



สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกัลปังหา, *Junceella* sp. และฟองน้ำ *Xestospongia* sp.
จากทะเลบริเวณจังหวัดกระบี่

โดย

พชร เพ็ชรประดับ

พฤศจิกายน 2553

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย เรื่อง สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกัลปังหา, *Junceella* sp.
และฟองน้ำ *Xestospongia* sp. จากทะเลบริเวณจังหวัดกระบี่

พชร เพ็ชรประดับ

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการอุดหนุนจาก โครงการพัฒนาการทำงานของอาจารย์รุ่นใหม่ โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ) รหัส MRG5080328 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ Prof. Dr. Victor Wray, Structural Biology Research Group, Helmholtz Center for Infection Research, Braunschweig, สำหรับความช่วยเหลือด้านการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ และ Prof. Dr. Peter Proksch, Institute of Pharmaceutical Biology and Biotechnology, HHU Duesseldorf ประเทศเยอรมันนี อ.ดร. คณิศ สุวรรณบริรักษ์ ภาควิชา เภสัชเวชและเภสัชพันธุศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำด้านเทคนิคตลอดการทำวิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้าที่
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
ระเบียบวิธีวิจัย	6
ผลการวิจัย	11
- สารทุติยภูมิจากกัลปังหา <i>Junceella</i> sp.	11
- สารทุติยภูมิจากฟองน้ำ <i>Xestospongia</i> sp.	36
สรุปผลการศึกษา	47
ภาคผนวก	50

สารบัญรูป

รูปที่		หน้าที่
รูปที่ 1	กัลปังหาสีขาว <i>Junceella</i> sp.	3
รูปที่ 2	ฟองน้ำ <i>Xestospongia</i> sp.	5
รูปที่ 3	^{13}C NMR (บน) ¹ และ DEPT (ล่าง) ของสาร Junceellin (J36)	11
รูปที่ 4	^1H NMR spectrum ของสาร Junceellin (J36)	12
รูปที่ 5	ชิ้นส่วนโมเลกุลที่เกิดจากการวิเคราะห์ H,H COSY cross peaks	12
รูปที่ 6	H,H COSY spectrum ของสาร J36 แสดงความสัมพันธ์บริเวณ cyclodecane และ cyclohexane	13
รูปที่ 7	การเข้าคู่กันของหมู่เมทิลฟังก์ชัน และ ester carbonyl	15
รูปที่ 8	HMBC spectrum ของสาร J36 แสดงความสัมพันธ์ภายในวงแหวน cyclodecane และ บางส่วนของ cyclohexane	16
รูปที่ 9	HMBC spectrum ของสาร J36 แสดงความสัมพันธ์ภายในวงแหวน 5-membered lactone ring และ บางส่วนของ cyclohexane	17
รูปที่ 10	HMBC spectrum แสดงการเชื่อมต่อหมู่ อะซีเตต กับ main nucleus ของสาร Junceellin (J36)	18
รูปที่ 11	^1H NMR spectrum ของสาร praelolide (J37)	22
รูปที่ 12	^{13}C NMR spectrum ของสาร praelolide (J37)	23
รูปที่ 13	^1H NMR ของสาร J13 (CDCl_3)	24
รูปที่ 14	^{13}C NMR (ล่าง) และ DEPT 135 (ขยาย) spectrum ของสาร J13	24
รูปที่ 15	H,H COSY spectrum ของสาร J13	25
รูปที่ 16	HMBC spectrum ของสาร J13 แสดง cross peaks ที่สำคัญ	26
รูปที่ 17	^1H NMR (บน) และ ^{13}C NMR (ล่าง) ของสาร J50	28
รูปที่ 18	H,H COSY spectrum ของสาร J50	29
รูปที่ 19	HMBC spectrum ของสาร J50	30
รูปที่ 20	^1H NMR (บน), ^{13}C NMR (ล่าง) ของสาร J51	32
รูปที่ 21	H,H COSY correlation ของสาร J51 แสดงการสร้างชิ้นส่วนกลีเซอรอล และสายโซ่ตรง	33
รูปที่ 22	HMBC แสดง cross peaks ที่สำคัญของสาร J51	34
รูปที่ 23	^1H NMR (บน) และ ^{13}C NMR (ล่าง) ของสาร aureol (T4) (CDCl_3)	37
รูปที่ 24	H,H COSY spectrum ของสาร aureol (T4)	38
รูปที่ 25	HMBC spectrum ของสาร aureol (T4)	39
รูปที่ 26	^1H NMR (บน), ^{13}C NMR (ล่าง) และ DEPT (กลาง) spectrum ของสาร T12 (CDCl_3)	42
รูปที่ 27	HMBC cross peaks ที่สำคัญของวงแหวนของสาร T12	43
รูปที่ 28	COSY spectrum ของสาร T12	44
รูปที่ 29	HMBC cross peaks ที่สำคัญในสายโซ่ตรงของสาร T12	45

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้าที่
ตารางที่ 1 ข้อมูล NMR ของ สาร Junceellin (J36) (CDCl ₃)	19
ตารางที่ 2 ข้อมูล NMR ของ สาร praelolide (J37) (CDCl ₃)	21
ตารางที่ 3 ข้อมูล NMR ของสาร J13 (CDCl ₃)	27
ตารางที่ 4 ข้อมูล NMR ของสาร J50 (CDCl ₃)	31
ตารางที่ 5 ข้อมูล NMR ของสาร J51 (CDCl ₃)	35
ตารางที่ 6 NMR data ของสาร aureol (T4) (CDCl ₃)	41
ตารางที่ 7 ข้อมูล NMR ของสาร T12 (CDCl ₃)	46

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่	หน้าที่
แผนภาพที่ 1 การสกัดแยกสารทุติยภูมิจาก กัลปังหา <i>Junceella</i> sp.	9
แผนภาพที่ 2 การสกัดแยกสารทุติยภูมิจาก ฟองน้ำ <i>Xestospongia</i> sp	10

สารบัญภาคผนวก

รูปผนวกที่	หน้าที่
รูปผนวกที่ 1 ¹ H NMR ของสาร junceellin (J36) (CDCl ₃)	51
รูปผนวกที่ 2 ¹³ C NMR ของสาร junceellin (J36) (CDCl ₃)	56
รูปผนวกที่ 3 DEPT 135 spectrum ของสาร junceellin (J36) (CDCl ₃)	57
รูปผนวกที่ 4 H,H COSY spectrum ของสาร junceellin (J36)	58
รูปผนวกที่ 5 HMQC spectrum ของสาร junceellin (J36)	59
รูปผนวกที่ 6 HMBC spectrum ของสาร junceellin (J36)	60
รูปผนวกที่ 7 HRMS spectrum ของสาร junceellin (J36)	61
รูปผนวกที่ 8 ¹ H NMR ของสาร praelolide (J37) (CDCl ₃)	62
รูปผนวกที่ 9 ¹³ C NMR (บน) และ DEPT 135 (ล่าง) ของสาร praelolide (J37)	63
รูปผนวกที่ 10 HMQC spectrum ของสาร praelolide (J37)	64
รูปผนวกที่ 11 H,H COSY spectrum ของสาร praelolide (J37)	65
รูปผนวกที่ 12 HMBC spectrum ของสาร praelolide (J37)	66
รูปผนวกที่ 13 HRMS spectrum ของสาร praelolide (J37)	67

รูปผนวกที่ 14	^1H NMR (บน), ^{13}C NMR (ล่าง) และ DEPT 135 spectra ของสาร J13 (CDCl_3)	68
รูปผนวกที่ 15	H,H COSY (บน) และ HMBC ของ สาร J13	69
รูปผนวกที่ 16	HRMS spectrum ของสาร J13	70
รูปผนวกที่ 17	^1H NMR spectrum ของสาร J50 (CDCl_3)	71
รูปผนวกที่ 18	^{13}C NMR และ DEPT 135 spectrum ของสาร J50 (CDCl_3)	71
รูปผนวกที่ 19	HMBC spectrum ของสาร J50	72
รูปผนวกที่ 20	HRMS spectrum ของสาร J50	73
รูปผนวกที่ 21	^1H NMR (บน) และ ^{13}C NMR (ล่าง) และ DEPT 135 spectra ส่วนขยายของสาร J51(CDCl_3)	74
รูปผนวกที่ 22	H,H COSY spectrum ของสาร J51	75
รูปผนวกที่ 23	HMBC spectrum ของสาร J51	76
รูปผนวกที่ 24	HRMS spectrum ของสาร J51	77
รูปผนวกที่ 25	^1H NMR spectrum ของสาร aureole (CDCl_3)	78
รูปผนวกที่ 26	^{13}C NMR และ DEPT 135 spectrum (CDCl_3) ของสาร aureol	78
รูปผนวกที่ 27	H,H COSY spectrum ของสาร aureole	79
รูปผนวกที่ 28	HMBC spectra ของสาร aureole	80
รูปผนวกที่ 29	LRMS spectrum ของสาร aureol	81
รูปผนวกที่ 30	^1H , ^{13}C NMR และ DEPT spectra ของสาร T12 (CDCl_3)	82
รูปผนวกที่ 31	H,H COSY (บน) และ HMBC spectra (ล่าง) ของสาร T12	83
รูปผนวกที่ 32	Maas spectrum (low resolution) ของสาร T12	84

บทคัดย่อ

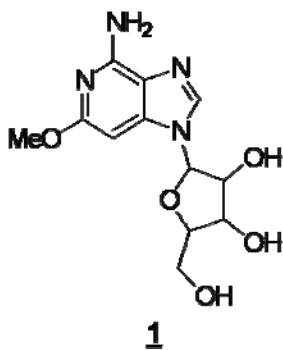
แยกสารกลุ่ม briarane diterpenes ได้สองชนิด คือ junceellin (J36), praelolide (J31) และอนุพันธ์ ester ของ decanoic acid ได้สามชนิดได้แก่ hexadecanoic acid hexadecyl ester (J13), octadecanoic acid 2-hydroxy-3-octadecanoyloxy-propyl ester (J50), hexadecanoic acid 3-hexadecyloxy-2-hydroxy-propyl ester (J51) จากกัลปังหาสีขาว *Junceella* sp. และสามารถแยกสารออกฤทธิ์จากฟองน้ำ *Xestospongia* sp. ได้สองชนิด คือ สารกลุ่ม sesterterpene hydroquinone คือสาร aureol (T4) และสารกลุ่ม sesterterpene-S-Oxide ชนิดใหม่ได้หนึ่งชนิด คือ 3-(4,8,12-trimethyl-trideca-3,7,11-trienyl)-thiophene1-oxide (T14) ทั้งสองสารมีฤทธิ์ต้านการเจริญ vero cells โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.45 and 2.82 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ T14 ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ วัณโรค (*Mycrobacterium tuberculosis*) โดยมีค่า MIC เท่ากับ 25 $\mu\text{g/mL}$

ABSTRACT

Two briarane diterpenes including junceellin (J36), praelolide (J37) and three decanoic acid derivatives including, hexadecanoic acid hexadecyl ester (J13), Octadecanoic acid 2-hydroxy-3-octadecanoyloxy-propyl ester (J50), hexadecanoic acid 3-hexadecyloxy-2-hydroxy-propyl ester (J51) were isolated from the Andaman Sea white gorgonian, *Junceella* sp. Biological active compounds, aureol (T4) and 3-(4,8,12-trimethyl-trideca-3,7,11-trienyl)-thiophene1-oxide (T14), from *Xestospongia* sp was also investigated. Both compounds showed cytotoxic activity against vero cells at the IC_{50} s 11.45 and 2.82 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Compound T14 also showed anti-tuberculosis (*Mycrobacterium tuberculosis*) with MIC at 25 $\mu\text{g/mL}$.

บทนำ

สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งผลิตโดยสิ่งมีชีวิตในทะเล เรียกว่า ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (marine natural products) โดยมีรายงานการค้นพบสารนิวคลีโอไซด์ spongosine (**1**) เป็นครั้งแรกจากฟองน้ำ *Cryptotethya crypta* (Bergmann and Freaney, 1951) หลังจากนั้นมีการวิจัยและค้นพบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลทั่วโลกและพบสารใหม่เป็นประจำโดยเฉพาะ ในปี ค.ศ. 2009 พบสารใหม่มากกว่า 1,000 ชนิด (Blunt *et al.*, 2009) โดยสารเหล่านี้มีโครงสร้างเคมีที่ซับซ้อนและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงเหมาะสำหรับพัฒนาใช้ทางการแพทย์ จากการรวบรวมการค้นพบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลของนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน ซึ่งรายงานใน natural products report ตั้งแต่ปี 1990 จนถึงปัจจุบัน (Blunt *et al.*, 2009) พบว่าฟองน้ำมีรายงานการค้นพบสาร secondary metabolite มากที่สุด รองลงมาเป็นกลุ่ม Cnidarians โดยเฉพาะกัลปังหา (Gorgonians) มีรายงานพบการสร้างสาร secondary metabolites ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดลองหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบอีกว่า สารเหล่านี้มีหน้าที่สำคัญต่อระบบนิเวศในทะเล เช่น ป้องกันการลงเกาะของตัวอ่อนสัตว์ ใช้สำหรับล่าเหยื่อและป้องกันตัวเอง จึงเป็นที่สนใจศึกษาของนักนิเวศวิทยาทางทะเล (Paul, 1992)



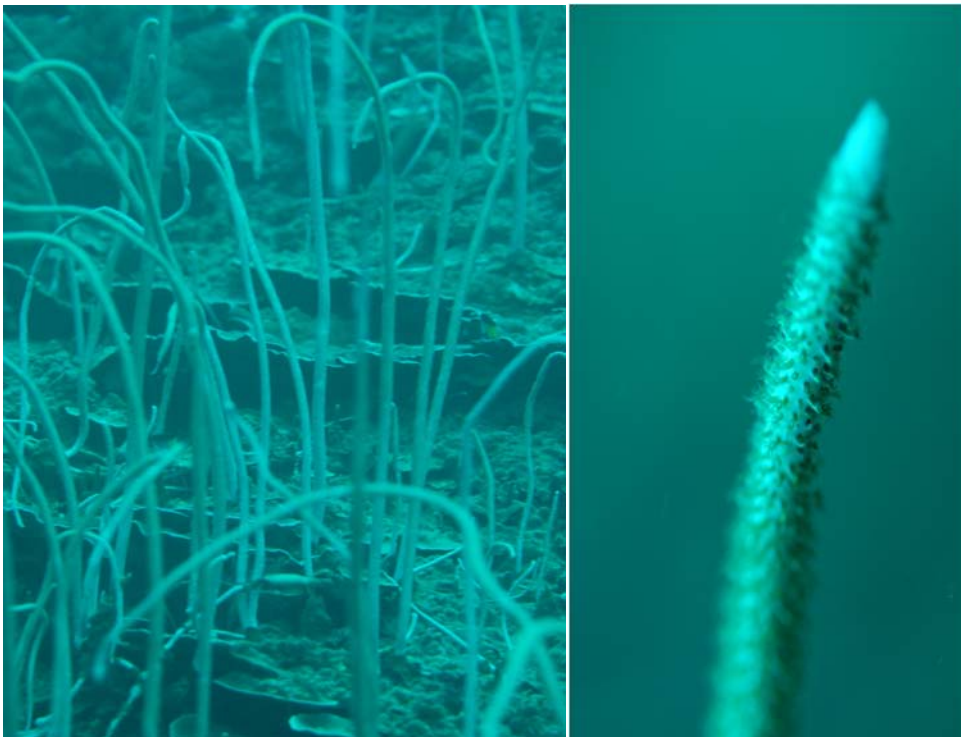
ประเทศไทยมีความยาวตลอดแนวชายฝั่งทั้งอ่าวไทยและทะเลอันดามันรวมกัน 2,815 กิโลเมตร โดยพื้นที่ชายฝั่งตะวันตกเชื่อมต่อกับทะเลอันดามัน มีความยาวมากกว่า 954 กิโลเมตร คิดเป็นพื้นที่ชายฝั่ง 70715.2 ตารางกิโลเมตร (www.royin.go.th) อุดมไปด้วยทรัพยากรชีวภาพที่มีความหลากหลายโดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จากโครงการสำรวจฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสิ่งสกัดหายาจากสิ่งมีชีวิตประเภทไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลอันดามันเมื่อ พ.ศ. 2550 พบกัลปังหาสีขาว (*Junceella* sp.) จำนวนมากเมื่อทำสิ่งสกัดหายาด้วยไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* โดยมีความกว้างของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10 เซนติเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ และพบสิ่งสกัดหายาในชั้นเอทิลอะซิเตตของฟองน้ำ *Xestospongia* sp. มีฤทธิ์เป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม (LC_{50} 15.5 $\mu\text{g/ml}$) จึงนำตัวอย่างทั้งสองมาศึกษาหาสารออกฤทธิ์

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารทุติยภูมิจากกัลปังหาสีขาว *Junceella* sp.

กัลปังหาเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในไฟลัม Cnidaria มีลักษณะทางอนุกรมวิธานดังนี้

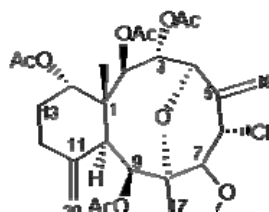
Phylum	Cnidaria
Class	Anthozoa
Order	Gorgonacea
Family	Ellisellidae
Genus	<i>Junceella</i>



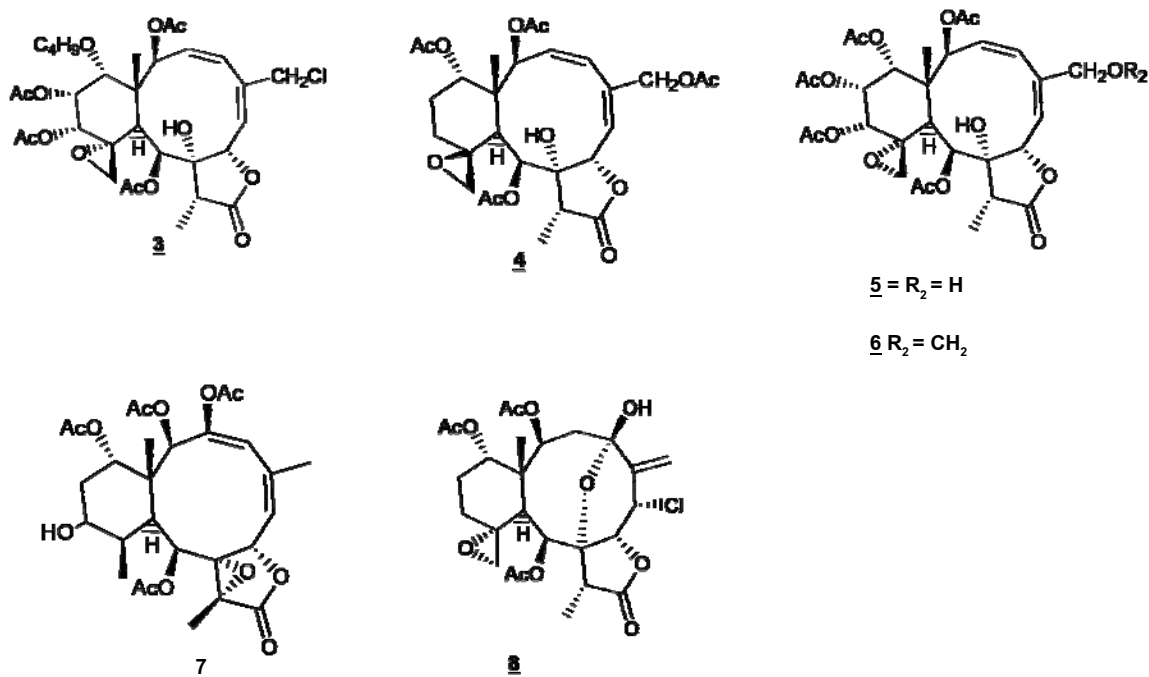
รูปที่ 1 กัลปังหาสีขาว *Junceella* sp.

Junceella แพร่กระจายในทะเลเขตร้อนและอบอุ่น พบมากในมหาสมุทรอินเดีย ทะเลบริเวณอินโดแปซิฟิกและทะเลจีนใต้ เนื่องจากลำตัวมีลักษณะอ่อนนุ่มจึงฝังตัวอยู่ในโพรงที่เป็นวัสถุแข็งแล้วยื่นหนวดออกมาดักจับแบคทีเรีย หรือสิ่งมีชีวิตแขวนลอยขนาดเล็กที่ล่องลอยมากับกระแสน้ำเป็นอาหาร มีรายงานการศึกษาสารทุติยภูมิ จากกัลปังหาสกุลนี้ครั้งแรกใน ค.ศ. 1983 พบสาร briarane - type diterpene จาก *J. squamata* (Subrahmanyam, 1998) ต่อมา มีการค้นพบอนุพันธ์ของสารกลุ่มนี้มากกว่า 39 สาร ส่วนสารกลุ่มอื่น เช่น steroids, N-acetylsphingosines และ Triacetoneamine พบน้อยมาก (Sung *et al*, 2004)

ลักษณะโมเลกุลของ briarane-type diterpene ประกอบด้วยวงแหวนขนาดหกเหลี่ยม (cyclohexane) เชื่อมต่อวงแหวนขนาดสิบเหลี่ยม (cyclodecane) ซึ่งจะเชื่อมต่อกับ 5 membered lactone ring ลักษณะเด่นอีกประการหนึ่งคือการมีหมู่คลอรีนตำแหน่งที่หกของสารบางชนิดในกลุ่มนี้ เช่นสาร robustolide A (2)



ความหลากหลายของโครงสร้างเกิดขึ้นที่ 3 บริเวณของโมเลกุล ส่วนแรกจำนวนพันธะคู่ การแทนที่ของออกซิเจนและหมู่ไฮดรอกซี (-OH) บริเวณวงแหวน cyclodecane ส่วนที่สองเป็นการแทนที่ของหมู่อีพอกไซด์ (epoxide) ตำแหน่งที่ 11 และการแทนที่ของหมู่ acyl ในวงแหวน cyclohexane สารกลุ่ม briarane-type diterpene หลายชนิด เช่น juncins R (3) และ Y (4) มีฤทธิ์ป้องกันการลงเกาะ (antifouling) ของตัวอ่อนเพรียง *Balanus amphitrite* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Qi *et al.*, 2006) juncenolides C (5) และ D (6) ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Shen *et al.*, 2003) สาร excavatolide C (7), fragilide C (8) มีฤทธิ์ยับยั้งไม่ให้เม็ดเลือดขาวสร้าง superoxide anion (Sung *et al.*, 2008) สำหรับประเทศไทยยังไม่พบรายงานการศึกษาลักษณะทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดนี้



สารทุติยภูมิจากฟองน้ำ *Xestospongia* sp.

ฟองน้ำสกุล *Xestospongia* พบแพร่หลายทั่วโลกทั้งในทะเลเขตร้อนและเขตอบอุ่น มีลำดับทางอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Porifera
Class Demospongia

Order	Haploscherida
Family	Petrosiidae
Genus	<i>Xestospongia</i>



รูปที่ 2 ฟองน้ำ *Xestospongia* sp.

ฟองน้ำสกุลนี้ผลิตสารทุติยภูมิหลายกลุ่ม เช่น alkaloids, polycyclic quinones, hydroquinones, polyacetylenic acids, heterocyclic compounds และ sterols (Calcul *et al.*, 2003) สารเหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น alkaloids และสาร เฮทเทอโรไซคลิก มีฤทธิ์ เป็นพิษต่อเซลล์ทดลองหลายชนิด (Edrada *et al.*, 1996; Oku *et al.*, 2004) กลุ่มควิโนนมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเทส และยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (Cao *et al.*, 2005; Edrada *et al.*, 1996) ส่วนสาร sterols โดยเฉพาะ halogenated sterols มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ทดลอง (Iguchi *et al.*, 1994) เป็นต้น ในประเทศไทยมีรายงานการค้นพบสาร bistetrahydroisoquinoline alkaloids จากฟองน้ำสกุลนี้ (Suwanborirux *et al.*, 2003)

ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่าง

ใช้วิธีการดำน้ำแบบ SCUBA เก็บตัวอย่างในปริมาณที่เหมาะสม โดยเหลือบางส่วนของตัวอย่างไว้ในธรรมชาติ เพื่อให้ส่วนที่เหลือเจริญกลับคืนใหม่ มีการถ่ายภาพได้และฉีมน้ำ บันทึกสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย เป็นข้อมูล

ประกอบกรจำแนกชนิด ตัวอย่างถูกเก็บในถุงพลาสติกปิดสนิทแช่ในน้ำแข็ง ก่อนนำมาเก็บที่อุณหภูมิ -20°C ณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

2. การจำแนกชนิดของตัวอย่าง

ตัวอย่างจะถูกส่งไปจำแนกชนิดที่ Zoological Museum, University of Amsterdam

3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (โดยห้องปฏิบัติการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ BIOTEC)

3.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อวัณโรค

ใช้เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37Ra) ทดลองในจานหลุมทดลอง (384 well plate) โดยวิธี GFP (Green Fluorescence Protein Detection) (Changsen *et al.*, 2003) ละลายตัวอย่างสารทดสอบด้วยร้อยละ 5 DMSO (5 % DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นสูงสุด $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ แล้วเจือจางแบบลดลงสองเท่า (two fold series dilution) นำตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆปริมาตร $5\text{ }\mu\text{L}$ ใส่ในจานหลุมที่มีเชื้อแบคทีเรียทดสอบปริมาตร $45\text{ }\mu\text{L}$ ซึ่งมีแบคทีเรียประมาณ $2 \times 10^4 - 1 \times 10^5\text{ cfu/ml/well}$ นำไปบ่มในตู้ทดลองที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วัน (โดยทำการทดลองสองซ้ำ) หลังจากนั้นนำไปประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งโดยวัดด้วยแสง fluorescence (SpectraMax M5) แปลผลและรายงานเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งได้ หรือค่า MIC ตัวควบคุมแบ่งเป็นสองชนิด คือ positive control ใช้ rifampicin, streptomycin, isoniazid และ ofloxacin ส่วน negative control ใช้ 0.5 % DMSO

3.2 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ทดลองชนิด Vero cell

โดยวิธี GFP ทดสอบในจานหลุมทดลอง (384 well plate) ตามวิธีของ Hunt *et al.*, 1999 ดัดแปลงโดย Changsen *et al.*, 2003 การทดลองทำโดยเติมเซลล์ทดลองปริมาตร $45\text{ }\mu\text{L}$ (จำนวนเซลล์ประมาณ $3.3 \times 10^4\text{ cell/mL}$) ลงในหลุมทดลองแต่ละหลุม(ทำ 2 ซ้ำ) ภายในหลุมบรรจุสารทดสอบปริมาตร $5\text{ }\mu\text{L}$ (ละลายสารทดสอบด้วย 5% DMSO ให้มีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ แล้วเจือจางลดลงแบบสองเท่า) จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 4 วัน ประเมินผลโดยวัดด้วยแสง Fluorescence (MolecularSpectra M5) คำนวณค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Pro Software

4. การสกัดและแยกสารบริสุทธิ์

ตัดตัวอย่างกัลปังหาเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ส่วนฟองน้ำตัดและบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอัตโนมัติ ตัวอย่างที่ผ่านการตัดบดแล้วจะถูกแช่ในเมทานอลเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ระเหยเอาเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้ของเหลวสกัดเมทานอล (aqueous methanol) ซึ่งถูก partition ด้วย เฮกเซน (C_6H_{14}) ไคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) หรือ เอทิลอะซิเตต (EtOAc) และ บิวทานอล (BuOH) ตามลำดับ¹ ระเหยเอาตัวทำละลายอินทรีย์ออกจากสิ่งสกัดเหลวแต่ละส่วน ด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดันได้สิ่งสกัดหยาบ (crude extracts) ชั้น C_6H_{16} , CH_2Cl_2 หรือ EtOAc . MeOH และ BuOH ตามลำดับ สิ่งสกัดหยาบในแต่ละส่วนจะถูกประเมินน้ำหนักและนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ก่อนแยกหาองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์โดยวิธีการทางโครมาโทกราฟีแบบต่างๆ (แผนภาพที่ 1 และ 2)

¹ กรณีกัลปังหาสิ่งสกัดเหลวเมทานอลถูก partition ด้วย C_6H_{14} , CH_2Cl_2 และ BuOH ส่วนตัวอย่างฟองน้ำ สิ่งสกัดเหลวเมทานอล ถูก partition ด้วย C_6H_{14} , EtOAc และ BuOH ตามลำดับ

TCL ใช้ Si-gel F₂₅₄ ความหนา 0.2 mm (Cat no. 1.05554.001, Merck, Darmstadt, Germany), โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ใช้วัสดุแยกแบบ Si-gel ขนาด 230-400 mesh (Cat No. 1.09385-1000, Sigma-Aldrich, Germany)

4.1 การแยกสารจากกัลปังหาสีขาว *Juceella* sp.

4.1.1. การแยกสารจากสิ่งสกัดหยาบชั้นเฮกเซน

แยกสิ่งสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนเป็นส่วน ๆ (fractionated) ด้วย si-gel vlc column ใช้ เฮกเซนเป็นตัวชะเริ่มต้น จากนั้นเปลี่ยนตัวชะให้มีความแรงของขั้วมากขึ้นจนถึงขั้วสูงสุด (CH₂Cl₂ : MeOH, 7:3, v/v) การชะในแต่ละขั้นตอน จะทำซ้ำหลายครั้งพร้อมทั้งประเมินประสิทธิภาพการแยกด้วย TLC ทุกครั้งก่อนเปลี่ยนความแรงขั้ว และกำหนดสัดส่วนของตัวชะที่จะใช้ครั้งถัดไป ในขั้นตอนนี้ได้สิ่งสกัดจำนวน 8 fractions (J1-J8) เมื่อทดสอบด้วย TLC และพ่นด้วยสารเคมีทดสอบ anisaldehyde ปรากฏลักษณะดวงสีเหลืองบนแผ่น TLC fraction J1 (300 mg) และ J4 (500 mg) แยก fraction J1 ด้วย si-gel column chromatography ใช้ส่วนผสมระหว่างเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ (eluent) โดยเพิ่มความแรงขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์อัตราส่วนร้อยละสิบ ในขั้นตอนนี้แยกได้จำนวน 5 fractions และพบ fraction หมายเลข J13 (5 mg, 0.3 %) เป็นสารบริสุทธิ์ รูปแบบทางเคมีบนแผ่น TLC ของ fraction หมายเลข J4 ปรากฏเป็นจุดสีเหลืองซ้อนกันสองจุด จึงนำมาแยก ด้วย si-gel column 2 ครั้ง ครั้งแรกใช้ส่วนผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลอะซิเตต 8:2 (v/v) เป็นตัวชะ ส่วนคอลัมน์ที่สองใช้ ส่วนผสมของ เฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนอัตราส่วน 1:1 (v/v) เป็นตัวชะ จากนั้นเลือก fraction สะอาดที่สุด (J47) มาแยกด้วย semipreparative TLC โดยใช้เทคนิคแช่ซ้ำจำนวน 6 ครั้ง ครั้งแรกใช้เฮกเซนเป็นตัวชะ ครั้งที่สองถึงหกใช้ส่วนผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน (1:1, v/v) ตรวจวัดการแยกด้วยสารทดสอบ anisaldehyde (ตัดเอาเฉพาะขอบ เพื่อทำเครื่องหมายแถบแยก) ขูดเนื้อ silica gel ตามรอยแถบแยกด้วยแผ่นโลหะ นำเนื้อ silica gel ไปบดและบรรจุในคอลัมน์ขนาดเล็กชะด้วยไดคลอโรมีเทนเมื่อระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกแล้วได้สาร J50 (7 mg, 0.4 %) และ J51 (3 mg, 0.2 %) ตามลำดับ

4.1.2. การแยกสารจากสิ่งสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน

แยกสิ่งสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนด้วย si-gel column ชะด้วยเฮกเซน จากนั้นเพิ่มความแรงขั้วของตัวชะเป็นส่วนผสมของเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน (1:1, v/v) ตรวจสอบและรวม fraction โดยใช้ข้อมูลการตอบสนองต่อสารทดสอบ anisaldehyde เป็นสีส้มบนแผ่น TLC ในขั้นตอนนี้แยกได้ 5 fractions fraction หมายเลข J30 มีสารเป้าหมายเป็นองค์ประกอบ (โดยการทดสอบ TLC) จึงถูกแยกด้วย si-gel column ชะด้วยส่วนผสมระหว่างเฮกเซนและเอทิลอะซิเตต (9.8:0.2, v/v) ได้สาร J36 (7.5 mg, 0.6 %) และ J37 (10 mg, 0.8 %) ตามลำดับ

4.2 การแยกสารจากฟองน้ำ *Xestospongia* sp.

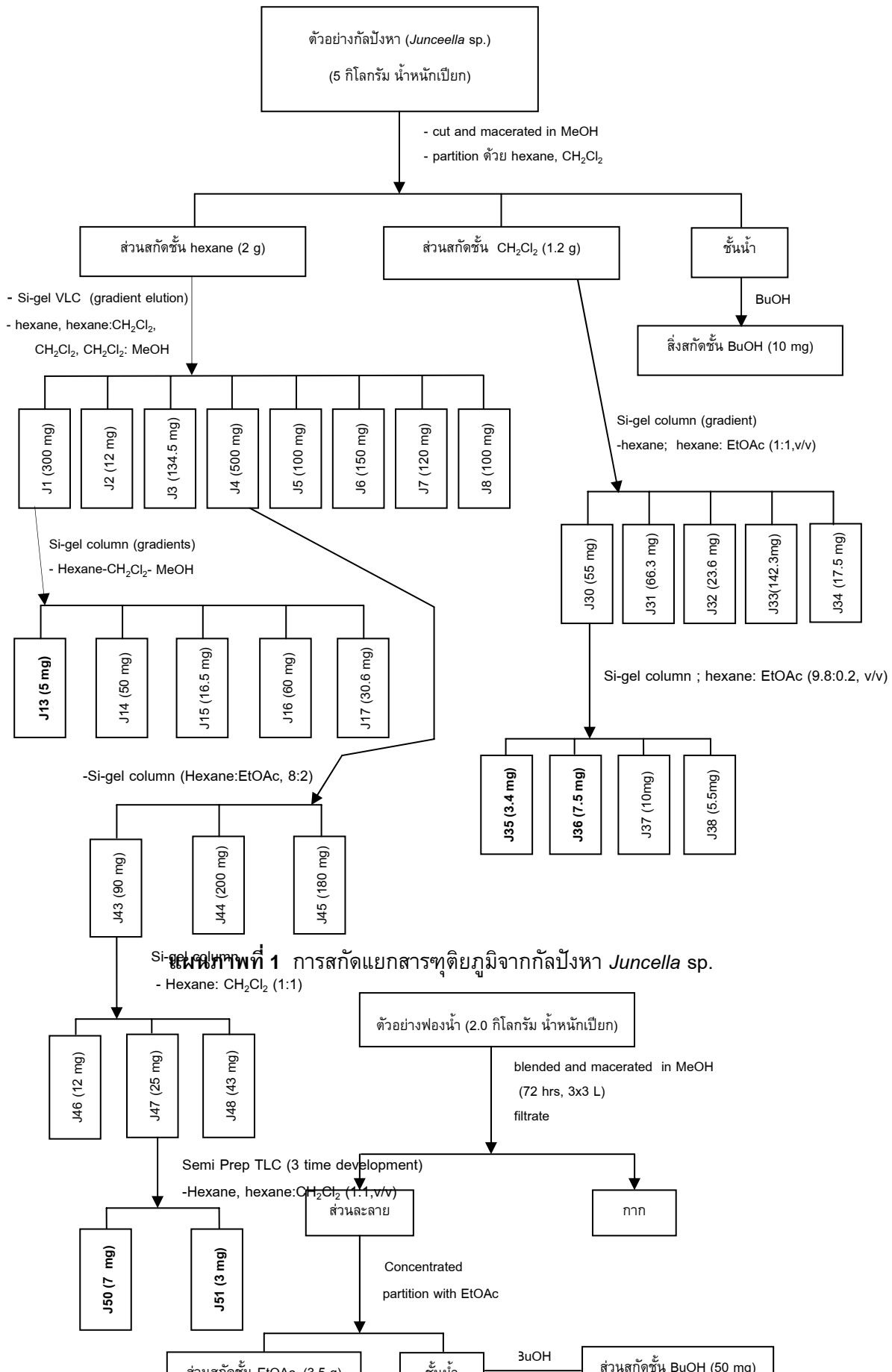
บดตัวอย่างฟองน้ำ (2 kg น้ำหนักเปียก) ด้วยเครื่องบดอันโนมิตี แช่สกัดใน MeOH เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ทำ ซ้ำ 3 ครั้ง) กรองแยกกากทั้งส่วนของเหลวนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดันได้ของเหลวสกัดเป็นน้ำซึ่งถูก partition ด้วย EtOAc ชั้นสารอินทรีย์นำไประเหยแห้งส่วนชั้นน้ำ partition ด้วย BuOH ได้สิ่งสกัดหยาบชั้น EtOAc และ BuOH ตามลำดับ สิ่งสกัดหยาบชั้น EtOAc มีเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) และมีจุดสีเหลือง สองจุดเด่นชัดบนแผ่น TLC จุดแรกตอบสนองต่อ แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm ส่วนจุดที่สองไม่ตอบสนอง (ใช้ลักษณะนี้เป็นตัวติดตามการแยก) จึงคัดเลือกมาแยกเป็นส่วนๆ ด้วย si-gel vlc column ใช้การชะแบบค่อยๆ เพิ่มความแรงของขั้ว เริ่มจาก เฮกเซน CH₂Cl₂ และ MeOH ตามลำดับ โดยเพิ่มความแรงขั้วของตัวชะครั้งละ 10 % ใช้ TLC ตรวจสอบการชะก่อนเพิ่มความแรงขั้วของตัวชะ ครั้งต่อไป Fraction T1 มีจุดสีเหลืองไม่ตอบสนองต่อแสง UV จึง

ถูกแยกด้วย preparative TLC ใช้ส่วนผสมระหว่างเฮกเซนกับ CH_2Cl_2 (7:3, v/v) เป็น mobile phase แยกได้สาร aureole (10 mg) Fraction T2 ปรากฏจุดสีเหลืองตอบสนองต่อแสง UV จึงแยกด้วย si-gel column ชะด้วยส่วนผสมระหว่าง เฮกเซนกับ EtOAc (9:1, v/v) แยกได้สาร Xestophenoxide (T12) หนัก 10 mg

5. เครื่องมือวิเคราะห์

5.1 NMR spectrometer: วิเคราะห์หาโครงสร้างสารบริสุทธิ์โดยใช้เครื่อง DMX 600 NMR spectrometer ใช้ TMS เป็น internal standard วิเคราะห์ที่ Structural Biology Research Unit, Helmholtz Center for Infection Research, Braunschweig ประเทศเยอรมัน และใช้เครื่อง 500 FT NMR spectrometer, Model Unity Inova, Varian ใช้ TMS เป็น internal standard วิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

5.2 Mass spectrometry: HRMS วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Finigan LCQDECA-7000 Mass Spectrometer วิเคราะห์ที่ Department of Structural Biology Research, Helmholtz Center for Infection Research, Braunschweig ประเทศเยอรมันนี้, Low Resolution Mass วิเคราะห์โดย Thermofinigan Mass Spectrometer MAT 95XL ทดสอบโดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



แผนภาพที่ 1 การสกัดแยกสารทุติยภูมิจากกัลปังหา *Juncella* sp.

