



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การสกัดแยกและเตรียมอนุพันธ์ของคาร์บาโซลและคูมารินจากสองฟ้าแดง

Isolation and derivatization of carbazoles and coumarins

from *Clausena harmandiana* Pierre.

หัวหน้าโครงการ

ฉวี เย็นใจ

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปีที่พิมพ์ พ.ศ. 2555

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนในการทำวิจัย โดยงานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนประจำปี 2553-2554

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่จำเป็น

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยทดลองฤทธิ์ทางชีวภาพศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผู้วิจัย

2555

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อภาษาไทย

ส่องฟ้าแดงเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาอาการปวดท้อง ปวดหัว แก้ไข้ และยังเป็นสมุนไพรบำรุงร่างกาย ได้มีการรายงานว่ารากของพืชชนิดนี้ประกอบด้วยสารประเภทคาร์บาโฮลอัลคาลอยด์เป็นจำนวนมาก พร้อมทั้งยังพบสารประเภทคูมารินด้วยเช่นกัน ยังได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นฤทธิ์ต้านเชื้อรา เชื้อมาลาเรีย เชื้อวัณโรค และมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งอีกด้วย

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการแยกสกัดรากของส่องฟ้าพบว่าได้สารบริสุทธิ์ทั้งสิ้นจำนวน 20 สาร มีสารประเภทคาร์บาโฮล 15 สาร คูมาริน 4 สาร มี 1 สารที่เป็นซินนามิลเอสเทอร์ เมื่อนำสาร heptaphylline (I) และ 7-methoxyheptaphylline (II) ไปทำการดัดแปลงโครงสร้างได้อนุพันธ์ทั้งสิ้น 19 อนุพันธ์ เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* ต้านเชื้อมาลาเรียต่อเชื้อ *Plasmodium falciparum* และต้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* พบว่าสารส่วนใหญ่ไม่ค่อยแสดงฤทธิ์ที่คั่นก ขกเว้นสาร **IIa** ซึ่งแสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรียโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.27 mg/ml สำหรับฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งนั้นได้ทดสอบกับเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดคือ NCI-H187 (มะเร็งปอด), MCF-7 (มะเร็งเต้านม), KB (มะเร็งช่องปาก) และเซลล์ปกติ (Vero cell lines).

พบว่าสาร **Ih** และ **Iii** แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ที่ดีด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.02 และ 0.66 μM ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่า ellipticine ซึ่งเป็นสารมาตรฐานประมาณ 138 และ 4 เท่า นอกจากนี้ออกซิมี **Ih** แสดงค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง KB เท่ากับ 0.17 μM ซึ่งสูงกว่า ellipticine เท่ากับ 10 เท่า และแสดงความเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ปกติ ($IC_{50} = 66.01 \mu M$) จะเห็นได้ว่าสารนี้น่าจะสามารถพัฒนาให้เป็นยาต่อไปได้

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Clausena harmandiana (Rutaceae), known in Thai as “Song Fa”, is a medicinal plant which has shown some therapeutic activities against stomach ache, headache, sickness, and as a health promoting herb. It has been found that the roots of this plant contain a large amount of carbazole alkaloids together with coumarins. Biological activities of the chemical constituents from *C. harmandiana* have been evaluated as being antifungal, antimalarial, anti-TB, and having cytotoxicity.

In this study, twenty compounds were isolated from the root of *Clausena harmandiana* including fifteen carbazoles, four coumarins and one cinnamate ester. heptaphylline (**I**) and 7-methoxyheptaphylline (**II**) were used as the starting material for structural modification and nineteen carbazole alkaloids were synthesized. All isolated compounds were evaluated for their biological activities such as an antifungal against *Candida albicans*, an antiplasmodial against *Plasmodium falciparum*, an antimycobacterial against *Mycobacterium tuberculosis*. It was found that all compounds showed moderate to weak activities against all tests except compound **Iia** exhibited strong activity against *Plasmodium falciparum*. Cytotoxicity against NCI-H187 (human lung cancer), MCF-7 (breast cancer), KB (oral human epidermal carcinoma) and Vero cell lines (African green monkey kidney, normal cell) were also evaluated.

Among these derivatives, **Ih** and **Iii** showed cytotoxicity against the NCI-H187 cell line with IC_{50} values of 0.02 and 0.66 μ M, respectively, which are about 138 and 4 fold stronger than the ellipticine standard. In addition, oxime **Ih** displayed cytotoxicity against KB cells with an IC_{50} value of 0.17 μ M which is about 10 times stronger than the ellipticine. This compound demonstrated weak cytotoxicity against Vero cells ($IC_{50} = 66.01 \mu$ M). The results show convincingly that **Ih** may be a promising lead for the development of cytotoxic agents.

คำสำคัญ: ส่องฟ้า; ความเป็นพิษต่อเซลล์; มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งช่องปาก

Clausena harmandiana; cytotoxicity; NCI-H187; KB; Vero cells

เรื่อง	สารบัญเรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ		1
บทคัดย่อ		2
สารบัญเรื่อง		5
สารบัญตาราง		6
สารบัญภาพ		6
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย		9
บทนำ		11
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง		12
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย		13
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล		20
สรุปผลการทดลอง		47
เอกสารอ้างอิง		48
ภาคผนวก		51

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 เปอร์เซนต์ yield ของสารที่แยกสกัดได้	29
ตารางที่ 2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ทั้งหมด	40

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1 สารประกอบที่พบในรากส่่งฟ้าแดง	12
ภาพที่ 2 แผนผังการสกัดรากของส่่งฟ้าแดง	14
ภาพที่ 3 แผนผังการแยกสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน	15
ภาพที่ 4 แผนผังการแยกสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตท	15
ภาพที่ 5 ปฏิกริยาการเติมหมู่เมทิล	31
ภาพที่ 6 ปฏิกริยากับกรดซัลฟูริกเข้มข้น	34
ภาพที่ 7 ปฏิกริยากับ <i>m</i> CPBA	35
ภาพที่ 8 ปฏิกริยาการเกิด oxime	37
ภาพที่ 9 ปฏิกริยา bromination	38
ภาพที่ 10 IR spectrum of heptaphylline (I)	52
ภาพที่ 11 ¹ H NMR spectrum of heptaphylline (I)	52
ภาพที่ 12 ¹³ C NMR spectrum of heptaphylline (I)	53
ภาพที่ 13 IR spectrum of 7-methoxyheptaphylline (II)	53
ภาพที่ 14 ¹ H NMR spectrum of 7-methoxyheptaphylline (II)	54
ภาพที่ 15 ¹³ C NMR spectrum of 7-methoxyheptaphylline (II)	54
ภาพที่ 16 IR spectrum of 2-methoxyheptaphylline (Ia)	55
ภาพที่ 17 ¹ H NMR spectrum of 2-methoxyheptaphylline (Ia)	55
ภาพที่ 18 ¹³ C NMR spectrum of 2-methoxyheptaphylline (Ia)	56
ภาพที่ 19 IR spectrum of 9-methylheptaphylline (Ib)	56
ภาพที่ 20 ¹ H NMR spectrum of 9-methylheptaphylline (Ib)	57
ภาพที่ 21 ¹³ C NMR spectrum of 9-methylheptaphylline (Ib)	57
ภาพที่ 22 IR spectrum of 2-methoxy-9-methylheptaphylline (Ic)	58
ภาพที่ 23 ¹ H NMR spectrum of 2-methoxy-9-methylheptaphylline (Ic)	58
ภาพที่ 24 ¹³ C NMR spectrum of 2-methoxy-9-methylheptaphylline (Ic)	59

ภาพที่ 25	IR spectrum of 2,7-dimethoxyheptaphylline (IIa)	59
ภาพที่ 26	¹ H NMR spectrum of 2,7-dimethoxyheptaphylline (IIa)	60
ภาพที่ 27	¹³ C NMR spectrum of 2,7-dimethoxyheptaphylline (IIa)	60
ภาพที่ 28	IR spectrum of 2,7-dimethoxy-9-methylheptaphylline (IIc)	61
ภาพที่ 29	¹ H NMR spectrum of 2,7-dimethoxy-9-methylheptaphylline (IIc)	61
ภาพที่ 30	¹³ C NMR spectrum of 2,7-dimethoxy-9-methylheptaphylline (IIc)	62
ภาพที่ 31	IR spectrum of 5-formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (Id)	62
ภาพที่ 32	¹ H NMR spectrum of 5-formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (Id)	63
ภาพที่ 33	¹³ C NMR spectrum of 5-formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (Id)	63
ภาพที่ 34	IR spectrum of 5-formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyran[3,2-a]carbazole (IId)	64
ภาพที่ 35	¹ H NMR spectrum of 5-formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyran[3,2-a]carbazole (IId)	64
ภาพที่ 36	¹³ C NMR spectrum of 5-formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyran[3,2-a]carbazole (IId)	65
ภาพที่ 37	IR spectrum of 1-(3'-methylbutyl-2',3'-oxirane)mukonal (Ie)	65
ภาพที่ 38	¹ H NMR spectrum of 1-(3'-methylbutyl-2',3'-oxirane)mukonal (Ie)	66
ภาพที่ 39	¹³ C NMR spectrum of 1-(3'-methylbutyl-2',3'-oxirane)mukonal (Ie)	66
ภาพที่ 40	IR spectrum of 5-formyl-2-hydroxy-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (If)	67
ภาพที่ 41	¹ H NMR spectrum of 5-formyl-2-hydroxy-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (If)	67
ภาพที่ 42	¹³ C NMR spectrum of 5-formyl-2-hydroxy-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (If)	68
ภาพที่ 43	IR spectrum of 4-Formyl-2(1'-hydroxy-1'-methylethyl)furano[3,2-a]carbazole (Ig)	68
ภาพที่ 44	¹ H NMR spectrum of 4-Formyl-2(1'-hydroxy-1'-methylethyl)furano[3,2-a]carbazole (Ig)	69
ภาพที่ 45	¹³ C NMR spectrum of 4-Formyl-2(1'-hydroxy-1'-methylethyl)furano[3,2-a]carbazole (Ig)	69
ภาพที่ 46	IR spectrum of 1-(3'-methylbutyl-2',3'-oxirane)-7-methoxymukonal (Iie)	70
ภาพที่ 47	¹ H NMR spectrum of 1-(3'-methylbutyl-2',3'-oxirane)-7-methoxymukonal (Iie)	70
ภาพที่ 48	¹³ C NMR spectrum of 1-(3'-methylbutyl-2',3'-oxirane)-7-methoxymukonal (Iie)	71
ภาพที่ 49	IR spectrum of 5-formyl-2-hydroxy-3,3-dimethyl-9-methoxypyran[3,2-a]carbazole (IIIf)	71
ภาพที่ 50	¹ H NMR spectrum of 5-formyl-2-hydroxy-3,3-dimethyl-9-methoxypyran[3,2-a]carbazole (IIIf)	72
ภาพที่ 51	¹³ C NMR spectrum of 5-formyl-2-hydroxy-3,3-dimethyl-9-methoxypyran[3,2-a]carbazole (IIIf)	72

ภาพที่ 52 ¹ H NMR spectrum of 4-Formyl-2-(1'-hydroxy-1'-methylethyl)-8-methoxyfurano[3,2-a]carbazole (Ig)	73
ภาพที่ 53 ¹³ C NMR spectrum of 4-Formyl-2-(1'-hydroxy-1'-methylethyl)-8-methoxyfurano[3,2-a]carbazole (Ig)	73
ภาพที่ 54 IR spectrum of heptaphylline oxime (Ih)	74
ภาพที่ 55 ¹ H NMR spectrum of heptaphylline oxime (Ih)	74
ภาพที่ 56 ¹³ C NMR spectrum of heptaphylline oxime (Ih)	75
ภาพที่ 57 IR spectrum of 7-methoxyheptaphylline oxime (IIh)	75
ภาพที่ 58 ¹ H NMR spectrum of 7-methoxyheptaphylline oxime (IIh)	76
ภาพที่ 59 ¹³ C NMR spectrum of 7-methoxyheptaphylline oxime (IIh)	76
ภาพที่ 60 IR spectrum of 1-(2'-bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)mukonal (Ii)	77
ภาพที่ 61 ¹ H NMR spectrum of 1-(2'-bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)mukonal (Ii)	77
ภาพที่ 62 ¹³ C NMR spectrum of 1-(2'-bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)mukonal (Ii)	78
ภาพที่ 63 IR spectrum of 2-bromo-5-formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (Ij)	78
ภาพที่ 64 ¹ H NMR spectrum of 2-bromo-5-formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (Ij)	79
ภาพที่ 65 ¹³ C NMR spectrum of 2-bromo-5-formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (Ij)	79
ภาพที่ 66 IR spectrum of 1-(2'-bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)-6-bromo-7-methoxymukonal (IIIi)	80
ภาพที่ 67 ¹ H NMR spectrum of 1-(2'-bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)-6-bromo-7-methoxymukonal (IIIi)	80
ภาพที่ 68 ¹³ C NMR spectrum of 1-(2'-bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)-6-bromo-7-methoxymukonal (IIIi)	81
ภาพที่ 69 IR spectrum of 2,8-dibromo-5-formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyran[3,2-a]carbazole (IIj)	81
ภาพที่ 70 ¹ H NMR spectrum of 2,8-dibromo-5-formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyran[3,2-a]carbazole (IIj)	82
ภาพที่ 71 ¹³ C NMR spectrum of 2,8-dibromo-5-formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyran[3,2-a]carbazole (IIj)	82

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

%	Percent
δ	Chemical shift
ν	Wavenumber
$^{\circ}\text{C}$	Degree Celsius
μg	Microgram
μM	Micromolar
^{13}C NMR	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
^1H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
2D NMR	Two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance
br d	Broad doublet
br s	Broad singlet
br t	Broad triplet
calcd.	Calculated
CD_3OD	Methanol- d_4
CDCl_3	Chloroform- d
CH_2Cl_2	Dichloromethane
cm^{-1}	Per centimeter
d	Doublet
$\text{DMSO}-d_6$	Dimethylsulfoxide- d_6
dd	Doublet of doublet
dq	Doublet of quartet
EtOAc	Ethyl acetate
g	Gram
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
Hz	Hertz

H_2SO_4	Sulfuric acid
IC_{50}	Half Maximal Inhibitory Concentration
IR	Infrared spectrum
J	Coupling constant
KBr	Potassium bromide
KOH	Potassium hydroxide
m	Multiplet
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -Chloroperbenzoic acid
MeI	Methyl iodide
MeOH	Methanol
mg	Milligram
MHz	Megahertz
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
ml	Milliliter
mp	Melting point
$\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$	Hydroxylamine hydrochloride
NaH	Sodium hydride
Na_2SO_4	Sodium sulfate
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
PLC	Preparative Layer Chromatography
ppm	Parts per million
s	Singlet
t	Triplet
TLC	Thin Layer Chromatography

1. บทนำ

1.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพืช

ต้นไม้ในสกุล *Clausena* เช่น *C. anisata*, *C. dentata*, *C. excavate*, *C. gullauminii*, *C. harmandiana*, *C. lansium*, และ *C. heptaphylla* นั้นเมื่อสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีพบว่า สารสำคัญประกอบด้วยสารกลุ่ม carbazoles และ coumarins เป็นส่วนใหญ่ สำหรับส่อดฟ้าดง หรือชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Clausena harmandiana* เป็นพืชที่ขึ้นทั่วไปในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศไทยสามารถพบได้ในทุกภาค โคนเฉพาะในภาคอีสานขึ้นกระจายอยู่ทั่วไป

ส่อดฟ้าดงเป็นไม้พุ่มขนาดเล็กมีความสูง 20-50 ซม. ใบประกอบแบบขนนก เรียงสลับ ใบย่อย 3-7 ใบ รูปไข่แกมวงรีขอบขนาน กว้าง 2.5-4 ซม. ยาว 4-8 ซม. เนื้อใบมีจุดน้ำมันกระจาย ดอกเป็นดอกช่อ ออกที่ปลายกิ่ง กลีบดอกสีขาวแกมเหลือง ผลสด รูปทรงกลม มีสรรพคุณในการแก้ไข้ปวดศีรษะ แก้ผดผื่นคัน แก้หลอดลมอักเสบ ผู้วิจัยได้ทำการทดลองศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของส่อดฟ้าดงพบว่ามีสารประกอบประเภทคาร์บาโซล และคูมาริน¹ และเมื่อศึกษาต่อไปพบว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่างด้วยกัน¹ อย่างไรก็ตามยังมีสารอีกหลายตัวที่ยังไม่ได้ทำการแยกออกมาให้บริสุทธิ์ ผู้วิจัยจึงมีความต้องการที่จะทำการสกัดแยกเพื่อให้ได้สารกลุ่มคาร์บาโซล และคูมารินเพิ่มขึ้น เพื่อจะได้นำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่นๆเพิ่มเติม ซึ่งอาจส่งผลให้ได้สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าที่เคยมีการรายงานไป

เนื่องจากสารบางตัวในส่อดฟ้าดงมีปริมาณมากพอสมควร ผู้วิจัยจึงมีแผนที่จะทำการดัดแปลงโครงสร้างของสารเหล่านี้ด้วยวิธีทางเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ให้ได้อนุพันธ์ใหม่ๆ โดยหวังว่าอนุพันธ์ใหม่เหล่านั้นอาจแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น หากการวิจัยประสบผลสำเร็จก็อาจทำให้ได้สารนำ (lead compound) ในการที่จะพัฒนาต่อไปเป็นยาได้ และจะเป็นการส่งผลให้มีการพัฒนาสมุนไพรชนิดนี้ให้มีประโยชน์มากยิ่งขึ้น เป็นการเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรไทยให้มากยิ่งขึ้น

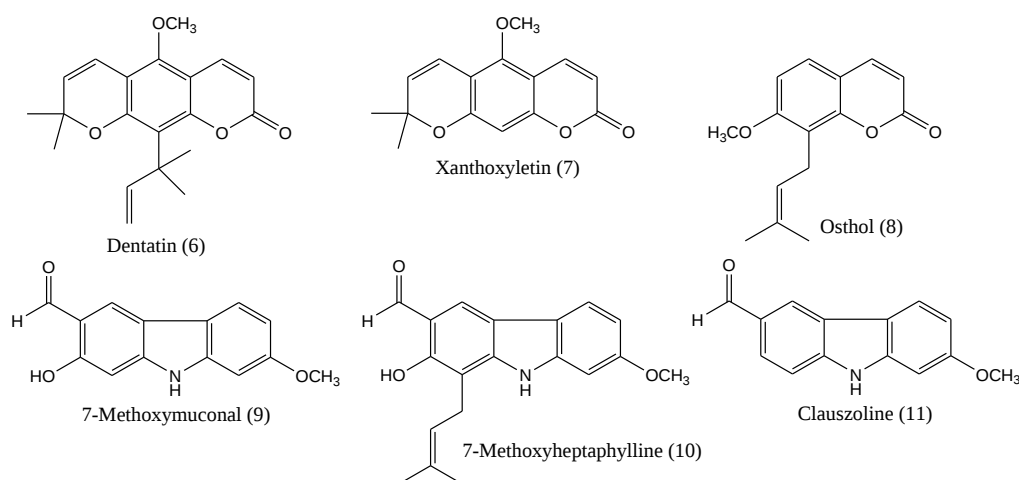
โรคมาเร็ง วัณโรค และมาลาเรีย เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่มีความสำคัญอยู่ในอันดับต้นๆของประเทศ ในกรณีของโรคมาเร็งนั้นพบว่ายาที่ใช้รักษาโรคมาเร็งชนิดต่างๆ ยังไม่สามารถรักษาครอบคลุมได้ทุกชนิดของโรคในผู้ป่วย อีกทั้งยังพบอุบัติการณ์ของโรคที่ดื้อต่อยามีพิษข้างเคียงสูง รวมทั้งยามีราคาแพง การศึกษาและวิจัยด้วยยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงแต่มีพิษและฤทธิ์ข้างเคียงน้อยจึงยังมีความจำเป็นอยู่ การรักษาโรคมาเร็งในปัจจุบันยังไม่สามารถรักษาได้ด้วยยาเดี่ยวๆ แต่ต้องใช้ยารักษาเมเร็งหลายชนิดที่มีกลไกแตกต่างกันในการรักษา ร่วม และอาจมีการผ่าตัดหรือฉายรังสีด้วย สมุนไพรในต่างประเทศที่ได้ถูกพัฒนาจนนำมาใช้ในการรักษาโรคมาเร็ง เช่น ต้น Yew และ ต้นแพงพวยฝรั่ง เป็นต้น สำหรับสมุนไพรไทยมีหลายชนิดที่เชื่อว่ารักษาโรคมาเร็งได้เช่นกัน

ปัญหาการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย โดยเฉพาะประเภทพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) เป็นเหตุจูงใจให้มีการศึกษาค้นคว้าหาการรักษามาลาเรียชนิดใหม่ๆ ที่

ให้ผลดีในการรักษา นอกจากนี้ปัญหานี้ของโรคเอดส์ยังนำไปสู่การกลับมาของวัณโรค ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเสียชีวิตของผู้ป่วยเอดส์ การค้นคว้าหายาใหม่ๆจากสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคจะช่วยให้มีการพัฒนายาใหม่ที่มีโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างไปจากเดิม

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในปี คศ. 1984³ ได้มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรากสอ่งฟ้าแดง พบว่ามีสาร 5 ตัวเป็นสารกลุ่มคาร์บาโซล 1 ตัวคือ heptaphylline (3) และคูมาริน 5 ตัวคือ clausarin (4), norentatin (5), dentatin (6), xanthoxyletin (7) และ osthol (8) ต่อมาในปี คศ. 1988⁴ ได้ค้นพบสารกลุ่มคาร์บาโซลเพิ่มเติมได้แก่ 7-methoxymukonal (9) และ 7-methoxyheptaphylline (10) ในปี คศ. 2000⁵ กลุ่มผู้วิจัยได้ทำการศึกษารากของสอ่งฟ้าแดง พบว่ามีสาร 4 ตัวได้แก่ heptaphylline (3), clausarin (4), dentatin (6) และ clauszoline (11) และนำไปทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อมาลาเรีย พบว่าสาร 3, 4 และ 6 แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรียด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 3.2, 8.5 และ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ



ภาพที่ 1 สารประกอบที่พบในรากสอ่งฟ้าแดง

อย่างไรก็ตามผู้วิจัยคาดว่ายังมีสารอีกหลายตัวที่ยังไม่ได้แยกออกมาให้บริสุทธิ์ เนื่องจากพืชในสกุลนี้เช่น *Clausena excavate*⁶⁻⁸ มีสารกลุ่มคาร์บาโซลและคูมารินหลายตัวที่นอกเหนือจากที่ค้นพบในสอ่งฟ้า ผู้วิจัยจึงคิดว่าสอ่งฟ้าก็น่าจะมีแนวโน้มที่มีสารอีกมากที่ยังไม่ได้แยกสกัดออกมา จึงต้องการที่จะแยกสารเหล่านั้นออกมา พิสูจน์โครงสร้างทางเคมี และนำสารที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากโครงสร้างของคาร์บาโซลซึ่งมีหมู่ฟังก์ชัน aldehyde และ methoxy ในโมเลกุล ผู้วิจัยจึงคิดที่จะดัดแปลงโครงสร้างให้ได้อนุพันธ์ที่มีโครงสร้างหลากหลาย โดยหวังว่าอาจมีอนุพันธ์บางตัว

ที่อาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น โดยจะส่งสารทั้งหมดที่ได้ให้โครงการย่อยที่ 3-5 นอกจากนี้จะทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา เชื้อวัณโรค เชื้อมาลาเรีย พร้อมทั้งฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง KB, NCI-H187, MCF-7 และความเป็นพิษต่อกับเซลล์ปกติ (Vero cells) อีกด้วย⁹⁻¹² สำหรับคูมารินซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันเป็น α,β -unsaturated lactone และ alkene ก็สามารถที่จะดัดแปลงโครงสร้างได้เช่นกัน

3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เก็บตัวอย่างสมุนไพร นำมาหั่น อบแห้งและบดจนเป็นผงละเอียด

3.2 แยกสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้ hexane, EtOAc และ MeOH

3.3 นำสารสกัดหยาบชั้น hexane และ EtOAc มาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี และตกผลึกให้ได้ปริมาณมากพอ

3.4 นำคาร์บาไซด heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline มาปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยวิธีทางเคมีอินทรีย์ โดยใช้ปฏิกิริยาต่างๆเช่น epoxidation, oxime formation, hydrolysis เป็นต้น ตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ทั้งหมดด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี

3.6 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค, เชื้อรา, เชื้อมาลาเรีย และความเป็นพิษต่อเซลล์ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

3.7 ส่งสารทั้งหมดที่ได้ให้โครงการย่อยที่ 3-5 เพื่อทำการทดสอบต่อไป

ดำเนินการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ นอกจากนี้จะทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต้านเชื้อรา เชื้อวัณโรค เชื้อมาลาเรีย พร้อมทั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB, NCI-H187, MCF-7 และกับเซลล์ปกติ (Vero cells) ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ต.คลองหลวง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี

วิธีการทดลอง

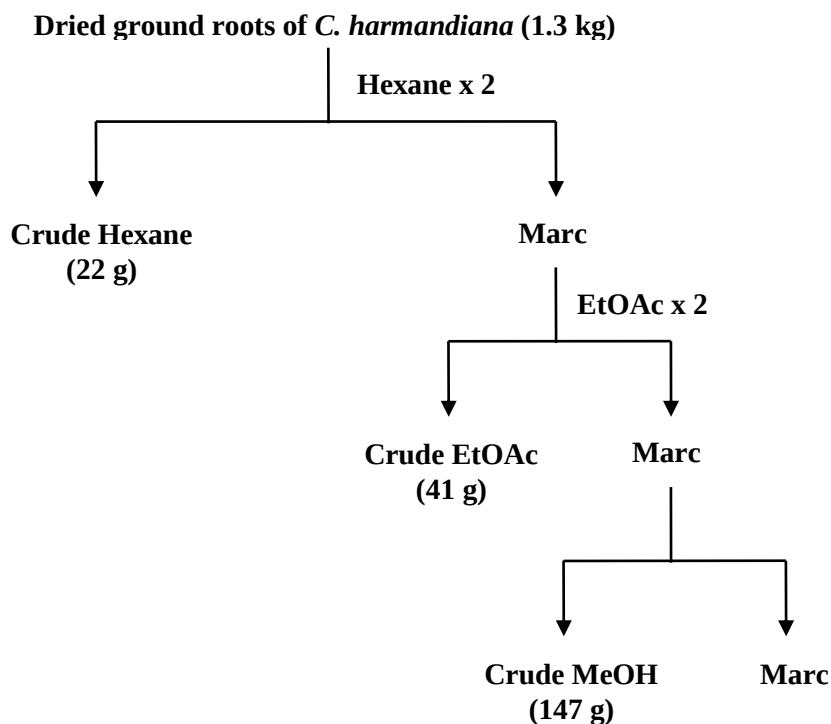
การแยกสารให้บริสุทธิ์

นำรากสอฝามาหั่น อบแห้ง บดละเอียดได้น้ำหนักหยาบ 1.3 กิโลกรัม นำมาแช่ด้วยเฮกเซน 2 ลิตร 2 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 3 วัน พร้อมทั้งคนอย่างสม่ำเสมอ นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง ได้สารสกัดหยาบเฮกเซน 22 กรัม แฉกที่เหลือนำเอทิลอะซิเตต EtOAc จำนวน 2 ลิตร 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง ได้สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต 41 กรัม แฉกที่เหลือนำ MeOH จำนวน 2 ลิตร 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง ได้สารสกัดหยาบเมทานอล 147 กรัม

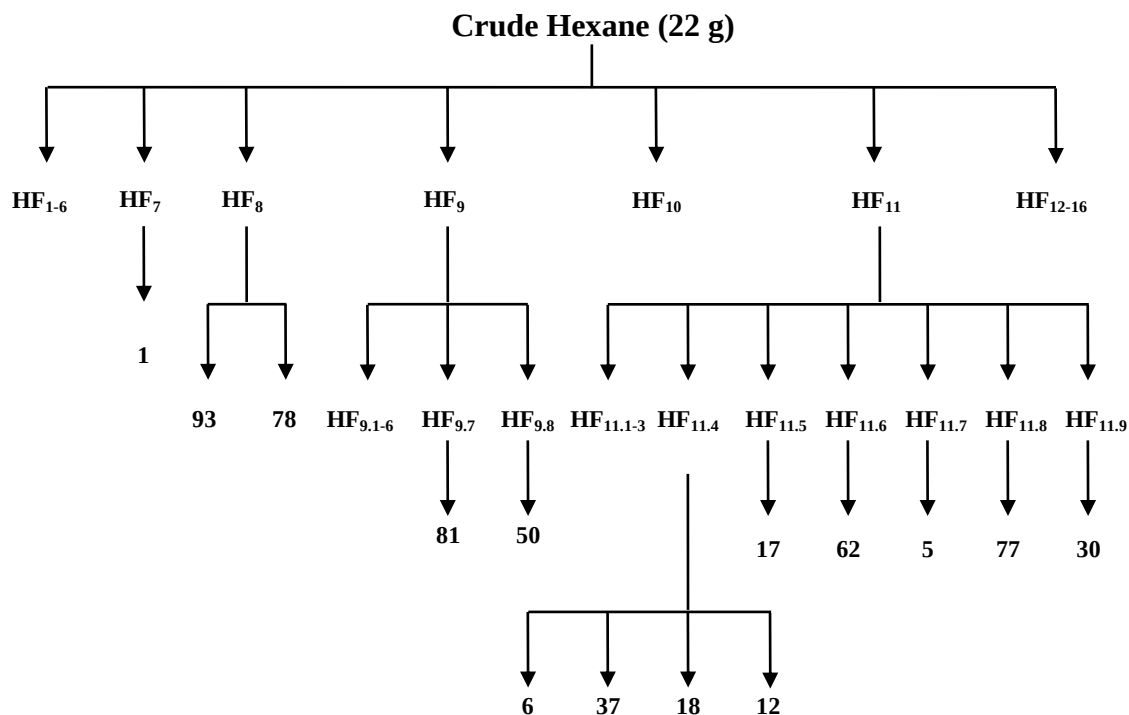
นำสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และเฮกเซนเป็น mobile phase เพิ่มขั้วของตัวทำละลายขึ้นเรื่อยๆ โดยการเติมเอทิลอะซิเตต จนกระทั่งเปลี่ยนเป็น 100% เอทิลอะซิเตต จากนั้นปรับขั้วของตัวทำละลายให้

เพิ่มขึ้นด้วยการเติมเมธานอล จนกระทั่งเป็น 100% เมธานอล เก็บสารสกัดเป็น fraction ย่อยๆ ได้ทั้งสิ้น 16 fractions โดยใช้สัญลักษณ์แทนเป็น HF1, HF2, HF3,.....HF16 ตามลำดับ

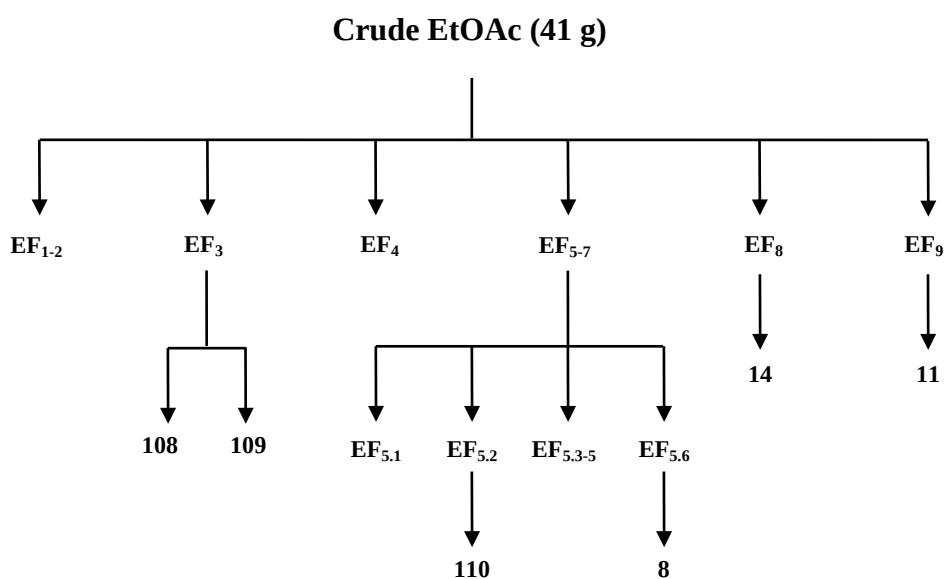
นำ HF7 มาตกผลึกด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ได้ heptaphylline (1) (2.8 g 0.22%) fraction ย่อย HF8 มาตกผลึกด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ได้ 7-methoxyheptaphylline (2) (4.3 g 0.33%) นำ filtrate มาตกผลึกซ้ำ ได้ dentatin (3) (3.2 g, 0.25%) นำ fraction HF9 มาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography (CC) โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และตัวทำละลายผสมของ เฮกเซนและเอทิลอะซิเตท เป็น mobile phase เพิ่มขั้วของตัวทำละลายขึ้นเรื่อยๆ โดยการเติม EtOAc เก็บสารสกัดเป็น fraction ย่อยๆ ได้ทั้งสิ้น 8 fractions คือ HF9.1, HF9.2,.....HF9.8 นำ fraction ย่อย HF9.7 และ HF9.8 มาแยกต่อด้วยวิธี PLC ได้สาร glycosinine (4) (13 mg, 0.001%) และ clauszoline-K (5) (24 mg, 0.0018%) แยก fraction HF11 ด้วยวิธี CC โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และตัวทำละลายผสมของ เฮกเซนและเอทิลอะซิเตท เป็น mobile phase เพิ่มขั้วของตัวทำละลายขึ้นเรื่อยๆ โดยการเติม EtOAc เก็บสารสกัดเป็น fraction ย่อยๆ ได้ทั้งสิ้น 9 fractions คือ HF11.1, HF11.2,.....HF11.9 นำ fraction ย่อย HF11.4 มาแยกต่อด้วยวิธี PLC ได้สาร xanthoxyletin (6) (1.2 g, 0.09%) osthol (7) (65 mg, 0.005%), methyl carbazole-3-carboxylate (8) (15 mg, 0.0012%) และ mukonal (9) (24 mg, 0.0018%) ในการแยก fraction HF11.5 ด้วย PLC พบว่าได้สาร heptazoline (10) (5 mg, 0.0004%) นำ fraction HF11.6-11.9 มาตกผลึกด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ได้ 7-methoxymukonal (11) (1.6 g, 0.12%), nordentatin (12) (1.4 g, 0.11%), 7-hydroxyheptaphylline (13) (56 mg, 0.0043%) และ clausine-C (14) (20 mg, 0.0015%) ตามลำดับ



ภาพที่ 2 แผนผังการสกัดรากของต่อ่งฟ้าแดง



ภาพที่ 3 แผนผังการแยกสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน



ภาพที่ 4 แผนผังการแยกสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตท

สำหรับสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตท มาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และเฮกเซนเป็น mobile phase เพิ่มหัวของตัวทำละลายขึ้นเรื่อยๆ โดยการเติม เอทิลอะซิเตท จนกระทั่งเปลี่ยนเป็น 100% เอทิลอะซิเตท จากนั้นปรับหัวของตัวทำละลายให้เพิ่มขึ้นด้วยการเติมเมทานอล จนกระทั่งเป็น 100% เมทานอล เก็บสารสกัดเป็น fraction ย่อยๆ ได้ทั้งสิ้น 9 fractions โดยใช้สัญลักษณ์แทนเป็น EF1, EF2, EF3,.....EF9 ตามลำดับ นำ fraction ย่อย EF3 มาแยกต่อด้วยวิธี PLC ได้สาร docosyl ferulate (**15**) (9 mg, 0.0007%) และ clausine-V (**16**) (11 mg, 0.0008%) มาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และเฮกเซนเป็น mobile phase เพิ่มหัวของตัวทำละลายขึ้นเรื่อยๆ โดยการเติม เอทิลอะซิเตท จนกระทั่งเปลี่ยนเป็น 100% เอทิลอะซิเตท จากนั้นปรับหัวของตัวทำละลายให้เพิ่มขึ้นด้วยการเติมเมทานอล จนกระทั่งเป็น 100% เมทานอล เก็บสารสกัดเป็น fraction ย่อยๆ ได้ทั้งสิ้น 6 fractions โดยใช้สัญลักษณ์แทนเป็น EF5.1, EF5.2, EF5.3,.....EF5.6 ตามลำดับ นำ fraction EF5.2 และ 5.6 มาตกผลึกด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ได้ 7-methoxymurrayacine (**17**) (17 mg, 0.0013%) และ clausine (**18**) (12 mg, 0.0009%) ตามลำดับ นำ fraction EF8 และ EF9 มาตกผลึกด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ได้ lansine (**19**) (4.8 g, 0.37%) และ clausine-K (**20**) (2.2 mg, 0.17%) ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย *Plasmodium falciparum*

เชื้อมาลาเรียที่ใช้ศึกษาคือ *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ K1 ซึ่งคือต่อยาหลายชนิด (multidrug resistant strain) การเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องทดลองโดยวิธีของ Trager & Jensen (1976) โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 20 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperrazine-N'-2-ethanesulfonic acid), 32 mM NaHCO₃ และ 10% heat inactivated human serum ที่มี 3% erythrocytes ที่ 37°C ใน 3% CO₂ incubator โดยทำการ passaged เชื้อโดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงทุกวัน

ทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารที่จะทดสอบด้วย microculture radioisotope techniques ใช้วิธีของ Desjardines et al. (1979) โดยสรุปการทดลองคร่าวๆดังนี้ ใส่ 200 μ L ของ 1.5% erythrocytes ที่มี 1% parasitemia (เชื้ออยู่ในระยะ early ring stage) ใน well ของ plate เติมน้ำที่จะทดสอบในขนาดต่างๆกันลงไป 25 μ L (สารละลายใน 1% DMSO, ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 0.1%) นำไปบ่มที่ 37°C ใน 3% CO₂ incubator จากนั้นเติม 25 μ L ของ [³H] hypoxanthine (Amersham, USA) ที่อยู่ใน culture medium (มีความเข้มข้น 0.5 μ Ci) ลงในแต่ละ well นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาณของ [³H] hypoxanthine ที่ถูก incorporate เป็น

หน่วย count per minute ด้วยเครื่อง TopCount microplate scintillation counter (Packard, USA). ปริมาณของ [^3H] hypoxanthine จะสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย จำนวนเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียโดยใช้สูตร

$$\% \text{ parasite growth} = \text{CPM}_T / \text{CPM}_U \times 100$$

CPM_T เท่ากับ count per minute ของเชื้อที่ถูก treat ด้วยสารที่ทดสอบ หรือ reference drug (dihydroartemisinin; DHA) ส่วน CPM_U เท่ากับ count per minute ของเชื้อกลุ่มควบคุมที่ treat ด้วย vehicle (DMSO) ความเข้มข้นของสารทดสอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของ parasite ได้ 50 % ถือเป็นค่า IC_{50}

2. ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans*

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Candida albicans* (ATCC 90028) ใน potato dextrose agar (PDA) ที่ 30°C เป็นเวลา 3 วันนำเชื้อ 3-5 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงใน RPMI-1640 โดยทำการเขย่าที่ 30°C จนได้เชื้อ 5×10^5 CFU/ml.

