



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากบุหรงดอย ระฆังเขี้ยว
และมะตะ

(Chemical Constituents and Biological Activities from
Dasymaschalon yunnanense, *Milusa cuneata* and *Garcinia
mckeaniana*)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญวดี ฤทธิ์วิกรม

มิถุนายน 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากบุงหรงดอย ระฆังเขียว และมะตะ
(Chemical Constituents and Biological Activities from *Dasymaschalon yunnanense*,
Millettia cuneata and *Garcinia mckeaniana*)

ผู้วิจัย สังกัด
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญวดี ฤทธิวิกรม

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและต้นสังกัด

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ: TRG5880098

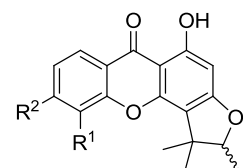
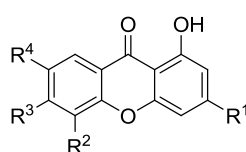
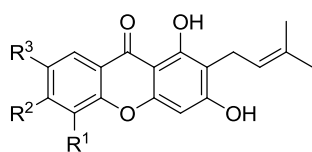
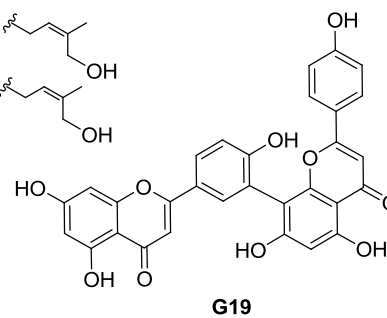
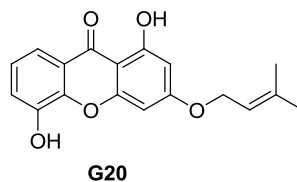
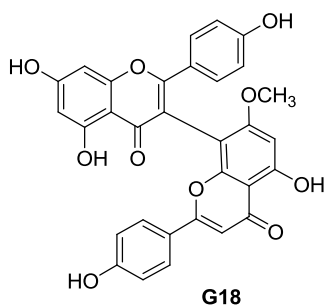
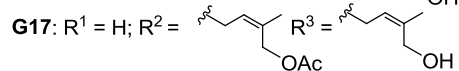
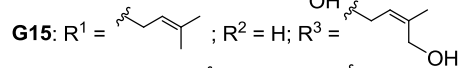
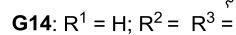
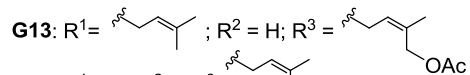
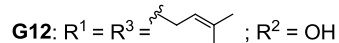
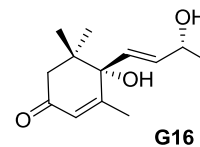
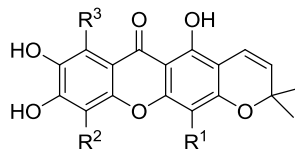
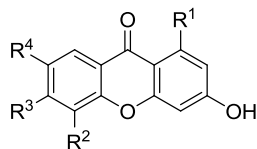
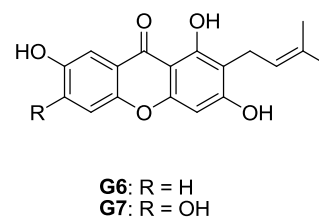
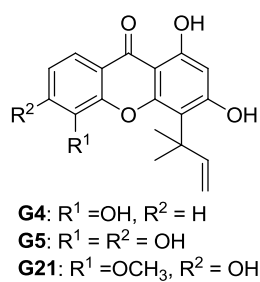
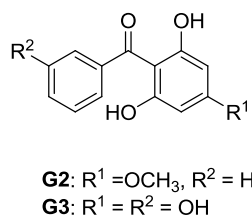
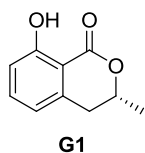
ชื่อโครงการ: องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากบุหงดอย ระฆังเขียว และมะตะ
(Chemical Constituents and Biological Activities from *Dasymaschalon yunnanense*, *Milium cuneata* and *Garcinia mckeaniana*)

ชื่อหลักวิจัย และสถาบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญวดี ฤทธิวิกรม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address: thunwadee.r@cmu.ac.th, othunwadee@gmail.com

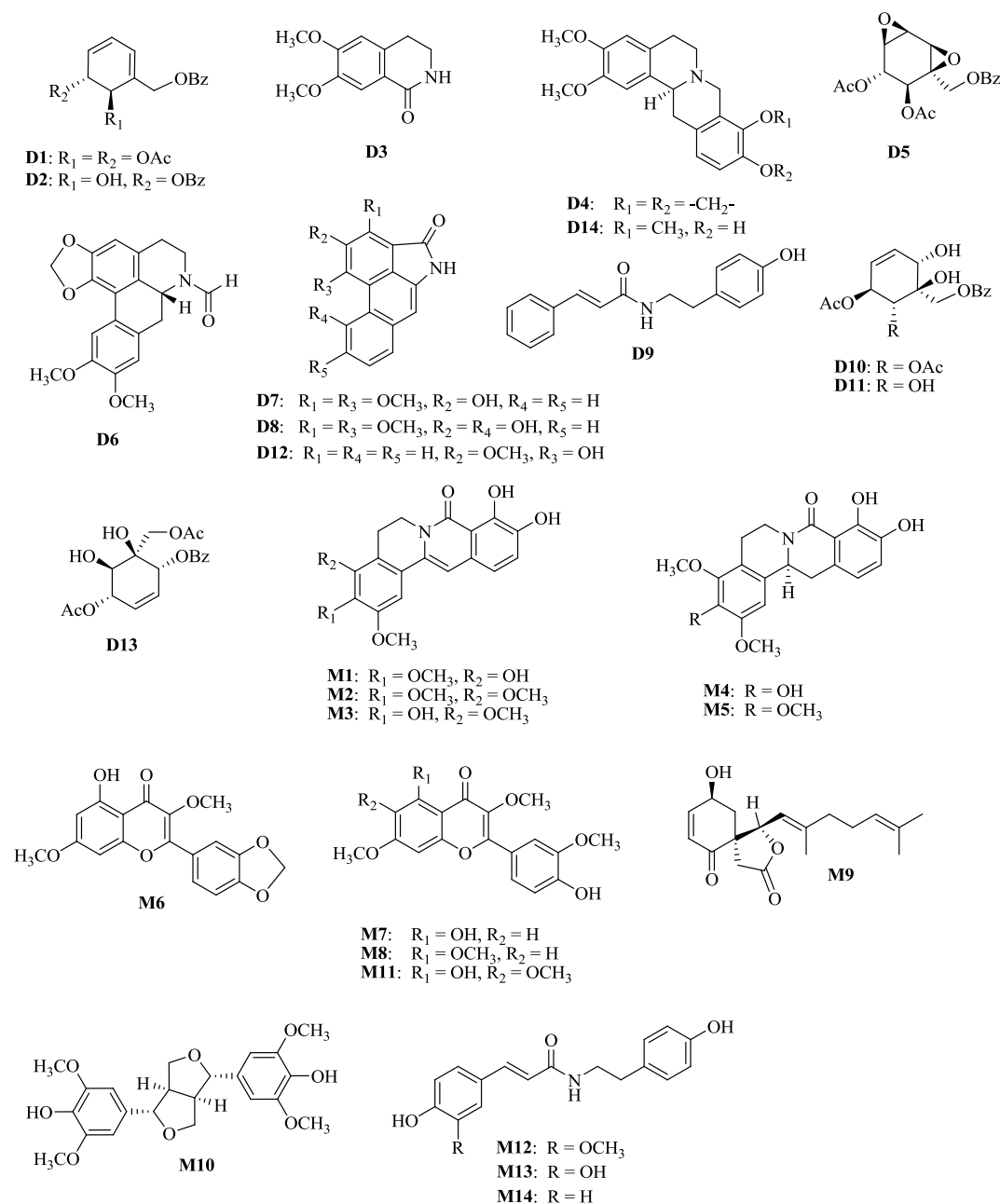
ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (1 กรกฎาคม 2558 – 30 มิถุนายน 2560)

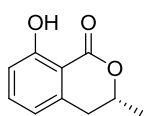
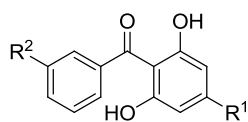
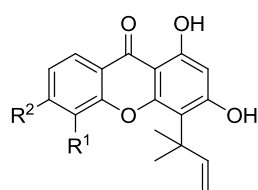
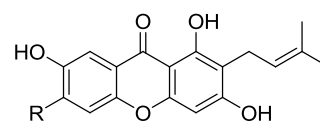
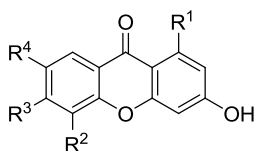
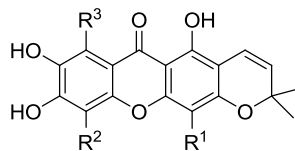
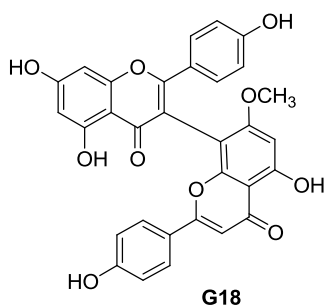
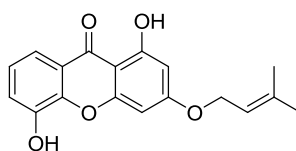
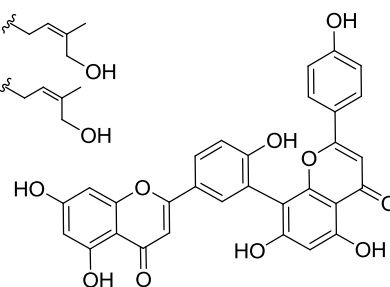
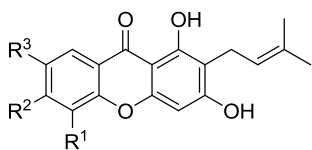
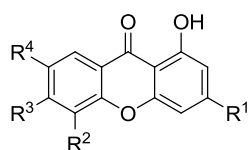
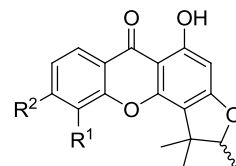
คำหลัก : *Dasymaschalon yunnanense*, *Milium cuneata*, *Garcinia mckeaniana*,
Cytotoxicity, Antimalarial activity.



Abstract

The investigation of chemical constituents and biological activity compounds from *Dasymaschalon yunnanense*, *Miliusa cuneata* and *Garcinia mckeaniana* led to the isolation of 55 compounds including 11 new compounds (M1-M5, G12, G14, G17-G18, G20 and G27) together with 44 known compounds using chromatographic techniques. Their structures were elucidated by 1D and 2D NMR spectroscopic data. Their antimalarial and cytotoxic activities were evaluated.



**G1****G2:** $R^1 = \text{OCH}_3$, $R^2 = \text{H}$ **G3:** $R^1 = R^2 = \text{OH}$ **G4:** $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$ **G5:** $R^1 = R^2 = \text{OH}$ **G21:** $R^1 = \text{OCH}_3$, $R^2 = \text{OH}$ **G6:** $R = \text{H}$ **G7:** $R = \text{OH}$ **G8:** $R^1 = R^2 = \text{OH}$; $R^3 = R^4 = \text{H}$ **G9:** $R^1 = R^4 = \text{OH}$; $R^2 = R^3 = \text{H}$ **G10:** $R^1 = R^3 = R^4 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$ **G11:** $R^1 = \text{OCH}_3$; $R^2 = \text{H}$; $R^3 = R^4 = \text{OH}$ **G12:** $R^1 = R^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; $R^2 = \text{OH}$ **G13:** $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; $R^2 = \text{H}$; $R^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\text{OAc}$ **G14:** $R^1 = \text{H}$; $R^2 = R^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\text{OH}$ **G15:** $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; $R^2 = \text{H}$; $R^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\text{OH}$ **G17:** $R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\text{OAc}$; $R^3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\text{OH}$ **G18****G20****G19****G22:** $R^1 = \text{OH}$; $R^2 = R^3 = \text{H}$ **G27:** $R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{OH}$; $R^3 = \text{OCH}_3$ **G23:** $R^1 = R^3 = \text{OH}$; $R^2 = \text{H}$; $R^4 = \text{OCH}_3$ **G24:** $R^1 = R^4 = \text{H}$; $R^2 = \text{OCH}_3$; $R^3 = \text{OH}$ **G25:** $R^1 = \text{OCH}_3$; $R^2 = \text{OH}$ **G26:** $R^1 = \text{OH}$; $R^2 = \text{H}$

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีจากต้นบุหงดอย (ใบ) ระฆังเขียว (ใบ และกิ่ง) และ มะตะ (เปลือกลำต้น ใบ และกิ่งใหญ่)
2. วิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากต้นบุหงดอย ระฆังเขียว และมะตะ
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชดังกล่าว

ระเบียบวิธีวิจัย

1. เก็บพืชแต่ละชนิด ทำการแยกส่วนและตัดให้เป็นชิ้นเล็ก
2. สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน (แช่ด้วยตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน)
3. กรอง และระเหยตัวทำละลายแบบลดความดันเพื่อให้ได้ส่วนสกัดหยาบอะซิโตน
4. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากส่วนสกัดหยาบของพืชแต่ละชนิด เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น
5. ทำการแยกส่วนสกัดหยาบให้เป็นส่วนย่อย
6. ทำส่วนย่อยให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โครมาโทกราฟีแผ่นหนา และ/หรือ การตกผลึก
7. วิเคราะห์หาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี เช่น NMR, UV, IR และ MS ตลอดจนการวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบ และ/หรือ X-ray crystallography
8. นำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น (ทั้งนี้ขึ้นกับสารบริสุทธิ์ที่มีปริมาณมากพอ)

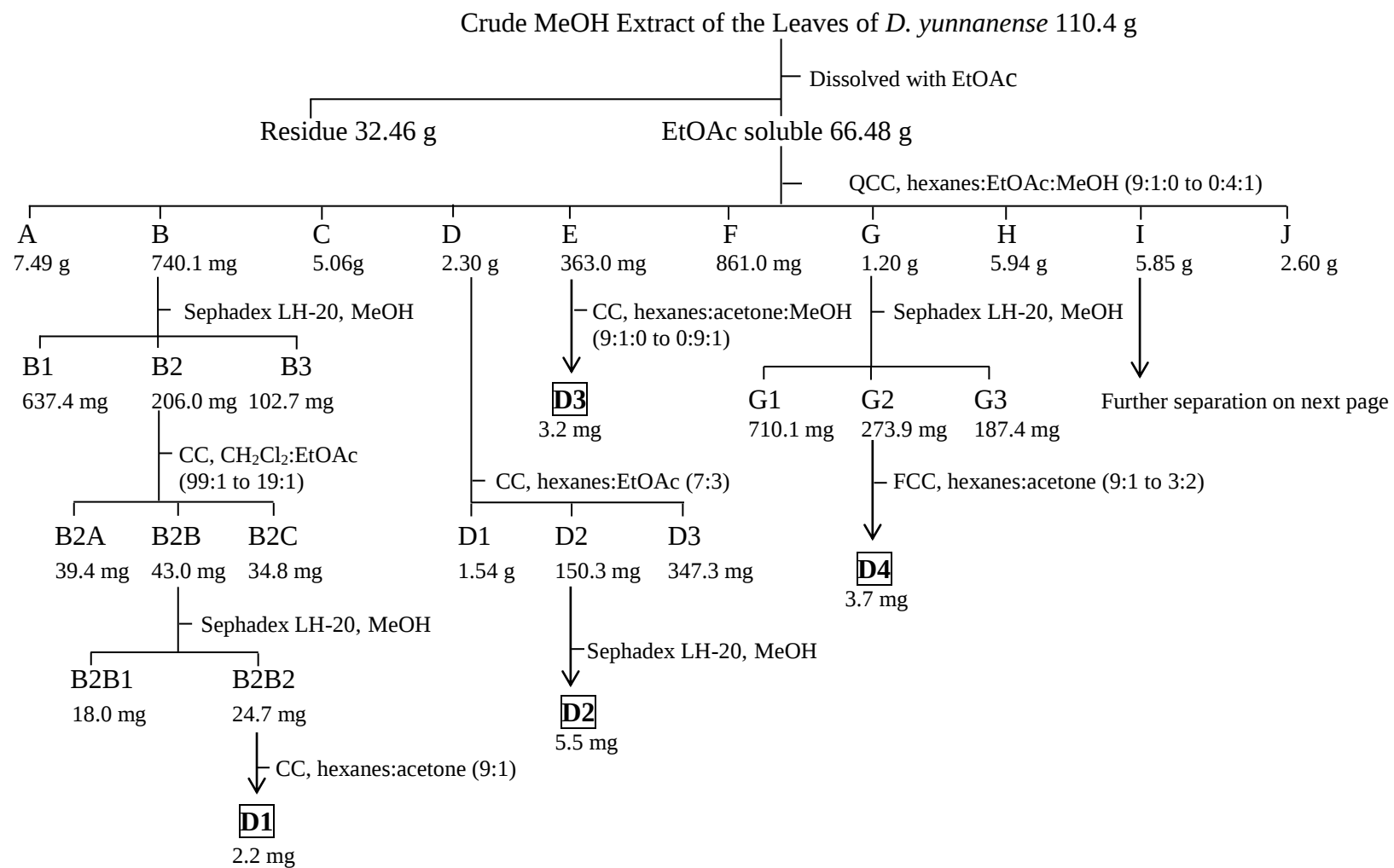
ผลการทดลอง

1. การสกัดและแยกองค์ประกอบทางเคมีจากใบของต้นบุหงดอย

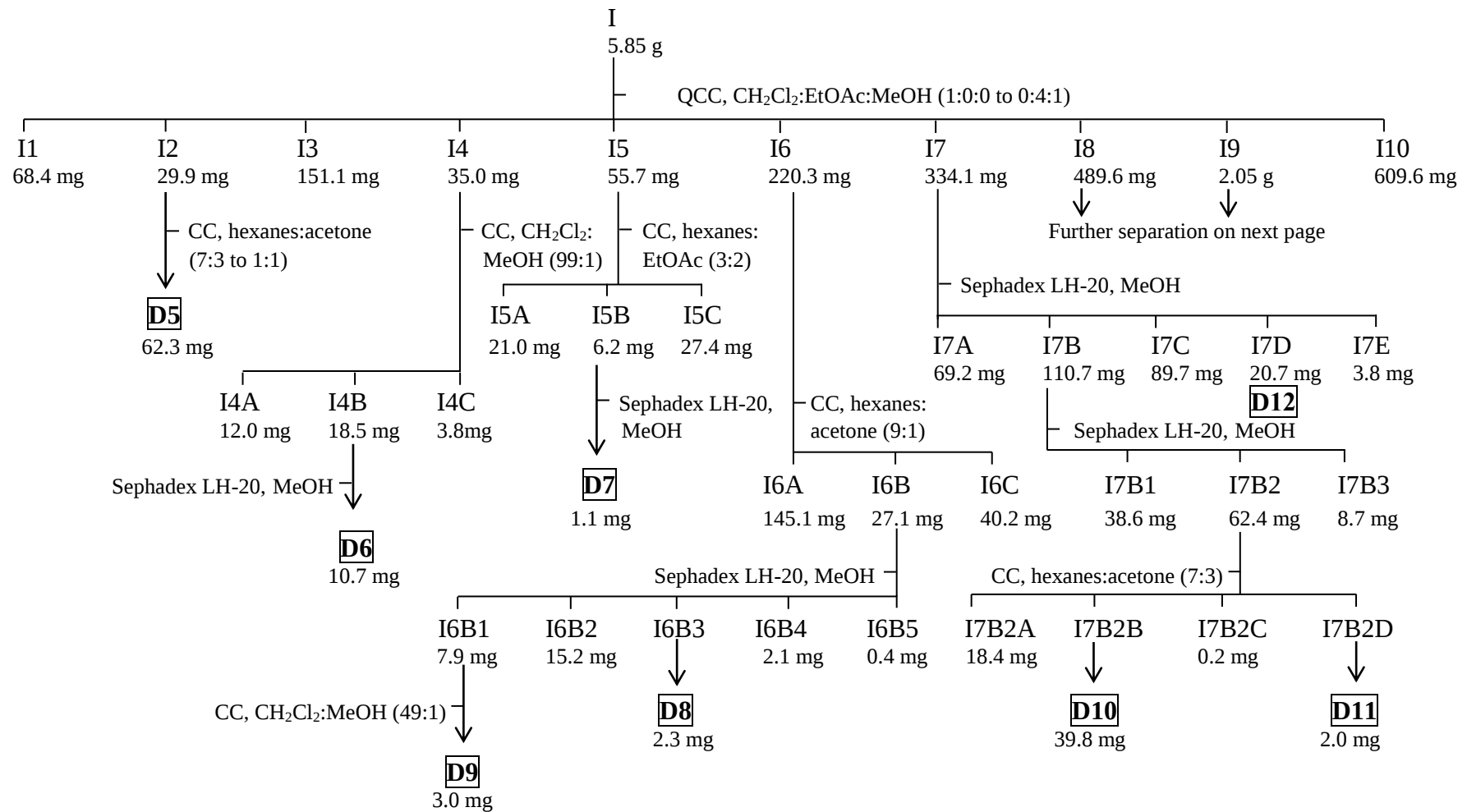
ใบบุหงดอยแห้งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (1.6 กิโลกรัม) สกัดด้วย MeOH 15 ลิตร 3 ครั้งๆ ละ 3 วัน ระเหยตัวทำละลาย ได้ส่วนสกัดหยาบน้ำหนัก 110.4 กรัม ลักษณะเป็นของหนืดเหนียวสีเขียวเข้ม นำส่วนสกัดหยาบทั้งหมดละลายใน EtOAc ได้ส่วนสกัดหยาบที่ละลายได้ น้ำหนัก 66.48 กรัม ลักษณะเป็นของหนืดสีเขียวเข้ม ทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็ว โดยใช้ hexanes:EtOAc:MeOH (9:1:0 ถึง 0:4:1) เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 10 ส่วน (A-J) นำส่วนย่อย B (740.1 mg) มาแยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (B1-B3) ศึกษาส่วนย่อยที่สอง (206.0 mg) แยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ CH₂Cl₂:EtOAc (99:1 ถึง 19:1) เป็นตัวชะได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (B2A-B2C) ส่วนย่อยที่ B2B (43.0 mg) แยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 2 ส่วน (B2B1 และ B2B2) ซึ่งนำส่วนที่สองมาแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโท

ราฟี่ ด้วย hexanes:acetone (9:1) ได้สารบริสุทธิ์ 1 สาร คือ *trans*-5,6-Diacetoxy-1-(benzyloxymethyl)-1,3-cyclohexadiene (**D1**) (Kodpinid, M., *et al.*, 1983) น้ำหนัก 2.2 mg เป็นของหนืดไม่มีสี ส่วนย่อย D (2.30 g) แยกเป็นส่วนย่อยด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:EtOAc (7:3) เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (D1-D3) ส่วนย่อยที่ D2 (150.3 mg) ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Sephadex LH-20 ด้วย 100% MeOH ได้สารบริสุทธิ์ 1 สาร คือ (–)-Desoxypipoxide (Schulte, G.R., *et al.*, 1982) (**D2** น้ำหนัก 5.5 mg) ลักษณะเป็นของหนืดสีเหลือง สาร Corydaldine (Oliva-Madrid, M.J., *et al.*, 2012) (**D3** น้ำหนัก 3.2 mg) ลักษณะเป็นของหนืดสีเหลือง แยกได้จากส่วนย่อย E (363.0 mg) โดยใช้ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวชะคือ hexanes:acetone:MeOH (9:1:0 ถึง 0:9:1) ส่วนย่อย G (1.20 g) แยกด้วย Sephadex LH-20 ตัวชะ 100% MeOH ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (G1-G3) ส่วนย่อย G2 (273.9 mg) นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยมีซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ โดยใช้ hexanes:acetone (9:1 ถึง 3:2) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ คือ (–)-Sinactine (Seeger, C., *et al.*, 2004) (**D4** น้ำหนัก 3.7 mg) ลักษณะเป็นของแข็งสีส้มอ่อน ส่วนย่อย I (5.85 g) ถูกแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็ว โดยใช้ CH₂Cl₂:EtOAc:MeOH (1:0:0 ถึง 0:4:1) เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 10 ส่วน (I1-I10) ส่วนย่อย I2 (29.9 mg) แยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:acetone (7:3 ถึง 1:1) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ สาร (+)-Crotepoxide (Nazir, N., *et al.*, 2009) (**D5** น้ำหนัก 62.3 mg) เป็นผลึกรูปเข็มใสไม่มีสี ส่วนย่อย I4 (35.0 mg) แยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ CH₂Cl₂:MeOH (99:1) เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน นำส่วนย่อย I4B (18.5 mg) แยกให้บริสุทธิ์ ด้วยเฟสคงที่คือ Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ คือ (–)-Arcabucoine (Corredor, B. and Cuca, S. 2011) (**D6** น้ำหนัก 10.7 mg) เป็นของหนืดเหนียวสีเหลืองน้ำตาล เข้ม ส่วนย่อย I5 (55.7 mg) แยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:EtOAc (3:2) เป็นตัวชะ และแยกต่อให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ คือ Goniopedaline (Yang, X.N., *et al.*, 2010) (**D7** น้ำหนัก 1.1 mg) เป็นของแข็งสีเหลือง ส่วนย่อย I6 (220.3 mg) แยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:acetone (9:1) เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (I6A-I6C) นำส่วนย่อยที่ I6B (27.1 mg) แยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 5 ส่วน (I6B1-I6B5) สาร 3,5-Dihydroxy-2,4-dimethoxyaristolactam (Chanakul, W., *et al.*, 2011) (**D8** น้ำหนัก 2.3 mg) เป็นของแข็งสีเหลือง ได้จากส่วนย่อย I6B3 ในขณะที่สาร *trans*-N-Cinnamoyltyramine (Le Thi, H., *et al.*, 2014) (**D9** น้ำหนัก 3.0 mg) เป็นของหนืดเหนียวสีเหลือง ได้จากการแยกส่วนย่อย I6B1 (7.9 mg) ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ CH₂Cl₂:MeOH (49:1) เป็นตัวชะ ส่วนย่อย I7 (334.1 mg) Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 5 ส่วน (I7A-I7E) ส่วนย่อย I7B (110.7 mg) แยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ 3 ส่วนย่อย (I7B1-I7B3) ส่วนย่อย I7B2

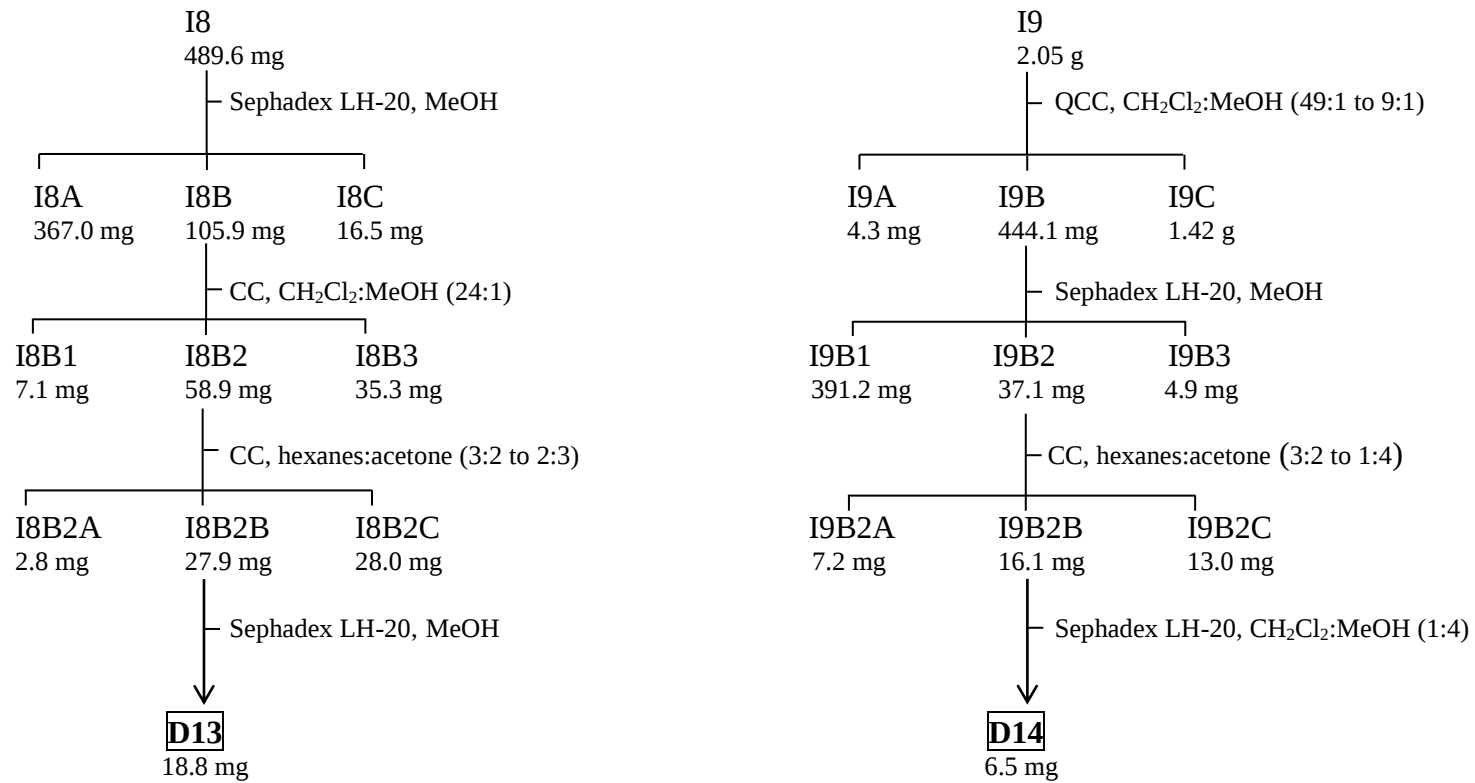
(62.4 mg) ถูกทำให้บริสุทธิ์ ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:acetone (7:3) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 2 สาร คือ (+)-Senediol (Starks, C.M., *et al.*, 2012) (**D10** น้ำหนัก 39.8 mg) และ 1S,2R,3R,4S-2-[(Benzoyloxy)methyl]cyclohex-5-ene-1,2,3,4-tetrol 4-acetate (Starks, C.M., *et al.*, 2012) (**D11** น้ำหนัก 2.0 mg) ทั้งสองสารมีลักษณะ เป็นของหนืดไม่มีสี จากส่วนย่อยลำดับที่ 2 และ 4 ตามลำดับ ทำการศึกษาส่วนย่อย I7D (20.7 mg) ให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้สาร Piperolactam A (Desai, S.J., *et al.*, 1988) (**D12** น้ำหนัก 2.2 mg) ลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ส่วนย่อย I8 (489.6 mg) ถูกแยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ 3 ส่วนย่อย (I8A-I8C) ส่วนย่อย I8B (105.9 mg) นำมาแยกต่อด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี สองรอบโดยใช้ CH₂Cl₂:MeOH (24:1) และ hexanes:acetone (3:2 ถึง 2:3) เป็นตัวชะ ได้ 3 ส่วนย่อย (I8B2A-I8B2C) ส่วนย่อย I8B2B (27.9 mg) ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการแยกกับ Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์คือ Uvaribonol G (Pan, X., *et al.*, 1998) (**D13** น้ำหนัก 18.8 mg) เป็นของหนืดสีเหลือง ส่วนย่อย I9 (2.05 g) นำมาแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็ว โดยใช้ CH₂Cl₂:MeOH (49:1 ถึง 9:1) เป็นตัวชะ ได้ 3 ส่วนย่อย (I9A-I9C). ส่วนย่อย I9B (444.1 mg) มาแยกด้วย Sephadex LH-20 และซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วย 100% MeOH และ hexanes:acetone (3:2 ถึง 1:4) เป็นตัวชะ ตามลำดับ ได้ 3 ส่วนย่อย (I9B2A-I9B2C) ส่วนย่อยที่สอง น้ำหนัก 16.1 mg ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ CH₂Cl₂:MeOH (1:4) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 1 สาร คือ (-)-Corydalmine (Ingkaninan, K., *et al.*, 2006) (**D14** น้ำหนัก 6.5 mg) ลักษณะเป็นของหนืดเหนียวสีเหลืองส้ม (ดังแผนภาพ 1)