แผนภาพที่ 2 การสกัดแยกสารทุติยภูมิจากฟองน้ำ *Xestospongia* sp.

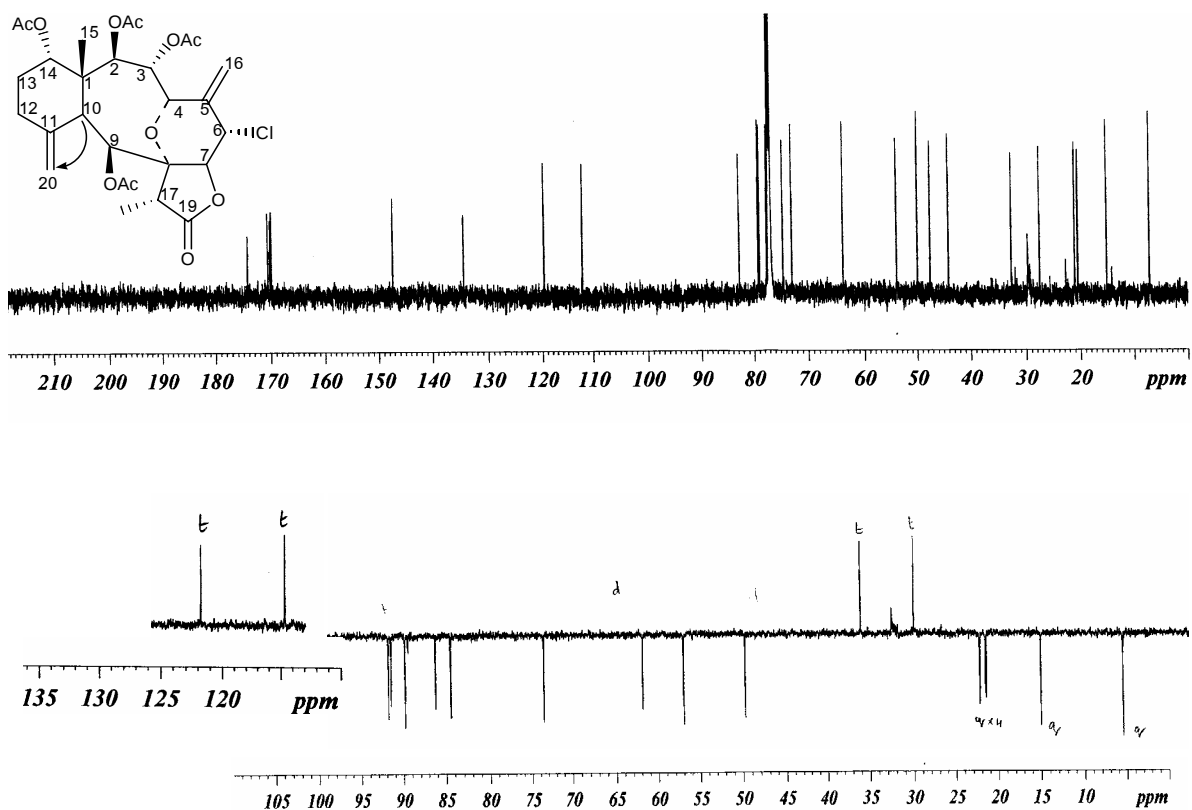
ผลการวิจัย

ผลการศึกษาสารทุติยภูมิจากกัลปังหาสีขาว *Junceella* sp. และฟองน้ำ *Xestospongia* sp. สามารถแยกสารจากกัลปังหาได้จำนวน 5 สาร ได้แก่อนุพันธ์ของ briarane diterpenes คือ junceellin (J36) , praelolide (J37) และกลุ่มกรดไขมันที่พบครั้งแรกในฟองน้ำชนิดนี้ คือ xestocanoic (J13), xestoglycerol (J50), xestocylester (J51) สามารถแยกสารจากฟองน้ำได้ 2 สารได้แก่ สารกลุ่ม sesterterpene hydroquinone คือสาร aureole (T7) สาร sesterterpene-S-Oxide ชนิดใหม่จำนวน 1 สาร คือ xestophenoxide (T12) การศึกษาโครงสร้างเคมีทำได้ดังนี้

I. สารทุติยภูมิจากกัลปังหา *Junceella* sp.

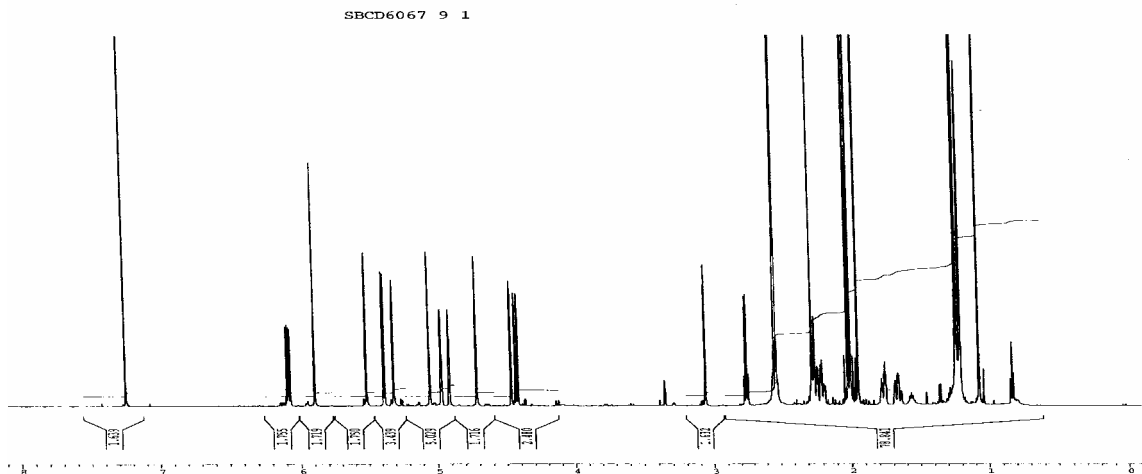
สาร junceellin (J36)

จากข้อมูล ^{13}C NMR สเปกตรัมของ J36 (รูปที่ 3) รายงานคาร์บอนจำนวน 28 อะตอม จำแนกเป็น 6 (q), 4 (t), 9 (d) และ 9 (s) เมื่อวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูล HRMS spectrum รายงาน pseudomolecular ions $(\text{M}+\text{H})^+$, $(\text{M}+\text{NH}_4)^+$ และ $(\text{M}+\text{Na})^+$ เท่ากับ 583.1941, 600.2206 และ 605.1753 ตามลำดับ (รูปผนวกที่ 7) สอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{O}_{11}\text{Cl}$ สามารถคำนวณ degree of unsaturation ได้เท่ากับ 10



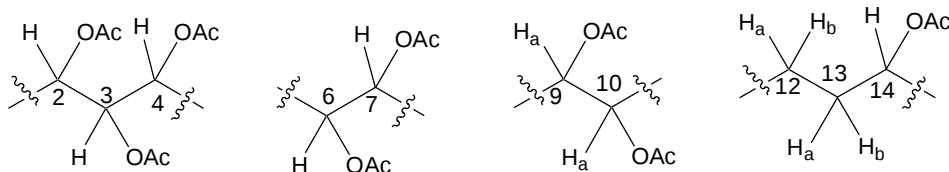
รูปที่ 3 ^{13}C NMR (บน) และ DEPT (ล่าง) ของสาร junceellin (J36)

ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสาร J36 (รูปที่ 4 ตารางที่ 1) ปรากฏสัญญาณ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกมีค่าเคมีคัลชีฟ (δ_{H}) ระหว่าง 4.0-6.5 ประกอบด้วยสัญญาณ olefinic methine protons ที่ δ_{H} เท่ากับ 6.12 (H-3, dd, $J = 7.0, 4.0$ Hz), 5.90 (H-9), s, 5.42 (H-2, d, $J = 7.0$ Hz), 4.95 (H-6, td, $J = 2.5, 3.0$ Hz), 4.90 (H-14, t, $J = 3$ Hz), 4.49 (H-7, d, $J = 3.0$ Hz), 4.48 (H-4, d, $J = 10.0$ Hz) และสัญญาณ olefinic methylenes จำนวน 4 สัญญาณคือ 5.55 (H_b-16b, d, $J = 3$ Hz), 5.34 (H_a-16a, d, $J = 3$ Hz), 5.05 (H_a-20a, br s) และ 4.70 (H_b-20b, br s) กลุ่มที่สองอยู่ระหว่าง δ_{H} 1-3.5 ประกอบด้วยสัญญาณ acetate methyls 4 สัญญาณ คือ δ_{H} 2.30 (s), 2.03 (s), 2.05 (s) และ 1.59 (s); methyl ที่ δ_{H} 1.1 (H₃-15, s), 1.29 (H₃-18, m, d, $J = 7$ Hz) สัญญาณ aliphatic methine ที่ δ_{H} 3.1 (H-10, s) aliphatic methylenes ที่ δ_{H} 2.25 (H-12a m), 2.15 (H-12b, m), 1.75 (H-13a, m), 1.65 (H-13b m) ใช้ข้อมูล NMR spectra แบบสองมิติ (2D-NMR) เพื่อเชื่อมต่อดัชนีส่วนและสร้างเป็นโมเลกุลที่สมบูรณ์ดังนี้

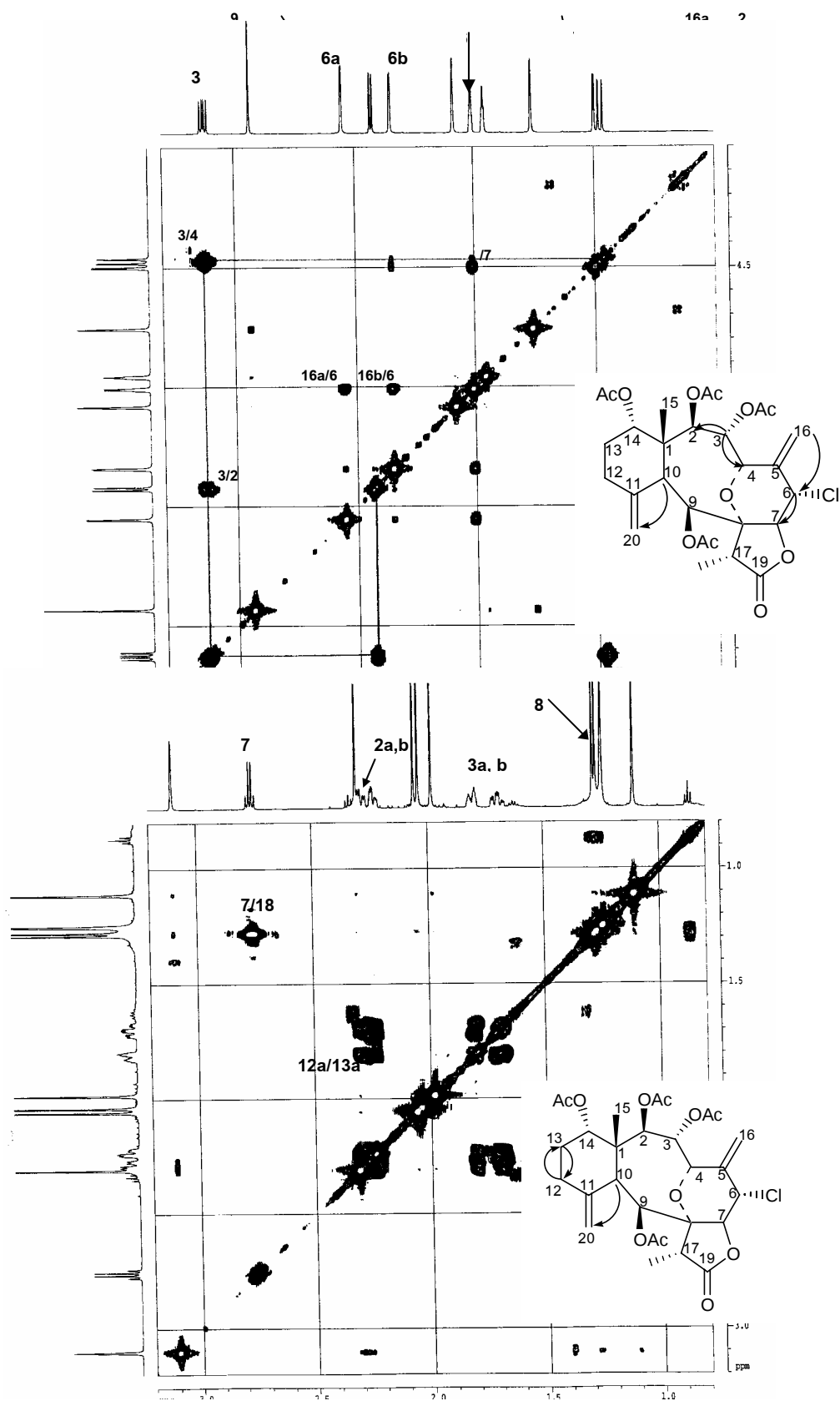


รูปที่ 4 ^1H NMR spectrum ของ สาร junceellin (J36)

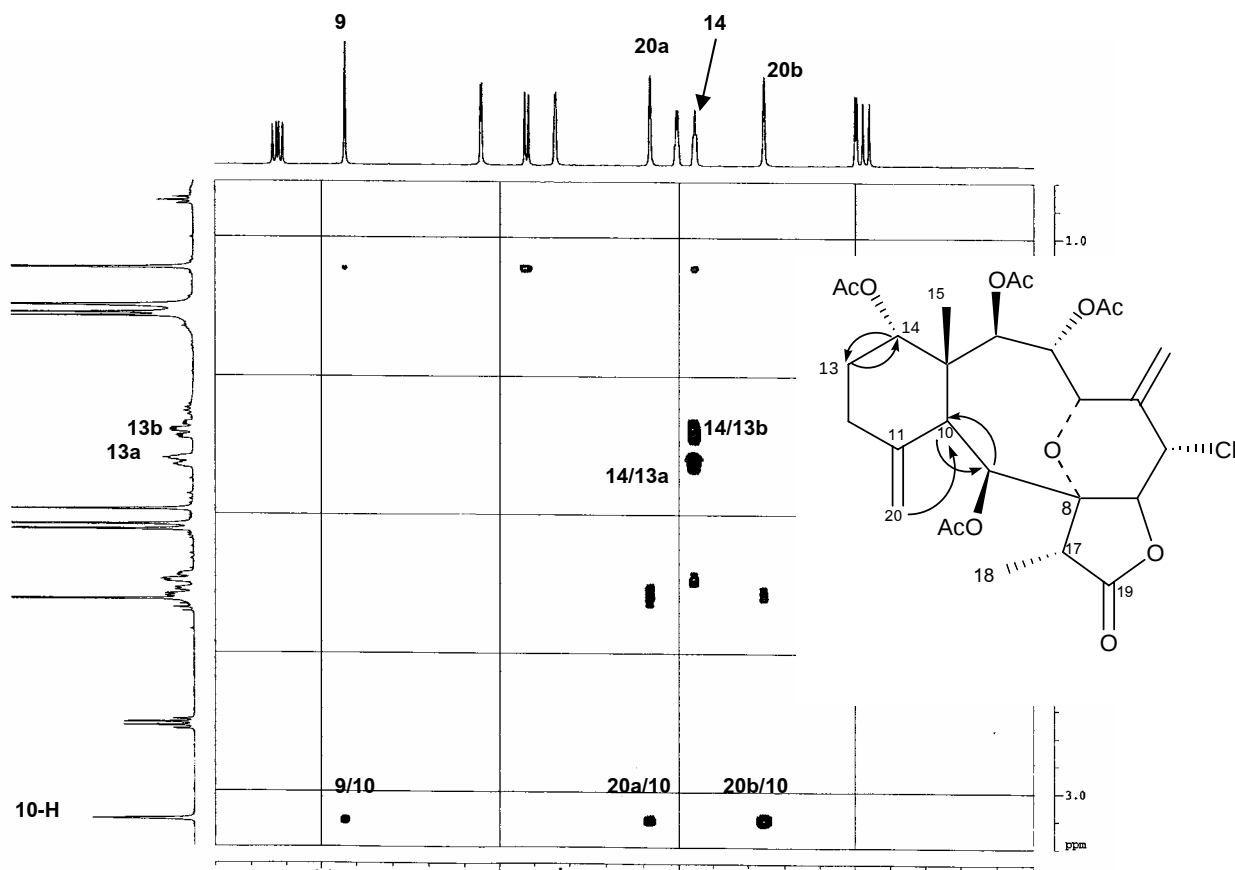
ข้อมูล H,H COSY spectrum (รูปที่ 6) พบโปรตอน 3 สัญญาณสัมพันธ์กันแบบ vicinal coupling จำนวน 2 ชุด คือ δ_{H} 5.14 (H-2)/ 6.12 (H-3)/4.48 (H-4); 2.25 (H_a-12), 2.15 (H_b-12)/1.75 (H_a-13, 1.65(H_b-13)/4.90 (H-14) และโปรตอน 2 สัญญาณสัมพันธ์กันแบบ vicinal coupling จำนวน 2 ชุด คือ 4.90 (H-6)/4.49 (H-7); 5.90 (H-9)/3.10(H-10) (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ชิ้นส่วนโมเลกุลที่เกิดจากการวิเคราะห์ ^1H , ^1H COSY cross peaks



รูปที่ 6 H,H COSY spectrum ของสาร J36 แสดงความสัมพันธ์บริเวณ cyclodecane และ cyclohexane



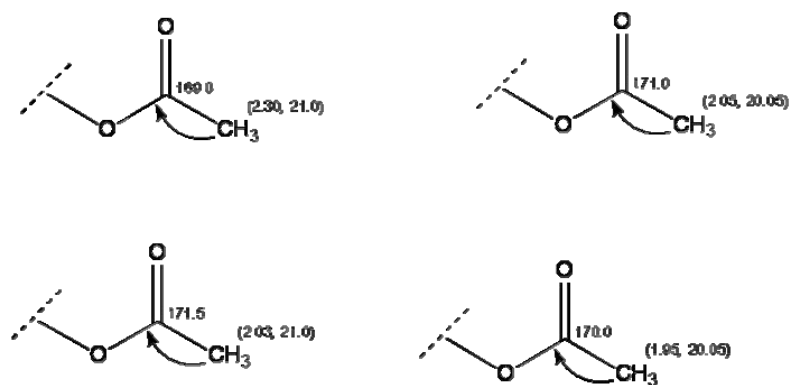
รูปที่ 6 (ต่อ)

ข้อมูลสเปกตรัมแบบ HMBC (รูปที่ 8-10) ถูกใช้เพื่อสร้างชิ้นส่วน cyclodecane, cyclohexane และ 5-membered lactone ring รวมทั้งการประกอบกันเป็นโครงสร้างสมบูรณ์ วงแหวน cyclodecane เกิดจากการต่อเชื่อมสัญญาณ long range CH ที่สำคัญ คือ δ_H 6.12 (H-3) ไปยัง δ_C 48.0 (C-1), 134.0 (C-5); δ_H 4.48 (H-4) ไปยัง δ_C 73.0 (C-2), 54.0 (C-6), 83.0 (C-8), 119.0 (C-16); δ_H 4.49 (H-7) ไปยัง δ_C 134.0 (C-5); δ_H 5.90 (H-9) ไปยัง δ_C 48.0 (C-1); δ_H 3.10 (H-10) ไปยัง δ_C 48.0 (C-1), 83.0 (C-8) และ δ_H 5.55 (H_a-16), 5.34 (H_b-16) ไปยัง δ_C 54.0 (C-6)

วงแหวน 5-membered lactone ring เชื่อมต่อกับวงแหวน cyclodecane ที่ตำแหน่ง C-8 และ C-7 โดยใช้ข้อมูล HMBC จาก δ_H 5.90 (H-9) ไปยัง δ_C 50.0 (C-17) ซึ่ง ณ ตำแหน่งนี้ถูกต่อเชื่อมด้วยหมู่เมทิลฟังก์ชัน (methyl group) ที่ δ_H 1.29 และ δ_C 7.0 โดยที่หมู่ฟังก์ชันนี้แสดงความสัมพันธ์ไปที่ δ_C 83.0 (C-8), 50.0 (C-17) และ ester carbonyl ที่ δ_C 174.0 (C-19) (รูปที่ 7)

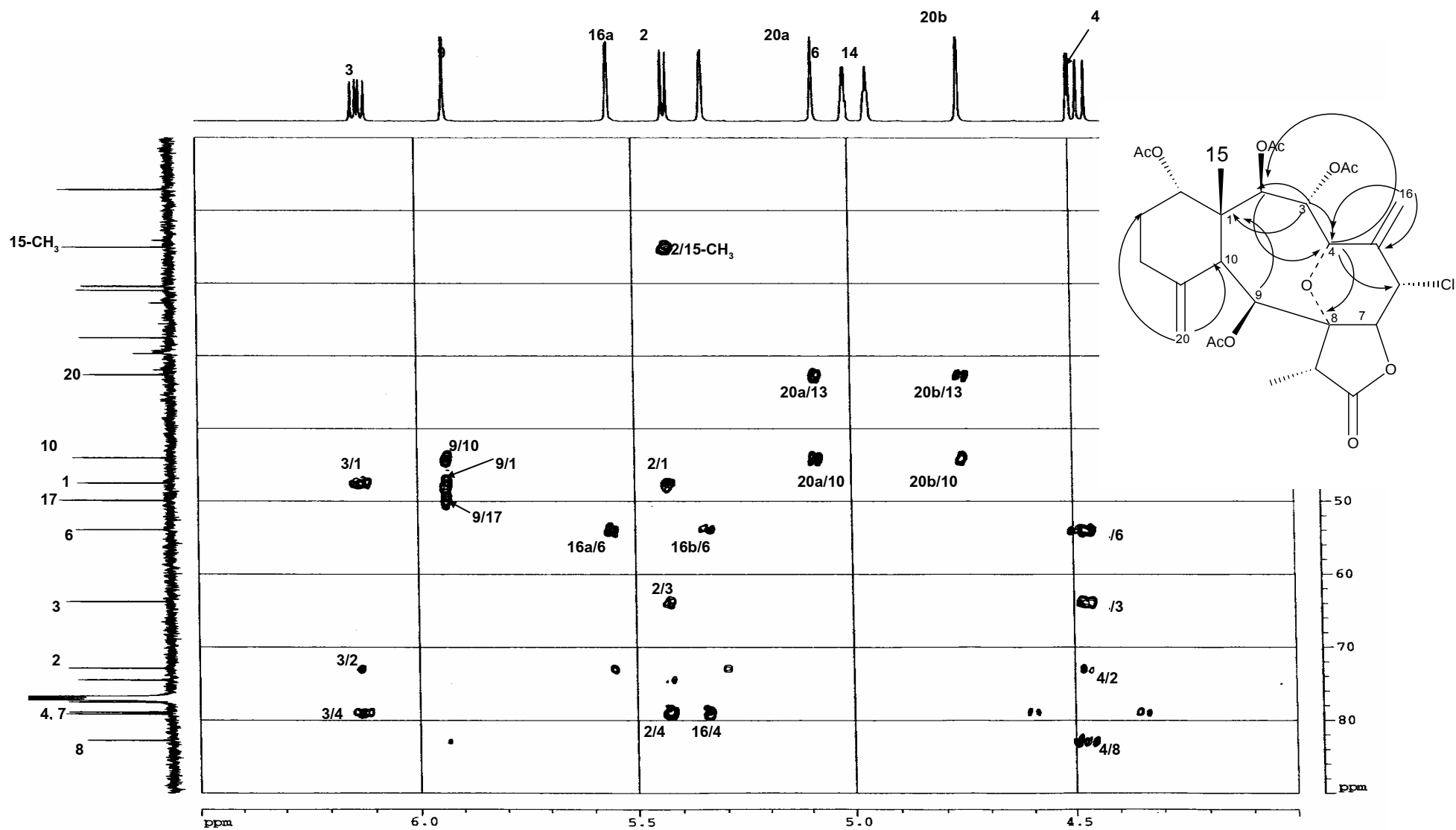
การกำหนดตำแหน่งวงแหวน cyclohexane ต่อเข้าที่ตำแหน่ง C-1 และ C-10 โดยการใช้ความสัมพันธ์จาก δ_H 3.10 (H-10) ไปยัง δ_C 112.0 (C-20), 48.0 (C-1), ในขณะที่ δ_H 5.05 (H_a-20), 5.70 (H_b-20) แสดงความสัมพันธ์ไปที่

δ_C 32.0 (C-13), 44.0 (C-10) นอกจากนั้น หมู่เมทิลฟังก์ชันที่ δ_H 1.01 (H₃-15) แสดงความสัมพันธ์ไปที่ δ_C 48.0 (C-1), 73.0 (C-2), 44.0 (C-10) และ 74.8 (C-14) เป็นการยืนยันว่าหมู่เมทิลนี้อยู่บน C-1 ซึ่งเป็นจุดเชื่อมต่อของ วงแหวน cyclohexane กับ cyclodecane. หมู่เมทิลฟังก์ชันถูกจัดให้เข้าคู่กับ acetate carbonyl (รูปที่ 7) และต่อเชื่อมเข้ากับโครงสร้างหลักโดยใช้ข้อมูลจาก HMBC spectrum (รูปที่ 8) δ_H 5.14 (H-2) สัมพันธ์กับ acetate carbonyl ที่ δ_C 171.0; δ_H 6.12 (H-3) กับ δ_C 170.0; δ_H 5.90 (H-9) กับ δ_C 169.0 เป็นการยืนยันว่าหมู่เอซีเตตเชื่อมต่อกับ C-2, C-3 และ C-9 ส่วนออกซิเจนที่เหลือหนึ่งอะตอมต่อเชื่อมกับ C-4 และ 8 เพราะค่า เคมีคัลชีฟของ C-4 ที่ค่า δ_C 74.8 และ 83.0 ซึ่งเป็นลักษณะของคาร์บอนที่ต่อกับออกซิเจนอะตอมเพราะออกซิเจนมีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตี (electronegativity) สูงกว่าคาร์บอนอะตอมจึงดึงอิเล็กตรอนเข้าหาตัวเองทำให้ความหนาแน่นของอิเล็กตรอนรอบคาร์บอนต่ำลงจึงรับรู้ความถี่ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าได้มากขึ้น หรือเกิดปรากฏการณ์ deshielding ที่ C-4 และ C-8 การกำหนดตำแหน่งคลอรีนอะตอมและโครงสร้างสมบูรณ์ทำโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ยางานมาก่อนซึ่งกำหนดโครงสร้างโดยใช้ข้อมูล x-ray crystallography (Subrahmanyam *et al.*, 1998) เมื่อพิสูจน์โครงสร้างสมบูรณ์แล้วให้ชื่อสาร J36 ว่า junceellin

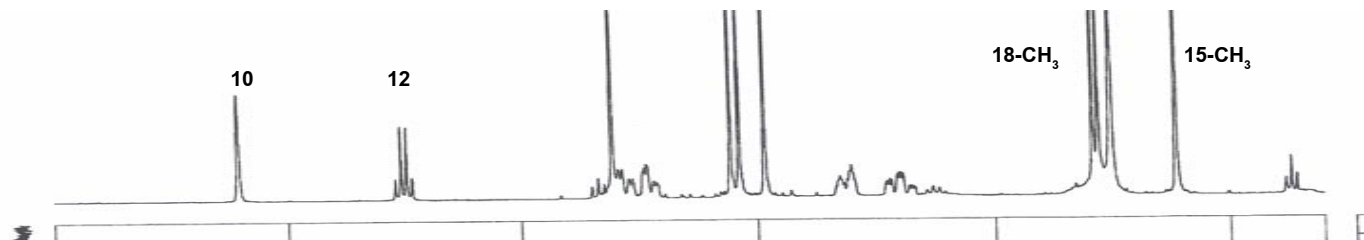


รูปที่ 7 การเข้าคู่กันของหมู่เมทิลฟังก์ชันและ ester carbonyl

สาร junceellin (J36) ถูกแยกได้ครั้งแรกจากกัลปังหาสีขาว *Junceella fragilis* ในทะเลจีนใต้ (Lin *et al.*, 1983) การพิสูจน์ทราบโครงสร้างที่สมบูรณ์ทำโดยใช้ x-ray crystallography (Yao, *et al.*, 1984) หลังจากนั้นมียางานการพบสารนี้อีกครั้งจากกัลปังหาสีแดง *Gorgonella umbraculum* ในทะเลประเทศอินเดียและได้มีการตรวจสอบยืนยันความถูกต้องอีกครั้งโดยใช้ข้อมูล NMR ร่วมกับ x-ray crystallography (Subrahmanyam *et al.*, 1998)

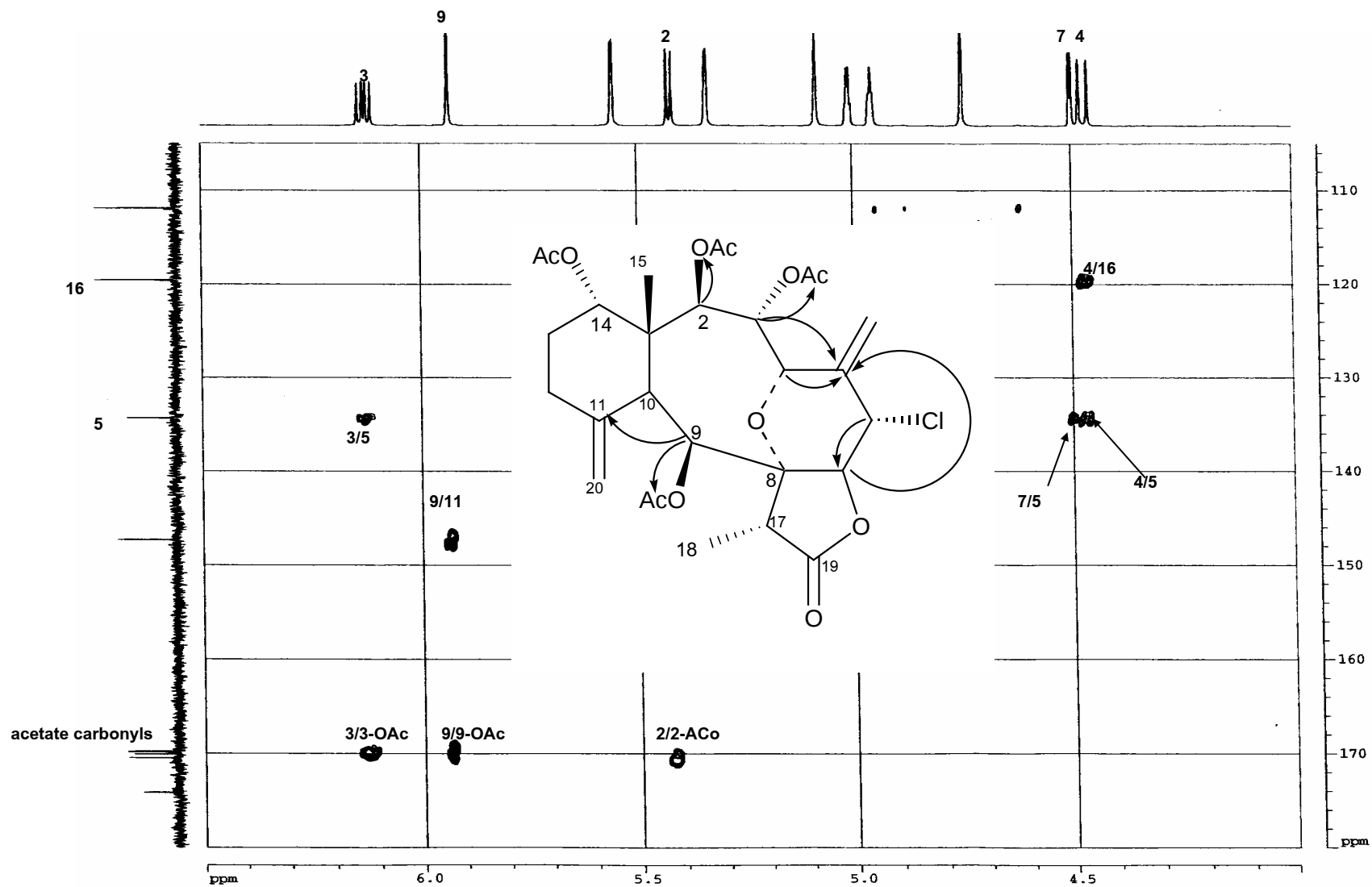


รูปที่ 8 HMBC spectrum ของสาร J36 แสดงความสัมพันธ์ภายในวงแหวน cyclodecane และ บางส่วนของ cyclohexane



MBC spectrum ของสาร J36 แสดงความสัมพันธ์ภายในวงแหวน cyclodecane และ บางส่วนของ cyclohexane

รูปที่ 9 HMBC spectrum ของสาร J36 แสดงความสัมพันธ์ภายในวงแหวน 5-membered lactone ring และ บางส่วนของ cyclohexane



รูปที่ 10 HMBC spectrum แสดงการเชื่อมต่อหมู่ อะซิเตดกับmain nucleus ของสาร junceellin (J36)

ตารางที่ 1 ข้อมูล NMR ของ สาร junceellin (J36) (CDCl_3)

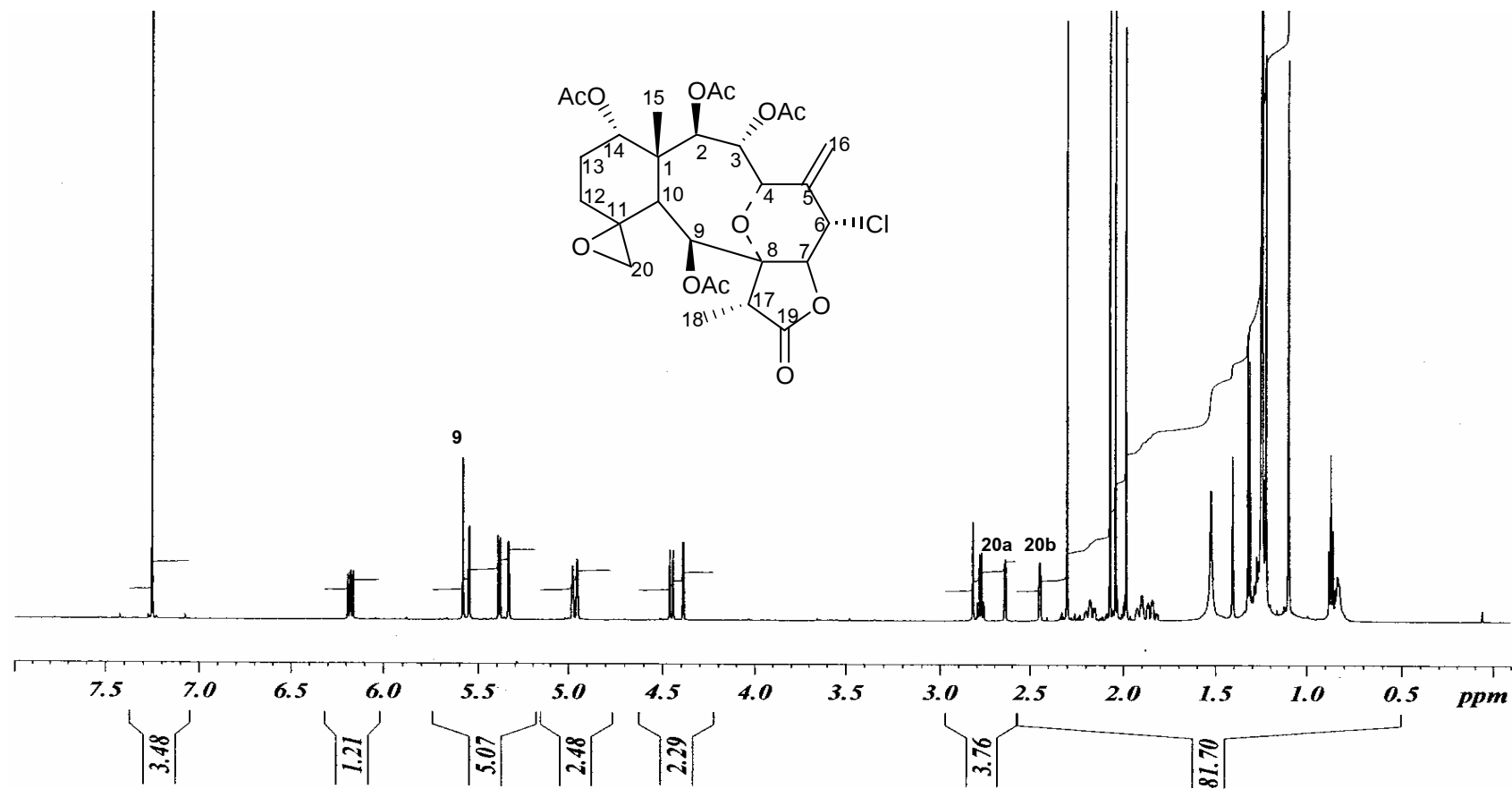
Position	δH (mult, J in Hz)	δC	COSY correlation	HMBC correlation
1	-	48.0	-	
2	5.14 (d, 7.0)	73.0	H-3	C-12, C-13, C-15, 2- CH_3
3	6.12(dd, 7.0, 10.0)	64.0	H-2, H-4	C-1, C-2, C-4, C-5, 3- CH_3
4	4.48 (d, 10.0)	79.0	-	C-2, C-3, C-5, C-8, C-16
5	-	134.0	-	-
6	4.95 (dd, 2.5, 3.0)	54.0	H-7	8
7	4.49	79.5	H-6	5
8	-	83.0	-	-
9	5.90 (br s)	78.0	H-10	C-1, C-8, C-10, acetate-169.0
10	3.10 (br s)	44.0	H-9	C-1, C-8, C-15, C-20
11	-	148.0	-	
12	a: 2.25, b: 2.15 m	27.0	H_2 -13, H_2 -20	
13	a:1.75, b: 1.65 m	32.0	H_2 -12, H-14	
14	4.90 (t, 3)	74.8	H_2 -13, H_b -12	
15- CH_3	1.10	15.0	-	
16	a: 5.55 (d, 3), b: 5.34 (d, 3)	119.0	-	C-6
17	2.75 (q, 7)	50.0	-	C-19
18- CH_3	1.29 (d, 7)	7.0	-	C-8, C-17, C-19
19	-	174.0	-	
20	4.70 (br s), 5.0 (br s)	112.0	H_a -12, H-10	
acetate carbonyls and acetate methyls				
		169.0	21.0	1.30
		170.0	20.1	1.95
		171.0	20.1	2.05
		171.0	21.0	2.03

สาร praelolide (J37)

