



รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การศึกษาทางพฤษเคมีของต้นข้าวหอม

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

615.323
22
ศ129ก

โดย

กนิต สุวรรณวิรัชย์
สุรตนา อำนวยผล

๗๗
๒-๐๘-๒๐

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ทฤษฎีรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาทางพฤกษเคมีของต้นข้าวหลาม

โดย

คณิต สุวรรณบริรักษ์

สุรัตนา อำนวยผล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมษายน 2539

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ในรูปของทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชประจำปีงบประมาณ 2538 (จำนวนเงิน 300,000 บาท)

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Professor John M. Cassady แห่ง College of Pharmacy, the Ohio State University ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และข้อมูล HR-MS และ NMR บางส่วน

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. Eric Hu ที่ให้ข้อมูล NMR บางส่วน และการทดลองในการเตรียมอนุพันธ์ mesitoates และ อนุพันธ์ Mosher esters



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ

การศึกษาทางพฤกษเคมีของต้นข้าวหลาม

ชื่อผู้วิจัย

นายคณิต สุวรรณบริรักษ์

นางสุรัตนา อำนวยผล

เดือนและปีที่วิจัยเสร็จ

เมษายน 2539

บทคัดย่อ

ได้ทำการสกัดแยกสารจากเปลือกต้นข้าวหลาม *Goniothalamus marcanii* Craib โดยใช้วิธีทางโครมาโทกราฟีควบคู่ไปกับผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ทำให้สามารถแยกสารได้ 4 กลุ่ม โดยการวิเคราะห์ข้อมูลจากสเปกโทรสโกปีเพื่อพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้ ทำให้ทราบว่าสารทั้ง 4 กลุ่มคือ 1-azaanthraquinones, flavanoids, triterpenoids และ mono-THF annonaceous acetogenins โดยที่สารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ที่แยกได้เป็นสารชนิดใหม่ 1 ชนิด คือ marcanine C ร่วมกับสารที่ทราบสูตรโครงสร้างแล้ว 2 ชนิด คือ marcanine A และ dielsiquinone ส่วนสารกลุ่ม flavanoids ที่แยกได้เป็นสารที่ทราบสูตรโครงสร้างแล้ว 1 ชนิด คือ pinocembrin ออกฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้น้อย ส่วนสารกลุ่ม triterpenoids แบบ cycloartane ซึ่งเป็นสารใหม่ 1 ชนิด คือ 21,23-epoxycycloart-24-ene-3-ol แต่ไม่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ส่วนสารกลุ่ม mono-THF annonaceous acetogenins ที่แยกได้เป็นสารผสมของ annonacin กับ สารชนิดใหม่คือ 16S,19S annonacin ซึ่งมี relative stereochemistry ที่วง tetrahydrofuran เป็นแบบ *erythro-trans-erythro* ซึ่งเป็นการค้นพบ relative stereochemistry แบบนี้เป็นครั้งแรกในสารกลุ่มนี้ การศึกษา relative และ absolute stereochemistry ของสารกลุ่มนี้ ทำได้โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางโปรตอนเอ็นเอ็นอาร์ ของอนุพันธ์ mesitoates และ อนุพันธ์ Mosher esters ตามลำดับ สารที่แยกได้ทุกชนิดยกเว้นสาร flavanoid และ triterpenoid มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคนในหลอดทดลองหลายชนิดอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า ED₅₀ ในระดับความเข้มข้น 10⁻¹-10⁻² มคก.ต่อมล.

Project Title

Phytochemical Study of *Goniothalamus marcanii* Craib

Name of the Investigator

Mr. Khanit Suwanborirux

Mrs. Surattana Amnuoyopol

Year

April 1996

Abstract

By means of the combination of chromatographic techniques and bioassay-directed fractionation led to the isolation of four groups of compounds from *Goniothalamus marcanii* stem bark. They are 1-azaanthraquinones, flavanoid, triterpenoid and mono-THF annonaceous acetogenins. Their chemical structures were elucidated mainly based on extensive analyses of spectroscopic data. One new 1-azaanthraquinone named marcanine C was isolated, in addition to two knowns, marcanine A and dielsiquinone. A known flavanoid named pinocembrin was slightly cytotoxic. A new cycloartane triterpenoid named 21,23-epoxycycloart-24-ene-3-ol, had no cytotoxic activity. The mono-THF annonaceous acetogenins were obtained as a mixture of two diastereomers which were annonacin and a new 16S,19S annonacin. The *erythro-trans-erythro* relative stereochemistry across the tetrahydrofuran ring in 16S,19S annonacin was the first report from this group. The relative and absolute stereochemistry of the isolated annonaceous acetogenins were determined by analyses of $^1\text{H-NMR}$ spectra of their mesitoates and Mosher esters derivatives, respectively. All of the isolated compounds except the flavonoid and triterpenoid were significantly cytotoxic against various types of human solid tumor cell lines with ED_{50} in the range of 10^{-1} - 10^{-2} $\mu\text{g/ml}$.

สารบัญ

| | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ | ii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | iv |
| สารบัญ | v |
| รายการตารางประกอบ | vii |
| รายการรูปประกอบ | ix |
| รายการแผนภูมิประกอบ | xiii |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| บทที่ 2 การสำรวจแนวคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 3 |
| สารกลุ่ม 1-azaanthraquinones | 3 |
| 1. การพบในธรรมชาติ | 3 |
| 2. ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones | 4 |
| สารกลุ่ม annonaceous acetogenins | 5 |
| 1. การพบในธรรมชาติ | 5 |
| 2. การแบ่งชนิดตามสูตรโครงสร้างทางเคมี | 5 |
| 3. ฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร annonaceous acetogenins | 8 |
| 4. ความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างและการออกฤทธิ์ | 10 |
| 5. สารกลุ่ม acetogenins จาก <i>Goniothalamus giganteus</i> Hook. f. & Thomas | 10 |
| บทที่ 3 วิธีการวิจัยและผลการวิจัย | 14 |
| วิธีการวิจัย | 14 |
| 1. การเก็บพืชเพื่อการวิจัย | 14 |
| 2. เทคนิคทั่วไป | 14 |
| 2.1 Thin layer chromatography (TLC) | 14 |
| 2.2 Column chromatography | 15 |
| 2.3 Spectroscopy | 15 |
| 2.4 การเตรียมอนุพันธ์ | 16 |
| 2.5 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ | 17 |
| ผลการวิจัย | 18 |
| 1. การเตรียมสารสกัดหยาบ | 18 |

| | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 2. การแยกสารจากสารสกัดต่างๆ ซึ่งควบคุมโดยการทดสอบการ ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioassay-directed fractionation) | 20 |
| 2.1 การแยกสาร NPK11916 | 24 |
| 2.2 การแยกสาร NPF2593 | 24 |
| 2.3 การแยกสาร NPF2611 และ NPF2833 | 24 |
| 2.4 การแยกสาร NPF1452 | 24 |
| 2.5 การแยกสาร NPK038-1 | 26 |
| 3. ข้อมูลทาง spectroscopy ของสารที่แยกได้ | 29 |
| 3.1 NPK11916 (marcanine A) | 29 |
| 3.2 NPF2611 (dielsiquinone) | 30 |
| 3.3 NPF2593 (marcanine C) | 31 |
| 3.4 NPF2833 (pinoembrin) | 32 |
| 3.5 NPF1452 (21, 23-epoxycycloart-24-ene,3-ol) | 32 |
| 3.6 NPK038-1 (สารผสม annonacin และ 16S,19S annonacin) | 33 |
| บทที่ 4 การอภิปรายและสรุปผล | 36 |
| การกำหนดสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้ | 36 |
| 1. NPK11916 (marcanine A) | 36 |
| 2. NPF2611 (dielsiquinone) | 40 |
| 3. NPF2593 (marcanine C) | 41 |
| 4. NPF2833 (pinoembrin) | 44 |
| 5. NPF1452 (21, 23-epoxycycloart-24-ene,3-ol) | 45 |
| 6. NPK038-1 (สารผสม annonacin และ 16S,19S annonacin) | 49 |
| การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้ | 57 |
| บทที่ 5 ข้อเสนอแนะ | 58 |
| เอกสารอ้างอิง | 59 |
| ภาคผนวก | 64 |

รายการตารางประกอบ

| ตารางที่ | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. แสดงฤทธิ์ในการฆ่า brine shrimp และ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ F 001 ถึง F 007 | 20 |
| 2. จำนวน fraction จากการสกัดแยก F006 | 21 |
| 3. การรวม fractions ที่ได้จาก F006 และ แสดงฤทธิ์ในการฆ่า brine shrimp และ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของแต่ละ fraction รวม | 22 |
| 4. แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของแต่ละ fraction ที่แยกได้จาก F 009 | 23 |
| 5. จำนวน fraction จากการสกัดแยก F013 และ F014 | 26 |
| 6. แสดงการรวม fraction ที่แยกได้จาก F013, F014 และฤทธิ์ในการฆ่า brine shrimp | 27 |
| 7. แสดงการรวม fraction ที่แยกได้จาก F024 ฤทธิ์ในการฆ่า brine shrimp และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคน | 27 |
| 8. แสดงข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์ของ ^1H (500 MHz) และ ^{13}C (125 MHz) ของสาร NPK038-1 และ NPK038-1 tetraacetate ใน CDCl_3 | 35 |
| 9. แสดงข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์ของ ^1H (500 MHz) และ ^{13}C (125 MHz), multiplicity, coupling constants (J, Hz), ^1H - ^1H และ long-range ^1H - ^{13}C correlations ของสาร NPK11916 ใน CDCl_3 | 39 |
| 10. เปรียบเทียบ δ_{H} , multiplicity (J, Hz) ของสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ที่แยกได้ | 42 |
| 11. เปรียบเทียบ δ_{C} ของสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ที่แยกได้ | 43 |
| 12. แสดงข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์ใน CDCl_3 ของ ^1H (500 MHz) และ ^{13}C (125 MHz) ของสาร NPF1452 และ ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับโปรตอน (^1H , ^1H -COSY), โปรตอนกับคาร์บอน ในสเปกตรัม HMBC | 47 |
| 13. ค่า exact mass และ elemental composition ของไอออนย่อยจาก สเปกตรัม HR EIMS ของ NPK038-1 และ NPK038-1-tetraacetate | 50 |

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 14. | แสดงการกำหนด relative stereochemistry ที่โปรตอน methine ของวง THF (C-16, C-19) และของหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ข้างเคียง (C-15, C-20) ของ NPK038-1-A1 | 53 |
| 15. | แสดงการกำหนด relative stereochemistry ที่โปรตอน methine ของวง THF (C-16, C-19) และของหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ข้างเคียง (C-15, C-20) ของ NPK038-1-A2 | 53 |
| 16. | แสดงการกำหนด absolute configuration ที่ C-4 ของ NPK038-1-A1, NPK038-1-A2 โดยเปรียบเทียบกับ annonacin | 55 |
| 17. | แสดงการกำหนด absolute configuration ที่ C-15 และ C-20 ของ NPK038-1-A1, NPK038-1-A2 โดยเปรียบเทียบกับ annonacin | 55 |
| 18. | แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งบางชนิดของคนของสารที่แยกได้ | 57 |



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

| รูปที่ | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. ตัวอย่างสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones | 4 |
| 2. กลุ่มย่อย A1–A5 ของสารกลุ่ม annonaceous acetogenins | 5 |
| 3. สูตรโครงสร้างพื้นฐานของสารกลุ่ม adjacent bis-THF annonaceous acetogenins | 6 |
| 4. สูตรโครงสร้างพื้นฐานของสารกลุ่ม mono-THF annonaceous acetogenins | 6 |
| 5. สูตรโครงสร้างพื้นฐานของสารกลุ่ม non-adjacent bis-THF annonaceous acetogenins | 7 |
| 6. สูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม non-THF annonaceous acetogenins | 7 |
| 7. สูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม adjacent tri-THF annonaceous acetogenins | 8 |
| 8. สาร annonaceous acetogenins ที่ได้จากเปลือกต้น <i>Goniothalamus giganteus</i> | 12 |
| 9. สเปกตรัมอุลตราไวโอเล็ตของสาร NPK11916 ใน ก. MeOH ข. MeOH + 2.5 N NaOH ค. MeOH + sodium acetate | 65 |
| 10. สเปกตรัมอินฟราเรดของสาร NPK11916 (KBr disc) | 66 |
| 11. แมสสเปกตรัมแบบ HREI ของสาร NPK11916 | 67 |
| 12. ก. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK11916 ใน CDCl ₃ | 68 |
| 12. ข. แสดง coupling diagram ของโปรตอนของสาร NPK11916 | 69 |
| 12. ค. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของสาร NPK11916 ใน D ₂ O | 70 |
| 13. ก. สเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (125 MHz) ของสาร NPK11916 ใน CDCl ₃ | 71 |
| 13. ข. สเปกตรัม DEPT 135 ของสาร NPK11916 ใน CDCl ₃ | 72 |
| 14. สเปกตรัม ¹ H, ¹ H COSY ของสาร NPK11916 | 73 |
| 15. ก. สเปกตรัม HSQC ของสาร NPK11916 | 74 |
| 15. ข. สเปกตรัม HSQC ของสาร NPK11916 (ขยาย) | 75 |
| 16. ก. สเปกตรัม HMBC (J = 8 Hz) ของสาร NPK11916 | 76 |
| 16. ข. สเปกตรัม HMBC (J = 8 Hz) ของสาร NPK11916 (ขยาย) | 77 |

| รูปที่ | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 17. สเปกตรัมอินฟราเรดของสาร NPF2611 (film) | 78 |
| 18. แมสสเปกตรัมแบบ HREI ของสาร NPF2611 | 79 |
| 19. ก. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPF2611 ใน CDCl ₃ | 80 |
| 19. ข. แสดง coupling diagram ของโปรตอน ของสาร NPF2611 | 81 |
| 20. สเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (125 MHz) ของสาร NPF2611 ใน CDCl ₃ | 82 |
| 21. สเปกตรัมอุลตราไวโอเล็ตของสาร NPF2593 ใน ก. MeOH ข. MeOH + 2.5 N NaOH ค. MeOH + sodium acetate | 83 |
| 22. สเปกตรัมอินฟราเรดของสาร NPF2593 (KBr disc) | 84 |
| 23. แมสสเปกตรัมแบบ HREI ของสาร NPF2593 | 85 |
| 24. ก. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPF2593 ใน CDCl ₃ | 86 |
| 24. ข. แสดง coupling diagram ของโปรตอน ของสาร NPF2593 | 87 |
| 25. ก. สเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (125 MHz) ของสาร NPF2593 ใน CDCl ₃ | 88 |
| 25. ข. สเปกตรัม DEPT 135 ของสาร NPF2593 | 89 |
| 26. สเปกตรัม ¹ H, ¹ H COSY ของสาร NPF2593 | 90 |
| 27. ก. สเปกตรัม ¹³ C, ¹ H COSY ของสาร NPF2593 | 91 |
| 27. ข. สเปกตรัม ¹³ C, ¹ H COSY ของสาร NPF2593 (ขยาย) | 92 |
| 28. ก. สเปกตรัม COLOC ของสาร NPF2593 | 93 |
| 28. ข. สเปกตรัม COLOC ของสาร NPF2593 (ขยาย) | 94 |
| 29. สเปกตรัม NOE ของสาร NPF2593 เมื่อ irradiate ที่ 4.85 ppm | 95 |
| 30. เปรียบเทียบสเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ที่แยกได้ | 96 |
| 31. เปรียบเทียบสเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ของสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ที่แยกได้ | 97 |
| 32. สเปกตรัมอินฟราเรดของสาร NPF2833 (KBr disc) | 98 |
| 33. แมสสเปกตรัมแบบ HREI ของสาร NPF2833 | 99 |
| 34. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPF2833 ใน CDCl ₃ | 100 |
| 35. สเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (125 MHz) ของสาร NPF2833 ใน CDCl ₃ | 101 |

| | | |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 36. | สเปกตรัมอินฟราเรดของสาร NPF1452 (film) | 102 |
| 37. | แมสสเปกตรัมแบบ HREI ของสาร NPF 1452 | 103 |
| 38. | สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPF1452 ใน CDCl ₃ | 104 |
| 39. | สเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (125 MHz) ของสาร NPF1452 ใน CDCl ₃ | 105 |
| 40. | สเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ DEPT 135 ของสาร NPF1452 ใน CDCl ₃ | 106 |
| 41. | สเปกตรัม ¹ H, ¹ H COSY ของสาร NPF1452 ใน CDCl ₃ | 107 |
| 42. | สเปกตรัม ¹³ C, ¹ H COSY ของสาร NPF1452 ใน CDCl ₃ | 108 |
| 43. | สเปกตรัม HMBC ของสาร NPF1452 ใน CDCl ₃ | 109 |
| 44. | สเปกตรัมอุลตราไวโอเล็ต ของสารผสม NPK038-1 (ใน MeOH) | 110 |
| 45. | สเปกตรัมอินฟราเรด ของสารผสม NPK038-1 (KBr disc) | 111 |
| 46. | แมสสเปกตรัมแบบ FAB ของสาร NPK038-1 | 112 |
| 47. | แมสสเปกตรัมแบบ HREI ของสาร NPK038-1 | 113 |
| 48. | ก. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK 038-1 ใน CDCl ₃ | 114 |
| 48. | ข. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของสาร NPK 038-1 เปรียบเทียบกับ annonacin | 115 |
| 49. | ก. สเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (125 MHz) ของสาร NPK038-1 ใน CDCl ₃ | 116 |
| 49. | ข. สเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ของสาร NPK038-1 เปรียบเทียบกับ annonacin | 117 |
| 50. | สเปกตรัม ¹ H, ¹ H COSY ของสาร NPK038-1 | 118 |
| 51. | ก. สเปกตรัม ¹³ C, ¹ H COSY ของสาร NPK038-1 | 119 |
| 51. | ข. สเปกตรัม ¹³ C, ¹ H COSY ของสาร NPK038-1 (ขยาย) | 120 |
| 52. | แมสสเปกตรัมแบบ FAB ของสาร NPK038-1 tetraacetate | 121 |
| 53. | แมสสเปกตรัมแบบ HREI ของสาร NPK038-1 tetraacetate | 122 |
| 54. | สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1 tetraacetate | 123 |
| 55. | สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A1 mesitoate ใน C ₆ D ₆ | 124 |
| 56. | สเปกตรัม ¹ H, ¹ H COSY (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A1 mesitoate ใน C ₆ D ₆ | 125 |

| รูปที่ | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 57. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A2 mesitoate ใน C_6D_6 | 126 |
| 58. สเปกตรัม $^1H, ^1H$ COSY ((500 MHz) ของสาร NPK038-1-A2 mesitoate ใน C_6D_6 | 127 |
| 59. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A1 per-(R)-MTPA ester ใน $CDCl_3$ | 128 |
| 60. สเปกตรัม $^1H, ^1H$ COSY (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A1 per-(R)-MTPA ester ใน $CDCl_3$ | 129 |
| 61. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A1 per-(S)-MTPA ester ใน $CDCl_3$ | 130 |
| 62. สเปกตรัม $^1H, ^1H$ COSY (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A1 per-(S)-MTPA ester ใน $CDCl_3$ | 131 |
| 63. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A2 per-(R)-MTPA ester ใน $CDCl_3$ | 132 |
| 64. สเปกตรัม $^1H, ^1H$ COSY (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A2 per-(R)-MTPA ester ใน $CDCl_3$ | 133 |
| 65. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A2 per-(S)-MTPA ester ใน $CDCl_3$ | 134 |
| 66. สเปกตรัม $^1H, ^1H$ COSY (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A2 per-(S)-MTPA ester ใน $CDCl_3$ | 135 |

รายการแผนภูมิประกอบ

| แผนภูมิที่ | | หน้า |
|------------|-------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. | การเตรียมสารสกัดหยาบจากเปลือกต้นข้าวหลาม | 19 |
| 2. | แสดงการแยกสาร NPK11916, NPF2611, NPF2593, NPF2833, และ NPF1452 จาก F009 | 25 |
| 3. | แสดงการแยกสาร NPK038-1 จาก F013 และ F014 | 28 |
| 4. | แสดงการแตกเป็นไอออนย่อยใน HR EIMS ของ NPK038-1 และอนุพันธ์ tetraacetate | 51 |



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทที่ 1

บทนำ

ต้นข้าวหลามมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Goniothalamus marcanii* Craib เป็นพืชในวงศ์ Annonaceae พบได้ในภาคใต้เหนือ และตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (เต็ม สมิตินันท์, 1980)

ต้นข้าวหลามเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กสูง 3-7 เซนติเมตร เปลือกต้นสีน้ำตาล มีช่องอากาศกระจายอยู่เล็กน้อย ใบเรียงสลับกัน เป็นใบเดี่ยว มีลักษณะยาวรี ใบคล้ายหนัง ปลายใบสั้นแหลมฐานใบค่อนข้างแหลม ก้านใบสีน้ำตาลมีขนสั้น นุ่ม มีเส้นใบ 9-18 คู่ เป็นลายร่างแหบาง ๆ หรือมองไม่เห็น ยาว 11-15 เซนติเมตร ดอกเดี่ยว ออกตามซอกใบ มี 2 เพศ สีเขียว ก้านดอกย่อยมีใบประดับที่ฐานยาว 1-5 เซนติเมตร มีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ รูปไข่ หรือแหลม มีกลีบดอก 6 กลีบ เป็น 2 วง อยู่ใต้รังไข่ เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก รังไข่มีจำนวนมาก เมล็ดมี 2 เมล็ด (Royal Botanic Gardens, Kew, 1922 และ Sinclair, 1955)

พืชสกุล *Goniothalamus* มีทั้งหมด 11 ชนิด พบกระจายอยู่ในอินเดียตะวันออกเฉียงใต้ ศรีลังกา พม่า ไทย อินโดจีน มาเลเซีย นิวกินีเหนือ และฟิลิปปินส์ (Sinclair, 1955) ในประเทศไทย พบพืชสกุลนี้ 10 ชนิด (Craib, 1931 และ เต็ม สมิตินันท์, 1980) คือ

- G. calvicarpa* Craib
- G. expansus* Craib จำปูน (ชุมพร นครศรีธรรมราช)
- G. giganteus* Hook-f&th. ป่าหนันช้าง (ตรัง)
- G. griffithii* Hook-f&th. สะบั้งงาป่า (เชียงใหม่) หนังกัดตัวผู้ (น่าน)
- G. macrophyllus* Hook-f&Th. ราชครูดำ (ปัตตานี)
- G. marcanii* Craib ข้าวหลาม (หนองคาย)
- G. saigoneusis* Pierre ex Finet&Gognep.
- G. subevenius* King.
- G. tapis* Miq., บูหงาลำเจียก (กรุงเทพมหานคร)
- G. undulatus* Ridl. ส่าเหล้าต้น (ระนอง)

จากงานวิจัยเบื้องต้นของเราในการตรวจหาพิษพันธ์ต่าง ๆ ที่มีสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกต้นข้าวหลาม (*Goniothalamus marcanii* Craib) ที่เก็บจากอำเภอ ภูเรือ จังหวัดเลย เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ฆ่า brine shrimp (BST) และการออกฤทธิ์ความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็งของคนหลายชนิด พบว่าออกฤทธิ์ได้ดีมาก โดยที่สารสกัดด้วยเมทานอล ให้ผลต่อ BST มีค่า $LD_{50} = 3$ มคก./มล. ให้ผลความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคนหลายชนิด คือ เซลล์มะเร็งปอด (A549) มีค่า $ED_{50} = 2$ มคก./มล. เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) มีค่า $ED_{50} = 9$ มคก./มล. เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7) มีค่า $ED_{50} = 0.05$ มคก./มล. เซลล์มะเร็งเม็ดสีที่ผิวหนัง (RPMI) มีค่า $ED_{50} = 10$ มคก./มล. และ เซลล์มะเร็งสมอง (U251) มีค่า $ED_{50} = 3$ มคก./มล. จากการตรวจสอบเบื้องต้นนี้ที่พบฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และเนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาพิษชนิดนี้มาก่อน ทำให้ผู้วิจัยสนใจเลือกที่จะทำการศึกษาทางพิษวิทยาของพิษชนิดนี้โดยมีวัตถุประสงค์ของงานวิจัยดังนี้ คือ

1. เพื่อทำการสกัดแยกสารเคมีจากเปลือกต้นข้าวหลาม
2. เพื่อทำการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้
3. เพื่อทำการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองของสารที่แยกได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รายงานทางพฤกษเคมีของพืชในวงศ์ Annonaceae ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1982 ได้มีการรวบรวมโดย Leboeuf และคณะ (1982) พบว่าพืชในวงศ์นี้สามารถผลิตสารได้หลายกลุ่ม ได้แก่ สารกลุ่ม alkaloids, carbohydrates, lipids, amino acids, proteins, polyphenols, essential oils, terpenes และ aromatic compounds ส่วนการศึกษาทางพฤกษเคมีของพืชในสกุล *Goniothalamus* ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเฉพาะใน *G. giganteus* Hookf&Th., และ *G. scortechinii* King เท่านั้น ส่วนต้นข้าวหลามยังไม่มีรายงานการวิจัย สารเคมีส่วนใหญ่ที่พบในพืชสกุลนี้ ได้แก่ สารพวก 1-azaanthraquinones, aceto- genins และ styryllactones

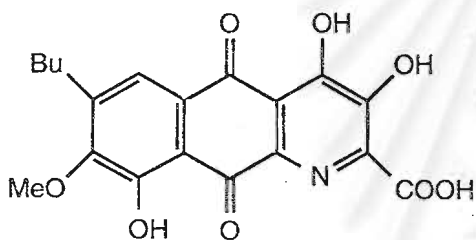
สารกลุ่ม 1- azaanthraquinones

1. การพบในธรรมชาติ

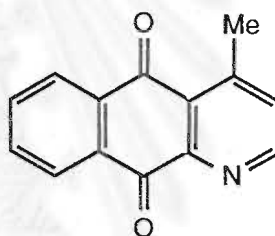
สาร 1- azaanthraquinones อาจจัดเป็นสารกลุ่ม quinones หรือ alkaloids ก็ได้ เป็นสารที่ไม่ค่อยพบมากนักในธรรมชาติ สารธรรมชาติชนิดแรกที่พบ คือ phomazarin ซึ่งแยกได้จากเส้นใยของรา *Phoma terrestris* Hansen (*Pyrenochaeta terrestris* Hansen) ซึ่งเป็นราที่ทำให้เกิดโรค "pinkroot" ในหัวหอม (Birch และคณะ, 1979) ส่วนในพืชชั้นสูงนั้นพบสารกลุ่มนี้เฉพาะในวงศ์ Annonaceae ได้แก่ สาร cleistopholine ซึ่งได้จากเปลือกรากของ *Cleistopholis patus* (Benth) Engl. & Diels. (Waterman & Muhammad, 1985), *Annona hayesii* Saff. (Rasamizafy และคณะ, 1987) และจากเปลือกต้นของ *Meiogyne virgata* (Tadic และคณะ, 1987) สาร dielsiquinone จากเนื้อไม้ของ *Guatteria dielsiana* (Goulart และคณะ, 1986) และสาร scorazanone จากรากของ *G. scortechinii* King (Din, Colegate&Razak, 1990)

2. ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones

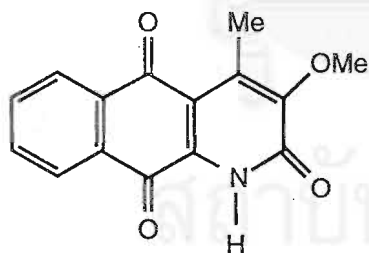
ในปี 1989 Konoshima และคณะ ได้ทำการตรวจสอบสารพวก quinones กลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ anthraquinones, naphthoquinones, azaanthraquinones, azaflorenones และสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งต่อ Epstein-Barr Virus Early Antigen (EBV-EA) โดยการเหนี่ยวนำด้วย 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ใน Raji cell เพื่อหาสารที่ยับยั้งการเป็น tumor promoters ผลการตรวจสอบพบว่า สาร naphthoquinones ที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้สูงมากเป็น 10 เท่าของสารกลุ่ม anthraquinones และ azaanthraquinones และจากการศึกษาสรุปได้ว่าสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones เมื่อมีหมู่ไฮดรอกซิล ที่คาร์บอนที่ 5 และ/หรือคาร์บอนที่ 8 จะเพิ่มฤทธิ์การยับยั้ง ถ้ามีการ methylation ของหมู่ไฮดรอกซิล จะทำให้ลดฤทธิ์การยับยั้ง ส่วนหมู่ methyl เมื่อเข้าแทนที่ในวง pyridine ของ 1-azaanthraquinones จะไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์



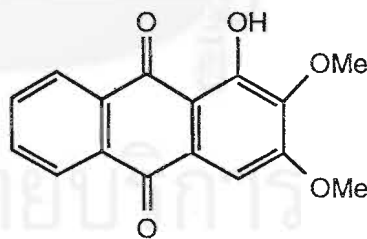
Phomazarin



Cleistopholine



Dielsiquinone



Scorazanone

รูปที่ 1. ตัวอย่างสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones

สารกลุ่ม Annonaceous acetogenins

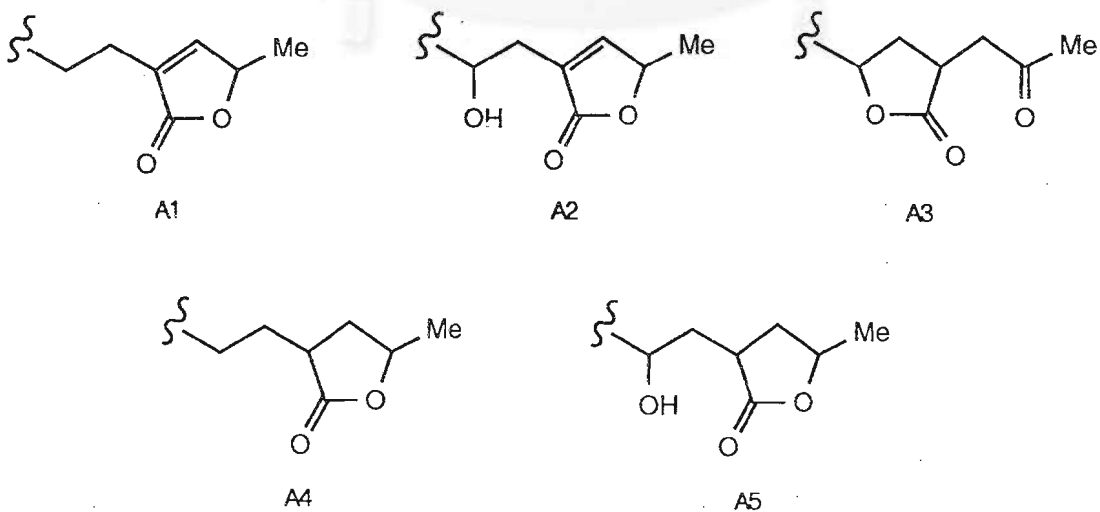
สารกลุ่มนี้เป็นอนุพันธ์ของ polyketides ประกอบไปด้วยวง tetrahydrofuran (THF) และ methylated γ -lactone (บางครั้งมีการจัดเรียงเป็น methyl ketolactone) มีหมู่ไฮดรอกซิล, อาเซโตซิล และ/หรือ คีโตซิล หลายหมู่แทนที่ใน hydrocarbon chain ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา ได้มีการแยกสารใหม่ในกลุ่มนี้ประมาณมากกว่า 90 ชนิด สารเหล่านี้ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้กว้างมาก ตัวอย่าง เช่น ออกฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์, ฤทธิ์ต้านเนื้องอก, ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย, ฤทธิ์ต้านจุลชีพ, ฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน, สารฆ่าศัตรูพืชและสัตว์ (pesticidal) เป็นต้น สารบางชนิดได้จัดลิขสิทธิ์เป็นสารเคมีบำบัดมะเร็ง เช่น bullatacin และ bullatacinone จัดลิขสิทธิ์ในสหรัฐอเมริกา, สาร squamostatin A และอนุพันธ์จัดลิขสิทธิ์ในญี่ปุ่น รวมทั้ง annonins จัดลิขสิทธิ์เป็นยาฆ่าแมลงในสหรัฐอเมริกาด้วย

1. การพบในธรรมชาติ

สารพวก acetogenins ที่พบในวงศ์ Annonaceae ได้มีการศึกษาในสกุล *Annona*, *Asimina*, *Goniothalamus*, *Rollinia*, *Uvaria* และ *Xylopia* (Alkofahi และคณะ 1988; 1990; Rupprecht, Hui and McLaughlin, 1990; Fang และคณะ, 1991, 1992a, 1992b, 1993; Colman-Saizarbitoria และคณะ, 1994; Colman-Saizarbitoria, Gu and McLaughlin 1994, Gu และคณะ, 1994)

2. การแบ่งชนิดตามสูตรโครงสร้างทางเคมี

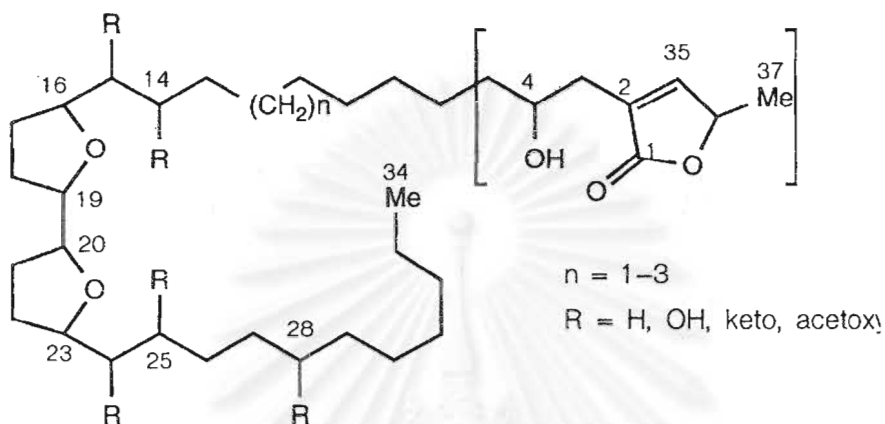
สาร acetogenins สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มตามจำนวนและการจัดเรียงของวง THF แต่ละกลุ่มอาจแบ่งเป็นกลุ่มย่อย (subtypes) ได้เป็น 5 กลุ่มย่อย ตามโครงสร้างของวง γ -lactone เรียกว่ากลุ่มย่อย A1-A5 (Cave และคณะ, 1993)



รูปที่ 2 กลุ่มย่อย A1-A5 ของสารกลุ่ม annonaceous acetogenins

2.1 Adjacent bis-THF annonaceous acetogenins

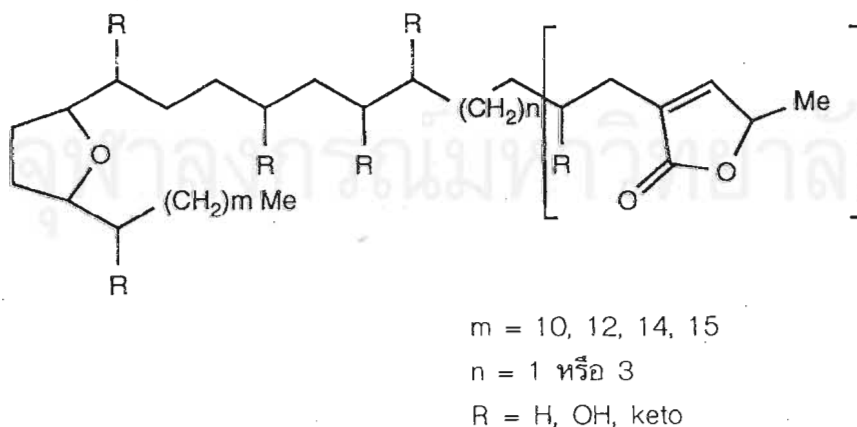
สาร acetogenins ที่มีวง THF 2 วง อยู่ติดกัน เป็นสารกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด โดยมีสูตรโครงสร้างแตกต่างกันไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ จำนวนหรือตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล จำนวนคาร์บอน (C35 หรือ C37) ตำแหน่งของวง THF และ stereochemistry บริเวณรอบ ๆ วง THF



รูปที่ 3 : สูตรโครงสร้างพื้นฐานของสารกลุ่ม adjacent bis-THF annonaceous acetogenins

2.2 Mono-THF annonaceous acetogenins

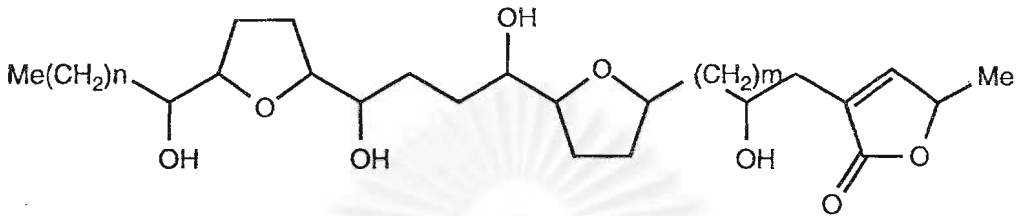
สารประกอบกลุ่มนี้จะมียวง THF 1 วง แต่จะแตกต่างกันที่ จำนวนและตำแหน่งของ หมู่ไฮดรอกซิล ความยาวของสายโซ่คาร์บอน (C35 ถึง C39) ชนิดของวง γ -lactone รวมทั้ง จำนวนและตำแหน่งของหมู่คีโตน พันธะคู่ และ/หรือตำแหน่งของวง THF ในสายโซ่คาร์บอน



รูปที่ 4 : สูตรโครงสร้างพื้นฐานของสารกลุ่ม mono-THF annonaceous acetogenins

2.3 Non-adjacent bis-THF annonaceous acetogenins

สารกลุ่มนี้จะมียัง THF 2 วง แยกออกจากกันด้วย 4 คาร์บอน วง γ -lactone ในส่วนปลายที่พบได้ในสารกลุ่มนี้มี 4 ชนิด คือ A1-3 และ A5 สารประกอบกลุ่มนี้จะมียังหมู่ไฮดรอกซิล 3 หรือ 4 หมู่อยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ กัน และประกอบไปด้วย คาร์บอน 37 อะตอม



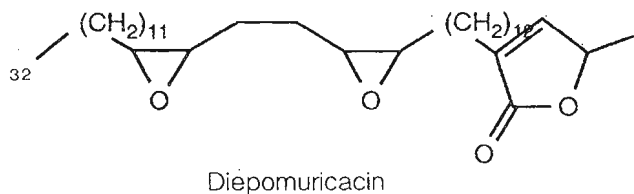
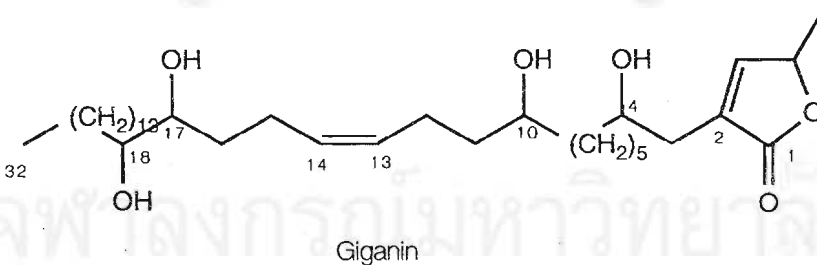
$$m = 5 \text{ หรือ } 7$$

$$n = 9 \text{ หรือ } 11$$

รูปที่ 5 : สูตรโครงสร้างพื้นฐานของสารกลุ่ม non-adjacent bis-THF annonaceous acetogenins

2.4 Non-THF annonaceous acetogenins

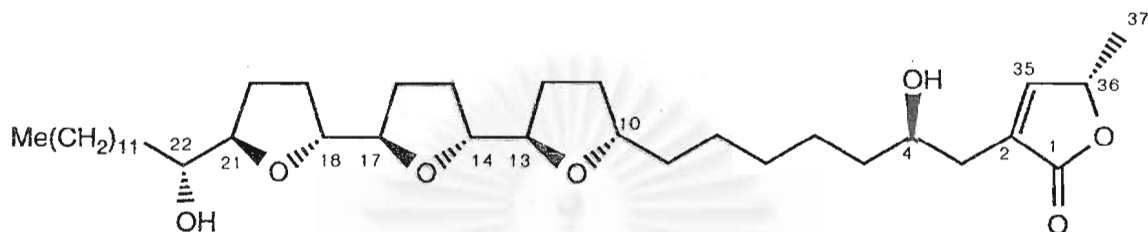
สาร acetogenins ในกลุ่มนี้ จะมีส่วนของวง α , β -unsaturated γ -lactone อยู่ที่ด้านปลาย และไม่มีวง THF อยู่ แต่สารในกลุ่มนี้จะมีหมู่ epoxide หรือพันธะคู่ อยู่ในสายโซ่ สารเหล่านี้อาจเป็นสารตั้งต้นในขบวนการชีวสังเคราะห์ของสาร acetogenins ในกลุ่มอื่น ๆ (Rupprecht, Hui and McLaughlin, 1990; Fang และคณะ, 1993; Cave และคณะ, 1993)



รูปที่ 6 : สูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม non-THF annonaceous acetogenins

2.5 Adjacent tri-THF annonaceous acetogenins

สาร goniocin ยังเป็นสารเพียงสารชนิดเดียวที่ประกอบไปด้วยวง THF 3 วง เรียงต่อเนื่องกัน สารนี้ในธรรมชาติได้เคยถูกทำนายไว้แล้วโดยอาศัย biogenetic pathway (Gu และคณะ, 1994)



Goniocin

รูปที่ 7 : สูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม adjacent tri-THF annonaceous acetogenins

3. ฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร annonaceous acetogenins

พืชในวงศ์ Annonaceae รวมทั้งสารสกัดที่ได้จากพืชในวงศ์นี้หลายชนิดได้ถูกใช้เป็นยาพื้นบ้านเพื่อฆ่าแมลง ใช้เป็นสารต้านเนื้องอก, ทำให้อาเจียน ฯลฯ และต่อมาพบว่าฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่างในยาพื้นบ้านนั้นเกิดจากสารกลุ่ม acetogenins

3.1. ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและฤทธิ์ต้านเนื้องอก

จากการตรวจสอบด้วยเซลล์มะเร็งของคนพบว่า สาร acetogenins ส่วนใหญ่มีการออกฤทธิ์ที่คล้ายคลึงกัน สารหลายชนิดมีค่า GI₅₀ (ความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับ control) ที่ใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 10⁻⁵ ถึง 10⁻⁷ มคก./มล. โดยที่สารกลุ่ม bis-THF acetogenins ที่แยกได้จาก *Annona bullata* และ *Asimina triloba* ออกฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ได้สูงมาก มีค่า ED₅₀ อยู่ในช่วง 10⁻¹² มคก./มล. (Hui, Rupprecht, Liu และคณะ, 1989; Hui, Rupprecht, Anderson และคณะ, 1989; Gu, Fang Rieser และคณะ, 1993b; Gu, Fang, Zeng และคณะ, 1993; Gu Fang, Miesbauer และคณะ, 1993a; Rupprecht และคณะ, 1986; Zhao และคณะ, 1992; 1993; 1994) โดยเฉพาะสาร bullatacin, asimicin และ asimicin ออกฤทธิ์ได้ดีในเซลล์มะเร็งของลำไส้ใหญ่ (HT-29) ส่วนสาร annonacin และ gigantecin มีรายงานว่า ออกฤทธิ์ต้านการแบ่งเซลล์ (antimitotic) (9ASK, astrocytoma reversal) โดยการยับยั้ง tubulin ถึงแม้ว่า annonacin ไม่สามารถจับกับ tubulin ได้โดยตรง (Rupprecht และคณะ, 1990)

สาร acetogenins หลายชนิด เช่น bullatacin, bullatacinone bullatalicinone และ squamocin ได้รับการตรวจสอบแล้วว่ามียฤทธิ์ต้านเนื้องอกในสัตว์ทดลอง ผลการตรวจสอบต่อ L1210 murine leukemia พบว่าสาร bullatacin และ bullatacinone ออกฤทธิ์ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยออกฤทธิ์แรงเป็น 300 และ 40 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสาร taxol สารทั้งสองได้รับการจดลิขสิทธิ์ในสหรัฐอเมริกา เพื่อใช้เป็นสารเคมีบำบัดมะเร็ง ส่วนในญี่ปุ่นได้จดลิขสิทธิ์ squamostatin A และอนุพันธ์ จากการตรวจสอบด้วย Ames test กับสารที่แยกได้จาก *Asimina triloba* พบว่าไม่มีฤทธิ์เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) จึงคาดว่าสาร acetogenins ไม่เป็นสารก่อมะเร็ง ซึ่งเป็นข้อดีกว่ายาต้านเนื้องอกอีกหลายชนิดในปัจจุบัน (Fang และคณะ, 1993)

3.2 ฤทธิ์ต้านปรสิต (antiparasite)

สารกลุ่ม acetogenins ได้แก่ สาร cherimolin, dihydrocherimolin ซึ่งแยกได้จาก *Annona cherimolia* สาร annonacin, annonacinone, murisolin, corossolin และ corossolone จาก *A. muricata* สารเหล่านี้ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรคเท้าช้าง (filaricides) *Molinema dessetae* โดยมีค่า LD₅₀ ระหว่าง 0.37 ถึง 0.60 มก./มล.

สาร asimicin, annonacin, goniotalamicin มีฤทธิ์ต้านมาเลเรีย มีความแรงเท่ากับหรือมากกว่า tetracycline ในกรณีของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่ดื้อต่อยา (Indochina W-2 และ Sierra Leone D-6) (Rupprecht และคณะ, 1990)

3.3 ฤทธิ์ฆ่าศัตรูพืชและสัตว์ (pesticidal activity)

สาร asimicin เป็นสารชนิดแรกในกลุ่ม acetogenins ที่มีการทดสอบฤทธิ์ฆ่าศัตรูพืช ต่อมาพบสารในกลุ่มนี้อีกอีกหลายชนิด ได้แก่ bullatacin, annonin VI, annonacin, goniotalamicin และ sylvaticin annonin (squamocin) และ neoannonin มีฤทธิ์ในการฆ่าไข่ และดักแด้ ใน *Drosophila* feeding test. แต่สารพวก ketolactones เช่น bullatacinone ไม่ออกฤทธิ์ในขนาดของสารระดับเดียวกัน แสดงว่าวง γ -lactone ในส่วนปลายมีบทบาทที่สำคัญต่อฤทธิ์ฆ่าศัตรูพืชและสัตว์ของสารกลุ่ม acetogenins (Rupprecht และคณะ 1990) นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกต้น *Asimina triloba* และจากเมล็ดของ *Annona muricata* ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นสารกลุ่ม acetogenins มีฤทธิ์อย่างแรงในการทำลายแมลงขนาดเล็ก เช่น aphids, white flies และแมลงเต่าทองพันธุ์ Colorado potato และยังพบว่ามีฤทธิ์เสริมกันได้ดี ระหว่างสารสกัดที่มีสาร azadarachtin อยู่ด้วย ซึ่งนำไปสู่สูตรผสมใหม่ของยาที่ใช้ฆ่าศัตรูพืช และสัตว์ได้ดี (Fang และคณะ 1993)

4. ความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างและการออกฤทธิ์

Rupprecht และคณะ (1990) และ Fang และคณะ (1993) ได้รวบรวมความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร annonaceous acetogenins ซึ่งจากการศึกษาพบว่า การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเหล่านี้ขึ้นอยู่กับจำนวนวง THF กล่าวคือ สารประกอบที่มีวง THF 2 วง อยู่ชิดกันออกฤทธิ์ได้แรงกว่าสารประกอบที่มีวง THF อยู่ไม่ชิดกัน แต่สารทั้ง 2 กลุ่มนี้ยังออกฤทธิ์ได้แรงกว่าสารประกอบที่มี THF วงเดียว ส่วนสารที่ไม่มีวง THF เลยจะมีฤทธิ์น้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า วง γ -lactone ในส่วนปลายของโมเลกุล ก็มีความจำเป็นต่อการออกฤทธิ์ โดยเมื่อทำการ reduction ต่อพันธะคู่ในวง α, β -unsaturated γ -lactone จะลดการออกฤทธิ์ ส่วนสารที่เป็น ketolactone (A3) type จะมีฤทธิ์น้อยกว่าสารที่มีวง α, β -unsaturated γ -lactone ส่วนหมู่ ketone ในวง γ -lactone นั้นเมื่อถูก reduced ยังทำให้มีฤทธิ์อยู่บ้าง ส่วนหมู่ไฮดรอกซิลในสายโซ่ของโมเลกุล ก็มีความสำคัญมากต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 มีผลทำให้ฤทธิ์เพิ่มขึ้น สารประกอบที่มีหมู่ ketone ในสายโซ่ของโมเลกุลจะมีฤทธิ์น้อยกว่าสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเนื่องจากเมื่อทำการ reduction หมู่ carbonyl ไปเป็น alcohol จะทำให้ฤทธิ์เพิ่มขึ้น การมีพันธะคู่ และหรือ vicinal diol ในสายโซ่ของโมเลกุล ทำให้มีฤทธิ์เพิ่มขึ้น โดยพบว่าอนุพันธ์ acetonide ของ vicinal diols, อนุพันธ์ acetate และการเข้าแทนที่หมู่ไฮดรอกซิลทำให้สารประกอบมีฤทธิ์น้อยกว่าสารประกอบตั้งต้น แต่อย่างไรก็ตามบทบาทของ stereochemistry ต่อการออกฤทธิ์ยังไม่ชัดเจนนัก โดยพบว่าสาร diastereomers ของ asimicin ได้แก่ rolliniastatins 1 และ 2, 4-hydroxy-25-desoxyneorollinacin และ bullatacin มีความแรงในการออกฤทธิ์แตกต่างกัน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลง stereochemistry ของ chiral center อาจมีผลทำให้ฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นมากกว่าล้านเท่า

5. สารกลุ่ม acetogenins จาก *Goniothalamus giganteus* Hook. f. & Thomas

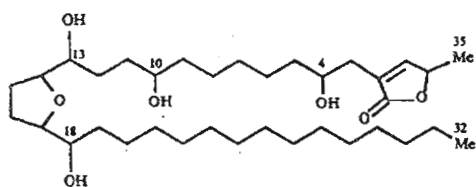
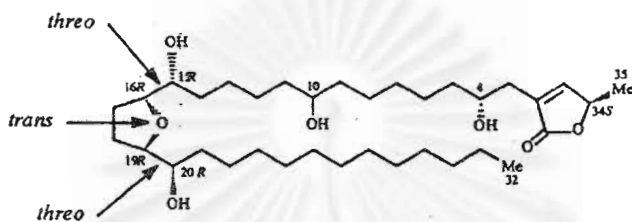
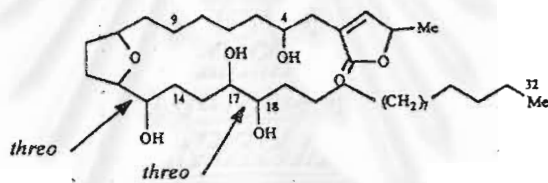
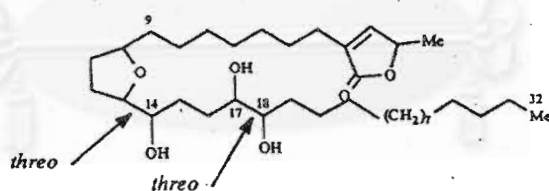
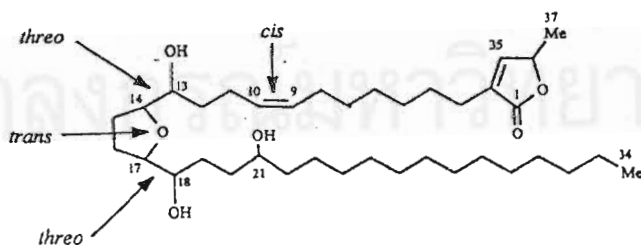
นักวิจัยกลุ่มของ McLaughlin ได้ทำการแยกสาร annonaceous acetogenins จากเปลือกต้น *G. giganteus* Hook f.&Th. จากประเทศไทย ซึ่งเป็นสารกลุ่ม mono-THF 8 ชนิด คือ goniothalamycin, annonacin (Alkofahi และคณะ, 1988), gigantetrocin, gigantriocin (Fang และคณะ, 1991), giganenin (Fang, Anderson, Smith, Wood และคณะ, 1992b), gigantetronenin, gigantronenin และ annomontacin (Fang, Anderson, Smith, McLaughlin และคณะ, 1992a) เป็นสารกลุ่ม non-adjacent bis-THF ได้ 2 ชนิด คือ gigantecin (Alkofahi และคณะ, 1990) และ 4-deoxygigantecin (Fang, Anderson, Smith, Wood และคณะ, 1992b) และเป็นสารกลุ่มใหม่ tri-THF 1 ชนิด คือ gonycin (Gu และคณะ, 1994) ซึ่งแสดงโครงสร้างไว้ในรูปที่ 8

annonacin มี absolute configuration ที่ C-15 และ C-20 เป็น R (Rieser และคณะ, 1991) ส่วน absolute stereochemistry ของ goniocin คือ 4R, 10S, 13R, 14R, 17R, 18R, 21R, 36S ซึ่งทำการพิสูจน์โดยการเตรียมเป็นอนุพันธ์ Mosher ester (MTPA) (Gu และคณะ, 1994) สารเหล่านี้ออกฤทธิ์ฆ่าศัตรูพืชและสัตว์ และเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่มีความแรงสูง

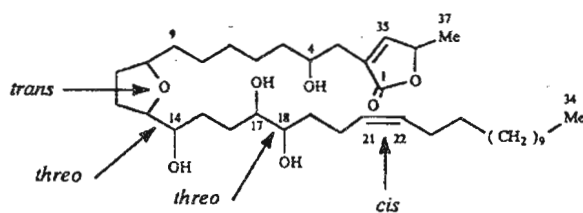
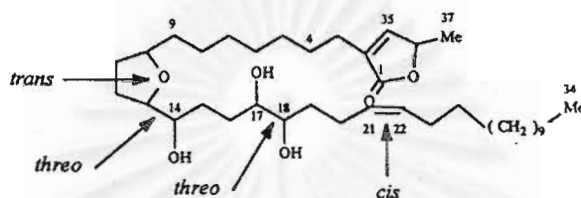
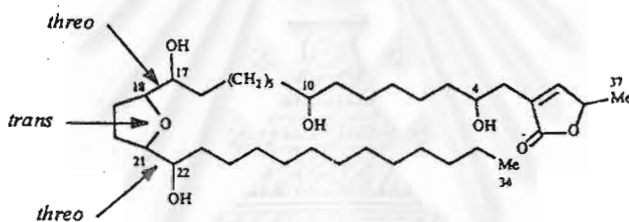
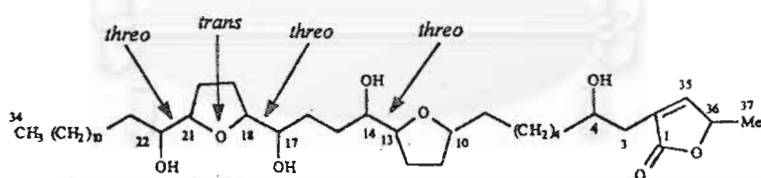
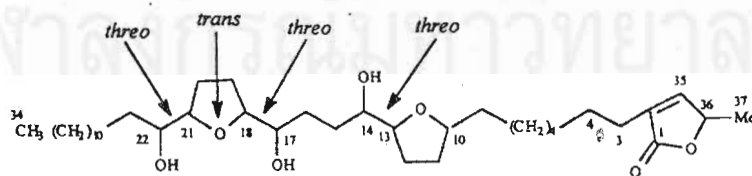
gigantecin และ giganenin ซึ่งเป็นสารที่มี mono-THF และมีพันธะคู่อยู่ในสายไซโมเลกุล จะออกฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ที่มีฤทธิ์มากที่สุด สาร gigantecin ออกฤทธิ์แรงมาก และยังมีความเฉพาะเจาะจงต่อ เซลล์มะเร็งของปอด (A-549) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยมีค่า ED₅₀ ประมาณ 10^{-7} ถึง 10^{-9} มคก./มล. ส่วนสาร giganenin มีค่า ED₅₀ ประมาณ 10^{-7} - 10^{-8} มคก./มล. สาร gigantetrocin, gigantetronenin, gigantrionenin, annomontacin และ annonacin ออกฤทธิ์ปานกลาง มีค่า ED₅₀ ประมาณ 10^{-3} มคก./มล. สาร gigantriocin และ 4-deoxygigantecin ออกฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ได้ดีที่สุด คือ มีค่า ED₅₀ ประมาณ 10^{-1} มคก./มล. จากข้อมูลต่าง ๆ พอสรุปได้ว่าสารที่เป็นพวก non-adjacent bis-THF acetogenins จะมีฤทธิ์แรงกว่าพวกที่เป็น mono-THF acetogenins การมีพันธะคู่ในสายไซโมเลกุลจะทำให้ฤทธิ์เพิ่มขึ้น และการมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 4 มีความสำคัญมากต่อการทำให้ฤทธิ์เพิ่มขึ้น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. Goniiothalamycin ($C_{35}H_{64}O_7$, MW 596)2. Annonacin ($C_{35}H_{64}O_7$, MW 596)3. Gigantetrocin ($C_{35}H_{64}O_7$, MW 596)4. Gigantriocin ($C_{35}H_{64}O_6$, MW 580)5. Giganenin ($C_{37}H_{60}O_6$, MW 606)

รูปที่ 8. สาร annonaceous acetogenins ที่ได้จากเปลือกต้น *Goniiothalamus giganteus*

6. Gigantetronenin (C₃₇H₆₆O₇, MW 622)7. Gigantrionenin (C₃₇H₆₆O₆, MW 606)8. Annomontacin (C₃₇H₆₂O₇, MW 624)9. Gigantecin (C₃₇H₆₆O₈, MW 638)10. 4-deoxygigantecin (C₃₇H₆₆O₇, MW 622)

บทที่ 3

วิธีการวิจัยและผลการวิจัย

วิธีการวิจัย

1. การเก็บพืชเพื่อการวิจัย

เก็บต้นข้าวหลามจากอำเภอกูเรือ จังหวัดเลย โดยคำแนะนำจากหมอแว วงศ์คำ โสภน หมอสมุนไพรมหาวิทยาลัยขอนแก่น บ้านโคกผิง อำเภอกูเรือ จังหวัดเลย และทำการเปรียบเทียบกับตัวอย่างพันธุ์พืช (Kerr 8533 และ Maxwell 71-234) ที่กองพืชพรรณ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร พบว่าเป็นพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Goniothalamus marcanii* Craib. ตัวอย่างแห้งของต้นข้าวหลามนี้ได้เก็บไว้ที่ ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. เทคนิคทั่วไป

2.1. Thin layer chromatography (TLC) :

ตัวดูดซับ : ซิลิกาเจล GF254 (E.Merck) หนา 250 ไมครอน. ขนาดของแผ่น 2x5 ซม., 10x20 ซม.

ซิลิกาเจล KC18 F (Whatman) หนา 250 ไมครอน. ขนาดของแผ่น 2x5 ซม., 10x20 ซม.

- การตรวจสอบ
- UV absorption ที่ $\lambda = 254$ และ 365 นม. และ
 - ฟันด้วยน้ำยา 5% phosphomolybdic acid ใน เอทานอล ทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูสีที่เกิดขึ้น และ
 - ฟันด้วยน้ำยา 5% anisaldehyde ในกรดกำมะถันทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูสีที่เกิดขึ้น

2.2. Column chromatography

2.2.1 quick column chromatography

ตัวดูดซับ : ซิลิกาเจล 60 (no. 9385) ขนาดอนุภาค 0.040–0.063 มม.
(230–400 mesh ASTM)

การบรรจุ : แบบเปียก (wet-packing)

ตัวชะ (eluant) : สารละลายผสมของ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เมทานอล
และสารละลายผสมของ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เอธิลอะซิเตท,
เมทานอล

2.2.2 gel filtration chromatography

ตัวดูดซับ : Sephadex LH-20

การบรรจุ : ให้ตัวดูดซับแฉนวนอยู่ในตัวชะเป็นเวลา 24 ชม. ก่อนบรรจุ

2.2.3 medium pressure liquid chromatography (MPLC)

คอลัมน์ : คอลัมน์สำเร็จ Lichorprep[®] RP-18 (0.040–0.063 มม.)
ขนาด 3x25 ซม.