แผนภาพ 1 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนใบของบุหงดอย



แผนภาพ 1 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนใบของบุนนาค (ต่อ)



แผนภาพ 1 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนใบของบุหงดอย (ต่อ)

2. การสกัดและแยกองค์ประกอบทางเคมีของต้นระฆังเขี้ยว

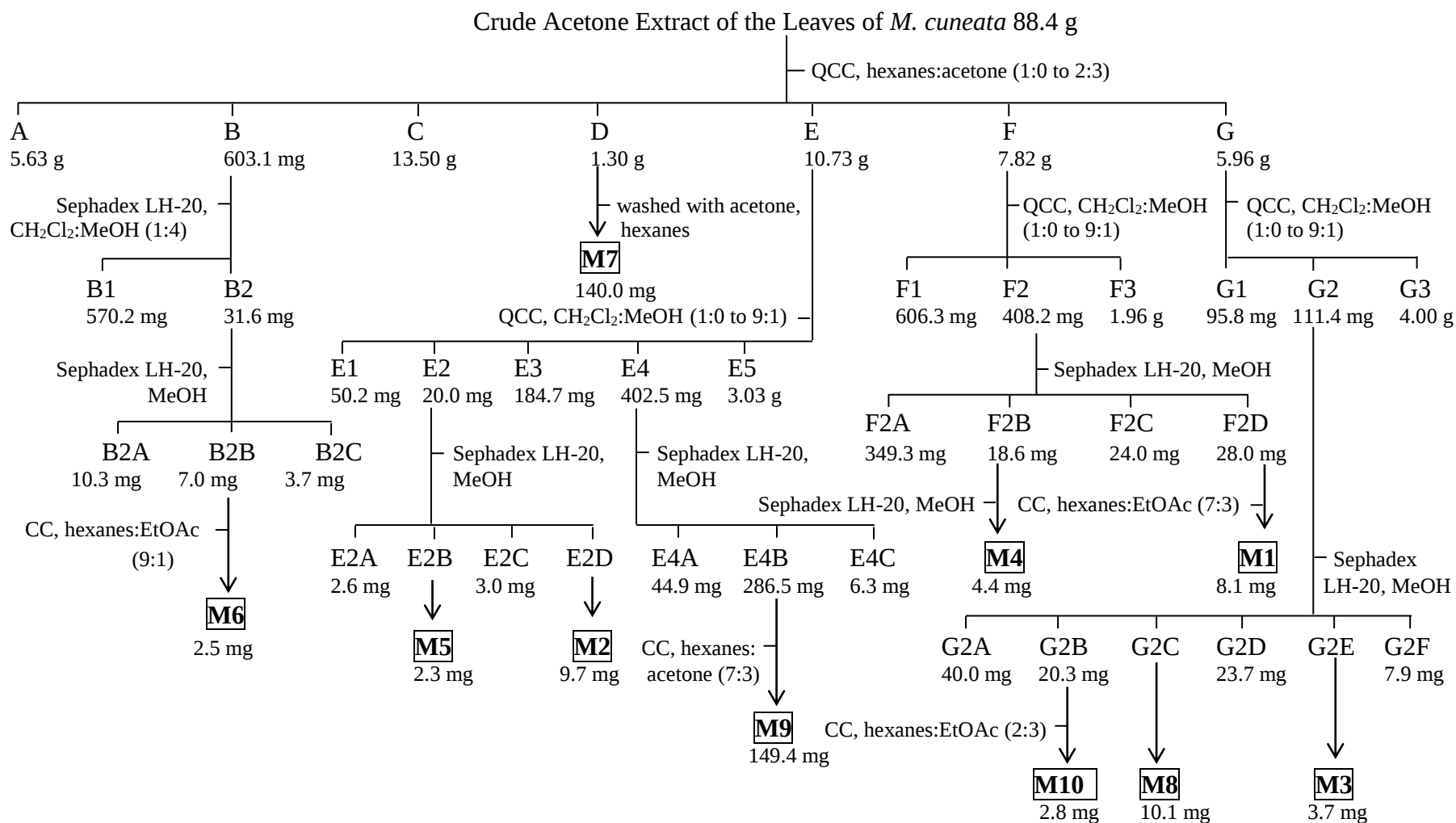
2.1 ส่วนใบ

ใบระฆังเขี้ยวแห้งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (0.6 กิโลกรัม) สกัดด้วยอะซิโตน 15 ลิตร 3 ครั้งๆละ 3 วัน ระเหยตัวทำละลาย ได้ส่วนสกัดหยาดน้ำหนัก 88.4 กรัม ลักษณะเป็นของหนืดเหนียวสีเขียวเข้ม ส่วนสกัดหยาดทั้งหมดถูกแยกส่วนย่อยด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็ว โดยใช้ hexanes และเพิ่มขั้วด้วย acetone จนถึง hexanes:acetone (2:3) เป็นตัวชะ ได้ 7 ส่วนย่อย(A-G) ส่วนย่อย B (603.1 mg) แยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ CH_2Cl_2 :MeOH (1:4) เป็นตัวชะ ได้ 2 ส่วนย่อย (B1 และ B2) ส่วนย่อยสุดท้าย (31.6 mg) แยกต่อด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (B2A-B2C) ส่วนย่อย B2B (7.0 mg) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:EtOAc (9:1) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 1 สาร คือ 5-Hydroxy-3,7-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavone (Higa, M., *et al.*, 1990) (**M6** น้ำหนัก 2.5 mg) ลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองน้ำตาลเข้ม ส่วนย่อย D (1.30 g) นำมาล้างด้วยอะซิโตน และhexanes ตามลำดับ ให้ของแข็งบริสุทธิ์สีเหลือง ซึ่งคือ Pachypodol (Sy, L.K., and Brown, G.D., 1998) (**M7** น้ำหนัก 140.0 mg) ทำการแยกส่วนย่อย E (10.73 g) ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ CH_2Cl_2 :MeOH (1:0 ถึง 9:1) เป็นตัวชะ ได้ 5 ส่วนย่อย (E1-E5) ส่วนย่อย E2 (20.0 mg) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ให้สารบริสุทธิ์ใหม่ 2 สาร ที่ไม่มีการรายงานโครงสร้างมาก่อน คือ Miliusacunine E (**M5** น้ำหนัก 2.3 mg) ลักษณะเป็นของหนืดสีเหลือง และ Miliusacunine B (**M2** น้ำหนัก 9.7 mg) เป็นของแข็งสีเหลืองจากส่วนย่อยที่ 2 และที่ 4 ตามลำดับ ส่วนย่อย E4 (402.5 mg) แยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะได้ 3 ส่วนย่อย (E4A-E4C) ส่วนย่อย E4B (286.5 mg) แยกต่อด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:acetone (7:3) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ (+)-Miliusol (Huong, D.T., *et al.*, 2004) (**M9** น้ำหนัก 149.4 mg) เป็นของหนืดสีเหลือง ส่วนย่อย F (7.82 g) นำมาแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็ว โดยใช้ CH_2Cl_2 :MeOH (1:0 ถึง 9:1) เป็นตัวชะ ได้ 3 ส่วนย่อย (F1-F3) ส่วนย่อย F2 (408.2 mg) ถูกแยกต่อด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 4 ส่วน (F2A-F2D) ส่วนย่อย F2B (18.6 mg) แยกต่อด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ใหม่ 1 สาร ที่ไม่มีการรายงานโครงสร้างมาก่อน คือ Miliusacunine D (**M4** น้ำหนัก 4.4 mg) เป็นของหนืดเหนียวสีเหลืองน้ำตาลเข้ม ส่วนย่อย F2D (28.0 mg) แยกต่อด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:EtOAc (7:3) เป็นตัวชะ ได้ สารบริสุทธิ์ใหม่ 1 สาร ที่ไม่มีการรายงานโครงสร้างมาก่อน คือ Miliusacunine A (**M1** น้ำหนัก 8.1 mg) ลักษณะเป็นของแข็งสีชมพู ส่วนย่อย G (5.96 g) มาแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็ว โดยใช้ CH_2Cl_2 :MeOH (1:0 ถึง 9:1) เป็นตัวชะ ได้ 3 ส่วนย่อย (G1-G3) ส่วนย่อย G2 (111.4 mg) นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์

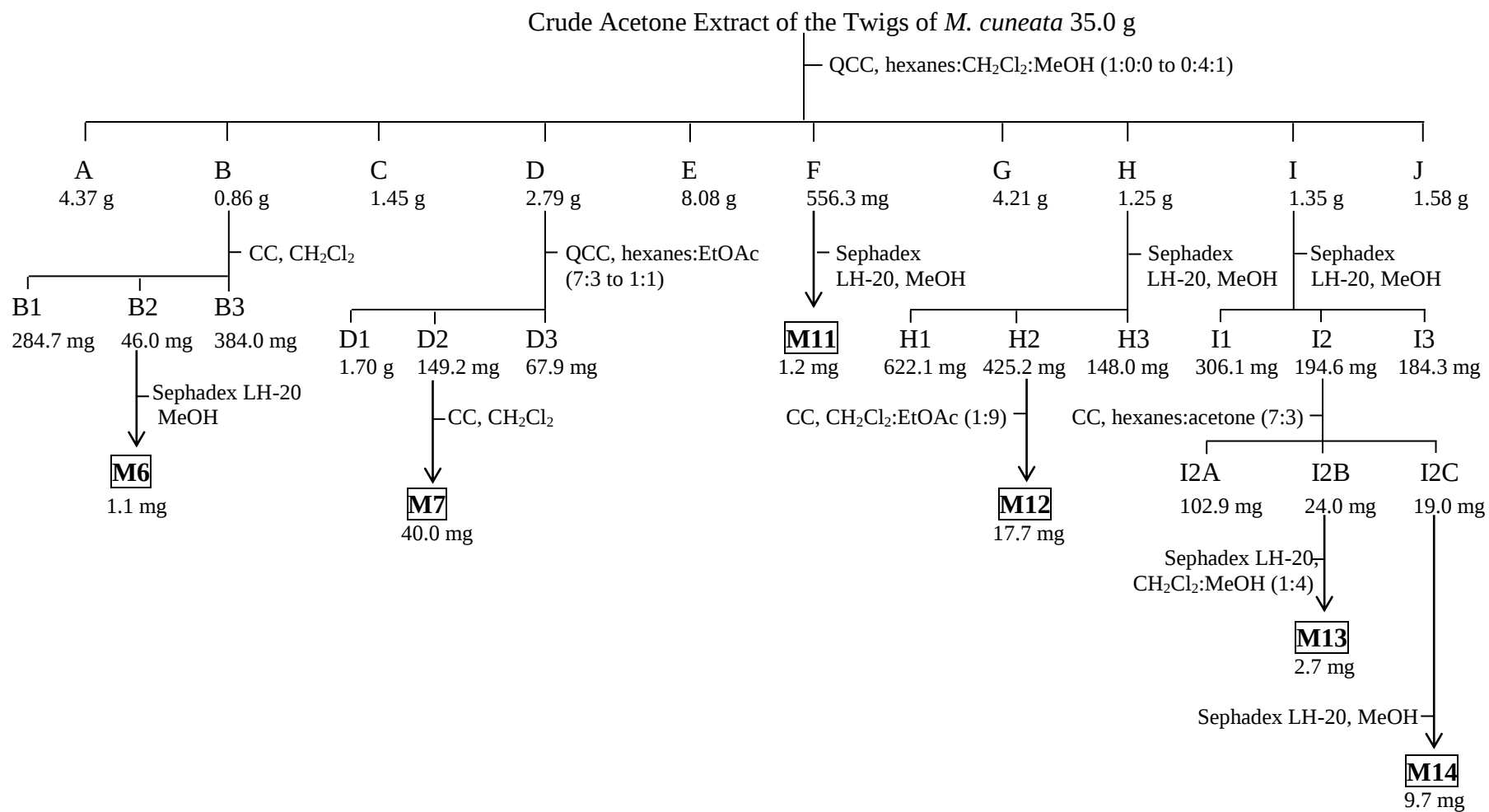
2 สาร คือ 4'-Hydroxy-3,5,7,3'-tetramethoxyflavone (Likhitwitayawuid, K., *et al.*, 2006) (**M8** น้ำหนัก 10.1 mg) เป็นของหนืดเหนียวสีเหลือง และ Miliusacunine C (**M3** น้ำหนัก 3.7 mg) เป็นของหนืดเหนียวสีแดงน้ำตาลเข้ม โดยสารใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานโครงสร้างมาก่อน จากส่วนย่อยลำดับที่ 3 และที่ 5 ตามลำดับ ขณะที่ส่วนย่อย G2B (20.3 mg) นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:EtOAc (2:3) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ (+)-Syringaressinol (Monthong, W., *et al.*, 2011) (**M10** น้ำหนัก 2.8 mg) ลักษณะเป็นของหนืดสีเหลือง (ดังแผนภาพ 2.1)

2.2 ส่วนกิ่ง

กิ่งแห้งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ของต้นระฆังเขี้ยว (2.2 กิโลกรัม) สกัดด้วยอะซิโตน 15 ลิตร 3 ครั้งๆละ 3 วัน ระเหยตัวทำละลาย ได้ส่วนสกัดหยาบน้ำหนัก 35.0 กรัม ลักษณะเป็นของหนืดเหนียวสีน้ำตาล นำส่วนสกัดหยาบอะซิโตนทั้งหมดแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็ว โดยใช้ hexanes:CH₂Cl₂:MeOH (1:0:0 ถึง 0:4:1) เป็นตัวชะได้ 10 ส่วนย่อย (A-J) ส่วนย่อย B (860.0 mg) แยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 100% CH₂Cl₂ ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (B1-B3) ส่วนย่อย B2 (46.0 mg) แยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ คือ **M6** (1.1 mg) ซึ่งซ้ำกับในส่วนใบ ส่วนย่อย D (2.79 g) นำมาแยกเป็นส่วนๆด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็วโดยใช้ hexanes:EtOAc (7:3 ถึง 1:1) เป็นตัวชะได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (D1-D3) ส่วนย่อย D2 (149.2 mg) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 100% CH₂Cl₂ เป็นตัวชะให้สารบริสุทธิ์ **M7** (40.0 mg) ซึ่งพบในส่วนใบเช่นกัน ส่วนย่อย F (556.3 mg) ถูกแยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ Chrysopenetin (Sy, L.K., and Brown, G.D., 1998) (**M11** น้ำหนัก 1.2 mg) เป็นของหนืดสีแดงน้ำตาลเข้ม ส่วนย่อย H (1.25 g) ถูกนำมาแยกด้วย Sephadex LH-20 และ ซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 100% MeOH และ CH₂Cl₂:EtOAc (1:9) ตามลำดับ ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ *trans*-N-Feruloyltyramine (Al-Taweel, A.M., *et al.*, 2012) (**M12** เป็นของหนืดสีส้ม (17.7 mg) ส่วนย่อย I (1.40 g) ถูกนำมาแยกด้วย Sephadex LH-20 และ ซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 100% MeOH และ hexanes:acetone (7:3) เป็นตัวชะตามลำดับ ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (I2A-I2C) ทำการแยกส่วนย่อย I2B (24.0 mg) ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH ได้สารบริสุทธิ์ คือ *trans*-N-Caffeoyltyramine (Han, S.H., *et al.*, 2002), **M13** เป็นของหนืดเหนียวสีเหลืองส้ม (2.7 mg) ในขณะที่สาร *trans*-N-Coumaroyltyramine (Al-Taweel, A.M., *et al.*, 2012) **M14** (9.7 mg) เป็นของแข็งสีขาว ได้จากการแยกส่วนย่อย I2C (19.0 mg) ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ (ดังแผนภาพ 2.2)



แผนภาพ 2.1 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนใบของระงังเขยิบ



แผนภาพ 2.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนกิ่งของระฆังเขี้ยว

3. การสกัดและแยกองค์ประกอบทางเคมีของต้นมะตะ

3.1 ส่วนเปลือกลำต้น

เปลือกต้นมะตะแห้งหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 2.50 กิโลกรัม สกัดด้วยอะซิโตน 8 ลิตร 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง ระเหยตัวทำละลาย ได้ส่วนสกัดหยาบลักษณะเป็นของหนืดเหนียวสีน้ำตาลเข้ม น้ำหนัก 56.6 กรัม นำส่วนสกัดหยาบอะซิโตนทั้งหมดแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็ว โดยใช้ hexanes:CH₂Cl₂:MeOH (1:0:0 ถึง 0:0:1) เป็นตัวชะ ได้ 11 ส่วนย่อย (A-K) ส่วนย่อย B (268.3 mg เป็นของหนืดสีน้ำตาล) มาแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วย hexanes:EtOAc (19:1) ได้ส่วนย่อย 3 สาร (B1-B3) ส่วนย่อย B2 (21.3 mg) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ *R*-(–)-Mellien (**G1**) (Efdi, M., *et al.*, 2007) น้ำหนัก 3.0 mg เป็นผงสีเหลือง ส่วนย่อย D (419.0 mg เป็นของหนืดสีน้ำตาล) นำมาแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes: acetone (9:1) ได้ 3 ส่วนย่อย (D1-D3) ส่วนย่อย D2 (13.2 mg) ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ Cotoin (**G2**) (Gottlieb, O.R., *et al.*, 1958 and Mitasev, B., *et al.*, 2009) น้ำหนัก 10.0 mg เป็นของแข็งสีเหลือง ส่วนย่อย F (1.02 g เป็นยางสีน้ำตาลเข้ม) นำมาแยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ สองครั้ง ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ Pancixanthone A (**G4**) (Ito, C., *et al.*, 1996) น้ำหนัก 9.3 mg เป็นของหนืดสีเหลือง ส่วนย่อย H (489.1 mg เป็นของหนืดสีน้ำตาล) ถูกแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วย hexanes:acetone (4:1) เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 5 ส่วน (H1-H5) ส่วนย่อย H2 (87.4 mg) ถูกแยกอีกครั้งด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วย hexanes:EtOAc (17:3) เป็นตัวชะ ได้ 3 ส่วนย่อย (H2A-H2C) ส่วนย่อย H2B (13.1 mg) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ 1,3,7-Trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone (**G6**) (Garcia Cortez, D.A., *et al.*, 1998) น้ำหนัก 6.7 mg เป็นของแข็งสีเหลือง สาร Assiguxanthone A (**G5**) (Ito, C., *et al.*, 1997) น้ำหนัก 2.0 mg เป็นผงสีเหลือง ได้จากส่วนย่อย H4 (20.5 mg) ที่แยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ส่วนย่อย J (4.71 g เป็นยางสีน้ำตาลเข้ม) ถูกแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ CH₂Cl₂:MeOH (99:1 ถึง 9:1) ได้ส่วนย่อย 9 ส่วนย่อย (J1-J9) ส่วนย่อย J2 (329.6 mg) ถูกนำมาแยกให้บริสุทธิ์ 2 ครั้งด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี และ Sephadex LH-20 โดยใช้ hexanes:acetone (4:1) และ 100% MeOH ตามลำดับ ส่วนย่อย J2B คือสารบริสุทธิ์ Montixanthone (**G11**) (Ngouela, S., *et al.*, 2005) น้ำหนัก 3.7 mg เป็นของแข็งสีเหลือง ส่วนย่อย J4 (762.6 mg) ถูกแยกให้เป็นส่วนๆด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็ว โดยใช้ hexanes:CH₂Cl₂ (1:4) เพิ่มช้าจนถึง 100% CH₂Cl₂ และเพิ่มช้าต่อด้วย MeOH จนถึง CH₂Cl₂:MeOH (19:1) ได้ส่วนย่อย 4 ส่วน (J4A-J4D) สาร 1,3,7-Trihydroxyxanthone (**G9**) (Zuo, J., *et al.*, 2014) น้ำหนัก 2.0 mg เป็นของแข็งสีเหลือง ได้จากส่วนย่อย J4B (99.0 mg) ที่ผ่านการแยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100%

MeOH เป็นตัวชะ ส่วนย่อย J4C (145.6 mg) นำมาแยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH ได้ 3 ส่วนย่อย (J4C1-J4C3) ส่วนย่อย J4C3 (30.2 mg) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (97:3) ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ 1,3,5-Trihydroxyxanthone (**G8**) (Iinuma, M., *et al.*, 1997 and Helesbeux, J.J., *et al.*, 2004) น้ำหนัก 6.3 mg เป็นของแข็งสีเหลือง สาร Assiguxanthone B (**G7**) (Ito, C., *et al.*, 1997) น้ำหนัก 4.8 mg เป็นของแข็งสีเหลือง ได้จากส่วนย่อย J6 (341.1 mg) ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ส่วนย่อย J8 (987.5 mg) ถูกแยกเป็นส่วนย่อยด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 5 ส่วน (J8A-J8E) ส่วนย่อย J8B (20.0 mg) ถูกแยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ 3 ส่วนย่อย (J8B1-J8B3) ส่วนย่อย J8B2 (12.6 mg) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:acetone (7:3) ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ 2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenone (**G3**) (Jamila, N., *et al.*, 2014 and Peters, S., *et al.*, 1998) น้ำหนัก 6.7 mg เป็นของแข็งสีเหลือง ส่วนย่อย J8D (374.9 mg) ถูกแยก 2 ครั้งด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี และ Sephadex LH-20 โดยใช้ hexanes:acetone (7:3) และ 100% MeOH เป็นตัวชะ ตามลำดับ สาร Norathyriol (**G10**) (Locksley, H.D., *et al.*, 1966 and Fromentin, Y., *et al.*, 2012) น้ำหนัก 4.4 mg เป็นผลสีเหลือง แยกได้จากส่วนย่อย J8D2 (12.4 mg) ดังแผนภาพ 3.1

3.2 ส่วนใบ

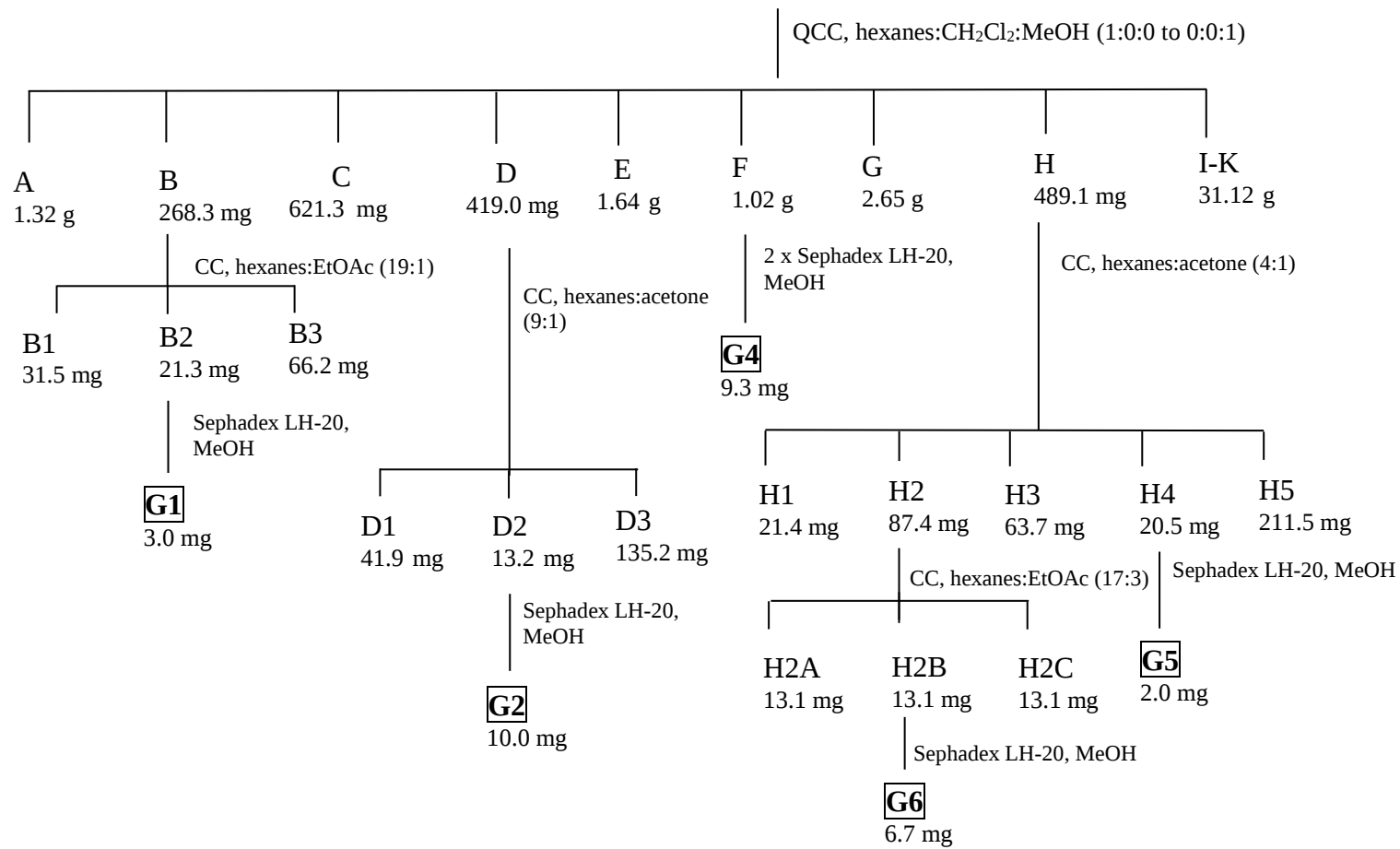
ใบมะตะแห่งนี้เป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 0.7 กิโลกรัม สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน 8 ลิตร 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง ระเหยตัวทำละลาย ได้ส่วนสกัดหยาบ น้ำหนัก 95.6 กรัม ลักษณะเป็นยางสีน้ำตาลเข้ม นำส่วนสกัดหยาบอะซิโตนทั้งหมดแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็ว โดยใช้ hexanes:acetone:MeOH (1:0:0 ถึง 0:0:1) เป็นตัวชะ ได้ 8 ส่วนย่อย (A-H) ส่วนย่อย B (3.08 g เป็นของหนืดสีน้ำตาล) แยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็ว โดยใช้ hexanes:acetone (1:0 ถึง 0:1) ได้ส่วนย่อย 5 ส่วน (B1-B5) ส่วนย่อย B2 (739.0 mg) ถูกแยกด้วย Sephadex LH-20 ใน 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ 3 ส่วนย่อย (B2A-B2C) ส่วนย่อย B2B (482.0 mg) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 20% hexanes:acetone (4:1) ได้สารบริสุทธิ์ Mckeanianone A (**G12**) น้ำหนัก 28.9 mg, เป็นของแข็งสีเหลือง ซึ่งเป็นสารใหม่ สาร Bannaxanthone I (**G13**) (Na, Z., *et al.*, 2010) น้ำหนัก 7.0 mg เป็นของแข็งสีเหลือง ได้จากการแยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ จากส่วนย่อย B4 (258.1 mg) ส่วนย่อย C (2.61 g เป็นยางสีน้ำตาล) แยกเป็นส่วนย่อยโดยใช้ Sephadex LH-20 ใน 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ 3 ส่วนย่อย (C1-C3) ส่วนย่อย C2 (311.8 mg) นำมาแยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ 3 ส่วนย่อย (C2A-C2C) ส่วนย่อย C2B (23.3 mg) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:EtOAc (17:3) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ คือ

