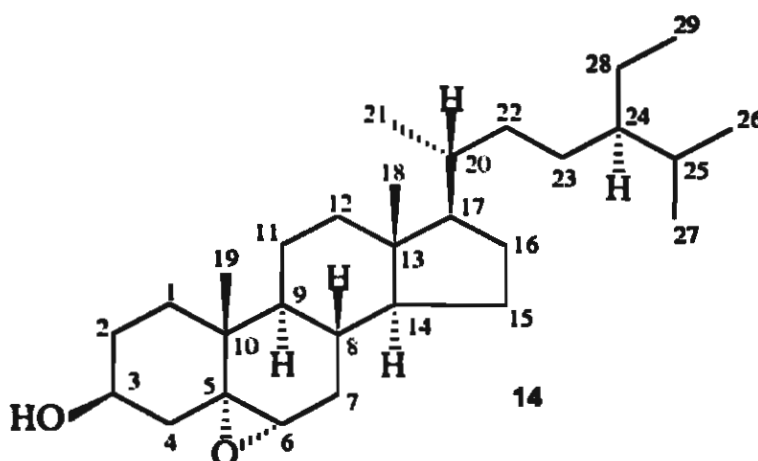


ตารางที่ 7 (ต่อ)

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 จุติหลอมเหลว สูงกว่า 300°C (decompose) ค่า $[\alpha]_D -1.3^\circ$ (c 0.24, MeOH) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

IR ν_{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)

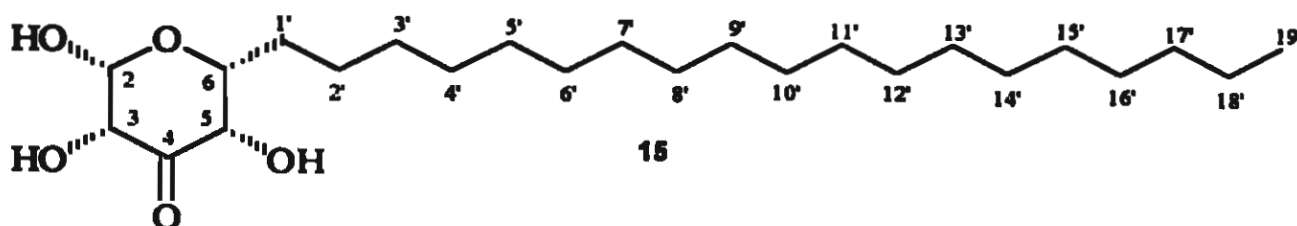
2*R**,3*R**,5*S**-Trihydroxy-6*R**-nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15) มีลักษณะเป็นผงสีขาว (CHCl₃+MeOH) ไม่ดูดกลืนแสงในช่วง UV จุดหลอมเหลว 118-120°C ค่า $[\alpha]_D^{25} +15^\circ$ (c 0.04, CHCl₃+MeOH (1:1)) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

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

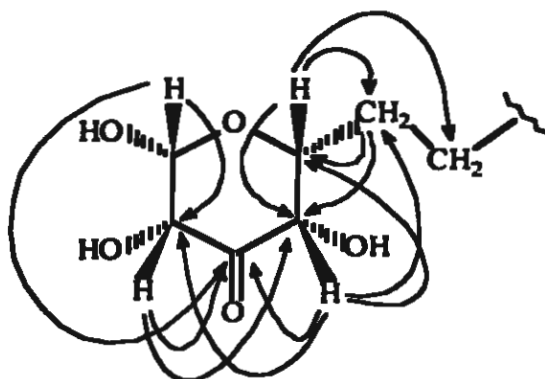
EIMS 70 eV, *m/z* (rel. int.) : 414 [M]⁺ (8), 385 (4), 368 (10), 284 (23), 256 (100)

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 $2R^*,3R^*,5S^*$ -trihydroxy- $6R^*$ -nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ยังไม่เคยมีรายงานการพบมาก่อน

ตารางที่ 9 ^1H และ ^{13}C NMR assignments รวมทั้ง HMBC และ NOE correlations ของสาร $2R^*,3R^*,5S^*$ -trihydroxy- $6R^*$ -nonadecyl-tetrahydro-pyran-4-one (15) (Chemical shifts รายงานเป็นค่า ppm ใน $\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$)