ตัวชะ : 10% น้ำในเมทานอล

ปั๊ม : Buchi 681 chromatographic pump

การเตรียมสารตัวอย่าง : สารตัวอย่างต้องละลายในตัวชะที่มีปริมาณน้อย กรองผ่าน
Toyopak[®] C-18 filter

การตรวจสอบ : ใช้ normal phase TLC ใช้ 8% เมทานอลในเอธิลอะซิเตท
เป็นตัวชะ ตรวจสอบโดยใช้ UV และพ่นน้ำยาตามข้อ 1

2.3. Spectroscopy

2.3.1 ultraviolet absorption spectra

เครื่องมือ : Milton Roy Spectronic[®] 3000 Array single beam
spectrometer
(ศูนย์เครื่องมือวิจัยคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ตัวทำละลาย : เมทานอล (AR, E. Merck)

2.3.2 Infrared absorption spectra

เครื่องมือ : Shimadzu IR-440 infrared spectrometer (ศูนย์เครื่องมือวิจัย
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

เทคนิค : thin film บน NaCl cells หรือ ทำเป็น KBr disc

2.3.3 mass spectra

– low resolution mass spectra

เครื่องมือ : Finnigan 4023 GC/MS with INCOS 2000 data system
(Chemical Research Equipment Center, the Ohio State University) หรือ
Finnigan MAT with INCOS 50 data system
(ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

– high resolution mass spectra

เครื่องมือ : VG 70-250 S หรือ Kratos MS-50 mass spectrometer
(Chemical Research Equipment Center, the Ohio State University)

3.4 nuclear magnetic resonance spectra

เครื่องมือ : JEOL JMN-A-500 spectrometer (500 MHz ^1H -NMR และ 125 MHz ^{13}C -NMR) (ศูนย์เครื่องมือวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) หรือ
Bruker AM-500 spectrometer
(Chemical Research Equipment Center, the Ohio State University)

ตัวทำละลาย : deuterated chloroform, deuterated acetone, หรือ deuterated benzene ใช้ค่า chemical shift ใน ^1H -NMR ที่ δ 7.24, 2.05, 7.20 ppm และใน ^{13}C -NMR ที่ δ 77.0, 206.0, 128.5 ppm ตามลำดับ เป็น internal reference

2.4. การเตรียมอนุพันธ์

2.4.1 การเตรียมอนุพันธ์ acetate

นำสารตัวอย่าง 6 มิลลิกรัม กวนผสมกับ anhydrous pyridine 0.5 มิลลิตร และ acetic anhydride 1 มิลลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมาเติมน้ำแข็ง และนำของผสมนี้มาทำการ partition กับ คลอโรฟอร์ม นำชั้นคลอโรฟอร์มมาทำให้แห้งโดยใช้ anhydrous sodium sulfate แล้วนำมาระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ ได้อนุพันธ์ acetate แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย TLC

2.4.2 การเตรียมอนุพันธ์ mesitoate

ทำตามวิธีของ Gale และคณะ (1993)

นำสารตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม กวนผสมกับ 2, 4, 6-tri-methylbenzoyl chloride (20 มคล.) และ N, N-diisopropylethyl amino (5 มคล.) ในคลอโรฟอร์ม (0.2 มล.) ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งค้างคืน เติมไดคลอโรมีเทน (15 มล.) ในของผสม แล้วล้างด้วย 1N NaHCO_3 (10 มล.) นำชั้นไดคลอโรมีเทนมาทำให้แห้งด้วย Na_2SO_4 กรอง แล้วระเหยให้แห้งได้อนุพันธ์ mesitoate แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย TLC

2.4.3 การเตรียมอนุพันธ์ Mosher หรือ MTPA ester

ทำตามวิธีของ Dale และ Mosher (1973)

- สารเคมีที่ใช้ :
- (R)(+)- α -Methoxy- α -(trifluoro methyl) phenylacetic acid [(R)-MTPA] (Aldrich, No.15, 526-8 [α]_D + 72°)
 - (S)(-)- α -Methoxy- α -(trifluoro methyl) phenylacetic acid [(S)-MTPA] (Aldrich, No.31, 803-5, [α]_D-72°)
 - Oxalyl chloride (Aldrich, No.0-880-1)
 - N, N-Dimethyl formamide (Aldrich, No. 31, 993-7)

นำ (S)-หรือ (R)-MTPA (40 มิลลิกรัม, 0.17 มิลลิโมล), oxalyl chloride (1 มิลลิลิตร, 1.5 กรัม, 11.82 มิลลิโมล) และ N, N-dimethyl formamide (10 มล., 0.01 มิลลิโมล) มาทำปฏิกิริยากันในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะไม่เกิดฟอง เกิดเป็น Mosher acid chloride นำไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ ผสมสารตัวอย่าง 10 มิลลิกรัม ซึ่งละลายในไดคลอโรมีเทน (2 มิลลิลิตร) และ anhydrous pyridine (13 มล., 0.17 มิลลิโมล) ให้ทำปฏิกิริยาในอุณหภูมิห้อง ทั้งค้างคืน ตรวจสอบปฏิกิริยาเป็นระยะ ด้วย TLC โดยใช้ซิลิกาเจล GF254 เป็นตัวขับ ใช้ เฮกเซน/เอธิลอะซีเตท (3:2) เป็นตัวชะ เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์ นำ Mosher ester มาทำให้เข้มข้นและแยกให้บริสุทธิ์ด้วย TLC โดยใช้ตัวดูดซับ และตัวชะเช่นเดียวกันกับที่ใช้ตรวจสอบปฏิกิริยา

2.5 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.5.1 การตรวจสอบฤทธิ์ฆ่า brine shrimp

(ทำตามวิธีของ Meyer และคณะ 1982)

ละลายตัวอย่างใน เมธานอล เจือจางจนได้ความเข้มข้นเป็น 10,100,1000 มก./มล. ใส่ลงในขวดขนาด 10 มล. ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง เตรียมความเข้มข้นละ 3 ขวด

นำ brine shrimp cysts (*Artemia salina* Leach) (Aquarium product , Glen Burne, MD. 2106, U.S.A.) มาเพาะในจานรูปสี่เหลี่ยมก้นตื้นที่มีน้ำทะเลเทียม (ของผสมเกลือของ Instant Oceans, Aquarium System, Inc. ผสมกับน้ำกลั่น) จานรูปสี่เหลี่ยมแบ่งเป็น 2 ตอน ตอนหนึ่งเลี้ยงในที่มืด อีกตอนหนึ่งใช้คอมไฟส่อง ทั้งไว้นาน 48 ชม. ตัวอ่อน brine shrimp ที่ฟักออกมาจะว่ายน้ำไปยังตอนที่สว่าง ดูด brine shrimp 10 ตัวใส่ในขวด แล้วเติมด้วยน้ำทะเลเทียมจนครบ 5 ml เติม dry yeast suspension เป็นอาหาร ทิ้งไว้ได้แสงไฟ เมื่อครบ 24 ชม. นำมานับจำนวน brine shrimp ที่มีชีวิต คำนวณร้อยละการตายของ brine shrimp ของตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น และของตัวอย่าง control นำไปหาค่า LD₅₀ และ 95% confident interval ได้จากวิธีของ Finney

2.5.2 ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

การทดสอบนี้ ได้รับความช่วยเหลือจาก Professor John M. Cassady แห่ง Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, College of Pharmacy, the Ohio State University โดยใช้เซลล์มะเร็งเฉพาะเลี้ยงของคน ได้แก่ A549 (human non-small cell lung carcinoma), HT29 (human colon adenocarcinoma), MCF7 (human breast carcinoma), RPMI (melanoma), U251 (multiform glioblastoma)

ทำการตรวจสอบโดยนำ cell-line aliquots ใส่ลงในหลุม microtiter plate อบเป็นเวลา 24 ชม. ให้เซลล์คงที่ เติมสารที่จะทดสอบลงไปให้มีความเข้มข้น 5-log dilution อบไว้อีก 48 ชม. ทำการตรึงเซลล์ โดยใช้ trichloroacetic acid ล้างหลาย ๆ ครั้ง ย้อมสีเซลล์ด้วย sulforhodamine B (SRB) ซึ่งเป็นสีย้อมที่จับกับโปรตีน อ่านค่า optical density ซึ่งแปรผันตามปริมาณโปรตีนด้วย spectrophotometric plate reader ที่ความยาวคลื่น 515 nm. ใช้ doxorubicin (Adriamycin) เป็นสารเปรียบเทียบฤทธิ์

ผลการวิจัย

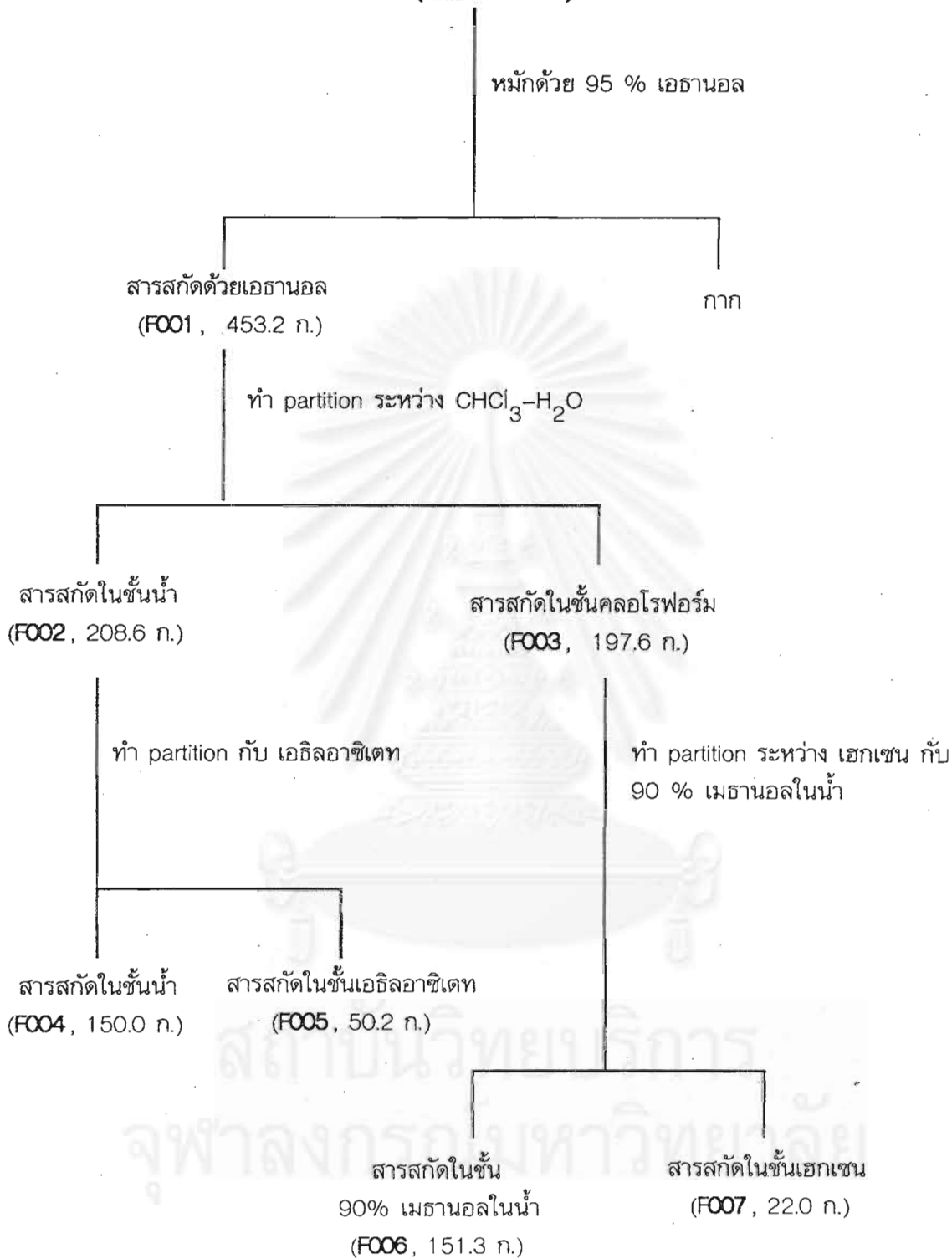
1. การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำเปลือกต้นข้าวหลามที่อบแห้ง (6.8 กิโลกรัม) มาบดให้เป็นผงหยาบ แล้วหมักด้วย 95%เอทานอล นำสารละลายแอลกอฮอล์ที่สกัดได้มาระเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันบรรยากาศ จนได้สารสกัดขั้นเหนียวสีน้ำตาล (FOO1, 453.2 กรัม) นำมาสกัดแยกต่อโดยทำ partition ระหว่าง คลอโรฟอร์ม และน้ำ แยกได้สารสกัดในชั้นน้ำ (FOO2, 208.6 กรัม) และสารสกัดในชั้น คลอโรฟอร์ม (FOO3, 197.6 กรัม)

เมื่อนำ FOO2 มาทำ partition กับ เอธิลอะซิเตท แยกได้สารสกัดในชั้นน้ำ (FOO4, 150 กรัม) และสารสกัดในชั้น เอธิลอะซิเตท (FOO5, 50.2 กรัม)

สารสกัดในชั้น คลอโรฟอร์ม (FOO3) เมื่อนำมาทำ partition ระหว่าง เฮกเซน และ 90% เมทานอลในน้ำ แยกได้สารสกัดในชั้น 90% เมทานอล ซึ่งเมื่อนำมาระเหยภายใต้การลดความดันบรรยากาศ จะได้สารสกัดขั้นเหนียว (FOO6, 151.3 กรัม) และสารสกัดในชั้น เฮกเซน เมื่อระเหยได้ผงแห้ง (FOO7, 22.0 กรัม) (แผนภูมิที่ 1) นำทุกสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์การฆ่า brine shrimp (Brine shrimp lethality test, BST) และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งแสดงผลตามตารางที่ 1

เปลือกต้นข้าวทลามแห้งบดหยาบ
(6.8 กิโลกรัม)



แผนภูมิที่ 1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากเปลือกต้นข้าวทลาม

2 การแยกสารจากสารสกัดต่างๆ ซึ่งควบคุมโดยการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioassay-directed fractionation)

จากการนำสารสกัด F001–F007 ไปทดสอบฤทธิ์การฆ่า brine shrimp พบว่า F001, F003, F006 เป็นสารสกัดที่น่าสนใจ และได้นำ F001, F006, F007 ไปทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคน 5 ชนิด คือ A-549, HT-29, MCF-7, RPMI และ U251 พบว่า F001 และ F006 ออกฤทธิ์ได้ดี (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ในการฆ่า brine shrimp และ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ F001 ถึง F007

| Fractions | น้ำหนัก (กรัม) | BST (LD50 มคก./มล.) | ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคน (ED50, มคก./มล.) | | | | |
|------------|----------------|---------------------|------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | A 549 | HT29 | MCF 7 | RPMI | U 251 |
| F001 | 453.2 | 7.34 | 2×10^1 | 6×10^1 | 4×10^0 | 1×10^2 | 1×10^0 |
| F002 | 208.6 | >100 | – | – | – | – | – |
| F003 | 197.6 | 3.95 | – | – | – | – | – |
| F004 | 150.0 | >100 | – | – | – | – | – |
| F005 | 50.2 | >100 | – | – | – | – | – |
| F006 | 151.3 | 3.08 | 2×10^0 | 9×10^0 | 5×10^{-2} | 1×10^1 | 3×10^0 |
| F007 | 22.0 | >100 | ndt | ndt | ndt | ndt | ndt |
| Adriamycin | | – | 1×10^{-1} | 1×10^{-1} | 1×10^{-1} | 3×10^{-2} | 1×10^{-1} |

หมายเหตุ A549 = เซลล์มะเร็งปอดคน
 HT29 = เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของคน
 MCF7 = เซลล์มะเร็งเต้านมของคน
 RPMI = เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของคน
 U251 = เซลล์มะเร็งสมองของคน
 ndt = ไม่แสดงฤทธิ์ที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 10 มคก./มล.

นำสารสกัด F006 (150 กรัม) มาสกัดแยกด้วยวิธี quick column chromatography โดยใช้คอลัมน์เป็น sintered glass filter ใช้ ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ (800 กรัม) สารละลายที่ใช้เพื่อชะสารจากคอลัมน์ เริ่มจาก เฮกเซน และ คลอโรฟอร์ม, คลอโรฟอร์ม ที่มีส่วนผสมของ เมทานอล จาก 1% ไปถึง 20% เก็บ fraction ครั้งละ 300 มล. ได้ทั้งหมด 59 fractions ส่วน fraction สุดท้ายใช้ 50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ชะสารจากคอลัมน์ จนคาดว่าไม่มีสารเหลืออยู่น้อยที่สุด ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวน fraction จากการสกัดแยก F006

| ลำดับที่ของ Fraction | ตัวทำละลาย | ปริมาตร (มิลลิตร) |
|----------------------|------------------------|-------------------|
| 1-2 | เฮกเซน | 600 |
| 3-5 | คลอโรฟอร์ม | 900 |
| 6-10 | 1% เมทานอล/คลอโรฟอร์ม | 1,500 |
| 11-20 | 2% เมทานอล/คลอโรฟอร์ม | 3,000 |
| 21-30 | 5% เมทานอล/คลอโรฟอร์ม | 3,000 |
| 31-43 | 8% เมทานอล/คลอโรฟอร์ม | 4,000 |
| 44-50 | 10% เมทานอล/คลอโรฟอร์ม | 2,000 |
| 51-59 | 20% เมทานอล/คลอโรฟอร์ม | 2,500 |
| 60 | 50% เมทานอล/คลอโรฟอร์ม | 2,000 |

นำ fractions ที่ได้มาตรวจสอบโดยใช้ TLC มี ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ สารจะเป็นสารละลายผสมของ คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (95:5) ตรวจสอบโดยพ่นด้วยน้ำยา phosphomolybdic acid ทำการรวม fractions ที่มีส่วนประกอบของสารเหมือนกัน หรือใกล้เคียงกันตามลักษณะที่ปรากฏบนแผ่น TLC แล้วระเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันบรรยากาศนำมาซึ่งหาน้ำหนักและทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีววิทยา (BST และ การเป็นพิษต่อเซลล์) ผลการทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 3

จากผลการทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า F009 แสดงฤทธิ์ที่ดี และมีปริมาณมาก จึงได้เลือกมาเพื่อทำการสกัดแยกสารต่อไป

การสกัดแยกสารจาก F009 ใช้วิธี flash column chromatography โดยใช้ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ นำ F009 (6.7 กรัม) ละลายในเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน (1:1) เติมลงบน ซิลิกาเจล ส่วนบนของคอลัมน์ ใช้ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน และ เมทานอล เป็นตัวชะโดยเพิ่มเมทานอล จากน้อยไปมาก เก็บ fraction ละ 75 มล. นำ fraction ที่ได้มาทดสอบบน TLC ที่มีซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ ใช้ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล อัตราส่วน (97:3) เป็นสารชะ ตรวจสอบภายใต้แสงเหนือม่วง (UV₂₅₄) และพ่นด้วยน้ำยา phosphomolybdic acid ผลจาก TLC นำมารวบรวม fraction ที่มีส่วนประกอบของสารเหมือนกันเข้าด้วยกัน นำมาระเหยแห้ง ซึ่งหาน้ำหนักได้ fraction รวมทั้งหมด 20 fractions คือ F061 ถึง F080 นำไปทดสอบการออกฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ ดังแสดงผลในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 การรวม fractions ที่ได้จาก F006 และแสดงฤทธิ์ในการฆ่า brine shrimp และ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของแต่ละ fraction รวม

| Fraction รวม | ลำดับที่ของ fraction | น้ำหนัก (กรัม) | BST (LD ₅₀ มคก./มล.) | ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคน (ED ₅₀ , มคก./มล.) | | | | |
|--------------|----------------------|----------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | | A549 | HT29 | MCF7 | RPMI | U251 |
| F008 | 1-12 | 0.83 | 3.31 | 7x10 ⁻¹ | 9x10 ⁻¹ | 8x10 ⁻¹ | 6x10 ⁻¹ | 5x10 ⁻¹ |
| F009 | 13-17 | 14.54 | 4.81 | 9x10 ⁻¹ | 7x10 ⁰ | 1x10 ⁻¹ | 3x10 ⁰ | 2x10 ⁰ |
| F010 | 18 | 2.82 | 3.08 | 1x10 ⁻¹ | 6x10 ⁰ | 9x10 ⁻² | 4x10 ⁰ | 2x10 ⁰ |
| F011 | 19-20 | 5.77 | 2.58 | 4x10 ⁻¹ | 5x10 ⁰ | 4x10 ⁻² | 6x10 ⁰ | 3x10 ⁰ |
| F012 | 21-24 | 5.25 | 3.31 | 3x10 ⁰ | 1x10 ¹ | 1x10 ⁰ | ndt | 9x10 ⁰ |
| F013 | 25-30 | 29.21 | 3.31 | 2x10 ⁻¹ | 2x10 ⁰ | 4x10 ⁻¹ | 8x10 ⁻¹ | 2x10 ⁰ |
| F014 | 31-33 | 27.74 | 1.04 | 2x10 ⁻¹ | 6x10 ⁰ | ndt | 8x10 ⁰ | 2x10 ⁰ |
| F015 | 34-36 | 11.15 | 3.56 | 5x10 ⁰ | ndt | 4x10 ⁰ | ndt | ndt |
| F016 | 37-39 | 8.26 | 6.49 | 2x10 ⁰ | 8x10 ⁰ | 5x10 ⁻¹ | 1x10 ¹ | 5x10 ⁰ |
| F017 | 40-45 | 12.59 | 46.19 | 6x10 ⁻¹ | 1x10 ⁻¹ | 3x10 ⁻¹ | 6x10 ⁰ | 4x10 ⁰ |
| F018 | 46-50 | 4.98 | >100 | 2x10 ⁻² | 4x10 ⁻⁰ | 5x10 ⁻² | ndt | ndt |
| F019 | 51-55 | 2.98 | 24.83 | 1x10 ⁻¹ | ndt | 6x10 ⁰ | ndt | ndt |
| F020 | 56-60 | 2.88 | >100 | 9x10 ⁰ | ndt | 3x10 ⁰ | ndt | ndt |
| Adriamycin | | | | 1x10 ⁻¹ | 1x10 ⁻¹ | 1x10 ⁻¹ | 3x10 ⁻² | 3x10 ⁻² |

ndt = ไม่แสดงฤทธิ์ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 10 มคก./มล.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของแต่ละ fraction ที่แยกได้จาก F009

| Fractions | น้ำหนัก (มิลลิกรัม) | ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคน (ED50, มคก./มล.) | |
|------------|---------------------|---------------------------------------------------------|--------------------|
| | | A549 | MCF7 |
| F061 | 1.3 | 1×10^1 | 1×10^1 |
| F062 | 17.4 | 8×10^{-1} | 8×10^{-1} |
| F063 | 18.0 | 7×10^0 | 3×10^0 |
| F064 | 16.9 | ndt | ndt |
| F065 | 18.9 | ndt | ndt |
| F066 | 18.8 | 1×10^1 | 8×10^0 |
| F067 | 55.0 | ndt | ndt |
| F068 | 30.5 | ndt | ndt |
| F069 | 47.5 | ndt | ndt |
| F070 | 34.4 | 7×10^0 | 1×10^1 |
| F071 | 27.6 | 6×10^{-1} | 4×10^{-1} |
| F072 | 75.7 | 7×10^{-1} | 3×10^0 |
| F073 | 114.2 | 3×10^{-1} | 6×10^{-1} |
| F074 | 52.1 | 9×10^{-2} | 2×10^{-1} |
| F075 | 21.6 | 1×10^{-1} | 2×10^{-1} |
| F076 | 35.5 | 5×10^{-1} | 3×10^0 |
| F077 | 44.0 | 3×10^0 | 2×10^0 |
| F078 | 1,549.7 | 1×10^{-1} | 2×10^{-1} |
| F079 | 709.7 | 1×10^0 | ndt |
| F080 | 1,114.8 | ndt | ndt |
| Adriamycin | | 1×10^{-2} | 1×10^{-2} |

ndt = ไม่แสดงฤทธิ์ที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 10 มคก./มล.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าเกือบทุก fraction มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ ยกเว้น F067 และ F068 และเมื่อนำ F061 ถึง F080 มาสกัดแยกต่อ พบว่า แยกสารได้หลายชนิด ซึ่งได้สรุปไว้ในแผนภูมิที่ 2

2.1 การแยกสาร NPK11916

นำ F076 (35 มิลลิกรัม) มาละลายใน ไดคลอโรมีเทน ตั้งทิ้งไว้จะเกิดตะกอนสีเหลือง นำมากรองและล้างทำให้แห้งตกผลึกซ้ำใน ไดคลอโรมีเทน ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง 1 สาร คือ NPK11916 (6.5 มิลลิกรัม, 2.1×10^{-4} % นน./นน.)

2.2 การแยกสาร NPF2593

นำ F077 (44 มิลลิกรัม) มาละลายในเอธิลอะซีเตท ตั้งทิ้งไว้จะเกิดตะกอนของสารผสม (19 มิลลิกรัม) นำสารผสมมาแยกโดยใช้ preparative TLC ใช้ 2% เมทานอล ในไดคลอโรมีเทน เป็นตัวชะสามารถแยกสารสีส้มได้ 1 ชนิด คือ NPF2593 (9.0 มิลลิกรัม, 2.9×10^{-4} % นน./นน.)

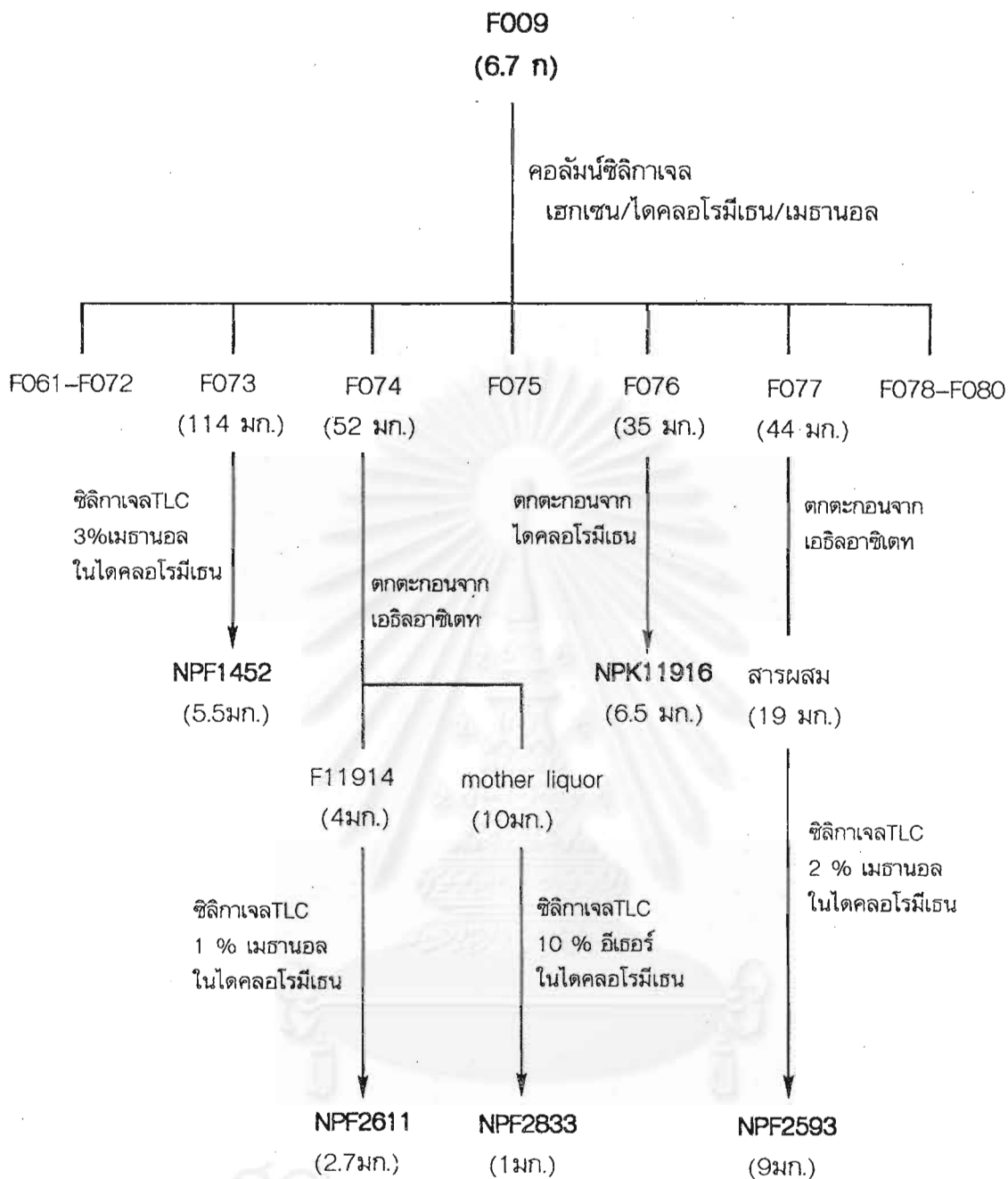
2.3 การแยกสาร NPF2611 และ NPF2833

นำ F074 (52 มิลลิกรัม) มาละลายด้วยเอธิลอะซีเตท เมื่อตั้งทิ้งไว้จะเกิดตะกอน F11914 (4 มิลลิกรัม) เมื่อนำมาแยกโดยทำ preparative TLC ใช้ 1% เมทานอล ในไดคลอโรมีเทน เป็นตัวชะ สามารถแยกสารสีเหลืองอมส้มได้ 1 สาร คือ NPF2611 (2.7 มิลลิกรัม, 8.6×10^{-5} % นน./นน.)

ส่วนชั้นเอธิลอะซีเตท ที่เหลือจากการกรองตะกอนของ NPF11914 เมื่อนำมาระเหยแห้งได้ของแข็ง (10 มิลลิกรัม) นำมาแยกโดยทำ preparative TLC ใช้ 1% เมทานอล ในไดคลอโรมีเทน เป็นตัวชะ แยกได้สารผสม (5 มิลลิกรัม) นำสารผสมนี้มาแยกด้วย preparative TLC อีกครั้ง โดยใช้ 10% อีเธอร์ในไดคลอโรมีเทน เป็นตัวชะ แยกสารสีเหลืองได้ 1 สาร คือ NPF2833 (1.0 มิลลิกรัม, 1.5×10^{-7} % นน./นน.)

2.4 การแยกสาร NPF1452

นำสาร F073 (114 มิลลิกรัม) มาแยกสาร โดยใช้เทคนิค preparative TLC มีซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ (หนา 0.5 มม., 20x20 เซนติเมตร) มี 3% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน เป็นตัวชะ สามารถแยกสารที่เป็นตะกอนเบาสีขาวได้ 1 ชนิด คือ NPF1452 (5.5 มิลลิกรัม, 8.1×10^{-7} % นน./ นน.)



แผนภูมิที่ 2. แสดงการแยกสาร NPK11916, NPF2611, NPF2593, NPF2833 และ NPF1452 จาก F009

2.5 การสกัดแยกสาร NPK038-1

นำ F013 และ F014 ซึ่งมีลักษณะของ TLC pattern คล้ายกันมารวมกัน และแยกโดยใช้วิธี quick column chromatography ใช้ sintered glass filter เป็นคอลัมน์ ใช้ ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ ใช้ เฮกเซน, คลอโรฟอร์มและ เมทานอล เป็นตัวชะ โดยเพิ่มปริมาณ % เมทานอล จากน้อยไปมาก เก็บได้ 45 fractions fraction ละ 100-200 มล. ใช้ เมทานอล ล้างตอนท้าย ผลการรวบรวม fraction แสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จำนวน fraction จากการสกัดแยก F013 และ F014

| ลำดับที่ของ fraction | ตัวทำละลาย | ปริมาตร (มิลลิเมตร) |
|----------------------|------------------------|---------------------|
| 1 | เฮกเซน | 200 |
| 2 | เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม | 500 |
| 3-9 | คลอโรฟอร์ม | 700 |
| 10-19 | 1% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม | 1,000 |
| 20-29 | 2% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม | 1,000 |
| 30-39 | 3% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม | 1,000 |
| 40-44 | 5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม | 500 |
| 45-47 | เมทานอล | 600 |

นำ fraction ที่ได้มาตรวจสอบบน TLC ที่มี ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ คลอโรฟอร์ม-เมทานอล 9:1 เป็นตัวชะ ตรวจสอบโดยพ่นด้วยน้ำยา phosphomolybdic acid รวบรวม fractions ที่มีส่วนประกอบของสารเหมือนกันเข้าด้วยกันได้ 6 fractions คือ F021-F027 นำมาตรวจสอบฤทธิ์ฆ่า brine shrimp ได้ผลตามตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่า F024 มีฤทธิ์ค่อนข้างสูง ($LD_{50} = 5$ มก./มล.) จึงนำมาแยกโดยใช้วิธี short column chromatography มี เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เอทิลอะซิเตท และ เมทานอล เป็นสารชะ ได้ 5 fractions คือ F032, F033, F034, F035 และ F036 F 035 เป็น fraction ที่ออกฤทธิ์ได้ดี จึงนำมาแยกโดยใช้วิธี gel filtration มี sephadex LH-20 เป็นตัวดูดซับ และ เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน (2:1) เป็นตัวชะ แยกได้ 4 fractions คือ F037-F040 และพบว่า F038 ออกฤทธิ์ได้ดีทั้งต่อ BST และฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ (ตารางที่ 7) จึงนำ F038 มาทำการแยกด้วย preparative TLC. ใช้ เฮกเซน-เอทิลอะซิเตท-เมทานอล (3:6.8:0.2) เป็นตัวชะ สามารถแยกสารได้ 1 ชนิด คือ NPK038-1 (114.4 มก., 8.2×10^{-1} %นน./นน.) และได้สรุปการแยกสารจาก F013 และ F014 ในแผนภูมิที่ 3

ตารางที่ 6 แสดงการรวม fraction ที่แยกได้จาก F013, F014 และฤทธิ์ในการฆ่า brine shrimp

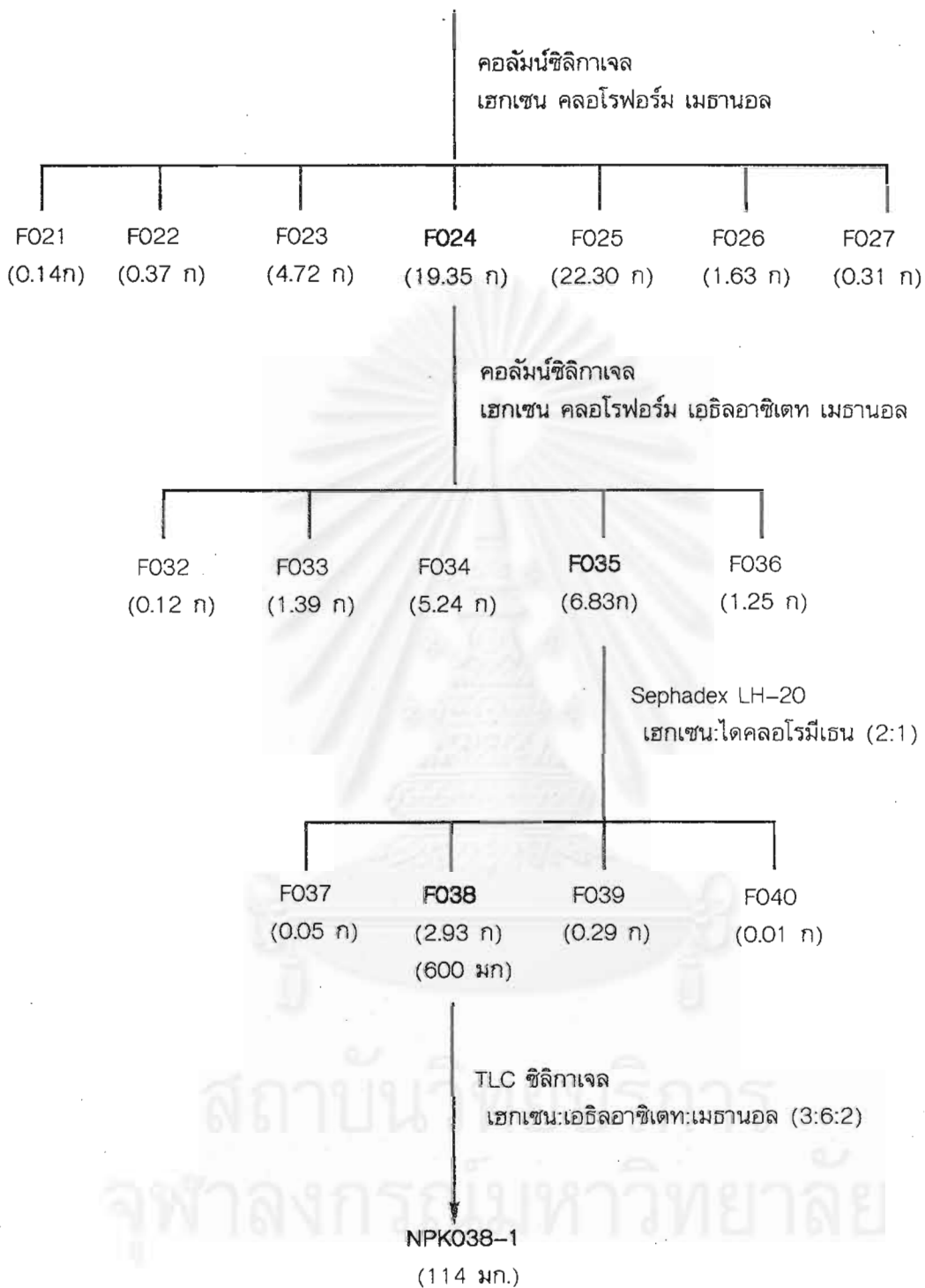
| Fraction รวม | Fraction ย่อย | น้ำหนัก (กรัม) | BST LD50 (มคก./มล.) |
|--------------|---------------|----------------|------------------------|
| F021 | 1-4 | 0.14 | - |
| F022 | 5-6 | 0.37 | 16.54 |
| F023 | 7-15 | 4.27 | 14.81 |
| F024 | 16-27 | 19.35 | 8.23 |
| F025 | 28-45 | 22.30 | 5.81 |
| F026 | 46 | 1.63 | 33.40 |
| F027 | 47 | 0.31 | 15.16 |

ตารางที่ 7 แสดงการรวม fraction ที่แยกได้จาก F024 ฤทธิ์ในการฆ่า brine shrimp และฤทธิ์
ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคน

| Fractions รวม | น้ำหนัก (กรัม) | BST LD50 (มคก./ มล.) | ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคน (ED50, มคก./มล.) | | | | |
|------------------|-------------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | A 549 | HT 29 | MCF 7 | RPMI | U 251 |
| F032 | 0.12 | >100 | - | - | - | - | - |
| F033 | 1.39 | 20.28 | - | - | - | - | - |
| F034 | 5.24 | 5.24 | 9×10^{-2} | 4×10^0 | 1×10^{-1} | 2×10^0 | 4×10^0 |
| F035 | 6.83 | 9.60 | 7×10^{-2} | 5×10^0 | 1×10^{-1} | 1×10^1 | 4×10^0 |
| F036 | 1.25 | 12.91 | - | - | - | - | - |
| F037 | 0.05 | - | - | - | - | - | - |
| F038 | 2.93 | 0.26 | 3×10^0 | 8×10^0 | 9×10^{-1} | 1×10^1 | 8×10^0 |
| F039 | 0.29 | 0.30 | - | - | - | - | - |
| F040 | 0.01 | - | - | - | - | - | - |
| Adria- mycin | - | - | 3×10^{-2} | 3×10^{-2} | 3×10^{-2} | 2×10^{-2} | 2×10^{-2} |

F013 และ F014

(56.9 กรัม)



แผนภูมิที่ 3 แสดงการแยกสาร NPK038-1 จาก F013 และ F014

3. ข้อมูลทาง Spectroscopy ของสารที่แยกได้

3.1 NPK 11916 (marcanine A)

(1-aza-4-methyl-2-oxo-1,2-dihydro9,10-anthracenedione.)

| | | |
|--------------------|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MP | : | 210–212 °C |
| UV | : | λ_{\max} nm (log ϵ) ใน เมทานอล (รูปที่ 9ก) 223 (4.09), 260 (4.21), 295 (4.08), 345 sh (3.34), 406 (3.21) λ_{\max} nm (log ϵ) ใน เมทานอล; + 2.5 N NaOH (รูปที่ 9ข) 238 (94.18), 280 (4.32), 323 (3.95), 454 (3.24); λ_{\max} nm (log ϵ) ใน เมทานอล; + sodium acetate (รูปที่ 9ค) 280 (4.29), 322 (3.91), 453 (3.21) |
| IR (KBr disc) | : | ν_{\max} cm ⁻¹ , KBr disc (รูปที่ 10) 3540–3314, 1684, 1646, 1593, 1531, 1467 |
| HR-EIMS | : | m/z (relative intensity) (รูปที่ 11) 240.0613 [M+1] (15); 239.0581 [M] ⁺ (100), C ₁₄ H ₉ NO ₃ จากการคำนวณ 239.0580; 211.0646 [M-CO] ⁺ (40); 210.0578 [M-CO-H] ⁺ (33); 183.0686 [M-2CO] ⁺ (9); 182.0593 [M-2CO-H] ⁺ (11); 154.0651 [M-3CO-H] ⁺ (11) |
| ¹ H NMR | : | δ (ppm), 500 MHz ใน chloroform-d; (รูปที่ 12 ก, ข, ค) 2.71 (3H, d, J = 0.9 Hz, 4-CH ₃), 6.69 (1H, q, J = 0.9 Hz, H-3), 7.78 (1H, dt, J = 7.6, 1.2 Hz, H-6), 7.86 (1H, dt, J = 7.6, 1.2 Hz, H-7), 8.19 (1H, dd, J = 7.6, 1.2 Hz, H-5), 8.24 (1H, dd, J = 7.6, 1.2 Hz, H-8), 9.72 (1H, br s, 1-N-H) |

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

^{13}C NMR : δ (ppm) 125 MHz ใน chloroform-d; (รูปที่ 13 ก, ข)
 22.8 (q, 4-CH₃), 116.1 (s, C-4a), 126.7 (d, C-5), 127.6
 (d, C-8), 127.7 (d, C-3), 130.0 (s, C-10a), 133.3 (s, C-8a),
 133.7 (d, C-6), 135.8 (d, C-7), 139.8 (s, C-4), 152.2
 (s, C-9a), 160.4 (s, C-2), 178.0 (s, C-10), 181.4 (s, C-9)

3.2 NPF 2611 (dielsiquinone)

(1-aza-3-methoxy-4-methyl-2-oxo-9,10-anthracenedione.)

IR : ν_{max} cm⁻¹, film; (รูปที่ 17)
 2963, 2919, 2850, 1685, 1672, 1662

HR-EIMS : m/z, (relative intensity); (รูปที่ 18)
 269.0680 [M]⁺ (100), C₁₅H₁₁NO₄ จากการคำนวณ 269.0688 :
 268.593 [M-1]⁺ (10) ; 254.0448[M-CH₃]⁺ (17) ; 241.0741
 [M-CO]⁺ (17) ; 240.0690 [M-CO-H]⁺ (39) ; 226.0504[M-
 CH₃-CO]⁺ (15) ; 212.0706 [M-2CO-H]⁺ (10) ; 198.0555
 [M-CH₃-2CO]⁺ (29) ; 184.0713 [M-3CO-H]⁺ (8)

^1H NMR : δ (ppm)500 MHz, ใน chloroform-d; (รูปที่ 19 ก, ข)
 2.66 (3H, s, 4-CH₃) , 4.06 (3H, s, O-CH₃) , 7.76 (1H, dt, J
 = 7.7, .09 Hz, H-6) , 7.83 (1H, dt, J = 7.7, 0.9 Hz, H-7), 8.16
 (1H, dd, J = 7.6, 0.9Hz, H-5) , 8.22 (1H, dd, J = 7.7, 0.9 Hz,
 H-8)

^{13}C NMR : δ (ppm)125 MHz, ใน chloroform-d; (รูปที่ 20)
 13.9 (q, 4-CH₃), 60.0 (q, O-CH₃), 119.7 (s, C-4a) , 126.5
 (d, C-5), 127.5 (d, C-8) , 128.9 (s, C-10a) , 130.0 (s, C-8a),
 133.6 (d, C-6), 134.7 (s, C-4) 135.4 (d, C-7), 137.6 (s, C-9a),
 152.8 (s, C-3) 156.8 (s, C-2), 177.4 (s, C-10), 182.0 (s, C-9)

3.3 NPF 2593 (marcanine C)

(1-aza-1-methyl-3-methoxy-4-hydroxymethyl-2-oxo-9,10-anthracenedione)

- UV : λ_{\max} nm (log ϵ) ใน เมทานอล; (รูปที่ 21ก)
272 (4.23), 306 sh (3.97), 323sh (3.82), 419 (3.19),
 λ_{\max} nm (log ϵ) ใน เมทานอล; + 2.5N NaOH : (รูปที่ 21ข)
272 (4.29), 305 sh (4.1), 325sh (3.97), 415 (3.58) :
 λ_{\max} nm (log ϵ) ใน เมทานอล; + sodium acetate : (รูปที่ 21ค)
273 (4.23) , 3.05 sh (3.99), 324 sh (3.82), 415 (3.22)
- IR : ν_{\max} cm⁻¹ , KBr disc : (รูปที่ 22)
3720-3234, 2929, 1657, 1584, 1514,
- HR-EIMS : m/z (relative intensity) : (รูปที่ 23)
300.0847 [M+1]⁺ (14), ; 299.0792 [M]⁺ (83), C₁₆H₁₃NO₅
จากการคำนวณ 299.0790; 284.0506 [M-CH₃]⁺ (100); [M-CO-
H]⁺ (7); 256.0582 [M-CH₃-CO]⁺ (21); 239.0557 [M-CH₃-
CO-OH]⁺ (16); 211.0634 [M-CH₃-2CO-OH]⁺ (8); 210.0566
[M-CH₃-2CO-H-OH]⁺ (11); 183.0674 [M-CH₃-3CO-OH]⁺ (4);
182.0601 [M-CH₃-3CO-H-OH]⁺ (6)
- ¹H NMR : δ (ppm) 500 MHz ใน chloroform-d; (รูปที่ 24 ก, ข)
3.90 (1H, br s, CH₂-OH), 3.97 (3H, s, N-CH₃), 4.10
(3H, s, O-CH₃), 4.92 (2H, brs, CH₂OH), 7.77 (1H, ddd, J =
7.3, 6.9, 1.8 Hz, H-6), 7.97 (1H, ddd, J = 7.3, 6.9, 1.8 Hz,
H-7), 8.09 (1H, dd, J = 6.7, 2.3 Hz, H-5), 8.14 (1H, dd, J =
6.7, 2.3 Hz, H-8)
- ¹³C NMR : δ (ppm) 125 MHz ใน chloroform- d ; (รูปที่ 25 ก, ข)
35.4 (q, N-CH₃), 56.3 (t, CH₂-OH), 60.9 (q, O-CH₃), 119.9
(s, C-4a), 126.7 (d, C-8), 126.8 (d, C-5), 132.1 (s, C-8a และ
C-10a), 134.2 (d, C-6), 134.5 (d, C-7), 135.6 (s, C-4), 140.2
(s, C-9a), 151.0 (s, C-3), 159.1 (s, C-2), 179.9 (s, C-10),
184.2 (s, C-9),

3.4 NPF 2833 (pinocebrine)

- IR : ν_{\max} cm⁻¹, KBr disc; (รูปที่ 32)
3500–3200 (broad), 1631, 1604, 1583, 1467
- EIMS : m/z (% relative intensity) (รูปที่ 33)
256 (M⁺, 71), 255 (54), 238 (9), 228 (4), 176.9 (100), 152 (88), 124 (62), 104 (27)
- ¹H NMR : δ (ppm), 500 MHz ใน CDCl₃ (รูปที่ 34)
12.03 (1H, s), 7.47–7.37 (5H, m), 6.01 (1H, d, J = 2.3 Hz),
6.00 (1H, d, J = 2.3 Hz), 5.43 (1H, dd, J = 3.1, 13.1 Hz), 3.09 (1H, dd, J = 13.1, 17.2 Hz), 2.85 (1H, dd, J = 3.1, 17.2 Hz)
- ¹³C NMR : δ (ppm), 125 MHz ใน CDCl₃ (รูปที่ 35)
195.8, 164.4, 163.2, 138.3, 128.9, 126.1, 103.3, 96.8, 95.5,
79.2, 43.3

3.5 NPF 1452 (21,23-epoxycycloart-24-ene-3-ol)

- IR : ν_{\max} cm⁻¹, film; (รูปที่ 36)
3400–3300, 2940–2800, 1650, 1400, 1380, 1020, 750
- HR-EIMS : m/z (relative intensity); (รูปที่ 37)
(M⁺+1) 441.3653 (21), (M⁺) 440.3651 (63), 425.3433 (100),
422.3550 (35), 407.3315 (42), 385.3058 (17), 379.2990 (20),
353.2822 (11.69), 301.2489 (15), 300.2445 (57), 285.2228 (89),
245.1901 (15), 147.1167 (26), 135.1180 (33), 125.0965 (95)
- ¹H-NMR : δ (ppm), 500MHz ใน chloroform-d; (รูปที่ 38)
0.31 (1H, d, J = 4.3 Hz, Ha-19), 0.57 (1H, d, J = 4.3 Hz, Hb-19),
0.81 (1H, Ha-6), 0.81 (3H, s, 29-CH₃), 0.89 (3H, s, 18-CH₃)
0.97 (3H, s, 28-CH₃), 0.98 (3H, s, 30-CH₃), 1.09 (1H, Ha-11),
1.15 (1H, Ha-7), 1.25 (1H, Ha-16), 1.28 (1H, Ha-1),
1.30 (1H, Ha-22), 1.36 (1H, Hb-11), 1.35 (1H, H-5), 1.38 (1H, Ha-15),
1.40 (1H, H₂-12), 1.51 (1H, Hb-16), 1.53 (1H, H-8),
1.58 (1H, Hb-1), 1.58 (1H, Ha-2), 1.63 (1H, Hb-6),

1.70 (3H, br s, 27-CH₃), 1.75 (1H, H-17), 1.75 (3H, br s, 26-CH₃), 1.76 (1H, Hb-2), 1.87 (1H, m, Hb-15), 1.96 (1H, m, Hb-7), 2.10 (1H, ddd, J = 9.6, 5.8, 4.6 Hz, Hb-22), 2.22 (1H, m, H-20), 3.28 (1H, m, H-3), 3.39 (1H, dt, J = 2.5, 7.6 Hz, Ha-21), 3.94 (1H, t, J = 7.6 Hz, Hb-21), 4.53 (1H, ddt, J = 9.6, 8.5, 4.9 Hz, H-23), 5.18 (1H, br d, J = 8.5 Hz, H-24)

¹³C-NMR : δ (ppm) 25MHz ใน chloroform-d; (รูปที่ 39)
 13.7 (q, 29-CH₃), 18.0 (q, 27-CH₃), 18.5 (q, 30-CH₃), 19.3 (q, 18-CH₃), 20.0 (s, C-9), 20.9 (t, C-6), 25.4 (q, 28-CH₃), 25.8 (q, 26-CH₃), 26.2 (t, C-11), 26.3 (t, C-7), 26.4 (s, C-10), 27.9 (t, C-15), 30.0 (t, C-19), 30.3 (t, C-2), 31.3 (t, C-16), 31.9 (t, C-1), 35.8 (t, C-12), 40.4 (t, C-22), 40.5 (s, C-4), 43.7 (d, C-20), 45.4 (s, C-14), 47.0 (d, C-5), 47.8 (d, C-8), 48.3 (s, C-13), 50.9 (d, C-17), 71.4 (t, C-21), 75.2 (d, C-23), 78.7 (d, C-3), 126.2 (d, C-24), 135.7 (s, C-25)

3.6. NPK038-1 (สารผสมของ annonacin และ 16S,19S annonacin)

[α]_D : +14.4 (c=0.003, MeOH)

UV : λ_{max} nm (log ε) ใน เมทานอล; (รูปที่ 44)
 208(4.08)

IR : ν_{max} cm⁻¹, film บน KBr; (รูปที่ 45)
 487-3386, 2923, 2852, 1748, 1083

FAB-MS : (m-NBA), m/z (relative intensity) (รูปที่ 46)
 619 [M+Na]⁺, 597 [MH]⁺; 579.(1) [MH-H₂O]⁺; 561.(1) [MH-2H₂O]⁺; 543. (1) [MH-3H₂O]⁺; 525.(2) [MH-4H₂O]⁺

- HR-EIMS : m/z (relative intensity); (รูปที่ 47)
 561.4514 (3, C₃₅H₆₁O₅), 543.4389 (14, C₃₅H₂O₄),
 525.4337 (10, C₃₅H₅₇O₃), 379.2500 (0.2, C₂₃H₃₃O₅),
 361.2386 (5.3, C₂₂H₃₃O₄), 343.2283 (5.8, C₂₂H₃₁O₃),
 309.2082 (5.0, C₁₈H₂₉O₄) 291.1936 (7.2, C₁₈H₂₇O₃),
 273.1842 (6.5, C₁₈H₂₅O₅), 269.2473 (2.9, C₁₇H₃₃O₂),
 251.2377 (1.7, C₁₇H₃₁O), 223.1332 (1.4, C₁₃H₁₉O₃),
 205.1206 (3.1, C₁₃H₁₇O₂), 199.1461 (2.6, C₁₃H₂₇O),
 141.0566 (4.7, C₇H₉O₃), 123.0427 (1.8, C₇H₇O₂)
- ¹H-NMR : δ (ppm) 500MHz ใน chloroform-d; (ตารางที่ 8 และ รูปที่ 48 ก)
- ¹³C-NMR : δ (ppm) 125MHz ใน chloroform-d; (ตารางที่ 8 และ รูปที่ 49 ก)
- อนุพันธ์ NPK038-1 tetraacetate
- FAB-MS : (m-NBA) m/z (relative intensity); (รูปที่ 52)
 765.(3) [MH]⁺; 705 (8) [MH-AcOH]⁺; 645 (6) [MH-2AcOH]⁺;
 585 (5) [MH-3AcOH]⁺; 525 (5) [MH-4AcOH]⁺
- HR-EIMS : m/z (relative intensity); (รูปที่ 53)
 463.2739 (6.4, C₂₆H₃₉O₇); 403.2526 (6.7, C₂₄H₃₅O₅);
 393.2543 (1.3, C₂₂H₃₂O₆); 343.2293 (17.4, C₂₂H₃₁O₃);
 333.2072 (1.9, C₂₀H₂₉O₄); 325.2134 (16.7, C₁₇H₂₅O₆);
 311.2549 (1.1, C₁₉H₃₅O₃); 273.1768 (6.7, C₈H₂₅O₂);
 265.1631 (1.4, C₁₅H₂₁O₄); 251.2388 (38.5, C₁₇H₃₁O);
 205.1213 (9.2, C₁₃H₁₇O₂); 123.0441 (9.5, C₇H₇O₂)
- ¹H-NMR : δ (ppm) 500MHz ใน chloroform-d; (ตารางที่ 8 และ รูปที่ 54)

ตารางที่ 8 แสดงข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์ของ ^1H (500 MHz) และ ^{13}C (125 MHz) ของสาร NPK038-1 และ NPK038-1 tetraacetate ใน CDCl_3

| ตำแหน่ง | NPK 038-1 | | NPK 038-1 tetraacetate |
|---------|------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| | δC (ppm) | δH (ppm) | δH (ppm) |
| 1 | 174.6 | - | - |
| 2 | 131.1 | - | - |
| 3a | 3.3 | 2.51, dd (14.0, 0.5) | 2.54, dd (5.5, 4.3) |
| 3b | 33.4 | 2.40, dd (14.0, 8.5) | 2.51, dd (5.4, 7.8) |
| 4 | 69.7, 69.8 | 3.81, m | 5.12, m |
| 5 | 33.9, -37.2 | 1.4-1.6, m | 1.4-1.6, m |
| 6-8 | 29.6 | 1.2-1.4, m | 1.2-1.4, m |
| 9 | 33.9-37.2 | 1.4-1.6, m | 1.4-1.6, m |
| 10 | 71.6, 71.7 | 3.59, m | 4.85, m |
| 11 | 33.9-37.2 | 1.4-1.6, m | 1.4-1.6, m |
| 12-13 | 29.6 | 1.2-1.4, m | 1.2-1.4, m |
| 14 | 33.9-37.2 | 1.4-1.6, m | 1.4-1.6, m |
| 15 | 74.0, 74.1 | 3.41, m | 4.85, m |
| 16 | 82.6 | 3.78, m | 3.96, m |
| 17-18 | 28.8, 28.1 | 1.65, 1.99, m และ 1.74, 1.93, m | 1.89, m และ 1.95, m |
| 19 | 82.6 | 3.78, m | 3.96, m |
| 20 | 74.2, 74.3 | 3.41, m | 4.85, m |
| 21 | 33.9-37.2 | 1.4-1.6, m | 1.4-1.6, m |
| 22-31 | 29.6 | 1.2-1.4, m | 1.2-1.4, m |
| 32 | 14.0, 14.1 | 0.88, t (7.0) | 0.89, t (7.0) |
| 33 | 151.9 | 7.19, br s | 7.08, br s |
| 34 | 78.0 | 5.06, q (6.7) | 5.02, q (5.5) |
| 35 | 19.1 | 1.43, d (6.7) | 1.40, d (6.7) |
| Acetate | - | - | 2.03, 2.04, 2.07 |



บทที่ 4

การอภิปรายและสรุปผล

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดด้วยเอทานอล จากเปลือกต้นข้าวหลาม *Goniothalamus marcanii* Craib พบว่ามีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคนในหลอดทดลอง อันได้แก่ เซลล์มะเร็งปอด, มะเร็งลำไส้, มะเร็งเต้านม, มะเร็งผิวหนัง, มะเร็งสมอง และรวมทั้งพบว่าให้ผลต่อการทดสอบฤทธิ์ฆ่า brine shrimp ด้วย จึงได้นำสารสกัดด้วยเอทานอลนี้มาทำการสกัดและแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี ได้สาร 4 กลุ่ม คือ สารกลุ่ม 1–azaanthraquinones สารกลุ่ม flavonoids สารกลุ่ม triterpenoids และสารกลุ่ม annonaceous acetogenins โดยสารกลุ่ม 1–azaanthraquinones ที่แยกได้เป็นสารชนิดใหม่ 1 สาร คือ marcanine C (NPF2593) และสารที่ทราบสูตรโครงสร้างแล้ว 2 สาร คือ marcanine A (NPK11916) และ dielsiquinone (NPF 2611) สารกลุ่ม flavonoids ที่แยกได้คือ pinocembrin (NPF2833) สารกลุ่ม triterpenoids ที่แยกได้เป็นสารชนิดใหม่คือ 21,23–epoxycycloart–24–ene–3–ol (NPF1452) ส่วนสารกลุ่ม annonaceous acetogenins ที่แยกได้เป็นส่วนผสมของสาร diastereomers 2 ชนิด (NPK038–1) คือ annonacin และ diastereomer ของ annonacin ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่ คือ 16S,19S annonacin สารกลุ่ม 1–azaanthraquinones และสารกลุ่ม annonaceous acetogenins ที่แยกได้แสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ข้างต้นในขนาด $ED_{50} 10^{-1}-10^{-2}$ มคก./มล. ส่วนสาร pinocembrin มีค่า $ED_{50} 2.5$ มคก./มล. และสาร triterpenoid ที่แยกได้ไม่มีฤทธิ์

การกำหนดสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้

1. NPK11916 (marcanine A)

สาร NPK11916 เป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองได้จาก F009 โดยผ่านการแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ใช้ ซิลิกาเจลเป็นคอลัมน์และใช้ เฮกเซน/ไดคลอโรมีเทน/เอทานอล เป็นตัวชะ สามารถแยกสารได้ 6.5 มก ($2.1 \times 10^{-4}\%$ นน/นน ของเปลือกต้น) ผลึกที่ได้นำมาทำการตกผลึกซ้ำในไดคลอโรมีเทน สารนี้เมื่อทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคนพบว่า มีฤทธิ์ในความเข้มข้น $ED_{50} 10^{-1}$ มคก./มล.

