



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกและฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบทางเคมีจากเมล็ดชมพู่ป่า

โดย

ดร. ปริญช ชุมแก้ว

กันยายน 2553

สัญญาเลขที่ MRG5280148

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกและฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบทางเคมีจากเมล็ดชมพูป่า

โดย

ดร. ปริญ ชุมแก้ว
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุน
สนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการวิจัยตลอดโครงการวิจัย ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กำนัน จันทรพรหมมา นักวิจัยที่ปรึกษาในโครงการ ที่ให้คำปรึกษาจนงานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบคุณ นางสาวยุพเรศน์ พัลพัฒน์ นักวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ที่ช่วยเหลือการบันทึกข้อมูล NMR บางส่วน และสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่ช่วยเหลือการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือในการวิจัย

ดร.ปริญช ชุมแก้ว
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2553

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5280148

ชื่อโครงการ: การแยกและฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบทางเคมีจากเมล็ดชมพู่มะนาว

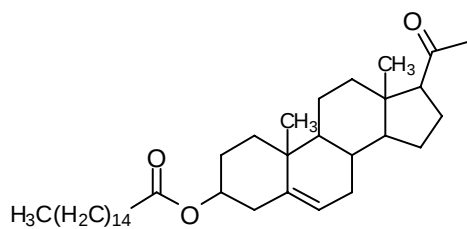
ชื่อนักวิจัย: ดร.ปริญญ ชุมแก้ว คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

Email address: parinuch.c@gmail.com, parinuch.c@psu.ac.th

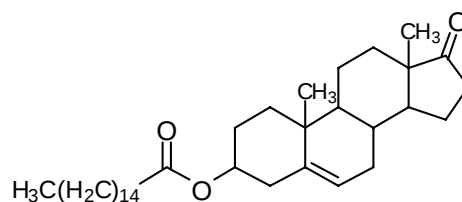
ระยะเวลาโครงการ: 16 มีนาคม 2552 ถึง 15 มีนาคม 2554

การศึกษาขององค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดชมพู่มะนาว สามารถแยกสารได้จำนวน 9 สาร โดยเป็นสารใหม่ 1 สาร ได้แก่ stigmast-5-ene-3 β ,17 α -diol (**SF4**) และสารที่ทราบโครงสร้างแล้วจำนวน 8 สาร ได้แก่ pregnenolone-3-O-palmitate (**SF1**), dehydroepiandrosterone-3-O-palmitate (**SF2**), 3 β -sitostanol (**SF3**), stigmast-5-ene-3 β -yl formate (**SF5**), stigmast-5-ene-3 β ,7 α -diol (**SF6**), stigmast-5-ene-3-one (**SF7**), 3 β -sitosterol (**SF8**) และ stigmast-5-ene-7 α -methoxy-3 β -ol (**SF9**) ซึ่งเป็นสารประเภท steroids และสารประกอบทุกตัว (**SF1-SF9**) นำไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดคือ มะเร็งปอด (NCI-H187) มะเร็งทรวงอก (BC) และมะเร็งในช่องปาก (KB) และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาเลเรีย (*Plasmodium falciparum*) พบว่าสารใหม่ **SF4** แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC₅₀ 6.63 μ g/mL (NCI-H187) 10.67 μ g/mL (KB) และ 14.86 μ g/mL (BC) และแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาเลเรีย ในระดับอ่อน โดยมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 25 μ g/mL นอกจากนี้แล้ว **SF5**, **SF6**, และ **SF9** ยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC₅₀ 9.45-13.89 μ g/mL โครงสร้างของสารใหม่วิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี โดยเฉพาะ UV, IR, 1D และ 2D NMR และ MS นอกจากนี้ยังยืนยันโครงสร้างของสารที่ทราบโครงสร้าง โดยการเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกตรัมกับข้อมูลที่มีรายงานแล้ว

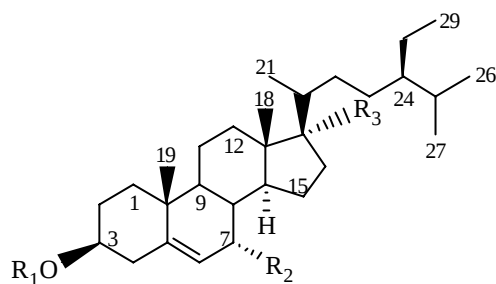
คำสำคัญ: *Syzygium siamense*; myrtaceae; steroidal; cytotoxicity



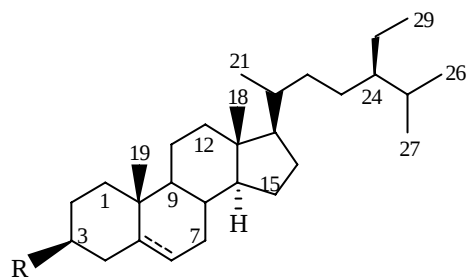
SF1



SF2



	R ₁	R ₂	R ₃
SF4	H	H	OH
SF5	CHO	H	H
SF6	H	OH	H
SF9	H	OMe	H



SF3	R = OH; C5-C6 saturated
SF7	R = O; C5-C6 unsaturated
SF8	R = OH; C5-C6 unsaturated

Abstract

Project code: MRG5280148

Project title: Isolation and Biological Activities of Chemical Constituents from the seeds of *Syzygium siamense*

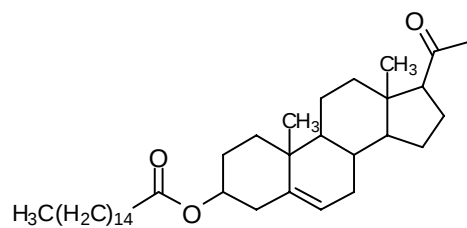
Investigator: Dr. Parinuch Chumkaew, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Suratthani Campus

Email address: parinuch.c@gmail.com, parinuch.c@psu.ac.th

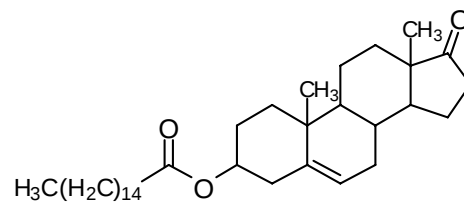
Project period: 16 March 2552 to 15 March 2554

Investigation of chemical constituents from the seeds of *Syzygium siamense* led to the isolation of nine compounds. A new compound, stigmast-5-ene-3 β ,17 α -diol (**SF4**), together with eight known compounds, pregnenolone-3-O-palmitate (**SF1**), dehydroepiandrosterone-3-O-palmitate (**SF2**), 3 β -sitostanol (**SF3**), stigmast-5-ene-3 β -yl formate (**SF5**), stigmast-5-ene-3 β ,7 α -diol (**SF6**), stigmast-5-ene-3-one (**SF7**), 3 β -sitosterol (**SF8**), and stigmast-5-ene-7 α -methoxy-3 β -ol (**SF9**). The isolated compounds (**SF1-SF9**) were evaluated for their cytotoxic activities against NCI-H187 (human small cell lung cancer), BC (human breast cancer), and KB (human oral epidermoid carcinoma cancer) cell lines and for antimalarial activity against *Plasmodium falciparum*. Compound **SF4** was found to be the moderate active against NCI-H187, KB and BC cancer cell lines with the IC₅₀ value of 6.63, 10.67 and 14.86 μ g/mL, respectively, and showed antimalarial activity with the IC₅₀ of 25 μ g/mL. In addition, compound **SF5**, **SF6**, and **SF9** were found to be cytotoxic activities against NCI-H187, KB and BC cancer cell in the range with the IC₅₀ 9.45-13.89 μ g/mL. Structure of new compound was characterized by spectroscopic methods including UV, IR, 1D- and 2D-NMR and MS whereas all known compounds were characterized by ¹H NMR and comparison of their physical and spectral data with reported values.