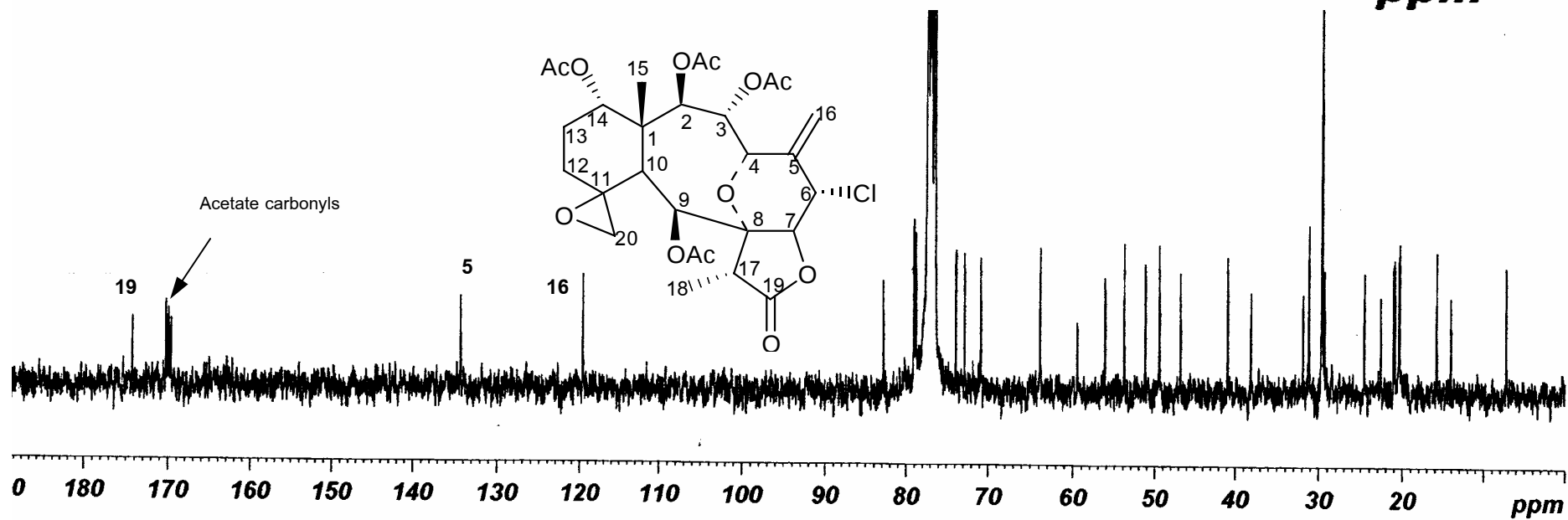
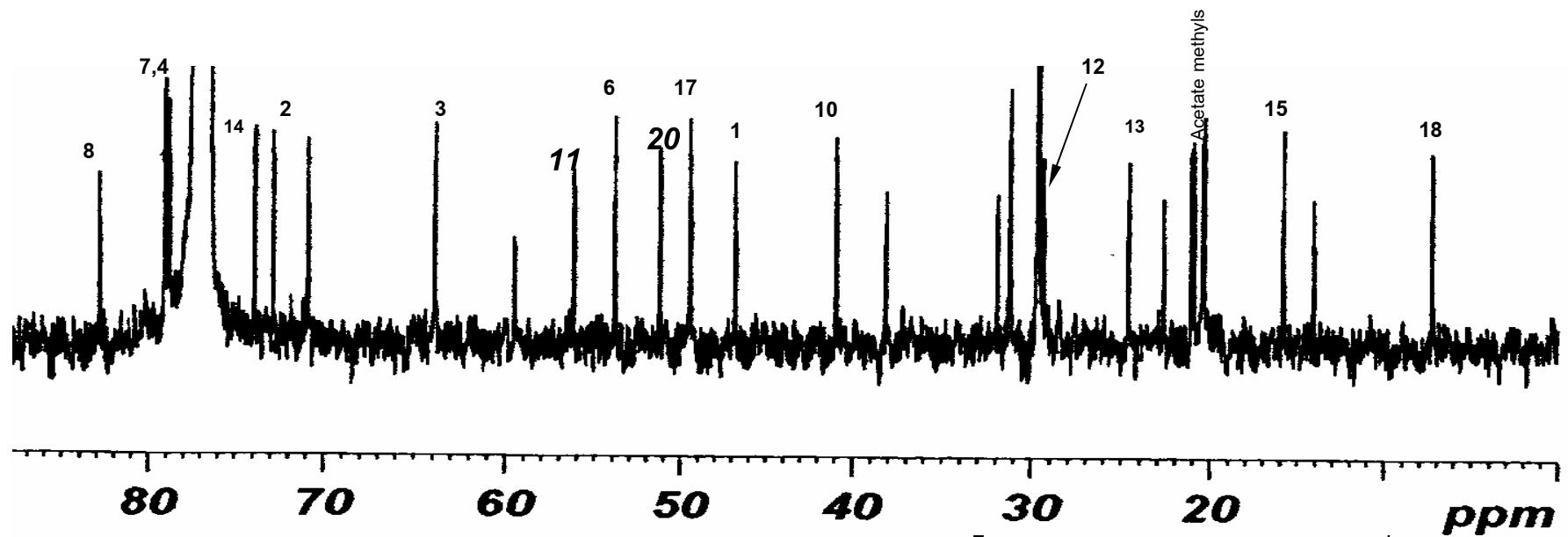
J37 เป็นสารลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองใส เมื่อพิจารณา ^1H NMR spectrum (รูปที่ 11) พบว่ามีลักษณะเหมือนกับสาร J36 เกือบทุกประการ ยกเว้นสัญญาณของโปรตอนตำแหน่งที่ 9 มีค่า δ_{H} 5.60 แทนที่จะเป็น 5.90 และสัญญาณของโปรตอนตำแหน่งที่ $\text{H}_{\text{a}}-20$ และ $\text{H}_{\text{b}}-20$ เรโซแนนซ์บริเวณ upfield ที่ δ_{H} 2.64 และ 2.45 แทนที่จะเป็น 4.70, 5.25 สอดคล้องกับข้อมูล ^{13}C NMR spectrum (รูปที่ 12) C-20 มีค่า δ_{C} 51.0 ในขณะที่ J36 มีค่า δ_{C} 112.0 ยิ่งไปกว่านั้นค่า δ_{C} ที่ตำแหน่ง C-11 เท่ากับ 56.20 ppm แทนที่จะเป็น 148.0 ppm ดังนั้นเป็นการยืนยันว่าโครงสร้างของ J37 แตกต่างจาก J36 เฉพาะบริเวณตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 11 กับ 20 เท่านั้น จากข้อมูล HRMS (รูปผนวกที่ 13) พบว่า J37 มี pseudomolecular ion $(\text{M}+\text{H})^+$, $(\text{M}+\text{NH}_4)^+$, $(\text{M}+\text{Na})^+$ เท่ากับ 599.1895, 616.2158 และ 621.1704 (สอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{O}_{12}\text{Cl}$) ซึ่งมีความมวลมากกว่า J36 จำนวน 16 หน่วย จึงสรุปได้ว่าการฟอร์มอีพอกไซด์ (epoxide) ที่ตำแหน่ง C-11 กับ C-20 ข้อมูล NMR ของ J37 แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูล NMR ของ สาร praelolide (J37) (CDCl_3)

Position	δH (mult, J in Hz)	δC	COSY correlation	HMBC correlation
1	-	46.9	-	-
2	5.40 (d, 7.0)	73.0	H-3	C-1, C-3, C-4, C-15, 2-OAc
3	6.18 (dd, 7.0, 10.0)	64.0	H-2, H-4	C-1, C-2, C-4, 3-OAc
4	4.46 (d, 10.0)	79.5	-	C-2, C-3, C-5, C-6, C-8, C-16
5	-	134	-	-
6	4.95 (d, 7)	54.0	H-7	-
7	4.39, d (7)	79.5	H-6	C-5, C-8
8	-	82.9	-	-
9	5.60 s	71.0	-	C-1, C-10, C-11, C-17, 9-OAc
10	2.83 s	41.0	-	C-1, C-8, C-11, C-15, C-20
11	-	56.2	-	-
12	2.15 m, 2.20 m	30.0	-	-
13	1.88 m, 1.83 m	25.0	-	-
14	4.98 (t, 3, 3)	74.5	-	-
15-CH ₃	1.17 s	16.0	-	C-1, C-2, C-10, C-14
16	5.55 (d, 3), 5.34 (d, 3)	119.0	H-17	C-4, C-5, C-6
17	2.78 (q, 6, 6, 7)	49.0	H-16	C-18, C-19
18-CH ₃	1.33 (d, 7)	7.8	-	C-8, C-17
19	-	174.2	-	-
20	A: 2.64 (dd, 4, 1), b: 2.45 (t, 3, 6)	51.0	-	-
acetate carbonyls and acetate methyls				
169.6 21.0 2.30				
169.8 20.1 2.1				
169.9 20.1 2.04				
170.2 20.1 1.98				



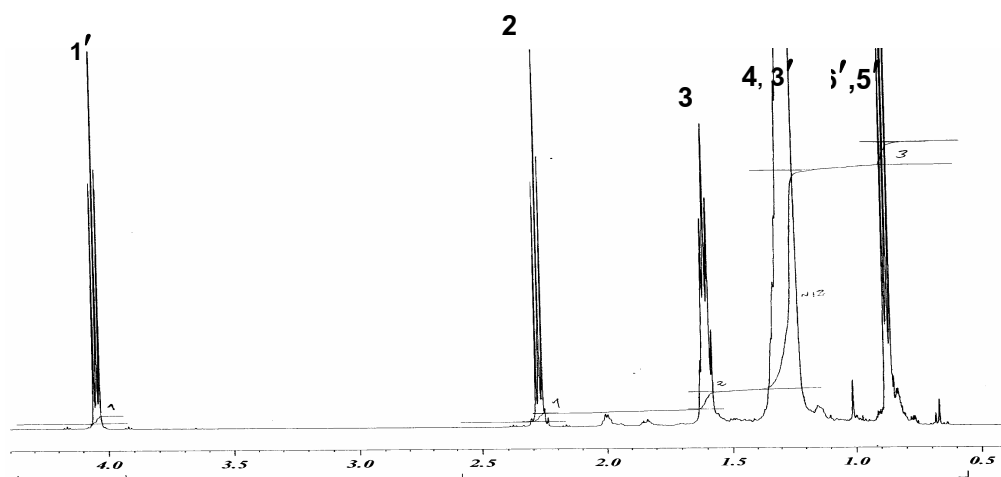
รูปที่ 11 ^1H NMR spectrum ของสาร praelolide (J37)



รูปที่ 12 ^{13}C NMR spectrum ของสาร praelolide (J37)

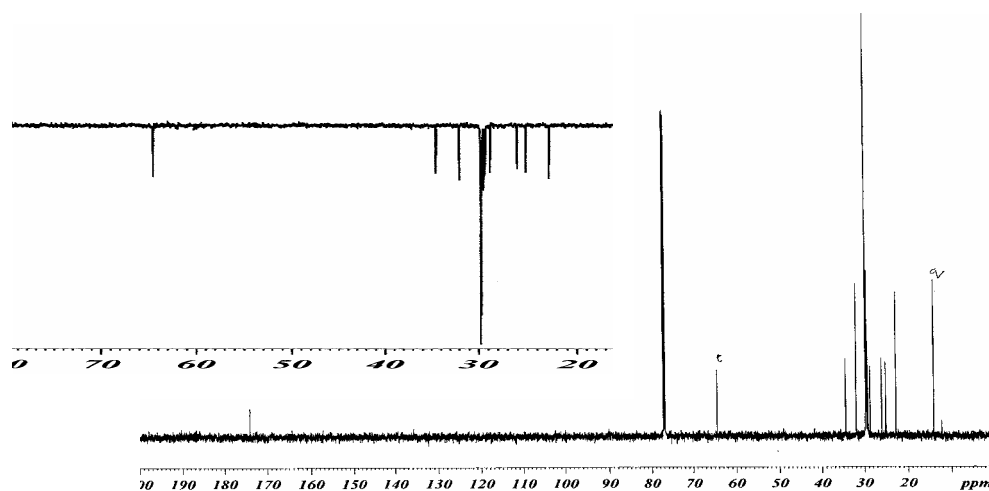
สาร Hexadecanoic acid hexadecyl ester (J13)

สาร J13 มีลักษณะเป็นผงสีขาวแยกได้โดยวิธี semi-preparative TLC (แผนภาพที่ 1) ^1H NMR spectrum (รูปที่ 13) ปรากฏ 4 สัญญาณ ได้แก่ที่ δ_{H} 4.10 (H_2-1), 2.30 (H_2-2), 1.60 (H_2-3), 0.85 (H_3-6) และมีตำแหน่งสัญญาณเมทิลีนโปรตอนซ้อนทับกับ สัญญาณน้ำของตัวทำละลายอินทรีย์ (CDCl_3) ที่ δ_{H} 1.30 ผลการ integration สัญญาณซ้อนทับนี้ได้จำนวนโปรตอนจำนวน 56 อะตอม ส่วนสัญญาณอื่นมีจำนวนโปรตอนเป็นสองเท่าบ่งชี้ลักษณะ chemically equivalent โมเลกุล



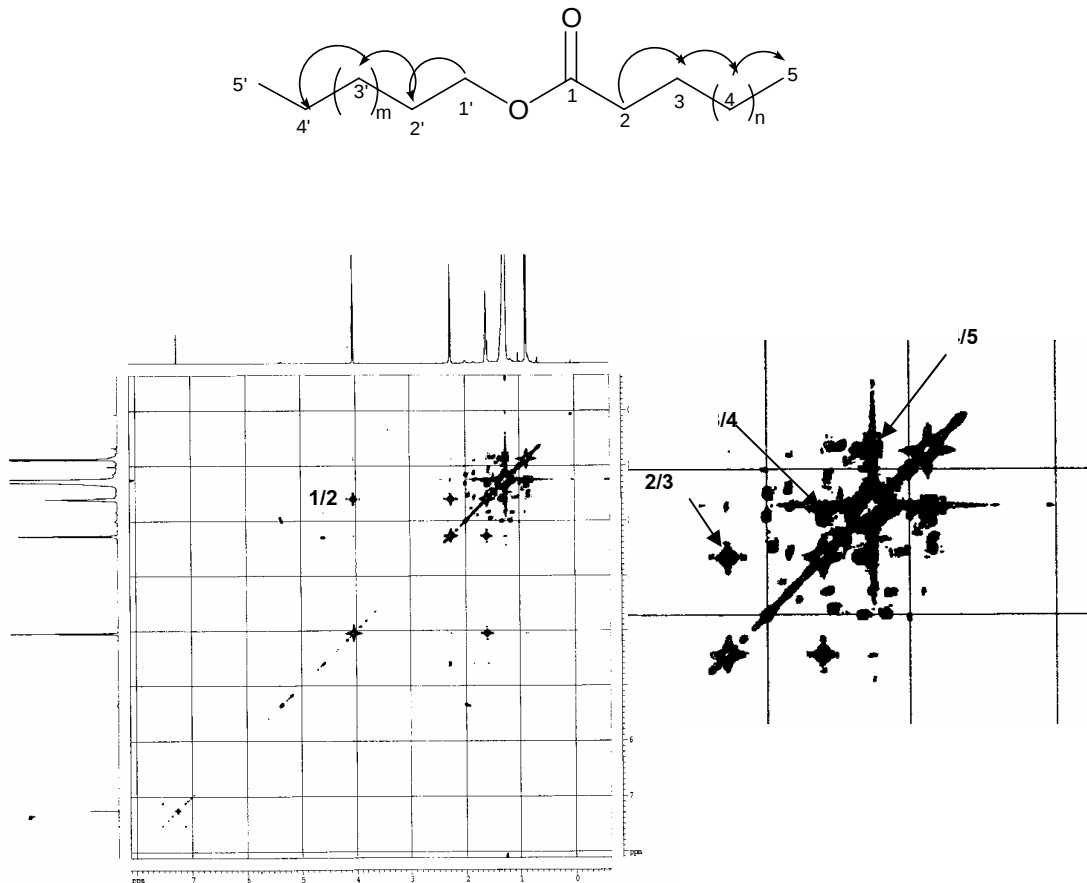
รูปที่ 13 ^1H NMR spectrum ของสาร J13

^{13}C NMR spectrum (รูปที่ 14) ปรากฏเมทิลฟังก์ชัน ($-\text{CH}_3$) จำนวน 1 สัญญาณ เมทิลีน ($-\text{CH}_2$) จำนวน 8 สัญญาณ ที่ δ_{C} 30.0 ประกอบด้วยหลายสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ค่า chemical shift เดียวกัน และเอสเทอร์คาร์บอนิลจำนวน 1 สัญญาณที่ δ_{C} 174.0 ดังนั้นโมเลกุลจึงมีลักษณะ $-\text{CH}_2-$ หลายหน่วยต่อกันเป็นเส้นตรงกระจายทั้งสองด้าน โดยมีเอสเทอร์คาร์บอนิลเป็นตัวเชื่อม



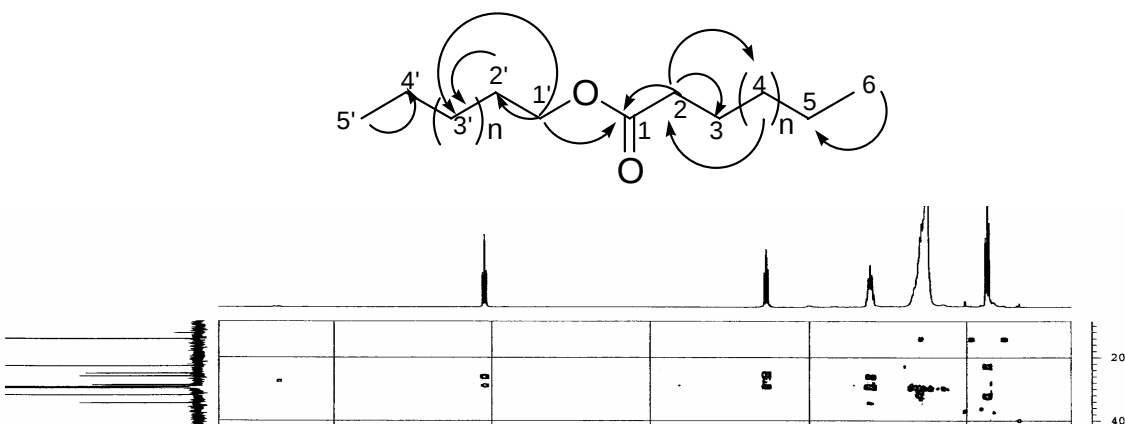
รูปที่ 14 ^{13}C NMR (ล่าง) และ DEPT 135 (ขยาย) spectrum ของสาร J13

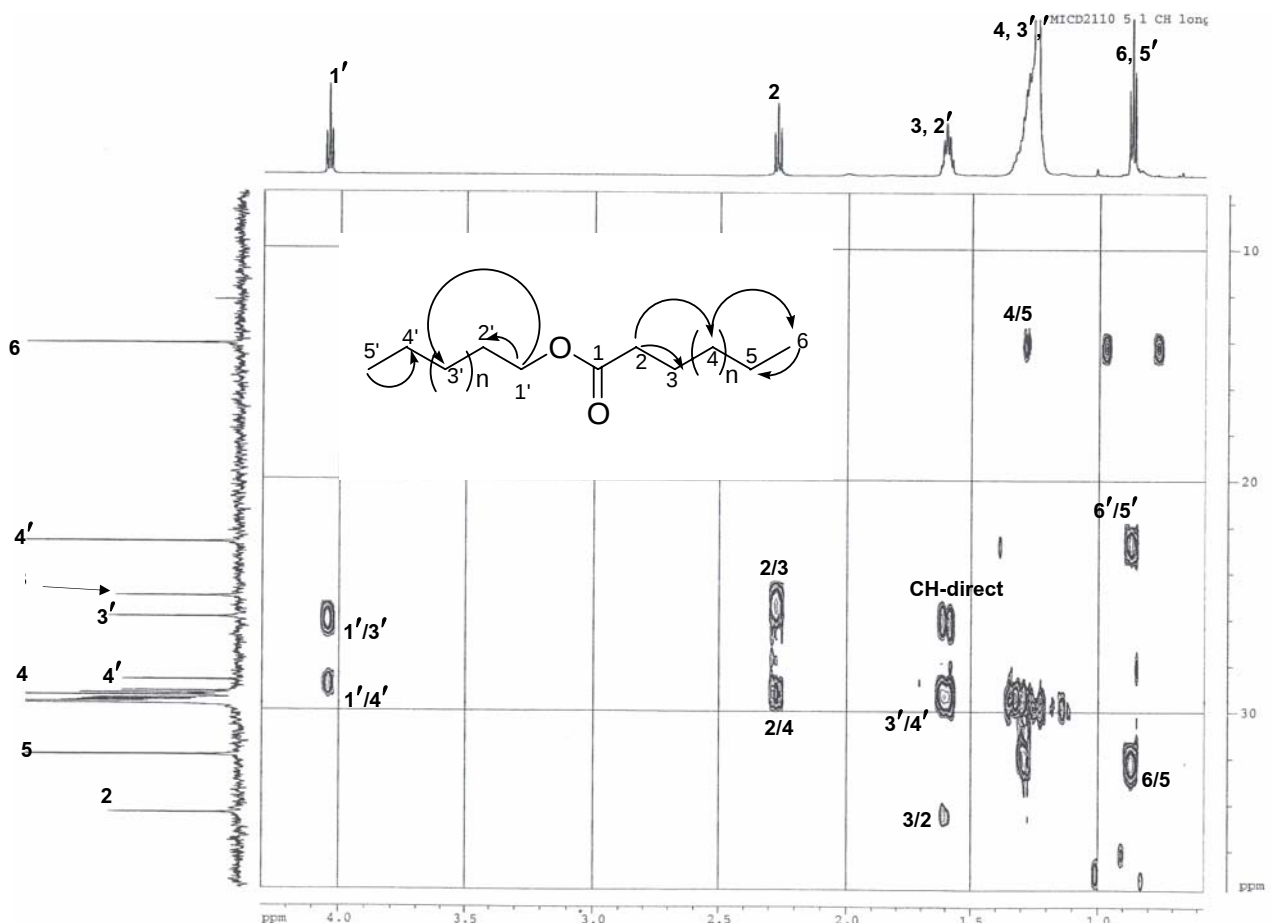
จากการวิเคราะห์ข้อมูล H,H COSY spectrum (รูปที่ 15) แสดง cross peak ความสัมพันธ์ที่ H_2-1'/H_2-2' , $H_2-2'/(H_2-3')_m$, $(H_2-3')_m/H_2-4'$ และ H_2-4'/H_3-5' สามารถสร้าง spin system แบบ $-CH_2(CH_2)_mCH_3$ 1 ชุด ส่วนชุดที่ 2 เป็นอีกด้านหนึ่งของโมเลกุลซึ่งมีค่า chemical shift เดียวกัน (ยกเว้น H_2-2) เริ่มจาก H_2-2/H_2-3 จนถึง H_2-5/H_3-6 , H_2-3/H_2-4 , H_2-4/H_2-5 (ดังรูปที่ 15) รูปร่างโมเลกุลจึงเป็นเส้นตรง m และ n คือจำนวน CH_2 ที่ปรากฏเป็นสัญญาณซ้อนทับกันที่ δ_H 1.30 และ δ_C 30.0 นั้นเอง



รูปที่ 15 H,H COSY spectrum ของสาร J13

การยืนยันตำแหน่งต่างๆ ของโมเลกุลโดยวิเคราะห์ข้อมูล long range CH correlation หรือ HMBC (รูปที่ 16 ตารางที่ 3) สรุปได้ดังนี้ δ_H 4.10 (H_2-1') สัมพันธ์กับ เอสเทอร์คาร์บอนที่ δ_C 174.0, 28.5 ($C-3'$), 26.0 ($C-2'$); δ_H 2.30 (H_2-2) สัมพันธ์กับเอสเทอร์คาร์บอนที่ δ_C 174.0, 25.5 ($C-3$); 29.0 ($C-4$); δ_H 1.30 (H_2-4) กับ δ_C 34.5 ($C-2$) นอกจากนี้ยังพบ HMBC cross peak ของ methyl proton (H_3-6 และ H_3-5') กับ δ_C 32.0 และ 23.0 จึงกำหนดให้เป็น methyl carbon ที่ตำแหน่ง 5' และ 6 ตามลำดับ ดังนั้นจึงกำหนดตำแหน่งของโมเลกุลเบื้องต้นได้ดังนี้

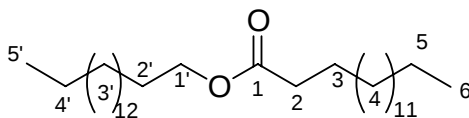




รูปที่ 16 HMBC spectrum ของสาร J13 แสดง cross peaks ที่สำคัญ

ข้อมูล HRMS ให้ค่า pseudomolecular ion peak $[M+H]^+$ ที่ m/z 481.4981 (รูปผนวกที่ 16) สอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{32}H_{64}O_2$ ในขณะที่ข้อมูล DEPT พบจำนวนคาร์บอนและโปรตอนเท่ากับ C_9H_{18} โดยไม่รวมสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ค่า chemical shift ซ้อนทับกัน แสดงว่ามีจำนวนคาร์บอนและโปรตอนที่เหลือเป็นของ $(CH_2)_n$ ที่ซ่อนอยู่ใน

peak น้ำ ซึ่งมีค่าเท่ากับ $C_{32-9=23}H_{64-18=46}$ หรือ $(CH_2)_{23}$ ดังนั้น n จึงถูกแบ่งเป็นสองค่าคือ 11 และ 12 สาร J13 จึงถูกพิสูจน์ให้เป็น Hexadecanoic acid hexadecyl ester ดังรูป



ตารางที่ 3 ข้อมูล NMR ของสาร J13 ($CDCl_3$)

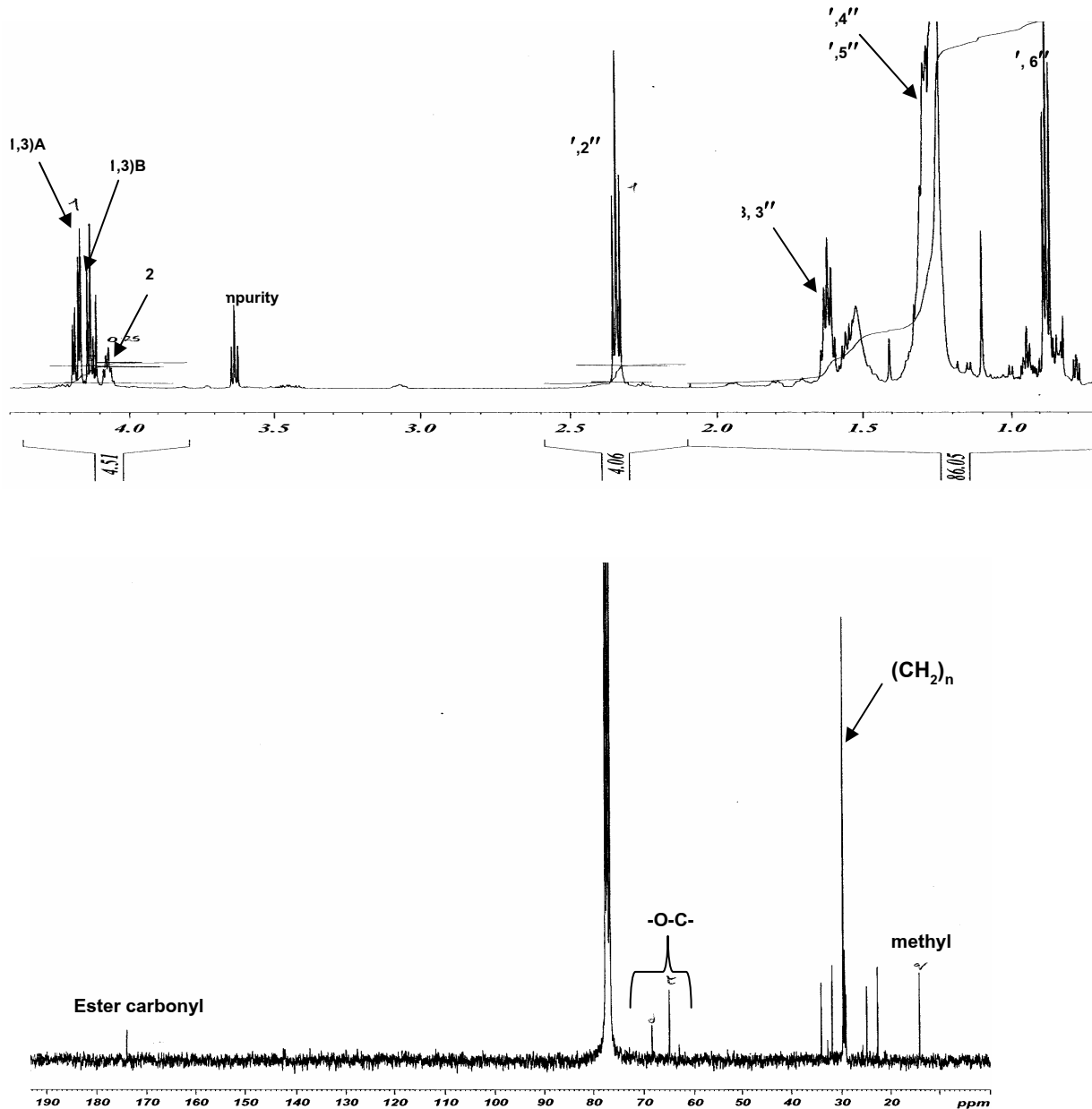
Position	δ_H (mult, J in Hz)	δ_C	COSY	HMBC
1'	4.10 (t, 7.0)	64.0	H_2-2'	C-2', 3', ester carbonyl
2	2.30 (t, 7.0)	34.5	H_2-3	C-3, 4, ester carbonyl
*3,2'	1.60 (p, 7.0)	16.0, 25.5	$H_2-2, 4, 3'$	C-4, 3'
*4,3'	} Over lapping at 1.30 (m)	28.5, 29.0	$H_2-3, 5, H-2', 4'$	C-5, 4'
5, 4'		23, 32 m		
6, 5'-CH ₃	0.85 (t, 7.0)	14.5	$H_2-5, 4'$	C-6, 5'
Ester carbonyl δ_C 174.0				

*สัญญาณของ 4 และ 5 ซ้อนทับกันที่ δ_H 1.3 จำแนกจากสัญญาณ C-13, ตำแหน่งที่ 4 และ 5 อาจสลับกันได้

สาร J50 (Octadecanoic acid 2-hydroxy-3-octadecanoyloxy-propyl ester)

สาร J50 มีลักษณะเป็นผงสีขาวแยกได้โดยวิธี semi-preparative TLC รูปแบบ 1H NMR (รูปที่ 17) แสดงส่วนที่เป็นกลีเซอรอลจำนวน 2 สัญญาณระหว่าง δ_H 4.0-4.5 สัญญาณที่ upfield ระหว่าง δ_H 0.80-2.50 มีความคล้ายคลึง

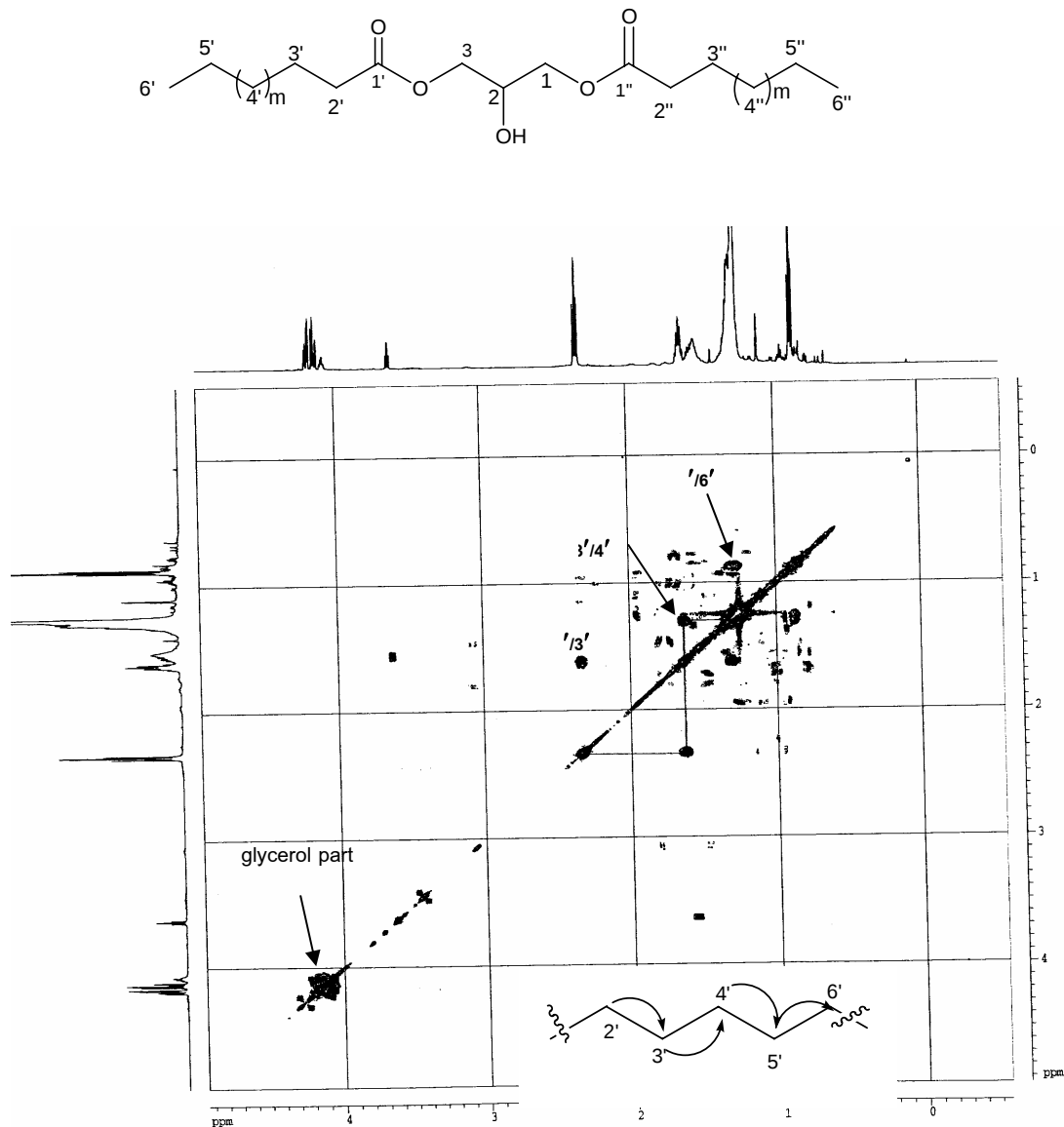
กับสาร J13 ทุกประการ ผลการ integrate ทุกสัญญาณพบจำนวนโปรตอนเป็นสองเท่า ยกเว้นสัญญาณที่ δ_H 1.30 มีจำนวนโปรตอน 52 อะตอม ^{13}C NMR (รูปที่ 17) ปรากฏ 9 สัญญาณ ประกอบด้วย เอสเทอร์คาร์บอนิล จำนวน 1 สัญญาณ aliphatic methylene 6 สัญญาณ, methine จำนวน 1 สัญญาณ และ methyl carbon 1 สัญญาณ สัญญาณซ้อนทับกันที่ δ_H 1.30 และ δ_C 30 เป็นลักษณะของ chemically equivalent molecules เช่นเดียวกับสาร J13



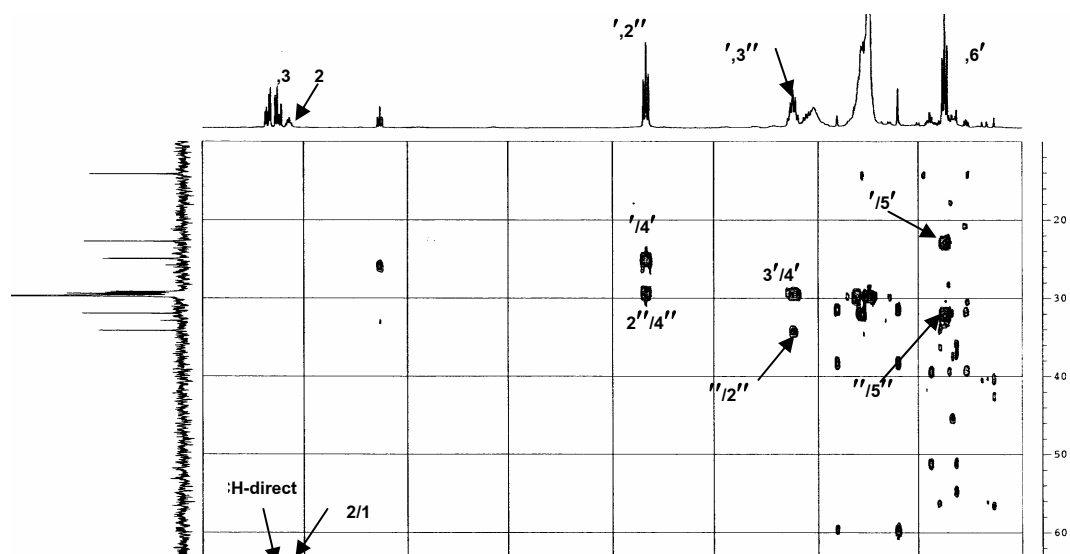
รูปที่ 17 1H NMR (บน) และ ^{13}C NMR (ล่าง) ของสาร J50