จากแมสสเปคตรัม แบบ high resolution electron impact (HREI) ตามรูปที่ 11 แสดงมวลของสาร ที่ m/z 239.0581 (100%) ดังนั้นสาร NPK 11916 จึงมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{14}H_9NO_3$ (ค่าจากการคำนวณ 239.0580) นอกจากนี้ในแมสสเปคตรัมยังแสดงการแตกตัวของโมเลกุลเป็นไอออนย่อย (fragment ions) ที่ m/z 211 (40%) และ 183 (9%) โดยเกิดจากการสูญเสีย CO ไป 1 และ 2 โมเลกุลตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ว่าควรจะมีกลุ่ม quinonoid ในโมเลกุล ซึ่ง

สอดคล้องกับข้อมูลในสเปกตรัมอินฟราเรด ที่แสดงการดูดกลืนแสงของหมู่คาร์บอนิลใน quinone nucleus ที่ 1684 และ 1646 cm^{-1} (รูปที่ 10) รวมทั้งข้อมูลของสเปกตรัมอุลตราไวโอเล็ต (รูปที่ 9) มีค่า λ_{max} ($\log \epsilon$) ที่ 223 (4.09), 260 (4.21), 295 (4.08), 345 (3.34) และ 406 (3.12) nm ซึ่งบ่งชี้ว่ามีหมู่ quinone ที่มีการคอนจูเกชัน (conjugation) ในโมเลกุล

การกำหนดตำแหน่งของโปรตอนในโครงสร้างทางเคมีของสาร NPK 11916 อาศัยค่า chemical shift (δ) และ coupling constant (J) ในสเปกตรัมของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์แบบ 1 มิติ (รูปที่ 12 ก-ค) ร่วมกับข้อมูลจากสเปกตรัมของเอ็นเอ็มอาร์แบบ 2 มิติ (^1H , ^1H COSY รูปที่ 14) จากสเปกตรัมของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์แบบ 1 มิติ ยืนยันว่า มีวงอโรเมติกที่มีการแทนที่แบบ ortho-disubstitution ซึ่งมีสัญญาณของโปรตอนที่มีการ coupling กัน 4 โปรตอน โดยโปรตอนคู่ที่อยู่ใกล้กลุ่มคาร์บอนิลมีสัญญาณที่ δ 8.24 ppm (dd, J = 7.6, 1.2 Hz) และ 8.19 ppm (dd, J = 7.6, 1.2 Hz) และโปรตอนคู่ที่อยู่ไกลจากกลุ่มคาร์บอนิลมีสัญญาณที่ δ 7.86 ppm (dt, J = 7.6, 1.2 Hz) และ 7.78 ppm (dt, J = 7.6, 1.2 Hz) โปรตอนทั้ง 4 จึงถูกกำหนดเป็น H-8, H-5, H-7, H-6 ตามลำดับ ในเป็นโครงสร้างของ anthraquinoid (Waterman และ Muhammad, 1985) โดยในสเปกตรัมของเอ็นเอ็มอาร์แบบ 2 มิติ แสดงสัญญาณของ H-8 มีการ ortho coupling กับ H-7 ด้วยค่า J เป็น 7.6 Hz และมีการ meta coupling กับ H-6 ด้วยค่า J เป็น 1.2 Hz ส่วน H-7 มีการ ortho coupling กับ H-6 และ H-8 ด้วยค่า J เป็น 7.6 Hz และมีการ meta coupling กับ H-5 ด้วยค่า J เป็น 1.2 Hz ส่วน H-6 มีการ ortho coupling กับ H-7 และ H-5 ด้วยค่า J เป็น 7.6 Hz และมีการ meta coupling กับ H-8 ด้วยค่า J เป็น 1.2 Hz สำหรับ H-5 มีการ ortho coupling กับ H-6 ด้วย ค่า J เป็น 7.6 Hz และ มีการ meta coupling กับ H-7 ด้วยค่า J เป็น 1.2 Hz นอกจากนี้สเปกตรัมของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์แบบ 1 มิติ ยังแสดงว่ามีกลุ่ม 4-methylpyridone โดยมีโปรตอนโอลิฟินิคที่ δ 6.69 ppm (q, J = 0.9 Hz, H-3) ซึ่งมีการ homoallylic coupling (J = 0.9 Hz) กับโปรตอนของเมทิลที่ δ 2.71 ppm (d, J = 0.9 Hz, 4-CH₃) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลในสเปกตรัมของเอ็นเอ็มอาร์แบบ 2 มิติ ที่ยืนยันการมีกลุ่ม 4-methylpyridone ในโมเลกุล ส่วนสัญญาณที่ δ 9.72 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณที่กว้างนั้นเป็น exchangable โปรตอน ที่เกิดจาก NH (ใน D₂O, รูปที่ 12 ค)

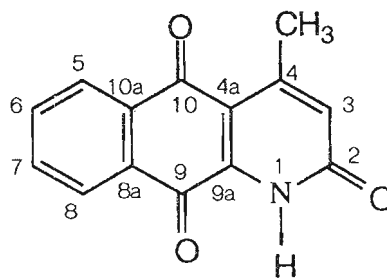
สเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ของสาร NPK11916 (รูปที่ 13 ก) ยืนยันว่ามีคาร์บอนทั้งหมด 14 อะตอม และสามารถแบ่งเป็นคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้โดยใช้วิธี DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) (รูปที่ 13 ข) โดยในสเปกตรัม DEPT 135 แสดงสัญญาณบวกของคาร์บอน methine และ methyl และสัญญาณลบของคาร์บอน methylene แต่ไม่แสดงสัญญาณคาร์บอน quaternary ดังนั้นคาร์บอนทั้งหมด 14 คาร์บอน จึงถูกกำหนดว่าเป็นคาร์บอน quaternary 8 คาร์บอน ที่สัญญาณ δ 181.4, 178.0, 160.4, 152.2, 139.8, 133.3, 130.0 และ 116.1 ppm. มี 5 คาร์บอน methine ชนิด sp^2 ที่ δ 135.8, 133.7, 127.7, 127.6 และ 126.7 ppm. และมีคาร์บอน methyl ที่ δ 22.8 ppm. การกำหนดตำแหน่งคาร์บอนให้สมบูรณ์ทำเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิคของเอ็นเอ็มอาร์แบบ 2 มิติคือ HSQC (High Sensitive Quantum Coherence) (รูปที่ 15 ก, ข) และ HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) (รูปที่ 16 ก, ข) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง โปรตอน และ คาร์บอน ผ่านทาง 1-bond และ long-range coupling ตามลำดับ จากสเปกตรัม HSQC แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง โปรตอน และ คาร์บอน ดังต่อไปนี้ H-3 (6.69 ppm) – C-3 (127.7 ppm), H-5 (8.19 ppm) – C-5

(126.7 ppm), H-6 (7.78 ppm) – C-6 (133.7 ppm), H-7 (7.86 ppm) – C-7 (135.8 ppm), H-8 (8.24 ppm) – C-8 (127.6 ppm), 4-CH₃ ($\delta_{\text{H}} = 2.71\text{ppm}$ และ $\delta_{\text{C}} = 22.8\text{ ppm}$)

ส่วนคาร์บอนชนิด quaternary ถูกกำหนดโดยอาศัย long range coupling ซึ่งปรากฏในสเปกตรัม HMBC สัญญาณ 2 แห่งในบริเวณ down field ที่ δ 181.4 (C-9) และ 178.0 ppm (C-10) เป็นของหมู่คาร์บอนิลของนิวเคลียส quinone ซึ่งยืนยันด้วย 3-bond coupling กับสัญญาณ H-8 (8.24 ppm) และ H-5 (8.19 ppm) ตามลำดับ สัญญาณที่ δ 160.4 ppm (C-2) เป็นของหมู่คาร์บอนิลของกลุ่ม lactam ซึ่งยืนยันด้วยอินฟราเรดสเปกตรัม ที่บ่งชี้ว่ามีกลุ่ม lactam (NHCO) ที่ $3540\text{--}3341\text{ cm}^{-1}$ และ 1646 cm^{-1} และในสเปกตรัมอุลตราไวโอเล็ต ที่แสดง bathochromic shift เมื่อเติม sodium hydroxide หรือ sodium acetate (Scott, 1964; Cook และคณะ, 1972; King, Dilling, and Tefertiller, 1972)

สัญญาณของคาร์บอนชนิด quaternary ที่ δ 152.2 ppm ซึ่งอยู่ down field มาก ถูกกำหนดให้เป็น C-9a เนื่องจากต่อโดยตรงกับไนโตรเจน และยืนยันด้วย 3-bond coupling กับสัญญาณของโปรตอนเมธิล ที่ δ 2.71 ppm ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับข้อมูลของ cleistopholine ซึ่งมีสัญญาณที่ δ 150.1 ppm (Tadic และคณะ 1987) สัญญาณที่ δ 116.1 ppm แสดง 3-bond coupling กับ H-3 (6.69 ppm) และ 4-CH₃ (2.71 ppm) จึงกำหนดเป็นสัญญาณของ C-4a และสัญญาณที่ δ 139.8 ppm เป็นของ C-4 ส่วนสัญญาณของ C-8a และ C-10a อยู่ที่ δ 133.3 และ 130.0 ppm ตามลำดับ เนื่องจากสัญญาณของ C-8a มี 3-bond coupling กับ H-5 (8.19 ppm) และ H-7 (7.86 ppm) ส่วนสัญญาณของ C-10a มี 3-bond coupling กับ H-6 (7.78 ppm) และ H-8 (8.24 ppm) long-range correlations ซึ่งอาศัยข้อมูลจากสเปกตรัม HMBC ได้สรุปแสดงไว้ในตารางที่ 9

เมื่อศึกษาข้อมูลดังกล่าวแล้วพบว่า NPK11916 เป็นสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ที่ชื่อว่า 1-aza-4-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-9,10-anthracenedione หรือ marcanine A ซึ่งเคยมีการสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง 2-amino-1,4-naphthoquinone กับ ethyl acetate (Marcos, Predegal และ Avendano 1994) อย่างไรก็ตามรายงานนี้เป็นการรายงานการค้นพบสารนี้ในธรรมชาติเป็นครั้งแรกและยังสามารถกำหนดค่า chemical shifts ของโปรตอนและคาร์บอนได้อย่าง ครบถ้วน



NPK11916

นอกจากนี้พบว่าการแตกตัวของโมเลกุลเป็นไอออนย่อยใน HREI-MS สนับสนุนสูตรโครงสร้างของสาร NPK11916. โดยที่สารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ส่วนใหญ่ molecular ion มักจะเป็น base peak ด้วย การแตกตัวของโมเลกุลเป็นไอออนย่อยที่สำคัญ คือ การสูญเสียโมเลกุลของ CO ของสารกลุ่ม quinones ทำให้ได้ไอออนย่อยที่ m/z 211.0646 (40%, $M^+ - CO$) และ 183.0686 (9%, $M^+ - 2CO$)

ตารางที่ 9 แสดงข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์ของ 1H (500 MHz) และ ^{13}C (125 MHz), multiplicity, coupling constants (J, Hz), $^1H-^1H$ และ long-range $^1H-^{13}C$ correlations ของสาร NPK11916 ใน $CDCl_3$

| ตำแหน่ง | δ_C (ppm) | δ_H (ppm) multiplicity (J, Hz) | $^1H-^1H$ correlations | long-range $^1H-^{13}C$ correlations |
|-------------------|---------------------|------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|
| 1 | - | 9.72 br s | - | - |
| 2 | 160.4 | - | - | - |
| 3 | 127.7 | 6.69 q (0.9) | 4-CH ₃ | C-4a, 4-CH ₃ |
| 4 | 139.8 | - | - | - |
| 4a | 116.1 | - | - | - |
| 5 | 126.7 | 8.19 dd (7.6, 1.2) | H-6 | C-7, C-8a, C-10 |
| 6 | 133.7 | 7.78 dt (7.6, 1.2) | H-5, H-7 | C-9, C-10a |
| 7 | 135.8 | 7.86 dt (7.6, 1.2) | H-6, H-8 | C-5, C-8a |
| 8 | 127.6 | 8.24 dd (7.6, 1.2) | H-7 | C-6, C-9, C-10a |
| 8a | 133.3 | - | - | - |
| 9 | 181.4 | - | - | - |
| 9a | 152.2 | - | - | - |
| 10 | 178.0 | - | - | - |
| 10a | 130.0 | - | - | - |
| 4-CH ₃ | 22.8 | 2.71d (0.9) | H-3 | C-3, C-9a |

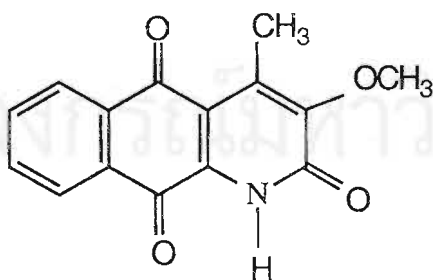
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. NPF 2611 (dielsiquinone)

สาร NPF 2611 เป็นผลึกสีเหลือง ได้จาก F074 ซึ่งนำมาแยกโดยใช้ preparative TLC บนซิลิกาเจล และ 1% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน เป็นตัวชะ ได้สาร 2.7 มก (8.6×10^{-5} % นน./นน. ของเปลือกต้น) สารนี้เมื่อทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคนพบว่า มีฤทธิ์ในความเข้มข้น $ED_{50} 10^{-2}$ มคก./มล.

จากการศึกษาข้อมูลทางสเปกโทรโกปีพบว่า NPF2611 เป็นสารกลุ่ม 1-azaanthraquinone เช่นเดียวกับสาร NPK11916 เนื่องจากแมสสเปกตรัมแบบ HREI (รูปที่ 18) มีสัญญาณไอออนโมเลกุล (molecular ion) ที่ m/z 269.0680 (100%) จึงควรมีสสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{11}NO_4$ (ค่าจากการคำนวณ 269.0688) และจากลักษณะการแตกเป็นไอออนย่อยก็บ่งชี้ว่ามีกลุ่ม quinonoid ในโมเลกุล ซึ่งสอดคล้องกับสเปกตรัมอินฟราเรด ที่แสดงการดูดกลืนแสงของหมู่คาร์บอนิลที่เลขคลื่น 1685, 1672 และ 1662 cm^{-1} (รูปที่ 17)

การกำหนดโครงสร้างทางเคมีของสาร NPF2611 อาศัยค่า chemical shifts และ coupling constants ทั้งในโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ และคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (รูปที่ 19 ก, ข และ รูปที่ 20) โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลของ NPK11916 ซึ่งเป็นสารกลุ่มเดียวกันที่พิสูจน์สูตรโครงสร้างไว้แล้วข้างต้น (ตารางที่ 10 และ 11) โดยที่โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของ NPF2611 จะมีความแตกต่างคือจะไม่พบสัญญาณของ 3-H ที่ δ 6.69 ppm แต่มีสัญญาณของ 3-OCH₃ ที่ δ 4.06 แทน ส่วนสัญญาณอื่นยังคงเดิม แสดงว่าตำแหน่งที่ 3 มีการแทนที่ H ด้วย OCH₃ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลในคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ ซึ่งมีสัญญาณที่ δ 60.0 ppm. ซึ่งเป็นสัญญาณของ 3-OCH₃ จึงสรุปได้ว่า สาร NPF2611 คือ dielsiquinone ซึ่งเคยแยกได้จากเนื้อไม้ของ *Guatteria dielsiana* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Annonaceae เช่นเดียวกัน (Goulart และคณะ 1986) อย่างไรก็ตามรายงานนี้เป็นการรายงานการค้นพบสารนี้ในเป็นครั้งแรกในพืชสกุล *Goniothalamus* และยังสามารถกำหนดค่า chemical shifts ของโปรตอนและคาร์บอนได้อย่างครบถ้วน รวมทั้งการรายงานฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารชนิดนี้



NPF2611

3. NPF2593 (marcanine C)

สาร NPF2593 เป็นผลึกรูปเข็มสีส้ม ได้จาก F077 โดยนำมาแยกด้วย preparative TLC บนซิลิกาเจล ใช้ 2% เมทานอลใน ไดคลอโรมีเทน เป็นตัวชะ ได้สาร NPF2593 ซึ่งนำมาตกผลึกซ้ำใน เมทานอล ได้ผลึกรูปเข็มสีส้ม 9 มก (2.9×10^{-4} %น.น./น.น. ของเปลือกต้น) สารนี้เมื่อทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคนพบว่า มีฤทธิ์ในความเข้มข้น $ED_{50} 10^{-1}$ มก./มล.

จากการศึกษาข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีพบว่า NPF2593 เป็นสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones เช่นเดียวกับสาร 2 ชนิดแรก จากแมสสเปกตรัมแบบ HREI (รูปที่ 23) แสดงว่าสารนี้ มีน้ำหนักโมเลกุลที่ m/z 299.0792 (83%) จึงสามารถกำหนดสูตรโมเลกุลได้เป็น $C_{16}H_{13}NO_5$ (ค่าจากการคำนวณ, 299.0790) จากลักษณะการแตกเป็นไอออนย่อยบ่งชี้ว่ามีกลุ่ม quinonoid ในโมเลกุล ซึ่งสอดคล้องกับสเปกตรัมอินฟราเรด ที่แสดงการดูดกลืนแสงของหมู่คาร์บอนิล ที่เลขคลื่น 1657 cm^{-1} นอกจากนี้ยังมีการดูดกลืนแสงของหมู่ hydroxyl เป็นสัญญาณกว้างเพิ่มขึ้นมาด้วย ที่เลขคลื่นในช่วง $3720\text{--}3234 \text{ cm}^{-1}$ (รูปที่ 22) ส่วนสเปกตรัมอุลตราไวโอเล็ตของ NPF2593 ไม่เกิดการ bathochromic shift เมื่อเติม sodium hydroxide หรือ sodium acetate (รูปที่ 21 ก, ข, ค) แสดงว่ามีการแทนที่ที่ N

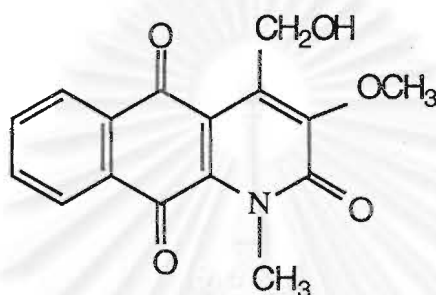
การกำหนดโครงสร้างทางเคมีของสาร NPF2593 อาศัยค่า chemical shifts และ coupling constants ของโปรตอน และคาร์บอน ทั้งในโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ และคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ ทั้งชนิด 1 มิติ และ 2 มิติ และเปรียบเทียบกับข้อมูลของสาร NPK11916 และ NPF2611 ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น (รูปที่ 30 และ 31, ตารางที่ 10 และ 11)

จากสเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของ NPF2593 (รูปที่ 24) ไม่มีสัญญาณของ 3-H ที่ δ 6.69 ppm แต่มีสัญญาณของ 3-OCH₃ ที่ δ 4.10 ppm เหมือนกับของ NPF2611 นอกจากนี้ยังไม่มีสัญญาณของ 4-CH₃ ที่ δ 2.66 ppm แต่มีสัญญาณที่ δ 4.92 ซึ่งเป็นของ CH₂OH และยังมีสัญญาณกว้างอยู่ที่ δ 3.90 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของ OH นอกจากนี้ยังมีสัญญาณของ N-CH₃ ที่ δ 3.97 ppm จากข้อมูลในสเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์แบบ 2 มิติ (¹H, ¹H-COSY) (รูปที่ 26) พบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนอะโรมาติก (H5-H8) เช่นเดียวกับใน NPK11916 นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณของ 4-CH₂ และ OH (δ 3.97 และ 3.90 ppm ตามลำดับ)

จากการเปรียบเทียบข้อมูลคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ของสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ทั้งสามชนิด (รูปที่ 31 และตารางที่ 11) และจากสเปกตรัม DEPT 135 (รูปที่ 25 ข) สามารถกำหนดได้ว่าสัญญาณที่ δ 56.3 ppm เป็นของ CH₂-OH ส่วนสัญญาณที่ δ 60.9 ppm เป็นของ O-CH₃ และ δ 35.4 ppm เป็นของ N-CH₃ จากข้อมูลในสเปกตรัมเอ็นเอ็มอาร์แบบ 2 มิติ (¹³C-¹H COSY) (รูปที่ 27 ก, ข) สามารถกำหนด chemical shifts ของคาร์บอนและโปรตอน ตำแหน่งเดียวกันได้ดังนี้ N-CH₃ (δ_H 3.97, δ_C 35.4 ppm), 3-OCH₃ (δ_H 4.10, δ_C 60.9 ppm), 4-CH₂OH (δ_H 4.92, δ_C 56.3 ppm) จากสเปกตรัมเอ็นเอ็มอาร์แบบ 2 มิติชนิด ¹³C-

^1H COLOC (รูปที่ 28 ก ข) ซึ่งแสดง long-range correlations พบว่า 4- CH_2 มี correlations กับ C-4a (119.9 ppm), C-4 (135.6 ppm) และ C-3 (151.0 ppm) N- CH_3 มี correlations กับ C-9a (140.2 ppm) และ C-2 (159.1 ppm) และ 3- OCH_3 มี correlation กับ C-3 (151.0 ppm)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จึงสรุปได้ว่า NPF2593 มีสูตรโครงสร้างเป็น 1-aza-1-methyl-3-methoxy-4-hydroxymethyl-2-oxo-9,10-anthracenedione ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่ จึงตั้งชื่อว่า marcanine C



NPF2593

ตารางที่ 10. เปรียบเทียบ δ_{H} (ppm), multiplicity (J, Hz) ของสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ที่แยกได้

| Position | δ_{H} , multiplicity (J, Hz) | | |
|----------------------|--------------------------------------------|--------------------------|--------------------|
| | NPK11916 | NPF2593 | NPF2611 |
| 1 | 9.72 br s | - | - |
| 2 | - | - | - |
| 3 | 6.69 q (0.9) | - | - |
| 4 | - | - | - |
| 4a | - | - | - |
| 5 | 8.19 dd (7.6, 1.2) | 8.09 dd (6.7, 2.3) | 8.16 dd (7.6, 0.9) |
| 6 | 7.78 dt (7.6, 1.2) | 7.73 ddd (7.3, 6.9, 1.8) | 7.76 dt (7.7, 0.9) |
| 7 | 7.86 dt (7.6, 1.2) | 7.79 ddd (7.3, 6.9, 1.8) | 7.83 dt (7.7, 0.9) |
| 8 | 8.24 dd (7.6, 1.2) | 8.14 dd (6.7, 2.3) | 8.22 dd (7.7, 0.9) |
| 1-NCH ₃ | - | 3.97 s | - |
| 3-OCH ₃ | - | 4.01 s | 4.06 s |
| 4-CH ₃ | 2.71 d (0.9) | - | 2.66 s |
| 4-CH ₂ OH | - | 4.92 br s | - |
| 4-CH ₂ OH | - | 3.90 br s | - |

ตารางที่ 11. เปรียบเทียบ δ_C (ppm) ของสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ที่แยกได้

| Position | δ_C | | |
|----------------------|------------|---------|---------|
| | NPK11916 | NPF2593 | NPF2611 |
| 1 | – | – | – |
| 2 | 160.4 | 159.1 | 156.8 |
| 3 | 127.7 | 151.0 | 152.8 |
| 4 | 139.8 | 135.6 | 134.7 |
| 4a | 116.1 | 119.9 | 119.7 |
| 5 | 126.7 | 126.8 | 126.5 |
| 6 | 133.7 | 134.2 | 133.6 |
| 7 | 135.8 | 134.5 | 134.5 |
| 8 | 127.6 | 126.7 | 127.5 |
| 8a | 133.3 | 132.1 | 130.0 |
| 9 | 181.4 | 184.2 | 182.0 |
| 9a | 152.2 | 140.2 | 137.6 |
| 10 | 178.0 | 179.9 | 177.4 |
| 10a | 130.0 | 132.1 | 128.9 |
| 1-NCH ₃ | – | 35.4 | – |
| 3-OCH ₃ | – | 60.9 | 60.0 |
| 4-CH ₃ | 22.8 | – | 13.9 |
| 4-CH ₂ OH | – | 56.3 | – |

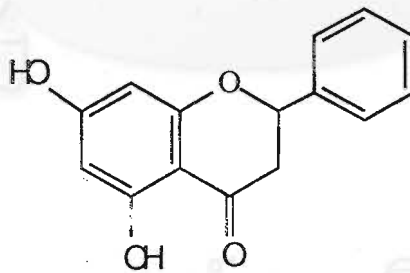
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. NPF2833 (pinocembrin)

สาร NPF2833 เป็นสารสีเหลือง แยกได้จาก F074 โดยวิธี preparative TLC บนซิลิกาเจล และใช้ 1% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน เป็นตัวชะ แยกได้สารผสม เมื่อทำ preparative TLC อีกครั้ง โดยใช้ 10% อีเธอร์ในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ แยกได้สาร 1 มก. (1.5×10^{-7} % นน./นน. ของเปลือกต้น) สารนี้เมื่อทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคนพบว่า มีฤทธิ์ในความเข้มข้น ED₅₀ 2.5 มคก./มล.

ข้อมูลจากแมสสเปกตรัมแบบ EIMS (รูปที่ 33) สารนี้มีไอออนของโมเลกุลที่ m/z 256 (71%) จากสเปกตรัมอินฟราเรด (รูปที่ 32) พบว่ามีการดูดกลืนแสงของหมู่ไฮดรอกซิล เป็นช่วงกว้างที่เลขคลื่น 3500–3200 cm^{-1} และของหมู่คาร์บอนิลที่เลขคลื่น 1631 cm^{-1}

จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (รูปที่ 34) พบว่ามีสัญญาณของ 3 โปรตอนที่มีการ coupling กันแบบ ABX ที่ δ 2.85 ppm. (dd, J = 3.1, 17.2 Hz), 3.09 ppm (dd, J = 13.1, 17.2 Hz) และ 5.43 ppm (dd, J = 3.1, 13.1 Hz) จึงกำหนดให้เป็น H-3a, H-3b และ H-2 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ 5-OH ที่ δ 12.03 ppm เป็น sharp singlet และอยู่ที่บริเวณ down field มาก ซึ่งส่งผลจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิลที่ C-4 นอกจากนี้ยังพบโปรตอน 5 โปรตอน ที่ δ 7.47–7.37 ppm. ซึ่งเป็นโปรตอนอะโรมาติกของ ring B ส่วนโปรตอนอะโรมาติกที่ตำแหน่ง 6 และ 8 ของ ring A จะได้รับอิทธิพลของ 5-OH และ 7-OH ทำให้เคลื่อนไปที่บริเวณ up field กว่า คือ ที่ δ 6.01 และ 6.00 ppm ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจาก คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ ทำให้สรุปได้ว่า NPF2833 เป็นสารพวก flavanones ที่เคยพบแล้วจากพืชในวงศ์เดียวกันคือ *Uvaria chamae* ซึ่งมีชื่อว่า pinocembrin (Lasswell และ Hufford, 1977)



NPF2833

จากการแตกเป็นไอออนย่อยใน EIMS สนับสนุนว่าสาร NPF 283 มีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารกลุ่ม flavanones โดยมี base peak ที่ m/z 179 ซึ่งเป็นไอออนย่อยของ $\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_5$, จากการแตกเป็นไอออนย่อยแบบ Retro-Diels-Alder ที่ ring C เกิดเป็นไอออนย่อย 2 ไอออน ที่ m/z 152 (88%) และ 104 (27%)

5. NPF1452 (21,23-epoxycycloart-24-ene-3-ol)

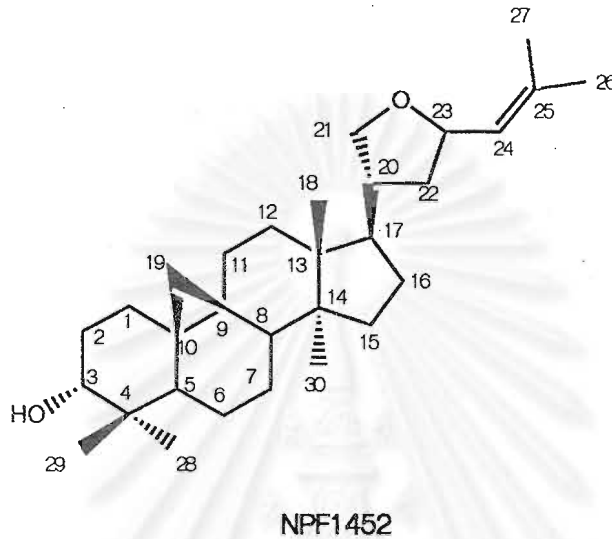
สาร NPF1452 เป็นสารสีขาว ที่แยกได้จาก F073 โดยการทำให้ preparative TLC มีซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ และ 3% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน เป็นตัวชะ แยกได้ NPF1452 ปริมาณ 5.5 มิลลิกรัม (8.1×10^{-7} นน./นน. ของเปลือกต้น) จากแมสสเปกตรัม HREI (รูปที่ 37) แสดงสัญญาณไอออนของโมเลกุล (M^+) ที่ m/z 440.3651 ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{48}O_2$ จากสเปกตรัมอินฟราเรด (รูปที่ 36) พบว่ามีสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งเป็นสัญญาณกว้าง ที่เลขคลื่น $3400-3300\text{ cm}^{-1}$ และเมื่อศึกษาโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของอนุพันธ์ acetate พบว่า NPF 1452 มีหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ที่ตำแหน่ง C-3

การกำหนดโครงสร้างของสาร NPF1452 อาศัยค่า chemical shift และ coupling constant ทั้งในสเปกตรัมโปรตอนและคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์แบบ 1 มิติ และใช้ข้อมูลสนับสนุนจากสเปกตรัมโปรตอนและคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์แบบ 2 มิติ ทั้งชนิด $^1H-^1H$ COSY (รูปที่ 41) และชนิด $^{13}C-^1H$ COSY (รูปที่ 42) และ HMBC (รูปที่ 43) มาช่วยในการกำหนดค่า chemical shifts ทั้งของโปรตอนและคาร์บอนได้ รวมทั้งบอกความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนที่ coupling กัน ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอน และคาร์บอน ที่ห่างออกไป 2-3 bonds ดังสรุปไว้ตารางที่ 12

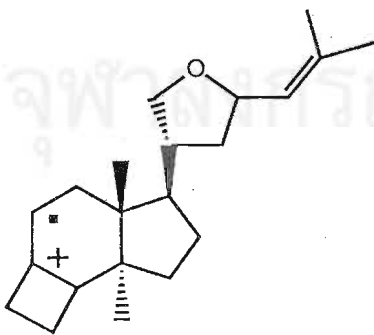
จากการศึกษาข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีพบว่าสาร NPF1452 เป็นสารกลุ่ม triterpenoid ชนิด cycloartane โดยข้อมูลของสเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (รูปที่ 39) และ สเปกตรัม DEPT 135 (รูปที่ 40) พบว่าสาร NPF1452 มีคาร์บอนทั้งสิ้น 30 อะตอม ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล และพบว่าสเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (รูปที่ 38) แสดงหมู่ cyclopropyl โดยมีสัญญาณ 2 โปรตอน ที่บริเวณ up field เป็น broad doublet ($J = 4.5\text{ Hz}$) ที่ δ 0.31 (Ha-19) และ 0.57 (Hb-19) ppm ซึ่งเป็นของโปรตอนที่ C-19 โดยยืนยันได้จาก long-range correlations ระหว่าง H2-19 กับ C-1, C-9, และ C-10 ในสเปกตรัม HMBC (รูปที่ 43) และยังมีสัญญาณโปรตอน singlet ของหมู่ tertiary methyl 4 หมู่ ที่ δ 0.81 (29-CH₃), 0.89 (18-CH₃), 0.97 (28-CH₃) และ 0.98 (30-CH₃) ppm และมีโปรตอนของ vinylic methyl อีก 2 หมู่ เป็นสัญญาณ broad singlet อยู่ในบริเวณ down field กว่าที่ δ 1.70 (27-CH₃) และ 1.75 (26-CH₃) ppm ซึ่ง coupling กับสัญญาณโปรตอน olefinic ที่ δ 5.18 (H-24) ppm นอกจากนี้ยังพบโปรตอน methylene ที่ δ 3.39 (Ha-21), 3.94 (Hb-21) ppm และโปรตอน methine ที่ δ 4.53 (H-23) ppm จากค่า chemical shifts ของโปรตอนเหล่านี้ แสดงว่ามี oxygen เชื่อมระหว่างคาร์บอนทั้งสองเกิดเป็นวง tetrahydrofuran ขึ้นใน side chain และ การ coupling ระหว่าง H-23 กับ H-24 ($J = 8.5\text{ Hz}$) ยืนยันว่ามีพันธะคู่อยู่ที่ side chain ส่วนสัญญาณโปรตอนที่ δ 3.28 (H-3) มีลักษณะเป็น multiplet แสดงว่าการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-3 เป็นแบบ axial หรือ α configuration และทำให้ H-3 ที่เป็น equatorial เกิด W-type coupling correlation กับ Ha-1 ได้ใน $^1H-^1H$ COSY จากสเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ยืนยันสัญญาณคาร์บอน methylene (C-19) ที่ δ 30.0 ppm และยืนยันสัญญาณคาร์บอน methyl 6 คาร์บอนที่ δ 13.7 (C-29), 18.0 (C-27), 18.5 (C-30), 19.3 (C-18), 25.4 (C-28) และ 25.8 (C-26) ppm นอกจากนี้ยังพบสัญญาณคาร์บอนที่ต่อกับ oxygen ที่ δ 71.4 (C-21), 75.2 (C-23) และ 78.7 (C-3) ppm และพบสัญญาณคาร์บอน พันธะคู่ 1 คู่ ที่ δ 126.2 (C-24) และ 135.7 (C-25) ppm นอกจากนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ของ NPF1452 กับ สารพวก cycloartanes

หลายชนิดที่มีโครงสร้างหลักเหมือนกัน (Inoue และคณะ 1985, Herz และคณะ 1985) พบว่าค่า δ ของคาร์บอน ต่าง ๆ ในโครงสร้างหลักมีความใกล้เคียงกันมาก

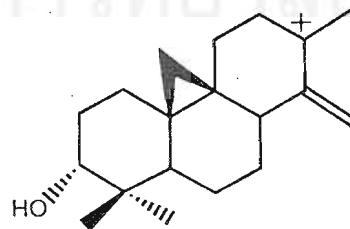
จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นสามารถพิสูจน์ได้ว่า NPF1452 เป็นสารพวก cycloartane triterpenoids ชนิดใหม่ที่มีชื่อว่า 21,23-epoxycycloart-24-ene-3-ol ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีดังนี้



นอกจากนี้ข้อมูลการแตกเป็นไอออนย่อยใน EIMS ยังสามารถสนับสนุนโครงสร้างของสาร NPF1452 ได้ โดยที่การแตกเป็นไอออนย่อยเริ่มจากวง 9:19-cyclopropane เกิดเป็นไอออน a ที่ m/z 300 (57%) และมีการแตกที่วง D พร้อมกับการ rearrangement ของโปรตอน 1 อะตอมเกิดเป็นไอออน b ที่ m/z 273 (8%) (Arthur, Ko และ Cheung, 1974) นอกจากนี้ยังพบไอออนย่อยต่าง ๆ ที่ m/z 425 $[M-CH_3]^+$ (100%), m/z 422 $[M-H_2O]^+$ (35%), m/z 407 $[M-CH_3-H_2O]^+$ (41%), m/z 385 $[M-CH=C-(CH_3)_2]^+$ (17%) และ ไอออนของส่วน side chain ที่แตกออก ที่ m/z 125 $[C_8H_{13}O]^+$ (95%)



ไอออน a, $M/Z = 300$ (57%)



ไอออน b, $M/Z = 273$ (8%)

ตารางที่ 12 แสดงข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์ของ ^1H (500 MHz) และ ^{13}C (125 MHz), ของสาร NPF1452 และ ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับโปรตอน ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY), โปรตอนกับคาร์บอนในสเปกตรัม HMBC

| ตำแหน่งที่ | δ_{H} (ppm) | δ_{C} (ppm) | ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอน กับ โปรตอน ใน $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY | ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอน กับ คาร์บอน ใน HMBC |
|------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1. | a 1.28 b 1.58 | 31.9 | 1b, 2a, 2b, 3 1a, 2b | C-3, C-10, C-19 C-3, C-10 |
| 2. | a 1.58 b 1.76 | 30.3 | 1a, 2b, 3 1a, 1b, 2a, 3 | |
| 3. | 3.28 | 78.7 | 1b, 2a, 2b | C-28, C-29 |
| 4. | - | 40.5 | - | - |
| 5. | 1.35 | 47.0 | 1b, 6a, b | - |
| 6. | a 0.81 b 1.63 | 20.9 | 5, 6b, 7a 5, 6a, 7a | C-8, C-10 - |
| 7. | a 1.15 b 1.96 | 26.3 | 7b, 8 6b, 7a | - - |
| 8. | 1.53 | 47.8 | 7a, 11a, b, 30 | C-9, C-10, C-11, C-13, C-19 |
| 9. | - | 20.0 | - | - |
| 10. | - | 26.4 | - | - |
| 11. | a 1.09 b 1.36 | 26.2 | 12a, b, 11b | - - |
| 12. | 1.40 | 35.8 | 17, 11a | C-18 |
| 13. | - | 48.3 | - | - |
| 14. | - | 45.4 | - | - |
| 15. | a 1.38 b 1.87 | 27.9 | 15b, 17 15a, 17 | - - |
| 16. | a 1.25 b 1.51 | 31.3 | 16b, 17 16a, 17 | - - |
| 17. | 1.75 | 50.9 | 15a, 15b, 16a, 16b, 20, 22a | - |
| 18. | 0.89 | 19.3 | - | C-12, C-13, C-14 |
| 19. | a 0.31 b 0.57 | 30.0 | 19b 19a | C-1, C-9, C-10 C-9, C-10 |

ตารางที่ 11 (ต่อ)

| ตำแหน่งที่ | δ_H (ppm) | δ_C (ppm) | ความสัมพันธ์ระหว่าง โปรตอน กับ โปรตอน ใน 1H , 1H -COSY | ความสัมพันธ์ระหว่าง โปรตอน กับ คาร์บอน ใน HMBC |
|------------|------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 20. | 2.22 | 43.7 | 17, 21a, 21b, 22a, 22b | - |
| 21. | a 3.39 b 3.94 | 71.4 | 20, 21b 20, 21a | - C-22, C-23 |
| 22. | a 1.30 b 2.10 | 40.4 | 20, 22b, 23 20, 22a, 23 | C-21 - |
| 23. | 4.53 | 75.2 | 20, 22a, 22b, 24 | - |
| 24. | 5.18 | 126.2 | 23, 26, 27 | C-26, C-27 |
| 25. | - | 135.7 | - | - |
| 26. | 1.75 | 25.8 | 24 | C-24, C-25, C-27 |
| 27. | 1.70 | 18.0 | 24 | C-24, C-25, C-26 |
| 28. | 0.97 | 25.4 | - | C-4 |
| 29. | 0.81 | 13.7 | - | C-4 |
| 30. | 0.98 | 18.5 | - | C-13, C-14 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. NPK038-1 (สารผสม annonacin และ 16S,19S annonacin)

สาร NPK038-1 แยกได้จาก F038 โดยการทำให้ preparative TLC ได้เป็นผงอันยรูป ลักษณะเหมือนไข ข้อมูลจากแมสสเปกตรัมชนิด FAB (Fast Atom Bombardment) พบว่าสัญญาณไอออน (M+1)⁺ ที่ m/z 597 ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลของ NPK038-1 จึงเป็น 596 (รูปที่ 46)

จากข้อมูลของสเปกตรัมอินฟราเรดพบสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล ที่เลขคลื่น 1748 cm⁻¹ (รูปที่ 45) ส่วนข้อมูลจากสเปกตรัมอุลตราไวโอเล็ต พบว่ามี λ_{max} ที่ 208 nm. (รูปที่ 44) จากสเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์แบบ 1 มิติ (รูปที่ 48 ก, ข) และแบบ 2 มิติ ¹H-¹H COSY (รูปที่ 50) พบว่ามีโปรตอนอยู่ 6 โปรตอนที่มี coupling correlations กันคือ ระหว่างสัญญาณที่ δ 7.19 (H-33), 5.06 (H-34) และ 1.43 (35-CH₃) ppm และระหว่างสัญญาณที่ δ 2.51 (H.3a), 2.40 (H-3b), และ 3.81 (H-4) ppm และจากสเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (รูปที่ 49 ก) ร่วมกับสเปกตรัม ¹³C-¹H COSY (รูปที่ 51 ก, ข) พบสัญญาณของ 7 คาร์บอน เช่นกันที่ δ 174.6 (C-1), 151.9 (C-33), 131.1 (C-2), 78.0 (C-34), 69.7 (C-4), 33.3 (C-3) และ 19.1 (C-35) ppm ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เป็นลักษณะเฉพาะของวง methylated α,β -unsaturated γ -lactone ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-4 อยู่ด้วย ซึ่งพบได้ทั่วไปในสารกลุ่ม annonaceous acetogenins (Rupprecht, Hui และ McLaughlin, 1990; Fang และคณะ, 1993)

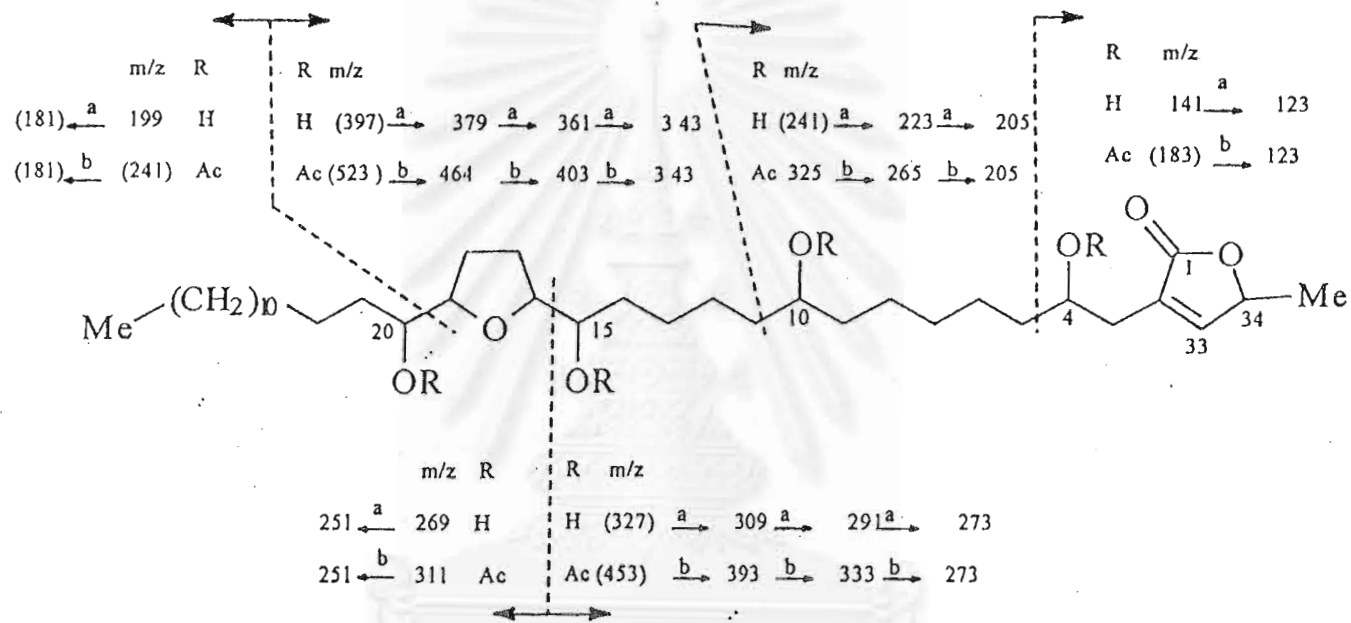
ในการวิเคราะห์ข้อมูลจากสเปกโตรสโคปีเพิ่มเติมพบว่าโครงสร้างทางเคมีของสาร NPK 038-1 ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล 4 หมู่อยู่ในโมเลกุล ซึ่งยืนยันด้วยสเปกตรัมอินฟราเรดที่มีสัญญาณในช่วงกว้างที่เลขคลื่น 3487-3386 cm⁻¹ ประกอบกับข้อมูลจากการแตกเป็นไอออนย่อย ใน FAB-MS ที่มีการสูญเสียโมเลกุลของน้ำ (m/z 18) ถึง 4 ครั้ง จากไอออน [MH]⁺ ของสาร NPK038-1 เป็นไอออนย่อยที่ m/z 579, 561, 543 และ 525 และมีการสูญเสียโมเลกุลของ AcOH (m/z 60) ถึง 4 ครั้ง จากไอออน [MH]⁺ ที่ m/z 765 ของอนุพันธ์ tetraacetate ใน FAB-MS (รูปที่ 52) เป็นไอออนย่อยที่ m/z 705, 645, 585 และ 525 นอกจากนี้สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของสาร NPK038-1 ยังมีสัญญาณของโปรตอน hydroxylated methine 4 โปรตอน ที่ δ 3.81 (H-4), 3.59 (H-10) และ 3.41 (H-15, H-20) ppm ซึ่งเคลื่อนไปที่บริเวณ down field ในสเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของอนุพันธ์ tetraacetate (รูปที่ 54) ที่ δ 5.12 และ 4.85 ppm นอกจากนี้ยังพบว่าโมเลกุลของสาร NPK038-1 มีวง tetrahydrofuran (THF) อยู่ 1 วง เนื่องจากในโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของสาร NPK038-1 จะมีสัญญาณของโปรตอน oxygenated methine 2 โปรตอน ใน THF ที่ δ 3.78 (H-16 และ H-19) ppm ซึ่งมีการเคลื่อนไปที่บริเวณ down field น้อย (δ 3.96 ppm) ในอนุพันธ์ tetraacetate จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นแสดงว่า NPK038-1 เป็นสารพวก mono-THF annonaceous acetogenins ที่มีสูตรโมเลกุลเป็น C₃₅H₆₄O₇

การกำหนดตำแหน่งของ THF และ หมู่ไฮดรอกซิลทั้ง 4 หมู่ ในโครงสร้างโมเลกุลของ NPK038-1 สามารถทำได้โดยวิเคราะห์การแตกเป็นไอออนย่อยในสเปกตรัม HREI-MS ของสาร NPK038-1 (รูปที่ 47) และ ของอนุพันธ์ tetraacetate (รูปที่ 53) ดังสรุปไว้ในตารางที่ 13 และ แผนภูมิที่ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตำแหน่งของวง THF ควรจะเป็นระหว่าง C-16 และ C-19 และ ของหมู่ไฮดรอกซิล ที่ C-4, C-10, C-15 และ C-20 เช่นเดียวกับสาร annonacin (McCloud และคณะ, 1987)

ตารางที่ 13 ค่า exact mass และ elemental composition ของไอออนย่อยจากสเปกตรัม HREI-MS ของ NPK038-1 และ NPK038-1 tetraacetate

| ไอออนย่อยของ NPK038-1 | | | ไอออนย่อยของ NPK038-1 tetraacetate | |
|--------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| cleaved bond | Composition | m/z (%rel. intensity) | Composition | m/z (%rel. intensity) |
| C-4/C-5 | C ₇ H ₇ O ₂ | 123.0427 (1.8) | C ₇ H ₇ O ₂ | 123.0441 (9.5) |
| | C ₇ H ₉ O ₃ | 141.0566 (4.7) | | |
| C-10/C-11 | C ₁₃ H ₁₇ O ₂ | 205.1206 (3.1) | C ₁₃ H ₁₇ O ₂ | 205.1213 (9.2) |
| | C ₁₃ H ₁₉ O ₃ | 223.1332 (1.4) | C ₁₅ H ₂₁ O ₄ | 265.1631 (1.4) |
| | | | | C ₁₇ H ₂₅ O ₆ |
| C-15/C-16 | C ₁₇ H ₃₁ O | 251.2377 (1.7) | C ₁₇ H ₃₁ O | 251.2388 (38.5) |
| | C ₁₇ H ₃₃ O ₂ | 269.2473 (2.9) | C ₁₉ H ₃₅ O ₃ | 311.2549 (1.1) |
| | C ₁₈ H ₂₅ O ₂ | 273.1842 (6.5) | C ₁₈ H ₂₅ O ₂ | 273.1768 (6.7) |
| | C ₁₈ H ₂₇ O ₃ | 291.1936 (7.2) | C ₂₀ H ₂₉ O ₄ | 333.2072 (1.9) |
| | C ₁₈ H ₂₉ O ₄ | 309.2082 (5.0) | C ₂₂ H ₃₂ O ₆ | 393.2543 (1.3) |
| C-19/C-20 | C ₁₃ H ₂₇ O | 199.1461 (2.6) | C ₂₂ H ₃₁ O ₆ | 343.2293 (17.4) |
| | C ₂₂ H ₃₁ O ₃ | 343.2305 (5.8) | | |
| | C ₂₂ H ₃₃ O ₄ | 361.2386 (5.3) | | |
| | C ₂₂ H ₃₅ O ₅ | 379.2500 (0.2) | | |
| | | | C ₂₄ H ₃₅ O ₅ | 403.2526 (6.7) |
| | | | C ₂₆ H ₃₉ O ₇ | 463.2739 (6.4) |

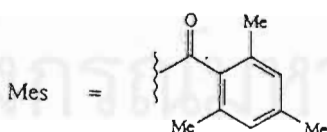
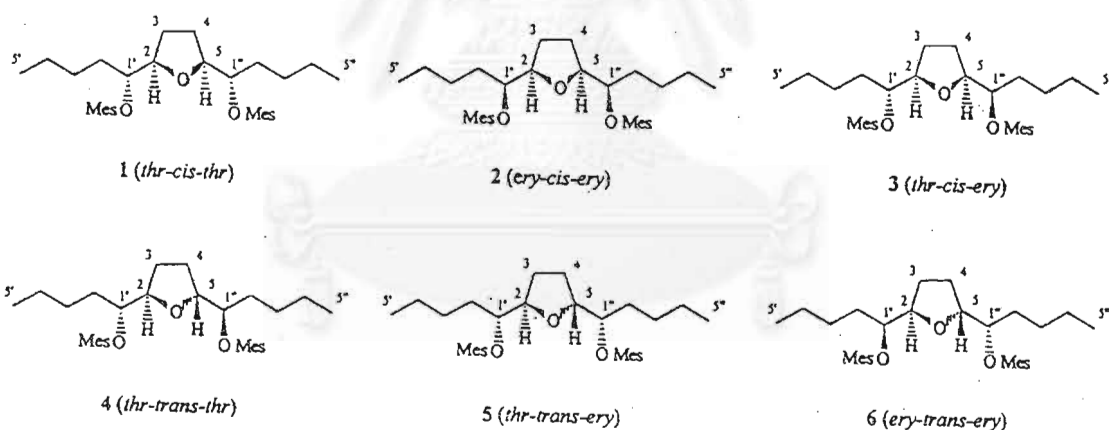
เมื่อวิเคราะห์สเปกตรัมเอ็นเอ็มอาร์ พบว่า NPK038-1 เป็นของผสมที่แยกไม่ได้ ของ สาร acetogenins ที่เป็น isomer กัน 2 สาร ในอัตราส่วน 1:1 โดยเรียกสารทั้งสองว่า NPK038-1-A1 และ NPK038-1-A2 จากการเปรียบเทียบสเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์กับสาร annonacin (รูปที่ 48 ข) และ ¹H-¹H COSY (รูปที่ 50) แสดงสัญญาณ multiplet ของโปรตอน methylene 2 คู่ ที่ δ 1.65, 1.99 และ 1.74, 1.93 ppm ซึ่งเป็น โปรตอนที่ C-17 และ C-18 ในวง THF ของ NPK038-1-A1 และ NPK038-1-A2 ตามลำดับ นอกจากนี้การเปรียบเทียบสเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์กับสาร annonacin (รูปที่ 49 ข) ช่วยยืนยันการมี 2 isomeric acetogenins โดยมีสัญญาณ 6 คู่ที่ δ 14.0-14.1 (C-32), 28.1-28.8 (C-17, C-18), 69.7-69.8 (C-4), 71.6-71.7 (C-10), 74.0-74.1 (C-15) และ 74.2-74.3 (C-20) ppm.



แผนภูมิที่ 4. แสดงการแตกเป็นไอออนย่อยใน HR-EIMS ของ NPK038-1 และ อนุพันธ์ tetraacetate (ตัวเลขในวงเล็บ = ไม่นับไอออนย่อย, a = การสูญเสีย H₂O 1 โมเลกุล, b = การสูญเสีย AcOH 1 โมเลกุล)

เพื่อพิสูจน์ relative stereochemistry ที่โปรตอน methine ของวง THF (C-16, C-19) และของหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ข้างเคียง (C-15, C-20) ของสาร isomers ทั้งสอง จึงได้นำสาร NPK038-1 มาเตรียมเป็นอนุพันธ์ permesitoate แล้วแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC ใช้ซิลิกาเจล C-18 เป็นตัวขับ และใช้อาซิโตไนตริล/เมทานอล (4:1) เป็นตัวชะ ได้อนุพันธ์ permesitoates ของ NPK038-1-A1 และ NPK038-1-A2 เมื่อวิเคราะห์สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ และ สเปกตรัม ^1H - ^1H COSY ของอนุพันธ์ permesitoates โดยใช้ C_6D_6 เป็นตัวทำละลาย (รูปที่ 55-58) แล้วนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับสารสังเคราะห์ต้นแบบ 6 สาร ดังรูปที่แสดงข้างล่าง สารสังเคราะห์ต้นแบบจะมี relative stereochemistry แตกต่างกันที่คาร์บอน methine ของวง THF และของหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ข้างเคียง คือ สาร dimesitoate esters ของ α,α -dibutyl-2,5-tetra hydrofuran dimethanols (Gale และคณะ 1993a, b) โดยเปรียบเทียบผลต่างสัมบูรณ์ของค่า δ ระหว่าง โปรตอน methine ของวง THF และระหว่าง โปรตอน methine ของหมู่ ester สารที่มี relative stereochemistry เหมือนกันจะมีผลรวมของผลต่างสัมบูรณ์ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด ตามสูตรคือ

$$\Sigma \Delta \delta \text{H} = | \delta \text{H}_{\text{obs.}} - \delta \text{H}_{\text{model}} |_{\text{ring methine}} + | \delta \text{H}_{\text{obs.}} - \delta \text{H}_{\text{model}} |_{\text{ester methine}}$$



จากการวิเคราะห์พบว่า อนุพันธ์ permesitoates ของ NPK038-1-A1 และ NPK 038-1-A2 มีโปรตอน methine ของวง THF และ โปรตอน methine ของหมู่ ester มีลักษณะที่สมมาตรกัน (symmetry) ของเนื่องจากมีสัญญาณเพียงสัญญาณเดียวในแต่ละตำแหน่ง คือที่ δ 4.13, 4.12 ppm และ ที่ δ 5.32, 5.54 ppm ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบผลต่างสัมบูรณ์ของค่า δ แล้วสรุปว่า relative stereochemistry ที่โปรตอน methine ของวง THF (C-16, C-19) และของหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ข้างเคียง (C-15, C-20) ของสาร NPK038-1-A1 และ NPK 038-1-A2 เป็น *threo-trans-threo* และ *erythro-trans-erythro* ตามลำดับ ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 14 และ 15

ตารางที่ 14 แสดงการกำหนด relative stereochemistry ที่โปรตอน methine ของวง THF (C-16, C-19) และของหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ข้างเคียง (C-15, C-20) ของ NPK038-1-A1

| NPK 038-1-A1 stereochemistry ที่เป็นไปได้ ของ C-15/C-16 และ C-20/C-19 | ring methine | | ester methine | | การกำหนด relative stereochemistry | |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|-----------------------------------|---|
| | $\delta H_{\text{obs.}}$ = 4.13 | | $\delta H_{\text{obs.}}$ = 5.32 | | | |
| | δH_{model} | $ \Delta\delta H $ | δH_{model} | $ \Delta\delta H $ | $\Sigma\Delta\delta H$ | |
| <i>threo-cis-threo</i> | 3.97 | 0.16 | 5.29 | 0.03 | 0.19 | |
| <i>erythro-cis-erythro</i> | 3.93 | 0.20 | 5.45 | 0.13 | 0.33 | |
| <i>threo-trans-threo</i> | 4.09 | 0.04 | 5.35 | 0.03 | 0.07 | / |
| <i>erythro-trans-erythro</i> | 4.05 | 0.08 | 5.48 | 0.16 | 0.24 | |

ตารางที่ 15 แสดงการกำหนด relative stereochemistry ที่โปรตอน methine ของวง THF (C-16, C-19) และของหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ข้างเคียง (C-15, C-20) ของ NPK038-1-A2

| NPK 038-1-A2 stereochemistry ที่เป็นไปได้ ของ C-15/C-16 และ C-20/C-19 | ring methine | | ester methine | | การกำหนด relative stereochemistry | |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|-----------------------------------|---|
| | $\delta H_{\text{obs.}}$ = 4.12 | | $\delta H_{\text{obs.}}$ = 5.54 | | | |
| | δH_{model} | $ \Delta\delta H $ | δH_{model} | $ \Delta\delta H $ | $\Sigma\Delta\delta H$ | |
| <i>threo-cis-threo</i> | 3.97 | 0.15 | 5.29 | 0.25 | 0.40 | |
| <i>erythro-cis-erythro</i> | 3.93 | 0.19 | 5.45 | 0.09 | 0.28 | |
| <i>threo-trans-threo</i> | 4.09 | 0.03 | 5.35 | 0.19 | 0.22 | |
| <i>erythro-trans-erythro</i> | 4.05 | 0.07 | 5.48 | 0.06 | 0.13 | / |

การกำหนด absolute configuration ของคาร์บอน carbinol ทำได้โดยประยุกต์ใช้วิธีของ Mosher (Ohtani และคณะ, 1991 และ Rieser และคณะ, 1992) โดยสังเคราะห์อนุพันธ์ Mosher esters (หรือ MTPA esters) จาก (S) และ (R)- α -methoxy(fluoromethyl)phenylacetic acid (MTPA) ของสาร NPK038-1 แล้วนำอนุพันธ์นี้ไปทำการวิเคราะห์สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ และสเปกตรัม ^1H - ^1H COSY ของอนุพันธ์ NPK038-1-A1 per (S) และ per (R) MTPA esters (รูปที่ 59-62) และ ของอนุพันธ์ NPK038-1-A2 per (S) และ per (R) MTPA esters (รูปที่ 63-66) เพื่อหาค่าความแตกต่างของ δ ของโปรตอนที่อยู่รอบ ๆ ของแต่ละคาร์บอน carbinol ของอนุพันธ์ per (S) และ per (R) MTPA esters ($\Delta\delta_{\text{H}} = \delta_{\text{S}} - \delta_{\text{R}}$) โปรตอนที่มี $\Delta\delta_{\text{H}}$ เป็นบวกจะอยู่ทางขวาของคาร์บอน carbinol ส่วนโปรตอนที่มี $\Delta\delta_{\text{H}}$ เป็นลบจะอยู่ทางซ้าย ดังนั้น การกำหนด configuration จะเป็นไปตามกฎ Cahn-Ingold-Prelog จากการวิเคราะห์แสดงว่าคาร์บอน carbinol ที่ C-4, C-15 และ C-20 ของ NPK038-1-A1 และ NPK038-1-A2 มี absolute configuration เป็น R ทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 16 และ 17

อย่างไรก็ตามการกำหนด absolute stereochemistry ของ carbinol center ที่ C-10 ของ NPK038-1-A1 และ NPK038-1-A2 ไม่สามารถทำได้โดยวิธี Mosher เพราะค่า δ ของโปรตอนที่ CH₂-8, CH₂-9, CH₂-11 และ CH₂-12 ใน MTPA ester ไม่สามารถกำหนดได้ เนื่องจากการเหลื่อมซ้อนกันของสัญญาณเหล่านี้ ส่วน absolute configuration ของคาร์บอน ใน butenolide ที่ C-34 ถูกกำหนดเป็น S โดยเปรียบเทียบกับข้อมูล NMR ของสาร annonacin ซึ่งมี absolute configuration เป็น S ที่ C-34 (Fang และคณะ, 1993; Rieser และคณะ 1992)

เนื่องจาก absolute configuration ของสาร NPK038-1-A1 และ NPK038-1-A2 ที่ C-15, C-20 เป็น R เหมือนกัน แต่สาร NPK038-1-A1 มี relative stereochemistry ของวง THF เป็น *threo-trans-threo* จึงสามารถกำหนด absolute configuration ของ C-16 และ C-19 เป็น R ดังนั้นสาร NPK039-1-A1 คือ annonacin ซึ่งเป็นสารที่เคยแยกได้จาก *Annona densicoma*, *A. squamosa* และ *G. giganteus* (Rupprecht และคณะ, 1990) ส่วนสาร NPK038-1-A2 มี relative stereochemistry ของวง THF เป็น *erythro-trans-erythro* ดังนั้น absolute configuration ของ C-16 และ C-19 จึงเป็น S สาร NPK038-1-A2 เป็นสารชนิดใหม่เรียกชื่อว่า 16S,19S annonacin ซึ่งรายงานนี้ถือเป็นการค้นพบครั้งแรกว่าสาร annonaceous acetogenins มี relative stereochemistry ของวง THF เป็นแบบ *erythro-trans-erythro*

สถาบันวิจัยบรการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

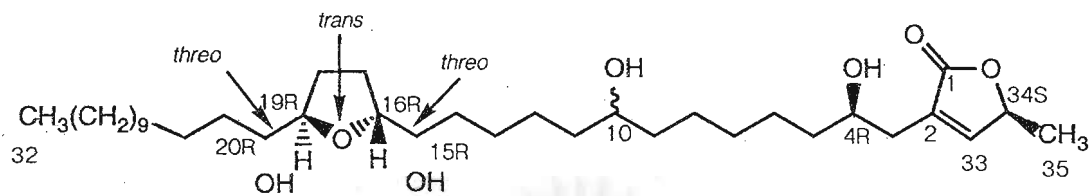
ตารางที่ 16 แสดงการกำหนด absolute configuration ที่ C-4 ของ NPK038-1-A1 และ NPK038-1-A2 โดยเปรียบเทียบกับ annonacin

| อนุพันธ์ MTPA ester | MTPA configuration | $\Delta\delta H = \delta_S - \delta_R$ | | | | | Configuration |
|-----------------------------------|-----------------------|----------------------------------------|-------------------|------|------|-------|---------------|
| | | H ₂ -5 | H ₂ -3 | H-33 | H-34 | Me-35 | |
| annonacin | S | 1.61 | 2.57 | 6.70 | 4.84 | 1.26 | 4R |
| | R | 1.56 | 2.62 | 6.94 | 4.88 | 1.28 | |
| | $\Delta\delta$ | pos. | neg. | neg. | neg. | neg. | |
| NPK038-1-A1 และ NPK038-1-A2 | S | 1.62 | 2.57 | 6.74 | 4.87 | 1.27 | 4R |
| | R | 1.57 | 2.62 | 6.95 | 4.90 | 1.30 | |
| | $\Delta\delta$ | pos. | neg. | neg. | neg. | neg. | |

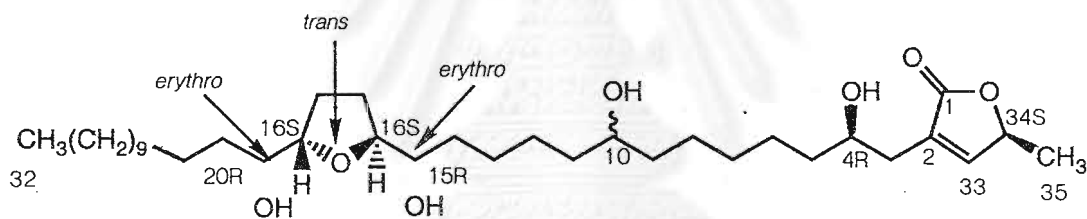
ตารางที่ 17 แสดงการกำหนด absolute configuration ที่ C-15 และ C-20 ของ NPK038-1-A1 และ NPK038-1-A2 โดยเปรียบเทียบกับ annonacin

| อนุพันธ์ MTPA ester | MTPA configuration | $\Delta\delta H = \delta_S - \delta_R$ | | | | | Configuration |
|------------------------|-----------------------|----------------------------------------|------|-------------------------|------|--------------------|---------------|
| | | H ₂ -14 | H-16 | H ₂ 17/18 | H-19 | H ₂ -21 | |
| annonacin | S | 1.53 | 3.89 | 1.66 | 3.89 | 1.53 | 15R, 20R |
| | R | 1.46 | 3.98 | 1.37 | 3.98 | 1.46 | |
| | $\Delta\delta$ | pos. | neg. | neg. | neg. | pos. | |
| NPK038-1-A1 | S | 1.59 | 3.90 | 1.65 | 3.90 | 1.59 | 15R, 20R |
| | R | 1.50 | 4.00 | 1.38 | 4.00 | 1.50 | |
| | $\Delta\delta$ | pos. | neg. | neg. | neg. | pos. | |
| NPK038-1-A2 | S | 1.38 | 3.86 | 1.81 | 4.05 | 1.67 | 15R, 20R |
| | R | 1.35 | 3.89 | 1.85 | 4.11 | 1.67 | |
| | $\Delta\delta$ | pos. | neg. | neg. | neg. | zero | |

โครงสร้างทางเคมีของ NPK038-1 A1 (annonacin) และ NPK038-2 A2 (16S,19S annonacin) แสดงได้ดังรูปข้างล่างนี้



NPK038-1-A1 (annonacin)



NPK038-1-A2 (16S,19S annonacin)

วาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

จากการนำสารที่แยกได้จากเปลือกต้นของ *Goniothalamus marcanii* ไปตรวจสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งบางชนิดของคน ในหลอดทดลองดังแสดงผลในตารางที่ 18 พบว่า สารกลุ่ม 1-azaanthraquinones และสารกลุ่ม annonaceous acetogenins แสดงฤทธิ์ในการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิดที่ใช้ทดสอบได้ดี โดยมีค่า ED₅₀ อยู่ในช่วง 10⁻¹-10⁻² มคก./มล. ส่วนสาร pinocembrin (NPF2833) ซึ่งเป็นสารพวก flavanones มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคนบ้างคือ เซลล์มะเร็งปอด (A459) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT 29) โดยมีค่า ED₅₀ 2.5 มคก./มล. ส่วนสาร 21, 23-epoxycycloart-24-ene,3-ol (NPF1452) ไม่พบว่ามีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

สารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ที่แยกได้ คือ marcanine A (NPK11916) และ marcanine C (NPF2593) ออกฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิดมีค่า ED₅₀ ในระดับ 10⁻¹ มคก./มล. แต่สาร dielsiquinone (NPF2611) ออกฤทธิ์ได้ดีกว่าในเซลล์มะเร็งปอด (A-549), เซลล์มะเร็งเต้านมของคน (MCF 7) และ เซลล์มะเร็งผิวหนัง (RPMI) โดยมีค่า ED₅₀ ในระดับ 10⁻² มคก./มล. นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสาร dielsiquinone มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Epstein-Barr virus ได้ (Konoshima และคณะ 1989) จากการเปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีของสารทั้ง 3 ชนิดพอที่จะชี้แนะในเบื้องต้นได้ว่า ถ้าใช้หมู่ OCH₃ แทนที่ตำแหน่ง 3 จะเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และ ถ้าใช้หมู่ N-CH₃ แทนที่ N-H ก็จะมีผลลดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

สาร mono-THF annonaceous acetogenins ที่แยกได้คือ NPK038-1 เป็นสารผสมในอัตราส่วน 1:1 ของสาร annonacin และ 16S,19S annonacin แต่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับเดียวกับสาร annonacin จึงอาจสรุปได้ว่า configuration ที่ต่างกันที่วง THF (16R,19R และ 16S,19S) ไม่มีผลต่อฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ และจากการรายงานสรุปฤทธิ์ทางชีวภาพของสารกลุ่มนี้ (Rupprecht และคณะ, 1990 และ Fang และคณะ, 1993) ได้เสนอว่าฤทธิ์ทางชีวภาพของสารกลุ่มนี้นอกจากขึ้นอยู่กับวง α,β -unsaturated γ -lactone แล้วยังขึ้นกับจำนวนของวง THF ในโมเลกุลด้วย สารที่มีวง THF 2 วงติดกัน (adjacent bis-THF) จะมีฤทธิ์แรงกว่าสารที่มีวง THF วงเดียว (mono-THF)

ตารางที่ 18 แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งบางชนิดของคนของสารที่แยกได้

| สารที่แยกได้ | ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคน (ED ₅₀ มคก./มล.) | | | | |
|--------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | A 549 | HT 29 | MCF 7 | RPMI | U 251 |
| NPK 11916 | 1x10 ⁻¹ | 1x10 ⁻¹ | 1x10 ⁻¹ | 1x10 ⁻¹ | 2x10 ⁻¹ |
| NPF 2593 | 3x10 ⁻¹ | 1x10 ⁻¹ | 3x10 ⁻¹ | 2x10 ⁻¹ | - |
| NPF 2611 | 3x10 ⁻² | 3x10 ⁻¹ | 3x10 ⁻² | 3x10 ⁻² | 1x10 ⁻¹ |
| NPK 038-1 | 1x10 ⁻² | 4x10 ⁻¹ | 1 | 5 | 1x10 ⁻¹ |
| NPF 2833 | 2.5 | 2.5 | - | - | - |

บทที่ 5

ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากเปลือกต้นข้าวหลามมีฤทธิ์ที่ดีในการบินพิษต่อเซลล์มะเร็งของคนหลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งปอด (A549), เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT29), เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF 7), เซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวหนัง (RPMI) และเซลล์มะเร็งสมอง (U251) และยังมีฤทธิ์ที่ดีมากในการทดสอบการฆ่า brine shrimp และได้ทำการสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าวได้สาร 2 กลุ่ม คือ สารกลุ่ม 1-azaanthraquinones และ สารกลุ่ม annonaceous acetogenins

สารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ที่พบในพืชชนิดนี้เป็นสารที่มีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นจึงเป็นปัญหาในการที่จะทำการศึกษากิจกรรมทางชีวภาพ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในขั้นตอนต่อไป แต่เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มนี้ไม่ยุ่งยากซับซ้อน จึงมีความเป็นไปได้ในการเพิ่มปริมาณของสารโดยวิธีการสังเคราะห์ โดยที่ได้เคยมีการสังเคราะห์สารกลุ่มนี้ได้ โดยใช้ปฏิกิริยาระหว่าง 2-amino-1,4-naphthoquinone และ ethyl acetoacetate (Marcos, Pedregal และ Avendano 1994) ซึ่งคาดว่าวิธีนี้น่าจะนำมาประยุกต์ในสังเคราะห์สาร marcanine A และ สารอนุพันธ์ 1-azaanthraquinone ชนิดอื่น ๆ ได้ นอกจากนี้ควรที่จะทำการสกัดแยกสารจาก fractions อื่นซึ่งมีแนวโน้มว่าจะพบอนุพันธ์ชนิดใหม่ ซึ่งสามารถทำให้เรามีความเข้าใจในความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างและการออกฤทธิ์ของสารได้ดีขึ้น และควรทำการศึกษาสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ของพืชในสกุลนี้ชนิดอื่น ๆ ซึ่งอาจพบการผลิตสารในปริมาณสูงก็ได้

สารกลุ่ม annonaceous acetogenins ที่พบในพืชชนิดนี้เป็นสารที่มีปริมาณสูง แต่เป็นสารที่มีโมเลกุลซับซ้อน เนื่องจากมี chiral center หลายแห่ง จึงมีโอกาสที่จะพบสาร isomers ได้หลายชนิด ดังนั้นจึงคาดว่านอกจากสารผสมของ annonacin และ 16S,19S annonacin แล้ว น่าจะมีสาร annonaceous acetogenins ชนิดอื่นอีก จึงควรทำการแยกสารชนิดใหม่ในกลุ่มนี้จาก fractions อื่นที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนี้ควรเน้นการศึกษา stereochemistry ของสารในกลุ่มนี้เพื่อใช้ในการอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่าง stereochemistry และการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้ ซึ่งยังไม่มีข้อมูลรูปที่แน่นอน และเนื่องจากสารหลายชนิดในกลุ่มนี้ยังมีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง ดังนั้นจึงควรที่จะทำการตรวจสอบฤทธิ์ในการฆ่าแมลงของสารที่แยกได้ควบคู่กันไปด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Alkofahi, A., et al. 1990. Gigantecin : A novel antimitotic and cytotoxic acetogenin, with nonadjacent tetrahydrofuran rings, from *Goniothalamus giganteus* (Annonaceae). **Experientia** 46 : 539–541.
- Alkofahi, A., Rupprecht, J.K., Smith, D.L., Chang, Ch.-J., and McLaughlin, J.L. 1988. Goniiothalamycin and annonacin : Bioactive acetogenins from *Goniothalamus giganteus* (Annonaceae). **Experientia**.44 : 83–85.
- Arthur, H.R., Ko, P.D.S. and Cheung, H.T. 1974. Triterpenes of **Lithocarpus** Species. **Phytochemistry** 13 : 2551–2557.
- Bhakuni, R.S., Shukla, Y.N., and Thakur, R.S. 1987 Triterpenoids from *Cornus capitata* . **Phytochemistry** 26(9) : 2607–2610.
- Birch, A.J., Butler, D.N., Effenberger, R., Rickards, R.W., and Simpson, T.J. 1979. Studies in relation to biosynthesis. Part 47. Phomazarin. Part 1. The structure of phomazarin, an azaanthraquinone produced by *Pyrenochaeta terrestris* Hansen. **J. Chem. Soc. Perkin I** : 807–815.
- Cave, A., et al. 1993. Recent advances in the acetogenins of Annonaceae. In K.R. Downum et al. (eds.), **Phytochemical potential of tropical plants**, pp. 167–202. New York : Plenum Press.
- Colman–Saizarbitoria, T., et al. 1994. Bioactive annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopiia aromatica*.. **J. Nat. Prod.** 57 : 486–493.
- Colman–Saizarbitoria, T., Gu, Z.–M., and McLaughlin, J.L. 1994. Two new bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopiia aromatica*. **J. Nat. Prod.** 57 : 1661–1669.
- Cook, M.J., Katrizky, A.R., Linda, P., and Tack, R.D. 1972. Aromaticity and tautomerism. Part I. The aromatic resonance energy of 2–pyridone and the related thione, methide, and imine. **J. Chem. Soc. Perkin II** : 1295–1301.