สาร Mckeanianone B (**G14**) น้ำหนัก 2.1 mg และ สาร Bannaxanthone E (**G15**) (Han, Q.B., *et al.*, 2008) น้ำหนัก 7.1 mg ลักษณะเป็นของหนืดสีเหลืองที่สองสาร ส่วนย่อย E (5.50 g) เป็นยางสีน้ำตาลเข้ม นำมาแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็วด้วย hexanes:CH₂Cl₂:MeOH (1:4:0 ถึง 0:9:1) ได้ส่วนย่อย 3 ส่วนย่อย (E1-E3) ส่วนย่อย E2 (1.40 g) นำมาแยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ 5 ส่วนย่อย (E2A-E2E) ส่วนย่อย E2B (188.2 mg) นำมาแยกซ้ำด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (E2B1-E2B3) ส่วนที่ E2B2 (69.3 mg) ทำให้บริสุทธิ์ด้วย hexanes:EtOAc (4:1) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ คือ Vomifoliol (**G16**) (Hammani, S., *et al.*, 2004) น้ำหนัก 17.5 mg เป็นของหนืดสีเหลือง ส่วนย่อย E2D (700.0 mg) ถูกนำมาแยกด้วย Sephadex LH-20 และซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 100% MeOH และ hexanes:EtOAc (4:1) เป็นตัวชะ ตามลำดับได้สารบริสุทธิ์ Mckeanianone C (**G17**) (37.7 mg) เป็นของหนืดสีเหลืองและเป็นสารใหม่ ส่วนย่อย G (5.27 g) ลักษณะเป็นยางสีน้ำตาลเข้ม นำมาแยกเป็นส่วนย่อยด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วย CH₂Cl₂:MeOH (1:0 ถึง 9:1) ได้ 5 ส่วนย่อย (G1-G5) ส่วนย่อย G2 (187.6 mg) นำมาแยกส่วนต่อด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (G2A-G2C) ส่วนย่อย G2B (34.4) ให้สารบริสุทธิ์ คือ Mckeaniabiflavone (**G18**) น้ำหนัก 18.1 mg เป็นของแข็งสีเหลืองซึ่งนำมาแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:EtOAc (7:3) เป็นตัวชะ สาร Amentoflavone (**G19**) (Carbonezi, C.A., *et al.*, 2007) น้ำหนัก 9.0 mg เป็นของแข็งสีเหลือง ได้จากการแยก ส่วนย่อย G4 (449.3) ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี และ Sephadex LH-20 โดยใช้ CH₂Cl₂:MeOH (97:3) และ 100% MeOH เป็นตัวชะ ตามลำดับ

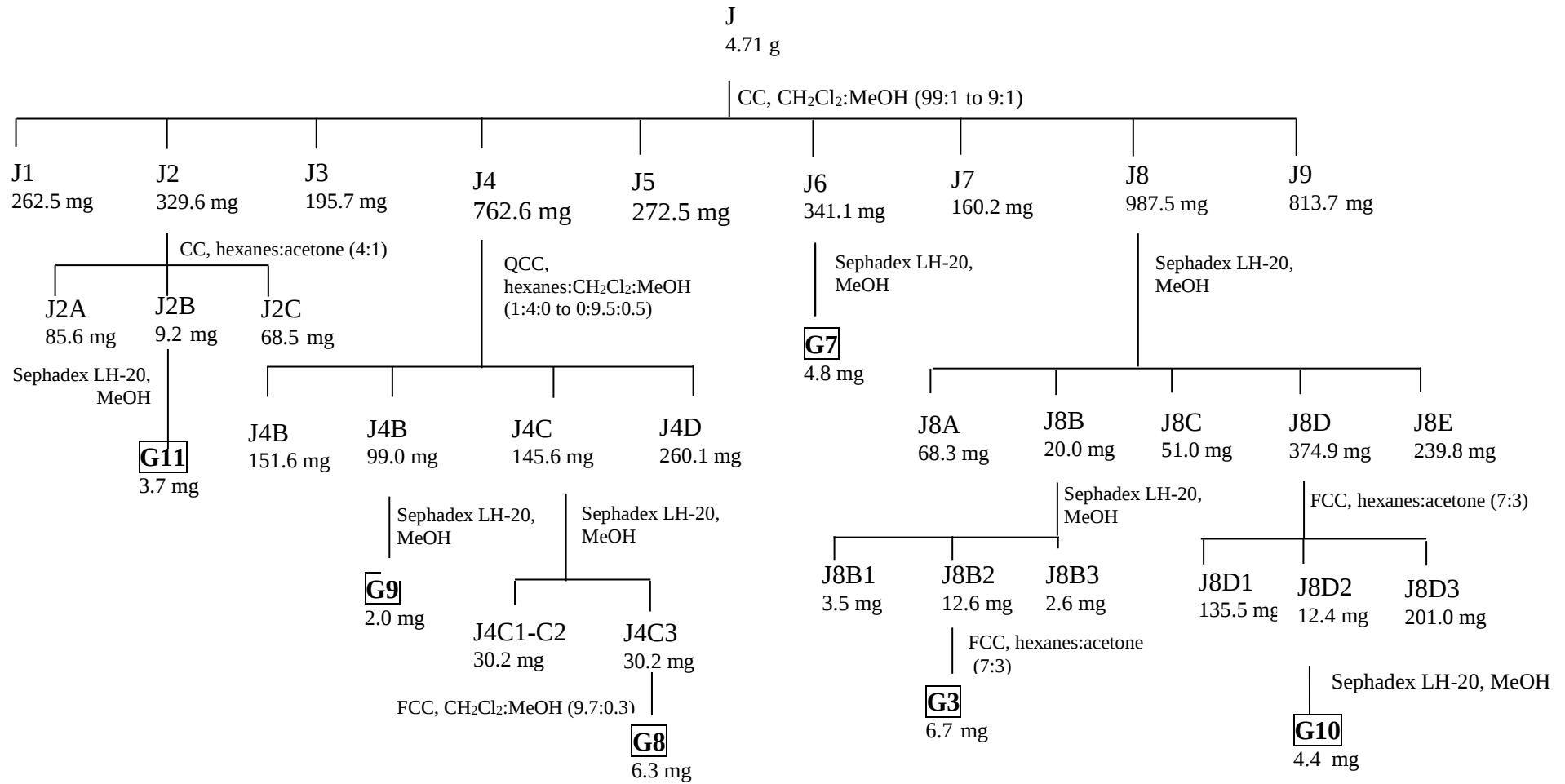
3.3 ส่วนกิ่งใหญ่

กิ่งใหญ่จะแห้งหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 7.0 กิโลกรัม สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน 15 ลิตร 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง ระเหยตัวทำละลาย ได้ส่วนสกัดหยาบ น้ำหนัก 225.8 กรัม ลักษณะเป็นยางสีน้ำตาลเข้ม นำส่วนสกัดหยาบอะซิโตนทั้งหมดแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟีอย่างรวดเร็ว โดยใช้ hexanes:CH₂Cl₂:MeOH (1:0:0 ถึง 0:0:1) เป็นตัวชะได้ 8 ส่วนย่อย (A-H) ส่วนย่อย B (5.15 g) นำมาแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:EtOAc (8.5:1.5) เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (B1-B3) ส่วนย่อย B2 (385.2 mg) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์คือ **G4** ซึ่งเป็นสารที่พบในส่วนเปลือก น้ำหนัก 22.6 mg เป็นของแข็งสีเหลือง ส่วนย่อย D (4.17 g) แยกต่อด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:acetone (8.5:1.5) ถึง 1:1) ได้ส่วนย่อย 10 ส่วน (D1-D10) ส่วนย่อย D2 (38.9 mg) แยกต่อด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะได้สารบริสุทธิ์ซึ่งเป็นสารใหม่ คือ Mckeanianone D (**G20**) น้ำหนัก 6.9 mg เป็นของแข็งสีเหลือง สาร Neriifolone A (**G21**) (Nuangnaowarat, W., *et al.*, 2010) น้ำหนัก 11.5 mg เป็นของแข็งสีเหลือง ได้จากส่วนย่อย D4 (385.2 mg) โดยการทำให้บริสุทธิ์

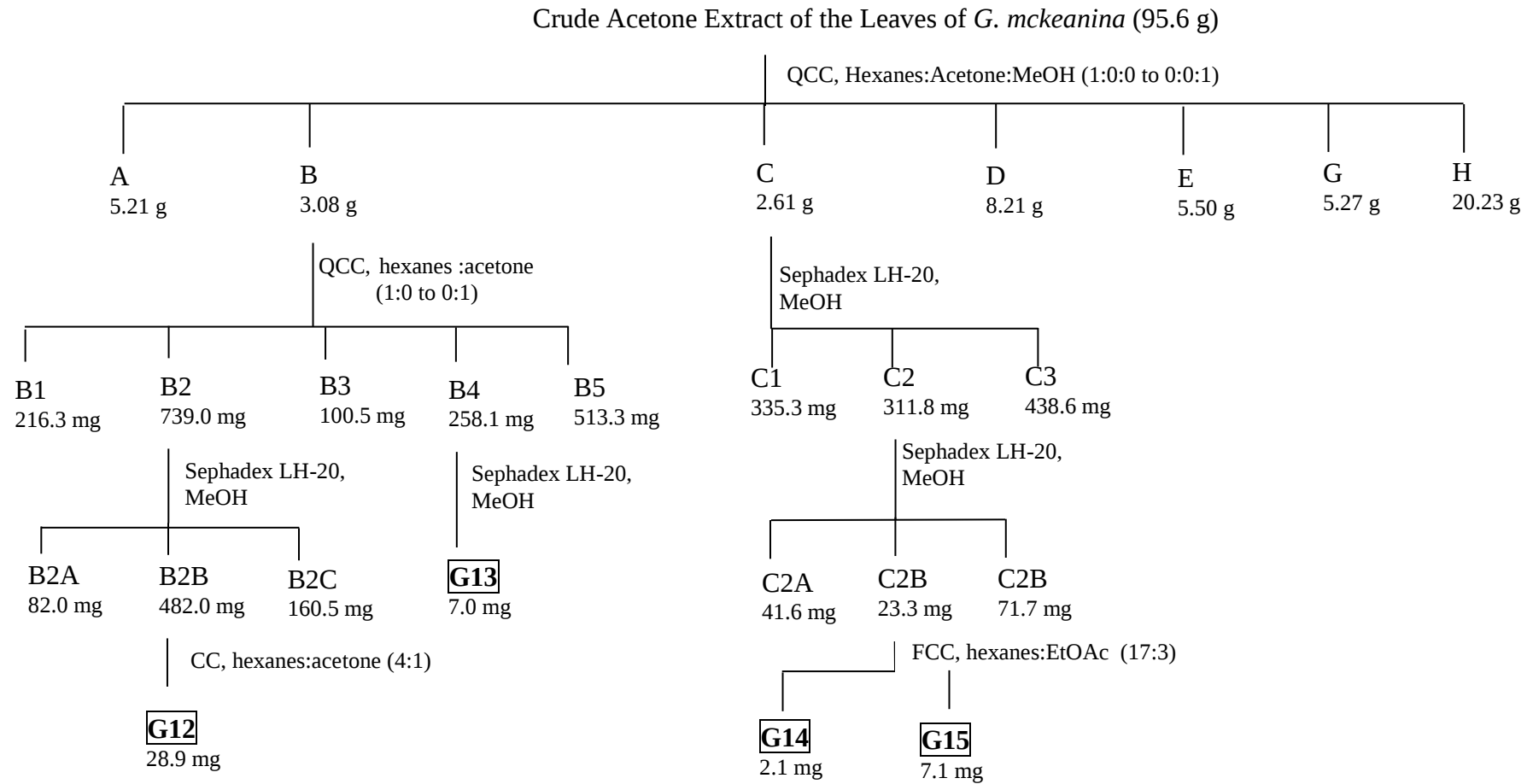
กา คอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วย hexanes:acetone (4:1) เป็นตัวชะ ส่วนย่อย D6 (59.1 mg) นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะได้สารบริสุทธิ์ คือ 1,3,5-Trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-9H-xanthen-9-one (**G22**) (Helesbeux, J.J., *et al.*, 2004) น้ำหนัก 3.6 mg เป็นของแข็งสีเหลือง ส่วนย่อย D8 (89.7 mg) นำมาแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ hexanes:EtOAc (7:3) ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (D8A-D8C) ส่วนย่อย D8B (16.5 mg) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ **G8** น้ำหนัก 3.7 mg เป็นของแข็งสีเหลือง ซึ่งพบแล้วในส่วน เปลือกลำต้น สาร 1,3,6-Trihydroxy-7-methoxyxanthone (linuma, M., *et al.*, 1997) (**G23**) เป็นของแข็งสีเหลือง น้ำหนัก 4.0 mg ได้จากการแยกส่วนย่อยสุดท้าย D10 (71.6 mg) ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ แยกส่วนย่อย E มาเพียง 15.0 g จาก 100 g ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วย hexanes (100%) เพิ่มชั่วจนถึง CH₂Cl₂ (100%) และเพิ่มชั่วต่อจนถึง MeOH (100%) ได้สาร 10 ส่วนย่อย (E1-E10) ส่วนย่อย E2 (51.1 mg) แยกให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์คือ Pancixanthone B (**G26**) (Ito, C., *et al.*, 1996) น้ำหนัก 8.4 mg เป็นของแข็งสีเหลือง ส่วนย่อย E3 (105.5 mg) แยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 สารคือ Buchanaxanthone (**G24**) (Jackson, B., *et al.*, 1968) และ 5-O-Methyl-2-deprenylrheediaxanthone B (**G25**) (Rath, G., *et al.*, 1996) น้ำหนัก 3.0 และ 3.6 mg เป็นของแข็งสีเหลืองทั้งคู่ ตามลำดับ จากการทำซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วย hexanes:CH₂Cl₂ (3:2) และส่วนย่อย E3B แยกต่อด้วย hexanes:CH₂Cl₂ (1:1) เป็นตัวชะ ได้สาร **G25** ขณะที่ **G26** ได้จากส่วนย่อย E3D (24.0 mg) แยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ส่วนย่อย E5 (135.1 mg) แยกสารบริสุทธิ์ ได้ 1 สารซึ่งเป็นสารใหม่ คือ Mckeanianone E (**G27**) น้ำหนัก 3.1 mg เป็นของแข็งสีเหลือง ได้จากการแยกด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี และ Sephadex LH-20 ด้วย hexanes:EtOAc (8.5:1.5) และ 100% MeOH เป็นตัวชะ ตามลำดับ

Crude Acetone Extract of the Stem Bark of *G. mckeaninana* (56.6 g)

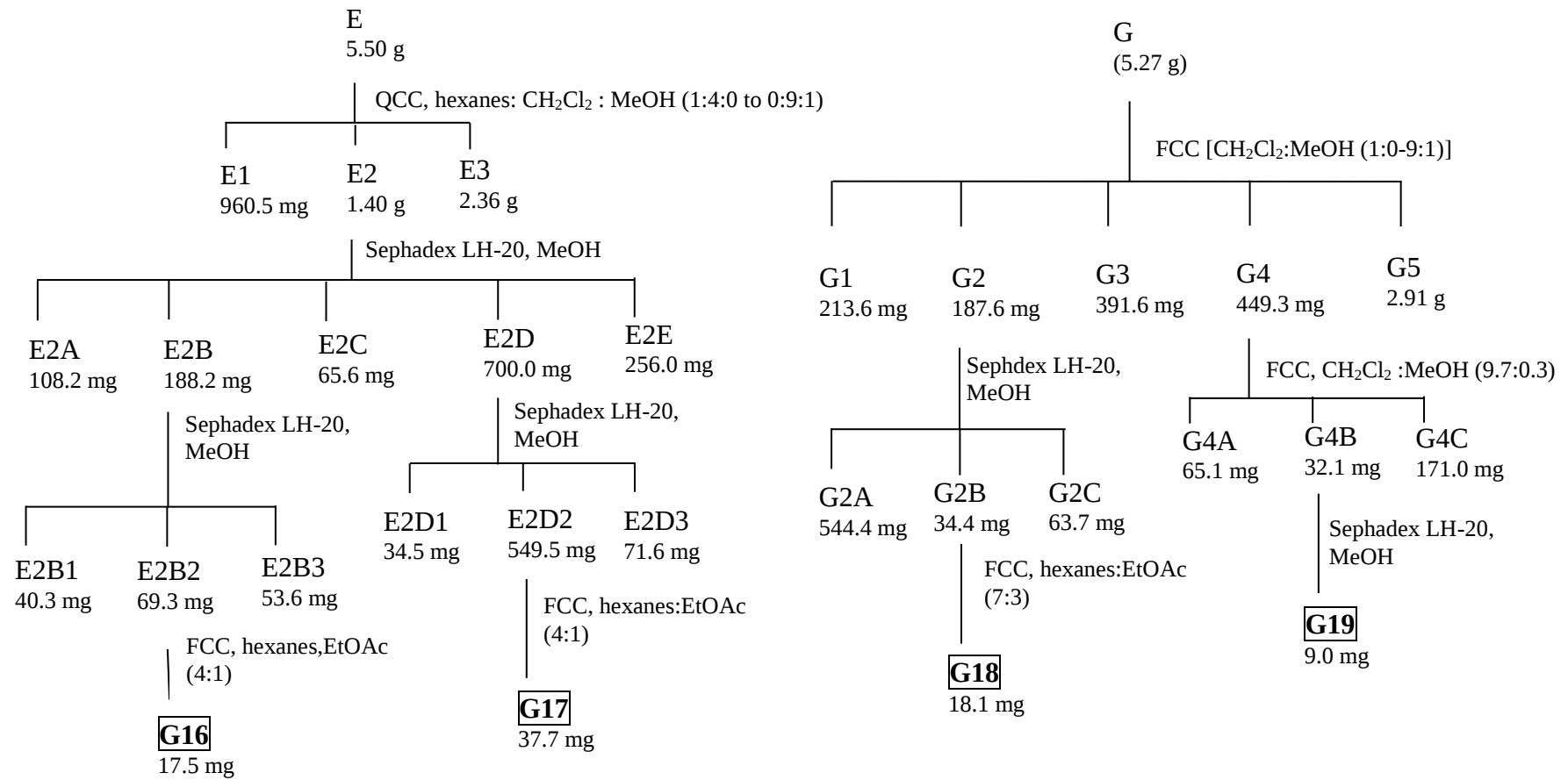
แผนภาพ 3.1 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนเปลือกลำต้นของมะตะ



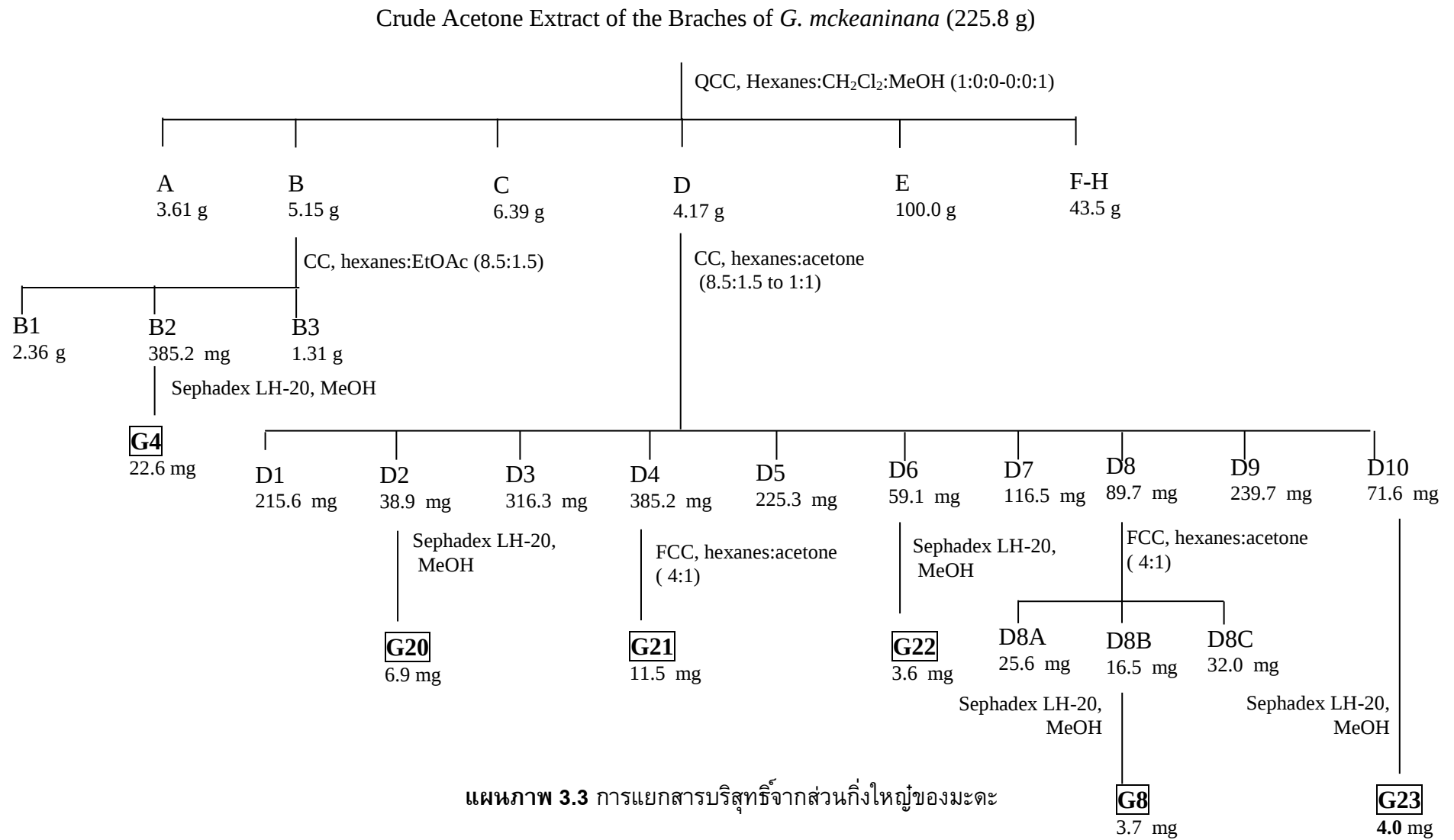
แผนภาพ 3.1 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนเปลือกลำต้นของมะตะ (ต่อ)

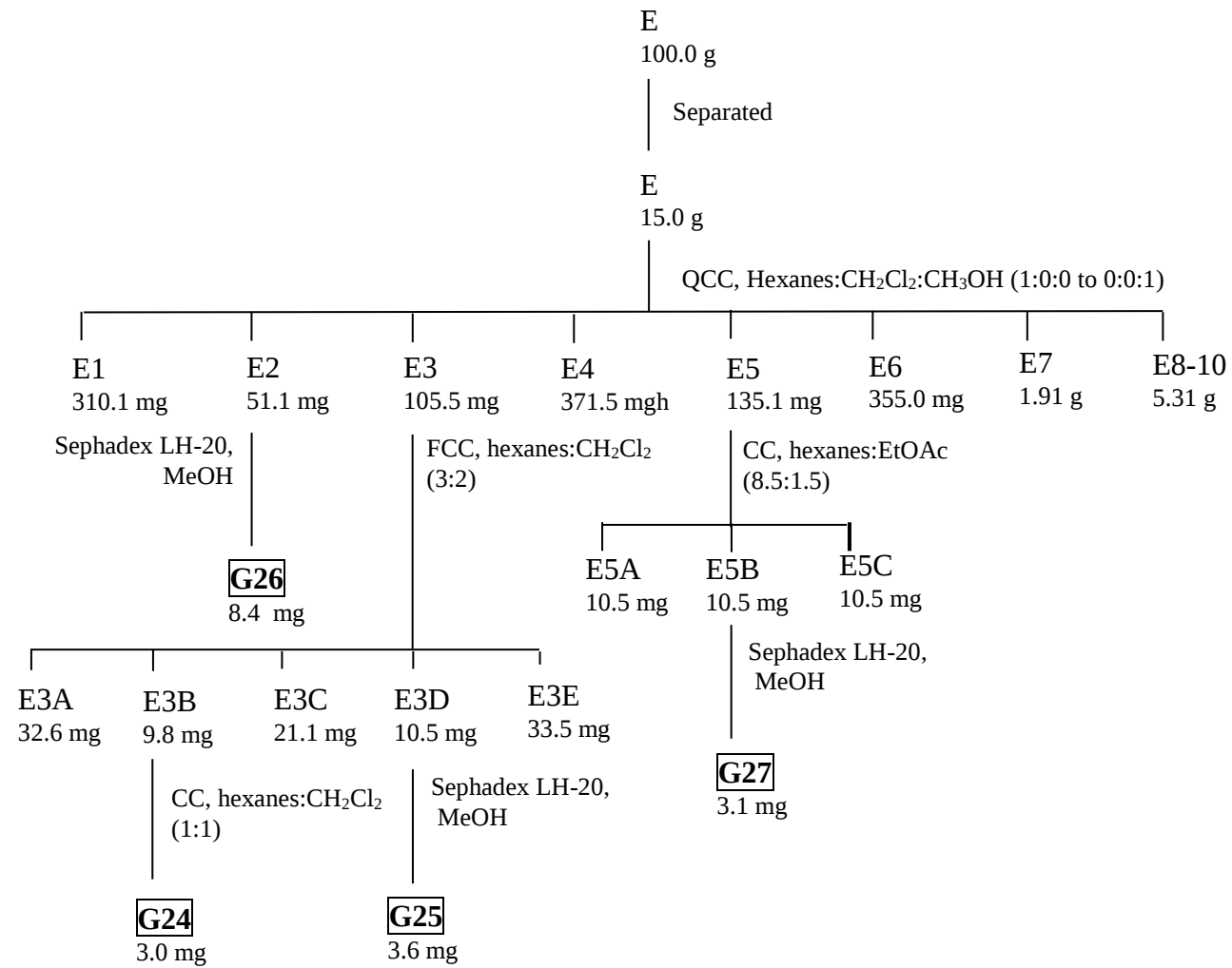


แผนภาพ 3.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนใบของมะเดะ



แผนภาพ 3.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนไขของมะตะ (ต่อ)





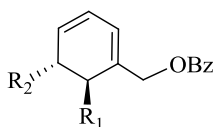
แผนภาพ 3.3 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนกิ่งใหญ่ของมะตะ (ต่อ)

สรุปผลและอภิปรายผล

อภิปรายผลการทดลอง

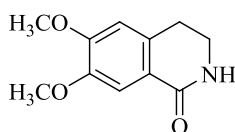
1. บุษรงคอย (*Dasymaschalon yunnanense*)

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในส่วนใบของต้นบุษรงคอย สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 14 สาร คือ *trans*-5,6-diacetoxy-1-(benzoyloxymethyl)-1,3-cyclohexadiene (**D1**), (–)-desoxypipoxide (**D2**), corydaldine (**D3**), (–)-sinactine (**D4**), (+)-crotepoxy (**D5**), (–)-arcabucoine (**D6**), goniopedaline (**D7**), 3,5-dihydroxy-2,4-dimethoxyaristolactam (**D8**), *trans*-*N*-cinnamoyltyramine (**D9**), (+)-senediol (**D10**), 1*S*,2*R*,3*R*,4*S*-2-[(benzoyloxy)methyl]cyclohex-5-ene-1,2,3,4-tetrol-4-acetate (**D11**), piperolactam A (**D12**), uvaribonol G (**D13**), (–)-corydalmine (**D14**)

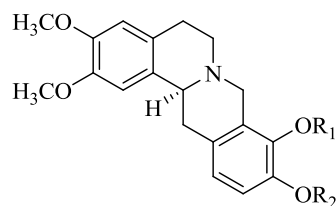


D1: $R_1 = R_2 = \text{OAc}$

D2: $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OBz}$

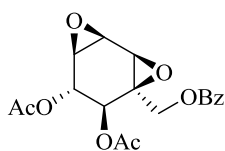


D3

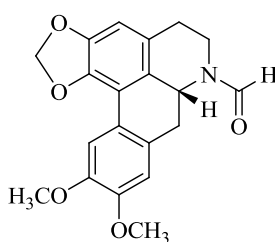


D4: $R_1 = R_2 = -\text{CH}_2-$

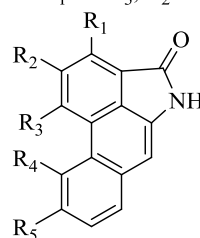
D14: $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$



D5



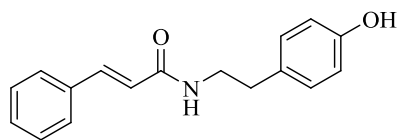
D6



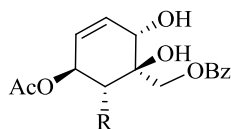
D7: $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}, R_4 = R_5 = \text{H}$

D8: $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3, R_2 = R_4 = \text{OH}, R_5 = \text{H}$

D12: $R_1 = R_4 = R_5 = \text{H}, R_2 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{OH}$

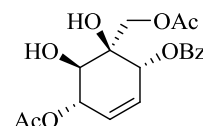


D9



D10: $R = \text{OAc}$

D11: $R = \text{OH}$

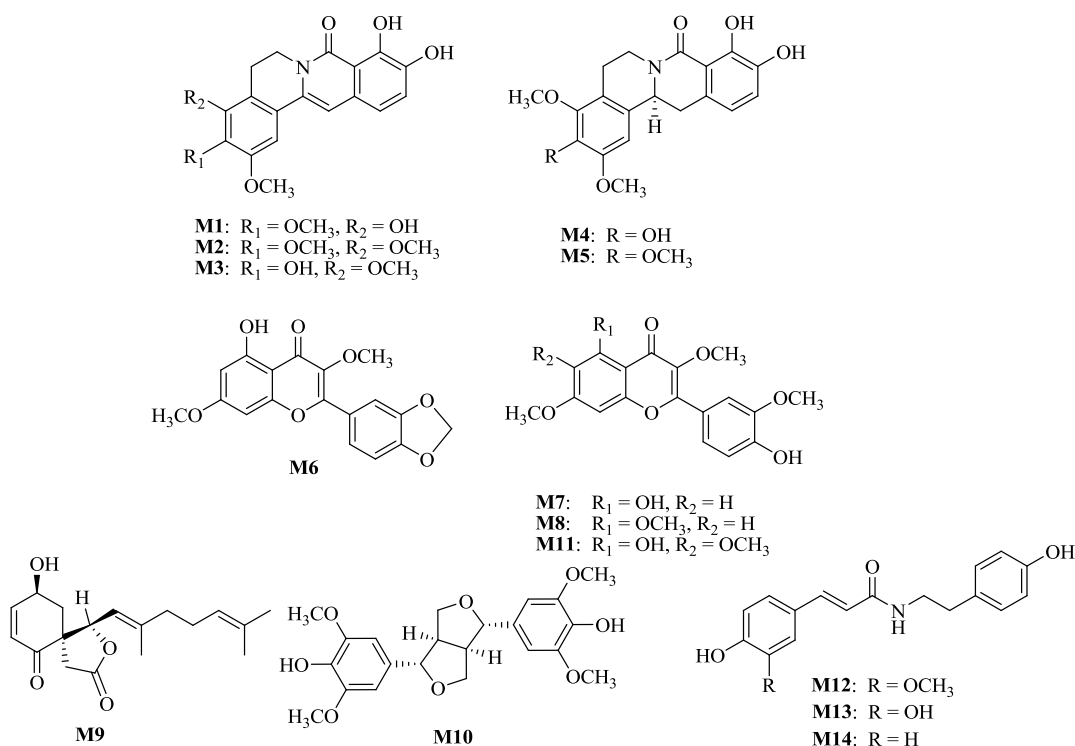


D13

โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ (**D1-D14**) ที่แยกได้จากใบของต้นบุษรงคอย

