



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “สารที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคมะเร็งจากเป็ด้าใหญ่”

โดย ศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เรืองสำราญ และคณะ

ตุลาคม 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “สารที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคมะเร็งจากเปล้าใหญ่”

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เรืองสำราญ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ดร. ธนพงษ์ กริธาดำรงเดช	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. นางสาวจำเรียง ธรรมธร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ตามสัญญาเลขที่
DBG4880013

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: DBG488013

ชื่อโครงการ: สารที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคมะเร็งจากเปล้าใหญ่

ชื่อนักวิจัย: ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เรืองสำราญ

E-mail Address: Sophon_Ren@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: กันยายน 2548 - ตุลาคม 2552

ได้สกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius* Roxb.) สามารถแยกสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ได้ 2 ชนิด คือ kaur-16-en-19-oic acid (1) และ (-)-hardwickiic acid (2) จากจังหวัดราชบุรี แยกได้ 3 ชนิด คือ acanthoic acid (3), acanthol (4) และ (-)-hardwickiic acid (2) จากจังหวัดนครสวรรค์ แยกได้ 3 ชนิด คือ kaur-16-en-19-oic acid (1), labda-7,12(E),14-triene-17-ol (9) และ labda-7,12(E),14-triene-17-oic acid (10) ซึ่งสาร 1-4 และ 9-10 ดังกล่าวข้างต้น เป็นสารที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว ส่วนเปล้าใหญ่จากจังหวัดน่านแยกสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ชนิดใหม่ได้ 2 สาร คือ (5 α ,8 β ,9 α ,10 β ,14 α)-cleistantha-13(17),15-dien-3 β -ol (5) และ 3,4-seco-cleistantha-4(18),13(17),15-trien-3-oic acid (6) และได้สังเคราะห์อนุพันธ์ 2 ชนิด จากสาร 6 โดยปฏิกิริยาอีพอกซิเดชัน คือ 13,17-epoxy-3,4-seco-cleistantha-4(18),15-dien-3-oic acid (7) และ 14-epoxypimara-4(18),15-dien-3-oic acid (8) และได้นำสาร 5-8 มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด คือ KATO-3 (กระเพาะอาหาร), SW620 (ลำไส้), BT474 (เต้านม), HEP-G2 (ตับ) และ CHAGO (ปอด) พบว่าสาร 5 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง SW620, KATO-3, HEP-G2 และ CHAGO โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.5, 6.0, 6.1 และ 5.5 μ g/ml ตามลำดับ สาร 6 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด SW620 และ KATO-3 เพียงเล็กน้อย โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 8.6 และ 9.6 μ g/ml ตามลำดับ ส่วนสาร 7 และ 8 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด

Abstract

Project Code: DBG488013

Project Title: Chemical constituents with cytotoxicity of *Croton oblongifolius* Roxb.

Investigator: Professor Dr. Sophon Roengsumran

E-mail Address: Sophon_Ren@yahoo.com

Project Period: September 2005– October 2009

Chemical constituents from stem bark of *Croton oblongifolius* Roxb. were isolated. Two diterpenoid compounds, kaur-16-en-19-oic acid (**1**) and (–)-hardwickiic acid (**2**) were isolated from Prachuab Khiri Khan Province. Three compounds, acanthoic acid (**3**), acanthol (**4**) and (–)-hardwickiic acid (**2**) were isolated from Ratchaburi Province. Three compounds, kaur-16-en-19-oic acid (**1**), labda-7,12(E),14-triene-17-ol (**9**) and labda-7,12(E),14-triene-17-oic acid (**10**) were isolated from Nakhonsawan Province. Compounds **1-4** and **9-10** which described above have been reported. Two new diterpenoid compounds, (5 α ,8 β ,9 α ,10 β ,14 α)-cleistantha-13(17),15-dien-3 β -ol (**5**) and 3,4-seco-cleistantha-4(18),13(17),15-trien-3-oic acid (**6**) were isolated from stem bark of *Croton oblongifolius* Roxb. from Nan Province. And two derivatives were synthesized by epoxidation reaction from compound **6**. Compounds **5-8** were tested for cytotoxicity against 5 human tumor cell lines, KATO-3 (gastric), SW620 (colon), BT474 (breast), HEP-G2 (hepatoma) and CHAGO (lung). The results showed that compound **5** was active against SW620, KATO-3, HEP-G2 and CHAGO cell lines with IC₅₀ values of 0.5, 6.0, 6.1 and 5.5 μ g/ml, respectively. Compound **6** showed low active against SW620 and KATO-3 with IC₅₀ values of 8.6 and 9.6 μ g/ml, respectively. Compound **7** and **8** were inactive against all cell lines.

บทนำ

เปล้าใหญ่ มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Croton oblongifolius* Roxb. เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae[1] พบกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย พืชชนิดนี้จัดเป็นพืชสมุนไพรไทยที่สามารถใช้ประโยชน์ทางยาได้จากหลายส่วนของลำต้น[2] เช่น ใบสามารถใช้เป็นยาบำรุง ผลใช้รักษาอาการปวดประจำเดือน เมล็ดใช้เป็นยาห้ามเลือด เปลือกใช้รักษาอาการท้องอืด ส่วนรากใช้แก้อาการปวดท้อง รักษาโรคท้องร่วงได้[3] เนื่องจากเปล้าใหญ่มีคุณสมบัติในการใช้เป็นยาดังนั้นจึงทำให้มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในต้นเปล้าใหญ่อย่างต่อเนื่อง และพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของต้นเปล้าใหญ่เป็นแหล่งสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ที่สำคัญ ที่มีแนวโน้มว่าจะได้สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถพัฒนาไปเป็นยาได้ จากการศึกษาพบว่าต้นเปล้าใหญ่ที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากแต่ละจังหวัดสร้างสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ต่างชนิดกัน โดยสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ที่พบมี 7 ประเภท ประกอบด้วย เซมเบรน ไดเทอร์พีนอยด์, แลเบเดน ไดเทอร์พีนอยด์, ฮาลิเมน ไดเทอร์พีนอยด์, เคลอโรเดน ไดเทอร์พีนอยด์, โคลสแทนเทน ไดเทอร์พีนอยด์, คอเรน ไดเทอร์พีนอยด์ และ พิมาริน ไดเทอร์พีนอยด์ และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเหล่านั้นที่สำคัญคือเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ด้วยเหตุที่จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเปล้าใหญ่ในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยและคณะจึงได้เก็บตัวอย่างเปล้าใหญ่เหล่านั้นและบริเวณใกล้เคียงมาศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (Internal Transcribed Spacer) พบว่าแตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงเป็นไปได้ว่าเปล้าใหญ่มีความหลากหลายทางสายพันธุ์สูงมากและเป็นไปได้ว่าจะได้สารประกอบชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยและคณะจึงต้องการแยกสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากเปล้าใหญ่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบในกลุ่มไดเทอร์พีนอยด์ และทำการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารเหล่านั้น

วัตถุประสงค์

1. แยกหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากเปล้าใหญ่
2. เพื่อดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์เพิ่มมากขึ้น
3. ค้นหาสารออกฤทธิ์กับเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ

การทดลองและผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและการสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีของเปล้าใหญ่

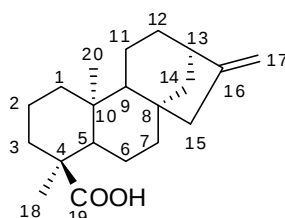
ทำการเก็บตัวอย่างต้นเปล้าใหญ่จาก จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จังหวัดราชบุรี จังหวัดน่าน และ จังหวัดนครสวรรค์ โดยนำส่วนเปลือกลำต้นมาสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งให้แห้งสนิท และบดให้เป็นผงละเอียด จากนั้นนำไปทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เฮกเซน เอธิลอะซีเตต และเมทานอล ตามลำดับ ระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดเป็นตัวทำละลายชนิด commercial grade ที่กลั่นให้บริสุทธิ์แล้ว

2. การแยกองค์ประกอบทางเคมีจากเปล้าใหญ่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

นำเปลือกต้นเปล้าใหญ่ที่มีน้ำหนักแห้ง 4.4 กิโลกรัม มาสกัดด้วยเฮกเซน 3 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง ทำการระเหยตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบเฮกเซนเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอมเขียว น้ำหนัก 82.6 กรัม นำกากที่เหลือมาสกัดด้วยเอธิลอะซีเตต 3 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง ทำการระเหยตัวทำละลาย ได้ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล น้ำหนัก 60.4 กรัม กากที่เหลือมาสกัดด้วยเมทานอล ทำการระเหยตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบเมทานอลเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม น้ำหนัก 7.2 กรัม

นำสารสกัดหยาบเฮกเซนมาแยกองค์ประกอบทางเคมี โดยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ะด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เฮกเซน-เอธิลอะซีเตต เอธิลอะซีเตต-เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ เก็บสารที่ผ่านจากคอลัมน์ทีละ 50 ml ทำการรวมสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกันโดยใช้การเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และใช้वानิลินในสารละลายกรด ในการตรวจสอบสารแต่ละส่วนที่เก็บได้ และนำสารที่เก็บได้แต่ละส่วนไปแยกซ้ำโดยใช้เทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าได้สารประกอบ 1 เป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 10.9 กรัม ซึ่งเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (MS) พบว่ามีโมเลกุลไอออน (m/z) เป็น 302 ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{30}O_2$ และได้พิสูจน์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค FT-IR ปรากฏแถบที่ 3300 cm^{-1} แสดงการสั่นของหมู่ไฮดรอกซิล ที่ $2940, 2851\text{ cm}^{-1}$ แสดงการสั่นของ $sp^3\text{ C-H}$ ที่ 1680 cm^{-1} แสดงการสั่นของ $C=O$ ที่ 1465 cm^{-1} แสดงการสั่นของ $C=C$ และที่ $1255, 1192\text{ cm}^{-1}$ แสดงการสั่นของ $C-O$