ตำแหน่ง	^{13}C	^1H	HMBC (^{13}C)	NOESY
2	70.8	5.44 (<i>d</i> , $J = 5.5$ Hz)	4	3, 6
3	69.3	5.11 (<i>d</i> , $J = 5.5$ Hz)	4, 5	2, 5
4	178.1			
5	89.6	4.84 (<i>d</i> , $J = 3.4$ Hz)	3, 4, 6, 1'	3, 6
6	70.7	4.17 (<i>td</i> , $J = 8.8, 3.4$ 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> , $J = 7$ Hz)	17', 18'	

2.8) 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)

6 β -(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

6 β -(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

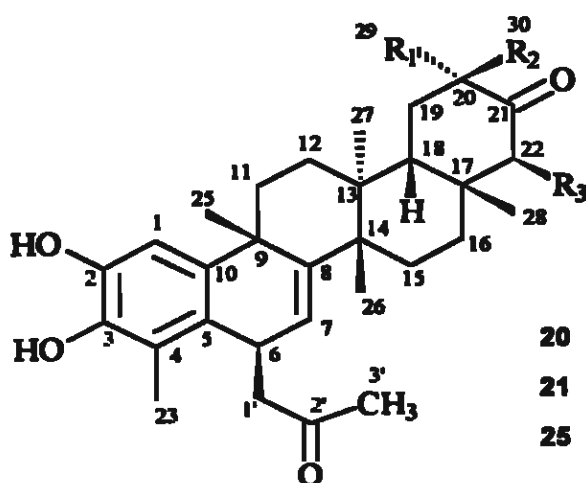
6 β -(2'-Oxo-propyl)-20-hydroxy-20-*epi*-tingenol (25) มีลักษณะเป็น lacquer สีเหลืองอ่อน (EtOAc) ค่า $[\alpha]_D -8^\circ$ (c 0.15, MeOH) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

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		

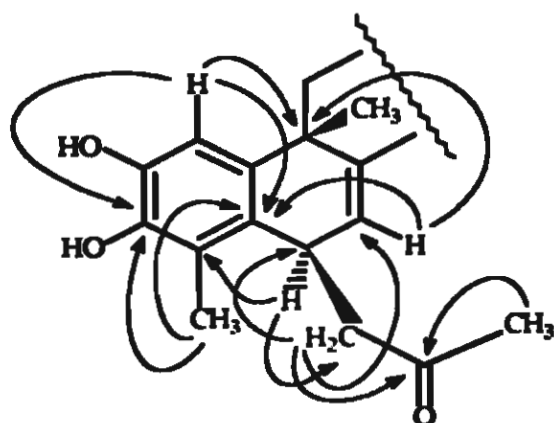
ตารางที่ 12 (ต่อ)

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

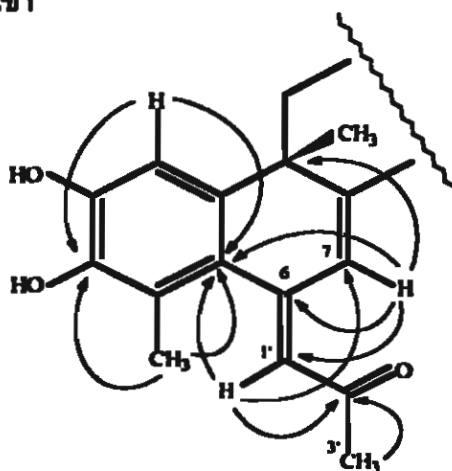
UV λ_{max} (MeOH), nm (log ϵ) : 216 (3.96), 268 (3.44), 322 (3.75), 366 (3.65)

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)

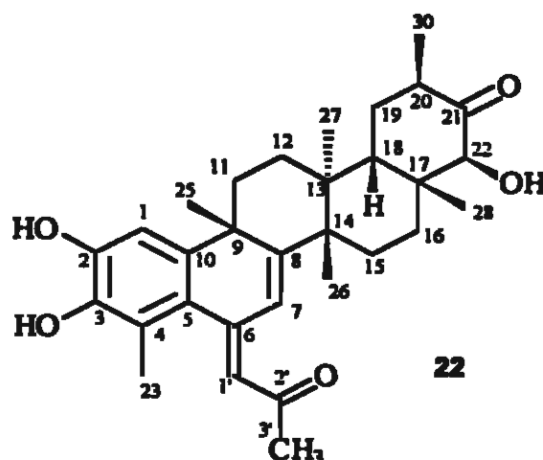
NMR ดูตารางที่ 13

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 อาจสลับกัน2.10) 20-Hydroxy-20-*epi*-Isotingenone IV (23)

