



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

สารต้านเชื้อไวรัสเริ่มจากเปลือกผลตูมกาแดง

โดย

อุทัย ไสธนะพันธ์ และคณะ

สิงหาคม 2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

สารต้านเชื้อไวรัสเริ่มจากเปลือกผลตูมกาแดง

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุทัย โสธนะพันธุ์
ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์ ดร. รพีพล ภโวาท
ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่.....	10 ต.ย. 2546
เลขทะเบียน.....	00057
เลขเรียกหนังสือ.....	43

CC 12

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย; สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)
เลขที่ 979-17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400
โทร. 298-0455 โทรสาร 298-0476
Home page : <http://www.tri.or.th>
E-mail : tri-info@tri.or.th



กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนสนับสนุนการทำวิจัยนี้ ดังนี้

คุณแวว วงศ์คำโสม ซึ่งเป็นแพทย์พื้นบ้านที่แนะนำให้รู้จักพืชสมุนไพรชุมกาแดง

คุณวรรณ ศรีรินทร์นุช และคุณวรรณวิมล เมฆบุญส่งลาภ ซึ่งเป็นนักวิทยาศาสตร์ประจำศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความเอาใจใส่ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง nuclear magnetic resonance spectrometer

อาจารย์ผานิต เวชกาญจนา อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และคุณวิฑูรย์ แซ่โง้ว นักวิทยาศาสตร์ประจำศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความใส่ใจในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometer

อาจารย์ ดร.วิรัชตา ธนกิจเจริญวัฒน์ อาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่อง polarimeter

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่อำนวยความสะดวกต่างๆ ในการทำวิจัย

และขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับงานวิจัยนี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF/62/2543

ชื่อโครงการ : สารต้านเชื้อไวรัสเริ่มจากเปลือกผลตูมกาแดง

ชื่อนักวิจัย :

อุทัย โสชนะพันธุ์ - คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิมลมาศ ลิปิพันธ์ - คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รพีพล ภาโววาท - คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : uthai@su.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

เริ่มเป็นโรคที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสเริ่ม งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการหาสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริ่มจากเปลือกผลของตูมกาแดง

โดยอาศัยเทคนิคทาง chromatography สามารถสกัดแยกสาร 12 ชนิดจากสารสกัดที่เตรียมจากตัวทำละลาย *n*-hexane และ chloroform ได้แก่สาร glyptopetolide (4) isoarborinol (5) β -sitosterol (6) β -sitostenone (7) palmitic acid (8) 22 β -hydroxy-tingenone (9) 22 β -hydroxy-isotingenone III (10) salaspermic acid (11) 6-oxo-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (12) β -sitosterol-3 β -D-glucopyranoside (13) 5 α ,6 α -epoxystigmastan-3 β -ol (14) และ 2*R**,3*R**,5*S**-trihydroxy-6*R**-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15) นอกจากนี้ ยังได้เตรียมสาร (10) และอนุพันธ์อีก 8 ชนิดโดยวิธีกิ่งสังเคราะห์ ได้แก่สาร isotingenone III (18) 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone III (19) 6 β -(2'-oxo-propyl)-tingenol (20) 6 β -(2'-oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21) 6-(*E*-2'-oxo-propylidene)-22 β -hydroxy-tingenol (22) 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone IV (23) 19,20-didehydro-isotingenone III (24) และ 6 β -(2'-oxo-propyl)-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (25) การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารทุกชนิดจะอาศัยข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง spectroscopy

วิธีที่ใช้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสคือ plaque reduction assay สาร 10, 18 และ 19 แสดงฤทธิ์ที่นำสนใจต่อเชื้อไวรัสเริ่มทั้ง 2 types โดยมีค่า EC₅₀ อยู่ในช่วง 2-6 μ g/ml และค่า selectivity index อยู่ในช่วง 7.8-17.5 สารทั้งสามมีโครงสร้างหลักที่เหมือนกัน คือเป็น phenolic-(9 $\rightarrow$ 8)-D:A-friedo-24-noroleanane ระบบ divinyl-phenolic ที่พบในโครงสร้างส่วน ring A/B/C จะมีความสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม

Keywords : ตูมกาแดง ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม isotingenone III

phenolic-(9 $\rightarrow$ 8)-D:A-friedo-24-noroleanane

Abstract

Project Code : PDF/62/2543

Project Title : Chemical constituents with antiherpetic activity from the pericarp of
Glyptopetalum sclerocarpum Laws.

Investigators :

Uthai Sotanaphun - Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

Vimolmas Lipipun - Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University

Rapepol Bavovada - Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University

E-mail Address : uthai@su.ac.th

Project Period : 2 years

Herpes is a disease caused by the infection of *Herpes simplex* virus. Searching for the antiherpetic constituents from the pericarp of *Glyptopetalum sclerocarpum* Laws. was the objective of this study.

Based on chromatographic techniques, twelve compounds were purified from *n*-hexane and chloroform extracts. These compound were glyptopetolide (4), isoarborinol (5), β -sitosterol (6), β -sitostenone (7), palmitic acid (8), 22 β -hydroxy-tingenone (9), 22 β -hydroxy-isotingenone III (10), salaspermic acid (11), 6-oxo-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (12), β -sitosterol-3 β -*D*-glucopyranoside (13), 5 α ,6 α -epoxystigmastan-3 β -ol (14), and 2*R**,3*R**,5*S**-trihydroxy-6*R**-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15). Compound (10) and the other eight derivatives : isotingenone III (18), 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone III (19), 6 β -(2'-oxo-propyl)-tingenol (20), 6 β -(2'-oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21), 6-(*E*-2'-oxo-propylidene)-22 β -hydroxy-tingenol (22), 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone IV (23), 19,20-didehydro-isotingenone III (24) and 6 β -(2'-oxo-propyl)-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (25), were also semi-synthesized. Chemical structure of all compounds were determined by spectroscopic evidence.

A plaque reduction was used for antiviral assay. Compounds 10, 18 and 19 displayed interesting activity against HSV-1 and HSV-2 with EC₅₀ 2-6 μ g/ml and selectivity index 7.8-17.5. These three compounds possessed the same phenolic-(9 $\rightarrow$ 8)-*D:A-friedo*-24-noroleanane skeleton. The divinyl-phenolic system at ring A/B/C of their structures was important for antiherpetic action.

Keywords : *Glyptopetalum sclerocarpum*, antiherpetic, isotingenone III,
phenolic-(9 $\rightarrow$ 8)-*D:A-friedo*-24-noroleanane

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ (ไทย)	ii
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	vi
สารบัญแผนภูมิ	vii
สารบัญรูป	viii
คำย่อ	ix
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. บทนำทั่วไป	1
2. ทูมกาแดง	1
3. สารต้านไวรัสเริ่มจากพืชวงศ์ Celastraceae	2
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	7
1. ตัวอย่างพืช	7
2. เทคนิคทางพฤกษเคมี	7
3. เทคนิคทางสเปกโทรสโคปี	7
4. การหาคุณสมบัติทางฟิสิกส์	7
5. การเตรียมสารสกัดหยาบ	8
6. การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบ <i>n</i> -hexane	8
6.1) การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด H-B	9
6.2) การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด H-C	10
7. การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบ chloroform	13
7.1) การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด C-B	13
8. การเตรียมสาร Isotingenone III และอนุพันธ์	15
9. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มของส่วนสกัดและสารบริสุทธิ์	19
บทที่ 3 ผลการทดลอง	20
1. การสกัดแยกสารบริสุทธิ์ และการเตรียมสารโดยวิธีกึ่งสังเคราะห์	20
2. การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์	20
2.1) Glyptopetolide, Isoarborinol, β -Sitosterol, Palmitic acid, 22 β -Hydroxytingenone, Isotingenone III, 22 β -Hydroxy-isotingenone III และ 20-Hydroxy-20- <i>epi</i> -isotingenone III	20

	หน้า
2.2) β -Sitostenone	21
2.3) Salaspermic acid	23
2.4) 6-Oxo-20-hydroxy-20- <i>epi</i> -tingenol	25
2.5) β -Sitosterol-3 β -O-D-glucopyranoside	27
2.6) 5 α ,8 α -Epoxytigmastan-3 β -ol	30
2.7) 2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>S</i> *-Trihydroxy-6 <i>R</i> *-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one	32
2.8) 6 β -(2'-Oxo-propyl)-tingenol, 6 β -(2'-Oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol และ 6 β -(2'-Oxo-propyl)-20-hydroxy-20- <i>epi</i> -tingenol	34
2.9) 6-(<i>E</i> -2'-Oxo-propylidene)-22 β -hydroxy-tingenol	39
2.10) 20-Hydroxy-20- <i>epi</i> -isotingenone IV	41
2.11) 19,20-Didehydro-isotingenone III	44
3. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริ่ม	46
บทที่ 4 บทวิจารณ์ และสรุป	48
1. การสกัดแยกสารบริสุทธิ์	48
2. การตั้งนิยามฐานวิถีชีวสังเคราะห์	48
3. การกึ่งสังเคราะห์อนุพันธ์ของ isotingenone III	49
4. ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มของสารบริสุทธิ์	52
เอกสารอ้างอิง	53
Output จากโครงการวิจัย	57
ภาคผนวก	58

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสจากพืชวงศ์ Celastraceae	2
ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทุมกาแดง	8
ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มของส่วนสกัดและส่วนสกัดย่อย ที่เตรียมจากสารสกัดหยาบ <i>n</i> -hexane	9
ตารางที่ 4 ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มของส่วนสกัดที่เตรียมจากสารสกัดหยาบ chloroform	13
ตารางที่ 5 ¹ H และ ¹³ C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร β-sitostenone (7)	22
ตารางที่ 6 ¹ H และ ¹³ C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร 6-oxo-20-hydroxy-20- <i>epi</i> -tingenol (12)	26
ตารางที่ 7 ¹ H และ ¹³ C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร β-sitosterol-3β-O-D-glucopyranoside (13)	28
ตารางที่ 8 ¹ H และ ¹³ C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร 5α,6α-epoxystigmastan-3β-ol (14)	31
ตารางที่ 9 ¹ H และ ¹³ C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร 2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>S</i> *-trihydroxy-6 <i>R</i> *-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15)	33
ตารางที่ 10 ¹ H และ ¹³ C NMR assignments ของสาร 6β-(2'-oxo-propyl)-tingenol (20)	35
ตารางที่ 11 ¹ H และ ¹³ C NMR assignments ของสาร 6β-(2'-oxo-propyl)-22β-hydroxy-tingenol (21).....	36
ตารางที่ 12 ¹ H และ ¹³ C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร 6β-(2'-oxo-propyl)-20-hydroxy-20- <i>epi</i> -tingenol (25)	37
ตารางที่ 13 ¹ H และ ¹³ C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร 6-(<i>E</i> -2'-oxo-propylidene)-22β-hydroxy-tingenol (22)	40
ตารางที่ 14 ¹ H และ ¹³ C NMR assignments รวมทั้ง HMBC ของสาร 20-hydroxy-20- <i>epi</i> -isotingenone IV (23)	43
ตารางที่ 15 ¹ H และ ¹³ C NMR assignments รวมทั้ง HMBC ของสาร 19,20-didehydro-isotingenone III (24) ...	45
ตารางที่ 16 ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มและความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารบริสุทธิ์	47

สารบัญแผนภูมิ

		หน้า
แผนภูมิที่ 1	การแยกส่วนสกัดอย่างคร่าว ๆ ของสารสกัดหยาบชั้น <i>n</i> -hexane	8
แผนภูมิที่ 2	การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด H-B	10
แผนภูมิที่ 3	การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด H-C	11
แผนภูมิที่ 4	การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด H-C (ต่อ)	12
แผนภูมิที่ 5	การแยกส่วนสกัดอย่างคร่าว ๆ ของสารสกัดหยาบชั้น chloroform และการสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด C-B	14
แผนภูมิที่ 6	การเตรียมสาร isotingenone III (18) และสารผลิตภัณฑ์อื่นจากสาร tingenone (16) รวมถึงการสกัดแยกให้บริสุทธิ์	16
แผนภูมิที่ 7	การเตรียมสาร 22 β -hydroxy-isotingenone III (10) และสารผลิตภัณฑ์อื่นจากสาร 22 β -hydroxytingenone (9) รวมถึงการสกัดแยกให้บริสุทธิ์	17
แผนภูมิที่ 8	การเตรียมสาร 20-hydroxy-20- <i>epi</i> -isotingenone III (19) และสารผลิตภัณฑ์อื่นจากสาร 20-hydroxy-20- <i>epi</i> -tingenone (17) รวมถึงการสกัดแยกให้บริสุทธิ์	18
แผนภูมิที่ 9	สมมุติฐานวิถีชีวสังเคราะห์ของสาร 6-oxo-20-hydroxy-20- <i>epi</i> -tingenol (12)	48
แผนภูมิที่ 10	สมมุติฐานวิถีชีวสังเคราะห์ของสาร 2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>S</i> *-trihydroxy-8 <i>R</i> *-nonadecyl-tetrahydro- pyran-4-one (15)	49
แผนภูมิที่ 11	กลไกปฏิกิริยาการก่ิงสังเคราะห์สาร isotingenone III (18), 22 β -hydroxy-isotingenone III (10) และ 20-hydroxy-20- <i>epi</i> -isotingenone III (19) จากสาร tingenone (16), 22 β -hydroxy-tingenone (9) และ 20-hydroxy-20- <i>epi</i> -tingenone (17) ตามลำดับ	49
แผนภูมิที่ 12	สมมุติฐานกลไกปฏิกิริยาการก่ิงสังเคราะห์สาร 6 β -(2'-oxo-propyl)-tingenol (20), 6 β -(2'-oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21) และ 6 β -(2'-oxo-propyl)-20-hydroxy- 20- <i>epi</i> -tingenol (25) จากสาร tingenone (16), 22 β -hydroxy-tingenone (9) และ 20-hydroxy-20- <i>epi</i> -tingenone (17) ตามลำดับ	50
แผนภูมิที่ 13	สมมุติฐานกลไกปฏิกิริยาการก่ิงสังเคราะห์สาร 20-hydroxy-20- <i>epi</i> -isotingenone IV (23) จากสาร 20-hydroxy-20- <i>epi</i> -tingenone (17)	51

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 ภาพแสดง conformation ของสาร salaspermic acid (11)	24
รูปที่ 2 ^1H - ^{13}C HMBC long-range correlations ที่สำคัญของสาร 6-oxo-20-hydroxy-20- <i>epi</i> -tingenol (12) ...	25
รูปที่ 3 ภาพแสดง conformation ของสาร β -sitosterol-3 β -O-D-glucopyranoside (13) และ NOEs ที่สำคัญบางตำแหน่ง	28
รูปที่ 4 ^1H - ^{13}C HMBC long-range correlations ที่สำคัญของสาร 2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>S</i> *-trihydroxy-6 <i>R</i> *- nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15)	32
รูปที่ 5 ^1H - ^{13}C HMBC long-range correlations ที่สำคัญที่ ring A และ B ของสาร 6 β -(2'-oxo-propyl)-tingenol (20), 6 β -(2'-oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21) และ 6 β -(2'-oxo-propyl)-20-hydroxy-20- <i>epi</i> -tingenol (25)	38
รูปที่ 6 ^1H - ^{13}C HMBC long-range correlations ที่สำคัญที่ ring A และ B ของสาร 6-(<i>E</i> -2'-oxo-propylidene)-22 β -hydroxy-tingenol (22)	39
รูปที่ 6 ^1H - ^{13}C HMBC long-range correlations ที่สำคัญที่ ring A, B และ C ของสาร 20-hydroxy-20- <i>epi</i> -isotingenone IV (23)	42
รูปที่ 7 ภาพแสดง conformation ของสาร 20-Hydroxy-20- <i>epi</i> -isotingenone IV (23)	43
รูปที่ 8 ^1H - ^{13}C HMBC long-range correlations ที่สำคัญที่ ring E ของสาร 19,20-didehydro-isotingenone III (24)	45

คำย่อ

<i>br</i>	= broad (for NMR spectra)
<i>c</i>	= concentration (g/100 ml)
°C	= degree Celsius
<i>cc</i>	= column chromatography
CDCl ₃	= deuteriochloroform
CHCl ₃	= chloroform
¹³ C-NMR	= carbon-13 nuclear magnetic resonance
<i>cosy</i>	= correlation spectroscopy
<i>d</i>	= doublet (for NMR spectra)
<i>dd</i>	= doublet of doublet (for NMR spectra)
<i>ddd</i>	= doublet of doublet of doublet (for NMR spectra)
<i>ddq</i>	= doublet of doublet of quartet (for NMR spectra)
DEPT	= distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	= dimethyl sulfoxide
<i>dt</i>	= doublet of triplet (for NMR spectra)
EC ₅₀	= 50% effective concentration
EIMS	= electron impact mass spectrum
Et ₂ O	= diethyl ether
EtOAc	= ethyl acetate
EtOH	= ethanol
eV	= electron volt
<i>fc</i>	= flash chromatography
<i>g</i>	= gram
HCl	= hydrochloric acid
HMBC	= proton detected heteronuclear multiple bond connectivity
HMQC	= proton detected heteronuclear multiple quantum coherence
¹ H-NMR	= proton nuclear magnetic resonance
Hz	= hertz
IC ₅₀	= 50% inhibition concentration
IR	= infrared
<i>J</i>	= coupling constant
<i>m</i>	= multiplet (for NMR spectra)
[M] ⁺	= molecular ion

MeOH	= methanol
MH	= Muller Hinton
MHz	= mega hertz
mg	= milligram
ml	= milliliter
mm	= millimeter
MS	= mass spectrum
<i>m/z</i>	= mass per charge ratio
nm	= nanometer
NMR	= nuclear magnetic resonance
NOE	= nuclear overhauser effect
NOESY	= nuclear overhauser effect spectroscopy
ppm	= part per million
<i>R_f</i>	= retardative factor, relative front
<i>s</i>	= singlet (for NMR spectra)
<i>t</i>	= triplet (for NMR spectra)
<i>td</i>	= triplet of doublet (for NMR spectra)
TLC	= thin-layer chromatography
TMS	= tetramethylsilane
UV	= ultraviolet
v/v	= volume by volume
[α]_D	= specific rotation at 589 nm
ϵ	= molar absorptivity
δ	= chemical shift
λ_{max}	= wavelength at maximum absorption
μg	= microgram
ν_{max}	= wave number at maximum absorption

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำทั่วไป

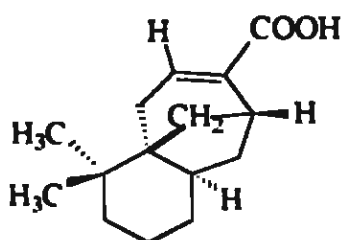
เริม เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Herpes simplex Virus* (HSV) ซึ่งมี 2 types คือ HSV-1 ทำให้เกิดโรคในช่องปาก ริมฝีปาก หน้าและตา และ HSV-2 ทำให้เกิดโรคบริเวณอวัยวะเพศ ปัจจุบัน มียาที่ใช้รักษาเริมอยู่จำกัดเพียงไม่กี่ชนิด ได้แก่ acyclovir, ganciclovir sodium, famciclovir และ valacyclovir ซึ่งทุกชนิดมีโครงสร้างทางเคมีเป็นอนุพันธ์ของ purine และยาทุกชนิดยังไม่สามารถรักษาโรคนี้ให้หายขาด เมื่อผู้ป่วยถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยแวดล้อมบางอย่าง ก็จะเกิดโรคในบริเวณที่เคยเป็นซ้ำอีก การแสวงหายาที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น

โดยธรรมชาติ พืชจะพยายามป้องกันตัวจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งเชื้อไวรัส โดยวิธีการต่างๆ แม้เชื้อไวรัสที่ก่อโรคกับมนุษย์จะแตกต่างจากพืช แต่สารที่พืชสร้างหลายชนิดก็มีฤทธิ์ต้านไวรัสที่ก่อโรคในมนุษย์ได้ สารที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริมที่ค้นพบจากพืช ได้แก่ methyl gallate¹, gallotannins², phloroglucinol derivatives³, isoflavone glycosides⁴, hypericin⁵, glycyrrhizin⁶, scopadulin⁷⁻⁸, citrussinine⁹ เป็นต้น

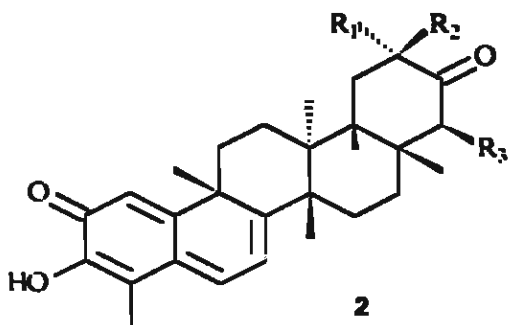
2. ตุมกาแดง

ตุมกาแดง (*Glyptopetalum sclerocarpum* Laws.) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งในตำรับยาของหมอแฉว วงศ์คำโสม ซึ่งเป็นหมอพื้นบ้านที่อาศัยอยู่ในบริเวณภูเขา จังหวัดเลย ใช้รักษาโรคเกี่ยวกับเชื้อรา และโรคมาลาเรีย เป็นพืชที่เคยมีรายงานถึงสารที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริม¹⁰ งานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ทั้งหมดเกี่ยวกับตุมกาแดงจะได้อะจากการศึกษาส่วนเปลือกต้น พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้

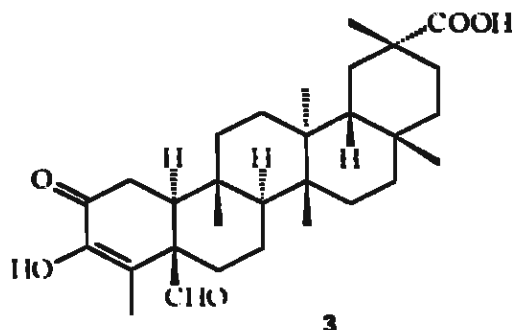
1. สารกลุ่ม sesquiterpenes คือ sclerocarpic acid (1) มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริม¹⁰
2. สารกลุ่ม quinone-methide triterpenes หลายชนิดที่เป็นอนุพันธ์ของ tingenone (2)¹¹⁻¹³ มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา¹⁴ แบคทีเรีย¹⁴⁻¹⁵ และเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง^{12,16-19}
3. สารกลุ่ม triterpenes คือ cangoronine (3), glyptopetolide (4) และ isoarborinol (5)²⁰ สารเหล่านี้ให้ผลลบกับการตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา และแบคทีเรีย



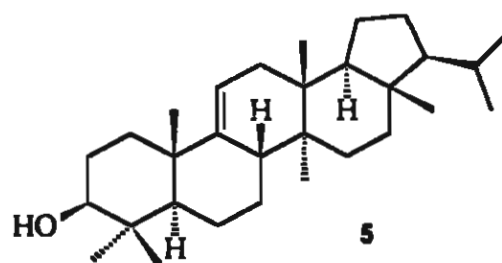
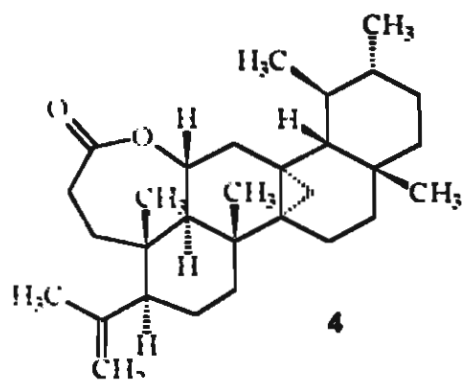
1



2



3

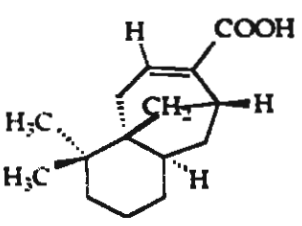
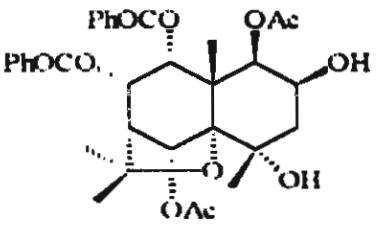


3. สารต้านไวรัสเริ่มจากพืชวงศ์ Celastraceae

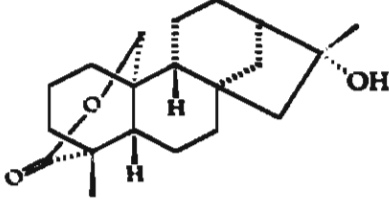
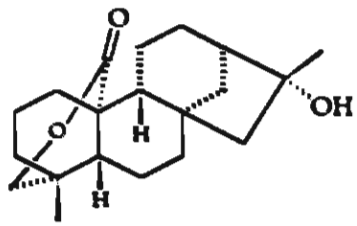
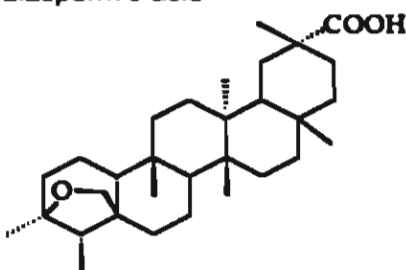
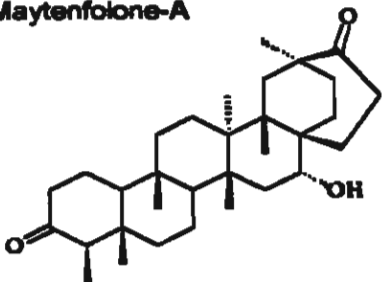
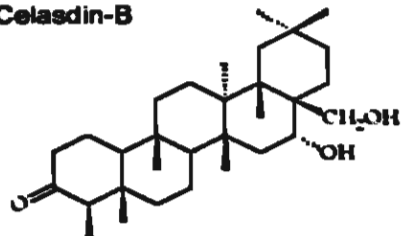
จากการค้นพบพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Celastraceae ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ สารหลายชนิดมีศักยภาพสูงจนได้รับการศึกษาทางคลินิก กลุ่มสารสำคัญที่พบได้จากพืชวงศ์นี้ได้แก่ สารกลุ่ม maytansinoids มีฤทธิ์ต้านเนื้องอก²² สารกลุ่ม quinone-methide triterpenes ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา แบคทีเรีย¹⁴⁻¹⁵ และเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง^{12-13,19} และสารกลุ่ม sesquiterpene-pyridine alkaloid มีฤทธิ์ฆ่าแมลง²⁰⁻²³

พืชวงศ์นี้ยังเป็นแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส ดังสรุปในตารางที่ 1 สารเหล่านี้มีความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมี แสดงถึงความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมีที่พบในพืชวงศ์นี้ ทำให้มีโอกาสเป็นไปได้มากที่จะพบสารต้านเชื้อไวรัสเริ่มชนิดอื่นๆ อีกจากพืชวงศ์นี้

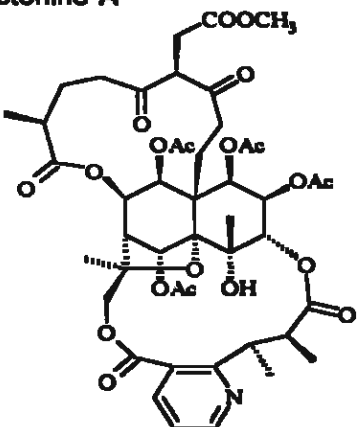
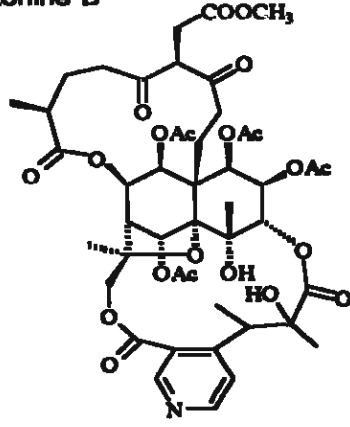
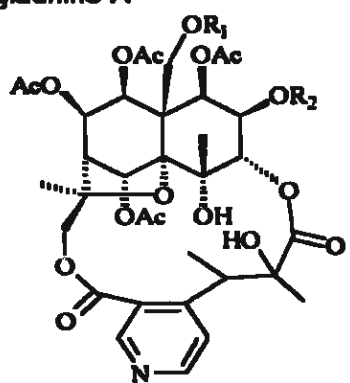
ตารางที่ 1 สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสจากพืชวงศ์ Celastraceae

ชื่อสาร	แหล่งที่พบ	เชื้อไวรัสที่มียผล ^a	เอกสารอ้างอิง
1. Sesquiterpenes Sclerocarpic acid 	<i>Glyptopetalum sclerocarpum</i> (เปลือกต้น)	HSV-1 ใน Vero cell (EC ₅₀ 5 µg/ml, SI >10) HSV-2 ใน Vero cell (EC ₅₀ 12.5 µg/ml, SI >4)	10
Triptofordin C-2 	<i>Typterygium wilfordii</i> var. <i>regellii</i> (ใบ)	HSV-1 ใน HeLa cell (EC ₅₀ 3.7 µg/ml, SI 24), human cytomegalovirus ใน HEI cell (EC ₅₀ 8.1 µg/ml, SI 8.1)	24-25