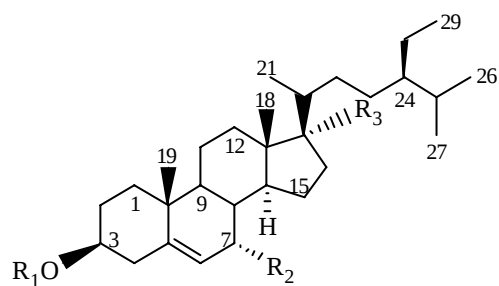
Keywords: *Syzygium siamense*; myrtaceae; steroidal; cytotoxicity



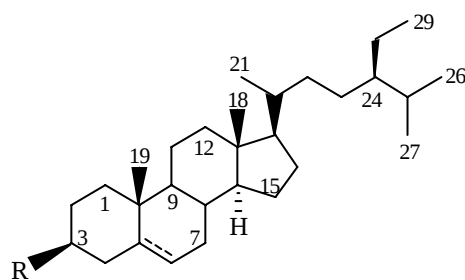
SF1



SF2



	R ₁	R ₂	R ₃
SF4	H	H	OH
SF5	CHO	H	H
SF6	H	OH	H
SF9	H	OMe	H



SF3	R = OH; C5-C6 saturated
SF7	R = O; C5-C6 unsaturated
SF8	R = OH; C5-C6 unsaturated

Executive Summary

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีบทบาทสำคัญในการศึกษาเพื่อค้นคว้าหายาการรักษาโรคหรือการประยุกต์ใช้ในด้านอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นการค้นหาลำดับประกอบทางเคมีจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาเพื่อให้เกิดการค้นพบตัวยาหรือสารประกอบใหม่ ๆ ในอนาคต

แพทย์แผนโบราณมีการใช้พันธุ์ไม้หลายชนิดเป็นสมุนไพรในการรักษาโรค ซึ่งบางชนิดก็จะมีผลข้างเคียงหรือมีพิษหากรับประทานเข้าไปในปริมาณมาก ๆ เนื่องจากมีการรับประทานทั้งส่วน เช่น มีการนำทั้ง กิ่งหรือราก ของพันธุ์ไม้มาต้มแล้วนำน้ำที่ได้จากการต้มมาดื่มซึ่งจะทำให้ร่างกายได้รับทั้งสารที่มีคุณและโทษในขณะเดียวกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาอย่างเป็นระบบเพื่อแยกและหาองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบนั้น ๆ อย่างจำเพาะเจาะจงเพื่อให้ได้ข้อมูลของสารที่ออกฤทธิ์และสามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างถูกต้องจึงจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากเมล็ดชมพูป่า

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดชมพูป่า สามารถแยกสารประกอบกลุ่ม steroids ได้จำนวน 9 สาร โดยเป็นสารใหม่ 1 สาร ได้แก่ stigmast-5-ene-3 β ,17 α -diol (**SF4**) และสารที่ทราบโครงสร้างแล้วจำนวน 8 สาร ได้แก่ pregnenolone-3-O-palmitate (**SF1**), dehydroepiandrosterone-3-O-palmitate (**SF2**), 3 β -sitostanol (**SF3**), stigmast-5-ene-3 β -yl formate (**SF5**), stigmast-5-ene-3 β ,7 α -diol (**SF6**), stigmast-5-ene-3-one (**SF7**), 3 β -sitosterol (**SF8**) และ stigmast-5-ene-7 α -methoxy-3 β -ol (**SF9**) และสารประกอบทุกตัว (**SF1-SF9**) นำไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดคือ มะเร็งปอด (NCI-H187) มะเร็งทรวงอก (BC) และมะเร็งในช่องปาก (KB) และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาเลเรีย (*Plasmodium falciparum*) พบว่าสารใหม่ **SF4** แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC₅₀ 6.63 μ g/mL (NCI-H187) 10.67 μ g/mL(KB) และ 14.86 μ g/mL(BC) และแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาเลเรีย ในระดับอ่อนโดยมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 25 μ g/mL นอกจากนี้แล้ว **SF5**, **SF6**, และ **SF9** ยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC₅₀ 9.45-13.89 μ g/mL

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบจากผลชมพูป่า (*Syzygium siamense*)

Compound	Cytotoxic activity (IC ₅₀ , $\mu\text{g/ml}$) ^a			Antimalarial IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) ^b
	KB	NCI-H187	BC	
SF1	>50	50.00	>50	>50
SF2	50.00	43.25	>50	>50
SF3	>50	26.45	>50	>50
SF4	10.67	6.63	14.86	25
SF5	22.89	10.67	17.63	>50
SF6	13.89	9.45	10.17	25
SF7	>50	>50	>50	>50
SF8	>50	20.43	>50	>50
SF9	12.25	10.33	10.76	25
Elliticine	0.338	0.440	-	-
Doxorubicin	0.142	0.036	0.817	-
Dihydroartemisinin	-	-	-	3.7 nM

^aResults are expressed as IC₅₀ values ($\mu\text{g/ml}$); activity: <5 strong, 5-20 moderate, 20-50 weak, >50 inactive. Key to cell lines used: KB = oral human epidermoid carcinoma; BC = human breast cancer cell; NCI-H187 = human small cell lung cancer; ^bAgainst *Plasmodium falciparum*

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ (ไทย)	ii
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	iv
Executive Summary	vi
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	3
ผลการทดลอง วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง	9
เอกสารอ้างอิง	12
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.	14
ภาคผนวก	15

บทนำ

พรรณไม้วงศ์ชมพู (Myrtaceae) เป็นพืชในเขตร้อนและกึ่งร้อน ทั่วโลกมีอยู่ประมาณ 100 สกุล 3,000 ชนิด (Heywood, 1985) สำหรับในประเทศไทยพบจำนวน 14 สกุล 115 ชนิด (Parnell and Chantaranothai, 2002) หลายชนิดมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ผลสามารถรับประทานได้ และบางชนิดนำมาใช้เป็นยาสมุนไพร เช่น หว้า (*Syzygium cumini*) ใช้ใบต้มน้ำแก้โรคบิด ผลแก้ท้องร่วง เนื้อไม้นำมาสร้างที่อยู่อาศัย หรือทำส่วนประกอบของเรือและเกวียน เป็นต้น

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของต้นชมพูป่า

ชมพูป่า *Syzygium siamense* เป็นไม้ต้นขนาดใหญ่สูง 10-15 เมตร เปลือกเรียบ บางครั้งแตกเป็นสะเก็ด สีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาลแดง ใบ เดี่ยวเรียงตรงข้าม แผ่นใบลักษณะรูปใบหอกหรือรูปใบหอกแกมขอบขนาน กว้าง 2.7–8 เซนติเมตร ยาว 9–27 เซนติเมตร ปลายใบแหลมถึงเรียวแหลม โคนใบมนเว้าเข้าเป็นรูปหัวใจ หรือบางครั้งสอบแคบเป็นรูปลิ้น เส้นแขนงใบ 7–14 คู่ ก้านใบยาว 0.3–0.8 เซนติเมตร ดอก สีแดงแกมม่วง ออกเป็นช่อกระจุกที่ปลายกิ่งหรือง่ามใบ ผลลักษณะกลม หรือรูปไข่ สีเขียวถึงสีม่วง ปลายผลเป็นกลีบ ซึ่งพัฒนามาจากกลีบเลี้ยง

ลักษณะทางนิเวศวิทยา

ชมพูป่ามีการกระจายพันธุ์ตามริมห้วย ในป่าดิบแล้งและป่าดิบชื้น ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ออกดอกช่วงเดือนธันวาคม–มีนาคม ผลแก่ช่วงเดือนพฤษภาคม–มิถุนายน

จากการตรวจสอบเอกสารทางวิชาการพบว่ามีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของพืชใน genus นี้ดังนี้

ในปี ค.ศ. 1995 Srivastava และคณะได้ทำการศึกษาสกัดทุกส่วนของพืชจาก *S. samrangense* พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ต้าน immunostimulant activity

ในปี ค.ศ. 2000 Djipa และคณะได้ทำการศึกษาสกัดของเปลือกไม้จาก *S. jambos* พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ต้าน Antimicrobial activity

ในปี ค.ศ. 2001 Muruganandem และคณะได้ทำการศึกษาสกัดของเปลือกไม้จาก *S. cumini* พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ต้านเกี่ยวกับการอักเสบ Anti-inflammatory activity

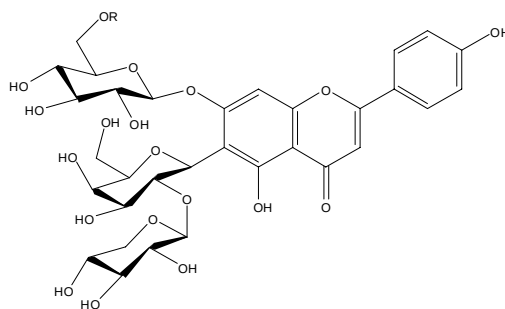
ในปี ค.ศ. 2002 Shafi และคณะได้ทำการศึกษาสกัดของน้ำมันจากใบ *S. cumini* และ *S. travancoricum* พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ต้าน Antibacterial activity

