



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ สารลิโมนอยด์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง
จาก *Xylocarpus* sp.

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนัสฐา พุดหอม

ตุลาคม 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ สารลิโมนอยด์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจาก *Xylocarpus* sp.

คณะผู้วิจัย

ผศ. ดร.ชนิษฐา พุดหอม

สังกัด

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

จากการนำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอลกอฮอล์ของเมล็ดตะบูนขาวมาทำการแยกด้วยเทคนิคทางคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่างๆ พบว่าได้สารลิโมนอยด์ในกลุ่ม protolimonoid ชนิดใหม่ 3 ชนิด คือ protoxylocarpin F-H (**XG-4**, **XG-14** และ **XG-10**) ร่วมกับสารลิโมนอยด์ที่มีการรายงานมาก่อนอีก 10 ชนิด และ catechin นอกจากนั้นยังพบสารลิโมนอยด์กลุ่ม phragmalin ชนิดใหม่อีก 3 ชนิดคือ moluccensin H-J (**XM-1**, **XM-2** และ **XM-3**) จากการนำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอลกอฮอล์ของเมล็ดตะบูนดำมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ ซึ่งทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารเหล่านี้ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ และสารทั้งหมดที่แยกได้ถูกนำมาประเมินฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด คือมะเร็งเต้านม (BT474), มะเร็งปอด (CHAGO), มะเร็งลำไส้ (KATO-3), มะเร็งกระเพาะอาหาร (SW-620) และมะเร็งตับ (Hep-G2)

Abstract

Three new protolimonoids, protoxylocarpins F-H (**XG-4**, **XG-14** and **XG-10**), along with ten known limonoids and catechin, were isolated from the kernel seeds of *Xylocarpus granatum*. In addition, three new phragmalin limonoids, moluccensins H-J (**XM-1**, **XM-2** and **XM-3**), were isolated from the seed kernels of the cedar mangrove, *Xylocarpus moluccensis* (Lamk.) Roem. Their structures were elucidated on the basis of extensive spectroscopic data analysis. All compounds isolated were evaluated for cytotoxic activity against five human tumor cell lines: breast (BT474), lung (CHAGO), gastric (KATO-3), colon (SW-620) and liver (Hep-G2) cancer cell lines.

Executive Summary

โครงการ สารลิโมนอยด์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจาก *Xylocarpus* sp.

ผู้วิจัยหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา พุดหอม

จากการนำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซิเททของเมล็ดตะบูนขาวมาทำการแยกด้วยเทคนิคทางคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่างๆ ได้แก่ นอร์มัลคอลัมน์โครมาโทกราฟี รีเวอร์สคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าได้สารลิโมนอยด์ในกลุ่ม protolimonoid ชนิดใหม่ 3 ชนิด คือ protoxylocarpin F-H (**XG-4**, **XG-14** และ **XG-10**) ร่วมกับสารลิโมนอยด์ที่มีการรายงานมาก่อนอีก 10 ชนิด และ catechin นอกจากนี้เมื่อนำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซิเททของเมล็ดตะบูนดำมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ ยังพบสารลิโมนอยด์กลุ่ม phragmalin ชนิดใหม่อีก 3 ชนิดคือ moluccensin H-J (**XM-1**, **XM-2** และ **XM-3**) ซึ่งทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารเหล่านี้ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ เช่น 1D และ 2D NMR, mass spectrometry, IR spectrophotometry เป็นต้น และสารทั้งหมดที่แยกได้ถูกนำมาประเมินฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด คือ มะเร็งเต้านม (BT474), มะเร็งปอด (CHAGO), มะเร็งลำไส้ (KATO-3), มะเร็งกระเพาะอาหาร (SW-620) และมะเร็งตับ (Hep-G2) ซึ่งพบว่ามีสารเพียง 4 ชนิดที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบ ดังนี้

XG-5 แสดงความเป็นพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และเซลล์มะเร็งปอด (CHAGO)

XG-11 แสดงความเป็นพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) เท่านั้น

XG-12 แสดงความเป็นพิษปานกลางเฉพาะต่อเซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) เท่านั้น

XG-13 แสดงความเป็นพิษปานกลางเฉพาะต่อเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) เท่านั้น

Output ที่ได้จากโครงการ

คาดว่าจะได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Natural Products อย่างน้อย 2 ฉบับ ซึ่งได้ทำการ submit ไปเรียบร้อยแล้ว

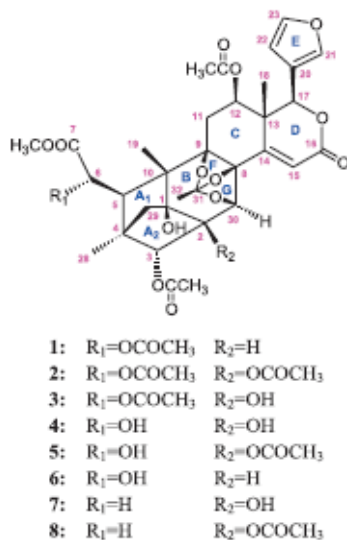
สารลิโมนอยด์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจาก *Xylocarpus* sp.

บทนำ

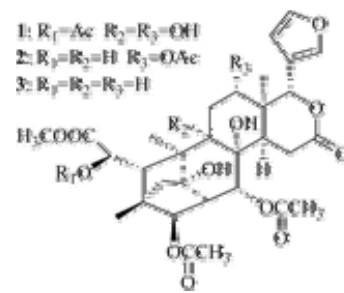
พืชในสกุล *Xylocarpus* เป็นพืชป่าชายเลนที่จัดอยู่ในวงศ์ Meliaceae ซึ่งในประเทศไทยมีเพียง 3 ชนิด คือ ตะบูนขาว (*Xylocarpus granatum*), ตะบูนดำ (*Xylocarpus moluccensis*) และ ตะบัน (*Xylocarpus rumphii*) จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา พบว่าสารที่แยกได้จากส่วนต่างๆ โดยเฉพาะจากผลของตะบูนขาวเป็นสารลิโมนอยด์ที่มีโครงสร้างหลากหลายและฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ตัวอย่างเช่น

ปี ค.ศ. 2005-2007 Jun Wu และคณะ¹ ทำการแยกสารจากเมล็ดและเปลือกต้นของตะบูนขาว พบสารลิโมนอยด์ชนิดใหม่หลายชนิดและศึกษาฤทธิ์ด้านการกีดกันแมลงของสารเหล่านี้ ดังแสดงข้างล่าง

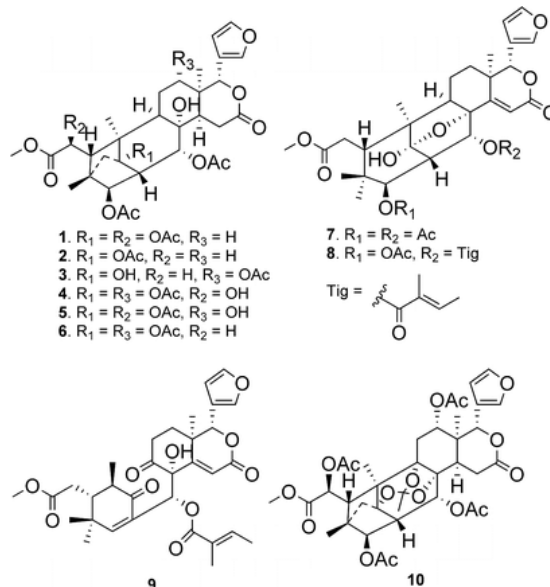
(ค.ศ. 2005)



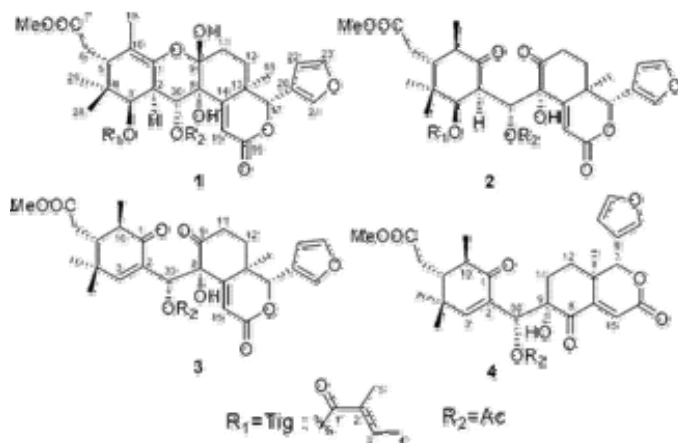
(ค.ศ. 2007)



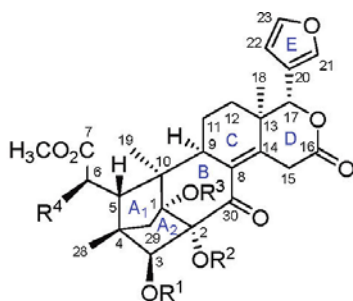
ปี ค.ศ. 2007 Wenhan Lin และคณะ² ทำการแยกสารจากส่วนเปลือกผลของตะบูนขาว พบสารลิโมนอยด์ชนิดใหม่ 10 ชนิด และพบว่าสารลิโมนอยด์ในกลุ่ม phragmalin orthoester (**10**) แสดงฤทธิ์ด้านการกีดกันแมลง *Mythimna separate* ดีมาก



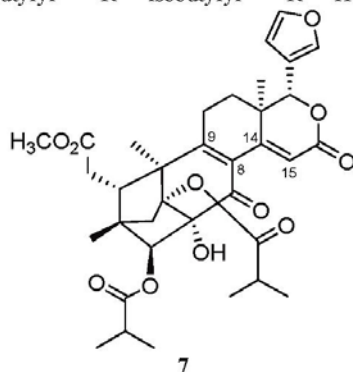
ปี ค.ศ. 2006 Jian-Min Yue และคณะ³ ทำการแยกสารจากเมล็ดของตะบูนขาว พบสารลิโมนอยด์ชนิดใหม่ที่มีโครงสร้างที่ไม่ธรรมดาแบบ 9,10-seco 4 ชนิด และสารเหล่านี้แสดงความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ดังแสดงข้างล่าง



เมื่อเร็วๆ นี้ (2009) Jun Wu และคณะ⁴ ได้ทำการแยกสารจากเมล็ดของตะบูนดำ พบสารลิโมนอยด์กลุ่ม phragmalin ชนิดใหม่ 7 ชนิด ดังแสดงข้างล่าง



- 1: $R^1 = \text{isobutyryl}$ $R^2 = \text{H}$ $R^3 = \text{isobutyryl}$ $R^4 = \text{H}$
- 2: $R^1 = 2S\text{-methylbutyryl}$ $R^2 = \text{H}$ $R^3 = \text{isobutyryl}$ $R^4 = \text{H}$
- 3: $R^1 = \text{isobutyryl}$ $R^2 = \text{H}$ $R^3 = 2S\text{-methylbutyryl}$ $R^4 = \text{H}$
- 4: $R^1 = 2S\text{-methylbutyryl}$ $R^2 = \text{H}$ $R^3 = \text{isobutyryl}$ $R^4 = \text{OH}$
- 5: $R^1 = \text{isobutyryl}$ $R^2 = \text{H}$ $R^3 = 2S\text{-methylbutyryl}$ $R^4 = \text{OH}$
- 6: $R^1 = \text{isobutyryl}$ $R^2 = \text{isobutyryl}$ $R^3 = \text{H}$ $R^4 = \text{H}$



สำหรับตะบูนดำ ยังไม่ค่อยมีรายงานวิจัยออกมามากนัก จึงเป็นพืชที่น่าสนใจมาก ส่วนตะบูนขาว แม้ว่าจะมีการค้นพบสารลิโมนอยด์ออกมาค่อนข้างมาก แต่งานวิจัยจากตะบูนขาวที่พบในไทยยังมีอยู่น้อยมาก จึงน่าสนใจนำมาวิจัยต่อเช่นกัน

วัตถุประสงค์

เพื่อสกัดแยกสารลิโมนอยด์ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ

การทดลอง

การแยกและสกัดสารบริสุทธิ์

1. เมล็ดตะบูนขาว

นำเมล็ดตะบูนขาวตากแห้งประมาณ 2 กิโลกรัม มาบดให้ละเอียด และนำมาแช่ในตัวทำละลายเมทานอล 5 ลิตร (3 วัน x 3) นำส่วนสกัดเมทานอลที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกจนเหลือประมาณ 1/3 แล้วนำมาพาร์ทิชันระหว่างน้ำและเอทิลเอซิเททในอัตราส่วน 1:1 (3 ครั้ง) จะได้ส่วนสกัดเอทิลเอซิเทท เมื่อระเหยตัวทำละลายออกจะได้ส่วนสกัดหยาบเอทิลเอซิเททประมาณ 50 กรัม ขั้นตอนการสกัดได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 1

dried, ground kernel seeds of
Xylocarpus granatum (2 kg)

-soaked in MeOH (5L)
3 days x3
-filtered
-evaporated

MeOH crude extract

-partitioned between EtOAc and H₂O
-evaporated

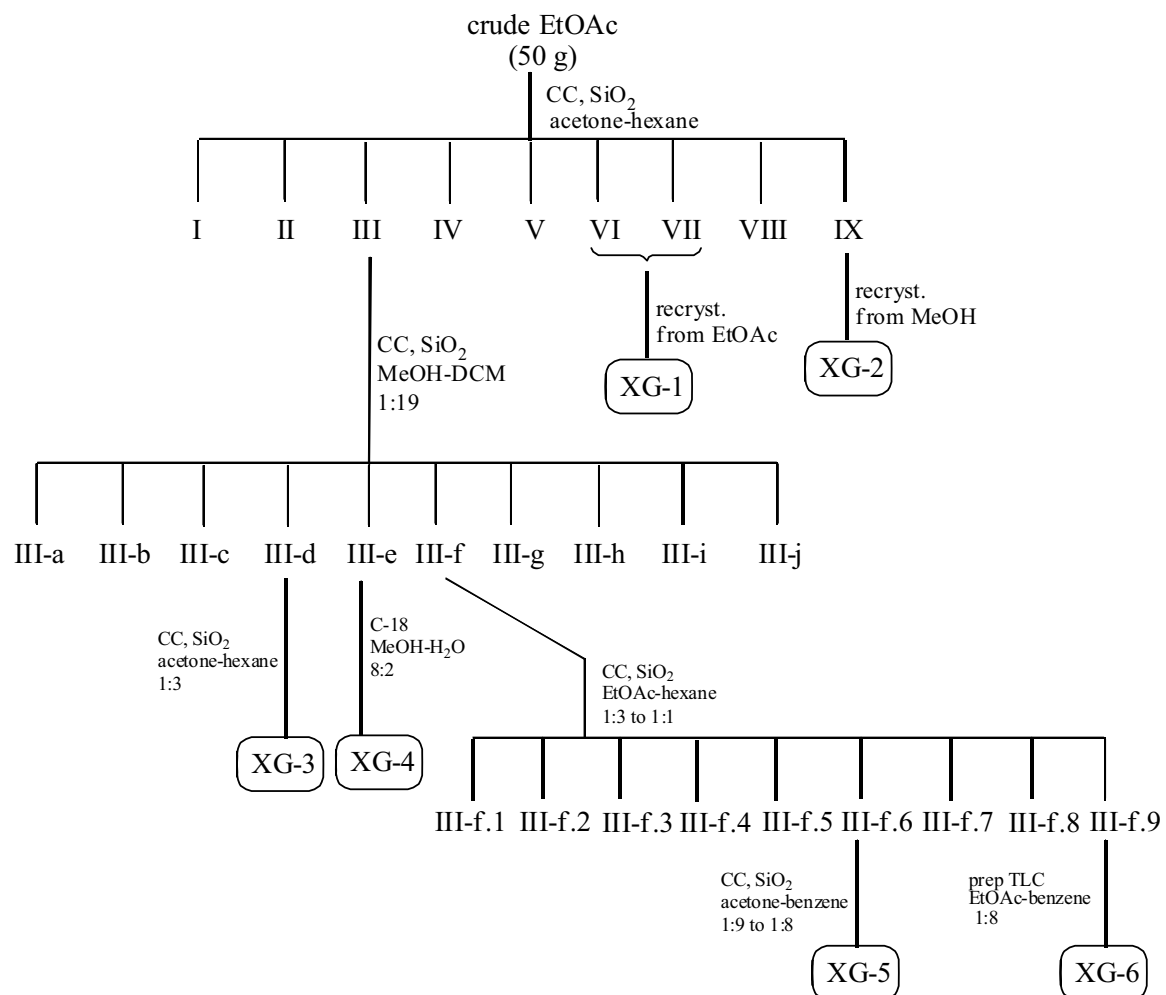
EtOAc crude extract

(~50 g)

