



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ไชโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา พุดหอม
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดือนพฤษภาคม 2555

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง
จาก *Gardenia* spp.

คณะผู้วิจัย

ผศ. ดร.ชนิษฐา พุดหอม

สังกัด

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัยสกว. และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

In this research, the apical buds or exudate collected from the apical buds of 3 species of Thai Gardenia including *G. obtusifolia*, *G. thailandica* and *G. collinsae* were chosen for isolation, purification and characterization of their triterpene constituents. The chromatographic separation of apical buds of *G. obtusifolia* led to the isolation of three new cycloartane triterpenes, namely gardenoins E-H (**41-44**), together with five known compounds, secaubryenol (**27**), dikamakiartanes A, C and D (**45-47**), and 5 α -cycloart-24-ene-3,16,23-trione (**48**). The similar treatment with *G. thailandica* yielded two additional new cycloartanes, namely gardenoins I and J (**49-50**), along with two known derivatives, sootepin E (**34**) and coronalolic acid (**51**), other than secaubryenol (**27**). Unlike other species, the isolation of *G. collinsae* apical buds provided two new dammarane triterpenes, (20*R*,24*R*)-epoxy-3-oxo-dammarane-25*E*,26-diol (**52**) and (20*R*,24*S*)-epoxy-3-oxo-dammarane-25*E*,26-diol (**53**), as well as one known compound (20*R*,24*R*)-ocotillone (**54**). All isolated compounds were evaluated for their cytotoxicity toward five cancer cell lines. Generally, 3,4-*seco*-cycloartane type triterpenes with exomethylene γ -lactone moiety displayed broad cytotoxicity on all cell lines tested. Chemical modification of C-1 and C-26 position of this type compound was further carried out. However, all semi-synthetic ester and amide analogs did not give any improved result, but they gave the better selectivity. In addition, some naturally occurring 3,4-*seco*-cycloartane triterpenes and semi-synthetic analogs were tested for their antiangiogenic activity on a rat aortic sprouting assay, an ex vivo model angiogenesis. Among these compounds, a naturally occurring 3,4-*seco*-cycloartane triterpene, sootepin B (**31**) obtained from *G. sootepensis*, displayed the most potent activity in terms of the inhibition of microvessel sprouting from rat aortic rings in a dose-dependent manner with IC₅₀ value of 4.46 μ M and the complete inhibition was observed at a dose of 20 μ M. Its angiogenic effect was found to occur via suppression of endothelial cell (HUVEC) proliferation and tube formation, and was likely mediated by regulation (inhibition) of the Erk1/2 signaling pathway.

Keywords : Gardenia, cycloartane triterpene, cytotoxicity, antiangiogenesis

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการสกัดแยกสารจากส่วนยอดหรือเรซินที่เก็บจากส่วนยอดของพืชสกุล *Gardenia* ที่พบในประเทศไทย 3 ชนิด ได้แก่ *G. obtusifolia*, *G. thailandica* และ *G. collinsae* พบสารไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนชนิดใหม่ 4 ชนิดจากส่วนยอดของ *G. obtusifolia* ซึ่งให้ชื่อว่า Gardenoin E-H (41-44) และสารกลุ่มเดียวกันที่มีการรายงานมาก่อนอีก 5 ชนิด คือ *secaubryenol* (27), *dikamakiartane A, C* และ *D* (45-47) และ 5α -*cycloart-24-ene-3,16,23-trione* (48) และยังได้สารไซโคลอาร์เทนชนิดใหม่จากเรซินที่เก็บจากส่วนยอดของ *G. thailandica* คือ Gardenoin I-J (49-50) และได้สารที่มีการรายงานมาก่อนเพิ่มอีก 2 ชนิด คือ *sootepin E* (34) และ *coronaloic acid* (51) อย่างไรก็ตามไม่พบสารไซโคลอาร์เทนจากส่วนยอดของ *G. collinsae* แต่สามารถแยกได้สารแอมมาเรนไตรเทอร์พีนชนิดใหม่ 2 ชนิดคือ (20*R*,24*R*)-*epoxy-3-oxo-dammarane-25E,26-diol* (52) และ (20*R*,24*S*)-*epoxy-3-oxo-dammarane-25E,26-diol* (53) ซึ่งเป็น epimer กัน และอนุพันธ์ที่มีการรายงานมาก่อนอีก 1 ชนิดคือ (20*R*,24*R*)-*ocotillone* (54) เมื่อนำสารที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด พบว่าสารไซโคลอาร์เทนชนิด 3,4-*seco-cycloartane* ที่มีโครงสร้างส่วนที่เป็น *exomethylene γ -lactone ring* ให้ฤทธิ์ดีที่สุด จากนั้นจึงทำการสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์และเอไมด์ที่ตำแหน่งที่ 1 และ 26 ของสารกลุ่มนี้เพื่อดูความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่อการออกฤทธิ์ พบว่าอนุพันธ์ที่ได้ไม่มีฤทธิ์ดีกว่าสารตั้งต้นอย่างมีนัยสำคัญแต่มีความเลือกจำเพาะสูงขึ้น นอกจากนี้ยังได้นำสาร 3,4-*seco-cycloartane* ที่แยกได้และอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์ที่ได้มาทดสอบการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ซึ่งเป็นกระบวนการพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตและแพร่กระจายตัวของมะเร็งทุกชนิด พบว่า *sootepin* (31) ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เคยแยกได้จาก *G. sootepensis* ให้ฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุดโดยสามารถยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ใน *ex vivo model* ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 20 μ M และมีค่า $IC_{50} = 4.46 \mu$ M โดยการยับยั้งนี้ พบว่าเกิดผ่านการยับยั้ง proliferation ($IC_{50} = 1.20 \mu$ M) และ tube formation ($IC_{50} = 11.20 \mu$ M) แต่แทบไม่มีผลต่อ migration ของ HUVEC เลย นอกจากนี้ยังพบว่า พบว่า *sootepin B* แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยผ่านกลไกยับยั้งการ phosphorylation ของ Erk 1/2 เป็นหลัก

Executive Summary

โครงการ: ไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจาก *Gardenia spp.*

วัตถุประสงค์

1) สกัดแยกสารไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนจากพืชสกุล *Gardenia* ที่พบในประเทศไทย และนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ จากนั้นทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารที่แยกได้ด้วยปฏิกิริยาเคมีเพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่อการออกฤทธิ์

2) ศึกษาศักยภาพของสารที่แยกได้และอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ต่อการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (anti-angiogenesis) ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตและแพร่กระจายตัวของมะเร็งทุกชนิด

ผลการดำเนินงาน

1) สามารถแยกสารไตรเทอร์พีนบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 16 ชนิด ดังนี้คือ

- จากส่วนยอดของ *G. obtusifolia* แยกได้สารไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนชนิดใหม่ 4 ชนิดคือ gardenoin E-H (41-44) และสารไซโคลอาร์เทนที่มีการรายงานมาก่อนอีก 5 ชนิด ได้แก่ dikamakiartane A, C และ D (45-47), 5 α -cycloart-24-ene-3,16,23-trione (48) และ secaubryenol (27)
- จากเรซินที่เก็บจากส่วนยอดของ *G. thailandica* แยกได้สารไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ gardenoin I และ J (49-50) และสารกลุ่มเดียวกันที่มีการรายงานมาก่อนอีก 3 ชนิด คือ secaubryenol (27), sootepin E (34) และ coronalolic acid (51)
- จากส่วนยอดของ *G. collinsae* ไม่พบสารกลุ่มไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีน แต่สามารถแยกได้สารไตรเทอร์พีนกลุ่มแดมมาเรน (dammarane) ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ (20*R*,24*R*)-epoxy-3-oxo-dammarane-25*E*,26-diol (52) และ (20*R*,24*S*)-epoxy-3-oxo-dammarane-25*E*,26-diol (53) ซึ่งเป็น epimer กัน และอนุพันธ์ที่มีการรายงานมาก่อนอีก 1 ชนิดคือ (20*R*,24*R*)-ocotillone (54)

2) เมื่อนำสารที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ทำให้ทราบว่า สารไซโคลอาร์เทนชนิด 3,4-*seco*-cycloartane ที่มีโครงสร้างส่วนที่เป็น exomethylene γ -lactone ring แต่การมีวง furan ใน side chain (C20-C27) จะทำให้ฤทธิ์ลดลงอย่างมาก และเมื่อทำการยืนยันโดยทำปฏิกิริยาการเติมด้วยนิวคลีโอไฟล์ที่ exomethylene ของวง γ -lactone ring พบว่าอนุพันธ์ที่ได้ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งใดๆ ที่ทดสอบเลย ซึ่งชี้ให้เห็นว่า โครงสร้างส่วนที่เป็น exomethylene γ -lactone ring มีความจำเป็นต่อการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้ตามที่สันนิษฐานไว้

3) การสังเคราะห์อนุพันธ์ 3,4-*seco*-cycloartane ที่มีโครงสร้างส่วนที่เป็น exomethylene γ -lactone ring โดยเลือกใช้ coronalolide (11) และ sootepin A (30) เป็นสารตั้งต้น ได้อนุพันธ์เอสเทอร์และแ

ไมด์รวมทั้งสิ้น 27 อนุพันธ์ ซึ่งให้ผลความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งใกล้เคียงกับสารตั้งต้นทั้งสองชนิดแต่มีความจำเพาะเจาะจงสูงขึ้น

4) ได้นำสาร 3,4-seco-cycloartane ที่แยกได้จากพืช *Gardenia* ทั้งหมดและอนุพันธ์กิ่งสังเคราะห์บางชนิดมาคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ด้วย ex vivo model พบว่า sootepin (31) ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้จาก *G. sootepensis* ให้ฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุดโดยสามารถยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 20 μM และมีค่า $\text{IC}_{50} = 4.46 \mu\text{M}$ โดยการยับยั้งนี้พบว่าเกิดผ่านการยับยั้ง proliferation ($\text{IC}_{50} = 1.20 \mu\text{M}$) และ tube formation ($\text{IC}_{50} = 11.20 \mu\text{M}$) แต่แทบไม่มีผลต่อ migration ของ HUVEC เลย นอกจากนี้ยังพบว่า พบว่า sootepin B แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยผ่านกลไกยับยั้งการ phosphorylation ของ Erk $\frac{1}{2}$ เป็นหลัก

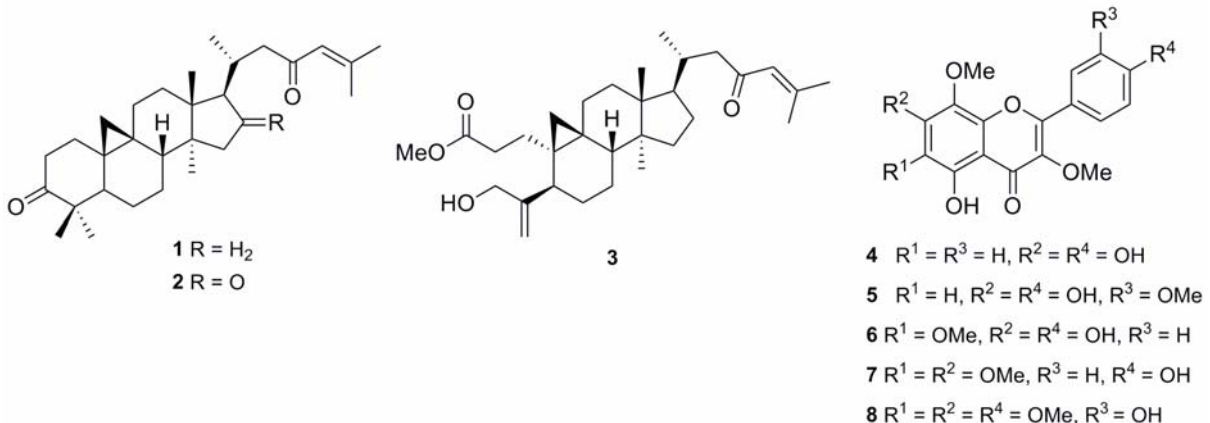
โครงการวิจัย ไโซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจาก *Gardenia spp.*

บทนำ

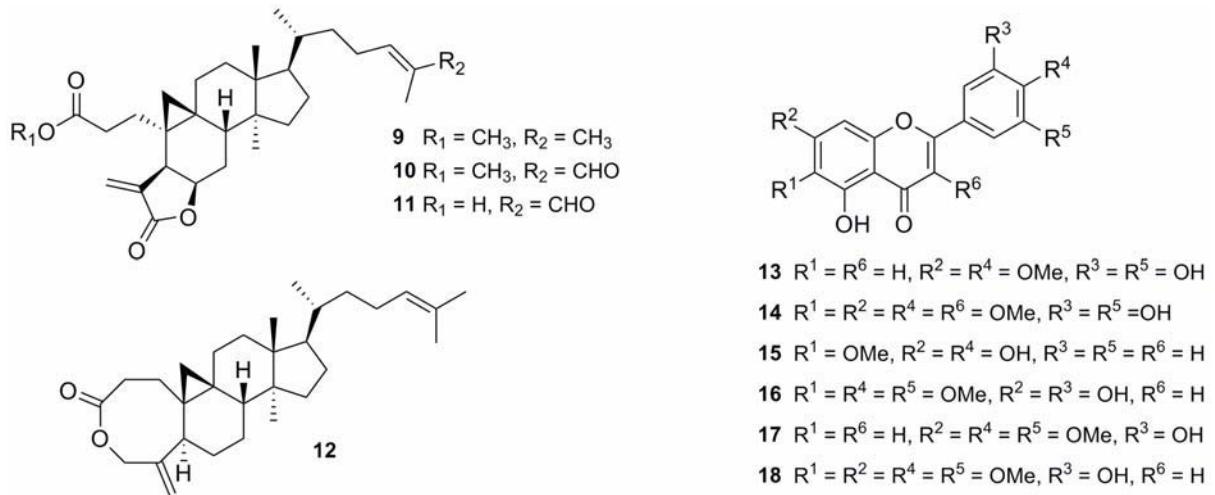
มะเร็งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สำคัญทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้วและประเทศที่กำลังพัฒนา และมีงานวิจัยหลายชิ้นพบว่า คนมีแนวโน้มจะเป็นมะเร็งมากขึ้นทุกปี เช่น ในอังกฤษ พบว่า ผู้หญิงวัยกลางคนเป็นมะเร็งเพิ่มขึ้นราว 6,000 คน ทุกปี ในประเทศไทยก็เช่นกัน ในปี พ.ศ. 2549 พบผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 66,000 ราย โดยในผู้ชายพบมะเร็งปอดและตับมากที่สุด สำหรับในผู้หญิงคือมะเร็งปากมดลูก ปอด และเต้านม แม้ว่ายาที่ใช้ในการรักษามะเร็งในปัจจุบันมีอยู่หลายชนิด แต่เนื่องจากมะเร็งสามารถเกิดขึ้นได้กับทุกส่วนของร่างกายและมะเร็งแต่ละชนิดก็มีความแตกต่างกัน ดังนั้นยาที่ใช้จึงต้องมีความเลือกจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด และปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือยาส่วนใหญ่ที่ใช้มักมีผลข้างเคียงค่อนข้างมาก จึงทำให้นักวิจัยต่างๆ ยังคงต้องค้นหายารักษามะเร็งชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงแต่ให้ผลข้างเคียงที่น้อย ซึ่งยารักษามะเร็งที่ใช้ได้ดีส่วนใหญ่ได้มาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น พิษสมุนไพรมะเร็งในทะเล จุลินทรีย์ เป็นต้น และได้มีรายงานว่า ประมาณ 60% ของยาชนิดใหม่ที่จดทะเบียนในช่วง ค.ศ. 1981-2002 โดย FDA คือยารักษาโรคมะเร็ง ไมเกรน และความดันโลหิตสูง เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือสารที่ปรับเปลี่ยนโครงสร้างมาจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่า พิษสมุนไพรรักษาโรคมะเร็งไทยน่าจะเป็นแหล่งเป้าหมายที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งสำหรับการค้นหายารักษามะเร็งชนิดใหม่ เนื่องจากประเทศไทยมีข้อได้เปรียบด้านความอุดมสมบูรณ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและมีความหลากหลายทางชีวภาพอยู่แล้ว

จากการศึกษารายงานการวิจัยต่างๆ พบว่าสารกลุ่มไตรเทอร์พีนเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และสารกลุ่มนี้หลายชนิดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและยับยั้งเชื้อ HIV ได้ดี โดยเฉพาะสารกลุ่ม seco-ไตรเทอร์พีน ซึ่งพบมากในพืชสกุล *Gardenia* ตัวอย่างเช่น

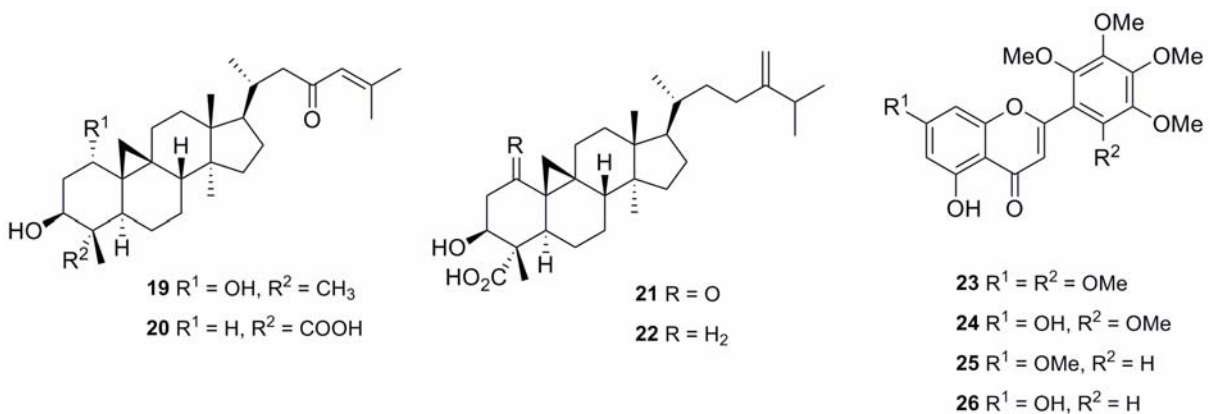
ปี ค.ศ. 2002 Patoomratana Tuchinda และคณะ¹ ศึกษาฤทธิ์ต้าน HIV และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จาก *G. obtusifolia* พบ cycloartane triterpene 3 ชนิด (1-3) และฟลาโวนอยด์ 5 ชนิด (4-8) ซึ่งสาร 33 มีฤทธิ์ยับยั้ง HIV ดีที่สุดคือ 99% ที่ความเข้มข้น 200 mg/mL



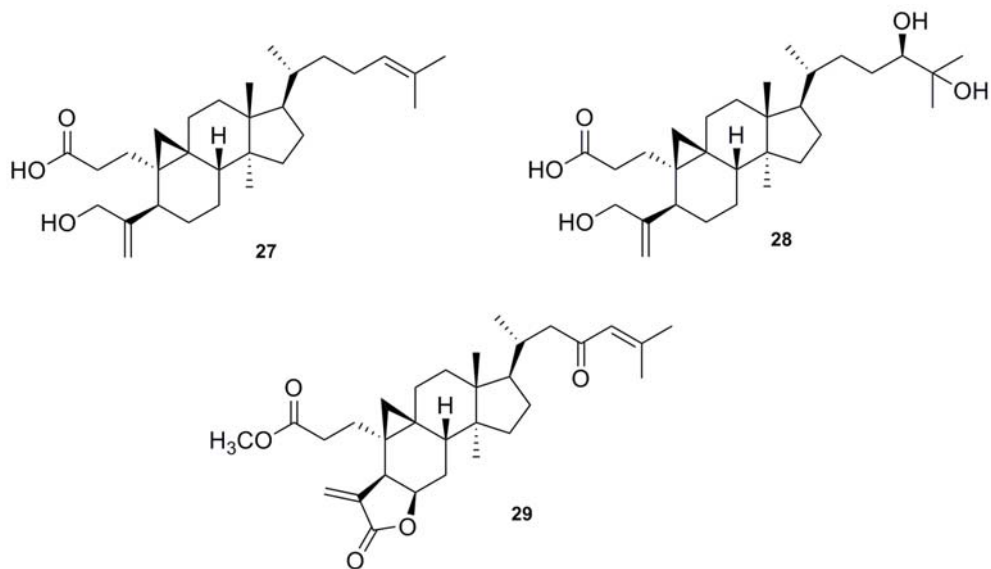
ปี ค.ศ. 2004 Vichai Reutrakul และคณะ² สกัดสารจากใบและกิ่งของ *G. tubifera* พบสาร cycloartane triterpene 4 ชนิด (9-12) และฟลาโวนอยด์ 6 ชนิด (13-18) โดยสาร 9 และ 10 เป็นสารชนิดใหม่ และนำสารเหล่านี้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและฤทธิ์ต้าน HIV



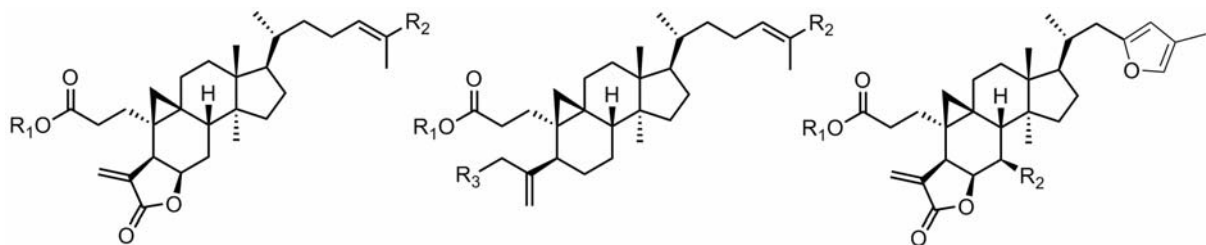
ในปีเดียวกัน Patoomratana Tuchinda และคณะ³ ศึกษาสารสำคัญจากกิ่งและใบของ *G. thailandica* พบ cycloartane triterpene 4 ชนิด (19-22) และฟลาโวนอยด์ 4 ชนิด (23-26) และนำสารเหล่านี้มาทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV และพบว่าสาร 19-22 มีฤทธิ์ในระดับปานกลางถึงดี



ปี ค.ศ. 2006 Raphal Grougnet และคณะ⁴ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ *G. aubryi* พบสาร seco-ไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนชนิดใหม่ 3 ชนิด (27-29) และนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ปากมดลูก และต่อมลูกหมาก พบว่า เฉพาะสาร 29 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบทุกชนิด



ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำส่วนยอดหรือเรซิน (exudate) ที่เก็บได้จากส่วนยอดของพืช *Gardenia* ที่พบในไทยมาทำการสกัดแยกสาร ในเบื้องต้นได้ทำการสกัดแยกสารจากส่วนยอดของ *G. sootepensis* และ *G. tubifera* และพบสาร 3,4-*seco*-ไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนชนิดใหม่ 5 ชนิด (**30-34**) และสารกลุ่มเดียวกันที่มีรายการมาก่อนอีก 4 ชนิด (**35-38**) จาก *G. sootepensis* และสาร 3,4-*seco*-ฟลูราโนไซโคลอาร์เทนชนิดใหม่ 3 ชนิดจาก *G. tubifera* (**39-41**) ซึ่งสาร 3,4-*seco*-ไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบในเกณฑ์ดีและน่าสนใจ ขณะที่สารกลุ่ม 3,4-*seco*-ฟลูราโนไซโคลอาร์เทนไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบเลย จากนั้นผู้วิจัยจึงนำพืชสกุลนี้อีก 3 สายพันธุ์ คือ *G. obtusifolia*, *G. thailandica* และ *G. collinsae* มาศึกษาเบื้องต้นด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์นี้มีสารกลุ่มไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันแต่มีความแตกต่างทางโครงสร้างย่อย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่า เมื่อนำสารสกัดหยาบจากส่วนยอดของพืชทั้งสามชนิดนี้มาทำการแยก จะสามารถได้สารกลุ่มไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนที่มีโครงสร้างที่หลากหลาย และจะเป็นประโยชน์ยิ่งในการนำไปศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารเหล่านี้ต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง รวมถึงการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยปฏิกิริยาเคมีจะทำให้ได้สารกลุ่มนี้ที่มีโครงสร้างหลากหลายมากขึ้น ซึ่งข้อมูลต่างๆ ที่ได้จะมีประโยชน์ต่อการนำสารเหล่านี้ไปพัฒนาเป็นยาในอนาคต



30 R₁ = CH₃, R₂ = CH₂OH
31 R₁ = H, R₂ = CH₃
35 R₁ = CH₃, R₂ = CH₃
36 R₁ = H, R₂ = CHO
37 R₁ = CH₃, R₂ = CHO

27 R₁ = H, R₂ = CH₃, R₃ = OH
32 R₁ = CH₃, R₂ = CH₃, R₃ = OH
33 R₁ = CH₃, R₂ = CHO, R₃ = OH
34 R₁ = H, R₂ = CH₃, R₃ = H

38 R₁ = H, R₂ = H
39 R₁ = CH₃, R₂ = H
40 R₁ = CH₃, R₂ = OH

วัตถุประสงค์

1) สกัดแยกสารไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนจากพืชสกุล *Gardenia* ที่พบในประเทศไทย และนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ จากนั้นทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารที่แยกได้ด้วยปฏิกิริยาเคมีเพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่อการออกฤทธิ์

2) ศึกษาศักยภาพของสารที่แยกได้และอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ต่อการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (anti-angiogenesis) ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตและแพร่กระจายตัวของมะเร็งทุกชนิด

การทดลอง

ส่วนที่ 1: การสกัดแยกสารจากพืชสกุล *Gardenia*

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการสกัดแยกสารจากส่วนยอดหรือเรซินที่เก็บจากส่วนยอดของพืชสกุล *Gardenia* 3 ชนิด ได้แก่ *G. obtusifolia*, *G. thailandica* และ *G. collinsae* ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และทำการพิสูจน์ทราบโครงสร้างโดยอาศัยเทคนิค NMR และ mass spectroscopy

1.1 การสกัดแยกสารจากส่วนยอดของ *G. obtusifolia*

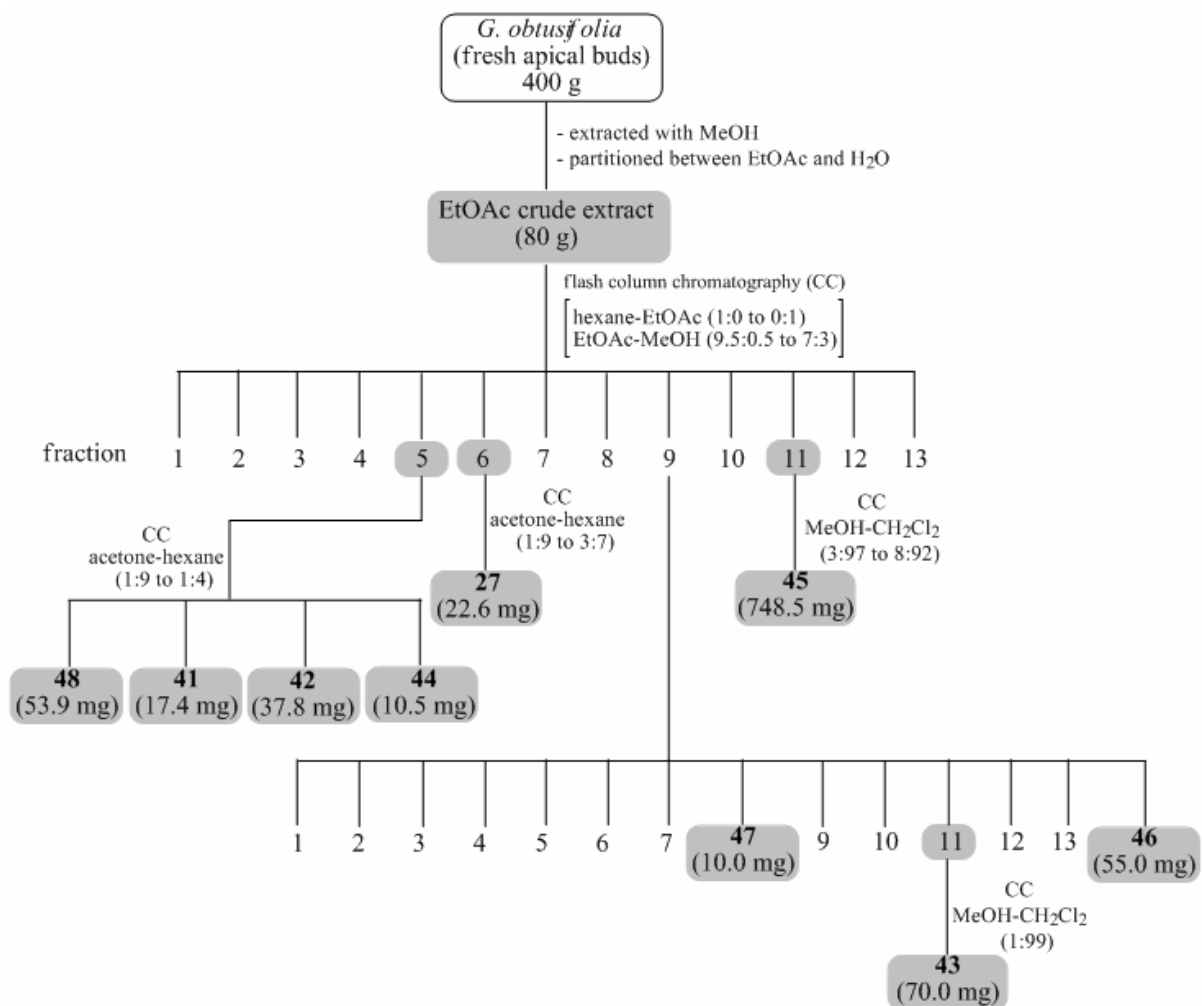
ได้นำส่วนยอดสด (fresh apical bud) ของ *G. obtusifolia* 400 กรัม มาสกัดด้วยเมธานอล (2 ลิตร x 2, ครั้งละ 2 วัน) แล้วระเหยตัวทำละลายออก จากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้มาพาร์ทิชันระหว่างน้ำ (300 มิลลิลิตร) กับเอซิลแอซิเทท (300 มิลลิลิตร x 3) ได้ส่วนสกัดหยาบ EtOAc 80 กรัม ซึ่งได้นำมาทำการแยกด้วยเฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ซิลิกาเจล) โดยใช้ hexane-EtOAc และ EtOAc-MeOH แบบเกรเดียนท์เป็นตัวชะ และทำการรวม fraction โดยอาศัยการดูองค์ประกอบที่คล้ายกันด้วยเทคนิค thin-layer chromatography (TLC) ได้ทั้งหมด 13 ส่วน (1-13)

นำส่วนที่ 5 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ซิลิกาเจล) และใช้ acetone-hexane ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:9 ถึง 1:4 เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 4 ชนิดคือ สาร 8 (53.9 มิลลิกรัม), สาร 1 (17.4 มิลลิกรัม), สาร 2 (37.8 มิลลิกรัม) และสาร 4 (10.5 มิลลิกรัม) และเมื่อนำส่วนที่ 6 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคเดียวกันโดยใช้ acetone-hexane ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:9 ถึง 3:7 เป็นตัวชะ ได้สาร 9 (22.6 มิลลิกรัม)

นำส่วนที่ 9 มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ซิลิกาเจล) และใช้ acetone-hexane ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:4 ถึง 1:1 เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อยทั้งหมด 14 ส่วน (9.1-9.14) และพบว่าส่วนย่อยที่ 8 และ 14 เป็นสารบริสุทธิ์คือ สาร 7 (10 มิลลิกรัม) และสาร 6 (55 มิลลิกรัม) จากนั้นได้นำส่วนย่อยที่ 9.11 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเดียวกันโดยใช้ MeOH-CH₂Cl₂ (1:99) เป็นตัวชะ ได้สาร 3 (70 มิลลิกรัม)

นำส่วนที่ 11 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ซิลิกาเจล) และใช้ MeOH-CH₂Cl₂ ในอัตราส่วนตั้งแต่ 3:97 ถึง 8:92 เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์อีก 1 ชนิดคือสาร 5 (748.5 มิลลิกรัม)

การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนยอดของ *G. obtusifolia* ได้สรุปไว้ดังแสดงในแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 1 แสดงการสกัดแยกสารจากส่วนยอดของ *G. obtusifolia*

1.2 การสกัดแยกสารจากเรซินของ *G. thailandica*

นำเรซิน (exudate) ที่เก็บจากส่วนยอดของ *G. thailandica* 10 กรัม มาละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างเมธานอลกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1:1 (20 มิลลิลิตร) จากนั้นสารละลายที่ได้มาทำการแยกออกเป็นส่วนๆ ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ซิลิกาเจล) โดยใช้ acetone-hexane ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:4 ถึง 1:0 เป็นตัวชะ และทำการรวม fraction โดยอาศัยการดูจุดประกอบที่คล้ายกันด้วยเทคนิค TLC ได้ทั้งหมด 11 ส่วน (1-11)

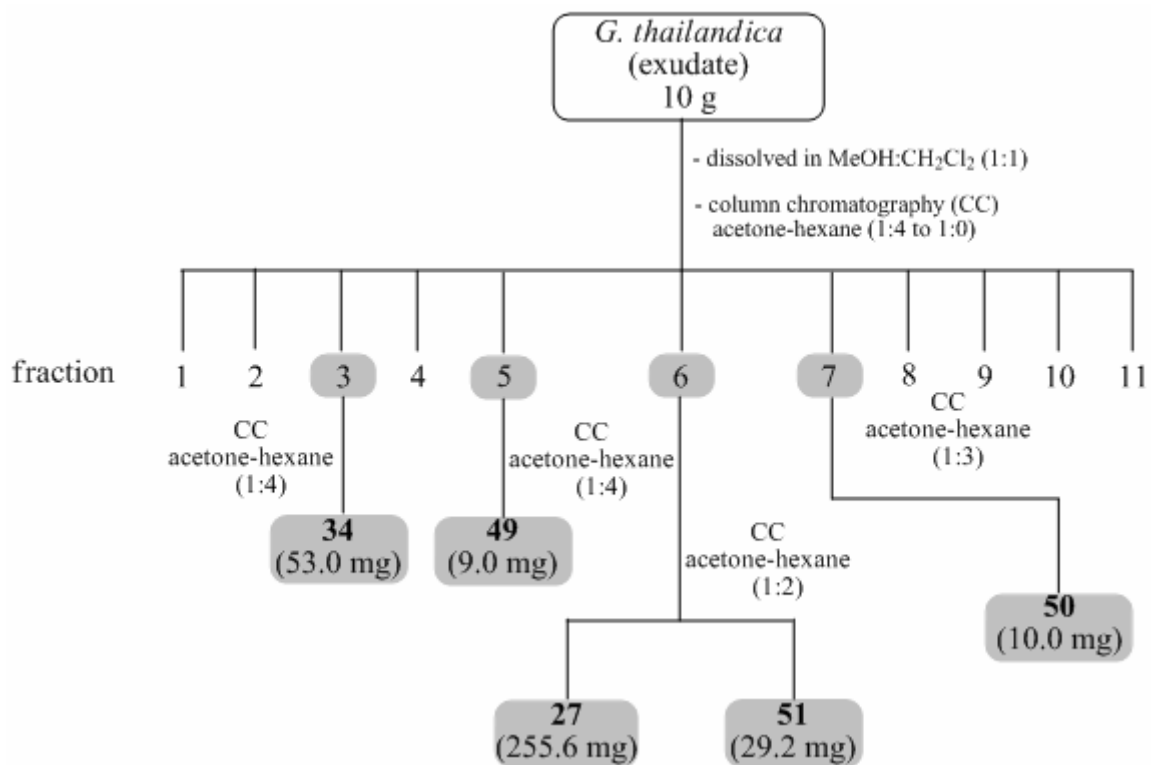
นำส่วนที่ 3 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ซิลิกาเจล) และใช้ acetone-hexane ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:4 เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ สาร 10 (53.0 มิลลิกรัม) และเมื่อนำส่วนที่ 6 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคเดียวกันโดยใช้ระบบตัวชะแบบเดียวกันคือ acetone-hexane ใน

อัตราส่วนตั้งแต่ 1:4 ได้สารบริสุทธิ์อีกหนึ่งชนิดคือสาร **12** (22.6 มิลลิกรัม) ส่วนที่ 5 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคเดียวกันโดยใช้ acetone-hexane ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:9 ถึง 3:7 เป็นตัวชะ ได้สาร **10** (22.6 มิลลิกรัม)

นำส่วนที่ 6 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ซีลิกาเจล) และใช้ acetone-hexane ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:2 เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือสาร **9** (255.6 มิลลิกรัม) เช่นเดียวกับที่พบในส่วนยอดของ *G. obtusifolia* และสาร **13** (29.2 มิลลิกรัม)

เมื่อนำส่วนที่ 7 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ซีลิกาเจล) และใช้ acetone-hexane ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:3 เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์อีกหนึ่งชนิดคือสาร **11** (10.0 มิลลิกรัม)

การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนยอดของ *G. thailandica* ได้สรุปไว้ดังแสดงในแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2 แสดงการสกัดแยกสารจากเรซิน (exudate) จากส่วนยอดของ *G. thailandica*

1.3 การสกัดแยกสารจากส่วนยอดของ *G. collinsae*

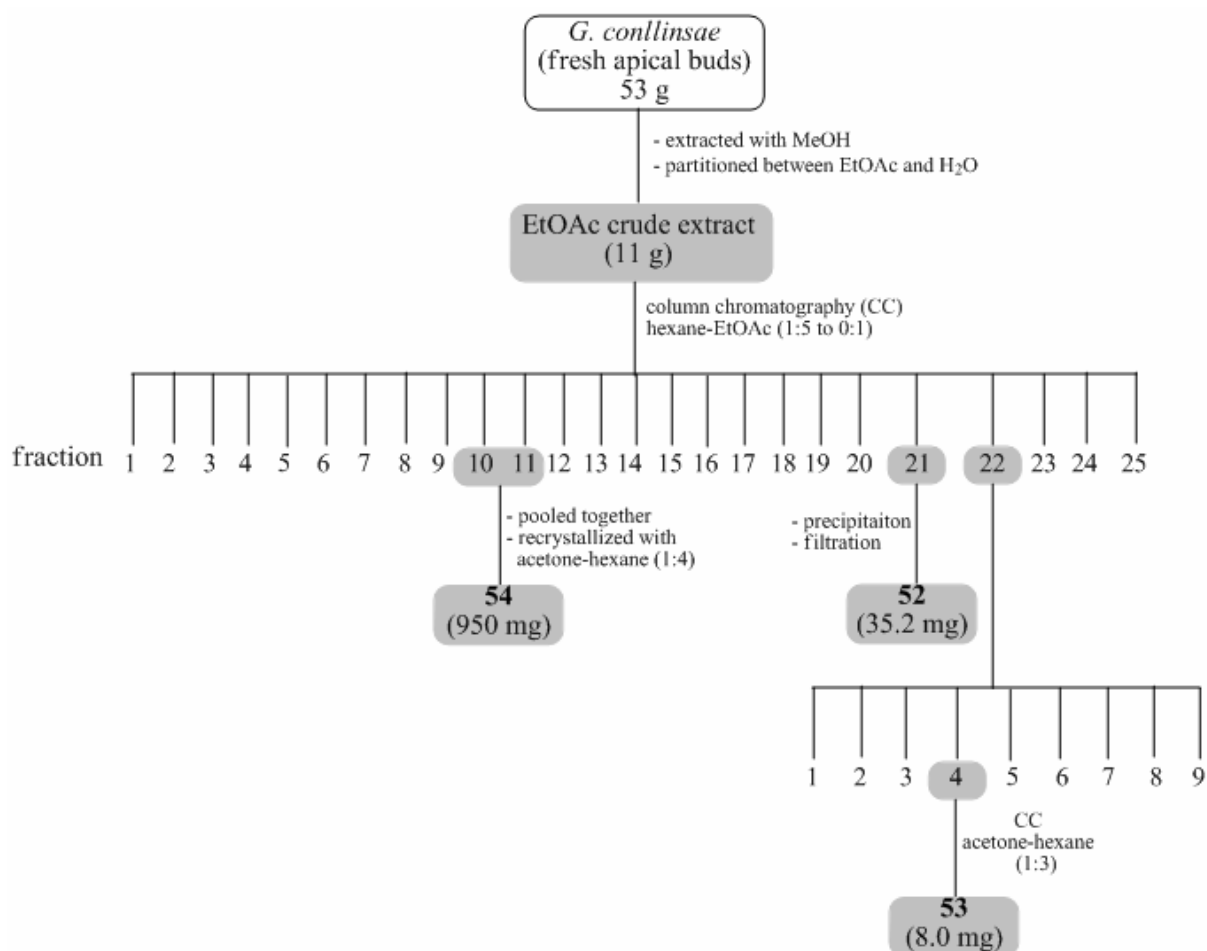
นำส่วนยอดสด (fresh apical bud) ของ *G. collinsae* 53 กรัม มาสกัดด้วยเมทานอล (500 มิลลิลิตร x 2, ครั้งละ 1 วัน) แล้วระเหยตัวทำละลายออก จากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้มาพาร์ทิชันระหว่างน้ำ (200 มิลลิลิตร) กับเอซิลแอซิเทท (200 มิลลิลิตร x 3) ได้ส่วนสกัดหยาบ EtOAc 11 กรัม ซึ่งได้นำมาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ซีลิกาเจล) โดยใช้ hexane-EtOAc แบบเกรเดียนท์เป็นตัวชะ และ

ทำการรวม fraction โดยอาศัยการดูองค์ประกอบที่คล้ายกันด้วยเทคนิค thin-layer chromatography (TLC) ได้ทั้งหมด 25 ส่วน (1-25)

นำส่วนที่ 10 และ 11 มารวมกันเนื่องจากมีองค์ประกอบหลักเหมือนกัน จากนั้นนำมาตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง acetone กับ hexane ในอัตราส่วน 1:4 ได้สารไตรเทอร์พีนประเภท dammarane บริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ สาร **16** (950 มิลลิกรัม) และส่วนที่ 21 พบว่ามีการตกตะกอนออกมาเป็นของแข็งสีขาว ซึ่งเมื่อทำการกรองและล้างด้วยตัวทำละลาย ได้สารบริสุทธิ์ประเภทเดียวกันอีกหนึ่งชนิดคือสาร **14** (35.2 มิลลิกรัม)

นำส่วนที่ 22 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ซิลิกาเจล) และใช้ acetone-hexane ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:3 เป็นตัวชะ ได้สารไตรเทอร์พีนประเภท dammarane บริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ สาร **15** (8.0 มิลลิกรัม)

การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนยอดของ *G. collinsae* ได้สรุปไว้ดังแสดงในแผนภาพที่ 3



แผนภาพที่ 3 แสดงการสกัดแยกสารจากส่วนยอดของ *G. collinsae*

ส่วนที่ 2: การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร 3,4-seco-ไซโคลอาร์เทนที่แยกได้

2.1 ปฏิกริยาของ 3,4-seco-ไซโคลอาร์เทนกับนิวคลีโอไฟล์บางชนิด

2.1.1 ปฏิกริยาของ tubiferolide methyl ester (35) กับสารประกอบซัลเฟอร์และเอมีน

ละลาย tubiferolide methyl ester (35) 20.0 mg, 0.04 mmol) และอนุพันธ์ซัลเฟอร์หรือเอมีน (2-mercaptoethanol หรือ morpholine, 0.04 mmol) ในเอทานอล (0.5 mL) และ CH₂Cl₂ (2.0 mL) จากนั้นคนที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ระบายตัวทำละลายออก แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ¹H NMR

2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ 3,4-seco-ไซโคลอาร์เทนต่าง ๆ

2.2.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์กลุ่มที่ 1 ของ coronalolide (11)

ผสม coronalolide (11) (50 mg, 0.10 mmol), แอลกอฮอล์หรือเอมีน (0.16 mmol), DCC (25.0 mg, 0.12 mmol), HOBt (17.0 mg, 0.13 mmol) และ triethylamine (100 μL, 0.60 mmol) ลงใน CH₂Cl₂ (3.0 mL) จากนั้นคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน เติมน้ำ CH₃CN เย็นลงไปจะได้ตะกอนตกออกมา กรองตะกอนออกแล้วนำส่วนใสมาระเหยตัวทำละลายออก นำส่วนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยซิลิกาเจลซึ่งชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอธิลเอซิเททกับเฮกเซน หรือระหว่างอะซีโตนกับเฮกเซน

อนุพันธ์ 56 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ phenol ได้ 30.3 mg; 54% yield; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃); δ_H 9.42 (s, 1H), 7.41 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.28 (m, 1H), 7.92 (d, *J* = 7.7, 2H), 6.51 (t, *J* = 7.2, 1H), 6.38 (br s, 1H), 5.81 (br s, 1H), 4.80 (dd, *J* = 14.4, 7.4 Hz, 1H), 3.33 (d, *J* = 8.2, 1H), 2.84-1.90 (m, 11H), 1.86-1.20 (m, 15H), 0.97 (m, 9H), 0.49 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 0.27 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃); δ_C 195.3, 171.5, 170.6, 155.2, 150.5, 139.2×2, 129.5×2, 126.0, 123.2, 121.4×2, 74.4, 51.4, 48.6, 45.7, 39.1, 38.3, 36.0, 34.8, 34.7, 33.0, 31.6, 30.9, 28.2, 27.8, 27.2, 26.6, 26.0, 25.2, 24.9, 23.4, 20.1, 18.2, 9.1; HRESIMS *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₃₆H₄₆O₅Na, 581.3243, found 581.3234

อนุพันธ์ 59 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ *L*-phenylalanine methyl ester ได้ 14.0 mg; 21% yield; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃); δ_H 9.39 (s, 1H), 7.27 (m, 3H), 7.07 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.49 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 5.92 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.73 (br s, 1H), 4.88 (dd, *J* = 13.2, 6.0 Hz, 1H), 4.71 (dd, *J* = 14.3, 7.3 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.22 (m, 1H), 2.42-1.80 (m, 10H), 1.78-1.20 (m, 16H), 0.92 (m, 9H), 0.40 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 0.16 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C 195.4, 172.2, 171.7, 170.8, 155.3, 139.2, 139.1, 135.8, 129.2×2, 128.6×2, 127.2, 123.3, 74.5, 53.0, 52.5, 51.4, 48.6, 45.8, 39.0, 38.3, 37.8, 36.0, 34.8, 34.7, 33.9, 33.0, 31.3, 28.4, 27.8, 27.3, 26.6, 26.0, 25.1, 23.4, 20.1, 18.3, 16.0, 9.2; HRESIMS *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₄₀H₅₃NO₆Na, 666.3771, found 666.3811

อนุพันธ์ 60 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ benzylamine ได้ 12.2 mg; 22% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 9.39 (s, 1H), 7.29 (m, 5H) 6.49 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 4.71 (dd, $J = 14.6, 7.8$ Hz, 1H), 4.44 (m, 2H), 2.44-1.26 (m, 24H), 3.26 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 0.94-0.90 (m, 9H), 0.41 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 0.19 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 195.4, 171.9, 170.8, 155.3, 139.2 \times 2, 138.1, 128.8 \times 2, 128.0 \times 2, 127.7, 123.3, 74.5, 51.4, 48.7, 45.8, 43.8, 39.2, 38.4, 36.0, 34.8, 34.8, 33.6, 33.0, 31.6, 28.5, 27.8, 27.3, 26.6, 26.0, 25.1, 23.3, 20.2, 18.3, 16.0, 9.2; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{NO}_4$, 572.3740, found 572.3755

อนุพันธ์ 61 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ decylamine ได้ 10.0 mg, 16% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3); δ_{H} 9.39 (s, 1 H), 6.48 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 5.48 (m, 1H), 4.73 (q, $J=7.4, 7.6$ Hz, 1H), 3.24 (m, 3H), 2.41-1.25 (m, 40H) 0.94-0.86 (m, 12H), 0.41 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 0.19 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 195.4, 172.0, 170.8, 155.2, 139.3, 139.2, 123.3, 74.6, 51.5, 48.7, 45.8, 39.7, 39.2, 38.4, 36.1, 34.8, 34.8, 33.7, 33.0, 31.9, 31.6, 29.6, 29.5 \times 2, 29.3 \times 2, 28.5, 27.8, 27.4, 26.9, 26.6, 26.0, 25.2, 23.4, 22.7, 20.2, 18.3, 16.0, 14.1, 9.2; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{NO}_4$, 622.4835, found 622.4812

อนุพันธ์ 62 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ heptylamine ได้ 11.0 mg, 19% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3); δ_{H} 9.40 (s, 1 H), 6.49 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.79 (s, 1H), 5.45 (m, 1H), 4.74 (q, $J = 6.5, 6.4$ Hz, 1H), 3.25 (m, 3H), 2.41-1.30 (m, 34H), 0.95-0.88 (m, 12H), 0.42 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 0.20 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3); δ_{C} 195.3, 172.0, 170.8, 155.2, 139.3, 139.2, 123.3, 74.6, 51.5, 48.8, 45.8, 39.8, 39.3, 38.4, 36.1, 34.95, 34.8, 33.7, 33.1, 31.7, 31.6, 29.7, 28.9, 28.5, 27.8, 27.4, 26.9, 26.6, 26.1, 25.2, 23.4, 22.6, 20.2, 18.3, 16.1, 14.1, 9.2; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{NO}_4$, 580.4366, found 580.4298

อนุพันธ์ 63 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ *n*-butylamine ได้ 10.0 mg, 19% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3); δ_{H} 9.40 (s, 1H), 6.49 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.33 (br s, 1H), 5.79 (br s, 1H), 4.74 (m, 1H), 3.26 (m, 3H), 2.47-1.67 (m, 14H), 1.66-1.16 (m, 17H), 0.97-0.89 (m, 9H), 0.41 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 0.19 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 195.3, 172.0, 170.8, 155.2, 139.3, 139.2, 123.3, 74.6, 51.5, 48.7, 45.8, 39.4, 39.3, 38.4, 36.1, 34.9, 34.8, 33.7, 33.0, 31.7, 31.6, 28.5, 27.8, 27.4, 26.6, 26.1, 25.2, 23.4, 20.2, 20.1, 18.3, 16.0, 13.7, 9.2 ; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{NO}_4$, 538.3896, found 538.3844

อนุพันธ์ 64 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ *sec*-butylamine ได้ 12.0 mg, 22% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3); δ_{C} 9.39 (s, 1H), 6.48 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 6.33 (br s, 1H), 5.78 (br s,