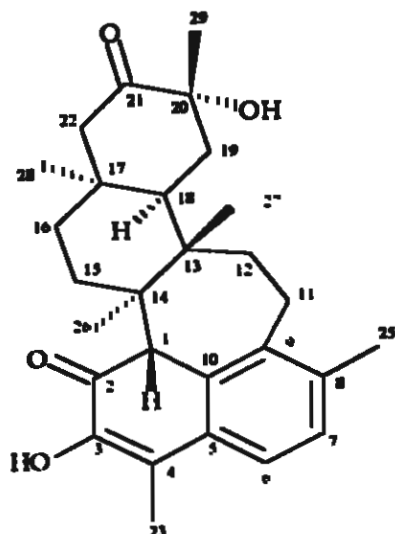
20-Hydroxy-20-*epi*-Isotingenone IV (23) มีลักษณะเป็น Isocouper ที่เหลืองอ่อน (EtOAc) ค่า $[\alpha]_D -176^\circ$ (c 0.15, MeOH) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

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

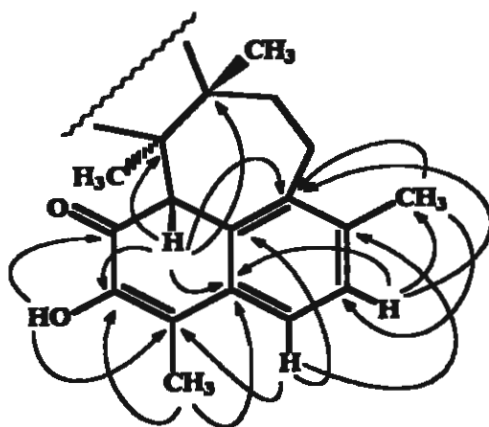
EIMS 70 eV, m/z (rel. int.) : 436 $[\text{M}]^+$ (197), 418 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (3), 256 (3), 241 (10), 215 (19), 202 (16), 201 (100), 200 (6)

NMR ดูตารางที่ 14



23

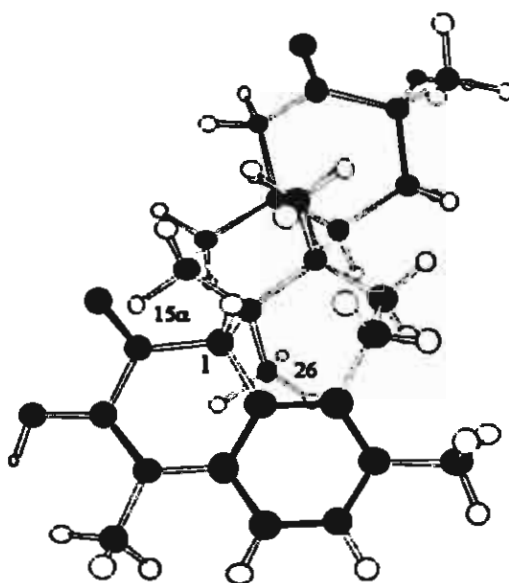
จากข้อมูล MS สารนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 436 a.m.u. จาก ^{13}C NMR และ DEPT spectra จึงสรุปสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_4$ ^{13}C NMR spectrum แสดงสัญญาณของ carbonyl carbon 2 สัญญาณ คือที่ 215.2 และ 197.1 ppm ซึ่งสอดคล้องกับ carbonyl carbons ที่ตำแหน่ง 20 และ 2 ของอนุพันธ์ tingenone 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)

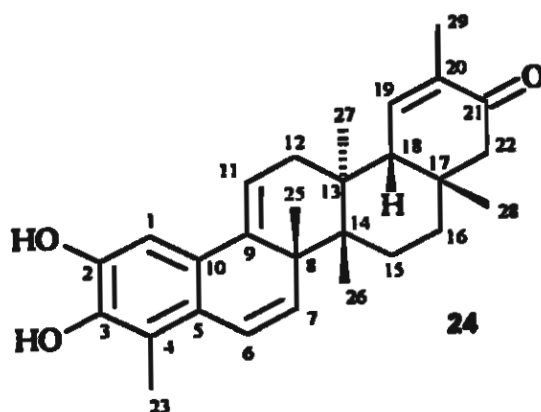
19,20-Didehydro-isotingenone III (24) มีลักษณะเป็น lacquer สีเหลืองอ่อน (EtOAc) ค่า $[\alpha]_D -87^\circ$ (c 0.1, MeOH) มีข้อมูลทาง spectroscopy ดังนี้

