

## รายงานฉบับสมบูรณ์

การค้นหายาจากพืชสมุนไพรไทยวงศ์ Rutaceae ที่มี

ศักยภาพต้านมะเร็งหรือจุลชีพ ปีที่ 3

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัตน์ ละภูเขียว  
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร. วงศ์ พะโคดี

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ดร. สุวรรณมา เดชาทัย

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร. ตาโรจน์ จินประชา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ดร. รัชฎวดี ฤทธิวิกรม

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2556

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่สนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์เครื่องมือในการวิจัย รวมทั้งสนับสนุนเงินทุนวิจัยตลอดโครงการวิจัย (งบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2556) ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่บันทึกข้อมูล HRMS

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัตน์ ละภูเขียว

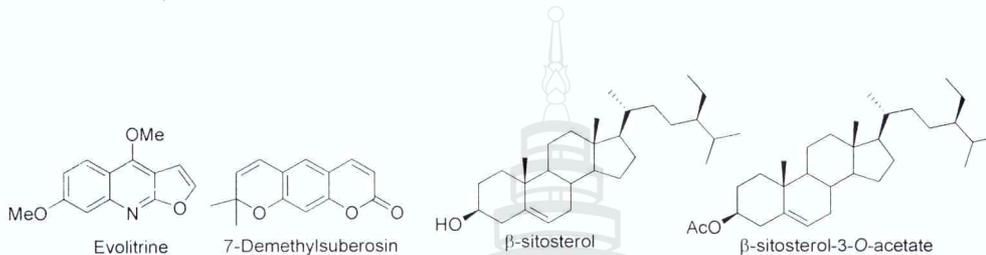
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2556



## บทคัดย่อ

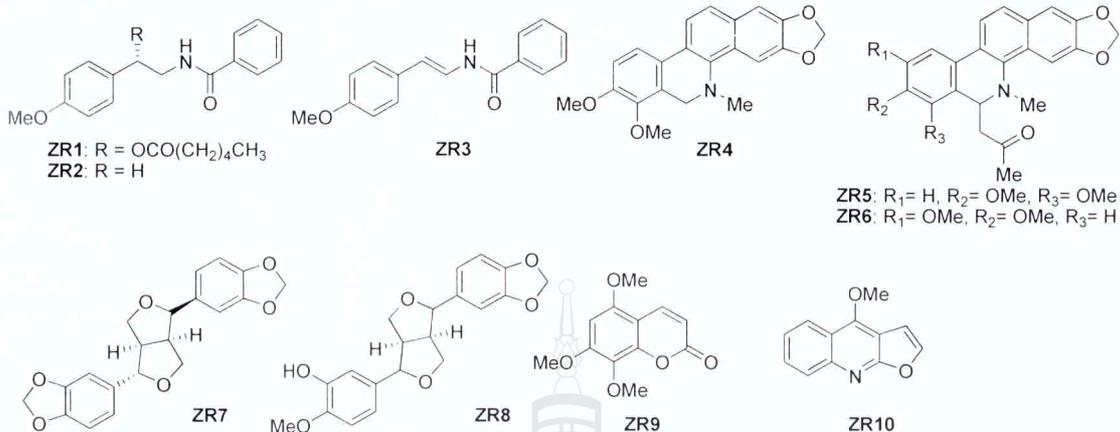
จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของต้นเพ็ญกระถิงและเครื่องเห่า สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีได้ 4 ชนิดคือสารประกอบควิโนลีน แอลคาลอยด์ ไพราโนคูมาริน  $\beta$ -sitosterol และ  $\beta$ -sitosterol-3-O-acetate



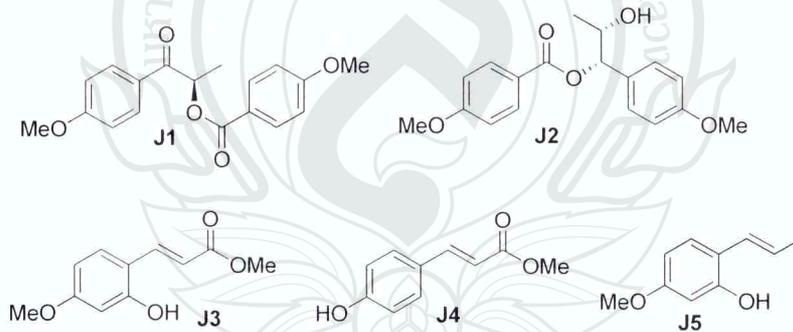
ในการสกัดต้นเครื่องเห่าได้ส่วนสกัดในปริมาณน้อยและเมื่อตรวจสอบโครมาโทแกรมพบว่า มีลักษณะที่ไม่น่าแปลกใจคือโครมาโทแกรมไม่แสดงหรือแสดงลักษณะของสารประกอบประเภทแอลคาลอยด์ในระดับต่ำ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำส่วนสกัดหยาบมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่า ไม่สามารถแยกสารประกอบทางเคมีได้จึงหยุดทำการศึกษาในส่วนนี้

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนรากและเปลือกลำต้นมะเขว่น สามารถแยกสารประกอบได้ทั้งหมด 10 สาร เป็นสารประกอบเอไมด์ใหม่ 1 สารคือ 2S-(+)-zanthorhetsamide (ZR1) และสารที่มีการรายงานแล้ว 9 สารคือ (N-(4-methoxyphenethyl)benzamide (ZR2), alatamide (ZR3), dihydrochelerythrine (ZR4), 6-acetyldihydrochelerythrine (ZR5), 8-acetyldihydrochelitidine (ZR6), asarinin (ZR7), horsfieldine (ZR8), 5,7,8-trimethoxycoumarin (ZR9) and dictamine (ZR10)

สารประกอบที่แยกได้ทุกชนิดจากต้นมะเขว่น (ยกเว้นสารประกอบ ZR6) ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกสองสายพันธุ์คือ *Staphylococcus aureus* และ MRSA SK1 และแบคทีเรียแกรมลบสองสายพันธุ์คือ *Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli* สารประกอบ ZR4 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ MRSA SK1 ได้ในระดับดีโดยมีค่า MIC เป็น 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  นอกจากนี้แล้วสาร ZR4 ยังแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *E. coli* ได้ในระดับปานกลางโดยมีค่า MIC เป็น 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ในขณะที่สารที่เหลือแสดงฤทธิ์ในระดับต่ำโดยมีค่า MIC เท่ากันคือ 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  หรือไม่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ



จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนผลจันทร์หอม สามารถแยกสารประกอบได้ทั้งหมด 5 สาร เป็นสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์ใหม่ 1 สารคือ harmandianone (**J1**) และสารที่มีการรายงานแล้ว 4 สารคือ verimol B (**J2**), (*E*)-3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)propanoate (**J3**), (*E*)-methyl-*p*-coumarate (**J4**) และ (*E*)-5-methoxy-2-(prop-1-enyl)phenol (**J5**) สารประกอบทุกตัวที่แยกได้จากผลจันทร์หอมยกเว้นสารประกอบ **J2** ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์คือ MRSA SK1, *S. aureus* TISTR 1466, *E. coli* TISTR 780 และ *S. typhimurium* TISTR 292 จากการทดลองพบว่าสารประกอบทุกตัวแสดงฤทธิ์ได้ในระดับต่ำโดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 64–128 µg/mL



## บทสรุปผู้บริหาร

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีบทบาทสำคัญในการศึกษาเพื่อค้นคว้าหายามารักษาโรคหรือการประยุกต์ใช้ในด้านอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นการค้นหาคู่ประกอบทางเคมีจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาเพื่อให้เกิดการค้นพบตัวยาหรือสารประกอบใหม่ๆ ในอนาคต

แพทย์แผนโบราณมีการใช้พันธุ์ไม้หลายชนิดเป็นสมุนไพรในการรักษาโรค ซึ่งบางชนิดก็จะมีผลข้างเคียงหรือมีพิษหากรับประทานเข้าไปในปริมาณมากๆ เนื่องจากมีการรับประทานทั้งส่วน เช่น มีการนำทั้ง กิ่ง หรือ ราก ของพันธุ์ไม้มาต้มแล้วนำน้ำที่ได้จากการต้มมาดื่มซึ่งจะทำให้ร่างกายได้รับทั้งสารที่มีคุณและโทษในขณะเดียวกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาอย่างเป็นระบบเพื่อแยกและหาคู่ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบนั้นๆ อย่างจำเพาะเจาะจง เพื่อให้ได้ข้อมูลของสารที่ออกฤทธิ์และสามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างถูกต้อง จึงจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์วิจัยองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืช 4 ชนิดคือเพี้ยกระโทก เครื่องูเห่า มะแขว่น และ จันทน์หอม และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารประกอบที่แยกได้ส่วนใหญ่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์คือ *Staphylococcus aureus*, MRSA SK1, *Salmonellae typhimurium* และ *Escherichia coli* ในระดับต่ำหรือไม่แสดงฤทธิ์ยกเว้นสารประกอบ dihydrochelerythrine (ZR4) แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสายพันธุ์ MRSA SK1 ในระดับดีโดยมีค่า MIC = 8 µg/mL ในด้านเคมีพบสารที่มีโครงสร้างที่น่าสนใจหลายสารและมีสองสารคือ harmandianone (J1) ซึ่งแยกได้จากผลจันทน์หอม และ 2S-(+)-zanthorhetsamide (ZR1) แยกได้จากต้นมะแขว่น เป็นสารประกอบใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน นอกจากนี้แล้วยังพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของผลจันทน์หอมที่แยกได้ทั้งหมดเป็นสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์และมีความแตกต่างจากส่วนกิ่งซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มของคาร์บาโซลแอลคาร์ลอยด์

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทคัดย่อ	(2)
บทสรุปผู้บริหาร	(4)
สารบัญ	(6)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	9
บทที่ 4 ผลการวิจัย	12
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	22
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	26



# บทที่ 1 บทนำ

## 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่นำไปสู่การค้นคว้าวิจัย

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติคือสารอินทรีย์ที่ได้จากพืชหรือสัตว์ โดยสารเคมีดังกล่าวอาจมีคุณสมบัติเป็นยา อาหาร น้ำหอม หรือสีย้อม โดยทั่วไปนักเคมีส่วนใหญ่มีความสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ และในปัจจุบันความสนใจของนักเคมีได้มีการขยายวงกว้างออกไปในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของจุลชีพ และสิ่งมีชีวิตได้ทะเล รวมไปถึงการใช้จุลชีพในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมี ดังนั้นการค้นหาลำดับองค์ประกอบทางเคมีจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาเพื่อให้เกิดการค้นพบตัวยาหรือสารประกอบใหม่ๆ ในอนาคต

ยาสำคัญหลายชนิดใช้สารที่ได้จากพืชเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ ดังนั้นจึงมีการวิจัยเพื่อพยายามหาลำดับองค์ประกอบสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคหรือเพื่อสังเคราะห์สารอนุพันธ์ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาวิจัยและทดสอบสารที่ได้จากตัวอย่างพืชจำนวนมากหลายชนิดและจากหลายๆ ส่วนของพืชจึงจะค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามการสกัดสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นเพียงการเริ่มต้นในกระบวนการศึกษาเพื่อที่จะค้นพบสารสำคัญใหม่ๆ แต่ขั้นตอนที่สำคัญคือการหาเอกลักษณ์หรือโครงสร้างทางเคมีของสารและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนั้นๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปทางด้านการสังเคราะห์ เกล็ดสังเคราะห์ และการแพทย์

งานวิจัยด้านการค้นหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติเป็นการทำงานวิจัยที่อาศัยความร่วมมือกับนักวิทยาศาสตร์หลากหลายสาขาซึ่งได้แก่ นักพฤกษศาสตร์ (เป็นผู้จำแนกชนิดของพรรณไม้) นักเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (สกัด แยกสารให้บริสุทธิ์ วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี) นักวิทยาศาสตร์สาขาเภสัชวิทยา ชีววิทยา สรีรวิทยา จุลชีววิทยา และ แพทย์ (ศึกษาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ) และ นักเคมีอินทรีย์สังเคราะห์

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสกัดและแยกองค์ประกอบทางเคมีจากพืชกระทิง เครื่องเห่า มะแขว่น และ จันทน์หอม ให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์โครงสร้าง
2. ทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและต้านจุลชีพ ของส่วนสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์
3. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและโครงสร้างทางเคมี

## 1.3 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

1. แยกองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัดหยาบแอซิโตนของพืชกระทิง เครื่องเห่า มะแขว่น และ จันทน์หอม

2. วิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีซึ่งได้แก่ UV IR NMR และ MS

3. ทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และ/หรือ ต้านจุลชีพขององค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากพืช กระเทียม เครื่องูเห่า มะเขว่น และ จันทน์หอม

#### 1.4 นิยามศัพท์

ไม่มี

#### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. เผยแพร่ข้อมูลด้านสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและ/หรือ ต้านจุลชีพ
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชวงศ์ส้ม เพื่อพัฒนาไปสู่ตัวยาในอนาคต
3. ตีพิมพ์ผลงานในระดับนานาชาติ หรือจดสิทธิบัตร



## บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

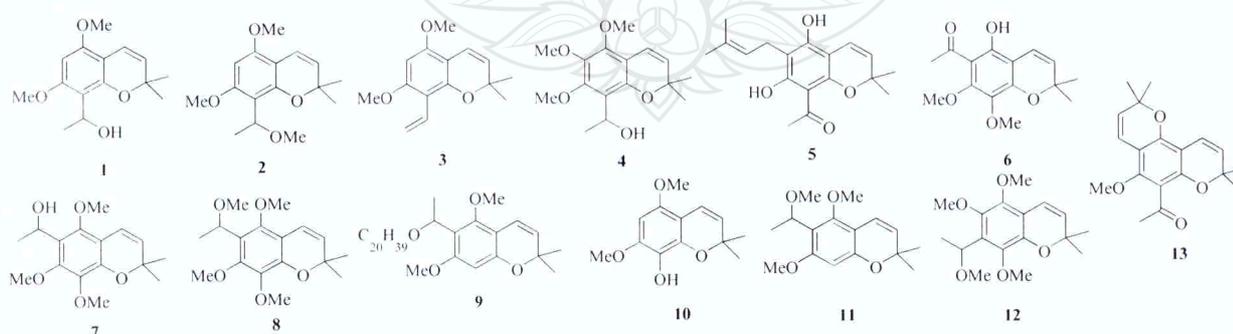
### 2.1 ทฤษฎี ตัวแบบ แนวคิด เหตุผล หรือสมมุติฐาน

คูมารินและแอลคาร์ลอยด์ เป็นสารสำคัญหลักที่พบมากในพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) จากการสืบค้นบทความทางวิชาการพบว่าสารประกอบคูมารินและแอลคาร์ลอยด์ ที่แยกได้จากพืชในวงศ์นี้ แสดงฤทธิ์ต้านมาลาเรีย เซลล์มะเร็ง HIV–reverse transcriptase และจุลชีพอย่างมีนัยสำคัญ เพี้ยกระโทง เครื่องเห่า มะแขว่น และจันทน์หอมเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ส้ม ซึ่งพบได้ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้คาดว่าจะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าสารที่พบในชนิดอื่นๆของวงศ์นี้ และสามารถนำสารออกฤทธิ์นั้นไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางด้านต่างๆเช่น ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง หรือยาสมุนไพรเป็นต้น

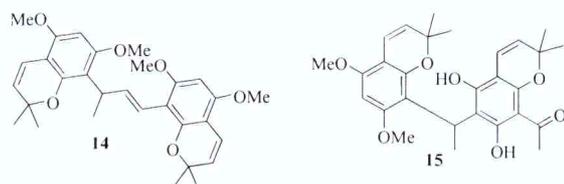
### 2.2 สรุปสาระสำคัญจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เพี้ยกระโทง (*Melicope pteleifolia*) เป็นไม้พุ่มหรือไม้ต้นขนาดเล็ก ใบประกอบแบบนิ้วมือ มี 3 ใบย่อย เรียงตรงข้าม ดอกมีลักษณะเป็นช่อ ประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมาก กลีบดอกสีขาว ออกที่ง่ามใบ ผลรูปกลม สีดำเมื่อแก่แตก ใบและยอดอ่อน นำมารับประทานกับลาบ ชาวไทใหญ่นำดอก มาลวกและทานกับน้ำพริก นอกจากนั้นใบสด ยังสามารถแก้ตุ่มคัน และป้องกันยุงกัดได้อีกด้วย สำหรับกะเหรี่ยงในจังหวัดแม่ฮ่องสอน นำใบมาขยำไฟอ่อนแล้วขยี้เป็นแผ่นเล็กๆ หรือใส่ทั้งใบลงในแกง เพื่อเพิ่มรสขม หรือลวกทานกับน้ำพริก ชนเผ่ากะเหรี่ยงในจังหวัดเชียงใหม่นำยอดอ่อนและดอกมารับประทานสดหรือนำไปผึ่งแดดให้แห้ง แล้วใช้เป็นผักจิ้มน้ำพริก ในส่วนรากราก เป็นยารักษาโรคริดสีดวง หัว ต้มกิน ทำให้หมดลูกของผู้หญิงเข้าอยู่

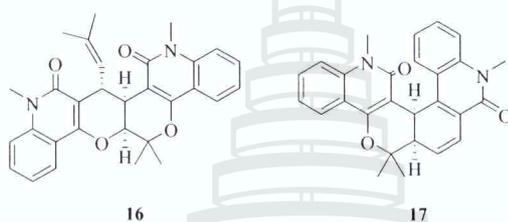
จากการสืบค้นบทความทางวิชาการพบว่ามีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเพี้ยกระโทงมาบ้างแล้วโดยในปี 1997 Kamperdick และคณะได้รายงานองค์ประกอบทางเคมีชนิดใหม่ประเภท benzopyran จากส่วนใบ จำนวน 13 สาร (1–14)



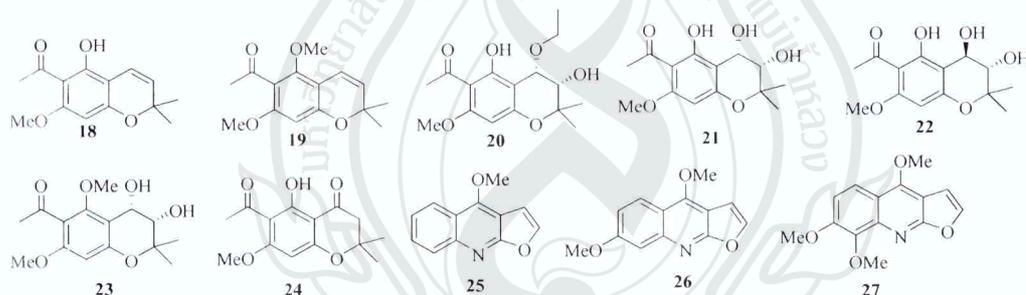
ในปี 1998 Van และคณะได้รายงานสารประกอบไดเมอร์ benzopyran ใหม่ 2 สาร (14 และ 15) จากส่วนใบ



ในปี 1999 Kamperdick และคณะ รายงานสารประกอบ bisquinolinone ใหม่ 2 สาร (16 และ 17) จากส่วนใบ



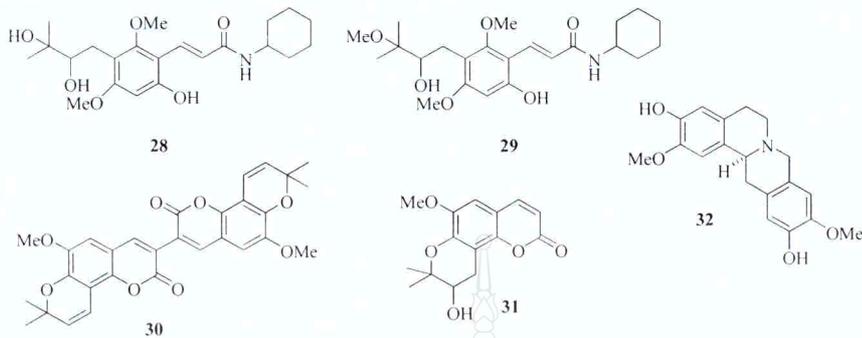
ในปี 2011 Li และคณะ รายงานองค์ประกอบทางเคมี benzopyran (18-24) และ furoquinoline (25-27) จากส่วนลำต้น



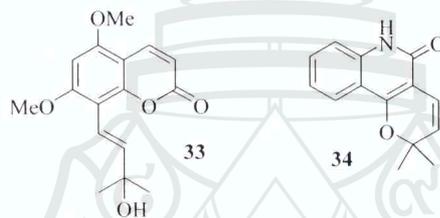
**เครื่องห้า** (*Toddalia asiatica*) เป็นไม้เถาเนื้อแข็งเลื้อยพันไม้อื่น เถาอ่อนมีหนามแหลมคม เมื่อเถาแก่หนามจะกลายเป็นปุ่ม เปลือกเถาสีน้ำตาล เนื้อไม้สีเหลือง ใบเป็นใบประกอบ ใบย่อยสามใบ รูปขอบขนานแกมไข่ ผิวใบมีจุดน้ำมันกระจายอยู่ทั่วไป ดอกออกเป็นช่อกระจุกที่ปลายกิ่ง สีเหลืองแกมเขียว ผลกลม สีเขียว เมื่อสุกสีเหลือง มีกลิ่นคล้ายพริกไทย ใช้แต่งกลิ่นอาหาร ใบ ยอดอ่อน และผล ใช้เป็นผักรับประทานกับข้าวหรือขนมจีน

จากการสืบค้นเอกสารทางวิชาการพบว่ามีการศึกษาขององค์ประกอบทางเคมีจากต้นเครื่องห้าน้อยมาก โดยในปี 1997 Tsai และคณะได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากต้นเครื่องห้าและรายงานสารใหม่

amide 2 สาร (28 และ 29) และ coumarin 1 สาร (30) และได้รายงานสารใหม่ coumarin 1 สาร (31) และกลุ่ม alkaloid 1 สาร (32) ในปี 1998

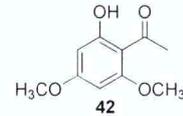
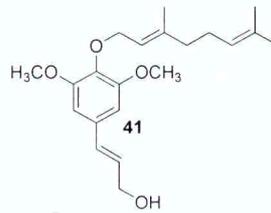
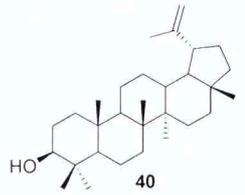
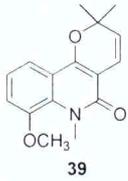
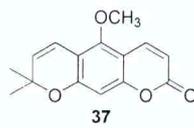
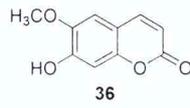
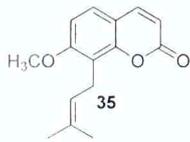