1H), 5.52 (m, 1H), 4.73 (dd, $J = 14.6, 7.8$ Hz, 1H), 3.27 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.07 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.39-1.44 (m, 25 H), 0.92 (m, 15H), 0.48 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 0.18 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} ; 195.4, 172.1, 170.8, 155.3, 139.3, 139.2, 123.3, 74.6, 51.5, 48.7, 47.0, 45.8, 39.2, 38.4, 36.1, 34.8, 34.8, 33.7, 33.0, 31.7, 29.7, 28.5, 27.8, 27.3, 26.6, 26.1, 25.2, 23.4, 20.2, 20.2, 20.1, 18.3, 16.0, 9.2; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{NO}_4$, 538.3896, found 538.3842

อนุพันธ์ 65 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ *tert*-butylamine ได้ 14.0 mg, 16% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3); δ_{H} 9.40 (s, 1H), 6.49 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.34 (br s, 1H), 5.80 (br s, 1H), 5.30 (br s, 1H), 5.26 (br s, 1H), 4.74 (dd, $J = 14.7, 7.6$ Hz, 1H), 3.27 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 2.41 (m, 1H), 2.35-1.87 (m, 7 H), 1.82-1.45 (m, 12H), 1.41-1.18 (m, 12 H), 0.94 (m, 9H), 0.41 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 0.19 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3); δ_{C} 195.3, 171.4, 170.8, 155.2, 139.24, 139.20, 123.3, 74.5, 51.5, 51.4, 48.7, 45.8, 39.3, 38.4, 36.1, 34.9, 34.8, 34.5, 33.0, 31.7, 29.7, 28.8 \times 3, 28.6, 27.8, 27.4, 26.6, 25.2, 23.4, 20.2, 18.3, 16.0, 9.2; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{NO}_4$, 538.3896, found 538.3850

อนุพันธ์ 70 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ pyrrolidine ได้ 12.3 mg, 23% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3); δ_{H} 9.38 (s, 1H), 6.48 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.31 (s, 1H), 5.79 (s, 1H), 4.75 (dd, $J = 12.5, 6.3$ Hz, 1H), 3.45 (s, 4H), 3.30 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 2.47-1.19 (m, 28H), 0.94 (m, 9H), 0.39 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 0.20 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 195.4, 171.1, 170.9, 155.3, 139.3, 139.2, 123.2, 74.6, 51.5, 48.7, 46.8, 46.0, 45.8, 39.2, 38.5, 36.1, 34.9, 34.8, 33.0, 31.8, 31.0, 28.6, 27.8, 27.4, 26.6, 26.1, 25.2, 24.4, 24.4, 23.6, 20.2, 18.3, 16.1, 9.2; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{NO}_4$, 536.3740, found 536.3725

อนุพันธ์ 71 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ piperidine ได้ 12.0 mg, 22% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 9.40 (s, 1H), 6.49 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 4.76 (dd, $J = 14.3, 7.3$ Hz, 1H), 3.56 (m, 2H), 3.41 (m, 2H), 3.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 2.49-1.22 (m, 30H), 0.95 (m, 9H), 0.41 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 0.22 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 195.4, 170.9, 170.5, 155.3, 139.3, 139.2, 123.2, 74.6, 51.5, 48.7, 46.8, 45.8, 42.8, 39.3, 38.5, 36.1, 34.9, 34.8, 33.0, 31.6, 30.4, 28.6, 27.8, 27.4, 26.7, 26.6, 26.0, 25.5, 25.2, 24.5, 23.6, 20.2, 18.3, 16.1, 9.2; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{NO}_4$, 550.3896, found 550.3903

2.2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์กลุ่มที่ 2 ของ coronalolide (11)

ผสม coronalolide (11) (50 mg, 0.10 mmol), *N*-hydroxysuccinimide (17.4 mg, 0.15 mmol), EDC \cdot HCl (31.5 mg, 0.15 mmol) ลงใน CH_2Cl_2 (2.0 mL) จากนั้นคนให้ทั่ว แล้วเติมสารละลายของแอมีน (0.15 mmol) และ K_2CO_3 (100 mg, 0.80 mmol) ในน้ำ (2.0 mL) อย่างช้าๆ คนที่อุณหภูมิห้องเป็น

เวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 1N HCl เทส่วนผสมละลายลงในกรวยแยกแล้วสกัดด้วย EtOAc (x2) และล้างด้วย sat. NaHCO₃ และ brine จากนั้นทำให้ปราศจากน้ำด้วย MgSO₄ กรองและระเหยตัวทำละลายออก นำส่วนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยซิลิกาเจลซึ่งชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอธิลแอซีเททกับเฮกเซนหรือระหว่างอะซีโทนกับเฮกเซน

อนุพันธ์ 57 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ *N*-hydroxysuccinimide ได้ 17.5 mg, 30% yield; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃); δ_H 9.40 (s, 1H), 6.49 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 6.35 (br s, 1H), 5.75 (br s, 1H), 4.77 (m, 1H), 3.26 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 2.93-2.67 (m, 6H), 2.47-2.24 (m, 2H), 2.16-1.87 (m, 2H), 1.85-1.43 (m, 14H), 1.41-1.16 (m, 4H), 0.95 (m, 9H), 0.47 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 0.27 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C 195.3, 170.5, 169.0, 168.2, 155.2, 139.2, 139.1, 123.2, 74.4, 51.5, 48.6, 45.7, 39.1, 39.2, 38.2, 36.0, 34.9, 34.8, 33.0, 30.8, 28.4, 28.1, 27.8, 27.2, 26.6, 26.0, 25.6×2, 25.3, 23.8, 20.1, 18.3, 16.2, 9.2; HRESIMS *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₃₄H₄₆NO₇, 580.3274, found 580.3336

อนุพันธ์ 58 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ *N*-hydroxysuccinimide ได้ 17.5 mg, 30% yield; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃); δ_H 9.39 (s, 1H), 7.16 (br s, 5H), 6.48 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 6.17 (br s, 1H), 5.56 (br s, 1H), 4.57 (br s, 2H), 3.22-2.89 (m, 4H), 2.41-1.25 (m, 23H), 0.92-0.79 (m, 9H), 0.25 (br s, 1H), - 0.06 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C 195.3, 173.8, 171.2×2, 155.3, 139.2×2, 137.5, 129.1×2, 128.5×2, 126.8, 123.4, 74.8, 51.4, 50.7, 48.6, 45.7, 39.0, 38.3, 37.4, 36.1, 34.8, 33.3, 32.9, 31.5, 30.8, 28.2, 27.8, 27.2, 26.4, 26.1, 25.0, 23.4, 20.1, 18.3, 15.9, 9.2; HRESIMS *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₃₉H₅₂NO₆, 630.3795, found 630.3805

อนุพันธ์ 66 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ diethylamine ได้ 21.0 mg, 19% yield; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃); δ_H 9.40 (s, 1H), 6.49 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.80 (s, 1H), 4.76 (dd, *J* = 14.4, 7.4 Hz, 1H), 3.40-3.29 (m, 5H), 2.46-1.10 (m, 30H), 0.95-0.93 (m, 9H), 0.42 (d, *J* = 4.96 Hz, 1H), 0.21 (d, *J* = 4.96 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C 195.3, 171.3, 170.8, 155.2, 139.3, 139.2, 123.2, 74.5, 51.5, 48.8, 45.8, 42.2, 40.3, 39.4, 38.5, 36.1, 34.9, 34.8, 33.0, 31.6, 30.2, 28.7, 27.8, 27.4, 26.7, 26.1, 25.1, 23.4, 20.2, 18.3, 16.0, 14.5, 13.1, 9.2; HRESIMS *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₃₄H₅₂NO₄, 538.3896, found 538.3886

อนุพันธ์ 67 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ 3-bromopropylamine HCl ได้ 10.2 mg, 17% yield; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 9.40 (s, 1 H), 6.49 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 5.74 (s, 1H), 4.75 (dd, *J* = 13.7, 6.5 Hz, 1H), 3.43 (m, 4H), 3.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 2.41-1.26 (m, 26H), 0.95-0.93 (m, 9H), 0.42 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 0.20 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C 195.3, 172.3, 170.7, 155.2, 139.2, 139.2, 123.2, 74.5, 51.4, 48.7, 45.8, 39.2, 38.4, 38.3, 36.0, 34.8, 34.8, 33.5, 33.0, 32.1, 31.5, 30.8, 28.5, 27.8, 27.3, 26.6,

26.0, 25.1, 23.3, 20.2, 18.3, 16.0, 9.2; HRESIMS m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{33}H_{49}^{79}BrNO_4$, 602.2845, found 602.2855

อนุพันธ์ 68 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ 3-methoxypropylamine ได้ 15.0 mg, 27% yield; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H 9.40 (s, 1H), 6.49 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 4.74 (dd, $J = 13.7, 6.1$ Hz, 1H), 3.50 (m, 2H), 3.35 (s, 5H), 3.28 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 2.41-1.22 (m, 26H), 0.95-0.93 (m, 9H), 0.42 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 0.19 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C 195.3, 171.9, 170.8, 155.2, 139.3, 139.2, 123.1, 74.5, 72.1, 58.8, 51.4, 48.7, 45.8, 39.1, 38.5, 38.4, 36.0, 34.8, 34.8, 33.7, 33.0, 31.6, 29.0, 28.5, 27.8, 27.3, 26.5, 26.0, 25.1, 23.4, 20.1, 18.3, 16.0, 9.1; HRESIMS m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{34}H_{52}NO_5$, 554.3845, found 554.3830

อนุพันธ์ 69 : สังเคราะห์จาก coronalolide กับ cyclohexylamine ได้ 11.3 mg, 20% yield; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H 9.40 (s, 1H), 6.49 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.80 (s, 1H), 5.34 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.74 (q, $J = 6.9, 6.8$ Hz, 1H), 4.12 (dd, $J = 13.6, 6.8$ Hz, 1H), 3.29 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.74 (m, 1H), 2.43-1.10 (m, 33H), 0.95-0.93 (m, 9H), 0.41 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 0.20 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C 195.3, 171.1, 170.8, 155.2, 139.3, 139.2, 123.3, 74.6, 51.5, 48.7, 48.4, 45.8, 39.2, 38.4, 36.1, 34.8, 34.8, 33.8, 33.2 \times 2, 33.0, 31.6, 28.6, 27.8, 27.3, 26.6, 26.0, 25.5, 25.2, 24.9 \times 2, 23.4, 20.2, 18.3, 16.0, 9.2; HRESIMS m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{36}H_{54}NO_4$, 564.4053, found 564.4012

2.2.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์กลุ่มที่ 1 ของ sootepin A (30)

ละลาย sootepin A (30.0 mg, 0.06 mmol) ใน CH_2Cl_2 (3.0 mL) จากนั้นเติม triethylamine (100 μ L, 0.60 mmol) และ acid chloride (0.2 mmol) คนที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ ระเหยตัวทำละลายออก นำส่วนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยซิลิกาเจลซึ่งชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอธิลแอซิทเททกับเฮกเซน

อนุพันธ์ 72 : สังเคราะห์จาก sootepin A กับ acetyl chloride ได้ 15.6 mg, 48% yield; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H 6.33 (s, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.45 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.74 (dd, $J = 14.7, 7.6$ Hz, 1H), 4.45 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.23 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 2.56-1.06 (m, 27H), 0.93-0.89 (m, 9H), 0.42 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 0.17 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C 173.5, 171.0, 170.7, 139.2, 130.4, 129.7, 123.1, 74.5, 70.4, 51.8, 51.4, 48.7, 45.7, 39.1, 38.4, 35.9, 35.7, 34.8, 33.0, 31.3, 31.0, 28.2, 27.8, 27.3, 26.6, 25.1, 24.7, 23.2, 21.0, 20.1, 18.4, 15.9, 13.9; HRESIMS m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{33}H_{49}O_6$, 541.3529, found 541.3553

อนุพันธ์ 73 : สังเคราะห์จาก sootepin A กับ isobutyryl chloride ได้ 25.5 mg, 73% yield; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H 6.33 (s, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.43 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.74 (m, 1H),

4.45 (s, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.23 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 2.67-1.06 (m, 33H), 0.93-0.89 (m, 9H), 0.42 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 0.17 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 177.0, 173.4, 170.7, 139.2, 130.0, 129.8, 129.8, 123.0, 74.5, 70.0, 51.8, 51.4, 48.7, 45.7, 39.1, 38.4, 35.9, 35.8, 34.8, 34.1, 33.0, 31.2, 31.0, 28.2, 27.8, 27.3, 26.6, 25.2, 24.6, 23.2, 20.1, 19.0, 18.4, 18.3, 15.9, 13.8; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{O}_6$, 568.3764, found 568.3759

อนุพันธ์ 74 : สังเคราะห์จาก sootepin A กับ benzoyl chloride ได้ 25.5 mg, 73% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3); 8.06 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.38 (m, 1H), 6.34 (br s, 1H), 5.74 (br s, 1H), 5.55 (m, 1H), 4.71 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.23 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H) 2.57-1.05 (m, 25H), 0.92 (m, 9H), 0.43 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 0.18 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 173.5, 170.7, 166.5, 139.2, 133.6, 132.9, 130.2, 129.6 \times 2, 128.3 \times 2, 126.3, 123.1, 74.5, 70.7, 51.8, 51.4, 48.7, 45.7, 39.1, 38.4, 35.9, 35.7, 34.8, 33.0, 31.3, 30.9, 28.3, 27.8, 27.3, 26.6, 25.2, 24.7, 23.2, 20.1, 18.4, 15.9, 14.0; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_6\text{Na}$, 625.3505, found 625.3542

2.2.4 การสังเคราะห์อนุพันธ์กลุ่มที่ 2 ของ sootepin A (30)

เติม *N,N*-dimethylformamide (DMF, 0.5 mL) ลงในสารละลายของ carboxylic acid (0.25 mmol) ใน CH_2Cl_2 (2.0 mL) ขณะคน จากนั้นเติม oxalyl chloride (85 μL , 1.0 mmol) และคนที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ ระเหยตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดหยาบของ acid chloride จากนั้นเติมสารละลายของ sootepin A (30.0 mg, 0.06 mmol) และ triethylamine (100 μL , 0.6 mmol) ใน CH_2Cl_2 (1.0 mL) ลงไปใน acid chloride ที่ได้ หลังจากคน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% NaHCO_3 แล้วสกัดด้วย EtOAc นำส่วนสกัด EtOAc ที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออก แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยซิลิกาเจลซึ่งชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง เอธิลเอซิทเททกับเฮกเซน

อนุพันธ์ 75 : สังเคราะห์จาก sootepin A กับ 4-fluorobenzoic acid ได้ 20.8 mg, 56% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 8.06 (m, 2H), 7.10 (t, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.33 (s, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.53 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.73 (dd, $J = 15.0, 7.6$ Hz, 1H), 4.69 (s, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.23 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 2.52-1.08 (m, 24H), 0.92-0.90 (m, 9H), 0.42 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 0.17 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 173.5, 170.7, 167.0, 165.5, 164.5, 139.2, 132.2, 132.1, 130.5, 129.7, 123.1, 115.6, 115.4, 74.5, 70.9, 51.8, 51.4, 48.7, 45.7, 39.1, 38.4, 35.9, 35.7, 34.8, 33.0, 31.2, 31.0, 28.2, 27.8, 27.3, 26.6, 25.1, 24.7, 23.1, 20.1, 18.4, 15.9, 14.0; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{FO}_6$, 621.3591, found 621.3585

อนุพันธ์ 76 : สังเคราะห์จาก sootepin A กับ 4-chlorobenzoic acid ได้ 11.1 mg, 29% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7.98 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.34 (s, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.53 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.70 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.23 (d, $J = 7.9$

Hz, 1H), 2.52-1.09 (m, 24H), 0.93-0.91 (m, 9H), 0.43 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 0.17 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 173.5, 170.7, 165.6, 139.3, 139.2, 131.0 $\times 2$, 130.6, 129.6, 128.7 $\times 2$, 128.9, 123.1, 74.5, 71.0, 51.8, 51.4, 48.7, 45.7, 39.1, 38.4, 35.9, 35.7, 34.8, 33.0, 31.3, 31.0, 28.2, 27.8, 27.3, 26.6, 25.1, 24.7, 23.1, 20.1, 18.4, 15.9, 14.0; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{50}^{35}\text{ClO}_6$, 637.3296, found 637.3310

อนุพันธ์ 77 : สังเคราะห์จาก sootepin A กับ 4-bromobenzoic acid ได้ 11.0 mg, 27% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7.91 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.34 (s, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.53 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.70 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.23 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 2.56-1.08 (m, 24H), 0.92-0.91 (m, 9H), 0.43 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 0.17 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 173.5, 170.7, 165.7, 139.2, 131.7 $\times 2$, 131.1 $\times 2$, 130.6, 129.6, 129.4, 128.0, 123.1, 74.5, 71.0, 51.8, 51.4, 48.7, 45.7, 39.1, 38.4, 35.9, 35.7, 34.8, 33.0, 31.3, 31.0, 28.3, 27.8, 27.3, 26.6, 25.1, 24.7, 23.1, 20.1, 18.4, 15.9, 14.0; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{50}^{79}\text{BrO}_6$, 681.2791, found 681.2795

อนุพันธ์ 78 : สังเคราะห์จาก sootepin A กับ 4-nitrobenzoic acid ได้ 14.4 mg, 37% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 8.28 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 8.21 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.33 (s, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.57 (m, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.72 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.23 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 2.52-1.22 (m, 24H), 0.93-0.92 (m, 9H), 0.42 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 0.18 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 173.4, 170.7, 164.6, 150.6, 139.3, 135.8, 131.4, 130.7 $\times 2$, 129.2, 123.5 $\times 2$, 123.0, 74.5, 71.7, 51.8, 51.5, 48.7, 45.7, 39.1, 38.4, 35.9, 35.7, 34.9, 33.0, 31.3, 31.0, 28.3, 27.8, 27.3, 26.6, 25.2, 24.7, 23.3, 20.1, 18.4, 16.0, 14.0; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{NO}_7$, 648.3536, found 648.3540

อนุพันธ์ 79 : สังเคราะห์จาก sootepin A กับ 4-methylbenzoic acid ได้ 17.0 mg, 46% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.33 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 5.73 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 5.52 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.74 (dd, $J = 14.7, 6.9$ Hz, 1H), 4.69 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.23 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 2.56-1.08 (m, 27H), 0.92-0.90 (m, 9H), 0.42 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 0.16 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 173.5, 170.7, 166.5, 142.7, 139.2, 130.5, 129.5 $\times 2$, 128.7 $\times 2$, 128.5, 127.1, 123.1, 74.5, 70.7, 51.8, 51.4, 48.7, 45.7, 39.1, 38.4, 35.9, 35.7, 34.8, 33.0, 31.2, 31.0, 28.2, 27.8, 27.3, 26.6, 25.1, 24.7, 23.1, 21.3, 20.1, 18.4, 15.9, 14.0; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{O}_6$, 617.3842, found 617.3855

อนุพันธ์ 80 : สังเคราะห์จาก sootepin A กับ 4-phenoxybenzoic acid ได้ 21.3 mg, 51% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 8.01 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.38 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.18 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.98 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.33 (s, 1H), 5.73 (s, 1H),

5.52 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.74 (dd, $J = 15.0, 7.3$ Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 2.52-1.08 (m, 24H), 0.92-0.90 (m, 9H), 0.42 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 0.16 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 173.5, 170.7, 166.0, 161.8, 139.2, 131.7 $\times 2$, 130.2, 130.1, 130.0 $\times 2$, 129.9, 124.8, 124.5, 123.1, 120.1 $\times 2$, 117.3 $\times 2$, 74.5, 70.6, 51.9, 51.4, 48.7, 45.7, 39.1, 38.4, 35.9, 35.8, 34.8, 33.0, 31.2, 31.0, 28.2, 27.8, 27.3, 26.6, 25.1, 24.7, 23.0, 20.1, 18.4, 15.9, 14.0; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{55}\text{O}_7$, 695.3948, found 695.3920

อนุพันธ์ 81 : สังเคราะห์จาก sootepin A กับ isonicotinic acid ได้ 19.9 mg, 55% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 8.77 (d, $J = 3.7$ Hz, 2H), 7.85 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 6.33 (br s, 1H), 5.73 (br s, 1H), 5.55 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.74 (s, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.23 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 2.56-1.09 (m, 25H), 0.91 (m, 9H), 0.42 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 0.17 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 173.5, 170.7, 164.9, 150.5 $\times 2$, 139.2, 137.7, 131.3 $\times 2$, 129.2, 123.1, 122.9, 74.5, 71.6, 51.9, 51.4, 48.7, 45.7, 39.1, 38.3, 35.9, 35.7, 34.8, 33.0, 31.2, 31.0, 28.2, 27.8, 27.3, 26.6, 25.1, 24.7, 23.2, 20.1, 18.4, 15.9, 14.0; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{NO}_6$ 604.3638, found 604.3560

อนุพันธ์ 82 : สังเคราะห์จาก sootepin A กับ quinoline-2-carboxylic acid ได้ 20.0 mg, 51% yield; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 8.30 (m, 2H), 8.16 (m, 1H), 7.88 (m, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.64 (m, 1H), 6.33 (br s, 1H), 5.72 (br s, 1H), 5.59 (m, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.72 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.21 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 2.46-1.01 (m, 24H), 0.88 (m, 9H), 0.40 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 0.15 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 173.5, 170.7, 165.2, 148.2, 147.7, 139.2, 137.2, 130.9, 130.8, 130.2, 129.4, 129.3, 128.5, 127.5, 123.1, 121.0, 74.5, 71.7, 51.8, 51.4, 48.7, 45.7, 39.1, 38.3, 35.9, 35.7, 34.8, 33.0, 31.2, 31.0, 28.2, 27.8, 27.2, 26.6, 25.1, 24.7, 23.1, 20.1, 18.4, 15.9, 14.1; HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{NO}_6$, 654.3795, found 654.3715

ส่วนที่ 3: การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Cytotoxic assay)

ในการทดสอบนี้ใช้วิธี MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] โดยทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ Hep-G2 (hepatocarcinoma), SW620 (colon adenocarcinoma), Chago (undifferentiated lung carcinoma), KATO-3 (gastric carcinoma) และ BT474 (breast ductal carcinoma)

ใส่เซลล์มะเร็งที่ทดสอบลงใน 96-well plate หลุมละ 1×10^5 cells แล้วบ่มที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศ CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูด media ที่ทิ้ง แล้วเติม media ใหม่ที่มีสารที่ต้องการทดสอบและ DMSO สำหรับ blank แล้วบ่มที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศ CO_2 5% อีก 72 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (5 mg/mL in PBS) ลงในทุกหลุมๆ ละ 10 μL บ่มที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศ

CO₂ 5% อีก 4 ชั่วโมง ละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้นด้วย 0.4N HCl ใน isopropanol แล้ววัดค่า absorbance ด้วย microplate reader ที่ 540 nm

ส่วนที่ 4: การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Anti-angiogenic assay)

4.1 การทดสอบด้วย ex vivo model (rat aortic sprouting assay)

ตัดหลอดเลือดแดงใหญ่(aorta) ของหนู Wistar ให้มีความยาว 1 mm แล้วนำมาวางใน 6-well plate จากนั้นหยอดสารละลาย gel matrix (porcine tendon collagen solution 8 volumes, 10x Eagle's MEM 1 volume และ reconstitution buffer 1 volume) ลงบน aortic ring หลุมละ 0.5 mL เมื่อ gel แข็งตัว เติม RPMI 2 mL ที่มีสารที่ต้องการทดสอบหรือ DMSO สำหรับหลุมควบคุม จากนั้นบ่มที่ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ CO₂ 5% เป็นเวลา 7 วัน แล้วถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ และนำมาคำนวณหาความยาวของหลอดเลือดคัพิลลารีที่งอกออกมาโดยวัดจากขอบรอยตัดของหลอดเลือดจนถึงจุดกึ่งกลางของความยาวโดยเฉลี่ย

4.2 การทดสอบด้วย in vitro model

การทดลองในส่วนนี้เป็นการดูผลของสารที่ทดสอบต่อเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) ซึ่งจะประกอบด้วย 3 การทดลองย่อย และการหา target protein ดังนี้

4.2.1 ผลต่อการเจริญเติบโตของ HUVEC (HUVEC proliferation assay)

ใส่ HUVEC suspension ใน HuMedia EG2 (1.5×10^4 cells/mL) ลงใน 96-well plate หลุมละ 100 μ L บ่มที่ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ CO₂ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูด media ทิ้ง แล้วเติม media ใหม่ที่มีสารที่ต้องการทดสอบหรือ DMSO สำหรับ blank แล้วบ่มที่ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ CO₂ 5% อีก 72 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจวัดการเจริญเติบโตของเซลล์โดยการเติม WST-8 reagent หลุมละ 10 μ L แล้วนำมาวัดค่า absorbance ด้วย microplate reader

4.2.2 ผลต่อการเกิดโครงสร้างแบบ tube ของ HUVEC (HUVEC tube formation assay)

การทดลองนี้ใช้ BD Matrigel โดยหยอดเจลลงใน 96-well plate หลุมละ 50 μ L บ่มที่ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ CO₂ 5% เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว จากนั้นเติม HUVEC suspension ใน HuMedia EG2 (1×10^5 cells/mL) ที่มีสารที่ต้องการทดสอบตามความเข้มข้นที่ต้องการหรือ DMSO สำหรับ blank หลุมละ 100 μ L แล้วบ่มต่อที่ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ CO₂ 5% อีก 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์และนำมาหาความยาวโดยรวมของลักษณะเป็น tube ที่เกิดขึ้น

4.2.3 ผลต่อการไมเกรทของ HUVEC (HUVEC migration assay)

วาง insert ที่มี microporous membrane ขนาด 8 μ m ลงใน 24-well plate แล้วหยอด 0.1% (w/v) gelatin ลงใน insert ละ 300 μ L ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม HUVEC suspension ใน MEM 199 ที่มี 0.1%(w/v) bovine serum albumin (2.5×10^5 cells/mL) ลงบนเจลใน

insert แต่ละอัน และเติม MEM 199 ที่มี 0.1%(w/v) bovine serum albumin, VEGF (10 ng/mL) และมีหรือไม่มีสารที่ทดสอบลงในแต่ละหลุม (ด้านล่าง insert) หลุมละ 400 μ L แล้วบ่มที่ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ CO₂ 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เซลล์ที่ไม่เกิดการไมเกรทซึ่งจะอยู่ด้านบนของเมมเบรนออกด้วย cotton swab จากนั้น fix เซลล์ที่ไม่เกรทด้วยเมทานอลและย้อมด้วย Diff-quick stain และนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

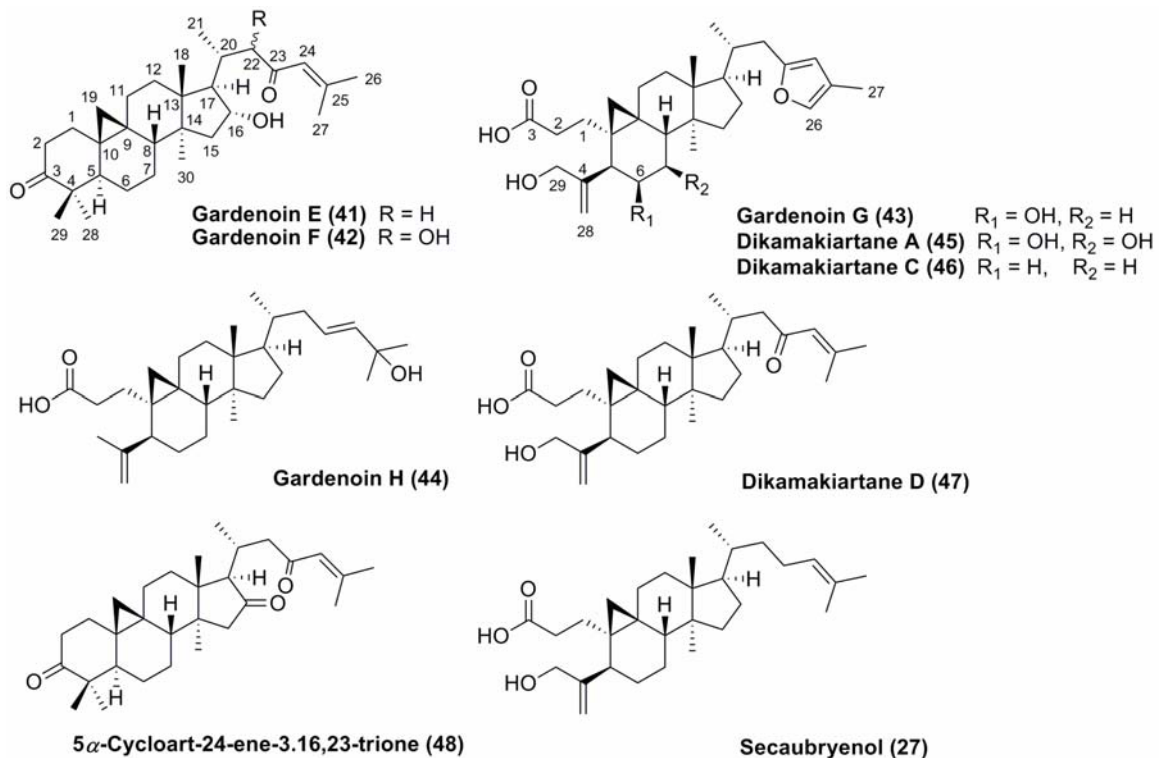
4.2.3 การหา target protein (Western blot analysis)

ทรีท HUVEC ด้วยสารที่ต้องการทดสอบหรือ DMSO สำหรับ control เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นกระตุ้นด้วย VEGF (10 ng/mL) เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย PBS เย็นสองครั้ง แล้วทำการไลเซท (lysate) ด้วย mammalian protein extraction จากนั้นนำมาเซนทริฟิวส์เป็นเวลา 15 นาที ที่ 12000 rpm ที่ 4 °C แล้วนำมาหาปริมาณโปรตีนด้วย microBCA protein assay kit โดยมี BSA เป็นสารมาตรฐาน นำโปรตีนที่ได้สำหรับแต่ละ sample (50 μ g) มาแยกด้วย SDS polyacrylamide gel electrophoresis แล้ว transfer ลงบน nitrocellulose membrane หลังจากทำการบล็อก แช่เมมเบรนที่ได้ด้วย primary antibody ที่สนใจ ที่ 4 °C ข้ามคืนสำหรับ phosphorylated antibody และ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องสำหรับ total antibody จากนั้นตรวจดูแบนด์ของโปรตีนแต่ละชนิดด้วย chemiluminescence โดยใช้ WesternBreeze (Invitrogen) กับ ChemiDoc XRS (BIO-RAD)

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ตอนที่ 1. การพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้

การพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้จากส่วนยอดของ *G. obtusifolia*



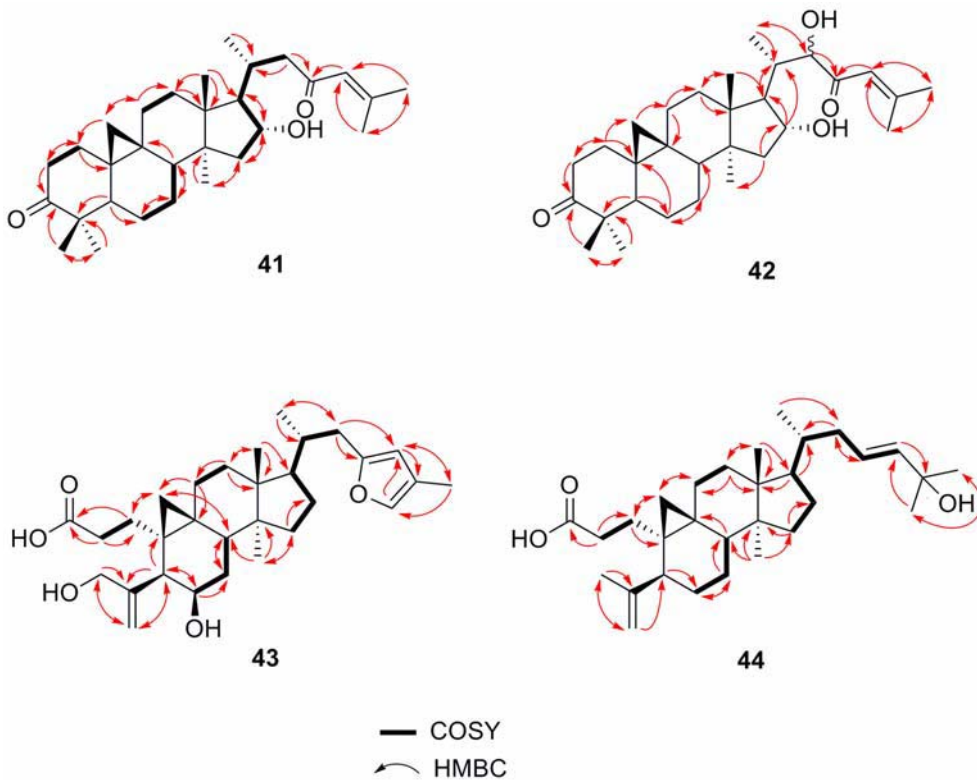
รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของสารไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนที่แยกได้จากส่วนยอดของ *G. obtusifolia*

จากข้อมูล HRESIMS พบว่าสาร **41** มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{30}H_{40}O_3$ (m/z 477.3341 $[M+Na]^+$, calcd 477.3345) ซึ่งแสดงว่ามี degree of unsaturation เท่ากับ 8

จากข้อมูล 1H NMR (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าสาร **41** เป็นสารประเภทไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีน เนื่องจากมีสัญญาณที่เป็นลักษณะเฉพาะของ C-19 เมทิลีนโปรตอนของวงไซโคลโพรเพนเป็นคู่ doublet ที่ δ_H 0.58 และ 0.79 ($J = 4.1$ Hz)

จากข้อมูล ^{13}C NMR (ตารางที่ 2) และ HSQC พบว่าสาร **1** ประกอบด้วยคาร์บอน 30 คาร์บอน ซึ่งเป็นเทอร์เชียรีเมทิล 6 หมู่, เซคันดารีเมทิล 1 หมู่, เมทิลีน 9 หมู่, เมไธน์ 6 หมู่ ซึ่งหนึ่งหมู่ต่อกับออกซิเจน (oxygenated) และอีกหนึ่งหมู่เป็นพันธะคู่ (olefinic), ควอร์เทอร์นารีคาร์บอน 6 คาร์บอนซึ่งมีหนึ่งคาร์บอนเป็น olefinic carbon, และหมู่คีโตน 2 หมู่

จากข้อมูล NMR ข้างต้นจึงสรุปได้ว่าสาร **41** เป็นสารไตรเทอร์พีนอยด์ประเภท normal cycloartanone และจากการวิเคราะห์ข้อมูล 2D NMR โดยเฉพาะ 1H - 1H COSY, HMBC และ NOESY ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 ตามลำดับ จึงสามารถสรุปได้ว่าสาร **41** มีโครงสร้างและ relative stereochemistry ดังแสดงในรูปที่ 1 ดังนั้นสาร **41** จึงเป็นสารชนิดใหม่และตั้งชื่อว่า gardenoin E

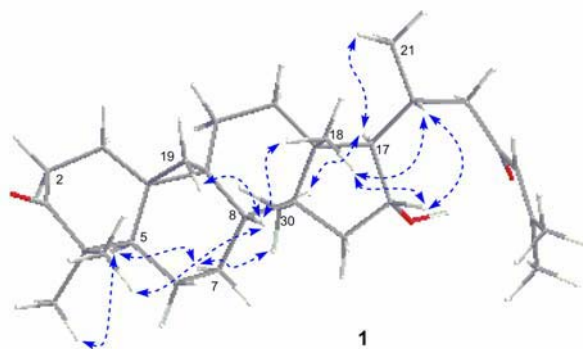


รูปที่ 2 แสดง 1H - 1H COSY และ HMBC correlation ที่สำคัญของสาร **41-44**

ตารางที่ 1 ข้อมูล ^1H (400 MHz) NMR ของสาร 41-44

position	1 ^{a)}	2 ^{a)}	3 ^{b)}	4 ^{a)}
1	1.22 (m)	1.55 (m)	1.30 (m)	1.35 (m)
	1.87 (m)	1.86 (m)	2.11 (m)	2.07 (m)
2	2.31 (m)	2.31 (m)	2.32 (m)	2.31 (m)
	2.70 (m)	2.70 (m)		2.53 (m)
3				
4				
5	1.72 (m)	1.74 (m)	2.55 (m)	2.42 (m)
6	0.92 (m)	0.99 (m)	3.96 (br s)	1.08 (m)
	1.57 (m)	1.59 (m)		1.51 (m)
7	1.18 (m)	1.19 (m)	1.31 (m)	1.08 (m)
	1.36 (m)	1.39 (m)	1.97 (m)	1.31 (m)
8	1.53 (m)	1.50 (m)	2.07 (m)	1.57 (m)
9				
10				
11	1.17 (m)	1.19 (m)	1.08 (m)	1.31 (m)
	2.11 (m)	2.12 (m)	2.20 (m)	2.06 (m)
12	1.72 (m)	1.86 (m)	1.59 (m)	1.64 (m)
13				
14				
15	1.43 (m)	1.52 (m)	1.25 (m)	1.31 (m)
	1.88 (m)	1.85 (m)		
16	4.00 (m)	4.25 (dd, 5.7, 8.2)	1.17 (m)	1.91 (m)
			1.89 (m)	
17	1.74 (m)	2.07 (m)	1.60 (m)	1.59 (m)
18	1.05 (s)	1.08 (s)	0.97 (s)	0.98 (s)
19	0.58 (d, 4.1)	0.57 (d, 4.0)	0.42 (d, 3.0)	0.40 (d, 4.3)
	0.79 (d, 4.1)	0.79 (d, 4.0)	1.11 (d, 3.0)	0.73 (d, 4.3)
20	2.16 (m)	2.10 (m)	1.64 (m)	1.46 (m)
21	0.97 (d, 6.7)	0.68 (d, 5.8)	0.75 (d, 6.0)	0.86 (d, 6.4)
22	2.41 (dd, 7.4, 15.0)	4.44 (d, 4.2)	2.16 (m)	1.75 (m)
	2.83 (dd, 4.0, 15.0)		2.60 (m)	2.19 (m)
23				5.60 (br s)
24	6.11 (br s)	6.16 (s)	5.80 (br s)	5.60 (br s)
25				
26	2.16 (s)	2.23 (s)	7.02 (br s)	1.31 (br s)
27	1.90 (s)	1.99 (s)	1.83 (s)	1.31 (br s)
28	1.05 (s)	1.04 (s)	5.08 (br s)	4.73 (br s)
			5.14 (br s)	4.81 (br s)
29	1.10 (s)	1.09 (s)	4.14 (d, 13.0)	1.69 (s)
			3.94 (d, 13.0)	
30	1.15 (s)	1.17 (s)	0.91 (s)	0.92 (s)

^a recorded in CDCl_3 ; ^b recorded in $\text{acetone-}d_6$



รูปที่ 3 แสดง NOESY correlation ที่สำคัญของสาร 41

ตารางที่ 2 ข้อมูล ^{13}C (100 MHz) NMR ของสาร 41-44

position	1 ^{a)}	2 ^{a)}	3 ^{b)}	4 ^{a)}
1	33.3, CH ₂	33.3, CH ₂	30.7, CH ₂	28.8, CH ₂
2	37.4, CH ₂	37.4, CH ₂	31.3, CH ₂	31.3, CH ₂
3	216.4, qC	216.5, qC	173.5, qC	179.1, qC
4	50.2, qC	50.2, qC	149.7, qC	149.4, qC
5	48.4, CH	48.4, CH	45.8, CH	45.9, CH
6	21.4, CH ₂	20.8, CH ₂	67.4, CH	27.7, CH ₂
7	26.7, CH ₂	26.7, CH ₂	27.6, CH ₂	25.0, CH ₂
8	47.5, CH	48.1, CH	38.8, CH	47.7, CH
9	20.4, qC	20.4, qC	20.7, qC	21.4, qC
10	26.1, qC	26.1, qC	24.8, qC	27.0, qC
11	26.0, CH ₂	26.0, CH ₂	25.9, CH ₂	27.0, CH ₂
12	32.5, CH ₂	32.7, CH ₂	32.5, CH ₂	32.9, CH ₂
13	47.2, qC	47.0, qC	44.9, qC	45.1, qC
14	47.5, qC	47.7, qC	47.9, qC	49.0, qC
15	47.9, CH ₂	46.1, CH ₂	35.3, CH ₂	35.6, CH ₂
16	77.5, CH	76.5, CH	29.3, CH ₂	28.0, CH ₂
17	61.2, CH	59.3, CH	51.9, CH	52.0, CH
18	19.1, CH ₃	19.8, CH ₃	18.0, CH ₃	18.1, CH ₃
19	29.9, CH ₂	29.9, CH ₂	32.1, CH ₂	29.7, CH ₂
20	32.0, CH	36.4, CH	35.8, CH	36.4, CH
21	19.9, CH ₃	12.7, CH ₃	17.6, CH ₃	18.3, CH ₃
22	50.4, CH ₂	78.7, CH	34.2, CH ₂	39.0, CH ₂
23	202.6, qC	200.2, qC	154.8, qC	125.7, CH
24	125.1, CH	118.8, CH	108.4, CH	139.3, CH
25	155.7, qC	160.2, qC	119.7, qC	70.9, qC
26	20.8, CH ₃	21.5, CH ₃	136.9, CH	29.9, CH ₃
27	27.8, CH ₃	28.2, CH ₃	8.4, CH ₃	29.8, CH ₃
28	22.2, CH ₃	22.2, CH ₃	113.6, CH ₂	111.6, CH ₂
29	20.8, CH ₃	21.4, CH ₃	63.5, CH ₂	19.7, CH ₃
30	20.1, CH ₃	20.0, CH ₃	18.8, CH ₃	19.3, CH ₃

^a recorded in CDCl₃; ^b recorded in acetone-*d*₆

สำหรับสาร **42** พบว่ามี ^1H และ ^{13}C NMR spectrum (ตารางที่ 1 และ 2) คล้ายกับสาร **41** มาก และจากข้อมูล HRESIMS มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$ (m/z 493.3289 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd 493.3294) ซึ่งมากกว่าสาร **41** 16 mass units จากข้อมูลข้างต้นจึงสันนิษฐานได้ว่าสาร **2** เป็นอนุพันธ์ของสาร **41** ที่มี หมู่ OH เพิ่มขึ้นมา 1 หมู่

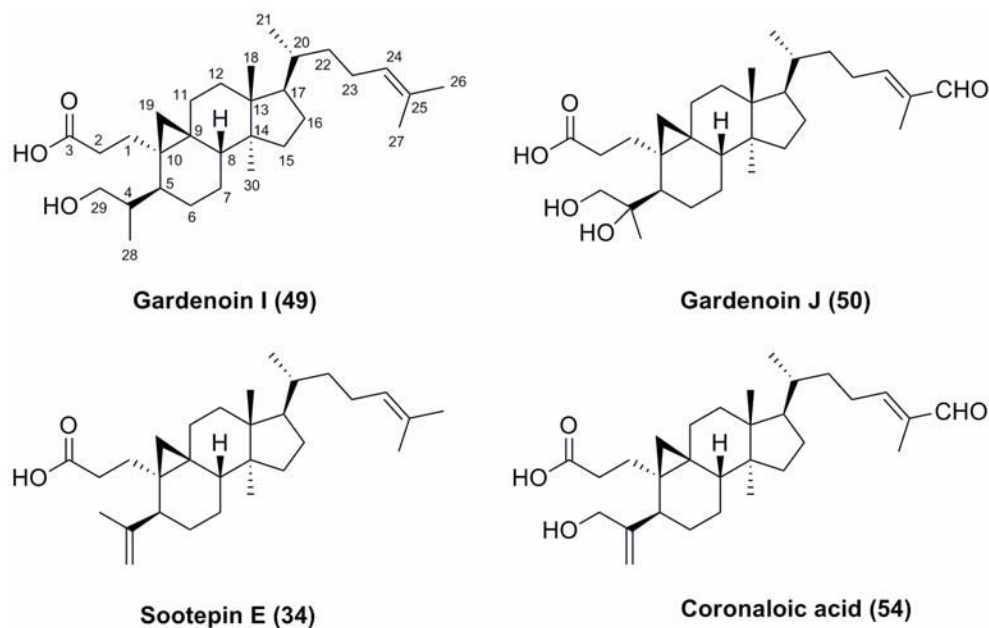
จากการพิจารณาข้อมูล HSQC, ^1H - ^1H COSY และ HMBC พบว่าสาร **42** มี $-\text{CH}-\text{OH}$ (δ_{H} 4.44, s; δ_{C} 78.7) แทนเมธิลีนในตำแหน่งที่ 22 ในสาร **41** ดังแสดงในรูปที่ 2 และมี relative stereochemistry แบบเดียวกับสาร **41** เนื่องจากมี NOESY correlation ในลักษณะเดียวกัน ดังนั้นสาร **42** จึงเป็นสารชนิดใหม่และตั้งชื่อว่า gardenoin F

สาร **43** พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5$ (HRESIMS m/z 507.3087 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd 507.3086) และ ^1H NMR (ตารางที่ 1) แสดงลักษณะเฉพาะของสารกลุ่มไฮโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีน เช่นกัน ซึ่งมีสัญญาณโปรตอนเป็นคู่ doublet ที่ δ_{H} 0.42 และ 1.11 ($J = 3.0$ Hz) ของ C-19 เมธิลีนโปรตอนของวงไฮโคลโพรเพน และยังมีสัญญาณของ terminal alkene ที่มีลักษณะเป็น broad singlet ที่ δ_{H} 5.08 และ 5.14 จากข้อมูลนี้จึงสันนิษฐานได้ว่าสาร **43** เป็นสารไฮโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีน ประเภท 3,4-seco cycloartane นอกจากนี้ข้อมูล 1D และ 2D NMR ยังชี้ให้เห็นว่ามีหมู่ 2,4-disubstituted furan ring (δ_{H} 5.80, 7.02; δ_{C} 108.4 CH, 119.7 qC, 136.9 CH, 154.8 qC) อยู่ที่ส่วน side chain ด้วย เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูล NMR อย่างละเอียด พบว่าสาร **43** มีโครงสร้างคล้ายกับสารที่เคยมีการรายงานมาก่อนคือ dikamaliartane A (**45**) ซึ่งแยกได้จากยอดของ *G. obtusifolia* ด้วยเช่นกัน แต่แตกต่างกันตรงที่สาร **43** มีหมู่เมธิลีนแทนที่ oxygenated methine ในตำแหน่งที่ 7 ของสาร **45** ซึ่งยืนยันได้จากข้อมูล HMBC ที่แสดงในรูปที่ 2 และมี relative stereochemistry แบบเดียวกับสาร **45** เนื่องจากมี NOESY correlation ในลักษณะเดียวกัน ดังนั้นสาร **43** จึงเป็นสารชนิดใหม่และตั้งชื่อว่า gardenoin G

สาร **44** พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ (HRESIMS m/z 479.3496 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd 479.3501) และมีสัญญาณ ^1H NMR ที่เป็นลักษณะเฉพาะของไฮโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนประเภท 3,4-seco cycloartane คือ คู่ doublet ที่ δ_{H} 0.40 และ 0.73 ($J = 4.3$ Hz) ของ C-19 เมธิลีนโปรตอนของวงไฮโคลโพรเพน และ singlet ที่ δ_{H} 4.71 และ 4.73 นอกจากนี้ข้อมูล 1D และ 2D NMR ยังชี้ให้เห็นว่ามี disubstituted double bond [δ_{H} 5.60 brs (2H); δ_{C} 125.7 CH, 139.3 CH] อยู่ที่ส่วน side chain ซึ่งระบุได้ว่าเป็นตำแหน่งที่ 23 และ 23 จาก HMBC correlation (รูปที่ 2) เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูล NMR อย่างละเอียด พบว่าสาร **43** มีโครงสร้างคล้ายกับสารที่ผู้วิจัยเคยแยกได้จากส่วนยอดของ *G. turbifera* คือ gardenoin D แต่แตกต่างกันตรงที่สาร **44** มีหมู่ vinylic methyl แทนที่ oxygenated methylene ในตำแหน่งที่ 29 ของ gardenoin D ซึ่งยืนยันได้จากข้อมูล HMBC ที่แสดงในรูปที่ 2 และมี relative stereochemistry แบบเดียวกับ gardenoin D เนื่องจากมี NOESY correlation ในลักษณะเดียวกัน ดังนั้นสาร **44** จึงเป็นสารชนิดใหม่และตั้งชื่อว่า gardenoin H

สำหรับสาร **27** และ **45-48** จากการเปรียบเทียบข้อมูล NMR กับข้อมูลในวารสารวิจัยต่างๆ (literature) พบว่าเป็นสารที่ได้มีการรายงานมาแล้วคือ dikamakiartane A, C และ D (**45-47**), 5 α -cycloart-24-ene-3,16,23-trione (**48**) และ secaubryenol (**27**) ตามลำดับ ซึ่งเคยแยกได้จากพืชสกุล Gardenia เช่นเดียวกัน และมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1

การพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้จากเรซินของ *G. thailandica*

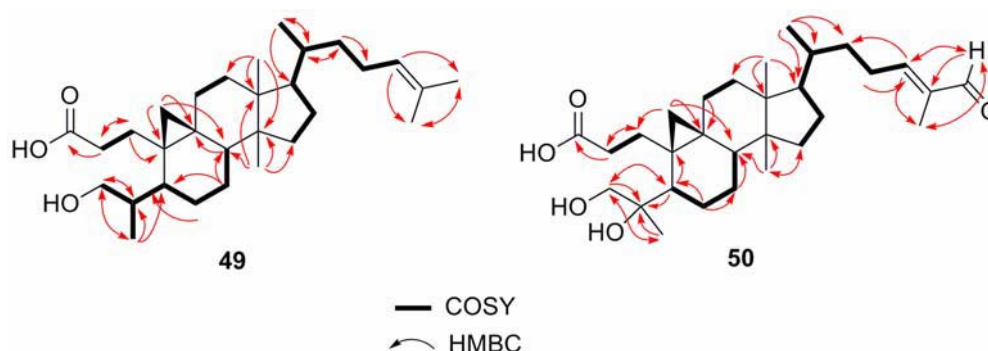


รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของสารไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนที่แยกได้จากเรซินของ *G. thailandica*