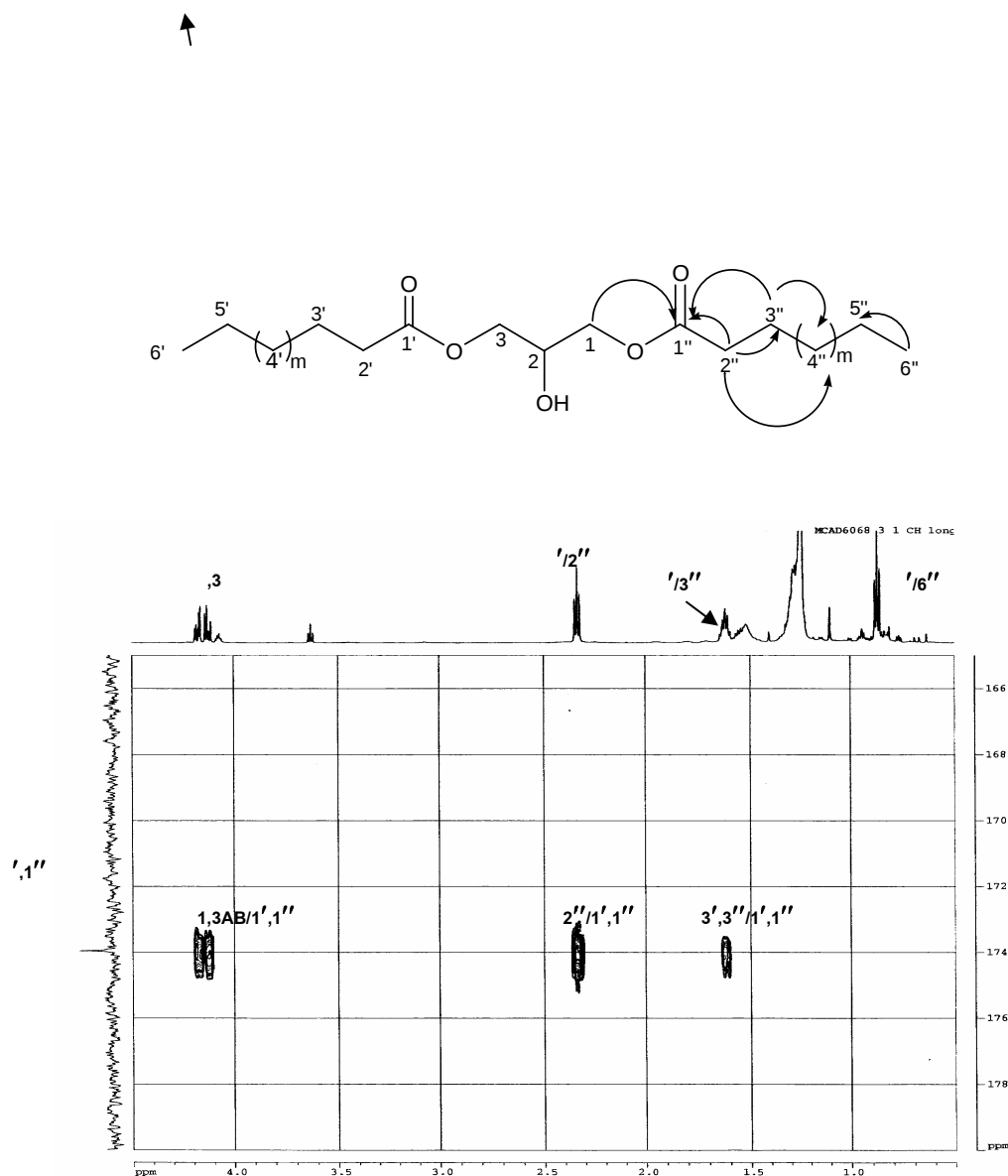
H,H COSY spectrum (รูปที่ 18) แสดงให้เห็นการเชื่อมต่อของหน่วยกลีเซอรอลที่ δ_H 4.19 (H_a -3), 4.10 (H_b -1)/4.09 (H_b -2) ส่วนเมทิลีนโซ่ตรงสร้างจากการวิเคราะห์ cross peaks ที่ δ_H 2.35 (H_2 -2', H_2 -2'')/ δ_H 1.62 (H_2 -3', H_2 -3''); H_2 -3', H_2 -3'')/ δ_H 1.25 (H_2 -4, H_2 -4'') และ H_2 -4, H_2 -4'')/ δ_H 1.25 (H_2 -5, H_2 -5''); H_2 -5, H_2 -5'')/ δ_H 0.83 (H_3 -6', 6'') ตามลำดับ การเชื่อมต่อหน่วยกลีเซอรอลกับกับเมทิลีนโซ่ตรงทำโดยวิเคราะห์ long range CH cross peaks (รูปที่ 19) H_2 -1, H_2 -2' และ H_2 -3')/ δ_C 174.0 (ester carbonyl) นอกจากนี้ยังพบ cross peak ที่ δ_H 0.83 (H_3 -6')/ δ_C

23.0 และ 31.0 ซึ่งเป็นเมทิลีนคาร์บอนเชื่อมต่อโดยตรงกับเมทิลฟังก์ชัน จึงกำหนดให้เป็นตำแหน่ง C-4', C-5' ทำให้ทราบสูตรโครงสร้างเบื้องต้นดังนี้



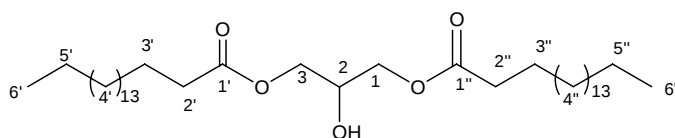
รูปที่ 18 ^1H , ^1H COSY spectrum ของสาร J50





รูปที่ 19 HMBC spectrum ของสาร J50

ข้อมูล HRMS (รูปผนวกที่ 20) ปรากฏ pseudomolecular ion peak $[M+H]^+$ ที่ m/z 629.58025 สอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{39}H_{76}O_5$ แต่จากโครงสร้างเบื้องต้นทำให้ทราบสูตรโมเลกุลคือ $C_{13}H_{24}O_5$ ดังนั้นจำนวนคาร์บอนและโปรตอนที่เหลือจึงเท่ากับ $C_{39-13=26}H_{76-24}$ หรือ $C_{26}H_{52}$ เนื่องจากเป็น equivalent molecule ชิ้นส่วนนี้จึงถูกจัดให้อยู่ทั้งสองข้างของโมเลกุลอย่างละเท่าๆกัน m ในโครงสร้างจึงเท่ากับ 13 หรือ $(CH_2)_{13}$ สาร J50 จึงถูกพิสูจน์ทราบเป็นสารกลุ่ม diacylglycerol ชื่อ Octadecanoic acid 2-hydroxy-3-octadecanoyloxy-propyl ester ข้อมูล NMR แสดงรายละเอียดในตารางที่ 4 สารนี้ยังไม่มีรายงานการค้นพบจากฟองน้ำทะเล

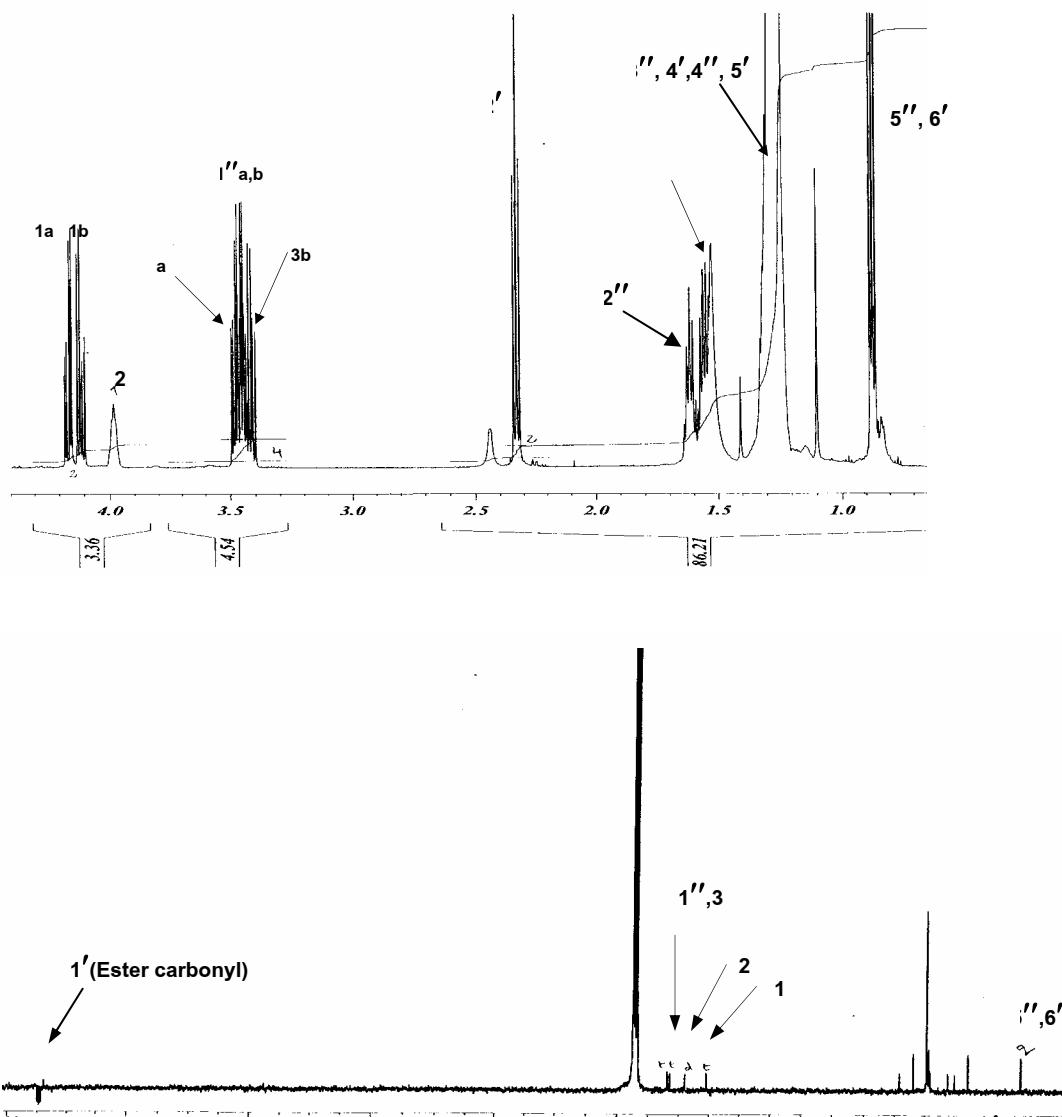


ตารางที่ 4 ข้อมูล NMR ของสาร J50 (CDCl₃)

Position	δ_H	δ_C	COSY correlation	HMBC correlation
1,3	A: 4.19 dd (4.4, 11.4) B: 4.10 dd (4.4, 11.4)	65.0	H-2	C-2, ester carbonyl
2	4.09 p (4.4)	69.0	H ₂ -1, H ₂ -3	C-1, C-3
2',2''	2.35 t (7.6)	34.0	H ₂ -3', H ₂ -3''	ester carbonyl
3',3''	1.62 p (7.6)		H ₂ -2', H ₂ -2''	H-4'H-4''
4',4''	1.25 m	30.0	-	-
5', 5''	1.25 m	23.0, 31.0	-	-
6'/6''	0.83 t (6.83)	15.0	H ₂ -5', H ₂ -5''	C-5', C-5''
ester carbonyl 173.0				

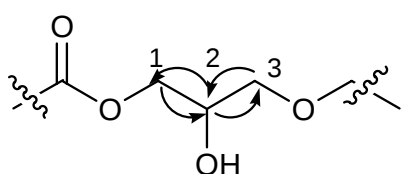
สาร Hexadecanoic acid 3-hexadecyloxy-2-hydroxy-propyl ester (J51)

สาร J51 มีลักษณะเป็นผงสีขาวแยกได้โดย semipreparative TLC ¹H NMR spectrum (รูปที่ 20) ปรากฏสัญญาณ aliphatic methylenes (-CH₂) 2 กลุ่ม กลุ่มแรกต่อเชื่อมกับออกซิเจนอะตอม ที่ δ_H 3.40-4.40, กลุ่มที่ 2 อยู่ในสายตรงของโครงสร้าง ที่ δ_H 1.0-2.50 และพบสัญญาณของเมทิลฟังก์ชันที่ δ_H 0.85 ตามลำดับ จากการทำ integration พบว่าจำนวนโปรตอนของสัญญาณที่ δ_H 1.65, 1.60 และ 0.85 มีจำนวนสองเท่า ส่วนสัญญาณที่ 1.25 (ซ้อนทับกับฟีกน้ำ) มี 46 โปรตอน ข้อมูล ¹³C NMR (รูปที่ 20) มี 12 สัญญาณ และจากข้อมูล DEPT 135 spectrum สามารถจำแนกได้ดังนี้ -O-CH₂ ที่ δ_C 65.8 (C-1), 70.9 (C-3), 71.0 (C-1''); -CHOH ที่ δ_C 69.5 (C-2) ส่วนสัญญาณที่ δ_C 23.0-40.0 จำนวน 6 สัญญาณเป็นของ -CH₂ ในโซ่ตรง และอีกหนึ่งสัญญาณที่ δ_C 14.90 เป็นหมู่ methyl carbon สัญญาณที่ δ_C 29.5 มีความสูงของพีคมากเกิดจากการซ้อนทับกันหลายสัญญาณที่ค่า chemical shift เดียวกัน แสดงลักษณะ chemically equivalent

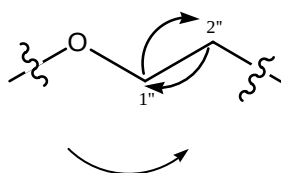


รูปที่ 20 ^1H NMR (บน), ^{13}C NMR (ล่าง) spectrum ของสาร J51

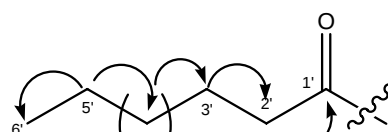
ข้อมูล H,H COSY (รูปที่ 21) แสดงความสัมพันธ์ต่อเนื่องระหว่าง δ_{H} 4.15, 4.12 (H_a -1, H_b -1) กับ δ_{H} 3.98 (H -2) และ H -2 กับ δ_{H} 3.49 (H_a -3), 3.41 (H_b -3) ได้ขึ้นส่วนของกลีเซอรอล ซึ่งยืนยันโดย HMBC cross peaks ที่ H_2 -1/ H_2 -3 ในขณะที่ขึ้นส่วนของโซ่ตรงสร้างจากการวิเคราะห์ H,H COSY cross peaks ความสัมพันธ์ระหว่าง δ_{H} 2.30 (H_2 -2') / δ_{H} 1.65 (H_2 -3'); H_2 -3' / δ_{H} 1.51 (H_2 -4'); H_2 -4' / δ_{H} 1.30 (H_2 -5'); H_2 -5' / δ_{H} 0.85 (H_3 -6') และ δ_{H} 2.45 (H_2 -1'') / δ_{H} 1.65 (H_2 -2'') เชื่อมต่อสายตรงเข้ากับกลีเซอรอลโดยวิเคราะห์ HMBC cross peaks (รูปที่ 22) ที่ H_2 -1, H_2 -2', H_2 -6'/ester carbonyl; H_2 -1'' / δ_{C} 70.9 (C-3), δ_{C} 27.0 (C-2''), δ_{C} 29.5 (C-3')



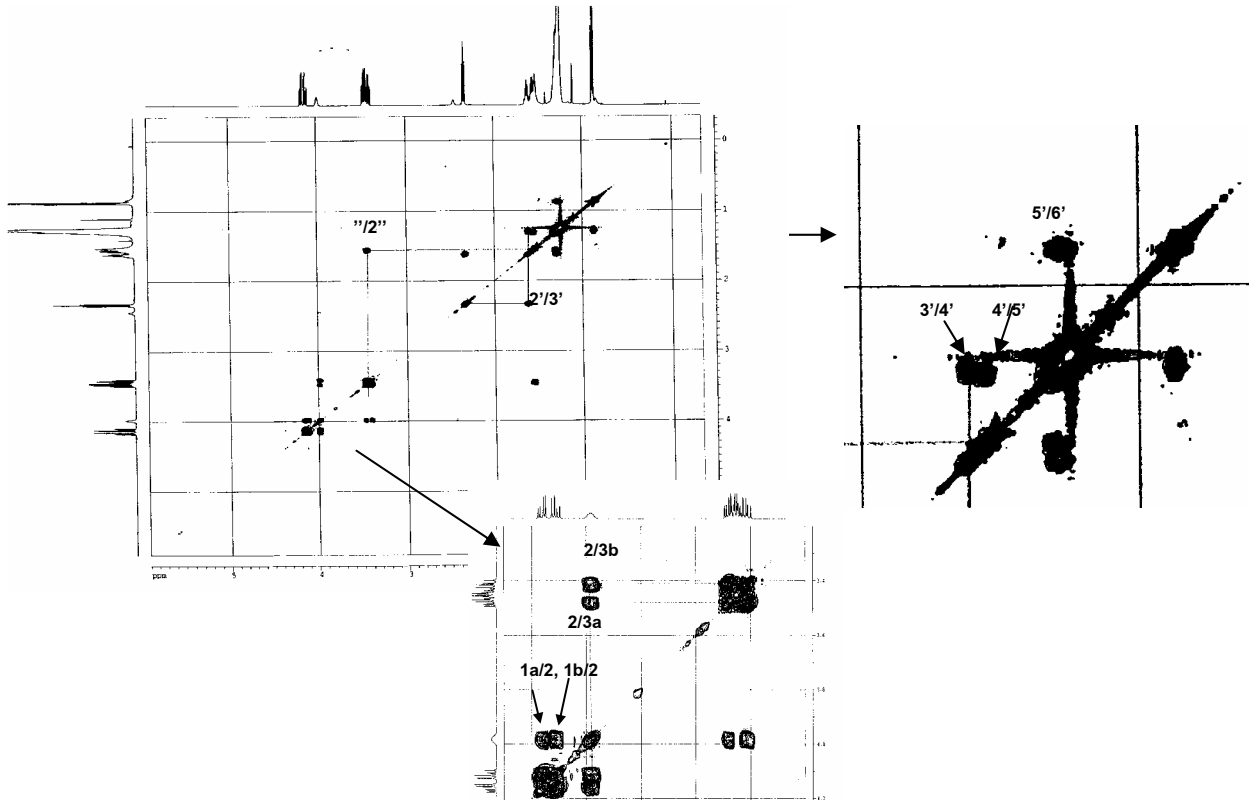
ขึ้นส่วนของกลีเซอรอล



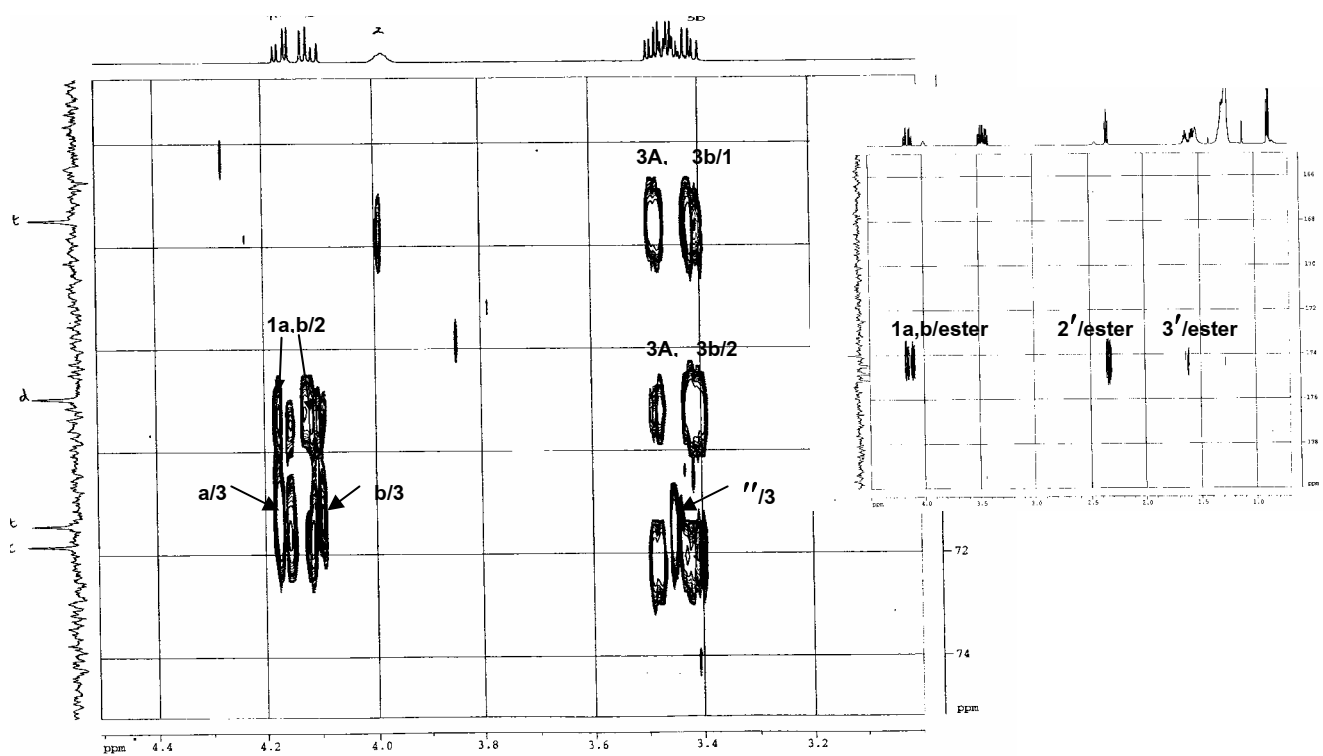
COSY correlation

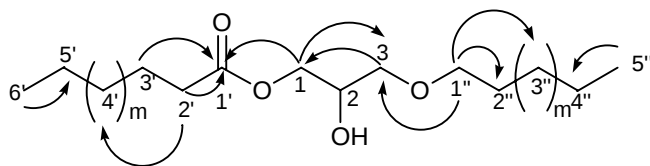


ขึ้นส่วนของสายตรง

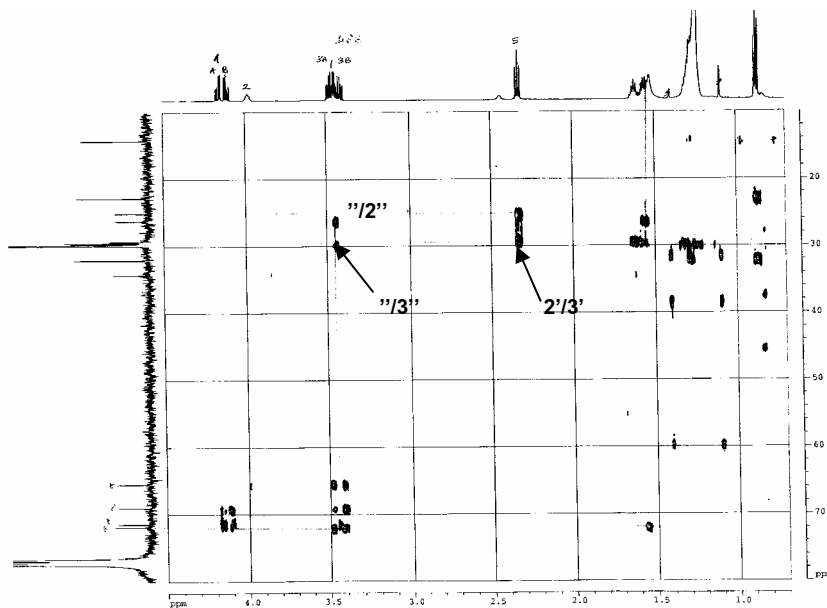


รูปที่ 21 H,H COSY correlation ของสาร J51 แสดงการสร้างชิ้นส่วนกลีเซอรอลและสายโซ่ตรง



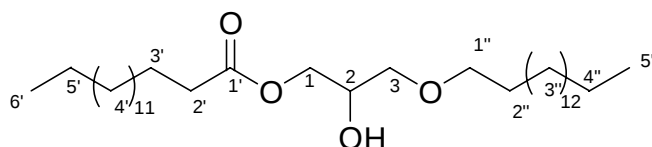


Long range correlation ที่ใช้เชื่อมสายโซ่ตรงกับกลีเซอรอล



รูปที่ 22 HMBC แสดง cross peaks ที่สำคัญของสาร J51

จากข้อมูล HRMS (รูปผนวกที่ 24) ให้ค่า pseudomolecular ion peak ที่ 555.1708 ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{35}H_{70}O_4$ แต่จากข้อมูล NMR สามารถคำนวณสูตรโมเลกุลเป็น $C_{12}H_{24}O_4$ ดังนั้นสูตรโมเลกุลที่เหลือจึงเป็น $C_{23}H_{46}$ ซึ่งเป็นคาร์บอนและโปรตอนตำแหน่ง $4'$ $(CH_2)_{11}$ และ $3''$ $(CH_2)_{12}$ ตามลำดับ ดังนั้นโครงสร้างโมเลกุลของสาร J51 พิสูจน์ให้เป็นอนุพันธ์ของ acylester ether ของ glycerol ชื่อ Hexadecanoic acid 3-hexadecyloxy-2-hydroxypropyl ester



ตารางที่ 5 ข้อมูล NMR ของสาร J51

Position	δ_H	δ_C	COSY correlation	HMBC correlation
1	a:4.15 (dd, 4.4, 11.5)	65.8	H-2	C-2, C-3, ester carbonyl

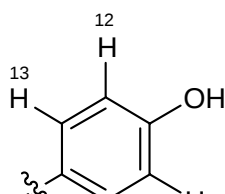
	b:4.12 (dd, 4.4, 11.5)			
2	3.98 m	69.5	H-1, H-3	C-1
3	A:3.49 (dd, 4.2, 9.5) B:3.41 (dd, 4.2, 9.5)	70.9	H-2	C-1, C-2, C-4''
1''	2.45 (dd, 3.4, 6.7, 13.2)	71.0	H-2', H ₂ -2''	C-3, C-2'', C-3''
2'	2.30 (dd, 6.1, 14.3)	34.0	H ₂ -3''	C-3, C-7, ester carbonyl
2'',3'	1.65 (p)	25.0, 27.2	H-1'', H-3'', H ₂ -2', H ₂ -4'	ester carbonyl
3'',4'	1.51 (m)	29.5	H ₂ -2'', H ₂ -4'', H ₂ -2', H ₂ -4'	-
4'',5'	1.30 (m)	23.0, 31.0	H ₂ -3'', H ₂ -5'', H ₂ -3', H ₂ -5', H ₃ -5'	-
5''-CH ₃	0.85 (t, 7.0, 10.5)	14.5	H ₃ -5''	-
6'-CH ₃			H ₂ -4'', H ₂ -5''	-
Ester carbonyl 174.0				

II. สารทุติยภูมิจากฟองน้ำ *Xestospongia* sp.

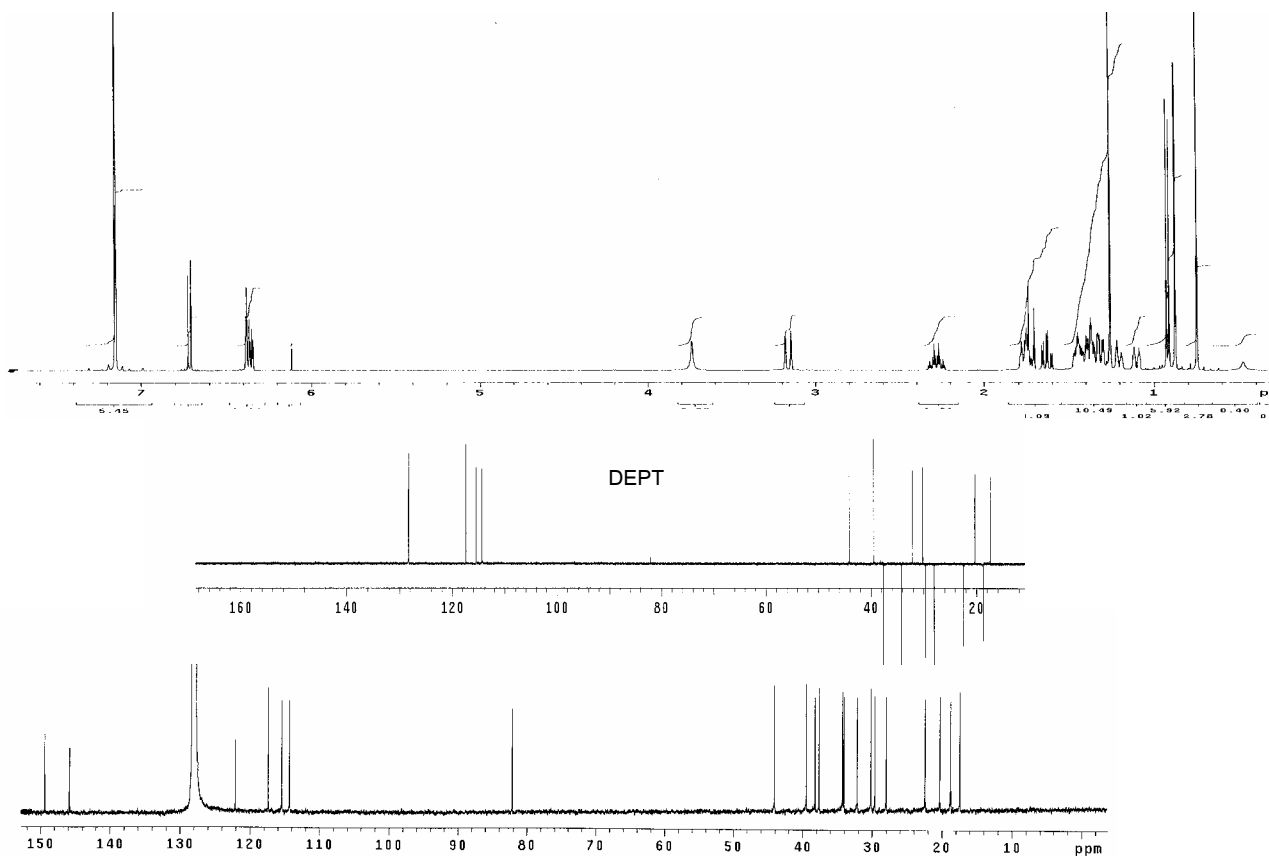
สาร aureol (T4)

สาร T4 มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองแยกได้โดย column chromatography ¹H NMR (รูปที่ 23) แสดง 4 กลุ่มสัญญาณได้แก่ วงแหวนเบนซีนสามสัญญาณ ที่ δ_H 6.10-6.80 สัญญาณของ oxygenated aliphatic methine จำนวน 3 สัญญาณ ที่ δ_H 2.1-4.0; aliphatic methylene ระหว่าง δ_H 1.0-2.0 และเมทิลฟังก์ชันจำนวน 4 สัญญาณ ที่ δ_H 0.85-1.20 ข้อมูล ¹³C NMR พบว่ามีคาร์บอนจำนวน 21 อะตอม สามารถจำแนกเป็นคาร์บอนประเภทต่างๆโดยใช้ข้อมูลจาก DEPT 135 spectrum (รูปที่ 23) ดังนี้ เมทิลคาร์บอนจำนวน 4 สัญญาณ ที่ δ_C 17.4, 20.2, 30.2 และ 32.1; aliphatic methylenes จำนวน 6 สัญญาณ ที่ δ_C 18.7, 22.4, 27.9, 29.6, 34.2, 37.6; aliphatic methine จำนวน 2 สัญญาณ ที่ δ_C 39.5, 44.1; aromatic methine จำนวน 3 สัญญาณ ที่ δ_C 114.4, 115.5, 117.4 และ quaternary carbons จำนวน 6 สัญญาณ ได้แก่ δ_C 34.0, 38.2, 82.1, 122.1, 145.8, 149.4

¹H NMR ที่ δ_H 6.32 (H-13, dd, J = 3, 9 Hz), 6.40, (H-15, d, J = 3 Hz), 6.70 (H-12, J = 9 Hz) เป็นความสัมพันธ์ในลักษณะ ortho-ortho และ ortho-meta ทำให้สามารถหาชิ้นส่วน 1, 2, 4-trisubstitution benzene ring ได้ดังรูป



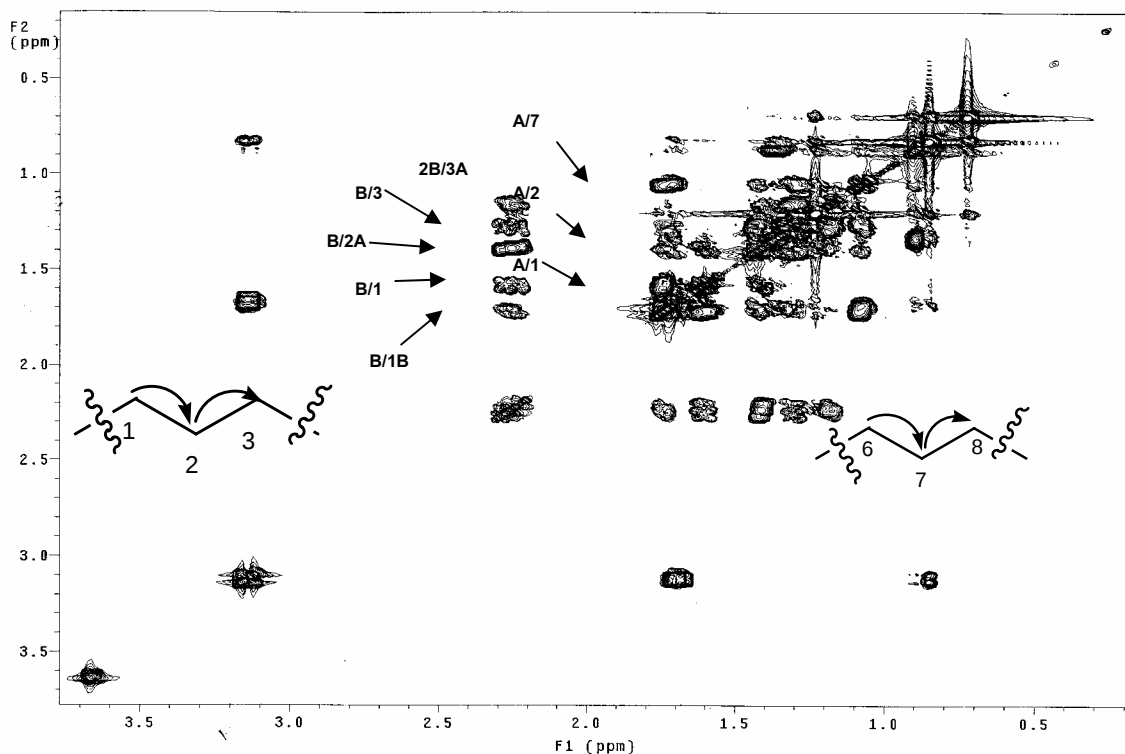
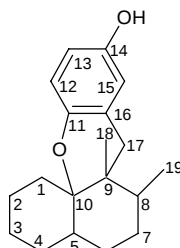
ข้อมูล LRMS ให้ค่า molecular ion peak ที่ m/z 314.2201 (รูปผนวกที่ 29) สอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{21}H_{29}O_2$ มี unsaturation number เท่ากับ 7 เนื่องจากมีวงแหวนเบนซีน 1 วง (unsaturation number = 4) ดังนั้นที่เหลือจึงเป็นวงแหวน 3 วงซ้อนกัน



รูปที่ 23 ^1H NMR (บน) และ ^{13}C NMR (ล่าง) ของสาร aureol (T4) (CDCl_3)

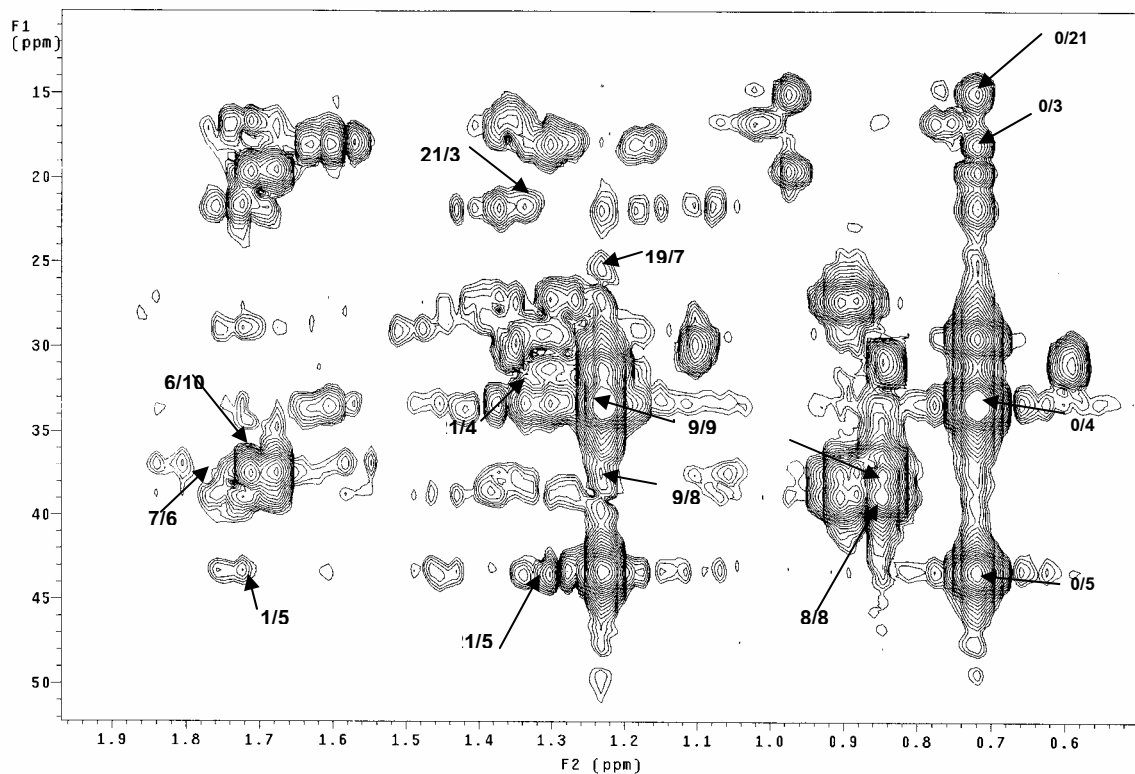
Spin system แบบ $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ และ $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ สร้างโดยข้อมูล COSY cross peak (รูปที่ 24) ต่อเนื่อง ดังนี้ δ_{H} 1.28 (H_a-3), 1.42 (H_b-3 , m)/1.42 (H_a-2), 2.20 (H_b-2 , p, $J = 4$, 13)/1.60 (H_a-1 , t, 4.5, 13), 1.76 (H_b-1 , t, 4, 13) และ δ_{H} 1.20 (H_a-6 , br d, $J = 13$), 1.30 (H_b-6)/1.10 ($\text{H}-7$) ตามลำดับ

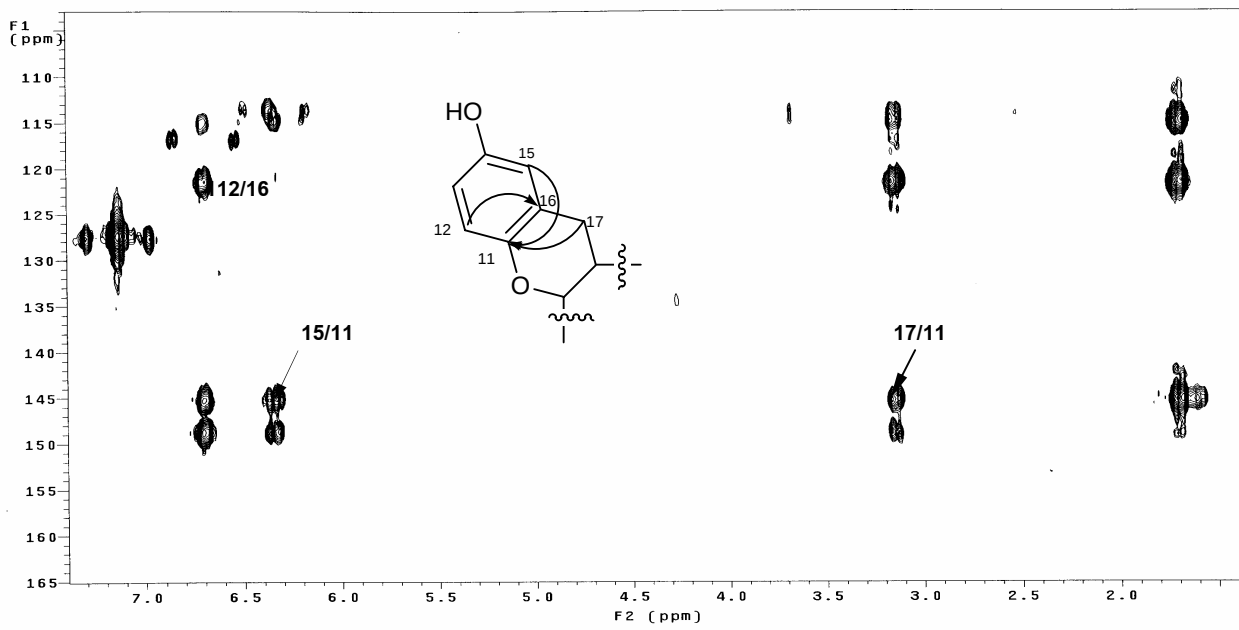
ข้อมูล HMBC ใช้สร้างวงแหวน chroman โดย เชื่อมต่อวงแหวน dihydropyran เข้ากับวงแหวนเบนซีนด้วยการวิเคราะห์ cross peaks ที่ δ_{H} 3.19 (H_2-17 , S) / δ_{C} 145.8 (C-11), 115.5 (C-15) ส่วนวงแหวน tetramethyl-decahydro-naphthalene สร้างโดยการวิเคราะห์ HMBC crossk peak (ตารางที่ 6) ที่สำคัญดังนี้ δ_{H} 1.76 (H_b-1), δ_{H} 1.28 (H_a-3 , br d, $J = 13.0$) / δ_{C} 44.1 (C-5); δ_{H} 1.23 ($\text{H}-2$, p, $J = 4$, 13) / δ_{C} 82.1 (C-10); δ_{H} 1.35 (H_2-6) / δ_{C} 34.2 (C-4); δ_{H} 1.35 (H_2-5) / δ_{C} 38.2 (C-9), C-10; δ_{H} 1.10 (H_2-7) / δ_{C} 38.2 (C-9) ระบบทั้งสองส่วนถูกต่อเชื่อมกันด้วย cross peak δ_{H} 0.86 (H_3-18 , d, $J = 17$) / C-17 สารที่แยกได้นี้อยู่ในกลุ่ม Sesquiterpene hydroquinone ชื่อ aureol (T4) ดังรูป