ในปี 2000 Oketch-Rabah และคณะพบสารใหม่ coumarin 1 สาร (33) จากรากเครื่องเทศ และจากการศึกษาส่วนใบของเครื่องเทศในปี 2009 Duraiyadiyan และ Ignaciuthu ได้รายงานสารประกอบ 1 สาร (34) ที่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา

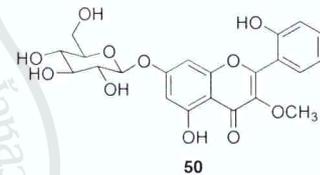
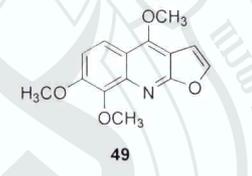
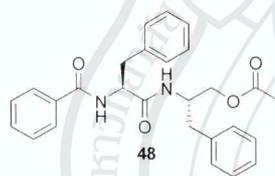
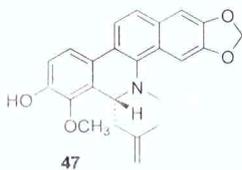
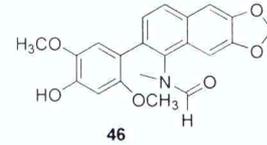
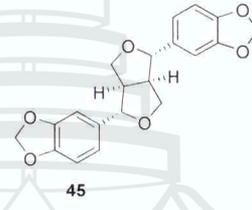
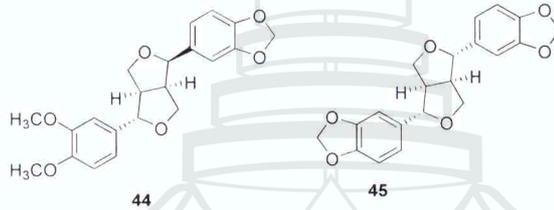
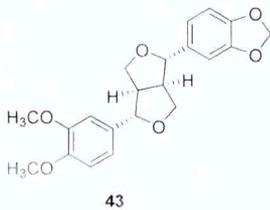


มะแขว่น หรือ กำจัดต้น (*Zanthoxylum rhetsa*) เป็นไม้ไม่ผลัดใบ สูง 35 เมตร เรือนยอดโปร่ง แผ่กว้าง ลำต้นยาวและตรง เปลือกต้นสีเทาอ่อน มีหนามอันแข็งยาว 1.2-2.5 เซนติเมตร ฐานรูปกรวย เปลือกชั้นนอกบาง เปลือกชั้นในสีครีมอ่อน ใบ 15-63 เซนติเมตร แบบขนนกชั้นเดียว เรียงแบบสลับ ใบย่อย 5-14 คู่ ขนาดใบย่อย 7-18 × 2.5-6 เซนติเมตร ใบย่อยที่ปลายใหญ่ที่สุด ฐานใบไม่สมมาตร ขอบใบเรียบ ใบแก่เกลี้ยง มักจะมีแต้มสีแดงตามขอบใบและก้านใบ เมื่อขยี้จะมีกลิ่นหอมฉุน เส้นใบข้าง 8-15 คู่ จรดกันที่ขอบใบ ก้านใบร่วม 3-13 เซนติเมตร พองออกที่ข้อและมีหนาม ดอกสีเขียวอ่อน มักแยกเพศ ช่อดอกยาว 8-20 เซนติเมตร ออกที่ปลายกิ่งก้าน กลีบเลี้ยงและกลีบดอกชั้นละ 4-5 กลีบ ดอกตัวเมีย ขนาดเล็กกว่า ปลายก้านเกสรตัวเมียอยู่ด้านข้าง เกสรตัวผู้ 4-5 อัน มีหมอนรองดอกสีเหลืองอ่อน ผลกลม 0.6-0.9 เซนติเมตร เป็นช่อกว้าง มีถึง 100 ผล ผิวเป็นจุดๆ คล้ายลูกกอล์ฟ แตกได้เป็น 2-5 ส่วน แต่ละส่วนมีเมล็ดสีดำ 1 เมล็ด ผลอ่อนสีเขียวอ่อน มีต่อมสีเข้ม เมื่อสุกสีชมพูหรือแดง มีเนื้อบาง กลิ่นคล้ายน้ำมะนาว

จากการสืบค้นข้อมูลทางวิชาการพบที่มีการรายงานบทความทางวิชาการมาบ้างแล้ว ตัวอย่างองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากต้นมะแขว่นแสดงดังนี้

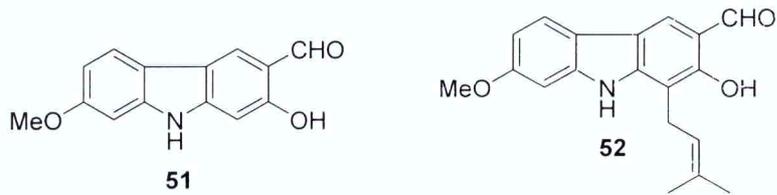


จากการตรวจสอบบทความทางวิชาการของพืชสกุล *Zanthoxylum* พบว่าได้มีการรายงานองค์ประกอบทางเคมีหลายกลุ่ม ยกตัวอย่างเช่น

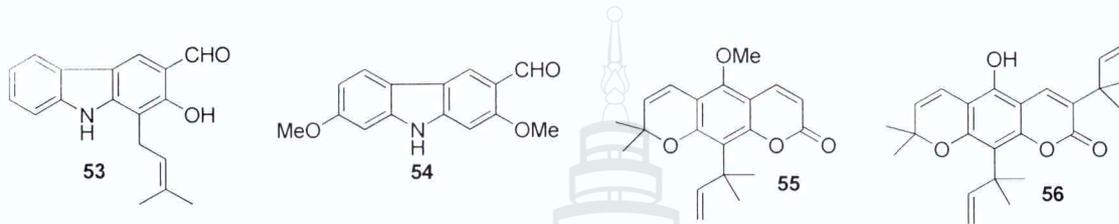


จันทน์หอม (*Clausena harmandiana*) เป็นไม้พุ่มลำต้นสีเขียวอมน้ำตาลเข้ม ไม่มีขน ใบประกอบ มีลักษณะขนนกปลายคี่ เรียงสลับ ใบรวมมีใบย่อย 3-7 ใบ ใบสีเขียวเข้ม ผิวใบมัน มีจุดน้ำมันกระจาย และจุดโปร่งใส สามารถส่องทะลุไปอีกด้านได้ ขอบใบมีรอยหยักแบบฟันเลื่อยห่าง ช่อดอกแบบแยกแขนง เกิดที่ปลายยอด ดอกเดี่ยวสีเหลืองอมเขียวอ่อน ๆ อับเรณูสีเหลือง ผลเป็นรูปกลมรี ผลอ่อนสีเขียว ผลแก่เป็นสีชมพูอมขาว จากการสืบค้นวารสารทางวิชาการพบว่ามีมีการรายงานองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่ม coumarins และ alkaloids จาก *C. harmandiana* ดังนี้

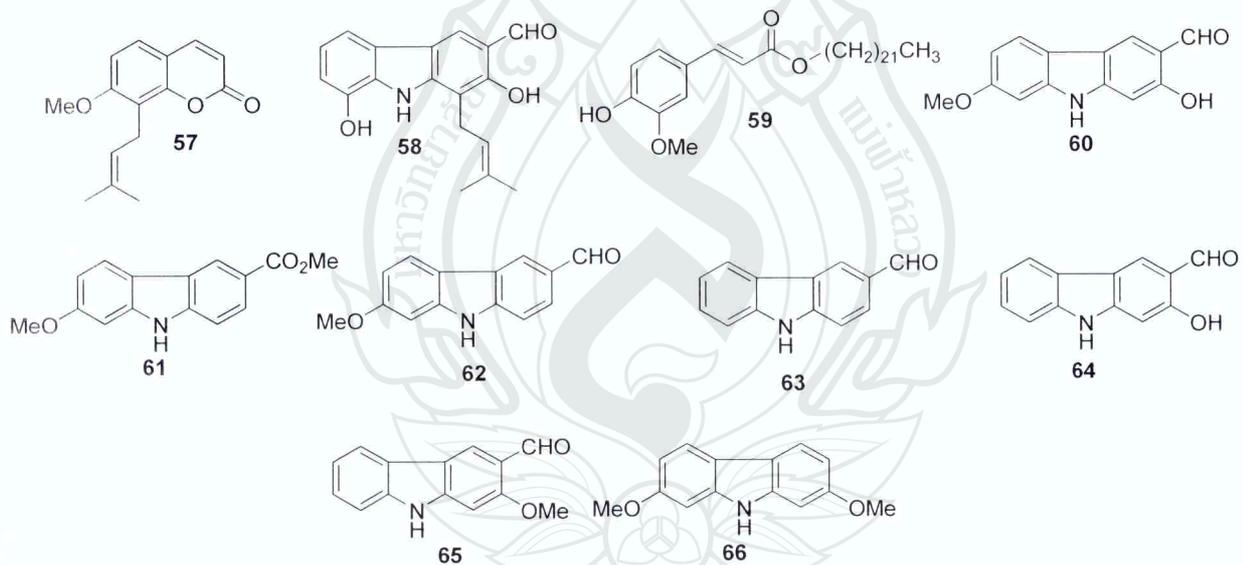
ในปี ค.ศ. 1988 Chaichantipyuth และคณะ ได้รายงานผลทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง ของสารประกอบ carbazole alkaloid



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



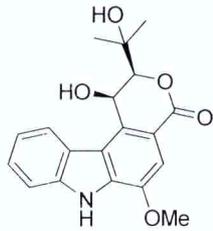
ในปี ค.ศ. 2010 Thongthoom และคณะ สามารถแยกสารประกอบ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง



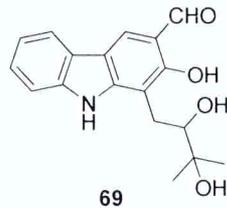
ในปี 2013 Maneerat และคณะสามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนกิ่ง ได้ทั้งหมด 16 สาร เป็นสารประกอบคาร์บาโซลอัลคาลอยด์ใหม่ 3 สาร (67-69) และสารที่มีการรายงานแล้ว 13 สาร



67



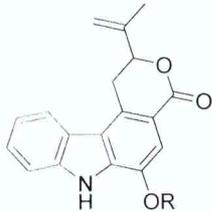
68



69



70

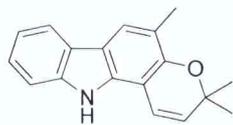


71. R = H

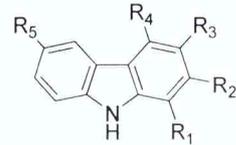
72: R = Me



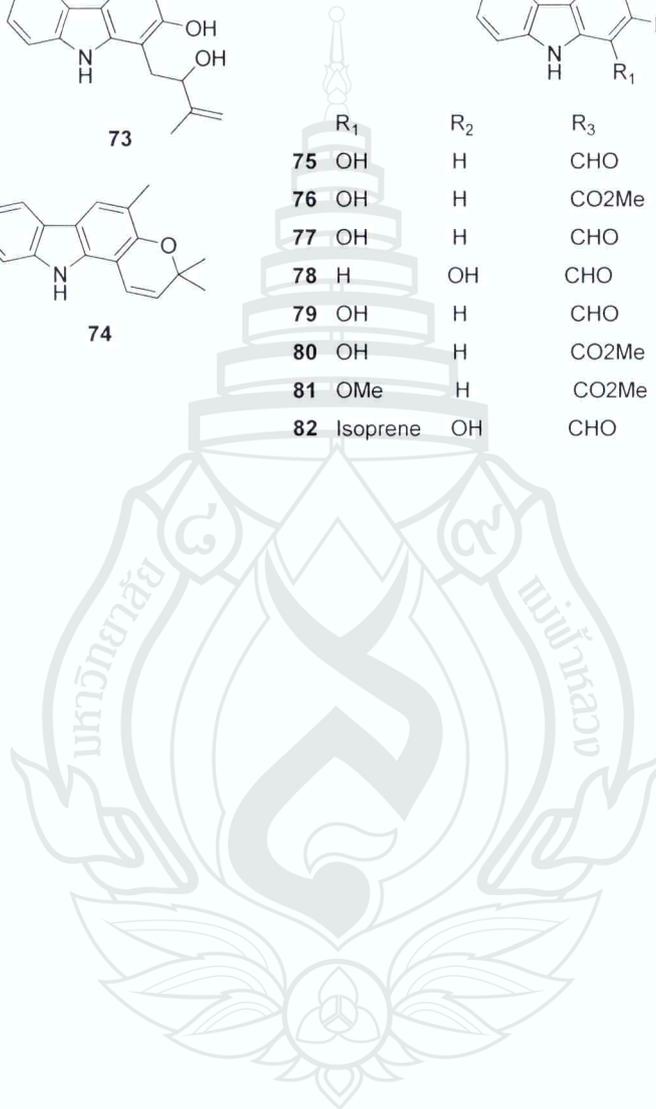
73



74



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
75	OH	H	CHO	H	H
76	OH	H	CO <sub>2</sub> Me	H	H
77	OH	H	CHO	H	OH
78	H	OH	CHO	H	OH
79	OH	H	CHO	Isoprene	H
80	OH	H	CO <sub>2</sub> Me	Isoprene	H
81	OMe	H	CO <sub>2</sub> Me	Isoprene	H
82	Isoprene	OH	CHO	H	H



## บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

### วิธีการทดลอง

#### 3.1 เครื่องมือและสารเคมี

##### 3.1.1 เครื่องมือ

- Nuclear Magnetic Resonance spectrum 400 MHz Bruker
- BUCHI Rotary evaporator
- FT-IR Spectrometer
- UV SPECCORD S100

##### 3.1.2 สารเคมี

- |   |   |
|---|---|
| - Hexanes (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> ) | - Dichloromethane (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )          |
| - Ethyl acetate (EtOAc)                     | - Acetone (CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> )                |
| - Methanol (CH <sub>3</sub> OH)             | - Chloroform (CH <sub>3</sub> Cl)                             |
| - Dueterochloroform (CD <sub>3</sub> Cl)    | - Acetone-d <sub>6</sub> (CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> ) |
| - Silica gel 60 (Merck)                     | - Silica gel 100 (Merck)                                      |

#### 3.2. พืชตัวอย่าง

เพ็ญกระทิง เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ ปี 2554 โดย อาจารย์ James Maxwell  
เครื่องเห่า เก็บจากจังหวัดเชียงราย ปี 2554 โดย อาจารย์ Martin van de Bult  
มะแขว่น เก็บจากจังหวัดเชียงราย ปี 2554 โดย ผศ. ดร. สุรัตน์ ละภูเขียว ได้รับการระบุชนิดจาก  
อาจารย์ James Maxwell

ผลจันทร์หอม เก็บจากจังหวัดเชียงราย ปี 2554 โดย ผศ. ดร. สุรัตน์ ละภูเขียว ได้รับการระบุ  
ชนิดจาก อาจารย์ James Maxwell

#### 3.3. การสกัดและการแยกสาร

การสกัดและการแยกสารให้บริสุทธิ์จากลำต้นเพ็ญกระทิง

นำลำต้นเพ็ญกระทิง ที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งลมให้แห้ง สกัดด้วย EtOAc 2 ครั้ง ๆ ละ 3 วัน จากนั้น  
นำส่วนที่ได้จากการสกัดด้วย EtOAc มาระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้ส่วนสกัดหยาบ  
EtOAc (36.82 g) นำส่วนสกัดหยาบ EtOAc ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ใช้ซิลิกา  
เจล เป็นตัวดูดซับ โดยมี hexanes และ EtOAc เป็นตัวชะในลักษณะเพิ่มขั้วขึ้นตามลำดับ ได้ 14 ส่วนย่อย  
(1A-1N)

ส่วนย่อย 1D (353.21 mg) นำไปแยกต่อด้วย Sephadex LH-20 ชะด้วย 100% MeOH ได้ β-  
stigmasterol (100 mg)

ส่วนย่อย 1M (228.32 mg) นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 5% acetone-hexanes ได้  $\beta$ -stigmasterol-3-O-acetate (18.2 mg)

ส่วนย่อย 1E (2.12 g) นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 100% hexanes-100% EtOAc ได้ สาร volitrine (25.9 mg) และ 7-demethylsuberosin (5.7 mg)

### การสกัดและการแยกสารให้บริสุทธิ์จากลำต้นมะเขวน

นำรากและเปลือกลำต้นมะเขวนตากแห้ง ที่บดพอแตก (6.65 Kg) มาสกัดด้วย acetone 2 ครั้งๆ ละ 3 วัน จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายออก ได้ส่วนสกัดหยาบ acetone (140 g) แล้วนำส่วนสกัดหยาบดังกล่าวไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ใช้ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ ใช้ hexanes และ acetone เป็นตัวชะในลักษณะเพิ่มขั้วขึ้นตามลำดับได้ 14 ส่วน (2A - 2N)

ส่วนย่อย 2D (9.2 g) นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วย hexanes และ EtOAc ได้ 8 ส่วนย่อย (DA-DH) นำส่วนย่อย DC (1.6 g) นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วย 5% EtOAc-hexanes ได้สารบริสุทธิ์ (ZR4 (6.2 mg)

ส่วนย่อย 2G (19.3 g) และ H (15.5 g) นำมารวมกันและแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ใช้ซิลิกาเจล ชะด้วย hexanes และ EtOAc ได้สารบริสุทธิ์ ZR7 (400.5 mg) และ ZR10 (29.4 mg)

ส่วนย่อย 2J (7.05 g) นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ชะด้วย hexanes และ EtOAc ได้ 20 ส่วนย่อย (JA-JT) นำส่วนย่อย JM (912.7 mg) ไปแยกต่อด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้ง ชะด้วย 30%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -hexanes ได้ 4 ส่วนย่อย (JM1-JM4) จากนั้นนำส่วนย่อย JM3 (274.8 mg) มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้ง ชะด้วย 30% EtOAc-hexanes ได้สารบริสุทธิ์ ZR2 (39.5 mg) และ ZR3 (3.0 mg)

ส่วนย่อย JO (520.2 mg) นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 20% acetone-hexanes ได้ 6 ส่วนย่อย (JO1-JO6) สารบริสุทธิ์ ZR9 (2.2 mg) แยกได้จากส่วนย่อย JO2 (215.4 mg) ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 10% EtOAc-hexanes

ส่วนย่อย JS (363.0 mg) นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ชะด้วย hexanes และ EtOAc ได้สารบริสุทธิ์ 5 (4.2 mg), 8 (52.0 mg) และ ZR10 ส่วนย่อย (JS1-JS10)

ส่วนย่อย JS3 (146.9 mg) นำไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และชะด้วย 5%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -hexanes ได้สารบริสุทธิ์ 6 (15.1 mg)

นำส่วนย่อย 2N (1.11 g) มาทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีและชะด้วย 40% hexanes- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ได้ 5 ส่วนย่อย (NA-NE) สารบริสุทธิ์ ZR1 (6.2 mg) แยกได้จากส่วนย่อย NA (35.0 mg) ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และชะด้วย 20% acetone-hexanes

### การสกัดและการแยกสารให้บริสุทธิ์จากผลจันทน์หอม

นำผลสดจันทน์หอม ที่บดพอละเอียด (2.04 Kg) มาสกัดด้วย acetone 2 ครั้งๆ ละ 3 วัน จากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้มาทำการระเหยแห้ง ได้ส่วนสกัดหยาบ JHF (181.5 g) นำส่วนสกัดหยาบดังกล่าวมาทำการแยกด้วยกระบวนการทางโครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และชะแบบเพิ่มขั้นขึ้นตามลำดับระหว่าง hexanes และ EtOAc ได้ส่วนย่อยทั้งหมด 6 ส่วน (A-F)

นำส่วนย่อย B (537.9 mg) มาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 30%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -hexanes ได้สารบริสุทธิ์ 5 (4.2 g)

นำส่วน D (1.45 g) ไปแยกด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ และแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 25% EtOAc-hexanes ได้สารบริสุทธิ์ 1 (2.2 mg)

ส่วนย่อย E (7.05 g) นำไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว และชะด้วย 10% EtOAc-hexanes ถึง 100% EtOAc แบบเพิ่มขั้นขึ้นตามลำดับ ได้ส่วนย่อยอีก 4 ส่วน (E1-E4) จากนั้นนำส่วนย่อย E2 (176.5 mg) มาทำการแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 30% EtOAc-hexanes ได้ส่วนสกัดอีก 4 ส่วน (E2a-E2d) นำส่วนสกัด E2b (128.6 mg) และ E2c (9.7 mg) มาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ 3 (30.9 mg) และ 4 (2.0 mg) ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 2% acetone-hexanes และ Sephadex LH-20 ชะโดย 100% MeOH ตามลำดับ

ส่วนย่อย E3 (1.37 g) นำไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ชะด้วย 20% EtOAc-hexanes ถึง 100% EtOAc แบบเพิ่มขั้นขึ้นตามลำดับ และแยกต่อด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ 100% MeOH เป็นตัวชะ ตามลำดับ ได้สารบริสุทธิ์ 2 (1.1 mg)

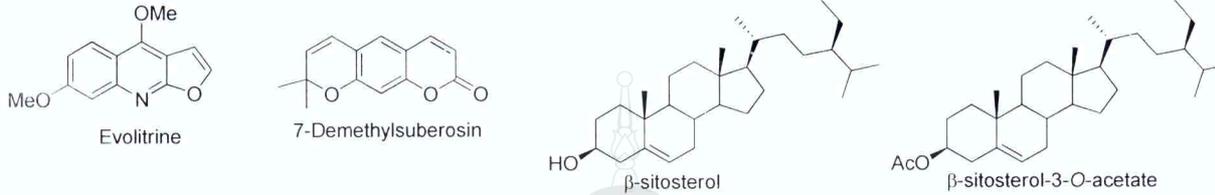
#### 3.4. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

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  $\mu\text{L}$  ลงในไมโครเพลทตั้งแต่หลุมที่ 1-15 และปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  ที่หลุมที่ 16 ดูดยาด้านจุลชีพ (vancomycin หรือ gentamycin) ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  ลงในไมโครเพลทหลุมที่ 1 ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายจากหลุมที่ 1 ไปใส่หลุมที่ 2 ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ (two fold dilution) จนถึงหลุมที่ 14 ดูดทั้ง 50  $\mu\text{L}$  จากนั้นดูดสารละลายเชื้อที่ต้องการทดสอบปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  ใส่ลงในหลุมที่ 1-15 โดยหลุมที่ 15 จะเป็น positive control และหลุมที่ 16 เป็น negative control จากนั้นเติม inoculum ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.18% resazurin ปริมาตร 10  $\mu\text{L}$  แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 2-3 ชั่วโมง อ่านผลหลุมที่เชื้อไม่เจริญจะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าจะไม่มีการเจริญของเชื้อ ส่วนหลุมที่ไม่เปลี่ยนแปลงสี (สีม่วงคงเดิม) แสดงว่ามีการเจริญของเชื้อ จากนั้นบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยังยั้งเชื้อได้ เป็นค่า MIC