ในปี ค.ศ. 2004 Handrasekaran และคณะได้ทำการศึกษาสกัดของเมล็ดจาก *S. jambolanum* พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ต้าน Antibacterial and Antifungal activity

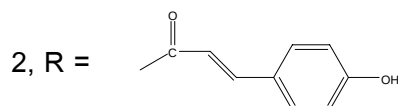
ในปี ค.ศ. 2005 Banerjee และคณะได้ทำการศึกษาสกัดของผลจาก *S. cumini* พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ต้าน Antioxidant activity

ในปี ค.ศ. 2005 Djoukeng และคณะได้ทำการศึกษาสกัดของใบจาก *S. guineense* พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ต้าน Antibacterial activity

ในปี ค.ศ. 2006 Mahmoud ได้ทำการศึกษาสวนสกัดของเมล็ดจาก *S. aromaticum* สามารถแยกสารประกอบ triglycosides ได้ 2 สารคือ



1, R = H



ในปี ค.ศ. 2007 Pena และคณะได้ทำการศึกษาสวนสกัดของใบจาก *S. jambos* พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ต้าน Antinociceptive activity

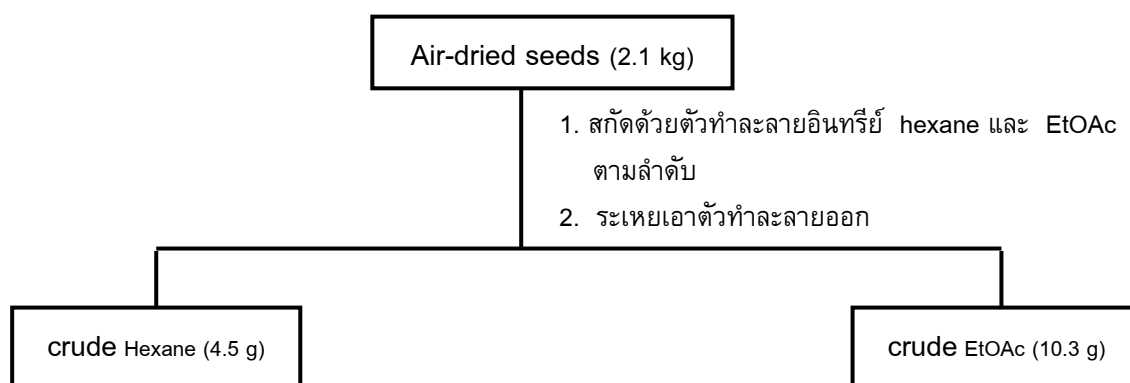
ในปี ค.ศ. 2008 Simirgiotis และคณะได้ทำการศึกษาสวนสกัดของผลจาก *S. samarngense* พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ต้าน Antioxidant activity

จากข้อมูลการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชใน genus นี้และจากการสืบค้นข้อมูลทางวิชาการ (SciFinder Scholar) ของต้นชมพูป่า *Syzygium siamense* พบว่าไม่มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเมล็ดชมพูป่า ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเมล็ดชมพูป่า

วิธีการทดลอง

การสกัดและการแยกสารให้บริสุทธิ์จากเมล็ดชมพูป่า

นำเมล็ดชมพูป่าแห้ง (2.1 kg) ที่บดพอแตก มาทำการสกัดด้วย hexane 2 ครั้งๆละ 5 วัน เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดหยาบ hexane (4.5 g) จากนั้นทำการสกัดซ้ำแต่ใช้ EtOAc สกัดแทน hexane เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดหยาบ EtOAc (10.3 g)



จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบ hexane (4.5 g) ไปแยกต่อด้วย CC (column chromatography) และใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ โดยมี hexane และ EtOAc เป็นตัวชะ (eluant) ในลักษณะ polarity-gradient ได้ 4 fractions (H1-H4)

Fraction H1 (1.65 g) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย 10% EtOAc-hexane ได้ 5 fraction (H1A-H1E) และเมื่อนำ fraction H1B (43.5 mg) ไปแยกต่อด้วยวิธี prep. TLC โดยใช้ 10% EtOAc-hexane เป็นตัวชะได้สาร **SF1** (10.5 mg) และเมื่อนำ fraction H1D (50.6 mg) ไปแยกต่อด้วยวิธี prep. TLC โดยใช้ 15% EtOAc-hexane เป็นตัวชะได้สาร **SF2** (12.3 g).

SF1: pregnenolone-3-O-palmitate

FT-IR (neat) $V_{\max}$ cm^{-1} 1730 (C=O stretching), 1640 (C=C stretching).

^1H NMR (CDCl_3) (500 MHz) 5.35 (*d*, $J = 5.0$ Hz, H-6), 4.59 (*m*, H-3), 2.26 (*t*, $J = 7.5$ Hz, H-2'), 2.12 (*s*, H-21), 1.25 (*brs*, H-3' to H-15') 0.88 (*t*, $J = 6.5$ Hz, H-16'), 0.99 (*s*, H-19), 0.61 (*s*, H-18).

^{13}C NMR (CDCl_3) (125 MHz) 36.9 (C-1), 31.9 (C-2), 73.5 (C-3), 38.0 (C-4), 139.7 (C-5), 122.2 (C-6), 27.7 (C-7), 31.8 (C-8), 49.8 (C-9), 38.7 (C-10), 22.6 (C-11), 36.5 (C-12), 43.9 (C-13), 56.8 (C-14), 24.4 (C-15), 21.0 (C-16), 63.6 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3

(C-19), 209.6 (C-20), 31.5 (C-21), 173.3 (C-1'), 34.7 (C-2'), 29.0-29.6 (C-3' to C-15'), 14.1 (C-16'). เป็นสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว

SF2: dehydroepiandrosterone-3-O-palmitate

¹H NMR (CDCl₃) (500 MHz) 5.36 (*d*, *J* = 5.1 Hz, H-6), 4.50 (*m*, H-3), 2.24 (*t*, *J* = 7.5 Hz, H-2'), 1.25 (*brs*, H-3' to H-15') 0.89 (*t*, *J* = 6.5 Hz, H-16'), 0.98 (*s*, H-19), 0.62 (*s*, H-18).

¹³C NMR (CDCl₃)(125 MHz) 36.8 (C-1), 32.0 (C-2), 72.5 (C-3), 38.2 (C-4), 140.2 (C-5), 121.8 (C-6), 27.5 (C-7), 32.0 (C-8), 49.8 (C-9), 38.7 (C-10), 22.6 (C-11), 36.5 (C-12), 43.9 (C-13), 56.6 (C-14), 24.4 (C-15), 37.9 (C-16), 206.2 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 172.3 (C-1'), 34.6 (C-2'), 29.0-29.6 (C-3' to C-15'), 14.1 (C-16'). เป็นสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว

Fraction H2 (0.9 g) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย 25% EtOAc-hexane ได้ 6 fraction (H2A-H2F) และเมื่อนำ fraction H2C (33.5 mg) ไปแยกต่อด้วยวิธี prep. TLC โดยใช้ 20% EtOAc-hexane เป็นตัวชะได้สาร **SF4** (6.7 mg).

SF4: stigmast-5-ene-3 β ,17 α -diol

¹H NMR (CDCl₃) (500 MHz) 5.33 (*d*, *J* = 5.5 Hz, H-6), 3.51 (*m*, H-3), 0.98 (*s*, H-19), 0.90 (*d*, *J* = 6.9 Hz, H-21), 0.85 (*d*, *J* = 6.5 Hz, H-27), 0.81 (*d*, *J* = 6.5 Hz, H-29), 0.79 (*d*, *J* = 6.5 Hz, H-26), 0.65 (*s*, H-18).

