

ตอนที่ 1

การศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของเนื้อไม้ฝาง (*Caesalpinea sappan* Linn.)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

1.1 ตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและแยกสารด้วยวิธีการโครมาโตกราฟีเป็นตัวทำละลายเกรดทั่วไป ก่อนนำมาใช้จะทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น ส่วนตัวทำละลายที่ใช้ตกผลึกสารเป็นเกรด AR และการกำจัดตัวทำละลายออกจากสาร จะใช้เครื่องระเหยตัวทำละลายโดยทำภายใต้ความดันต่ำ ส่วนใหญ่ใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 50-60° ซ

1.2 โครมาโตกราฟี วิธีการแยกนี้อาศัยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีใช้ซิลิกาเจล (silica gel) ของ Merck เป็นตัวดูดซับ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1.2.1 สำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ใช้ซิลิกาเจลสำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี 2 ชนิดคือ ซิลิกาเจลชนิดธรรมดาขนาดอนุภาคประมาณ 0.063-0.200 มิลลิเมตรและซิลิกาเจลชนิดละเอียด ขนาดอนุภาคประมาณต่ำกว่า 0.063 มิลลิเมตร

1.2.2 สำหรับโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นเคลือบบาง (thin nlayer chromatography, TLC) ใช้ซิลิกาเจล 60 เอฟ 254 (silica gel 60 F₂₅₄) เคลือบสำเร็จรูปบนแผ่นอลูมิเนียม มีความหนาของตัวดูดซับประมาณ 0.2 มิลลิเมตร ขนาดของแผ่นเคลือบสำเร็จมีขนาด 20x20 เซนติเมตร เมื่อนำมาใช้มักตัดให้มีขนาดประมาณ 2x5 หรือ 4x5 เซนติเมตร

การตรวจสอบจุดหรือแถบของสารบนแผ่น TLC ใช้วิธีมองจุดของสารบนแผ่น TLC โดยแสงอุลตราไวโอเลต ในช่วงความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และดูโดยการย้อมสีด้วยรีเอเจนท์ซึ่งประกอบด้วย anisaldehyde : กรดซัลฟูริกเข้มข้น : เอทานอล 2:3:100 โดยปริมาตร เมื่อนำแผ่น TLC ที่ทาหรือสเปรย์ด้วยรีเอเจนต์ดังกล่าวไปให้ความร้อนจะเกิดสีต่างๆตรงบริเวณที่มีสารอยู่

1.3 วัตถุดิบในการวิจัย

เนื้อไม้ฝาง (*Caesalpinea sappan* Linn) ที่ใช้ในการวิจัยทั้งได้มาจากตำบล..... อำเภอ..... จังหวัดกาญจนบุรี ปี พ.ศ.2553 และเก็บไว้ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

1.4 สเปกตรัม

1.4.1 อินฟราเรดสเปกตรัมบันทึกจากเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ยี่ห้อ Jasco รุ่น IR-700

1.4.2 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม บันทึกจากเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ยี่ห้อ Bruker และใช้ TMS เป็นสารมาตรฐานภายใน

1.4.3 แมสสเปกตรัมใช้เทคนิค Electron impact บันทึกจากเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ยี่ห้อ Finnkigen MATINCOS 50 MASS ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

1.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.4.5

1.4.6

} * * ?

2. การสกัดสาร

2.1 นำเนื้อไม้ฝางที่บดละเอียดแล้ว 2.5 มาสกัดด้วยเอทานอลจำนวน 3 ลิตร โดยแช่ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วัน

2.2 ส่วนสารละลายเอทานอลนำไประเหยตัวทำละลายออกจนสารที่ได้มีลักษณะข้นเหนียว

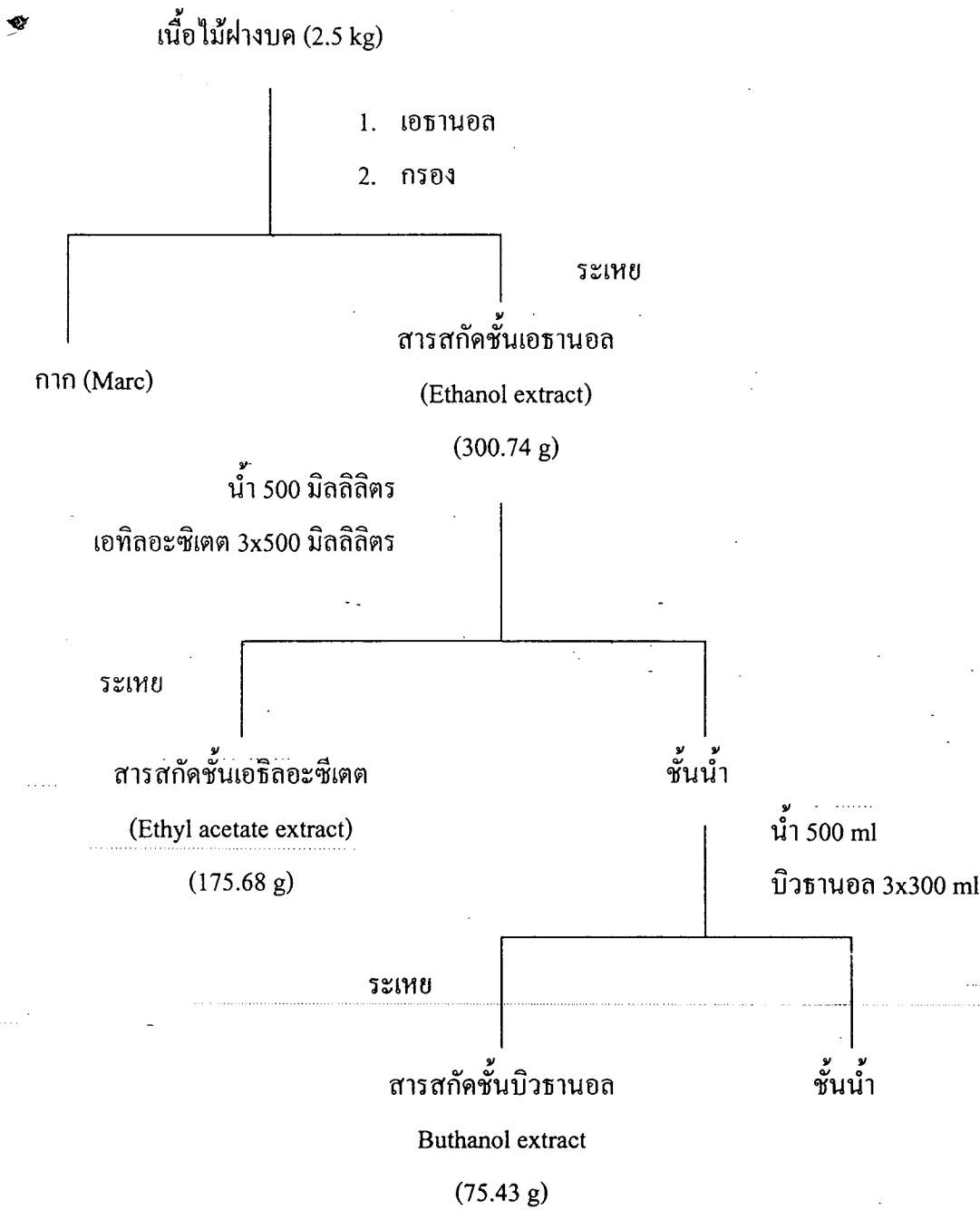
2.3 เติมน้ำปริมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนปริมาณ 200 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้กรวยแยก

2.4 นำสารละลายในชั้นน้ำมาสกัดต่อด้วยเอทิลอะซิเตท ปริมาณ 200 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง นำสารละลายเอทิลอะซิเตทไปกำจัดน้ำออกโดยการเติมโซเดียมซัลเฟต แล้วนำไปกรอง

2.5 นำสารละลายในชั้นเอทิลอะซิเตทที่กรองได้ไประเหยออก ได้สารสกัดเข้มข้นในส่วนตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท

2.6 นำชั้นน้ำที่ได้หลังจากสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมาสกัดด้วยเฮกเซนปริมาณ 200 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง นำสารละลายเอทิลอะซิเตทไปกำจัดน้ำออกโดยการเติมโซเดียมซัลเฟต แล้วนำไปกรอง

2.7 นำสารละลายในชั้นเฮกเซนที่กรองได้ไประเหยออก ได้สารสกัดเข้มข้นในส่วนตัวทำละลายเฮกเซน



แผนภาพที่ 1แสดงการสกัดเนื้อไม้ฝาง

3. การแยกสาร

คอลัมน์โครมาโตกราฟีของสารสกัดในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตและ/หรือส่วนย่อยรวมที่ได้จากการแยกสารให้ได้บริสุทธิ์โดยกระบวนการคอลัมน์โครมาโตกราฟีมักทำโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล และการชะสารออกจากคอลัมน์อาจใช้ระบบตัวชะชนิดเคี้ยวตลอดการแยกหรือทำการชะโดยค่อยๆเพิ่มสภาพมีขั้วของตัวชะทีละน้อย ภายหลังการนำส่วนย่อยที่ออกมาเป็นตัวชะต่างๆมาทำการตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวชะสำหรับ TLC ชนิดต่างๆกันที่เหมาะสม จะทำให้สามารถรวมส่วนย่อยที่มีคุณสมบัติทาง TLC คล้ายกันไว้ด้วยกัน

จากลักษณะที่สังเกตได้จาดาก TLC และปริมาณของสารจากส่วนย่อยรวมต่างๆ อาจจำเป็นต้องทำการแยกสารย่อยรวมใหม่อีกครั้งหรือหลายครั้งด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวชะที่เหมาะสม การใช้กระบวนการดังกล่าวหลายๆครั้ง จะทำให้แยกสารได้บริสุทธิ์ขึ้น การเพิ่มสภาพมีขั้วของตัวชะ ทำได้โดยเพิ่มตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่า โดยเพิ่มประมาณ 1-2% และตัวชะแต่ละระบบที่ใช้ จะใช้ประมาณ 100-200 มิลลิลิตรแล้วแต่เหมาะสม การชะจะหยุดเมื่อเห็นว่าสารมีสภาพขั้วสูงสุดออกมาจากคอลัมน์แล้ว

ส่วนที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต (Ethylacetate extract)

นำส่วนที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตปริมาณ 5.6844 กรัม มาละลายในเอทิลอะซิเตตปริมาตรไม่เกิน 50 มิลลิลิตรแล้วคลุกด้วยซิลิกาเจลชนิดหยาบ หลังจากทำให้แห้งนำไปบรรจุลงคอลัมน์ ซึ่งใช้ซิลิกาเจลชนิดหยาบเช่นกันโดยใช้ปริมาณ 250 กรัม ใช้ระบบตัวชะเริ่มแรกเป็น hexane จากนั้นค่อยเพิ่มสภาพความมีขั้วให้แก่ตัวชะโดยการเพิ่มปริมาณ ethylacetate ประมาณ 10% จนระบบที่ชะเป็น ethylacetate 100% นำส่วนย่อย (fraction) ต่างๆที่ได้มาตรวจสอบด้วย TLC และตรวจจุด (spot) ของสารบนแผ่น TLC ด้วยแสง UV และใช้รีเอเจนต์ตรวจสอบควบคู่ไปด้วย จากนั้นจึงรวมส่วนย่อยที่มีสารคล้ายกันหรือมีส่วนประกอบตรงกันตามที่ปรากฏบนแผ่น TLC เข้าด้วยกันได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ C-1 ส่วนย่อยที่ 1-20 ดูดกลืนแสง UV ให้สีม่วงเข้มที่ 254 นาโนเมตรและให้สีส้มแดงกับรีเอเจนต์สองจุด หนัก 0.2473 กรัม

กลุ่มที่ C-2 ส่วนย่อยที่ 21-74 ดูดกลืนแสง UV ให้สีม่วงเข้มที่ 254 นาโนเมตรและให้สีส้มแดงกับรีเอเจนต์ หนัก 1.3127 กรัม

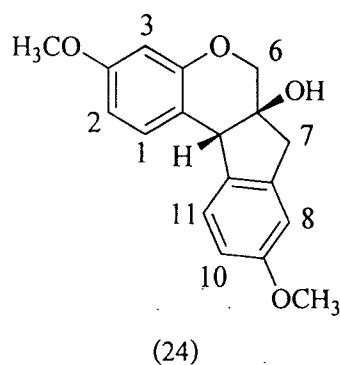
กลุ่มที่ C-3 ส่วนย่อยที่ 75-104 ดูดกลืนแสง UV ให้สีม่วงเข้มที่ 254 นาโนเมตรและให้สีส้มแดงเข้มกับรีเอเจนต์ หนัก 2.5864 กรัม

กลุ่มที่ C-4 ส่วนย่อยที่ 105-126 ดูดกลืนแสง UV ให้สีม่วงเข้มที่ 254 นาโนเมตรและให้สีน้ำตาลกับรีเอเจนต์ หนัก 0.2177 กรัม

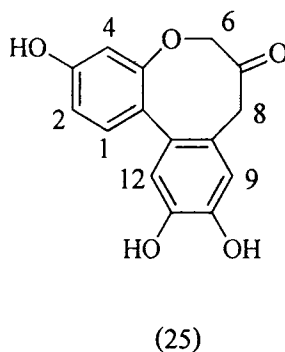
จากกลุ่มต่างๆทั้ง 11 กลุ่ม เมื่อนำไปตรวจสอบและศึกษาต่อไปทำให้สามารถแยกสารได้ 5 ชนิด ดังนี้

กลุ่ม C-2 ส่วนย่อยที่ 21-74

นำสารกลุ่มนี้มาแยกอีกครั้งด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบตัวชะแบบคงที่ด้วย hexane:ethylacetate (3:1) นำส่วนย่อย (fraction) ต่างๆที่ได้มาตรวจสอบด้วย TLC และตรวจจุด (spot) ของสารบนแผ่น TLC ด้วยแสง UV และรีเอเจนต์ปรากฏว่ามีสารที่น่าสนใจหนึ่งชนิดจากส่วนย่อยที่ 50-75 ดูดกลืนแสง UV และให้สีเหลืองส้มกับรีเอเจนต์น้ำหนัก 15.2 มิลลิกรัมซึ่งเป็นสารที่ค้นพบเป็นครั้งแรกคือ ยังไม่มีชื่อ

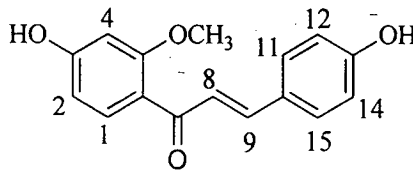


จากนั้นนำส่วนย่อยที่ 157-174 มาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีอีกครั้ง โดยใช้ระบบตัวชะแบบคงที่เป็น 40% ethylacetate:hexane นำส่วนย่อย (fraction) ต่างๆที่ได้มาตรวจสอบด้วย TLC และตรวจจุด (spot) ของสารบนแผ่น TLC ด้วยแสง UV และรีเอเจนต์ปรากฏว่ามีสารที่สามารถดูดกลืนแสง UV 254 และให้ม่วงน้ำตาลกับรีเอเจนต์น้ำหนัก 0.5578 กรัม ซึ่งสารที่แยกได้นี้คือ protosappanin A



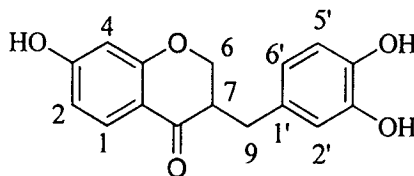
กลุ่ม C-3 ส่วนย่อยที่ 75-104

นำสารกลุ่มนี้มาแยกอีกครั้งด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบตัวชะแบบคงที่ด้วย hexane:ethylacetate (3:2) นำส่วนย่อย (fraction) ต่างๆที่ได้มาตรวจสอบด้วย TLC และตรวจจุด (spot) ของสารบนแผ่น TLC ด้วยแสง UV และรีเอเจนต์ปรากฏว่าสามารถแบ่งสารที่น่าสนใจได้เป็นสามกลุ่ม และสามารถแยกออกมาได้บริสุทธิ์คือกลุ่มที่สอง ส่วนย่อยที่ 5-14 ตรวจกลิ่น UV และให้สีเหลือง สัมกับรีเอเจนต์หนัก 45.3 มิลลิกรัม สารที่ได้นี้คือ 3-deoxysappanchalcone



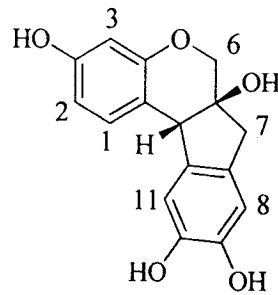
(26)

ส่วนสารกลุ่มที่สาม ที่มีสารปริมาณมากที่สุดได้นำมาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบตัวชะแบบคงที่ในอัตราส่วน ethylacetate:hexane (1:1) โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล ชนิดหยาบ นำส่วนย่อย (fraction) ต่างๆที่ได้มาตรวจสอบด้วย TLC และตรวจจุด (spot) ของสารบนแผ่น TLC ด้วยแสง UV และรีเอเจนต์ปรากฏส่วนย่อยที่ 6-14 มีสารที่สามารถตรวจกลิ่นแสง UV 254 และให้สีแดงกับรีเอเจนต์น้ำหนัก 20.2 มิลลิกรัม สารที่แยกได้นี้คือ 3-deoxysappanone B



(27)

และส่วนย่อยที่ 34-44 มีสารที่สามารถดูดกลืนแสง UV 254 และให้แดงเข้มกับรีเอเจนต์น้ำหนัก 0.72 กรัม สารที่แยกได้นี้คือ brazilin



(28)

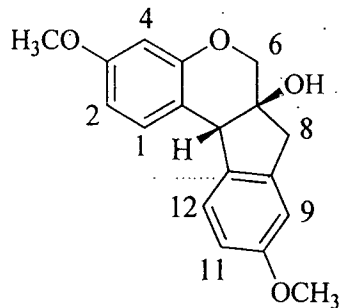
ผลของการวิจัยและอภิปรายผล

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างของสารประกอบจากเนื้อไม้ฝาง (*Caesalpinia sappan* Linn) โดยนำเนื้อไม้ของต้นฝางมาบดแล้วสกัดด้วยเอธานอล หลังจากระเหยตัวทำละลายออกแล้ว นำสารสกัดซึ่งมีลักษณะหนืดที่มาละลายน้ำแล้วสกัดด้วยเอธิลอะซีเตต จากนั้นนำสารสกัดจากชั้นสารละลายเอธิลอะซีเตตไประเหยออก จะได้สารสกัดในส่วนนี้แล้วนำไปทำการแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป

ส่วนสารสกัดด้วยเอธิลอะซีเตต

เมื่อนำส่วนที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตมาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีแล้วนำกลุ่มย่อยจากการแยกมาตรวจสอบด้วย TLC และรีเอเจนต์ปรากฏว่าสามารถแยกสารได้ 5 ชนิดดังนี้

1) Compound (24)



Compound (24)

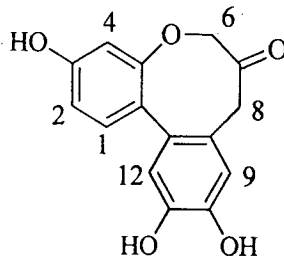
Compound (24) มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_{18}H_{18}O_4$ ซึ่งสามารถยืนยันได้จากแมสสเปกตรัมที่แมสสเปกตรัมให้พิกของไอออนโมเลกุลที่ค่า m/z ๒๖๖ ยังไม่เขียนอธิบายรายละเอียดสเปกตรัม

?

ตารางที่ 1 แสดง 1H , ^{13}C NMR and HMBC ของ compound 24 ใน $CDCl_3$

ตำแหน่ง	δ_H ppm (J in Hz)	δ_C ppm	HMQC
1	-	-	-
1a	-	-	-

2. Compound (25)



(25)

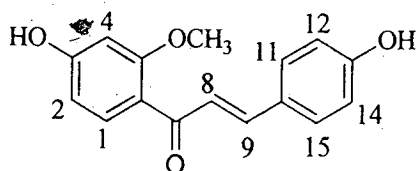
Compound (25) มีจุดหลอมเหลว 00 °ซ สูตรโครงสร้างเป็น $C_{15}H_{12}O_5$ ซึ่งสามารถยืนยันได้จากแมสสเปกตรัมที่แมสสเปกตรัมให้พีคของไอออนโมเลกุลที่ค่า $m/z = 337$ จากโปรตอน NMR สเปกตรัมบอกให้ทราบว่าไม่มีเมทิลีนสองหมู่ที่แตกต่างกัน โดยหมู่แรกปรากฏที่ตำแหน่ง δ 3.81(singlet) และอีกหนึ่งหมู่ปรากฏที่ตำแหน่ง δ 4.97 (singlet) เช่นกัน และนอกจากนี้ยังพบอะโรมาติกโปรตอนตำแหน่ง δ 7.18 (doublet, $J = 8.6\text{Hz}$) และ δ 7.57 (doublet, $J = 8.6\text{Hz}$) ซึ่งเป็นตำแหน่งของโปรตอนตำแหน่ง 1 และ 2 ตามลำดับ โดยความสัมพันธ์ของโปรตอนตำแหน่งทั้งสองนี้ยืนยันได้จากสเปกตรัมของ COSY นอกจากนี้ยังพบหมู่อะโรมาติกโปรตอนตำแหน่ง δ 7.13-7.14 อีกสามโปรตอนซึ่งปรากฏที่ตำแหน่งใกล้เคียงกันมาก ซึ่งสัญญาณที่ปรากฏเป็นสัญญาณของโปรตอนตำแหน่งที่ 4, 9 และ 12 ตามลำดับ

นอกจากนี้จากข้อมูลของคาร์บอน NMR ยังพบว่าสัญญาณที่เกิดขึ้นทั้งหมด 15 สัญญาณ โดยพบสัญญาณที่สำคัญคือสัญญาณที่ δ 205.8 ซึ่งเป็นสัญญาณของหมู่คาร์บอนิลและข้อมูลจากเทคนิค HMBC ทำให้ทราบว่าโปรตอนตำแหน่งที่ 7 และ 8 ต่างก็อยู่ติดกับคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลนี้ และจากการเปรียบเทียบค่า chemical shift ทำให้ทราบว่า Compound (25) คือ protosappanin A

ตารางที่ 2 แสดง ^1H , ^{13}C NMR และ HMBC ของ compound 25 ใน DMSO-d₆

ตำแหน่ง	δ_{H} ppm (<i>J</i> in Hz)	δ_{C} ppm	HMBC
1	7.57 d (8.6)	129.9	C-1a, 2, 3, 4, 4a
1a	-	129.9	-
2	7.18 d (8.7)	112.6	C-3, 4, 4a
3	-	157.7	-
4	7.13 s	108.3	C-1, 1a, 2, 3, 4a, 12a
4a	-	158.6	-
6	4.97 s	77.9	C-4a, 7, 8
7	-	205.8	-
8	3.81 s	48.3	C-1a, 7, 9, 12, 12a
8a	-	125.4	-
9	7.14 s	117.1	C-1, 1a, 7
10	-	144.6	-
11	-	144.8	-
12	7.14 s	116.9	C-1, 1a, 8, 8a, 10, 11, 12a
12a	-	123.2	-

3. Compound (26)



(26)

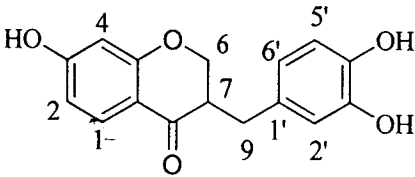
Compound (26) มีลักษณะเป็นของแข็งกึ่งเหลว มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_{16}H_{14}O_4$ ซึ่งสามารถยืนยันได้จากแมสสเปกตรัมที่แมสสเปกตรัมให้พีคของไอออนโมเลกุลที่ค่า $m/z = 337$ จากโปรตอน NMR สเปกตรัมบอกให้ทราบว่า มีหมู่ methoxy หนึ่งหมู่ โดยปรากฏสัญญาณเป็น singlet ที่ δ 3.82 และพบสัญญาณที่เป็นหมู่อะโรมาติกโปรตอนที่เกิดจากวงเบนซีนสองวงที่มีหมู่แทนที่แตกต่างกัน ดังนี้ ที่ค่า δ 6.79 (doublet, $J=8.4$) และ δ 7.50 (doublet, $J=8.4$) จากค่า coupling constant (J) นี้ทำให้ทราบว่าอะโรมาติกโปรตอนนี้เกิดจากวงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่เป็นแบบ ortho นั้นเอง โดยสามารถยืนยันได้จากความสัมพันธ์ที่ได้จากข้อมูลของเทคนิค COSY ที่พบ cross peak ของโปรตอนทั้งสองตำแหน่ง ส่วนตำแหน่งของอะโรมาติกโปรตอนของวงเบนซีนอีกหนึ่งวง จากข้อมูลของ NMR แสดงให้เห็นว่าจะมีลักษณะเป็นแบบ ABX system ที่ δ 7.49 (doublet, $J=8.4$) δ 6.43 (doublet of doublet, $J=8.4, 1.6$) และ δ 6.48 (doublet, $J=1.6$) โดยโปรตอนที่ปรากฏสัญญาณเหล่านี้เป็นโปรตอนของตำแหน่ง 1 2 และ 4 ตามลำดับ ซึ่งโปรตอนตำแหน่งที่ 1 จะเกิดการ coupling กับโปรตอนตำแหน่งที่ 2 โดยค่า coupling constant ที่พบจะมีลักษณะกว้างแสดงว่าเป็น vicinal โปรตอน ส่วนโปรตอนตำแหน่งที่ 2 จะเกิดการ coupling กับโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 1 และโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 4 โดยค่า coupling ที่เกิดขึ้นจะมีสองค่า แสดงให้เห็นว่าโปรตอนเป็น vicinal โปรตอนกับโปรตอน 1 และเป็น long range coupling กับโปรตอนตำแหน่งที่ 4 โดยดูได้จากค่า coupling constant ที่แคบระหว่างโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 2 และโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 4

นอกจากนี้ยังพบสัญญาณที่สำคัญอีกหนึ่งกลุ่มคือสัญญาณที่ตำแหน่ง δ 7.34 (doublet, $J=16.0$) และ δ 6.48 (doublet, $J=16.0$) ซึ่งเป็นสัญญาณของโปรตอนที่ตำแหน่ง α , β -unsaturated carbonyl ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}=\text{O}$) จากค่า coupling constant (J) ที่กว้างนี้ทำให้ทราบว่าโปรตอนดังกล่าวอยู่ในตำแหน่ง para ซึ่งกันและกันและจากการเปรียบเทียบค่า chemical shift ทำให้ทราบว่า Compound (26) คือ 3-deoxysappanchalcone

ตารางที่ 3 แสดง ¹H, ¹³C NMR และ HMBC ของ compound 26 ใน DMSO-d6

Position	δ _H ppm (J in Hz)	δ _C ppm	HMBC
1	7.49 d (8.4)	141.3	C-3, 5, 7
2	6.43 dd (1.6, 8.4)	108.8	C-4, 6
3	-	162.5	-
4	6.48 d (1.6)	116.3	C-2, 3, 5, 6
5	-	160.3	-
6	-	120.2	-
7	-	188.9	-
8	7.45 d (16.0)	141.5	C-5, 7, 9, 10, 11, 15
9	7.34 d (16.0)	123.9	C-1, 7, 10
10	-	125.9	C-1, 1a, 7
11	7.50 d (8.4)	130.1	C-7, 13
12	6.79 d (8.4)	116.3	C-10, 12, 13, 14
13	-	159.5	-
14	6.79 d (8.4)	116.3	C-10, 12, 13, 14
15	7.50 d 8.4	130.1	C-7, 13

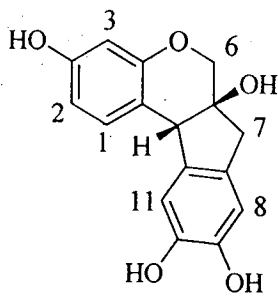
4. Compound (27)



(27)

Compound (27) มีจุดหลอมเหลว 00 °ซ มีสูตรโครงสร้างเป็น C₁₆H₁₄O₅ ซึ่งสามารถยืนยันได้ จากแมสสเปกตรัมที่แมสสเปกตรัมให้พิกของไอออนโมเลกุลที่ค่า m/z = ยังไม่มีข้อมูล จากโปรตอน NMR สเปกตรัมบอกให้ทราบว่าไม่มีเอาข้อมูลมาใส่ สารที่แยกได้นี้คือ sappanchalcone

5. Compound (28)



(28)

Compound (28) มีจุดหลอมเหลว 00°C มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_{16}H_{14}O_5$ ซึ่งสามารถยืนยันได้จากแมสสเปกตรัมที่แมสสเปกตรัมให้พิกของไอออนโมเลกุลที่ค่า $m/z = 337$ จากโปรตอน NMR สเปกตรัมบอกให้ทราบว่าไม่มีเมทิลีนสองหมู่ ได้แก่ δ 3.21, 3.39 (doublet, $J=1.6$) เป็นสัญญาณโปรตอนตำแหน่ง 7 และ δ 4.08, 4.35 (doublet, $J=1.6$) เป็นสัญญาณโปรตอนตำแหน่ง 6 และพบสัญญาณตำแหน่ง δ 4.36 (singlet) เป็นสัญญาณโปรตอนตำแหน่ง 12 นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของอะโรมาติกโปรตอนอีกห้าชุด โดยมีสัญญาณชุดที่หนึ่งตำแหน่ง δ 7.65 (doublet, $J=8.4$) เป็นสัญญาณของโปรตอน 1 และสัญญาณชุดที่สองตำแหน่ง δ 7.65 (doublet, $J=8.4$) เป็นสัญญาณของโปรตอน 2 โดยสัญญาณทั้งสองนี้เกิดจากการ coupling กันเอง สามารถยืนยันได้จากข้อมูล COSY ที่แสดง cross peak ระหว่างโปรตอนที่ 1 และ 2 นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของอะโรมาติกโปรตอนที่ δ 6.73 (singlet) ที่เป็นสัญญาณของโปรตอนที่ตำแหน่ง 4 ส่วนสัญญาณชุดที่สี่และห้าเป็นสัญญาณของอะโรมาติกโปรตอนที่ตำแหน่ง 8 และ 11 โดยมีค่า δ 7.15 และ δ 7.06 ตามลำดับ

จากข้อมูลของคาร์บอน NMR พบสัญญาณของคาร์บอน 16 ชนิด โดยสัญญาณที่สำคัญคือสัญญาณตำแหน่ง δ 76.4 และ δ 41.9 ซึ่งเป็นสัญญาณของคาร์บอนของหมู่เมทิลีน โดยค่า chemical shift ที่เป็น low field กว่าแสดงให้เห็นว่าเป็นสัญญาณของคาร์บอนที่ต่อกับออกซิเจน และจากการเปรียบเทียบค่า chemical shift ทำให้ทราบว่า Compound (28) คือ brazilin

ตารางที่ 5 แสดง ^1H , ^{13}C NMR และ HMBC ของ compound 28 ใน DMSO-d6

Position	δ_{H} ppm (J in Hz)	δ_{C} ppm	HMBC
1	7.65 d (8.4)	130.9	C-2, 3, 4, 4a, 12
1a	-	114.4	-
2	6.93 d (8.4)	108.8	C-1a, 4, 4a
3	-	154.1	-
4	6.73 s	102.8	C-1a, 2, 3, 4a, 12
4a	-	156.5	-
6	4.08, 4.35 d (11.2, 1.2)	76.4	C-1, 1a, 7, 11, 11a, 12
6a	-	69.6	-
7	3.21, 3.39 d (11.2, 11.2)	41.9	C-6, 6a, 7a, 8, 11a, 12
7a	-	129.8	-
8	7.15 s	112.1	C-7a, 9, 11
9	-	144.0	-
10	-	144.3	-
11	7.06 s	111.7	C-7, 9, 11, 11a, 12
11a	-	114.4	-
12	4.36 s	49.6	C-1, 1a, 7, 8, 9, 11

Reference

- Shimokawa, T.; Kinjo, J.; Yamahara, J.; Yamasaki, M.; Nohara, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1985, **33**, 3545–3547.
- Nagai, M.; Nagumo, S. *Chem. Pharm. Bull.* 1987, **35**, 3002–3005.
- Namokoshi, M.; Nakata, H.; Numo, M.; Ozawa, T.; Saitoh, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1987, **35**, 2761–2773.
- Namikoshi M.; Nakata H.; Nuno M.; Ozawa T.; Saitoh T. *Chem Pharm Bull.* 1987, **35**, 3568–3575.
- Nagai, M.; Nagumo, S. *Chem. Pharm. Bull.* 1990, **38**, 1490–1494.
- Yang, BO.; Ke, CQ.; He, ZS.; Yang, YP.; Ye, Y. *Tetrahedron Lett.* 2002, **43**, 1731–1733.
- Mar, W.; Lee, HT.; Je, KH.; Choi, HY.; Soe, EK. *Arch Pharm Res.* 2003, **26**, 174–150

11. Nguyen, M.T.T.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Tran, Q.L.; Kadota, S. *Chem. Pharm. Bull.* 2005, **53**, 984-988.
12. Fu, L. C.; Huang, X. A.; Lai, Z. Y.; Hu, Y. J.; Liu, H. J.; Cai, X. L. *Molecules*. 2008, **13**, 1923-1930.
13. Zhao, H.; Bai, H.; Wang, Y. *J Nat Med.* 2008, **62**, 325-327

1H bc-ru-1414

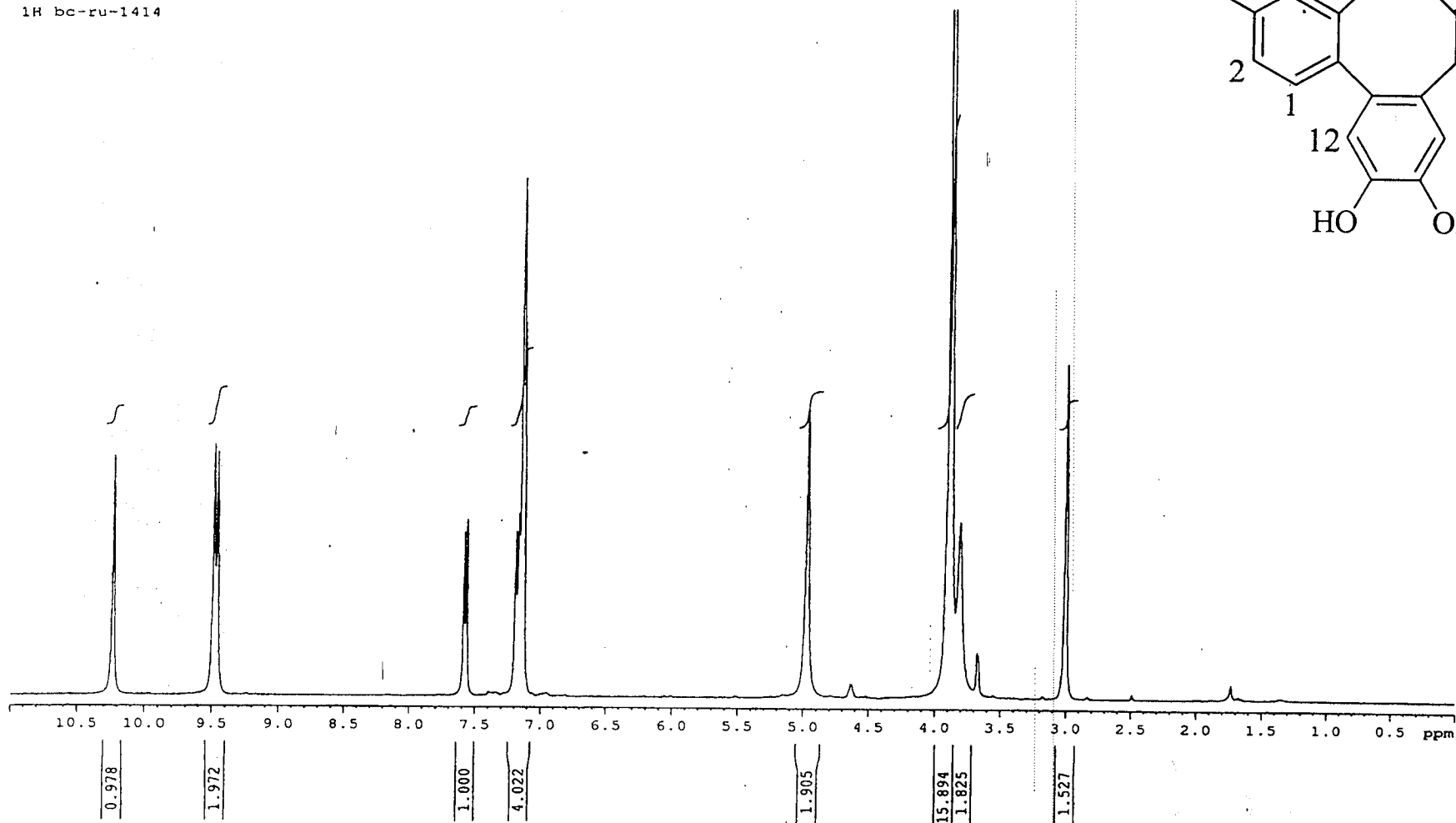
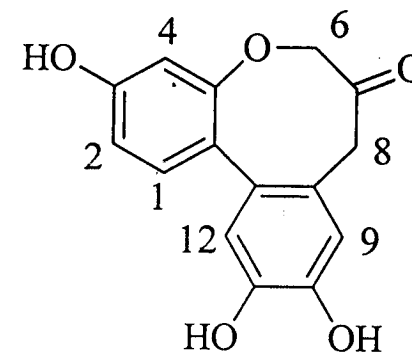


Figure 2 ^1H NMR Spectrum of protosappanin A (25)

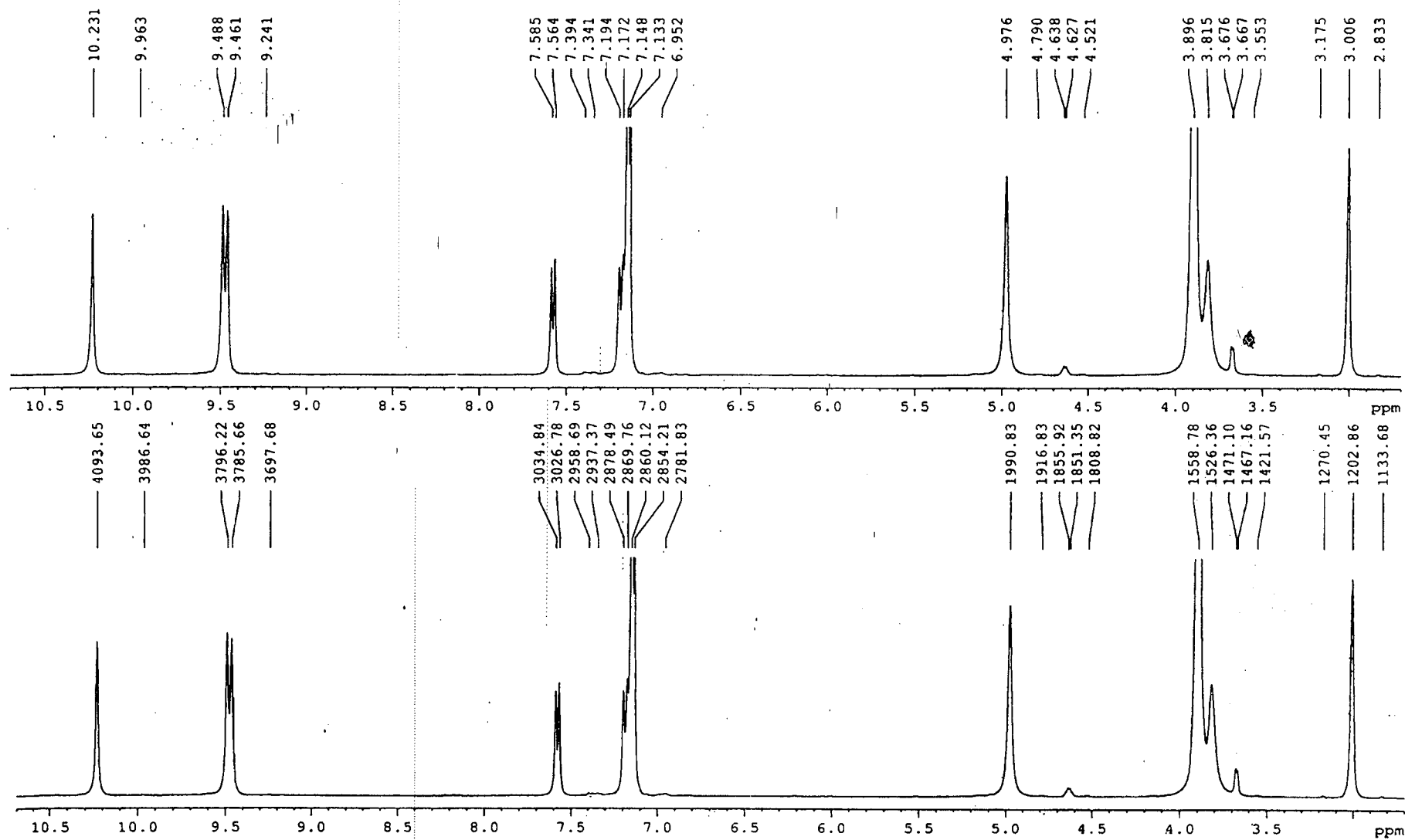


Figure 2a ^1H NMR Spectrum of protosappanin A (25)

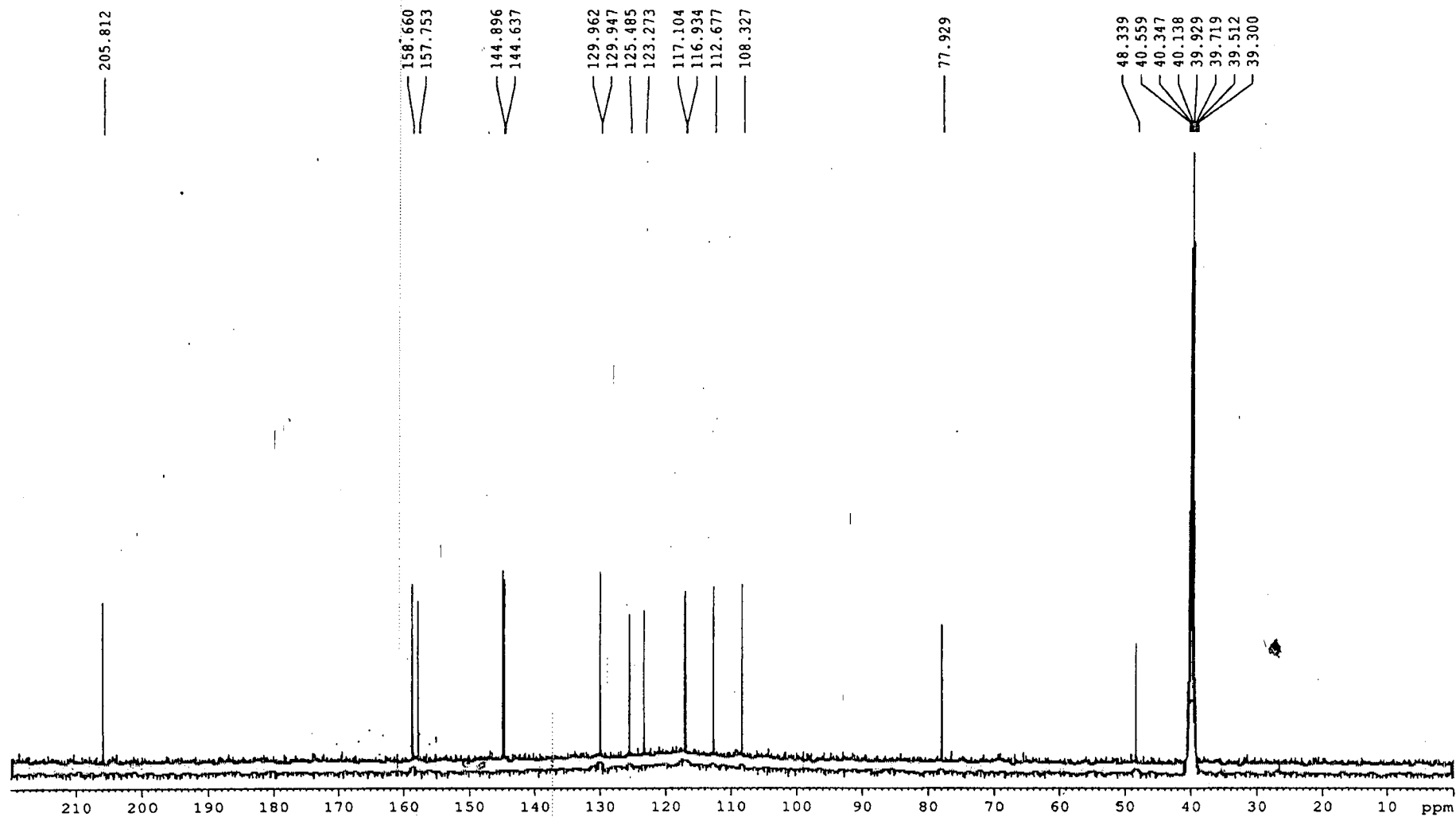


Figure 2b ¹³C NMR Spectrum of protosappanin A (25)

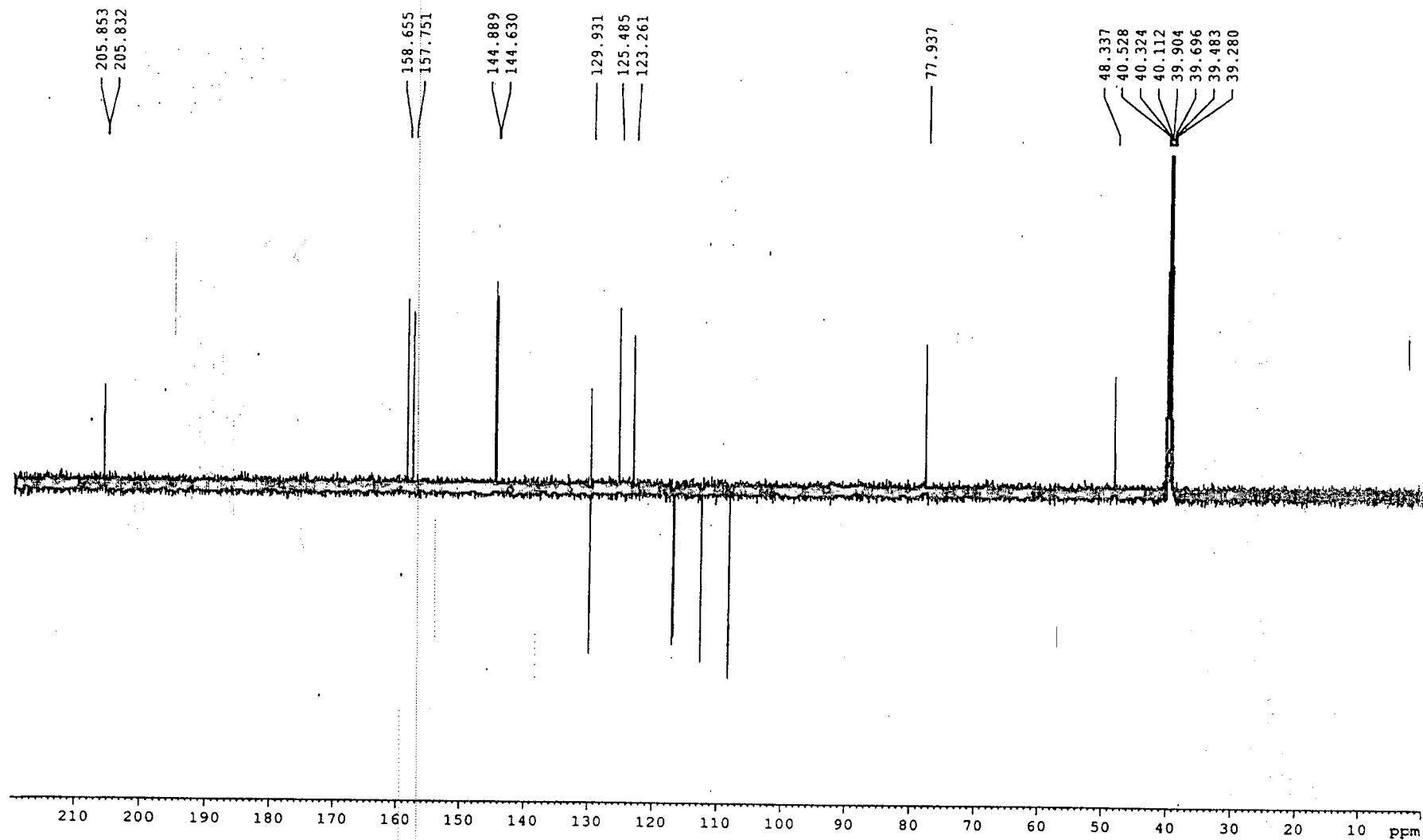


Figure 2c Jmod Spectrum of protosappanin A (25)

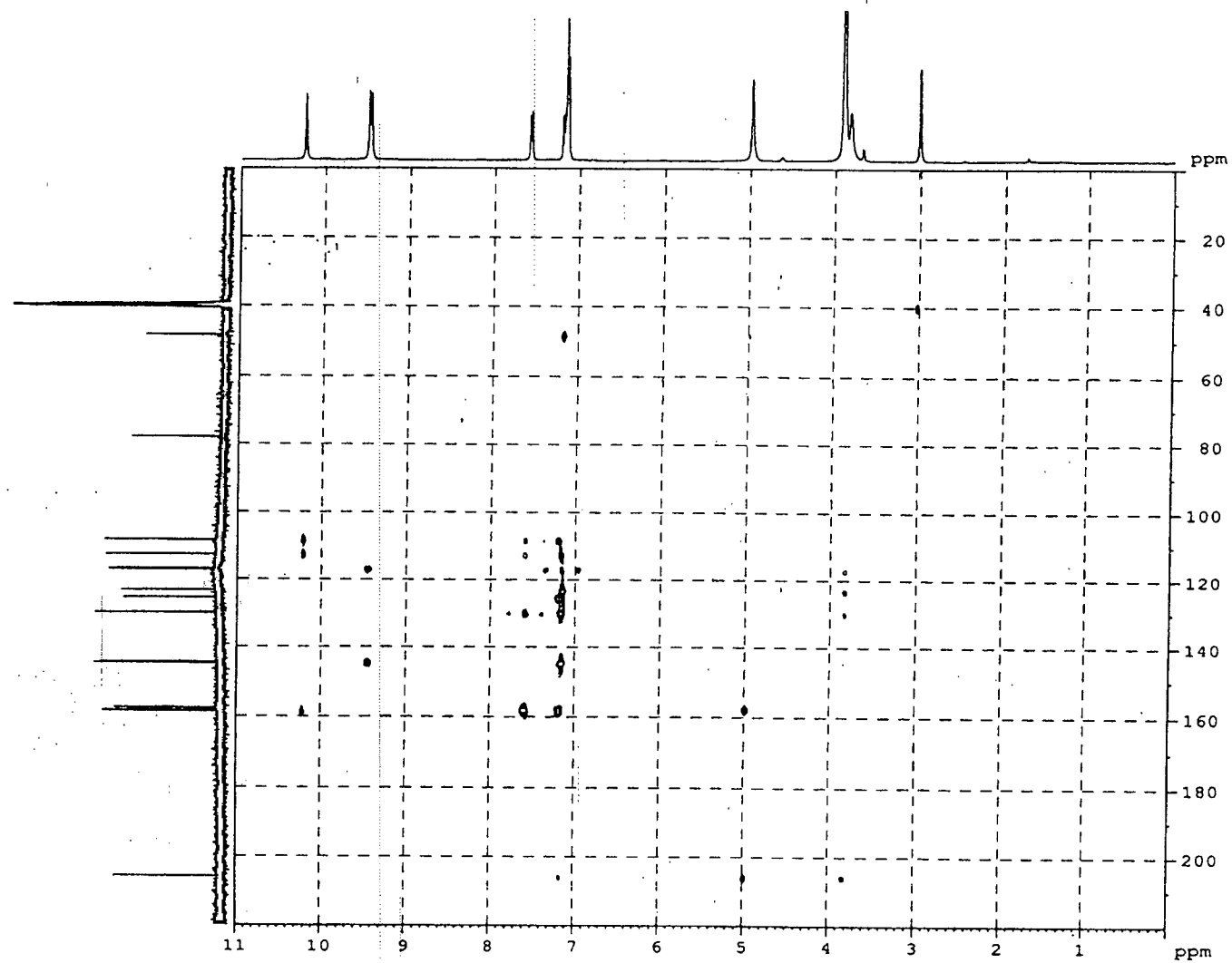


Figure 2d HMBC Spectrum of protosappanin A (25)

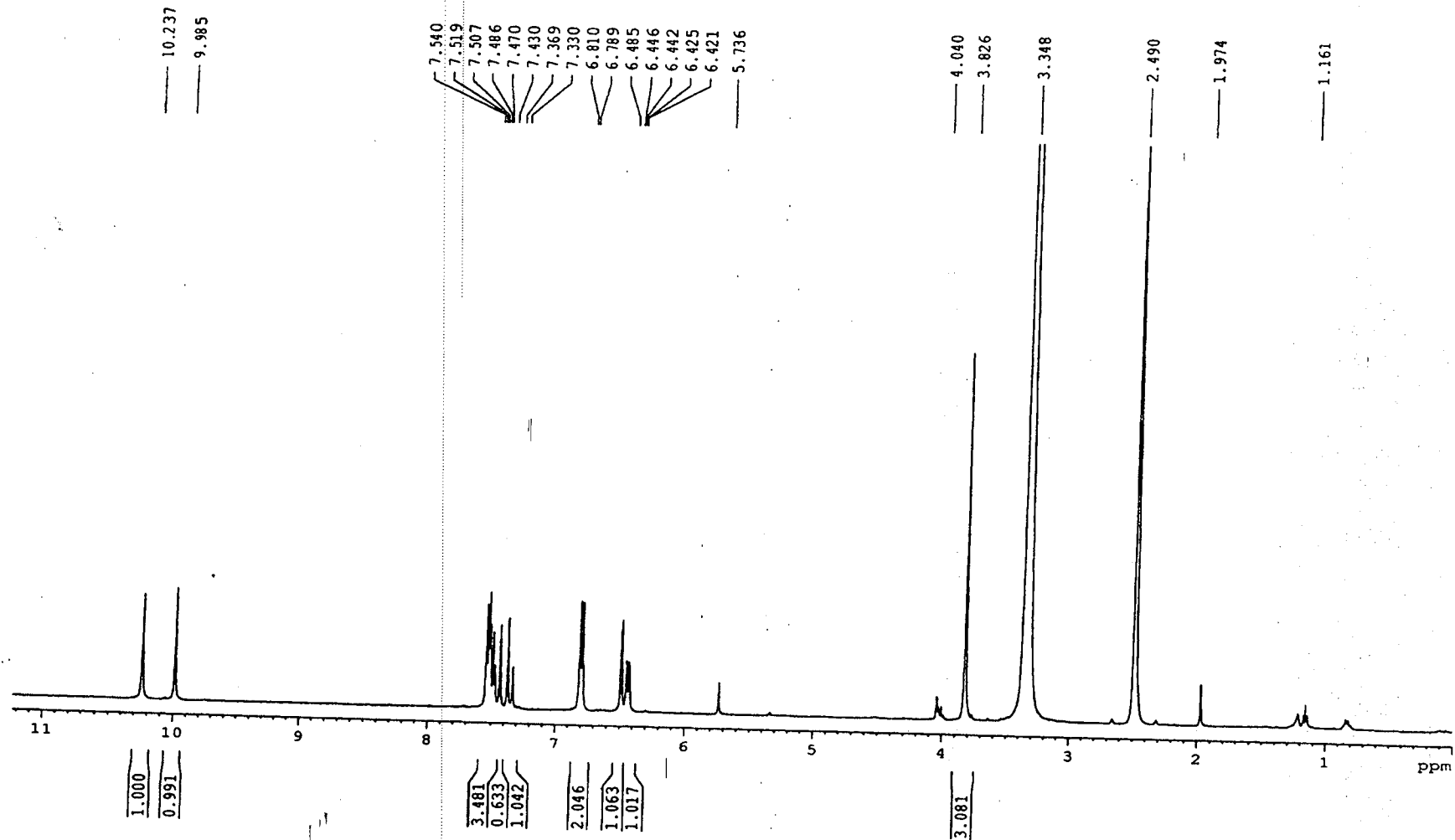


Figure 3 ^1H NMR Spectrum of 3-deoxysappanchalcone (26)

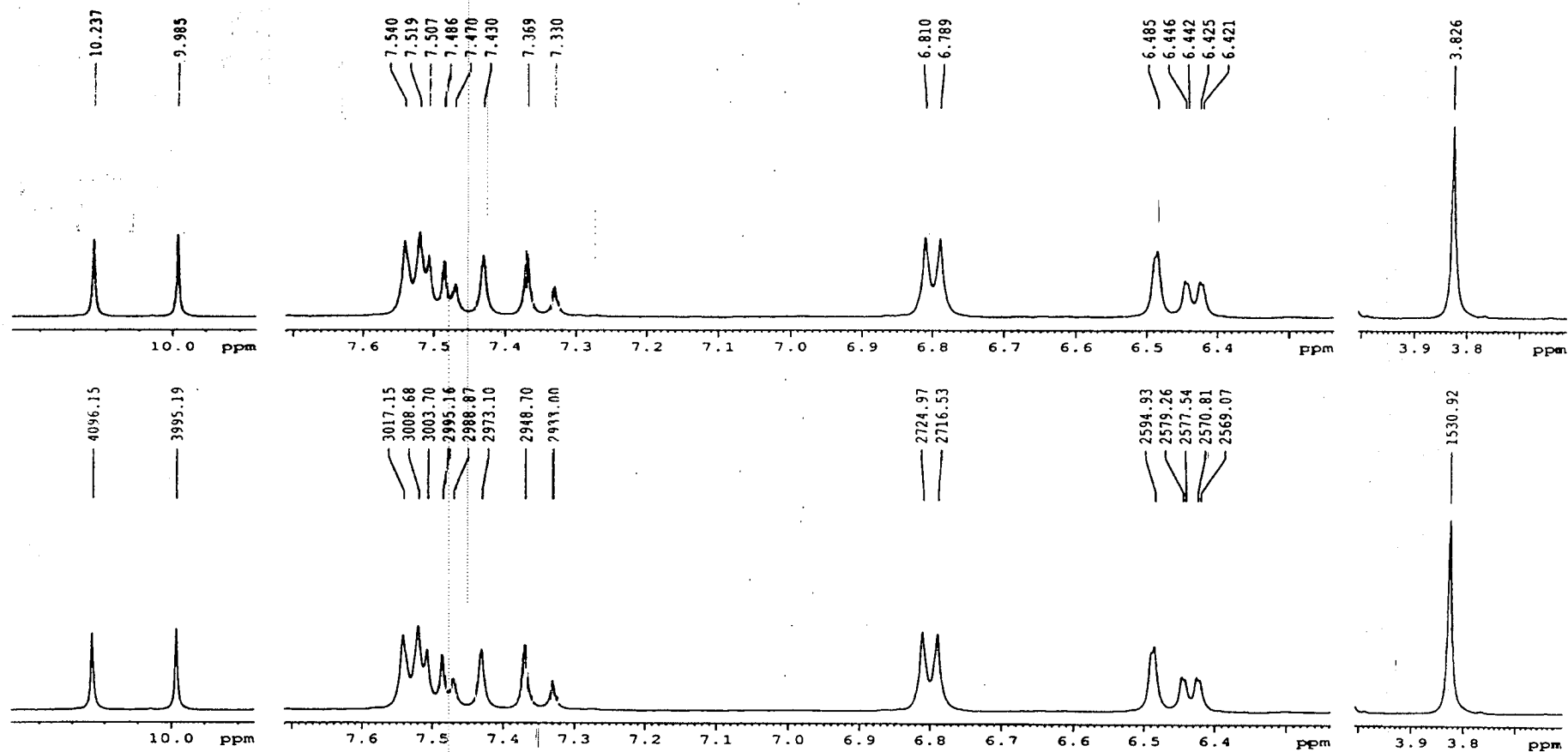


Figure 3a ^1H NMR Spectrum of 3-deoxysappanchalcone (26)

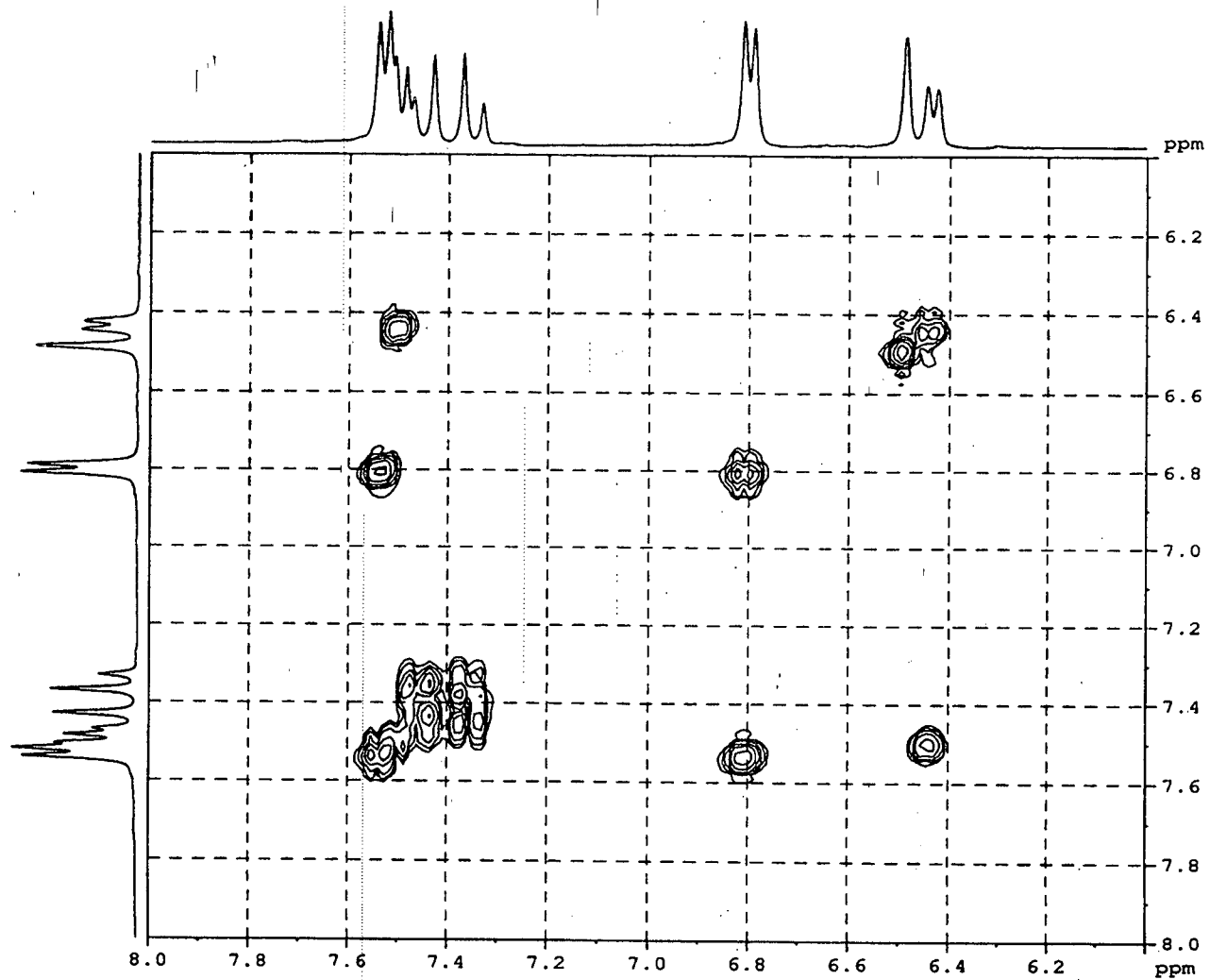
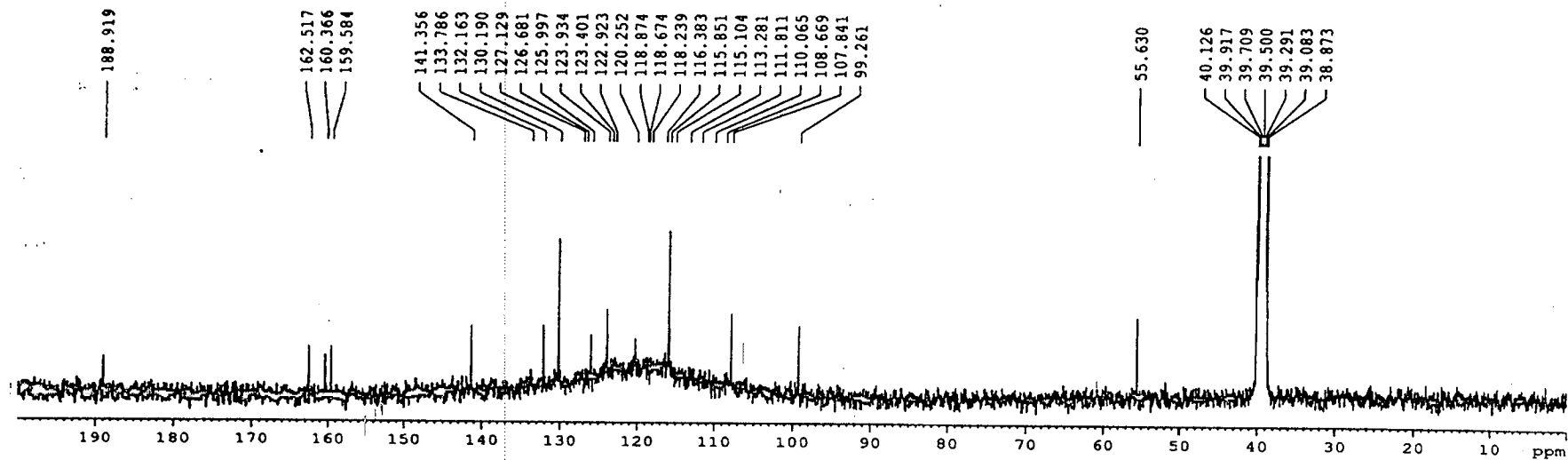


Figure 3b ^1H NMR Spectrum of 3-deoxysappanchalcone (26)



13C (jmod) CS-BC-(2)-48/2 in DMSO-d6

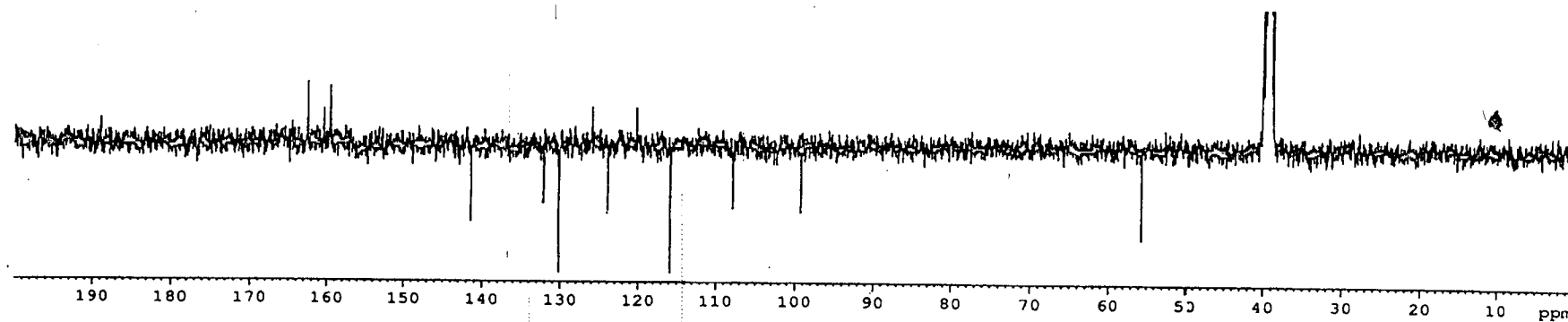


Figure 3c ^{13}C NMR Spectrum of 3-deoxysappanchalcone (26)

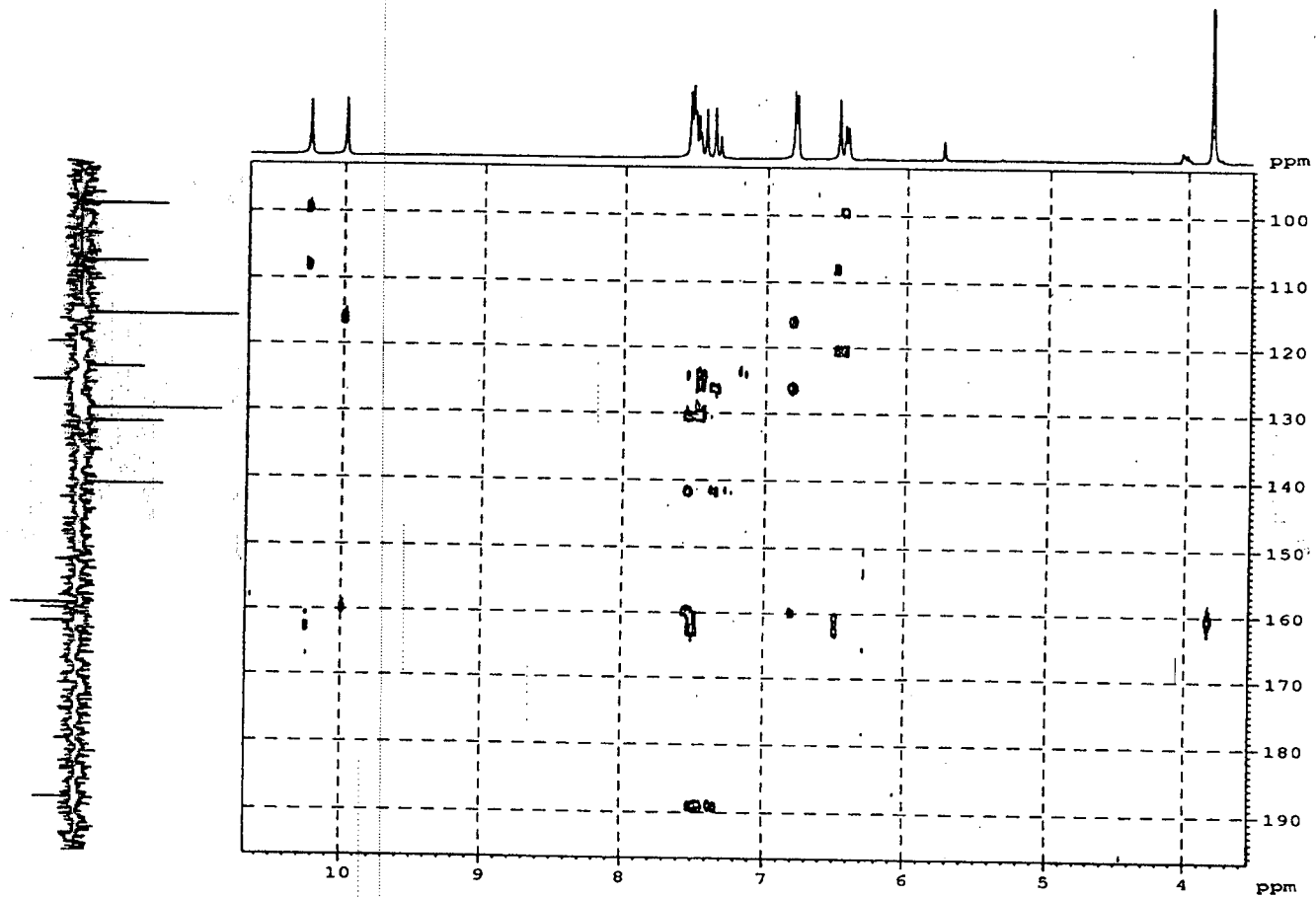


Figure 3d HMBC Spectrum of 3-deoxysappanchalcone (26)

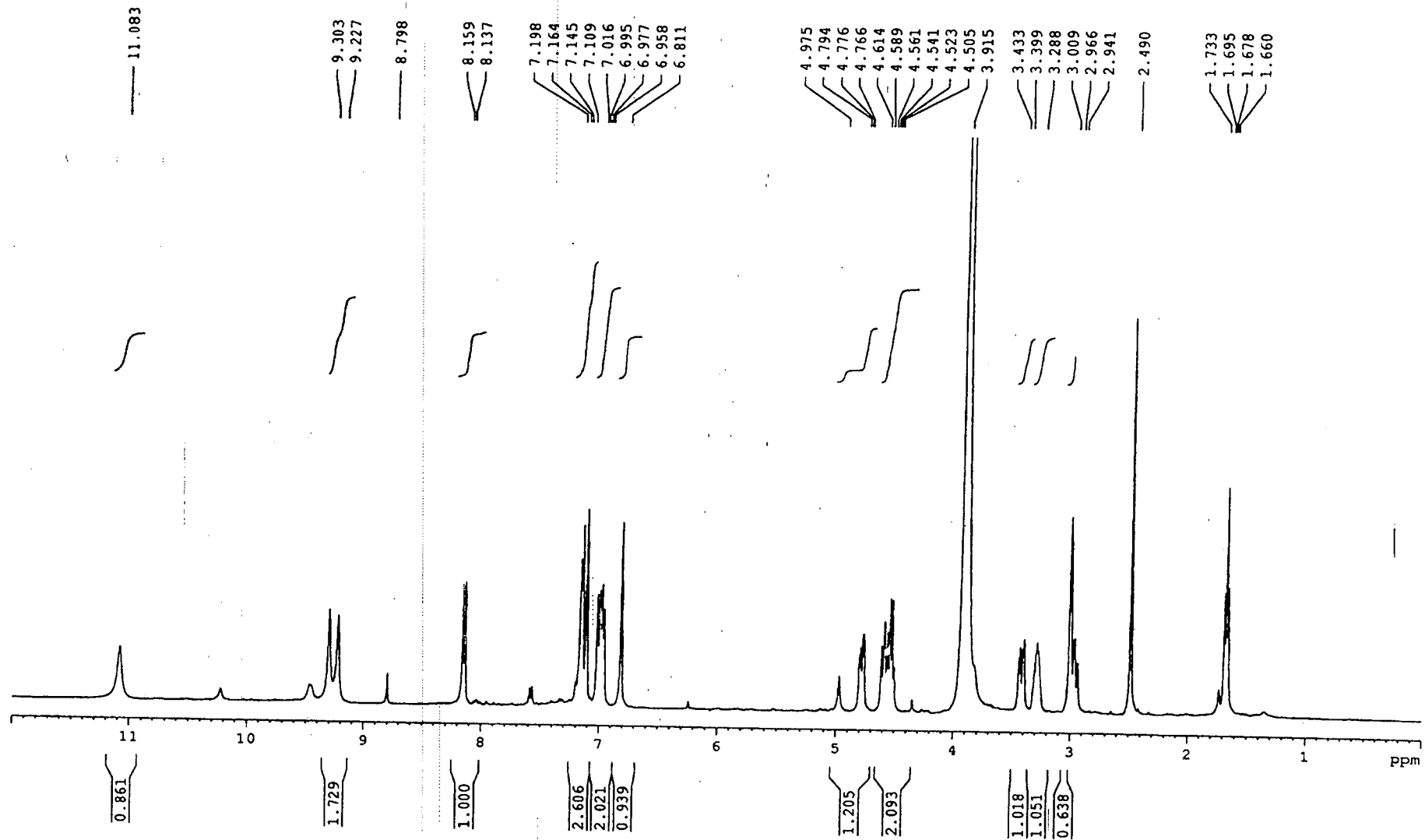


Figure 4 ^1H NMR Spectrum of 3-deoxysappanone B (27)

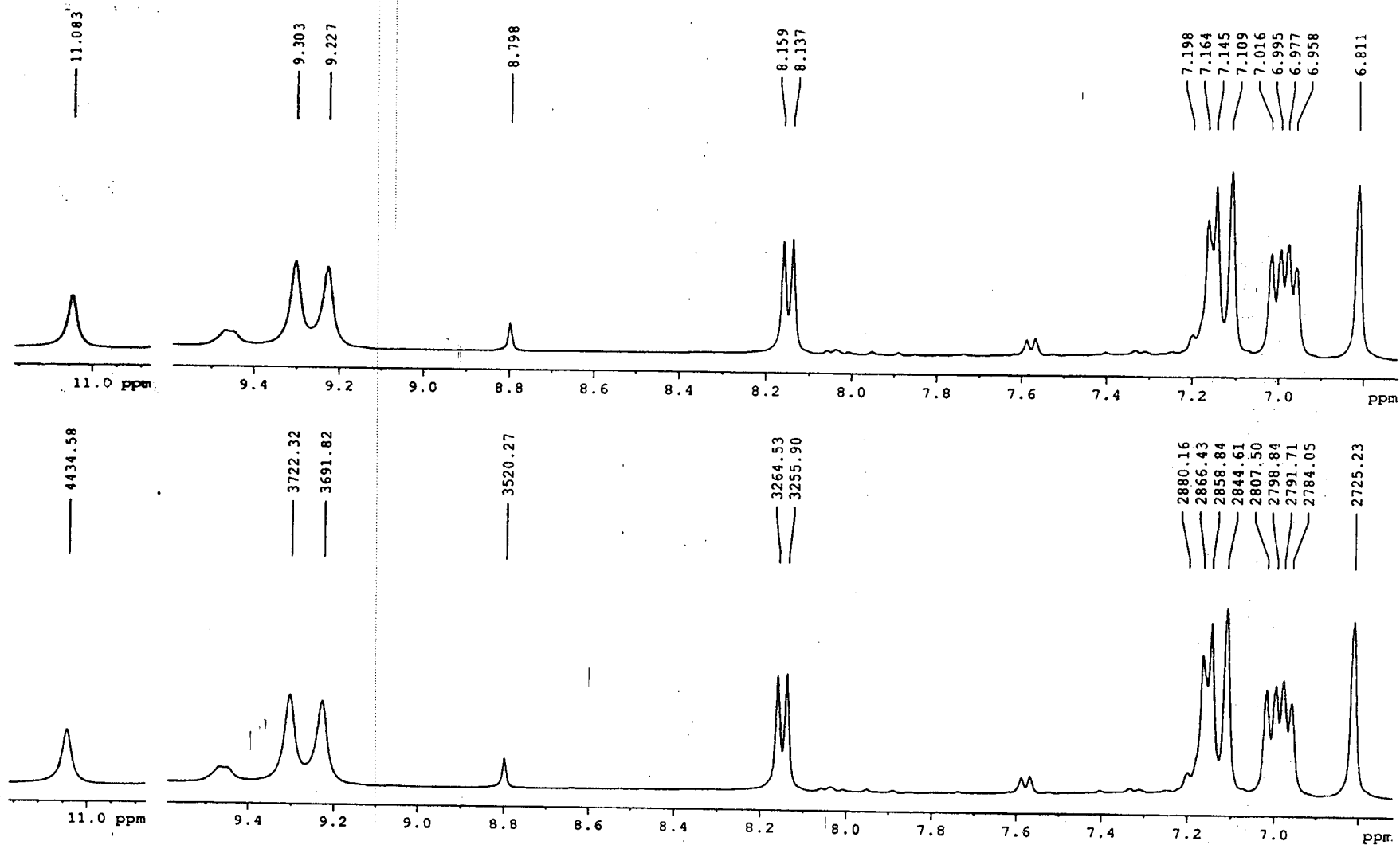


Figure 4a ^1H NMR Spectrum of 3-deoxysappanone B (27)

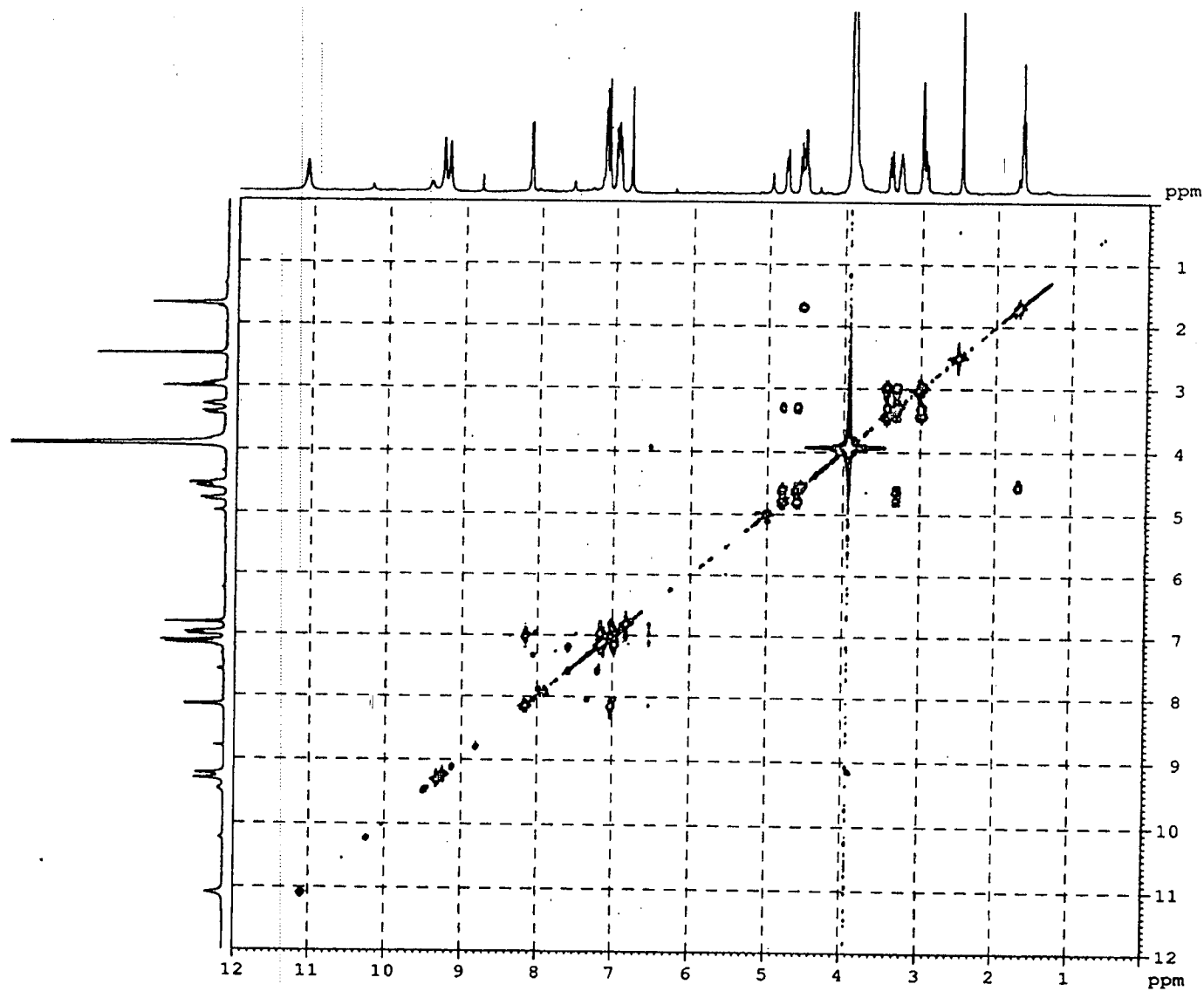
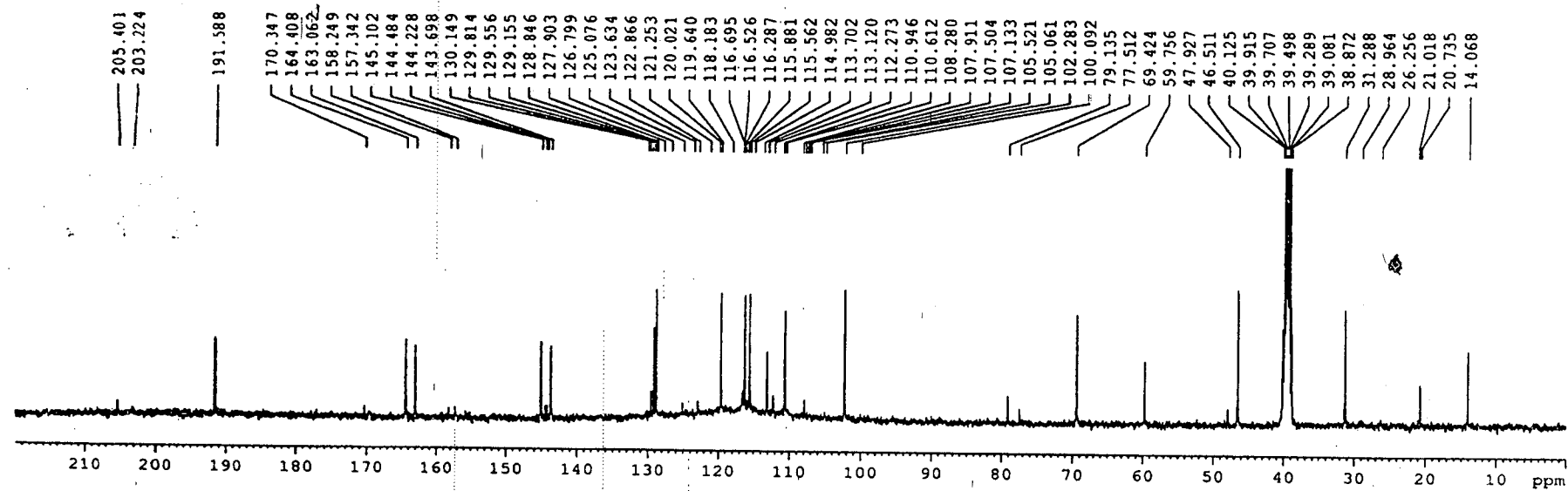


Figure 4b COSY Spectrum of 3-deoxysappanone B (27)



^{13}C (jmod) bc-(2)-47/5-15 in dms -d_6

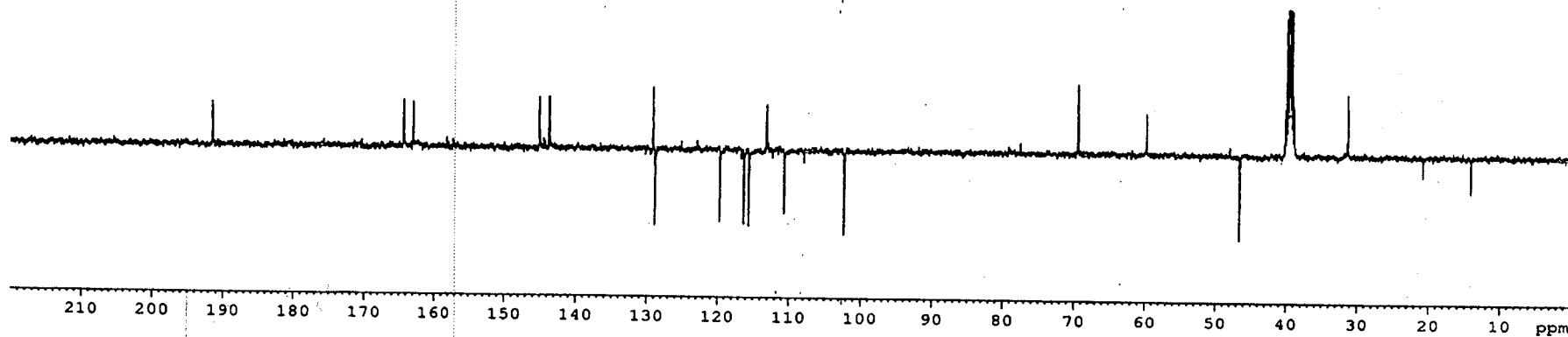


Figure 4c ^{13}C Spectrum of 3-deoxysappanone B (27)

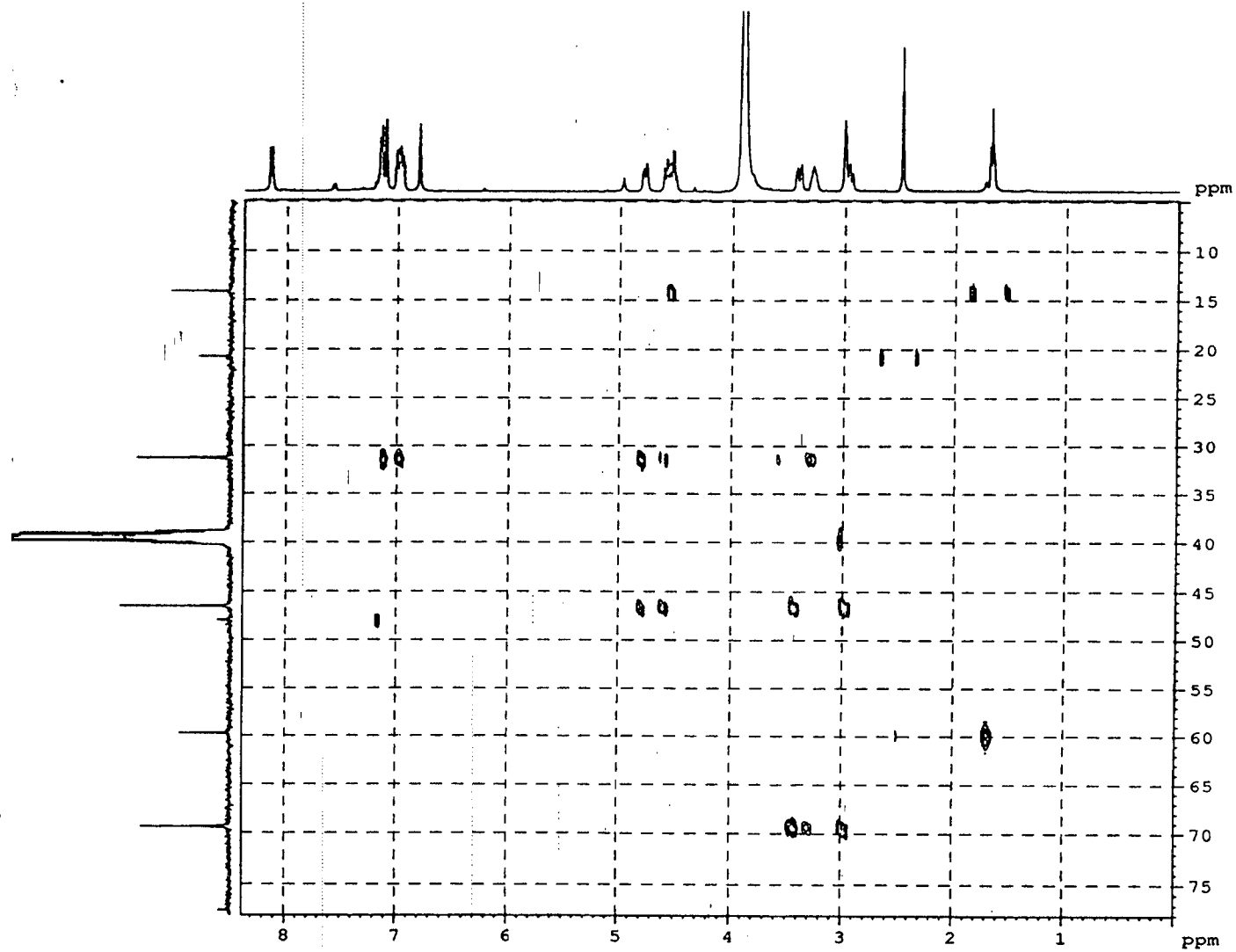


Figure 4d HMBC Spectrum of 3-deoxysappanone B (27)

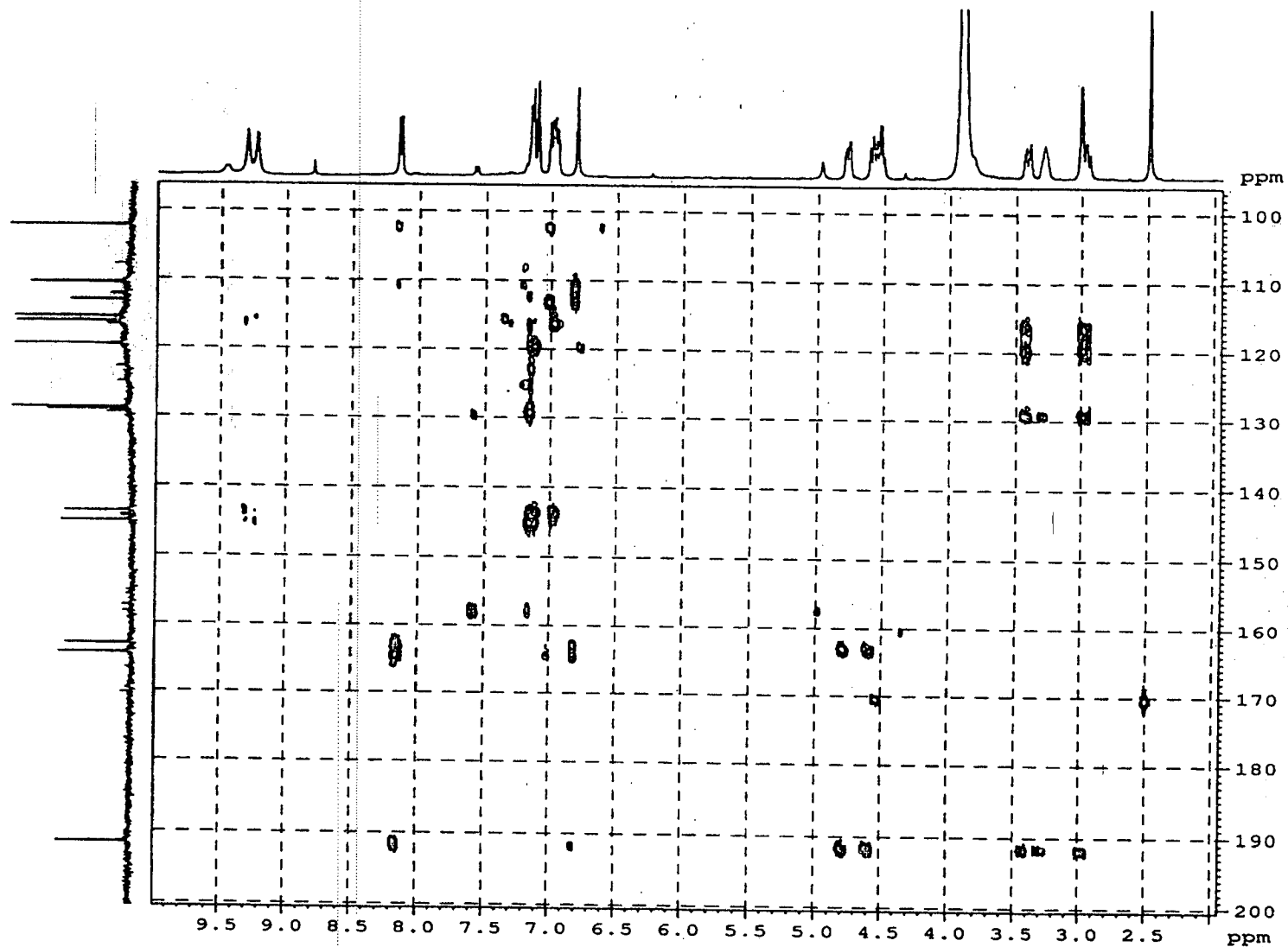


Figure 4e HMBC Spectrum of 3-deoxysappanone B (27)

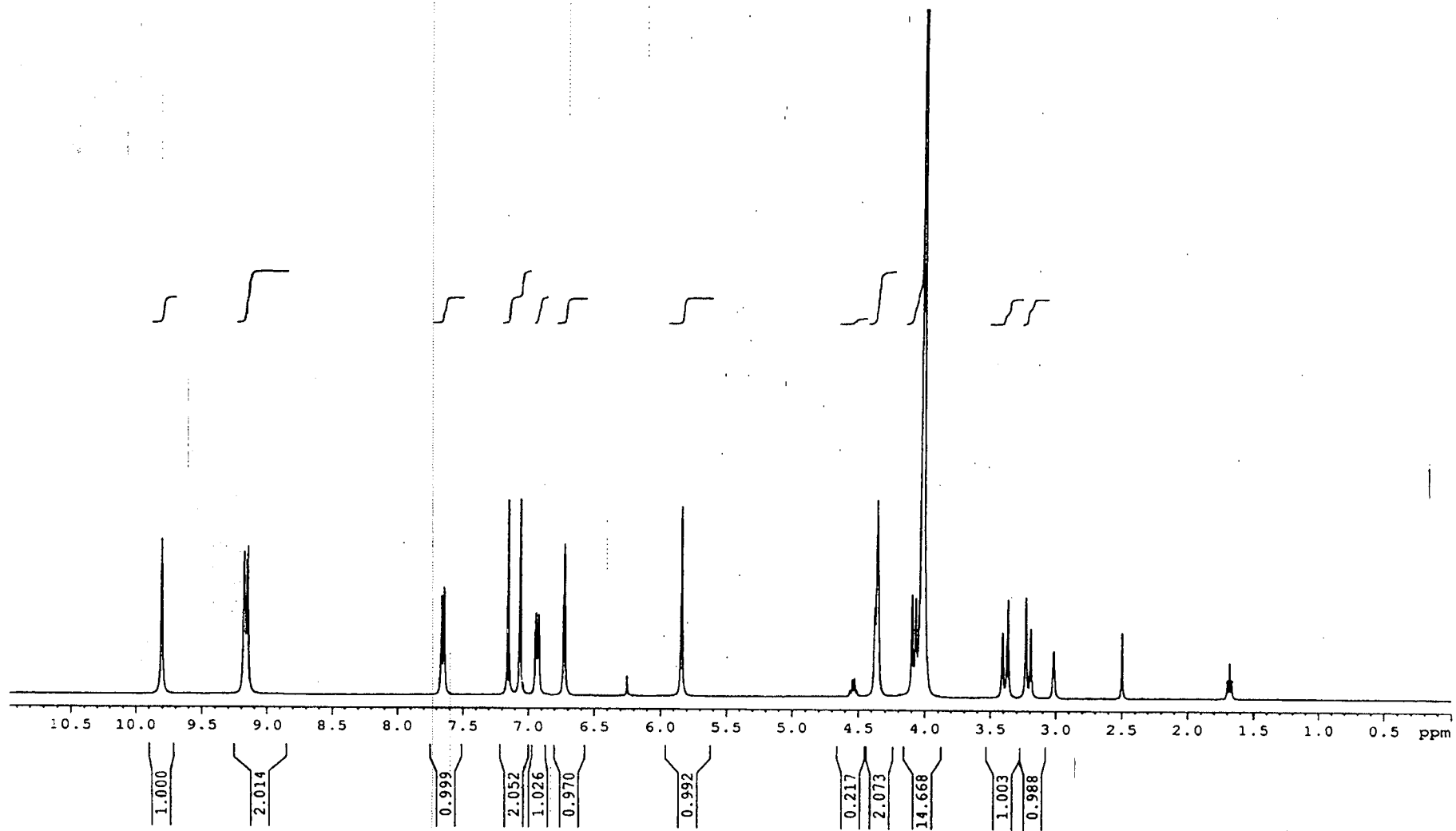


Figure 5 ^1H NMR Spectrum of brazilin (28)

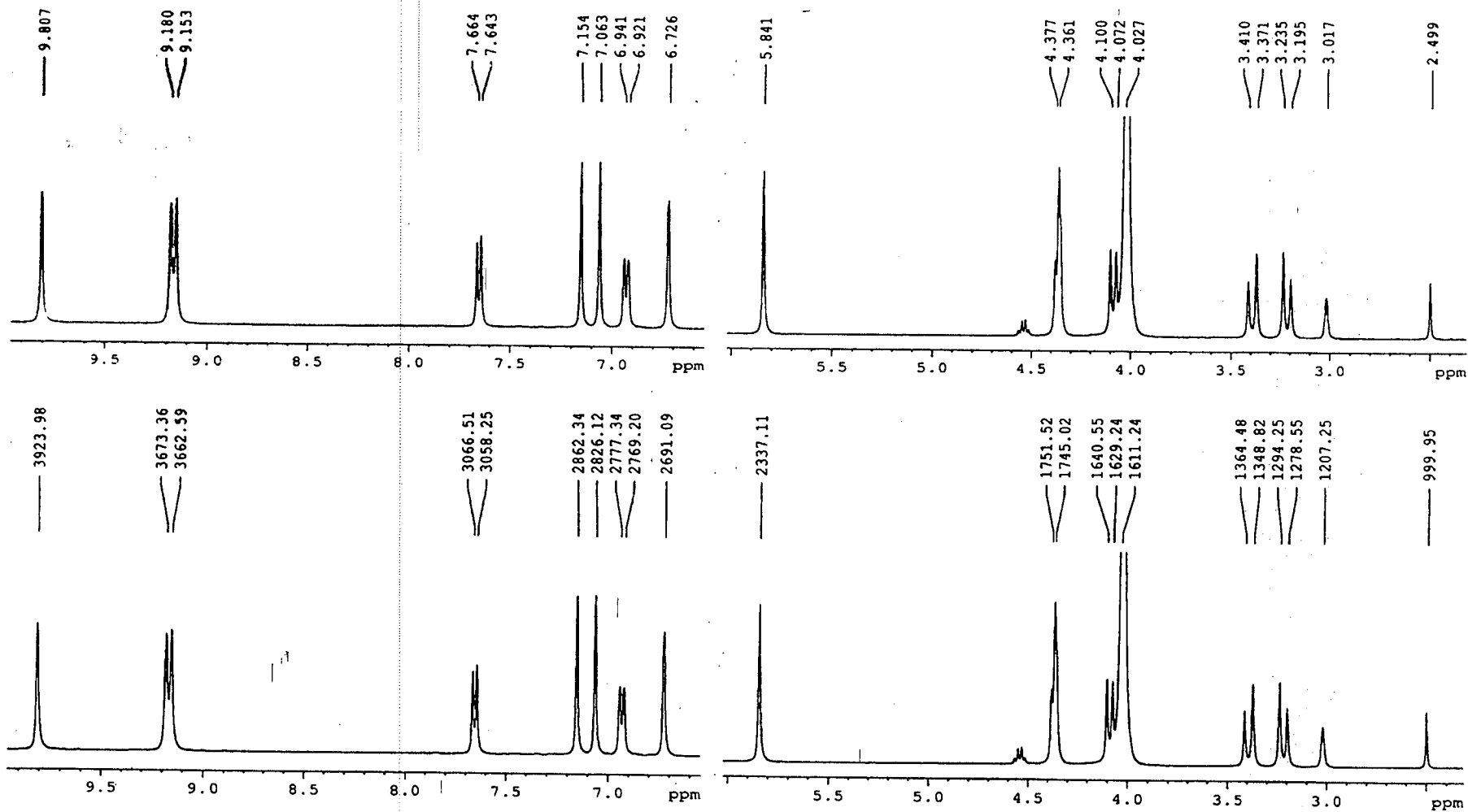
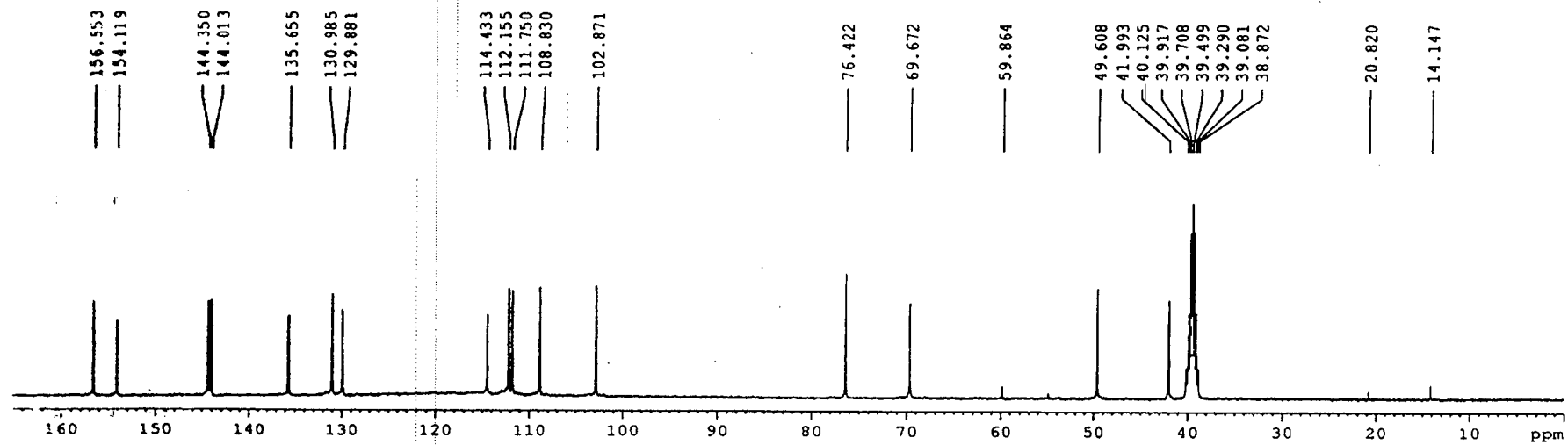


Figure 5a ^1H NMR Spectrum of brazilin (28)



¹³C (jmod) CS-bc-2-57/2 DMSO-d-6

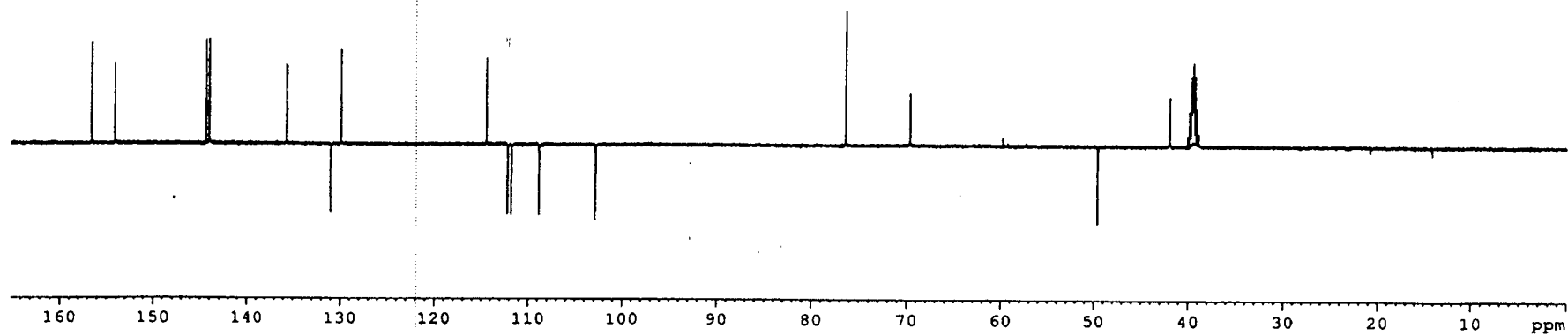


Figure 5b ¹³C NMR and Jmod Spectrum of brazilin (28)

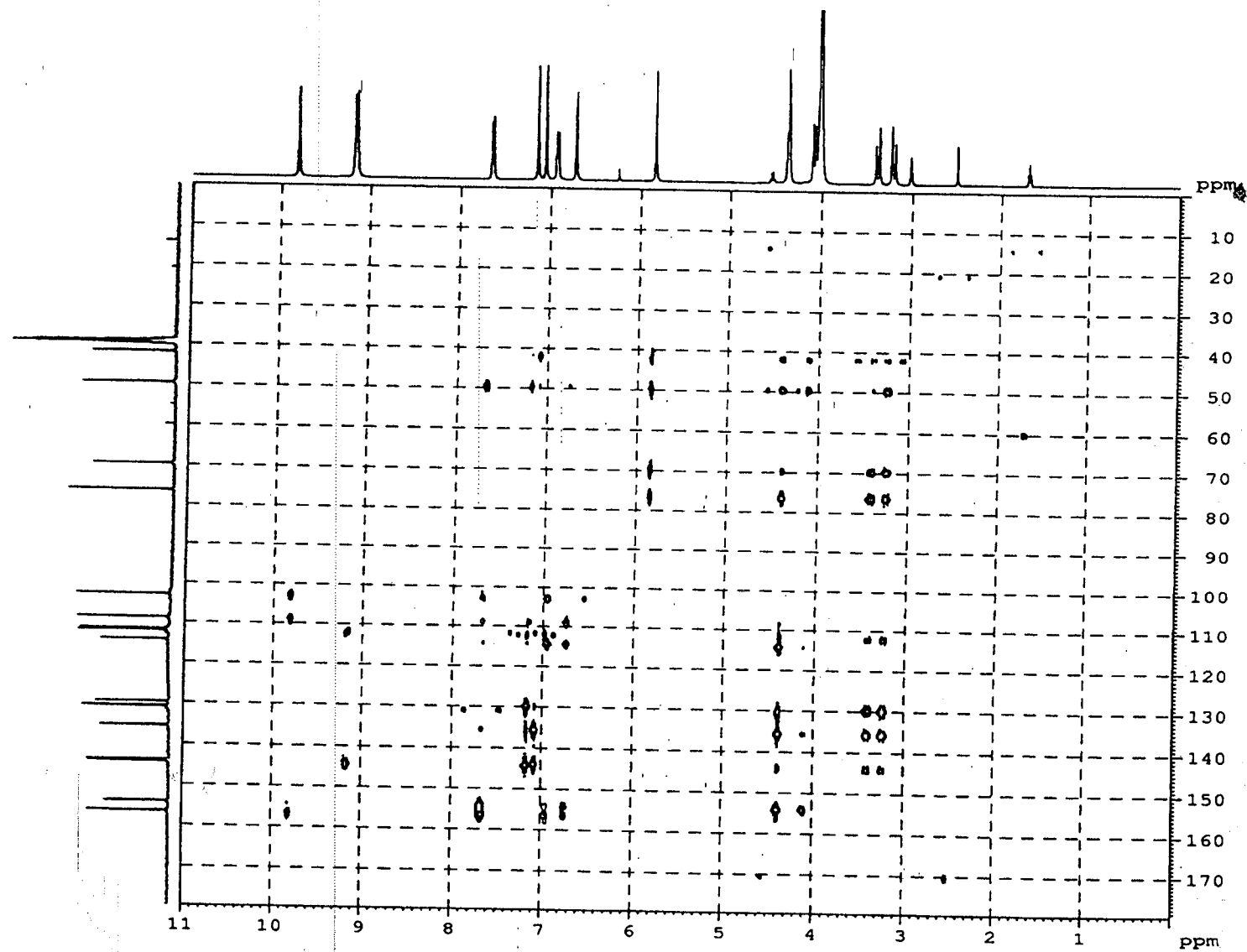


Figure 5c HMBC Spectrum of brazilin (28)

เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นเครื่องห้า (*Toddalia asiatica*)

บทนำ

1. คำนำ

พืชสกุล *Toddalia* จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae มีลักษณะเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง เลื้อยพาดพันอยู่บนพรรณไม้อื่นยาว 2-20 เมตร กิ่งก้านมีหนาม ใบประกอบแบบนิ้วมือ เรียงสลับ ใบย่อย 3 ใบ รูปขอบขนานแกมไข่กลับ กว้าง 1-2 ซม. ยาว 3-8 ซม. เนื้อใบมีจุดน้ำมันกระจาย ดอกช่อ ออกที่ปลายกิ่งและซอกใบ กลีบดอกสีเหลืองแกมเขียว ผลสรุปทรงกลม เมื่อสุกสีส้ม เป็นพืชที่ใช้เป็นยาแผนโบราณทั้งในเมืองไทย และประเทศอื่นๆหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศเคนยา กลุ่มชนหลายกลุ่มได้ใช้ในการรักษาโรคมalaria และโรคอื่นๆ ในทุกส่วนของพืชสกุลนี้ได้พบว่ามีคุณค่าทางยา โดยเฉพาะส่วนรากมีความเชื่อกันว่ามียุทธินทางยาสูง การใช้รากแช่กับสุราใช้ดื่มเพื่อรักษาโรคมalaria เรียกว่า แก้วไข่ และใช้รักษาโรคกระเพาะอาหาร สำหรับการรักษาโรคปวดฟันใช้รากเคี้ยวในขณะที่การใช้เพื่อระงับอาการไอจะใช้ส่วนที่เป็นผล^[1]

2. ความสำคัญและปัญหาที่ทำการวิจัย

จากการศึกษาวรรณกรรมทางเคมีของพืชสกุล *Toddalia* พบว่ามีสารที่เป็นองค์ประกอบมากมายที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ^[2] นอกจากนั้นพืชในสกุลนี้ได้ใช้เป็นยาแผนโบราณกันมาเป็นเวลานาน ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุลนี้โดยมุ่งหวังว่าอาจค้นพบสารตัวใหม่ๆที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

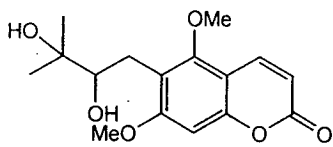
3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อสกัดแยก หาสูตร โครงสร้าง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเปลือกของ *Toddalia asiatica*

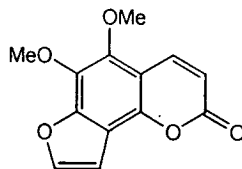
4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชในสกุล *Toddalia* ได้มีผู้ทำวิจัยในแง่พฤกษเคมีกันบ้างแล้วโดยได้ค้นพบสารประเภทคูมาริน ตัวอย่างเช่น Wing และคณะ^[3] ได้แยกสาร toddalolactone (1) จากเปลือก ต่อมาในปี ค.ศ. 1981 Wang และคณะ^[4] ได้ทำการแยกสารคูมารินจากเปลือก รากซึ่งได้ใช้เป็นยาแผน

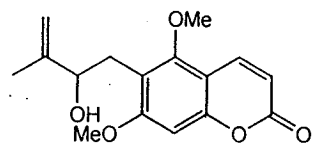
โบราณในการรักษา analgesic and antipyretic activity สามารถแยกสาร pimpinellin (2) และในปีเดียวกัน Sharma และคณะ^[5] ได้แยกสารคูมารินเพิ่มเติมอีก 2 ชนิดคือ toddaol (3) และ toddanone (4) จากรากของพืชสกุล toddalia สองปีต่อมาได้มีนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นคือ Ishii และคณะ^[6] ได้แยกสารคูมารินตัวใหม่คือ toddalenone (5) ในปี ค.ศ. 1990 Tan และคณะ^[7] ได้แยกสารคูมารินจากรากของพืชสกุลนี้โดยใช้วิธีการสกัดแบบ supercritical fluid extraction สามารถแยกสารอนุพันธ์ของ toddalolactone (6) และ aculeatin (7) ในปีต่อมานักวิจัยกลุ่มเดียวกัน^[8] ได้ใช้วิธี supercritical fluid and Soxhlet extraction สามารถแยกสารประกอบหลักได้คือ toddalolactone (8) สารประกอบดังกล่าวอาจเป็นสาร artifact ที่เกิดขึ้นจากขั้นตอนของการสกัดแยก สารประเภทคูมารินบางชนิดสามารถยับยั้งเชื้อมาลาเรียได้ เช่น 5,7-dimethoxy-8-(3'-hydroxy-3'-methyl-1'-butene)-coumarin (9) การค้นพบนี้ช่วยยืนยันการใช้พืชชนิดนี้ในการรักษาโรคมาลาเรียในสมัยโบราณ^[9]



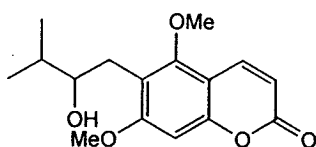
(1)



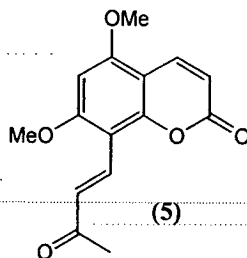
(2)



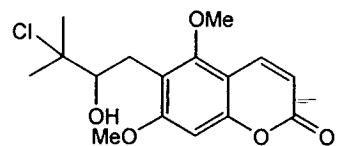
(3)



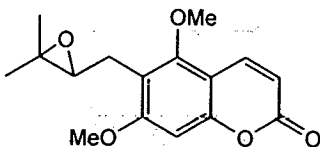
(4)



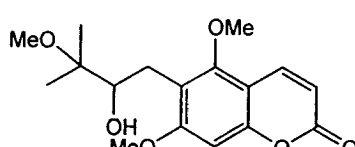
(5)



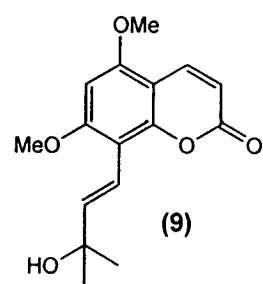
(6)



(7)

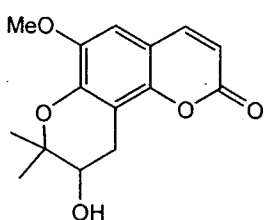


(8)

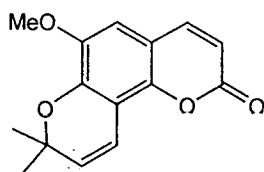


(9)

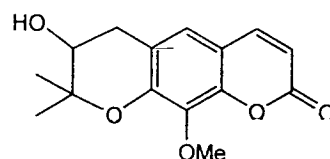
จากการศึกษาเนื้อไม้ของพืชสกุล *Toddalia* สามารถแยกสารได้ 30 ชนิด นับตั้งแต่ สารคูมาริน อัลคาลอยด์ สารประเภท benzoquinone และสารประเภทอะมีน โดยเฉพาะสาร cyclohexylamine เป็นการแยกครั้งแรกจากธรรมชาติ และจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า มีสาร 7 ชนิดที่ยับยั้งการเจริญตัวของเชื้อราในหลอดทดลอง^[10] สารในกลุ่มประเภทคูมาริน ได้แก่ toddanin (10), braylin (11) และ amottianin (12)



(10)

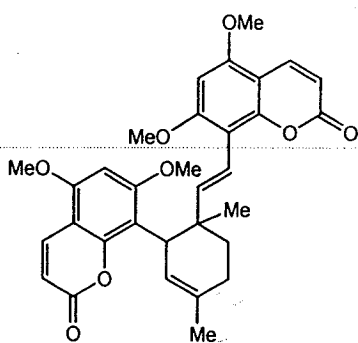


(11)

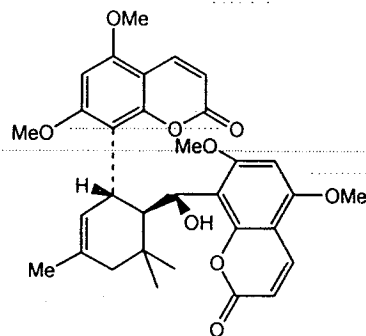


(12)

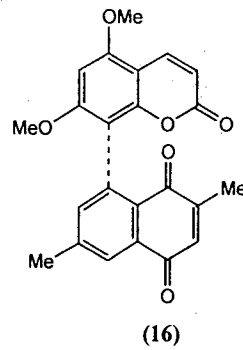
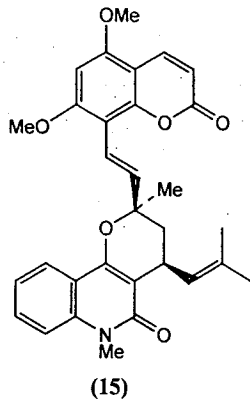
สารประเภทไดเมอร์ของคูมาริน toddasin (13) สามารถแยกได้จากรากของพืชสกุล *Toddalia* โดย Sharma และคณะ^[11] นอกจากนั้นสารประเภท biscoumarin เช่น toddalosin (14) พบในพืชสกุลนี้โดยนักวิจัยจากประเทศญี่ปุ่นนำโดย Ishii และคณะ^{3,2,6 [12]} โครงสร้างของสารสามารถยืนยันได้โดยใช้เทคนิคทาง X-ray นอกจากนั้นสารในกลุ่มไดเมอร์ toddacomalone (15) และ toddacomaquinone (16) ก็สามารถแยกได้เพิ่มจากพืชในสกุลนี้^[13]



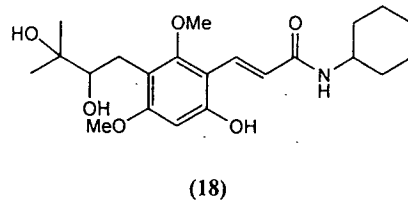
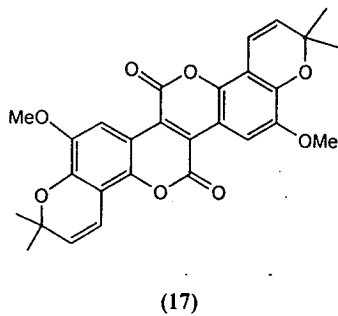
(13)



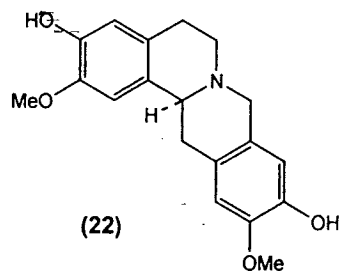
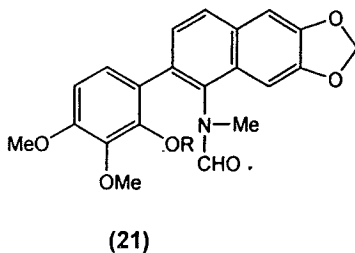
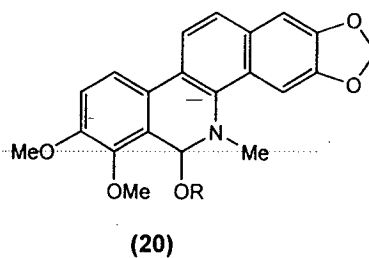
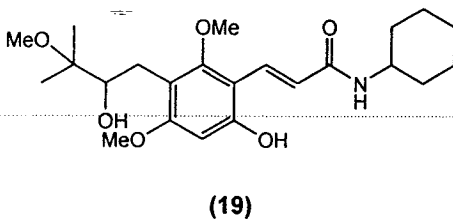
(14)



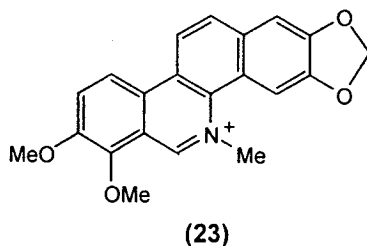
การศึกษาเนื้อไม้ของรากพบว่ามีการพบสารในกลุ่มโคเมอร์ของคูมาริน toddasiatin (17) และสารในกลุ่ม *N*-cyclohexylamide ซึ่งมีชื่อเรียกว่า toddaliamide (18) และ methyltoddaliamide (19) โดยที่สารในกลุ่มนี้เป็นสารกลุ่มแรกที่สามารถแยกได้จากธรรมชาติ^[14]



8-Hydroxydihydrochelyerythrine (20) และ arnottianamide (21) แยกได้จากรากของพืชในสกุล toddalia โดย Sharma และคณะ^[15]



สารในกลุ่ม tetrahydroprotoberberine ซึ่งเป็นสารตัวใหม่แยกได้จากพืชในสกุลนี้คือ (-)-isocoreximine (22) สารในกลุ่มอัลคาลอยด์ที่แยกได้จากพืชสกุล *Toddalia* ในประเทศเคนยา ปรากฏว่าพบสาร nitidine (23) เป็นส่วนประกอบหลักซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองได้ 50% โดยได้ใช้ทดสอบกับเชื้อ *Plasmodium falciparum* ในช่วงของความเข้มข้นที่ 9-108 ng/ml ยิ่งไปกว่านั้นสาร nitidine (23) ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อ HIV ได้ในระดับของความเข้มข้นที่ 1-10 ng/ml^[16]



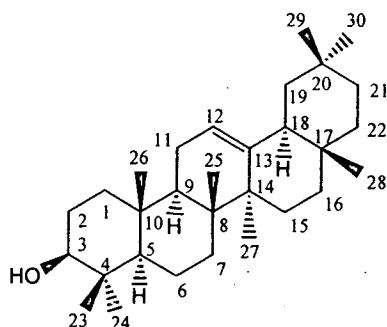
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการนำส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลของเปลือกต้นเครือทุเห่า (*Toddalia asiatica*) มาแยกโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบต่างๆสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 7 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลจาก IR NMR (1D และ 2D) และ MS สเปกตรัม พบว่าสาร [3.2.6(24)] เป็นสาร triterpenoid ชื่อ α -amyrin อีก 6 ชนิดเป็นสารในกลุ่ม คูมาริน และอนุพันธ์ [3.2.6(25)]- [3.2.6(30)]

สาร triterpenoid [3.2.6(24)] มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนคลื่นแสงของหมู่ไฮดรอกซิลที่ 3416 cm^{-1} จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมพบว่ามีสัญญาณของ methyl proton อยู่ 8 กลุ่มที่ δ 0.77 (3H, s, Me), 0.81 (3H, s, Me), 0.85 (6H, s, 2xMe) 0.92 (3H, s, Me) 0.95 (3H, s, Me), 0.98 (3H, s, Me) และ 1.10 (3H, s, Me) จาก $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมพบว่ามี 30-คาร์บอนซึ่งเป็นสัญญาณสัญญาณของกลุ่ม methyl 8 กลุ่ม, methylene 10 กลุ่ม, methine 5 กลุ่มและ non-protonated 5 กลุ่ม จากการพบสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ ที่ δ 5.16 (1H, bs, =CH) และ สัญญาณของ olefinic carbon ที่ δ 121.8 และ 145.2 ทำให้ทราบว่าโครงสร้างของสารน่าจะเป็น triterpenoid แบบ taraxer-14-en-skeleton หรือ taraxer-12-en-skeleton^[3.2.6(17)] นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอนของ methine ที่ δ 3.20 (1H, dd, $J=3.6, 12\text{ Hz}$, CH-3) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสัญญาณโปรตอนของ methine ที่อยู่ติดกับหมู่

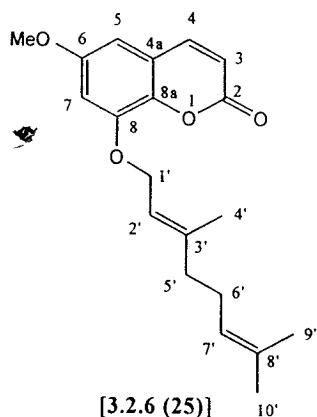
OH จากข้อมูลข้างต้นนี้บ่งบอกว่า เป็นสารประเภท triterpenoid และมีลักษณะใกล้เคียงกับสาร

□-amyrin [3.2.6(18)]



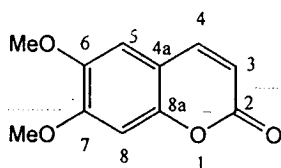
3.2.6 (24)

สารคูมาริน [3.2.6(25)] มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลือง IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนคลื่นแสงของหมู่ คาร์บอนิล ของ □□□-unsaturated ที่ 1736 cm^{-1} และ หมู่ อะโรมาติกที่ $1592, 1478\text{ cm}^{-1}$ จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมพบว่ามีสัญญาณของ methyl proton อยู่ 3 กลุ่มที่ □□ 1.54 (3H, s, 9'-Me), 1.62 (3H, s, 10'-Me) และ 1.64 (3H, s, 4'-Me) สัญญาณของ กลุ่ม methoxy ที่ □ 4.15 (3H, s, OMe) เพียง 1 กลุ่ม จาก $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมพบว่ามี 20-คาร์บอน ซึ่งเป็นสัญญาณสัญญาณของกลุ่ม methyl 3 กลุ่ม, methylene 3 กลุ่ม, methine 6 กลุ่มและ non-protonated 7 กลุ่ม สัญญาณของ กลุ่ม methylene 3 กลุ่ม ที่ □□ 1.98 (4H, m, 5'-CH₂ and 6'-CH₂) และ 4.58 (2H, d, $J=7.1\text{ Hz}$, 1'-CH₂), สัญญาณของกลุ่ม methine 2 กลุ่มที่ □□ 4.99 (2H, m, 7'-CH₂) และ 5.57 (1H, t, $J=7.1\text{ Hz}$, 2'-CH) นอกจากนั้นยังพบสัญญาณของ aromatic proton 2 ชุดที่ □□ 6.96 (1H, d, $J=2.1\text{ Hz}$, H-5) และ 7.59 (1H, d, $J=2.1\text{ Hz}$, H-7) มีลักษณะเป็น doublet จาก splitting pattern และค่า coupling constant ของ aromatic protons แสดงว่าเป็น 1,3-disubstituted benzene นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอนของ □□□-unsaturated ketone ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารประเภทคูมารินที่ □□ 6.25 (1H, d, $J=9.8\text{ Hz}$, H-3) และ 8.12 (1H, d, $J=9.8\text{ Hz}$, H-4) จากข้อมูลข้างต้นนี้บ่งบอกว่า เป็นสารประเภทคูมารินที่มีหมู่แทนที่บนวง aromatic ที่ตำแหน่ง 6 หรือ 8 โดยที่กลุ่ม methoxy และกลุ่ม side chain อาจอยู่ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งที่กล่าวมา



[3.2.6 (25)]

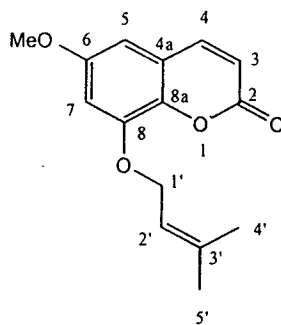
สารคูมาริน [3.2.6(26)] มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง เหลือง IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนคลื่นแสงของหมู่ คาร์บอนิล ของ $\square\square\square$ -unsaturated ที่ 1718 cm^{-1} และ หมู่ อะโรมาติกที่ $1594, 1479\text{ cm}^{-1}$ จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมพบว่ามีสัญญาณของกลุ่ม methoxy จำนวน 2 กลุ่มที่ $\square\square 4.15$ (6H, s, 6-OMe and 7-OMe) นอกจากนั้นยังพบสัญญาณของ aromatic 2 ตัวที่ $\square\square 6.97$ (1H, *d*, $J = 1.5\text{ Hz}$, H-5), 7.60 (1H, *d*, $J = 1.5\text{ Hz}$, H-8) จาก splitting pattern และค่า coupling constant ของ aromatic protons แสดงว่าเป็น 1,4-disubstituted benzene นอกจากนั้นยังพบสัญญาณโปรตอนของ $\square\square\square$ -unsaturated ketone ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารประเภทคูมารินที่ 6.26 (1H, *d*, $J = 9.8\text{ Hz}$, H-3) และ 8.10 (1H, *d*, $J = 9.8\text{ Hz}$, H-4) จาก ESIMS พบค่า $m/z\ 229$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ จากข้อมูลที่ได้แสดงว่าเป็นสารกลุ่มของคูมารินที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสาร [3.2.6(26)].



[3.2.6 (26)]

สารคูมาริน [3.2.6(27)] มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนคลื่นแสงของหมู่ คาร์บอนิล ของ $\square\square\square$ -unsaturated ที่ 1739 cm^{-1} และ หมู่ อะโรมาติกที่ $1606, 1477\text{ cm}^{-1}$ จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมพบว่ามีสัญญาณของ methyl proton อยู่ 2 กลุ่มที่ $\square\square 1.63$ (3H, s, 4'-Me) และ 1.71 (3H, s, 5'-Me) สัญญาณของกลุ่ม methoxy จำนวน 1 กลุ่มที่ $\square\square 4.15$ (3H, s, 7-OMe) นอกจากนั้นยังพบสัญญาณของ methylene proton ที่ $\square\square 4.82$

(2H, *d*, $J = 7.2$ Hz, 1'-CH₂) มีลักษณะเป็น doublet จาก splitting pattern และค่า coupling constant แสดงว่ามี proton ข้างเคียงเพียงหนึ่งตัวซึ่งแสดงให้เห็นว่าจะต้องอยู่ใกล้กับสัญญาณของ proton ที่ δ 5.58 (1H, *t*, $J = 7.2$ Hz, 2'-CH) สัญญาณที่เหลืพบว่ามีสัญญาณของ aromatic 2 กลุ่มที่ δ 6.96 (1H, *d*, $J = 2$ Hz, 5-ArH) และ 7.59 (1H, *d*, $J = 2$ Hz, 7-ArH) จาก splitting pattern และค่า coupling constant แสดงให้ทราบว่าเป็นสัญญาณของ aromatic ที่มีการ coupling proton ข้างเคียงเพียงหนึ่งตัวและเกาะอยู่ในตำแหน่งที่เป็น 1 กับ 3 ของวงอะโรมาติก นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอนของ $\square\square\square$ -unsaturated ketone ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ สารประเภทคูมารินที่ δ 6.24 (1H, *d*, $J = 9.6$ Hz, H-3) และ 8.10 (1H, *d*, $J = 9.6$ Hz, H-4) มีลักษณะเป็น doublet จากข้อมูลที่ได้แสดงว่าเป็นสารกลุ่มของคูมารินที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับ สาร [3.2.6(27)] แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลที่มีอยู่ยังไม่เพียงพอที่จะยืนยัน โครงสร้างได้อย่างแน่นอน ต้องรอผลยืนยันโครงสร้างจากข้อมูลสเปกโตรสโกปีอื่นๆ (MS).