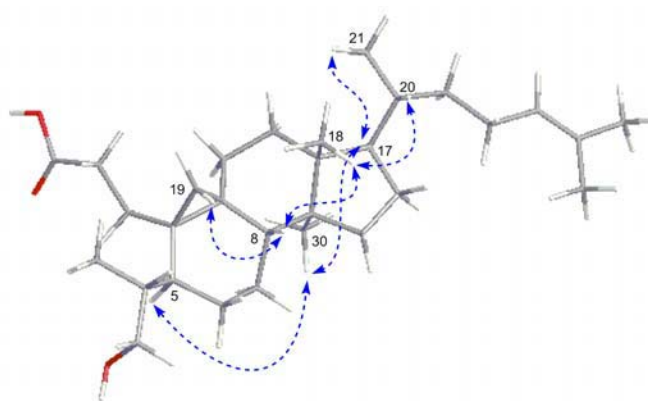
จากข้อมูล HRESIMS พบว่าสาร **49** มีสูตรโมเลกุลเป็น C₃₀H₅₀O₃ (m/z 481.3655 [M+Na]⁺, calcd 481.3658) และมีสัญญาณ ¹H NMR (ตารางที่ 3) ที่เป็นลักษณะเฉพาะของไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนประเภท 3,4-seco cycloartane คือ คู่ doublet ที่ δ_H 0.36 และ 0.61 ($J = 4.2$ Hz) ของ C-19 เมธิลีนโปรตอนของวงไซโคลโพรเพน และมี ¹H และ ¹³C NMR spectrum คล้ายกับ secaubryenol (**27**) มาก ยกเว้นไม่พบสัญญาณของ exomethylene ที่ δ_H ประมาณ 5 ใน ¹H NMR แต่พบสัญญาณของ secondary methyl เพิ่มอีกหนึ่งหมู่ที่ δ_H 0.81 (d, $J = 7.0$ Hz) และของ methine อีกอีกหนึ่งหมู่ที่ δ_H 2.15 และข้อมูล ¹³C NMR ก็แสดงลักษณะที่สอดคล้องกันคือ การหายไปของพันธะคู่ของหมู่เมธิลีน และการมีสัญญาณของเมธิลและ methane ขึ้นมาแทนที่ ซึ่งข้อมูลนี้ทำให้ทราบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างที่ตำแหน่ง 4 และ 28

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูล ¹H-¹H COSY และ HMBC พบว่าสาร **49** มีโครงสร้างตามที่สันนิษฐานคือเป็นอนุพันธ์ของ secaubryenol (**27**) ที่พันธะคู่ในตำแหน่งที่ 4 และ 28 ถูกรีดิวซ์เป็นหมู่เมธิลและ methine แทน และมี relative stereochemistry แบบเดียวกับ secaubryenol (**27**) เนื่องจากมี

NOESY correlation ในลักษณะเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 6 ดังนั้นสาร **49** จึงเป็นสารชนิดใหม่และตั้งชื่อว่า gardenoin I



รูปที่ 5 แสดง ^1H - ^1H COSY และ HMBC correlation ที่สำคัญของสาร **49** และ **50**



รูปที่ 6 แสดง NOESY correlation ที่สำคัญของสาร **49**

สำหรับสาร **50** จากข้อมูล HRESIMS พบว่ามีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$ (m/z 511.3403 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd 511.3399) และมีสัญญาณ ^1H NMR ที่เป็นลักษณะเฉพาะของไซโคลอาร์เทนไตรเทอร์พีนประเภท 3,4-*seco* cycloartane เช่นกัน คือคู่ broad singlet ที่ δ_{H} 0.54 และ 0.56 ของ C-19 เมธิลีนโปรตอนของวงไซโคลโพรเพน นอกจากนี้ยังพบว่ามี ^1H และ ^{13}C NMR spectrum (ตารางที่ 3) คล้ายกับสาร **49** มาก แต่มีสัญญาณของหมู่อัลดีไฮด์ที่ δ_{H} 9.38 และสัญญาณของหมู่ vinylic methyl หายไปหนึ่งหมู่ ซึ่งจากการวิเคราะห์ข้อมูล HMBC สามารถยืนยันได้ว่า สาร **50** มีหมู่อัลดีไฮด์แทนหมู่ vinylic methyl ที่พบในสาร **49** จริงดังแสดงในรูปที่ 5

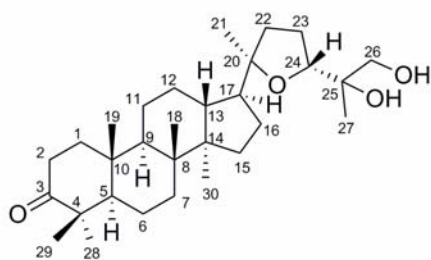
นอกจากนี้สิ่งที่แตกต่างอีกส่วนหนึ่งคือ พบว่าสาร **50** มี oxygenated quaternary carbon เพิ่มมาหนึ่งคาร์บอน แต่สัญญาณของ C-4 methine ที่เคยพบในสาร **49** หายไป และเมื่อพิจารณาจากข้อมูล HMBC (รูปที่ 5) พบว่ามีหมู่ OH ต่ออยู่กับ C-4 แทน H ในสาร **49** ดังนั้นสาร **50** จึงเป็นสารชนิดใหม่และตั้งชื่อว่า gardenoin J ซึ่งมี relative stereochemistry แบบเดียวกับสาร **49** เนื่องจากมี NOESY correlation ในลักษณะเดียวกัน

ตารางที่ 3 ^1H (400 MHz) และ ^{13}C (100 MHz) NMR ของสาร 49 และ 50 (CDCl_3)

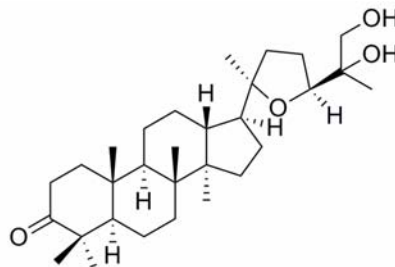
Position	49		50	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	27.9 CH ₂	1.34 m	29.9 CH ₂	1.37 m 2.51 m
2	31.8 CH ₂	2.32 m 2.49 m	31.9 CH ₂	2.28 m 2.68 m
3	179.2 C	-	178.7 C	-
4	36.6 CH	2.15 m	78.3 C	-
5	35.3 CH	1.94 m	42.9 CH	2.08 m
6	25.2 CH ₂	1.01 m 1.28 m	24.8 CH ₂	1.79 m 2.06 m
7	25.0 CH ₂	1.28 m	25.8 CH ₂	1.27 m
8	48.4 CH	1.42 m	48.7 CH	1.29 m
9	21.3 C	-	23.5 C	-
10	27.2 C	-	29.7 C	-
11	27.0 CH ₂	1.17 m 2.11 m	26.5 CH ₂	1.14 m 2.12 m
12	33.1 CH ₂	1.65 m	33.1 CH ₂	1.65 m
13	45.0 C	-	44.9 C	-
14	48.9 C	-	47.9 C	-
15	35.9 CH ₂	1.39 m	35.9 CH ₂	1.30 m
16	28.1 CH ₂	1.28 m	28.2 CH ₂	1.27 m 1.91 m
17	52.3 CH	1.58 m	52.2 CH	1.60 m
18	18.3 CH ₃	0.95 s	18.6 CH ₃	0.94 s
19	30.3 CH ₂	0.61 d (4.2) 0.39 d (4.2)	31.1 CH ₂	0.54 br s 0.56 br s
20	35.8 CH	1.28 m	35.9 CH	1.42 m
21	18.2 CH ₃	0.88 d (6.3)	18.0 CH ₃	0.91 m
22	36.3 CH ₂	1.03 m 1.42 m	34.7 CH ₂	1.22 m 1.60 m
23	24.9 CH ₂	1.86 m 2.04 m	26.1 CH ₂	2.27 m 2.40 m
24	125.2 CH	5.10 t (6.9)	155.8 CH	6.50 t (7.1)
25	130.9 C	-	139.1 C	-
26	25.7 CH ₃	1.68 s	195.6 CH	9.38 s
27	17.6 CH ₃	1.60 s	9.2 CH ₃	1.74 s
28	11.8 CH ₃	0.81 d (7.0)	24.4 CH ₃	1.22 s
29	66.7 CH ₂	3.48 d (7.1)	67.6 CH ₂	3.46 d (11.0) 3.88 d (11.0)
30	19.4 CH ₃	0.91 s	19.5 CH ₃	0.90 s

สำหรับสาร **27**, **34** และ **54** จากการเปรียบเทียบข้อมูล NMR กับข้อมูลในวารสารวิจัยต่างๆ (literature) พบว่าเป็นสารที่ได้มีการรายงานมาแล้วคือ *secaubryenol* (**9**), *sootepin E* (**12**) และ *coronaloic acid* (**13**) ตามลำดับ ซึ่งเคยแยกได้จากพืชสกุล *Gardenia* เช่นเดียวกัน และมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1 และ 4

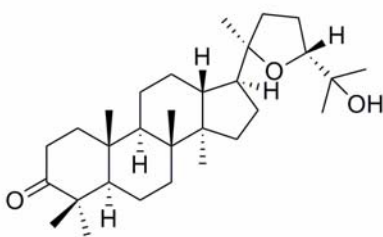
การพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้จากส่วนยอดของ *G. collinsae*



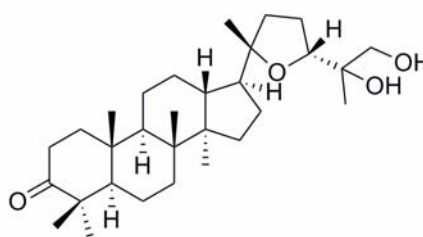
20R,24R-epoxy-3-oxo-dammarane-25 ϵ ,26-diol (52)



20R,24S-epoxy-3-oxo-dammarane-25 ϵ ,26-diol (53)



20R,24R-ocotillone (54)



20S,24R-epoxy-3-oxo-dammarane-25 ϵ ,26-diol (55)

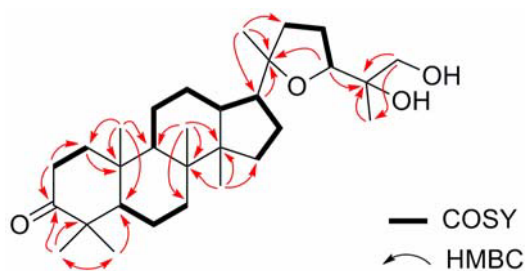
รูปที่ 7 แสดงโครงสร้างของสารแดมมาเรนนไตรเทอร์พีนที่แยกได้จากส่วนยอดของ *G. collinsae*

สาร **52** พบว่ามีสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{50}O_4$ จากข้อมูล HRESIMS (m/z 497.3609 $[M+Na]^+$, calcd 497.3607) และประกอบด้วยคาร์บอน 30 คาร์บอน ซึ่งจากข้อมูล ^{13}C NMR และ HSQC พบว่ามีหมู่คีโตน 1 หมู่, เทอร์เชียรีเมธิล 7 หมู่, เมธิลีน 11 หมู่ซึ่งมีหนึ่งหมู่เป็นแบบ oxygenated, เมไธน 5 หมู่ซึ่งมีหนึ่งหมู่เป็นแบบ oxygenated และควอร์เทอร์นารีคาร์บอน 6 คาร์บอนซึ่งสองคาร์บอนเป็นแบบ oxygenated และจากข้อมูล 1H NMR (ตารางที่ 4) พบสัญญาณ singlet ของหมู่เทอร์เชียรีเมธิล 7 หมู่ที่ δ_H 0.87, 0.93, 0.99, 1.01, 1.03, 1.08 และ 1.16 ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สอดคล้องกับสารไตรเทอร์พีนประเภทแดมมาเรน (dammarane-type triterpene)

จากการวิเคราะห์ข้อมูล 2D NMR (1H - 1H COSY, HSQC, HMBC) พบว่าสาร **52** มีโครงสร้าง (planar structure) เหมือนกับสารที่เคยรายงานมาก่อนคือ (20S,20R)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 ϵ ,26-diol (**55**) ที่แยกได้จาก *Mangifera indica* แต่สิ่งที่ต่างกันคือ ^{13}C resonance ของ Me-21 ซึ่งใน

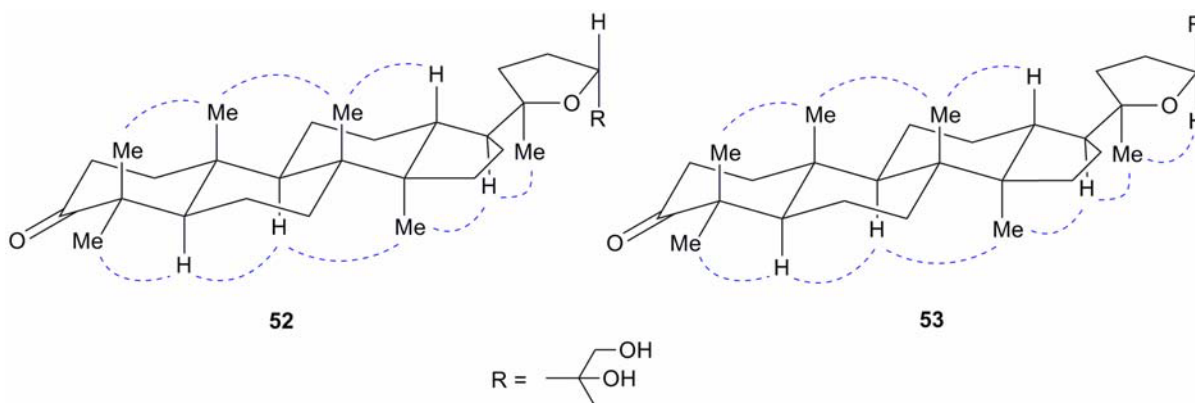
สาร **52** มีค่า 26.7 และในสาร **55** มีค่า 22.5 และ ^{13}C resonance ของ oxygenated carbon ของ tetrahydrofuran ring ซึ่งในสาร **55** มีค่า 87.8 (C-20) และ 86.3 (C-24) ขณะที่ในสาร **55** มีค่า 86.4 (C-20) และ 82.7 (C-24) ดังนั้นแสดงว่าสาร **52** และ **55** เป็น diastereomer ซึ่งกันและกันที่มี relative configuration ที่ C-20 และ C-24 แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ^{13}C NMR ที่ C-20 และ C-24 ของสาร **52** กับ **54** ($20R, 24R$ -ocotillone) พบว่าใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังไม่พบ NOESY correlation ระหว่าง Me-21 และ H-24 (รูปที่ 9) จึงสรุปได้ว่าสาร **52** มี configuration แบบ $20R, 24R$ และเป็นสารชนิดใหม่คือ ($20R, 24R$)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 ϵ ,26-diol

สำหรับสาร **53** จากข้อมูล HRESIMS, 1D และ 2D NMR พบว่ามีสูตรโมเลกุลและโครงสร้าง (planar structure) เหมือนกับสาร **52** แตกต่างกันที่ข้อมูล NOESY ตรงที่ใน NOESY spectrum ของสาร **15** พบ correlation ระหว่าง Me-21 และ H-24 (รูปที่ 9) อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สาร **52** เป็น diastereomer กับสาร **52** และ **55** ซึ่งมี configuration แบบ $20R, 24S$ และเป็นสารชนิดใหม่คือ ($20R, 24S$)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 ϵ ,26-diol



รูปที่ 8 แสดง ^1H - ^1H COSY และ HMBC correlation ที่สำคัญของสาร **52**

สำหรับสาร **54** จากการเปรียบเทียบข้อมูล NMR กับข้อมูลในวารสารวิจัยต่างๆ (literature) พบว่าเป็นสารที่ได้มีการรายงานมาแล้วคือ ($20R, 24R$ -ocotillone) และมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 6 แสดง NOESY correlation ที่สำคัญของสาร **52** และ **53**

ตารางที่ 4 ^1H (400 MHz) และ ^{13}C (100 MHz) NMR ของสาร 52 และ 53 (CDCl_3)

position	52		53	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1a	39.9 CH ₂	1.91 m	39.9 CH ₂	1.91 m
1b		1.45 m		1.44 m
2	34.1 CH ₂	2.46 m	34.1 CH ₂	2.46 m
3	218.0 C	-	218.1 C	-
4	47.4 C	-	47.4 C	-
5	55.3 CH	1.36 m	55.3 CH	1.37 m
6a	19.6 CH ₂	1.55 m	19.7 CH ₂	1.55 m
6b		1.45 m		1.46 m
7	34.5 CH ₂	1.30 m	34.6 CH ₂	1.31 m
		1.56 m		1.56 m
8	40.2 C	-	40.3 C	-
9	49.9 CH	1.41 m	49.7 CH	1.42 m
10	36.8 C	-	36.9 C	-
11a	22.1 CH ₂	1.52 m	22.3 CH ₂	1.51 m
11b		1.25 m		1.24 m
12a	25.7 CH ₂	1.75 m	25.8 CH ₂	1.76 m
12b		1.33 m		1.29 m
13	43.1 CH	1.61 m	43.0 CH	1.64 m
14	50.0 C	-	50.0 C	-
15a	31.3 CH ₂	1.47 m	31.4 CH ₂	1.46 m
15b		1.10 m		1.09 m
16	26.1 CH ₂	1.80 m	27.1 CH ₂	1.82 m
17	50.0 CH	1.85 m	50.1 CH	1.86 m
18	16.0 CH ₃	0.99 s	16.1 CH ₃	0.99 s
19	15.1 CH ₃	0.93 s	15.2 CH ₃	0.93 s
20	87.8 C	-	86.8 C	-
21	26.7 CH ₃	1.16 s	26.7 CH ₃	1.16 s
22a	34.4 CH ₂	1.78 m	34.7 CH ₂	1.88 m
22b		1.68 m		1.70 m
23a	26.2 CH ₂	2.08 m	27.1 CH ₂	1.81 m
23b		1.81 m		1.23 m
24	86.3 CH	3.82 dd (4.9, 10.4)	86.3 CH	3.83 dd (4.7, 10.2)
25	70.6 C	-	72.5 C	-
26a	71.3 CH ₂	3.67 t (10.8)	67.5 CH ₂	3.73 d (11.0)
26b		3.37 d (10.8)		3.39 t (11.0)
27	20.0 CH ₃	1.01 s	21.4 CH ₃	1.11 s

ตารางที่ 4 ^1H (400 MHz) และ ^{13}C (100 MHz) NMR ของสาร 52 และ 53 (CDCl_3) (ต่อ)

position	52		53	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
28	27.0 CH_3	1.08 s	26.9 CH_3	1.07 s
29	21.0 CH_3	1.03 s	21.0 CH_3	1.04 s
30	16.2 CH_3	0.87 s	16.3 CH_3	0.87 s
26-OH		3.21 br d (10.56)		

ตอนที่ 2 ผลความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้

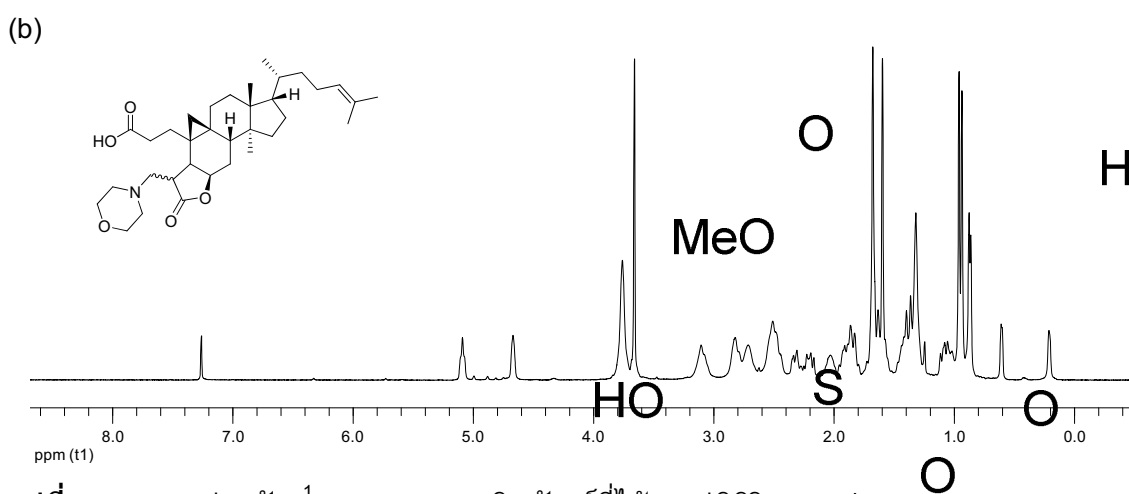
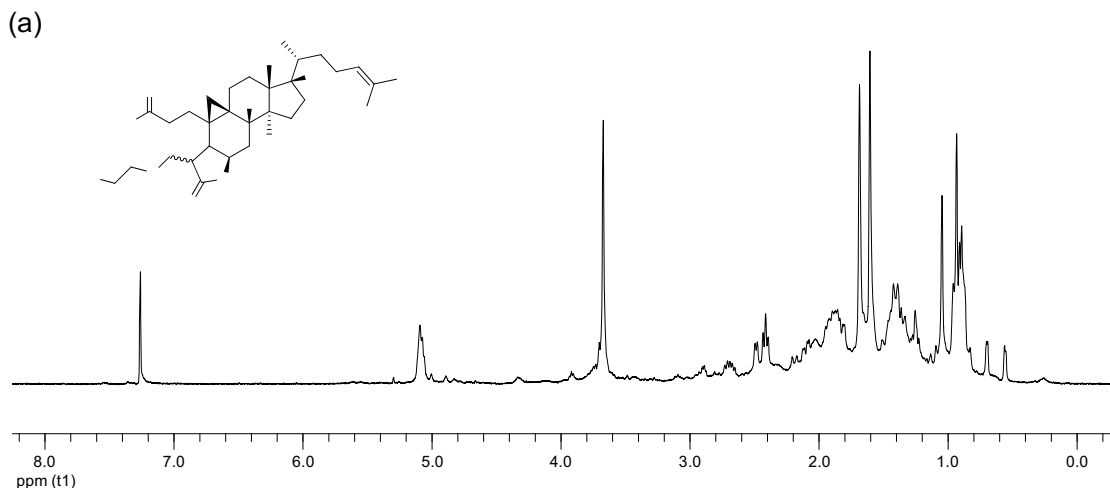
สารที่แยกได้ทั้งหมดได้นำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474), เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO), เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW-620) ด้วยวิธี MTT

จากผลการทดลองที่ผู้วิจัยได้ทำมาก่อนหน้านี้และงานวิจัยในครั้งนี้อยู่สอดคล้องกันคือ สารที่จะแสดงความเป็นพิษที่ดีต่อเซลล์มะเร็งจะเป็นสารกลุ่ม 3,4-seco-cycloartane triterpene ที่มีโครงสร้างส่วนที่เป็น exomethylene γ -lactone ring แต่การมีวง furan ใน side chain (C20-C27) จะทำให้ฤทธิ์ลดลงอย่างมาก หรือที่มีโครงสร้างเป็น exomethylene ที่ตำแหน่ง 29 ไม่มีหมู่ OH ดังแสดงในตารางที่ 4 ดังนั้นจึงได้ทำการพิสูจน์ว่าหมู่ exomethylene γ -lactone ring มีผลต่อการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจริงหรือไม่ โดยนำสารที่มีหมู่นี้มาทำปฏิกิริยาการเติม (addition reaction) กับนิวคลีโอไฟล์บางชนิด แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งในที่นี้เลือกใช้ tubiferolide methyl ester (35) เป็นสารตั้งต้น เนื่องจากสารนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดที่ทดสอบด้วยค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 7.06-11.97 μM เมื่อนำ 35 มาทำปฏิกิริยากับ 2-mercaptoethanol และ morpholine พบว่าเกิดการเติมที่พันธะคู่ของวง γ -lactone ตามที่คาดเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค ^1H NMR ดังแสดงในรูปที่ 7 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ทั้งสองมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าไม่มีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งเหล่านี้ จึงทำให้สรุปได้ว่าหมู่ exomethylene γ -lactone ring มีความจำเป็นต่อการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่มนี้อย่างยิ่ง

ตารางที่ 4 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสาร **41-54**

สาร	IC ₅₀ (μM)*				
	BT-474	KATO-3	CHAGO	SW-620	Hep-G2
41	>20	7.24	5.51	5.58	>20
42	>20	>20	>20	>20	>20
43	>20	>20	>20	>20	>20
44	>20	>20	>20	>20	>20
45	>20	>20	>20	>20	>20
46	>20	>20	>20	>20	>20
47	>20	>20	>20	>20	>20
48	>20	>20	>20	>20	>20
49	>20	>20	>20	>20	>20
50	>20	>20	>20	>20	>20
51	>20	>20	>20	>20	>20
52	>20	>20	>20	>20	>20
53	>20	>20	>20	>20	>20
54	>20	>20	6.25	6.25	>20

* >20 μM = inactive

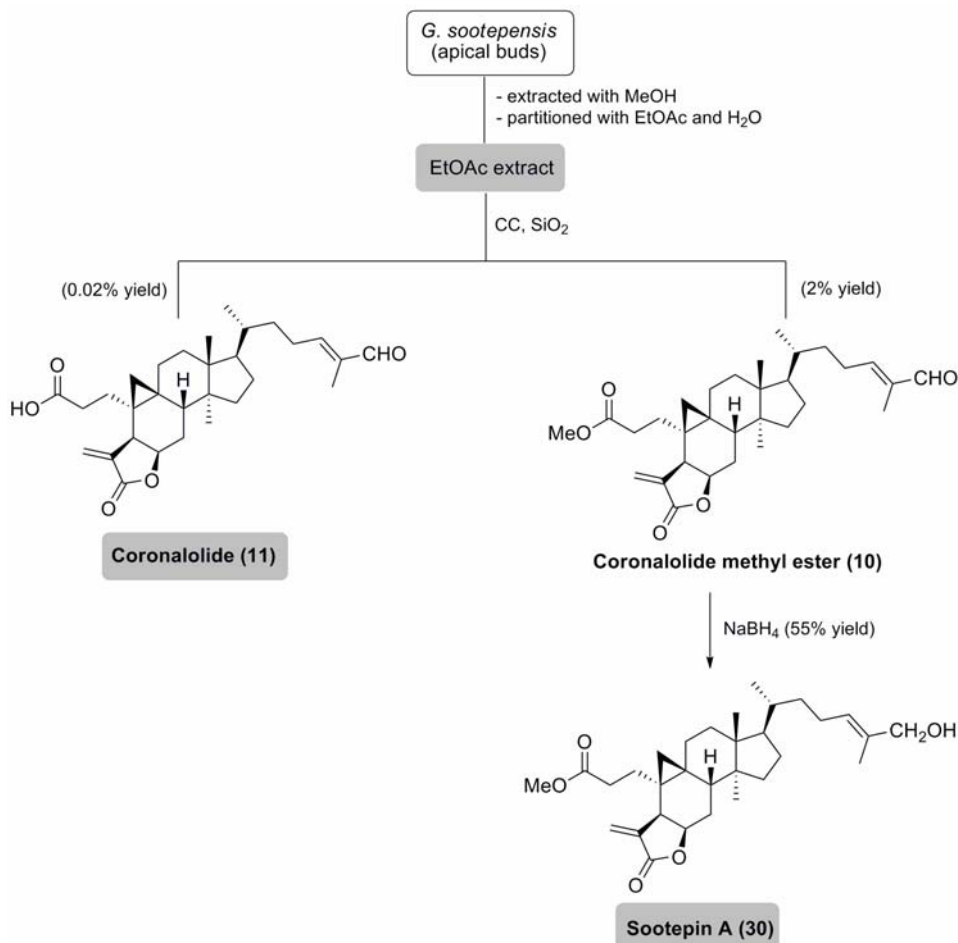


รูปที่ 7 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง tubiferolide methyl ester (35) กับ 2-mercaptoethanol และ morpholine

ตอนที่ 3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ 3,4-seco-cycloartane triterpene และความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่อการออกฤทธิ์

การสกัดแยกสารเพื่อนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุพันธ์

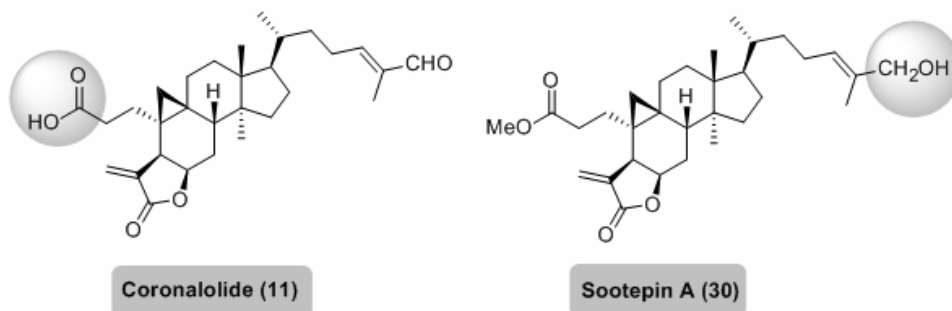
ดังที่กล่าวข้างต้น สารที่แสดงความเป็นพิษที่ดีต่อเซลล์มะเร็งจะเป็นสารกลุ่ม 3,4-seco-cycloartane triterpene ที่มีโครงสร้างส่วนที่เป็น exomethylene γ -lactone ring แต่ไม่มีวง furan ใน side chain (C20-C27) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกสาร 2 ชนิดเพื่อนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุพันธ์ต่างๆ ต่อไป คือ coronalolide (11) และ sootepin A (30) ซึ่งสารทั้งสองนี้ผู้วิจัยพบว่าสามารถแยกได้จากส่วนยอดของ *G. sootepensis* ซึ่งสาร 11 สามารถแยกได้ในปริมาณค่อนข้างมากคือ 0.02% yield ขณะที่สาร 30 แยกได้ในปริมาณน้อยมาก แต่ผู้วิจัยพบว่าสามารถแยกสาร coronalolide methyl ester (10) ได้ในปริมาณมาก (2% yield) จึงนำสารนี้มาทำการรีดิวซ์ด้วย NaBH_4 จะได้ sootepin A (20) (55% yield) ซึ่งจะใช้เป็นสารตั้งต้นต่อไป การสกัดและเตรียมสาร 10 และ 30 แสดงไว้ในแผนภาพที่ 4



แผนภาพที่ 4 แสดงการสกัดและเตรียมสาร **11** และ **34** เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์

การสังเคราะห์อนุพันธ์ 3,4-*seco*-cycloartane triterpene

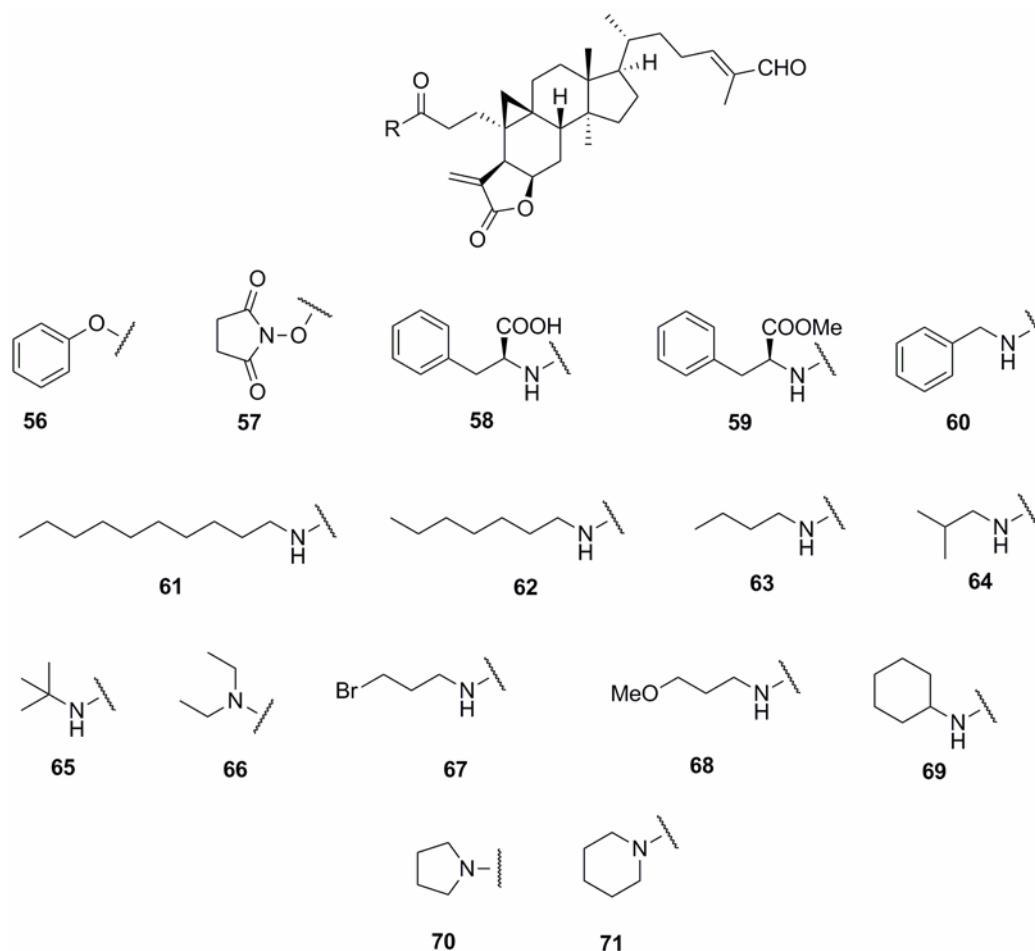
ในการสังเคราะห์นี้ ได้เลือกสารสองชนิด คือ coronalolide (**11**) และ sootepin A (**30**) เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์อนุพันธ์ต่างๆ โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างนั้นจะทำการปรับเปลี่ยนที่หมู่คาร์บอกซิลิก (COOH) ที่ตำแหน่งที่ 1 ของ coronalolide (**11**) และหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ตำแหน่งที่ 26 ของ sootepin A (**30**) ทั้งนี้เพื่อเป็นการดูผลของโครงสร้างที่เปลี่ยนไปทั้งด้านซ้ายและขวาของสารกลุ่มนี้ว่าจะมีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างไร



รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งที่จะทำการตัดแปรด้วยปฏิกิริยาเคมีของสาร **11** และ **30**

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่คาร์บอกซิลิกที่ตำแหน่งที่ 1 ของ coronalolide (11) ปฏิบัติการแรกทำโดยนำสาร 11 มาตั้งปฏิกิริยากับฟีนอลหรือเอมีนชนิดต่างๆ โดยใช้ DCC หรือ EDC ร่วมกับ HOBt เป็น coupling agent และได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์และแอมไนด์ ดังแสดงในรูปที่ 9 และผลความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 5 สำหรับการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่ไพรมารีแอลกอฮอล์ที่ตำแหน่งที่ 26 ของ sootepin A (30) เป็นเอสเทอร์ชนิดต่างๆ มาทำปฏิกิริยากับ acid chloride ชนิดต่างๆ ในสภาวะที่เป็นเบส ซึ่งแสดงโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ไว้ในรูปที่ 10 และผลความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้แสดงไว้ในตารางที่ 6

จากผลความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง แม้ว่าไม่มีอนุพันธ์ใดที่สังเคราะห์ได้ให้ผลที่ดีกว่าสารตั้งต้นทั้งสองชนิดอย่างมีนัยสำคัญ แต่สามารถสรุปได้ว่าเมื่อหมู่คาร์บอกซิลิกที่ตำแหน่งที่ 1 ของ coronalolide (11) ถูกเปลี่ยนเป็นแอมไนด์จะมีความเลือกจำเพาะสูงขึ้น และในทำนองเดียวกันอนุพันธ์เอสเทอร์ของ sootepin A (30) ก็ให้ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เลือกจำเพาะดีขึ้น

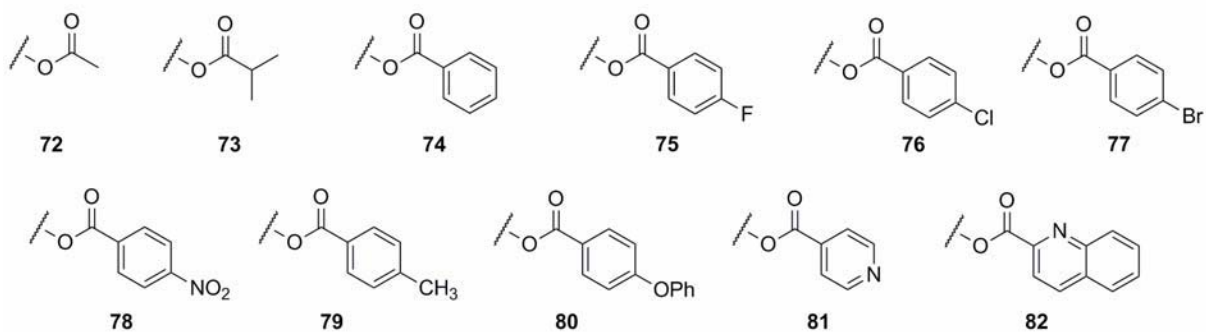
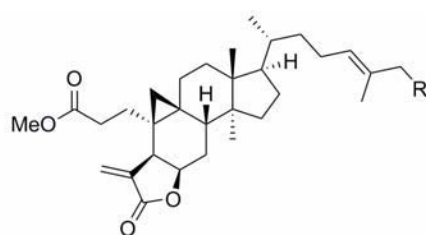


รูปที่ 9 แสดงอนุพันธ์ของ coronalolide (11) ที่สังเคราะห์ได้

ตารางที่ 5 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ coronalolide (11) และอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้

สาร	IC ₅₀ (M)*				
	BT-474	KATO-3	CHAGO	SW-620	Hep-G2
11	13.65	12.12	11.23	10.32	13.28
56	>20	>20	9.65	12.21	8.21
57	>20	>20	>20	>20	>20
58	>20	>20	7.84	10.51	9.73
59	>20	>20	7.55	10.05	>20
60	>20	16.16	10.27	12.05	10.63
61	>20	>20	>20	>20	>20
62	>20	>20	10.71	13.40	7.52
63	>20	>20	10.19	11.55	>20
64	>20	>20	8.37	10.47	>20
65	>20	>20	10.06	10.92	>20
66	>20	>20	12.58	12.63	11.53
67	>20	>20	13.42	10.37	>20
68	>20	>20	12.64	11.07	15.75
69	>20	>20	7.09	12.52	>20
70	>20	>20	15.19	9.95	16.26
71	>20	14.13	14.04	11.17	>20

* >20 μM = inactive



รูปที่ 10 แสดงอนุพันธ์ของ sootepin A (30) ที่สังเคราะห์ได้

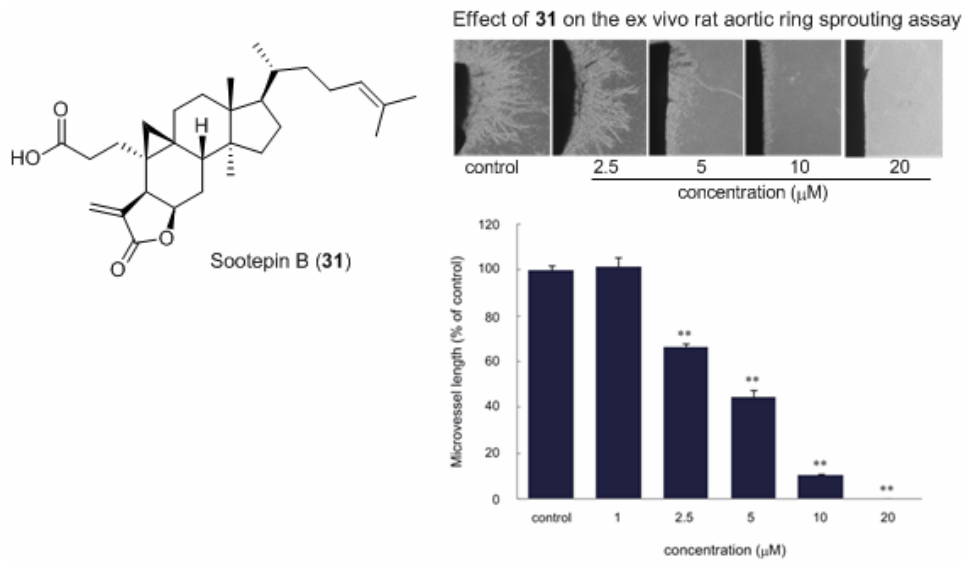
ตารางที่ 6 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ sootepin A (30) และอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้

สาร	IC ₅₀ (M)*				
	BT474	KATO-3	CHAGO	SW-620	Hep-G2
34	11.80	4.21	7.96	3.61	5.82
72	>20	>20	15.05	7.84	8.91
73	>20	>20	14.31	4.34	7.12
74	>20	>20	11.99	5.08	9.65
75	>20	13.69	8.75	5.82	5.62
76	>20	14.45	10.18	8.13	8.46
77	>20	>20	>20	11.02	>20
78	>20	>20	12.98	10.81	12.69
79	>20	>20	11.30	12.45	14.79
80	>20	>20	11.83	7.47	8.76
81	>20	>20	11.35	12.01	11.89
82	>20	>20	9.54	11.18	9.79

* >20 μ M = inactive

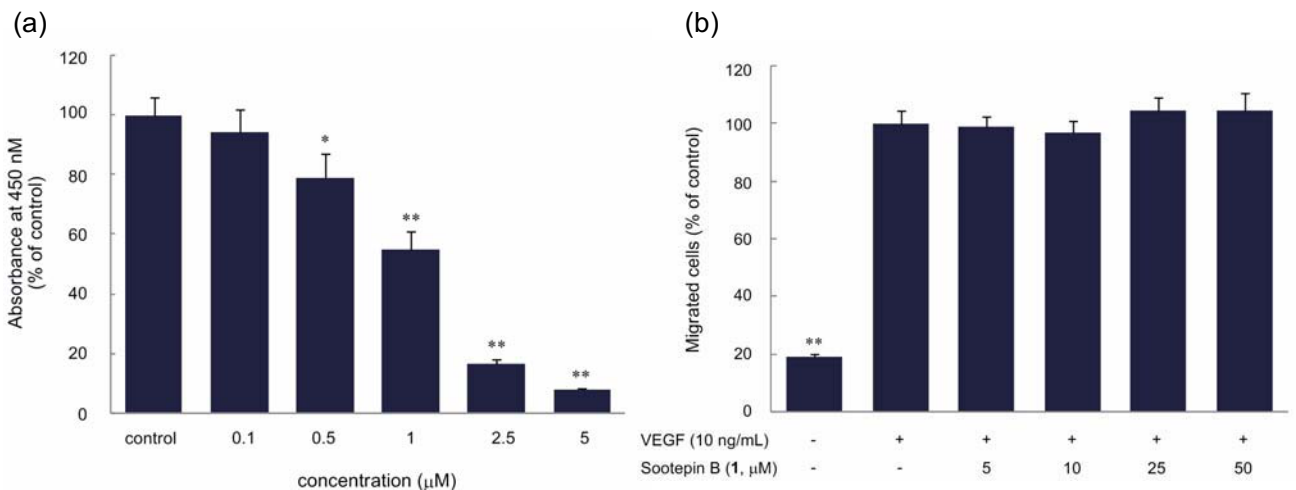
ตอนที่ 4 ผลยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของสาร 3,4-seco-cycloartane triterpene ที่แยกได้ และอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์บางชนิด

ในงานวิจัยนี้ นอกจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ แล้ว ผู้วิจัยยังสนใจทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (antiangiogenesis) เนื่องจากการสร้างหลอดเลือดใหม่เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญของมะเร็งทุกชนิดเพื่อการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายตัวด้วย ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้นำสาร 3,4-seco-cycloartane triterpene ที่แยกได้จากพืช Gardenia ทั้ง 5 ชนิดที่ผู้วิจัยได้ทำการวิจัยมาทั้งหมดและอนุพันธ์ข้างต้นที่สังเคราะห์ขึ้นบางชนิดมาคัดกรองหาสารที่ให้ฤทธิ์ที่ดีที่สุด โดยใช้ ex vivo model ซึ่งเป็นการดูการยับยั้งการงอกใหม่ของหลอดเลือดหนู (rat aortic ring sprouting assay) พบว่าสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ sootepin B (31) ให้ฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุดโดยสามารถยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 20 μ M และมีค่า IC₅₀ = 4.46 μ M ดังแสดงในรูปที่



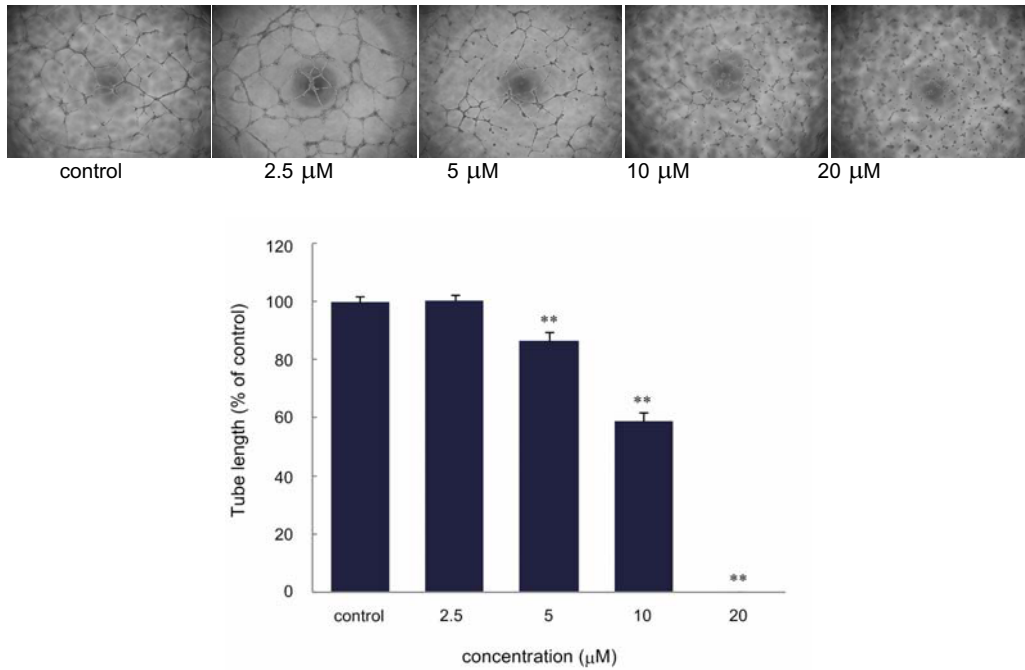
รูปที่ 11 แสดงโครงสร้างและฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ใน ex vivo model ของ sootepin B

จากนั้นได้ทำการศึกษากลไกการทำงานของ sootepin B (**31**) โดยดูผลของสารต่อการทำงานของเซลล์ HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) ในฟังก์ชันต่างๆ ได้แก่ proliferation, tube formation และ migration พบว่า sootepin B (**31**) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยผ่านการยับยั้ง proliferation ($\text{IC}_{50} = 1.20 \mu\text{M}$) และ tube formation ($\text{IC}_{50} = 11.20 \mu\text{M}$) แต่แทบไม่มีผลต่อ migration ของ HUVEC เลย ดังแสดงในรูปที่ 12



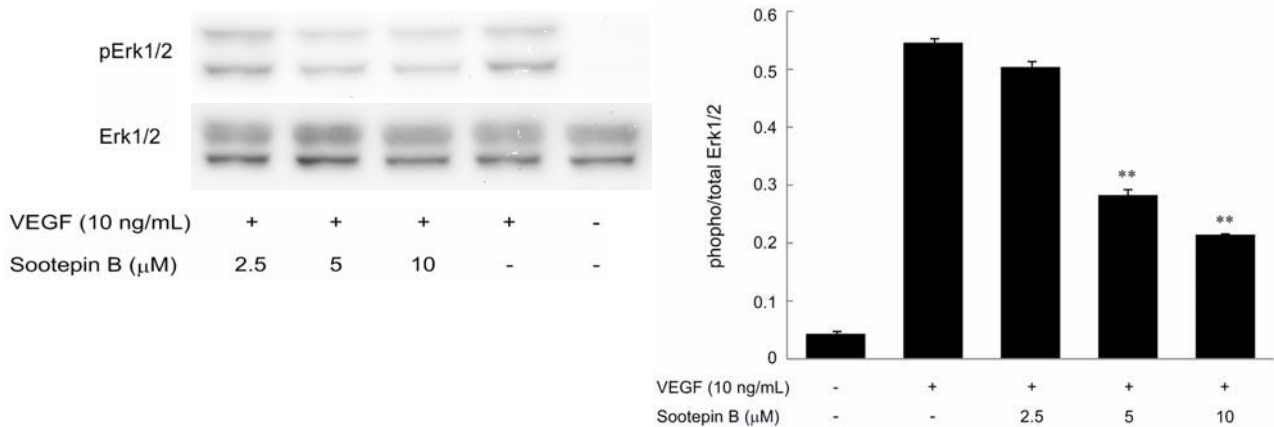
รูปที่ 12 แสดงฤทธิ์ของ sootepin B (**31**) ต่อการทำงานของในฟังก์ชันต่างๆ ของ HUVEC (a) proliferation (b) migration และ (c) tube formation

(c)



รูปที่ 12 แสดงฤทธิ์ของ sootepin B (31) ต่อการทำงานในฟังก์ชันต่างๆ ของ HUVEC (a) proliferation (b) migration และ (c) tube formation (ต่อ)

ต่อมาได้นำสาร sootepin B (31) มาทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ (mechanism of action) ด้วยวิธี western blot analysis พบว่า sootepin B แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยผ่านกลไกยับยั้งการ phosphorylation ของ Erk 1/2 ซึ่งขึ้นกับความเข้มข้นของสาร (dose dependent manner) แต่ไม่มีผลต่อการ phosphorylation ของ Akt ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 แสดงฤทธิ์ของ sootepin B (31) ในการยับยั้งการ phosphorylation ของ Erk 1/2

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์วารสารวิชาการระดับนานาชาติจำนวน 4 เรื่อง
 - 1.1 เรื่อง Gardenoins E-H, Cycloartane Triterpenes from the Apical Buds of *Gardenia obtusifolia* ตีพิมพ์ในวารสาร Chemical & Pharmaceutical Bulletin 2011, 59(3), 385-387
 - 1.2 เรื่อง Cycloartane Triterpenes from the Exudate of *Gardenia thailandica* ตีพิมพ์ในวารสาร Phytochemistry Letters 2011, 4, 26-29
 - 1.3 เรื่อง Dammarane Triterpenes from the Apical Buds of *Gardenia collinsae* ตีพิมพ์ในวารสาร Phytochemistry Letters 2011, 4, 183-186
 - 1.4 เรื่อง Antiangiogenic activity of 3,4-seco-cycloartane triterpenes from Thai *Gardenia* spp. and their semi-synthetic analogs ตีพิมพ์ในวารสาร Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2012, 22, 512-517

2. การนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์จำนวน 1 เรื่อง
 - 2.1 เรื่อง Sootependial, a new 3,4-seco-cycloartane from a Thai *Gardenia* plant, induces apoptosis in liver cancer cells and angiogenic inhibition ในงานประชุม EFMC-ISMC 2012 - 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry ระหว่างวันที่ 2-6 กันยายน 2555 ณ เมือง Berlin ประเทศเยอรมนี

ภาคผนวก ก

List of Figure

Figure		Page
S1	^1H NMR spectrum of gardenoin E (41) (CDCl_3 , 400 MHz)	45
S2	^{13}C NMR spectrum of gardenoin E (41) (CDCl_3 , 100 MHz)	45
S3	^1H - ^1H COSY spectrum of gardenoin E (41) (CDCl_3)	46
S4	HSQC spectrum of gardenoin E (41) (CDCl_3)	46
S5	HMBC spectrum of gardenoin E (41) (CDCl_3)	47
S6	1D NOE spectrum of gardenoin E (41) (CDCl_3)	47
S7	^1H NMR spectrum of gardenoin F (42) (CDCl_3 , 400 MHz)	49
S8	^{13}C NMR spectrum of gardenoin F (42) (CDCl_3 , 100 MHz)	49
S9	^1H - ^1H COSY NMR spectrum of gardenoin F (42) (CDCl_3)	50
S10	HSQC spectrum of gardenoin F (42) (CDCl_3)	50
S11	HMBC spectrum of gardenoin F (42) (CDCl_3)	51
S12	1D NOE spectrum of gardenoin F (42) (CDCl_3)	51
S13	^1H NMR spectrum of gardenoin G (43) (acetone- d_6 , 400 MHz)	53
S14	^{13}C NMR spectrum of gardenoin G (43) (acetone- d_6 , 100 MHz)	53
S15	^1H - ^1H COSY NMR spectrum of gardenoin G (43) (acetone- d_6)	54
S16	HSQC spectrum of gardenoin G (43) (acetone- d_6)	54
S17	HMBC spectrum of gardenoin G (43) (acetone- d_6)	55
S18	1D NOE spectrum of gardenoin G (43) (acetone- d_6)	55
S19	^1H NMR spectrum of gardenoin H (44) (CDCl_3 , 400 MHz)	57
S20	^{13}C NMR spectrum of gardenoin H (44) (CDCl_3 , 100 MHz)	57
S21	^1H - ^1H COSY NMR spectrum of gardenoin H (44) (CDCl_3)	58
S22	HSQC spectrum of gardenoin H (44) (CDCl_3)	58
S23	HMBC spectrum of gardenoin H (44) (CDCl_3)	59
S24	1D NOE spectrum of gardenoin H (44) (CDCl_3)	59
S25	^1H NMR spectrum of dikamakiartane A (45) (acetone- d_6 , 400 MHz)	60
S26	^{13}C NMR spectrum of dikamakiartane A (45) (acetone- d_6 , 100 MHz)	61
S27	^1H NMR spectrum of dikamakiartane C (46) (acetone- d_6 , 400 MHz)	61
S28	^1H NMR spectrum of dikamakiartane D (47) (CDCl_3 , 400 MHz)	62
S29	^{13}C NMR spectrum of dikamakiartane D (47) (CDCl_3 , 100 MHz)	62
S30	^1H NMR spectrum of 5a-cycloart-24-ene-3,16,23-trione (48) (CDCl_3)	63

Figure	Page
S31 ¹³ C NMR spectrum of 5a-cycloart-24-ene-3,16,23-trione (48) (CDCl ₃)	63
S32 ¹ H NMR spectrum of secaubryenol (27) (CDCl ₃ , 400 MHz)	64
S33 ¹³ C NMR spectrum of secaubryenol (27) (CDCl ₃ , 100 MHz)	64
S34 ¹ H NMR spectrum of gardenoin I (49) (CDCl ₃ , 400 MHz)	65
S35 ¹³ C NMR spectrum of gardenoin I (49) (CDCl ₃ , 100 MHz)	65
S36 ¹ H- ¹ H COSY spectrum of gardenoin I (49) (CDCl ₃)	66
S37 HSQC spectrum of gardenoin I (49) (CDCl ₃)	66
S38 HMBC spectrum of gardenoin I (49) (CDCl ₃)	67
S39 NOESY spectrum of gardenoin I (49) (CDCl ₃)	67
S40 ¹ H NMR spectrum of gardenoin J (50) (CDCl ₃ , 400 MHz)	68
S41 ¹³ C NMR spectrum of gardenoin J (50) (CDCl ₃ , 100 MHz)	68
S42 ¹ H- ¹ H COSY spectrum of gardenoin J (50) (CDCl ₃)	69
S43 HSQC spectrum of gardenoin J (50) (CDCl ₃)	69
S44 HMBC spectrum of gardenoin J (50) (CDCl ₃)	70
S45 NOESY spectrum of gardenoin J (50) (CDCl ₃)	70
S46 ¹ H NMR spectrum of sootepin E (34) (CDCl ₃ , 400 MHz)	71
S47 ¹³ C NMR spectrum of sootepin E (34) (CDCl ₃ , 100 MHz)	71
S48 ¹ H NMR spectrum of coronaloic acid (51) (CDCl ₃ , 400 MHz)	72
S49 ¹³ C NMR spectrum of coronaloic acid (51) (CDCl ₃ , 100 MHz)	72
S50 ¹ H NMR spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 <i>E</i> ,26-diol (52) (CDCl ₃ , 400 MHz)	73
S51 ¹³ C NMR spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 <i>E</i> ,26-diol (52) (CDCl ₃ , 100 MHz)	73
S52 ¹ H- ¹ H COSY NMR spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 <i>E</i> ,26-diol (52)	74
S53 HSQC spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 <i>E</i> ,26-diol (52)	74
S54 HMBC spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 <i>E</i> ,26-diol (52)	75
S55 NOESY spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 <i>E</i> ,26-diol (52)	75
S56 ¹ H NMR spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>S</i>)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 <i>E</i> ,26-diol (53) (CDCl ₃ , 400 MHz)	76

Figure		Page
S57	¹³ C NMR spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>S</i>)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 <i>E</i> ,26-diol (53) (CDCl ₃ , 100 MHz)	76
S58	¹ H- ¹ H COSY NMR spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>S</i>)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 <i>E</i> ,26-diol (53)	77
S59	HSQC spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>S</i>)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 <i>E</i> ,26-diol (53)	77
S60	HMBC spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>S</i>)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 <i>E</i> ,26-diol (53)	78
S61	NOESY spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>S</i>)-epoxy-3-oxo-dammarane-25 <i>E</i> ,26-diol (53)	78
S62	¹ H NMR spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-ocotillone (54) (CDCl ₃ , 400 MHz)	79
S63	¹³ C NMR spectrum of (20 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-ocotillone (54) (CDCl ₃ , 100 MHz)	79

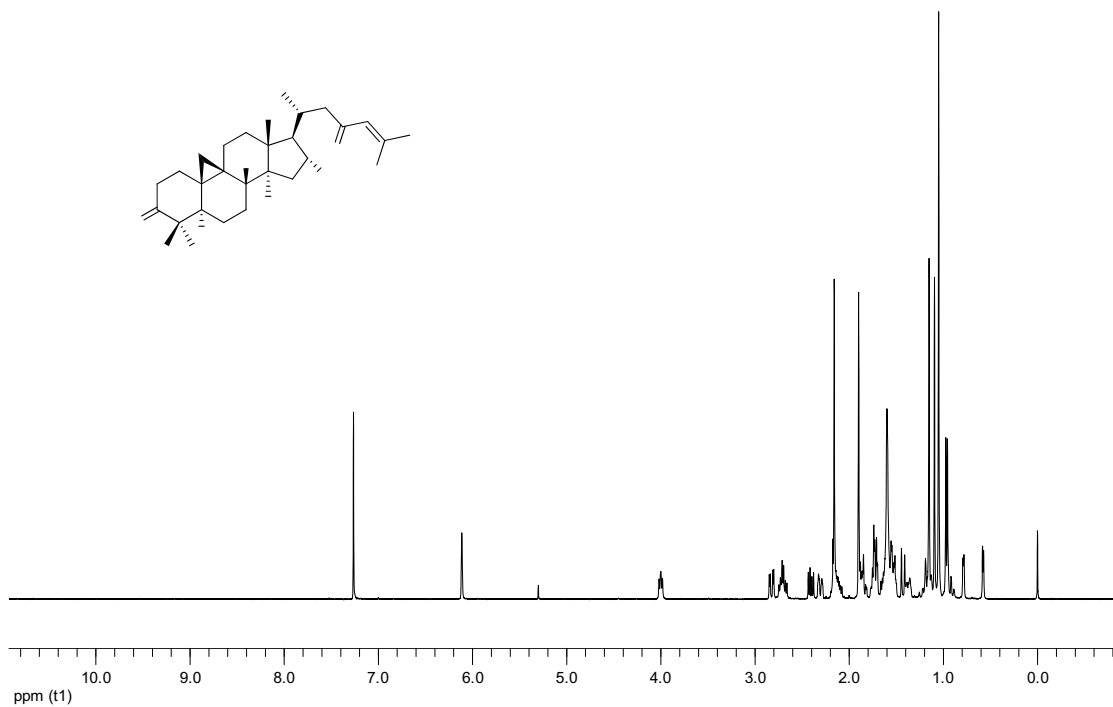


Figure S1. ¹H NMR spectrum of gardenoin E (**41**) (CDCl₃, 400 MHz)

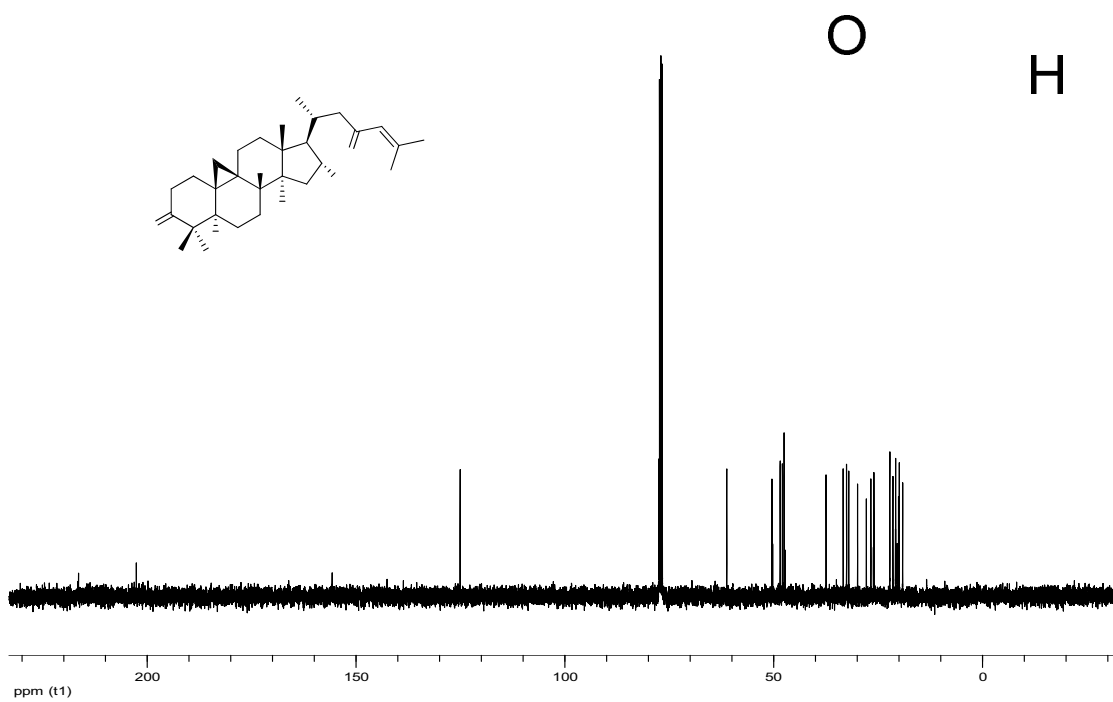


Figure S2. ¹³C NMR spectrum of gardenoin E (**41**) (CDCl₃, 100 MHz)

H

O

H

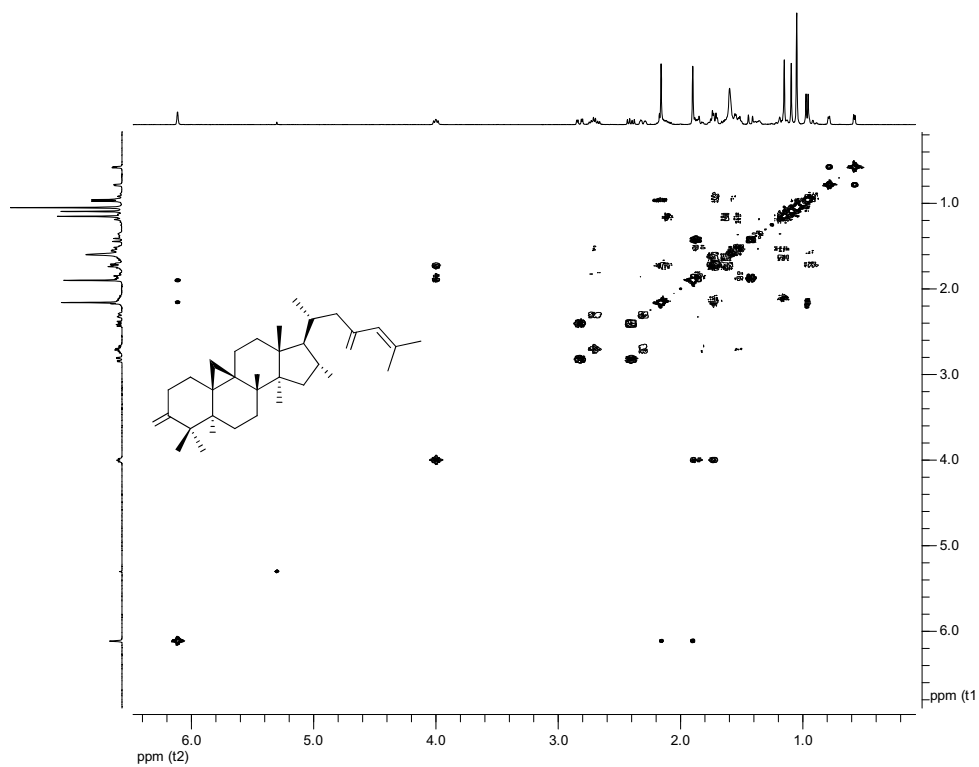


Figure S3. ^1H - ^1H COSY spectrum of gardenoin E (**41**) (CDCl_3)

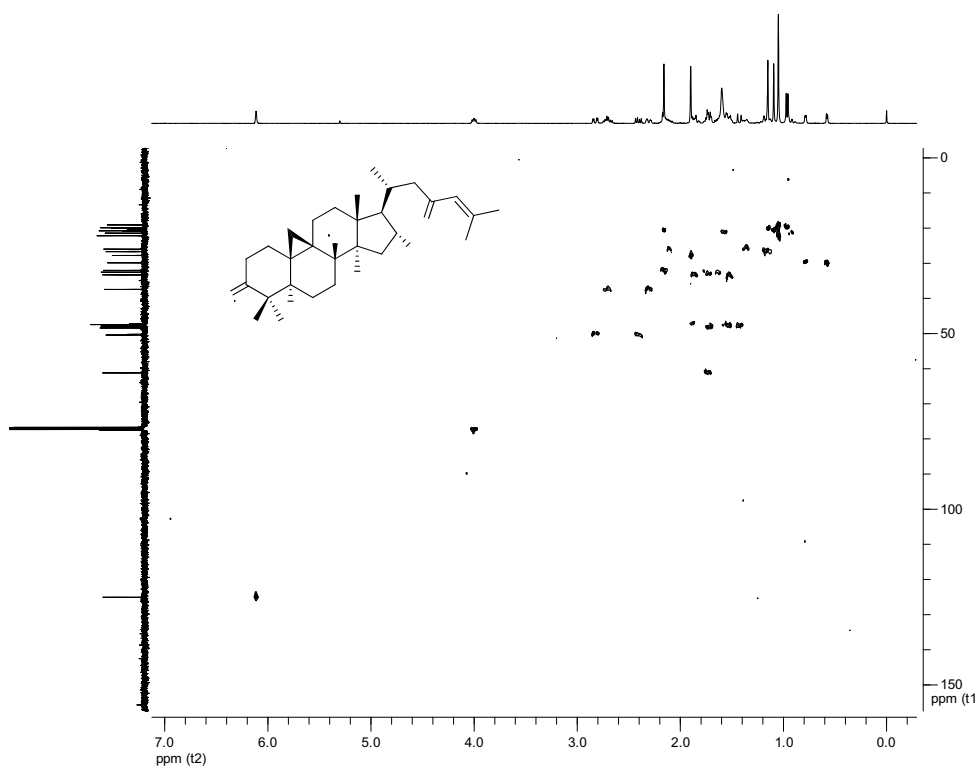


Figure S4. HSQC spectrum of gardenoin E (**41**) (CDCl_3)

O
H

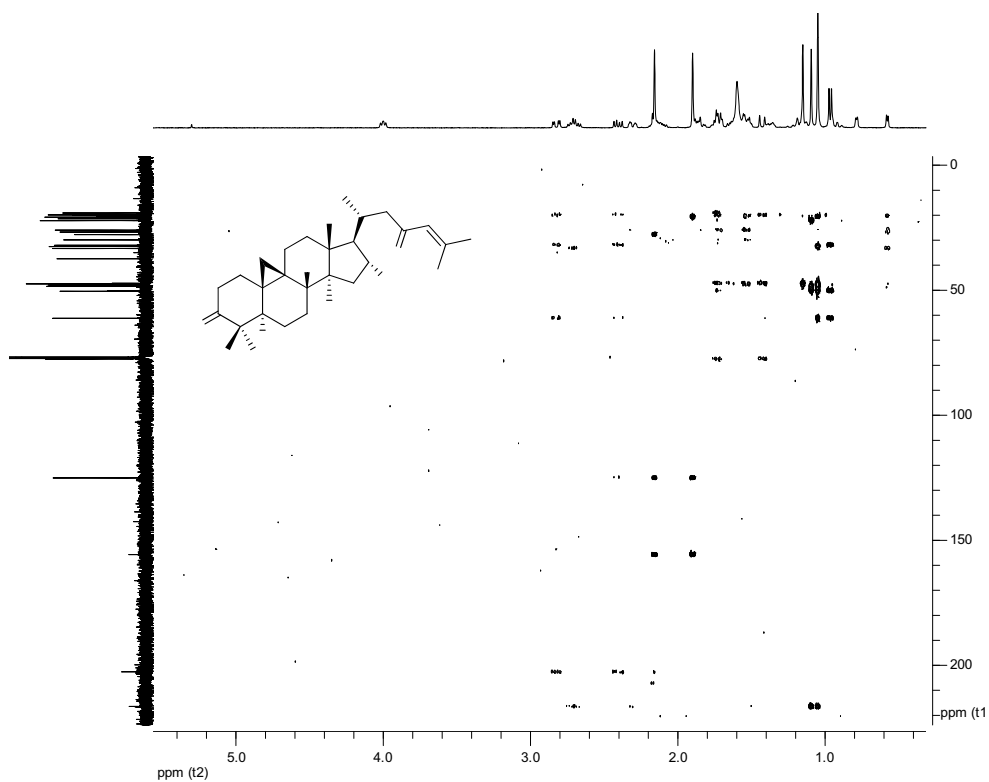


Figure S5. HMBC spectrum of gardenoin E (41) (CDCl₃)

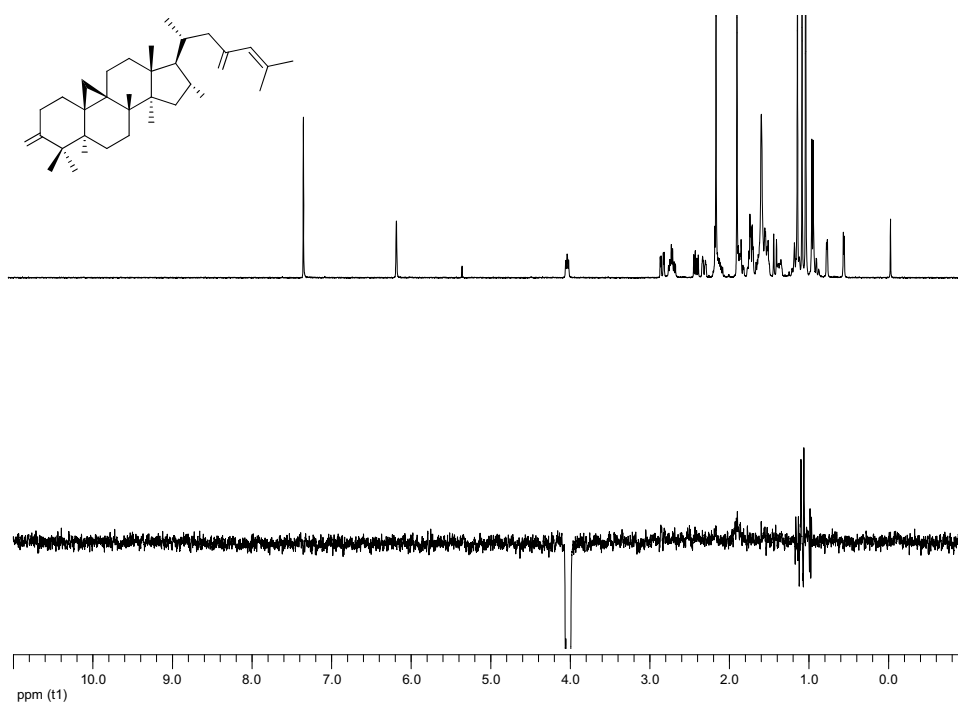
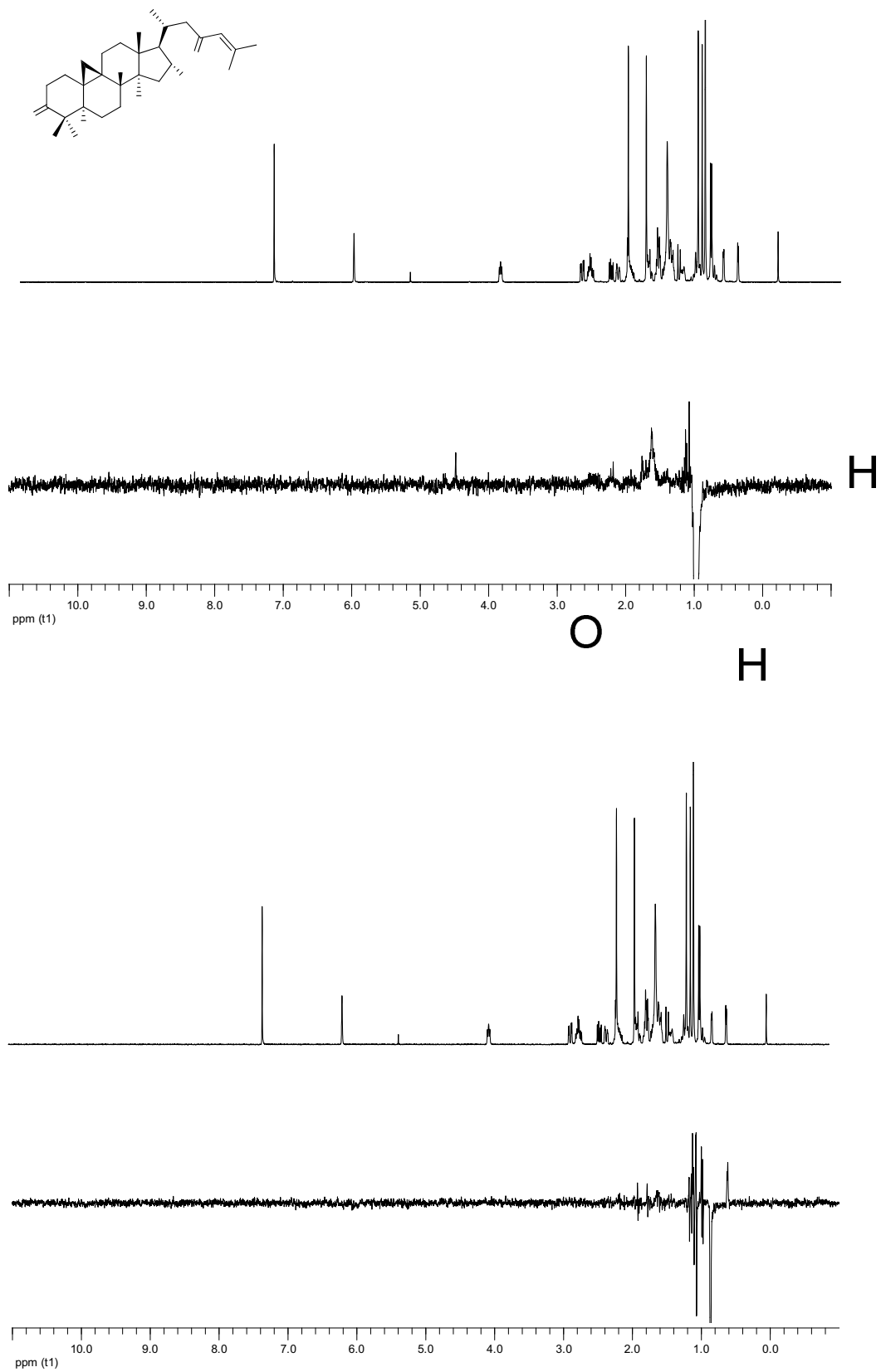


Figure S6. 1D NOE spectrum of gardenoin E (41) (CDCl₃)

○



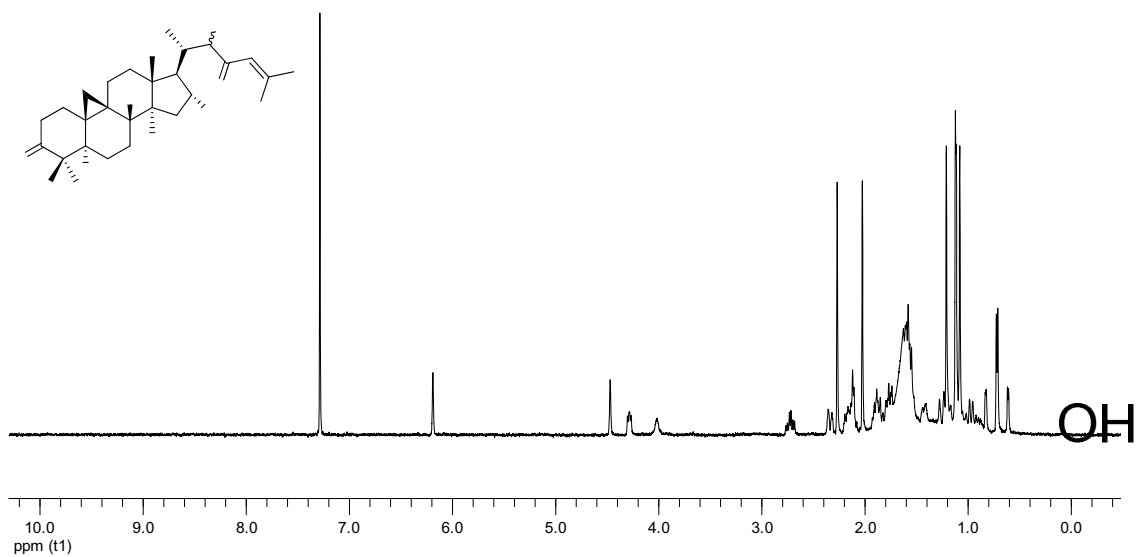


Figure S7. ^1H NMR spectrum of gardenoin F (**42**) (CDCl_3 , 400 MHz)

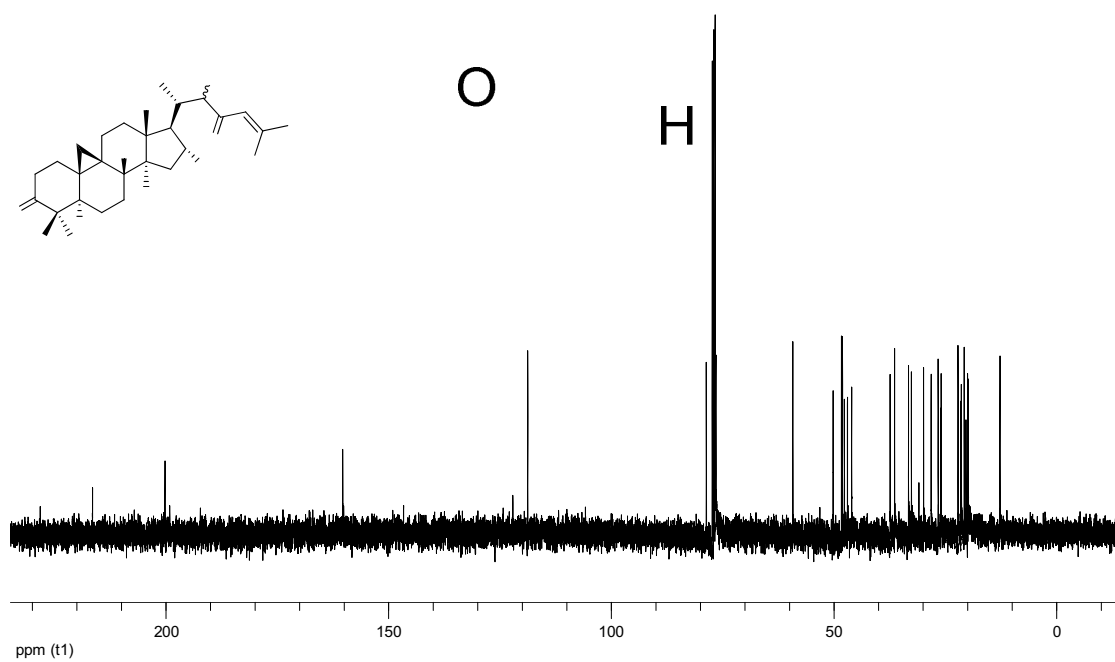


Figure S8. ^{13}C NMR spectrum of gardenoin F (**42**) (CDCl_3 , 100 MHz)

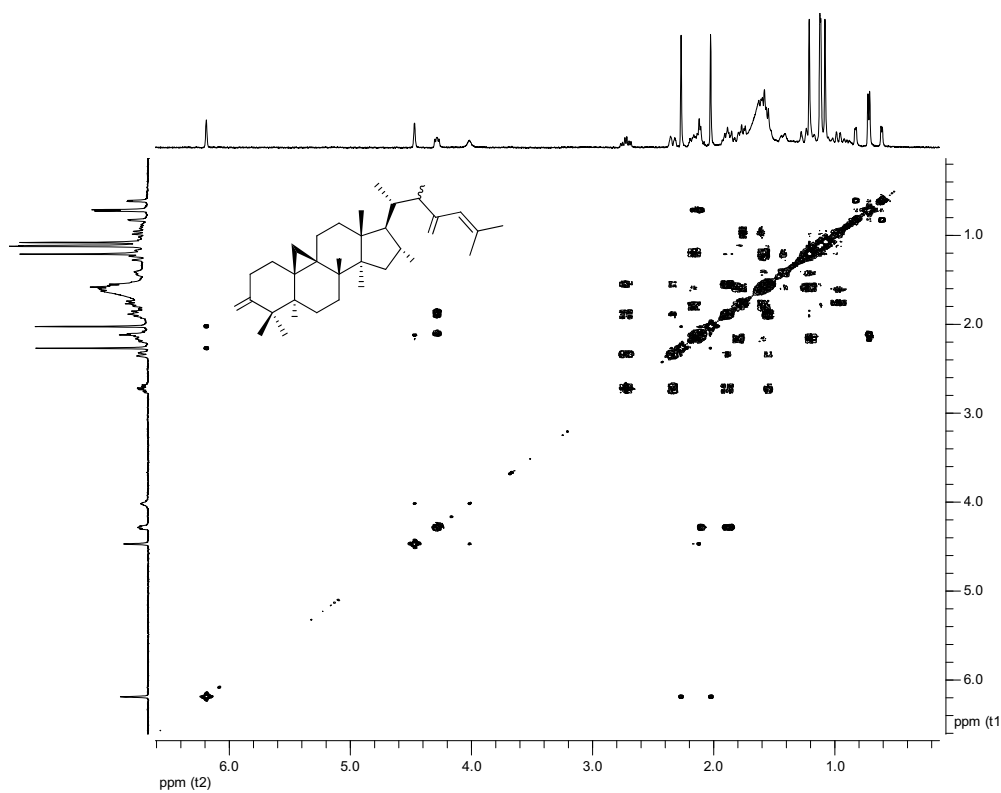


Figure S9. ^1H - ^1H COSY spectrum of gardenoin F (**42**) (CDCl_3)

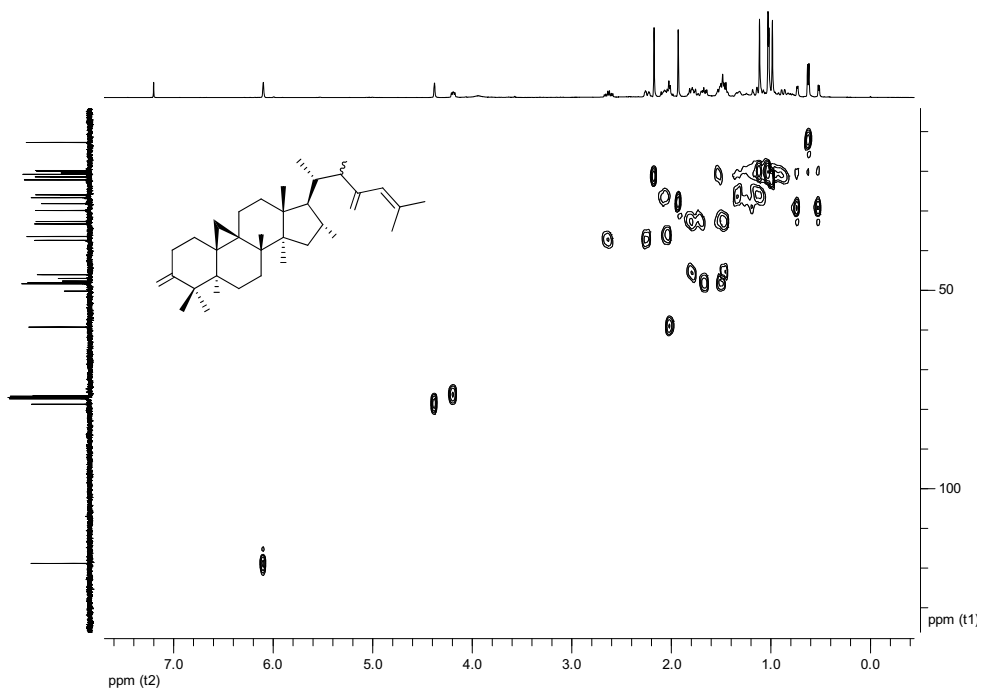


Figure S10. HSQC spectrum of gardenoin F (**42**) (CDCl_3)

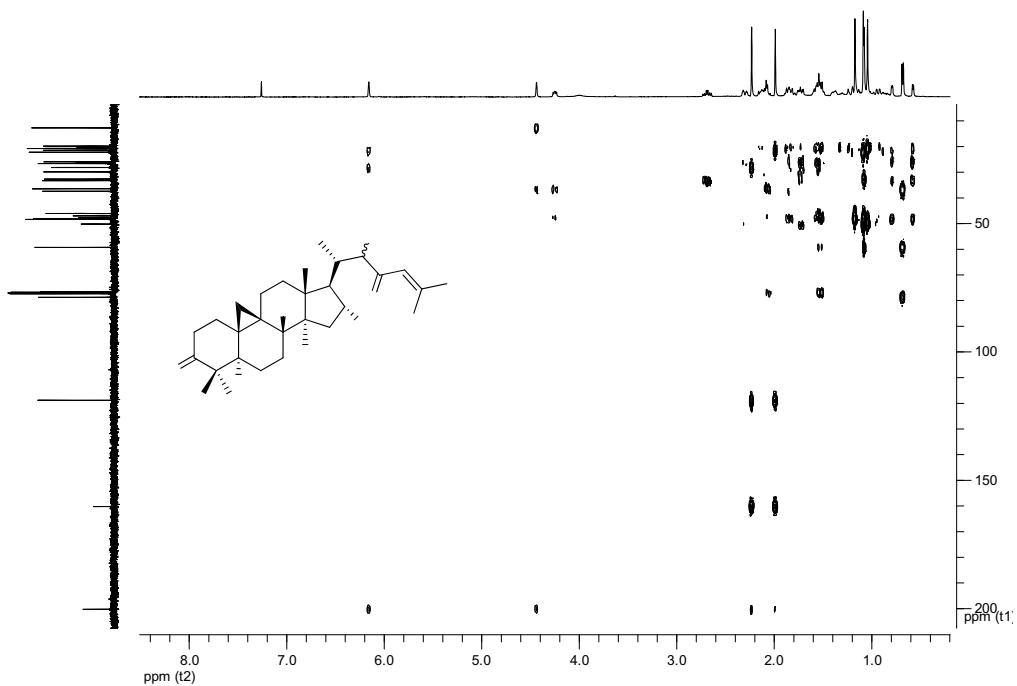


Figure S11. HMBC spectrum of gardenoin F (**42**) (CDCl_3)

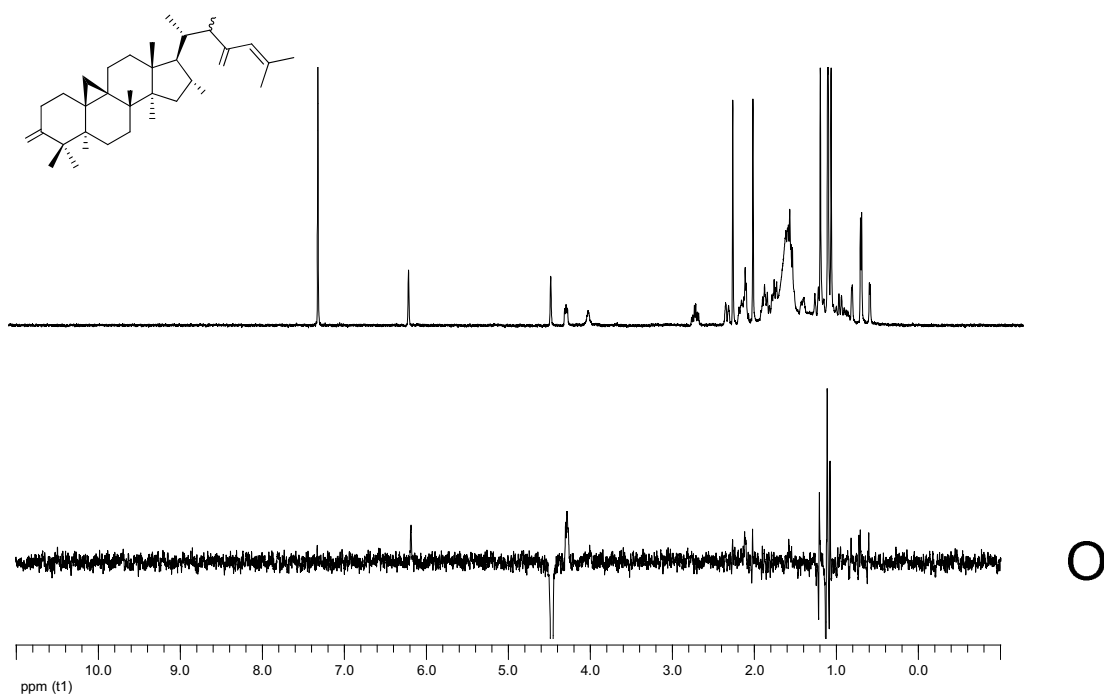


Figure S12. 1D NOE spectrum of gardenoin F (**42**) (CDCl_3)

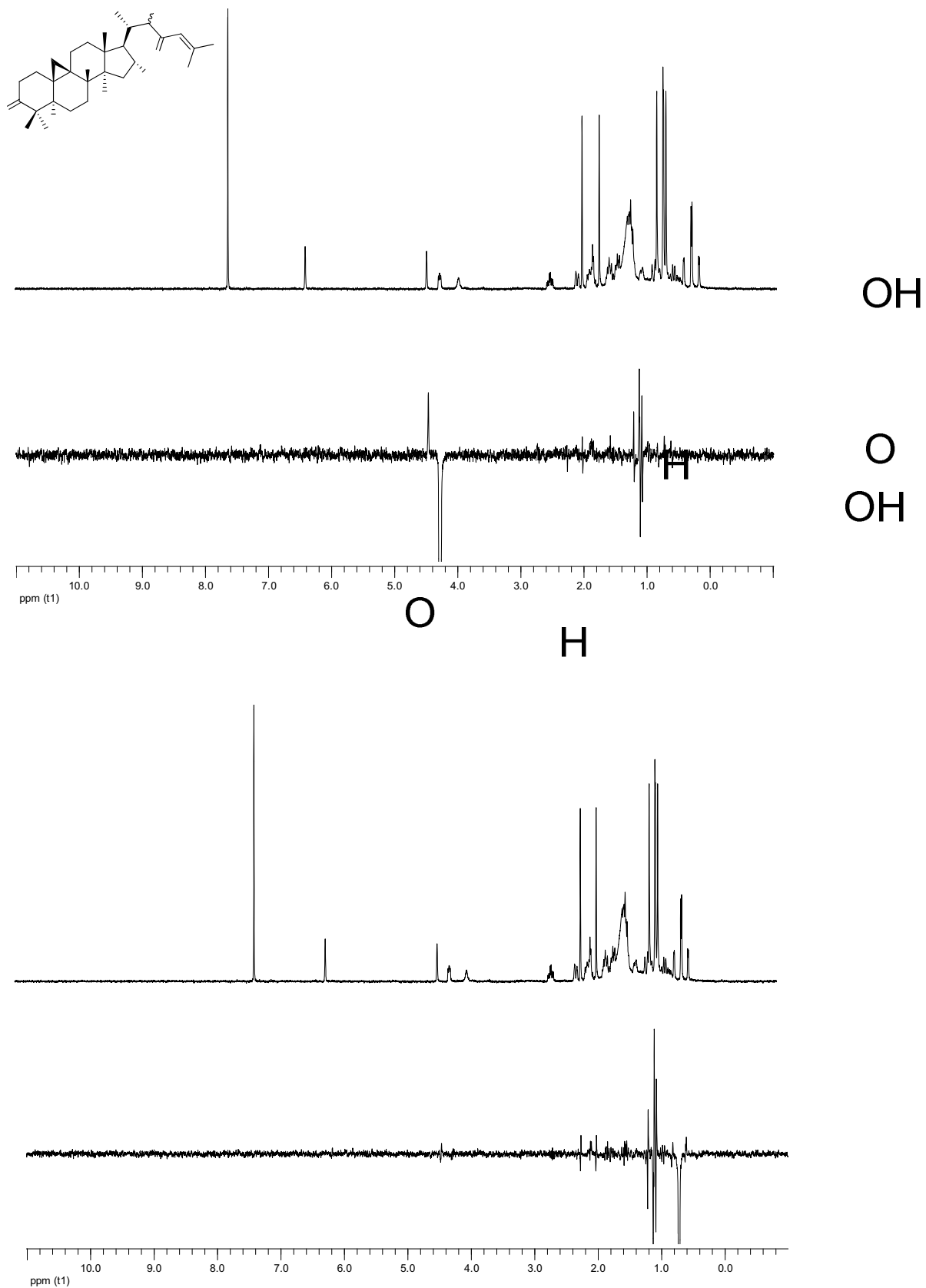


Figure S12. 1D NOE spectrum of gardenoin F (**42**) (CDCl₃) (continue)

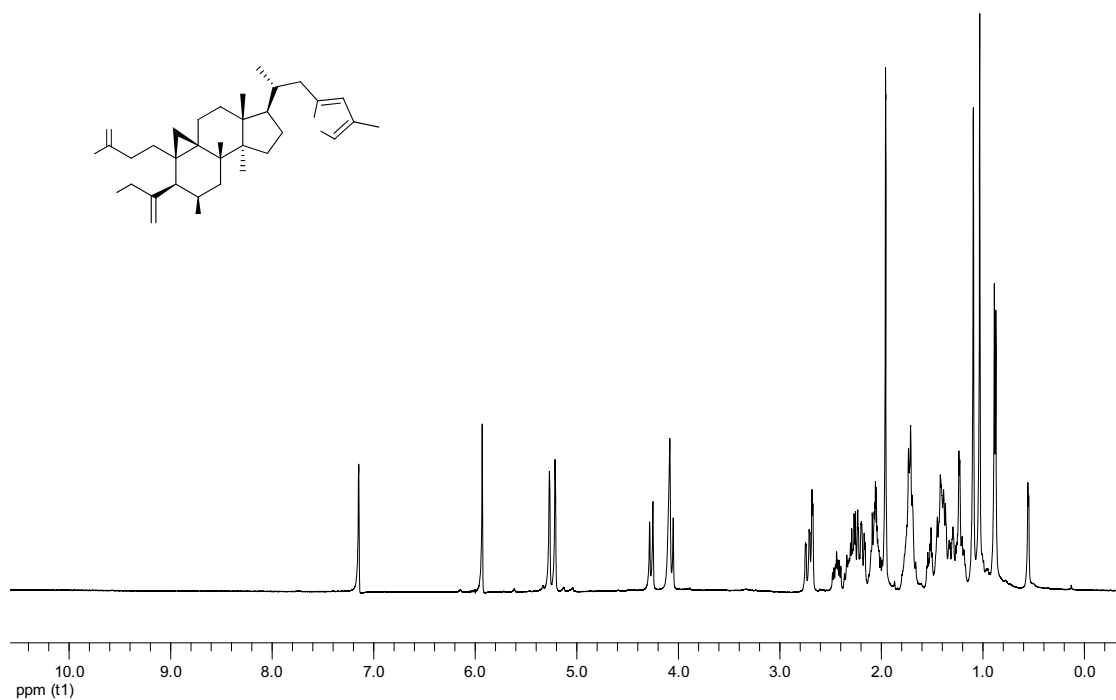
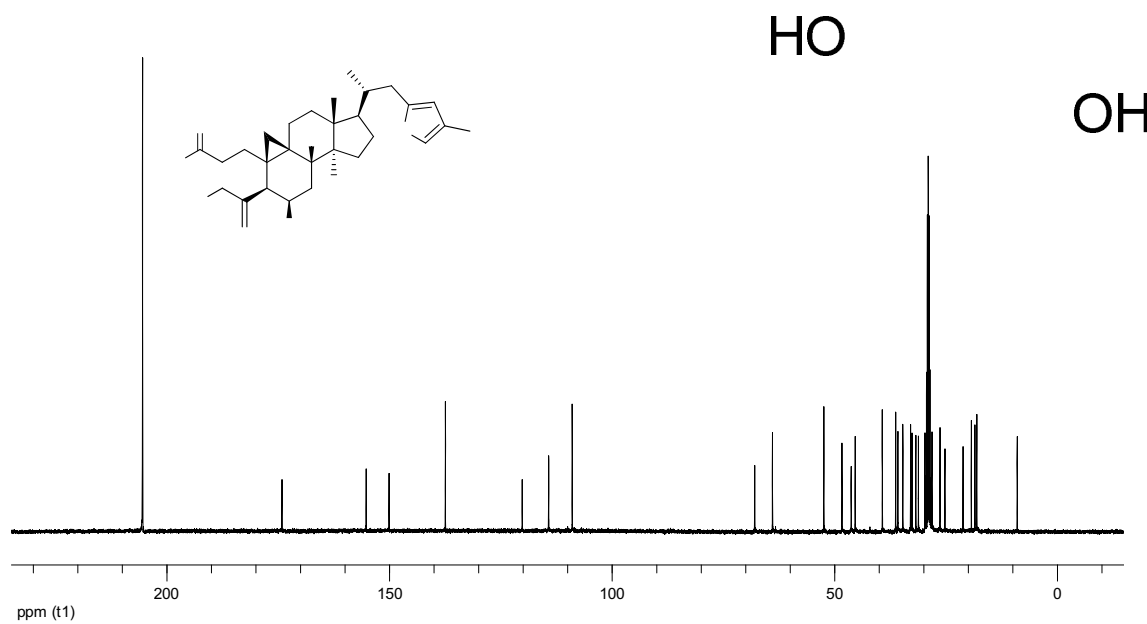


Figure S13. ^1H NMR spectrum of gardenoin G (**43**) (acetone- d_6 , 400 MHz)

O

H

HO



HO

OH

Figure S14. ^{13}C NMR spectrum of gardenoin G (**43**) (acetone- d_6 , 100 MHz)

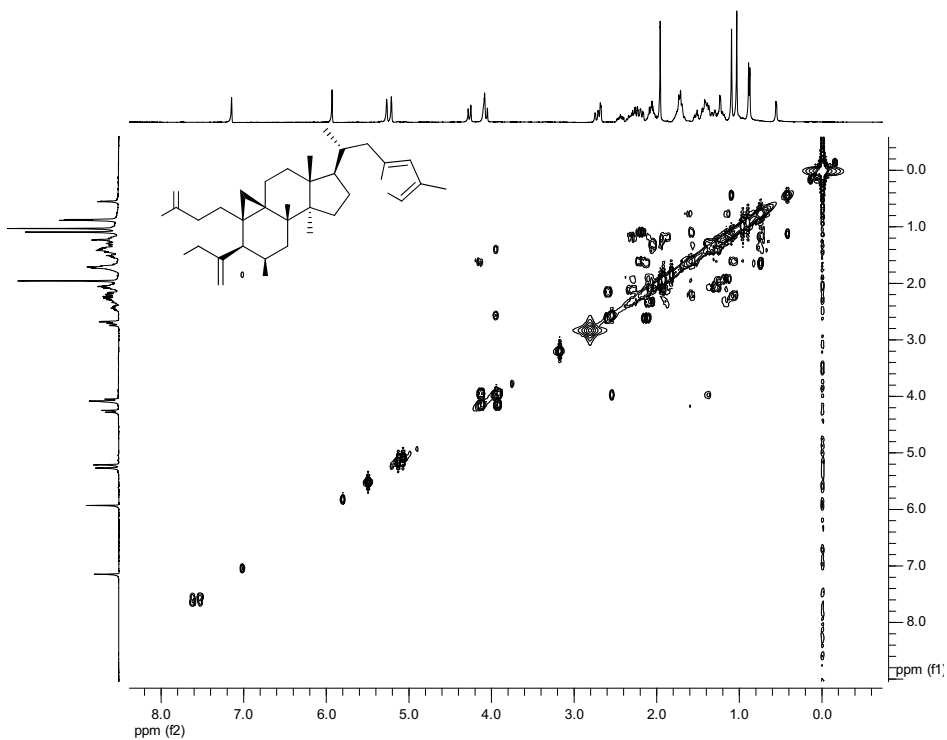


Figure S15. ^1H - ^1H COSY spectrum of gardenoin G (43) (acetone- d_6)