ในการทดสอบทำโดยใส่ 45 μL ของ yeast cell suspension ใน well ของ 384-well plate แล้วเติมสารที่จะทดสอบในขนาดต่างๆกันลงไป 5 μL นำไปบ่มที่ 37°C นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10 μL ของ 62.5 $\mu\text{g/ml}$ resazurin solution บ่มที่ 37°C นาน 30 นาที ทำการวัดปริมาณสาร fluorescent ที่ excitation wavelength ที่ 530 nm และ emission wavelength ที่ 590 nm ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, USA) Fluorescence signal จาก wells ที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ (RPMI-1640) ใช้เป็น background control เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อคำนวณจาก fluorescence units ของเซลล์ที่ treat ด้วยสารทดสอบ (FU_T) และเซลล์ที่ไม่ถูก treat (FU_C) โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (\text{FU}_T / \text{FU}_C)] \times 100$$

ความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อได้ 50% (คือค่า IC_{50}) หาได้จาก dose-response curve ที่ plot โดยใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบ 6 ค่า เมื่อทำการเจือจางสารแบบ 2-fold serially dilution ในการทดสอบใช้ Amphotericin B และ 0.5% DMSO เป็น positive และ negative control ตามลำดับ

3. ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis*

เชื้อที่ใช้ศึกษาเป็นเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37Ra ที่ express green fluorescent protein (GFP; H37Ra gfp) ที่ establish โดย Changsen, et al. (2003). ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ H37Ra gfp บน 7H10 agar ที่มี 30 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin ที่ 37°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หรือจน

สังเกตเห็นเชื้อเจริญเติบโต การเตรียม starter cultures โดยนำเชื้อ 2-3 โคโลนีใส่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด 7H9 broth ที่เสริมด้วย 0.2% v/v Middlebrook OADC enrichment solution (BD Biosciences) และ 30 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin นำไปบ่มที่ 37°C ใน shaker incubator (200 rpm) จนกระทั่งได้ความขุ่นของเชื้อเมื่อนำไปวัด optical density (OD) ที่ 550 nm ระหว่าง 0.5 and 1

ในการเตรียมเชื้อปริมาณมากๆ ทำโดยนำ starter cultures มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 7H9 broth ในอัตราส่วน 1/10 แล้วบ่มที่ 37°C ใน shaker incubator (200 rpm) จนกระทั่งความขุ่นของเชื้อเมื่อนำไปวัด OD ที่ 550 nm อยู่ในช่วง 0.5 ถึง 1 นำ suspension ของเชื้อไปปั่นเหวี่ยง นำตะกอนเซลล์ไปล้างและ suspend ใน PBS buffer แล้วทำการ sonicate 8 ครั้งๆละ 15 วินาที นำ sonicated samples มาแบ่ง และนำไปเก็บที่ -80°C นาน 2 ถึง 3 เดือนก่อนนำมาใช้ การหาปริมาณของเชื้อใน stock ทำโดยใช้ colony forming unit (cfu) assay ปริมาณของเชื้อที่เหมาะสมในการทำ anti-TB assay หาได้จากการทำ serial dilutions โดยใช้เชื้อที่เจริญในวันที่ 7 ซึ่งอยู่ในช่วง log phase มาทำการศึกษา ทำการเจือจางสารที่จะทดสอบเป็น serial dilutions ใน 5% DMSO ในการทดสอบทำโดยเติม 5 μl ของสารที่จะทดสอบในขนาดต่างๆกันลงใน well ของ 384-well plate เติม 45 μl ของเชื้อที่มีปริมาณ 2×10^4 ถึง 1×10^5 cfu/ml ลงใน well นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจวัด fluorescence signals ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, USA) ที่ excitation และ emission wavelengths ที่ 485 nm and 535 nm ตามลำดับ fluorescence signals ที่ day zero ใช้เป็น background control การทดลองทำ 2 ซ้ำ เปอร์เซนต์ของ growth inhibition คำนวณจากค่า fluorescence unit ของเชื้อที่ treat กับสารทดสอบ (FU_T) และเชื้อที่ไม่ถูก treat ด้วยสารทดสอบ (FU_C) ดังสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (\text{FU}_T / \text{FU}_C)] \times 100$$

ความเข้มข้นของสารหรือยาที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 90% ถือเป็นค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) การทดสอบใช้ Rifampicin, streptomycin, isoniazid และ ofloxacin เป็น positive controls และ 0.5% DMSO เป็น a negative control

4. ฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่

- KB cell line (epidermoid carcinoma of oral cavity, ATCC-CCL-17)
- MCF-7 cell line (breast adenocarcinoma, ATCC HTB-22)
- NCI-H187 (small cell lung carcinoma, ATCC CRL-5804)

ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี Resazurin Microplate Assay (REMA) โดยสรุปการทดลองคร่าวๆดังนี้ นำเซลล์ที่อยู่ในระยะ log phase มาทำการเจือจางให้ได้ปริมาณ

เซลล์ 7×10^4 cells/ml สำหรับ KB และ 9×10^4 cells/ml สำหรับ NCI-H187 และ MCF-7 ทำการเจือจางสารที่จะทดสอบใน 5% DMSO ในการทดสอบเติม 5 μ l ของสารที่จะทดสอบในขนาดต่างๆกันลงใน well ของ 384-well plates จากนั้นเติม 45 μ l ของ cell suspension ที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่ 37°C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 3 วันสำหรับ KB และ MCF-7 และ 5 วันสำหรับ NCI-H187 จากนั้นเติม 12.5 μ l ของ 62.5 μ g/ml resazurin solution ลงในแต่ละ well นำไปบ่มที่ 37°C นาน 4 ชั่วโมง ทำการวัด fluorescence signal ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 multi-detection microplate reader (Molecular Devices, USA) ที่ excitation และ emission wavelengths 530 nm และ 590 nm ตามลำดับ เปอร์เซนต์การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์คำนวณโดยใช้สูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100$$

FU_T เท่ากับ fluorescent units ของเซลล์ที่ treat ด้วยสารทดสอบ

FU_C เท่ากับ fluorescent units ของเซลล์ที่ไม่ได้ treat ด้วยสารทดสอบ

ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ 50% (IC₅₀) หาได้จาก Dose response curves ที่ plot โดยใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบ 6 ค่า เมื่อทำการเจือจางสารแบบ 2-fold serially diluted โดยใช้ SOFTMax Pro software (Molecular Devices, USA)

5. การหาค่าเซลล์ปกติ Vero cells (African green monkey kidney)

ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ Vero cells โดยใช้ Green Fluorescent Protein (GFP) based assay เตรียม GFP-expressing Vero cell line โดยการ transfecting Vero cells (ATCC CCL-81) ด้วย pEGFP-N1 plasmid (Clontech) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน minimal essential medium ที่เสริมด้วย 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1.5 g/L sodium bicarbonate และ 0.8 mg/mL geneticin ที่ 37°C ใน 5% CO₂ incubator ในการทดสอบเติม 5 μ l ของสารที่จะทดสอบในขนาดต่างๆกันลงใน well ของ 384-well plates เติม 45 μ l ของ cell suspension (3.3×10^4 cells/ml) ลงในแต่ละ well บ่มที่ 37°C ใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 4 วัน ทำการวัด fluorescence signals ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, USA) ที่ excitation และ emission wavelengths 485 nm และ 535 nm ตามลำดับ fluorescence signal ที่ day 0 ใช้เป็น background control เปอร์เซนต์ cytotoxicity คำนวณโดยใช้สูตร

$$\% \text{ Cytotoxicity} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100$$

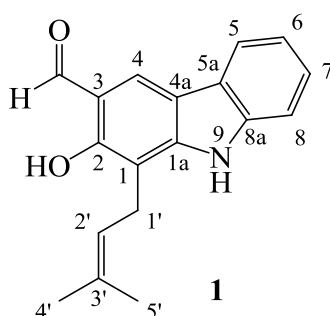
FU_T เท่ากับ mean fluorescent units ของเซลล์ที่ treat ด้วยสารทดสอบ

FU_C เท่ากับ mean fluorescent units ของเซลล์ที่ไม่ได้ treat ด้วยสารทดสอบ

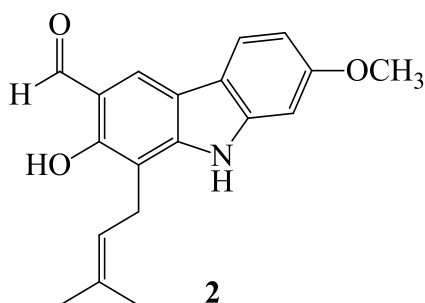
ค่า IC_{50} หาได้จาก dose-response curves ที่ plot โดยใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบ 6 ค่า เมื่อทำการเจือจางสารแบบ FU_T เท่ากับ 2-fold serially dilution โดยใช้ SOFTMax Pro software (Molecular Devices, USA) มี Ellipticine และ 0.5% DMSO เป็น positive และ negative control ตามลำดับ

4. ผลการทดลอง

คุณสมบัติทางกายภาพและสเปกโตรสโกปีของสารที่แยกได้ทั้งหมด

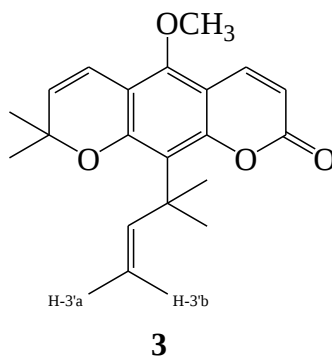


Heptaphylline (1). ผลึกสีเหลือง ; จุดหลอมเหลว $168-170^{\circ}\text{C}$, IR (KBr) $V_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 3292, 2926, 1614, 1474, 1449, 1329, 1237, 1183, 739 ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 11.65 (1H, s, OH), 9.91 (1H, s, CHO), 8.23 (1H, br s, NH), 8.04 (1H, s, H-4), 7.97 (1H, d, $J = 7.8 \text{ Hz}$, H-5), 7.37-7.41 (2H, m, H-7 and H-8), 7.24-7.28 (1H, m, H-6), 5.31 (1H, t, $J = 6.9 \text{ Hz}$, H-2'), 3.64 (2H, d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, H-1'), 1.90 (3H, s, H-5'), 1.77 (3H, s, H-4') ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 195.4 (CHO), 157.8 (C-2), 145.0 (C-1a), 140.1 (C-8a), 134.2 (C-3'), 125.9 (C-4), 125.3 (C-7), 123.6 (C-5a), 121.2 (C-2'), 120.8 (C-6), 119.8 (C-5), 117.3 (C-4a), 115.4 (C-3), 110.9 (C-8), 109.0 (C-1), 25.7 (C-4'), 22.8 (C-1'), 18.1 (C-5')

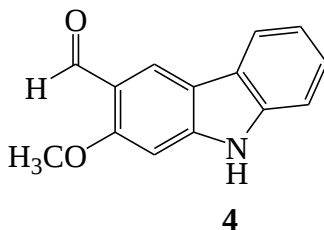


7-Methoxyheptaphylline (2). ของแข็งสีเหลือง; mp $150-152^{\circ}\text{C}$, IR (KBr) $V_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 3326, 2958, 1612, 1465, 1324, 1188, 1161, 1028 ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 11.62 (1H, s, OH), 9.86 (1H, s, CHO), 8.16 (1H, br s, NH), 7.88 (1H, s, H-4), 7.81 (1H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-5), 6.89 (1H, br

d, $J = 1.6$ Hz, H-8), 6.87 (1H, dd, $J = 8.5, 1.8$ Hz, H-6), 5.30 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-2'), 3.90 (3H, s, OCH₃), 3.60 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 1.88 (3H, s, H-5'), 1.76 (3H, s, H-4'); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 195.3 (CHO), 159.0 (C-7), 157.3 (C-2), 145.2 (C-1a), 141.5 (C-8a), 134.1 (C-3'), 124.0 (C-4), 121.3 (C-2'), 120.5 (C-5), 117.5 (C-4a), 117.2 (C-5a), 115.3 (C-3), 109.0 (C-1), 108.9 (C-6), 95.6 (C-8), 55.7 (OCH₃-7), 25.7 (C-4'), 22.8 (C-1'), 18.1 (C-5'); HRMS m/z 310.1440 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₉H₁₉NO₃+H, 310.1443).

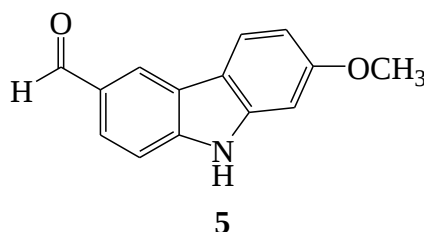


Dentatin (3). ของแข็งไม่มีสี ; mp 93-94 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm⁻¹ : 3437, 2966, 1728, 1612, 1588, 1463, 1381, 1328, 1193, 1139, 1086, 986. 970 ; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.86 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 6.56 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-6), 6.30 (1H, dd, $J = 17.4, 10.6$ Hz, H-2'), 6.18 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 5.69 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-7), 4.94 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-3'b), 4.87 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-3'a), 3.82 (3H, s, OCH₃), 1.66 (6H, s, C-4' and C-5'), 1.45 (6H, s, 2CH₃-8) ; ¹³C NMR (CDCl₃) δ 160.7 (C-2), 156.0 (C-9a), 154.0 (C-1a), 151.2 (C-5), 149.8 (C-2'), 138.9 (C-4), 130.4 (C-7), 119.2 (C-10), 116.3 (C-6), 111.7 (C-3), 108.3 (C-5a), 108.2 (C-3'), 107.5 (C-4a), 77.4 (C-8), 63.4 (OCH₃), 41.2 (C-1'), 29.4 (C-4' and C-5'), 27.5 (2CH₃-8).

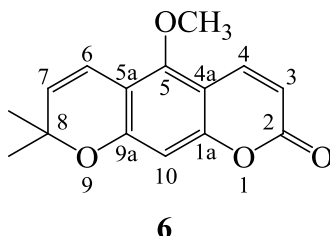


Glycosinine (4). ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน; mp 184-186 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm⁻¹ : 3311, 2926, 1666, 1607, 1461, 1261, 1202, 1168, 1033, 808 ; ¹H NMR (CDCl₃) δ 10.42 (1H, s, CHO), 8.49 (1H, s, H-4), 8.25 (1H, s, NH), 7.93 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.29-7.34 (2H, m, H-7 and H-

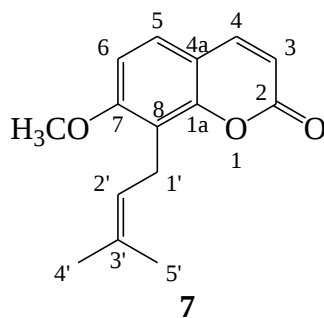
8), 7.17-7.21 (1H, m, H-6), 6.80 (1H, s, H-1), 3.92 (3H, s, OCH₃) ; ¹³C NMR (CDCl₃) δ 189.5 (CHO), 161.6 (C-2), 145.0 (C-1a), 139.9 (C-8a), 125.8 (C-7), 123.7 (C-5a), 121.8 (C-4), 120.8 (C-6), 120.2 (C-5), 119.0 (C-3), 117.4 (C-4a), 110.7 (C-8), 92.4 (C-1), 55.9 (OCH₃).



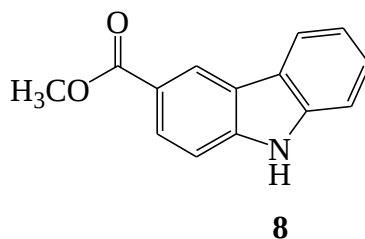
Clauszoline-K (5). ของแข็งสีเหลือง; mp 214-216 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm⁻¹ : 3313, 2843, 1672, 1606, 1570, 1479, 1323, 1238, 1199, 1161, 1121, 1025, 822 ; ¹H NMR (CDCl₃) δ 10.04 (1H, s, CHO), 9.09 (1H, s, NH), 8.47 (1H, s, H-4), 7.97 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5), 7.87 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, H-2), 7.44 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-1), 6.94 (1H, br d, *J* = 2.0 Hz H-8), 6.90 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, H-6), 3.90 (3H, s, OCH₃) ; ¹³C NMR (CDCl₃) δ 192.2 (CHO), 159.7 (C-7), 143.7 (C-1a), 141.6 (C-8a), 128.9 (C-3), 126.3 (C-2), 123.7 (C-4a), 122.9 (C-4), 121.4 (C-5), 116.9 (C-5a), 110.6 (C-1), 109.2 (C-6), 95.2 (C-8), 55.6 (OCH₃) ; HRMS *m/z* 226.0868 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₄H₁₁NO₂+H, 226.0868).



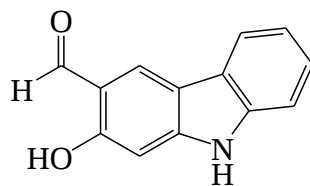
Xanthoxyletin (6). ของแข็งไม่มีสี ; mp 131-133 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm⁻¹ : 3434, 2971, 1725, 1616, 1600, 1140, 1083 ; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.83 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-4), 6.56 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H-6), 6.54 (1H, s, H-10), 6.19 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-3), 5.69 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H-7), 3.85 (3H, s, OCH₃), 1.45 (6H, s, 2CH₃-8) ; ¹³C NMR (CDCl₃) δ 161.0 (C-2), 157.5 (C-9a), 155.5 (C-1a), 152.8 (C-5), 138.5 (C-4), 130.6 (C-7), 115.8 (C-6), 112.3 (C-3), 111.3 (C-5a), 107.3 (C-4a), 100.8 (C-10), 77.5 (C-8), 63.6 (OCH₃), 28.1 (2CH₃-8).



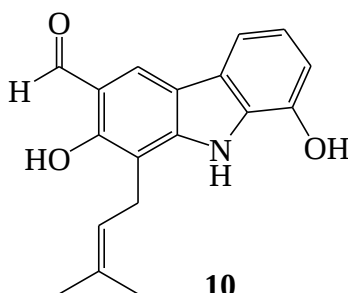
Osthol (7). ของแข็งไม่มีสี ; mp 79-81 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} : 3414, 2914, 1718, 1604, 1277, 1252, 1121, 1090, 840 ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.60 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-4), 7.28 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-5), 6.83 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-6), 6.22 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-3), 5.22 (1H, t, J = 7.2 Hz, H-2'), 3.91 (3H, s, OCH_3), 3.53 (2H, d, J = 7.2 Hz, H-1'), 1.83 (3H, s, C-5'), 1.66 (3H, s, C-4') ; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 161.4 (C-2), 160.2 (C-7), 152.8 (C-1a), 143.7 (C-4), 132.6 (C-3'), 126.2 (C-5), 121.1 (C-2'), 118.0 (C-8), 113.0 (C-3), 107.3 (C-6), 107.3 (C-4a), 56.0 (OCH_3), 25.8 (C-4'), 21.9 (C-1'), 17.9 (C-5') ; HRMS m/z 267.0996 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3+\text{Na}$, 267.0997).



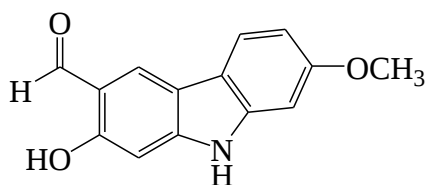
Methyl carbazole-3-carboxylate (8). ของแข็งสีเหลือง; mp 180-182 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} : 3289, 2953, 1686, 1628, 1605, 1436, 1308, 1247, 731 ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.82 (1H, s, H-4), 8.34 (1H, br s, NH), 8.12-8.15 (2H, m, H-2 and H-5), 7.45-7.47 (2H, m, H-7 and H-8), 7.42 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-1), 7.29 (1H, m, H-6), 3.98 (3H, s, OCH_3) ; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 167.8 (C=O), 142.2 (C-1a), 139.9 (C-8a), 127.4 (C-2), 126.5 (C-7), 123.3 (C-5a), 123.1 (C-3), 122.9 (C-4), 121.4 (C-4a), 120.6 (C-5), 120.3 (C-6), 110.9 (C-8), 110.1 (C-1), 51.9 (OCH_3) ; HRMS m/z 226.0951 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2+\text{H}$, 226.0868).

**9**

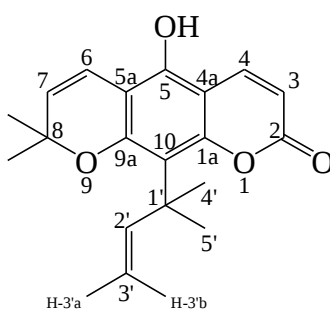
Mukonal (9). ของแข็งสีเหลือง ; mp 230-231 °C, IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3376, 2961, 1651, 1457, 1327, 1249, 1167, 774 ; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 9.84 (1H, s, CHO), 8.11 (1H, s, H-4), 7.92 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.33-7.34 (2H, m, H-7 and H-8), 7.17-7.21 (1H, m, H-6), 6.80 (1H, s, H-1) ; ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 195.3 (CHO), 160.5 (C-2), 146.4 (C-1a), 141.0 (C-8a), 127.3 (C-4), 125.8 (C-7), 123.1 (C-5a), 120.3 (C-6), 119.5 (C-5), 117.9 (C-4a), 114.9 (C-3), 110.9 (C-8), 96.4 (C-1) ; HRMS m/z 212.0712 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_2+\text{H}$, 212.0712).

**10**

Heptazoline (10). ของแข็งสีเหลือง ; mp 208-209 °C, IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3278, 2926, 1610, 1587, 1324, 1222, 1083 ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 11.55 (1H, s, OH), 9.85 (1H, s, CHO), 9.04 (1H, br s, NH), 7.98 (1H, s, H-4), 7.49 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.06 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-6), 6.83 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7), 5.30 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-2'), 3.60 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 1.86 (3H, s, H-5'), 1.71 (3H, s, H-4') ; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 195.3 (CHO), 157.4 (C-2), 144.7 (C-1a), 142.1 (C-8), 133.8 (C-3'), 129.5 (C-8a), 125.7 (C-4), 125.3 (C-5a), 121.3 (C-6), 121.0 (C-2'), 117.8 (C-4a), 115.3 (C-3), 111.5 (C-5), 111.2 (C-7), 109.3 (C-1), 25.6 (C-4'), 22.9 (C-1'), 17.9 (C-5') ; HRMS m/z 296.1292 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3+\text{H}$, 296.1287).

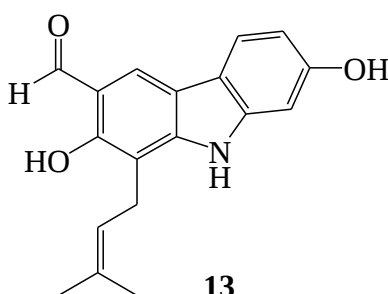
**11**

7-Methoxymukonal (11). ขอบแข็งสีเหลือง; mp 208-209 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} : 3264, 2952, 1615, 1469, 1353, 1315, 1247, 1183, 1157, 1028, 815 ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 11.42 (1H, s, OH), 9.92 (1H, s, CHO), 8.15 (1H, br s, NH), 8.04 (1H, s, H-4), 7.84 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 6.89 (1H, s, H-8), 6.87 (1H, d, J = 8.1, 2.1 Hz, H-6), 6.83 (1H, s, H-1), 3.89 (3H, s, OCH_3) ; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 195.2 (CHO), 160.0 (C-2), 159.1 (C-7), 146.6 (C-1a), 142.4 (C-8a), 125.6 (C-4), 120.1 (C-5), 118.0 (C-4a), 116.7 (C-5a), 114.9 (C-3), 108.3 (C-6), 96.1 (C-1), 95.2 (C-8), 55.0 (OCH_3 -7) ; HRMS m/z 242.0816 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_3+\text{H}$, 242.0817).



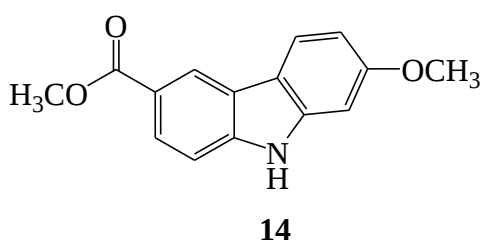
12

Nordentatin (12). ผลึกสีเหลืองอ่อน ; mp 179-181 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} : 3248, 2974, 1685, 1605, 1588, 1559, 1318, 1178, 1138 ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.04 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-4), 6.55 (1H, d, J = 9.9 Hz, H-6), 6.38 (1H, s, OH), 6.27 (1H, dd, J = 17.4, 10.6 Hz, H-2'), 6.13 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-3), 5.67 (1H, d, J = 9.9 Hz, H-7), 4.91 (1H, d, J = 17.4 Hz, H-3'b), 4.84 (1H, d, J = 10.6 Hz, H-3'a), 1.63 (6H, s, C-4' and C-5'), 1.43 (6H, s, 2CH_3 -8) ; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 161.7 (C-2), 156.0 (C-9a), 154.1 (C-1a), 150.0 (C-2'), 146.8 (C-5), 139.5 (C-4), 129.8 (C-7), 116.0 (C-10), 115.2 (C-6), 110.0 (C-3), 108.0 (C-3'), 106.2 (C-5a), 104.0 (C-4a), 77.1 (C-8), 41.0 (C-1'), 29.5 (C-4' and C-5'), 27.3 (2CH_3 -8).

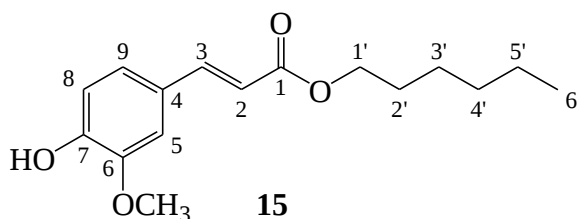


13

7-Hydroxyheptaphylline (13). ของแข็งสีเหลือง; mp 193-195 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} : 3257, 2920, 1615, 1454, 1327, 1221, 1156 ; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 9.82 (1H, s, CHO), 7.86 (1H, s, H-4), 7.72 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.82 (1H, br d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.72 (1H, dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, H-6), 5.27 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-2'), 3.56 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 1.83 (3H, s, H-5'), 1.70 (3H, s, H-4') ; ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 195.3 (CHO), 156.9 (C-2), 155.8 (C-7), 145.2 (C-1a), 141.9 (C-8a), 133.7 (C-3'), 123.8 (C-4), 121.2 (C-2'), 120.4 (C-5), 117.7 (C-4a), 116.6 (C-5a), 115.0 (C-3), 109.4 (C-6), 109.0 (C-1), 97.3 (C-8), 25.6 (C-4'), 22.8 (C-1'), 17.9 (C-5') ; HRMS m/z 318.1108 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3+\text{Na}$, 318.1106).

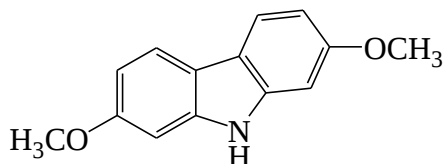


Clausine-C (14). ของแข็งสีเหลือง; mp 193-195 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} : 3285, 2918, 2453, 1698, 1600, 1440, 1315, 1261, 1206, 1165, 1097, 1030 ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.70 (1H, s, H-4), 8.23 (1H, br s, NH), 8.06 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2), 7.98 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.38 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-1), 6.93 (1H, br d, $J = 1.5$ Hz, H-8), 6.90 (1H, dd, $J = 8.5, 1.9$ Hz, H-6), 3.96 (3H, s, OCH_3 -ester), 3.90 (3H, s, OCH_3 -7) ; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 168.0 (C=O), 159.6 (C-7), 142.3 (C-1a), 141.3 (C-8a), 126.3 (C-2), 123.3 (C-4a), 121.9 (C-4), 121.5 (C-3), 121.4 (C-5), 117.1 (C-5a), 109.8 (C-1), 109.0 (C-6), 95.1 (C-8), 55.6 (OCH_3 -7), 51.9 (OCH_3 -ester).

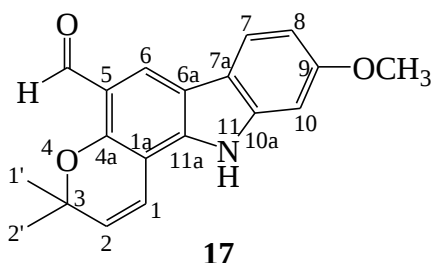


Docosyl ferulate (15). ของแข็งไม่มีสี; mp 70-71 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} : 3456, 2918, 2850, 1624, 1599, 1519, 1472, 1286, 1254, 1182 ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.60 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-3), 7.07 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-9), 7.03 (1H, s, H-5), 6.91 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-8), 6.29 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-2), 5.84 (1H, s, OH), 4.18 (1H, t, $J = 6.7$ Hz, H-1'), 3.93 (3H, s, OCH_3), 1.67-1.71

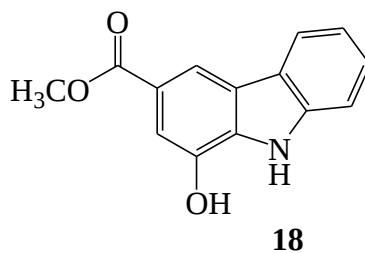
(4H, m, H-2' and H-3'), 1.38 (4H, m, H-4' and H-5'), 0.88 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, H-6') ; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 167.3 (CHO), 147.9 (C-7), 146.7 (C-6), 144.6 (C-3), 127.1 (C-4), 123.0 (C-9), 115.7 (C-2), 114.7 (C-8), 109.3 (C-5), 64.6 (C-1'), 55.9 (OCH_3), 31.9 (C-5'), 28.8 (C-2'), 26.0 (C-3'), 22.7 (C-4'), 14.1 (C-6').

**16**

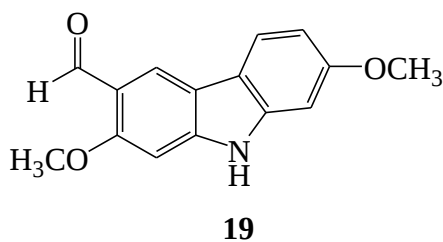
Clausine-V (16). ผลึกรูปเข็มสีขาว ; mp 240-242 $^{\circ}\text{C}$, IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3384, 2928, 1610, 1457, 1265, 1233, 1160, 1120, 1027, 825, 806 ; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 7.74 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4 and H-5), 6.84 (2H, s, H-1 and H-8), 6.72 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3 and H-6), 3.81 (6H, s, OCH_3 -2 and -7) ; ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 157.9 (C-2 and C-7), 141.3 (C-1a and C-8a), 119.6 (C-4 or C-5), 119.5 (C-4 or C-5), 117.2 (C-4a and C-5a), 107.2 (C-3 and C-6), 94.7 (C-1 and C-8), 55.2 (OCH_3 -2 and OCH_3 -7).

**17**

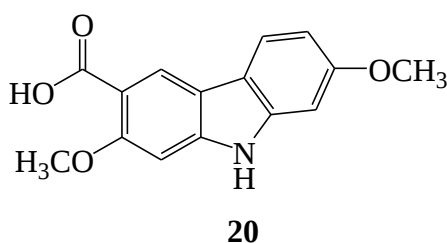
7-Methoxymurrayacine (17). ขอบ้างสีเหลือง; mp 220-222 $^{\circ}\text{C}$, IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3186, 2985, 1633, 1576, 1425, 1316, 1234, 1201, 1156, 813 ; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 10.34 (1H, s, CHO), 8.20 (1H, s, H-6), 7.77 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-7), 6.86 (1H, br d, $J = 2.1$ Hz, H-10), 6.76 (1H, dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, H-8), 6.68 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-1), 5.70 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-2), 3.83 (3H, s, OCH_3), 1.47 (6H, s, C-1' and C-2') ; ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 189.9 (CHO), 158.8 (C-9), 154.2 (C-4a), 142.2 (C-10a), 141.4 (C-11a), 129.5 (C-2), 120.6 (C-7), 118.3 (C-6), 117.7 (C-5), 117.6 (C-6a), 117.5 (C-7a), 116.6 (C-1), 108.1 (C-8), 104.1 (C-1a), 95.7 (C-10), 77.3 (C-3), 55.6 (OCH_3), 27.5 (C-1' and C-2').



Clausine-E (18). ของแข็งสีเทาดำ; mp 193-194 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} : 3330, 2949, 1698, 1663, 1594, 1500, 1436, 1355, 1318, 1263, 1088, 1005, 759; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 8.30 (1H, s, H-4), 7.99 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.44 (1H, s, H-2), 7.42 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-8), 7.35 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, H-7), 7.16 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6), 3.87 (3H, s, OCH_3); ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 168.8 (C=O), 142.0 (C-1), 139.9 (C-8a), 132.8 (C-1a), 126.1 (C-7), 124.1 (C-4a), 123.6 (C-5a), 121.0 (C-3), 120.4 (C-5), 119.6 (C-6), 115.0 (C-4), 111.3 (C-8), 110.9 (C-2), 51.9 (OCH_3).

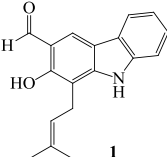
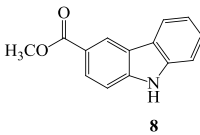
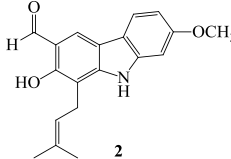
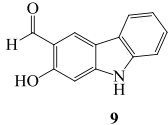
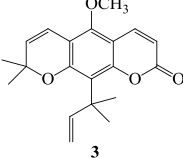
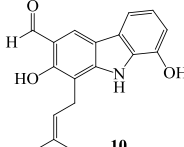
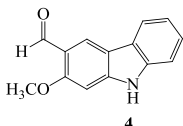
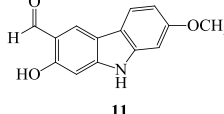
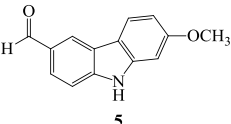
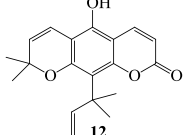
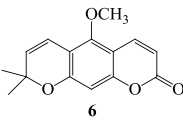
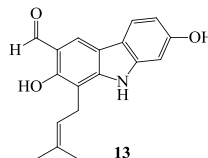
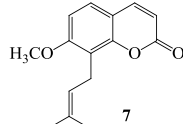
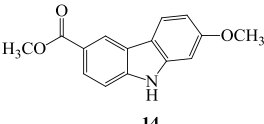


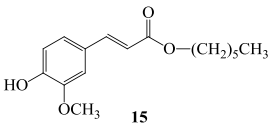
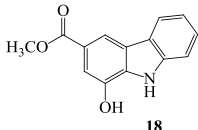
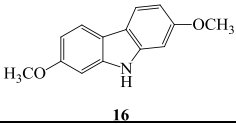
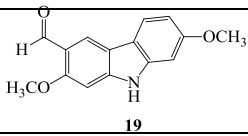
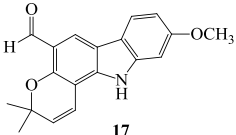
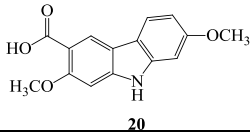
Lansine (19). ของแข็งสีเหลืองเข้ม; mp 210-212 °C (dec.), IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} : 3249, 2858, 1665, 1604, 1471, 1430, 1274, 1251, 1157, 1036, 819; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 10.32 (1H, s, CHO), 8.33 (1H, s, H-4), 7.81 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 6.92 (2H, s, H-1 and H-8), 6.79 (1H, dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, H-6), 3.97 (OCH_3 -7), 3.86 (OCH_3 -2); ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 190.3 (CHO), 161.1 (C-2), 158.9 (C-7), 146.4 (C-1a), 142.1 (C-8a), 120.24 (C-5), 120.2 (C-4), 117.8 (C-3), 117.6 (C-4a), 117.0 (C-5a), 108.3 (C-6), 95.2 (C-8), 92.3 (C-1); HRMS m/z 278.0392 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_3 + \text{Na}$, 278.0793).



Clausine-K (20). พงสีเทา ; mp 239-240 °C (dec.), IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3446, 3315, 2927, 1664, 1618, 1578, 1200, 1163, 1084 ; ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 11.24 (1H, s, COOH), 8.32 (1H, s, H-4), 7.88 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.02 (1H, s, H-1), 6.96 (1H, br d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.74 (1H, dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, H-6), 3.84 (6H, s, OCH_3 -2 and OCH_3 -7) ; ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 168.3 (COOH), 158.5 (C-7), 157.7 (C-2), 143.8 (C-1a), 142.0 (C-8a), 123.4 (C-4), 120.8 (C-5), 116.6 (C-3), 116.1 (C-4a), 112.9 (C-5a), 108.6 (C-6), 95.5 (C-8), 94.3 (C-1), 56.3 (OCH_3 -2), 55.7 (OCH_3 -7).