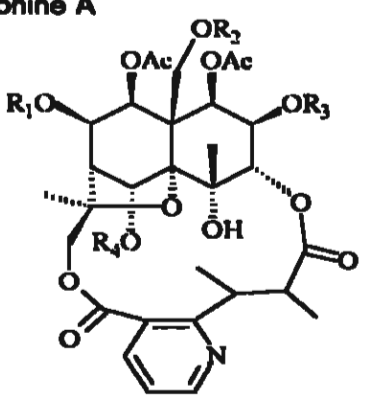
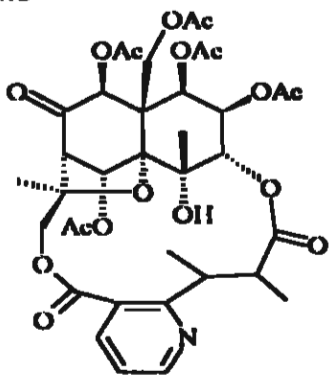
ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อสาร	แหล่งที่พบ	เชื้อไวรัสที่มีผล	เอกสารอ้างอิง
2. Diterpenes Tripterifordin 	<i>Typterygium wilfordii</i> (ราก)	HIV-1 ใน H9 lymphocytes (EC ₅₀ 1 µg/ml, SI >2.5)	26
Neotripterifordin 	<i>Typterygium wilfordii</i> (ราก)	HIV-1 ใน H9 lymphocytes (EC ₅₀ 25 nM, SI 125)	27-28
3. Triterpenes Salaspermic acid 	<i>Typterygium wilfordii</i> (ราก)	HIV-1 ใน H9 lymphocytes (EC ₅₀ 53 µM, SI 5.3)	29
Maytenfolone-A 	<i>Celastrus hindsii</i> (ลำต้น)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC ₅₀ 1.8 µg/ml, SI 4)	30
Celasdin-B 	<i>Celastrus hindsii</i> (ลำต้น)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC ₅₀ 0.8 µg/ml, SI 3)	30

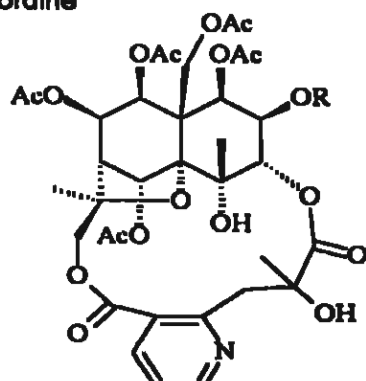
ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อสาร	แหล่งที่พบ	เชื้อไวรัสที่มียด*	เอกสารอ้างอิง
4. Sesquiterpene alkaloids Triptonine A 	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC ₅₀ 2.54 µg/ml, SI 39.4)	31-32
Triptonine B 	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC ₅₀ <0.10 µg/ml, SI >1000)	32
Hypoglaunine A  (R ₁ = Furanoyl, R ₂ = Ac)	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC ₅₀ 0.131 µg/ml, SI >789)	31-32
Hypoglaunine B (R ₁ = Ac, R ₂ = Furanoyl)	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC ₅₀ 0.10 µg/ml, SI >1000)	31-32

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อสาร	แหล่งที่พบ	เชื้อไวรัสที่มีผล*	เอกสารอ้างอิง
Hyponine A  $(R_1 = R_2 = R_3 = \text{Ac}, R_4 = \text{Furanoyl})$	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC_{50} 1.00 $\mu\text{g/ml}$, SI 27.7)	32
Hyponine B $(R_1 = R_3 = R_4 = \text{Ac}, R_2 = \text{Furanoyl})$	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC_{50} 0.10 $\mu\text{g/ml}$, SI >1000)	32
Hyponine E $(R_1 = \text{Nicotiny}, R_2 = R_3 = \text{Ac}, R_4 = \text{Furanoyl})$	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC_{50} 0.172 $\mu\text{g/ml}$, SI 11.3)	31-32
Hyponine F $(R_1 = R_2 = R_4 = \text{Ac}, R_3 = \text{Furanoyl})$	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC_{50} 35.2 $\mu\text{g/ml}$, SI >2.84)	32
Forresine $(R_1 = R_2 = R_4 = \text{Ac}, R_3 = \text{Benzoyl})$	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC_{50} 0.480 $\mu\text{g/ml}$, SI >208)	31-32
Cangonine E-1 $(R_1 = R_2 = R_3 = \text{Ac}, R_4 = \text{Benzoyl})$	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC_{50} 0.9 $\mu\text{g/ml}$, SI 63.4)	31-32
Euonymine $(R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{Ac})$	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC_{50} 0.203 $\mu\text{g/ml}$, SI 113)	32
Neoeuonymine $(R_1 = R_2 = R_3 = \text{Ac}, R_4 = \text{H})$	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC_{50} 0.884 $\mu\text{g/ml}$, SI >113)	32
Evonine 	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC_{50} 0.503 $\mu\text{g/ml}$, SI 42.1)	32

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อสาร	แหล่งที่พบ	เชื้อไวรัสที่มีผล*	เอกสารอ้างอิง
Wilfordine  (R = Benzoyl)	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC ₅₀ <0.10 µg/ml, SI >220)	32
Wilfortrine (R = Furanoyl)	<i>Tripterygium hypoglaucum</i> (เปลือกกราก)	HIV ใน H9 lymphocytes (EC ₅₀ <0.10 µg/ml, SI >1000)	32

* ความแรงของการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสแสดงในวงเล็บ

EC₅₀ (Effective Concentration at 50%) คือความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสได้ 50%

SI (Selectivity Index) คืออัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ 50% ต่อความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของไวรัสได้ 50%

HSV คือ *Herpes simplex virus*

HIV คือ Human Immuno-Deficiency virus

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างพืช

เก็บเปลือกผลตูมกาแดง จากบริเวณเขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ ในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2540 จัดทำ Voucher specimen เก็บเป็นตัวอย่างในการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ และเป็นตัวอย่างอ้างอิง เก็บไว้ ณ ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ตากเปลือกผลให้แห้งในที่ร่ม และบดให้เป็นผงละเอียด

2. เทคนิคทางพฤกษเคมี

Thin-layer chromatography (TLC) จะใช้ silica gel 60GF₂₅₄ (No. 7739, Merck) เคลือบบนแผ่นกระจกให้ความหนา 0.25 มิลลิเมตร ตรวจสอบผลโดยการสังเกตด้วยตาเปล่าภายใต้แสงปกติ และแสง ultraviolet (254 และ 366 nm) และสังเกตด้วยตาเปล่าเมื่อให้ความร้อน 110°C นาน 15 นาที หลังจากฉีกแผ่นด้วย 5% vanillin ใน 1% H₂SO₄ ใน ethanol

Preparative TLC เตรียมเหมือน TLC ตรวจสอบผลโดยการสังเกตด้วยตาเปล่าภายใต้แสงปกติ และแสง ultraviolet (254 และ 366 nm) ขูด silica gel ตำแหน่งที่มีสารที่ต้องการออกจากแผ่นกระจก ล้างสารออกจาก silica gel ด้วย acetone : methanol (1:1) หรือ methanol กรอง และระเหยสารละลายให้แห้ง หลังจากนั้น ละลายสารด้วย chloroform หรือ chloroform : methanol (1:1) กรอง และระเหยสารละลายให้แห้งอีกครั้ง

Column chromatography ที่ใช้ในการวิจัยมี 3 ชนิดคือ

- Conventional column chromatography (cc) จะบรรจุ silica gel 60 ที่มีขนาดของอนุภาค 0.040-0.083 มิลลิเมตร (No. 9385, Merck) ลงในหลอดแก้ว น้ำหนักของ silica gel และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดแก้วที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่จะนำมาผ่าน

- Flash chromatography (fc) เทคนิคทั่วไปเหมือน cc แต่ใช้ silica gel 60 ที่มีขนาดของอนุภาค 0.015-0.040 มิลลิเมตร (No. 15111, Merck) และผ่านตัวทำละลายด้วยการใช้ความดัน

- Gel filtration chromatography เทคนิคทั่วไปเหมือน cc แต่ใช้ Sephadex[®] LH20 (Pharmacia Biotech)

3. เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

Infrared (IR) spectra ใช้เทคนิค thin film บันทึกการทะลุผ่านของแสงด้วยเครื่อง Nicolet Magna-IR Spectrometer 750

Mass spectra (MS) ใช้เทคนิค electron impact โดยมีพลังงานของอิเล็กตรอนที่ใช้เท่ากับ 70 eV บันทึกน้ำหนักของชิ้นส่วนโมเลกุลสารที่แตกตัวจากการถูกปะทะด้วยลำอิเล็กตรอน โดยใช้เครื่อง Hewlett Peckard 5989B Mass Spectrometer

Proton และ carbon nuclear magnetic resonance (¹H NMR and ¹³C NMR) spectra บันทึกด้วยเครื่อง JEOL JNM-A500 (Alpha series) 500 MHz NMR Spectrometer

4. การหาคุณสมบัติทางฟิสิกส์

จุดหลอมเหลว วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Electrothermal digital melting point apparatus

การเบี่ยงเบนแสง polarized วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Perkin Elmer 341 Polarimeter รายงานเป็นค่า specific rotations

องค์ประกอบของธาตุ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Perkin Elmer PE2400 series II CHNS/O Analyser

5. การเตรียมสารสกัดหยาบ

เตรียมสารสกัดจากเปลือกผลทุมกาแดงจำนวน 500 กรัม โดยเทคนิค Soxhlet's extraction ได้สารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย *n*-hexane, chloroform และ methanol จำนวน 15.20, 11.3 และ 98.8 กรัมตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สารสกัดหยาบที่เตรียมจากตัวทำละลาย *n*-hexane และ chloroform แสดงฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม 50% ในขณะที่สารสกัดหยาบที่เตรียมจากตัวทำละลาย methanol ไม่มีฤทธิ์ (ตารางที่ 2) งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาเฉพาะสารสกัดหยาบ *n*-hexane และ chloroform

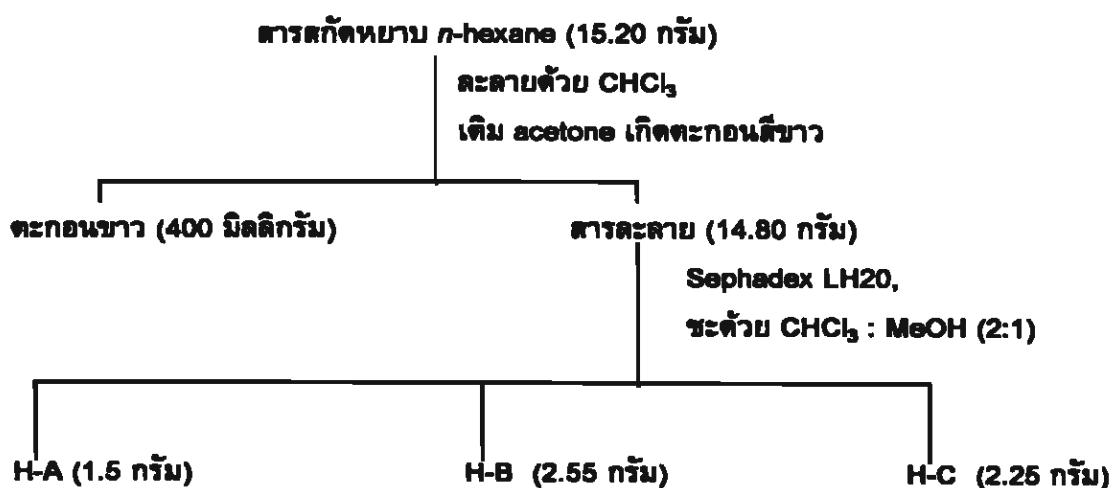
ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทุมกาแดง*

สารสกัดหยาบ (50 µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด plaque เมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม	
	HSV-1	HSV-2
<i>n</i> -Hexane	50	50
Chloroform	50	75
Methanol	0	0

* ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ทุกตัวอย่างไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

6. การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบ *n*-hexane

ละลายสารสกัดหยาบ *n*-hexane (15.20 กรัม) ด้วย chloroform เล็กน้อย ตกตะกอนด้วย acetone ใต้ตะกอนยางสีขาว 400 มิลลิกรัม ซึ่งไม่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม และได้สารละลาย 14.80 กรัม (แผนภูมิที่ 1) ระเหยสารละลายให้แห้ง นำไปผ่าน gel chromatography ะด้วย chloroform : methanol (2:1) แยกสารสกัดได้เป็น 3 ส่วน คือ H-A (1.50 กรัม) H-B (2.55 กรัม) และ H-C (2.25 กรัม) ส่วนสกัด H-A ประกอบด้วยสารสกปรก เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มของส่วนสกัดทั้ง 3 ส่วน พบว่าที่ความเข้มข้น 50 µg/ml มีเฉพาะส่วนสกัด H-C เท่านั้นที่มีฤทธิ์ ส่วนสกัด H-B พบมีฤทธิ์เมื่อใช้ความเข้มข้น 100 µg/ml (ตารางที่ 3)



แผนภูมิที่ 1 การแยกส่วนสกัดอย่างคร่าวๆ ของสารสกัดหยาบชั้น *n*-hexane

ตารางที่ 3ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มของส่วนสกัดและส่วนสกัดย่อย ที่เตรียมจากสารสกัดหยาบ *n*-hexane^a

ส่วนสกัด (50 µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด plaque เมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม	
	HSV-1	HSV-2
H-A	0	0
H-B	5	0
H-B ^b	45	40
H-C	50	50
HC-1	0	0
HC-2	43	26
HC-3 ^c		
HC-4 ^d	52	24
HC-5	82	67

^a ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ทุกตัวอย่างไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

^b ตรวจสอบที่ความเข้มข้น 100 µg/ml

^c มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงมาก ไม่สามารถตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม

^d ตรวจสอบที่ความเข้มข้น 20 µg/ml แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ 100% ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml

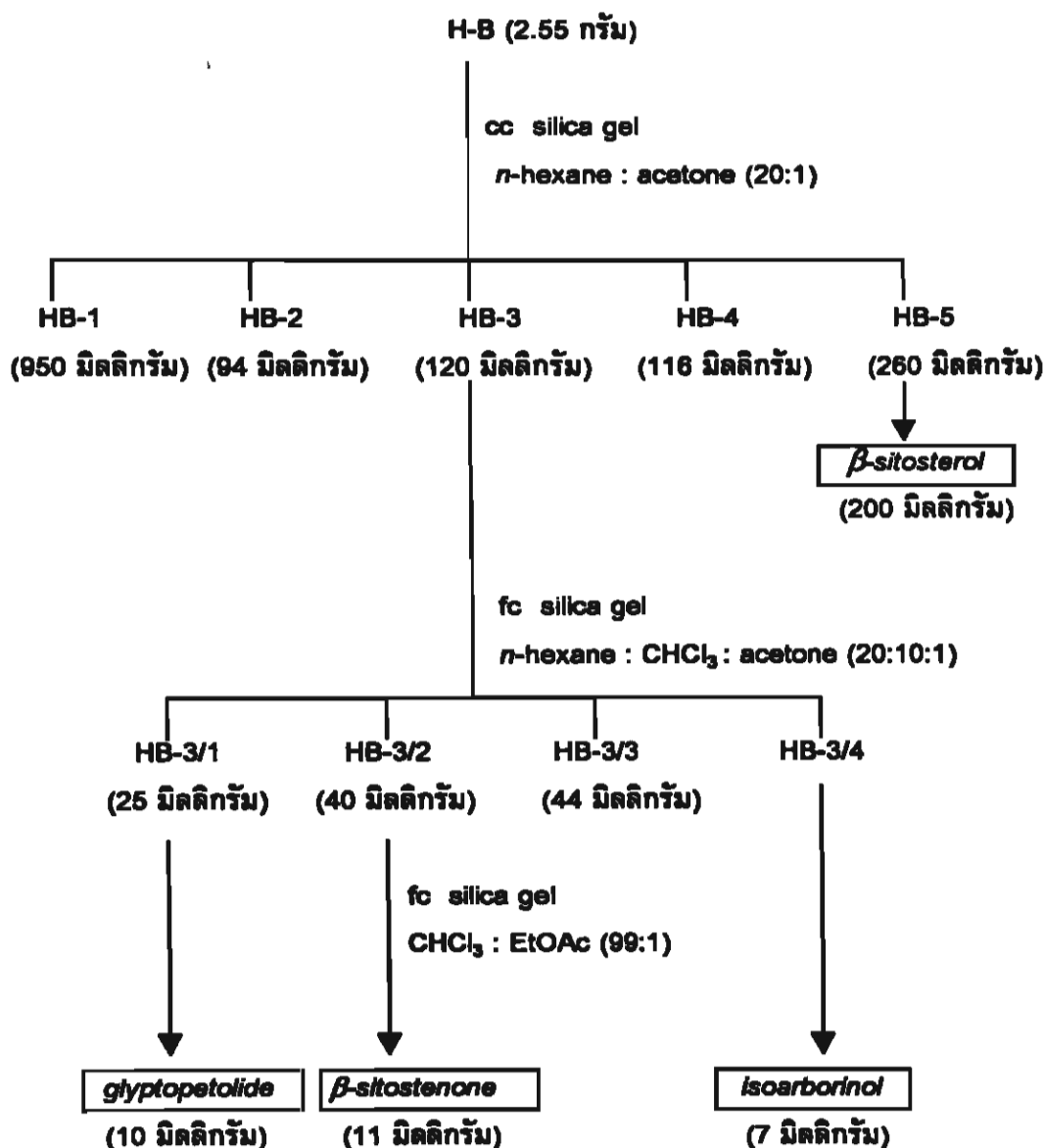
6.1) การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด H-B

นำส่วนสกัด H-B มาแยกเป็นส่วนย่อย โดยผ่าน cc ชะด้วย *n*-hexane : acetone (20:1) ได้ส่วนสกัดย่อย 5 ส่วนคือ HB-1 (950 มิลลิกรัม) HB-2 (94 มิลลิกรัม) HB-3 (120 มิลลิกรัม) HB-4 (116 มิลลิกรัม) และ HB-5 (260 มิลลิกรัม) (แผนภูมิที่ 2)

ส่วนสกัด HB-5 สามารถตกผลึกสาร β -sitosterol (6) (200 มิลลิกรัม)

นำส่วนสกัด HB-3 มาผ่าน fc ชะด้วย *n*-hexane : CHCl₃ : acetone (20:10:1) ได้ส่วนสกัดย่อย 4 ส่วน สามารถตกผลึกสารบริสุทธิ์ glyptopetalide (4) (10 มิลลิกรัม) จากส่วนสกัดย่อยที่ 1 และได้สารสารบริสุทธิ์ isorborinol (5) (7 มิลลิกรัม) จากส่วนย่อยที่ 4

ส่วนสกัดย่อยที่ 2 (40 มิลลิกรัม) ของส่วนสกัด HB-3 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน fc ชะด้วย CHCl₃ : EtOAc (99:1) ได้สารบริสุทธิ์ β -sitostenone (7) 11 มิลลิกรัม



แผนภูมิที่ 2 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด H-B

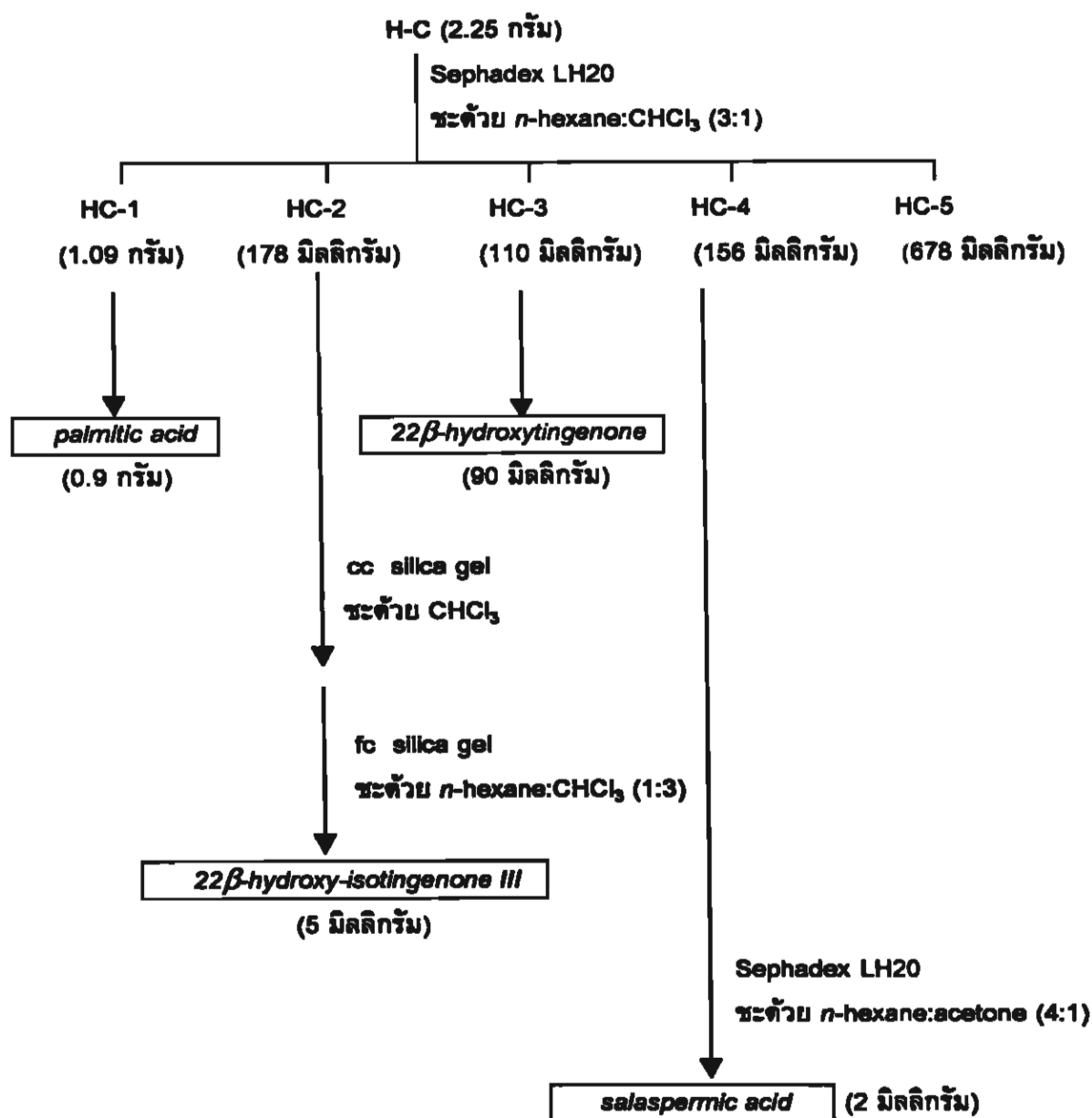
6.2) การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด H-C

แยกส่วนสกัด H-C (2.25 กรัม) เป็นส่วนย่อยตามแผนภูมิที่ 3 คือนำมาผ่าน gel chromatography ด้วย n -hexane : chloroform (3:1) ได้ส่วนสกัดย่อย 5 ส่วนคือ HC-1 (1.09 กรัม) HC-2 (178 มิลลิกรัม) HC-3 (110 มิลลิกรัม) HC-4 (156 มิลลิกรัม) และ HC-5 (678 มิลลิกรัม)ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มของส่วนสกัดย่อยทั้ง 5 ส่วนแสดงในตารางที่ 2

จากส่วนสกัดย่อย HC-1 สามารถแยกสาร *palmitic acid* (8) จำนวน 0.9 กรัม และส่วนสกัดย่อย HC-3 สามารถตกผลึกสารบริสุทธิ์ *22β-hydroxytingenone* (9) จำนวน 90 มิลลิกรัม

นำส่วนสกัดย่อย HC-2 มาผ่าน cc ด้วย chloroform และผ่าน fc ด้วย n -hexane : chloroform (1:3) สามารถแยกสารบริสุทธิ์ *22β-hydroxy-isotingenone III* (10) 5 มิลลิกรัม

นำส่วนสกัดย่อย HC-4 มาผ่าน gel chromatography ด้วย *n*-hexane : acetone (4:1) สามารถตกผลึกสารบริสุทธิ์ *salaspermic acid* (11) 2 มิลลิกรัม



แผนภูมิที่ 3 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด H-C

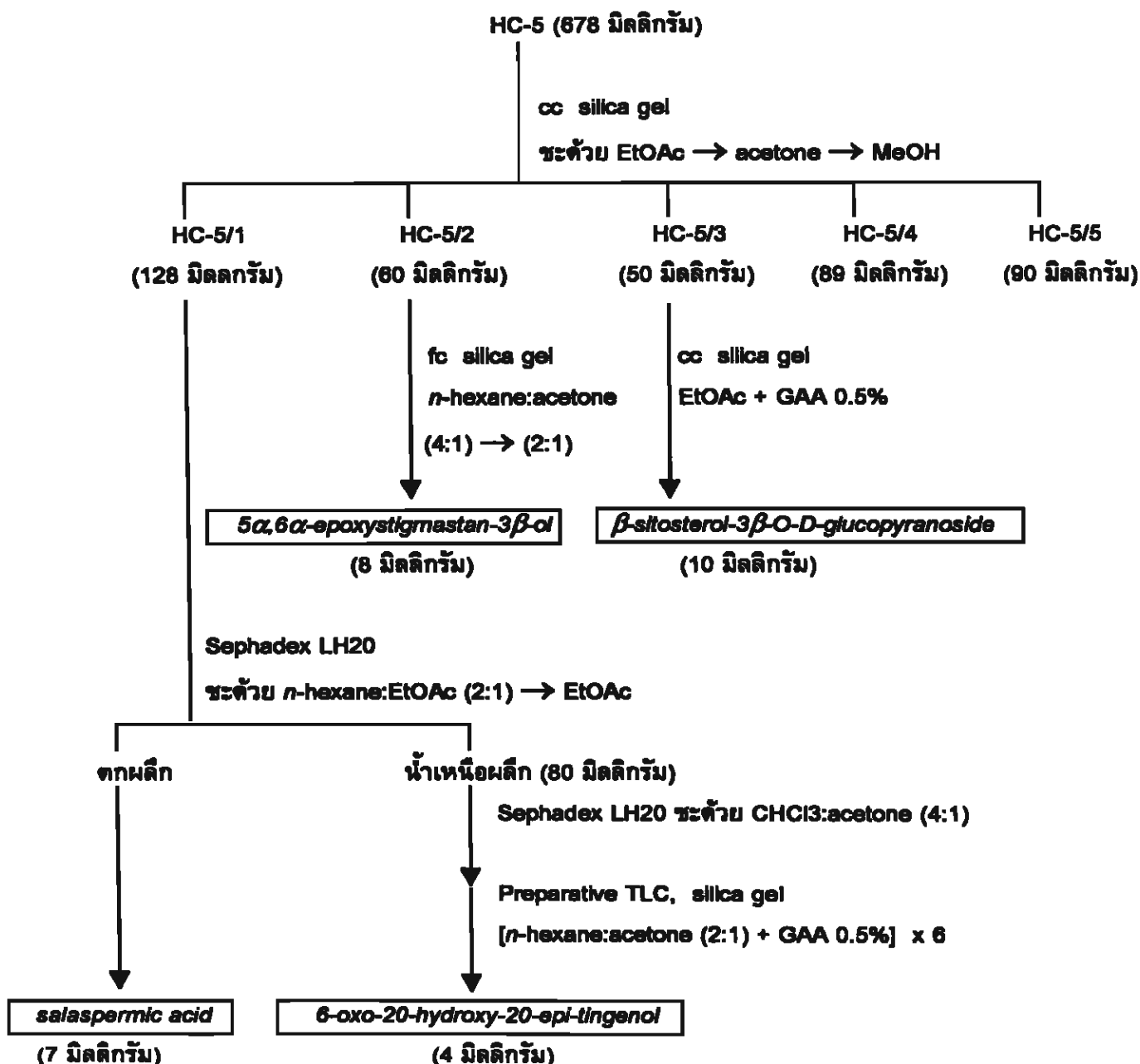
นำส่วนสกัด HC-5 มาผ่าน cc ด้วยตัวทำละลายตามความมีขี้ เริ่มจาก ethyl acetate, ethyl acetate : acetone (1:1), acetone, acetone : methanol (1:1) และ methanol ได้สารสกัด 5 ส่วนย่อย (แผนภูมิที่ 4) ส่วนย่อยที่ 4 (89 มิลลิกรัม) และ 5 (90 มิลลิกรัม) มีปริมาณน้อย และมีองค์ประกอบทางเคมีมากมายหลายชนิด จึงมิได้ศึกษาต่อ

นำสารสกัดส่วนย่อยที่ 1 ของ HC-5 (128 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ gel chromatography ด้วยตัวทำละลายตามความมีขี้ เริ่มจาก *n*-hexane : ethyl acetate (2:1) และ ethyl acetate ได้สารบริสุทธิ์ *salaspermic*

acid (11) 7 มิลลิกรัม นำส่วนของน้ำเหนือมลิก (80 มิลลิกรัม) มาผ่าน gel chromatography อีกครั้ง ชะด้วย chloroform : acetone (4:1) ตามด้วยการทำ preparative TLC ใช้ mobile phase คือ *n*-hexane : acetone (2:1) ที่มี glacial acetic acid 0.5% develop ซ้ำ 6 ครั้ง ได้สารบริสุทธิ์ *6-oxo-20-hydroxy-20-epi-tingenol* (12) 4 มิลลิกรัม

