1.77 m	38.1	0.74–0.84 m 1.45–1.53 m
2	23.9	1.73–1.78 m 1.82–1.89 m	23.9	1.75–1.83 m	23.7	1.71–1.79 m 1.84–1.94 m	18.6	1.33–1.40 m 1.43–1.53 m
3	76.7	5.24 dd (10.8, 5.7)	76.7	5.31 dd (10.8, 4.8)	76.9	5.23 dd (11.7, 4.5)	42.0	0.98–1.10 m 1.26–1.38 m
4	43.9	—	48.2	—	43.1	—	33.2	—
5	78.8	—	79.0	—	77.2	—	54.6	0.80 dd (10.8, 2.7)
6	73.4	5.42 d (4.2)	71.3	4.16 d (3.3)	55.0	3.25 d (4.2)	22.0	1.16–1.23 m 1.55–1.63 m
7	74.0	4.05 dd (10.2, 4.2)	78.2	5.19 dd (11.1, 3.3)	54.0	3.01 d (4.2)	35.2	1.15–1.23 m 1.94–2.23 m
8	37.6	3.38 ddd (10.5, 9.9, 8.1)	34.3	2.76 ddd (11.1, 9.0, 8.4)	35.6	2.21–2.26 m	36.9	1.55–1.65 m
9	41.2	2.24–2.35 m	41.5	2.32 ddd (9.0, 7.5, 4.8)	35.3	2.24–2.38 m	56.9	1.04 td (14.1, 2.1)
10	41.1	—	40.9	—	39.1	—	37.3	—
11	21.5	2.44–2.54 m	21.4	2.47–2.55 m	23.6	2.25–2.31 m 2.38–2.44 m	36.4	1.79 t (14.1) 2.13 dd (14.1, 2.1)
12	150.7	—	150.5	—	149.8	—	211.8	—
13	113.1	—	112.8	—	122.1	—	33.4	—
14	45.6	3.38 d (8.1)	45.4	3.29 d (8.4)	31.0	2.90 qd (6.9, 5.4)	38.5	0.94 dd (5.7, 1.5)
15	108.8	6.13 d (1.8)	108.3	6.07 d (1.8)	109.3	6.15 d (1.8)	37.3	1.37–1.45 m
16	141.2	7.17 d (1.8)	144.4	7.17 d (1.8)	141.0	7.17 d (1.8)	62.3	3.47 dd (11.7, 8.1) 3.73 dd (11.7, 5.7)
17	175.9	—	174.6	—	17.1	1.11 d (6.9)	14.1	1.17 s
18	22.7	1.03 s	15.2	1.06 s	23.2	1.16 s	33.4	0.78 s
19	19.2	1.26 s	64.0	4.63 d (12.0) 5.39 d (12.0)	19.6	1.34 s	21.5	0.73 s
20	16.5	1.40 s	15.7	1.35 s	16.4	1.24 s	14.1	0.71 s
OCH ₃	52.2	3.68 s	52.1	3.68 s				
OCOCH ₃	170.8		170.7					
OCOCH ₃	21.7	2.10 s	21.0	2.00 s				
19-OCOCH ₃			171.6					
19-OCOCH ₃			21.0	1.98 s				
1'	166.1	—	166.1	—	166.2	—		
2'	130.6	—	130.4	—	130.8	—		
3'/7'	129.5	7.95 br d (7.2)	129.7	8.03 br d (7.8)	129.6	8.00 br d (7.5)		
4'/6'	128.4	7.37 t (7.2)	128.3	7.38 t (7.8)	128.4	7.39 t (7.5)		
5'	133.0	7.92 tt (7.2, 2.1)	133.0	7.50 br t (7.8)	132.9	7.51 tt (7.5, 1.5)		
5-OH		2.01 br s		2.21 s				

^a Assignments were based on HMQC, HMBC, and COSY experiments.

proton at C-5 (δ 2.01) showed cross-peaks with H-3, H-6, H-7, H-9, and Me-18, whereas the methine proton H-14 (δ 3.38) displayed cross-peaks with H-7 and H-9 but not with H-8 supporting a benzoyloxy and CO₂Me group as β -oriented. Thus, **12** was deduced to be 3 β -benzoyloxy-6 β -acetoxy-7 β -hydroxy-14 β -methoxycarbonylvouacapen-5 α -ol and was named as pulcherrin O.

The molecular formula of pulcherrin P (**13**) was determined to be C₃₂H₃₈O₁₁ ([M]⁺ *m/z* 598.2423) by HREIMS. The ¹H and ¹³C NMR spectral data (Table 4) of **13** were similar to those of **12**. The differences were shown as a replacement of a singlet at δ 1.26 (Me-19) in **12** with an oxymethylene protons at δ 4.63 and 5.39 (each, d, *J*=12.0 Hz; 2H-19) and an acetyl group (δ_H 1.98; δ_C 21.0, and δ_C 171.6) in **13**, whose position was supported by the HMBC correlations of oxymethylene protons at δ 4.63 and 5.39 (2H-19) with the carbons at δ 15.2 (C-18), 48.2 (C-4), 76.7 (C-3), 79.0 (C-5), and 171.6 (OCOCH₃). Furthermore the HMBC correlations of an oxymethine proton at δ 5.19 (H-7) with the carbons at δ 34.3 (C-8), 45.4 (C-14), and 170.7 (OCOCH₃) and of an oxymethine proton at δ 4.16 (H-6) with carbons at δ 34.3 (C-8), 40.9 (C-10), 78.2 (C-7), and 79.0 (C-5) implied the locations of an OAc group and an OH at C-7 and C-6, respectively. The relative stereochemistry of **13** was analyzed by NOESY experiment, in which the oxymethylene protons (2H-19) showed a cross-peak with the methyl protons at δ 1.35 (Me-20). Therefore, **13** was 3 β -benzoyloxy-6 β -hydroxy-7 β ,19-diacetoxy-14 β -methoxycarbonylvouacapen-5 α -ol and was named as pulcherrin P.

Pulcherrin Q (**14**) showed the molecular ion [M]⁺ at *m/z* 436.2250 by HREIMS spectrum in agreement with the formula C₂₇H₃₂O₅. The ¹H and ¹³C NMR spectral data (Table 4) of **14** showed characteristics similar to those of **5** except for the presence of a 1,2-disubstituted epoxide ring resonanced as two oxymethine protons at δ_H 3.25 and 3.01 (each d, *J*=4.2 Hz; δ_C 55.0, 54.0, respectively) instead of 2 sets of methylene protons as in **5**. The signal at δ_H 3.25 was deduced to be an oxymethine proton H-6 from its HMBC correlations with the carbons at δ 39.1 (C-10), 43.1 (C-4), 54.0 (C-7), and 77.2 (C-5), and the other proton as H-7 (δ_H 3.01) from its HMBC correlations with the carbons at δ 31.0 (C-14), 35.3 (C-9), 35.6 (C-8), and 55.0 (C-6), whose data suggested an epoxide ring between C-6 and C-7. The relative stereochemistry of **14** was determined on the basis of coupling constants and the results of NOESY experiments. The large *J* values for H-6 and H-7 (*J*=4.2 Hz) suggested a *cis* epoxide ring. From the NOESY correlations, an oxymethine proton at δ 3.25 (H-6) showed cross-peaks with the protons at δ 1.16 (Me-18) and 3.01 (H-7), and an oxymethine proton at δ 3.01 (H-7) with the methyl protons at δ 1.11 (Me-17) indicating that this *cis* epoxide ring should be β -oriented. Thus, **14** was assigned as 3 β -benzoyloxy-6 β ,7 β -epoxyvouacapen-5 α -ol and was named as pulcherrin Q.

Pulcherrin R (**15**) had the molecular formula C₂₀H₃₂O₂ ([M]⁺ *m/z* 304.2405) based on HREIMS. The ¹³C NMR (Table 4) and DEPT spectral data exhibited 20 carbons including a carbonyl at δ 211.8 (C-12) and an oxymethylene carbon at δ 62.3 (C-16). The ¹H NMR spectral

data (Table 4) showed four aliphatic methyl groups at δ 0.71 (Me-20), 0.73 (Me-19), 0.78 (Me-18), and 1.17 (Me-17), and the oxymethylene protons at δ 3.47 (dd, $J=11.7, 8.1$ Hz; H-16) and 3.73 (dd, $J=11.7, 5.7$ Hz; H-16). The presence of a cyclopropane ring was deduced from the ^1H NMR, COSY, and HMQC spectra that exhibited two signals at δ_{H} 0.94 (dd, $J=5.7, 1.5$ Hz, H-14; δ_{C} 38.5) and 1.37–1.45 (m, H-15; δ_{C} 37.3). The observed HMBC correlations of a singlet methyl group at δ 1.17 (Me-17) with the carbons at δ 33.4 (C-13), 37.3 (C-15), 38.5 (C-14), and 211.8 (C-12), and of the oxymethylene protons at δ 3.47 and 3.73 (2H-16) with the carbons at δ 33.4 (C-13), 37.3 (C-15), and 38.5 (C-14) supported the assignments. These data suggested a carbonyl group at C-12 and an OH group at C-16, whereas C-13, C-14, and C-15 formed a cyclopropane ring. The NOESY cross-peaks of the proton signal at δ 1.79 (t, $J=14.1$ Hz; H_{ax} -11) with the protons at δ 0.71 (Me-20), 1.37–1.45 (H-15), and 1.55–1.65 (H-8), of a methine proton at δ 0.94 (H-14) with the methyl protons at δ 1.17 (Me-17), 1.04 (H-9) and oxymethylene protons at δ 3.47 and 3.73 (2H-16) but no correlation with H-15 supported the α -orientation of H-14, Me-17, and 2H-16 hence suggesting a *cis* cyclopropyl ring with an α -hydroxy methyl side chain. The stereochemistry of compound **15** was implied by biogenetic pathway from the pimarane skeleton.¹³ Therefore, **15** was assigned as 13,14,15-cyclopropa-12-oxo-16-hydroxypimarane and was named as pulcherrin R.

All the furanoditerpenes isolated have similar stereochemistry. The three six-membered rings A, B, and C are fused as a *trans/anti/trans* system. The configurations of H-8, Me-20, and Me-19 are β -oriented, whereas those of H-9, Me-17, Me-18, and OH-5 are α -oriented. With substituent groups, the configurations of H-3, H-6, and H-7 are α -oriented.

The CH_2Cl_2 extract from the roots of *C. pulcherrima* showed an inhibition of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cell lines with an IC_{50} value of 6.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Further separation and purification led to the isolation of 23 diterpenes (**1**–**23**) as shown in Fig. 1. The results indicated that compound **14** was the most potent inhibitor of NO production (Table 5) with an IC_{50} value of 2.9 μM and compounds **8**, **9**, **11**–**15**, and **17**–**23** significantly reduced LPS-stimulated NO production with the IC_{50} values in the range of 3.4–10.2 μM better than that of the positive control, indomethacin ($\text{IC}_{50}=14.5$ μM), whereas other compounds exhibited weak activity. Compounds **17** ($\text{IC}_{50}=5.3$ μM) and **18** ($\text{IC}_{50}=8.2$ μM) showed much better activity than **3** ($\text{IC}_{50}=59.7$ μM) suggesting that the cinnamoyloxy and benzoyloxy groups at C-6 may increase the activity more than the acetoxy group. The substitution of a benzoyloxy group at C-3 (**11**, $\text{IC}_{50}=4.2$ μM) and C-7 (**19**, $\text{IC}_{50}=6.0$ μM) demonstrated significantly increase in NO inhibitory activity compared to that of **10** ($\text{IC}_{50}=26.7$ μM). The oxidation at C-19 of **10** ($\text{IC}_{50}=26.7$ μM) resulted in 2-fold increase in activity against NO production compared to that of **6** ($\text{IC}_{50}=47.5$ μM).

