



รายงานผลการวิจัย  
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

สารต้านมาลาเรียจากน้ำเต้าลม

โดย

กิตติศักดิ์ อิจิตวิทยาวุฒิ  
จิระพันธ์ กริ่งไกร

ธันวาคม 2539

จพ  
ก 15  
009457

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทฤษฎีรัชดาภิเษกสมโภช



รายงานผลการวิจัย

สารต้านมาลาเรียจากน้ำเต้าลม

โดย

สถาบันวิทยบริการ

กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวัฒน์

จิระพันธ์ กริ่งไกร

ธันวาคม 2539

I18344748

27 ต.ค. 2542

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัย  
นี้ในรูปของเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2539 ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ  
วิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้บริการเครื่องมือนิวเคลียร์  
แมกเนติกเรโซแนนซ์อย่างดีเยี่ยม



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย	สารต้านมาลาเรียจากน้ำเต้าลม
ชื่อผู้วิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ รองศาสตราจารย์ ดร. จิระพันธ์ กริ่งไกร
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	ธันวาคม 2539

### บทคัดย่อ

ได้ทำการสกัดเอาสารบริสุทธิ์จากต้นน้ำเต้าลม *Nepenthes thorelii* Lec. (Nepenthaceae) แยกได้ 5 ชนิด ได้แก่ plumbagin, isoshinanolone, octadecyl caffeate, 2-methylnaphthazarin และ droserone เมื่อนำสารเหล่านี้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียในงานทดลองโดยวิธีวัดปริมาณ [<sup>3</sup>H]hypoxanthine ที่เชื้อ *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ T<sub>9/94</sub> รับเข้าไป แล้วทำการเปรียบเทียบสารเหล่านี้กับยาต้านมาลาเรียที่ใช้กันในปัจจุบัน ได้แก่ pyrimethamine (IC<sub>50</sub> 11.29 ไมโครโมลาร์) และ chloroquine (IC<sub>50</sub> 0.09 ไมโครโมลาร์) พบว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียแรงได้แก่ plumbagin (IC<sub>50</sub> 0.27 ไมโครโมลาร์) ส่วนสารอื่นมีฤทธิ์ปานกลางและอ่อน (5.79 - 22.06 ไมโครโมลาร์) นอกจากนี้ยังได้สังเคราะห์สารอื่นอีก 7 ชนิดโดยใช้ plumbagin เป็นสารตั้งต้น แล้วนำมาทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ข้อมูลที่ได้ชี้ว่าโครงสร้างส่วน quinone เป็นส่วนสำคัญในการออก

ฤทธิ์ และการเติมกลุ่มแทนที่ซึ่งมีผลลดความหนาแน่นของอิเล็กตรอนรอบคาร์บอนที่

ตำแหน่งที่สามของโครงสร้าง naphthoquinone จะลดความแรงของฤทธิ์ต้านมาลาเรียลง



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**Project Title** Antimalarial Agents from *Nepenthes thorelii* Lec.

**Names of the Investigators** Associate Professor Dr. Kittisak Likhitwitayawuid

Associate Professor Dr. Jerapan Krungkrai

**Month and Year of completion** December, 1996

### Abstract

From *Nepenthes thorelii* Lec. (Nepenthaceae), five pure compounds, namely plumbagin, isoshinanolone, octadecyl caffeate, 2-methylnaphthazarin and droserone were isolated. In an *in vitro* [<sup>3</sup>H]hypoxanthine incorporation experiment, plumbagin exhibited strong antimalarial activity ( $IC_{50}$  0.27  $\mu$ M) against the T<sub>9/94</sub> strain of *Plasmodium falciparum* while the other compounds showed only moderate to weak activity ( $IC_{50}$  5.79 - 22.06  $\mu$ M) as compared with currently used antimalarial drugs such as pyrimethamine ( $IC_{50}$  11.29  $\mu$ M) and chloroquine ( $IC_{50}$  0.09  $\mu$ M). In addition, seven naphthoquinone-related compounds were prepared using plumbagin as the starting material. Comparison of the antimalarial potential of these natural and synthetic products suggested that the quinone ring was essential for the activity, and that this activity would be attenuated by the presence

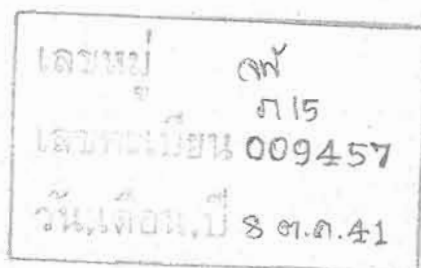
of a substituent capable of reducing electron density at C-3 of the naphthoquinone skeleton.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	v
รายการตารางประกอบ	viii
รายการรูปประกอบ	ix
รายการคำย่อและสัญลักษณ์	xi
บทนำ	1
การสำรวจความคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
วิธีการวิจัยและผลการวิจัย	7
การอภิปรายผล ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ	23
เอกสารอ้างอิง	26





## รายการตารางประกอบ

ตารางที่	ชื่อ	หน้า
1	ฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารบริสุทธิ์	22



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการรูปประกอบ

รูปที่	ชื่อ	หน้า
1	โครงสร้างของสารที่สกัด และที่สังเคราะห์ได้	31
2	การเกิดสาร 11 ระหว่างการเตรียมสาร 10 จากสาร 8	32
3	$^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร 1	33
4	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร 1	34
5	$^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร 2	35
6	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร 2	36
7	$^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร 3	37
8	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร 3	38
9	$^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร 4	39
10	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร 4	40
11	$^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร 5	41
12	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร 5	42
13	$^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร 6	43
14	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร 6	44

15	$^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร 7	45
16	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร 7	46
17	$^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร 8	47
18	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร 8	48
19	$^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร 9	49
20	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร 9	50
21	$^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร 10	51
22	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร 10	52
23	$^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร 11	53
24	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร 11	54
25	$^1\text{H}$ NMR spectrum ของสาร 12	55
26	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum ของสาร 12	56

## รายการคำย่อและสัญลักษณ์

ก.	กรัม
กก.	กิโลกรัม
มก.	มิลลิกรัม
มคก.	ไมโครกรัม
มคล.	ไมโครลิตร
มค.โมลาร์	ไมโครโมลาร์
มล.	มิลลิลิตร
ล.	ลิตร
°C	degree Celsius
COSY	correlation spectroscopy
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
d	doublet (for nmr)
dd	doublet of doublets (for nmr)
$\delta$	chemical shift (ppm)
EIMS	electron impact mass spectrum

$\epsilon$	molar absorptivity
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
$^1\text{H}$ NMR	proton nuclear magnetic resonance
$^{13}\text{C}$ NMR	carbon-13 nuclear magnetic resonance
HRFABMS	high-resolution fast-atom bombardment mass spectrum
Hz	Hertz
IR	infrared spectrum
$J$	coupling constant (Hertz)
$\lambda_{\text{max}}$	wavelength at maximum absorption
m	multiplet (for nmr)
MHz	mega-Hertz
ml	milliliter
$\mu\text{l}$	microliter
$\mu\text{M}$	micromolar
$m/z$	mass to charge ratio

$\nu_{\max}$	wave number at maximum absorption
s	singlet (for nmr)
TLC	thin-layer chromatography
UV	ultraviolet



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทนำ



มาลาเรียเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อปรสิต (parasite) พวก *Plasmodia* โดยมียุงก้นปล่อง (*Anopheles*) เป็นพาหะ แม้ว่าจะได้มีการรณรงค์พยายามที่จะกำจัดมาลาเรียให้หมดไปจากโลกมากกว่าสามสิบปีแล้วก็ตาม มาลาเรียก็ยังคงเป็นโรคร้ายที่คอยบั่นทอนสุขภาพและทำลายคุณภาพชีวิตของมนุษย์มาตลอดโดยไม่มีทีท่าว่าจะลดน้อยลงไป (1) จากสถิติขององค์การอนามัยโลก ทุกๆปีจะมีผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียมากกว่าหนึ่งร้อยล้านคน และในจำนวนนี้ประมาณกันว่าผู้ป่วยกว่าหนึ่งล้านคนจะมีอาการรุนแรงถึงแก่ชีวิต (2) ลักษณะโดยทั่วไปของโรคมาลาเรียนั้น นอกจากจะอาจก่อให้เกิดอาการป่วยรุนแรงแบบเฉียบพลันจนถึงแก่ชีวิตแล้ว ยังอาจก่อความทรมาณให้แก่ผู้ป่วยในเวลาต่อมา ด้วยอาการป่วยเรื้อรังอันเนื่องมาจากเชื้อที่หลบซ่อนอยู่ในตับ ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต กำลั้งใจ และกำลั้งกายในการประกอบกรงาน จึงนับได้ว่ามาลาเรียเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทั้งทางเศรษฐกิจและสังคมอย่างสูง (3) จากสาเหตุดังกล่าว องค์การอนามัยโลกจึงได้พยายามทบทวนและประเมินผลการกำจัดและควบคุมมาลาเรียที่ได้ดำเนินการตลอดมา ซึ่งแม้ว่าจะได้ทุ่มเทพยายามมากมายเพื่อการวิจัยผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรีย แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จ (4) ความพยายามครั้งล่าสุดได้เริ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2536 โดยองค์การอนามัยโลกได้ออกประกาศ "กลยุทธ์ในการควบคุมมาลาเรียทั่วโลก (Global Malaria Control Strategy)" โดยนอกจากจะเน้นการตรวจวินิจฉัย การรักษา การป้องกัน และการควบคุมการ

ระบาดของโรคแล้ว ยังประกาศส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยมาลาเรียทั้งในแง่ของการวิจัยพื้นฐานและการวิจัยประยุกต์ (2)

สำหรับบ้านเรานั้น ปัญหาของมาลาเรียถ้ามองอย่างผิวเผินแล้ว จะดูเหมือนว่าได้บรรเทาลงไปมาก ถ้าพิจารณาจากอัตราป่วย และอัตราตายต่อปีของประชากร จากสถิติในปี พ.ศ. 2535 พบว่าเรามีอัตราป่วย 3.15 คนต่อประชากร 1,000 คน และอัตราตาย 1.80 คนต่อประชากร 100,000 คน (5) ซึ่งเป็นค่าตัวเลขที่ชี้แนวโน้มการควบคุมโรคที่จะเป็นไปตามเป้าหมายของแผนพัฒนาการสาธารณสุขตามแผนพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 7 (พ.ศ.2535-2539) ที่กำหนดไว้ว่าจะลดอัตราการป่วยให้เหลือเป็น 3.0 คนต่อประชากร 1,000 คน และลดอัตราตายให้เป็น 1.5 คนต่อประชากร 100,000 คน (7) แต่ถ้าเราวิเคราะห์อย่างลึกซึ้งแล้ว จะพบว่าสถานการณ์ของโรคมมาลาเรียในปัจจุบันยังคงอยู่ในลักษณะที่น่าเป็นห่วงอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากมาลาเรียยังคงเป็นโรคที่พบอยู่ทั่วไปทุกภาค ยกเว้นเพียงบางจังหวัดใหญ่เท่านั้น นอกจากนี้การควบคุมการระบาดของโรคกำลังกลายเป็นปัญหาที่ทวีความสลับซับซ้อนมากขึ้น โดยมีสาเหตุมาจากปัจจัยคุกคามที่สำคัญ 2 ประการ ประการแรกได้แก่ ความลำบากในการติดตามดูแล รักษา ฝ้าระวัง และควบคุมไข้มาลาเรียในกลุ่มคนที่มีการเดินทางย้ายถิ่นฐานอยู่เสมอ ซึ่งได้แก่ กลุ่มคนที่มีการอพยพเคลื่อนย้ายสูง ชนกลุ่มน้อย กลุ่มคนที่อาศัยบริเวณชายแดน รวมถึงนักท่องเที่ยวทั้งชาวไทยและต่างประเทศอีกด้วย (7) ปัจจัยคุกคามประการที่สองซึ่งมีความ



สำคัญไม่น้อยกว่าประการแรกได้แก่ ปัญหาการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งก่อให้เกิดความยุ่งยากในการรักษาจนบางครั้งไม่อาจรักษาชีวิตผู้ป่วยไว้ได้ หรือในบางกรณีรักษาได้แต่ไม่หายขาด เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องระยะเวลาที่ผู้ป่วยยอมรักษาตัวในโรงพยาบาล (7, 8)

เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่พบในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งในประเทศไทยเราคือดื้อยา chloroquine และ sulfadoxine/pyrimethamine (9) นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียดังกล่าวยังเริ่มดื้อต่อยารักษามาลาเรียที่ออกมาใหม่และเคยใช้ได้ผลดีเช่น mefloquine อีกด้วย (10) ทำให้การรักษามาลาเรียให้หายขาดเป็นไปได้ยากขึ้น ต้องใช้ยาตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปเช่น quinine ร่วมกับ tetracycline เพื่อให้ได้ผลดีในการรักษา แต่ก็พบว่าเชื้อดังกล่าวเริ่มดื้อกับยา quinine แล้วเช่นกัน (9) จะเห็นได้ว่าเชื้อมาลาเรียมีการปรับตัวและพัฒนาให้มีความทนและดื้อต่อยาที่เราใช้อยู่เสมอ ทำให้การวิจัยค้นหายาชนิดใหม่เพื่อใช้ฆ่าเชื้อมาลาเรียเป็นสิ่งที่จะต้องทำได้ ในทางตรงกันข้ามกลับจะต้องกระทำกันอย่างเป็นระบบและต่อเนื่อง เพื่อให้ได้ยาใหม่ไว้ใช้แทนยาเก่าได้ทันต่อสถานการณ์ ในขณะนี้ทิศทางการวิจัยยารักษามาลาเรียทางคลินิกในบ้านเรามุ่งศึกษาฤทธิ์ของสารจากธรรมชาติชื่อ artemisinin รวมทั้งอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์ของสารนี้ เนื่องจากพบว่าสารเหล่านี้ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *P. falciparum* ในผู้ป่วยได้ดี (11) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารอนุพันธ์ชื่อ artesunate นั้นใช้รับประทานให้ผลในการรักษามาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (*falciparum malaria*) แบบเฉียบพลันได้ผลดีเทียบเท่ากับการรักษาด้วย quinine ร่วมกับ

tetracycline (12) อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่รักษาจนอาการดีขึ้นด้วยสารในกลุ่มนี้จะมีอัตราป่วยกลับ (recrudescence rate) สูง (13) ซึ่งอาจนับได้ว่าเป็นข้อด้อยของยาในกลุ่มนี้ สาร artemisinin (จีนเรียก Qinghaosu) นั้นโดยข้อเท็จจริงแล้วเป็นสารธรรมชาติที่พบครั้งแรกในพืชชื่อ *Artemisia annua* L. (จีนเรียก Qinghao) ซึ่งใช้เป็นยาพื้นบ้านใช้รักษาไข้มาลาเรียในประเทศจีนมาหลายพันปี (14) ถ้าเรามองย้อนกลับไปจะพบว่า อันที่จริงยาด้านมาลาเรียที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันล้วนมีจุดเริ่มต้นมาจากการศึกษาสารที่ได้จากธรรมชาติมาแทบทั้งสิ้น โดยเริ่มตั้งแต่การพบ quinine ในเปลือกต้น *Cinchona* ในปี พ.ศ. 2363 ซึ่งการศึกษาฤทธิ์และโครงสร้างของ quinine ในเวลาต่อมาได้นำไปสู่การสังเคราะห์ยาด้านมาลาเรียหลายชนิด เช่น chloroquine และ primaquine (15) ยาด้านมาลาเรียชนิดใหม่ artemisinin และอนุพันธ์แม้ว่าจะมีข้อจำกัดในการใช้ แต่ก็ก็เป็นสิ่งที่ดอกย้ำให้เห็นถึงความสำคัญและความสำเร็จของการวิจัยยาใหม่ที่เริ่มต้นจากการศึกษาสมุนไพรและตำรายาพื้นบ้าน นอกจากนี้ยังเป็นเครื่องชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะพบสารต้านมาลาเรียชนิดใหม่จากแหล่งธรรมชาติอื่น ๆ อีก ซึ่งอาจมีฤทธิ์ดีกว่าและสามารถนำมาพัฒนาใช้แทนยาที่ใช้ไม่ได้ผลได้ในอนาคต

## การสำรวจความคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชสกุล *Nepenthes* เป็นพืชกินแมลง จัดอยู่ในวงศ์ Nepenthaceae ในบ้านเราพบว่า มีอยู่ 6 ชนิด แต่ชนิดที่เราคุ้นชื่อกันดีได้แก่ หม้อแกงลิง (*Nepenthes ampullaria* Jack) (16) ต้นหม้อแกงลิงนี้แม้ว่าจะไม่มีการกล่าวใช้ในตำรายาไทย แต่ในมาเลเซียนั้นชาวบ้านนำต้นมาต้มดื่มแก้อาการจับไข้เป็นระยะ (remittent fever) (17) ด้วยเหตุที่อาการจับไข้เป็นระยะนั้นเป็นลักษณะเด่นเฉพาะของโรคมาลาเรีย (15) ดังนั้นเราจึงอาจสรุปวิเคราะห์ในเชิงตรรกได้ว่า ต้นหม้อแกงลิงนี้ชาวมาเลเซียใช้เป็นยาพื้นบ้านรักษาไข้มาลาเรีย จากการสำรวจงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชในสกุล *Nepenthes* โดยอาศัยฐานข้อมูลของ NAPRALERT และ Chemical Abstracts ไม่พบว่าเคยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านมาลาเรียของต้นหม้อแกงลิง หรือ พืชอื่นในสกุลดังกล่าว จึงกล่าวได้ว่า การศึกษาถึงฤทธิ์ต้านมาลาเรียและสารสำคัญ (active constituents) ต้นหม้อแกงลิง หรือพืชอื่นในสกุลนี้เป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง แต่การศึกษาหาสารต้านมาลาเรียจากต้นหม้อแกงลิง (*N. ampullaria*) ในทางปฏิบัตินั้นมีความเป็นไปได้ยาก เนื่องจากพืชดังกล่าวเป็นพืชที่หาพบได้ยากในบ้านเรา ไม่สามารถที่จะจัดเก็บหาได้เป็นจำนวนมากพอต่อการวิจัย ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว เราจึงได้เบนเข็มความสนใจมายังพืชข้างเคียงในสกุลนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำเต้าลม (*N. thorelii*) ซึ่งเป็นพืชที่พบได้ง่ายกว่าและสามารถที่จะเก็บได้ในปริมาณมากพอที่จะนำมาศึกษาต่อ จากความรู้ในเชิงเคมีอนุกรมวิธาน (chemotaxonomy) เราประเมินว่าในต้นน้ำเต้าลมนั้นมีความ

เป็นไปได้สูงที่จะพบสารที่มีโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพใกล้เคียงกันกับสารที่มีในต้น

หม้อแกงลิง

น้ำเต้าลม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nepenthes thorelii* Lec. มีลักษณะเป็นพืชไม้เถา

(climber) (16) จากการตรวจสอบสิ่งสกัดเอทานอล (ethanol extract) ของน้ำเต้าลม พบว่ามี

ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Plasmodium* ในจานทดลอง (*in vitro*) โดยมีค่า  $IC_{90} = 50$  มคก./มล.( $\mu\text{g/ml}$ )

เมื่อนำส่วนสกัดคลอโรฟอร์ม (chloroform fraction) มาทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียพบว่ามีค่า

$IC_{90} = 10$  มคก./มล (18) จากข้อมูลเบื้องต้นดังกล่าว เราอาจตั้งสมมติฐานได้ว่า ในต้นน้ำเต้า

