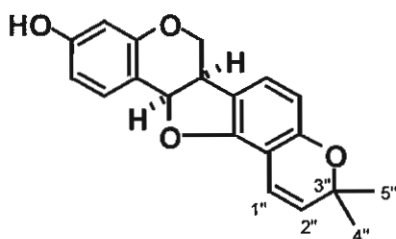


3.2.7(12)

แตกต่างคือสัญญาณของ aromatic proton ใน ring A ซึ่งปรากฏในลักษณะ AMX system และไม่พบสัญญาณของหมู่ prenyl

จากการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR ของสาร 3.2.7(19) และจากการเปรียบเทียบกับข้อมูล NMR ที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.7[31]} คาดว่าสาร 3.2.7(19) คือ phaseollin



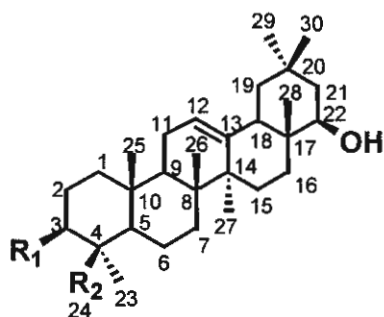
3.2.7(19)

16. Sophoradiol [3.2.7(20)]

สาร 3.2.7(20) เป็นของแข็งสีขาว ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของ tertiary methyl 8 หมู่ที่ δ 0.77, 0.85, 0.89, 0.92, 0.95, 0.97, 1.02 และ 1.10 สัญญาณของ carbiny proton 2 โปรตอนตำแหน่ง 3 และ 22 ปรากฏในลักษณะ doublet of doublet ที่ δ 3.19 ($J = 10.8, 4.8$ Hz) และ triplet ที่ δ 3.41 ($J = 5.2$ Hz) ตามลำดับ และสัญญาณของ olefinic proton ที่ตำแหน่ง 12 ปรากฏในลักษณะ triplet ที่ δ 5.23 ($J = 3.4$ Hz) ส่วน EIMS สเปกตรัมแสดงพีค molecular ion ที่ m/z 442

การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.2.7(20) ได้จากการวิเคราะห์ 1D และ 2D NMR และ EIMS และจากการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.7[32,33]} จึงคาดว่าสาร 3.2.7(20) คือ sophoradiol

3.2.7(13)



3.2.7(20) $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{CH}_3$

3.2.7(21) $R_1 = \text{O}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$

3.2.7(22) $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$

17. Melilotigenin C [3.2.7(21)]

สาร 3.2.7(21) เป็นของแข็งสีขาว ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของ tertiary methyl 7 หมู่ที่ δ 0.86, 0.90, 0.976, 0.980, 1.02, 1.11 และ 1.26 สัญญาณของ carbonyl proton ที่ตำแหน่ง 22 ปรากฏในลักษณะ triplet ที่ δ 3.43 ($J = 5.2$ Hz) สัญญาณของหมู่ hydroxymethylene ปรากฏในลักษณะ doublet 2 ชุดที่ δ 3.46 ($J = 11.2$ Hz) และ 3.96 ($J = 11.2$ Hz) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ olefinic proton ที่ตำแหน่ง 12 ปรากฏในลักษณะ triplet ที่ δ 5.26 ($J = 3.4$ Hz) ^{13}C NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่ง 3 ที่ δ 220.9 ส่วน EIMS สเปกตรัมแสดงพิกัด molecular ion ที่ m/z 456

จากการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR และ EIMS ของสาร 3.2.7(21) และจากการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.7[34]} คาดว่าสาร 3.2.7(21) คือ melilotigenin C

18. Soyasapogenol B [3.2.7(22)]

สาร 3.2.7(22) เป็นของแข็งสีขาว ^1H และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร 3.2.7(22) จะคล้ายคลึงกับ ^1H และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร 3.2.7(21) จุดที่แตกต่างคือตำแหน่งที่ 3 ของสาร 3.2.7(22) เป็นหมู่ไฮดรอกซิล ขณะที่ตำแหน่งที่ 3 ของสาร

3.2.7(14)

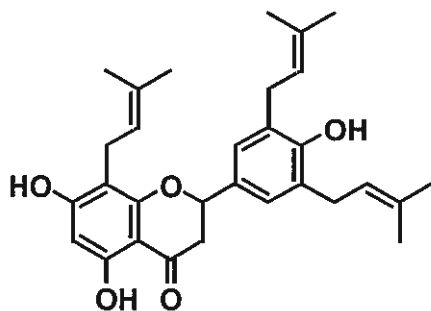
3.2.7(21) เป็นหมู่คาร์บอนิล ส่วน EIMS สเปกตรัมแสดงพีค molecular ion ที่ m/z 458

จากการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR และ EIMS ของสาร 3.2.7(22) และจากการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.7[33,35,36]} คาดว่าสาร 3.2.7(22) คือ soyasapogenol B

19. 5-Hydroxysophoranone [3.2.7(23)]

สาร 3.2.7(23) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ flavanone ประกอบด้วยสัญญาณ doublet of doublet 1 ชุดของ H-2 ที่ δ 5.27 ($J = 13.0, 2.8$ Hz) และสัญญาณ doublet of doublet อีก 2 ชุดของ H-3 ที่ δ 2.77 (1H, $J = 17.1, 2.8$ Hz) และ δ 3.03 (1H, $J = 17.1, 13.0$ Hz) สัญญาณของ aromatic proton ใน ring A และ B ปรากฏในลักษณะ singlet 2 ชุดที่ δ 5.99 (1H) และ 7.03 (2H) ตามลำดับ สัญญาณที่เหลือใน ^1H NMR สเปกตรัมคือสัญญาณของหมู่ prenyl 3 หมู่ที่ตำแหน่ง C-8, C-3' และ C-5' และสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ที่ตำแหน่ง C-5, C-7 และ C-4' สัญญาณของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-5 ปรากฏในลักษณะ broad singlet ที่ δ 12.00 เป็นผลมาจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิล การยืนยันตำแหน่งของหมู่ prenyl 3 หมู่และหมู่ไฮดรอกซิลที่เหลืออีก 2 หมู่ได้มาจาก HMBC, NOESY และ NOE difference สเปกตรัม

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR ของสาร 3.2.7(23) และจากการเปรียบเทียบกับข้อมูล NMR ที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.7[38,39]} คาดว่าสาร 3.2.7(23) คือ 5-hydroxysophoranone



3.2.7(23)

จากการนำสารบริสุทธิ์ 10 ชนิดที่แยกได้จากลำต้นของทองหลางป่ามาทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก 16 สายพันธุ์ ผลการทดสอบได้แสดงในตารางที่ 3.2.7 (8) พบว่า erybraedin A [3.2.7(3)] และ erythrabyssin II [3.2.7(4)] สามารถด้านการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptococcus* ได้ดีที่สุดโดยมีค่า MIC 0.78-1.56 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับสารที่มีฤทธิ์รองลงมาคือ erystagallin A [3.2.7(5)] และ erycristagallin [3.2.7(11)] ซึ่งมีค่า MIC 0.78-3.13 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนสารที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus* ซึ่งรวมถึงสายพันธุ์ที่ต้านยา (MRSA และ VRSA) ได้ดีที่สุดคือสาร 3.2.7(11) โดยมีค่า MIC 0.39-1.56 $\mu\text{g/ml}$ ลำดับรองลงมาคือสาร 3.2.7(4) (MIC 0.78-3.13 $\mu\text{g/ml}$) สาร 3.2.7(3) (MIC 0.78-6.25 $\mu\text{g/ml}$) และสาร 3.2.7(5) (MIC 0.78-12.5 $\mu\text{g/ml}$) นอกจากนี้ยังพบว่า erysubin F [3.2.7(10)] ซึ่งเป็นสารกลุ่ม isoflavone มีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptococcus* และ *Staphylococcus* ทั้งหมดที่นำมาทดสอบในระดับอ่อนที่สุด สารกลุ่ม flavanone 2 ชนิดได้แก่ glabrol [3.2.7(9)] และ 5-hydroxysophoranone [3.2.7(23)] และสารกลุ่ม pterocarpan 3 ชนิดได้แก่ eryvarin E [3.2.7(6)], erythrabyssin-1 [3.2.7(7)] และ eryvarin D [3.2.7(8)] มีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptococcus* และ *Staphylococcus* หลายสายพันธุ์ในระดับอ่อน จะเห็นว่าสารกลุ่ม pterocarpan ที่นำมาทดสอบทั้งหมดประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-3 หมู่ prenyl ที่ตำแหน่ง C-10 และหมู่ไฮดรอกซิลหรือหมู่ methoxyl ที่ตำแหน่ง C-9 ส่วนสารกลุ่ม flavanone และ isoflavone ที่นำมาทดสอบประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-7 และ C-4' และหมู่ prenyl ที่ตำแหน่ง C-8 และ C-3' อยู่ในโมเลกุล จากผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียแสดงว่าความแตกต่างในโครงสร้างหลักของสารที่ทดสอบ (ได้แก่ pterocarpan, flavanone, isoflavone) การมีหมู่แทนที่รวมถึงตำแหน่งของหมู่แทนที่มีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่าสารกลุ่ม pterocarpan ที่มีหมู่ prenyl ที่ตำแหน่ง C-2 หรือ C-4 และ C-10 มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-3 และ

3.2.7(16)

C-9 และ/หรือมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-6a จะเพิ่มฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรีย ในทางตรงกันข้ามพบว่าการแทนที่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-9 ด้วยหมู่ methoxyl จะลด ฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามพบว่าสารกลุ่ม flavanone ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล ที่ตำแหน่ง C-5 และมีหมู่แทนที่ใน ring B จำนวนมากอาจจะเพิ่มหรือลดฤทธิ์ด้านการเจริญ ของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบว่าเป็นสายพันธุ์ *Streptococcus* หรือ *Staphylococcus* ตามลำดับ สำหรับสาร 3.2.7(3), 3.2.7(4), 3.2.7(5), 3.2.7 (7), 3.2.7(10), 3.2.7(11) และ 3.2.7(19) ได้เคยมีผู้รายงานการทดสอบฤทธิ์ด้าน การเจริญของแบคทีเรียกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ^{3.2.7[2-4,40-43]} แต่ยังไม่เคยมีรายงานการ ทดสอบกับแบคทีเรีย 16 สายพันธุ์ในตารางที่ 3.2.7 (8) Sato และคณะ^{3.2.7[42]} ได้รายงาน ว่า erycristagallin [3.2.7(11)] มีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียดีที่สุดต่อสายพันธุ์ mutans streptococci, oral streptococci อื่นๆ, *Actinomyces* และ *Lactobacillus* โดยมีค่า MIC 1.56-6.25 µg/ml สารที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียรองลงมาคือ erystagallin A [3.2.7(5)] (MIC 3.13-12.5 µg/ml) ขณะที่ Tanaka และคณะ^{3.2.7[43]} พบว่าสารที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ MRSA ได้ดีที่สุดคือสาร 3.2.7 (11) (MIC 3.13-6.25 µg/ml)

จากผลการทดสอบข้างต้นสรุปได้ว่า erybraedin A [3.2.7(3)], erythrabysin II [3.2.7(4)], erystagallin A [3.2.7(5)] และ erycristagallin [3.2.7(11)] อาจจะไป ใช้เป็นสารต้านการเจริญของแบคทีเรียหลายสายพันธุ์โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ต้านยา MRSA และ VRSA ได้ เพราะสารเหล่านี้แสดงฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ใน ระดับดีกว่ายาปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ vancomycin และ oxacillin นอกจากนี้ยังพบว่าสาร 3.2.7(11) มีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ VRSA ทั้งหมดที่ใช้ทดสอบได้ดีที่ สุด (MIC 0.39-1.56 µg/ml) ทั้งๆที่ยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดที่ใช้ทดสอบไม่แสดงฤทธิ์ด้าน การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ VRSA

ตารางที่ 3.2.7(1) ข้อมูล ^1H NMR ของสาร 3.2.7(3)-3.2.7(8) และ 3.2.7(11) ใน CDCl_3 (400 MHz)

H	3.2.7(3)	3.2.7(4)	3.2.7(5)	3.2.7(6)	3.2.7(7)	3.2.7(8)	3.2.7(11)
1	7.27 d (8.4)	7.23 s	7.21 s	7.20 s	7.34 d (8.3)	7.33 d (8.2)	7.19 s
2	6.54 d (8.4)				6.52 dd (8.3, 2.2)	6.44 dd (8.2, 1.6)	
4		6.39 s	6.35 s	6.40 s	6.33 d (2.2)	6.41 d (1.6)	6.41 s
6	3.58 <i>r-like</i> (10.9) 4.27 dd (10.9, 5.0)	3.57 <i>t-like</i> (10.9) 4.18 dd (10.9, 4.9)	3.94 d (11.5) 4.16 d (11.5)	5.49 s	3.95 d (11.6) 4.17 d (11.6)	5.50 s	5.48 s
6a	3.48 m	3.47 m					
7	6.93 d (8.0)	6.93 d (8.0)	7.11 d (8.3)	7.07 d (8.4)	7.10 d (8.3)	7.06 d (8.4)	7.01 d (8.1)
8	6.35 d (8.0)	6.35 d (8.0)	6.46 d (8.3)	6.82 d (8.4)	6.46 d (8.3)	6.82 d (8.4)	6.75 d (8.1)
11a	5.46 d (6.7)	5.42 d (6.6)	5.21 s		5.21 s		
1'	3.39 d (7.0)	3.32 d (6.8)	3.31 d (7.3)	3.31 d (7.2)			3.31 d (7.3)
2'	5.22 t (7.0)	5.30 t (6.8)	5.30 t (7.3)	5.33 t (7.2)			5.32 t (7.3)
4'	1.79 s	1.774 s*	1.76 s	1.78 s			1.78 s
5'	1.71 s	1.766 s*	1.76 s	1.78 s			1.78 s
1''	3.35 d (7.0)	3.37 d (7.3)	3.24 d (7.2)	3.61 d (7.2)	3.23 d (7.0)	3.60 d (6.9)	3.68 d (7.3)
2''	5.28 t (7.0)	5.27 t (7.3)	5.18 t (7.2)	5.33 t (7.2)	5.17 t (7.0)	5.33 t (6.9)	5.37 t (7.3)
4''	1.79 s	1.78 s*	1.72 s	1.87 s	1.71 s	1.86 s	1.88 s
5''	1.72 s	1.73 s*	1.63 s	1.67 s	1.61 s	1.67 s	1.76 s
9-OMe			3.78 s	3.87 s	3.78 s	3.87 s	

* Assignments in same vertical column may be interchanged.

3.2.7(18)

ตารางที่ 3.2.7(2) ข้อมูล ^{13}C NMR ของสาร 3.2.7(3)-3.2.7(8) และ 3.2.7(11) ใน CDCl_3 (100 MHz)

C	3.2.7(3)	3.2.7(4)	3.2.7(5)	3.2.7(6)	3.2.7(7)	3.2.7(8)	3.2.7(11)
1	129.3	132.0	132.0	121.4	132.3	121.3	121.3
2	109.6	121.0	121.6	119.8	110.2	108.4	119.9
3	155.5	155.7	155.6	155.2	157.0	156.9	155.3
4	115.1	103.9	103.81	104.1	103.6	103.8	104.2
4a	153.9	155.1	154.0	153.5	155.6	155.1	153.4
6	66.8	66.6	69.6	65.5	69.5	65.7	65.5
6a	39.9	40.1	77.0	105.8	76.9	105.7	106.2
6b	118.8	118.8	120.5	119.8	120.4	119.6	111.2
7	122.2	122.3	120.7	115.2	120.7	115.3	115.9
8	108.0	108.2	103.85	107.8	103.9	107.9	112.5
9	155.6	155.9	159.8	154.8	159.8	154.8	151.9
10	110.4	110.3	113.6	114.4	113.7	114.4	119.2
10a	158.4	158.5	158.5	154.7	158.5	154.8	154.5
11a	78.8	78.3	84.3	147.4	84.2	147.2	147.2
11b	112.6	112.5	112.5	109.9	112.8	110.0	109.8
1'	22.3	29.2	29.1	29.0			29.1
2'	121.8	121.9	121.8	121.9			122.0
3'	134.0	134.8	134.8	134.9			134.7
4'	17.8	17.85*	17.9	17.9			17.91*
5'	25.7	25.8	25.79*	25.8			25.8
1"	23.1	23.2	22.5	22.9	22.5	22.9	23.1
2"	121.5	121.4	122.0	122.0	121.9	121.9	121.1
3"	134.7	135.1	131.7	131.9	131.7	132.0	135.1
4"	17.8	17.88*	17.7	17.7	17.7	17.8	17.89*
5"	25.7	25.77	25.76*	25.8	25.7	25.8	25.8
OMe			55.9	56.7	55.9	56.7	

* Assignments in same vertical column may be interchanged.