¹³C NMR (CDCl₃)(125 MHz) 37.2 (C-1), 31.8 (C-2), 71.8 (C-3), 39.7 (C-4), 140.6 (C-5), 121.7 (C-6), 31.5 (C-7), 31.8 (C-8), 50.0 (C-9), 42.2 (C-10), 21.0 (C-11), 36.4 (C-12), 42.1 (C-13), 56.7 (C-14), 24.2 (C-15), 26.0 (C-16), 82.5 (C-17), 14.2 (C-18), 19.3 (C-19), 36.1 (C-20), 18.7 (C-21), 33.9 (C-22), 28.2 (C-23), 45.7 (C-24), 29.0 (C-25), 19.0 (C-26), 19.8 (C-27), 23.0 (C-28), 11.9 (C-29). สารนี้ไม่เคยมีการรายงานว่ามีพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Fraction H3 (0.4 g) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย 25% EtOAc-hexane ได้ 5 fraction (H3A-H3E) และเมื่อนำ fraction H3B (40.5 mg) ไปแยกต่อด้วยวิธี prep. TLC โดยใช้ 20% EtOAc-hexane เป็นตัวชะได้สาร **SF3** (14.2 mg).

SF3: 3 β -sitostanol

¹ H NMR (CDCl ₃) (500 MHz)	3.53 (<i>m</i> , H-3), 0.99 (<i>s</i> , H-19), 0.91 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.9 Hz, H-21), 0.85 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.5 Hz, H-27), 0.81 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.5 Hz, H-29), 0.79 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.5 Hz, H-26), 0.68 (<i>s</i> , H-18).
¹³ C NMR (CDCl ₃)(125 MHz)	37.0 (C-1), 31.5 (C-2), 71.3 (C-3), 38.1 (C-4), 44.8 (C-5), 28.5 (C-6), 32.4 (C-7), 35.3 (C-8), 50.4 (C-9), 35.6 (C-10), 20.8 (C-11), 36.4 (C-12), 41.0 (C-13), 54.4 (C-14), 24.3 (C-15), 26.0 (C-16), 55.6 (C-17), 11.8 (C-18), 19.0 (C-19), 36.2 (C-20), 18.9 (C-21), 34.0 (C-22), 28.2 (C-23), 45.9 (C-24), 29.2 (C-25), 19.0 (C-26), 19.9 (C-27), 23.1 (C-28), 11.9 (C-29). เป็นสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว

นำส่วนสกัดหยาบ EtOAc (10.3 g) ไปแยกด้วย CC (column chromatography) และใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ โดยมี hexane และ EtOAc เป็นตัวชะ (eluant) ในลักษณะ polarity-gradient ได้ 6 fractions (E1-E6)

Fraction E2 (1.1 g) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย 10% EtOAc-hexane ได้ 5 fraction (E2A-E2E) และเมื่อนำ fraction E2C (102.3 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย 15% EtOAc-hexane ได้สาร **SF6** (9.2 mg).

SF6: stigmast-5-ene-3 β ,7 α -diol

¹ H NMR (CDCl ₃) (500 MHz)	8.01 (<i>s</i> , H-1'), 5.37 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5.0 Hz, H-6), 4.72 (<i>m</i> , H-3), 1.01 (<i>s</i> , H-19), 0.91 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.5 Hz, H-21), 0.85 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.0 Hz, H-27), 0.82 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.0 Hz, H-29), 0.79 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.0 Hz, H-26), 0.65 (<i>s</i> , H-18).
¹³ C NMR (CDCl ₃)(125 MHz)	37.6 (C-1), 27.8 (C-2), 73.9 (C-3), 39.3 (C-4), 139.2 (C-5), 122.9 (C-6), 31.5 (C-7), 31.4 (C-8), 49.6 (C-9), 39.6 (C-10), 21.0 (C-11), 36.5 (C-12), 42.2 (C-13), 56.6 (C-14), 24.2 (C-15), 26.0 (C-16), 55.9 (C-17), 11.8 (C-18), 19.2

(C-19), 36.1 (C-20), 18.7 (C-21), 33.8 (C-22), 27.7 (C-23), 45.7 (C-24), 29.0 (C-25), 19.0 (C-26), 19.8 (C-27), 23.0 (C-28), 11.9 (C-29), 160.6 (C-1'). เป็นสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว

Fraction E3 (1.8 g) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย 25% EtOAc-hexane ได้ 7 fraction (E3A-E3G) และเมื่อนำ fraction E3B (140.5 mg) นำไปแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย 30% EtOAc-hexane ได้สาร **SF5** (11.3 mg) และเมื่อนำ fraction E3D (40.5 mg) ไปแยกต่อด้วยวิธี prep. TLC โดยใช้ 25% EtOAc-hexane เป็นตัวชะได้ และ **SF7** (8.7 mg).

SF5: stigmast-5-ene-3 β -yl formate

¹H NMR (CDCl₃) (500 MHz) 8.01 (s, H-1'), 5.37 (d, *J* = 5.0 Hz, H-6), 4.72 (m, H-3), 1.01 (s, H-19), 0.91 (d, *J* = 6.5 Hz, H-21), 0.85 (d, *J* = 7.0 Hz, H-27), 0.82 (d, *J* = 7.0 Hz, H-29), 0.79 (d, *J* = 7.0 Hz, H-26), 0.65 (s, H-18).

¹³C NMR (CDCl₃)(125 MHz) 37.6 (C-1), 27.8 (C-2), 73.9 (C-3), 39.3 (C-4), 139.2 (C-5), 122.9 (C-6), 31.5 (C-7), 31.4 (C-8), 49.6 (C-9), 39.6 (C-10), 21.0 (C-11), 36.5 (C-12), 42.2 (C-13), 56.6 (C-14), 24.2 (C-15), 26.0 (C-16), 55.9 (C-17), 11.8 (C-18), 19.2 (C-19), 36.1 (C-20), 18.7 (C-21), 33.8 (C-22), 27.7 (C-23), 45.7 (C-24), 29.0 (C-25), 19.0 (C-26), 19.8 (C-27), 23.0 (C-28), 11.9 (C-29), 160.6 (C-1'). สารนี้ไม่เคยมีการรายงานว่าพบในธรรมชาติแต่มีการรายงานการสังเคราะห์มาก่อน

SF7: stigmast-5-ene-3-one

¹H NMR (CDCl₃) (500 MHz) 5.34 (d, *J* = 5.0 Hz, H-6), 0.99 (s, H-19), 0.92 (d, *J* = 7.0 Hz, H-21), 0.87 (d, *J* = 6.5 Hz, H-27), 0.81 (d, *J* = 6.5 Hz, H-29), 0.84 (d, *J* = 6.5 Hz, H-26), 0.68 (s, H-18).

¹³C NMR (CDCl₃)(125 MHz) 37.1 (C-1), 32.0 (C-2), 199.2 (C-3), 39.2 (C-4), 140.6 (C-5), 122.0 (C-6), 31.8 (C-7), 35.6 (C-8), 53.8 (C-9), 38.6 (C-10), 21.0 (C-11), 39.6 (C-12), 42.4 (C-13), 56.8 (C-14), 24.2 (C-15), 28.2 (C-16), 55.9 (C-17), 11.9 (C-18), 17.4 (C-19), 36.4 (C-20), 18.7 (C-21), 35.2 (C-22), 25.7 (C-23),

45.8 (C-24), 29.2 (C-25), 19.0 (C-26), 19.8 (C-27), 23.2 (C-28), 12.2 (C-29). เป็นสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว

Fraction E4 (1.2 g) นำไปแยกด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย 35% EtOAc-hexane ได้ 4 fraction (E4A-E4D) และเมื่อนำ fraction E4B (32.5 mg) ไปแยกด้วยวิธี prep. TLC โดยใช้ 25% EtOAc-hexane เป็นตัวชะได้สาร **SF8** (13.5 mg).

SF8: 3 β -sitosterol

¹H NMR (CDCl₃) (500 MHz) 5.32 (*d*, *J* = 5.5 Hz, H-6), 3.52 (*m*, H-3), 0.99 (*s*, H-19), 0.91 (*d*, *J* = 6.9 Hz, H-21), 0.85 (*d*, *J* = 6.5 Hz, H-27), 0.81 (*d*, *J* = 6.5 Hz, H-29), 0.79 (*d*, *J* = 6.5 Hz, H-26), 0.68 (*s*, H-18).