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1. ผลการวิจัยตามวัตถุประสงค์

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีของต้นเพี้ยกระทั่งสามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานแล้วจำนวน 4 สาร โดยโครงสร้างของสารประกอบเหล่านี้วิเคราะห์โดยอาศัยข้อมูล  $^1\text{H NMR}$  สเปกโทรสโกปี



Volitrine เป็นสารประกอบควิโนลีนแอลคาร์ลอยด์ โดยแสดง สัญญาณ  $^1\text{H NMR}$  ของหมู่ OMe 2 หมู่ที่  $\delta$  3.91 (3H, s) และ 4.40 (3H, s) สัญญาณของวงแหวนฟิวแรน  $\delta$  7.55 (1H, d, 2.0 Hz) และ 7.03 (1H, d, 2.0 Hz) และสัญญาณแอรอแมติกแบบ ABX 1 ชุดสัญญาณที่  $\delta$  8.14 (1H, d, 8 Hz), 7.31 (1H, d, 2.0 Hz) และ 7.07 (1H, dd, 8, 2.0 Hz) โดยมีโครงสร้างและ  $^1\text{H NMR}$  ดังแสดง

Volitrine เป็นสารประกอบไพราโนคูมาริน โดยแสดง สัญญาณ  $^1\text{H NMR}$  วงแหวนโครมีนดังนี้  $\delta$  6.37 (1H, d, 12.0 Hz), 5.71 (1H, d, 12.0 Hz) และหมู่ Me 2 หมู่ที่ 1.49 (6H, s) สัญญาณของ  $\alpha, \beta$ -unsaturated lactone ที่  $\delta$  6.25 (1H, d, 12.0 Hz) และ 7.60 (1H, d, 12.0 Hz) และสัญญาณแอรอแมติกที่มีการคู่ควบแบบพารา 2 สัญญาณคือ  $\delta$  7.01 (1H, s) และ 6.57 (1H, s) โดยมีโครงสร้างและ  $^1\text{H NMR}$  ดังแสดง

$\beta$ -sitosterol เป็นสเตียรอยด์พื้นฐานที่พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด โดยมีสัญญาณ  $^1\text{H NMR}$  ที่สำคัญดังนี้ ที่  $\delta$  5.70 (1H, s), 3.69 (1H, m), 1.10–2.60 (กลุ่มสัญญาณของ CH และ  $\text{CH}_2$ ) และ 0.70–0.95 (กลุ่มสัญญาณของ  $\text{CH}_3$ )

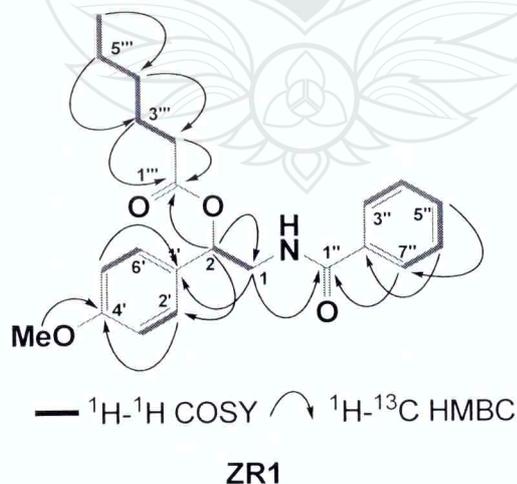
$\beta$ -sitosterol-3-O-acetate เป็นสเตียรอยด์พื้นฐานเช่นเดียวกัน โดยมีสัญญาณ  $^1\text{H NMR}$  ที่สำคัญดังนี้ ที่  $\delta$  5.39 (1H, s), 4.42 (1H, m), 2.23 (2H, m), 2.03 (3H, s), 1.10–2.10 (กลุ่มสัญญาณของ CH และ  $\text{CH}_2$ ) และ 0.70–1.10 (กลุ่มสัญญาณของ  $\text{CH}_3$ )

ในการสกัดต้นเครื่องเห่าได้ส่วนสกัดในปริมาณน้อยและเมื่อตรวจสอบโครมาโทแกรมพบว่ามีลักษณะที่ไม่น่าสนใจและเมื่อนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีไม่สามารถแยกสารประกอบทางเคมีได้ จึงหยุดทำการศึกษาในส่วนนี้

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนรากและเปลือกลำต้นมะแขว่น สามารถแยกสารประกอบได้ทั้งหมด 10 สาร เป็นสารประกอบเอไมด์ใหม่ 1 สาร (ZR1) และสารที่มีการรายงานแล้ว 9 สาร (ZR2–ZR10)

สารประกอบ ZR1,  $[\alpha]_D^{30} +55.7$  ( $\text{CDCl}_3$ ), แยกได้เป็นของแข็งสีขาว จากข้อมูลของ ESI-TOF-MS จะแสดง  $[\text{M}]^+$  ที่  $m/z$  369.3510 ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_4$  จากข้อมูลของ UV จะแสดงแถบดูดกลืนที่  $\lambda_{\text{max}}$  228, 274, and 281 nm ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมเลกุลนี้มีระบบคอนจูเกต

ข้อมูล IR แสดงหมู่ฟังก์ชันของหมู่คาร์บอนิล ที่ 1740 (ester) และ 1648 (amide)  $\text{cm}^{-1}$  สำหรับข้อมูลของ  $^1\text{H}$  NMR แสดงสัญญาณของ NH ( $\delta$  6.42, br s), กลุ่มสัญญาณของวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่แทนที่เพียงหมู่เดียว [ $\delta$  7.71 (2H, br d,  $J = 7.6$  Hz, H-3'' and H-7''), 7.49 (1H, br t,  $J = 7.2$  Hz, H-5'') and 7.42 (2H, m, H-4'' and H-6'')], กลุ่มสัญญาณของวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่แทนที่สองหมู่ที่ตำแหน่งที่ 1 และ 4 [ $\delta$  7.32 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2' and H-6') and 6.90 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3' and H-5')], หมู่ OMe 1 หมู่ ( $\delta$  3.80, s, 4'-OMe), สัญญาณของ oxymethine ( $\delta$  5.95, dd,  $J = 8.0, 4.4$  Hz, H-2) และ สัญญาณของ methylene ( $\delta$  3.82, 2H, m, H-1) จากข้อมูลข้างต้นทำให้ทราบว่าสารประกอบนี้เป็นอนุพันธ์ของ tembamide acetate ที่แยกได้จากพืชสกุลพริกไทย *Piper guayranum* (Maxwell et al., 1989) นอกจากนี้แล้วสารประกอบ 1 ยังแสดงสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR ของหมู่ hexanonyl (Kanokmedhakul et al., 2007) ที่  $\delta_{\text{H}}$  2.34 (t, 7.6 Hz, H-2''')/  $\delta_{\text{C}}$  34.5 (C-2'''),  $\delta_{\text{H}}$  1.26 (m, H-3''')/  $\delta_{\text{C}}$  29.5 (C-3'''),  $\delta_{\text{H}}$  1.58 (m, H-4''')/  $\delta_{\text{C}}$  24.9 (C-4'''),  $\delta_{\text{H}}$  1.27 (m, H-5''')/  $\delta_{\text{C}}$  22.8 (C-5'''),  $\delta_{\text{H}}$  0.85 (t, 6.4 Hz, H-6''')/  $\delta_{\text{C}}$  14.1 (C-6''') และ C=O at  $\delta_{\text{C}}$  173.6 (C-1''') โดยหมู่นี้จะมาแทนที่หมู่ acetyl ของสารประกอบ tembamide acetate [ $\delta_{\text{H}}$  2.12/  $\delta_{\text{C}}$  21.5 (CH<sub>3</sub>) และ  $\delta_{\text{C}}$  172.0 (C=O)] (Maxwell et al., 1989) โดยข้อมูลเหล่านี้สามารถยืนยันได้ด้วย COSY และ HMBC สเปกตรัม โดยที่ H-2 ( $\delta$  5.95), H-2''' ( $\delta$  2.34) และ H-3''' ( $\delta$  1.58) แสดงความสัมพันธ์กับ C-1''' ( $\delta$  173.6) ใน HMBC สเปกตรัม นอกจากนี้แล้วจากข้อมูลของส่วนย่อยแมสสเปกตรัมที่  $m/z$  254.1 [ $\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2$ ]<sup>+</sup> ทำให้สามารถยืนยันหมู่ hexanonyl ได้เช่นกัน ดังนั้นสารประกอบ ZR1 คือ zanthorhetsamide (2-benzamido-1-(4-methoxyphenyl)ethylhexanoate) เมื่อนำ zanthorhetsamide มาไฮโดรลิซิสด้วย  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ได้สารประกอบ tembamide โดยมีข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR และค่าการหมุนจำเพาะ (specific rotation) ( $[\alpha]_{\text{D}}^{26} +45.2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) เหมือนกันกับ S-(+)-tembamide ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +56.9$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) (Kamal et al., 2004) ที่ได้จากการสังเคราะห์ จากข้อมูลนี้สามารถคาดคะเนได้ว่าสารประกอบ zanthorhetsamide ควรที่จะมี configuration ที่เหมือนกับ S-(+)-tembamide ซึ่งก็คือ 2S-(+)-zanthorhetsamide

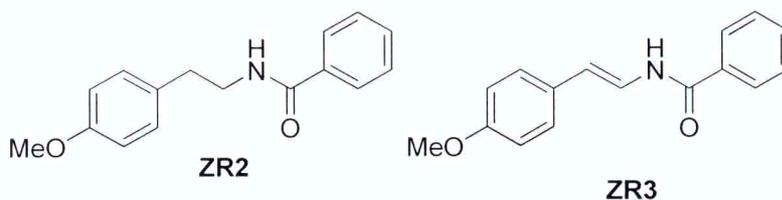


ตารางที่ 1 แสดงข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) และ  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) **ZR1**

ตำแหน่ง	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., $J$ in Hz)	ตำแหน่ง	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., $J$ in Hz)
1	45.2	3.82 (m)	5''	131.7	7.49 (br t, $J = 7.2$ )
2	74.1	5.95 (dd, $J = 8.0, 4.4$ )	6''	128.7	7.42 (m)
1'	129.8	-	7''	126.8	7.71 (br d, $J = 7.6$ )
2'	127.9	7.32 (d, $J = 8.4$ )	1'''	173.6	-
3'	114.1	6.90 (d, $J = 8.4$ )	2'''	34.5	2.34 (t, $J = 7.6$ )
4'	159.8	-	3'''	24.9	1.58 (m)
5'	114.1	6.90 (d, $J = 8.4$ )	4'''	29.5	1.26 (m)
6'	127.9	7.32 (d, $J = 8.4$ )	5'''	22.8	1.27 (m)
1''	167.5	-	6'''	14.1	0.85 (t, $J = 6.4$ )
2''	134.3	-	4'-OMe	55.4	3.80 (s)
3''	126.8	7.71 (br d, $J = 7.6$ )	NH	-	6.42 (br s)
4''	128.7	7.42 (m)			

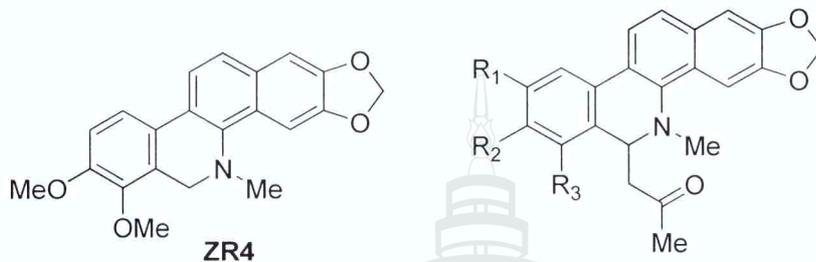
สำหรับสารประกอบตัวอื่นเป็นสารที่ได้มีการรายงานแล้วคือ (*N*-(4-methoxyphenethyl)benzamide (**ZR2**) (Vargas et al., 2010), alataamide (**ZR3**) (Maxwell et al., 1989), dihydrochelerythrine (**ZR4**) (Martin et al., 2005), 6-acetyldihydrochelerythrine (**ZR5**) (Chen et al., 2011), 8-acetyldihydronitidine (**ZR6**) (Nissanka et al., 2001), asarinin (**ZR7**) (Gunatilaka et al., 1982), horsfieldine (**ZR8**) (Gunatilaka et al., 1982), 5,7,8-trimethoxycoumarin (**ZR9**) (Cheng et al., 2005) and dictamine (**ZR10**) (Tanaka et al., 1985)

สารประกอบ **ZR2** เป็นสารประกอบเอไมด์เช่นเดียวกับสาร **ZR1** โดยสาร **ZR2** (*N*-(4-methoxyphenethyl)benzamide) (Vargas et al., 2010) เป็นของแข็งสีขาวโดยแสดงสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR ในลักษณะที่คล้ายกับสาร **ZR1** ยกเว้นที่ตำแหน่งที่ 2 ของสาร 2 เป็นสัญญาณของหมู่เมทิลีน สัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR ทั้งหมดของสาร 2 เป็นดังนี้  $\delta_H$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 7.72 (2H, br d,  $J = 7.2$  Hz, H-2'' และ H-6''), 7.49 (1H, m, H-4''), 7.41 (2H, m, H-3'' และ H-5''), 7.16 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3' และ H-5'), 6.88 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2' และ H-6'), 3.80 (3H, s, 3'-OMe), 3.70 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1), 3.67 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-1), 2.89 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-2), 2.87 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1)



สารประกอบ สาร **ZR3** (alataamide) (Maxwell and Ramperad, 1989) ของแข็งสีขาว เป็นสารประกอบเอไมด์เช่นเดียวกับสาร **ZR1** และ **ZR2** สัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR มีลักษณะคล้ายกับสาร **ZR2**

ยกเว้นที่ตำแหน่งที่ 1 และ 2 ของสาร 3 เป็นสัญญาณของโอลิฟินิคโปรตอน สัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR ทั้งหมดของสาร **ZR3** เป็นดังนี้  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 7.83 (2H, br d,  $J = 7.2$  Hz, H-2'' และ H-6''), 7.63 (1H, d,  $J = 14.8$  Hz, H-1), 7.61-7.45 (3H, m, H-3'', H-4'' และ H-5''), 7.30 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3' และ H-5'), 6.85 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2' และ H-6'), 6.22 (1H, d,  $J = 14.8$  Hz, H-2), 3.80 (3H, s, 3'-OMe)



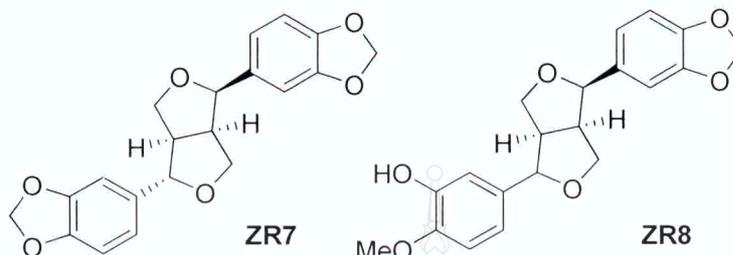
**ZR5:**  $\text{R}_1 = \text{H}$ ,  $\text{R}_2 = \text{OMe}$ ,  $\text{R}_3 = \text{OMe}$   
**ZR6:**  $\text{R}_1 = \text{OMe}$ ,  $\text{R}_2 = \text{OMe}$ ,  $\text{R}_3 = \text{H}$

สารประกอบ **ZR4** (dihydrochelerythrine) (Martin et al., 2005) เป็นของแข็งสีขาว เป็นสารประกอบในกลุ่มของพีแนนทรีดีน แอลคาร์ลอยด์ โดยมีสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR ทั้งหมดเป็นดังนี้  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 7.70 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-12), 7.67 (1H, s, H-1), 7.51 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-11), 7.48 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-9), 7.11 (1H, s, H-4), 6.94 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-10), 6.05 (2H, s,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 4.30 (2H, s, H-6), 3.93 (3H, s, 8-Me), 3.88 (3H, s, 7-Me), 2.60 (3H, s, N-Me)

สารประกอบ **ZR5** (6-acetyldihydrochelerythrine) (Cheng, et al., 2011) เป็นของแข็งสีขาว เป็นสารประกอบในกลุ่มของพีแนนทรีดีน แอลคาร์ลอยด์เช่นเดียวกับ สาร **ZR4** โดยสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร **ZR5** มีลักษณะที่คล้ายกับสาร **ZR4** ยกเว้นที่ตำแหน่งที่ 2 ของสาร **ZR5** จะปรากฏสัญญาณเพิ่มเติมของหมู่ propanonyl สัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR ทั้งหมดเป็นดังนี้  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 7.71 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-12), 7.54 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-11), 7.51 (1H, s, H-1), 7.48 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-10), 7.10 (1H, s, H-4), 6.96 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-9), 6.04 (2H, br s,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 5.04 (1H, dd,  $J = 11.2$  และ  $3.6$  Hz, H-6), 3.95 (3H, s, 7-OMe), 3.92 (3H, s, 8-OMe), 2.64 (3H, s, N-Me), 2.58 (1H, dd,  $J = 14.8$  และ  $11.2$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{COCH}_3$ ), 2.26 (1H, dd,  $J = 14.8$  และ  $3.6$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{COCH}_3$ ), 2.06 (3H, s,  $-\text{CH}_2\text{COCH}_3$ )

สารประกอบ **ZR6** (8-acetyldihydrochelerythrine) (Nissanka, et al., 2001) เป็นของหนืดสีเหลือง เป็นสารประกอบในกลุ่มของพีแนนทรีดีน แอลคาร์ลอยด์เช่นเดียวกับ สาร **ZR4** และ **ZR5** โดยสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR ของสาร **ZR6** มีลักษณะที่คล้ายกับสาร **ZR5** ยกเว้นตำแหน่งของหมู่ OMe ในสาร **ZR6** จะเกาะอยู่ที่ตำแหน่ง 4 และ 5 สัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR ทั้งหมดเป็นดังนี้  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 7.71 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-12), 7.56 (1H, s, H-1), 7.51 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-11), 7.32 (1H, s, H-10), 7.12 (1H, s, H-4), 6.85 (1H, s, H-7), 6.05 (2H, br s,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 4.55

(1H, dd,  $J = 8.8$  และ  $6.0$  Hz, H-6), 3.99 (3H, s, 9-OMe), 3.94 (3H, s, 8-OMe), 2.69 (1H, dd,  $J = 15.6$  และ  $8.8$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{COCH}_3$ ), 2.61 (3H, s, N-Me), 2.33 (1H, dd,  $J = 15.6$  และ  $5.6$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{COCH}_3$ ), 1.98 (3H, s,  $-\text{CH}_2\text{COCH}_3$ )



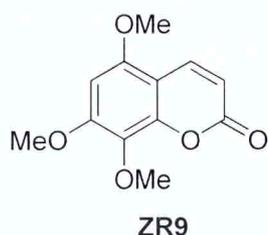
สารประกอบ **ZR7** (asarinin) (Gunatilaka et al., 1982) เป็นของแข็งสีขาว เป็นสารประกอบในกลุ่มของลิแกน โดยมีสัญญาณ  $^1\text{H NMR}$  ทั้งหมดเป็นดังนี้  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 6.88 (2H, br d, H-6 และ H-6'), 6.85-6.78 (4H, m, H-2, H-3, H-2' และ H-3'), 5.98 (2H, s,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 5.97 (2H, s,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 4.85 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz, H-7), 4.41 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-7'), 4.11 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz, H-8'), 3.86-3.82 (2H, m, H-9), 3.34-3.29 (2H, m, H-9'), 2.88 (1H, m, H-8)

สารประกอบ **ZR8** (horsfieldine) (Gunatilaka, et al., 1982) เป็นของแข็งสีขาว เป็นสารประกอบในกลุ่มของลิแกนเช่นเดียวกับสาร **ZR7** สัญญาณ  $^1\text{H NMR}$  ของสาร **ZR8** มีลักษณะคล้ายกับสารประกอบ **ZR7** ยกเว้นสาร **ZR8** จะปรากฏสัญญาณของหมู่ OH และหมู่ OMe แทนสัญญาณของหมู่  $-\text{OCH}_2\text{O}-$  ในสารประกอบ **ZR7** สัญญาณ  $^1\text{H NMR}$  ทั้งหมดของสาร **ZR8** เป็นดังนี้  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 7.49 (1H, s, H-6), 7.02 (1H, br s, H-6'), 6.91-6.80 (4H, m, H-2, H-5, H-2' และ H-3'), 5.99 (2H, s,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 4.84 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-7), 4.40 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-7'), 4.13 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-8'), 3.86 (3H, s, 4-OMe), 3.84-3.76 (2H, m, H-9), 3.45-3.37 (1H, m, H-9'), 3.22 (1H, t,  $J = 8.8$  Hz, H-9'), 2.88-2.83 (1H, m, H-8).  $\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz): 147.8 (C-4'), 147.2 (C-4), 146.9 (C-5), 145.4 (C-5'), 136.2 (C-1), 130.4 (C-1'), 119.2 (C-2), 118.2 (C-2'), 114.6 (C-6), 109.3 (C-6'), 107.7 (C-3), 106.3 (C-3'), 101.0 ( $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 87.4 (C-7'), 81.7 (C-7), 70.6 (C-9), 69.3 (C-9'), 55.3 (4-OMe), 54.8 (C-8), 50.0 (C-8')

สารประกอบ **ZR9** (5,7,8-trimethoxycoumarin) (Cheng, et al., 2005) ของหนืดสีเหลือง เป็นสารประกอบคูมารินพื้นฐาน โดยมีสัญญาณ  $^1\text{H NMR}$  เป็นดังนี้  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 7.61 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-4), 6.66 (1H, s, H-6), 6.35 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-3), 4.04 (3H, s, 8-OMe), 3.99 (3H, s, 7-OMe), 3.90 (3H, s, 5-OMe)

สารประกอบ **ZR10** (dictamine) (Tanaka et al., 1985) เป็นของแข็งสีขาว เป็นสารประกอบควิโนลีน แอลคาร์ลอยด์ พื้นฐาน โดยมีสัญญาณ  $^1\text{H NMR}$  เป็นดังนี้  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 8.25 (1H, br d,  $J = 8.4$  Hz, H-2), 8.01 (1H, br d,  $J = 8.4$  Hz, H-3), 7.70-7.66 (1H, m, H-6), 7.60