3.2.7(19)

ตารางที่ 3.2.7(3) ข้อมูล ^1H -(400 MHz) และ ^{13}C -(100 MHz) NMR ของสาร 3.2.7(9) และ 3.2.7(10)

ใน CDCl_3

position	3.2.7(9)		3.2.7(10)	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2	5.35 <i>dd</i> (13.2, 2.6)	79.5	7.96 <i>s</i>	152.5
3	2.79 <i>dd</i> (16.8, 2.6) 2.99 <i>dd</i> (16.8, 13.2)	44.0		124.6
4		192.0		177.0
5	7.72 <i>d</i> (8.6)	126.5	8.00 <i>d</i> (8.8)	125.2
6	6.51 <i>d</i> (8.6)	110.5	6.87 <i>d</i> (8.8)	114.9
7		161.5		159.2
8		114.6		114.7
9		160.9		155.6
10		114.9		118.1
1'		131.1		123.9
2'	7.17 <i>d</i> (1.6)	127.9	7.25 <i>d</i> (1.8)	130.7
3'		154.6		127.2
4'		127.2		154.6
5'	6.82 <i>d</i> (8.8)	115.8	6.81 <i>d</i> (8.1)	115.8
6'	7.18 <i>dd</i> (8.8, 1.6)	125.4	7.21 <i>dd</i> (8.1, 1.8)	128.2
1''	3.36 <i>d</i> (7.9)	22.2	3.57 <i>d</i> (7.0)	22.1
2''	5.23 <i>t</i> (7.9)	121.1	5.25 <i>t</i> (7.0)	120.7
3''		135.1*		134.7
4''	1.71 <i>s</i> *	25.78*	1.83 <i>s</i>	18.0
5''	1.76 <i>s</i> *	17.9	1.72 <i>s</i>	25.8
1'''	3.39 <i>d</i> (7.7)	29.7	3.34 <i>d</i> (7.1)	29.6
2'''	5.31 <i>t</i> (7.7)	121.4	5.30 <i>t</i> (7.1)	121.8
3'''		135.0*		134.5
4'''	1.71 <i>s</i> *	25.76*	1.74 <i>s</i>	17.9
5'''	1.76 <i>s</i> *	17.9	1.72 <i>s</i>	25.8
OH	5.48 <i>br s</i> , 6.35 <i>br s</i>			

* Assignments in same vertical column may be interchanged.

3.2.7(20)

ตารางที่ 3.2.7(4) ข้อมูล ^1H NMR ของสาร 3.2.7(14), 3.2.7(15) และ 3.2.7(20)-3.2.7(22) (400 MHz)

H	3.2.7(14) ^a	3.2.7(15) ^a	3.2.7(20) ^a	3.2.7(21) ^a	3.2.7(22) ^b
3	3.17 <i>dd</i> (11.2, 4.8)	3.19 <i>m</i>	3.19 <i>dd</i> (10.8, 4.8)		3.35 <i>m</i>
12			5.23 <i>t</i> (3.4)	5.26 <i>t</i> (3.4)	5.19 <i>br s</i>
18		0.95 <i>s</i>			
19		0.12 <i>d</i> (3.8) 0.36 <i>d</i> (3.8)			
21		0.88 <i>d</i> (4.4)			
22			3.41 <i>t</i> (5.2)	3.43 <i>t</i> (5.2)	3.38 <i>m</i>
23	0.95 <i>s</i>		0.97 <i>s</i> ^c	1.26 <i>s</i>	1.18 <i>s</i>
24	0.74 <i>s</i>		0.77 <i>s</i>	3.46 <i>d</i> (11.2) 3.96 <i>d</i> (11.2)	3.28 <i>d</i> (11.2) 4.15 <i>d</i> (11.2)
25	0.81 <i>s</i>		0.92 <i>s</i>	0.980 <i>s</i>	0.85 <i>s</i>
26	1.01 <i>s</i>	1.01 <i>d</i> (6.8) ^c	0.95 <i>s</i>	0.976 <i>s</i>	0.89 <i>s</i>
27	0.92 <i>s</i>	1.00 <i>d</i> (6.8) ^c	1.10 <i>s</i>	1.11 <i>s</i>	1.06 <i>s</i>
28	0.76 <i>s</i>	0.87 <i>s</i>	0.85 <i>s</i>	0.86 <i>s</i>	0.81 <i>s</i>
29	4.54 <i>br s</i> , 4.66 <i>br s</i>	0.96 <i>d</i> (6.8)	0.89 <i>s</i>	1.02 <i>s</i>	0.86 <i>s</i>
30	1.66 <i>s</i>		1.02 <i>s</i> ^c	0.90 <i>s</i>	0.98 <i>s</i>
31		4.64 <i>br s</i> , 4.69 <i>br s</i>			

^a Spectra recorded in CDCl_3 .

^b Spectrum recorded in CDCl_3 + two drops of CD_3OD .

^c Assignments in same vertical column may be interchanged.

3.2.7(21)

ตารางที่ 3.2.7(5) ข้อมูล ^{13}C NMR ของสาร 3.2.7(14), 3.2.7(15) และ 3.2.7(20)-3.2.7(22) (100 MHz)

C	3.2.7(14) ^a	3.2.7(15) ^a	3.2.7(20) ^a	3.2.7(21) ^a	3.2.7(22) ^b
1	38.8	30.8	38.6	38.9	38.3
2	27.5	34.8	27.2	34.4	25.8
3	79.0	76.6	79.0	220.9	80.5
4	38.9	44.6	38.8	51.3	42.5
5	55.4	43.4	55.2	56.0	55.8
6	18.4	24.7	18.3	19.4	18.3
7	34.4	28.1	32.77 ^c	32.70	33.0
8	41.0	46.8	39.7	39.7	39.6
9	50.6	23.6	47.6	46.6	47.6
10	37.2	29.6	36.9	36.5	37.3
11	21.0	25.2	23.5	24.0	23.6
12	25.3	35.4	122.5	122.3	122.3
13	38.2	45.4	143.9	144.0	143.8
14	42.8	48.9	42.1	42.4	42.0
15	27.5	32.9	25.9	25.9	28.19
16	35.7	27.0	28.2 ^c	28.4	27.3
17	43.0	52.2	37.4	37.5	36.6
18	48.4	17.8	44.7	45.1	44.7
19	48.0	27.2	46.1	46.3	46.0
20	150.9	36.1	30.5	30.6	30.4
21	29.7	18.4	41.4	41.7	41.2
22	40.0	35.1	76.6	77.0	76.4
23	28.0	31.4	28.1 ^c	22.2	22.3
24	15.3	156.9	15.6	65.9	64.4
25	16.1	33.9	15.6	16.3	16.1
26	16.0	22.0 ^c	16.9	16.8	16.8
27	14.6	21.9 ^c	25.4	25.2	25.2
28	18.0	19.1	20.0	20.0	19.8
29	109.3	14.4	32.84	32.65	32.5
30	19.3		28.2 ^c	28.3	28.15
31		106.0			

^a Spectra recorded in CDCl_3 .

^b Spectrum recorded in CDCl_3 + two drops of CD_3OD .

^c Assignments in same vertical column may be interchanged.

3.2.7(22)

ตารางที่ 3.2.7(6) ข้อมูล ^1H -(400 MHz) และ ^{13}C -(100 MHz) NMR ของสาร 3.2.7(16) และ 3.2.7(19) ใน CDCl_3

position	3.2.7(16)		3.2.7(19)	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	7.28 <i>d</i> (8.4)	129.2	7.39 <i>d</i> (8.4)	132.3
2	6.55 <i>d</i> (8.4)	109.6	6.54 <i>dd</i> (8.4, 2.4)	109.7
3		155.7		157.1
4		115.0	6.40 <i>d</i> (2.4)	103.6
4a		154.0		156.7
6	3.56 <i>t-like</i> (11.0) 4.25 <i>dd</i> (11.0, 4.8)	66.7	3.58 <i>t-like</i> (10.8) 4.21 <i>dd</i> (10.8, 5.2)	66.6
6a	3.46 <i>m</i>	39.9	3.47 <i>m</i>	39.7
6b		119.4		119.0
7	6.93 <i>d</i> (7.8)	123.7	6.93 <i>d</i> (8.0)	123.8
8	6.32 <i>d</i> (7.8)	108.3	6.32 <i>d</i> (8.0)	108.6
9		153.6		153.7
10		106.1		106.2
10a		155.4		155.4
11a	5.48 <i>d</i> (6.8)	79.4	5.47 <i>d</i> (6.4)	78.7
11b		112.3		112.6
1'	3.38 <i>d</i> (6.8)	22.4		
2'	5.19 <i>t</i> (6.8)	121.6		
3'		134.6		
4'	1.71 <i>s</i>	25.8		
5'	1.78 <i>s</i>	17.8		
1''	6.49 <i>d</i> (10.0)	116.4	6.49 <i>d</i> (9.8)	116.5
2''	5.55 <i>d</i> (10.0)	129.4	5.56 <i>d</i> (9.8)	129.6
3''		76.1		76.1
4''	1.37 <i>s</i> *	27.9	1.38 <i>s</i> *	27.7*
5''	1.41 <i>s</i> *	27.9	1.41 <i>s</i> *	27.8*
OH	5.36 <i>s</i>		5.14 <i>s</i>	

* Assignments in same vertical column may be interchanged.

3.2.7(23)

ตารางที่ 3.2.7(7) ข้อมูล ^1H -(400 MHz) และ ^{13}C -(100 MHz) NMR ของสาร 3.2.7(23) ใน CDCl_3

position	3.2.7(23)	
	^1H	^{13}C
2	5.27 <i>dd</i> (13.0, 2.8)	79.0
3	2.77 <i>dd</i> (17.1, 2.8) 3.03 <i>dd</i> (17.1,13.0)	43.2
4		196.7
5		163.6
6	5.99 <i>s</i>	96.7
7		159.9
8		106.2
9		162.2
10		103.0
1'		130.3
2'	7.03 <i>s</i>	125.7
3'		127.4
4'		153.0
5'		127.4
6'	7.03 <i>s</i>	125.7
1''	3.28 <i>d</i> (6.8)	21.8
2''	5.20 <i>t</i> (6.8)	121.60 ^a
3''		134.74 ^b
4''	1.75 <i>s</i>	25.8
5''	1.75 <i>s</i>	17.82 ^c
1''', 1''''	3.35 <i>d</i> (7.2)	29.7
2''', 2''''	5.30 <i>t</i> (7.2)	121.67 ^a
3''', 3''''		134.79 ^b
4''', 4''''	1.70 <i>s</i>	25.8
5''', 5''''	1.75 <i>s</i>	17.86 ^c
5-OH	12.00 <i>br s</i>	
7-OH	6.25 <i>br s</i>	
4'-OH	5.48 <i>br s</i>	

^{a,b,c} Assignments in same vertical column may be interchanged.

ตารางที่ 3.2.7 (8)ฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียของสาร 3.2.7(3-11) และ 3.2.7(23) (MIC, g/ml)

Bacteria	Compound											Antibiotics	
	3.2.7 (3)	3.2.7 (4)	3.2.7 (5)	3.2.7 (6)	3.2.7 (7)	3.2.7 (8)	3.2.7 (9)	3.2.7 (10)	3.2.7 (11)	3.2.7 (23)	3.2.7 (23)	Vancomycin	Oxacillin
Genus Streptococcus													
<i>S. agalactiae</i> 16442	0.78	1.56	1.56	>50	6.25	>25	>50	>50	3.13	25	2.0	2.0	1.5
<i>S. agalactiae</i> 11159	0.78	1.56	0.78	>50	12.5	25	25	>50	3.13	0.78	1.0	1.0	3.0
<i>S. constellatus</i> 12428	0.78	1.56	0.78	>50	6.25	25	12.5	>50	0.78	>50	2.0	2.0	4.0
<i>S. mutans</i> 27175	0.78	0.78	NT	>50	1.56	>25	>50	>50	1.56	>50	0.02	0.02	<0.02
<i>S. milleri</i> group	0.78	0.78	1.56	>50	6.25	12.5	12.5	>50	0.78	>50	4.0	4.0	0.38
<i>S. sobrinus</i>	1.56	1.56	3.13	50	6.25	25	50	50	3.13	6.25	1.5	1.5	0.75
Genus Staphylococcus													
<i>Staphylococcus</i> coagulase negative	1.56	1.56	6.25	25	6.25	50	25	>50	0.78	>50	0.09	0.09	2.0
<i>S. aureus</i> ATCC25923	3.13	1.56	3.13	>50	6.25	>25	50	>50	1.56	>50	2.0	2.0	0.03
<i>S. aureus</i> ATCC29213	NT	NT	NT	50	6.25	>25	25	50	0.78	NT	4.0	4.0	25
Drug-resistant strains													
<i>S. aureus</i> MRSA N1	0.78	0.78	0.78	>50	6.25	>25	50	>50	1.56	>50	2.0	2.0	>256
<i>S. aureus</i> MRSA 20625	3.13	0.78	6.25	50	12.5	>25	>50	>50	1.56	>50	1.5	1.5	>256
<i>S. aureus</i> MRSA 20626	0.78	0.78	1.56	>50	6.25	>25	25	>50	1.56	>50	2.0	2.0	>256
<i>S. aureus</i> MRSA 20627	1.56	1.56	1.56	50	6.25	>25	12.5	>50	0.78	>50	2.0	2.0	>256
<i>S. aureus</i> VRSA 20622	3.13	1.56	12.5	50	12.5	>25	6.25	>50	1.56	>50	>256	>256	>256
<i>S. aureus</i> VRSA 20623	6.25	3.13	3.13	25	6.25	>25	12.5	>50	0.39	>50	>256	>256	>256
<i>S. aureus</i> VRSA 20624	6.25	1.56	12.5	50	6.25	3.13	6.25	50	1.56	>50	>256	>256	>256

NT: Not tested.

วัสดุและวิธีการ

นำลำต้นของทองหลางป่าแห้งที่บดละเอียดแล้ว (1 kg) มาสกัดด้วยเฮกเซนโดยใช้ Soxhlet กรองสารละลายที่ได้แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดเฮกเซน (9.9 g) สำหรับกากที่เหลือสกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอลตามลำดับ ได้ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน (14.5 g) และส่วนสกัดเมทานอล

(ก) ส่วนสกัดเฮกเซน

นำส่วนสกัดเฮกเซน (9.8 g) มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเริ่มจากเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ รวมกลุ่มได้ 11 กลุ่ม เลือกกลุ่ม H_6 , H_7 และ H_{10} มาแยกสารต่อไป

กลุ่ม H_6 (646.8 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมากับคลอโรฟอร์ม กรองเอาของแข็ง (110.7 mg) ออกมา แล้วนำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล และใช้ตัวชะคลอโรฟอร์ม-เฮกเซน 7:93 รวมได้ 11 กลุ่ม นำเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{6.8}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{6.8}$ ให้ของแข็งสีขาว (25.2 mg) ของสารกลุ่ม ferulic acid ester [3.2.7 (1)]; EIMS: m/z (rel. int.) 586 (M^+ , 21), 558 (M^+ , 11), 194 (83), 177 (62); ข้อมูล 1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.7(11)}

กลุ่ม H_7 (2.0 g) เป็นกลุ่มที่ออกมากับเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 0.5:99.5 ถึง 1:99 กรองเอาของแข็งออก แล้วนำไปตกผลึกในคลอโรฟอร์ม-เมทานอล ได้ผลึกสีขาวของสารผสมระหว่าง β -sitosterol และ stigmasterol [3.2.7(2)] (450.2 mg) การยืนยันโครงสร้างของสารชนิดนี้ได้จาก 1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากพืชชนิดอื่น

ส่วน filtrate (1.3 g) ที่ได้จากกลุ่ม H_7 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเริ่มจากเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 8:92 ถึงเอทิลอะซีเตต โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ รวมกลุ่มได้ 15 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{7.3}$ และ $H_{7.4}$ มาแยกสารต่อไป

3.2.7(26)

กลุ่มย่อย $H_{7.3}$ (575.7 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาที่เอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 9:91 ถึง 13:87 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ 2 ครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล ครั้งแรกใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 5:95 ถึง 15:85 ครั้งที่สองใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 6:94 รวมกลุ่มได้ 7 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{7.3.3}$ และ $H_{7.3.6}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{7.3.3}$ ให้ของแข็งสีขาว (10.5 mg) ของสารผสมระหว่าง stigmast-4-en-3-one [3.2.7(12)] และ stigmasta-4,22-dien-3-one [3.2.7(13)]; 1H NMR ($CDCl_3$): δ 0.6-1.2 (6 X CH_3), 5.70 (1H, *br s*, $-COCH=C$), 5.13 (less than 1H, *dd*, $J = 15.1, 8.4$ Hz, $-^{22}CH=CH-$), 5.00 (less than 1H, *dd*, $J = 15.1, 8.6$ Hz, $-CH=^{23}CH-$); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 199.3 (C-3), 123.7 (C-4), 171.3 (C-5), 138.0 (C-22), 129.6 (C-23); EIMS: m/z (rel. int.) 412 (M^+ , 5), 410 (M^+ , 20), 271 (26), 229 (60), 124 (100).