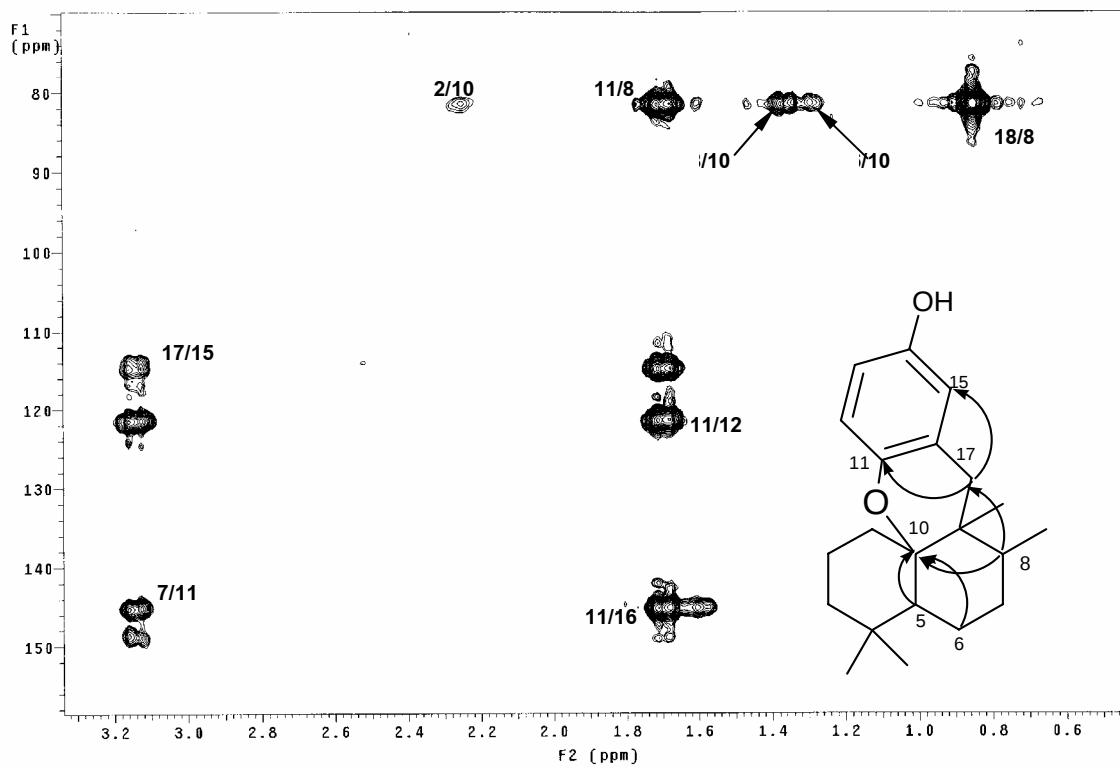
รูปที่ 24 H,H COSY spectrum ของสาร aureol (T4)

สาร aureole ถูกแยกได้จากฟองน้ำหลายชนิดโดยเฉพาะสกุล *Dysidea* เช่น *D. cinerea*, *D. avara*, (Crispino *et al.*, 1989; Minale, *et al.*, 1974) ส่วนฟองน้ำชนิดอื่นได้แก่ *Dactylospongia elegans* และ *Smenospongia* sp. (Mitome *et al.*, 2002; Kondracki and Guoyot, 2004) aureol มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญหลายประการได้แก่ ด้านการเจริญของเชื้อไวรัส เช่น เชื้อไขหวัดใหญ่ PR8 influenza ($EC_{50} = 0.0063 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$), ยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็ง เช่น P388 ($IC_{50} = 9 \mu\text{g}/\text{ml}$), เซลล์มะเร็งปอด A549 ($IC_{50} = 4.3 \mu\text{g}/\text{ml}$) (Nakatani *et al.*, 2003)





รูปที่ 25 HMBC spectrum ของสาร aureol (T4)



รูปที่ 25 (ต่อ)

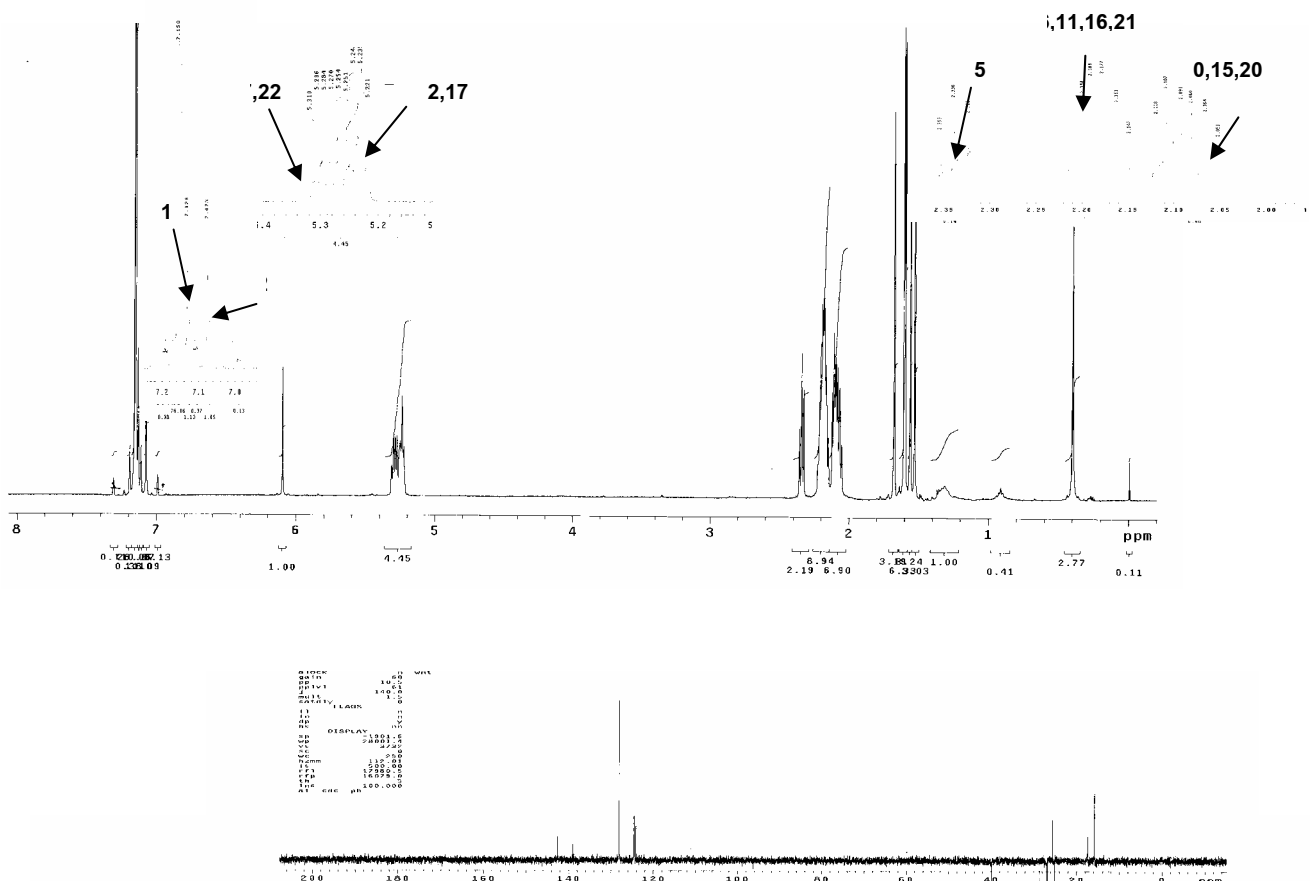
ตารางที่ 6 NMR data ของสาร aureol (T4) (CDCl₃)

Position	¹ H-NMR (multiplicity, J in Hz)	¹³ C-NMR	COSY	HMBC
1	1.60, 1.76 (p, 4.5, 13.5)	29.6	H-2	C-2, C-3, C-5, C-10
2	1.42, (m), 2.2 (p, 4, 13)	18.7	H-1, H-3	C-4, C-10
3	1.28, (brd, 13) 1.45 (m)	22.4	H-2	C-1, C-5
4	-	34.2	-	
5	1.35 (m)	44.1	-	
6	1.20 (brd, 13.0), 1.30 (m)	34.0	H-7	C-5, C-8, C-10
7	1.10 (m)	27.9	H-6	C-9, 19-CH ₃
8	1.34 (s)	39.5	-	C-6, C-10
9	-	38.2	-	
10	-	82.1	-	
11	-	145.8	-	
12	6.70(d, 9)	117.4	H-13	C-11, C-14, C-16,
13	6.32 (dd, 9, 3)	114.3	H-12	C-11, C-14, C-15
14	-	149.4	-	
15	6.40 (d, 3)	115.5	-	C-11, C-13
16	-	122.1	-	
17	3.19 (s, 17)	37.6	-	C-8, C-15, C-16, 18-CH ₃
18-CH ₃	0.86 (d, 17)	20.3	-	C-9, C-10, C-17
19-CH ₃	1.23 (s)	30.2	-	C-6, C-7, C-8, C-9
20-CH ₃	0.72 (s)	32.1	-	C-3, C-4, C-5, 21-CH ₃

21-CH ₃	1.42 (s)	17.4	-	C-3, C-4, C-5, 20-CH ₃
--------------------	----------	------	---	-----------------------------------

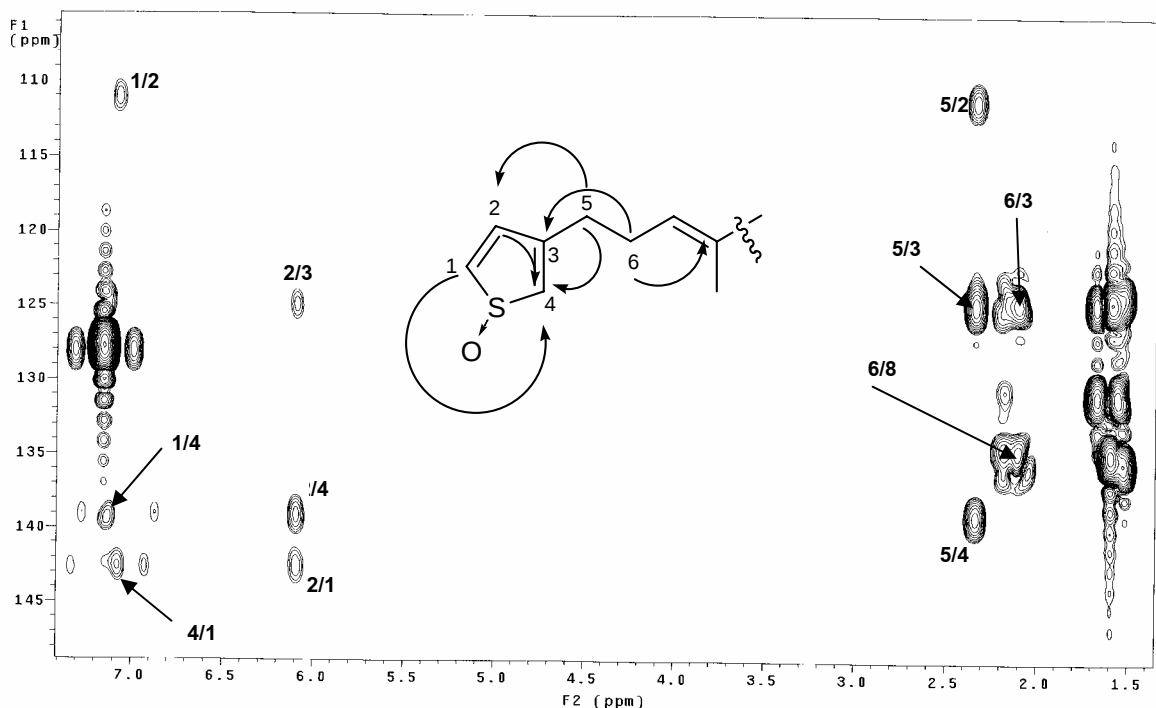
สาร 3-(4,8,12,16-Tetramethyl-heptadeca-3,7,11,15-tetraenyl)-thiophene 1-oxide (T12)

มีลักษณะเป็นน้ำมันใสแยกได้โดย preparative TLC (แผนภาพที่ 2) ¹H NMR (รูปที่ 26) ปรากฏสัญญาณดังนี้ เมทิลฟังก์ชันจำนวน 5 สัญญาณ (δ_H 1.67, 1.60, 1.59, 1.55, 1.52) aliphatic methylene จำนวน 5 สัญญาณ ผลการทำ integration พบว่า สัญญาณที่ δ_H 2.05-2.11 ประกอบด้วยโปรตอนจำนวน 6 อะตอม สัญญาณที่ δ_H 2.15-2.20 มี 8 อะตอมและอีก หนึ่งสัญญาณแยกออกมาคือ δ_H 23.4 (H₂) ในโปรตอนสเปกตรัมยังพบ olefinic protons จำนวน 2 สัญญาณ ระหว่าง δ_H 5.22-5.28 มี 4 โปรตอน และ 3 โปรตอนเรโซแนนซ์บริเวณวงแหวนอะโรมาติก (δ_H 7.12, 7.07, 6.15) ข้อมูล ¹³C NMR ปรากฏ 25 สัญญาณ และจาก DEPT 135 spectrum สามารถจำแนกประเภทสัญญาณได้ดังนี้ 7 sp^2 , 5 sp^2 quaternary, 8 sp^3 และ 5 เมทิลฟังก์ชัน ดังนั้นจึงเสนอสูตรโมเลกุลเบื้องต้นคือ C₂₅H₃₈



ข้อมูล HRMS แสดง molecular ion peak ที่ m/z 386.2643 สอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{25}H_{18}OS$ โมเลกุลนี้
 รูปที่ 26 1H NMR (บน), DEPT (กลาง) และ ^{13}C NMR (ล่าง) spectrum ของ T12 ($CDCl_3$)
 จึงมี unsaturation number เท่ากับ 7 เนื่องจาก มี 12 sp^2 คาร์บอน คำนวณเป็น 6 degree of unsaturation ดังนั้น
 ส่วนที่เหลือของโมเลกุลจึงต้องเป็น 1 วงแหวน โดยพิจารณา HMBC cross peaks (รูปที่ 27) ของอะโรมาติกโปรตอน
 ที่ δ_H 7.12 (H-1, brs)/ δ_C 125.1 (C-3), 132.9 (C-4); 6.15 (H-2, brs)/C-4; 7.07 (H-4, brs)/ δ_C 142.8 (C-1), 111.9
 (C-2) โปรตอนและคาร์บอนชุดนี้จึงถูกจัดให้เป็นโปรตอนในวงแหวน thiophene

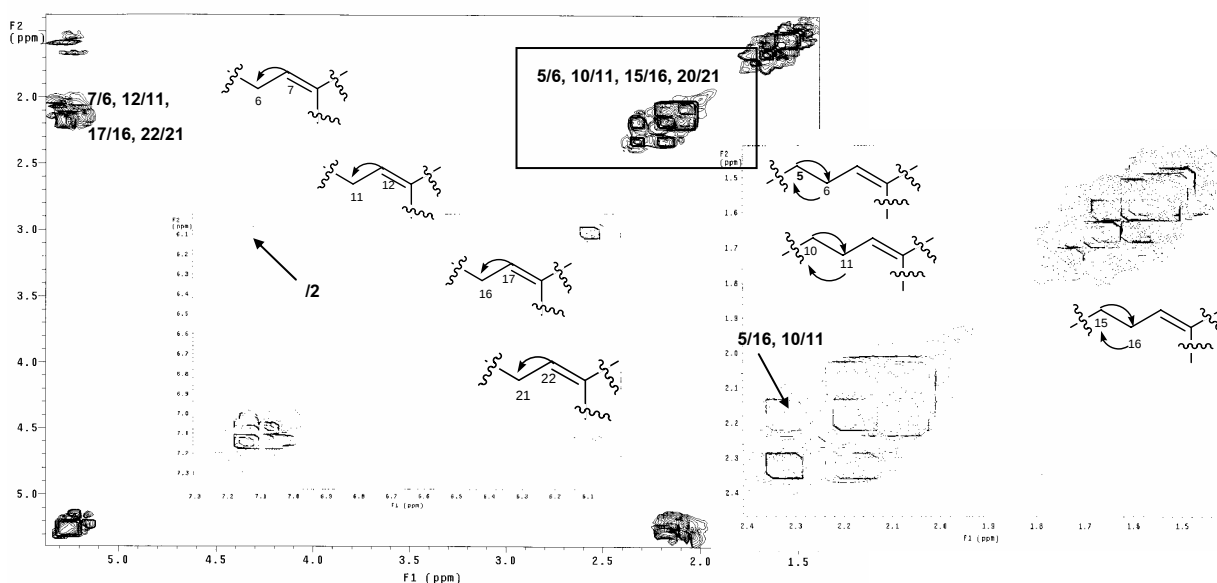
pulse sequence: ghmqc_da



รูปที่ 27 HMBC cross peaks ที่สำคัญของวงแหวนของสาร T12

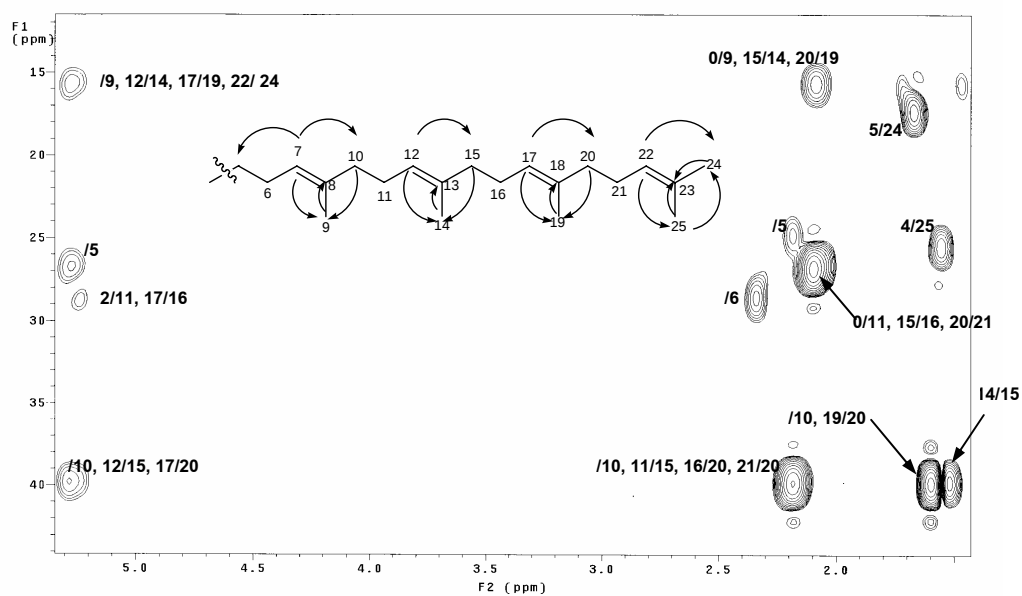
โครงสร้างของสายตรงสร้างโดยใช้ข้อมูล H,H COSY (รูปที่ 28) ดังนี้ δ_H 2.34 (H_2 -5, t, $J = 7.5, 15.0$) / δ_H 2.19 (H_2 -6, m) / δ_H 5.28 (H-7); δ_H 2.11 (H_2 -10, m) / δ_H 2.17 (H_2 -11, m) / δ_H 5.22 (H-12, T, $J = 7, 13$); δ_H 2.05 (H_2 -

15, m)/ δ_{H} 2.18 (H₂-16, m)/ δ_{H} 5.24 (H-17, m); δ_{H} 2.20 (H₂-20, m)/ δ_{H} 2.10 (H₂-21, m)/ δ_{H} 5.26 (H-22, m) ดังนั้นในสายตรงประกอบด้วย spin system แบบ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$ จำนวน 4 ชุด



รูปที่ 28 COSY spectrum ของสาร T12

ใช้ข้อมูล HMBC cross peak (รูปที่ 29) เชื่อมต่อ spin system แบบ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$ ให้เป็นโครงร่างเส้นตรง ดังนี้ H-7/ δ_{C} 40.1 (C-10); H-12/ δ_{C} 40.6 (C-15); H-17/ δ_{C} 40.2 (C-20) และ H₂-20/ δ_{C} 124.8 (C-22) เมทิลโปรตอนที่มี δ_{H} 1.67 (H₃-24) และ 1.55 (H₃-25) แสดง 2J -correlation กับ sp^2 quaternary carbons C-23 (δ_{C} 131.1) และทั้งสองเมทิลโปรตอนแสดง 3J -correlation กับ C-22 จึงสรุปได้ว่าปลายด้านหนึ่งของโครงสร้างเป็น geminal dimethyl ดังนั้นปลายอีกด้านหนึ่งจึงถูกเชื่อมต่อไปกับวงแหวน thiophene-S-Oxide ซึ่งถูกยืนยันโดย HMBC cross peak H₂-5/C-4 หมู่เมทิลที่เหลือจำนวน 3 หมู่ถูกเชื่อมต่อกับ δ_{C} 134.6 (C-8); 135.6 (C-13) และ 135.0 (C-18) โดยข้อมูล HMBC cross peaks ดังนี้ H₃-9/ δ_{C} 124.9 (C-7), C-8, C-10; H₃-14/ δ_{C} 124.3 (C-12), C-13, C-15; H₃-19/ δ_{C} 124.7 (C-17), C-18 and C-20 ตามลำดับ สารนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม sesterterpene-S-Oxide ชื่อ 3-(4,8,12,16-Tetramethylheptadeca-3,7,11-trienyl)-thiophene 1-oxide ซึ่งถูกแยกได้ครั้งแรกจากฟองน้ำสกุลนี้



รูปที่ 29 HMBC cross peak ที่สำคัญในสายโซ่ตรงของสาร T12

ตารางที่ 7 ข้อมูล NMR ของสาร T12 (CDCl₃)

position	δ_{H} (mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}	COSY correlation	HMBC correlation
1	7.12 br s	142.8	H-2	C-2, 4
2	6.15 br s	111.9	H-1	C-1, 3, 4
3	-	125.1	-	-
4	7.07 br s	139.2	-	C-1, 2
5	2.34 t (7.5, 15.0)	25.3	H-6	H-2, 3, 4
6	2.19 m	28.8	H-5, H-7	C-3, 8
7	5.28 m	124.9	H-6	C-5, 10
8	-	134.9	-	-
9	1.60 s	16.1	-	C-7, 8, 10
10	2.11 m	40.1	H-11	C-7, 9, 11
11	2.17 m	27.2	H-10, H-12	C-8, 10, 12, 13
12	5.22 t (7.0, 13.3)	124.3	H-11	C-11, 14, 15
13	-	135.6	-	-
14	1.52 s	16.1	H-16	C-12, 13, 15
15	2.05 m	40.6	H-16	C-13, 17
16	2.18 m	26.9	H-15, H-17	C-12, 13
17	5.24 m	124.7	H-16	C-13, 14, 15, 20
18	-	135.0	-	-
19	1.59 s	16.1	-	C-17, 18, 20
20	2.20 m	40.2	H-21	C-17, 19, 23
21	2.10 m	27.0	H-20, H-22	C-20, C-23
22	5.28 m	124.8	H-21	C-20, 22, 23
23	-	131.1	-	-
24	1.55 s	17.7	-	C-22, 23, 25
25	1.67 s	25.8	-	C-22, 23, 24

สรุป

การวิจัยครั้งนี้สามารถแยกสารทุติยภูมิได้ 5 ชนิด จากกัลปังหาสีขาวสกุล *Junceella* sp. ได้แก่ junceellin (J36) และ praelolide (J37) ทั้งสองสารจัดอยู่ในกลุ่ม briarane diterpene และเป็น taxonomic marker ของกัลปังหาสกุลนี้ สาร junceellin และ praelolide ถูกพบครั้งแรกจากกัลปังหา *Gorgonella umbraculum* ในมหาสมุทรอินเดีย ทั้งสองสารยังไม่พบข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพ (Subrahmanyam et al., 1998) อย่างไรก็ตามมีรายงานพบบางอนุพันธ์มีฤทธิ์ยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในน้ำโดยเฉพาะตัวอ่อนเพรียง (*Balanus Amphitrite*) (Changyun et al., 2008) ส่วนอีก 3 ชนิดเป็นอนุพันธ์ของ decanoic acid ซึ่งยังไม่พบรายงานการแยกกรดไขมันกลุ่มนี้จากกัลปังหาสกุล *Junceella* มาก่อน กรดไขมันกลุ่มที่แยกได้มีลักษณะสายตรงยาวแบบสมมาตร ในการวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้เนื่องจากสารที่แยกได้มีปริมาณน้อย หากต้องการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพควรใช้ตัวอย่างสดมากกว่า 10 กิโลกรัมเพื่อให้มีสารเพียงพอต่อการทดสอบ

ฟองน้ำสกุล *Xestospongia* sp. ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายกลุ่มโดยเฉพาะอัลคาลอยด์ และ คิวโนน (Calcul et al., 2003) แต่ปัจจุบัน (11.2010) ยังไม่พบรายงานการค้นพบสาร linear sesterterpene และ norsesquiterpene จากฟองน้ำสกุลนี้ (Order Haplosclerida) โดยปกติสารกลุ่ม linear sesterterpene จะผลิตโดยฟองน้ำ Order Dictyoceratida และ Dendroceratida (Shen et al., 2006) ส่วน sesquiterpene hydroquinone ผลิตโดยฟองน้ำสกุล Dictyoceratida (Minale et al., 1974) แต่ในการวิจัยครั้งนี้พบสารทั้งสองกลุ่ม ดังนั้นเป็นไปได้ว่าจุลชีพร่วมอาศัย (symbiosis microorganisms) เป็นผู้สร้างสารดังกล่าว

เอกสารอ้างอิง

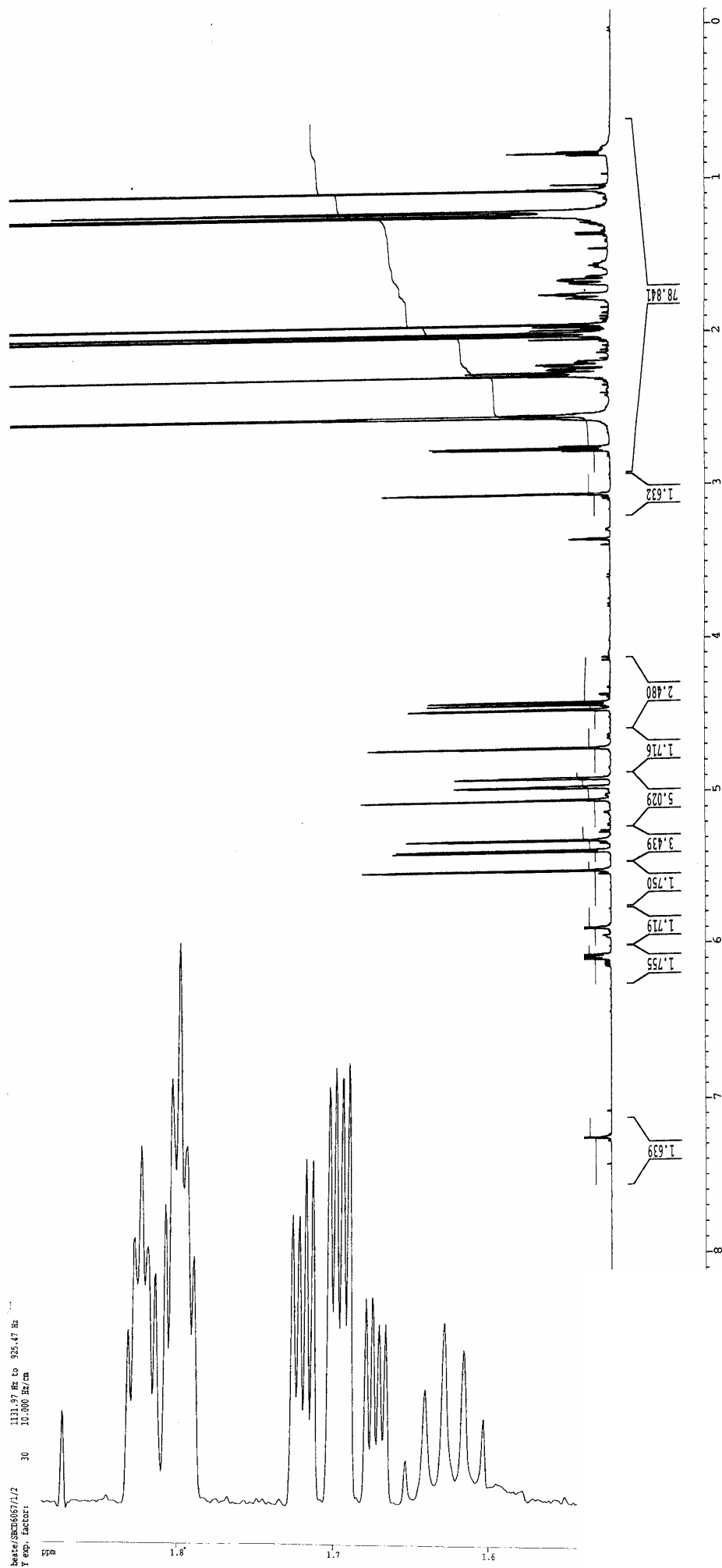
- Bergmann, W.; Feeney, R. J.; *J. Org. Chem* 1951, 16, 918-987.
- Blunt, J. H.; Copp, B. R.; Hu, W. P.; Munro, M.H.G.; Northcote, P. T.; Princep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* 2009, 26, 170-244.
- Calcul, L.; Longeon, A.; Mourabit, A. A.; Guyot, M., Bourguet-Kondracki, M. L. *Tetrahedron*. 2003, 59, 6539-6544.
- Cao, S.; Foster, C.; Brisson, M.; Lazo, J. S.; Kingston, D. V. I. *Bioorg. Med. Chem. Letter*. 2005, 13, 999-1003.
- Changsen, C.; Franzblau, S. G.; Palittapongarnpim, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 43, 3682 - 3687.
- Changyun, W.; Haiyan, L.; Changlun, S.; Yanan, W.; Liang, L.; Huashi, G. *Acta Ecol. Si.*, 2008, 28, 2320-2328.
- Crispino, A, Guilio A.D., Rosa, D.S., and Strazzullo, G. *J. Nat. Prod.* 1989,52 :646-648.
- Hunt, L.; Jordan, M.; De Jesus M., Wurm, F.M. *Biotechno. Bioeng.* 1999, 65, 201-205.
- Edrada, R. A.; Proksch, P.; Wray, V., Christ, R.; Witte, L.; Van Soest, R. V. M. *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 973-967.
- Iguchi, K.; Shimura, H.; Taira, S.; Yokoo, C.; Matsumoto, K.; Yamada, Y. *J. Org. Chem.* 1994, 59, 7499-7502.
- Kondracki, M.L., Guyot, M. *Tetrahedron* 2004, 45, 1995-2000.
- Minale, L.; Riccio, R.; Sodano, G. *Tetrahedron letters*. 1974, 38, 3401-3404.
- Mitome H., Nagasawa , T., Miyaoka H., Yamada, Y., Van Soest, R.W.M. *Tetrahedron* 2002,58, 1693-1696.
- Nakatani, M.; Nakamura, M.; Suzuki, A.; Fuchikami, T.; Inoue, M.; Katoh T. *Arkivoc* 2003, 8: 45-57
- Oku, N.; Nagai, K.; Shindoh, N.; Terada, Y.; Van Soest, R. W. M.; Fusetani, N.; *Bioorg. Med. Chem. Letter*. 2004, 14, 2617-2620.

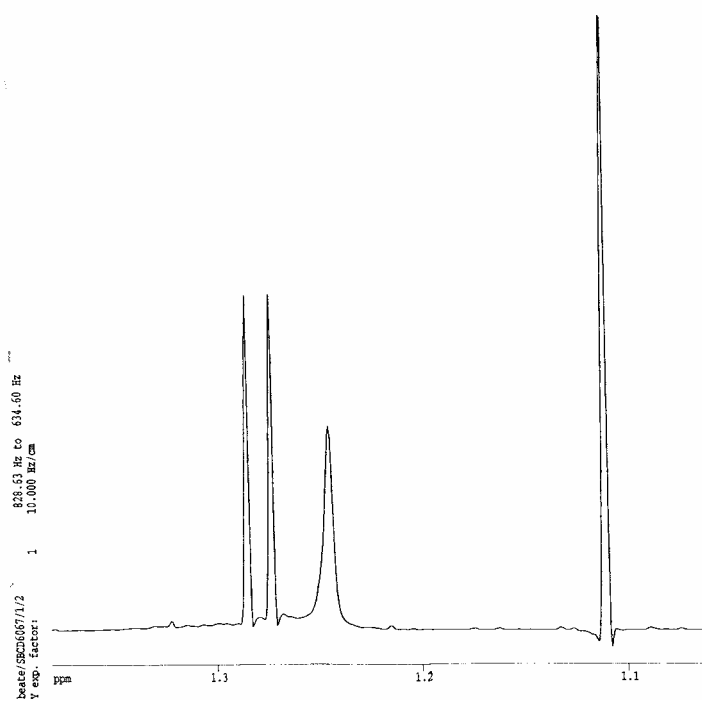
- Paul, V. J. 1992, *Chemical defends of benthic marine invertebrates*, in: ecological roles of marine natural products (Ed Paul, V.J.), Comstock Publishing Associate, London, 164-188.
- Qi, S. H.; Zhang, Si.; Qian, P. Q.; Xiao, Z. H.; Li, M. Y.; *Tetrahedron* 2006, 62, 9123-9130.
- Shen, Y. C.; Lin, Y. C.; Co, C. L.; Ko, C. L.; Wang, L.T. *J. Nat. Prod.* 2003, 66, 302-305.
- Shen, Y. C.; Lo, K. L.; Lin, Y. C.; Khalil, A. T.; Kuo Y. H.; Shih, P. S. *Tetrahedron letters.* 2006, 47, 4007-4010.
- Subrahmanyam, C.; Kulatheeswaran, R.; Ward, R. S. *J. Nat. Prod.* 1998, 61, 1120-1122.
- Sung, P. J.; Gwo, H. H.; Fan, T. Y.; Li, J. J.; Dong, J.; Han, C. C.; Wu, S. L.; Fang, L. S. *Biochem. Syst. Ecol* 2004, 32, 185-196.
- Suwanborirux, K.; Amnuoyopol, S.; Plubrukarn, A.; Pummangura, S.; Kubo, A.; Tanaka, C.; Saito, N. *J Nat. Prod.* 2003, 66, 1441-1446.
- Sung, P. Y.; Lin, M. R.; Su, Y. D.; Chiang, M. Y.; Hu, W. P.; Su, J. H.; Chen, M. H.; Hwang, T. L.; Sheu, J. H. *Tetrahedron.* 2008, 64, 2596-2604.

www.royin.go.th (ค้นเมื่อวันที่ 17 มค. 2554)