(1H, br d,  $J = 2.8$  Hz, H-8), 7.46–7.42 (1H, m, H-7), 7.04 (1H, br d,  $J = 2.8$  Hz, H-5), 4.41 (3H, s, 4-OMe)



สารประกอบที่แยกได้ทุกชนิดจากต้นมะแขว่น (ยกเว้นสารประกอบ **ZR6**) ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกสองสายพันธุ์คือ *Staphylococcus aureus* และ MRSA SK1 และแบคทีเรียแกรมลบสองสายพันธุ์คือ *Salmonellae typhimurium* และ *Escherichia coli* โดยใช้ vancomycin (MIC = 1 และ 0.25  $\mu\text{g/mL}$  สำหรับ MRSA SK1 และ *S. aureus* ตามลำดับ) และ gentamycin (MIC = 0.25 และ 0.125  $\mu\text{g/mL}$  สำหรับ *E. coli* และ *S. typhimurium* ตามลำดับ) เป็นสารมาตรฐาน จากการทดลองพบว่าสารทุกชนิดแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *S. typhimurium* ได้ในระดับต่ำโดยมีค่า MIC เท่ากันคือ 128  $\mu\text{g/mL}$  และสารทุกชนิดไม่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ *S. aureus* มีเพียงสารประกอบ **ZR4** ที่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ MRSA SK1 ได้ในระดับดีโดยมีค่า MIC เป็น 8  $\mu\text{g/mL}$  ในขณะที่สารที่เหลือไม่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกในสายพันธุ์นี้ นอกจากนี้แล้วสาร **ZR4** ยังแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *E. coli* (MIC = 16  $\mu\text{g/mL}$ ) ได้ในระดับปานกลางในขณะที่สารที่เหลือแสดงฤทธิ์ในระดับต่ำโดยมีค่า MIC เท่ากันคือ 128  $\mu\text{g/mL}$  หรือไม่แสดงฤทธิ์เลย เป็นที่น่าสังเกตว่าสาร **ZR4**–**ZR6** เป็นสารประกอบในกลุ่มของฟีแนนทรินดีน แอลคาร์ลอยด์ โดยที่สารประกอบ **ZR4** นั้นไม่มีหมู่แทนที่ในตำแหน่งที่ 6 ซึ่งส่งผลให้สารประกอบ **ZR4** แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ MRSA SK1 และแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *E. coli* ได้ดีกว่าสาร **ZR5** และ **ZR6**



ตารางที่ 2 ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของส่วนสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากและเปลือกลำต้นมะเข้วาน

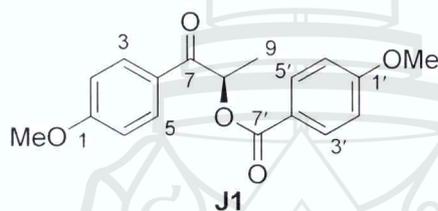
Compound	Minimum Inhibition Concentrations (MIC, $\mu\text{g/mL}$ )			
	MRSA SK1	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
ZR1	Inactive	Inactive	128	128
ZR2	Inactive	Inactive	Inactive	128
ZR3	Inactive	Inactive	128	128
ZR4	8	Inactive	16	128
ZR5	Inactive	Inactive	128	128
ZR7	Inactive	Inactive	128	128
ZR9	Inactive	Inactive	128	128
ZR10	Inactive	Inactive	Inactive	128
Vancomycin	1	0.25	Not test	Not test
Gentamycin	Not test	Not test	0.25	0.125

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนผลจันทร์หอม สามารถแยกสารประกอบได้ทั้งหมด 5 สาร เป็นสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์ใหม่ 1 สาร (J1) และสารที่มีการรายงานแล้ว 4 สาร (J2- J5)

สารประกอบ J1 (harmandianone) เป็นของแข็งสีขาวมีจุดหลอมเหลวเป็น 114–117 °C สารประกอบนี้แสดง  $[M+Na]^+$   $m/z$  337.1046 ในข้อมูลของ ESI-TOF-MS ซึ่งเป็นข้อมูลที่สอดคล้องกับสูตรโมเลกุล  $C_{18}H_{18}O_5$  จากข้อมูลของ UV สเปกตรัม แถบดูดกลืนที่  $\lambda_{\text{max}}$  201, 213, 267 และ 272 nm ในขณะที่ IR สเปกตรัม จะแสดงแถบการยึดของหมู่ aryl ester ( $1689\text{ cm}^{-1}$ ) และ aryl ketone ( $1712\text{ cm}^{-1}$ ) สำหรับข้อมูล  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารประกอบนี้จะแสดงกลุ่มสัญญาณของ *p*-methoxybenzoyl ที่  $\delta_{\text{H}}$  7.98 (2H, d,  $J = 8.4\text{ Hz}$ , H-3' และ H-5')/ $\delta_{\text{C}}$  131.9,  $\delta_{\text{H}}$  6.95 (2H, d,  $J = 8.4\text{ Hz}$ , H-2' และ H-6')/ $\delta_{\text{C}}$  113.6,  $\delta_{\text{H}}$  3.87 (3H, s, 1'-OMe)/ $\delta_{\text{C}}$  55.5,  $\delta_{\text{C}}$  122.0 (C-4') และ  $\delta_{\text{C}}$  163.6 (C-1') (Sy and Brown, 1998) โดยสามารถยืนยันหมู่ *p*-methoxybenzoyl ได้ด้วยข้อมูลของ HMBC ดังนี้ H-3'/H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  7.98) แสดงความสัมพันธ์กับ C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  163.6) และ C-7' ( $\delta_{\text{C}}$  165.9) ในขณะที่ 1'-OMe ( $\delta_{\text{H}}$  3.87) แสดงความสัมพันธ์กับ C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  163.6) นอกจากนี้แล้วยังพบว่าเมื่อใช้ข้อมูลของ COSY, HMQC และ HMBC ยังสามารถวิเคราะห์ส่วนของโครงสร้างที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนิลโพรพานอยด์ (หมู่ *p*-methoxyphenyl-1-oxopropanone) ได้อีกด้วย โดยหมู่นี้จะแสดงกลุ่มสัญญาณของ  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ที่  $\delta_{\text{H}}$  7.80 (2H, d,  $J = 8.4\text{ Hz}$ , H-3 และ H-5)/ $\delta_{\text{C}}$  130.9,  $\delta_{\text{H}}$  6.93 (2H, d,  $J = 8.4\text{ Hz}$ , H-2 และ H-6)/  $\delta_{\text{C}}$  114.0,  $\delta_{\text{H}}$  6.15 (1H, q,  $J = 6.2\text{ Hz}$ , H-8)/ $\delta_{\text{C}}$  71.3,  $\delta_{\text{H}}$  3.86 (3H, s, 1-OMe)/ $\delta_{\text{C}}$  55.4,  $\delta_{\text{H}}$  1.63 (3H, d,  $J = 6.2\text{ Hz}$ , H-9)/ $\delta_{\text{C}}$  17.3,  $\delta_{\text{C}}$  195.3 (C-7),  $\delta_{\text{C}}$  163.8 (C-1) และ  $\delta_{\text{C}}$  127.4 (C-4) ในขั้นสุดท้ายสามารถเชื่อมต่อกับส่วนของโครงสร้างทั้งสองเข้าด้วยกันได้โดยใช้ข้อมูลของ HMBC ดังนี้ H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  6.15) และ H-3'/H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  7.98) แสดง

ความสัมพันธ์แบบ  $^3J$  กับหมู่ aryl ester C-7' ( $\delta_c$  165.9) จากข้อมูลนี้สรุปได้ว่า หมู่ *p*-methoxyphenyl-1-propanone และ *p*-methoxybenzoyl มีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะอีเทอร์ที่ C-8 และ C-7' การวิเคราะห์หา absolute configuration ที่ C-8 ของสารประกอบ **J1** (harmandianone) สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบข้อมูลของค่าหมุนจำเพาะ (specific rotation) กับสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน โดยพบว่าสารประกอบ (2*S*)-hydroxy-1-phenyl-propanone มีค่าหมุนจำเพาะเป็น  $[\alpha]_D^{20} = -86$  ( $c = 2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) (Kihumbu et al., 2002) โดยที่ (2*R*)-hydroxy-1-phenyl-propanone มีค่าหมุนจำเพาะเป็น  $[\alpha]_D^{20} = +70$  ( $c = 1.7$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) (Demir et al., 2001) และจากการวัดค่าหมุนจำเพาะเป็นของสารประกอบ **J1** (harmandianone) พบว่าสารนี้มีค่าหมุนจำเพาะเป็น  $[\alpha]_D^{27} = +60.3$  ( $c = 0.014$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารประกอบ **J1** มี absolute configuration ที่ C-8 เป็น *R* configuration ข้อมูลรายละเอียดของ  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR และ HMBC แสดงในตารางที่ 3

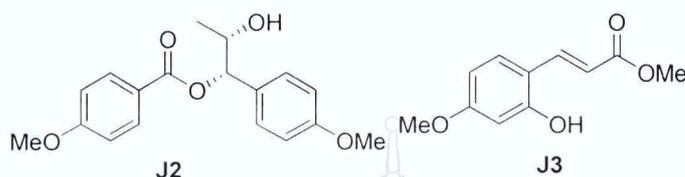
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูล  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR และ HMBC ของ harmandianone (**J1**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



Position	$\delta_H$ (mult., $J$ in Hz)	$\delta_C$	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )
1	—	163.8	—
2/6	6.93 (d, 8.4)	114.0	C-1, C-2 or C-6, C-4
3/5	7.80 (d, 8.4)	130.9	C-1, C-3 or C-5, C-7
4	—	127.4	—
7	—	195.3	—
8	6.15 (q, 6.2)	71.3	C-9, C-7'
9	1.63 (d, 6.2)	17.3	C-7, C-8
1'	—	163.6	—
2'/6'	6.95 (d, 8.4)	113.6	C-1', C-2' or C-6', C-4'
3'/5'	7.98 (d, 8.4)	131.9	C-1', C-3' or C-5', C-7'
4'	—	122.0	—
7'	—	165.9	—
1-OMe	3.86 (s)	55.4	C-1
1'-OMe	3.87 (s)	55.5	C-1'

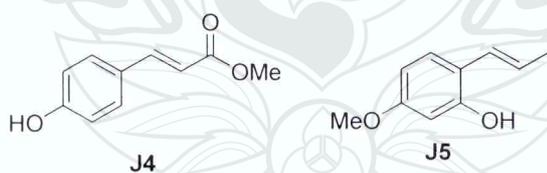
สารประกอบ **J2** (verimol B) (Sy& Brown, 1998) ของหนีดไม่มีสี จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์เช่นเดียวกับสารประกอบ **J1** สารประกอบนี้เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้วโดย

แสดงสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR ดังนี้  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 8.03 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3' และ H-5'), 7.34 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3 และ H-5), 6.92 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2' และ H-6'), 6.88 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2 และ H-6), 5.71 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-7), 4.19 (1H, m, H-8), 3.86 (3H, s, 1'-OMe), 3.79 (3H, s, 1-OMe), 1.13 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-9).



สารประกอบ **J3** ((*E*)-3-(2-Hydroxy-4-methoxy-phenyl)propanoate) (Cordoba et al., 2007) ของแข็งสีเหลือง จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์เช่นเดียวกับสารประกอบ **J1** และ **J2** สารประกอบนี้เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้วโดยแสดงสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR ดังนี้  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 7.62 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-7), 7.07 (1H, dd,  $J = 8.4$  และ 1.6 Hz, H-3), 7.03 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-6), 6.91 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2), 6.30 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-8), 5.93 (1H, br s, 4-OH), 3.93 (3H, s, 1-OMe), 3.75 (3H, s, 9-OMe).  $\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz): 167.7 (C-9), 147.9 (C-5), 146.7 (C-1), 145.9 (C-7), 126.9 (C-4), 123.0 (C-3), 115.2 (C-8), 114.7 (C-2), 109.3 (C-6), 55.9 (1-OMe), 51.6 (9-OMe)

สารประกอบ **J4** ((*E*)-Methyl-*p*-coumarate) (Muhammed et al., 2011) ของแข็งสีเหลือง จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์เช่นเดียวกับสารประกอบ **J1**, **J2** และ **J3** สารประกอบนี้เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้วโดยแสดงสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR ดังนี้  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 7.64 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-7), 7.43 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3 และ H-5), 6.85 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2 และ H-6), 6.30 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-8), 3.79 (3H, s, 9-OMe)



สารประกอบ **J5** ((*E*)-5-Methoxy-2-(prop-1-enyl)phenol) (Bottini et al., 1986) ของแข็งสีเหลือง จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์เช่นเดียวกับสารประกอบ **J1**, **J2**, **J3** และ **J4** สารประกอบนี้เป็นสารที่เคยมีการรายงานแล้วโดยแสดงสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR ดังนี้  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 7.98 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3' และ H-5'), 7.80 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3 และ H-5), 6.95 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2' และ H-6'), 6.93 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2 และ H-6), 6.15 (1H, q,  $J = 6.2$  Hz, H-8), 3.87 (3H, s, 1'-OMe), 3.86 (3H, s, 1-OMe), 1.63 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz, H-9).  $\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz): 195.3 (C-7), 165.9 (C-7'), 163.8 (C-1), 163.6

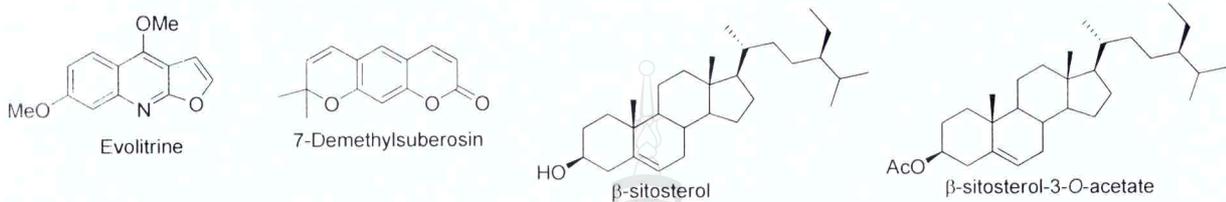
(C-1'), 131.9 (C-3' และ C-5'), 130.9 (C-3 และ C-5), 127.4 (C-4), 122.0 (C-4'), 114.0 (C-2 และ C-6), 113.6 (C-2' และ C-6'), 71.3 (C-8), 55.5 (1'-OMe), 55.4 (1-OMe), 17.3 (C-9)

สารประกอบทุกตัวที่แยกได้จากผลจันทรหอมยกเว้นสารประกอบ J2 ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์คือ MRSA SK1, *S. aureus* TISTR 1466, *E. coli* TISTR 780 และ *S. typhimurium* TISTR 292 จากการทดลองพบว่าสารประกอบทุกตัวแสดงฤทธิ์ได้ในระดับต่ำโดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 64 – 128  $\mu\text{g/mL}$



## บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

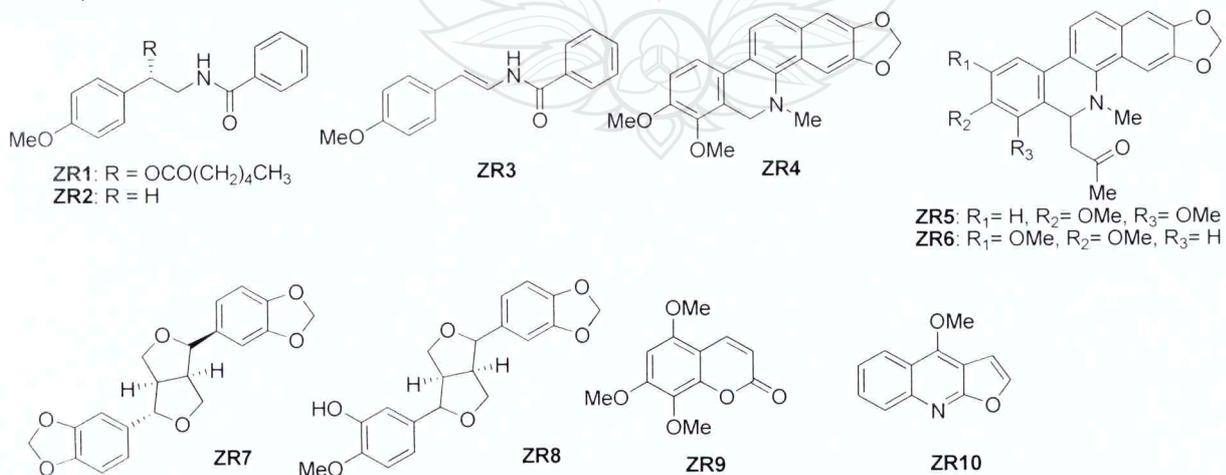
จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของต้นเพี้ยกระโทงและเครื่องเห่า สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีได้ 4 ชนิดคือสารประกอบควิโนลีน แอลคาลอยด์ ไพราโนคูมาริน  $\beta$ -sitosterol และ  $\beta$ -sitosterol-3-O-acetate



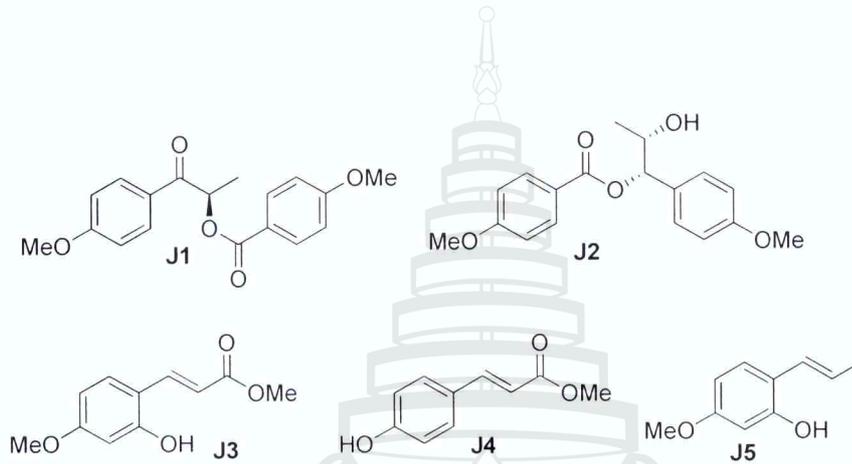
ในการสกัดต้นเครื่องเห่าได้ส่วนสกัดในปริมาณน้อยและเมื่อตรวจสอบโครมาโทแกรมพบว่าลักษณะที่ไม่น่าสนใจคือโครมาโทแกรมไม่แสดงหรือแสดงลักษณะของสารประกอบประเภทแอลคาลอยด์ในระดับต่ำ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำส่วนสกัดหยาบมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าไม่สามารถแยกสารประกอบทางเคมีได้จึงหยุดทำการศึกษาในส่วนนี้

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนรากและเปลือกลำต้นมะเขว่น สามารถแยกสารประกอบได้ทั้งหมด 10 สาร เป็นสารประกอบเอไมด์ใหม่ 1 สาร (ZR1) และสารที่มีการรายงานแล้ว 9 สาร (ZR2- ZR10)

สารประกอบที่แยกได้ทุกชนิดจากต้นมะเขว่น (ยกเว้นสารประกอบ ZR6) ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกสองสายพันธุ์คือ *Staphylococcus aureus* และ MRSA SK1 และแบคทีเรียแกรมลบสองสายพันธุ์คือ *Salmonellae typhimurium* และ *Escherichia coli* สารประกอบ ZR4 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ MRSA SK1 ได้ในระดับดีโดยมีค่า MIC เป็น 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  นอกจากนี้แล้วสาร ZR4 ยังแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *E. coli* ได้ในระดับปานกลางโดยมีค่า MIC เป็น 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ในขณะที่สารที่เหลือแสดงฤทธิ์ในระดับต่ำโดยมีค่า MIC เท่ากันคือ 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  หรือไม่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ



จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนผลจันท์หรือหอม สามารถแยกสารประกอบได้ทั้งหมด 5 สาร เป็นสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์ใหม่ 1 สาร (J1) และสารที่มีการรายงานแล้ว 4 สาร (J2- J5) สารประกอบทุกตัวที่แยกได้จากผลจันท์หรือหอมยกเว้นสารประกอบ J2 ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์คือ MRSA SK1, *S. aureus* TISTR 1466, *E. coli* TISTR 780 และ *S. typhimurium* TISTR 292 จากการทดลองพบว่าสารประกอบทุกตัวแสดงฤทธิ์ได้ในระดับต่ำโดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 64 – 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  นอกจากนี้แล้วยังพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของผลจันท์หรือหอมที่แยกได้ทั้งหมดเป็นสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์และมีความแตกต่างจากส่วนกิ่งซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มของคาร์บาโซล แอลคาร์ลอยด์



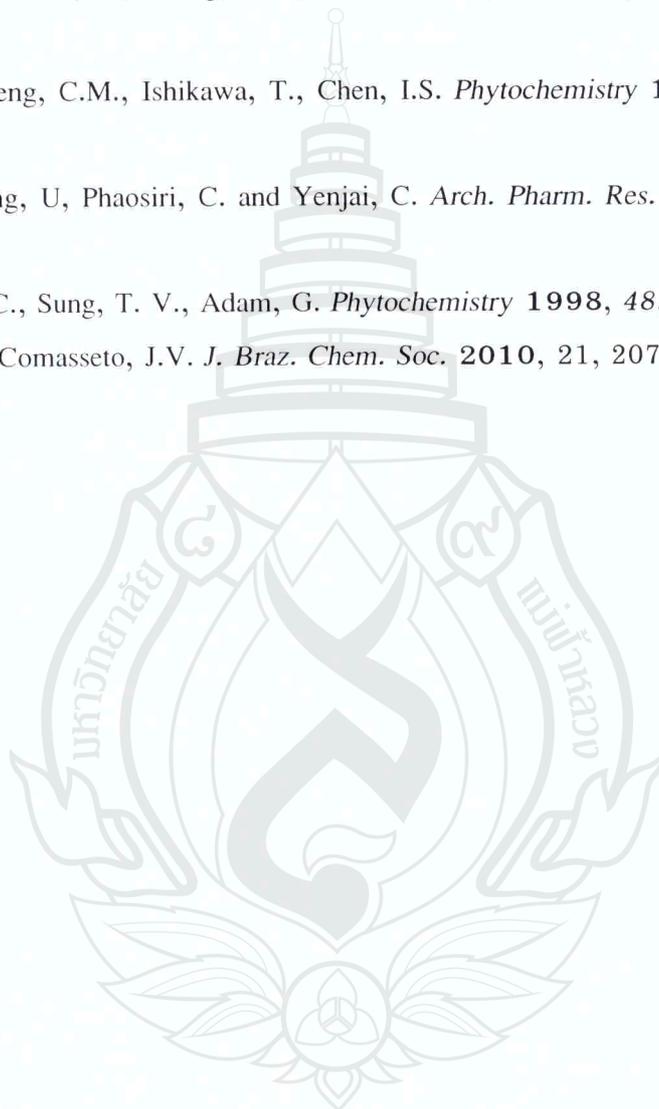
### ปัญหา อุปสรรค และแนวทางแก้ไขในการทำวิจัย