กลุ่มย่อย $H_{7.3.6}$ (155.0 mg) นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะอะซีโตน-เฮกเซน 7:93 รวมกลุ่มได้ 5 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{7.3.6.3}$ และ $H_{7.3.6.5}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{7.3.6.3}$ (33.7 mg) นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 5:95 รวมกลุ่มได้ 7 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{7.3.6.3.1}$ และ $H_{7.3.6.3.3}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{7.3.6.3.1}$ ให้ของแข็งสีขาว (5.7 mg) ของ lupeol [3.2.7(14)] การยืนยันโครงสร้างได้จากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากพืชชนิดอื่น สำหรับ 1H และ ^{13}C NMR ของสาร 3.2.7(14) ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(4) และ 3.2.7(5) ตามลำดับ

กลุ่มย่อย $H_{7.3.6.3.3}$ ให้ของแข็งสีขาว (9.1 mg) ของ cycloeucalenol [3.2.7(15)]; EIMS: m/z (rel. int.) 426 (M^+ , 4), 411 (14), 408 (25), 393 (33), 383 (8), 353 (8), 301 (7); 1H และ ^{13}C NMR ของสาร 3.2.7(15) ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(4) และ 3.2.7(5) ตามลำดับ

3.2.7(27)

กลุ่มย่อย $H_{7.3.6.5}$ (23.0 mg) นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 10:90 รวมกลุ่มได้ 11 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{7.3.6.5.4}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{7.3.6.5.4}$ ให้น้ำมันใส (2.1 mg) ของ erybraedin B [3.2.7(16)] 1H และ ^{13}C NMR ของสาร 3.2.7(16) ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(6)

กลุ่มย่อย $H_{7.4}$ (222.7 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมากับเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 15:85 ถึง 16:84 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 0.2:99.8 รวมกลุ่มได้ 14 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{7.4.4}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{7.4.4}$ ให้อะซีตของแข็งสีขาว (8 mg) ของ erybraedin A [3.2.7(3)] 1H และ ^{13}C NMR ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(1) และ 3.2.7(2) ตามลำดับ

กลุ่ม H_{10} (3.8 g) เป็นกลุ่มที่ออกมากับเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 5:95 ถึง 30:70 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล และใช้ตัวชะเริ่มจากเฮกเซน อะซีโตน และเมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ รวมกลุ่มได้ 19 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{10.5}$, $H_{10.6}$, $H_{10.7}$ และ $H_{10.9}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{10.5}$ (370.2 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมากับอะซีโตน-เฮกเซน 22:78 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล ครั้งแรกใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 20:80 ครั้งที่สองใช้ตัวชะอะซีโตน-เฮกเซน 15:85 รวมกลุ่มได้ 4 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{10.5.2}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{10.5.2}$ ให้อะซีตของแข็งสีขาว (7.8 mg) ของสารผสมระหว่าง 3β -hydroxystigmast-5-en-7-one [3.2.7(17)] และ 3β -hydroxystigmasta-5,22-dien-7-one [3.2.7(18)]; 1H NMR ($CDCl_3$): δ 0.6–1.3 (6 X CH_3), 3.65 (1H, m, $-CH(OH)-$), 5.67 (1H, br s, $C=CHCO-$), 5.15 (less than 1H, dd, $J = 15.1, 8.4$ Hz, $-^{22}CH=CH-$), 5.00 (less than 1H, dd, $J = 15.1, 8.6$ Hz, $-CH=^{23}CH-$); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 70.5 (C-3), 165.1 (C-5), 126.1 (C-6), 202.3 (C-7), 138.1 (C-

3.2.7(28)

22), 129.5 (C-23); EIMS: m/z (rel. int.) 428 (M^+ , 30), 426 (M^+ , 18), 287 (40), 269 (25), 192 (100).

กลุ่มย่อย $H_{10.6}$ (547.9 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมากับอะซีโตน-เฮกเซน 24:76 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ 2 ครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล ครั้งแรกใช้ตัวชะเริ่มจากคลอโรฟอร์มถึงเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 5:95 โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ครั้งที่สองใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 20:80 รวมกลุ่มได้ 11 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{10.6.2}$ และ $H_{10.6.3}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{10.6.2}$ (33.1 mg) นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 10:90 รวมกลุ่มได้ 9 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{10.6.2.5}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{10.6.2.5}$ ให้ของแข็งสีเหลืองอ่อน (6.6 mg) ของ 5-hydroxysophoranone [3.2.7(23)] 1H และ ^{13}C NMR ของสาร 3.2.7(23) ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(7)

กลุ่มย่อย $H_{10.6.3}$ (37.9 mg) นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 10:90 รวมกลุ่มได้ 6 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{10.6.3.3}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{10.6.3.3}$ ให้น้ำมันใส (3.0 mg) ของ phaseollin [3.2.7(19)] 1H และ ^{13}C NMR ของสาร 3.2.7(19) ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(6)

กลุ่มย่อย $H_{10.7}$ (808.5 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมากับอะซีโตน-เฮกเซน 26:74 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะคลอโรฟอร์มถึงเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 20:80 รวมกลุ่มได้ 14 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{10.7.6}$ และ $H_{10.7.11}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{10.7.6}$ เป็นกลุ่มที่ออกมากับเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 0.5:99.5 ให้ของแข็งสีขาว (6.8 mg) ของ erythrabyssin II [3.2.7(4)] 1H และ ^{13}C NMR ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(1) และ 3.2.7(2) ตามลำดับ

3.2.7(29)

กลุ่มย่อย $H_{10.7.11}$ (146.3 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาจากเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 3:97 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเอทิลอะซิเตต-เฮกเซน 30:70 รวมกลุ่มได้ 6 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{10.7.11.3}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{10.7.11.3}$ ให้น้ำมันใส (12.4 mg) ของ *erystagallin A* [3.2.7(5)] 1H และ ^{13}C NMR ของสาร 3.2.7(5) และสารที่เกิดขึ้นใหม่คือ *eryvarin E* [3.2.7(6)] ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(1) และ 3.2.7(2) ตามลำดับ

กลุ่มย่อย $H_{10.9}$ (252.6 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาจากอะซิโตน-เฮกเซน 30:70 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 2:98 รวมกลุ่มได้ 12 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{10.9.11}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{10.9.11}$ ให้น้ำมันใส (11.7 mg) ของ *erythrabisin-1* [3.2.7(7)] 1H และ ^{13}C NMR ของสาร 3.2.7(7) และสารที่เกิดขึ้นใหม่คือ *eryvarin D* [3.2.7(8)] ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(1) และ 3.2.7(2) ตามลำดับ

(ข) ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน

นำส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน (14.5 g) มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเริ่มจากคลอโรฟอร์ม และเมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ รวมกลุ่มได้ 8 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่ม C_2 มาแยกสารต่อไป

กลุ่ม C_2 (11.6 g) เป็นกลุ่มที่ออกมาจากเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 3:97 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเริ่มต้นจากอะซิโตน-เฮกเซน 5:95 ถึงอะซิโตน โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ รวมกลุ่มได้ 13 กลุ่ม นำกลุ่มย่อย $C_{2.6}$, $C_{2.7}$, $C_{2.8}$, $C_{2.9}$ และ $C_{2.11}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $C_{2.6}$ เป็นกลุ่มที่ออกมาจากอะซิโตน-เฮกเซน 20:80 ได้ของแข็งสีขาวของสารผสมระหว่าง β -sitosterol และ stigmasterol [3.2.7(2)] (28.1 mg) สารชนิดนี้เคยแยกได้จากส่วนสกัดเฮกเซน

กลุ่มย่อย $C_{2.7}$ (354.1 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาจากอะซิโตน-เฮกเซน 25:75 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล ครั้งแรกใช้ตัวชะอะซิโตน-เฮกเซน

20:80 ส่วนครั้งที่สองใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวชะ รวมกลุ่มได้ 5 กลุ่ม นำเฉพาะกลุ่มย่อย $C_{2.7.4}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $C_{2.7.4}$ ให้ของแข็งสีขาว (11.8 mg) ของ sophoradiol [3.2.7(20)]; EIMS: m/z (rel. int.) 442 (M^+ , 2), 427 (1), 424 (1), 409 (2), 234 (100); 1H และ ^{13}C NMR ของสาร 3.2.7(20) ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(4) และ 3.2.7(5) ตามลำดับ

กลุ่มย่อย $C_{2.8}$ (1.9 g) เป็นกลุ่มที่ออกมาที่อะซีโตน-เฮกเซน 27:73 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล และใช้ตัวชะอะซีโตน-เฮกเซน 22:78 รวมกลุ่มได้ 14 กลุ่ม นำเฉพาะกลุ่มย่อย $C_{2.8.6}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $C_{2.8.6}$ (93.4 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาที่อะซีโตน-เฮกเซน 22:78 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล และใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-ไดคลอโรมีเทน 20:80 รวมกลุ่มได้ 5 กลุ่ม นำเฉพาะกลุ่มย่อย $C_{2.8.6.2}$ และ $C_{2.8.6.3}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $C_{2.8.6.2}$ ให้ของแข็งสีขาว (2.0 mg) ของ melilotigenin C [3.2.7(21)]; EIMS: m/z (rel. int.) 456 (M^+ , 1), 426 (2), 411 (1), 234 (100); 1H และ ^{13}C NMR ของสาร 3.2.7(21) ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(4) และ 3.2.7(5) ตามลำดับ

กลุ่มย่อย $C_{2.8.6.3}$ ให้ของแข็งสีขาว (13.2 mg) ของ soyasapogenol B [3.2.7(22)]; EIMS: m/z (rel. int.) 458 (M^+ , 1), 440 (1), 425 (1), 407 (2), 234 (100); 1H และ ^{13}C NMR ของสาร 3.2.7(22) ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(4) และ 3.2.7(5) ตามลำดับ

กลุ่มย่อย $C_{2.9}$ (1.48 g) เป็นกลุ่มที่ออกมาที่อะซีโตน-เฮกเซน 30:70 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเริ่มต้นจากเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 30:70 เอทิลอะซีเตต และเมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ รวมกลุ่มได้ 15 กลุ่ม นำเฉพาะกลุ่มย่อย $C_{2.9.3}$ และ $C_{2.9.5}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $C_{2.9.3}$ (471.6 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาที่เอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 31:69 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 2:98 รวมกลุ่มได้ 8 กลุ่ม นำเฉพาะกลุ่มย่อย $C_{2.9.3.3}$ และ $C_{2.9.3.5}$ มาทำการแยกสารต่อไป

3.2.7(31)

กลุ่มย่อย $C_{2.9.3.3}$ (91.2 mg) นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 30:70 รวมกลุ่มได้ 8 กลุ่ม นำเฉพาะกลุ่มย่อย $C_{2.9.3.3.5}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $C_{2.9.3.3.5}$ ให้น้ำมันใส (5.4 mg) ของ glabrol [3.2.7(9)] ^1H และ ^{13}C NMR ของสาร 3.2.7(9) ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(3)

กลุ่มย่อย $C_{2.9.3.5}$ ให้น้ำมันใส (27.7 mg) ของ erythrabisin-1 [3.2.7(7)] สารชนิดนี้เคยแยกได้จากส่วนสกัดเฮกเซน

กลุ่มย่อย $C_{2.9.5}$ (111.5 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 34:66 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 3:97 รวมกลุ่มได้ 4 กลุ่ม นำเฉพาะกลุ่มย่อย $C_{2.9.5.4}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $C_{2.9.5.4}$ ให้น้ำมันใส (8.3 mg) ของ erysubin F [3.2.7(10)] ^1H และ ^{13}C NMR ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(3)

กลุ่มย่อย $C_{2.11}$ (867.0 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับอะซีโตน-เฮกเซน 40:60 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล และใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 25:75 รวมกลุ่มได้ 17 กลุ่ม นำเฉพาะกลุ่มย่อย $C_{2.11.16}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $C_{2.11.16}$ (206.7 mg) นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะอะซีโตน-เฮกเซน 30:70 รวมกลุ่มได้ 10 กลุ่ม นำเฉพาะกลุ่มย่อย $C_{2.11.16.3}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $C_{2.11.16.3}$ ให้ของแข็งสีเหลืองอ่อน (7.1 mg) ของ erycrystagallin [3.2.7(11)] ^1H และ ^{13}C NMR ดังแสดงในตารางที่ 3.2.7(1) และ 3.2.7(2) ตามลำดับ

(ค) การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียใช้ disc diffusion method ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauer และคณะ^{3.2.7(44)} คือนำแบคทีเรียที่จะทดสอบมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion Broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่บ่มเพาะได้มาปรับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับ ความขุ่นของ McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งเทียบเท่ากับจำนวนแบคทีเรีย 10^5 - 10^6 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร แล้วจึงนำแบคทีเรียที่เตรียมได้ 0.1 มิลลิลิตรไปเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร

3.2.7(32)

เลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar หลังจากนั้นนำแผ่นดิสก์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งละลายด้วย DMSO (Dimethyl sulfoxide) (เจือจางลง 2 เท่าตามลำดับ) ปริมาณ 10 ไมโครลิตรวางบนผิววุ้นที่มีแบคทีเรียชนิดต่างๆ บ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ในการทดสอบนี้ใช้ DMSO เป็น negative control และใช้ยา vancomycin และ oxacillin (E-test, AB Biodisk, Sweden) เป็น positive control เมื่อสิ้นสุดการบ่มเพาะให้วัด inhibition zone สำหรับแต่ละการทดสอบจะทำ 2 ซ้ำ

เอกสารอ้างอิง

- 3.2.7[1] Dyke, S. F.; Quessy, D. *The Alkaloids Chemistry and Physiology*, Vol. 18, In: Rodrigo, R. G. A. (Ed.); Academic Press: New York, 1981; p. 1.
- 3.2.7[2] Kamat, V. S.; Chuo, F. Y.; Kubo, I.; Nakanishi, K. *Heterocycles* 1981, 15, 1163.
- 3.2.7[3] Mitscher, L. A.; Drake, S.; Gollapudi, S. R.; Okwute, S. K. *J. Nat. Prod.* 1987, 50, 1025.
- 3.2.7[4] Mitscher, L. A.; Okwute, S. K.; Gollapudi, S. R.; Drake, S.; Avona, E. *Phytochemistry* 1988, 27, 3449.
- 3.2.7[5] Telikepalli, H.; Gollapudi, S. R.; K-Shokri, A.; Velazquez, L.; Sandmann, R. A.; Veliz, E. A.; Rao, K. V. J.; Madhavi, A. S.; Mitscher, L. A. *Phytochemistry* 1990, 29, 2005.
- 3.2.7[6] Mckee, T. C.; Bokesch, H. R.; McCormick, J. L.; Rashid, M. A.; Spielvogel, D.; Gustafson, K. R.; Alavanja, M. M.; Cardellina, J. H.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* 1997, 60, 431.
- 3.2.7[7] Dewick, P. M. Isoflavonoids. In: Harborne, J. B. (Ed.), 1994, p. 117.
- 3.2.7[8] Barron, D.; Ibrahim, R. K. *Phytochemistry* 1996, 43, 921.
- 3.2.7[9] Tsuda, Y.; Sano, T. The alkaloids, Vol. 48, In: Gordell, G. A. (Ed); Academic Press, 1996, p. 249.
- 3.2.7[10] Tanaka, H.; Etoh, H.; Shimizu, H.; Oh-Uchi, T.; Terada, Y.; Tateishi, Y. *Planta Med.* 2001, 67, 871.
- 3.2.7[11] Rukachaisirikul, T.; Intaraudom, J.; Chawanasak, S.; Suksamram, A. *ScienceAsia* 2000, 26, 159.
- 3.2.7[12] Pouchert, C. J.; Behnke, J. *The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra*, 3rd ed.; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1993, 3,