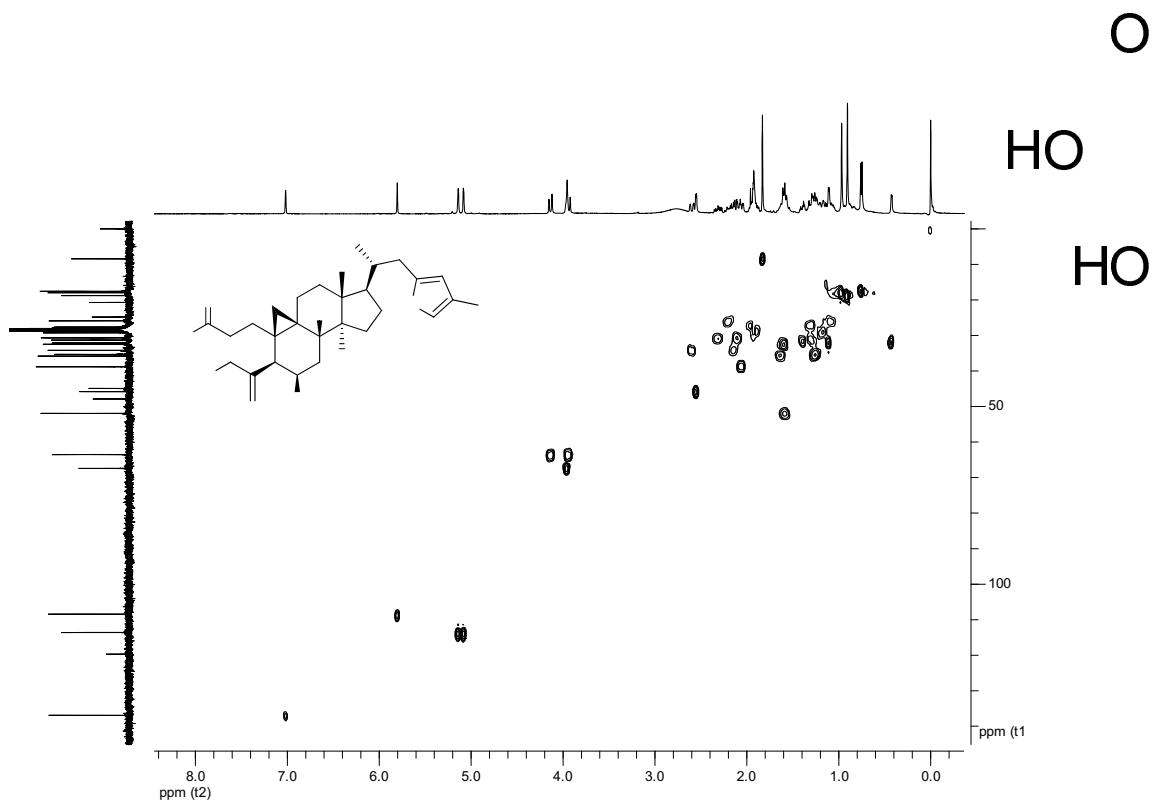


Figure S16. HSQC spectrum of gardenoin G (43) (acetone- d_6)

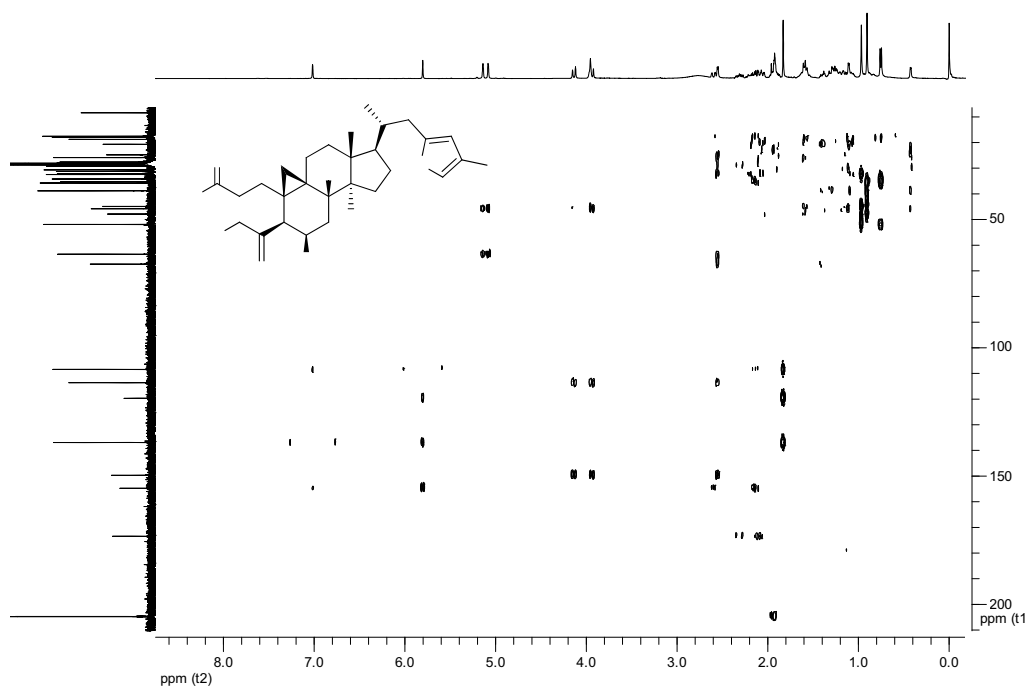


Figure S17. HMBC spectrum of gardenoin G (43) (acetone-d₆)

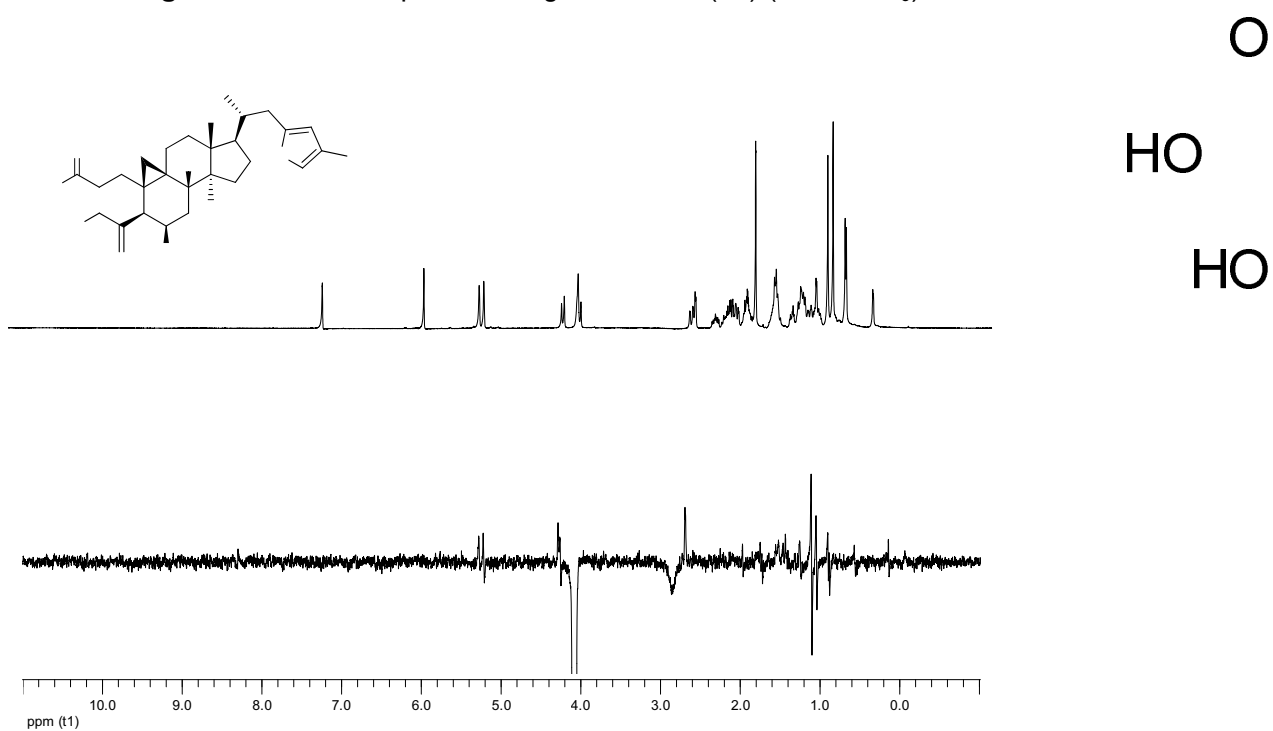


Figure S18. 1D NOE spectrum of gardenoin G (43) (acetone-d₆)

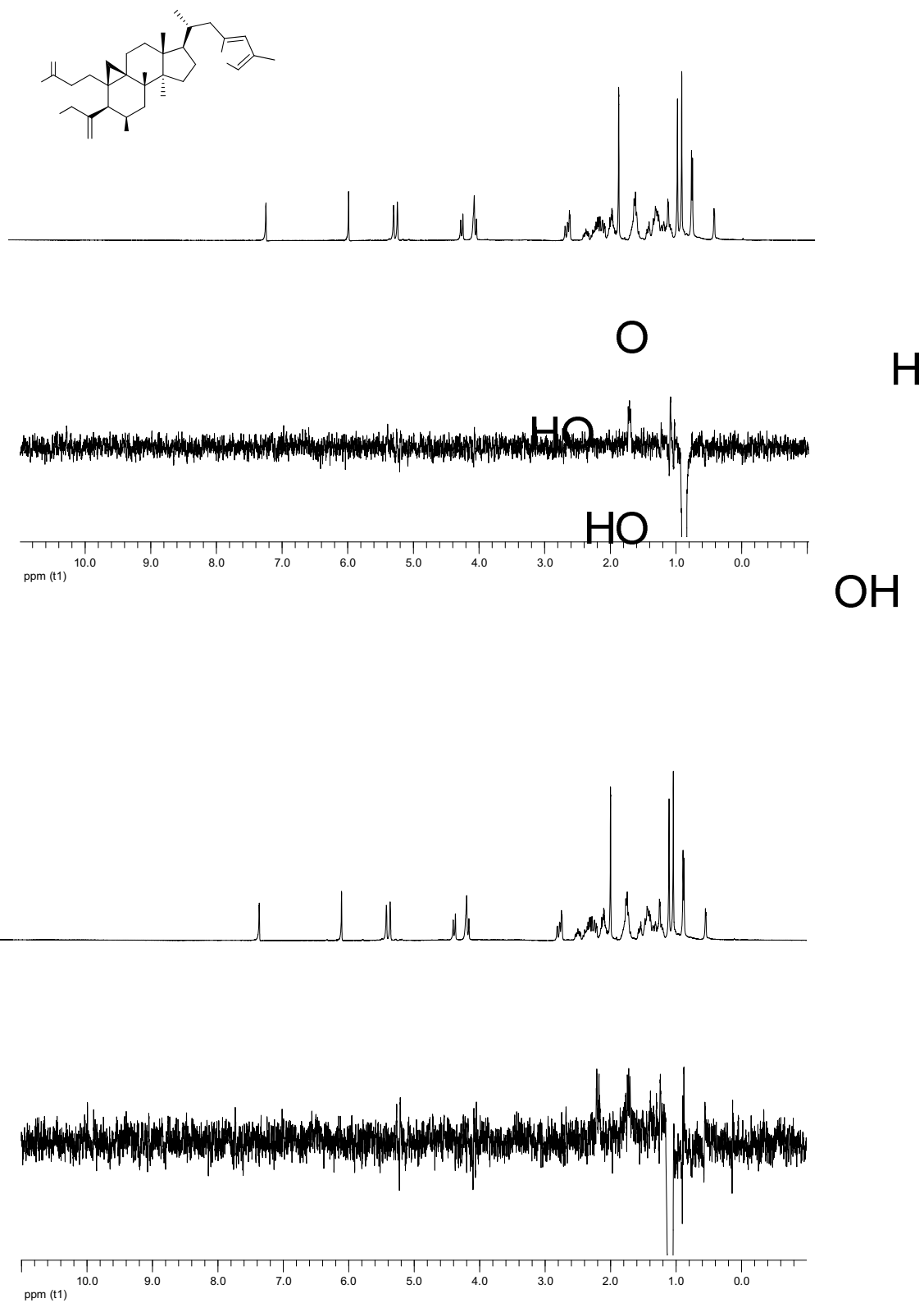


Figure S18. 1D NOE spectrum of gardenoin G (**43**) (acetone- d_6) (continue)

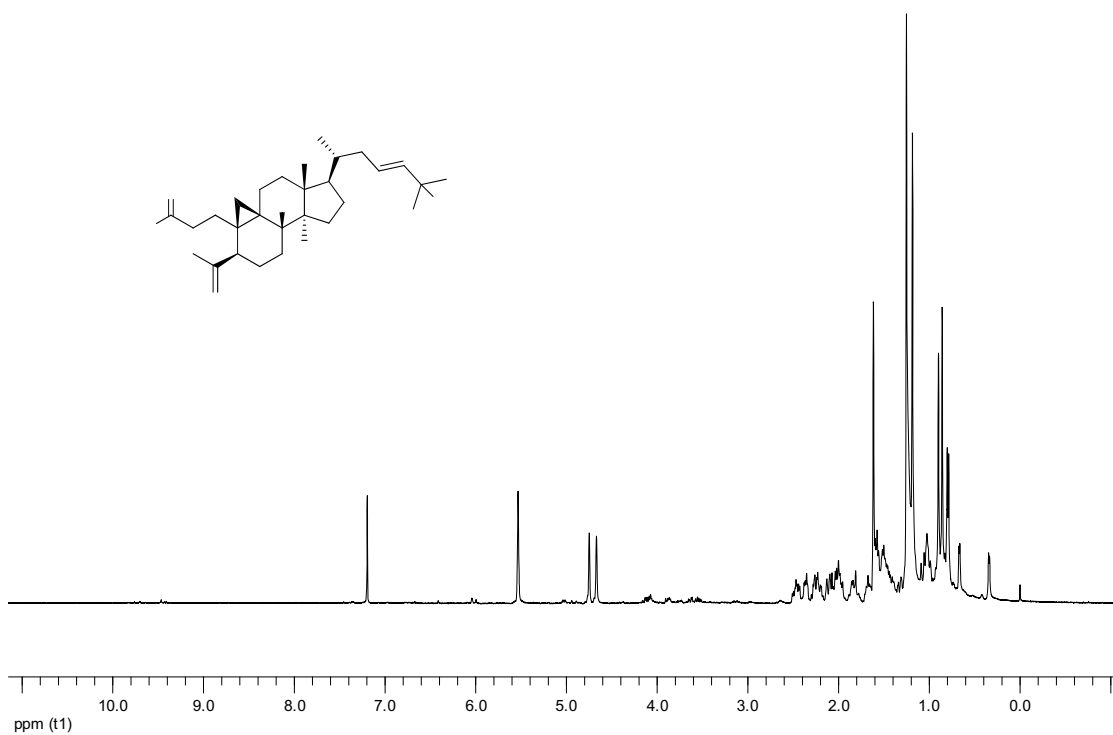


Figure S19. ^1H NMR spectrum of gardenoin H (**43**) (CDCl_3 , 400 MHz)

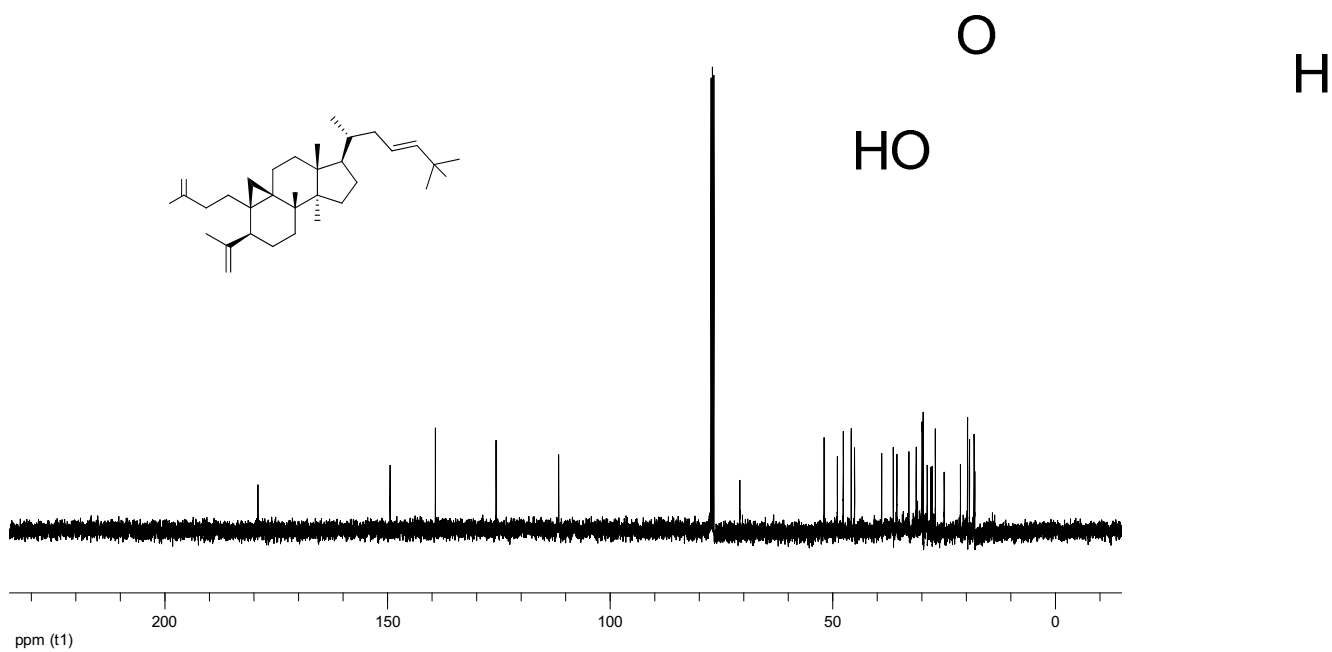


Figure S20. ^{13}C NMR spectrum of gardenoin H (**43**) (CDCl_3 , 100 MHz)

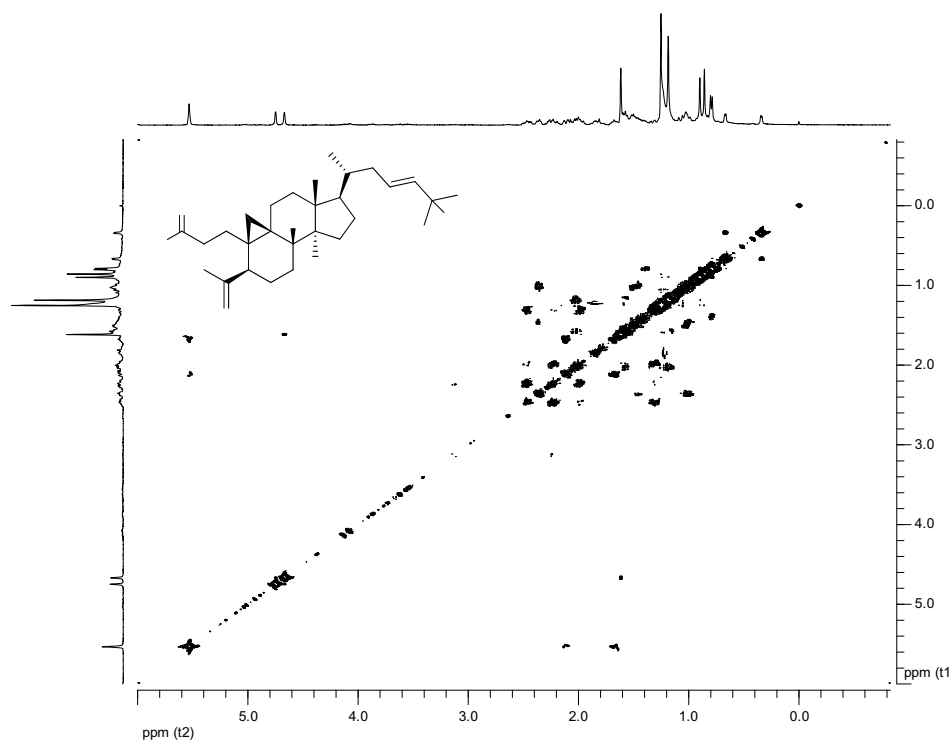


Figure S21. ^1H - ^1H COSY spectrum of gardenoin H (**44**) (CDCl_3)

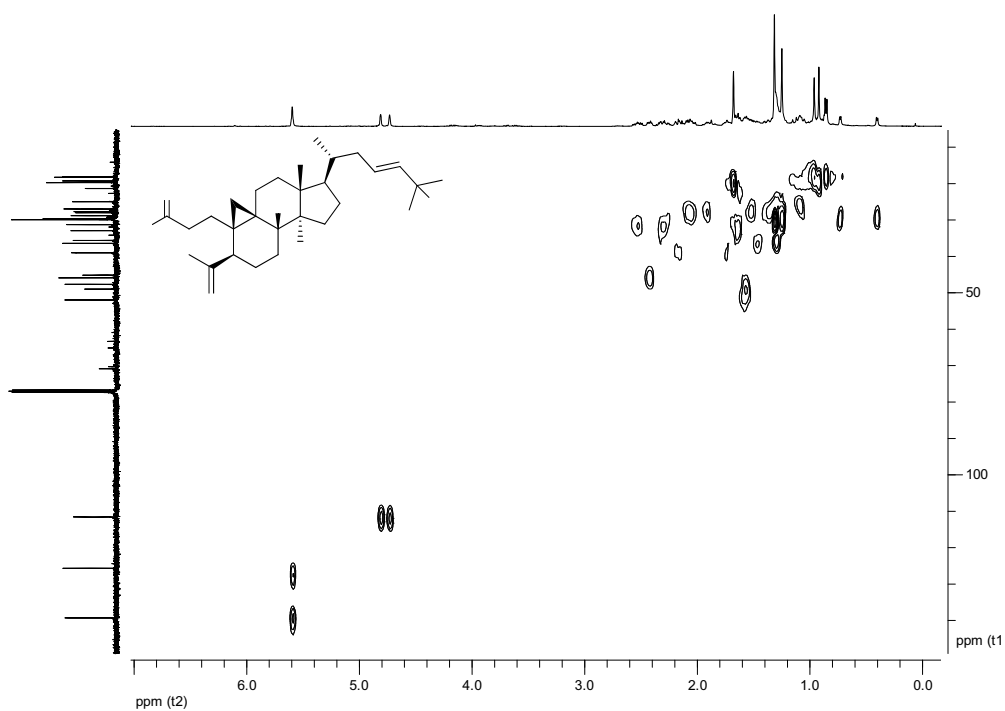


Figure S22. HSQC spectrum of gardenoin H (**44**) (CDCl_3)

O
HO

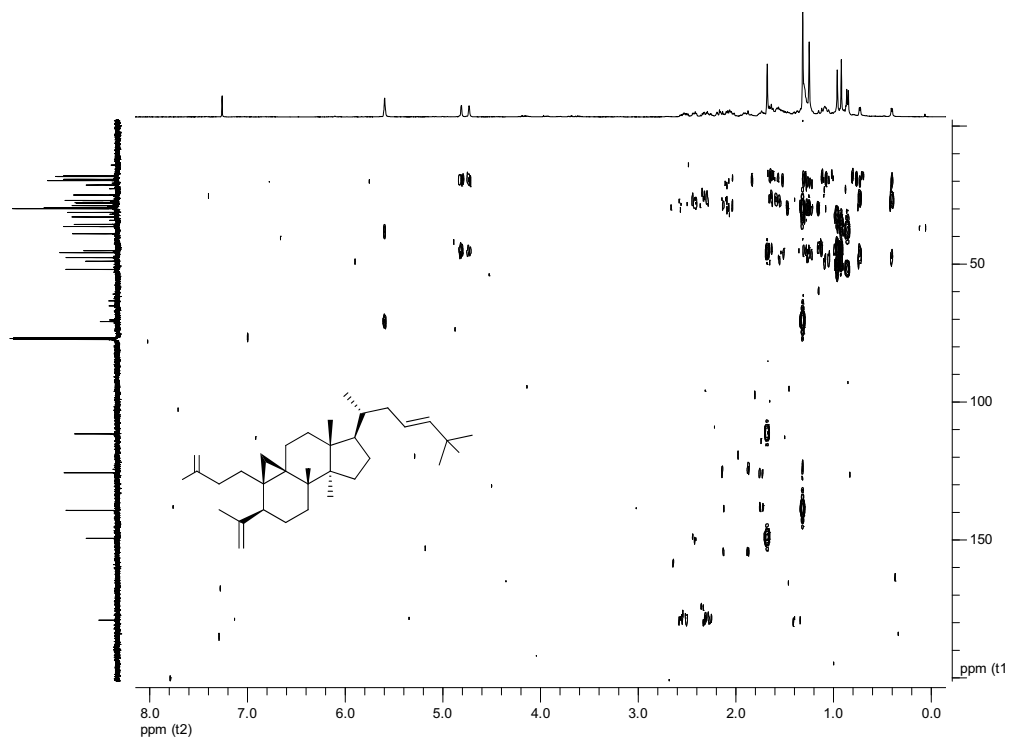


Figure S23. HMBC spectrum of gardenoin H (44) (CDCl_3)

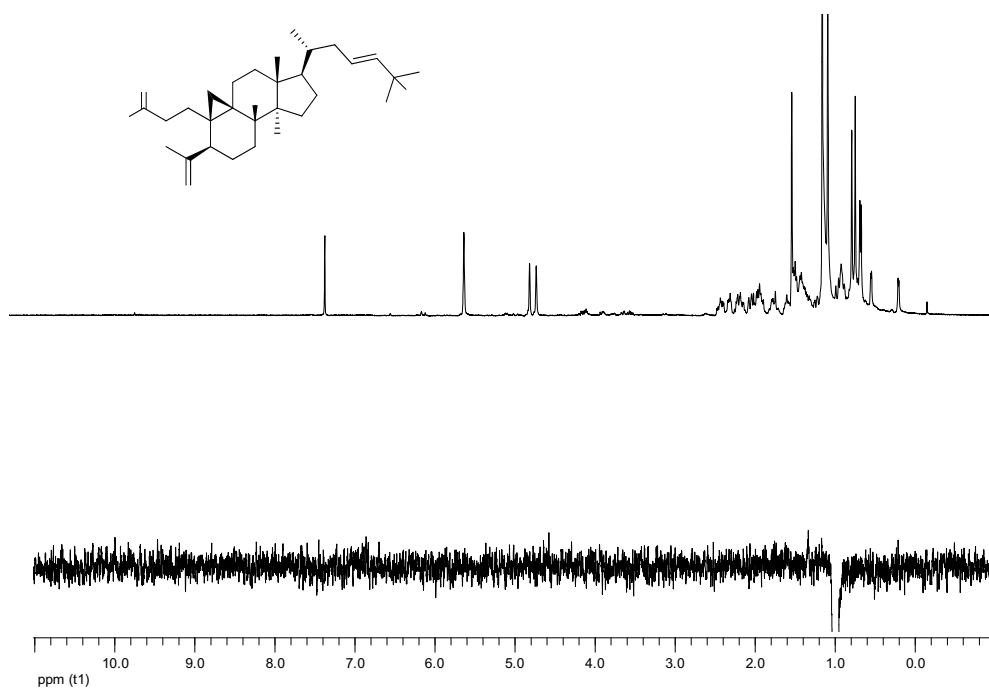


Figure S24. 1D NOE spectrum of gardenoin H (44) (CDCl_3)

O

HO

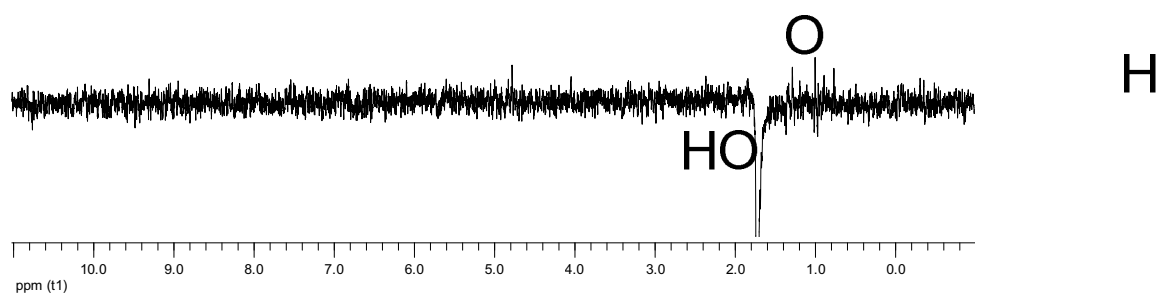
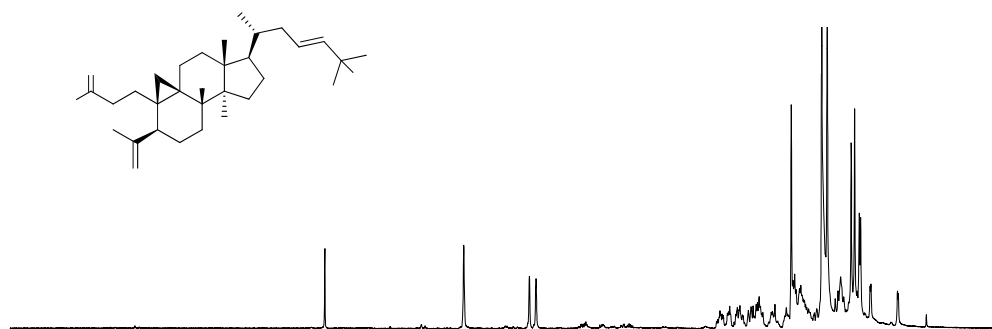


Figure S24. 1D NOE spectrum of gardenoin H (**44**) (CDCl_3) (continue)

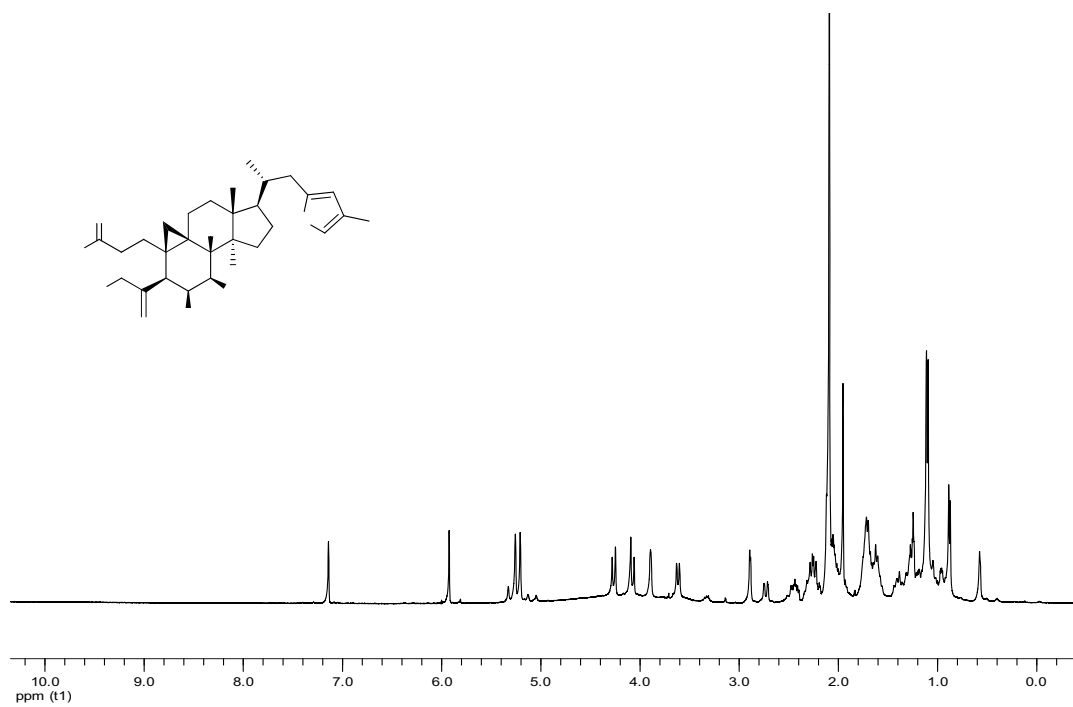


Figure S25. ^1H NMR spectrum of dikamakiartane A (**45**) (acetone-d_6 , 400 MHz)

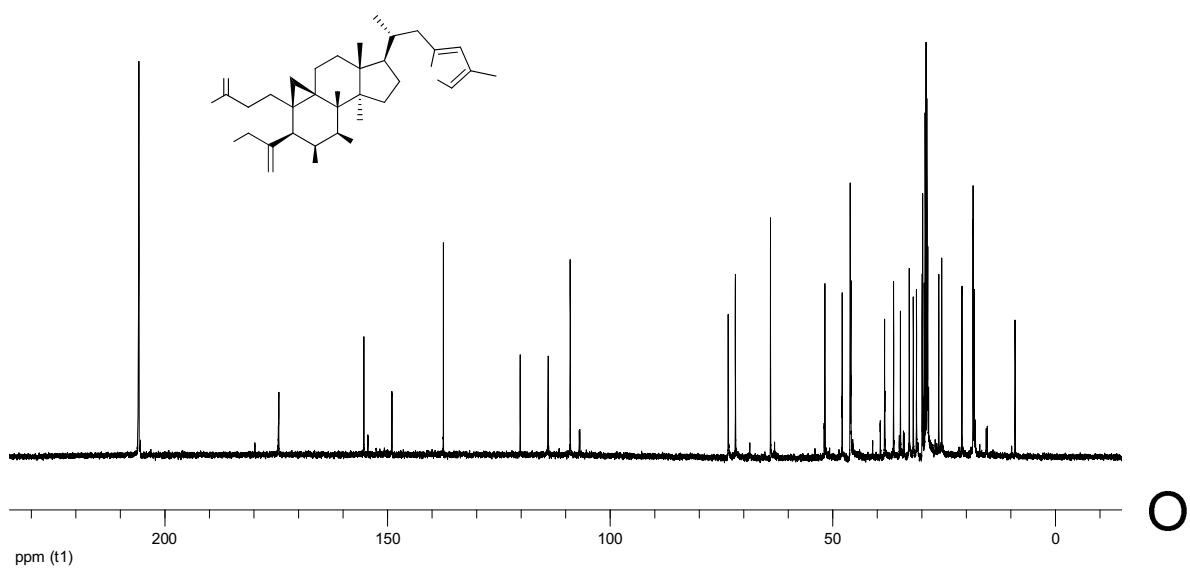


Figure S26. ^{13}C NMR spectrum of dikamakiartane A (**45**) (acetone- d_6 , 100 MHz)

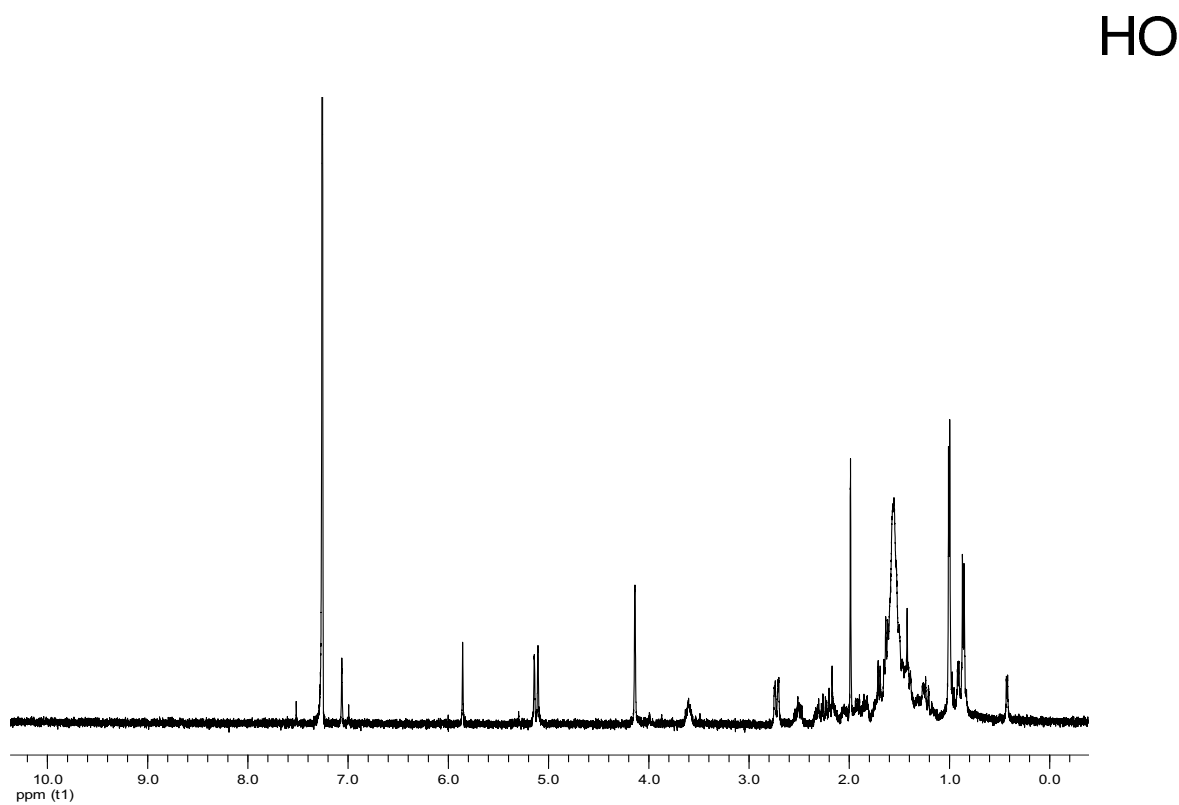


Figure S27. ^1H NMR spectrum of dikamakiartane C (**46**) (acetone- d_6 , 400 MHz)

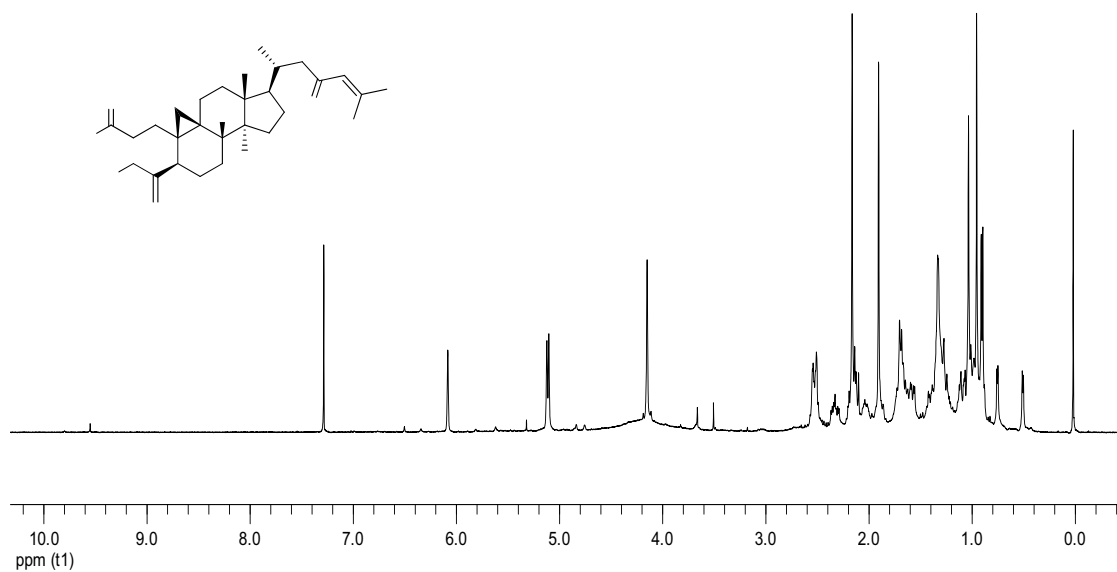


Figure S28. ¹H NMR spectrum of dikamakiartane D (47) (CDCl₃, 400 MHz)

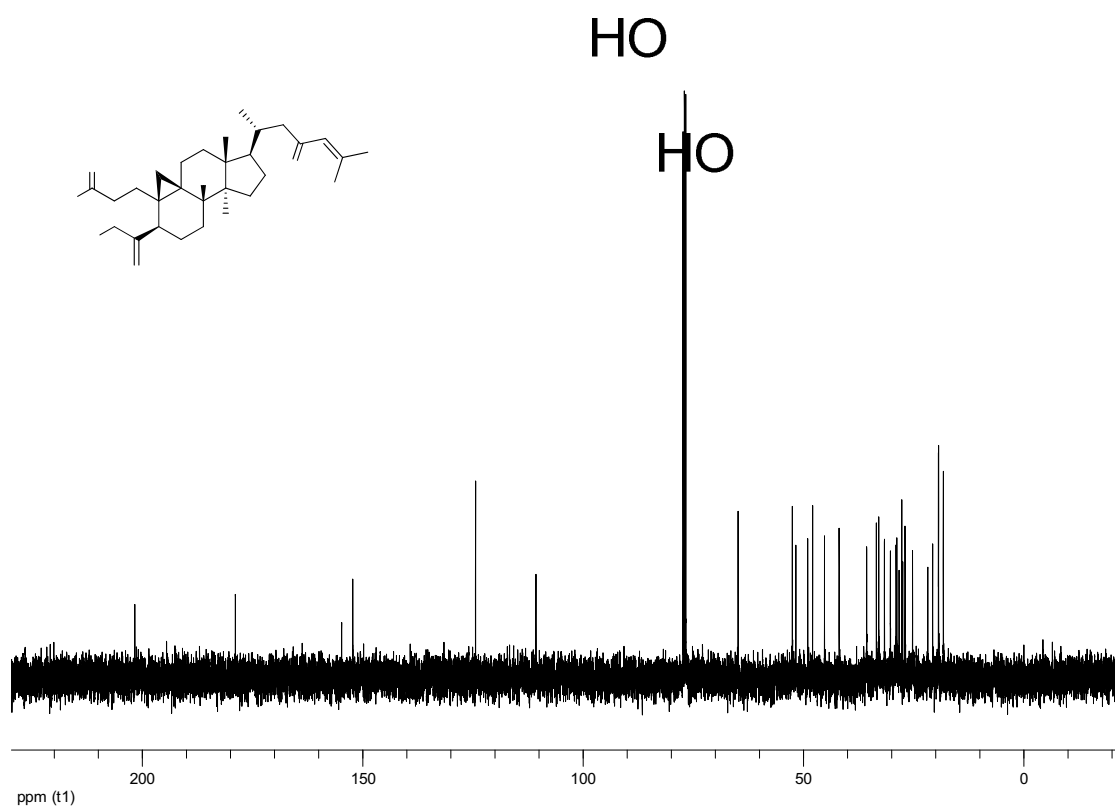


Figure S29. ¹³C NMR spectrum of dikamakiartane D (47) (CDCl₃, 100 MHz)

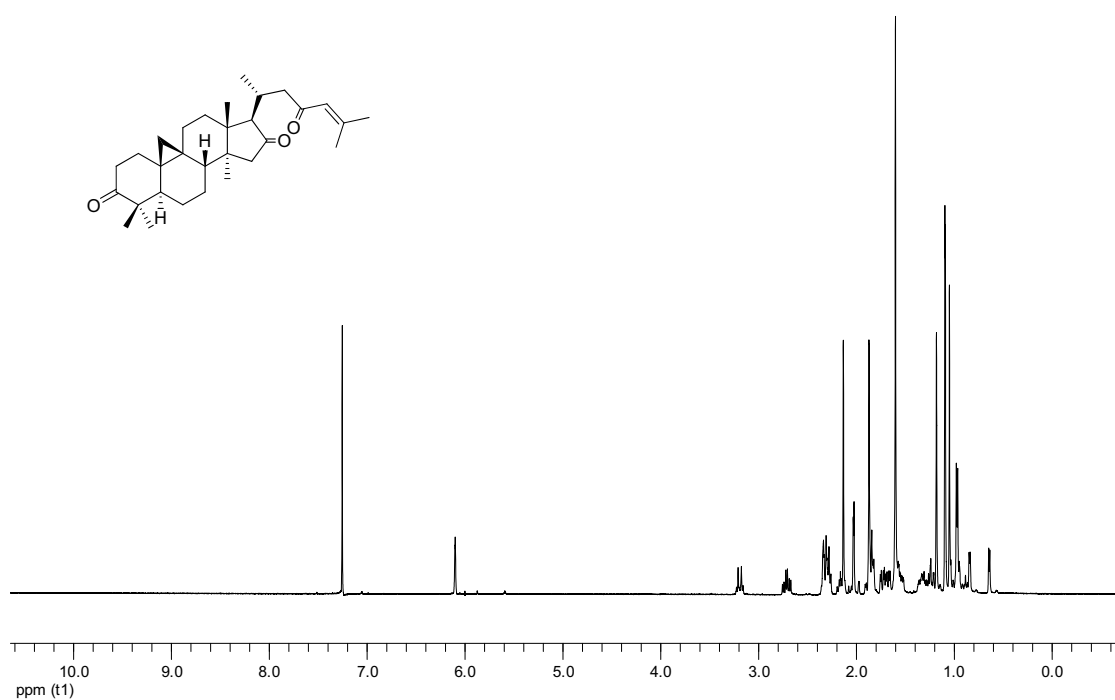


Figure S30. ¹H NMR spectrum of 5 α -cycloart-24-ene-3,16,23-trione (**48**) (CDCl₃, 400 MHz)

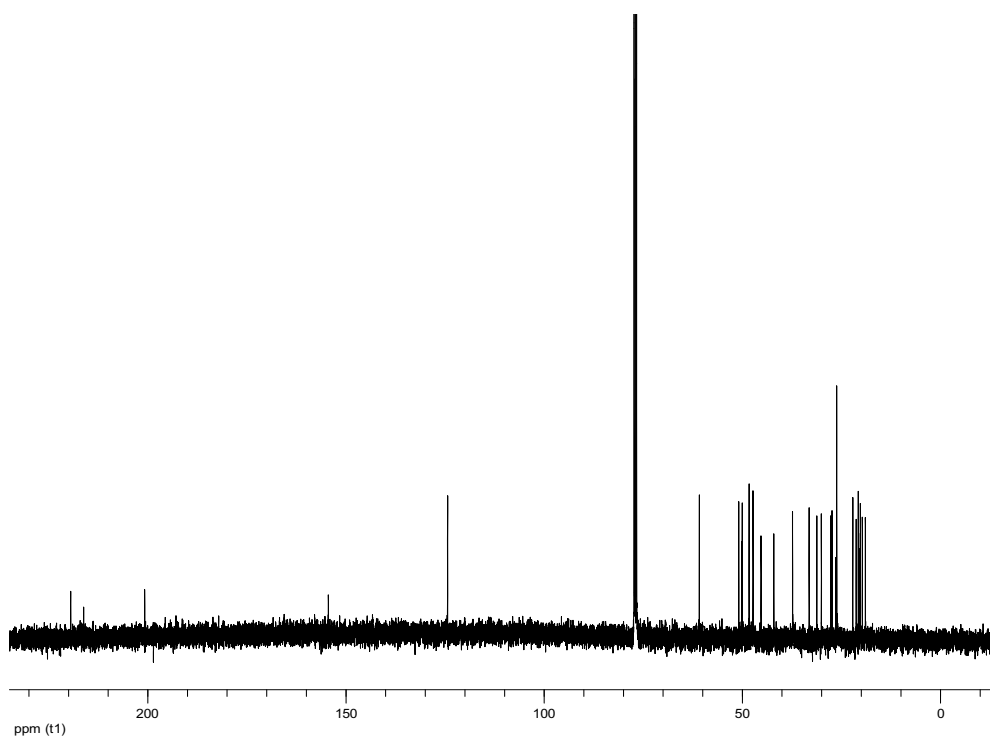


Figure S31. ¹³C NMR spectrum of 5 α -cycloart-24-ene-3,16,23-trione (**48**) (CDCl₃, 100 MHz)

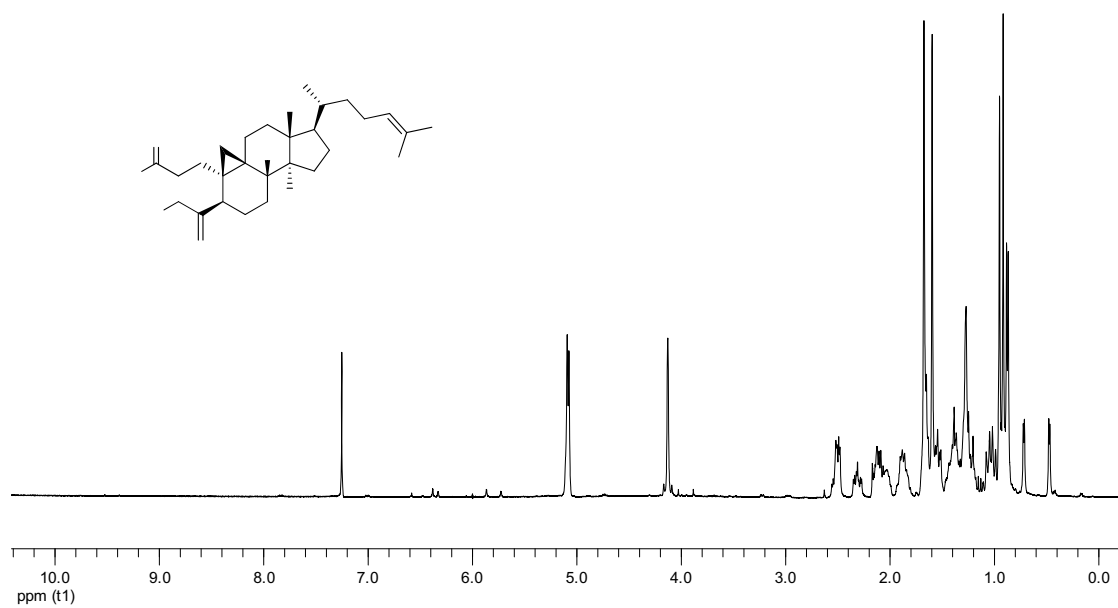


Figure S32. ^1H NMR spectrum of secaubryenol (**27**) (CDCl_3 , 400 MHz)