2. ระฆังเขี้ยว (*Milusa cuneata*)

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากต้นระฆังเขี้ยว สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 14 สาร ซึ่งเป็นสารใหม่ 5 สาร โดยแบ่งเป็นในส่วนของต้นระฆังเขี้ยว สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 10 สาร โดยเป็นสารใหม่ 5 สาร คือ miliusacunines A-E (**M1-M5**) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้ว 5 สาร คือ 5-hydroxy-3,7-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavone (**M6**), pachypodol (**M7**), 4'-hydroxy-3,5,7,3'-tetramethoxyflavone (**M8**), (+)-miliusol (**M9**) และ(+)-syringaessinol (**M10**) ขณะที่การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนกิ่ง สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 6 สาร และซ้ำกับส่วนใบ 2 สาร โดยสารทั้งหมดเป็นสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้ว คือ **M6**, **M7**, chrysoplenetin (**M11**), *trans*-*N*-feruloyltyramine (**M12**), *trans*-*N*-caffeoyltyramine (**M13**) และ *trans*-*N*-coumaroyltyramine (**M14**)

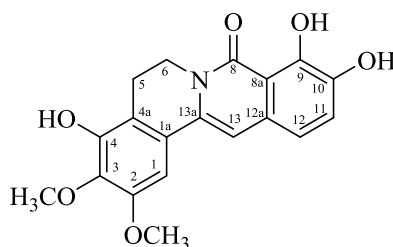


โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ (**M1-M14**) ที่แยกได้จากใบและกิ่งของต้นระฆังเขี้ยว

สาร **M1**

สาร **M1** มีลักษณะเป็นของแข็งสีชมพูใส มีจุดหลอมเหลว 218-220 °C สูตรโมเลกุล $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{NO}_4$ พบค่า m/z 356.1136 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. 356.1134) จากข้อมูล UV พบการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 224, 338, 371 และ 389 nm และข้อมูล IR สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณของหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล (3419 cm^{-1}) คาร์บอนิลเอไมด์ (1649 cm^{-1}) และ วงอะโรมาติก (1584 และ 1504 cm^{-1}) จากข้อมูล UV และ IR แสดงลักษณะโครงสร้างหลักของ oxoprotoberberine จาก

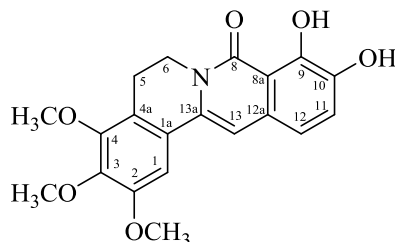
ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสาร **M1** ปรากฏสัญญาณของคีเลทไฮดรอกซิลที่ δ_{H} 13.17 (*br s*, 1H) พบ 2 สัญญาณของอะโรมาติกที่คู่ควบแบบ *ortho* ที่ δ_{H} 7.25 (*d*, $J = 8.4$ Hz, 1H) และ 7.02 (*d*, $J = 8.4$ Hz, 1H) อะโรมาติก 1 สัญญาณ ที่ δ_{H} 7.12 (*s*, 1H) โอลิฟินิก 1 สัญญาณ ที่ δ_{H} 7.24 (*s*, 1H) เมทิลีนที่คู่ควบกัน 2 สัญญาณ ที่ δ_{H} 4.24 (*t*, $J = 6.2$ Hz, 1H) และ 2.96 (*t*, $J = 6.2$ Hz, 1H) และ เมททอกซี 2 สัญญาณ ที่ δ_{H} 3.95 (*s*, 3H) และ 3.84 (*s*, 3H) จากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ DEPT แสดงสัญญาณคาร์บอนของ คาร์บอนิลของหมู่เอไมด์ ที่ δ_{C} 165.8 ควอเตอร์นารี 10 สัญญาณที่ δ_{C} 152.9, 148.1, 147.5, 143.2, 137.7, 135.0, 130.6, 126.1 116.2 และ 111.6, เมทไทน์ 4 สัญญาณ ที่ δ_{C} 123.1, 116.7, 104.9 และ 100.7, เมทิลีน 2 สัญญาณที่ δ_{C} 39.4 และ 21.4 และเมททอกซี 2 สัญญาณ ที่ δ_{C} 60.8 และ 56.2 จากข้อมูล 2D-NMR คีเลทไฮดรอกซิลโปรตอน ที่ δ_{H} 13.17 อยู่บนคาร์บอน C-9 (δ_{C} 148.1) เนื่องจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับคาร์บอนิลของเอไมด์ที่ C-8 (δ_{C} 165.8) อะโรมาติกโปรตอนคู่ควบแบบ *ortho* 2 สัญญาณที่ δ_{H} 7.25 และ 7.02 เป็นโปรตอน H-11/ δ_{C} 123.1 และ H-12/ δ_{C} 116.7 ตามลำดับ จากข้อมูล HMBC สเปกตรัม H-11 แสดงความสัมพันธ์กับ C-9, C-10 (δ_{C} 143.2) และ C-12a (δ_{C} 130.6) และ H-12 แสดงความสัมพันธ์กับ C-8a (δ_{C} 111.6), C-10 และ C-13 (δ_{C} 104.9) โปรตอนโอลิฟินิกปรากฏสัญญาณ ที่ δ_{H} 7.24 พบว่าเป็น H-13 ซึ่งยืนยันจากข้อมูล HMQC และ HMBC และจากข้อมูลเหล่านี้ยืนยันได้ว่า C-9 และ C-10 ที่ปรากฏในสนามต่ำมีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่แทนที่ โปรตอนเมทิลีนที่ปรากฏในสนามต่ำที่ δ_{H} 4.24 คือ เมทิลีน (H₂-6) เนื่องจากได้รับอิทธิพล (inductive effect) จากอะตอมไนโตรเจนของหมู่เอไมด์ และจากความสัมพันธ์ HMBC กับ C-4a (δ_{C} 116.2), C-5 (δ_{C} 21.4), C-8 (δ_{C} 165.8) และ C-13a (δ_{C} 135.0) ดังนั้น โปรตอนเมทิลีนที่เหลือที่คู่ควบกัน δ_{H} 2.96 จึงคือโปรตอน H-5 ตำแหน่ง C-4 จึงถูกแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล โดยค่าเคมีคัลชิฟท์คาร์บอนที่ δ_{C} 147.5 และจากความสัมพันธ์ HMBC ระหว่าง H₂-5 และ C-4 หมู่เมททอกซี 2 หมู่ ที่ δ_{H} 3.95 และ 3.84 เชื่อมกับ C-2 (δ_{C} 152.9) และ C-3 (δ_{C} 137.7) ตามลำดับ โดยยืนยันจากความสัมพันธ์ HMBC และค่าเคมีคัลชิฟท์ของคาร์บอนที่ C-3 ที่ปรากฏในสนามสูง (δ_{C} 137.7) เนื่องจากผลของหมู่แทนที่ของออกซิเจนตรงตำแหน่ง *ortho* ทั้งสองข้าง ซึ่ง singlet โปรตอนอะโรมาติกที่ δ_{H} 7.12 คือโปรตอน H-1 โดยยืนยันจากความสัมพันธ์ HMBC กับ C-2, C-3 และ C-13a ดังนั้นสาร **M1** (*miliusacunine A*) คือ 8-oxo-4,9,10-trihydroxy-2,3-dimethoxy-5,6-dihydroberberine



Miliusacunine A (**M1**): bright pink solid; mp 218–220 °C; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ) 224 (4.5), 338 (4.2), 371 (4.1) and 389 (4.1); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3419, 1649, 1617, 1584, 1504, 1463, 1278 and 1126 cm^{-1} ; ^1H NMR (acetone- d_6 , 400 MHz) and ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 100 MHz) data, see ตาราง 1; HRESIMS m/z 356.1136 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{NO}_6$, 356.1134).

สาร M2

สาร **M2** มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง จุดหลอมเหลว 217-218 °C โดยมีค่า m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ จาก HRESIMS ที่ 392.1112 และมีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{Na}$ โดยข้อมูลสเปกตรัมของสาร **M2** คล้ายกับสาร **M1** ยกเว้น สาร **M2** ต่างจาก **M1** ซึ่งพบหมู่เมทอกซีที่เพิ่มขึ้นมา 1 สัญญาณที่ δ_{H} 3.89 โดยเมทอกซีหมู่ใหม่นี้เชื่อมกับคาร์บอน C-4 (δ_{C} 151.1) และสามารถยืนยันตำแหน่งของหมู่เมทอกซีใหม่นี้จากความสัมพันธ์ HMBC ระหว่าง โปรตอนเมทิลีน (H_2 -5) ที่ δ_{H} 2.98 (t , $J = 6.2$ Hz) กับ C-4 ดังนั้น สาร **M2** (miliusacunine B) คือ 4-O-methyl ether ของสาร **M1**

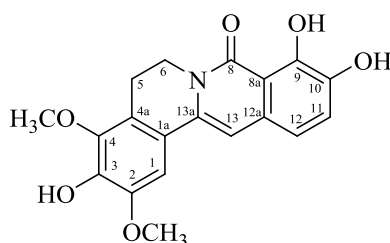


Miliusacunine B (**M2**): yellow solid; mp 217–218 °C; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ) 224 (4.6), 341 (4.2), 371 (4.2) and 389 (4.1); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3388, 1648, 1586, 1494, 1461, 1280 and 1032 cm^{-1} ; ^1H NMR (acetone- d_6 , 400 MHz) and ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 100 MHz) data, see ตาราง 1; HRESIMS m/z 392.1112 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{Na}$, 392.1110).

สาร M3

สาร **M3** มีลักษณะเป็นของหนืดเหนียวสีน้ำตาลแดง มี UV และ IR คล้ายกับสาร **M1** จากข้อมูล ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR พบว่าหมู่เมทอกซี 1 หมู่ของ **M3** เชื่อมกับตำแหน่งคาร์บอนในโครงสร้างต่างจากสาร **M1** ซึ่งเมทอกซีหมู่ที่ δ_{H} 3.91 แสดงความสัมพันธ์ HMBC กับ C-4 (δ_{C} 143.8) ขณะที่ความสัมพันธ์ HMBC ระหว่าง โปรตอนเมทิลีน H_2 -5 ที่ δ_{H} 2.98 (t , $J = 5.8$ Hz) และ C-4 จากข้อมูลนี้ยืนยันว่าเมทอกซีหมู่ใหม่นี้เชื่อมกับคาร์บอน C-4 และเมทอก

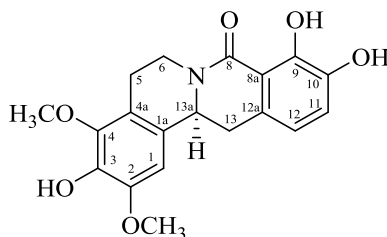
ซีที่ δ_{H} 4.00 เชื่อมกับคาร์บอน C-2 (δ_{C} 147.2) โดยอาศัยข้อมูล HMBC กับ C-2 ดังนั้นหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง C-3 คือ หมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งสัมพันธ์กับค่าเคมีคัลชิฟท์ของ C-3 ที่ δ_{C} 139.8 เนื่องจากผลของหมู่แทนที่ *ortho* oxygen ดังนั้นตำแหน่งของเมททอกซีและไฮดรอกซิลจึงเชื่อมกับคาร์บอน C-2 และ C-3 ตามลำดับ ซึ่งยืนยันโดยอาศัยความสัมพันธ์ HMBC ระหว่างอะโรมาติกโปรตอน H-1 (δ_{H} 7.04/ δ_{C} 103.0) กับ C-2 และ C-3 ดังนั้นโครงสร้างของสาร **M3** (miliusacunine C) คือ 8-oxo-3,9,10-trihydroxy-2,4-dimethoxy-5,6-dihydroberberine



Miliusacunine C (**M3**): brownish-red gum; UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ) 225 (4.3), 340 (4.0), 372 (3.9) and 389 (3.9); IR (neat) ν_{max} 3421, 1648, 1611, 1583, 1502, 1463, 1278, 1126 and 1093 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) data, see ตาราง 1; HRESIMS m/z 378.0958 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_6\text{Na}$, 378.0954).

สาร **M4**

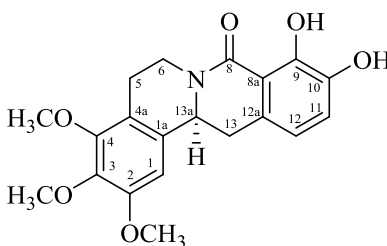
สาร **M4** มีลักษณะเป็นของหนืดสีเหลืองน้ำตาล ค่า specific rotation $[\alpha]_D^{28}$ -175 (c 0.07, MeOH) โดย ^1H -NMR สเปกตรัมของสาร **M4** คล้ายกับสาร **M3** แต่ที่แตกต่างอย่างเห็นได้ชัดคือ **M4** ปรากฏสัญญาณที่เพิ่มขึ้นมาของ โปรตอนเมทไธน์ ที่ δ_{H} 3.14 (*br d*, $J = 15.3$ Hz) และ โปรตอนเมทิลีนที่ 2.89 (*br t*, $J = 15.3$ Hz) ที่คู่ควบกัน ซึ่งโปรตอนเมทิลีนนี้อยู่บนคาร์บอน C-13 (δ_{C} 37.1) โดยพบสัญญาณความสัมพันธ์จากข้อมูล HMQC และ HMBC ระหว่าง H-13 กับ C-1a (δ_{C} 126.7), C-8a (δ_{C} 111.2), C-12 (δ_{C} 116.8), C-12a (δ_{C} 128.2) และ C-13a (δ_{C} 55.7) และระหว่างอะโรมาติกโปรตอน H-12 ที่ δ_{H} 6.61 (*d*, $J = 8.0$ Hz) กับ C-13 โปรตอนเมทไธน์ ที่ (δ_{H} 4.83) อยู่บนคาร์บอน C-13a จากข้อมูล HMBC สเปกตรัม ดังนั้นโครงสร้างของสาร **M4** (miliusacunine D) คือ (–)-(S)-8-oxo-3,9,10-dihydroxy-2,4-dimethoxy-5,6,13,13a-tetrahydroberberine ได้จากการเปรียบเทียบค่า specific rotation กับสาร (S)-(–)-2,3-dimethoxy-8-oxoberberine, $[\alpha]_D$ -413.8 (c 0.36, CHCl_3) โดยสารนี้ยืนยันโดยเทคนิค X-ray ด้วย



Miliusacunine D (**M4**): brownish-yellow gum; $[\alpha]_D^{28}$ -175 (c 0.074, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ) 218 (4.5), 262 (4.0) and 341 (3.8); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3421, 1636, 1615, 1584, 1459, 1267, 1120 and 1091 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) data, see ตาราง 2; HRESIMS m/z 380.1104 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{Na}$, 380.1110).

สาร M5

สาร **M5** มีลักษณะเป็นของหนืดสีเหลือง $[\alpha]_D^{28}$ -93 (c 0.02, MeOH) เมื่อเทียบข้อมูล NMR กับสาร **M4** พบสัญญาณที่เพิ่มขึ้นมาของหมู่เมทอกซี 1 สัญญาณที่ δ_{H} 3.89 ในสาร **M5** ซึ่งเมทอกซีนี้อยู่บนคาร์บอน C-3 ด้วยข้อมูล HMBC ที่แสดงความสัมพันธ์กับ C-3 (δ_{C} 140.9) และยืนยันตำแหน่งของเมทอกซีที่เพิ่มขึ้นมาจากความสัมพันธ์ HMBC ของอะโรมาติกโปรตอน H-1 (δ_{H} 6.53) กับ C-3 ดังนั้นโครงสร้างของสาร **M5** (miliusacunine E) คือ $(-)\text{-(S)-3-O-methyl ether}$ ของสาร **M4**



Miliusacunine E (**M5**): yellow viscous oil; $[\alpha]_D^{28}$ -93 (c 0.024, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ) 218 (4.4), 265 (3.8) and 325 (3.5); IR (neat) $\nu_{\max}$ 3421, 1635, 1590, 1459, 1271, 1121, 1097 and 1029 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) data, see ตาราง 2; HRESIMS m/z 372.1454 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{NO}_6$, 372.1447).

ตาราง 1 NMR Spectroscopic Data of **M1** and **M2** in Acetone- d_6 and **M3** in $CDCl_3$

Position	M1			M2			M3		
	δ_C (C-type)	δ_H (mult., J in Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C (C-type)	δ_H (mult., J in Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C (C-type)	δ_H (mult., J in Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)
1	100.7 (CH)	7.12 (s)	C-1a, C-2, C-3, C-4a, C-13a	105.3 (CH)	7.34 (s)	C-1a, C-2, C-3, C-4a, C-13a	103.0 (CH)	7.04 (s)	C-2, C-3, C-4a, C-13a
1a	126.1 (C)	-	-	126.3 (C)	-	-	121.5 (C)	-	-
2	152.9 (C)	-	-	154.0 (C)	-	-	147.2 (C)	-	-
3	137.7 (C)	-	-	144.1 (C)	-	-	139.8 (C)	-	-
4	147.5 (C)	-	-	151.1 (C)	-	-	143.8 (C)	-	-
4a	116.2 (C)	-	-	122.5 (C)	-	-	122.1 (C)	-	-
5	21.4 (CH ₂)	2.96 (t, 6.2)	C-1a, C-4, C-4a, C-6	22.0 (CH ₂)	2.98 (t, 6.2)	C-1a, C-4, C-4a, C-6	21.6 (CH ₂)	2.98 (t, 5.6)	C-1a, C-4, C-6, C-4a
6	39.4 (CH ₂)	4.24 (t, 6.2)	C-4a, C-5, C-8, C-13a	39.7 (CH ₂)	4.23 (t, 6.2)	C-4a, C-5, C-8, C-13a	39.0 (CH ₂)	4.25 (t, 5.6)	C-4a, C-5, C-8, C-13a
8	165.8 (C)	-	-	166.1 ^a (C)	-	-	165.0 (C)	-	-
8a	111.6 (C)	-	-	111.9 (C)	-	-	109.9 (C)	-	-
9	148.1 (C)	-	-	148.3 ^a (C)	-	-	146.8 (C)	-	-

^a Observed by HMBC data.

ตาราง 1 (Continued)

Position	M1			M2			M3		
	δ_C (C-type)	δ_H (mult., J in Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C (C-type)	δ_H (mult., J in Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C (C-type)	δ_H (mult., J in Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)
10	143.2 (C)		-	143.4 (C)	-	-	141.8 (C)	-	-
11	123.1 (CH)	7.25 (d, 8.4)	C-9, C-10, C-12a	122.5 (CH)	7.26 (d, 8.4)	C-9, C-10, C-12a	121.6 (CH)	7.28 (d, 8.2)	C-9, C-10, C-12a
12	116.7 (CH)	7.02 (d, 8.4)	C-8a, C-10, C-11, C-12a, C-13	117.0 (CH)	7.03 (d, 8.4)	C-8a, C-10, C-13, C-11	116.0 (CH)	6.97 (d, 8.2)	C-8a, C-10, C-13
12a	130.6 (C)		-	130.8 (C)	-	-	130.2 (C)	-	-
13	104.9 (CH)	7.24 (s)	C-1a, C-8a, C-12, C-12a, C-13a	105.2 (CH)	7.25 (s)	C-1a, C-8a, C-12, C-13a	103.8 (CH)	6.86 (s)	C-1a, C-8a, C-11, C-13a
13a	135.0 (C)		-	134.7 (C)	-	-	134.7 (C)	-	-
2-OCH ₃	56.2 (CH ₃)	3.95 (s)	C-2	56.6 (CH ₃)	3.95 (s)	C-2	56.7 (CH ₃)	4.00 (s)	C-2
3-OCH ₃	60.8 (CH ₃)	3.84 (s)	C-3	61.3 (CH ₃)	3.88 (s)	C-3			
4-OCH ₃	-	-	-	61.1 (CH ₃)	3.89 (s)	C-4	61.0 (CH ₃)	3.91 (s)	C-4
9-OH	-	13.17 (br s)	-	-	13.15 (br s)	-	-	-	-

^a Observed by HMBC data.

ตาราง 2 NMR Spectroscopic Data of **M4** and **M5** in CDCl₃

Position	M4				M5			
	δ_{C} (C-type)		δ_{H} (<i>mult.</i> , <i>J</i> in Hz)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	δ_{C} (C-type)		δ_{H} (<i>mult.</i> , <i>J</i> in Hz)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	103.8	(CH)	6.52 (s)	C-1a, C-2, C-3, C-13a, C-4a	104.9	(CH)	6.53 (s)	C-1a, C-2, C-3, C-4a, C-13a
1a	126.7	(C)	-	-	131.1	(C)	-	-
2	146.8	(C)	-	-	152.7	(C)	-	-
3	137.3	(C)	-	-	140.9 ^a	(C)	-	-
4	144.3	(C)	-	-	151.0	(C)	-	-
4a	121.3	(C)	-	-	121.4	(C)	-	-
5	23.0	(CH ₂)	3.05 (br <i>d</i> , 15.7)	C-1a, C-4, C-4a, C-6	23.0	(CH ₂)	3.03 (br <i>d</i> , 16.2)	C-1a, C-4a, C-6
			2.70 (<i>m</i>)	C-1a, C-4, C-4a, C-6			2.70 (<i>m</i>)	C-1a, C-4, C-4a, C-6
6	38.0	(CH ₂)	4.88 (br <i>d</i> , 13.2)	C-4a, C-5, C-8, C-13a	38.2	(CH ₂)	4.87 (br <i>d</i> , 13.0)	C-4a, C-5, C-13a
			2.86 (br <i>d</i> , 14.1)	C-4a, C-5, C-13a			2.85 (br <i>d</i> , 12.2)	C-4a, C-5, C-13a
8	168.5	(C)	-	-	168.6	(C)	-	-
8a	111.2	(C)	-	-	111.3	(C)	-	-
9	148.6	(C)	-	-	148.7	(C)	-	-

^a Observed by HMBC data. ^b Signal partially obscured.

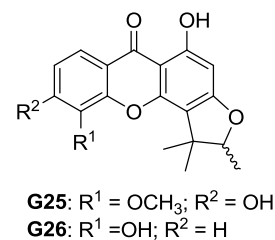
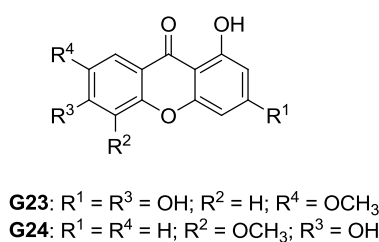
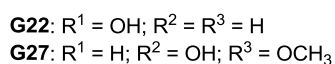
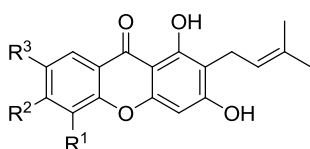
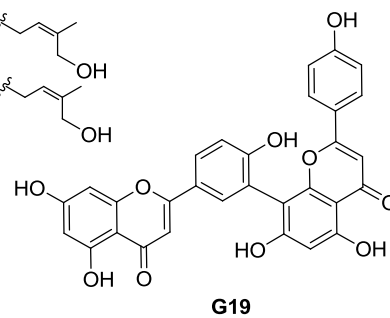
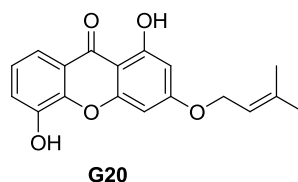
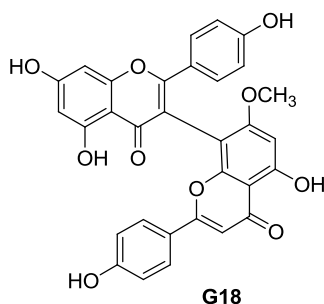
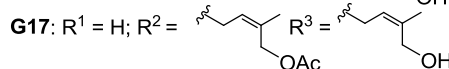
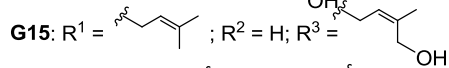
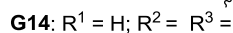
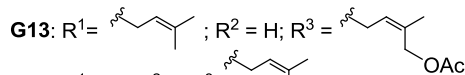
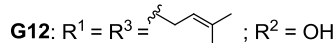
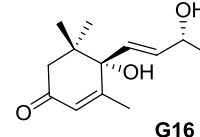
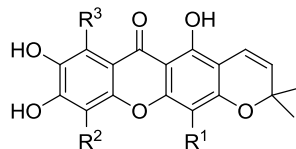
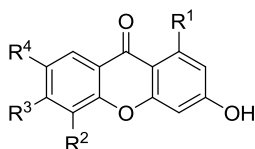
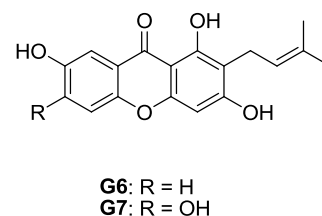
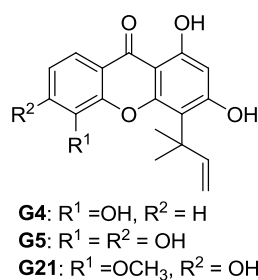
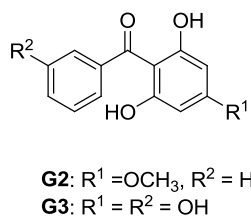
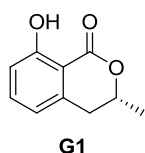
ตาราง 2 (Continued)

Position	M4				M5			
	δ_c (C-type)		δ_H (mult., J in Hz)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	δ_c (C-type)		δ_H (mult., J in Hz)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
10	143.9	(C)	-	-	144.1	(C)	-	-
11	118.2	(CH)	6.99 (<i>d</i> , 8.0)	C-9, C-10, C-12a	118.4	(CH)	6.99 (<i>d</i> , 7.7)	C-9, C-10, C-12a
12	116.2	(CH)	6.61 (<i>d</i> , 8.0)	C-8a, C-10, C-11, C-13	116.9	(CH)	6.61 (<i>d</i> , 7.7)	C-8a, C-10, C-11, C-13
12a	128.2	(C)	-	-	128.2	(C)	-	-
13	37.1	(CH ₂)	3.14 (<i>br d</i> , 15.3) ^b	C-1a, C-8a, C-12, C-12a, C-13a	37.1	(CH ₂)	3.15 (<i>br d</i> , 15.2) ^b	C-8a, C-12, C-12a, C-13a
			2.89 (<i>br t</i> , 15.3) ^b	C-1a, C-8a, C-11, C-12, C-12a, C-13a			2.91 (<i>br t</i> , 15.2) ^b	C-1a, C-8a, C-11, C-12, C-12a, C-13a
13a	55.7	(CH)	4.83 (<i>br d</i> , 13.2) ^b	C-1, C-1a, C-4a, C-13	55.9	(CH)	4.82 (<i>br d</i> , 13.5) ^b	C-1, C-1a, C-4a, C-13
2-OCH ₃	56.4	(CH ₃)	3.92 (<i>s</i>)	C-2	56.4	(CH ₃)	3.92 (<i>s</i>)	C-2
3-OCH ₃	-	-	-	-	61.0	(CH ₃)	3.89 (<i>s</i>)	C-3
4-OCH ₃	60.6	(CH ₃)	3.89 (<i>s</i>)	C-4	61.1	(CH ₃)	3.89 (<i>s</i>)	C-4
9-OH	-	-	12.75 (<i>br s</i>)	-	-	-	12.74 (<i>br s</i>)	-
10-OH	-	-	5.59 (<i>br s</i>)	-	-	-	-	-

^a Observed by HMBC data. ^b Signal partially obscured.