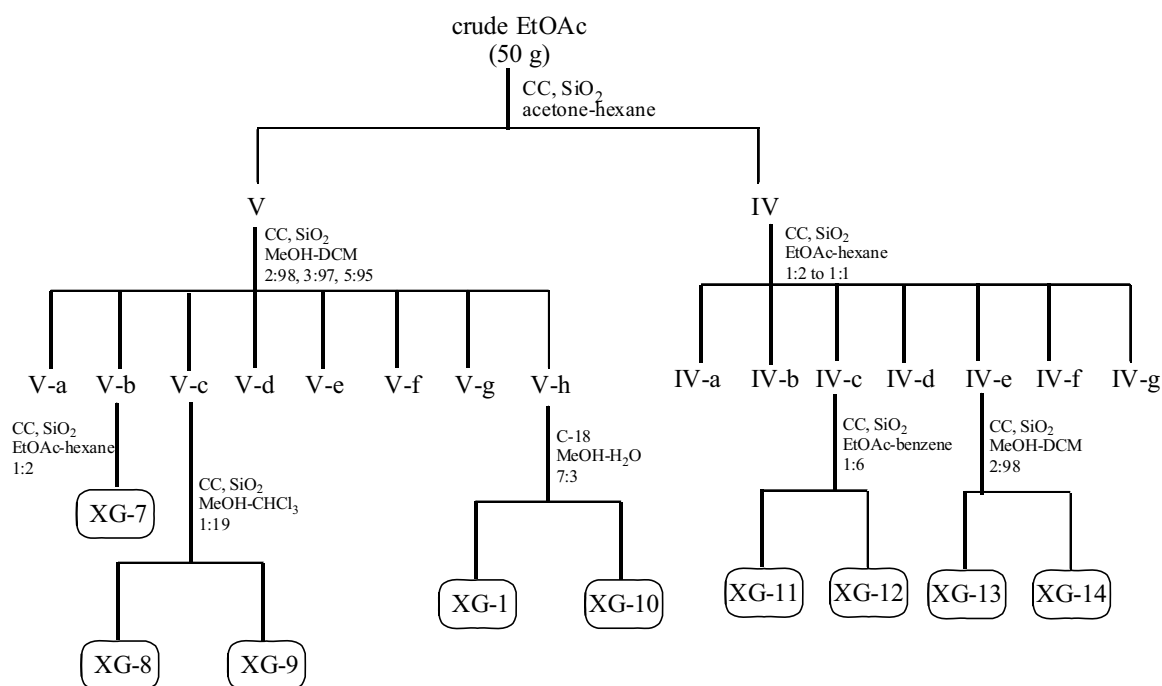
แผนภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการสกัดส่วนสกัดหยาบเอทิลเอซิเททจากเมล็ดตะบูนขาว

นำส่วนสกัดหยาบเอทิลเอซิเททที่ได้ (50 กรัม) มาทำการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์โดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีต่างๆ ได้แก่ นอร์มัล-คอลัมน์โครมาโทกราฟี, รีเวอร์ส-คอลัมน์โครมาโทกราฟี, เพอร์พาราทีฟ ธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี เป็นต้น ซึ่งได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 14 ชนิด ซึ่งเป็นสารใหม่ 3 ชนิด คือ **XG-4**, **XG-10** และ **XG-14** และสารที่มีการรายงานมาก่อน 11 ชนิด ขั้นตอนการแยกได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ และปริมาณของสารที่แยกได้ แสดงไว้ในตารางข้างล่าง

สารประกอบ	ปริมาณ (กรัม)	สารประกอบ	ปริมาณ
XG-1	2.245	XG-8	0.014
XG-2	0.514	XG-9	0.015
XG-3	0.362	XG-10	0.166
XG-4	0.171	XG-11	0.022
XG-5	0.020	XG-12	0.025
XG-6	0.005	XG-13	0.033
XG-7	0.007	XG-14	0.086



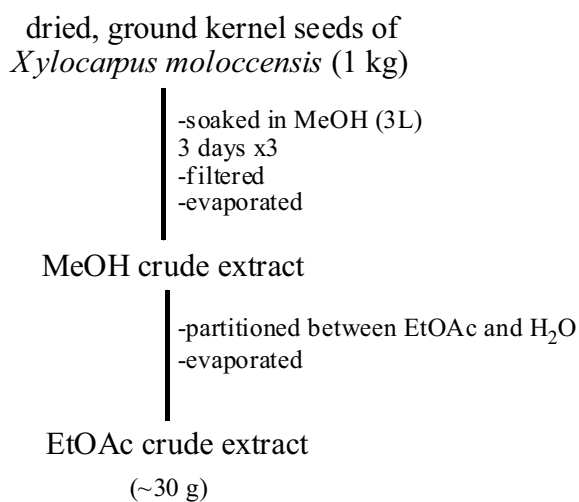
แผนภาพที่ 2 แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซิเททของเมล็ดตะบูนขาว



แผนภาพที่ 3 แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซิเททของเมล็ดตะบูนขาว (ต่อ)

2. เมล็ดตะบูนดำ

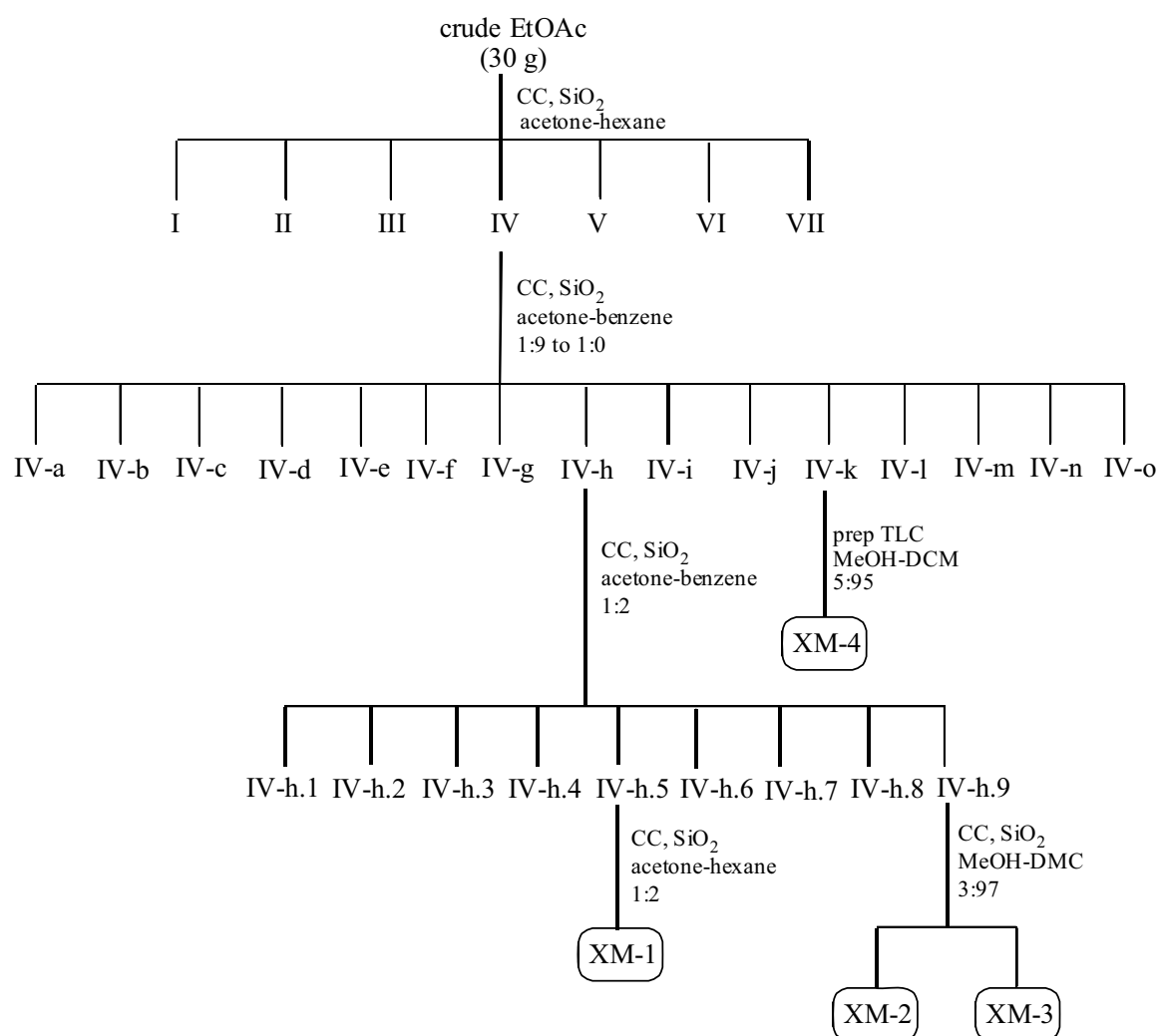
นำเมล็ดตะบูนขาวตากแห้งประมาณ 1 กิโลกรัม มาบดให้ละเอียด และทำการสกัดและแยกสารเช่นเดียวกับเมล็ดตะบูนขาว ซึ่งสามารถแยกสารบริสุทธิ์ชนิดใหม่ได้ทั้งหมด 3 ชนิด คือ **XM-1**, **XM-2**, และ **XM-3** (สำหรับ **XM-4** อยู่ระหว่างการพิสูจน์โครงสร้าง) ขั้นตอนการสกัดและการแยกสารบริสุทธิ์ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 4 และ 5 และปริมาณของสารที่แยกได้ แสดงไว้ในตารางข้างล่าง



แผนภาพที่ 4 แสดงขั้นตอนการสกัดส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซิเททจากเมล็ดตะบูนดำ

และปริมาณของสารที่แยกได้ แสดงไว้ในตารางข้างล่าง

สารประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
XM-1	0.061
XM-2	0.128
XM-3	0.156



แผนภาพที่ 5 แสดงการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซิเททของเมล็ดตะบูนดำ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Cytotoxic Assays)

ใช้วิธี MTT ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 5 เซลล์ไลน์ ได้แก่

BT-474	เซลล์มะเร็งเต้านม
SW-620	เซลล์มะเร็งลำไส้
Hep-G2	เซลล์มะเร็งตับ
KATO-3	เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร
CHAGO	เซลล์มะเร็งปอด

การเตรียมเซลล์

1. เพาะเซลล์ใน tissue culture flask ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงซึ่งประกอบด้วย RPMI 1640 และ fetal calf serum 5% แล้วนำมาบ่มที่ 37 °C 5%CO₂ เป็นเวลา 3 วัน จนได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 2-4 x 10⁶ เซลล์ต่อขวด จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เซลล์ตกตะกอน แล้วดูดส่วนใสทิ้ง
2. เติม 0.05% trypsin และ EDTA 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 2-5 นาที ดูด trypsin ทิ้ง เติมอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ แล้วเคาะให้เซลล์หลุด เติมน้ำให้มีความเข้มข้น 25,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งทำการนับโดยใช้ counting chamber
3. เติมเซลล์ที่ได้อลงใน microtiter plate แบบ 96 หลุมๆ ละ 200 ไมโครลิตร

การเตรียมสารตัวอย่างทดสอบ

เตรียมสารตัวอย่างทดสอบให้มีความเข้มข้นสูงสุด 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน DMSO

การทดสอบ

1. นำเซลล์ที่เตรียมไว้จากการเตรียมเซลล์ในข้อ 3 มาเติมสารละลายของสารตัวอย่างทดสอบ 2 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °C 5%CO₂ เป็นเวลา 3 วัน
2. เติมสารละลาย MTT 10 ไมโครลิตรต่อหลุม และนำมาบ่มที่ 37 °C 5%CO₂ อีก 4 ชั่วโมง
3. เติม DMSO 150 ไมโครลิตรต่อหลุม และนำมาเขย่าบน plate mixer นาน 5 นาที
4. เติม 0.1 M glycine (pH 10.5) 25 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่านาน 5 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

การคำนวณ

$$\% \text{ cell survival (PS)} = \frac{\text{OD}_{\text{test}}}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100$$

OD_{test} คือค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ + สารทดสอบ

OD_{control} คือค่าการดูดกลืนแสงของ DMSO control

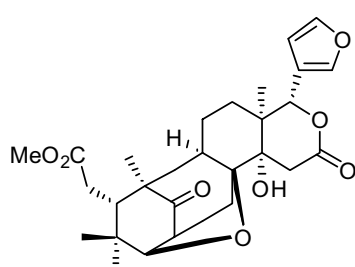
การหาค่า IC₅₀

เมื่อสารทดสอบให้ค่า % cell survival <50% จะพิจารณาว่าสารนั้นแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งนั้นๆ ซึ่งสารนั้นจะนำมาทำการทดลองซ้ำที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เซลล์ตาย 50% ซึ่งคือค่า IC₅₀

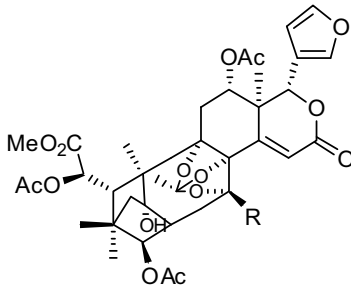
ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง

ผลการแยกสารจากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอลกอฮอล์ของเมล็ดตะบูนขาว

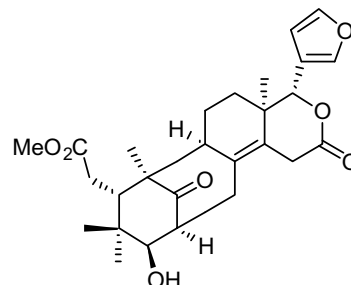
เมื่อนำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอลกอฮอล์ของเมล็ดตะบูนขาวประมาณ 50 กรัม มาทำการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่างๆ ได้แก่ นอร์มัล-คอลัมน์โครมาโทกราฟี, รีเวอร์ส-คอลัมน์โครมาโทกราฟี, เพอร์พาราทีฟ ธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี เป็นต้น ได้สารลิโมนอยด์ชนิดใหม่ 3 ชนิดคือ **XG-4**, **XG-10** และ **XG-14** ซึ่งเป็นสารลิโมนอยด์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม protolimonoid จึงตั้งชื่อเป็น protoxylocarpin F (**XG-4**), G (**XG-14**) และ H (**XG-10**) และพบสารที่มีการรายงานมาก่อนอีก 11 ชนิด ซึ่ง 10 ชนิดเป็นสารลิโมนอยด์ คือ xylocensin K (**XG-1**), O (**XG-8**) และ P (**XG-9**), proceranolide (**XG-3**), 7-deacetylgenudin (**XG-5**), chisocheton F (**XG-6**), mexicanolide (**XG-7**), 7-oxo-7-deacetoxygenudin (**XG-11**), xylogranatin C (**XG-12**), และ methyl angolensate (**XG-13**) และสารซึ่งไม่ใช่ลิโมนอยด์อีกหนึ่งชนิดคือ catechin (**XG-2**) ซึ่งโครงสร้างของสารเหล่านี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1



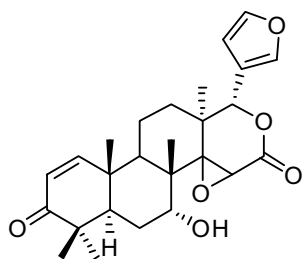
XG-1: xylocensin K



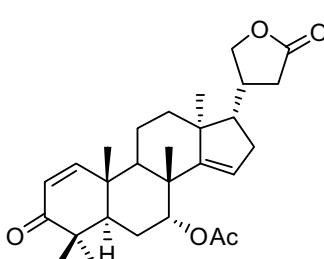
XG-8: R=H, xylocensin O
XG-9: R= OAc, xylocensin P



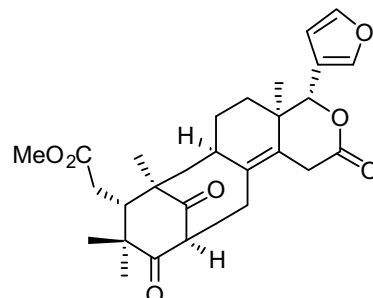
XG-3: proceranolide



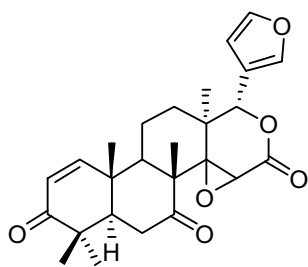
XG-5: 7-deacetylgenudin



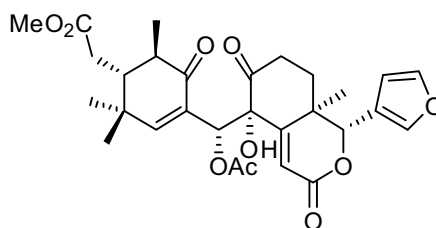
XG-6: chisocheton F



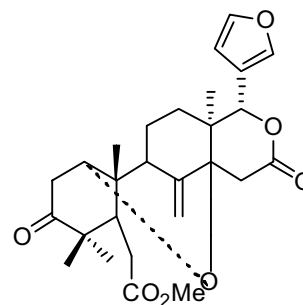
XG-7: mexicanolide



XG-11: 7-oxo-7-deacetoxygenuin



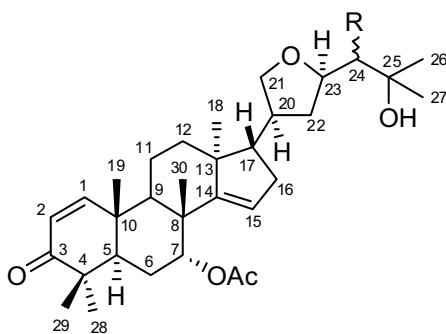
XG-12: xylogranatin C



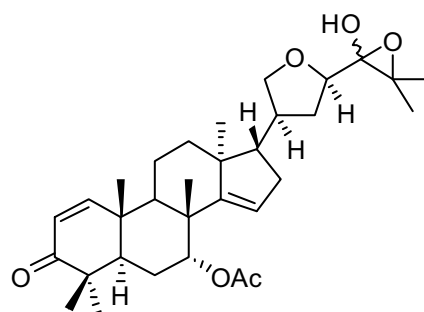
XG-13: methyl angolensate

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของสารลิโมนอยด์ที่มีการรายงานมาก่อน