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Melting points were determined on the Fisher–John melting point apparatus. The optical rotation $[\alpha]_{\text{D}}$ values were determined with a JASCO P-1020 polarimeter. The IR spectra were measured with a Perkin–Elmer FTS FT-IR spectrophotometer. The UV spectra were measured with an UV-160A spectrophotometer (Shimadzu) and principle bands (λ_{max}) were recorded as wavelengths (nm) and $\log \epsilon$ in MeOH solution. The ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded using 300 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield™ spectrometers in CDCl_3 solution. Chemical shifts are recorded in parts per million (δ) with tetramethylsilane (TMS) as an internal reference. The EIMS was obtained from a MAT 95 XL mass spectrometer. Vacuum liquid chromatography (VLC) and column chromatography (CC) were

carried out on silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) and silica gel 100 (Merck), respectively.

3.2. Reagents

Lipopolysaccharide (LPS, from *Escherichia coli*), RPMI-1640 medium, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), indomethacin and phosphate buffer saline (PBS) were purchased from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, Missouri, USA). Fetal calf serum (FCS) was bought from Gibco (Invitrogen, California, USA). Penicillin–streptomycin was purchased from Invitrogen (Invitrogen, California, USA). 96-Well microplates were obtained from Nunc (Nunc, Birkroed, Denmark). ELISA test kits of PGE₂ and TNF- α were from R&D systems (R&D systems, Minnesota, USA). Other chemicals were from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, Missouri, USA).

3.3. Plant material

C. pulcherrima (L.) Swartz. was collected from Songkhla province, Thailand in October 2007. Identification was made by Assoc. Prof. Dr. Kitichate Sridith, Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University and a specimen (No. SC51) was deposited at the Prince of Songkla University Herbarium.

3.4. Extraction and isolation

Air-dried roots (6.3 kg) of *C. pulcherrima* was extracted with CH_2Cl_2 (each 2×10 L, for 5 days) at room temperature. The crude extract was evaporated under reduced pressure to afford a brownish CH_2Cl_2 (75.3 g) extract, which was further purified by VLC using hexane as eluent and increasing polarity with EtOAc and MeOH to give sixteen fractions (P1–P16). Fraction P2 (5.9 g) was further purified by VLC with hexane– CH_2Cl_2 (1:4, v/v) to give **23** (90.5 mg), **16** (50.2 mg), **6** (275.2 mg), **7** (90.0 mg), and **5** (28.1 mg) and a mixture of two compounds (158.0 mg), which were further separated by CC with acetone–hexane (1:9, v/v) to give **4** (15.0 mg) and **1** (10.3 mg). Fraction P4 (10.0 g) was recrystallized from CH_2Cl_2 to give **18** (2.54 g), and the mother liquor (7.5 g) was further subjected to VLC with hexane as eluent and increasing polarity with CH_2Cl_2 and EtOAc to afford six subfractions (P4a–P4f). Subfraction P4c (183.4 mg) was purified by CC with acetone–hexane (1:9, v/v) to give **2** (5.8 mg). Subfraction P4d (584.9 mg) was separated by CC with CH_2Cl_2 –hexane (7:3, v/v) to yield **14** (5.2 mg) and **9** (10.0 mg). Repeated recrystallization from CH_2Cl_2 of fraction P6 (624.2 mg) yielded **17** (138.0 mg). Fraction P7 (2.9 g) was separated by VLC with hexane as eluent and increasing polarity with CH_2Cl_2 and EtOAc to give nine subfractions (P7a–P7i) and **19** (355.0 mg). Each subfraction was further separated by CC with acetone–hexane (1:4, v/v) to afford **8** (18.2 mg) and **11** (25.0 mg) from subfraction P7e (401.4 mg), **3** (3.0 mg) from subfraction P7f (273.5 mg), and finally **10** (25.0 mg) from subfraction P7g (117.0 mg). Fraction P9 (5.0 g) was recrystallized from CH_2Cl_2 to give **21** (1.24 g). Fraction P10 (2.9 g) was further purified by VLC and eluted with a gradient of CH_2Cl_2 –EtOAc (1:4 to 1:1, v/v) to give seven subfractions (P10a–P10g). Purification of subfraction P10c (283.2 mg) by CC with acetone– CH_2Cl_2 (2:3, v/v) afforded **15** (7.0 mg) while **22** (13.0 mg) was purified from subfraction P10f (124.7 mg) by CC with CH_2Cl_2 –acetone (1:9, v/v). Fraction P13 (2.7 g) was further purified by VLC with acetone– CH_2Cl_2 (1:4, v/v) to give six subfractions (P13a–P13f). Subfraction P13c (151.7 mg) was separated by CC with EtOAc–hexane (2:3, v/v) to yield **13** (10.0 mg). Subfraction P13e (197.8 mg) was isolated by CC with EtOAc– CH_2Cl_2 (1:9, v/v) to give **12** (10.0 mg). Finally, **20** (12.5 mg) was isolated from fraction P15 (941.4 mg) by VLC (CH_2Cl_2 to MeOH– CH_2Cl_2 , 3:7, v/v) and followed by CC with EtOAc– CH_2Cl_2 (1:19, v/v).

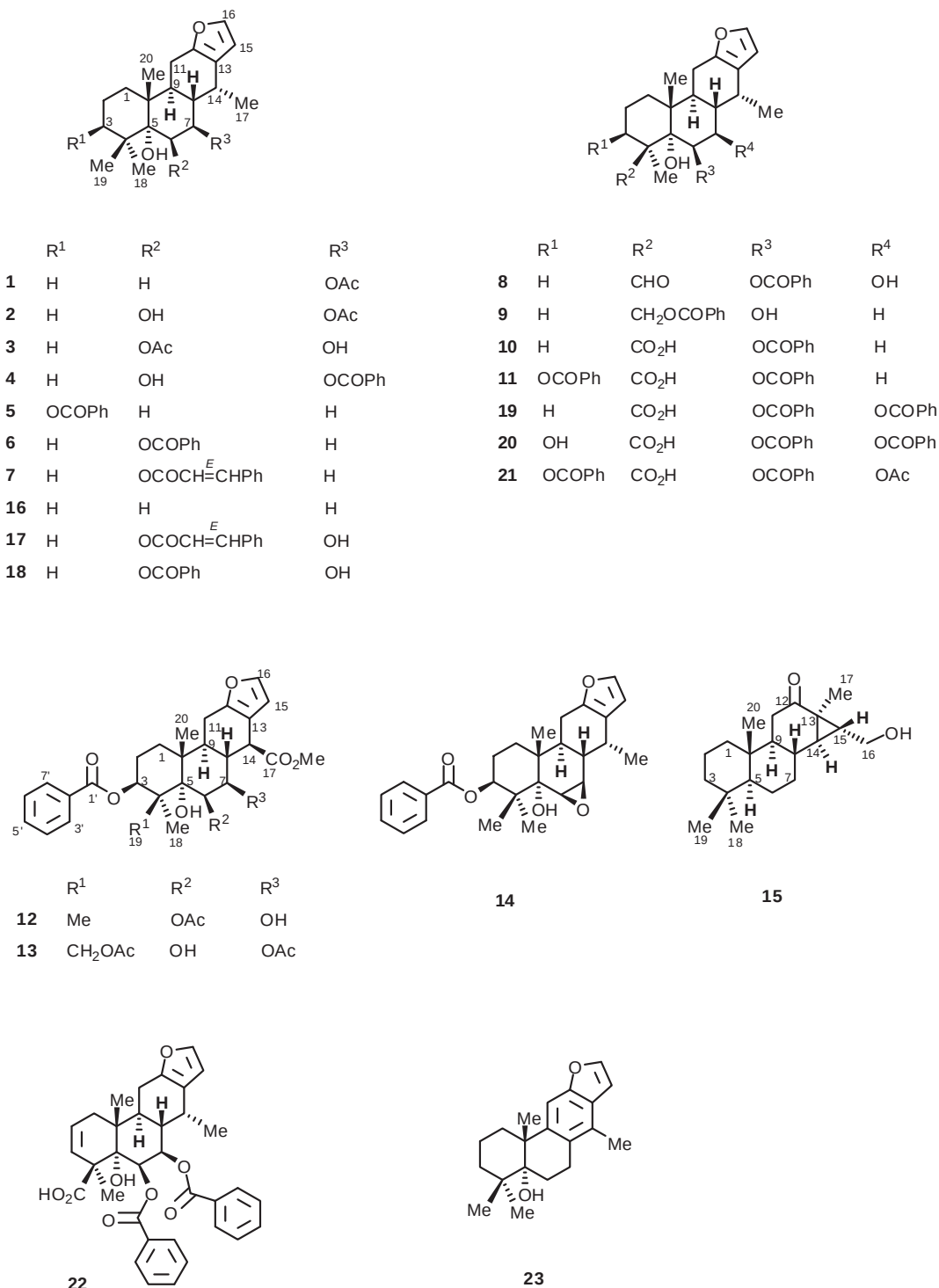


Fig. 1. Structures of compounds 1–23.

3.4.1. Pulcherrin D (1). Viscous oil; $[\alpha]_D^{25} +23.7$ (c 0.27, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 216 (3.88) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3453 (O–H), 2931 (C–H), 1723 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 1; HREIMS: m/z 360.2301 [M]⁺ (calcd for C₂₂H₃₂O₄, 360.2301).

3.4.2. Pulcherrin E (2). Viscous oil; $[\alpha]_D^{25} +36.1$ (c 0.20, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 214 (3.84) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3455 (O–H), 2920 (C–H), 1723 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 1; HREIMS: m/z 376.2250 [M]⁺ (calcd for C₂₂H₃₂O₅, 376.2250).

3.4.3. Pulcherrin F (3). Viscous oil; $[\alpha]_D^{25} +67.4$ (c 0.08, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 215 (3.78) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3425 (O–H), 2929 (C–H), 1734 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 1; HREIMS: m/z 376.2252 [M]⁺ (calcd for C₂₂H₃₂O₅, 376.2250).

3.4.4. Pulcherrin G (4). White solid; mp 126–128 °C; $[\alpha]_D^{25} +57.1$ (c 0.18, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 225 (3.26) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3494 (O–H), 2932 (C–H), 1710 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 2; HREIMS: m/z 438.2410 [M]⁺ (calcd for C₂₇H₃₄O₅, 438.2406). The physical and spectral data of **4** from

Table 5
Inhibitory effects on NO production^a of compounds **1**–**23**

Compounds	% Inhibition at various concentrations (μM)						IC ₅₀ (μM)
	0	1	3	10	30	100	
1	0.0±2.0	—	—	13.7±1.6	32.1±2.0**	70.8±2.2**	48.5
2	0.0±2.0	—	—	9.9±3.4	37.3±3.1**	71.2±1.9**	46.1
3	0.0±2.0	—	—	−0.5±3.6	24.1±3.1**	67.9±4.1**	59.7
4	0.0±8.6	—	—	36.8±1.1**	39.0±1.9**	79.4±1.2**	43.2
5	0.0±2.3	—	—	25.2±1.7**	44.2±2.4**	45.1±2.2 ^b **	>100
6	0.0±2.3	—	—	8.3±1.5	33.0±1.3**	72.8±1.4 ^b **	47.5
7	0.0±2.3	—	—	17.5±2.4	47.6±2.9**	71.8±2.0 ^b **	37.4
8	0.0±4.8	—	—	53.2±3.1**	67.0±2.1**	104.3±1.8 ^b **	10.2
9	0.0±4.8	—	—	57.9±2.6**	82.4±1.9**	104.3±2.0 ^b **	6.4
10	0.0±2.0	—	—	15.6±2.1	69.8±2.0**	76.4±2.0 ^b **	26.7
11	0.0±4.8	27.3±2.1	34.8±2.0*	71.0±3.8**	95.0±1.7**	99.4±3.4 ^b **	4.2
12	0.0±8.2	—	38.3±2.6*	78.0±4.2**	97.8±4.9 ^b **	105.4±1.9 ^b **	4.2
13	0.0±8.2	—	42.6±1.8**	77.4±3.3**	101.1±5.0**	104.8±4.8 ^b **	3.4
14	0.0±8.2	—	49.7±2.4**	81.2±4.1**	103.8±4.7**	104.9±5.4 ^b **	2.9
15	0.0±8.2	—	32.8±2.1*	67.7±4.6**	98.4±3.8**	100.5±4.6 ^b **	5.4
16	0.0±2.3	—	—	9.7±2.0	35.9±2.7**	67.5±0.9 ^b **	50.7
17	0.0±8.6	—	38.5±2.1*	60.1±0.4**	88.3±0.9**	104.0±0.9 ^b **	5.3
18	0.0±8.6	—	29.6±1.8	55.6±1.3**	71.7±4.2**	104.5±1.6 ^b **	8.2
19	0.0±9.3	−2.3±2.8	2.3±2.0	100.0±1.5 ^b **	102.0±5.2 ^b **	108.7±1.8 ^b **	6.0
20	0.0±9.3	—	36.2±2.2*	64.7±0.5**	100.0±2.0**	106.0±5.2 ^b **	5.2
21	0.0±9.3	2.3±3.2	13.0±1.3	102.2±4.2 ^b **	103.8±5.0 ^b **	108.7±1.5 ^b **	5.6
22	0.0±8.2	—	39.5±2.2*	71.5±3.3**	105.4±2.2**	105.9±3.1 ^b **	4.4
23	0.0±8.2	—	35.4±2.4*	58.1±3.7**	71.0±2.7**	100.0±3.2**	7.0
Indomethacin	0.0±4.2	—	15.5±1.7	36.4±2.3**	60.9±3.7**	104.5±1.7**	14.5

Statistical significance, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.^a Each value represents mean±S.E.M. of four determinations.^b Cytotoxic effect was observed.

the synthesis:⁸ white solid; mp 125–127 °C; $[\alpha]_D^{25} +23.7$ (c 0.27, CHCl₃); ¹H NMR and ¹³C NMR data, see Table 2.