ลมนั้นมีสารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรีย และด้วยเหตุที่ยังไม่มีผู้ใดศึกษาพืชชนิดนี้มาก่อน ไม่ว่าจะ

เป็นในด้านพฤกษเคมี หรือฤทธิ์ชีวภาพ การสกัดหาสารต้านมาลาเรียจากพืชดังกล่าวข้างต้น จึง

เป็นสิ่งที่น่าสนใจและท้าทายความสามารถของนักวิจัยอย่างยิ่ง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## วิธีการวิจัยและผลการวิจัย

งานในโครงการวิจัยนี้อาจแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วนใหญ่ๆ ได้แก่ (1) การสกัดแยกเอาสารบริสุทธิ์จากสิ่งสกัด (2) การศึกษาโครงสร้างของสารที่แยกได้ (3) การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารที่แยกได้ และ (4) การทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารที่แยกได้และที่สังเคราะห์ได้

### (1) การสกัดแยกเอาสารบริสุทธิ์จากสิ่งสกัด

เก็บต้นน้ำเต้าลมมาจากจังหวัดชุมพร เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2538 นำมาอบให้แห้งที่ 60 °C ได้น้ำหนักประมาณ 1.3 กก. จากนั้นนำมาแช่สกัดด้วยเอทานอล (ethanol) จำนวน 4 ล. ครั้งๆ ละ 3 วัน กรองเอาสิ่งสกัดที่ได้มารวมกันแล้วระเหยเอาเอทานอลออก ได้เป็นสิ่งสกัดหยาบเอทานอลหนักประมาณ 30 ก. นำสิ่งสกัดหยาบที่ได้นี้มาแยกส่วน (partition) โดยใช้คลอโรฟอร์ม (chloroform) น้ำ และเอิน-บูทานอล (n-butanol) ได้เป็นสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม (18 ก.) สิ่งสกัดน้ำ (3.5 ก.) และสิ่งสกัดเอินบูทานอล (7.8 ก.) เมื่อนำสิ่งสกัดแต่ละส่วนไปทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรีย พบว่าสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ( $IC_{90} = 10$  มก./มล.) ส่วนสิ่งสกัดน้ำและสิ่งสกัดเอิน-บูทานอลไม่มีฤทธิ์ ( $IC_{90} > 100$  มก./มล.) จึงนำสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มมาทำการสกัดแยกต่อไป

นำสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มมาทำการแยกต่อ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ใช้ ซิลิกาเจล (silica gel) เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) และใช้ ปิโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) กับ เอธิลแอซิเตต (ethyl acetate) เป็นตัวชะ (eluent) ในลักษณะ polarity-gradient แยกได้เป็น 4 ส่วน

ส่วนที่หนึ่ง นำไปตกผลึกใน petroleum ether/acetone ได้เป็นสาร 1 (3 ก.) ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพดังนี้ ผลึกรูปเข็มสีส้ม; จุดหลอมเหลว; 77-78 °C; EIMS:  $m/z$  (% relative intensity) 188 (100), 173 (25), 160 (25), 145 (5), 131 (45), 120 (23), 114 (4), 103 (9), 92 (27), 77 (12), 74 (6), 63 (26), 51 (11); UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ) 209 (4.50), 264 (4.06), 418 (3.58); IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  1664, 1455, 1364, 1259;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.19 (3H, d,  $J = 1.5$  Hz, 2- $\text{CH}_3$ ), 6.79 (1H, q,  $J = 1.5$  Hz, H-3), 7.24 (1H, dd,  $J = 1.8, 7.6$  Hz, H-6), 7.59 (1H, dd,  $J = 7.6, 7.6$  Hz, H-7), 7.62 (1H, dd,  $J = 1.8, 7.6$  Hz, H-8), 11.95 (1H, s, 5-OH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.5 (2- $\text{CH}_3$ ), 115.1 (C-4a), 119.2 (C-8), 124.1 (C-6), 132.0 (C-8a), 135.4 (C-3), 136.0 (C-7), 149.6 (C-2), 161.1 (C-5), 184.7 (C-1), 190.2 (C-4).

ส่วนที่สอง นำไปแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ และใช้คลอโรฟอร์ม กับ เอธิลเอซิเทตเป็นตัวชะในลักษณะ polarity-gradient แยกได้เป็น 2 ส่วน

ส่วนแรกนำไปแยกต่อโดยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบางชนิดที่ใช้ในการสกัดแยก (preparative thin-layer chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์กับเอธิลเอซิเทต ในอัตราส่วน 85 ต่อ 15 เป็นตัวพา (developing solvent) ได้สาร 2 (14 มก.) ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพดังต่อไปนี้ EIMS  $m/z$  (% relative intensity) 192 (79), 177 (14), 163 (9), 150 (36), 131 (13), 121 (100), 115 (7), 103 (6), 93 (15), 83 (20), 77 (11), 65 (24), 55 (3); UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ) 214 (3.99), 258 (3.8), 332 (3.33); IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  3101, 1638, 1455, 1343, 1243;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.17 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, 2- $\text{CH}_3$ ), 2.42 (1H, m, H-2), 2.56 (1H, dd,  $J = 4.3, 17.7$  Hz, H-3<sub>a</sub>), 2.86 (1H, dd,  $J = 17.7, 11.0$  Hz, H-3<sub>b</sub>), 4.74 (1H, d,  $J = 2.8$  Hz, H-1), 6.92 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-8), 6.93 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-6), 7.47 (1H, dd,  $J = 7.3, 7.3$  Hz, H-7), 12.40 (1H, s, 5-OH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.1 (2- $\text{CH}_3$ ), 34.4 (C-2), 40.7 (C-3), 71.1 (C-1), 114.9 (C-4a), 118.1 (C-6), 118.6 (C-8), 136.9 (C-7), 145.0 (C-8a), 162.7 (C-5), 204.7 (C-4).

ส่วนหลังนำไปแยกต่อในลักษณะคล้ายกันแต่ใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์กับเอธิลแอลกอฮอล์

ในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 เป็นตัวพา ได้สาร 3 (25 มก.) ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพดังต่อไปนี้

EIMS  $m/z$  (% relative intensity) 432 (11), 180 (42), 163 (28), 111 (11), 97 (22),

83 (43), 69 (53), 55 (73), 43 (100); IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  3500, 2990, 2800, 1700,

1610, 1230, 1190;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$  0.87 (3H, dd,  $J = 7.0, 7.0$

Hz, H-18'') 1.24 - 1.31 (m, 30H,  $\text{H}_2$ -3'' -  $\text{H}_2$ -17''), 1.68 (2H, m,  $\text{H}_2$ -2''), 4.29 (2

H, dd,  $J = 6.7, 6.7$  Hz, H-1''), 6.65 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-2), 7.22 (1H, d,  $J = 8.2$

Hz, H-5'), 7.20 (1H, dd,  $J = 1.8, 8.2$  Hz, H-6'), 7.62 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2'),

8.01 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-3);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$  14.3 (C-18''),

22.9, 26.3, 29.2, 29.6, 29.8, 29.9, 30.0, 32.1 (C-3'' - C-17''), 29.6 (C-2''), 64.4

(C-1''), 115.1 (C-2), 115.8 (C-2'), 116.7 (C-6'), 122.0 (C-5'), 126.9 (C-1'),

145.8 (C-3), 147.7 (C-4'), 150.5 (C-3'), 167.6 (C-1).

ส่วนที่สาม นำไปแยกในคอลัมน์ของ sephadex LH 20 โดยใช้เมทานอล (methanol)

เป็นตัวพา แล้วนำไปแยกต่อโดยวิธี preparative TLC ใช้ ทอลูอีน (toluene) กับเอธิลแอลกอฮอล์ใน

อัตราส่วน 95:5 เป็นตัวพาแยกได้สาร 4 (2 มก.) ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพดังต่อไปนี้ EIMS

$m/z$  (% relative intensity) 204 (94), 189 (83), 175 (18), 161 (76), 156 (39), 147



(39), 141 (27), 133 (53), 128 (18), 119 (71), 105 (100), 91 (87), 81 (47), 77 (42), 67 (23), 61 (10), 55 (26); IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  2922, 1640, 1230;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.01 (3H, d,  $J = 1.5$  Hz, 2- $\text{CH}_3$ ), 6.81 (q,  $J = 1.5$  Hz, H-3), 7.20 (1H, d,  $J = 8.9$  Hz, H-7), 7.29 (1H, d,  $J = 8.9$  Hz, H-6), 12.60 (2H, s, 5-OH, 8-OH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.6 (2- $\text{CH}_3$ ), 115.5 (C-4a), 124.3 (C-6), 128.2 (C-8a), 134.9 (C-3), 135.6 (C-8), 138.0 (C-7), 150.0 (C-2), 161.4 (C-5), 185.2 (C-1), 190.5 (C-4).

ส่วนที่สี่ นำไปผ่านคอลัมน์สองคอลัมน์ คอลัมน์แรกใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับและใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์กับเอธิแอซิเทตเป็นตัวชะ คอลัมน์ที่สองใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับและใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์กับเอซิโตนเป็นตัวชะ แยกได้สาร 5 (7 มก.) ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพดังต่อไปนี้  
 EIMS  $m/z$  (% relative intensity) 204 (53), 158 (19), 147 (61), 130 (45), 121 (48), 97 (9), 91 (48), 83 (22), 75 (35), 69 (26), 63 (79), 55 (81); UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ) 228 (4.70), 279 (4.68), 401 (4.15); IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  3485, 1626, 1450, 1100;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.10 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ), 7.20 (1H, dd,  $J = 1.2, 8.2$  Hz, H-6), 7.23 (1H, br s, 3-OH), 7.62 (1H, dd,  $J = 7.7, 7.7$  Hz, H-7), 7.66 (1H, dd,  $J = 1.2, 7.7$  Hz, H-8), 11.1 (1H, s, 5-OH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  8.8 ( $2\text{-CH}_3$ ), 112.9 (C-4a), 119.6 (C-8), 121.8 (C-2), 123.2 (C-6), 132.7 (C-8a), 137.5 (C-7), 152.8 (C-3), 161.2 (C-5), 184.2 (C-1), 184.5 (C-4).

## (2) การศึกษาโครงสร้างของสารที่แยกได้

ได้ทำการศึกษาโครงสร้างของสารที่แยกได้ทั้งหมด โดยวิเคราะห์คุณสมบัติของสารทางกายภาพของสาร ได้ข้อสรุปดังนี้

สาร 1 มีโครงสร้างเดียวกับสาร plumbagin (19-21) นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทาง  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารนี้อย่างละเอียดโดยใช้เทคนิค DEPT, HMQC และ HMBC เข้าช่วย พบว่า  $^{13}\text{C}$  NMR assignments ของสารนี้ที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง C-2, C-6, C-7, C-8, C-4a และ C-8a (21) มีความผิดพลาดต้องมีการแก้ไข

สาร 2 มีโครงสร้างเป็น isoshinanolone (19, 22) ได้ทำการทดลอง NMR เพิ่มเติมซึ่งได้แก่  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY, NOESY, DEPT, HMQC และ HMBC ซึ่งยืนยันโครงสร้างของสารดังกล่าว นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้อีกยังช่วยให้สามารถทำ  $^{13}\text{C}$  NMR assignment ของสารนี้ได้สมบูรณ์

สาร 3 มีโครงสร้างเป็น octadecyl caffeate (23) ได้ทำการทดลอง  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY, NOESY, DEPT, HMQC และ HMBC เพิ่มเติมเช่นเดียวกันเพื่อทำ  $^{13}\text{C}$  NMR assignments ของสารนี้ เนื่องจากยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อน

สาร 4 มีโครงสร้างเป็น 2-methylnaphthazarin (24) ได้ทำการทดลอง  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, DEPT, HMQC และ HMBC เพิ่มเติมเพื่อทำ complete assignments ของทั้ง  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR resonances เนื่องจากยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อน

สาร 5 มีโครงสร้างเป็น droserone (25) ได้ทำการทดลอง  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, DEPT, HMQC และ HMBC เพิ่มเติมเพื่อแก้ไข  $^{13}\text{C}$  NMR assignments ที่มีผู้รายงานไว้ (27)

### (3) การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารที่แยกได้

เนื่องจากสาร plumbagin ที่แยกได้มีปริมาณมาก (3 ก.) จึงได้ใช้สาร plumbagin ดังกล่าว เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารที่มีโครงสร้างต่างออกไป ได้สารอนุพันธ์ทั้งสิ้น 7 ชนิด สารเหล่านี้ได้นำไปศึกษาคุณสมบัติทาง NMR อย่างละเอียดโดยใช้เทคนิค HMQC และ HMBC ช่วยในการทำ  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR assignments อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเพื่อเก็บข้อมูลที่อาจเป็นประโยชน์ในการเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้

#### (3.1) การสังเคราะห์สาร 5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [6]

ละลาย plumbagin (1) 750 มก. ในคลอโรฟอร์ม 10 มล. เติม silver (I) oxide 3 ก. และ iodomethane 15 มล. คนทิ้งไว้ค้างคืน กรองเอา filtrate มาระเหยให้แห้งได้ 5-methoxy-

2-methyl-1,4-naphthoquinone [6] 737 มก. สาร 6 มีคุณสมบัติทางกายภาพดังต่อไปนี้ EIMS  $m/z$  (% relative intensity) 202 (100), 189 (8), 173 (22), 156 (15), 145 (12), 128 (14), 115 (22), 104 (26), 88 (14), 76 (42), 69 (12), 55 (17), 39 (26), 32 (11);  $IR_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  2900, 1660, 1590, 1430, 1300, 1220;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.14 (3H, d,  $J = 1.5$  Hz, 2- $\text{CH}_3$ ), 4.01 (3H, s, 5- $\text{OCH}_3$ ), 6.74 (1H, q,  $J = 1.5$  Hz, H-3), 7.29 (1H, dd,  $J = 0.9, 8.7$  Hz, H-6), 7.66 (1H, dd,  $J = 8.7, 8.7$  Hz, H-7), 7.76 (1H, dd,  $J = 0.9, 8.7$  Hz, H-8);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  15.8 (2- $\text{CH}_3$ ), 56.4 (5- $\text{OCH}_3$ ), 117.6 (C-4a), 119.3 (C-6), 120.0 (C-8), 134.4 (C-8a), 134.6 (C-3), 137.8 (C-7), 145.4 (C-2), 159.4 (C-5), 184.5 (C-4), 185.8 (C-1). คุณสมบัติทาง  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารนี้ตรงกับที่มีผู้รายงานไว้ (20, 26)

(3.2) การสังเคราะห์สาร 5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone-2,3-epoxide

[7]

อุ่นสารละลายของ 5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [6] 700 มก. ในเมธานอล 10 มล. แล้วเติมสารละลายซึ่งประกอบด้วย hydrogen peroxide 1 มล. ใน sodium carbonate solution (5% w/v) จำนวน 7 มล. เขย่าอย่างแรงให้เข้ากัน นำ reaction mixture ที่ได้มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 70 มล. นำสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มที่ได้มาระเหยให้แห้งได้สาร

5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone-2,3-epoxide [7] 517 มก. ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพดังนี้ EIMS  $m/z$  (% relative intensity) 218 (100), 203 (32), 189 (29), 175 (44), 161 (34), 147 (23), 135 (35), 119 (30), 91 (21), 76 (61), 63 (32), 50 (29), 43 (92), 32 (18); IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  2947, 2922, 1690, 1588, 1451, 1255;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.71 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ), 3.83 (1H, s, H-3), 3.95 (3H, s, 5- $\text{OCH}_3$ ), 7.27 (1H,  $J = 0.9, 7.9$  Hz, H-6), 7.56 (1H, dd,  $J = 0.9, 7.6$  Hz, H-8), 7.64 (1H, dd,  $J = 7.6, 7.6$  Hz, H-7);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.4 (2- $\text{CH}_3$ ), 56.4 (5- $\text{OCH}_3$ ), 61.5 (C-2), 61.6 (C-3), 117.6 (C-6), 119.5 (C-8), 120.5 (C4a), 134.3 (C-8a), 135.0 (C-7), 158.9 (C-5), 191.2 (C-4), 192.9 (C-1). สารนี้เคยมีผู้สังเคราะห์ไว้ (27) แต่ไม่มีรายงานคุณสมบัติทาง  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR

### (3.3) การสังเคราะห์ 3-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [8]

นำ 5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone-2,3-epoxide [7] 400 มก. มาเติมกรด sulfuric จำนวน 1 มล. รอจน reaction mixture เปลี่ยนเป็นสีแดงแล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมน้ำลงไปจนเห็นตะกอนสีเหลืองตกลงมา กรองเอาตะกอนที่ได้ ทำให้แห้ง ได้เป็นสาร 3-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [8] จำนวน 242 มก. ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพดังนี้ EIMS  $m/z$  (% relative intensity) 218 (100), 200 (7), 189 (10), 172

(16), 147 (14), 131 (14), 105 (13), 91 (12), 84 (18), 76 (29), 65 (15), 55 (30), 43 (35), 32 (50); IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  3255, 2811, 1658, 1636, 1538, 1202;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.07 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ), 4.03 (3H, s, 5- $\text{OCH}_3$ ), 7.24 (1H, dd,  $J = 0.8, 8.4$  Hz, H-6), 7.69 (1H, dd,  $J = 8.4, 8.0$  Hz, H-7), 7.71 (1H, s, 3-OH), 7.79 (1H, dd,  $J = 0.8, 8.0$  Hz, H-8);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.4 (2- $\text{CH}_3$ ), 56.5 (5- $\text{OCH}_3$ ), 116.6 (C-6), 116.9 (C-4a), 118.0 (C-2), 119.6 (C-8), 135.2 (C-8a), 136.2 (C-7), 153.6 (C-3), 160.0 (C-5), 179.6 (C-4), 184.8 (C-1). คุณสมบัติทาง UV และ  $^1\text{H}$  NMR ของสารนี้ตรงกับที่มีผู้รายงานไว้ (28)

(3.4) การสังเคราะห์ 3-acetyloxy-5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [9]

นำสาร 3-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [8] 40 มก. ละลายใน pyridine 0.5 มล. เติม acetic anhydride 1 มล. คนทิ้งไว้ค้างคืน แล้วเติมน้ำนำมาสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม นำชั้นคลอโรฟอร์มมากำจัดน้ำด้วย anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  แล้วระเหยให้แห้งได้สาร 3-acetoxy-5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone 20 มก. ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพดังนี้  
 EIMS  $m/z$  (% relative intensity) 260 (2), 218 (85), 200 (12), 172 (12), 161 (9), 131 (6), 91 (6), 76 (15), 63 (9), 55 (14), 43 (100), 32 (7); IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  3454, 1663, 1276, 1165 ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.06 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ), 2.40

(3H, s, 3-OCOCH<sub>3</sub>), 4.00 (5-OCH<sub>3</sub>), 7.28 (1H, dd,  $J = 0.9, 7.9$  Hz, H-6), 7.67 (1H, dd,  $J = 7.6, 7.9$  Hz, H-7), 7.79 (1H,  $J = dd, 0.9, 7.6$  Hz, H-8); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.6 (2-CH<sub>3</sub>), 20.4 (3-OCOCH<sub>3</sub>), 56.5 (3H, 5-OCH<sub>3</sub>), 117.8 (C-6), 118.5 (C-4a), 119.4 (C-8), 133.5 (C-2), 134.3 (C-8a), 135.2 (C-7), 151.9 (C-3), 160.1 (C-5), 167.9 (3-OCOCH<sub>3</sub>), 176.6 (C-4), 185.0 (C-1). สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติ หรือมีผู้สังเคราะห์มาก่อน