ส่วนสกัดหยาบจากต้นเครื่องห่าได้ปริมาณน้อยและแสดงลักษณะของโครมาโทแกรมที่ไม่น่าสนใจ จึงไม่ทำการศึกษาต่อ นอกจากนี้องค์ประกอบทางเคมีของต้นพืชกระทิงที่แยกได้มีลักษณะของโครงสร้างที่ไม่น่าสนใจ ดังนั้นคณะผู้วิจัยมีความเห็นว่าให้หยุดทำการศึกษาพืชทั้งสองชนิด แต่อย่างไรก็ตามเป้าหมายของการศึกษาพืชวงศ์ส้มในงานวิจัยนี้ต้องได้ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 2 เรื่อง ดังนั้นทีมวิจัยจึงได้เพิ่มพืชวงศ์ส้มอีก 2 ชนิดเพื่อทำการศึกษาทดแทนคือมะเข้วานและจันท์หรือหอม

## เอกสารอ้างอิง

- Bottini, A.T., Dav, V., Garfagnoli, D.J., Mathela, C.S., Melkani, A. B., Angela, A. Sturm, N.S. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 207-211.
- Chaichantipyuth, C., Pummangura, S., Naowsaran, K. and Thanyavuthi, D. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 1285-1288.
- Chen, J.J., Lin, Y.H., Day, S.H., Hwang, T.L., Chen, I.S. *Food Chem.* **2011**, *125*, 282-287.
- Cheng, M.J., Lee, K.H., Tsai, I.L., Chen, I.S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5915-5920.
- CLSI (2002). Reference Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard M7-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, USA.
- Cordoba, R., Tormo, N.S., Medared, A.F. Plumet, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5300-5315.
- Duraipandiyam, V., Ignacimuthu, S. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *123*, 494-498.
- Gunatilaka, A.A.L., Jasmin De Silva, A.M.Y., Sotheeswaran, S., Tellederatne, L.M.V. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2719-2723.
- Harrowven, D.C., Nunn, M.I.T., Blumire, N.J., Fenwick, D.R. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4447-4454.
- Kamal, A., Shaik, A.A., Sandbhor, M., Malik, M.S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3939-3944.
- Kamperdick, C., Van, N.H., Sung, T.V., Adam, G. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1049-1056.
- Kamperdick, C., Van, N.H., Sung, T.V., Adam, G. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 177-181.
- Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Buayairaksa, M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1122-1126.
- Ladino, O.J.P., Suarez, L.E.C. *Biochem. Syst. Ecol.* **2010**, *38*, 853-856.
- Li, S.G., Tian, H.Y., Ye, W.C., Jiang, R.W. *Biochemical Systematics and Ecology* **2011**, *39*, 64-67.
- Maneerat, W., Phakodee, W., Ritthiwigrom, T., Cheenpracha, S., Promgool, T., Yossathera, K., Deachathai, S., Laphookhieo, S. *Fitoterapia*, **2012**, *83*, 1110-1114.
- Martin, M.T., Rasoanaivo, L.H., Raharisololalao, A. *Fitoterapia* **2005**, *76*, 590-593.
- Maxwell, A., Ramperad, D. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 411-414.
- Muhammed, S., Nasim, A., Naheed, R., Shaiq, A. M. Abdul, J. *J. Nat. Prod. Res.* **2011**, *13*, 1122-1127.
- Nissanka, A.P.K., Karunaratne, V., Bandara, B.M.R., Kumar, V., Nakanishi, T., Nishi, M., Inada, A., Tillekeratne, L.M.V., Wijesundara, D.S.A., Gunatilaka, A.A.L. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 857-861.

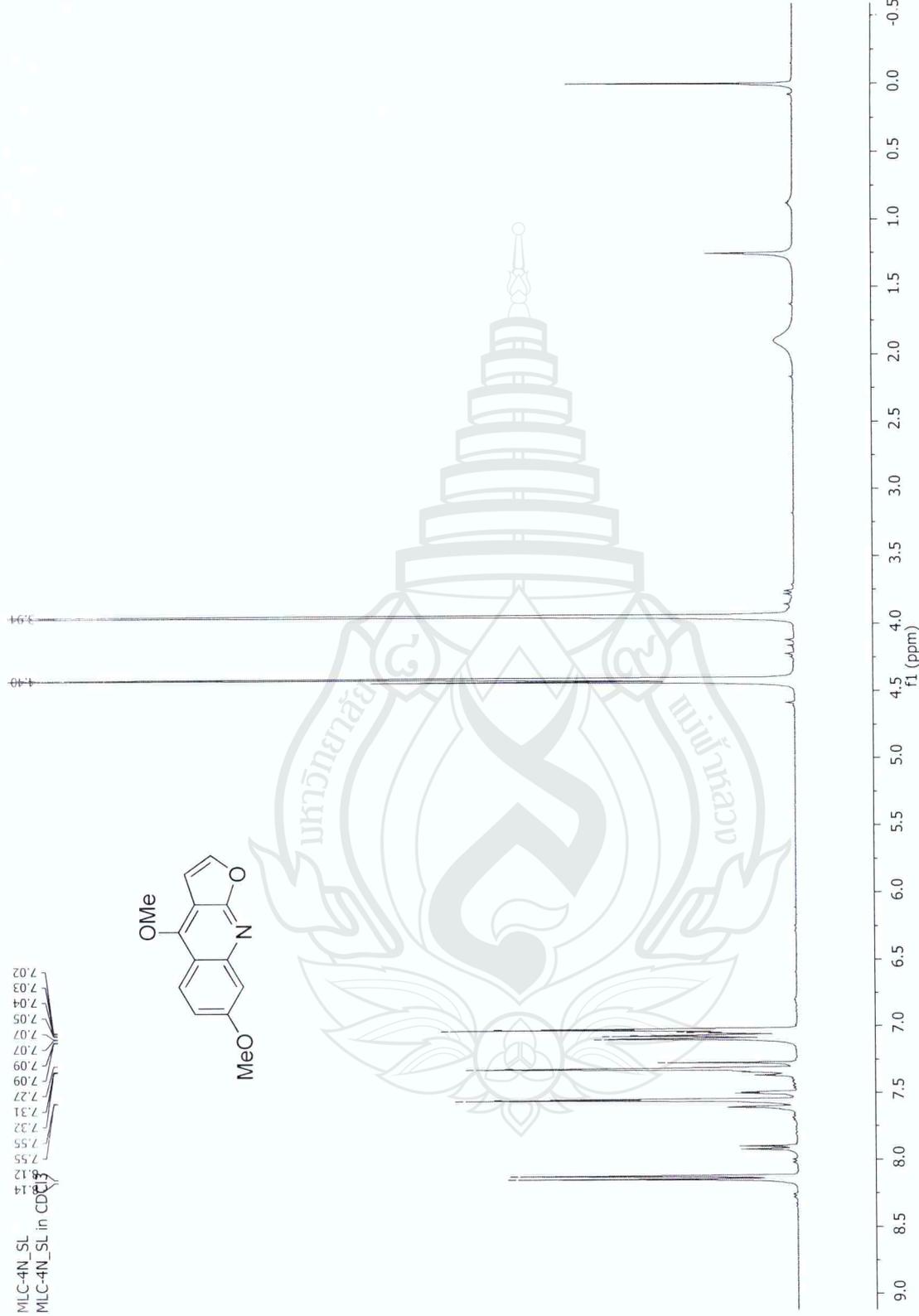
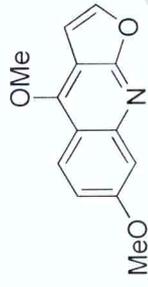
- Oketch-Rabah, H.A., Mwnagi, J.W., Lisgarten, J., Mberu, E.K. *Fitoterapia* **2000**, *71*, 636-640.
- Sy, L. K., Brown, G.D. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 987-992.
- Smitinand, T., *Thai Plant Names, Revised ed.* Prachachon Co, Bangkok, (2001).
- Tanaka, H., Ahn, J.W., Katayama, M., Wada, K., Marumo, S., Osaka, Y. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 2189-2190.
- Tsai, I.L., Fang, S.C., Ishikawa, T., Chang, C.T., Chen, I.S. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1383-1386.
- Tsai, I. L. Wun, M.F., Teng, C.M., Ishikawa, T., Chen, I.S. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1377-1382.
- Thongthoom, T., Songsiang, U, Phaosiri, C. and Yenjai, C. *Arch. Pharm. Res.* **2010**, *33*, 675-680.
- Van, N.H., Kamperdick, C., Sung, T. V., Adam, G. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1055-1057.
- Vargas, F., Toledo, F.T., Comasseto, J.V. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 2072-2078.



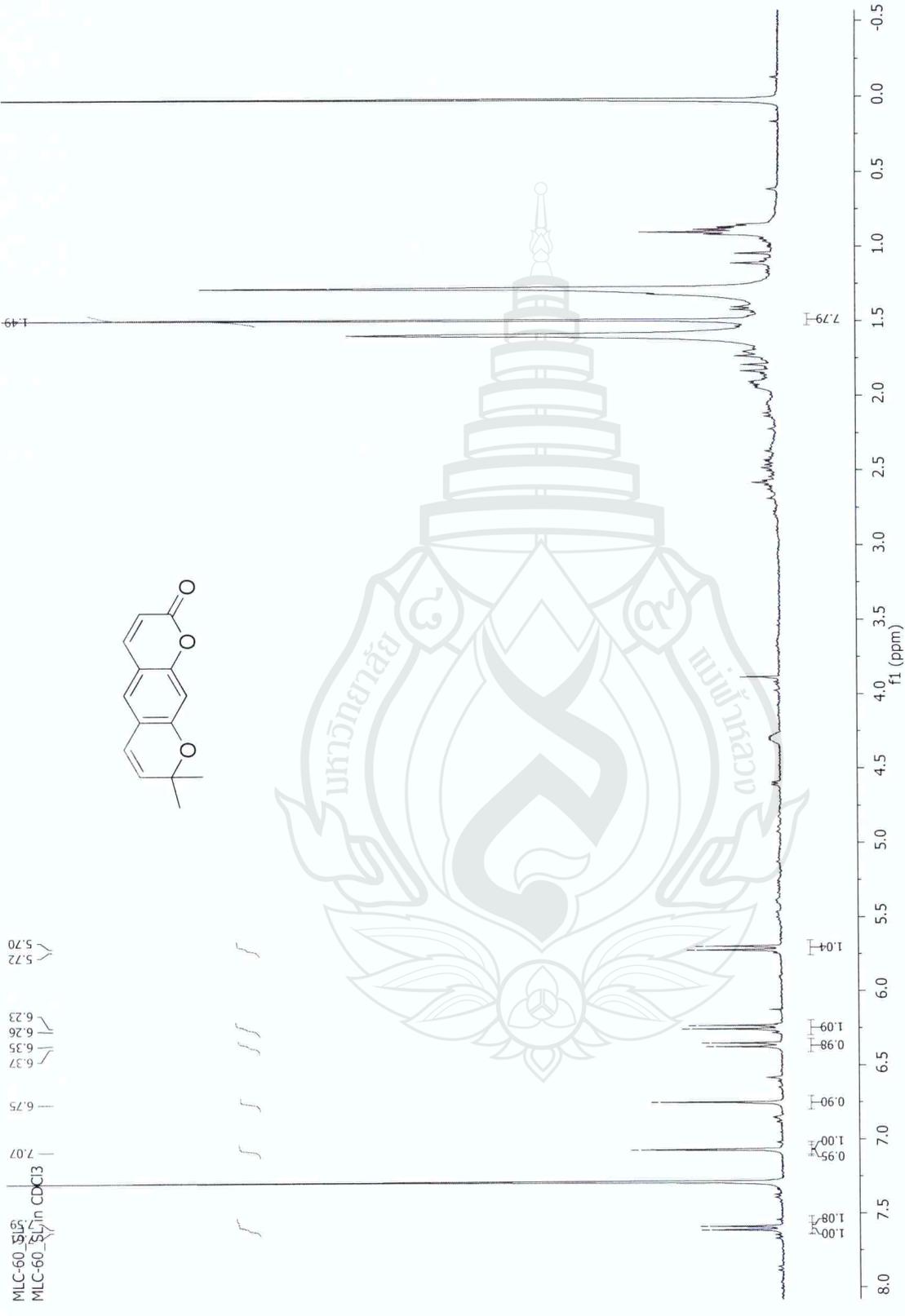


MLC-4N\_SL  
MLC-4N\_SL in CDCl<sub>3</sub>

7.02  
7.03  
7.04  
7.05  
7.07  
7.07  
7.09  
7.09  
7.27  
7.31  
7.32  
7.55  
7.55  
8.14  
8.14



S1 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼 of Volitrine (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

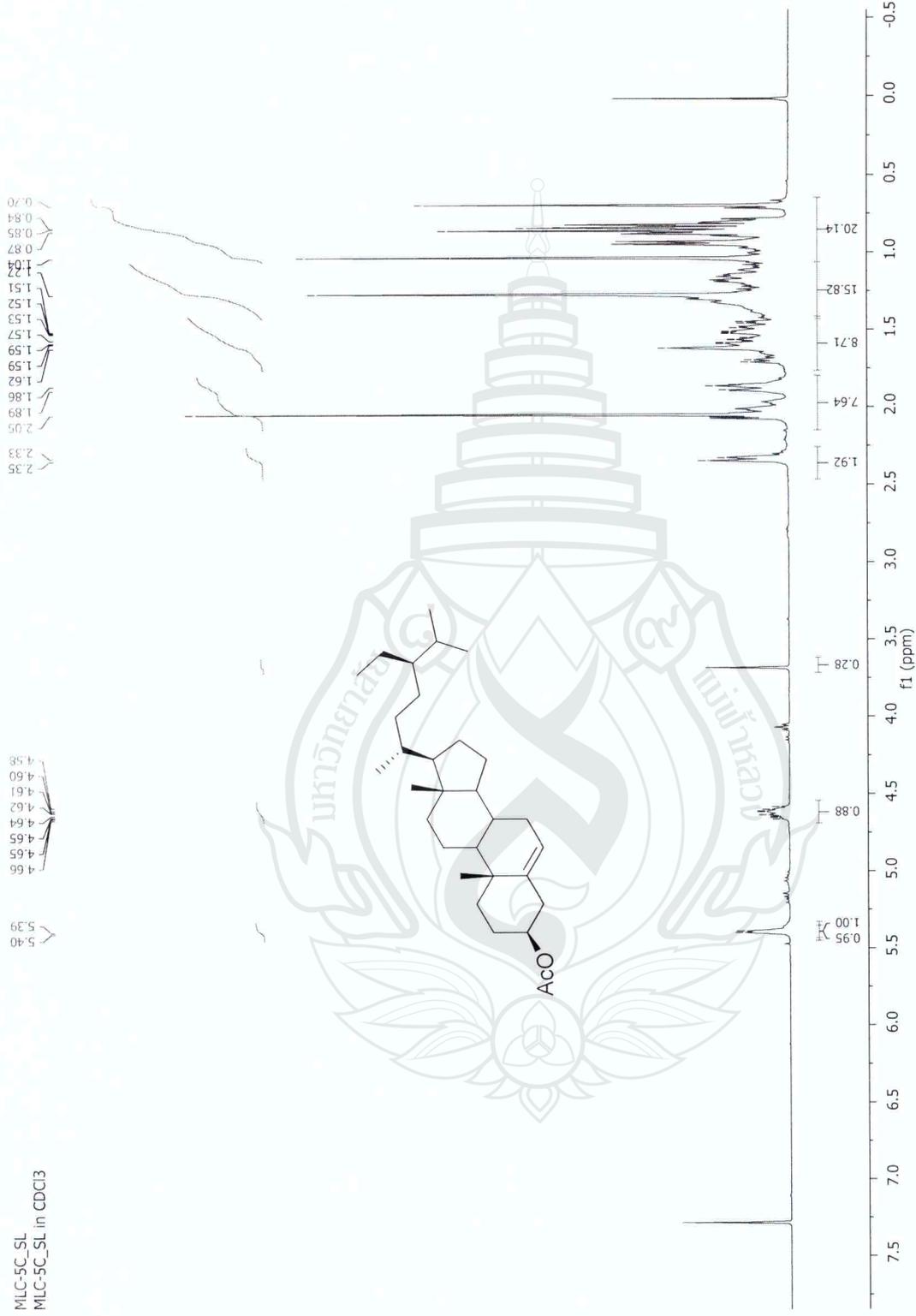


S2 <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัมของ 7-Demethylsuberosin (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

MLC-5A\_SL  
MLC-5A\_SL.in CDCl3

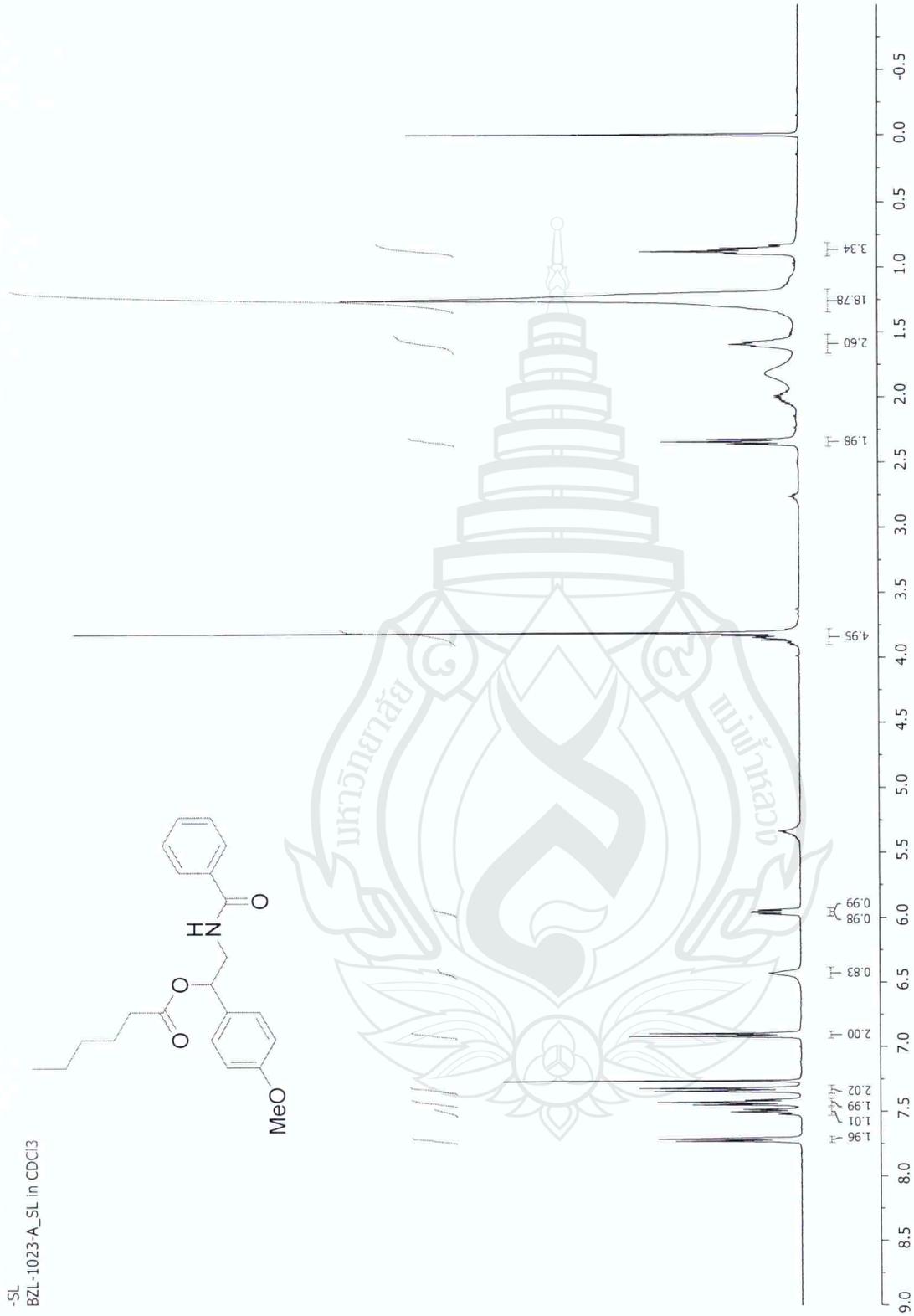
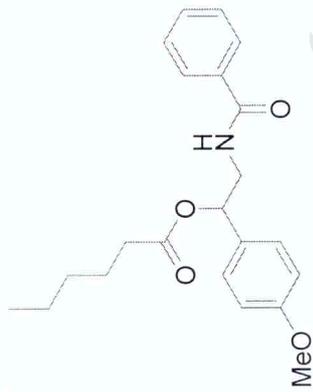


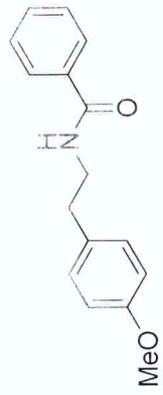
MLC-5C\_SL  
MLC-5C\_SL in CDCl<sub>3</sub>



S4 <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัมของ β-stigmasterol-3-O-acetate (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