569A

- 3.2.7[13] Lester, A.; Mitscher, S. K.; Okwute, S. R.; Gollapudi, S. D.; Avona, E. *Phytochemistry* 1988, **27**, 3449.
- 3.2.7[14] Tanaka, H.; Tanaka, T.; Etoh, H. *Phytochemistry* 1998, **47**, 475.
- 3.2.7[15] Tanaka, H.; Tanaka, T.; Etoh, H. *Phytochemistry* 1997, **45**, 835.
- 3.2.7[16] Tanaka, H.; Hirata, M.; Etoh, H.; Watanabe, N.; Shimizu, H.; Ahmad, M.; Khan, Z.; Anwar, M. *Heterocycles* 2001, **55**, 2341.
- 3.2.7[17] Fomum, Z. T.; Ayafor, J. F.; Wandji, J.; Fomban, W. G.; Nkengfack, A. E. *Phytochemistry* 1986, **25**, 757.
- 3.2.7[18] Yenesew, A.; Derese, S.; Irungu, B.; Midiwo, J. O.; Waters, N. C.; Liyala, P.; Akala, H.; Heydenreich, M.; Peter, M. G. *Planta Med.* 2003, **69**, 658.
- 3.2.7[19] Asada, Y.; Li, W.; Yoshikawa, T. *Phytochemistry* 2000, **55**, 323.
- 3.2.7[20] Tanaka, H.; Etoh, H.; Watanabe, N.; Shimizu, H.; Ahmad, M.; Rizwani, G. H. *Phytochemistry* 2001, **56**, 769.
- 3.2.7[21] Mitscher, L. A.; Ward, J. A.; Drake, S.; Rao, G. S. *Heterocycles* 1984, **22**, 1673.
- 3.2.7[22] Greca, M. D.; Monaco, P.; Previtera, L. *J. Nat. Prod.* 1990, **53**, 1430.
- 3.2.7[23] Tandon, S.; Rastogi, R. P. *Planta Med.* 1976, **29**, 190.
- 3.2.7[24] Mahato, S. B.; Banerjee, S. *Experientia* 1980, **36**, 515.
- 3.2.7[25] Reynolds, W. F.; McLean, S.; Poplawski, J.; Enriquez, R. G.; Escobar, L. I.; Leon, I. *Tetrahedron* 1986, **42**, 3419.
- 3.2.7[26] Kocor, M.; Pyrek, J. *St. J. Org. Chem.* 1973, **38**, 3688.
- 3.2.7[27] Wen, L.; Weiming, C.; Zhi, X.; Xiaotian, L. *Planta Med.* 1986, **4**.
- 3.2.7[28] Khuong-Huu, F.; Sangare, M.; Chari, V. M.; Bekaert, A.; Devys, M.;

- Barbier, M.; Lukacs, G. *Tetrahedron Lett.* 1975, 1787.
- 3.2.7[29] Notaro, G.; Piccialli, V.; Sica, D. *J. Nat. Prod.* 1992, **55**, 1588.
- 3.2.7[30] Achenbach, H.; Schwinn, A. *Phytochemistry* 1995, **38**, 1037.
- 3.2.7[31] Perrin, D. R. *Tetrahedron Lett.* 1964, 29.
- 3.2.7[32] Kinjo, J.; Miyamoto, I.; Miurakami, K.; Kida, K.; Tomimatsu, T.; Yamasaki, M.; Nohara, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1985, **33**, 1293.
- 3.2.7[33] Mahato, S. B.; Kundu, A. P. *Phytochemistry* 1994, **37**, 1517.
- 3.2.7[34] Macias, F. A.; Simonet, A. M.; Galindo, J. C. G.; Pacheco, P. C.; Sanchez, J. A. *Phytochemistry* 1998, **49**, 709.
- 3.2.7[35] Kitagawa, I.; Yoshikawa, M.; Yosioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* 1976, **24**, 121.
- 3.2.7[36] Maximo, P.; Lourenco, A. *Phytochemistry* 1998, **48**, 359.
- 3.2.7[37] Folkers, K.; Shavel, J. Jr.; Koniuszy, F. *J. Am. Chem. Soc.* 1941, **63**, 1544.
- 3.2.7[38] Baruah, P.; Barua, N. C.; Sharma, R. P.; Baruah, J. N.; Kulanthaivel, P.; Herz, W. *Phytochemistry* 1984, **23**, 443.
- 3.2.7[39] Matsuura, N.; Nakai, R.; Iinuma, M.; Tanaka, T.; Inoue, K. *Phytochemistry* 1994, **36**, 255.
- 3.2.7[40] Mitscher, L. A.; Okwute, S. K.; Gollapudi, S. R.; Keshavarz-Shokri, A. *Heterocycles* 1988, **27**, 2517.
- 3.2.7[41] Iinuma, M.; Okawa, Y.; Tanaka, T.; Kobayashi, Y.; Miyauchi, K. *Heterocycles* 1994, **39**, 687.
- 3.2.7[42] Sato, M.; Tanaka, H.; Fujiwara, S.; Hirata, M.; Yamaguchi, R.; Etoh, H.; Tokuda, C. *Phytochemistry* 2002, **9**, 427.
- 3.2.7[43] Tanaka, H.; Sato, M.; Fujiwara, S.; Hirata, M.; Etoh, H.; Takeuchi, H. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002, **35**, 494.

3.2.7(36)

- 3.2.7[44] Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Truck, M. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966, **45**, 426.

โครงการย่อยกลุ่มที่ 3: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยา

3.2 เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยา

โครงการวิจัยหน่วยที่ 3.2.8: ดอกสาบเสือ (*Chromolaena odorata*)

บทนำ

1. คำนำ

Chromolaena odorata (L.) R. M. King & H. Robinson (synonym: *Eupatorium odoratum* L.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Asteraceae สรรพคุณทางยาพื้นบ้านที่มีรายงานคือ ใบใช้รักษาอาการไอ และใช้ร่วมกับตะไคร้และใบฝรั่งในการรักษาโรคมะเร็ง น้ำที่คั้นจากใบที่นำมาบดหรือตำให้หยาบเลือดจากการถูกของมีคม นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณด้านอื่นคือ แก้ก้องร่ง เป็นยาฝาดสมาน antispasmodic ลดความดัน แก้อักเสบ และขับปัสสาวะ^{3.2.8[1]} ในประเทศไทยใช้ส่วนต้นแก้ปวดท้อง ท้องขึ้น ท้องเฟ้อ แก้นมคัด แก้วม ไข้ดูหนอง ส่วนของใบใช้รักษาแผลสด สมานแผล ถอนพิษ แก้อักเสบ แก้พิษน้ำเหลือง แก้ตาฟาง แก้ตาและ ห้ามเลือด แก่ริดสีดวงทวารหนัก และรักษาแผลเปื่อย ดอกใช้แก้ร้อนในกระหายน้ำ ชูกำลัง แก้อ่อนเพลีย บำรุงหัวใจ แก้ไข้ พืชทั้งต้นแก้บาดทะยัก^{3.2.8[2]}

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ท้าววิจัย

สาบเสือเป็นพืชที่มีสรรพคุณในการใช้เป็นยาพื้นบ้านหลายสรรพคุณ ในแง่ของการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงเป็นสมุนไพรที่น่าสนใจ และจากการที่พืชชนิดนี้เป็นวัชพืชที่รู้จักกันดีชนิดหนึ่งซึ่งในบางท้องถิ่นมีพืชชนิดนี้รุกรานเข้าไปในที่เพาะปลูกมากขึ้นเรื่อยๆ หากพืชชนิดนี้มีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ อาจเป็นทางหนึ่งที่จะหาทางนำพืชชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ จากการสำรวจวรรณกรรมพบว่าส่วนใบและต้นของสาบเสือได้มีผู้ศึกษาส่วนประกอบทางเคมีกันมากพอ

ควร แต่ส่วนดอกมีการศึกษากันน้อย จึงสนใจที่จะศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของดอกของพืชชนิดนี้

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อหาส่วนประกอบทางเคมีของดอกสาบเสือ
- 2) เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชชนิดนี้ได้มีผู้ศึกษาส่วนประกอบทางเคมีกันมาคือ ส่วนใบและลำต้นมีสารประเภทน้ำมันหอมระเหย^{3.2.8(3-6)} สารพวกสเตียรอยด์^{3.2.8(7)} triterpenes^{3.2.8(8,9)} ฟลาโวนอยด์^{3.2.8(8-19)} สำหรับดอกของพืชชนิดนี้ได้มีผู้ศึกษาน้ำมันหอมระเหย พบ bornyl acetate, β -cubebene, α -pinene และ β -caryophyllene^{3.2.8(20,21)} เป็นส่วนประกอบหลัก พบไขมันซึ่งมีกรดไขมัน myristic, palmitic, linoleic และ linolenic เป็นองค์ประกอบ^{3.2.8(22)} และพบ pyrrolizidine alkaloids คือ 7- และ 9-angeloylretronecine, intermedine, rinderine และ 3'-acetylinderine^{3.2.8(23)}

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของฟลาโวนอยด์

นำดอกสาบเสือมาสกัดด้วยเฮกเซน คลอโรฟอร์มและเมทานอล จากชั้นคลอโรฟอร์ม ได้แยกฟลาโวนอยด์ออกมา 6 ชนิดคือ isosakuranetin [3.2.8(1)], persicogenin [3.2.8(2)], 5,6,7,4'-tetramethoxyflavanone [3.2.8(3)], 4'-hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavanone [3.2.8(4)], 2'-hydroxy-4,4',5',6'-tetramethoxychalcone [3.2.8(5)] และ 4,2'-dihydroxy-4',5',6'-trimethoxychalcone [3.2.8(6)] จากชั้นเมทานอล แยกได้ฟลาโวน 2 ชนิดคือ acacetin [3.2.8(7)] และ luteoline [3.2.8(8)]

3.2.8(3)

ฟลาโวน 3.2.8(1)-3.2.8(4) แยกได้จากส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของดอกสาบเสือ สาร 3.2.8(1) มีข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ EIMS ตรงกับ isosakuranetin ซึ่งได้มีผู้เคยแยกมาแล้วจากใบของสาบเสือ^{3.2.8[10]} ทำการยืนยันว่าหมู่ methoxyl อยู่ที่ตำแหน่ง 4' โดยเทคนิค NOE

สาร 3.2.8(2) มี $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมคล้ายคลึงกับสาร 3.2.8(1) ต่างกันที่วง B แสดง 1,3,4-trisubstituted pattern ได้ทำการพิสูจน์ว่าหมู่ methoxyl อยู่ที่ตำแหน่ง 4' โดยเทคนิค NOE จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$ และ EIMS) แสดงว่าสาร 3.2.8(2) คือ persicogenin ซึ่งเคยแยกได้จาก *Eupatorium sternburgianum*^{3.2.8[24]}

สาร 3.2.8(3) มีรูปแบบของ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมคล้ายกับสาร 3.2.8(1) ยกเว้นในส่วนของวง A ซึ่งแสดงเพียงสัญญาณ singlet ของ 1 โปรตอนของ H-8 ที่ δ 6.32 ส่วน $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสาร 3.2.8(3) และ 3.2.8(4) คล้ายคลึงกันมาก ต่างกันที่มีหมู่ methoxyl เพิ่มขึ้นในสาร 3.2.8(3) จากการที่สาร 3.2.8(3) มีพีคที่ m/z 134 ใน EIMS ในขณะที่สาร 3.2.8(4) มีพีคที่ m/z 120 แสดงว่าสาร 3.2.8(4) เป็น 4'-demethoxyl analogue ของสาร 3.2.8(3) ปรากฏว่าสารทั้งสองชนิดนี้ เคยค้นพบมาแล้วในส่วนเหนือดินของต้นสาบเสือ^{3.2.8[13]}

$^1\text{H-NMR}$ ของสาร 3.2.8(5) และ 3.2.8(6) แสดงลักษณะเฉพาะของ chalcones โดยมี substitution pattern แบบเดียวกับสาร 3.2.8(3) และ 3.2.8(4) EIMS ยืนยันเอกลักษณ์กับสาร 3.2.8(5) และ 3.2.8(6) ซึ่งเคยแยกมาจากใบ^{3.2.8[10]} และส่วนเหนือดิน^{3.2.8[13]} ของสาบเสื้อมาก่อน

ฟลาโวนอยด์กลุ่มที่สามเป็นพวกฟลาโวน 3.2.8(7) และ 3.2.8(8) สำหรับฟลาโวน 3.2.8(7) มีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีสอดคล้องกับฟลาโวน acacetin ซึ่งมีผู้แยกได้จากใบของพืชชนิดนี้^{3.2.8[11]} ส่วนสาร 3.2.8(8) มีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีตรงกับฟลาโวน luteolin ซึ่งเป็นสารที่ทราบกันดี^{3.2.8[25,26]} แต่ไม่เคยแยกได้จากสาบเสื้อมาก่อน

ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์

ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

นำสาร 3.2.8(1) และ สาร 3.2.8(3)-3.2.8(8) ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra)^{3.2.8[27]} ส่วนสาร 3.2.8(2) มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการทดสอบ สาร 3.2.8(1) แสดงฤทธิ์ปานกลาง โดยมีค่า MIC ที่ 50 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนสาร 3.2.8(4), 3.2.8(7) และ 3.2.8(8) แสดงฤทธิ์ที่อ่อน โดยมีค่า MIC ที่ 200 $\mu\text{g/ml}$ เนื่องจาก flavanones 3.2.8(1) และ 3.2.8(4) และ flavones 3.2.8(7) และ 3.2.8(8) แสดงฤทธิ์ใน

3.2.8(4)

การทดสอบ อาจเป็นไปได้ที่พันธะคู่ที่วง C ไม่จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจาก chalcones 3.2.8(5) และ 3.2.8(6) ไม่มีฤทธิ์ในการทดสอบนี้ อาจสรุปเบื้องต้นได้ว่า การที่สารฟลาโวนอยด์จะแสดงฤทธิ์ต้านวัณโรคได้ จะต้องมียวง C อยู่ด้วย ไม่ว่าจะเป็นชนิดอิมตัวหรือไม่อิมตัวก็ได้ การที่สาร 3 ไม่มีฤทธิ์ แต่สาร 3.2.8(1) และ 3.2.8(4) มีฤทธิ์เช่นนี้สมควรได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของสาร 3.2.8(3) และ 3.2.8(4) จะเห็นว่าเมื่อเกิด methylation สาร 3.2.8(4) ที่ตำแหน่ง 4' ได้สาร 3.2.8(3) มีผลทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพหมดไป นอกจากนี้ ดูเหมือนว่าการมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่ตำแหน่ง 5 และ 7 เช่นเดียวกับการที่ไม่มีหมู่ methoxyl ที่ตำแหน่ง 6 ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น

ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์

นำสาร 3.2.8(1) และ สาร 3.2.8(3)-3.2.8(8) ไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ KB, BC NCI-H187^{3.2.8[28]} ส่วนสาร 3.2.8(2) มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการทดสอบ ปรากฏว่าสารทุกชนิดไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และมีสาร 3.2.8(8) เท่านั้นที่ให้ผลบวกต่อ เซลล์ BC โดยมีค่า MIC 11.0 µg/ml สำหรับเซลล์ NCI นั้น เฉพาะสาร 3.2.8(7) และ 3.2.8(8) ให้ผลบวก โดยมีค่า MIC เป็น 7.0 และ 5.5 µg/ml ตามลำดับ

วัสดุและวิธีการ

พืชที่ใช้ในการวิจัย

ดอกسابเสือเก็บมาจากดอกไม้ขาว อำเภอดงหลวง จังหวัดสุพรรณบุรี ตัวอย่างพืชได้เก็บไว้ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง (หมายเลข RU 0033)

การสกัดแยก

นำดอกسابเสือแห้งที่บดแล้ว (1.3 kg) มาสกัดด้วยตัวทำละลายที่ร้อนตามลำดับคือ *n*-hexane, chloroform และ methanol ตามลำดับ (3 L x 4) ได้ hexane (27.54 g), chloroform (28.79 g) และ methanol (46.89 g) extracts ตามลำดับ นำส่วนสกัดคลอโรฟอร์ม (25.00 g) มาแยกโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และใช้ตัวชะเป็น CHCl₃, CHCl₃-EtOAc และ EtOAc-MeOH ได้ 18 fractions นำ fractions ที่ 6 มาแยกสารออกจากกัน โดยใช้

3.2.8(5)

ตัวชะ hexane-EtOAc ได้ 13 subfractions นำ subfractions ที่ 10 มาทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธีการคล้ายคลึงกับข้างต้น ได้สาร 3.2.8(2) (1 mg) นำ fraction 7 มาแยกสาร โดยใช้ตัวชะเป็น hexane-CHCl₃, CHCl₃ และ CHCl₃-MeOH ได้ 9 subfractions นำ subfractions ที่ 6 มาแยกสารให้บริสุทธิ์ ได้สาร 3.2.8(5) (2 mg) ทำนองเดียวกัน จาก subfractions ที่ 7 สามารถแยกได้สาร 3.2.8(3) (2 mg) และจาก subfractions ที่ 8 ได้สาร 3.2.8(1) (16 mg) และสาร 3.2.8(6) (2 mg)

นำส่วนสกัดเมทานอล (25.00 g) มาแยกออกเป็น fractions โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ 18 fractions นำ fraction ที่ 7 มาแยกทำนองเดียวกัน โดยใช้ตัวชะ EtOAc และ EtOAc-MeOH ได้ 8 subfractions นำ subfraction ที่ 6 มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ 2 ครั้ง ได้สาร 3.2.8(7) (2 mg) สำหรับ subfraction ที่ 9 เมื่อใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ซ้ำ 2 ครั้ง ได้สาร 3.2.8(4) (2.5 mg) ส่วน fraction 12 เมื่อทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี 2 ครั้ง ได้สาร 3.2.8(8) (8 mg)

Compound 3.2.8(1) (isosakuranetin): white needles, mp: 178–179 °C ; IR $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3158, 2956, 1636, 1598, 1518, 1496, 1302, 1253, 1164, 833; EIMS m/z (% rel. intensity): 286 [M]⁺ (62), 152 (95), 134 (100), 124 (10); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 2.77 (1H, dd, J = 17.1, 3.0 Hz, H-3a), 3.09 (1H, dd, J = 17.1, 13.0 Hz, H-3b), 3.81 (3H, s, 4'-OMe), 5.33 (1H, dd, J = 13.0, 3.0 Hz, H-2), 5.84 (1H, br s, 7-OH), 5.95 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-6), 5.97 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.93 (2× 1H, d, J = 8.7 Hz, H-3', H-5'), 7.35 (2×1H, d, J = 8.7 Hz, H-2', H-6').