¹³C NMR (CDCl₃) (125 MHz) 37.2 (C-1), 31.1 (C-2), 71.6 (C-3), 39.3 (C-4), 140.2 (C-5), 121.4 (C-6), 31.5 (C-7), 31.8 (C-8), 50.0 (C-9), 38.3 (C-10), 21.2 (C-11), 36.4 (C-12), 42.4 (C-13), 56.6 (C-14), 24.2 (C-15), 26.0 (C-16), 55.6 (C-17), 11.8 (C-18), 19.0 (C-19), 36.2 (C-20), 18.9 (C-21), 34.0 (C-22), 28.2 (C-23), 45.9 (C-24), 29.2 (C-25), 19.0 (C-26), 19.9 (C-27), 23.1 (C-28), 11.9 (C-29). เป็นสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว

Fraction E5 (1.1 g) นำไปแยกด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย 25% EtOAc-hexane ได้ 5 fraction (E4A-E4E) และเมื่อนำ fraction E4C (22.5 mg) ไปแยกด้วยวิธี prep. TLC โดยใช้ 25% EtOAc-hexane เป็นตัวชะได้สาร **SF9** (7.7 mg).

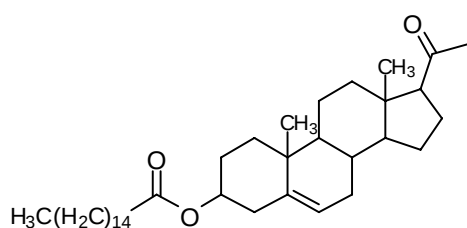
SF9: stigmast-5-ene-7 α -methoxy-3 β -ol

¹H NMR (CDCl₃) (500 MHz) 5.34 (*d*, *J* = 5.0 Hz, H-6), 3.82 (*t*, *J* = 4.8 Hz, H-7), 3.52 (*m*, H-3), 3.28 (*s*, OMe), 0.99 (*s*, H-19), 0.93 (*d*, *J* = 7.0 Hz, H-21), 0.86 (*d*, *J* = 6.5 Hz, H-27), 0.81 (*d*, *J* = 6.5 Hz, H-29), 0.82 (*d*, *J* = 6.5 Hz, H-26), 0.66 (*s*, H-18).

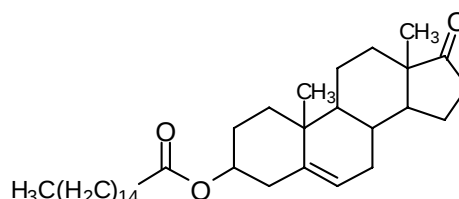
^{13}C NMR (CDCl_3)(125 MHz) 36.7 (C-1), 31.5 (C-2), 71.4 (C-3), 39.8 (C-4), 140.6 (C-5), 121.6 (C-6), 73.9 (C-7), 37.2 (C-8), 48.5 (C-9), 42.1 (C-10), 20.8 (C-11), 36.2 (C-12), 42.4 (C-13), 56.5 (C-14), 24.3 (C-15), 26.2 (C-16), 55.6 (C-17), 11.5 (C-18), 18.3 (C-19), 36.2 (C-20), 18.8 (C-21), 33.8 (C-22), 28.2 (C-23), 45.7 (C-24), 29.2 (C-25), 19.0 (C-26), 19.7 (C-27), 23.1 (C-28), 11.9 (C-29). เป็นสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว

ผลการทดลอง วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง

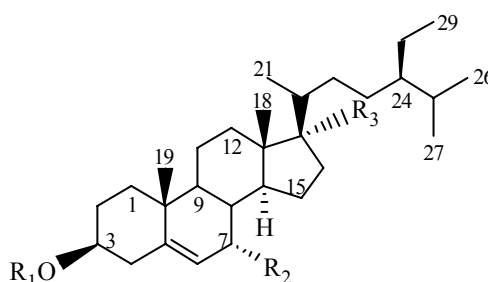
การศึกษาการแยกองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเมล็ดชมพูป่า เป็นงานวิจัยพื้นฐานที่มีวัตถุประสงค์หลัก คือ ค้นหาองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืช จากการดำเนินงานวิจัยที่ผ่านมาสามารถแยกสารและวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบจากส่วนสกัดเฮกเซนและส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตได้สารทั้งหมดจำนวน 9 สาร ได้แก่ (SF1-SF9) ซึ่งในจำนวนนี้เป็นสารใหม่จำนวน 1 สาร คือ **SF4** และได้ส่งสารบริสุทธิ์ไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดง



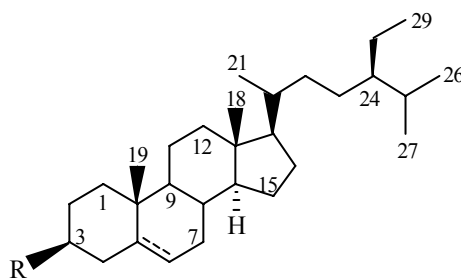
SF1



SF2



	R ₁	R ₂	R ₃
SF4	H	H	OH
SF5	CHO	H	H
SF6	H	OH	H
SF9	H	OMe	H

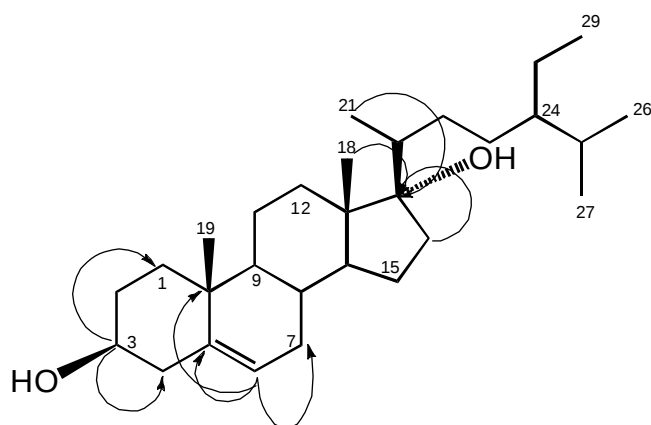


SF3 R = OH; C5-C6 saturated

SF7 R = O; C5-C6 unsaturated

SF8 R = OH; C5-C6 unsaturated

สเตอรอยด์ **SF4** เป็นสารใหม่โดยให้ชื่อว่า stigmast-5-ene-3 β ,17 α -diol จากข้อมูลของ HRFABMS (m/z 430.3809 [M]⁺) ได้สูตรโมเลกุลของ **SF4** เป็น C₂₉H₅₀O₂ สารตัวนี้แสดงสัญญาณ ¹³C NMR จำนวน 29 คาร์บอนซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารกลุ่มสเตอรอยด์ ประกอบด้วยตำแหน่งของคาร์บอนที่ต่อเชื่อมกับออกซิเจน 2 ตำแหน่งปรากฏสัญญาณที่ δ_c 71.8 (C-3) และ δ_c 82.5 (C-17) และตำแหน่งพันธะคู่คาร์บอนแบบ trisubstituted ปรากฏสัญญาณที่ δ_c 140.6 (C-5) และ δ_c 121.7 (C-6) ส่วนสัญญาณ ¹H NMR ประกอบด้วยสัญญาณของหมู่ methyl 6 สัญญาณ 0.98 (s, H-19), 0.90 (d, J = 6.9 Hz, H-21), 0.85 (d, J = 6.5 Hz, H-27), 0.81 (d, J = 6.5 Hz, H-29), 0.79 (d, J = 6.5 Hz, H-26), 0.65 (s, H-18) เพิ่มเติมที่ δ_H 5.33 (d, J = 5.5 Hz, H-6) และ δ_H 3.51 (m, H-3) และสามารถยืนยันตำแหน่งของโปรตอน H-3 ด้วยข้อมูลของ COSY ที่แสดงสัญญาณคู่ควบของโปรตอน H-3 กับ H-4 ที่ δ_H 2.31 และ 2.26 และสัญญาณคู่ควบของโปรตอน H-3 กับ H-2 ปรากฏที่ δ_H 1.86 จากข้อมูล HMBC ของ **SF4** พบว่า H-3 (δ_H 3.51) แสดงความสัมพันธ์กับ C-1 (δ_c 37.2) และ C-4 (δ_c 39.7) และ H-6 (δ_H 5.33) แสดงความสัมพันธ์กับ C-5 (δ_c 140.6), C-7 (δ_c 31.5) และ C-10 (δ_c 42.2) จากข้อมูลเพิ่มเติมของ HMBC พบว่า H-16, H-18 และ H-21 แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนชนิด quaternary δ_c 82.5 ซึ่งแสดงว่าหมู่ hydroxyl นั้นเกาะอยู่ที่ตำแหน่ง C-17 ส่วนสเตอริโอเคมีของหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่ C-17 ยืนยันจากข้อมูล NOESY พบว่าเมื่อฉายแสงไปยัง H-18 β มีผลทำให้สัญญาณของโปรตอน H-8 และ H-20 เพิ่มขึ้น สรุปได้ว่า H-8 และ H-20 มีสเตอริโอเคมีแบบชี้ขึ้น ซึ่งเมื่อ H-20 มีสเตอริโอเคมีแบบชี้ขึ้นก็มีผลทำให้ C-20 มีสเตอริโอเคมีแบบชี้ขึ้น และจากข้อมูลนี้ทำให้หมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่ C-17 จึงมีสเตอริโอเคมีแบบชี้ลง ดังแสดง