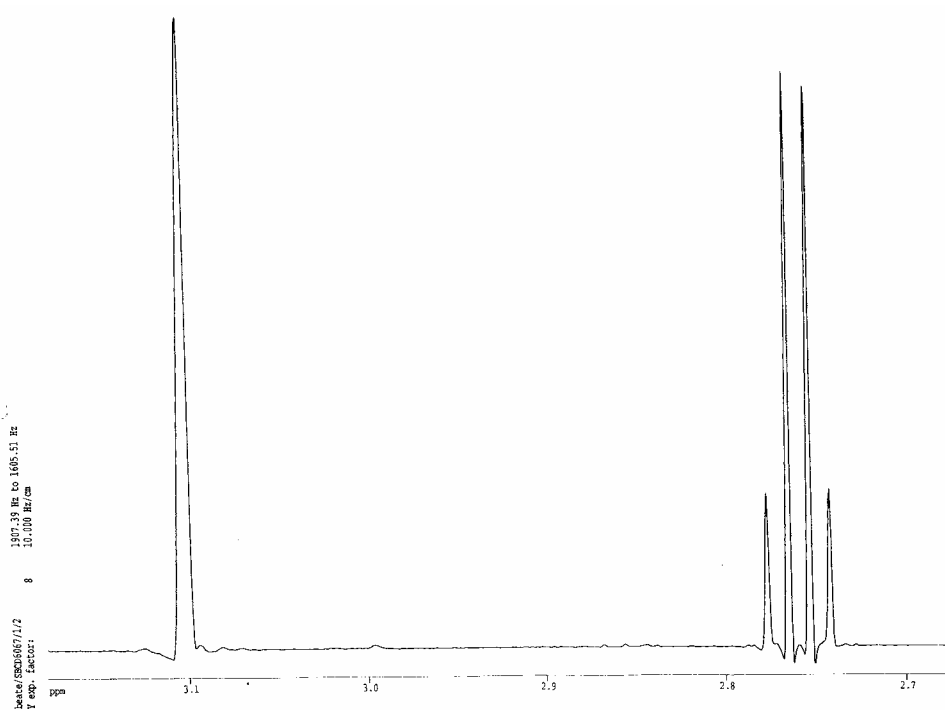
ภาคผนวก

SB006067 9 1

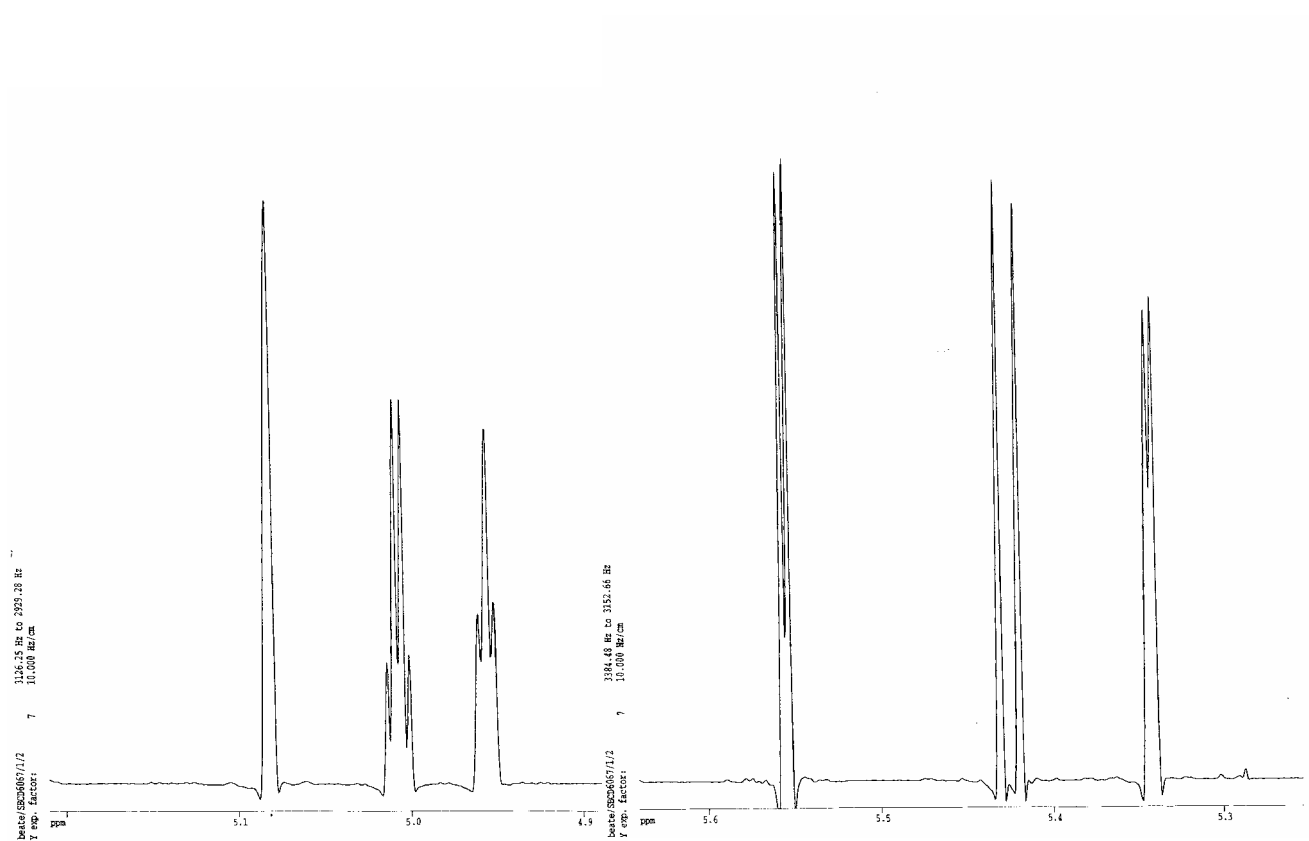
รูปผนวกที่ 1 ^1H NMR ของสาร juncellin (J36) (CDCl_3)



รูปผนวกที่ 1 (ต่อ)

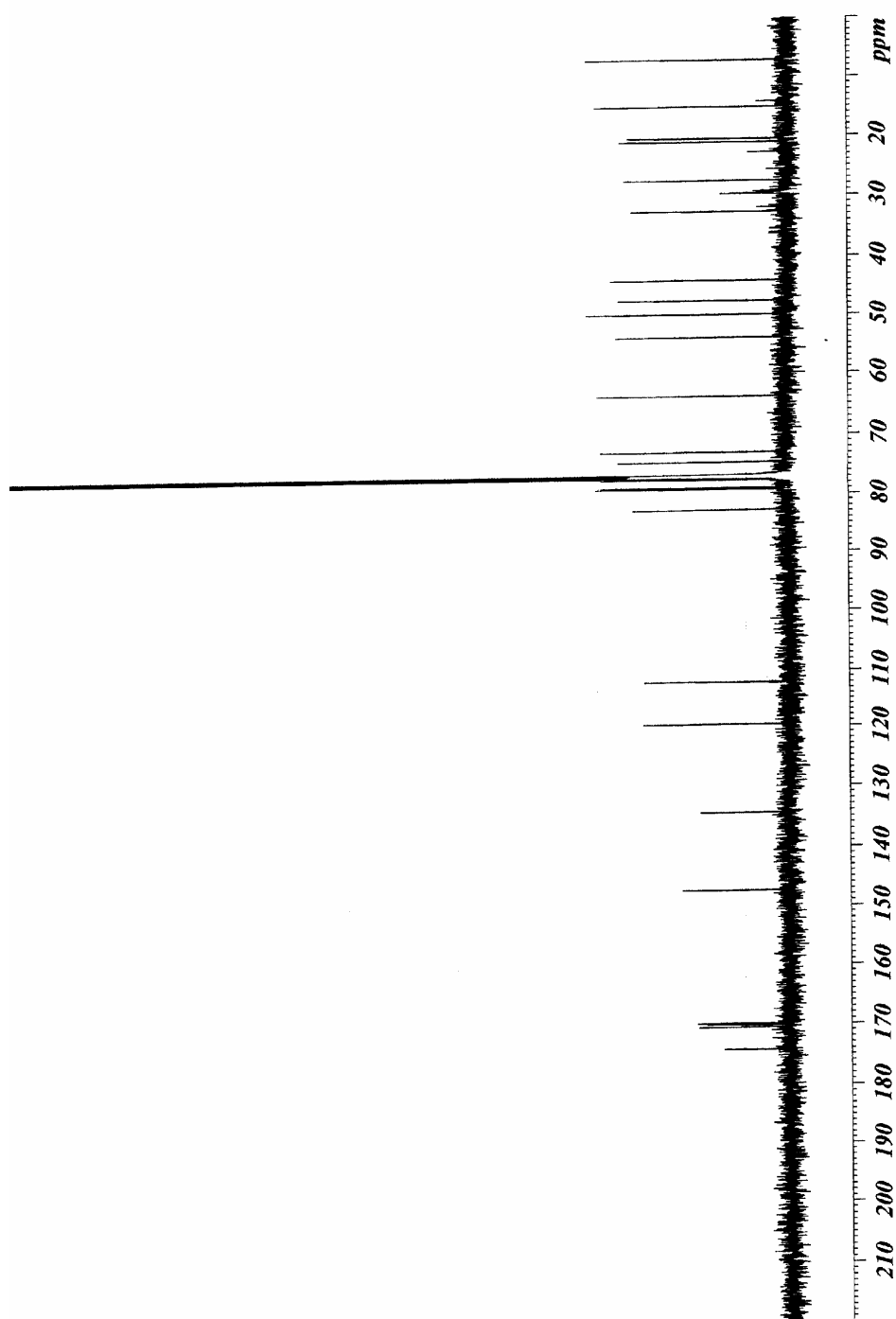


รูปผนวกที่ 1 (ต่อ)

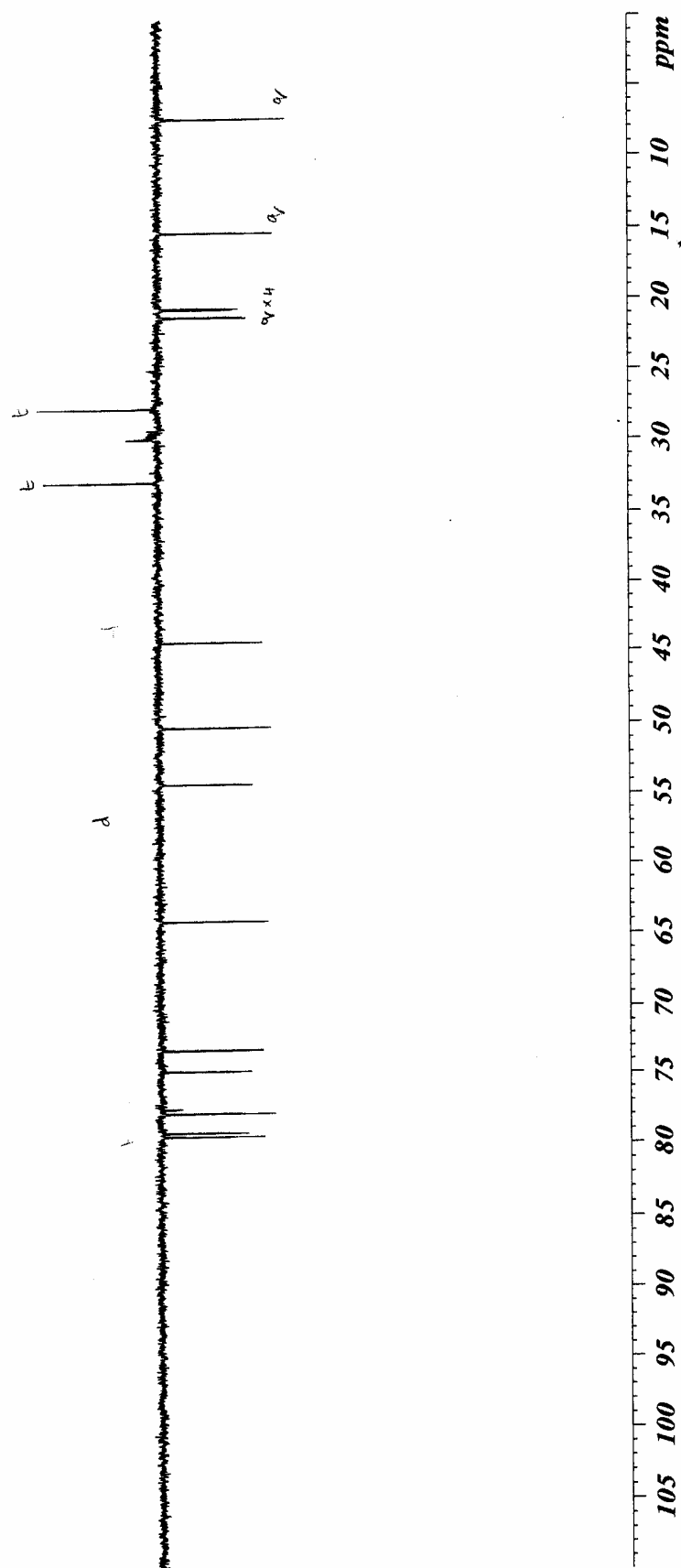


รูปผนวกที่ 1 (ต่อ)

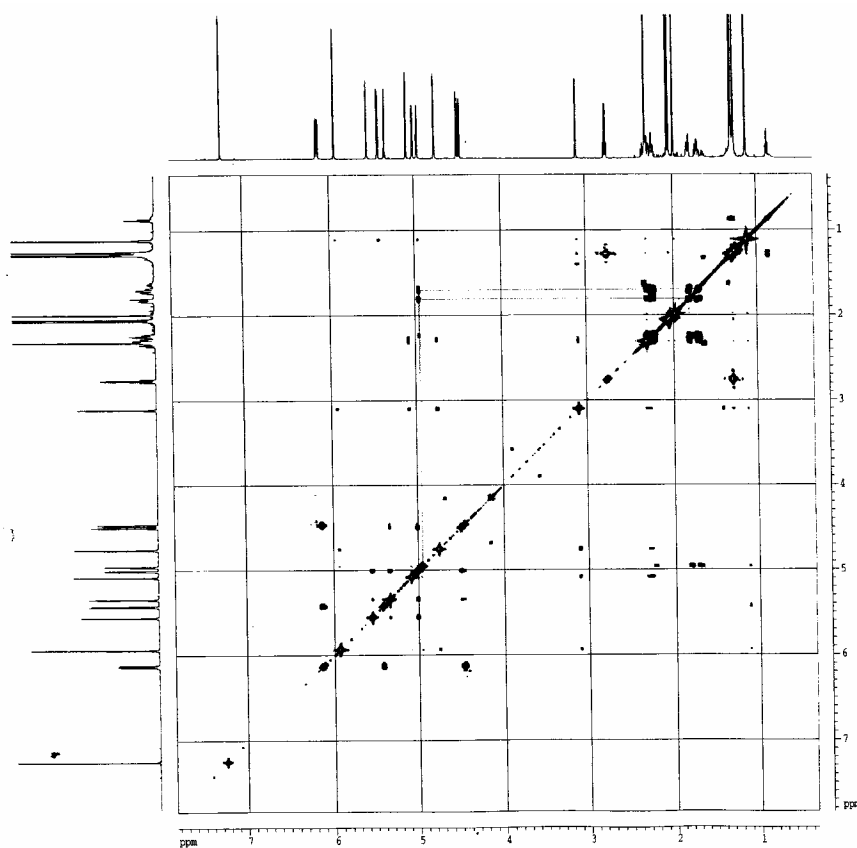
รูปผนวกที่ 1 (ต่อ)



รูปผนวกที่ 2 ^{13}C NMR ของสาร junceellin (J36) (CDCl_3)



รูปผนวกที่ 3 DEPT 135 spectrum ของสาร juncellin (J36) (CDCl_3)



SBCD6067 2 1 Pec
J36

Current Data Parameters

NAME	SBCD6067
EXPNO	2
PROCNO	1

F2 - Acquisition Parameters

Date_	500050
Time	14.48
INSTRUM	spect
PROBHD	5 mm Triple
PULPROG	cosyppgaf
TD	2048
SOLVENT	CDCl3
NS	16
DS	8
SWH	4496.403 Hz
FIDRES	2.195509 Hz
AQ	0.2277876 sec
RG	2048
DW	111.200 usec
DE	12.00 usec
TE	300.0 K

F1 - Acquisition parameters

ND0	1
TD	256
SFO1	600.0325 MHz
FIDRES	17.564074 Hz
SW	7.494 ppm

F2 - Processing parameters

SI	2048
SP	600.0300262 MHz
WDW	SINE
SSB	0
LB	0.00 Hz
GB	0
PC	1.00

F1 - Processing parameters

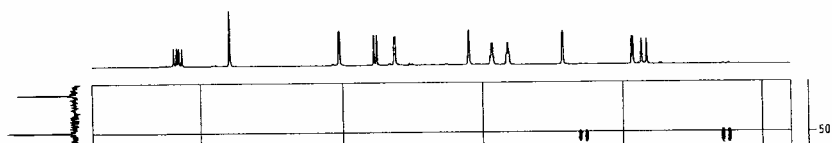
SI	1024
MC2	GF
SP	600.0300162 MHz
WDW	SINE
SSB	0
LB	0.00 Hz
GB	0

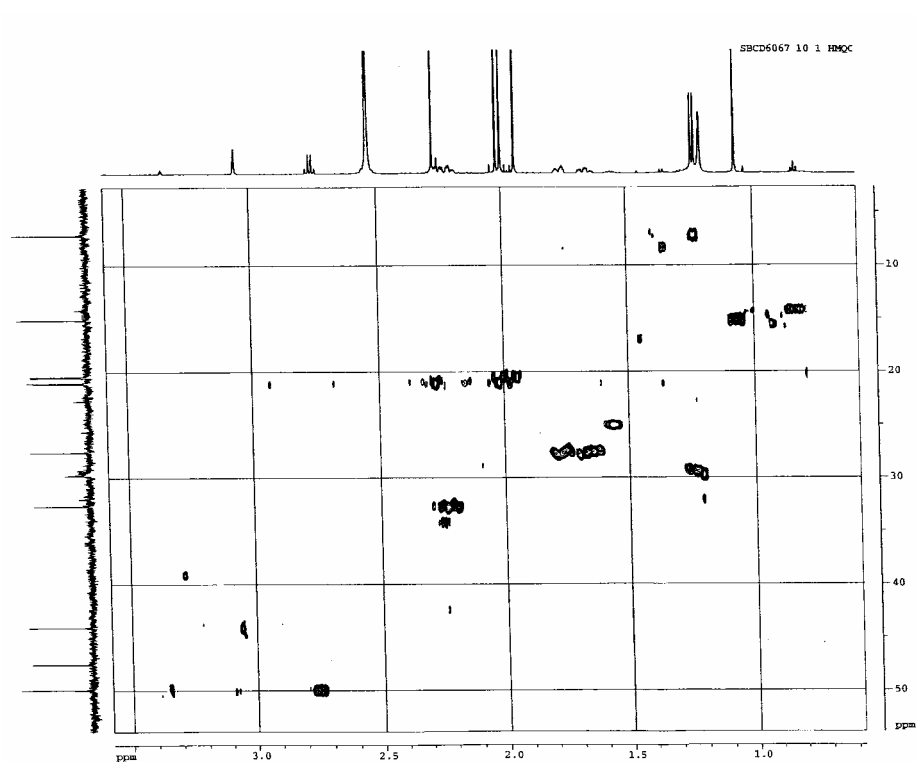
2D NMR plot parameters

CK2	20.00 cm
CK1	20.00 cm
F2PLO	7.840 ppm
F2LO	4704.05 Hz
F2FHI	0.346 ppm
F2FHL	207.64 Hz
F1PLO	7.840 ppm
F1LO	4704.05 Hz
F1FHI	0.346 ppm
F1FHL	207.64 Hz
F2FPMCM	0.37468 ppm/cm
F2FZCM	224.82013 Hz/cm
F1FPMCM	0.37468 ppm/cm
F1FZCM	224.82013 Hz/cm

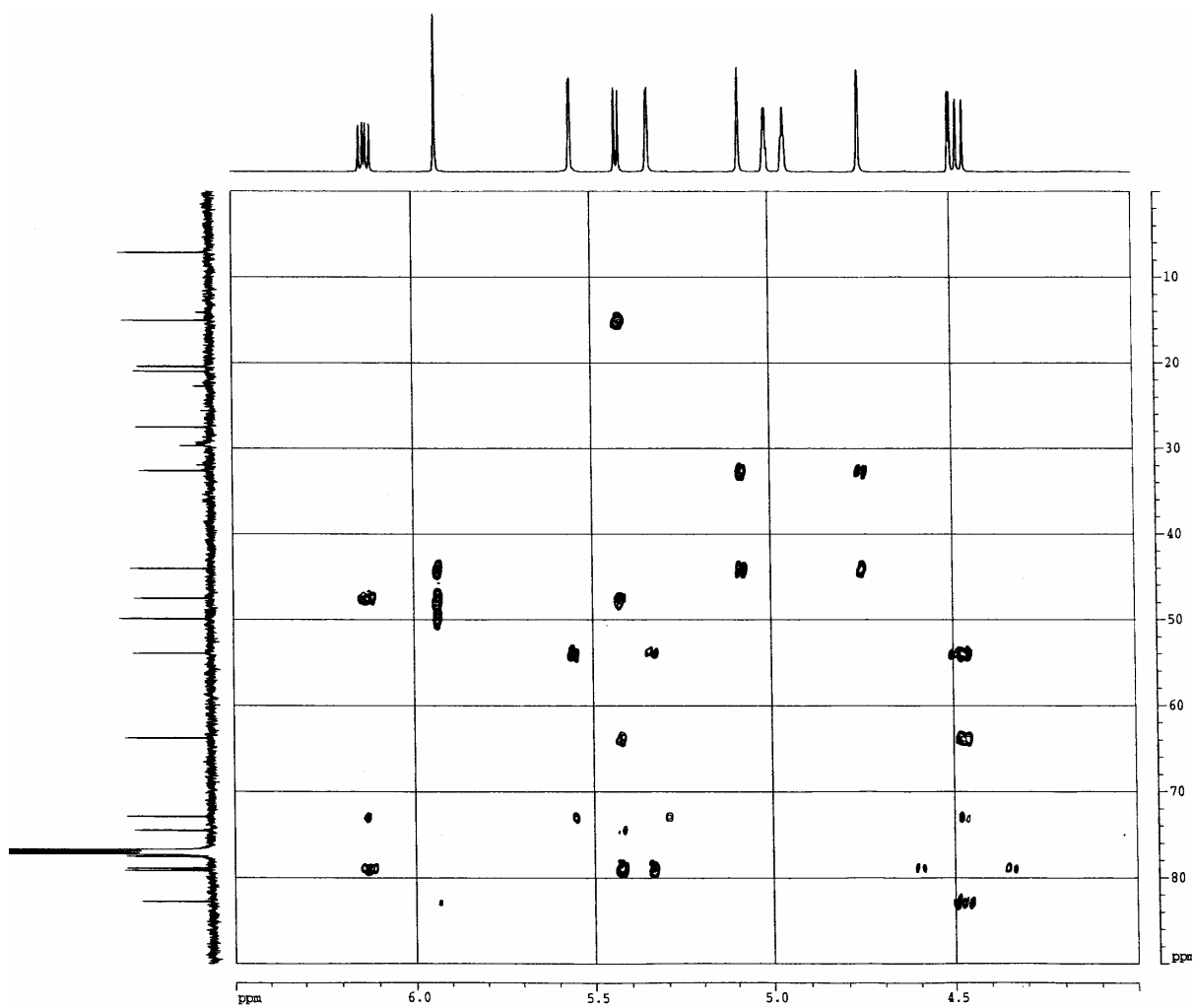
รูปผนวกที่ 4 H,H COSY spectrum ของสาร junceellin (J36)

SBCD6067 10 1 RMQC





รูปผนวกที่ 5 HMQC spectrum ของสาร junceellin (J36)



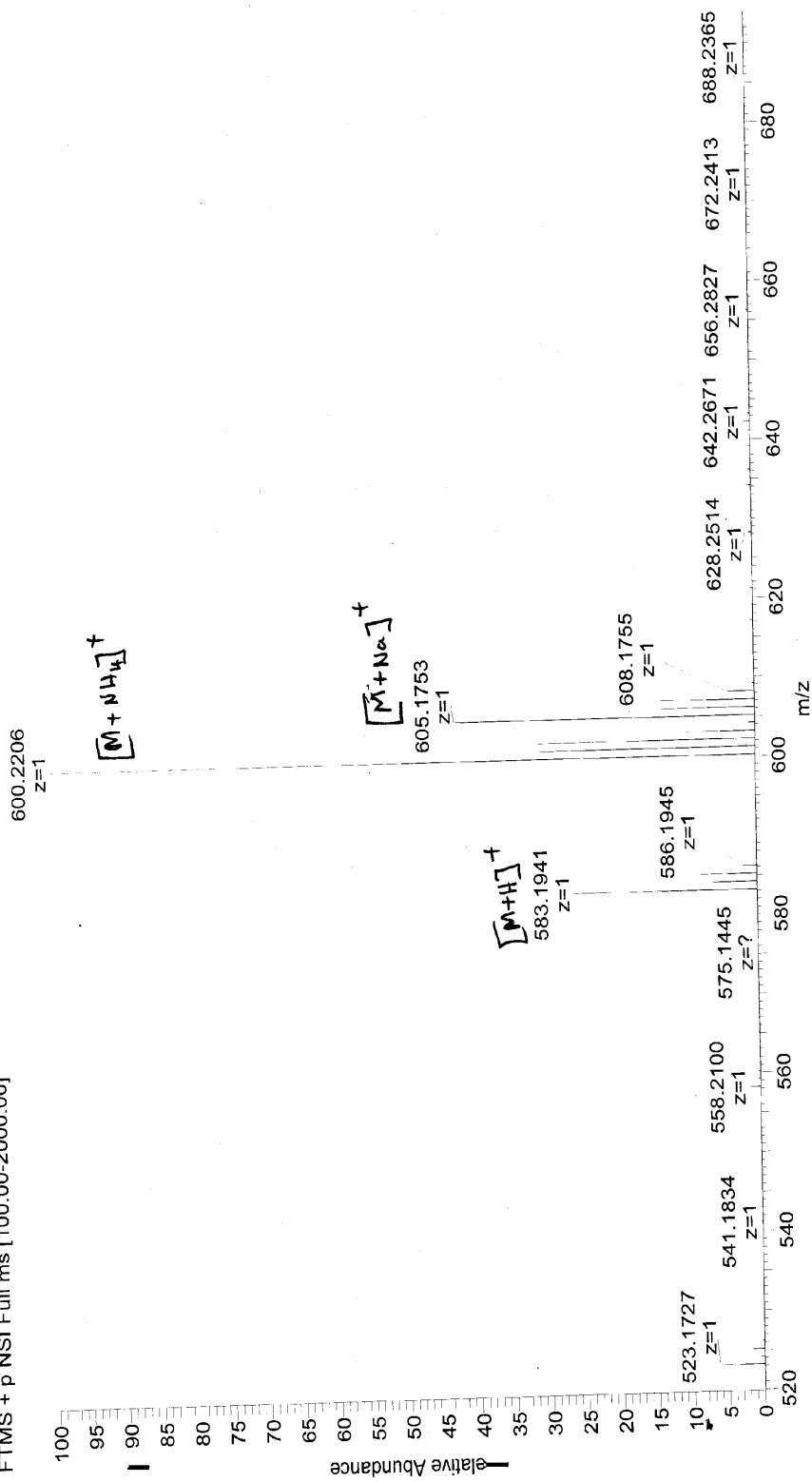
รูปผนวกที่ 6 HMBC spectrum ของสาร junceellin (J36)

C:\Xcalibur\...Nadelmessungen\M0481A

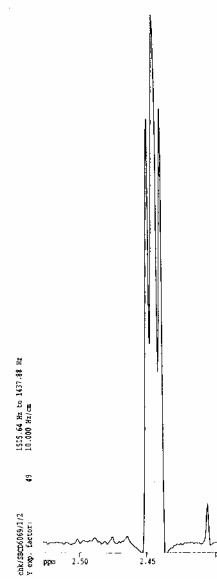
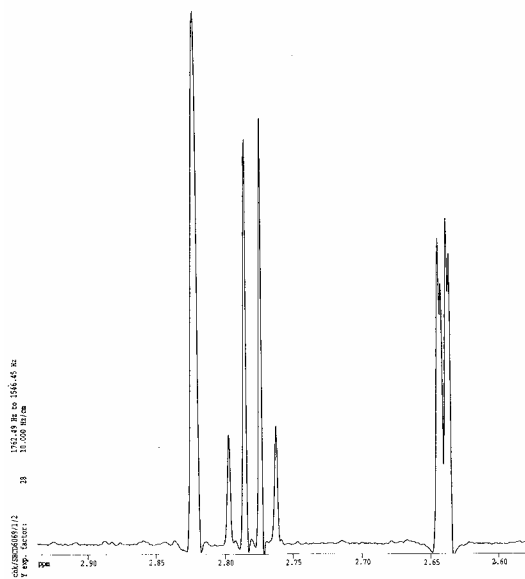
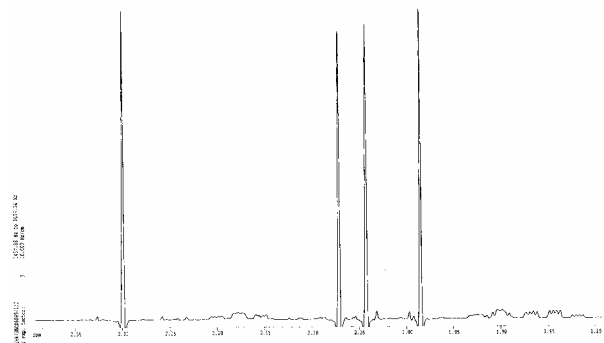
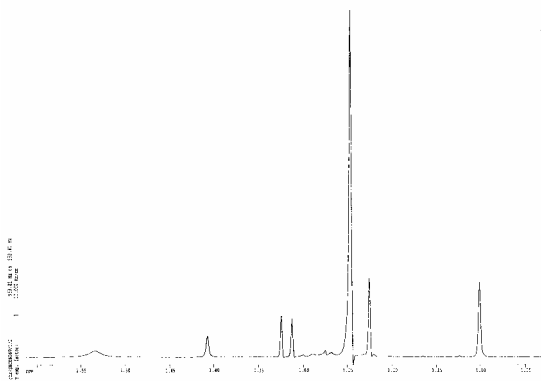
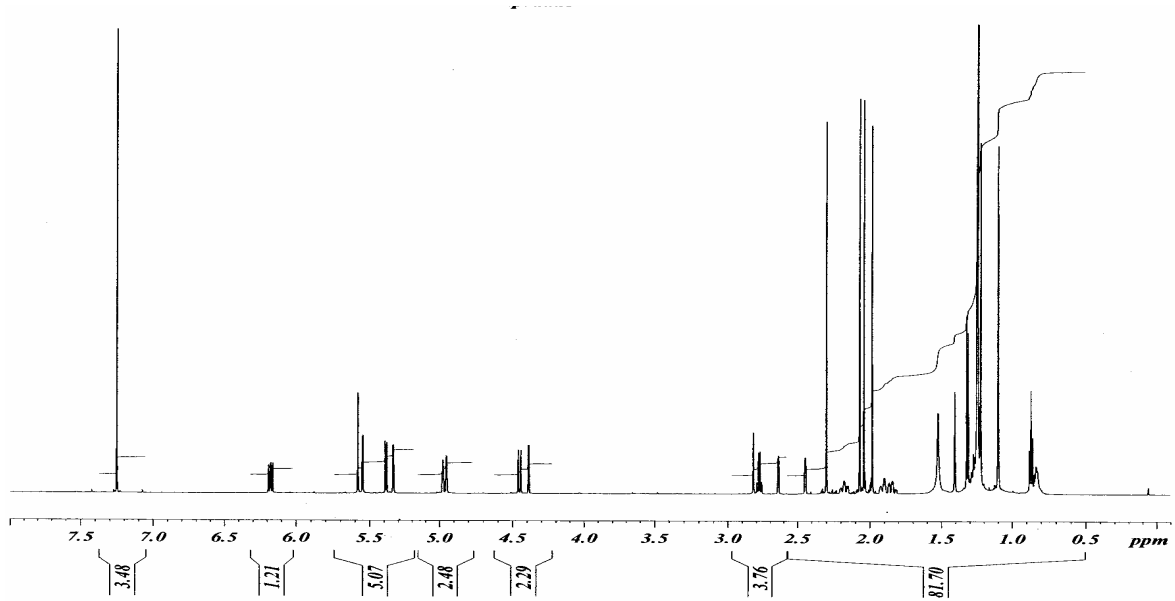
8/9/2010 11:57:08 AM

115gruen, J36, VWR

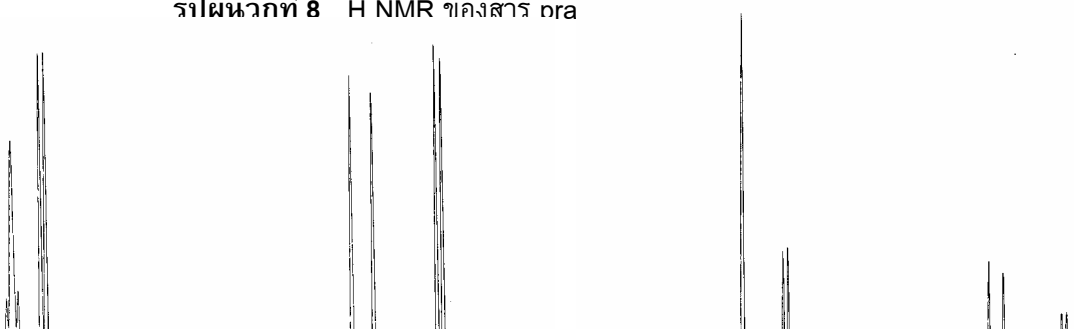
M0481A #1-8 RT: 0.01-0.95 AV: 8 NL: 6.87E7
T: FTMS + p NSI Full ms [100.00-2000.00]

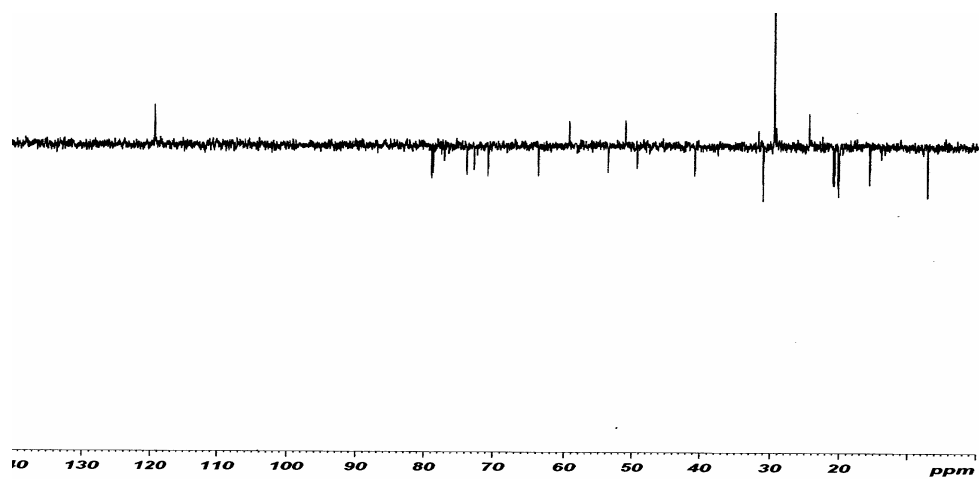
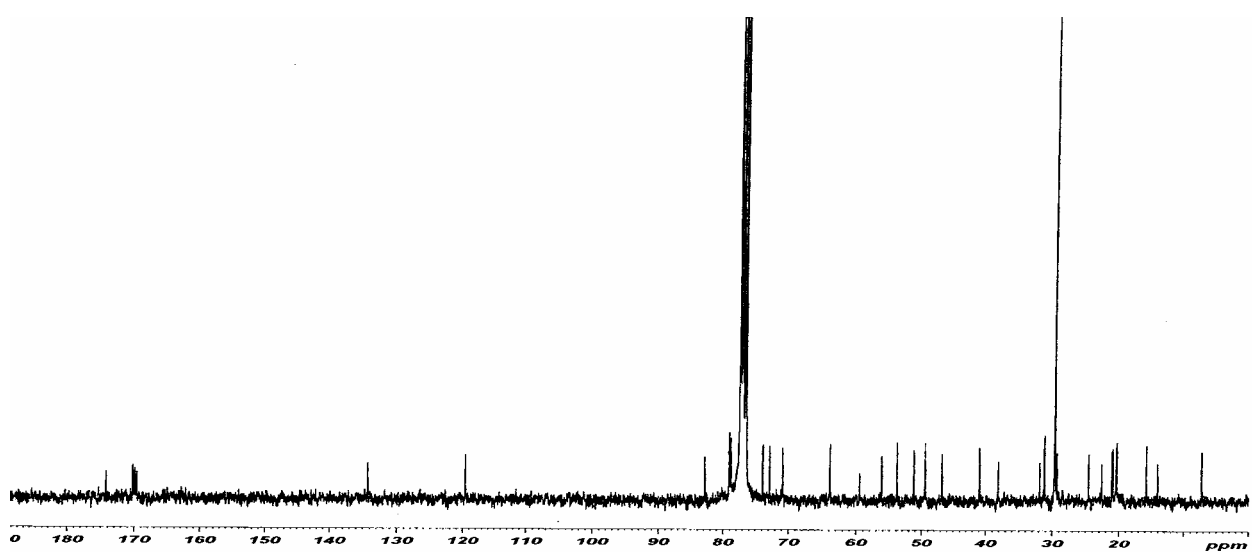


รูปผนวกที่ 7 HRMS spectrum ของสาร juncellin (J36)

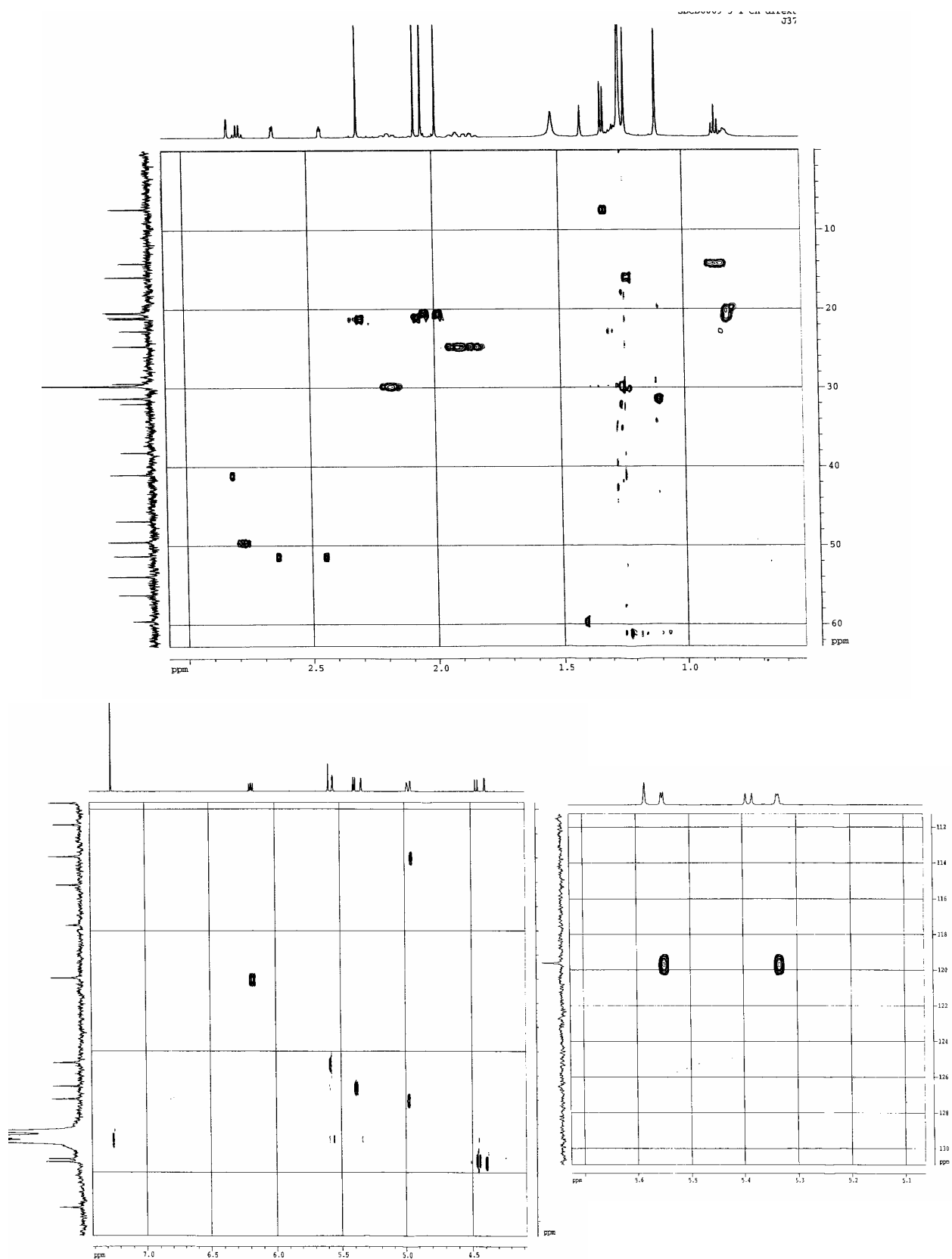


ภาพผนวกที่ 8 ^1H NMR ของสาร pra

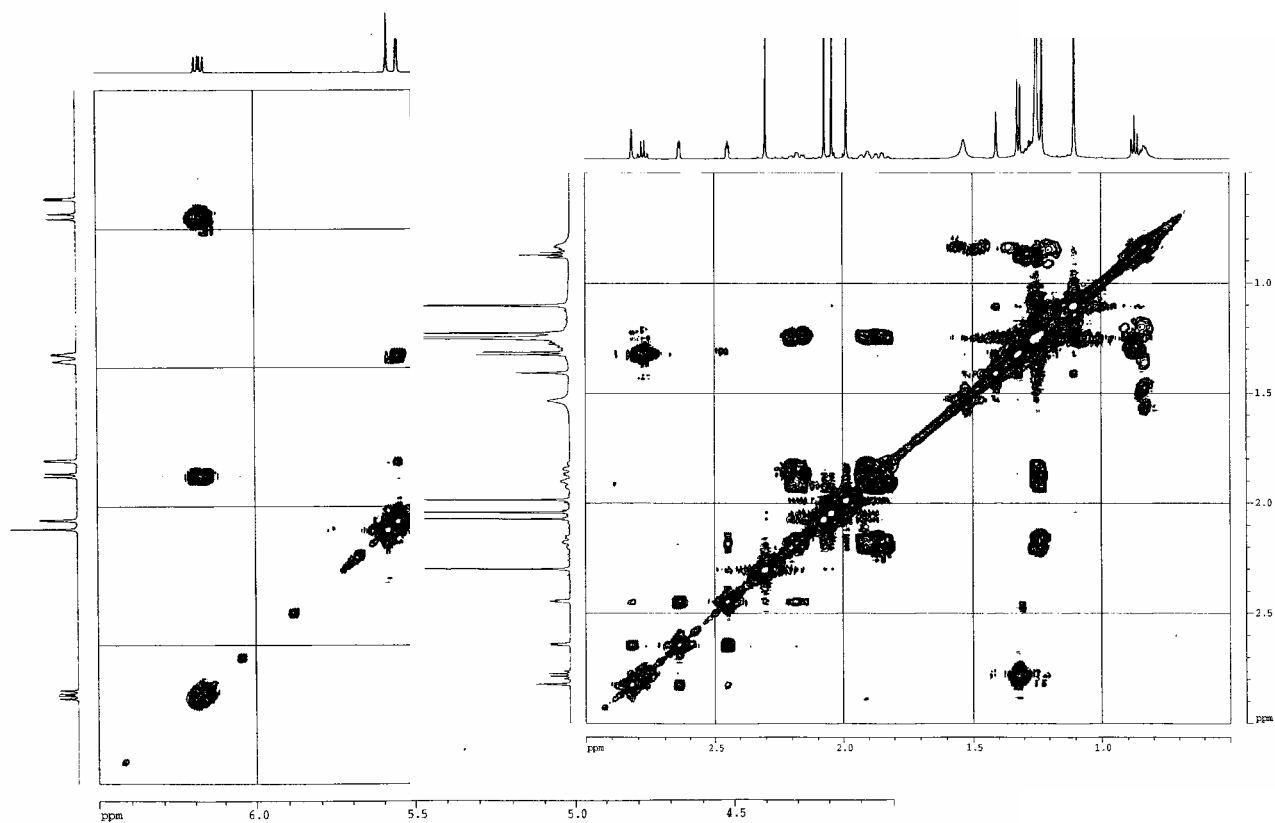




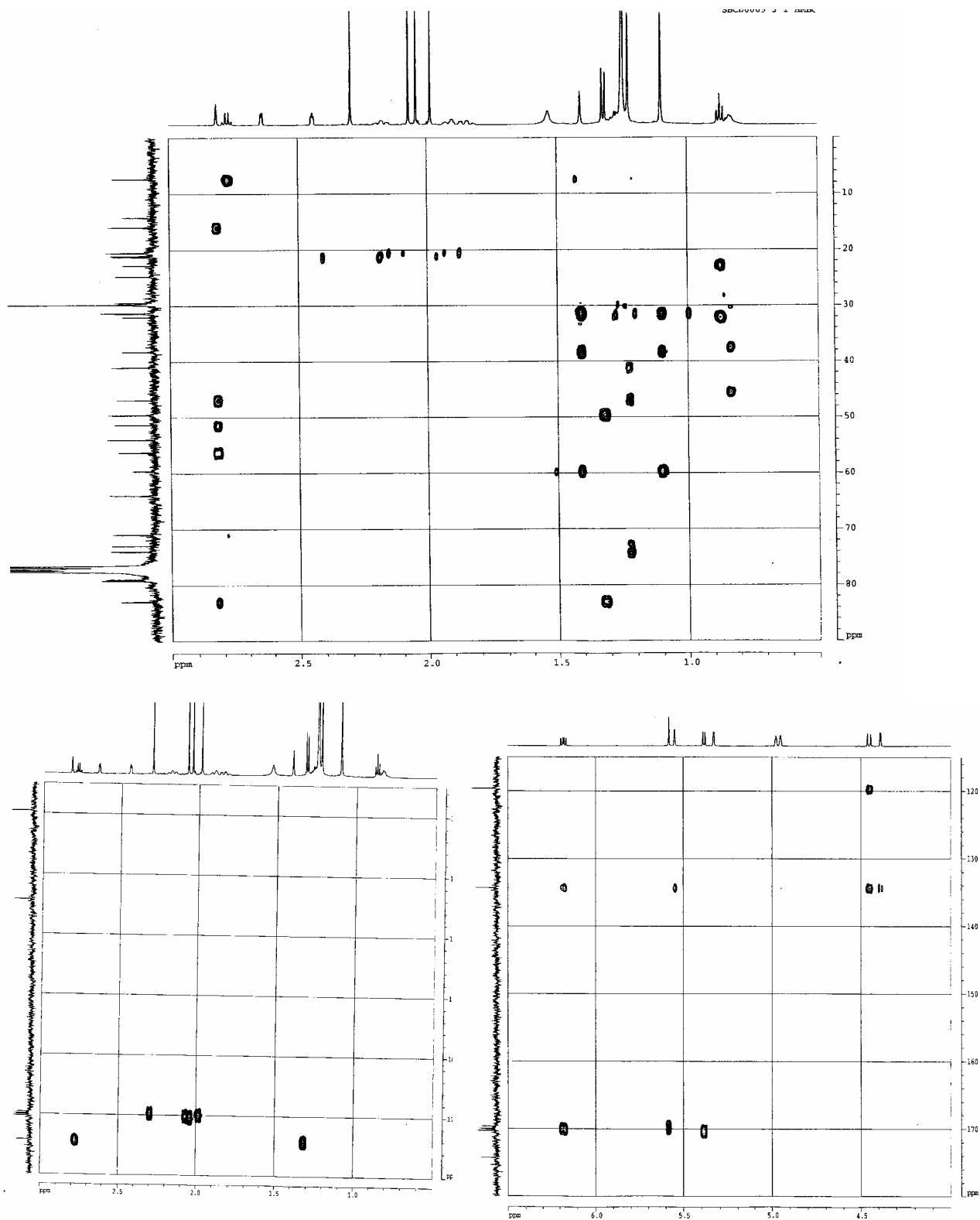
รูปผนวกที่ 9 ^{13}C NMR (บน) และ DEPT 135 (ล่าง) ของสาร praelolide (J37)



รูปผนวกที่ 10 HMQC spectrum ของสาร praelolide (J37)



รูปผนวกที่ 11 ^1H - ^1H COSY spectrum ของสาร praelolide (J37)



รูปผนวกที่ 12 HMBC spectrum ของสาร praelolide (J37)

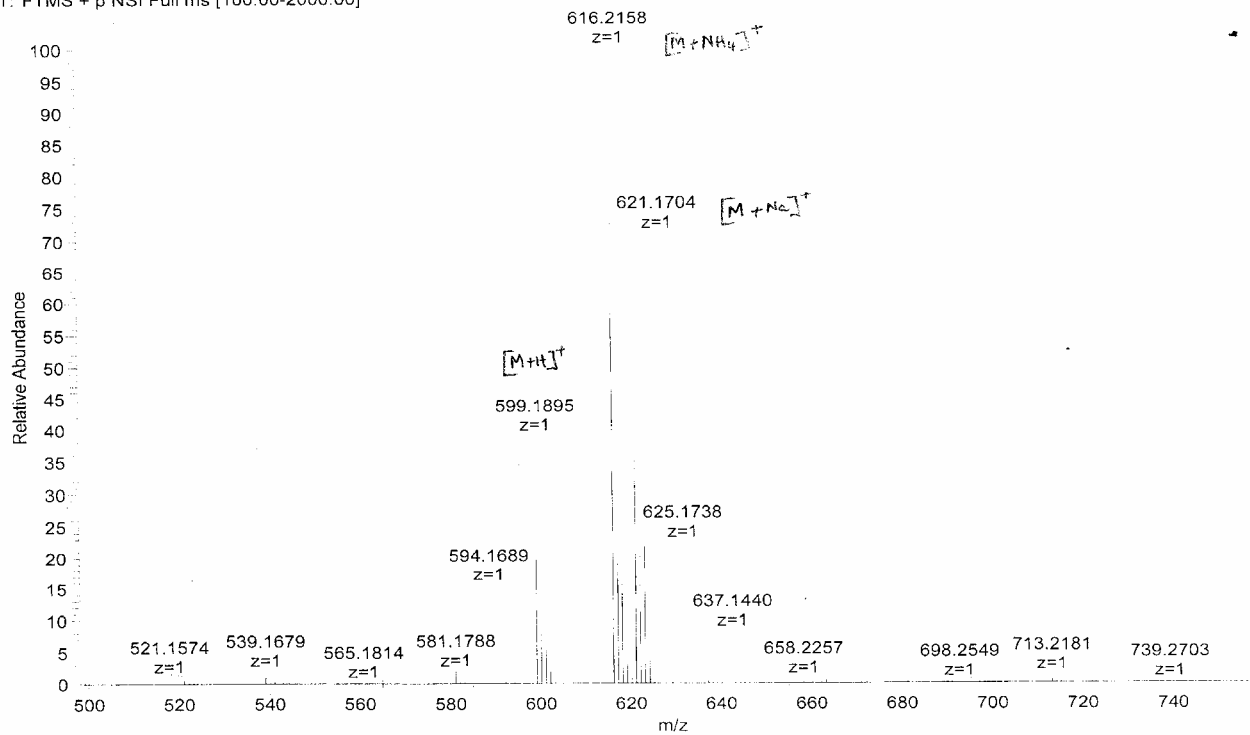
C:\xcalibur\...\Nadelmessungen\M0483A

8/9/2010 12:09:49 PM

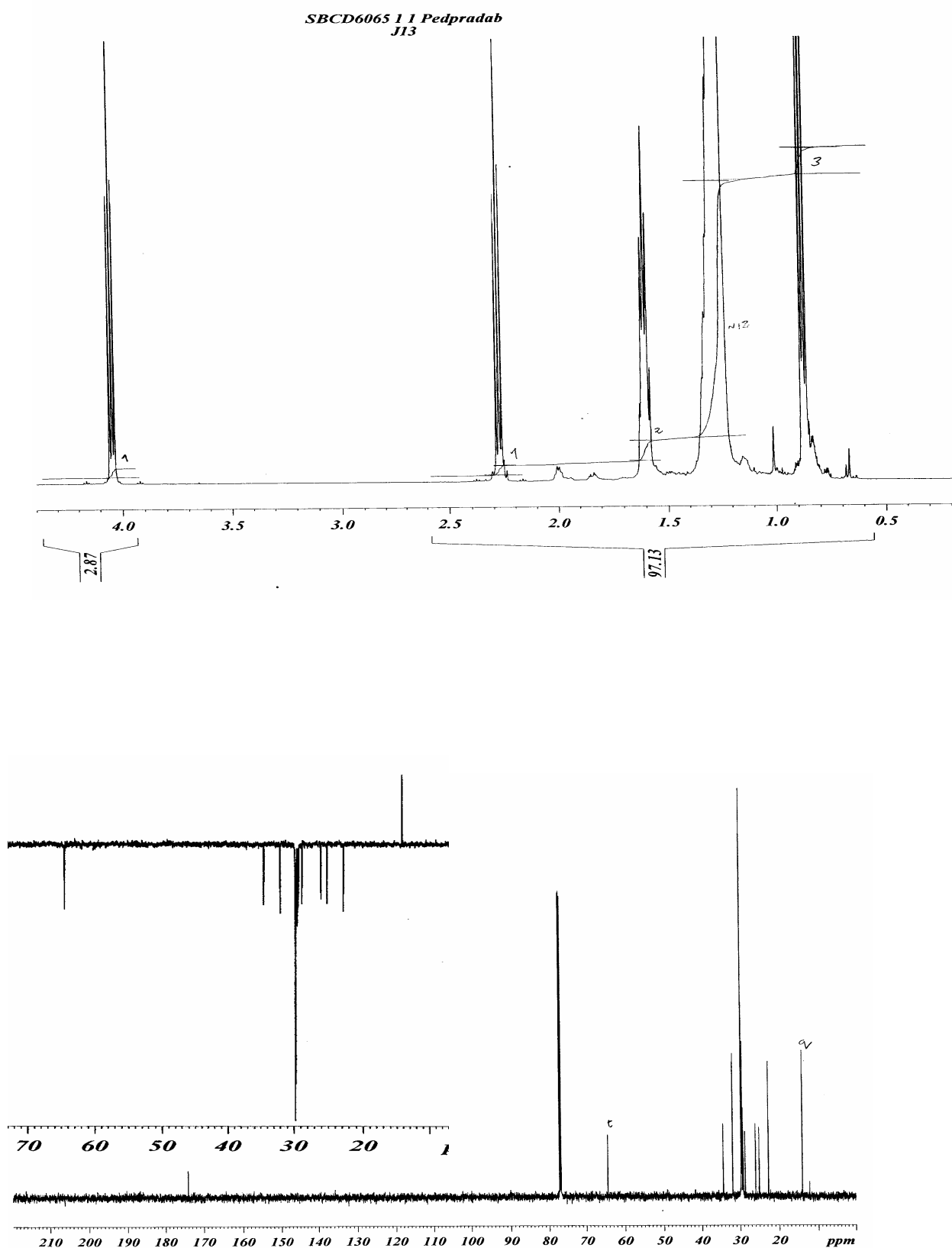
117gruen, J37, VWR

M0483A #1-8 RT: 0.01-0.95 AV: 8 NL: 1.54E8

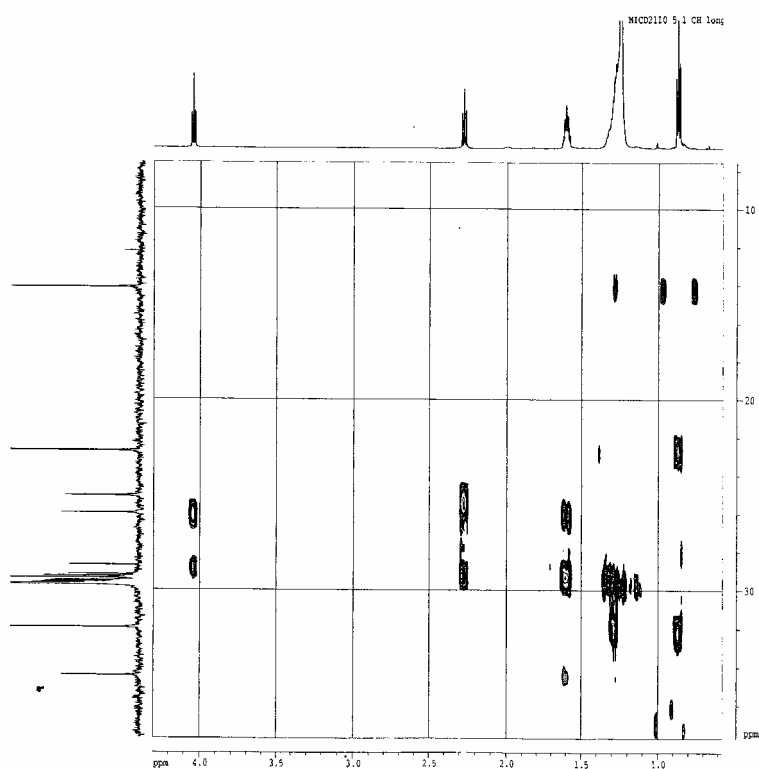
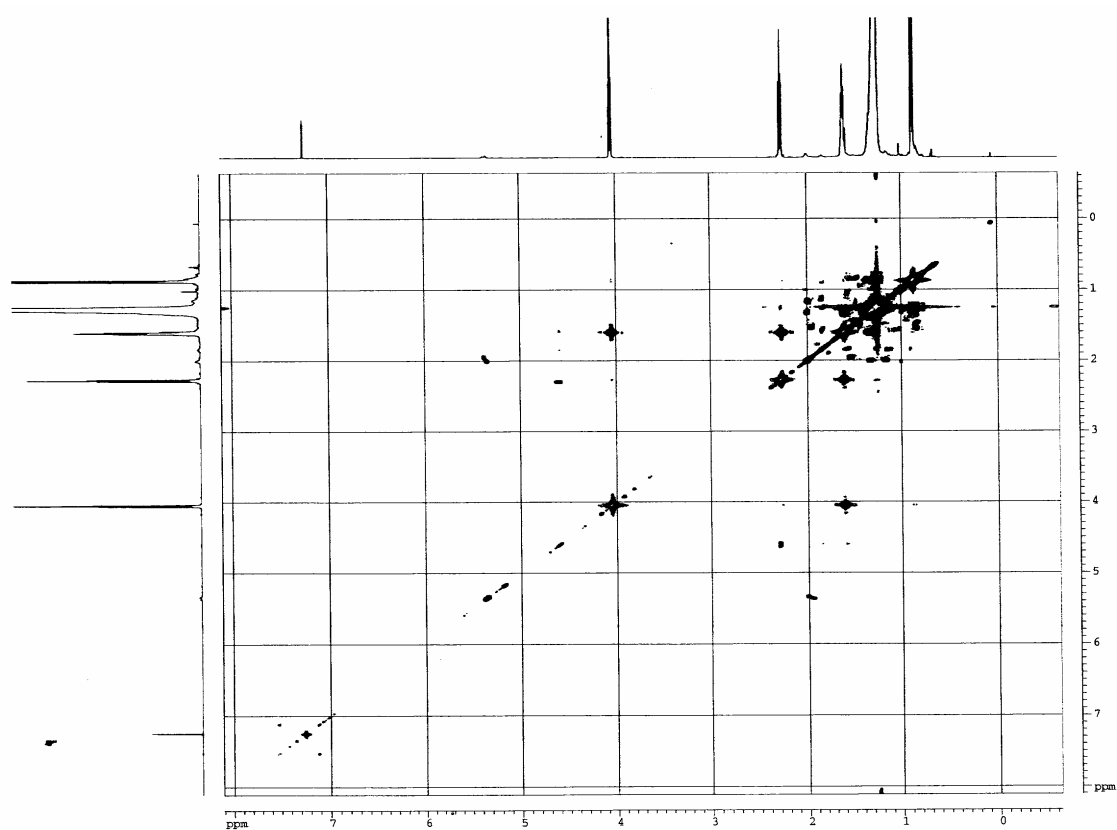
T: FTMS + p NSI Full ms [100.00-2000.00]



รูปผนวกที่ 13 HRMS spectrum ของสาร praelolide (J37)

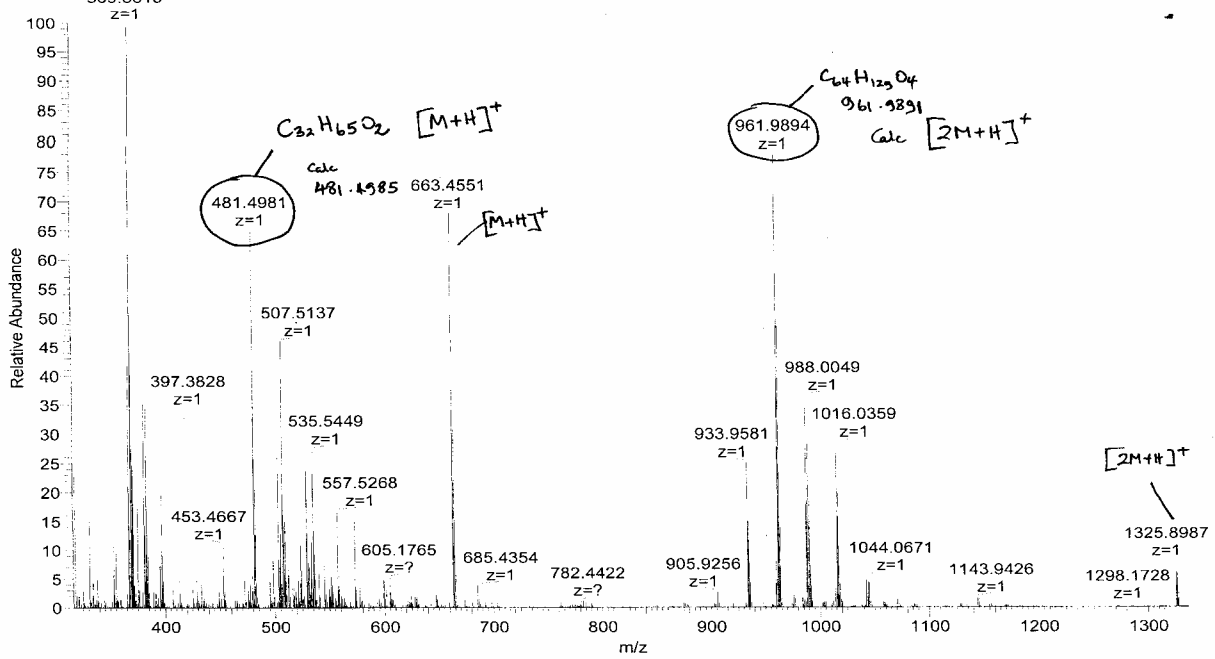


รูปผนวกที่ 14 ^1H NMR (บน), ^{13}C NMR (ล่าง) และ DEPT 135 spectra ของสาร J13 (CDCl_3)

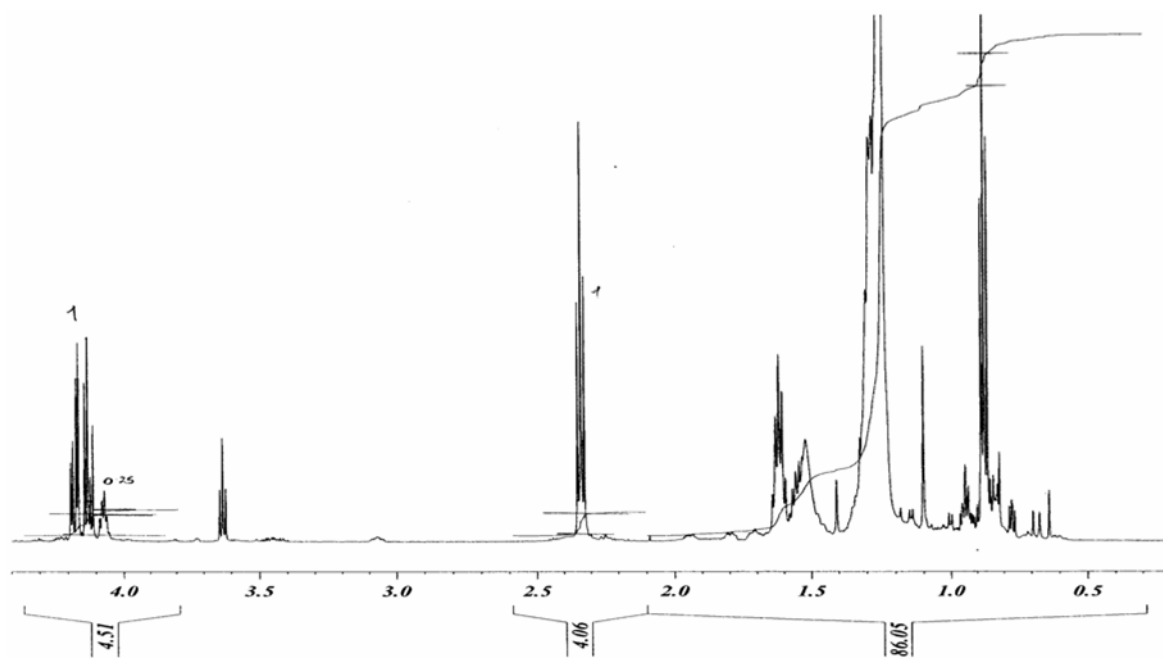


รูปผนวกที่ 15 ^1H , ^1H COSY (บน) และ HMQC ของ สาร J13

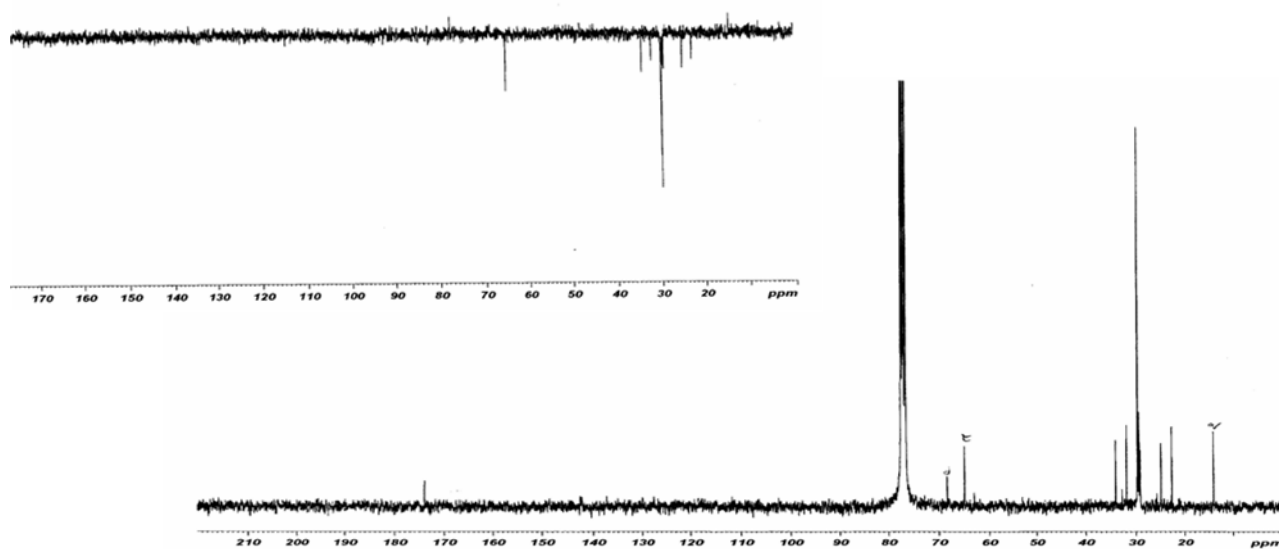
00479B #1-7 RT: 0.00-0.87 AV: 7 NL: 5.51E4
 FTMS + p NSI Full ms [100.00-2000.00]
 369.3516



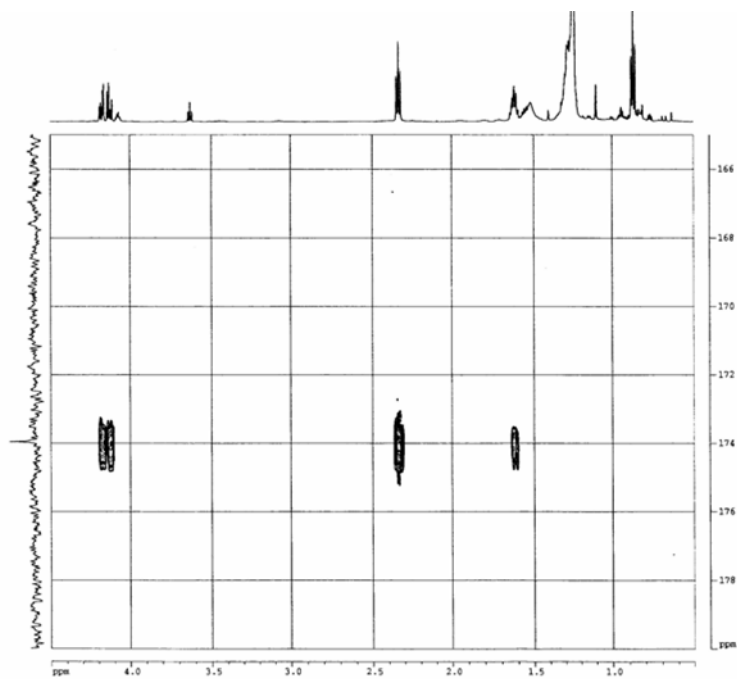
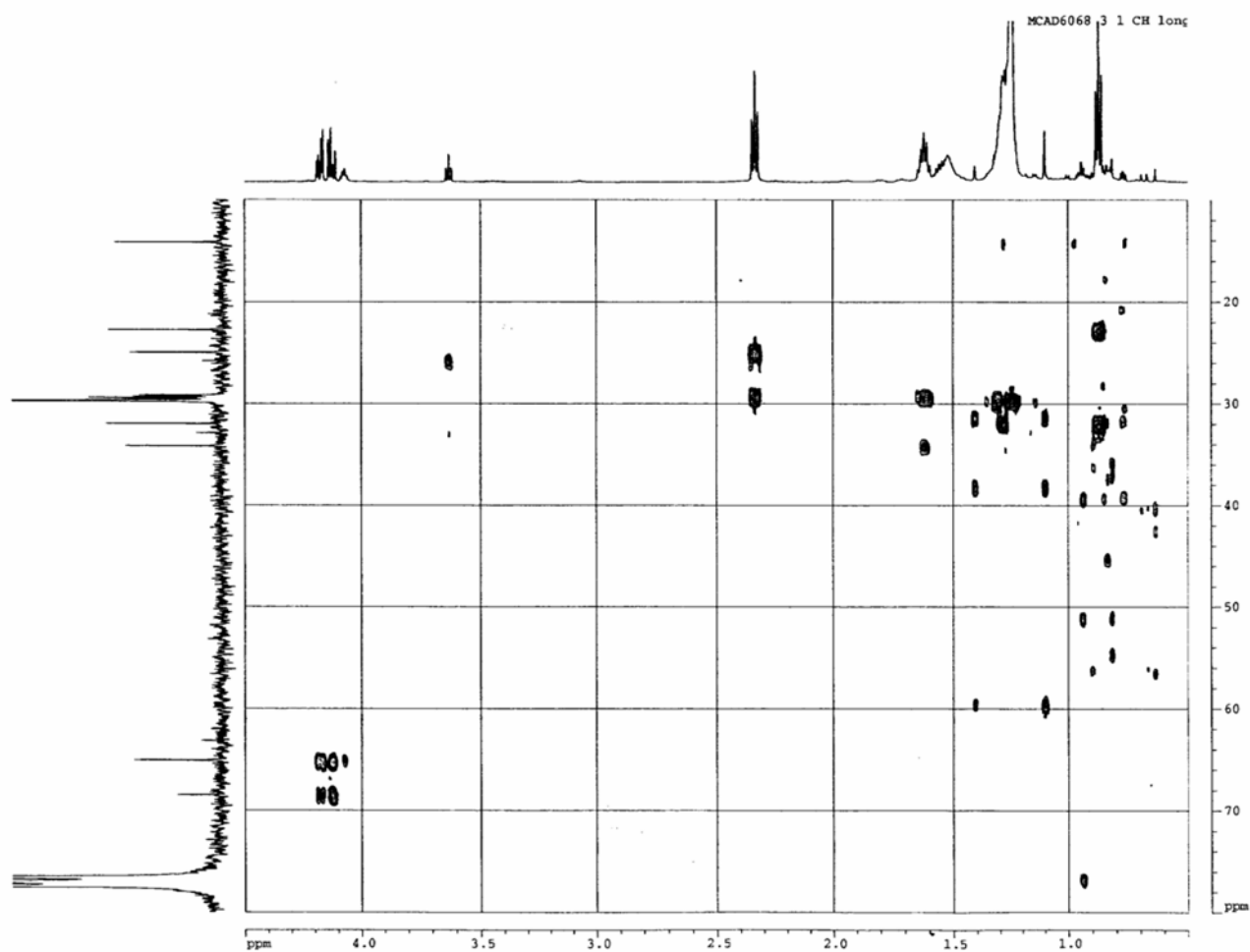
รูปผนวกที่ 16 HRMS spectrum ของสาร J13



รูปผนวกที่ 17 ^1H NMR spectrum ของสาร J50 (CDCl_3)



รูปผนวกที่ 18 ^{13}C NMR และ DEPT 135 spectrum ของสาร J50 (CDCl_3)



รูปผนวกที่ 19 HMBC spectrum ของสาร J50

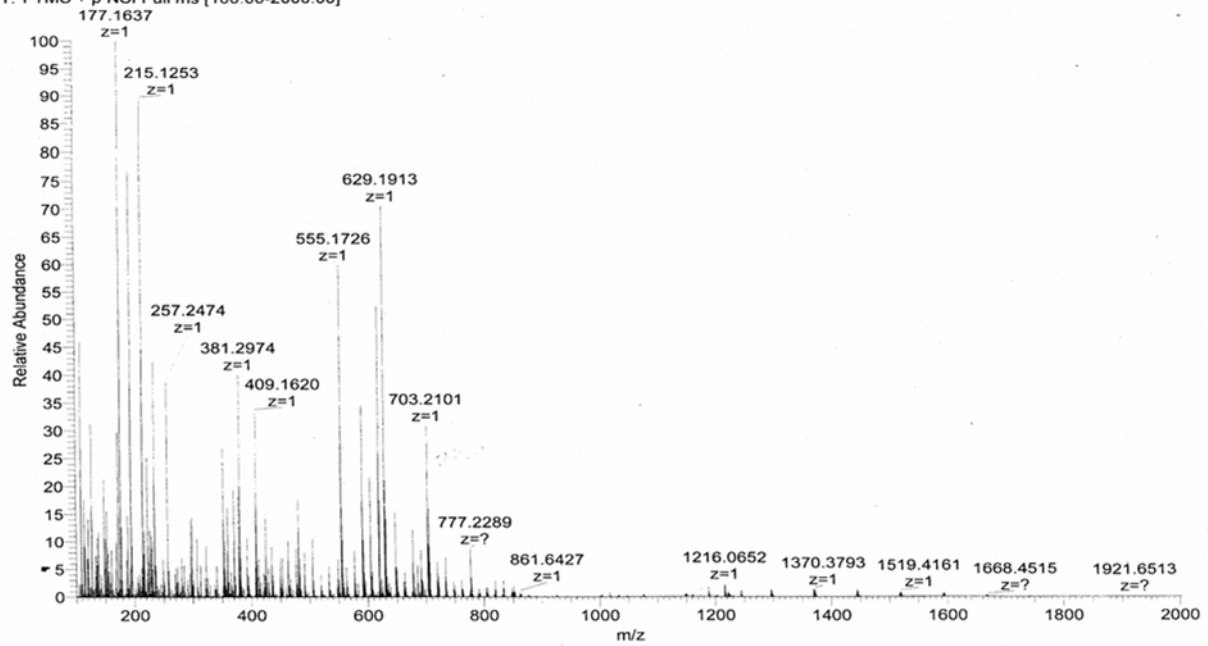
C:\Xcalibur\...Nadelmessungen\M0482A

8/9/2010 12:05:01 PM

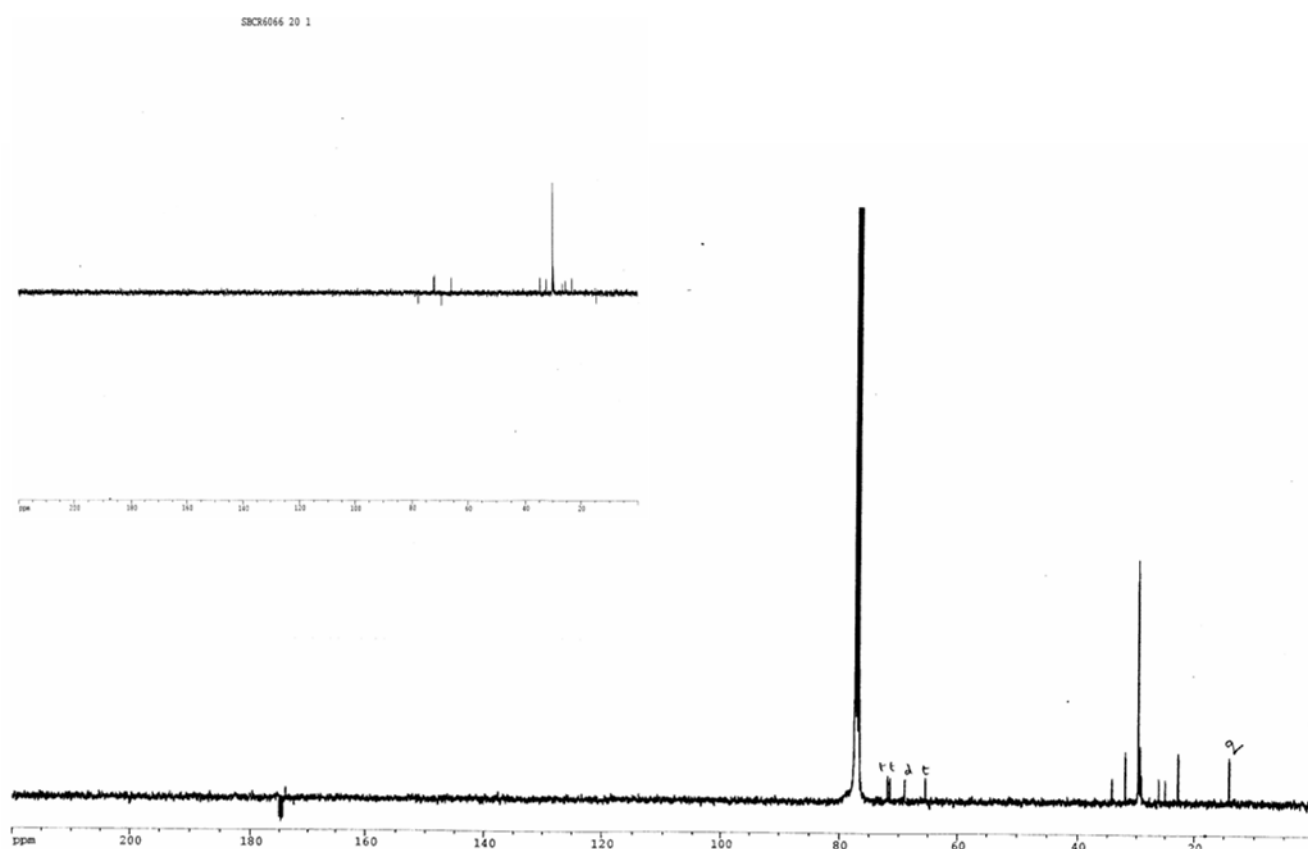
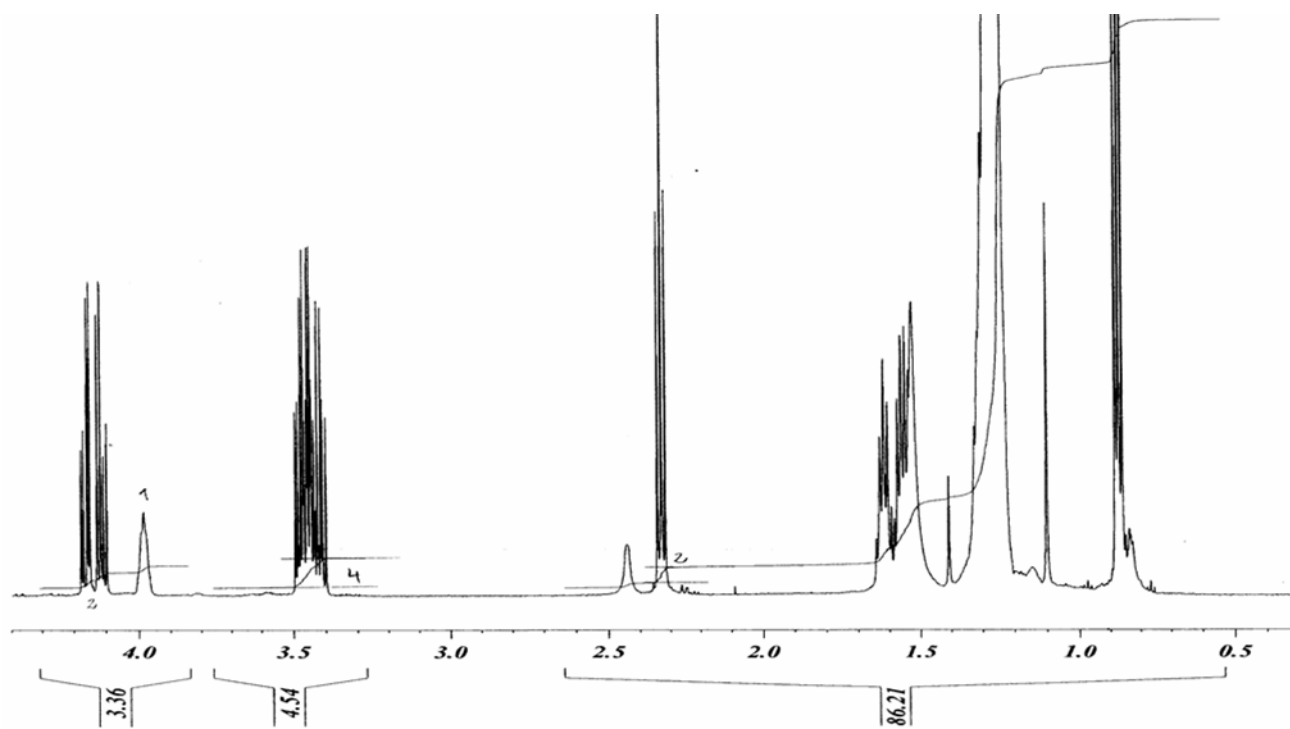
116gruen, J50, VWR