Compound 3.2.8(2) (persicogenin): IR $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3450, 2916, 2848, 1636, 1515, 1458, 1273, 1205, 1156; EIMS m/z (% rel. intensity): 316 [M]⁺ (100), 286 (15), 167 (72), 150 (30), 149 (11), 137 (65); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 2.77 (1H, dd, J = 17.1, 3.0 Hz, H-3a), 3.06 (1H, dd, J = 17.1, 12.9 Hz, H-3b), 3.78 (3H, s, 7-OMe), 3.90 (3H, s, 4'-OMe), 5.31 (1H, dd, J = 12.9, 3.0 Hz, H-2), 5.66 (1H, br s, 3'-OH), 6.03 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-6), 6.05 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.86 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5'), 6.91 (1H, dd, J = 8.3, 2.0 Hz, H-6'), 7.03 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 11.95 (1H, s, 5-OH).

3.2.8(6)

Compound 3.2.8(3) (5,6,7,4'-tetramethoxyflavanone): IR $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 2934, 2847, 1677, 1600, 1516, 1484, 1457, 1261, 1200, 1106, 1020; EIMS m/z (% rel. intensity): 344 $[\text{M}]^+$ (72), 210 (100), 195 (78), 167 (33), 134 (2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.74 (1H, dd, $J = 16.6, 2.2$ Hz, H-3a), 3.01 (1H, dd, $J = 16.6, 13.3$ Hz, H-3b), 3.80, 3.81, 3.84, 3.92 (each 3H, each s, 5-OMe, 6-OMe, 7-OMe, 4'-OMe), 5.33 (1H, dd, $J = 13.3, 2.2$ Hz, H-2), 6.32 (1H, s, H-8), 6.93 (2 $\times$ 1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', H-5'), 7.36 (2 $\times$ 1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', H-6').

Compound 3.2.8(4) (4'-hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavanone): EIMS m/z (% rel. intensity): 330 $[\text{M}]^+$ (98), 210 (87), 195 (100), 167 (65), 120 (10); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.74 (1H, dd, $J = 16.6, 2.8$ Hz, H-3a), 2.99 (1H, dd, $J = 16.6, 13.3$ Hz, H-3b), 3.80, 3.85, 3.92 (each 3H, each s, 5-OMe, 6-OMe, 7-OMe), 5.31 (1H, dd, $J = 13.3, 2.8$ Hz, H-2), 6.32 (1H, s, H-8), 6.86 (2 $\times$ 1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', H-5'), 7.31 (2 $\times$ 1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', H-6').

Compound 3.2.8(5) (2'-hydroxy-4,4',5',6'-tetramethoxychalcone): EIMS m/z (% rel. intensity): 344 $[\text{M}]^+$ (35), 210 (100), 195 (71), 167 (27); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.81, 3.84, 3.88, 3.90 (each 3H, each s, 4-OMe, 4'-OMe, 5'-OMe, 6'-OMe), 6.27 (1H, s, H-3'), 6.92 (2 $\times$ 1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3, H-5), 7.58 (2 $\times$ 1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2, H-6), 7.82, 7.83 (each 1H, each br s, H- α , H- β), 13.74 (1H, s, 2'-OH).

Compound 3.2.8(6) (4,2'-dihydroxy-4',5',6'-trimethoxychalcone): EIMS m/z (% rel. intensity): 330 $[\text{M}]^+$ (100), 210 (91), 195 (80), 167 (34); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.81, 3.88, 3.91 (each 3H, each s, 4'-OMe, 5'-OMe, 6'-OMe), 5.14 (1H, br s, 4-OH), 6.27 (1H, s, H-3'), 6.85 (2 $\times$ 1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3, H-5), 7.54 (2 $\times$ 1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2, H-6), 7.80, 7.81 (each 1H, each br s, H- α , H- β), 13.72 (1H, s, 2'-OH).

3.2.8(7)

Compound 3.2.8(7) (acacetin): IR $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3450, 2927, 1654, 1560, 1508, 1241, 1190, 1165; EIMS m/z (% rel. intensity): 284 $[\text{M}]^+$ (100), 283 (7), 256 (2), 152 (5), 132 (20), 124 (4), 117 (4), 89 (4); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$, 15:1) δ : 3.84 (3H, s, 4'-OMe), 6.22 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 6.38 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 6.51 (1H, br s, H-3), 6.96 (2 $\times$ 1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', H-5'), 7.79 (2 $\times$ 1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', H-6').

Compound 3.2.8(8) (luteolin): mp: 330-332 $^{\circ}\text{C}$; IR $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3423, 2920, 1654, 1611, 1500, 1367, 1267, 1164, 1032, 839; EIMS m/z (% rel. intensity): 286 $[\text{M}]^+$ (100), 258 (26), 153 (14), 134 (7); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$, 10:1) δ : 6.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.37 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.45 (1H, s, H-3), 6.88 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 7.31 (1H, dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, H-6'), 7.33 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2').

การทดสอบฤทธิ์ antimycobacterial

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ใช้ Microplate Alamar Blue Assay (MABA)^{3.2.8[27]} ผลการทดสอบ ดูตารางที่ 3.2.8(1)

การทดสอบฤทธิ์ cytotoxicity

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมะเร็งจากเซลล์ human epidermoid carcinoma of the mouth (KB), human breast cancer (BC) and human small cell lung cancer (NCI-H187) ใช้ colorimetric method^{3.2.8[28]} ผลการทดสอบ ดูตารางที่ 3.2.8(2)

3.2.8(8)

ตารางที่ 3.2.8(1) Antimycobacterial activity of flavonoids

Compound	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
3.2.8(1)	50
3.2.8(3)	inactive ^a
3.2.8(4)	200
3.2.8(5)	inactive ^a
3.2.8(6)	inactive ^a
3.2.8(7)	200
3.2.8(8)	200

^aInactive at $> 200 \mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 3.2.8(2) Cytotoxicity of flavonoids

Compound	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)		
	KB	BC	NCI-H187
3.2.8(1)	inactive ^a	inactive ^a	inactive ^a
3.2.8(3)	inactive ^a	inactive ^a	inactive ^a
3.2.8(4)	inactive ^a	inactive ^a	inactive ^a
3.2.8(5)	inactive ^a	inactive ^a	inactive ^a
3.2.8(6)	inactive ^a	inactive ^a	inactive ^a
3.2.8(7)	inactive ^a	inactive ^a	7.0
3.2.8(8)	inactive ^a	11.0	5.5

^aInactive at $> 20 \mu\text{g/ml}$

เอกสารอ้างอิง

- 3.2.8[1] Iwu, M. M. Handbook of African medicinal plants. CRC Press: Ann Arbor, 1993; pp. 181-182.
- 3.2.8[2] Bunyapraphatsara, N.; Chokechaijaroenporn, O. Thai Medicinal Plants, Vol. 4. Faculty of Pharmacy, Mahidol University and National Center for Genetic Engineering and Biotechnology: Bangkok, 2000; pp. 622-626.
- 3.2.8[3] Inya-Agha, S. I.; Oguntimein, B. O.; Sofowora, A.; Benjamin, T. V. *Int. J. Crude Drug Res.* 1987, **25**, 49.
- 3.2.8[4] Lamaty, G.; Menut, C.; Zollo, P. H. A.; Kuate, J. R.; Bessiere, J. M.; Quamba, J. M.; Silou, T. *J. Essen. Oil Res.* 1992, **4**, 101.
- 3.2.8[5] Bamba, D.; Bessiere, J. M.; Marion, L.; Pelissier, Y.; Fouraste, I. *Planta Med.* 1993, **59**, 184.
- 3.2.8[6] Chowdhury, A. R. *J. Essen. Oil-Bearing Plants* 2002, **5**, 14.
- 3.2.8[7] Ahmad, M.; Nabi, M. N. *Sci. Res. Dacca, Pakistan* 1967, **4**, 154.
- 3.2.8[8] Talapatra, S. K.; Bhar, D. S.; Talapatra, B. *Phytochemistry* 1974, **13**, 284.
- 3.2.8[9] Talapatra, S. K.; Bhar, D. S.; Talapatra, B. *Indian J. Chem.* 1977, **15B**, 806.
- 3.2.8[10] Bose, B. K.; Chakrabarti, P.; Chakravarti, S.; Dutta, S. P.; Barua, A. K. *Phytochemistry* 1973, **12**, 667.
- 3.2.8[11] Bose, P. K.; Chakrabarti, P.; Chakravarti, S.; Dutta, S. P.; Barua, A. K. *Trans. Bose Res. Inst. (Calcutta)* 1974, **37**, 25.
- 3.2.8[12] Arene, E. O.; Pettit, G. R.; Ode, R. H. *Lloydia* 1978, **41**, 186.
- 3.2.8[13] Barua, R. N.; Sharma, R. P.; Thyagarajan, G.; Hertz, W. *Phytochemistry* 1978, **17**, 1807.
- 3.2.8[14] Metwally, A. M.; Ekejiuba, E. C. 1981, **42**, 403.
- 3.2.8[15] Hai, M. A.; Biswas, P. K.; Shil, K. C.; Ahmad, M. U. *J. Bangladesh Chem. Soc.* 1991, **4**, 47.
- 3.2.8[16] Triratana, T.; Suwannuraks, R.; Naengchomnong, W. *J. Med. Assoc. Thailand* 1991, **74**, 283.

- 3.2.8[17] Hai, M. A.; Saha, K.; Ahmad, M. U. *J. Bangladesh Chem. Soc.* 1995, **8**, 139.
- 3.2.8[18] Wollenweber, E.; Dorr, M.; Muniappan, R. *Biochem. Syst. Ecol.* 1995, **23**, 873.
- 3.2.8[19] Wollenweber, E.; Roitman, J. N. *Biochem. Syst. Ecol.* 1996, **24**, 479.
- 3.2.8[20] Dung, N. X.; Lo, V. N.; An, N. T. *Tap Chi Duoc Hoc* 1991, 13.
- 3.2.8[21] Baruah, R. N.; Leclercq, P. A. *Planta Med.* 1993, **59**, 283.
- 3.2.8[22] Baruah, R. N.; Pathak, M. G. *Ind. J. Nat. Prod.* 1993, **9**, 17.
- 3.2.8[23] Biller, A.; Boppre, M.; Witte, L.; Hartmann, T. *Phytochemistry*, 1994, **35**, 615.
- 3.2.8[24] Gonzalez, A. G.; Fraga, B. M.; Hernandez, M. G.; Garcia, V. P. *Phytochemistry* 1982, **21**, 1826.
- 3.2.8[25] Pollock, J. R. A.; Stevens, R. Eds.; Dictionary of Organic Compounds, Vol. 4. Oxford University Press; New York, 1965; p. 2030.
- 3.2.8[26] Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer: New York, 1970.
- 3.2.8[27] Collins, L. A.; Franzblau, S. G. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, **41**, 1004.
- 3.2.8[28] Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenny, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990, **82**, 1107.

3.2.9(1)

โครงการย่อยกลุ่มที่ 3: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยา

3.2 เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยา

โครงการวิจัยหน่วยที่ 3.2.9: มะคำดีควาย (*Sapindus rarak*)

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ท้าววิจัย

มะคำดีควาย (*Sapindus rarak* A. DC.) เป็นไม้ขนาดกลาง มีความสูงประมาณ 15 เมตร มีสรรพคุณพื้นบ้านในการป้องกันรังแคศีรษะ^{3.2.9[1,2]} แกँลิ้ว^{3.2.9[1]} น้ำคั้นจากผลมีความเป็นพิษต่อปลา^{3.2.9[3]} สารสกัดของพืชชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา^{3.2.9[4]} จากการทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดเอทิลอะซีเตต และเมทานอล ของผลมะคำดีควาย (ไม่รวมเมล็ด) พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราที่น่าสนใจ จึงได้ทำการศึกษาต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อสกัดแยก ศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดผลมะคำดีควาย (ไม่รวมเมล็ด) และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

3. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีรายงานวิจัยการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกผลมะคำดีควาย พบสารประกอบ molluscicidal saponins hederagenin, mukurozi-saponin G, mukurozi-saponin E₁ [3.2.9 (1)] และ sapindoside B [3.2.9(2)]^{3.2.9[5]} และ uncommon polyol quebrachitol และ sesquiterpene glycoside mukurozioside IIb^{3.2.9[6]}

3.2.9(2)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการนำสารสกัดเอทิลอะซีเตต และเมทานอลของผลมะคำดีควายแห้ง (ไม่รวมเมล็ด) มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบ triterpene glycoside ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ hederagenin [3.2.9(3)],^{3.2.9[7-8]} 23-O-acetylhederagenin 3-O-(4-O-acetyl-β-D-xylopyranosyl)-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside [3.2.9(4)],^{3.2.9[9]} rarakoside [3.2.9(5)], hederagenin 3-O-(4-O-acetyl-β-D-xylopyranosyl)-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside [3.2.9(1)],^{3.2.9[5]} α-hederin [3.2.9(6)]^{3.2.9[7,10]} และ sapindoside B [3.2.9(2)]^{3.2.9[5,11]} พร้อมกับสารผสมของ β-sitosterol 3-O-β-D-glucopyranoside และ stigmasterol 3-O-β-D-glucopyranoside โดยที่สาร rarakoside [3.2.9(5)] เป็นสารชนิดใหม่

Rarakoside [3.2.9(5)] เป็น triterpene glycoside ชนิดใหม่ เป็นผงสีขาว ข้อมูล HRFABMS (negative ion mode) แสดง pseudomolecular ion ที่ m/z 923.5019 ซึ่งตรงกับ C₄₈H₇₆O₁₇ ลักษณะของ ¹H NMR สเปกตรัมบ่งบอกว่าเป็น triterpene glycoside ข้อมูล ¹H NMR ในส่วนของ คล้ายคลึงกับ hederagenin [3.2.9(3)] มีข้อแตกต่างที่สำคัญคือสัญญาณที่ upfield และ downfield shifts ของ H-3 และ H₂-23 ข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR พบว่ามีสัญญาณ anomeric ของหมู่ rhamnose ที่ δ_H 6.31 (br s) และ δ_C 101.5 จากข้อมูล 2D NMR มีสัญญาณ anomeric ของหมู่ xylose ที่ δ_H 5.47 และ δ_C 107.4 และของ arabinose ที่ δ_H 4.92 และ δ_C 105.2 การพบ m/z 791 และ m/z 749 สอดคล้องกับการแตกของหมู่ xylose และ xylose ร่วมกับหมู่ acetyl ในขณะที่ m/z 603 สอดคล้องกับการแตกของหมู่ xylose, acetyl และ rhamnose จาก molecular ion จากลักษณะการแตกในแมสสเปกตรัมทำให้สามารถทราบลำดับของหมู่น้ำตาลดังแสดงในสูตรโครงสร้างของสาร 3.2.9(5) การพบสัญญาณที่ 1734 cm⁻¹ ใน IR สเปกตรัม ร่วมกับการพบหมู่เมทิลที่ δ_H 2.05 และหมู่คาร์บอนิลที่ δ_C 170.7 ใน NMR สเปกตรัมเป็นการยืนยันว่ามีหมู่ acetoxyl หมู่ acetoxyl นี้ควรจะอยู่ที่ตำแหน่ง 23 ทั้งนี้สังเกตได้จากการที่เกิด downfield shift ของ H₂-23 (δ_H 4.52 และ 4.59) ในสาร 3.2.9(5) เมื่อเทียบกับ H₂-23 (δ 3.93 และ 4.28) ของสาร 3.2.9(1) หรือ สาร 3.2.9(2) การพบความสัมพันธ์ HMBC ระหว่าง H-23 กับ acetoxyl carbonyl carbon เป็น