แสดงข้อมูล HMBC ของ **SF4**

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (**SF1-SF9**) นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาเลเรีย (*Plasmodium falciparum*) และทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดคือ มะเร็งปอด (NCI-H187) มะเร็งทรวงอก (BC) และมะเร็งในช่องปาก (KB) ซึ่งในการทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1

จากตารางที่ 1 พบว่า สารใหม่ **SF4** แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} 6.63 $\mu\text{g/mL}$ (NCI-H187) 10.67 $\mu\text{g/mL}$ (KB) และ 14.86 $\mu\text{g/mL}$ (BC) และแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาเลเรีย (*Plasmodium falciparum*) ในระดับอ่อน โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 25 $\mu\text{g/mL}$ นอกจากนี้แล้ว **SF5**, **SF6**, และ **SF9** ยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} 9.45-13.89 $\mu\text{g/mL}$

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบจากผลชมพูป่า (*Syzygium siamense*)

Compound	Cytotoxic activity (IC ₅₀ , $\mu\text{g/ml}$) ^a			Antimalarial IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) ^b
	KB	NCI-H187	BC	
SF1	>50	50.00	>50	>50
SF2	50.00	43.25	>50	>50
SF3	>50	26.45	>50	>50
SF4	10.67	6.63	14.86	25
SF5	22.89	10.67	17.63	>50
SF6	13.89	9.45	10.17	25
SF7	>50	>50	>50	>50
SF8	>50	20.43	>50	>50
SF9	12.25	10.33	10.76	25
Elliticine	0.338	0.440	-	-
Doxorubicin	0.142	0.036	0.817	-
Dihydroartemisinin	-	-	-	3.7 nM

^aResults are expressed as IC₅₀ values ($\mu\text{g/ml}$); activity: <5 strong, 5-20 moderate, 20-50 weak, >50 inactive. Key to cell lines used: KB = oral human epidermoid carcinoma; BC = human breast cancer cell; NCI-H187 = human small cell lung cancer; ^bAgainst *Plasmodium falciparum*

เอกสารอ้างอิง

1. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. พรรณไม้ดัดแปลงของประเทศไทย. กรุงเทพฯ : บริษัท ไดมอนด์ พรินต์ติ้ง จำกัด, 2542.
2. Heywood, V. H. **1985**. "Flowering plants of the wood" Croom Helm, England.
3. Parnell, J. and Chantaranothai, P. **2002**. "Flora of Thailand" Prachachon Co. Ltd., Bangkok. vol. 7, part 4, pp. 778-914.
4. Nassar, M. I. **2006**. "Flavonoid triglycosides from the seeds of *Syzygium aromaticum*" *Carbohydrate Research*, 341, 1, 160-163.
5. Avila-Pena, D.; Pena, N.; Quintero, L. and Suarez-Roca, H. **2007**. "Antinociceptive activity of *Syzygium jambos* leaves extract on rats" *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 2, 380-385.
- 6 Djoukeng, J.D.; Abou-Mansour, E.; Tabacchi, R.; Tapondjou, A.L.; Bouda, H. and

- Lontsi, D. **2005**. "Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae)" *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 1-3, 283-286.
7. Banerjee, A.; Dasgupta, N. and De, B. **2005**. "In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini*" *Food Chemistry*, 90, 4, 727-733.
 8. Chandrasekaran, M. and Venkatesalu, V. **2004**. "Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds" *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 1, 105-108.
 9. Shafi, P. M.; Rosamma, M. K.; Jamil, K. and Reddy, P. S. **2002**. "Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils" *Fitoterapia*, 73,5, 414-416.
 10. Muruganandan, S.; Srinivasan, K.; Chandra, S.; Tandan, S. K.; Lal, J. and Raviprakash, V. **2001**. "Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark" *Fitoterapia*, 72, 4, 369-375.
 11. Djipa, C. D.; Delmee, M. and Quetin-Leclercq, J. **2000**. "Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae)" *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 1-2, 307-313.
 12. Nair, A. G. R.; Krishnan, S.; Ravikrishna, C. and Madhusudanan, K. P. **1999**. "New and rare flavonol glycosides from leaves of *Syzygium samarangense*" *Fitoterapia*, 70, 2, 148-151.
 13. Tanaka, T.; Orii, Y.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I. and Kouno, I. **1996**. "Syzyginins A and B, two ellagitannins from *Syzygium aromaticum*" *Phytochemistry*, 43, 6, 1345-1348.
 14. Srivastava, R.; Shaw, A. K. and Kulshreshtha, D. K. **1995**. "Triterpenoids and chalcone from *Syzygium samarangense*" *Phytochemistry*, 38, 3, 687-689.
 15. Djoukeng, J. D.; Mansour, E. A.; Tabacchi, R.; Tapondjou, A. L.; Bouda, H. and Lontsi, D. **2005**. "Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense*" *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 283-286.
 16. Nassar, M. I. **2006**. "Flavonoid triglycosides from the seeds of *Syzygium aromaticum*" *Carbohydrate Research*, 341, 160-163.
 17. Pena, D. A.; Pena, N.; Quintero, L. and Roca, H. S. **2007**. "Antinociceptive activity of *Syzygium jambos* leaves extract on rats" *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 380-385.
 18. Simirgiotis, M. J.; Adachi, S.; To, S.; Yang, H.; Reynertson, K. A.; Basile, M. J.; Gil, R. R.; Weinstein, I. B. and Kennelly, E. **2008**. "Cytotoxic chalcones and antioxidants

- from the fruits of *Syzygium samarangense*" *Food Chemistry*, 107, 813-819.
16. Boonsri, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., Kanjana-opas, A., Chantrapromma, K. 2006 Antibacterial and cytotoxic xanthenes from the roots of *Cratoxylum formosum*. *Phytochemistry* 67, 723-727.
17. Xin, Z.Q., Lu, J.J., Ke, C.Q., Hu, C.X., Lin, L.P., Ye, Y. 2008. Constituents from *Clausena excavata*. *Chem. Pharm. Bull.* 56, 827-830.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

1. **Chumkaew P**, Kato S, Chantrapromma K. New cytotoxic steroids from the fruits of *Syzygium siamense*. *J Asian Nat Prod Res.* 2010; 12(5): 424-428.

ภาคผนวก

This article was downloaded by: [Chumkaew, Parinuch]

On: 21 May 2010

Access details: Access Details: [subscription number 922440071]

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Journal of Asian Natural Products Research

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713454007>

New cytotoxic steroids from the fruits of *Syzygium siamense*

Parinuch Chumkaew ^a; Shigeru Kato ^b; Kan Chantrapromma ^c

^a Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Suratthani, Thailand ^b

Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Seikei University, Musashino-city, Tokyo,

Japan ^c Research Unit of Natural Products Utilization, Walailak University, Thasala, Nakhon Si Thammarat, Thailand

Online publication date: 20 May 2010

To cite this Article Chumkaew, Parinuch, Kato, Shigeru and Chantrapromma, Kan (2010) 'New cytotoxic steroids from the fruits of *Syzygium siamense*', Journal of Asian Natural Products Research, 12: 5, 424 — 428

To link to this Article: DOI: 10.1080/10286021003762028

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/10286021003762028>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

NOTE

New cytotoxic steroids from the fruits of *Syzygium siamense*

Parinuch Chumkaew^{a*}, Shigeru Kato^b and Kan Chantrapromma^c

^aFaculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Suratthani Campus, Suratthani 84000, Thailand; ^bDepartment of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Seikei University, 3-3-1 Kichijouji-kitamachi, Musashino-city, Tokyo 180-8633, Japan

^cResearch Unit of Natural Products Utilization, Walailak University, Thasala, Nakhon Si Thammarat 80160, Thailand

(Received 10 January 2010; final version received 8 March 2010)

A new sterol, stigmast-5-ene-3 β ,17 α -diol (**1**), together with six known compounds, stigmast-5-ene-3 β -yl formate (**2**), stigmast-5-ene-3 β ,7 α -diol (**3**), stigmast-5-ene-7 α -methoxy-3 β -ol (**4**), stigmast-5-ene-3-one (**5**), 3 β -sitostanol (**6**), and 3 β -sitosterol (**7**), was isolated from the fruits of *Syzygium siamense*, of which compound **2** is reported for the first time from a natural source. Their structures were elucidated by spectroscopic methods. The isolated compounds (**1**–**7**) were evaluated for their cytotoxic activities against human oral epidermoid carcinoma cancer (KB), human breast cancer (BC), and human small cell lung cancer (NCI-H187) cell lines.