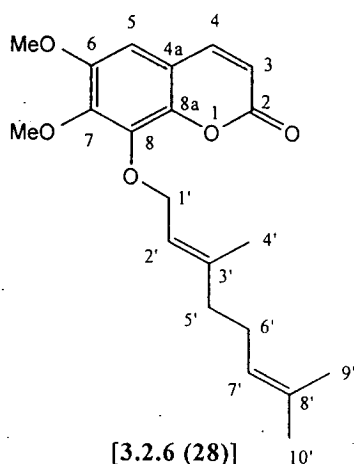


[3.2.6 (27)]

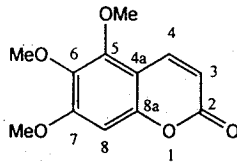
สารคูมาริน [3.2.6(28)] มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืน คลื่นแสงของหมู่ คาร์บอนิล ของ $\square\square\square$ -unsaturated ที่ 1729 cm^{-1} และ หมู่อะโรมาติกที่ $1604, 1504\text{ cm}^{-1}$ จาก ¹H-NMR สเปกตรัมพบว่ามีสัญญาณของ methyl proton อยู่ 3 กลุ่มที่ δ 1.55 (3H, *s*, 9'-Me), 1.56 (3H, *s*, 10'-Me), 1.65 (3H, *s*, 4'-Me), 2.00 (4H, *m*, 5'-CH₂ and 6'-CH₂) สัญญาณของกลุ่ม methoxy ที่ δ 3.89 (3H, *s*, 6-OMe) และ 3.93 (3H, *s*, 7-OMe) 2 กลุ่ม สัญญาณของ กลุ่ม methylene 3 กลุ่ม ที่ δ 2.00 (4H, *m*, 5'-CH₂ and 6'-CH₂) 4.58 (2H, *d*, $J=7.1$ Hz, 1'-CH₂) สัญญาณของ กลุ่ม methine 2 กลุ่มที่ δ 4.58 (2H, *m*, 7'-CH₂) และ 5.56 (1H, *t*, $J = 7.1$ Hz, 2'-CH) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ aromatic proton 1 ชุดที่ δ 6.13 (1H, *s*, H-5) จาก splitting pattern ของ aromatic protons แสดงว่าเป็นสัญญาณของ aromatic proton ที่ไม่มีหมู่ proton ข้างเคียง เนื่องจากมี splitting pattern มีลักษณะเป็น singlet

ซึ่งน่าจะเป็นสัญญาณของ aromatic proton ตำแหน่งที่ 5 นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอนของ $\square\square\square$ -unsaturated ketone ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารประเภทคูมารินที่ $\square\square$ 6.31 (1H, $d, J = 9.7$ Hz, H-3) และ 7.95 (1H, $d, J = 9.7$ Hz, H-4) จาก ESIMS พบค่า m/z 381.2 (M+Na)⁺

จากข้อมูลข้างต้นนี้บ่งบอกว่าเป็นสารประเภทคูมารินที่มีโครงสร้างคล้ายกับสารคูมาริน [3.2.6(28)] อย่างไรก็ตามข้อมูลที่มีอยู่ยังไม่เพียงพอที่จะยืนยันโครงสร้างได้อย่างแน่นอน ต้องรอผลยืนยันโครงสร้างจากข้อมูลสเปกโทรสโกปีอื่นๆ (¹³C-NMR).

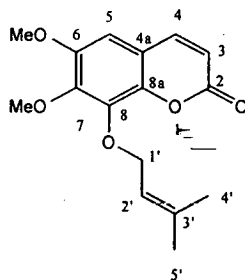


สารคูมาริน [3.2.6(29)] มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง จาก ¹H-NMR สเปกตรัมพบว่ามีสัญญาณของกลุ่ม methoxy จำนวน 3 กลุ่มที่ $\square\square$ 3.88 (3H, s, 6-OMe), $\square\square$ 3.89 (3H, s, 5-OMe) และ $\square\square$ 3.94 (3H, s, 7-OMe) จาก ¹³C-NMR สเปกตรัมพบว่ามี 12-คาร์บอนซึ่งเป็นสัญญาณของกลุ่ม methoxy 3 กลุ่ม, methine 3 กลุ่มและ non-protonated 6 กลุ่มพบสัญญาณของ aromatic ที่ $\square\square$ 6.31 (1H, s, ArH-8), จาก splitting pattern และค่า coupling constant ของ aromatic protons มีลักษณะเป็น singlet แสดงว่าไม่มีหมู่ proton ข้างเคียง นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอนของ $\square\square\square$ -unsaturated ketone ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารประเภทคูมารินที่ 6.13 (1H, $d, J = 9.7$ Hz, H-3) และ 7.94 (1H, $d, J = 9.7$ Hz, H-4) จาก ESIMS พบค่า m/z 237.4 (M+H)⁺ การยืนยันตำแหน่งของหมู่ OMe ที่ C-5 ได้มาจาก HMBC สเปกตรัม จากข้อมูลที่ได้แสดงว่าน่าจะเป็นสารกลุ่มของคูมารินที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสาร [3.2.6(29)]



[3.2.6 (29)]

สารคูมาริน [3.2.6(30)] มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง เหลือง IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนคลื่นแสงของหมู่ คาร์บอนิล ของ $\square\square\square$ -unsaturated ที่ 1722 cm^{-1} และ หมู่ อะโรมาติกที่ $1603, 1505\text{ cm}^{-1}$ จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมพบว่า มีสัญญาณของ methyl proton อยู่ 2 กลุ่มที่ $\square\square 1.66$ (3H, s, 4'-Me) และ 1.71 (3H, s, 5'-Me) สัญญาณของ กลุ่ม methoxy จำนวน 2 กลุ่มที่ $\square\square 3.88$ (3H, s, 6-OMe), 3.92 (3H, s, 7-OMe) นอกจากนั้นยังพบสัญญาณของ methylene proton ที่ $\square\square 4.52$ (2H, d, $J=7.2\text{ Hz}$, 1'-CH₂) มีลักษณะเป็น doublet จาก splitting pattern และค่า coupling constant แสดงว่ามี proton ข้างเคียงเพียงหนึ่งตัวซึ่งแสดงให้เห็นว่า จะต้องอยู่ใกล้กับสัญญาณของ proton ที่ $\square\square 5.55$ (1H, t, $J=7.2\text{ Hz}$, 2'-CH) สัญญาณที่เหลือพบว่า มีสัญญาณของ aromatic เพียงหนึ่งตัวที่ $\square\square 6.30$ (1H, s, 5-ArH) มีลักษณะเป็น singlet แสดงให้ทราบว่า เป็นสัญญาณของ aromatic ที่ไม่มี proton ข้างเคียง นอกจากนั้นยังพบสัญญาณโปรตอนของ $\square\square\square$ -unsaturated ketone ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารประเภทคูมารินที่ $\square\square 6.10$ (1H, d, $J=9.6\text{ Hz}$, H-3) และ 7.29 (1H, d, $J=9.6\text{ Hz}$, H-4) มีลักษณะเป็น doublet) จาก ESIMS พบค่า m/z 313.1 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ จากข้อมูลที่ได้แสดงว่าเป็นสารกลุ่มของคูมารินที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสาร [3.2.6(30)] การยืนยันโครงสร้างของสารชนิดนี้อยู่ระหว่างการเก็บข้อมูลอื่นๆมาประกอบ



[3.2.6 (30)]

วัสดุและวิธีการ

นำส่วนเปลือกของต้นเครือทุเรียน (2 kg) มาสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH จำนวน 3 ลิตรที่อุณหภูมิห้องนาน 1 สัปดาห์ กรองสารละลายที่ได้แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัด MeOH (89.5 g) นำส่วนที่สกัดได้มา partition ด้วย CHCl_3 และน้ำ ทำการสกัดด้วย CHCl_3 จำนวน 3 ครั้งได้ส่วนสกัด CHCl_3 (26.4 g) นำส่วนที่เป็นชั้นน้ำมา partition ด้วย EtOAc จำนวน 4 ครั้งได้ส่วนสกัด EtOAc (19.1 g).

(ก) ส่วนสกัด CHCl_3

นำส่วนสกัด CHCl_3 (26.4 g) มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีมาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลโดยเริ่มจากเฮกเซน และเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต โดยเพิ่มปริมาณของเอทิลอะซิเตตขึ้นเรื่อยๆ รวมกลุ่มได้ 17 กลุ่มเลือกกลุ่มต่างๆที่ได้มาแยกให้ให้บริสุทธิ์ต่อไป

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่แยกออกมาด้วยตัวทำละลายเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต (80:20) นำมาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีอีกครั้งโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลโดยเริ่มจากเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม (90:10) เป็นตัวชะ จัดกลุ่มได้ 10 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 2 และ 3 (250 mg) นำมาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีอีกครั้งโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลโดยเริ่มจากเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต (94:6) เป็นตัวชะให้ของแข็งสีขาวของสาร triterpenoid [3.2.6(24)] (24 mg)

สาร [3.2.6(24)]

IR $V_{\max} \text{ cm}^{-1}$ 3416, 2922, 1428, 1019.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 0.72 (1H, m, 5-CH), 0.77 (3H, s, Me), 0.81 (3H, s, Me), 0.85 (6H, s, 2xMe), 0.92 (3H, s, Me), 0.95 (3H, s, Me), 0.98 (3H, s, Me), 1.10 (3H, s, Me), 1.55 (1H, m, 18-CH), 1.95 (1H, m, 9-CH), 3.20 (1H, dd, $J=3.6, 12 \text{ Hz}$, 3-CH), 5.16 (1H, m, 12-CH=).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\square$ 15.5 (26- CH_3), 15.6 (23- CH_3), 16.8 (24- CH_3), 18.4 (CH_2), 23.6 (CH_2), 23.7 (25- CH_3), 26.0 (28- CH_3), 26.2 (CH_2), 27.0 (CH_2), 27.3 (CH_2), 28.1 (30- CH_3), 28.4 (29- CH_3), 31.1 (C), 32.5 (C), 32.7 (CH_2), 33.3 (27- CH_3), 34.8 (CH_2), 37.0 (C), 37.2 (CH_2), 38.6 (CH_2), 38.8 (C), 39.8 (C), 42.0 (C), 46.9 (CH_2), 47.3 (18- CH_3), 47.7 (19- CH_3), 55.2 (5-CH), 79.1 (3 $\square$ -CH), 121.8 (12-CH=), 145.2 (13-C).

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่แยกออกมาจากตัวทำละลายเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต (60:40) ได้สารมีลักษณะกึ่งของแข็งสีเหลือง (10.80 g) นำสารที่ได้จำนวน (1.33 g) นำมาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีอีกครั้งโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลโดยเริ่มจากเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม (50:50) เป็นตัวชะ จัดกลุ่มได้ 6 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 2 (371 mg) นำมาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีอีกครั้งโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลโดยเริ่มจากเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต (84:16) เป็นตัวชะให้ของแข็งสีเหลืองของสาร [3.2.6(25)] (12 mg) และ สาร [3.2.6(26)] (4.2 mg)

สาร [3.2.6(25)]

IR ν_{max} cm^{-1} 2923, 2848, 1736 (C=O), 1592, 1478, 1350, 1142, 1064, 823, 846.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\square\square$ 1.54 (3H, s, 9'-Me), 1.62 (3H, s, 10'-Me), 1.64 (3H, s, 4'-Me), 1.98 (4H, m, 5'- CH_2 and 6'- CH_2), 4.15 (3H, s, 6-OMe), 4.85 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, 2'- CH_2), 4.99 (1H, m, 7'-CH), 5.57 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, 2'-CH), 6.25 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-3), 6.96 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5), 7.59 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-7), 8.10 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-4).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\square$ 16.5 (4'- CH_3), 17.7 (9'- CH_3), 25.6 (10'- CH_3), 26.4 (6'- CH_2), 39.6 (5'- CH_2), 60.8 (6-OMe), 70.3 (1'- CH_2), 105.1 (5-ArH), 107.6 (4a-C), 112.8 (3-CH), 114.6 (8-C), 119.5 (2'-CH), 123.8 (7'-CH), 131.7 (8'-C), 139.4 (4-CH), 143.1 (3'-C), 144.5 (8a-C), 145.1 (7-ArH), 150.9 (6-C), 160.5 (C=O).

สาร [3.2.6(26)]

IR ν_{max} cm^{-1} 1749, 1718 (C=O), 1594, 1479, 1355, 1136, 1071, 812, 748.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 4.15 (6H, s, 6-OMe and 7-OMe), 6.26 (1H, *d*, $J = 9.8$ Hz, H-3), 6.97 (1H, *d*, $J = 1.5$ Hz, H-5), 7.60 (1H, *d*, $J = 1.5$ Hz, H-8), 8.10 (1H, *d*, $J = 9.8$ Hz, H-4).

ESIMS (+ve) : $m/z = 229$ (100%, $\text{M}+\text{Na}^+$).

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่แยกออกมาจากตัวทำละลายเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต (60:40) ได้สารมีลักษณะกึ่งของแข็งสีเหลือง (10.80g) นำสารที่เหลือจากการแยกครั้งแรกจำนวน (9.74 g) มาทำการแยกเพิ่มโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลโดยเริ่มจากเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต (85:15) เป็นตัวชะ จัดกลุ่มได้ 12 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 4-6 มีลักษณะเป็นของเหลวสีเขียว (1.875g) นำมาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีอีก 7 ครั้งโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลโดยเริ่มจากเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต (88:12) เป็นตัวชะให้ของแข็งสีเหลืองของสาร [3.2.6(27)] (16.4 mg)

สาร [3.2.6(27)]

IR $V_{\max} \text{ cm}^{-1}$ 1739 (C=O), 1606, 1477, 1354, 1147, 1068, 937, 815, 745.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.63 (3H, s, 4'-Me), 1.71 (3H, s, 5'-Me), 4.15 (3H, s, 6-OMe), 4.82 (2H, *d*, $J = 7.2$ Hz, 1'-CH₂), 5.58 (1H, *t*, $J = 7.2$ Hz, 2'-CH), 6.24 (1H, *d*, $J = 9.6$ Hz, 3-CH), 6.96 (1H, s, 5-ArH), 7.59 (1H, s, 7-ArH), 8.05 (1H, *d*, $J = 9.6$ Hz, 4-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 18.0 (4'-Me), 25.7 (5'-Me), 60.8 (6-OMe), 70.4 (1'-CH₂), 105.0 (5-ArH), 107.7 (4a-C), 112.8 (3-CH), 114.7 (8-C), 119.9 (2'-CH), 139.2 (4-CH), 139.5 (3'-C), 144.4 (8a-C), 145.0 (7-ArH), 150.8 (6-C), 160.4 (C=O).

กลุ่มย่อยที่ 7 มีลักษณะเป็นของเหลวปนของแข็ง (5.489 g) นำมาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีอีก 4 ครั้งโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลโดยเริ่มจากเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต (86:14) เป็นตัวชะได้ของเหลวสีเหลืองของสาร [3.2.6(28)] (3 mg)

สาร [3.2.6(28)]

IR $V_{\max} \text{ cm}^{-1}$ 2926, 1729 (C=O), 1604, 1504, 1438, 1344, 1148, 1120, 1054, 952, 823.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1.55 (3H, s, 9'-Me), 1.56 (3H, s, 10'-Me), 1.65 (3H, s, 4'-Me), 2.00 (4H, m, 5'- CH_2 and 6'- CH_2), 3.89 (3H, s, 6-OMe), 3.93 (3H, s, 7-OMe), 4.58 (2H, d , $J = 7.1$ Hz, 1'- CH_2), 5.04 (1H, m, 7'-CH), 5.56 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, 2'-CH), 6.12 (1H, d , $J = 9.7$ Hz, H-3), 6.31 (1H, s, H-5), 7.95 (1H, d , $J = 9.7$ Hz, H-4).

ESIMS (+ve): $m/z = 359.0$ (5%, $\text{M}+\text{H}^+$), 381.2 (100%, $\text{M}+\text{Na}^+$).

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มที่ที่แยกออกมาจากตัวทำละลายเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต (60:40) ได้สารมีลักษณะกึ่งของแข็งสีน้ำตาล (1.082 g) นำสารที่ได้จำนวน (1.33 g) นำมาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีอีกครั้งโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลโดยเริ่มจากเฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน (44:56) เป็นตัวชะ จักกลุ่มได้ 6 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 2 มีลักษณะเป็นของเหลวปนของแข็งสีเหลืองเข้ม (292 mg) นำมาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีอีก 3 ครั้งโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลโดยเริ่มจากเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต (90:10) เป็นตัวชะได้ของเหลวสีเหลืองของสาร [3.2.6(29)] (2.7 mg)

สาร 3.2.6(29)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\square$ 3.88 (3H, s, 6-OMe), 3.89 (3H, s, 5-OMe), 3.94 (3H, s, 7-OMe), 6.13 (1H, d , $J = 9.7$ Hz, H-3), 6.31 (1H, s, ArH-8), 7.94 (1H, d , $J = 9.7$ Hz, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\square$ 56.1 (5-OMe, 6-OMe), 56.5 (7-OMe), 91.5 (8-ArH), 104.1 (4a-C), 111.2 (3-CH), 130.4 (6-C), 138.7 (4-CH), 148.8 (8a-C), 152.3 (5-C), 156.1 (7-C), 160.8 (C=O).

ESIMS (+ve): $m/z = 237.4$ (70%, $\text{M}+\text{H}^+$), 472.9 (85%, $2\text{M}+\text{H}^+$), 495.0 (100%, $2\text{M}+\text{Na}^+$).

(ข) ส่วนสกัด EtOAc

นำส่วนสกัด EtOAc (19.1 g) มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลโดยเริ่มจากเฮกเซน เฮกเซน-เอทิลอะซิเตต เอทิลอะซิเตต และเอทิลอะซิเตต-เมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของเอทิลอะซิเตตและ เมทานอลขึ้นเรื่อยๆรวมกลุ่มได้ 17 กลุ่มเลือกกลุ่มต่างๆ ที่ได้มาแยกให้ให้บริสุทธิ์ต่อไป

กลุ่มที่ 5 (225 mg) เป็นกลุ่มที่แยกออกมาจากตัวทำละลายเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต (40:60) มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีอีกครั้งโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลโดยเริ่มจากเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต (84:16) เป็นตัวชะจัดกลุ่มได้ 16 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 6-7 (66.3 mg) มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีอีกครั้งโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลโดยเริ่มจากเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต (88:12) เป็นตัวชะให้ของแข็งสีเหลืองของสาร **[3.2.6(30)]** (12.8 mg)

สาร [3.2.6(30)]

IR $V_{\max} \text{ cm}^{-1}$ 2923, 1722 (C=O), 1603, 1505, 1474, 1438, 1344, 1148, 1119, 1099, 957, 818.

$^1\text{H-NMR}$ (400 Mz, CDCl_3): $\square$ 1.66 (3H, s, 4'-Me), 1.71 (3H, s, 5'-Me), 3.88 (3H, s, 6-OMe), 3.92 (3H, s, 7-OMe), 4.52 (2H, d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 1'-CH₂), 5.55 (1H, t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2'-CH), 6.10 (1H, d, $J = 9.6 \text{ Hz}$, 3-CH) 6.30 (1H, s, 5-ArH), 7.92 (1H, d, $J = 9.6 \text{ Hz}$, 4-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\square$ 18.4 (4'-Me), 26.2 (5'-Me), 56.4 (6-OMe), 56.8 (7-OMe), 70.5 (1'-CH₂), 91.8 (5-ArH), 104.3 (4a-C), 111.5 (3-CH), 120.6 (2'-CH₂), 129.3 (8-C), 139.2 (4-CH), 139.5 (3'-C), 149.5 (8a-C), 152.7 (5-C), 156.9 (7-C), 161.3 (C=O).

ESIMS (+ve): $m/z = 291.2$ (10%, $\text{M}+\text{H}^+$), 313.1 (100%, $\text{M}+\text{Na}^+$), 602.9 (80%, $2\text{M}+\text{Na}^+$).