- Craib, W.G. 1931. *Florae Siamensis Enumeratio. A list of the plants known from Siam with records of their occurrence.* vol. 1 : Polypetalae. Bangkok : Published under the auspices of the Siam Society.
- Din, L.B., Colegate, S.M., and Razak, D.A. 1990. Scorazanone, a 1-azaanthraquinone from *Goniothalamus scortechinii*. **Phytochemistry** 29 : 346–248.
- Fang, X.-P., Anderson, J.E., Smith, D.L., McLaughlin, J.L., and Wood, K.V. 1992a. Gigantetronenin and gigantrionenin : novel cytotoxic acetogenins from *Goniothalamus giganteus*. **J. Nat. Prod.** 55 : 1655–1663.
- Fang, X.-P., Anderson, J.E., Smith, D.L., Wook, K.V., and McLaughlin, J.L. 1992b. Giganenin, a highly potent monotetrahydrofuran acetogenin and 4-deoxy-gigantecin from *Goniothalamus giganteus*. **Heterocycles** 34 : 1075–1083.
- Fang, X.-P., et al 1991. Gigantetrocin and gigantriocin : Two novel bioactive annonaceous acetogenins from *Goniothalamus giganteus*. **Heterocycles** 32 : 11–17.
- Fang, X.-P., Rieser, M.J., Gu, Z.-M., Zhao, G.-X., and McLaughlin, J.L. 1993. Annonaceous acetogenins : an updated review. **Phytochemical Analysis** 4 : 27–48.
- Gale, J.B., et al. 1993a. Stereochemistry of monotetrahydrofuran moiety in cytotoxic polyketides. Part A : Synthesis of model compounds. **Tetrahedron Lett.** 34 : 5847–5850.
- Gale, J.B., et al. 1993b. Stereochemistry of monotetrahydrofuran moiety in cytotoxic polyketides. part B : Application of proton chemical shift patterns. **Tetrahedron Lett.** 34 : 5851–5854.
- Goulart, M.O.F., Santana, A.E.G., Oliveira, A.B.D., Oliveira, G.G.O., and Maia, J.G.S. 1986. Azafluorenones and azaanthraquinone from *Guatteria dielsiana*. **Phytochemistry** 25 : 1691–1695.
- Gu, z.-M., Fang, X.-P., Miesbauer, L.R., Smith, D.L., and McLaughlin, J.L. 1993a. 30-, 31-, and 32-Hydroxybullatacinones : Bioactive terminally hydroxylated annonaceous acetogenins from *Annona bullata*. **J. Nat. Prod.** 56 : 870–876.

- Gu, Z.-M., Fang, X.-P., Rieser, M.J., et al. 1993. New cytotoxic annonaceous acetogenins : Bullatanocin and *cis*- and *trans*-bullatanocinone, from *Annona bullata*(Annonaceae). **Tetrahedron** 49 : 747-754.
- Gu, Z.-M., Fang, X.-P., Zeng, L., and McLaughlin, J.L. 1994. Goniocin from *Goniothalamus giganteus* : The first tri-THF annonaceous acetogenin. **Tetrahedron Lett.** 35 : 5367-5368.
- Gu, Z.-M., Fang, X.-P., L., Wood, K.V., and McLaughlin, J.L., 1993b. Bullacin : A new cytotoxic annonaceous acetogenin from *Annona bullata*.. **Heterocycles** 36 : 2221-2228.
- Herz, W. Watanabe, K., Kulanthaivel, P., and Blount, J.F. 1985 Cycloarthanes from *Lindheimeria Texana*. **Phytochemistry** 24(11): 2645-2654.
- Hui, Y.-H., Rupprecht, J.K., Anderson, J.E., et al. 19989. Bullatalicin, a novel bioactive acetogenin from *Annona bullata*(Annonaceae). **Tetrahedron** 45 : 6941-6948.
- Hui, Y.-H., Rupprecht, J.K., Liu, Y.M., et al. 1989. Bullatacin and bullatacinone : Two highly potent bioactive acetogenins from *Annona bullata*.. **J. Nat. Prod.** 52 : 463-477.
- Inoue, T., Sakurai, N., Nagai, M., and Peigen, X. 1985 Beesioside III, a cyclolanostanol xyloside from the rhizomes of *Beesia calthaefolia* and *Souliea vaginata*.. **Phytochemistry**..24(6) : 1329-1331.
- King, S.S.T., Dilling, W.L., and Tefertiller, N.B. 1972. An infrared study of the tautomerism of chlorinated 2-pyridinols isolated in an argon matrix. **Tetrahedron** 28 : 5859-5863.
- Lasswell, Jr., W.L. and Hufford, C.D. 1977. Cytotoxic C-Benzylated Flavonoids from *Uvaria chamae*. **J. Org. Chem.** 42(8) : 1295-1301.
- Leboeuf, M., Cave, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B., and Mukherjee R. 1982. The Phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry** 21 : 2783-2813.
- Marcos, A., Pedregal, C., and Avendano, C. 1994. Synthesis of 2- and 4-oxo-1H-1-azaanthracene-9,10-diones from 2-amino-1,4-naphthoquinone. **Tetrahedron Lett.** 50 : 12941-12952.

- McCloud, T.G., Smith, D.L., Chang, C.-J., and Cassady, J.M. 1987. Annonacin, a novel, biologically active polyketide from *Annona densicoma*... **Experientia** 43 : 947-949
- Rasamizafy, S., Hocquemiller, R., Cassels, B.K., and Cave, A. 1987. Alcaloides de *Annona hayesii*. **J. Nat. Prod.** 50 : 759-761.
- Reiser, J.M., et al. 1992. Determination of absolute configuration of stereogenic carbinol centers in Annonaceous acetogenins by ^1H - and ^{19}F -NMR analysis of Mosher ester derivatives. **J. Am. Chem. Soc.** 114 : 10203-10213.
- Rieser, M.J., Kozlowski, J.F., Wood, K.V., and McLaughlin, J.L. 1991. Muricatacin : A simple biologically active acetogenin derivative from the seeds of *Annona muricata* (Annonaceae). **Tetrahedron Lett.** 32 :1137-1140.
- Royal Botanic Gardens, Kew. 1922. **Bulletin of miscellaneous information.** London : Published by His Majesty's stationary office.
- Rupprecht, J.K., et al. 1986. Asimicin, a new cytotoxic and pesticidal acetogenin from the pawpaw, *Asimina triloba* (Annonaceae). **Heterocycles** 24 : 1197-1201.
- Rupprecht, J.K., Hui, Y.-H., and McLaughlin, J.L., 1990. Annonaceous acetogenins : A review. **J. Nat. Prod.** 53 : 237-278.
- Scott, A.I. 1964. **Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products**, pp. 165-190. New York : Pergamon Press (The Macmillan Co.)
- Sinclair J. 1955. A revision of the Malayan Annonaceae. **The Gardens' Bulletin Singapore** 14 : 149-516.
- Tadic, D., Cassels, B.K., Leboeuf, M., and Cave, A. 1987. Kinabaline and the aporphinoid biogenesis of azaanthracene and azafluorene alkaloids. **Phytochemistry** 26 : 537-541.
- Tem Smitinand. 1980. **Thai plant names (Botanical names-Vernacular names)**, pp. 166-167. Bangkok : Funny publishing limited partnership.
- Waterman, P.G., and Muhammand, I. 1985. Sesquiterpenes and alkaloids from *Cleistopholis patens*. **Phytochemistry** 24 : 523-527.

Zhao, G., Hui, Y.-H., Rupprecht, J.K., McLaughlin, J.L., and Wood, K.V. 1992. Additional bioactive compounds and trilobacin, a novel highly cytotoxic acetogenin, from the bark of *Asimina triloba*. **J. Nat. Prod.** 55 : 347–356.

Zhao, G.-X., et al. 1993. Biologically active acetogenins from stem bark of *Asimina triloba*. **Phytochemistry** 33 : 1065–1073.

Zhao, G.-X., Miesbauer, L.R., Smith, D.L., and McLaughlin, J.L. 1994. Asimin, asiminacin, and asiminecin : Novel highly cytotoxic asimicin isomers from *Asimina triloba*. **J. Med. Chem.** 37 : 1971–1976.

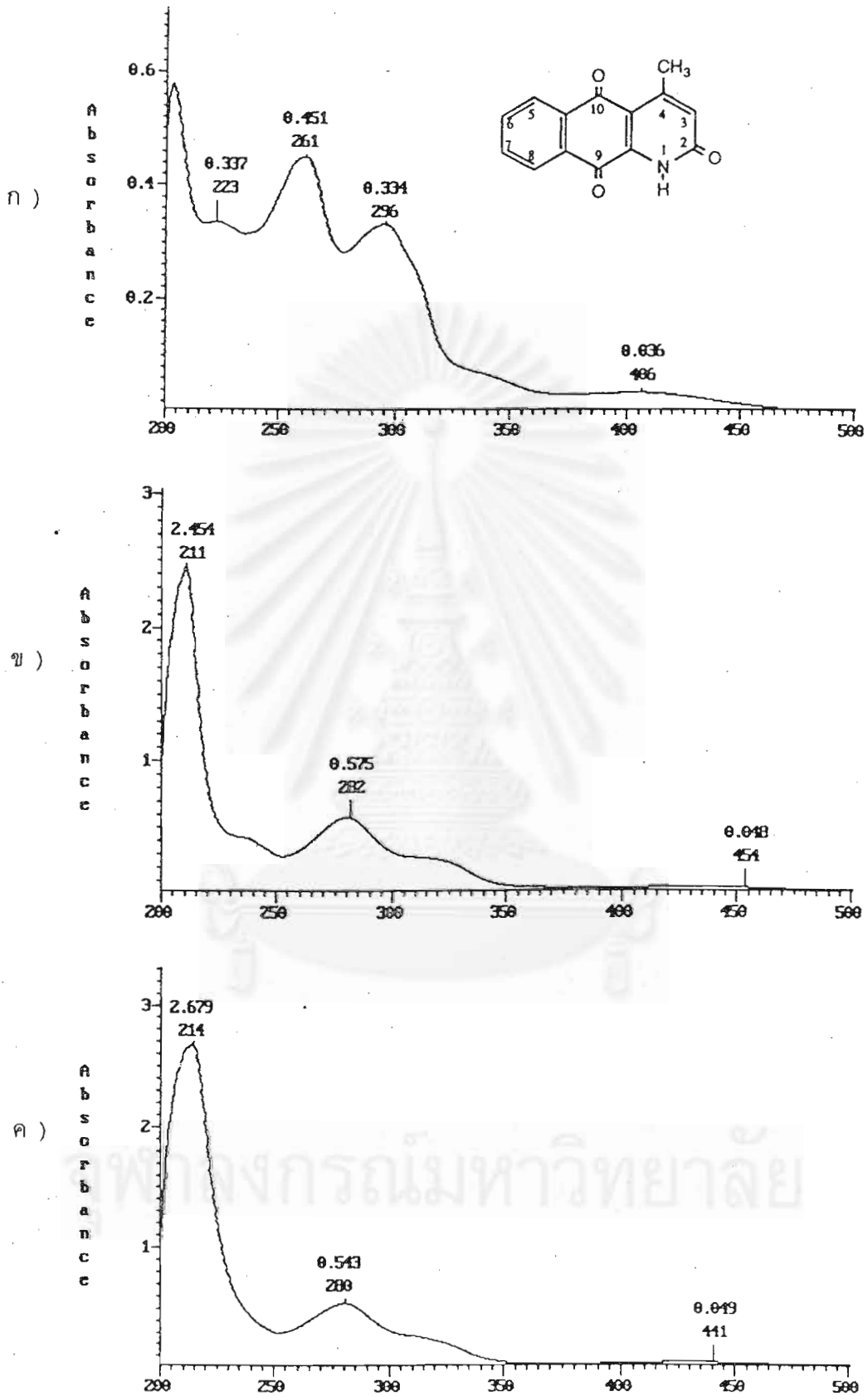


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

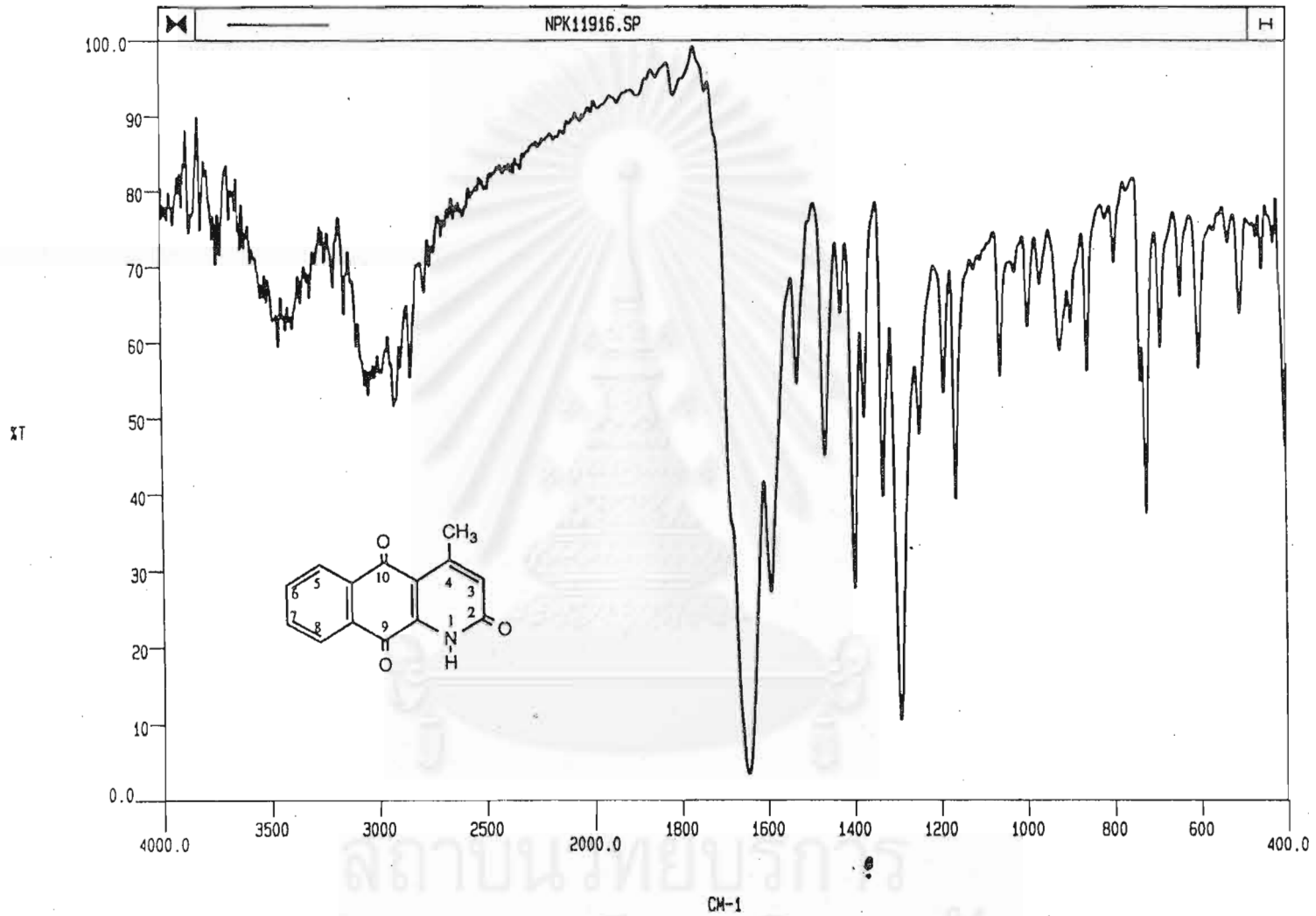


ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

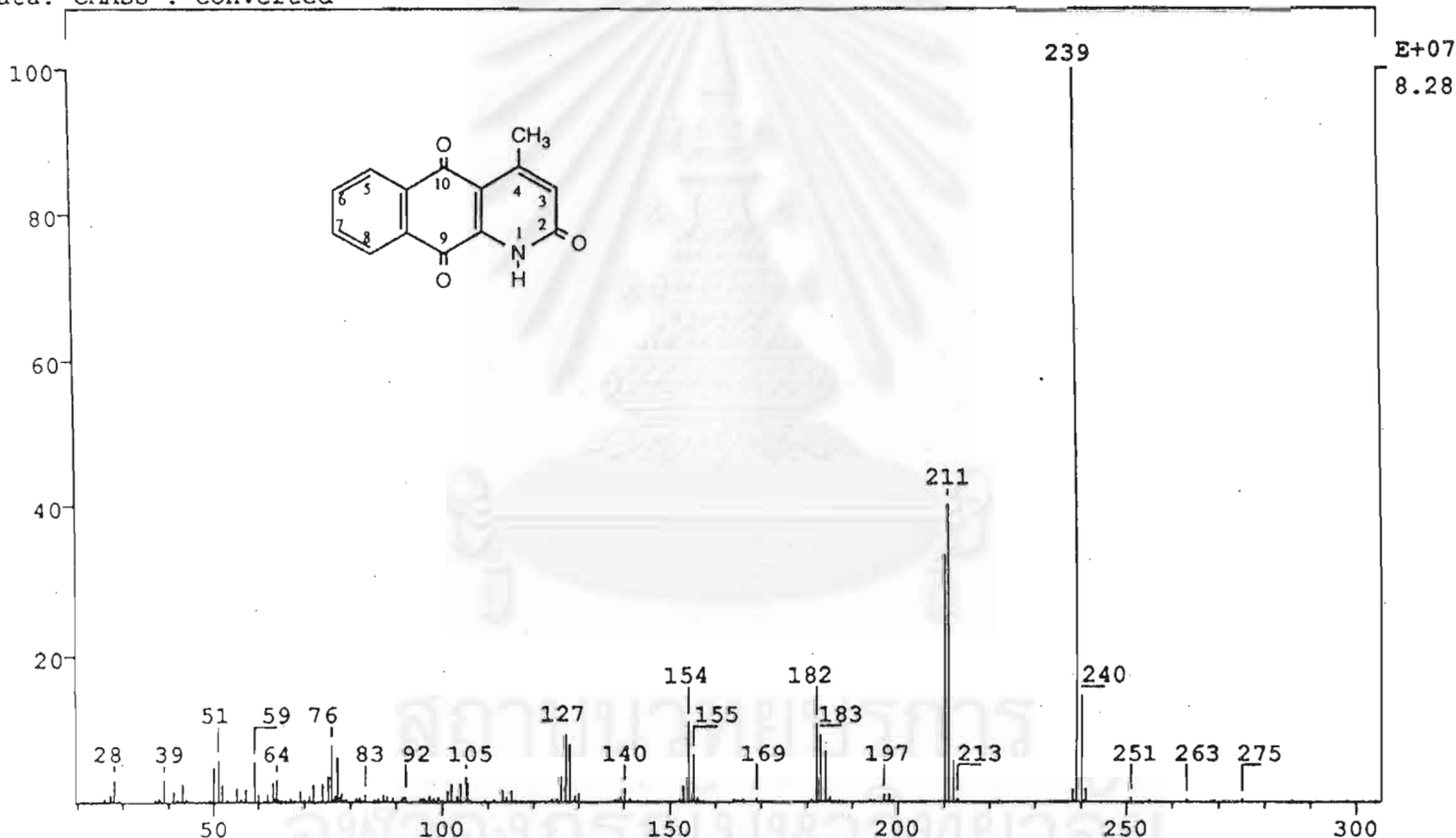


รูปที่ 9. สเปกตรัมอัลตราไวโอเล็ตของสาร NPK11916 ใน ก.) MeOH , ข.) MeOH + 2.5 N NaOH, ค.) MeOH + sodium acetate



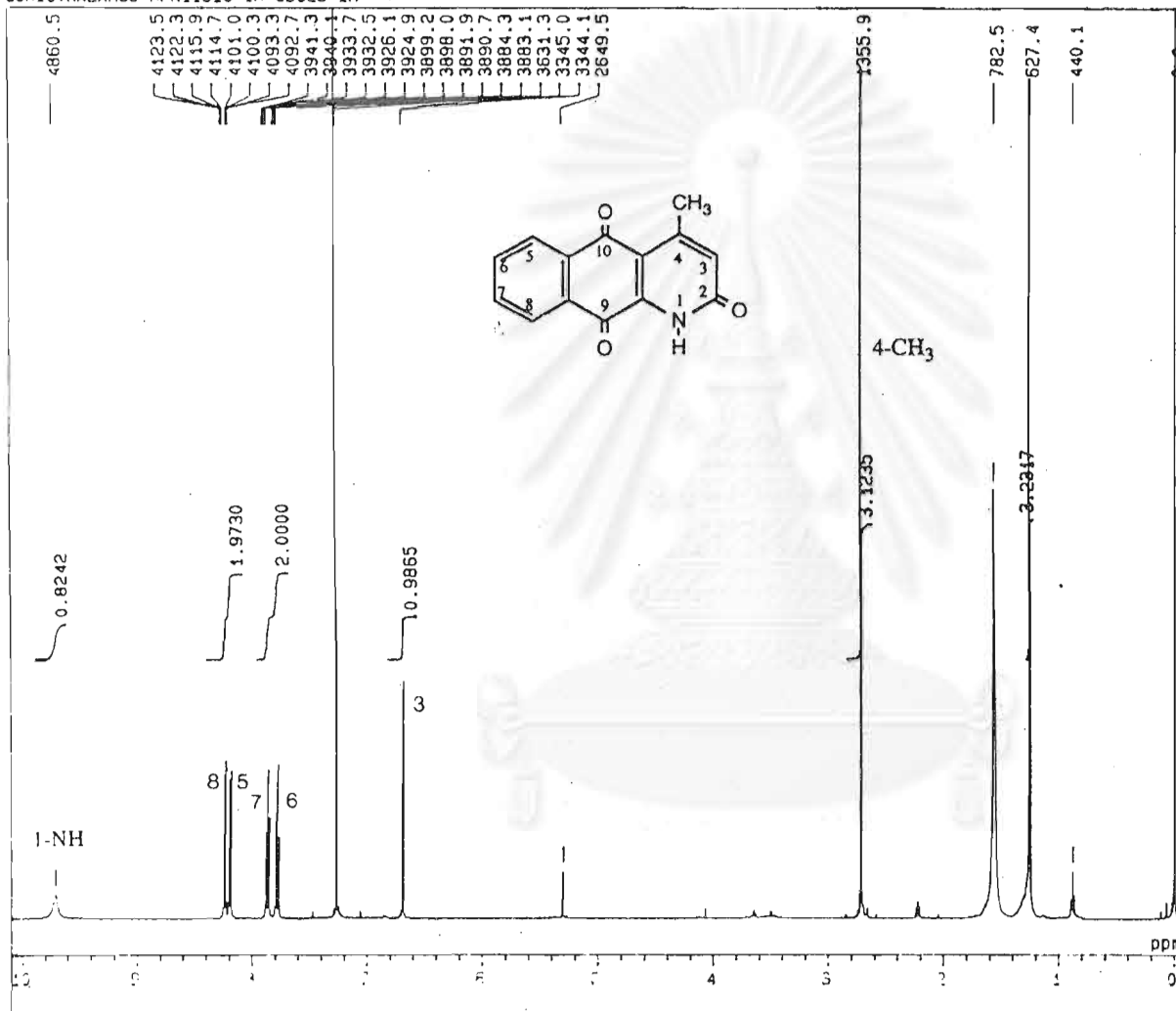
รูปที่ 10. สเปกตรัมอินฟราเรดของสาร NPK11916 (KBr disc)

SPEC: 072806AC 28-Jul-94 Elapse: 00:07:01.9 25
 Samp: D138L NPK 11916 HR-EI N. SUN Start : 11:25:56 29
 Comm: MAT-900
 Mode: EI +VE +LMR BSCAN (EXP) UP HR
 Oper: DC Client: CASSADY Inlet : Vial 1
 Base: 239.1 Inten : 82762240 Masses: 25 > 600
 Norm: 239.1 RIC : 506938562 #peaks: 767
 Peak: 1000.00 mmu
 Data: CMASS : converted



รูปที่ 11. แมสสเปคตรัมแบบ HREI ของสาร NPK11916

GONIOTHALAMUS NPK11916 IN CDCL3 1H



12-APR-1994 15:39:50.17

DFILE : ALPHA
SFILE : KS-NPK11916-1H

COMNT : GONIOTHALAMUS NPK11916 IN ()
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 10000.00 Hz
SCANS : 32
DUMMY : 4
ACQTM : 3.2768 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 18
PW1 : 5.38 usec

OBNUC : 1H
OBFREQ : 500.00 MHz
OBSET : 162410.00 Hz

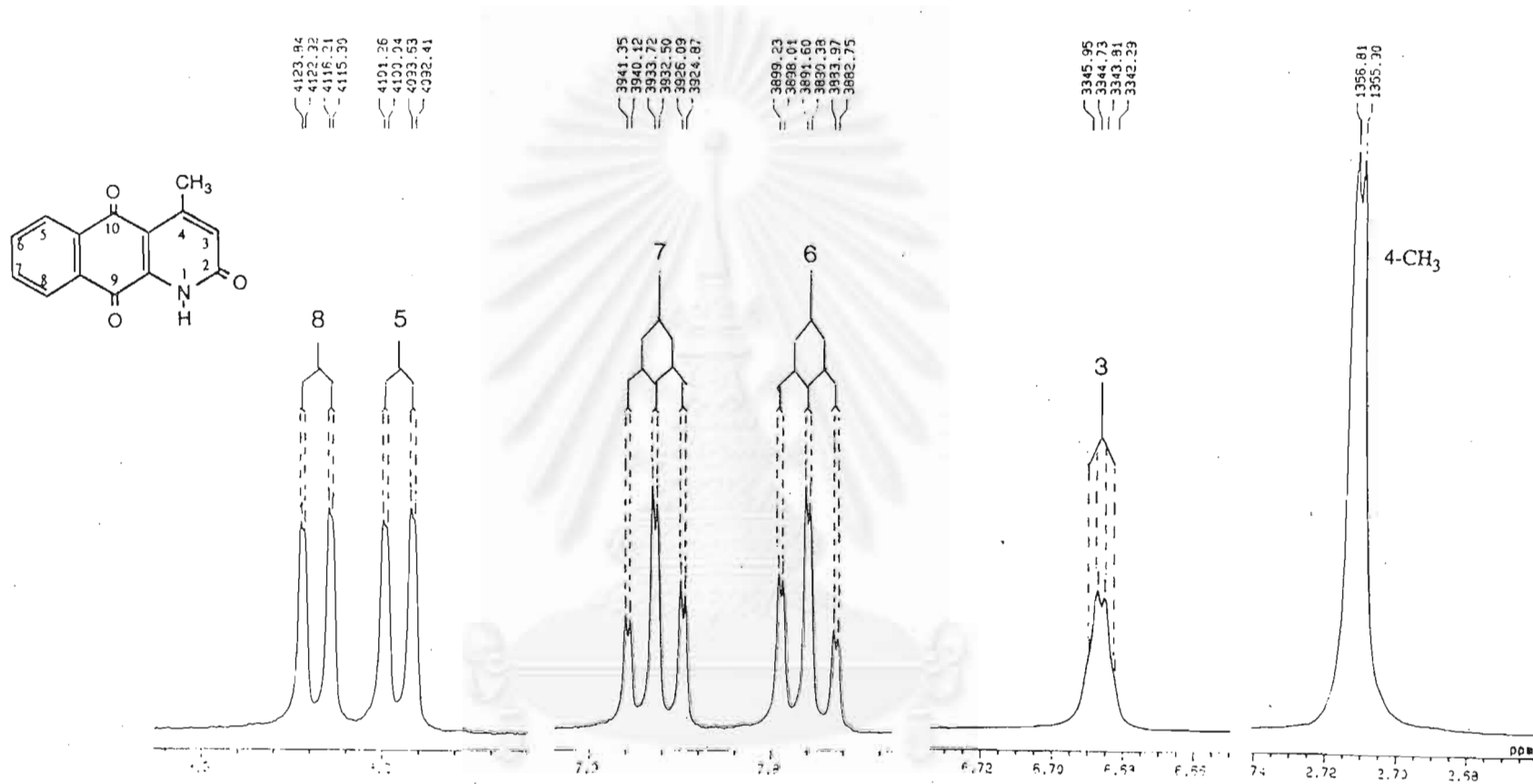
IRNUC : 1H
IRFREQ : 500.00 MHz
IRSET : 160727.26 Hz
IRATN : 150
IRAPPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRRNS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 29.0 c
CSPED : 13 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.31 Hz
BF : 0.10 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 5101.32 Hz
XS : -10.07 Hz
operator

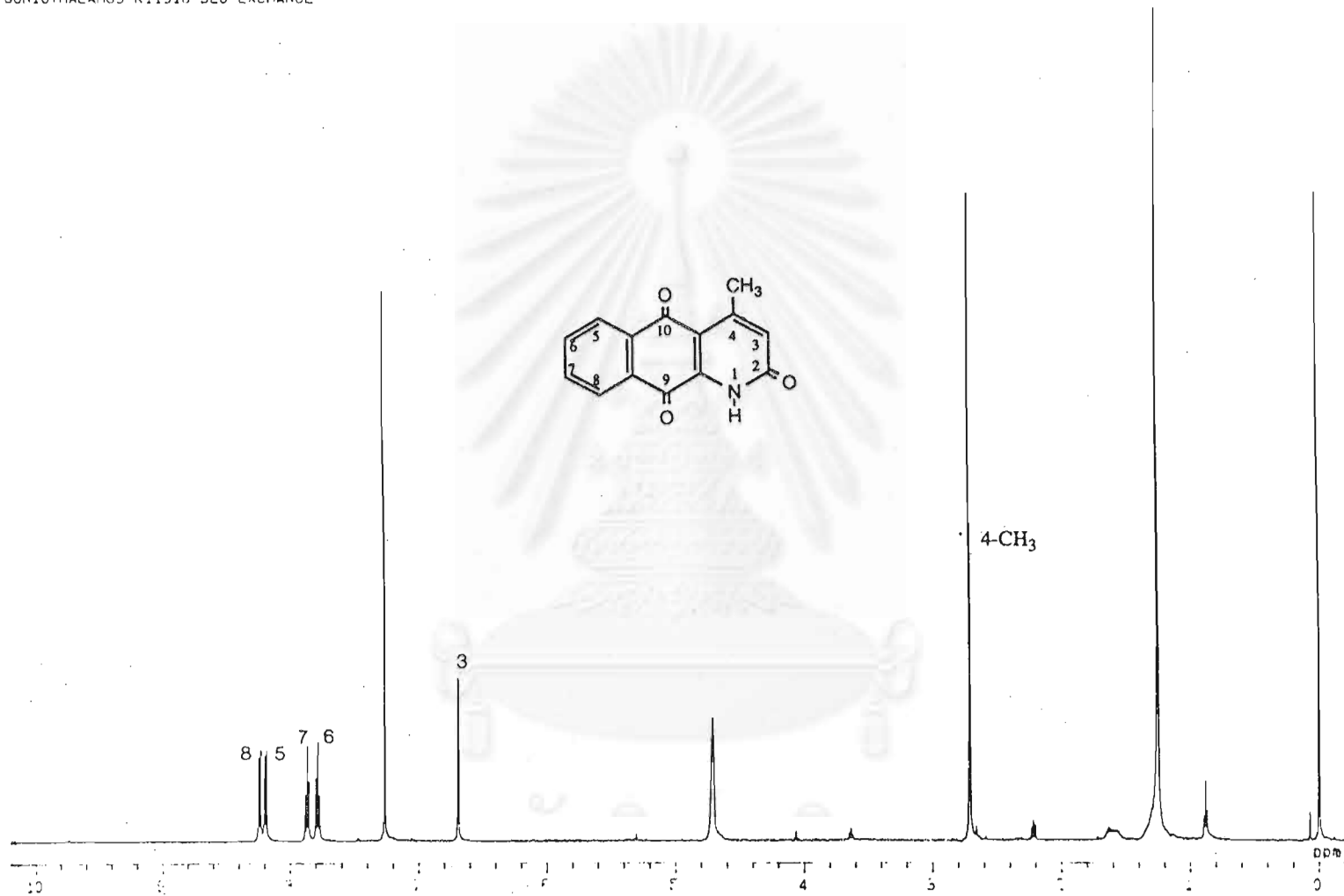


รูปที่ 12. ก. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK11916 ใน CDCl₃

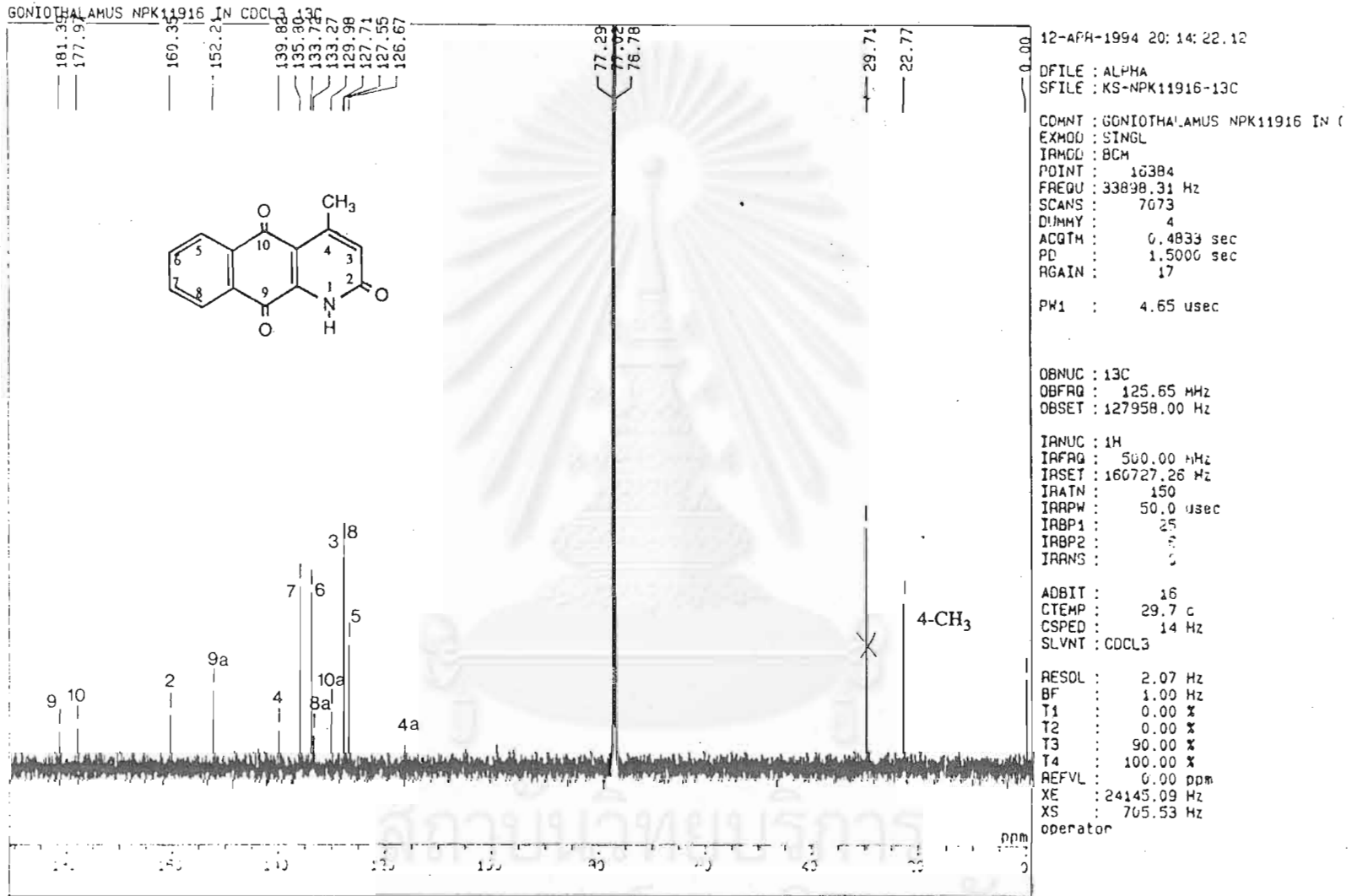


รูปที่ 12 ข. แสดง coupling diagram ของโปรตอน ของสาร NPK11916

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

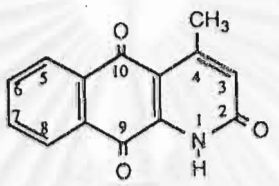
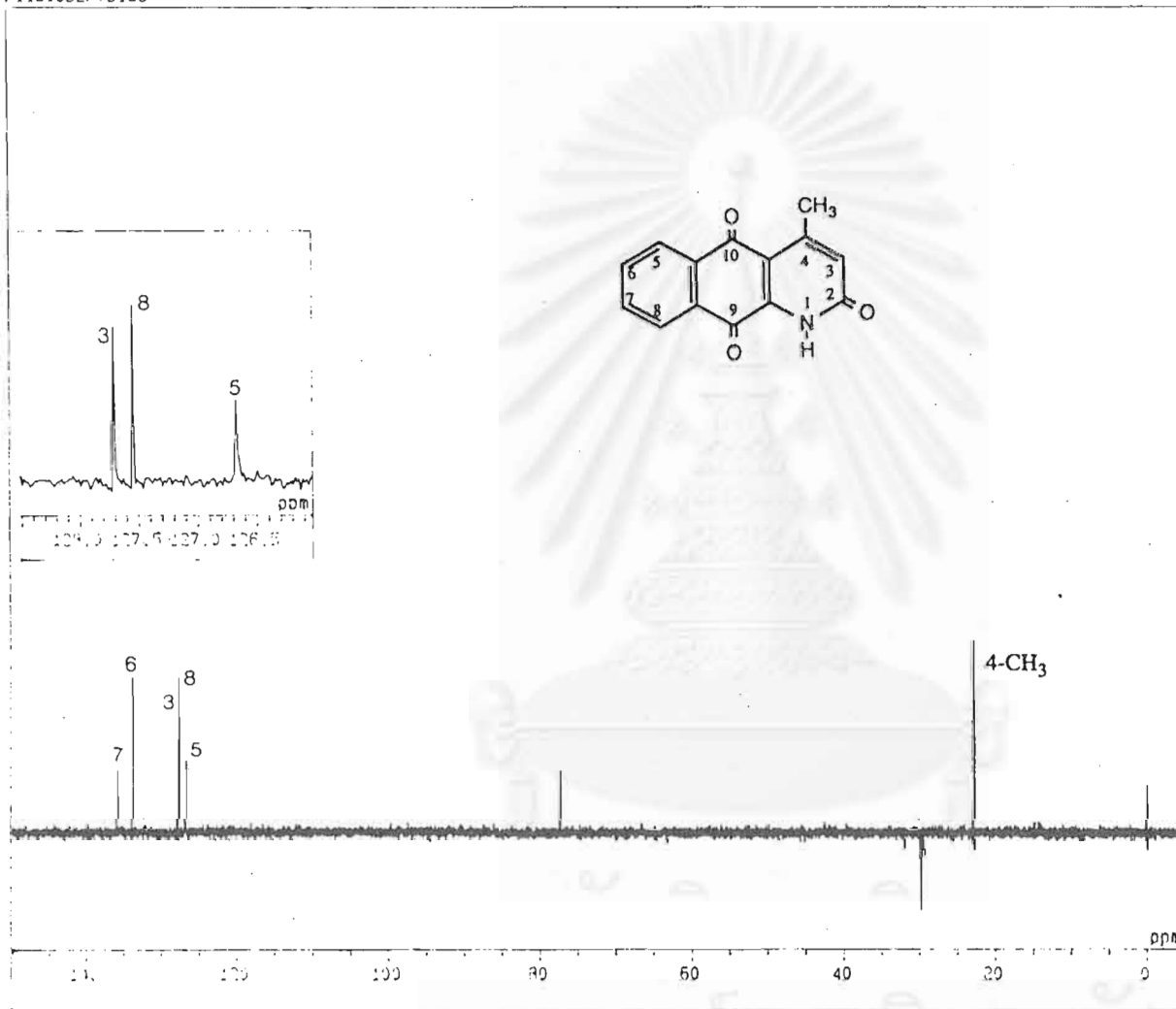


รูปที่ 12. ค. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของสาร NPK11916 ใน D₂O



รูปที่ 13. ก. สเปกตรัมคาร์บอนอินเอ็มอาร์ (125 MHz) ของสาร NPK11916 ใน CDCl₃

F11916DEPT0135



CFILE : ALPHA
SFILE : WA-F11916DEPT0135
COMNT : F11916DEPT0135
EXMOD : DEPTD
IRMOD : IRLV2
POINT : 16384
FREQU : 33898.31 Hz
SCANS : 22000
DUMMY : 4
ACQTM : 0.4833 sec
PD : 2.0000 sec
RGAIN : 15
PW1 : 9.30 usec
PW2 : 16.13 usec
PW3 : 10.75 usec
DTIM1 : 5.17241 msec
ICNST : 145.00 Hz

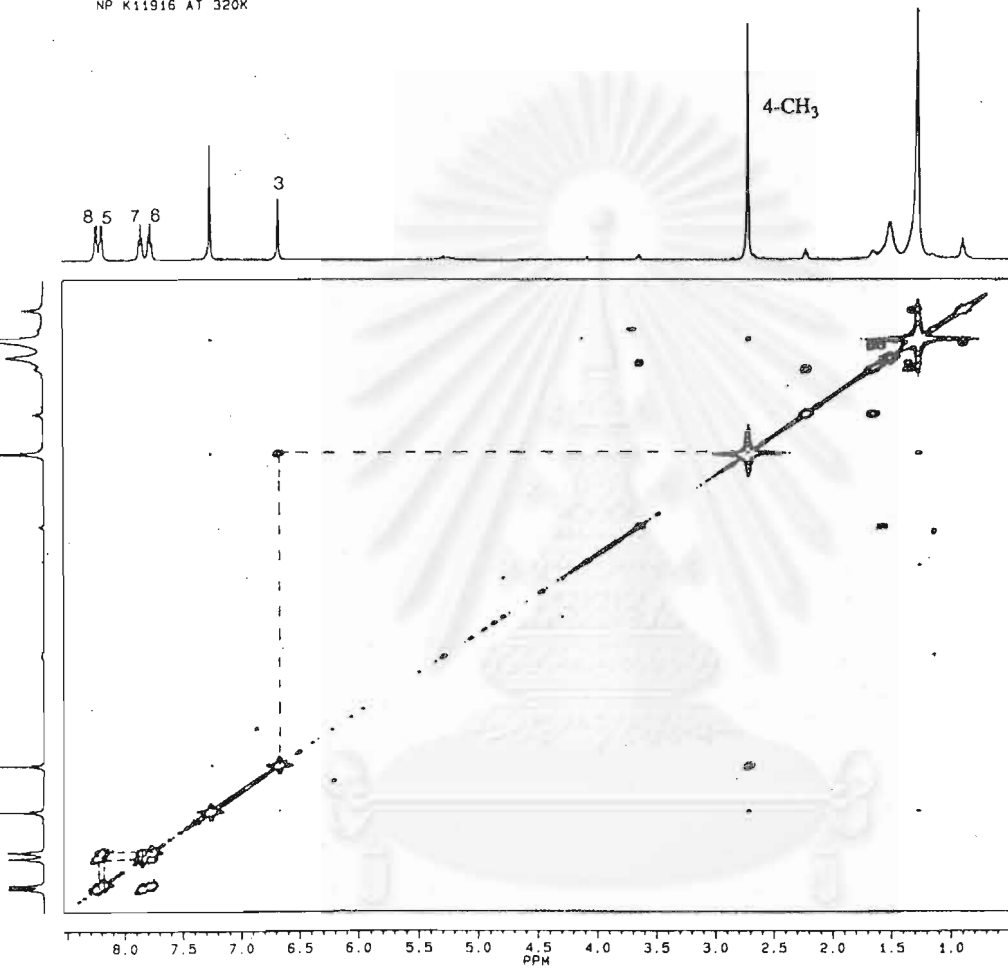
QBNUC : 13C
QBFRG : 125.65 MHz
QBSET : 127958.00 Hz
IRNUC : 1H
IRFRQ : 500.00 MHz
IRSET : 162410.00 Hz
IRATN : 150
IRAPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRANS : 0
ACBIT : 16
CTEMP : 28.8 c
CSPED : 14 Hz
SLVNT : CDCL3
RESOL : 2.07 Hz
BF : 0.00 Hz
REFVL : 0.00 ppm
XE : 19489.37 Hz
XS : 3535.90 Hz
operator

รูปที่ 13. ข. สเปกตรัม DEPT 135 ของสาร NPK11916 ใน CDCl₃

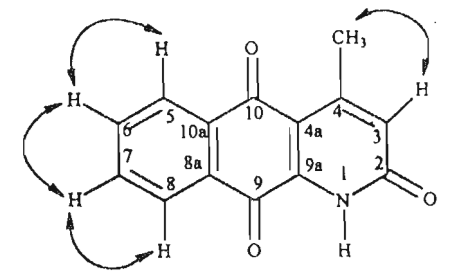
NP K11916 AT 320K



NP11916G.SMX
 F1 PROJ: NPK11916.002
 F2 PROJ: NPK11916.002
 AU PROG: COSY16.AU
 DATE 25-10-93
 SI2 2048
 SI1 1024
 SW2 5813.953
 SW1 2906.977
 NDO 1



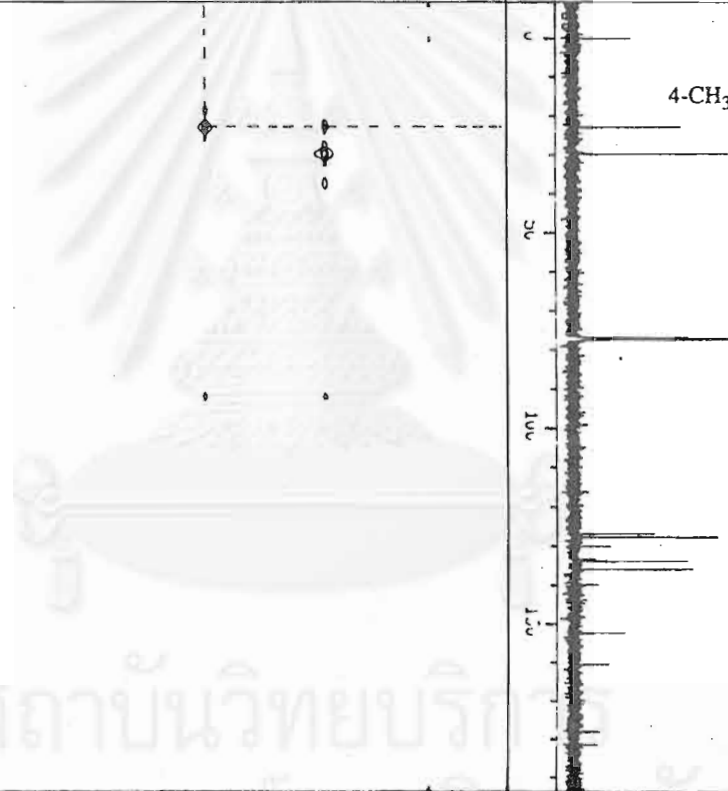
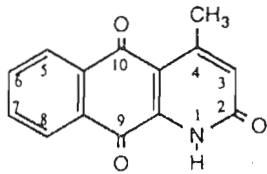
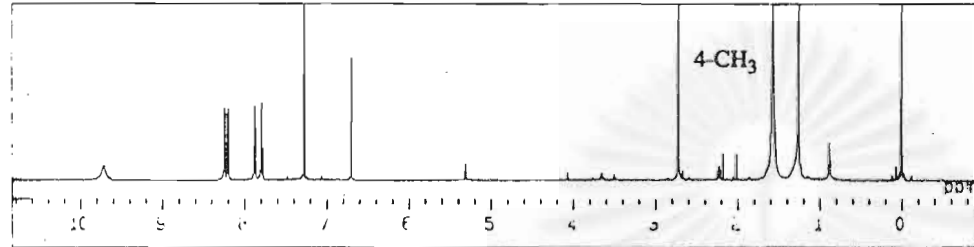
WDW2 S
 WDW1 S
 SSB2 0
 SSB1 0
 MC2 M
 PLIM ROW: F1 8.533P
 F2 .496P
 AND COLUMN: F1 8.533P
 F2 .496P
 D1 1.4000000
 P1 8.50
 DC .0000030
 RD 0.0
 PW 0.0
 DE 110.00
 NS 32
 OS 4
 NE 400
 IN .0001720



รูปที่ 14. สเปกตรัม $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY ของสาร NPK11916

สำนักงานวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GONIOTHALAMUS NPK11916 HSGC



30-APR-1994 20:29:22.90

DFILE : ALPHA
SFILE : KS-NPK11916-HSQC

COMNT : GONIOTHALAMUS NPK11916 HSGC

EXMOD : HSQC
IRMGD : IRLV2
POINT : 512
FREQU : 5903.19 Hz
SCANS : 128
DUMMY : 32
ACGTM : 0.0867 sec
PD : 1.5006 sec
RGAIN : 18

CLFRQ : 25523.23 Hz
CLPNT : 256
TOSCN : 128
CINWT : 10.00 usec
CINT2 : 19.59 usec
PW1 : 24.00 usec
PW3 : 17.50 usec
PI1 : 62.5000 msec
PI3 : 160.2320 msec
JCNST : 145.00 Hz

OBNUC : 1H
OBFRO : 500.00 MHz
OBSET : 162395.35 Hz

IRNUC : 13C
IRFRQ : 125.65 MHz
IRSET : 126873.85 Hz
IRATN : 120
IRAPW : 1.4 usec
IRBP1 : 100
IRBP2 : 2
IRANS : 4

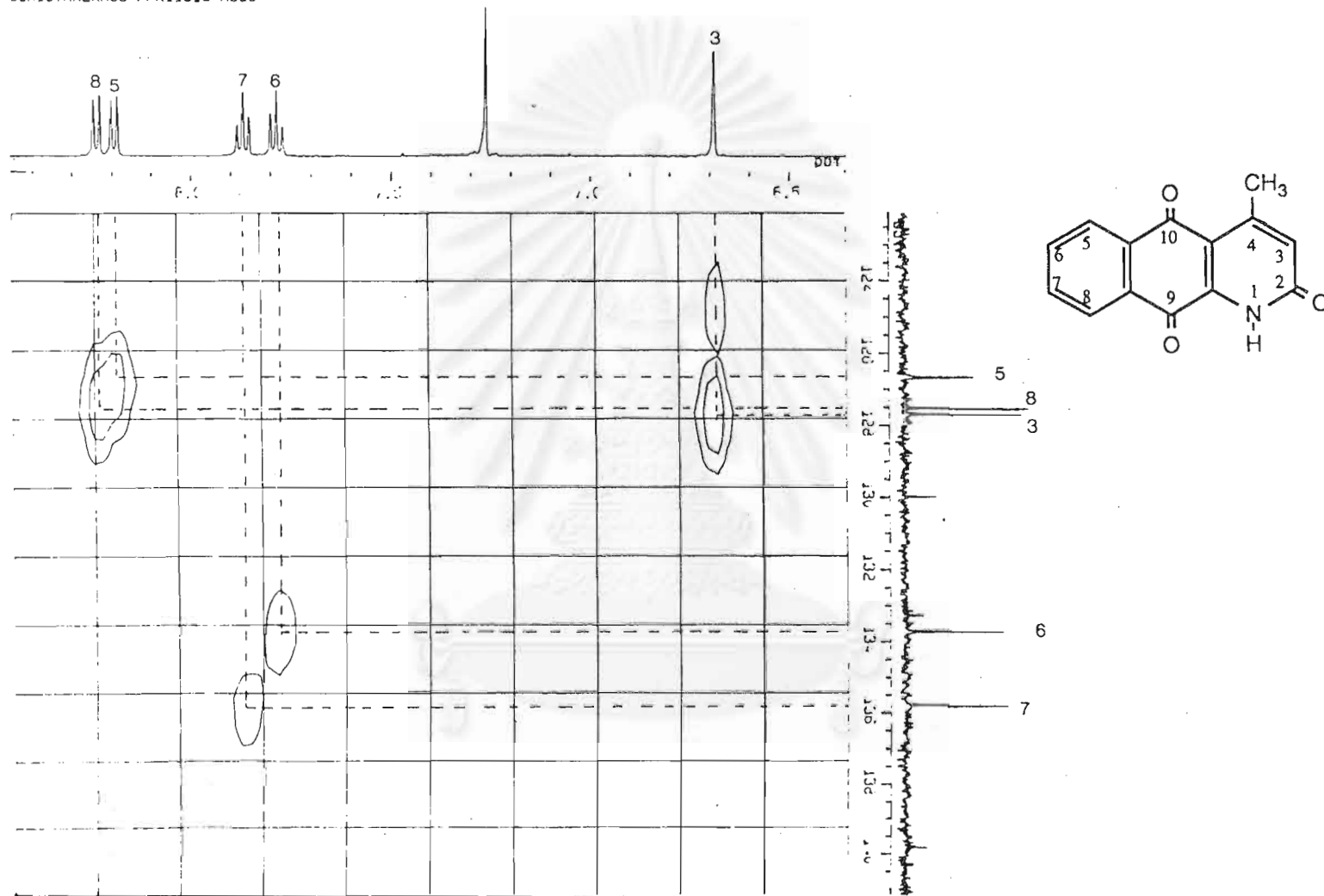
ADBIT : 16
CTEMP : 25.0 c
CSPED : 0 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 11.53 Hz
CLRSO : 99.70 Hz
TLINE : 4
THTOP : 1.0000
THBTM : 0.0700

operator

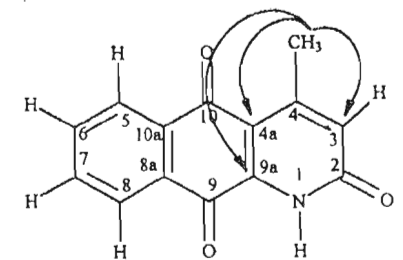
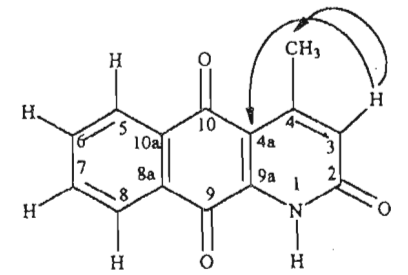
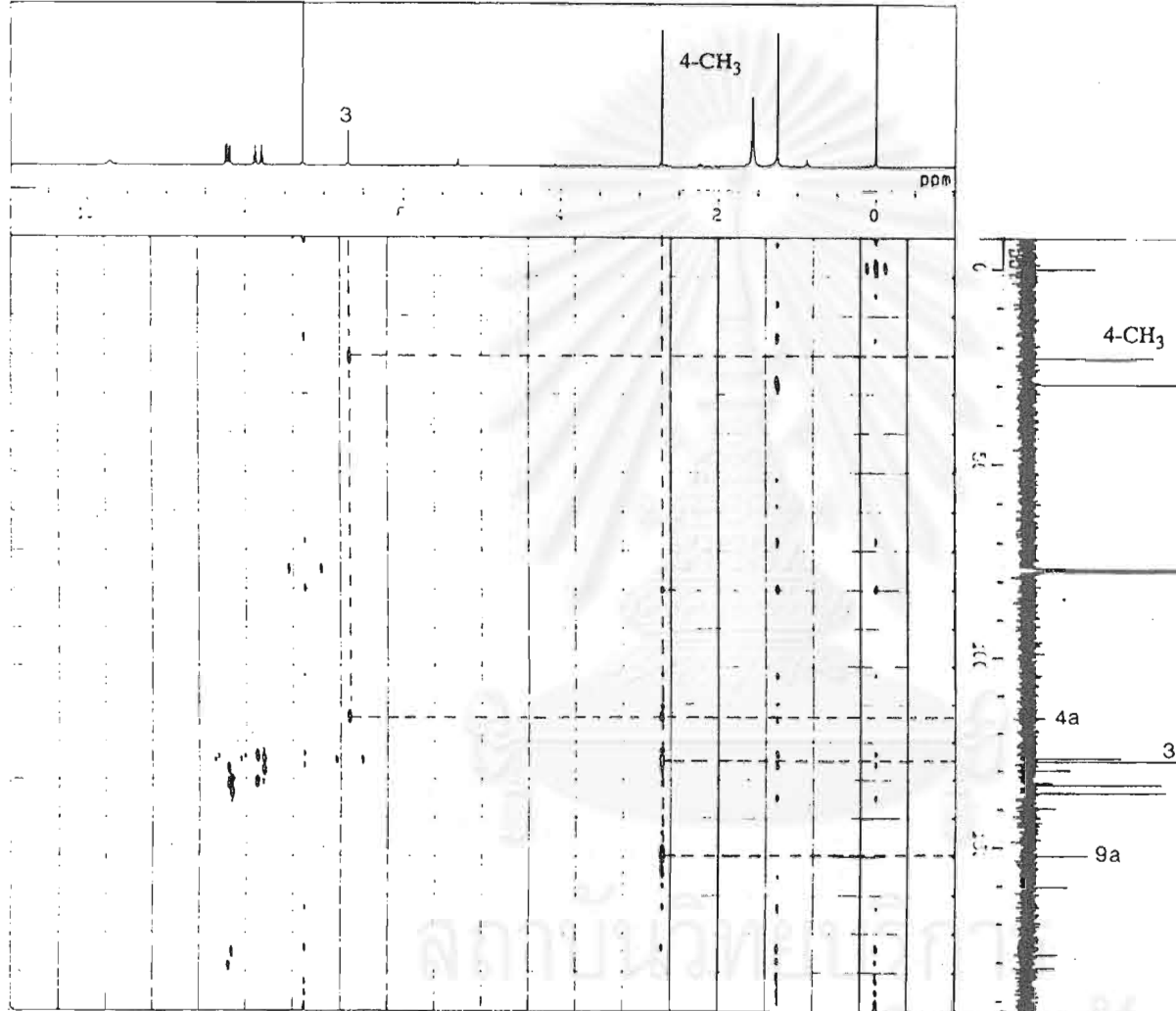
รูปที่ 15. ก. สเปกตรัม HSQC ของสาร NPK11916