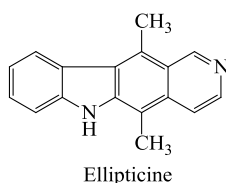
ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ yield ของสารที่แยกสกัดได้

สาร	% yield		สาร	% yield
 1	0.22		 8	0.0012
 2	0.33		 9	0.0018
 3	0.25		 10	0.0004
 4	0.001		 11	0.12
 5	0.0018		 12	0.11
 6	0.09		 13	0.0043
 7	0.005		 14	0.0015

สาร	% yield		สาร	% yield
 15	0.0007		 18	0.0009
 16	0.0008		 19	0.37
 17	0.0013		 20	0.17

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ heptaphylline (I) และ 7-methoxyheptaphylline (II)

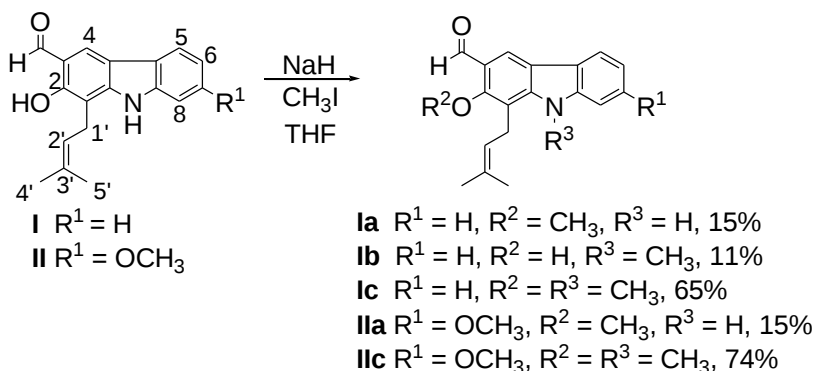
จากการที่สารต้านมะเร็งชนิดหนึ่งชื่อ ellipticine มีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของคาร์บาโซล ซึ่งมีส่วนหนึ่งของโมเลกุลเป็นไพริดีนดังแสดงตามรูป ฉะนั้นนักวิจัยจึงจะพยายามปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline ให้มีหมู่ฟังก์ชันคล้ายกับ ellipticine โดยใช้ประโยชน์ของหมู่อัลดีไฮด์ ซึ่งว่องไวต่อปฏิกิริยา และเนื่องจากทั้ง heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline มีหมู่ prenyl, hydroxyl และไนโตรเจน จึงจะทำปฏิกิริยาต่างๆเช่น methylation, cyclisation, epoxidation, oxime formation และ bromination เพื่ออาจจะทำให้ได้อนุพันธ์ใหม่ๆที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี



1. ปฏิกิริยา methylation ด้วย methyl iodide

เติมสารละลายคาร์บาโซล heptaphylline (0.03 mmole) ใน THF (1 mL) ลงในสารละลาย NaH (0.19 mmole) ใน THF (1 mL) ที่อุณหภูมิ 0°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน จากนั้นเติม MeI ที่เกินพอ (0.1 mL) อย่างช้าๆ ที่อุณหภูมิ 0°C ทำการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 30°C กวนสารละลายเป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายลงในน้ำเย็น แล้วสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (2×20 mL) รวมชั้นสารอินทรีย์เข้าด้วยกัน ล้างน้ำ สารละลายอิมัลชันเกลือแกง ทำให้แห้งด้วย Na₂SO₄ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วย PLC ได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด คือ **Ia**, **Ib** และ **Ic**

ในกรณีของสาร 2 ทำเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร **IIa** และ **IIc**



ภาพที่ 5 ปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิล

2-Methoxyheptaphylline (**1a**). 7.9 mg, 15 % yield, yellow solid; mp 130-131 °C, IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3170, 2989, 1662, 1621, 1596, 1457, 1334, 1230, 1062, 735; ^1H NMR (CDCl_3) δ 10.40 (1H, s, CHO), 8.50 (1H, s, H-4), 8.26 (1H, br s, NH), 8.05 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5), 7.40-7.45 (2H, m, H-7 and H-8), 7.26-7.29 (1H, m, H-6), 5.31 (1H, t, $J = 6.4$ Hz, H-2'), 3.94 (3H, s, OCH_3), 3.70 (2H, d, $J = 6.4$ Hz, H-1'), 1.93 (3H, s, H-5'), 1.79 (3H, s, H-4'); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 190.1 (CHO), 159.3 (C-2), 144.1 (C-1a), 140.2 (C-8a), 134.4 (C-3'), 126.3 (CH-7), 123.7 (C-5a), 122.4 (C-3), 121.4 (CH-2'), 120.8 (CH-4), 120.6 (CH-6), 120.2 (C-1), 120.0 (CH-5), 116.3 (C-4a), 110.9 (CH-8), 64.8 (OCH_3), 25.7 (CH_3 -4'), 23.9 (CH_2 -1'), 18.2 (CH_3 -5'); HRMS m/z 294.1493 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_2+\text{H}$, 294.1494).

9-Methylheptaphylline (**1b**). 5.8 mg, 11 % yield, yellow solid; mp 89-90 °C, IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3414, 2926, 1620, 1483, 1355, 1322, 1235, 1192, 755; ^1H NMR (CDCl_3) δ 11.73 (1H, s, OH), 9.88 (1H, s, CHO), 8.04 (1H, s, H-4), 7.97 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-5), 7.45 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-7), 7.34 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-8), 7.25-7.29 (1H, m, H-6), 5.24 (1H, br t, $J = 5.5$ Hz, H-2'), 4.03 (3H, s, N-CH_3), 3.84 (2H, d, $J = 5.5$ Hz, H-1'), 1.84 (3H, s, H-5'), 1.74 (3H, s, H-4'); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 194.9 (CHO), 158.9 (C-2), 145.3 (C-1a), 142.8 (C-8a), 132.5 (C-3'), 125.7 (CH-7), 124.8 (CH-4), 123.7 (CH-2'), 123.2 (C-5a), 120.6 (CH-6), 119.2 (CH-5), 118.0 (C-4a), 114.7 (C-3), 110.3 (C-1), 108.9 (CH-8), 32.1 (NCH_3), 25.7 (CH_3 -4'), 22.8 (CH_2 -1'), 18.2 (CH_3 -5'); HRMS m/z 294.1488 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_2+\text{H}$, 294.1494).

2-Methoxy-9-methylheptaphylline (**1c**). 36 mg, 65 % yield, yellow solid; mp 75-78 °C, IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 2924, 2853, 1666, 1622, 1592, 1450, 1429, 1321, 1242, 1196, 1049, 743; ^1H NMR (CDCl_3) δ 10.38 (1H, s, CHO), 8.51 (1H, s, H-4), 8.06 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5), 7.48 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.37 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-8), 7.28 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-6), 5.27 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, H-2'), 4.01 (3H, s, N-CH_3), 3.93 (3H, s, OCH_3), 3.89 (2H, d, $J = 5.5$ Hz, H-1'), 1.86 (3H, s, H-5'), 1.74 (3H, s, H-4'); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 190.0 (CHO), 160.3 (C-2), 144.2 (C-1a), 142.8 (C-8a), 132.8 (C-3'), 126.2 (CH-7), 124.2 (CH-2'), 123.2 (C-5a), 121.7 (C-4a), 120.9 (C-1), 120.5 (CH-4), 120.1 (CH-6), 119.8 (CH-5), 117.8 (C-3), 109.0 (CH-8), 65.0 (OCH_3), 32.0 (NCH_3), 25.6 (CH_3 -4'), 23.6 (CH_2 -1'), 18.3 (CH_3 -5'); HRMS m/z 308.1645 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_2+\text{H}$, 308.1645).

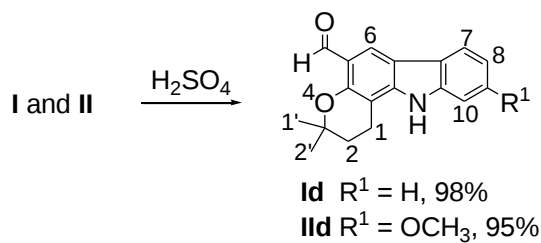
2,7-Dimethoxyheptaphylline (**IIa**). 8.7 mg, 15 % yield, yellow solid; mp 148-150 °C, IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3247, 2921, 1662, 1599, 1451, 1424, 1322, 1229, 1200, 1161, 1061; ^1H NMR (CDCl_3) δ 10.39 (1H, s, CHO), 8.38 (1H, s, H-4), 8.14 (1H, br s, NH), 7.90 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 6.92 (1H, br d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.88 (1H, dd, J = 8.5, 2.1 Hz, H-6), 5.30 (1H, t, J = 6.6 Hz, H-2'), 3.93 (3H, s, OCH_3 -2), 3.90 (3H, s, OCH_3 -7), 3.68 (2H, d, J = 6.6 Hz, H-1'), 1.93 (3H, s, H-5'), 1.79 (3H, s, H-4'); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 190.1 (CHO), 159.4 (C-2), 158.7 (C-7), 144.2 (C-1a), 141.5 (C-8a), 134.4 (C-3'), 122.4 (C-3), 121.5 (CH-5), 121.3 (CH-2'), 120.4 (C-4a), 118.8 (CH-4), 117.4 (C-1), 116.1 (C-5a), 109.2 (CH-6), 95.4 (CH-8), 64.8 (OCH_3 -2), 55.7 (OCH_3 -7), 25.7 (CH_3 -4'), 23.9 (CH_2 -1'), 18.2 (CH_3 -5'); HRMS m/z 324.1594 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_3+\text{H}$, 324.1594).

2,7-Dimethoxy-9-methylheptaphylline (**IIc**). 45 mg, 74 % yield, yellow solid; mp 144-146 °C, IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 2927, 2849, 1672, 1591, 1442, 1357, 1243, 1228, 1180, 1132, 1054, 1041, 834, 804; ^1H NMR (CDCl_3) δ 10.36 (1H, s, CHO), 8.37 (1H, s, H-4), 7.90 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 6.88 (1H, dd, J = 8.5, 1.4 Hz, H-6), 6.81 (1H, br d, J = 1.4 Hz, H-8), 5.26 (1H, t, J = 4.9 Hz, H-2'), 3.97 (3H, s, N-CH_3), 3.92 (6H, s, OCH_3 -2 and OCH_3 -7), 3.85 (2H, d, J = 4.9 Hz, H-1'), 1.85 (3H, s, H-5'), 1.74 (3H, s, H-4'); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 190.0 (CHO), 159.6 (C-2), 159.4 (C-7), 144.4 (C-1a), 144.2 (C-8a), 132.7 (C-3'), 124.2 (CH-2'), 121.7 (C-3), 121.1 (C-4a), 120.8 (CH-5), 118.5 (CH-4), 117.7 (C-1), 116.9 (C-5a), 108.4 (CH-6), 93.9 (CH-8), 65.0 (OCH_3 -2), 55.7 (OCH_3 -7), 32.0 (NCH_3), 25.6 (CH_3 -4'), 23.6 (CH_2 -1'), 18.3 (CH_3 -5'); HRMS m/z 338.1748 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_3+\text{H}$, 338.1750).

2. ปฏิกริยากับกรดซัลฟูริกเข้มข้น

เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นที่ละลายลงในคาร์บาโซล บดเข้าด้วยกันในโถรงเป็นเวลา 5 นาที ปลอ่ยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายอิมตัวของ NaHCO_3 (0.5 mL) และ เอทิลอะซิเตท (2 mL) เติสารละลายลงในน้ำเย็น แล้วสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (2×20 mL) รวมชั้นสารอินทรีย์เข้าด้วยกัน ล้างน้ำ สารละลายอิมตัวเกลือแกง ทำให้แห้งด้วย Na_2SO_4 ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วย PLC ได้สารบริสุทธิ์ **Id**

ในกรณีของสาร 2 ทำเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร **IIId**



ภาพที่ 6 ปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริกเข้มข้น

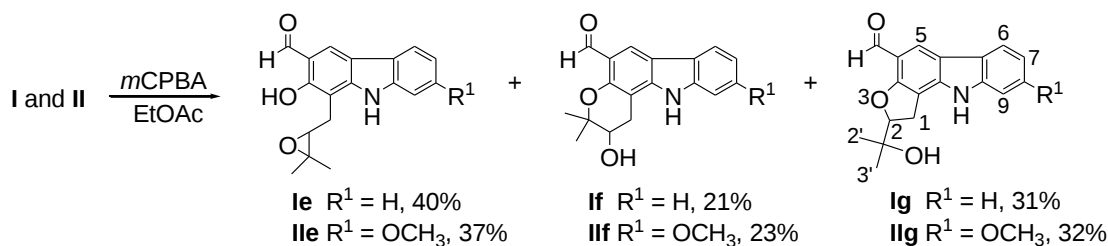
5-Formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (**Id**) [34]. 19.2 mg, 98 % yield, white solid; mp 228-230 °C, IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3263, 2972, 1661, 1603, 1456, 1331, 1238, 1167; ^1H NMR (CDCl_3) δ 10.43 (1H, s, CHO), 8.38 (1H, s, H-6), 8.01 (1H, br s, NH), 7.91 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-7), 7.27-7.34 (2H, m, H-9 and H-10), 7.15-7.18 (1H, m, H-8), 2.82 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-1), 1.94 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-2), 1.39 (6H, s, H-1' and H-2'); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 189.9 (CHO), 155.6 (C-4a), 143.4 (C-11a), 139.9 (C-10a), 125.5 (CH-9), 124.4 (C-7a), 120.8 (CH-8), 120.2 (CH-7), 119.2 (CH-6), 119.0 (C-5), 116.4 (C-6a), 110.6 (CH-10), 102.4 (C-1a), 75.2 (C-3), 31.6 (CH_2 -2), 26.7 (CH_3 -1' and 2'), 18.0 (CH_2 -1); HRMS m/z 302.1157 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_2+\text{Na}$, 302.1157).

5-Formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyrano[3,2-a]carbazole (**IId**). 20.6 mg, 95 % yield, white solid; mp 210-211 °C, IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3165, 2928, 1595, 1444, 1322, 1241, 1200, 1160; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 10.33 (1H, s, CHO), 8.47 (1H, s, H-6), 7.77 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-7), 6.89 (1H, br d, $J = 1.7$ Hz, H-10), 6.76 (1H, dd, $J = 8.5, 1.7$ Hz, H-8), 3.83 (3H, s, OCH_3), 2.84 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-1), 1.93 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-2), 1.38 (6H, s, H-1' and H-2'); ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 194.7 (CHO), 162.5 (C-9), 159.0 (C-4a), 148.6 (C-11a), 146.0 (C-10a), 133.3 (C-7a), 124.4 (CH-7), 121.78 (CH-6), 121.76 (C-5), 120.6 (C-6a), 112.0 (CH-8), 106.7 (C-1a), 99.7 (CH-10), 79.1 (C-3), 59.4 (OCH_3), 35.5 (CH_2 -2), 30.4 (CH_3 -1' and 2'), 21.7 (CH_2 -1); HRMS m/z 310.1436 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_3+\text{H}$, 310.1443).

3. ปฏิกิริยากับ *m*CPBA

เติม *m*-CPBA (1.2 eq, 0.08 mmole) ลงในสารละลายคาร์บาโซลในเอทิลอะซิเตท 1 mL กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง เทสารละลายลงในน้ำเย็น แล้วสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (2×20 mL) รวมชั้นสารอินทรีย์เข้าด้วยกัน ล้างน้ำ สารละลายอิมตัวเกลือแอง ทำให้แห้งด้วย Na_2SO_4 ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วย PLC ได้สารบริสุทธิ์ **Ie**, **If** และ **Ig**

ในกรณีของสาร 2 ทำเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร **IIf**, **IIIf** และ **IIg**



ภาพที่ 7 ปฏิกริยากับ mCPBA

1-(3'-Methylbutyl-2',3'-oxirane)mukonal (**Ie**). 8.27 mg, 40 % yield, yellow solid; mp 241-242 °C, IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3330, 2968, 1637, 1455, 1432, 1379, 1344, 1231, 895, 783, 747; ^1H NMR (CDCl_3) δ 11.78 (1H, s, OH), 9.92 (1H, s, CHO), 9.45 (1H, br s, NH), 8.10 (1H, s, H-4), 7.98 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5), 7.46 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 7.39 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.25 (1H, m, H-6), 3.96 (1H, dd, $J = 15.4, 1.1$ Hz, H-1'a or b), 2.99 (1H, dd, $J = 9.6, 1.1$ Hz, H-2'), 2.46 (1H, dd, $J = 15.4, 9.6$ Hz, H-1'b or a), 1.58 (3H, s, H-5'), 1.41 (3H, s, H-4'); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 195.3 (CHO), 157.9 (C-2), 146.0 (C-1a), 140.6 (C-8a), 126.1 (CH-4), 125.9 (CH-7), 123.6 (C-5a), 120.7 (CH-6), 119.7 (CH-5), 117.6 (C-4a), 115.2 (C-3), 111.4 (CH-8), 106.6 (C-1), 64.4 (CH-2'), 60.3 (C-3'), 24.8 (CH_3 -4'), 24.1 (CH_2 -1'), 19.0 (CH_3 -5'); HRMS m/z 318.1107 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3+\text{Na}$, 318.1106).

5-Formyl-2-hydroxy-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (**If**). 4.34 mg, 21 % yield, pale yellow amorphous solid; mp 283-284 °C, IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3435, 2925, 1592, 1452, 1326, 1228; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 10.35 (1H, s, CHO), 8.35 (1H, s, H-6), 7.92 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-7), 7.39 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-10), 7.31 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-9), 7.16 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-8), 3.93 (1H, t, $J = 5.6$ Hz, H-2), 3.12 (1H, dd, $J = 16.3, 5.6$ Hz, H-1a or b), 2.80 (1H, dd, $J = 16.4, 5.6$ Hz, H-1b or a), 1.44 (3H, s, H-1' or H-2'), 1.35 (3H, s, H-2' or H-1'); ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 190.6 (CHO), 154.5 (C-4a), 144.6 (C-11a), 140.8 (C-10a), 125.4 (CH-9), 123.8 (C-7a), 120.1 (CH-8), 119.7 (CH-7), 119.1 (CH-6), 117.8 (C-5), 117.0 (C-6a), 110.9 (CH-10), 101.9 (C-1a), 78.1 (C-3), 68.4 (CH-2), 26.7 (CH_2 -1), 25.0 (CH_3 -1' or 2'), 20.1 (CH_3 -2' or 1'); HRMS m/z 318.1106 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3+\text{Na}$, 318.1106).

4-Formyl-2-(1'-hydroxy-1'-methylethyl)furano[3,2-a]carbazole (**Ig**). 6.4 mg, 31 % yield, yellow solid; mp 214 °C (dec.), IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3392, 1660, 1629, 1596, 1456, 1378, 1230, 1141, 955; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 10.04 (1H, s, CHO), 8.21 (1H, s, H-5), 7.92 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-6), 7.32-7.36 (2H, m, H-8 and 9), 7.17 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-7), 4.86 (1H, t, $J = 9.2$ Hz, H-2), 3.25 (2H, d, $J = 9.2$ Hz, H-1), 1.31 (3H, s, H-2' or 3'), 1.23 (3H, s, H-3' or 2'); ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 189.85 (CHO), 160.9 (C-3a), 141.6 (C-10a), 141.1 (C-9a), 125.7 (CH-8),

123.7 (C-6a), 121.9 (CH-5), 120.3 (CH-7), 119.7 (CH-6), 118.99 (C-5a), 113.4 (C-4), 110.98 (CH-9), 107.6 (C-1a), 91.8 (CH-2), 71.54 (C-1'), 27.8 (CH₂-1), 24.7 (CH₃-2' or 3'), 23.8 (CH₃-3' or 2'); HRMS m/z 296.1282 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₈H₁₇NO₃+H, 296.1286).

1-(3'-Methylbutyl-2,3'-oxirane)-7-methoxymukonal (**IIe**). 8.43 mg, 37 % yield, dark yellow amorphous solid; mp 145-147 °C, IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3304, 2967, 1618, 1430, 1330, 1238, 1160; ¹H NMR (CDCl₃) δ 11.73 (1H, s, OH), 9.87 (1H, s, CHO), 9.37 (1H, br s, NH), 7.93 (1H, s, H-4), 7.80 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 6.95 (1H, s, H-8), 6.85 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H-6), 3.92 (1H, d, J = 15.5 Hz, H-1'a or b), 3.88 (3H, s, OCH₃), 2.99 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-2'), 2.42 (1H, dd, J = 15.5, 9.7 Hz, H-1'b or a), 1.56 (3H, s, H-5'), 1.40 (3H, s, H-4'); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 195.3 (CHO), 159.0 (C-7), 157.3 (C-2), 146.1 (C-1a), 141.9 (C-8a), 124.7 (CH-4), 120.4 (CH-5), 117.7 (C-4a), 117.0 (C-5a), 115.0 (C-3), 109.2 (CH-6), 106.5 (C-1), 95.7 (CH-8), 64.5 (CH-2'), 60.4 (C-3'), 55.6 (OCH₃), 24.8 (CH₃-4'), 24.0 (CH₂-1'), 18.9 (CH₃-5'); HRMS m/z 348.1207 [M+Na]⁺ (calcd. for C₁₉H₁₉NO₄+Na, 348.1212).

5-Formyl-2-hydroxy-3,3-dimethyl-9-methoxypyran[3,2-a]carbazole (**IIIf**). 5.24 mg, 23 % yield, yellow solid; mp 142-143 °C, IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3388, 2929, 1596, 1323, 1233, 1199, 1159; ¹H NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ 10.33 (1H, s, CHO), 8.22 (1H, s, H-6), 7.79 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-7), 6.93 (1H, s, H-10), 6.78 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-8), 3.92 (1H, m, H-2), 3.85 (3H, s, OCH₃), 3.12 (1H, dd, J = 16.2, 5.4 Hz, H-1a or b), 2.80 (1H, dd, J = 16.2, 7.2 Hz, H-1b or a), 1.44 (3H, s, H-1' or H-2'), 1.35 (3H, s, H-2' or H-1'); ¹³C NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ 190.6 (CHO), 158.8 (C-9), 154.0 (C-4a), 144.9 (C-11a), 142.3 (C-10a), 120.3 (CH-7), 117.8 (CH-6), 117.59 (C-7a), 117.56 (C-5), 117.1 (C-6a), 108.3 (CH-8), 102.0 (C-1a), 95.5 (CH-10), 78.0 (C-3), 68.4 (CH-2), 55.2 (OCH₃), 26.7 (CH₂-1), 24.9 (CH₃-1' or 2'), 20.0 (CH₃-2' or 1'); HRMS m/z 348.1217 [M+Na]⁺ (calcd. for C₁₉H₁₉NO₄+Na, 348.1212).

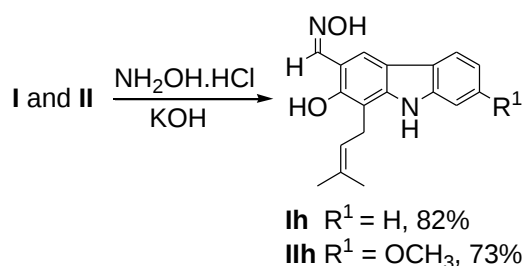
4-Formyl-2-(1'-hydroxy-1'-methylethyl)-8-methoxyfurano[3,2-a]carbazole (**IIg**). 7.3 mg, 32 % yield, pale yellow solid; mp 208-210 °C (dec.), IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3392, 1660, 1629, 1596, 1456, 1378, 1230, 1141, 955; ¹H NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ 10.01 (1H, s, CHO), 8.06 (1H, s, H-5), 7.76 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-6), 6.86 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-9), 6.76 (1H, dd, J = 8.5, 2.1 Hz, H-7), 4.83 (1H, t, J = 9.0 Hz, H-2), 3.25 (1H, dd, J = 13.0, 9.0 Hz, H-1a or b), 3.17 (1H, dd, J = 13.0, 9.0 Hz, H-1b or a), 1.30 (3H, s, H-2' or 3'), 1.22 (3H, s, H-3' or 2'); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 189.8 (CHO), 160.4 (C-3a), 158.9 (C-8), 142.4 (C-9a), 141.8 (C-10a), 120.5 (C-6a), 120.4 (CH-5), 119.1 (CH-6), 117.5 (C-5a), 113.3 (C-4), 108.2 (CH-7), 107.6 (C-1a), 95.8 (CH-9), 91.6 (CH-

2), 71.5 (C-1'), 55.5 (OCH₃), 27.8 (CH₂-1), 24.8 (CH₃-2' or 3'), 23.8 (CH₃-3' or 2'); HRMS m/z 326.1387 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₉H₁₉NO₄+H, 326.1392).

4. ปฏิกิริยาการเกิด oxime

เติม NH₂OH•HCl ลงในสารละลายคาร์บาโซลในเอทิลอะซิเตท 2 mL เติม สารละลาย KOH ในเอทานอล (1 mL) แล้วกวนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เทสารละลายลงในน้ำเย็น แล้วสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (2×20 mL) รวมชั้นสารอินทรีย์เข้าด้วยกัน ล้างน้ำ สารละลายอิมตัวเกลือแกง ทำให้แห้งด้วย Na₂SO₄ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วย PLC ได้สารบริสุทธิ์ **Ih**

ในกรณีของสาร 2 ทำเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร **IIh**



ภาพที่ 8 ปฏิกิริยาการเกิด oxime

Heptaphylline oxime (**Ih**). 16.9 mg, 82 % yield, dark brown amorphous solid; mp 167-169 °C, IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3443, 2927, 1612, 1438, 1363, 1328, 1305, 1236, 1179, 998, 741; ¹H NMR (CDCl₃) δ 10.22 (1H, br s, OH), 8.39 (1H, s, CH-oxime), 8.03 (1H, br s, NH), 7.93 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-5), 7.71 (1H, s, H-4), 7.32-7.40 (2H, m, H-7 and H-8), 7.21 (1H, t, J = 7.7 Hz, H-6), 7.15 (1H, br s, N-OH), 5.35 (1H, t, J = 6.7 Hz, H-2'), 3.68 (2H, d, J = 6.8 Hz, H-1'), 1.91 (3H, s, H-5'), 1.77 (3H, s, H-4'); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 154.2 (CH-oxime), 153.6 (C-2), 141.6 (C-1a), 139.8 (C-8a), 133.6 (C-3'), 125.0 (CH-7), 123.7 (C-5a), 121.8 (CH-2'), 121.0 (CH-4), 120.0 (CH-6), 119.5 (CH-5), 116.7 (C-4a), 110.6 (CH-8), 110.3 (C-3), 109.5 (C-1), 25.7 (CH₃-4'), 23.6 (CH₂-1'), 18.1 (CH₃-5'); HRMS m/z 295.1438 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₈H₁₈N₂O₂+H, 295.1447).

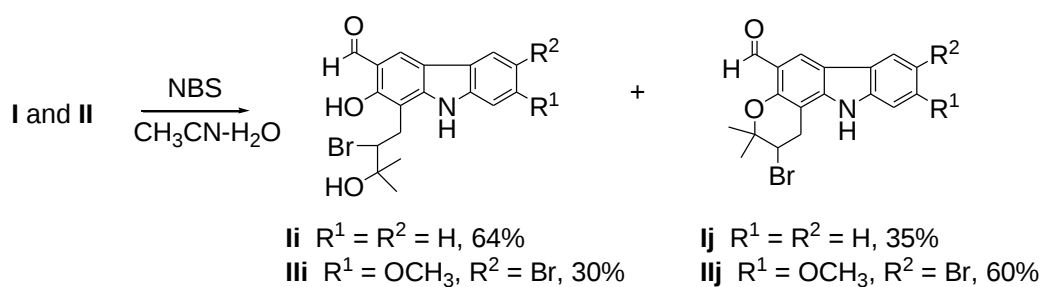
7-Methoxyheptaphylline oxime (**IIh**). 16.6 mg, 73 % yield, dark yellow amorphous solid; mp 201-203 °C, IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3442, 2911, 2534, 1616, 1434, 1319, 1234, 1171, 993; ¹H NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ 8.26 (1H, s, CH-oxime), 7.71 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 7.50 (1H, s, H-4), 6.84 (1H, s, H-8), 6.73 (1H, dd, J = 8.5, 2.1 Hz, H-6), 5.26 (1H, t, J = 6.8 Hz, H-2'), 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.56 (2H, d, J = 6.8 Hz, H-1'), 1.81 (3H, s, H-5'), 1.67 (3H, s, H-4'); ¹³C NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ 158.2 (C-7), 153.2 (CH-oxime), 152.7 (C-2), 141.3 (C-1a), 141.2 (C-8a), 133.2 (C-3'),

122.0 (CH-2'), 120.0 (CH-5), 119.6 (CH-4), 117.5 (C-5a), 116.6 (C-4a), 110.5 (C-3), 109.4 (C-1), 107.9 (CH-6), 95.3 (CH-8), 55.6 (OCH₃), 25.6 (CH₃-4'), 23.5 (CH₂-1'), 18.0 (CH₃-5'); HRMS m/z 325.1544 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₉H₂₀N₂O₃+H, 325.1546).

5. ปฏิกิริยาการเติม *N*-Bromosuccinamide (NBS)

เติมสารละลาย *N*-Bromosuccinamide (0.01 mmole) ใน MeCN:H₂O (1:1, 2 mL) ลงในสารละลายคาร์บาโซลในเอทิลอะซิเตท 2 mL ที่อุณหภูมิ 0°C และกวนที่อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมอุณหภูมิของสารละลายเป็นอุณหภูมิห้องพร้อมทั้งกวนตลอดเวลาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทสารละลายลงในน้ำเย็น แล้วสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (2×20 mL) รวมชั้นสารอินทรีย์เข้าด้วยกัน ล้างน้ำ สารละลายอิมัลชันแกว่ง ทำให้แห้งด้วย Na₂SO₄ ระเหยแห้ง ทำให้บริสุทธิ์ด้วย PLC ได้สารบริสุทธิ์ **II** และ **Ij**

ในกรณีของสาร 2 ทำเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร **III** และ **Iij**



ภาพที่ 9 ปฏิกิริยา bromination

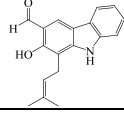
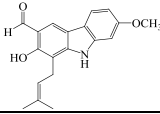
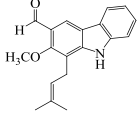
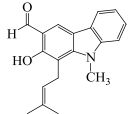
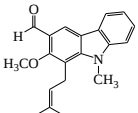
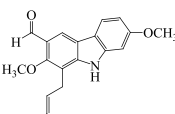
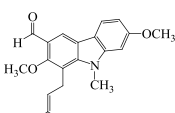
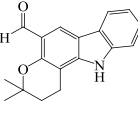
1-(2'-Bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)mukonal (**II**). 21.7 mg, 64 % yield, pale yellow solid; mp 130-132 °C, IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3408, 2978, 1614, 1474, 1384, 1330, 1230, 743; ¹H NMR (CDCl₃) δ 11.74 (1H, s, OH-2), 9.93 (1H, s, CHO), 8.65 (1H, br s, NH), 8.11 (1H, s, H-4), 7.99 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-5), 7.39-7.45 (2H, m, H-7 and H-8), 7.29 (1H, m, H-6), 4.59 (1H, dd, J = 10.6, 2.0 Hz, H-2'), 3.83 (1H, dd, J = 14.9, 2.2 Hz, H-1'a or b), 3.23 (1H, dd, J = 14.9, 10.6 Hz, H-1'b or a), 2.29 (1H, br s, OH-3'), 1.55-1.56 (6H, s, H-4' and H-5'); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 195.4 (CHO), 158.5 (C-2), 145.3 (C-1a), 140.3 (C-8a), 126.0 (CH-7), 125.9 (CH-4), 123.7 (C-5a), 120.9 (CH-6), 119.8 (CH-5), 117.6 (C-4a), 115.2 (C-3), 111.0 (CH-8), 107.3 (C-1), 73.2 (C-3'), 68.1 (CH-2'), 30.4 (CH₂-1'), 27.4 (CH₃-4' or 5'), 26.5 (CH₃-5' or 4'); HRMS m/z 398.0368 [M+Na]⁺ (calcd. for C₁₈H₁₈BrNO₃+Na, 398.0368).

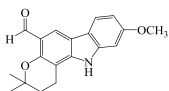
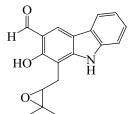
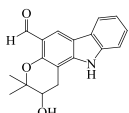
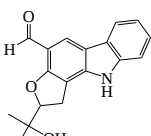
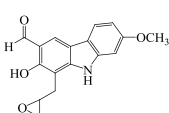
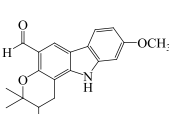
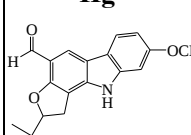
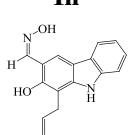
2-Bromo-5-formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (**Ij**). 11.3 mg, 35 % yield, pale yellow solid; mp 232-234 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} : 3255, 2980, 1664, 1601, 1457, 1334, 1241, 1175, 1129, 737; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 10.33 (1H, s, CHO), 8.38 (1H, s, H-6), 7.91 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-7), 7.36 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-10), 7.30 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-9), 7.16 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-8), 4.37 (1H, dd, $J = 8.7, 5.8$ Hz, H-2), 3.50 (1H, dd, $J = 16.7, 5.8$ Hz, H-1a or b), 3.30 (1H, dd, $J = 16.7, 8.8$ Hz, H-1b or a), 1.58 (3H, s, H-1' or H-2'), 1.48 (3H, s, H-2' or H-1'); ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 190.0 (CHO), 154.0 (C-4a), 143.3 (C-11a), 140.6 (C-10a), 125.6 (CH-9), 123.8 (C-7a), 120.4 (CH-8), 119.9 (CH-7), 119.7 (CH-6), 117.9 (C-5), 117.3 (C-6a), 111.0 (CH-10), 101.7 (C-1a), 77.8 (C-3), 51.2 (CH-2), 30.1 (CH_2 -1), 26.7 (CH_3 -1' or 2'), 21.6 (CH_3 -2' or 1'); HRMS m/z 381.0342 $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{BrNO}_2+\text{Na}$, 381.0340).

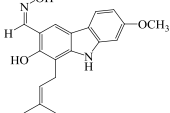
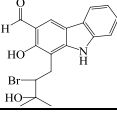
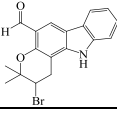
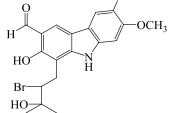
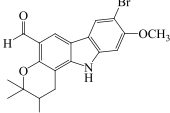
1-(2'-Bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)-6-bromo-7-methoxymukoral (**Iii**). 13.1 mg, 30 % yield, brown solid; mp 118-120 °C, IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} : 3363, 2918, 1619, 1466, 1363, 1291, 1201, 1168, 1038; ^1H NMR (CDCl_3) δ 11.64 (1H, s, OH), 9.84 (1H, s, CHO), 8.59 (1H, br s, NH), 8.03 (1H, s, H-4), 7.89 (1H, s, H-5), 6.91 (1H, s, H-8), 4.50 (1H, dd, $J = 10.6, 2.4$ Hz, H-2'), 3.91 (3H, s, OCH_3), 3.74 (1H, dd, $J = 14.9, 2.4$ Hz, H-1'a or b), 3.13 (1H, dd, $J = 14.9, 10.6$ Hz, H-1'b or a), 1.49 (3H, s, H-5'), 1.48 (3H, s, H-4'); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 195.4 (CHO), 158.1 (C-7), 154.7 (C-2), 145.3 (C-1a), 140.5 (C-8a), 124.9 (CH-4), 124.1 (CH-5), 118.1 (C-5a), 116.8 (C-4a), 115.4 (C-3), 107.6 (C-1), 104.8 (C-6), 95.0 (CH-8), 73.2 (C-3'), 67.9 (CH-2'), 56.5 (OCH_3), 30.4 (CH_2 -1'), 27.4 (CH_3 -4' or 5'), 26.5 (CH_3 -5' or 4'); HRMS m/z 483.9763 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{NO}_4+\text{H}$, 483.9763).

2,8-Dibromo-5-formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyran[3,2-a]carbazole (**Iij**). 25.2 mg, 60 % yield, pale yellow solid; mp 260 °C (dec.), IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} : 3414, 2976, 1665, 1593, 1444, 1200, 1169; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 10.29 (1H, s, CHO), 8.20 (1H, s, H-6), 8.01 (1H, s, H-7), 6.94 (1H, s, H-10), 4.37 (1H, dd, $J = 8.5, 5.8$ Hz, H-2), 3.88 (3H, s, OCH_3), 3.49 (1H, dd, $J = 17.0, 5.7$ Hz, H-1a or b), 3.24-3.31 (1H, m, H-1b or a), 1.57 (3H, s, H-1' or H-2'), 1.47 (3H, s, H-2' or H-1'); ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 190.0 (CHO), 154.4 (C-9), 153.6 (C-4), 143.6 (C-11a), 141.1 (C-10a), 124.0 (CH-7), 118.8 (CH-6), 118.3 (C-7a), 118.1 (C-5), 116.5 (C-6a), 104.1 (C-8), 103.5 (C-1a), 95.0 (CH-10), 77.8 (C-3), 56.3 (OCH_3), 51.1 (CH-2), 30.0 (CH_2 -1), 26.6 (CH_3 -1' or 2'), 21.7 (CH_3 -2' or 1'); HRMS m/z 487.9475 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{Br}_2\text{NO}_3+\text{Na}$, 487.9473).

ตารางที่ 1ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ทั้งหมด

Compound	yield	AntiTB (MIC)	Antimalarial (IC ₅₀ , μ g/ml)	Antifungal (IC ₅₀ , μ g/ml)	Cytotoxicity (IC ₅₀ , μ M)			
					NCI - H187	KB	MCF	Vero cells
I 		Inactive	Inactive	Inactive	1.32	1.61	Inactive	92.74
II 		25.00	Inactive	Inactive	1.68	2.75	84.43	Inactive
Ia 	15	Inactive	Inactive	Inactive	4.49	12.81	31.15	169.86
Ib 	11	25.00	Inactive	Inactive	44.21	166.34	18.92	34.56
Ic 	65	Inactive	Inactive	Inactive	62.52	147.4	ND	148.74
IIa 	15	Inactive	3.27	Inactive	19.51	11.04	23.75	61.07
IIc 	74	Inactive	Inactive	Inactive	4.83	69.77	14.31	45.94
Id 	98	Inactive	Inactive	Inactive	65.19	26.38	93.76	Inactive

Compound	yield	AntiTB (MIC)	Antimalarial (IC ₅₀ , μ g/ml)	Antifungal (IC ₅₀ , μ g/ml)	Cytotoxicity (IC ₅₀ , μ M)			
					NCI - H187	KB	MCF	Vero cells
IIId 	95	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
Ie 	40	Inactive	Inactive	Inactive	5.31	54.82	46.55	74.46
If 	21	Inactive	Inactive	Inactive	6.06	5.99	Inactive	Inactive
Ig 	31	ND	ND	ND	3.05	155.29	ND	Inactive
IIe 	37	12.50	Inactive	Inactive	20.07	9.22	15.24	75.33
IIIf 	23	Inactive	Inactive	Inactive	3.04	120.48	Inactive	Inactive
IIg 	32	ND	ND	ND	12.94	71.21	ND	Inactive
Ih 	82	25	Inactive	Inactive	0.02	0.17	19.26	66.01

Compound	yield	AntiTB (MIC)	Antimalarial (IC ₅₀ , μ g/ml)	Antifungal (IC ₅₀ , μ g/ml)	Cytotoxicity (IC ₅₀ , μ M)			
					NCI - H187	KB	MCF	Vero cells
IIh 	73	6.25	Inactive	Inactive	3.67	18.16	22.90	Inactive
Ii 	64	Inactive	Inactive	24.94	30.19	17.38	18.84	Inactive
Ij 	35	Inactive	Inactive	Inactive	77.44	6.00	20.96	Inactive
IIIi 	30	Inactive	Inactive	Inactive	0.66	36.34	ND	12.53
IIj 	60	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
Isoniazid		0.023						
Rifampicin		0.003						
Dihydroartemisinin			3.7 nM					
Amphotericin B				0.034				
Ellipticine					2.77	1.78		3.82
Doxorubicine							4.34	

ND = No Data

Inactive สำหรับ antiTB, antimalarial และ antifungal > 50 μ g/ml

Inactive สำหรับ cytotoxicity > 200 μ M

โครงสร้างของ heptaphylline (**I**) และ 7-methoxyheptaphylline (**II**) มีหมู่ OH และ NH ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยา methylation โดยใช้ methyl iodide และมี NaH ทำหน้าที่เป็นด่างไปจับโปรตอน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีทั้งที่เป็น monomethylation และ dimethylation จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ทั้งสิ้น 5 สาร ได้แก่ **Ia-Ic**, **IIa** และ **IIc**

จากการที่โมเลกุลของสารตั้งต้นมีพันธะคู่ ขณะเดียวกันก็มีหมู่ hydroxyl เมื่อนำสาร **I** และ **II** ไปทำปฏิกิริยากับกรด จึงทำให้เกิดการ protonation ที่พันธะคู่ ได้คาร์โบแคทไอออนที่เสถียร จากนั้น ออกซิเจนจึงเข้าสร้างพันธะได้เป็นสารประกอบ pyrans **Id** และ **IId** ตามลำดับ

จากการทำปฏิกิริยา epoxidation ของ heptaphylline ด้วย *m*CPBA พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ทั้งสิ้น 3 สาร โดยเป็นการเกิดปฏิกิริยาที่พันธะคู่ ได้เป็น epoxide **Ie** และเนื่องจากปฏิกิริยานี้อยู่ในสถานะที่เป็นกรด จึงทำให้พบการเปิดวง epoxide โดยหมู่ hydroxyl ได้เป็นอนุพันธ์ pyran **If** และ furan **Ig** ซึ่งปฏิกิริยาเช่นนี้ก็พบได้กับสาร 7-methoxyheptaphylline โดยได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร **IIf**, **IIg** และ **IIg** ตามลำดับ

ในการทำปฏิกิริยาควมแน่นให้เกิด oxime นั้น สารเคมีที่ใช้เป็นเกลือ $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ จึงต้องมีการเติมด่าง KOH ลงไปเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ดี เกิดการเข้าสร้างพันธะของไนโตรเจนอะตอม และเกิดการสูญเสียน้ำได้ดียิ่งขึ้น จะเห็นได้ว่าได้ผลผลิต **Ih** และ **IIh** ที่ดี ประมาณ 82 และ 73 % ตามลำดับ

ปฏิกิริยา bromination สามารถทำได้โดยใช้ *N*-bromosuccinamide ในตัวทำละลายผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ เมื่อสารตั้งต้นเป็น heptaphylline พบว่าเกิด bromonium ion ที่พันธะคู่ จากนั้นน้ำเข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3' ได้เป็นสาร **Ii** นอกจากนี้ยังเกิดการชนของออกซิเจนของหมู่ hydroxyl ได้เป็น bromopyran **Ij** อีกด้วย สำหรับ 7-methoxyheptaphylline นั้นปฏิกิริยาก็เกิดคล้ายคลึงกับ heptaphylline แต่พบว่าการเกิดปฏิกิริยา bromination ที่วงอะโรมาติกเพิ่มเติม โดยเกิดการแทนที่ที่ตำแหน่ง ortho กับหมู่ methoxy (ตำแหน่งที่ 6) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น **III** และ **IIj** ตามลำดับ

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด พบว่าในกรณีของฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค สารส่วนใหญ่ไม่แสดงฤทธิ์ (โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดสอบคือ 50 mg/ml) อย่างไรก็ตามพบว่า สาร oxime **IIh** มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 mg/ml ซึ่งออกฤทธิ์ดีที่สุดที่ทดสอบ อนุพันธ์ทั้งหมด ขณะที่ oxime **Ih** มีค่า MIC เท่ากับ 25 mg/ml จะเห็นว่าสารทั้งสอง (**Ih** และ **IIh**) มี

โครงสร้างที่เป็น oxime คล้ายคลึงกัน นอกจากนี้สาร epoxide **IIe** ยังแสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อวัณโรค โดยมีค่า MIC เท่ากับ 12.50 mg/ml

จากการทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียและเชือรานัน พบว่าส่วนใหญ่สารคาร์บาโซลเหล่านี้ไม่แสดงฤทธิ์ดังกล่าว ยกเว้นสาร **IIa** ซึ่งแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 3.27 mg/ml กับเชื้อมาลาเรีย อย่างไรก็ตามผู้วิจัยคิดว่าไม่สามารถหาความสัมพันธ์ทางโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพได้

จากการที่มีการค้นพบว่าสาร ellipticine ซึ่งเป็นอนุพันธ์คาร์บาโซลสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ ทำให้มีการนำอนุพันธ์คาร์บาโซลไปทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งมากขึ้น เช่นเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60) murine leukemia (L1210), มะเร็งปอด (NCI-H1299) มะเร็งลำไส้ (HT29 และ HCT116) สำหรับการทดลองที่ผู้วิจัยได้ทำครั้งนี้ได้ทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งปอด NCI-H187, เซลล์มะเร็งช่องปาก KB, เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 พร้อมทั้งทดสอบกับเซลล์ปกติ Vero cells ผลของการทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 1 จะเห็นว่ามีค่าที่น่าสนใจมากพอควร จากสารตั้งต้น heptaphylline (**I**) และ 7-methoxyheptaphylline (**II**) ซึ่งมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง NCI-H187 เป็น 1.32 และ 1.68 μM กับเซลล์ KB มีค่าเป็น 1.61 และ 2.75 μM แต่กับเซลล์มะเร็ง MCF-7 ค่า IC_{50} ค่อนข้างสูง ซึ่งแสดงว่าสารทั้งสองชนิดนี้ค่อนข้างเลือกสรรเฉพาะเซลล์มะเร็ง NCI-H187 และ KB จากข้อมูลความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cells) ก็พบว่ามีค่าเป็น 92.47 และ inactive ตามลำดับ นั่นแสดงว่าสารทั้งสองนี้น่าจะพัฒนาให้เป็นสารต้านมะเร็งได้ เพราะสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งบางชนิด แต่ขณะเดียวกันก็ไม่ทำลายหรืออย่างน้อยเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ปกติ อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาฤทธิ์กับเซลล์อื่นๆให้มากกว่านี้ และศึกษาให้ลึกซึ้งเพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติม จากผลการทดสอบพบว่าสารอนุพันธ์ **Ia** และ **IIc** แสดงฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง NCI-H187 โดยมีค่า IC_{50} ประมาณ 4-5 μM ขณะที่ อนุพันธ์อื่นที่ได้จากการเติมหมู่เมทิลแสดงฤทธิ์ที่ไม่ค่อยดีนักกับเซลล์ชนิดนี้ สาร **Ia-Ic** และ **IIa** และ **IIc** แสดงฤทธิ์น้อยต่อเซลล์ KB, MCF-7 และ Vero cells ยกเว้น **Ia** และ **IIa** แสดงฤทธิ์ปานกลางกับเซลล์ KB ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 11-13 μM จากผลการทดสอบของสาร **Ia** และ **IIa** กับเซลล์มะเร็ง KB จะเห็นได้ว่าหมู่ methoxy ที่ตำแหน่ง C-2 และหมู่ NH มีความสำคัญต่อฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง KB ผลการทดสอบยังชี้ให้เห็นว่าสาร **Ia** และ **IIc** มีการเลือกสรรที่จะฆ่าเซลล์ NCI-H187 ที่ดี เมื่อดูโดยภาพรวมจะเห็นว่าอนุพันธ์ที่เกิดจากการเติมหมู่เมทิลมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง MCF-7 ดีขึ้นกว่าสารตั้งต้น ยกเว้นสาร **Ic**

ซึ่งไม่แสดงฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งแต่อย่างไรก็ตามอนุพันธ์เหล่านี้มีความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งในระดับปานกลาง

สารประกอบไพแรน **Id** และ **IId** แสดงผลที่ไม่ดีต่อทุกเซลล์ สำหรับอีพอกไซด์ **Ie** และไพแรน **Ig** แสดงผลในการฆ่าเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 5.31 และ 3.05 μM ตามลำดับ ขณะที่แสดงฤทธิ์ที่อ่อน หรือ ไม่ฆ่าเซลล์อื่นๆเลย ในทางตรงข้าม hydroxypyran **If** แสดงฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็ง NCI-H187 และ KB ประมาณ 6 μM ซึ่งมากกว่าสารไพแรน **Id** ที่มีลักษณะคล้ายกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 65.19 และ 26.38 μM ตามลำดับ ผลเช่นนี้ทำให้เชื่อได้ว่าความมีขั้วของสารน่าจะมีส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นที่น่าสังเกตว่าสาร **If** อาจจะเป็นสารที่สามารถพัฒนาไปเป็นสารต้านมะเร็งได้เพราะไม่แสดงฤทธิ์ฆ่าเซลล์ปกติ ในกรณีของสาร **Ile-Ilg** พบว่า ไฮโดรไพแรน **IIf** แสดงฤทธิ์ที่ดี ($IC_{50} = 3.04 \mu M$) ต่อเซลล์ NCI-H187 กว่าไพแรน **IId** ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน (มีค่า $IC_{50} = \text{inactive}$) ซึ่งอาจเนื่องมาจากสารนี้มีขั้วมากกว่าจากผลการทดสอบฤทธิ์ของ **Ie-Ig** และ **Ile-Ilg** จะเห็นว่าอนุพันธ์เหล่านี้แสดงฤทธิ์อย่างคัดสรรกับเซลล์ NCI-H187 ในกรณีของสาร **Ile** แสดงฤทธิ์อ่อนต่อเซลล์ NCI-H187 ($IC_{50} = 20.07 \mu M$) กว่าเซลล์ KB ($IC_{50} = 9.22 \mu M$) ซึ่งตรงข้ามกับฤทธิ์ของ **Ie, Ig, IIf** และ **Ilg** เมื่อเปรียบเทียบสารเอพอกไซด์ **Ie** และ **Ile** จะเห็นว่าฤทธิ์ตรงข้ามกันอาจเนื่องมาจากหมู่ methoxy ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 มีความชอบกับเซลล์ KB ในทางตรงกันข้ามกับสาร **IIf** ต่อเซลล์ KB ($IC_{50} = 120.48 \mu M$) ซึ่งต่ำกว่าสาร **If** ($IC_{50} = 5.99 \mu M$) อาจอธิบายได้ว่าหมู่ methoxy ของ pyrano alcohol ทำให้ฤทธิ์ต่อเซลล์ KB ลดลง สำหรับกรณีฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็ง MCF-7 นั้นโดยทั่วไปไม่ค่อยแสดงฤทธิ์ที่ดี ยกเว้นสาร **Ile** ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.24 μM

ได้มีการรายงานว่าคาร์บาโซลแบบ amidine มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง (30) ดังนั้นจึงได้สังเคราะห์สารอนุพันธ์ oxime ซึ่งมีโครงสร้างคล้าย amidine ขึ้นมาและคาดหวังว่าจะแสดงฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งที่ดี ผลการทดสอบปรากฏว่า oxime **Ih** แสดงฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งที่ดีขึ้นมากกับเซลล์ NCI-H187 และ KB ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.02 และ 0.17 μM ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสูงเป็น 66 และ 9 เท่าเมื่อเทียบกับสารตั้งต้น heptaphylline จะเห็นได้ว่าสาร **Ih** แสดงฤทธิ์ที่อ่อนกับเซลล์ปกติ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 66.01 μM จากผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าหมู่ oxime น่าจะเป็นหมู่ที่สำคัญในการฆ่าเซลล์มะเร็ง ในกรณีของเซลล์ MCF-7 พบว่า **Ih** และ **IIf** ก็ให้ค่าที่ดีปานกลางโดย

มีค่า $IC_{50} = 19.26$ และ $22.90 \mu M$ ซึ่งสาร oxime ทั้งสองตัวนี้ก็ยังไม่เหมาะกับการใช้รักษามะเร็งชนิด MCF-7

จากการรายงานข่าวสาร pyrimidocarbazolidione (ER37326) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง KB ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ $0.35 \mu M$ โดยสารนี้มีหมู่ amino หรือ acetyl ที่ตำแหน่ง 8 ซึ่งได้พิสูจน์ได้ว่าเป็นหมู่ที่จำเป็นในการออกฤทธิ์ อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าสาร **Ih** แสดงฤทธิ์ที่แรงกว่าสาร ER37326 เป็นที่น่าสังเกตว่าทั้งสาร ER37326 และสาร **Ih** ก็มีหมู่oxime ที่ตำแหน่งเดียวกัน ในกรณีของสาร **Ih** แสดงฤทธิ์ที่น้อยกว่า **Ih** ทั้งเซลล์ NCI-H187 และ KB ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 3.67 และ $18.16 \mu M$ ตามลำดับ และยังไม่ออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์ปกติ นั้นแสดงว่าหมู่ methoxy ที่ตำแหน่ง 7 ลดความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งดังกล่าว

ได้มีรายงานการวิจัยว่าสาร chlorocarbazole เป็นสารต้านมะเร็งชนิดหนึ่ง ทางคณะผู้วิจัยจึงพยายามสังเคราะห์สารประกอบประเภท halogen ขึ้น โดยทำการสังเคราะห์สารประกอบ bromo carbazole และทำการประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสาร **III** แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุดในบรรดาอนุพันธ์เหล่านี้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $0.66 \mu M$ กับเซลล์ NCI-H187 ซึ่งสูงกว่าสาร **IIf** และ **Ilg** ถึงประมาณ 2.5 เท่า หากเปรียบเทียบกับสาร 7-methoxyheptaphylline อย่างไรก็ตามสารนี้แสดงฤทธิ์ปานกลางกับเซลล์ปกติด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ $12.53 \mu M$ นอกจากนี้ สาร **Ij** ยังแสดงฤทธิ์ที่เฉพาะกับเซลล์ KB ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ $6 \mu M$

สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบสำหรับการทดลองนี้คือ ellipticine ซึ่งมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง $1.7-3.8 \mu M$ เป็นที่น่าสนใจว่า สาร **Ih** แสดงฤทธิ์ที่ดีกว่าประมาณ 138 และ 10 เท่าตามลำดับ ขณะที่ **III** แสดงฤทธิ์ต่อเซลล์ NCI-H187 สูงกว่า ellipticine ประมาณ 4 เท่า ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสาร **Ih** น่าจะเป็นสารที่สามารถถูกพัฒนาต่อเป็นสารต้านมะเร็งได้ เพราะแสดงฤทธิ์ที่ดีในการฆ่าเซลล์มะเร็ง NCI-H187 และ KB แต่แสดงฤทธิ์ที่อ่อนต่อเซลล์ปกติ แต่อาจไม่เหมาะกับการจะใช้รักษามะเร็งเต้านม จากการทดสอบค่าการละลายพบว่า สาร **Ih** ละลายได้ดีมากในแอลกอฮอล์ (เมทานอลและเอทานอล) แต่ละลายได้น้อยในน้ำ หากจะมีการพัฒนาต่อไปอาจจะต้องมีการเติมหมู่ฟังก์ชันบางหมู่ลงไปโดยใช้กระบวนการสังเคราะห์เพื่อให้ละลายน้ำได้ดีขึ้น

5. สรุปผลการทดลอง

จากการแยกสกัดรากของส่องฟ้าพบว่าได้สารบริสุทธิ์ทั้งสิ้นจำนวน 20 สาร ได้แก่ heptaphylline (1), 7-methoxyheptaphylline (2), dentatin (3), glycosinine (4), clauszoline-K (5), xanthoxyletin (6), osthol (7), methyl carbazole-3-carboxylate (8), mukonal (9), heptazoline (10), 7-methoxymukonal (11), nordentatin (12), 7-hydroxyheptaphylline (13), clausine-C (14), docosyl ferulate (15), clausine-V (16), 7-methoxymurrayacine (17), clausine-E (18), lansine (19), clausine-K (20) เมื่อนำสาร heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline ไปทำการดัดแปลงโครงสร้างได้อนุพันธ์ทั้งสิ้น 19 อนุพันธ์ โดยใช้ปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิล ปฏิกิริยาการปิดวง ปฏิกิริยาการกับ m-CPBA ปฏิกิริยาการเกิดออกซิมและปฏิกิริยาโบรมิเนชัน เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* ด้านเชื้อมาลาเรียต่อเชื้อ *Plasmodium falciparum* และด้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* พบว่าสารส่วนใหญ่ไม่ค่อยแสดงฤทธิ์ที่คั่นก ยกเว้นสาร **Ia** ซึ่งแสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรียโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.27 mg/ml สำหรับฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งนั้นได้ทดสอบกับเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดคือ NCI-H187 (มะเร็งปอด), MCF-7 (มะเร็งเต้านม), KB (มะเร็งช่องปาก) และเซลล์ปกติ (Vero cell lines). พบว่าสาร **Ih** และ **Iii** แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ที่ดีด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.02 และ 0.66 μM ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่า ellipticine ซึ่งเป็นสารมาตรฐานประมาณ 138 และ 4 เท่า นอกจากนี้ออกซิม **Ih** แสดงค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง KB เท่ากับ 0.17 μM ซึ่งสูงกว่า ellipticine เท่ากับ 10 เท่า และแสดงความเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ปกติ ($IC_{50} = 66.01 \mu M$) จะเห็นได้ว่าสารนี้น่าจะสามารถพัฒนาให้เป็นยาต่อไปได้

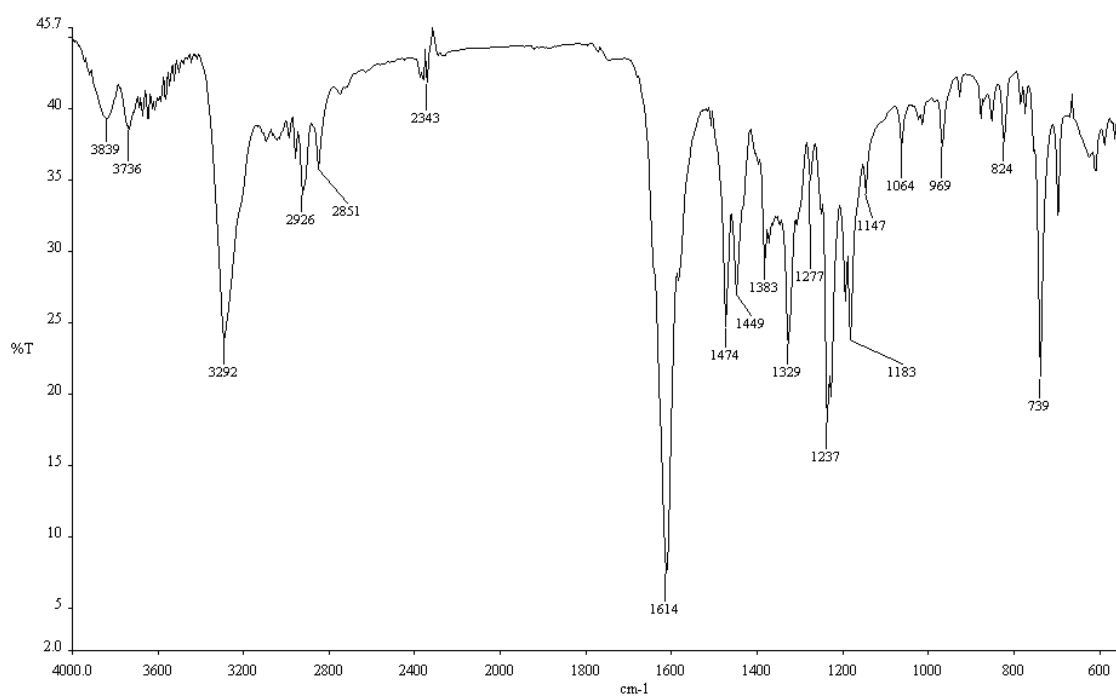
บรรณานุกรม

- [1] T.S. Wu, S.C. Huang, P.L. Wu, C.M. Teng, *Phytochemistry* 43 (1996) 133-140.
- [2] C. Ito, M. Itoigawa, S. Katsuno, M. Omura, H. Tokuda, H. Nishino, H. Furukawa, *J. Nat. Prod.* 63 (2000) 1218-1224.
- [3] C. Yenjai, S. Sripontan, P. Sriprajun, P. Kittakoop, A. Jintasirikul, M. Tanticharoen, Y. Thebtaranonth, *Planta Med.* 66 (2000) 277-279.
- [4] U. Songsiang, T. Thongthoom, C. Boonyarat, C. Yenjai, *J. Nat. Prod.* 74 (2011) 208-212.
- [5] T.S. Wu, S.C. Huang, P.L. Wu, C.S. Kuoh, *Phytochemistry* 52 (1999) 523-527.
- [6] A. Sunthitikawinsakul, N. Kongkathip, B. Kongkathip, S. Phonnakhu, J.W. Daly, T.F. Spande, Y. Nimit, S. Rochanaruangrai, *Planta Med.* 69 (2003) 155-157.
- [7] A. Chakraborty, C. Saha, G. Podder, B.K. Chowdhury, P. Bhattacharyya, *Phytochemistry* 38 (1995) 787-789.
- [8] T. Nakamura, N. Kodama, Y. Arai, T. Kumamoto, Y. Higuchi, C. Chaichantipyuth, T. Ishikawa, K. Ueno, S. Yano, *J. Nat. Med.* 63 (2009) 21-27.
- [9] B. Kongkathip, N. Kongkathip, A. Sunthitikawinsakul, C. Napaswat, C. Yoosook, *Phytother. Res.* 19 (2005) 728-731.
- [10] C. Ito, M. Itoigawa, S. Katsuno, M. Omura, H. Tokuda, H. Nishino, H. Furukawa, *J. Nat. Prod.* 63 (2000) 1218-1224.
- [11] C. Ito, M. Itoigawa, K. Aizawa, K. Yoshida, N. Ruangrunsi, H. Furukawa, *J. Nat. Prod.* 72 (2009) 1202-1204.
- [12] Z.Q. Xin, J.J. Lu, C.Q. Ke, C.X. Hu, L.P. Lin, Y. Ye, *Chem. Pharm. Bull.* 56 (2008) 827-830.
- [13] K. Noipha, T. Thongthoom, U. Songsiang, C. Boonyarat, C. Yenjai, *Diabetes Res. Clin. Pract.* (2010) e61-e71.
- [14] J. Wangboonskul, S. Pummangura, C. Chaichantipyuth, *J. Nat. Prod.* 47 (1984) 1058-1059.
- [15] S. Issa, N. Walchshofer, I. Kassab, H. Termoss, S. Chamat, A. Geahchan, Z. Bouaziz, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 2567-2577.
- [16] Y.L. Chen, H.M. Hung, C.M. Lu, K.C. Li, C.C. Tzeng, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 6539-6546.

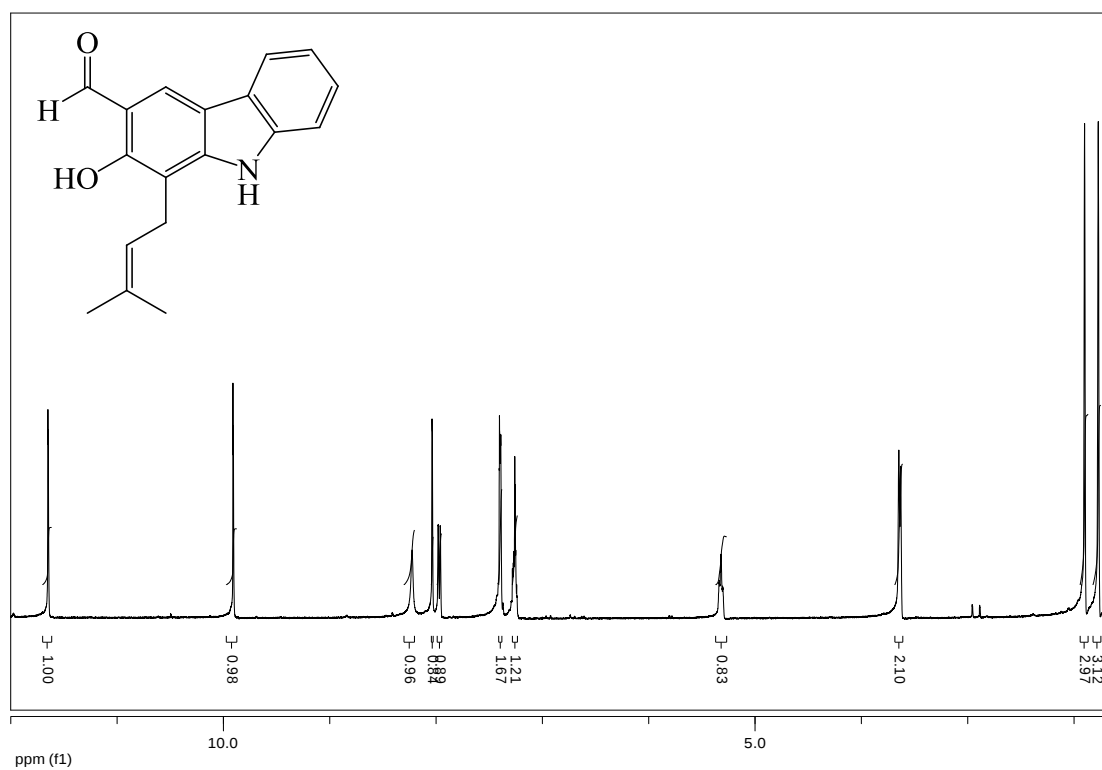
- [17] M. Compain-Batissou, D. Latreche, J. Gentili, N. Walchshofer, Z. Bouaziz, *Chem. Pharm. Bull.* 52 (2004) 1114-1116.
- [18] A. Aouacheria, B. Néel, Z. Bouaziz, R. Dominique, N. Walchshofer, J. Paris, H. Fillion, G. Gillet, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 1605-1616.
- [19] T. Thongthoom, U. Songsiang, C. Phaosiri, C. Yenjai, *Arch. Pharm. Res.* 33 (2010) 675-680.
- [20] C. Yenjai, S. Wanich, S. Pitchuanchom, B. Sripanidkulchai, *Arch. Pharm. Res.* 32 (2009) 1179-1184.
- [21] S. Wanich, C. Yenjai, *Arch. Pharm. Res.* 32 (2009) 1185-1189.
- [22] C. Yenjai, S. Wanich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 2821-2823.
- [23] U. Songsiang, S. Pitchuanchom, C. Boonyarat, C. Hahnvajanawong, C. Yenjai, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 3794-3802.
- [24] Y. Ideyama, M. Kudoh, K. Tanimoto, Y. Susaki, T. Nanya, T. Nakahara, H. Ishikawa, T. Yoden, M. Okada, T. Fujikura, H. Akaza, H. Shikama, *The Prostate* 37 (1998) 10-18.
- [25] J. Huang, X. Li, R. Hilf, R.A. Bambara, M. Muyan, *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 5 (2005) 379-396.
- [26] S. Issa, N. Walchshofer, I. Kassab, H. Termoss, S. Chamat, A. Geahchan, Z. Bouaziz, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 2567-2577.
- [27] M.K. Roy, V. Na Thalang, G. Trakoontivakorn, K. Nakahara, *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 41-51.
- [28] E. Conchon, F. Anizon, B. Aboab, R.M. Golsteyn, S. Le'once, B. Pfeiffer, M. Prudhomme, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 282-292.
- [29] N. Guilbaud, L. Kraus-Berthier, D. Saint-Dizier, M.H. Rouillon, M. Jan, M.F. Burbridge, M. Visalli, E. Bisagni, A. Pierré, G. Atassi, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 38 (1996) 513-521.
- [30] F.A. Tanious, W.D. Wilson, D.A. Patrick, R.R. Tidwell, P. Colson, C. Houssier, C. Tardy, C. Bailly, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 3455-3464.
- [31] J. Kamata, T. Okada, Y. Kotake, J. Nijima, K. Nakamura, T. Uenaka, A. Yamaguchi, K. Tsukahara, T. Nagasu, N. Koyanagi, K. Kitoh, K. Yoshimatsu, H. Yoshino, H. Sugumi, *Chem. Pharm. Bull.* 52 (2004) 1071-1081.
- [32] V. Moinet-Hedin, T. Tabka, F. Sichel, P. Gauduchon, J.Y. Le Talaër, C. Saturnino, B. Letois, J.C. Lancelot, M. Robba, *Eur. J. Med. Chem.* 32 (1997) 113-122.

- [33] R. Begum, M.S. Rahman, A.M.S. Chowdhury, M.M. Rahman, M.A. Rashid, *Nat. Prod. Commun.* 3 (2008), 815-818.
- [34] B.S. Joshi, V.N. Kamat, D.H. Gawad, T.R. Govindachari, *Phytochemistry* 11 (1972), 2065-2071.
- [35] J.O. Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 5421-5426.
- [36] L. Hunt, M. Jordan, M. De Jesus, F.M. Wurm, *Biotechnol. Bioeng.* 65 (1999) 201-205.

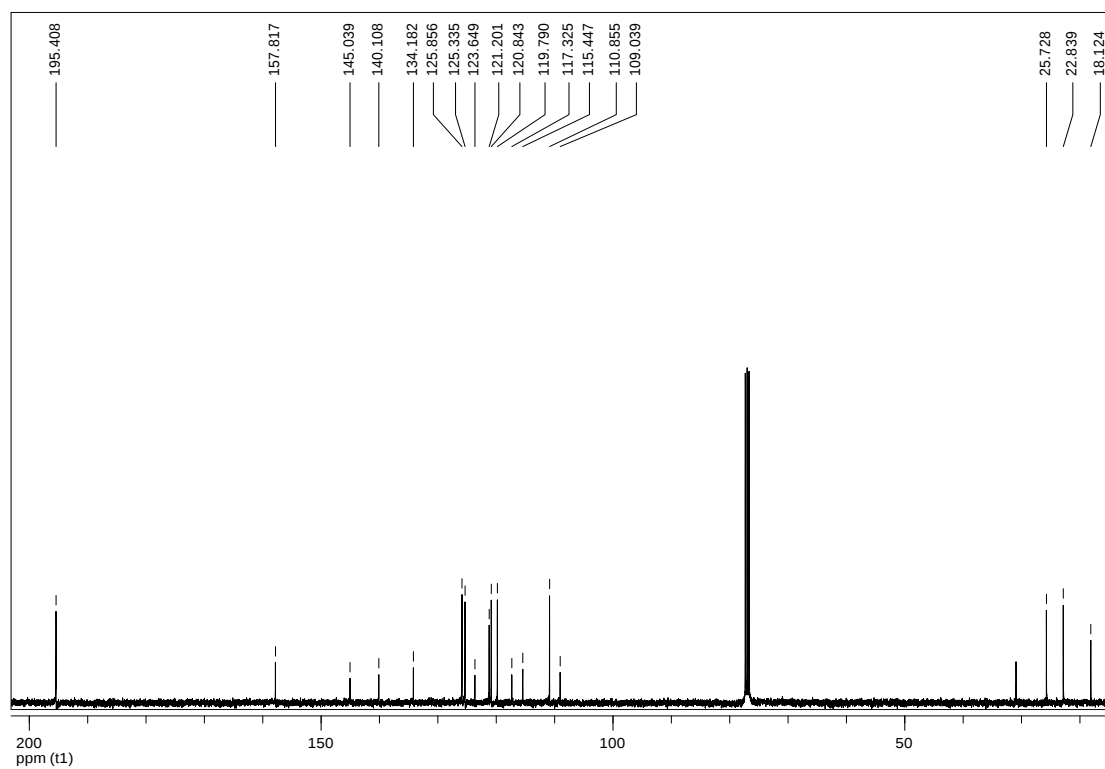
ภาคผนวก



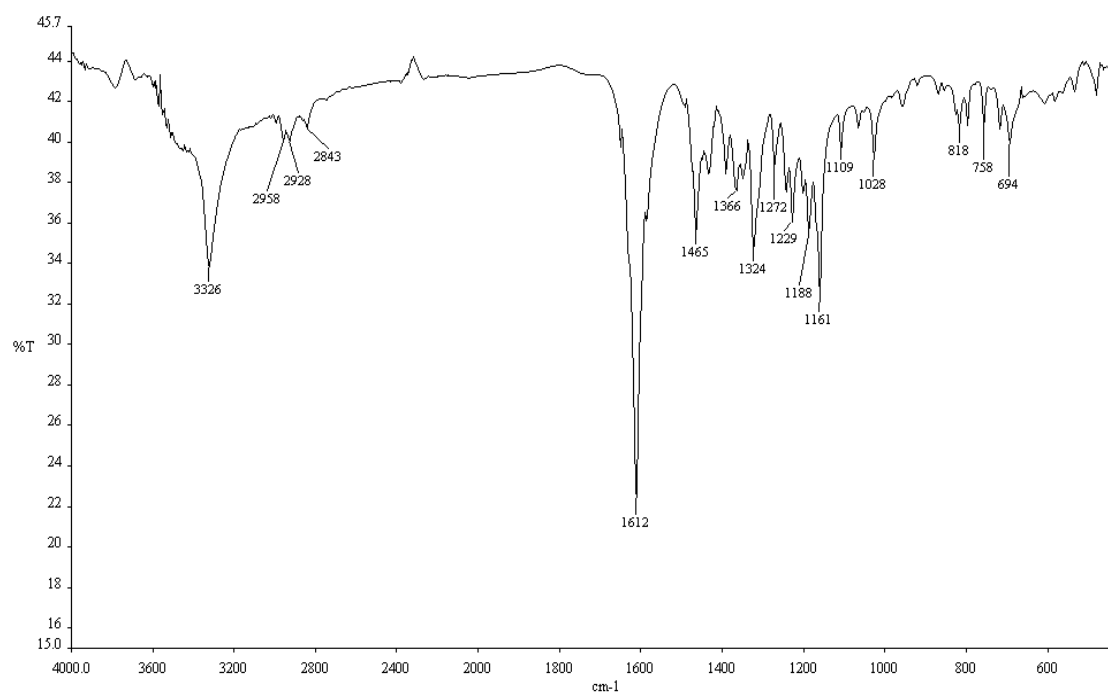
ภาพที่ 10 IR spectrum of heptaphylline (I).



ภาพที่ 11 ¹H NMR spectrum of heptaphylline (I).

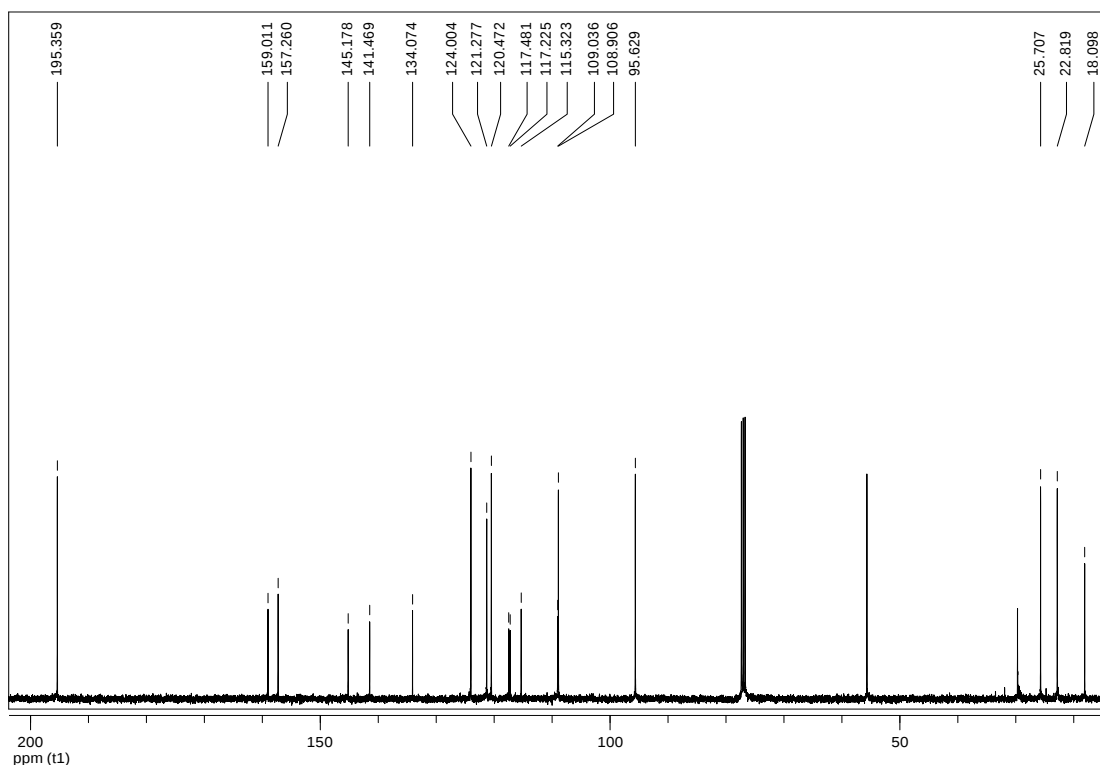


ภาพที่ 12 ^{13}C NMR spectrum of heptaphylline (I).

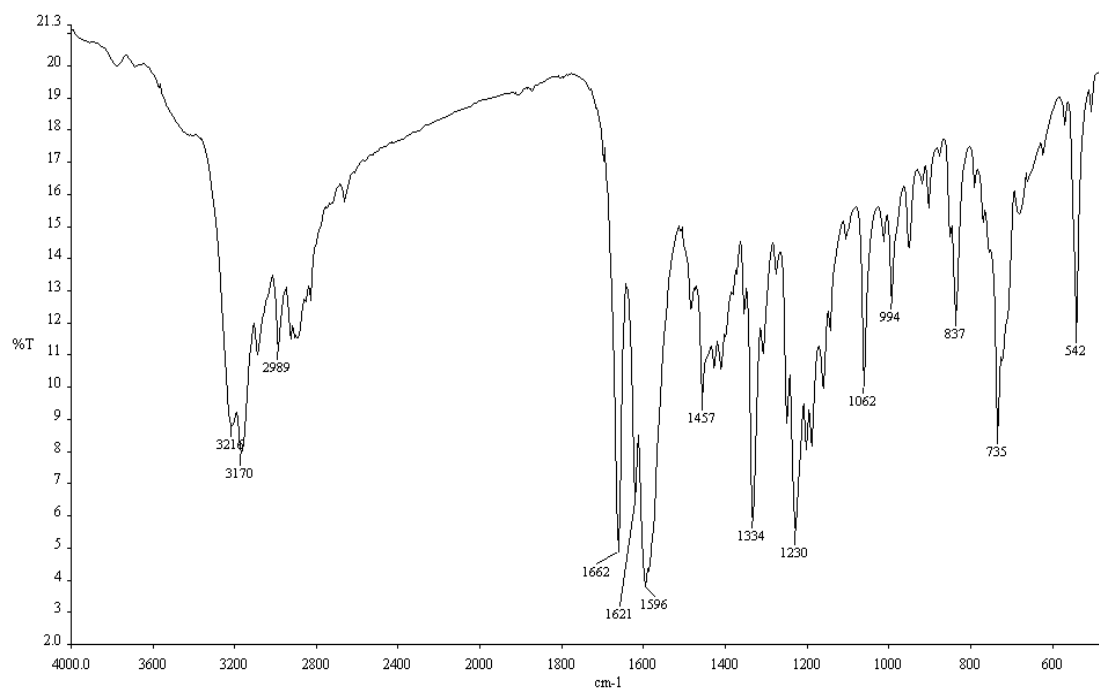


ภาพที่ 13 IR spectrum of 7-methoxyheptaphylline (II).

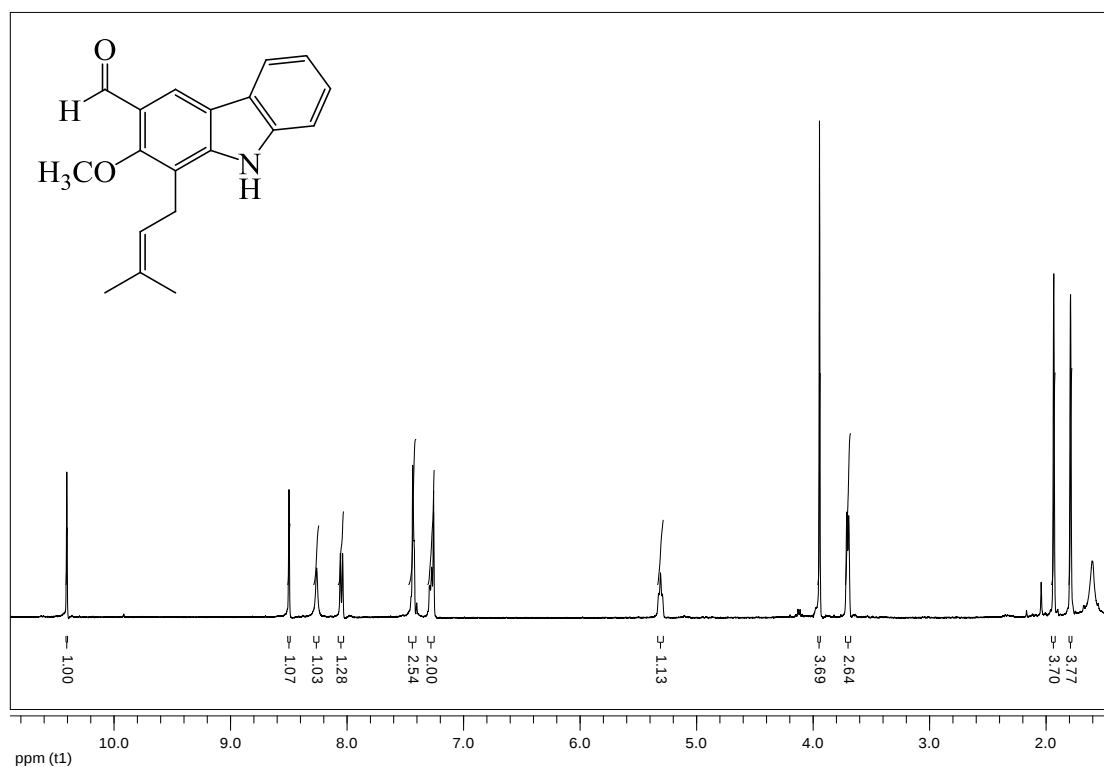
ภาพที่ 14 ^1H NMR spectrum of 7-methoxyheptaphylline (II).



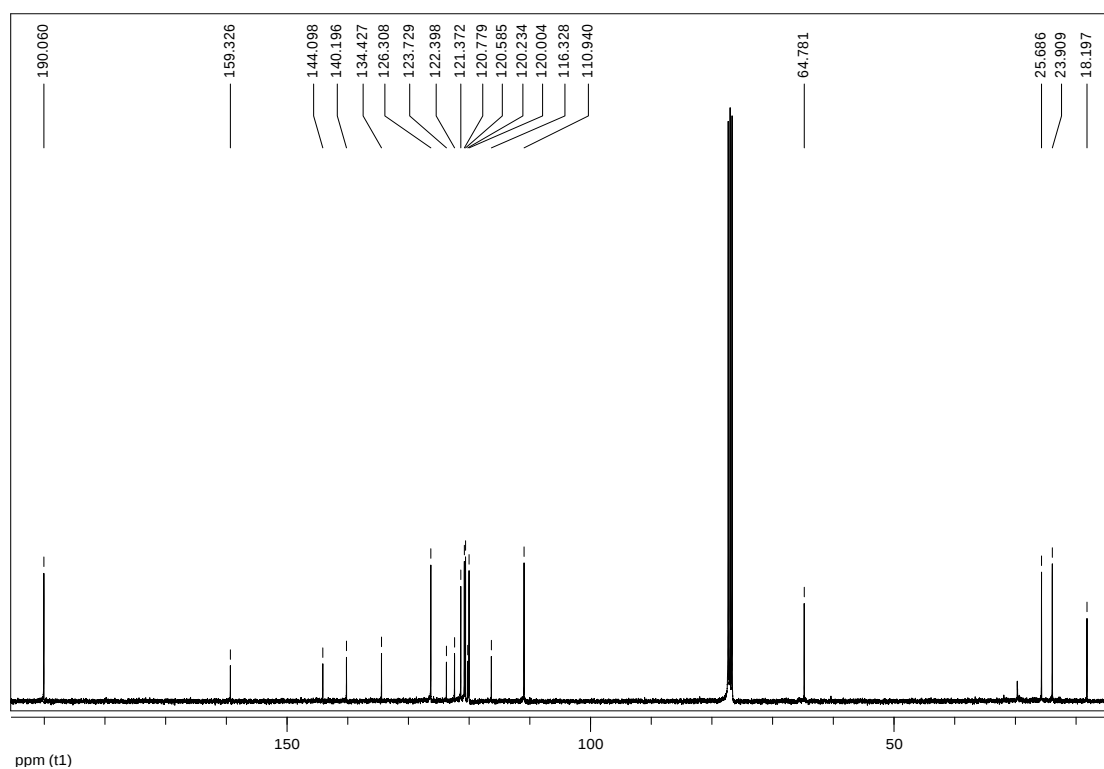
ภาพที่ 15 ^{13}C NMR spectrum of 7-methoxyheptaphylline (II).



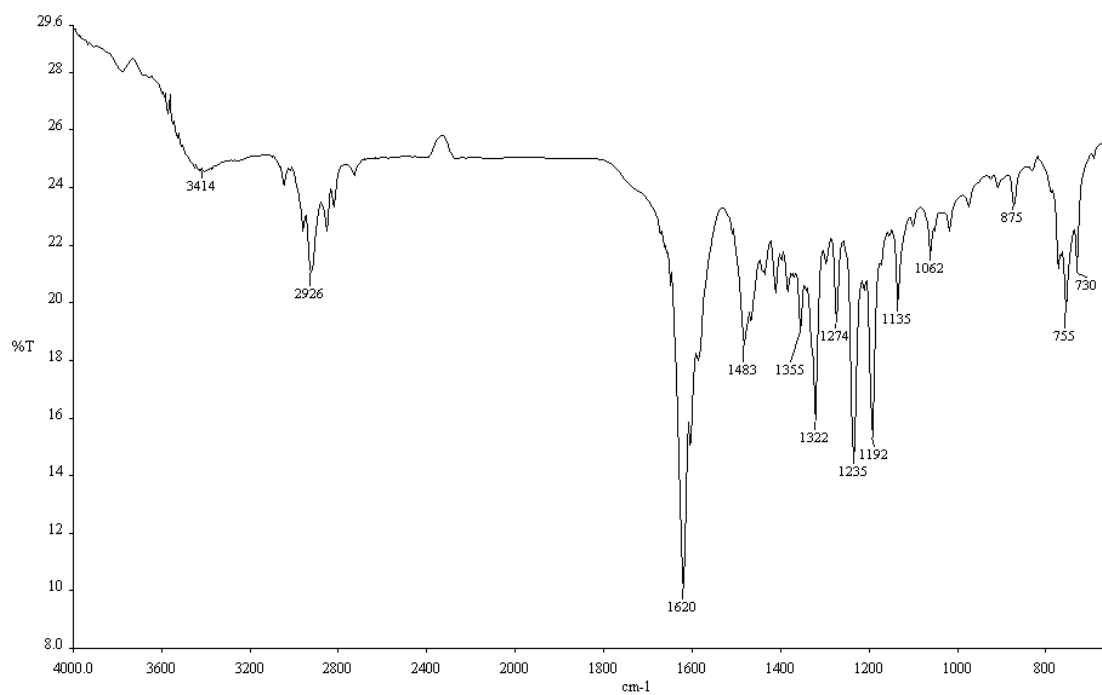
ภาพที่ 16 IR spectrum of 2-methoxyheptaphylline (Ia).



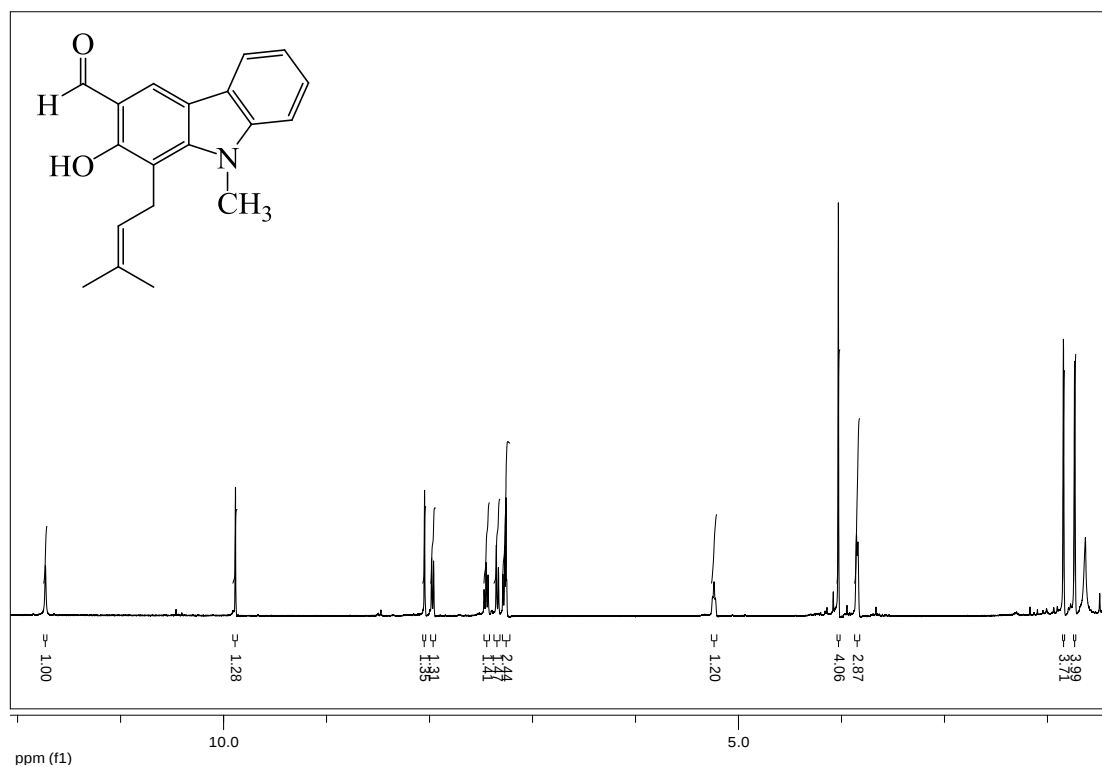
ภาพที่ 17 ¹H NMR spectrum of 2-methoxyheptaphylline (Ia).



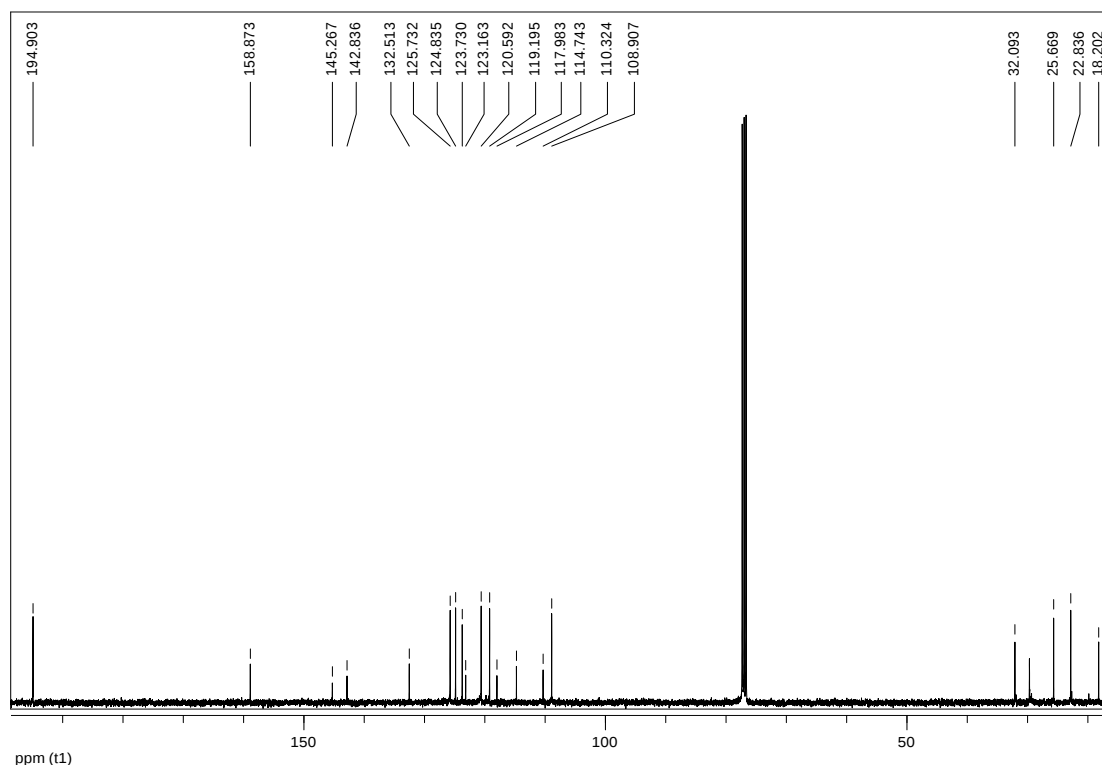
ภาพที่ 18 ¹³C NMR spectrum of 2-methoxyheptaphylline (**1a**).



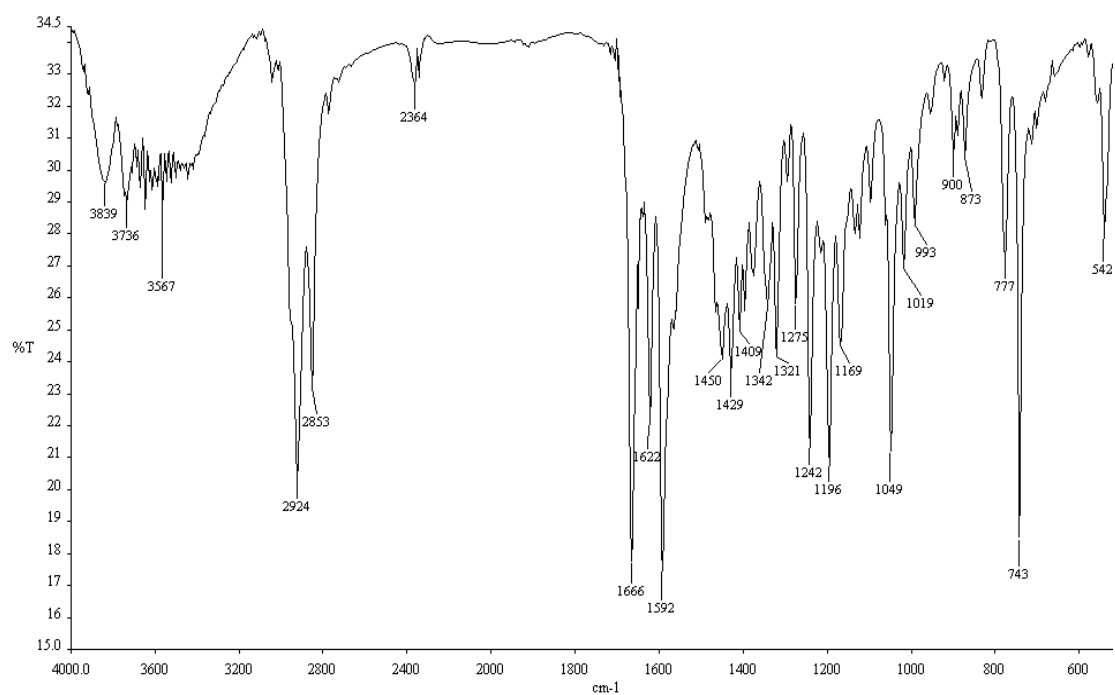
ภาพที่ 19 IR spectrum of 9-methylheptaphylline (**1b**).



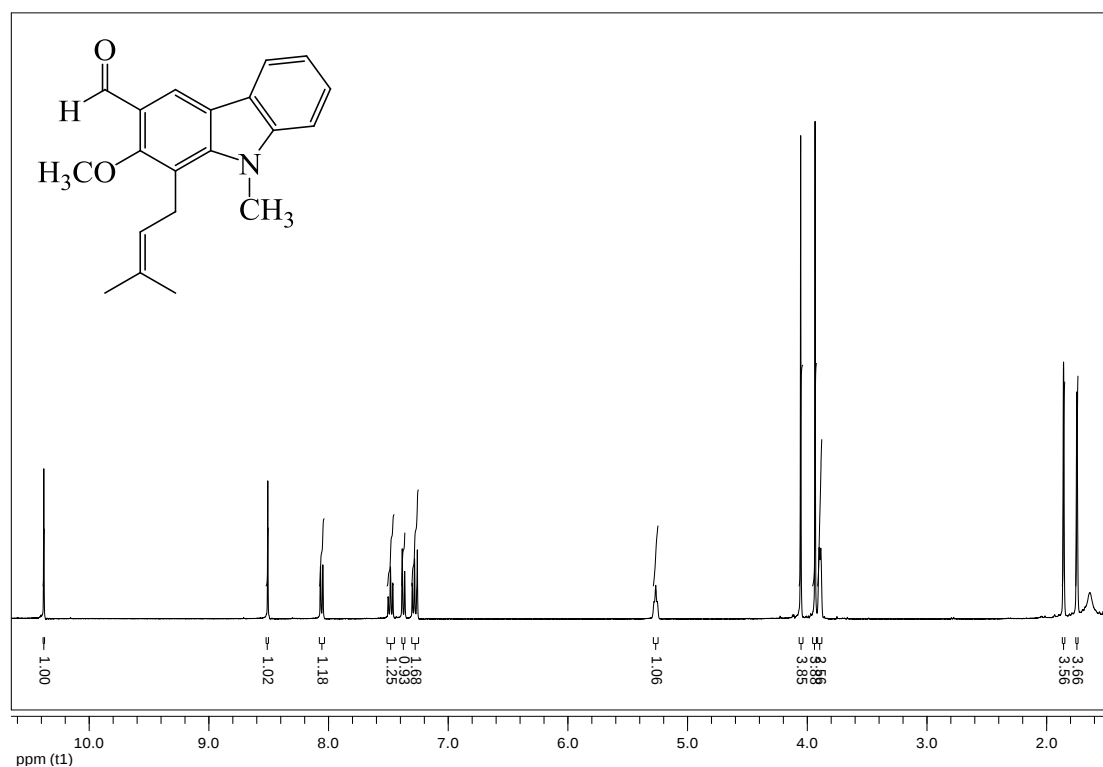
ภาพที่ 20 ¹H NMR spectrum of 9-methylheptaphylline (Ib).



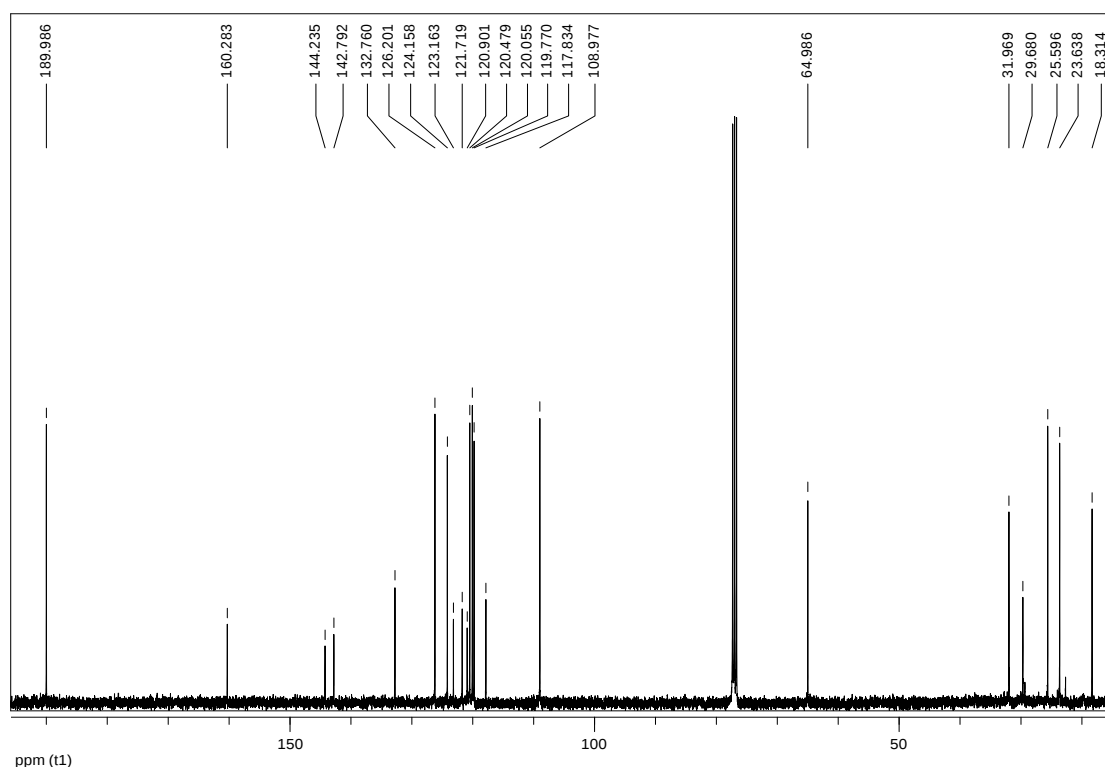
ภาพที่ 21 ¹³C NMR spectrum of 9-methylheptaphylline (Ib).



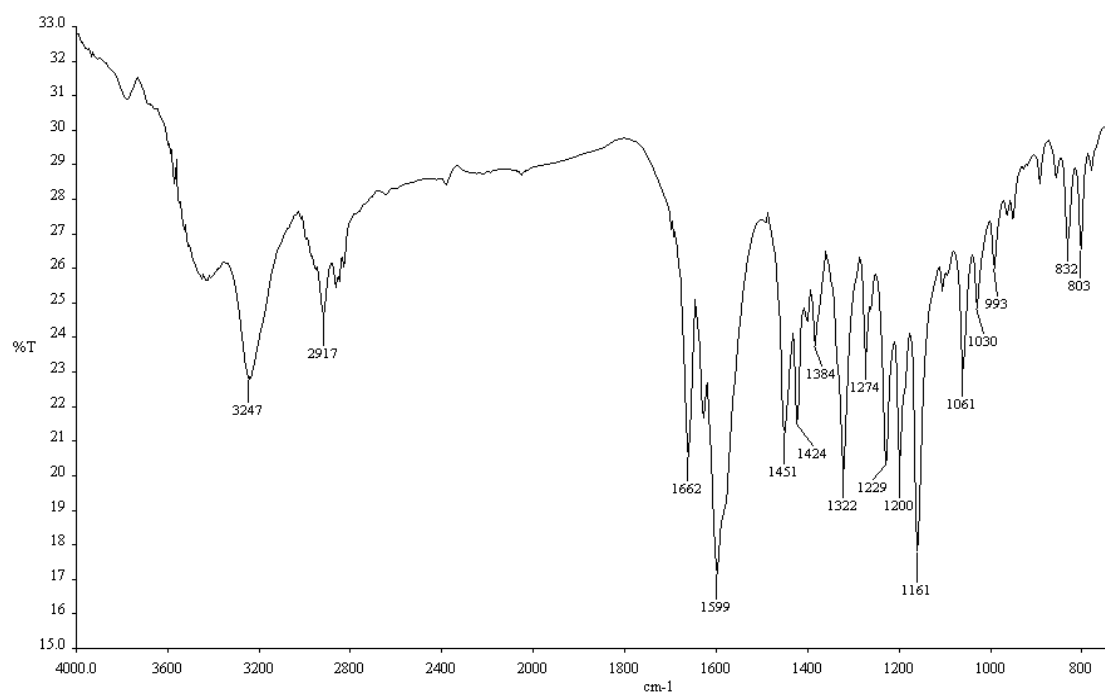
ภาพที่ 22 IR spectrum of 2-methoxy-9-methylheptaphylline (1c).



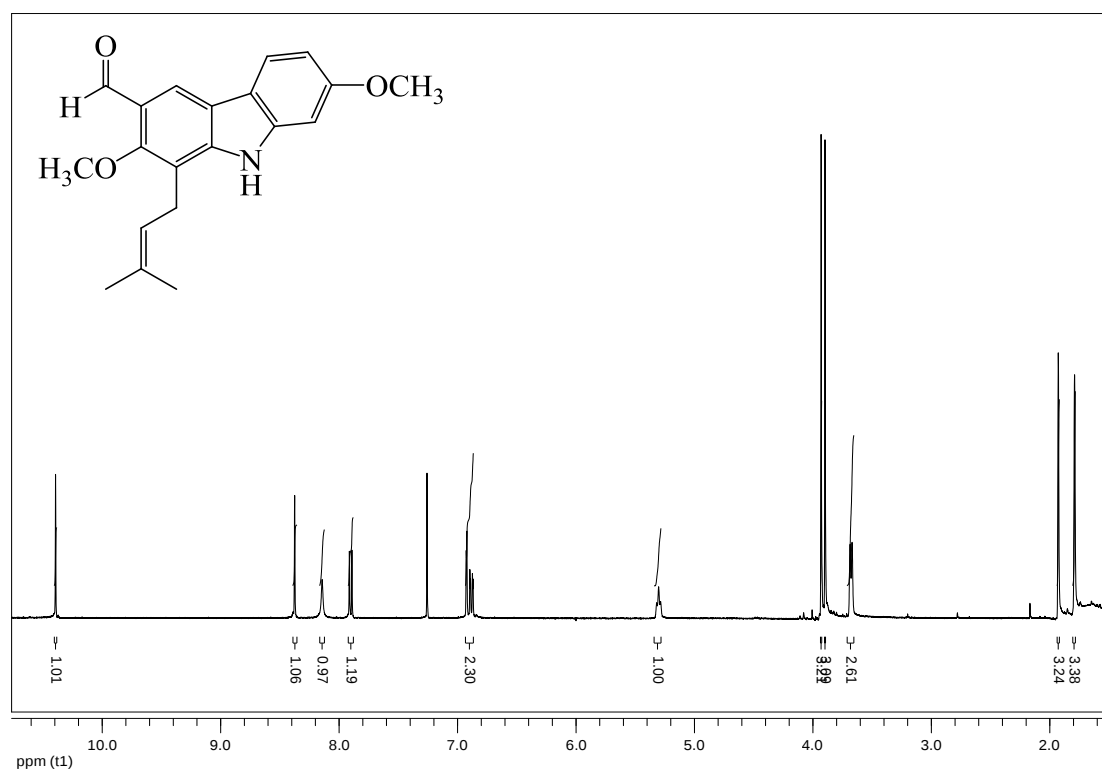
ภาพที่ 23 ¹H NMR spectrum of 2-methoxy-9-methylheptaphylline (1c).



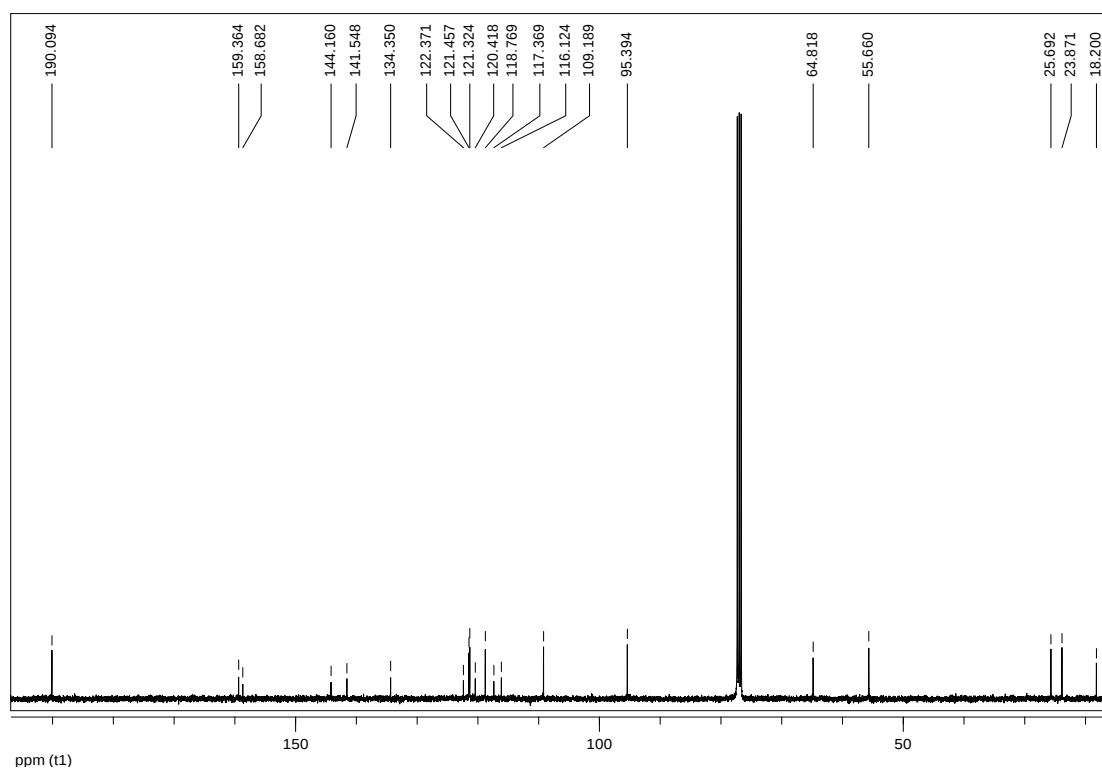
ภาพที่ 24 ^{13}C NMR spectrum of 2-methoxy-9-methylheptaphylline (Ic).



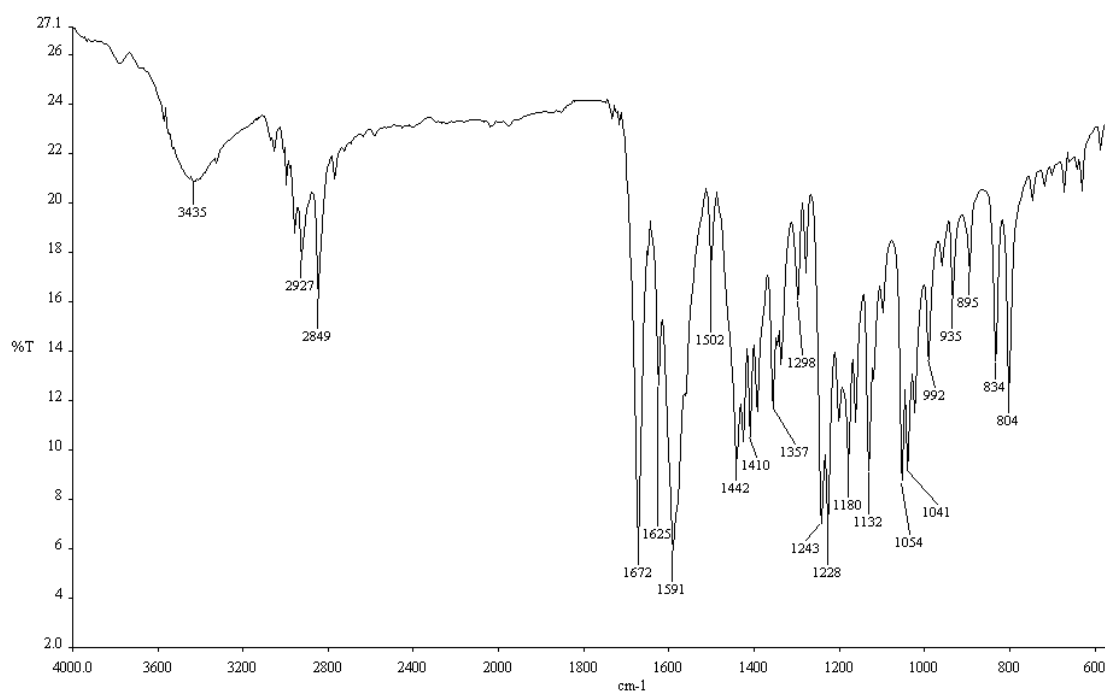
ภาพที่ 25 IR spectrum of 2,7-dimethoxyheptaphylline (IIa).



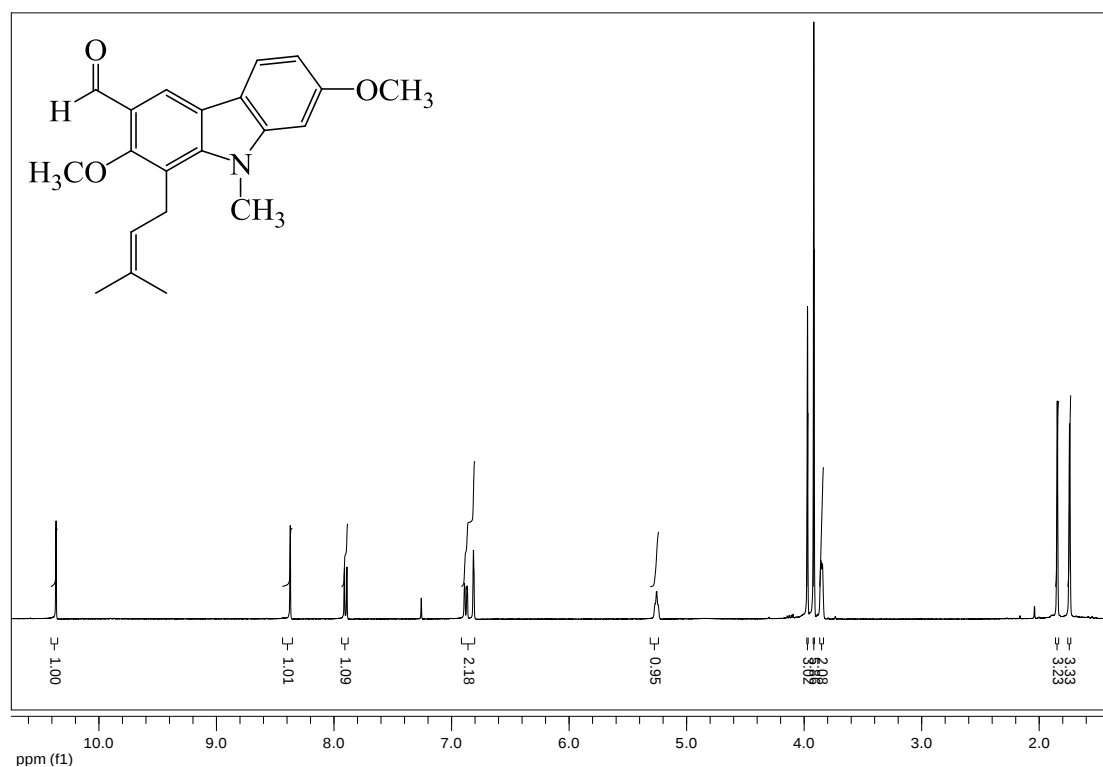
ภาพที่ 26 ¹H NMR spectrum of 2,7-dimethoxyheptaphylline (IIa).



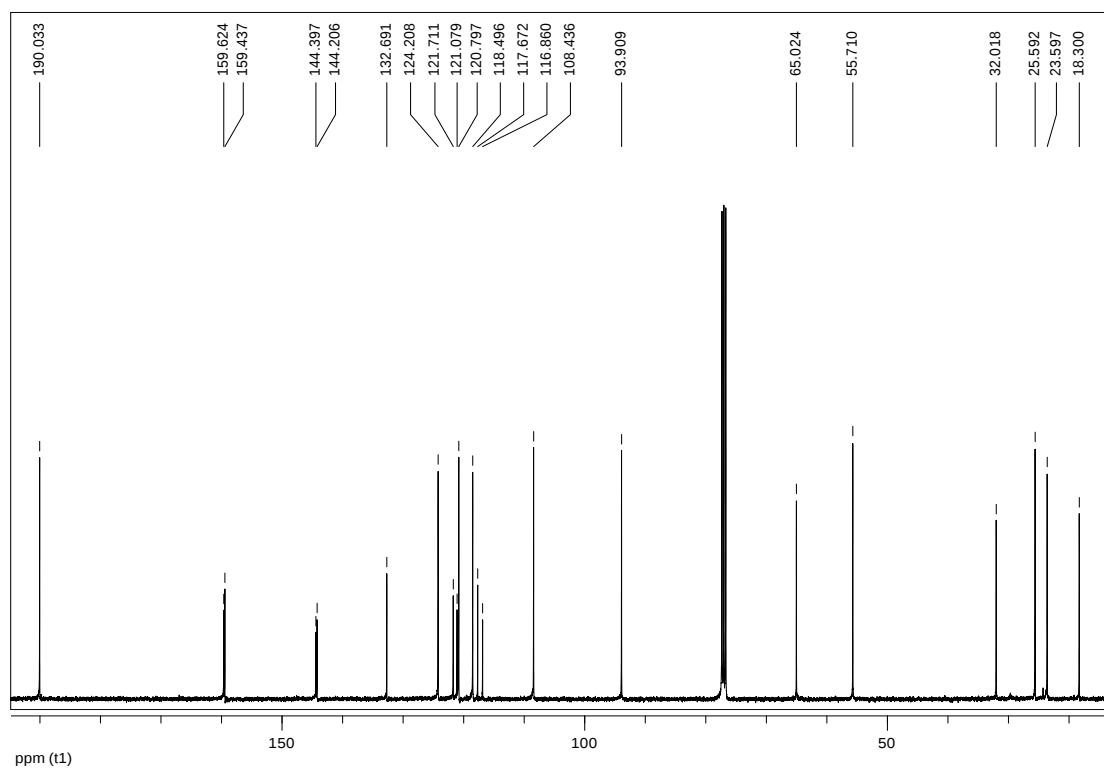
ภาพที่ 27 ¹³C NMR spectrum of 2,7-dimethoxyheptaphylline (IIa).



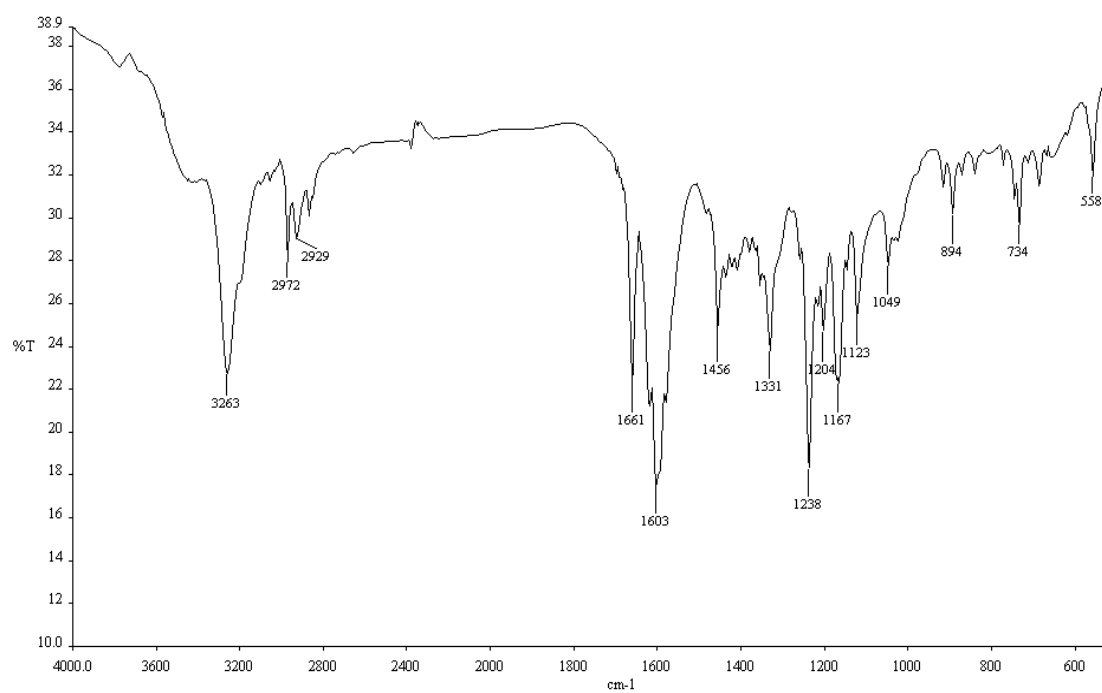
ภาพที่ 28 IR spectrum of 2,7-dimethoxy-9-methylheptaphylline (IIc).



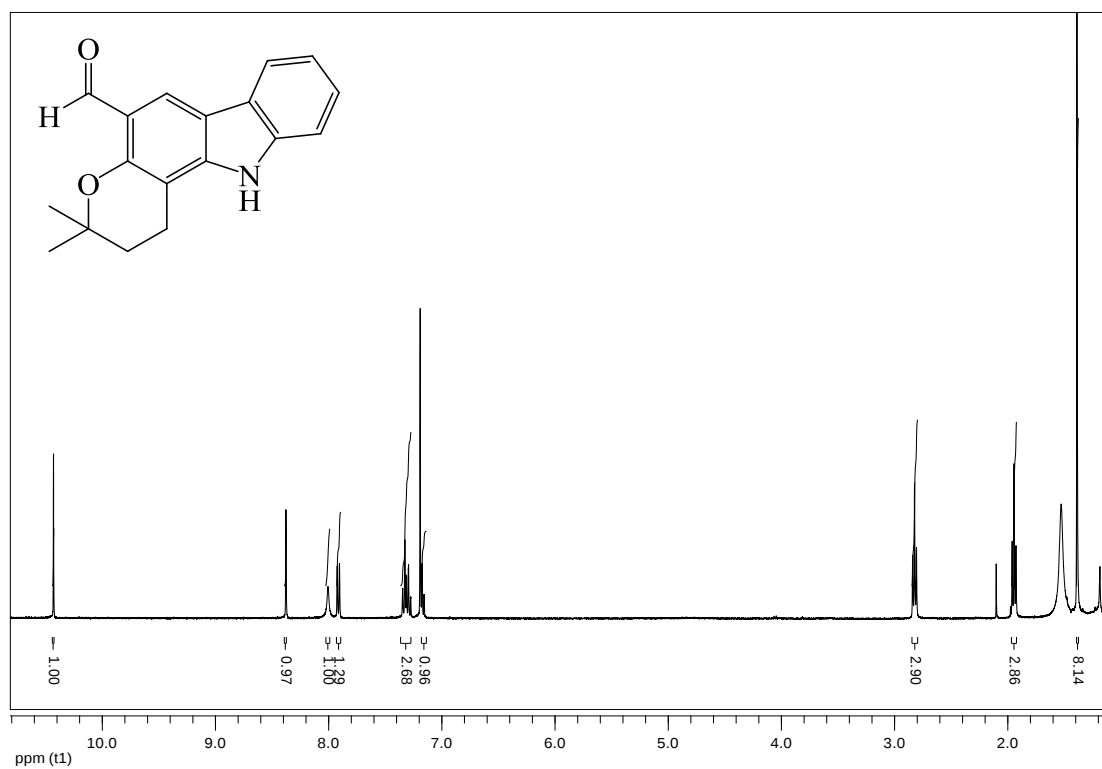
ภาพที่ 29 ^1H NMR spectrum of 2,7-dimethoxy-9-methylheptaphylline (IIc).



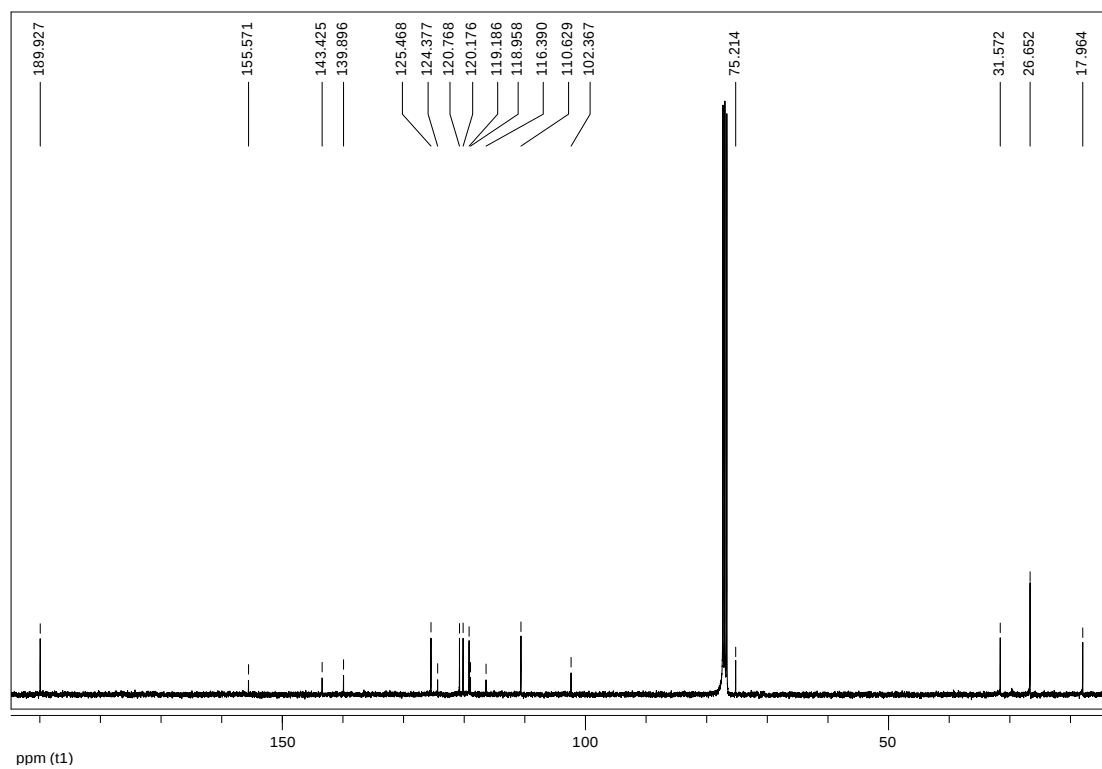
ภาพที่ 30 ¹³C NMR spectrum of 2,7-dimethoxy-9-methylheptaphylline (IIc).



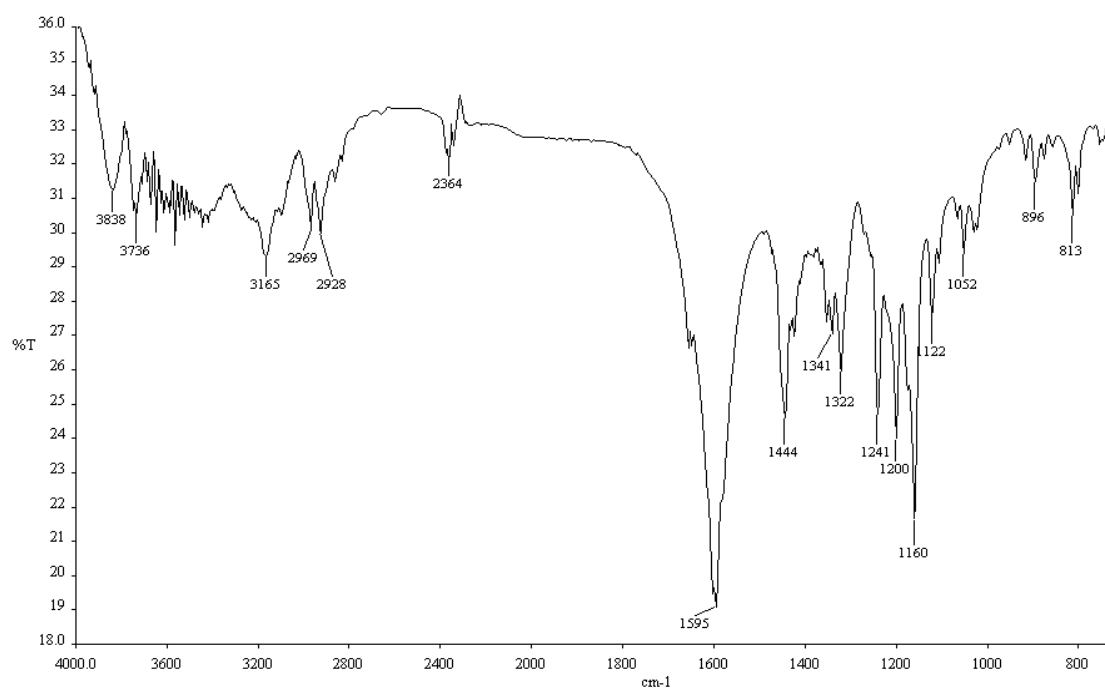
ภาพที่ 31 IR spectrum of 5-formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (Id).



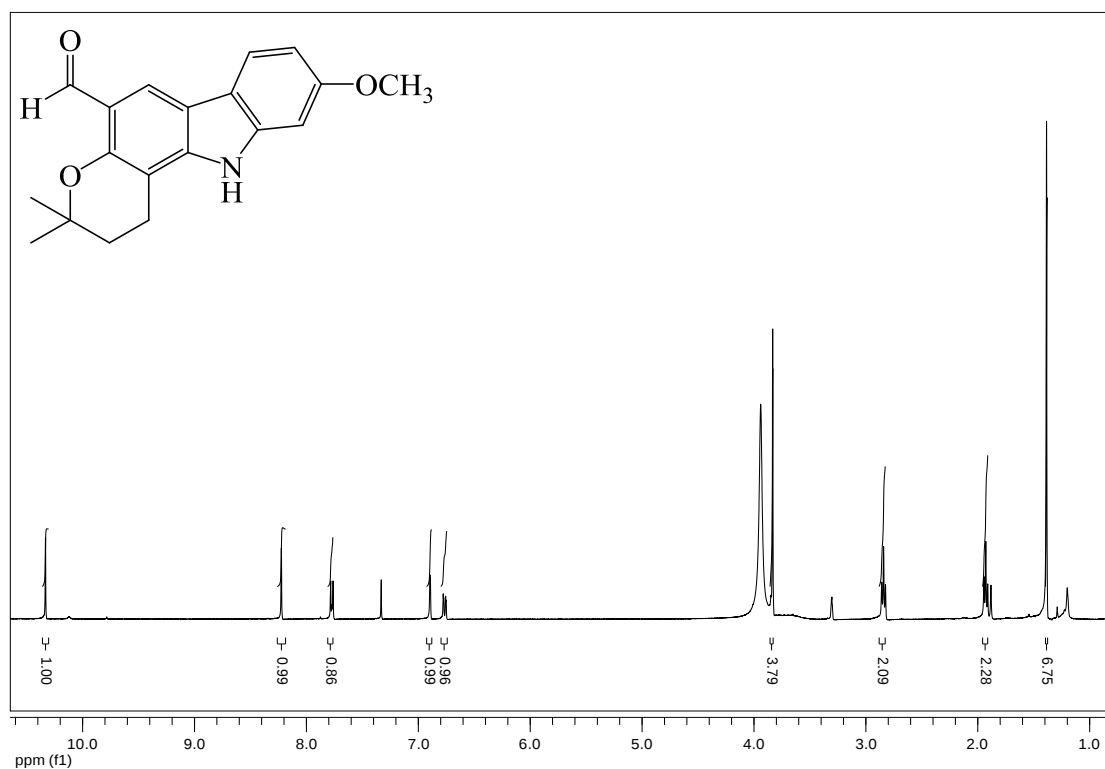
ภาพที่ 32 ¹H NMR spectrum of 5-formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (**Id**).



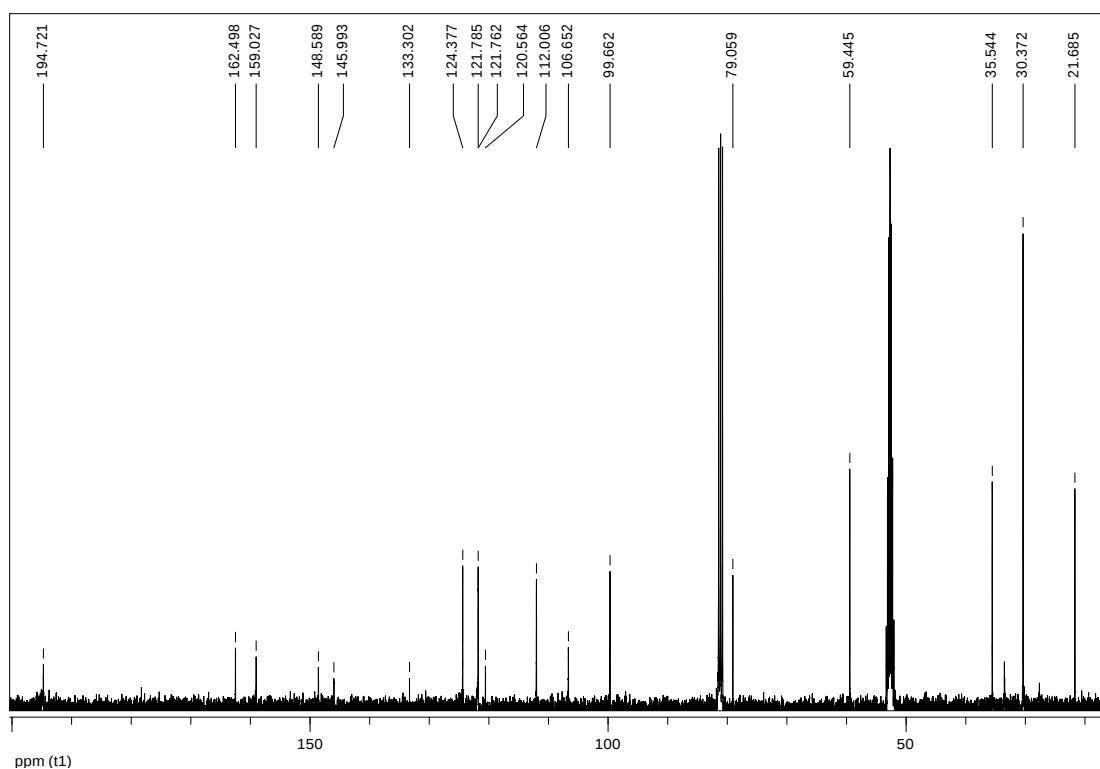
ภาพที่ 33 ¹³C NMR spectrum of 5-formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (**Id**).



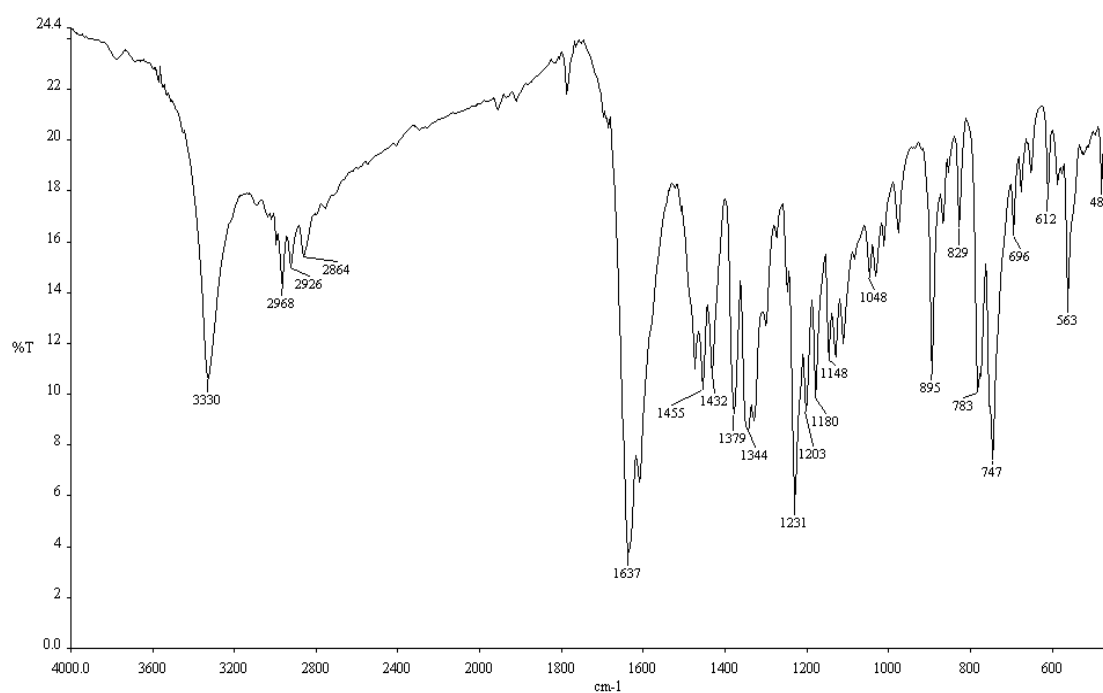
ภาพที่ 34 IR spectrum of 5-formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyran[3,2-a]carbazole (**IIId**).



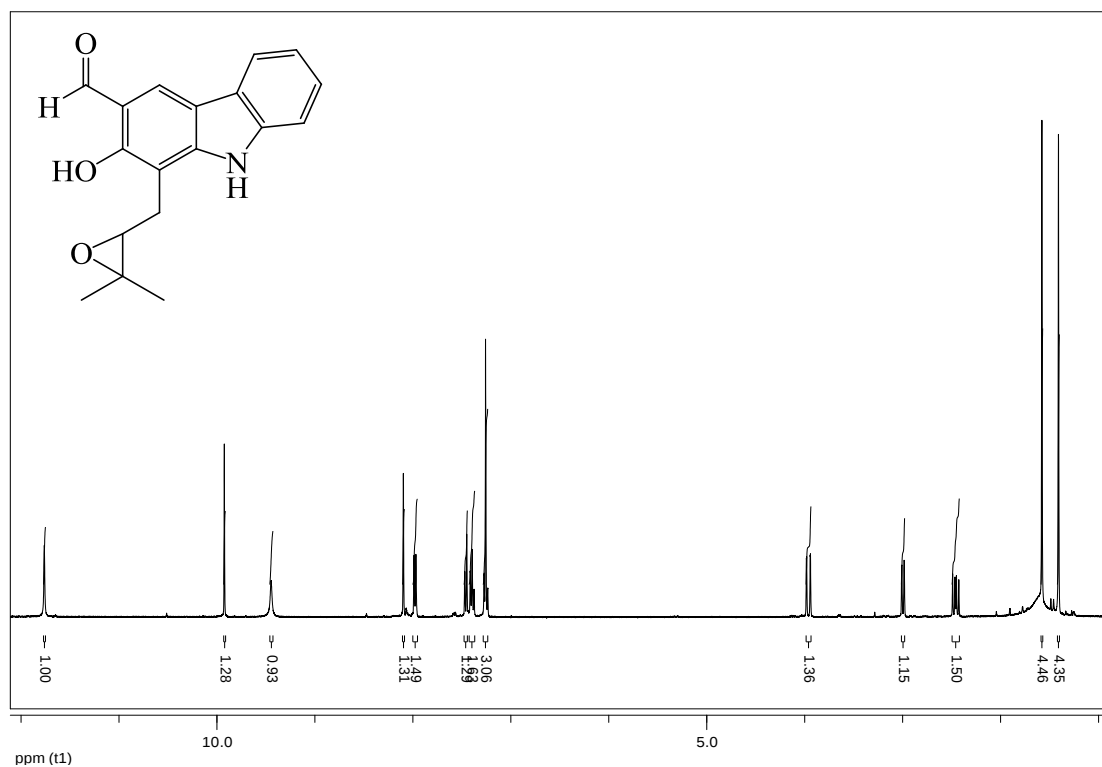
ภาพที่ 35 ^1H NMR spectrum of 5-formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyran
[3,2-a]carbazole (**IIId**).



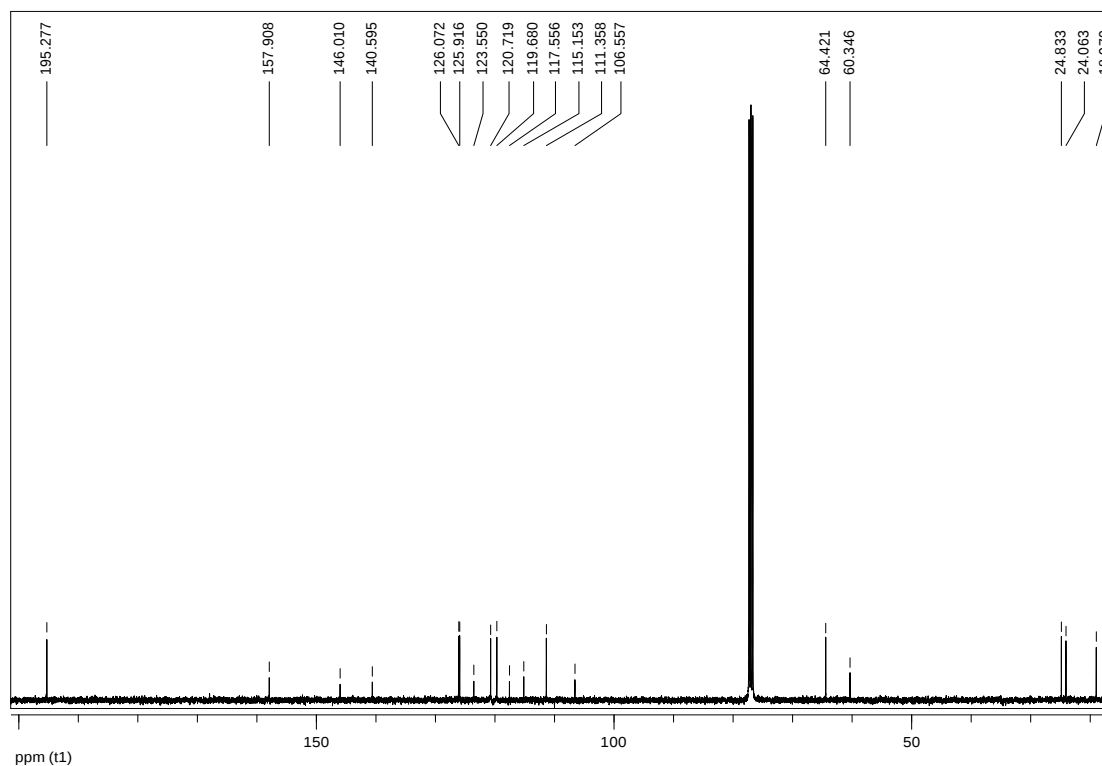
ภาพที่ 36 ¹³C NMR spectrum of 5-formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyrano[3,2-a]carbazole (IIId).



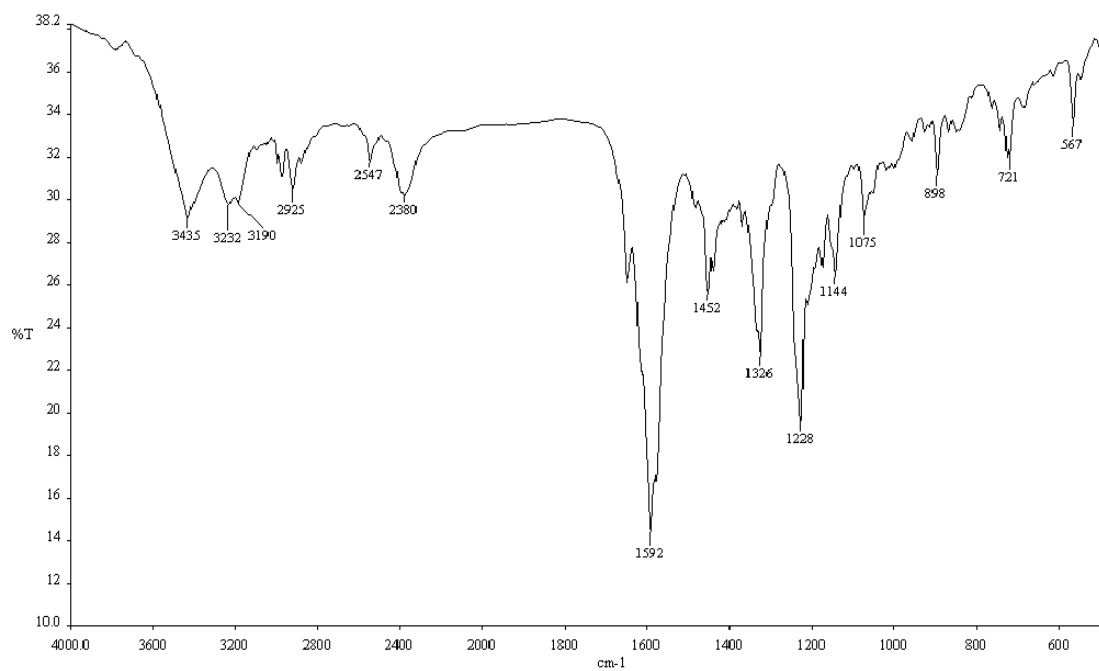
ภาพที่ 37 IR spectrum of 1-(3'-methylbutyl-2',3'-oxirane)mukonal (Ic).



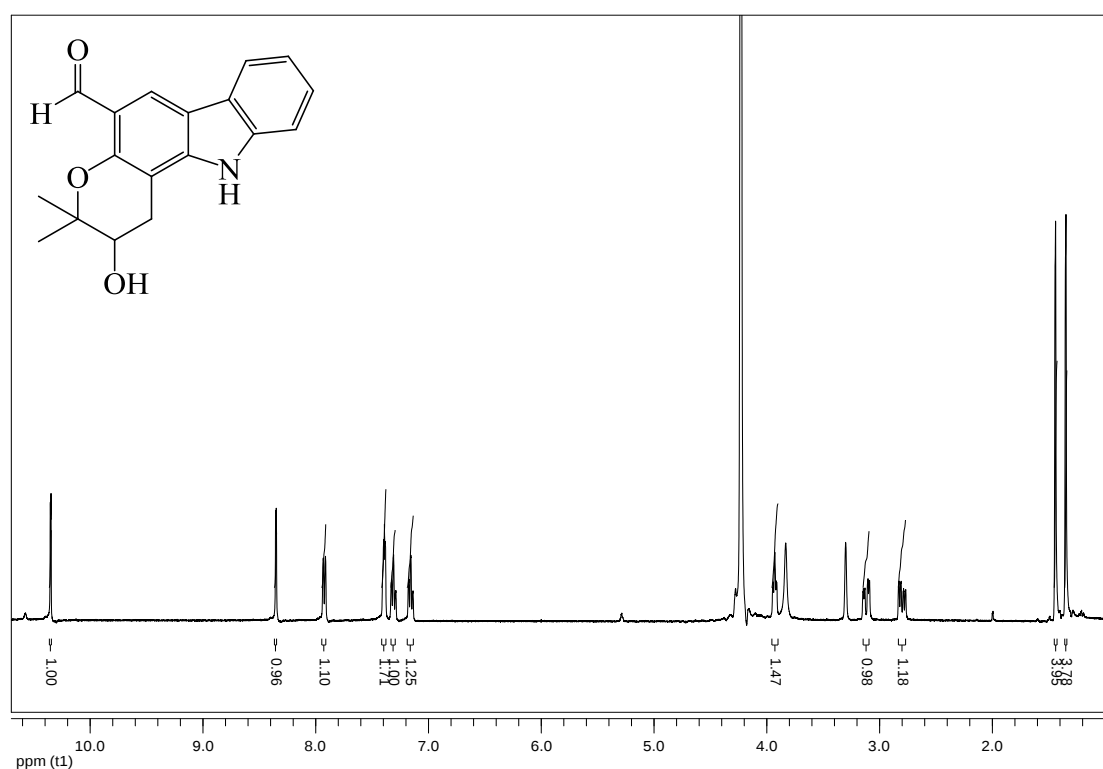
ภาพที่ 38 ¹H NMR spectrum of 1-(3'-methylbutyl-2',3'-oxirane)mukonal (Ic).



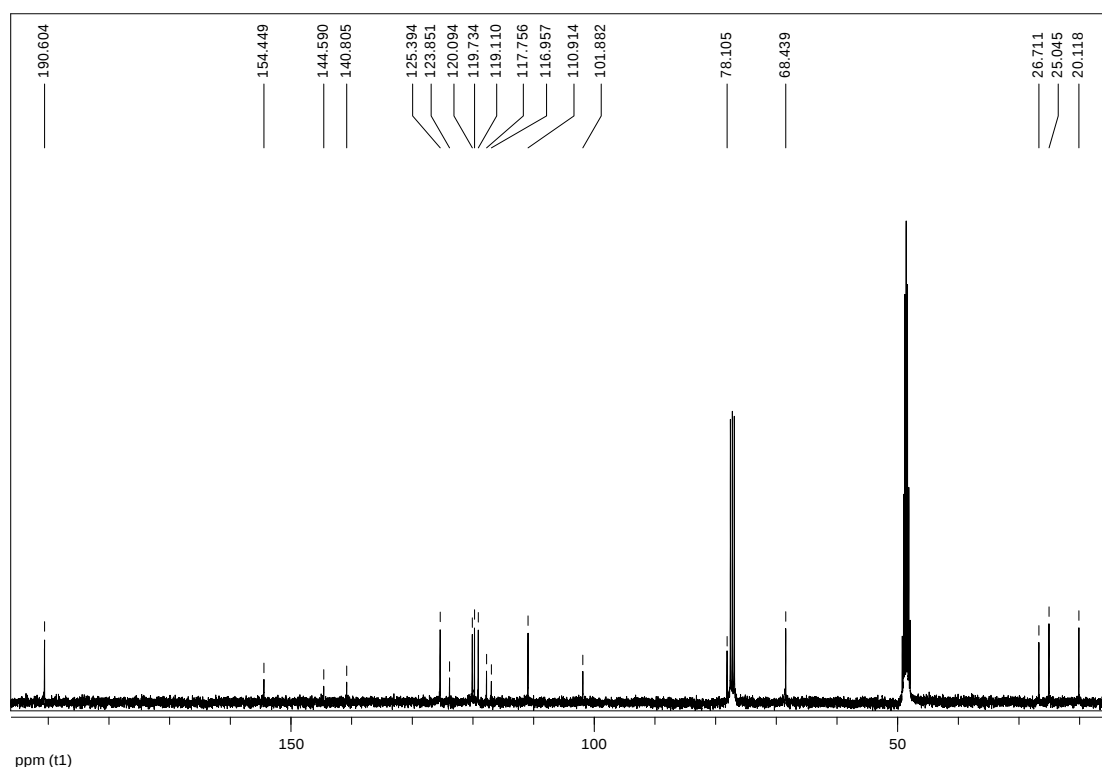
ภาพที่ 39 ¹³C NMR spectrum of 1-(3'-methylbutyl-2',3'-oxirane)mukonal (Ic).



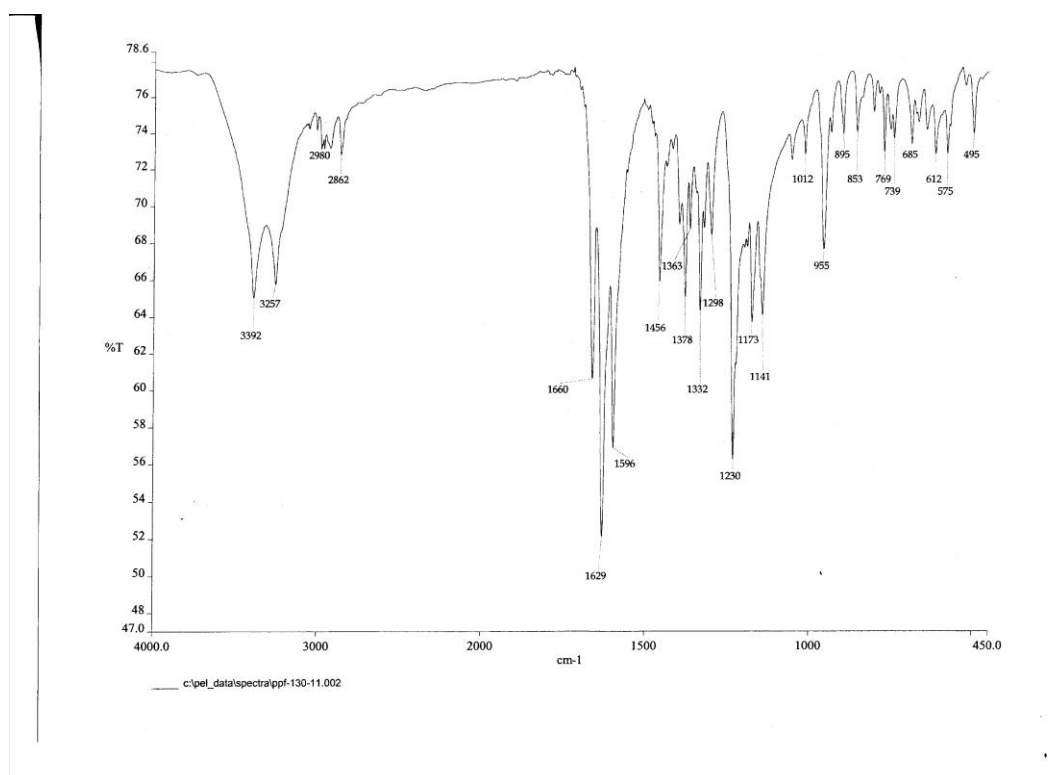
ภาพที่ 40 IR spectrum of 5-formyl-2-hydroxy-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (If).