จากการพิสูจน์โครงสร้างด้วย $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ได้ผลดังตารางที่ 1 ร่วมกับ 2D NMR พบว่าสารประกอบ **1** มีค่า chemical shift ที่สอดคล้องตรงกับสาร kaur-16-en-19-oic acid และเป็นสารที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว[4]



รูปที่ 1 โครงสร้างสารประกอบ **1**

ตารางที่ 1 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ **1**

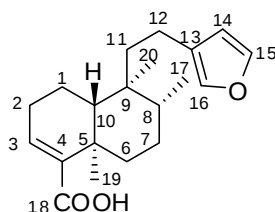
ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	^{13}C	^1H
1	40.6	0.87 (1H, br) 0.85 (1H, d, $J=4$)
2	19.0	1.84 (1H, br) 1.86 (1H, br)
3	37.7	1.12 (1H, d, $J=5$ Hz) 2.16 (1H, d, $J=14$ Hz)
4	43.2	-
5	56.9	1.07 (1H, d, $J=7$ Hz)
6	21.7	1.82 (1H, d, $J=3$ Hz) 1.93 (1H, br)
7	41.3	1.54 (1H, br) 1.46 (1H, br)
8	44.2	-
9	55.6	1.05 (1H, d, $J=7$ Hz)
10	39.6	-
11	18.4	1.60 (1H, br) 1.59 (1H, br)

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	¹³ C	¹ H
12	33.0	1.49 (1H, br) 1.64 (1H, br)
13	43.8	2.64 (1H, br)
14	39.4	1.16 (1H, dd, $J=5,11$ Hz) 2.01 (1H, dd, $J=2,11$ Hz)
15	48.9	2.06 (1H, br) 2.04 (1H, d, $J=2$ Hz)
16	155.5	-
17	102.8	4.75 (1H, s) 4.81 (1H, s)
18	28.6	1.22 (3H, s)
19	184.9	-
20	15.1	0.99 (3H, s)

สารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตเมื่อนำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ๒๒ ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เฮกเซน-เอธิลอะซีเตต เอธิลอะซีเตต-เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ พบว่าได้สารประกอบ **1** น้ำหนัก 1.1 กรัม และได้สารประกอบ **2** เป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 1.7 กรัม เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างด้วย FT-IR ปรากฏแถบการดูดกลืนที่ 3140 cm^{-1} แสดงการสั่นของหมู่ไฮดรอกซิล ที่ 2930 cm^{-1} แสดงการสั่นของ sp^3 C-H ที่ $1760, 1724\text{ cm}^{-1}$ แสดงการสั่นของ C=O ที่ 1597 cm^{-1} แสดงการสั่นของ C=C ที่ $1192, 1174\text{ cm}^{-1}$ แสดงการสั่นของ C-O และที่ 869 แสดงการสั่นของ C=CH out of plane

เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (MS) พบว่ามีโมเลกุลไอออน (m/z) เป็น 316 ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{28}O_3$

จากการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค 1D และ 2D NMR ได้ผลดังตารางที่ 2 พบว่าสารประกอบ 2 มีค่า chemical shift ที่สอดคล้องตรงกับสาร (-)-hardwickiic acid ซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว และพบว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง [5, 6]



รูปที่ 2 โครงสร้างสารประกอบ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วย ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ 2

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	^{13}C	^1H
1	17.9	1.56 (1H, m) 1.64 (1H, m)
2	27.7	2.14 (1H, m) 2.27 (1H, m)
3	140.1	6.80 (1H, dd, $J=3.0, 4.4$ Hz)
4	142.0	-
5	37.9	-
6	36.5	1.09 (1H, td, $J=5.2, 12.9, 13.0$ Hz) 2.38 (1H, dt, $J=3.2, 3.2, 13.0$ Hz)
7	27.1	1.35 (1H, m) 1.48 (1H, m)
8	36.4	1.50 (1H, m)
9	39.1	-
10	46.9	1.37 (1H, m)
11	39.2	1.48 (1H, m) 1.59 (1H, m)

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	¹³ C	¹ H
12	18.3	2.14 (1H, m) 2.23 (1H, m)
13	126.1	-
14	111.3	6.22 (1H, dd, <i>J</i> =0.8, 1.7 Hz)
15	138.7	7.17 (1H, br s)
16	143.0	7.24 (1H, d, <i>J</i> =0.8 Hz)
17	16.2	0.79 (3H, d, <i>J</i> =6.5 Hz)
18	173.0	-
19	20.7	1.21 (3H, s)
20	18.3	0.773H, s)

3. การแยกองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกใหญ่ จังหวัดราชบุรี

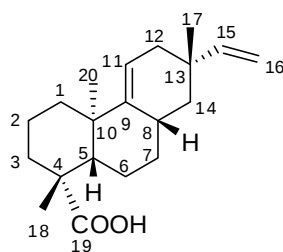
นำเปลือกต้นเปลือกใหญ่บดละเอียดที่มีน้ำหนักแห้ง 3.7 กิโลกรัม มาสกัดด้วยเฮกเซน 3 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง ทำการระเหยตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบเฮกเซนเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล น้ำหนัก 301.4 กรัม นำกากที่เหลือมาสกัดด้วยเอธิลอะซีเตต 3 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง ทำการระเหยตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล น้ำหนัก 74.1 กรัม กากที่เหลือมาสกัดด้วยเมทานอล ทำการระเหยตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบเมทานอลเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม น้ำหนัก 10.2 กรัม

นำสารสกัดหยาบเฮกเซนมาแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เฮกเซน-เอธิลอะซีเตต เอธิลอะซีเตต-เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ เก็บสารที่ผ่านจากคอลัมน์ทีละ 50 ml ทำการรวมสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกันโดยใช้การเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และใช้วานิลินในสารละลายกรด ในการตรวจสอบสารแต่ละส่วนที่เก็บได้

หลังรวม fraction ที่ชะด้วย 30% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน ปรากฏว่ามีผลึกใสไม่มีสีตกออกมาจำนวนมาก ทำการกรองแยกผลึก และสารละลายที่เหลือนำไประเหยตัวทำละลาย และนำกลับมาตกผลึกซ้ำ ได้สารประกอบ 3 เป็นผลึกใสไม่มีสี น้ำหนัก 153.9 กรัม ซึ่งเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (MS) พบว่ามีโมเลกุลไอออน (*m/z*) เป็น 302 ซึ่งมีสูตร

โมเลกุลเป็น $C_{20}H_{30}O_2$ และได้พิสูจน์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค FT-IR ปรากฏแถบที่ 3080 cm^{-1} แสดงการสั่นของหมู่ไฮดรอกซิล ที่ $2934, 2856\text{ cm}^{-1}$ แสดงการสั่นของ $sp^3\text{ C-H}$ ที่ 1690 cm^{-1} แสดงการสั่นของ $C=O$ ที่ 1464 cm^{-1} แสดงการสั่นของ $C=C$ ที่ $1261, 1183\text{ cm}^{-1}$ แสดงการสั่นของ $C-O$ และที่ 811 แสดงการสั่นของ $C=CH$ out of plane

จากการพิสูจน์โครงสร้างด้วย $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ได้ผลดังตารางที่ 3 พบว่าสารประกอบ **3** มีค่า chemical shift ที่สอดคล้องตรงกับสาร acanthoic acid และเป็นสารที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว[7] ซึ่ง acanthoic acid เป็นสารที่มีรายงานฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ[8] และลดอาการปวดประสาท ลดความดันโลหิตสูง ลดอาการข้ออักเสบ และลดอาการเบหวาน[9]



รูปที่ 3 โครงสร้างสารประกอบ **3**

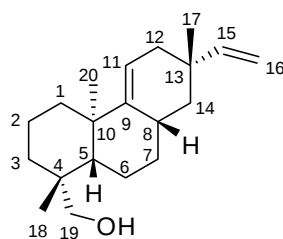
ตารางที่ 3 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ **3**

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	^{13}C	^1H
1	41.8	1.29 (1H, m) 1.80 (1H, m)
2	18.9	1.92 (1H, m) 2.20 (1H, m)
3	38.1	0.99 (1H, m) 2.15 (1H, m)
4	44.1	-
5	47.8	1.67 (1H, dd, $J=6.2, 13.0\text{ Hz}$)
6	20.3	1.48 (1H, m) 1.90 (1H, m)
7	27.8	1.22 (1H, m) 1.74 (1H, m)

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	¹³ C	¹ H
8	28.7	2.30 (1H, m)
9	149.9	-
10	38.3	-
11	116.6	5.39 (1H, m)
12	37.5	1.78 (1H, m) 2.01 (1H, m)
13	34.8	-
14	41.7	1.04 (1H, m) 1.47 (1H, m)
15	150.2	5.85 (1H, dd, $J= 10.4, 17.4$ Hz)
16	109.2	4.87 (1H, dd, $J=1.2, 10.4$ Hz) 4.93 (1H, dd, $J=1.2, 17.4$ Hz)
17	22.2	0.97 (3H, s)
18	28.6	1.25 (3H, s)
19	184.8	-
20	22.4	1.00 (3H, s)