3.4.5. Pulcherrin H (5). White solid; mp 195–196 °C; $[\alpha]_D^{25} +106.5$ (c 0.25, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 228 (3.96) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3525 (O–H), 2929 (C–H), 1700 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 2; HREIMS: m/z 422.2454 [M]⁺ (calcd for C₂₇H₃₄O₄, 422.2457).

3.4.6. Pulcherrin I (6). White solid; mp 131–133 °C; $[\alpha]_D^{25} +28.8$ (c 0.18, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 226 (3.87) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3549 (O–H), 2934 (C–H), 1708 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 2; HREIMS: m/z 422.2459 [M]⁺ (calcd for C₂₇H₃₄O₄, 422.2457).

3.4.7. Pulcherrin J (7). White solid; mp 135–136 °C; $[\alpha]_D^{25} +52.8$ (c 0.17, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 216 (3.65), 275 (3.67) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3516 (O–H), 2933 (C–H), 1709 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 2; HREIMS: m/z 448.2617 [M]⁺ (calcd for C₂₉H₃₆O₄, 448.2614).

3.4.8. Pulcherrin K (8). Viscous oil; $[\alpha]_D^{25} +20.3$ (c 0.21, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 225 (3.94) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3471 (O–H), 2935 (C–H), 1710 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 3; HREIMS: m/z 452.2198 [M]⁺ (calcd for C₂₇H₃₂O₆, 452.2199).

3.4.9. Pulcherrin L (9). Viscous oil; $[\alpha]_D^{25} +64.1$ (c 0.07, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 227 (3.82) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3471 (O–H), 2927 (C–H), 1720 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 3; HREIMS: m/z 438.2405 [M]⁺ (calcd for C₂₇H₃₄O₅, 438.2406).

3.4.10. Pulcherrin M (10). Viscous oil; $[\alpha]_D^{25} +19.7$ (c 0.20, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 225 (3.90) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3508 (O–H), 2931 (C–H), 1707 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 3; HREIMS: m/z 452.2196 [M]⁺ (calcd for C₂₇H₃₂O₆, 452.2199).

3.4.11. Pulcherrin N (11). Viscous oil; $[\alpha]_D^{25} +23.6$ (c 0.14, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 226 (3.96) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3508 (O–H), 2934 (C–H), 1704 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 3; HREIMS: m/z 572.2411 [M]⁺ (calcd for C₃₄H₃₆O₈, 572.2410).

3.4.12. Pulcherrin O (12). Viscous oil; $[\alpha]_D^{25} +26.7$ (c 0.30, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 228 (3.98) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3470 (O–H), 2930 (C–H), 1720 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 4; HREIMS: m/z 540.2361 [M]⁺ (calcd for C₃₀H₃₈O₉, 540.2359).

3.4.13. Pulcherrin P (13). Viscous oil; $[\alpha]_D^{25} +54.7$ (c 0.18, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 227 (3.89) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3468 (O–H), 2927 (C–H), 1716 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 4; HREIMS: m/z 598.2423 [M]⁺ (calcd for C₃₂H₃₈O₁₁, 598.2414).

3.4.14. Pulcherrin Q (14). Viscous oil; $[\alpha]_D^{25} +48.8$ (c 0.17, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 226 (3.92) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3436 (O–H), 2930 (C–H), 1713 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 4; HREIMS: m/z 436.2250 [M]⁺ (calcd for C₂₇H₃₂O₅, 436.2250).

3.4.15. Pulcherrin R (15). Viscous oil; $[\alpha]_D^{25} +83.8$ (c 0.20, CHCl₃); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3372 (O–H), 2926 (C–H), 1688 (C=O) cm^{−1}; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 4; HREIMS: m/z 304.2405 [M]⁺ (calcd for C₂₀H₃₂O₂, 304.2402).

3.5. Anti-inflammatory activity assay

Inhibitory effects of compounds on NO production from RAW 264.7 cells.

Inhibitory effects on NO production by murine macrophage-like RAW 264.7 cells were evaluated using a modified method from that previously reported.¹⁴ Briefly, the RAW 264.7 cell line [purchased from Cell Lines Service (CLS)] was cultured in RPMI medium supplemented with 0.1% sodium bicarbonate and 2 mM glutamine,

penicillin G (100 units/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 10% FCS. The cells were harvested with trypsin–EDTA and diluted to a suspension in a fresh medium. The cells were seeded in 96-well plates with 1×10^5 cells/well and allowed to adhere for 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After that the medium was replaced with a fresh medium containing 200 µg/mL of LPS together with the test samples at various concentrations and was then incubated for 48 h. NO production was determined by measuring the accumulation of nitrite in the culture supernatant using the Griess reagent. Cytotoxicity was determined using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) colorimetric method. Briefly, after 48 h incubation with the test samples, MTT solution (10 µL, 5 mg/mL in PBS) was added to the wells. After 4 h incubation, the medium was removed, and isopropanol containing 0.04 M HCl was then added to dissolve the formazan production in the cells. The optical density of the formazan solution was measured with a microplate reader at 570 nm. The test compounds were considered to be cytotoxic when the optical density of the sample-treated group was less than 80% of that in the control (vehicle-treated) group. Indomethacin was used as a positive control. The stock solution of each test sample was dissolved in DMSO, and the solution was added to the medium RPMI (final DMSO is 1%). Inhibition (%) was calculated using the following equation and IC₅₀ values were determined graphically ($n=4$):

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

A–C: NO₂[−] concentration (µM) [A: LPS (+), sample (−); B: LPS (+), sample(+); C: LPS (−), sample (−)].

3.6. Statistical analysis

The results were expressed as mean±S.E.M of four determinations at each concentration for each sample. The IC₅₀ values were calculated using the Microsoft Excel program. Statistical

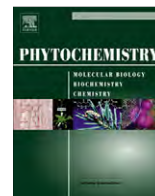
significance was calculated by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's test.

Acknowledgements

O.Y. thanks the Office of the Higher Education Commission, Thailand for supporting by grant fund under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Joint Ph.D. Program Thai Doctoral degree for this research. We thank the Thailand Research Fund (BRG5280013) for financial support and the Graduate School, Prince of Songkla University for partial support. O.Y. thanks Dr. Yaowapa Sukpondma for the NMR measurement.

References and notes

- Smitinand, T.; Larson, K. *Flora of Thailand*; ASRCT: Bangkok, 2001; 94.
- McPherson, D. D.; Che, C.-T.; Cordell, G. A.; Soejarto, D. D.; Pezzuto, J. M.; Fong, H. H. S. *Phytochemistry* **1986**, 25, 167–170.
- Promsawan, N.; Kittakoop, P.; Boonphong, S.; Nongkunsarn, P. *Planta Med.* **2003**, 69, 776–777.
- Ragasa, C. Y.; Hofleña, J. G.; Rideout, J. A. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1107–1110.
- Patil, A. D.; Freyer, A. J.; Webb, R. L.; Zuber, G.; Reichwein, R.; Bean, M. F.; Faucette, L.; Johnson, R. K. *Tetrahedron* **1997**, 53, 1583–1592.
- Pranithanchai, W.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Subhadhirasakul, S.; Chantrapromma, K. *Phytochemistry* **2009**, 70, 300–304.
- Coll, J. C.; Bowden, B. F. *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 934–936.
- Roach, J. S.; McLean, S.; Reynolds, W. F.; Tinto, W. F. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1378–1381.
- Kuroda, C.; Ueshino, T.; Nagano, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2004**, 77, 1737–1740.
- Cheenpracha, S.; Srisuwan, R.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Chantrapromma, S.; Chantrapromma, K.; Fun, H.-K.; Anjum, S.; Atta-ur-Rahman. *Tetrahedron* **2005**, 61, 8656–8662.
- Che, C.-T.; McPherson, D. D.; Cordell, G. A.; Fong, H. H. S. *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 561–569.
- (a) Das, B.; Srinivas, Y.; Sudhakar, C.; Mahender, I.; Laxminarayana, K.; Reddy, P. R.; Raju, T. V.; Jakka, N. M.; Rao, J. V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 2847–2850; (b) Ragasa, C. Y.; Ganzon, J.; Hofleña, J.; Tamboong, B.; Rideout, J. A. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51, 1208–1210.
- Yodsaoue, O.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Tewtrakul, S.; Chantrapromma, S. *Phytochemistry* **2010**, 71, 1756–1764.
- Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Nguyen, N. T.; Awale, S.; Nobukawa, T.; Kadota, S. *Planta Med.* **2003**, 69, 500–505.



Diterpenoids and triterpenoids with potential anti-inflammatory activity from the leaves of *Aglaia odorata*

Orapun Yodsauae^a, Jarinthon Sonprasit^a, Chatchanok Karalai^{a,*}, Chanita Ponglimanont^a, Supinya Tewtrakul^b, Suchada Chantrapromma^a

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand

^b Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2011

Received in revised form 2 December 2011

Available online 8 February 2012

Keywords:

Aglaia odorata

Meliaceae

Dolabellane diterpenoid

Dammarane triterpenoid

Protostane triterpenoid

Anti-inflammatory

ABSTRACT

Chemical investigation of the leaves of the oriental medicinal plant *Aglaia odorata* resulted in the isolation of five compounds: two dolabellane diterpenoids, two dammarane triterpenoids and a protostane triterpenoid, along with twenty known compounds. Their structures were elucidated on the basis of extensive spectroscopic analysis and by comparison of their NMR spectroscopic data with those reported in the literature. The anti-inflammatory activities of all compounds were evaluated as inhibitory activities against lipopolysaccharide (LPS) induced nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cell lines. Eleven compounds possessed potent nitric oxide inhibitory activity with IC₅₀ values ranging from 2.1 to 14.2 μM, these being better than that of the positive control, indomethacin (IC₅₀ = 14.5 μM). In addition, three compounds exhibited significant activity against PGE₂ release with IC₅₀ values of 2.6, 16.1 and 23.0 μM.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aglaia is a genus of more than 100 species belonging to the Mahogany family which occurs in the tropical and subtropical forests of Southeast Asia, Northern Australia, and the Pacific. *Aglaia odorata* is one of the plants in this genus, locally known in Thai as Pra-yong or Hom-glai. The leaves and roots of this plant have been used by the local Thai people as folk medicines for the treatment of heart disease, bruises, traumatic injury, febrile and toxin by causing vomiting (Bunyapraphatsara, 2000). They also have interesting biological activities such as anticancer (Inada et al., 2001), insecticidal (Ishibashi et al., 1993; Janprasert et al., 1993; Nugroho et al., 1999) and anti-leukemic activities (Hayashi et al., 1982). Moreover, the ethanol extract of the leaves given orally (250 mg/kg) produced a significant inhibition in a cutaneous herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection model in mice (Lipipun et al., 2003).