Keywords: *Syzygium siamense*; Myrtaceae; steroidal; cytotoxicity

1. Introduction

Syzygium siamense belongs to the family Myrtaceae, which is distributed in several Southeast Asian countries. This plant has been used by the local Thai people in folk medicine for its diuretic, odontalgic, stomachic, and stimulant properties [1]. Volatile oils from the species of *Syzygium* exhibit antibacterial activity [2,3]. Previous work on this genus reported their anti-inflammatory, antihypertensive, anticonvulsant, and antimicrobial activities [4–8], but until today, no phytochemical studies have been carried out to identify the active metabolites. As a part of our search for bioactive metabolites from Thai medicinal plants [9–11], we investigated the hexane and ethyl acetate soluble extracts from the fruits of *S. siamense* and

it was found to exhibit significant cytotoxic activity when evaluated against a panel of human cell lines.

Fractionation of the hexane and ethyl acetate extracts from the fruits of *S. siamense* led to the isolation of a new naturally occurring stigmast-5-ene-3 β ,17 α -diol (**1**), along with six known sterols, stigmast-5-ene-3 β -yl formate (**2**), stigmast-5-ene-3 β ,7 α -diol (**3**), stigmast-5-ene-7 α -methoxy-3 β -ol (**4**), stigmast-5-ene-3-one (**5**), 3 β -sitostanol (**6**), and 3 β -sitosterol (**7**) (Figure 1). The structures of the known compounds were elucidated by comparison of their physical and spectral data with the literature values [12–15]. The obtained sterol derivatives, **1**–**7**, were evaluated biologically against human cancer cell lines.

*Corresponding author. Email: parinuchc@hotmail.com

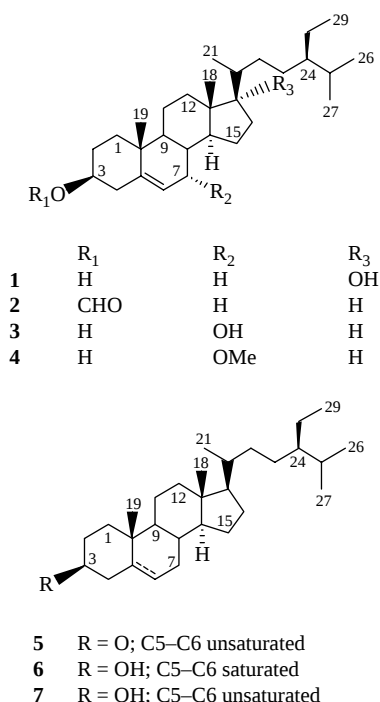


Figure 1. Structures of compounds **1–7** from *S. siamense*.

2. Results and discussion

Sterol (**1**) was isolated as a colorless gum, and the molecular formula $C_{29}H_{50}O_2$ was established by HR-FAB-MS at m/z 430.3809 $[M]^+$. Its IR spectrum showed the presence of hydroxyl (3450 cm^{-1}) and trisubstituted olefinic groups (845 and 1670 cm^{-1}). The steroid nature of this compound was deduced from a combination of ^{13}C NMR and DEPT-135 spectra, which showed that the compound had 29 carbon atoms, including 4 quaternary carbons, 8 methines, 11 methylenes, and 6 methyl groups. One oxygenated methine carbon resonated at δ 71.8 (C-3), one oxygenated quaternary carbon at δ 82.5 (C-17), and two trisubstituted double bond carbon atoms C-5 and C-6 at δ 140.6 and 121.7, respectively. The ^1H NMR spectrum (Table 1) indicated the presence of characteristic steroidal methyl signals; two methyl singlets resonated at δ 0.65 (Me-18) and 0.98 (Me-19), and four

methyl doublets at δ 0.79 ($J = 6.5\text{ Hz}$, Me-26), 0.81 ($J = 6.5\text{ Hz}$, Me-29), 0.85 ($J = 6.9\text{ Hz}$, Me-27), and 0.90 ($J = 6.9\text{ Hz}$, Me-21). The characteristic H-6 of steroid 5,6-enes was noticed at δ 5.33 as a doublet ($J = 5.5\text{ Hz}$). The presence of a β oxygenation was indicated by a broad methine multiplet at δ 3.51. In the COSY spectrum, the broad multiplet signal for H-3 showed coupling to H-4 protons resonating at δ 2.31 and 2.26, which were in turn coupled to H-2 appearing at δ 1.86. The results from the HMBC experiment indicated long-range correlations from H-3 to C-1 and C-4, from H-6 to C-5, C-7, and C-10. In addition to C-5 at δ 140.6, C-10 at δ 42.2, and C-13 at δ 42.1, compound **1** possessed a fourth quaternary carbon at δ 82.5, suggesting an oxygen-bearing carbon. To be in accordance with the HMBC correlations between this carbon (δ 82.5) and H-16, H-18, and H-21, the hydroxyl group had to be located on C-17. Consequently, the chemical shift of C-18 was shifted downfield from δ 11.8 to 14.2, when compared to the sitosterol [16,17]. The NOESY correlations between Me-18 β , H-8, and H-20 suggested the β -orientation for C-20 and, consequently, the α -orientation for the hydroxyl group, features normally exhibited by a steroid skeleton. Assignments of proton and carbon signals for the side chain of **1** were strongly supported by the literature data [18–20]. On the basis of the above evidence, the structure of **1** was characterized as stigmast-5-ene-3 β ,17 α -diol.

Sterol (**2**) was determined as stigmast-5-ene-3 β -yl formate, and its structure was established by mass spectrometry, 1D and 2D NMR techniques and by comparison with those available in the literature [12]. This compound is reported for the first time from a natural source.

The isolated compounds **1–7** were evaluated for their cytotoxic activities against human oral epidermoid carcinoma cancer (KB), human breast cancer (BC), and human small cell lung cancer

Table 1. ¹H NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) spectral data for **1**^a and **2**^a.

Position	1		2	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	37.2	1.13 (m) 1.84 (m)	37.6	1.11 (m) 1.86 (m)
2	31.8	1.56 (m) 1.86 (m)	27.8	1.53 (m) 1.94 (m)
3	71.8	3.51 (m)	73.9	4.72 (m)
4	39.7	2.26 (m) 2.31 (m)	39.3	2.24 (m) 2.31 (m)
5	140.6		139.2	
6	121.7	5.33 (d, 5.5)	122.9	5.37 (d, 5.0)
7	31.5	1.53 (m) 2.01 (t, 3.5)	31.5	1.54 (m) 2.02 (t, 3.5)
8	31.8	1.65 (m)	31.4	1.67 (m)
9	50.0	1.26 (m)	49.6	1.21 (m)
10	42.2		39.6	
11	21.0	1.51 (m) 1.62 (m)	21.0	1.51 (m) 1.61 (m)
12	36.4	1.67 (m)	36.5	1.65 (m)
13	42.1		42.2	
14	56.7	1.66 (m)	56.6	1.66 (m)
15	24.2	1.15 (m) 1.75 (m)	24.2	1.18 (m) 1.76 (m)
16	26.0	1.46 (m) 2.23 (m)	26.0	1.40 (m) 2.22 (m)
17	82.5		55.9	
18	14.2	0.65 (s)	11.8	0.65 (s)
19	19.3	0.98 (s)	19.2	1.01 (s)
20	36.1	1.59 (m)	36.1	1.58 (m)
21	18.7	0.90 (d, 6.9)	18.7	0.91 (d, 6.5)
22	33.9	1.02 (m) 2.02 (m)	33.8	1.04 (m) 1.99 (m)
23	28.2	1.04 (m) 1.35 (m)	27.7	1.06 (m) 1.39 (m)
24	45.7	0.95 (m)	45.7	0.96 (m)
25	29.0	1.68 (m)	29.0	1.67 (m)
26	19.0	0.79 (d, 6.5)	19.0	0.79 (d, 7.0)
27	19.8	0.85 (d, 6.9)	19.8	0.85 (d, 7.0)
28	23.0	1.16 (m) 1.32 (m)	23.0	1.15 (m) 1.30 (m)
29	11.9	0.81 (d, 6.5)	11.9	0.82 (d, 7.0)
OCHO	—	—	160.6	8.01 (s)

Notes: ^aTMS was used as an internal standard, and chemical shifts (δ) are presented in parts per million. *J* values are given in Hz in parentheses.