(3.5) การสังเคราะห์ 3,5-dimethoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [10]

ละลายสาร 3-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [8] 70 มก. ในคลอโรฟอร์ม 10 มล. เติม silver (I) oxide 400 มก. และ methyl iodide 10 มล. คนทิ้งไว้ค้างคืน นำ reaction mixture ที่ได้มาระเหยให้แห้ง แล้วนำมาแยกด้วยวิธี preparative thin-layer chromatography (ซิลิกาเจล, ปีโตรเลียมอีเธอร์ : เอธิลเอซิเทต 7:3) ได้สาร products 2 ชนิดคือ 3,5-dimethoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [10] 12 มก. และ สาร 11 (7 มก.) ซึ่งเป็นสารที่เป็นผลพลอยได้ (by-product)

สาร 10 มีคุณสมบัติทางกายภาพดังนี้ EIMS  $m/z$  (% relative intensity) 232 (100), 217 (42), 202 (13), 189 (23), 173 (22), 159 (12), 145 (10), 135 (16), 115 (20), 91 (12), 76 (43), 63 (23), 55 (20), 39 (26); IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup> 3471, 2970,

2847, 1690, 1584, 1256;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.50 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ), 4.00 (5- $\text{OCH}_3$ ), 4.11 (3- $\text{OCH}_3$ ), 7.25 (1H, dd,  $J = 1.1, 8.8$  Hz, H-6) 7.63 (dd,  $J = 8.8, 8.8$  Hz, H-7), 7.73 (1H, dd,  $J = 1.1, 8.8$  Hz, H-8);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.9 (2- $\text{CH}_3$ ), 56.4 (5- $\text{OCH}_3$ ), 60.9 (3- $\text{OCH}_3$ ), 117.2 (C-6), 118.9 (C-8), 119.3 (C-4a), 128.9 (C-2), 134.4 (C-8a), 134.7 (C-7), 158.7 (C-3), 159.5 (C-5), 180.2 (C-4), 185.8 (C-1). คุณสมบัติทาง  $^1\text{H}$  NMR ของสารนี้ตรงกับที่มีผู้รายงานไว้ (29)

สาร 11 มีโครงสร้าง เป็น 2,2-dimethyl-3-hydroxy-3-methoxycarbonyl-4-methoxy-1H-inden-1-one และมีคุณสมบัติทางกาย าวดังนี้ HRFABMS 265.1088 (M+H) calcd. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_5$  (265.1076); EIMS  $m/z$  (% relative intensity) 264 (0.1), 205 (100), 190 (9), 175 (2), 144 (3), 115 (3), 91 (4), 77 (4), 63 (2), 51 (2), 45 (6), 32 (1); IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  3443, 2961, 2931, 1726, 1272, 1004;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.12 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ), 1.22 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ), 3.67 (3H, s, 3- $\text{COOCH}_3$ ), 3.90 (3H, s, 4- $\text{OCH}_3$ ), 7.11 (1H, d,  $J = 7.93$  Hz, H-5), 7.40 (1H, dd,  $J = 0.6, 7.6$  Hz, H-7), 7.48 (1H, dd,  $J = 7.6, 7.6$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  18.3 (2- $\text{CH}_3$ ), 23.0 (2- $\text{CH}_3$ ), 52.9 (3- $\text{COOCH}_3$ ), 55.0 (C-2), 55.8 (4- $\text{OCH}_3$ ), 82.1



(C-3), 115.8 (C-7), 116.2 (C-5), 131.5 (C-6), 137.2 (C-7a), 138.2 (C-3a), 157.0 (C-4), 174.1 (OCOCH<sub>3</sub>), 206.3 (C-1). สารนี้ไม่มีผู้รู้จักมาก่อน

(3.6) การสังเคราะห์ 3-chloro-2-methyl-5-methoxy-1,4-naphthoquinone [12]

นำสาร 5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone-2,3-epoxide [7] 70 มก. มาละลายใน 5% HCl ใน MeOH 20 มล. แล้ว reflux เป็นเวลา 2 ชม. นำ reaction mixture ไปผ่าน ion-exchange column แล้วนำมาแยกต่อโดยวิธี preparative TLC ได้ สาร 3-chloro-2-methyl-5-methoxy-1,4-naphthoquinone [12] 12 มก. และสารที่เป็นผลพลอยได้อีก 2 ชนิด คือ 3-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [8] 14 มก. และ สาร 3,5-dimethoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [10] 10 มก.

สาร 12 มีคุณสมบัติทางกายภาพดังนี้ EIMS  $m/z$  (% relative intensity) 238 (36), 236 (100), 219 (4), 201 (28), 186 (8), 171 (48), 158 (9), 143 (70), 130 (11), 115 (90), 102 (32), 91 (16), 76 (57), 63 (35), 50 (24); IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup> 3400, 2800, 1656, 1585, 1321, 1275, 1055; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  2.30 (3H, s, 2-CH<sub>3</sub>), 4.02 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 7.34 (1H, dd,  $J = 0.9, 8.4$  Hz, H-6), 7.68 (1H, dd,  $J = 7.6, 7.6$  Hz, H-7) 7.77 (1H, dd,  $J = 0.9, 7.6$  Hz, H-8); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.1 (2-CH<sub>3</sub>), 56.5 (5-OCH<sub>3</sub>), 117.9 (C-6), 119.2 (C-4a), 119.7 (C-

8), 133.9 (C-8a), 135.1 (C-7), 142.4 (C-3), 145.0 (C-2), 160.0 (C-5), 176.0 (C-4), 182.9 (C-1). สารนี้ไม่เคยมีรายงานว่าพบในธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาก่อน

โครงสร้างของสารที่แยกได้และที่สังเคราะห์ทั้งหมด [1 - 12] แสดงไว้ในรูปที่ 1

#### (4) การทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารที่สกัดและที่สังเคราะห์ได้

ใช้วิธี radioisotope-labelled hypoxanthine incorporation (30) ในการตรวจสอบ โดยทดสอบกับเชื้อ *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ T<sub>9/94</sub> เลี้ยงใน candle jar การทดสอบทำในจานไมโครไทเทออร์ (microtiter plate)

##### (4.1) การเตรียมสารละลายของสารทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ

(4.1.1) ภาชนะและเครื่องใช้ทุกชนิดก่อนใช้ต้องฆ่าเชื้อ (sterile) และตลอดการทดลองจะต้องใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic technique)

(4.1.2) เตรียมอาหารเลี้ยงโดยนำ RPMI-1640 จำนวน 10.4 ก. ละลายในสารละลายซึ่งประกอบด้วย HEPES buffer 5.49 ก. ในน้ำกลั่น 960 มล. ปั่นให้เข้ากันแล้วเติมสารละลาย gentamicin ในน้ำ (40 มก./มล.) จำนวน 0.9 มล. นำสารละลายที่ได้มากรองให้ปราศจากเชื้อ เมื่อนำมาใช้ แบ่งมาจำนวน 21.8 มล. แล้วเติม สารละลาย 7.5% NaHCO<sub>3</sub>

จำนวน 0.7 มล. และ serum ของเลือดกลุ่ม O จำนวน 2.5 มล. ได้เป็น cRPMI ซึ่งมีปริมาตรรวม

ทั้งสิ้น 25.0 มล. ซึ่งเพียงพอใช้ใน งานไมโครไทเทอร์ จำนวน 1 งาน

#### (4.2) การเตรียมเชื้อ

เตรียมจากเชื้อที่เลี้ยงไว้ นำมาผสมกับเลือดกลุ่ม O ให้ได้ parasitemia เป็นร้อยละ 0.5 และมี hematocrit ร้อยละ 1.6

#### (4.3) การทดสอบฤทธิ์

ทำใน งานไมโครไทเทอร์ ซึ่งแต่ละงานประกอบด้วยหลุมจำนวน 96 หลุม ในแต่ละหลุมประกอบด้วย

(4.3.1) สารละลายของสารทดสอบใน cRPMI ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันจำนวน 25 มคล. (ไมโครลิตร,  $\mu$ l)

(4.3.2) suspension ของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียจำนวน 200 มคล. ยกเว้นในหลุม baseline จะใช้ suspension ของเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีเชื้อมาลาเรีย (non-PRBC) จำนวน 200  $\mu$ l แทน หลังจากปล่อยให้เชื้อเจริญ 24 ชม. ใน candle jar แล้วนำมาเติม

(4.3.3) สารละลายของ [ $^3$ H]hypoxanthine ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 25 มคล. จากนั้นปล่อยให้เชื้อเจริญต่อไปอีก 18 ชม. แล้วเก็บผลการทดลองโดยดูดเอาสิ่งทดสอบในแต่ละหลุมมากรองผ่านกระดาษกรอง ทั้งกระดาษกรองให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาตัดใส่

ependorf ขนาด 1.5 มล. เติม scintillation cocktail แล้ววัด radioactivity ที่เกาะอยู่บน  
 กระดาษกรอง โดยใช้ scintillation counter นำค่า cpm ที่ได้มา plot กับความเข้มข้นของสารใน  
 หน่วย มคก./มล. ( $\mu\text{g/ml}$ ) หรือ มค.โมลาร์ ( $\mu\text{M}$ ) เพื่อคำนวณหา  $\text{IC}_{50}$  ผลการทดสอบของสาร  
 1 - 12 แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารบริสุทธิ์

สาร	$\text{IC}_{50}$	
	มคก./มล	มค.โมลาร์
1	0.05	0.27
2	4.00	20.83
3	2.40	11.76
4	2.50	5.79
5	4.50	22.06
6	0.18	0.89
7	0.60	2.75
8	7.00	32.11
9	32.0	123.07
10	0.90	3.88
11	15.00	56.82
12	40.00	168.07
pyrimethamine	2.80	11.29
chloroquine	0.03	0.09

## การอภิปรายผล ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ

ในการสกัดแยกหาสารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากรากของน้ำเต้าลมนั้น สามารถแยกได้สารบริสุทธิ์จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ plumbagin [1], isoshinanolone [2], octadecyl caffeate [3], 2-methylnaphthazarin [4] และ droserone [5] โดยสาร 1 มีปริมาณมากที่สุด (3 ก.) ได้นำสารเหล่านี้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียกับ *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ T<sub>9/94</sub> เมื่อเปรียบเทียบค่า IC<sub>50</sub> (μM) ของสารเหล่านี้โดยมี chloroquine และ pyrimethamine เป็นสารอ้างอิงแล้วพบว่า ในสารทั้ง 5 ชนิดที่แยกได้ สาร 1 มีฤทธิ์แรงที่สุด โดยมีฤทธิ์เป็น 40 เท่าของ pyrimethamine แต่เป็น 1/3 เท่าของ chloroquine สารที่มีความแรงถัดมาเป็นสาร 3 ซึ่งมีฤทธิ์เป็น 2 เท่าของ pyrimethamine โดยประมาณ แต่มีฤทธิ์เป็นประมาณ 1/6 เท่าของ chloroquine สาร 4 มีความแรงใกล้เคียงกับ pyrimethamine ส่วนสาร 2 และ 5 มีฤทธิ์อ่อนกว่าทั้ง pyrimethamine และ chloroquine จากผลการทดลองข้างต้นจึงสรุปได้ว่าฤทธิ์ต้านมาลาเรียของน้ำเต้าลมนั้นเกิดเนื่องมาจากสาร plumbagin [1] ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่พบในปริมาณมากที่สุด

เนื่องจากสาร plumbagin [1] มีโครงสร้างเป็น 1,4-naphthoquinone จึงได้ดำริที่จะทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารกลุ่ม 1,4-naphthoquinones นี้ ในโครงการนี้ได้ใช้สาร plumbagin [1] เป็นสารตั้งต้นเพื่อสังเคราะห์สารอื่นโดยวิธีต่าง ๆ เนื่อง

จากเป็นสารที่สกัดได้ในปริมาณมาก ได้สารกึ่งสังเคราะห์ทั้งสิ้น 7 ชนิด ได้แก่ สาร 5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [6], 5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone-2,3-epoxide [7], 3-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [8], 3-acetoxy-5-methoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [9], 3,5-dimethoxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone [10], 2,2-dimethyl-3-hydroxy-3-methoxycarbonyl-4-methoxy-1H-inden-1-one [11] และ 3-chloro-2-methyl-5-methoxy-1,4-naphthoquinone [12] สาร 11 เกิดขึ้นระหว่างการเตรียมสาร 10 จากปฏิกิริยาของสาร 8 กับ  $\text{CH}_3\text{I}/\text{Ag}_2\text{O}$  เนื่องจากในปฏิกิริยาดังกล่าวได้เกิดสาร intermediate ที่มีลักษณะเป็น  $\alpha$ -diketo สารนี้อยู่ในสารละลายต่างจึงเกิด benzil-benzilic re-arrangement ได้โครงสร้าง ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยา methylation ต่อไปได้เป็นสาร 11 (รูปที่ 2) เมื่อนำสาร 1 - 12 มาทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียเพื่อเปรียบเทียบ พบว่าโครงสร้างส่วน quinone ของสารกลุ่มนี้เป็นโครงสร้างที่มีส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ ดังจะเห็นได้จากฤทธิ์ต้านมาลาเรียที่ลดลง 15 เท่าในสาร 11 เมื่อเทียบกับสาร 10 ในกรณีของสาร 7 แม้แสดงฤทธิ์อยู่บ้างคงเนื่องมาจากโครงสร้างที่เป็น epoxide ring ที่อาจไวต่อ non-specific nucleophilic attack ผลของกลุ่มแทนที่ในโครงสร้างส่วนที่เป็น aromatic ring ที่มีต่อฤทธิ์ต้านมาลาเรียนั้นไม่ชัดเจน ส่วนการเติมกลุ่มแทนที่ซึ่งลดความหนาแน่นของอิเล็กตรอนรอบคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ 3 ของโครงสร้าง naphthoquinone จะทำลายฤทธิ์ต้านมาลาเรียดังจะเห็นได้จากค่า

$IC_{50}$  ที่เพิ่มขึ้นในสาร 8, 9, 10 และ 12 ซึ่งมีกลุ่ม hydroxy, acetoxy, methoxy และ chloro ที่คาร์บอนที่ตำแหน่งที่ 3 ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้ เราอาจเสนอสมมติฐานสำหรับการวิจัยในขั้นต่อไปได้ว่า การเลือกเติมกลุ่มที่เพิ่มความหนาแน่นของอิเล็กตรอนที่คาร์บอนตำแหน่งที่สาม อาจให้ผลในทางตรงกันข้าม คือให้อนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ดีกว่าสารตั้งต้น ข้อมูลนี้นับได้ว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง 1,4-naphthoquinone เพื่อให้มีฤทธิ์แรงขึ้นในขั้นต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## เอกสารอ้างอิง

- (1) Division of Control of Tropical Diseases, *World Health Statistics Quarterly* 43: 68-69, 1990.
- (2) WHO Malaria Unit: Global malaria control. *Bull. World Health Organization* 71: 281-281, 1993.
- (3) Wernsdorfer, G. and McGregor, I. *Malaria: principles and practice of malariology*, pp. 1421-1471. New York, Churchill Livingstone, 1988.
- (4) Siddiqui, W.A.: General conclusions and recommendations for the Asia and Pacific conference on malaria. In *Proceedings of the Asia and Pacific conference on malaria: practical considerations on malaria vaccines and clinical trials*. April 21-27, 1985, Honolulu, Hawaii, USA.
- (5) กรองทอง ทิมาสาร สถานการณ์มาลาเรียในปัจจุบัน เอกสารเผยแพร่ในการประชุมวิชาการเรื่องซิงเฮาและอนุพันธ์อาตีมิซินิน 13 กันยายน 2537 องค์การเภสัชกรรม
- (6) คณะกรรมการวางแผนพัฒนาการสาธารณสุข แผนพัฒนาการสาธารณสุขตามแผนพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 7 (พ.ศ. 2535-2539)

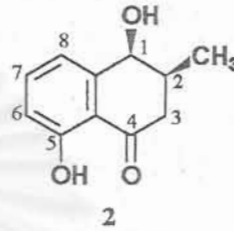
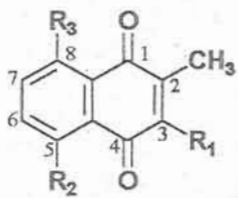


- (7) Ruayajin, O.: Factors affecting malaria related behavior: a literature review of behavioral theories and relevant research. In *Social and economic aspects of malaria control*, eds. S. Sornmani and W. Fungladda, pp. 36-69. Bangkok, Mahidol University, 1991.
- (8) Butraporn, P. : Social epidemiology of malaria. In *Social and economic aspects of malaria control*, eds. S. Sornmani and W. Fungladda, pp. 14-35. Bangkok, Mahidol University, 1991.
- (9) Payne, D.: Annex I. In *Physician's Guide to effective management of cases of malaria, 1993*, ed. H.A.H. Marshall, pp. 98-101. Tokyo, International Medical Foundation of Japan, 1993.
- (10) Fontanet, A.L., Johnston, B.D., Walker, A.M., Bergqist, Y., Hellgren, U., and Rooney, W.: Falciparum malaria in eastern Thailand: a randomized trial of the efficacy of a single dose of mefloquine. *Bull. World Health organization* 72: 73-78, 1994.
- (11) Jiang, J.B., Li, G.Q., Guo, X.B., and Kong, Y.C.: Antimalarial activity of mefloquine and qinhaosu. *Lancet* 2: 285-288, 1982.

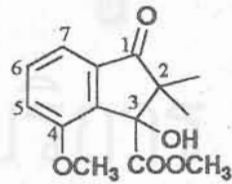
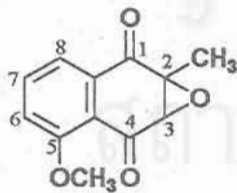
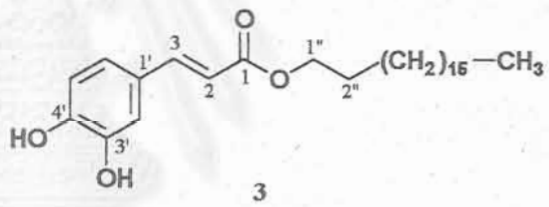
- (12) Karbwang, J., Na-Bangchang, K., Thanavibul, A., Bunnag, D., Chongsuphajasiddhi, T., and Harinasuta, T.: Comparison of oral artesunate and quinine plus tetracycline in acute uncomplicated falciparum malaria. *Bull. World Health Organization* 72: 233-238, 1994.
- (13) Looareesuwan, S. and Chongsuphajasiddhi, T.: Drug Treatment of falciparum malaria. *J. Infect. Dis. Antimicrob. Agents* 11: 89-93, 1993.
- (14) Qinghaosu Research Group.: Crystal structure and absolute configuration of Qinghaosu. *Sci. Sin.* 23: 380-396, 1980.
- (15) James, D.M. and Gilles, H.M. *Human antiparasitic drugs: pharmacology and usage*, pp. 120-164. New York, John Wiley and Sons, 1985.
- (16) Smitinand, T. *Thai plant names*, pp. 239-240. Bangkok, Funny Publishing, 1980.
- (17) Perry, L.M. *Medicinal plants of east and southeast Asia* p. 287. Cambridge, MIT Press, 1980
- (18) Likhitwitayawuid, K. and Krungkrai, J.: Antimalarial activity screening of Thai medicinal plants. *Confidential Reports*, 1994.