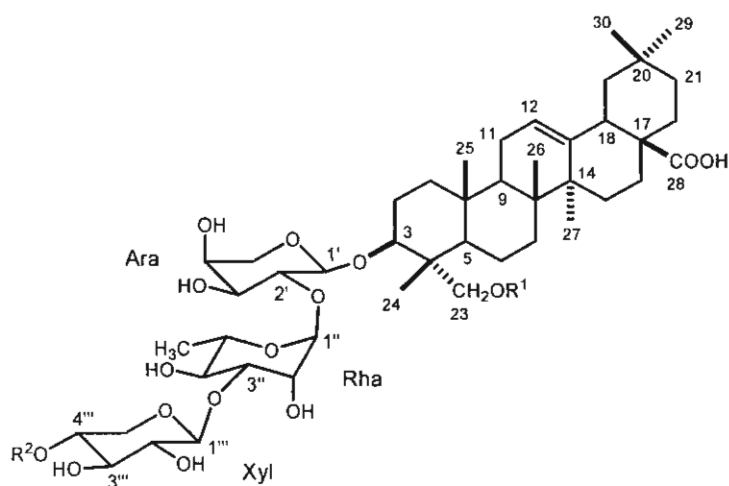
3.2.9(3)

การยืนยันตำแหน่งของหมู่ acetoxyl นี้ นอกจากนั้นแล้วยังพบ large upfield shift ของ H-3 ในสาร 3.2.9(5) (δ 3.93) เมื่อเทียบกับของสาร 3.2.9(1) (δ 4.30) และสาร 3.2.9(2) (δ 4.28) ^{3.2.9[9]}

เทคนิค HMBC ทำให้ทราบตำแหน่งของ aglycone ที่ต่อกับน้ำตาล นั่นคือการพบความสัมพันธ์ระหว่าง anomeric proton ของ arabinose H_A-1 กับ C-3 และ H-3 กับ C_A-1 แสดงว่า arabinose unit อยู่ที่ตำแหน่ง 3 นอกเหนือจากพบการเกิด pronounced downfield shift ของสัญญาณ C-3 ในสาร 3.2.9(5) เมื่อเทียบกับของสาร 3.2.9(3) ในทำนองเดียวกันการพบความสัมพันธ์ระหว่าง anomeric proton ของ rhamnose H_R-1 กับ C-2 arabinose (C_A-2) และ H_A-2 กับ C_R-1 แสดงว่า rhamnose unit อยู่ที่ตำแหน่ง 2 ของ arabinose unit และการพบความสัมพันธ์ระหว่าง anomeric proton ของ xylose (H_X-1) กับ rhamnose unit C_R-3 และ H_R-3 กับ C_X-1 แสดงว่าหมู่ น้ำตาลที่ปลายคือ xylose unit ต่ออยู่ที่ตำแหน่ง 3 ของ rhamnose unit นอกเหนือจากนี้แล้วยังพบ large downfield shift ของสัญญาณ C_R-3 ในสาร 3.2.9(5) เมื่อเทียบกับของสาร 3.2.9(6) ดังนั้นสาร 3.2.9(35) จึงมีโครงสร้างเป็น 23-O-acetylhederagenin 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside และให้ชื่อว่า rarakoside

เมื่อนำสารทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา พบว่าเฉพาะ sapindoside B [3.2.9(2)] และ α-Hederin [3.2.9(6)] เท่านั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา โดยที่สาร 3.2.9(2) มีฤทธิ์สูงกว่าสาร 3.2.9(6) ต่อเชื้อ *Candida albicans* ATCC 10230, *C. kruselii*, *Trichophyton mentagrophyte*, *T. rubrum* และ *Acremonium* spp. ส่วนสาร 3.2.9(6) มีฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อรา *T. rubrum* สาร 3.2.9(2) มีฤทธิ์ยับยั้งระดับปานกลางต่อเชื้อรา *C. tropicalis* ในขณะที่ สาร 3.2.9(6) มีฤทธิ์ยับยั้งระดับปานกลางต่อเชื้อรา *T. mentagrophyte* และ *Acremonium* spp. ส่วนสาร 3.2.9(1) และ 3.2.9(3-5) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราทุกชนิด ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสาร 3.2.9(2) และ 3.2.9(6) สอดคล้องกับที่เคยมีผู้รายงาน ^{3.2.9[12]} ผลการทดสอบนี้แสดงว่าหมู่ น้ำตาลมีความสำคัญต่อฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา ในขณะที่หมู่ acetoxyl ที่อยู่บนน้ำตาลทำให้สูญเสียฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา

3.2.9(4)



3.2.9(1) $R^1 = H$, $R^2 = Ac$ (Mukurozi-saponin E_1)

3.2.9(2) $R^1 = R^2 = H$ (Sapindoside B)

3.2.9(3) $R^1 = H$, no glycosidic unit (Hederagenin)

3.2.9(4) $R^1 = R^2 = Ac$ (23-O-Acetylhederagenin 3-O-(4-O-acetyl- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranoside))

3.2.9(5) $R^1 = Ac$, $R^2 = H$ (Rarakoside)

3.2.9(6) $R^1 = H$, no xylose unit (α -Hederin)

3.2.9(5)

วัสดุและวิธีการ

การสกัด

ทำการสกัดผลมะคำดีควาย (ไม่รวมเมล็ด) ที่แห้งและหั่นแล้ว (3.9 กิโลกรัม) ด้วยเฮกเซน เอทิลอะซีเตต และเมทานอล (ปริมาตร 3 ลิตร จำนวน 6 ครั้งในแต่ละสารสกัด) ได้สารสกัดเฮกเซน (8.9 กรัม ลักษณะเป็นขี้ผึ้งสีเหลืองอมส้ม) เอทิลอะซีเตต (265.9 กรัม เป็นของหนืดสีน้ำตาลเข้ม) และเมทานอล (919.0 กรัม เป็นของหนืดสีน้ำตาลเข้ม) ตามลำดับ สารสกัดเอทิลอะซีเตต และเมทานอล แสดงฤทธิ์ด้านเชื้อรา จึงนำมาแยกต่อไป

การแยกและทำสารให้บริสุทธิ์

สารสกัดเอทิลอะซีเตต

นำสารสกัดเอทิลอะซีเตตมาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, ใช้ระบบชะ *n*-hexane-EtOAc, EtOAc, EtOAc-MeOH และ MeOH โดยค่อยๆเพิ่มปริมาตรของตัวทำละลายชนิดมีขั้ว) สามารถแยกได้สาร 12 กลุ่ม

สารกลุ่ม 5 นำมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (CHCl_3 และ CHCl_3 -MeOH โดยค่อยๆเพิ่มปริมาตรของเมทานอล) ได้ 6 กลุ่มย่อย เมื่อนำกลุ่มย่อยที่ 5 มาตกผลึก พบว่าได้สาร 3.2.9(3)^{3.2.9[7-8]} (82 มิลลิกรัม เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี)

สารกลุ่ม 12 นำมาแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิดเร็ว (silica gel, *n*-hexane-EtOAc, EtOAc และ EtOAc-MeOH) แยกได้ 10 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 7 นำมาแยกโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่ออีก 2 ครั้ง ได้สาร 3.2.9(4)^{3.2.9[9]} (12 มิลลิกรัม เป็นผงสีขาว) จากการใช้ตัวชะ CH_2Cl_2 และ CH_2Cl_2 -MeOH

กลุ่มย่อยที่ 8 นำมาแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่ออีก 3 ครั้ง (ใช้ตัวชะ EtOAc และ EtOAc-MeOH) ตามด้วย reversed-phase column chromatography (silica gel 60 RP-

3.2.9(6)

18 (40–63 μm) ชะด้วย H_2O – MeOH โดยเพิ่มปริมาตรของ MeOH) สามารถแยกได้สารใหม่ rarakoside [3.2.9(5)] (12 มิลลิกรัม เป็นผงสีขาว)

สารสกัดเมทานอล

นำสารสกัดเมทานอลมาแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิดเร็ว (silica gel, CHCl_3 , CHCl_3 – MeOH และ MeOH) แยกได้ 5 กลุ่ม

กลุ่ม 4 มาแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel ใช้ CHCl_3 – MeOH เป็นตัวชะ) แยกได้ 19 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 8 นำมาล้างด้วย CHCl_3 ได้สารผสมของแซ็งส์ขาวของ β -sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside และ stigmasterol 3-O- β -D-glucopyranoside (2.4 มิลลิกรัม)

กลุ่ม 5 นำมาแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, CHCl_3 , CHCl_3 – MeOH) แล้วนำกลุ่มย่อยที่ 6 มาแยกต่อโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, CH_2Cl_2 และ CH_2Cl_2 – MeOH) ได้ 10 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 2 นำมาแยกต่อ (silica gel, ชะด้วย CH_2Cl_2 และ CH_2Cl_2 – MeOH) ตามด้วยการแยกต่อโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, EtOAc และ EtOAc – MeOH) ให้ hederagenin 3-O-(4-O-acetyl- β -D-xylopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranoside [3.2.9(1)]^{3.2.9[5]} (18 มิลลิกรัม)

กลุ่มย่อยที่ 4 เช่นเดียวกับกลุ่มย่อยที่ 2 นำมาแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel ชะด้วย CH_2Cl_2 และ CH_2Cl_2 – MeOH) ตามด้วยการแยกต่อโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel ใช้ระบบชะ CH_2Cl_2 – MeOH , 95:5) ให้ hederagenin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranoside (α -hederin) [3.2.9(6)]^{3.2.9[7,10]} (14 มิลลิกรัม)

3.2.9(7)

กลุ่มย่อยที่ 6 แยกต่อโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, EtOAc และ EtOAc-MeOH) ให้ hederagenin 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside (sapindoside B) [3.2.9(2)]^{3.2.9(5,11)} (36 มิลลิกรัม เป็นผลึกไม่มีสี)

Rarakoside [3.2.9(5)]: เป็นผงสีขาว m.p. 217-220 °C (dec.) ให้สีเขียวน้ำเงิน กับ anisaldehyde reagent $[\alpha]_D^{30} + 24.0^\circ$ (MeOH, c 0.10); IR (KBr): $\nu_{\max}$ 3421, 2927, 1734, 1647, 1559, 1458, 1386, 1238, 1047, 668 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5), aglycone protons: δ 0.88 (3H, s, 25-Me), 0.92 (3H, s, 29-Me), 0.99 (3H, s, 30-Me), 1.01 (3H, s, 26-Me), 1.12 (3H, s, 24-Me), 1.31 (3H, s, 27-Me), 2.05 (3H, s, AcO), 3.36 (1H, br d, $J = \text{ca } 13 \text{ Hz}$, H-18), 3.93 (1H, overlapping signal, H-3), 4.52, 4.59 ($2 \times 1\text{H}$, overlapping signal, H₂-23), 5.47 (1H, overlapping signal, H-12), sugar protons: δ 1.58 (3H, d, $J = 6 \text{ Hz}$, H-6''), 3.92 (1H, overlapping signal, H-5'''a), 4.08 (1H, t, $J = 8.0 \text{ Hz}$, H-2'''), 4.20 ($3 \times 1\text{H}$, overlapping signal, H-3', H-3''', H-4'''), 4.22 (1H, overlapping signal, H-4'), 4.37 (1H, overlapping signal, H-5'''b), 4.47 (1H, t, obscured signal, H-4''), 4.50 (1H, overlapping signal, H-5'a), 4.59 ($2 \times 1\text{H}$, overlapping signal, H-2', H-5'b), 4.65 (1H, m, H-5''), 4.76 (1H, dd, obscured signal, H-3''), 4.90 (1H, overlapping signal, H-2''), 4.92 (1H, overlapping signal, H-1'), 5.47 (1H, overlapping signal, H-1'''), 6.31 (1H, br s, H-1''); $^{13}\text{C-NMR}$ (pyridine- d_5), aglycone carbons: δ 13.5 (C-24), 16.0 (C-25), 17.4 (C-26), 18.4 (C-6), 20.9 (acetyl CH_3), 23.9 (C-11, C-16, C-30), 26.0 (C-27), 26.2 (C-2), 28.3 (C-15), 31.0 (C-20), 33.0 (C-7), 33.4 (C-22), 34.4 (C-21), 36.9 (C-10), 38.7 (C-1), 39.8 (C-8), 42.1 (C-14)^a, 42.2 (C-18)^a, 42.4 (C-4)^a, 46.7 (C-19)^c, 46.9 (C-17)^c, 48.4 (C-5)^b, 48.6 (C-9)^b, 66.0 (C-23), 67.4 (C-5'''), 71.3 (C-4'''), 75.8 (C-2'''), 78.5 (C-3'''), 82.3 (C-3), 122.2 (C-12), 145.3 (C-13), 170.7 (acetyl CO), 180.1 (C-28), sugar carbons: 18.5 (C-6''), 66.1 (C-5'), 69.6 (C-4')^d, 69.7 (C-5'')^d, 71.8 (C-2''), 72.9 (C-4''), 74.7 (C-3'),

3.2.9(8)

75.3 (C-2'), 83.3 (C-3''), 101.5 (C-1''), 105.2 (C-1'), 107.4 (C-1'''),^{a-d} assignments may be reversed for signals with the same superscript; ความสัมพันธ์ HMBC: H_A-1' (C-3), H-3 (C_A-1'), H_R-1'' (C_A-2'), H_A-2' (C_R-1''), H_X-1''' (C_R-3''), H_R-3'' (C_X-1'''), H-23 (acetyl CH₃); FABMS (negative ion mode): *m/z* (rel. intensity) 923 [M-H]⁻ (100), 791 [(M-H)-132]⁻ (20), 749 [(M-H)-132+42]⁻ (15), 603 [(M-H)-132-42-146]⁻ (20), HR-FABMS (negative ion mode): *m/z* 923.5019 [M-H]⁻ (คำนวณสำหรับ C₄₈H₇₆O₁₇-H, 923.5004).