GONIOTHALAMUS NPK11916 HSGC

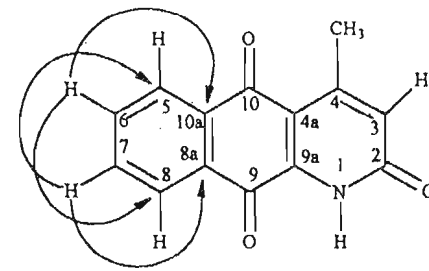
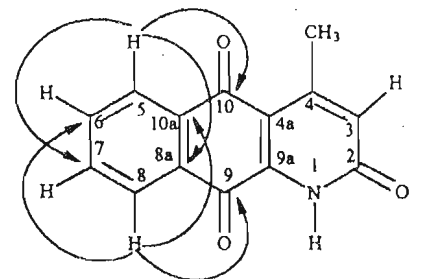
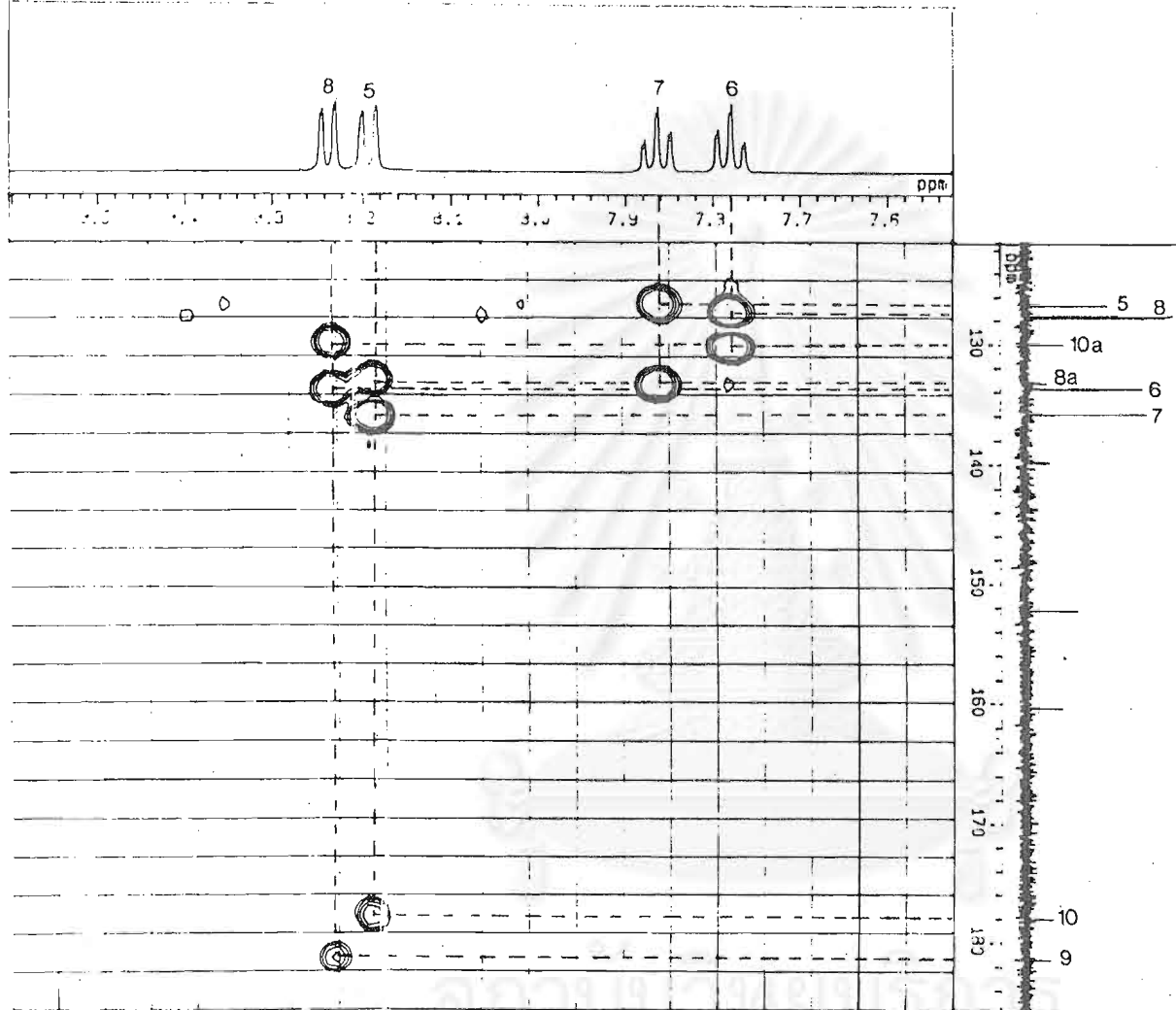


รูปที่ 15. ข. สเปกตรัม HSQC ของสาร NPK11916 (ขยาย)

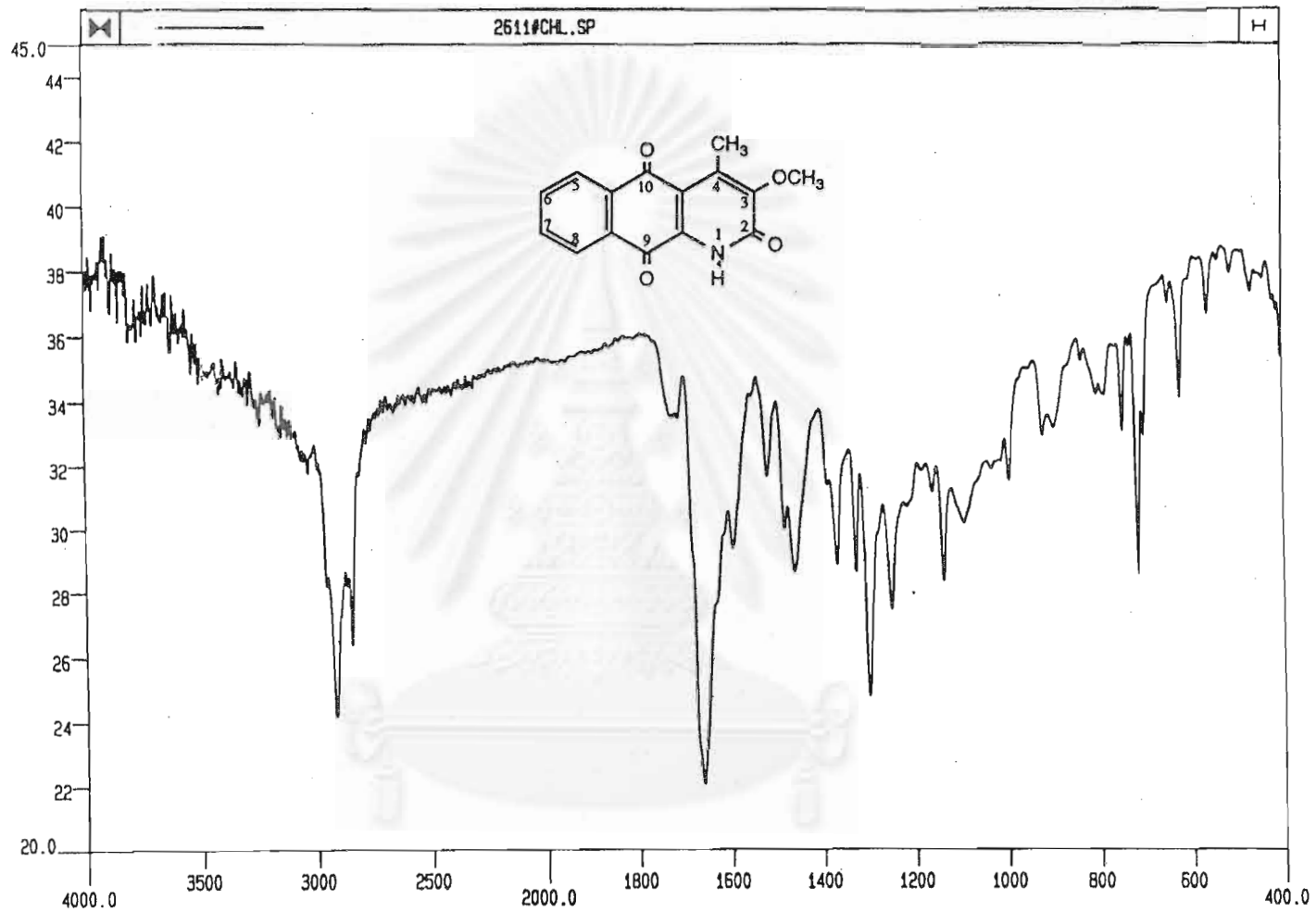
GONIOTHALAMUS NPK11916 HMBC 8 HZ



รูปที่ 16. ก. สเปกตรัม HMBC (J = 8 Hz) ของสาร NPK11916



รูปที่ 16. ข. สเปกตรัม HMBC ($J = 8 \text{ Hz}$) ของสาร NPK11916 (ขยาย)

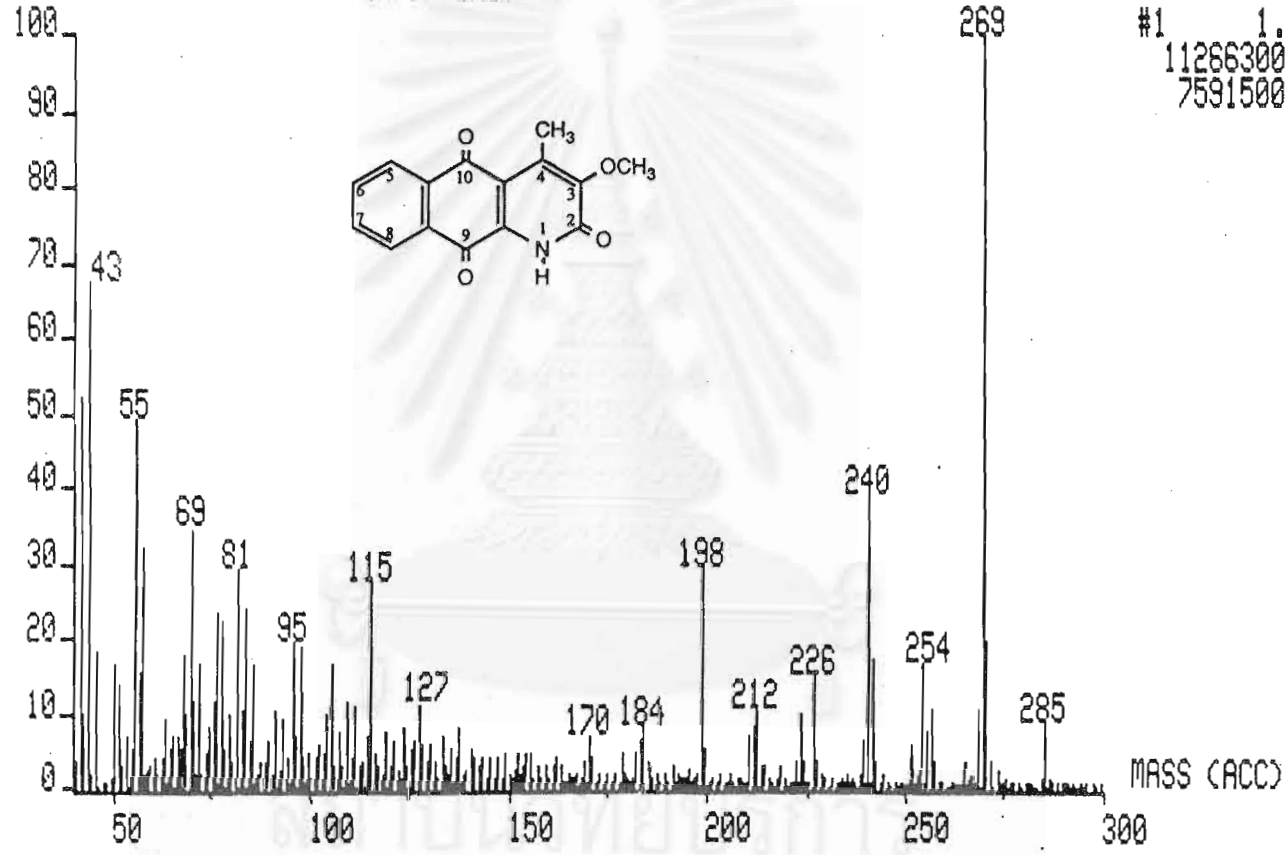


CM-1

รูปที่ 17. สเปกตรัมอินฟราเรดของสาร NPF2611 (film)

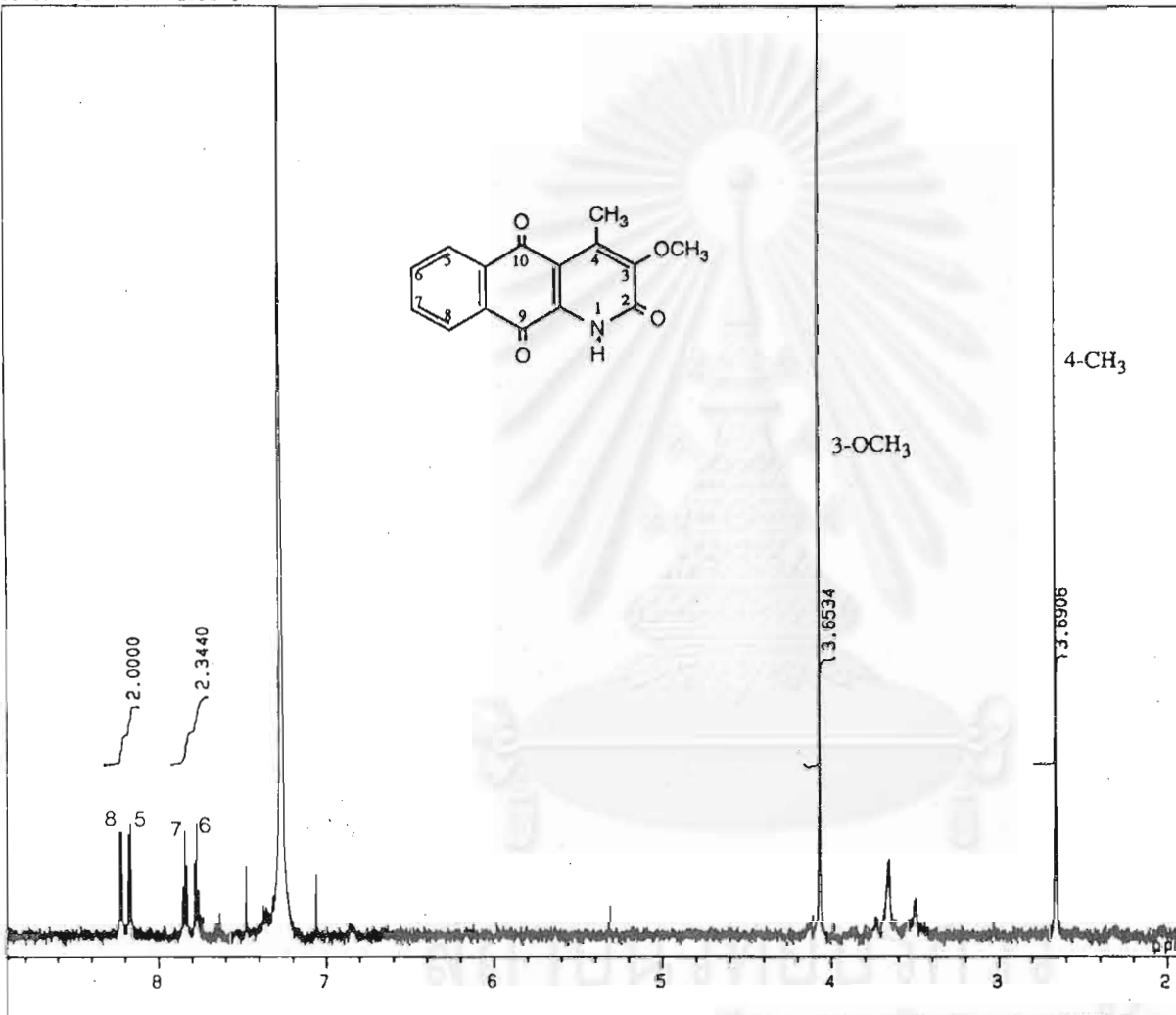
E101705A#1 x1 Bgd=0 17-OCT-94 12:35+0:00:00 70-250S EI+
 BpM=0 I=7.7mvs Hm=300 TIC=2142897024 AV Aent:OSU-CCIC Sys:HREI
 E014B NPF2611 HR-EI N. SUN/CASSADY PT= 0° Cal:E101705

#1 1.0
 112663000
 75915000



รูปที่ 18. แมสสเปกตรัมแบบ HREI ของสาร NPF2611

6CNIOTHALAMUS NPF2611 1H



16-JUN-1994 19:04:32.69

LFIL: ALPHA
SFIL: KS-NPF2611-1H

GCNT: 6CNIOTHALAMUS NPF2611 1H
EXHD: SINGL
IRMC: NON
PLNT: 327.08
FREGU: 10000.00 HZ
SCANS: 32
DUMY: 4
ACQTM: 3.2708 sec
FL: 3.0000 sec
RGAIN: 18
FM: 3.58 usec

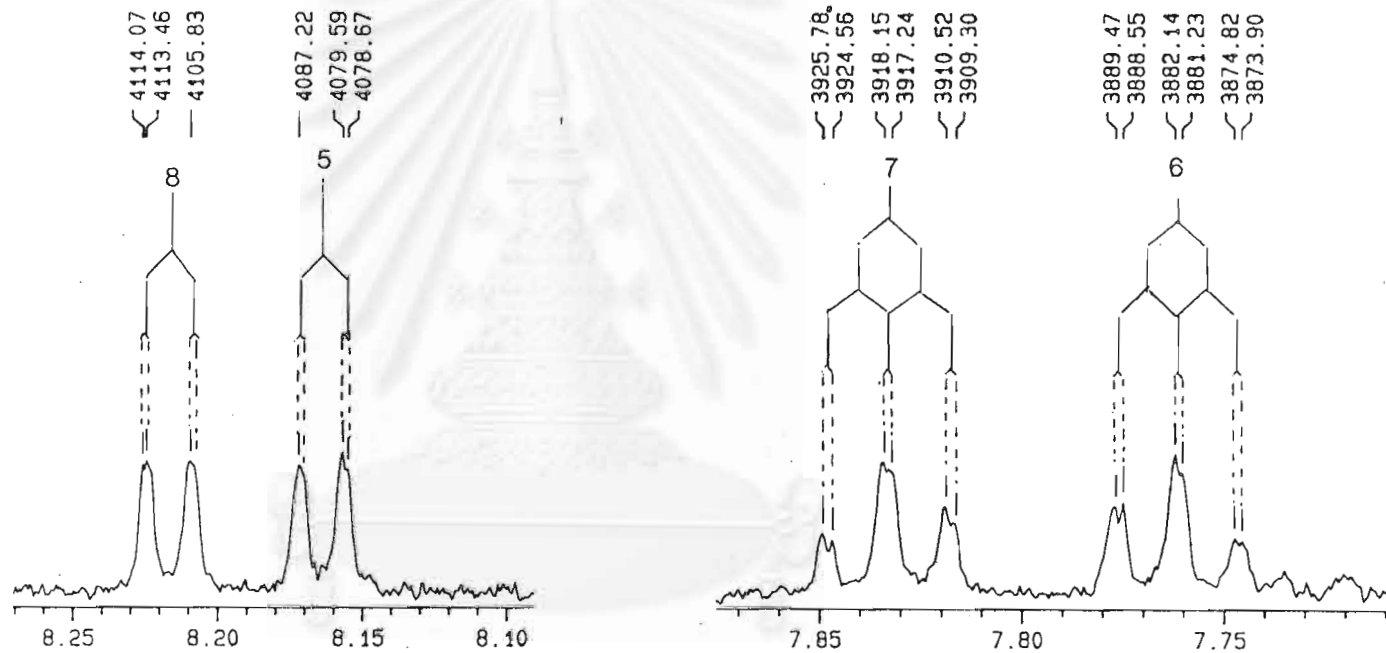
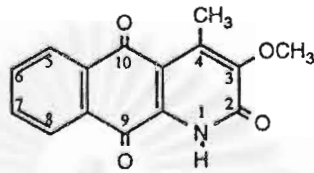
ObNOC: 14
ObP6: 500.00 MHz
ObDET: 162410.00 HZ

IPR00: 14
IPR06: 500.00 MHz
IPDET: 162410.00 HZ
IPATN: 0.1
IPR0W: 50.0 usec
IPR01: 30
IPR02: 0
IPR0S: 0

ALBIT: 10
CTEMP: 28.1 C
CSIED: 11 HZ
SLVNT: CDCL3

RESL: 0.51 HZ
BF: 0.50 HZ
T1: 0.00 %
T2: 0.00 %
T3: 90.00 %
T4: 100.00 %
REFVL: 0.00 DDT
XE: 5519.90 HZ
XF: -262.94 HZ
LOCATOR

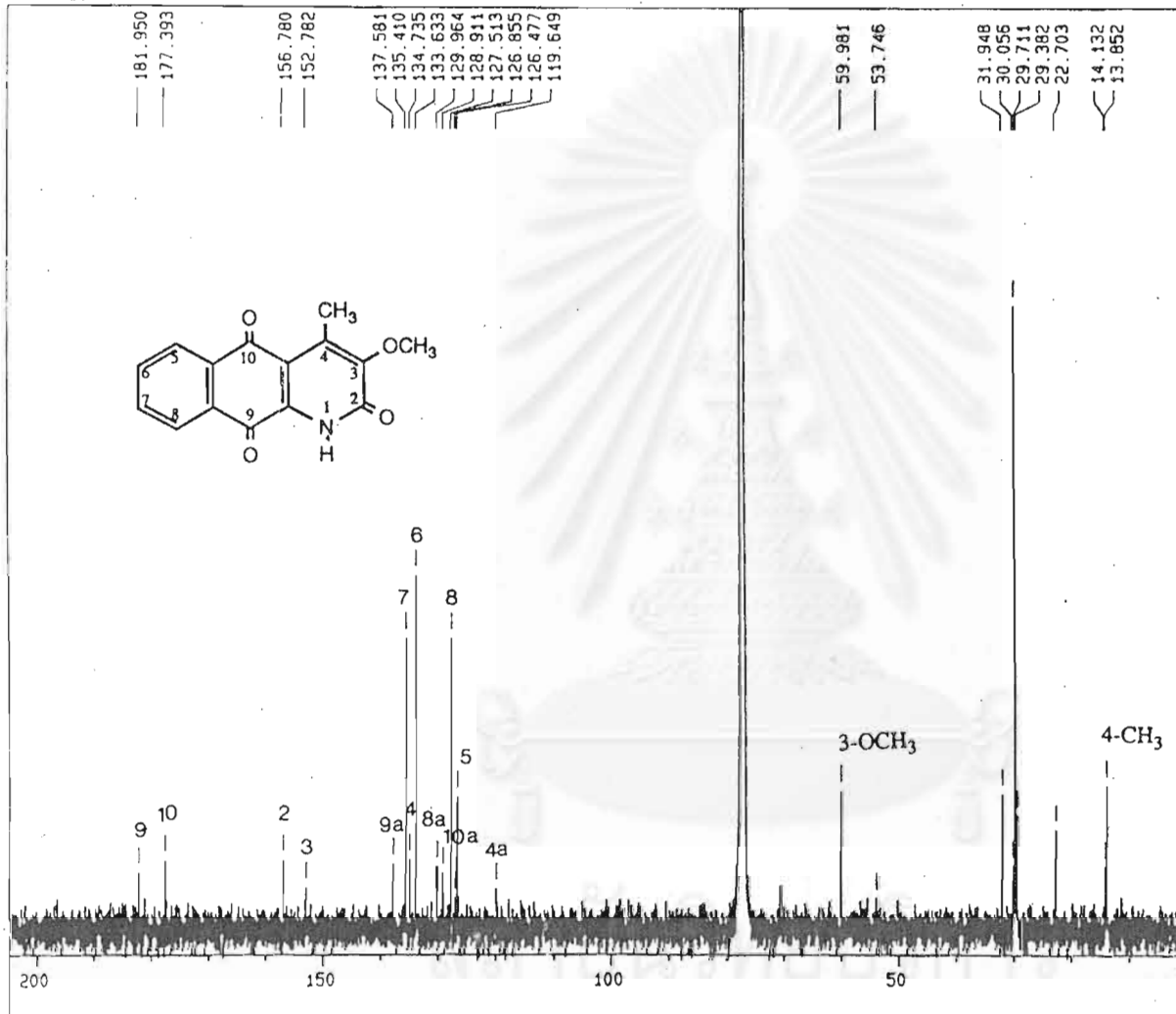
รูปที่ 19. ก. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPF2611 ใน CDCl₃



รูปที่ 19. ข. แสดง coupling diagram ของโปรตอน ของสาร NPF2611

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NPF2611BCM



29-AUG-1994 12: 44: 39.72

 * CHULALONGKORN UNIVERSITY *
 * JNM-A500 *

SFILE : KS-NPF2611C
 COMNT : NPF2611BCM

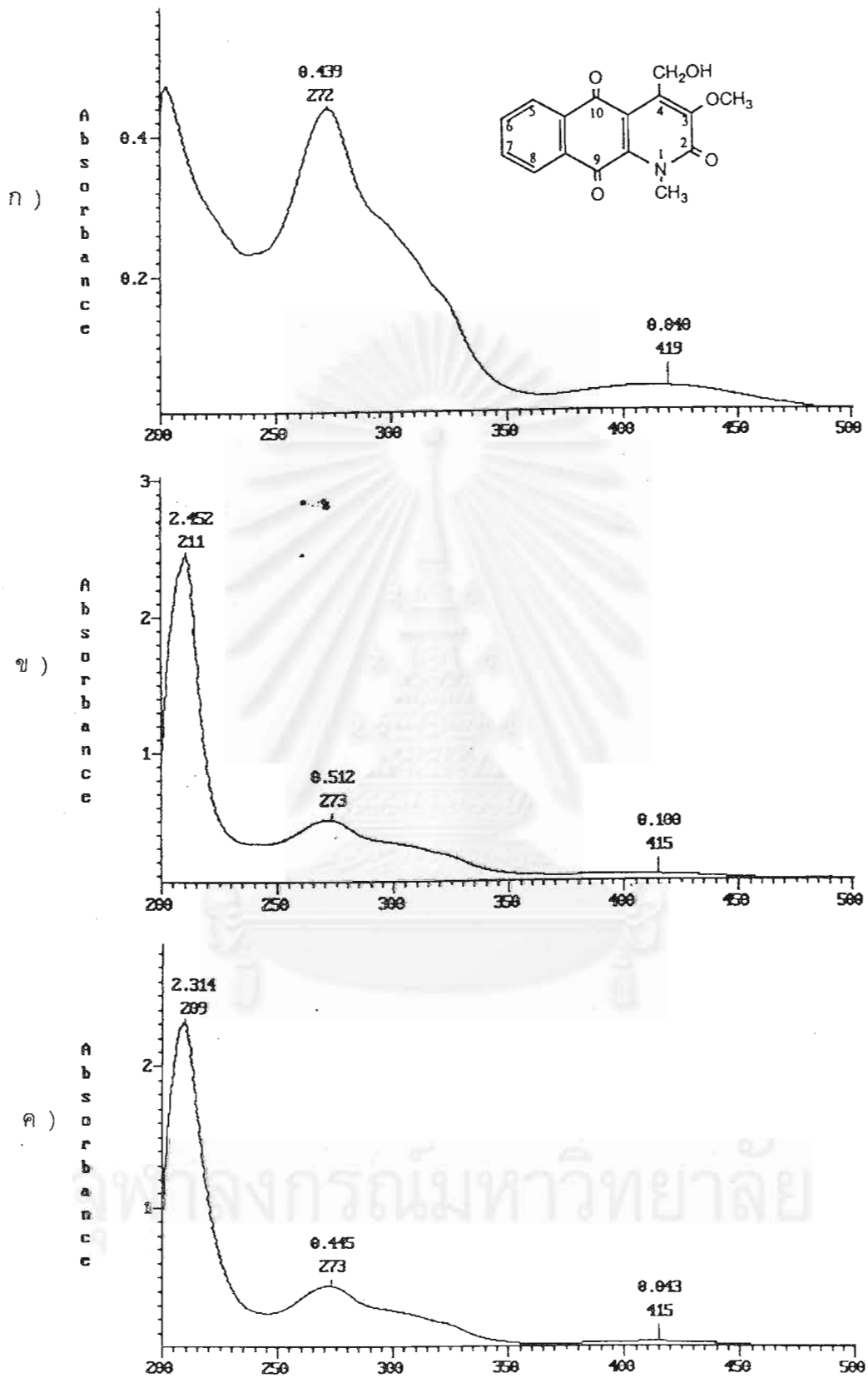
EXMOD : SINGL
 IRMOD : BCM
 POINT : 16384
 FREQU : 33898.31 Hz
 SCANS : 89783
 DUMMY : 4
 ACQTM : 0.4833 sec
 PD : 2.0000 sec
 RGAIN : 23
 PW1 : 4.75 usec
 OBNUC : 13C
 OBFREQ : 125.65 MHz
 OBSET : 127958.00 Hz

IRNUC : 1H
 IAFREQ : 500.00 MHz
 IRSET : 162410.00 Hz
 IRATN : 250
 IRRPW : 50.0 usec
 IRBP1 : 30
 IRBP2 : 6
 IRRNS : 0

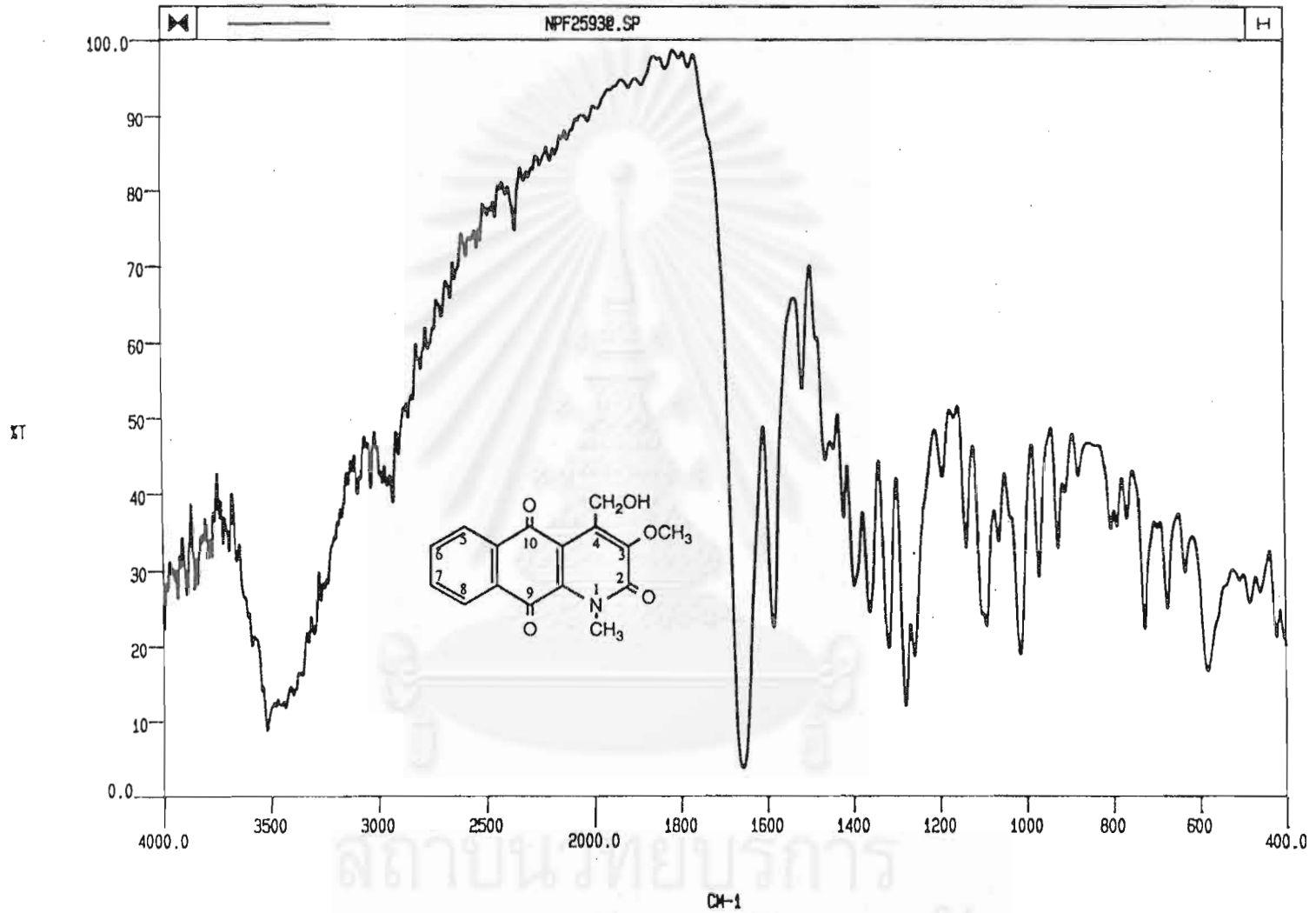
ADBIT : 16
 CTEMP : 29.1 c
 CSPED : 11 Hz
 SLVNT : CDCL3
 RESOL : 2.07 Hz
 BF : 1.00 Hz
 REFVL : 0.00 ppm
 XE : 25905.80 Hz
 XS : -174.83 Hz

OPERATOR :

รูปที่ 20. สเปกตรัมคาร์บอนอินเอ็มอาร์ (125 MHz) ของสาร NPF2611 ใน CDCl₃



รูปที่ 21. สเปกตรัมอุลตราไวโอเล็ตของสาร NPF2593 ใน ก.) MeOH, ข.) MeOH + 2.5 N NaOH, ค.) MeOH + sodium acetate



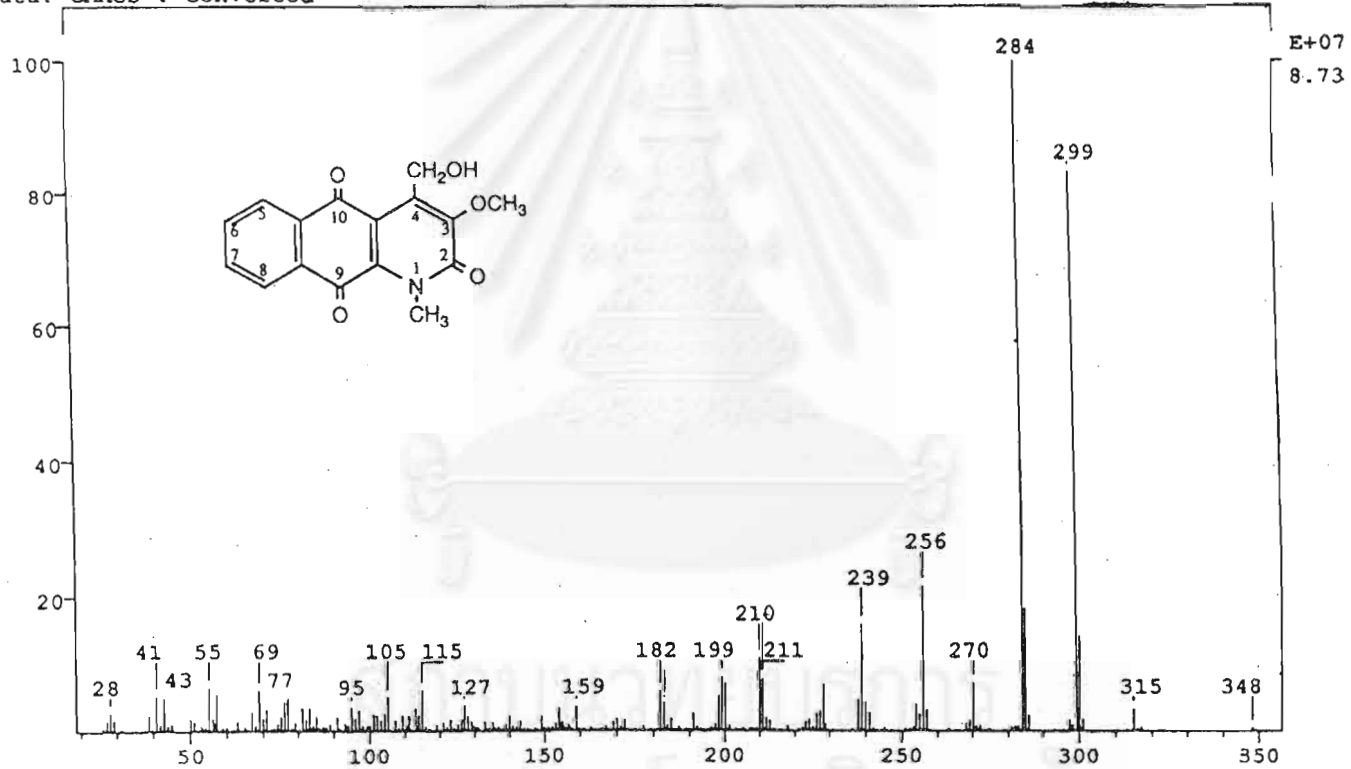
รูปที่ 22. สเปกตรัมอินฟราเรดของสาร NPF2593 (KBr disc)

SPEC: 072807CC
 Samp: D138M NPF 2093 HR-EI N. SUN
 Comm: MAT-900
 Mode: EI +VE +LMR BSCAN (EXP) UP HR
 Oper: DC
 Base: 284.1
 Norm: 284.1
 Peak: 1000.00 mmu
 Data: CMASS : converted

28-Jul-94 Elapse: 00:04:52.9 17
 Start : 12:43:14 27

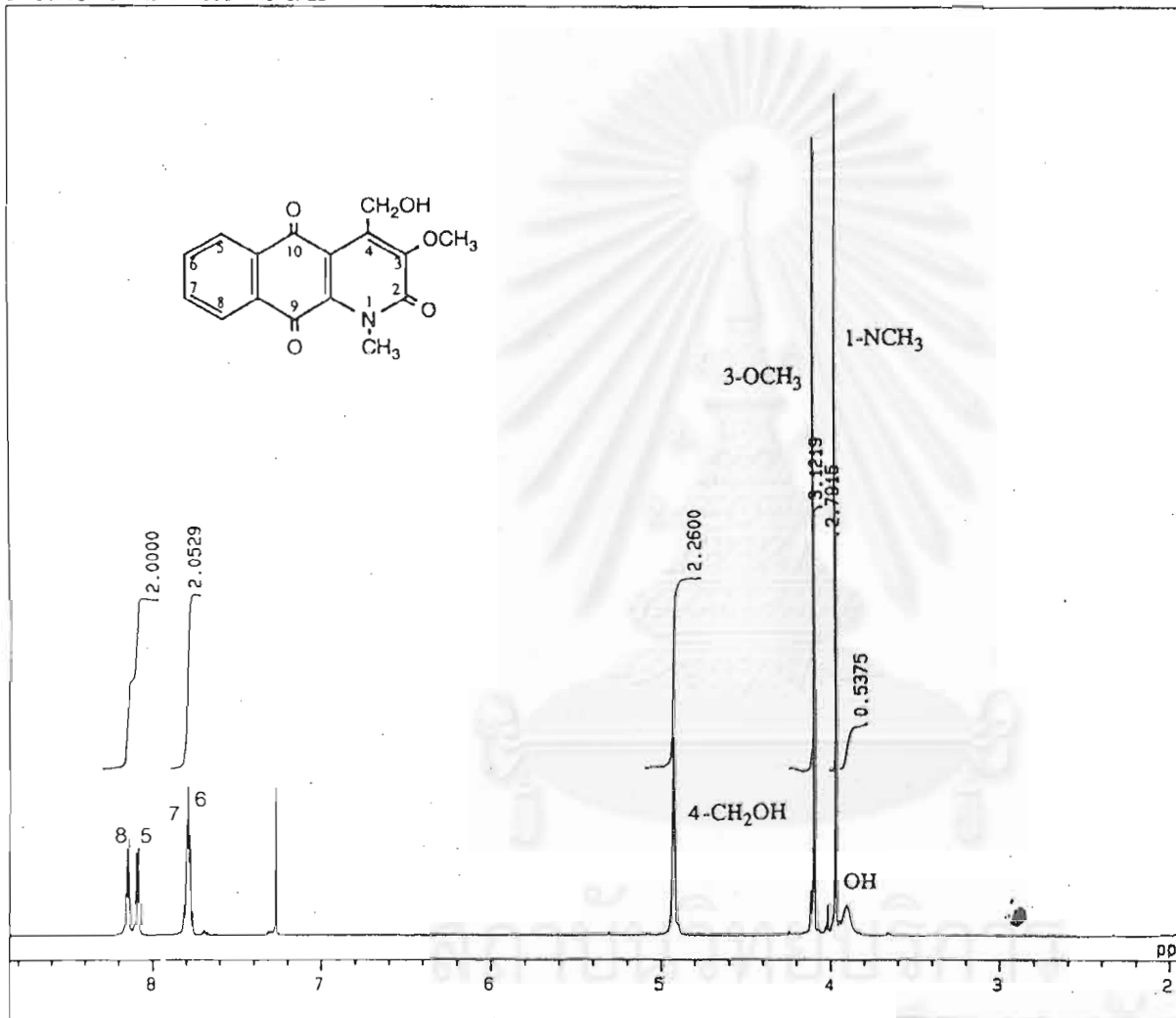
Client: CASSADY
 Inten : 87335424
 RIC : 791614154

Inlet : Vial 1
 Masses: 25 > 600
 #peaks: 1397



รูปที่ 23. แมสสเปคตรัมแบบ HREI ของสาร NPF2593

1H SINGL NUN KSNPK2593 F01 SPL3



15-JUN-1994 19:10:10.00

CPILF : ALPHA
 CPILF : KSNPK25931NUN_133

CONNT : 1H SINGL NUN KSNPK2593 F01
 EXMUL : SINGL
 IRMUL : NUN
 POINT : 16384
 FREQ : 10000.00 Hz
 P1 : 1.0000 sec
 P2 : 3.0615 sec
 P3 : 20
 P4 : 5.00 msec

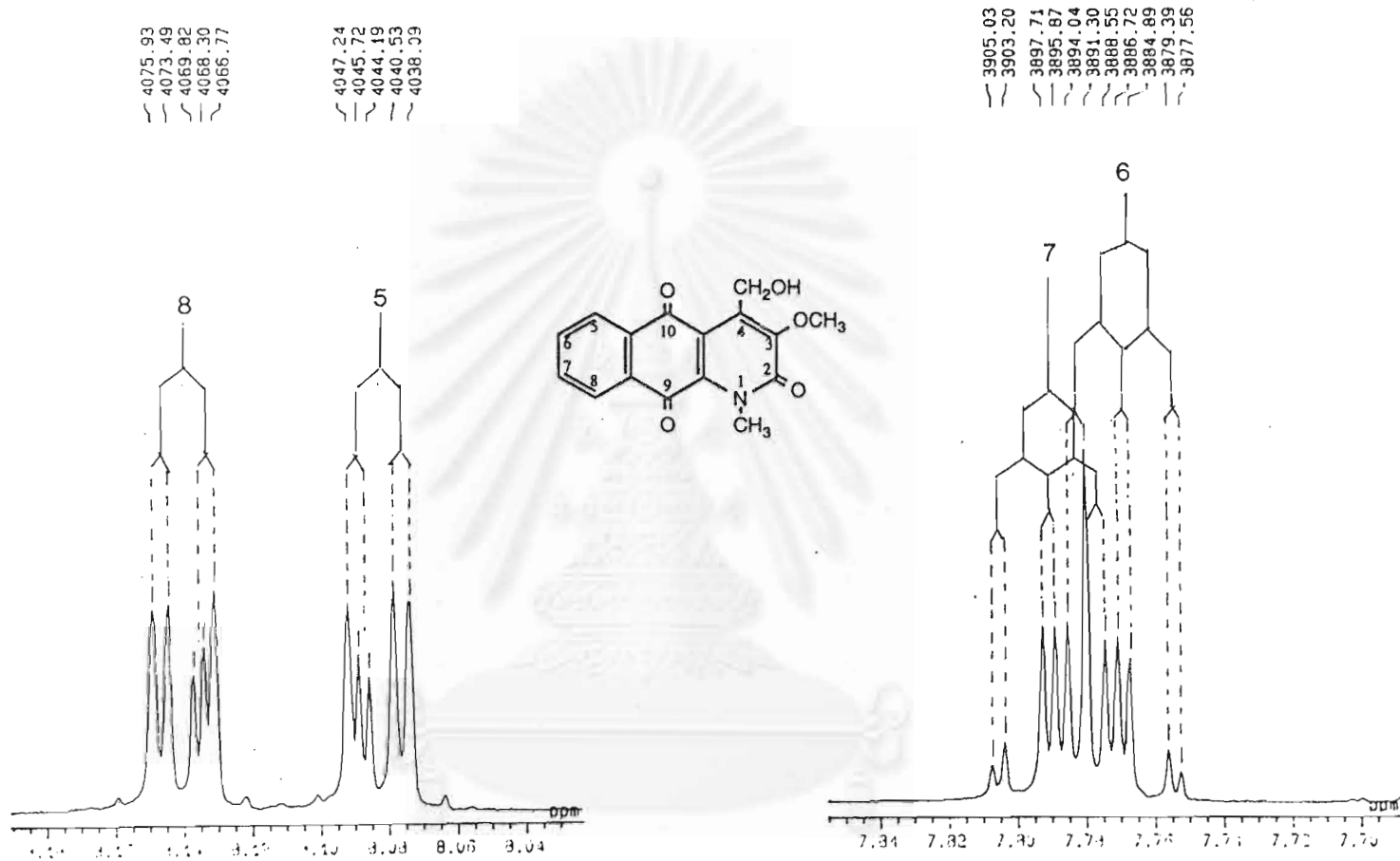
DBN1 : 14
 DBN2 : 500.00 MHz
 DBN3 : 162410.00 Hz

IRM1 : 14
 IRM2 : 500.00 MHz
 IRM3 : 162410.00 Hz
 IRM4 : 150
 IRM5 : 50.0 msec
 IRM6 : 30
 IRM7 : 5
 IRM8 : 1

ALBIT : 16
 ALB2 : 27.5
 ALB3 : 10 Hz
 ALB4 : CDCL3

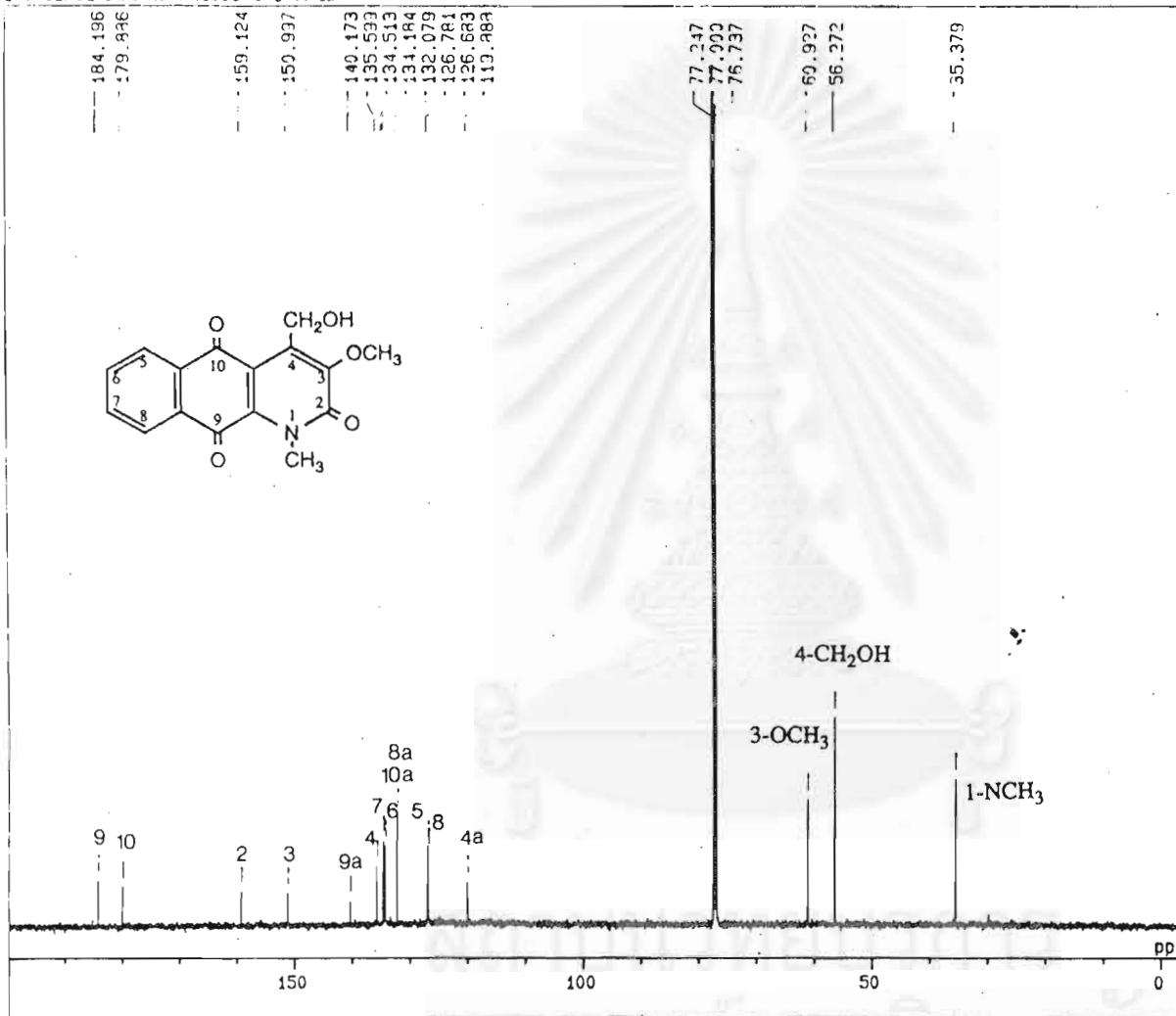
ALB5 : 0.51 Hz
 ALB6 : 0.31 Hz
 ALB7 : 0.00 %
 ALB8 : 0.00 %
 ALB9 : 0.00 %
 ALB10 : 100.00 %
 ALB11 : 100.00 %
 ALB12 : 0.00000
 X1 : 5494.87 Hz
 X2 : -187.39 Hz
 operation

รูปที่ 24. ก. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPF2593 ใน CDCl₃



รูปที่ 24. ข. แสดง coupling diagram ของโปรตอน ของสาร NPF2593

13C SINGL 60K K3MPK2593 F1: 2213



23-MAY-1997 10:38:17.07
 DFILE : K3MPK2593E1_133
 SFILE : KL-HA-100
 COMPT : 131 INTEL 60K K3MPK2593 F1
 EXMUL : 131
 IRMUL : 500
 POINT : 16344
 FREQ : 55-125.51 Hz
 SCAN : 1014
 DUMY :
 ACQTH : 0.1455 sec
 PD : 1.5167 sec
 RGAIN : 15

241 : 8.00 12.0

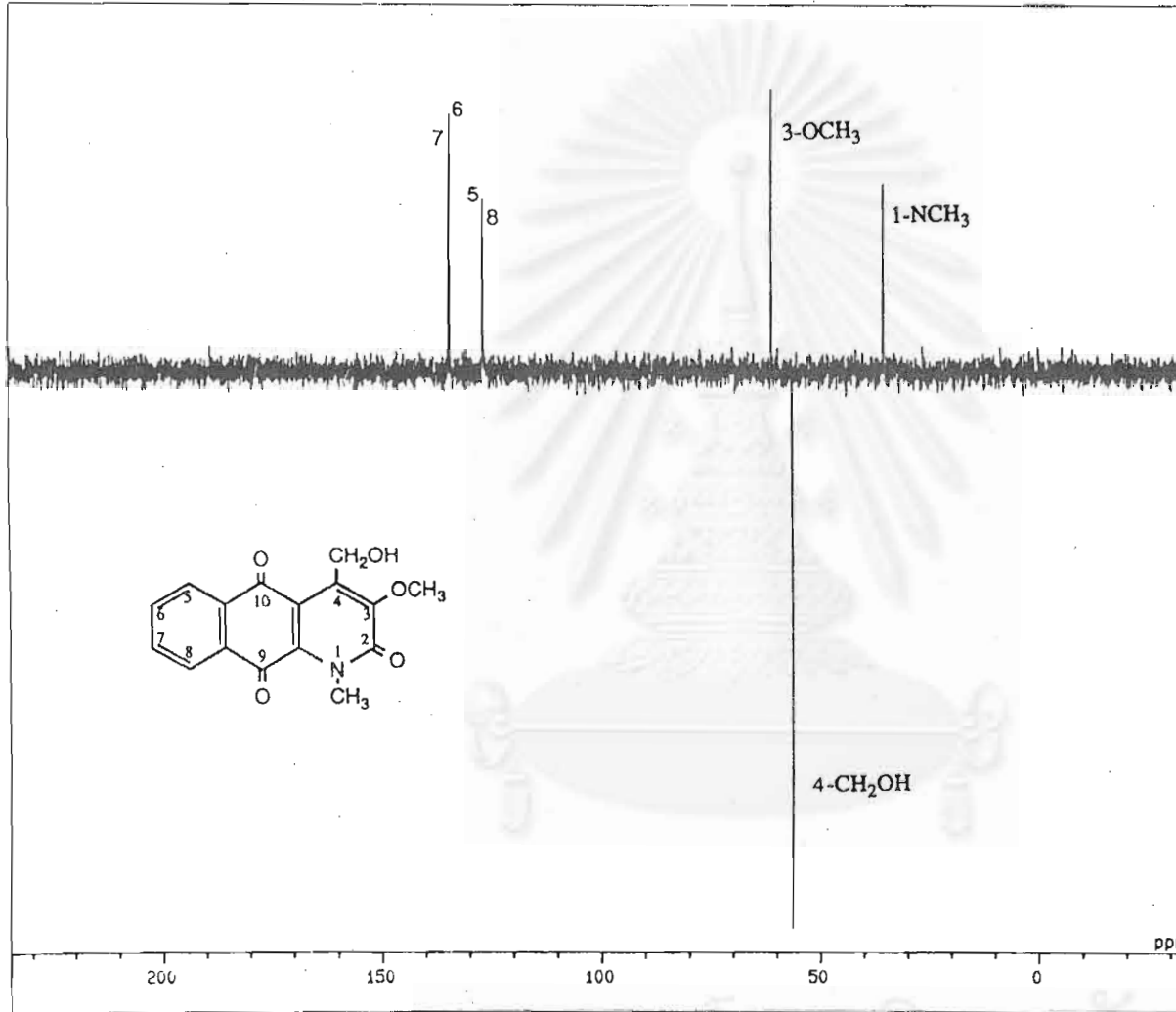
OBN10 : 15
 OBF10 : 120.65 MHz
 OBN10 : 120.65 MHz

IRN10 : 14
 IRF10 : 100.00 MHz
 IR10T : 100.00 MHz
 IR10P : 150
 IR10R : 100.00 MHz
 IR10S : 50
 IR10F :
 IR10M :

ADBIT : 16
 GTEM : 14.0
 GSPED : 10 Hz
 GUNIT : 1.0

RESOL : 1.07 Hz
 SF : 125.76 MHz
 T1 : 1.00 Y
 T2 : 1.00 Y
 T3 : 1.00 Y
 T4 : 1.00 Y
 REF1 : 127.00 ppm
 XE : 125.76 MHz
 XG : 125.76 MHz
 operation

รูปที่ 25. ก. สเปกตรัมคาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (125 MHz) ของสาร NPF2593 ใน CDCl₃



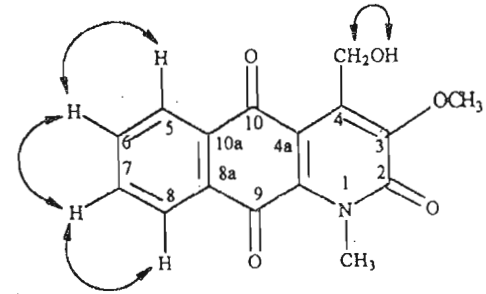
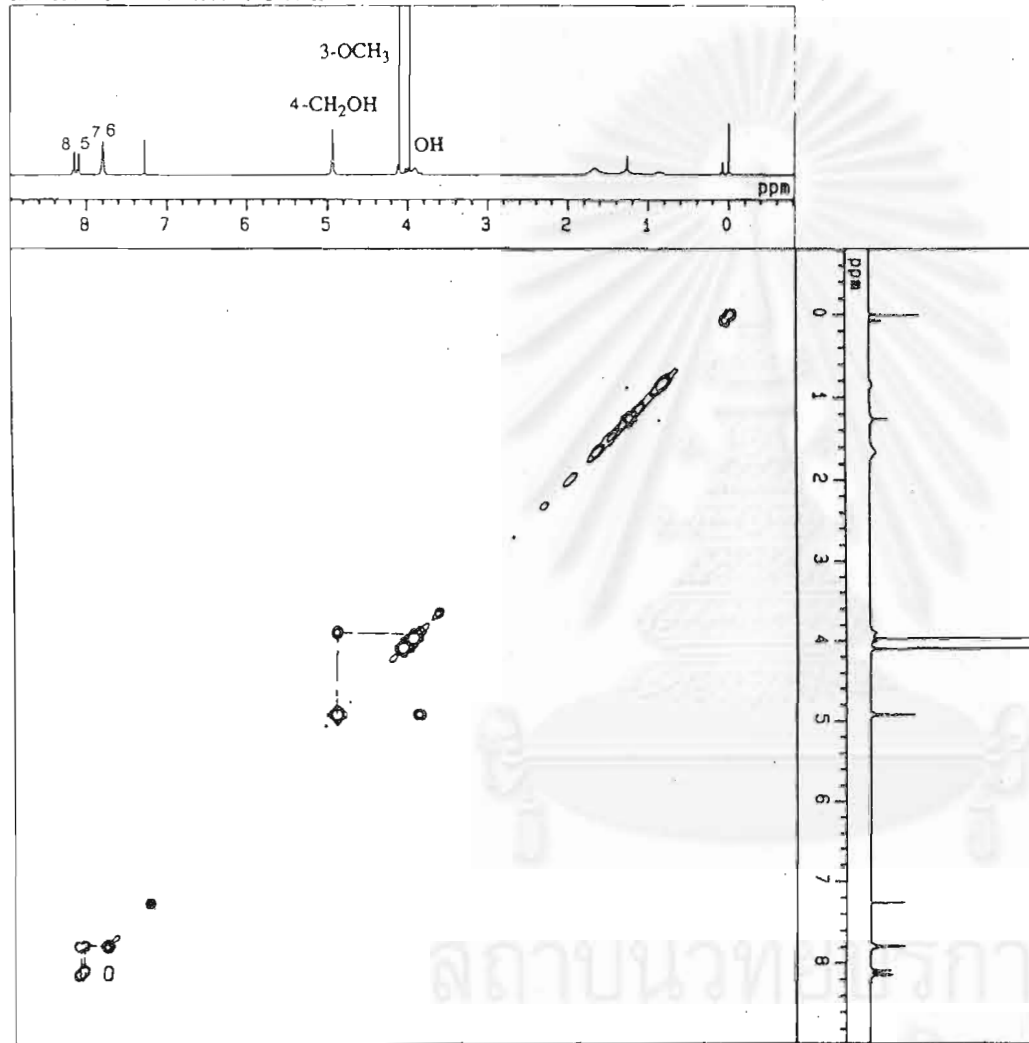
DEPT: 135
 FILE: NPF2593.D
 NAME: NPF2593
 COMMENT: 13C DEPT 135 NMR NPF2593 F
 F2: 100.625 MHz
 F1: 125.761 MHz
 PULP: zgpg30
 PRG: zgpg30
 ACQ: 0.145 sec
 DE: 0.001 sec
 INJ: 10
 SFO: 100.625 MHz
 SF: 125.761 MHz
 AQ: 0.145 sec
 FIDRES: 0.0001 Hz
 SFO: 100.625 MHz
 SF: 125.761 MHz
 AQ: 0.145 sec