- (19) Bhattacharyya J. and De Carvalho, V.R.: *Epi-isoshinanolone* from *Plumbago scandens*. *Phytochemistry* **25**: 764-765, 1986.
- (20) Sankaram, A. V.B., Narayana Reddy, V.V., Marthandamurthi, M.:  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of some naturally occurring binaphthoquinones and related compounds. *Phytochemistry* **25**: 2867-2871, 1986.
- (21) Yue, J., Lin, Z., Wang, D., Feng, Y. and Sun, H.: Plumbasides A-C three naphthoquinone derivatives from *Ceratostigma minus*. *Phytochemistry* **35**: 1023-1025, 1994.
- (22) Tezuka, M., Takahashi, C., Kuroyanagi, M., Satake, M., Yoshihira, K. and Natori, S.: New naphthoquinones from *Diospyros*. *Phytochemistry* **12**: 175-183, 1973.
- (23) Inuma, M., Ohyama, M. and Tanaka, T.: Flavonoids in roots of *Sophora prostrata*. *Phytochemistry* **38**: 539-543, 1995.
- (24) Ferreira, M.A., Costa, M.A.C., Alves, A.C.: Identification of methylnaphthazarin in *Diospyros* species. *Phytochemistry* **11**: 2352-2353, 1972.

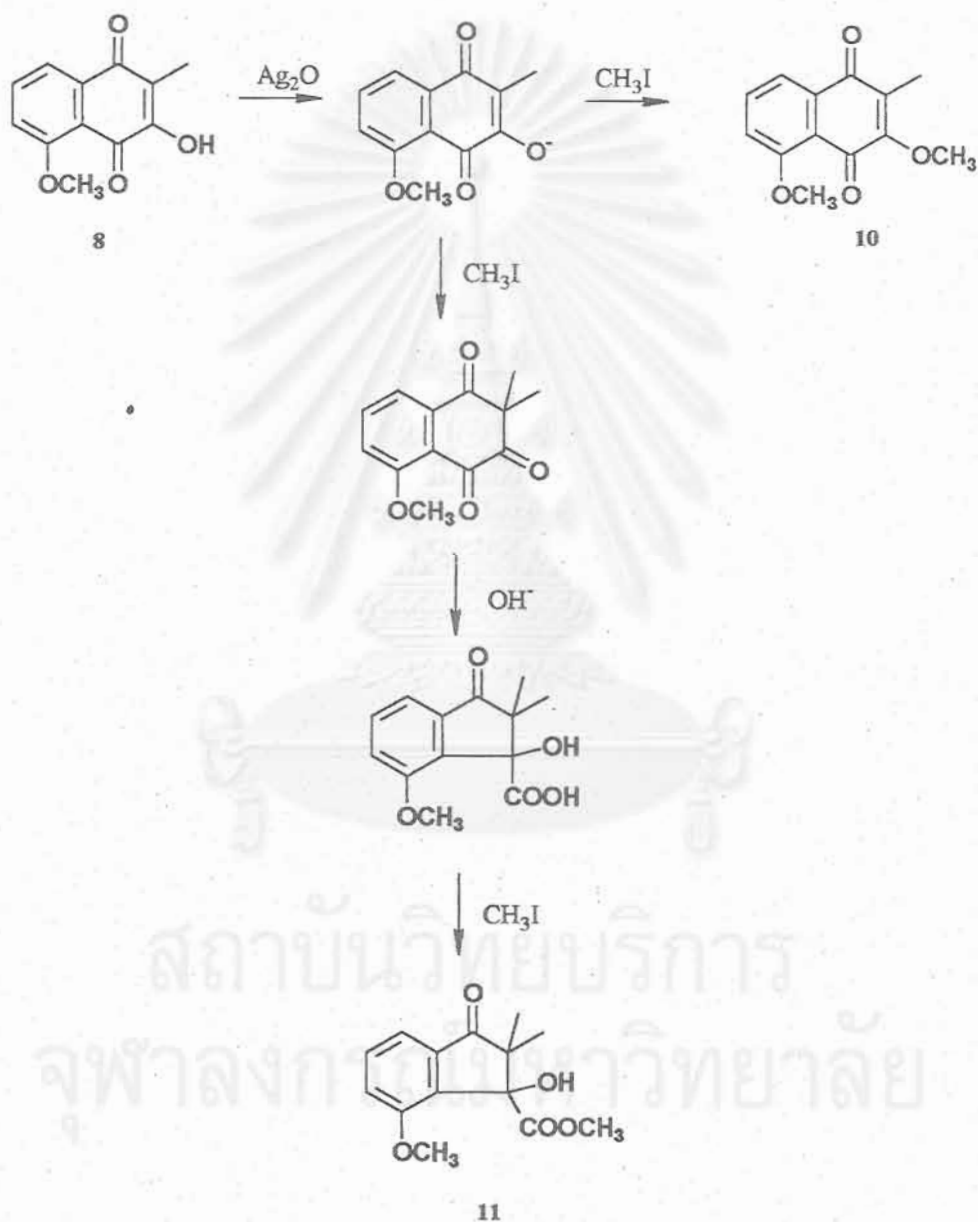
- (25) Kreher, B., Neszelyi, A. and Wagner, H.: Naphthoquinones from *Dionaea muscipula*. *Phytochemistry* **29**: 605-606, 1990.
- (26) Dinda, B., Chel, G., Saha, S. and Patra, A.: Reactions of naturally occurring  $\alpha$ -naphthoquinones: part I. *Indian J. Chem.* **33B**: 502-506, 1994.
- (27) Pluim, H. and Wynberg, H.: Catalytic asymmetric induction in oxidation reactions: synthesis of optically active epoxynaphthoquinones. *J. Org. Chem.* **45**: 2498-2502, 1980.
- (28) Ghera, E. and Ben-David, Y.: Annulation reactions leading to naphthalene derivatives: new syntheses of natural 1,2- and 1,4-naphthoquinones. *J. Org. Chem.* **50**: 3355-3359, 1985.
- (29) Giles, R.G.F., Roos, G.H.P.: Syntheses of substituted 1,4-naphthoquinones by Diels-Alder addition of methoxycyclohexadienes to substituted 1,4-benzoquinones. *J. Chem. Soc. PerkinsI*: 2057-2060, 1976.
- (30) Desjardins, R.E., Canfield, C., Haynes, J.D., and Chulay, J.J.: Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemther.* **16**: 710-718, 1979.



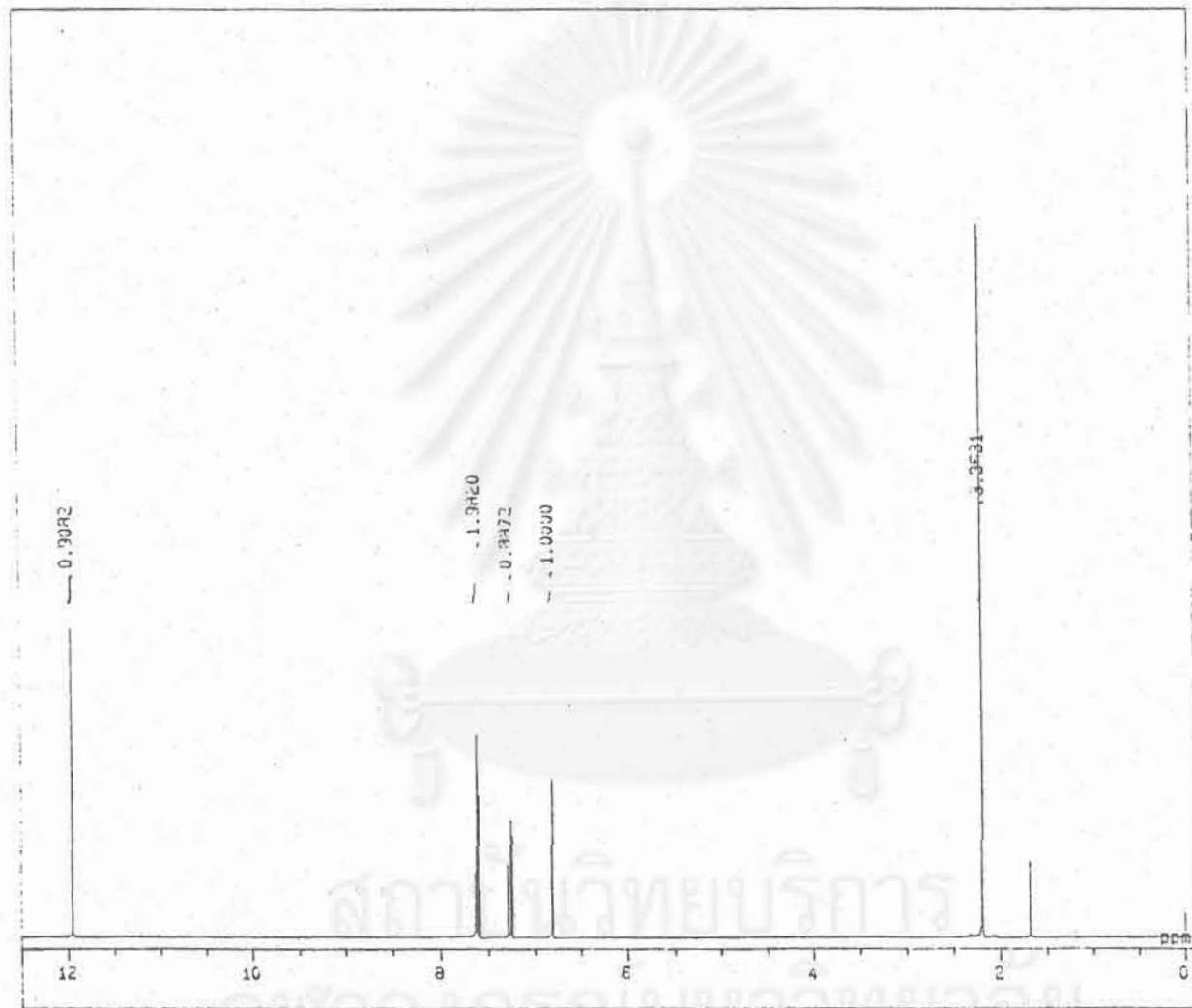
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
1	H	OH	H
4	H	OH	OH
5	OH	OH	H
6	H	OMe	H
8	OH	OMe	H
9	OAc	OMe	H
10	OMe	OMe	H
12	Cl	OMe	H



รูปที่ 1 โครงสร้างของสารที่สกัด และสังเคราะห์ได้

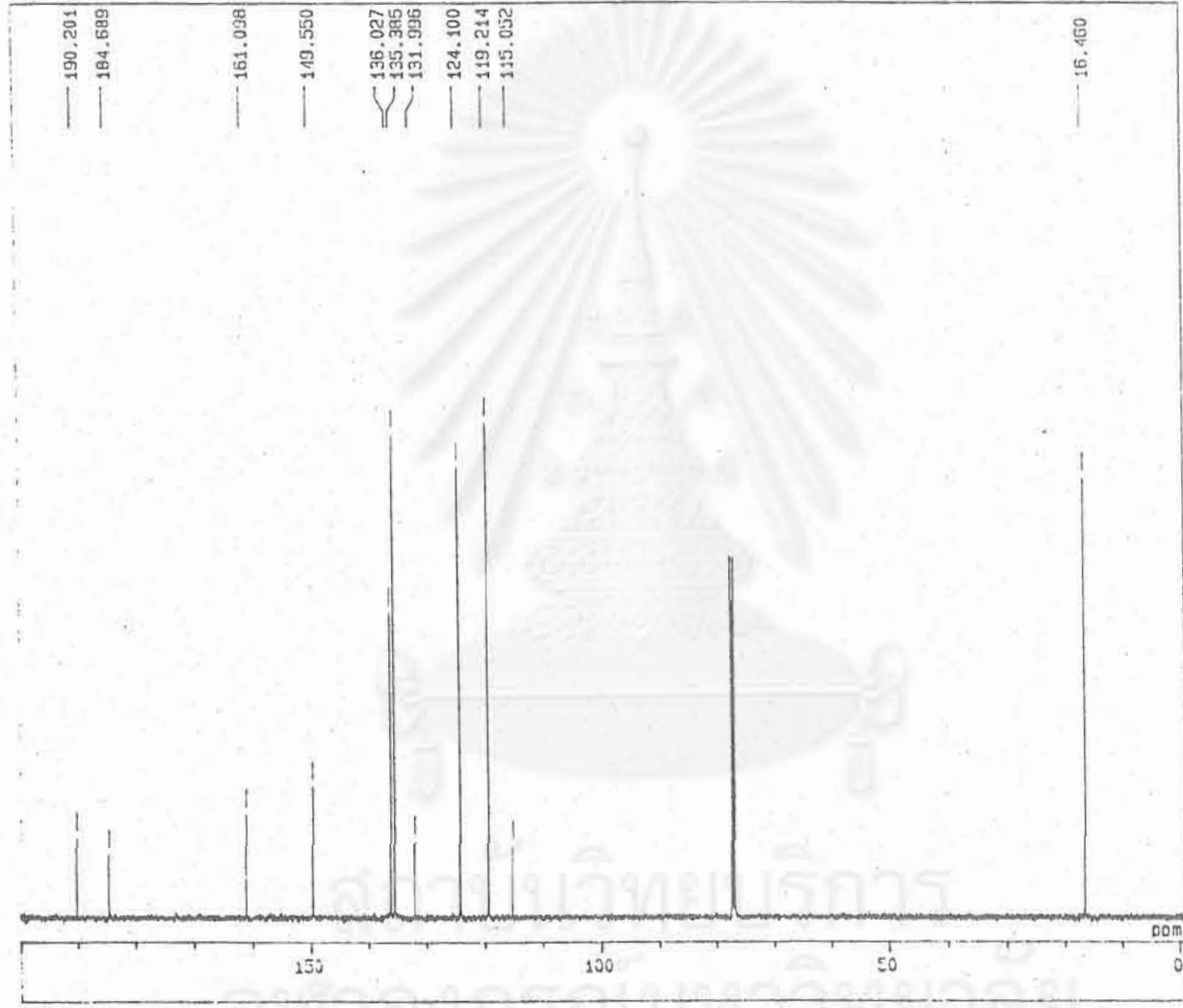


รูปที่ 2 การเกิดสาร 11 ระหว่างการเตรียมสาร 10 จากสาร 8



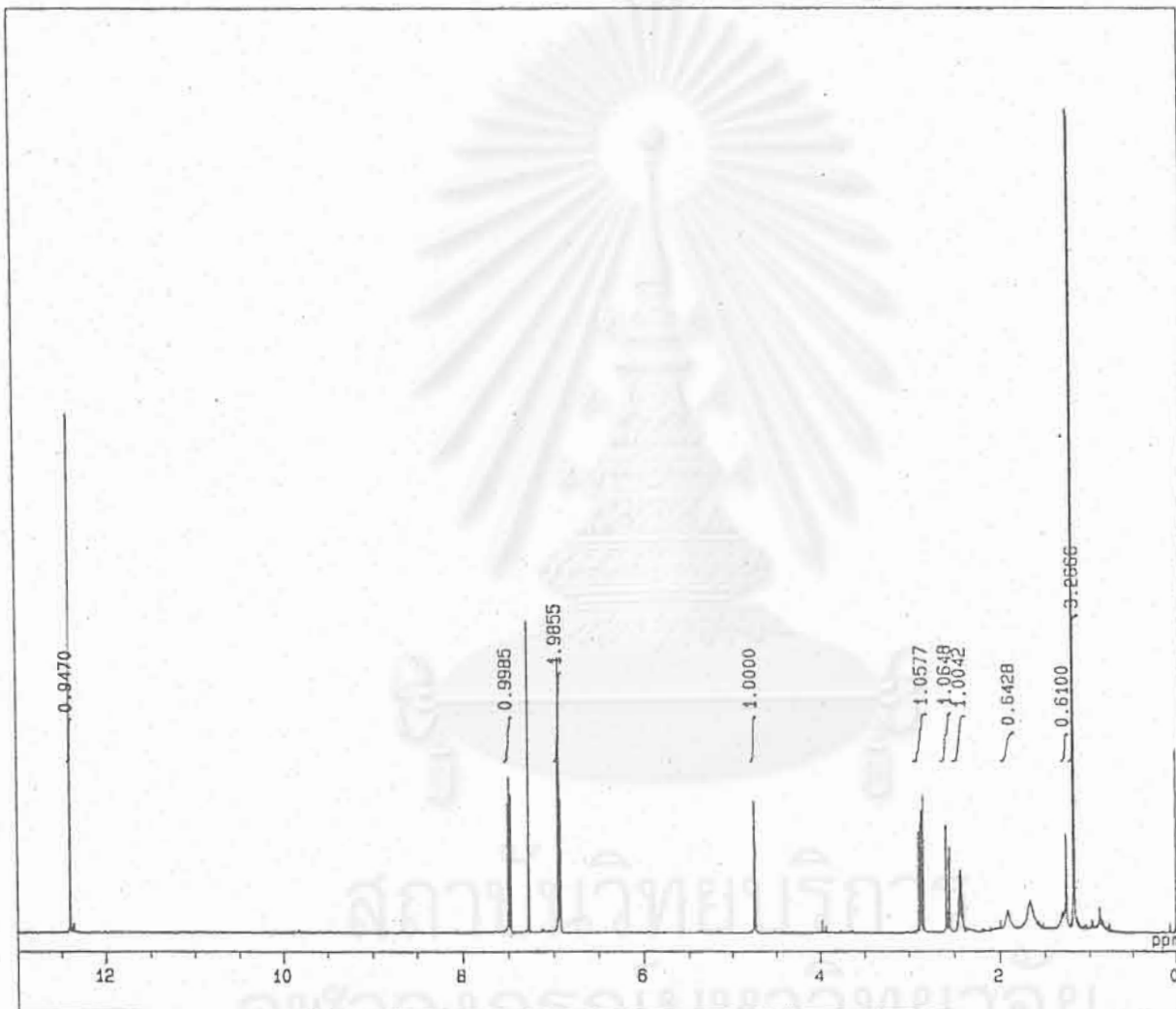
รูปที่ 3

$^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร 1



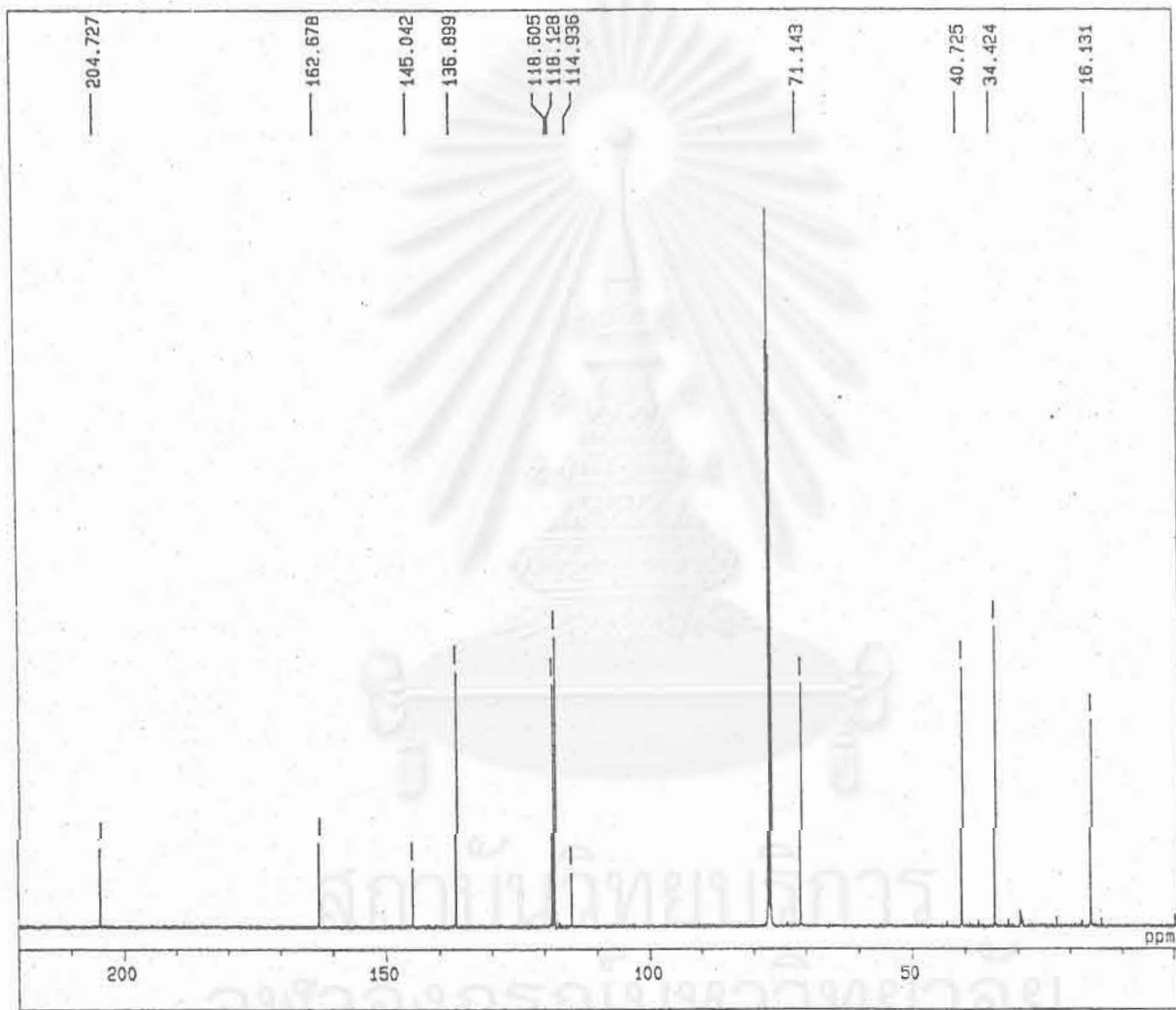
รูปที่ 4  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร 1