ส่วนย่อยที่ 3 (50 มิลลิกรัม) เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย cc ชะด้วย ethyl acetate ที่มี glacial acetic acid 0.5% ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือสาร *β -sitosterol-3 β -O-D-glucopyranoside* (13) 10 มิลลิกรัม

นำสารสกัดส่วนย่อยที่ 2 ของ HC-5 (60 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย fc ชะด้วย *n*-hexane : acetone จากอัตราส่วน 4:1 จนถึง 2:1 ได้สารบริสุทธิ์ *5 α ,6 α -epoxystigmastan-3 β -ol* (14) 8 มิลลิกรัม



แผนภูมิที่ 4 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด H-C (ต่อ)

7. การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบ chloroform

ละลายสารสกัดหยาบ chloroform (11.3 กรัม) ด้วย methanol ได้ส่วนที่ละลายได้เป็นสารละลายใส 8.5 กรัม และตะกอนของยางสีขาว 2.5 กรัม นำส่วนของสารละลายไปผ่าน gel chromatography ด้วย chloroform : methanol (1:1) สารสกัดหยาบถูกแยกเป็น 3 ส่วนคือ C-A (1.1 กรัม) C-B (3.2 กรัม) และ C-C (4.1 กรัม) ส่วนสกัดทั้ง 3 แสดงฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มต้นแสดงในตารางที่ 4 ส่วนสกัด C-A ไม่มีฤทธิ์ ส่วนส่วนสกัด C-C มีสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลายชนิดมาก ซึ่งเมื่อพยายามสกัดแยกให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มก็ลดลงอย่างมาก จึงไม่สามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ งานวิจัยนี้จึงศึกษาเพียงส่วนสกัด C-B

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มต้นของส่วนสกัดที่เตรียมจากสารสกัดหยาบ chloroform ^a

ส่วนสกัด (50 µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด plaque เมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม	
	HSV-1	HSV-2
C-A	0	0
C-B	25	75
CB-1	20	25
CB-2	50	10
C-C	60	20

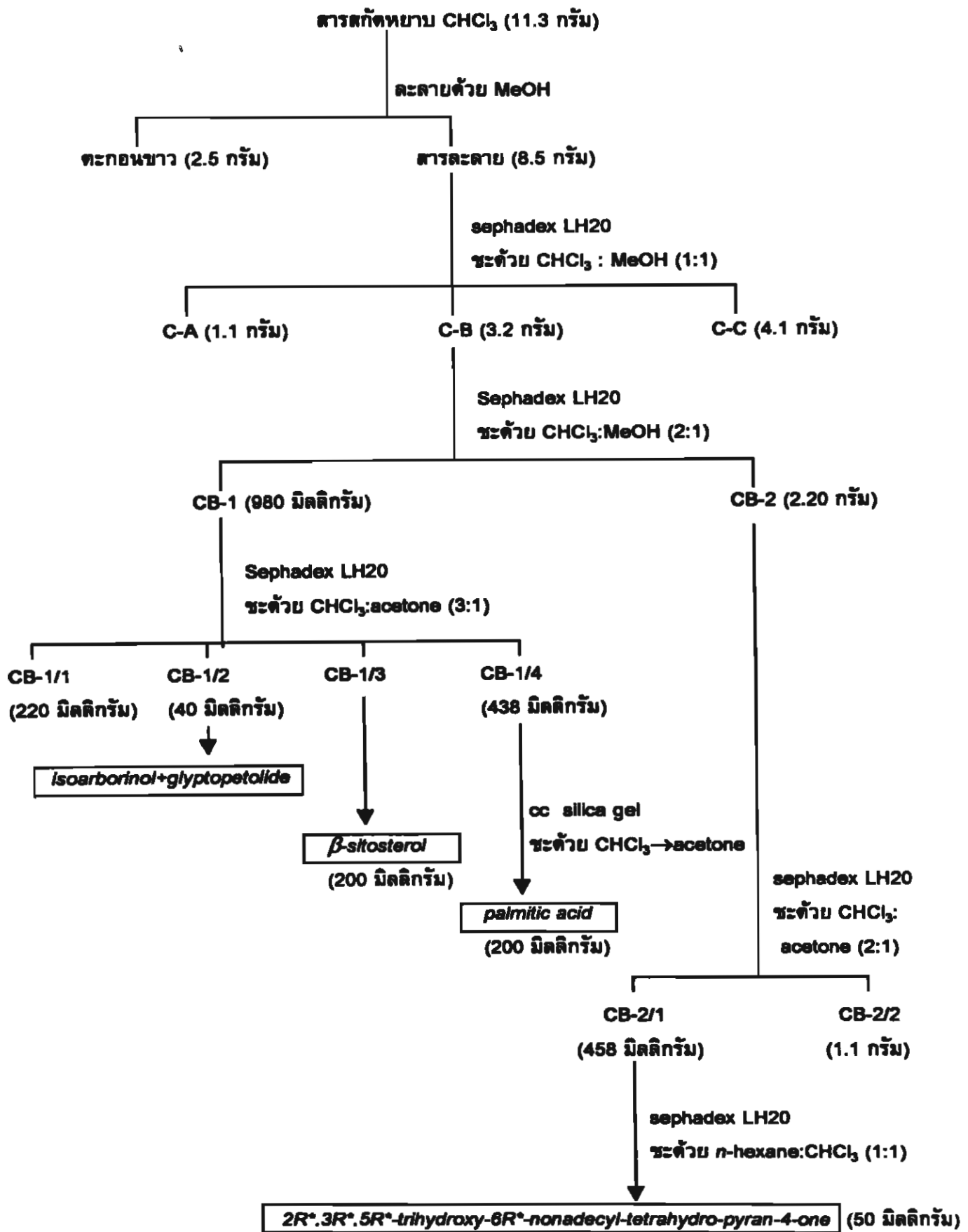
^a ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ทุกตัวอย่างไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

7.1) การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด C-B

นำส่วนสกัด C-B (3.2 กรัม) มาผ่าน gel chromatography ด้วย chloroform : methanol (2:1) แยกส่วนสกัดเป็น 2 ส่วน คือ CB-1 (980 มิลลิกรัม) และ CB-2 (2.2 กรัม) ส่วนสกัดย่อยทั้ง 2 แสดงฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มต้นแสดงในตารางที่ 4

ส่วนสกัดย่อย CB-1 นำมาผ่าน gel chromatography ด้วย chloroform : acetone (3:1) แยกสารเป็น 4 ส่วนย่อย ส่วนย่อยที่ 2 (40 มิลลิกรัม) เป็นส่วนผสมระหว่างสาร *isoeborinol* (5) และสาร *glyptopetolide* (4) ส่วนย่อยที่ 3 คือสารบริสุทธิ์ *β-sitosterol* (6) 200 มิลลิกรัม ส่วนย่อยที่ 4 นำมาผ่าน cc ด้วยตัวทำละลายตามความมีขั้ว คือ chloroform และ acetone ได้สารบริสุทธิ์ *palmitic acid* (8) 200 มิลลิกรัม

ส่วนสกัดย่อย CB-2 นำมาผ่าน gel chromatography ด้วย chloroform : acetone (2:1) แยกสารเป็น 2 ส่วนย่อย ส่วนย่อยที่ 1 นำมาผ่าน gel chromatography ด้วย *n*-hexane : chloroform (1:1) ได้สารบริสุทธิ์ *2R*,3R*,5R*-trihydroxy-6R*-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one* (15) 50 มิลลิกรัม สำหรับส่วนย่อยที่ 2 มีสารเคมีเป็นองค์ประกอบมากมาย ไม่ประสบผลสำเร็จในการศึกษา



แผนภูมิที่ 5 การแยกส่วนสกัดอย่างคร่าวๆ ของสารสกัดหยาบชั้น chloroform และการสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด C-B

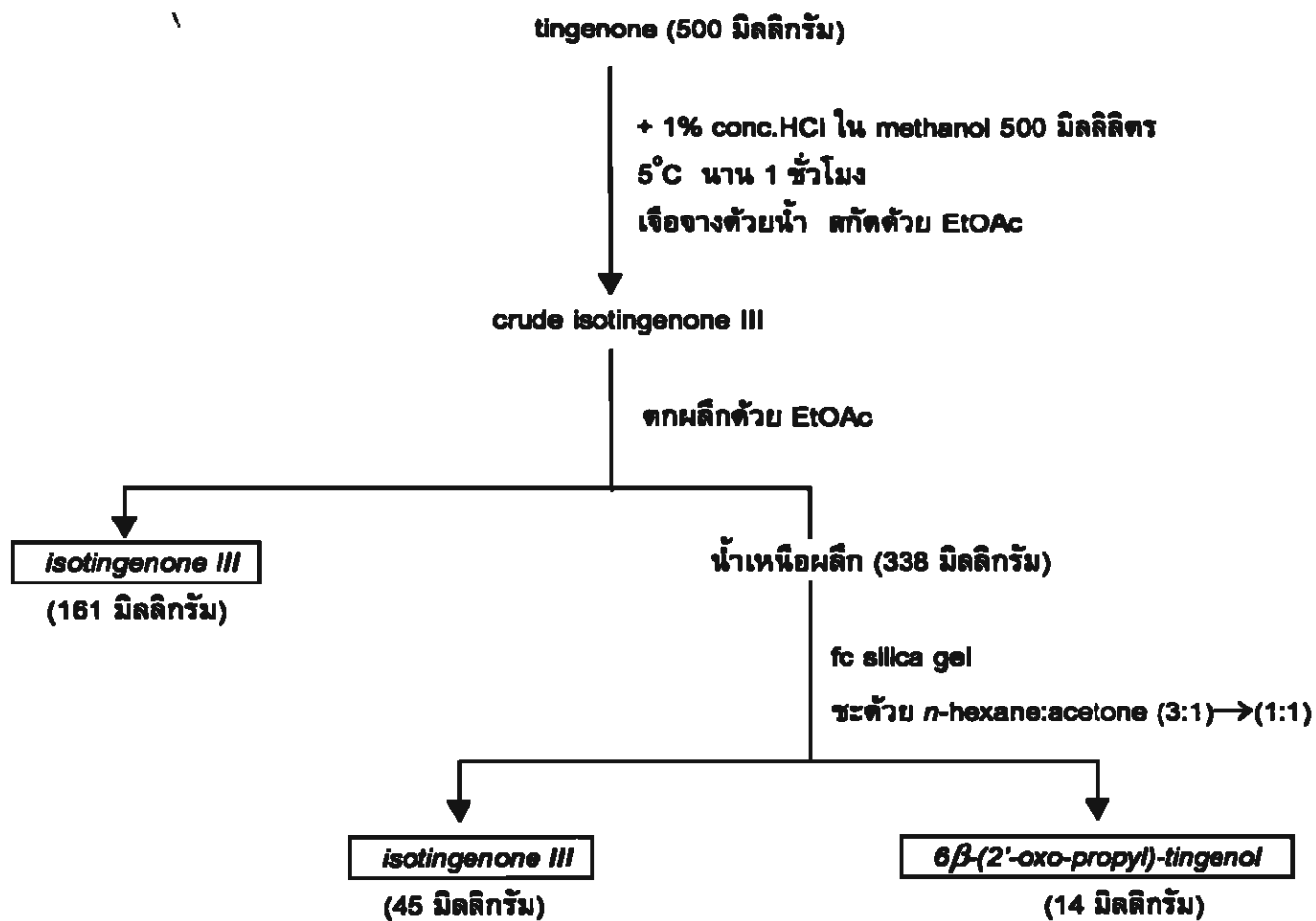
8. การเตรียมสาร *isotingenone III* และอนุพันธ์

ใช้วิธีการที่มีรายงานในเอกสารอ้างอิงหมายเลข 14 ดังนี้ ใช้สารตั้งต้นคือ *tingenone* (16), *22 β -hydroxytingenone* (9) และ *20-hydroxy-20-epi-tingenone* (17) ที่สกัดได้จากส่วนเปลือกต้นของชุมกาแดง¹¹ เตรียมให้เป็นอนุพันธ์ภายใต้ความเป็นกรด โดยละลายสารตั้งต้น 500 มิลลิกรัมใน methanol ต่อยๆ เติม hydrochloric acid เข้มข้น จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% ของ hydrochloric acid เข้มข้นใน methanol (pH ประมาณ 2) ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 5°C นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำ และสกัดด้วย ethyl acetate ล้างสารสกัด ethyl acetate ด้วยน้ำ จนหมดความเป็นกรด กำจัดน้ำที่ปนในสารสกัดด้วย sodium sulfate anhydrous ระเหยสารสกัดให้แห้ง จะได้สารสกัดหยาบของ *isotingenone III*, *22 β -hydroxy-isotingenone III* และ *20-hydroxy-20-epi-isotingenone III* จากสารตั้งต้น *tingenone*, *22 β -hydroxytingenone* และ *20-hydroxy-20-epi-tingenone* ตามลำดับ

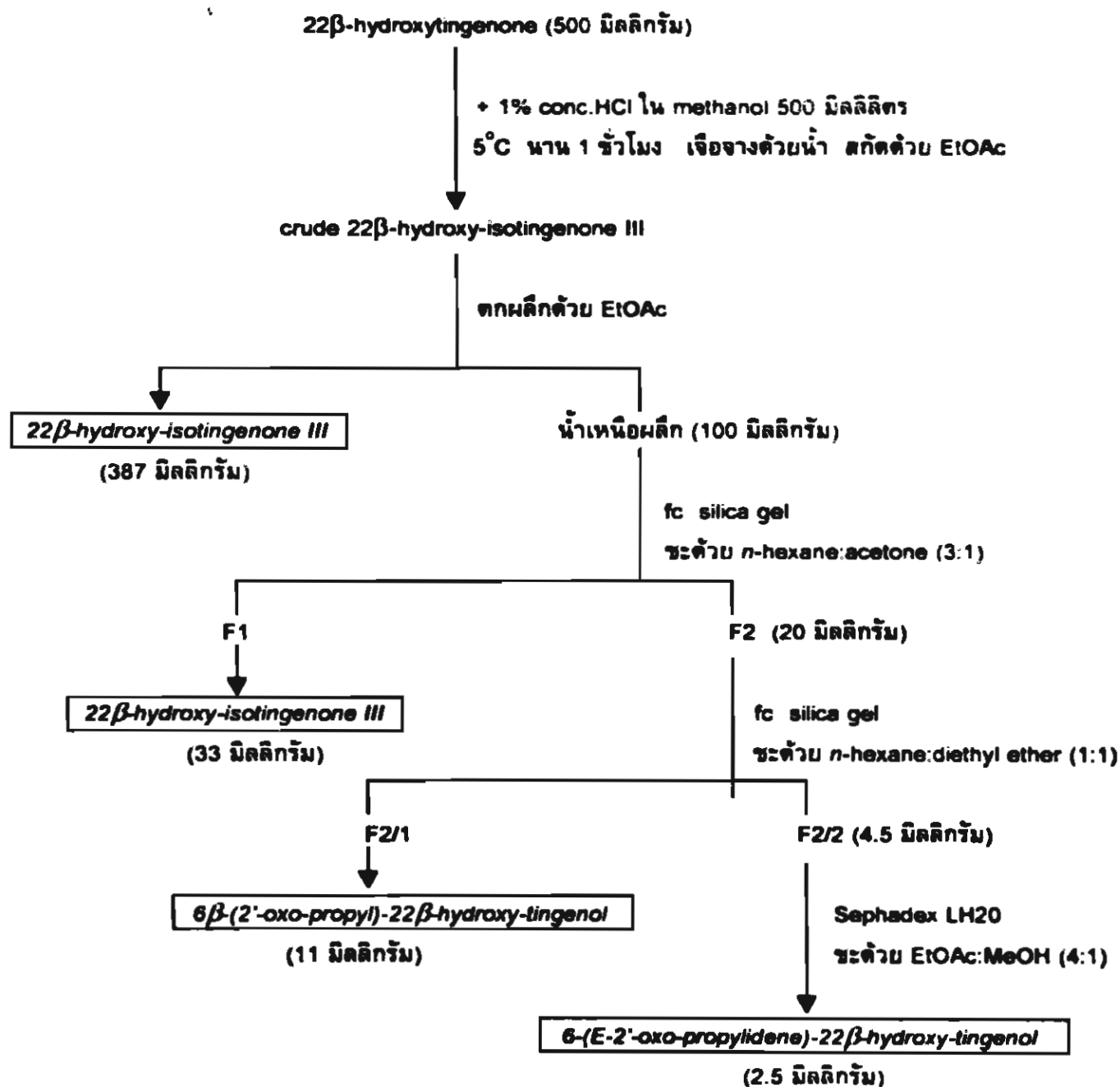
ละลายสารสกัดหยาบ *isotingenone III* ด้วย ethyl acetate สามารถตกผลึกสาร *isotingenone III* (18) 161 มิลลิกรัม ส่วนของน้ำเหนือผลึก (338 มิลลิกรัม) นำมาผ่าน fc ที่ชะด้วย *n*-hexane : acetone จากสัดส่วน (3:1) จนถึง (1:1) ส่วนที่ชะออกมาก่อนคือสาร *isotingenone III* (18) 45 มิลลิกรัม และได้สาร *6 β -(2'-oxo-propyl)-tingenol* (20) 14 มิลลิกรัม จากส่วนที่ชะออกมาช้ากว่า (แผนภูมิที่ 6)

ละลายสารสกัดหยาบ *22 β -hydroxy-isotingenone III* ด้วย ethyl acetate สามารถตกผลึกสาร *22 β -hydroxy-isotingenone III* (10) 387 มิลลิกรัม ส่วนของน้ำเหนือผลึก (100 มิลลิกรัม) นำมาผ่าน fc ชะด้วย *n*-hexane : acetone (3:1) แยกสารเป็น 2 ส่วนคือ F1 และ F2 ได้สาร *22 β -hydroxy-isotingenone III* (10) 33 มิลลิกรัม จาก F1 ส่วน F2 (20 มิลลิกรัม) เมื่อนำไปผ่าน fc ชะด้วย *n*-hexane : diethyl ether (1:1) แยกสารได้เป็น 2 ส่วน ได้สาร *6 β -(2'-oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol* (21) 11 มิลลิกรัม จาก F2/1 ในขณะที่ส่วน F2/2 (20 มิลลิกรัม) นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย gel chromatography ชะด้วย ethyl acetate : methanol (4:1) ได้สาร *6-(E-2'-oxo-propylidene)-22 β -hydroxy-tingenol* (22) 2.5 มิลลิกรัม (แผนภูมิที่ 7)

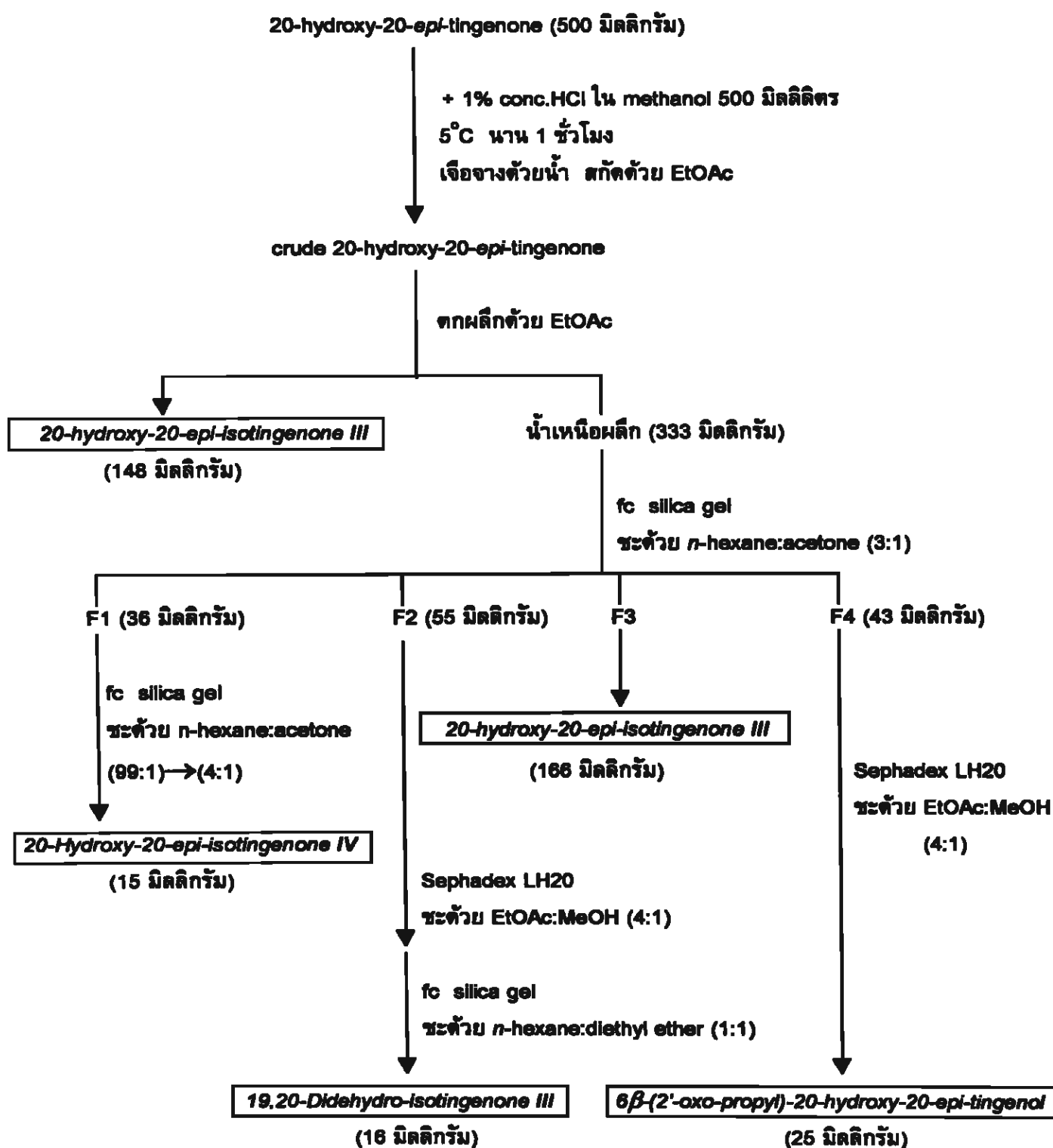
ละลายสารสกัดหยาบ *20-hydroxy-20-epi-isotingenone III* ด้วย ethyl acetate สามารถตกผลึกสาร *20-hydroxy-20-epi-isotingenone III* (19) 148 มิลลิกรัม นำส่วนของน้ำเหนือผลึก (333 มิลลิกรัม) นำมาผ่าน fc ชะด้วย *n*-hexane : acetone (3:1) แยกสารเป็น 4 ส่วนคือ F1-F4 ส่วน F3 คือสารบริสุทธิ์ *20-hydroxy-20-epi-isotingenone III* (19) 166 มิลลิกรัม นำ F1 (36 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน fc ชะด้วย *n*-hexane : acetone จากสัดส่วน (99:1) จนถึง (4:1) ได้สาร *20-hydroxy-20-epi-isotingenone IV* (23) 15 มิลลิกรัม ส่วน F2 (55 มิลลิกรัม) เมื่อนำมาผ่าน gel chromatography และ fc ที่ชะด้วย ethyl acetate : methanol (4:1) และ *n*-hexane : diethyl ether (1:1) ตามลำดับ ได้สาร *19,20-didehydro-isotingenone III* (24) 16 มิลลิกรัม และส่วน F4 เมื่อนำผ่าน gel chromatography ที่ชะด้วย ethyl acetate : methanol (4:1) ได้สารบริสุทธิ์ *6 β -(2'-oxo-propyl)-20-hydroxy-20-epi-tingenol* (25) 25 มิลลิกรัม (แผนภูมิที่ 8)



แผนภูมิที่ 6 การเตรียมสาร isotingenone III (18) และสารผลิตภัณฑ์อื่นจากสาร tingenone (16) รวมถึงการสกัดแยกให้บริสุทธิ์



แผนภูมิที่ 7 การเตรียมสาร 22 β -hydroxy-isotingenone III (10) และสารผลิตภัณฑ์อื่นจากสาร 22 β -hydroxytingenone (9) รวมถึงการสกัดแยกให้บริสุทธิ์



แผนภูมิที่ 8 การเตรียมสาร 20-hydroxy-20-epi-isotingenone III (19) และสารผลิตภัณฑ์อื่นจากสาร 20-hydroxy-20-epi-tingenone (17) รวมถึงการสกัดแยกให้บริสุทธิ์

9. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มของส่วนสกัดและสารบริสุทธิ์

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม จะใช้ตามวิธีที่รายงานในเอกสารอ้างอิงหมายเลข 33 ดังนี้

9.1) การตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มโดยใช้วิธี plaque reduction assay (inactivation assay) เชื้อไวรัสที่ใช้คือ HSV-1 (KOS) และ HSV-2 (Baylor 186) เตรียมสารละลายของสารที่ต้องการตรวจสอบฤทธิ์ความเข้มข้นต่างๆ ด้วย 100% DMSO และเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ (complete medium) ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับ 10% ผสมสารละลายกับเชื้อไวรัส (30 PFU/25 μ l) อย่างละ 25 μ l ปั่นที่อุณหภูมิห้อง (25-30°C) นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น เติม Vero cell suspension (6×10^5 cells/ml) จำนวน 50 μ l และบ่มส่วนผสมที่ 37°C ภายใต้ 5% CO₂ humidified incubator นาน 3 ชั่วโมง เติม overlay medium (1% tragacanth in complete medium) 75 μ l และสารละลายของสารที่ต้องการตรวจสอบ 25 μ l แล้วบ่มต่อเนื่อง 2-3 วัน นับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้น เทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่ได้เติมสารที่ต้องการตรวจสอบฤทธิ์ ค่าขนาดหาความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเกิด plaque ได้ครึ่งหนึ่ง (EC₅₀) โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 9.0 ใช้ acyclovir เป็นสารมาตรฐานที่ให้ผลบวก

9.2) การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยทดสอบกับ Vero cell เติมสารละลายของสารที่ต้องการตรวจสอบในความเข้มข้นต่างๆ 25 μ l ใน Vero cell suspension (6×10^5 cells/ml) จำนวน 75 μ l และบ่มที่ 37°C ภายใต้ 5% CO₂ humidified incubator นาน 2-3 วัน ดูผลความเป็นพิษของสารต่อเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่มีสารทดสอบ หาความเข้มข้นของสารที่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ครึ่งหนึ่ง (IC₅₀) โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 9.0

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การสกัดแยกสารบริสุทธิ์ และการเตรียมสารโดยวิธีกึ่งสังเคราะห์

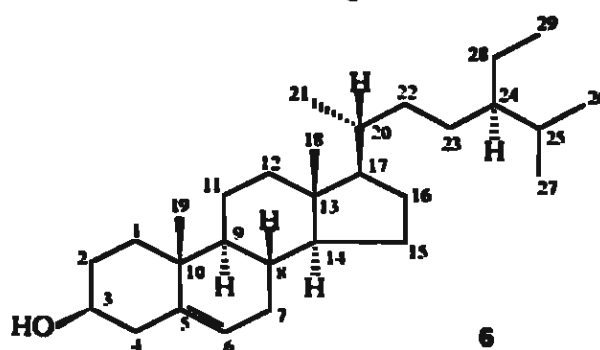
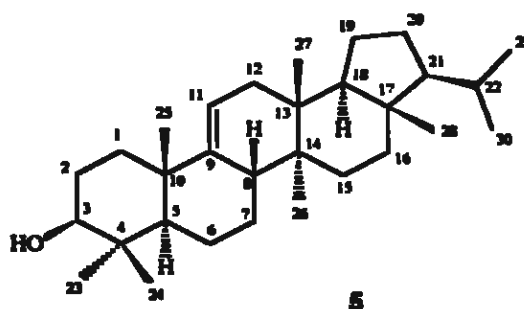
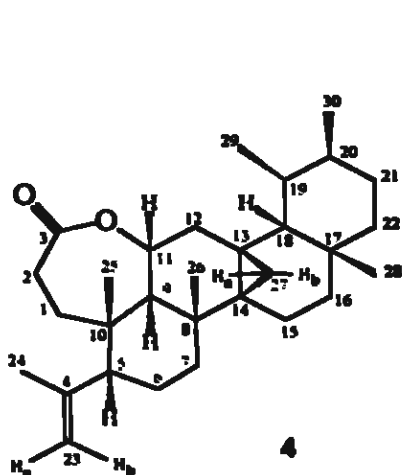
การวิจัยนี้ สามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์ทั้งสิ้น 11 ชนิดจากสารสกัดหยาบชั้น *n*-hexane ของเปลือกผลของทุมกาแดง คือ glyptopetolide (4), isocarborinol (5), β -sitosterol (6), β -sitosterone (7), palmitic acid (8), 22 β -hydroxytingenone (9), 22 β -hydroxy-isotingenone III (10), salaspemic acid (11), 6-oxo-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (12), β -sitosterol-3 β -O-*D*-glucopyranoside (13) และ 5 α ,6 α -epoxystigmastan-3 β -ol (14) และสามารถแยกสารบริสุทธิ์ 5 ชนิดจากสารสกัดหยาบชั้น chloroform คือ glyptopetolide (4), isocarborinol (5), β -sitosterol (6), palmitic acid (8) และ 2*R**,3*R**,5*R**-trihydroxy-6*R**-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15)