3. มะตะ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากต้นมะตะสามารถแยกสารได้ทั้งหมด 27 สาร ซึ่งเป็นสารใหม่ 6 สาร โดยแบ่งเป็นในส่วนเปลือกลำต้นของต้นมะตะ สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 11 สาร โดยเป็นสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วทั้งหมด คือ *R*-(–)-mellien (**G1**), cotoin (**G2**), 2,3',4,6-tetrahydroxybenzophenone (**G3**), pancixanthone A (**G4**), assiguxanthones A and B (**G5** and **G7**), 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone (**G6**), 1,3,5-trihydroxyxanthone (**G8**), 1,3,7-trihydroxyxanthone (**G9**), norathyriol (**G10**) and montixanthone (**G11**) ขณะที่การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนใบ สามารถแยกสารได้ 8 สาร โดยเป็นสารใหม่ 4 สาร คือ mckeanianones A-C (**G12**, **G14** and **G17**) และสารประเภท biflavone 1 สาร mckeaniabiflavone (**G18**) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้ว 4 สาร คือ bannaxanthones I and E (**G13** and **G15**), vomifoliol (**G16**) และamentoflavone (**G19**) ส่วนการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในส่วนกิ่งใหญ่ สามารถแยกสารได้จำนวน 10 สาร โดยเป็นสารใหม่ 2 สาร คือ mckeanianones D-E (**G20** และ **G27**) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้ว 8 สารคือ neriifolone A (**G21**), 1,3,5-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-9H-xanthen-9-one (**G22**), 1,3,6-trihydroxy-7-methoxyxanthone (**G23**), buchanaxanthone (**G24**), 5-*O*-methyl-2-deprenylrheediaxanthone B (**G25**) และ pancixanthone B (**G26**) โดยสารพบสารซ้ำในส่วนเปลือกลำต้น 2 สาร คือ **G4** และ **G8**

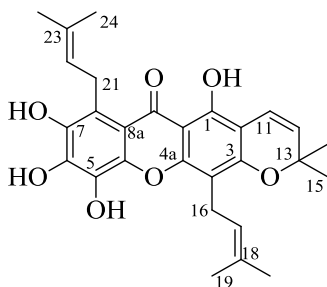


โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ (G1-G27) ที่แยกได้จากเปลือกลำต้น ใบ และกิ่งใหญ่ของต้นมะเดะ

สาร G12

มีลักษณะทางกายภาพเป็นของแข็งสีเหลือง จุดหลอมเหลวที่ $187-189^\circ\text{C}$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 479.2063 (calcd. 479.2070) $[\text{M}+\text{H}]^+$ และสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_7$ จากสเปกตรัมของ UV แสดงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 217, 295, 337 และ 384 nm ซึ่งสอดคล้องกับสารกลุ่มแซนโทน สเปกตรัมของ IR พบแถบการสั่นของหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลและคาร์บอนิลที่เลขคลื่น 3418 และ 1648 cm^{-1} ตามลำดับ $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัมพบหนึ่งสัญญาณ

ของคีเลตไฮดรอกซิลโปรตอน δ_{H} 13.97 (1H, s) หนึ่งชุดสัญญาณของวงไดเมทิลโครมีนที่ δ_{H} 6.69 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-11) 5.69 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-12) และ 1.47 (6H, s, H-14 และ H-15) และ 2 ชุดสัญญาณของหมู่ prenyl ที่ δ_{H} 5.31 (*br t*, $J = 6.2$ Hz, H-22), 4.17 (2H, d, $J = 6.2$ Hz, H-21) 1.86 (3H, s, H-25) และ 1.64 (3H, s, H-24) และ 5.21 (1H, *br t*, $J = 6.8$ Hz, H-17) 3.42 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, H-16) 1.83 (3H, s, H-20) และ 1.63 (3H, s, H-19) จากความสัมพันธ์ HMBC ของตำแหน่ง 1-OH ที่ δ_{H} 13.97 กับ C-1 (δ_{C} 156.7) และ C-9a (δ_{C} 104.1) ยืนยันได้ว่าหมู่ไฮดรอกซิลเชื่อมอยู่กับโครงสร้างหลักที่ตำแหน่งที่ 1 วงไดเมทิลโครมีนจะเกาะอยู่ที่ตำแหน่งที่ C-2 (δ_{C} 104.7) และ C-3 (δ_{C} 157.7) ด้วยพันธะอีเทอร์ จากข้อมูลของ HMBC ของโอลิฟินิคโปรตอนที่สนามต่ำ H-11 (δ_{H} 6.69) กับ C-1 และ C-2 หมู่ prenyl หนึ่งชุดสัญญาณที่ δ_{H} 5.21, 3.42, 1.83 และ 1.63 ต่อกับโครงสร้างหลักแซนโทน ที่ C-4 (δ_{C} 106.9) อาศัยความสัมพันธ์ของ HMBC ของเมทิลีนโปรตอน H-16 (δ_{H} 3.42) กับ C-3, C-4 และ C-4a (δ_{C} 154.3) ขณะที่อีกหมู่ prenyl จะเชื่อมอยู่ที่ตำแหน่งที่ C-8 (δ_{C} 129.0) ซึ่งยืนยันจากความสัมพันธ์ HMBC ของเมทิลีนโปรตอนสนามต่ำ H-21 (δ_{H} 4.17) กับออกซิเจนคาร์บอน C-7 (δ_{C} 141.8), C-8 และ C-8a (δ_{C} 111.8) โดยตำแหน่ง C-5 (δ_{C} 152.5) และ C-6 (δ_{C} 152.6) จะถูกแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล เนื่องจากค่าเคมีคัลชิฟท์ของคาร์บอนที่สนามต่ำ ดังนั้น สาร **G12** คือ mckeanianone A หรือ 1,5,6,7-tetrahydroxy-6,6'-dimethyl-2 H-pyrano(2',3':3,2)-4,8-di(3-methylbut-2-enyl)-xanthone

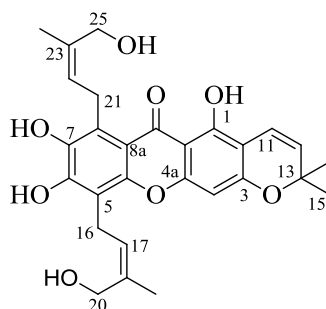


Mckeanianone A (**G12**): Yellow solid; mp 187-189 °C; UV (CH₃OH) λ_{max} nm (log ϵ): 217 (4.39), 295 (4.61), 337 (4.04), 384 (3.79); IR (neat) ν_{max} : 3418, 1649, 1610, 1463, 1285 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) and ¹³C NMR (100 MHz, Acetone-*d*₆) spectral data see ตาราง 3; HRESI-TOFMS m/z 479.2063 [M+H]⁺(calcd for 479.2070, C₂₈H₃₁O₇).

สาร G14

มีลักษณะทางกายภาพเป็นของหนืดสีเหลือง พบ m/z ที่ 517.1839 (calcd. 517.1836) [M+Na]⁺ และสูตรโมเลกุลเป็น C₂₈C₃₀O₈ ข้อมูลจากสเปกตรัม UV และ IR แสดงการดูดกลืน

แสงและแถบการสั่นของหมู่ฟังก์ชันคล้ายกับสาร **G12** ยิ่งกว่านั้น ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของคีเลตไฮดรอกซิลโปรตอน (δ_{H} 13.78, *br s*) 1 วงไดเมทิลโครมีนที่ δ_{H} 6.69 (1H, *d*, $J = 10.0$ Hz, H-11), 5.54 (1H, *d*, $J = 10.0$ Hz, H-12) และ 1.44 (6H, *s*, H-14 และ H-15) พบ 1 ชุดสัญญาณอะโรมาติกโปรตอน (δ_{H} 6.25, *s*, H-4) และ 2 หมู่ของoxygenated prenyl ที่ δ_{H} 5.40 (1H, *t*, $J = 8.0$ Hz, H-17) 4.30 (2H, *s*, H-20) 3.60 (2H, *d*, $J = 8.0$ Hz, H-16) และ 1.73 (3H, *s*, H-19) และ 5.59 (1H, *t*, $J = 7.8$ Hz, H-22), 4.26 (2H, *s*, H-25), 4.13 (2H, *d*, $J = 7.8$ Hz, H-21) และ 1.73 (3H, *s*, H-24) จากข้อมูล 2D NMR นำเสนอว่าสาร **G14** มีลักษณะโครงสร้างของ pyrano-xanthone เหมือนสาร **G12** โดยมีคีเลตไฮดรอกซิล (δ_{C} 13.78) อยู่ที่ตำแหน่ง C-1 (δ_{C} 157.7) และวงไดเมทิลโครมีนเชื่อมกับโครงสร้างหลักที่ตำแหน่ง C-2 (δ_{C} 104.3) และ C-3 (δ_{C} 159.7) นอกจากนี้ อะโรมาติกโปรตอนที่ δ_{H} 6.25 อยู่ตำแหน่งที่ 4 ของโครงสร้างหลัก เนื่องจากแสดงความสัมพันธ์ HMBC กับ C-2, C-3, C-4a (δ_{C} 156.3) และ C-9a (δ_{C} 103.8) เมทิลีนโปรตอนของหมู่ oxygenated prenyl หมู่หนึ่งที่ (δ_{H} 4.13, H-21) มีความสัมพันธ์ HMBC ไปยังออกซิเจนคาร์บอน C-7 (δ_{C} 139.1), C-8 (δ_{C} 124.2) และ C-8a (δ_{C} 111.3) สำหรับเมทิลีนโปรตอนของหมู่ prenyl อีกหน่วยนั้น (δ_{H} 3.60, H-16) แสดงความสัมพันธ์ HMBC กับอะโรมาติกคาร์บอน C-5 (δ_{C} 112.2), C-6 (δ_{C} 151.0) และ C-10a (δ_{C} 149.7) จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นสองหมู่ของ oxygenated prenyl เชื่อมอยู่กับโครงสร้างหลักของแซนโทน ที่ตำแหน่ง C-8 และ C-5 ตามลำดับ โดยส่วนแอลคีนของ oxygenated prenyl มีรูปร่างเป็น *Z*- $\Delta^{17,18}$ and *Z*- $\Delta^{22,23}$ โดยอาศัยข้อมูลของ NOESY ที่พบความสัมพันธ์ของ H-16 (δ_{H} 3.60) กับ H-20 (δ_{H} 4.30) และ H-17 (δ_{H} 5.40) กับ H-19 (δ_{H} 1.73) อีกหนึ่งพันธะคู่ H-21 (δ_{H} 4.13) กับ H-25 (δ_{H} 4.26) และ H-22 (δ_{H} 5.59) กับ H-24 (δ_{H} 1.73) ดังนั้น สาร **G14** ถูกเรียกชื่อเป็น mckeanianone B หรือ 1,6,7-trihydroxy-6,6'-dimethyl-2 H-pyrano(2',3':3,2)-5,8-di(4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl)-xanthone

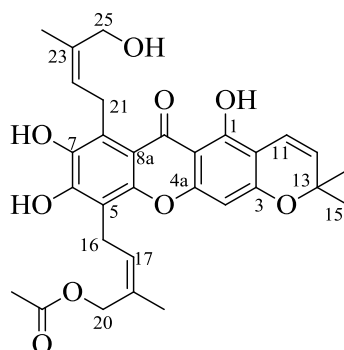


Mckeanianone B (**G14**): Yellow viscous oil; UV (CH_3OH) λ_{max} nm (log ϵ): 218 (4.49), 292 (4.57), 338 (4.18), 379 (3.96) ; IR (neat) ν_{max} : 3447, 1704, 1650, 1611, 1446, 1288

cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) and ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spectral data see ตาราง 3; HRESI-TOFMS m/z 517.1839 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for 517.1838, $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_8\text{Na}$).

สาร G17

มีลักษณะทางกายภาพเป็นของหนืดสีเหลือง จากแมสสเปกตรัมพบ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ที่ค่า m/z ที่ 559.1945 (calcd. 559.1944) และมีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_9$ จากข้อมูล UV, IR, ^1H และ ^{13}C NMR มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับสาร G14 ยกเว้นมีการเพิ่มขึ้นของหนึ่งแถบการสั่นที่เลขคลื่น 1763 cm^{-1} ซึ่งเป็นของคาร์บอนิลเอสเทอร์ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูล ^1H NMR ที่พบสัญญาณของหมู่อะซิโทกซีที่ δ_{H} 2.12 (3H, s) โดยหมู่อะซิโทกซีนี้อาจจะเชื่อมอยู่ที่ C-20 (δ_{C} 63.6) อาศัยข้อมูลจาก HMBC สเปกตรัม ซึ่งเมททิลีนโปรตอน H_2 -20 (δ_{H} 4.87) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนิลของหมู่อะซิโทกซี (δ_{C} 171.7) จากข้อมูลข้างต้น สาร G17 มีชื่อว่า mckeanianone C หรือ 1,6,7-trihydroxy-6,6'-dimethyl-2H-pyrano (2',3':3,2)-5-(4-acetoxy-3-methylbut-2-enyl)-8-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl)-xanthone



Mckeanianone C (G17): Yellow viscous oil; UV (CH_3OH) λ_{max} nm (log ϵ): 217 (4.27), 295 (4.40), 338 (3.84), 383 (3.61); IR (neat) ν_{max} : 3418, 1736, 1650, 1597, 1448, 1244 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) and ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spectral data see ตาราง 3; HRESI-TOFMS m/z 559.1945 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for 559.1944, $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_9\text{Na}$).

ตาราง 3 NMR spectroscopic data (400 MHz, CDCl₃) for mckeanianones A-C (**G12**, **G14** and **G17**)

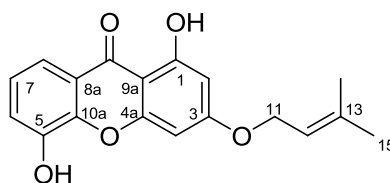
Position	G12			G14			G17		
	δ_{H} , (J in Hz)	δ_{C} (type)	HMBC	δ_{H} , (J in Hz)	δ_{C} (type)	HMBC	δ_{H} , (J in Hz)	δ_{C} (type)	HMBC
1		156.7 (C)			157.7 (C)			158.0 (C)	
2		104.7 (C)			104.3 (C)			104.5 (C)	
3		157.7 (C)			159.7 (C)			159.7 (C)	
4		106.9 (C)		6.25, s, 1H	94.1 (CH)	2, 3, 4a, 9, 9a	6.31, s, 1H	94.2 (CH)	2, 3, 4a, 9a
4a		154.3 (C)			156.3 (C)			156.3 (C)	
5		152.5 ^b (C)			112.2 (C)			112.2 (C)	
6		152.6 ^b (C)			151.0 (C)			151.3 (C)	
7		141.8 (C)			139.1 (C)			139.4 (C)	
8		129.0 (C)			124.2 (C)			124.0 (C)	
8a		111.8 (C)			111.3 (C)			111.3 (C)	
9		183.5 (C)			182.8 (C)			182.9 (C)	
9a		104.1 (C)			103.8 (C)			103.9 (C)	
10a		153.6 (C)			149.7 (C)			150.0 (C)	
11	6.69, d (10.0), 1H	116.5 (CH)	2, 3, 13, 14	6.69, d (10.0), 1H	115.8 (CH)	1, 2, 3, 13, 14, 15	6.73, d (10.0), 1H	115.9 (CH)	1, 2, 3, 13
12	5.69, d (10.0), 1H	128.0 (CH)	2, 13, 14	5.54, d (10.0), 1H	127.2 (CH)	2, 13, 14, 15	5.56, d (10.0), 1H	127.2 (CH)	2, 13, 14, 15
13		78.5 (C)			78.0 (C)			78.0 (C)	
14	1.47, s, 3H	28.4 (CH ₃)	12, 13	1.44, s, 3H	28.4 (CH ₃)	12, 13, 15	1.47, s, 3H	28.5 (CH ₃)	12, 13, 15
15	1.47, s, 3H	30.6 (CH ₃)	12, 13, 14	1.44, s, 3H	28.4 (CH ₃)	12, 13, 14	1.47, s, 3H	28.5 (CH ₃)	12, 13, 14
16	3.42, d (6.8), 2H	21.9 (CH ₂)	3, 4, 4a, 17, 18	3.60, d (8.0), 2H	22.4 (CH ₂)	5, 6, 10a	3.67, d (7.4), 2H	22.4 (CH ₂)	5, 6, 10a, 17, 18
17	5.21, brt (6.8), 1H	123.3 (CH)	4, 16	5.40, t (8.0), 1H	125.4 (CH)	19, 20	5.52, t (7.4), 1H	127.5 (CH)	19, 20

18		131.4 (C)			134.7 (C)			130.8 (C)	
19	1.63, s, 3H	25.9 (CH ₃)	17, 18, 20	1.73, s, 3H	22.6 (CH ₃)	17, 18, 20	1.73, s, 3H	21.5 (CH ₃)	17, 18, 20
20	1.83, s, 3H	18.1 (CH ₃)	17, 18, 19	4.30, s, 2H	62.1 (CH ₂)	17, 18, 19	4.87, s, 2H	63.6 (CH ₂)	17, 18, 19, CO(Ac)
21	4.17, d (6.2), 2H	26.3 (CH ₂)	7, 8, 8a, 22	4.13, d (7.8), 2H	26.1 (CH ₂)	7, 8, 8a, 22, 23	4.21, d (8.0), 2H	26.5 (CH ₂)	7, 8, 8a, 22, 23
22	5.31, brt (6.2), 1H	124.4 (CH)	8, 21	5.59, t (7.8), 1H	127.5 (CH)	8, 24, 25	5.73, t (8.0), 1H	128.5 (CH)	24, 25
23		131.5 (C)			133.7 (C)			132.9 (C)	
24	1.64, s, 3H	26.0 (CH ₃)	22, 23, 25	1.73, s, 3H	22.9 (CH ₃)	22, 23, 25	1.79, s, 3H	23.4 (CH ₃)	22, 23, 25
25	1.86, s, 3H	18.3 (CH ₃)	22, 23, 24	4.26, s, 2H	62.3 (CH ₂)	22, 23, 24	4.37, s, 2H	63.2 (CH ₂)	22, 23, 24
OH-1	13.97, s, 1H		1, 9a	13.78, brs, 1H			13.80, brs, 1H		
CO(Ac)								171.7 (C)	
CH ₃ (Ac)							2.12, s, 3H	21.2 (CH ₃)	CO(Ac)

^aMeasured in acetone-*d*₆, ^bThese assignments could be interchanged.

สาร G20

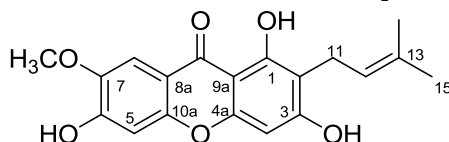
ลักษณะทางกายภาพเป็นของแข็งสีเหลือง จุดหลอมเหลวที่ 206-207 °C มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{18}H_{16}O_5$ โดยพบ m/z ที่ 312.09995 $[M]^+$ ข้อมูล UV, IR และ NMR คล้ายกับสาร 1,3,5-trihydroxyxanthone (**G8**) ยกเว้น หน่วย isoprene ที่เพิ่มขึ้น ที่ δ_H 5.51 (1H, *t*, $J = 6.6$ Hz, H-12), 4.72 (2H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-11), 1.80 (3H, *s*, H-15), 1.79 (3H, *s*, H-14) ซึ่ง isoprene หน่วยนี้เชื่อมกับโครงสร้างหลักของแซนโทนที่ตำแหน่ง C-3 (δ_C 167.2) อาศัยข้อมูล HMBC ยืนยัน โดยที่แสดงความสัมพันธ์ของเมทิลีนโปรตอน H-11 (δ_H 4.72) กับ C-3, C-12 (δ_C 120.0) และ C-13 (δ_C 139.2) ดังนั้นสาร **G20** จึงให้ชื่อเป็น mckeanianone D หรือ 1,5-dihydroxy-3-O-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone



Mckeanianone D (**G20**): Yellow solid; mp 206-207 °C; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 252 (4.20), 312 (3.85), 369 (3.18) nm; IR (neat) ν_{max} 3385, 1653, 1569, 1456 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) and ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6) spectral data see ตาราง 4; HRMS (EI): m/z 312.09995 $[M]^+$ (calcd for 312.09977, $C_{18}H_{16}O_5$)

สาร G27

ลักษณะทางกายภาพเป็นของแข็งสีเหลือง สลายตัวที่อุณหภูมิมากกว่า 129 °C จากข้อมูลแมสสเปกตรัมพบสัญญาณของ $[M+H]^+$ ที่ m/z 343.1179 และสูตรโมเลกุลเป็น $C_{19}H_{18}O_6$ ข้อมูลของ UV, IR และ NMR คล้ายกับสาร 1,3,6-trihydroxy-7-methoxyxanthone (**G23**) แต่มีที่แตกต่างกันตรงที่มีการเพิ่มขึ้นของหน่วย isoprene ที่ δ_H 5.30 (1H, *t*, $J = 7.2$ Hz, H-12), 3.37 (2H, *d*, $J = 7.2$ Hz, H-11), 1.80 (3H, *s*, H-15), 1.66 (3H, *s*, H-14) จากข้อมูล HMBC พบว่า หน่วย isoprene ที่เพิ่มขึ้นจะเชื่อมอยู่กับโครงสร้างหลักของแซนโทนที่ตำแหน่ง C-2 (δ_H 110.4) โดยข้อมูล HMBC เมทิลีนโปรตอน H-11 (δ_H 3.37) แสดงความสัมพันธ์กับ C-1 (δ_C 161.2), C-2, C-12 (δ_C 123.4) และ C-13 (δ_C 131.5) ซึ่งยืนยันโครงสร้างของสาร mckeanianone E เป็น 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone ซึ่งสารนี้ได้มีการรายงานในการสังเคราะห์มาก่อนแต่ไม่มีรายงานข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี



Mckeanianone E (**G27**): Yellow solid; mp decomposed >129 °C; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 258 (4.41), 320 (4.18), 366 (3.98) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3269, 1647, 1559, 1482 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6) and ^{13}C NMR (125 MHz, acetone- d_6) spectral data see ตาราง 4; HRESI-TOFMS: m/z 343.1179 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for 343.1182, $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_6$).

ตาราง 4 NMR spectroscopic data of mckeanianones D (**G20**) and E (**G27**)

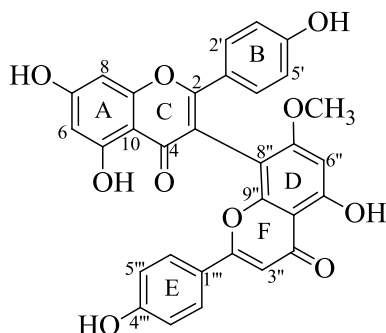
Position	G20			G27		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)	HMBC	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}^a (type)	HMBC ^a
1		164.4 (C)			161.2 (C)	
2	6.35, d (2.2), 1H	98.4 (CH)	1, 3, 4, 9a		110.4 (C)	
3		167.2 (C)			163.2 (C)	
4	6.57, d (2.2), 1H	94.1 (CH)	2, 3, 4a, 9, 9a	6.49, s, 1H	93.9 (CH)	2, 3, 4a, 9, 9a
4a		158.5 (C)			156.6 (C)	
5		147.0 (C)		6.92, s, 1H	103.5 (CH)	7, 8a, 9, 10a
6	7.36, dd (7.9, 1.5), 1H	121.5 (CH)	8, 10a		155.0 (C)	
7	7.29, t (7.9), 1H	125.0 (CH)	5, 8a		146.6 (C)	
8	7.67, dd (7.9, 1.5), 1H	116.3 (CH)	6, 9, 10a	7.56, s, 1H	105.7 (CH)	6, 7, 9
8a		122.5 (C)			113.1 (C)	
9		182.0 (C)			180.5 (C)	
9a		104.2 (C)			103.2 (C)	
10a		146.1 (C)			153.3 (C)	
11	4.72, d (6.6), 2H	66.4 (CH_2)	3, 12, 13	3.37, d (7.2), 2H	22.0 (CH_2)	1, 2, 12, 13
12	5.51, t (6.6), 1H	120.0 (CH)	14, 15	5.30, t (7.2), 1H	123.4 (CH)	14, 15
13		139.2 (C)			131.5 (C)	
14	1.79, s, 3H	25.8 (CH_3)	12, 13, 15	1.66, s, 3H	25.9 (CH_3)	12, 13, 15
15	1.80, s, 3H	18.3 (CH_3)	12, 13, 14	1.80, s, 3H	17.9 (CH_3)	12, 13, 14
OH-1	12.91, brs, 1H			13.45, brs, 1H		
OMe-7				3.99, s, 3H	56.6 (CH_3)	7

^a Recorded at 500 MHz

สาร **G18**

มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง จุดหลอมเหลวที่ 237-239 °C มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{31}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ ซึ่งแสดง m/z ที่ 553.1155 (calcd. 553.1135) $[\text{M}+\text{H}]^+$ UV สเปกตรัมแสดงค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดอยู่ที่ 218, 269 และ 331 nm ในขณะที่ IR สเปกตรัมแสดงแถบการสั่นของหมู่ hydroxyl และ คอนจูเกตคาร์บอนิลที่เลขคลื่น 3444 และ 1650 cm^{-1} ตามลำดับ จากสเปกตรัมของ ^1H NMR แสดง สองสัญญาณของคีเลตไฮดรอกซิลที่ δ_{H} 13.09 และ 12.97 (1H, br s) 2 ชุดสัญญาณของ 4 อะโรมาติกโปรตอน ของ สองวง *p*-substituted aromatic ที่ δ_{H} 7.49

(2H, d , $J = 8.4$ Hz, H-2', H-6'), 6.76 (2H, d , $J = 8.4$ Hz, H-3', H-5'); และ 7.74 (2H, d , $J = 8.4$ Hz, H-2''', H-6'''), 6.97 (2H, d , $J = 8.4$ Hz, H-3''', H-5''') ซึ่งเป็นของวงอะโรมาติก B และ E ตามลำดับ พบ 4 สัญญาณของ Singlet อะโรมาติกโปรตอน ที่ δ_H 6.63, 6.57, 6.33 และ 6.33 แต่ละ 1H คือตำแหน่งที่ H-8, H-3'', H-6 และ H-6'' ตามลำดับ และหมู่เมทอกซีที่ δ_H 3.82 (3H, s) จากสเปกตรัมของ ^{13}C NMR และ DEPT135 พบ 27 สัญญาณของ 31 คาร์บอน แบ่งเป็น 18 ควอเตอร์นารีคาร์บอน (δ_C 183.3, 182.1, 165.2, 165.1, 164.7, 163.6, 163.5, 163.1, 163.0, 160.8, 158.9, 156.4, 124.8, 124.2, 111.2, 105.6, 104.7 และ 100.5) 12 เมทไน์คาร์บอน (δ_C 130.9 (2C), 128.8 (2C), 116.1 (2C), 115.4 (2C), 104.5, 99.9, 99.8 และ 94.7) และ หนึ่งเมทิลคาร์บอน (δ_C 55.9) จากข้อมูล 2D NMR พบว่า คีเลตไฮดรอกซิลที่ δ_H 12.97 แสดงความสัมพันธ์ HMBC กับ C-5 (δ_C 163.1), C-6 (δ_C 99.8) และ C-10 (δ_C 104.7) อะโรมาติกโปรตอนที่ δ_H 6.33 อยู่ที่ตำแหน่งที่ 6 โดยอาศัยข้อมูล HMQC และแสดงความสัมพันธ์กับ C-7 (δ_C 165.2) และ C-8 (δ_C 94.7) ซึ่งอะโรมาติกโปรตอน H-6 แสดงคู่ควบกับ H-8 (δ_H 6.57) ในสเปกตรัม COSY และโปรตอน H-8 แสดงความสัมพันธ์กับ C-4 (δ_C 182.1), C-6, C-7, C-9 (δ_C 158.9) และ C-10 ในสเปกตรัม HMBC นอกจากนี้ความสัมพันธ์ HMBC ของอะโรมาติกโปรตอน H-2' (δ_H 7.49 ของวง *p*-substituted aromatic) และ C-2 (δ_C 165.1) แสดงให้เห็นว่าวง *p*-substituted aromatic เชื่อมอยู่ที่ตำแหน่ง C-2 ของโครงสร้างหลัก ส่วนตำแหน่งที่ C-4' ของวง *p*-substituted aromatic ถูกแทนที่โดยหมู่ hydroxyl เนื่องจากค่าเคมีคัลชิฟท์ที่ปรากฏที่สนามต่ำ จากข้อมูลก่อนหน้านี้รวมทั้งค่าเคมีคัลชิฟท์ของ C-3 (δ_C 111.2), C-5 และ C-7 ทำให้ได้ส่วนของ 3-substituted-5,7-dihydroxy-(4-hydroxyphenyl) flavone ในส่วนของฟลาโวนอีกหน่วย พบว่า คีเลตไฮดรอกซิลที่ δ_H 13.09 เชื่อมอยู่ที่ตำแหน่ง C-5'' (δ_C 163.0) จากความสัมพันธ์ HMBC กับ C-5'', C-6'' (δ_C 99.9) และ C-10'' (δ_C 105.6) โอลิฟีนิกโปรตอนที่ δ_H 6.63 (H-3'') แสดงสัญญาณ cross peak กับ C-2'' (δ_C 164.7), C-4'' (δ_C 183.3), C-10'' และ C-1''' (δ_C 124.2) ของวง *p*-substituted aromatic นอกเหนือจากนี้ที่ C-4''' ของวงนี้ยังถูกแทนที่ด้วยหมู่ hydroxyl จากค่าเคมีคัลชิฟท์ของคาร์บอนที่สนามต่ำ (δ_C 163.6) สำหรับอะโรมาติกโปรตอนที่ δ_H 6.33 อยู่บน C-6'' จากข้อมูล HMQC และมีความสัมพันธ์ในสเปกตรัม HMBC กับ C-3, C-4'', C-5'', C-7'' (δ_C 163.5), C-8'' (δ_C 100.5) และ C-10'' จากความสัมพันธ์ HMBC ของ H-6'' กับ C-3 แสดงให้เห็นว่าฟลาโวนสองหน่วย เชื่อมต่อกันที่ตำแหน่ง C-3 และ C-8'' โดยสอดคล้องกับข้อมูลสเปกโตรสโกปีของสารที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ biapigenin และ 4'''-O-methyl-biapigenin ซึ่งมีข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR คล้ายคลึงกัน ยกเว้นหมู่เมทอกซีที่เพิ่มขึ้นมา ดังนั้นสาร **G18** มีชื่อว่า mckeaniabiflavone หรือ 7''-methoxy-4',4''',5,5'',7-pentahydroxy-[3→8'']-biflavone



Mckeaniabiiflavone (**G18**): Yellow solid; mp 237-239 °C; UV (CH₃OH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 218 (4.57), 269 (4.51), 331 (4.30); IR (neat) $\nu_{\max}$: 3444, 1650, 1608, 1508, 1178 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) and ¹³C NMR (100 MHz, Acetone-*d*₆) spectral data see ตาราง 5; HRESI-TOFMS *m/z* found 553.1155 [M+H]⁺ (calcd for 553.1135, C₃₁H₂₁O₁₀).