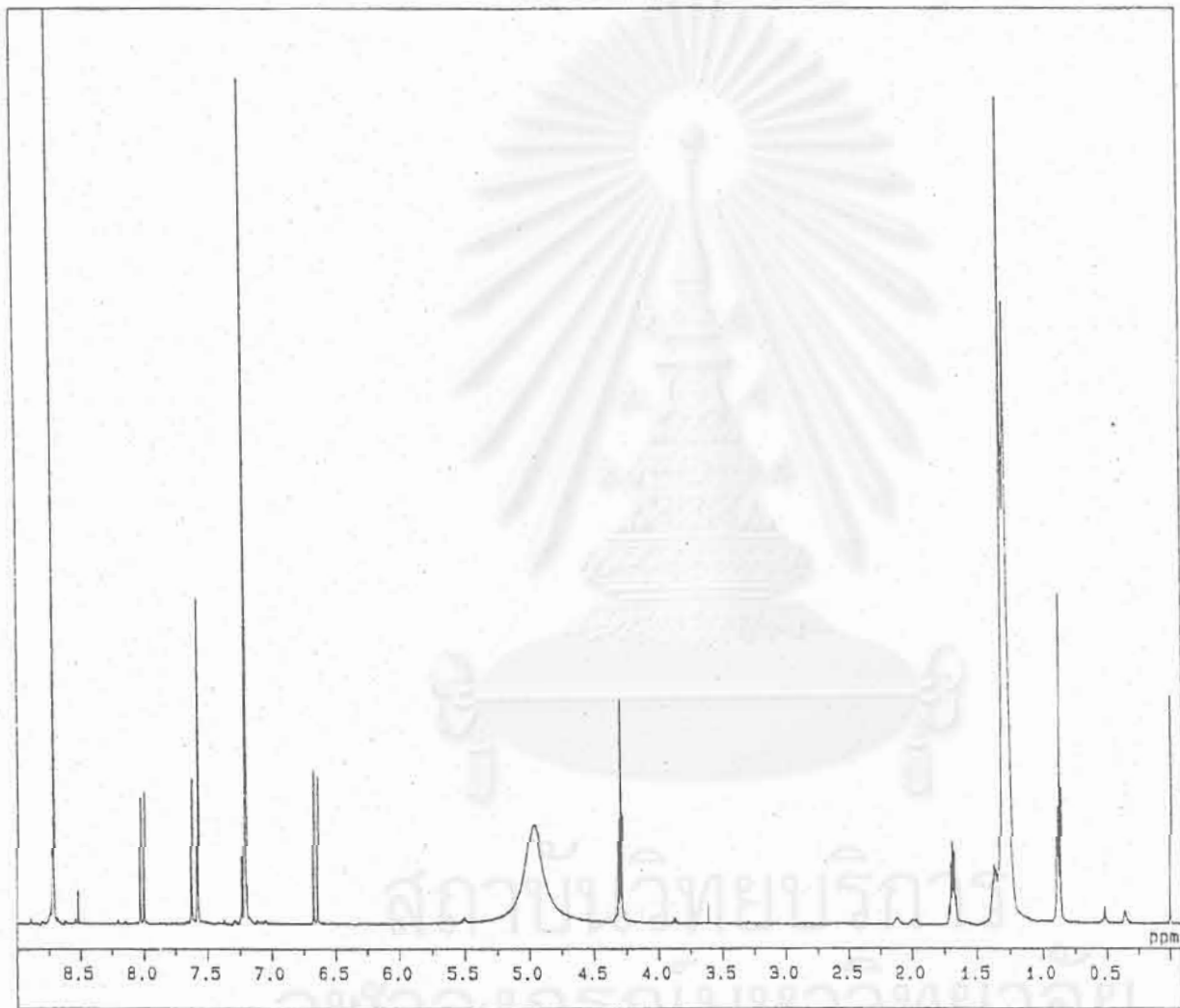


รูปที่ 5

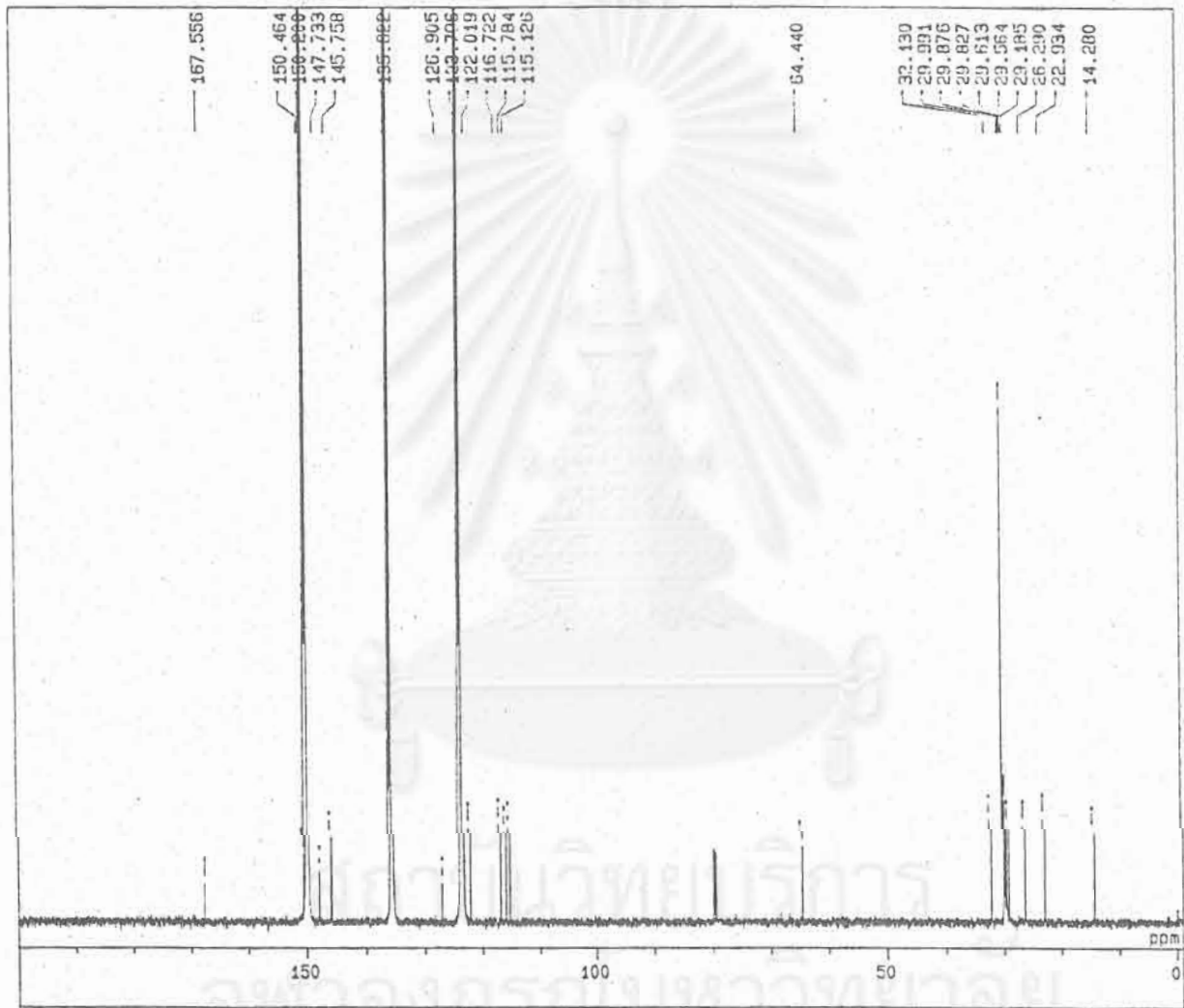
$^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร 2



รูปที่ 6  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร 2

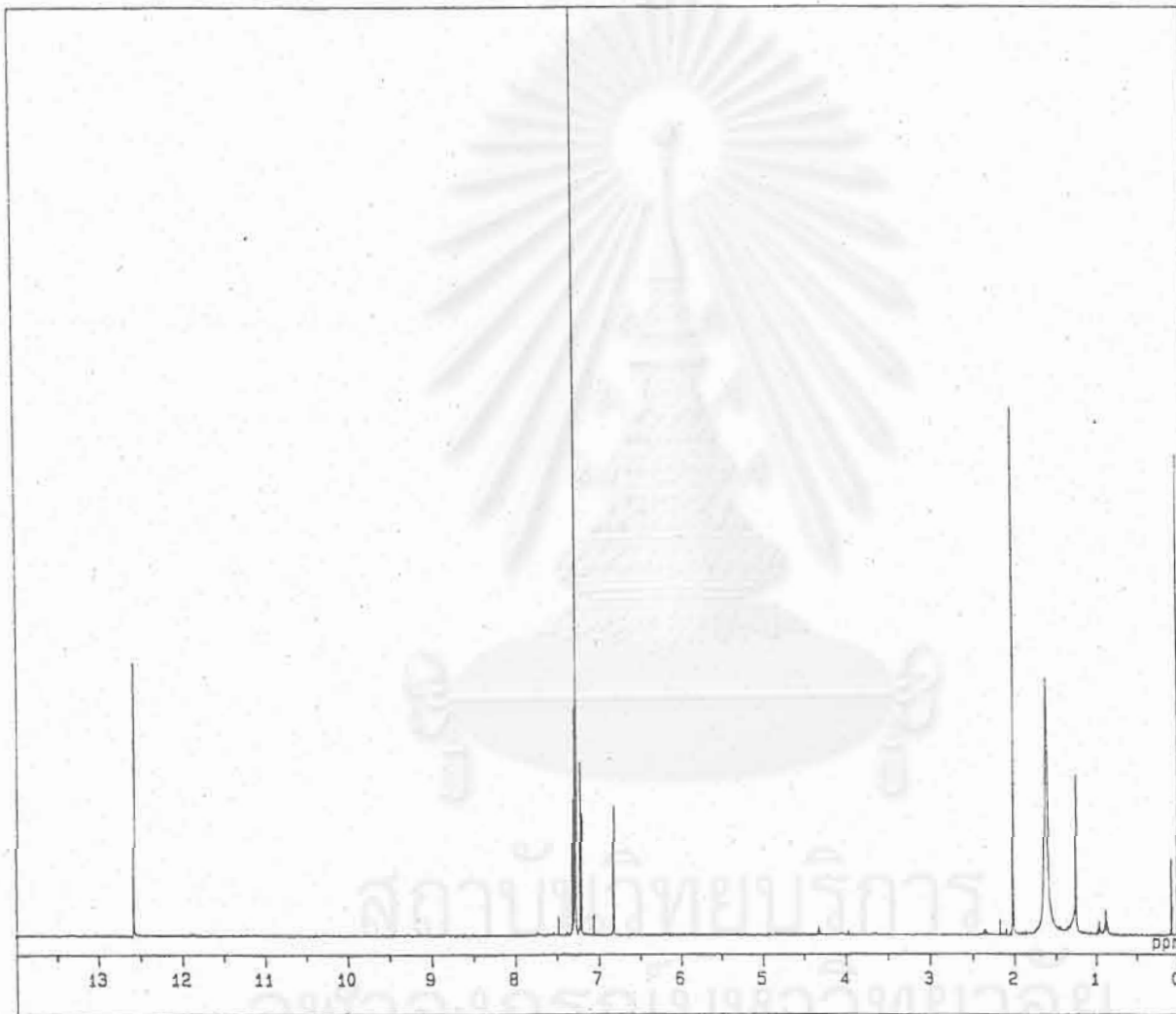


รูปที่ 7  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร 3

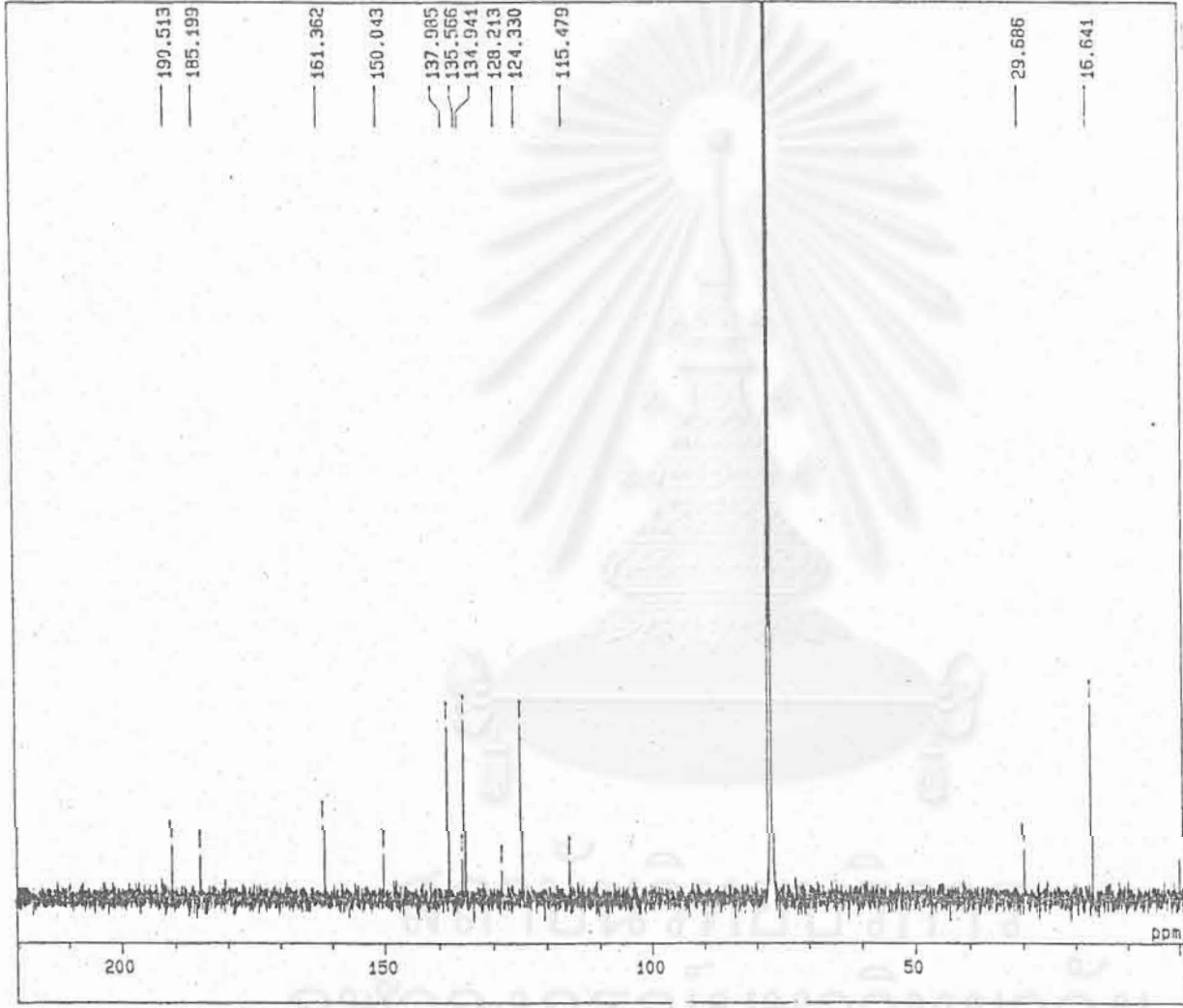


รูปที่ 8

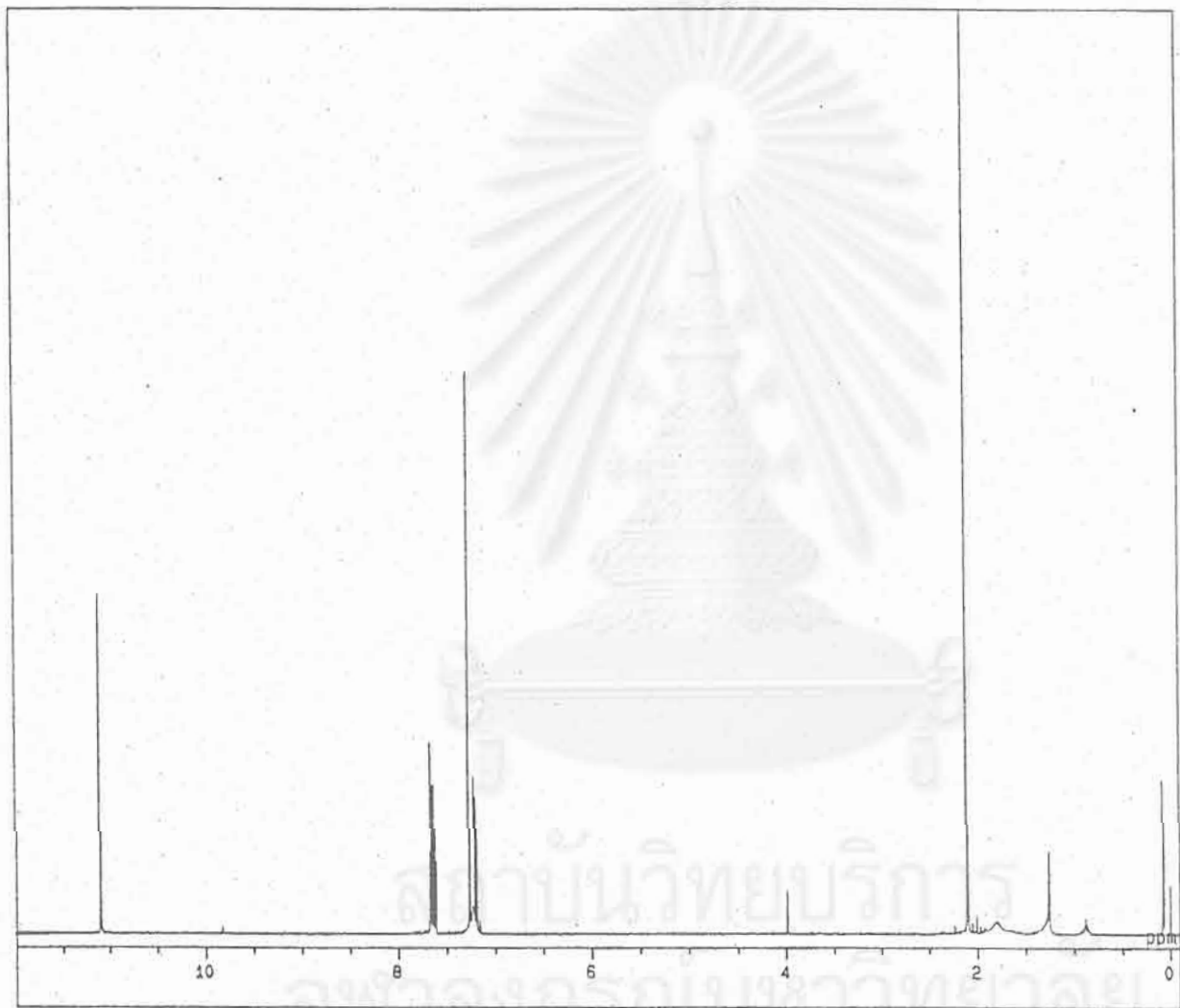
$^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร 3



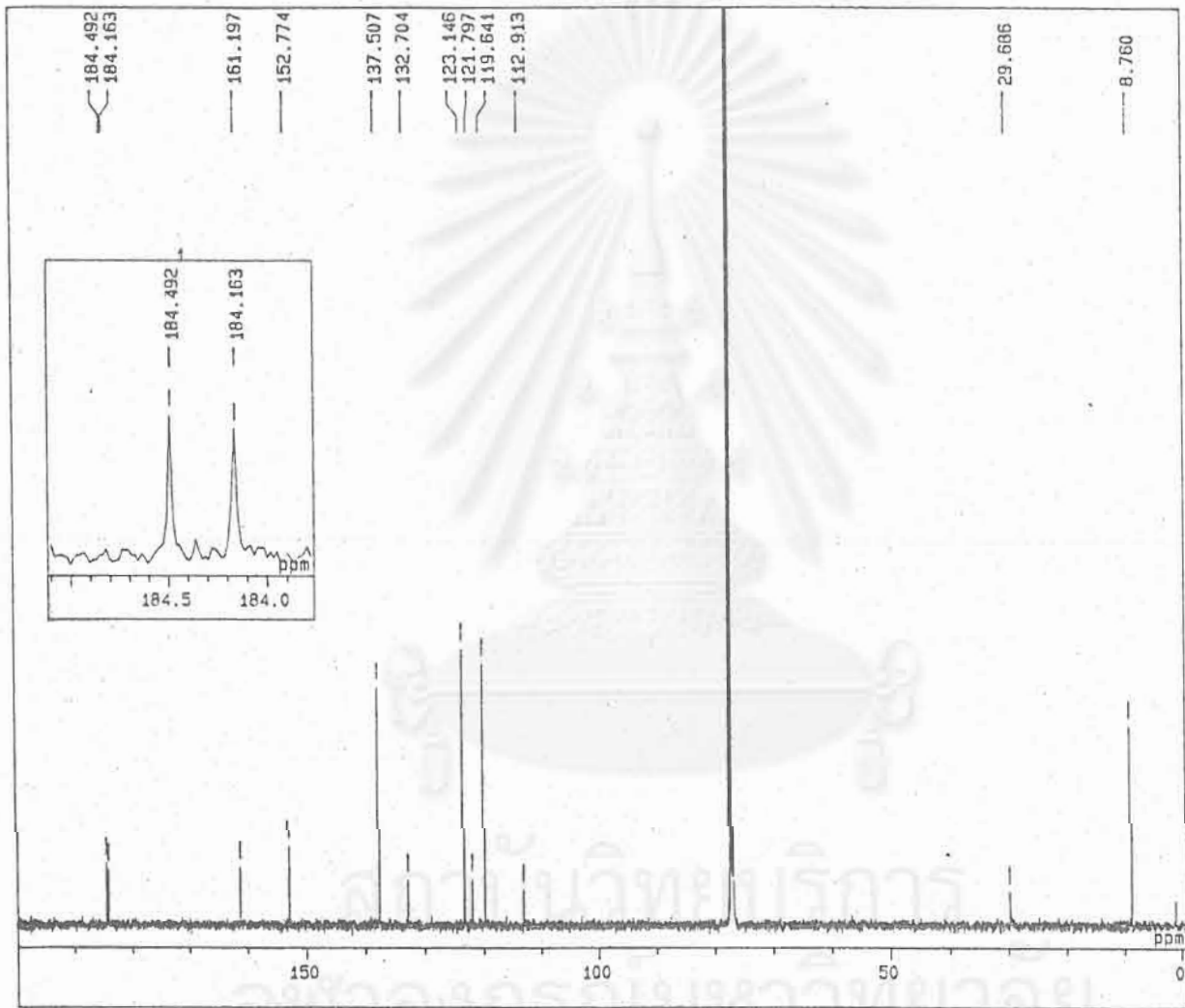
รูปที่ 9  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร 4



รูปที่ 10  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร 4



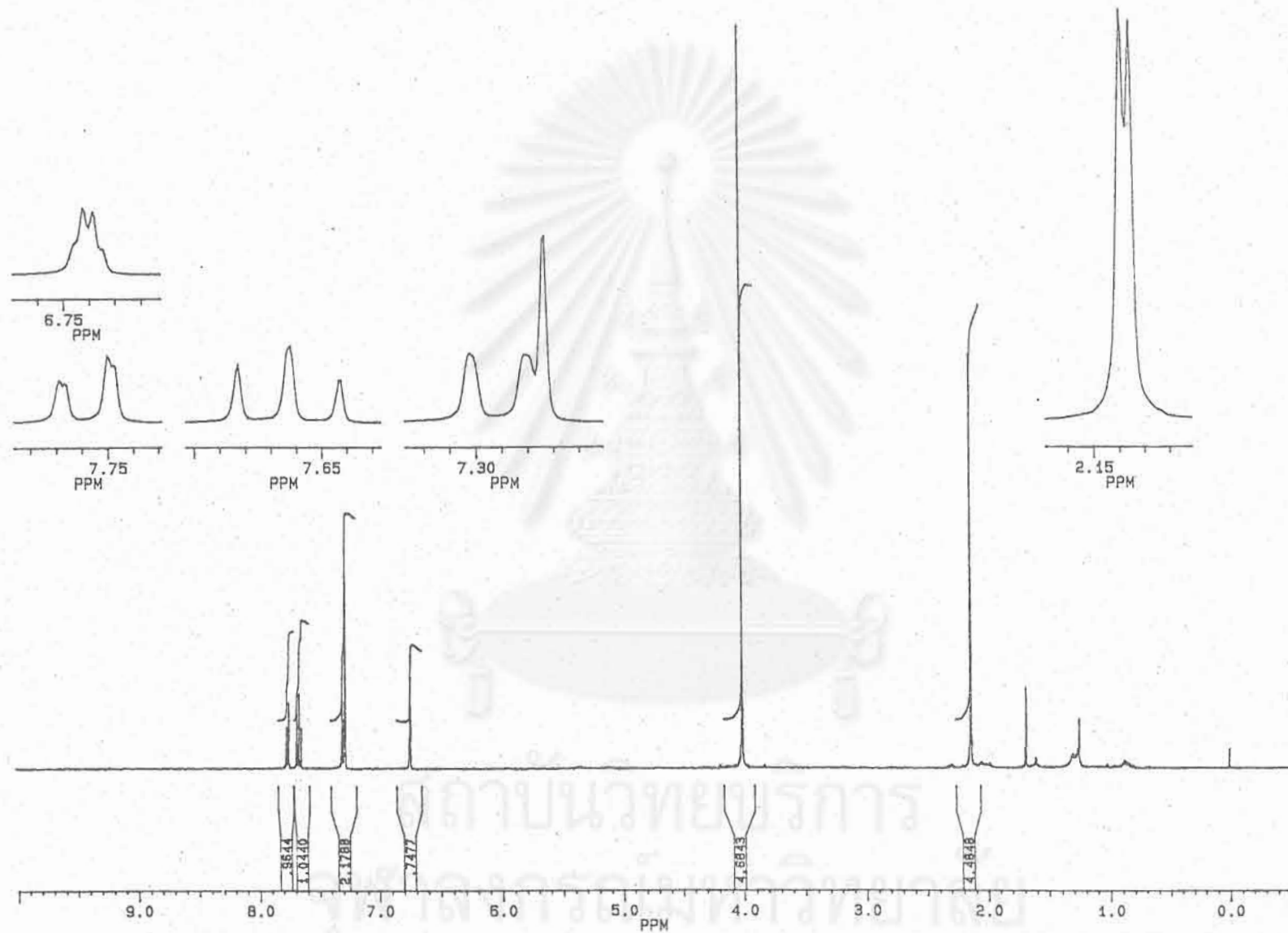
รูปที่ 11  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร 5