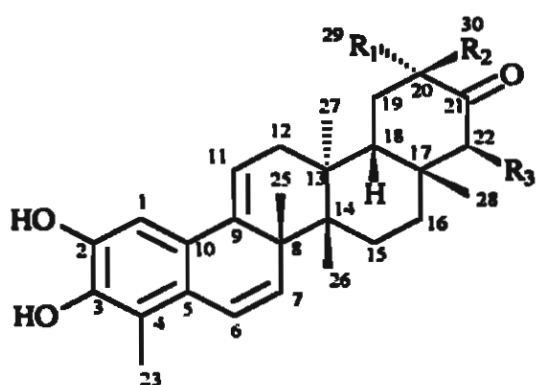
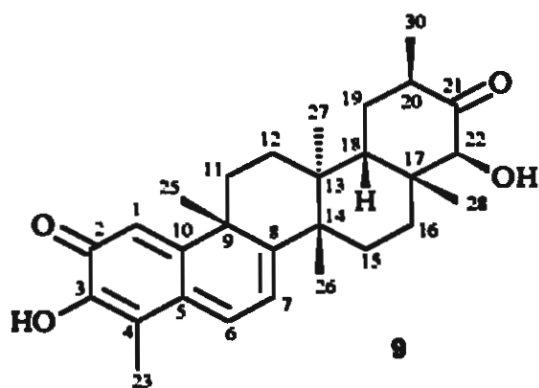
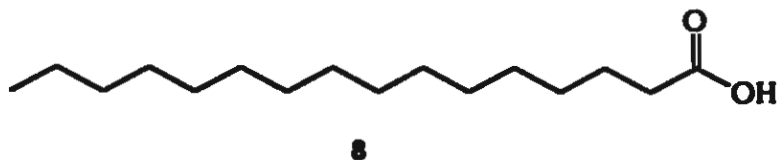
นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังได้เตรียมสารโดยวิธีกึ่งสังเคราะห์ ได้สาร 2 ชนิดจากสารตั้งต้น tingenone (16) คือ isotingenone III (18) และ 6 β -(2'-oxo-propyl)-tingenol (20) ได้สาร 3 ชนิดจากสารตั้งต้น 22 β -hydroxy-tingenone (9) คือ 22 β -hydroxy-isotingenone III (10), 6 β -(2'-oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21) และ 6-(*E*-2'-oxo-propylidene)-22 β -hydroxy-tingenol (22) และได้สาร 4 ชนิดจากสารตั้งต้น 20-hydroxy-20-*epi*-tingenone (19) คือ 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone III (19), 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone IV (23), 19,20-didehydro-isotingenone III (24) และ 6 β -(2'-oxo-propyl)-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (25)

2. การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์

2.1) Glyptopetolide (4), Isocarborinol (5), β -Sitosterol (6), Palmitic acid (8), 22 β -Hydroxytingenone (9), isotingenone III (18), 22 β -Hydroxy-isotingenone III (10) และ 20-Hydroxy-20-*epi*-isotingenone III (19)

สารเหล่านี้เคยสกัดแยกได้จากส่วนเปลือกต้นของพืชชนิดนี้^{11, 12, 14, 20} การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์จะอาศัยการเปรียบเทียบข้อมูล Thin-layer chromatography และหรือ infrared spectroscopy เทียบกับสารมาตรฐาน





10 $R_1 = H$, $R_2 = CH_3$, $R_3 = OH$

18 $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = CH_3$

19 $R_1 = CH_3$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$

2.2) β -Sitostenone (7)

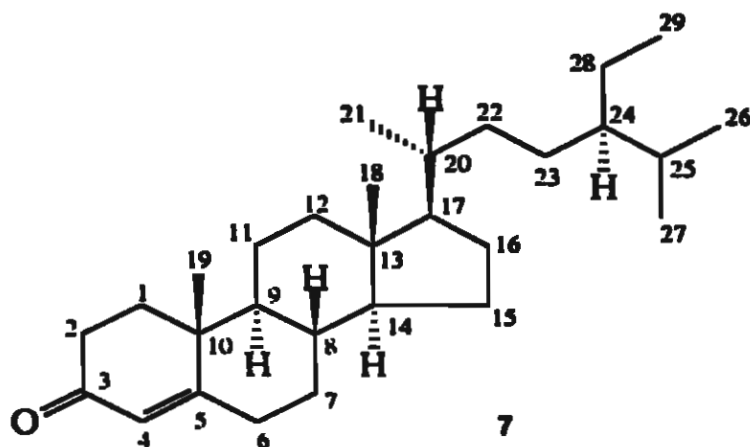
β -Sitostenone (7) มีลักษณะเป็นผงสีขาว ($CHCl_3$) จุดหลอมเหลว $75^\circ C$ ค่า $[\alpha]_D +68.5^\circ$ (c 1.00, $CHCl_3$)
มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

UV λ_{max} (MeOH), nm (log ϵ) : 241 (4.47)

IR ν_{max} (thin film) cm^{-1} : 2958, 2885, 1734, 1685, 1613, 1471, 1377, 1269, 1226, 1187, 756

EIMS 70 eV, m/z (rel. int.) : 412 $[M]^+$ (87), 410 (14), 397 (15), 370 (23), 355 (9), 349 (1), 327 (11), 314 (7),
298 (9), 289 (44), 288 (38), 271 (26), 229 (60), 147 (51), 124 (100)

NMR ตารางที่ 5



ตารางที่ 5 ^1H และ ^{13}C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร β -sitostenone (7)
(Chemical shifts รายงานเป็นค่า ppm ใน CDCl_3)

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H	HMBC (^{13}C)	NOESY
1	35.7	α 1.67 (dt, $J = 13.9, 4.3$ Hz)	2, 3, 9, 10, 19	2 α , 9
		β 1.99 (ddd, $J = 13.9, 5.0, 3.5$ Hz)	2, 3, 5, 10, 19	2 α , 19
2	34.0	α 2.31 (ddd, 16.9, 4.3, 3.5 Hz)	1, 3, 4, 10	1 α , 1 β
		β 2.39 (ddd, 16.9, 13.9, 5.0 Hz)	1, 3, 10	19
3	199.7	-		
4	123.7	5.70 (s)	2, 6, 10	
5	171.8	-		
6	32.9	α 2.24 (ddd, $J = 14.6, 4.2, 2.4$ Hz)	4, 5, 8	7 α
		β 2.36 (m)	4, 5, 7	19
7	32.0	α 1.01 (m)		6 α
		β 1.82 (ddd, 12.7, 5.9, 3.1 Hz)	5	15 α
8	35.6	1.52 (dq, $J = 10.9, 3.1$ Hz)		18, 19
9	53.8	0.90 (m)		1 α , 12 α
10	38.6	-		
11	21.0	α 1.49 (qd, $J = 12.9, 3.5$ Hz)	9, 12, 13	
		β 1.40 (dq, $J = 12.9, 3.5$ Hz)	9, 12	12 β , 19
12	39.6	α 1.14 (m)		9
		β 2.01 (td, $J = 12.9, 3.5$ Hz)	9, 11, 13, 14, 17	11 β , 18, 21
13	42.3	-		
14	55.8	0.96 (m)		
15	24.2	α 1.59 (dt, $J = 9.8, 2.2$ Hz)	13, 14, 17	7 β , 17
		β 1.12 (m)		
16	28.2	α 1.84 (m)	13, 14, 17	
		β 1.27 (m)		
17	58.0	1.07 (m)		15 α
18	12.0 ^a	0.68 (s)	12, 13, 14, 17	8, 12 β , 19, 20, 21
19	17.4	1.16 (s)	1, 5, 9, 10	1 β , 2 β , 6 β , 8,
20	36.1	1.34 (m)		18, 21
21	18.7	0.89 (d, $J = 6.7$ Hz)	17, 20, 22	12 β , 18, 20
22	33.8	a 1.30 (m)		
		b 1.00 (m)		
23	26.0	a 1.14 (m)		24, 25
		b 1.11 (m)		
24	45.8	0.91 (m)		23 α
25	29.1	1.64 (m)	23, 24, 26, 28	23 α , 26, 27
26	19.8 ^b	0.81 (d, $J = 6.7$ Hz) ^c	24, 25, 27	25
27	19.0 ^b	0.79 (d, $J = 6.7$ Hz) ^c	24, 25, 26	25
28	23.0	a 1.25 (m)	23, 24, 25, 29	
		b 1.19 (m)	23, 24, 25, 29	
29	11.9 ^a	0.82 (t, $J = 7.3$ Hz)	28	

a, b, c = อาจสลับกัน

จากข้อมูล MS ซึ่งแสดง molecular ion เท่ากับ 412 a.m.u. และข้อมูล ^{13}C NMR และ DEPT spectra แสดงว่าสารนี้มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DEPT พบหมู่ methyl ทั้งหมด 6 หมู่ หมู่ methyl เหล่านี้แสดงตำแหน่งและลักษณะของสัญญาณใน ^1H NMR ที่คล้ายคลึงกับสัญญาณของ β -sitosterol (6) คือพบเป็น singlet 2 หมู่ (δ 0.68 และ 1.16 ppm) doublet 3 หมู่ (δ 0.79, 0.81 และ 0.89 ppm) และ triplet 1 หมู่ (δ 0.82 ppm) สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า β -sitosterol (6) 2 หน่วย แสดงว่ามี olefinic เพิ่มอีก 1 หมู่จากโครงสร้างของ β -sitosterol (6) รวมเป็นทั้งสิ้น 2 หมู่ และควรอยู่ในลักษณะ conjugate กัน เพราะสารนี้สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นของ ultraviolet ได้ โดยแสดง λ_{max} ที่ 241 nm Double bond 1 ตำแหน่งจะอยู่ในสภาพของหมู่ ketone เนื่องจากแสดงเป็นสัญญาณของ carbonyl carbon ที่ δ 199.7 ppm และยังสามารถตรวจพบสัญญาณของหมู่ carbonyl ใน IR spectrum ในตำแหน่ง wave number ที่ต่ำกว่าปกติเล็กน้อย (ν 1685 cm^{-1}) เป็นการยืนยันว่าหมู่ carbonyl อยู่ในลักษณะที่ conjugate กับ double bond โดยอาศัยการศึกษาด้วยเทคนิค HMBC หมู่ ketone นี้ถูกกำหนดให้ที่ตำแหน่ง 3 เนื่องจากมี long-range correlation ระหว่าง carbonyl carbon กับ methylene protons ที่ตำแหน่ง 1 ส่วน double bond ถูกกำหนดให้อยู่ที่ตำแหน่ง 4-5 เพราะ carbon ที่ตำแหน่ง 5 (δ 171.8 ppm) ซึ่งเป็น quaternary carbon มี three-bond correlation ไปยัง methyl proton ตำแหน่ง 19 methylene proton ที่ตำแหน่ง 1 และ 7 ในขณะที่ C-4 (δ 123.7 ppm) ซึ่งเป็น methine carbon มี long-range correlation กับ methylene proton ที่ตำแหน่ง 2 และ 6

จากข้อมูลทั้งหมด จึงสรุปว่าสารนี้คือ β -sitostenone (7) เป็นสารที่พบในพืชหลายชนิด เช่น *Maytenus guianensis*³⁴, *Austroplenckia populnea*³⁵, *Croton lechleri*³⁶, *Harrisonia abyssinica*³⁷ เป็นต้น

2.3) Salaspermic acid (11)

Salaspermic acid (11) มีลักษณะเป็นผงสีขาว (CHCl_3) ไม่ดูดกลืนแสงในช่วง UV ค่า $[\alpha]_D^{20} +1.2^\circ$ (c 0.08, MeOH) มีคุณสมบัติทาง spectroscopy ดังนี้

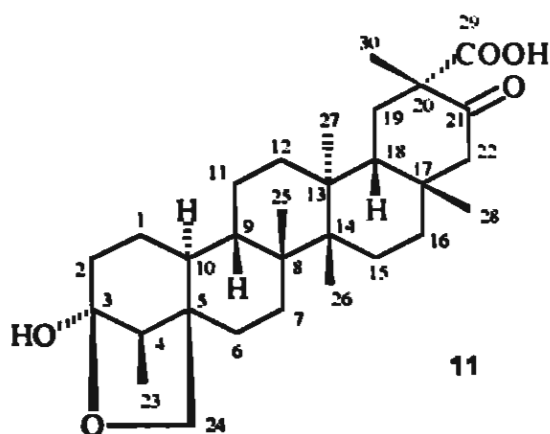
EIMS 70 eV, m/z (rel. int.): 472 [M]⁺ (30), 454 (5), 442 (5), 426 (4), 396 (8), 368 (6), 358 (7), 288 (6), 256 (24), 235 (14), 189 (14), 125 (100), 109 (38)

^1H -NMR ($\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1) δ : 4.09 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-24a), 3.53 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-24b), 2.27 (1H, br.d, J = 13.4 Hz, H-19 α), 2.06 (1H, br.d, J = 13.8 Hz, H-21 α), 1.93 (1H, td, J = 13.8, 3.7 Hz, H-22 α), 1.82 (1H, dd, J = 10.5, 4.1 Hz, H-2 β), 1.15 (3H, s, CH_3 -30), 1.03 (3H, s, CH_3 -26), 0.92 (3H, s, CH_3 -25), 0.92 (3H, s, CH_3 -28), 0.91 (3H, d, J = 7.9 Hz, CH_3 -23), 0.80 (3H, s, CH_3 -27)

^{13}C -NMR ($\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1) δ : 182.3 (s, C-29), 109.1 (s, C-3), 73.9 (t, C-24), 57.4 (d, C-10), 53.8 (d, C-4), 50.3 (d, C-8), 47.3 (s, C-5), 44.6 (d, C-18), 40.5 (s, C-20), 39.4 (s, C-13), 39.3 (s, C-14), 37.7 (s, C-9), 37.0 (t, C-22), 36.4 (t, C-16), 34.7 (t, C-11), 33.8 (t, C-6), 32.5 (t, C-2), 32.0 (q, C-30), 31.9 (q, C-28), 30.6 (t, C-19), 30.4 (s, C-17), 30.0 (t, C-21), 29.6 (t, C-12), 29.4 (t, C-15), 20.1 (t, C-1), 19.6 (t, C-7), 17.8 (q, C-26), 16.9 (q, C-25), 16.7 (q, C-27), 7.7 (q, C-23)

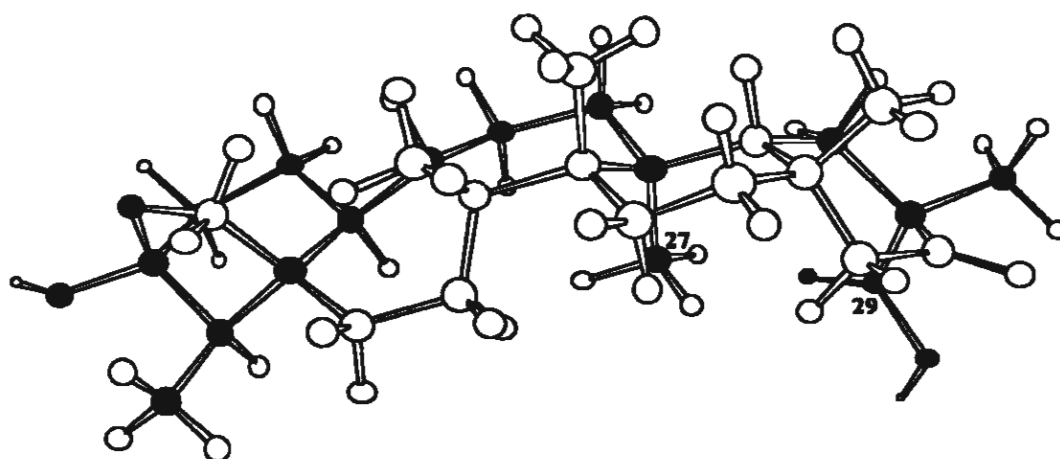
จากข้อมูล MS ซึ่งแสดงสัญญาณ molecular ion เท่ากับ 472 a.m.u. และข้อมูล ^{13}C NMR และ DEPT spectra แสดงว่าสารนี้มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค DEPT พบหมู่ methyl ทั้งหมด 6 หมู่ จาก ^1H NMR spectrum methyl 5 หมู่ (δ 1.15, 1.03, 0.92, 0.92 และ 0.80 ppm) มีลักษณะเป็น singlet ซึ่งแสดงว่า

เป็นหมู่ methyl ที่ติดบน quaternary carbon และมีหมู่ methyl 1 หมู่มีลักษณะเป็น doublet (δ 0.91 ppm) ซึ่งแสดงว่าเป็นหมู่ methyl ที่ติดบน methine carbon จากข้อมูลเหล่านี้ จึงคาดว่าสารนี้เป็นสารกลุ่ม triterpenes ที่มีโครงสร้างแบบ friedelane ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มักพบในพืชวงศ์ Celastraceae โดยหมู่ methyl ที่มีสัญญาณ ^1H NMR เป็น doublet คือหมู่ methyl ที่ตำแหน่ง CH_3 -23 อย่างไรก็ตาม โครงสร้างหลัก friedelane ควรมีหมู่ methyl ทั้งหมด 8 หมู่ หมู่ methyl ที่ขาดหายไป 1 หมู่ของสารนี้ถูกแทนที่ด้วยหมู่ carboxyl เนื่องจากตรวจพบสัญญาณ ^{13}C NMR ของ carbonyl carbon ที่ δ 182.3 ppm หมู่ carboxyl นี้จะอยู่ที่ตำแหน่ง 29 เนื่องจากเมื่อสร้างโครงสร้างของสารแบบ 3 มิติ (รูปที่ 1) หมู่ carboxyl นี้จะวางตัวใกล้หมู่ methyl ที่ตำแหน่ง 27 เกิด shielding effect ส่งผลให้สัญญาณ ^1H NMR ของ H_3 -27 ปรากฏในตำแหน่งที่ upfield กว่าปกติ (δ 0.80 ppm)



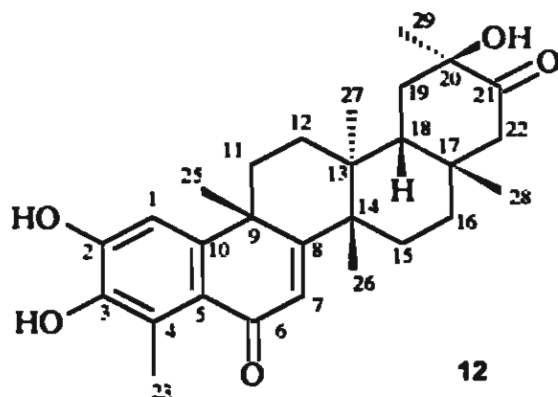
หมู่ methyl ที่ขาดหายไปอีก 1 หมู่จะตรวจพบแทนด้วยหมู่ methylene ซึ่งแสดงสัญญาณ NMR ในช่วงที่ downfield (^1H NMR δ 4.09 และ 3.53 ppm, ^{13}C NMR δ 72.9 ppm) แสดงว่าเป็นหมู่ methylene ที่ติดกับ oxygen ซึ่งเกิดจากการมี ether bridge เชื่อมระหว่าง carbon ที่ตำแหน่ง 3 และ 24 นอกจากนี้ ยังมีหมู่ hydroxyl ติดที่ carbon ตำแหน่ง 3 เกิดเป็นโครงสร้าง hemiacetal สังเกตได้จากสัญญาณ ^{13}C NMR ของ C-3 จะเป็น quaternary carbon ที่ปรากฏในช่วงที่ downfield กว่าปกติ (δ 109.1 ppm)

เมื่อตรวจสอบข้อมูลโครงสร้างของสารนี้กับสารที่เคยมีรายงาน พบว่ามีข้อมูล NMR และ MS ที่สอดคล้องกับสาร salaspermic acid (11) ซึ่งเป็นสารที่เคยมีรายงานพบในพืชวงศ์ Celastraceae หลายชนิด เช่น *Tripterygium wilfordii*²⁹ และ *Kokoona ochracea*¹⁷ เป็นต้น



รูปที่ 1 ภาพแสดง conformation ของสาร salaspermic acid (11)

2.4) 6-Oxo-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (12)



6-Oxo-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (12) มีลักษณะเป็น lacquer สีเหลืองอ่อน (CHCl_3) ค่า $[\alpha]_D^{+7.5}$ (c 0.09, CHCl_3) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

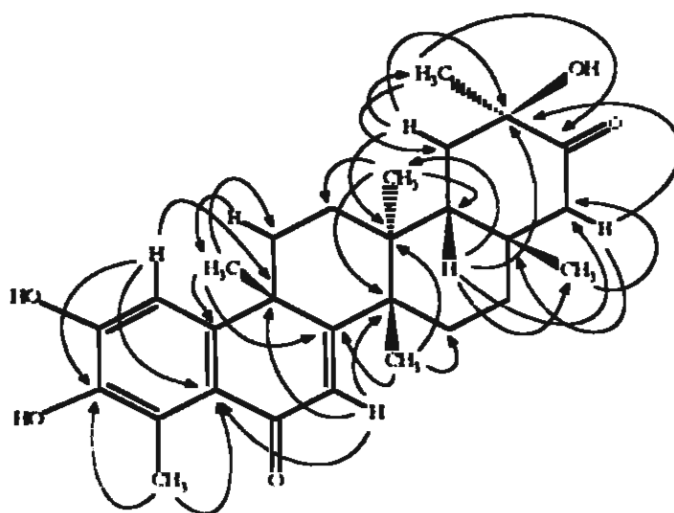
UV λ_{max} (MeOH), nm (log ϵ) : 206 (3.51), 251 (3.25), 303 (3.03)

IR ν_{max} (thin film) cm^{-1} : 3000-3600, 2928, 1712, 1638, 1582, 1460, 1315, 755

EIMS 70 eV. m/z (rel. int.) : 452 $[\text{M}]^+$ (100), 437 (40), 409 (20), 257 (18), 218 (30), 149 (42)

NMR ดูตารางที่ 6

จากข้อมูล MS สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 452 a.m.u. และจาก ^{13}C NMR และ DEPT spectra ทำให้สรุปสูตรโมเลกุลของสารนี้คือ $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_5$ ลักษณะสัญญาณ ^1H และ ^{13}C NMR ในส่วนบริเวณ upfield ของ spectra มีความใกล้เคียงมากกับของสาร 20-hydroxy-20-*epi*-tingenone (17) เช่นพบสัญญาณของหมู่ methyl ทั้งสิ้น 6 หมู่ ซึ่งต่ออยู่กับ quaternary carbon พบสัญญาณของ methylene carbon (C-22) ที่ 50.2 ppm และ methylene protons (H_2 -22) ที่ 1.93 และ 2.99 ppm นอกจากนี้ ยังมีสัญญาณของ carbonyl carbon (C-21) ที่ 215.0 ppm ข้อมูลเหล่านี้แสดงว่าสารนี้มีโครงสร้างหลักเป็น triterpene ในกลุ่มของ tingenone ซึ่งสามารถสนับสนุนได้โดยการศึกษาด้วยเทคนิค HMBC ดังสรุปผลในรูปที่ 2 และหมู่ methyl ตำแหน่ง 20 จะวางในทิศทาง α เนื่องจากมีความสัมพันธ์ NOE กับหมู่ methyl ที่ตำแหน่ง 27 สารนี้จึงเป็นอนุพันธ์ของ 20-hydroxy-20-*epi*-tingenone (17) โดยมีความแตกต่างเฉพาะที่ส่วน ring A และ B ของโครงสร้างเท่านั้น



รูปที่ 2 ^1H - ^{13}C HMBC long-range correlations ที่สำคัญของสาร 6-oxo-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (12)

ตารางที่ 6 ^1H และ ^{13}C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร 6-oxo-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (12) (Chemical shifts รายงานเป็นค่า ppm ใน CDCl_3)

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H	HMBC (^{13}C)	NOESY
1	108.6	6.89 (s)	2, 3, 5, 9	11 β , 25
2	148.0	-		
3	140.6	-		
4	125.4	-		
5	122.5	-		
6	187.6	-		
7	126.1	6.26 (s)	5, 9, 14	15 β
8	171.2	-		
9	40.1	-		
10	151.2	-		
11	33.8	α 2.01 (td, $J = 13.6, 6.1$ Hz)	9, 25	
		β 2.22 (br.d, $J = 13.6$ Hz)		1, 25
12	30.0	α 1.70 (br.d, $J = 13.6$ Hz)	9, 13, 14	
		β 1.79 (dt, $J = 13.6, 4.3$ Hz)	13	25
13	39.6	-		
14	43.8	-		
15	29.0	α 1.84 (m)	13, 14	7
		β 1.70 (br.d, $J = 13.1$ Hz)		
16	35.5	α 1.63 (td, $J = 14.3, 3.3$ Hz)	22, 28	
		β 1.87 (m)		
17	36.2	-		
18	43.3	1.91 (m)	13, 17, 20, 22, 28	26, 28
19	36.8	α 2.25 (dd, $J = 15.9, 8.7$ Hz)	13, 17, 18, 20, 29	
		β 2.20 (dd, $J = 15.9, 11.8$ Hz)	13, 17, 18, 20, 29	
20	73.8	-		
21	215.0	-		
22	50.2	α 2.99 (d, $J = 14.2$ Hz)	17, 21, 28	27, 29
		β 1.93 (d, $J = 14.2$ Hz)	17, 18, 20, 21, 28	
23	13.6	2.65 (s)	3, 4, 5	
25	37.9	1.52 (s)	8, 9, 10, 11	1, 11 β , 12 β , 26
26	22.1	1.36 (s)	8, 13, 14, 15	18, 25, 28
27	19.4	0.89 (s)	12, 13, 14, 18	22 α , 29
28	33.1	1.09 (s)	16, 18, 22	18, 26
29	28.9	1.34 (s)	19, 20, 21	22 α , 27

ข้อมูล ^1H NMR แสดงสัญญาณของ protons ในบริเวณ downfield เพียง 2 สัญญาณ คือที่ 6.26 และ 6.89 ppm ทั้ง 2 สัญญาณมีลักษณะเป็น singlet ส่วน ^{13}C NMR หากไม่นับสัญญาณของ C-21 จะมีสัญญาณของ aromatic carbons, olefinic carbons และ carbonyl carbon รวมทั้งสิ้น 9 สัญญาณ เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค HMBC สัญญาณของ protons และ carbons เหล่านี้มี long-range correlation ดังสรุปในรูปที่ 2 และจาก UV spectrum แสดงลักษณะของระบบ aromatic ring โดยมี λ_{max} ที่ตรงกับสารในกลุ่ม 6-oxo-phenolic triterpenes³⁸ เช่นเดียวกับ IR spectrum ที่มีสัญญาณของหมู่ hydroxyl ($3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$) และ conjugated ketone (1638 cm^{-1}) สารนี้จึงมีระบบของ 6-oxo-phenolic ที่ ring A และ B และสรุปโครงสร้างคือ 6-oxo-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (12) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่รายงานการพบเป็นครั้งแรก

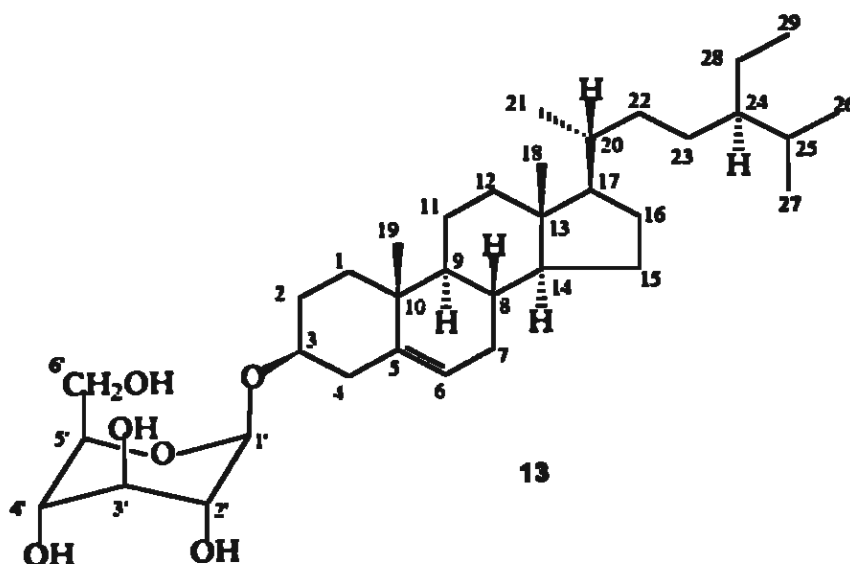
2.5) β -Sitosterol-3 β -O-D-glucopyranoside (13)

β -Sitosterol-3 β -O-D-glucopyranoside (13) มีลักษณะเป็นผงสีขาว (CHCl_3) ไม่ดูดกลืนแสงในช่วง UV จุดหลอมเหลว $279\text{--}282^\circ\text{C}$ ค่า $[\alpha]_D -31.7^\circ$ (c 0.06, $\text{CHCl}_3\text{+MeOH}$ (1:1)) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

IR ν_{max} (thin film) cm^{-1} : 3100-3700, 2936, 1716, 1460, 1381, 1082, 1029

EIMS 70 eV, m/z (rel. int.) : 414 (53), 396 (100), 368 (28), 284 (16), 256 (47), 213 (27), 129 (25)