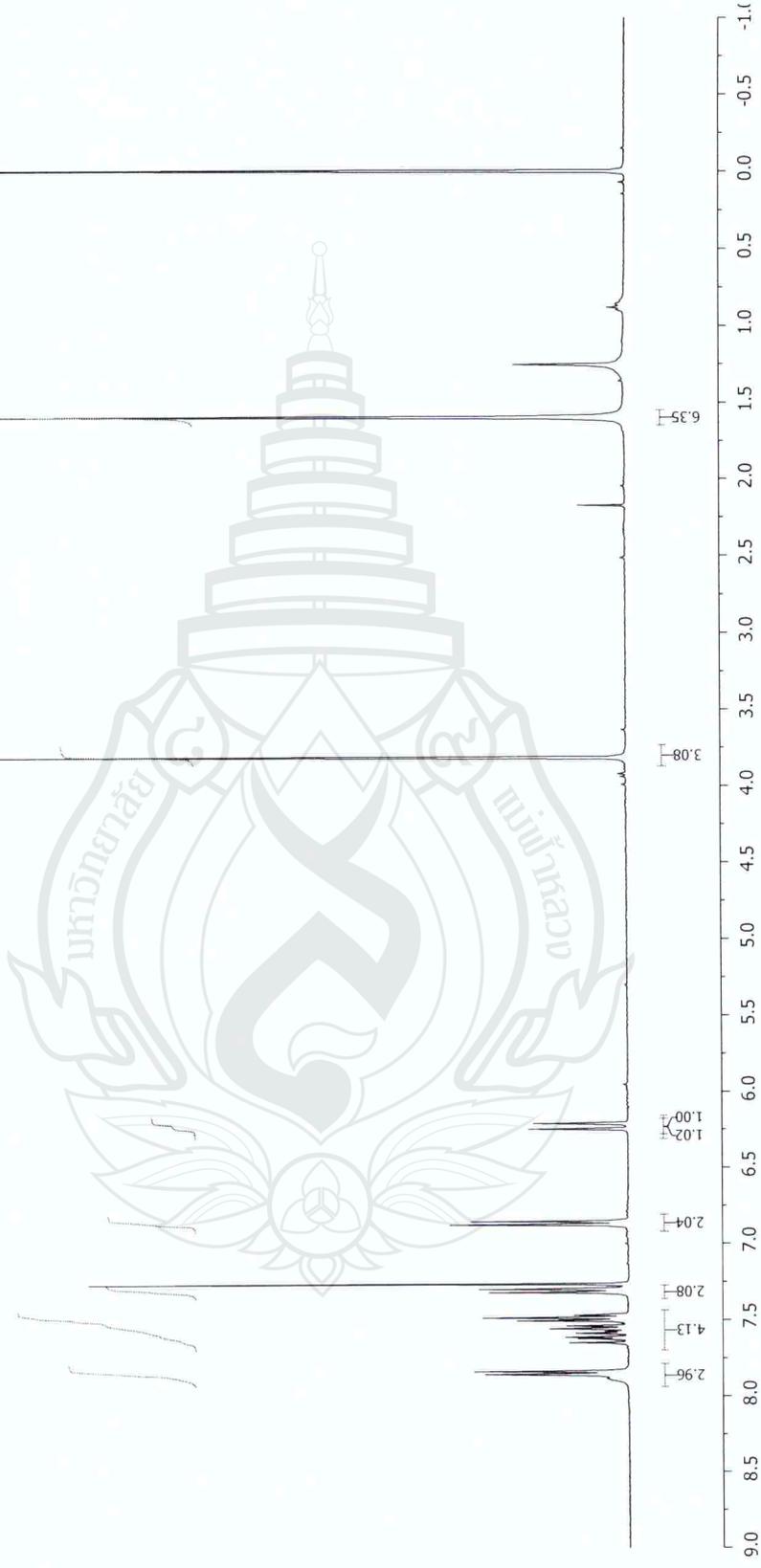
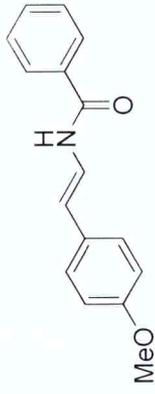
-SL  
BZL-1023-A\_SL in CDCl3





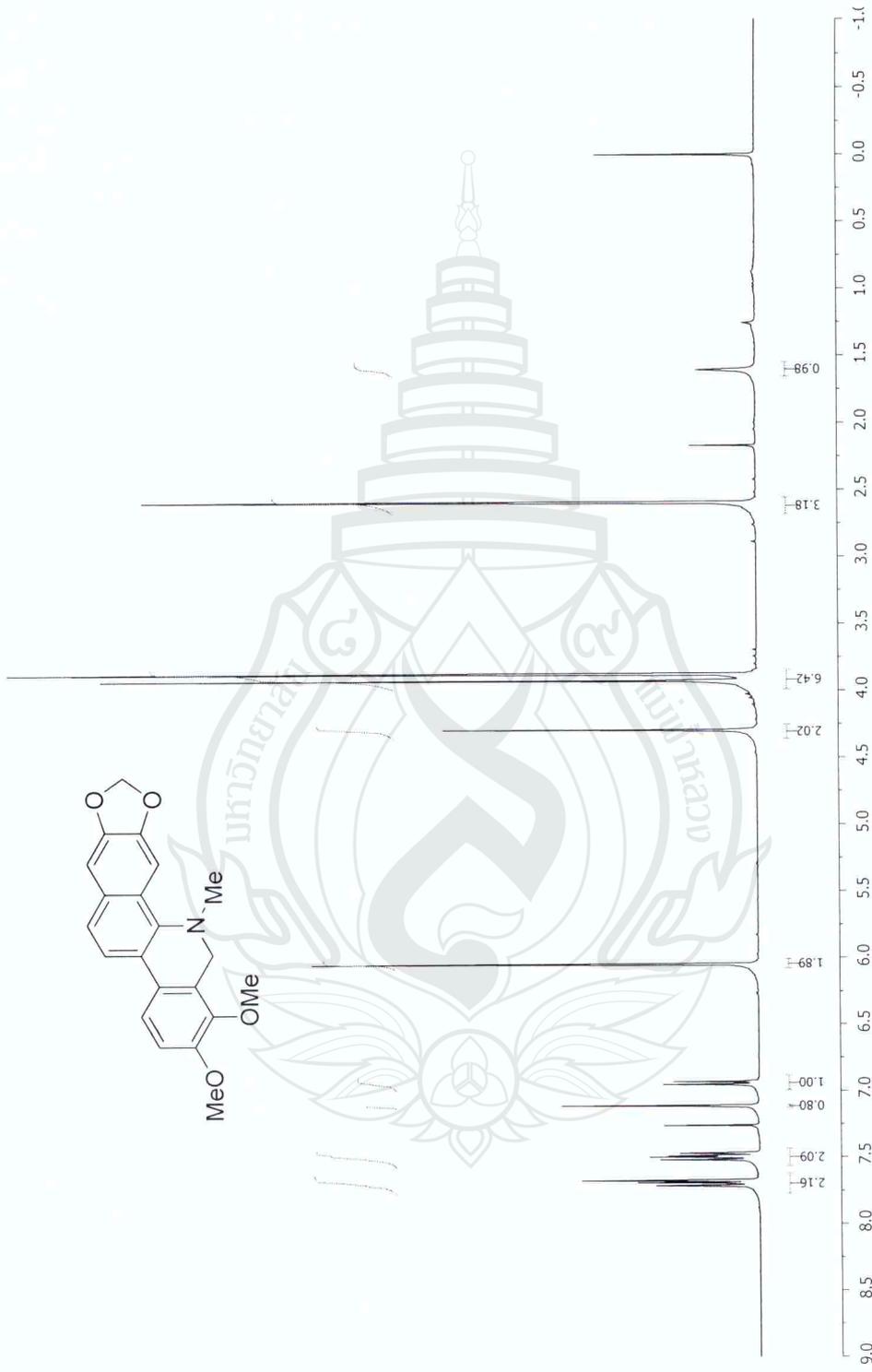
S6 <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัมของ N-(4-methoxyphenethyl)benzamide (ZR2) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

BZL-C14-A\_SL  
BZL-C14-A\_SL in CDCl<sub>3</sub>



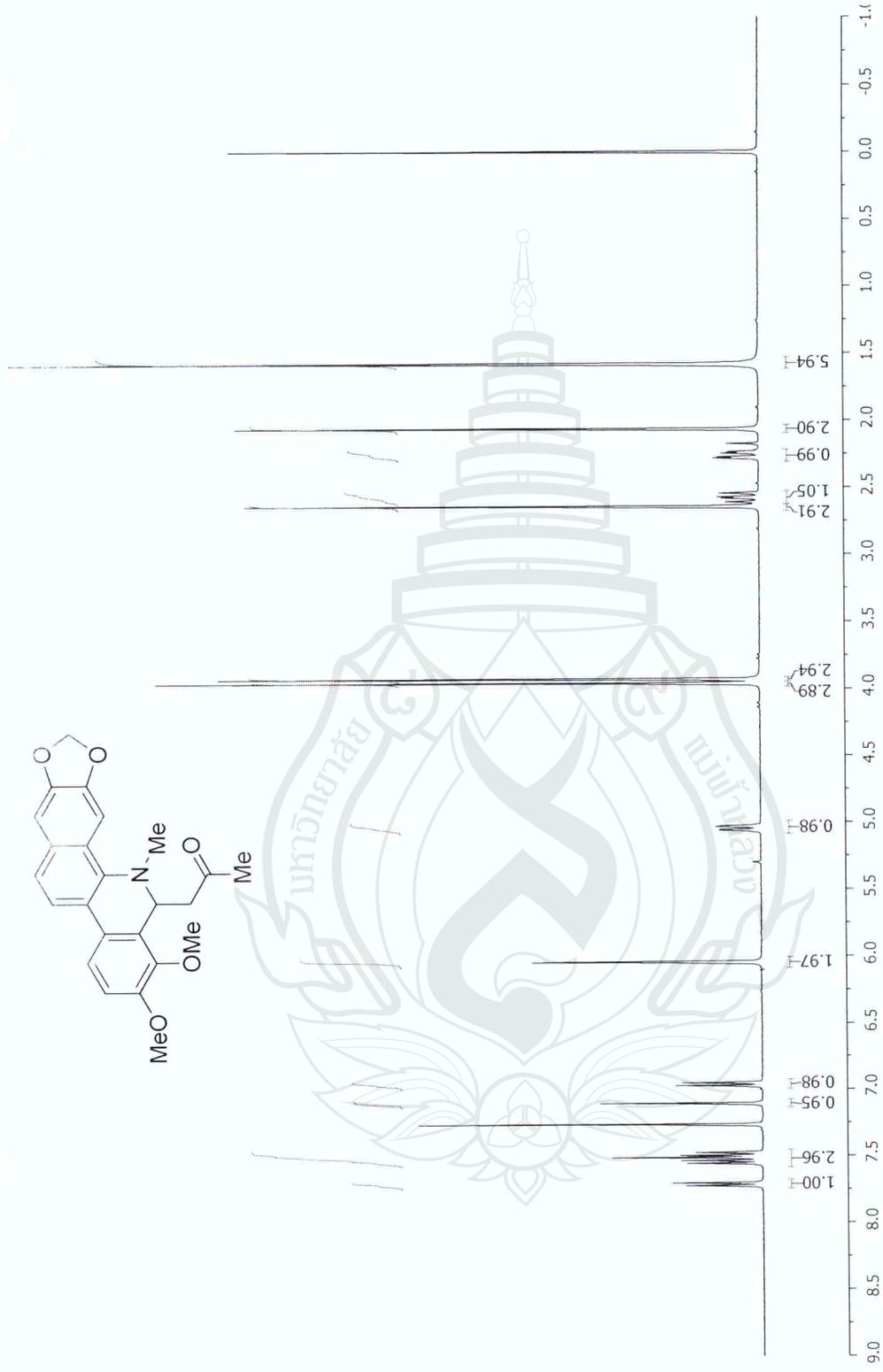
S7 <sup>1</sup>H NMR spectrum of Alatumide (ZR3) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

BZL-C4-E\_SL  
BZL-C4-E\_SL

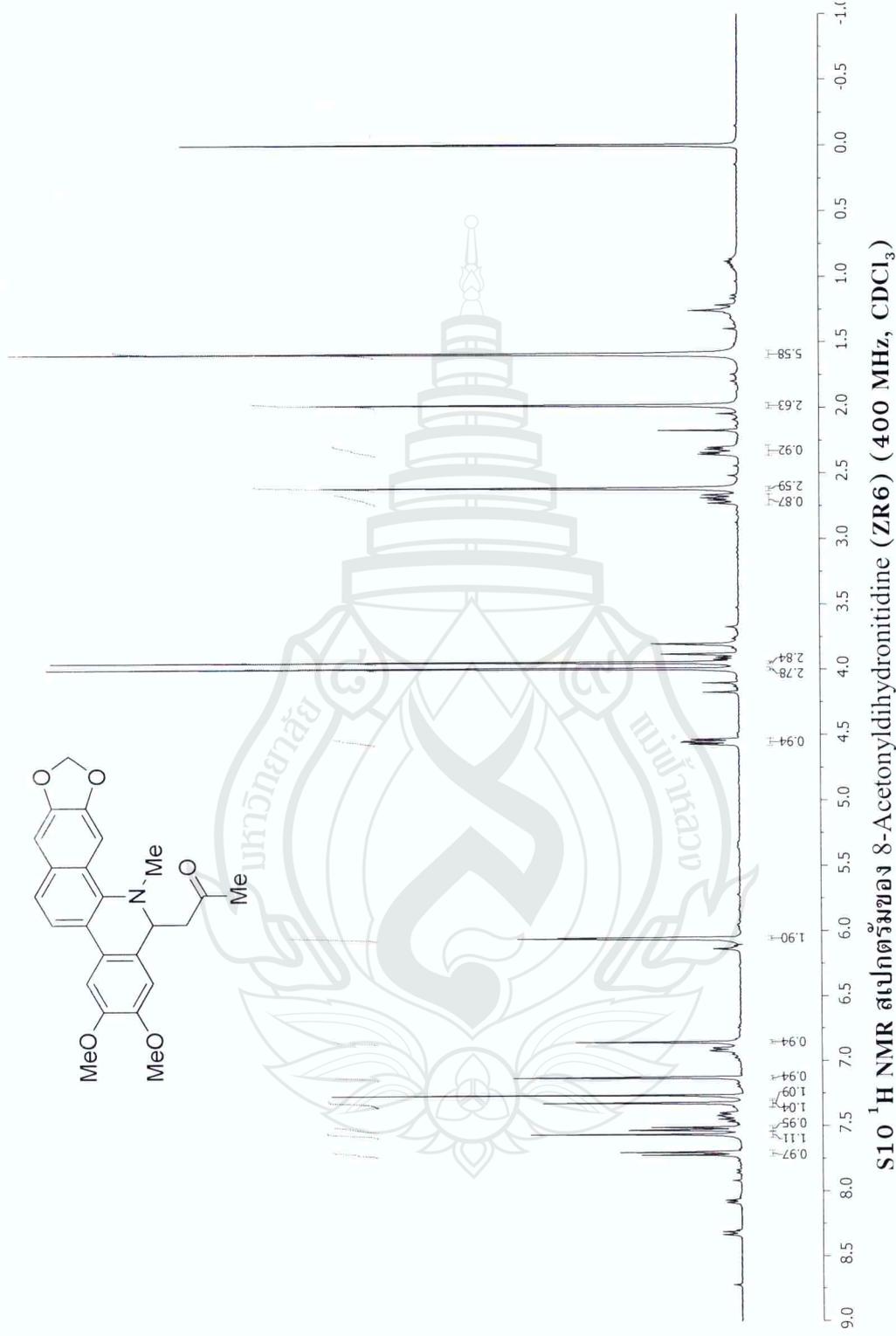


S8 <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัมของ Dihydrochelerithrine (ZR4) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