ตาราง 5 NMR (400 MHz) Data of **G18** in Acetone-*d*₆

Position	δ_{C} , type	δ_{H} , (mult., <i>J</i> in Hz)	HMBC (¹ H→ ¹³ C)
2	165.1 C		
3	111.2 C		
4	182.1 C		
5	163.1 C		
6	99.8 CH	6.33 (<i>br s</i>)	7, 8
7	165.2 C		
8	94.7 CH	6.57 (<i>br s</i>)	4, 6, 7, 9, 10
9	158.9 C		
10	104.7 C		
1'	124.8 C		
2'	130.9 CH	7.49 (<i>d</i> , 8.4)	2, 3', 4'
3'	116.1 CH	6.76 (<i>d</i> , 8.4)	2, 1', 2', 4'
4'	160.8 C		
5'	116.1 CH	6.76 (<i>d</i> , 8.4)	2, 1', 2', 4'
6'	130.9 CH	7.49 (<i>d</i> , 8.4)	2, 3', 4'
2''	164.7 C		
3''	104.5 CH	6.63 (<i>s</i>)	2'', 4'', 10'', 1'''
4''	183.3 C		
5''	163.0 C		
6''	99.9 CH	6.33 (<i>br s</i>)	3, 4'', 5'', 7'', 8'', 10''
7''	163.5 C		
8''	100.5 C		

9''	156.4	C		
10''	105.6	C		
1'''	124.2	C		
2'''	128.8	CH	7.74 (d, 8.4)	3''', 4'''
3'''	115.4	CH	6.97 (d, 8.4)	1''', 4'''
4'''	163.6	C		
5'''	115.4	CH	6.97 (d, 8.4)	1''', 4'''
6'''	128.8	CH	7.74 (d, 8.4)	4''', 5'''
7''-OCH ₃	55.9	CH ₃	3.82 (s)	7''
5-OH			12.97 (br s)	5, 6, 10
5''-OH			13.09 (br s)	5'', 6'', 10''

จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (Antimalaria, *P. falciparum*), ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก 4 สายพันธุ์; *Bacillus cereus* TISTR 688, *B. subtilis* TISTR 008, *Micrococcus luteus* TISTR 884 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 และแบคทีเรียแกรมลบ 4 สายพันธุ์; *Escherichia coli* TISTR 780, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Salmonella typhimurium* TISTR 292 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 พีซีทั้ง 3 ชนิด ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ซึ่งสารบริสุทธิ์ทั้งหมดแสดงฤทธิ์ MIC > 100 µg/mL ยกเว้น สาร **D7** แสดงฤทธิ์ดีที่สุดในการต้านแบคทีเรีย *B. subtilis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่ค่า MIC 32 µg/mL ในขณะที่ ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ได้ผลการทดสอบเป็นดังตาราง 6-8.

ตาราง 6 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ จากใบของต้นบุหร่ง

ดอย (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)

Compounds	Cytotoxic activities		Antimalarial activity against <i>P. falciparum</i> (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	
	KB	Vero cells	TM4	K1
D1	- ^a	- ^a	11.7±5.07	12.8±8.10
D2	- ^a	- ^a	- ^a	16.1±0.15
D4	- ^b	- ^b	18.2±8.93	27.2±8.09
D6	- ^a	7.99±2.84	2.04±0.20	1.84±0.48
D7	- ^b	44.0±6.70	33.2±7.41	27.9±7.38
D14	- ^a	- ^a	1.82 ± 0.66	3.12 ± 0.38
Doxorubicin ^c	0.56			
Ellipticine ^c		0.093		
Chloroquine ^d			0.0096	0.089±0.012
Cycloguanil ^d			0.0095±0.003	0.81±0.19
Pyrimethamine ^d			0.019±0.003	7.7±2.1

^aInactive > 20 $\mu\text{g/mL}$. ^bInactive > 50 $\mu\text{g/mL}$. ^cPositive control for cytotoxic assay. ^dReference drugs for antiplasmodial activity. Compounds **D3**, **D5** and **D8-D13** were inactive to all assays.

ตาราง 7 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ จากใบและกิ่งของต้น

ระฆังเขี้ยว (IC₅₀, $\mu\text{g/mL}$)

Compounds	Cytotoxic activity		Antimalarial activity against <i>P. falciparum</i>	
	KB	Vero cells	TM4	K1
M1	- ^a	- ^a	6.86 ± 1.19	9.33 ± 3.40
M2	- ^a	- ^a	9.44 ± 0.45	3.97 ± 1.52
M3	- ^a	- ^a	14.7 ± 0.36	11.5 ± 3.54
M4	- ^a	- ^a	13.6 ± 1.64	9.32 ± 4.98
M5	- ^a	- ^a	- ^a	10.8 ± 1.16
M8	- ^a	- ^a	11.3 ± 6.54	10.0 ± 4.22
M9	3.10 ± 0.03	4.11 ± 0.15	3.39 ± 0.62	2.77 ± 0.29
M11	- ^a	- ^a	14.8 ± 2.45	4.65 ± 1.38
M12	- ^a	- ^a	- ^a	17.2 ± 1.84
M13	- ^b	- ^b	- ^b	7.12 ± 0.62
Doxorubicin ^c	0.56			
Ellipticine ^c		0.093		
Chloroquine ^d			0.0096	0.089 ± 0.012
Cycloguanil ^d			0.0095 ± 0.003	0.81 ± 0.19
Pyrimethamine ^d			0.019 ± 0.003	7.7 ± 2.1

^aInactive > 20 $\mu\text{g/mL}$. ^bInactive > 10 $\mu\text{g/mL}$. ^cPositive control for cytotoxic assay.

^dReference drugs for antiplasmodial activity. Compounds **M6**, **M7**, **M10** and **M14** were inactive to all assays.

ตาราง 8 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ จากเปลือกลำต้น ใบ และกิ่งใหญ่ของต้นมะเดะ (IC_{50} , μM)

Compounds	Cytotoxicity		Antimalarial activity against <i>P. falciparum</i>	
	KB	Vero cells	TM4	K1
G4	- ^a	36.5±8.0	13.7±4.5	19.8±2.0
G5	- ^a	31.3±2.6	39.1±6.3	32.7±5.99
G6	- ^b	- ^b	14.9±2.0	14.9±3.3
G7	- ^b	22.9±1.0	10.4±1.9	11.5±2.0
G12	2.3	5.1	6.2±0.4	5.2±0.4
G13	7.6	6.9	8.5±1.2	3.6±1.7
G14	26.9±3.6	12.6±0.9	6.7±0.6	6.4±0.5
G15	17.5	13.2±4.6	8.3±0.9	7.3±1.2
G17	- ^b	29.5±3.9	6.0±1.1	6.6±0.7
G20	- ^a	- ^a	15.1.0±3.9	14.3±1.8
G21	- ^a	- ^b	22.1±0.7	19.5±1.0
G26	- ^a	25.3±1.4	10.8±0.7	15.4±2.6
G27	- ^a	- ^a	27.7±3.4	25.7±2.3
Chloroquine ^c			0.03	0.3±0.04
Cycloguanil ^c			0.04±0.01	3.2±0.8
Pyrimethamine ^c			0.08±0.01	31.0±8.4
Doxorubicin ^d	1.0	-		
Ellipticine ^d	-	0.4		

* Concentration in $\mu g/mL$. ^a Inactive >50 $\mu g/mL$. ^b Inactive >20 μM . ^c Standard compound for antimalarial activity. ^d Standard compound for cytotoxicity. Compounds **G1-G3**, **G8-G11**, **G16**, **G18-G19** and **G22-G25** were inactive to all assays.

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากต้นบุหร่งดอยส่วนใบ แยกสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้ว 14 สาร (**D1-D14**) ส่วนใบและกิ่งของต้นระฆังเขี้ยว สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมี 14 สารเช่นกัน โดยพบสารใหม่ 5 สาร คือ miliusacunines A-E (**M1-M5**) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วอีก 9 สาร (**M6-M14**) ในขณะที่ต้นมะเดะ ส่วนเปลือกต้น ใบ และกิ่งใหญ่ พบองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จำนวน 27 สาร แบ่งเป็นสารใหม่ 6 สาร คือ mckeanianones A-E (**G12**, **G14**, **G17**, **G20** และ **G27**) และ mckeaniabiflavone (**G18**) และ

สารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้ว 21 สาร (**G1-G11**, **G13**, **G15-G16**, **G19** และ **G21-G26**) ต้น
 บูหรงดอย สาร **D14** แสดงฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ชนิด TM4 ดีที่สุดที่ค่า $1.82 \pm 0.66 \mu\text{g/mL}$ และไม่
 เป็นพิษกับเซลล์ปกติ ขณะที่สาร **D1-D2**, **D4** และ **D6-D7** แสดงฤทธิ์ในการต้านมาลาเรีย ในช่วง
 IC_{50} 2.04 - 33.2 และ $1.84 - 27.9 \mu\text{g/mL}$ ต่อเชื้อ TM4 และ K1 ตามลำดับ ตันระฆังเขียว สาร
M9 แสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ $3.10 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$
 และแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียทั้งสองดีที่สุด ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 3.39 ± 0.62 และ 2.77 ± 0.29
 $\mu\text{g/mL}$ ต่อชนิด TM4 และ K1 ตามลำดับ แต่ยังไม่แสดงฤทธิ์ต่อเซลล์ปกติที่ IC_{50} เท่ากับ of
 $4.11 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$ ขณะที่ **M1-M5**, **M8**, และ **M11-M13** แสดงฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียน้อยกว่า
M9 โดยมีค่า IC_{50} ในช่วง 6.86 - 14.8 และ 3.97 - 17.2 $\mu\text{g/mL}$ ต่อชนิด TM4 และ K1
 ตามลำดับ แต่ทั้งหมดไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ โดยสาร **M1** ต้านมาลาเรียชนิด TM4 ดีที่สุดด้วย
 ค่า IC_{50} เท่ากับ $6.86 \pm 1.19 \mu\text{g/mL}$ สำหรับต้านมาลาเรียชนิด K1 สาร **M2** แสดงค่า IC_{50}
 เท่ากับ $3.97 \pm 1.52 \mu\text{g/mL}$ ตันมะตะ สาร **G12-G15** แสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก
 และเซลล์ปกติ ด้วยค่า IC_{50} ในช่วง 2.3 - 26.9 ± 3.6 และ 5.1 - $13.2 \pm 4.6 \mu\text{M}$ ตามลำดับ สาร
G4 แสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งช่องปากเช่นกันแต่ต้านเซลล์ปกติได้ด้วย ส่วนฤทธิ์
 มาลาเรีย สาร **G12-G15** และ **G17** แสดงฤทธิ์ที่ดีในการต้านมาลาเรีย ด้วยค่า IC_{50} ในช่วง
 $6.0 \pm 1.1 - 8.5 \pm 1.2$ และ $3.6 \pm 1.7 - 7.3 \pm 1.2 \mu\text{M}$ ต่อชนิด TM4 และ K1 ตามลำดับ โดยสาร
G17 ต้านมาลาเรียชนิด TM4 ดีที่สุดด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ $6.0 \pm 1.1 \mu\text{M}$ สำหรับต้านมาลาเรียชนิด
 K1 สาร **G13** แสดงค่า IC_{50} ดีที่สุดเท่ากับ $3.6 \pm 1.7 \mu\text{M}$ ในขณะที่สารแซนโทนจากพืชนี้แสดง
 ฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียเป็นส่วนใหญ่

กิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

ไม่มี

ปัญหาและอุปสรรค

ไม่มี

ความเห็นและข้อเสนอแนะ

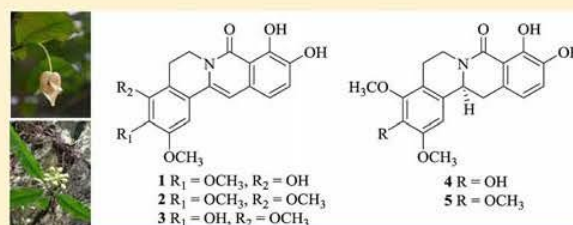
ไม่มี

ภาคผนวก
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Antimalarial Oxoprotoberberine Alkaloids from the Leaves of *Miliusa cuneata*Thanika Promchai,[†] Atchara Jaidee,[†] Sarot Cheenpracha,[‡] Kongkiat Trisuwan,[†] Roonglawan Rattanajak,[§] Sumalee Kamchonwongpaisan,[§] Surat Laphookhieo,[‡] Stephen G. Pyne,^{||} and Thunwadee Ritthiwigrom^{*,†}[†]Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Sutep, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand[‡]School of Science, University of Phayao, Maeka, Muang, Phayao 56000, Thailand[§]Medical Molecular Biology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Thailand Science Park, Pathumthani 12120, Thailand[‡]Natural Products Research Laboratory, School of Science, Mae Fah Luang University, Tasud, Muang, Chiang Rai 57100, Thailand^{||}School of Chemistry, University of Wollongong, Wollongong, New South Wales 2522, Australia

S Supporting Information

ABSTRACT: Five new oxoprotoberberine alkaloids, miliusacunines A–E (1–5), along with nine known compounds, 6–14, were isolated from an acetone extract of the leaves and twigs of *Miliusa cuneata*. Their structures were elucidated by spectroscopic analysis. All isolated compounds were evaluated for their cytotoxicities against the KB and Vero cell lines and for antimalarial activities against the *Plasmodium falciparum* strains TM4 and K1 (a sensitive and a multi-drug-resistant strain, respectively). Compound 1 showed in vitro antimalarial activity against the TM4 strain, with an IC₅₀ value of 19.3 ± 3.4 μM, and compound 2 demonstrated significant activity against the K1 strain, with an IC₅₀ value of 10.8 ± 4.1 μM. Both compounds showed no discernible cytotoxicity to the Vero cell line at the concentration levels evaluated.



The plant genus *Miliusa* (Annonaceae) comprises about 50 species and is distributed from the Indian subcontinent to Indochina, the Malaysia Peninsula, and the Southeast Asian islands, to New Guinea and northern Australia.¹ Some species have been utilized in traditional medicine, and, for example, *M. velutina* has been used as a tonic and aphrodisiac² and *M. balansae* for gastropathy and glomerulonephropathy.³ The plants from this genus are reported to contain secondary metabolites inclusive of alkaloids,^{4–6} acetogenins,⁷ homogenetic acid derivatives,^{8–10} flavonoids,^{5,8–13} dihydrochalcones,^{5,8} neolignans and lignans,^{14,15} and terpenoids.⁵ Several of these chemical constituents exhibited antibacterial,⁷ cytotoxic,^{5,7,12–15} and antihyperpetic^{14,15} activities.

Miliusa cuneata Craib is known locally in Thailand as “Ra-Khang-Khieo”. Recently, two new isoquinoline alkaloids and 13 known alkaloids were isolated from the stems and leaves of *M. cuneata*.⁴ Herein are reported the isolation and structure elucidation of five new oxoprotoberberines, miliusacunines A–E (1–5), together with nine known compounds (6–14), from an acetone extract of the leaves and twigs of *M. cuneata* as well as an evaluation of their in vitro biological activities against the *Plasmodium falciparum* strains TM4 and K1 and the human oral epidermal carcinoma (KB) cell line.

RESULTS AND DISCUSSION

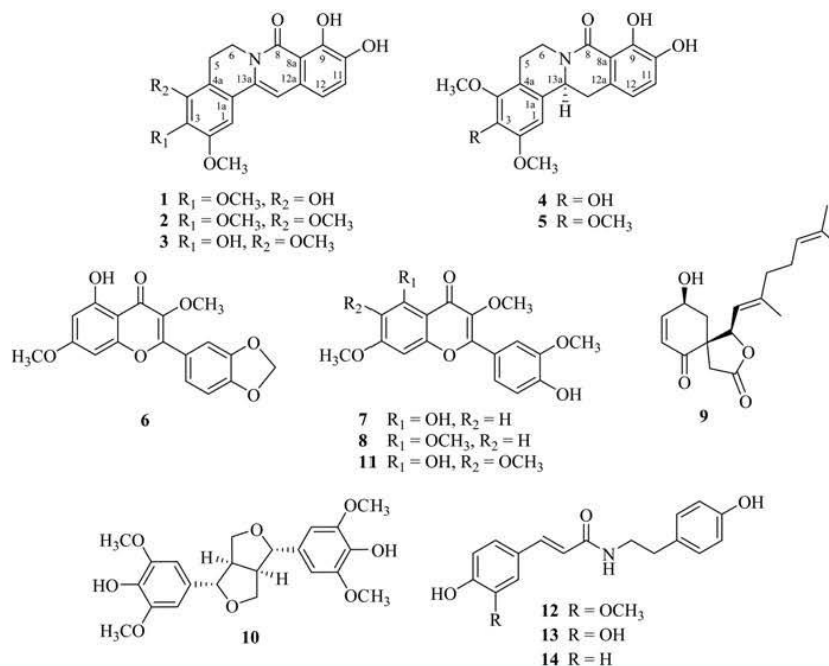
Column chromatographic separation of an acetone extract of the leaves of *M. cuneata* afforded five new alkaloids, miliusacunines A–E (1–5), along with five known compounds, namely, 5-hydroxy-3,7-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavone (6),¹⁶ pachypodol (7),^{12,17} 4'-hydroxy-3,5,7,3'-tetramethoxyflavone (8),¹⁸ (+)-miliusol (9),¹⁰ and (+)-syringaresinol (10).¹⁹ Also, an acetone extract of the twigs of *M. cuneata* was subjected to column chromatography over silica gel and Sephadex LH-20 to provide six known substances, compounds 6 and 7, chrysopenetin (11),¹⁷ *N*-trans-feruloyltyramine (12),²⁰ *N*-trans-cafeoyltyramine (13),²¹ and *N*-trans-coumaroyltyramine (14).^{20,22}

Compound 1 was isolated as a bright pink solid with mp 218–220 °C and demonstrated a molecular formula of C₁₉H₁₈NO₆ as assigned from the HRESIMS ion peak at *m/z* 356.1136 [M + H]⁺ (calcd 356.1134). The UV spectrum displayed maximal absorption bands at λ_{max} 224, 338, 371, and 389 nm, and the IR spectrum revealed the presence of one or more hydroxy groups (3419 cm^{−1}), a conjugated amide group (1649 cm^{−1}), and an aromatic (1584 and 1504 cm^{−1}) ring system, indicating the presence of an oxoprotoberberine nucleus.^{23,24} The ¹H NMR spectrum (Table 1) displayed

Received: November 27, 2015

Published: March 1, 2016

Chart 1

Table 1. ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) Data of Miliusacunines A and B (1 and 2) in Acetone- d_6 and Miliusacunine C (3) in CDCl_3

position	1				2				3			
	δ_{C}	type	δ_{H} (J in Hz)	HMBC ^a	δ_{C}	type	δ_{H} (J in Hz)	HMBC ^a	δ_{C}	type	δ_{H} (J in Hz)	HMBC ^a
1	100.7	CH	7.12, s	1a, 2, 3, 4a, 13a	105.3	CH	7.34, s	1a, 2, 3, 4a, 13a	103.0	CH	7.04, s	2, 3, 4a, 13a
1a	126.1	C			126.3	C			121.5	C		
2	152.9	C			154.0	C			147.2	C		
3	137.7	C			144.1	C			139.8	C		
4	147.5	C			151.1	C			143.8	C		
4a	116.2	C			122.5	C			122.1	C		
5	21.4	CH ₂	2.96, t (6.2)	1a, 4, 4a, 6	22.0	CH ₂	2.98, t (6.2)	1a, 4, 4a, 6	21.6	CH ₂	2.98, t (5.6)	1a, 4, 4a, 6
6	39.4	CH ₂	4.24, t (6.2)	4a, 5, 8, 13a	39.7	CH ₂	4.23, t (6.2)	4a, 5, 8, 13a	39.0	CH ₂	4.25, t (5.6)	4a, 5, 8, 13a
8	165.8	C			166.1 ^b	C			165.0	C		
8a	111.6	C			111.9	C			109.9	C		
9	148.1	C			148.3 ^b	C			146.8	C		
10	143.2	C			143.4	C			141.8	C		
11	123.1	CH	7.25, d (8.4)	9, 10, 12a	122.5	CH	7.26, d (8.4)	9, 10, 12a	121.6	CH	7.28, d (8.2)	9, 10, 12a
12	116.7	CH	7.02, d (8.4)	8a, 10, 11, 12a, 13	117.0	CH	7.03, d (8.4)	8a, 10, 11, 13	116.0	CH	6.97, d (8.2)	8a, 10, 13
12a	130.6	C			130.8	C			130.2	C		
13	104.9	CH	7.24, s	1a, 8a, 12, 12a, 13a	105.2	CH	7.25, s	1a, 8a, 12, 13a	103.8	CH	6.86, s	1a, 8a, 11, 13a
13a	135.0	C			134.7	C			134.7	C		
OCH ₃ (2)	56.2	CH ₃	3.95, s	2	56.6	CH ₃	3.95, s	2	56.7	CH ₃	4.00, s	2
OCH ₃ (3)	60.8	CH ₃	3.84, s	3	61.3	CH ₃	3.88, s	3				
OCH ₃ (4)					61.1	CH ₃	3.89, s	4	61.0	CH ₃	3.91, s	4
OH (9)			13.17, br s				13.15, br s					

^aHMBC correlations are from proton(s) stated to the indicated carbon. ^bObserved from the HMBC spectrum.

resonances for a chelated hydroxy group (δ_{H} 13.17, 1H, br s), two *ortho*-coupled aromatic protons [δ_{H} 7.25 (1H, d, $J = 8.4$

Hz) and 7.02 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)], a singlet aromatic proton (δ_{H} 7.12), a singlet olefinic proton (δ_{H} 7.24), a set of coupled

Table 2. ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) Data of Miliusacunines D and E (4 and 5) in CDCl_3

position	4				5			
	δ_{C}	type	δ_{H} (J in Hz)	HMBC ^a	δ_{C}	type	δ_{H} (J in Hz)	HMBC ^a
1	103.8	CH	6.52, s	1a, 2, 3, 4a, 13a	104.9	CH	6.53, s	1a, 2, 3, 4a, 13a
1a	126.7	C			131.1	C		
2	146.8	C			152.7	C		
3	137.3	C			140.9 ^c	C		
4	144.3	C			151.0	C		
4a	121.3	C			121.4	C		
5	23.0	CH_2	3.05, br d (15.7) 2.70, m	1a, 4, 4a, 6 1a, 4, 4a, 6	23.0	CH_2	3.03, br d (16.2) 2.70, m	1a, 4a, 6 1a, 4, 4a, 6
6	38.0	CH_2	4.88, br d (13.2) 2.86, br d (14.1)	4a, 5, 8, 13a 4a, 5, 13a	38.2	CH_2	4.87, br d (13.0) 2.85, br d (12.2)	4a, 5, 13a 4a, 5, 13a
8	168.5	C			168.6	C		
8a	111.2	C			111.3	C		
9	148.6	C			148.7	C		
10	143.9	C			144.1	C		
11	118.2	CH	6.99, d (8.0)	9, 10, 12a	118.4	CH	6.99, d (7.7)	9, 10, 12a
12	116.8	CH	6.61, d (8.0)	8a, 10, 11, 13	116.9	CH	6.61, d (7.7)	8a, 10, 11, 13
12a	128.2	C			128.2	C		
13	37.1	CH_2	3.14, br d (15.3) ^b 2.89, br t (15.3) ^b 4.83, br d (13.2) ^b	1a, 8a, 12, 12a, 13a 1a, 8a, 11, 12, 12a, 13a	37.1	CH_2	3.15, br d (15.2) ^b 2.91, br t (15.2) ^b 4.82, br d (13.5) ^b	8a, 12, 12a, 13a 1a, 8a, 11, 12, 12a, 13a 1, 1a, 4a, 13
13a	55.7	CH			55.9	CH		
OCH_3 (2)	56.4	CH_3	3.92, s	2	56.4	CH_3	3.92, s	2
OCH_3 (3)					61.0	CH_3	3.89, s	3
OCH_3 (4)	60.6	CH_3	3.89, s	4	61.1	CH_3	3.89, s	4
OH (9)			12.75, br s				12.74, br s	
OH (10)			5.59, br s					

^aHMBC correlations are from proton(s) stated to the indicated carbon. ^bSignal partially obscured. ^cObserved from the HMBC spectrum.

methylene protons [δ_{H} 4.24 (2H, t, $J = 6.2$ Hz) and 2.96 (2H, t, $J = 6.2$ Hz)], and two methoxy groups at δ_{H} 3.95 and 3.84 (each, 3H, s). Compound 1 showed resonances for an amide carbonyl (δ_{C} 165.8), 10 quaternary carbons (δ_{C} 152.9, 148.1, 147.5, 143.2, 137.7, 135.0, 130.6, 126.1, 116.2, and 111.6), four methines (δ_{C} 123.1, 116.7, 104.9, and 100.7), two methylenes (δ_{C} 39.4 and 21.4), and two methoxy groups (δ_{C} 60.8 and 56.2) in the ^{13}C NMR and DEPT spectra (Table 1). The chelated hydroxy proton at δ_{H} 13.17 was located at C-9 (δ_{C} 148.1) due to being hydrogen bonded to the amide carbonyl carbon at C-8 (δ_{C} 165.8). Two *ortho*-coupled aromatic protons at δ_{H} 7.25 and 7.02 were assigned to H-11/ δ_{C} 123.1 and H-12/ δ_{C} 116.7, respectively, on the basis of the correlations of H-11 with C-9, C-10 (δ_{C} 143.2), and C-12a (δ_{C} 130.6) and H-12 with C-8a (δ_{C} 111.6), C-10, and C-13 (δ_{C} 104.9) in the HMBC spectrum. The olefinic proton resonating at δ_{H} 7.24 was assigned as H-13 based on HMQC and HMBC correlations. These data together with the carbon chemical shifts of C-9 and C-10 confirmed the presence of the hydroxy groups at C-9 and C-10. The low-field methylene protons at δ_{H} 4.24 were assigned to H-6 due to the inductive effect of the N atom of the amide group and HMBC correlations with C-4a (δ_{C} 116.2), C-5 (δ_{C} 21.4), C-8 (δ_{C} 165.8), and C-13a (δ_{C} 135.0). The remaining coupled methylene protons at δ_{H} 2.96 were attributed to H-5. The substituent at C-4 was identified as a hydroxy group from its ^{13}C NMR chemical shift (δ_{C} 147.5) and the HMBC correlation between H-5 and C-4. The two methoxy groups (δ_{H} 3.95 and 3.84) were located at C-2 (δ_{C} 152.9) and C-3 (δ_{C} 137.7), respectively, on the basis of HMBC correlations and their ^{13}C NMR chemical shifts. The resonance for C-3 appeared at a high field (δ_{C} 137.7) due to the occurrence of two *ortho* oxygen

substituents. The singlet aromatic proton resonance at δ_{H} 7.12 was assigned to H-1, on the basis of the HMBC correlations with C-2, C-3, and C-13a. Consequently, compound 1 (miliusacunine A) was elucidated as 8-oxo-4,9,10-trihydroxy-2,3-dimethoxy-5,6-dihydroberberine.

Compound 2 was obtained as a yellow solid (mp 217–218 °C), which showed a $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ion at m/z 392.1112 in the HRESIMS, consistent with a molecular formula of $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{Na}$ (calcd 392.1110). The spectroscopic data of compound 2 were similar to those of 1, except that compound 2 displayed an additional methoxy group resonance at δ_{H} 3.89. This methoxy group was located at C-4 (δ_{C} 151.1) based on the HMBC correlation with C-4. This assignment was further supported from the HMBC correlation between the methylene protons H-5 [δ_{H} 2.98 (t, $J = 6.2$ Hz)] and C-4. Therefore, compound 2 (miliusacunine B) was characterized as the 4-*O*-methyl ether of compound 1.

Compound 3 was obtained as a brownish-red gum, and its UV and IR data were similar to those of compound 1. Its ^1H NMR and ^{13}C NMR data indicated one of the methoxy groups in 3 to be located at a different position from that found in 1. The methoxy group resonance at δ_{H} 3.91 showed a HMBC correlation to C-4 (δ_{C} 143.8), while a HMBC correlation between the methylene protons H-5 [δ_{H} 2.98 (t, $J = 5.6$ Hz)] and C-4 was also observed. This indicated that the methoxy group is located at C-4. The other methoxy group (δ_{H} 4.00) was located at C-2 (δ_{C} 147.2), according to its HMBC correlation with C-2. The substituent at C-3 was assigned as a hydroxy group by the relative high field ^{13}C NMR chemical shift of C-3 at δ_{C} 139.8 due to its two *ortho* oxygen substituents. The locations of the methoxy and hydroxy groups attached at

Table 3. Cytotoxic and Antimalarial Activities of Compounds 1–14 (IC₅₀, μ M)

compound	cytotoxic activity		antimalarial activity against <i>P. falciparum</i>	
	KB	Vero cells	TM4	K1
1	α	α	19.3 ± 3.4	26.3 ± 9.6
2	α	α	25.6 ± 1.2	10.8 ± 4.1
3	α	α	41.4 ± 1.0	32.4 ± 10.0
4	α	α	38.1 ± 4.6	26.1 ± 13.9
5	α	α	α	29.1 ± 3.1
6	α	α	α	α
7	α	α	α	α
8	α	α	31.5 ± 18.3	27.9 ± 11.8
9	10.2 ± 0.1	13.5 ± 0.5	11.1 ± 2.0	9.1 ± 1.0
10	α	α	α	α
11	α	α	39.5 ± 6.5	12.4 ± 3.7
12	α	α	α	54.9 ± 5.9
13	α	α	α	23.8 ± 2.1
14	α	α	α	α
doxorubicin ^b	1.0			
ellipticine ^b		0.4		
chloroquine ^c			0.03	0.3 ± 0.04
cycloguanil ^c			0.04 ± 0.01	3.2 ± 0.8
pyrimethamine ^c			0.08 ± 0.01	31.0 ± 8.4

^aInactive at IC₅₀ > 47.8 μ M. ^bPositive control for cytotoxic assay. ^cReference drugs for antiparasmodal assays.

C-2 and C-3, respectively, were also confirmed by the HMBC correlations between the aromatic proton H-1 (δ_{H} 7.04/ δ_{C} 103.0) and C-2 and C-3. Thus, the structure of 3 (miliusacumine C) was assigned as 8-oxo-3,9,10-trihydroxy-2,4-dimethoxy-5,6-dihydroberberine.