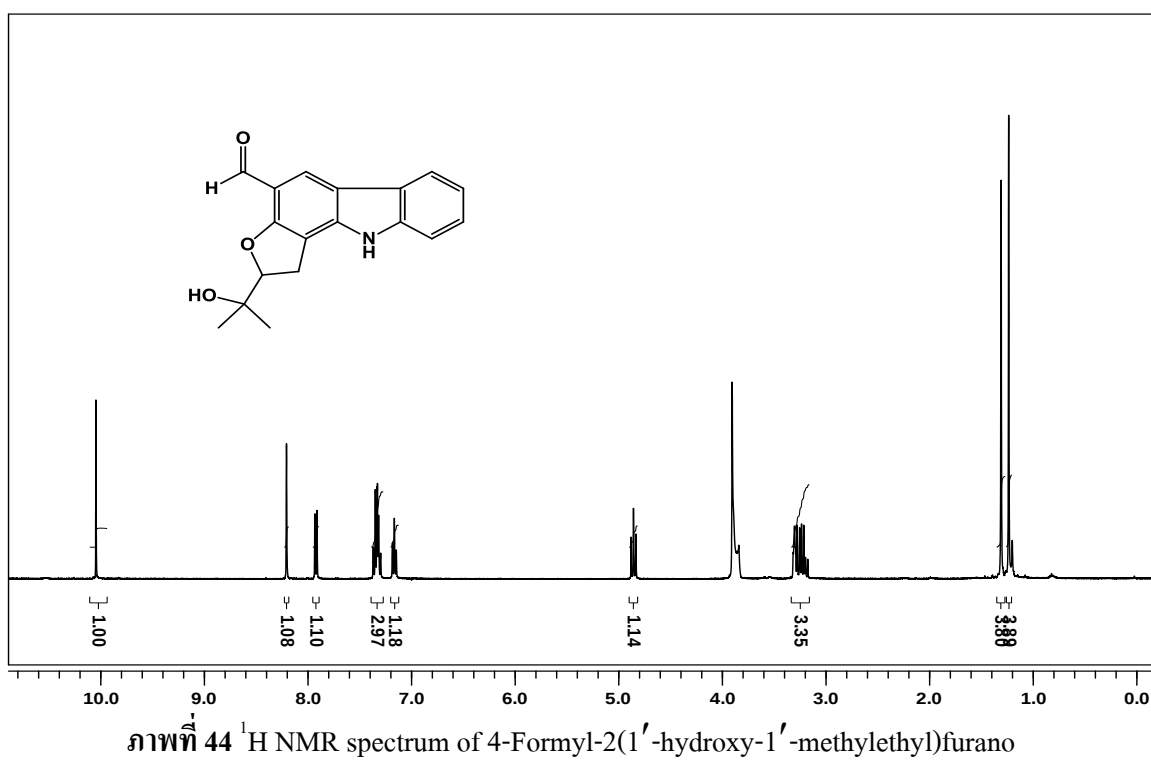
ภาพที่ 41 ^1H NMR spectrum of 5-formyl-2-hydroxy-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (If).



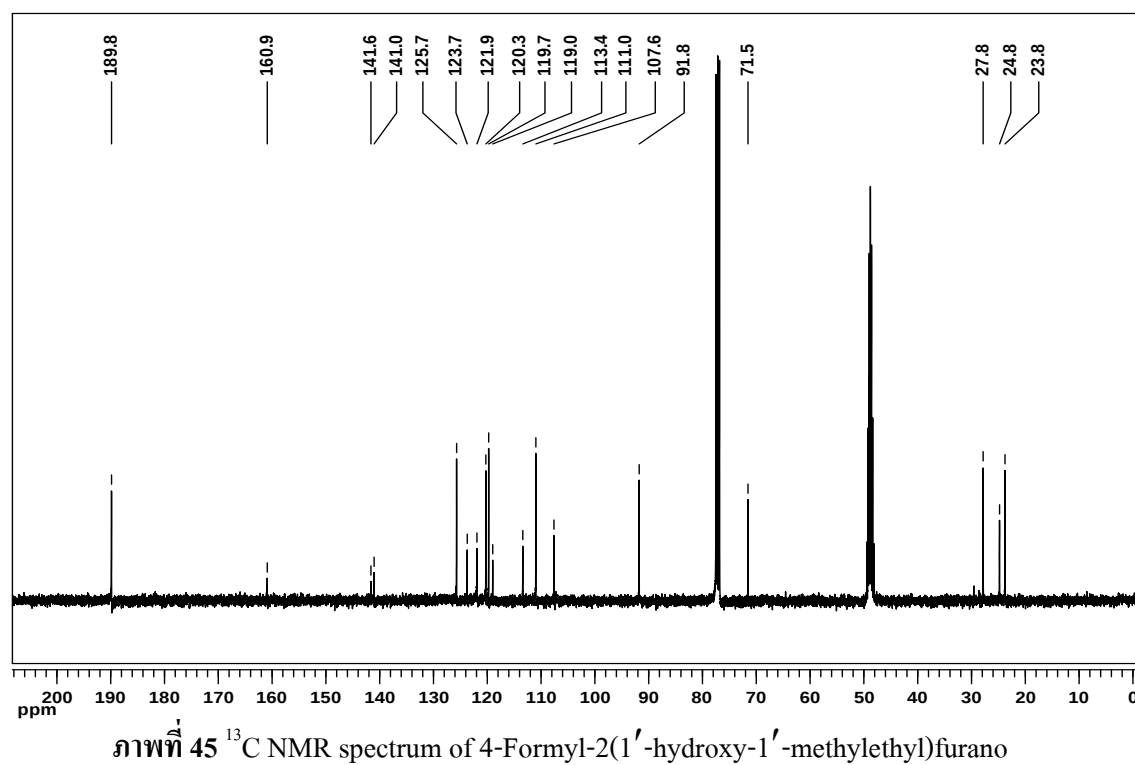
ภาพที่ 42 ¹³C NMR spectrum of 5-formyl-2-hydroxy-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (II).



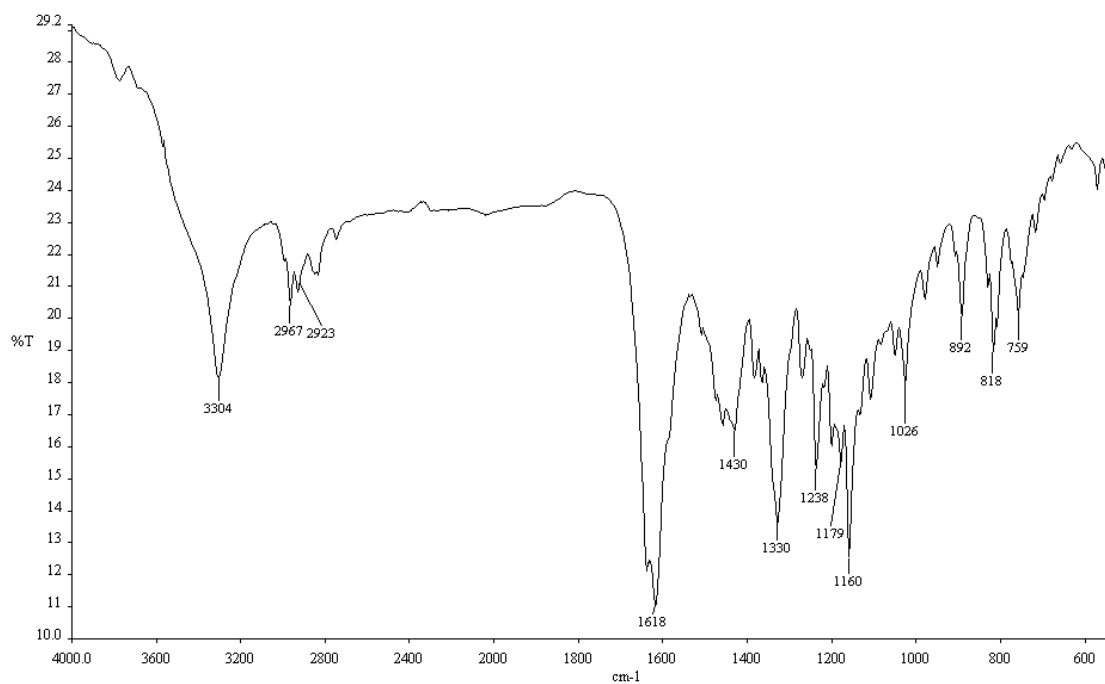
ภาพที่ 43 IR spectrum of 4-Formyl-2-(1'-hydroxy-1'-methylethyl)furano[3,2-a]carbazole (Ig)



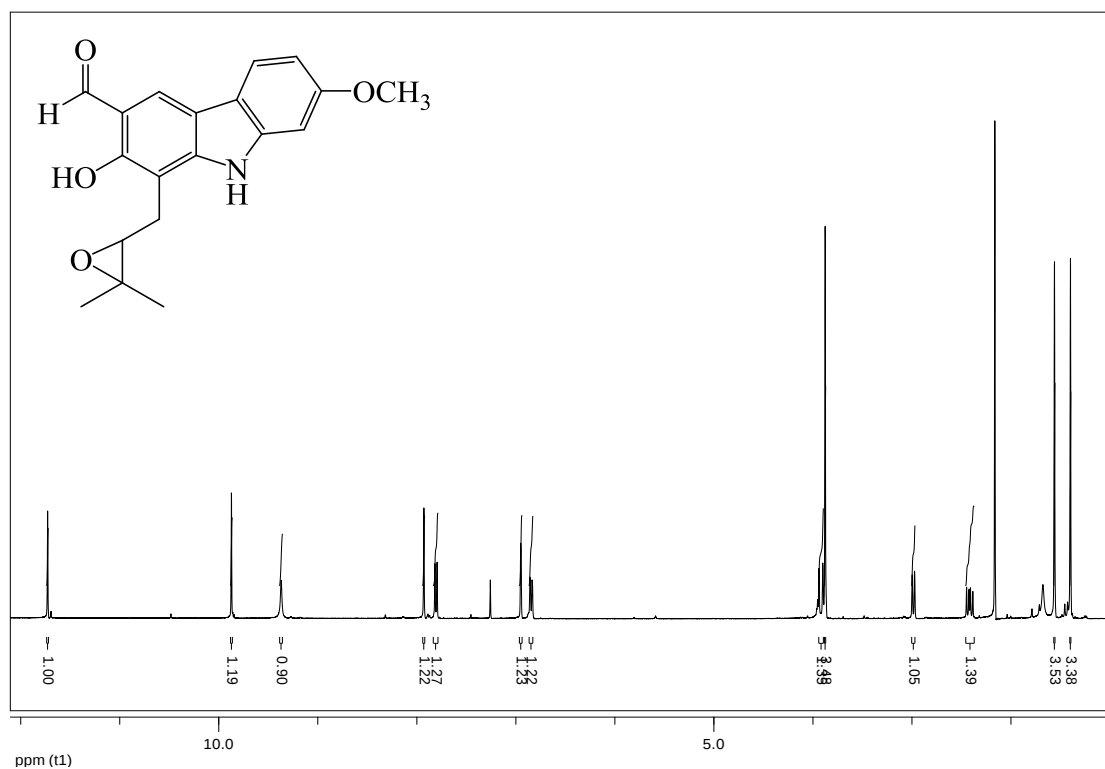
[3,2-a]carbazole (Ig)



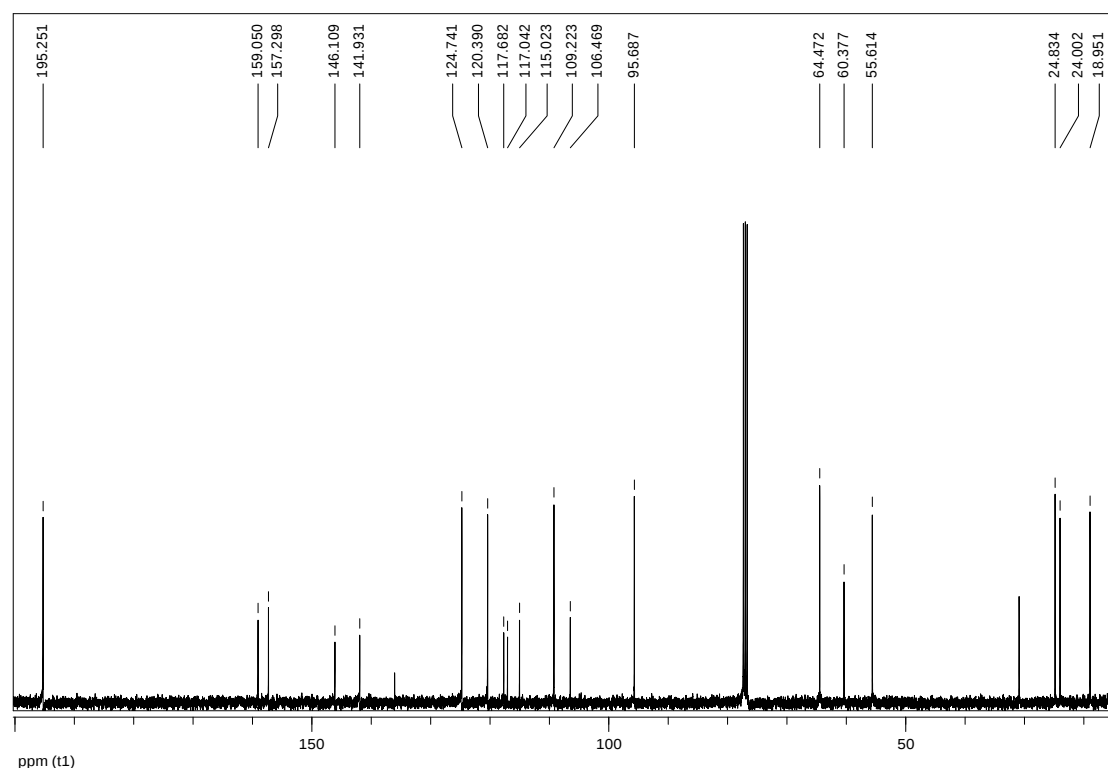
[3,2-a]carbazole (Ig)



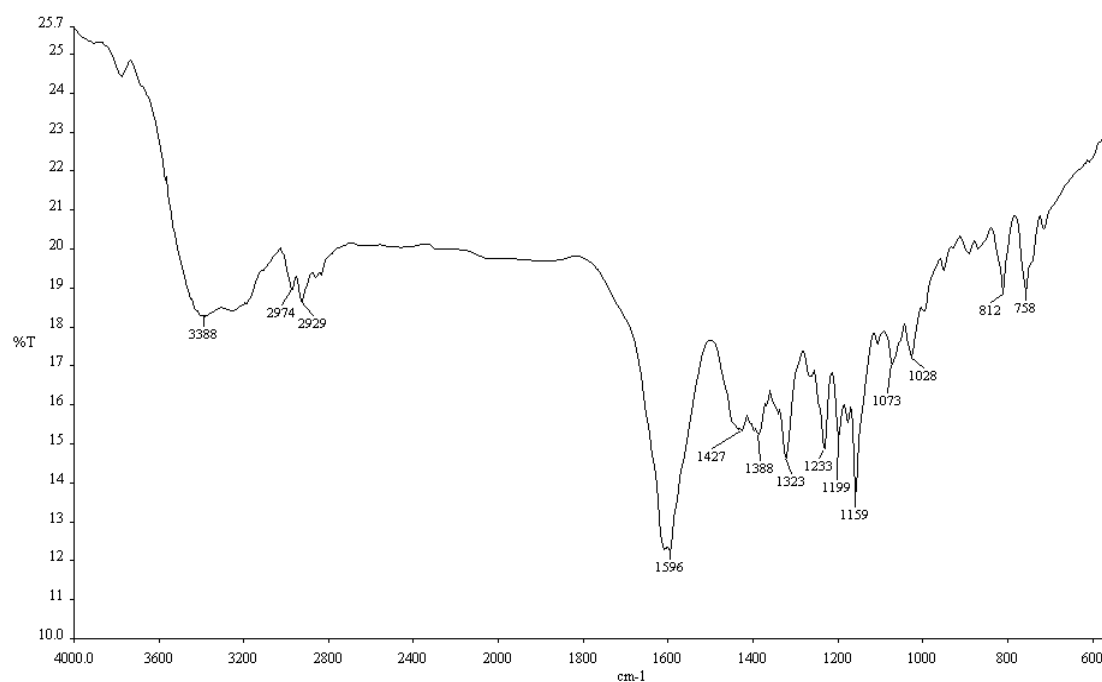
ภาพที่ 46 IR spectrum of 1-(3'-methylbutyl-2',3'-oxirane)-7-methoxymukonal (IIe).



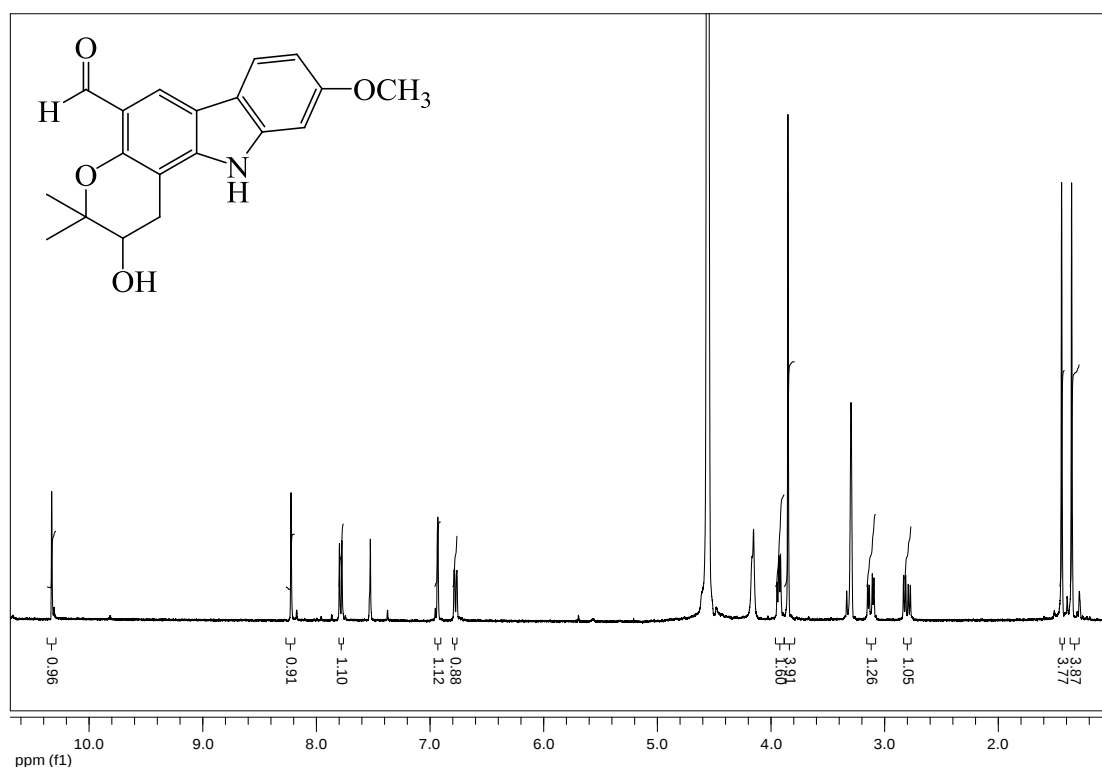
ภาพที่ 47 ¹H NMR spectrum of 1-(3'-methylbutyl-2',3'-oxirane)-7-methoxymukonal (IIe).



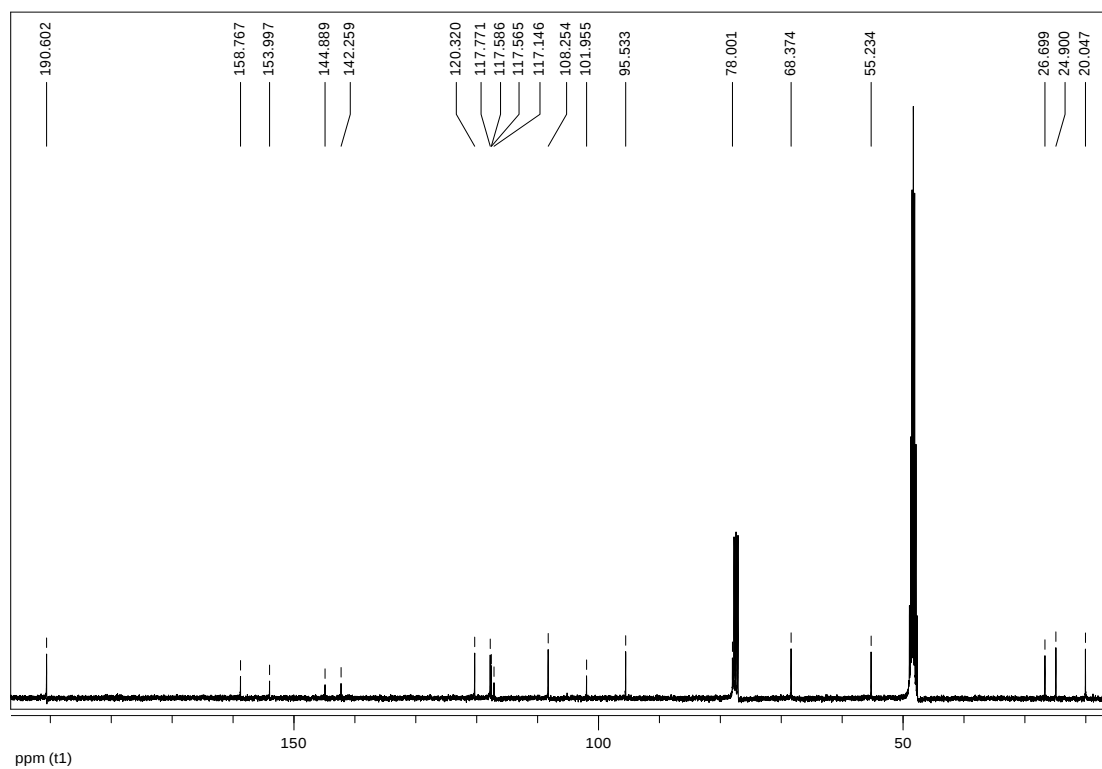
ภาพที่ 48 ¹³C NMR spectrum of 1-(3'-methylbutyl-2',3'-oxirane)-7-methoxymukonal (IIc).



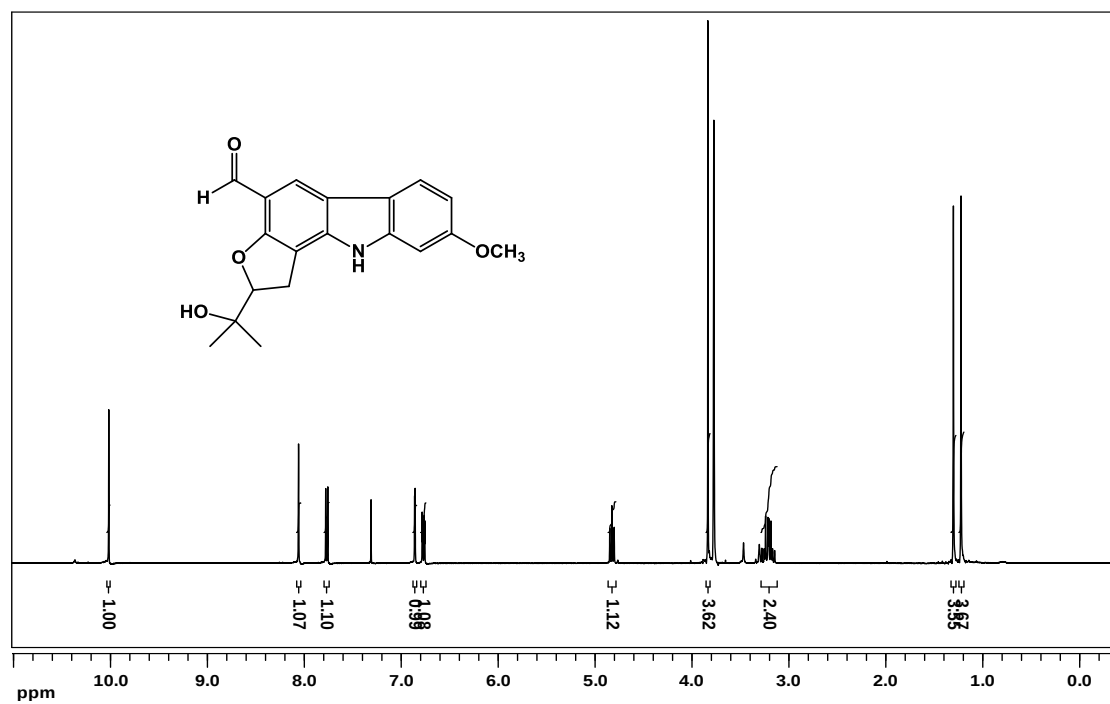
ภาพที่ 49 IR spectrum of 5-formyl-2-hydroxy-3,3-dimethyl-9-methoxypyran[3,2-a]carbazole (III).



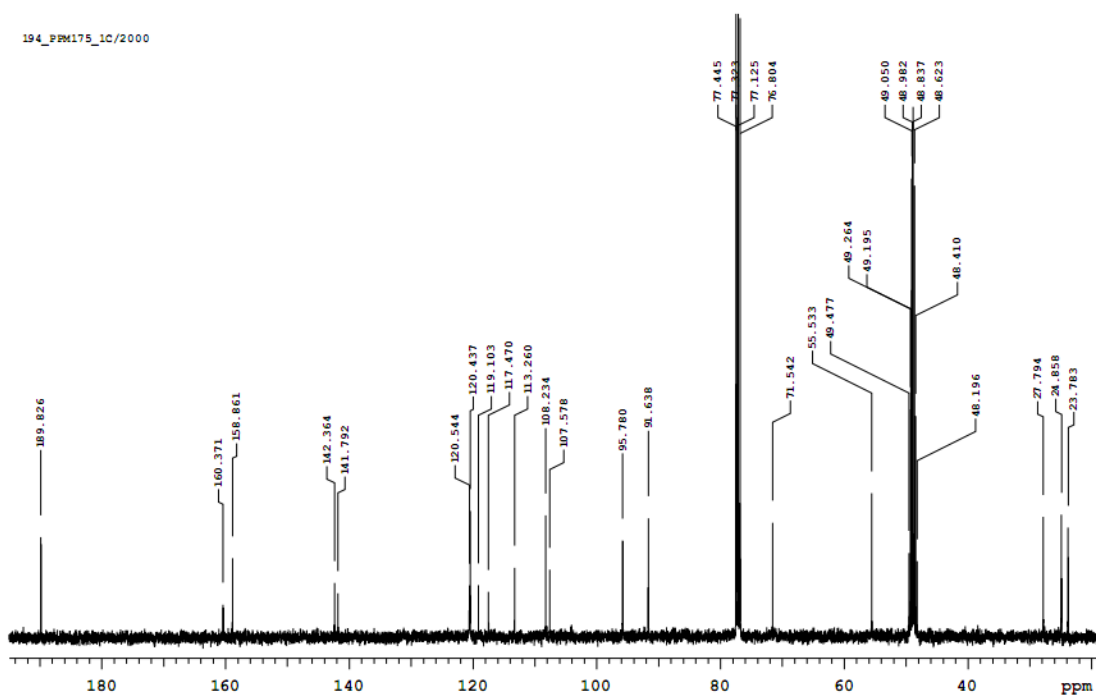
ภาพที่ 50 ¹H NMR spectrum of 5-formyl-2-hydroxy-3,3-dimethyl-9-methoxypyrido[3,2-a]carbazole (III).



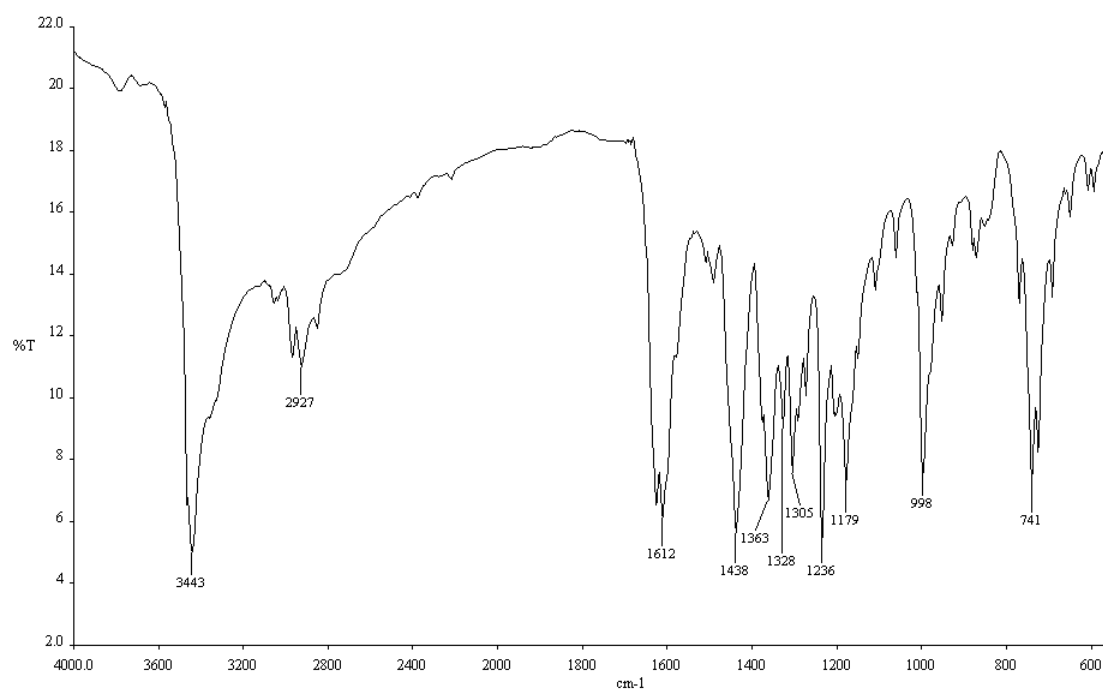
ภาพที่ 51 ¹³C NMR spectrum of 5-formyl-2-hydroxy-3,3-dimethyl-9-methoxypyrido[3,2-a]carbazole (III).



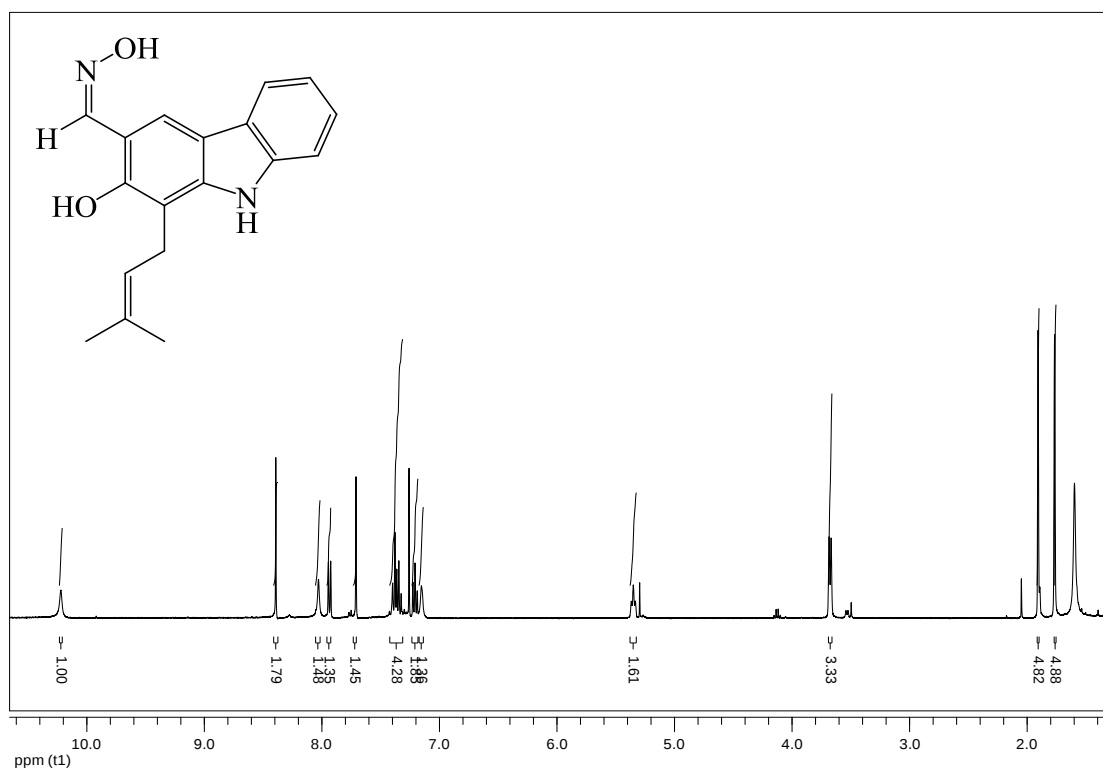
ภาพที่ 52 ¹H NMR spectrum of 4-Formyl-2-(1'-hydroxy-1'-methylethyl)-8-methoxyfurano[3,2-a]carbazole (IIg)



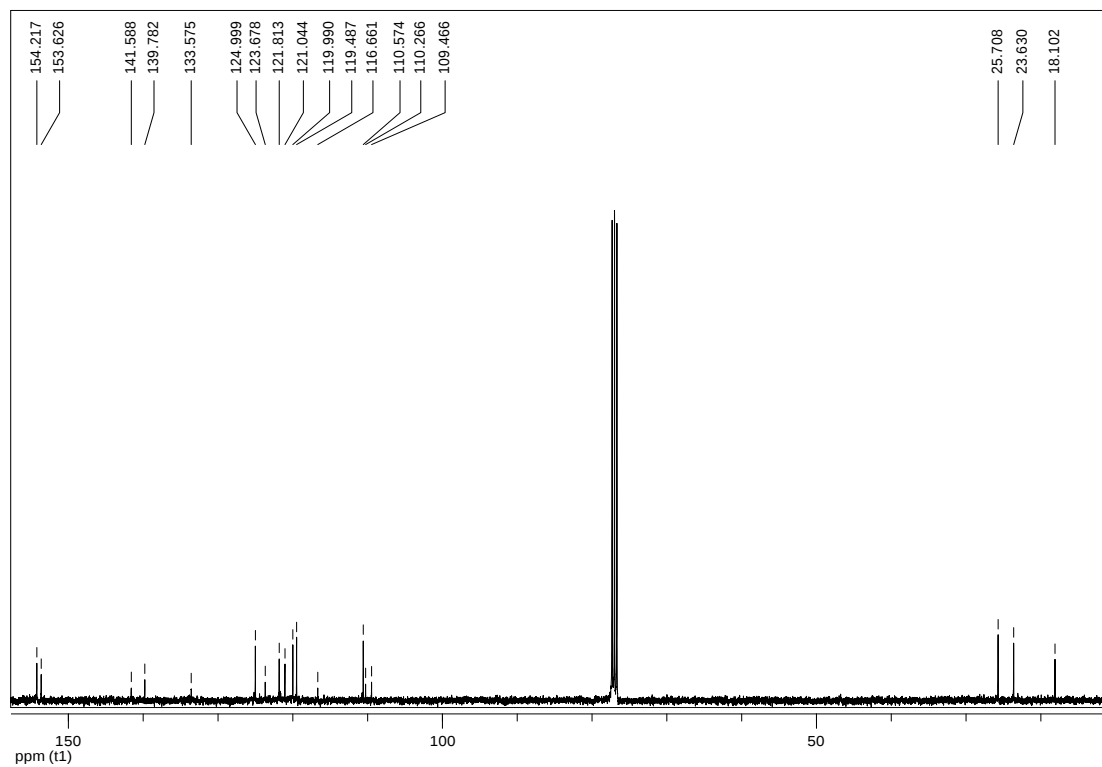
ภาพที่ 53 ¹³C NMR spectrum of 4-Formyl-2-(1'-hydroxy-1'-methylethyl)-8-methoxyfurano[3,2-a]carbazole (IIg)



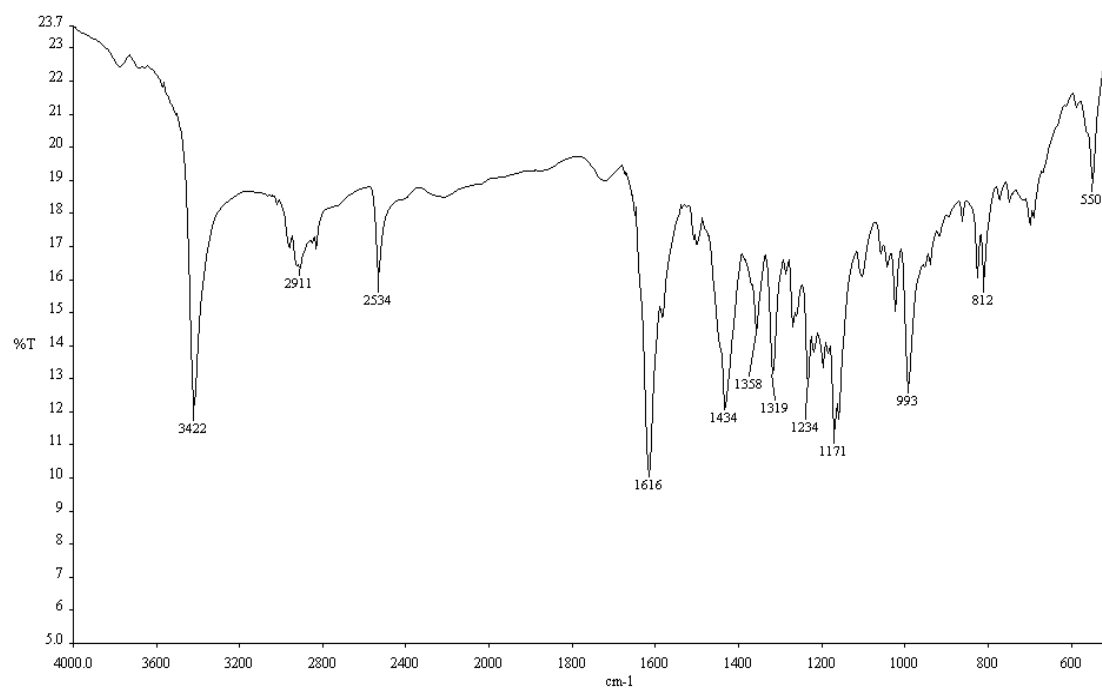
ภาพที่ 54 IR spectrum of heptaphylline oxime (Ih).