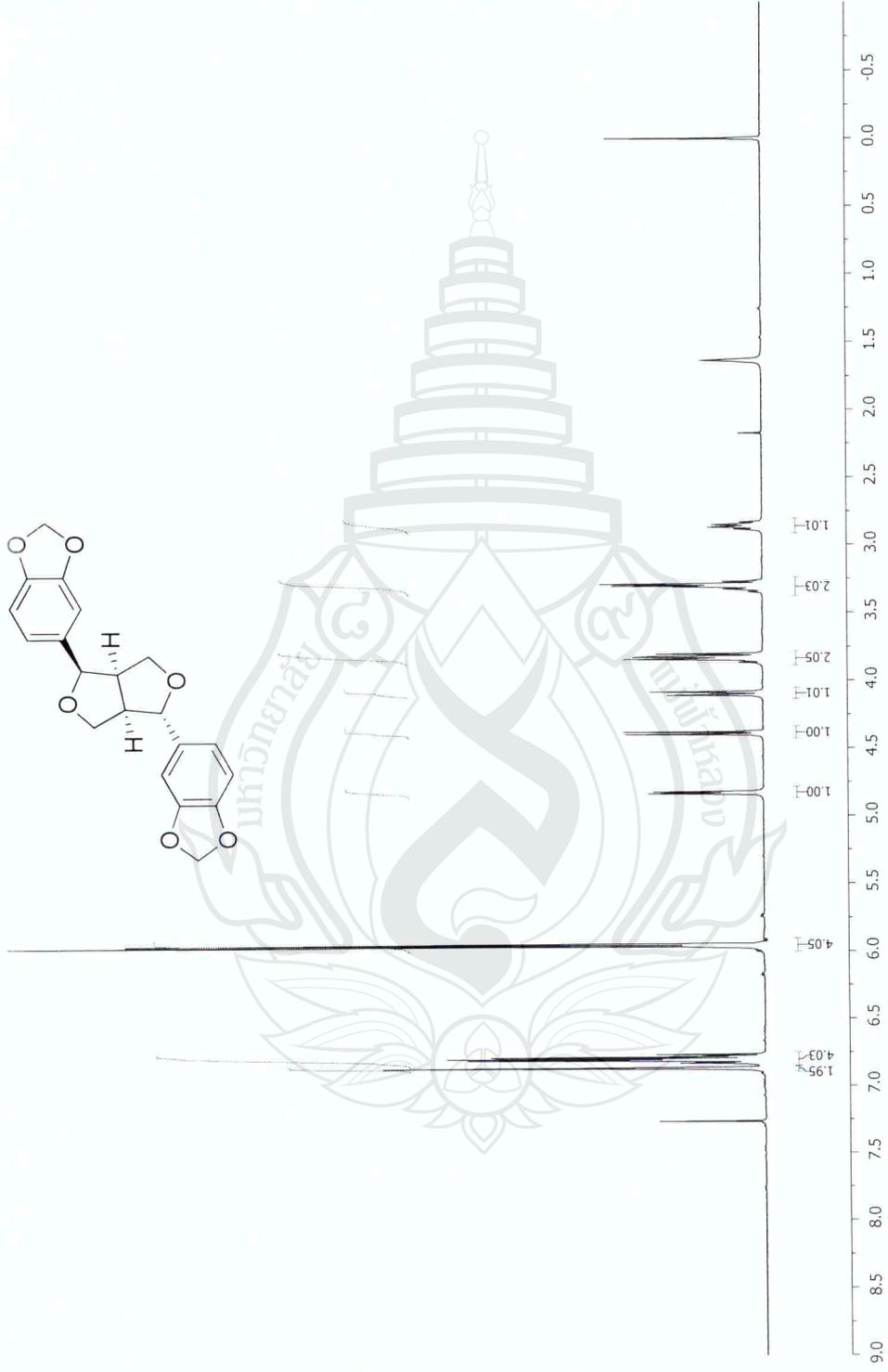
BZL-S17-B in CDCl<sub>3</sub>



BZL-C19-A\_SL  
BZL-C19-A\_SL in CDCl<sub>3</sub>

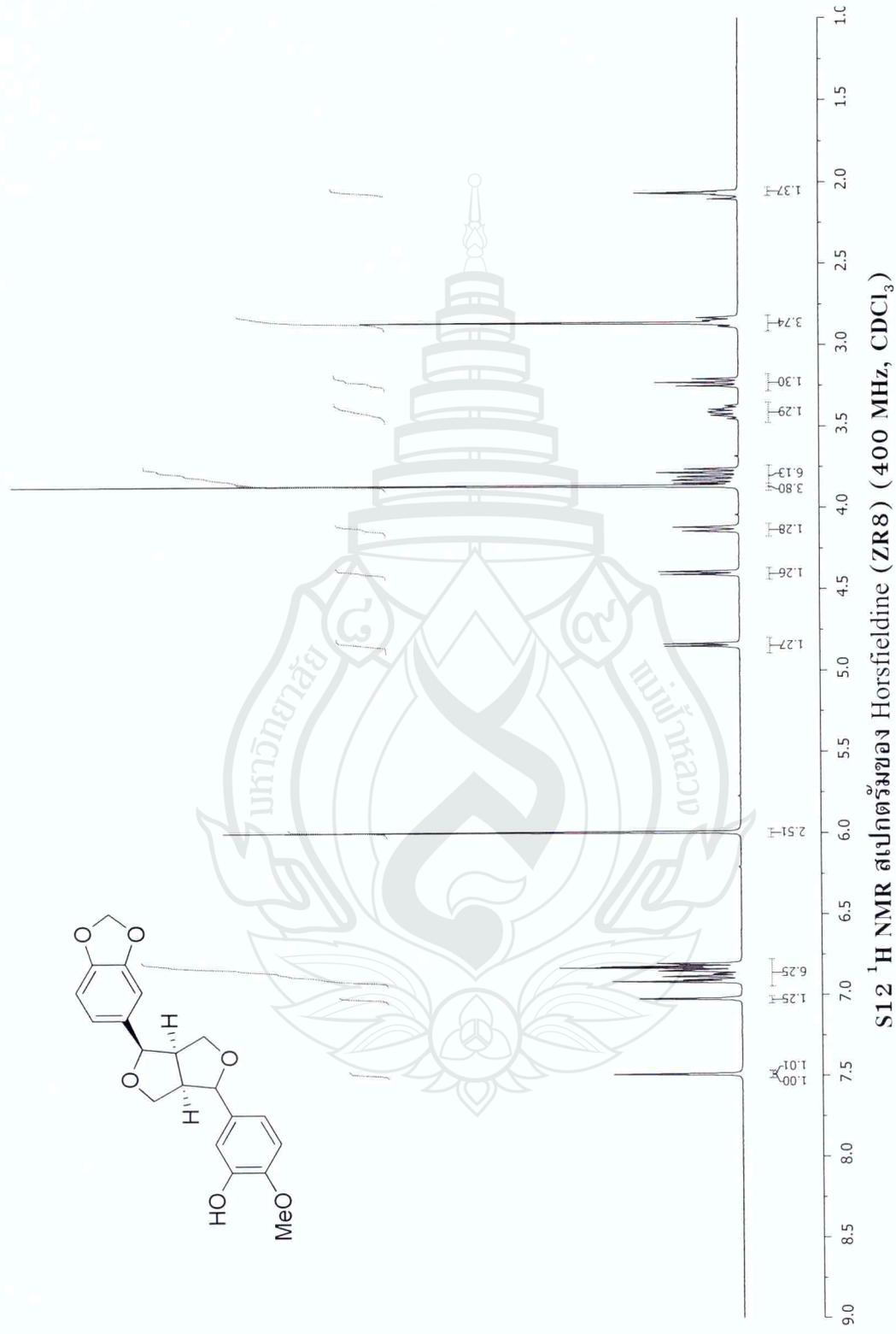


BZL-G9+1\_SL  
BZL-G9+1\_SL.in CDCl3

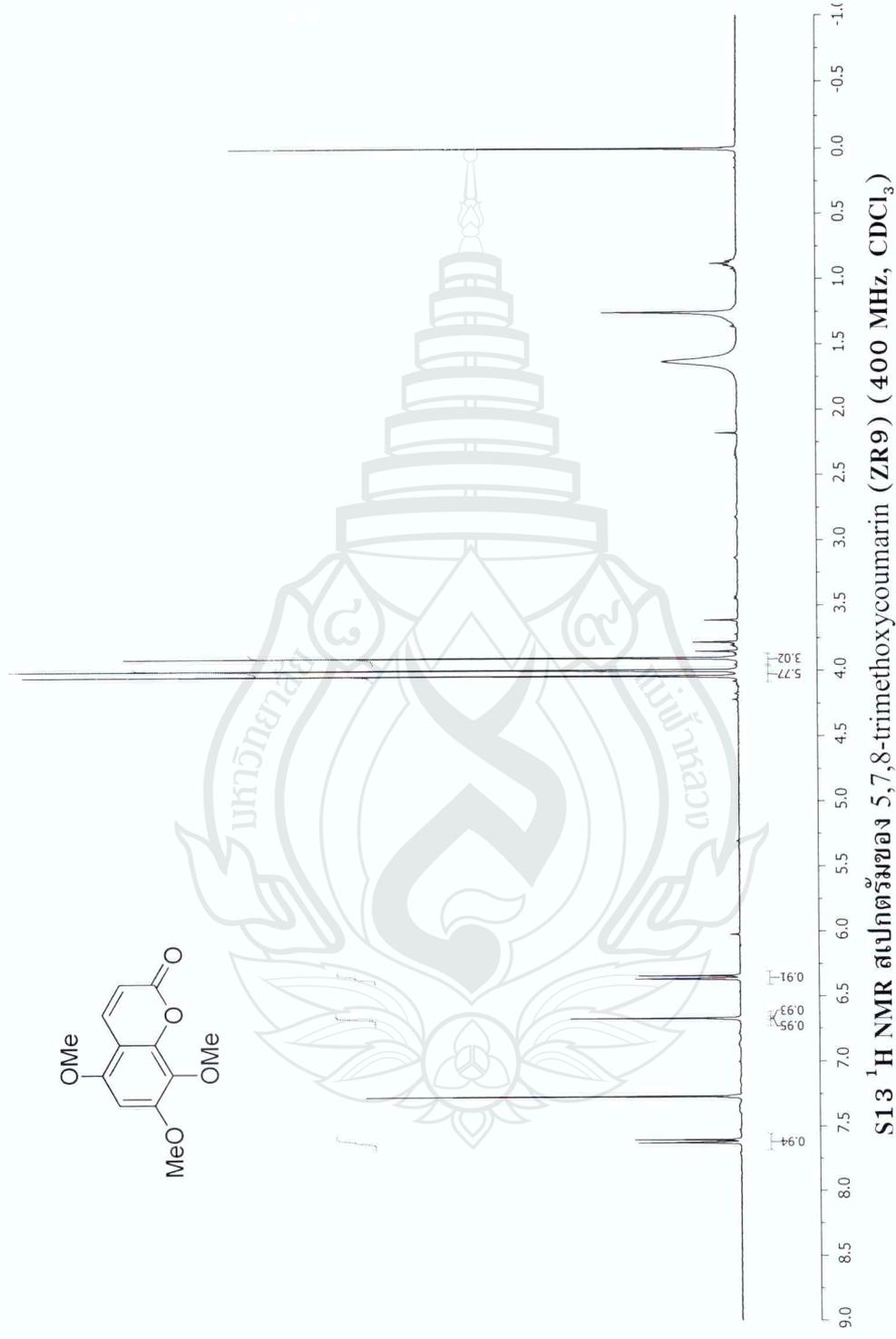
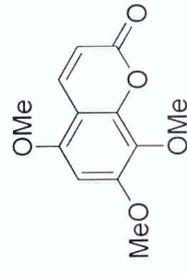


S11  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของ Asarinin (ZR7) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

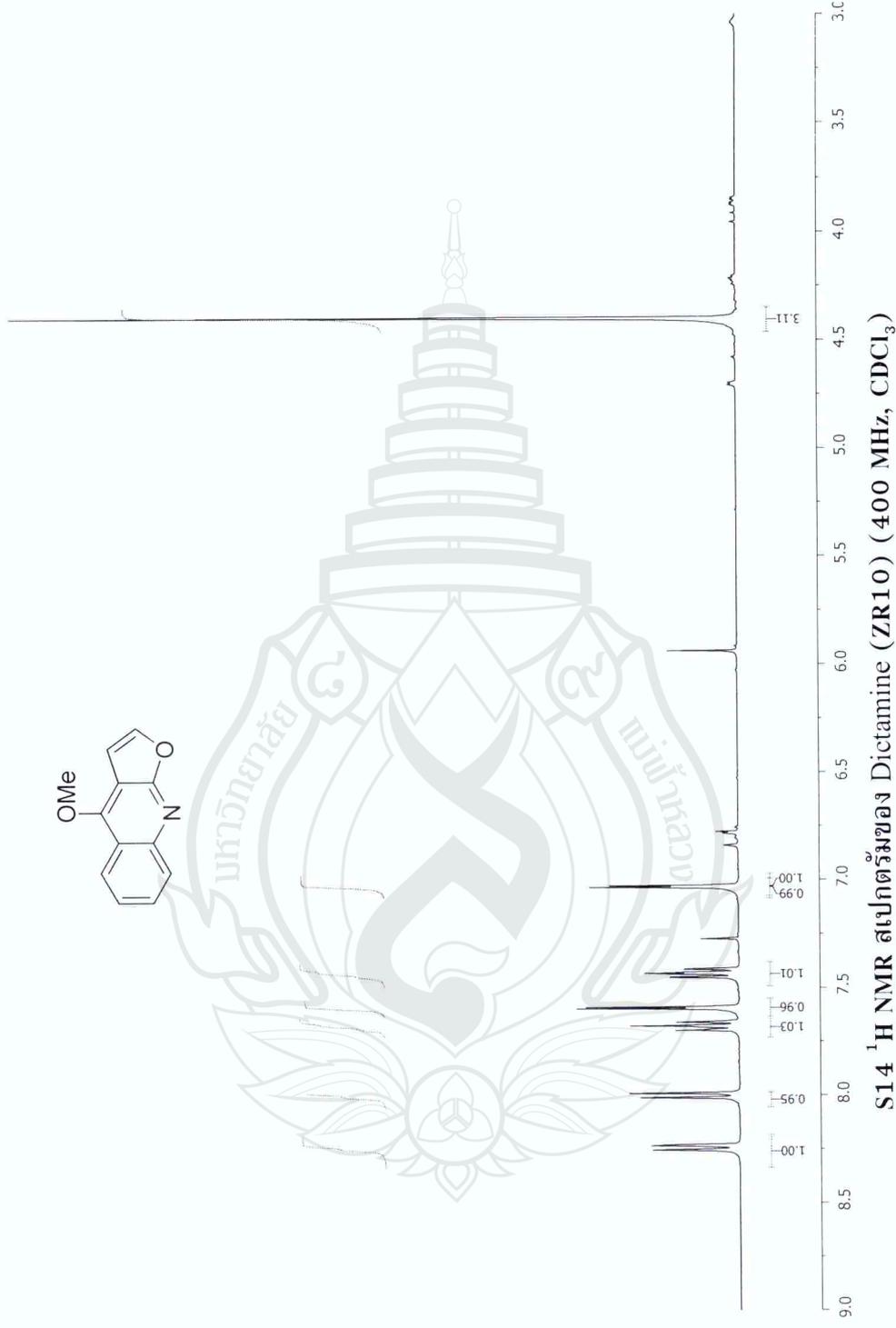
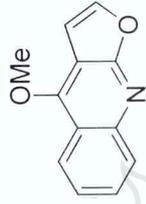
BZL-517-D\_SL  
BZL-517-D\_SL in CDCl<sub>3</sub>

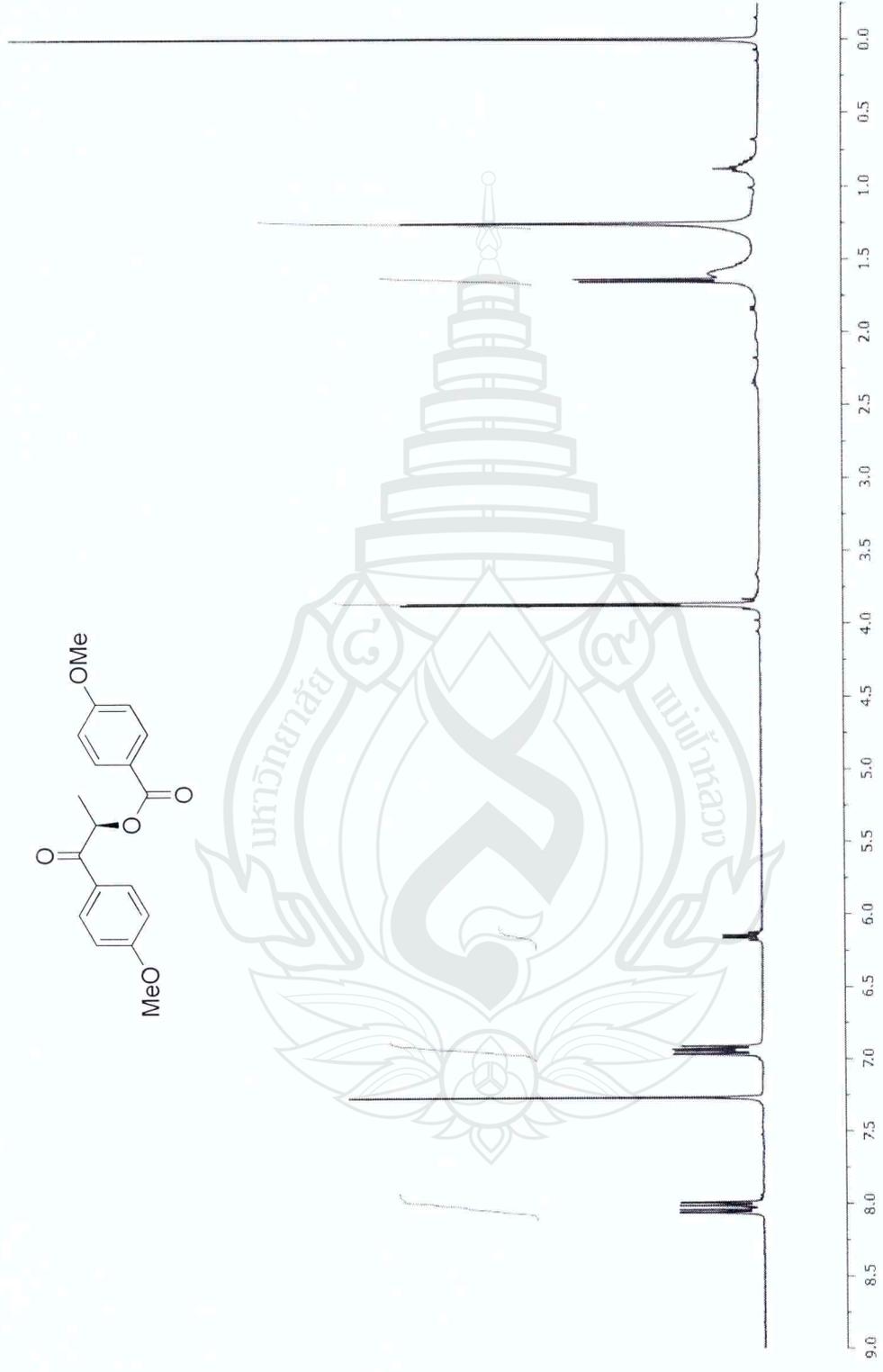
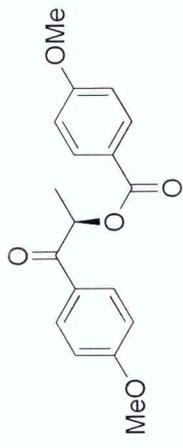


BZL-F13B\_SL  
BZL-13F-B\_SL in CDCl<sub>3</sub>



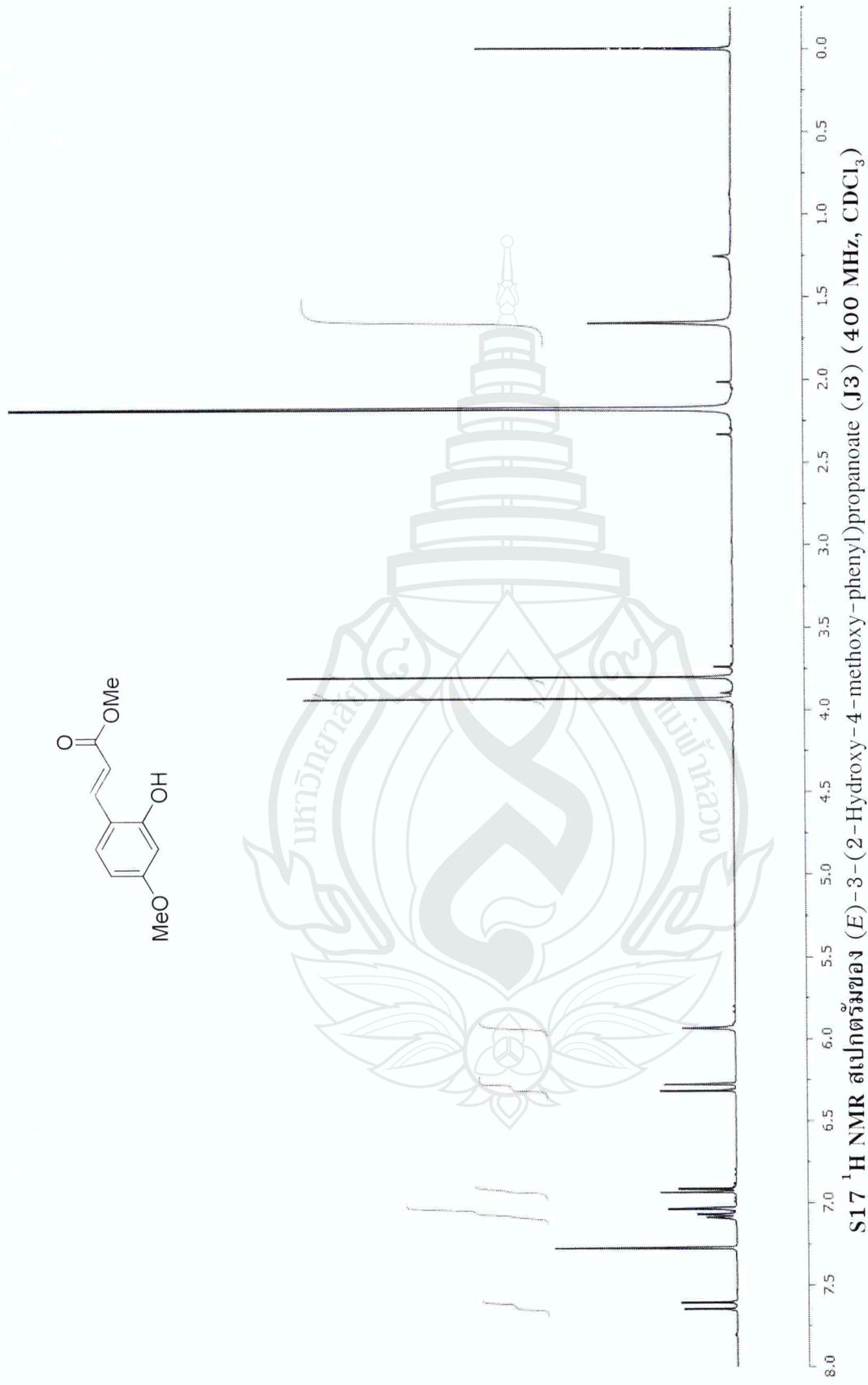
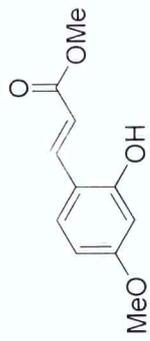
BZL-G10-G  
BZL-G10-G\_SL in CDCl<sub>3</sub>

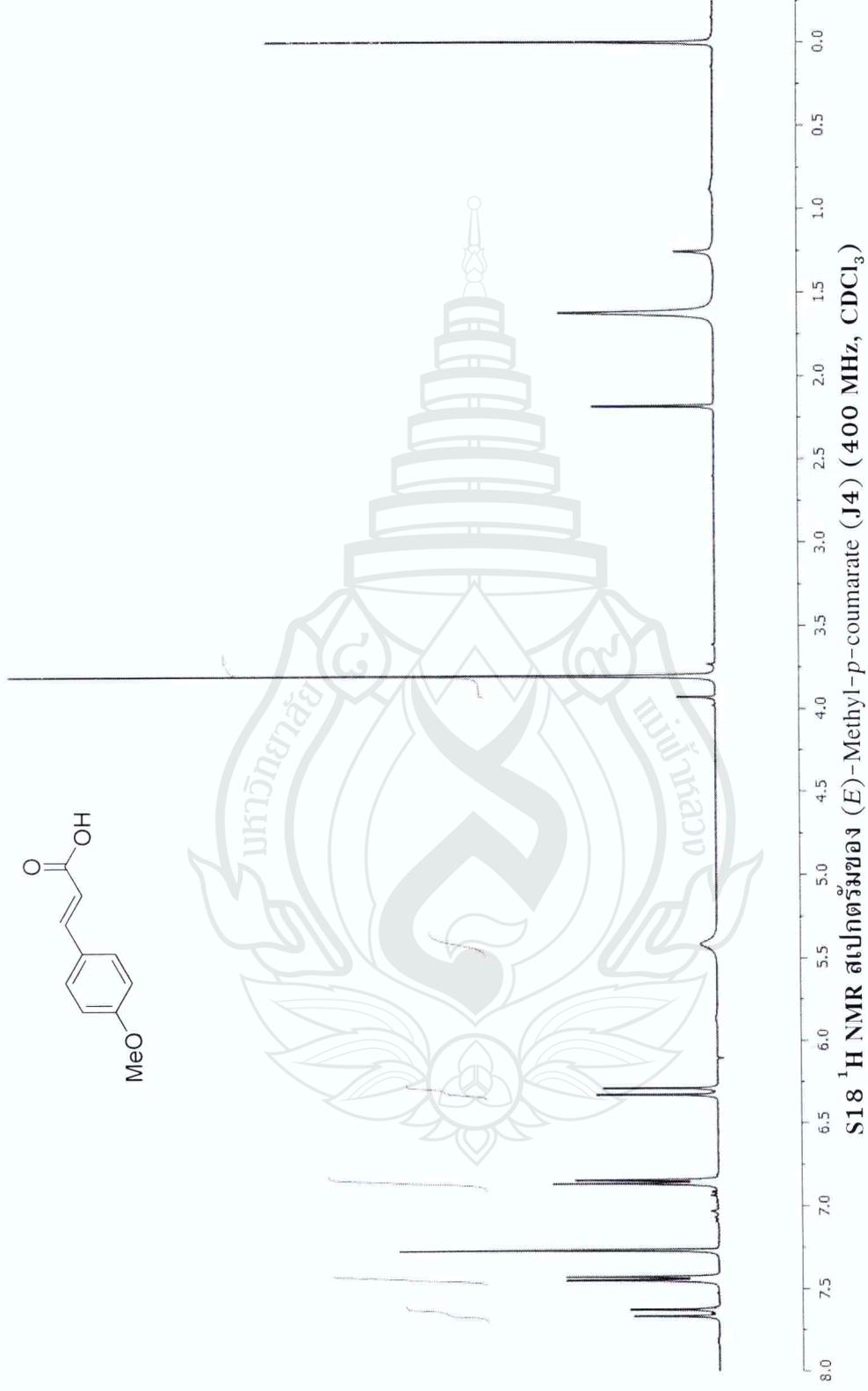


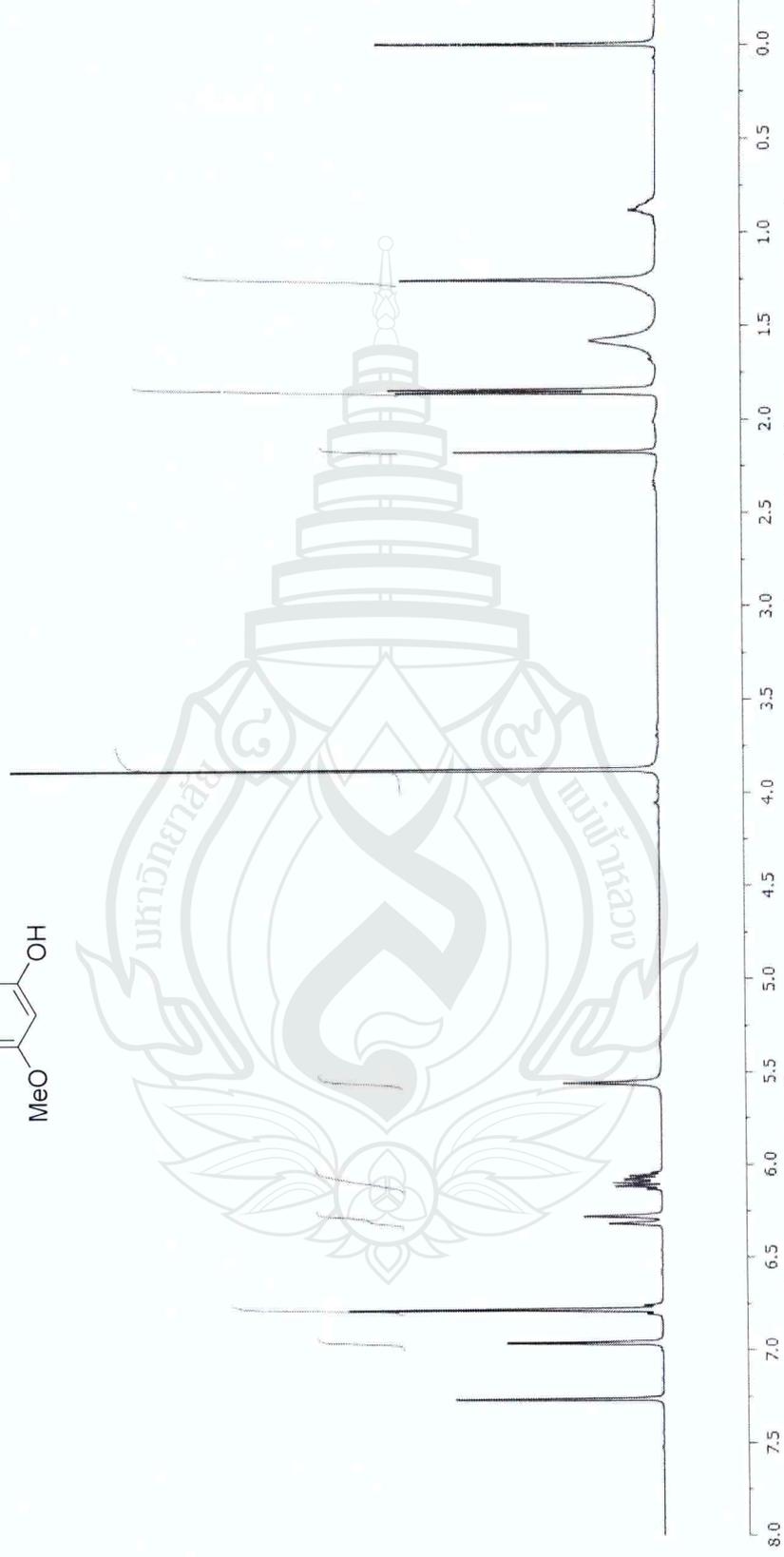
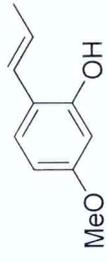