Compound 4 was obtained as a brownish-yellow gum and gave a specific rotation of $[\alpha]_{\text{D}}^{28} -175$ (c 0.07, MeOH). The ¹H NMR spectroscopic data of 4 were similar to those of 3. The main differences found were the additional methine ¹H NMR signal [δ_{H} 4.83 (1H, br d, J = 13.2 Hz)], which was coupled to two diastereotopic methylene protons [δ_{H} 3.14 (1H, br d, J = 15.3 Hz) and 2.89 (1H, br t, J = 15.3 Hz)] for compound 4. This methylene group was situated at C-13 (δ_{C} 37.1) by the observation of its HMQC cross-peak and the HMBC correlations of H-13 to C-1a (δ_{C} 126.7), C-8a (δ_{C} 111.2), C-12 (δ_{C} 116.8), C-12a (δ_{C} 128.2), and C-13a (δ_{C} 55.7) and between the aromatic proton H-12 [δ_{H} 6.61 (d, J = 8.0 Hz)] and C-13. The methine proton (δ_{H} 4.83) was located at C-13a (δ_{C} 55.7) from the correlation between the singlet aromatic proton at δ_{H} 6.52 (H-1) and C-13a in the HMBC spectrum. Therefore, the structure of 4 (miliusacumine D) was analyzed as (–)-(S)-8-oxo-3,9,10-trihydroxy-2,4-dimethoxy-5,6,13,13a-tetrahydroberberine. Its configuration was assigned based on the sign of its specific rotation when compared to that of the related compound (S)-(-)-2,3-dimethoxy-8-oxoberberine, $[\alpha]_{\text{D}} -413.8$ (c 0.36, CHCl₃),²⁵ for which the structure was assigned using X-ray crystallography.

Compound 5 was obtained as a yellow gum with a specific rotation of $[\alpha]_{\text{D}}^{28} -93$ (c 0.02, MeOH). Comparison of its NMR data with those of 4 showed the presence of an additional resonance for a methoxy group (δ_{H} 3.89) in 5, which was located at C-3 on the basis of its HMBC correlation with C-3 (δ_{C} 140.9). The aromatic proton H-1 (δ_{H} 6.53) correlated to C-3 in the HMBC spectrum, further supporting the location of the additional methoxy group. Thus, the structure of 5 (miliusacumine E) was assigned as the (–)-(S)-3-O-methyl ether of compound 4.

All of the isolated compounds were evaluated for their cytotoxic activities against the KB (human oral epidermoid cancer cell line) and a noncancerous cell line (African green monkey kidney cell line) as well as for antimalarial activity against the *P. falciparum* strains TM4 and K1 (multi-drug-resistant strains) (Table 3). Compound 9 exhibited cytotoxic activity against the KB cell line with an IC₅₀ value of 10.2 ± 0.1 μ M and showed antimalarial activity against both strains with IC₅₀ values of 11.1 ± 2.0 and 9.1 ± 1.0 μ M, respectively. However, this compound was relatively cytotoxic, with an IC₅₀ value of 13.5 ± 0.5 μ M against the Vero cell line. In earlier work, compound 9 was isolated from the leaves, twigs, and flowers of *Miliusa sinensis* and was demonstrated as being cytotoxic to the human oral epidermoid carcinoma (KB), human prostate carcinoma (LNCaP), human lung carcinoma (Lu-1), human colon carcinoma (Col-2), and human umbilical vein endothelial (HUVEC) cell lines.²⁶ Compounds 1–5, 8, and 11–13 displayed weaker antimalarial activity than compound 9, with IC₅₀ values ranging from 19.3–41.4 and 10.8–54.9 μ M against the TM4 and K1 strains, respectively. None of these were cytotoxic for the Vero cell line. Among these, compound 1 showed antimalarial activity against the TM4 strain with an IC₅₀ value of 19.3 ± 3.4 μ M, and compound 2 demonstrated significant activity against the K1 strain with an IC₅₀ value of 10.8 ± 4.1 μ M.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Melting points were measured with a Sanyo Gallenkamp melting point apparatus and are uncorrected. Optical rotation values were determined on a Bellingham and Stanley APD440 polarimeter. The UV spectra were recorded with a PerkinElmer UV-vis spectrophotometer, whereas the IR spectra were obtained using a Bruker Tensor FT-IR spectrophotometer. NMR spectroscopic data were obtained on a 400 MHz Bruker Ultra Shield FT-NMR and a 500 MHz Varian Unity INOVA NMR spectrometer. Chemical shifts (δ) are recorded in parts per million in CDCl₃ (δ_{H} 7.26 and δ_{C} 77.2) and/or acetone-*d*₆ (δ_{H} 2.05 and δ_{C} (CO) 206.2 and (CH₃) 29.8), with TMS as an internal reference. Mass spectrometric data were obtained on a Micro TOF, Bruker Daltonics mass

spectrometer. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck). Column chromatography (CC) was performed on Sephadex LH-20 and silica gel (Merck) type 100 (63–200 μ m) and type 60 (5–40 μ m for quick column chromatography; QCC). All solvents for extraction and chromatography were routinely distilled prior to use.

Plant Material. The leaves and twigs of *M. cuneata* were collected at Doi Tung, Chiang Rai Province, Thailand, in September 2013. The plant was identified by Mr. James F. Maxwell from the CMUB Herbarium, Chiang Mai University, where a voucher specimen has been deposited (specimen no. Martin van de Bult 1328).

Extraction and Isolation. The air-dried leaves (0.60 kg) of *M. cuneata* were extracted with acetone (15 L) over a period of 3 days for three times at room temperature. Removal of the solvent under reduced pressure provided an acetone extract (88.41 g) as a dark green gum. The crude extract was separated by QCC over silica gel, eluting with a gradient of hexanes and acetone (1:0 to 2:3), to give seven fractions (L1–L7). Fraction L2 (603.1 mg) was separated over Sephadex LH-20 with CH₂Cl₂–MeOH (1:4) to afford two subfractions (L2A and L2B), and the latter subfraction (31.6 mg) was fractionated further over Sephadex LH-20 with MeOH to provide three subfractions (L2B1–L2B3). The second subfraction (7.0 mg) was purified by CC over silica gel using EtOAc–hexanes (1:9) as mobile phase to afford compound 6 (2.5 mg) as a brownish-yellow solid, mp 181–183 °C, lit. 182–183 °C.¹⁶ Fraction L4 (1.30 g) was washed with MeOH and then hexanes, and the remaining solid was dried under vacuum to give compound 7 (140 mg) as a yellow solid, mp 173–174 °C, lit. 171–172 °C.²⁷ Separation of fraction L5 (10.73 g) by QCC over silica gel, with gradient elution using CH₂Cl₂–MeOH (1:0 to 9:1), gave five subfractions (L5A–L5E). Purification of subfraction L5B (20.0 mg) over Sephadex LH-20 with MeOH gave compound 5 (1.3 mg) as a yellow gum and 2 (9.7 mg) as a yellow solid, respectively. Subfraction L5D (402.5 mg) was separated over Sephadex LH-20 with MeOH to produce three subfractions (L5D1–L5D3). Subfraction L5D2 (286.5 mg) was further purified by CC with acetone–hexanes (3:7) to yield compound 9 (149.4 mg) as a yellow, viscous oil. Fraction L6 (7.82 g) was separated over silica gel by QCC with a gradient of CH₂Cl₂–MeOH (1:0 to 9:1) to afford three subfractions (L6A–L6C). Subfraction L6B (408.2 mg) was further separated over Sephadex LH-20 with MeOH to provide four additional subfractions (L6B1–L6B4). The second subfraction, L6B2 (18.6 mg), was further purified over Sephadex LH-20 with MeOH to afford compound 4 (4.4 mg) as a brownish-yellow gum. Subfraction L6B4 (28.0 mg) was further separated by CC over silica gel with EtOAc–hexanes (3:7) to provide compound 1 (8.1 mg) as a bright pink solid. Fraction L7 (5.96 g) was separated over silica gel by QCC with a gradient of CH₂Cl₂–MeOH (1:0 to 9:1) to afford three subfractions (L7A–L7C). Subfraction L7B (111.4 mg) was separated over Sephadex LH-20 with MeOH to obtain compound 8 (10.1 mg) as a yellow gum and compound 3 (3.7 mg) as a brownish-red gum. Subfraction L7B2 (20.3 mg) was further purified by CC over silica gel using EtOAc–hexanes (3:2) as mobile phase to afford compound 10 (2.8 mg) as a yellow, viscous oil.

The air-dried twigs (2.21 kg) of *M. cuneata* were macerated with acetone (15 L) over a period of 3 days (three times) at room temperature. The combined extracts were evaporated under reduced pressure to afford an acetone extract (35.0 g) as a dark brown gum. The crude extract was separated by QCC over silica gel and eluted with a gradient of hexanes–CH₂Cl₂–MeOH (1:0:0 to 0:4:1) to give nine fractions (T1–T9). Fraction T2 (860.0 mg) was separated by CC over silica gel eluting with CH₂Cl₂ to give three subfractions (T2A–T2C). Subfraction T2B (46.0 mg) was purified over Sephadex LH-20 with MeOH to provide compound 6 (1.1 mg). Fraction T4 (2.79 g) was fractionated by QCC using EtOAc–hexanes (3:7 to 1:1) for elution to give three subfractions (T4A–T4C). Subfraction T4B (149.2 mg) was further purified by CC with CH₂Cl₂ to provide compound 7 (40.0 mg). Fraction T6 (556.3 mg) was purified over Sephadex LH-20 with MeOH to afford compound 11 as a brownish-red gum (1.2 mg). Fraction T8 (1.25 g) was separated over Sephadex LH-20 with MeOH to provide three subfractions (T8A–T8C).

Subfraction T8B (425.2 mg) was purified by CC with EtOAc–CH₂Cl₂ (9:1) to give compound 12 as an orange gum (17.7 mg). Fraction T9 (1.40 g) was separated over Sephadex LH-20 with MeOH to give three fractions (T9A–T9C). Subfraction T9B (194.6 mg) was further fractionated by CC with acetone–hexanes (3:7) to yield three fractions (T9B1–T9B3). Separation of subfraction T9B2 (24.0 mg) over Sephadex LH-20 with MeOH provided compound 13 as an orange-yellow gum (2.7 mg). Purification of subfraction T9B3 (19.0 mg) over Sephadex LH-20 with MeOH furnished compound 14 (9.7 mg) as a white solid, with mp 247–249 °C, lit. 248 °C.²²

Miliusacurine A (1): bright pink solid; mp 218–220 °C; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 224 (4.5), 338 (4.2), 371 (4.1), 389 (4.1) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3419, 1649, 1617, 1584, 1504, 1463, 1278, 1126 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; HRESIMS m/z 356.1136 [M + H]⁺, calcd for C₁₉H₁₈NO₆, 356.1134.

Miliusacurine B (2): yellow solid; mp 217–218 °C; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 224 (4.6), 341 (4.2), 371 (4.2), 389 (4.1) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3388, 1648, 1586, 1494, 1461, 1280, 1032 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; HRESIMS m/z 392.1112 [M + Na]⁺, calcd for C₂₀H₁₉NO₆Na, 392.1110.

Miliusacurine C (3): brownish-red gum; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 225 (4.3), 340 (4.0), 372 (3.9), 389 (3.9) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3421, 1648, 1611, 1583, 1502, 1463, 1278, 1126, 1093 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; HRESIMS m/z 378.0958 [M + Na]⁺, calcd for C₁₉H₁₇NO₆Na, 378.0954.

Miliusacurine D (4): brownish-yellow gum; [α]_D²⁵ –175 (c 0.07, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 218 (4.5), 262 (4.0), 341 (3.8) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3421, 1636, 1615, 1584, 1459, 1267, 1120, 1091 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 2; HRESIMS m/z 380.1104 [M + Na]⁺, calcd for C₁₉H₁₉NO₆Na, 380.1110.

Miliusacurine E (5): yellow gum; [α]_D²⁵ –93 (c 0.02, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 218 (4.4), 265 (3.8), 325 (3.5) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3421, 1635, 1590, 1459, 1271, 1121, 1097, 1029 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 2; HRESIMS m/z 372.1454 [M + H]⁺, calcd for C₂₀H₂₂NO₆, 372.1447.

Cytotoxicity Assays. KB cells (human oral epidermal carcinoma cells) and normal Vero cells (kidney epithelial cells of the African green monkey, *Cercopithecus aethiops*)²⁸ were obtained from the Bioassay Laboratory, BIOTEC, NSTDA, Pathumthani, Thailand. Vero cells were maintained and cultured in MEM/EBSS supplemented with heated fetal bovine serum (10%), NaHCO₃ (2.2 g/L), and sodium pyruvate (1%). KB cells were cultured in DMEM/low glucose supplemented with heated fetal bovine serum (10%), NaHCO₃ (3.7 g/L), and NEAA (1%). Cytotoxicity was evaluated using the sulforhodamine B assay.²⁹ Ellipticine and doxorubicin were used as the standard compounds.

Antimalarial Assay. The in vitro antimalarial activity against two strains of *Plasmodium falciparum* (TM4, a wild-type chloroquine and antifolate-sensitive strain, and K1, a multi-drug-resistant strain), obtained from Prof. S. Thaithong, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn, Bangkok, Thailand, was evaluated. The parasites were maintained in human red blood cells in RPMI 1640 medium supplemented with HEPES (25 mM), sodium bicarbonate (0.2%), and human serum (8%) in a carbon dioxide (3%) incubator maintained at 37 °C. The test samples were made up in DMSO solution (25 μ L, diluted in the culture medium) and placed in triplicate in a 96-well plate where parasitized erythrocytes (200 μ L) with a cell suspension (1.5%) of parasitemia (0.5–1%) were then added to the wells. The culture was incubated (18–20 h). The antiparasmodial activity testing was carried out using the microdilution radioisotope technique as described by Yuthavong et al.³⁰ Chloroquine, cycloguanil, and pyrimethamine were used as reference substances.³¹ Human erythrocytes and serum were obtained from donors after providing informed consent, following a protocol approved by the NSTDA Ethics Committee for Human Research, document no. 0007/2557.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01054.

1D and 2D NMR data of compounds 1–5 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +66 5394 3341, ext 222. Fax: +66 5389 2277. E-mail: thunwadee.r@cmu.ac.th, othunwadee@gmail.com.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This paper is dedicated to the memory of Mr. James F. Maxwell (Herbarium of Chiang Mai University). This work was supported by the Thailand Research Fund and Chiang Mai University (Grant No. TRG5880098). T.P. and A.J. acknowledge a Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST) and the Graduate School of Chiang Mai University. We would like also to thank the bioassay laboratory, BIOTEC, NSTDA, Pathumthani, Thailand, for the KB and Vero cells, Prof. S. Thaithong, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn, Bangkok, Thailand, for malaria parasites, and financial support from NSTDA's Cluster Program Management to S.K.

■ REFERENCES

- (1) Chaowasku, T.; KeBler, P. J. A. *Nord. J. Bot.* **2013**, *31*, 680–699.
- (2) Chuakul, W.; Sornthornchareonon, N. *Thai J. Phytopharm.* **2003**, *10*, 25–32.
- (3) Wu, R.; Ye, Q.; Chen, N. Y.; Zhang, G. L. *Chin. Chem. Lett.* **2001**, *12*, 247–248.
- (4) Chen, B.; Feng, C.; Li, B. G.; Zhang, G. L. *Nat. Prod. Res.* **2003**, *17*, 397–402.
- (5) Thuy, T. T. T.; Quan, T. D.; Anh, N. T. H.; Sung, T. V. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 1361–1365.
- (6) Hasan, C. M.; Jumana, S.; Rashid, M. A. *Nat. Prod. Lett.* **2000**, *14*, 393–397.
- (7) Jumana, S.; Hasan, C. M.; Rashid, M. A. *Fitoterapia* **2000**, *71*, 559–561.
- (8) Kamperdick, C.; Van, N. H.; Sung, T. V. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 991–994.
- (9) Sawasdee, K.; Chaowasku, T.; Lipipun, V.; Dufat, T. H.; Michel, S.; Jongbunprasert, V.; Likhitwitayawuid, K. *Biochem. Syst. Ecol.* **2014**, *54*, 179–181.
- (10) Huong, D. T.; Kamperdick, C.; Sung, T. V. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 445–447.
- (11) Thao, N. P.; Luyen, B. T. T.; Tai, B. H.; Cuong, N. M.; Kim, Y. C.; Minh, C. V.; Kim, Y. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3859–3863.
- (12) Huong, D. T.; Luong, D. V.; Thao, T. T. P.; Sung, T. V. *Pharmazie* **2005**, *60*, 627–629.
- (13) Naphong, C.; Pompimon, W.; Sombutsiri, P. *Am. J. Appl. Sci.* **2013**, *10*, 787–792.
- (14) Sawasdee, K.; Chaowasku, T.; Lipipun, V.; Dufat, T. H.; Michel, S.; Likhitwitayawuid, K. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 4259–4263.
- (15) Sawasdee, K.; Chaowasku, T.; Lipipun, V.; Dufat, T. H.; Michel, S.; Likhitwitayawuid, K. *Fitoterapia* **2013**, *85*, 49–56.
- (16) Higa, M.; Ohshiro, T.; Ogihara, K.; Yogi, S. *Yakugaku Zasshi* **1990**, *110*, 822–827.
- (17) Sy, L. K.; Brown, G. D. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1207–1211.
- (18) Likhitwitayawuid, K.; Kongsiriwet, C.; Jongbunprasert, V.; Sritularak, B.; Wongseripipatana, S. *Arch. Pharmacol. Res.* **2006**, *29*, 199–202.
- (19) Monthong, W.; Pitchuanchom, S.; Nuntasen, N.; Pompimon, W. *Am. J. Appl. Sci.* **2011**, *8*, 1268–1271.
- (20) Al-Taweel, A. M.; Perveen, S.; El-Shafae, A. M.; Fawzy, G. A.; Malik, A.; Afza, N.; Iqbal, L.; Latif, M. *Molecules* **2012**, *17*, 2675–2682.
- (21) Han, S. H.; Lee, H. H.; Lee, I. S.; Moon, Y. H.; Woo, E. R. *Arch. Pharmacol. Res.* **2002**, *25*, 433–437.
- (22) Mata, R.; Morales, I.; Pérez, O.; Rivero-Cruz, I.; Acevedo, L.; Enriquez-Mendoza, L.; Bye, R.; Franzblau, S.; Timmermann, B. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1961–1968.
- (23) Cheng, J. J.; Tsai, T. H.; Lin, L. C. *Planta Med.* **2012**, *78*, 1873–1877.
- (24) Faizi, S.; Khan, R. A.; Azher, S.; Khan, S. A.; Tauseef, S.; Ahmad, A. *Planta Med.* **2003**, *69*, 350–355.
- (25) Gzella, A.; Chrzanowska, M.; Dreas, A.; Froelich, A. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2006**, *62*, o598–o600.
- (26) Zhang, H. J.; Ma, C.; Nguyen, V. H.; Nguyen, M. C.; Tan, G. T.; Santarsiero, B. D.; Mesecar, A. D.; Soejarto, D. D.; Pezzuto, J. M.; Fong, H. H. S. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 693–708.
- (27) Orabi, K. Y.; Mossa, J. S.; Muhammed, I.; Alloush, M. H.; Galal, A. M.; El-Feraly, F. S.; Mc Phail, A. T. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1665–1668.
- (28) Hunt, L.; Jordan, M.; De Jesus, M.; Wurm, F. M. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 201–205.
- (29) Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112–1116.
- (30) Yuthavong, Y.; Vilaivan, T.; Chareonsethakul, N.; Kamchonwongpaisan, S.; Sirawaraporn, W.; Quarrell, R.; Lowe, G. J. *Med. Chem.* **2000**, *43*, 2738–2744.
- (31) Wangchuk, P.; Keller, P. A.; Pyne, S. G.; Taweetipat, M.; Tonsomboon, A.; Rattanajak, R.; Kamchonwongpaisan, S. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 730–742.



Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tet

Antimalarial polyoxygenated and prenylated xanthenes from the leaves and branches of *Garcinia mckeaniana*



Chiramet Auranwiwat^a, Surat Laphookhieo^b, Roonglawan Rattanajak^c,
Sumalee Kamchonwongpaisan^c, Stephen G. Pyne^d, Thunwadee Ritthiwigrom^{a,*}

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Sutep, Muang, Chiang Mai, 50200, Thailand

^b Natural Products Research Laboratory, School of Science, Mae Fah Luang University, Tasud, Muang, Chiang Rai, 57100, Thailand

^c Medical Molecular Biology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Thailand Science Park, Pathum Thani, 12120, Thailand

^d School of Chemistry, University of Wollongong, Wollongong, New South Wales, 2522, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2016

Received in revised form 29 August 2016

Accepted 9 September 2016

Available online 10 September 2016

Keywords:

Garcinia mckeaniana

Clausiaceae

Pyrano-xanthone

Antimalarial activity

ABSTRACT

The first phytochemical investigation of the leaf and branch extracts of *Garcinia mckeaniana* has led to the isolation and characterization of five new polyoxygenated and prenylated xanthenes, mckeanianones A–E (1–5), and one new biflavone, mckeaniabiflavone (6), together with 13 known compounds (7–19). The diprenylated pyrano-xanthenes (1–3) and the biflavone (6) were isolated from the leaves while the monoprenylated xanthenes (4 and 5) were isolated from the branches. The structures of all isolated compounds were elucidated based on spectroscopic methods and were evaluated for their antimalarial activities against the *Plasmodium falciparum* strains, TM4 (drug sensitive strain) and K1 (a multidrug resistant strain), and cytotoxicity against a Vero cell line (African green monkey kidney epithelial cells). The pyrano-xanthenes (1–3, 7 and 8), having two isoprene units, were generally the most active compounds with IC₅₀ values in the range of 6.0±1.1–8.5±1.2 and 3.6±1.7–7.3±1.2 µM, respectively against the TM4 and K1 strains. Of these compounds 2, 3 and 8 were 2–5 times less cytotoxic against a Vero cell line (IC₅₀ values of 12.6±0.9, 29.5±3.9 and 13.2±4.6 µM, respectively) in comparison with their antiplasmodial activities.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

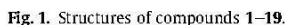
Garcinia plants (Clusiaceae) are well documented for producing a variety of secondary metabolites, especially xanthenes,^{1a–d} flavonoids,^{1d} benzophenones² and terpenoids.^{1a} These plants have been used in traditional medicines^{1d,3a–c} and some of the compounds isolated from these plants have shown noteworthy pharmacological activities, including antimalarial,⁴ antimicrobial,^{5a–c} antioxidant^{5c} and cytotoxic activities.⁶ Thus *Garcinia* plants are an outstanding source of bioactive phytochemicals and therefore an important species to investigate for new bioactive compounds. In our continuous research for new bioactive metabolites from *Garcinia* plants,^{5a–b,7a–b} we herein report our results from the first phytochemical investigation of the leaf and branch extracts from *Garcinia mckeaniana* Craib. This plant is locally named ‘Ma da’ and is found in the North of Thailand. This study resulted in the isolation of six new natural products (1–6), together with 13 known compounds (7–19). The biological activities of these compounds against the *Plasmodium*

falciparum strains, TM4 and K1 and their cytotoxicities against a Vero cell line are reported.

2. Results and discussion

The concentrated acetone extract of the air dried leaves of *G. mckeaniana* was subjected to column chromatography and afforded three new xanthenes, mckeanianones A–C (1–3), and one new biflavone, mckeaniabiflavone (6), together with three known compounds, bannaxanthenes I (7)⁸ and E (8),⁶ and amentoflavone (9).⁹ The crude acetone extract of the air dried branches of *G. mckeaniana* was separated by column chromatography resulting in the isolation of two new natural xanthenes, mckeanianones D–E (4–5) along with 10 known compounds, pancixanthenes A and B (10 and 17),¹⁰ neriifolone A (11),¹¹ 1,3,5-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-9H-xanthen-9-one (12),¹² 1,3,6-trihydroxy-7-methoxyxanthone (13),¹³ 1,3,5-trihydroxyxanthone (14),¹⁴ buchanaxanthone (15),¹⁵ 5-O-methyl-2-deprenylrheediaxanthone B (16),¹⁶ assiguxanthone A (18)¹⁷ and 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone (19)¹⁸ (Fig. 1). Full experimental information is provided in the **Supplementary data**.

* Corresponding author. E-mail addresses: thunwadee.r@cmu.ac.th, othunwadee@gmail.com (T. Ritthiwigrom).



McKeanianone C (**3**) was obtained as a yellow viscous oil, that gave a $[M+Na]^+$ ion at m/z 559.1945 in the HRESI-TOFMS which

Table 1
NMR spectroscopic data (400 MHz, CDCl₃) for mckeanianones A–C (1–3)

Position	1 ^a			2			3		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)	HMBC	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)	HMBC	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)	HMBC
1		156.7 (C)			157.7 (C)			158.0 (C)	
2		104.7 (C)			104.3 (C)			104.5 (C)	
3		157.7 (C)			159.7 (C)			159.7 (C)	
4		106.9 (C)		6.25, s, 1H	94.1 (CH)	2, 3, 4a, 9, 9a	6.31, s, 1H	94.2 (CH)	2, 3, 4a, 9a
4a		154.3 (C)			156.3 (C)			156.3 (C)	
5		152.5 ^b (C)			112.2 (C)			112.2 (C)	
6		152.6 ^b (C)			151.0 (C)			151.3 (C)	
7		141.8 (C)			139.1 (C)			139.4 (C)	
8		129.0 (C)			124.2 (C)			124.0 (C)	
8a		111.8 (C)			111.3 (C)			111.3 (C)	
9		183.5 (C)			182.8 (C)			182.9 (C)	
9a		104.1 (C)			103.8 (C)			103.9 (C)	
10a		153.6 (C)			149.7 (C)			150.0 (C)	
11	6.69, d (10.0), 1H	116.5 (CH)	2, 3, 13, 14	6.69, d (10.0), 1H	115.8 (CH)	1, 2, 3, 13, 14, 15	6.73, d (10.0), 1H	115.9 (CH)	1, 2, 3, 13
12	5.69, d (10.0), 1H	128.0 (CH)	2, 13, 14	5.54, d (10.0), 1H	127.2 (CH)	2, 13, 14, 15	5.56, d (10.0), 1H	127.2 (CH)	2, 13, 14, 15
13		78.5 (C)			78.0 (C)			78.0 (C)	
14	1.47, s, 3H	28.4 (CH ₃)	12, 13	1.44, s, 3H	28.4 (CH ₃)	12, 13, 15	1.47, s, 3H	28.5 (CH ₃)	12, 13, 15
15	1.47, s, 3H	30.6 (CH ₃)	12, 13, 14	1.44, s, 3H	28.4 (CH ₃)	12, 13, 14	1.47, s, 3H	28.5 (CH ₃)	12, 13, 14
16	3.42, d (6.8), 2H	21.9 (CH ₂)	3, 4, 4a, 17, 18	3.60, d (8.0), 2H	22.4 (CH ₂)	5, 6, 10a	3.67, d (7.4), 2H	22.4 (CH ₂)	5, 6, 10a, 17, 18
17	5.21, br t (6.8), 1H	123.3 (CH)	4, 16	5.40, t (8.0), 1H	125.4 (CH)	19, 20	5.52, t (7.4), 1H	127.5 (CH)	19, 20
18		131.4 (C)			134.7 (C)			130.8 (C)	
19	1.63, s, 3H	25.9 (CH ₃)	17, 18, 20	1.73, s, 3H	22.6 (CH ₃)	17, 18, 20	1.73, s, 3H	21.5 (CH ₃)	17, 18, 20
20	1.83, s, 3H	18.1 (CH ₃)	17, 18, 19	4.30, s, 2H	62.1 (CH ₂)	17, 18, 19	4.87, s, 2H	63.6 (CH ₂)	17, 18, 19, CO(Ac)
21	4.17, d (6.2), 2H	26.3 (CH ₂)	7, 8, 8a, 22	4.13, d (7.8), 2H	26.1 (CH ₂)	7, 8, 8a, 22, 23	4.21, d (8.0), 2H	26.5 (CH ₂)	7, 8, 8a, 22, 23
22	5.31, br t (6.2), 1H	124.4 (CH)	8, 21	5.59, t (7.8), 1H	127.5 (CH)	8, 24, 25	5.73, t (8.0), 1H	128.5 (CH)	24, 25
23		131.5 (C)			133.7 (C)			132.9 (C)	
24	1.64, s, 3H	26.0 (CH ₃)	22, 23, 25	1.73, s, 3H	22.9 (CH ₃)	22, 23, 25	1.79, s, 3H	23.4 (CH ₃)	22, 23, 25
25	1.86, s, 3H	18.3 (CH ₃)	22, 23, 24	4.26, s, 2H	62.3 (CH ₂)	22, 23, 24	4.37, s, 2H	63.2 (CH ₂)	22, 23, 24
OH-1	13.97, s, 1H		1, 9a	13.78, brs, 1H			13.80, brs, 1H		
CO(Ac)								171.7 (C)	
CH ₃ (Ac)							2.12, s, 3H	21.2 (CH ₃)	CO(Ac)

^a Measured in acetone-*d*₆.

^b These assignments could be interchanged.

corresponded to the molecular formula C₃₀H₃₂O₉ (calcd for C₃₀H₃₂O₉Na, *m/z* 559.1944). The UV, IR, ¹H and ¹³C NMR spectra indicated that compound **3** was closely related to compound **2**, except the IR spectrum showed an additional band at 1736 cm⁻¹, which indicated the presence of an ester carbonyl functional group. In conjunction with this, the ¹H NMR spectrum also contained an additional resonance for an acetoxy group at δ_{H} 2.12 (3H, s). The location of the acetoxy group at C-20 (δ_{C} 63.6) was based on the HMBC correlation between the resonance for H₂-20 (δ_{H} 4.87) and that for the acetoxy carbonyl (δ_{C} 171.7). This identified

mckeanianone C as 1,6,7-trihydroxy-6,6'-dimethyl-2H-pyrano(2', 3':3,2)-5-(4-acetoxy-3-methylbut-2-enyl)-8-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl)-xanthone (**3**).