Hederagenin [3.2.9(3)]: เป็นสารหลัก เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี mp. >300 °C ให้สีฟ้ากับ anisaldehyde reagent ข้อมูล ¹H NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.9[6-7]}

สาร 3.2.9(4): เป็นผงสีขาว ให้สีเขียวกับ anisaldehyde reagent ข้อมูล ¹H- และ ¹³C-NMR สอดคล้องกับ 23-O-acetylhederagenin 3-O-(4-O-acetyl-β-D-xylopyranosyl)-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside ที่มีผู้แยกได้จากต้น *S. emarginatus*^{3.2.4[8]}

สาร 3.2.9(1): ให้สีเขียวกับ anisaldehyde reagent ข้อมูล ¹H- และ ¹³C-NMR สอดคล้องกับ mukurozi-saponin E1 หรือ hederagenin 3-O-(4-O-acetyl-β-D-xylopyranosyl)-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside ที่มีผู้แยกได้จากต้น *S. mukurossi*^{3.2.9[9]}

α-Hederin [3.2.9(6)]: ขงแข็งสีขาว ให้สีเขียวกับ anisaldehyde reagent ข้อมูล ¹H- และ ¹³C-NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.9[10-11]}

Sapindoside B [3.2.9(2)]: เป็นผลึกไม่มีสี mp. 238-240 °C ให้สีเขียวกับ anisaldehyde reagent ข้อมูล ¹H- และ ¹³C-NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.9[12-13]}

3.2.9(9)

ตาราง 3.2.9(1)ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสาร 3.2.9(2) และ 3.2.9(6)

เชื้อรา	MIC (µg/ml)	
	สาร 3.2.9(2)	สาร 3.2.9(6)
<i>Microsporum</i> spp.	54	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10230	6.8	NA
<i>C. krusei</i>	6.8	85.0
<i>C. tropicalis</i>	27.0	NA
<i>Trichophyton mentagophyte</i>	13.5	42.5
<i>T. rubrum</i>	6.8	10.6
<i>Acremonium</i> spp.	6.8	21.3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	NA	NA
<i>A. flavus</i>	NA	NA
<i>Penicillium</i> spp.	NA	NA

NA, noactivity at 100 µg/ml

เอกสารอ้างอิง

- 3.2.9[1] Burkill, I. H. A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula. Vol. II. Ministry of Agriculture and Co-operatives, Kuala Lumpur, 1966, pp. 1993.
- 3.2.9[2] Bunyaphratharsa, N.; Chokechaijaroenporn, O. Thai Medicinal Plants, Vol. 3. Faculty of Pharmacy, Mahidol University and National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, 2000, pp. 547.
- 3.2.9[3] Chiayvareesajja, S.; Mahabusarakam, W.; Maxwell, J. F.; Wiriyachitra, P.; Towers, G. H. N. *J. Sci. Soc. Thailand* 1987, 13, 29.
- 3.2.9[4] Phongpaichit, S.; Suvannarat, N.; Petcharat, V.; Ongsakul, M.; Nilrat, L.; Wiriyachitra, P. *Songkhanakarin J. Sci. Tech.* 1992, 14, 361.
- 3.2.9[5] Hamburger, M.; Slacanin, I.; Hostettmann, K.; Dyatmiko, W.; Sutarjadi, W. *D. Phytochem. Anal.* 1992, 3, 231.
- 3.2.9[6] Chung, M. S.; Kim, N. C.; Long, L.; Shamon, L.; Ahmad, W. Y.; Sagrero-Nieves; Kardono, L. B. S.; Kennelly, E. J.; Pezzuto, J. M.; Soejarto, D. D.; Kinghorn, A. D. *Phytochem. Anal.* 1997, 8, 49.
- 3.2.9[7] Sawada, H.; Miyakoshi, M.; Ida, Y.; Shoji, J. *Phytochemistry* 1993, 34, 1117.
- 3.2.9[8] Jayasinghe, L.; Shimada, H.; Hara, N.; Fujimoto, Y. *Phytochemistry* 1995, 40, 891.
- 3.2.9[9] Kanchanapoom, T.; Kasai, R.; Yamasaki, K. *Chem. Pharm. Bull.* 2001, 49, 1195.

3.2.9(11)

- 3.2.9[10] Lavaud, C.; Marie-Laure, C.; Pouny, I.; Litaudon, M.; Sevenet, T.
Phytochemistry **2001**, *57*, 469.
- 3.2.9[11] Kimata, H.; Nakashima, T.; Kokubun, S.; Nakayama, K.; Mitoma, Y.;
Kitahara, T.; Yata, N.; Tanaka, O. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 1998.

3.2.10(1)

โครงการย่อยกลุ่มที่ 3: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยา

3.2 เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยา

โครงการวิจัยหน่วยที่ 3.2.10: ขนุนป่า (*Artocarpus rigidus* subsp. *rigidus*)

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

พืชในสกุล *Artocarpus* (วงศ์ Moraceae) มีประมาณ 47 ชนิด พบกระจายอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และแปซิฟิก^{3.2.10(1)} ในประเทศไทยพบพืชสกุลนี้บางชนิด รวมทั้งขนุนป่า (*Artocarpus rigidus* Blume subsp. *rigidus*) ในภาคใต้ ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชชนิดนี้มาก่อน จากการทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดคลอโรฟอร์มและเมทานอล ของส่วนเปลือกราก พบว่ามีฤทธิ์ antiplasmodial, antimycobacterial และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่น่าสนใจ จึงได้ทำการศึกษาต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อสกัดแยก ศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดของส่วนเปลือกรากขนุนป่า และศึกษาฤทธิ์ antiplasmodial, antimycobacterial และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

3. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

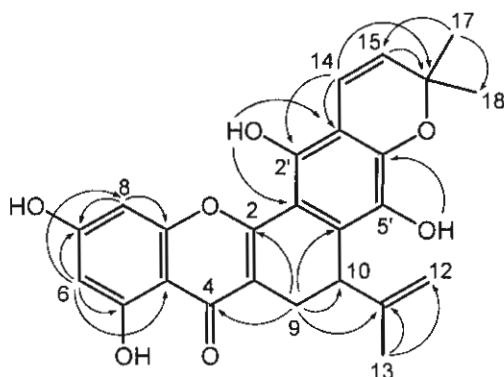
มีรายงานวิจัยการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชในสกุล *Artocarpus*^{3.2.10(2)} แต่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ *A. rigidus* subsp. *rigidus* มาก่อน

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกกรากขนุนป่า (*A. rigidus subsp. rigidus*) พบสารฟีนอลิก 6 ชนิด เป็นสารฟีนอลิกชนิดใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ artorigidusin A [3.2.10(1)] และ โครโมน artorigidusin B [3.2.10(2)] พร้อมกับสารที่มีผู้รายงานไว้แล้วคือ แซนโทน artonol B [3.2.10(3)], ฟลาโวนอยด์ artonin F [3.2.10(4)], ฟลาโวนอยด์ cycloartobiloxanthone [3.2.10(5)] และแซนโทน artoindonesianin C [3.2.10(6)] สาร 3.2.10(3-4) เคยพบใน *A. communis*^{3.2.10[3,4]} ส่วนสาร 3.2.10(5) และ 3.2.10(6) เคยมีการรายงานไว้แล้วในพืช *A. nobilis*^{3.2.10[5]} และ *A. teysmanii*^{3.2.10[6]} ตามลำดับ

สาร 3.2.10(1) เป็นสารสีเหลืองอมน้ำตาล m.p. 224–226 °C IR สเปกตรัมพบ หมู่ไฮดรอกซิล (3535, 3434 cm^{-1}) และ conjugated keto (1662 cm^{-1}) ของฟลาโวน ข้อมูล HRFABMS (positive ion mode) แสดง $[M+H]^+$ ion ที่ m/z 435.1446 ซึ่งตรงกับ $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{O}_7$ ลักษณะของ ^1H NMR สเปกตรัม [ตาราง 3.2.10(1)] แสดง two doublet ($J = 1.9$ Hz) ที่ δ 6.24 และ 6.56 ซึ่งเป็นลักษณะของสัญญาณ H-6 and H-8 ตามลำดับของฟลาโวนอยด์ ความสัมพันธ์ HMBC ยืนยันว่าสารนี้มีหมู่แทนที่ชนิด 5,7-dihydroxyl มีหมู่ 5-hydroxyl ซึ่งสังเกตจาก chelated signal ที่ δ 13.14 ในข้อมูล ^1H -NMR ^1H -NMR สเปกตรัมของ 3.2.10(1) แสดงสัญญาณแบบ ABX ของ two double doublets ที่ δ 2.44 ($J = 16.0$ และ 6.6 Hz) และ 3.35 ($J = 16.0$ และ 2.0 Hz) และ broad doublet ที่ δ 3.97 ($J = 6.6$ Hz) ของ H-9 และ H-10 ตามลำดับ สารนี้มีหมู่ isopropenyl โดยพบสัญญาณ singlet ที่ δ 1.75 และ two broad singlet ที่ δ 4.30 และ 4.63 และจากความสัมพันธ์ HMBC ทำให้ทราบว่าต่ออยู่ที่ตำแหน่ง 10 สารนี้มีวง 2,2-dimethylpyran โดยพบสัญญาณ two singlet ที่ δ 1.44 (17-Me) และ 1.46 (18-Me) และ two olefinic resonances ที่ δ 5.74 (H-15) และ 6.75 (H-14) การกำหนดตำแหน่งของหมู่ต่างๆ รวมทั้งหมู่ phenolic hydroxyl ที่ 2' และ 5' กระทำโดยใช้การทดลอง HMBC การกำหนดข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR กระทำโดยใช้การทดลอง COSY, DEPT, HMQC และ HMBC ข้อมูล ^1H -และ ^{13}C -NMR ของสาร 3.2.10(1) คล้ายคลึงกับของ artonol E^{3.2.10[3]} แตกต่างที่สาร 3.2.10(1) ไม่มีหมู่ methoxyl ที่ตำแหน่ง 7 ดังนั้นฟลาโวนอยด์นี้จึงมีโครงสร้างเป็น 3.2.10(1) และให้ชื่อว่า artorigidusin A

3.2.10(3)

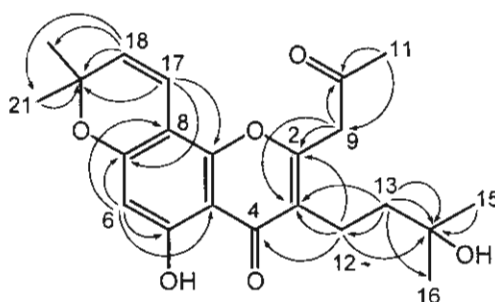


โครงสร้างและความสัมพันธ์ HMBC ของ 3.2.10(1)

สาร 3.2.10(2) เป็นสารสีส้มอมน้ำตาล IR สเปกตรัมแสดงหมู่ไฮดรอกซิล (3383 cm^{-1}) conjugated keto (1659 cm^{-1}) และ keto (1727 cm^{-1}) ข้อมูล HRFABMS แสดง $[M+H]^+$ ion ที่ m/z 387.1802 ซึ่งตรงกับ $C_{22}H_{26}O_6$ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม [ตารางที่ 3.2.10 (1)] แสดงสัญญาณ broad singlet ที่ δ 12.75 แสดงว่ามีหมู่ chelated 5-hydroxyl พบสัญญาณของ aromatic singlet เพียงแห่งเดียวของ H-6 ที่ δ 6.22 การพบ broad singlet ของสองหมู่เมทิลที่ δ 1.43 และ two doublets ($J = 10.0\text{ Hz}$) ของ olefinic resonances ที่ δ 5.51 และ 6.55 แสดงว่ามีวง 2,2-dimethylpyran ซึ่งยืนยันโดยใช้การทดลอง HMBC

สารนี้มีหมู่ 1,1-dimethylpropanol ที่ตำแหน่ง 3 ซึ่งทราบได้จากสัญญาณของ two-proton multiplets สองชุดที่ δ 2.52 (H-12) และ 1.60 (H-13) และ singlet ของหมู่ methyl สองหมู่ (15-Me และ 16-Me) ที่ δ 1.26 สัญญาณของ two singlet ที่ δ 3.81 (H-9) และ 2.30 (H-11) เป็นของหมู่ $-\text{CH}_2\text{COCH}_3$ ที่ตำแหน่ง 2 มีหมู่ saturated keto ที่ C-10 ซึ่งยืนยันโดยพบ $^{13}\text{C-NMR}$ resonance ที่ δ 201.0 การทดลอง HMBC ยืนยันว่ามีหมู่แทนที่ทั้งสองชนิดและสอดคล้องกับโครงสร้างดังกล่าว ดังนั้นโครโมนนี้จึงมีโครงสร้างเป็น 3.2.10(2) ให้ชื่อว่า artorigidusin B

3.2.10(4)



โครงสร้างและความสัมพันธ์ HMBC ของ 3.2.10(2)

เมื่อนำสารทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ และผลการทดสอบฤทธิ์แสดงไว้ในตารางที่ 3.2.10(2) พบว่าเฉพาะสาร 3.2.10(1), 3.2.10(4) และ 3.2.10(5) เท่านั้นมีฤทธิ์ antiplasmodial ต่อเชื้อ *Plasmodium falciparum* สารทั้ง 6 ชนิดแสดงฤทธิ์ antimycobacterial ต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* โดยที่สาร 3.2.10(4) แสดงฤทธิ์สูงที่สุดที่ค่า MIC 6.25 µg/ml สาร 3.2.10(5) และ 3.2.10(6) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB ในระดับปานกลาง ในขณะที่สาร 3.2.10(2), 3.2.10(5) และ 3.2.10(6) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด BC สาร 3.2.10(1-3), 3.2.10(5) และ 3.2.10(6) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด NCI-H187 โดยที่ artonol B [3.2.10(3)] แสดงฤทธิ์สูงที่สุดที่ค่า IC₅₀ 1.26 µg/ml

วัสดุและวิธีการ

การสกัด

ทำการสกัดเปลือกกรากขนุนป่า (เก็บจากอำเภोजะนะ จังหวัดสงขลา เมื่อ พ.ศ. 2544 ตัวอย่างพืช (Wisit Arjchomphu No. 011) เก็บรักษาไว้ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) ที่แห้งและบดแล้ว (1.5 กิโลกรัม) ด้วยเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ตามลำดับ โดยใช้การสกัดอย่างต่อเนื่อง ได้สารสกัดเฮกเซน (8.4 กรัม ลักษณะเป็นของขุ่นสีน้ำตาล) สารสกัดคลอโรฟอร์ม (16.1 กรัม เป็นของแข็งหนืดสีน้ำตาลเข้ม) และสารสกัดเมทานอล (45.6 กรัม เป็นสารสีน้ำตาลเข้ม) ตามลำดับ

การแยกและทำสารให้บริสุทธิ์

สารสกัดคลอโรฟอร์ม

นำสารสกัดคลอโรฟอร์ม (14.9 กรัม) มาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิดเร็ว (silica gel, 60 PF₂₅₄, 250 กรัม ใช้ระบบชะ *n*-hexane-CHCl₃, CHCl₃ และ CHCl₃-MeOH โดยค่อยๆเพิ่มปริมาตรของตัวทำละลายชนิดมีขั้ว) สามารถแยกได้สาร 12 กลุ่ม (C1-C12)

สารกลุ่ม C10 นำมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, 0.063-0.200 mm, 125 กรัม) ชะด้วย *n*-hexane-CH₂Cl₂, CH₂Cl₂ และ CH₂Cl₂-MeOH โดยค่อยๆเพิ่มปริมาตรของเมทานอล) ได้ 11 กลุ่มย่อย เมื่อนำกลุ่มย่อยที่ 3 แยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ระบบชะ CH₂Cl₂ and CH₂Cl₂-MeOH) ตามด้วยนำมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ใช้ระบบ isocratic, 0.9% MeOH ใน CH₂Cl₂) พบว่าได้สาร 3.2.10(1) (7 มิลลิกรัม เป็นของแข็งสีเหลืองน้ำตาลอ่อน)

3.2.10(6)

รวมสารกลุ่ม C11 และ C12 แล้วนำมาแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, 0.063–0.200 mm, 150 กรัม) ชะด้วย *n*-hexane–CHCl₃, CHCl₃ และ CHCl₃–MeOH โดยค่อยๆเพิ่มปริมาตรของตัวทำละลายมีขั้ว) ได้ 15 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 6 นำมาแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่ออีก 3 ครั้ง โดยใช้ระบบชะเช่นเดิม ได้ artonol B [3.2.9(3)] (14 มิลลิกรัม เป็นผลึกรูปเข็มสีส้มอ่อน) m.p. 267–270 °C.