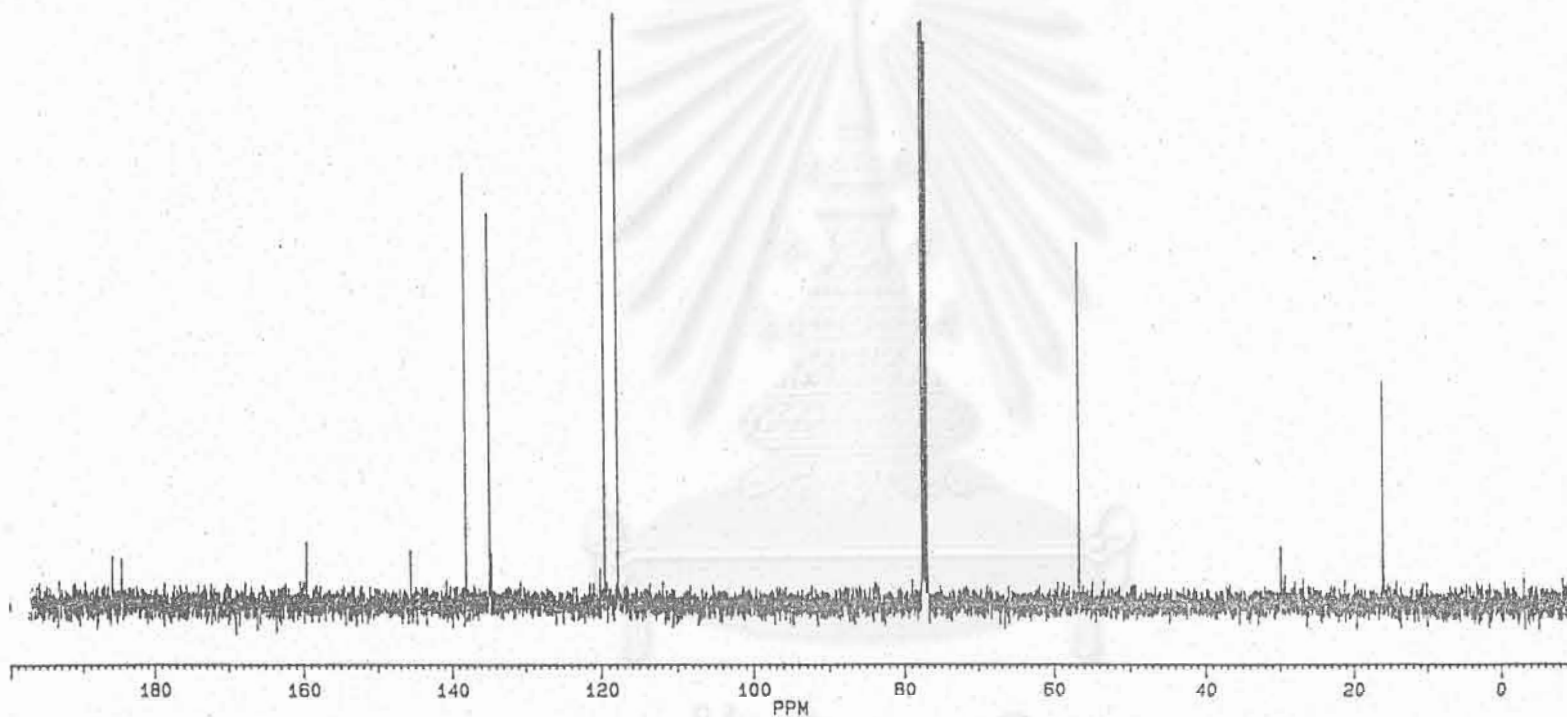
รูปที่ 12

$^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร 5



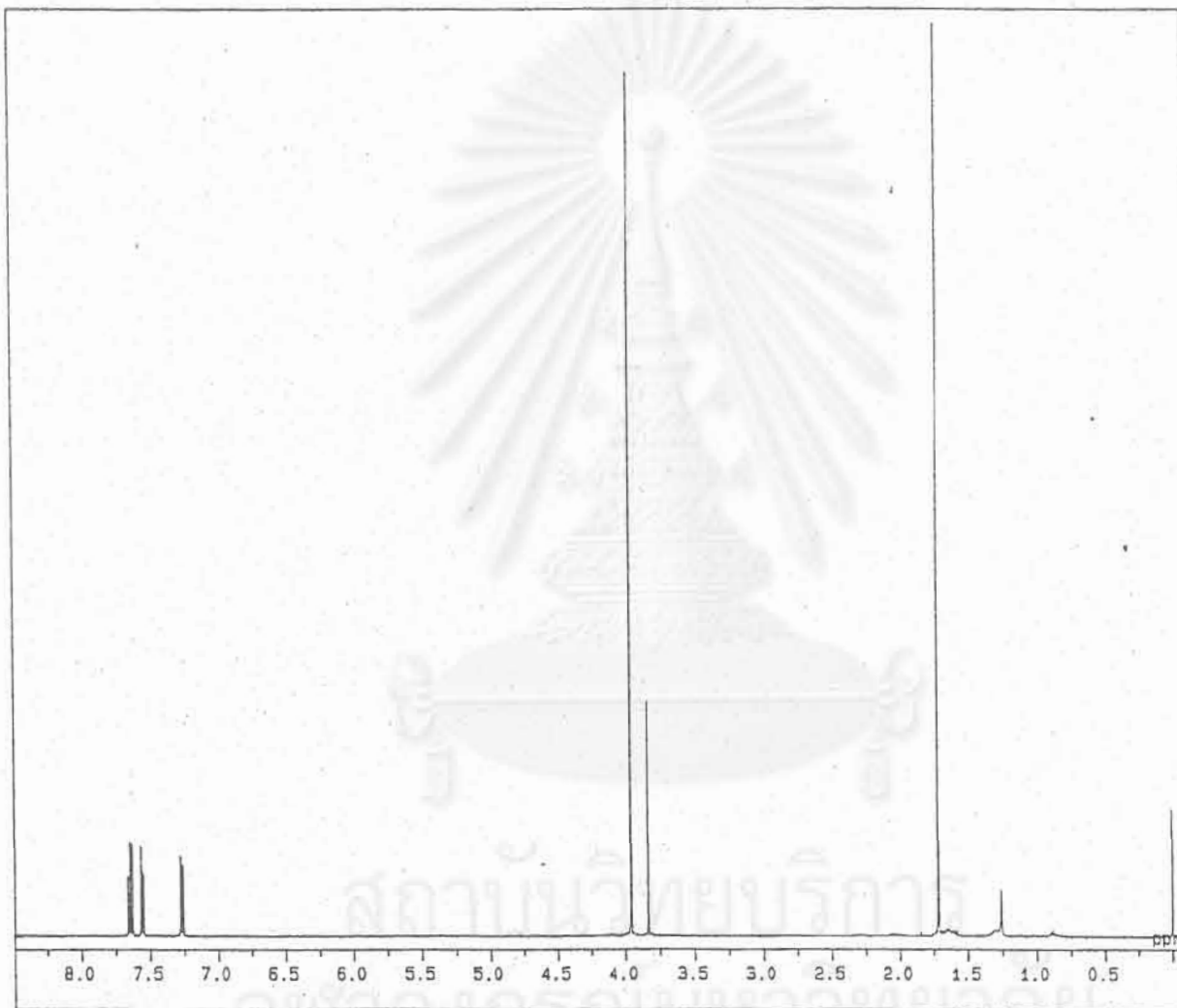


รูปที่ 13  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร 6

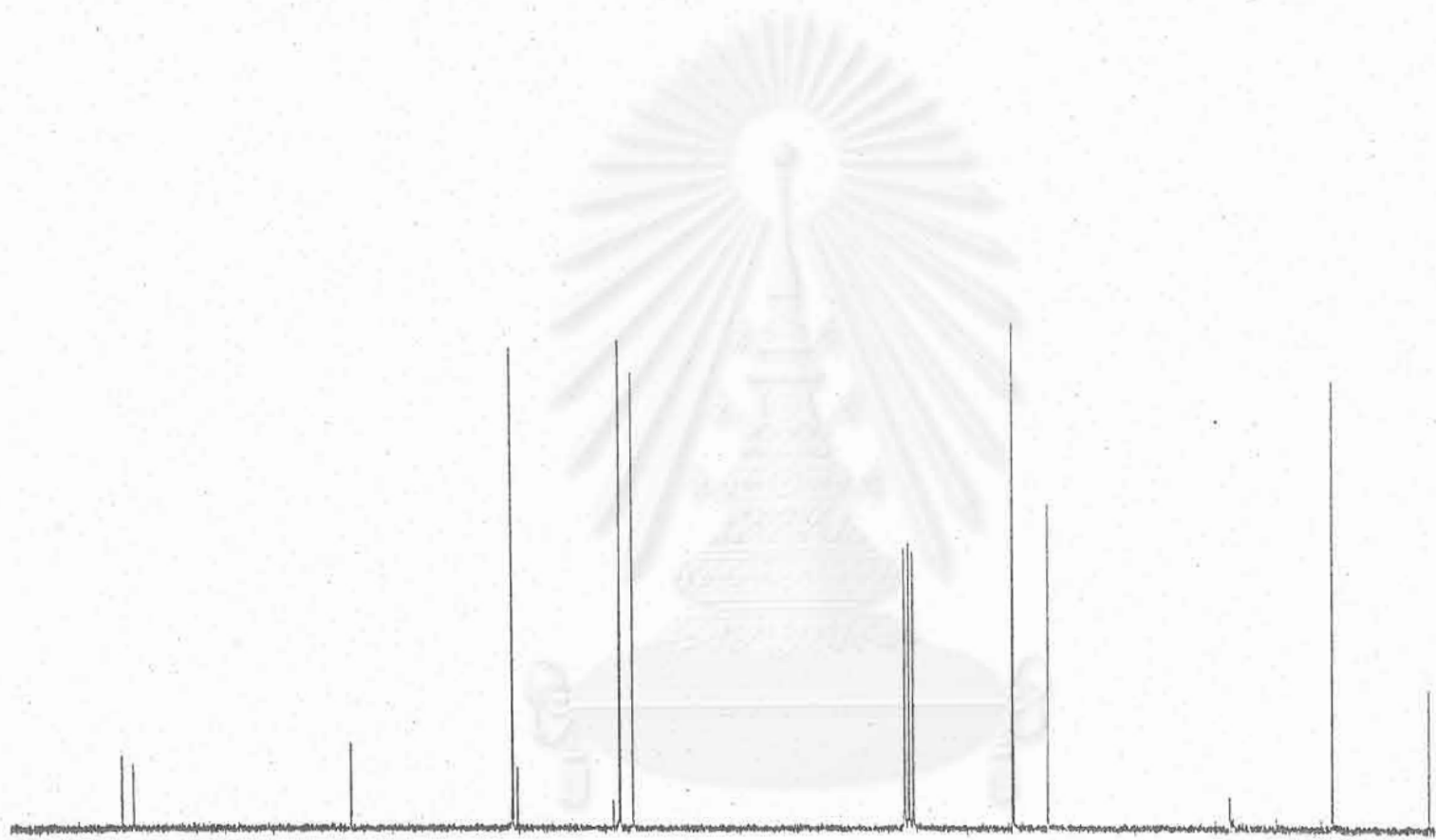


รูปที่ 14  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร 6

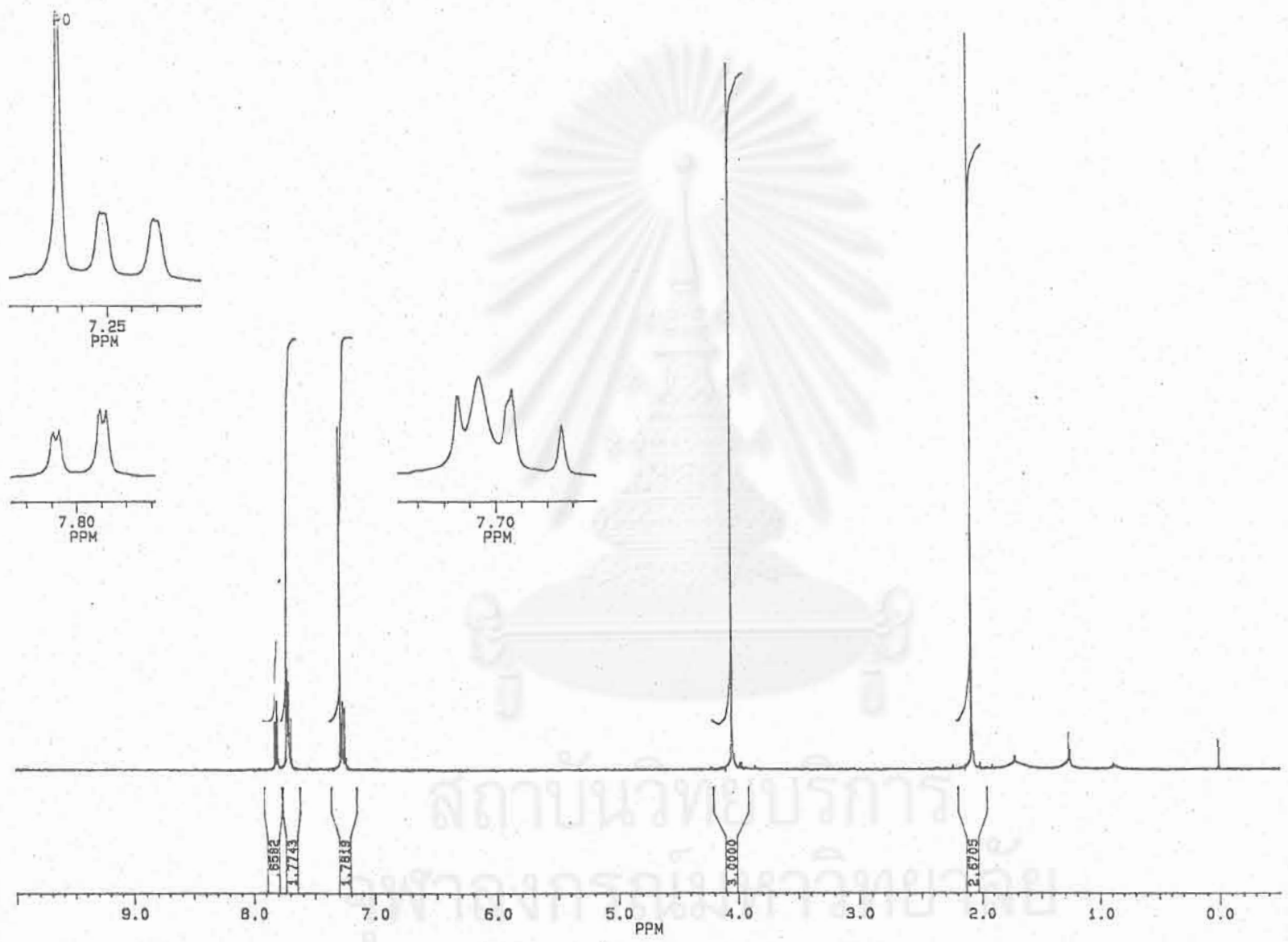
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



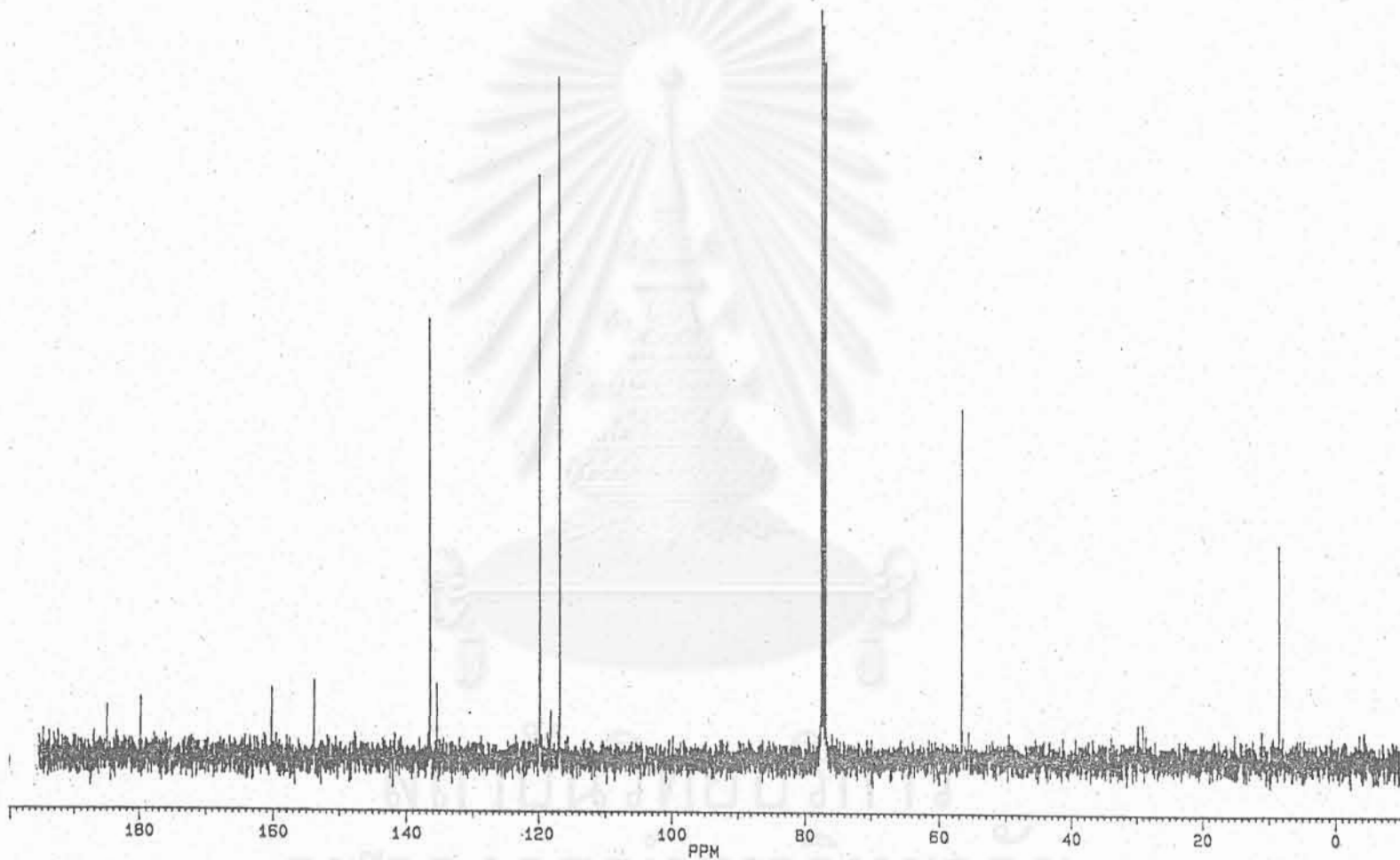
รูปที่ 15  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร 7



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
รูปที่ 16  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร 7