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)

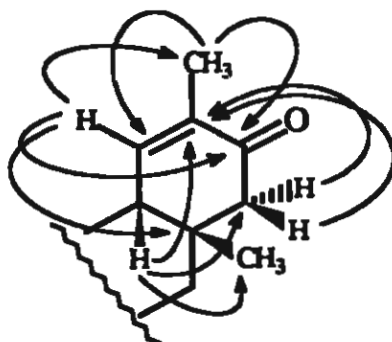
NMR ดูตารางที่ 15



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

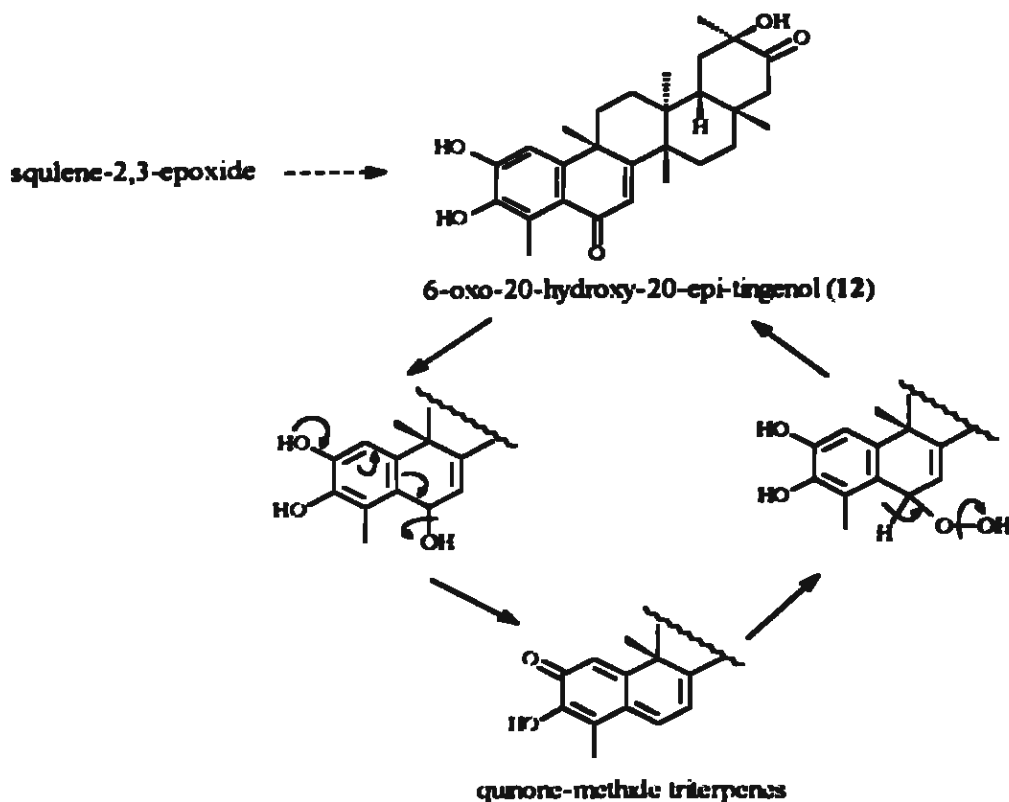
งานวิจัยนี้สามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากเปลือกผลทุ้มกาแดงทั้งสิ้น 12 ชนิด จำแนกสารเหล่านี้เป็นกลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี ดังนี้

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)

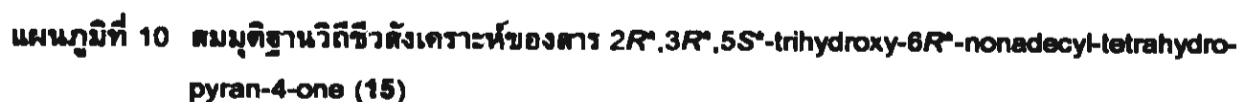
สาร 12 และ 15 เป็นสารโครงสร้างใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน

2. การสันนิษฐานวิถีชีวสังเคราะห์

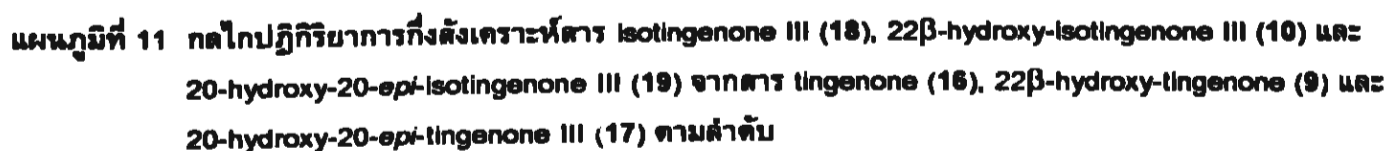
สาร 12 มีโครงสร้างหลัก 6-oxo-phenolic-D:A-*friedo*-24-noroleananes คาดว่าเป็น intermediate ของการชีวสังเคราะห์ของสารโครงสร้างหลัก quinone-methide triterpenes⁴³ หรืออาจมีชีวสังเคราะห์มาจากสารโครงสร้างหลัก quinone-methide triterpenes⁴³⁻⁴⁴ ดังแสดงในแผนภูมิที่ 9 ส่วนสาร 15 คาดว่ามีวิถีชีวสังเคราะห์ทาง acetate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