DEPT: 135
 DEPT: 135
 DEPT: 135
 IRP: 14
 IRF: 100.625 MHz
 IRP: 100.625 MHz
 IRATH: 150
 IR: 100.625 MHz
 IR: 50
 IR: 10
 IR: 4
 ACET: 16
 CDE: 1.4
 CDE: 10 Hz
 CDE: 1.4

RF: 100.625 MHz
 SF: 125.761 MHz
 RF: 100.625 MHz
 SF: 125.761 MHz
 AQ: 0.145 sec
 CDE: 1.4

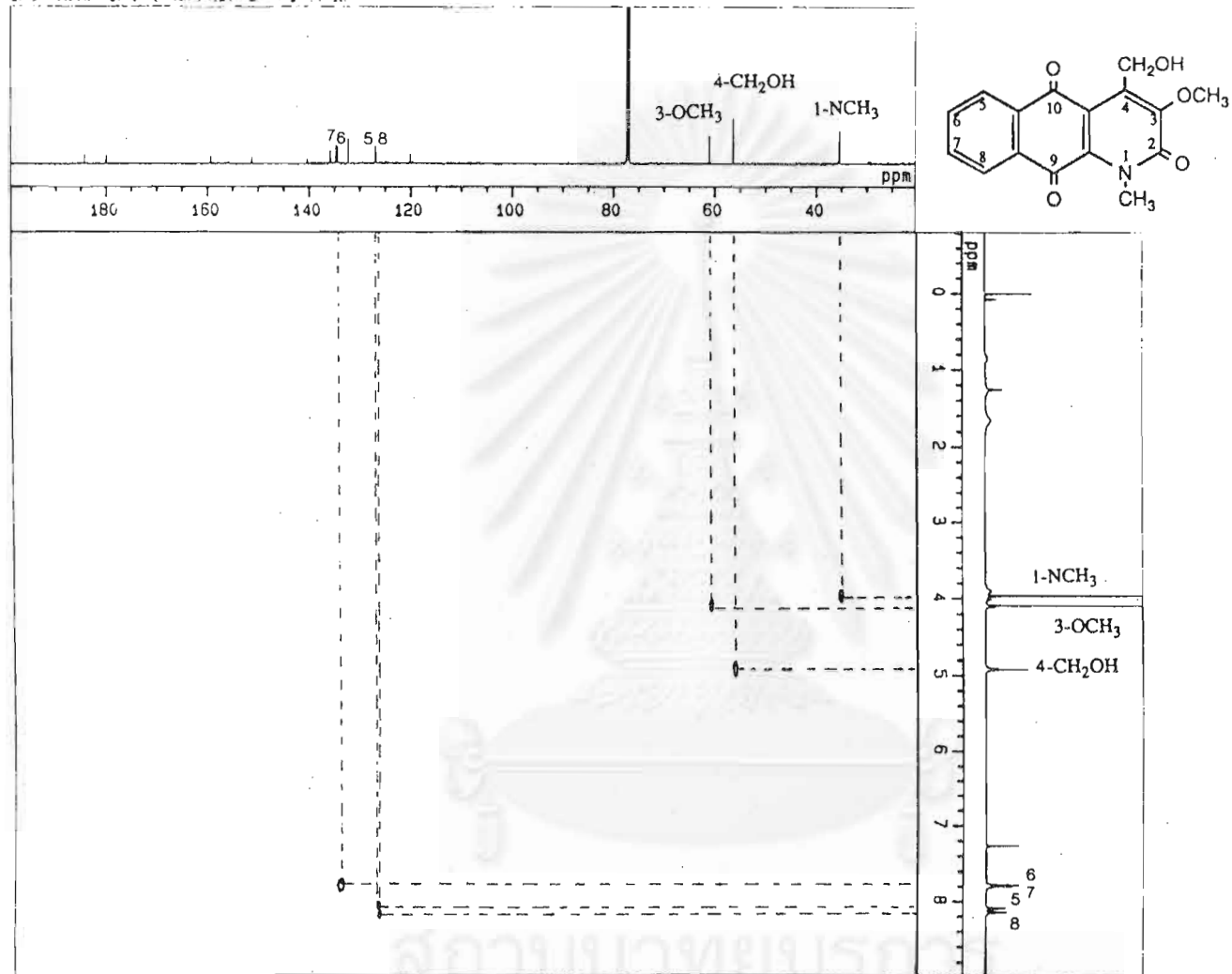
รูปที่ 25. ข. สเปกตรัม DEPT 135 ของสาร NPF2593

1H COSY (DEKORP2593) 501 31.15

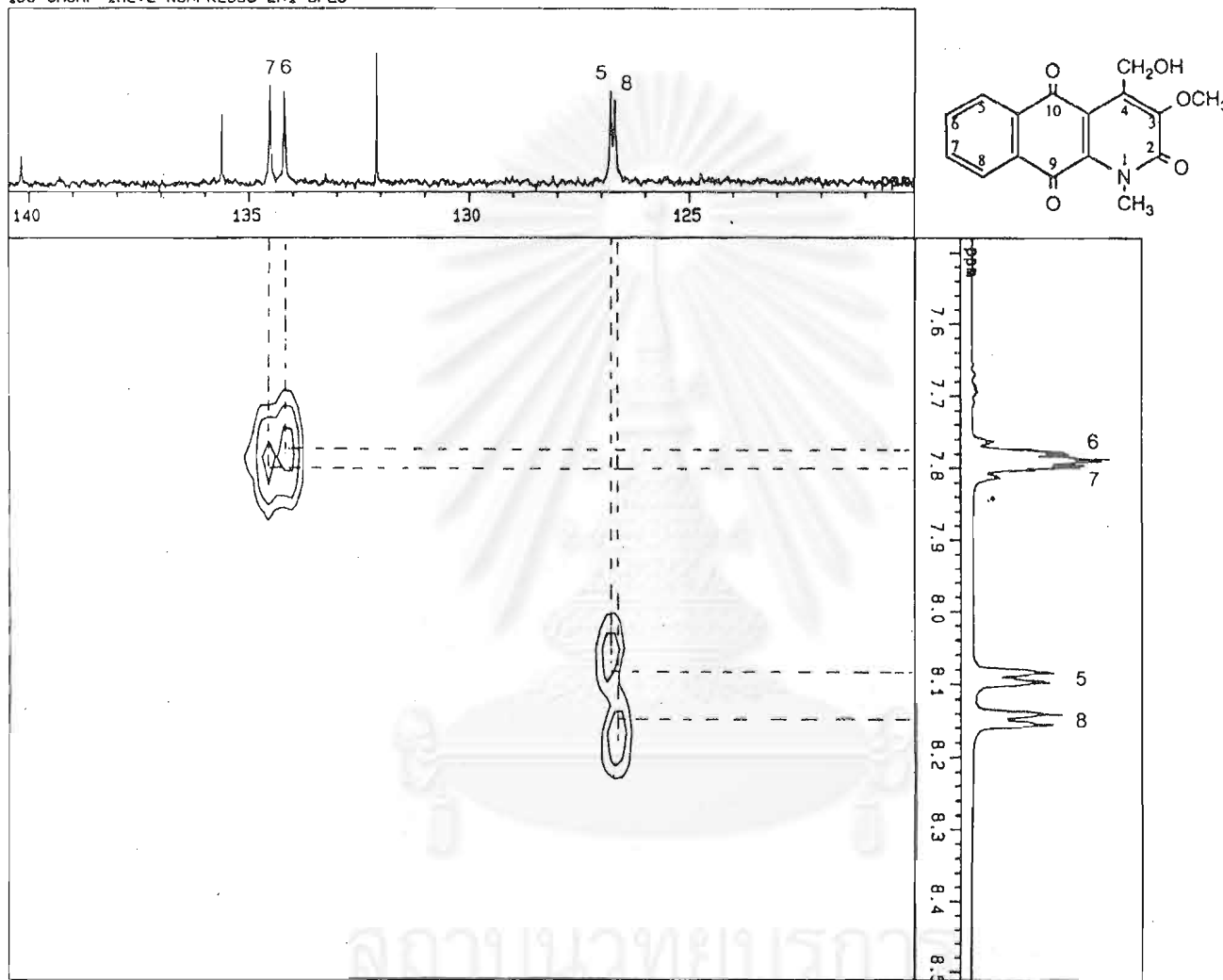


รูปที่ 26. สเปกตรัม¹H,¹H COSY ของสาร NPF2593

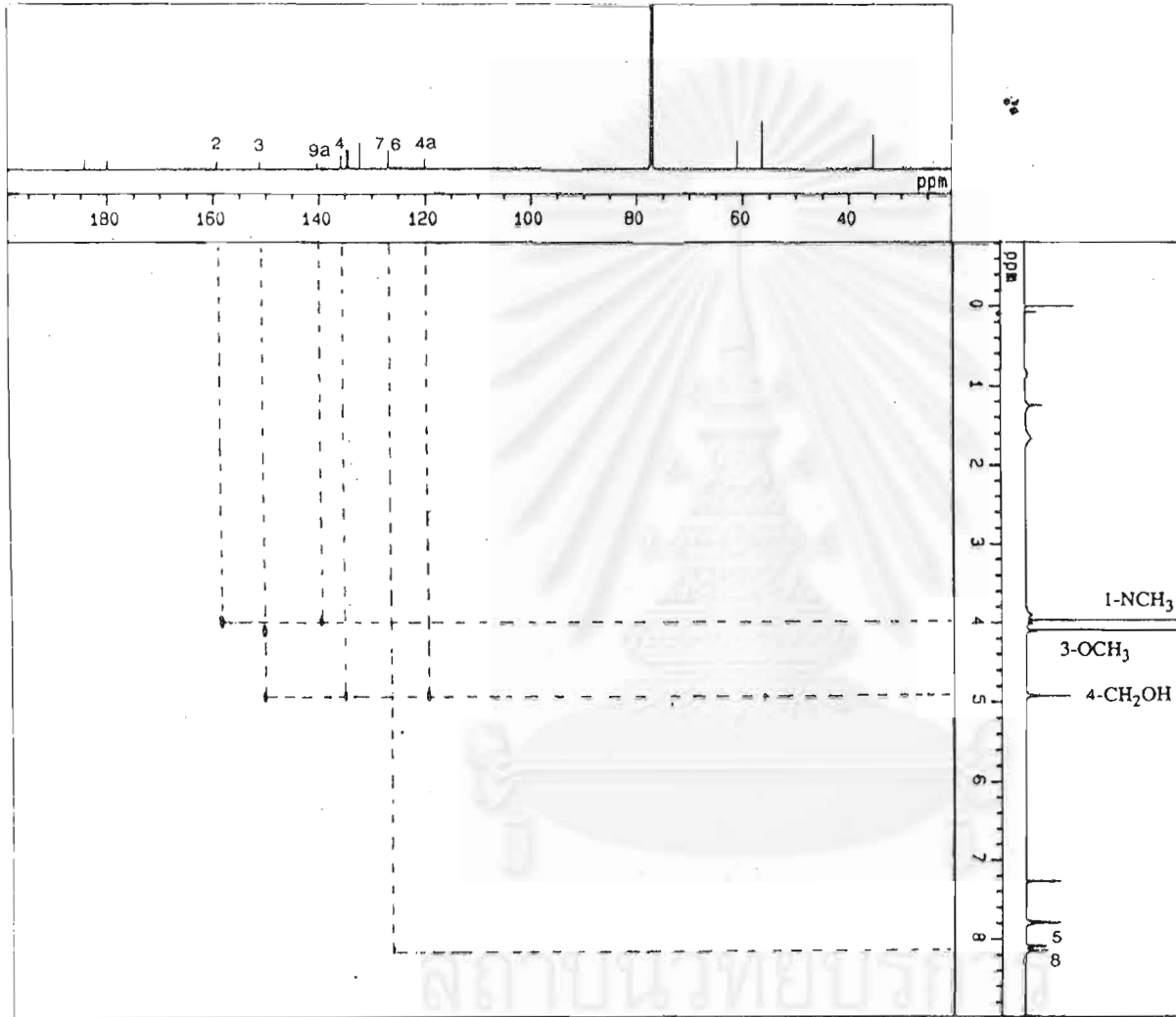
13C, 1H COSY IR 100 KSMAN2015 100 80.0



รูปที่ 27 ก. สเปกตรัม ^{13}C , ^1H COSY ของสาร NPF2593

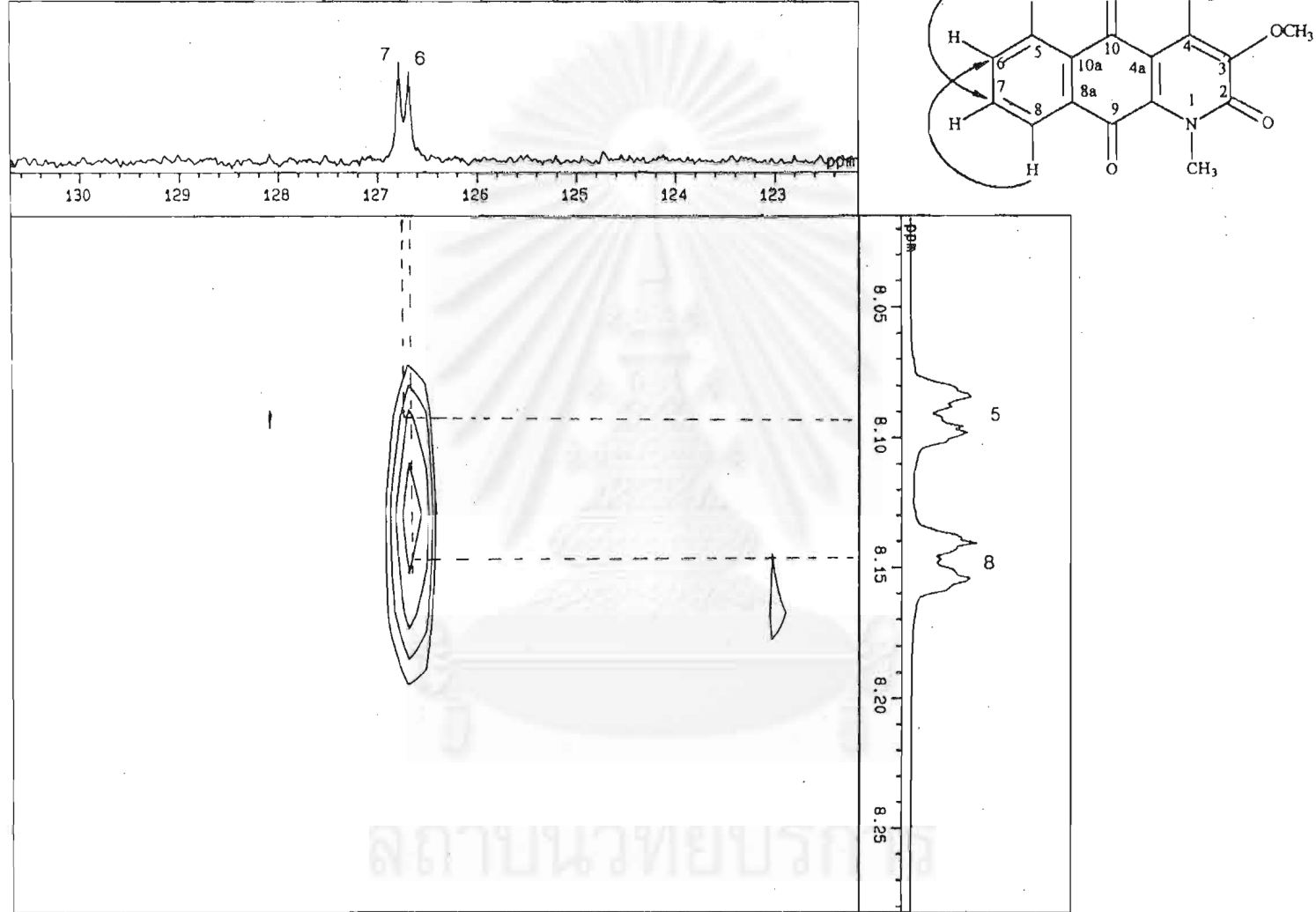


รูปที่ 27. ข. สเปกตรัม $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ COSY ของสาร NPF2593 (ขยาย)



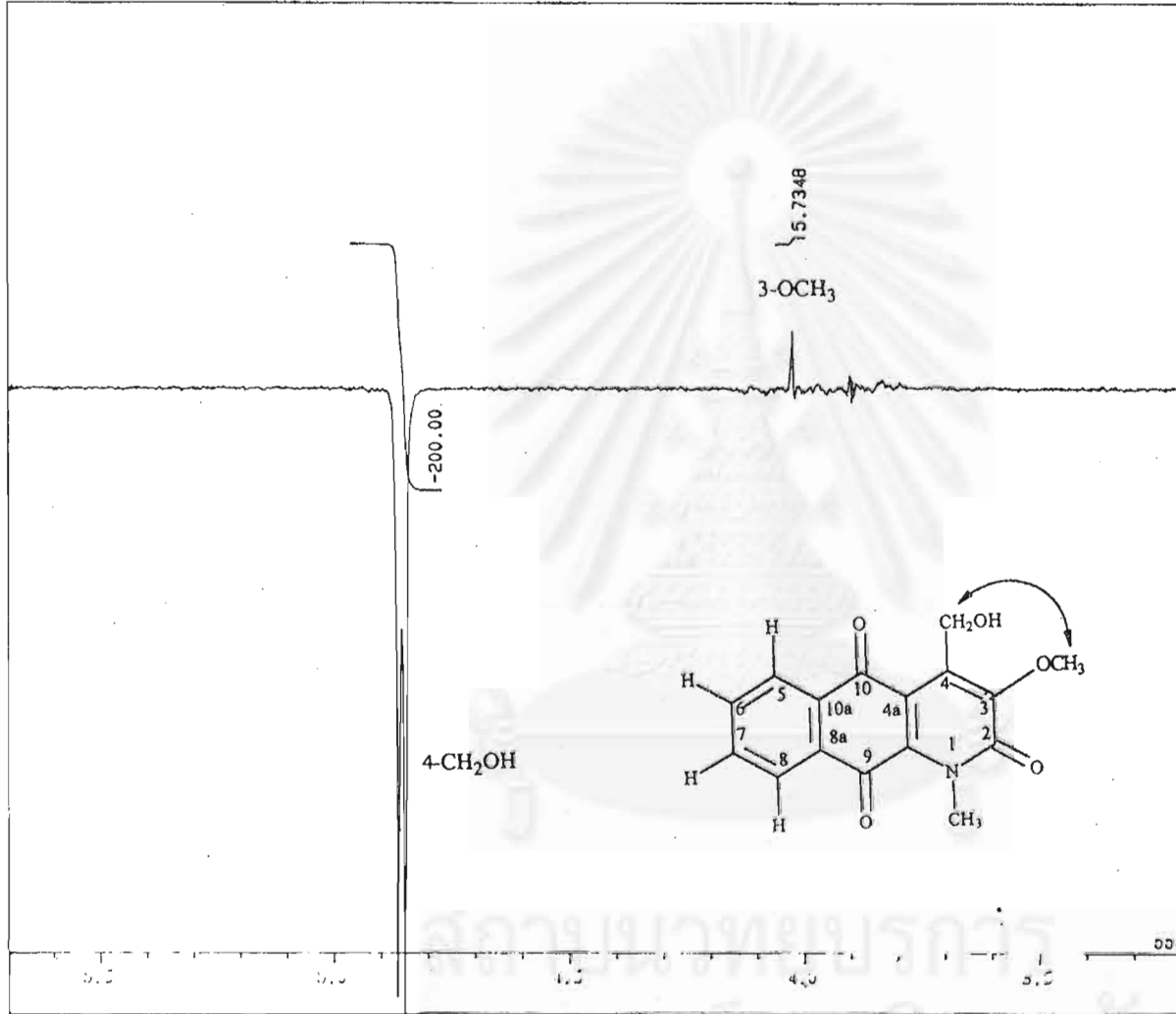
รูปที่ 28. ก. สเปกตรัม COLOC ของสาร NPF2593

13C COLOC IRLV2 KSNPK2593 EN1 SPL3



รูปที่ 28. ข. สเปกตรัม COLOC ของสาร NPF2593 (ขยาย)

6ONITHALAM'S NPK2593 NOE irr. at 4.85 ppm



14-JUN-1994 21:11:40.22

CFILE : ALPHA
SFILF : KS-NPK2593NOE

COMPT : 6ONITHALAM'S NPK2593 NOE
EXMOL : NCEUF
IRMSD : HNGP
POINT : 163R4
FREQ1 : 550.150 Hz
SCANS : 2
DIRTY : 4
ACQTM : 2.0700 sec
PC : 15.0000 sec
RGAIN : 15

PW1 : 5.00 usec

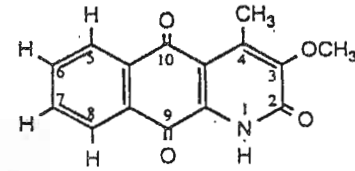
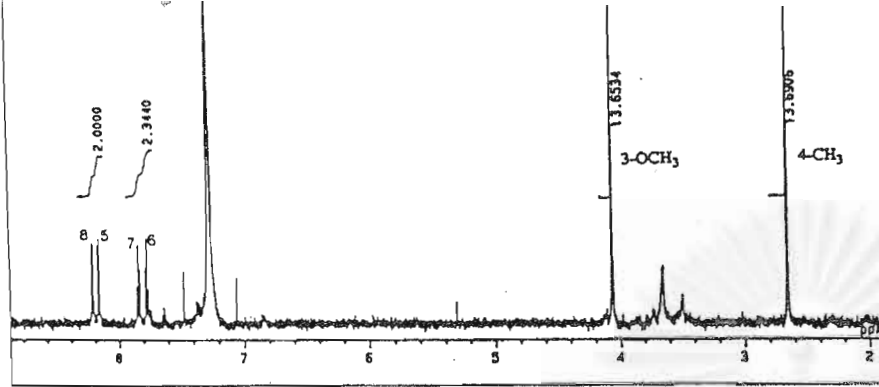
OBNUC : 1H
OBFRG : 500.00 MHz
OBSET : 162379.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRG : 500.00 MHz
IRSET : 162379.17 Hz
IRATI : 400
IRAPW : 50.0 usec
IRBP1 : 30
IRBP2 : 6
IRAMS : 0

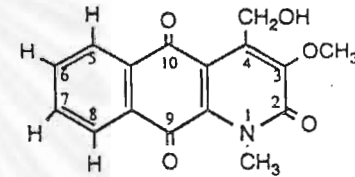
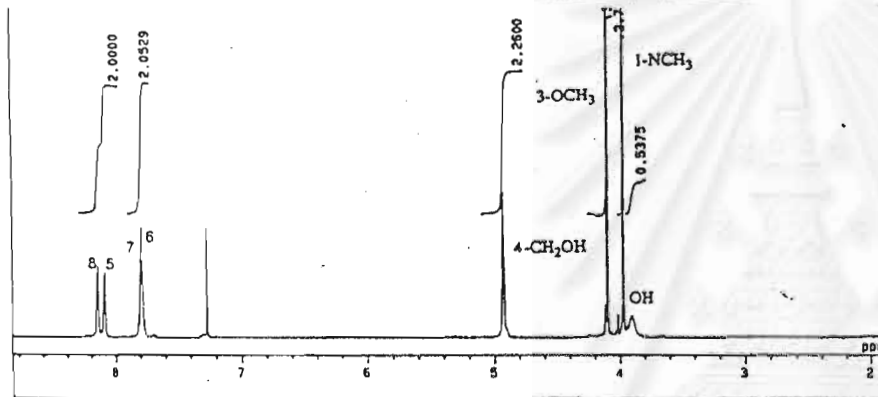
ACBIT : 16
CTEMP : 29.3 c
CSPEL : 0 Hz
CLVNT : CDCL3

RESOL : 0.34 Hz
SF : 0.34 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 100.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XF : 1257.30 Hz
XS : -15.75 Hz
operator

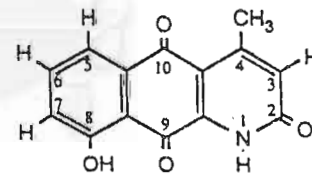
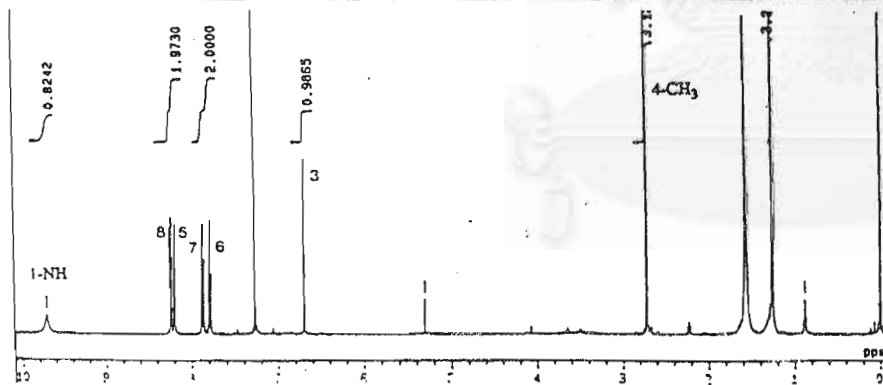
รูปที่ 29. สเปกตรัม NOE ของสาร NPF2593 เมื่อ irradiate ที่ 4.85 ppm



NPF2611 (Dielsiquinone)
(MW 269.0680)

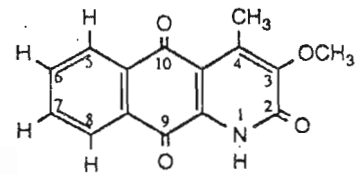
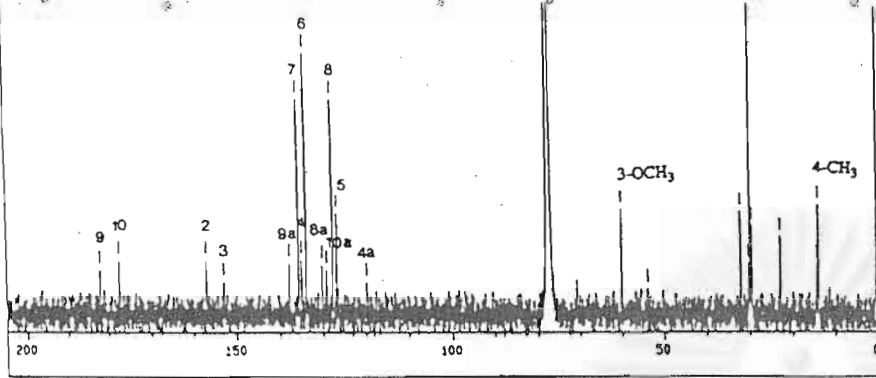


NPF 2593 (Marcanine C)
(MW 299.0792)

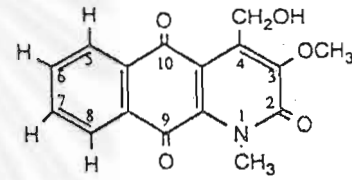
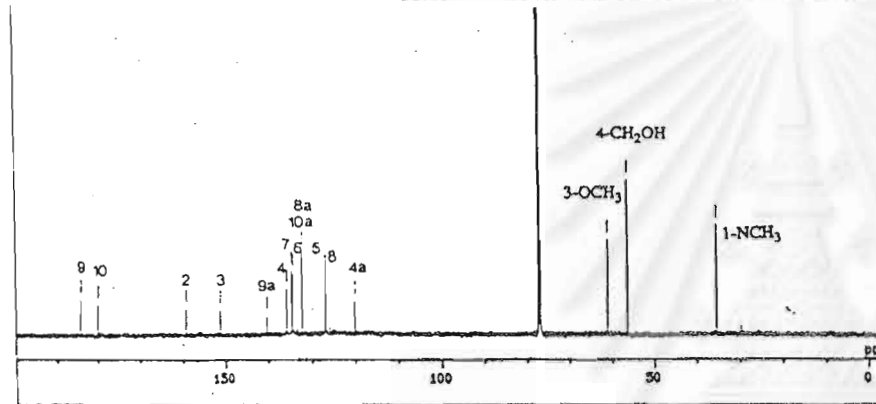


NPK11916 (Marcanine A)
(MW 239.0581)

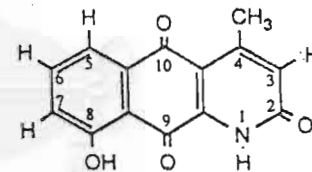
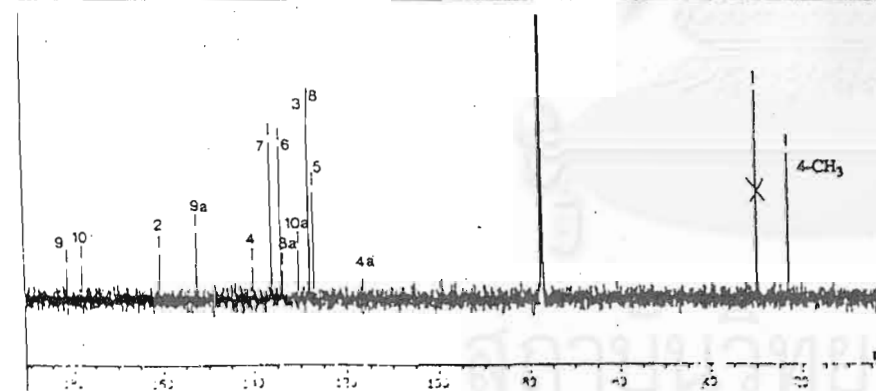
รูปที่ 30. เปรียบเทียบสเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ที่แยกได้



NPF2611 (Dielsiquinone)
(MW 269.0680)

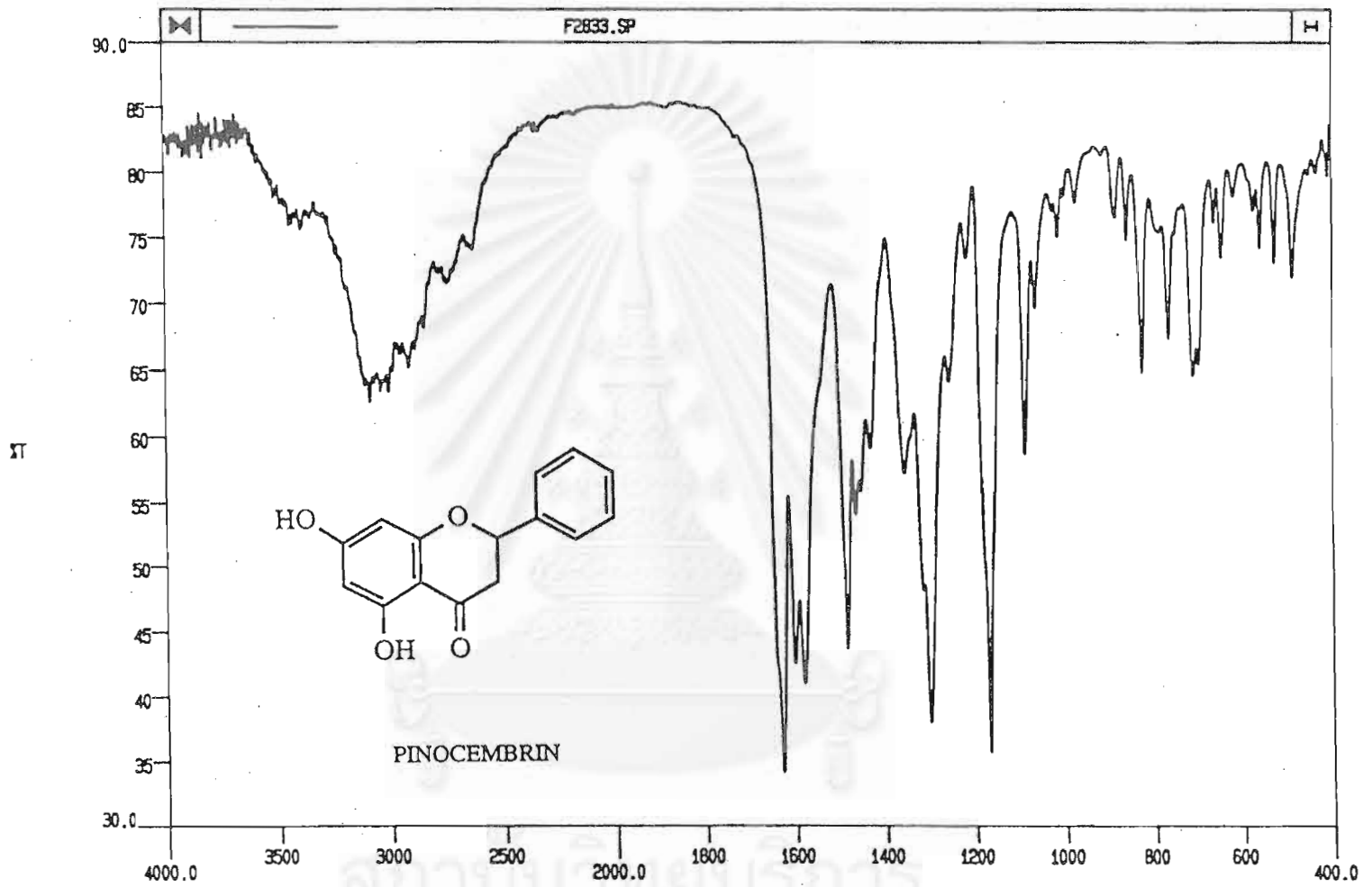


NPF 2593 (Marcanine C)
(MW 299.0792)



NPK11916 (Marcanine A)
(MW 239.0581)

รูปที่ 31. เปรียบเทียบสเปกตรัมคาร์บอนอินเอ็มอาร์ของสารกลุ่ม 1-azaanthraquinones ที่แยกได้



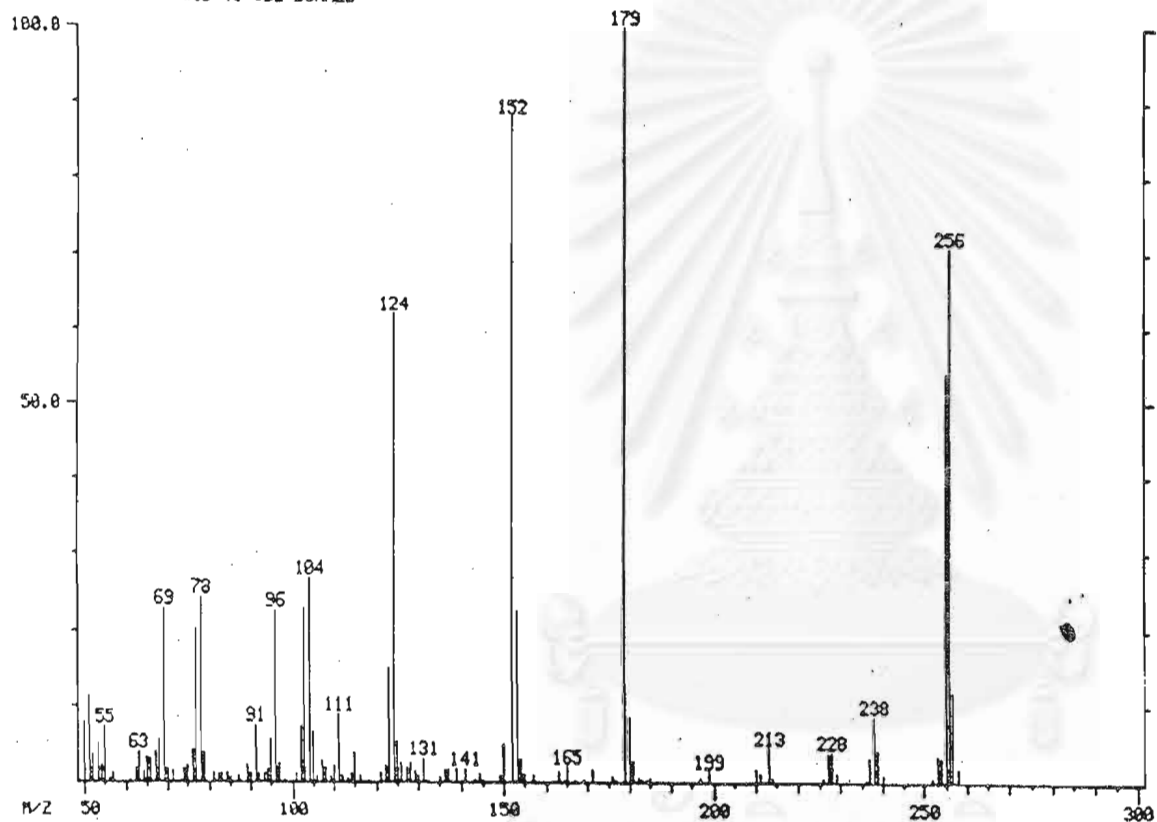
รูปที่ 32. สเปกตรัมอินฟราเรดของสาร NPF2833 (KBr disc)

มหาวิทยาลัยมหจุลาลงกรณราชวิถยาลัย

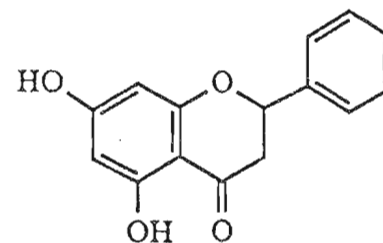
MASS SPECTRUM
08/17/94 13:33:00 + 2:45
SAMPLE: NPF2833
COND.S: DIP 40/300 @30/MIN
TEMP: 80 DEG. C
#89 TO #92 SUMMED

DATA: CALTAB #98
CALI: CALTAB #3

BASE M/Z: 179
RIC: 406016.

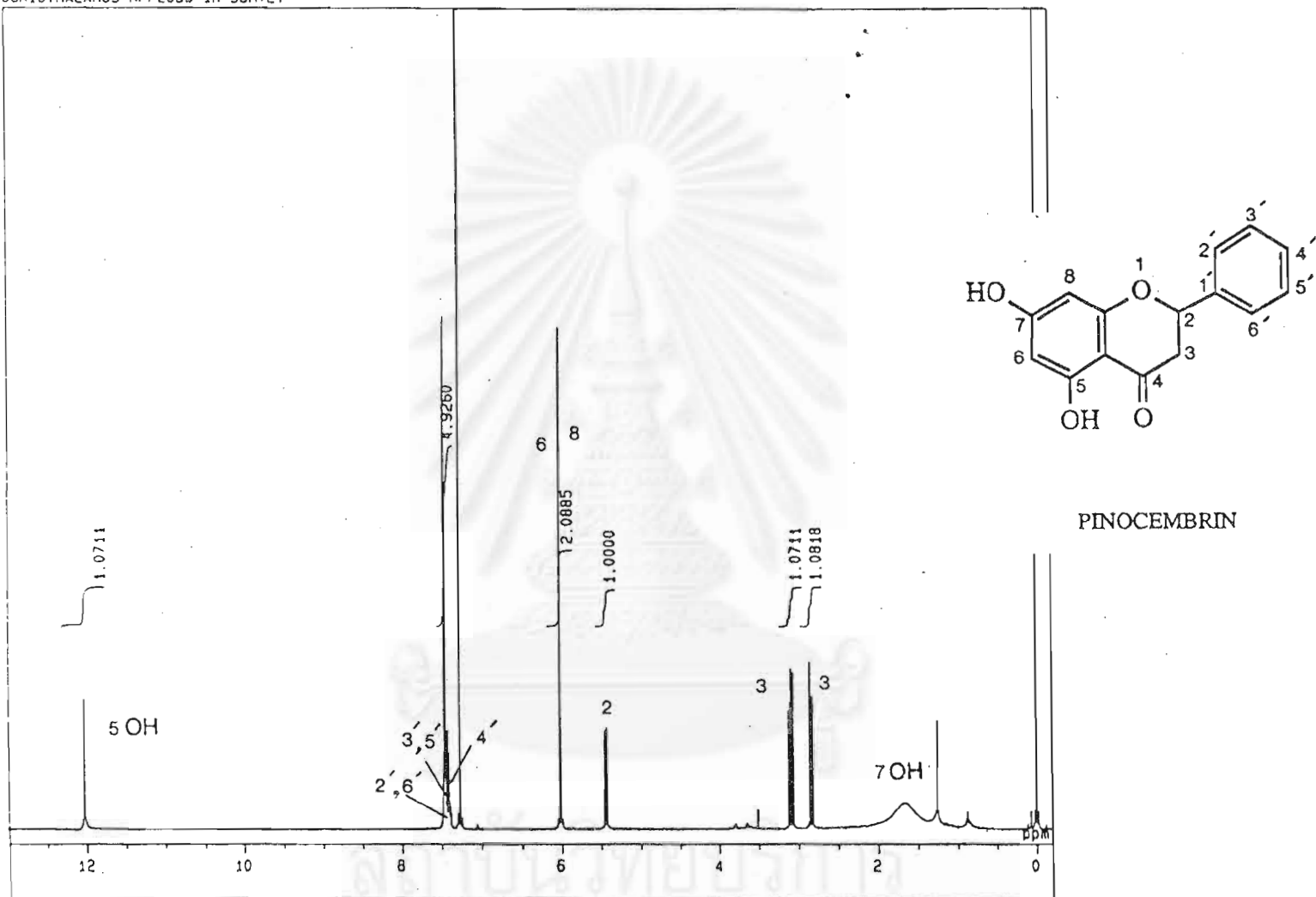


49792.
0.



PINOCEBRIN

รูปที่ 33. แมสสเปกตรัมแบบ HREI ของสาร NPF2833



รูปที่ 34. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPF2833 ใน CDCl₃

13C SINGL BCM NPF2833 EN1 SPL2

21-JUL-1994 09:12:37.35

CHULALONGKORN
JNM-A500

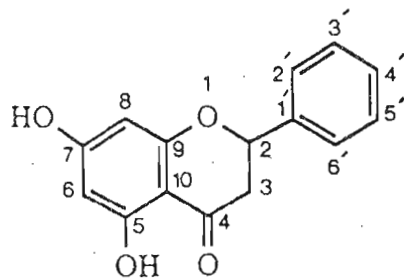
SFILE : NPF28331BCM_E1S2
COMNT : 13C SINGL BCM NPF2833 EN1

EXMOD : SINGL
IRMOD : BCM
POINT : 16384
FREQU : 33898.31 Hz
SCANS : 8000
DUMMY : 4
ACQTM : 0.4833 sec
PD : 2.0000 sec
RGAIN : 23
PW1 : 4.75 usec
OBNUC : 13C
OBFRQ : 125.65 MHz
OBSET : 127958.00 Hz

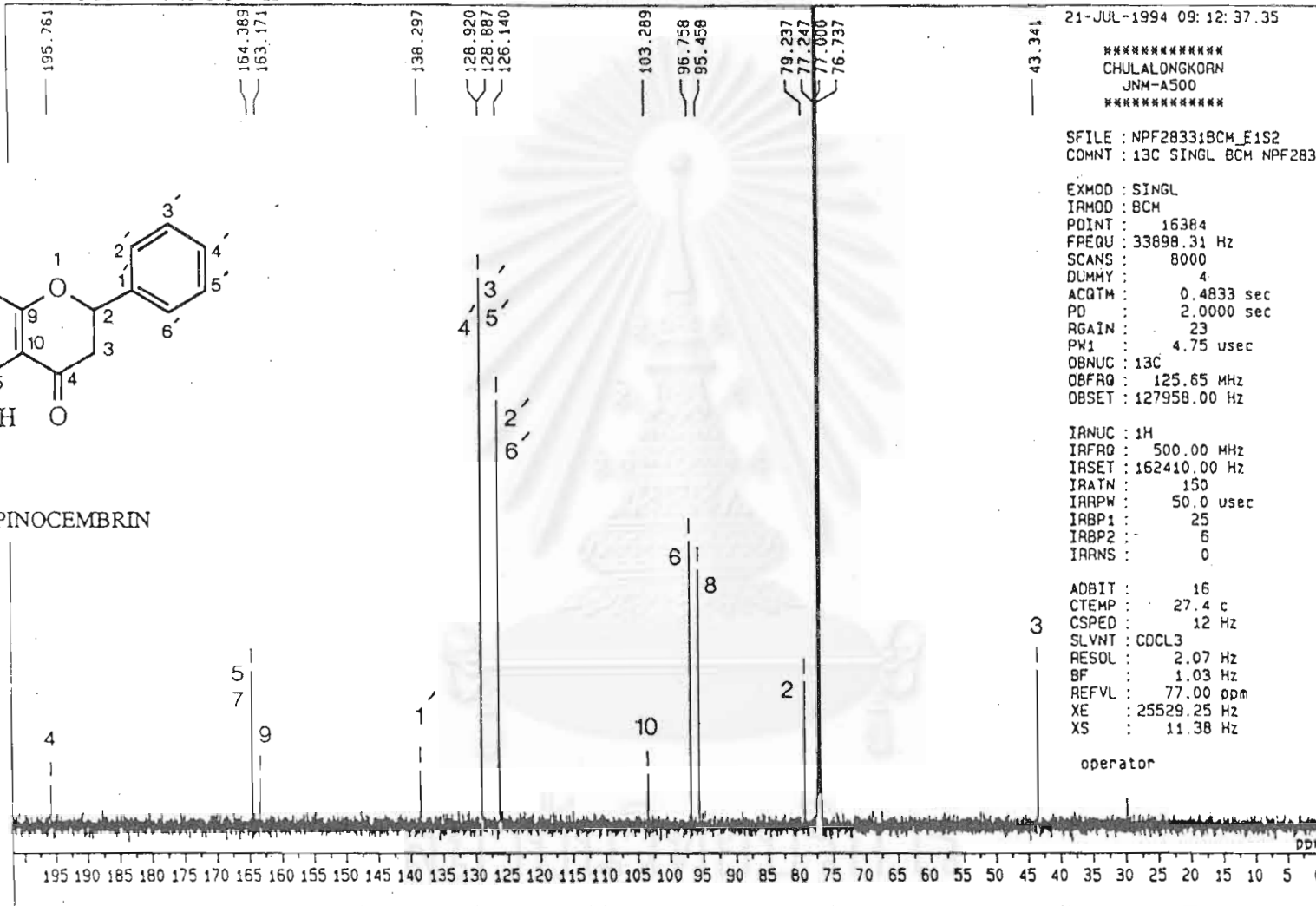
IRNUC : 1H
IRFRQ : 500.00 MHz
IRSET : 162410.00 Hz
IRATN : 150
IARPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRANS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 27.4 c
CSPED : 12 Hz
SLVNT : CDCL3
RESOL : 2.07 Hz
BF : 1.03 Hz
REFVL : 77.00 ppm
XE : 25529.25 Hz
XS : 11.38 Hz

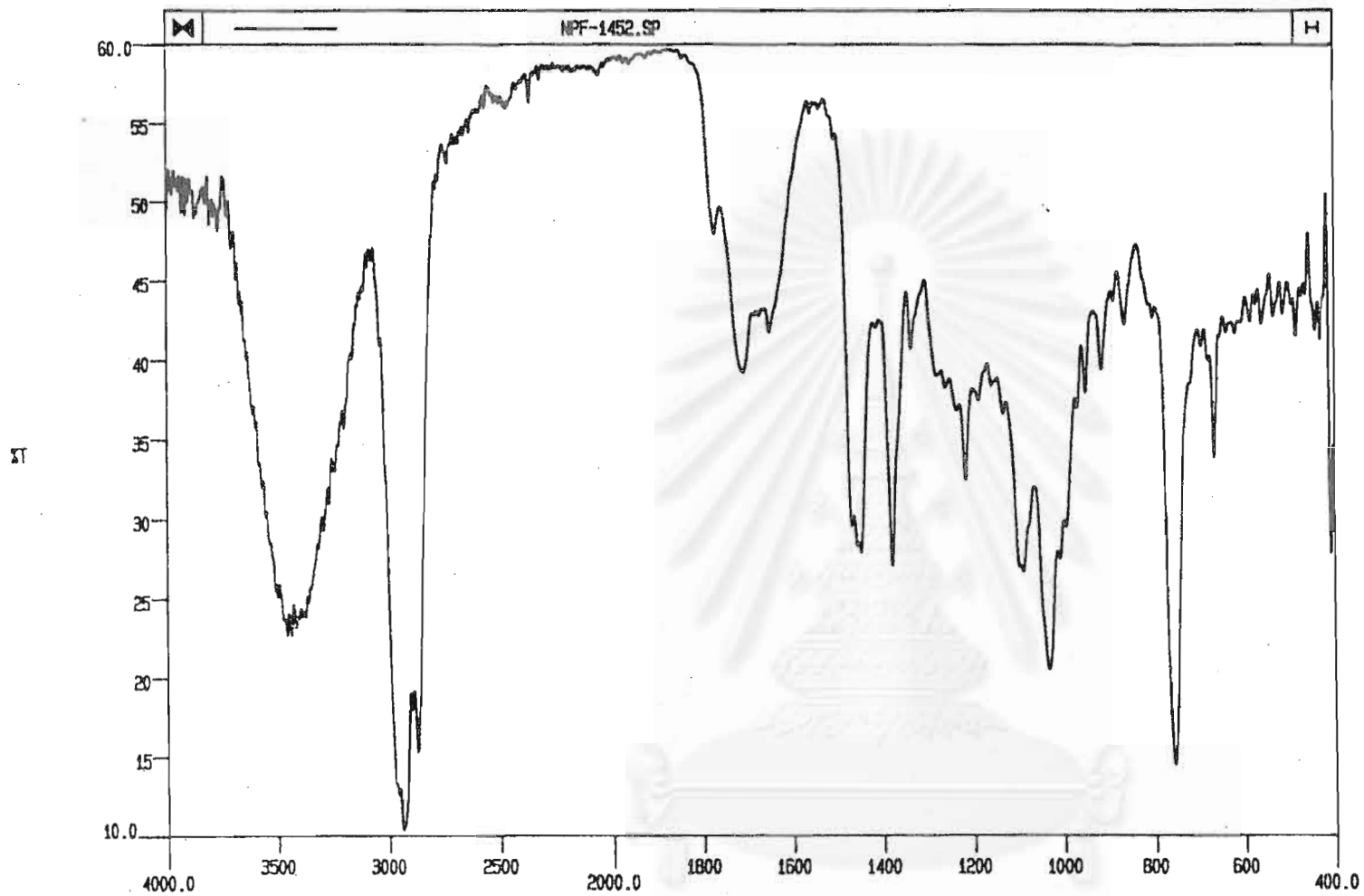
operator



PINOCEBRIN

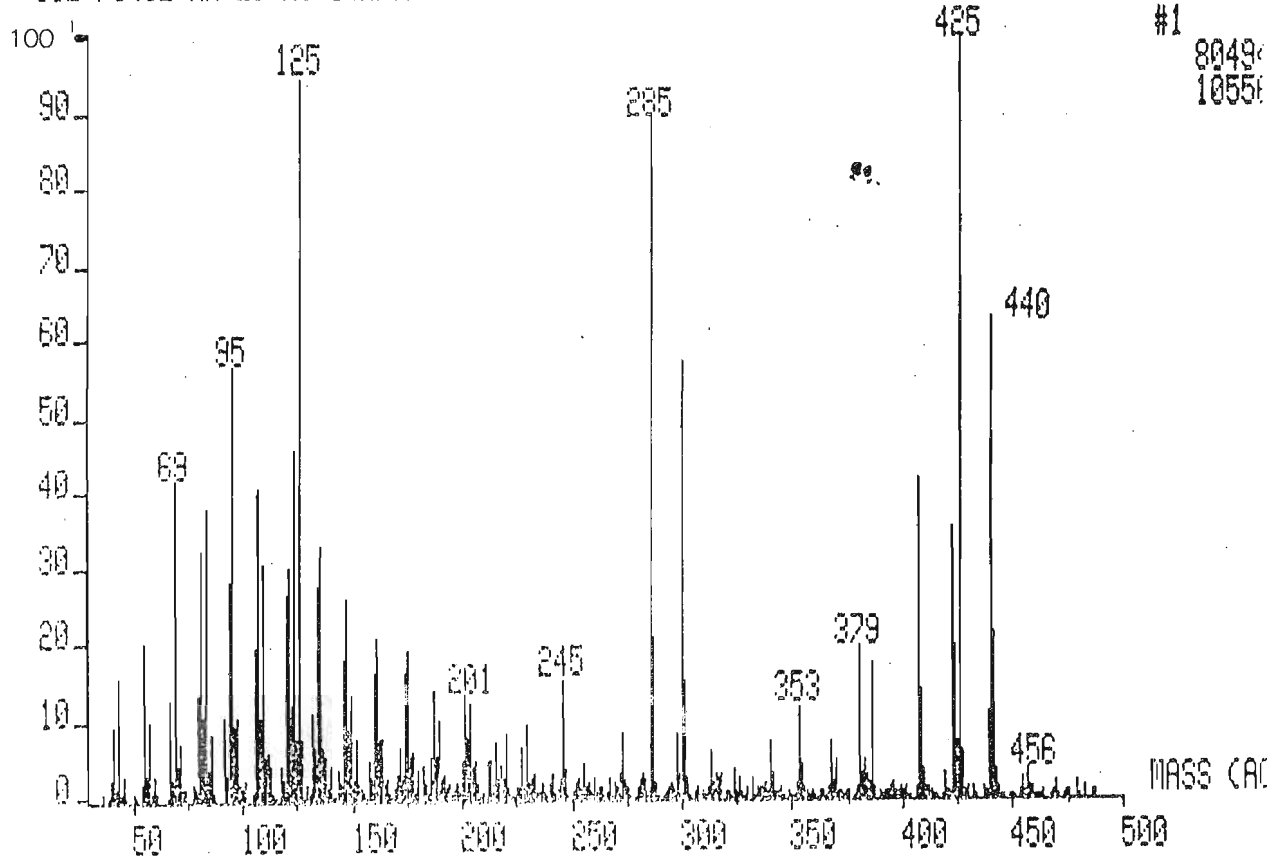


รูปที่ 35. สเปกตรัมคาร์บอนอินเอ็มอาร์ (125 MHz) ของสาร NPF2833 ใน CDCl₃



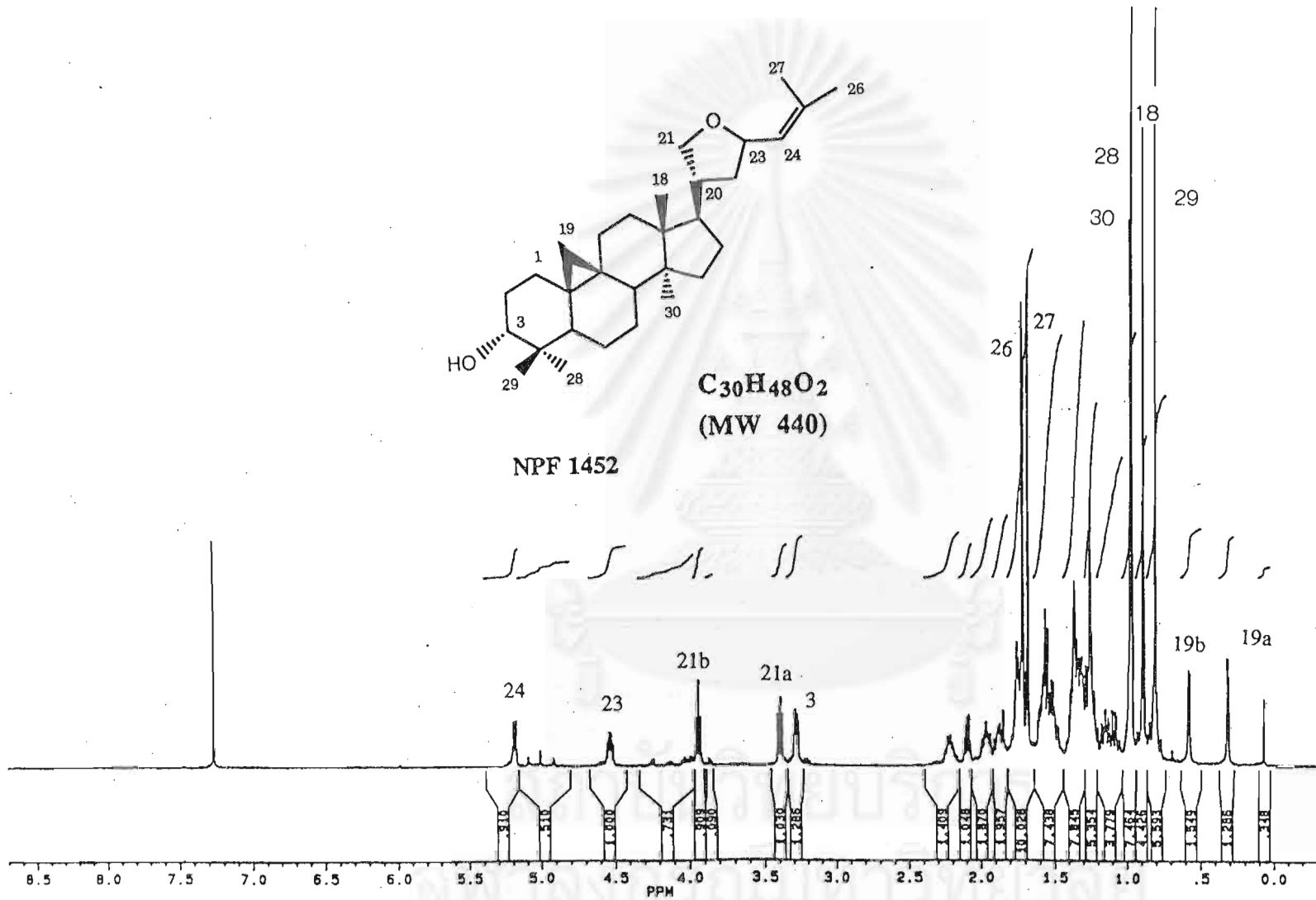
รูปที่ 36. สเปกตรัมอินฟราเรดของสาร NPF1452 (film)

30101A#1 x1 Bgd=0 01-AUG-95 14:51+0:00:00 70-250S EI+
 M=0 I=5.5nA Hm=490 TIC=1927395968 RV Acnt:03U-CCIC Sys:HREI
 11E F1452 HR-EI N. SUN/CASSADY PT= 0° Cal:E08010



รูปที่ 37. แมสสเปกตรัมแบบ HREI อองสาร NPF 1452

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



NPF1452H.003
DATE 29-11-93

SF 500.135
SY 165.0
O1 7500.000
SI 32768
TD 32768
SM 6024.096
HZ/PT .368

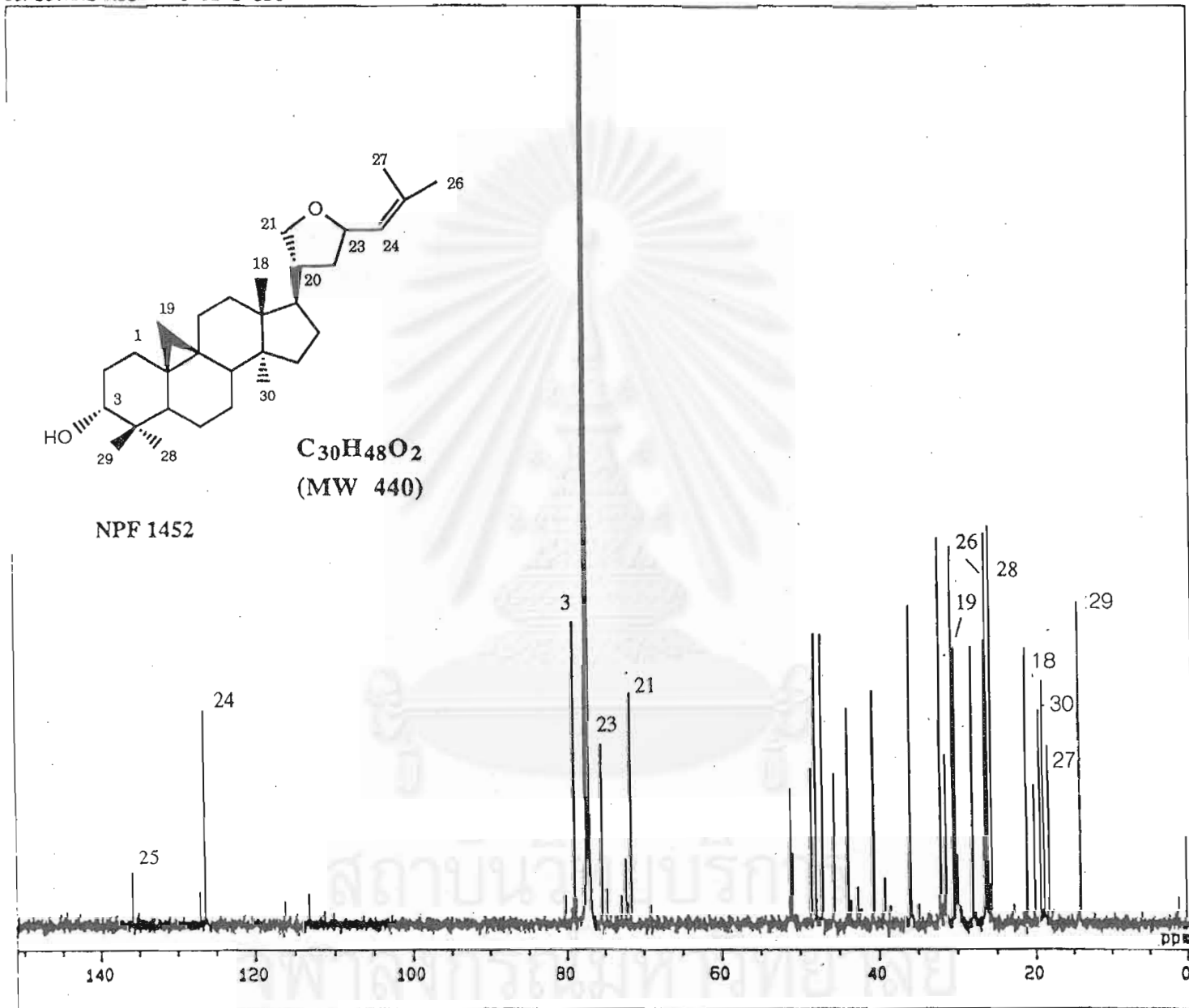
PW 10.0
RD 0.0
AQ 2.720
RG 160
NS 32
TE 303