สำหรับโครงสร้างของสารลิโมนอยด์ชนิดใหม่ทั้ง 3 ชนิด ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2 ซึ่งทำการพิสูจน์โครงสร้างได้โดยอาศัยเทคนิค 1D และ 2D NMR spectra



XG-4: R = β -OH, protoxylocarpin F
XG-14: R = α -OH, protoxylocarpin G



XG-10: protoxylocarpin H

รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของสารลิโมนอยด์ชนิดใหม่ที่แยกได้จากเมล็ดตะบูนขาว

Protoxylocarpin F (XG-4): กัมไสไม่มีสี;

$[\alpha]_D^{25}$ -57.0 (c 0.1, MeOH);

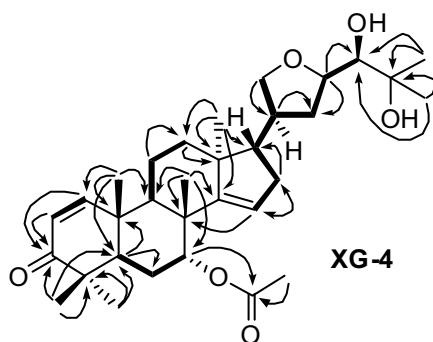
UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 235 (4.10);

IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3453, 2937, 1733, 1668, 1458, 1381, 1250, 1058, and 732 cm^{-1} ;

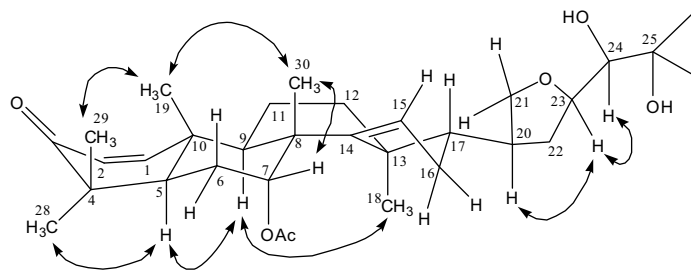
^1H และ ^{13}C NMR (CDCl_3), ดูตารางที่ 1;

HRESIMS m/z 531.3348 (calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_6 + \text{Na}$, 531.3349)

โครงสร้างของ protoxylocarpin F สามารถพิสูจน์ได้โดยใช้ COSY และ HMBC เป็นหลักซึ่งแสดงในรูปที่ 3 และสเตอริโอเคมีสามารถพิสูจน์ได้โดย NOESY ดังแสดงในรูปที่ 4

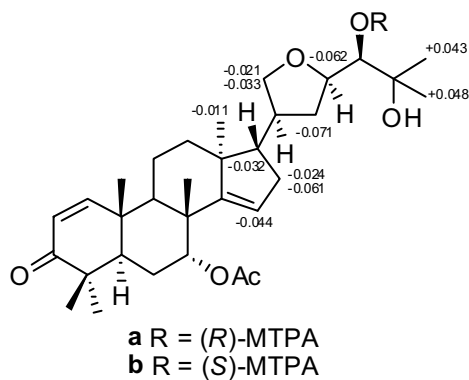


รูปที่ 3 แสดง COSY และ HMBC correlation



รูปที่ 4 แสดง NOESY correlation

สำหรับ absolute stereochemistry ของ OH ในตำแหน่งที่ 24 พบว่าเป็น $\beta\text{-OH}$ จากวิธี Mosher esterification ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงค่า $\Delta\delta$ (in ppm) = $\delta_S - \delta_R$ ที่ได้จาก (S)- และ (R)-MTPA เอสเทอร์ **1b** และ **1a**

Protoxylocarpin G (XG-14): กัมไสไม่มีสี;

$[\alpha]_D^{25} +38.0$ (c 0.1, MeOH);

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 215 (4.08);

IR (KBr) $V_{\max}$ 3460, 2950, 1728, 1460, 1437, 1381, 1255, 1170, 1026 และ 732 cm^{-1} ;

^1H และ ^{13}C NMR (CDCl_3), ดูตารางที่ 1;

HRESIMS m/z 531.3345 (calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_6 + \text{Na}$, 531.3349)

จากข้อมูล NMR พบว่า protoxylocarpin G มีโครงสร้างเหมือนกับ protoxylocarpin F และเป็น C-24 epimer ของ protoxylocarpin F ซึ่งดูได้จากค่า specific rotation ที่มีเครื่องหมายตรงกันข้าม

Protoxylocarpin H (XG-10): กัมไสไม่มีสี;

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +13.0$ (c 0.1, MeOH);

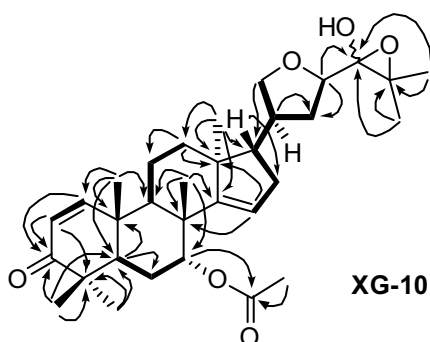
UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 230 (4.09);

IR (KBr) $V_{\max}$ 3454, 2941, 1736, 1667, 1461, 1381, 1250, 1028 และ 826 cm^{-1} ;

^1H และ ^{13}C NMR (CDCl_3), ดูตารางที่ 1;

HRESIMS m/z 549.3190 (calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{O}_6 + \text{Na}$, 549.3192)

โครงสร้างของ protoxylocarpin H สามารถพิสูจน์ได้โดยใช้ COSY และ HMBC (รูปที่ 6) เป็นหลักเช่นกันและพบว่าต่างจาก protoxylocarpin F และ G เฉพาะค่าบริเวณ side chain ซึ่งมี acetal carbon (C-24) เพิ่มขึ้นมา และสเตอริโอเคมีก็เหมือนกับ protoxylocarpin F และ G ซึ่งดูได้จาก NOESY เช่นกัน



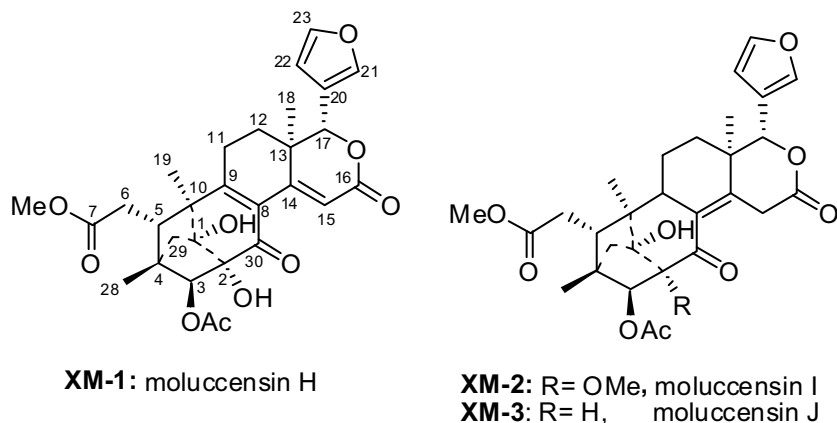
รูปที่ 6 แสดง COSY และ HMBC correlation ของ XG-10

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C ของ XG-4, XG-10 และ XG-14

position	XG-4		XG-14		XG-10	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	7.10 d (10.0)	158.5	7.14 d (10.4)	158.5	7.14 d (10.0)	158.3
2	5.97 d (10.0)	125.4	5.80 d (10.4)	125.5	5.83 d (10.0)	125.4
3	-	204.8	-	204.8	-	204.8
4	-	44.1	-	44.2	-	44.1
5	2.10 m	46.2	2.16 m	46.4	2.14 m	46.1
6	1.64 m; 1.70 m	23.8	1.80 m; 1.90 m	24.0	1.76 m	23.8
7	5.16 br s	74.7	5.20 br s	74.8	5.19 br s	74.6
8	-	42.7	-	42.8	-	42.6
9	2.13 m	38.5	2.20 m	38.7	2.16 m	38.4
10	-	39.8	-	39.7	-	39.8
11	1.58 m; 1.83 m	16.7	1.55 m; 2.00 m	16.8	1.49 m, 1.73 m	16.7
12	1.60 m; 1.83 m	34.0	2.26 m	34.9	1.92 m, 2.16 m	33.9
13	-	46.3	-	46.2	-	46.5
14	-	159.2	-	159.0	-	158.7
15	5.23 br d (2.4)	119.0	5.30 br d (2.4)	119.6	5.25 br s	119.2
16	1.93 m; 2.21 m	35.0	2.26 m	35.0	2.14 m	29.8
17	1.84 m	54.2	2.00 m	52.3	1.40 m	57.1
18	0.91 s	20.0	0.90 s	20.4	1.04 s	20.4
19	1.09 s	19.0	1.14 s	19.1	1.13 s	19.0
20	1.84 m	36.3	1.88 m	35.8	1.76 m	34.5
21	3.44 dd (2.8, 13.6); 3.54 br d (12.4)	64.2	3.42 dd (2.0, 12.0) 3.98 br d (11.6)	70.0	3.60 m, 3.79 m	65.3
22	1.55 m; 1.91 m	37.9	1.52 m; 2.04 m	36.2	1.69 m	32.8
23	3.74 ddd (2.4, 8.8, 10.4)	68.0	3.86 ddd (2.8, 8.8, 13.2)	64.4	3.85 m	67.5
24	3.36 d (8.8)	80.7	2.98 d (8.8)	86.5	-	95.5
25	-	76.2	-	74.3	-	76.3
26	1.24 s	26.3	1.30 s	28.6	1.39 s	24.3
27	1.10 s	22.4	1.25 s	23.8	1.25 s	23.1
28	1.00 s	21.3	1.05 s	21.3	1.04 s	21.2
29	1.00 s	27.0	1.05 s	27.0	1.04 s	27.0
30	1.12 s	27.4	1.18 s	27.3	1.13 s	27.3
7-OCOCH ₃	1.88 s	21.2	1.92 s	21.2	1.92 s	21.1
7-OCOCH ₃	-	170.2	-	170.2	-	170.2

ผลการแยกสารจากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอลกอฮอล์ของเมล็ดตะบูนดำ

เมื่อนำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอลกอฮอล์ของเมล็ดตะบูนดำประมาณ 30 กรัม มาทำการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่าง ๆ เช่นเดียวกับเมล็ดตะบูนขาว ได้สารลิโมนอยด์ชนิดใหม่ 3 ชนิดคือ **XM-1**, **XM-2**, และ **XM-3** ซึ่งเป็นสารลิโมนอยด์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม phragmalin ซึ่งตั้งชื่อเป็น moluccensin H (**XM-1**), I (**XM-2**), และ J (**XM-3**) ซึ่งโครงสร้างของสารเหล่านี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงโครงสร้างของสารที่แยกได้จากเมล็ดตะบูนดำ

โครงสร้างของสารลิโมนอยด์ชนิดใหม่ทั้ง 3 ชนิดนี้ พิสูจน์ได้โดยอาศัยเทคนิคทาง 1D และ 2D NMR ร่วมกับ mass spectrometry ด้วย

Moluccensin H (XM-1): กัมไสไม่มีสี;

$[\alpha]_D^{20} +140$ (c 0.10, CH₃OH);

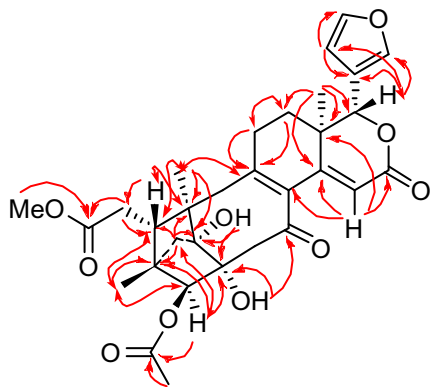
UV (CH₃OH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 265 (4.16) nm;

IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3452, 2957, 1737, 1682, 1636, 1376, 1227, 1029 และ 875 cm⁻¹;

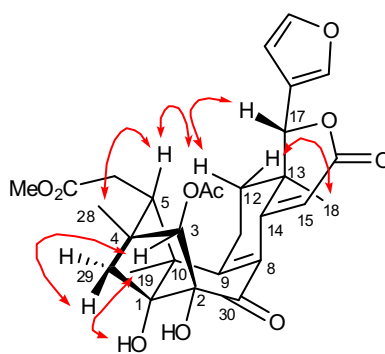
¹H NMR และ ¹³C NMR data, ดูตารางที่ 2;

HRESIMS m/z 563.1888 [M+Na]⁺ (calcd. C₂₉H₃₂O₁₀Na, 563.1893)

โครงสร้างของ moluccensin H สามารถพิสูจน์ได้โดยใช้ COSY และ HMBC เป็นหลักซึ่งแสดงในรูปที่ 8 และสเตอริโอเคมีสามารถพิสูจน์ได้โดย NOESY ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 8 แสดง COSY และ HMBC correlation ของ XM-1



รูปที่ 9 แสดง NOESY correlation ของ XM-1

Moluccensin I (XM-2): กัมสีเหลื่องอ่อน;

$[\alpha]_D^{20}$ -12 (c 0.10, CH_3OH);

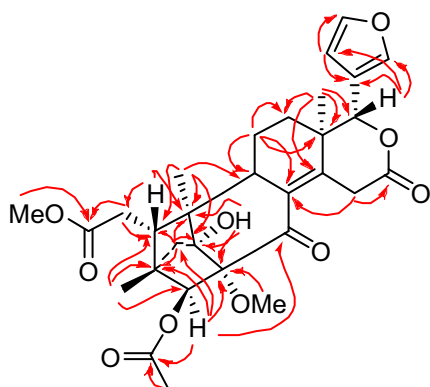
UV (CH_3OH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 215 (4.12) nm;

IR (KBr) V_{max} 3458, 2944, 1743, 1504, 1460, 1373, 1228, 1163, 1111, 1024, 913, 875 และ 731 cm^{-1} ;

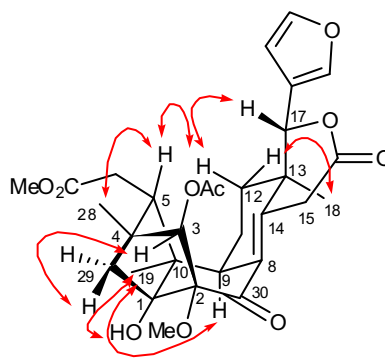
^1H NMR และ ^{13}C NMR data, ดูตารางที่ 2;

HRESIMS m/z 579.2201 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{10}\text{Na}$, 579.2206)

โครงสร้างของ moluccensin I สามารถพิสูจน์ได้โดยใช้ COSY และ HMBC เป็นหลัก เช่นเดียวกับ moluccensin H ซึ่งแสดงในรูปที่ 10 และสเตอริโอเคมีสามารถพิสูจน์ได้โดย NOESY ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 10 แสดง COSY และ HMBC correlation ของ XM-2



รูปที่ 11 แสดง NOESY correlation ของ XM-2

Moluccensin J (XM-3): กัมสีเหลืองอ่อน;

$[\alpha]_D^{20}$ -4 (*c* 0.10, CH₃OH);

UV (CH₃OH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 290 (3.13) nm;

IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3452, 2944, 1741, 1505, 1461, 1437, 1372, 1236, 1164, 1025, 912, 875 และ 731 cm⁻¹;

¹H NMR และ ¹³C NMR data, ดูตารางที่ 2;

HRESIMS *m/z* 549.2100 [M+Na]⁺ (calcd. C₂₉H₃₄O₉Na, 549.2101)

โครงสร้างของ moluccensin J สามารถพิสูจน์ได้โดยใช้ COSY และ HMBC เป็นหลัก เช่นเดียวกับ moluccensin I และพบว่า moluccensin J เป็นอนุพันธ์ methoxy ของ moluccensin I ดังแสดงในรูปที่ 7

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C ของ XM-1, 2 และ 3

position	XM-1		XM-2		XM-3	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1		86.6		84.7		84.4
2		80.6		92.2	3.44 (s)	63.6
3	4.90 (s)	87.6	4.92 (s)	82.8	4.95 (s)	83.7
4		45.1		40.1		40.6
5	2.79 (m)	43.5	2.37 (t, 10.0)	39.6	2.13 (m)	40.5
6	2.40 (m)	33.1	2.25 (d, 12.0)	34.2	2.22 (dd, 2.8, 15.6)	34.2
	2.52 (dd, 5.6, 17.2)		2.43 (m)		2.38 (dd, 4.4, 15.6)	
7		173.4		172.9		172.9
8		121.8		133.9		135.2
9		168.9	2.46 (m)	46.9	2.43 (br m)	48.1
10		48.4		55.4		56.4
11	2.43 (m)	25.2	1.43 (m)	18.7	1.40 (m)	19.5
			1.74 (m)		1.73 (m)	
12	1.49 (m)	30.5	1.41 (m)	31.4	1.38 (m)	31.9
	1.67 (br m)		1.49 (m)		1.52 (m)	
13		36.4		40.8		40.4
14		152.3		139.2		132.1
15	7.00 (s)	115.2	3.75 (m)	33.0	3.37 (d, 19.2)	35.3
					3.89 (d, 19.2)	
16		165.5		169.9		171.0
17	5.02 (s)	80.4	5.17 (s)	80.2	5.17 (s)	80.9
18	0.99 (s, 3H)	15.7	1.00 (s, 3H)	17.1	0.97 (s, 3H)	17.0
19	1.22 (s, 3H)	16.1	1.03 (s, 3H)	15.1	0.96 (s, 3H)	14.7
20		119.9		120.4		120.4
21	7.49 (s)	141.3	7.45 (s)	141.2	7.43 (s)	141.2
22	6.45 (s)	110.0	6.40 (s)	110.0	6.39 (s)	110.1
23	7.44 (s)	143.1	7.40 (s)	143.0	7.38 (s)	142.9
28	0.97 (s, 3H)	16.7	0.96 (s, 3H)	19.7	0.94 (s, 3H)	19.1
29	1.87 (dd, 2.0, 11.2)	41.7	1.72 (m)	43.7	1.94 (d,	44.1
	1.94 (d, 11.2)		2.20 (d, 13.2)		2.12 (br s)	
30		194.6		203.5		205.1
7-OCH ₃	3.70 (s, 3H)	52.2	3.65 (s, 3H)	51.8	3.63 (s, 3H)	51.7
3-OAc		169.5		170.1		170.5
	1.96 (s, 3H)	20.6	2.15 (s, 3H)	20.5	2.10 (s, 3H)	20.6
2-OCH ₃			3.40 (s)	55.1		
2-OH	4.95 (s)					
1-OH	2.88 (br s)		2.93 (br s)			

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

สารลิโมนอยด์บริสุทธิ์ที่แยกได้ทุกชนิดถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ซึ่งผลได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 ซึ่งจะเห็นได้ว่า มีสารลิโมนอยด์เพียง 4 ชนิดที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบบางเซลล์ไลน์เท่านั้น ดังนี้

XG-5 แสดงความเป็นพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และมะเร็งปอด (CHAGO)

XG-11 แสดงความเป็นพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) เท่านั้น

XG-12 แสดงความเป็นพิษปานกลางเฉพาะต่อเซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) เท่านั้น

XG-13 แสดงความเป็นพิษปานกลางเฉพาะต่อเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) เท่านั้น

ตารางที่ 3 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ **XG-1** ถึง **XG-14** และ **XM-1** ถึง **XM-3**

สารประกอบ	IC ₅₀ /cell line				
	KATO-3	CHAGO	SW-620	Hep-G2	BT-474
XG-1	>10	>10	>10	>10	>10
XG-2	>10	>10	>10	>10	>10
XG-3	>10	>10	>10	>10	>10
XG-5	9.99	7.05	>10	>10	>10
XG-6	>10	>10	>10	>10	>10
XG-7	>10	>10	>10	>10	>10
XG-8	>10	>10	>10	>10	>10
XG-9	>10	>10	>10	>10	>10
XG-10	>10	>10	>10	>10	>10
XG-11	>10	>10	>10	7.09	>10
XG-12	>10	4.97	>10	>10	>10
XG-13	>10	>10	>10	4.52	>10
XG-14	>10	>10	>10	>10	>10
XM-1	>10	>10	>10	>10	>10
XM-2	>10	>10	>10	>10	>10
XM-3	>10	>10	>10	>10	>10

Output ที่ได้จากโครงการ

คาดว่าจะได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Natural Products อย่างน้อย 2 ฉบับ ซึ่งได้ทำการ submit ไปเรียบร้อยแล้ว

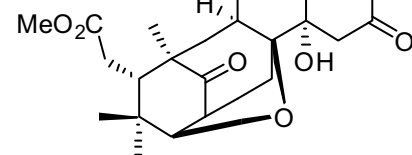
เอกสารอ้างอิง

1. (a) Wu, J.; Xiao, Q.; Zhang, S.; Li, X.; Xiao, Z.; Ding, H.; Li, Q. *Tetrahedron* **2005**, 61, 8382-8389. (b) Zhou, Y.; Chen, F.; Wu, J.; Zou, K. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 1083-1085.
2. Cui, J.; Wu, J.; Deng, Z.; Proksch, P.; Lin, W. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 772-778.
3. Yin, S.; Fan, C.-Q.; Wang, X.-N.; Lin, L.-P.; Ding, J. Yue, J.-M. *Organic Lett.*, **2006**, 8, 4935-4938.
4. Li, M.-Y.; Yang, S.-X.; Pan, J.-Y.; Xiao, Q.; Satyanandamurty, T.; Wu, J. *J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 1657-1662.

NMR spectrum ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

- Figure S1.** ^1H NMR spectrum of **XG-1** in CDCl_3 .
- Figure S2.** ^{13}C NMR spectrum of **XG-1** in CDCl_3 .
- Figure S3.** ^1H NMR spectrum of **XG-2** in CDCl_3 .
- Figure S4.** ^{13}C NMR spectrum of **XG-2** in CDCl_3 .
- Figure S5.** ^1H NMR spectrum of **XG-3** in CDCl_3 .
- Figure S6.** ^{13}C NMR spectrum of **XG-3** in CDCl_3 .
- Figure S7.** ^1H NMR spectrum of **XG-4** in CDCl_3 .
- Figure S8.** ^{13}C NMR spectrum of **XG-4** in CDCl_3 .
- Figure S9.** COSY spectrum of **XG-4** in CDCl_3 .
- Figure S10.** HSQC spectrum of **XG-4** in CDCl_3 .
- Figure S11.** HMBC spectrum of **XG-4** in CDCl_3 .
- Figure S12.** NOESY spectrum of **XG-4** in CDCl_3 .
- Figure S13.** ^1H NMR spectrum of **XG-5** in CDCl_3 .
- Figure S14.** ^{13}C NMR spectrum of **XG-5** in CDCl_3 .
- Figure S15.** ^1H NMR spectrum of **XG-6** in CDCl_3 .
- Figure S16.** ^{13}C NMR spectrum of **XG-6** in CDCl_3 .
- Figure S17.** ^1H NMR spectrum of **XG-7** in CDCl_3 .
- Figure S18.** ^{13}C NMR spectrum of **XG-7** in CDCl_3 .
- Figure S19.** ^1H NMR spectrum of **XG-8** in CDCl_3 .
- Figure S20.** ^{13}C NMR spectrum of **XG-8** in CDCl_3 .
- Figure S21.** ^1H NMR spectrum of **XG-9** in CDCl_3 .
- Figure S22.** ^{13}C NMR spectrum of **XG-9** in CDCl_3 .
- Figure S23.** ^1H NMR spectrum of **XG-10** in CDCl_3 .
- Figure S24.** ^{13}C NMR spectrum of **XG-10** in CDCl_3 .
- Figure S25.** COSY spectrum of **XG-10** in CDCl_3 .
- Figure S26.** HSQC spectrum of **XG-10** in CDCl_3 .
- Figure S27.** HMBC spectrum of **XG-10** in CDCl_3 .
- Figure S28.** NOESY spectrum of **XG-10** in CDCl_3 .
- Figure S29.** ^1H NMR spectrum of **XG-11** in CDCl_3 .
- Figure S30.** ^{13}C NMR spectrum of **XG-11** in CDCl_3 .
- Figure S31.** ^1H NMR spectrum of **XG-12** in CDCl_3 .
- Figure S32.** ^{13}C NMR spectrum of **XG-12** in CDCl_3 .

Figure S33. ^1H NMR spectrum of **XG-13** in CDCl_3 .
Figure S34. ^{13}C NMR spectrum of **XG-13** in CDCl_3 .
Figure S35. ^1H NMR spectrum of **XG-14** in CDCl_3 .
Figure S36. ^{13}C NMR spectrum of **XG-14** in CDCl_3 .
Figure S37. COSY spectrum of **XG-14** in CDCl_3 .
Figure S38. HSQC spectrum of **XG-14** in CDCl_3 .
Figure S39. HMBC spectrum of **XG-14** in CDCl_3 .
Figure S40. NOESY spectrum of **XG-14** in CDCl_3 .
Figure S41. ^1H NMR spectrum of **XM-1** in CDCl_3 .
Figure S42. ^{13}C NMR spectrum of **XM-1** in CDCl_3 .
Figure S43. COSY spectrum of **XM-1** in CDCl_3 .
Figure S44. HSQC spectrum of **XM-1** in CDCl_3 .
Figure S45. HMBC spectrum of **XM-1** in CDCl_3 .
Figure S46. NOESY spectrum of **XM-1** in CDCl_3 .
Figure S47. ^1H NMR spectrum of **XM-2** in CDCl_3 .
Figure S48. ^{13}C NMR spectrum of **XM-2** in CDCl_3 .
Figure S49. COSY spectrum of **XM-2** in CDCl_3 .
Figure S50. HSQC spectrum of **XM-2** in CDCl_3 .
Figure S51. HMBC spectrum of **XM-2** in CDCl_3 .
Figure S52. NOESY spectrum of **XM-2** in CDCl_3 .
Figure S53. ^1H NMR spectrum of **XM-3** in CDCl_3 .
Figure S54. ^{13}C NMR spectrum of **XM-3** in CDCl_3 .
Figure S55. COSY spectrum of **XM-3** in CDCl_3 .
Figure S56. HSQC spectrum of **XM-3** in CDCl_3 .
Figure S57. HMBC spectrum of **XM-3** in CDCl_3 .
Figure S58. NOESY spectrum of **XM-3** in CDCl_3 .



XG-1: xyloccensin K

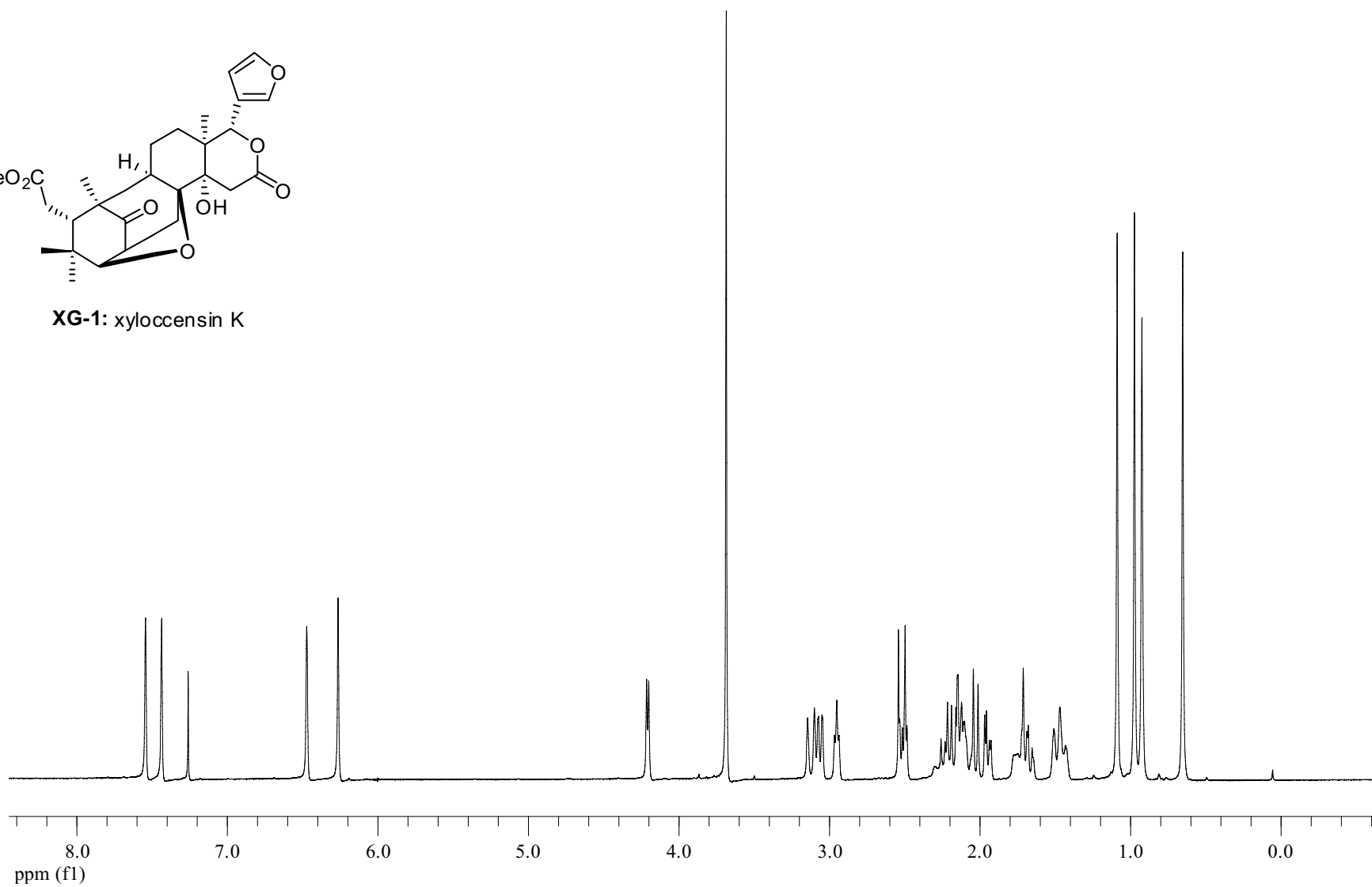
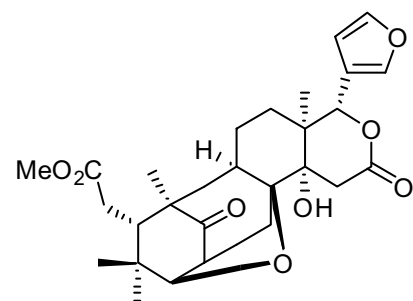


Figure S1. ^1H NMR spectrum of **XG-1** in CDCl_3 .



XG-1: xylocensin K

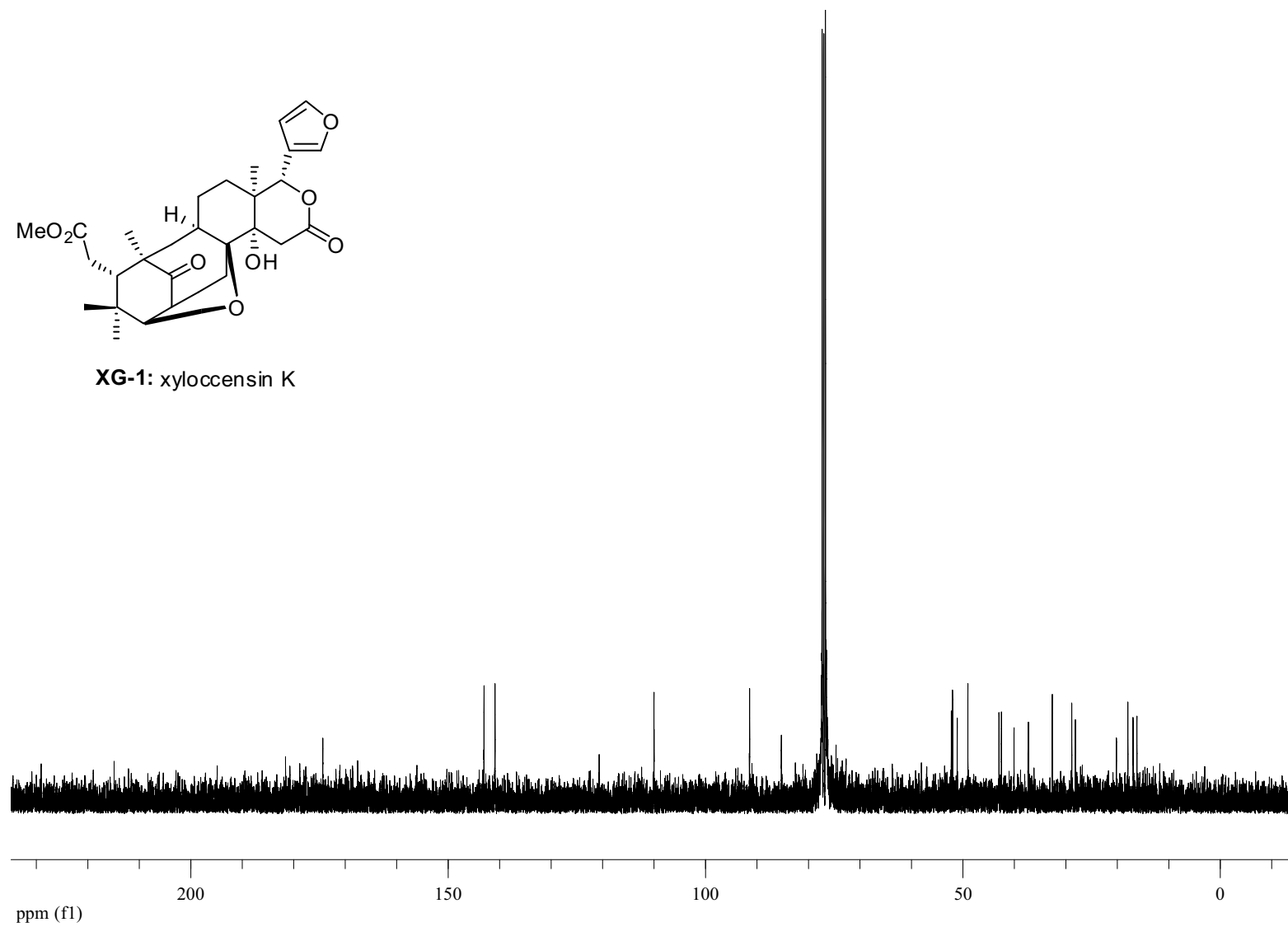


Figure S2. ^{13}C NMR spectrum of **XG-1** in CDCl_3 .

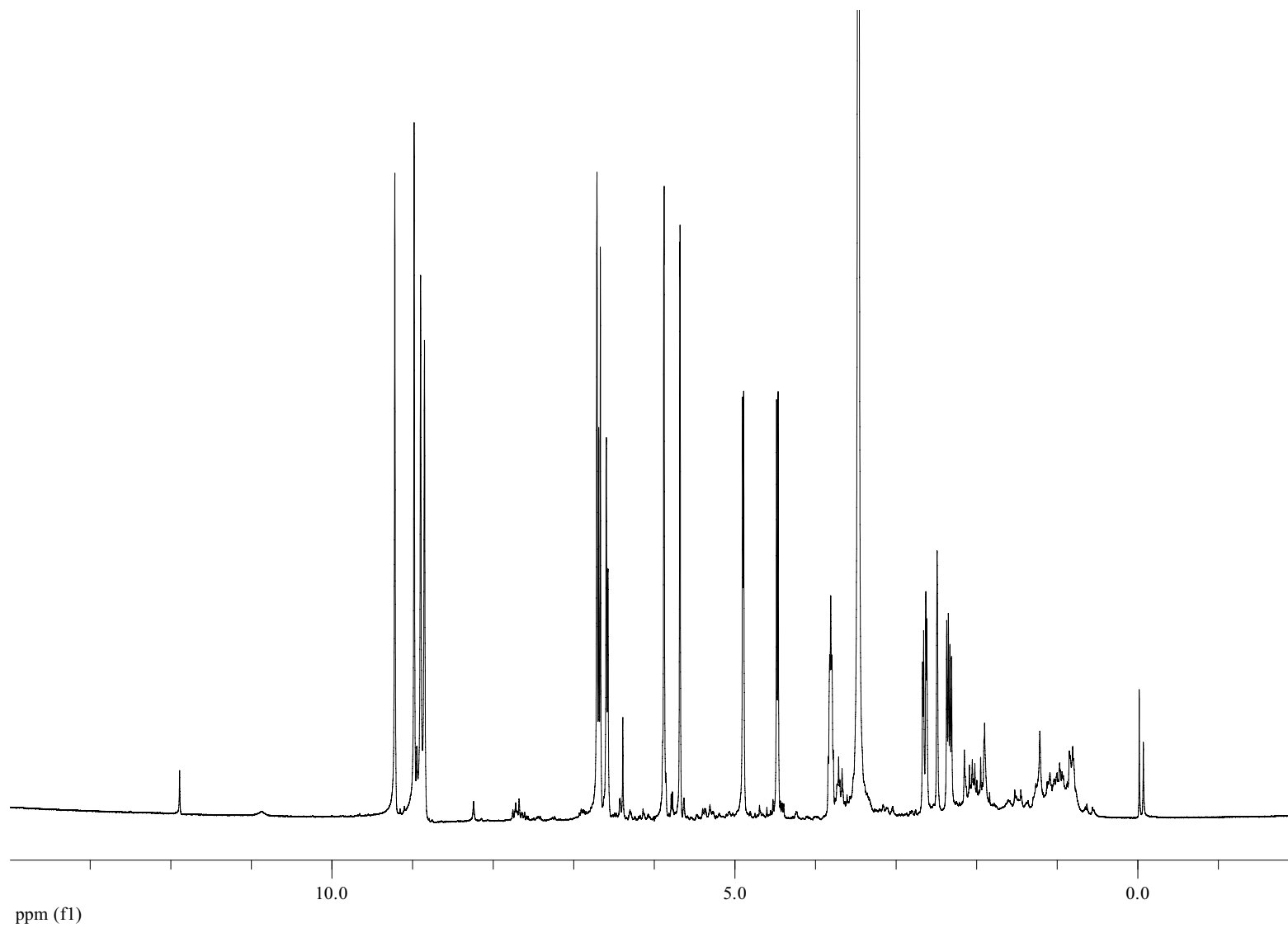


Figure S3. ^1H NMR spectrum of **XG-2** in DMSO.

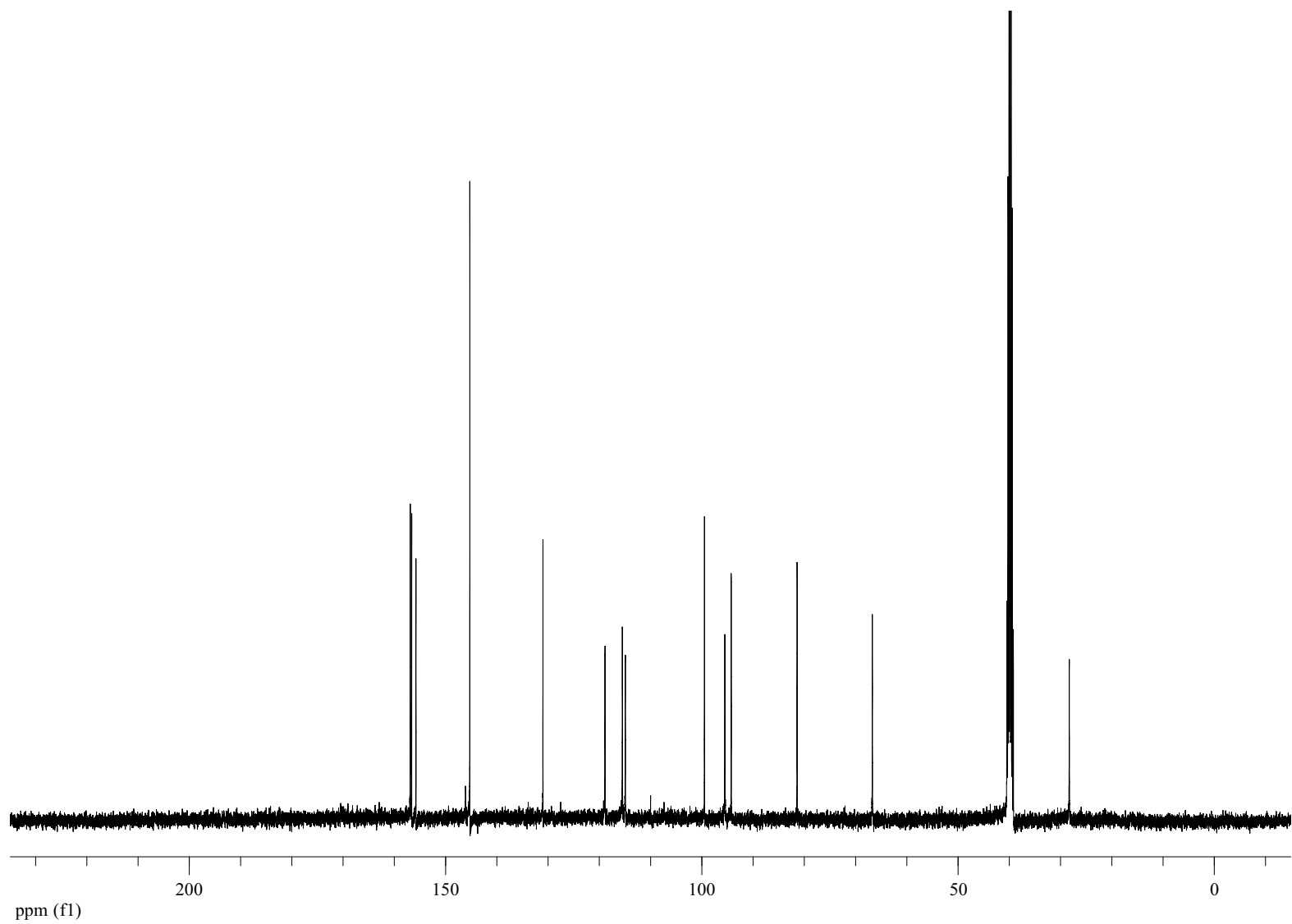


Figure S4. ^{13}C NMR spectrum of **XG-2** in DMSO.

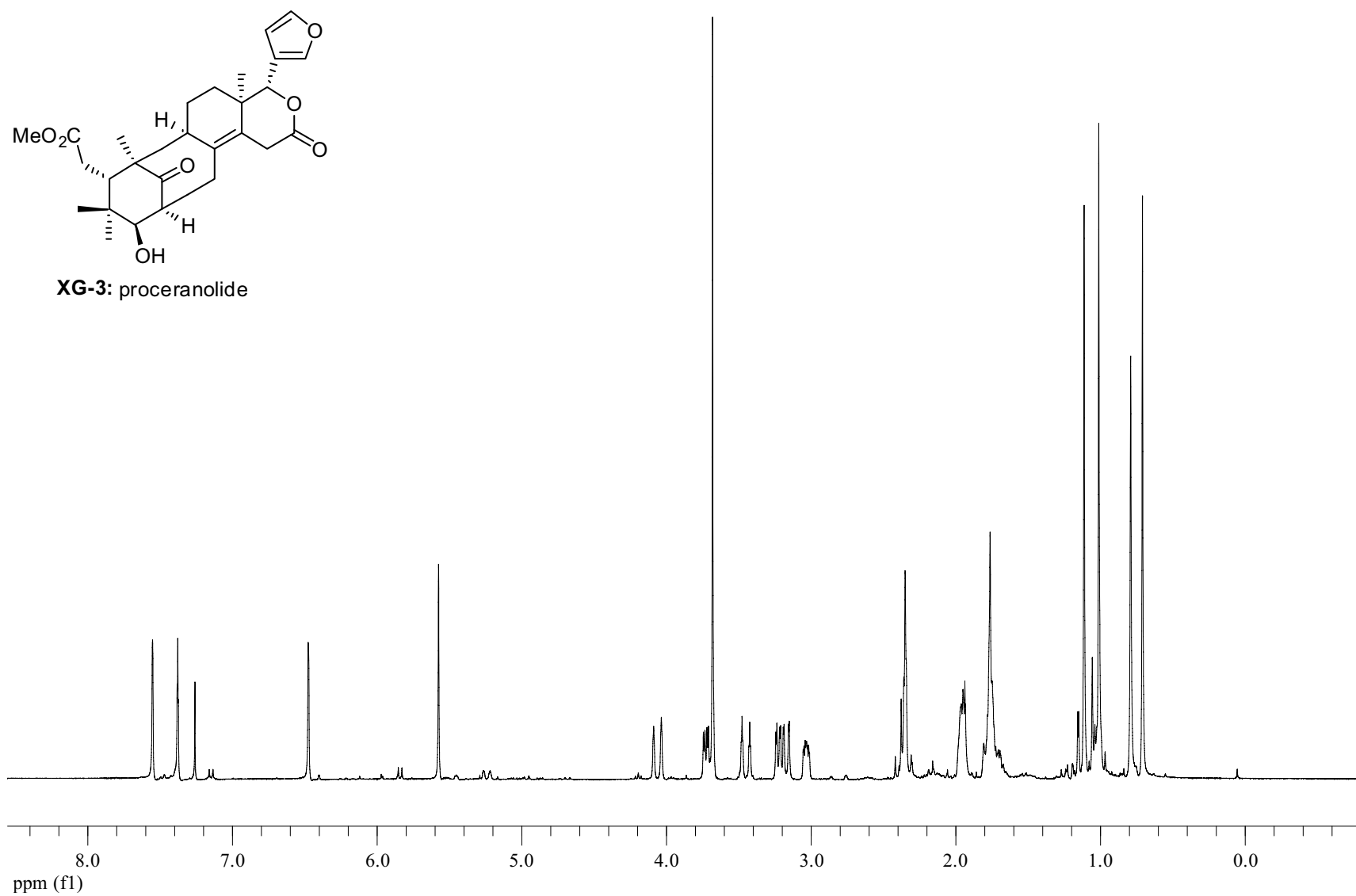
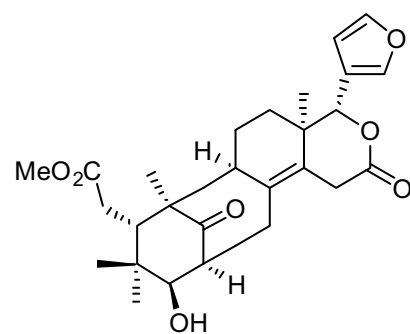


Figure S5. ^1H NMR spectrum of **XG-3** in CDCl_3 .



XG-3: proceranolide

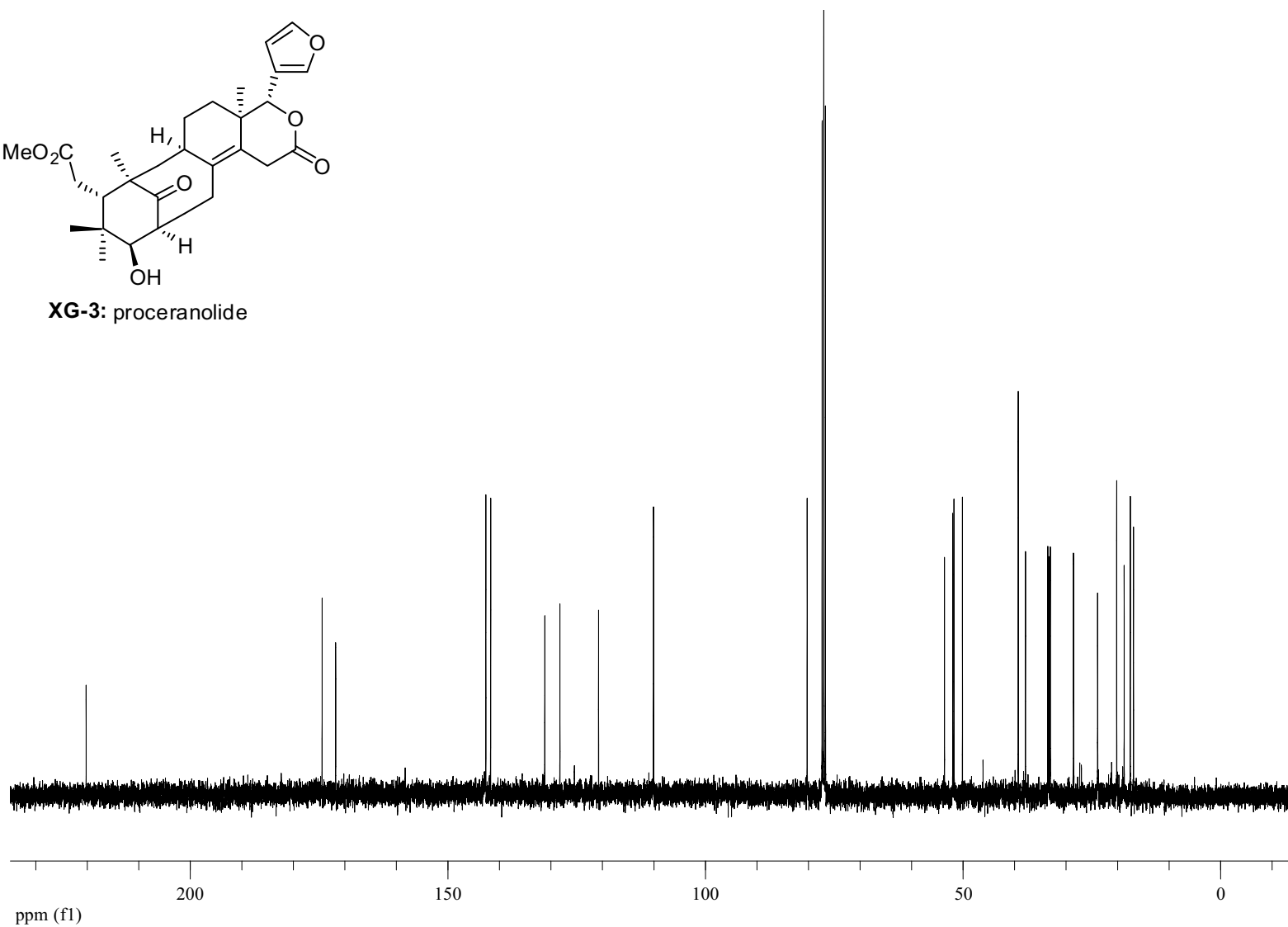
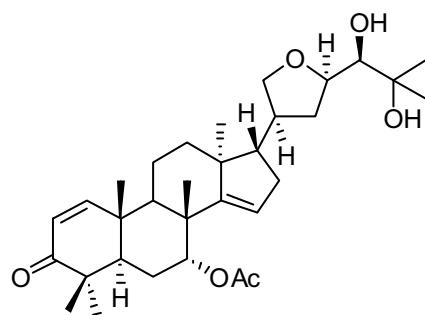


Figure S6. ¹³C NMR spectrum of **XG-3** in CDCl₃.



XG-4: Protoxylocarpin F

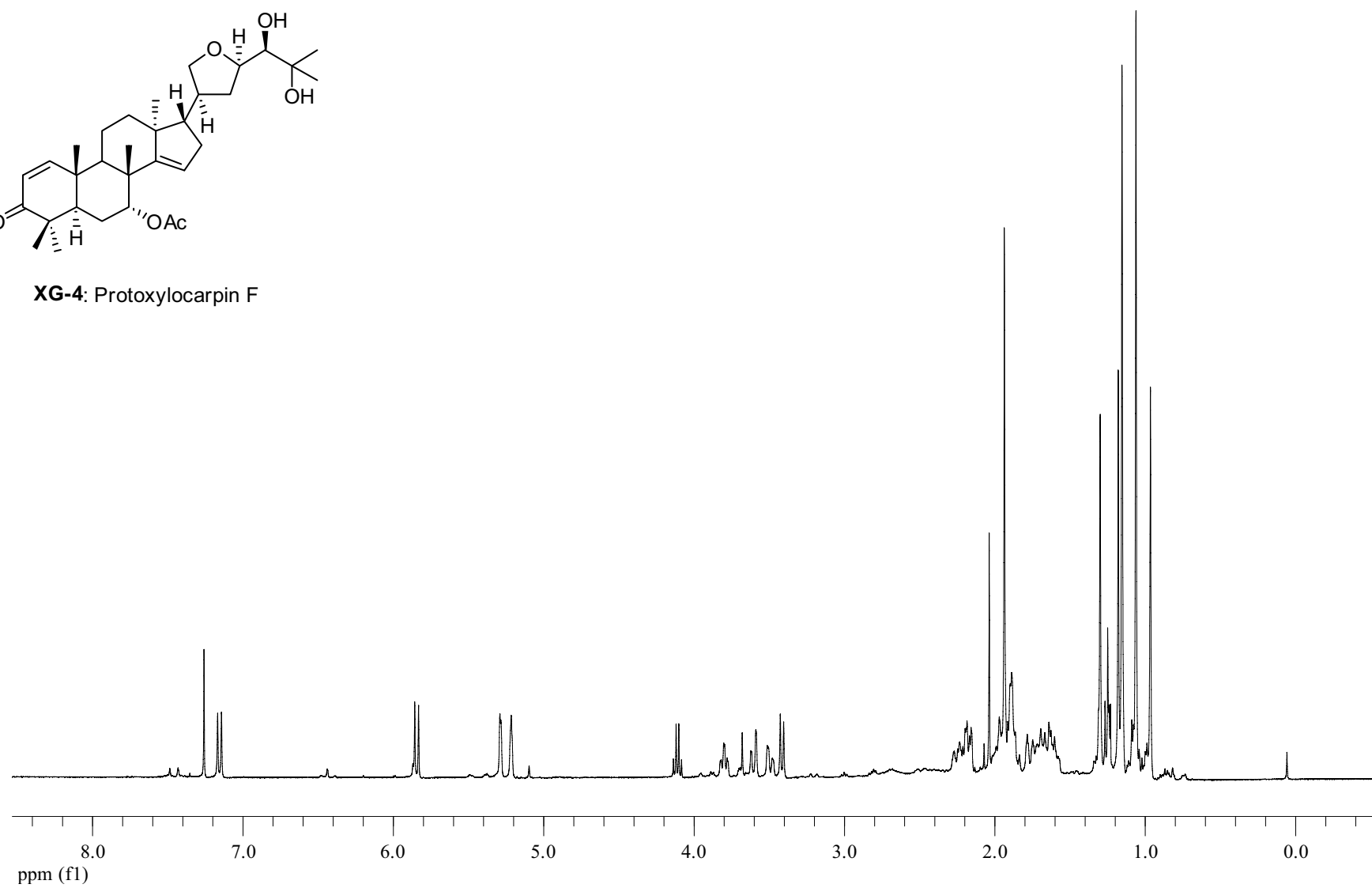
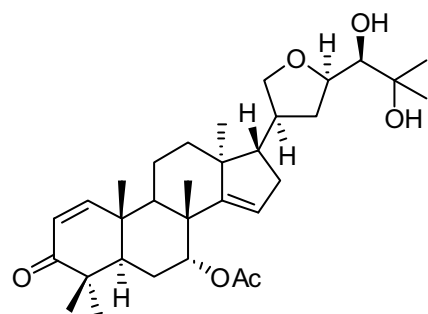


Figure S7. ^1H NMR spectrum of **XG-4** in CDCl_3 .



XG-4: Protoxylocarpin F

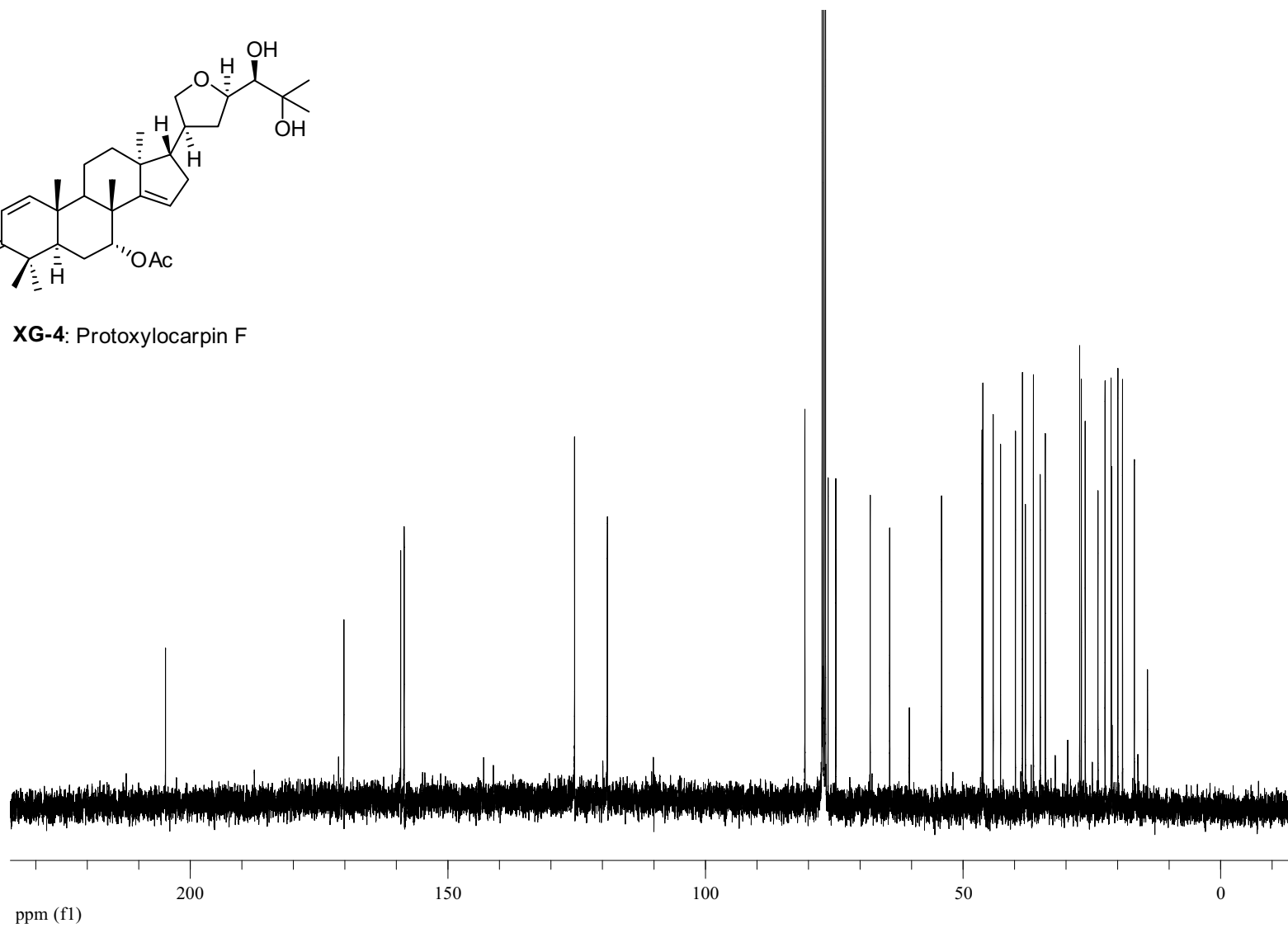
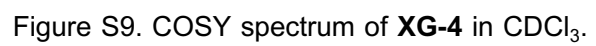
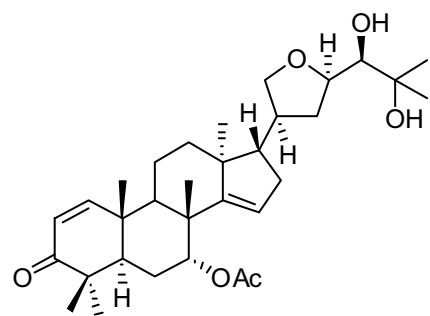


Figure S8. ^{13}C NMR spectrum of **XG-4** in CDCl_3 .





XG-4: Protoxylocarpin F

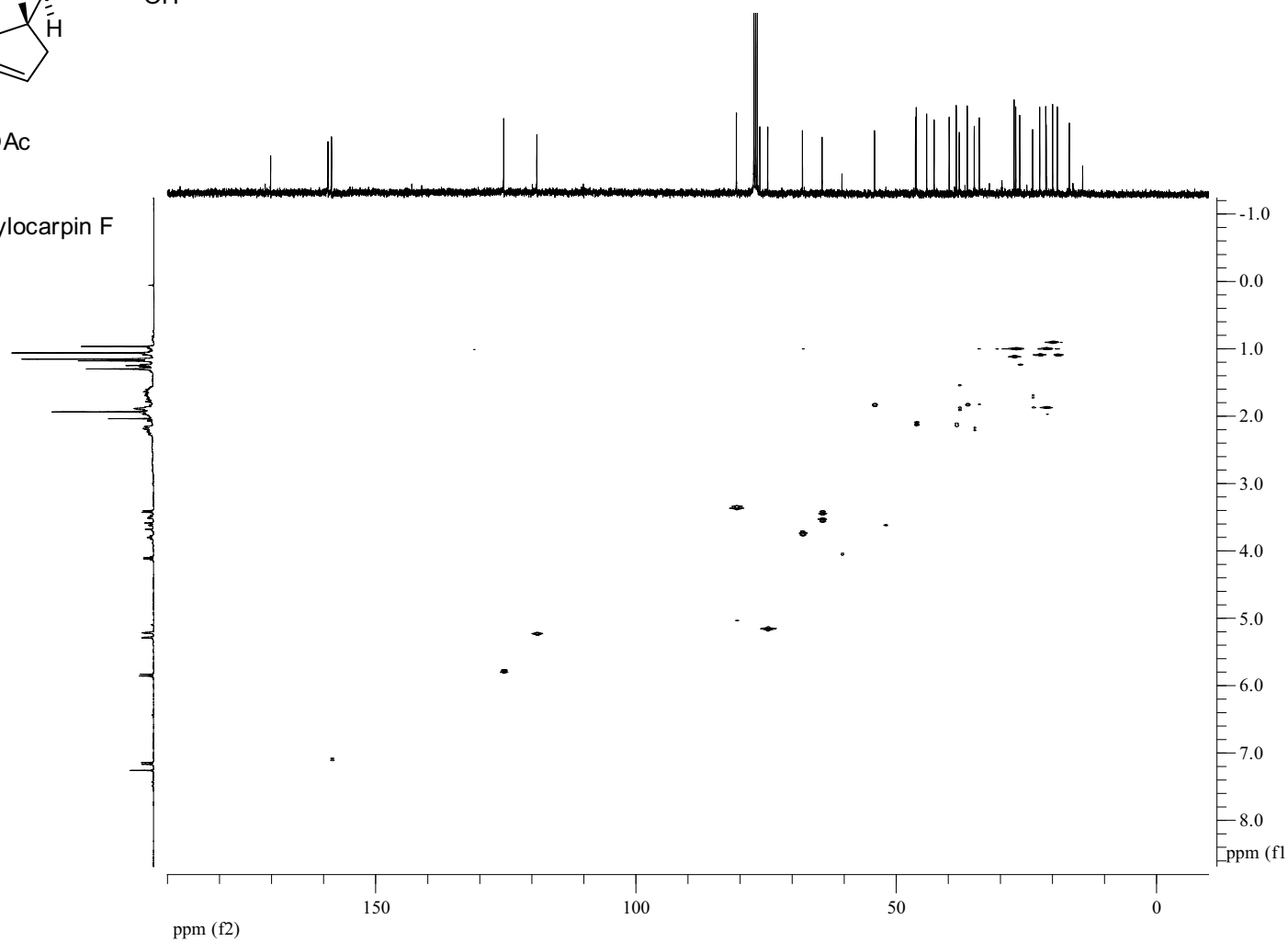
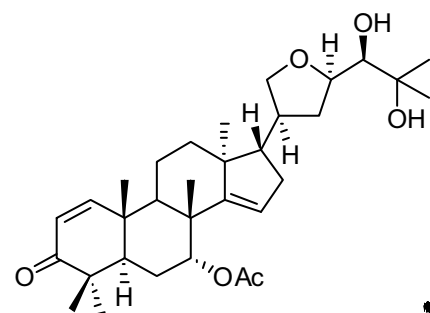


Figure S10. HSQC spectrum of **XG-4** in CDCl₃.



XG-4: Protoxylocarpin F

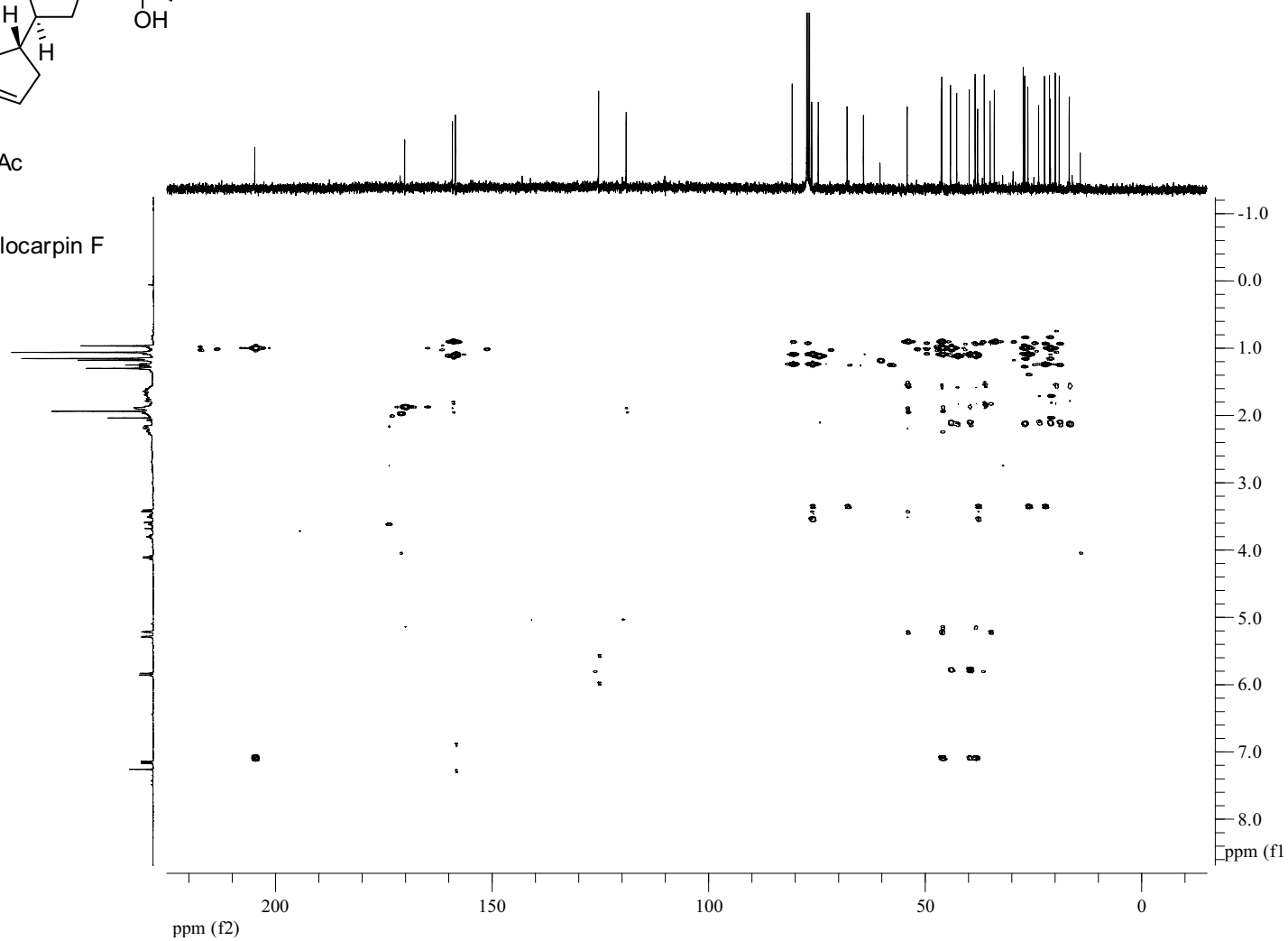
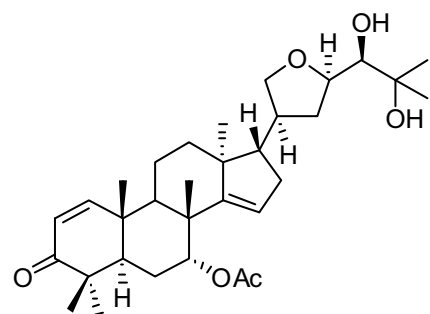


Figure S11. HMBC spectrum of **XG-4** in CDCl_3 .