Mckeanianone D (**4**) was isolated as a yellow solid (mp 206–207 °C). The molecular formula C₁₈H₁₆O₅ was indicated from the mass ion peak at *m/z* 312.09995 [M]⁺ in its HREIMS spectrum. The UV, IR and NMR spectra were similar to those of compound **14**,¹⁴ except for the additional isoprene unit resonances [δ_{H} 5.51 (1H, t, *J*=6.6 Hz, H-12), 4.72 (2H, d, *J*=6.6 Hz, H-11), 1.80 (3H, s, H-15), 1.79 (3H, s, H-14)] in the ¹H and ¹³C NMR spectra (Table 2). This isoprene

Table 2
NMR spectroscopic data (400 MHz in acetone-*d*₆) of mckeanianones D (**4**) and E (**5**)

Position	4			5		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)	HMBC	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} ^a (type)	HMBC ^a
1		164.4 (C)			161.2 (C)	
2	6.35, d (2.2), 1H	98.4 (CH)	1, 3, 4, 9a		110.4 (C)	
3		167.2 (C)			163.2 (C)	
4	6.57, d (2.2), 1H	94.1 (CH)	2, 3, 4a, 9, 9a	6.49, s, 1H	93.9 (CH)	2, 3, 4a, 9, 9a
4a		158.5 (C)			156.6 (C)	
5		147.0 (C)		6.92, s, 1H	103.5 (CH)	7, 8a, 9, 10a
6	7.36, dd (7.9, 1.5), 1H	121.5 (CH)	8, 10a		155.0 (C)	
7	7.29, t (7.9), 1H	125.0 (CH)	5, 8a		146.6 (C)	
8	7.67, dd (7.9, 1.5), 1H	116.3 (CH)	6, 9, 10a	7.56, s, 1H	105.7 (CH)	6, 7, 9
8a		122.5 (C)			113.1 (C)	
9		182.0 (C)			180.5 (C)	
9a		104.2 (C)			103.2 (C)	
10a		146.1 (C)			153.3 (C)	
11	4.72, d (6.6), 2H	66.4 (CH ₂)	3, 12, 13	3.37, d (7.2), 2H	22.0 (CH ₂)	1, 2, 12, 13
12	5.51, t (6.6), 1H	120.0 (CH)	14, 15	5.30, t (7.2), 1H	123.4 (CH)	14, 15
13		139.2 (C)			131.5 (C)	
14	1.79, s, 3H	25.8 (CH ₃)	12, 13, 15	1.66, s, 3H	25.9 (CH ₃)	12, 13, 15
15	1.80, s, 3H	18.3 (CH ₃)	12, 13, 14	1.80, s, 3H	17.9 (CH ₃)	12, 13, 14
OH-1	12.91, brs, 1H			13.45, brs, 1H		
OMe-7				3.99, s, 3H	56.6 (CH ₃)	7

^a Recorded at 500 MHz.

unit was at C-3 (δ_C 167.2) based on the HMBC correlations between H-11 (δ_H 4.72) and the ^{13}C NMR resonances for C-3, C-12 (δ_C 120.0) and C-13 (δ_C 139.2). Therefore, mckeanianone D was determined to be 1,5-dihydroxy-3-O-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone (4).

Mckeanianone E (5) was isolated as a yellow solid (decomposed $>129^\circ C$). Its HRESIMS displayed a positive molecular ion $[M+H]^+$ at m/z 343.1179, which was consistent with the molecular formula of $C_{19}H_{18}O_6$. The UV, IR and NMR spectra were similar to those of compound 13,¹³ with the only difference being an additional isoprene unit resonances [δ_H 5.30 (1H, t, $J=7.2$ Hz, H-12), 3.37 (2H, d, $J=7.2$ Hz, H-11), 1.80 (3H, s, H-15), 1.66 (3H, s, H-14)] in the 1H and ^{13}C NMR spectra (Table 2). This isoprene unit was at C-2 (δ_C 110.4) on the basis of the HMBC correlations between H-11 (δ_H 3.37) and the ^{13}C NMR resonances for C-1 (δ_C 161.2), C-2, C-12 (δ_C 123.4) and C-13 (δ_C 131.5). The structure of mckeanianone E was therefore confirmed to be 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone (5). This compound was synthesized earlier however its spectroscopic data was not reported.²⁰

Mckeaniabiflavone (6) was obtained as a yellow solid (mp 237–239 $^\circ C$). The molecular formula, $C_{31}H_{20}O_{10}$, was deduced from the HRESI-TOFMS which show a pseudomolecular ion at m/z 553.1155 (calcd 553.1135) $[M+H]^+$. The UV spectrum of compound 6 showed maximum absorption bands at λ_{max} (MeOH) 218, 269 and 331 nm while the IR spectrum showed absorption bands for a hydroxy group and a conjugated carbonyl group at 3444 and 1650 cm^{-1} , respectively. The 1H NMR spectrum (Table 3) displayed resonances for two chelated hydroxy protons (δ_H 13.09 and 12.97, each 1H, br s), two sets of four-aromatic protons for two *p*-disubstituted aromatic rings [δ_H 7.49 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2', H-6'), 6.76 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3', H-5'); and 7.74 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2'', H-6''), 6.97 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3'', H-5'')] which were assigned to the

with C-6 as well as the HMBC correlations with C-7 (δ_C 165.2) and C-8 (δ_C 94.7). The aromatic proton H-6 correlated with H-8 (δ_H 6.57) in the 1H – 1H COSY spectrum which correlated with C-4 (δ_C 182.1), C-6, C-7, C-9 (δ_C 158.9) and C-10 in the HMBC spectrum. The HMBC correlations between the aromatic protons H-2' (δ_H 7.49, of the *p*-disubstituted aromatic ring) and C-2 (δ_C 165.1) established the attachment of this aromatic unit at C-2. The substituent at C-4' (δ_C 160.8) of the *p*-disubstituted aromatic ring was assigned as a hydroxy group on the basis of its chemical shift. Consequently this data together with the chemical shifts of C-3 (δ_C 111.2), C-5 and C-7 suggested a 3-substituted-5,7-dihydroxy-(4-hydroxyphenyl) flavone moiety. In the other flavone unit, the chelated hydroxy proton (δ_H 13.09) was located at C-5'' (δ_C 163.0) due to its HMBC correlations to C-5'', C-6'' (δ_C 99.9) and C-10'' (δ_C 105.6). The olefinic proton at δ_H 6.63 (H-3'') showed cross peaks in the HMBC spectrum to C-2'' (δ_C 164.7), C-4'' (δ_C 183.3), C-10'' and C-1''' (δ_C 124.2) of the *p*-disubstituted aromatic ring. In addition, C-4''' of this aromatic ring was substituted by a hydroxy group due to its low field chemical shift (δ_C 163.6). The aromatic proton resonating at δ_H 6.33 was located at C-6'' from the HMQC spectrum as well as the HMBC correlations between H-6'' and C-3, C-4'', C-5'', C-7'' (δ_C 163.5), C-8'' (δ_C 100.5) and C-10''. The HMBC correlations between H-6'' and C-3 indicated that the two flavone units were linked between C-3 and C-8''. This was further supported by a comparison of the NMR spectroscopic data of 6 with those of the related biflavones, biapigenin (the de-O-methyl derivative of 6)²¹ and its constitutional isomer, 4'''-O-methyl-biapigenin.²² These three compounds had very similar 1H and ^{13}C NMR spectroscopic data, except for the resonances associated with the presence or absence of the methoxy group. Thus compound mckeaniabiflavone was identified as 7'''-methoxy-4',4'',5,5'',7-pentahydroxy-[3 $\rightarrow$ 8'']-biflavone (6).

Table 3
NMR spectroscopic data (400 MHz, acetone- d_6) for mckeaniabiflavone (6)

6							
Position	δ_{Hb} (J in Hz)	δ_C (type)	HMBC	Position	δ_{Hb} (J in Hz)	δ_C (type)	HMBC
2		165.1 (C)		2''		164.7 (C)	
3		111.2 (C)		3''	6.63, s, 1H	104.5 (CH)	2'', 4'', 10'', 1''
4		182.1 (C)		4''		183.3 (C)	
5		163.1 (C)		5''		163.0 (C)	
6	6.33, brs, 1H	99.8 (CH)	7, 8	6''	6.33, brs, 1H	99.9 (CH)	3, 4'', 5'', 7'', 8'', 10''
7		165.2 (C)		7''		163.5 (C)	
8	6.57, s, 1H	94.7 (CH)	4, 6, 7, 9, 10	8''		100.5 (C)	
9		158.9 (C)		9''		156.4 (C)	
10		104.7 (C)		10''		105.6 (C)	
1'		124.8 (C)		1'''		124.2 (C)	
2'	7.49, d (8.4), 1H	130.9 (CH)	2, 3', 4'	2'''	7.74, d (8.4), 1H	128.8 (CH)	3'', 4''
3'	6.76, d (8.4), 1H	116.1 (CH)	2, 1', 2', 4'	3'''	6.97, d (8.4), 1H	115.4 (CH)	1'', 4''
4'		160.8 (C)		4'''		163.6 (C)	
5'	6.76, d (8.4), 1H	116.1 (CH)	2, 1', 2', 4'	5'''	6.97, d (8.4), 1H	115.4 (CH)	1'', 4''
6'	7.49, d (8.4), 1H	130.9 (CH)	2, 3', 4'	6'''	7.74, d (8.4), 1H	128.8 (CH)	4'', 5''
OH-5	12.97, brs, 1H		5, 6, 10	OH-5''	13.09, brs, 1H		5'', 6'', 10''
				OMe-7'''	3.82, s, 3H	55.9 (CH ₃)	7''

aromatic protons of rings B and E, respectively, four uncoupled (singlet) aromatic protons (δ_H 6.63, 6.57, 6.33 and 6.33, each 1H, H-3'', H-8, H-6 and H-6'', respectively) and one methoxy group (δ_H 3.82). The ^{13}C NMR and DEPT 135 spectra of 6 displayed only 27 resonances for the total of 31 carbons; 18 quaternary carbons (δ_C 183.3, 182.1, 165.2, 165.1, 164.7, 163.6, 163.5, 163.1, 163.0, 160.8, 158.9, 156.4, 124.8, 124.2, 111.2, 105.6, 104.7 and 100.5), 12 methine carbons [δ_C 130.9 (2C), 128.8 (2C), 116.1 (2C), 115.4 (2C), 104.5, 99.9, 99.8 and 94.7] and one methyl (δ_C 55.9) carbon. The chelated hydroxy proton at δ_H 12.97 showed HMBC correlations to C-5 (δ_C 163.1), C-6 (δ_C 99.8) and C-10 (δ_C 104.7). The aromatic proton resonating at δ_H 6.33 was assigned to H-6 due to its HMQC cross peak

All of the isolated compounds were tested for their antimalarial activities against the *P. falciparum* strains, TM4 (drug sensitive strain) and K1 (a multidrug resistant strain)²³ and their cytotoxic activity against a Vero cell line (African green monkey kidney epithelial cells)²⁴ (Table 4). The five pyrano-xanthones 1–3, 7 and 8, all isolated from the leaves and having two isoprene substituents, were generally the most active compounds and showed significant activities against the TM4 and K1 strains with IC_{50} values in the range of 6.0 ± 1.1 – 8.5 ± 1.2 and 3.6 ± 1.7 – 7.3 ± 1.2 μM , respectively. Only compounds, 1 and 7, were not tested against Vero cells (Table 4).

Compounds 2, 3 and 8 were 2–5 times less cytotoxic against Vero cells (IC_{50} values of 12.6 ± 0.9 , 29.5 ± 3.9 and 13.2 ± 4.6 μM ,

Table 4
Antimalarial and cytotoxic activities (IC₅₀, μ M)

Compounds ^a	Antimalarial activity against <i>P. falciparum</i>		Cytotoxic activity
	TM4	K1	Vero cells
1	6.2±0.4	5.2±0.4	— ^b
2	6.7±0.6	6.4±0.5	12.6±0.9
3	6.0±1.1	6.6±0.7	29.5±3.9
4	15.1±3.9	14.3±1.8	— ^c
5	27.7±3.4	25.7±2.3	— ^c
7	8.5±1.2	3.6±1.7	— ^b
8	8.3±0.9	7.3±1.2	13.2±4.6
10	13.7±4.5	19.8±2.0	36.5±8.0
11	22.1±0.7	19.5±1.0	— ^c
17	10.8±0.7	15.4±2.6	25.3±1.4
18	39.1±6.3	32.7±5.99	31.3±2.6
19	31.5±2.0	25.1±2.1	— ^c
Ellipticine ^d			0.4
Chloroquine ^e	0.03	0.3±0.04	
Cycloguanil ^e	0.04±0.01	3.2±0.8	
Pyrimethamine ^e	0.08±0.01	31.0±8.4	

^a Compounds **6**, **9** and **12–16** were inactive in all assays.

^b Due to insolubility problems an accurate value could not be obtained.

^c Inactive at IC₅₀>50 μ M.

^d Positive control for cytotoxic assay.

^e Reference drugs for antiparasmodial activity.

respectively) in comparison with their antiparasmodial activities. The xanthenes, **4**, **5**, **10**, **11** and **17–19**, having one free or cyclized isoprene substituent had significantly weaker antiparasmodial activities and cytotoxicities. The xanthenes **12** and **16**, the xanthenes (**13–15**), having no isoprene substituent, and the biflavones, **6** and **9** were inactive in all assays. Other *Garcinia* species containing xanthenes have been documented to have antiparasmodial activities.^{25a–c} Some of these xanthenes have the 9-xanthone structure related to compounds **4**, **5**, **10**, **11** and **17–19** while three others (isolated from the stem bark of *G. vieillardii*, demethylcalabaxanthone, dombakina-xanthone and macluraxanthone) have the pyrano-xanthone structure found in compounds **1–3**, **7** and **8** that were isolated here, but having one or two isoprene substituents. These three compounds had antiparasmodial activities with IC₅₀ values in the range of 0.9–1.9 μ g/mL, however their cytotoxic activities were not reported.^{25c}

3. Conclusions

Six new natural products and 13 known compounds was the first report that isolated from *G. mckeaniana*. The isolated compounds showed antimalarial activities against the *P. falciparum* strains, TM4 and K1, and cytotoxic activities against a Vero cell line. The isolated xanthone compounds, having a pyrano ring and two isoprene units, showed the highest antimalarial activities against the *P. falciparum* strains, and cytotoxic activities against a Vero cell line than those with only one isoprene unit. While the xanthenes and biflavonoids, without an isoprene unit, were inactive in all assays.

4. Spectral data of new compounds

4.1. Mckeanianone A (1)

Yellow solid; mp 187–189 °C; *R*_f (20% acetone/hexanes) 0.29; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 217 (4.39), 295 (4.61), 337 (4.04), 384 (3.79) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3418, 1649, 1610, 1463 cm⁻¹; δ_{H} (400 MHz, acetone-*d*₆) 13.97 (1 H, s, OH-1), 6.69 (1 H, d, *J* 10.0 Hz, H-11), 5.69 (1 H, d, *J* 10.0 Hz, H-12), 5.31 (1 H, br t, *J* 6.2 Hz, H-22), 5.21 (1 H, br t, *J* 6.8 Hz, H-17), 4.17 (2 H, d, *J* 6.2 Hz, H-21), 3.42 (2 H, d, *J* 6.8 Hz, H-16), 1.86 (3 H, s, H-25), 1.83 (3 H, s, H-20), 1.64 (3 H, s, H-24), 1.63

(3 H, s, H-19), 1.47 (6 H, s, H-14 and H-15); δ_{C} (100 MHz, acetone-*d*₆) 183.5, 157.7, 156.7, 154.3, 153.6, 152.6, 152.5, 141.8, 131.5, 131.4, 129.0, 128.0, 124.4, 123.3, 116.5, 111.8, 106.9, 104.7, 104.1, 78.5, 30.6, 28.4, 26.3, 26.0, 25.9, 21.9, 18.3, 18.1; HRESI-TOFMS: *m/z* 479.2063 [M+H]⁺, calcd for 479.2070, C₂₈H₃₁O₇.

4.2. Mckeanianone B (2)

Yellow viscous oil; *R*_f (30% acetone/hexanes) 0.30; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 218 (4.49), 292 (4.57), 338 (4.18), 379 (3.96) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3447, 1650, 1611, 1446, 1288 cm⁻¹; δ_{H} (400 MHz, CDCl₃) 13.78 (1 H, s, OH-1), 6.69 (1 H, d, *J* 10.0 Hz, H-11), 6.25 (1 H, s, H-4), 5.59 (1 H, t, *J* 7.8 Hz, H-22), 5.54 (1 H, d, *J* 10.0 Hz, H-12), 5.40 (1 H, t, *J* 8.0 Hz, H-17), 4.30 (2 H, s, H-20), 4.26 (2 H, s, H-25), 4.13 (2 H, d, *J* 7.8 Hz, H-21), 3.60 (2 H, d, *J* 8.0 Hz, H-16), 1.73 (6 H, s, H-19 and H-24), 1.44 (6 H, s, H-14 and H-15); δ_{C} (100 MHz, CDCl₃) 182.8, 159.7, 157.7, 156.3, 151.0, 149.7, 139.1, 134.7, 133.7, 127.5, 127.2, 125.4, 124.2, 115.8, 112.2, 111.3, 104.3, 103.8, 94.1, 78.0, 62.3, 62.1, 28.4 (2C), 26.1, 22.9, 22.6, 22.4; HRESI-TOFMS: *m/z* 517.1839 [M+Na]⁺, calcd for 517.1838, C₂₈H₃₀O₈Na.

4.3. Mckeanianone C (3)

Yellow viscous oil; *R*_f (20% acetone/hexanes) 0.31; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 217 (4.62), 292 (4.70), 338 (4.09), 382 (4.04) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3418, 1736, 1650, 1597, 1448, 1244 cm⁻¹; δ_{H} (400 MHz, CDCl₃) 13.80 (1 H, br s, OH-1), 6.73 (1 H, d, *J* 10.0 Hz, H-11), 6.31 (1 H, s, H-4), 5.73 (1 H, t, *J* 8.0 Hz, H-22), 5.56 (1 H, d, *J* 10.0 Hz, H-12), 5.52 (1 H, t, *J* 7.4 Hz, H-17), 4.87 (2 H, s, H-20), 4.37 (2 H, s, H-25), 4.21 (2 H, d, *J* 8.0 Hz, H-21), 3.67 (2 H, d, *J* 7.4 Hz, H-16), 2.12 (3 H, s, CH₃(Ac)), 1.79 (3 H, s, H-24), 1.73 (3 H, s, H-19), 1.47 (6 H, s, H-14 and H-15); δ_{C} (100 MHz, CDCl₃) 182.9, 171.7, 159.7, 158.0, 156.3, 151.3, 150.0, 139.4, 132.9, 130.8, 128.5, 127.5, 127.2, 124.0, 115.9, 112.2, 111.3, 104.5, 103.9, 94.2, 78.0, 63.6, 63.2, 28.5 (2C), 26.5, 23.4, 22.4, 21.5, 21.2; HRESI-TOFMS: *m/z* 559.1945 [M+Na]⁺, calcd for 559.1944, C₃₀H₃₂O₉Na.

4.4. Mckeanianone D (4)

Yellow solid; mp 206–207 °C; *R*_f (20% EtOAc/hexanes) 0.35; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 252 (4.20), 312 (3.85), 369 (3.18) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3385, 1653, 1569, 1456 cm⁻¹; δ_{H} (400 MHz, acetone-*d*₆) 12.91 (1 H, br s, OH-1), 7.67 (1 H, dd, *J* 7.9, 1.5 Hz, H-8), 7.36 (1 H, dd, *J* 7.9, 1.5 Hz, H-6), 7.29 (1 H, t, *J* 7.9 Hz, H-7), 6.57 (1 H, d, *J* 2.2 Hz, H-4), 6.35 (1 H, d, *J* 2.2 Hz, H-2), 5.51 (1 H, t, *J* 6.6 Hz, H-12), 4.72 (2 H, d, *J* 6.6 Hz, H-11), 1.80 (3 H, s, H-15), 1.79 (3 H, s, H-14); δ_{C} (100 MHz, acetone-*d*₆) 182.0, 167.2, 164.4, 158.5, 147.0, 146.1, 139.2, 125.0, 122.5, 121.5, 120.0, 116.3, 104.2, 98.4, 94.1, 66.4, 25.8, 18.3; HRMS (EI): *m/z* 312.09995 [M]⁺ (calcd for 312.09977, C₁₈H₁₆O₅).

4.5. Mckeanianone E (5)

Yellow solid; mp decomposed >129 °C; *R*_f (30% EtOAc/hexanes) 0.28; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 258 (4.41), 320 (4.18), 366 (3.98) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3269, 1647, 1559, 1482 cm⁻¹; δ_{H} (400 MHz, acetone-*d*₆) 13.45 (1 H, br s, OH-1), 7.56 (1 H, s, H-8), 6.92 (1 H, s, H-5), 6.49 (1 H, s, H-4), 5.30 (1 H, t, *J* 7.2 Hz, H-12), 3.99 (3 H, s, OMe-7), 3.37 (2 H, d, *J* 7.2 Hz, H-11), 1.80 (3 H, s, H-15), 1.66 (3 H, s, H-14); δ_{C} (125 MHz, acetone-*d*₆) 180.5, 163.2, 161.2, 156.6, 155.0, 153.3, 146.6, 131.5, 123.4, 113.1, 110.4, 105.7, 103.5, 103.2, 93.9, 56.6, 25.9, 22.0, 17.9; HRESI-TOFMS: *m/z* 343.1179 [M+H]⁺ (calcd for 343.1182, C₁₉H₁₉O₆).

4.6. Mckeaniabiflavone (6)

Yellow solid; mp 237–239 °C; R_f (5% MeOH/CH₂Cl₂) 0.45; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 218 (4.57), 269 (4.51), 331 (4.30) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3444, 1650, 1608, 1508, 1178 cm⁻¹; δ_H (400 MHz, acetone-*d*₆) 13.09 (1 H, br s, OH-5''), 12.97 (1 H, br s, OH-5), 7.74 (2 H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''' and H-6'''), 7.49 (2 H, d, *J* 8.4 Hz, H-2' and H-6'), 6.97 (2 H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''' and H-5'''), 6.76 (2 H, d, *J* 8.4 Hz, H-3' and H-5'), 6.63 (1 H, s, H-3''), 6.57 (1 H, s, H-8), 6.33 (2 H, br s, H-6 and H-6''), 3.82 (3 H, s, OMe-7''); δ_C (100 MHz, acetone-*d*₆) 183.3, 182.1, 165.2, 165.1, 164.7, 163.6, 163.5, 163.1, 163.0, 160.8, 158.9, 156.4, 130.9 (2C), 128.8 (2C), 124.8, 124.2, 116.1 (2C), 115.4 (2C), 111.2, 105.6, 104.7, 104.5, 100.5, 99.9, 99.8, 94.7, 55.9; HRESI-TOFMS: *m/z* 553.1155 [M+H]⁺, calcd for 553.1135, C₃₁H₂₁O₁₀.

Acknowledgements

This paper is dedicated to the memory of Mr. James F. Maxwell (Herbarium of Chiang Mai University). This work was supported by the Thailand Research Fund and Chiang Mai University (Grant No. TRG5880098). CA acknowledges the Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST) for a scholarship. We thank the bioassay laboratory, BIOTEC, NSTDA, Thailand for KB and Vero cells and financial support to SK from NSTDA's Cluster Management Program.

Supplementary data

Supplementary data (Experimental section, HRMS and 1D and 2D NMR spectroscopic data of compounds 1–6) related to this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2016.09.018>.

References and notes

- (a) Nguyen, L.-H. D.; Harrison, L. J. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 111–114; (b) Sukandar, E. R.; Ersam, T.; Fatmawati, S.; Siripong, P.; Aree, T.; Tip-pyang, S. *Fito-terapia* **2016**, *108*, 62–65; (c) Trisuwan, K.; Boonyaketgason, S.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 3600–3602; (d) Panthong, K.; Pongcharoen, W.; Phongpaichit, S.; Taylor, W. C. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 999–1004.
- Nguyen, H.-D.; Trinh, B. T.-D.; Nguyen, L.-H. D. *Phytochem. Lett.* **2011**, *4*, 129–133.
- (a) Pedraza-Chaverri, J.; Cardenas-Rodriguez, N.; Orozco-Ibarra, M.; Perez-Rojas, J. M. *Food. Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 3227–3239; (b) Ritthiwigrom, T.; Laphookhieo, S.; Pyne, S. G. *Maejo Int. J. Sci. Technol.* **2013**, *7*, 212–231; (c) Jamila, N.; Khairuddean, M.; Yaacob, N. S.; Kamal, N. N. S. N. M.; Osman, H.; Khan, S. N.; Khan, N. *Bioorg. Chem.* **2014**, *54*, 60–67.
- Upengui, Y.; Robledo, S. M.; Romero, J. F. G.; Quiñones, W.; Archbold, R.; Torres, F.; Escobar, G.; Nariño, B.; Echeverri, F. *Phytother. Res.* **2015**, *29*, 1195–1201.
- (a) Tantapakul, C.; Phakhodee, W.; Ritthiwigrom, T.; Cheenpracha, S.; Prawat, U.; Deachathai, S.; Laphookhieo, S. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1660–1664; (b) Sriyatep, T.; Siridechakorn, L.; Maneerat, W.; Pansanit, A.; Ritthiwigrom, T.; Andersen, R. J.; Laphookhieo, S. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 265–271; (c) Fouotsa, H.; Lannang, A. M.; Dzoyem, J. P.; Tatsimo, S. J. N.; Neumann, B.; Mbazona, C. D.; Razakarivony, A. A.; Nkengfack, A. E.; Eloff, J. N.; Sewald, N. *Planta Med.* **2015**, *81*, 594–599.
- Han, Q.-B.; Yang, N.-Y.; Tian, H.-L.; Qiao, C.-F.; Song, J.-Z.; Chang, D. C.; Chen, S.-L.; Luo, K. Q.; Xu, H.-X. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2187–2192.
- (a) Trisuwan, K.; Ritthiwigrom, T. *Arch. Pharm. Res.* **2012**, *35*, 1733–1738; (b) Auranwiwat, C.; Trisuwan, K.; Saia, A.; Pyne, S. G.; Ritthiwigrom, T. *Fitoterapia* **2014**, *98*, 179–183.
- Na, Z.; Xu, Y.-K. *Nat. Prod. Res.* **2010**, *24*, 1648–1653.
- Carbonezi, C. A.; Hamerski, L.; Leslie Guantilaka, A. A.; Cavaleiro, A.; Castro-Gamboa, I.; Silva, D. H. S.; Furlan, M.; Young, M. C. M.; Lopes, M. N.; Bolzani, V. D. S. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 319–324.
- Ito, C.; Miyamoto, Y.; Rao, K. S.; Furukawa, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 441–443.
- Nuangnaowarat, W.; Phupong, W.; Isaka, M. *Heterocycles* **2010**, *81*, 2335–2341.
- Helesbeux, J.-J.; Duval, O.; Dartiguelongue, C.; Séraphin, D.; Oger, J.-M.; Richomme, P. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2293–2300.
- Iinuma, M.; Tosa, H.; Ito, T.; Tanaka, T.; Riswan, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1744–1747.
- Iinuma, M.; Ito, T.; Tosa, H.; Tanaka, T.; Miyake, R.; Chelladurai, V. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 1423–1429.
- Jackson, B.; Locksley, H. D.; Scheinmann, F. J. *Chem. Soc. C* **1968**, 2579–2583.
- Rath, G.; Potrerat, O.; Mavi, S.; Hostettman, K. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 513–520.
- Ito, C.; Miyamoto, Y.; Nakayama, M.; Kawai, Y.; Rao, K. S.; Furukawa, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1403–1413.
- García Cortez, D. A.; Young, M. C. M.; Marston, A.; Wolfender, J.-L.; Hostettmann, K. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1367–1374.
- Ito, C.; Itoigawa, M.; Miyamoto, Y.; Onoda, S.; Rao, K. S.; Mukainaka, T.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa, H. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 206–209.
- Hamada, M.; Iikubo, K.; Ishikawa, Y.; Ikeda, A.; Umezawa, K.; Nishiyama, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3151–3153.
- Schmidt, B.; Jaroszewski, J. W.; Bro, R.; Witt, M. *Staerk D. Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1978–1987.
- Al-Shagdari, A.; Alarcón, A. B.; Cuesta-Rubio, O.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8*, 1237–1240.
- Wangchuk, P.; Keller, P. A.; Pyne, S. G.; Taweechotipatr, M.; Tonsomboon, A.; Rattanakaj, R.; Kamchonwongpaisan, S. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 730–732.
- Hunt, L.; Jordan, M.; Jesus, M. D.; Wurm, F. M. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 201–205.
- (a) Likhitwitayawuid, K.; Chanmahasathien, W.; Ruangrungrasi, N.; Krungkrai, J. *Planta Med.* **1998**, *64*, 281–282; (b) Likhitwitayawuid, K.; Phadungcharoen, T.; Krungkrai, J. *Planta Med.* **1998**, *64*, 70–72; (c) Hay, A.-E.; Helesbeux, J.-J.; Duval, O.; Labaï, M.; Grellier, P.; Richomme, P. *Life Sci.* **2004**, *75*, 3077–3085.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
 - ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ 2 เรื่อง

ผู้แต่ง: Thanika Promchai, Atchara Jaidee, Sarot Cheenpracha, Kongkiat Trisuwan, Roonglawan Rattanajak, Sumalee Kamchonwongpaisan, Surat Laphookhieo, Stephen G. Pyne, Thunwadee Ritthiwigrom *

ชื่อเรื่อง: Antimalarial oxoprotoberberine alkaloids from the leaves of *Miliusa cuneata*

ชื่อวารสาร: Journal of Natural Products (IF 3.798)

ปี: 2016 เล่มที่: 79 หน้า: 978–983.

ผู้แต่ง: Chiramet Auranwiwat, Surat Laphookhieo, Roonglawan Rattanajak, Sumalee Kamchonwongpaisan, Stephen G. Pyne, Thunwadee Ritthiwigrom *

ชื่อเรื่อง: Antimalarial polyoxygenated and prenylated xanthones from the leaves and branches of *Garcinia mckeaniana*

ชื่อวารสาร: Tetrahedron (IF 2.641)

ปี: 2016 เล่มที่: 43 เลขที่: 72 หน้า: 6837-3842.
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - **เชิงวิชาการ**

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากพืชทั้ง 3 ชนิดทำให้ทราบว่ามีโครงสร้างที่หลากหลายและน่าสนใจหลายชนิด สารบริสุทธิ์ส่วนใหญ่ มีฤทธิ์ในการต้านมาลาเรีย จากองค์ความรู้นี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นยารักษาโรค หรือนำมาเป็นพื้นฐานในการค้นคว้างานวิจัยด้านนี้และร่วมมือกับหลายๆสาขาได้ต่อไป เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด