b. 1140548

# รายงานฉบับสมบูรณ์

## การค้นหายาจากพืชสมุนไพรไทยวงศ์ Rutaceae ที่มีศักยภาพต้านมะเร็งหรือจุลชีพ ปีที่ 2

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัตน์ ละภูเขียว

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร. สาโรจน์ จีนประชา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2555

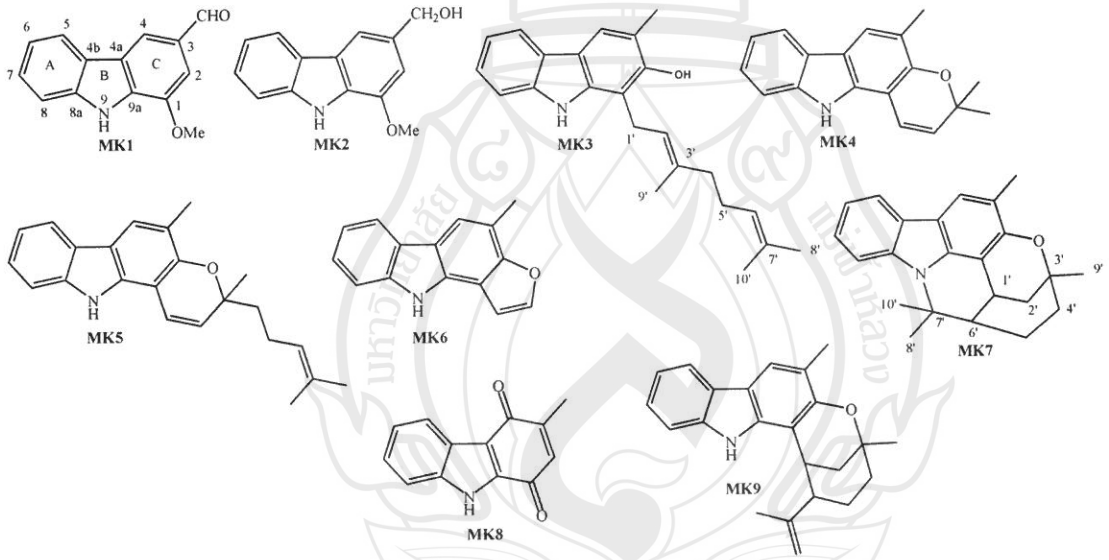
# กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการวิจัยตลอดโครงการวิจัย (งบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2555) ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อุมา ประวัติ และนางสาวนารีรัตน์ ทองทิพย์ ที่ช่วยเหลือการบันทึกข้อมูล NMR บางส่วน ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่บันทึกข้อมูล HRMS และสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่ช่วยเหลือการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือในการวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัตน์ ละภูเขียว
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
2555

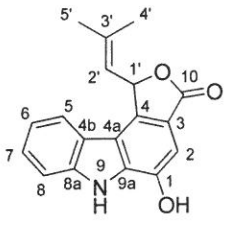
# บทคัดย่อ


จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของต้นหอมแขกสามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานแล้วจำนวน 9 สารคือ murrayanine (**MK1**) koenoline (**MK2**) mahanimbinol (**MK3**) girinimbine (**MK4**) mahanimbine (**MK5**) furostifoline (**MK6**) murrayazoline (**MK7**) murrayaquinone A (**MK8**) murrayazolidine (**MK9**) โครงสร้างของสารประกอบเหล่านี้วิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี สารที่แยกได้ทั้งหมดนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลอง 3 ชนิดคือ มะเร็งในช่องปาก (Oral cavity cancer, KB) มะเร็งปอด (Small cell lung cancer, NCI-H187) และมะเร็งทรวงอก (Breast cancer, MCF-7) จากการทดลองพบว่าสาร **MK8** จะแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดได้ดีกว่ายามาตรฐาน Ellipticine (4.79 μM) โดยมีค่า $IC_{50}$ อยู่ที่ 2.98 μM สำหรับสารอื่น ๆนั้นแสดงฤทธิ์ได้น้อยกว่ายามาตรฐาน

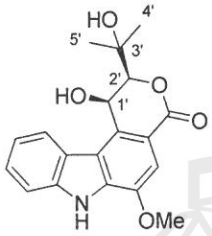



สำหรับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากกิ่งจันทร์หอม สามารถแยกสารประกอบได้ทั้งหมด 16 สาร โดยเป็นสารประกอบคาร์บาโซลอัลคาลอยด์ใหม่ 3 สารคือ harmandianamines A-C (**J1-J3**) และสารที่มีการรายงานแล้ว 13 สาร คือ clausevatine D (**J4**), clausamine A (**J5**), clausamine B (**J6**), clausine S (**J7**), girinimbine (**J8**), *O*-demethylmurrayanine (**J9**), clauszoline I (**J10**), clausine Z (**J11**), clauszoline N (**J12**), clausine D (**J13**), clausine F (**J14**), clausemine D (**J15**), heptaphylline (**J16**) โครงสร้างของสารประกอบเหล่านี้วิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี สารประกอบ **J1-J12, J14** และ **J15** ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์คือ *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, and methicillin-resistant

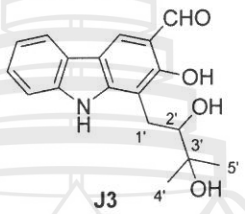
*Staphylococcus aureus* (MRSA) SK1 โดยพบว่าสารทุกตัวแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* TISTR 780 และ *Salmonella typhimurium* TISTR 292 ในระดับต่ำหรือไม่แสดงฤทธิ์ (64-128 μg/mL) สำหรับสาร **J6** แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ MRSA SK1 อย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่า MIC = 0.25 μg/mL ซึ่งดีกว่ายามาตรฐาน vancomycin (MIC = 1 μg/mL) สำหรับสาร **J5** และ **J14** แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ MRSA SK1 ได้ดีเช่นเดียวกันโดยมีค่า MIC เป็น 8 และ 4 μg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้แล้วสาร **J14** ยังแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ได้ดีเช่นกันโดยมีค่า MIC เป็น 4 μg/mL



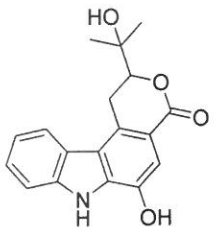
**J1**



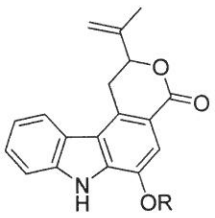
**J2**



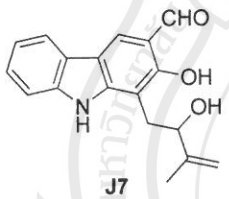
**J3**



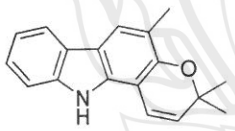
**J4**



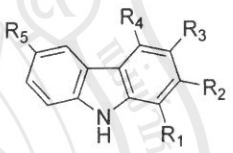
**J5**: R = H
**J6**: R = Me



**J7**



**J8**



| | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $R_4$ | $R_5$ |
|---|---|---|---|---|---|
| **J9** | OH | H | CHO | H | H |
| **J10** | OH | H | CO2Me | H | H |
| **J11** | OH | H | CHO | H | OH |
| **J12** | H | OH | CHO | H | OH |
| **J13** | OH | H | CHO | Isoprene | H |
| **J14** | OH | H | CO2Me | Isoprene | H |
| **J15** | OMe | H | CO2Me | Isoprene | H |
| **J16** | Isoprene | OH | CHO | H | H |

## บทสรุปผู้บริหาร

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีบทบาทสำคัญในการศึกษาเพื่อค้นคว้าหายามารักษาโรคหรือการประยุกต์ใช้ในด้านอื่น ๆที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นการค้นหาองค์ประกอบทางเคมีจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาเพื่อให้เกิดการค้นพบตัวยาหรือสารประกอบใหม่ ๆในอนาคต

แพทย์แผนโบราณมีการใช้พันธุ์ไม้หลายชนิดเป็นสมุนไพรในการรักษาโรค ซึ่งบางชนิดก็จะมีผลข้างเคียงหรือมีพิษหากรับประทานเข้าไปในปริมาณมาก ๆ เนื่องจากมีการรับประทานทั้งส่วน เช่น มีการนำทั้ง กิ่ง หรือ ราก ของพันธุ์ไม้มาต้มแล้วนำน้ำที่ได้จากการต้มมาดื่มซึ่งจะทำให้ร่างกายได้รับทั้งสารที่มีคุณและโทษในขณะเดียวกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาอย่างเป็นระบบเพื่อแยกและหาองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบนั้น ๆ อย่างจำเพาะเจาะจง เพื่อให้ได้ข้อมูลของสารที่ออกฤทธิ์และสามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างถูกต้องจึงจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์วิจัยองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืช 2 ชนิดคือหอมแขกและจันทร์หอม

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของหอมแขกสามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานแล้วจำนวน 9 สาร โดยที่ **MK8** สามารถแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งมะเร็งปอดได้ดีกว่ายามาตรฐาน Ellipticine (4.79 μM) โดยมีค่า $IC_{50}$ อยู่ที่ 2.98 μM สำหรับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของจันทร์หอมสามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานแล้วจำนวน 13 สารและสารใหม่ 3 สารคือ Harmandianamines A-C (**J1-J3**) โดยสาร **J6** แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ MRSA SK1 อย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่า MIC = 0.25 μg/mL ซึ่งดีกว่ายามาตรฐาน vancomycin (MIC = 1 μg/mL) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารแอลคาร์ลอยด์ **MK8** และ **J6** มีศักยภาพที่ดีในการต้านมะเร็ง และแบคทีเรียตามลำดับ ซึ่งสารทั้งสองตัวนี้อาจเป็นประโยชน์ในด้านการแพทย์ในอนาคต

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | (1) |
| บทคัดย่อ | (2) |
| บทสรุปผู้บริหาร | (4) |
| สารบัญ | (6) |
| สารบัญภาพ | (7) |
| **บทที่ 1** บทนำ | 1 |
| **บทที่ 2** แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 3 |
| **บทที่ 3** วิธีดำเนินการวิจัย | 8 |
| **บทที่ 4** ผลการวิจัย | 18 |
| **บทที่ 5** สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ | 27 |
| เอกสารอ้างอิง | 30 |
| ภาคผนวก | 32 |

# บทที่ 1 บทนำ

## 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่นำไปสู่การค้นคว้าวิจัย

แพทย์แผนโบราณมีการใช้พันธุ์ไม้หลายชนิดเป็นสมุนไพรในการรักษาโรค ซึ่งบางชนิดอาจมีผลข้างเคียงหรือมีพิษหากรับประทานเข้าไปในปริมาณมาก ๆ เนื่องจากมีการรับประทานทั้งส่วน เช่น นำกิ่งหรือ เมล็ด มาบดแล้วรับประทาน หรือ มีการนำทั้ง กิ่ง ใบ หรือ ราก ของพันธุ์ไม้มาต้มแล้วนำน้ำที่ได้จากการต้มมาดื่มซึ่งจะทำให้ได้ทั้งสารที่มีคุณและโทษในขณะเดียวกัน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาอย่างเป็นระบบเพื่อแยกและหาองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบนั้น ๆ อย่างจำเพาะเจาะจง เพื่อให้ได้ข้อมูลของสารที่ออกฤทธิ์และนำไปใช้ประโยชน์อย่างถูกต้องจึงจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

ยาสำคัญหลายชนิดใช้สารที่ได้จากพืชเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ ดังนั้นจึงมีการวิจัยเพื่อพยายามหาองค์ประกอบสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรค หรือ เพื่อสังเคราะห์สารคล้ายคลึง หรือ อนุพันธ์ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาวิจัยและทดสอบสารที่ได้จากตัวอย่างพืชจำนวนมากมายหลายชนิดและจากหลาย ๆ ส่วนของพืชจึงจะค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามการสกัดสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นเพียงการเริ่มต้นในกระบวนการศึกษาเพื่อ ที่จะค้นพบสารสำคัญใหม่ ๆ แต่ขั้นตอนที่สำคัญคือการหาเอกลักษณ์หรือโครงสร้างของสารและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนั้น ๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปทางด้านการสังเคราะห์ เภสัชเคมี และ การแพทย์

ปัจจุบันมีสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดที่อยู่ในระหว่างการวิจัยระดับคลินิคเพื่อใช้เป็นยาป้องกันโรคมะเร็งเช่นสารประกอบเคอร์คิวมินที่แยกได้จากพืชสกุลขมิ้น สารประกอบไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองและวิตามินซี เป็นต้น ดังนั้นการค้นคว้าวิจัยด้านสารออกฤทธิ์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงมีบทบาทที่สำคัญในการค้นคว้าหายามารักษาโรคในอนาคตและใช้ยังสามารใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เพื่อให้เกิดสารประกอบที่แสดงฤทธิ์ได้ดียิ่งขึ้น

ในการศึกษาวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้มุ่งเน้นศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) เนื่องจากเป็นพืชที่พบได้มากเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบว่าพืชวงศ์ส้มหลายชนิดยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสกัดและแยกองค์ประกอบทางเคมีจากหอมแขก และจันทร์หอมให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์โครงสร้าง

2. ทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและต้านจุลชีพ ของส่วนสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์

3. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและโครงสร้างทางเคมี

## 1.3 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

แยกองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตของหอมแขกและแอซิโตนของจันทร์หอมและทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

**1.4 นิยามศัพท์**

ไม่มี

**1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย**

1. เผยแพร่ข้อมูลด้านสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชวงศ์ Rutaceae เพื่อพัฒนาไปสู่ตัวยาในอนาคต
3. ตีพิมพ์ผลงานในระดับนานาชาติ หรือจดสิทธิบัตร

# บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

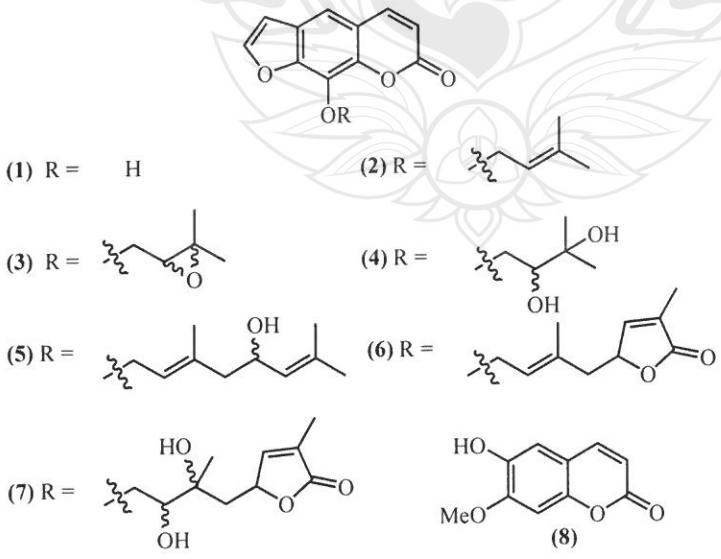
## 2.1 ทฤษฎี ตัวแบบ แนวคิด เหตุผล หรือสมมุติฐาน

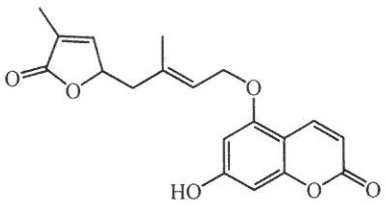
Coumarins และ Carbazole alkaliods เป็นสารประกอบหลักที่พบมากในพืชในวงศ์ Rutaceae จากการรายงานบทความทางวิชาการพบว่าสารประกอบ coumarins และ carbazole alkaloids ที่แยกได้จากพืชในวงศ์นี้ แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจเช่น ต้านมาลาเรีย ต้านมะเร็ง และต้านเชื้อจุลชีพ หอมแขก และจันทร์หอมเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Rutaceae ซึ่งเป็นพืชที่พบได้ในประเทศไทย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้คาดว่าจะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าสารที่พบในชนิดอื่น ๆของวงศ์นี้ และสามารถนำสารออกฤทธิ์นั้นไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางด้านต่าง ๆเช่น ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง หรือยาสมุนไพรเป็นต้น

## 2.2 สรุปสาระสำคัญจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

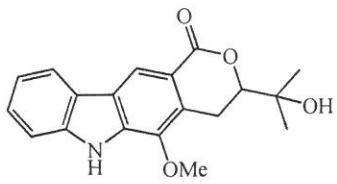
**จันทร์หอม** (*Clausena harmandiana*) จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นไม้พุ่ม ลำต้นสีเขียวอมน้ำตาลเข้ม ไม่มีขน ใบประกอบมีลักษณะขนนกปลายคี่ เรียงสลับ ใบรวมมีใบย่อย 3-7 ใบ ใบสีเขียวเข้ม ผิวใบมัน มีจุดน้ำมันกระจายและจุดโปร่งใส สามารถส่องทะลุไปอีกด้านได้ ขอบใบมีรอยหยักแบบฟันเลื่อยห่าง ช่อดอกแบบแยกแขนง เกิดที่ปลายยอด ดอกเดี่ยวสีเหลืองอมเขียวอ่อน ๆ อับเรณูสีเหลือง ผลเป็นรูปกลมรี ผลอ่อนสีเขียว ผลแก่เป็นสีชมพูอมขาว จากการสืบค้นวารสารทางวิชาการพบว่ามีการรายงานองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่ม coumarins และ alkaloids จากพืชสกุล *Clausena* ดังนี้เช่น

จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชวงศ์ส้ม สกุล *Clausena* พบว่า ในปี 2010 Maneerat และคณะ สามารถแยกสารประกอบ alkaloids และ coumarins ที่แสดงฤทธิ์ต้านมาลาเรียและมะเร็งในระดับที่น่าสนใจจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของส่วนกิ่งมะไฟจีน (*Clausena lansium*) ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดง

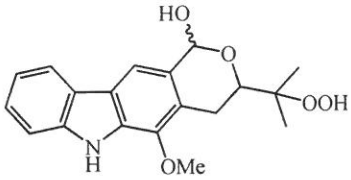




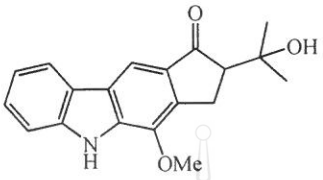
**(9)**



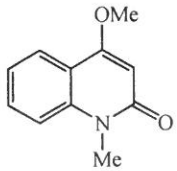
**(10)**



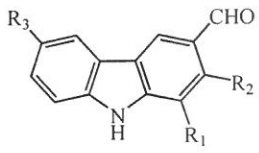
**(11)**

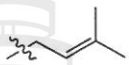


**(12)**

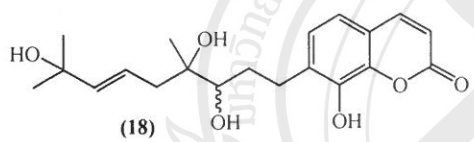


**(13)**

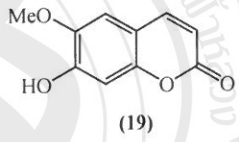


| | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ |
|---|---|---|---|
| **(14)** | OMe |  | H |
| **(15)** | H | OH | OMe |
| **(16)** | H | OMe | OMe |
| **(17)** | OMe | H | H |

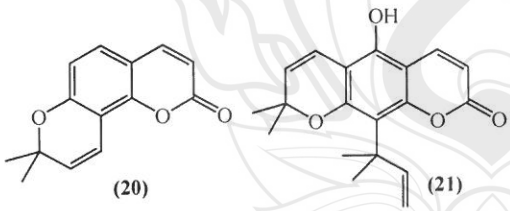
นอกจากนั้นแล้วในปี 2009 และ 2010 คณะผู้วิจัยยังทำการศึกษาวิจัยองค์ประกอบทางเคมีของส่วนผลและลำต้นสันโสก (*Clausena excavata*) สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีที่แสดงฤทธิ์ต้านมาลาเรียและมะเร็ง ดังแสดง



**(18)**



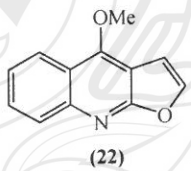
**(19)**



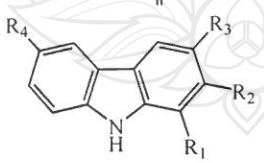
**(20)**



**(21)**



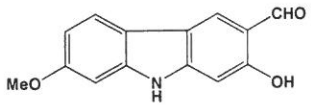
**(22)**



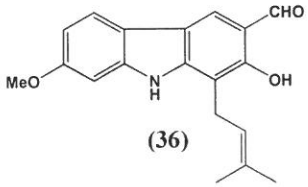
| | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $R_4$ |
|---|---|---|---|---|
| **(23)** | OMe | H | $CO_2Me$ | H |
| **(24)** | H | H | $CO_2Me$ | H |
| **(25)** | H | OH | CHO | OMe |
| **(26)** | OMe | H | CHO | H |
| **(27)** | H | H | CHO | H |
| **(28)** | H | OH | $CO_2Me$ | H |

| | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $R_4$ |
|---|---|---|---|---|
| **(29)** | H | OMe | CHO | H |
| **(30)** | H | OH | $CO_2Me$ | OH |
| **(31)** | OH | H | $CO_2Me$ | H |
| **(32)** | OH | H | CHO | H |
| **(33)** | OH | H | $CO_2Me$ | OH |
| **(34)** | OH | H | CHO | OH |

ในปี ค.ศ. 1988 Chaichantipyuth และคณะ ได้รายงานผลทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง ของสารประกอบ carbazole alkaloid จากต้นส่องฟ้า

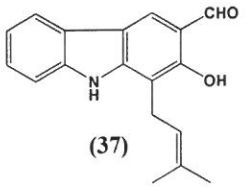



(35)

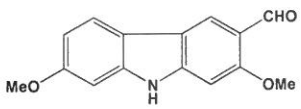



(36)

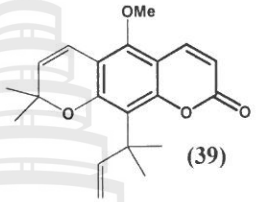
ในปี ค.ศ. 2000 Yenjai และคณะ สามารถแยกสารประกอบ coumarins และ carbazole alkaloids ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรงมาลาเรีย จากรากต้นส่องฟ้า



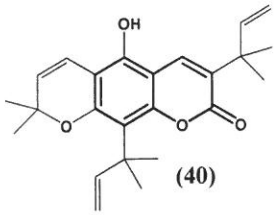

(37)




(38)

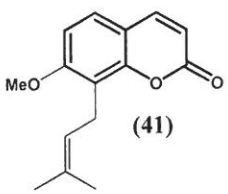



(39)

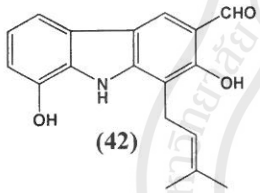



(40)

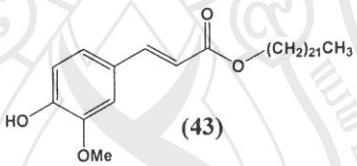
ในปี ค.ศ. 2010 Thongthoom และคณะ สามารถแยกสารประกอบ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง มีโครงสร้างดังแสดง จากรากต้นส่องฟ้า



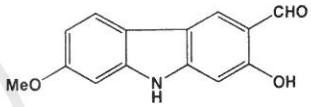

(41)



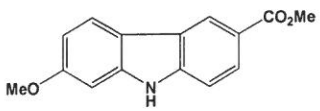

(42)



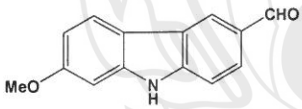

(43)



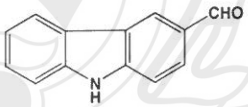

(44)



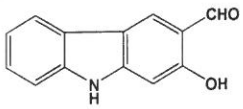

(45)



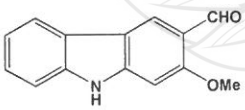

(46)



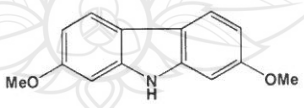

(47)




(48)




(49)

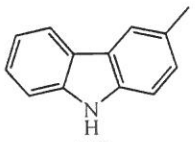



(50)

**หอมแขก** (*Murraya koenigii*) เป็นไม้พุ่มไม่ผลัดใบ หรือไม้ยืนต้นขนาดเล็ก อยู่ในวงศ์ส้ม (Rutaceae) **ใบ** เรียงแบบขนนกปลายคี่ ใบย่อยเรียงแบบสลับ รูปมนรีแคบหรือรูปหอก ใบเรียบหรือมีน้อยที่เป็นซี่หยักตื้น ๆ **ดอก** สีขาวอมเขียวหรือขาวแกมเหลือง กลิ่นหอม ช่อดอกแน่นด้านบนแบน ออกที่ปลายกิ่ง กลีบดอกโค้งกลับ **ผล** รูปกระสวยหรือรูปไข่ สีเขียวอมเหลือง สุกสีแดงสดหรือสีน้ำเงินเข้ม ก้าน

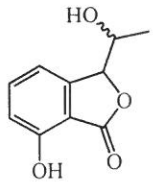
ผลสั้น เรียบเป็นมันมี 3 เมล็ด จากการศึกษาวารสารทางวิชาการพบว่ามีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากหอมแขกมาบ้างแล้ว ซึ่งสารประกอบที่แยกได้ส่วนใหญ่นั้นเป็น coumarins และ alkaloids ดังแสดง

ในปี ค.ศ. 2001 Sukari และคณะ สามารถแยกสารประกอบ carbazole alkaloidได้จากส่วนสกัดหยาบของรากหอมแขก ดังแสดง

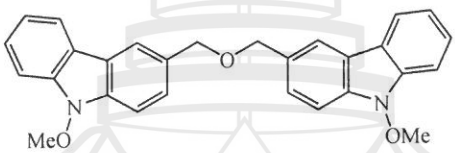


(51)

ในปี ค.ศ. 2005 Rahman และคณะ สามารถแยกสารจากส่วนลำต้นได้สารประกอบเบนโซไอโซฟูราโนน (benzoisofuranone) 1 สาร และสารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 1 สาร ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดง

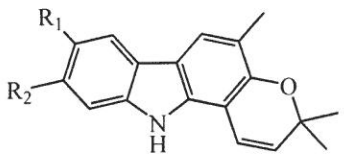


(52)

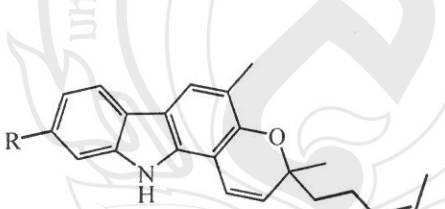


(53)

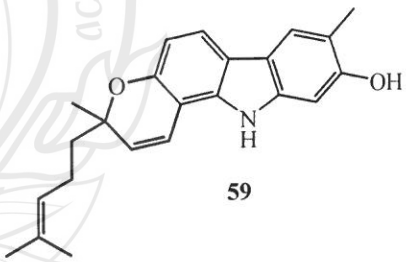
ในปี ค.ศ. 2006 Ito และคณะ สามารถแยกสารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ได้ 9 สาร ดังแสดง



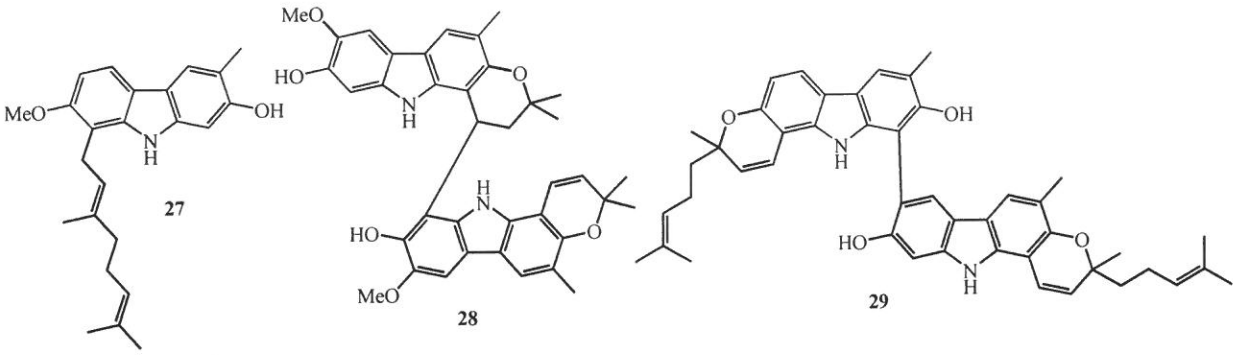
| | $R_1$ | $R_2$ |
|---|---|---|
| **(54)** | OH | H |
| **(55)** | OMe | H |
| **(56)** | OMe | OH |
| **23** | OMe | OMe |



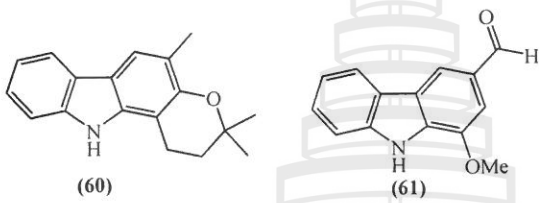
**(57)** R = H
**(58)** R = OH



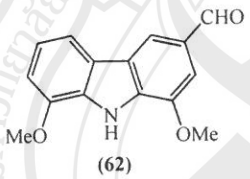
**59**



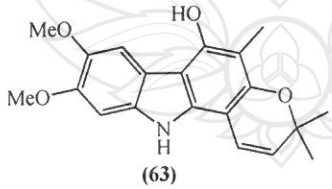

ในปี ค.ศ. 2007 Bakar และคณะ แยกสารประกอบ carbazole alkaloids จากส่วนรากและลำต้น ดังแสดง




ในปี ค.ศ. 2008 Intekhab และคณะ แยกสารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์จากรากได้สารประกอบ 3-formyl 1,8-dimethoxy carbazole




ในปี ค.ศ. 2010 Mandal และคณะ รายงานองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนเมล็ด ของสารประกอบ carbazole alkaloid ดังแสดง



# บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

## วิธีการทดลอง

### 3.1 เครื่องมือและสารเคมี

#### 3.1.1 เครื่องมือ

- Quick Column Chromatography
- Column Chromatography
- Nuclear Magnetic Resonance spectrum 400 MHz Bruker
- BUCHI Rotary evaporator
- FT-IR Spectrometor
- UV SPECCORD S100

#### 3.1.2 สารเคมี

- Hexanes ($C_6H_{14}$)
- Dichloromethane ($CH_2Cl_2$)
- Ethylacetate (EtOAc)
- Acetone ($CH_3COCH_3$)
- Methanol ($CH_3OH$)
- Chloroform ($CH_3Cl$)
- Dueterochloroform ($CD_3Cl$)
- Acetone-$d_6$ ($CD_3COCD_3$)
- Siliga gel 60 (Merck)
- Siliga gel 100 (Merck)

### 3.2. พืชตัวอย่าง

ลำต้นหอมแขก เก็บจากจังหวัดสตูล ปี 2553 (Specimen number MFU-NPR0010)

กิ่งจันทร์หอม เก็บจากจังหวัดเชียงราย ปี 2554 (Specimen number QBG 45334)

### 3.3. การสกัดและการแยกสาร

นำลำต้นหอมแขก (5.19 kg) ที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งลมให้แห้ง สกัดด้วยเอทิลแอซิเทต (EtOAc) 2 ครั้งๆละ 3 วันจากนั้นนำส่วนที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิลแอซิเทต มาระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซิเทต (38.71 g) นำส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตไปแยกต่อด้วย quick column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ โดยมี hexanes และ แอซิโตน เป็นตัวชะในลักษณะเพิ่มขั้วขึ้นตามลำดับ ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือสาร **MK7** และ13 ส่วนย่อย (A-M)

**Murrayazoline (MK7)**: ผลึกสีขาว mp 266-267°C; $^1$H NMR ($CDCl_3$) $\delta$ 7.89 (1H, br s, H-5), 7.49 (1H, br s, H-8), 7.46 (1H, br s, H-4), 7.24 (1H, m, H-6), 7.15 (1H, dt, $J$ = 7.6, 7.2 Hz, H-7), 3.30 (1H, br d, $J$ = 4.8 Hz, H-1′), 2.38 (1H, ddd, $J$ = 13.2, 4.4, 3.2 Hz, H-2′), 2.33 (3H, s, $CH_3$-3), 1.96 (1H, ddd, $J$ = 10.8, 6.4, 2.4 Hz, H-6′), 1.92 (1H, m, H-2′), 1.92 (3H, s, H-10′), 1.62 (1H, ddd, $J$ = 15.2, 6.8, 2.8 Hz, H-4′), 1.50 (1H, m, H-

5′), 1.45 (3H, s, H-9′), 1.31 (1H, m, H-4′), 1.28 (3H, s, $CH_3$-8′), 0.17 (1H, ddd, $J$ = 13.6, 11.6, 7.2 Hz, H-5′); $^{13}$C NMR ($CDCl_3$) δ 155.0 (C-2), 142.4 (C-8b), 140.6 (C-8a), 127.3 (C-4b), 122.6 (C-6), 119.8 (C-5), 119.2 (C-7), 119.1 (C-4), 118.4 (C-3), 113.9 (C-4a), 113.4 (C-8), 107.3 (C-1), 76.1 (C-3′), 60.1 (C-7′), 48.6 (C-6′), 36.8 (C-4′), 36.1 (C-2′), 30.1 (C-10′), 29.2 (C-9′), 28.3 (C-1′), 22.9 (C-8′), 21.8 (C-5′), 15.4 ($CH_3$-3)

ส่วนย่อย D (6.83 g) นำไปแยกต่อด้วย QCC ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย 20% $CH_2Cl_2$-hexanes ได้ สาร **MK4** (10 mg) และ 9 ส่วนย่อย (DA-DI) และส่วนย่อย DC (139.4 mg) นำไปแยกต่อด้วย CC ชะด้วย 20% $CH_2Cl_2$-hexanes ได้ สาร **MK3** (6.6 mg) และ **MK5** (3.6 mg)

**Mahanimbinol (MK3)**: ของหนืดสีน้ำตาล $^1$H NMR ($CDCl_3$) δ 7.93 (1H, br d, $J$ = 7.6 Hz, H-5), 7.85 (1H, br s, NH), 7.68 (1H, s, H-4), 7.36 (1H, br d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 7.30 (1H, br t, $J$ = 7.6, 7.2 Hz, H-6), 7.17 (1H, br t, $J$ = 7.2 Hz, H-7), 5.37 (1H, t, $J$ = 6.8 Hz, H-2′), 5.21 (1H, br s, OH), 5.07 (1H, m, H-6′), 3.62 (2H, d, $J$ = 6.8 Hz, H-1′), 2.40 (3H, s, $CH_3$-3), 2.12 (4H, m, H-4′ and -5′), 1.90 (3H, s, $CH_3$-9′), 1.66 (3H, s, $CH_3$-8′), 1.59 (3H, s, $CH_3$-10′); $^{13}$C NMR ($CDCl_3$) δ 151.2 (C-2), 139.4 (C-8a), 139.0 (C-3′), 138.4 (C-8b), 132.1 (C-7′), 124.2 (C-6), 123.6 (C-4b and C-6′), 121.3 (C-2′), 119.3 (C-4, C-5 and C-7), 117.0 (C-3), 116.6 (C-4a), 110.3 (C-8), 107.8 (C-1), 39.6 (C-4′), 26.4 (C-5′), 25.6 ($CH_3$-8′), 24.7 (C-1′), 17.7 ($CH_3$-10′), 16.5 ($CH_3$-3), 16.4 ($CH_3$-9′)

**Girinimbine (MK4)**: ผลึกสีขาว mp 175-176°C; $^1$H NMR ($CDCl_3$) δ 7.91 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.84 (1H, br s, NH), 7.67 (1H, s, H-4), 7.36 (1H, d, $J$ = 7.6 Hz, H-8), 7.29 (1H, t, $J$ = 8.0, 7.2 Hz, H-6), 7.17 (1H, t, $J$ = 7.6 Hz, H-7), 6.60 (1H, d, $J$ = 10.0 Hz, H-1′), 5.69 (1H, d, $J$ = 10.0 Hz, H-2′), 2.33 (3H, s, $CH_3$-3), 1.48 (6H, s, $CH_3$-4′ and $CH_3$-5′); $^{13}$C NMR ($CDCl_3$) δ 149.8 (C-2), 139.4 (C-8a), 134.8 (C-8b), 129.4 (C-2′), 124.2 (C-6), 123.9 (C-4b), 121.1 (C-3 and C-4), 119.4 (C-7), 119.3 (C-5), 118.6 (C-4a), 117.2 (C-1′), 110.3 (C-8), 104.4 (C-1), 75.8 (C-3′), 27.6 (C-4′ and C-5′), 16.0 ($CH_3$-3)

**Mahanimbine (MK5)**: ของแข็งสีขาว mp 68-71°C; $^1$H NMR ($CDCl_3$) δ 7.94 (1H, dd, $J$ = 7.6 Hz, H-5), 7.83 (1H, br s, NH), 7.69 (1H, s, H-4), 7.39 (1H, m, H-8), 7.30 (1H, m, H-7), 7.20 (1H, m, H-6), 6.61 (1H, d, $J$ = 9.6 Hz, H-1′), 5.65 (1H, d, $J$ = 9.6 Hz, H-2′), 5.15 (1H, t, $J$ = 7.2 Hz, H-6′), 2.37 (3H, s, $CH_3$-3), 2.20 (2H, m, H-5′), 1.79 (2H, m, H-4′), 1.69 (3H, s, $CH_3$-10′), 1.62 (3H, s, $CH_3$-8′), 1.48 (3H, s, $CH_3$-9′); $^{13}$C NMR ($CDCl_3$) δ 149.9 (C-2), 139.4 (C-8a), 134.9 (C-8b), 131.7 (C-7′), 128.5 (C-2′),

124.2 (C-8 and C-6′), 123.9 (C-4b), 121.2 (C-4), 119.5 (C-6), 119.3 (C-5), 118.4 (C-3), 117.6 (C-1′), 116.6 (C-4a), 110.4 (C-7), 104.2 (C-1), 78.2 (C-3′), 40.8 (C-4′), 25.8 (C-9′), 25.7 (C-10′), 22.8 (C-5′), 17.6 (C-8′), 16.1 ($CH_3$-3)

ส่วนย่อย E (592.1 mg) นำไปแยกต่อด้วย CC และชะด้วย 10% EtOAc-hexanes ได้สาร **MK8** (20.8 mg)

**Murrayaquinone A (MK8)**: ของแข็งสีแดง mp 241-242°C; $^1$H NMR (acetone-$d_6$) δ 11.64 (1H, br s, NH), 8.16 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-5), 7.63 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-8), 7.41 (1H, t, *J* = 8.0, 7.2 Hz, H-7), 7.34 (1H, t, *J* = 7.6, 7.2 Hz, H-6), 6.51 (1H, s, H-2), 2.15 (3H, s, $CH_3$-3) $^{13}$C NMR (acetone-$d_6$) δ 183.2 (C-1 and C-4), 148.4 (C-3), 137.6 (C-8a), 135.9 (C-8b), 131.5 (C-2), 126.5 (C-7), 124.0 (C-4a), 123.7 (C-4b and C-6), 122.1 (C-5), 113.5 (C-8), 15.0 ($CH_3$-3)

ส่วนย่อย F (8.52 g) นำไปแยกต่อด้วย QCC ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย EtOAc-hexanes ในลักษณะที่เพิ่มขั้นขึ้นตามลับดับจาก 5% EtOAc-hexanes ถึง 100% EtOAc ได้ 14 ส่วนย่อย (F1-F14) และส่วนย่อย F8 (272.9 mg) นำไปแยกต่อด้วย CC ชะด้วย 25% $CH_2Cl_2$-hexanes ได้สาร **MK9** (2.7 mg)

**Murrayazolidine (MK9)**: ของหนืดสีเหลือง $^1$H NMR ($CDCl_3$) δ 7.88 (1H, br d, *J* = 7.6 Hz, H-5), 7.71 (1H, br s, NH), 7.63 (1H, s, H-4), 7.31 (1H, br d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 7.25 (1H, m, H-7), 7.14 (1H, m, H-8), 4.76 (1H, s, H-8′), 4.80 (1H, s, H-8′), 3.40 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-1′), 2.57 (1H, m, H-6′), 2.33 (3H, s, $CH_3$-3), 1.88 (2H, dt, *J* = 12.8, 2.4 Hz, H-2′), 1.61 (2H, m, H-4′), 1.55 (2H, m, H-5′), 1.49 (3H, s, H-9′), 1.43 (3H, s, H-10′); $^{13}$C NMR ($CDCl_3$) δ 153.6 (C-2), 150.0 (C-7′), 124.3 (C-4b), 123.5 (C-7), 119.5 (C-4), 119.1 (C-8), 119.0 (C-5), 117.6 (C-3), 114.6 (C-4a), 112.0 (C-8′) 110.1 (C-6), 105.2 (C-1), 78.9 (C-3′), 48.7 (C-6′), 39.9 (C-4′), 37.4 (C-2′), 36.2 (C-1′), 29.0 (C-10′), 23.1 (C-5′), 21.6 (C-9′), 16.7 ($CH_3$-3)

นำส่วนย่อย G (427.0 mg), H (1.03 g) and I (594.0 mg) และนำไปแยกต่อด้วย sephadex LH-20 และใช้ MeOH เป็นตัวชะ ได้ 5 ส่วนย่อย (GA-GE) ส่วนย่อย GC (1.74 g) นำไปแยกต่อด้วย QCC โดยใช้ 40% $CH_2Cl_2$- hexanes เป็นตัวชะ ได้ 5 ส่วนย่อย (GC1-GC5) โดยสาร **MK1** (43.1 mg) ได้จากส่วนย่อย GC3 (454.0 mg) โดยการแยกด้วย CC และชะด้วย 50% $CH_2Cl_2$- hexanes

**Murrayanine (MK1)**: ของแข็งสีเหลือง mp 158-161°C; $^1$H NMR ($CDCl_3$) δ 10.04 (1H, s, CHO), 8.69 (1H, br s, NH), 8.18 (1H, br s, H-2), 8.10 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.51 (1H, m, H-8), 7.49 (1H, m, H-7), 7.45 (1H, br s, H-2), 7.31 (1H, m, H-6), 4.06

(3H, s, $OCH_3$); $^{13}C$ NMR ($CDCl_3$) $\delta$ 191.8 (CHO), 146.0 (C-1), 139.4 (C-8a), 134.0 (C-8b), 130.1 (C-3), 126.6 (C-7), 123.6 (C-4a and C-4b), 120.7 (C-5 and C-6), 120.4 (C-4), 111.5 (C-8), 103.5 (C-2), 55.8 ($OCH_3$)

ส่วนย่อย J (1.33 g) นำไปแยกด้วย sephadex LH-20 โดยใช้ MeOH เป็นตัวชะ ได้ 4 ส่วนย่อย (JA-JD) ส่วนย่อย JC (66.3 mg) นำไปตกผลึกด้วย hexanes ได้ **MK6** (8.9 mg) สำหรับ **MK2** (3.6 mg) ได้จากการแยกด้วย CC ของ ส่วนย่อย L (220.0 mg) โดยใช้ 40% EtOAc-$CH_2Cl_2$ เป็นตัวชะ

**Koeniline (MK2)**: ของหนืดสีน้ำตาล $^1H$ NMR ($CDCl_3$) $\delta$ 8.28 (1H, br s, NH), 8.03 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.65 (1H, br s, H-4), 7.46 (1H, br d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 7.41 (1H, m, H-7), 7.22 (1H, m, H-6), 6.95 (1H, br s, H-2), 4.80 (2H, s, H-1′), 4.01 (3H, s, $OCH_3$), 2.17 (1H, br s, OH); $^{13}C$ NMR ($CDCl_3$) $\delta$ 145.7 (C-1), 139.2 (C-8a), 132.7 (C-3), 129.1 (C-8b), 125.8 (C-7), 125.7 (C-4a), 124.0 (C-4b), 120.5 (C-5), 119.5 (C-6), 111.7 (C-4), 111.0 (C-8), 105.6 (C-2), 66.5 (C-1′), 55.5 ($OCH_3$)

**Furostifoline (MK6)**: ของแข็งสีเหลือง mp 238-242°C; $^1H$ NMR ($CDCl_3$) $\delta$ 9.93 (1H, br s, NH), 8.26 (1H, s, H-4), 7.92 (1H, d, $J$ = 7.6 Hz, H-5), 7.77 (1H, s, H-2′), 7.37 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 7.22 (1H, t, $J$ = 8.0, 7.2 Hz, H-7), 7.07 (1H, t, $J$ = 7.6, 7.2 Hz, H-6), 6.96 (1H, br s, H-1′), 2.34 (3H, s, $CH_3$-3); $^{13}C$ NMR ($CDCl_3$) $\delta$ 154,7 (C-2), 140.0 (C-8b), 139.9 (C-8a), 123.5 (C-7), 121.2 (C-2, C-4b and C-2′), 118.7 (C-5), 118.4 (C-6), 116.7 (C-3 and C-4a), 116.0 (C-1), 110.2 (C-8), 96.1 (C-1′), 15.8 ($CH_3$-3)

### 3.4 การสกัดและการแยกสารให้บริสุทธิ์จากกิ่งจันทร์หอม

นำกิ่งจันทร์หอมตากแห้ง ที่บดพอแตก (4.91 Kg) มาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ hexanes และ acetone อย่างละ 2 ครั้งๆละ 3 วัน จากนั้นทำการละเหยตัวทำละลายออก ได้ส่วนสกัดหยาบ hexanes (14.39 g) และ acetone (29.22 g) เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางโครมาโทกราฟี พบว่าส่วนสกัดหยาบทั้งสองแสดงคุณสมบัติคล้ายคลึงกัน จึงทำการรวมส่วนสกัดทั้งสอง ได้ส่วนสกัดหยาบ JHT (43.61 g) แล้วจึงนำส่วนสกัดหยาบดังกล่าวไปแยกด้วยกระบวนการ QCC โดยมี Si gel เป็นตัวดูดซับ ใช้ hexanes และ EtOAc เป็นตัวชะในลักษณะ polarity gradient ได้ส่วนย่อยทั้งหมด 12 ส่วน (A – L)

ส่วนย่อย C (1.10 g) นำไปแยกต่อด้วย CC ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ชะด้วย 30% $CH_2Cl_2$-hexanes ได้สารบริสุทธิ์ **J8** (2.1 mg) และ **J16** (19.9 mg)

**Girinimbine (J8)** (Furukawa et al., 1985)ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): 7.91 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.83 (1H, br s, 9-NH), 7.67 (1H, s, H-4), 7.38 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 7.30 (1H, t, $J$ = 8.0 Hz, H-7), 7.17 (1H, t, $J$ = 8.0 Hz, H-6), 6.64 (1H, d, $J$ = 10.0 Hz, H-1′), 5.70 (1H, d, $J$ = 10.0 Hz, H-2′), 2.32 (3H, s, 3-Me), 1.47 (6H, s, H-4′

และ H-5′)$\delta_C$ ($CDCl_3$, 100 MHz): 149.8 (C-2), 139.5 (C-8a), 134.8 (C-9a), 129.4 (C-7), 124.2 (C-2′), 123.9 (C-4b), 121.1 (C-5), 119.5 (C-1′), 119.3 (C-6), 118.5 (C-3), 117.2 (C-4), 116.7 (C-4a), 110.4 (C-8), 104.4 (C-1), 75.8 (C-3′), 27.6 (C-4′และ C-5′), 16.1 (3-Me) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

Heptaphylline (**J16**)(Wu & Furukawa ,1992) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): 11.65 (1H, s, 2-OH), 9.89 (1H, s, 3-CHO), 8.03 (1H, s, H-4), 7.96 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.40 (1H, m, H-8), 7.38 (1H, m, H-7), 7.27 (1H, m, H-6), 5.31 (1H, t, *J* = 3.2 Hz, H-2′), 3.63 (2H, d, *J* = 3.2 Hz, H-1′), 1.89 (3H, s, H-4′), 1.67 (3H, s, H-5′).$\delta_C$ ($CDCl_3$, 100 MHz): 195.4 (3-CHO), 157.8 (C-2), 145.0 (C-9a), 140.1 (C-8a), 134.2 (C-3′), 125.8 (C-7), 125.3 (C-4), 123.6 (C-4b), 121.2 (C-2′), 120.8 (C-5), 119.8 (C-6), 115.4 (C-4a), 110.8 (C-8), 109.0 (C-1), 25.7 (C-4′), 22.8 (C-1′), 18.1 (C-5′) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

ส่วนย่อย D (1.05 g) นำไปแยกด้วย CC ใช้ Si gel เป็นตัวดูดซับ ชะด้วย 50% $CH_2Cl_2$-hexanes ได้สารบริสุทธิ์ **J15** (46.0 mg)

Clausemine D (**J15**) (Ito et al., 2000) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): 8.52 (1H, br s, 9-NH), 8.14 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-5), 7.44 (1H, s, H-2), 7.49 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-8), 7.43 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-7), 7.26 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-6), 5.28 (1H, m, H-2′), 4.30 (2H, d, *J* = 5.6 Hz, H-1′), 4.01 (3H, s, 1-OMe), 3.89 (3H, s, 3-$CO_2$Me), 1.91 (3H, d, *J* = 1.2 Hz, H-4′) 1.70 (3H, d, *J* = 1.2 Hz, H-5′) เป็นสารที่มีการรายงานแล้ว

ส่วนย่อย E (1.05 g) นำไปแยกด้วยกระบวนการ colume chromatography ใช้ Si gel เป็นตัวดูดซับ ชะด้วย 60% $CH_2Cl_2$-hexanes และแยกต่อด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOHเป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ **J7** (4.6 mg)

Clausine S (**J7**) (Wu et al., 1999) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): 11.70 (1H, s, 2-OH), 9.90 (1H, s, 3-CHO), 9.46 (1H, br s, 9-NH), 8.07 (1H, s, H-4), 7.98 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-5), 7.43 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-8), 7.39 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-7), 5.00 ( 1H, br s, H-5a′), 4.86 (1H, br s, H-5b′), 4.78 (1H, br d, *J* = 8.4 Hz, H-2′), 3.38 (1H, dd, *J* = 14.8 and 2.0 Hz, H-1a′), 3.02 (1H, dd, *J* = 14.8 and 8.4 Hz, H-1b′), 1.91 (3H, s, H-4′). $\delta_C$ ($CDCl_3$, 100 MHz): 195.3 (3-CHO), 158.4 (C-2), 147.6 (C-3′), 146.6 (C-9a), 140.6 (C-8a), 125.8 (C-4 and C-8), 123.8 (C-4b), 120.6 (C-6), 119.7 (C-5), 117.4 (C-4a), 115.1 (C-1), 111.1 (C-7), 110.1 (C-5′), 107.4 (C-3), 76.7 (C-2′), 30.0 (C-1′), 18.6 (C-4′) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

ส่วนย่อย G (1.75 g) นำไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ และ CC ใช้ Si gel เป็นตัวดูดซับ ชะด้วย 30% EtOAc-hexanes ตามลำดับ ได้สารบริสุทธิ์ **J6** (18.3 mg) **J14** (13.8 mg) และ **J17** (40.0 mg)

Clausamine B (**J6**) (Ito et al., 1998) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): 8.74 (1H, br s, 9-NH), 8.06 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.61 (1H, s, H-2), 7.46 (1H, t, $J$ = 8.0 Hz, H-7), 7.27 (1H, t, $J$ = 8.0 Hz, H-6), 5.22 (1H, s, H-5a′), 5.09 (1H, s, H-5b′), 5.05 (1H, dd, $J$ = 12.0 และ 3.6 Hz, H-2′), 4.01 (3H, s, 1-OMe), 3.60 (1H, dd, $J$ = 16.4 และ 3.6 Hz, H-1a′), 3.43 (1H, dd, $J$ = 16.4 และ 12.0 Hz, H-1b′), 1.97 (3H, s, H-4′) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

ClausineF (**J14**) (Wu& Huang, 1992) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ (acetone-$d_6$, 400 MHz): 10.65 (1H, br s, 9-NH), 8.89 (1H, br s, 1-OH), 8.12 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.63 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 7.47 (1H, s, H-2), 7.42 (1H, t, $J$ = 8.0 Hz, H-7), 7.22 (1H, t, $J$ = 8.0 Hz, H-6), 5.24 (1H, t, $J$ = 5.6 Hz, H-2′), 4.33 (2H, d, $J$ = 5.6 Hz, H-1′), 3.83 (3H, s,3-$CO_2$Me), 1.89 (3H, s, H-4′), 1.67 (3H, s, H-5′). $\delta_C$ (acetone-$d_6$, 100 MHz): 169.1 (3-$CO_2$Me), 142.1 (C-1), 141.4 (C-9a), 141.3 (C-8a), 132.0 (C-3′), 126.3 (C-4b), 126.2 (C-7), 124.6 (C-2′), 124.2 (C-4a), 123.7 (C-5), 120.7 (C-3), 120.3 (C-6),112.8 (C-2), 112.3 (C-4 และ C-8), 51.8 (3-$CO_2$Me), 25.8 (C-5′), 18.4 (C-4′) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

Dectamine (**J17**) (Terezan et al., 2010) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ (acetone-$d_6$, 400 MHz): 8.27 (1H, d, $J$ = 8.4 Hz, H-5), 7.91 (1H, d, $J$ = 8.4 Hz, H-8), 7.88 (1H, d, $J$ = 2.8 Hz, H-2′), 7.70 (1H, t, $J$ = 8.4 Hz, H-7), 7.47 (1H, t, $J$ = 8.4 Hz, H-6), 7.41 (1H, d, $J$ = 2.8 Hz, H-3′), 4.54 (3H, s, 4-OMe) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

ส่วนย่อย H (2.98 g) นำไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วย CC โดยใช้ Si gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 30% EtOAc-hexanes ได้ส่วนย่อยอีก 4 ส่วน (H1-H4) จากนั้นนำส่วนย่อย H2 (234.1 mg) มาทำการแยกต่อด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOHเป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ **J13** (5.8 mg) และ 4 ส่วนย่อย (H2a-H2d)

Clausine D (**J13**) (Wu & Huang, 1992) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ (acetone-$d_6$, 400 MHz): 10.87 (1H, br s, 9-NH), 10.39 (1H, s, 3-CHO), 8.16 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.67 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 7.45 (1H, t, $J$ = 8.0 Hz, H-7), 7.43 (1H, s, H-2), 7.26 (1H, t, $J$ = 8.0 Hz, H-6), 5.31 (1H, t, $J$ = 5.6 Hz, H-2′), 4.38 (2H, d, $J$ = 5.6 Hz, H-1′), 1.93 (3H, s, H-4′), 1.70 (3H, s, H-5′) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

นำส่วนย่อย H2b (52.7 mg) มาทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยเทคนิค CC โดยใช้ silica gel เห็นตัวดูดซับและชะด้วย 5% acetone-$CH_2Cl_2$ได้สารบริสุทธิ์ **J9** (30.3 mg) **J10** (1.4 mg) และ **J12** (1.9 mg)

*O*-Demethylmurrayanine (**J9**) (Ngadjui et al., 1989) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ (acetone-$d_6$, 400 MHz): 10.83 (1H, br s, 9-NH), 10.01 (1H, s, 3-CHO),9.34 (1H, br s, 1-OH), 8.27 (1H, d, $J$ = 1.2 Hz, H-4), 8.21 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.65 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 7.47 (1H, t,$J$ = 8.0 Hz, H-7), 7.43 (1H, d, $J$ = 1.2 Hz, H-2), 7.26 (1H, t, $J$ = 8.0 Hz, H-6). $\delta_C$ (acetone-$d_6$, 100 MHz): 191.8 (3-CHO),144.5 (C-1), 141.4 (C-8a), 134.9 (C-9a), 127.1 (C-7), 125.1 (C-4a), 124.5 (C-4b), 121.3 (C-5), 120.8 (C-6), 119.2 (C-4), 112.7 (C-3และ C-8), 108.3 (C-2) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

Clauzoline I (**J10**) (Wu et al., 1997) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): 8.51 (1H, br s, 9-NH), 8.44 (1H, d, $J$ = 2.4 Hz, H-4), 8.09 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.61 (1H, d, $J$ = 2.4 Hz, H-2),7.50 (1H, t, $J$ = 8.0 Hz, H-7), 7.46 (1H, t, $J$ = 8.0 Hz, H-6), 7.29 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 3.97 (3H, s, 3-$CO_2$Me) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

Clauzoline N (**J12**) (Shi et al., 2010) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ (acetone-$d_6$, 400 MHz): 11.46 (1H, s, 2-OH),10.54 (1H, br s, 9-NH), 9.97 (1H, s, 3-CHO), 8.37 (1H, s, H-4), 8.24 (1H, br s, 6-OH), 7.53 (1H, d, $J$ = 2.0 Hz, H-5), 7.33 (1H, d, $J$ = 8.4 Hz, H-8), 6.97 (1H, dd, $J$ = 8.4 และ 2.0 Hz, H-7), 6.84 (1H, s, H-1) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

ส่วนย่อย H4 (160.3 mg) นำมาแยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ **J5** (22.3 mg)

Clausemine A (**J5**) (Ito et al., 1998) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ (acetone-$d_6$, 400 MHz): 10.87 (1H, br s, 9-NH), 9.22 (1H, br s, 1-OH), 8.20 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.67 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 7.56 (1H, s, H-2), 7.46 (1H, t, $J$ = 8.0 Hz, H-7), 7.26 (1H, t, $J$ = 8.0 Hz), 5.27 (1H, br s, H-5a′), 5.13 (1H, br d, $J$ =11.6 Hz, H-2′), 5.07 (1H, br s, H-5b′), 3.73 (1H, dd, $J$ = 16.4 และ 3.6 Hz, H-1a′), 3.51 (1H, dd, $J$ = 16.4 และ 11.6 Hz, H-1b′), 1.98 (3H, s, H-4′) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

ส่วนย่อย J (2.84 g) นำมาแยกด้วยเทคนิค QCC โดย silica gel ชะด้วย 5% EtOAc-$CH_2Cl_2$ และ Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ตามลำดับ ได้สารบริสุทธิ์ **J18** (2.4 mg)

γ-Fagarine (**J18**) (Terezan et al., 2010) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): 7.85 (1H, dd, $J$ = 8.4 และ 1.2 Hz, H-5), 7.65 (1H, d, $J$ = 2.8 Hz, H-2′), 7.36 (1H, t, $J$ = 8.4 Hz, H-6), 7.09 (1H, d, $J$ = 2.8 Hz, H-3′), 7.06 (1H, dd, $J$ = 8.4 และ 1.2 Hz, H-7), 4.45 (3H, s, 4-OMe), 4.08 (3H, s, 8-OMe) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

ส่วนย่อย K (4.42 g) ทำการแยกโดย QCC โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ชะแบบ gradient polarity จาก 20% EtOAc-hexanes ถึง 100% EtOAc ได้ส่วนย่อย 7 ส่วน (K1-K7) จากนั้นนำส่วนย่อย G2 (394.6 mg) มาแยกต่อด้วย Sephadex-LH20 ชะด้วย 100% MeOH และ CC โดยใช้ Si gel เป็นตัวดูดซับ ชะโดย 10% acetone-hexanes ได้สารบริสุทธิ์ **J1** (1.1 mg) และ **J3** (1.6 mg)

Harmandianamine A (**J1**) ของแข็งสีเหลือง mp 203.6 – 204.0 °C. $[\alpha]_D^{28}$= +6.46 (*C* = 0.008, MeOH). UV (MeOH) $\lambda_{max}$ 204, 207, 240, 250, 267, 310, 323, 337. IR (neat) $\nu_{max}$3250, 2923, 2852, 1735, 1798; $\delta_H$ (acetone-$d_6$, 500 MHz): 11.01 (1H, br s, 9-NH), 9.64 (1H, br s, 1-OH), 7.82 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.67 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-8), 7.46 (1H, td, *J* = 8.0 และ 1.5 Hz, H-7), 7.24 (1H, td, *J* = 8.0 และ 1.5 Hz, H-6), 7.20 (1H, s, H-2), 6.59 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, H-1′), 5.23 (1H, m, H-2′), 2.20 (3H, d, *J* = 1.5 Hz, H-4′), 1.86 (3H, d, *J* = 1.5 Hz, H-5′).$\delta_C$ (acetone-$d_6$, 125 MHz): 170.9 (C-10), 144.2 (C-1), 142.3 (C-8a), 141.9 (C-3′), 138.7 (C-3), 132.8 (C-9a), 126.9 (C-7), 123.1 (C-5), 121.7 (C-2′), 121.0 (C-4b), 120.9 (C-6), 118.7 (C-4a), 115.9 (C-4), 112.7 (C-8), 104.5 (C-2), 77.5 (C-1′), 30.2 (C-4′และ C-5′). EI-MS (*m/z*): 292 (94), 277 (56), 250 (18), 233 (12), 209 (100), 181 (15). HR-EI-MS (*m/z*): $[M]^+$ 293.1054 (calc. for $C_{18}H_{15}NO_3$, 293.1046) สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Harmandianamine C (**J3**) ของแข็งสีเหลือง mp 228.3 – 228.6 °C; $[\alpha]_D^{29}$= +18.6 (*C* = 0.011, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{max}$ 204, 236, 247, 277, 298, 327, 342; IR (neat) $\nu_{max}$3363, 2923, 2853, 1632, 1613, 1232; $\delta_H$ (acetone-$d_6$, 500 MHz): 11.78 (1H, br s, 2-OH), 10.61 (1H, br s, 9-NH), 9.97 (1H, s, 3-CHO),8.34 (1H, s, H-4), 8.07 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.50 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-8), 7.35 (1H, td, *J* = 8.0 และ 1.0 Hz, H-7), 7.20 (1H, td, *J* = 8.0 และ 1.0 Hz, H-6), 3.73 (1H, dd, *J* = 9.5 และ 2.0 Hz, H-2′), 3.36 (1H, dd, *J* = 14.5 และ 2.0 Hz, H-1a′), 2.81 (1H, m, H-1b′), 1.31 (3H, s H-4′), 1.30 (3H, s, H-5′). $\delta_C$ (acetone-$d_6$, 125 MHz): 196.8 (3-CHO),158.9 (C-2), 147.2 (C-9a), 142.0 (C-8a), 126.4 (C-4), 126.4 (C-7), 124.5 (C-4b), 121.0 (C-5), 120.4 (C-6), 118.1 (C-4a), 116.0 (C-3), 112.7 (C-8), 109.6 (C-1), 79.2 (C-2′), 73.1 (C-3′), 27.4 (C-1′), 26.0 (C-5′), 25.2 (C-4′). EI-MS (*m/z*):312 (51), 253 (38), 223 (100), 166 (20); HR-EI-MS (*m/z*): $[M]^+$313.1305 (calc. for $C_{18}H_{19}NO_4$, 313.1309) สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

ส่วนย่อย K4 (534.5 mg) แยกด้วย Sephadex-LH20 ชะด้วย 100% MeOH ได้สารบริสุทธิ์ **J11** (11.5 mg)

Clausine Z (**J11**) (Potterat et al., 2005) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ (acetone-$d_6$, 400 MHz): 10.55 (1H, br s, 9-NH), 9.97 (1H, s, 3-CHO), 8.16(1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-4), 7.60 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-4), 7.47 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-8),7.38 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-2), 7.05 (1H, dd, *J* = 8.8 และ 2.4 Hz, H-7) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

นำส่วนย่อย G6 (442.2 mg) มาแยกด้วย Sephadex-LH20 ชะด้วย 100% MeOHและ column chromatography โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ชะโดย 30% EtOAc-$CH_2Cl_2$ได้สารบริสุทธิ์ **J2** (1.8 mg) และ **J4** (7.1 mg)

Harmandianamine B (**J2**) ของแข็งสีเหลือง mp216.7 – 217.1°C. $[\alpha]_D^{29}$= +35.2 (*C* = 0.012, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{max}$204, 212, 237, 249, 269, 279, 323, 335; IR (neat) $\nu_{max}$3340, 2921, 2830, 1695, 1584, 1361; $\delta_H$ (acetone-$d_6$, 500 MHz): 11.01 (1H, br s, 9-NH), 8.30 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.67 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-8), 7.54 (1H, s, H-2), 7.48 (1H, td, *J* = 8.0 และ 1.5 Hz, H-7), 7.29 (1H, td, *J* = 8.0 และ 1.5 Hz, H-6), 5.83 (1H, dd, *J* = 4.0 และ 2.0 Hz, H-1′), 5.39 (1H, d, *J* = 4.0 Hz, 1′-OH), 4.71 (1H, br s, 3′-OH), 4.39 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2′), 4.08 (3H, s, 1-OMe), 1.60 (3H, s, H-4′), 1.52 (3H, s, H-5′); $\delta_C$ (acetone-$d_6$, 125 MHz): 166.3 (C-10), 147.9 (C-1), 141.3 (C-8a), 135.2 (C-9a), 130.4 (C-4), 127.0 (C-7), 123.4 (C-5), 121.0 (C-6), 120.5 (C-4b), 116.9 (C-3), 116.8 (C-4a), 112.7 (C-8), 106.1 (C-2) 84.2 (C-2′), 73.1 (C-3′), 63.6 (C-1′),56.2 (1-OMe), 27.0 (C-4′), 26.8 (C-5′); EI-MS (*m/z*):340 (88), 263 (100), 236 (46), 224 (22), 209 (20), 153 (14). HR-EI-MS (*m/z*): $[M]^+$341.1266 (calc. for $C_{19}H_{19}NO_5$, 341.1258) สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

Clausevatine D (**J4**) (Wu et al., 1998) ของแข็งสีเหลือง $\delta_H$ (acetone-$d_6$, 400 MHz): 10.87 (1H, br s, 9-NH), 9.31 (1H,br s, 1-OH), 8.20 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.67 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-8), 7.54 (1H, s,H-2), 7.46 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-7), 7.26 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 4.44 (1H, dd, *J* = 12.8 และ 3.6 Hz, H-2′), 3.77 (1H, dd, *J* = 16.4 และ 3.6 Hz, H-1a′), 3.42 (1H, dd, *J* = 16.4 และ 3.6 Hz, C-1b′), 1.42 (6H, s, H-4′และ H-5′) เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

### 3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในการศึกษาครั้งนี้ ขอรับบริการจากหน่วยปฏิบัติการทดสอบฤทธิ์ชีวภาพกลาง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ วิธีการทดสอบซึ่งดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย 3 cell lines คือ มะเร็งช่องปาก (human epidermoid carcinoma of oral cavity, KB), มะเร็งทรวงอก (breast adenocarcinoma, MCF-7) และมะเร็งปอด (human small cell lung cancer, NCI-H187) โดยวิธีการทดลองของ O'Brien ซึ่งมีรายละเอียดโดยย่อดังนี้

นำเซลล์มะเร็งทั้งสามเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้มาปรับจำนวนเซลล์เป็น 7 × 104 cells/mL สำหรับ KB cell line และ 9 × 104 cells/mL สำหรับ MCF-7 และ NCI-H187 cell lines แล้วเติม 45 μL ของเซลล์ลงไปใน 384-well plates ที่มีสารตัวอย่างอยู่ 5 μL (สารตัวอย่างละลายใน 5% DMSO) และ

เลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี 5% $CO_2$ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 วันสำหรับ KB และ MCF-7 cell lines และ 5 วันสำหรับ NCI-H187 cell line เมื่อครบกำหนดเวลาเติมสารละลาย resazurin 12.5 µL (ความเข้มข้นที่ 62.5 µg/mL) ลงไปในแต่ละหลุมและเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง SpectraMax M5 multi-detection microplate reader ที่ช่วงคลื่น 530 นาโนเมตร และ 590 นาโนเมตร และหาเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง (% inhibition) จากสมการดังต่อไปนี้

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

โดยที่ $FU_T$ และ $FU_C$ คือ fluorescent unit ในสภาวะที่มีสารสกัดและไม่มีสารสกัดตามลำดับ และค่า $IC_{50}$ สามารถคำนวณโดยการใช้ SOFTMax Pro software

### 3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

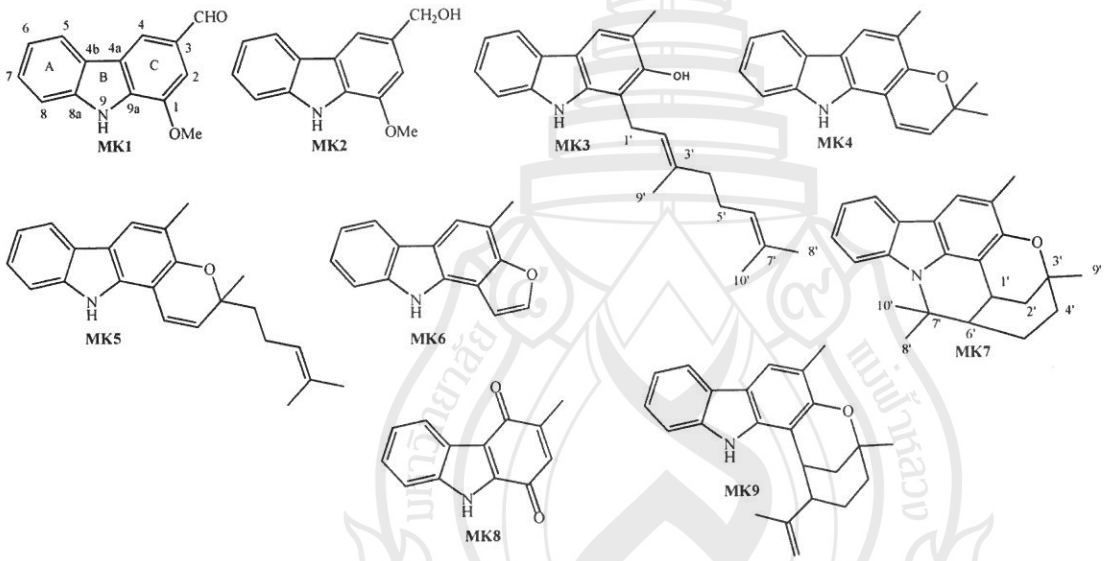
เชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์คือ คือ *Escherichia coli* TISTR 780 *Salmonella typhimurium* TISTR 292 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สำหรับสายพันธุ์ MRSA SK1 ได้รับจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียใช้วิธี broth micro dilution (CLSI M7-A4, 2006) มีวิธีการโดยย่อดังนี้ เติม Mueller-Hinton Broth ปริมาตร 50 µL ลงในไมโครเพลทตั้งแต่หลุมที่ 1-15 และปริมาตร 100 µL ที่หลุมที่ 16 ดูดยาต้านจุลชีพ (Vancomycin หรือ gentamycin) ปริมาตร 50 µL ลงในไมโครเพลทหลุมที่ 1 ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายจากหลุมที่ 1 ไปใส่หลุมที่ 2 ปริมาตร 50 µL ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ (two fold dilution) จนถึงหลุมที่ 14 ดูดทิ้ง 50 µL จากนั้นดูดสารละลายเชื้อที่ต้องการทดสอบปริมาตร 50 µL ใส่ลงในหลุมที่ 1-15 โดยหลุมที่ 15 จะเป็น positive control และหลุมที่ 16 เป็น negative control จากนั้นเติม inoculum ปริมาตร 50 µL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.18% resazurin ปริมาตร 10 µL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 2-3 ชั่วโมง อ่านผลหลุมที่เชื้อไม่เจริญจะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าจะไม่มีการเจริญของเชื้อ ส่วนหลุมที่ไม่เปลี่ยนแปลงสี (สีม่วงคงเดิม) แสดงว่ามีการเจริญของเชื้อ จากนั้นบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ เป็นค่า MIC

# บทที่ 4 ผลการวิจัย

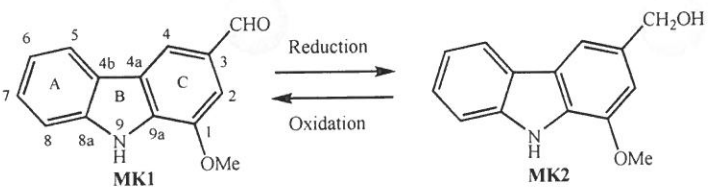
## 4.1. ผลการวิจัยตามวัตถุประสงค์

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีของรากหอมแขกสามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานแล้วจำนวน 9 สาร โดยโครงสร้างของสารประกอบเหล่านี้วิเคราะห์โดยอาศัยข้อมูล 1D และ 2D NMR สเปกโทรสโกปี

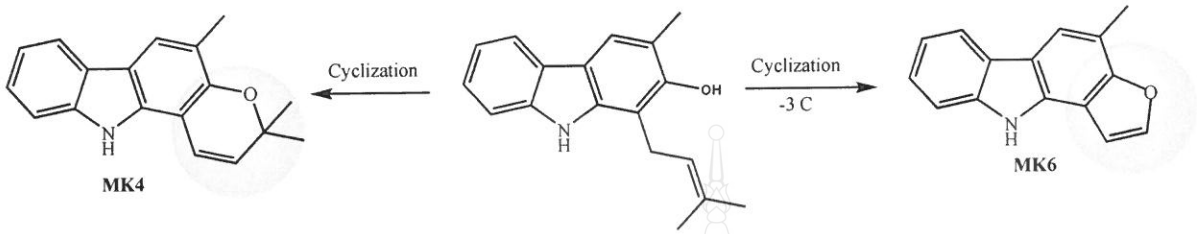
จากข้อมูล NMR พบว่าสารทั้ง 9 ชนิดเป็นสารประกอบประเภทคาร์บาโซลแอลคาร์ลอยด์ โดยมีสัญญาณ $^1$H NMR ของวง A เป็นไปในทำนองเดียวกันซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของวงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ในตำแหน่งที่ 1 และ 2 (1,2-disubstituted aromatic ring) โดยสัญญาณเหล่านี้จะปรากฏในช่วง 7.2-8.5 ppm ซึ่งเป็นจะสัญญาณของ H-5, H-6, H-7, และ H-8 นอกจากนี้แล้ว สัญญาณ $^1$H NMR ของสารทุกตัวยกเว้น สาร 7 จะแสดง สัญญาณ $^1$H NMR ของ NH ที่ประมาณ 8.7 ppm



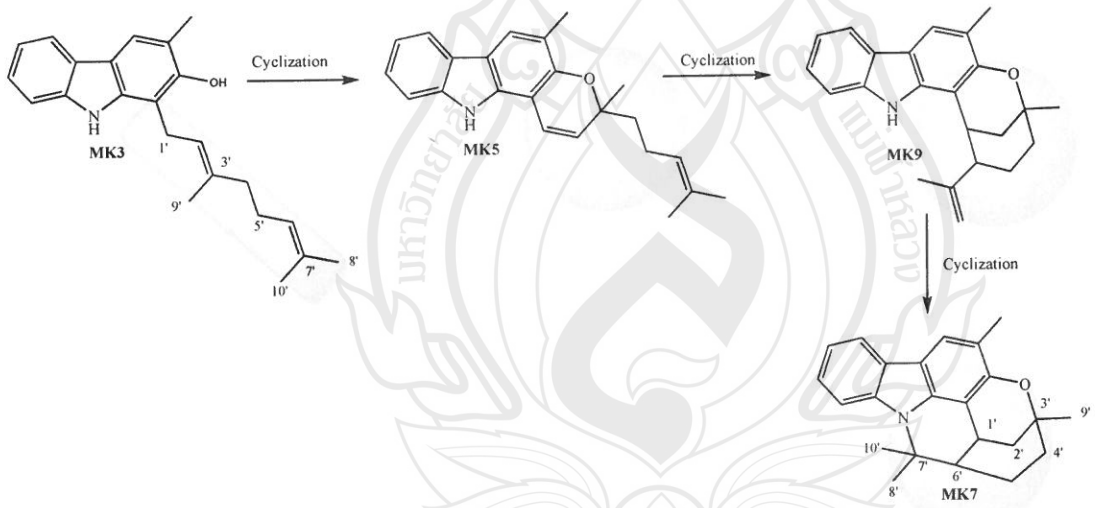

สารประกอบ **MK1** และ **MK2** มีแสดงสัญญาณของแอโรแมติกโปรตอนของวง C อยู่สองโปรตอนคือ H-2 และ H-4 โดยปรากฏสัญญาณที่ประมาณ 7.4 และ 8.1 ppm ตามลำดับนอกจากนี้แล้วสารทั้งสองตัวยังพบสัญญานณของ OMe ที่ประมาณ 4.0 ppm จุดต่างกันของสารทั้งสองอยู่ที่ตำแหน่งที่ 3 โดยสาร **MK1** จะปรากฏสัญญาณของแอลดีไฮด์โปรตอนที่ 10.04 ppm ขณะที่สาร **MK2** จะปรากฏสัญญาณของออกซีเมทิลีนโปรตอนที่ 4.80 ppm โดยสารทั้งสองมีความสัมพันธ์ทางโครงสร้างซึ่งกันและกันโดยผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันดังแสดง



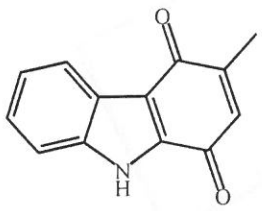
สำหรับโครงสร้าง **MK4** จะมีลักษณะของวงแหวนโครมีน และ **MK6** จะมีลักษณะของวงแหวนฟิวแรน ซึ่งสารทั้งสองก็มาจากวิถีชีวสังเคราะห์ในลักษณะเดียวกันโดยผ่านปฏิกิริยาการปิดวงแหวนโดยสาร **MK6** จะปิดวงแบบห้าเหลี่ยมและตามด้วยการกำจัดคาร์บอน สำหรับสาร **MK4** นั้นจะปิดวงแบบหกเหลี่ยม สำหรับสารดังแสดง




สารประกอบ **MK3-7** และ **MK9** จะแสดงสัญญาณของเมทิลแอโรแมติกโปรตอนเหมือกันที่ประมาณ 1.6 ppm และยังมีสัญญาณแอโรแมติกโปรตอนของ H-4 (วง C) ที่ประมาณ 7.6 ppm จากการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างของสาร **MK3, MK5, MK7** และ **MK9** พบว่าสารทั้งสี่ตัวนี้จะแสดงสัญญาณ $^{1}$H NMR และ $^{13}$C NMR ของหมู่ geranyl โดยที่สาร **MK3** เป็นสารต้นตอของสาร **MK5, MK7** และ **MK9** โดยผ่านปฏิกิริยาการปิดวงแหวนดังแสดง




สาร **MK8** จะมีลักษณะของวง C แตกต่างจากสารทั้ง **MK8** ตัวดังได้กล่าวมาแล้ว ซึ่งวง C ของสาร **MK8** จะมีลักษณะของควิโนน ซึ่งจะมีสัญญาณของ H-2 ที่ 6.51 และ 3-Me ที่ 2.15 ppm



สารที่แยกได้ทั้งหมดนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลอง 3 ชนิดคือ มะเร็งในช่องปาก (Oral cavity cancer, KB) มะเร็งปอด (Small cell lung cancer, NCI-H187) และมะเร็งในทรวงอก (Breast cancer, MCF-7) จากการทดลองพบว่าสาร **MK8** จะแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งมะเร็งปอดได้ดีกว่ายามาตรฐาน Ellipticine (4.79 μM) โดยมีค่า $IC_{50}$ อยู่ที่ 2.98 μM สำหรับสารอื่น ๆนั้นแสดงฤทธิ์ได้น้อยกว่ายามาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 1

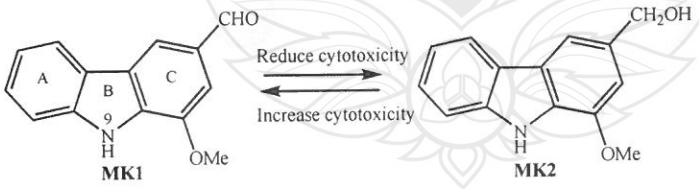
**ตารางที่ 1** ฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลอง **MK1- MK9**

| ชื่อสาร | ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ($IC_{50}$, μM) | | |
|---|---|---|---|
| | KB[a] | MCF-7[b] | NCI-H187[c] |
| Murrayanine (**MK1**) | 85.92 | 16.70 | 47.62 |
| Koenoline (**MK2**) | 203.17 | 61.60 | 92.64 |
| Mahanimbinol (**MK3**) | 29.92 | 51.58 | 18.81 |
| Girinimbine (**MK4**) | 8.74 | 28.80 | 58.94 |
| Mahanimbine (**MK5**) | 7.85 | 25.78 | 38.28 |
| Furostifoline (**MK6**) | 130.85 | 38.80 | 53.01 |
| Murrayazoline (**MK7**) | Inactive | Inactive | Inactive |
| Murrayaquinone A (**MK8**) | 15.25 | 8.10 | 2.98 |
| Murrayazolidine (**MK9**) | 88.19 | 7.12 | 73.00 |
| Ellipticine | 0.93 | Not test | 4.79 |
| Doxorubicin | 0.21 | 2.15 | 0.21 |

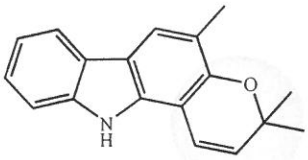
[a]KB=Oral cavity cancer; [b]MCF-7=Breast cancer; [c]NCI-H187=Small cell lung cancer

จากการศึกษาความสัมพันธ์ด้านโครงสร้างและการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งสามารถสรุปได้ดังนี้คือ

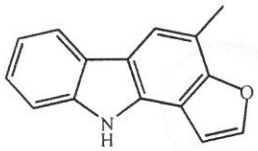
สาร **MK1** และ **MK2** มีสูตรโครงสร้างที่คล้ายกันมากแต่เมื่อหมู่แอลดีไฮด์ถูกรีดิวซ์ไปเป็นแอลกอฮอล์จะทำให้การออกฤทธิ์ต้านมะเร็งลดลงทุกเซลล์




การปิดวงแหวนแบบห้าเหลี่ยมและการกำจัดคาร์บอนของสาร **MK6** จะทำให้มีการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งลดลงเมื่อเทียบกับสาร **MK4**



MK4



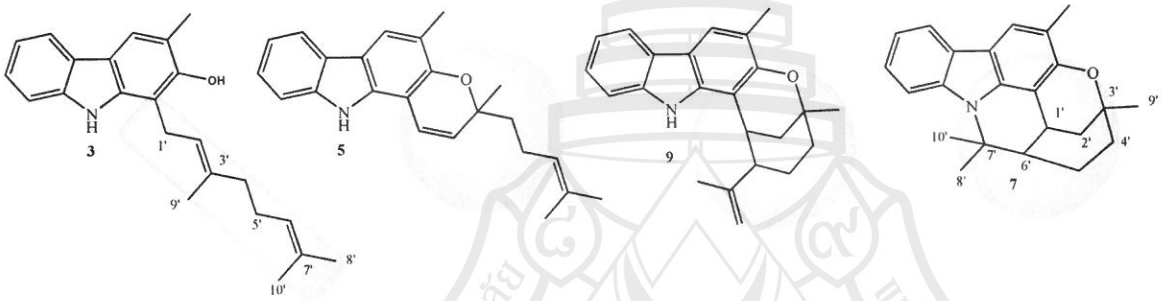
MK6
Reduce cytotoxicity

ผลของการปิดวงแหวนของหมู่ geranyl มีความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งเป็นดังนี้

การปิดวงเพียง 1 ครั้งของ **MK5** จะทำให้มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในช่องปากได้ดีกว่าไม่มีการปิดวงของสาร **MK3** และมีการปิดวงแบบต่อเนื่องของสาร **MK9** และ **MK7**

การปิดวง 2 ครั้งของสาร **MK9** จะทำให้มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งทรวงอกได้ดีกว่าไม่มีการปิดวงของสาร **MK3** การปิดวงเพียงครั้งเดียวของสาร **MK5** และ มีการปิดวงแบบต่อเนื่องของสาร **MK9**

การไม่ปิดวงของสาร **MK3** จะแสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดได้ดีกว่าการปิดวง

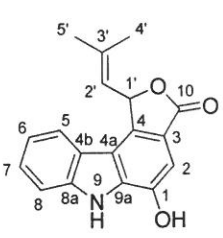


จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนกิ่งจันทร์หอม สามารถแยกสารประกอบได้ทั้งหมด 16 สาร เป็นสารประกอบคาร์บาโซลอัลคาลอยด์ใหม่ 3 สาร (**J1-J3**) และสารที่มีการรายงานแล้ว 13 สาร (**J4-J16**) โดยสารทั้งหมดเป็นสารประกอบในกลุ่มเดียวกับสารที่แยกได้จากต้นหอมแขก

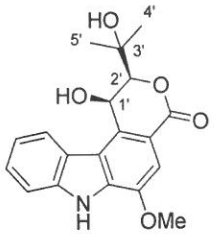
สารประกอบคาร์บาโซลที่แยกได้ทุกชนิดยกเว้นสาร **J11** และ **J12** ที่วงแหวน A จะไม่ปรากฏหมู่แทนที่โดยจะแสดงสัญญาณ $^1$H NMR อยู่ในช่วง 7-8 ppm ซึ่งเป็นจะสัญญาณของ H-5, H-6, H-7, และ H-8 สำหรับสาร **J11** และ **J12** ในตำแหน่งที่ 6 จะมีหมู่แทนที่ 1 หมู่คือ OH คาร์บาโซลที่แยกได้จะปรากฏสัญญาณ $^1$H NMR ที่แตกต่างกันเฉพาะวง C นอกจากนี้สารทุกตัวยังปรากฏสัญญาณของ NH ที่ประมาณ 10-11 ppm

Harmandianamine A เป็นของแข็งสีเหลือง (mp 203.6-204.0 °C) จากข้อมูลของ HR-EI-MS ที่ $[M]^+$ *m/z* 293.1054 พบว่า harmandianamine A มีสูตรเป็น $C_{18}H_{15}NO_3$ จากข้อมูลของ UV สเปกตรัมที่ $\lambda_{max}$ 204, 207, 240, 250, 267, 310, 323 และ 337 nm พบว่า harmandianamine A จัดเป็นสารประกอบประเภท carbazole alkaloids และปรากฏสัญญาณของ NH (3250 cm$^{-1}$) and $\gamma$-lactone carbonyl (1735 cm$^{-1}$) ใน IR สเปกตรัม สัญญาณของ $^1$H NMR ปรากฏสัญญาณของ NH ที่ $\delta$ 11.01 (br s), สัญญาณของวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่แทนที่แบบ 1,2-disubstituted benzene ที่ $\delta$ 7.82 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.67 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 7.46 (1H, td, $J$ = 8.0 และ 1.5 Hz,

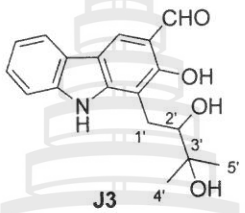
H-7), และ 7.24 (1H, td, $J$ = 8.0 และ 1.5 Hz, H-6), และสัญญาณของแอโรแมติกโปรตอนที่ δ 7.20 (1H, *s*, H-2) นอกจากนี้แล้วสัญญาณ $^{1}$H และ $^{13}$C NMR ยังแสดงลักษณะของหมู่ γ-lactone ที่ δ 6.59 (1H, d, $J$ = 10.5 Hz, H-1′/77.5 (C-1′), 5.23 (1H, m, H-2′)/121.7 (C-2′), 2.20 (3H, d, $J$ = 1.5 Hz, H-4′)/30.2 (C-4′), and 1.86 (3H, d, $J$ = 1.5 Hz, H-5′)/30.2 โดยเกาะอยู่ที่ตำแหน่ง C-3/C-4 ซึ่งยืนยันได้โดยการใช้ข้อมูลของ $^{3}J$ HMBC ของ H-2 (δ 7.20) และ H-1′ (δ 6.59) กับ carbonyl carbon C-10 (δ 170.9) สำหรับสัญญาณที่ 9.64 (1H, br s) เป็นสัญญาณของ hydroxy proton และเกาะอยู่ที่ C-1 รายละเอียดการระบุตำแหน่งต่างของโครงสร้างแสดงใน**ตารางที่ 2**



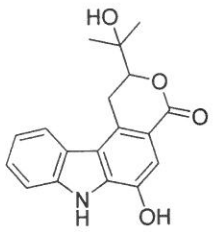
**J1**



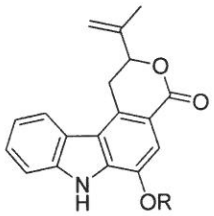
**J2**



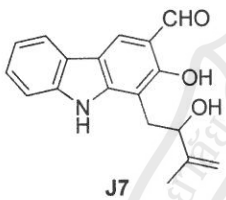
**J3**



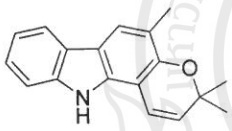
**J4**



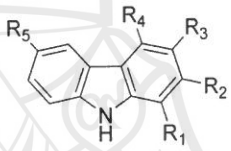
**J5**: R = H
**J6**: R = Me



**J7**



**J8**



| | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $R_4$ | $R_5$ |
|---|---|---|---|---|---|
| **J9** | OH | H | CHO | H | H |
| **J10** | OH | H | CO2Me | H | H |
| **J11** | OH | H | CHO | H | OH |
| **J12** | H | OH | CHO | H | OH |
| **J13** | OH | H | CHO | Isoprene | H |
| **J14** | OH | H | CO2Me | Isoprene | H |
| **J15** | OMe | H | CO2Me | Isoprene | H |
| **J16** | Isoprene | OH | CHO | H | H |

Harmandianamine B เป็นของแข็งสีเหลือง (mp 216.7-217.1 °C) จากข้อมูลของ HR-EI-MS ที่ $[M]^{+}$ *m/z* 341.1266 สารประกอบนี้มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{19}H_{19}NO_5$ สัญญาณ $^{1}$H NMR แสดงลักษณะของ 1,3,4-trisubstituted carbazole alkaloids คล้ายกับ harmandianamine B ที่ δ 11.01 (1H, br s, 9-NH), 8.30 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.67 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 7.54 (1H, s, H-2), 7.48 (1H, td, $J$ = 8.0 และ 1.5 Hz, H-7) 7.29 (1H, td, $J$ = 8.0 และ 1.5 Hz, H-6) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของหมู่ methoxyl ที่ δ 4.08 โดยเกาะอยู่ที่ตำแหน่ง C-1 (δ 147.9) จากการเปรียบเทียบสัญญาณ NMR กับ clausevatine E ซึ่งแยกได้จาก *C. excavata* พบว่าสัญญาณที่เหลือมีลักษณะที่คล้ายกัน [δ 5.83 (1H, dd, $J$ = 4.0 and 2.0, H-1′), 5.39 (1H, d, $J$ = 4.0 Hz, 1′-OH), 4.71 (1H, br s, 3′-OH), 4.39 (1H, d, $J$ = 2.0, H-2′), 1.60 (3H, s, H-4′), and 1.52 (3H, s,

H-5′)] และค่าคงที่ในการคู่ควบที่น้อย (ประมาณ 2.0 Hz) ระหว่าง H-1′ (δ 5.83) และ H-2′ (δ 4.39) สามารถระบุได้ว่าโปรตอนที่ตำแหน่ง H-1′ และ H-2′ อยู่ในทิศทางเดียวกัน รายละเอียดการระบุตำแหน่งต่างของโครงสร้างแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** แสดงข้อมูลสัญญาณ $^{1}H$, $^{13}C$ และ HMBC ของ harmandianamine A และ harmandianamine B

| Position | Harmandianamine A | | | Harmandianamine B | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\delta_H$ (mult., *J* in Hz) | $\delta_C$ | HMBC | $\delta_H$ (mult., *J* in Hz) | $\delta_C$ | HMBC |
| 1 | — | 144.2 | — | — | 147.9 | — |
| 2 | 7.20 (s) | 104.5 | C-1, C-3, C-9a, C-10 | 7.54 (s) | 106.1 | C-1, C-3, C-4, C-10 |
| 3 | — | 138.7 | — | — | 116.9 | — |
| 4 | — | 115.9 | — | — | 130.4 | — |
| 4a | — | 118.7 | — | — | 116.8 | — |
| 4b | — | 121.0 | — | — | 120.5 | — |
| 5 | 7.82 (d, 8.0) | 123.1 | C-4a, C-7 | 8.30 (d, 8.0) | 123.4 | C-4a, C-7, C-8a |
| 6 | 7.24 (td, 8.0 and 1.5) | 120.9 | C-4b, C-8 | 7.29 (td, 8.0 and 1.5) | 121.0 | C-4b, C-8 |
| 7 | 7.46 (td, 8.0 and 1.5) | 126.9 | C-5, C-8a | 7.48 (td, 8.0 and 1.5) | 127.0 | C-5, C-8a |
| 8 | 7.67 (d, 8.0) | 112.7 | C-4b, C-6 | 7.67 (d, 8.0) | 112.7 | C-4b, C-6 |
| 8a | — | 142.3 | — | — | 141.3 | — |
| 9a | — | 132.8 | — | — | 135.2 | — |
| 10 | — | 170.9 | — | — | 166.3 | — |
| 1′ | 6.59 (d, 10.5) | 77.5 | C-3, C-10, C-2′, C-3′ | 5.83 (dd, 4.0 and 2.0) | 63.6 | C-4, C-4a |
| 2′ | 5.23 (m) | 121.7 | — | 4.39 (d, 2.0) | 84.2 | — |
| 3′ | — | 141.9 | — | — | 73.1 | — |
| 4′ | 2.20 (d, 1.5) | 30.2 | C-3′, C-5′ | 1.60 (s) | 27.0 | C-2′ |
| 5′ | 1.86 (d, 1.5) | 30.2 | C-2′, C-4′ | 1.52 (s) | 26.8 | C-2′ |
| 9-NH | 11.01 (br s) | — | — | 11.01 (br s) | — | — |
| 1-OH | 9.64 (br s) | — | C-1, C-9a | — | — | — |
| 1-OMe | — | — | — | 4.08 (s) | 56.2 | C-1 |
| 1′-OH | — | — | — | 5.39 (d, 4.0) | — | — |
| 3′-OH | — | — | — | 4.71 (br s) | — | — |

Harmandianamine C เป็นของแข็งสีเหลือง (mp 228.3 -228.6 °C) จากข้อมูลของ HR-EI-MS ([M]$^{+}$ *m/z* 323.1305) พบว่าสูตรโมเลกุลของสารนี้คือ $C_{18}H_{19}NO_4$ สัญญาณ $^{1}H$ NMR ของสารนี้ปรากฏสัญญาณของ NH ที่ δ 10.61 (1H, br s), chelated hydrogen ที่ δ 11.78 (1H, s, 2-OH), โปรตอนของหมู่ formyl ที่ δ 9.97 (1H, s, 3-CHO), กลุ่มสัญญาณของ 1,2-disubstituted benzene ที่ δ 8.07 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.50 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-8), 7.35 (1H, td, *J* = 8.0 และ

1.0 Hz, H-7), 7.20 (1H, td, $J$ = 8.0 และ 1.0 Hz, H-6) และ สัญญาณแอโรแมติกโปรตอนที่ δ 8.34 (1H, s, H-4) นอกจากนี้ยังพบกลุ่มสัญญาณ $^1$H NMR ของหมู่ $-CH_2CH(OH)C(CH_3)_2OH$ ที่ at δ 3.73 (1H, dd, $J$ = 9.5 และ 2.0 Hz, H-2′), 3.36 (1H, dd, $J$ = 14.5 และ 2.0 Hz, H-1a′), 2.81 (1H, m, H-1b′), 1.31 (3H, s, H-4′), และ 1.30 (3H, s, H-5′) โดยเกาะอยู่ที่ C-1 รายละเอียดการระบุตำแหน่งต่างของโครงสร้างแสดงในตารางที่ 3

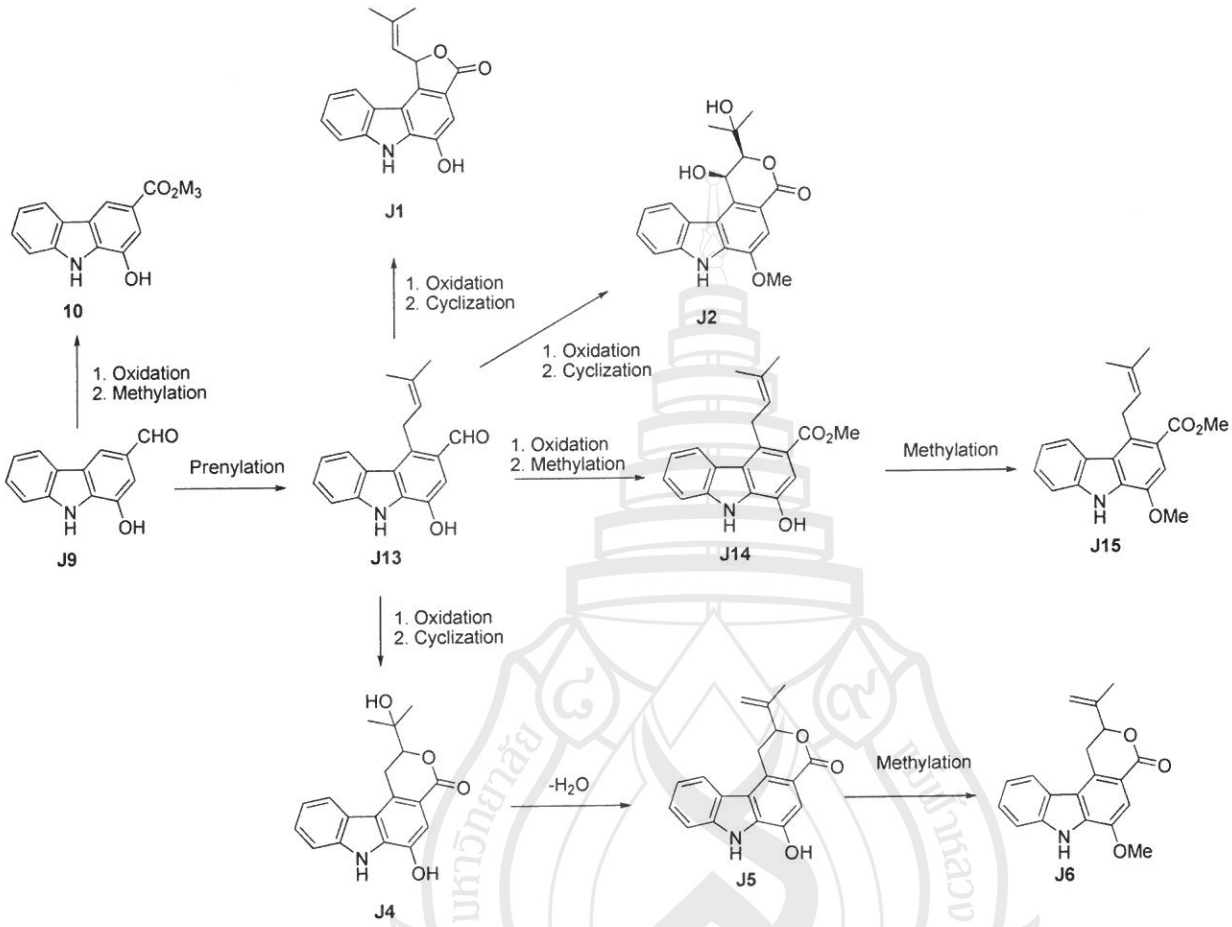
**ตารางที่ 3** แสดงข้อมูลสัญญาณ $^1$H, $^{13}$C และ HMBC ของ harmandianamine C

| Position | $\delta_H$ (mult., $J$ in Hz) | $\delta_C$ | HMBC |
|---|---|---|---|
| 1 | — | 109.6 | — |
| 2 | — | 158.9 | — |
| 3 | — | 116.0 | — |
| 4 | 8.34 (s) | 126.4 | C-2, C-4b, C-9a, 3-CHO |
| 4a | — | 118.1 | — |
| 4b | — | 124.5 | — |
| 5 | 8.07 (d, 8.0) | 121.0 | C-4a, C-7, C-8a |
| 6 | 7.20 (td, 8.0 and 1.0) | 120.4 | C-4b, C-8 |
| 7 | 7.35 (td, 8.0 and 1.0) | 126.4 | C-5, C-8a |
| 8 | 7.50 (d, 8.0) | 112.7 | C-4b, C-6 |
| 8a | — | 142.0 | — |
| 9a | — | 147.2 | — |
| 2-OH | 11.78 (br s) | — | — |
| 3-CHO | 9.97 (s) | 196.8 | C-2, C-3 |
| 9-NH | 10.61 (br s) | — | — |
| 1′ | 3.36 (dd, 14.5 and 2.0) | 27.4 | C-1, C-2, C-9a, C-2′ |
| | 2.81 (m) | | |
| 2′ | 3.73 (dd, 9.5 and 2.0) | 79.2 | C-3′ |
| 3′ | — | 73.1 | — |
| 4′ | 1.31 (s) | 25.2 | C-2′, C-3′, C-5′ |
| 5′ | 1.30 (s) | 26.0 | C-2′, C-3′, C-4′ |

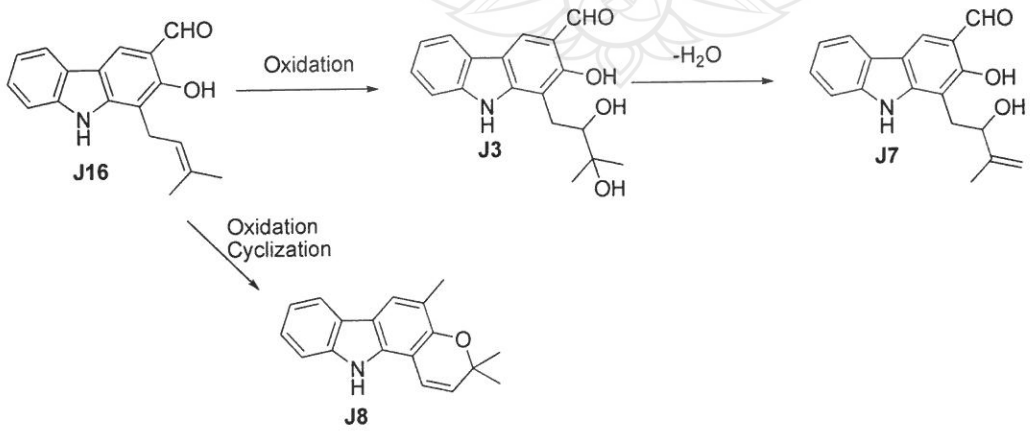
จากการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างและวิถีชีวสังเคราะห์ของสารประกอบแอลคาร์ลอยที่แยกได้จากกิ่งจันทร์หอมสามารถสรุปว่าสารประกอบ **J9** เป็นสารต้นตอของสารประกอบ **J1, J2, J4-J6, J10** และ **J13-J15**

Prenylation **J9** ที่ C-4 ได้สาร **J13** ต่อด้วยออกซิเดชันและการปิดวงแหวนในลักษณะที่แตกต่างกันสองแนวทาง โดยในแนวทางแรกเกิดการปิดวงแหวนแบบห้าเหลี่ยมและแนวทางที่สองแบบหกเหลี่ยมจะได้สาร **J1** และ **J2** ตามลำดับ นอกจากนี้ออกซิเดชันและการปิดวงแหวนของ **J13** ยังได้สาร **J4** อีกด้วย และเมื่อมีการ dehydration และตามด้วย methylation จะได้สาร **J5** และ **J6** ตามลำดับ ในทำนอง

เดียวกันเมื่อ ออกซิเดชันและ methylation สาร **J13** จะได้สาร **J14** และเกิด methylation ที่ 1-OH ได้ **J15** นอกจากนี้แล้วออกซิเดชันหมู่ CHO ของสาร **J9** เป็น $CO_2H$ และตามด้วยปฏิกิริยา methylation จะได้สาร **J10**




สำหรับความสัมพันธ์ของโครงสร้างและวิถีชีวสังเคราะห์ของสารประกอบ **J3, J7** และ **J8** พบว่าสารประกอบ **J16** เป็นสารต้นตอ โดยเมื่อออกซิเดชันและตามด้วย dehydration **J16** จะได้ **J3** และ **J7** ตามลำดับแต่ถ้าออกซิเดชันและตามด้วยการปิดวงแหวนจะได้ **J8**



สารประกอบ **J1-J12, J14** และ **J15** ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์คือ MRSA SK1, *S. aureus* TISTR 1466, *E. coli* TISTR 780 และ *S. typhimurium* TISTR 292 ดังแสดงในตารางที่ **4** โดยพบว่าสารทุกตัวแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในระดับต่ำหรือไม่แสดงฤทธิ์ (64-128 μg/mL) ต่อแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* TISTR 780 และ *S. typhimurium* TISTR 292 แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสาร **J6** แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ MRSA SK1 อย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่า MIC = 0.25 μg/mL ซึ่งดีกว่ายามาตรฐาน vancomycin (MIC = 1 μg/mL) สำหรับสาร **J5** และ **J14** ก็แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ MRSA SK1 ได้ดีเช่นเดียวกันโดยมีค่า MIC เป็น 8 และ 4 μg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้แล้วสาร **J14** ยังแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ *S. aureus* TISTR 1466 ได้ดีเช่นกันโดยมีค่า MIC เป็น 4 μg/mL

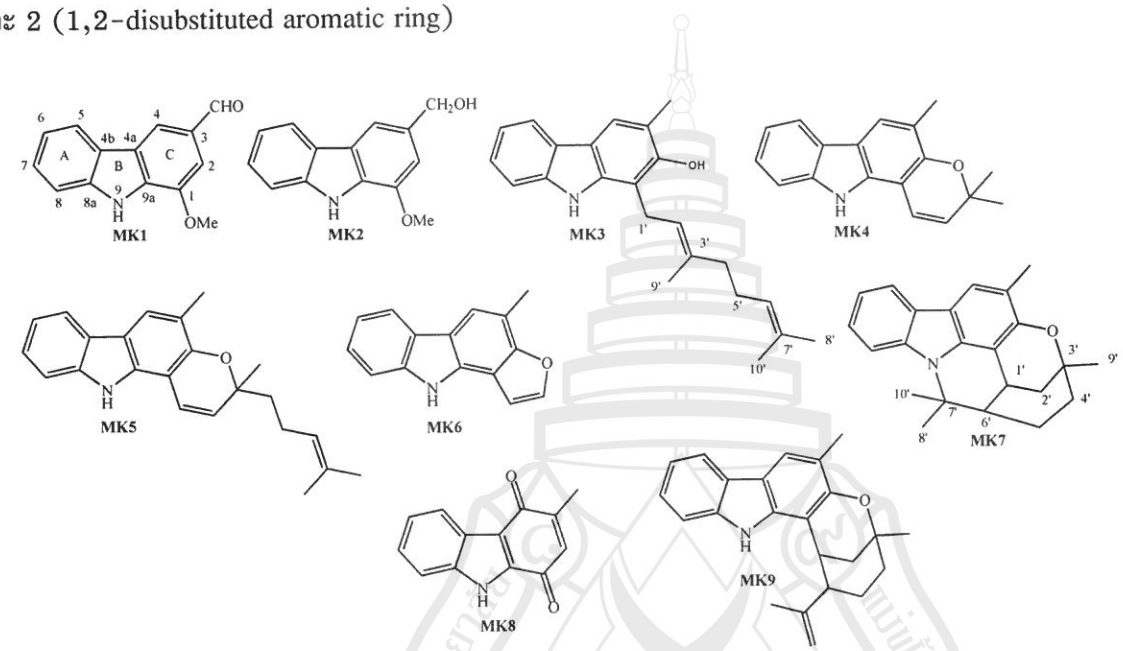
**ตารางที่ 4** ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของส่วนสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกิ่งจันทร์หอม

| Compound | Minimum Inhibition Concentrations (MIC, μg/mL) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | MRSA SK1 | *S. aureus* | *E. coli* | *S. typhimurium* |
| **J1** | 32 | 128 | 128 | 128 |
| **J2** | 64 | 128 | Inactive | 128 |
| **J3** | 128 | 128 | Inactive | 128 |
| **J4** | 32 | Inactive | Inactive | 128 |
| **J5** | 8 | 32 | 128 | 128 |
| **J6** | 0.25 | Inactive | Inactive | 128 |
| **J7** | 128 | Inactive | Inactive | 128 |
| **J8** | 128 | Inactive | Inactive | 128 |
| **J9** | 64 | 64 | Inactive | 64 |
| **J10** | 64 | 64 | 128 | 64 |
| **J11** | 128 | Inactive | 128 | 128 |
| **J12** | 16 | inactive | 64 | 128 |
| **J14** | 4 | 4 | 128 | 64 |
| **J15** | Inactive | Inactive | 128 | 128 |
| Vancomycin | 1 | 0.25 | Not tested | Not tested |
| Gentamycin | Not tested | Not tested | 0.25 | 0.125 |

Inactive at > 128 μg/mL

## บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของลำต้นหอมแขกสามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานแล้วจำนวน 9 สารคือ murrayanine (**MK1**) koenoline (**MK2**) mahanimbinol (**MK3**) girinimbine (**MK4**) mahanimbine (**MK5**) furostifoline (**MK6**) murrayazoline (**MK7**) murrayaquinone A (**MK8**) murrayazolidine (**MK9**) โดยสารทั้งหมดที่แยกได้เป็นสารประกอบคาร์บาโซลแอลคาร์ลอยด์ที่มีหมู่ Me อยู่ที่ตำแหน่งที่ 3 และวง A เป็นเป็นลักษณะเฉพาะของวงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ในตำแหน่งที่ 1 และ 2 (1,2-disubstituted aromatic ring)

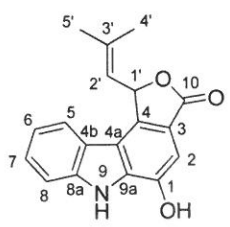



สารที่แยกได้ทั้งหมดนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลอง 3 ชนิดคือ มะเร็งในช่องปาก (Oral cavity cancer, KB) มะเร็งปอด (Small cell lung cancer, NCI-H187) และมะเร็งในทรวงอก (Breast cancer, MCF-7) จากการทดลองพบว่าสาร **MK8** จะแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งมะเร็งปอดได้ดีกว่ายามาตรฐาน Ellipticine (4.79 μM) โดยมีค่า $IC_{50}$ อยู่ที่ 2.98 μM สำหรับสารอื่น ๆนั้นแสดงฤทธิ์ได้น้อยกว่ายามาตรฐาน

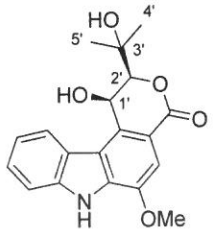
จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนกิ่งจันทร์หอม สามารถแยกสารประกอบได้ทั้งหมด 16 สาร เป็นสารประกอบคาร์บาโซลอัลคาลอยด์ใหม่ 3 สาร (**J1-J3**) คือ harmandianamines A-C (**J1-J3**) และสารที่มีการรายงานแล้ว 13 สาร คือ clausevatine D (**J4**), clausamine A (**J5**), clausamine B (**J6**), clausine S (**J7**), girinimbine (**J8**), *O*-demethylmurrayanine (**J9**), clauszoline I (**J10**), clausine Z (**J11**), clauszoline N (**J12**), clausine D (**J13**), clausine F (**J14**), clausemine D (**J15**), heptaphylline (**J16**) โดยสารทั้งหมดเป็นสารประกอบในกลุ่มเดียวกับสารที่แยกได้จากต้นหอมแขก

สารประกอบคาร์บาโซลที่แยกได้ทุกชนิดยกเว้นสาร **J11** และ **J12** ที่วงแหวน A จะไม่ปรากฏหมู่แทนที่โดยจะแสดงสัญญาณ $^1$H NMR อยู่ในช่วง 7-8 ppm ซึ่งเป็นจะสัญญาณของ H-5, H-6, H-7,

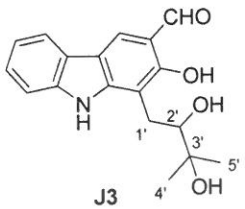
และ H-8 สำหรับสาร **J11** และ **J12** ในตำแหน่งที่ 6 จะมีหมู่แทนที่ 1 หมู่คือ OH คาร์บาโซลที่แยกได้จะปรากฏสัญญาณ $^{1}$H NMR ที่แตกต่างกันเฉพาะวง C นอกจากนี้สารทุกตัวยังปรากฏสัญญาณของ NH ที่ประมาณ 10-11 ppm



**J1**

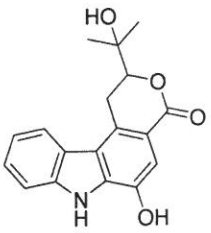


**J2**

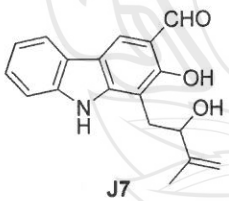


**J3**

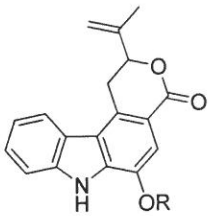
นอกจากนี้สารประกอบ **J1-J12, J14** และ **J15** ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์คือ MRSA SK1, *S. aureus* TISTR 1466, *E. coli* TISTR 780 และ *S. typhimurium* TISTR 292 โดยพบว่าสารทุกตัวแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในระดับต่ำหรือไม่แสดงฤทธิ์ (64-128 μg/mL) ต่อแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* TISTR 780 และ *S. typhimurium* TISTR 292 แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสาร **J6** แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ MRSA SK1 อย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่า MIC = 0.25 μg/mL ซึ่งดีกว่ายามาตรฐาน vancomycin (MIC = 1 μg/mL) สำหรับสาร **J5** และ **J14** ก็แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ MRSA SK1 ได้ดีเช่นเดียวกันโดยมีค่า MIC เป็น 8 และ 4 μg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้แล้วสาร **J14** ยังแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ *S. aureus* TISTR 1466 ได้ดีเช่นกันโดยมีค่า MIC เป็น 4 μg/mL



**J4**

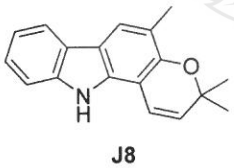


**J7**

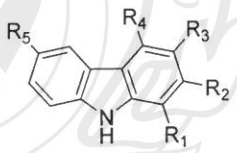


**J5**: R = H

**J6**: R = Me



**J8**



| | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $R_4$ | $R_5$ |
|---|---|---|---|---|---|
| **J9** | OH | H | CHO | H | H |
| **J10** | OH | H | CO2Me | H | H |
| **J11** | OH | H | CHO | H | OH |
| **J12** | H | OH | CHO | H | OH |
| **J13** | OH | H | CHO | Isoprene | H |
| **J14** | OH | H | CO2Me | Isoprene | H |
| **J15** | OMe | H | CO2Me | Isoprene | H |
| **J16** | Isoprene | OH | CHO | H | H |

**ปัญหา อุปสรรคในการทำวิจัย**

1. มหาวิทยาลัยไม่มีเครื่องระดับสูงในการทำงานวิจัย อันได้แก่ NMR, HPLC และ High resolution MS จึงทำให้เกิดความล่าช้าในการวิเคราะห์โครงสร้าง และทำให้การดำเนินงานวิจัยเป็นไปอย่างไม่ต่อเนื่อง และมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก

2. ไม่มีหน่วยงานในมหาวิทยาลัยที่ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญเช่น ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ต้านมะเร็ง และต้าน HIV เป็นต้น ซึ่งทำให้ต้องส่งสารบริสุทธิ์ไปทดสอบยังหน่วยงานนอกมหาวิทยาลัยซึ่งต้องรอผลการทดสอบนานกว่า 4 เดือนและมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก

# เอกสารอ้างอิง


Baker, N.H.A., Sukari, M.A., Rahmani, M., Sharif, A.M., Khalid, K., Yusuf, U.K. *Malalsian J. Anal. Sci.* **2007**, *11*, 173-176.

Chaichantipyuth, C., Pummangura, S., Naowsaran, K. and Thanyavuthi, D. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 1285-1288.

Furukawa, H., Wu, T. S., Ohta, T. &Kuoh, C. S. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**. *33*, 4132-4138.

He, H.P., Shen, Y.M., Zuo, G.Y., Zhu, W.M., Yang, X.S, Hao, X. J. *Chin. Chem. Lett.* **2000**, *11*, 539-542.

He, H.P., Zhang, J.X., Shen, Y.M., He, Y.N., Chen, C.X., Hao, X.J. *Helv. Chim. Acta.* **2002**, *85*, 671-677.

Intekhab, J., Aslam, M. *J. Saudi Chem. Soc.***2008**, 12, 515-518.

Ito, C., Itoigawa, M., Nakao, K., Murata, T., Tsuboi, M., Kaneda, N., Furukawa, H. *Phytochemistry* **2006**, *13*, 359-365.

Ito, C., Itoigawa, M., Katsuno, S., Omura, M., Tokuda, H., Nishino, H, Furukawa, H. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1218-1224.

Ito, C., Katsuno, S., Itoigawa, M., Ruangrungsi, N., Mukaianka, T., Okuda, M., Kitagawa, Y., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 125-128.

Ito, C., Katsuno, S., Ruangrungsi, N., Furukawa, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 344-346.

Jenjai, C., Sripontan, S., Sriprajun, P., Kittakoop, P., Jintasirikul, A., Tanticharoen, M. and Thetaranonth, Y. *Planta Med.* **2000**, *66*, 277-279.

Laphookhieo, S., Sripisut, T., Prawat, U, Karalai, C. *Heterocycles* **2009**, *78*, 2115-2119.

Maneerat, W., Laphookhieo, S. *Heterocycles* **2010**, *81*, 1261-1269.

Maneerat, W., Prawat, U., Saewan, N., Laphookhieo, S. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 665-668.

Mandal, S., Nayak, A., Kar, M., Banerjee, S.K., Das, A., Upadhyay, S.N., Singh, R.K., Banerji, A., Banerji, J. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 72-74.

Ngadjui, B. T., Ayafor, J. F., Sondengam B., Connolly, J. D. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1517-1519

Rahman, M.M., Gray, A.I. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1601-1606.

Portterat, O., Puder, C., Bolek, W., Wagner, K., Changqiang, Y., Gillardon, F. *Pharmazie*, **2005**, *60*, 637-639.

Shi, X. J., Ye, G., Tang, W. J., Zhao W. M. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 985-990.

Sukari, M.A., Ahmad, K., Haron, M.J., Muse, R. *Malalsian J. Anal. Sci.* **2001**, 7, 263-265.

Sunthitikawinsakul, A., Kongkathip, N., Kongkathip, B., Phonnakhu, S., Daly, J.W., Spande, T.F., Nimit, Y., Rochanaruangrai, S. *Planta Med.* **2003**, *69*, 155-157.

Songsiang U., Thongthoom T., Boonyarat C. &Yenjai C. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 208-212.

Takemura, Y., Kanao, K., Konoshima, A., Ju-ichi, M., Ito, C., Furukawa, H., Tokuda, H., Nishino, H. *Heterocycles* **2004**, *63*, 115-121.

Terezan, A. P., Rossi, R. A., Almeida, R. N. A., Freitas, T. G., Fenandes, J. B., Silva, M. F. G. F., Vieira, P. C., Bueno O. C., Pagnocca, F. C. &Pirani, J. R. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 882-886.

Thongthoom, T., Songsiang, U, Phaosiri, C. and Yenjai, C. *Arch. Pharm. Res.* **2010**, *33*, 675-680.

Wangboondkul, J. D., Pummangura S., Chaichantipyuth C. *J. Nat. Prod.* 1984, *47*, 1058-1059.

Wu, C., Katsuno, S., Ohta, H., Omura, M., Kajiura, I., Furukawa, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 48-52.

Wu, T. S., Furukawa, H. *J. Nat. Prod.* **1992**, *45*, 718-720.

Wu, T. S., Huang, S. C. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *40*, 1069-1071.

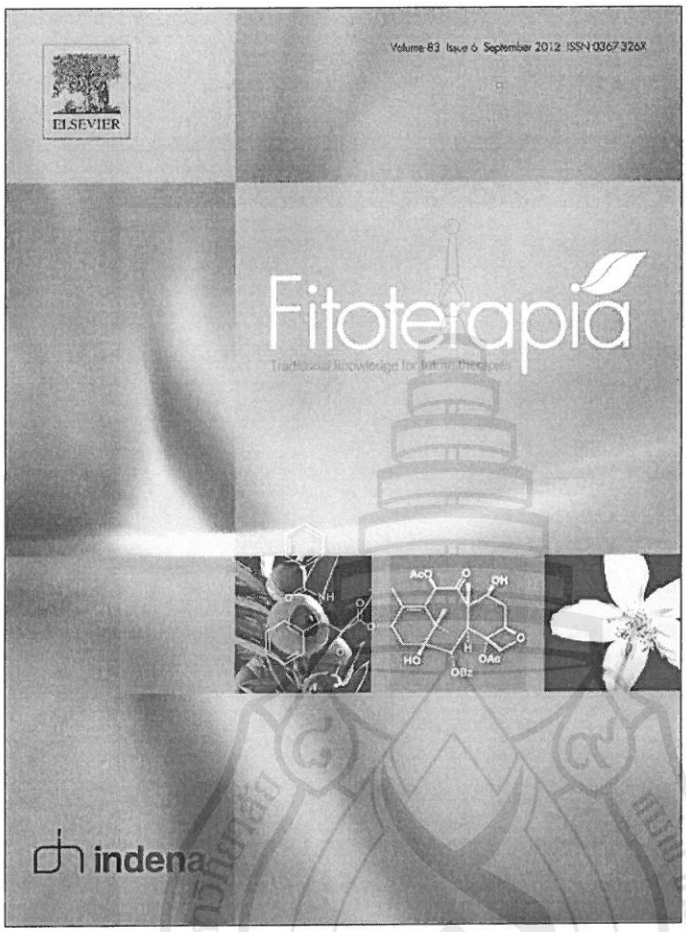
Wu, T. S., Huang, S. C., Wu, P. L. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46* 1459-1461.

Wu, T. S., Huang, S. C., Wu, P. L., Kuoh, C. S. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 523-527.

Yenjai C., Sripontan S., Sriprajun P., Kittakoop P., Jintasirikul A., Tanticharoen M. &Thebtaranonth Y. *Planta Med.* **2000**, *66*, 277 - 279.

# ภาคผนวก

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.




This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/copyright

Author's personal copy

Fitoterapia 83 (2012) 1110–1114

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Fitoterapia

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

# Antibacterial carbazole alkaloids from *Clausena harmandiana* twigs

Wisanu Maneerat [a], Wong Phakhodee [a], Thunwadee Ritthiwigrom [b], Sarot Cheenpracha [c], Trinop Promgool [a], Kulsiri Yossathera [a], Suwanna Deachathai [a], Surat Laphookhieo [a,*]

[a] Natural Products Research Laboratory, School of Science, Mae Fah Luang University, Tasud, Muang, Chiang Rai 57100, Thailand
[b] Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Sutep, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
[c] School of Science, University of Phayao, Maeka, Muang, Phayao 56000, Thailand

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 8 March 2012
Accepted in revised form 23 April 2012
Available online 2 May 2012

*Keywords:*
*Clausena harmandiana*
Carbazole alkaloid
Harmandianamines A-C
Anti-bacteria
Rutaceae

ABSTRACT

Three new carbazole alkaloids, harmandianamines A-C (**1–3**), together with fifteen known compounds (**4–18**) were isolated from the twigs of *Clausena harmandiana*. The structures were elucidated by spectroscopic methods, including UV, IR, NMR, and MS. The antibacterial activity against *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1 of some isolated compounds was also evaluated. Compound **6** exhibited significant antibacterial activity against MRSA SK1 with an MIC value of 0.25 μg/mL which higher than that of standard drug, vancomycin (MIC value = 1 μg/mL) whereas compounds **14** and **5** showed strong activity with MIC values of 4 and 8 μg/mL, respectively. Only compound **14** showed strong antibacterial activity against *S. aureus* TISTR 1466 with an MIC value of 4 μg/mL.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Clausena harmandiana* (Pierre) belonging to the family of Rutaceae, is distributed in northeastern Thailand. The young leaves are edible [1] and some parts of the plant have been used as traditional medicines for the treatment of illness, stomachache, and headache [2]. Many of carbazole alkaloids as well as coumarins were recognized as major compounds of *C. harmandiana* and some of them displayed interesting biological activities including antimalaria, anti-TB, cytotoxicity, and stimulate glucose uptake in L6 myotubes [1–4]. In a continuing search for bioactive metabolites from *Clausena* plants [5–9], we report herein the isolation and identification of three new carbazole alkaloids (**1–3**), harmandianamines A-C, along with fifteen known compounds including clausevatine D (**4**) [11], clausamine A (**5**) [12], clausamine B (**6**) [12], clausine S (**7**) [13], girinimbine (**8**) [14], *O*-demethylmurrayanine (**9**) [15], clauszoline I (**10**) [16], clausine Z (**11**) [17], clauszoline N (**12**) [18], clausine D (**13**) [19], clausine F (**14**) [19], clausemine D (**15**) [20], heptaphylline (**16**) [21], dectamine (**17**) [22], and γ-fagarine (**18**) [22] (Fig. 1) from *C. harmandiana* twigs. Also, the antibacterial activity against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* TISTR1466 and methicillin-resistant *S. aureus* SK1) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* TISTR 780 and *Salmonella typhimurium* TISTR 292) was also reported.

## 2. Experimental

### 2.1. General

Melting points were determined on a Buchi, B-540 visual thermometer. The optical rotation $[\alpha]_D$ values were determined with a Bellingham & Stanley ADP400 polarimeter. UV–vis spectra were recorded with a Perkin-Elmer UV–vis spectrophotometer. The IR spectra were recorded using Perkin-Elmer FTS FT-IR spectrophotometer. The $^1H$ and $^{13}C$ NMR spectra were recorded by 400 MHz Bruker or 500 MHz Varian UNITY INOVA spectrometers. Tetramethylsilane (TMS) are used as internal reference. The EI-MS and HR-EI-MS data were used MAT 95 XL mass spectrometer. Quick column chromatography (QCC) and column chromatography (CC) were carried out on

* Corresponding author. Tel.: +66 5391 6238; fax: +66 5391 6776.
*E-mail addresses:* surat@mfu.ac.th, s.laphookhieo@sci.mfu.ac.th (S. Laphookhieo).

0367-326X/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.fitote.2012.04.026

Author's personal copy



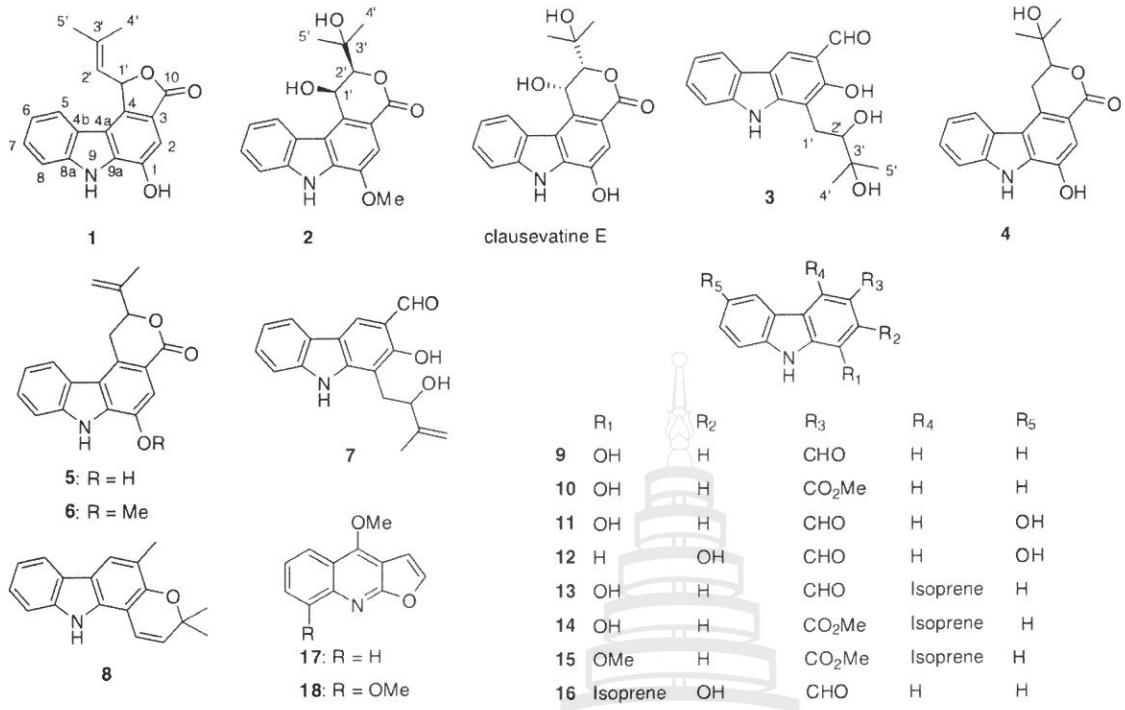



**Fig. 1.** Structures of alkaloids from *C. harmandiana* twigs.

silica gel 60 H (Merck, 5–40 μm) and silica gel 100 (Merck, 63–200 μm), respectively. Precoated plates of silica gel 60 $F_{254}$ were used for analytical purposes.

### 2.2. Plant material

The *C. harmandiana* twigs were collected from Chiang Rai Province, northern Thailand, in March 2010. The plant was identified by Dr. Monthon Norsaengsri and Mr. James Maxwell and a voucher specimen number QBG 45334 was deposited at the herbarium collection of Queen Sirikit Botanic Garden, Mae Rim, Chiang Mai, Thailand.

### 2.3. Extraction and isolation

Air-dried twigs of *C. harmandiana* (4.91 Kg) were extracted successively with hexanes and acetone over a period of 3 days at room temperature. The hexanes (14.39 g) and acetone (29.22 g) extracts were combined (43.61 g) and subjected to QCC over silica gel using a gradient of hexanes-EtOAc (100% hexanes to 100% EtOAc) to provide twelve fractions (A-L). Fraction C (1.10 g) was separated by CC with 30% $CH_2Cl_2$-hexanes to afford compounds **8** (2.1 mg) and **16** (19.9 mg). Fraction D (1.05 g) was performed by CC using 50% $CH_2Cl_2$-hexanes to yield compound **15** (46.0 mg). Fraction E (1.16 g) was subjected to CC with 60% $CH_2Cl_2$-hexanes and followed by Sephadex LH-20 eluting with 100% MeOH to give compound **7** (4.6 mg). Compounds **6** (18.3 mg), **14** (13.8 mg), and **17** (40.0 mg) were obtained from fraction G (1.75 g) by repeated Sephadex LH-20 with 100% MeOH and followed by CC using 30% EtOAc-hexanes. Fraction H (2.98 g) was separated by CC with 30% EtOAc-hexanes to provide four subfractions (H1-H4). Subfraction H2 (234.1 mg) was subjected to Sephadex LH-20 using 100% MeOH to afford compound **13** (5.8 mg) and four subfractions (H2a-H2d). Subfraction H2b (52.7 mg) was purified by CC with 5% acetone-$CH_2Cl_2$ to give compounds **9** (30.3 mg), **10** (1.4 mg), and **12** (1.9 mg). Fraction H4 (160.3 mg) was subjected to Sephadex LH-20 using 100% MeOH to give compound **5** (22.3 mg). Purification of fraction J (2.84 g) by QCC with 5% EtOAc-$CH_2Cl_2$ and followed by Sephadex LH-20 using 100% MeOH yielded compound **18** (2.4 mg). Fraction K (4.42 g) was separated by QCC with a gradient of 20% EtOAc-hexanes to 100% EtOAc to afford seven subfractions (G1-G7). Subfraction G2 (394.6 mg) was purified by Sephadex LH-20 using 100% MeOH and followed by CC with 10% acetone-hexanes to give compounds **1** (1.1 mg) and **3** (1.6 mg). The purification of subfraction K4 (534.5 mg) by Sephadex LH-20 using 100% MeOH gave compound **11** (11.5 mg). Compounds **2** (1.8 mg) and **4** (7.1 mg) were derived from subfraction G6 (442.2 mg) by Sephadex LH-20 with 100% MeOH and followed by CC using 30% EtOAc-$CH_2Cl_2$.

*Harmandianamine A* (**1**): Yellow solid; mp 203.6-204.0 °C; $[\alpha]_D^{28} = +6.46$ ($c = 0.008$, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{max}$ 204, 207, 240, 250, 267, 310, 323, 337; IR (neat) $\nu_{max}$ 3250, 2923, 2852, 1735, 1708; $^1H$ and $^{13}C$ NMR spectroscopic data see Table 1; EI-MS *m/z* 292 (94), 277 (56), 250 (18), 233 (12), 209 (100), 181 (15); HR-EI-MS (*m/z*): $[M]^+$ 293.1054 (calc. for $C_{18}H_{15}NO_3$, 293.1046).

*Harmandianamine B* (**2**): Yellow solid; mp 216.7-217.1 °C; $[\alpha]_D^{29} = +35.2$ ($c = 0.012$, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{max}$ 204, 212, 237, 249, 269, 279, 323, 335; IR (neat) $\nu_{max}$ 3340, 2921, 2830, 1695, 1584, 1361; $^1H$ and $^{13}C$ NMR spectroscopic data see Table 1; EI-MS *m/z* 340 (88), 264 (100), 236 (46), 224 (22), 209 (20), 153, (14); HR-EI-MS (*m/z*): $[M]^+$ 341.1266 (calc. for $C_{19}H_{19}NO_5$, 341.1258).

*Harmandianamine C* (**3**): Yellow solid; mp 228.3-228.6 °C; $[\alpha]_D^{29} = +18.6$ ($c = 0.011$, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{max}$ 204,

Author's personal copy



**Table 1**
$^1$H (500 MHz, acetone-$d_6$), $^{13}$C NMR (125 MHz, acetone-$d_6$) and HMBC correlations of compounds **1** and **2**.

| Position | **1** | | | **2** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\delta_H$ (mult., $J$ in Hz) | $\delta_C$ | HMBC ($^1$H→$^{13}$C) | $\delta_H$ (mult., $J$ in Hz) | $\delta_C$ | HMBC ($^1$H→$^{13}$C) |
| 1 | – | 144.2 | – | – | 147.9 | – |
| 2 | 7.20 (s) | 104.5 | C-1, C-3, C-9a, C-10 | 7.54 (s) | 106.1 | C-1, C-3, C-4, C-10 |
| 3 | – | 138.7 | – | – | 116.9 | – |
| 4 | – | 115.9 | – | – | 130.4 | – |
| 4a | – | 118.7 | – | – | 116.8 | – |
| 4b | – | 121.0 | – | – | 120.5 | – |
| 5 | 7.82 (d, 8.0) | 123.1 | C-4a, C-7 | 8.30 (d, 8.0) | 123.4 | C-4a, C-7, C-8a |
| 6 | 7.24 (td, 8.0 and 1.5) | 120.9 | C-4b, C-8 | 7.29 (td, 8.0 and 1.5) | 121.0 | C-4b, C-8 |
| 7 | 7.46 (td, 8.0 and 1.5) | 126.9 | C-5, C-8a | 7.48 (td, 8.0 and 1.5) | 127.0 | C-5, C-8a |
| 8 | 7.67 (d, 8.0) | 112.7 | C-4b, C-6 | 7.67 (d, 8.0) | 112.7 | C-4b, C-6 |
| 8a | – | 142.3 | – | – | 141.3 | – |
| 9a | – | 132.8 | – | – | 135.2 | – |
| 10 | – | 170.9 | – | – | 166.3 | – |
| 1′ | 6.59 (d, 10.5) | 77.5 | C-3, C-10, C-2′, C-3′ | 5.83 (dd, 4.0 and 2.0) | 63.6 | C-4, C-4a |
| 2′ | 5.23 (m) | 121.7 | – | 4.39 (d, 2.0) | 84.2 | – |
| 3′ | – | 141.9 | – | – | 73.1 | – |
| 4′ | 2.20 (d, 1.5) | 30.2 | C-3′, C-5′ | 1.60 (s) | 27.0 | C-2′ |
| 5′ | 1.86 (d, 1.5) | 30.2 | C-2′, C-4′ | 1.52 (s) | 26.8 | C-2′ |
| 9-NH | 11.01 (br s) | – | – | 11.01 (br s) | – | – |
| 1-OH | 9.64 (br s) | – | C-1, C-9a | – | – | – |
| 1-OMe | – | – | – | 4.08 (s) | 56.2 | C-1 |
| 1′-OH | – | – | – | 5.39 (d, 4.0) | – | – |
| 3′-OH | – | – | – | 4.71 (br s) | – | – |

236, 247, 277, 298, 327, 342; IR (neat) $\nu_{max}$ 3363, 2923, 2853, 1632, 1613, 1232; $^1$H and $^{13}$C NMR spectroscopic data see Table 2; EI-MS $m/z$ 312 (51), 253 (38), 223 (100), 166 (20); HR-EI-MS ($m/z$): $[M]^+$ 313.1305 (calc. for $C_{18}H_{19}NO_4$, 313.1309).

### 2.4. Antibacterial Assay

*E. coli* TISTR 780, *S. typhimurium* TISTR 292, and *S. aureus* TISTR 1466 were derived from the Microbiological Resources, Center of the Thailand Institute of Scientific and Technological Research whereas MRSA SK1 was derived from Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by a two-fold serial dilution method using Mueller Hinton broth according to the Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations (CLSI, 2002) [10]. The test substances were dissolved in DMSO. Vancomycin and gentamycin were used as standard drugs.

**Table 2**
$^1$H (500 MHz, acetone-$d_6$), $^{13}$C NMR (125 MHz, acetone-$d_6$), and HMBC correlations of compound **3**.

| Position | $\delta_H$ (mult., $J$ in Hz) | $\delta_C$ | HMBC ($^1$H→$^{13}$C) |
|---|---|---|---|
| 1 | – | 109.6 | – |
| 2 | – | 158.9 | – |
| 3 | – | 116.0 | – |
| 4 | 8.34 (s) | 126.4 | C-2, C-4b, C-9a, 3-CHO |
| 4a | – | 118.1 | – |
| 4b | – | 124.5 | – |
| 5 | 8.07 (d, 8.0) | 121.0 | C-4a, C-7, C-8a |
| 6 | 7.20 (td, 8.0 and 1.0) | 120.4 | C-4b, C-8 |
| 7 | 7.35 (td, 8.0 and 1.0) | 126.4 | C-5, C-8a |
| 8 | 7.50 (d, 8.0) | 112.7 | C-4b, C-6 |
| 8a | – | 142.0 | – |
| 9a | – | 147.2 | – |
| 2-OH | 11.78 (br s) | – | – |
| 3-CHO | 9.97 (s) | 196.8 | C-2, C-3 |
| 9-NH | 10.61 (br s) | – | – |
| 1′ | 3.36 (dd, 14.5 and 2.0)<br>2.81 (m) | 27.4 | C-1, C-2, C-9a, C-2′ |
| 2′ | 3.73 (dd, 9.5 and 2.0) | 79.2 | C-3′ |
| 3′ | – | 73.1 | – |
| 4′ | 1.31 (s) | 25.2 | C-2′, C-3′, C-5′ |
| 5′ | 1.30 (s) | 26.0 | C-2′, C-3′, C-4′ |

## 3. Results and discussion

The combination of hexanes and acetone extracts of *C. harmandiana* twigs was subjected to silica gel column chromatography to yield three new carbazole alkaloids (**1–3**) along with fifteen known alkaloids (**4–18**) (Fig. 1). All new compounds isolated from the twigs of *C. harmandiana* were carbazole alkaloids which contained non-substitute groups on ring A. These compounds showed common signals in $^1$H NMR spectra for N*H* signal ca. $\delta_H$ 10–11 ppm and a set of four spin proton signals of ring A at ca. $\delta_H$ 8.0 (H-5), 7.2 (H-6), 7.4 (H-7) and 7.5 (H-8).

Harmandianamine A (**1**) was obtained as a yellow solid (mp 203.6-204.0 °C) which showed the molecular ion peak at $[M]^+$ $m/z$ 293.1054 (calc. for 293.1046) in HR-EI-MS corresponding to the molecular formula of $C_{18}H_{15}NO_3$. Its UV spectrum displayed the maximum absorbances of carbazole alkaloid at $\lambda_{max}$ 204, 207, 240, 250, 267, 310, 323, and 337 nm [5–9], while the IR spectrum showed the absorption bands of NH (3250 cm$^{-1}$) and γ-lactone carbonyl (1735 cm$^{-1}$) functionalities [23]. The $^1$H NMR spectral data of **1** displayed signals of NH at $\delta_H$ 11.01 (br s), a set of 1,2-disubstituted benzene ring at $\delta_H$ 7.82 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.67 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 7.46 (1H, td, $J$ = 8.0 and 1.5 Hz, H-7), and 7.24 (1H, td, $J$ = 8.0 and 1.5 Hz, H-6), and an aromatic proton at $\delta_H$ 7.20 (1H, s, H-2) [11, 12, 19, 20]. The $^1$H and $^{13}$C NMR spectrum also showed signals of γ-lactone group at $\delta_H/\delta_C$ 6.59 (1H, d, $J$ = 10.5 Hz, H-1′)/ 77.5

Author's personal copy



(C-1′), 5.23 (1H, m, H-2′)/ 121.7 (C-2′), 2.20 (3 H, d, $J$ = 1.5 Hz, H-4′)/ 30.2 (C-4′), and 1.86 (3 H, d, $J$ = 1.5 Hz, H-5′)/ 30.2 C-5 [9, 23], which was placed on C-3/C-4 due to the $^3J$ HMBC correlations of H-2 ($\delta_H$ 7.20) and H-1′ ($\delta_H$ 6.59) with carbonyl carbon C-10 ($\delta_C$ 170.9). In addition, the hydroxy proton signal at $\delta_H$ 9.64 (1H, br s) was located at C-1 due to the HMBC correlations of this proton with C-1 ($\delta_C$ 144.2) and C-9a ($\delta_C$ 132.8). Therefore, the structure **1** was assigned as harmandianamine A. Detailed assignments of the protons and carbons as well as HMBC correlations are shown in Table 1.

Harmandianamine B (**2**) was obtained as a yellow solid (mp 216.7-217.1 °C). The HR-EI-MS showed the molecular ion peak at $[M]^+$ $m/z$ 341.1266 (calc. for 341.1258) corresponding to the molecular formula of $C_{19}H_{19}NO_5$. The $^1$H NMR spectrum displayed similar signals of 1,3,4-trisubstituted carbazole alkaloids pattern to that of **1** at $\delta_H$ 11.01 (1H, br s, 9-NH), 8.30 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.67 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 7.54 (1H, s, H-2), 7.48 (1H, td, $J$ = 8.0 and 1.5 Hz, H-7), and 7.29 (1H, td, $J$ = 8.0 and 1.5 Hz, H-6). In addition, the methoxyl group was also observed at $\delta_H$ 4.08 in $^1$H NMR spectrum which placed at C-1 because of the HMBC correlation between methoxyl protons with C-1 ($\delta_C$ 147.9). By comparison of NMR spectral data of **2** with that of clausevatine E [11] isolated from *C. excavata*, all remaining signals [$\delta_H$ 5.83 (1H, dd, $J$ = 4.0 and 2.0, H-1′), 5.39 (1H, d, $J$ = 4.0 Hz, 1′-OH), 4.71 (1H, br s, 3′-OH), 4.39 (1H, d, $J$ = 2.0, H-2′), 1.60 (3 H, s, H-4′), and 1.52 (3 H, s, H-5′)] were similar. The small coupling constant, 2.0 Hz, of H-1′ ($\delta_H$ 5.83) and H-2′ ($\delta_H$ 4.39) should be recognized as *syn* orientation of both protons. However, the stereochemistry at C-1′ and C-2′ of lactone ring was different with those of clausevatine E because of the opposite optical rotation (+35.2 (MeOH) for **2**; -92.4 (MeOH) for clausevatine E) [11]. The structure of **2** was, therefore, identified as harmandianamine B. Detailed assignments of the protons and carbons as well as HMBC correlations are shown in Table 1.

Harmandianamine C (**3**) was isolated as a yellow solid (mp 228.3 -228.6 °C), for which the molecular formula of $C_{18}H_{19}NO_4$ was inferred by HR-EI-MS ($[M]^+$ $m/z$ 323.1305, calc. 313.1309). The $^1$H NMR spectral data of **3** displayed signals of NH at $\delta_H$ 10.61 (1H, br s), a chelated hydrogen at $\delta_H$ 11.78 (1H, br s, 2-OH), a formyl proton at $\delta_H$ 9.97 (1H, s, 3-CHO), a set of 1,2-disubstituted benzene ring at $\delta_H$ 8.07 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-5), 7.50 (1H, d, $J$ = 8.0 Hz, H-8), 7.35 (1H, td, $J$ = 8.0 and 1.0 Hz, H-7), and 7.20 (1H, td, $J$ = 8.0 and 1.0 Hz, H-6), and an singlet aromatic proton at $\delta_H$ 8.34 (1H, s, H-4). The presence of $-CH_2CH(OH)C(CH_3)_2OH$ unit was also observed in the $^1$H NMR at $\delta_H$ 3.73 (1H, dd, $J$ = 9.5 and 2.0 Hz, H-2′), 3.36 (1H, dd, $J$ = 14.5 and 2.0 Hz, H-1a′), 2.81 (1H, m, H-1b′), 1.31 (3 H, s, H-4′), and 1.30 (3 H, s, H-5′) [13] which placed at C-1 due to the correlations of H-1′ ($\delta_H$ 3.36 and 2.81) and H-4 ($\delta_H$ 8.34) with C-2 ($\delta_C$ 158.9) and C-9a ($\delta_C$ 147.2) in the HMBC experiment. The structure of **3** was, therefore, assigned to harmandianamine C. Detailed assignments of the protons and carbons as well as HMBC correlations are shown in Table 2.

Compounds **1–12**, **14**, and **15** were evaluated for their antibacteria against MRSA SK1, *S. aureus* TISTR 1466, *E. coli* TISTR 780, and *S. typhimurium* TISTR 292 (Table 3). All tested compounds showed weak (64–128 μg/mL) or no activity against Gram-negative bacteria (*E. coli* TISTR 780 and *S. typhimurium* TISTR 292). However, compound **6** was found to be potent antibacteria against MRSA SK1 with an MIC value of 0.25 μg/mL which higher than a standard drug, vancomycin (MIC value = 1 μg/mL) while compounds **5** and **14** showed strong antibacteria against MRSA SK1 with MIC values of 8 and 4 μg/mL, respectively. Also, compound **14** displayed strong antibacteria against *S. aureus* TISTR 1466 with an MIC value of 4 μg/mL (Table 3). It should be noted that the γ-lactone (**1**) and δ-lactone (**4**) carbazoles reduced anti-bacterial activity against MRSA SK1 when compared to that of free prenyl carbazole **14**. However, the activity is enhanced when the dehydration (C-3′/C-5′) of **5** was formed. Moreover, selective *O*-methylation of **6** displayed more potent antibacterial activity than those of standard drug, vancomycin. Additionally, the selective benzylic oxidation of **2** intensively diminished activity.

**Table 3**
Antibacterial activity of compounds **1–12**, **14** and **15** from *C. harmandiana* twigs.

| Compound | Minimum Inhibition Concentrations (MIC, μg/mL) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | MRSA SK1 | *S. aureus* | *E. coli* | *S. typhimurium* |
| **1** | 32 | 128 | 128 | 128 |
| **2** | 64 | 128 | inactive | 128 |
| **3** | 128 | 128 | inactive | 128 |
| **4** | 32 | inactive | inactive | 128 |
| **5** | 8 | 32 | 128 | 128 |
| **6** | 0.25 | inactive | inactive | 128 |
| **7** | 128 | inactive | inactive | 128 |
| **8** | 128 | inactive | inactive | 128 |
| **9** | 64 | 64 | inactive | 64 |
| **10** | 64 | 64 | 128 | 64 |
| **11** | 128 | inactive | 128 | 128 |
| **12** | 16 | inactive | 64 | 128 |
| **14** | 4 | 4 | 128 | 64 |
| **15** | inactive | inactive | 128 | 128 |
| Vancomycin | 1 | 0.25 | Not tested | Not tested |
| Gentamycin | Not tested | Not tested | 0.25 | 0.125 |

Inactive at > 128 μg/mL.

## Acknowledgements

We would like to thank Thailand Research Fund (TRF) through the Royal Golden Jubilee PhD program for a scholarship to WM and SL (Grant no. PHD/0006/2552), Mae Fah Luang University, and National Research Council of Thailand (NRCT) for financial supports.

## References

[1] Songsiang U, Thongthoom T, Boonyarat C, Yenjai C. Claurailas A-D, cytotoxic carbazole alkaloids from the roots of *Clausena harmandiana*. J Nat Prod 2011;74:208–12.
[2] Thongthoom T, Songsiang U, Phaosiri C, Yenjai C. Biological activity of chemical constituents from *Clausena harmandiana*. Arch Pharm Res 2010;33:675–80.
[3] Yenjai C, Sripontan S, Sriprajun P, Kittakoop P, Jintasirikul A, Tanticharoen M, et al. Coumarins and carbazoles with antiplasmodial activity from *Clausena harmandiana*. Planta Med 2000;66:277–9.
[4] Noipha K, Thongthoom T, Songsiang U, Boonyarat C, Yenjai C. Carbazoles and coumarins from *Clausena harmandiana* stimulate glucose uptake in L6 myotubes. Diabetes Res Clin Pract 2010;90:e67–71.
[5] Maneerat W, Prawat U, Saewan N, Laphookhieo S. New coumarins from *Clausena lansium* twigs. J Braz Chem Soc 2010;21:655–8.
[6] Maneerat W, Laphookhieo S. Antitumoral alkaloids from *Clausena lansium*. Heterocycles 2010;81:1261–9.

Author's personal copy



[7] Maneerat W, Ritthiwigrom T, Cheenpracha S, Prawat U, Laphookhieo S. Clausenawallines A and B, two new dimeric carbazole alkaloids from the roots of *Clausena wallichii*. Tetrahedron Lett 2011;52:3303–5.
[8] Maneerat W, Tha-in S, Cheenpracha S, Prawat U, Laphookhieo S. New amides from the seeds of *Clausena lansium*. J Med Plant Res 2011;5:2812–5.
[9] Maneerat W, Ritthiwigrom T, Cheenpracha S, Laphookhieo S. Carbazole alkaloids and coumarins from *Clausena lansium* roots. Phytochem Lett 2012;5:26–8.
[10] CLSI. Reference Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard M7-A4. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2002.
[11] Wu TS, Huang SC, Wu PL. Lactonic carbazole alkaloids from the root bark of *Clausena excavata*. Chem Pharm Bull 1998;46:1459–61.
[12] Ito C, Katsuno S, Ruangrungsi N, Furukawa H. Structures of clausamine A, B, C, three novel carbazole alkaloids from *Clausena anisata*. Chem Pharm Bull 1998;46:344–6.
[13] Wu TS, Huang SC, Wu PL, Kuoh CS. Alkaloidal and other constituents from the root bark of *Clausena excavata*. Phytochemistry 1999;52:523–7.
[14] Furukawa H, Wu TS, Ohta T, Kuoh CS. Chemical constituents of *Murraya euchrestifolia* HAYATA. Structures of novel carbazolequinones and other new carbazole alkaloids. Chem Pharm Bull 1985;33:4132–8.
[15] Ngadjui BT, Ayafor JF, Sondengam BL, Connolly JD. Quinolone and carbazole alkaloids from *Clausena anisata*. Phytochemistry 1989;28:1517–9.
[16] Ito C, Katsuno S, Ohta H, Omura M, Kajiura I, Furukawa H. Constituents of *Clausena excavata*. Isolation and structural elucidation of new carbazole alkaloids. Chem Pharm Bull 1997;45:48–52.
[17] Potterat O, Puder C, Bolek W, Wagner K, Changqiang Y, Gillardon F. Clausine Z, a new carbazole alkaloid from *Clausena excavate* with inhibitory activity on CDK5. Pharmazie 2005;60:637–9.
[18] Shi XJ, Guan Y, Tang WJ, Zhao WM. A new coumarin and carbazole alkaloid from *Clausena vestita* D. D. Tao. Helv Chim Acta 2010;93:985–90.
[19] Wu TS, Huang SC. Clausine D and F, two new 4-prenylcarbazole alkaloids from *Clausena excavata*. Chem Pharm Bull 1992;40:1069–71.
[20] Ito C, Katsuno S, Itoigawa M, Ruangrungsi N, Mukainaka T, Okuda M, et al. New carbazole alkaloids from *Clausena anisata* with antitumor promoting activity. J Nat Prod 2000;63:125–8.
[21] Wu TS, Furukawa H. Biological and phytochemical investigation of *Clausena excavata*. J Nat Prod 1982;45:718–20.
[22] Terezan AP, Rossi RA, Almeida RNA, Freitas TG, Fernandes JB, Silva MFDGFD, et al. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. J Braz Chem Soc 2010;21:882–6.
[23] Ito C, Itoigawa M, Aizawa K, Yoshida K, Ruangrungsi N, Furukawa H. γ-Lactone carbazoles from *Clausena anisata*. J Nat Prod 2009;72:1202–4.

# CYTOTOXIC CARBAZOLE ALKALOIDS FROM THE STEMS OF *Murraya koenigii*

**Cholpisut Tantapakul,[1] Wong Phakhodee,[1] Thunwadee Ritthiwigrom,[2] Sarot Cheenpracha,[3] Uma Prawat,[4] Surat Laphookhieo[1*]**

1) Natural Products Research Laboratory, School of Science, Mae Fah Luang University, Tasud, Muang, Chiang Rai 57100, Thailand, fax: +66 5391 6776, e-mail: s.laphookhieo@sci.mfu.ac.th; 2) Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Sutep, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand; 3) School of Science, University of Phayao, Maeka, Muang, Phayao 56000, Thailand; 1) Laboratory of Natural Products Chemistry, Faculty of Science and Technology, Phuket Rajabhat University, Rassada, Muang, Phuket 83000

*The cytotoxic assay-guided investigation of Murraya koenigii stems led to the isolation and identification of nine carbazole alkaloids (**1-9**). Their structures were characterized by spectroscopic methods. All compounds were evaluated for their cytotoxicity against three human cancer cell lines including human epidermoid carcinoma of oral cavity (KB), breast adenocarcinoma (MCF-7) and human small cell lung cancer (NCI-H187). Among the cytotoxic activity tested compounds, quinocarbazole alkaloid **8**, exhibited strong cytotoxicity against NCI-H187 cell line with the $IC_{50}$ value of 2.98 μM whereas compounds **4** and **5** showed moderate cytotoxicity against KB cell line with $IC_{50}$ values of 8.74 and 7.85 μM, respectively. Compounds **8** and **9** also exhibited moderate cytotoxicity against MCF-7 cell line with $IC_{50}$ values of 8.10 and 7.12 μM, respectively.*

**Keywords:** *Murraya koenigii*, Rutaceae, carbazole alkaloid

*Murraya koenigii* is a tropical to sub-tropical small tree belonging to the Rutaceae family. The plant is native to India and is distributed in most of Southern Asia. The leaves of this plant are highly aromatic and young leaves are used as a vegetable herb in Southern part of Thailand. Various parts of the plant have been reported as a folk medicine. For example, the leaves are used as tonic, febrifuge, stomachic, anti-vomiting and eaten raw for curing dysentery and diarrhea [1]. The leaves, stems and roots are used externally in skin eruptions and bites of venomous animals while the barks and roots are used as stimulant [1]. Previous phytochemical investigation led to the isolation of a number of carbazole alkaloids and some of which have been indicated for their anti-oxidant, anti-tumor, anti-microbial, anti-inflammatory, anti-trypanocidal and mosquitocidal activities [2, 3, 4].