XG-4: Protoxylocarpin F

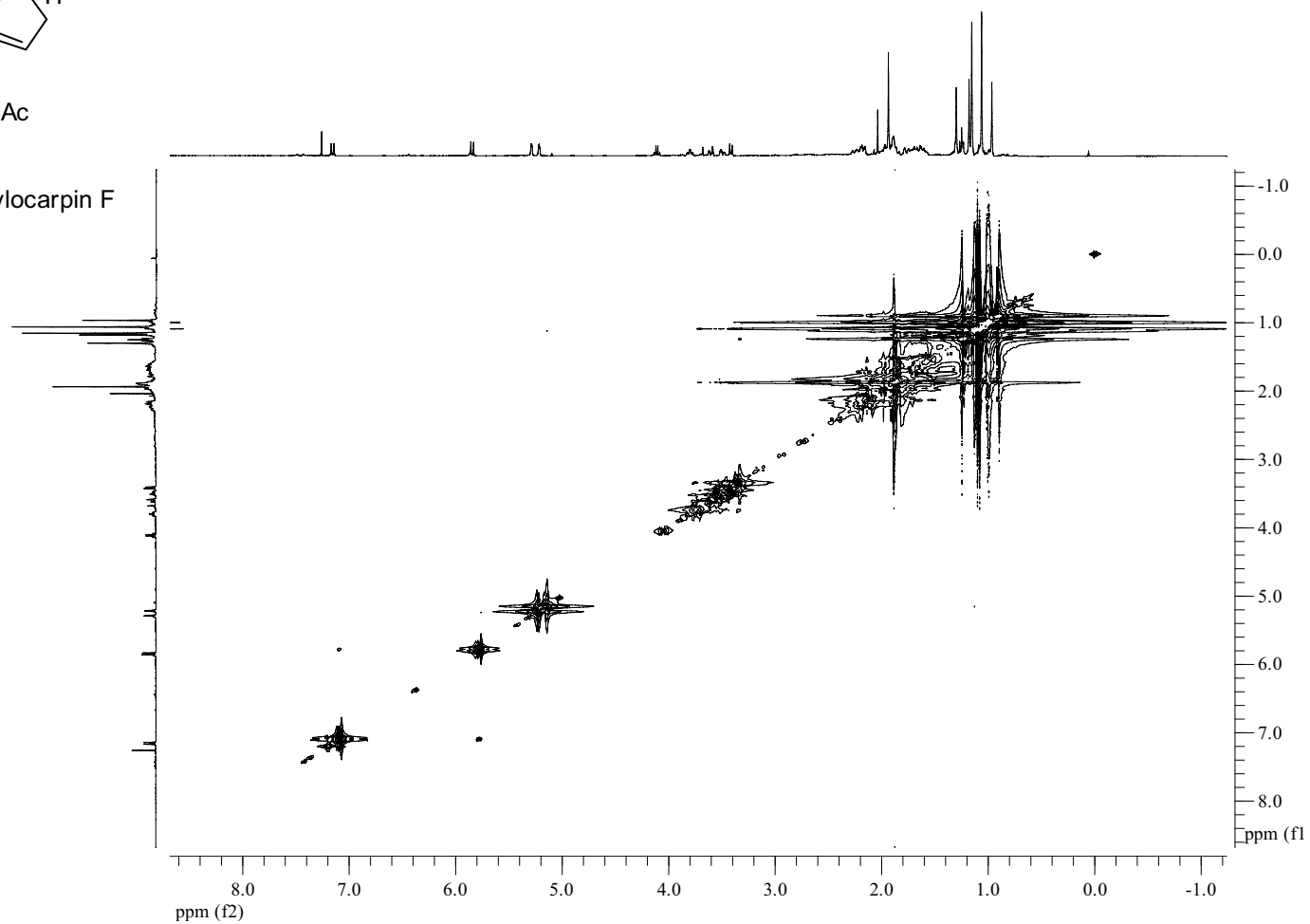
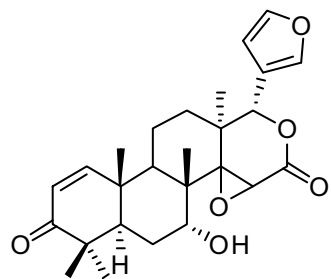


Figure S12. NOESY spectrum of **XG-4** in CDCl_3 .



XG-5: 7-deacetylgenudin

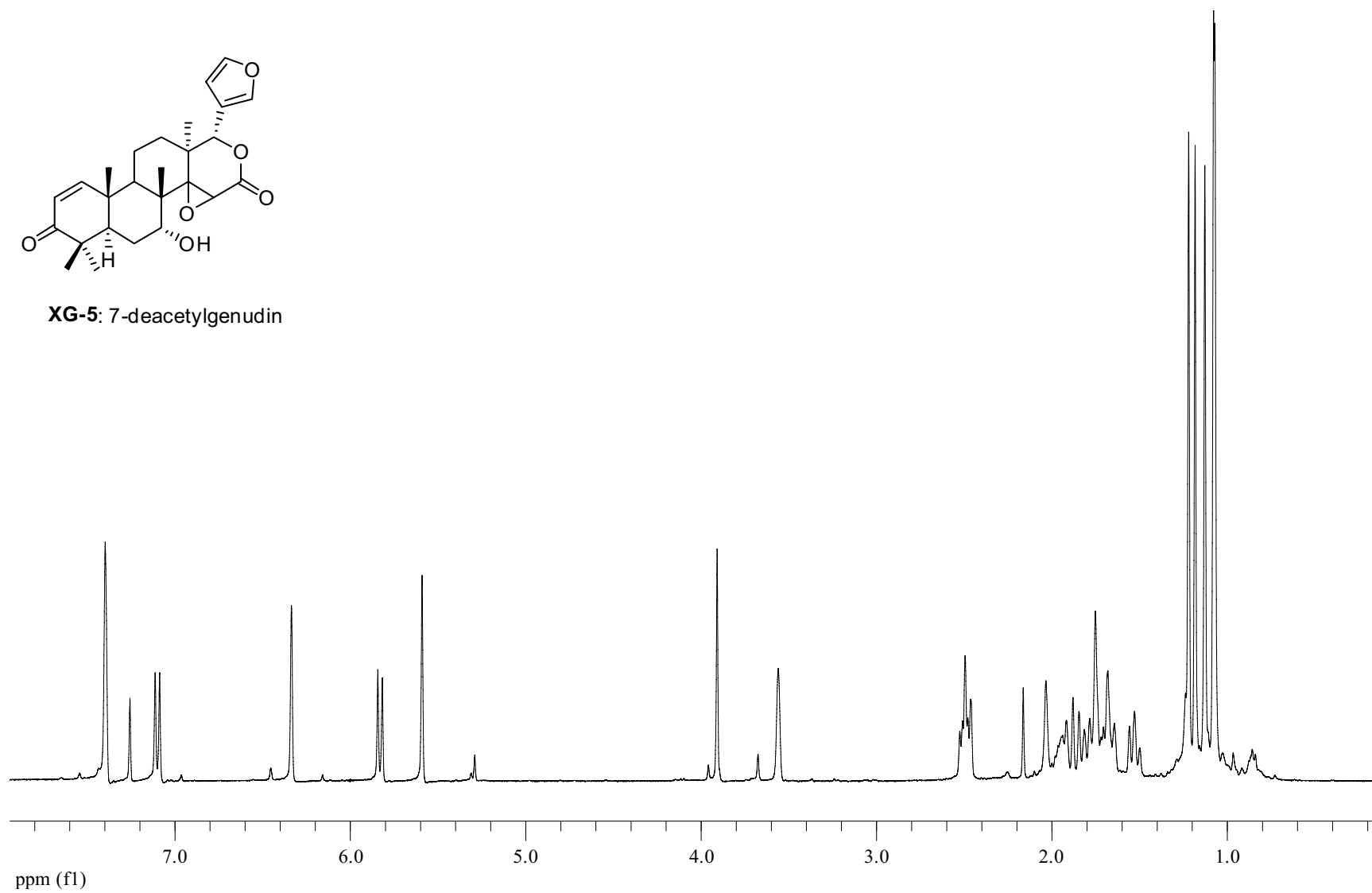
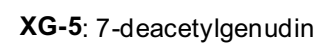
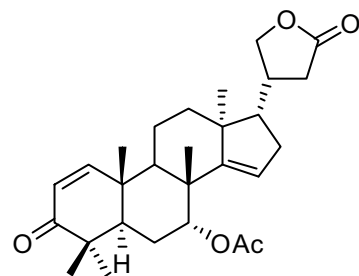


Figure S13. ^1H NMR spectrum of **XG-5** in CDCl_3 .





XG-6: chisocheton F

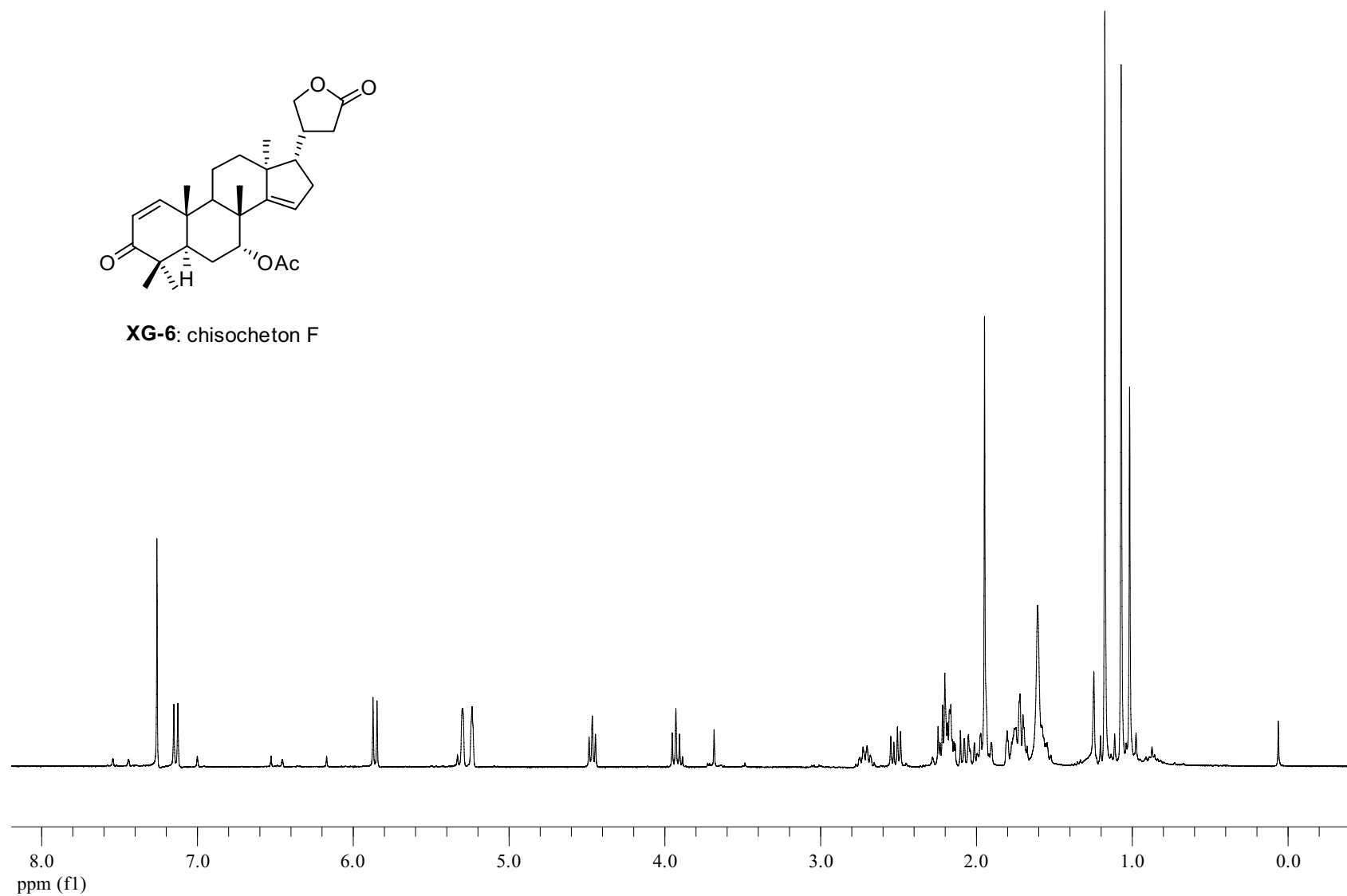


Figure S15. ^1H NMR spectrum of **XG-6** in CDCl_3 .

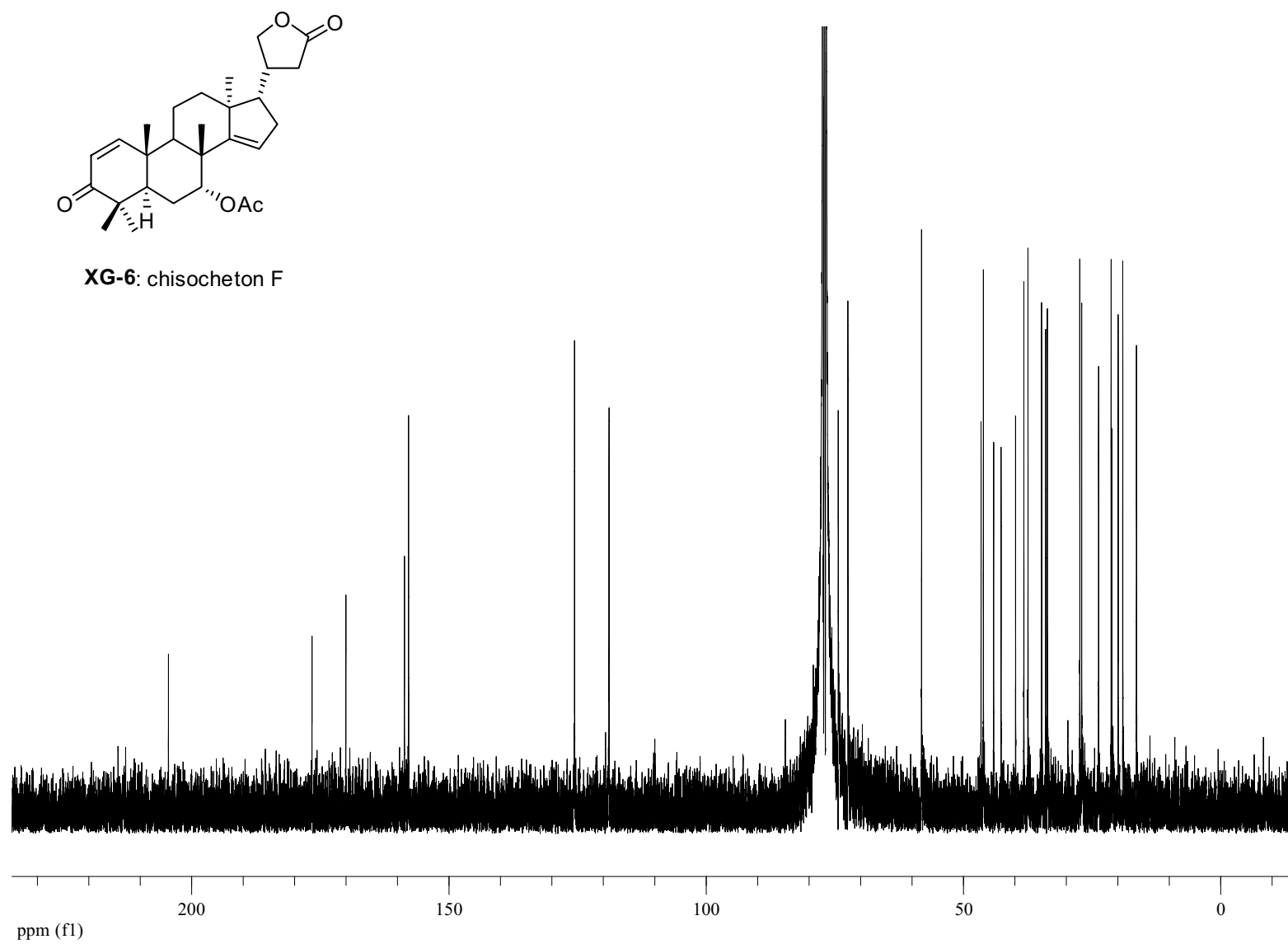
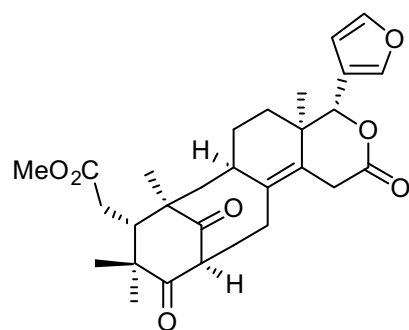


Figure S16. ^{13}C NMR spectrum of **XG-6** in CDCl_3 .