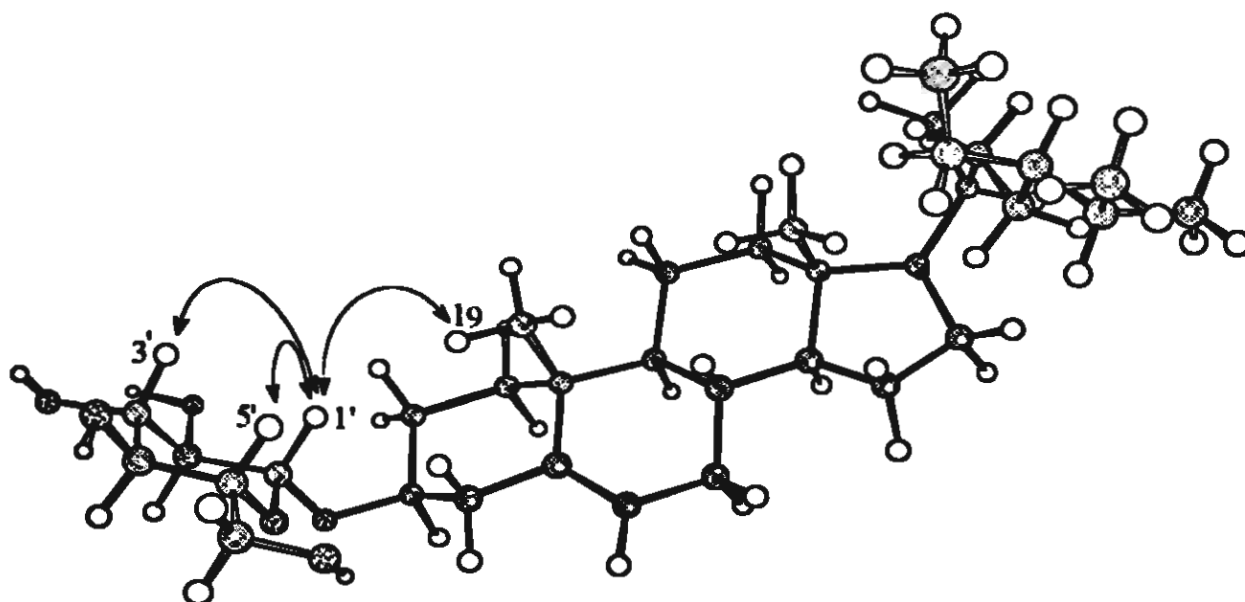
NMR ตารางที่ 7



ข้อมูล ^{13}C NMR และ DEPT spectra ของสารนี้ แสดงสัญญาณของหมู่ methyl ทั้งสิ้น 6 หมู่ ข้อมูล MS พบสัญญาณชัดเจนที่ m/z 414 a.m.u. และสีม่วงที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับ vanillin/sulphuric acid spray reagent จึงคาดว่าสารนี้มีโครงสร้างหลักเป็น steroids และจากตำแหน่งและลักษณะของสัญญาณ ^1H NMR ของหมู่ methyl ซึ่งพบเป็น singlet 2 หมู่ (δ 0.99 และ 0.67 ppm) doublet 3 หมู่ (δ 0.90, 0.81 และ 0.79 ppm) และ triplet 1 หมู่ (δ 0.82 ppm) มีความสอดคล้องกับข้อมูลของสาร β -sitosterol (6)³⁹ Double bond ที่ตำแหน่ง 5-6 ของโครงสร้างพิสตินได้จากสัญญาณ methine proton ที่ค่อนข้าง downfield (δ 5.33 ppm) มี long-range correlation ไปยัง carbon ที่ตำแหน่ง 4, 8 และ 10 และ quaternary carbon ที่ตำแหน่ง 5 (δ 141.1 ppm) มี long-range correlation กับ methyl proton ที่ตำแหน่ง 19 (δ 0.99 ppm) และยังพบสัญญาณ NMR ของน้ำตาล pyranose โดยมีสัญญาณของ anomeric carbon (C-1') ที่ δ 101.9 ppm และ anomeric proton (H-1') ที่ δ 4.37 ppm จากข้อมูล NOESY แสดงว่าเป็นน้ำตาล

ชนิด β -D-glucose เนื่องจากพบ NOE ระหว่าง proton ที่ตำแหน่ง 1', 3' และ 5' (รูปที่ 3) และน้ำตาลต่อเชื่อมกับโครงสร้างส่วน sterol ที่ตำแหน่ง 3 เนื่องจากพบ long-range correlation ระหว่าง anomeric proton กับ carbon ที่ตำแหน่ง 3 นอกจากนี้ NOE ที่พบระหว่าง anomeric proton กับ methyl proton ที่ตำแหน่ง 19 ก็ทำให้ทราบว่าหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง 3 อยู่ในทิศทาง β

จากข้อมูลทั้งหมด จึงสรุปว่าสารนี้คือ β -sitosterol-3 β -O-D-glucopyranoside (13) ซึ่งเป็นสารที่พบกระจายทั่วไปในอาณาจักรพืช



รูปที่ 3 ภาพแสดง conformation ของสาร β -sitosterol-3 β -O-D-glucopyranoside (13) และ NOEs ที่สำคัญบางตำแหน่ง (แสดงโดยลูกศร)

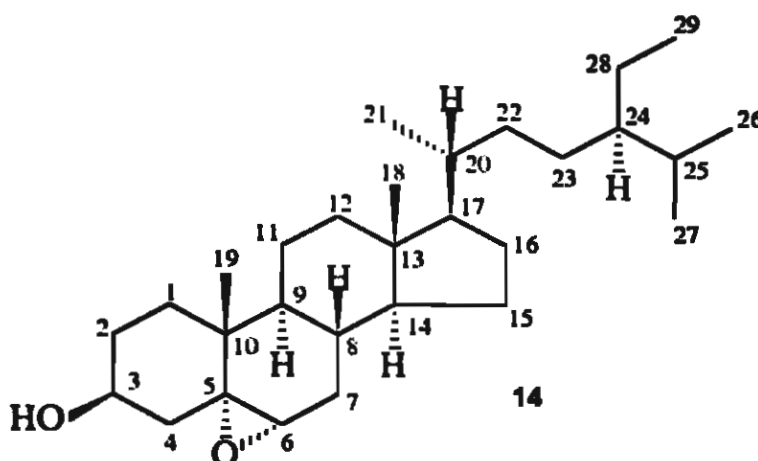
ตารางที่ 7 ^1H และ ^{13}C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร β -sitosterol-3 β -O-D-glucopyranoside (13) (Chemical shifts รายงานเป็นค่า ppm ใน $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1))

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H	HMBC (^{13}C)	NOESY
1	38.0	α 1.05 (m)		
		β 1.84 (dt, $J = 13.0, 3.2$ Hz)		
2	30.2	α 1.89 (m)		
		β 1.60 (m)		19
3	79.6	3.57 (t, $J = 11.3, 4.6$ Hz)	1'	
4	39.3	α 2.38 (ddd, $J = 13.1, 4.6, 2.1$ Hz)	2, 3, 5, 6, 10	6
		β 2.24 (t, $J = 12.1$ Hz)		19
5	141.2	-		
6	122.6	5.33 (br.s)	4, 8, 10	4 α
7	32.6	α 1.95 (m)		
		β 1.49 (m)	8	
8	32.6	1.44 (m)	7, 9	18, 19

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H	HMBC (^{13}C)	NOESY
9	51.0	0.91 (m)		14
10	37.4	-		
11	21.7	α 1.51 (m)		
		β 1.51 (m)		
12	40.5	α 1.15 (m)		21
		β 1.99 (dt, $J = 12.8, 3.4$ Hz)		18
13	43.0	-		
14	57.5	1.12 (m)	18	9
15	24.9	α 1.56 (m)		
		β 1.10 (m)		
16	28.9	α 1.22 (m)		
		β 1.22 (m)		
17	56.8	1.06 (m)	14	
18	12.2	0.67 (s)	12, 13, 14, 17	8, 12 β , 20, 21
19	19.7	0.99 (s)	1, 5, 9, 10	2 β , 4 β , 8, 1'
20	36.8	1.32 (m)		18
21	19.2	0.90 (d, $J = 6.7$ Hz)	17, 20, 22	12 α , 18
22	34.6	a 1.03 (m)		
		b 1.32 (m)	21	
23	26.7	a 1.15 (m)		
		b 1.15 (m)		
24	46.6	0.90 (m)		
25	29.8	1.63 (m)	23, 24, 26, 27, 28	
26	20.1	0.81 (d, $J = 6.7$ Hz)	24, 25, 27	
27	19.3	0.79 (d, $J = 7.0$ Hz)	24, 25, 26	
28	23.7	a 1.20 (m)	23, 24, 25, 29	
		b 1.27 (m)	23, 24, 25, 29	
29	12.2	0.82 (t, $J = 7.5$ Hz)	28	
1'	101.9	4.37 (d, $J = 7.6$ Hz)	3	19, 3', 5'
2'	74.4	3.17 (t, $J = 8.2$ Hz)	1', 3'	
3'	77.4	3.36 (t, $J = 8.7$ Hz)	4'	1'
4'	71.0	3.32 (t, $J = 9.16$ Hz)	5', 6'	
5'	77.0	3.25 (ddd, $J = 9.0, 5.4, 2.9$ Hz)		1'
6'	62.4	a 3.83 (dd, $J = 11.9, 2.4$ Hz)	5'	
		b 3.68 (dd, $J = 11.9, 5.3$ Hz)		

2.6) 5 α ,6 α -Epoxystigmastan-3 β -ol (14)



5 α ,6 α -Epoxystigmastan-3 β -ol (14) มีลักษณะเป็นผงสีขาว (CHCl₃+MeOH) ไม่ดูดกลืนแสงในช่วง UV จุดหลอมเหลว สูงกว่า 300°C (decompose) ค่า $[\alpha]_D -1.3^\circ$ (c 0.24, MeOH) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

IR $\nu_{\max}$ (thin film) cm⁻¹ : 3000-3600, 2931, 2862, 1709, 1656, 1452, 1375, 1254, 1037, 568

EIMS 70 eV, m/z (rel. int.) : 430 [M]⁺ (73), 412 (100), 378 (16), 367 (10), 359 (16), 316 (9), 305 (8), 290 (17), 271 (14), 247 (20), 229 (16), 187 (12), 159 (12)

NMR ตารางที่ 8

จากข้อมูล MS ซึ่งแสดงสัญญาณของ molecular ion เท่ากับ 430 a.m.u. และข้อมูล ¹³C NMR และ DEPT spectra แสดงว่าสารนี้มีสูตรโมเลกุลคือ C₂₉H₅₀O₂ เช่นเดียวกับสาร β -sitosterone (7) สารนี้แสดงตำแหน่งและสัญญาณ NMR ของสารกลุ่ม steroids ที่มีโครงสร้างหลักแบบ β -sitosterol (6) กล่าวคือ มีหมู่ methyl 6 หมู่ ที่แสดงลักษณะสัญญาณใน ¹H NMR ที่เป็น singlet 2 หมู่ (δ 0.61 และ 1.07 ppm) doublet 3 หมู่ (δ 0.73, 0.78 และ 0.83 ppm) และ triplet 1 หมู่ (δ 0.76 ppm) ข้อมูล NMR ของสารนี้สอดคล้องกับข้อมูลของ β -sitosterol (6) ยกเว้นเพียงข้อมูลที่ตำแหน่ง 5 และ 6 ของโครงสร้าง สัญญาณของหมู่ olefinic ถูกแทนที่ด้วยสัญญาณที่ upfield กว่า (δ_{C-5} 76.4 ppm, δ_{C-6} 76.0 ppm และ δ_{H-5} 3.38 ppm) ซึ่งเป็นลักษณะของสัญญาณของ carbon ที่เชื่อมต่อกับ atom ของ oxygen แต่เนื่องจากสารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า β -sitosterol 16 a.m.u. คือเท่ากับมี oxygen เพิ่มขึ้นเพียง 1 atom หมู่ function ที่ตำแหน่ง 5-6 จึงควรจะเป็น epoxide ring ทั้งนี้ ยืนยันได้จากสัญญาณที่ ν 1254 cm⁻¹ ใน IR spectrum

การศึกษา stereochemistry ของ epoxide ring ด้วยเทคนิค NOESY พบว่า H-6 มี NOE ถึง proton ที่ตำแหน่ง 4 β , 7 β , 8 และ 19 แสดงว่าหมู่ epoxy วางอยู่ในทิศทาง α ส่งผลให้ H-6 ทำมุม dihedral กับ H-7 α ประมาณ 90° H-6 จึง coupling กับเฉพาะ H-7 β และแสดงลักษณะสัญญาณใน ¹H NMR เป็น doublet ที่มีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 3.1 Hz

จากข้อมูลทั้งหมด จึงสรุปว่าสารนี้คือ 5 α ,6 α -epoxystigmastan-3 β -ol (14) มีรายงานว่าพบสารนี้ในผลิตภัณฑ์น้ำมันจากพืชที่ผ่านการให้ความร้อน หรือเก็บไว้นานๆ เป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยา oxidation ของ β -sitosterol (6) ⁴¹⁻⁴³

ตารางที่ 8 ^1H และ ^{13}C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร 5 α ,6 α -epoxystigmastan-3 β -ol (14) (Chemical shifts รายงานเป็นค่า ppm ใน $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1))

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H	HMBC (^{13}C)	NOESY
1	32.9	α 1.24 (m)		
		β 1.52 (m)	3, 5	19
2	31.0	α 1.73 (m)		
		β 1.45 (m)	10	19
3	67.8	3.93 (t, $J = 11.0, 5.4$ Hz)		
4	40.8 ^a	α 1.91 (br.d, $J = 12.2$ Hz)	3, 5	
		β 1.05 (m)		6
5	76.4	-		
6	76.0	3.38 (d, $J = 3.1$ Hz)	5	4 β , 7 α , 7 β , 8, 19
7	34.7 ^b	α 1.61 (m)		6
		β 1.50 (m)	8	6
8	31.0	1.61 (m)		6, 18, 19
9	46.0	1.24 (m)		
10	38.8	-		
11	21.8	α 1.27 (m)		18
		β 1.27 (m)		18
12	40.7 ^a	α 1.95 (dd, $J = 13.0, 11.4$ Hz)		17
		β 1.48 (m)		26, 27
13	43.4	-		
14	56.7	1.01 (m)		15 α
15	24.7	α 1.53 (m)		14
		β 1.03 (m)		18
16	27.8	α 1.15 (m)		18
		β 1.15 (m)		18
17	56.9	1.06 (m)		12 α
18	12.5	0.61 (s)	12, 13, 14, 17	8, 11, 15 β , 16, 21
19	17.0	1.07 (s)	1, 5, 9, 10	1 α , 2 β , 6, 8
20	36.8	1.23 (m)	18	
21	19.1	0.83 (d, $J = 6.4$ Hz)	17, 20, 22	18
22	34.6 ^b	a 1.21 (m)		
		b 0.93 (m)		
23	26.7	a 1.20 (m)		
		b 1.10 (m)		
24	46.6	0.84 (m)	22, 25	
25	29.8	1.58 (m)	26, 27	26, 27
26	20.1 ^c	0.78 (d, $J = 6.9$ Hz) ^d	24, 25, 27	12 β , 25
27	19.3 ^c	0.73 (d, $J = 6.9$ Hz) ^d	24, 25, 27	12 β , 25
28	23.6	a 1.17 (m)	24, 25	
		b 1.14 (m)	24, 25	
29	12.2	0.76 (t, $J = 7.5$ Hz)	28	

a, b, c, d = อาจสลับกัน

2.7) 2*R**,3*R**,5*S**-Trihydroxy-6*R**-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15)

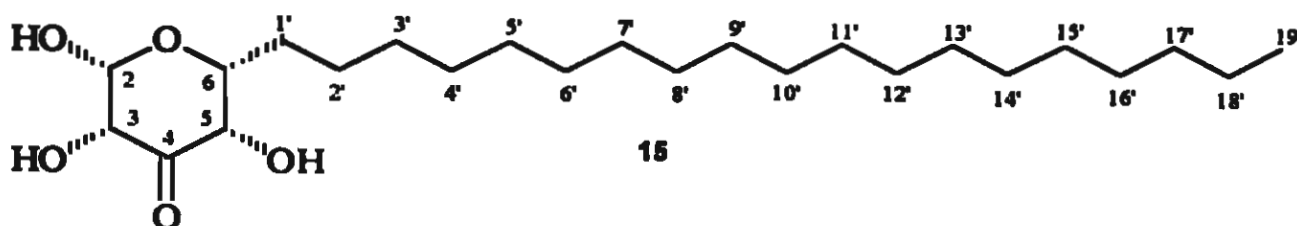
2*R**,3*R**,5*S**-Trihydroxy-6*R**-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15) มีลักษณะเป็นผงสีขาว (CHCl₃+MeOH) ไม่ดูดกลืนแสงในช่วง UV จุดหลอมเหลว 118-120°C ค่า $[\alpha]_D^{25} +15^\circ$ (c 0.04, CHCl₃+MeOH (1:1)) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

Anal. Calcd for C₂₄H₄₆O₅ : C, 69.51; H, 11.19. Found : C, 69.01; H, 11.92

IR $\nu_{\max}$ (thin film) cm⁻¹ : 3200-3400, 2916, 2851, 1765, 1723, 1472, 1364, 1186, 1091

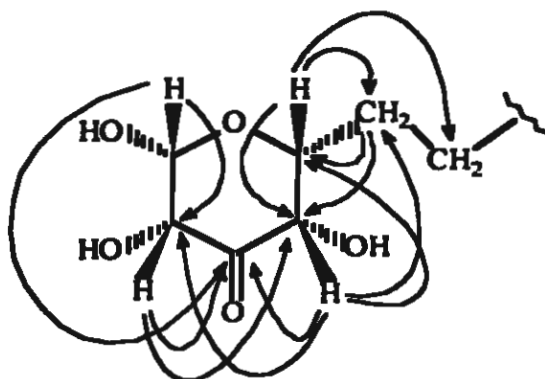
EIMS 70 eV, *m/z* (rel. int.) : 414 [M]⁺ (8), 385 (4), 368 (10), 284 (23), 256 (100)

NMR ดูตารางที่ 9



สารนี้แสดงสัญญาณของ molecular ion ที่ 414 a.m.u. จากการวิเคราะห์ CHN analysis สรุปว่าสารนี้มีสูตรโมเลกุลคือ C₂₄H₄₆O₅ สัญญาณใน ¹H และ ¹³C NMR ในช่วง upfield แสดงลักษณะของ long chain aliphatic alkane และสัญญาณช่วง downfield 4 สัญญาณ มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับสัญญาณของ monosaccharide นอกจากนี้ ยังมีสัญญาณของ ketone carbon ที่ 178.1 ppm ซึ่งสนับสนุนโดยสัญญาณที่ 1765 cm⁻¹ ใน IR spectrum

เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค HMBC พบความสัมพันธ์ระหว่าง protons และ carbons ในช่วง downfield ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างหลักแบบ pyran-4-one จากการที่สัญญาณ ¹H และ ¹³C ของตำแหน่ง 2, 3 และ 5 ปรากฏในช่วงที่ใกล้เคียงกับของ monosaccharide แสดงว่าที่ตำแหน่งเหล่านี้ควรมีหมู่ hydroxyl ติดอยู่ โดยเฉพาะที่ตำแหน่ง 2 จะมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับ anomeric proton (δ 5.44 ppm) ส่วนที่ตำแหน่ง 6 จะมี long-chain aliphatic side-chain ติดอยู่ ทำให้สัญญาณของ ¹H และ ¹³C NMR ปรากฏค่อนข้าง upfield กว่า (δ_{H-6} 4.17 ppm, δ_{C-6} 70.7 ppm) Long-range correlation จาก H-6 ไปยัง C-1' และ C-2' และจาก H-1' ไปยัง C-5 และ C-6 ยืนยันว่า side-chain ติดที่ตำแหน่ง 6 เมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลที่เหลือ และค่า integration ใน ¹H NMR Side-chain นี้ประกอบด้วย C₁₈H₃₆ และควรมีลักษณะเป็นสายตรง เนื่องจากตรวจพบหมู่ methyl ที่ปลายสุดเพียงหมู่เดียว (δ_{C-18} 14.3 ppm และ δ_{H-18} 0.85 ppm)



รูปที่ 4 ¹H-¹³C HMBC long-range correlations ที่สำคัญของสาร 2*R**,3*R**,5*S**-trihydroxy-6*R**-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15)

Stereochemistry ของสารนี้ถูกศึกษาด้วยเทคนิค NOESY ซึ่ง protons ทุก atoms บน pyran-4-one ring จะอยู่ในทิศทางเดียวกัน เนื่องจากมี NOE ถึงกันหมด จากข้อมูลทั้งหมด จึงสรุปโครงสร้างของสารนี้คือ 2*R**,3*R**,5*S**-trihydroxy-6*R**-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ยังไม่เคยมีรายงานการพบมาก่อน

ตารางที่ 9 ¹H และ ¹³C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร 2*R**,3*R**,5*S**-trihydroxy-6*R**-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15) (Chemical shifts รายงานเป็นค่า ppm ใน C₆D₆N)

ตำแหน่ง	¹³ C	¹ H	HMBC (¹³ C)	NOESY
2	70.8	5.44 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5.5 Hz)	4	3, 6
3	69.3	5.11 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5.5 Hz)	4, 5	2, 5
4	178.1			
5	89.6	4.84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3.4 Hz)	3, 4, 6, 1'	3, 6
6	70.7	4.17 (<i>td</i> , <i>J</i> = 8.8, 3.4 Hz)	3, 5, 1', 2'	2, 5
1'	34.0	1.75 (<i>m</i>)	5, 6, 2' 3'	
2'	26.4	a 1.47 (<i>m</i>)		
3'	29.6			
4'				
5'				
6'				
7'				
8'	29.5-30.0	1.20-1.35 (<i>m</i>)		
9'				
10'				
11'				
12'				
13'				
14'				
15'				
16'				
17'	32.1			
18'	22.9			
19'	14.3	0.85 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7 Hz)	17', 18'	

2.8) 6β -(2'-Oxo-propyl)-tingenol (20), 6β -(2'-Oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21) และ 6β -(2'-Oxo-propyl)-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (25)

6β -(2'-Oxo-propyl)-tingenol (20) มีลักษณะเป็น lacquer สีเหลืองอ่อน (EtOAc) ค่า $[\alpha]_D -102^\circ$ (c 0.15, MeOH) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

UV λ_{max} (MeOH), nm (log ϵ) : 218 (4.07), 250 (3.71), 280 (3.58)

IR ν_{max} (thin film) cm^{-1} : 3700-3100, 2955, 1702, 1453, 1384, 1292, 754

EIMS 70 eV, m/z (rel. int.) : 478 $[M]^+$ (23), 419 (2), 241 (100), 215 (16), 202 (17), 201 (75)

NMR ดูตารางที่ 10

6β -(2'-Oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21) มีลักษณะเป็น lacquer สีเหลืองอ่อน (EtOAc) ค่า $[\alpha]_D -107^\circ$ (c 0.15, MeOH) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

UV λ_{max} (MeOH), nm (log ϵ) : 218 (4.04), 284 (3.47)

IR ν_{max} (thin film) cm^{-1} : 3600-3100, 2931, 1704, 1456, 1379, 1292, 755

EIMS 70 eV, m/z (rel. int.) : 494 $[M]^+$ (5), 437 (8), 436 (8), 243 (16), 241 (16), 215 (13), 202 (24), 201 (100)

NMR ดูตารางที่ 11

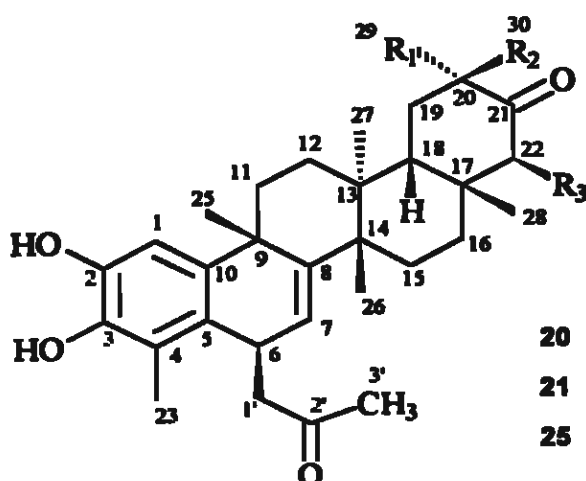
6β -(2'-Oxo-propyl)-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (25) มีลักษณะเป็น lacquer สีเหลืองอ่อน (EtOAc) ค่า $[\alpha]_D -8^\circ$ (c 0.15, MeOH) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

UV λ_{max} (MeOH), nm (log ϵ) : 219 (4.21), 286 (3.73)

IR ν_{max} (thin film) cm^{-1} : 3600-3200, 2955, 1709, 1458, 1378, 1364, 1291, 754

EIMS 70 eV, m/z (rel. int.) : 494 $[M]^+$ (4), 437 (4), 436 (4), 243 (19), 241 (14), 215 (19), 202 (22), 201 (100)

NMR ดูตารางที่ 12



20 $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = CH_3$

21 $R_1 = H$, $R_2 = CH_3$, $R_3 = OH$

25 $R_1 = CH_3$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$

ตารางที่ 10 ^1H และ ^{13}C NMR assignments ของสาร 6 β -(2'-oxo-propyl)-tingenol (20) (Chemical shifts รายงานเป็นค่า ppm ใน CDCl_3)

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H
1	109.2	6.79 (s)
2	142.2	
3	140.4	
4	119.8	
5	128.0	
6	32.8	4.00 (ddd, $J = 10.7, 6.3, 2.8$ Hz)
7	122.0	5.90 (d, $J = 6.3$ Hz)
8	149.3	
9	38.4	
10	141.9	
11	35.8	α 2.01 (td, $J = 13.2, 6.5$ Hz) β 2.15 (dt, $J = 13.2, 3.4$ Hz)
12	30.7	α 1.73 (m) β 1.73 (m)
13	38.9	
14	43.4	
15	28.8	α 1.74 (m) β 1.52 (m)
16	35.8	α 1.37 (br.d, $J = 14.0$ Hz) β 1.83 (td, $J = 14.0, 5.0$ Hz)
17	37.1	
18	43.5	1.60 (d, $J = 6.7$ Hz)
19	32.0	α 2.18 (m) β 1.70 (m)
20	41.9	2.50 (ddq, $J = 12.7, 6.2, 6.2$ Hz)
21	214.9	
22	51.8	α 2.92 (d, $J = 14.5$ Hz) β 1.82 (d, $J = 14.5$ Hz)
23	11.2	2.19 (s)
25	37.5	1.52 (s)
26	22.2	1.27 (s)
27	19.6	0.98 (s)
28	32.5	0.98 (s)
30	15.1	0.98 (d, $J = 6.2$ Hz)
2-OH		5.61 (br.s) [*]
3-OH		5.32 (br.s) [*]
22-OH		
1'	52.6	a 2.72 (dd, $J = 16.6, 2.8$ Hz) b 2.48 (dd, $J = 16.6, 10.7$ Hz)
2'	207.9	
3'	30.8	2.16 (s)

^{*} อาจสลับกัน

ตารางที่ 11 ^1H และ ^{13}C NMR assignments ของสาร 6 β -(2'-oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21) (Chemical shifts รายงานเป็นค่า ppm ใน CDCl_3)

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H
1	109.3	6.77 (s)
2	142.2	
3	140.6	
4	120.0	
5	128.0	
6	32.9	4.02 (ddd, $J = 10.9, 6.1, 2.9$ Hz)
7	122.0	5.88 (d, $J = 6.1$ Hz)
8	149.1	
9	37.0	
10	142.2	
11	36.0	α 1.97 (td, $J = 11.9, 8.6$ Hz) β 2.13 (br.d, $J = 11.9$ Hz)
12	30.6	α 1.72 (m) β 1.72 (m)
13	38.9	
14	43.1	
15	28.5	α 1.74 (m) β 1.49 (ddd, $J = 15.0, 4.7, 2.1$ Hz)
16	29.8	α 2.20 (m) β 1.53 (td, $J = 15.0, 4.7$ Hz)
17	45.0	
18	45.1	1.72 (d, $J = 13.1$ Hz)
19	31.9	α 2.18 (m) β 1.67 (m)
20	40.8	2.61 (ddq, $J = 12.3, 6.3, 6.3$ Hz)
21	214.1	
22	76.7	4.51 (d, $J = 3.4$ Hz)
23	11.3	2.18 (s)
25	37.6	1.51 (s)
26	22.3	1.27 (s)
27	20.5	0.92 (s)
28	24.9	0.83 (s)
30	14.7	1.03 (d, $J = 6.3$ Hz)
2-OH		5.91 (br.s) ^a
3-OH		5.49 (br.s) ^a
22-OH		3.76 (d, $J = 3.4$ Hz)
1'	51.8	a 2.73 (dd, $J = 16.5, 2.9$ Hz) b 2.46 (dd, $J = 16.5, 10.9$ Hz)
2'	208.0	
3'	30.7	2.17 (s)

^a อาจสลับกัน

ตารางที่ 12 ^1H และ ^{13}C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร 6 β -(2'-oxo-propyl)-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (25) (Chemical shifts รายงานเป็นค่า ppm ใน CDCl_3)