Nitric oxide (NO) is one of the inflammatory mediators causing inflammation in many organs and it has potent antimicrobial activity. This inorganic free radical has been implicated in physiological and pathological processes, such as vasodilation, non-specific host defense and acute or chronic inflammation. NO acts as a host defense agent by damaging pathogenic DNA, and as a regulatory molecule with homeostatic activities (Kuo and Schroeder, 1995).

However, excessive production of this free radical is pathogenic to the host tissue itself, since NO can bind with superoxide radicals and acts as a reactive radical which directly damages the function of normal cells (Moncada et al., 1991).

Since *A. odorata* has been used for the treatment of some inflammatory-related diseases such as bruises, traumatic injury and anti-HSV-1, the MeOH extract was examined which showed potent NO inhibitory activity with an IC₅₀ value of 5.2 μg/ml in our preliminary experiments. Reported herein is the separation of extracts of the leaves of *A. odorata* and which lead to the isolation of five novel compounds along with twenty known compounds. The anti-inflammatory activities of the compounds were evaluated.

2. Results and discussion

The CH₂Cl₂ and MeOH extracts of the leaves of *A. odorata* were separated by vacuum liquid chromatography (VLC) (Coll and Bowden, 1986) over silica gel to afford two dolabellane diterpenoids (**1**, **2**), two dammarane triterpenoids (**6**, **7**), and a protostane triterpenoid (**8**). The known compounds were identified by analysis of their spectroscopic data and comparison with literature data to be (1R,7E,11S,12R)-18-hydroxydolabella-4(16),7-dien-3-one (**3**) (Cai et al., 2010), (1R,3S,4S,7E,11S,12R)-3,4-epoxydolabella-7-en-18-ol (**4**) (Cai et al., 2010), (1R,3E,7E,11S,12R)-18-hydroxydolabella-3,7-dien (**5**) (Amico et al., 1981), 5α-dammar-20-ene-3β,24,25-triol (**9**) (Shiengthong et al., 1974; Boar and Damps, 1977),

* Corresponding author. Tel.: +66 7428 8444; fax: +66 7455 8841.

E-mail addresses: chatchanok.k@psu.ac.th, chatchanok_k@yahoo.com (C. Karalai).

24(*R*),25-dihydroxy-5 α -dammar-20-en-3-one (**10**) (Boar and Damps, 1977), aglaiol (**11**) (Akihisa et al., 1997; Shienghong et al., 1965, 1974; Boar and Damps, 1973, 1977), 24(*S*),25-epoxy-5 α -dammar-20-en-3-one (**12**) (Boar and Damps, 1977), dammar-a-20,25-dien-3 β ,24-diol (**13**) (De Pascual Teresa et al., 1986), 24-hydroxydammar-a-20,25-dien-3-one (**14**) (Inada et al., 1993), 2,3(*S*);22(*S*),23-dioxidosqualene (**15**) (D'Accolti et al., 2005),

aglaxiflorin D (**16**) (Xu et al., 2000), (+)-odorine (**17**) (Shienghong et al., 1979; Babidge et al., 1980), (+)-odorinol (**18**) (Shienghong et al., 1979; Babidge et al., 1980), naringenin trimethyl ether (**19**) (Seidel et al., 2000), 7,4'-*O*-dimethylnaringenin (**20**) (Oyama and Kondo, 2004), 4',5,7-trimethoxydihydroflavonol (**21**) (Islam and Tahara, 2000; Takahashi et al., 1988), 4',5,7-trimethoxyflavan-3,4-diol (**22**) (Takahashi et al., 1988), 4',5,7-tri-*O*-methylkaempferol

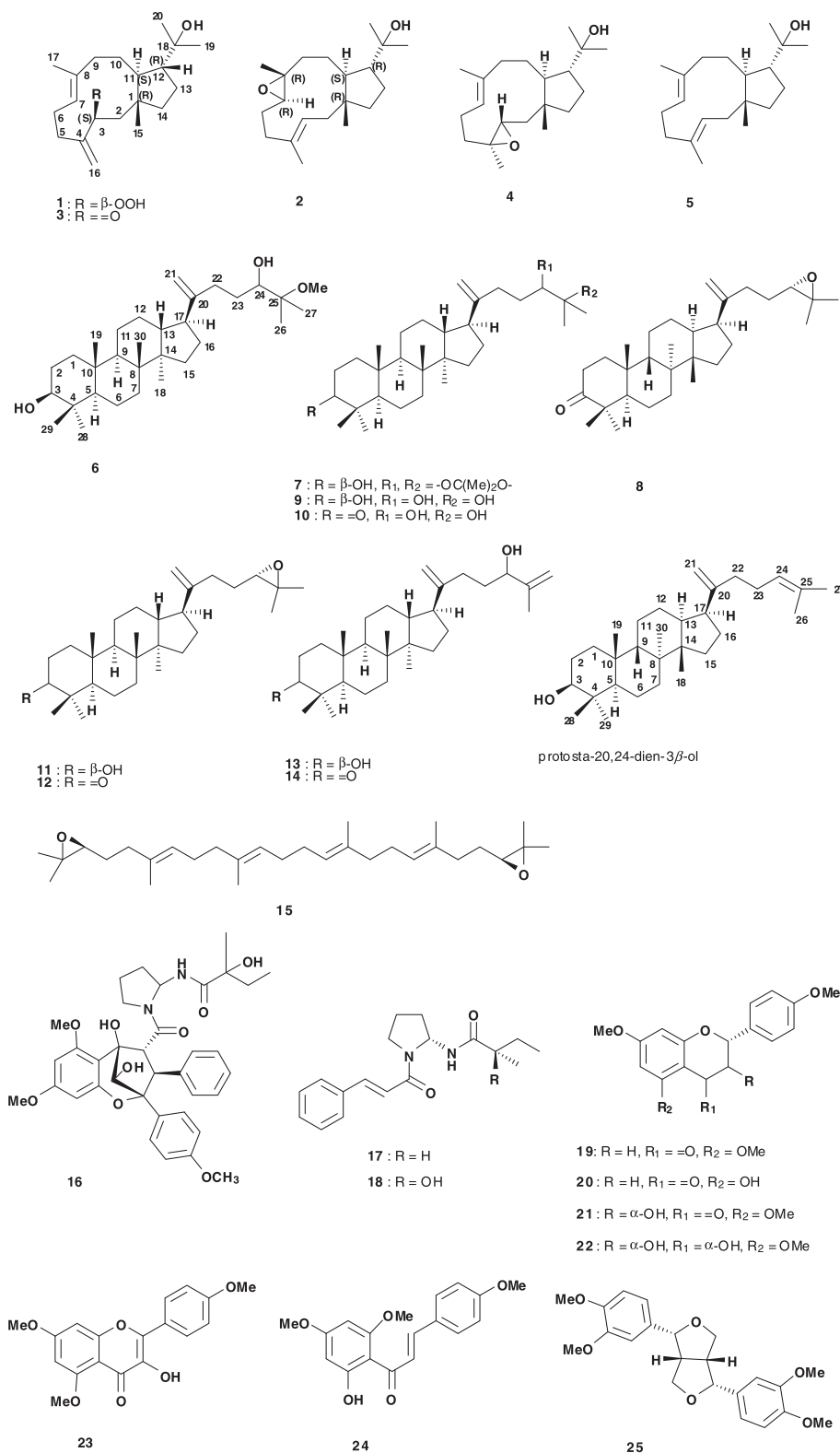


Fig. 1. Structures of compounds 1–25 and protosta-20,24-dien-3 β -ol.

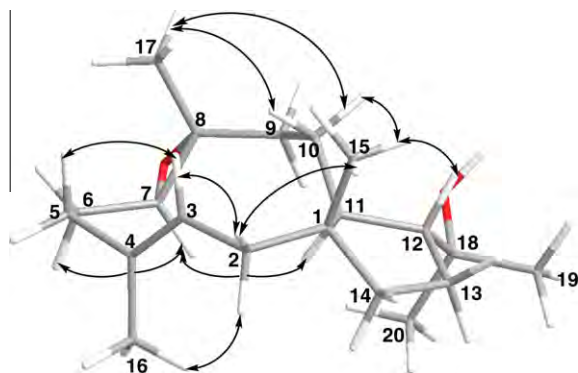


Fig. 3. Important NOESY cross-peaks of compound 2.

and 64.5 (C-7). These data suggested a 7,8-epoxide with a methyl substituent at C-8.

The relative stereochemistry of the epoxide was elucidated by analysis of the NOESY cross-peaks (Fig. 3). The epoxymethine proton at δ 2.74 (H-7) displayed a cross-peak with the proton at δ 1.52 (H-11) but no correlation with Me-15; hence H-11 and H-7 were on the same face of the molecule (trans annular protons, suggesting outer epoxide). The NOESY cross-peaks observed between the methyl protons at δ 1.19 (Me-17) with the methylene protons at δ 1.73, 1.80 (2H-10), between the methyl protons at δ 0.84 (Me-15) with the protons at δ 1.79 (H-12), 1.73, 1.80 (2H-10) and 1.98 (H_B-2) and between the olefinic proton at δ 5.16 (H-3) with the protons at δ 1.55 (H_B-5) and 1.98 (H_B-2) placed H-3,

Me-15, Me-17 and H-12 on the same face of the puckered molecule. Furthermore, the *E*-configuration of the double bond C-3/4 was suggested by a cross-peak of the methyl protons at δ 1.62 (Me-16) with the methylene proton at δ 2.01 (H_A-2) but none with the proton at δ 5.16 (H-3). From its co-occurrence in the plant with the known dolabellane diterpenoids (3–5), the structure of compound 2 was therefore elucidated as (1*R*,3*E*,7*R*,8*R*,11*S*,12*R*)-7,8-epoxydolabella-3-en-18-ol.

Compounds 6–8 were deduced to be triterpenes due to their violet color with the vanillin sulfuric acid tests. The IR, ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data of compounds 6 and 7 indicated tetracyclic triterpene skeletons closely related in structures to dammar-20-ene-3 β ,24,25-triol (9).

Compound 6 had molecular formula C₃₁H₅₄O₃ ([M]⁺ *m/z* 474.4070), based on HREIMS. The IR spectrum indicated the presence of hydroxyl functionality (3433 cm^{−1}). The ¹H NMR spectroscopic data (Table 2) showed seven tertiary methyl carbons at δ 0.77 (Me-29), 0.84 (Me-19), 0.87 (Me-30), 0.98 (Me-18, Me-28), 1.10 (Me-27) and 1.36 (Me-26) and terminal olefinic methylene protons at δ 4.71 and 4.76 (each br s, 2H-21). The ¹³C NMR and DEPT spectroscopic data (Table 3) displayed 31 carbons including those of exo-olefinic carbons at δ 107.5 (C-21) and 153.0 (C-20) and four oxycarbons at δ 49.0 (OMe), 76.4 (C-24), 77.5 (C-25) and 79.0 (C-3). Furthermore a methoxyl group at δ 3.23 (s; δ 49.0, 25-OMe) and two oxymethine protons at δ 3.20 (dd, *J* = 11.4, 5.7 Hz, H-3; δ 79.0) and δ 3.47 (dd, *J* = 9.9, 2.4 Hz, H-24; δ 76.4) were observed. The HMBC correlations of the oxymethine proton at δ 3.20 (H-3) with the carbons at δ 15.4 (C-29), 28.0 (C-28) and 39.1 (C-4) supported its location at C-3, whereas those of the

Table 2
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) spectroscopic data of compounds 6–10, 12 and protosta-20,24-dien-3 β -ol (δ in ppm, multiplicities, *J* in Hz).