นำ fraction ที่เหลือมาแยกองค์ประกอบซ้ำโดยพบว่าสามารถแยกสารประกอบโดยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ๒๒ ด้วยตัวทำละลาย เฮกซะน-เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน 30% สามารถแยกสารประกอบ 4 เป็นของแข็งสีขาวน้ำหนัก 1.7 กรัม เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (MS) พบว่ามีโมเลกุลไอออน (m/z) เป็น 288 ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{32}O$ และได้พิสูจน์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค FT-IR ปรากฏแถบที่ $3241-3152\text{ cm}^{-1}$ แสดงการสั่นของหมู่ไฮดรอกซิล ที่ 2923 cm^{-1} แสดงการสั่นของ $sp^3\text{ C-H}$ ที่ $1626, 1605\text{ cm}^{-1}$ $C=C$ ที่ $1262, 1186\text{ cm}^{-1}$ แสดงการสั่นของ $C-O$

จากการพิสูจน์โครงสร้างด้วย $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ได้ผลดังตารางที่ 4 พบว่าสารประกอบ 4 มีค่า chemical shift ที่สอดคล้องตรงกับสาร acanthol และเป็นสารที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว[7]



รูปที่ 4 โครงสร้างสารประกอบ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วย ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ 4

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	^{13}C	^1H
1	41.1	1.22 (1H, m) 1.86 (1H, m)
2	18.0	1.90 (1H, m) 2.14 (1H, m)
3	35.5	0.93 (1H, m) 1.84 (1H, m)
4	38.4	-
5	46.3	1.57 (1H, dd, J=6.0, 12.9 Hz)
6	19.1	1.49 (1H, m) 1.85 (1H, m)
7	26.9	1.18 (1H, m) 1.70 (1H, m)
8	29.0	2.30 (1H, m)
9	151.3	-
10	37.7	-
11	115.8	5.29 (1H, m)
12	37.6	1.77 (1H, m) 2.03 (1H, m)
13	34.8	-

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	¹³ C	¹ H
14	41.6	1.02 (1H, m) 1.39 (1H, m)
15	150.3	5.75 (1H, dd, J=17.4, 10.6 Hz)
16	109.1	4.79 (1H, dd, J=10.6, 1.3 Hz) 4.87 (1H, 17.4, 1.3 Hz)
17	22.4	0.98 (3H, s)
18	26.5	0.97 (3H, s)
19	65.1	3.84 (1H, d, J= 8.0 Hz) 3.54 (1H, d, J=8.0 Hz)
20	26.0	1.04 (3H, s)

สารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตเมื่อนำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ะด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เฮกเซน-เอธิลอะซีเตต เอธิลอะซีเตต-เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ สามารถแยกสารประกอบเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 0.6 กรัม เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างด้วย FT-IR แมสสเปกโตรเมตรี ¹H-NMR ¹³C-NMR และ 2D NMR พบว่าสารประกอบที่แยกได้คือ (-)-hardwickiic acid (**1**)

4. การแยกองค์ประกอบทางเคมีจากเปล้าใหญ่ จังหวัดน่าน

นำเปลือกต้นเปล้าใหญ่ที่แห้งและบดละเอียด น้ำหนักแห้ง 0.5 กิโลกรัม มาสกัดด้วยเฮกเซน 5 ลิตร ซ้ำ 2 ครั้ง ทำการระเหยตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบเฮกเซนเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอมเขียว น้ำหนัก 15 กรัม นำกากมาสกัดซ้ำด้วยเอธิลอะซีเตต 5 ลิตร ซ้ำ 2 ครั้ง ทำการระเหยตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง น้ำหนัก 25 กรัม กากที่เหลือนำมาสกัดด้วยเมทานอล 5 ลิตร ซ้ำ 2 ครั้ง ทำการระเหยตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง น้ำหนัก 20 กรัม

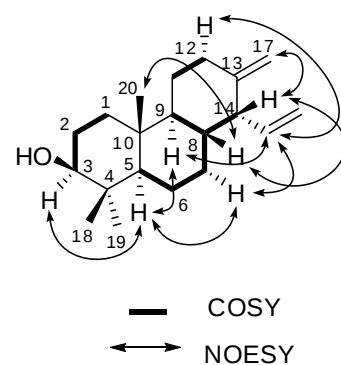
นำสารสกัดหยาบเฮกเซน (15 กรัม) มาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี เริ่มด้วยตัวทำละลายเฮกเซน จากนั้นเพิ่มขั้วของสารละลายโดยการเพิ่ม

เอธิลอะซีเตต จนถึงเอธิลอะซีเตต 100% เก็บสารที่ผ่านจากคอลัมน์ที่ละ 25 ml ทำการรวบสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกันโดยใช้การเทคนิคโครมาโทกราฟี และใช้วานิลินในสารละลายกรด ในการตรวจสอบสารแต่ละส่วนที่เก็บได้

จากการแยกดังที่กล่าวข้างต้นหลังจากทำการระเหยตัวทำละลายสามารถรวบส่วนที่เหมือนกันได้ทั้งหมด 3 fraction โดย fraction ที่ 1 ถูกชะออกมาที่ 0-20% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซนมีน้ำหนัก 2.1 กรัม fraction ที่ 2 ถูกชะออกมาที่ 25-30% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซนมีน้ำหนัก 5.4 กรัม และ fraction ที่ 3 ถูกชะออกมาที่ 50% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซนมีน้ำหนัก 1.3 กรัม

นำ fraction ที่ 1 และ 2 มาแยกองค์ประกอบซ้ำโดยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารประกอบ 5 ได้เป็นมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว เมื่อนำมาตกผลึกจากตัวทำละลายเมทานอล ได้เป็นผลึกสีขาวรูปเข็มน้ำหนัก 200 มิลลิกรัม (0.04% จากน้ำหนักแห้งของเปลือกต้นเปล้าใหญ่) สารประกอบ 5 เมื่อนำไปวิเคราะห์โดยวิธี elemental analysis พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{32}O$ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์โดยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีที่ปรากฏ m/z 289 $[M+H]^+$ และเมื่อนำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค FT-IR ปรากฏแถบการดูดกลืนที่ 3413 cm^{-1} แสดงการสั่นของหมู่ไฮดรอกซิล 1633 cm^{-1} แสดงการสั่นของ $C=C$

จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค 1H -NMR และ ^{13}C -NMR แสดงผล ดังตารางที่ 5 จาก ^{13}C -NMR ปรากฏสัญญาณของ oxygenated methine carbon (δ 79.1 ppm) สัญญาณของ exocyclic methylene (δ 106.4, CH_2 ; 152.4, C) และสัญญาณของ vinyl คาร์บอน (δ 137.7, CH; 115.9, CH_2) จากเทคนิค 1H -NMR ปรากฏสัญญาณของ olefinic โปรตอน ของ terminal methylene ที่ δ 4.57(s) และ 4.65(s) สัญญาณของ vinyl โปรตอน ที่ δ 6.01 (1H, ddd, $J=17.0$, 9.6 and 9.2 Hz), 5.02 (1H, dd, $J=9.6$ and 1.6 Hz), and 5.03 (1H, dd, $J=17.0$ and 1.6 Hz) และสัญญาณของ methyl โปรตอน ที่ δ 0.80 (3H, s), 0.97 (3H, s) และ 0.79 (3H, s) จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค 1D ร่วมกับ 2D NMR คือ COSY, HSQC, HMBC และ NOESY พบว่าสาร 5 มีโครงสร้างแบบ cleistanthane-type diterpenoid และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสเตอริโอเคมี โดยพิจารณาจาก NOESY สเปกตรัมอย่างละเอียด ทำให้ทราบว่า สารประกอบ 5 คือ $(5\alpha,8\beta,9\alpha,10\beta,14\alpha)$ -cleistantha-13(17),15-dien-3 β -ol (รูป 5)



รูป 5 โครงสร้างสารประกอบ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วย ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ 5

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	^{13}C	^1H
1	37.6 (t)	1α : 1.06 (1H, m) 1β : 1.73 (1H, m)
2	27.5 (t)	2α : 1.52 (1H, m) 2β : 1.63 (1H, ddd, $J=3.4, 7.3, 14.8$ Hz)
3	79.1 (d)	3.22 (1H, dd, $J=11.6, 4.5$ Hz)
4	38.9 (s)	-
5	54.3 (d)	0.78 (1H, m)
6	21.3 (t)	6α : 1.34 (1H, m) 6β : 1.62 (1H, m)
7	32.1 (t)	7α : 1.24 (1H, m) 7β : 1.50 (1H, m)
8	40.5 (d)	1.49 (1H, m)
9	49.2 (d)	1.04 (1H, m)
10	36.9 (s)	-
11	27.0 (t)	11α : 1.75 (1H, m) 11β : 1.77 (1H, m)
12	31.3 (t)	12α : 2.17 (1H, m) 12β : 2.17 (1H, m)

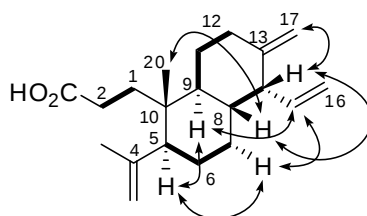
ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	¹³ C	¹ H
13	152.4 (s)	-
14	54.6 (d)	2.81 (1H, dd, $J=9.2, 4.2$ Hz)
15	137.7 (d)	6.01 (1H, ddd, $J=9.2, 9.6, 17.0$ Hz)
16	115.9 (t)	16 α : 5.02 (1H, dd, $J=9.6, 1.6$ Hz) 16 β : 5.03 (1H, dd, $J=17.0, 1.6$ Hz)
17	106.4 (t)	17 α : 4.57 (1H, s) 17 β : 4.65 (1H, s)
18	15.8 (q)	0.80 (3H, s)
19	28.4 (q)	0.97 (3H, s)
20	14.0 (q)	0.79 (3H, s)