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

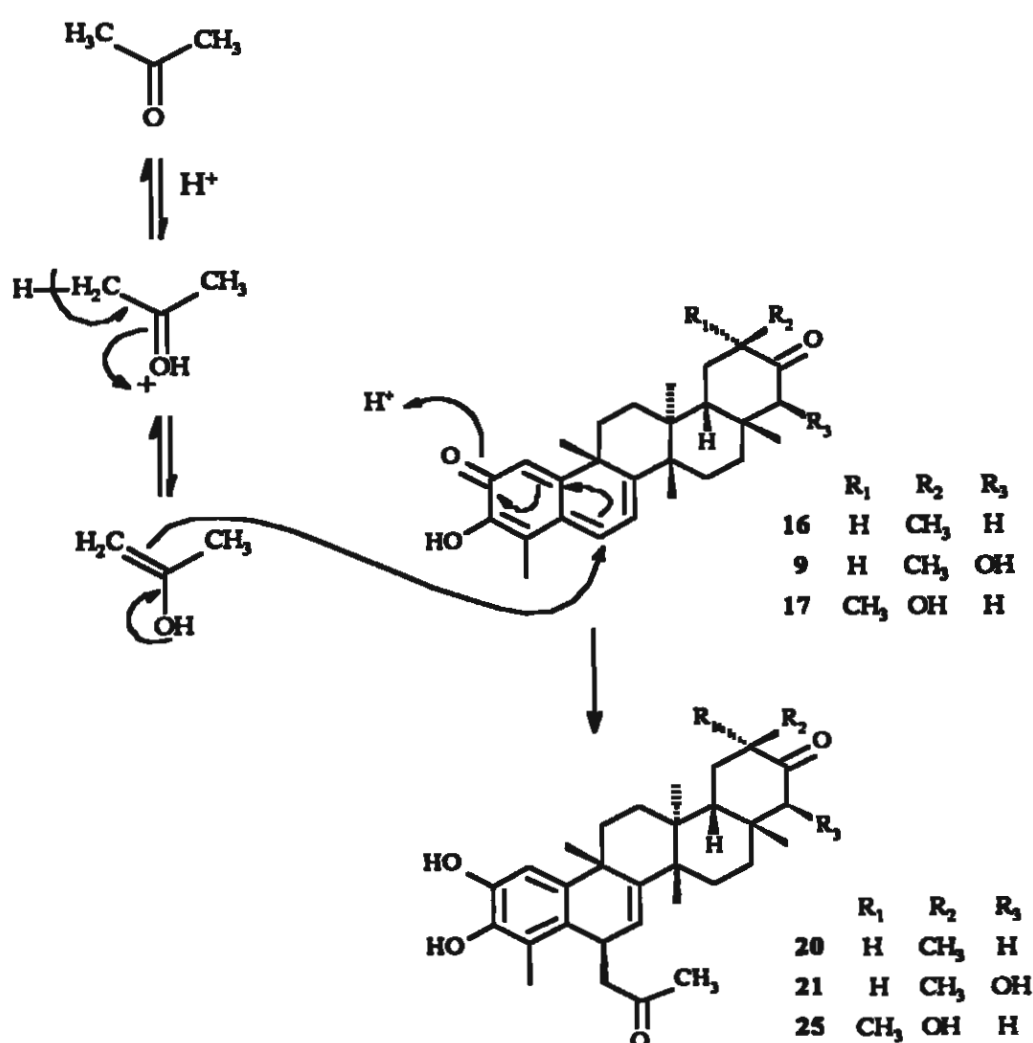


การวิจัยนี้พบว่าสาร 22 β -hydroxy-isotingenone III (10) แสดงฤทธิ์ต้านไวรัสริบ และมีความ selectivity Index ที่น่าสนใจ จึงได้เตรียมอนุพันธ์ของสารนี้อีก 2 ชนิด รวมทั้งเตรียมสารนี้เพิ่ม โดยใช้วิธีกิ่งดังเคราะห์จากสารตั้งต้นที่สกัดแยกได้จากส่วนเปลือกต้นของพืชนี้¹¹ ได้แก่สาร tingenone (16), 22 β -hydroxy-tingenone (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



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

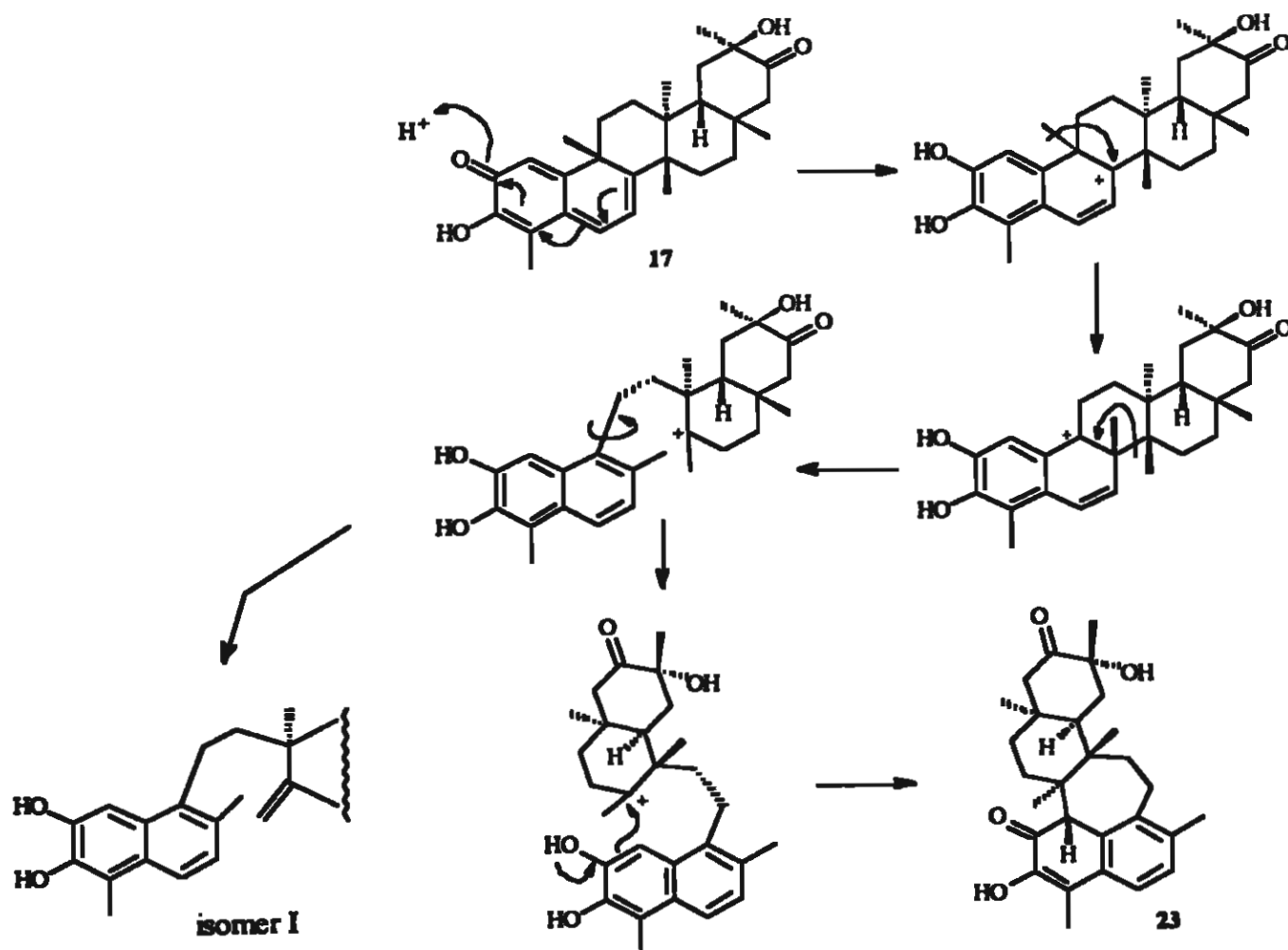
กลไกการกึ่งสังเคราะห์ของสาร 20, 21 และ 25 คาดว่าเกิดจากการป้อนเบื้อนของ acetone ใน methanol ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย ซึ่งพิสูจน์ได้จากการเปลี่ยนตัวทำละลาย โดยเมื่อใช้ acetone แทน methanol จะพบสารเหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์หลัก เมื่อ acetone ทำปฏิกิริยากับกรด จะเกิดปฏิกิริยา enolization อยู่ในรูป enol ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น 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 buehnanii*. *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 euoninoate 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 sesquiterpene 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