M0482A #1-7 RT: 0.00-0.88 AV: 7 NL: 4.22E4

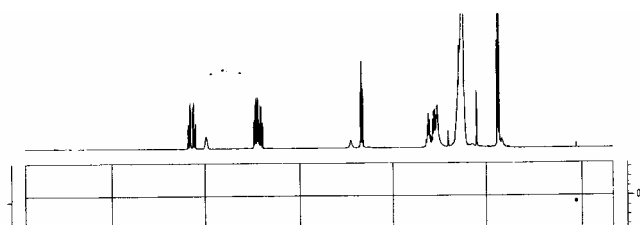
T: FTMS + p NSI Full ms [100.00-2000.00]

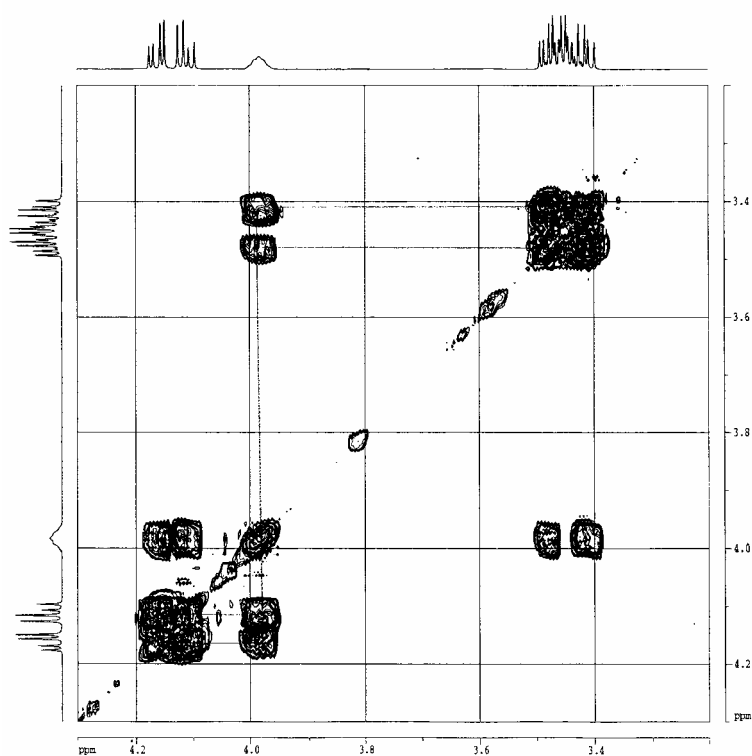


รูปผนวกที่ 20 HRMS spectrum ของสาร J50

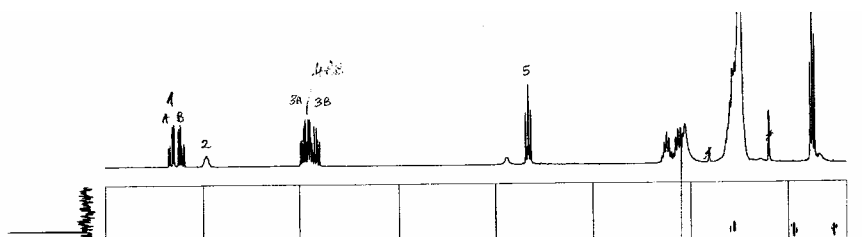


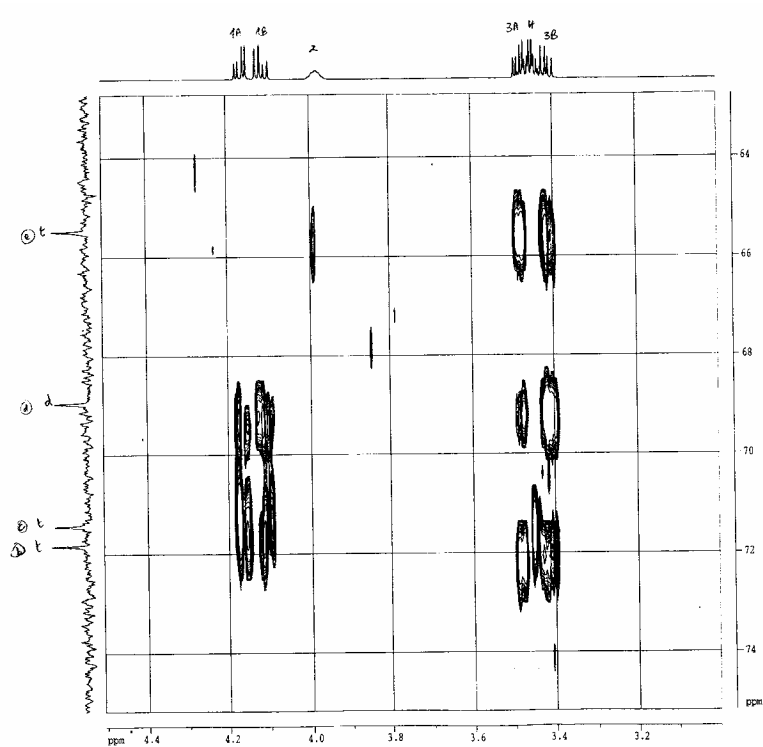
รูปผนวกที่ 21 ^1H NMR (บน) และ ^{13}C NMR (ล่าง) และ DEPT 135 spectra ส่วนขยายของสาร J51(CDCl_3)



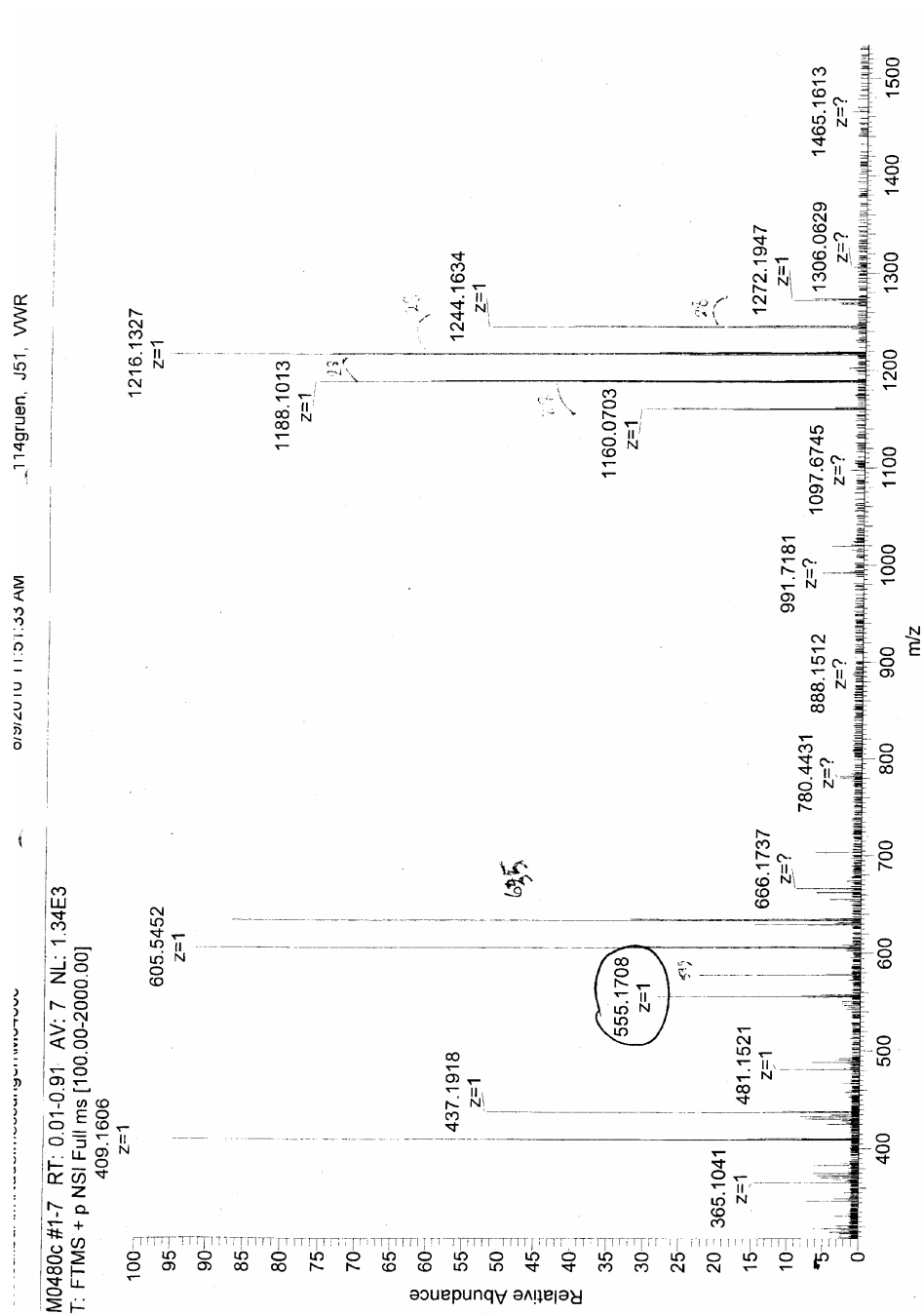


รูปผนวกที่ 22 H,H COSY spectrum ของสาร J51

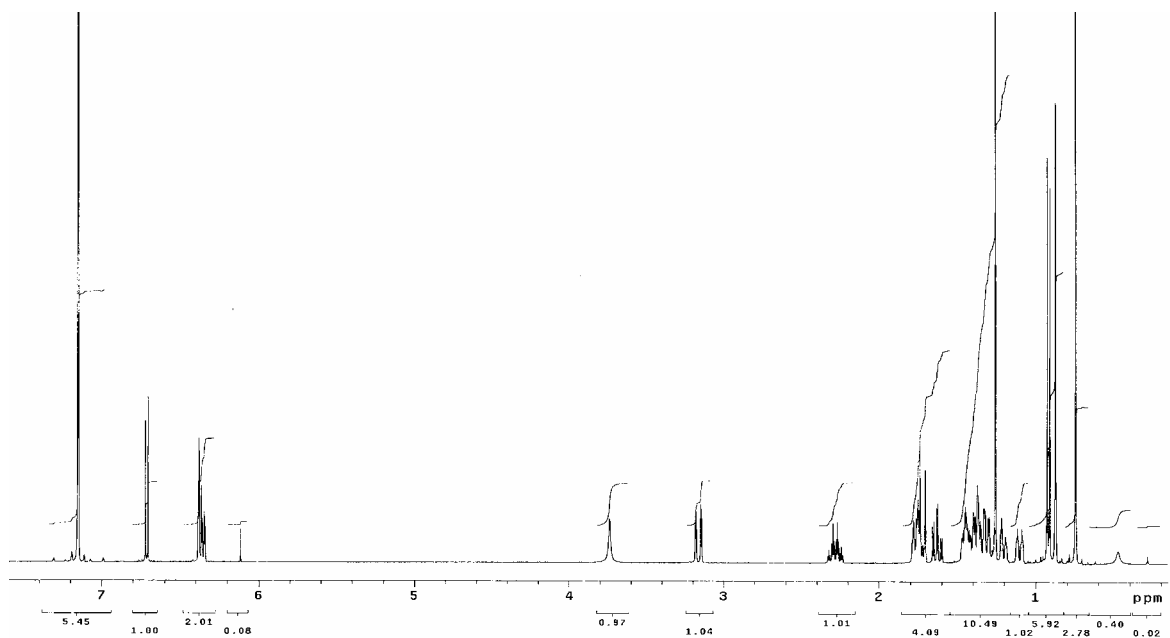




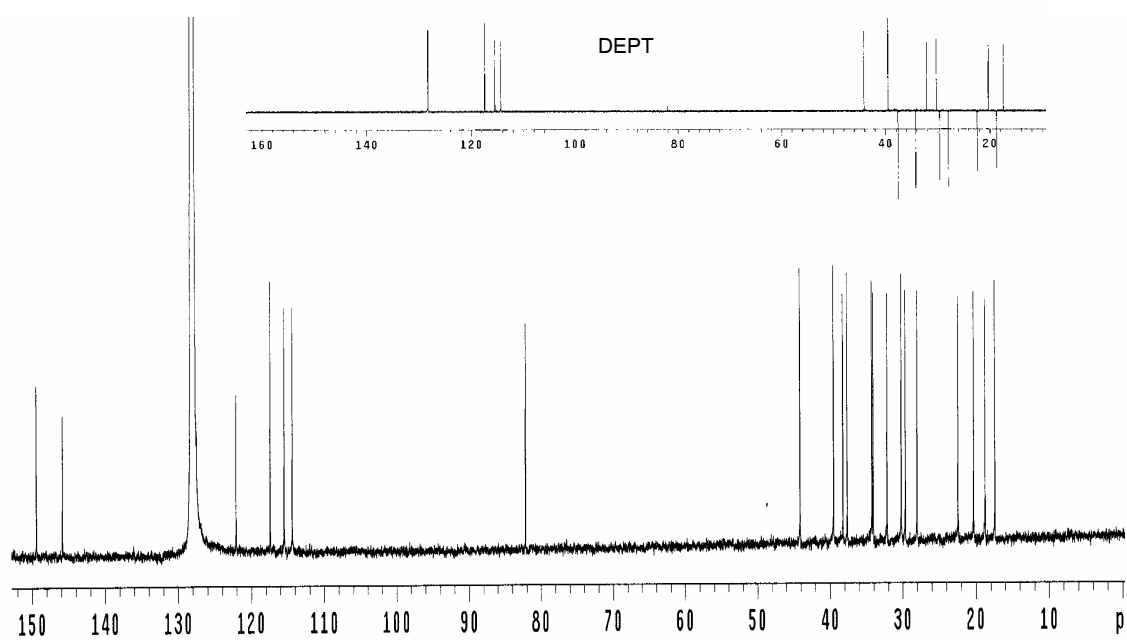
รูปผนวกที่ 23 HMBC spectrum ของสาร J51



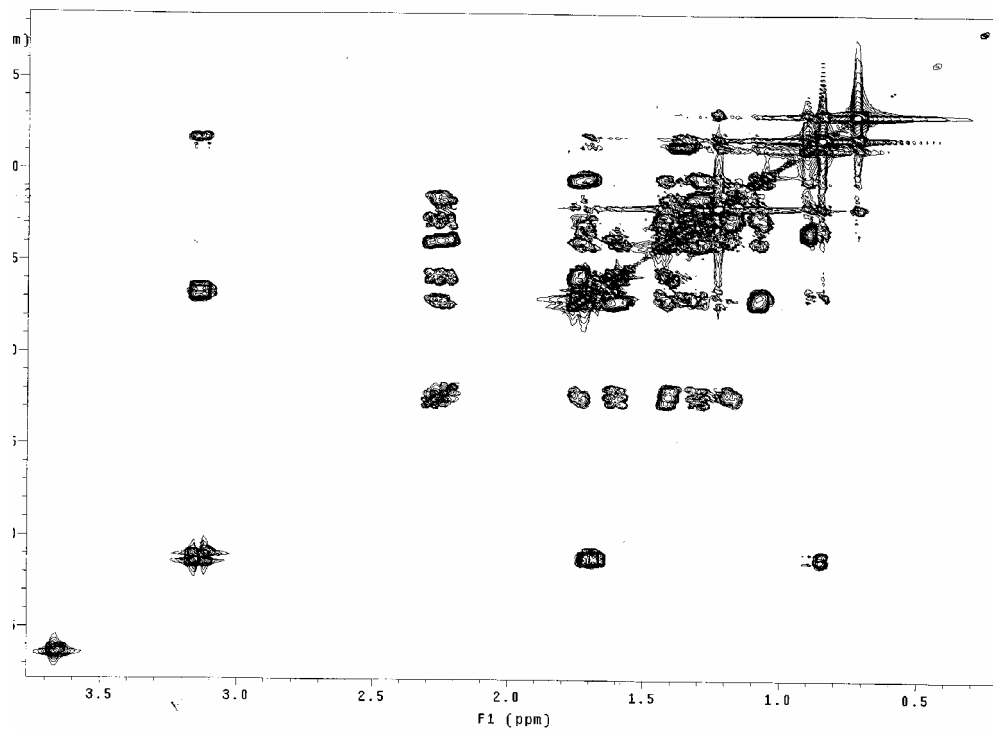
รูปผนวกที่ 24 HRMS spectrum ของสาร J51



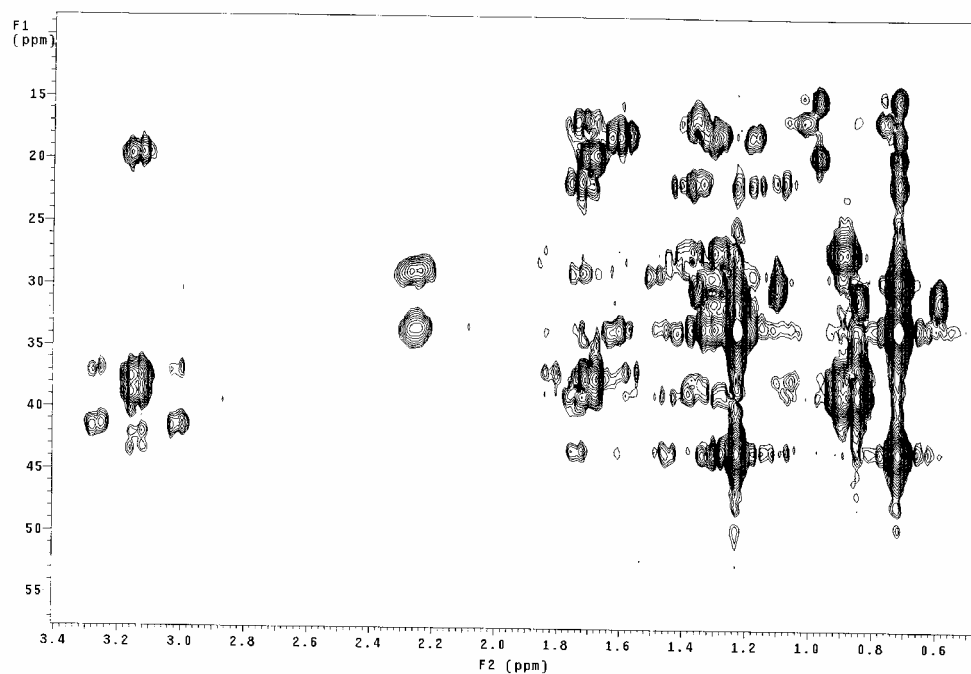
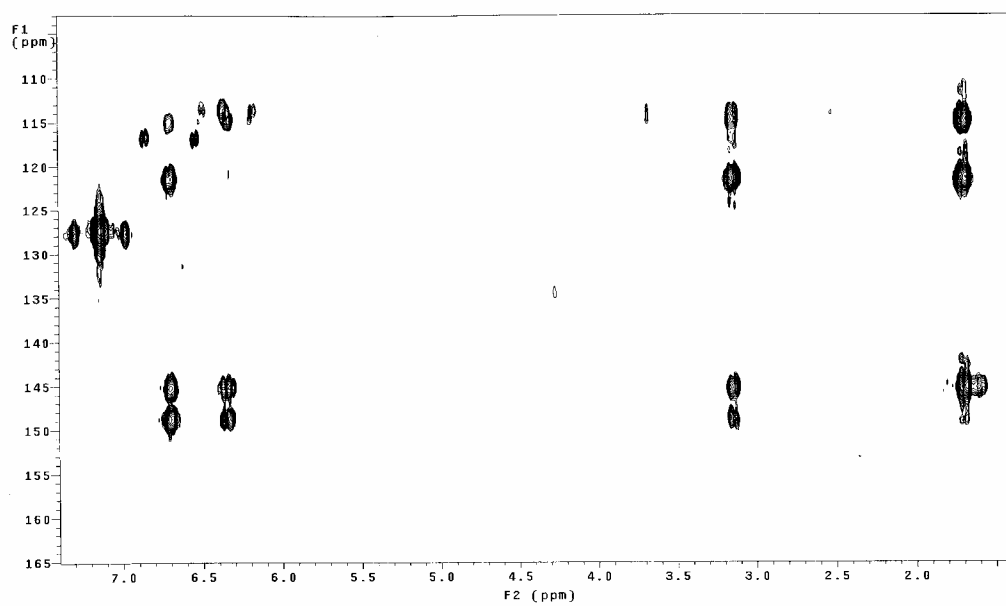
รูปผนวกที่ 25 ^1H NMR spectrum (CDCl_3) ของสาร aureole



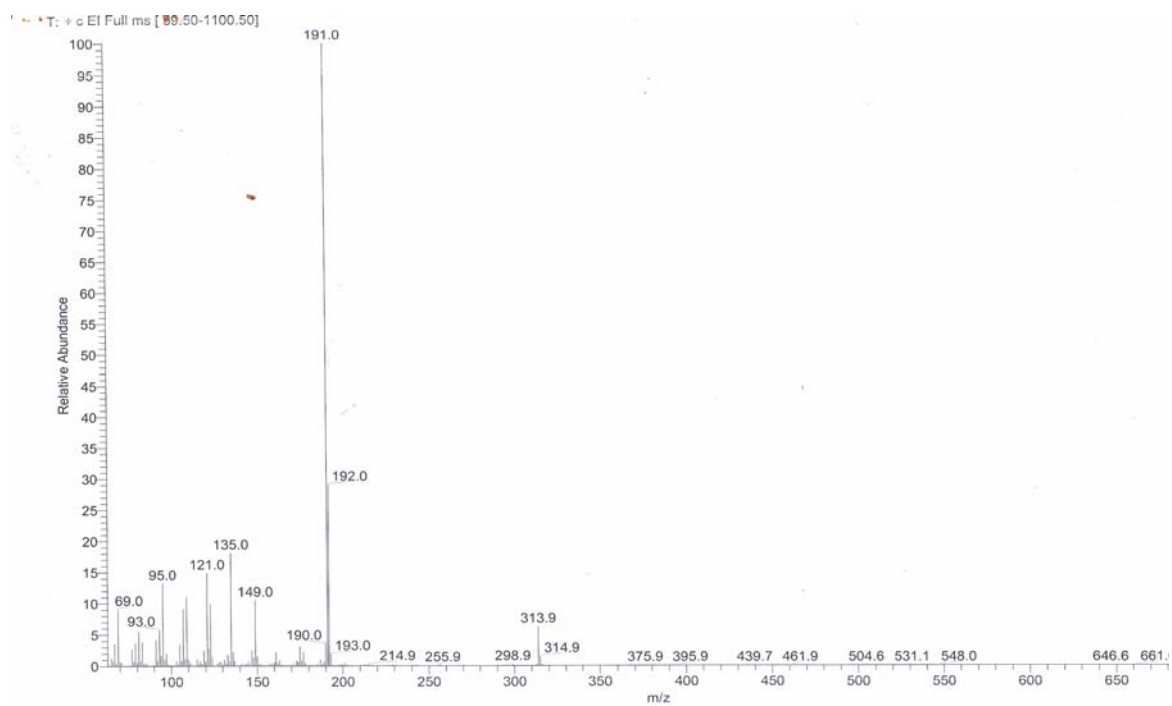
รูปผนวกที่ 26 ^{13}C NMR และ DEPT 135 spectrum (CDCl_3) ของสาร aureol



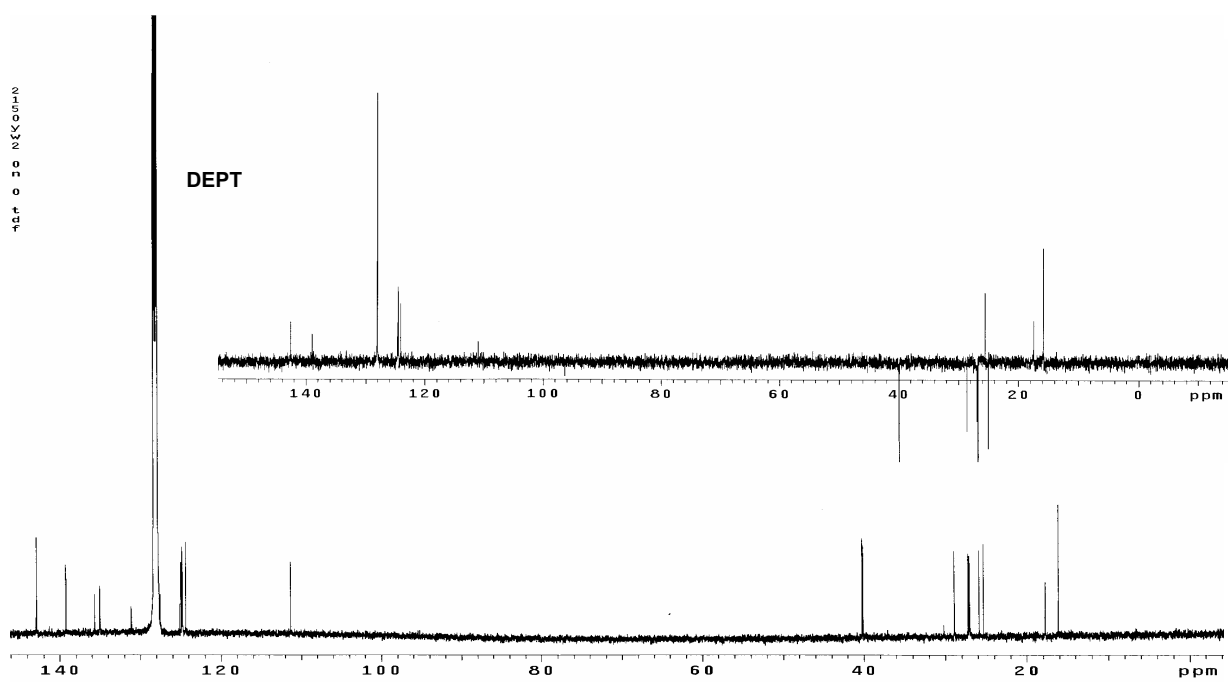
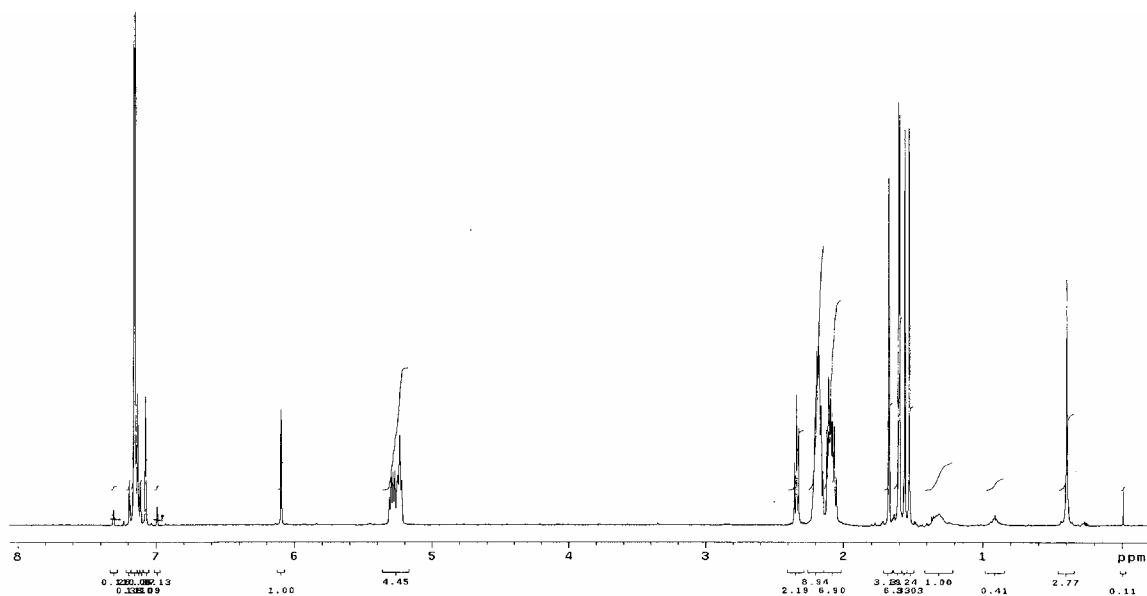
รูปผนวกที่ 27 H,H COSY spectrum ของสาร aureol



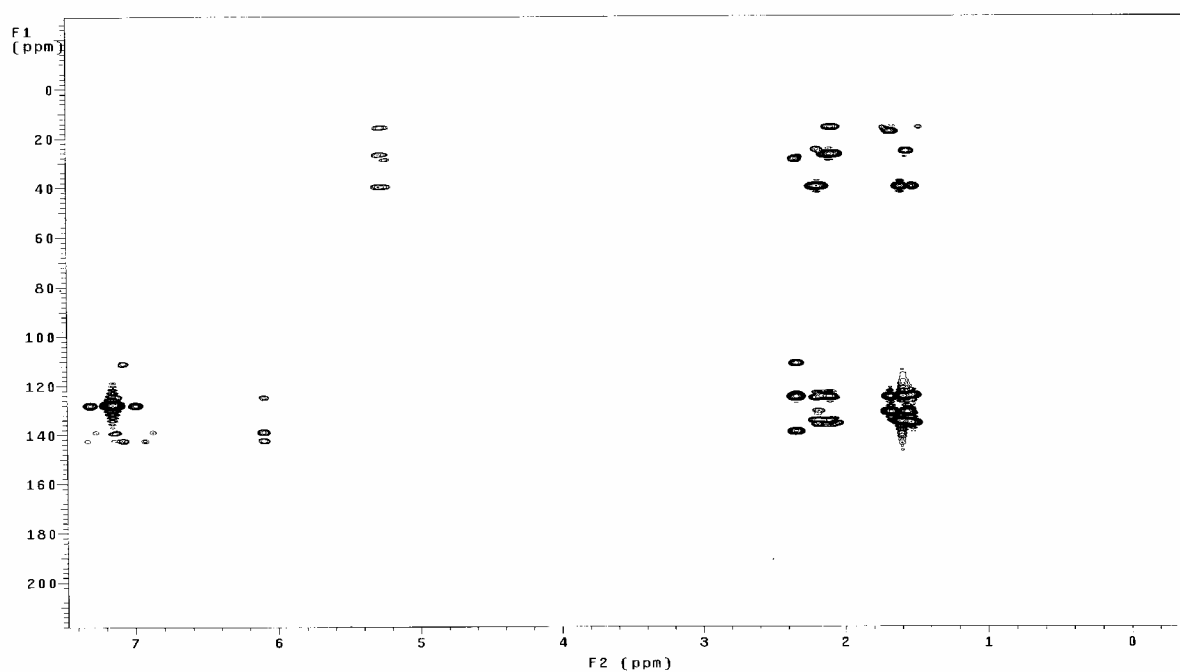
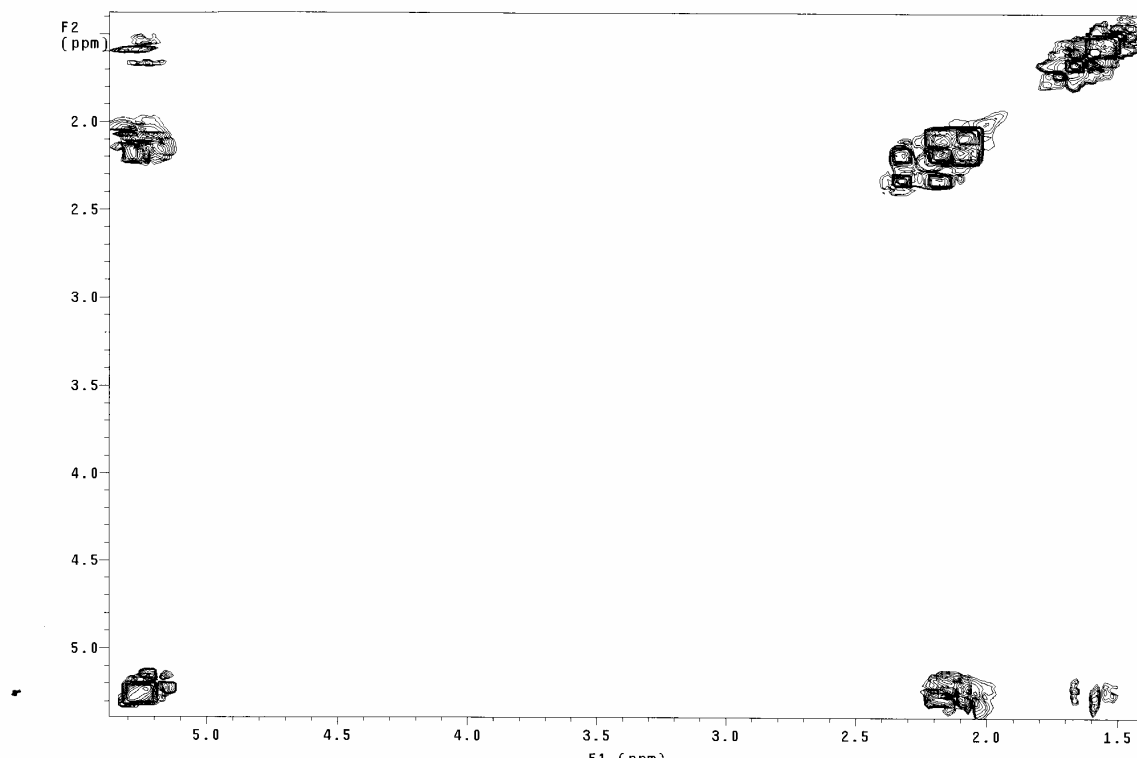
รูปผนวกที่ 28 HMBC spectra ของสาร aureol



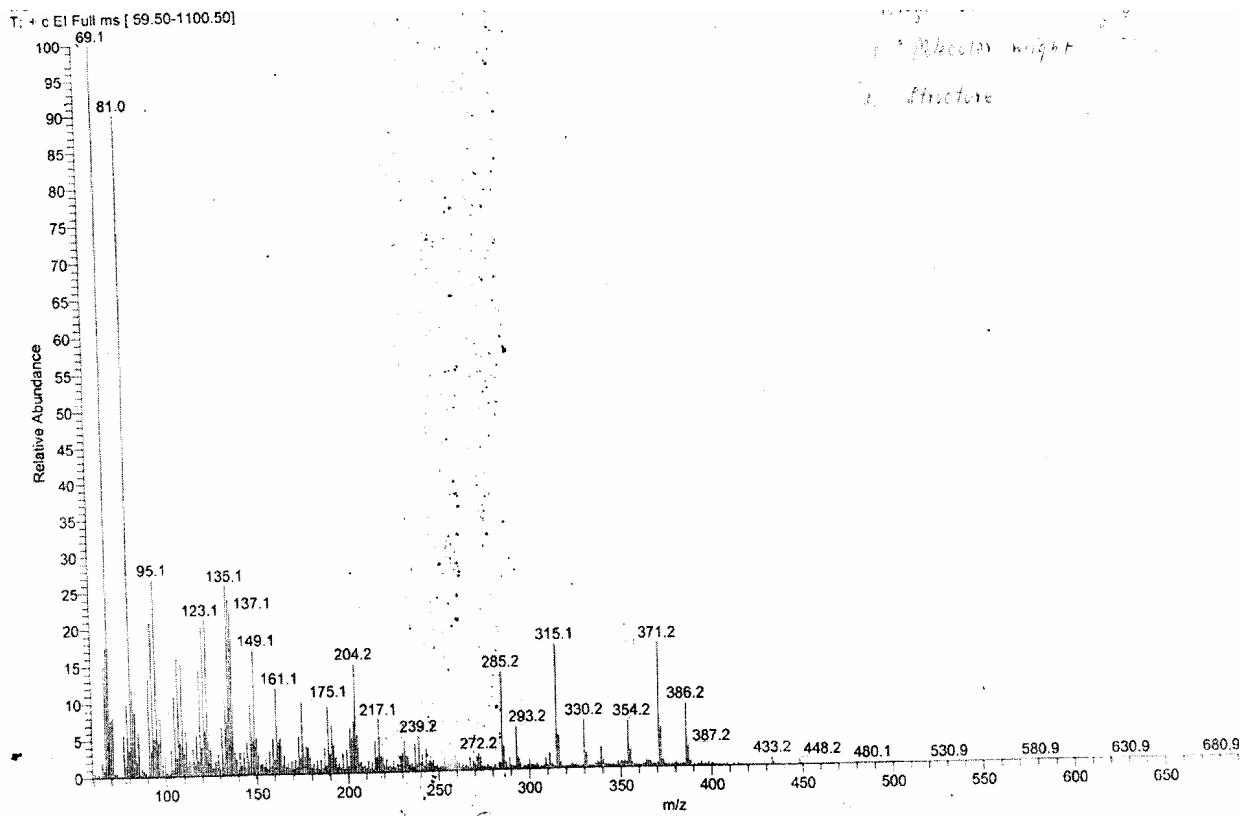
รูปผนวกที่ 29 LRMS spectrum ของสาร aureol



รูปผนวกที่ 30 ^1H , ^{13}C NMR และ DEPT spectra ของสาร T12 (CDCl_3)



รูปผนวกที่ 31 ¹H, ¹H COSY (บน) และ HMQC spectra (ล่าง) ของสาร T12



รูปผนวกที่ 32 Mass spectrum (low resolution) ของสาร T12