(NCI-H187) cell lines as shown in Table 2. The sterol derivatives **1**, **3**, and **4** showed moderate inhibitory effect against KB, BC, and NCI-H187 cells with IC₅₀ values from 6.63 to 14.86 μg/ml. Compound **2** exhibited moderate cytotoxicity against BC and

NCI-H187 cell lines with IC₅₀ values of 17.63 and 10.67 μg/ml, respectively, whereas compounds **6** and **7** were found to be exhibiting selective cytotoxic activity against the NCI-H187 cell line. It should be noted that the hydroxyl group

Table 2. Cytotoxic activities of compounds 1–7.

Sample	Cell lines ^a		
	KB	BC	NCI-H187
1	10.67	14.86	6.63
2	22.89	17.63	10.67
3	13.89	10.17	9.45
4	12.25	10.76	10.33
5	> 50	> 50	> 50
6	> 50	> 50	26.45
7	> 50	> 50	20.43

Note: ^aResults are expressed as IC₅₀ values (μg/ml); activity: <5, strong; 5–20, moderate; 20–50, weak; > 50, inactive.

at C-7/C-17 is important for cancer activity in a steroid skeleton, and it seemed to have increased the cytotoxicity.

3. Experimental

3.1 General experimental procedures

Specific rotations were determined with an Autopol II automatic polarimeter. UV spectra were measured with a UV-160A spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan), and IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 1750 FTIR spectrophotometer. The ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ using a 500 MHz Varian Unity INOVA spectrometer. Chemical shifts are recorded in parts per million (δ) in CDCl₃. Mass spectra (EI or FAB) were recorded on a Finnigan-MAT 95 XL spectrometer. Column chromatography was carried out on silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany).

3.2 Plant material

The fruits of *S. siamense* were collected in Khian Sa, Suratthani, Thailand, in March 2008. A voucher specimen (No. WU-0198) has been deposited in the herbarium of Walailak University, Thasala, Nakhon Si Thammarat, Thailand.

3.3 Extraction and isolation

The dried fruits of *S. siamense* (2.1 kg) were extracted with hexane and EtOAc at room temperature. The hexane extract (4.5 g) was subjected to column chromatography over silica gel and eluted with a gradient of hexane–EtOAc to afford four fractions (H1–H4). Fraction H2 (0.9 g) was purified by column chromatography using EtOAc–hexane (1:4) to give compound **1** (6.7 mg). Fraction H3 (0.4 g) was subjected to silica gel column chromatography eluted with EtOAc–hexane (1:4) to yield compound **6** (14.2 mg). The EtOAc extract (10.3 g) was chromatographed on a silica gel column and eluted with a gradient system of hexane–EtOAc to afford six fractions (E1–E6). Compounds **2** (11.3 mg) and **5** (8.7 mg) were derived from fraction E3 (1.8 g) by column chromatography using EtOAc–hexane (1:4) as the eluent. Fraction E2 (1.1 g) eluted with EtOAc–hexane (1:9) yielded compound **3** (9.2 mg) after purification by column chromatography. Fraction E5 (0.8 g) was purified by column chromatography using EtOAc–hexane (1:4) to give compound **4** (7.7 mg). Fraction E4 (1.2 g) was separated on a silica gel column eluting with EtOAc–hexane (1:3) to afford compound **7** (13.5 mg).

3.3.1 Compound (1)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{28}$ –35.2 (*c* = 0.010, CHCl₃); IR (CHCl₃) $\nu_{\max}$: 3450, 1670, 845 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR spectral data, see Table 1; HR-FAB-MS *m/z*: 430.3809 [M]⁺ (calcd for C₂₉H₅₀O₂, 430.3811).

3.3.2 Compound (2)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{28}$ –23.7 (*c* = 0.040, CHCl₃); IR (CHCl₃) $\nu_{\max}$: 1734, 1643, 840 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR spectral data, see Table 1; HR-FAB-MS *m/z*: 442.3818 [M]⁺ (calcd for C₃₀H₅₀O₂, 442.3811).

3.4 Cytotoxicity assay

The cytotoxicity assay employed the colorimetric method [21]. Ellipticine, the reference substance, exhibited activity toward KB, BC, and NCI-H187 cell lines, with the IC₅₀ range of 0.3–0.6 µg/ml (Table 2).

Acknowledgements

We are grateful to the Thailand Research Fund, the Commission on Higher Education (Grant No. MRG5280148), and Prince of Songkla University for the financial support. We would like to extend our appreciation to Assistant Professor Dr Surat Laphookhieo, School of Science, Mae Fah Luang University for giving valuable suggestions and to Dr Sergey Novikov, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University for English editing.

References

- [1] J. Parnell and P. Chantaranothai, *Flora of Thailand*, Vol. 7 (Prachachon Co. Ltd., Bangkok, 2002), p. 778.
- [2] M.I. Nassar, *Carbohydr. Res.* **341**, 160 (2006).
- [3] P.M. Shafi, M.K. Rosamma, K. Jamil, and P.S. Reddy, *Fitoterapia* **73**, 414 (2002).
- [4] D. Avila-Pena, N. Pena, L. Quintero, and H. Suarez-Roca, *J. Ethnopharmacol.* **112**, 380 (2007).
- [5] A.K.N. Chaudhuri, S. Pal, A. Gomes, and A. Bhattacharya, *Phytother. Res.* **4**, 5 (1990).
- [6] U.C. Bhargava, A.B. Westfall, and D.J. Siehr, *J. Pharm. Sci.* **57**, 1728 (1968).
- [7] T.C.M. De-Lima, P.A. Klueger, P.A. Pereira, W.P. Macedo-Neto, G.S. Morato, and M.R. Farias, *Phytother. Res.* **12**, 488 (1998).
- [8] D.C. Djadjo, M. Delmee, and J. Quetin-Leclercq, *J. Ethnopharmacol.* **71**, 307 (2000).
- [9] P. Chumkaew, C. Karalai, C. Ponglimanont, and K. Chantrapromma, *J. Nat. Prod.* **66**, 540 (2003).
- [10] P. Chumkaew, S. Kato, and K. Chantrapromma, *Chem. Pharm. Bull.* **53**, 95 (2005).
- [11] P. Chumkaew, S. Kato, and K. Chantrapromma, *Chem. Pharm. Bull.* **54**, 1344 (2006).
- [12] V. Srivastava, A.S. Negi, J.K. Kumar, and M.M. Gupta, *Steroids* **71**, 632 (2006).
- [13] Y.P. Jin, X.N. Wei, and Y.P. Shi, *Helv. Chim. Acta.* **90**, 776 (2007).
- [14] G.R. Pettit, A. Numata, G.M. Cragg, D.L. Herald, T. Takada, C. Iwamoto, R. Riesen, J.M. Schmidt, D.L. Doubek, and A. Goswami, *J. Nat. Prod.* **63**, 72 (2000).
- [15] J. Heyer, B. Parker, D. Becker, J. Ruffino, A. Fordyce, M.D. Witt, M. Bedard, and R. Grebenok, *Phytochemistry* **65**, 2967 (2004).
- [16] C. Funel, F. Berrue, C. Roussakis, R.F. Rodriguez, and P. Amade, *J. Nat. Prod.* **67**, 491 (2004).
- [17] Y. Li, M. Ishibashi, M. Satake, X. Chen, Y. Oshima, and Y. Ohizumi, *J. Nat. Prod.* **66**, 696 (2003).
- [18] S. Hoet, L. Pieters, G.G. Muccioli, J.L. Habib-Jiwan, F.R. Opperdoes, and J. Quetin-Leclercq, *J. Nat. Prod.* **70**, 1360 (2007).
- [19] G. Santafe, V. Paz, J. Rodriguez, and C. Jimenez, *J. Nat. Prod.* **65**, 1161 (2002).
- [20] G. Topcu, G. Kokdil, and S.M. Yalic, *J. Nat. Prod.* **63**, 888 (2000).
- [21] P. Skeham, R. Storaeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, and M.R. Boyd, *J. Natl Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990).