In the course of our ongoing search for bioactive compounds from Rutaceae medicinal plants [5-9], the EtOAc extract of the stems of *M. koenigii* exhibited cytotoxicity against three human cancer cell lines including oral cavity cancer (KB), breast cancer (MCF7), and small cell lung cancer (NCI-H187). In this paper, we describe on the isolation and cytotoxic activity of the crude extract and pure carbazole alkaloids from the stems of *M. koenigii*.

The EtOAc extract of *M. koenigii* roots showed cytotoxic activity against KB, MCF7 and NCI-H187 cancer cell lines with the $IC_{50}$ values of 35.54, 17.56 and 14.86 μg/mL, respectively. The activity-guided investigation of this extract resulted in the identification of nine carbazole alkaloids including murrayanine (**1**) [10], koenoline (**2**) [11], mahanimbinol (**3**) [12], girinimbine (**4**) [13], mahanimbine (**5**) [13], furostifoline (**6**) [14], murrayazoline (**7**) [13], murrayaquinone A (**8**) [13], and murrayazolidine (**9**) [13]. All structures were characterized by spectroscopic methods and comparison of their physical and spectral data with reported values.

As summarized in Table 1, all isolates were evaluated for their cytotoxicity against three human cancer cell lines, KB, MCF7 and NCI-H187. Among the activity tested compounds, quinocarbazole alkaloid, compound **8**, has potent cytotoxicity against NCI-H187 cell line with the $IC_{50}$ value of 2.98 μM which higher cytotoxicity than that of standard drug, ellipticine (4.79 μM). This compound also showed inhibitory effects against KB (15.25 μM) and MCF7 (8.10 μM) cell lines. Compounds **4** and **5** have the same trend of cytotoxicity which showed cytotoxicity against KB cell line with $IC_{50}$ values of 8.74 and 7.85 μM, respectively. They also exhibited cytotoxicity against MCF7 and NCI-H187 cell lines with $IC_{50}$ ranging from 28.80-58.94 μM. These results convince that the length of side chain of the pyran ring has no effective with these activities. However, the cytotoxicity against KB and MCF7 cell lines were decreased when the pyran ring of **5** was opened to generate the geranyl side chain of **3** (29.92 and MCF7 51.58 μM, respectively) whereas the cytotoxicity against NCI-H187 (18.81 μM) cell line was slightly increased. Similar to that of compound **3**, the furanocarbazole **6** also had lower cytotoxicity against KB (130.85 μM) and NCI-H187 (53.01 μM) cell lines when compared with the corresponding paranocarbazole **4** whereas the cytotoxicity against MCF7 cell line was increased (38.80 μM). In addition, structural variation between 3-formyl carbazole alkaloid **1** and 3-methylenehydroxyl carbazole alkaloid **2** also corresponded to the remarkably different activity. The 3-formyl carbazole alkaloid **1** exhibited cytotoxic activity against all cell lines with $IC_{50}$ values ranging from 16.70-85.92

μM which higher cytotoxicity than the corresponding 3-methylenehydroxyl carbazole alkaloid **2** ($IC_{50}$ values ranging from 61.60-203.17 μM). This result implied that the formyl group at C-3 of **1** may play an important role in the cytotoxicity against three cell lines. Compound **9** showed selective cytotoxicity against MCF7 cell line ($IC_{50}$ 7.12 μM) and weaker cytotoxicity against KB and NCI-H187 cell lines with the general $IC_{50}$ values of 88.19 and 73.00 μM, respectively. Surprisingly, compound **7** was found to be inactive in all cancer cell lines. This result could be concluded that the free NH of carbazole alkaloid framework is also important for the enhancing the activity.

It should be noted that the quinocarbazole alkaloid **8** demonstrated stronger cytotoxicity against NCI-H187 cell line than the ellipticine, standard drug (4.79 μM). This data suggest that the most potent of this compound might be investigated and developed as cytotoxic agents.

## EXPERIMENTAL

**General.** The $^{1}H$ and $^{13}C$ NMR spectra were recorded by 400 MHz Bruker spectrometer. Tetramethylsilane (TMS) was used as internal reference. Quick column chromatography (QCC) and column chromatography (CC) were carried out on silica gel 60 H (Merck, 5-40 μm) and silica gel 100 (Merck, 63-200 μm), respectively. Precoated plates of silica gel 60 $F_{254}$ were used for analytical purposes.

**Plant Material.** The stems of *M. koenigii* were collected in May 2010 from Krabi and Stoon Provinces, Southern Thailand. The plant specimen (MFU-NPR0010) was deposited at Natural Products Research Laboratory, School of Science, Mae Fah Luang University.

**Extraction and Isolation.** The stems of *M. koenigii* (5.19 kg) were extracted with EtOAc over the period of 3 days at room temperature. Removal of solvent under reduced pressure provided EtOAc extract (38.71 g) which was chromatographed by quick column chromatography (QCC) over silica gel and eluted with a gradient of *n*-hexane-acetone to afford **7** (25.7 mg) and thirteen fractions (A-M). Fraction D (2.25 g) was subjected to QCC with 20% $CH_2Cl_2$-*n*-hexane yielding **4** (10.0 mg) and nine subfractions (DA-DI). Subfraction DC (139.4 mg) was purified by CC with 20% $CH_2Cl_2$-*n*-hexane to afford **3** (6.6 mg) and **5** (3.6 mg). Fraction E (592.1 mg) was subjected to CC with 10% EtOAc-*n*-hexane to yield **8** (20.8 mg). Fraction F (8.52 g) was further subjected to QCC with a gradient of EtOAc- *n*-hexane (5% EtOAc- *n*-hexane to 100% EtOAc) to provide fourteen subfractions (F1-F14). Subfraction F8 (272.9 mg) was further purified by CC with 25% $CH_2Cl_2$- *n*-hexane to afford **9** (2.7 mg). Fractions G (427.0 mg), H (1.03 g) and I (594.0 mg) were combined and

subsequently separated by sephadex LH-20 with MeOH to give five subfractions (GA-GE). Subfraction GC (1.74 g) was further separated by QCC using 40% $CH_2Cl_2$-*n*-hexane giving five subfractions (GC1-GC5). Compound **1** (43.1 mg) was derived from subfraction GC3 (454.0 mg) by repeated CC using 50% $CH_2Cl_2$-*n*-hexane. Fraction J (1.33 g) was subjected to sephadex LH-20 with MeOH to afford four subfractions (JA-JD). Subfraction JC (66.3 mg) was recrystallized with *n*-hexane to give **6** (8.9 mg). Compound **2** (3.6 mg) was obtained from fraction L (220.0 mg) by CC with 40% EtOAc-$CH_2Cl_2$ as eluent.

**Murrayanine (1)**. Yellow solid. mp 158-161°C. $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm, *J*/Hz): 10.04 (1H, s, CHO), 8.69 (1H, br s, NH), 8.18 (1H, br s, H-2), 8.10 (1H, d, *J* = 8.0, H-5), 7.51 (1H, m, H-8), 7.49 (1H, m, H-7), 7.45 (1H, br s, H-2), 7.31 (1H, m, H-6), 4.06 (3H, s, $OCH_3$). $^{13}$C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ): 191.8 (CHO), 146.0 (C-1), 139.4 (C-8a), 134.0 (C-8b), 130.1 (C-3), 126.6 (C-7), 123.6 (C-4a and C-4b), 120.7 (C-5 and C-6), 120.4 (C-4), 111.5 (C-8), 103.5 (C-2), 55.8 ($OCH_3$).

**Koeniline (2)**. Brown viscous oil. $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm, *J*/Hz): 8.28 (1H, br s, NH), 8.03 (1H, d, *J* = 8.0, H-5), 7.65 (1H, br s, H-4), 7.46 (1H, br d, *J* = 8.0, H-8), 7.41 (1H, m, H-7), 7.22 (1H, m, H-6), 6.95 (1H, br s, H-2), 4.80 (2H, s, H-1'), 4.01 (3H, s, $OCH_3$), 2.17 (1H, br s, OH). $^{13}$C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ): 145.7 (C-1), 139.2 (C-8a), 132.7 (C-3), 129.1 (C-8b), 125.8 (C-7), 125.7 (C-4a), 124.0 (C-4b), 120.5 (C-5), 119.5 (C-6), 111.7 (C-4), 111.0 (C-8), 105.6 (C-2), 66.5 (C-1'), 55.5 ($OCH_3$).

**Mahanimbinol (3)**. Brown viscous oil. $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm, *J*/Hz): 7.93 (1H, br d, *J* = 7.6, H-5), 7.85 (1H, br s, NH), 7.68 (1H, s, H-4), 7.36 (1H, br d, *J* = 8.0, H-8), 7.30 (1H, br t, *J* = 7.6, 7.2, H-6), 7.17 (1H, br t, *J* = 7.2, H-7), 5.37 (1H, t, *J* = 6.8, H-2'), 5.21 (1H, br s, OH), 5.07 (1H, m, H-6'), 3.62 (2H, d, *J* = 6.8, H-1'), 2.40 (3H, s, $CH_3$-3), 2.12 (4H, m, H-4' and -5'), 1.90 (3H, s, $CH_3$-9'), 1.66 (3H, s, $CH_3$-8'), 1.59 (3H, s, $CH_3$-10'). $^{13}$C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ): 151.2 (C-2), 139.4 (C-8a), 139.0 (C-3'), 138.4 (C-8b), 132.1 (C-7'), 124.2 (C-6), 123.6 (C-4b and C-6'), 121.3 (C-2'), 119.3 (C-4, C-5 and C-7), 117.0 (C-3), 116.6 (C-4a), 110.3 (C-8), 107.8 (C-1), 39.6 (C-4'), 26.4 (C-5'), 25.6 ($CH_3$-8'), 24.7 (C-1'), 17.7 ($CH_3$-10'), 16.5 ($CH_3$-3), 16.4 ($CH_3$-9').

**Girinimbine (4)**. White crystal. mp 175-176°C. $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm, *J*/Hz): 7.91 (1H, d, *J* = 8.0, H-5), 7.84 (1H, br s, NH), 7.67 (1H, s, H-4), 7.36 (1H, d, *J* = 7.6, H-8), 7.29 (1H, t, *J* = 8.0, 7.2, H-6), 7.17 (1H, t, *J* = 7.6, H-7), 6.60 (1H, d, *J* = 10.0, H-1'), 5.69 (1H, d, *J* = 10.0, H-2'), 2.33 (3H, s, $CH_3$-3), 1.48 (6H, s, $CH_3$-4' and $CH_3$-5'). $^{13}$C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ): 149.8 (C-2), 139.4 (C-8a), 134.8 (C-8b), 129.4 (C-2'), 124.2 (C-6),

123.9 (C-4b), 121.1 (C-3 and C-4), 119.4 (C-7), 119.3 (C-5), 118.6 (C-4a), 117.2 (C-1'), 110.3 (C-8), 104.4 (C-1), 75.8 (C-3'), 27.6 (C-4' and C-5'), 16.0 ($CH_3$-3).

**Mahanimbine (5)**. White solid. mp 68-71°C. $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm, *J*/Hz): 7.94 (1H, dd, *J* = 7.6, H-5), 7.83 (1H, br s, NH), 7.69 (1H, s, H-4), 7.39 (1H, m, H-8), 7.30 (1H, m, H-7), 7.20 (1H, m, H-6), 6.61 (1H, d, *J* = 9.6, H-1'), 5.65 (1H, d, *J* = 9.6, H-2'), 5.15 (1H, t, *J* = 7.2, H-6'), 2.37 (3H, s, $CH_3$-3), 2.20 (2H, m, H-5'), 1.79 (2H, m, H-4'), 1.69 (3H, s, $CH_3$-10'), 1.62 (3H, s, $CH_3$-8'), 1.48 (3H, s, $CH_3$-9'). $^{13}$C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ): 149.9 (C-2), 139.4 (C-8a), 134.9 (C-8b), 131.7 (C-7'), 128.5 (C-2'), 124.2 (C-8 and C-6'), 123.9 (C-4b), 121.2 (C-4), 119.5 (C-6), 119.3 (C-5), 118.4 (C-3), 117.6 (C-1'), 116.6 (C-4a), 110.4 (C-7), 104.2 (C-1), 78.2 (C-3'), 40.8 (C-4'), 25.8 (C-9'), 25.7 (C-10'), 22.8 (C-5'), 17.6 (C-8'), 16.1 ($CH_3$-3).

**Furostifoline (6)**. Yellow solid. mp 238-242°C. $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm, *J*/Hz): 9.93 (1H, br s, NH), 8.26 (1H, s, H-4), 7.92 (1H, d, J = 7.6, H-5), 7.77 (1H, s, H-2'), 7.37 (1H, d, J = 8.0, H-8), 7.22 (1H, t, J = 8.0, 7.2, H-7), 7.07 (1H, t, J = 7.6, 7.2, H-6), 6.96 (1H, br s, H-1'), 2.34 (3H, s, $CH_3$-3). $^{13}$C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ): 154,7 (C-2), 140.0 (C-8b), 139.9 (C-8a), 123.5 (C-7), 121.2 (C-2, C-4b and C-2'), 118.7 (C-5), 118.4 (C-6), 116.7 (C-3 and C-4a), 116.0 (C-1), 110.2 (C-8), 96.1 (C-1'), 15.8 ($CH_3$-3).

**Murrayazoline (7)**. White crystal. mp 266-267°C. $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm, *J*/Hz): 7.89 (1H, br s, H-5), 7.49 (1H, br s, H-8), 7.46 (1H, br s, H-4), 7.24 (1H, m, H-6), 7.15 (1H, dt, *J* = 7.6, 7.2, H-7), 3.30 (1H, br d, *J* = 4.8, H-1'), 2.38 (1H, ddd, *J* = 13.2, 4.4, 3.2, H-2'), 2.33 (3H, s, $CH_3$-3), 1.96 (1H, ddd, *J* = 10.8, 6.4, 2.4, H-6'), 1.92 (1H, m, H-2'), 1.92 (3H, s, H-10'), 1.62 (1H, ddd, *J* = 15.2, 6.8, 2.8, H-4'), 1.50 (1H, m, H-5'), 1.45 (3H, s, H-9'), 1.31 (1H, m, H-4'), 1.28 (3H, s, $CH_3$-8'), 0.17 (1H, ddd, *J* = 13.6, 11.6, 7.2, H-5'); $^{13}$C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ): 155.0 (C-2), 142.4 (C-8b), 140.6 (C-8a), 127.3 (C-4b), 122.6 (C-6), 119.8 (C-5), 119.2 (C-7), 119.1 (C-4), 118.4 (C-3), 113.9 (C-4a), 113.4 (C-8), 107.3 (C-1), 76.1 (C-3'), 60.1 (C-7'), 48.6 (C-6'), 36.8 (C-4'), 36.1 (C-2'), 30.1 (C-10'), 29.2 (C-9'), 28.3 (C-1'), 22.9 (C-8'), 21.8 (C-5'), 15.4 ($CH_3$-3).

**Murrayaquinone A (8)**. Red solid. mp 241-242°C. $^1$H NMR (400 MHz, acetone-$d_6$, δ, ppm, *J*/Hz): 11.64 (1H, br s, NH), 8.16 (1H, d, *J* = 7.6, H-5), 7.63 (1H, d, *J* = 8.0, H-8), 7.41 (1H, t, *J* = 8.0, 7.2, H-7), 7.34 (1H, t, *J* = 7.6, 7.2, H-6), 6.51 (1H, s, H-2), 2.15 (3H, s, $CH_3$-3). $^{13}$C NMR (100 MHz, acetone-$d_6$, δ): 183.2 (C-1 and C-4), 148.4 (C-3), 137.6 (C-8a), 135.9 (C-8b), 131.5 (C-2), 126.5 (C-7), 124.0 (C-4a), 123.7 (C-4b and C-6), 122.1 (C-5), 113.5 (C-8), 15.0 ($CH_3$-3).

**Murrayazolidine (9)**. Yellow viscous oil. $^{1}$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm, *J*/Hz): 7.88 (1H, br d, *J* = 7.6, H-5), 7.71 (1H, br s, NH), 7.63 (1H, s, H-4), 7.31 (1H, br d, *J* = 8.0, H-6), 7.25 (1H, m, H-7), 7.14 (1H, m, H-8), 4.76 (1H, s, H-8'), 4.80 (1H, s, H-8'), 3.40 (1H, d, *J* = 2.4, H-1'), 2.57 (1H, m, H-6'), 2.33 (3H, s, $CH_3$-3), 1.88 (2H, dt, *J* = 12.8, 2.4, H-2'), 1.61 (2H, m, H-4'), 1.55 (2H, m, H-5'), 1.49 (3H, s, H-9'), 1.43 (3H, s, H-10'). $^{13}$C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ) 153.6 (C-2), 150.0 (C-7'), 124.3 (C-4b), 123.5 (C-7), 119.5 (C-4), 119.1 (C-8), 119.0 (C-5), 117.6 (C-3), 114.6 (C-4a), 112.0 (C-8') 110.1 (C-6), 105.2 (C-1), 78.9 (C-3'), 48.7 (C-6'), 39.9 (C-4'), 37.4 (C-2'), 36.2 (C-1'), 29.0 (C-10'), 23.1 (C-5'), 21.6 (C-9'), 16.7 ($CH_3$-3).

**Cytotoxic assay.** Cytotoxic assay against human epidermoid carcinoma of oral cavity (KB), breast adenocarcinoma (MCF7) and human small cell lung cancer (NCI-H187) cell lines were performed using the method described by Brien et al. (2000) [15]. In brief, cells at a logarithmic growth phase are harvested and diluted to $7 \times 10^4$ cells/mL for KB and $9 \times 10^4$ cells/mL for MCF7 and NCI-H187, in fresh medium. Successively, 5 μL of test sample diluted in a 5% DMSO, and 45 μL of cell suspension are added to 384-well plates, incubated at 37 °C in 5% $CO_2$ incubator. After the incubation period (3 days for KB and MCF7 and 5 days for NCI-H187), 12.5 μL of 62.5 μg/mL resazurin solution is added to each well, and the plates are then incubated at 37 °C for 4 h. The fluorescence signal is measured using SpectraMax M5 multi-detection microplate reader (Molecular Devices, USA) at the excitation and emission wavelengths of 530 nm and 590 nm, respectively. Percent inhibition of cell growth is calculated by the following equation: % Inhibition = $[1-(FU_T/FU_C)] \times 100$, where $FU_T$ and $FU_C$ are the mean fluorescent units from treated and untreated conditions, respectively. Dose response curves are plotted from 6 concentration of 2-fold serially diluted test compounds and the sample concentrations that inhibit cell growth by 50% ($IC_{50}$) can be derived using the SOFTMax Pro software (Molecular Devices, USA). Ellipticine and doxorubicin were used to standard reference substance in this study.

**ACKNOWLEDGEMENT**

We would like to thank National Research Council of Thailand (NRCT) for financial support. Mae Fah Luang University is also acknowledged for the M.Sc. graduate student research grant and laboratory facilities. We are grateful to Assoc. Prof. Dr. Uma Prawat and Ms. Nareerat Thongtip, Phuket Rajabhat University for recording some NMR spectral data. The Bioassay Research Facility of BIOTEC (Thailand) is also acknowledged for the cytotoxicity tests.

## REFERENCES


1. A.C. Adebajo, O.F. Ayoola, E.O. Iwalewa, A.A. Akindahunsi, N.O.A. Omisore, C.O. Adewunmi, and T.K. Adenowo, *Phytomedicine*, **13**, 246 (2006).
2. J. Intekhab and M. Aslam, *J. Saudi. Chem. Soc.*, **12**, 515 (2008).
3. K. Bhattacharya, S.K. Samanta, R. Tripathi, A. Mallick, S. Chandra, B.C. Pal, C. Shaha, and C. Mandal, *Biochem. Pharmacol.*, **79**, 361 (2010).
4. N.H.A. Bakar, M.A. Sukari, M. Rahmani, A.M. Sharif, K. Khalid, and U.K. Yusui, *Malaysian J. Anal. Sci.*, **11**, 173 (2007).
5. S. Cheenpracha and S. Laphookhieo, *Phytochemistry Lett.*, **4**, 187 (2011).
6. T. Sripisut, S. Cheenpracha, and S. Laphookhieo, *J. Asian. Nat. Prod.*, **13**, 556 (2011).
7. T. Sripisut and S. Laphookhieo, *J. Asian. Nat. Prod. Res.*, **12**, 614 (2010).
8. W. Maneerat, T. Ritthiwigrom, S. Cheenpracha, U. Prawat, and S. Laphookhieo, *Tetrahedron Lett.*, **52**, 3303 (2011).
9. W. Maneerat, U. Prawat, N. Seawna, and S. Laphookhieo, *J. Braz. Chem. Soc.*, **21**, 665 (2010).
10. D.P. Chakraborty, B.K. Barman, and P.K. Bose, *Tetrahedron*, **21**, 681 (1965).
11. M. Fiebig, J.M. Pezzuto, D.D. Soejarto, and A.D. Kinghorn, *Phytochemistry*, **24**, 3041 (1985).
12. C. Ito, Y. Thoyama, M. Omura, I. Kajiura, and H. Furukawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 2096 (1993).
13. H. Furukawa, S.W. Tian, T. Ohta, and S.K. Chang, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4132 (1985).
14. C. Ito, N. Okahana, S.W. Tian, L.W. Meei, S.L. Jeng, S.K. Chang, and H. Furukawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 230 (1992).
15. J.O. Brein, I. Wilson, T. Orton, and F. Pognan, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5421 (2000).