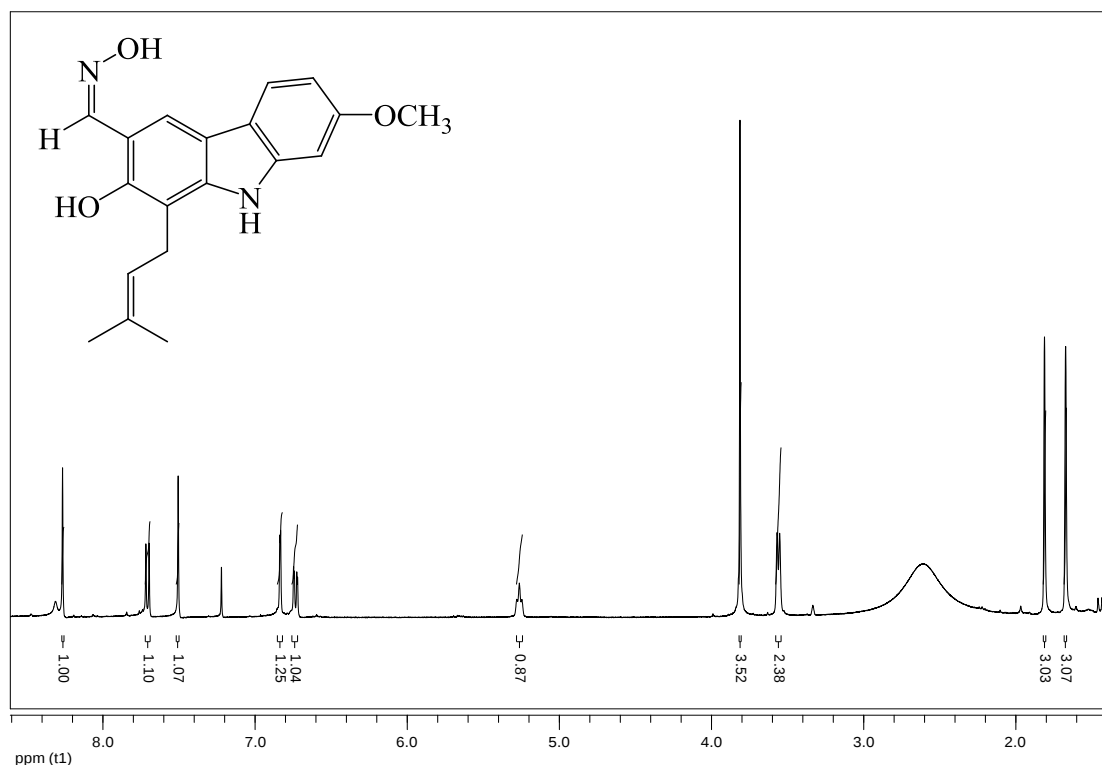
ภาพที่ 55 ¹H NMR spectrum of heptaphylline oxime (Ih).



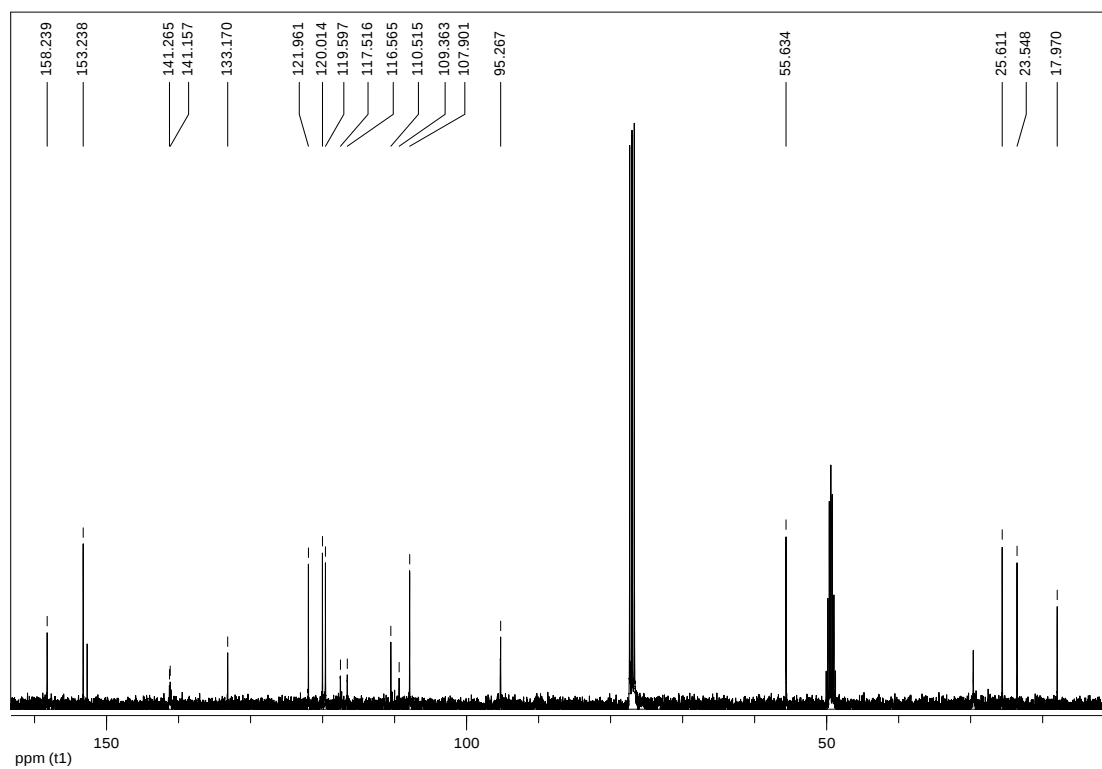
ภาพที่ 56 ¹³C NMR spectrum of heptaphylline oxime (Ih).



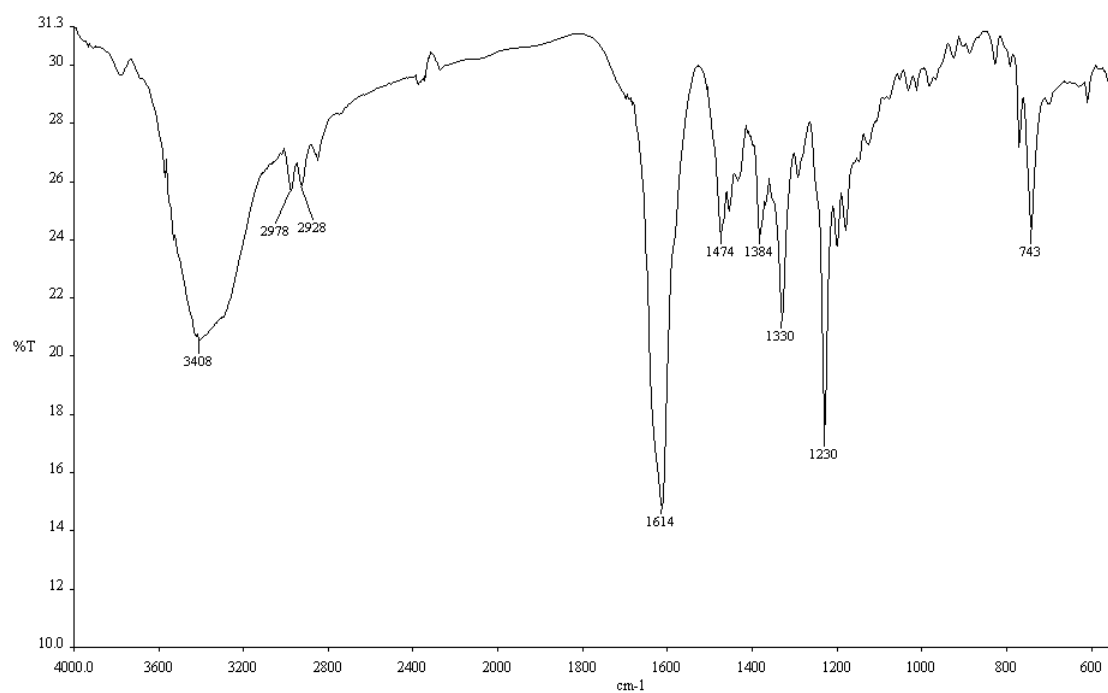
ภาพที่ 57 IR spectrum of 7-methoxyheptaphylline oxime (IIh).



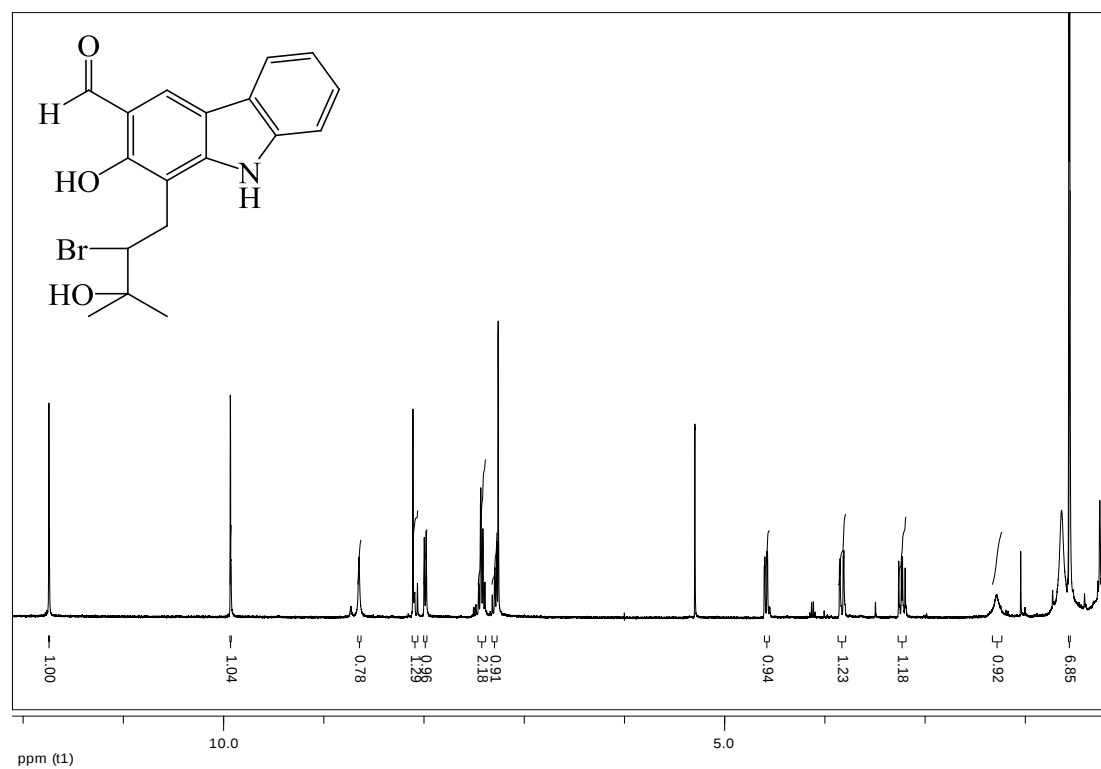
ภาพที่ 58 ¹H NMR spectrum of 7-methoxyheptaphylline oxime (IIh).



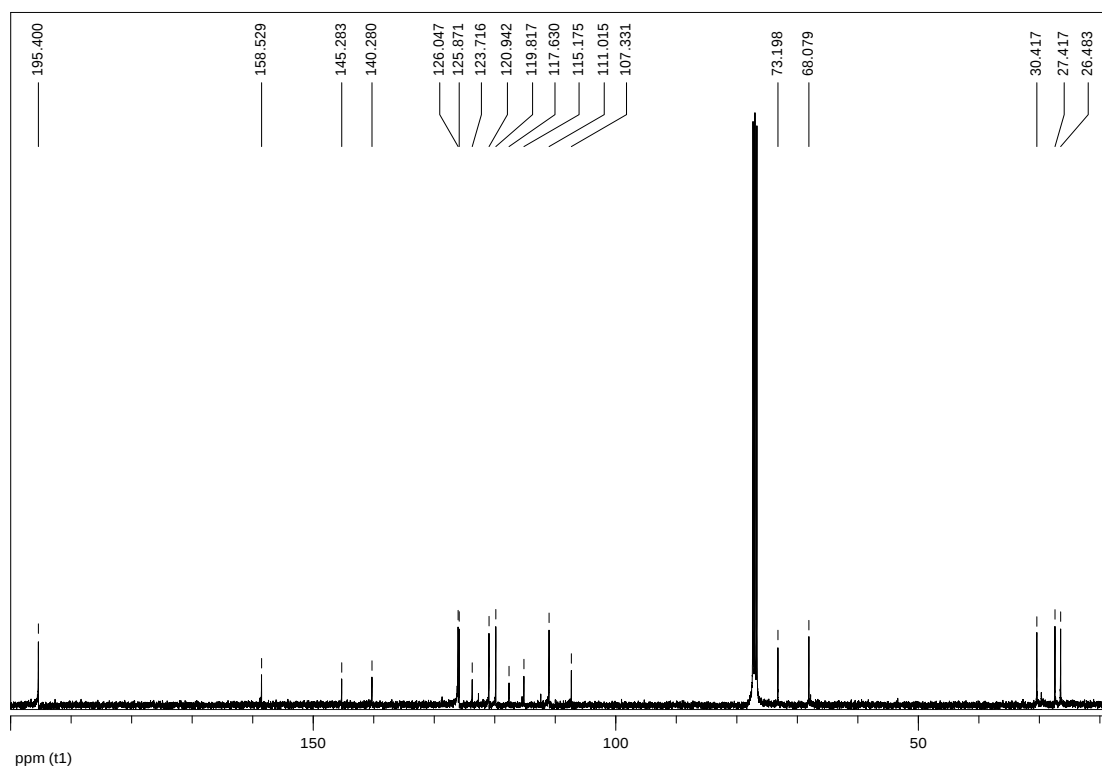
ภาพที่ 59 ¹³C NMR spectrum of 7-methoxyheptaphylline oxime (IIh).



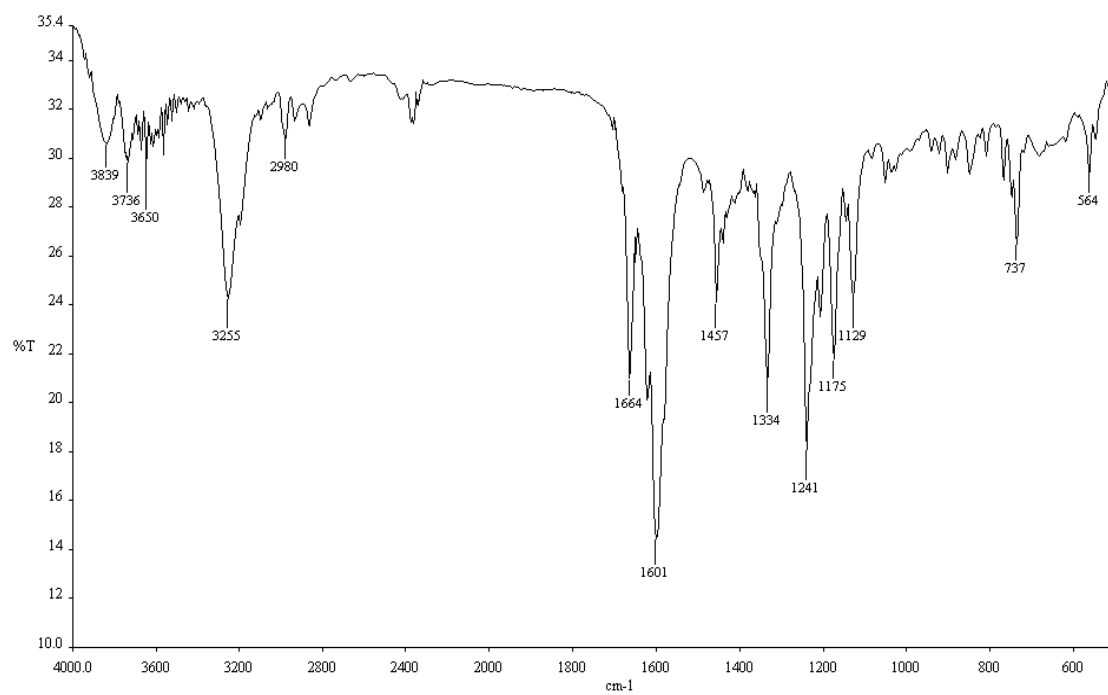
ภาพที่ 60 IR spectrum of 1-(2'-bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)mukonal (II).



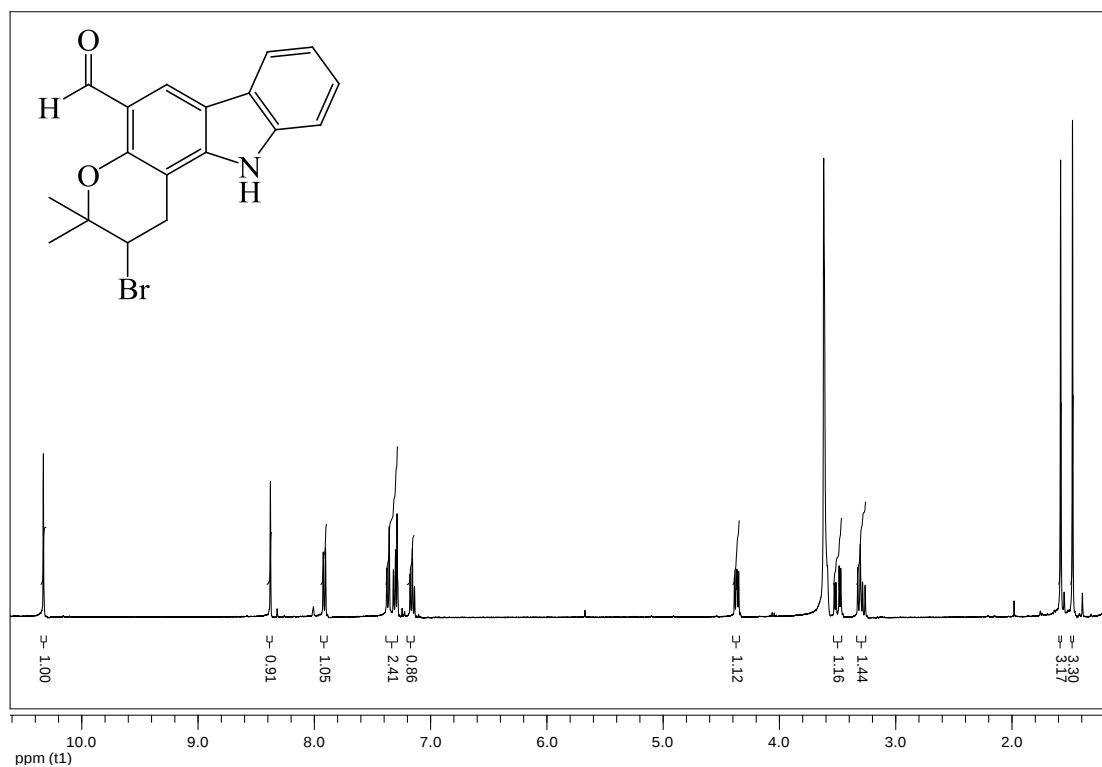
ภาพที่ 61 ¹H NMR spectrum of 1-(2'-bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)mukonal (II).



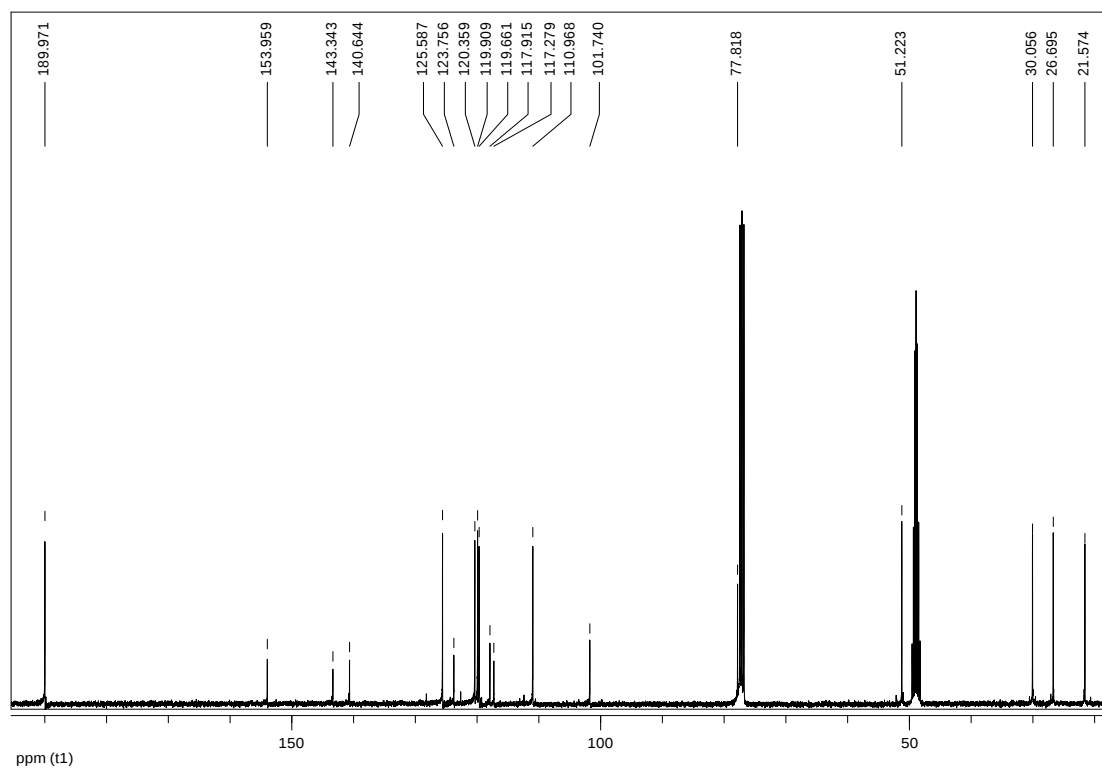
ภาพที่ 62 ¹³C NMR spectrum of 1-(2-bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)mukonal (II).



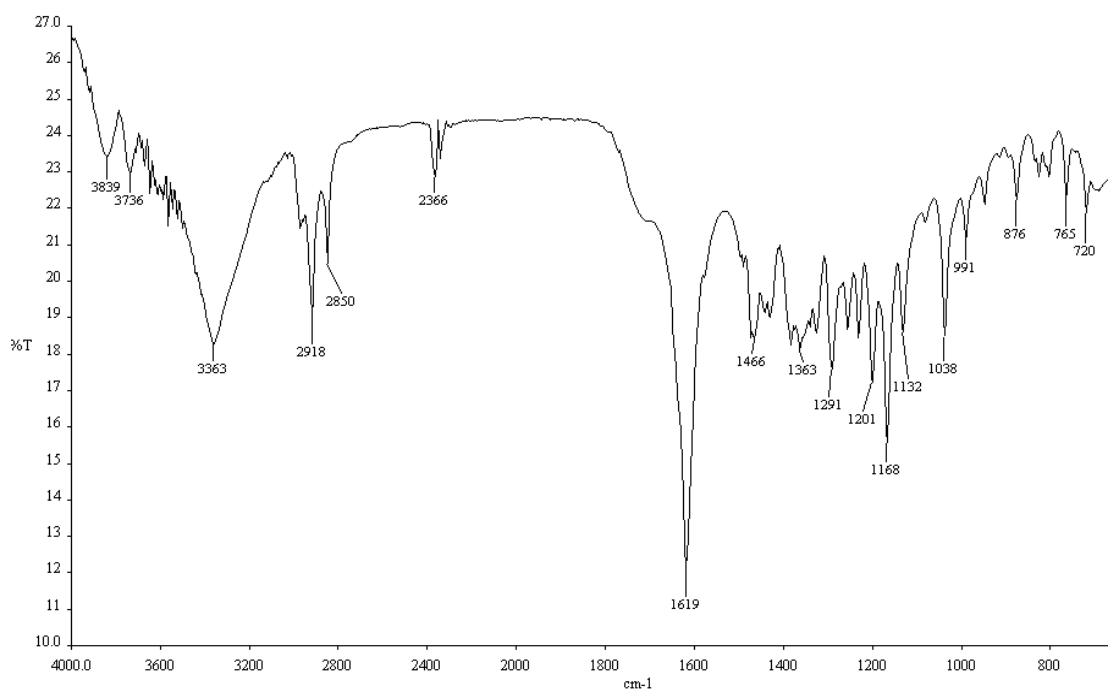
ภาพที่ 63 IR spectrum of 2-bromo-5-formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (II).



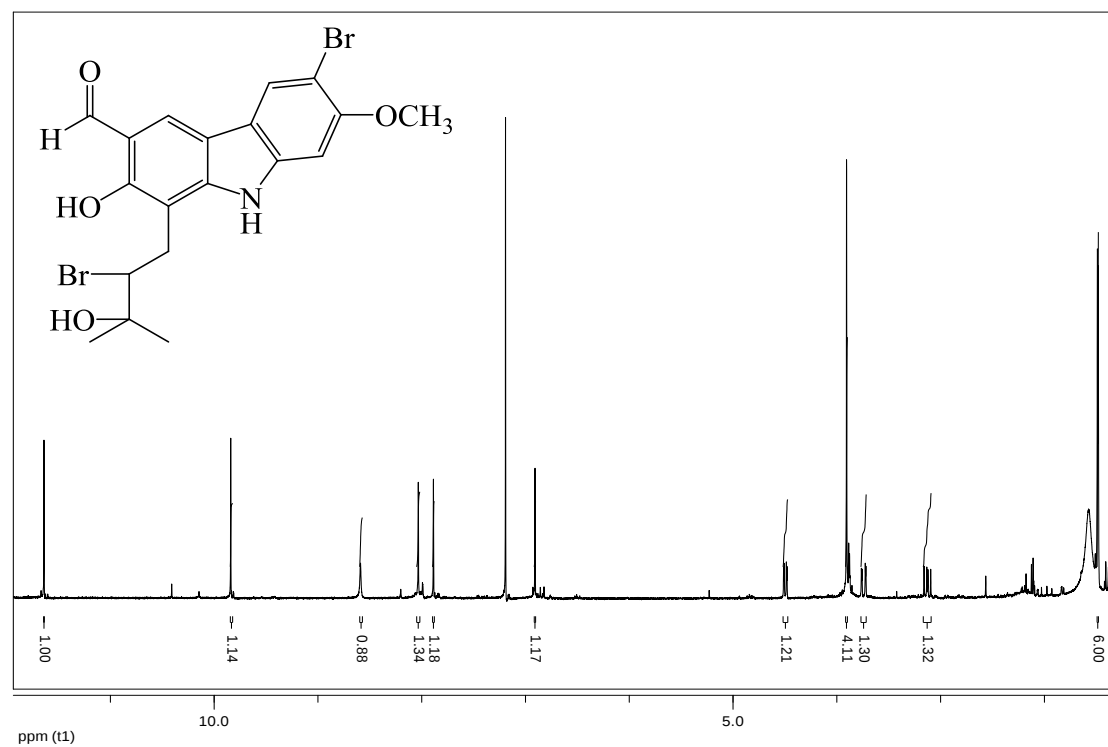
ภาพที่ 64 ^1H NMR spectrum of 2-bromo-5-formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (Ij).



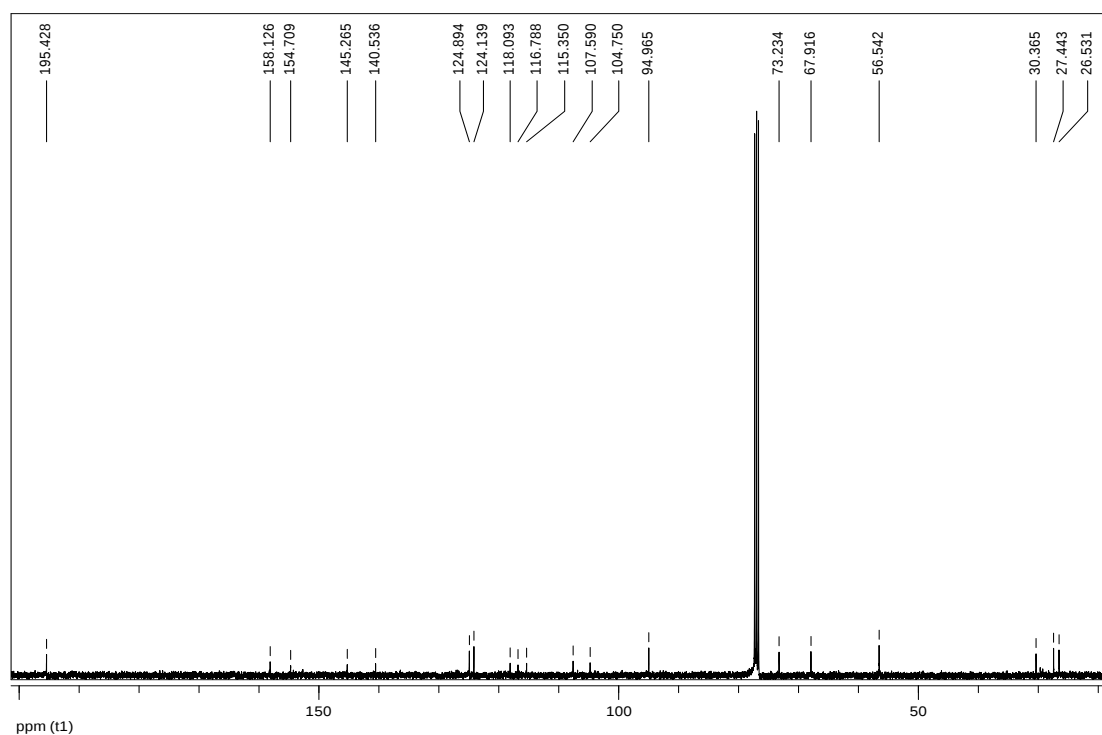
ภาพที่ 65 ^{13}C NMR spectrum of 2-bromo-5-formyl-3,3-dimethylpyrano[3,2-a]carbazole (Ij).



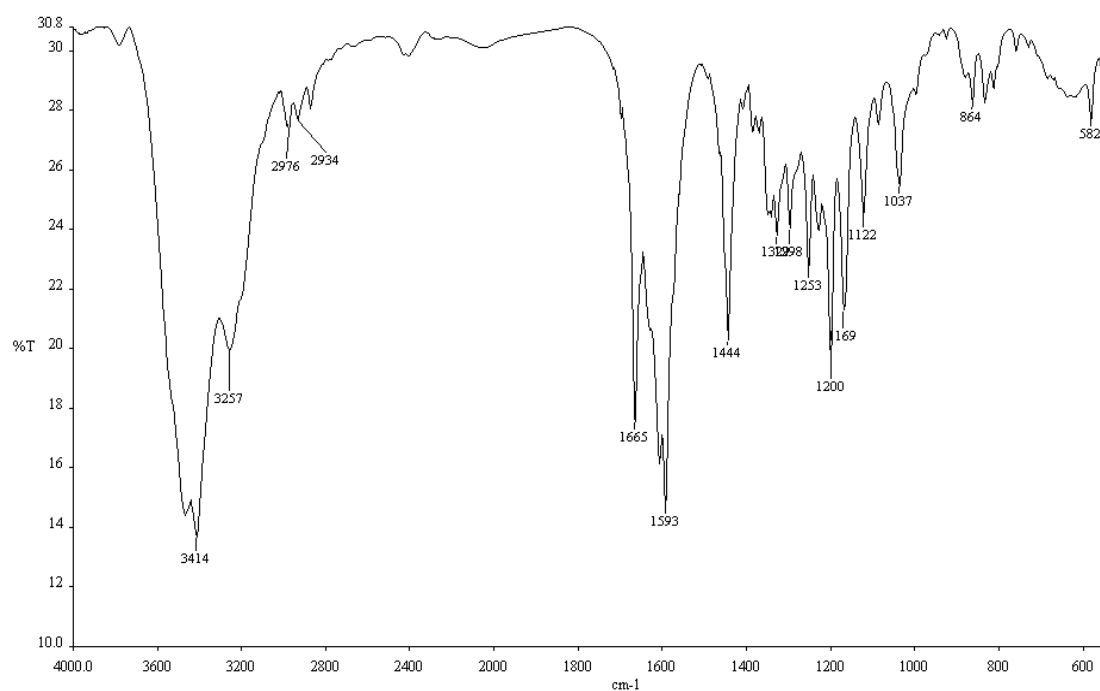
ภาพที่ 66 IR spectrum of 1-(2'-bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)-6-bromo-7-methoxymukonal (III).



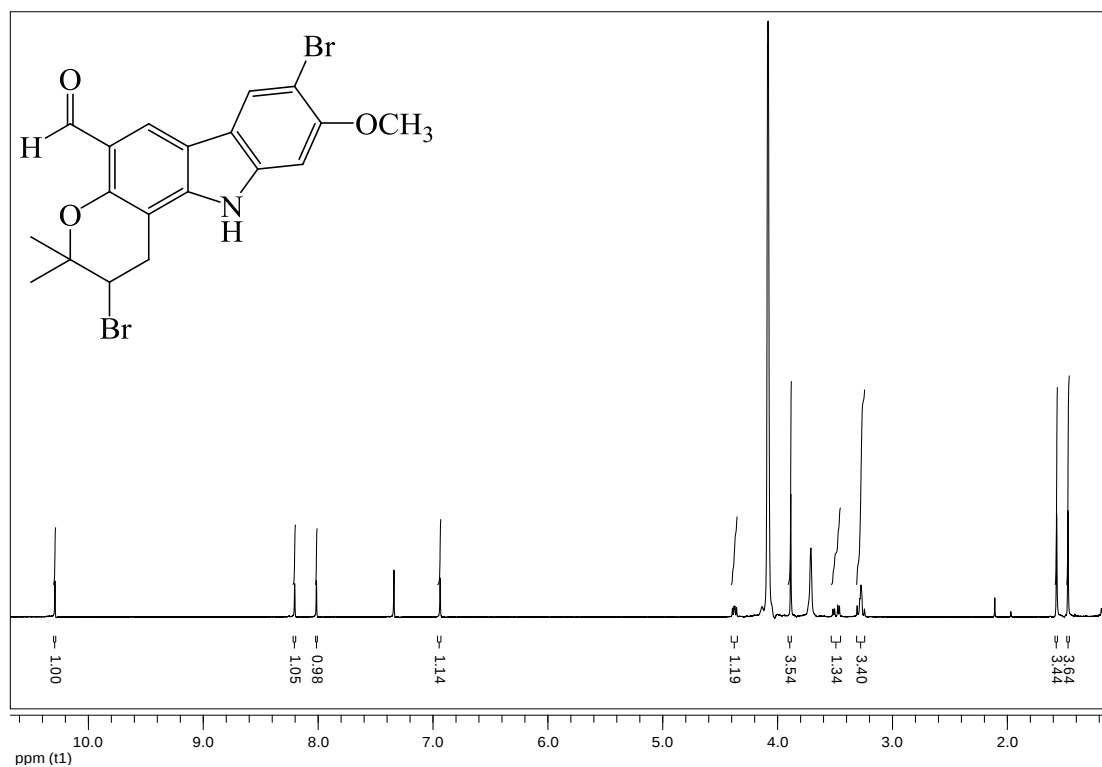
ภาพที่ 67 ^1H NMR spectrum of 1-(2'-bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)-6-bromo-7-methoxymukonal (III).



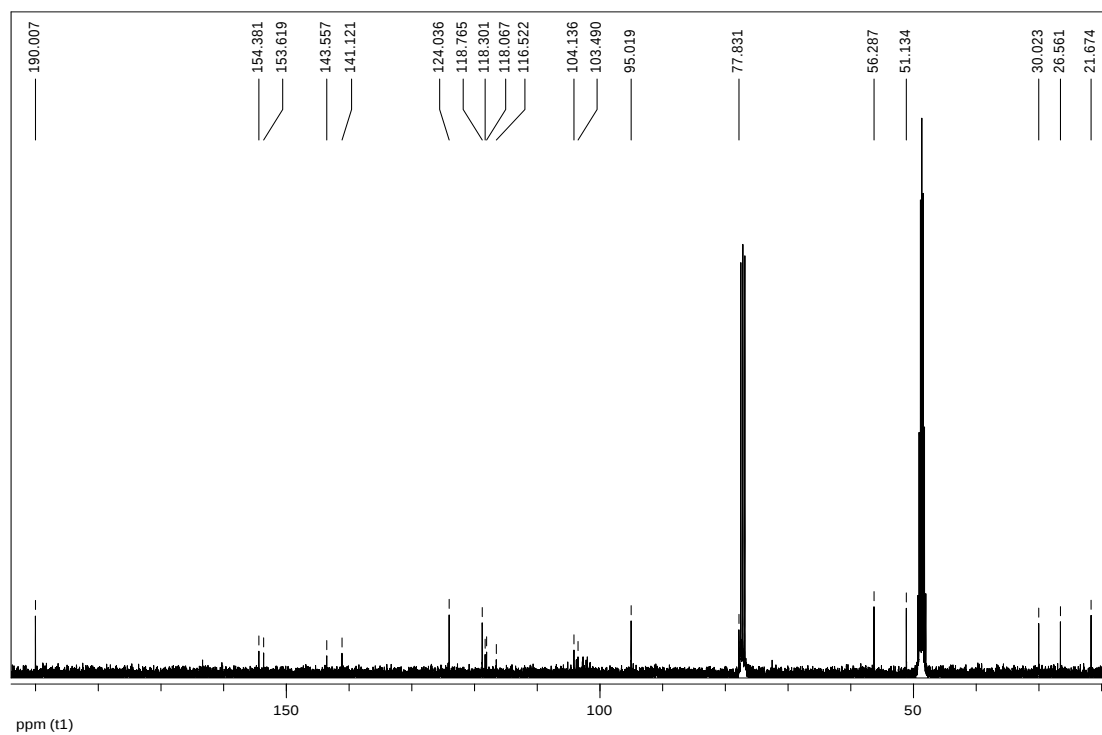
ภาพที่ 68 ¹³C NMR spectrum of 1-(2'-bromo-3'-hydroxy-3'-methylbutyl)-6-bromo-7-methoxymukonal (III).



ภาพที่ 69 IR spectrum of 2,8-dibromo-5-formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyran [3,2-a]carbazole (IIj).



ภาพที่ 70 ^1H NMR spectrum of 2,8-dibromo-5-formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyran[3,2-a]carbazole (IIj).



ภาพที่ 71 ^{13}C NMR spectrum of 2,8-dibromo-5-formyl-3,3-dimethyl-7-methoxypyran[3,2-a]carbazole (IIj).