สารประกอบ **6** สามารถแยกได้จาก fraction 2 จากสารสกัดหยาบเฮกเซน มาแยกซ้ำโดยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 30% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน และได้จากการแยกจากส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตโดยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สาร **6** เป็นของเหลวใสไม่มีสี น้ำหนัก 2.2 กรัม (0.4% จากน้ำหนักแห้งของเปลือกต้นเปล้าใหญ่) เมื่อวิเคราะห์สาร **6** โดยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี HRESIMS และ MS $[M+H]^+$ ปรากฏ m/z 303 จึงได้ว่าสาร **6** มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{30}O_2$ จากการวิเคราะห์โดยใช้ FT-IR ปรากฏแถบการดูดกลืนที่ $3400-2400\text{ cm}^{-1}$ และ 1704 cm^{-1} ซึ่งแสดงการสั่นของหมู่ carboxylic acid และที่ 1627 cm^{-1} แสดงการสั่นของ $C=C$

การวิเคราะห์โดยเทคนิค $^{13}\text{C-NMR}$ ร่วมกับ DEPT แสดงให้เห็นว่าสาร **6** มีคาร์บอนทั้งหมด 20 คาร์บอน ประกอบด้วย methyl คาร์บอนจำนวน 2 คาร์บอน methylene sp^3 คาร์บอนจำนวน 6 คาร์บอน methine sp^3 คาร์บอนจำนวน 4 คาร์บอน quaternary sp^3 คาร์บอนจำนวน 1 คาร์บอน methylene sp^2 คาร์บอนจำนวน 3 คาร์บอน methine sp^2 คาร์บอนจำนวน 1 คาร์บอน quaternary sp^2 คาร์บอนจำนวน 2 คาร์บอน และ carbonyl คาร์บอน ของหมู่ carboxylic

จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ได้ผลดังตารางที่ 6 จากโปรตอนสเปกตรัมแสดงสัญญาณที่ δ 4.59 ppm (1H, d, $J=0.9$ Hz), 4.67 ppm (1H, d, $J=0.9$ Hz), 1.74 ppm (3H, s) และ 0.84 ppm (3H, s) ซึ่งเป็นสัญญาณของโปรตอนบนพันธะคู่ที่อยู่ปลายด้านนอก และเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสาร **5** พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก ส่วนที่มีความแตกต่างชัดเจนคือ ที่วง A ของสาร **6** ตำแหน่งที่ 3 และ 4 ขาดออกจากกัน และตำแหน่งที่ 3 กลายเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก โครงสร้าง

ของสาร **6** หาได้จากความสัมพันธ์ของ COSY, TOCSY และ NOESY ซึ่งทำให้ทราบว่าสาร **6** คือ 3,4-seco-cleistantha-4(18),13(17),15-trien-3-oic acid ดังรูป 6



— COSY
 ↔ NOESY

รูป 6 โครงสร้างสารประกอบ **6**

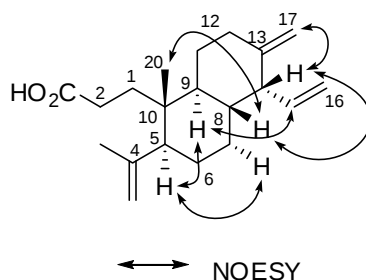
ตารางที่ 6 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วย ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ **6**

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	^{13}C	^1H
1	32.1 (t)	1.65 (2H, m)
2	28.1 (t)	2α : 2.42 (1H, m) 2β : 2.30 (1H, m)
3	181.0 (s)	-
4	148.4 (s)	-
5	50.7 (d)	1.96 (1H, dd, $J=12.8, 2.4$ Hz)
6	27.6 (t)	6α : 1.44 (1H, m) 6β : 1.67 (1H, m)
7	31.5 (t)	7α : 1.24 (1H, m) 7β : 1.46 (1H, m)
8	40.4 (d)	1.57 (1H, m)
9	41.0 (d)	1.26 (1H, m)
10	39.0 (s)	-
11	27.4 (t)	11α : 1.17 (1H, m) 11β : 1.72 (1H, m)

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	¹³ C	¹ H
12	31.3 (t)	2.20 (2H, m)
13	151.9 (s)	-
14	54.7 (d)	2.83 (1H, dd, $J=8.8, 4.4$ Hz)
15	137.3 (d)	6.02 (1H, ddd, $J=17.6, 10.4, 8.8$ Hz)
16	116.2 (t)	16 α : 5.03 (1H, dd, $J=10.4, 1.6$ Hz) 16 β : 5.04 (1H, dd, $J=17.6, 1.6$ Hz)
17	106.8 (t)	17 α : 4.59 (1H, d, $J=0.9$ Hz) 17 β : 4.67 (1H, d, $J=0.9$ Hz)
18	113.8 (t)	18 α : 4.67 (1H, s) 18 β : 4.88 (1H, s)
19	23.9 (q)	1.74 (3H, s)
20	16.8 (q)	0.84 (3H, s)

นำผลึกรูปเข็มของสาร **6** มาทำปฏิกิริยา epoxidation กับ *m*CPBA (1.2 eq.) ในตัวทำละลาย ไตคลอโรมีเทน ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ **7** เป็นผลิตภัณฑ์หลัก และสาร **8** เป็นสารผลิตภัณฑ์รอง ปฏิกิริยา epoxidation ของสาร **6** พบว่าจะไม่เกิด epoxidation ที่ตำแหน่ง isopropylene

สารประกอบ **7** มีโมเลกุลไอออน m/z 341 มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{20}H_{30}O_3$ จากข้อมูล 1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของสาร **7** (ตารางที่ 7) เปรียบเทียบกับสาร **6** มีลักษณะคล้ายคลึงกัน ยกเว้นที่ตำแหน่ง พันธะคู่ (C-13 และ C-17) ถูกเปลี่ยนให้เป็น epoxide และเมื่อพิจารณา 2D NMR ของสาร **7** รวมทั้งพิจารณาความสัมพันธ์ทางสเตอริโอเคมีจาก NOESY สเปกตรัม ทำให้สามารถทราบได้ว่า สาร **7** คือ 13,17-epoxy-3,4-seco-cleistantha-4(18),15-dien-3-oic acid ดังรูป 7



รูป 7 โครงสร้างสารประกอบ 7

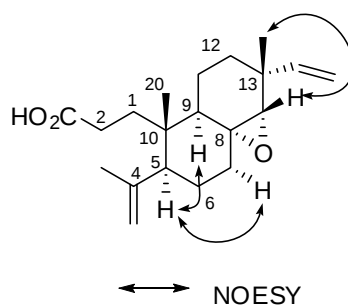
ตารางที่ 7 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วย ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ 7

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	^{13}C	^1H
1	32.1 (t)	1.65 (2H, m)
2	28.0 (t)	2α : 2.28 (1H, m) 2β : 2.43 (1H, m)
3	180.1 (s)	-
4	147.4 (s)	-
5	50.7 (d)	1.96 (1H, dd, $J=12.4, 2.8$ Hz)
6	27.5 (t)	6α : 1.42 (1H, m) 6β : 1.71 (1H, m)
7	31.1 (t)	7α : 1.19 (1H, m) 7β : 1.39 (1H, m)
8	36.6 (d)	1.86 (1H, m)
9	40.2 (d)	1.25 (1H, m)
10	39.0 (s)	-
11	29.3 (t)	11α : 1.16 (1H, m) 11β : 2.02 (1H, m)
12	23.0 (t)	12α : 1.46 (H, m) 12β : 1.64 (1H, m)
13	61.5 (s)	-
14	53.0 (d)	1.67 (1H, m)

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	¹³ C	¹ H
15	135.5 (d)	5.90 (1H, ddd, $J=17.2, 10.4, 10.0$ Hz)
16	118.3 (t)	16 α : 5.03 (1H, dd, $J=10.4, 2.0$ Hz) 16 β : 5.11 (1H, dd, $J=17.2, 2.0$ Hz)
17	53.9 (t)	17 α : 2.60 (1H, d, $J=4.4$ Hz) 17 β : 2.63 (1H, d, $J=4.8$ Hz)
18	113.7 (t)	18 α : 4.68 (1H, s) 18 β : 4.86 (1H, s)
19	23.9 (q)	1.74 (3H, s)
20	16.8 (q)	0.90 (3H, s)

ส่วนสารประกอบ **8** มีโมเลกุลาร์ไอออน m/z 318 และมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{30}O_3$ ข้อมูล 1H -NMR และ ^{13}C -NMR แสดงในตารางที่ 8 จากการพิจารณา ^{13}C -NMR สเปกตรัม ร่วมกับ HSQC พบว่า สาร **8** มีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 20 คาร์บอน ประกอบด้วย methyl คาร์บอน จำนวน 3 คาร์บอน methylene sp^3 -คาร์บอน จำนวน 6 คาร์บอน methine sp^3 -คาร์บอน จำนวน 2 คาร์บอน oxygenated methine sp^3 -คาร์บอน จำนวน 1 คาร์บอน quaternary sp^3 -คาร์บอน จำนวน 2 คาร์บอน oxygenated quaternary sp^3 -คาร์บอน จำนวน 1 คาร์บอน methylene sp^2 -คาร์บอน จำนวน 2 คาร์บอน methine sp^2 -คาร์บอน จำนวน 1 คาร์บอน quaternary sp^2 -คาร์บอน จำนวน 1 คาร์บอน และ carbonyl คาร์บอน ของ คาร์บอกซิลิก แอซิด จำนวน 1 คาร์บอน

จาก 2D NMR สเปกตรัม คือ HMBC COSY TOCSY NOESY และข้อมูลจากค่า coupling constant ทำให้ทราบโครงสร้างสาร **8** เป็นดังรูป 8 ซึ่งสารเป็นคือ 14-epoxypimara-4(18),15-dien-3-oic acid