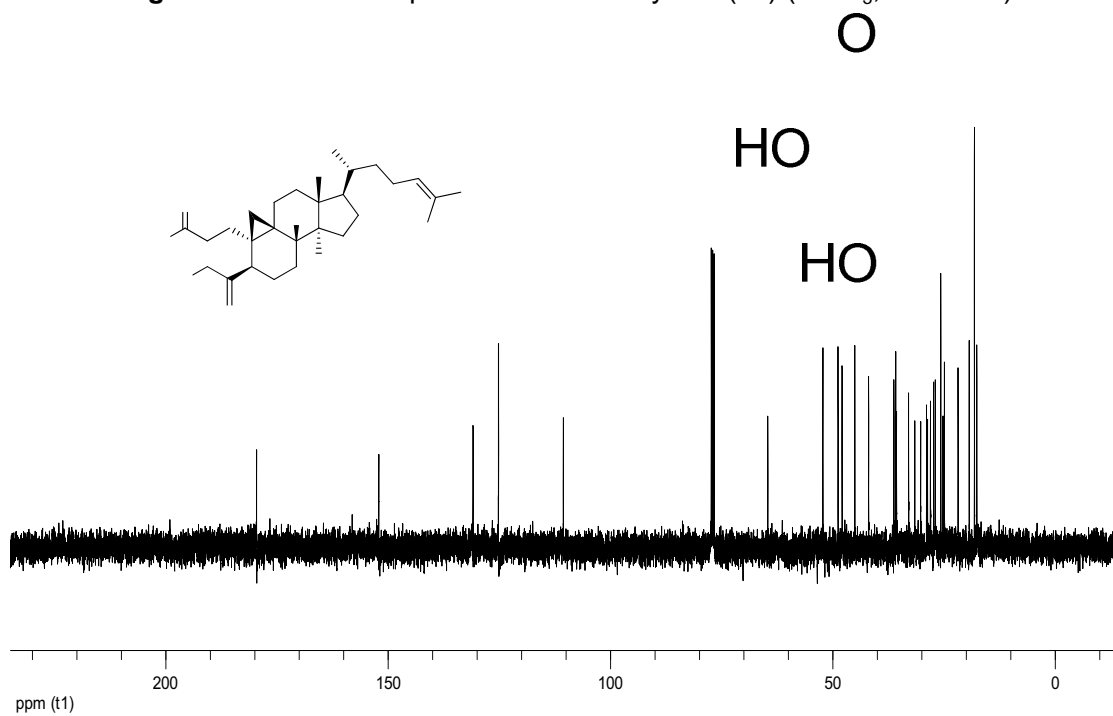


Figure S33. ^{13}C NMR spectrum of secaubryenol (**27**) (CDCl_3 , 100 MHz)

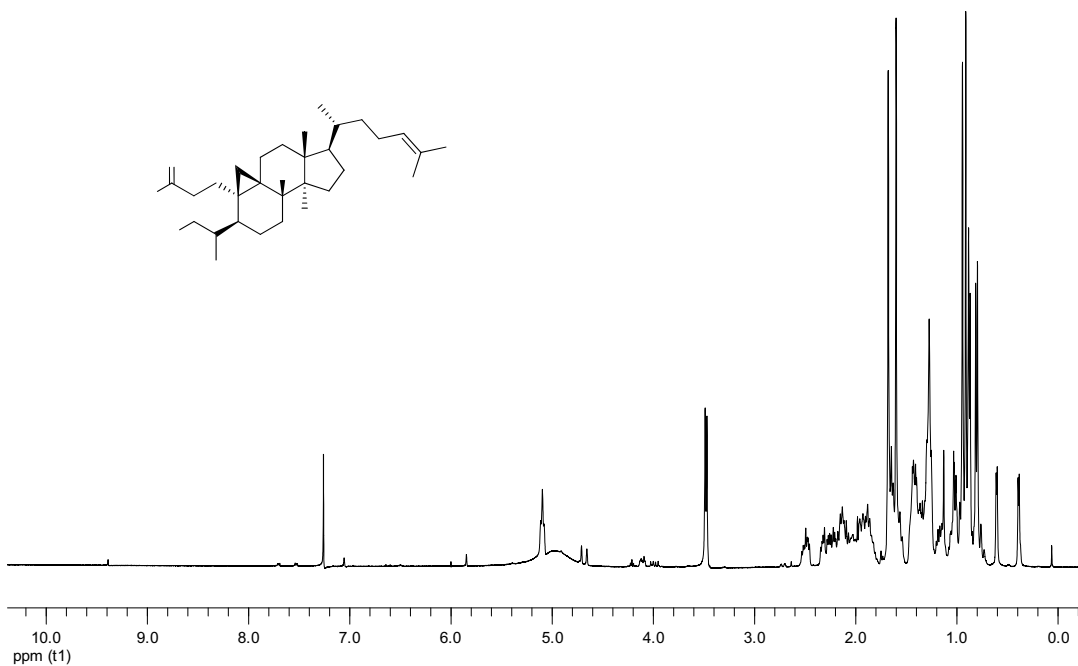


Figure S34. ^1H NMR spectrum of gardenoin I (**49**) (CDCl_3 , 400 MHz)

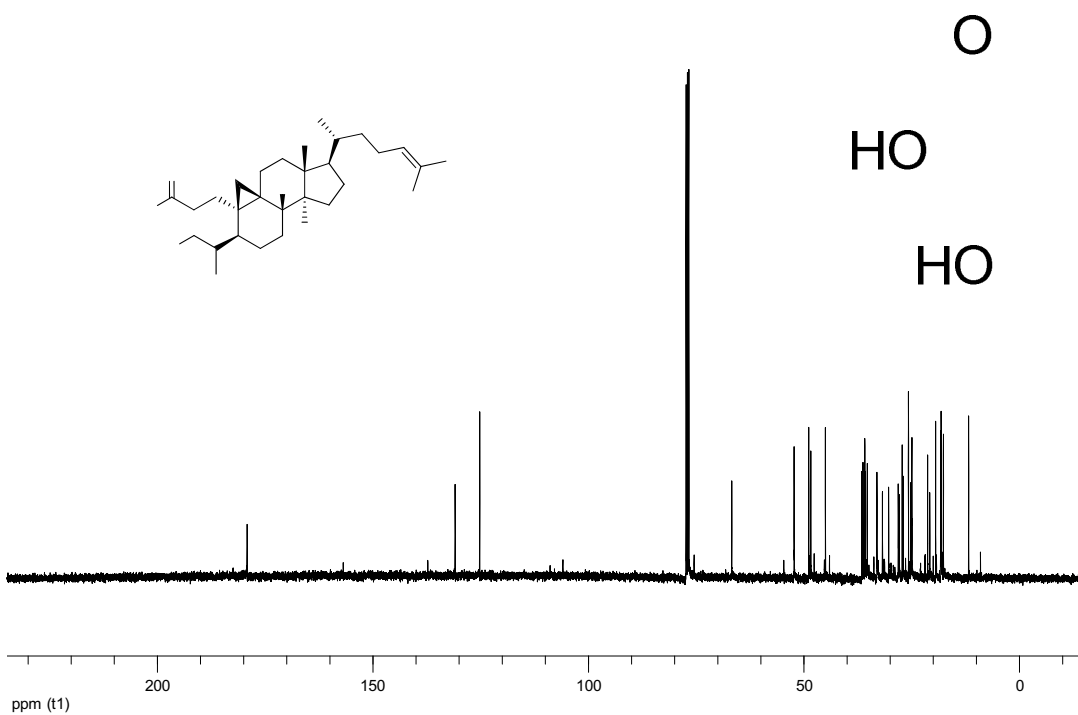


Figure S35. ^{13}C NMR spectrum of gardenoin I (**49**) (CDCl_3 , 100 MHz)

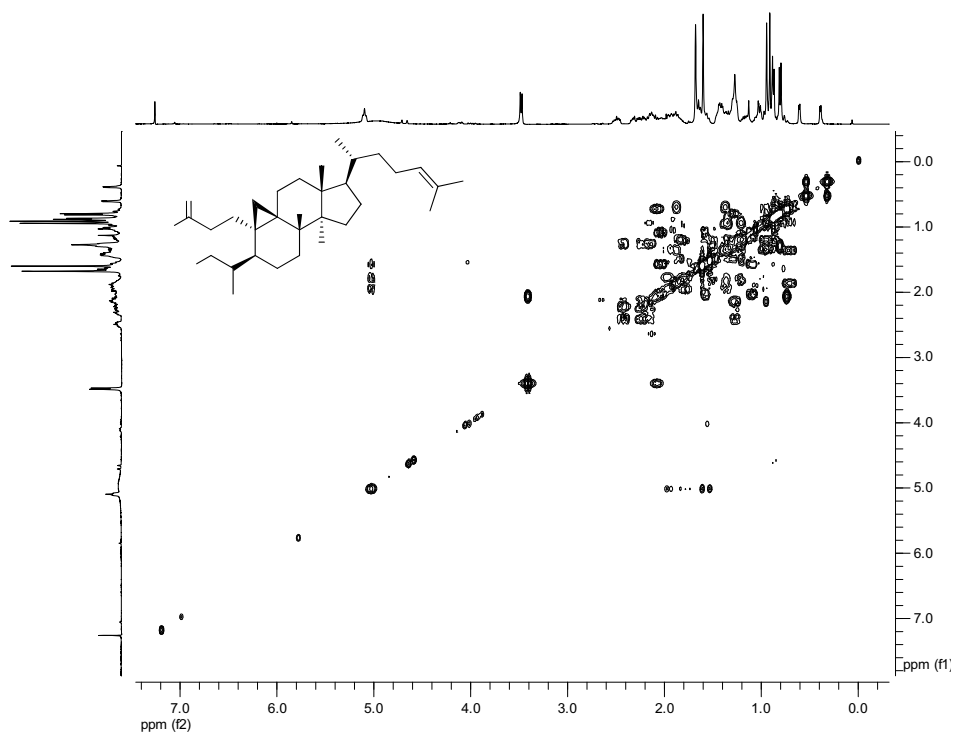


Figure S36. ^1H - ^1H COSY spectrum of gardenoin I (**49**) (CDCl_3)

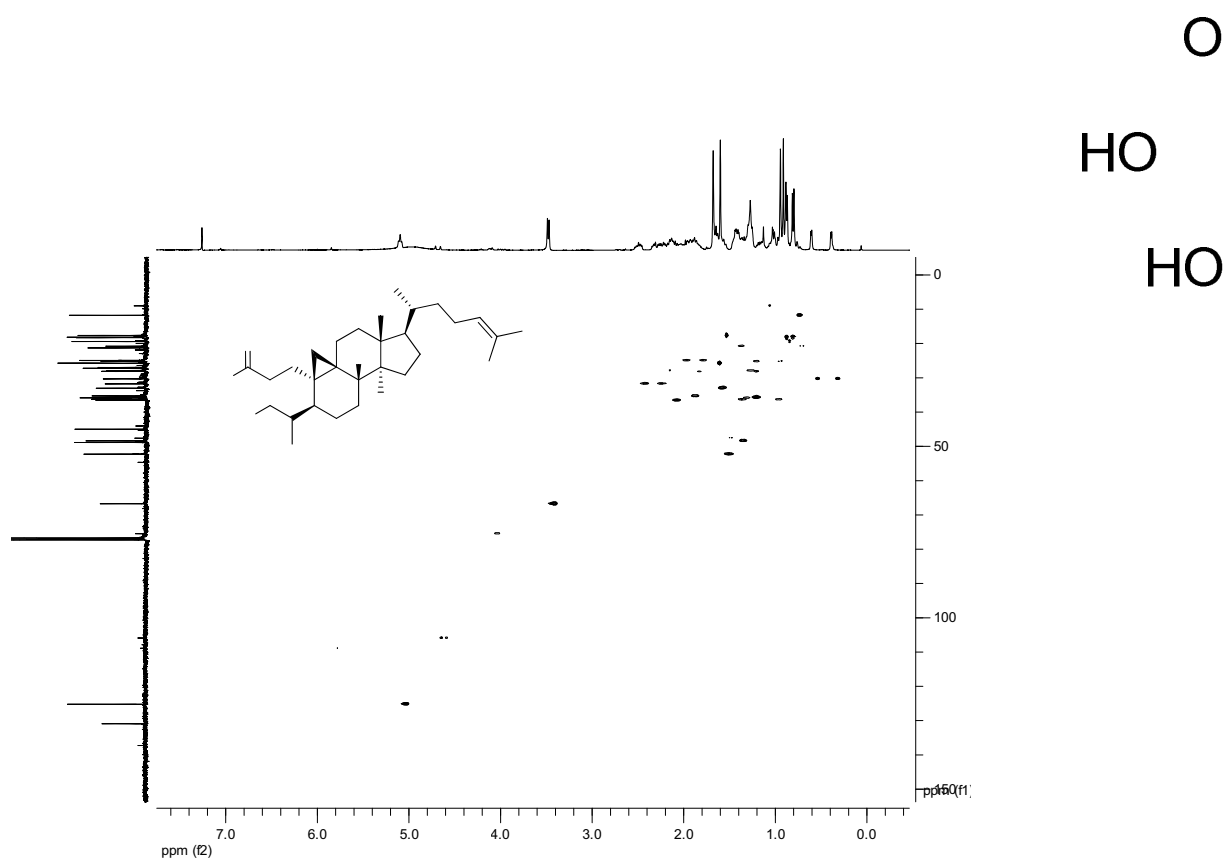


Figure S37. HSQC spectrum of gardenoin I (**49**) (CDCl_3)

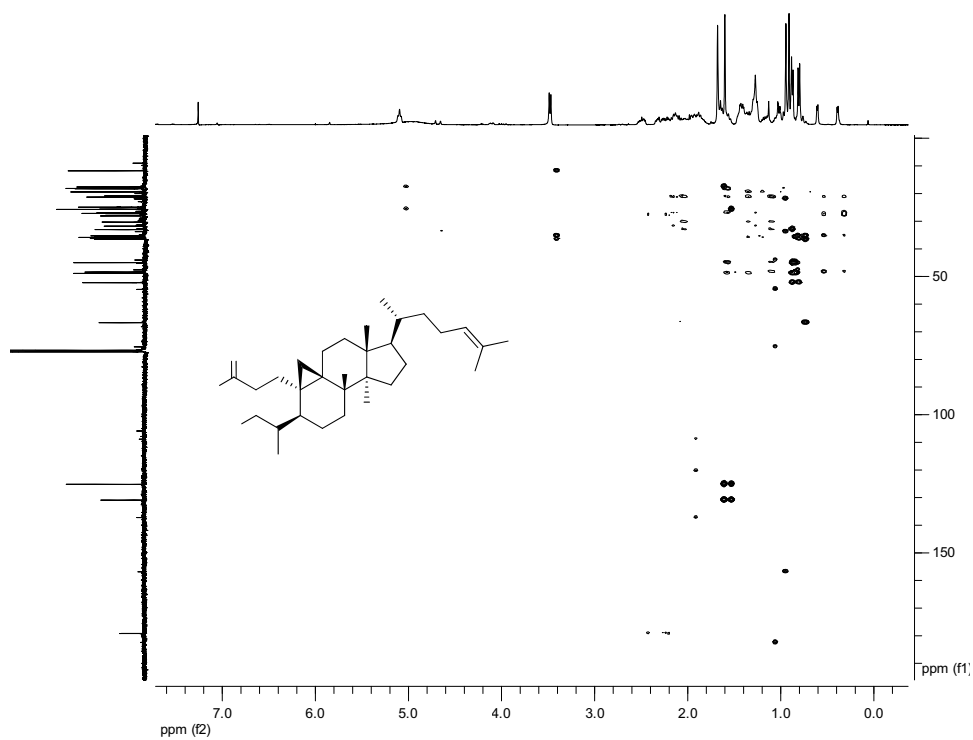


Figure S38. HMBC spectrum of gardenoin I (**49**) (CDCl₃)

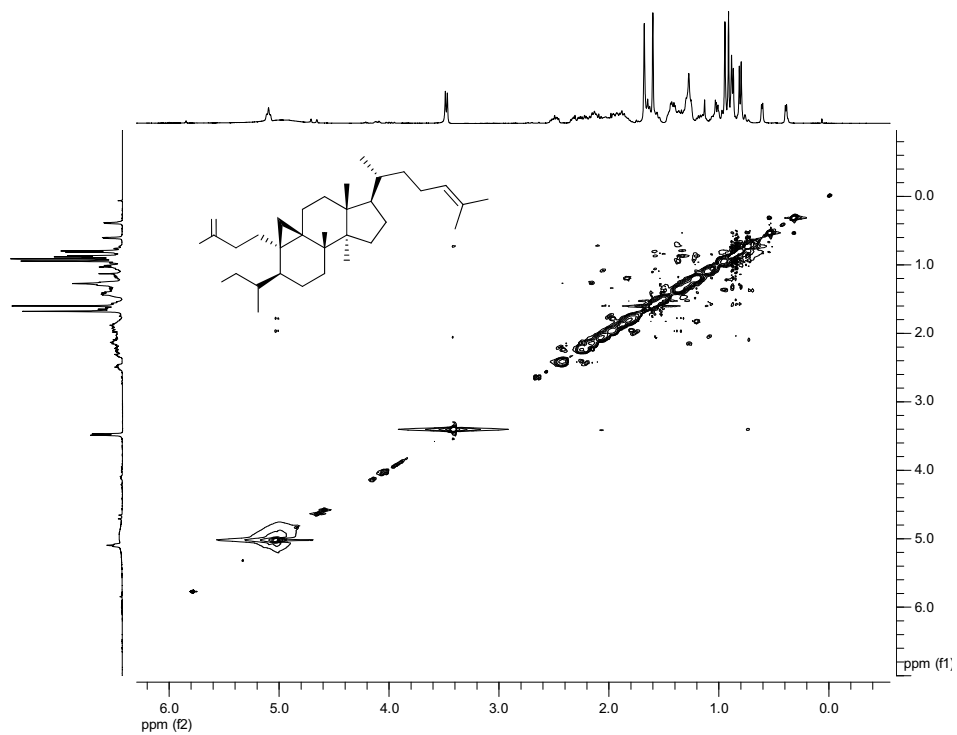


Figure S39. NOESY spectrum of gardenoin I (**49**) (CDCl₃)

O
HO
HO

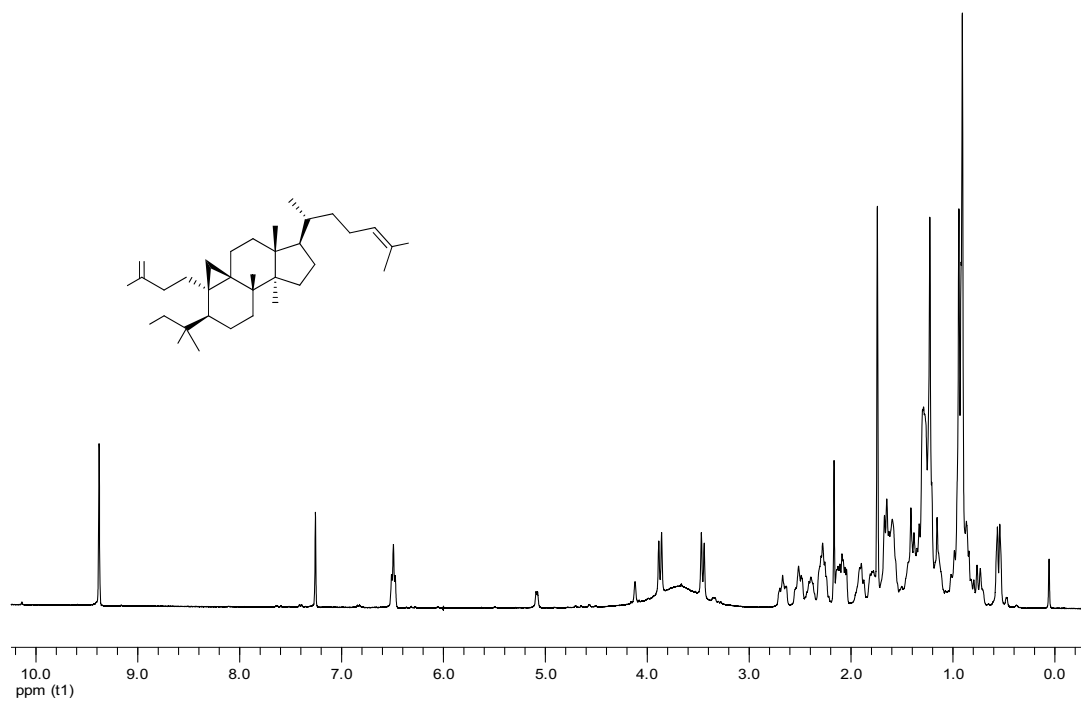


Figure S40. ¹H NMR spectrum of gardenoin J (**50**) (CDCl₃, 400 MHz)

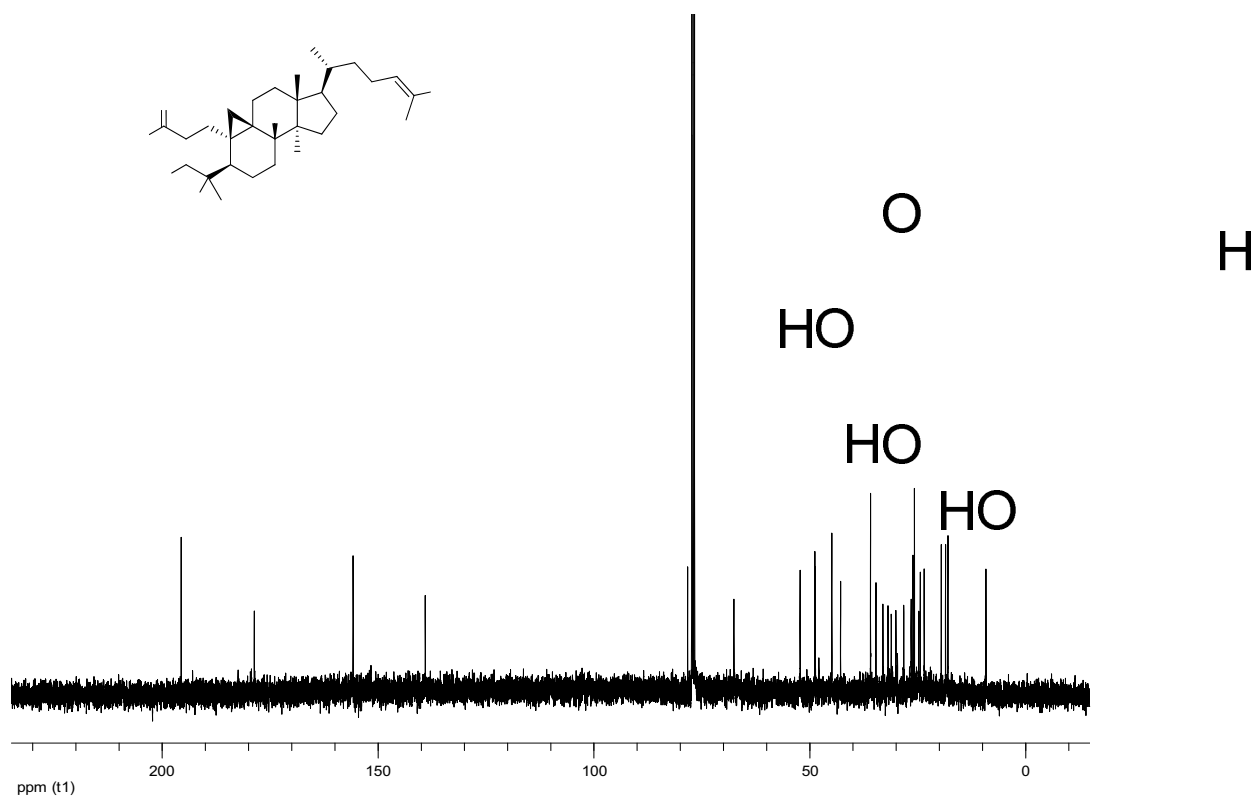


Figure S41. ¹³C NMR spectrum of gardenoin J (**50**) (CDCl₃, 400 MHz)

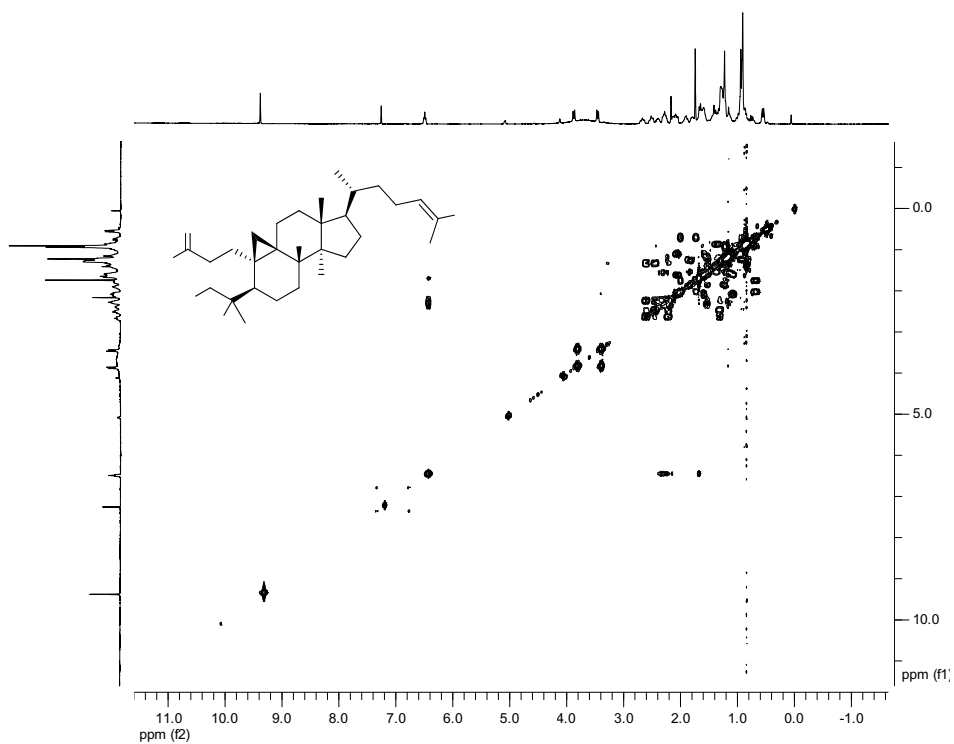


Figure S42. ^1H - ^1H COSY spectrum of gardenoin J (**50**) (CDCl_3)

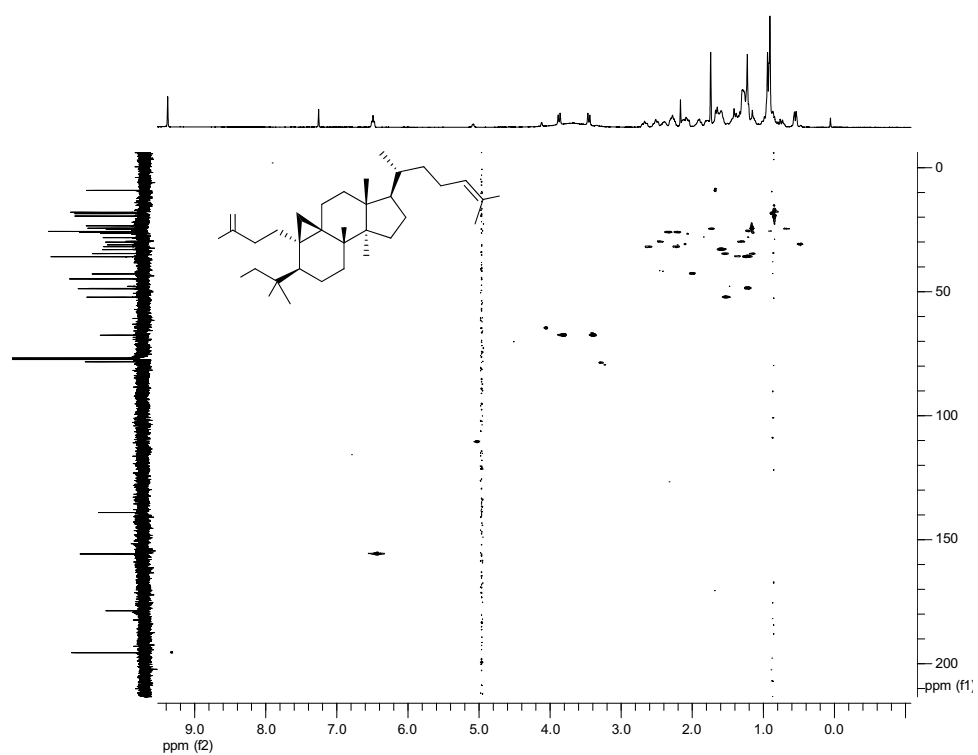
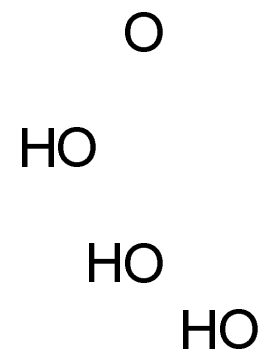


Figure S43. HSQC spectrum of gardenoin J (**50**) (CDCl_3)



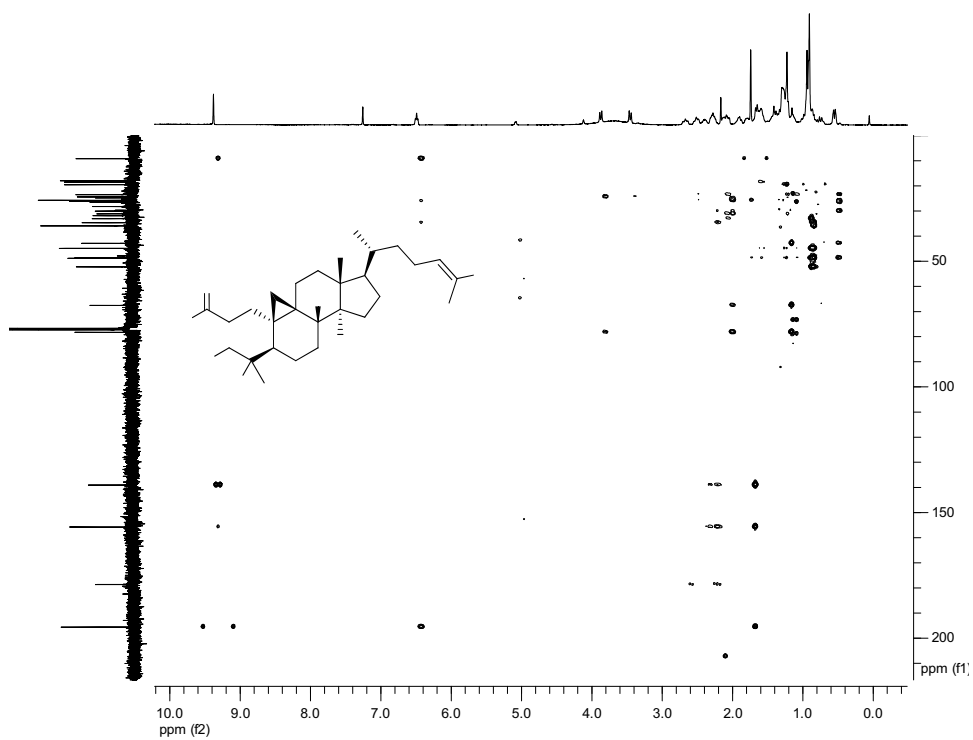


Figure S44. HMBC spectrum of gardenoin J (**50**) (CDCl_3)

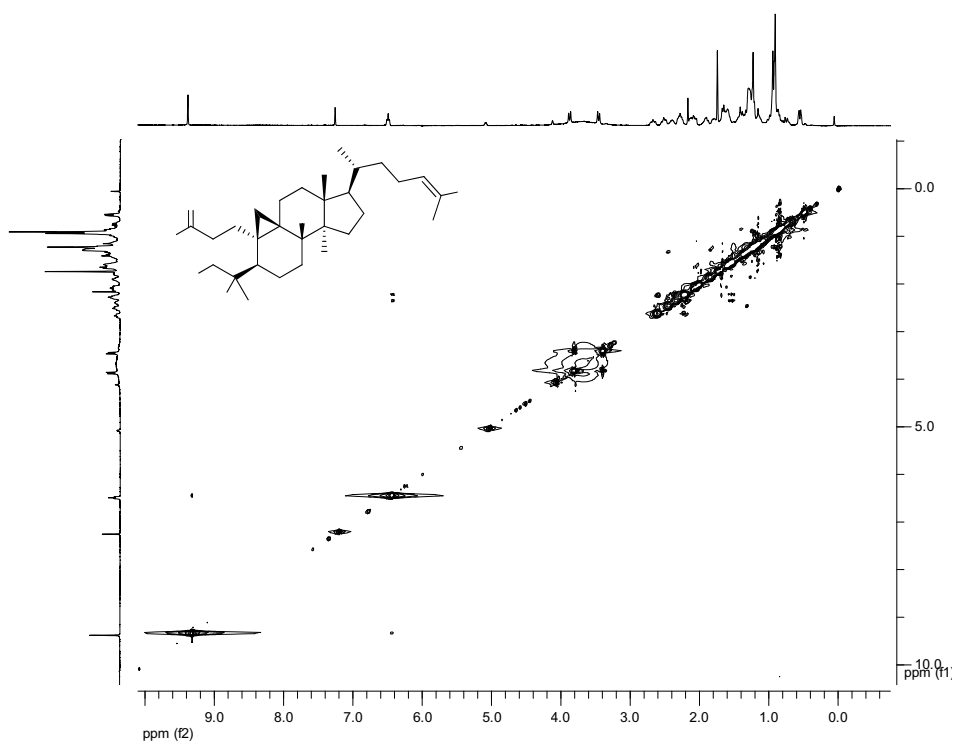


Figure S45. NOESY spectrum of gardenoin J (**50**) (CDCl_3)

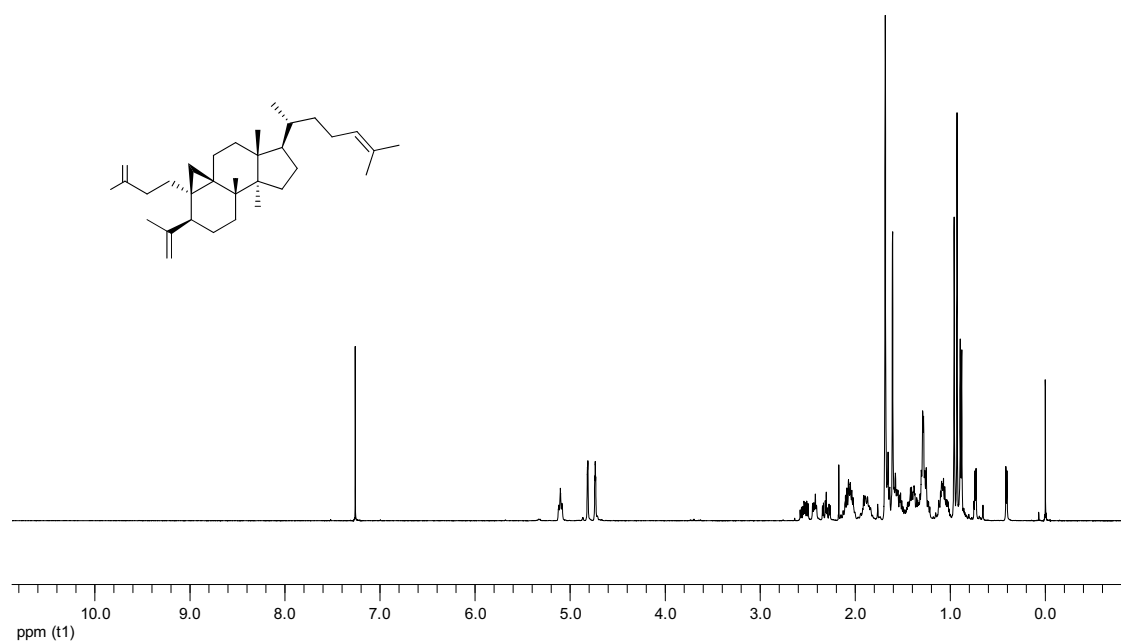


Figure S46. ¹H NMR spectrum of sootepin E (34) (CDCl₃, 400 MHz)

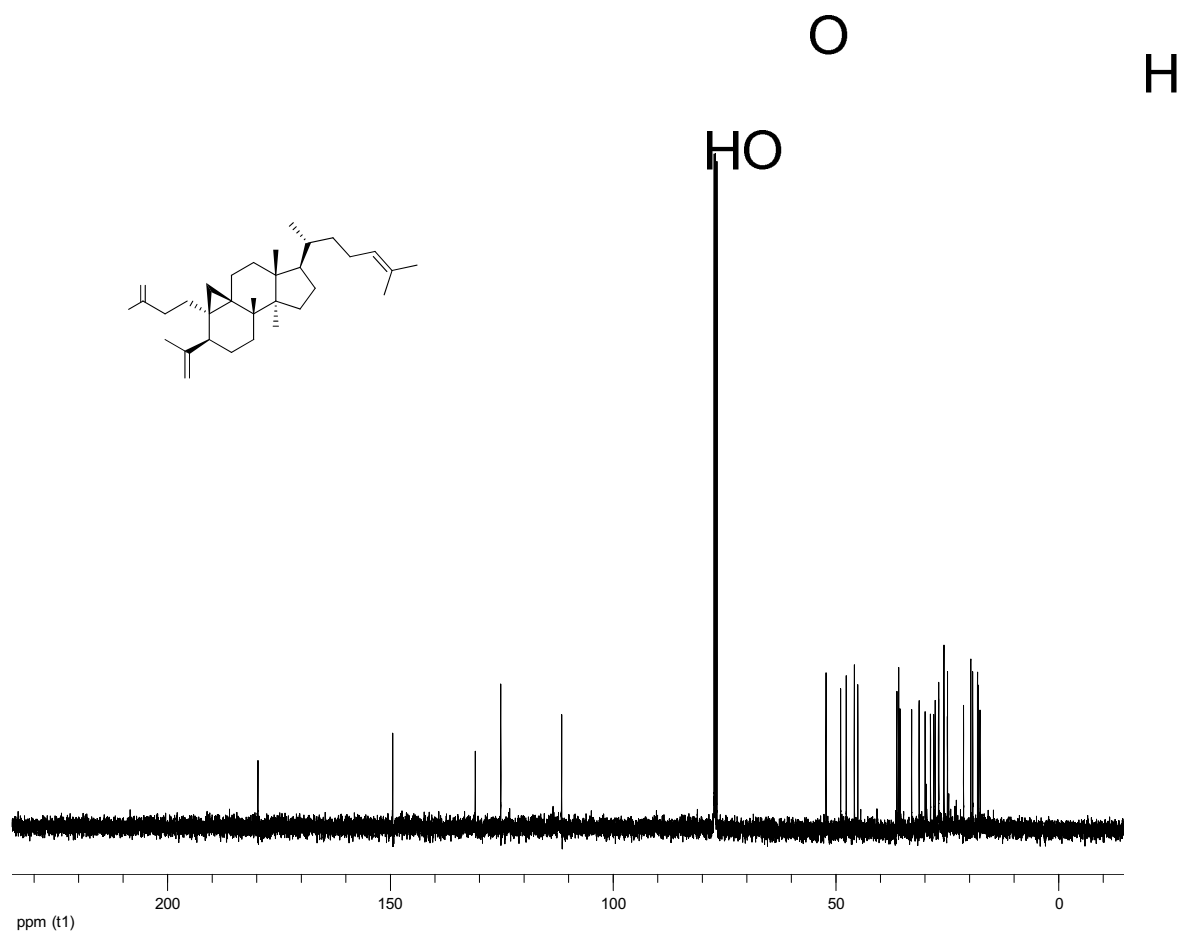


Figure S47. ¹³C NMR spectrum of sootepin E (34) (CDCl₃, 100 MHz)

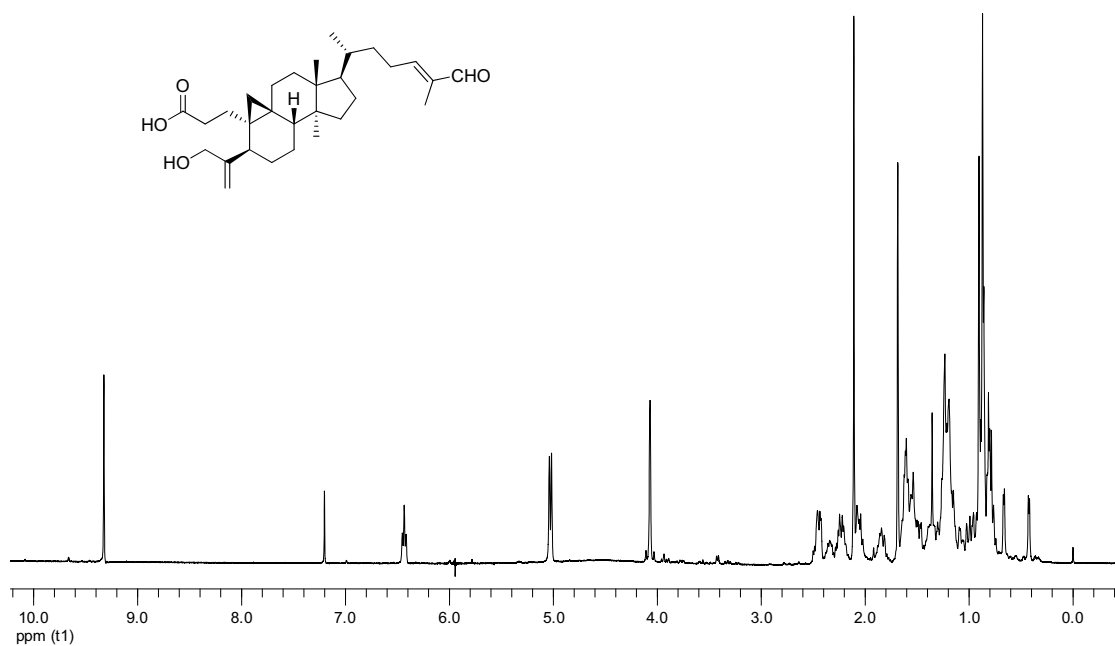


Figure S48. ¹H NMR spectrum of coronalioic acid (**51**) (CDCl₃, 400 MHz)

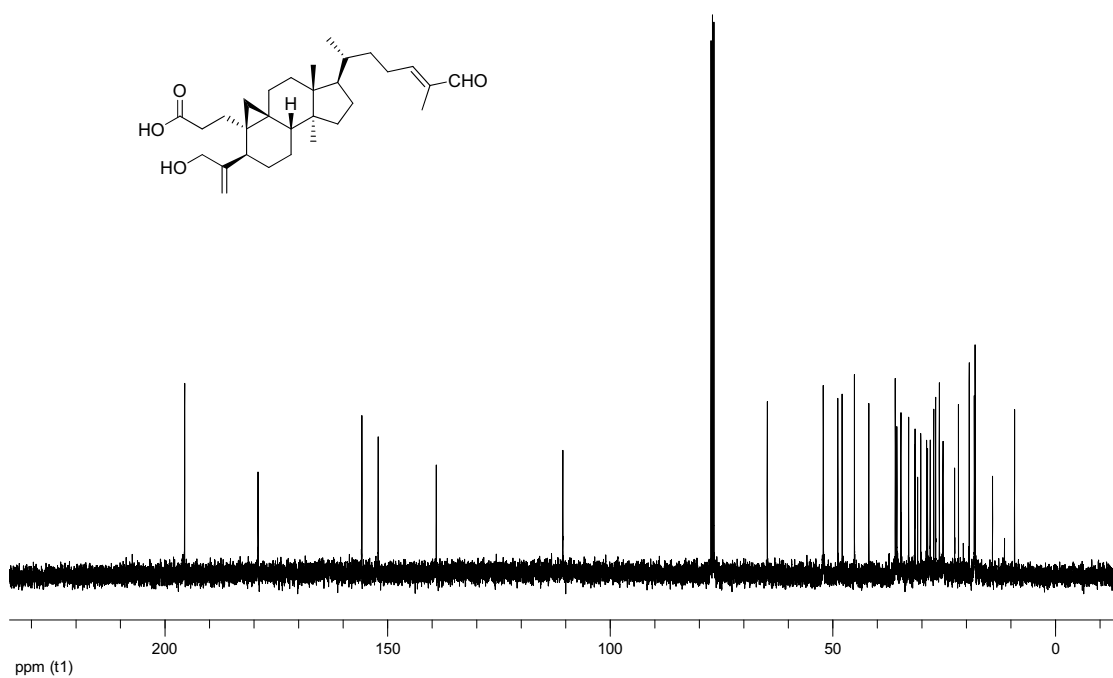


Figure S49. ¹³C NMR spectrum of coronalioic acid (**51**) (CDCl₃, 100 MHz)

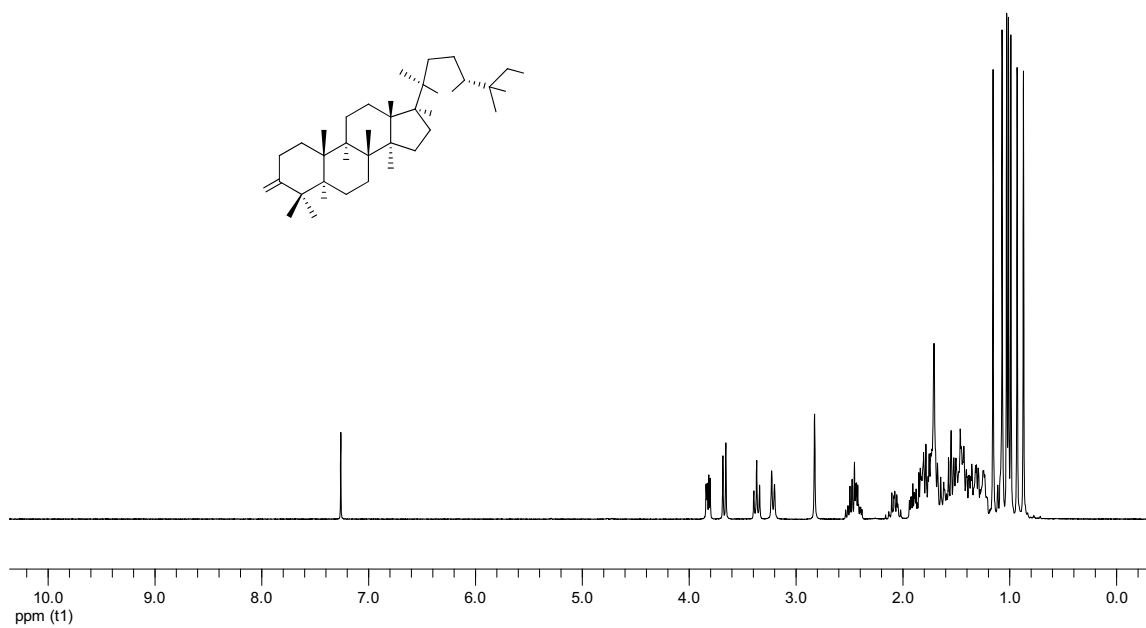


Figure S50. ¹H NMR spectrum of (20R,24R)-epoxy-3-oxo-dammarane-25E,26-diol (**52**) (CDCl₃, 400 MHz)

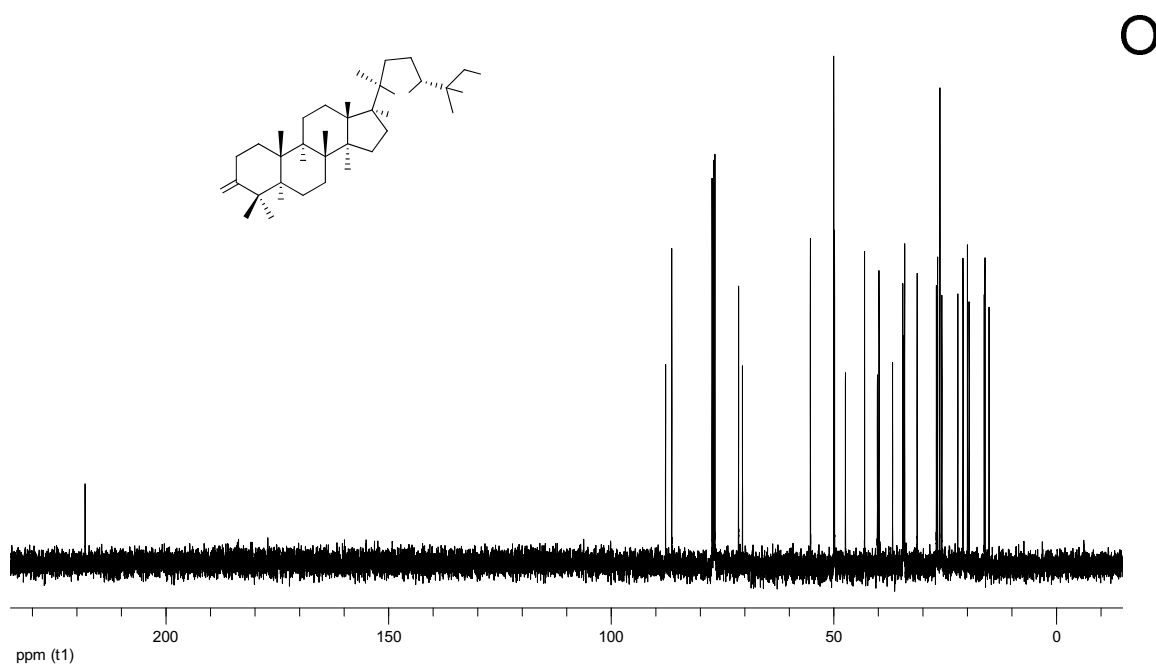


Figure S51. ¹³C NMR spectrum of (20R,24R)-epoxy-3-oxo-dammarane-25E,26-diol (**52**) (CDCl₃, 400 MHz)

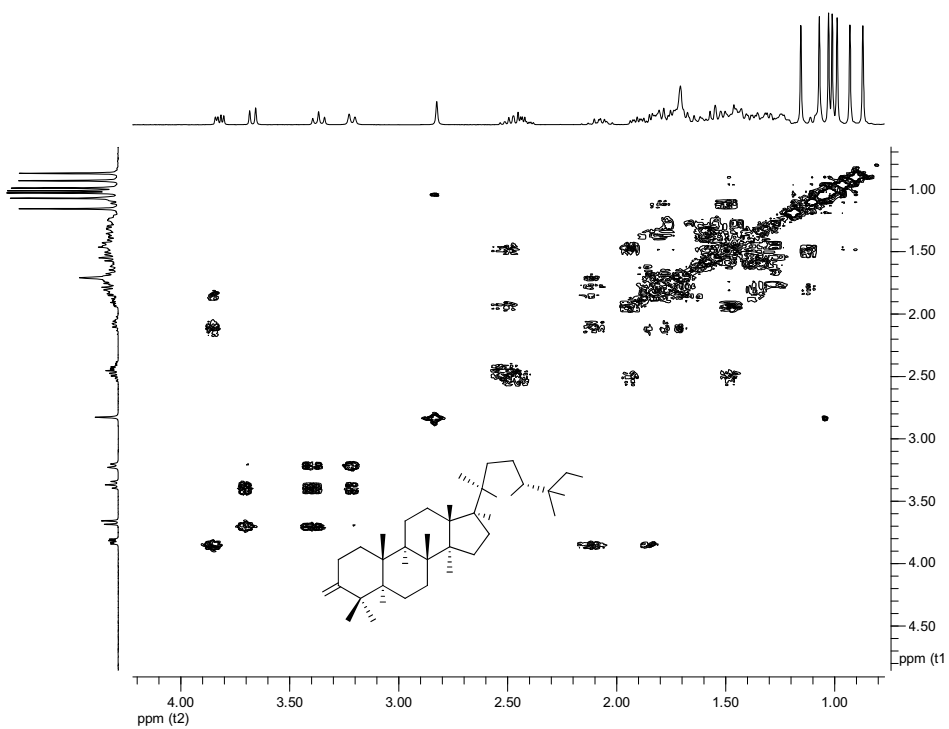


Figure S52. ^1H - ^1H COSY spectrum of (20*R*,24*R*)-epoxy-3-oxo-dammarane-25*E*,26-diol (**52**)