Position	6	7	8	9 ^a	10	12	Protosta-20,24-dien-3 β -ol
1	0.93 m, 1.73 m	0.95 m, 1.66 m	1.38 m, 2.01 m	0.99 m, 1.74 m	1.44 m, 1.93 m	1.45 m, 1.93 m	1.37 d (2), 1.38 d (3.5)
2	1.37 m, 1.55 m	1.06 m, 1.50 m	2.20 m, 2.58 m	1.56 m, 1.63 m	2.45 m, 2.54 m	2.29 m, 2.53 m	1.52 m, 1.68 d (4.6)
3	3.20 dd (11.4, 5.7)	3.13 dd (10.8, 5.4)	–	3.14 dd (11.1, 5.4)	–	–	3.22 dd (11.7, 5.0)
4	–	–	–	–	–	–	–
5	0.74 dd (11.4, 5.4)	0.66 dd (11.4, 1.8)	2.07 m	0.75 dd (11.1, 2.4)	1.35 m	1.37 m	1.43 d (10.3)
6	1.41 m, 1.58 m	1.38 m, 1.51 m	1.32 m, 1.38 m	1.49 m, 1.61 m	1.51 m, 1.58 m	1.48 m, 1.60 m	1.19–1.18 m, 1.49 m
7	1.27 m, 1.54 m	1.22 m, 1.49 m	1.12 m, 1.93 m	1.28 m, 1.60 m	1.31 m, 1.60 m	1.33 m, 1.60 m	1.18–1.17 m, 1.92 m
8	–	–	–	–	–	–	–
9	1.31 m	1.24 dd (6.3, 3.0)	1.44 m	1.36 m	1.35 m	1.40 m	1.44 t (14.1)
10	–	–	–	–	–	–	–
11	1.28 m, 1.56 m	1.03 m, 1.05 m	1.22 m, 1.41 m	1.35 m, 1.58 m	1.31 m, 1.60 m	1.37 m, 1.52 m	1.20–1.19 m, 1.46 m
12	1.33 m, 1.58 m	1.02 m, 1.47 m	1.18 m, 1.69 m	1.55 m, 1.60 m	1.51 m, 1.58 m	1.53 m, 1.55 m	1.16–1.14 m
13	1.67 m	1.61 m	1.95 m	1.75 m	1.73 m	1.70 m	1.97 d (3.6)
14	–	–	–	–	–	–	–
15	1.12 m, 1.63 m	1.03 m, 1.54 m	1.20 m, 1.41 m	1.09 m, 1.66 m	1.13 m, 1.63 m	1.12 m, 1.64 m	1.17–1.16 m, 1.42 d (3.3)
16	1.38 m, 1.89 m	1.81 m, 1.88 m	1.73 m, 1.77 m	1.80 m, 1.90 m	1.63 m, 1.66 m	1.41 m, 1.95 m	1.75 m
17	2.20 m	2.11 m	2.57 m	2.21 m	2.27 m	2.20 m	2.60 dt (9.2, 8.8)
18	0.98 s	0.91 s	0.80 s	1.02 s	1.02 s	1.01 s	0.82 s
19	0.84 s	0.78 s	0.69 s	0.88 s	0.94 s	0.94 s	0.87 s
20	–	–	–	–	–	–	–
21a	4.71 br s	4.65 br s	4.84 s	4.75 br s	4.73 br s	4.72 d (1.2)	4.86 s
b	4.76 br s	4.71 br s	4.88 s	4.73 d (1.2)	4.78 br s	4.78 br s	4.88 s
22	2.04 m, 2.32 m	1.94 m, 2.15 m	2.09 m, 2.18 m	2.05 m, 2.28 m	1.97 m, 2.09 m	1.95 m, 2.06 m	1.95 m, 2.10 m
23	1.58 m, 1.70 m	1.52 m, 1.60 m	1.49 m, 1.69 m	1.44 m, 1.78 m	1.25 m, 1.61 m	1.60 m, 1.66 m	1.91 m, 2.04 m
24	3.47 dd (9.9, 2.4)	3.64 dd (9.0, 3.3)	2.65 t (6.3)	3.28 dd (10.8, 1.5)	3.39 dd (10.2, 1.8)	2.75 t (6.0)	5.08 m
25	–	–	–	–	–	–	–
26	1.36 s	1.18 s	1.23 s	1.17 s	1.17 s	1.31 s	1.66 s
27	1.10 s	1.04 s	1.18 s	1.14 s	1.22 s	1.28 s	1.58 s
28	0.98 s	0.91 s	0.99 s	0.96 s	1.08 s	1.08 s	0.76 s
29	0.77 s	0.71 s	0.96 s	0.77 s	1.04 s	1.03 s	0.96 s
30	0.87 s	0.80 s	1.08 s	0.91 s	0.88 s	0.88 s	1.07 s
1'	–	–	–	–	–	–	–
2'	–	1.36 s	–	–	–	–	–
3'	–	1.27 s	–	–	–	–	–
25-OMe	3.23 s	–	–	–	–	–	–

Assignments were based on HMQC, HMBC and COSY experiments.

^a Spectra were recorded in acetone-*d*₆.

Table 3

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) spectroscopic data of compounds **6–10**, **12** and protosta-20,24-dien-3 β -ol (δ in ppm, multiplicities, J in Hz).

Position	6	7	8	9^a	10	12	Protosta-20,24-dien-3 β -ol
1	39.0	39.1	31.3	39.1	39.9	39.5	32.88
2	29.7	27.4	33.7	26.7	34.1	34.1	29.11
3	79.0	79.0	220.4	78.2	218.3	218.1	79.33
4	39.1	38.9	47.1	38.7	47.4	47.4	39.15
5	55.9	55.9	47.1	56.0	55.3	58.4	47.66
6	18.3	18.3	20.1	18.1	19.6	19.7	18.57
7	35.5	35.4	34.1	35.3	34.7	34.7	34.81
8	40.5	40.5	40.1	40.3	40.5	40.4	39.95
9	50.9	50.9	43.3	50.9	50.2	50.3	45.68
10	37.2	37.2	36.1	36.9	36.9	36.9	36.81
11	21.3	21.3	22.7	21.1	21.9	21.9	23.09
12	25.0	25.0	24.9	24.7	24.9	25.0	25.14
13	45.6	45.6	44.5	45.5	45.8	45.5	44.52
14	49.5	49.5	50.5	49.2	49.4	49.4	50.67
15	31.4	31.4	33.3	31.1	31.5	31.3	33.35
16	29.1	29.2	27.7	28.8	30.1	29.0	27.65
17	48.1	47.9	43.7	48.1	47.7	47.7	43.88
18	15.7	15.7	17.3	14.9	15.3	15.4	17.48
19	16.2	16.2	23.3	15.5	16.0	16.0	22.38
20	153.0	152.4	151.0	152.7	152.7	151.8	152.04
21	107.5	107.8	109.6	107.0	107.7	107.9	108.78
22	31.3	31.4	35.3	31.0	31.3	30.9	38.62
23	27.4	28.2	27.9	29.8	29.2	27.7	27.30
24	76.4	82.8	64.2	77.9	78.3	64.2	124.36
25	77.5	80.1	58.5	77.4	73.1	58.4	131.43
26	20.8	26.1	24.9	24.2	23.2	24.9	25.70
27	18.9	22.9	18.8	23.7	26.5	18.8	17.69
28	28.0	28.0	29.4	27.3	26.7	26.7	16.10
29	15.4	15.4	19.6	14.8	21.0	21.0	29.08
30	16.0	15.9	21.6	15.0	15.8	15.8	21.98
1'		106.5					
2'		28.6					
3'		26.9					
25-OMe	49.0						

Assignments were based on HMQC, HMBC and COSY experiments.

^a Spectra were recorded in acetone- d_6 .

oxymethine proton at δ 3.47 (H-24) with the carbons at δ 18.9 (C-27), 20.8 (C-26), 31.3 (C-22) and 77.5 (C-25), and of the methoxy group at δ 3.23 with the carbon at δ 77.5 (C-25) suggested an OH at C-24 and an OMe at C-25, respectively. The proton H-3 was assigned to be axially oriented from the small and large vicinal coupling constants ($J_{3\text{ax},2\text{eq}} = 5.7$ Hz, $J_{3\text{ax},2\text{ax}} = 11.4$ Hz). Therefore, the structure of **6** was established as 25-methoxy-5 α -dammar-20-en-3 β ,24-diol.

In order to investigate if compound **6** was an artefact derived from either acid-catalyzed methanolysis at C-25 of an epoxide ring of compound **11**, or nucleophilic addition of methanol to compound **13**, an experiment was carried out mimicking the isolation

process as follows. Compounds **11** and **13** were dissolved separately in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (0.5:9.5, v/v), the solutions were mixed with silica gel and stirred at RT for 5 days. Then the reaction mixtures were concentrated and the residues subjected to ^1H NMR measurements. The spectra showed only those of compounds **11** or **13** with none of **6**. Therefore it is provisionally deduced that compound **6** is a natural product from the plant.

The molecular formula of compound **7** was found to be $\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{O}_3$ ($[\text{M}]^+ m/z$ 550.4224), by HREIMS. The ^1H and ^{13}C NMR spectra of **7** (Tables 2 and 3) were comparable to those of **6**, except that compound **7** showed the presence of an acetonide (isopropylidene) group as indicated by two additional methyl signals in the ^1H NMR spectrum at δ_{H} 1.27 (s, Me-3') and 1.36 (s, Me-2'). There were also additional signals in the ^{13}C NMR spectrum at δ_{C} 26.9 (C-3'), 28.6 (C-2') and 106.5 (C-1') instead of an OMe group as in **6**, which allowed placement of an acetonide group unequivocally at C-24 and C-25. Based on this evidence, the structure of **7** was determined to be 3 β -hydroxy-5 α -dammar-20-en-24,25-acetonide.

Compound (**8**), with $[\text{M}]^+ m/z$ 440.3647 ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$) by HREIMS, exhibited a carbonyl functionality at 1702 cm^{-1} in the IR spectrum. The NMR spectroscopic data of **8** were comparable to those of 24(S),25-epoxy-5 α -dammar-20-dien-3-one (**12**) but **8** possessed a tetracyclic protostane skeleton whereas that of **12** was a dammarane. The two skeletons could be differentiated by comparison of the carbon chemical shifts at C-1, C-5, C-9 and C-17 whose values of the protostane were lower than those of the dammarane skeleton by 5–10 ppm. Furthermore the carbon chemical shift at C-19 of the protostane was higher than that of the dammarane skeleton by 6–8 ppm (Wu et al., 2005, 2006; Lodeiro et al., 2009; Mitsuguchi et al., 2009). The carbon chemical shifts of **8** were in agreement with those of protosta-20,24-dien-3 β -ol (Wu et al., 2006). The ^1H NMR spectrum (Table 2) exhibited seven methyl singlets at δ 0.69 (Me-19), 0.80 (Me-18), 0.96 (Me-29), 0.99 (Me-28), 1.08 (Me-30), 1.18 (Me-27) and 1.23 (Me-26) and two low field protons at δ 4.84 and 4.88 (each s, 2H-21). The latter indicated terminal olefinic methylene protons which gave HMQC cross-peaks to the carbon at δ 109.6. The presence of a trisubstituted epoxide ring was shown by the resonance of an oxymethine proton at δ_{H} 2.65 (t, $J = 6.3$ Hz) and carbon resonances at δ_{C} 64.2 and 58.5. The molecular formula $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$ was in agreement with a ketone and an epoxide functionality, of which a keto carbon resonance was evident at δ 220.4. The HMBC spectrum placed the keto carbon at C-3, from which the methyl protons at δ 0.99 (Me-28) correlated with the carbons at δ 19.6 (C-29), 47.1 (C-4), 47.1 (C-5) and 220.4 (C-3). The side-chain was placed at C-17 of the main skeleton from the HMBC correlations of the methine proton at δ 2.57 (m, H-17) with the carbons at δ 27.7 (C-16), 35.3 (C-22), 44.5 (C-13), 50.5 (C-14), 109.6 (C-21) and 151.0 (C-20) and of the terminal olefinic methylene protons at δ 4.84 and 4.88 (2H-21) with the carbons at δ 35.3 (C-22), 43.7 (C-17) and 151.0 (C-20). In addition, a dimethylepoxide ring was formed between C-24 and C-25 due to the