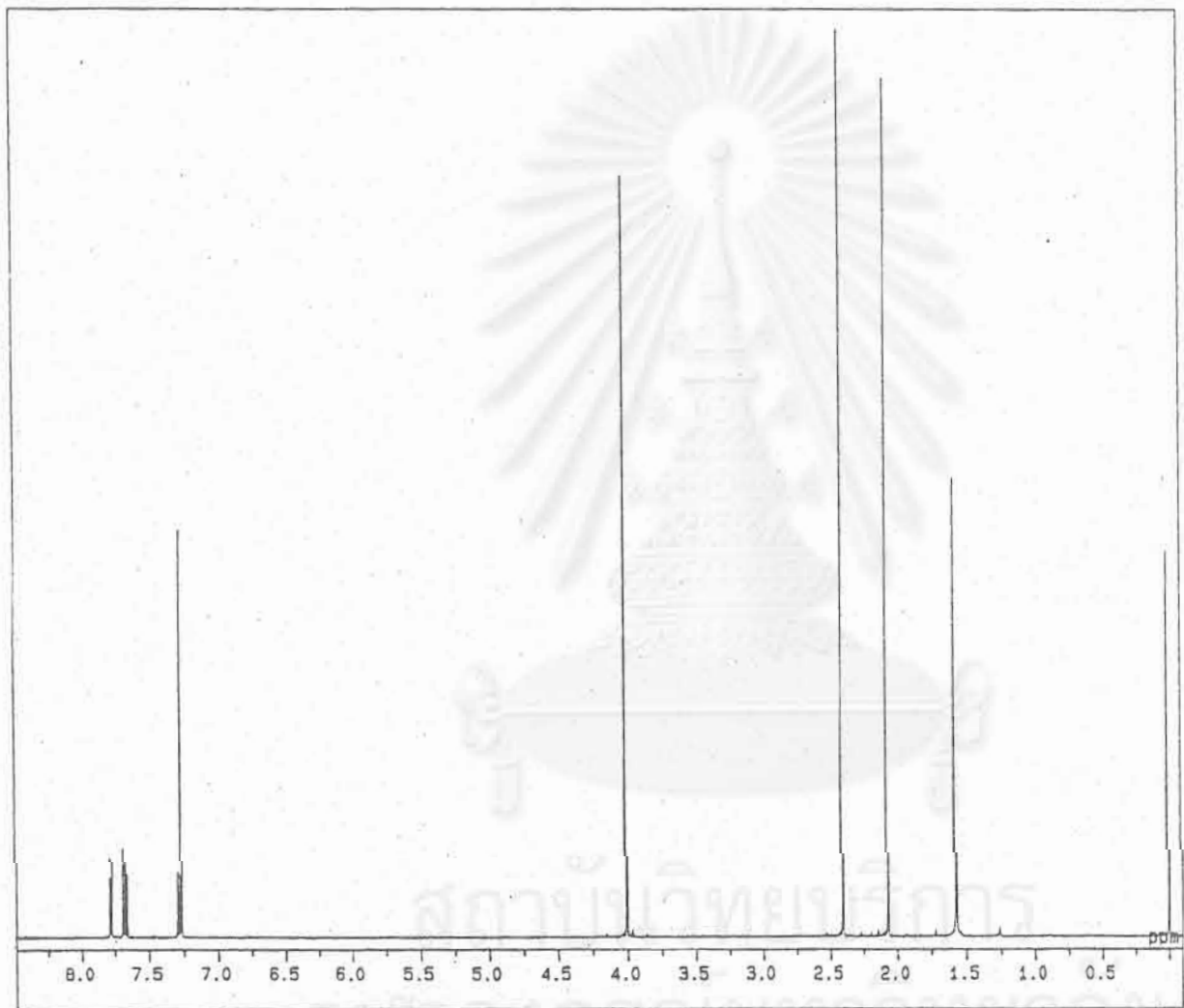


รูปที่ 17  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร 8

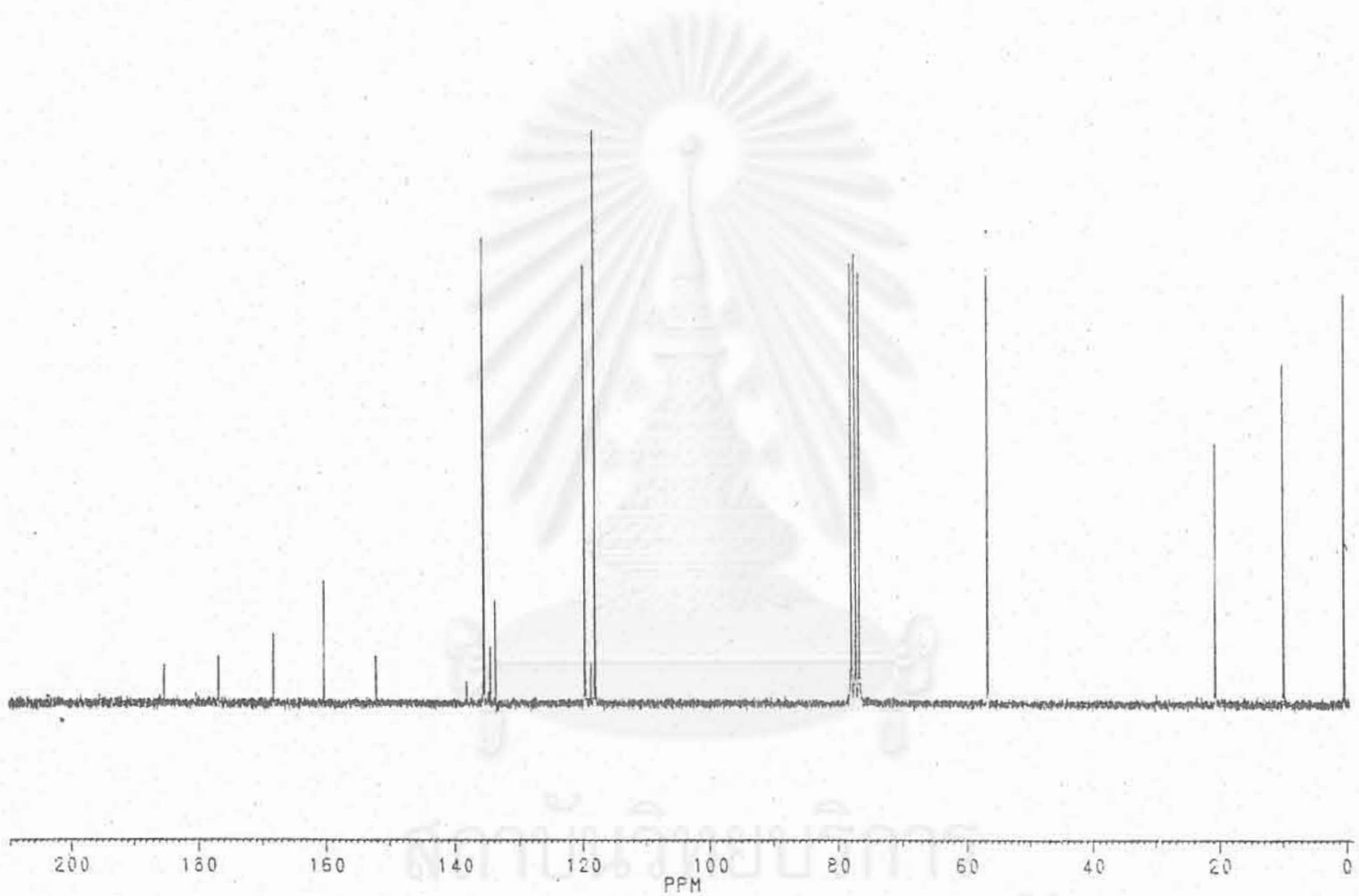


รูปที่ 18

$^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร 8

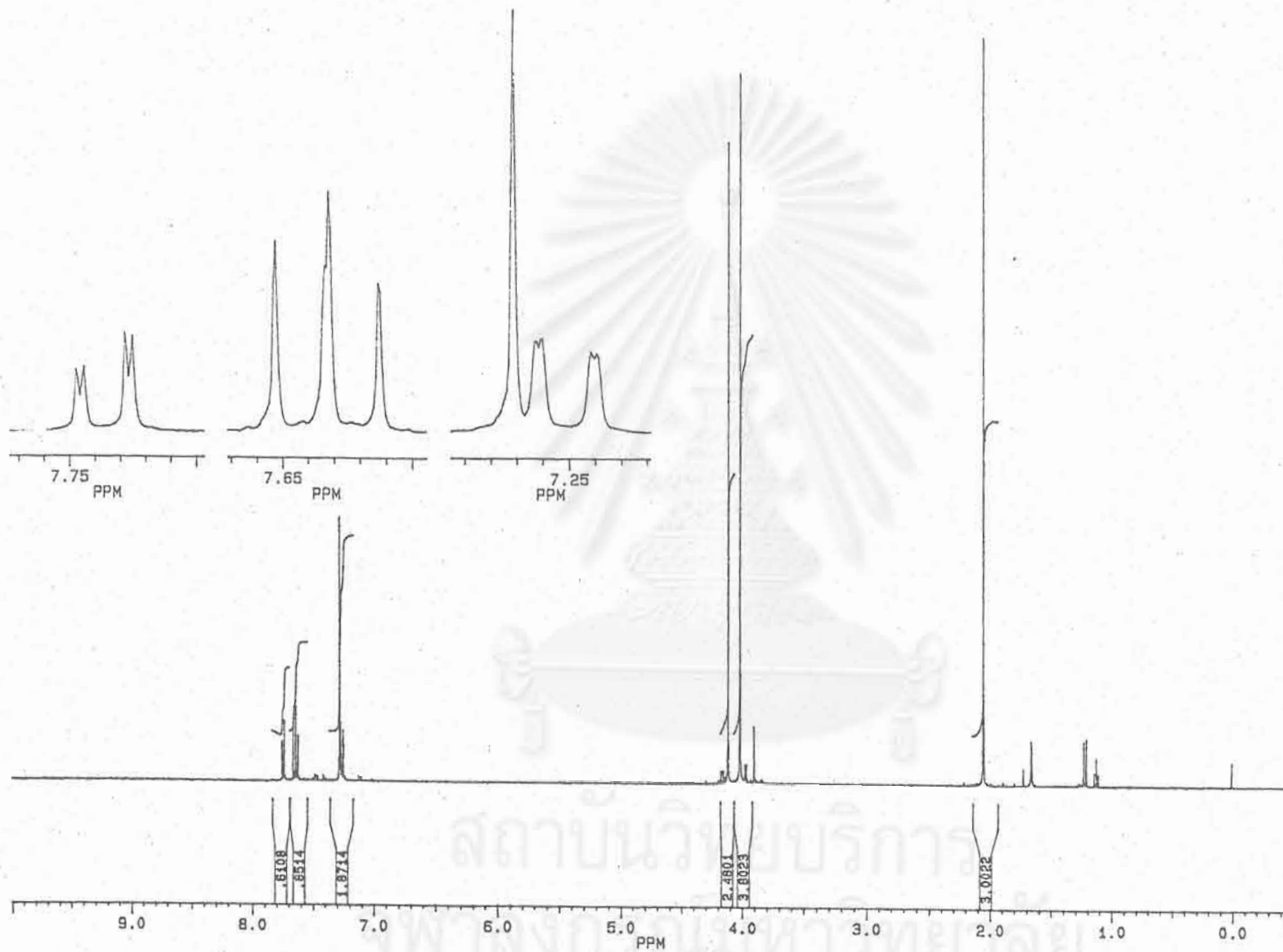


รูปที่ 19  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร 9

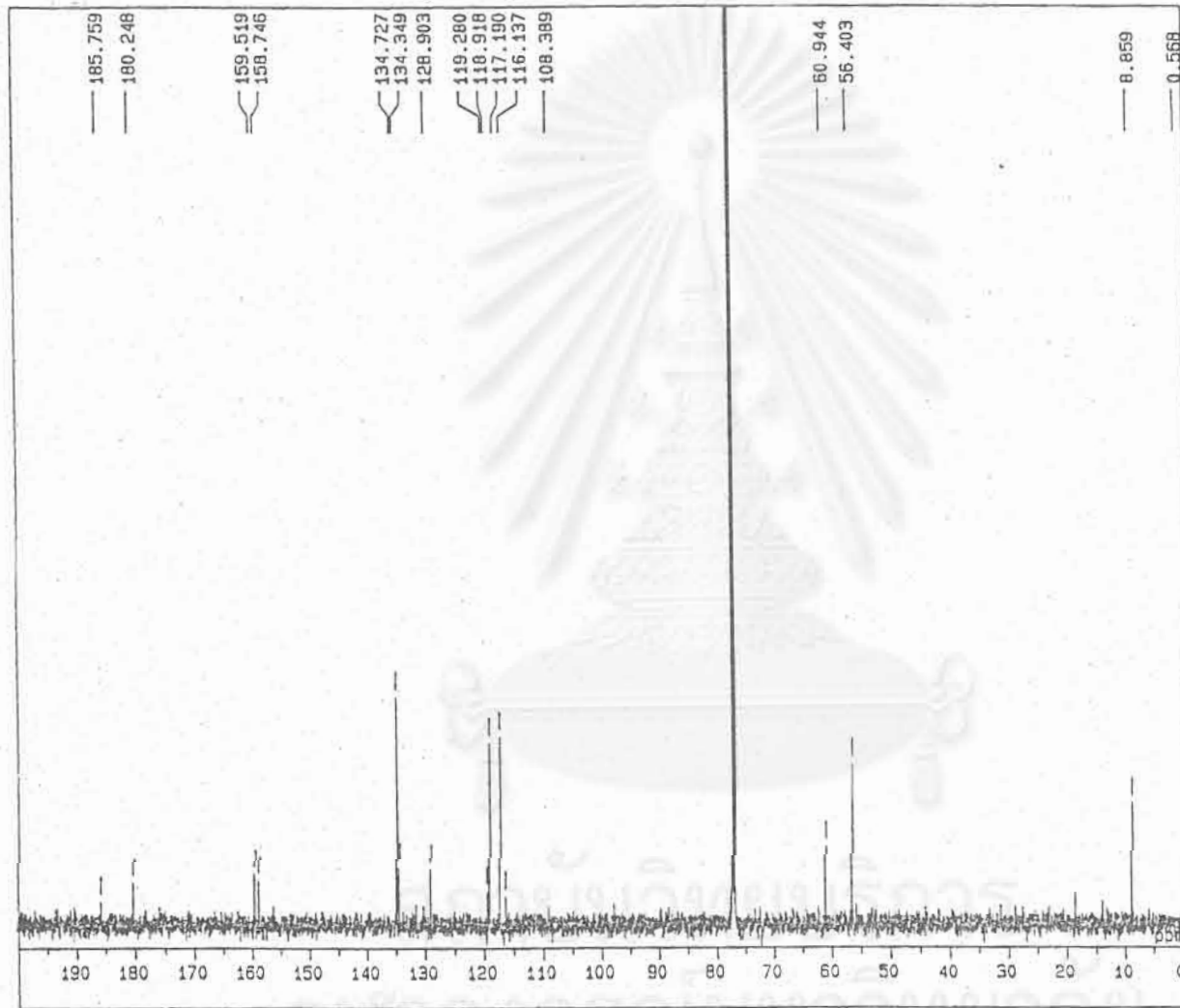


รูปที่ 20  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร 9

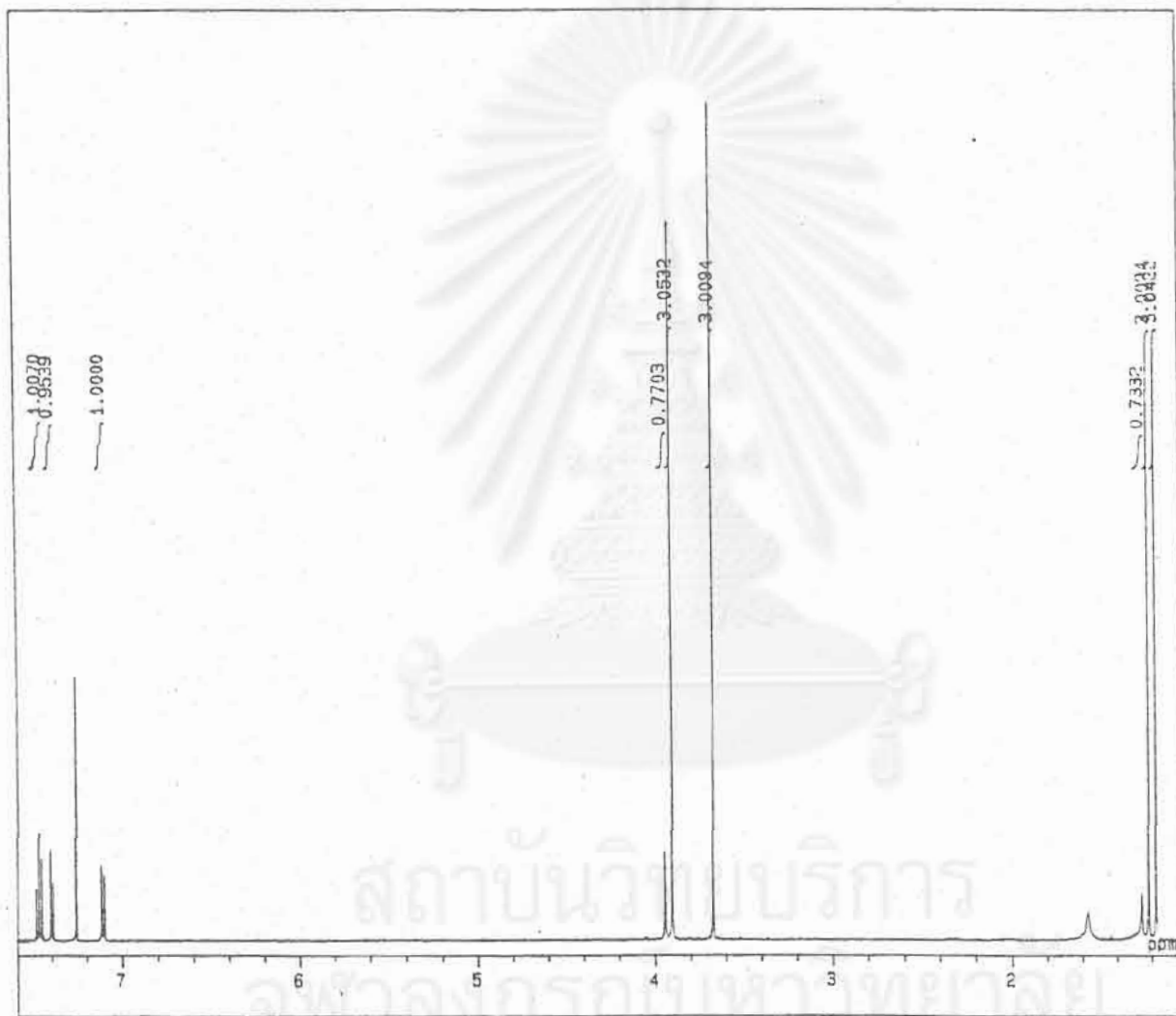




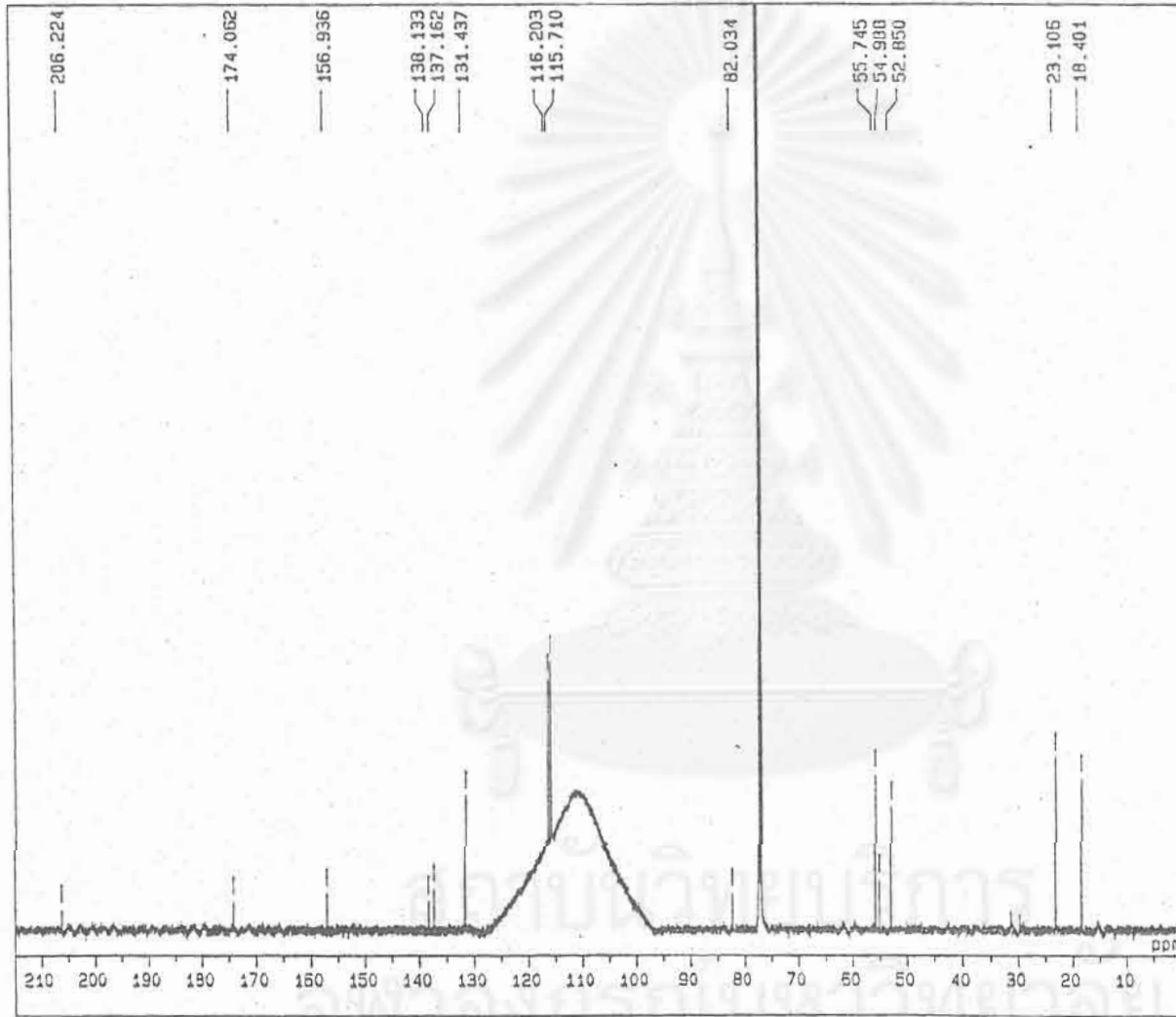
รูปที่ 21  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร 10



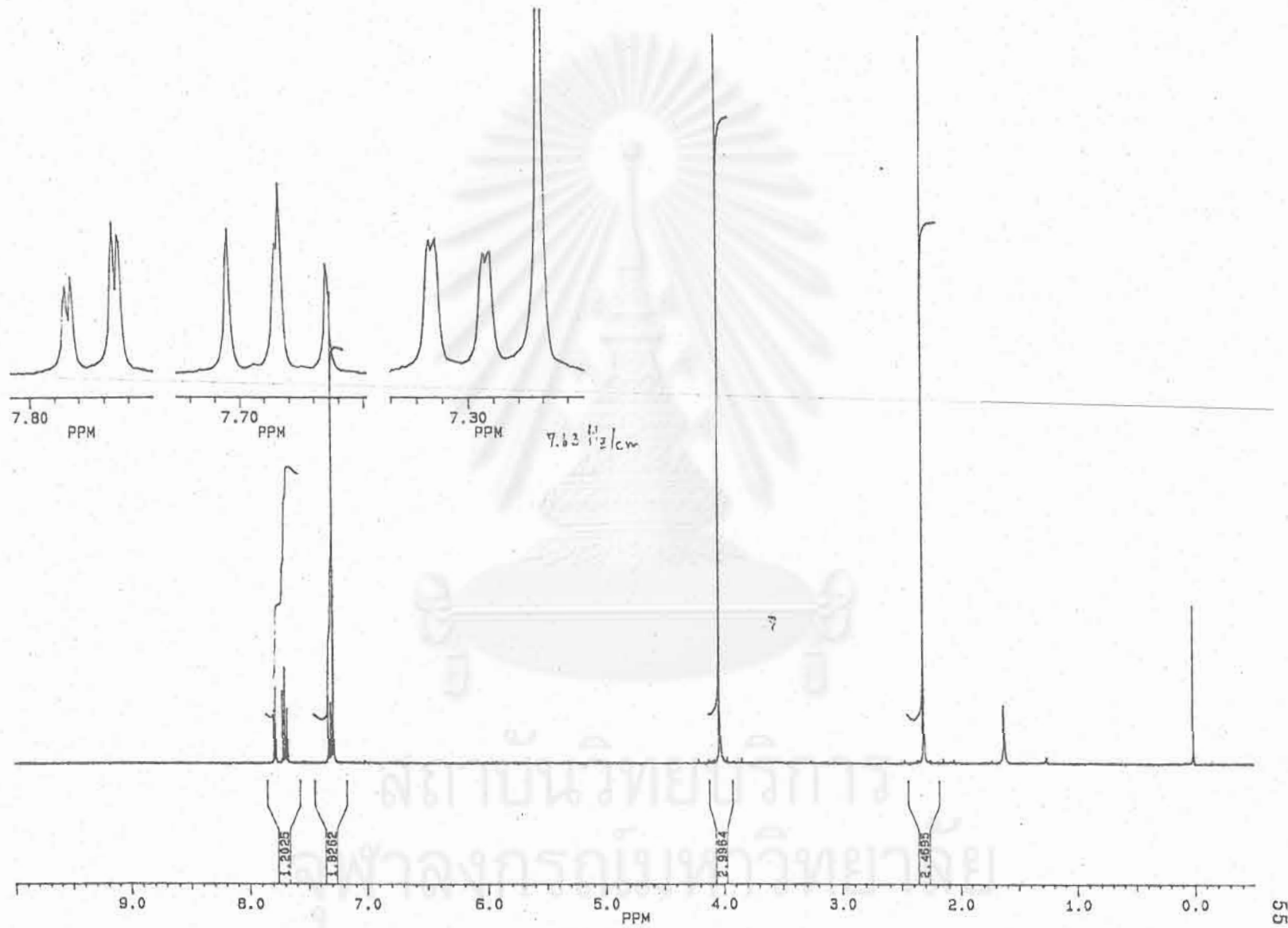
รูปที่ 22  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร 10



รูปที่ 23  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร 11

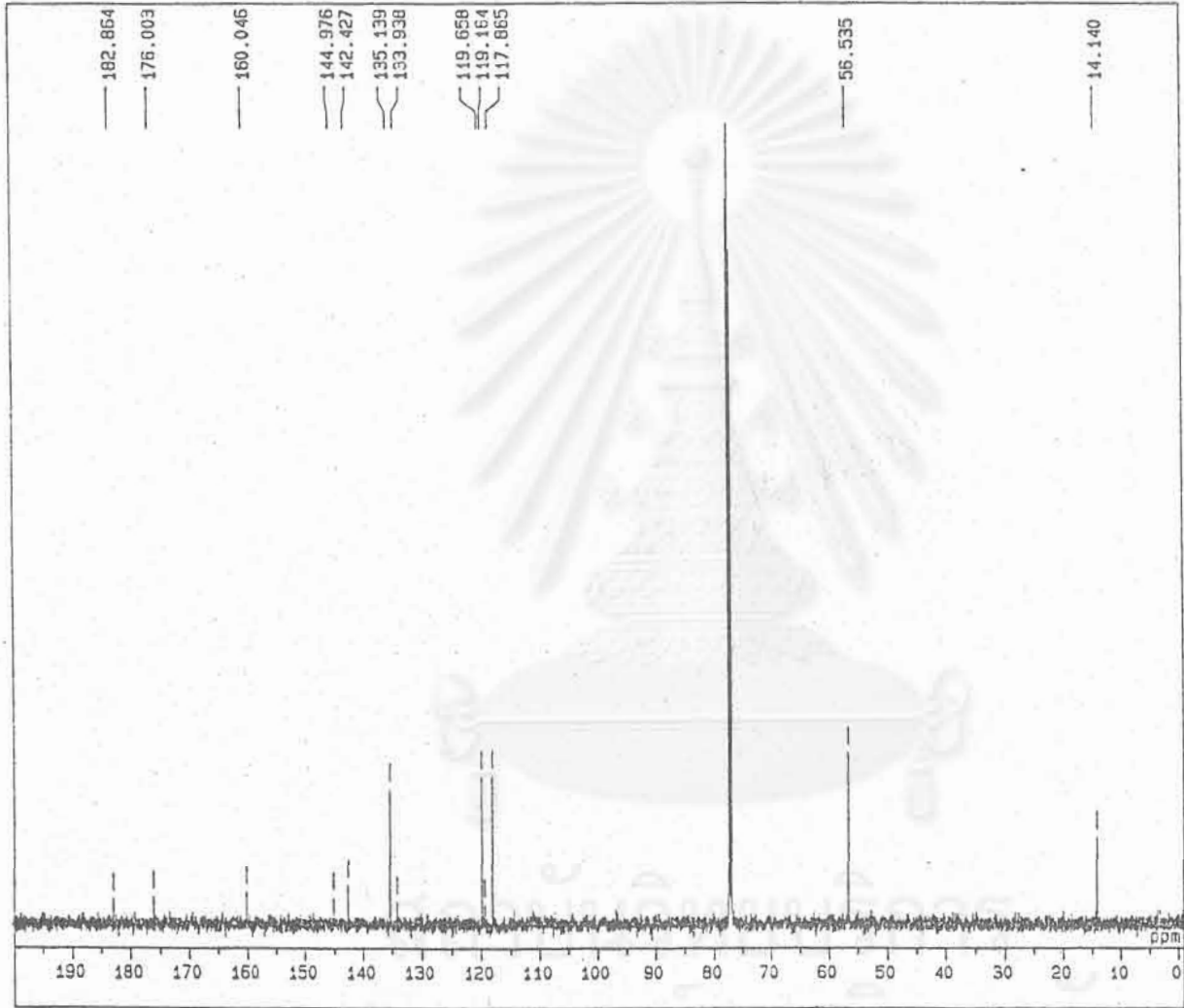


รูปที่ 24  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร 11



รูปที่ 26

$^{13}\text{C}$  NMR spectrum ของสาร 12



รูปที่ 25  $^1\text{H}$  NMR spectrum ของสาร 12