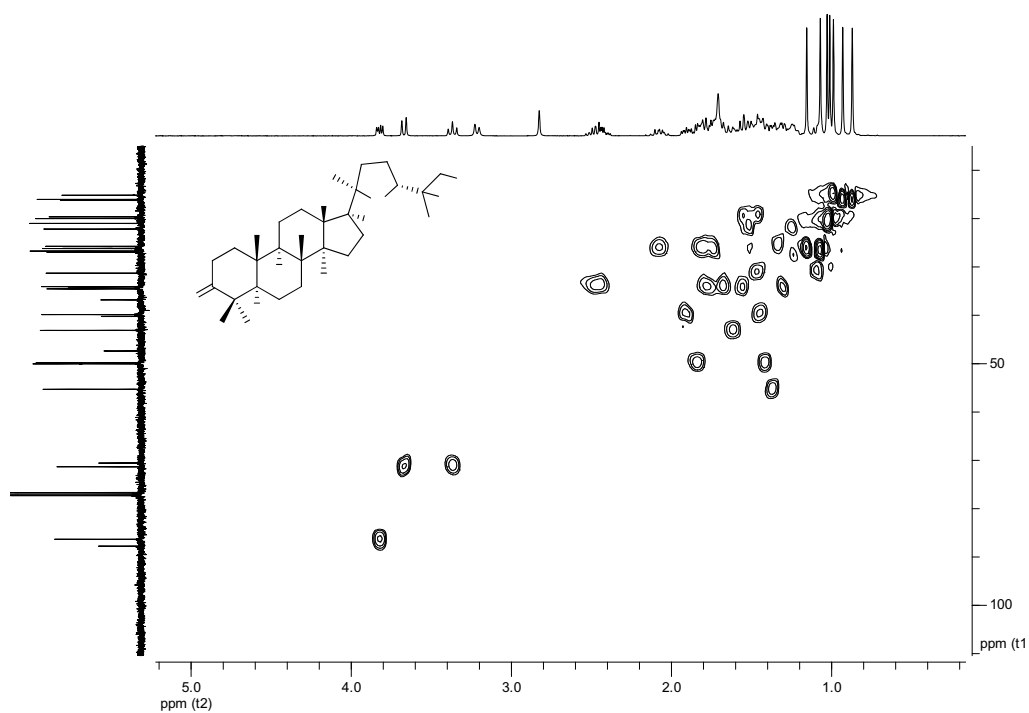


Figure S53. HSQC spectrum of (20*R*,24*R*)-epoxy-3-oxo-dammarane-25*E*,26-diol (**52**)

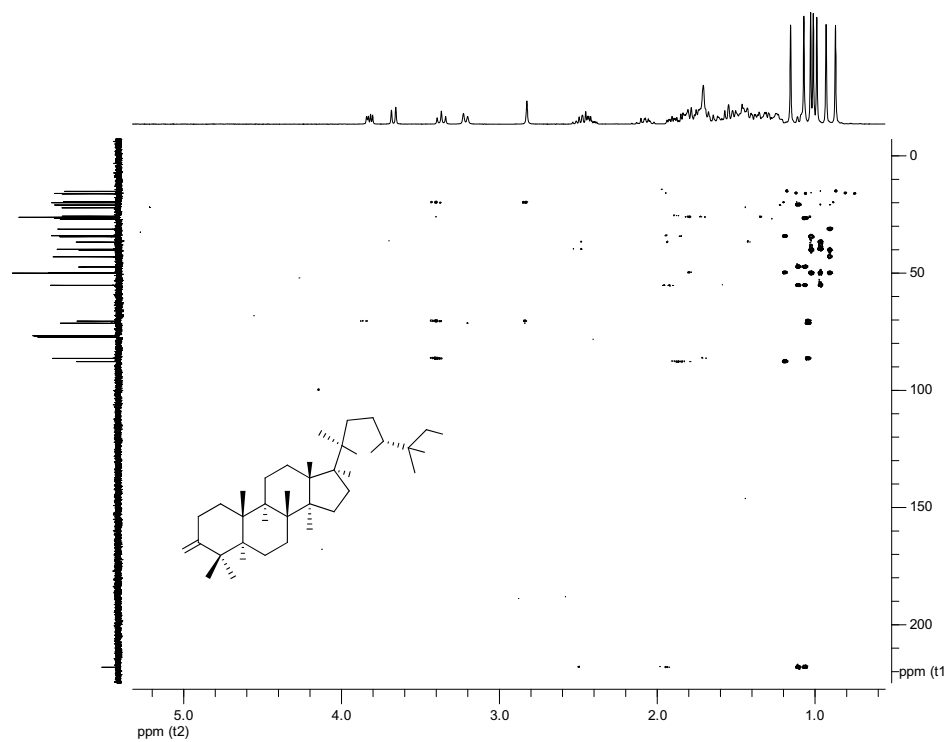


Figure S54. HMBC spectrum of *(20R,24R)*-epoxy-3-oxo-dammarane-25*E*,26-diol (**52**)

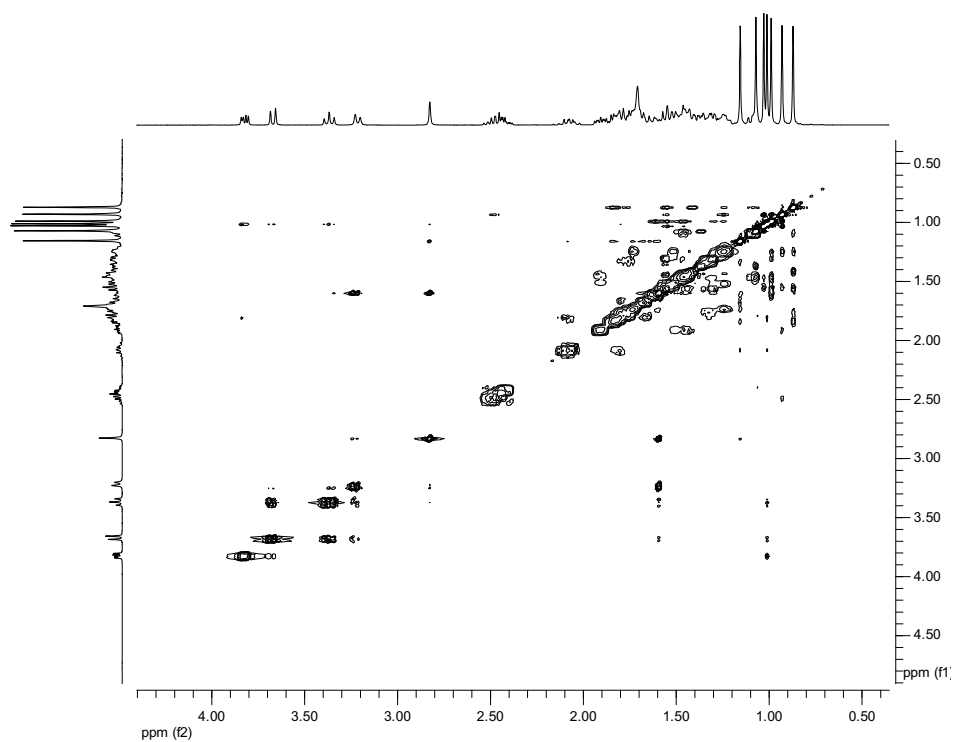


Figure S55. NOESY spectrum of *(20R,24R)*-epoxy-3-oxo-dammarane-25*E*,26-diol (**52**)

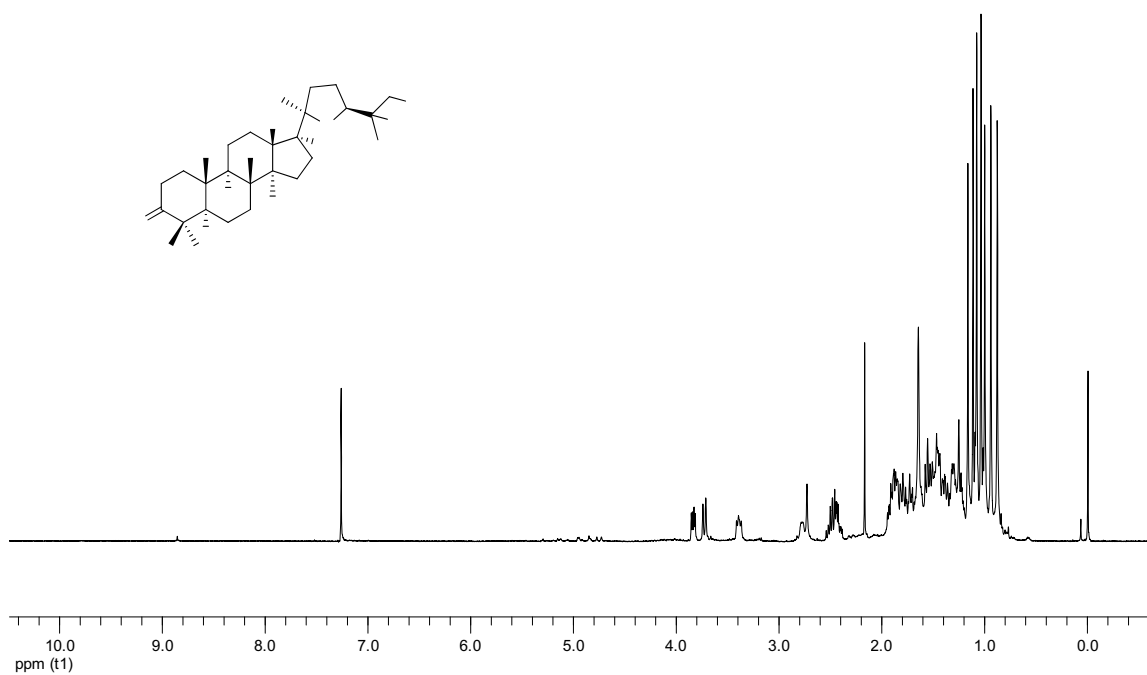


Figure S56. ^1H NMR spectrum of *(20R,24S)*-epoxy-3-oxo-dammarane-25*E*,26-diol (**53**)
(CDCl_3 , 400 MHz)

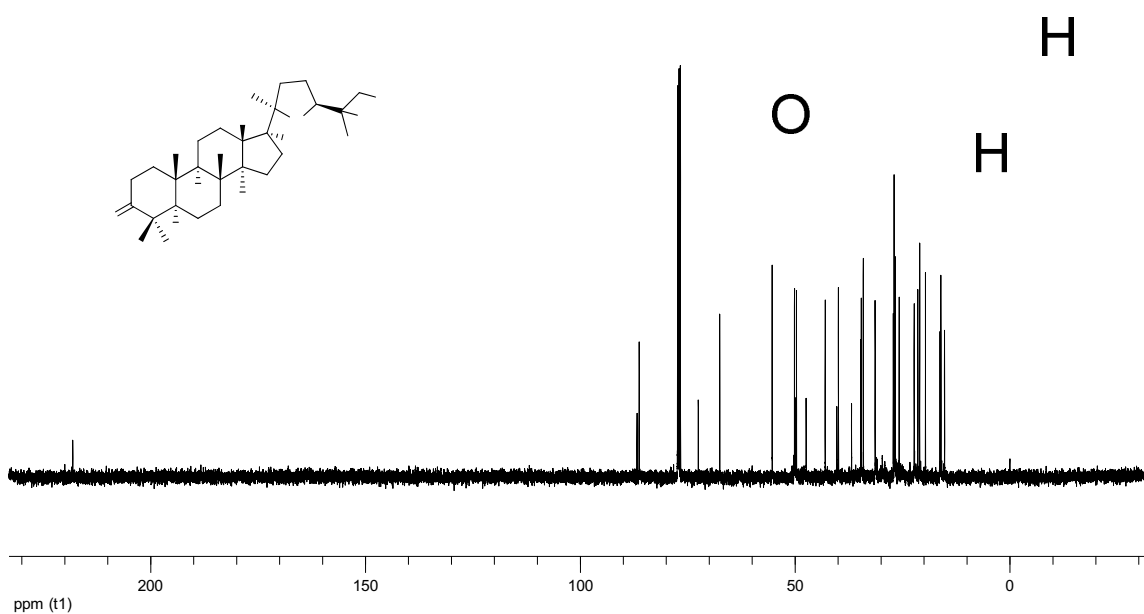


Figure S57. ^{13}C NMR spectrum of *(20R,24S)*-epoxy-3-oxo-dammarane-25*E*,26-diol (**53**)
(CDCl_3 , 100 MHz)

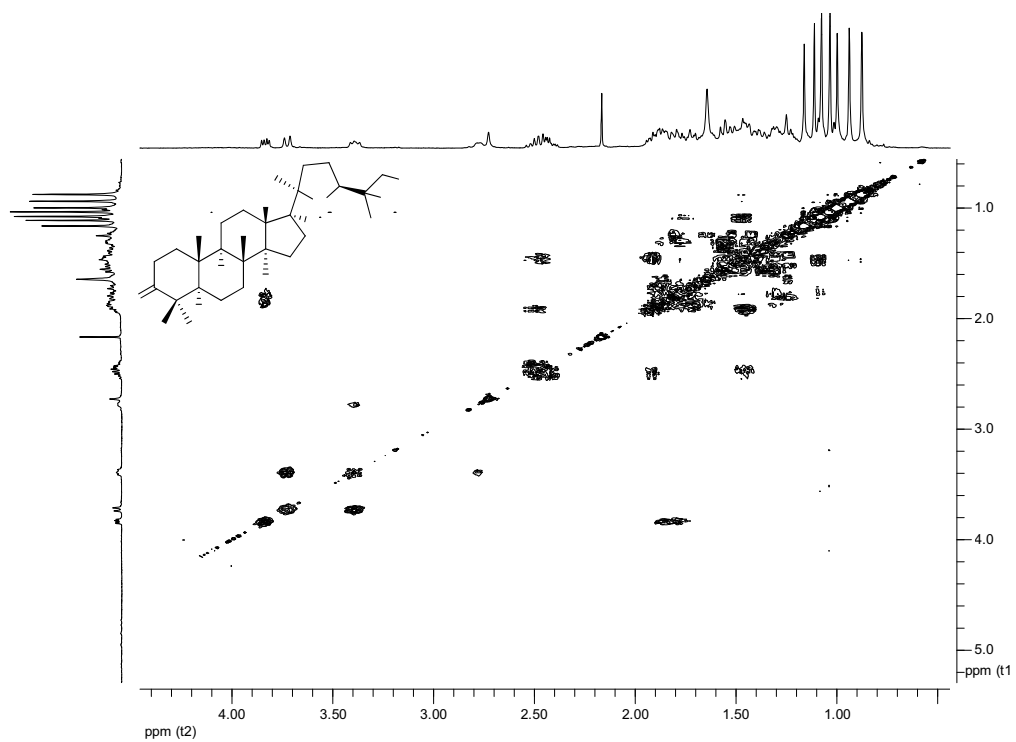


Figure S58. ^1H - ^1H COSY spectrum of (20*R*,24*S*)-epoxy-3-oxo-dammarane-25*E*,26-diol (**53**)

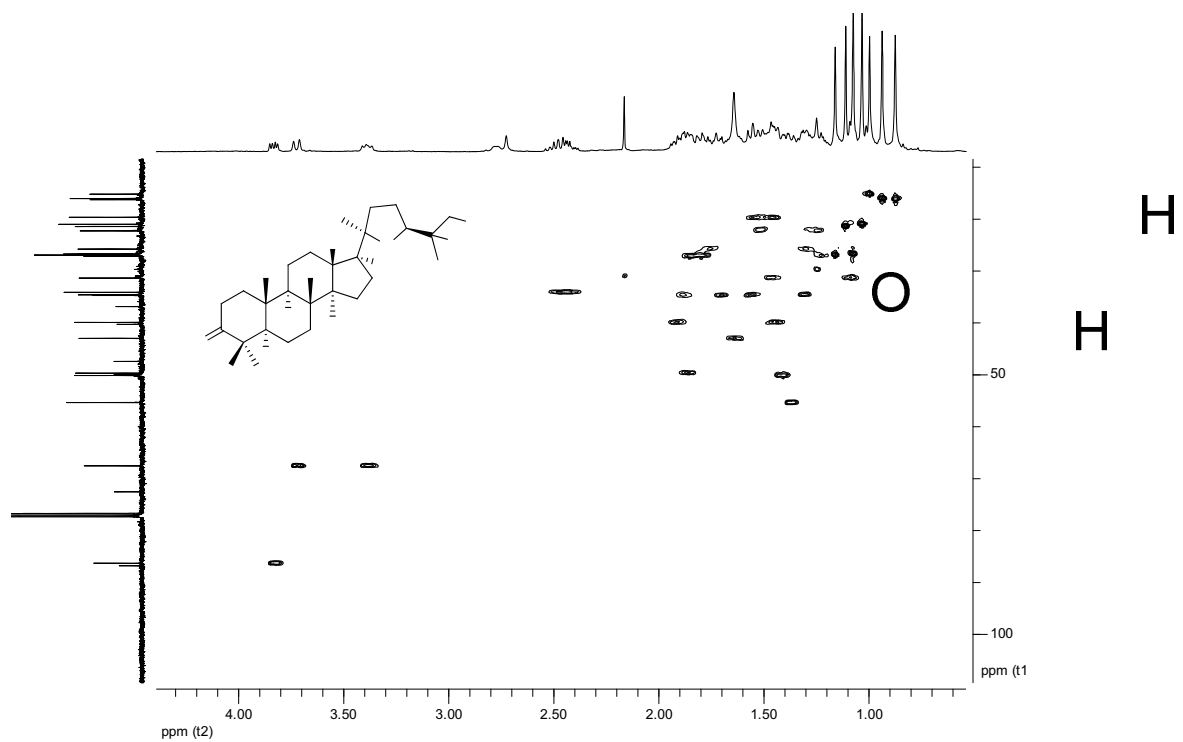


Figure S59. HSQC spectrum of (20*R*,24*S*)-epoxy-3-oxo-dammarane-25*E*,26-diol (**53**)

H

H

H

O

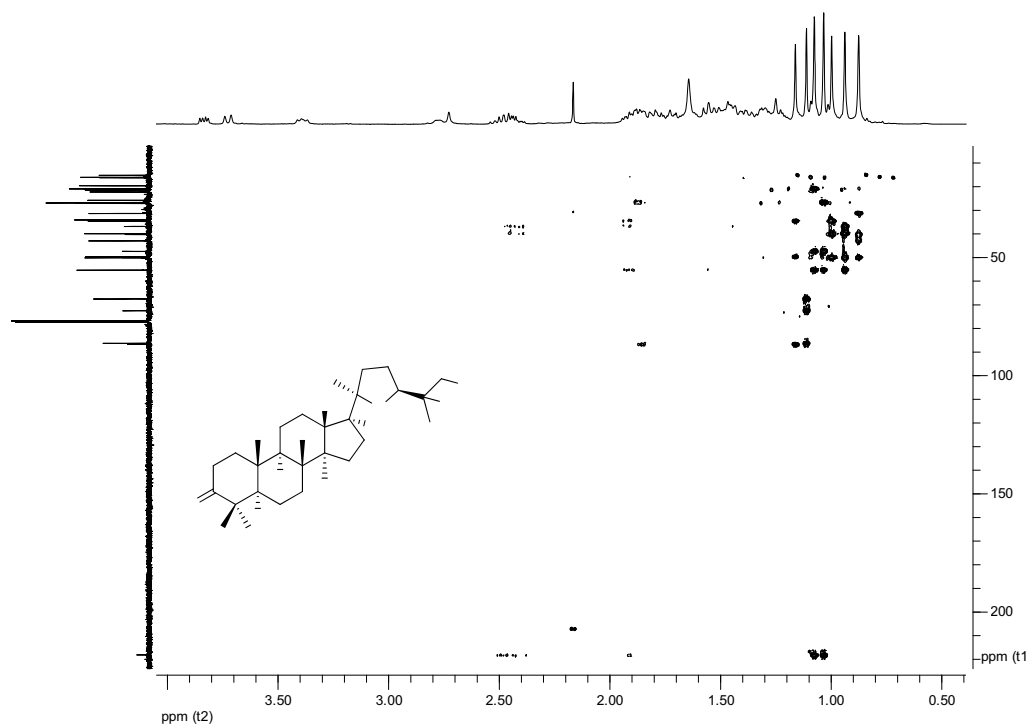


Figure S60. HMBC spectrum of (20R,24S)-epoxy-3-oxo-dammarane-25E,26-diol (53)

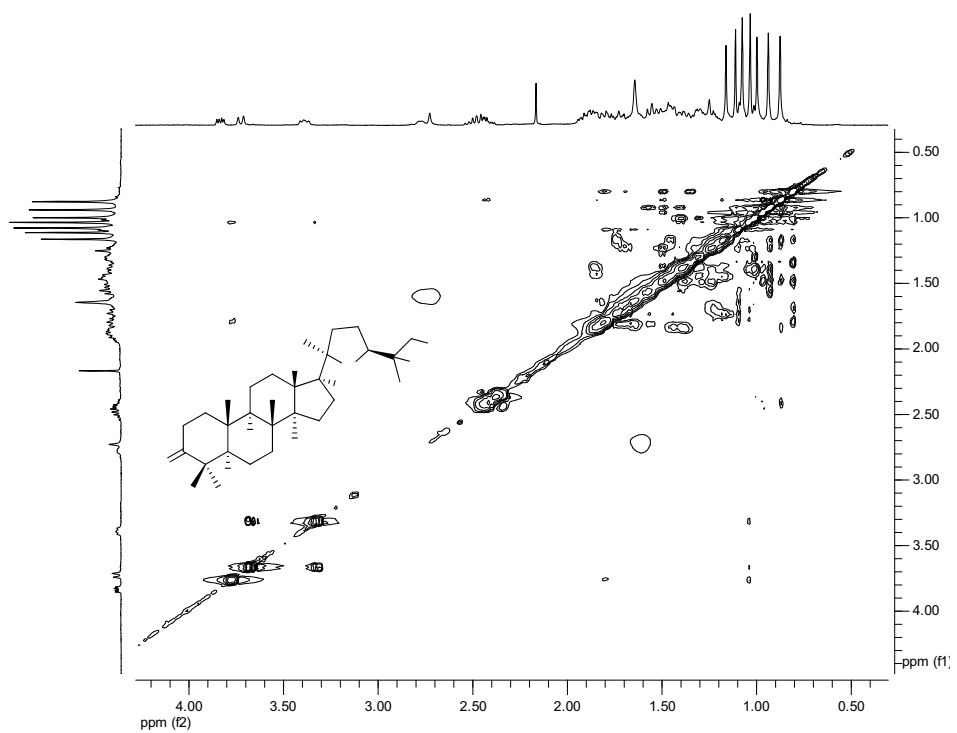


Figure S61. HMBC spectrum of (20R,24S)-epoxy-3-oxo-dammarane-25E,26-diol (53)

H
O
H

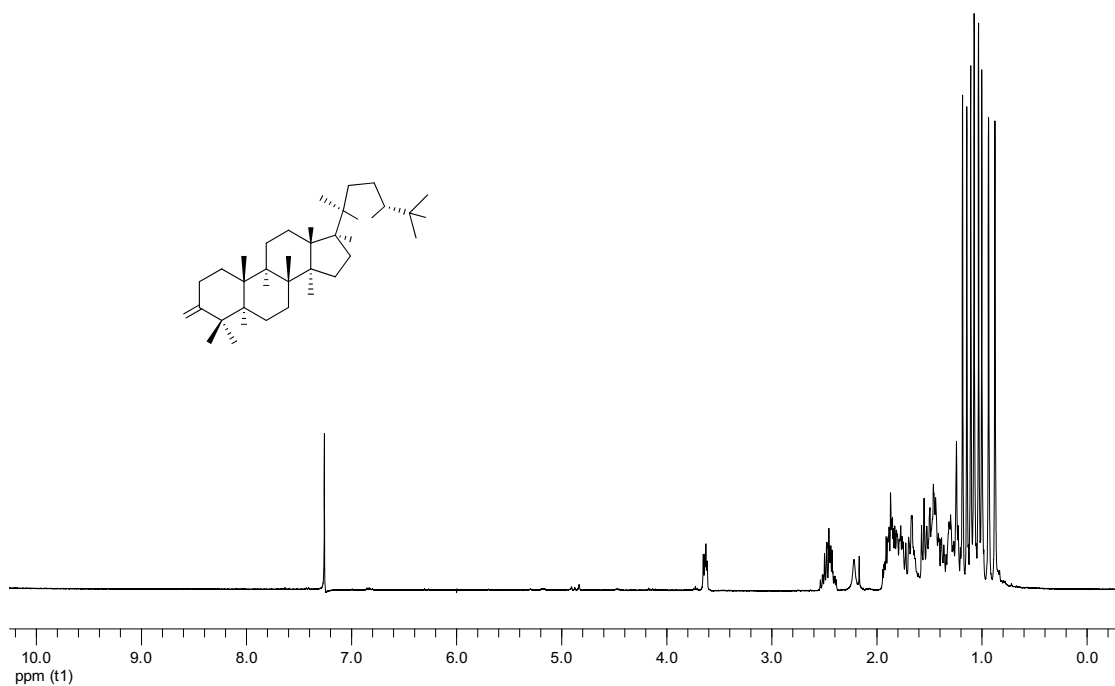


Figure S62. ^1H NMR spectrum of $(20R,24R)$ -ocotillone (**54**) (CDCl_3 , 400 MHz)

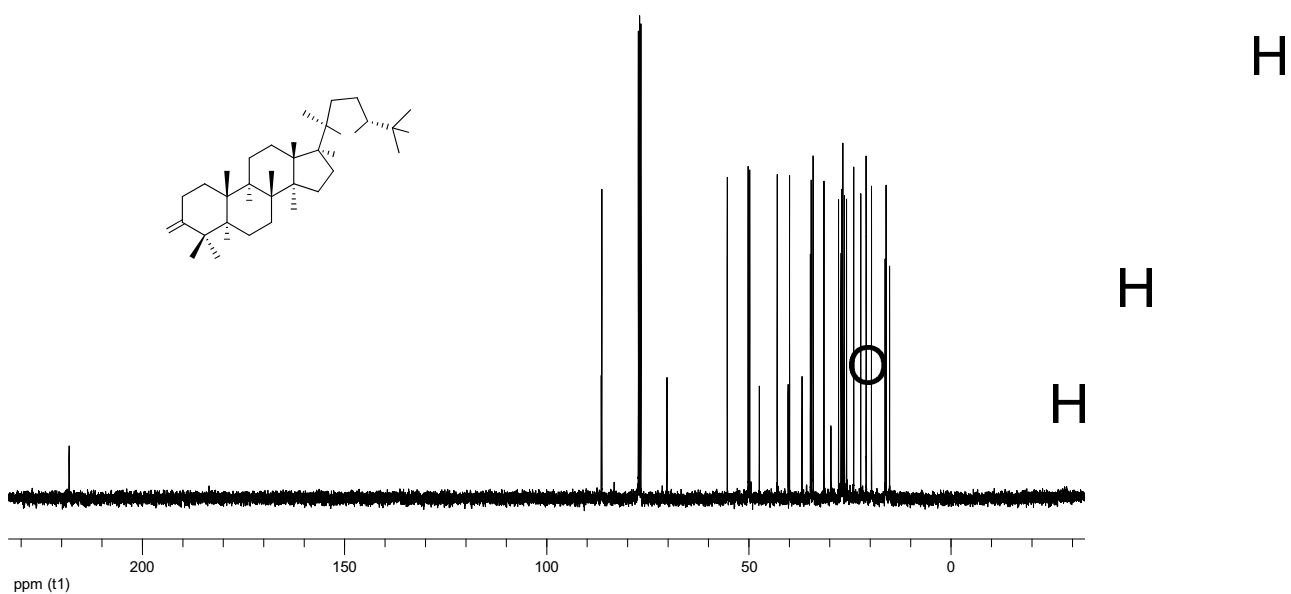
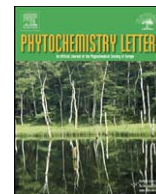


Figure S63. ^{13}C NMR spectrum of $(20R,24R)$ -ocotillone (**54**) (CDCl_3 , 400 MHz)

ภาคผนวก ข



Cycloartane triterpenes from the exudate of *Gardenia thailandica*

Thanesuan Nuanyai^{a,b}, Reungrit Sappapan^a, Tirayut Vilaivan^a, Khanitha Pudhom^{a,*}

^a Research Centre of Bioorganic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Payatai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

^b Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2010

Received in revised form 14 October 2010

Accepted 17 October 2010

Available online 29 October 2010

Keywords:

Cycloartane

Gardenoin

Gardenia thailandica

Cytotoxic

ABSTRACT

Two new cycloartane triterpenes, named gardenoins I–J (**1–2**), were isolated from the exudate of *Gardenia thailandica*, along with three known compounds, secoabryenol (**3**), sootepin E (**4**) and coronalioic acid (**5**). The structures were elucidated on the basis of spectroscopic evidence. Their cytotoxic effect on five human tumor cell lines was examined.

© 2010 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Plants belonging to the genus *Gardenia* have proved to produce a variety of cycloartane triterpenoids, some of which display interesting biological activities (Grougnet et al., 2006; Reutrakul et al., 2004; Silva et al., 1999; Tuchinda et al., 2002, 2004). Additionally, extracts of various species exhibiting anti-implantation and abortifacient effects (Lu et al., 1981), and antiulcer (Takase et al., 1989), antibacterial (Laurens et al., 1985), diuretic, analgesic, hypertensive and larvicidal activities (Hussian et al., 1991; Manson, 1939) have been reported. Previous investigations on the plants in this genus have led to the isolation of an array of structurally diverse cycloartanes with a wide range of biological activities, particularly cytotoxic and anti-HIV effects (Reutrakul et al., 2004; Tuchinda et al., 2002). Recently, we have also reported the isolation and identification of a number of cytotoxic 3,4-*seco*-cycloartane triterpenoids from two species found in Thailand, *G. sootepensis* and *G. tubifera* (Nuanyai et al., 2009, 2010). This prompted us to investigate another plant in this genus, *Gardenia thailandica*. In this paper, we describe the isolation, structural characterization and cytotoxicity of two new cycloartane triterpenes (**1–2**) from the exudate of *G. thailandica*, together with three known compounds, secoabryenol (**3**), sootepin E (**4**) and coronalioic acid (**5**).

2. Results and discussion

The exudate collected from the aerial parts of *G. thailandica* was dissolved in a 1:1 mixture of CH₂Cl₂ and MeOH, which was then subjected to silica gel column chromatography using acetone–hexane mixtures of increasing polarity as eluent. Further purification by repeated normal phase column chromatography gave two new 3,4-*seco*-cycloartane triterpenes (**1** and **2**) and three known compounds, secoabryenol (**3**), sootepin E (**4**) and coronalioic acid (**5**). The structures of **3–5** were determined by comparison of their NMR spectroscopic data with those in the literature (Grougnet et al., 2006; Nuanyai et al., 2009; Tuchinda et al., 2002).

Compound **1** was obtained as colorless gum. Its molecular formula was established as C₃₀H₅₀O₃ by the HRESIMS ion at *m/z* 481.3655 [M+Na]⁺ (calcd 481.3658), indicating six degrees of unsaturation. The IR absorption bands at 3443 and 1704 cm⁻¹ implied the presence of hydroxyl and carbonyl functionalities. The 1D NMR data (Table 1) indicated that two of the six units of unsaturation came from one carbon–carbon double bond and a carboxylic acid group. Therefore, the remaining degrees of unsaturation required **1** to have a tetracyclic core. Analysis of the ¹³C NMR and HSQC spectra revealed the presence of 30 nonequivalent carbons including one carboxylic carbonyl, six methyls (four tertiary and two secondary), 12 methylenes (one oxygenated), six methines (one olefinic) and five quaternary carbons (one olefinic). The ¹H NMR spectrum (Table 1) displayed typical signals associated with a 3,4-*seco*-cycloartane triterpenoid including two tertiary methyl singlets at δ_H 0.91 and 0.95, one secondary methyl doublet at 0.81 (d, *J* = 7.0 Hz), and a pair of doublets at δ_H 0.39 and 0.61 (*J* = 4.2 Hz), characteristic of the C-19

* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 7639; fax: +66 2 218 7598.
E-mail address: Khanitha.P@chula.ac.th (K. Pudhom).

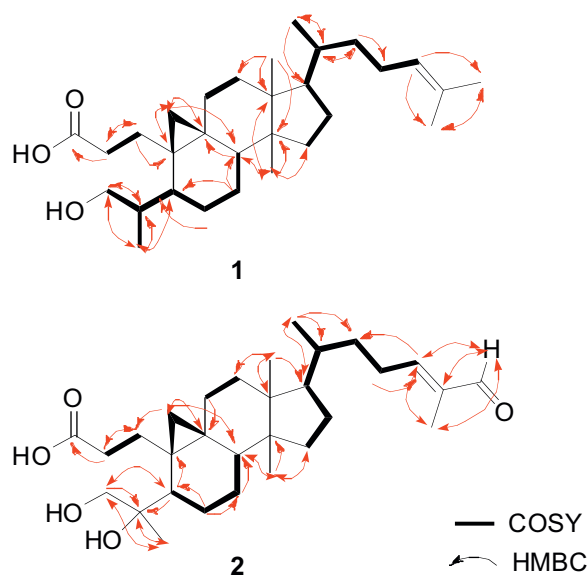


Fig. 2. ^1H – ^1H COSY and key HMBC correlations of **1** and **2**.

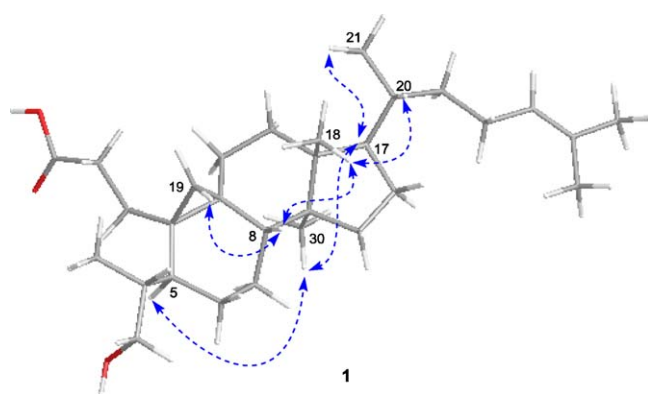


Fig. 3. Diagnostic NOE correlations of **1**.

cytotoxic against all cell lines tested as previously reported (Nuanyai et al., 2009), while compounds **1–3** and **5** did not display any cytotoxic effect at a dose of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Interestingly, the active compound **4** differed from the other compounds in the absence of a 29-hydroxy unit. This unit might cause the loss of biological activity of the compounds in this series.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Melting points were determined with a Fisher–Johns melting point apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured on a PerkinElmer 341 polarimeter at a wavelength of 589 nm. UV data were recorded on Shimadzu UV-160 spectrophotometer. IR spectra were recorded on Bruker vector 22 Fourier transform infrared spectrophotometer. The NMR spectra were recorded on a Varian YH400 spectrometer at 400 MHz for ^1H NMR and at 100 MHz for ^{13}C NMR using TMS (tetramethylsilane) as the internal standard. HRESIMS were obtained using a Bruker micrOTOF mass spectrometer.

3.2. Plant material

The exudate was manually collected from the fresh aerial parts of *G. thailandica* from Bangkhan, Bangkok, Thailand, in July 2009. A voucher specimen (BKF 159039) has been deposited at the Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.

3.3. Extraction and isolation

The exudate (10 g) of *G. thailandica* was dissolved in a 1:1 mixture of CH_2Cl_2 and MeOH (20 mL). This solution was subsequently subjected to passage over a silica gel column eluted with a gradient system of acetone–hexane (from 1:4 to 1:0) to yield 11 fractions (I–XI). Fraction III (453.7 mg) was subjected to silica gel column chromatography (CC) using a mixture of acetone–hexane (1:4) as an eluent to afford **4** (53 mg). Fraction V was further purified using a silica gel column eluted with acetone–hexane (1:4) to give **1** (9.0 mg). Fraction VI was rechromatographed on a silica gel column, eluting with acetone–hexane (1:2) to afford **3** (255.6 mg) and **5** (29.2 mg), while fraction VII was separated by CC eluting with acetone–hexane (1:3) to yield **2** (10.0 mg).

3.4. Gardenoin I (**1**)

Colorless gum; $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +29.0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 329.9 (2.37), 275.1 (2.49) nm; IR (KBr) 3443, 2934, 1704, 1600, 1452, 1370, 1108, 1046 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; HRESIMS m/z 481.3655 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3\text{Na}$, 481.3658).

3.5. Gardenoin J (**2**)

Colorless needles; mp 110–111 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +32.0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 231.1 (3.62), 227 (3.64) nm; IR (KBr) 3439, 2939, 1712, 1617, 1443, 1378, 1117, 1034 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; HRESIMS m/z 511.3403 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{Na}$, 511.3399).

3.6. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was evaluated against five human tumor cell lines using MTT colorimetric method as previously reported (Nuanyai et al., 2009, 2010). The following tumor cell lines were used in the assay; human breast ductal carcinoma ATCC No. HTB 20 (BT474), undifferentiated lung carcinoma (CHAGO), liver hepatoblastoma (Hep-G2), gastric carcinoma ATCC No. HTB 103 (KATO-3), and colon adenocarcinoma ATCC No. CCL 227 (SW-620). All cell lines were obtained from the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, and were cultured in RPMI-1640 supplemented with 25 mM HEPES, 0.25% (w/v) sodium bicarbonate, 5% (v/v) fetal bovine serum, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kayamycin.

Acknowledgements

This work was supported from the Thailand Research Fund (Grant no. DBG5380038), Research Funds from the Faculty of Science, Chulalongkorn University (RES-A1B1-23) and The 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphisek Somphot Endowment Fund). The authors are also grateful for Ratchadaphisek Somphot Endowment Fund (AG001B), and the Thai Government Stimulus Package (TKK2555) under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.phytol.2010.10.003](https://doi.org/10.1016/j.phytol.2010.10.003).

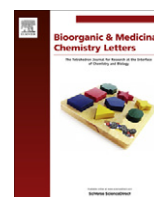
References

- Cantillo-Ciau, Z., Brito-Leoza, W., Quijino, L., 2001. *J. Nat. Prod.* 64, 953–955.
- Chen, Y., Lin, Z., Zhang, H., Sun, H., 1990. *Phytochemistry* 29, 3358–3359.
- Grougnet, R., Magiatis, P., Mitaku, S., Loizou, S., Moutsatsou, P., Terzis, A., Cabalion, F.T., Michel, S., 2006. *J. Nat. Prod.* 69, 1711–1714.
- Hussian, M.M., Sokomba, E.N., Shok, M., 1991. *Int. J. Pharmacogn.* 29, 94–100.
- Laurens, A., Mboup, S., Tignokpa, M., Sylla, O., Masquelier, 1985. *J. Pharm.* 40, 482–484.
- Lee, D., Cuendet, M., Axelrod, F., Chavez, P.I., Fong, H.H.S., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 2001. *Tetrahedron* 57, 7107–7112.
- Lu, R.F., Aeng, Y.R., Wang, W.C., 1981. *Sheng Chih Yu Bi Yun* 12, 16–18.
- Manson, D.J., 1939. *Malar. Inst. India* 2, 85–93.
- Nuanyai, T., Sappapan, R., Teerawatananon, T., Muangsin, N., Pudhom, K., 2009. *J. Nat. Prod.* 72, 1161–1164.
- Nuanyai, T., Chokpaiboon, S., Vilaivan, T., Pudhom, K., 2010. *J. Nat. Prod.* 73, 51–54.
- Reutrakul, V., Krachangchaeng, C., Tuchinda, P., Pohmakotr, M., Jaipetch, T., Yoosook, C., Kasisit, J., Sophasan, S., Sujarit, K., Santisuk, T., 2004. *Tetrahedron* 60, 1517–2152.
- Silva, G.L., Gil, R.R., Cui, B., Chai, H., Santisuk, T., Srisook, E., Reutrakul, V., Tuchinda, P., Sophasan, S., Sujarit, S., Upatham, S., Lynn, S.M., Farthing, J.E., Yang, S.-L., Lewis, J.A., O'Neill, M.J., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 1999. *Tetrahedron* 53, 529–538.
- Sun, H., Qiu, S., Lin, L., Wang, Z., Lin, Z., Pengsuparp, T., Pezzuto, J.M., Fong, H.H.S., Cordell, G.A., Farnsworth, N.R., 1996. *J. Nat. Prod.* 59, 525–527.
- Takase, H., Imanishi, K., Miura, O., Yumioka, E., Watanabe, H., 1989. *Jpn. J. Pharmacol.* 49, 301–308.
- Tan, R., Xue, H., Li, L.-N., 1991. *Planta Med.* 57, 877–888.
- Tuchinda, P., Pompimon, W., Reutrakul, V., Pohmakotr, M., Yoosook, C., Kongyai, N., Sophasan, S., Sujarit, S., Upatham, S., Santituk, T., 2002. *Tetrahedron* 58, 8073–8086.
- Tuchinda, P., Saiai, A., Pohmakotr, M., Yoosook, C., Kasisit, J., Napaswat, C., Santisuk, T., Reutrakul, V., 2004. *Planta Med.* 70, 366–370.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

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

Antiangiogenic activity of 3,4-*seco*-cycloartane triterpenes from Thai *Gardenia* spp. and their semi-synthetic analogs

Khanitha Pudhom^{a,*}, Thanesuan Nuanyai^{a,b}, Kiminori Matsubara^{c,*}, Tirayut Vilaivan^a^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand^b Center for Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand^c Department of Human Life Science Education, Graduate School of Education, Hiroshima University, Hiroshima 739-8524, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2011

Revised 7 October 2011

Accepted 27 October 2011

Available online 16 November 2011

Keywords:

3,4-*seco*-cycloartane*Gardenia*

Antiangiogenesis

ABSTRACT

Twelve naturally occurring 3,4-*seco*-cycloartane triterpenes (**1–12**) isolated from *Gardenia sootepensis* and *Gardenia obtusifolia*, and eight semi-synthetic derivatives (**13–20**) were evaluated for their antiangiogenic activity on a rat aortic sprouting assay, an ex vivo model of angiogenesis. Among these compounds, sootepin B (**1**) displayed the most potent activity in terms of the inhibition of microvessel sprouting from rat aortic rings in a dose-dependent manner with IC₅₀ value of 4.46 μM. Its angiogenic effect was found to occur via suppression of endothelial cell proliferation and tubular formation, and was likely mediated by regulation (inhibition) of the Erk1/2 signaling pathway.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Cancer is one of the important public health problems all over the world and continues to cause a large number of present deaths, including pre-reproductive deaths, and the per capita population level appears to be increasing in the affected populations. Despite many anticancer drugs having been discovered and developed for use in clinical treatments over the last few decades, most of available drugs are non-selective cytotoxic molecules that provoke severe adverse effects, as well as acquiring drug resistance. Therefore the discovery and development of new effective chemotherapeutic agents is still required in the fight against cancer.

The use of antiangiogenic therapy as an alternative treatment for cancer patients has attracted considerable attention from researchers in recent years since the development and progression of tumors is crucially dependent upon angiogenesis.^{1,2} Indeed, angiogenesis, the formation of new blood vessels from the pre-existing vasculature, is not only required for tumor growth and survival, but also for the transplantation and metastasis of tumors.^{3,4} The newly formed blood vessels promote tumor progression by supplying oxygen and nutrients in sufficient amounts and by removing the waste metabolites. Thus the inhibition of tumor angiogenesis is one of the most promising current approaches in the cancer prevention and treatment.⁵ Furthermore, therapy based upon targeting angiogenesis can be applied for a broad spectrum of tumors because angiogenesis is required for all of them, yet it has a low potential for the evolution of resistance due to

the genetic stability of endothelial cells whose migration and proliferation are involved in the angiogenesis process.

Ring-A 3,4-*seco*-cycloartane type triterpenes have been mainly found in plants belonging to the genus *Gardenia* from family Rubiaceae.^{6–11} Many of them have been found to exhibit cytotoxic activities towards various tumor cell lines.^{6–10} Recently we reported the isolation and characterization of a number of these triterpenoids from the apical buds and their exudate of some Thai *Gardenia* species that exhibit in vitro cytotoxicity against five human cancer lines.^{12–15} However, the effect of these triterpenes on angiogenesis is seldom investigated. In this Letter, we focus on the assessment of the antiangiogenic activity of 3,4-*seco*-cycloartanes obtained from *Gardenia sootepensis* and *Gardenia obtusifolia* and their semi-synthetic analogs in order to gain more information about the structure–activity relationship (SAR).

The twelve naturally occurring 3,4-*seco*-cycloartane triterpenes used in this study were isolated from the apical buds of *G. sootepensis* and the exudate of *G. obtusifolia* as previously reported.^{12,13} These are sootepin B (**1**), coronalolide (**2**), turbiferolide methyl ester (**3**), sootepin A (**4**), coronalolide methyl ester (**5**), gardenoins B and C (**6, 7**), sootepins C and E (**8, 9**), secaubryenol (**10**), and dikamakiar-tanes A and C (**11, 12**). As for the semi-synthetic derivatives, the first compound series (**13–17**) were prepared from coronalolide (**2**) by modification of the COOH at C-1 to ester and amide functions using the combination of DCC (EDC for **17**) and HOBt as the coupling agent. The second series of compounds (**18–20**) were obtained by modification of the primary alcohol of sootepin A (**4**). The benzoate **18** was prepared by treating **4** with benzoyl chloride in the presence of Et₃N. Reactions of **4** with the corresponding acids, pretreated with

* Corresponding authors. Tel.: +66 2 2187639; fax: +66 2 2541309.

E-mail addresses: Khanitha.P@chula.ac.th (K. Pudhom), kmatsuba@hiroshima-u.ac.jp (K. Matsubara).

oxalyl chloride in the presence of a catalytic amount of DMF to generate the acid chlorides, afforded **19** and **20**. The structures of the modified compounds, shown in Figure 1, were confirmed by spectroscopic data (see Supplementary data).

To investigate the SARs of both the natural and the semi-synthetic derivatives, their effect on angiogenesis was evaluated by monitoring the inhibition of microvessel sprouting from rat aortic rings (an ex vivo model) at a single dose of 25 μM .¹⁶ Among compounds possessing an exomethylene γ -lactone (**1–7** and **13–20**), the naturally occurring sootepin B (**1**), bearing a free COOH at C-1 and Me at C-26, showed the strongest antiangiogenic activity, completely suppressing the microvessel sprouting, followed by coronalolide (**2**) at ~85% inhibition, but their semi-synthetic derivatives were all less active. For the five natural compounds without an exomethylene γ -lactone group, sootepin E (**9**) showed the highest anti-angiogenic activity, at ~92% inhibition, which was the second highest of all 20 compounds after that of **1**. The esterification

and amidation of the C-1 carboxylic acid (**3–5**, **13–20**), as well as the presence of highly oxidized functionalities in place of the methyl group at C-26 (**2**, **4**, **5**, **13–20**) caused a significant loss of activity, revealing from only 40–60% and 10–50% inhibition, respectively (Fig. 2). Similar results were obtained from the derivatives with a cleaved C-6–C-29 bond (**8–12**). The free COOH at C-1 is also required for activity as observed in **9** and **10**, but they exhibited a lower activity than **1**, which suggests that the exomethylene γ -lactone (formed by lactonization of C-29 onto C-6) plays a crucial role for the antiangiogenic effect. Furthermore, there was no apparent significant or only a slight inhibition of angiogenesis by the four derivatives having a furan ring in the side chain (**6–7**, **11–12**).

Based on the results obtained from the screening using the ex vivo microvessel sprouting model, only sootepin B (**1**) was chosen for further evaluation, starting with its potency to suppress microvessel outgrowth by treating aortic rings with various doses

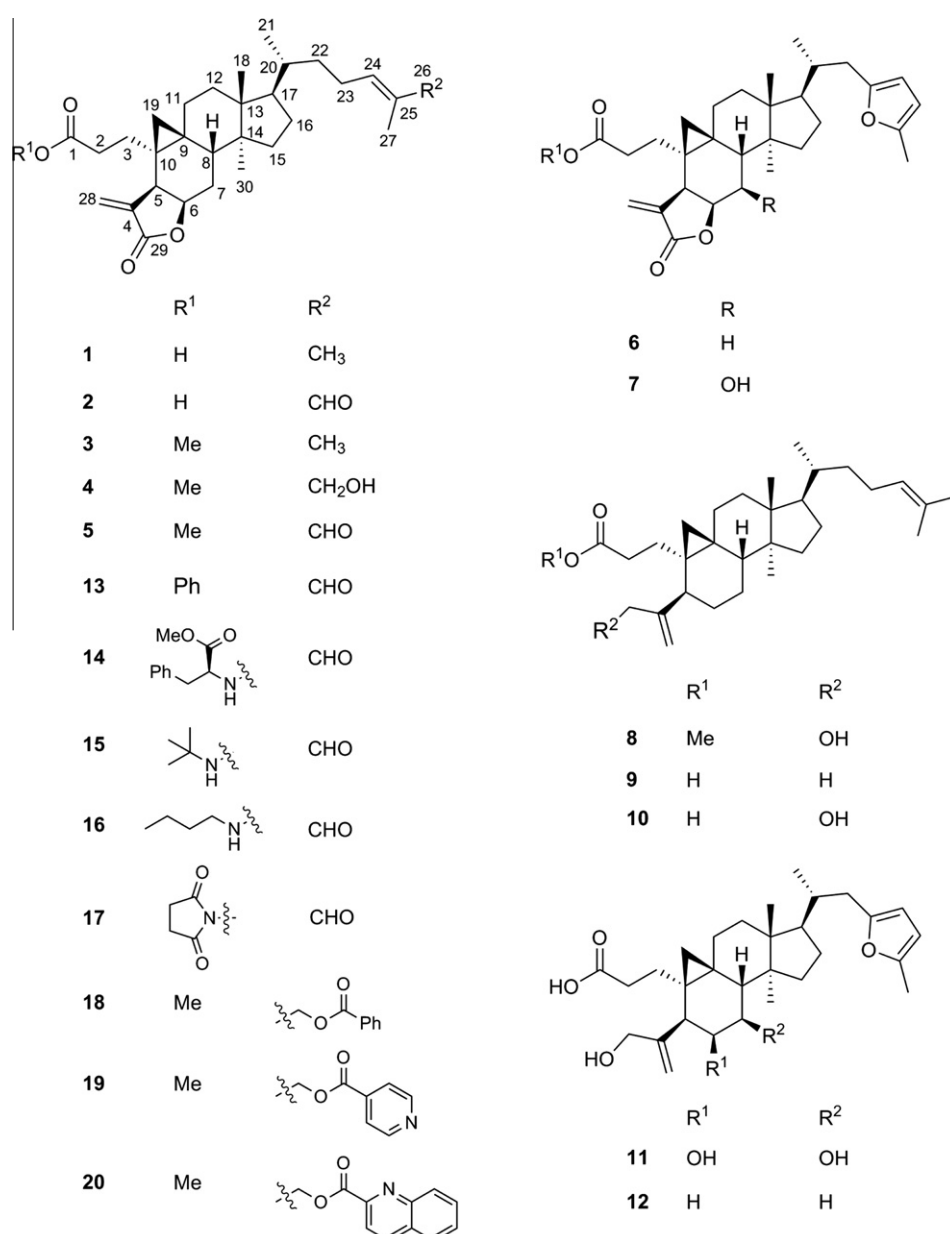


Figure 1. Structures of the naturally occurring 3,4-seco-cycloartanes (**1–12**) and their semisynthetic derivatives (**13–20**).