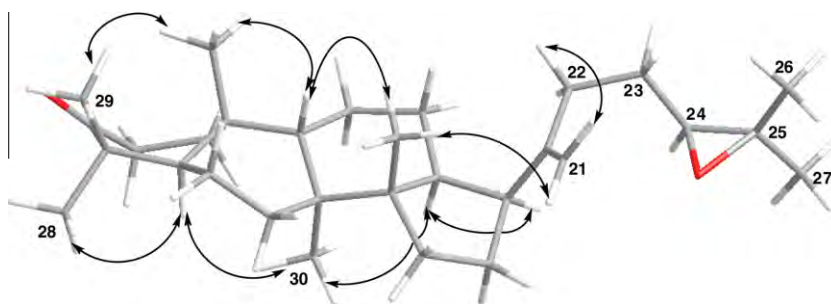
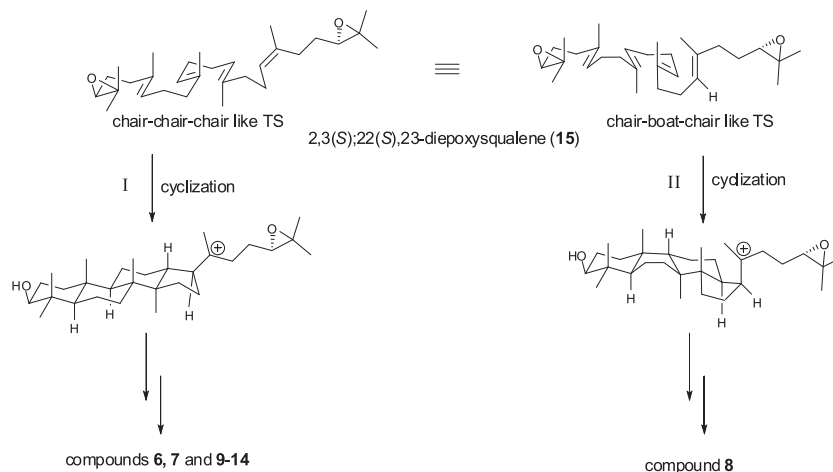


Fig. 4. Important NOESY cross-peaks of compound **8**.



Scheme 1. Plausible biosynthesis pathway of dammarane (**6**, **7**, **9–14**) and protostane (**8**) triterpenoids.

HMBC correlations of an epoxymethine proton at δ 2.65 (H-24) with the carbons at δ 24.9 (C-26), 27.9 (C-23), 35.3 (C-22) and 58.5 (C-25); in turn, the methyl protons at δ 1.18 (Me-27) showed correlations with the carbons at δ 24.9 (C-26), 58.5 (C-25) and 64.2 (C-24).

The relative stereochemistry of **8** was determined from the results of a NOESY experiment (Fig. 4). The methine proton at δ 2.07 (m, H-5) showed cross-peaks with the methyl protons at δ 0.99 (Me-28) and 1.08 (Me-30), and the methine proton at δ 1.95 (m, H-13) with the methyl protons at δ 1.08 (Me-30) and 2.57 (H-17), hence suggesting that H-5, H-13, H-17, Me-30 and Me-28 were on the same face of the molecule. In addition, the cross-peaks of the methyl protons at δ 0.69 (Me-19) with the protons at δ 0.96

(Me-29) and 1.44 (H-9), of the methyl protons at δ 0.80 (Me-18) with the proton at δ 1.44 (H-9) and the olefinic proton at δ 4.88 (H_b-21), and of the olefinic proton at δ 4.84 (H_a-21) with the proton at δ 2.09 (H-22) confirmed that H-9, Me-18, Me-19 and Me-29 were on the same face. These data suggested trans/syn/trans arrangement for the A-B-C ring system. However, the stereochemistry of the epoxide at C-24 should be of a 24S configuration, the same as in compound **12** (24S) by comparison of the carbon chemical shifts at C-23 to C-27 (see Tables 2 and 3). So far only 24S epoxides have been isolated from *A. odorata* which could be derived from 2,3(S);22(S),23-diepoxy-squalene, **15** (Xu et al., 2004; Cai et al., 2005b). Thus, **8** was deduced to be 24(S),25-epoxy-5 α -protost-20,25-dien-3-one.

Table 4
Inhibitory effects on NO production^a of compounds **1–25**.

Compounds	% Inhibition at various concentrations (μ M)						IC ₅₀ (μ M)
	0	1	3	10	30	100	
1	0.0 $\pm$ 5.0	–	–	7.7 $\pm$ 4.6	15.1 $\pm$ 4.2	101.8 $\pm$ 1.6 ^{**}	38.1
2	0.0 $\pm$ 5.0	–	–	16.3 $\pm$ 3.8	69.9 $\pm$ 1.8 ^{**}	99.1 $\pm$ 2.0 ^{b,**}	22.3
3	0.0 $\pm$ 5.0	–	–	8.2 $\pm$ 3.6	16.4 $\pm$ 3.0	93.3 $\pm$ 1.5 ^{**}	41.3
4	0.0 $\pm$ 5.0	–	–	28.7 $\pm$ 3.3 [*]	61.0 $\pm$ 2.0 ^{**}	98.5 $\pm$ 2.5 ^{**}	20.4
5	0.0 $\pm$ 5.0	–	–	53.2 $\pm$ 1.3 ^{**}	80.5 $\pm$ 2.9 ^{**}	101.5 $\pm$ 1.1 ^{b,**}	7.9
6	0.0 $\pm$ 6.8	–	–	53.5 $\pm$ 2.8 ^{**}	83.0 $\pm$ 1.5 ^{**}	97.5 $\pm$ 1.8 ^{b,**}	7.1
7	0.0 $\pm$ 6.8	–	–	42.6 $\pm$ 5.1 [*]	76.2 $\pm$ 0.9 ^{**}	87.1 $\pm$ 1.3 ^{b,**}	11.7
8	0.0 $\pm$ 4.2	–	–	25.0 $\pm$ 1.7 [*]	35.9 $\pm$ 1.4 ^{**}	77.6 $\pm$ 1.4 ^{**}	53.2
9	0.0 $\pm$ 6.8	–	–	33.7 $\pm$ 2.3 ^{**}	68.8 $\pm$ 3.0 ^{**}	101.8 $\pm$ 1.5 ^{b,**}	16.8
10	0.0 $\pm$ 6.8	–	46.2 $\pm$ 2.6 ^{**}	70.6 $\pm$ 3.0 ^{**}	90.4 $\pm$ 3.2 ^{b,**}	101.8 $\pm$ 2.9 ^{b,**}	3.1
11	0.0 $\pm$ 1.8	–	–	35.5 $\pm$ 3.6 ^{**}	79.1 $\pm$ 3.4 ^{**}	85.5 $\pm$ 4.5 ^{b,**}	14.2
12	0.0 $\pm$ 6.8	–	–	50.4 $\pm$ 1.3 ^{**}	77.0 $\pm$ 3.4 ^{**}	97.2 $\pm$ 0.6 ^{b,**}	9.1
13	0.0 $\pm$ 6.8	–	–	40.4 $\pm$ 2.7 ^{**}	55.3 $\pm$ 3.2 ^{**}	89.5 $\pm$ 2.9 ^{**}	17.9
14	0.0 $\pm$ 5.0	–	37.5 $\pm$ 2.7 [*]	62.1 $\pm$ 2.3 ^{**}	80.1 $\pm$ 4.3 ^{**}	97.5 $\pm$ 2.1 ^{b,**}	5.5
15	0.0 $\pm$ 1.8	–	–	20.9 $\pm$ 3.1 [*]	55.1 $\pm$ 3.7 ^{**}	75.2 $\pm$ 6.0 ^{b,**}	30.5
16	0.0 $\pm$ 4.9	29.3 $\pm$ 2.6	58.4 $\pm$ 3.1 ^{**}	92.3 $\pm$ 4.5 ^{**}	94.0 $\pm$ 4.0 ^{b,**}	94.5 $\pm$ 1.1 ^{b,**}	2.1
17	0.0 $\pm$ 4.9	–	–	44.4 $\pm$ 2.0 ^{**}	94.9 $\pm$ 3.0 ^{**}	97.5 $\pm$ 2.3 ^{**}	8.6
18	0.0 $\pm$ 4.9	–	–	14.5 $\pm$ 5.7	35.9 $\pm$ 4.4 ^{**}	66.8 $\pm$ 2.6 ^{b,**}	50.2
19	0.0 $\pm$ 4.9	–	–	43.6 $\pm$ 2.7 ^{**}	93.6 $\pm$ 3.8 ^{**}	99.7 $\pm$ 3.3 ^{**}	9.3
20	0.0 $\pm$ 4.9	–	–	–9.2 $\pm$ 5.3	21.4 $\pm$ 4.6	95.4 $\pm$ 1.3 ^{b,**}	42.3
21	0.0 $\pm$ 4.9	22.2 $\pm$ 1.8	48.9 $\pm$ 2.4 ^{**}	84.6 $\pm$ 2.7 ^{**}	100.0 $\pm$ 4.4 ^{**}	105.2 $\pm$ 0.8 ^{b,**}	3.0
22	0.0 $\pm$ 1.8	–	–	14.1 $\pm$ 3.9	25.2 $\pm$ 4.3 ^{**}	83.4 $\pm$ 2.1 ^{**}	41.9
23	0.0 $\pm$ 1.8	–	–	36.3 $\pm$ 2.9 ^{**}	44.0 $\pm$ 6.7 ^{**}	73.8 $\pm$ 4.8 ^{**}	28.5
24	0.0 $\pm$ 1.8	–	–	36.3 $\pm$ 5.3 ^{**}	71.8 $\pm$ 3.7 ^{**}	94.5 $\pm$ 3.4 ^{**}	15.4
25	0.0 $\pm$ 1.8	–	–	22.6 $\pm$ 7.6	72.6 $\pm$ 2.7 ^{**}	101.2 $\pm$ 3.7 ^{b,**}	19.7
Indomethacin	0.0 $\pm$ 4.2	–	15.5 $\pm$ 1.7	36.4 $\pm$ 2.3 ^{**}	60.9 $\pm$ 3.7 ^{**}	104.5 $\pm$ 1.7 ^{**}	14.5

(–) = not determined

^a Each value represents mean $\pm$ SEM of four determinations.

^b Cytotoxic effect was observed.

^{*} Statistical significance, $p < 0.05$.

^{**} Statistical significance, $p < 0.01$.

Table 5
Inhibition of PGE₂ production^a of compounds **5**, **6**, **10**, **12**, **14**, **16**, **17** and **21**.

Compounds	% Inhibition at various concentrations (μM)					IC ₅₀ (μM)
	0	3	10	30	100	
5	0.0 ± 2.3	–	–	–	27.8 ± 1.2**	>100
6	0.0 ± 1.6	–	–	–	29.9 ± 1.1**	>100
10	0.0 ± 2.3	–	–	–	19.3 ± 1.0**	>100
12	0.0 ± 2.3	–	–	–	48.7 ± 0.5**	>100
14	0.0 ± 2.3	–	–	–	49.5 ± 1.4**	>100
16	0.0 ± 1.6	49.5 ± 2.1**	57.0 ± 0.2**	58.1 ± 0.7**	59.5 ± 0.3**	2.6
17	0.0 ± 1.6	–	47.5 ± 1.3**	50.3 ± 1.4**	55.2 ± 0.5**	23.0
21	0.0 ± 1.6	–	46.5 ± 1.8**	55.2 ± 1.4**	58.2 ± 0.8**	16.1
	0	0.1	0.3	1	3	
Indomethacin	0.0 ± 2.0	38.4 ± 0.4**	48.7 ± 0.6**	52.7 ± 0.2**	74.6 ± 0.2**	0.4

(–) = not determined.