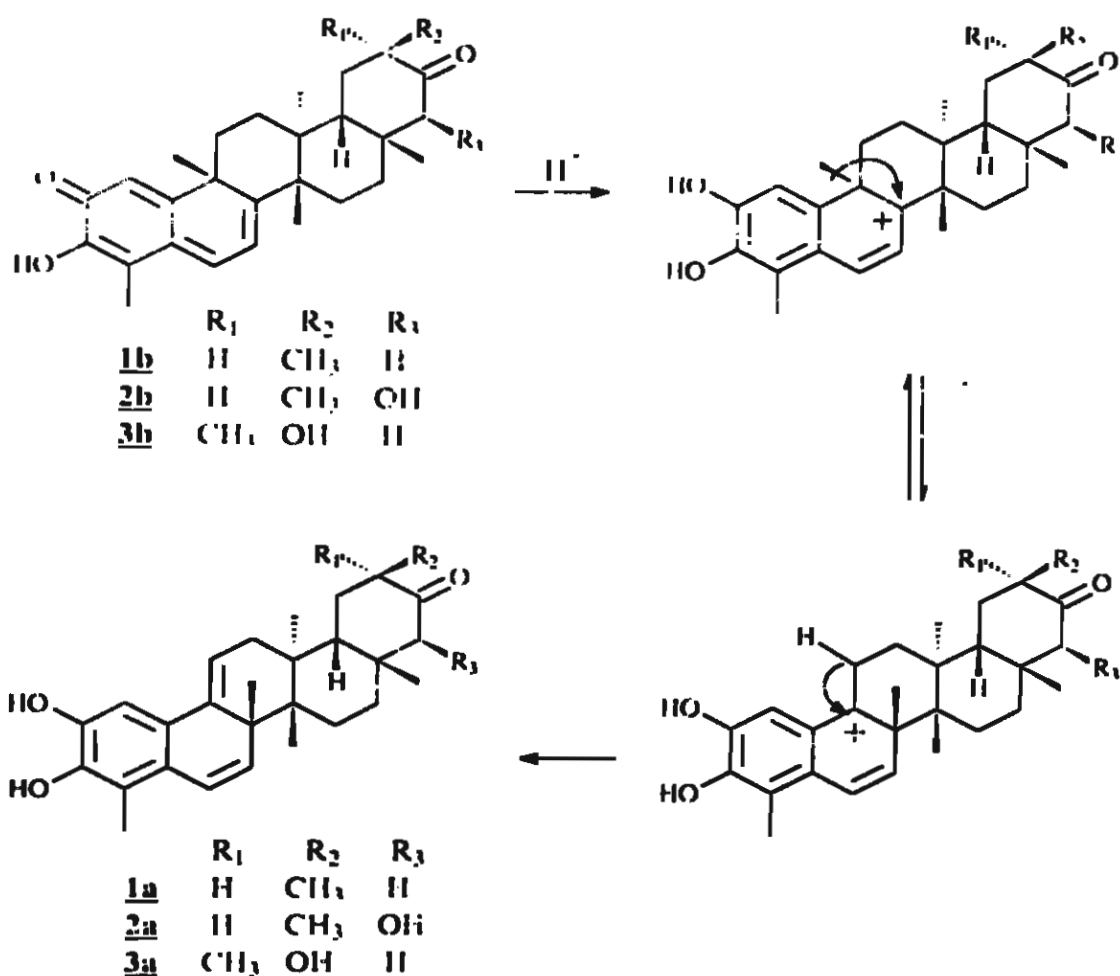


Figure 1 - Semisynthetic mechanism of **1a-3a** from **1b-3b** based on literature [9-10].