XG-7: mexicanolide

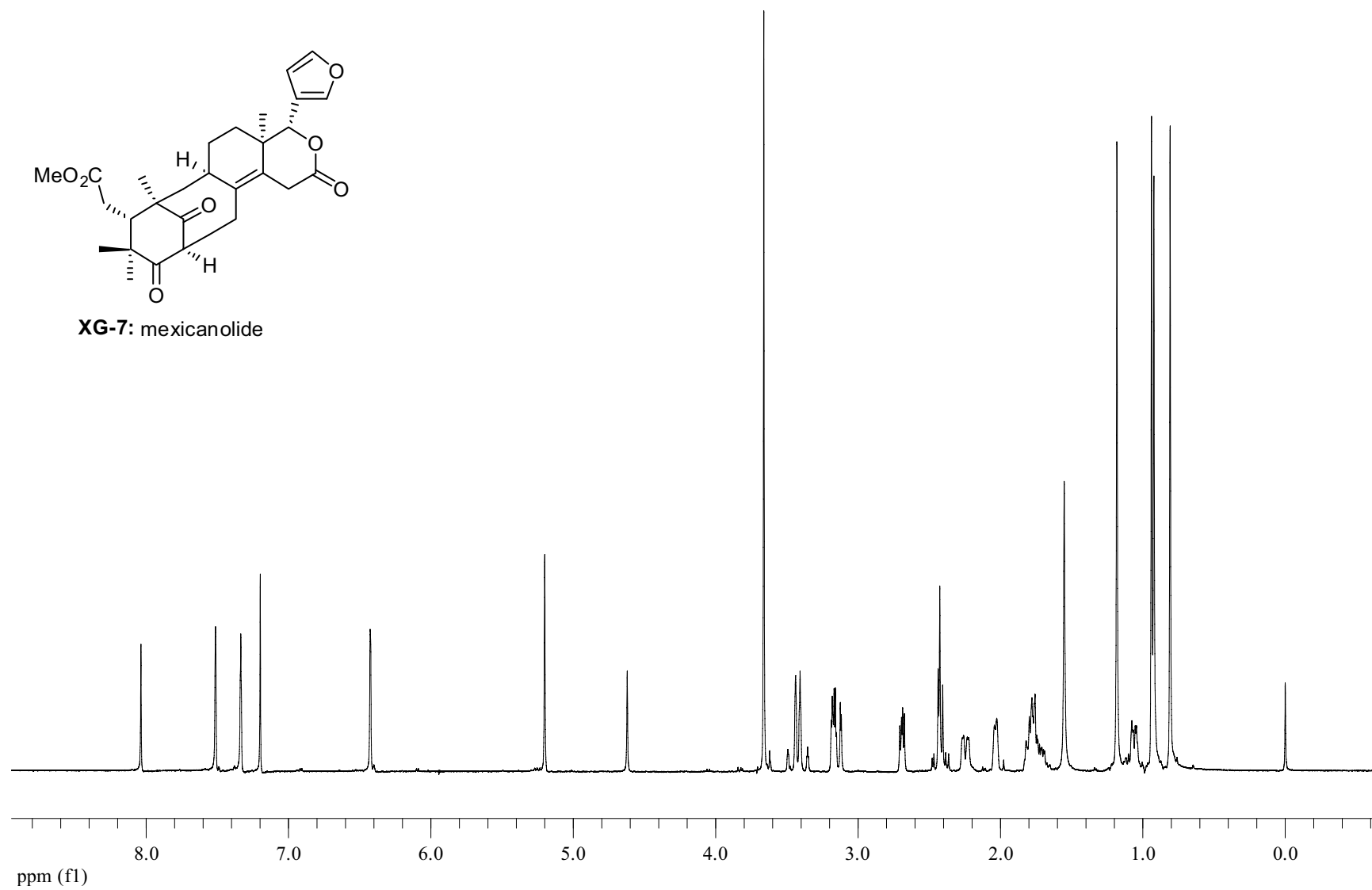
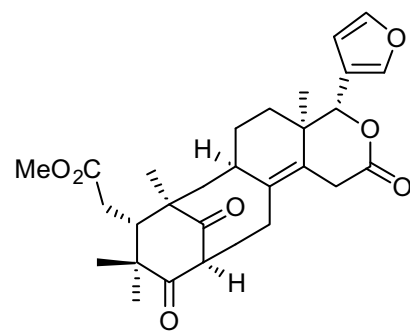


Figure S17. ^1H NMR spectrum of **XG-7** in CDCl_3 .



XG-7: mexicanolide

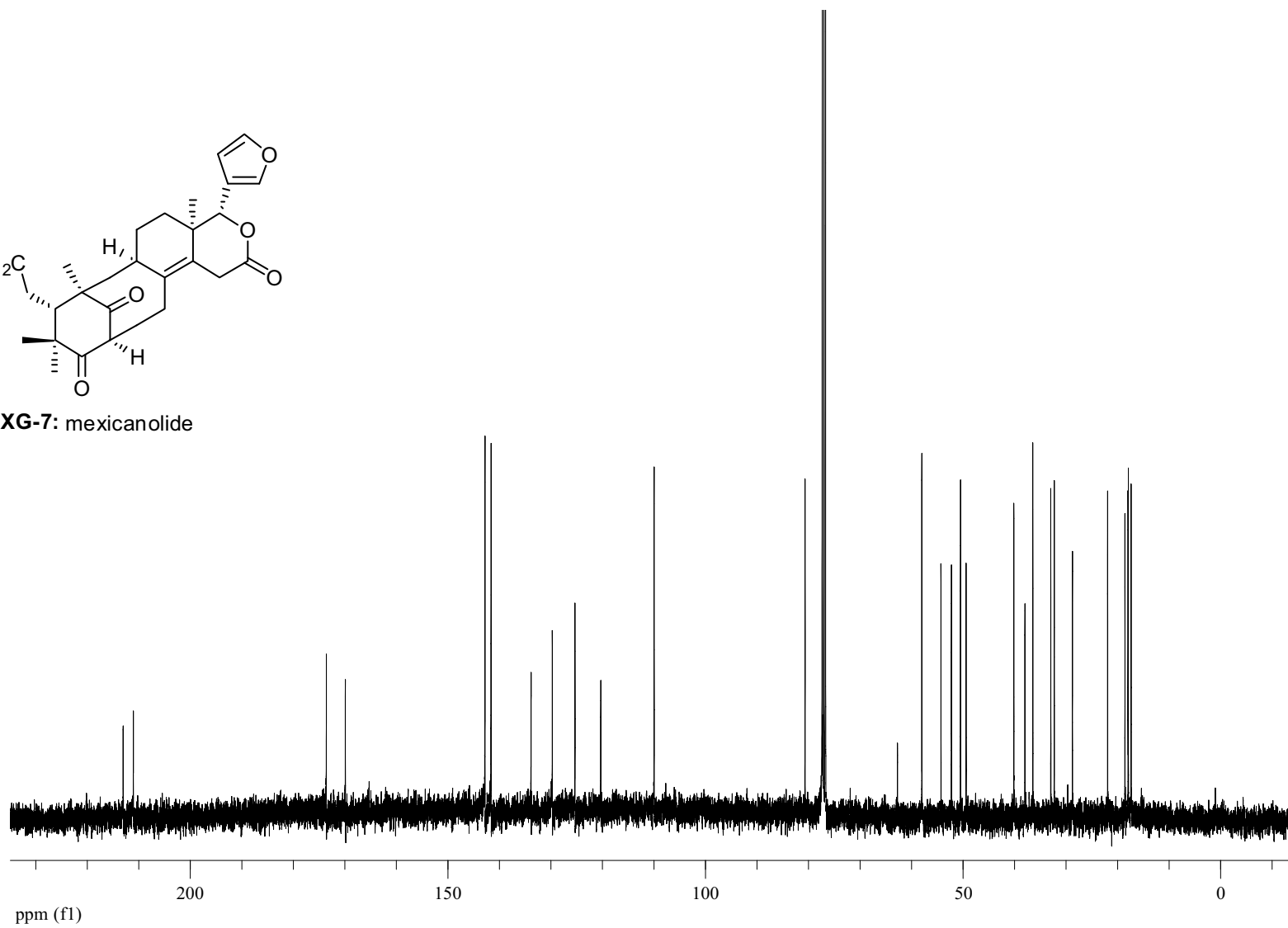


Figure S18. ^{13}C NMR spectrum of **XG-7** in CDCl_3 .

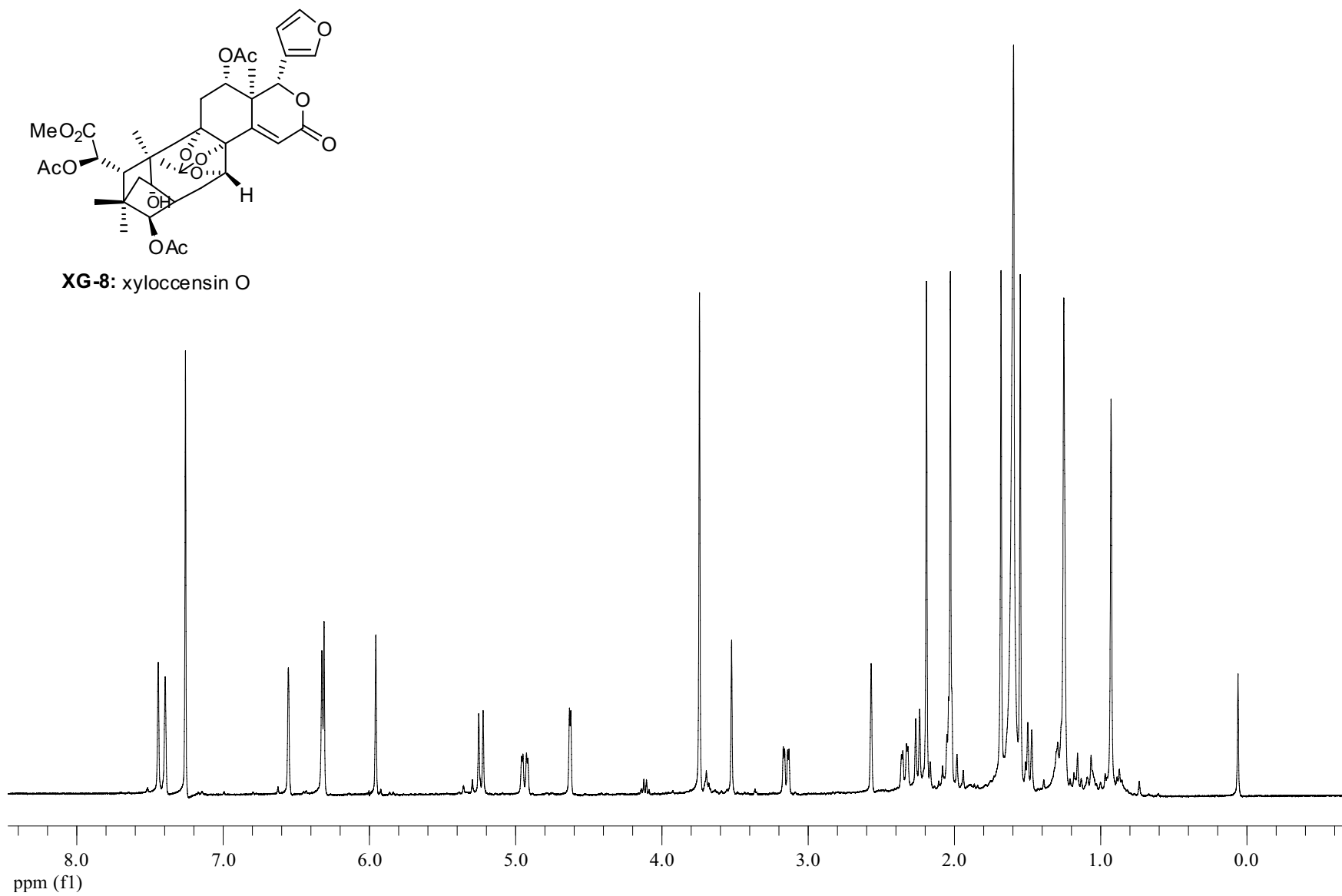
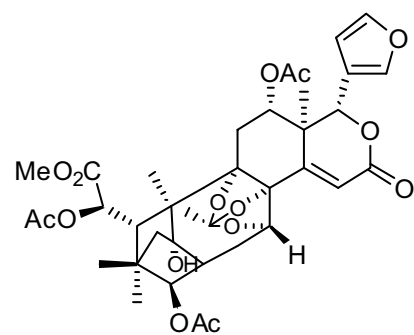


Figure S19. ¹H NMR spectrum of **XG-8** in CDCl₃.



XG-8: xylocensin O

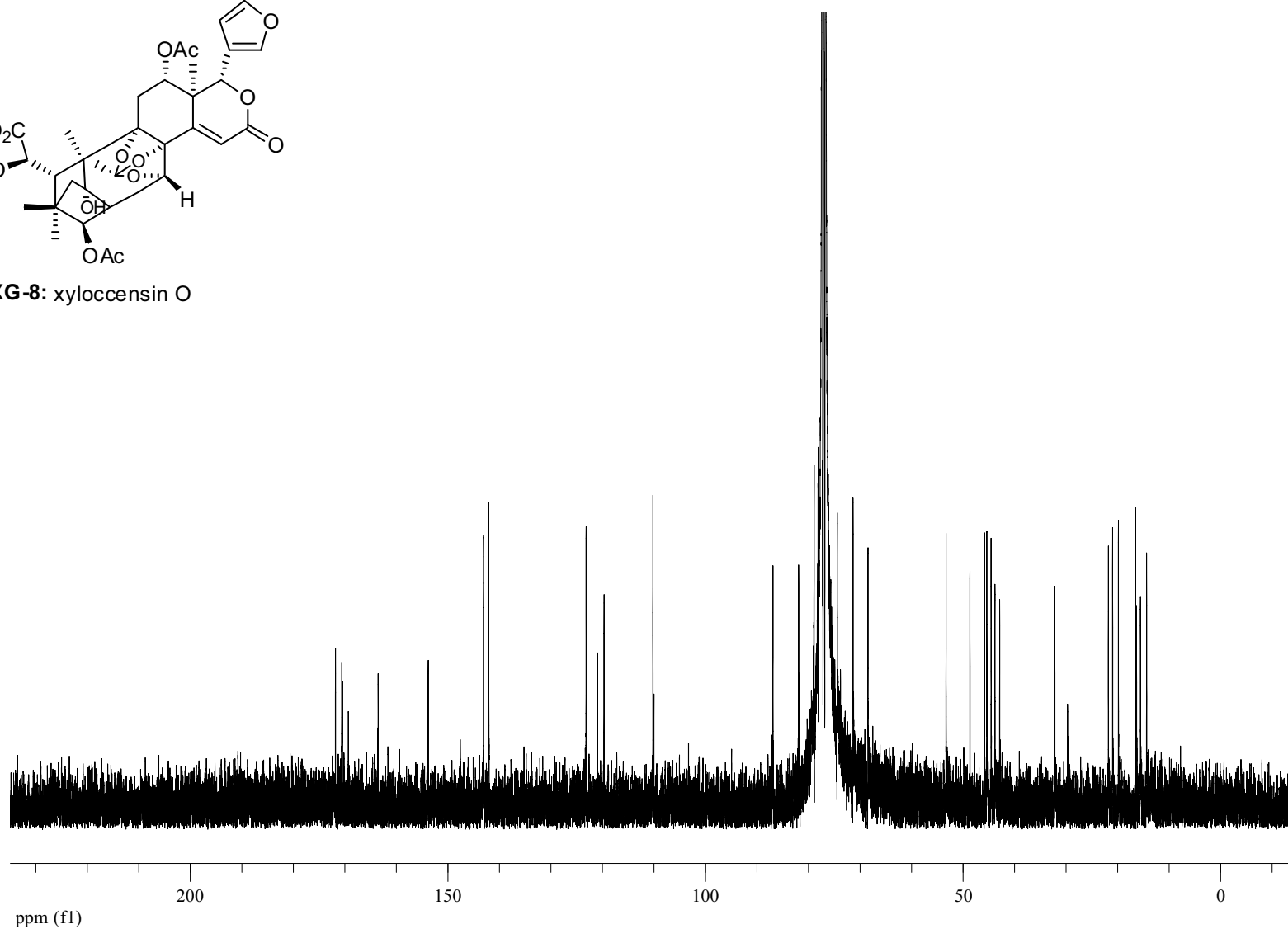


Figure S20 ^{13}C NMR spectrum of **XG-8** in CDCl_3 .