กลุ่มย่อยที่ 5 นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 ครั้ง (ใช้ตัวชะ CH₂Cl₂ และ CH₂Cl₂–MeOH) ให้อีก 3 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 1 เมื่อแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ใช้ระบบชะเดิม) ตามด้วยนำมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ใช้ระบบ isocratic, 0.9% MeOH ใน CHCl₃) พบว่าได้สาร artonin F [3.2.10(4)] (2 มิลลิกรัม เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน)

กลุ่มย่อยที่ 2 นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 ครั้ง สามารถแยกได้ cycloartobiloxanthone [3.2.10(5)] (15 มิลลิกรัม เป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองน้ำตาลเข้ม)

กลุ่มย่อยที่ 3 เมื่อแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ใช้ระบบ isocratic, 0.9% MeOH ใน CH₂Cl₂) ตามด้วยการแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ใช้ระบบ isocratic, 0.8% MeOH ใน CH₂Cl₂) ได้สาร 3.2.10(2) (7 มิลลิกรัม เป็นของแข็งสีส้มน้ำตาลอ่อน)

สารสกัดเมทานอล

นำสารสกัดเมทานอล (40.3 กรัม) มาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิดเร็ว (silica gel, 60 PF₂₅₄, 250 กรัม ใช้ระบบชะ CH₂Cl₂, CH₂Cl₂–EtOAc, EtOAc, EtOAc–MeOH และ MeOH โดยค่อยๆเพิ่มปริมาตรของตัวทำละลายชนิดมีขั้ว) สามารถแยกได้สาร 17 กลุ่ม (M1–17)

3.2.10(7)

สารกลุ่ม M7 นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 ครั้ง ด้วย CH_2Cl_2 และ $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{--MeOH}$ โดยค่อยๆเพิ่มปริมาตรของเมทานอล พบว่าได้สาร *artoindonesianin C* [3.2.10(6)] (2 มิลลิกรัม เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน)

Artorigidusin A [3.2.10(1)]: เป็นของแข็งสีเหลืองน้ำตาลอ่อน m.p. 224–226 °C; IR (KBr): ν_{max} 3535, 3434, 3159, 2964, 2913, 2855, 1662, 1615, 1560, 1515, 1451, 1401, 1370, 1262, 1183, 1095, 1028, 863, 802 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR แสดงในตารางที่ 3.2.10(1); ESMS: m/z (rel. int.) 435 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100); HRFABMS (positive ion mode): m/z 435.1446 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (คำนวณสำหรับ $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{O}_7+\text{H}$, 435.1444)

Artorigidusin B [3.2.10(2)]: เป็นของแข็งสีส้มน้ำตาลอ่อน IR (KBr): ν_{max} 3383, 2968, 2924, 2852, 1727, 1659, 1578, 1486, 1435, 1350, 1267, 1176, 1159, 1113, 1085, 822 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR แสดงในตารางที่ 3.2.10(1); ESMS: m/z (rel. int.) 409 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100); HRFABMS (positive ion mode): m/z 387.1802 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (คำนวณสำหรับ $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_6+\text{H}$, 387.1808)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ใช้วิธีการของ Desjardins และคณะ^{3.2.10[7]} ส่วนการเลี้ยงเชื้อ *Plasmodium falciparum* (K1, multidrug resistant strain) ใช้วิธีของ Trager และ Jensen^{3.2.10[8]} การทดสอบฤทธิ์ antimycobacterial ต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ใช้วิธีของ Microplate Alamar Blue^{3.2.10[9]}

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง human epidermoid carcinoma ช่องปาก (KB), human breast cancer (BC) และ human small cell lung cancer (NCI-H187) cells ใช้ colorimetric method ของ Skehan และคณะ^{3.2.10[10]}

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ แสดงในตารางที่ 3.2.10(2)

3.2.10(8)

ตาราง 3.2.10(1) ข้อมูล ^1H (300 MHz) และ ^{13}C (100 MHz) NMR ของสาร 3.2.10(1) (ใน acetone- d_6) และ 3.2.10(2) (ใน CDCl_3)

Position	3.2.10(1)		3.2.10(2)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		161.0	-	157.9
3		112.1		122.2
4		180.9		181.8
4a		104.9		104.8
5	13.14, <i>s</i>	163.2	12.75, <i>br s</i>	161.9
6	6.24, <i>d</i> (1.9)	99.8	6.22, <i>s</i>	100.1
7	9.80, <i>br s</i>	164.5		159.5
8	6.56, <i>d</i> (1.9)	94.9		100.7
8a		157.5		152.0
9	2.35, <i>dd</i> (16.0, 2.0) 2.44, <i>dd</i> (16.0, 6.6)	22.3	3.81, <i>s</i>	46.7
10	3.97, <i>br d</i> (6.6)	37.7		201.0
11		145.4	2.30, <i>s</i>	30.0
12	4.30, <i>br s</i> 4.63, <i>br s</i>	111.7	2.52, <i>m</i>	19.1
13	1.75, <i>s</i>	21.8	1.60, <i>m</i>	42.2
14	6.75, <i>d</i> (10.0)	117.2		70.5
15	5.74, <i>d</i> (10.0)	129.7	1.26, <i>s</i>	29.3
16		78.3	1.26, <i>s</i>	29.3
17	1.44, <i>s</i>	28.0	6.55, <i>d</i> (10.0)	114.6
18	1.46, <i>s</i>	28.0	5.51, <i>d</i> (10.0)	127.2
19				78.0
20			1.43, <i>s</i>	28.2
21			1.43, <i>s</i>	28.2
1'		107.1		
2'	8.02, <i>br s</i>	145.3		
3'		110.4		
4'		145.4		
5'	7.59, <i>s</i>	137.3		
6'		128.6		

Assignments were confirmed by COSY, HMQC, HMBC and DEPT experiments.

ตาราง 3.2.10(2)ฤทธิ์ Antiplasmodial, antimycobacterial และ cytotoxic ของสาร
3.2.10(1-6)

Compound	Antiplasmodial (IC ₅₀ , µg/ml)	Antimycobacterial (MIC, µg/ml)	Cytotoxicity (IC ₅₀ , µg/ml)		
			KB	BC	NCI-H187
3.2.10(1)	7.9	50	Inactive ^b	Inactive ^b	5.7
3.2.10(2)	Inactive ^a	12.5	Inactive ^b	12.10	15.63
3.2.10(3)	Inactive ^a	100	Inactive ^b	Inactive ^b	1.26
3.2.10(4)	2.4	6.25	Inactive ^b	Inactive ^b	Inactive ^b
3.2.10(5)	3.7	25	8.56	4.23	11.83
3.2.10(6)	Inactive ^a	12.5	8.4	7.7	7.1

^a Inactive at 10 µg/ml; ^b Inactive at 20 µg/ml.

3.2.10(10)

เอกสารอ้างอิง

- 3.2.10[1] Burkill, I. H. A dictionary of the economic products of the Malay peninsula, Vol. I. Ministry of Agriculture and Co-operatives, Kuala Lumpur, 1966, pp. 249.
- 3.2.10[2] a) Pavanadasivam, G; Sultanbawa, M. U. S.; Mageswaren, R. *Chemistry and Industry* **1974**, 875.
b) Dayal, R.; Seshadri, T. R. *Ind J. Chem.* **1974**, 12, 895.
- 3.2.10[3] Aida, M.; Yamaguchi, N.; Hano, Y.; Nomura, T. *Heterocycles* **1997**, 45, 163.
- 3.2.10[4] Hano, Y.; Yamagami, Y.; Kobayashi, M.; Isohata, R.; Nomura, T. *Heterocycles* **1990**, 31, 877-882.
- 3.2.10[5] Sultanbawa, M. U. S.; Surendrakumar, S. *Phytochemistry* **1989**, 28, 599.
- 3.2.10[6] Makmur, L.; Tukiran, S.; Achmad, S. A.; Aimi, N.; Hakim, E. H.; Kitajima, M.; Takayama, H. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 243.
- 3.2.10[7] Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, 17, 710.
- 3.2.10[8] Trager, W.; Jensen, J. B. *Science* **1976**, 193, 673.
- 3.2.10[9] Collins, L. A.; Franzblau, S. G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 1004.
- 3.2.10[10] Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenny, S.; Boyd, M. R. *J. Nat. Cancer Inst.* **1990**, 82, 1107.

ภาคผนวก

รายชื่อกลุ่มวิจัย

ชื่อ-นามสกุล	เมื่อเข้าร่วมโครงการ			ปัจจุบัน		
	ตำแหน่งวิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งในโครงการ	ตำแหน่งวิชาการ	สังกัด	สถานภาพปัจจุบัน
1. ดร. อภิชาติ สุขสำราญ	รศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	หัวหน้าโครงการ	ศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ยังอยู่ในโครงการ
2. ดร. อธิมา รุกชไชศิริกุล	รศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ผู้ร่วมวิจัย	รศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ยังอยู่ในโครงการ
3. ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ	รศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ผู้ร่วมวิจัย	รศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ยังอยู่ในโครงการ
4. ดร. สมเดช กนกเมธากุล	ผศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ผู้ร่วมวิจัย	รศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ยังอยู่ในโครงการ
5. ดร. นันทนา อรุณฤกษ์	ผศ.	ภาควิชาโณษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ ม. ศรีนครินทรวิโรฒ	ผู้ร่วมวิจัย	รศ.	ภาควิชาโณษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ ม. ศรีนครินทรวิโรฒ	ยังอยู่ในโครงการ

ชื่อ-นามสกุล	เมื่อเข้าร่วมโครงการ			ปัจจุบัน		
	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งในโครงการ	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	สถานภาพปัจจุบัน
6. น.ส. อรไท สุขเจริญ	รศ.	สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะ วิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ผู้ร่วมวิจัย	รศ.	สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะ วิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ยังอยู่ในโครงการ
7. ดร. บดินทร์ ชิตกุล	อ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ผู้ร่วมวิจัย	อ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ยังอยู่ในโครงการ
8. นายบุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล	อ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ผู้ร่วมวิจัย	ผศ.ดร.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ยังอยู่ในโครงการ
9. น.ส. สุรีย์พร หอมวิเศษวงศา		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาปริญญาเอก		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	กำลังศึกษาปริญญาเอก ยังอยู่ในโครงการ
10. นายถนิต ธนะจัดรัชชัยีตนะ		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาปริญญาเอก		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	กำลังศึกษาปริญญาเอก ยังอยู่ในโครงการ
11. นายอารักษ์ ช่วยนกุล		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาปริญญาโท		บริษัทเอกชน	จบปริญญาโทและทำงานแล้ว

ชื่อ-นามสกุล	เมื่อเข้าร่วมโครงการ			ปัจจุบัน		
	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งในโครงการ	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	สถานภาพปัจจุบัน
12. น.ส. สุภาวดี พรหมจินดา		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาปริญญาโท		ศึกษาต่อต่างประเทศ	จบปริญญาโทแล้ว
13. นายชนะ สิริการ		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาปริญญาโท		บริษัทเอกชน	จบปริญญาโทและทำงานแล้ว
14. น.ส. ทิพวรรณ จูประจบ		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาปริญญาโท		บริษัทเอกชน	จบปริญญาโทและทำงานแล้ว
15. นายชัชวาลย์ ช่างทำ		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาปริญญาโท		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	จบปริญญาโทแล้ว กำลังรอศึกษาต่อ ระดับปริญญาเอก
16. น.ส. นุสรา มุหะหมัด		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาปริญญาโท		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	กำลังเขียนวิทยานิพนธ์ระดับปริญญา โท
17. นายวิระ อีสโร		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาปริญญาโท		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	กำลังศึกษาระดับปริญญาโท

ชื่อ-นามสกุล	เมื่อเข้าร่วมโครงการ				ปัจจุบัน	
	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งในโครงการ	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	สถานภาพปัจจุบัน
18. นายมงคล บัวใหญ่รักษา		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. ขอนแก่น	นักศึกษาปริญญาโท		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. ขอนแก่น	จบปริญญาโทแล้ว ยังอยู่ในโครงการ
19. น.ส. ธีรดา ประจวบสุข		ภาควิชาเคมี วิทยาศาสตร์ ม. ขอนแก่น	นักศึกษาปริญญาโท		บริษัทเอกชน	จบปริญญาโทและทำงานแล้ว
20. น.ส. อุมาสี นามดวง		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาปริญญาโท		ภาควิชาเคมี คณะ วิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี ม. ราชภัฏ พระนคร	เข้าโครงการในช่วงหลัง จบปริญญา โทแล้ว
21. น.ส. เสาวณีย์ คำพันธ์		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ผู้ช่วยวิจัย		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	กำลังศึกษาปริญญาเอกทุน คปก. ยังอยู่ในโครงการ
22. น.ส. นริศรา สุวรรณโณชน		ภาควิชาเคมี วิทยาศาสตร์ ม. ศรีนครินทรวิโรฒ	ผู้ช่วยวิจัย		กองพิสูจน์หลักฐาน กรมตำรวจ	จบปริญญาโทและทำงานแล้ว
23. นายสมเกียรติ กองคุณ		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ผู้ช่วยวิจัย		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	กำลังศึกษาระดับปริญญาโท ยังอยู่ในโครงการ

ชื่อ-นามสกุล	เมื่อเข้าร่วมโครงการ			ปัจจุบัน	
	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งในโครงการ	ตำแหน่ง วิชาการ	สังกัด
24. นายสุทธิชัย ชัยสุภินันท์		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. ขอนแก่น	ผู้ช่วยวิจัย		บริษัทเอกชน
					จบปริญญาโทและทำงานแล้ว

ผลงานวิจัย

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

- 1) Suksamrarn S, Suwannapoch N, Phakhodee W, Thanuhiranlert J, Ratananukul P, Chimnoi N, Suksamrarn A. Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull* 2003; 51: 857-859. (Impact factor (2004) = 1.184)
- 2) Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Prajuabsuk T, Soyong K, Kongsaree P, Suksamrarn A. A bioactive triterpenoid and vulpinic acid derivatives from the mushroom *Scleroderma citrinum*. *Planta Med* 2003; 69: 568-571. (Impact factor (2004) = 1.639)
- 3) Homvisasevongsa S, Chuaynugul A, Chimnoi N, Suksamrarn A. Stereoselective synthesis and moulting activity of 2,3-diepi-20-hydroxyecdysone and 2,3-diepi-5 α -20-hydroxyecdysone. *Tetrahedron* 2004; 60: 3433-3438. (Impact factor (2004) = 2.643)
- 4) Rukachaisirikul T, Prabpai S, Kongsaree P, Suksamrarn A. (+)-Bornyl piperate, a new monoterpene ester from the roots of *Piper* aff. *pedicellatum*. *Chem Pharm Bull* 2004; 52: 760-761. (Impact factor (2004) = 1.184)
- 5) Rukachaisirikul T, Siriwattanakit P, Sukcharoenphol K, Wongvein C, Rattanaweang P, Wongwattanauch P, Suksamrarn A. Chemical constituents and bioactivity of *Piper samentosum*. *J Ethnopharmacol* 2004; 93: 173-176. (Impact factor (2004) = 1.420)
- 6) Suksamrarn A, Chotipong A, Suavansri T, Boongird S, Timsuksai P, Chuaynugul A. Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*. *Arch Pharm Res* 2004; 27: 507-511. (Impact factor (2004) = 0.686)
- 7) Yingyongnarongkul B, Kumpun S, Chimnoi N. C-25 epimeric 26-haloponasterone A: Synthesis, absolute configuration and moulting activity. *Steroids* 2005; 70: 636-644. (Impact factor (2004) = 2.337)
- 8) Suksamrarn S, Komutiban O, Ratananukul P, Lartpornmatulee N, Chimnoi N, Suksamrarn A. Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull* 2006, in press. (Impact factor (2004) = 1.184)

- 9) Suksamrarn S, Panseeta P, Kunchanawatta S, Distaporn T, Ruktasing S, Suksamrarn A. Ceanothane- and lupane-type triterpenes with antiplasmodial and antimycobacterial activities from *Ziziphus cambodiana*. *Chem Pharm Bull* 2006, accepted. (Impact factor (2004) = 1.184) เป็นผลงานที่ใช้ทุน สกว. ร่วมกับทุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
- 10) Changtam C, Sukcharoen O, Yingyongnarongkul B, Suksamrarn A. Biotransformations of 20-hydroxyecdysone and analogues by *Curvularia* NRRL 2178. *Steroids* 2006, accepted with corrections. (Impact factor (2004) = 2.337) เป็นผลงานที่ใช้ทุน สกว. ร่วมกับทุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
- 11) Rukachaisirikul T, Innok P, Aroonrerk N, Boonamnuyaylap W, Limrangsun S, Boonyon C, Woonjina U, Suksamrarn A. Antibacterial Pterocarpanes from *Erythrina subumbrans*. *J Ethnopharmacol*, submitted. (Impact factor (2004) = 1.420)
- 12) Namdaung U, Aroonrerk N, Suksamrarn S, Danwisetkanjana K, Saenboonrueng J, Arjchomphu W, Suksamrarn A. Bioactive constituents of the root barks of *Artocarpus rigidus* subsp *rigidus*. *Phytochemistry*, submitted. (Impact factor (2004) = 2.101)
- 13) ChUNET C, Aroonrerk N, Rukachaisirikul T, Suksamrarn S, Suksamrarn A. Antifungal triterpene glycosides from the fruits of *Sapindus rarak*. *Fitoterapia*, submitted. (Impact factor (2004) = 1.042)
- 14) Yingyongnarongkul B, Wongkrajang K, Jankam A, Kumpun S, Suksamrarn A. Antimycobacterial and cytotoxic activities of anthraquinones from *Prismatomeris filamentosus*. *Fitoterapia*, submitted. (Impact factor (2004) = 1.042) เป็นผลงานที่ใช้ทุน สกว. ร่วมกับทุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
- 15) Kumpun S, Yingyongnarongkul B, Lafont R, Suksamrarn A. Stereoselective synthesis and moulting hormone activity of integristerone A and analogues. *Tetrahedron*, manuscript in preparation. To be submitted to *Tetrahedron* by February 2006. (Impact factor (2004) = 2.643)
- 16) Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Nasomjai P, Soyong K, Isobe M, Kongsaree P, Prabpai S, Suksamrarn A. Antifungal azaphilones from the fungus *Chaetomium cupreum*, manuscript in preparation. To be submitted to *J Nat Prod* by February 2006. (Impact factor (2004) = 2.202)