FW 7600
O2 0.0
DP 63L D0

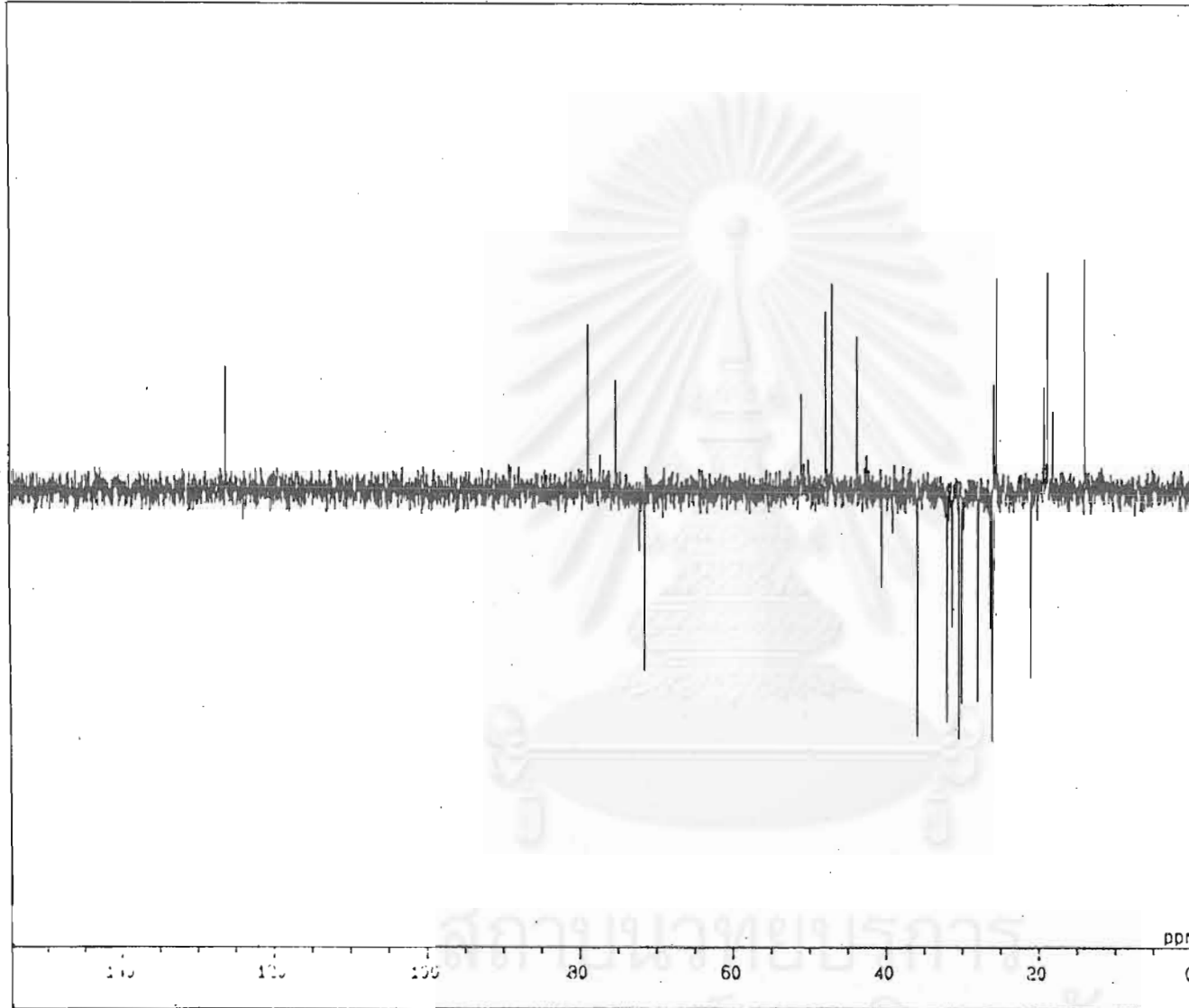
LB .300
GB 0.0
CX 35.00
CY 20.00
F1 8.700P
F2 -.300P
HZ/CM 128.605
PPM/CM .257
SR 5420.63



รูปที่ 38. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPF1452 ใน CDCl₃

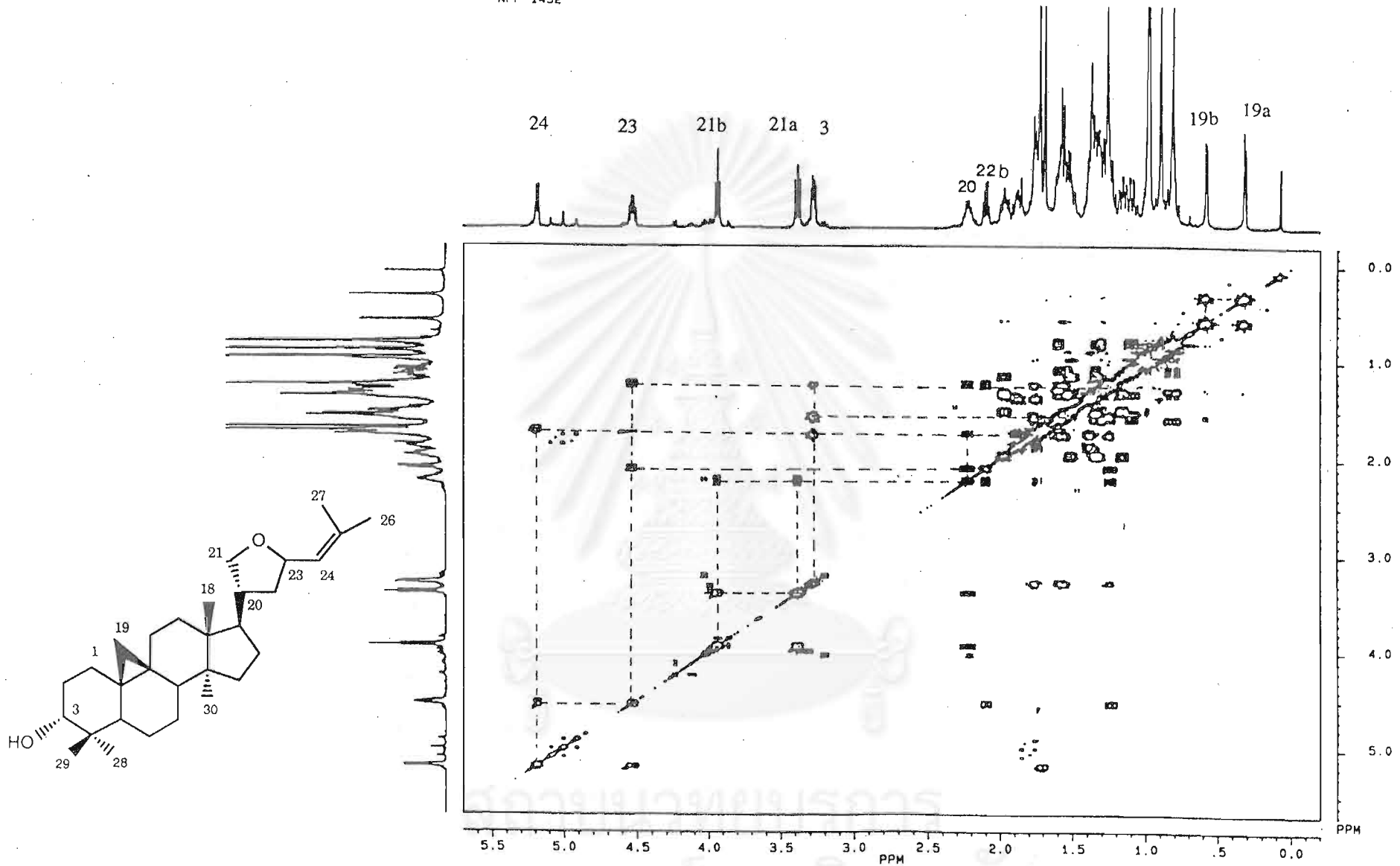


รูปที่ 39 สเปกตรัมคาร์บอนอินเอ็มอาร์ (125 MHz) ของสาร NPF1452 ใน $CDCl_3$

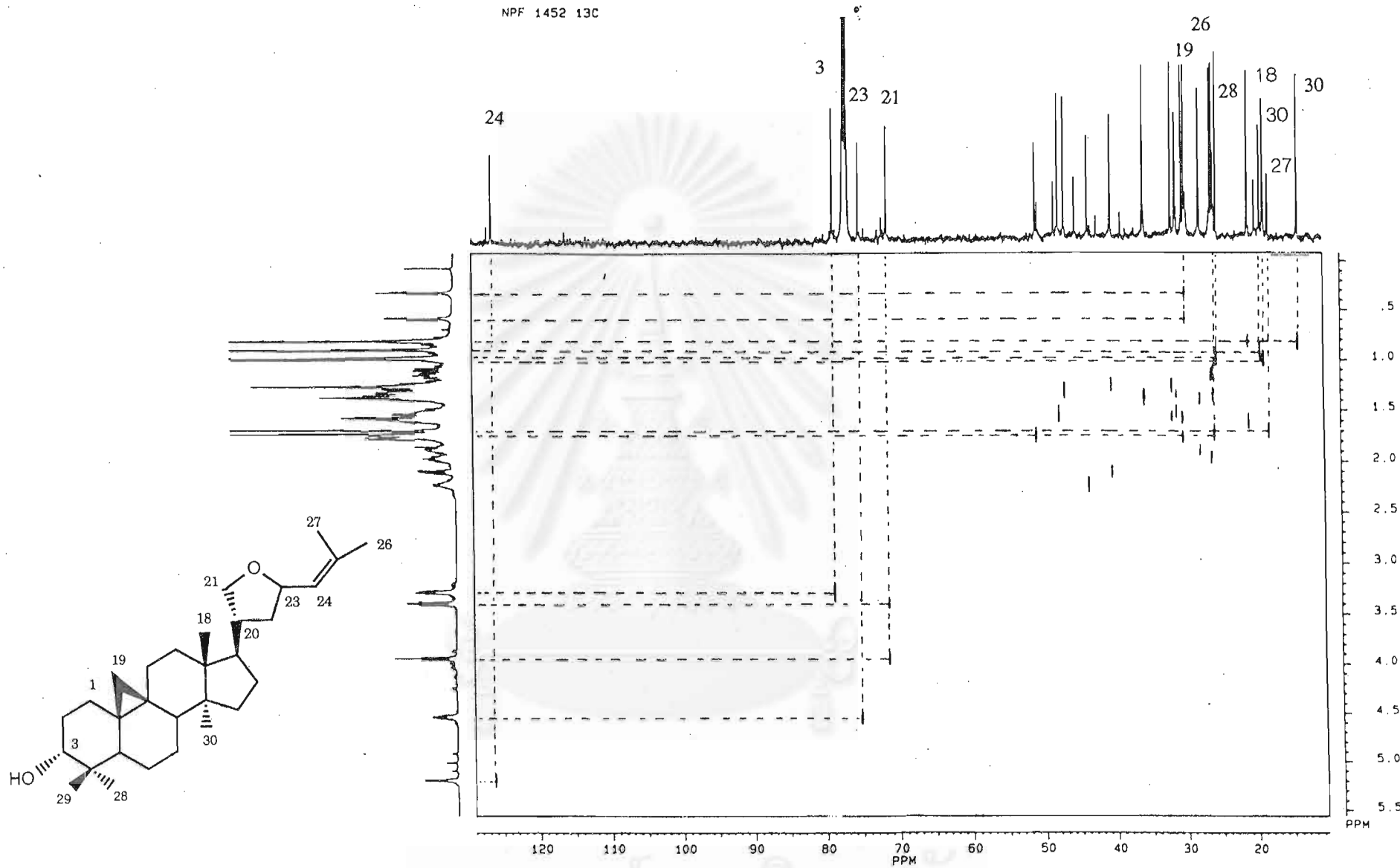


LFILE : ALPHA_135-452-1
 OFILE : KO-452-135-135
 QUNIT : GUNIOHALKUM NPF1452-1
 EXPR : DEPT3
 INPR : IRLV2
 POINT : 1024
 FREQ0 : 33398.51 Hz
 QWID : 4000.000
 QRES : 0.000
 AQC1 : 0.10000000
 PC : 1.00000000
 RGAIN : 1.00000000
 P1 : 9.000000
 P2 : 10.000000
 P3 : 10.000000
 OFF1 : 0.00000000
 POINT : 1024.0000
 SPM : 100
 LBPR : 125.77 Hz
 LBNET : 127.93333 Hz
 INPR : 1H
 INPR0 : 500.133 Hz
 INPR1 : 1024.000 Hz
 INPR2 : 0.000
 INPR3 : 500.133 Hz
 INPR4 : 0.000
 INPR5 : 0.000
 INPR6 : 0.000
 AQC1 : 0.10000000
 QRES : 0.00000000
 QWID : 4000.000
 SUNIT : GUNIO
 REF1 : 0.000 Hz
 OF : 0.000 Hz
 REFVL : 0.000 ppm
 X1 : 19015.000 Hz
 X2 : 2327.000 Hz
 Unit: ppm

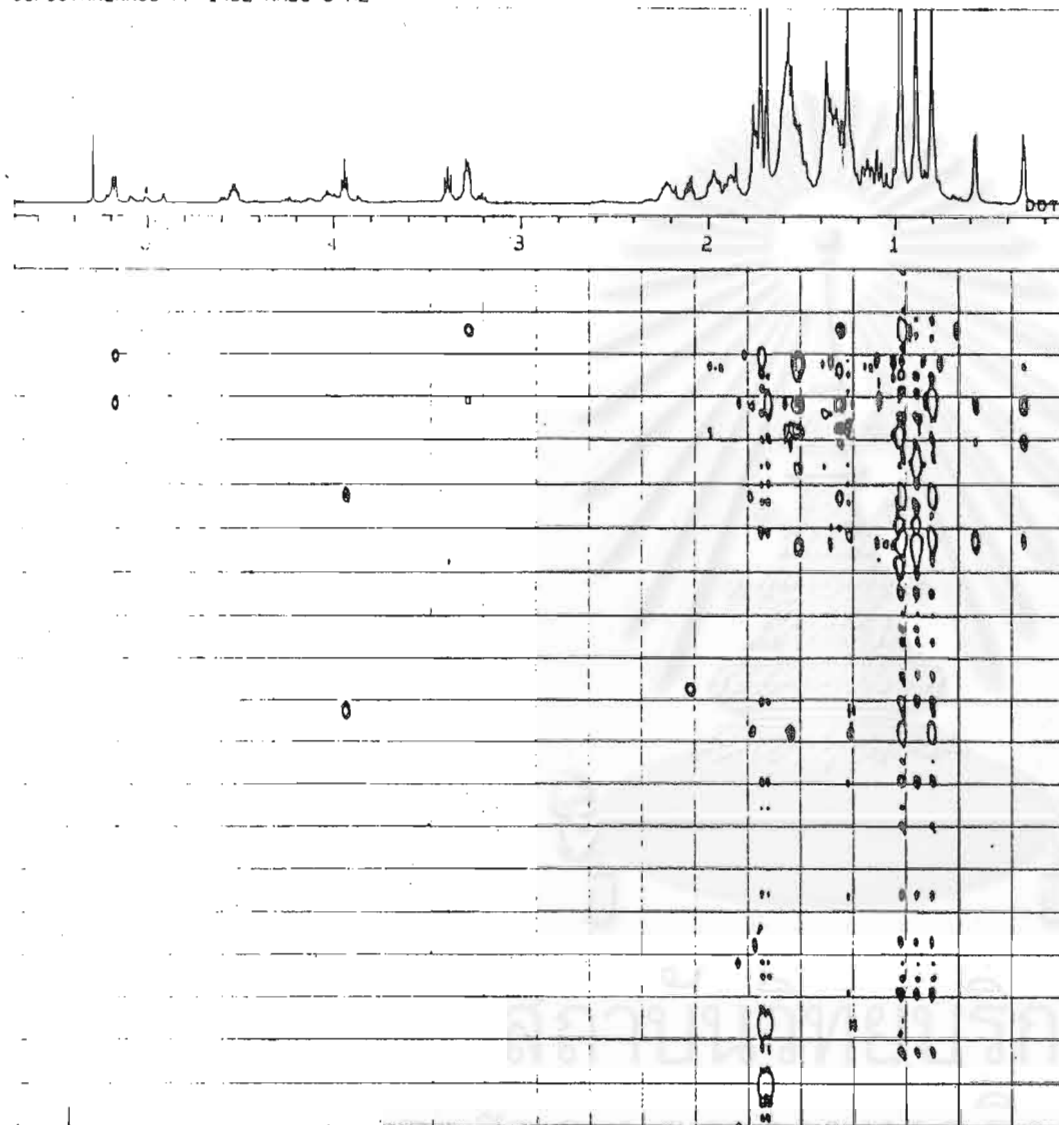
รูปที่ 40. สเปกตรัมคาร์บอนอินเอ็มอาร์ DEPT 135 ของสาร NPF1452 ใน CDCl₃



รูปที่ 41 สเปกตรัม ^1H , ^1H COSY ของสาร NPF1452 ใน CDCl_3



รูปที่ 42. สเปกตรัม $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ COSY ของสาร NPF1452 ใน CDCl_3



DFILE : ALPHA
SFILE : KS-NPF1452-HMBC8

CCMNT : GONIOTHALAMUS NPF1452 HMBC
EXMOD : HMBC
IRMOD : IRLV2
POINT : 1024
FREQU : 4666.36 Hz
SCANS : 128
DUMMY : 16
ACQTM : 0.2194 sec
PD : 2.0000 sec
RGAIN : 19

CLFRQ : 21635.00 Hz
CLPNT : 512
TOSCN : 128
CINWT : 10.00 usec
CINT2 : 23.11 usec

FW1 : 5.90 usec
FW3 : 17.50 usec
PI1 : 62.5000 msec
PI3 : 43.1612 msec
JCNST : 145.00 Hz

OBNUC : 1H
OBFRQ : 500.00 MHz
OBSET : 161835.00 Hz

IRNUC : 13C
IRFRQ : 125.63 MHz
IRSET : 124484.17 Hz
IRATN : 120
IRFPW : 1.4 usec
IRBP1 : 50
IRBP2 : 6
IRANS : 4

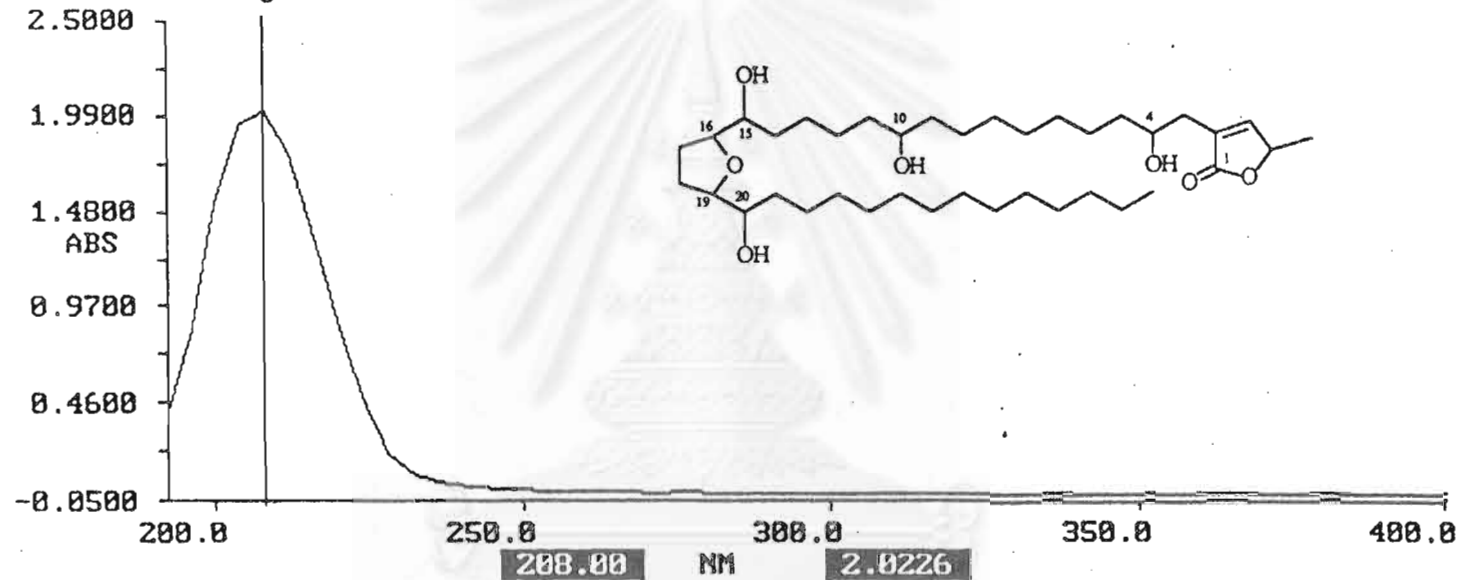
ADBIT : 16
CTEMP : 24.3 C
CSPED : 0 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 4.50 Hz
CLHSC : 42.26 Hz
TLINE : 4
THTOP : 0.2660
THBTM : 0.0800

operator

รูปที่ 43. สเปกตรัม HMBC ของสาร NPF1452 ใน CDCl₃.

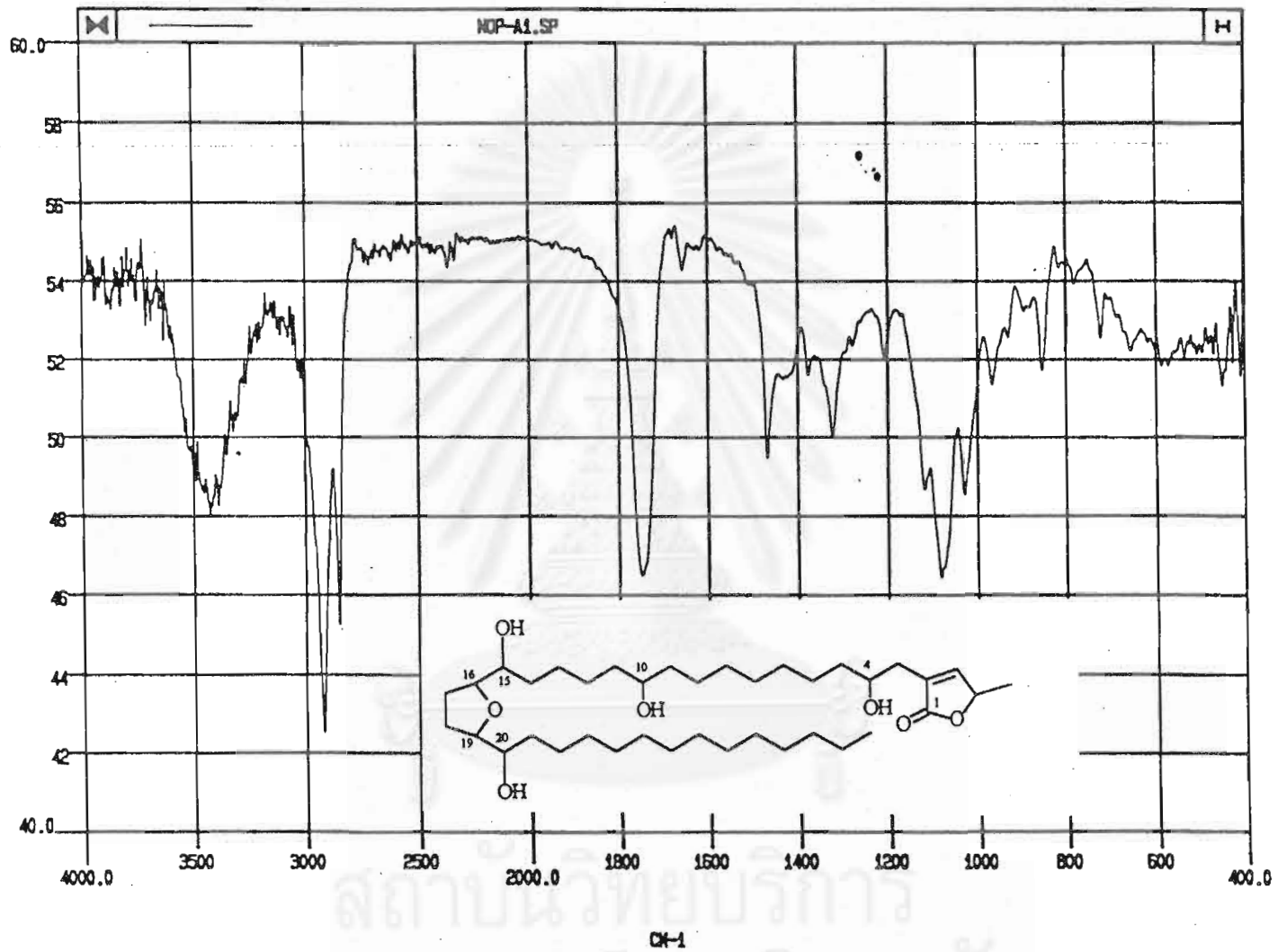
X: USER004 ; absc 400.0- 192.0; pts 53; int 4.00; ord -0.008-2.0226; A
inf: chromatogram of K038-1



รูปที่ 44. สเปกตรัมอุลตราไวโอเล็ต ของสารผสม NPK038-1 (ใน MeOH)

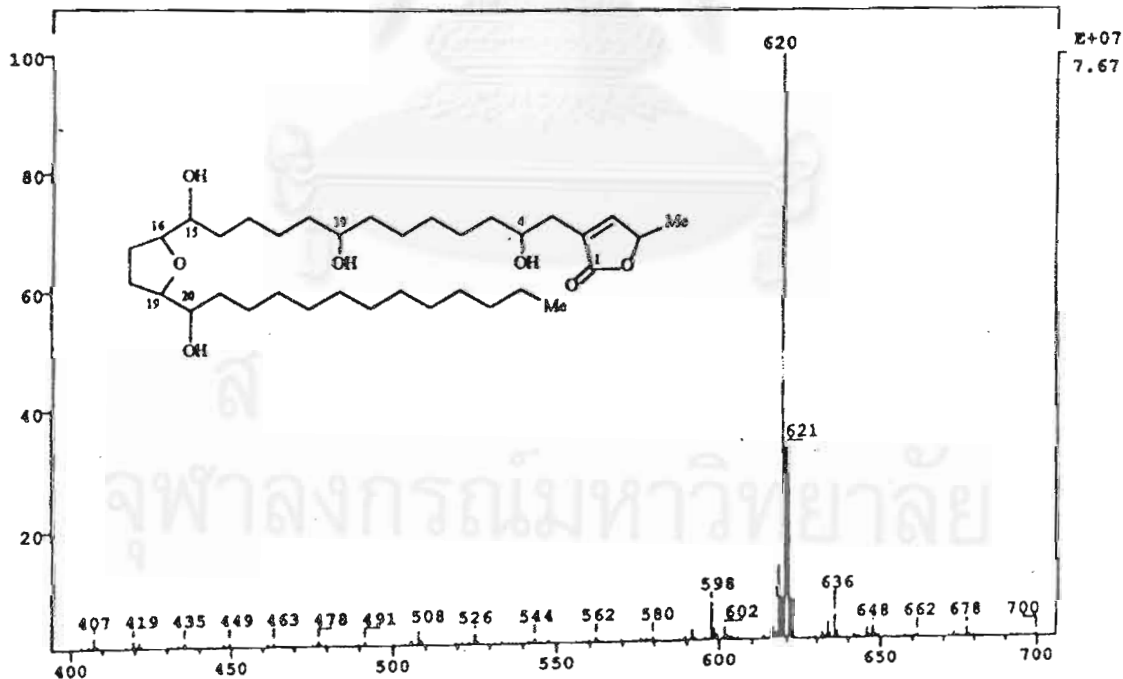
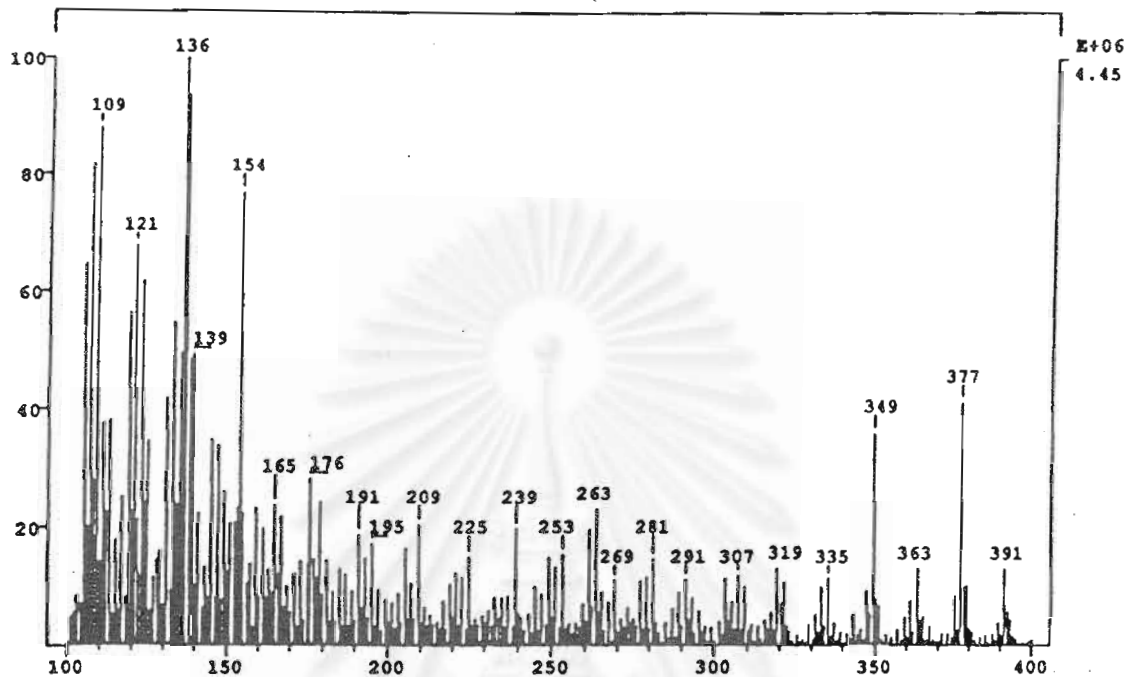
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

KT



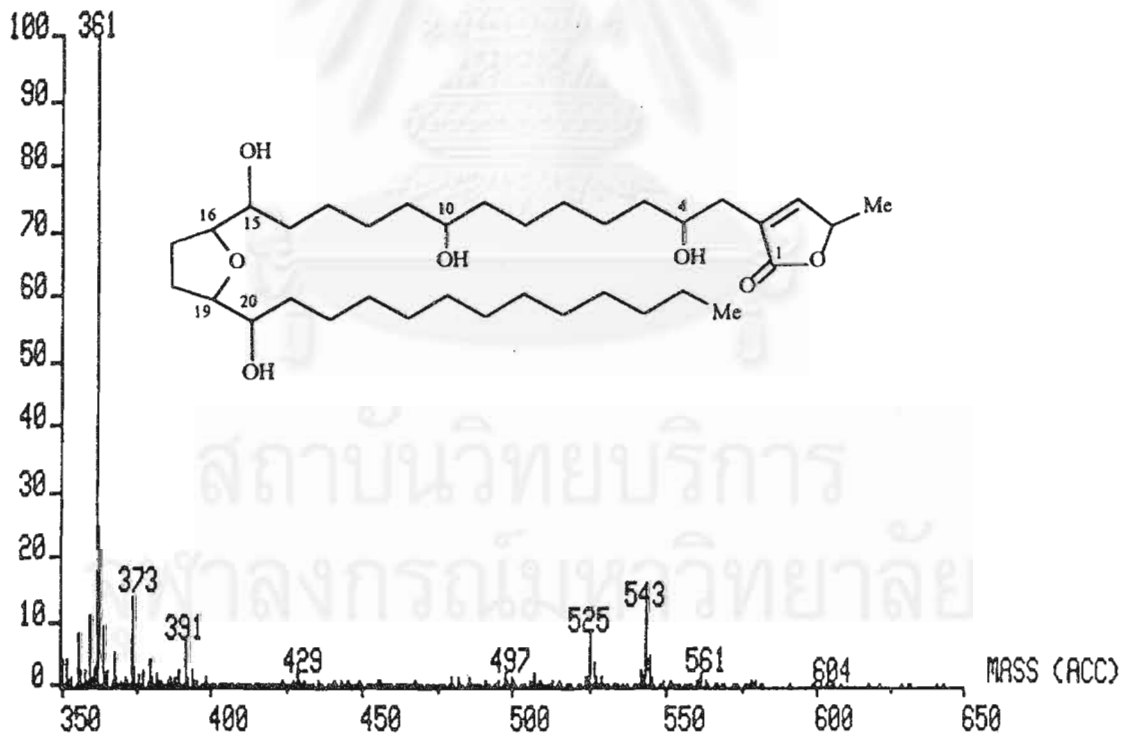
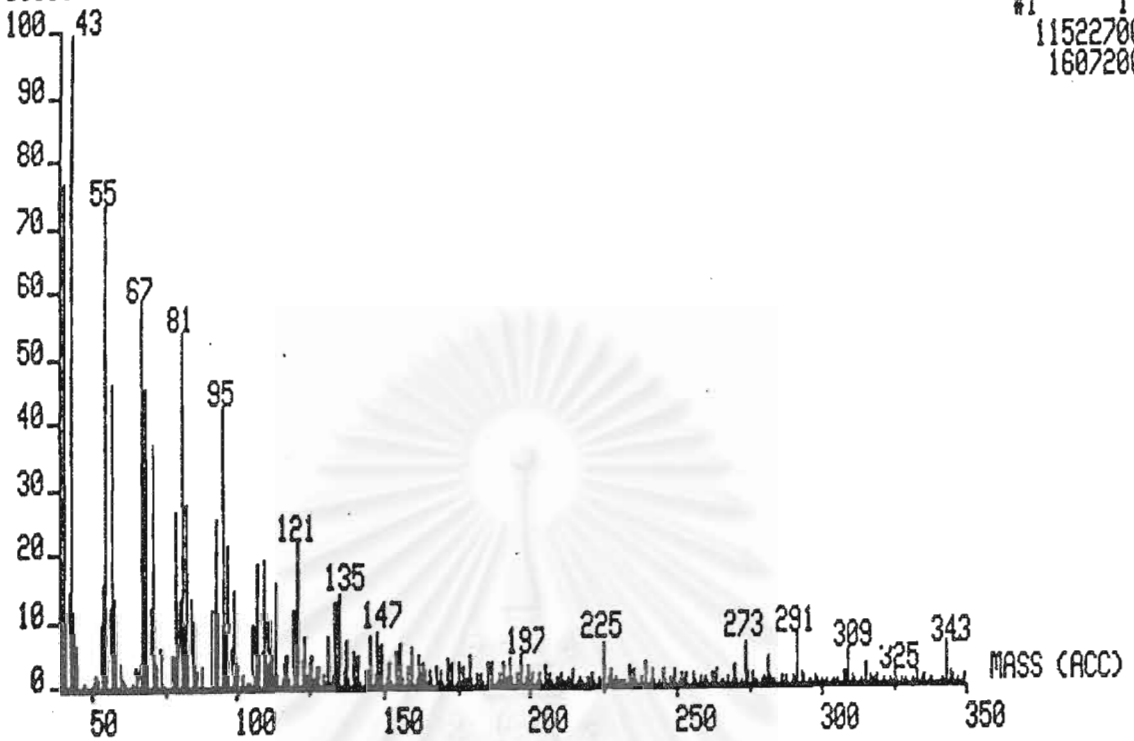
รูปที่ 45. สเปกตรัมอินฟราเรด ของสารผสม NPK038-1 (KBr disc)

SPEC: 071914
 Samp: A079G NP K038-1 SISM(+) in m-NBA SUPPAK 19-Jul-93 Elapse: 00:00:18.6 1
 Comm: MAT-900 Start : 12:22:50 4
 Mode: FAB +VE +HMR BSCAN (EXP) UP LR
 Oper: DC Client: CASSADY Inlet : Vial 1
 Base: 619.6 Inten : 76693248 Masses: 100 > 1500
 Norm: 619.6 RIC : 385449079 #peaks: 1703
 Peak: 1000.00 mmu



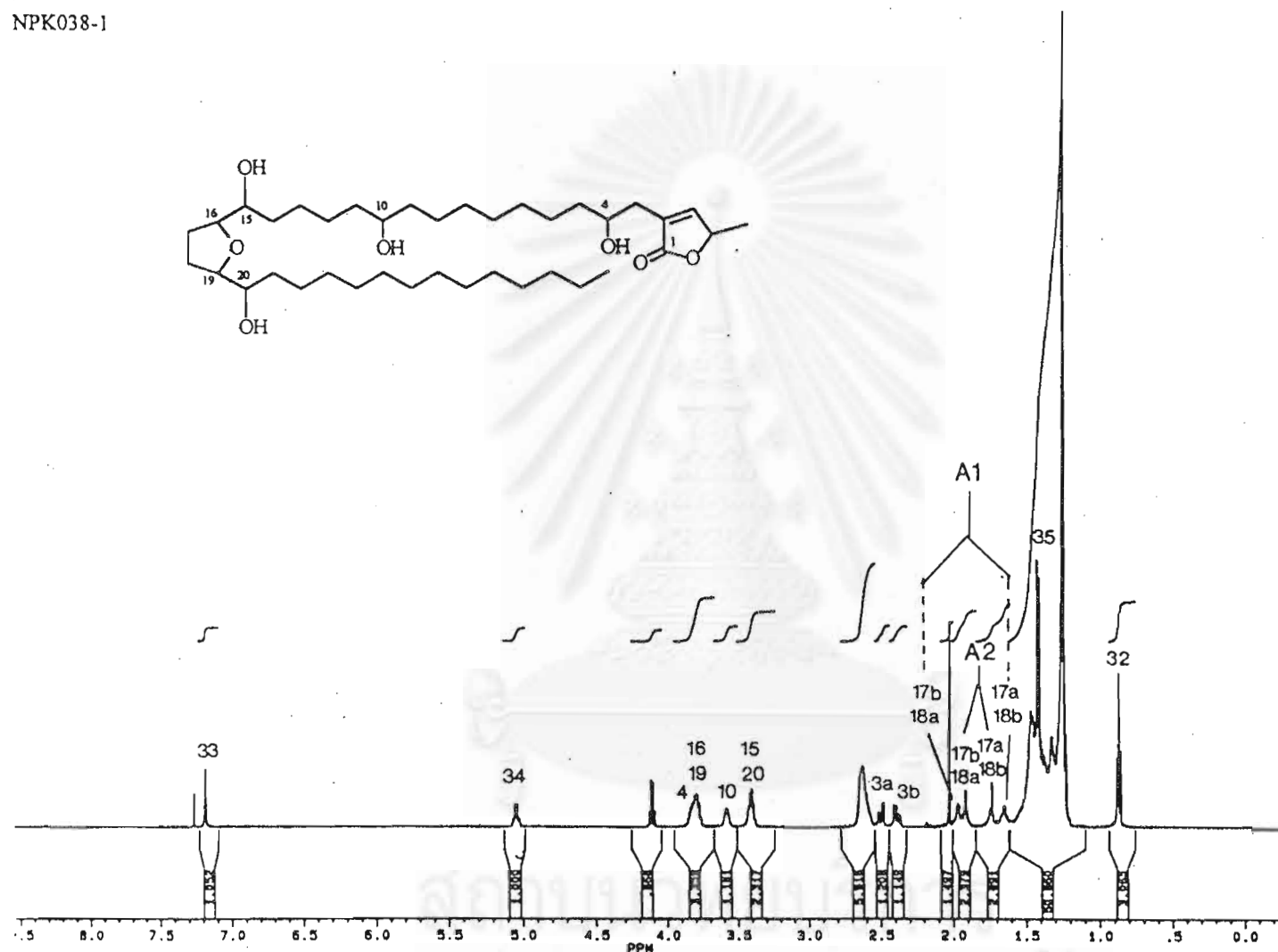
รูปที่ 46. แมสสเปคตรัมแบบ FAB ของสาร NPK038-1


D070901A#1 x1 Bgd=0 09-JUL-93 10:31+0:00:00 70-250S EI+
 BpM=0 I=147mvs Hm=650 TIC=42130362368 AV Acnt:OSU-CCIC Sys:HREI
 D006I NP K038-1 HR-EI N. SUPPAKUN/CASSADY PT= 0° Cal:D070901
 #1 1.0
 115227000
 16072000



รูปที่ 47. แมสสเปคตรัมแบบ HREI ของสาร NPK038-1

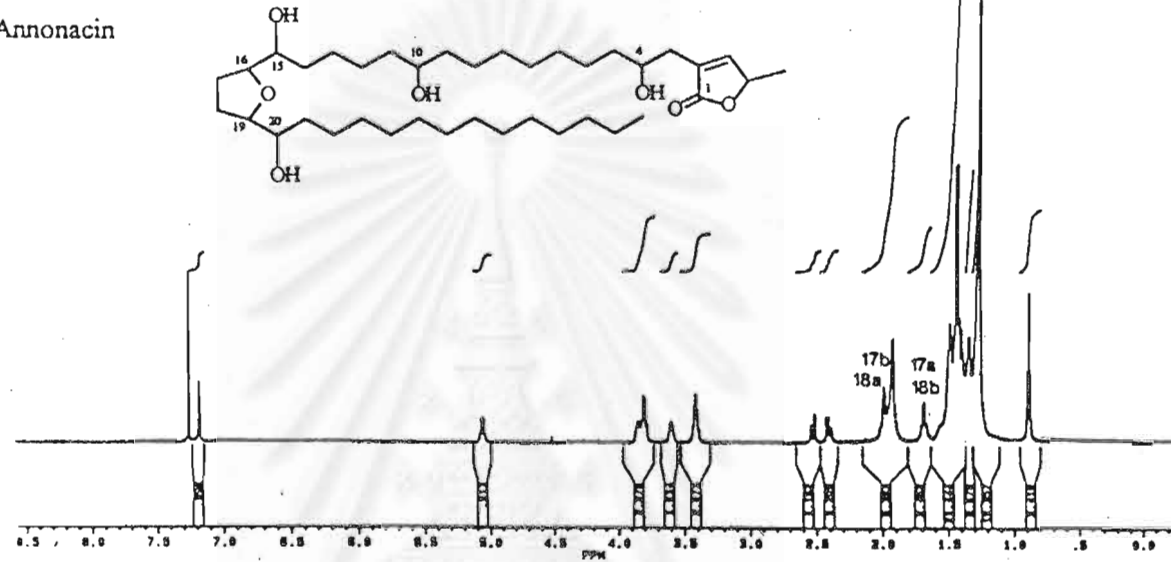
NPK038-1



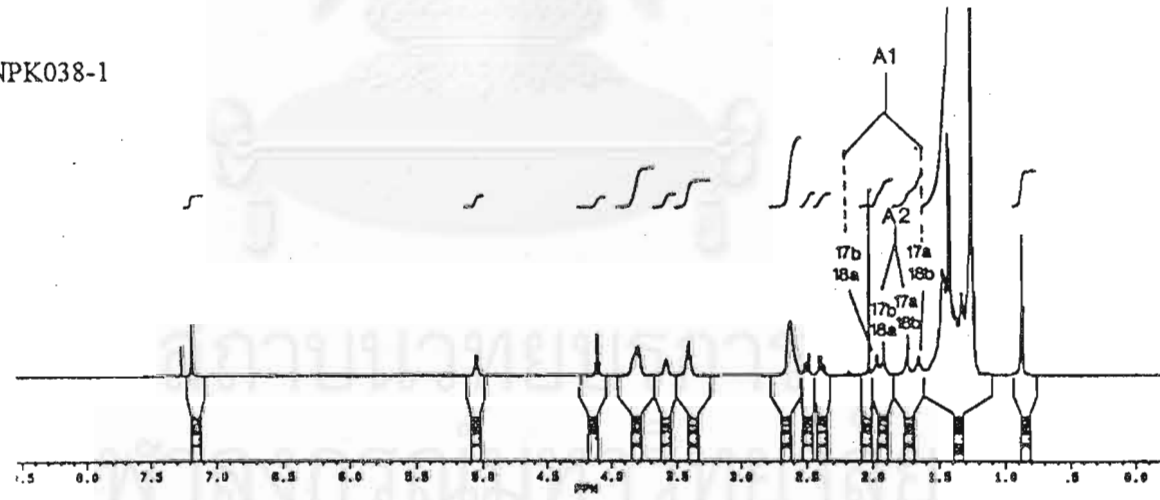

 NPA555M.002
 DATE 8-8-93
 SF 500.135
 SY 166.0
 O1 7500.000
 SI 32768
 TD 32768
 SM 6756.757
 HZ/PT .412
 PW 9.0
 RO 0.0
 AQ 2.425
 RG 32
 NS 32
 TE 373
 FM 30000
 O2 0.0
 DP 831.00
 LB .300
 GB 0.0
 CX 35.00
 CY 20.00
 F1 8.701P
 F2 -.300P
 HZ/CM 128.610
 PPM/CM .257
 SR 5421.29

รูปที่ 48. ก. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK 038-1 ใน CDCl₃

Annonacin

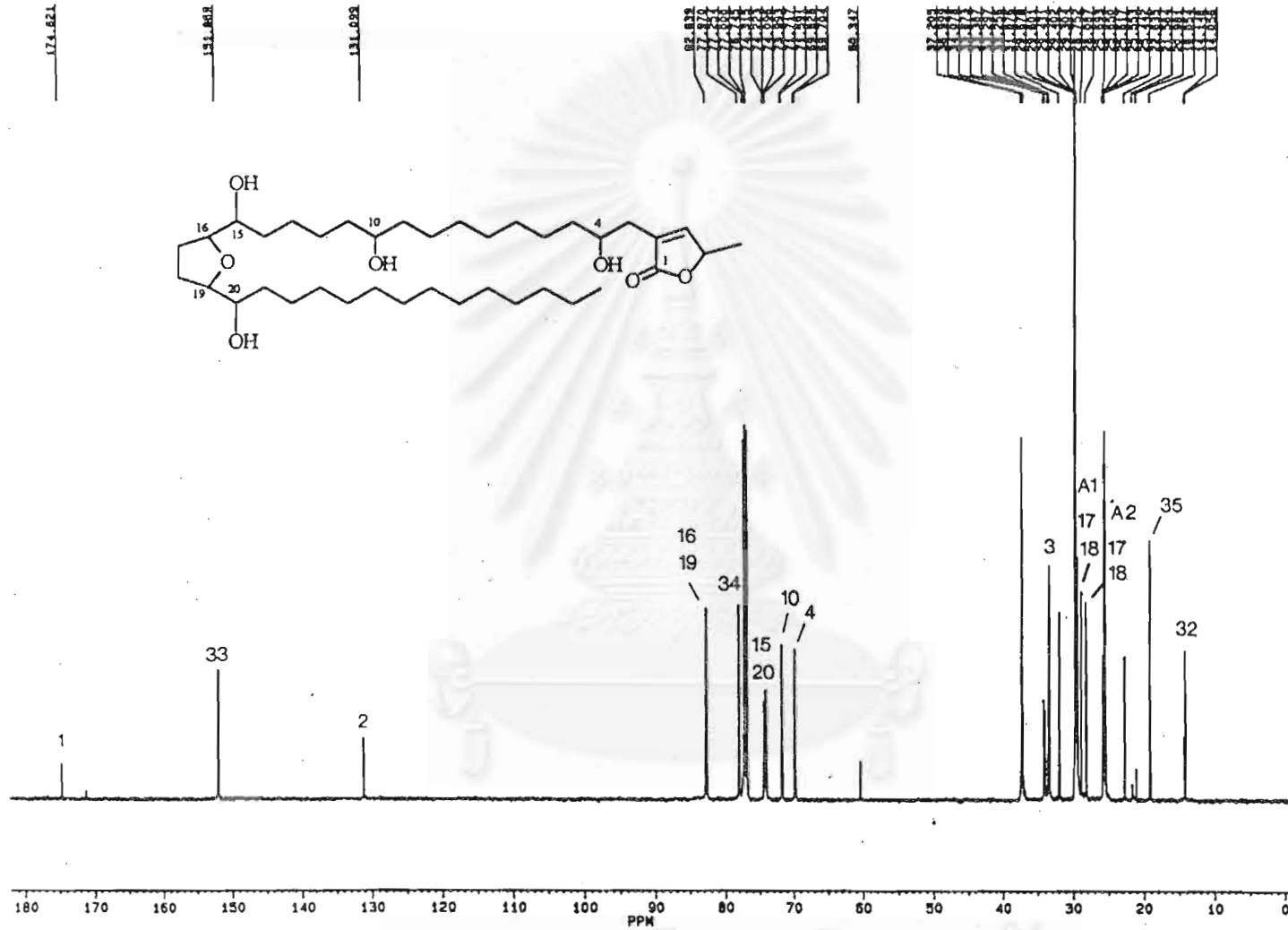


NPK038-1



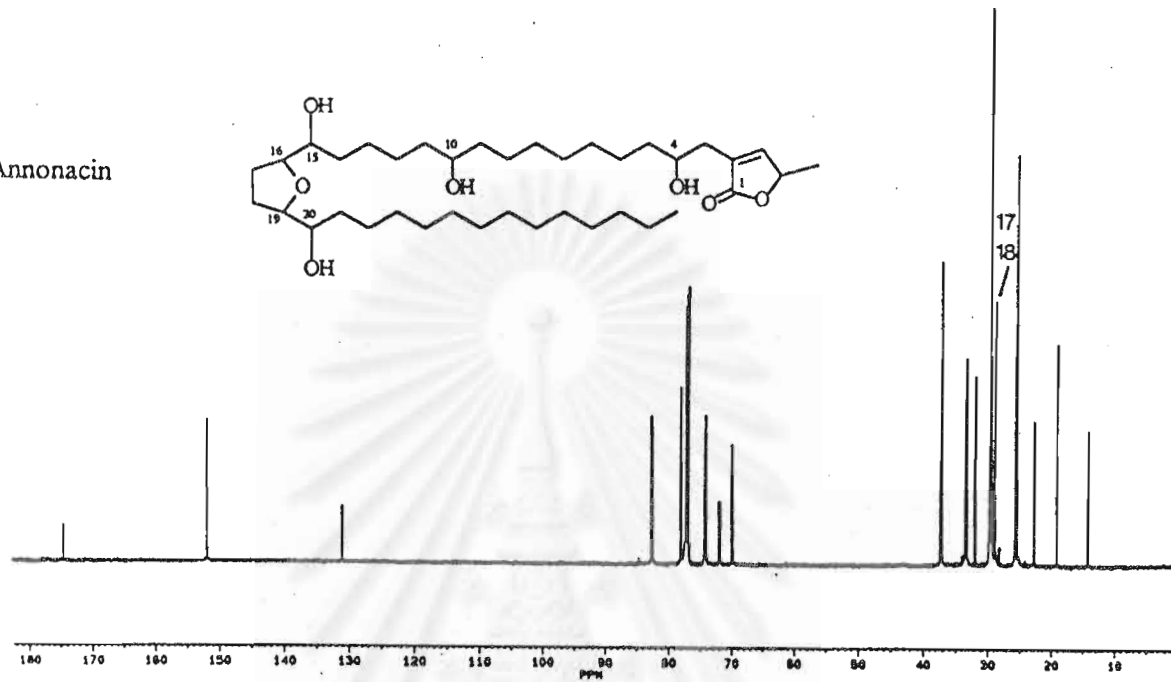
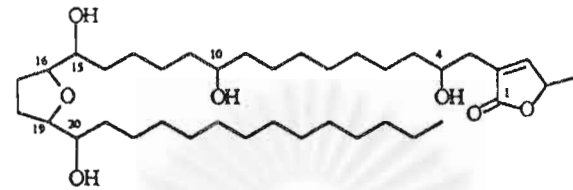
รูปที่ 48. ข. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของสาร NPK 038-1 เปรียบเทียบกับ annonacin

NPK038-1

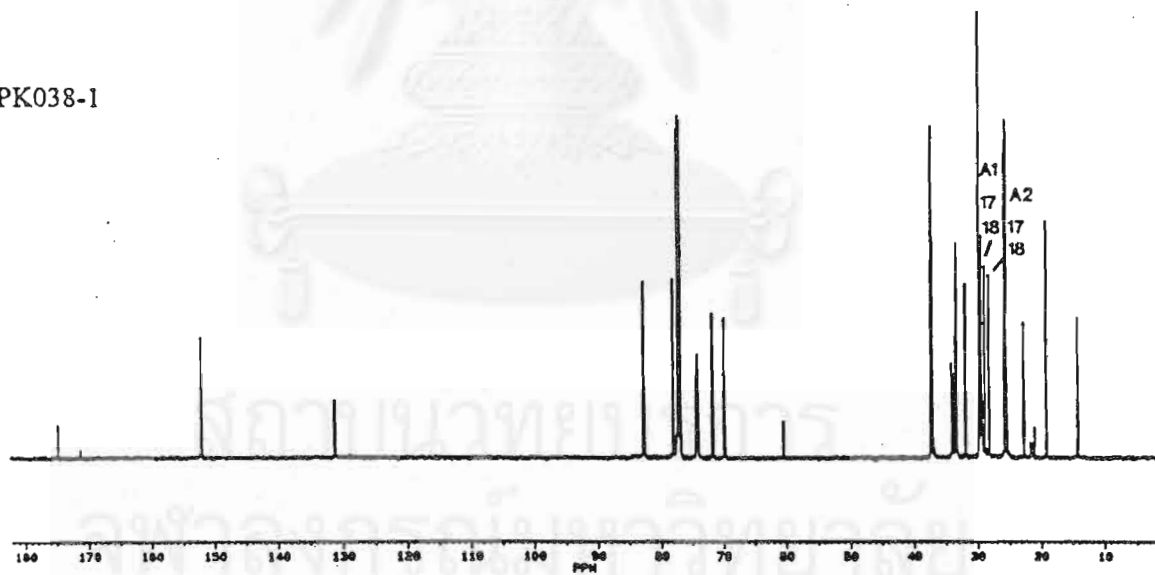


รูปที่ 49. ก. สเปกตรัมคาร์บอนอินเอ็มอาร์ (125 MHz) ของสาร NPK038-1 ใน CDCl₃

Annonacin

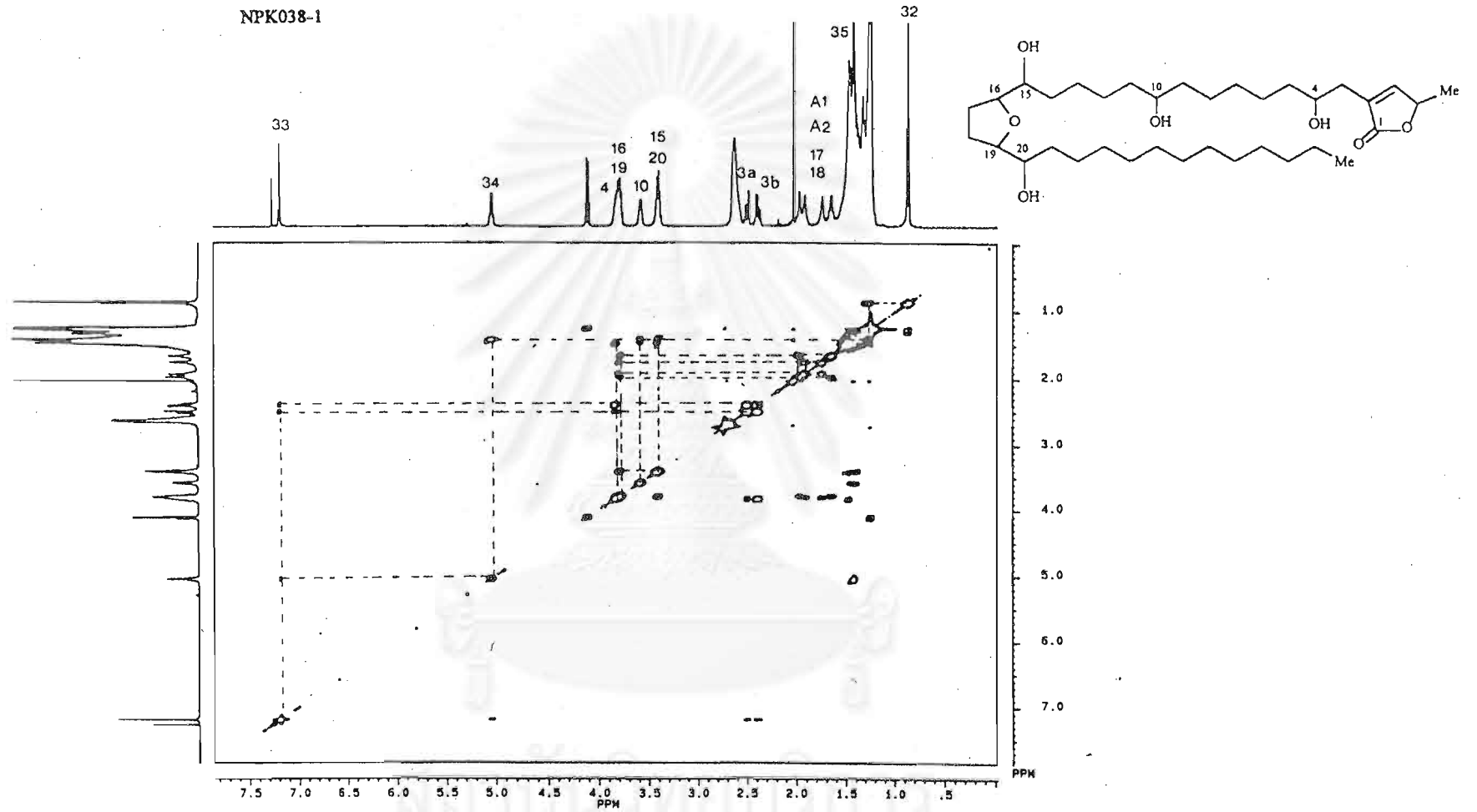


NPK038-1

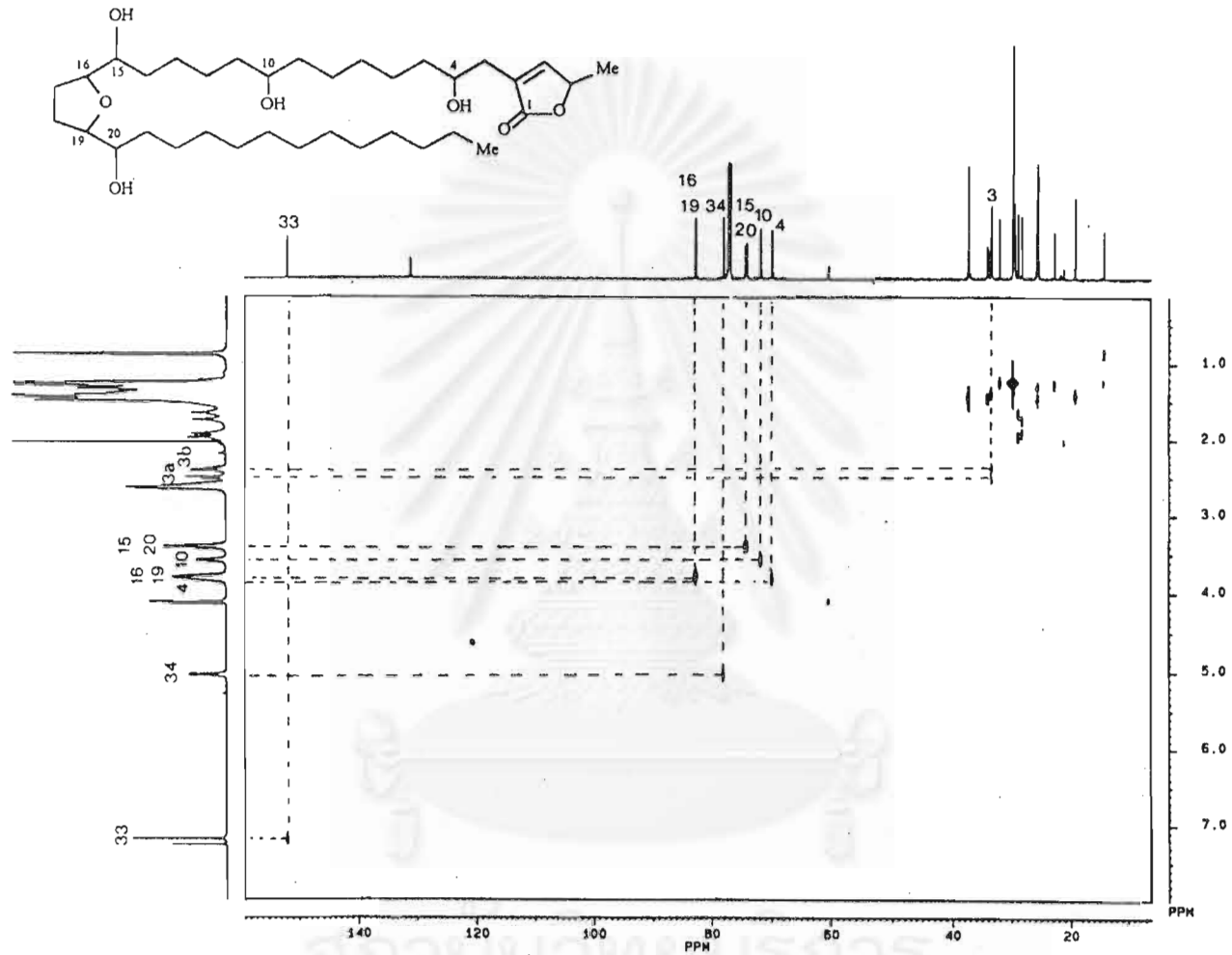


รูปที่ 49. ข. สเปกตรัมคาร์บอนอินเอ็มอาร์ของสาร NPK038-1 เปรียบเทียบกับ annonacin

NPK038-1

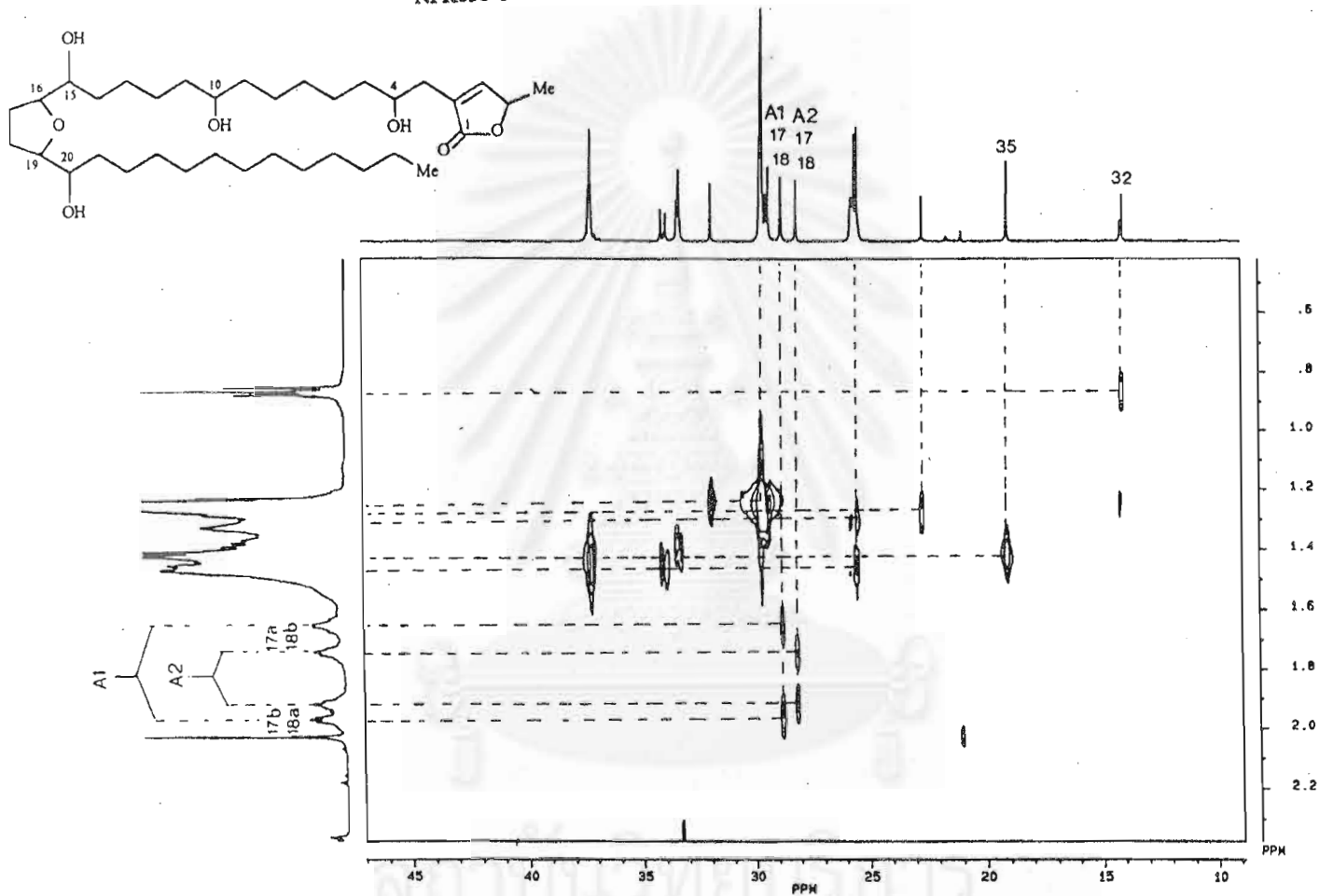


รูปที่ 50. สเปกตรัม ^1H , ^1H COSY ของสาร NPK038-1



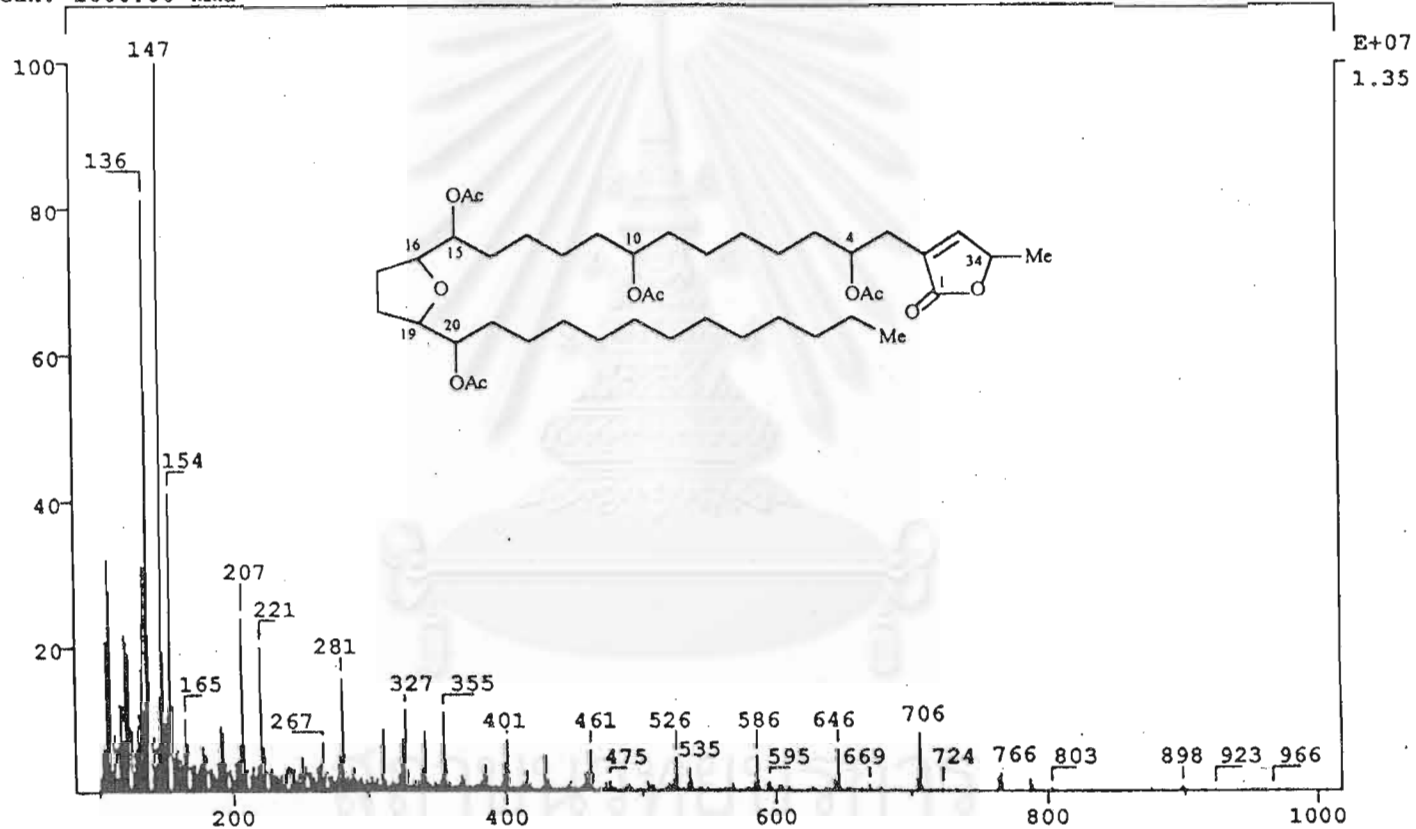
รูปที่ 51. ก. สเปกตรัม $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ COSY ของสาร NPK038-1