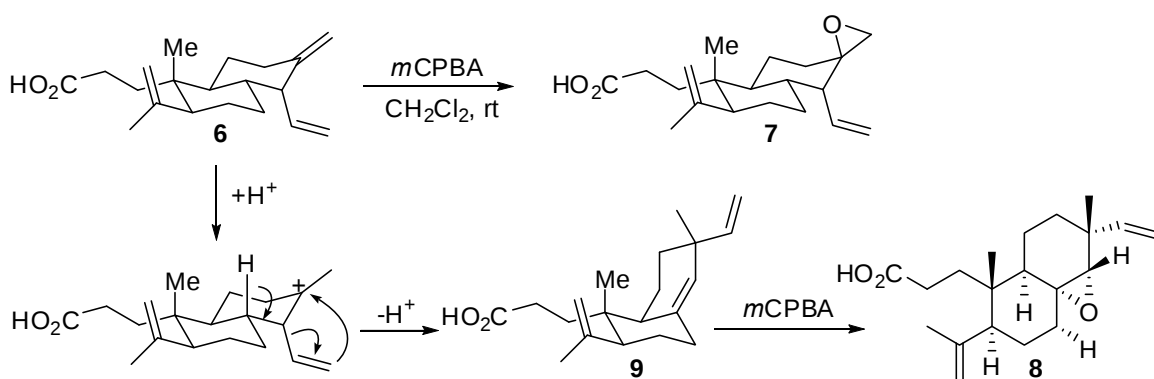
รูป 8 โครงสร้างสารประกอบ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วย ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ 8

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	^{13}C	^1H
1	32.1 (t)	1.66 (2H, m)
2	28.0 (t)	2α : 2.22 (1H, m) 2β : 2.44 (1H, m)
3	178.7 (s)	-
4	146.9 (s)	-
5	50.6 (d)	2.15 (1H, dd, $J=12.4, 2.4$ Hz)
6	25.6 (t)	6α : 1.49 (1H, m) 6β : 2.02 (1H, m)
7	34.7 (t)	7α : 1.27 (1H, m) 7β : 1.89 (1H, m)
8	61.4 (d)	-
9	43.3 (d)	1.22 (1H, m)
10	40.3 (s)	-
11	16.4 (s)	1.22 (2H, m)
12	34.9 (t)	1.38 (2H, m)
13	35.6 (s)	-
14	63.7 (d)	2.55 (1H, m)
15	146.8 (d)	5.87 (1H, ddd, $J=17.6, 10.4, 10.0$ Hz)

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	¹³ C	¹ H
16	112.0 (t)	16 α : 5.01 (1H, dd, $J=10.4, 2.0$ Hz) 16 β : 5.04 (1H, dd, $J=17.2, 2.0$ Hz)
17	22.0 (q)	1.10 (3H, s)
18	114.0 (t)	18 α : 4.74 (1H, s) 18 β : 4.90 (1H, s)
19	23.6 (q)	1.78 (3H, s)
20	18.3 (q)	0.98 (3H, s)

สารประกอบ **8** นั้นคาดว่าจะเกิดจากกระบวนการเร่งด้วยกรดระหว่างการศึกษา epoxidation แล้วเกิดผ่าน intermediate **9** ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ **8** ดังแผนภาพ 1



แผนภาพ 1 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาของสาร **6** เป็นสาร **7** และ **8**

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร **5**, **6**, **7** และ **8** นำสารประกอบทั้ง 4 ทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด คือ KATO-3, SW620, BT474, HEP-G2 และ CHAGO โดยใช้วิธี in vitro และติดตามผลโดยใช้วิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric method [10, 11] และใช้ Doxorubicin hydrochloride เป็นตัวควบคุมบวก ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 9 โดยสารประกอบ **1** มีฤทธิ์ในการยับยั้ง HEP-G2 สูง และมีฤทธิ์ยับยั้ง KATO-3, BT474 และ CHAGO ได้ปานกลาง สารประกอบ **2** มีฤทธิ์ยับยั้ง KATO-3, BT474 และ HEP-G2 ส่วนสารประกอบ **3** และ **4** ไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ทดสอบ

ตารางที่ 9 แสดงผลจากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารประกอบ 5-8^a

สารประกอบ	ชนิดของเซลล์มะเร็งทดสอบ ^b				
	KATO-3	SW620	BT474	HEP-G2	CHAGO
1	6.0	>10.0	6.1	0.5	5.5
2	9.6	>10.0	10.0	8.6	>10.0
3	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
4	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
Doxorubicin hydrochloride	0.5	1.2	2.2	1.7	0.1

^aResults are expressed as IC₅₀ values ($\mu\text{g/mL}$); ^bKATO-3, human gastric carcinoma ATCC No. HTB 103; SW620, human colon adenocarcinoma ATCC No. CCL 227; BT474, human breast ductal carcinoma ATCC No. HTB20; HEP-G2, human liver hepatoblastoma ATCC No. HB 8056; CHAGO, human undifferentiated lung carcinoma

จากการศึกษาผลการศึกษาที่ผ่านมาได้นำไปเขียนวารสาร และได้รับการตีพิมพ์ลงในวารสาร “Chemistry of Natural Compounds” ซึ่งเป็น journal ที่อยู่ใน Springer ดังเอกสารที่ได้แนบมาด้วยในท้ายรายงาน

5. การแยกองค์ประกอบทางเคมีจากเปล้าใหญ่ จังหวัดนครสวรรค์

นำเปลือกต้นเปล้าใหญ่ที่แห้งและบดละเอียดน้ำหนัก 2.9 กิโลกรัม มาสกัดด้วยเฮกเซน 3 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง ทำการระเหยตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบเฮกเซนเป็นของเหลวหนืด 61.5 กรัม นำกากที่เหลือมาสกัดด้วยเอธิลอะซีเตต 3 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง ทำการระเหยตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล น้ำหนัก 37.2 กรัม กากที่เหลือมาสกัดด้วยเมทานอล ทำการระเหยตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบเมทานอลเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้มข้นน้ำหนัก 11.8 กรัม

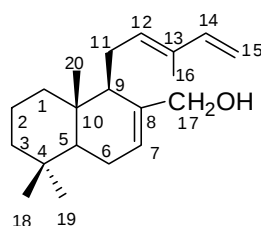
นำสารสกัดหยาบเฮกเซนมาแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ะด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เฮกเซน-เอธิลอะซีเตต เอธิลอะซีเตต-เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ เก็บสารที่ผ่านจากคอลัมน์ทีละ 50 ml ทำการรวมสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกันโดยใช้การ

เทคนิคอินฟราเรดโครมาโทกราฟี และใช้วานิลลินในสารละลายกรด ในการตรวจสอบสารแต่ละส่วนที่เก็บได้ และนำสารที่เก็บได้แต่ละส่วนไปแยกซ้ำโดยใช้เทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าได้สารประกอบเป็นของแข็งสีขาวน้ำหนัก 6.8 กรัม ซึ่งเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (MS), FT-IR, 1D และ 2D NMR ปรากฏว่าสารประกอบที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ สาร **1** (kaur-16-en-19-oic acid)

ส่วน fraction ที่เหลือเมื่อนำมาแยกซ้ำโดยเทคนิคซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 30% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน สามารถแยกสารประกอบ **9** ได้ เป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 741 มิลลิกรัม และสารประกอบ **10** เป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 325 มิลลิกรัม

เมื่อนำสารประกอบ **9** ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย FT-IR ปรากฏแถบการดูดกลืนที่ 3239-3160 cm^{-1} แสดงการสั่นของหมู่ไฮดรอกซิล ที่ 2917 cm^{-1} แสดงการสั่นของ sp^3 C-H ที่ 1631, 1608 cm^{-1} แสดงการสั่นของ C=C เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (MS) พบว่ามีโมเลกุลไอออน (m/z) เป็น 288 ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}$

จากการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค 1D และ 2D NMR ได้ผลดังตารางที่ 10 พบว่าสารประกอบ **9** คือ labda-7,12(E),14-triene-17-ol ซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว[12]



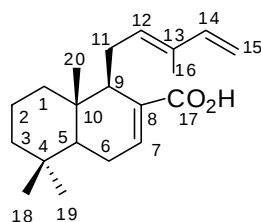
รูป 9 โครงสร้างสารประกอบ **9**

ตารางที่ 10 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วย ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ 9

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	^{13}C	^1H
1	39.6	1.02 (1H, dt, $J=3.8, 13.1$ Hz) 1.20 (1H, m)
2	18.8	1.45 (1H, t, $J=3.7$ Hz) 1.54 (1H, m)
3	42.2	1.16 (1H, dt, $J=3.2, 12.8$ Hz) 1.41 (1H, m)
4	33.0	-
5	49.8	1.24 (1H, dd, $J=4.8, 13.0$ Hz)
6	23.6	2.06 (1H, d, $J=5.8$ Hz) 1.92 (1H, m)
7	125.6	5.75 (1H, m)
8	138.6	-
9	52.3	2.09 (1H, m)
10	36.7	-
11	25.8	2.34 (1H, d, $J=14.8$ Hz) 2.15 (1H, m)
12	134.8	5.56 (1H, t, $J=6.8$ Hz)
13	133.5	-
14	141.3	6.35 (1H, dd, $J=10.6, 17.0$ Hz)
15	110.6	4.90 (1H, d, $J=10.6$ Hz) 5.06 (1H, d, $J=17.0$ Hz)
16	11.9	1.75 (3H, s)
17	66.0	3.88 (1H, d, $J=12.8$ Hz) 4.05 (1H, d, $J=12.8$ Hz)
18	33.2	0.86 (3H, s)
19	22.0	0.88 (3H, s)
20	13.9	0.77 (3H, s)

ส่วนสารประกอบ **10** ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย FT-IR ปรากฏแถบการดูดกลืนที่ 3418-2637 cm^{-1} แสดงการสั่นของหมู่ไฮดรอกซิล ที่ 2934 cm^{-1} แสดงการสั่นของ sp^3 C-H ที่ 1711 แสดงการสั่นของหมู่คาร์บอนิล และที่ 1631, 1608 cm^{-1} แสดงการสั่นของ C=C เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (MS) พบว่ามีโมเลกุลไอออน (m/z) เป็น 302 ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$

จากการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค 1D และ 2D NMR ได้ผลดังตารางที่ 11 พบว่าสารประกอบ **10** คือ labda-7,12(E),14-triene-17-oic acid ซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว[12]



รูป 9 โครงสร้างสารประกอบ **9**

ตารางที่ 11 แสดงผลจากการวิเคราะห์ด้วย ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ **10**

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	^{13}C	^1H
1	40.8	1.01 (1H, dt, $J=3.6, 13.0$ Hz) 1.20 (1H, m)
2	18.6	1.42 (1H, d, $J=2.8$ Hz) 1.54 (1H, m)
3	42.0	1.16 (1H, d, $J=3.8$ Hz) 1.42 (1H, m)
4	32.8	-
5	49.5	1.21 (1H, d, $J=4.2$ Hz)
6	23.9	2.04 (1H, m) 2.14 (1H, m)

ตำแหน่ง	Chemical shift (ppm)	
	¹³ C	¹ H
7	140.6	6.87 (1H, dt, $J=2.0, 6.2$ Hz)
8	133.7	-
9	50.0	2.37 (1H, m)
10	36.7	-
11	25.9	2.34 (1H, dd, $J=6.2, 16.8$ Hz) 2.58 (1H, m)
12	133.4	5.46 (1H, t, $J=6.8$ Hz)
13	133.1	-
14	141.7	6.31 (1H, dd, $J=10.6, 17.2$ Hz)
15	110.0	4.84 (1H, d, $J=10.6, 17.2$ Hz) 4.99 (1H, d, $J=17.2$ Hz)
16	11.7	1.65 (3H, s)
17	174.1	-
18	33.2	0.85 (3H, s)
19	22.1	0.89 (3H, s)
20	14.8	0.81 (3H, s)

รายการอ้างอิง

1. เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : หจก.แฟนนีพับลิชชิ่ง, 2523.
2. หลวงประเสริฐวิทย์ศาสตร์. ตำราสรรพคุณยาไทย. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ไต้เซียง, 2548.
3. เสี่ยงม พงษ์บุญรอด. ไม้เทศเมืองไทย. กรุงเทพมหานคร : เขษมบรรณกิจ, 2502.
4. Ngamrojanavanich, N., Sirimongkon, S., Roengsumran, S., Petsom, A., Kamimura, H. *Planta Medica*. **2003**, 69, 555.
5. Aiyar, V. N., Seshadri, T. R. *Phytochemistry*. **1972**, 11, 1473.
6. Sriyanok, S. M. Sc. Thesis, Department of chemistry, Faculty of science, Chulalongkorn University, 2000.
7. Kim, Y. H.; Chung, B. S.; Sankawa, U. *J. Nat. Prod.* **1988**, 51, 1080.
8. Suh, Y. G.; Kim, Y. H.; Park, M. H.; Choi, Y. H.; Lee, H. K.; Moon, J. Y.; Min, K. H.; Shin, D. Y.; Jung, J. K.; Park, O. H.; Jeon, R. O.; Park, H. S.; Kang, S. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 559.
9. Ling, T.; Chowdhury, C.; Kramer, B. A.; Vong, B. G.; Palladino, M. A.; Theodorakis, E. A. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8843-8853.
10. P. R. Twentyman and M. Luscombe, *Br. J. Cancer*, **56**, 279 (1987)
11. J. Carmichael, W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and B. Mitchell, *Cancer Research*. **1987**, 47, 936.
12. Roengsumran, S., Petsom, A., Sommit., D. and Vilaivan, T. *Phytochemistry*. **1999**, 50, 449.

ภาคผนวก

NEW CLEISTANTHANE DITERPENOIDS AND 3,4-*seco*-CLEISTANTHANE DITERPENOIDS FROM *Croton oblongifolius*

S. Roengsumran,¹ P. Pata,¹ N. Ruengraweevat,¹
J. Tummatorn,¹ S. Pornpakakul,¹ P. Sangvanich,¹
S. Puthong,² and A. Petsom^{1,2*}

UDC 547.596

Two new cleistanthane-type diterpenoids, 3-hydroxycleistantha-13(17),15-diene (**1**) and 3,4-*seco*-cleistantha-4(18),13(17),15-trien-3-oic acid (**2**), were isolated from the stem bark of *Croton oblongifolius* Roxb. Epoxidation of **2** gave two epoxides **3** and **4**. Their structures were established on the basis of spectroscopic data. Compound **1** showed nonspecific strong cytotoxicity against human tumor cell lines, compound **2** showed weak activity, and compounds **3** and **4** were inactive.

Key words: *Croton oblongifolius*, cleistanthane, diterpenoids, cytotoxicity.

In our previous work, the chemical constituents of *Croton oblongifolius* from various parts of Thailand were investigated and several diterpenoid compounds were reported, for example, cembranes [1, 2], labdane [3], halimane [4], clerodane [5], and kaurane [6]. Most of the compounds are obtained in good yield and possess biological activities such as cytotoxicity and inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity. Our preliminary study of *C. oblongifolius* from various locations in Thailand suggested that this plant is a very good source of diterpenoid compounds. As part of our continuing search for novel diterpenoids in this plant, we found two new cleistanthane diterpenoids for the first time from *C. oblongifolius*. In this paper, we report the structural determination and cytotoxicity of the new compounds.

Compound **1** was isolated as colorless needle crystals. The molecular formula of C₂₀H₃₂O was established by elemental analysis, ¹H and ¹³C NMR (Table 1 and 2), and MS [M+H]⁺ (*m/z* 289) data. The IR spectrum of **1** showed strong absorption bands at 3413 cm⁻¹ (OH stretching) and 1633 cm⁻¹ (C=C stretching). ¹³C NMR spectrum indicated the presence of 20 carbons.

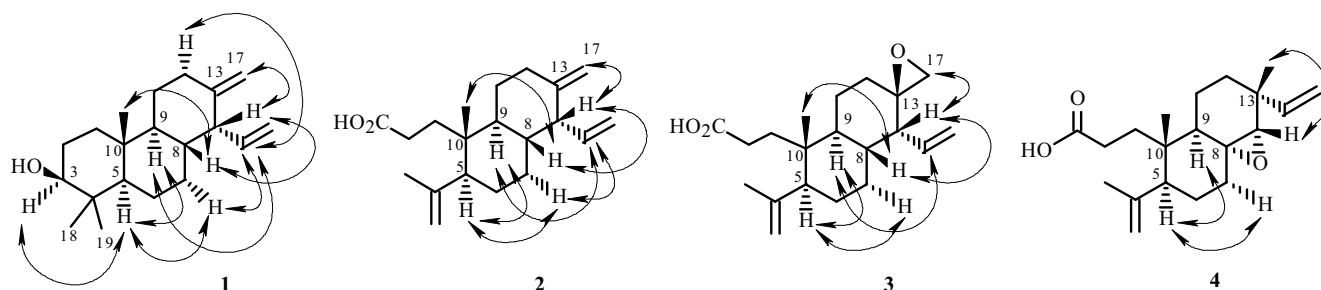


Fig. 1. Key NOESY correlations of **1**–**4**.

1) Research Centre for Bioorganic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwon, Bangkok 10330, Thailand; 2) Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwon, Bangkok 10330, Thailand, e-mail: polkit@gmail.com. Published in Khimiya Prirodnykh Soedinenii, No. 5, pp. 540–543, September–October, 2009. Original article submitted March 14, 2008.

TABLE 1. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) Data of Compounds **1–4**^{a,b}

Position	1	2	3	4
1 α	1.06 (m)	1.65 (m) ^c	1.65 (m) ^c	1.66 (m) ^c
1 β	1.73 (m)			
2 α	1.52 (m)	2.42 (m)	2.28 (m)	2.22 (m)
2 β	1.63 (ddd, J = 3.4, 7.3, 14.8)	2.30 (m)	2.43 (m)	2.44 (m)
3	3.22 (dd, J = 11.6, 4.5)			
5	0.78 (m)	1.96 (dd, J = 12.8, 2.4)	1.96 (dd, J = 12.4, 2.8)	2.15 (dd, J = 12.4, 2.4)
6 α	1.34 (m)	1.44 (m)	1.42 (m)	1.49 (m)
6 β	1.62 (m)	1.67 (m)	1.71 (m)	2.02 (m)
7 α	1.24 (m)	1.24 (m)	1.19 (m)	1.27 (m)
7 β	1.50 (m)	1.46 (m)	1.39 (m)	1.89 (m)
8	1.49 (m)	1.57 (m)	1.86 (m)	
9	1.04 (m)	1.26 (m)	1.25 (m)	1.02 (m)
11 α	1.75 (m)	1.17 (m)	1.16 (m)	1.22 (m) ^c
11 β	1.77 (m)	1.72 (m)	2.02 (m)	
12 α	2.17 (m)	2.20 (m) ^c	1.46 (m)	1.38 (m) ^c
12 β	2.17 (m)		1.64 (m)	
14	2.81 (dd, J = 9.2, 4.2)	2.83 (dd, J = 8.8, 4.4)	1.67 (m)	2.55 (m)
15	6.01 (ddd, J = 9.2, 9.6, 17.0)	6.02 (ddd, J = 17.6, 10.4, 8.8)	5.90 (ddd, J = 17.2, 10.4, 10.0)	5.87 (ddd, J = 17.6, 10.4, 10.0)
16 α	5.02 (dd, J = 9.6, 1.6)	5.03 (dd, J = 10.4, 1.6)	5.03 (dd, J = 10.4, 2.0)	5.01 (dd, J = 10.4, 2.0)
16 β	5.03 (dd, J = 17.0, 1.6)	5.04 (dd, J = 17.6, 1.6)	5.11 (dd, J = 17.2, 2.0)	5.04 (dd, J = 17.6, 2.0)
17 α	4.57 (s)	4.59 (d, J = 0.9)	2.60 (d, J = 4.4)	1.10 (s) ^d
17 β	4.65 (s)	4.67 (d, J = 0.9)	2.63 (d, J = 4.8)	
18 α	0.80 (s) ^d	4.67 (s)	4.68 (s)	4.74 (s)
18 β		4.88 (s)	4.86 (s)	4.90 (s)
19	0.97 (s) ^d	1.74 (s) ^d	1.74 (s) ^d	1.78 (s) ^d
20	0.79 (s) ^d	0.84 (s) ^d	0.90 (s) ^d	0.98 (s) ^d

^aChemical shifts in ppm, J values in Hz are in parentheses; ^bthe assignments were based on ¹H–¹H COSY, HSQC, and HMBC experiments.

^cIntensity of two protons; ^dintensity of three protons.

The ¹³C NMR spectrum showed a signal of oxygenated methine carbon (δ 79.1 ppm), the signals of exocyclic methylene (106.4, CH₂; 152.4, C), and a vinyl group (137.7, CH; 115.9, CH₂). ¹H NMR spectrum indicated two olefinic protons of terminal methylene at δ 4.57 (s) and 4.65 (s), vinyl protons at δ 6.01 (1H, ddd, J = 17.0, 9.6 and 9.2 Hz), 5.02 (1H, dd, J = 9.6 and 1.6 Hz), and 5.03 (1H, dd, J = 17.0 and 1.6 Hz), and three signals of methyl groups at δ 0.80 (3H, s), δ 0.97 (3H, s), and δ 0.79 (3H, s). The DEPT NMR spectra indicated the presence of three methyl carbons, six methylene carbons, and four methine carbons. The molecular formula of C₂₀H₃₂O indicated five double-bond equivalents. The ¹H and ¹³C NMR spectra indicated an exocyclic double-bond and a vinyl double-bond; therefore, **1** must consist of three rings. The 1D and 2D NMR, including COSY, NOESY, HMQC, and HMBC spectral data, showed that compound **1** has a cleistanthane-type diterpenoid structure. The stereochemistry of **1** was established by the coupling constants in the ¹H NMR spectrum and NOESY spectra. The coupling constant of H-3 (dd, J = 11.6 and 4.5 Hz) indicated that the hydroxyl group was equatorially oriented. The observed NOEs between H-3 and H-5 and between H-5 and H-9 and the absence of NOEs between H-5 and the methyl of C-20 in the NOESY experiment suggested that H-5, H-9, and C-20 was axially oriented. The coupling constant of H-14 with H-15 ($J_{14,15}$ = 9.2 Hz) and with H-8 ($J_{14,8}$ = 4.2 Hz) and the observed NOEs between H-14 and H-17, between H-14 and H-8, between H-15 and H_{ax}-7, and between H-15 and H_{ax}-12 in the NOESY experiment suggested that the vinyl group and H-8 were axially oriented. Thus, compound **1** was assigned the (5 α ,8 β ,9 α ,10 β ,14 α)-cleistantha-13(17),15-dien-3 β -ol structure.

TABLE 2. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) Data of Compounds **1–4**^a

Position	1	2	3	4
1	37.6 (t)	32.1 (t)	32.1 (t)	32.1 (t)
2	27.5 (t)	28.1 (t)	28.0 (t)	28.0 (t)
3	79.1 (d)	181.0 (s)	180.1 (s)	178.7 (s)
4	38.9 (s)	148.4 (s)	147.4 (s)	146.9 (s)
5	54.3 (d)	50.7 (d)	50.7 (d)	50.6 (d)
6	21.3 (t)	27.6 (t)	27.5 (t)	25.6 (t)
7	32.1 (t)	31.5 (t)	31.1 (t)	34.7 (t)
8	40.5 (d)	40.4 (d)	36.6 (d)	61.4 (d)
9	49.2 (d)	41.0 (d)	40.2 (d)	43.3 (d)
10	36.9 (s)	39.0 (s)	39.0 (s)	40.3 (s)
11	27.0 (t)	27.4 (t)	29.3 (t)	16.4 (s)
12	31.3 (t)	31.3 (t)	23.0 (t)	34.9 (t)
13	152.4 (s)	151.9 (s)	61.5 (s)	35.6 (s)
14	54.6 (d)	54.7 (d)	53.0 (d)	63.7 (d)
15	137.7 (d)	137.3 (d)	135.5 (d)	146.8 (d)
16	115.9 (t)	116.2 (t)	118.3 (t)	112.0 (t)
17	106.4 (t)	106.8 (t)	53.9 (t)	22.0 (q)
18	15.8 (q)	113.8 (t)	113.7 (t)	114.0 (t)
19	28.4 (q)	23.9 (q)	23.9 (q)	23.6 (q)
20	14.0 (q)	16.8 (q)	16.8 (q)	18.3 (q)

^aThe assignments were based on HSQC and HMBC experiments.TABLE 3. Cytotoxicity Data of Compounds **1–4**^a

Compounds	Cell lines ^b				
	KATO-3	SW620	BT474	HEP-G2	CHAGO
1	6.0	>10	6.1	0.5	5.5
2	9.6	>10	10	8.6	>10
3	>10	>10	>10	>10	>10
4	>10	>10	>10	>10	>10
Doxorubicin hydrochloride	0.5	1.2	2.2	1.7	0.1

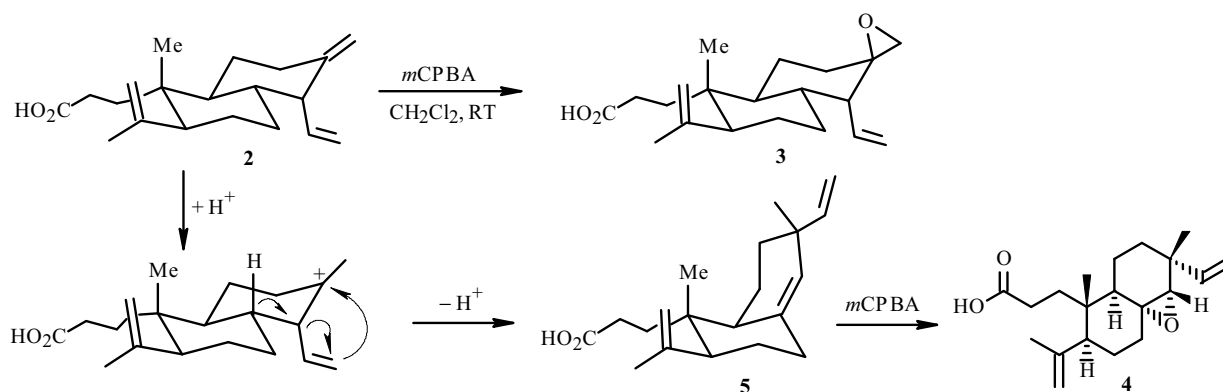
^aResults are expressed as IC_{50} values ($\mu\text{g/mL}$); ^bKATO-3, human gastric carcinoma ATCC No. HTB 103; SW620, human colon adenocarcinoma ATCC No. CCL 227; BT474, human breast ductal carcinoma ATCC No. HTB20; HEP-G2, human liver hepatoblastoma ATCC No. HB 8056; CHAGO, human undifferentiated lung carcinoma.

Compound **2** was isolated as a colorless oil. The molecular formula of compound **2** was assigned as $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ based on HRESIMS, ^1H and ^{13}C NMR (Table 1 and 2) and MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 303). The IR spectrum showed the presence of a carboxylic acid group ($3400\text{--}2400$ and 1704 cm^{-1}). The ^{13}C NMR spectrum and DEPT experiments revealed the presence of 20 carbons consisting of two methyl groups, six methylene sp^3 -carbons, four methine sp^3 -carbons, a quaternary sp^3 -carbon, three methylene sp^2 -carbons, a methine sp^2 -carbon, two quaternary sp^2 -carbons, and a carbonyl carbon of carboxylic group. Since the six degrees of unsaturation were accounted for, it was implied that **2** should contain two rings. The ^1H NMR spectrum revealed the presence of two terminal methylene groups [two olefinic protons at δ 4.59 (1H, d, $J = 0.9$ Hz) and δ 4.67 (1H, d, $J = 0.9$ Hz) and two olefinic protons at δ 4.67 (1H, s) and δ 4.88 (1H, s)]. The ^1H NMR also showed the presence of a vinyl group at δ 6.02 (1H, ddd, $J = 17.6, 10.4$, and 8.8 Hz), δ 5.03 (1H, dd, $J = 10.4$ and 1.6 Hz) and δ 5.04 (1H, dd, $J = 17.6$ and 1.6 Hz) and two methyl groups at δ 1.74 (3H, s) and δ 0.84 (3H, s). By comparison of spectral data of **2** with those of **1**, including a detailed analysis of 2D NMR spectra, it seems like the structure of **2** was quite similar to of **1**, except that the ring A of **2** was broken at C-3 and C-4 and C-3 became a carboxylic group. The HMBC experiment with the assistance of COSY, TOCSY, and NOESY led to the structure of **2** which was assigned as 3,4-*seco*-cleistantha-4(18),13(17),15-trien-3-oic acid.