^a Each value represents mean ± SEM of four determinations.

** Statistical significance, *p* < 0.01.

The biosynthesis pathway of protostane and dammarane triterpenes (Scheme 1) could be derived from the common 2,3(S); 22(S),23-diepoxy-squalene (**15**) by two routes. Pathway I, cyclization via a chair/chair/chair conformation of the potential A/B/C ring system resulted in a trans/anti/trans ring junction (A/B/C) (Xu et al., 2004; Cai et al., 2005b) of a dammarane triterpene. In pathway II, cyclization via a chair/boat/chair conformation of the potential A/B/C ring system would result in a trans/syn/trans ring junction (A/B/C) of a protostane triterpenoid, see Scheme 1.

The MeOH extract exhibited potent inhibitory activity against LPS-induced NO production in RAW264.7 cell lines with an IC₅₀ value of 5.2 μg/ml. Therefore all isolated compounds were evaluated for their anti-NO activity and the results are shown in Table 4. Compounds **16**, **21** and **10** possessed potent activity with IC₅₀ = 2.1, 3.0 and 3.1 μM, respectively, followed by compounds **14**, **6**, **5**, **17**, **19**, **7** and **11** (IC₅₀ values ranging from 5.5 to 14.2 μM), all of which were stronger than that of a clinically used drug (indomethacin IC₅₀ = 14.5 μM). The other compounds exhibited moderate and mild activities. Structure–activity relationships for anti-inflammatory activities of dolabellane diterpenes (**1**–**5**) suggested that one oxygen atom in the molecule gave higher activity than two or three oxygen atoms as shown in compound **5** (IC₅₀ = 7.9 μM) vs. compounds **1**, **2**, **3** and **4** (IC₅₀ = 38.1, 22.3, 41.3 and 20.4 μM, respectively). As for the class of tetracyclic triterpenes (**6**–**14**), the followings are proposed: (i) the keto group at C-3 was necessary for increasing the activity: compounds **10**, **12** and **14** were strongly active (IC₅₀ = 3.1, 9.1 and 5.5 μM, respectively) whereas compounds **9**, **11** and **13** with the hydroxyl at C-3 were less active (IC₅₀ = 16.8, 14.2 and 17.9 μM, respectively). For the aminopyrrolidines (**17** and **18**), compound **18** (IC₅₀ = 50.2 μM) with the hydroxyl substituent in the molecule resulted in a drastic decrease of the activity (**17**, IC₅₀ = 8.6 μM). Compounds **5**, **6**, **10**, **12**, **14**, **16**, **17** and **21** were also tested for their inhibitory effect on LPS-induced PGE₂ release in RAW264.7 cells. The result showed that **16** possessed the most potent activity against PGE₂ release with an IC₅₀ value of 2.6 μM, whereas **17** and **21** exhibited moderate activity with IC₅₀ values of 23.0 and 16.1 μM, respectively (Table 5).

3. Concluding remarks

The phytochemical investigation of *A. odorata* led to the isolation of five new compounds: two dolabellane diterpenoids (**1**, **2**), two dammarane triterpenoids (**6**, **7**) and a protostane triterpenoid (**8**), along with twenty known compounds. It is noteworthy that compound **8** has a tetracyclic protostane skeleton whereas that of **12** is a dammarane. The two skeletons could be differentiated by comparison of the carbon chemical shifts at C-1, C-5, C-9 and C-17 whose values of the protostane are lower than those of the

dammarane skeleton by about 5–10 ppm. Furthermore the carbon chemical shift at C-19 of the protostane is higher than that of the dammarane skeleton by about 6–8 ppm. The protostane was first isolated from this species. All compounds were evaluated for inhibitory activities against lipopolysaccharide (LPS) induced nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cell lines. Compounds **5**–**7**, **10**–**12**, **14**, **16**, **17**, **19** and **21** possessed potent nitric oxide inhibitory activity with IC₅₀ values ranging from 2.1 to 14.2 μM, better than that of the positive control, indomethacin (IC₅₀ = 14.5 μM). In addition, compounds **16**, **21** and **17** exhibited significant activity against PGE₂ release with IC₅₀ of 2.6, 16.1 and 23.0 μM, respectively.

4. Experimental

4.1. General experimental procedures

Melting points were determined on a Fisher-Johns melting point apparatus. Optical rotation [α]_D values were determined with a JASCO P-1020 polarimeter. IR spectra were measured with a Perkin-Elmer FTS FT-IR spectrometer. UV spectra were measured with a UV-160A spectrophotometer (Shimadzu) and principal bands ($\lambda_{\max}$) were recorded as wavelengths (nm) and log ϵ in CH₃OH and CHCl₃ solutions. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded using 300 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield™ spectrometers in either CDCl₃ or acetone-*d*₆ solution. Chemical shifts are recorded in parts per million (δ) with tetramethylsilane (TMS) as an internal reference. Vacuum liquid chromatography (VLC) (Coll and Bowden, 1986) and column chromatography (CC) were carried out on silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) and silica gel 100 (Merck), respectively. Reversed phase (RP)-18 silica gel was used for reversed phase CC. Precoated plates of silica gel 60 F₂₅₄ and reversed-phase (RP)-18 F₂₅₄) were used for analytical purposes.

4.2. Plant material

Leaves of *A. odorata* were collected from Songkhla province, southern part of Thailand in September 2008. Identification was made by Assoc. Prof. Dr. Kitichate Sridith, Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University and a specimen (No. OR53) was deposited at Prince of Songkla University Herbarium.

4.3. Extraction and isolation

Ground-dried leaves (53.70 g) of *A. odorata* were extracted with CH₂Cl₂ and MeOH (each 2 × 2 L, for 3 days) successively at room temperature and the solvent was evaporated under reduced

pressure to afford CH_2Cl_2 (23.50 g) and MeOH (5.23 g) extracts, respectively.

The CH_2Cl_2 extract (23.50 g) was subjected to VLC eluting with *n*-hexane and with EtOAc and MeOH, of increasing polarity successively to give ten fractions (D1–D10). Fraction D2 (6.03 g) was subjected to VLC eluting with *n*-hexane, CH_2Cl_2 and acetone to afford ten subfractions (D2a–D2j). Subfraction D2b (906.8 mg) was purified by CC with EtOAc–*n*-hexane (1:49, v/v) to give compounds **12** (60.1 mg), **5** (19.3 mg) and **15** (30.0 mg). Subfraction D2d (105.0 mg) was separated by CC with CH_2Cl_2 –*n*-hexane (1:4, v/v) to give compound **3** (2.5 mg). Subfraction D2f (106.8 mg) was purified by CC with acetone–*n*-hexane (1:9, v/v) to give compound **14** (3.1 mg). Subfraction D2h (859.3 mg) was purified by CC with acetone–*n*-hexane (1:4, v/v) to give compound **2** (40.1 mg). Subfraction D2j (231.6 mg) was separated by CC with acetone–*n*-hexane (3:17, v/v) to give compound **4** (8.5 mg). Fraction D3 (1.33 g) was subjected to VLC using *n*-hexane and EtOAc of increasing polarity as eluent to afford seven subfractions (D3a–D3g) and compounds **8** (7.2 mg), **13** (5.1 mg) and **7** (10.0 mg). Subfraction D3c (383.7 mg) was purified by CC with acetone–*n*-hexane (2:3, v/v) to give compound **20** (2.5 mg). Subfraction D3f (20.6 mg) was separated by prep. TLC with EtOAc– CH_2Cl_2 (1:9, v/v) to give compound **1** (5.0 mg). Fraction D4 (1.80 g) was subjected to CC with EtOAc–*n*-hexane (1:9, v/v) to afford six subfractions (C4a–C4f) and compound **12** (40.0 mg). Subfraction D4d (1.20 g) was separated by CC with acetone–*n*-hexane (3:17, v/v) to give compound **11** (60.0 mg). Fraction D6 (175.7 mg) was subjected to CC with MeOH– CH_2Cl_2 (1:49, v/v) to afford seven subfractions (D6a–D6g) and compounds **19** (5.0 mg) and **9** (5.0 mg). Subfraction D6d (120.3 mg) was purified by RP-18 CC with MeOH– H_2O (3:2, v/v) to give compounds **25** (15.0 mg) and **10** (10.0 mg). Fraction D8 (859.3 mg) was subjected to CC with EtOAc–*n*-hexane (7:13, v/v) to afford seven subfractions (D8a–D8g) and to give compounds **23** (15.0 mg) and **24** (10.0 mg). Subfraction D8c (80.3 mg) was separated by CC with CH_2Cl_2 to give compound **21** (30.5 mg). Subfraction D8e (50.2 mg) was purified by CC with CH_2Cl_2 to give compound **22** (4.0 mg). Fraction D10 (231.6 mg) was separated by CC with acetone–*n*-hexane (3:7, v/v) to give compounds **16** (10.3 mg), **17** (30.1 mg) and **18** (15.6 mg).

The MeOH extract (5.23 g) was partitioned in EtOAc and a soluble material was obtained (3.10 g) which was subjected to VLC eluting with *n*-hexane, EtOAc and MeOH of increasing polarity successively to give eight fractions (M1–M8). Fraction M3 (118.0 mg) was separated by CC with acetone–*n*-hexane (1:4, v/v) to give compound **6** (15.0 mg). Fraction M4 (85.2 mg) was recrystallized from acetone to give compound **9** (20.0 mg). Fraction M6 (105.9 mg) was recrystallized from acetone to give compound **10** (50.0 mg).

4.3.1. (1R,3S,7E,11S,12R)-3-Hydroperoxydolabella-4(16),7-dien-18-ol (**1**)

Viscous oil; $[\alpha]_D^{27} + 17.0$ (c 0.12 in CHCl_3); IR (neat) ν_{max} : 3434 (O–H), 2959 (C–H) cm^{-1} ; HREIMS: m/z $[\text{M}]^+$ 322.2492 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$, 322.2499); For ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) spectroscopic data, see Table 1.

4.3.2. (1R,3E,7R,8R,11S,12R)-7,8-Epoxydolabella-3-en-18-ol (**2**)

Viscous oil; $[\alpha]_D^{27} - 47.4$ (c 0.25 in CHCl_3); IR (neat) ν_{max} : 3430 (O–H), 2963 (C–H) cm^{-1} ; HREIMS: m/z $[\text{M}]^+$ 306.2553 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$, 306.2559); For ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) spectroscopic data, see Table 1.

4.3.3. 25-Methoxy-5 α -dammar-20-en-3 β ,24-diol (**6**)

Viscous oil; $[\alpha]_D^{27} + 35.5$ (c 0.30 in CHCl_3); IR (neat) ν_{max} : 3433 (O–H), 2931 (C–H) cm^{-1} ; HREIMS: m/z $[\text{M}]^+$ 474.4070 (calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{O}_3$, 474.4073); For ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) spectroscopic data, see Table 3.

4.3.4. 3 β -Hydroxy-5 α -dammar-20-en-24,25-acetonide (**7**)

Viscous oil; $[\alpha]_D^{27} + 22.7$ (c 0.50 in CHCl_3); IR (neat) ν_{max} : 3432 (O–H), 2945 (C–H) cm^{-1} ; HREIMS: m/z $[\text{M}]^+$ 500.4224 (calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{O}_3$, 500.4229); For ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) spectroscopic data, see Table 3.

4.3.5. 24(S),25-Epoxy-5 α -protost-20,25-dien-3-one (**8**)

Viscous oil; $[\alpha]_D^{27} + 80.9$ (c 0.43 in CHCl_3); IR (neat) ν_{max} : 2925 (C–H), 1702 (C=O) cm^{-1} ; HREIMS: m/z $[\text{M}]^+$ 440.3647 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$, 440.3649); For ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) spectroscopic data, see Table 3.