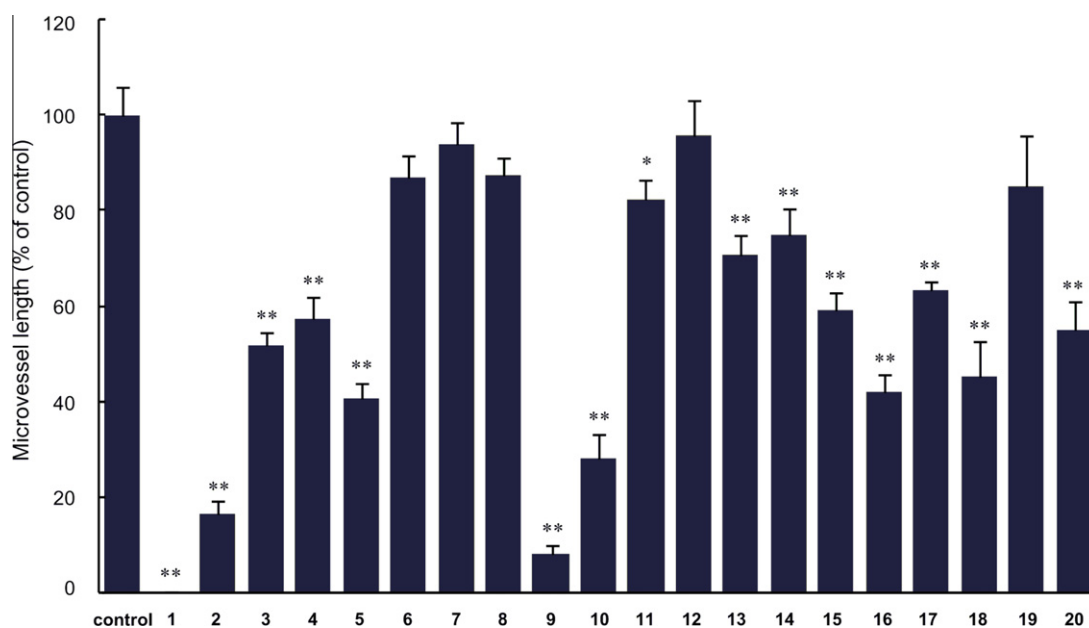


Figure 2. Effect of each of 3,4-seco-cycloartanes (1–20) at 25 μ M on the ex vivo angiogenesis rat aortic sprouting assay as an angiogenesis model. Values are the mean \pm SD ($n = 6$). Significantly different from the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

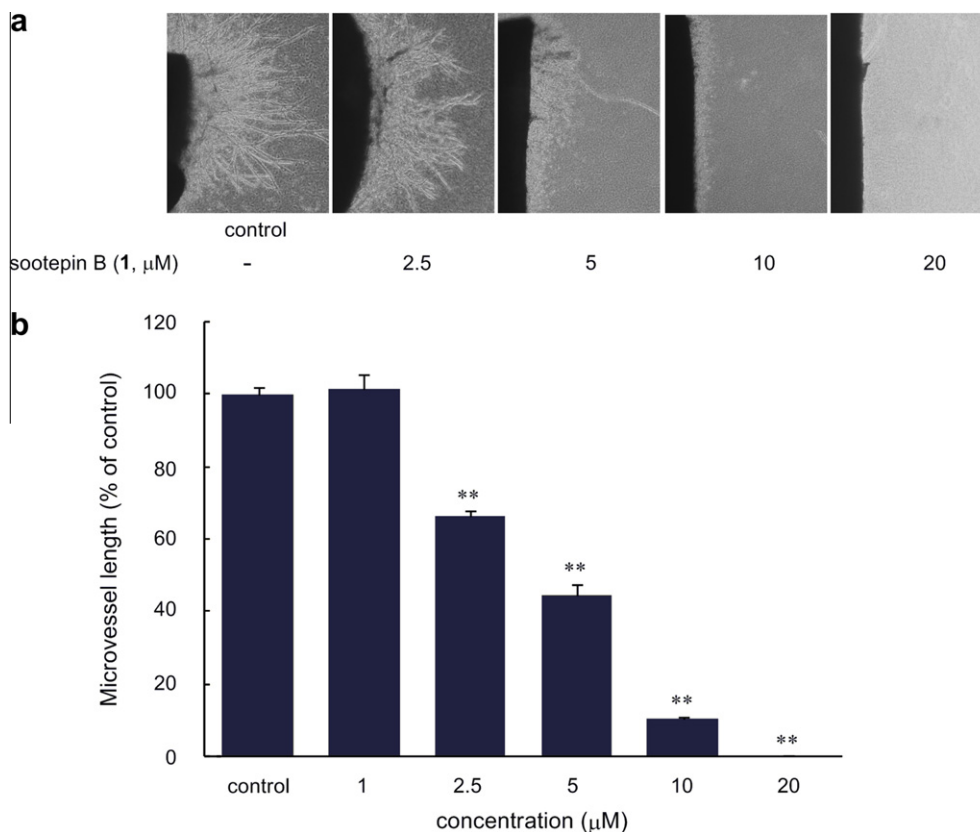


Figure 3. Inhibitory effect of sootepin B (1) at various concentrations on the ex vivo rat aortic sprouting assay. (a) Microscopic photograph of microvessel formation. (b) The average microvessel length on the seventh day of culture. Values are the mean \pm SD ($n = 6$). Significantly different from the control: ** $p < 0.01$.

of the compound. As shown in Figure 3, the inhibitory effect of **1** was found to be dose-dependent manner with an IC_{50} value of 4.46 μ M.

To investigate how sootepin B (**1**) could exert the anti-angiogenic effect, its in vitro inhibitory activity towards the functions

of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), in terms of the in vitro cell proliferation, tubular formation and migration, were evaluated. The effect of **1** on the proliferation of HUVECs was evaluated by using the WST-8 assay,¹⁷ following treatment of HUVECs with various concentrations of **1** or vehicle (DMSO)

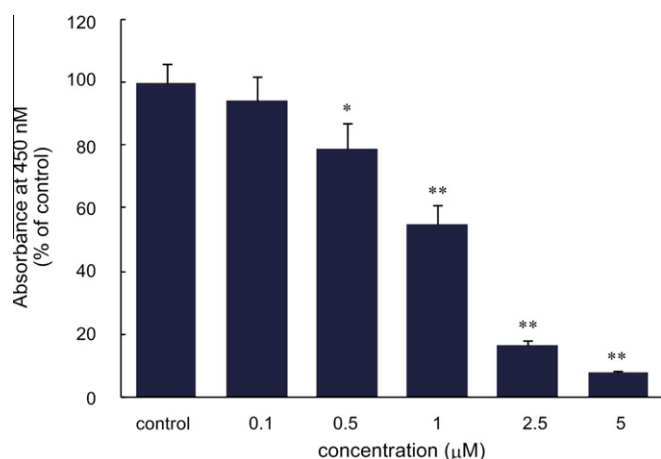


Figure 4. Effect of sootepin B (**1**) on the HUVEC proliferation. Values are the mean \pm SD ($n = 5$). Significantly different from the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

alone for 72 h. The results (Fig. 4) indicated that sootepin B (**1**) inhibited the proliferation of the endothelial cells in a dose-dependent manner with an IC_{50} value of 1.20 μ M. Next, whether sootepin B (**1**) could affect the HUVECs tubule formation was investigated,¹⁸ by inoculating HUVECs onto reconstituted basement membranes (Matrigel) and then allowing them to migrate, attach to each other and then form capillary-like structures.^{19,20} The effect of the compound was assessed by measuring the length of tube-structured cells compared to the vehicle control after incubation for 12 h. Sootepin B (**1**) was found to suppress tubule formation in the endothelial cells in a dose dependent manner with a significant inhibition being observed at 5 μ M, an IC_{50} of 11.20 μ M and the complete

inhibition at 20 μ M (Fig. 5). Finally, the effect of sootepin B (**1**) on the VEGF-induced migration of HUVECs was examined using a modified Boyden chamber assay.²¹ VEGF is known as a specific and pivotal growth factor involved in endothelial cell proliferation, migration and survival during blood vessel formation.^{22,23} HUVECs were seeded on cell culture inserts with sootepin B (**1**) at concentrations ranging from 5 to 50 μ M and VEGF (10 ng/mL). After incubation for 6 h, the membranes containing migrated cells were stained and cut off from the inserts. The number of migrated cells was then counted under a microscope. As seen in Supplementary Figure S9, VEGF strongly stimulated HUVECs migration and sootepin B (**1**) did not display any detectable effect upon this, even at a dose as high as 50 μ M. Thus **1** might not be involved in the VEGF-induced endothelial cell migration.

Based on these results from the above ex vivo and in vitro assays, sootepin B (**1**) would appear to be a potent angiogenic inhibitor, and that it mainly functions by suppression of endothelial cell proliferation and tubule formation, but has no effect upon cell migration.

The mechanism by which sootepin B (**1**) regulates angiogenic inhibition was then investigated by western blot analysis.²⁴ In angiogenesis there are two known important pathways responsible for VEGF stimulus on endothelial cells, the phosphoinositide 3-kinase/Akt and the extracellular signal-regulated kinase (Erk1/2) pathways. Both of these pathways are reported to be involved in endothelial cell proliferation, migration and survival.²⁵ The treatment of HUVECs with sootepin B (**1**) suppressed the phosphorylation of Erk1/2 in both a time- and dose-dependent manner (Fig. 6), but did not affect the expression of phosphorylated Akt (data not shown). This suggested that the antiangiogenic property of sootepin B (**1**) is mediated by alteration of the Erk1/2 signaling pathway. The strong suppressive effect of sootepin B (**1**) on the

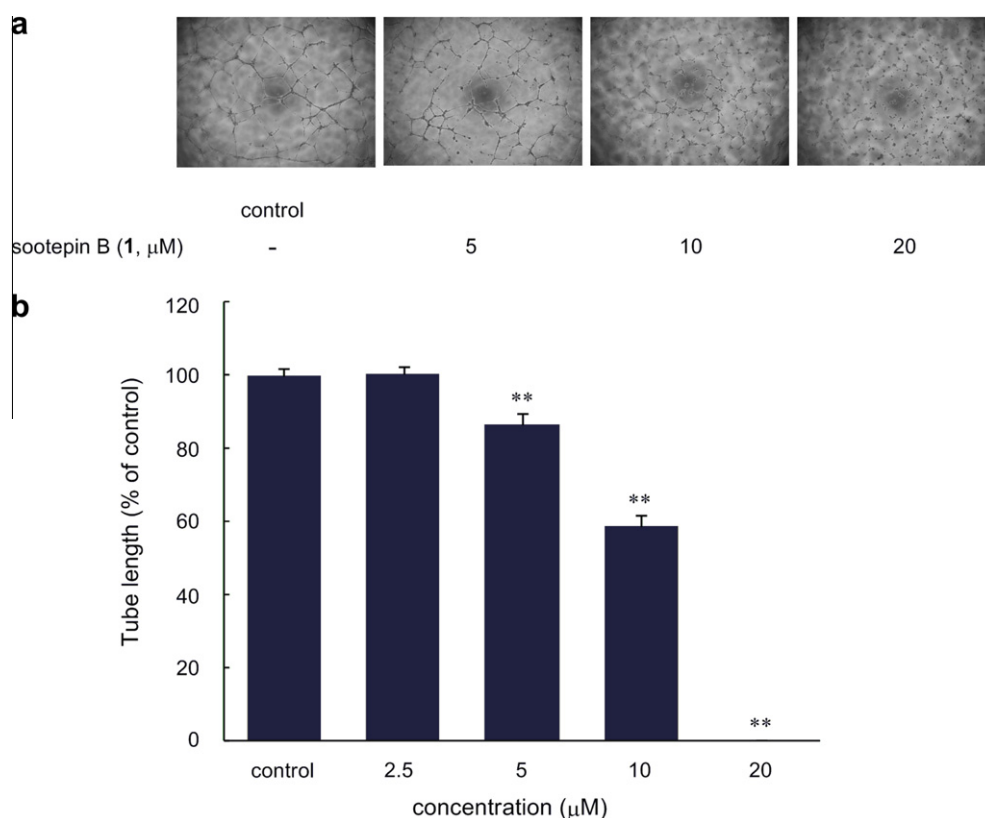


Figure 5. Effect of sootepin B (**1**) on the HUVEC tubular formation. (a) Microscopic photograph of tubular formation on the reconstituted gel after incubation for 12 h. (b) The average capillary length. Values are the mean \pm SD ($n = 5$). Significantly different from the control: ** $p < 0.01$.

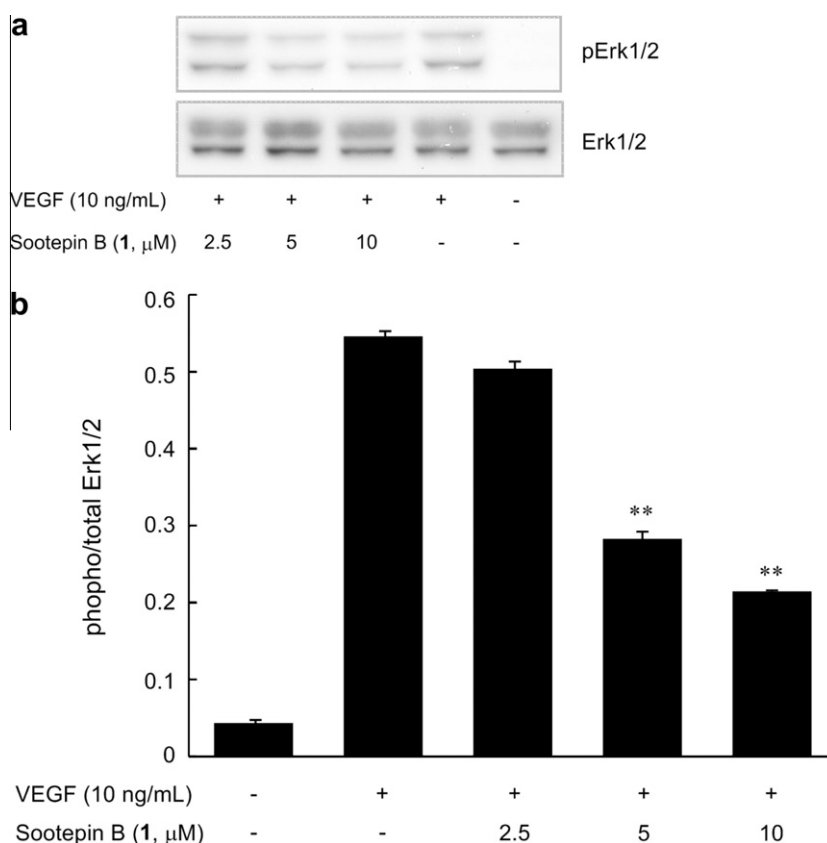


Figure 6. Effect of sootepin B (**1**) concentration on the phosphorylation level of Erk1/2 in HUVECs. (a) HUVECs were pretreated with various doses of sootepin B (**1**) or vehicle (DMSO) alone for 1 h. (b) The level of phosphorylated (pErk1/2) and total Erk1/2 protein was determined by western blot analysis. Values are the mean \pm SD ($n = 3$). Significantly different from the control: * $p < 0.05$.

phosphorylation of Erk1/2 is in line with a previous report in which inhibitors for Erk1/2 signaling pathway suppress endothelial cell proliferation.²⁶ Furthermore the inactive effect of sootepin B (**1**) on migration is consistent with the absence of any detectable effect on the phosphorylation of Akt since this pathway plays an important role in endothelial cell migration.²⁷

In summary, a series of 3,4-*seco*-cycloartane triterpenes, comprised of twelve naturally occurring and eight semi-synthetic derivatives, were evaluated for their antiangiogenic activity. The results indicated that the natural compound sootepin B (**1**) possesses a potent angiogenic activity, presumably mediated via suppression of endothelial cell proliferation and tubular formation. Its effect on angiogenesis might be mediated by regulation of the Erk1/2 signaling pathway. Therefore sootepin B (**1**) might be potentially useful in cancer therapy as an angiogenic inhibitor.

Acknowledgments

This work was supported by the Thailand Research Fund (Grant no. DBG5380038), the Hitachi Scholarship Foundation, Research Funds from the Faculty of Science (RES-A1B1-23), Chulalongkorn University, and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphisek Somphot Endowment Fund). The authors are also grateful for the Thai Government Stimulus Package (TKK2555) under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture.

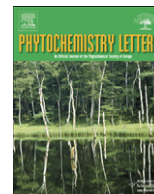
Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bmcl.2011.10.128](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.10.128).

References and notes

- Folkman, J.; Shing, Y. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10931.
- Folkman, J. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27.
- Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nature* **2000**, *407*, 2249.
- Bergers, G.; Benjamin, L. E. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 401.
- Herbst, R. S. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2006**, *11*, 635.
- Silva, G. L.; Gil, R. R.; Cui, B.; Chai, H.; Santisuk, T.; Srisook, E.; Reutrakul, V.; Tuchinda, P.; Sophasan, S.; Sujarit, S.; Upatham, S.; Lynn, S. M.; Farthing, J. E.; Yang, S.-L.; Lewis, J. A.; O'Neill, M. J.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 529.
- Tuchinda, P.; Pompimon, W.; Reutrakul, V.; Pohmakotr, M.; Yoosook, C.; Kongyai, S.; Sophapan, S.; Sujarit, K.; Upatham, S. E.; Santisuk, T. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8073.
- Reutrakul, V.; Krachangchaeng, C.; Tuchinda, P.; Pohmakotr, M.; Jaipetch, T.; Yoosook, C.; Kasisit, J.; Sophapan, S.; Sujarit, K.; Santisuk, T. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1517.
- Tuchinda, P.; Saijai, A.; Pohmakotr, M.; Yoosook, C.; Kasisit, J.; Napaswat, C.; Santisuk, T.; Reutrakul, V. *Planta Med.* **2004**, *70*, 366.
- Grougnet, R.; Magiatis, P.; Mitaku, S.; Loizou, S.; Moutsatsou, P.; Terzis, A.; Cabalion, P.; Tillequin, F.; Michel, S. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1711.
- Kunert, O.; Sreekanth, G.; Babu, G. S.; Adavi Roa, B. V. R.; Radhakishan, M.; Kumar, B. R.; Saf, R.; Appa Roa, A. V. N.; Schühly, W. *Chem. Biodivers.* **2009**, *6*, 1185.
- Nuanyai, T.; Sappapan, R.; Teerawatananond, T.; Muangsin, N.; Pudhom, K. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1161.
- Nuanyai, T.; Chokpaiboon, S.; Vilaivan, T.; Pudhom, K. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 51.
- Nuanyai, T.; Sappapan, R.; Vilaivan, T.; Pudhom, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 385.
- Nuanyai, T.; Sappapan, R.; Vilaivan, T.; Pudhom, K. *Phytochem. Lett.* **2011**, *4*, 26.
- Ex vivo angiogenesis assay. The rats were maintained according to the guide for the care and use of laboratory animals established by Hiroshima University. All experiments using animals were approved by Hiroshima University Animal Research Committee. A six-week-old specific pathogen free male Wistar rat was sacrificed by bleeding from the right femoral artery under anesthesia with diethyl ether. The thoracic aorta was removed, washed with RPMI 1640 medium, turned inside out, and cut into 1-mm lengths. The aortic rings were then placed on 6-well culture plate and covered with 0.5 mL of gel matrix solution (8 volumes of porcine tendon collagen solution, 1 volume of 10 \times Eagle's MEM and 1 volume of reconstitution buffer), and then allowed to gel at

- 37 °C for 30 min. Two millilitre of RPMI 1640 medium containing 1% (v/v) of TIS+ with the designated doses of the test compounds or vehicle (DMSO) were added to the wells. After incubation for 7 days at 37 °C in 5% CO₂, the capillary length was estimated under phase-contrast microscopy by measuring the distance from the cut end of the aortic segment to the approximate mid-point of the capillary.
- HUVEC proliferation assay. A HUVEC suspension in HuMedia EG2 (1.5×10^4 cells/mL) was seeded into each well of 96-well plate (100 µL) and incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO₂. The medium was then removed and replaced with fresh HuMedia EG2 containing various doses of sootepin B (**1**) or vehicle (DMSO) and incubated for 72 h at 37 °C in 5% CO₂. Cell proliferation was detected using the WST-8 reagent, and the inhibition of proliferation was measured at 450 nm using a microplate reader.
 - HUVEC tube formation assay. HUVEC tube formation was assayed using a BD Matrigel.^{19,20} The solid gel was prepared in a 96-well tissue culture plate according to the manufacture's instruction. HUVECs (1×10^5 cells/mL) in HuMedia EG2 medium containing various doses of sootepin B (**1**) or vehicle (DMSO) alone were seeded onto the surface of the solid BD Matrigel and incubated for 12 h at 37 °C in 5% CO₂. Tube formation was then observed under an inverted light microscope at 40× magnification. Microscopic fields were photographed with a digital camera (OLYMPUS DSE330-A system).
 - Kayashima, T.; Mori, M.; Yoshida, H.; Mizushina, Y.; Matsubara, K. *Cancer Lett.* **2009**, *278*, 34.
 - Kayashima, T.; Mori, M.; Mizutani, R.; Nishio, K.; Kuranochi, K.; Tsubaki, K.; Yoshida, H.; Mizushina, Y.; Matsubara, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *18*, 6305.
 - HUVEC migration assay. HUVEC migration was assayed using a modified Boyden chamber.^{19,20} A microporous membrane (8 µm) as an insert inside each well of 24-well cell culture plates was coated with 0.1%(w/v) gelatin. The HUVEC suspension (2.5×10^5 cells/mL) in Medium 199 with 0.1% (w/v) bovine serum albumin was seeded into each chamber (400 µL) and to each well was added with 400 µL of Medium 199 containing 0.1% (w/v) BSA and 10 ng/mL of human recombinant VEGF with or without sootepin B (**1**). The assembled chamber was incubated for 6 h at 37 °C in 5% CO₂. Non-migrated cells on the surface of the membrane were removed by scrubbing with a cotton swab. The migrated cells were then fixed with methanol, stained with Diff-Quik stain (Sysmex, Kobe, Japan), and then counted on three randomly selected fields of view for each membrane under a light microscope at 200× magnification.
 - Ferrara, N. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1999**, *237*, 1.
 - Shinkaruk, S.; Bayle, M.; Lain, G.; Délérís, G. *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents* **2003**, *3*, 95.
 - Western blot analysis. HUVECs were grown to confluence and then starved for 16 h in RPMI 1640 containing 5%(v/v) FBS. Cells were pretreated for 60 min with sootepin B (0–10 µM) or vehicle (DMSO) alone and stimulated by the addition of VEGF (10 ng/mL) for 10 min. After stimulation, cells were washed twice with PBS and then lysed with mammalian protein extraction reagent (M-PER; Pierce, Rockford, IL, USA). Lysates were clarified by centrifugation for 15 min at 12000 rpm at 4 °C. The protein concentration was determined using the microBCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) with BSA as standard. For each sample, 50 µg of total protein was separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions and then transferred to a nitrocellulose membrane. After blocking, the membranes were incubated with primary antibody for phospho-Erk1/2 or phospho-Akt (Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan) at 4 °C overnight and for Erk1/2 or Akt at room temperature, respectively. Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence using a WesternBreeze (Invitrogen) with a ChemiDoc XRS (BIO-RAD).
 - Zachary, I. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 1171.
 - Meadows, K. N.; Bryant, P.; Pumiglia, K. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 49289.
 - Goetze, S.; Eilers, F.; Bungenstock, A.; Kintscher, U.; Stawowy, P.; Blashchke, F.; Graf, K.; Law, R. E.; Fleck, E.; Grafe, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 1431.



Dammarane triterpenes from the apical buds of *Gardenia collinsae*

Thanesuan Nuanyai^{a,b}, Ruengrit Sappapan^a, Tirayut Vilaivan^a, Khanitha Pudhom^{a,*}

^a Research Centre of Bioorganic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^b Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2010

Received in revised form 28 February 2011

Accepted 3 March 2011

Available online 17 March 2011

Keywords:

Dammarane

Gardenia collinsae

Cytotoxic

ABSTRACT

Two new dammarane triterpenes, named 20*R*,24*R*-epoxy-3-oxo-dammarane-25 ξ ,26-diol (**1**) and its C-24 epimer (**2**), were isolated from the apical buds of *Gardenia collinsae*, along with a known compounds (20*R*,24*R*)-ocotillone (**3**). The structures were elucidated on the basis of spectroscopic evidence. Their cytotoxic effect on five human tumor cell lines was examined.

© 2011 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Gardenia* (Rubiaceae) comprises more than 80 species distributed over the tropical forests in various parts of the world and 15 species of them were reported to be found in Thailand (Smitinand, 2001). Various species of *Gardenia* plants have been used ethnomedically for abortifacient and contraceptive purposes (Woo et al., 1981; Mbela et al., 1992; Jain, 1989), and for the treatment of headaches, asthma and malaria (Croft and Tu'Ipulotu, 1980; Chhabra et al., 1991; Gessler et al., 1995). Additionally, extracts of several species exhibiting anti-implantation and abortifacient effects (Lu et al., 1981), and antiulcer (Takase et al., 1989), antibacterial (Laurens et al., 1985), diuretic, analgesic, hypertensive and larvicidal activities (Hussian et al., 1991; Manson, 1939) have been reported. Previous investigations on the plants in this genus have led to the isolation of an array of structurally diverse flavonoids and cycloartane triterpenoids, with a wide range of biological activities, particularly cytotoxic and anti-HIV effects (Reutrakul et al., 2004; Tuchinda et al., 2002). Recently, we have also reported the isolation and identification of a number of cytotoxic 3,4-*seco*-cycloartane triterpenoids from two species found in Thailand, *Gardenia sootepensis* and *Gardenia tubifera* (Nuanyai et al., 2009, 2010). In the continuing search for potential anti-cancer drug leads from Thai *Gardenia* plants, a new dammarane triterpene (**1**) and its epimer (**2**) were isolated from the apical buds of *G. collinsae*, together with one known compound (20*R*,24*R*)-ocotillone (**3**), as well as their cytotoxicity was also evaluated.

2. Results and discussion

The MeOH-soluble fraction of the fresh apical buds of *G. collinsae* was partitioned between EtOAc and H₂O to afford an EtOAc extract, which was then subjected to silica gel column chromatography using EtOAc-hexane mixtures of increasing polarity as eluent. Further purification by repeated normal-phase column chromatography yielded a new dammarane-type triterpene (**1**) and its C-24 epimer (**2**), along with (20*R*,24*R*)-ocotillone (**3**) (Fig. 1).

Compound **1**, a white amorphous powder, had the molecular formula C₃₀H₅₀O₄ as established by the HRESIMS ion at *m/z* 497.3609 [M+Na]⁺ (calcd 497.3607). Its IR spectrum showed absorption bands at 1710 and 3466 (broad) cm⁻¹, which indicated the presence of carbonyl and hydroxyl groups. Inspection of the ¹³C NMR and HSQC spectra revealed the presence of 30 nonequivalent carbons consisting of one ketone carbonyl, seven tertiary methyls, 11 methylenes (one oxygenated), five methines (one oxygenated) and six quaternary carbons (two oxygenated). The ¹H NMR spectrum of **1** (Table 1) displayed seven singlet signals of tertiary methyls at δ_{H} 0.87, 0.93, 0.99, 1.01, 1.03, 1.08 and 1.16, associating with dammarane-type triterpenoid. The planar structure of **1** was elucidated on the basis of 2D NMR (¹H–¹H COSY, HSQC and HMBC) spectroscopic data (Fig. 2). The tetrahydrofuran ring was evident from a key HMBC correlation from an oxygenated methine proton at δ_{H} 3.82 (H-24) to C-20. An oxygenated methylene group (δ_{H} 3.37 and 3.67; δ_{C} 71.3) was located as C-26 which was addressed by HMBC correlations from H-26 to C-24 and C-25. Detailed analyses of the NMR spectroscopic data of **1** as described above led to the establishment of the same planar structure as 20*S*,24*R*-epoxy-3-oxo-dammarane-25 ξ ,26-diol (**4**) (Anjaneyulu et al., 1993). The NMR data of **1** were also similar to those of **4**, with the marked difference being the ¹³C resonances of Me-21 (δ_{C} 22.5 for **4**) and oxygenated carbons of the tetrahydrofuran unit [δ_{C} 86.4 qC

* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 7639; fax: +66 2 218 7598.

E-mail address: Khanitha.P@chula.ac.th (K. Pudhom).

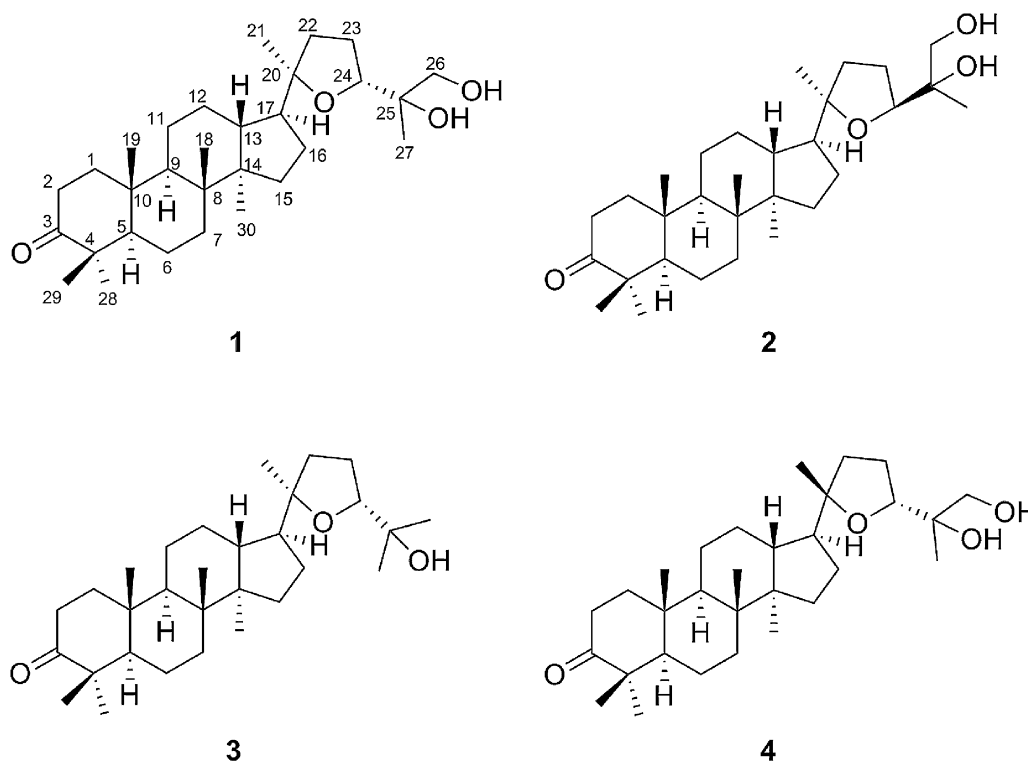


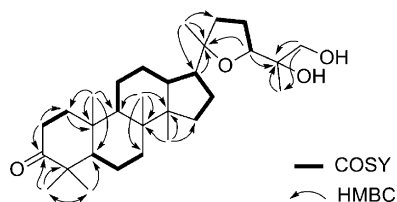
Fig. 1. Structures of the isolated dammarane triterpenes.

Table 1
NMR spectroscopic data (400 MHz, CDCl₃) for compounds 1–3.

Position	1		2		3	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
1a	39.9 CH ₂	1.91 m	39.9 CH ₂	1.91 m	39.9 CH ₂	1.93 m
1b		1.45 m		1.44 m		1.47 m
2	34.1 CH ₂	2.46 m	34.1 CH ₂	2.46 m	34.1 CH ₂	2.47 m
3	218.0 C	–	218.1 C	–	218.1 C	–
4	47.4 C	–	47.4 C	–	47.4 C	–
5	55.3 CH	1.36 m	55.3 CH	1.37 m	55.3 CH	1.37 m
6a	19.6 CH ₂	1.55 m	19.7 CH ₂	1.55 m	19.7 CH ₂	1.56 m
6b		1.45 m		1.46 m		1.46 m
7a	34.5 CH ₂	1.56 m	34.6 CH ₂	1.56 m	34.6 CH ₂	1.56 m
7b		1.30 m		1.31 m		1.31 m
8	40.2 C	–	40.3 C	–	40.3 C	–
9	49.9 CH	1.41 m	49.7 CH	1.42 m	49.8 CH	1.42 m
10	36.8 C	–	36.9 C	–	36.9 C	–
11a	22.1 CH ₂	1.52 m	22.3 CH ₂	1.51 m	22.3 CH ₂	1.52 m
11b		1.25 m		1.24 m		1.26 m
12a	25.7 CH ₂	1.75 m	25.8 CH ₂	1.76 m	25.8 CH ₂	1.77 m
12b		1.33 m		1.29 m		1.32 m
13	43.1 CH	1.61 m	43.0 CH	1.64 m	43.0 CH	1.68 m
14	50.0 C	–	50.0 C	–	50.0 C	–
15a	31.3 CH ₂	1.47 m	31.4 CH ₂	1.46 m	31.4 CH ₂	1.46 m
15b		1.10 m		1.09 m		1.09 m
16	26.1 CH ₂	1.80 m	27.1 CH ₂	1.82 m	27.0 CH ₂	1.84 m
17	50.0 CH	1.85 m	50.1 CH	1.86 m	50.2 CH	1.88 m
18	16.0 CH ₃	0.99 s	16.1 CH ₃	0.99 s	16.1 CH ₃	1.01 s
19	15.1 CH ₃	0.93 s	15.2 CH ₃	0.93 s	15.2 CH ₃	0.94 s
20	87.8 C	–	86.8 C	–	86.5 C	–
21	26.7 CH ₃	1.16 s	26.7 CH ₃	1.16 s	27.2 CH ₃	1.15 s
22a	34.4 CH ₂	1.78 m	34.7 CH ₂	1.88 m	34.8 CH ₂	1.88 m
22b		1.68 m		1.70 m		1.68 m
23a	26.2 CH ₂	2.08 m	27.1 CH ₂	1.81 m	26.4 CH ₂	1.79 m
23b		1.81 m		1.23 m		1.32 m
24	86.3 CH	3.82 dd (4.9, 10.4)	86.3 CH	3.83 dd (4.7, 10.2)	86.4 CH	3.63 m
25	70.6 C	–	72.5 C	–	70.2 C	–
26a	71.3 CH ₂	3.67 t (10.8)	67.5 CH ₂	3.73 d (11.0)	24.1 CH ₃	1.11 s
26b		3.37 d (10.8)		3.39 t (11.0)		
27	20.0 CH ₃	1.01 s	21.4 CH ₃	1.11 s	27.8 CH ₃	1.19 s
28	27.0 CH ₃	1.08 s	26.9 CH ₃	1.07 s	26.7 CH ₃	1.08 s
29	21.0 CH ₃	1.03 s	21.0 CH ₃	1.04 s	21.0 CH ₃	1.04 s

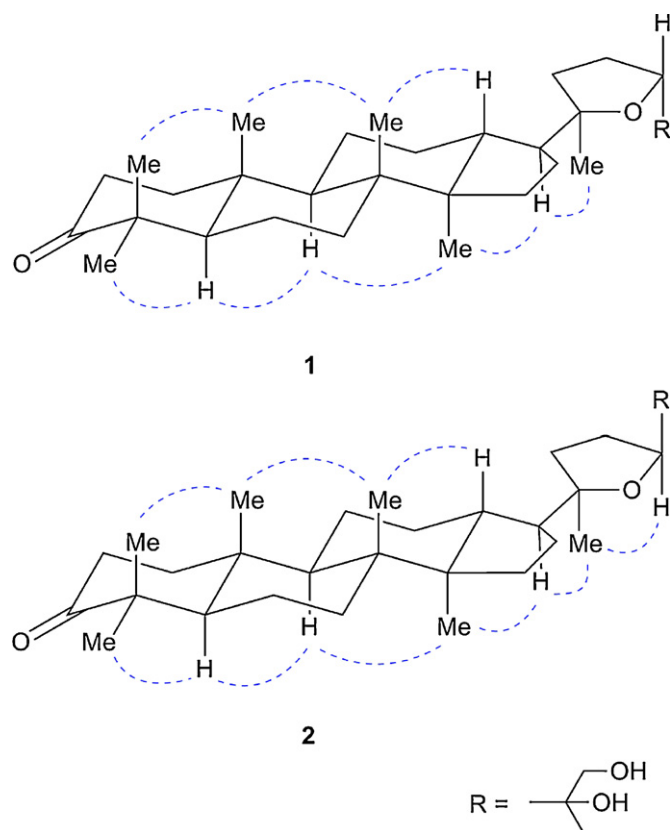
Table 1 (Continued)

Position	1		2		3	
	δ_c	δ_H (J in Hz)	δ_c	δ_H (J in Hz)	δ_c	δ_H (J in Hz)
30	16.2 CH ₃	0.87 s	16.3 CH ₃	0.87 s	16.3 CH ₃	0.88 s
26-OH		3.21 br d (10.56)				

**Fig. 2.** ¹H–¹H COSY and key HMBC correlations of **1**.

(C-20), 82.7 CH (C-24) for **4**]. These results implied that compounds **1** and **4** are diastereomers differing from each other by the relative configurations of the C-20 and C-24 chiral centers. Comparison of the ¹³C NMR data of **1** with those of (20*R*,24*R*)-ocotillone (**3**) and 20*S*,24*R*-epoxy-3-oxo-dammarane-25 ξ ,26-diol (**4**) at C-20 and C-24 (Table 1) indicated that compound **1** should have the 20*R*,24*R* configuration. Furthermore, this was also supported by the lack of NOESY correlation between Me-21 and H-24 (Fig. 3). Thus, compound **1** was determined to be a new dammarane triterpene, 20*R*,24*R*-epoxy-3-oxo-dammarane-25 ξ ,26-diol.

Compound **2** was obtained as colorless gum, and it had the same molecular formula and gross structure as compound **1** by HRESIMS and interpretation of its 2D NMR spectroscopic data. The NMR spectra of **2** (Table 1) were very similar to those of **1**. The only marked difference was the intense NOESY correlation between H-24 and Me-21 (Fig. 3) observed in **2**, but lacked in **1**. This supported that compound **2** should have the 20*R*,24*S* configuration.

**Fig. 3.** Key NOESY correlations of **1** and **2**.

Compound **3** was determined to be (20*R*,24*R*)-ocotillone by means of the comparison with the reported spectral data (Betacor et al., 1983; Wahlberg and Enzell, 1971).

The cytotoxicity of compounds **1–3** was tested in vitro against five human tumor cell lines. Only compound **3** was shown to be moderately cytotoxic against SW-620 and CHAGO cell lines with the same IC₅₀ value of 6.25 μ M, while compounds **1** and **2** did not display any cytotoxic effect at a dose of 10 μ g/mL. Interestingly, the active compound **3** differs from the other compounds in the absence of a C-26 oxygenated methylene group. The increasing of hydrophilic functionality at this position might cause the loss of biological activity of the compounds in this series.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Melting points were determined with a Fisher–Johns melting point apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 341 polarimeter at a wavelength of 589 nm. UV data were recorded on Shimadzu UV-160 spectrophotometer. IR spectra were recorded on Bruker vector 22 Fourier transform infrared spectrophotometer. The NMR spectra were recorded on a Varian YH400 spectrometer at 400 MHz for ¹H NMR and at 100 MHz for ¹³C NMR using TMS (tetramethylsilane) as the internal standard. HRESIMS were obtained using a Bruker micrOTOF mass spectrometer.

3.2. Plant material

The fresh apical buds of *G. collinsae* were collected from Nakorn Sawan Province, Thailand, in February 2010. A voucher specimen (BKF 159041) has been deposited at the Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.

3.3. Extraction and isolation

The fresh apical buds (53 g) of *G. collinsae* were extracted with MeOH (500 mL \times 2, each overnight). After removing the solvent under reduced pressure, the combined MeOH crude extract was suspended in H₂O (200 mL), then partitioned with EtOAc (200 mL \times 3), to afford an EtOAc crude extract (11 g). The EtOAc extract was fractionated by a silica gel column eluted with a gradient system of EtOAc–hexane to yield 25 pooled fractions (I–XXV). Fractions IX and X were combined together and then recrystallized with a 1:4 mixture of acetone–hexane to give **3** (950 mg). Fraction XXI afforded **1** (35.2 mg) after precipitation and filtration. Fraction XXII was rechromatographed on a silica gel column, eluting with MeOH–CH₂Cl₂ (2:98) system to afford nine subfractions (XXIIa–XXIIi). Subfraction XXIIId was further purified by column chromatography on silica gel with a mixture of acetone–hexane (1:3) to yield **2** (8.0 mg).

3.4. 20*R*,24*R*-epoxy-3-oxo-dammarane-25 ξ ,26-diol (**1**)

White amorphous powder; mp 165–166 °C; [α]_D²⁵ +31.0 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 334.0 (1.36), 232.0 (2.20) nm; IR (KBr) 3426, 2939, 1708, 1456, 1378, 1043 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; HRESIMS *m/z* 497.3609 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₀H₅₀O₄Na, 497.3607).

3.5. 20R,24S-epoxy-3-oxo-dammarane-25 ξ ,26-diol (2)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{25} +37.0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 243.9 (3.12) nm; IR (KBr) 3426, 2921, 1708, 1460, 1365, 1040 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; HRESIMS m/z 497.3611 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_4\text{Na}$, 497.3607).

3.6. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was evaluated against five human tumor cell lines using MTT colorimetric method as previously reported (Nuanyai et al., 2009, 2010). The following tumor cell lines were used in the assay; human breast ductal carcinoma ATCC No. HTB 20 (BT474), undifferentiated lung carcinoma (CHAGO), liver hepatoblastoma (Hep-G2), gastric carcinoma ATCC No. HTB 103 (KATO-3), and colon adenocarcinoma ATCC No. CCL 227 (SW-620). All cell lines were obtained from the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, and were cultured in RPMI-1640 supplemented with 25 mM HEPES, 0.25% (w/v) sodium bicarbonate, 5% (v/v) fetal bovine serum, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kayamycin.

Acknowledgments

This work was supported from The 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphisek Somphot Endowment Fund), Research Funds from the Faculty of Science, Chulalongkorn University (RES-A1B1-23), and the Thailand Research Fund (Grant No. DBG5380038). The authors are also grateful Thai Government Stimulus Package (TKK2555) under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.phytol.2011.03.001.

References

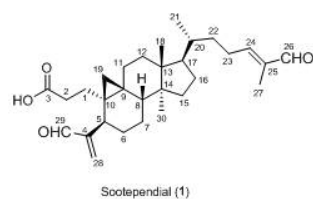
- Anjaneyulu, V., Babu, J.S., Krishna, M., Connolly, J.D., 1993. 3-Oxo-20S,24R-epoxy-dammarane-25 ξ ,26-diol from *Mangifera indica*. *Phytochemistry* 32, 469–471.
- Betacor, C., Freire, R., Hernández, R., Suárez, E., 1983. Dammarane triterpenes of *Trevoa trinervis*: structure and absolute stereochemistry of trevoagenins A, B, and C¹. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1119–1126.
- Chhabra, S.C., Mahunnah, R.L.A., Mshiu, E.N., 1991. Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania. V. Angiosperms (Passifloraceae to Sapindaceae). *J. Ethnopharmacol.* 33, 143–157.
- Croft, K.D., Tu'Ipulotu, P., 1980. *S. Pacific J. Nat. Sci.* 1, 45–47.
- Gessler, M.C., Msuya, D.E., Nkunya, M.H.H., Mwasumbi, L.B., Schär, A., Heinrich, M., Tanner, M., 1995. Traditional healers in Tanzania: the treatment of malaria with plant remedies. *J. Ethnopharmacol.* 48, 131–144.
- Hussain, M.M., Sokomba, E.N., Shok, M., 1991. Pharmacological effects of *Gardenia erubescens* in mice, rats and cats. *Int. J. Pharmacog.* 29, 94–100.
- Jain, S.P., 1989. Tribal remedies from Saranda forest, Bihar, India. *Int. J. Crude Drug Res.* 27, 29–32.
- Laurens, A., Mboup, S., Tignokpa, M., Sylla, O., Masquelier, J., 1985. Antimicrobial activity of some medicinal species of Dakar markets. *Pharmazie* 40, 482–484.
- Lu, R.F., Aeng, Y.R., Wang, W.C., 1981. *Sheng Chih Yu Bi Yun* 12, 16–18.
- Manson, D., 1939. *J. Malaria Inst. India* 2, 85–93.
- Mbela, T.K.M., Shabani, M., Dieyi, S., Cimanga, K., Moswa, L., 1992. Amoebicidal, fungicidal and bactericidal properties of bark extracts of *Gardenia jovis tonantis*. *Fitoterapia* 63, 179–181.
- Nuanyai, T., Sappapan, R., Teerawatananond, T., Muangsin, N., Pudhom, K., 2009. Cytotoxic 3,4-*seco*-cycloartane triterpenes from *Gardenia sootepensis*. *J. Nat. Prod.* 72, 1161–1164.
- Nuanyai, T., Chokpaiboon, S., Vilaivan, T., Pudhom, K., 2010. Cytotoxic 3,4-*seco*-cycloartane triterpenes from the exudate of *Gardenia tubifera*. *J. Nat. Prod.* 73, 51–54.
- Reutrakul, V., Krachangchaeng, C., Tuchinda, P., Pohmakotr, M., Jaipetch, T., Yoosook, C., Kasisit, J., Sophasan, S., Sujarit, K., Santisuk, T., 2004. Cytotoxic and anti-HIV-1 constituents from leaves and twigs of *Gardenia tubifera*. *Tetrahedron* 60, 1517–1522.
- Smitinand, T., 2001. Thai Plant Names, revised edition by The Forest Herbarium. Royal Forest Department, Pra Cha Chon Co., Ltd., Bangkok.
- Takase, H., Imanishi, K., Miura, O., Yumioka, E., Watanabe, H., 1989. Features of the anti-ulcer effects of Oren-gedoku-to (a traditional Chinese medicine) and its component herb drugs. *Jpn. J. Pharmacol.* 49, 301–308.
- Tuchinda, P., Pompimon, W., Reutrakul, V., Pohmakotr, M., Yoosook, C., Kongyai, N., Sophasan, S., Sujarit, S., Upathum, S., Santituk, T., 2002. Cytotoxic and anti-HIV-1 constituents of *Gardenia obtusifolia* and their modified compounds. *Tetrahedron* 58, 8073–8086.
- Wahlberg, I., Enzell, C.R., 1971. 20R,24-epsilon-2-ocotillone, a triterpenoid from commercial tolu balsam. *Acta Chem. Scand.* 25, 352–355.
- Woo, W.S., Lee, E.B., Shin, K.H., Kang, S.S., Chi, H.J., 1981. A review of research on plants for fertility regulation in Korea. *Korean J. Pharmacol.* 12, 153–170.

SOOTEPENDIAL, A NEW 3,4-SECO CYCLOARTANE FROM A THAI GARDENIA PLANT, INDUCES APOPTOSIS IN LIVER CANCER CELL AND ANGIOGENIC INHIBITION

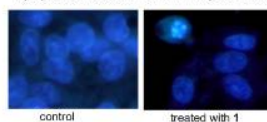
Khanitha Pudhom, Thanesuan Nuanyai, Kiminori Matsubara

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand
Department of Human Life Science Education, Graduate School of Education, Hiroshima University, Hiroshima 739-8524, Japan*

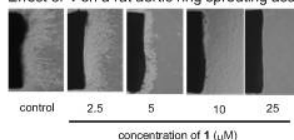
Ring-A 3,4-*seco*-cycloartane triterpenes have been mainly found in plants belonging to the genus *Gardenia* (Rubiceae). Many of them have been found to exhibit cytotoxic activity towards various cancer cell lines. We aimed to determine 3,4-*seco*-cycloartane from Thai *Gardenia* spp. potential for cancer leads and to explore the detailed mechanism. In this study, a new 3,4-*seco*-cycloartane triterpenes, sootependial (**1**) was isolated from bud exudate of Thai *G. sootepensis* and its structure was elucidated on the basis of spectroscopic data. Sootependial (**1**) showed potent cytotoxicity selective to human liver cancer cells (Hep-G2) in MTT assay and antiangiogenic activity in *ex vivo* model (a rat aortic ring sprouting) assay. Treatment with **1** exerted growth inhibition through G1 arrest and actively induced apoptosis of Hep-G2 cells. Its induction of apoptosis was accompanied by a reduction of Bcl-2 level. Moreover, its angiogenic effect was found to occur mainly by suppressing endothelial cell proliferation and tubule formation, suggesting the potential of **1** as a lead compound for cancer treatment.



Apoptotic induction of **1** in Hep-G2 cells



Effect of **1** on a rat aortic ring sprouting assay



References