NPK038-1



รูปที่ 51. ข. สเปกตรัม $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ COSY ของสาร NPK038-1 (ขยาย)

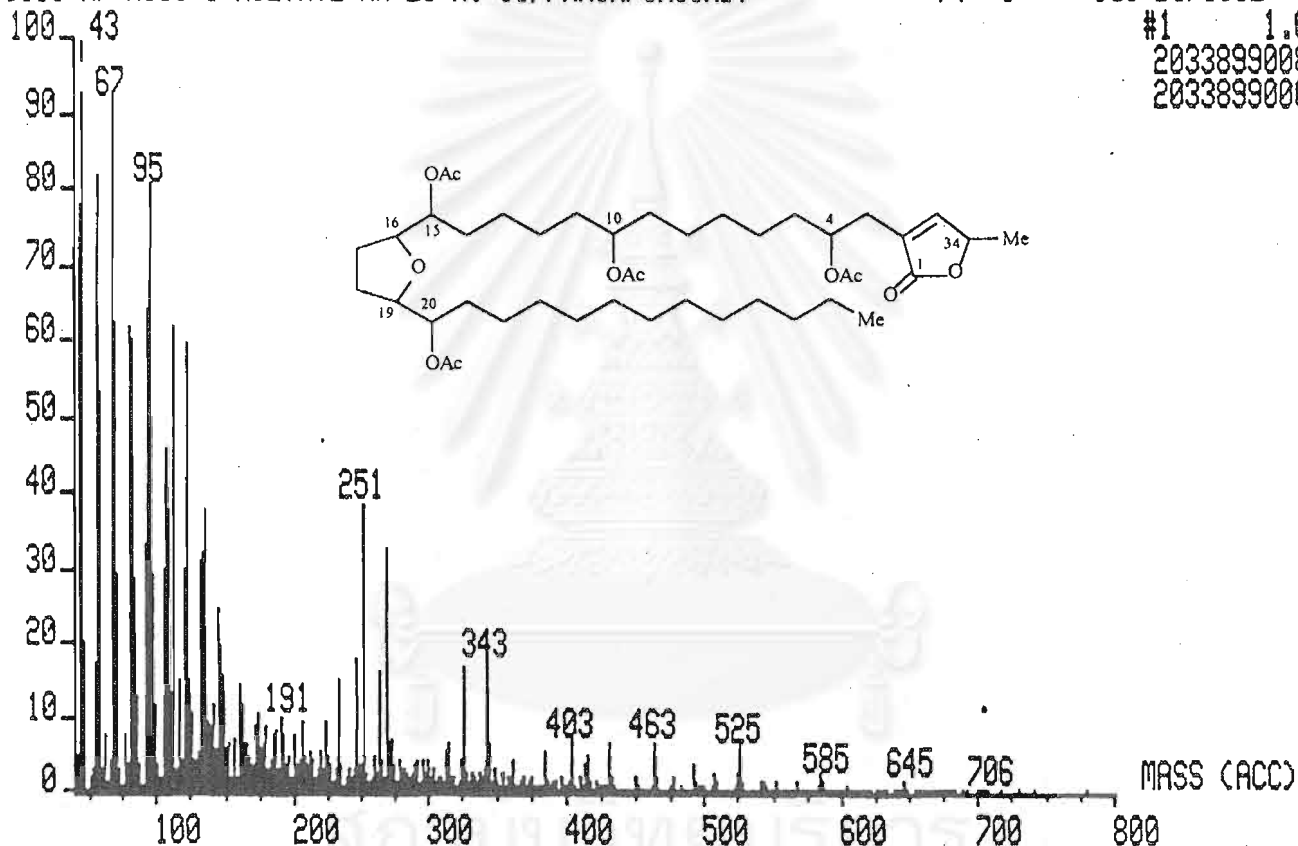
SPEC: 071915 19-Jul-93 Elapse: 00:00:16.6 1
 Samp: A079H NP K038-1 ACETATE SIMS(+) in m-NB Start : 12:33:19 5
 Comm: MAT-900
 Mode: FAB +VE +HMR BSCAN (EXP) UP LR
 Oper: DC Client: CASSADY Inlet : Vial 1
 Base: 147.1 Inten : 13547439 Masses: 100 > 1500
 Norm: 147.1 RIC : 305833594 #peaks: 2184
 Peak: 1000.00 mmu



รูปที่ 52. แมสสเปคตรัมแบบ FAB ของสาร NPK038-1 tetraacetate

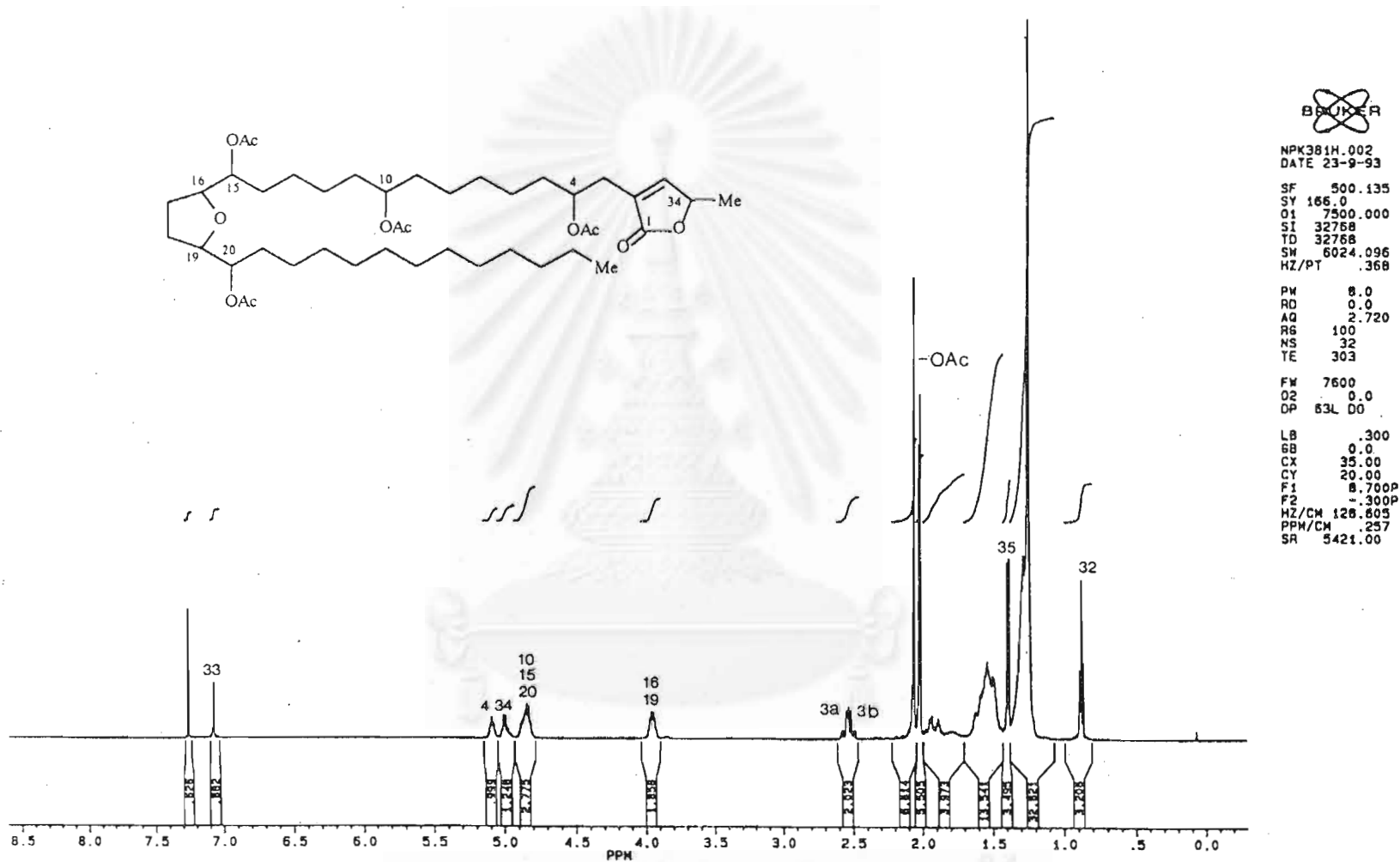
D070902A#1 x1 Bgd=0 09-JUL-93 11:48+0:00:00 70-250S EI+
 BpM=0 I=138mvs Hm=800 TIC=76526338048 AV Acnt:OSU-CCIC Sys:HREI
 D006J NP K038-1 ACETATE HR-EI N. SUPPAKUN/CASSADY PT= 0° Cal: D070902

#1 1.0
 2033899000
 2033899000

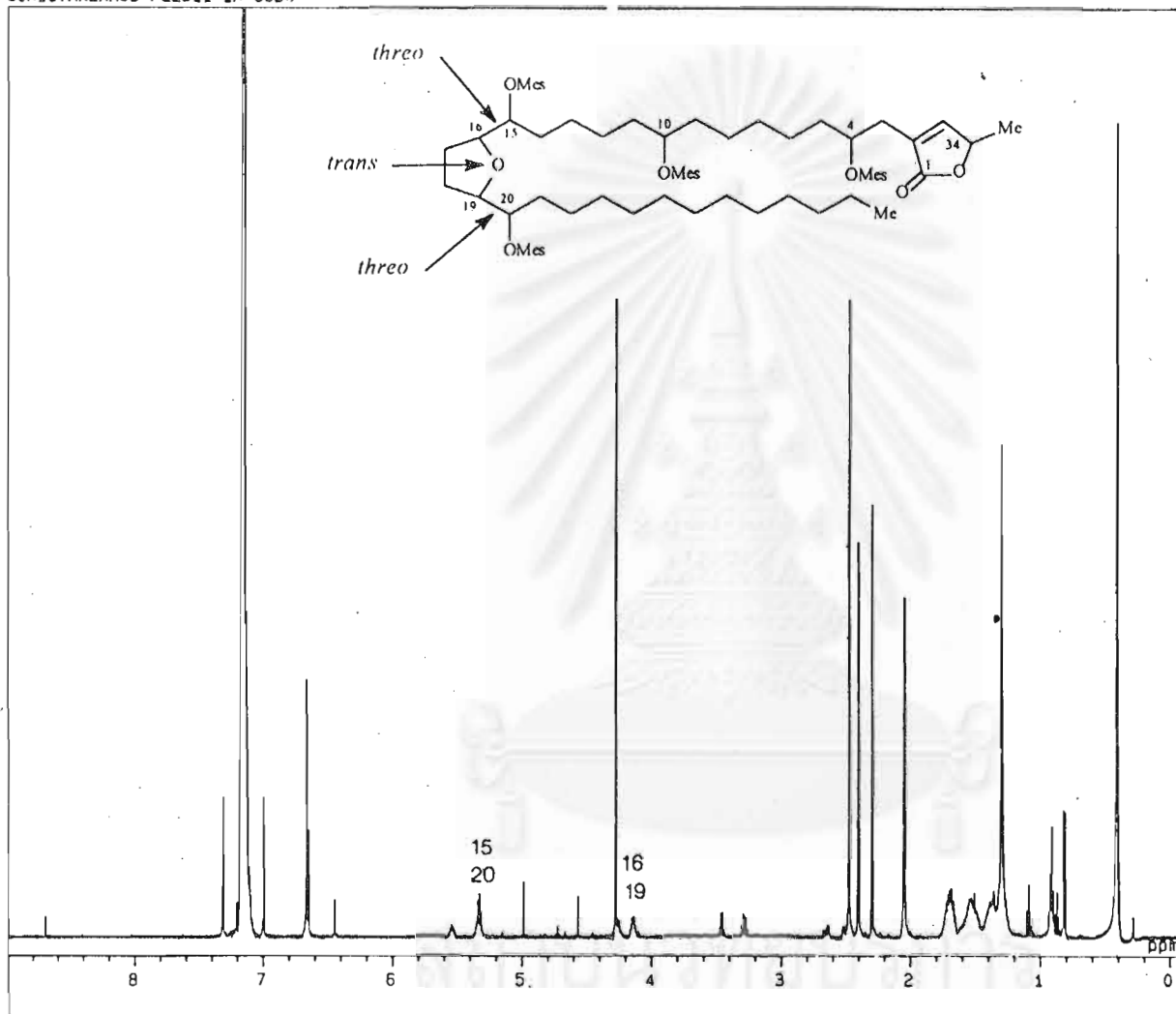


รูปที่ 53. แมสสเปคตรัมแบบ HREI ของสาร NPK038-1 tetraacetate

NPK038-1 acetate

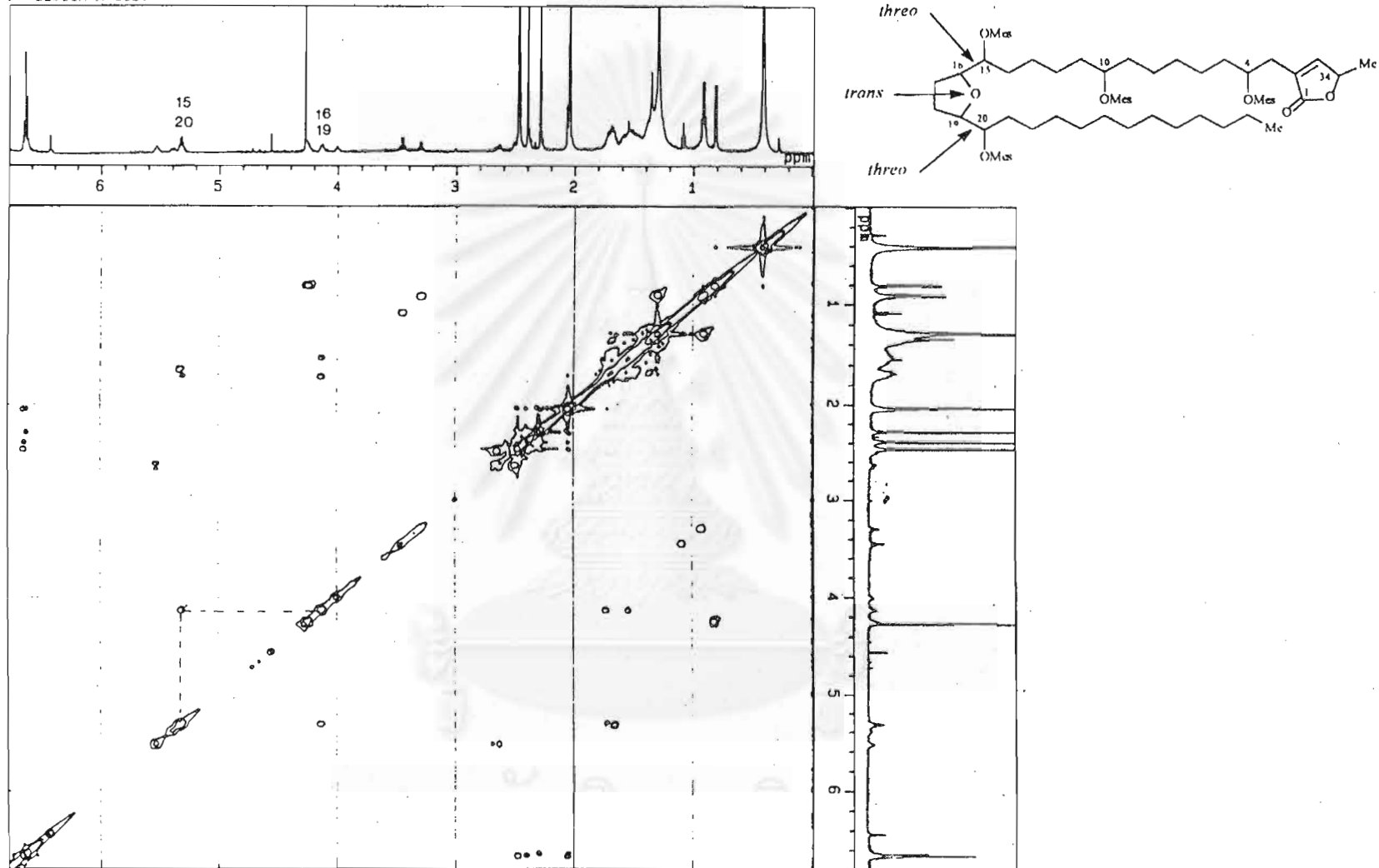


รูปที่ 54. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1 tetraacetate

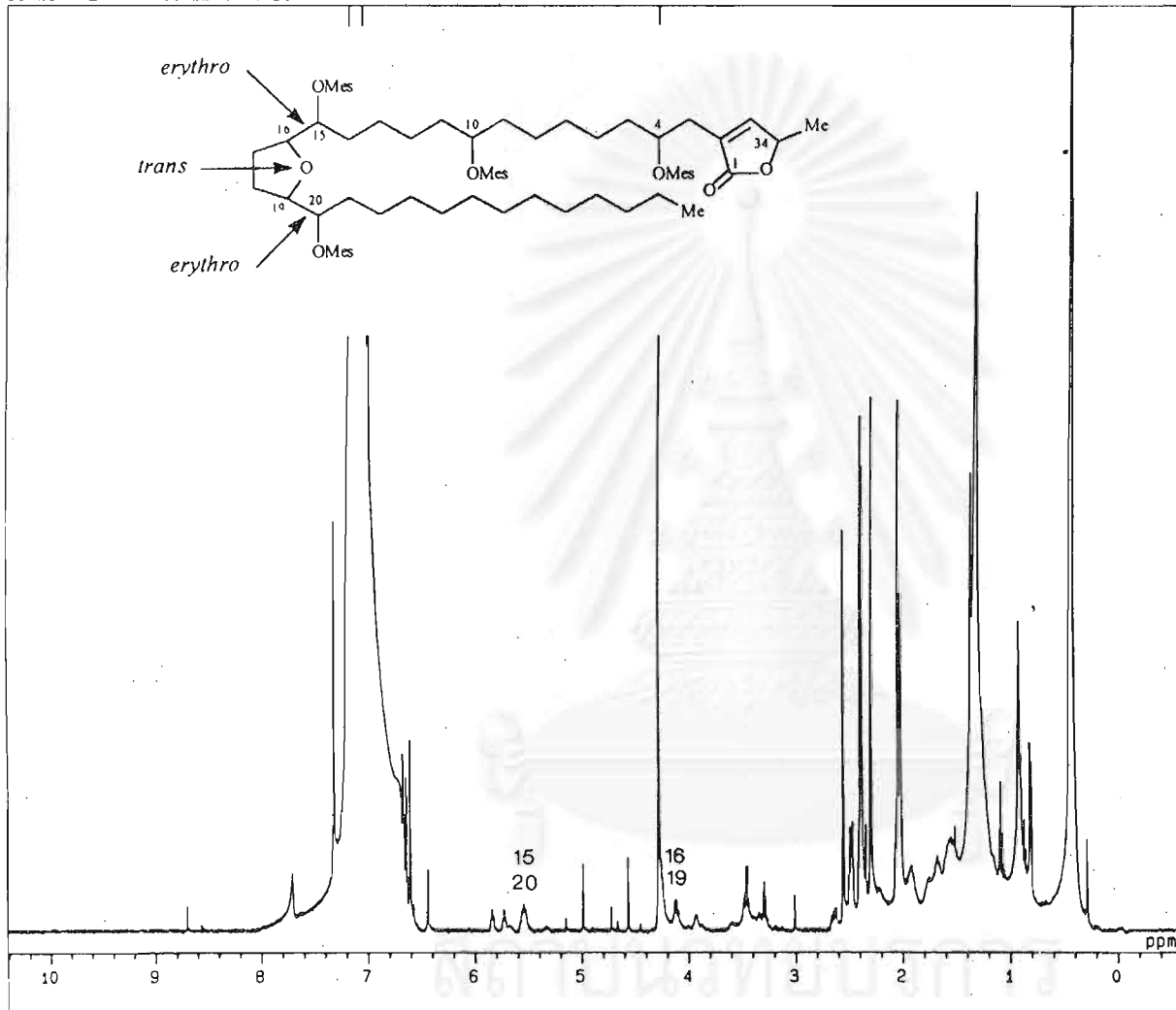


รูปที่ 55. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A1 mesitoate ใน C₆D₆

NPF22911H-H COSY

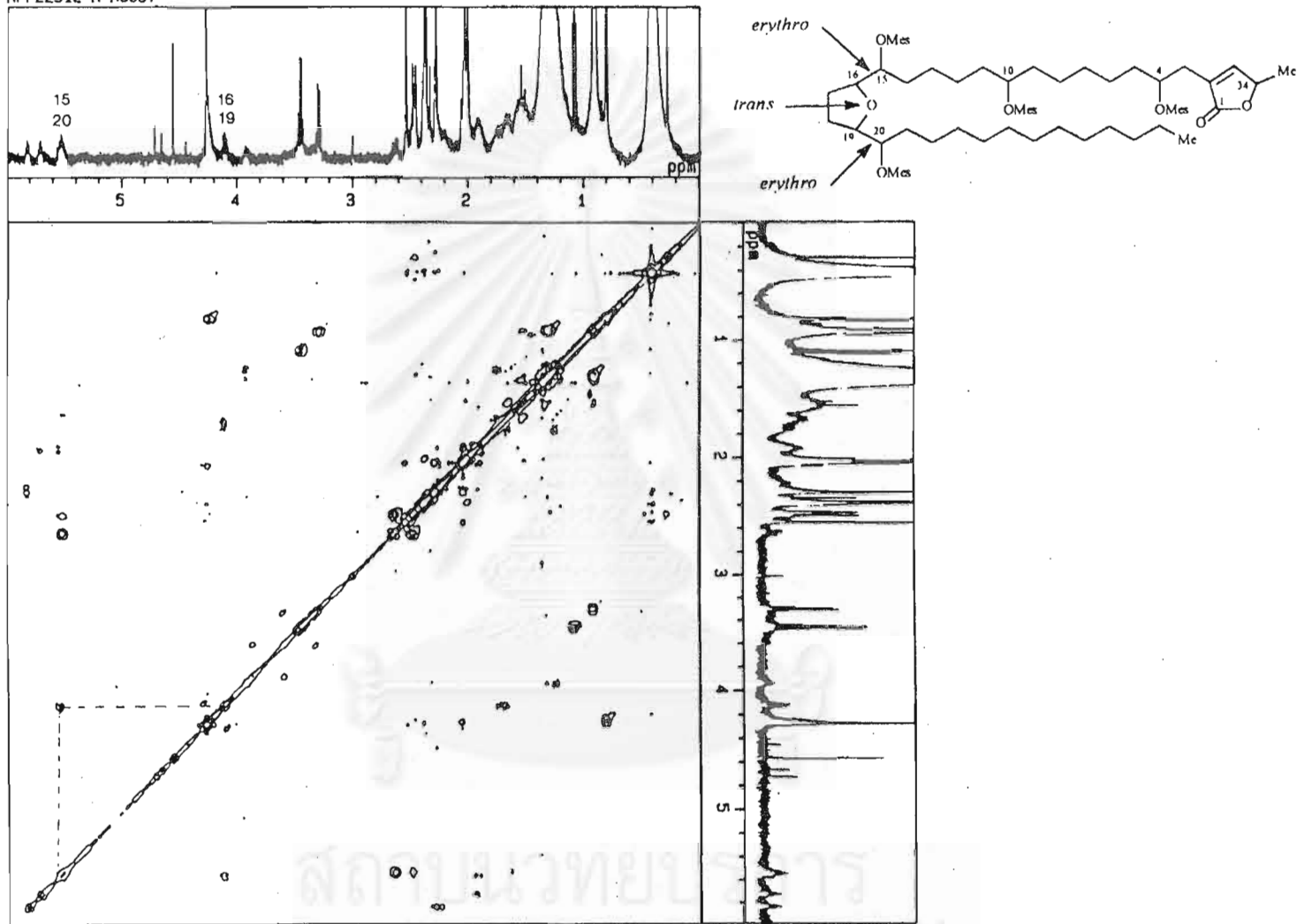


รูปที่ 56. สเปกตรัม ¹H, ¹H COSY (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A1 mesitoate ใน C₆D₆

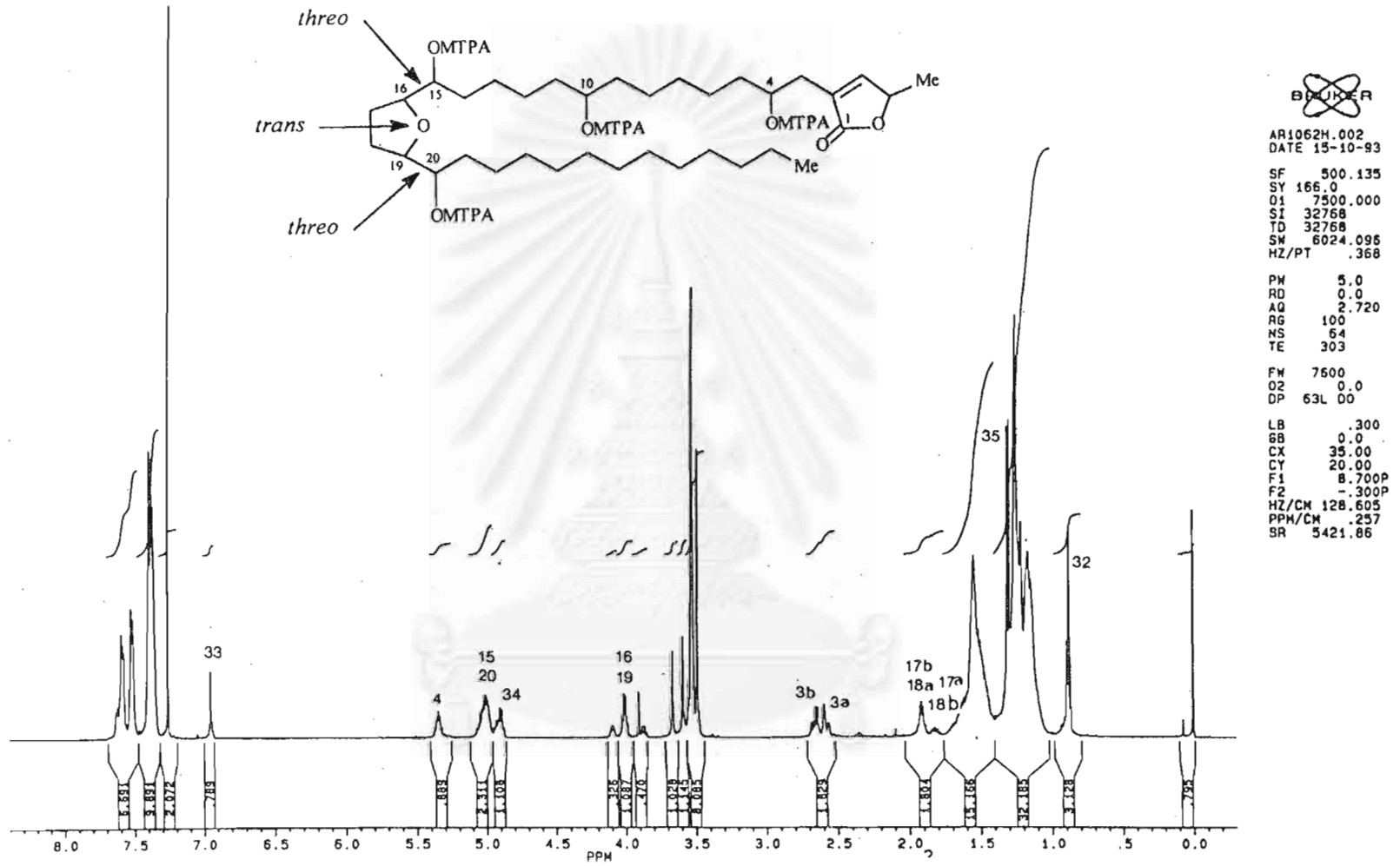


รูปที่ 57. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A2mesitoate ใน C₆D₆

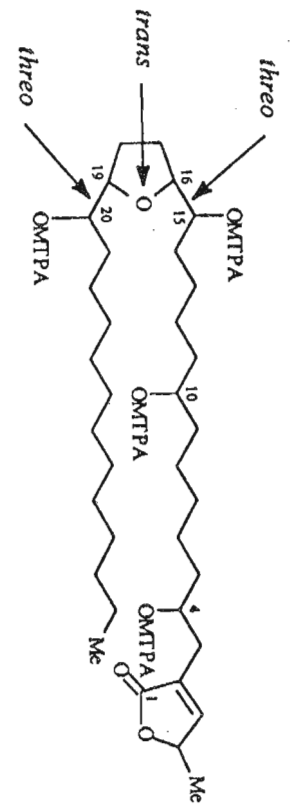
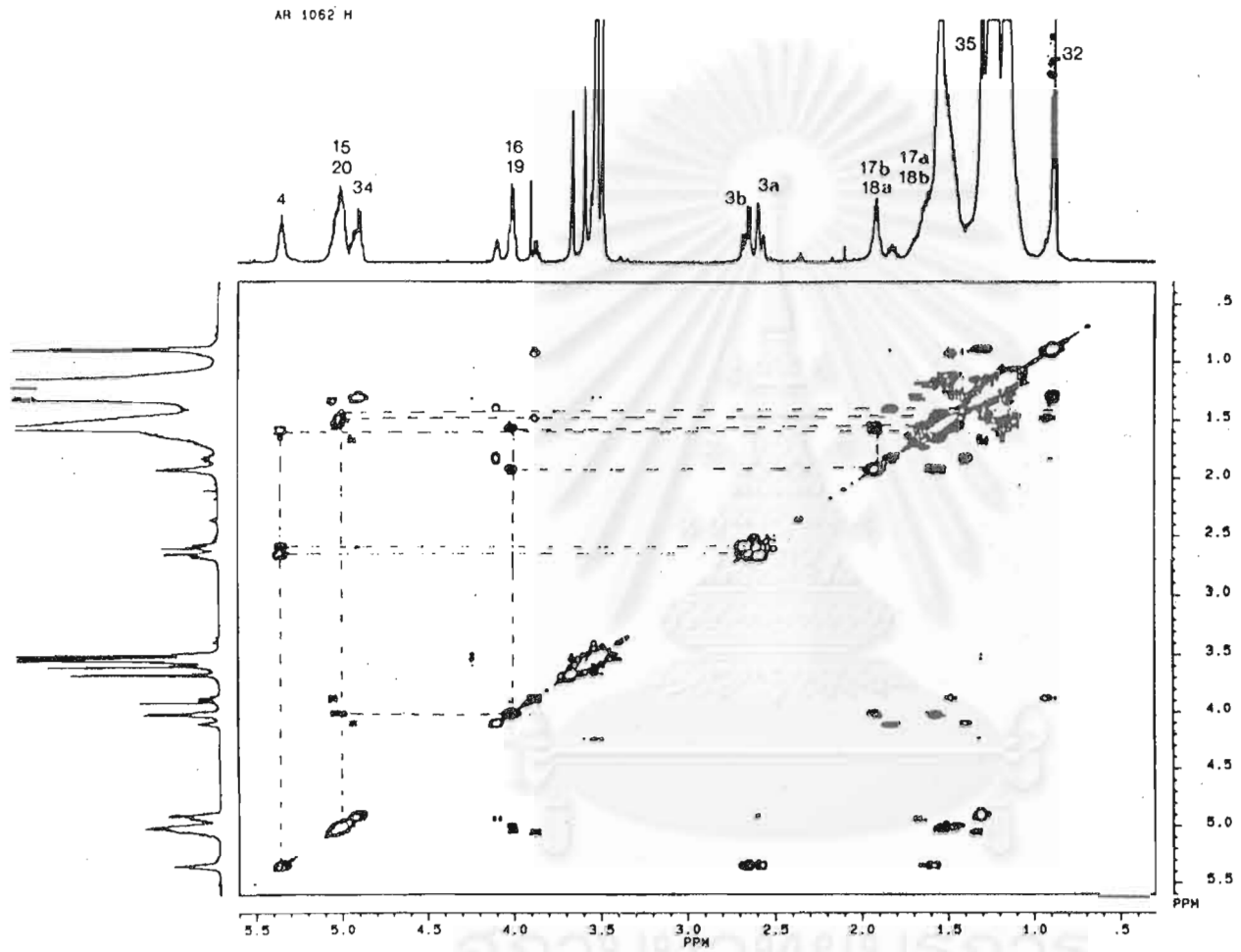
NPF22912-H-HCOSY



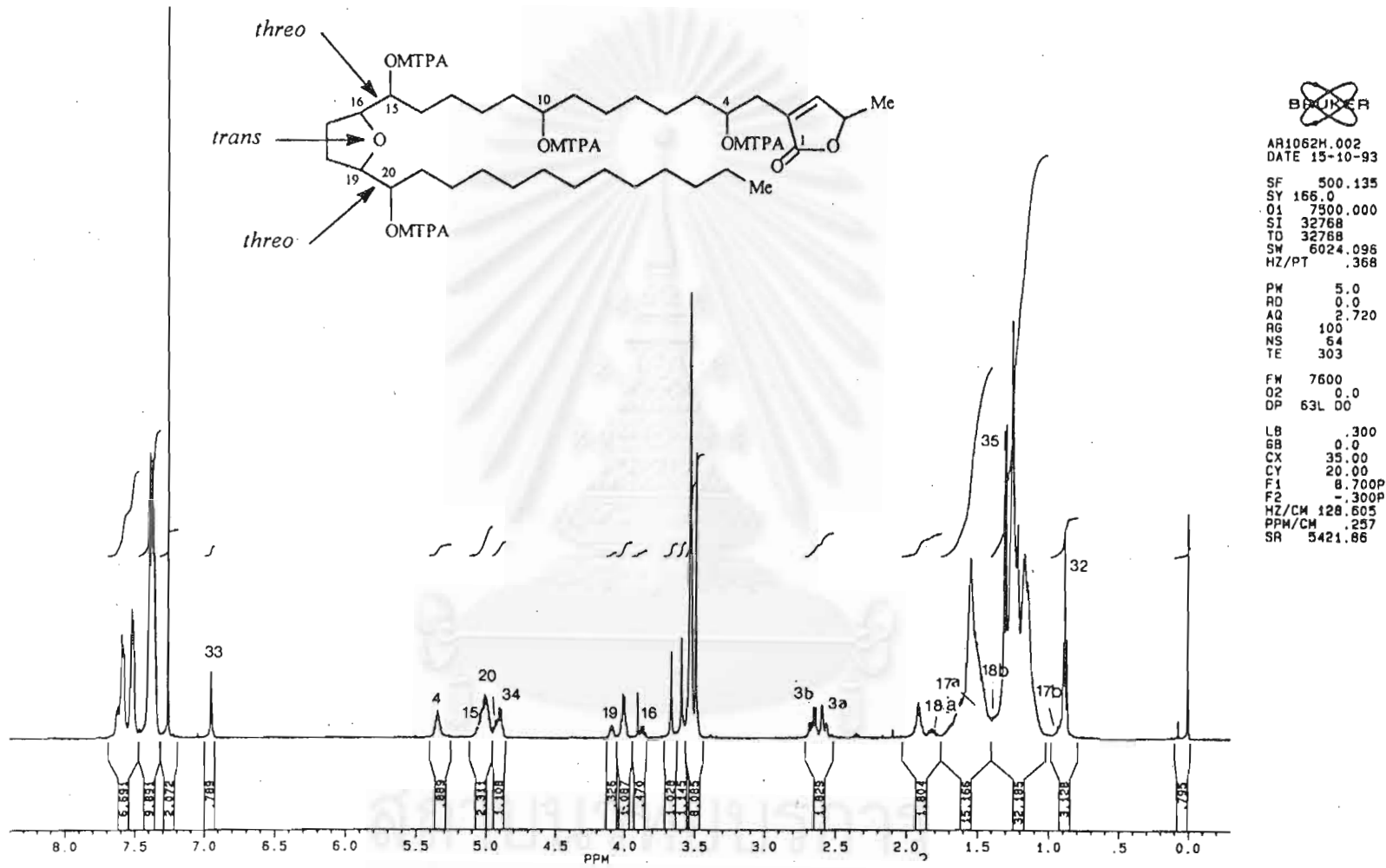
รูปที่ 58. สเปกตรัม $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY ((500 MHz) ของสาร NPK038-1-A2mesitoate ใน C_6D_6



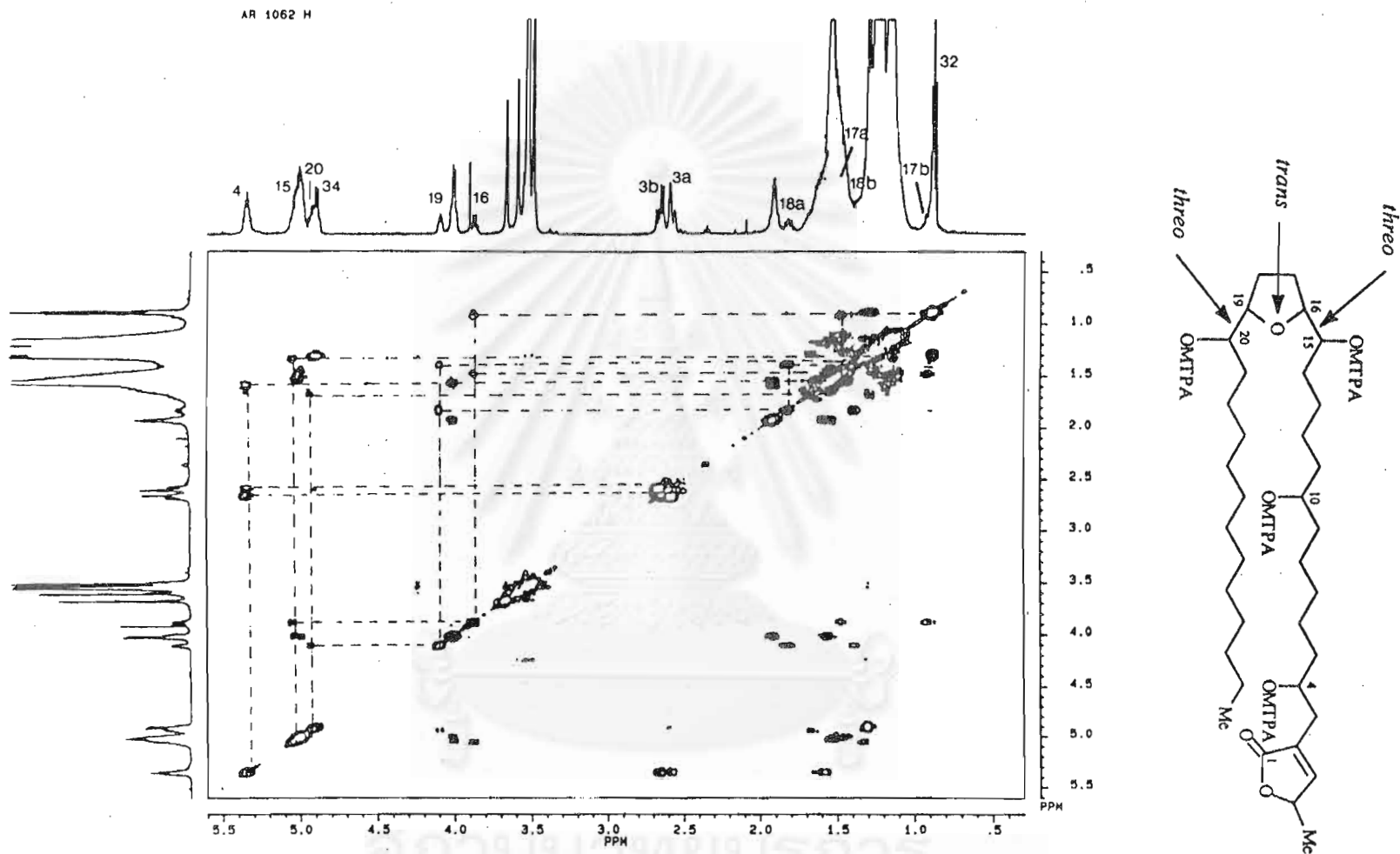
รูปที่ 59. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A1 per-(R)-MTPA ester ใน CDCl₃



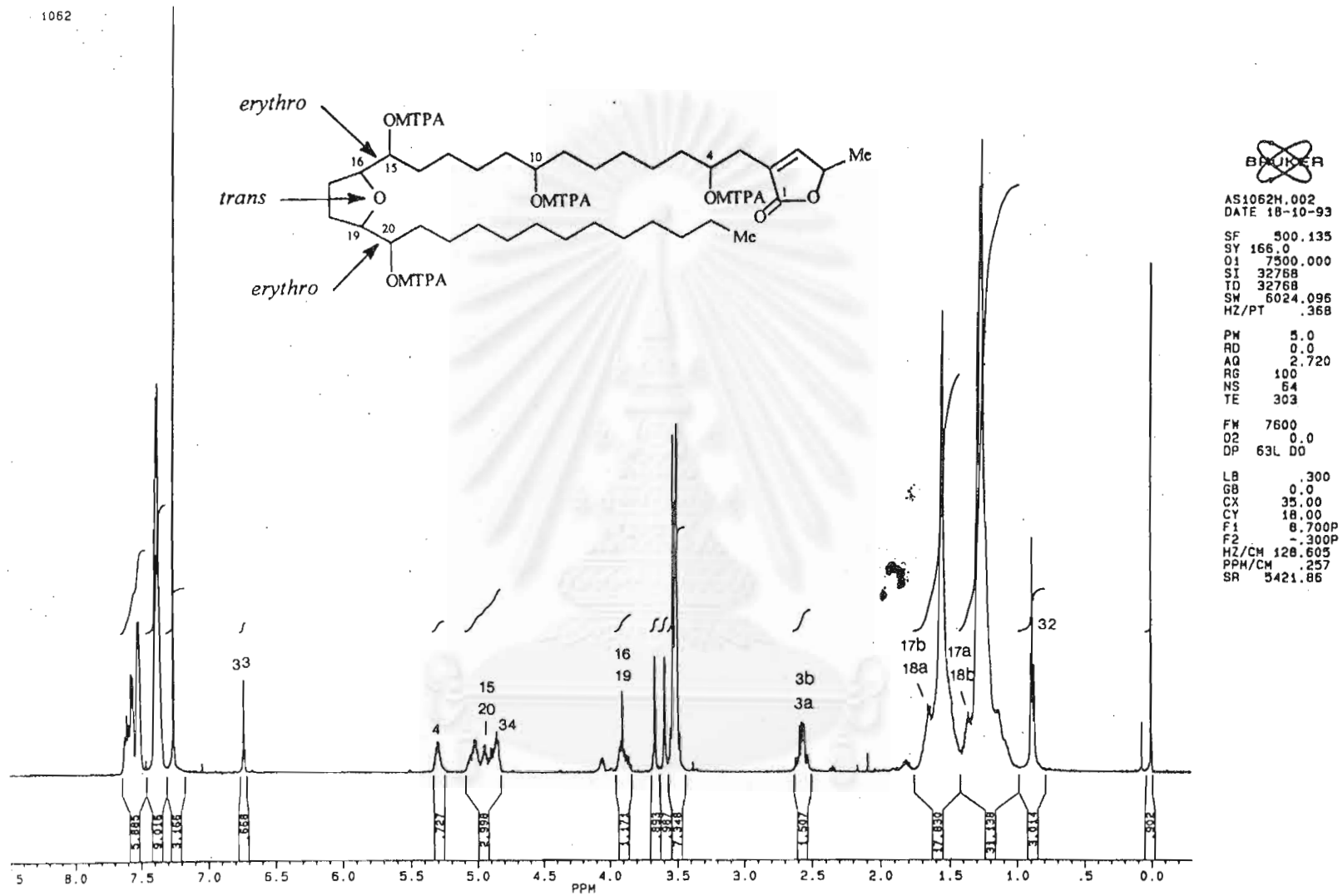
รูปที่ 60. สเปกตรัม $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A1 per-(R)-MTPA ester ใน CDCl_3



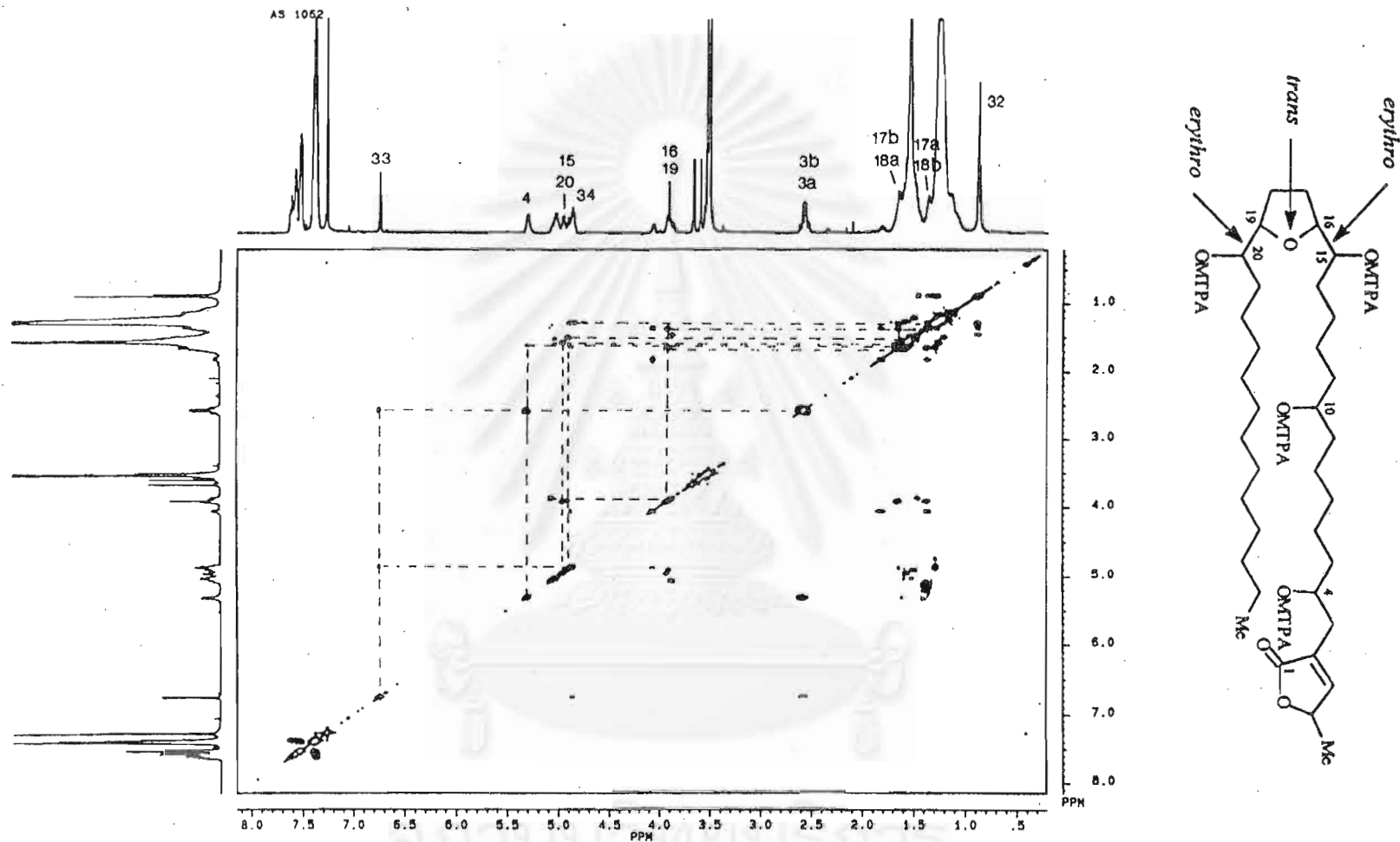
รูปที่ 61. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A1 per-(S)-MTPA ester ใน CDCl₃



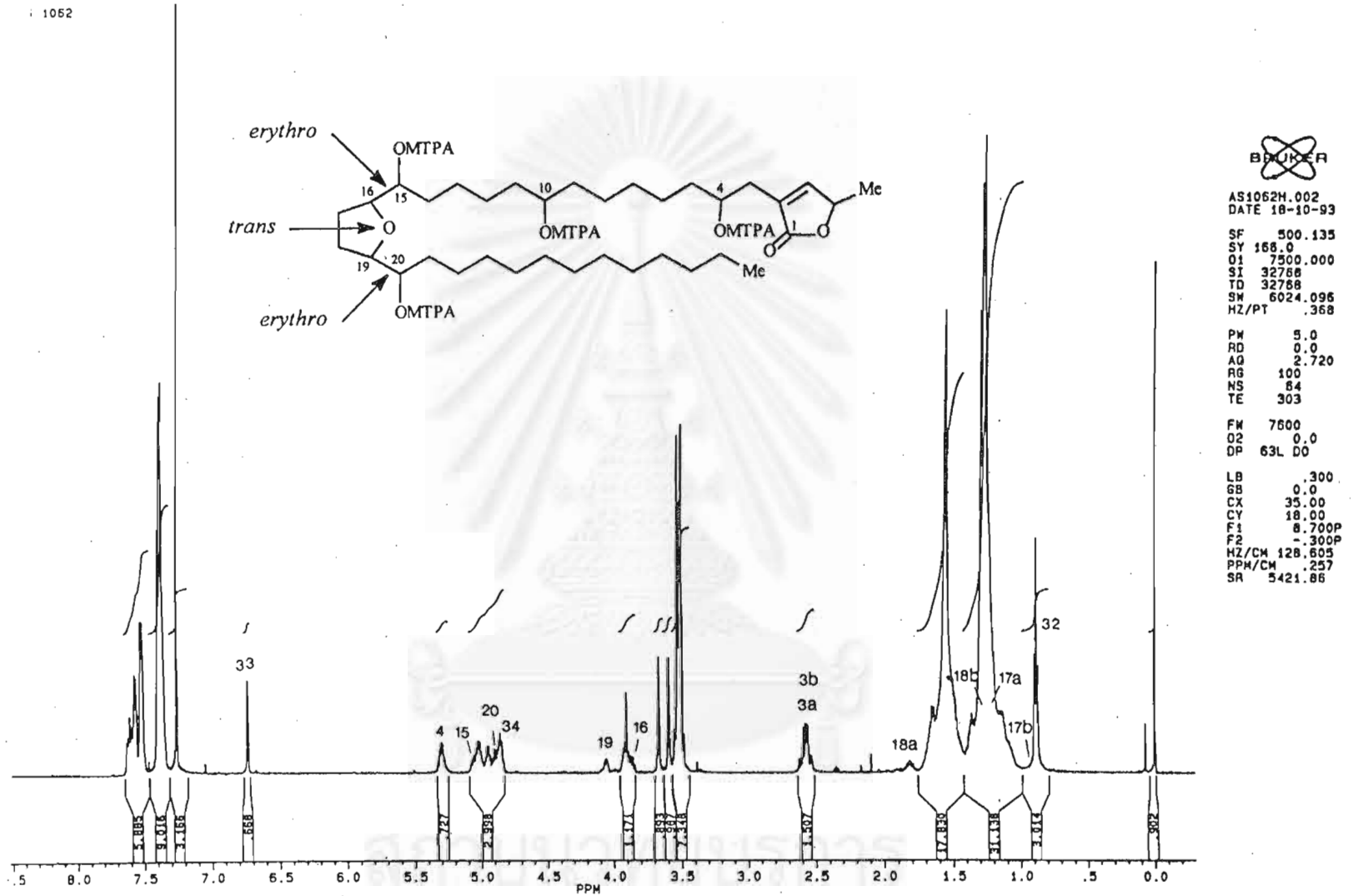
รูปที่ 62. สเปกตรัม $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A1 per-(S)-MTPA ester ใน CDCl_3



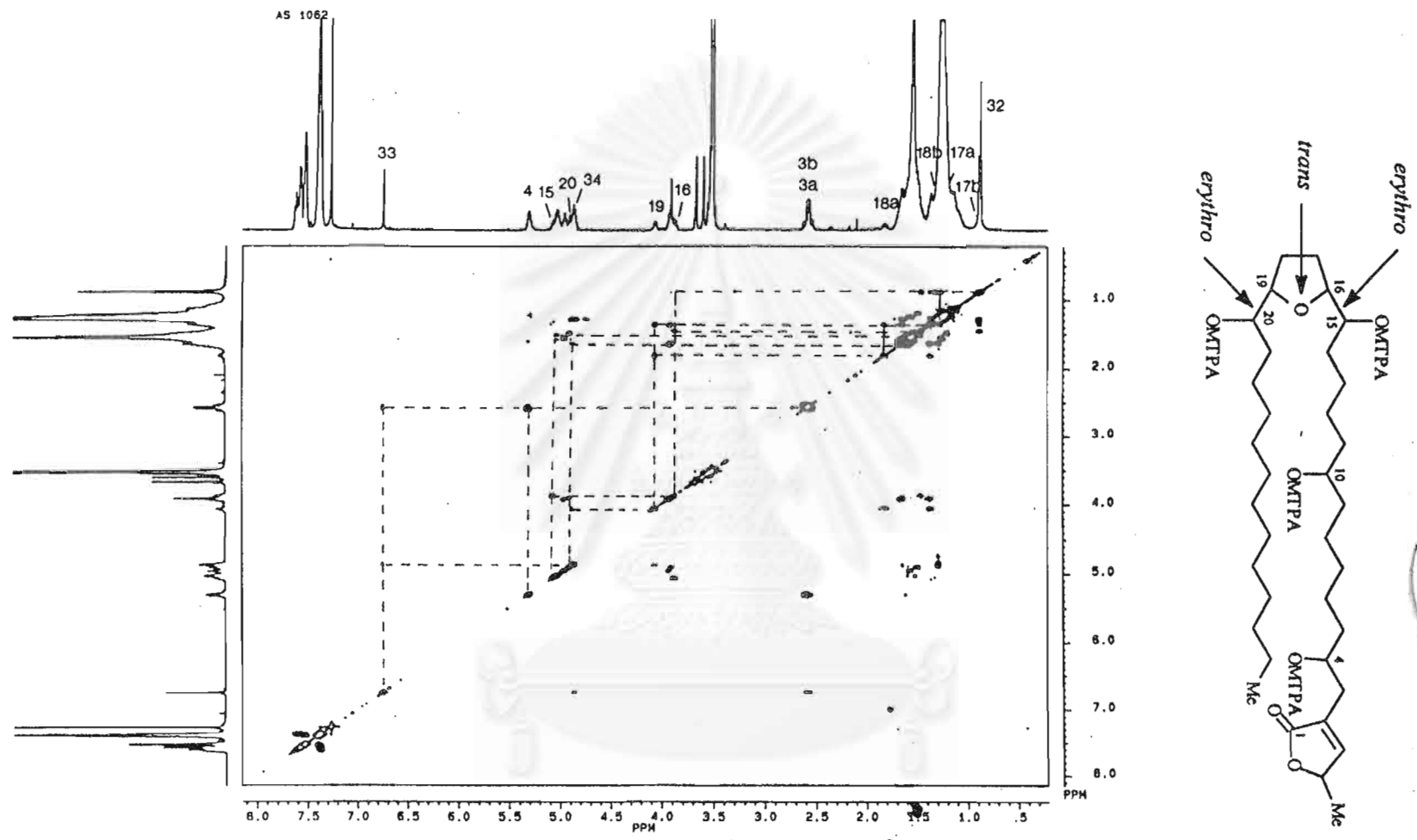
รูปที่ 63. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A2 per-(R)-MTPA ester ใน CDCl₃



รูปที่ 64. สเปกตรัม $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A2 per-(R)-MTPA ester ใน CDCl_3



รูปที่ 65. สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A2 per-(S)-MTPA ester ใน CDCl₃



รูปที่ 66. สเปกตรัม $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) ของสาร NPK038-1-A2 per-(S)-MTPA ester ใน CDCl_3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