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H	HMBC (^{13}C)	NOESY
1	109.0	6.77 (s)	2, 3, 5, 9	11 β , 25
2	142.1	-		
3	140.5	-		
4	119.9	-		
5	127.9	-		
6	32.8	4.00 (ddd, $J = 10.9, 6.3, 2.8$ Hz)	4, 5, 7, 8, 10, 1'	7, 23, 1'a, 1'b
7	122.2	5.91 (d, $J = 6.3$ Hz)	5, 6, 9, 14	6, 15
8	149.6	-		
9	37.2	-		
10	141.8	-		
11	35.5	α 1.95 (td, $J = 13.7, 5.8$ Hz)	10	11 β , 27
		β 2.11 (br.d, $J = 13.7$ Hz)		1, 11 α , 25
12	30.6	α 1.65 (m)		
		β 1.73 (m)	14, 26	
13	38.5	-		
14	43.1	-		
15	29.3	α 1.50 (m)	27	7, 26, 27
		β 1.50 (m)	27	7, 26, 27
16	36.0	α 1.55 (ddd, $J = 14.6, 5.5, 2.3$ Hz)		16 β
		β 1.84 (m)	14	16 α
17	36.8	-		
18	43.8	1.87 (m)	12, 13, 19, 21, 22, 27	19, 26, 28
19	37.0	α 2.25 (d, $J = 6.4$ Hz)	13, 17, 18, 20, 29	18, 27, 28, 29
		β 2.25 (d, $J = 6.4$ Hz)	13, 17, 18, 20, 29	18, 27, 28, 29
20	74.2	-		
21	215.6	-		
22	49.9	α 3.06 (d, $J = 14.0$ Hz)	17, 21, 28	22 β , 27
		β 1.91 (d, $J = 14.0$ Hz)	18, 20, 21	
23	11.2	2.18 (s)	3, 4, 5	6, 1'a, 1'b
25	37.0	1.50 (s)	8, 9, 10, 11	1, 11 β , 26, 1'a, 1'b, 3'
26	23.2	1.27 (s)	8, 13, 14, 15	15, 18, 25, 3'
27	19.5	0.90 (s)	11, 12, 13, 14, 18	11 α , 15, 19, 29
28	32.9	1.06 (s)	16, 18, 22	18, 19
29	29.1	1.34 (s)	19, 20, 21	19, 27
2-OH		5.88 (br.s) ^a		
3-OH		5.39 (br.s) ^a		

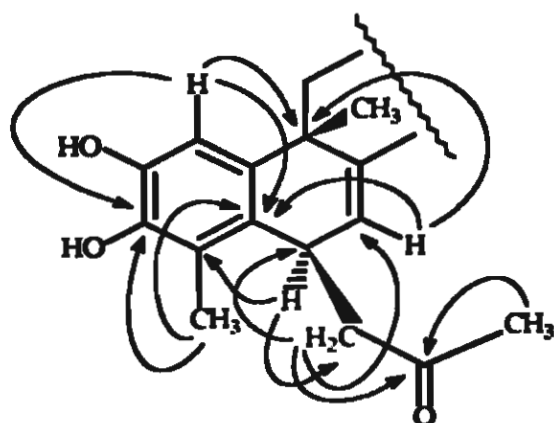
ตารางที่ 12 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H	HMBC (^{13}C)	NOESY
20-OH		3.59 (br.s)		
1'	51.7	a 2.73 (dd, $J = 16.8, 2.8$ Hz)	5, 6, 7, 2'	6, 23, 25, 1'b
		b 2.48 (dd, $J = 16.8, 10.9$ Hz)	6, 7, 2'	6, 23, 25, 1'a
2'	207.9			
3'	30.8	2.16 (s)	2'	25, 26

^a อาจสลับกัน

สาร 6 β -(2'-oxo-propyl)-tingenol (20), 6 β -(2'-oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21) และ 6 β -(2'-oxo-propyl)-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (25) เป็นผลิตภัณฑ์จากการเกิดปฏิกิริยาของสาร tingenone (16), 22 β -hydroxy-tingenone (9) และ 20-hydroxy-20-*epi*-tingenone (17) ตามลำดับ จากข้อมูล MS พบว่าสารทั้ง 3 มีน้ำหนักโมเลกุล 478, 494 และ 494 และจาก ^{13}C NMR และ DEPT spectra จึงสรุปสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_4$, $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_5$ และ $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_5$ ตามลำดับ สารเหล่านี้มีข้อมูล UV และ IR เหมือนกัน น้ำหนักโมเลกุลเพิ่มจากสารตั้งต้น 58 units เหมือนกัน น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเป็น methyl, methylene และ carbonyl อย่างละ 1 หมู่ จาก ^1H และ ^{13}C NMR spectra แสดงให้เห็นว่าสารแต่ละชนิดมีโครงสร้างส่วน ring C/D/E เหมือนกับสารตั้งต้น และทุกสารมีโครงสร้างส่วน ring A/B ที่เหมือนกัน โดยสัญญาณของ H-1, H-6 และ H-7 ปรากฏที่ δ 6.8, 4.0 และ 5.9 ppm ตามลำดับ และหากไม่รวม C-21 สารทั้ง 3 มีสัญญาณของ carbonyl และ aromatic carbons 9 สัญญาณ โดยสัญญาณของ protons และ carbons เหล่านี้แสดงความสัมพันธ์แบบ long range ดังแสดงในรูป 5 จึงสามารถสรุปโครงสร้างส่วน ring A/B ได้ว่ามีลักษณะแบบ allyl-phenolic นอกจากนี้ สัญญาณของ proton ที่ตำแหน่ง 6 มีลักษณะเป็น doublet of doublet of doublet แสดงว่านอกจาก H-7 แล้ว ยังมี protons อีก 2 atoms ที่อยู่ข้างเคียง โดย H-6 จะ coupling กับสัญญาณ methylene protons (H_2-1') ที่ δ 2.7 และ 2.5 ppm ซึ่งแสดง long-range correlation ต่อไปยัง carbonyl carbon (C-2') ที่ δ 208 ppm (รูปที่ 5) และพบว่ามี long-range correlation ระหว่าง carbonyl carbon นี้กับ methyl proton (H_3-3') ที่ δ 1.5 ppm แสดงว่าที่ตำแหน่ง 6 มีการเชื่อมต่อกับหมู่ acetonide และทิศทางของหมู่ function นี้จะเป็นแบบ β เพราะเมื่อศึกษาด้วยเทคนิค NOESY พบว่า CH_3-25 มีความสัมพันธ์แบบ NOE กับ H-1' และ H_3-3'

จากข้อมูลเหล่านี้ จึงสรุปว่าสารทั้ง 3 มีโครงสร้างเป็นสารชนิดใหม่ และให้ชื่อว่า 6 β -(2'-oxo-propyl)-tingenol (20), 6 β -(2'-oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21) และ 6 β -(2'-oxo-propyl)-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (25)



รูปที่ 5 ^1H - ^{13}C HMBC long-range correlation ที่สำคัญที่ ring A และ B ของสาร 6 β -(2'-oxo-propyl)-tingenol (20), 6 β -(2'-oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21) และ 6 β -(2'-oxo-propyl)-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (25)

2.9) 6-(E-2'-Oxo-propylidene)-22 β -hydroxy-tingenol (22)

6-(E-2'-Oxo-propylidene)-22 β -hydroxy-tingenol (22) มีลักษณะเป็น lacquer สีเหลืองอ่อน (EtOAc) ค่า $[\alpha]_D -131^\circ$ (c 0.06, MeOH) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

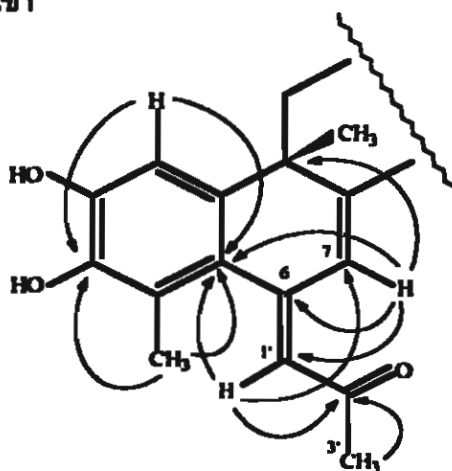
UV λ_{max} (MeOH), nm (log ϵ) : 216 (3.96), 268 (3.44), 322 (3.75), 366 (3.65)

IR ν_{max} (thin film) cm^{-1} : 3600-3100, 2960, 2630, 1705, 1652, 1620, 1543, 1458, 1378, 1296, 755

EIMS 70 eV, m/z (rel. Int.) : 492 [M] $^+$ (4), 477 [M-CH $_3$] $^+$ (18), 436 (8), 241 (87), 215 (21), 202 (31), 201 (100)

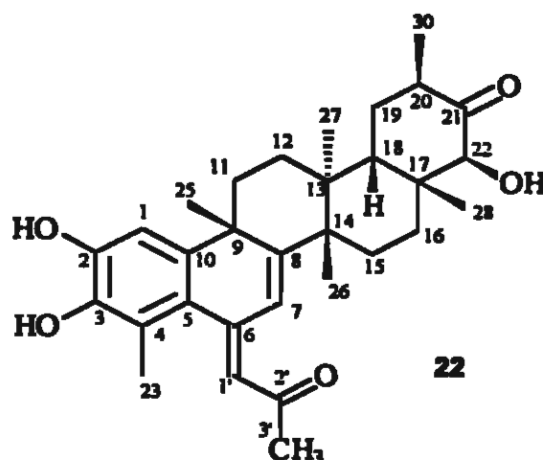
NMR ดูตารางที่ 13

จากข้อมูล MS สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 492 a.m.u. และจาก ^{13}C NMR และ DEPT spectra สามารถสรุปสูตรโมเลกุลของสารคือ $C_{31}H_{40}O_5$ สารนี้แสดงข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR ที่ใกล้เคียงกับสาร 6-(2'-oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21) ข้อมูลที่แตกต่างกันชัดเจนได้แก่ สัญญาณของ H-1'a และ H-1'b ซึ่งเคยพบที่ 2.5-2.7 ppm ของสาร 21 ไม่ปรากฏในสารนี้ สัญญาณช่วง downfield ของ 1H NMR ทั้งสิ้น 3 สัญญาณ มีลักษณะเป็น singlet ทั้งหมด โดยสัญญาณของ H-1 จะปรากฏที่ 8.85 ppm ส่วนอีก 2 สัญญาณซึ่งเป็น methine protons เหมือนกัน จะปรากฏที่ 7.75 และ 6.07 ppm โดยมีสัญญาณ ^{13}C ที่ 122.3 และ 120.2 ppm ตามลำดับ จากการศึกษาด้วยเทคนิค HMBC สัญญาณ 1H และ ^{13}C เหล่านี้มี long-range correlation ดังแสดงในรูปที่ 6 Methine proton ที่ δ 7.75 ppm มี long-range correlation ไปยัง C-5, C-6, C-9 และ C-14 ส่วน methine proton ที่ δ 6.07 ppm มี long-range correlation ไปยัง C-5 และ C-7 จึงสรุปว่า methine protons ทั้งสองเป็น protons ที่ตำแหน่ง 7 และ 1' ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบสัญญาณของ quaternary carbon ที่ δ 145.5 ppm ซึ่งมี long-range correlation กับ H-7 จึงน่าจะเป็น carbon ที่ตำแหน่ง 6 โครงสร้างของสารนี้จึงแตกต่างจากสาร 21 คือ มี double bond เพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง 6-1' น้ำหนักโมเลกุลจึงน้อยกว่า 2 units และเกิดลักษณะของ conjugated ketone ขึ้นในโครงสร้าง ซึ่งสามารถสังเกตได้จากสัญญาณที่ 1543 cm^{-1} ใน IR spectrum เช่นกัน Stereochemistry ของ double bond ที่ตำแหน่ง 6-1' พิสูจน์โดยเทคนิค NOESY พบ NOE correlation จาก H $_3$ -23 ไปยัง H-1' จึงสรุปว่า configuration ที่ตำแหน่งนี้เป็นแบบ *entgegen* (E) นอกจากนี้ ยังพบว่า H $_3$ -3' มี NOE กับ H-1' มากกว่ากับ H-7 Conformation ของ CH $_3$ -3' จึงน่าจะรอบหันออกจาก ring B มากกว่าหันเข้า



รูปที่ 6 1H - ^{13}C HMBC long-range correlation ที่สำคัญที่ ring A และ B ของสาร 6-(E-2'-oxo-propylidene)-22 β -hydroxy-tingenol (22)

จากข้อมูลทั้งหมด สารนี้จึงมีโครงสร้างเป็นสารชนิดใหม่ ให้ชื่อว่า 6-(*E*-2'-Oxo-propylidene)-22 β -hydroxy-tingenol (22)



ตารางที่ 13 ^1H และ ^{13}C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร 6-(*E*-2'-oxo-propylidene)-22 β -hydroxy-tingenol (22) (Chemical shifts รายงานเป็นค่า ppm ใน CDCl_3)

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H	HMBC (^{13}C)	NOESY
1	108.9	6.85 (s)	2, 3, 5, 9	11 β , 25
2	144.0	-		
3	141.0	-		
4	120.3	-		
5	126.3	-		
6	145.5	-		
7	122.3	7.75 (s)	5, 6, 9, 14, 1'	3', 15 β
8	159.5	-		
9	39.0	-		
10	145.6	-		
11	34.6	α 2.14 (m) β 2.14 (m)	13, 25 13, 25	27 1, 25
12	30.2	α 1.76 (m) β 1.76 (m)	11, 13 11, 13	27
13	39.4	-		
14	44.0	-		
15	28.1	α 1.74 (m) β 1.69 (ddd, $J = 13.7, 4.9, 2.6$ Hz)	26 13	7, 26
16	29.7	α 2.21 (m) β 1.58 (dd, $J = 14.8, 4.9$ Hz)	17, 18 17, 18, 22, 28	28, 16 β 16 α , 26, 28
17	45.1	-		
18	45.0	1.77 (d, $J = 7.3$ Hz)	17, 19, 20, 22, 27, 28	19 α , 19 β , 26, 28
19	32.1	α 2.19 (dd, $J = 14.5, 7.2$ Hz) β 1.73 (ddd, $J = 14.5, 14.0, 7.3$ Hz)	13, 17, 18, 20, 21 13, 17, 18, 20, 30	18, 20 18

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H	HMBC (^{13}C)	NOESY
20	40.9	2.61 (ddq, $J = 14.0, 7.2, 7.2$ Hz)	19, 31, 30	19 α , 27, 30
21	214.0	-		
22	76.6	4.51 (d, $J = 0.61$ Hz)	17, 18, 21, 28	27
23	15.3	2.48 (s)	3, 4, 5	1'
25	35.8	1.39 (s)	8, 9, 10, 11	1, 11 β , 26
26	22.4	1.34 (s)	8, 13, 14, 15	15 β , 16 β , 18, 25, 28
27	21.0	0.91 (s)	12, 13	11 α , 12 α , 20, 22
28	25.0	0.84 (s)	16, 17, 18, 22	16 α , 16 β , 18, 26
30	14.8	1.02 (d, $J = 7.2$ Hz)	19, 20, 21	20
2-OH		5.56 (br.s) ^a		
3-OH		5.17 (br.s) ^a		
22-OH		3.61 (br.s)		
1'	120.2	6.07 (s)	5, 7, 2'	3', 23
2'	198.7			
3'	32.6	2.27 (s)	2'	1', 7

^a อาจสลับกัน**2.10) 20-Hydroxy-20-*epi*-Isotingenone IV (23)**

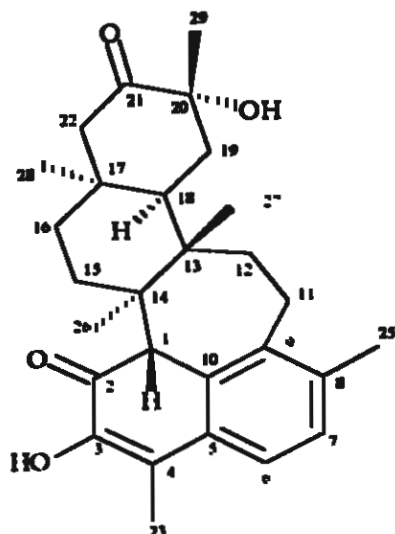
20-Hydroxy-20-*epi*-Isotingenone IV (23) มีลักษณะเป็น isomer ที่เหลืองอ่อน (EtOAc) ค่า $[\alpha]_D -176^\circ$ (c 0.15, MeOH) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

UV λ_{max} (MeOH), nm (log ϵ) : 235 (4.29), 260 (3.92), 333 (3.55)

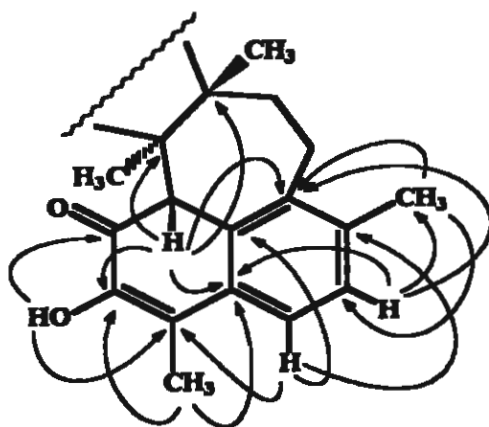
IR ν_{max} (thin film) cm^{-1} : 3600-3100, 2930, 1715, 1652, 1631, 1455, 1394, 1270, 756

EIMS 70 eV, m/z (rel. int.) : 436 $[\text{M}]^+$ (197), 418 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (3), 256 (3), 241 (10), 215 (19), 202 (16), 201 (100), 200 (6)

NMR ดูตารางที่ 14

**23**

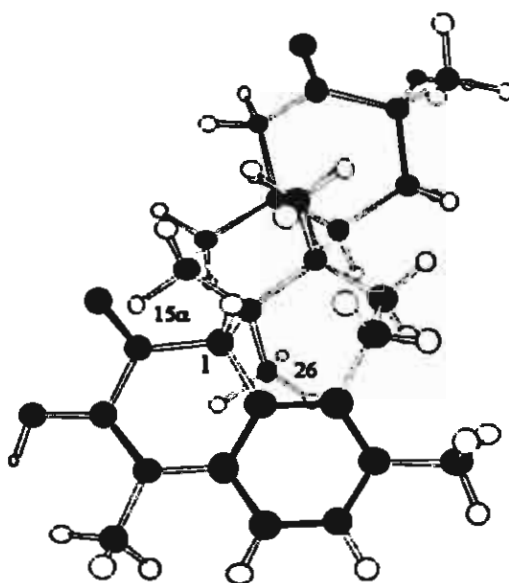
จากข้อมูล MS สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 436 a.m.u. จาก ^{13}C NMR และ DEPT spectra จึงสรุปสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_4$ ^{13}C NMR spectrum แสดงสัญญาณของ carbonyl carbon 2 สัญญาณ คือที่ 215.2 และ 197.1 ppm ซึ่งสอดคล้องกับ carbonyl carbons ที่ตำแหน่ง 20 และ 2 ของอนุพันธ์ tingenone ตามลำดับ ข้อมูลจาก IR spectrum ก็สนับสนุนการมีหมู่ carbonyl 2 หมู่ (1715 และ 1631 cm^{-1}) ข้อมูลจาก ^1H NMR พบสัญญาณในช่วง downfield 1 คู่ ที่มี *ortho* coupling ซึ่งกันและกัน ($J = 8.0$ Hz) ซึ่งเป็นลักษณะของ protons ที่ตำแหน่ง 6 และ 7 พบสัญญาณ hydroxyl proton δ 6.31 ppm และสัญญาณ singlet ที่คาดว่า เป็นของ H-1 ที่ δ 4.25 ppm ส่วนสัญญาณของ methyl protons พบว่านอกจากสัญญาณของ CH_3 -23 (δ 2.24 ppm) ยังพบสัญญาณของ methyl protons ที่ค่อนข้าง downfield อีก 1 สัญญาณ (δ 2.34 ppm) และอยู่ที่ upfield มาก (δ 0.54 ppm) อยู่ 1 สัญญาณ เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค HMBC พบว่า ring A, B และ C ของสารนี้มีลักษณะดังโครงสร้าง 23 CH_3 -25 ย้ายตำแหน่งมาติดบน C-8 สนับสนุนได้จาก long-range correlation จาก H_3 -25 ไปยัง C-7 และ C-9 และจาก H-7 ไปยัง C-25 (รูปที่ 6) Ring B มีลักษณะเป็น aromatic ring H_3 -25 จึงแสดงสัญญาณที่ค่อนข้าง downfield กว่าปกติ สำหรับส่วนของโครงสร้างที่น่าสนใจที่สุดคือ ring C นั้น แตกออกที่ตำแหน่ง 8-14 และมีการเชื่อมต่อใหม่ระหว่างตำแหน่ง 1-14 หลักฐานที่แสดงด้วยสัญญาณ NMR คือ ไม่พบ long-range correlation ระหว่าง H-7 กับ C-14 แต่กลับพบระหว่าง H-1 กับ C-13 และ C-14 ส่วนอื่นของโครงสร้างที่ ring D และ E จะแสดงข้อมูล NMR ที่สอดคล้องกับสาร 20-hydroxy-20-*epi*-tingenone (17)



รูปที่ 6 ^1H - ^{13}C HMBC long-range correlations ที่สำคัญที่ ring A, B และ C ของสาร 20-hydroxy-20-*epi*-tingenone IV (23)

ด้วยกลไกการปรับเปลี่ยนโครงสร้างจาก 20-hydroxy-20-*epi*-tingenone (17) ตามที่จะได้กล่าวต่อไปในบทวิจารณ์ H-1 ควรวางในทิศทาง β ซึ่งในลักษณะเช่นนี้ ทำให้ ring C, D และ E วางตัวอยู่ด้านหลังของ ring A และ B (รูปที่ 7) ส่งผลให้ CH_3 -26 และ H-15 α อยู่ในตำแหน่งที่ถูก shield ด้วยระบบ conjugated ของ ring A/B พอดี จึงแสดงสัญญาณใน ^1H NMR ที่ upfield กว่าปกติ ($\delta_{\text{H}-26}$ 0.54 ppm, $\delta_{\text{H}-15\alpha}$ 0.65 ppm) แต่หาก H-1 วางในทิศทาง α จะไม่ปรากฏลักษณะเช่นนี้

จากข้อมูลต่างๆ สารนี้จึงมีโครงสร้างตามรูปที่แสดง และเนื่องจากเป็นสารชนิดใหม่ที่ค้นพบจากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างภายใต้สภาวะกรด ของสารกลุ่ม qualone-methide triterpenes ซึ่งเดิมมีเพียง isomer I, II และ III⁴⁶ จึงกำหนดชื่อให้สารโครงสร้างเช่นนี้เป็น isomer IV และมีชื่อสำหรับสารนี้ว่า 20-Hydroxy-20-*epi*-isingenone IV (23)



รูปที่ 7 ภาพแสดง conformation ของสาร 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone IV (23)

ตารางที่ 14 ^1H และ ^{13}C NMR assignments รวมทั้ง HMBC ของสาร 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone IV (23)
(Chemical shifts รายงานเป็นค่า ppm ใน CDCl_3)

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H	HMBC (^{13}C)
1	53.4	4.25 (s)	2, 3, 5, 9, 10, 13, 14
2	197.1	-	
3	144.5	-	
4	126.3	-	
5	130.8	-	
6	122.0	7.18 (d, $J = 7.9$ Hz)	4, 8, 10
7	129.0	7.10 (d, $J = 7.9$ Hz)	5, 9, 25
8	134.1	-	
9	138.9	-	
10	137.1	-	
11	23.6	α 2.81 (br.t, $J = 14.6$ Hz)	8, 9, 12
		β 2.91 (ddd, $J = 14.6, 7.1, 1.8$ Hz)	8, 9, 10, 12, 13
12	33.7	α 1.86 (dd, $J = 14.6, 7.1$ Hz)	9, 11, 14
		β 1.22 (br.t, $J = 14.6$ Hz)	9, 14, 18, 27
13	44.3	-	
14	44.6	-	
15	31.2	α 0.65 (ddd, $J = 14.3, 6.0, 3.8$ Hz)	14, 18
		β 2.20 (m)	26
16	36.8	α 1.66 (ddd, $J = 15.0, 12.0, 6.0$ Hz)	15, 17, 22, 28
		β 1.47 (ddd, $J = 15.0, 6.0, 3.8$ Hz)	18
17	36.5	-	
18	46.3	1.80 (dd, $J = 8.4, 3.8$ Hz)	13, 16, 20, 22, 27, 28

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H	HMBC (^{13}C)
19	38.9	α 2.23 (m)	20
		β 2.23 (m)	20
20	73.5	-	
21	215.2	-	
22	49.2	α 1.89 (dd, $J = 14.5, 0.9$ Hz)	16, 17, 18, 21, 28
		β 3.06 (d, $J = 14.5$ Hz)	16, 17, 18, 21, 28
23	11.8	2.24 (s)	3, 4, 5
25	20.6	2.34 (s)	7, 8, 9
26	17.6	0.54 (s)	1, 13, 14, 15
27	18.5	1.54 (s)	12, 13, 14, 18
28	32.2	0.97 (s)	16, 18, 22
29	29.6	1.46 (s)	19, 21
3-OH		6.31 (s)	2, 3, 4
20-OH		3.21 (br.s)	19

2.11) 19,20-Didehydro-isotingenone III (24)

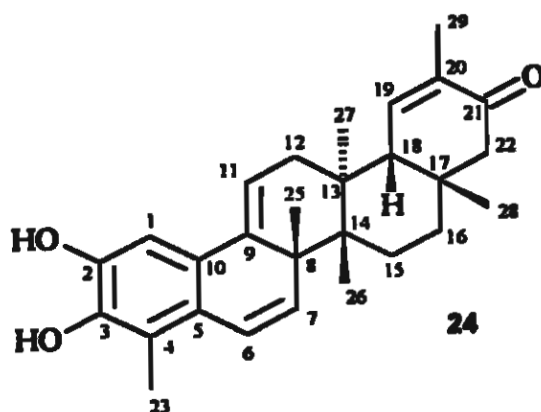
19,20-Didehydro-isotingenone III (24) มีลักษณะเป็น lacquer สีเหลืองอ่อน (EtOAc) ค่า $[\alpha]_D -87^\circ$ (c 0.1, MeOH) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

UV λ_{max} (MeOH), nm (log ϵ) : 250 (4.50), 305 (3.55)

IR ν_{max} (thin film) cm^{-1} : 3600-3100, 2930, 1718, 1658, 1621, 1454, 1379, 1298, 753

EIMS 70 eV, m/z (rel. int.) : 418 $[\text{M}]^+$ (2), 403 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ (2), 253 (2), 241 (8), 214 (4), 201 (6)

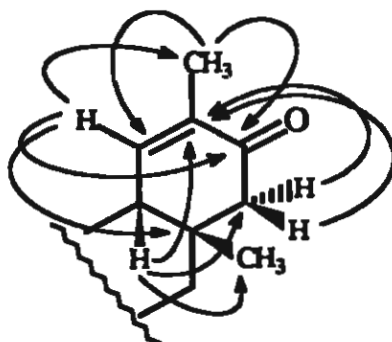
NMR ดูตารางที่ 15



จากข้อมูล MS สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 418 a.m.u. จาก ^{13}C NMR และ DEPT spectra จึงสรุปสูตรโมเลกุลของสารนี้คือ $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_3$ สารนี้มีข้อมูล ^1H NMR ใกล้เคียงกับสาร 20-Hydroxy-20-*epi*-isotingenone III (19) มาก แต่มีจุดที่แตกต่างอย่างชัดเจน 2 ประการคือ พบสัญญาณของ H-19 เพียงสัญญาณเดียว ซึ่งปรากฏที่ตำแหน่ง downfield มาก (δ 6.70 ppm) และสัญญาณของ CH_3 -29 ขยับ downfield มากกว่าปกติ (δ 1.83 ppm) เป็นลักษณะของหมู่

methyl ที่ติดบน double bond ทั้งนี้ จึงคาดว่าสารนี้เป็นอนุพันธ์ของ 20-Hydroxy-20-*epi*-isotingenone III (19) ที่เกิดการสูญเสีย 1 โมเลกุลออกที่ตำแหน่ง 19-20 เกิดเป็น double bond น้ำหนักโมเลกุลจึงน้อยลง 18 units สามารถสนับสนุนสมมติฐานนี้จากการศึกษาด้วยเทคนิค HMBC (รูปที่ 8) พบ long-range correlation จากสัญญาณของ methine proton ที่ δ 6.70 ppm ไปยัง C-17, C-21 และ CH₃-29 ซึ่งยืนยันได้ว่าสัญญาณของ proton นั้นเป็นของ H-19 และพบ long-range correlation จาก methyl protons ที่ δ 1.83 ppm ไปยัง C-19 และ C-21 ซึ่งยืนยันได้ว่า methyl protons นั้นเป็น H₃-29 นอกจากนี้ เมื่อเกิด double bond ที่ตำแหน่ง 19-20 จึงมีลักษณะของ conjugated ketone ขึ้น สัญญาณของ H-19 จึงปรากฏที่ตำแหน่ง downfield กว่า methine proton ปกติทั่วไป และเมื่อดังเกต IR spectrum ก็พบสัญญาณที่ 1658 cm⁻¹ ก็สนับสนุนการมีหมู่ conjugated carbonyl ส่วนโครงสร้างในส่วนอื่น จะแสดงข้อมูล NMR ที่สอดคล้องกับของสาร 20-Hydroxy-20-*epi*-isotingenone III (19) จึงมีโครงสร้างที่เหมือนกัน โดย chromophore ที่ ring A/B/C ที่เป็น divinyl phenolic ก็แสดง UV spectrum ที่เหมือนกัน

โดยสรุปจึงสามารถพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารนี้ได้ เป็นสารที่มีโครงสร้างใหม่ และเรียกชื่อว่า 19,20-didehydro-isotingenone III (24)



รูปที่ 8 ¹H-¹³C HMBC long-range correlations ที่สำคัญที่ ring E ของสาร 19,20-didehydro-isotingenone III (24)

ตารางที่ 15 ¹H และ ¹³C NMR assignments รวมทั้ง HMBC ของสาร 19,20-didehydro-isotingenone III (24)
(Chemical shifts รายงานเป็นค่า ppm ใน CDCl₃+CD₃OD (1:1))

ตำแหน่ง	¹³ C	¹ H	HMBC (¹³ C)
1	108.9	6.69 (s)	3, 5, 9
2	144.3	-	
3	142.3	-	
4	120.6	-	
5	121.6	-	
6	120.7	6.39 (d, J = 9.9 Hz)	4, 5, 8, 10
7	137.4	6.30 (d, J = 9.9 Hz)	5, 8, 9
8	44.2	-	
9	144.3	-	
10	130.2	-	
11	120.6	5.52 (dd, J = 6.5, 2.0 Hz)	8, 10, 12, 13
12	37.4	α 2.10 (dd, J = 9.5, 6.5 Hz)	9, 11, 13, 14, 27
		β 2.17 (br.d, J = 9.5 Hz)	
13	41.5	-	
14	40.2	-	

ตารางที่ 15 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H	HMBC (^{13}C)
15	24.5	α 2.08 (<i>m</i>)	13, 14
		β 1.43 (<i>m</i>)	
16	34.9	α 1.43 (<i>m</i>)	
		β 1.80 (<i>td</i> , $J = 14.0, 3.8$ Hz)	
17	35.0	-	
18	51.2	2.49 (<i>d</i> , $J = 5.8$ Hz)	13, 16, 17, 19, 20, 22, 27, 28
19	148.4	6.70 (<i>dd</i> , $J = 5.8, 1.2$ Hz)	17, 21, 29
20	136.2	-	
21	202.8	-	
22	47.8	α 2.89 (<i>d</i> , $J = 17.7$ Hz)	16, 17, 21, 28
		β 1.90 (<i>d</i> , $J = 17.7$ Hz)	16, 17, 18, 21, 28
23	11.2	2.19 (<i>s</i>)	3, 4, 5
25	22.7	1.07 (<i>s</i>)	7, 8, 9, 14
26	19.3	1.10 (<i>s</i>)	8, 14, 15
27	19.9	1.03 (<i>s</i>)	12, 13, 14, 18
28	31.9	1.06 (<i>s</i>)	16, 17, 18, 22
29	15.9	1.83 (<i>s</i>)	19, 20, 21

3. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริม

ส่วนสกัดหยาบจากการสกัดในแต่ละขั้นตอน จะถูกนำมาตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริม เพื่อเป็นแนวทางว่า สารออกฤทธิ์จะพบอยู่ในส่วนสกัดใด ก็เลือกส่วนสกัดนั้นมาสกัดแยกต่อจนได้สารบริสุทธิ์ที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ ทั้งนี้ เป็นไปตามหลักของ bioassay-directed fractionation

สารบริสุทธิ์ที่นำมาตรวจสอบฤทธิ์ได้แก่ สารที่สกัดแยกทุกชนิด (สาร 4-5, 7, 9-15) ยกเว้น palmitic acid (8) และ β -sitosterol (6) สารที่ได้จากการกึ่งตั้งเคราะห์ (สาร 10, 18-25) และสารตั้งต้นที่ใช้ในการกึ่งตั้งเคราะห์ (สาร 9, 16-17) ผลการตรวจสอบฤทธิ์แสดงดังตารางที่ 16 พบว่าสารกลุ่ม steroids (สาร 7, 13 และ 14) triterpenes (สาร 4, 5 และ 11) และ 15 ไม่มีฤทธิ์ ในขณะที่สาร 9, 16 และ 17 มีความเป็นพิษค่อนข้างสูง และสารที่ได้จากการกึ่งตั้งเคราะห์ เฉพาะสาร isotingenone III (18) 22 β -hydroxy-isotingenone III (10) และ 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone III (19) เท่านั้น ที่แสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจ และมีค่า selectivity index มากกว่า 5 ส่วนสาร 12, 20-25 มี selectivity index ต่ำมาก

ตารางที่ 16ฤทธิ์ต้านไวรัสและความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารบริสุทธิ์

สาร	ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (IC ₅₀ , µg/ml)	ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม (EC ₅₀ , µg/ml)		Selectivity Index (IC ₅₀ / ED ₅₀)	
		HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2
β-Sitosterone (7)	> 50	> 50	> 50		
β-Sitosterol-3β-D-glucopyranoside (13)	> 50	> 50	> 50		
5α,6α-Epoxytigmasteran-3β-ol (14)	> 50	> 50	> 50		
Glyptopetolide (4)	> 50	30	50	> 1.7	> 1.0
Isoarborinol (5)	28	30	30	0.9	0.9
Salaspermic acid (11)	> 50	> 50	> 50		
2R',3R',5S'-Trihydroxy-6R'-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15)	> 50	86	96	> 0.6	> 0.5
Tingenone (16)	1.9	- ^a	- ^a		
22β-Hydroxy-tingenone (9)	1.9	- ^a	- ^a		
20-Hydroxy-20-epi-tingenone (17)	0.5	- ^a	- ^a		
Isotingenone III (18)	35	3	4	11.7	8.8
22β-Hydroxy-isotingenone III (10)	35	5	6	7.0	5.8
20-Hydroxy-20-epi-isotingenone III (19)	35	2	2	17.5	17.5
19,20-Didehydro-isotingenone III (24)	23	5	10	4.6	2.3
6-Oxo-20-hydroxy-20-epi-tingenol (12)	35	> 20	> 20	< 1.8	< 1.8
6β-(2'-Oxo-propyl)-tingenol (20)	25	12	> 20	2.1	< 1.2
6β-(2'-Oxo-propyl)-22β-hydroxy-tingenol (21)	28	17	> 20	1.6	< 1.4
6β-(2'-Oxo-propyl)-20-hydroxy-20-epi-tingenol (25)	35	12	> 20	2.9	< 1.8
6-(E-2'-Oxo-propylidene)-22β-hydroxy-tingenol (22)	15	> 20	> 20	< 0.8	< 0.8
20-Hydroxy-20-epi-isotingenone IV (23)	35	18	> 20	1.9	< 1.8
Acyclovir	> 50	0.06	0.5	> 833.3	> 100

^aไม่ได้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม เนื่องจากมีความเป็นพิษค่อนข้างสูง

บทที่ 4

บทวิจารณ์ และสรุป

1. การสกัดแยกสารบริสุทธิ์

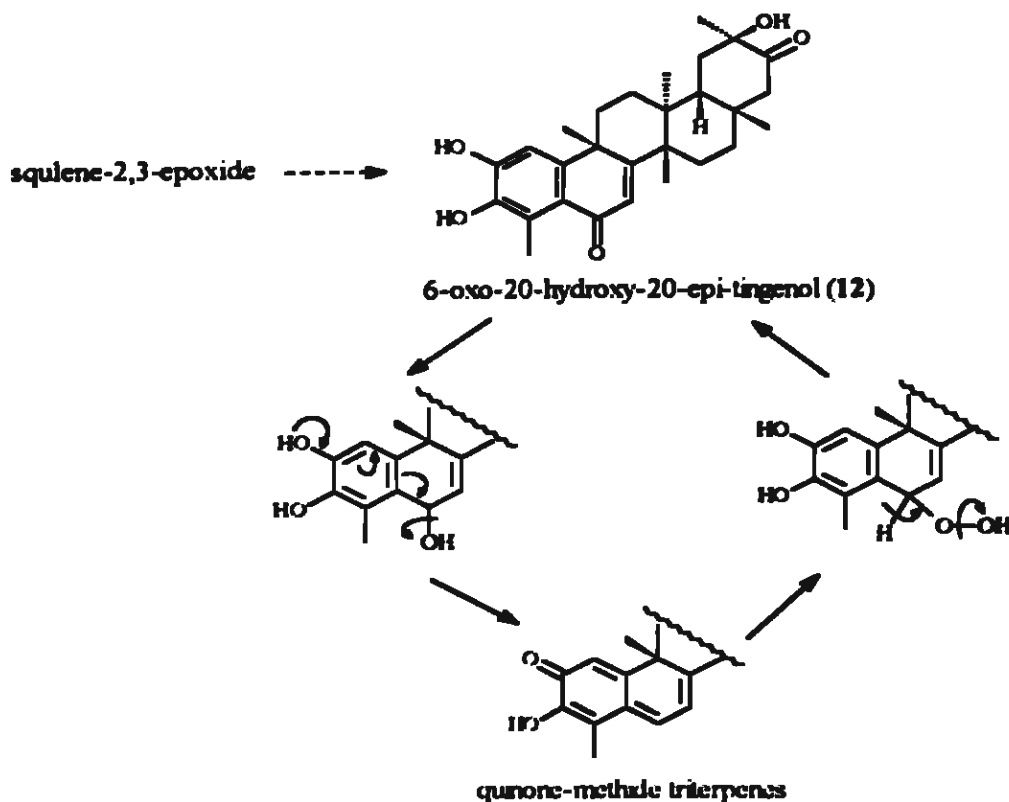
งานวิจัยนี้สามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากเปลือกผลตูมกาแดงทั้งสิ้น 12 ชนิด จำแนกสารเหล่านี้เป็นกลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี ดังนี้

1. Steroids ได้แก่สาร β -sitosterol (6), β -sitosteronone (7), β -sitosterol-3 β -D-glucopyranoside (13) และ 5 α ,6 α -epoxystigmastan-3 β -ol (14)
2. Triterpenes ได้แก่สาร glyptopetolide (4), isoarborinol (5) และ salespermic acid (11)
3. Quinone-methide triterpenes และอนุพันธ์ ได้แก่สาร 22 β -hydroxy-tingenone (9) และ 22 β -hydroxy-isotingenone III (10) และ 6-oxo-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (12)
4. สารโครงสร้างอื่นๆ ได้แก่สาร palmitic acid (8) และ 2*R**,3*R**,5*S**-trihydroxy-6*R**-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15)

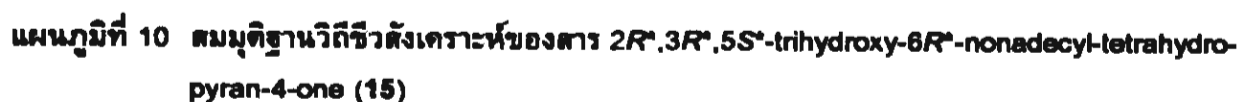
สาร 12 และ 15 เป็นสารโครงสร้างใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน

2. การสันนิษฐานวิถีชีวสังเคราะห์

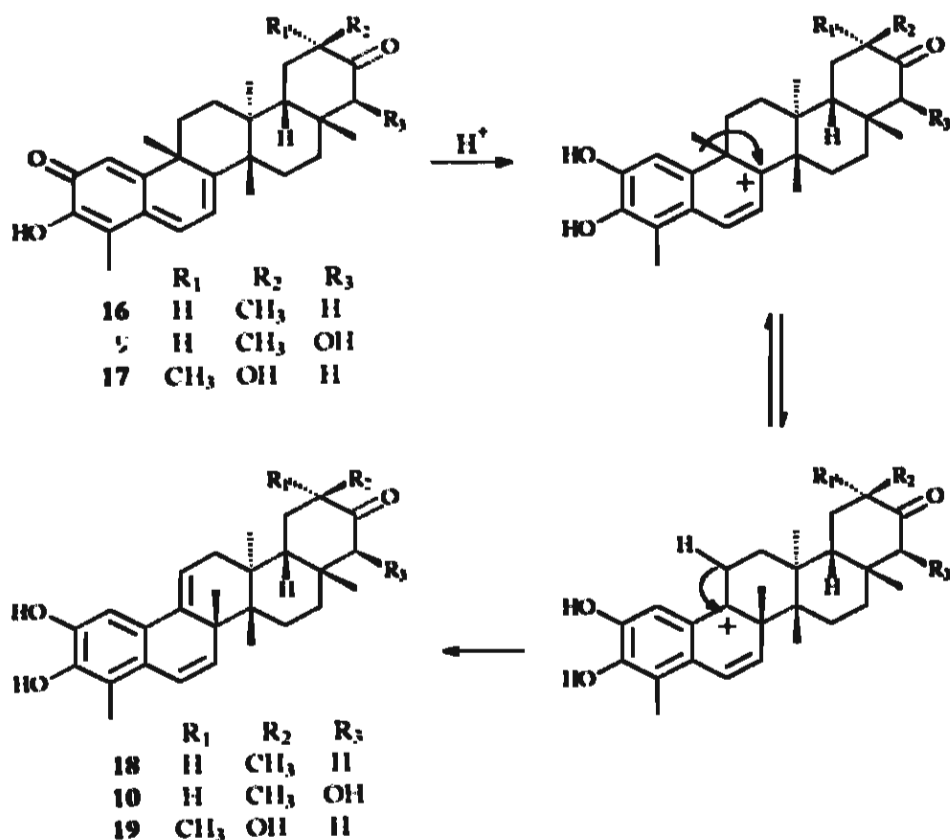
สาร 12 มีโครงสร้างหลัก 6-oxo-phenolic-D:A-*friedo*-24-noroleananes คาดว่าเป็น intermediate ของการชีวสังเคราะห์ของสารโครงสร้างหลัก quinone-methide triterpenes⁴³ หรืออาจมีชีวสังเคราะห์มาจากสารโครงสร้างหลัก quinone-methide triterpenes⁴³⁻⁴⁴ ดังแสดงในแผนภูมิที่ 9 ส่วนสาร 15 คาดว่ามีวิถีชีวสังเคราะห์ทาง acetate pathway ดังแสดงในแผนภูมิที่ 10



แผนภูมิที่ 9 สมมุติฐานวิถีชีวสังเคราะห์ของสาร 6-oxo-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (12)



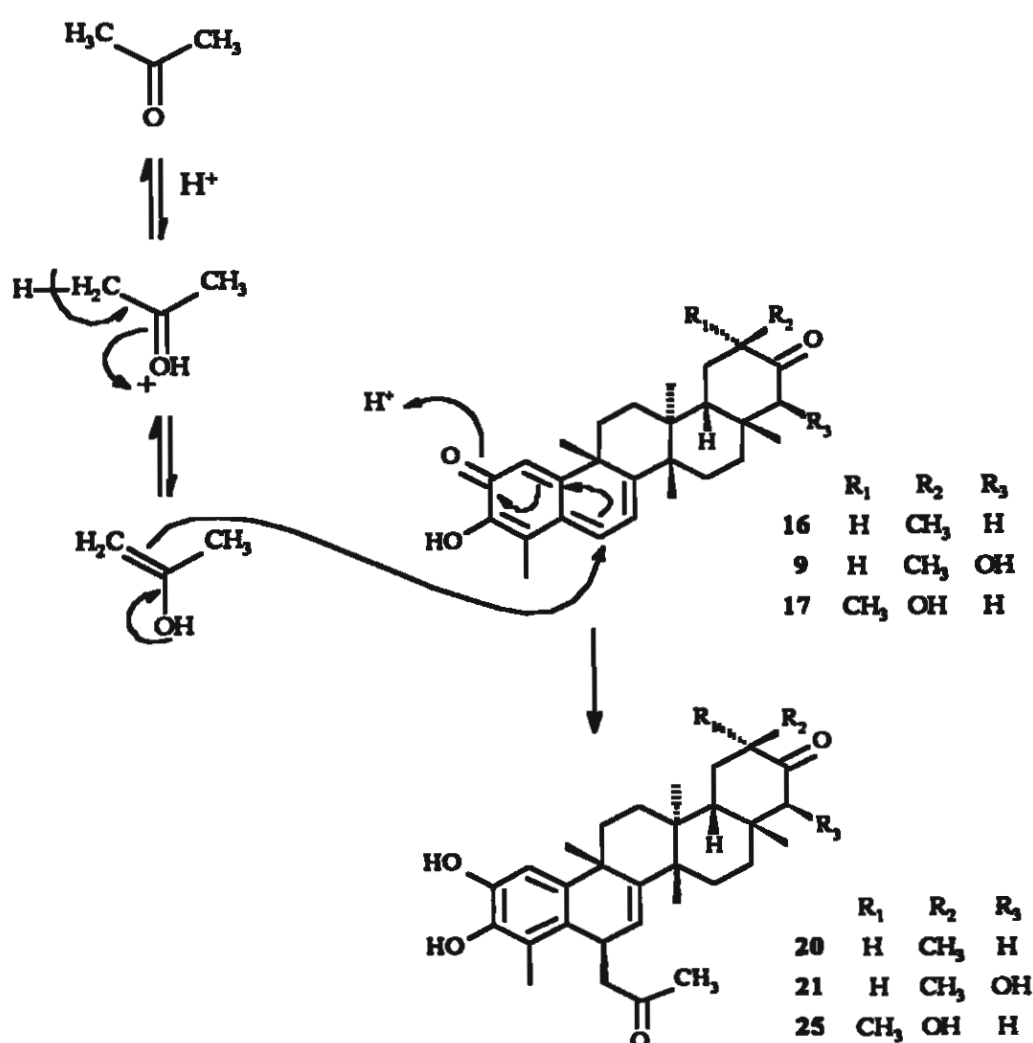
การวิจัยนี้พบว่าสาร 22 β -hydroxy-isotingenone III (10) แสดงฤทธิ์ต้านไวรัสริบ และมีความ selectivity Index ที่น่าสนใจ จึงได้เตรียมอนุพันธ์ของสารนี้อีก 2 ชนิด รวมทั้งเตรียมสารนี้เพิ่ม โดยใช้วิธีกิ่งดังเคราะห์จากสารตั้งต้นที่สกัดแยกได้จากส่วนเปลือกต้นของพืชนี้¹¹ ได้แก่สาร tingenone (16), 22 β -hydroxy-tingenone (9) และ 20-hydroxy-20-*epi*-tingenone (17) เตรียมเป็นสาร isotingenone III (18), 22 β -hydroxy-isotingenone III (10) และ 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone III (19) ตามลำดับ ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเป็น acid rearrangement มีกลไกดังแสดงในแผนภูมิที่ 11⁴⁵⁻⁴⁶



แผนภูมิที่ 11 กลไกปฏิกิริยาการก่ิงสังเคราะห์สาร Isotingenone III (18), 22 β -hydroxy-isotingenone III (10) และ 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone III (19) จากสาร tingenone (16), 22 β -hydroxy-tingenone (9) และ 20-hydroxy-20-*epi*-tingenone III (17) ตามลำดับ

จากการกึ่งสังเคราะห์ สามารถสกัดแยกสาร byproducts 6 ชนิด ได้แก่สาร 6 β -(2'-oxo-propyl)-tingenol (20), 6 β -(2'-oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21), 6-(E-2'-oxo-propylidene)-22 β -hydroxy-tingenol (22), 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone IV (23), 19,20-didehydro-isotingenone III (24) และ 6 β -(2'-oxo-propyl)-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (25) สารทั้ง 6 เป็นสารโครงสร้างใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน

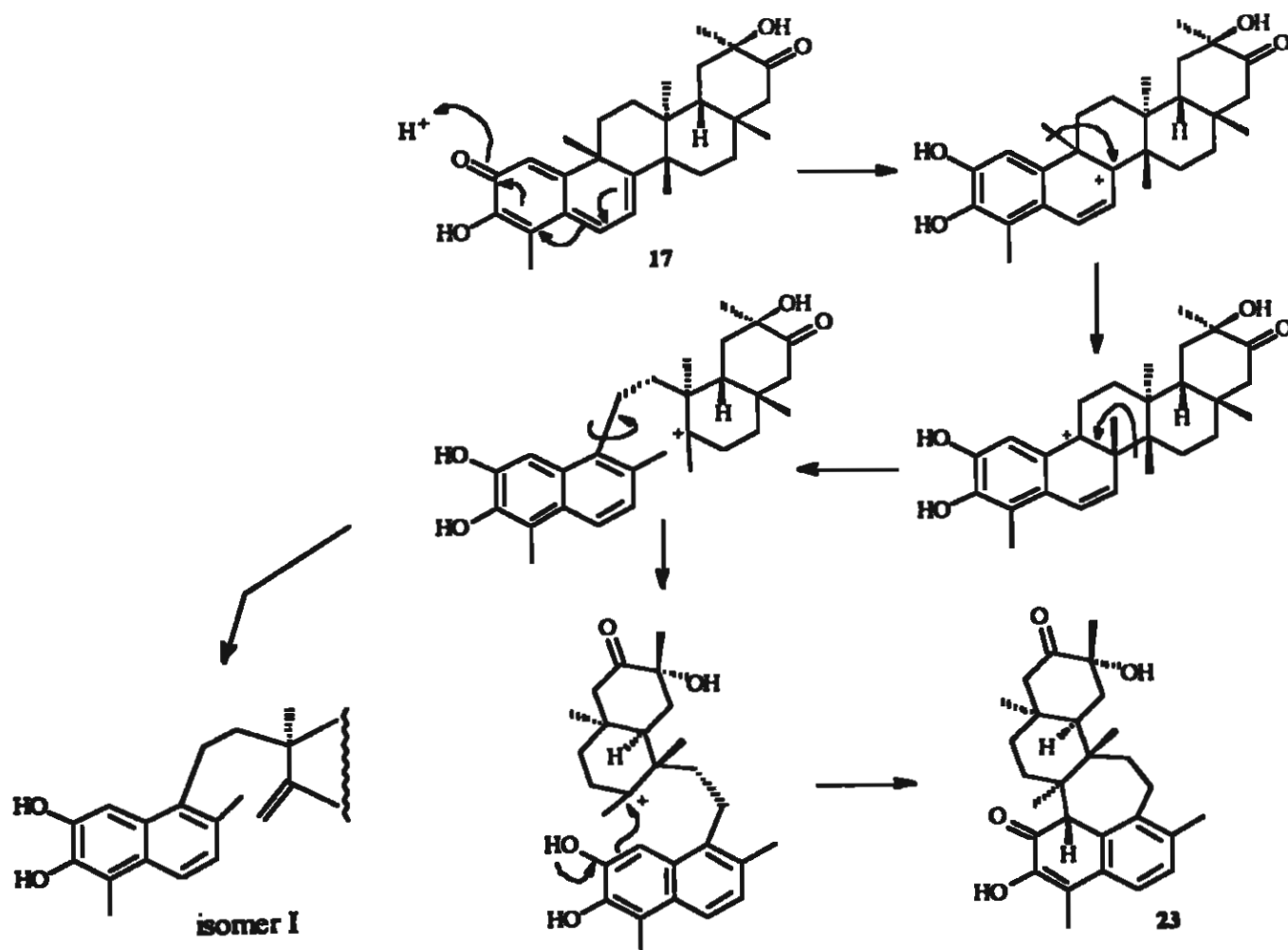
กลไกการกึ่งสังเคราะห์ของสาร 20, 21 และ 25 คาดว่าเกิดจากการป้อนเบื้อนของ acetone ใน methanol ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย ซึ่งพิสูจน์ได้จากการเปลี่ยนตัวทำละลาย โดยเมื่อใช้ acetone แทน methanol จะพบสารเหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์หลัก เมื่อ acetone ทำปฏิกิริยากับกรด จะเกิดปฏิกิริยา enolization อยู่ในรูป enol ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น nucleophile หลังจากนั้น จะเข้าทำปฏิกิริยา Michael addition ที่ตำแหน่ง 6 ของสารตั้งต้น (แผนภูมิที่ 12) เกิดเป็นหมู่ acetonyl เพิ่มขึ้นมา และคาดว่า สาร 21 เกิดปฏิกิริยา dehydrogenation ที่ตำแหน่ง 6,1' ต่อได้เป็นสาร 22



แผนภูมิที่ 12 สมมุติฐานกลไกปฏิกิริยาการกึ่งสังเคราะห์สาร 6 β -(2'-oxo-propyl)-tingenol (20), 6 β -(2'-oxo-propyl)-22 β -hydroxy-tingenol (21) และ 6 β -(2'-oxo-propyl)-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (25) จากสาร tingenone (16), 22 β -hydroxy-tingenone (9) และ 20-hydroxy-20-*epi*-tingenone (17) ตามลำดับ

กลไกการกึ่งสังเคราะห์ของสาร 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone IV (23) สามารถคาดไว้ตามแผนภูมิที่ 13 โดยในช่วงแรกของกลไกการเกิดปฏิกิริยาจะสอดคล้องกับการเกิด isomer I⁴⁵ ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารกลุ่ม quinone-methide triterpenes ภายใต้สภาวะกรด แต่ในการเกิด isomer I เมื่อ ring C แตกออก จะไม่มีการปิด ring ใหม่เหมือนสาร 23

ส่วนสาร 19,20-didehydro-isotingenone III (24) เกิดจากปฏิกิริยา dehydration ภายใต้สภาวะกรดที่ตำแหน่ง 19,20 ของสาร 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone III (19)



แผนภูมิที่ 13 สมมุติฐานกลไกปฏิกิริยาการกึ่งสังเคราะห์สาร 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone IV (23) จากสาร 20-hydroxy-20-*epi*-tingenone (17)

4. ฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มของสารบริสุทธิ์

เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มของสารต่างๆ ทั้งที่ได้จากการสกัดแยก ได้จากการกึ่งสังเคราะห์ รวมถึงสารตั้งต้นที่ใช้ในการกึ่งสังเคราะห์ พบว่าสารกลุ่ม steroids (สาร 7, 13 และ 14) triterpenes (สาร 4, 5 และ 11) และสาร 15 ไม่มีฤทธิ์ แม้ว่าสาร salasperric acid (11) จะเคยมีรายงานว่ามียฤทธิ์ต้านไวรัสเอดส์ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase²⁹ แต่ไม่มีผลต่อไวรัสเริ่มในการวิจัยนี้ เนื่องจากไวรัสเอดส์และเริ่มเป็นไวรัสคนละกลุ่ม มีระบบ metabolism ที่ไม่เหมือนกัน จึงต้องการสารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน

สารกลุ่ม quinone-methide triterpenes พบว่าเฉพาะสารจากการกึ่งสังเคราะห์ที่เป็นผลิตภัณฑ์หลัก (สาร 10, 18 และ 19) เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจ และค่า selectivity index มีนัยสำคัญ คือมีค่ามากกว่า 5 หรือมากกว่า $10^{26,31}$ อย่างไรก็ตาม สารทั้ง 3 ค่อนข้างเป็นพิษ ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ จะเป็นพิษต่อเซลล์ 100% แต่ที่น่าสนใจคือ เมื่อใช้ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ สารเหล่านี้จะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เลย แต่มีผลต้านไวรัสเริ่มได้เกือบ 100%

สาร 9, 16 และ 17 มีความเป็นพิษสูง ในขณะที่สาร 12 และสารกึ่งสังเคราะห์ 20-25 แม้จะมีความเป็นพิษใกล้เคียงกับสาร 10, 18 และ 19 แต่ไม่มีฤทธิ์หรือมีฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มได้น้อย ทำให้มีค่า selectivity index ต่ำเกินไป

เมื่อพิจารณาข้อมูลที่เคยมีรายงานเกี่ยวกับสารกึ่งสังเคราะห์ 10, 18 และ 19 สารเหล่านี้ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ในขณะที่สาร 9, 16 และ 17 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการกึ่งสังเคราะห์มีฤทธิ์¹⁴ แต่การวิจัยนี้พบว่า สาร 3 ชนิดหลังเป็นพิษค่อนข้างสูง จึงมีข้อสังเกตถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเหล่านี้ว่า ส่วนของโครงสร้างที่เป็นระบบ quinone-methide (ซึ่งพบในกรณีสาร 9, 16 และ 17) จะมีความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และทำให้มีความเป็นพิษ แต่เมื่อมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเป็นระบบ phenolic (สาร 10, 18 และ 19) ความเป็นพิษจะลดลง และสามารถแสดงฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มทดแทนฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่หายไป ความสำคัญของระบบ phenolic ต่อฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มสอดคล้องกับสารกลุ่ม flavonoids และ hydrolyzable tannins บางชนิดที่มีฤทธิ์ต้านไวรัส⁴⁷ อย่างไรก็ตาม หากเปรียบเทียบกับสาร 12, 20, 21, 22 และ 25 ซึ่งมีระบบของ phenolic ในโครงสร้างเช่นกัน แม้จะมีความเป็นพิษใกล้เคียงกัน แต่สาร 12, 20, 21, 22 และ 25 ไม่มีผลต่อไวรัสเริ่มหรือมีฤทธิ์น้อยกว่า จึงสามารถตั้งข้อสังเกตสำหรับสารกลุ่ม quinone-methide triterpenes และอนุพันธ์ว่า ระบบ phenolic ของ ring A ยังไม่เพียงพอกับฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม จะต้องมีหมู่ vinyl 2 หมู่ต่ออยู่แบบ conjugate ด้วย เกิดเป็นระบบ divinyl phenolic ดังเช่นที่พบในสาร 10, 18 และ 19 นอกจากนี้ หมู่ function ที่ ring E ก็มีผลต่อการแสดงฤทธิ์ ดังจะเห็นได้ว่าสาร 24 ซึ่งมีความแตกต่างจากสาร 18 เพียงมีหมู่ olefinic ที่ตำแหน่ง 19,20 แต่มีความเป็นพิษสูงกว่า และฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มก็ลดลง ทั้งนี้ double bond หรือ functional groups อื่นๆ ที่ ring E จะมีผลต่อความสามารถในการละลายในไขมัน (lipophilicity) ของสาร แล้วส่งผลต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งเคยมีการศึกษามาแล้วสำหรับสารอนุพันธ์ของ tingenone⁴⁸