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.

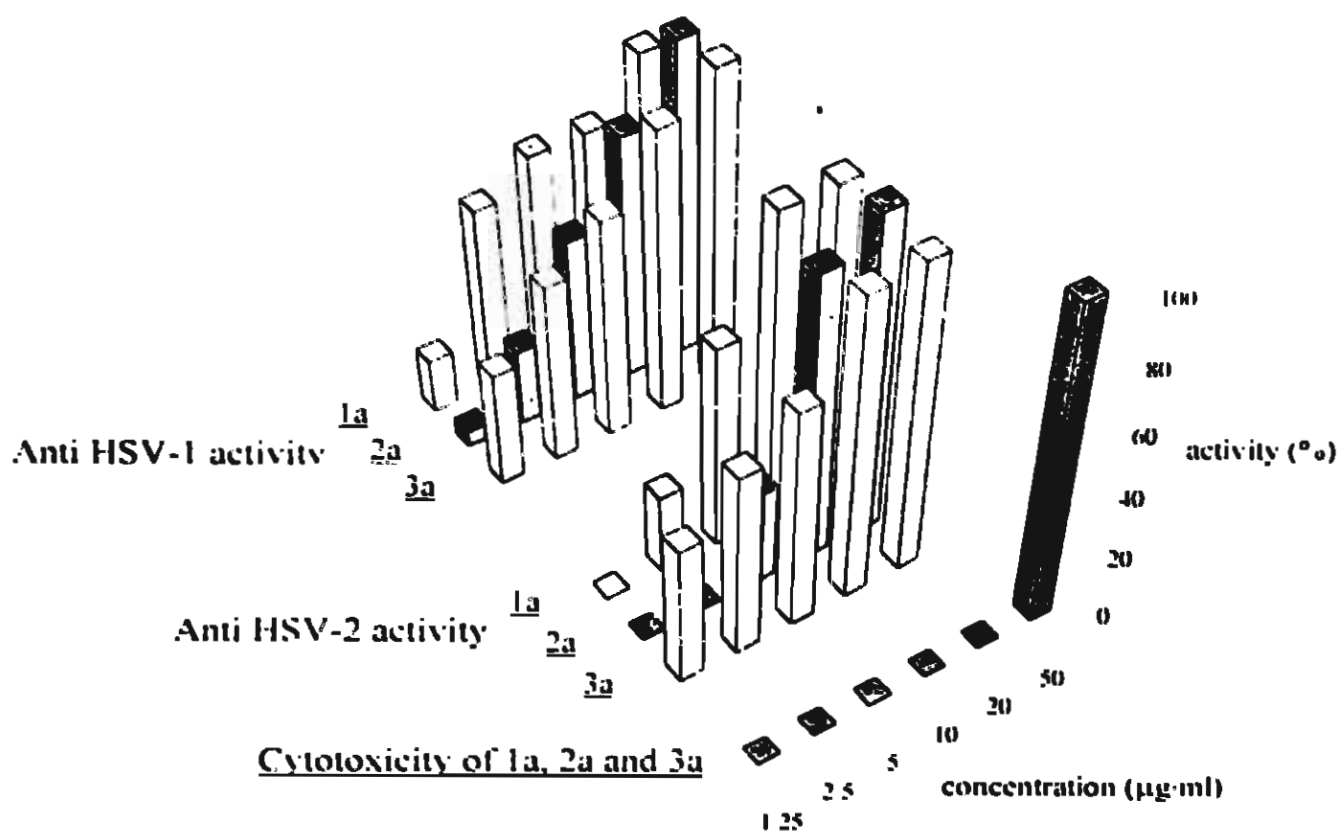


Figure 2 - Antiviral activities and cytotoxicity of 1a-3a.

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 Takaishi, 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. Gamliath, 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.