The relative stereochemistry of **2** at positions 5, 8, 9, 10, and 14 was determined on the basis of the coupling constant and NOESY experiments (Fig. 1).

Epoxidation of **2** with *m*CPBA in CH_2Cl_2 gave epoxide **3** as a major product and epoxide **4** as a minor product without the presence of epoxidation at the isopropylene moiety. The molecular formula of **3** was proposed to be $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$ based on microanalysis and ^1H and ^{13}C NMR data (Table 1 and 2). The spectral data of **3** were quite similar to those of compound **2**, except that the exocyclic double bond (C-13 and C-17) was replaced by the epoxide moiety. By comparison of the spectral data of **3** with those of **2** and a detailed analysis of 2D NMR spectra, it can be concluded that the structure of **3** was an epoxide of compound **2**. NOESY analysis with the assistance of the coupling constants led to the relative structure of **3** (Fig. 1) as 13,17-epoxy-3,4-*seco*-cleistantha-4(18),15-dien-3-oic acid.

Compound **4** showed a molecular ion with m/z 318 ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$). The ^{13}C NMR spectrum and HSQC experiments revealed the presence of 20 carbons consisting of three methyl groups, six methylene sp^3 -carbons, two methine sp^3 -carbons, an oxygenated methine sp^3 -carbon, a quaternary sp^3 -carbon, an oxygenated quaternary sp^3 -carbon, two methylene sp^2 -carbons, a methine sp^2 -carbon, a quaternary sp^2 -carbon, and a carbonyl carbon of carboxylic group. Since the six degrees of unsaturation were accounted for, it was implied that **4** should contain one epoxide ring and two additional rings. The HMBC experiment with the assistance of the coupling constants, COSY, TOCSY, and NOESY led to the structure of **4** (Fig. 1), and it can be concluded that compound **4** was 8,14-epoxypimara-4(18),15-dien-3-oic acid (Fig. 1). Compound **4** was derived from the intermediate **5**, which was thought to arise through an acid-catalyzed process during the epoxidation, as shown in Scheme 1.



Scheme 1.

The cytotoxicity of compounds **1–4** was tested against human tumor cell lines (Table 3). Compound **1** showed high activity for HEP-G2 and moderate activity for KATO-3, BT474, and CHAGO. Compound **2** had moderate activity for KATO-3, BT474, and HEP-G2. Compounds **3** and **4** did not show any strong cytotoxicity. Doxorubicin hydrochloride was used as positive control in all experiments and showed strong cytotoxicity for all cell lines.

EXPERIMENTAL

General Experimental Procedures. All commercial grade solvents were distilled prior to use. Melting points were determined on a Fisher-Johns melting point apparatus. The optical rotation was determined on a Perkin–Elmer 341 polarimeter. Measurements of UV spectra were carried out on a Hewlett Packard 8452A diode array spectrophotometer. IR spectra were recorded on a Nicolet Impact 410 spectrophotometer. Spectra of solid samples were recorded as KBr pellets. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 400.00 and 100.00 MHz, respectively, on a Varian Model Mercury 400 MHz instrument. Low-resolution MS were obtained with a MALDI/TOF mass spectrometer (Biflex Bruker, Germany). Microanalyses were determined on a Perkin–Elmer PE 2400 Series II.

Plant Material. The *C. oblongifolius* sample used in this study was collected from Amphur Viengsa, Nan Province, Thailand, in November 2003. Botanical identification was done by comparison with voucher specimen No. 9607 in the Herbarium of the Royal Forest Department of Thailand, Bangkok, Thailand.

Extraction and Isolation. The powdered sun-dried stem bark (0.5 kg) of *C. oblongifolius* was repeatedly extracted with hexane (2×5 L) at room temperature. The hexane extract was filtered and evaporated under reduced pressure to obtain a yellowish green oil (15 g). The plant residue was further re-extracted with EtOAc (2 × 5 L) and MeOH (2 × 5 L) to give the EtOAc (25 g) and MeOH (20 g) crude extracts, respectively. The hexane crude extract (15 g) was fractionated by silica gel column chromatography using Merck Si gel 60 (0.5 kg). The column was eluted with hexane–EtOAc gradient in a stepwise fashion, and 90 × 25 mL fractions were collected. After the solvent was separated by rotary evaporation under reduced pressure, the similar fractions were combined into three fraction: I (2.1 g, 0–20% EtOAc in hexane, F25–F42), II (5.4 g, 25–30% EtOAc in hexane, F43–F57), and III (1.3 g, 50% EtOAc in hexane, F58–F74). Compound **1** (200 mg, 0.04% based on dried plant) was obtained by recrystallization from methanol. Compound **2** (2.2 g, 0.4% based on dried plant) was obtained as a colorless oil by re-column chromatography of 5.4 g of fraction II on SiO₂ (100 g) and eluted with 30% EtOAc in hexane.

3-Hydroxycleistantha-13(17),15-diene (1), white needle crystal (200 mg, 0.04% based on the dried plant material), mp 102–104°C; $[\alpha]_D^{25} +11.06^\circ$ (*c* 0.32, EtOAc); UV (MeOH, $\lambda_{\max}$): 213 (log ϵ 2.89) nm; IR (KBr, $\nu_{\max}$, cm⁻¹): 3400–3200 (OH), 1627 (C=C); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) and ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), see Table 1 and 2; MS *m/z*: 289 [M+H]⁺; anal. C 83.24%, H 11.20%, calcd for C₂₀H₃₂O, C 83.27%, H 11.18%.

3,4-seco-Cleistantha-4(18),13(17),15-trien-3-oic acid (2), colorless oil (2 g, 0.4% based on the dried plant material; $[\alpha]_D^{25} +9.36^\circ$ (*c* 0.26, EtOAc); UV (MeOH, $\lambda_{\max}$): 217, (log ϵ 3.40) nm; IR ($\nu_{\max}$, neat, cm⁻¹): 3400–2400 (OH), 1699 (C=O), 1637 (C=C); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) and ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): Table 1 and 2; HRESIMS *m/z*: 303.2333 [M+H]⁺; calcd for C₂₀H₃₀O₂+H 303.2324.

Epoxidation of Compound 2. mCPBA (70%) (230 mg, 0.93 mmol) was added to a solution of **2** (235 mg, 0.78 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL). After stirring for 5 h at room temperature the reaction mixture was washed with saturated sodium carbonate solution and water, respectively. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to give a colorless residue (145 mg). The residue was separated by silica gel column chromatography eluted with a 1:1 ratio of hexane–EtOAc to yield compound **3** (120 mg, 50%) and then compound **4** (30 mg, 21%).

13,17-Epoxy-3,4-seco-cleistantha-4(18),15-dien-3-oic acid (3), colorless oil; $[\alpha]_D^{25} +97.17^\circ$ (*c* 1.83, EtOAc); UV (MeOH, $\lambda_{\max}$): 211 (log ϵ 6.65) nm; IR ($\nu_{\max}$, neat, cm⁻¹): 3130–3000 (OH), 1699 (C=O), 1632 (C=C); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) and ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): Table 1 and 2; MS *m/z*: 341 [M+Na]⁺; anal. C 75.41%, H 9.56%, calcd for C₂₀H₃₀O₃, C 75.43%, H 9.50%.

Compound (4), colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -1.56^\circ$ (*c* 2.60, EtOAc); UV (MeOH, $\lambda_{\max}$): 222 (log ϵ 3.54); IR ($\nu_{\max}$, neat, cm⁻¹): 3000 (OH), 2926, 2865, 1699 (C=O), 1632 (C=C), 1283 (C-O); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) and ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): Table 1 and 2; MS *m/z*: 319 [M+H]⁺.

Cytotoxicity Testing. Bioassay of cytotoxic activity against human tumor cell cultures *in vitro* was performed by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric method [7, 8]. Doxorubicin hydrochloride was used as a positive control substance.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the Thailand Research Fund (DBG4880013), the Thai Government (Nan), and the Graduate School and Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for financial support.

REFERENCES

1. S. Roengsumran, S. Achayindee, A. Petsom, K. Pudhom, P. Singtothong, C. Surachetapan, T. Vilaivan, *J. Nat. Prod.*, **61**, 652 (1998).
2. S. Roengsumran, P. Singtothong, K. Pudhom, N. Ngamrochanavanich, A. Petsom, and C. Chaichantipyuth, *J. Nat. Prod.*, **62**, 1163 (1999).
3. S. Roengsumran, A. Petsom, D. Sommit, and T. Vilaivan, *Phytochemistry*, **50**, 449 (1999).

4. S. Roengsumran, K. Musikul, A. Petsom, T. Vilaivan, P. Sangvanich, S. Pornpakakul, S. Puthong, C. Chaichantipyuth, N. Jaiboon, and N. Chaichit, *Planta Med.*, **68**, 274 (2002).
5. S. Roengsumran, S. Pornpakakul, N. Muangsin, P. Sangvanich, T. Nhujak, P. Singtothong, N. Chaichit, S. Puthong, and A. Petsom, *Planta Med.*, **70**, 87 (2004).
6. N. Ngamrojnavanich, S. Sirimongkon, S. Roengsumran, A. Petsom, and H. Kamimura, *Planta Med.*, **69**, 555 (2003).
7. P. R. Twentyman and M. Luscombe, *Br. J. Cancer*, **56**, 279 (1987).
8. J. Carmichael, W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and B. Mitchell, *Cancer Res.*, **47**, 936 (1987).