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาต่อไป ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ของสารกลุ่ม quinone-methide triterpenes เพื่อลดความเป็นพิษของสาร และควรมีการศึกษาด้วยจำนวนสารอนุพันธ์มากกว่านี้ เพื่อยืนยันผลสรุป นอกจากนี้ เนื่องจากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นแบบ inactivated virus กล่าวคือ เชื้อไวรัสจะสัมผัสกับสารที่ต้องการตรวจสอบโดยตรง ก่อนเติม Vero cell เพื่อให้เกิดการติดเชื้อแล้วอ่านผล สารที่ให้ผลบวกกับวิธีการนี้ จึงออกฤทธิ์ต่อไวรัสนอกเซลล์ แต่จะออกฤทธิ์ที่ขึ้นตอนภายในเซลล์หลังการติดเชื้อไวรัสได้หรือไม่ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

1. Kane, C. J. M., Menna, J. H. and Yeh, Y. C. Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, is a potent and highly specific inhibitor of *Herpes simplex virus in vitro*. I. Purification and characterization of methylgallate from *Sapium sebiferum*. *Biosci. Rep.* 8, 85, 1988.
2. Corthout, J., Pieters, L. A., Claeys, M., Vanden Bergerghe, D. A. and Vlietinck, A. J. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. *Phytochemistry* 30, 1129, 1991.
3. Arisawa, M., Fujita, A., Hayashi, T., Hayashi, K., Ochiai, H. and Morita, N. Cytotoxic and anti herpetic activity of phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicua* Euphorbiaceae. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 1624, 1990.
4. Tsuchiya, Y., Shimizu, M., Hiyama, Y., Itoh, K., Hashimoto, Y., Nakayama, M., Horie, T. and Morita, N. Antiviral activity of natural occuring flavonoids *in vitro*. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3881, 1985.
5. Tang, J., Colacino, J. M., Larsen, S. H. and Spitzer, W. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. *Antiviral Res.* 13, 313, 1990.
6. Hirabayashi, K., Iwata, S., Matsumoto, H., Mori, T., Shibata, S., Baba, M., Ito, M., Shigeta, S., Nakashima, H. and Yamamoto, N. Antiviral activities of glycyrrhizin and its modified compounds against human Immunodeficiency virus 1 HIV-1 and *Herpes simplex type Q* HSV-1 *in vitro*. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 112, 1991.
7. Hayashi, T., Hayashi, K., Uchida, K., Niwayama, S. and Morita, N. Antiviral agents of plant origin. II. Antiviral activity of scopadulcic acid B derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 239, 1990.
8. Hayashi, T., Kawasaki, M., Miwa, Y., Taga, T. and Morita, N. Antiviral from plant origin. III. Scopadulin, a novel tetracyclic diterpene from *Scoparia dulcis* L. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 945, 1990.
9. Yamamoto, N., Furukawa, H., Ito, Y., Yoshida, S., Maeno, K. and Nishiyama, Y. Anti-*Herpes* virus activity of citrusinine-I, a new acridone alkaloids, and related compounds. *Antiviral Res.* 12, 21, 1989.
10. Sotanaphun, U., Lipipun, V., Suttisri, R and Bavovada, R. A new antiviral and antimicrobial sesquiterpene from *Glyptopetalum sclerocarpum*. *Planta Medica* 65, 257-258, 1999.
11. Sotanaphun, U., Suttisri, R., Lipipun, V. and Bavovada, R. Quinone-methide triterpenoids from *Glyptopetalum sclerocarpum*. *Phytochemistry* 49, 1749-1755, 1998.
12. Bavovada, R., Blasko, G., Shieh, H.-L., Pezzuto, J. M., and Cordell, G. A. Spectral assignment and cytotoxicity of 22-hydroxytingenone from *Glyptopetalum sclerocarpum*. *Planta Med.* 56, 380-382, 1990.
13. Likhitwitayawuld, K., Bavovada, R., Lin, L.-Z., and Cordell, G. A. Revised structure of 20-hydroxytingenone and ^{13}C NMR assignments of 22 β -hydroxytingenone. *Phytochemistry* 34, 759-763, 1993.

14. Sotanaphun, U., Lipipun, V., Suttisri, R and Bavovada, R. Antimicrobial activity and stability of tingenone derivatives. *Planta Medica* 65, 450-2, 1999.
15. Moujir, L., Gutierrez-Navarro, A. M., Gonzalez, A. G., Ravelo, A. G. and Luis, J. G. The relationship between structure and antimicrobial activity in quinones from the Celastraceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 18, 25-28, 1990.
16. Osamu, S., Hiroshi, M., Koichi, T., Hideji, I. and Yoichi, I. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhwasca*. *J. Nat. Prod.* 57, 1675-1681, 1994.
17. Ngassapa, O., Soejarto, D. D., Pezzuto, J. M. and Fransworth, N. R. Quinone-methide triterpenes and salaspermic acid from *Kokoona ochracea*. *J. Nat. Prod.* 57, 1-8, 1994.
18. Kutney, J. P., Beale, M. H., Salisbury, P. J., Stuart, K. L., Worth, B. R., Townsley, P. M., Chalmers, W. T., Nilsson, K. and Jacoli, G.G. Isolation and characterization of natural products from plant tissue culture of *Maytenus buehneri*. *Phytochemistry* 20, 653-657, 1981.
19. Gonzalez, A. G., Ravelo, A. G., Bazzocchi, I. L., Jimenes, J., Gonzalez, C. M., Luis, J. G., Ferro, E. A., Gutierrez, A. Moujir, L. and de Las Heras, F. G. Biological study of triterpene quinones from Celastraceae. *Farmaco. Ed. Sci.* 43, 501-505, 1988.
20. Sotanaphun, U., Suttisri, R., Lipipun, V. and Bavovada, R. A new 3,4-seco-ursane triterpenoid from *Glyptopetalum sclerocarpum*. *Chem. Pharm. Bull.* 48, 1347-1349, 2000.
21. Suffness, M., Cordell, G. A. In : *The Alkaloids : Chemistry and pharmacology*. vol.25. (Brossi, A., ed.), pp. 142-156, Academic Press, Orlando, 1985.
22. Mata, R., Calazada, R., Diaz, E. and Toscano, R. A. Sesquiterpene euoniolate alkaloids from *Hippocratea excelsa*. *Planta Med.* 56, 517, 1990.
23. Han, B. H., Park, M. K., Ryu, J. H., Park, J. H. and Naoki, H. Sesquiterpene alkaloids from *Euonymus japonica*. *Phytochemistry* 29, 2303-2307, 1990.
24. Takaishi, Y., Ujita, K., Nakano, K., Murakami, K. and Tomimatsu, T. Sesquiterpene esters from *Tripterygium wilfordii* Hook Fil. var *regelii*, structures of triptofordins A-C1. *Phytochemistry* 26, 2325-9, 1987.
25. Hayashi, K., Hayashi, T., Ujita, K. and Takaishi, Y. Characterization of antiviral activity of a sesquiterpene, triptofordin C-2. *J. Antimicro. Chemother.* 37, 759-768, 1996.
26. Chen, K., Shi, Q., Fujioka, T., Zhang D.-C., Hu, C.-Q., Jin, J.-Q., Kilkuskie, R. E. and Lee, K.-H. Anti-AIDS agents. 4. Tripterifordin, a novel anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii* : Isolation and structural elucidation. *J. Nat. Prod.* 55, 88-92, 1992.
27. Chen, K., Shi, Q., Fujioka, T., Nakano, T., Hu, C. Q., Jin, J. Q., Kilkuskie, R. E. and Lee, K. H. Anti-AIDS agents XIX. Neotripterifordin, a novel anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii* : Isolation and structure elucidation. *Bioorg. Med. Chem.* 3, 1345-1348, 1995.

28. Corey, E. J. and Liu, K. Enantioselective total synthesis of the potent anti-HIV agent neotripterifordin. Reassignment of stereochemistry at C(16). *J. Am. Chem. Soc.* 119, 9929-9930, 1997.
29. Chen, K., Shi, Q., Kashiwada, Y., Zhang, D.-C., Hu C.-Q., Jin, J.-Q., Nozaki, H., Kilkuskie, R., Tramontano, E., Cheng, Y.-C., McPhail, D. R., McPhail, A. T. and Lee, K.-H. Anti-AIDS agents, 6. Salaspermic acid, an anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii*, and the structure-activity correlation with its related compounds. *J. Nat. Prod.* 55, 340-346, 1992.
30. Kuo, Y.-H. and Kuo, L.-M. Y. Antitumour and anti-AIDS triterpenes from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry* 44, 1275-1282, 1997.
31. Duan, H., Takaishi, Y., Bando, M., Kido, M., Imakura, Y. and Lee, K.-H. Novel seaquiterpene esters with alkaloid and monoterpene and related compounds from *Tripterygium hypoglaucum* : A new class of potent anti-HIV agents. *Tetrahedron Letters* 40, 2969-2972, 1999.
32. Duan, H., Takaishi, Y., Imakura, Y., Jia, Y., Li, D., Cosentino, L. M. and Lee, K.-H. Sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium hypoglaucum* and *Tripterygium wilfordii* : A new class of potent anti-HIV agents. *J. Nat. Prod.* 63, 357-361, 2000.
33. Abou-Karam, M. and Shier, W. T. A simple plaque reduction assay for antiviral agents from plants. Demonstration of frequent occurrence of antiviral activity in high plants. *J. Nat. Prod.* 53, 340-344, 1990.
34. De Sousa, J. R., Pinheiro, J. A., Ribeiro, E. F., de Souza, E., Maia, J. G. S. A sesquiterpene evoninoate alkaloid from *Maytenus quianensis*. *Phytochemistry* 25, 1776-1778, 1986.
35. De Sousa, J. R., Silva, G. D. F., Pedersoli, J. L., Alves, R. J. Friedelane and oleanane triterpenoids from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *Phytochemistry* 29, 3259-3261, 1990.
36. Cai, Y., Chen, Z. P., Phillipson, J. D. Diterpenes from *Croton lechleri*. *Phytochemistry* 32, 755-760, 1993.
37. Balde, A. M., Apers, S., de Bruyne, T. E., van den Heuvel, H., Claeys, M., Vlietinck, A. J., Pieters, L. A. C. Steroids from *Harrisonia abyssinica*. *Planta Medica* 66, 67 – 69, 2000.
38. Shiota, O., Morita, H., Takeya, K. and Itokawa, H. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. *J. Nat. Prod.* 57, 1675-1681, 1994.
39. Rubinstein, I., Goad, L. J., Clague, D. H. and Mulheim, L. J. The 220 MHz NMR spectra of phytosterols. *Phytochemistry* 15, 195-200, 1976.
40. Dutta, P. C. and Appelqvist, L. A. Studies on phytosterol oxides. 1. Effect of storage on the content in potato chips prepared in different vegetable oils. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 74, 647-657, 1997.
41. Dutta, P. C. Studies on phytosterol oxides. 2. Content in some vegetable oils and in french fried prepared in these oils. . *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 74, 659-666, 1997.
42. Nourooz-Zadeh, J. and Appelqvist, L. A. Isolation and quantitative determination of sterol oxides in plant-based foods : Soybean oil and wheat flour. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 69, 288-293, 1992.

43. Gunanherath, G. M. K. B. and Gunatilaka, A. A. L. Studied on terpenoids and steroids. Part 3. Structure and synthesis of a new phenolic D:A-friedo-24-noroleanane triterpenoid, zeyasterone, from *Kokoona zeylanica*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2845-2850, 1983.
44. Gamiath, C. A. and Gunatilaka, A. A. L. Studies on terpenoids and steroids. Part 14. Two phenolic friedo-23,24-dinoroleanane triterpenoids from *Kokoona zeylanica*. *Phytochemistry* 27, 3221-3224, 1988.
45. Nakanishi, K., Takahashi, Y. and Budzikiewicz, H. Pristimerin. Spectroscopic properties of the dienone-phenol-type rearrange products and other derivatives. *J. Org. Chem.* 30, 1725-1733, 1965.
46. Gamiath, C. B., Gunanherath, K. B. and Gunatilaka, A. A. L. Studies on terpenoids and steroids. Part 10. Structures of four new natural phenolic D:A-friedo-24-noroleanane triterpenoids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2849-2854, 1987.
47. Chu, C. K. and Cutler, H. G. (editors). *Natural Products as Antiviral agents*. Plenum Press, New York, 1992.
48. Sotaphun, U. Bioactive compounds from *Glyptocarpum sphaerocarpum* stem bark. *Ph.D. Dissertation (Pharmaceutical chemistry and natural products)*. Chulalongkorn University, 1996.

Output จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

อยู่ระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับ

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การวิจัยนี้ก่อให้เกิดการพัฒนาห้องปฏิบัติการ เคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ขึ้น ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เพื่อใช้เป็นแหล่งการสร้างนักวิจัยในระดับปริญญาบัณฑิตและบัณฑิตศึกษา และเกิดการสร้างความร่วมมือทางวิชาการกับคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. อื่นๆ

ผลงานวิจัย ได้มีการนำไปเสนอในที่ประชุมวิชาการ ในรูปแบบโปสเตอร์ คือ

Sotanaphun, U., Lipipun, V. and Bavovada, R. Phenolic-(9→8)-D:A-Friedo-24-noroleananes : A new class of antiviral agents. *Pharma Indochina II*, Hanoi, Vietnam, 20-23 October, 2001.

ภาคผนวก

PHARMA INDOCHINA II, 20-23 October 2001, Hanoi-Vietnam

PHENOLIC-(9→8)-D:A-FRIEDO-24-NOROLEANANES: A NEW CLASS OF ANTIVIRAL AGENTS.

*Uthai Sotanophun*¹, *Vimolmus Lipipun*² and *Rapepol Bavovada*²

¹ Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakorn-Pathom, Thailand

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

ABSTRACT

Antiviral activity of chemical constituents from *Glyptopetalum sclerocarpum* Laws (Celastraceae) were evaluated by a plaque reduction assay. Three compounds with a phenolic-(9→8)-D:A-friedo-24-noroleanane skeleton: isotingenone III **1a**, 22β-hydroxy-isotingenone III **2a** and 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone III **3a**, displayed activities against herpes simplex type 1 (ED₅₀ 3, 5 and 2 μg/ml, respectively) and herpes simplex type 2 (ED₅₀ 4, 6 and 2 μg/ml, respectively). These compounds were semi-synthesized from tingenone **1b**, 22β-hydroxy-tingenone **2b** and 20-hydroxy-20-*epi*-tingenone **3b**, respectively.

KEYWORDS: phenolic-(9→8)-D:A-friedo-24-noroleanane, antiviral activity, *Glyptopetalum sclerocarpum*

INTRODUCTION

Antiviral activity is one of several interesting biological activities attributed to chemical constituents from plants belonging to the family Celastraceae. Some of them were salaspermic acid [1], tripterifordin [2], neotripterifordin [3] and triptofordin C-2 [4], for example. We ever reported an anti-HSV compound, sclerocarpic acid, isolated from *Glyptopetalum sclerocarpum* Laws. [5]. In this continuing investigation, three phenolic-(9→8)-D:A-friedo-24-noroleananes: isotingenone III **1a**, 22β-hydroxy-isotingenone III **2a** and 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone III **3a**, were prepared from tingenone derivative (**1b-3b**) [6]. Their anti-HSV activities were preliminarily evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Semisynthesis of isotingenone III **1a, 22β-hydroxy-isotingenone III **2a** and 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone III **3a****

Isotingenone III **1a**, 22β-hydroxy-isotingenone III **2a** and 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone III **3a** were prepared as previously described [6]. Briefly, tingenone **1b**, 22β-hydroxy-tingenone **2b** and 20-hydroxy-20-*epi*-tingenone **3b** were obtained from the stem bark of *Glyptopetalum sclerocarpum* [7]. Dissolved each of them in 1% hydrochloric acid in methanol and left at 28-30°C for 1 hour. Then the solution was diluted with water and extracted with ethyl acetate. Ethyl acetate extract was subjected to a silica gel column chromatography eluted with *n*-hexane:diethyl ether (1:1) to obtain compound **1a-3a** from **1b-3b**, respectively.

Physical and spectroscopic data of **1a-3a** were consistent with those reported [6-8].

Antiviral assay

Plaque reduction assay [5] was used for testing antiviral activities against herpes simplex type 1 (KOS) and herpes simplex type 2 (Baylor 186). Dilution in 10% dimethyl sulfoxide in complete medium of test substance was mixed with an equal volume (25 μl) of viral solution (30 PFU/25 μl). The mixture was incubated at 28-30 °C for 1 hour before 50 μl of Vero cells suspension (6x10⁵ cells/ml) were added and further incubated at 37°C in 5% CO₂ humidified incubator for another 3 hours. Then, 75 μl of 1% tragacanth in complete medium was overlaid and incubated for 2-3 days. The concentration that produced 50% inhibition of plaque formation was determined. Acyclovir was used as positive control.

Cytotoxicity was evaluated by mixing 25 μl of dilution of test compound with 75 μl of Vero cells suspension. The mixture was incubated at 37°C in 5% CO₂ humidified incubator for 2-3 days.

RESULTS AND DISCUSSION

Based on mechanism proposed in literature [9-10], compounds **1a-3a** were prepared from compounds **1b-3b** under acidic condition (Figure 1). By comparing their physical and spectroscopic properties with those reported [7-8], **1a-3a** were identified as isotingenone III **1a**, 22β-hydroxy-isotingenone III **2a** and 20-hydroxy-20-*epi*-isotingenone III **3a**, respectively.

PHARMA INDOCHINA II, 20-23 October 2001, Hanoi-Vietnam

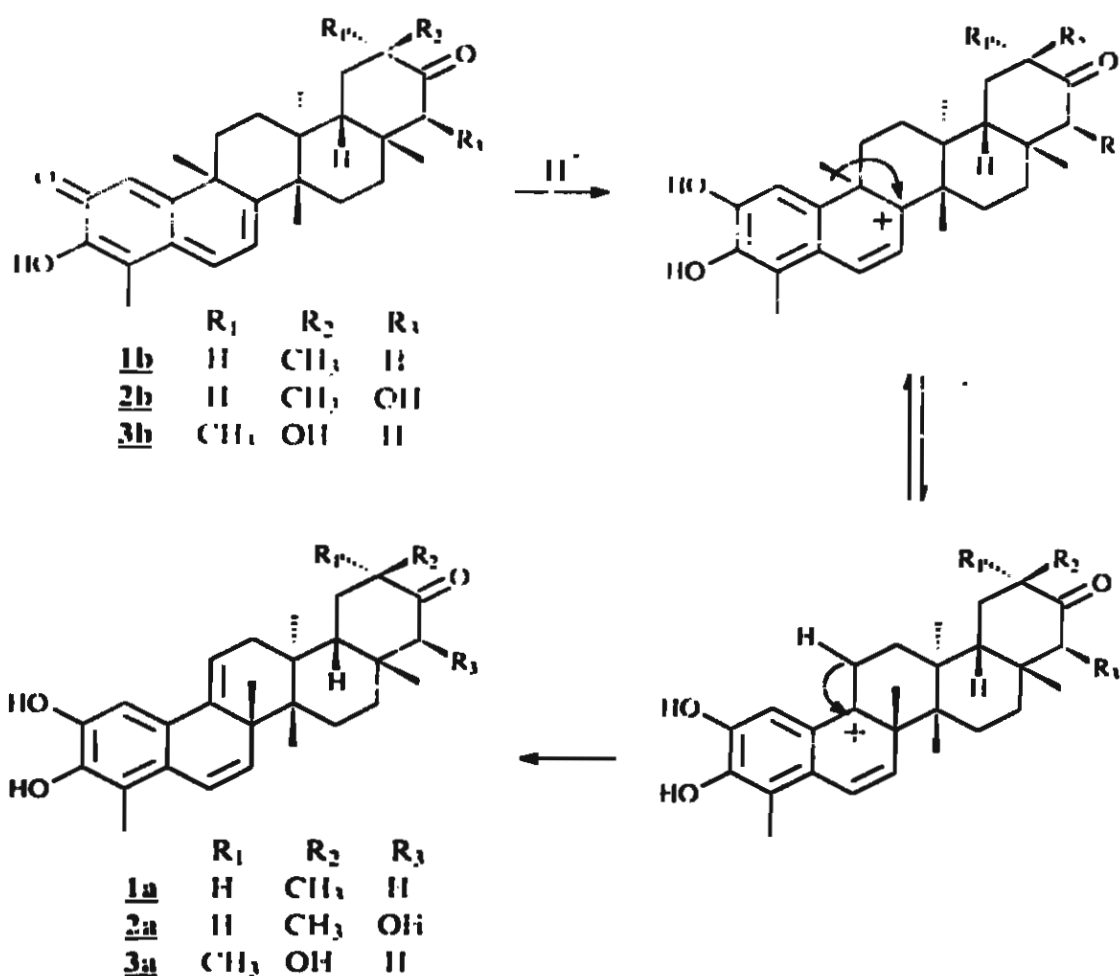


Figure 1 - Semisynthetic mechanism of **1a-3a** from **1b-3b** based on literature [9-10].

Compounds **1a-3a** displayed antiviral activities against HSV-1 and HSV-2 (Table 1). At 20 $\mu\text{g/ml}$, nearly all viral were inhibited, whereas they did not cause toxic activity to Vero cells. But when concentration was increase to 50 $\mu\text{g/ml}$, 100% of cytotoxicity was detected (Figure 2). The divinyl-phenolic moiety of the structures, especially the phenolic groups like that found in some antiviral flavonoids and hydrolysable tannins [11], may be importance for the activity. However, more study on structure-activity relationship of this compound group should be continued, at least, to improve their selectivity.

Table 1- Antiviral activities and cytotoxicity of **1a-3a**.

	Antiviral activity (ED ₅₀ , $\mu\text{g/ml}$)		Cytotoxicity (IC ₅₀ , $\mu\text{g/ml}$)
	HSV-1	HSV-2	
Isotingenone III 1a	3	4	35
22 β -Hydroxy-isotingenone III 2a	5	6	35
20-Hydroxy-20- <i>epi</i> -isotingenone III 3a	2	2	35
Acyclovir	0.06	0.5	>50

In previous report [6], we found that compounds **1a-3a** were non-active against bacteria and fungi, while their parents **1b-3b** displayed potent activities. Antiviral test of **1b-3b** was impossible owing to their strong cytotoxicity. It was interesting that after structure of quinone-methide triterpenes (**1b-3b**) were rearranged to phenolic-(9 $\rightarrow$ 8)-D:A-*friedo*-24-noroleananes (**1a-3a**), the antibacterial and antifungal activities were substituted with the antiviral activity.

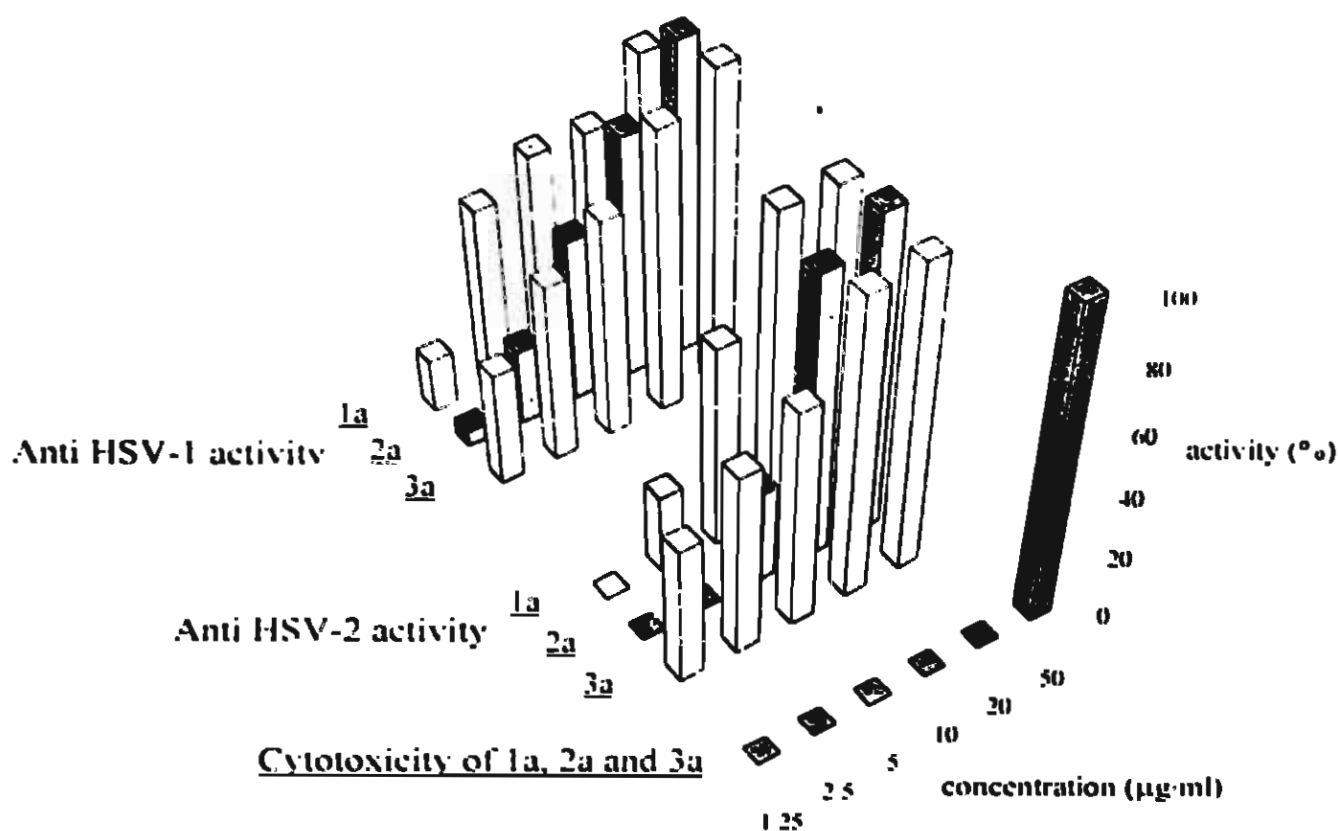


Figure 2 - Antiviral activities and cytotoxicity of 1a-3a.

ACKNOWLEDGEMENT

We gratefully acknowledge Thailand Research Fund for the financial support.

REFERENCE

1. Chen, K., Shi, Q., Kashwada, Y., Zhang, D.-C., Hu, C.-Q., Jin, J.-Q., Nozaki, H., Kilkuskie, R., Tramontano, E., Cheng, Y.-C., McPhail, D. R., McPhail, A. T. and Lee, K.-H. *J Nat Prod* 55 (1992): 340-346.
2. Chen, K., Shi, Q., Fujioka, T., Zhang, D.-C., Hu, C.-Q., Kilkuskie, R. E., Lee, K.-H. *J Nat Prod* 55 (1992): 88-92.
3. Chen, K., Shi, Q., Fujioka, T., Nakano, T., Hu, C.-Q., Jin, J.-Q., Kilkuskie, R. E. and Lee, K. H. *Bioorg Med Chem* 3 (1995): 1345-1348.
4. Hayashi, K., Hayashi, T., Ujita, K. and Fukaishi, Y. *J Antimicrob Chemother* 37 (1996): 759-768.
5. Sotanaphun, U., Lipipun, V., Suttisri, R. and Bayovada, R. *Planta Medica* 65 (1999): 257-258.
6. Sotanaphun, U., Lipipun, V., Suttisri, R. and Bayovada, R. *Planta Medica* 65 (1999): 450-452.
7. Sotanaphun, U., Suttisri, R., Lipipun, V. and Bayovada, R. *Phytochemistry* 49 (1998): 1749-1755.
8. Itokawa, H., Shiota, O., Ikuta, H., Marita, H., Takeya, H. and Inaka, Y. *Phytochemistry* 30 (1991): 3713-3716.
9. Delle Monache, F., Marini-Bettolo, G. B., Pomponi, M., de Mello, J. F., Goncalves de Lima, O., Thomson, R. H. *J Chem Soc., Perkin Trans I* (1979): 3127-3131.
10. Gamlath, C. B., Gunaherath, K. B., Gunatilaka, A. A. L. *J Chem Soc., Perkin Trans I* (1987): 2849-2854.
11. Chu, C. K. and Cutler, H. G. (editors). *Natural Products as Antiviral agents*. Plenum Press, New York, 1992.