4.4. Anti-inflammatory activity assay

4.4.1. Inhibitory effects of compounds on NO production from RAW264.7 cells

Inhibitory effects on NO production by murine macrophage-like RAW264.7 cells were evaluated using a method modified from that previously reported (Banskota et al., 2003). Briefly, the RAW264.7 cell line [purchased from Cell Lines Service (CLS)] was cultured in Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) medium supplemented with 0.1% NaHCO_3 and 2 mM glutamine, penicillin G (100 units/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 10% fetal calf serum (FCS). The cells were harvested with EDTA and diluted to a suspension in a fresh medium. The cells were seeded in 96-well plates with 1×10^5 cells/well and allowed to adhere for 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . Then the medium was replaced with a fresh medium containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LPS together with the test samples at various concentrations (3–100 μM) and incubated for 48 h. NO production was determined by measuring the accumulation of nitrite in the culture supernatant using the Griess reagent. Cytotoxicity was determined using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) colorimetric method. Briefly, after 48 h incubation with the test samples, MTT solution (10 μl , 5 mg/ml in phosphate buffered saline (PBS)) was added to the wells. After 4 h further incubation, the medium was removed and i-PrOH containing 0.04 M HCl was added to dissolve the formazan produced in the cells. The absorbance of the formazan solution was measured with a microplate reader at 570 nm. The test compounds were considered to be cytotoxic when the absorbance of the sample-treated group was less than 80% of that of the control (vehicle-treated) group. Indomethacin (an NSAID) was used as a positive control. The stock solution of each test sample was dissolved in DMSO, and the solution was added to the RPMI medium (final DMSO concn. is 1%). Inhibition (%) was calculated using the following equation and IC_{50} values were determined graphically ($n = 4$):

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A - B}{A - C} \times 100 \quad (1)$$

A–C: NO_2^- concentration (μM) [A: LPS (+), sample (–); B: LPS (+), sample (+); C: LPS (–), sample (–)].

4.4.2. Inhibitory effects of compounds on LPS-induced PGE_2 release from RAW264.7 cells

The mouse macrophage cell line (RAW264.7 cells) was purchased from Cell Lines Services (CLS). The cells were grown and maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 0.1% NaHCO_3 and 2 mM glutamine, penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 10% FBS in culture flasks at 37 °C, 5% CO_2 , in a fully humidified incubator. The cells were harvested with 0.25% trypsin–EDTA and re-suspended in a fresh medium. Cell counts were measured using a standard trypan blue cell counting technique. The cell concentration was adjusted to 1×10^6 cells/ml in the same medium. Cells suspension 100 μl were seeded in a 96-well plate

and incubated for 1 h at 37 °C. The medium was replaced with LPS in RPMI-1640 (100 µg/ml) which is the triggering agent for PGE₂ production. Then the test samples at various concentrations (3–100 µM) were dispensed into the wells. The cells were incubated for 48 h at the same condition. The supernatant was transferred into a 96-well ELISA plate and then PGE₂ concentrations were determined using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions. The absorbance at 450 nm was recorded using a microplate reader (Bio-Tek instruments, Inc.).

4.5. Statistical analysis

The results were expressed as mean ± standard error of means (S.E.M) of four determinations at each concentration for each sample. The IC₅₀ values were calculated using Microsoft Excel. Statistical significance was calculated by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's test.

Acknowledgments

O. Yodsasoue thanks the Office of the Higher Education Commission, Thailand for supporting the grant fund under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Joint Ph.D. Program Thai Doctoral degree. We thank the Thailand Research Fund (BRG5280013) for financial support and the Graduate School, Prince of Songkla University for partial support. O.Y thanks Dr. Yaowapa Sukpondma for the NMR measurement.

References

- Akihisa, T., Yasukawa, K., Kimura, Y., Takase, S., Yamanouchi, S., Tamura, T., 1997. Triterpene alcohols from camellia and sasanqua oils and their anti-inflammatory effects. *Chem. Pharm. Bull.* 45, 2016–2023.
- Amico, V., Currenti, R., Oriente, G., Piattelli, M., Tringali, C., 1981. 18-Hydroxy-3,7-dolabelladiene from the brown alga, *Dictyota dichotoma*. *Phytochemistry* 20, 848–849.
- Babidge, P.J., Massy-Westropp, R.A., Pyne, S.G., Shienhthong, D., Ungphakorn, A., Veerachai, G., 1980. The synthesis and stereochemistry of odorine. *Aust. J. Chem.* 33, 1841–1845.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Nguyen, N.T., Awale, S., Nobukawa, T., Kadota, S., 2003. DPPH radical scavenging and nitric oxide inhibitory activities of the constituents from the wood of *Taxus yunnanensis*. *Planta Med.* 69, 500–505.
- Boar, R.B., Damps, K., 1973. Configuration of aglaial, a (24S)-24,25-epoxy-triterpene. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 115–116.
- Boar, R.B., Damps, K., 1977. Triterpenoids of *Aglaia odorata*. Configuration of trisubstituted epoxides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 510–512.
- Bunyapraphatsara, N., 2000. Medicinal plants indigenous to Thailand, vol. 2. Mahidol University, Prachachon Ltd., Bangkok, pp. 559–562 (in Thai).
- Cai, X.-H., Luo, X.-D., Zhou, J., Hao, X.-J., 2005a. Dolabellane diterpenoids from the higher plant *Aglaia odorata*. *Helv. Chim. Acta* 88, 2938–2943.
- Cai, X.-H., Luo, X.-D., Zhou, J., Hao, X.-J., 2005b. Compound representatives of a new type of triterpenoid from *Aglaia odorata*. *Org. Lett.* 7, 2877–2879.
- Cai, X.-H., Wang, Y.-Y., Zhao, P.-J., Li, Y., Luo, X.-D., 2010. Dolabellane diterpenoids from *Aglaia odorata*. *Phytochemistry* 71, 1020–1024.
- Coll, J.C., Bowden, B.F., 1986. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *J. Nat. Prod.* 49, 934–936.
- D'Accolti, L., Annese, C., Fusco, C., 2005. Direct regio- and stereoselective synthesis of squalene 2,3;22,23-dioxide using dioxiranes. *Tetrahedron Lett.* 46, 8459–8462.
- De Pascual Teresa, J., Bellido, I.S., Gonzalez, M.S., Vicente, S., 1986. Tetracyclic triterpenes and nerolidol derivatives from *Santolina oblongifolia*. *Phytochemistry* 25, 185–190.
- Hayashi, N., Lee, K.-H., Hall, I.H., McPhail, A.T., Huang, H.-C., 1982. Structure and stereochemistry of (–)-odorinol, an antileukemic diamide from *Aglaia odorata*. *Phytochemistry* 21, 2371–2373.
- Inada, A., Nishino, H., Kuchide, M., Takayasu, J., Mukainaka, T., Nobukuni, Y., Okuda, M., Tokuda, H., 2001. Cancer chemopreventive activity of odorine and odorinol from *Aglaia odorata*. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 1282–1285.
- Inada, A., Somekawa, M., Murata, H., Nakanishi, T., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A., Darnaedi, D., Murata, J., 1993. Phytochemical studies on meliaceous plants. VIII. Structures and inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation of triterpenoids from leaves of *Chisocheton macrophyllus* King. *Chem. Pharm. Bull.* 41, 617–619.
- Ishibashi, F., Satasook, C., Ismant, M.B., Towers, G.H.N., 1993. Insecticidal 1H-cyclopentatetrahydro[b]benzofurans from *Aglaia odorata*. *Phytochemistry* 32, 307–310.
- Islam, M.T., Tahara, S., 2000. Dihydroflavonols from *Lannea coromandelica*. *Phytochemistry* 54, 901–907.
- Janprasert, J., Satasook, C., Sukumalanand, P., Champagne, D.E., Isman, M.B., Wiriyachitra, P., Towers, G.H.N., 1993. Rocaglamide, a natural benzofuran insecticide from *Aglaia odorata*. *Phytochemistry* 32, 67–69.
- Kuo, P.C., Schroeder, R.A., 1995. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann. Surg.* 221, 220–235.
- Lipipun, V., Kurokawa, M., Suttisri, R., Taweetchotipatr, P., Pramyoithin, P., Hattori, M., Shiraki, K., 2003. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 60, 175–180.
- Lodeiro, S., Xiong, Q., Wilson, W.K., Ivanova, Y., Smith, M.L., May, G.S., Matsuda, S.P., 2009. Protostadienol biosynthesis and metabolism in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Org. Lett.* 11, 1241–1244.
- Mitsuguchi, H., Seshime, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Kushiro, T., 2009. Biosynthesis of steroidal antibiotic fusidanes: functional analysis of oxidosqualene cyclase and subsequent tailoring enzymes from *Aspergillus fumigatus*. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 6402–6411.
- Miyazawa, M., Kasahara, H., Kameoka, H., 1995. Biotransformation of lignans: metabolism of (+)-eudesmin and (+)-magnolin in *Spodoptera litura*. *Phytochemistry* 39, 1027–1030.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109–142.
- Nugroho, B.W., Edrada, R.A., Wray, V., Witte, L., Bringmann, G., Gehling, M., Proksch, P., 1999. An insecticidal rocaglamide derivatives and related compounds from *Aglaia odorata* (Meliaceae). *Phytochemistry* 51, 367–376.
- Oyama, K., Kondo, T., 2004. Total synthesis of flavocommelin, a component of the blue supramolecular pigment from *Commelina communis*, on the basis of direct 6-C-glycosylation of flavan. *J. Org. Chem.* 69, 5240–5246.
- Seidel, V., Bailleul, F., Waterman, P.G., 2000. (Rel)-1β,2α-di-(2,4-dihydroxy-6-methoxybenzoyl)-3β,4α-di-(4-methoxyphenyl)-cyclobutane and other flavonoids from the aerial parts of *Goniotalamus gardneri* and *Goniotalamus thwaitesii*. *Phytochemistry* 55, 439–446.
- Shienhthong, D., Kokpol, U., Karntiang, P., Massy-Westropp, R.A., 1974. Triterpenoid constituents of Thai medicinal plants-II: isomeric aglaetriols and aglaiondiol. *Tetrahedron* 30, 2211–2215.
- Shienhthong, D., Ungphakorn, A., Lewis, D.E., Massy-Westropp, R.A., 1979. Constituents of Thai medicinal plants-IV new nitrogenous compounds – odorine and odorinol. *Tetrahedron Lett.* 20, 2247–2250.
- Shienhthong, D., Verasarn, A., Nanonggai-Suwanrath, P., Warnhoff, F.W., 1965. Constituents of Thai medicinal plants-I aglaial. *Tetrahedron* 21, 917–924.
- Smith, J.A., Maloney, D.J., Hecht, S.M., Lannigan, D.A., 2007. Structural basis for the activity of the RSK-specific inhibitor, SL0101. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 5018–5034.
- Takahashi, H., Li, S., Harigaya, Y., Onda, M., 1988. Heterocycles. XXII. Stereoselective synthesis of (+)-aromadendrin trimethyl ether and its enantiomer, and their reduction. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 1877–1881.
- Wu, T.-K., Liu, Y.-T., Chang, C.-H., 2005. Histidine residue at position 234 of oxidosqualene-lanosterol cyclase from *Saccharomyces cerevisiae* simultaneously influences cyclization, rearrangement, and deprotonation reactions. *ChemBioChem* 6, 1177–1181.
- Wu, T.-K., Liu, Y.-T., Chang, C.-H., Yu, M.-T., Wang, H.-J., 2006. Site-saturated mutagenesis of histidine 234 of *Saccharomyces cerevisiae* oxidosqualene-lanosterol cyclase demonstrates dual functions in cyclization and rearrangement reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 6414–6419.
- Xu, R., Fazio, G.C., Matsuda, S.P.T., 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* 65, 261–291.
- Xu, Y.-J., Wu, X.-H., Tan, B.K.H., Lai, Y.-H., Vittal, J.J., Imiyabir, Z., Madani, L., Khozirah, K.S., Goh, S.H., 2000. Flavonol-cinnamate cycloadducts and diamide derivatives from *Aglaia laxiflora*. *J. Nat. Prod.* 63, 473–476.