S15  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของ harmandianone (J1) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )









S19 <sup>1</sup>H NMR spectrum of (E)-5-methoxy-2-(prop-1-enyl)phenol (J5) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

## ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

### 1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย/ ภาษาอังกฤษ)

(ภาษาไทย) นายสุรัตน์ ละภูเขียว

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Surat Laphookhieo

### 2. ตำแหน่งปัจจุบัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์

### 3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail address

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ต.ท่าสูด อ. เมือง จ. เชียงราย 57100

โทรศัพท์ 0-5391-6778, 0-5391-6238

โทรสาร 0-5391-6776

E-mail: s.laphookhieo@sci.mfu.ac.th; surat@mfu.ac.th

### 4. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	สาขาวิชา	สถาบัน	ปีจบ
ปริญญาเอก	เคมีอินทรีย์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2005
ปริญญาโท	เคมีอินทรีย์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2002
ปริญญาตรี	เคมี	มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี	1999

### 5. รางวัลที่ได้รับ

รางวัล	สถาบันที่มอบ	ปี พ.ศ.
พนักงานผู้มีผลงานวิจัยยอดเยี่ยม	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	2551
นักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่	สมาคมส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์	2552
โล่เชิดชูเกียรติ นักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	2552
เงินทุนช่วยเหลือด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี	มูลนิธิโทรแห่งประเทศไทย	2553
รางวัลดุษฎีบัณฑิต คปก. ดีเด่น	โครงการปริญญาเอกกาญจณภิเษกสำนักงานสนับสนุนการวิจัย	2554

### 6. ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2548- ปัจจุบัน

อาจารย์ประจำสำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

### 7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เคมีของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

### 8. ประวัติการเผยแพร่ผลงานวิจัย (2007-2013)

1. Jain, S.; **Laphookhieo, S.**; Shi, Z.; Fu, L.; Akiyama, S.; Chen, Z.-S.; Youssef, D. T. A.; van Soest, R. W. M.; El Sayed, K. A. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by Sipholane Triterpenoids. **2007**. *J. Nat. Prod.*, **80**, 928–931.
2. Maneerat, W.; Fun, H. K.; Buatip, T.; **Laphookhieo, S.**; Chantrapromma. 6 $\alpha$ -Acetoxyepoxyzadiradione. **2007**. *Acta Cryst.*, **E63**, o3583–o3584, **2007**.
3. **Laphookhieo, S.**; Sroisuan, P.; Syers, J.K.; Kanjana-Opas, A.; Ponglimanont, C.; Karalai, C. Coumarins and xanthenes from the seed of *Mammea siamensis*. **2007**. *J. Braz. Chem. Soc.* **18**, 1077–1080.
4. Fun, H.K.; **Laphookhieo, S.**; Maneerat, W.; Chantrapromma, S. 2,8-Dihydroxy-1-(3-methylbut-2-enyl)-9H-Carbazole-3-carboxaldehyde, 2,8-dihydroxy-1-(3-methyl-2-butenyl). **2007**. *Acta Cryst.*, **E63**, o3964–o3965.
5. **Laphookhieo, S.**; Maneerat, W.; Koysomboon, S.; Kiattansakul, R.; Chantrapromma, K.; Syers, J. K. A novel limonoid from the seeds of *Chisocheton siamensis*. **2008**. *Can. J. Chem.* **86**, 205–208.
6. El Sayed, K. A.; **Laphookhieo, S.**; Youssef, M.; Prestridge, J. A.; Shirode, A.B.; Wali, V.B.; Sylvester, P.W. Semisynthetic and biotransformation studies of (1S,2E,4S,6R,7E,11E)-2,7,11-cembratriene-4,6-diol. **2008**. *J. Nat. Prod.* **71**, 117–122.
7. El Sayed, K.A.; **Laphookhieo, S.**; Baraka, H.N.; Yousaf, M.; Hebert, A.; Bagaley, D.; Rainey, F.A.; Muralidharan, A.; Thomas, S.; Shah, G.V. Biocatalytic and semisynthetic optimization of the anti-invasive tobacco (1S,2E,4R,6R,7E,11E)-2,7,11-cembratriene-4,6-diol. **2008**. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 2886–2893.
8. **Laphookhieo, S.**; Maneerat, W.; Buatip, T.; Syers, J. K. New xanthenes from *Cratogeomys cochinchinense*. **2008**. *Can. J. Chem.* **86**, 757–760.
9. Maneerat, W.; **Laphookhieo, S.**; Koysomboon, S.; Chantrapromma, K. Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from *Chisocheton siamensis*. **2008**. *Phytomedicine* **15**, 1130–1134.
10. **Laphookhieo, S.**; Maneerat, W.; Narmdorkmai, W.; Koysomboon, S. New xanthenes from barks and fruits of *Cratogeomys cochinchinense*. **2009**. *Heterocycles*. **78**, 757–760.
11. **Laphookhieo, S.**; Maneerat, W.; Koysomboon, S. Antimalarial and cytotoxic phenolic compounds from *Cratogeomys maingayi* and *Cratogeomys cochinchinense*. **2009**. *Molecules*. **14**, 1389–1395.
12. **Laphookhieo, S.**; Sripisut, T.; Prawat, U.; A new coumarin from *Clausena excavata*. **2009**. *Heterocycles*. **78**, 2115–2119.

13. Maneerat, W.; Prawat, U.; Seawan, N.; **Laphookhieo, S.** New coumarins from *Clausena lansium* twigs. **2010**. *J. Braz. Chem. Soc.* *21*, 665–668.
14. Maneerat, W. and **Laphookhieo, S.** Antitumoral alkaloids from *Clausena lansium*. **2010**. *Heterocycles.* *81*, 1261–1269.
15. Chantrapromma, S.; Jeerapong, J.; Kruahong, T.; **Laphookhieo, S.**; Fun, H.K. 1-(2,6-Dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenylpropan-1-one. **2010**. *Acta Cryst. E66*, o1120–o1121.
16. Sripisut, T. and **Laphookhieo, S.** Carbazole alkaloids from *Clausena excavata*. **2010**. *J. Asian Nat. Prod. Res.* *12*, 614–617.
17. **Laphookhieo, S.**; Phungpunya, C.; Tantapakul, C.; Techa, S.; Tha-in, S.; Narmdokmai, W. Chemical constituents from *Aegle marmelos*. **2011**. *J. Braz. Chem. Soc.* *22*, 176–178.
18. Jeerapong, C.; Cheenpracha, S.; Maneerat, W.; Kruahong, T.; Prawat, U.; **Laphookhieo, S.** The first hydroperoxy dihydrochalcone in the *Etlingera* genus: Etlinglittoralin from the rhizomes of *Etlingera littoralis*. **2011**. *Heterocycles.* *83*, 849–854.
19. Cheenpracha, S.; Phakhodee, W.; Ritthiwigrom, T.; Prawat, U. **Laphookhieo, S.** A New Depsidone from the Twigs of *Garcinia cowa*. **2011**. *Heterocycles.* *83*, 1139–1144.
20. Cheenpracha, S.; **Laphookhieo, S.** Alkaloids and amides from *Glycosmis macrophylla*. **2011**. *Phytochemistry Letters.* *4*, 187–189.
21. Maneerat, W.; Tha-in, S.; Cheenpracha, S.; Prawat, U.; **Laphookhieo, S.** New amides from the seeds of *Clausena lansium*. **2011**. *J. Med. Plants Res.* *5*, 2812–2815.
22. Sripisut, T.; Cheenpracha, S.; **Laphookhieo, S.** Chemical constituents from the roots of *Feroniella lucida*. **2011**. *J. Asian Nat. Prod.* *13*, 556–560.
23. 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*. **2011**. *Tetrahedron Letters.* *52*, 3303–3305.
24. Fun, H.K.; Maneerat, W.; **Laphookhieo, S.**; Chantrapromma, S. Glycozolidal. **2011**. *Acta Cryst. E67*, o1811–o1812.
25. Fun, H.K.; Siridechakorn, I.; **Laphookhieo, S.**; Chantrapromma, S. Absolute configuration of micromelin. **2011**. *Acta Cryst. E67*, o1706–o1707.
26. Kuvatanasuchati, J.; **Laphookhieo, S.**; Rodanant, P. Antimicrobial activity against periodontopathic bacteria and cytotoxic study of *Cratoxylum formosum* and *Clausena lansium*. **2011**. *J. Med. Plants Res.* *5*, 5988–5992.
27. Siridechakorn, I.; Ritthiwigrom, T.; **Laphookhieo, S.** Coumarins and carbazole alkaloids from the roots of *Micromilum glanduliferum*. **2012**. *Biochem. Syst. Ecol.* *40*, o69–70.

28. Maneerat, W.; Ritthiwigrom, T.; Cheenpracha, S.; **Laphookhieo, S.** Carbazole alkaloids and coumarins from *Clausena lansium* roots. **2012.** *Phytochemistry Letters*, 5, 26–28.
29. Sripisut, T.; Phakodee, W.; Ritthiwigrom, T.; Cheenpracha, S.; **Laphookhieo, S.** Lucidafuranocoumarins B and C from the twigs of *Feroniella lucida*: Absolute configurations of lucidafuranocoumarin C. **2012.** *Phytochemistry Letters*, 5, 309–312.
30. Sripisut, T.; Ritthiwigrom, T.; Promgool, T.; Yossathera, K.; Deachathai, S.; Phakodee, W.; Cheenpracha, S.; **Laphookhieo, S.** Glycopentaphyllone: the first isolation of hydroperoxyquinolone from the fruits of *Glycosmis pentaphylla*. **2012.** *Phytochemistry Letters*, 5, 379–381.
31. Maneerat, W.; Ritthiwigrom, T.; Cheenpracha, S.; Promgool, T.; Yossathera, K.; Deachathai, S.; Phakodee, W.; **Laphookhieo, S.** Bioactive Carbazole Alkaloids from *Clausena wallichii* Roots. **2012.** *Journal of Natural Products* 75, 741–746.
32. Maneerat, W.; Phakodee, W.; Ritthiwigrom, T.; Cheenpracha, S.; Promgool, T.; Yossathera, K.; Deachathai, S.; **Laphookhieo, S.** Antibacterial carbazole alkaloids from *Clausena harmandiana* twigs. **2012.** *Fitoterapia* 83, 1110–1114.
33. Tantapakul, C.; Phakodee, W.; Ritthiwigrom, T.; Yossathera, K.; Deachathai, S.; **Laphookhieo, S.** Antibacterial compounds from *Zanthoxylum rhetsa*. **2012.** *Archives Pharmacology Research*. 35, 1139–1142.
34. Sripisut, T.; Ritthiwigrom, T.; Cheenpracha, S.; Prawat, U.; **Laphookhieo, S.** Chemical Constituents from the Roots of *Clausena excavata*. **2012.** *Record Natural Product*, 6, 386–389.
35. Tantapakul, C.; Phakodee, W.; Ritthiwigrom, T.; Cheenpracha, S.; Prawat, U.; Deachathai, S.; **Laphookhieo, S.** Rearranged benzophenones and prenylated xanthenes from *Garcinia propinqua* twigs. **2012.** *Journal of Natural Products*, 75, 1660–1665.
36. Siridechakorn, I.; Phakodee, W.; Ritthiwigrom, T.; Promgool, T.; Deachathai, S.; Cheenpracha, S.; Prawat, U.; **Laphookhieo, S.** Antibacterial dihydrobenzopyran and xanthone derivatives from *Garcinia cowa* stem barks. **2012.** *Fitoterapia* 83, 1430–1434.
37. Cheenpracha, S.; Ritthiwigrom, T.; Karalai, C.; **Laphookhieo, S.** Candenatenins G–K, phenolic compounds from *Dalbergia candenatensis* heartwood. **2012.** *Phytochemistry Letters*, 5, 708–712.
38. Cheenpracha, S.; Ritthiwigrom, T.; **Laphookhieo, S.** Alstoniaphyllines A–C, unusual nitrogenous derivatives from the bark of *Alstonia macrophylla*. **2013.** *Journal of Natural Products*, 76, 723–726.
39. Phakodee, W.; Pongpam, P.; Saovapakhiran, A.; **Laphookhieo, S.** Coumarin precursor from *Micromelum integerrimum* leaves. **2013.** *Natural Product Communications*, 8, 799–701.

40. Maneerat, W.; Phakodee, W.; Ritthiwigrom, T.; Cheenpracha, S.; Deachathai, S.; Laphookhieo, S. Phenylpropanoid derivatives from *Clausena harmandiana* fruits. 2013. *Phytochemistry Letters*, 6, 18-20.

41. Maneerat, W.; Phakodee, W.; Cheenpracha, S.; Ritthiwigrom, T.; Deachathai, S.; Laphookhieo, S. Clausenawallines G-K, carbazole alkaloids from *Clausena wallichii* twigs. 2013. *Phytochemistry*, 88, 74-78.





## Antibacterial Compounds from *Zanthoxylum rhetsa*

Cholpisut Tantapakul<sup>1</sup>, Wong Phakhodee<sup>1</sup>, Thunwadee Ritthiwigrom<sup>2</sup>, Kulsiri Yossathera<sup>1</sup>, Suwana Deachathai<sup>1</sup>, and Surat Laphookhieo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Natural Products Research Laboratory, School of Science, Mae Fah Luang University, Tasud, Muang, Chiang Rai, 57100 Thailand and <sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Sutep, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand

(Received December 25, 2011/Revised January 17, 2012/Accepted January 19, 2012)

A new amide, zanthorhetsamide (**1**), along with nine known compounds (**2-10**) was isolated from the roots and stem barks of *Zanthoxylum rhetsa*. The structure was characterized by spectroscopic methods. In addition, the antibacterial activity of the isolates was evaluated. Dihydrochelerythrine (**4**) exhibited strong activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1 and moderate activity against *Escherichia coli* TISTR 780 with MIC values of 8 and 16 µg/mL, respectively.

**Key words:** Zanthorhetsamide, *Zanthoxylum rhetsa*, Rutaceae, Antibacterial activity

### INTRODUCTION

About 200 species of the plants of the genus *Zanthoxylum* are distributed in pantropical countries. Several species of *Zanthoxylum* are used in traditional medicine and consumed as vegetables, especially in Asian and African countries (Ladino and Suarez, 2010). Among them, *Z. acanthopodium*, *Z. armatum*, *Z. nitidum*, and *Z. rhetsa* are commonly used as spices and condiments in the Northern part of Thailand (Smitinand, 2001). *Z. rhetsa* produces a variety of biologically active metabolites including alkaloids, lignans, coumarins, and terpenoids (Cheng et al., 2005). In our ongoing study on chemical constituents and biological activity of Rutaceae plants, we report herein the isolation and structure elucidation of a new amide (**1**) along with nine known compounds (*N*-(4-methoxyphenethyl)benzamide (**2**) (Vargas et al., 2010), alatamide (**3**) (Maxwell and Ramperad, 1989), dihydrochelerythrine (**4**) (Martin et al., 2005), 6-acetyldihydrochelerythrine (**5**) (Chen et al., 2011), 8-acetyldihydrochelitidine (**6**) (Nissanka et al., 2001), asarinin (**7**) (Gunatilaka et al., 1982), horsfieldine (**8**) (Gunatilaka

et al., 1982), 5,7,8-trimethoxycoumarin (**9**) (Cheng et al., 2005) and dictamine (**10**) (Tanaka et al., 1985) from the stem barks and roots of *Z. rhetsa*.

### MATERIALS AND METHODS

#### General experimental procedure

The  $[\alpha]_D$  values were determined with a Bellingham & Stanley ADP440 polarimeter. The infrared (IR) and ultraviolet (UV) spectra were recorded on a Perkin-Elmer FTS FT-IR and a Perkin-Elmer UV-Vis spectrophotometers, respectively. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded using a 400 MHz Bruker spectrometer. Tetramethylsilane was used as internal reference. A MicroTOF, Bruker Daltonics mass spectrometer was used to correct electrospray ionization time-of-flight mass spectra (ESI-TOF-MS). 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<sub>254</sub> were used for analytical thin layer chromatography (TLC).

#### Plant material

The stem barks and roots of *Z. rhetsa* were collected in December 2008 from Chiang Rai Province, Northern Thailand. The plant was identified by Mr. James Maxwell, Chiang Mai University Herbarium and the

Correspondence to: Wong Phakhodee, Natural Products Research Laboratory, School of Science, Mae Fah Luang University, Tasud, Muang, Chiang Rai 57100, Thailand  
Tel: 66-5391-6238, Fax: 66-5391-6776  
E-mail: w.phakhodee@sci.mfu.ac.th

specimen (MFU-NPR0026) was deposited at Natural Products Research Laboratory, School of Science, Mae Fah Luang University.

### Extraction and isolation

The stem barks and roots of *Z. rhetsa* (6.65 kg) were extracted with acetone over the period of 3 days at room temperature. Removal of solvent under reduced pressure provided an acetone extract (140 g) that was chromatographed by QCC and eluted with a gradient of hexanes-acetone (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10) to yield 14 fractions (A-N). QCC of fraction D (9.2 g) with 5% ethyl acetate (EtOAc)-hexanes yielded eight subfractions (DA-DH). Subfraction DC (1.6 g) was purified by CC with 5% EtOAc-hexanes to yield compound **4** (6.2 mg). Fractions G (19.3 g) and H (15.5 g) were combined and subsequently subjected to QCC with 10% EtOAc-hexanes to yield **7** (400.5 mg) and **10** (29.4 mg). Fraction J (7.05 g) was further subjected to QCC with a gradient of EtOAc-hexanes (30% EtOAc-hexanes to 100% EtOAc) to provide 20 subfractions (JA-JT). Subfraction JM (912.7 mg) was further purified by CC with 30% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-hexanes to yield four subfractions (JM1-JM4). Subfraction JM3 (274.8 mg) was subsequently separated by CC with 30% EtOAc-hexanes to give **2** (39.5 mg) and **3** (3.0 mg). Subfraction JO (520.2 mg) was further purified by CC using 20% acetone-hexanes to give six subfractions (JO1-JO6). Compound **9** (2.2 mg) was derived from subfraction JO2 (215.4 mg) by repeated CC using 10% EtOAc-hexanes. Subfraction JS (363.0 mg) was subjected to QCC with a gradient of EtOAc-hexanes (30% EtOAc-hexanes to 100% EtOAc) to yield **5** (4.2 mg), **8** (52.0 mg) and 10 subfractions (JS1-JS10). Subfraction JS3 was further purified by CC with 5% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-hexanes to provide **6** (15.1 mg). Fraction N (1.11 g) was subjected to CC with 40% hexanes-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to afford five subfractions (NA-NE). Compound **1** (6.2 mg) was obtained from subfraction NA (35.0 mg) by CC with 20% acetone-hexanes as an eluent.

### Zanthorhetsamide (1)

White amorphous solid; mp 67-69°C;  $[\alpha]_D^{30} +55.7$  ( $c = 0.01$ , CHCl<sub>3</sub>); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) nm (log  $\epsilon$ ) 228 (4.08), 274 (3.24), 281 (3.16); Fourier transform (FT)-IR (KBr)  $\nu_{max}$  1740, 1648 cm<sup>-1</sup>; ESI-TOF-MS  $m/z$  369.3510 [M]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub>, 369.1940); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, in CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, in CDCl<sub>3</sub>) data, see Table I.

### Hydrolysis of zanthorhetsamide

Zanthorhetsamide (2.2 mg), dissolved in methanol (1 mL), was added to K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 mg). The resulting

**Table I.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) and <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) data of zanthorhetsamide (**1**) in CDCl<sub>3</sub>

Position	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., $J$ in Hz)
1	45.2	3.82 (m)
2	74.1	5.95 (dd, $J = 8.0, 4.4$ )
1'	129.8	-
2'	127.9	7.32 (d, $J = 8.4$ )
3'	114.1	6.90 (d, $J = 8.4$ )
4'	159.8	-
5'	114.1	6.90 (d, $J = 8.4$ )
6'	127.9	7.32 (d, $J = 8.4$ )
1''	167.5	-
2''	134.3	-
3''	126.8	7.71 (br d, $J = 7.6$ )
4''	128.7	7.42 (m)
5''	131.7	7.49 (br t, $J = 7.2$ )
6''	128.7	7.42 (m)
7''	126.8	7.71 (br d, $J = 7.6$ )
1'''	173.6	-
2'''	34.5	2.34 (t, $J = 7.6$ )
3'''	24.9	1.58 (m)
4'''	29.5	1.26 (m)
5'''	22.8	1.27 (m)
6'''	14.1	0.85 (t, $J = 6.4$ )
4'-OMe	55.4	3.80 (s)
NH	-	6.42 (br s)

mixture was stirred at room temperature for 10 min and filtered through pad column chromatography (30% EtOAc-hexanes) to give *S*-(+)-tembamide (1.3 mg). Yield: 81%; white solid;  $[\alpha]_D^{26} +45.2$  ( $c = 0.01$ , CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, in CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.75 (2H, *dd*,  $J = 8.8, 1.6$  Hz, H-3'', 7''), 7.49 (1H, *tt*,  $J = 7.6, 7.2, 1.6, 1.2$  Hz, H-5''), 7.41 (2H, *m*, H-4'', 6''), 7.32 (2H, *br d*,  $J = 8.8$  Hz, H-2', 6'), 6.90 (2H, *br d*,  $J = 8.8$  Hz, H-3', 5'), 6.63 (1H, *br s*, NH), 4.90 (1H, *br dd*,  $J = 5.6, 2.0$  Hz, H-2), 3.90 (1H, *s*, HO-2), 3.86 (1H, *m*, H-1), 3.79 (3H, *s*, OMe-4'), 3.50 (1H, *m*, H-1).

### Antibacterial activity testing

*Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, and *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 were obtained from the Microbiological Resources, Centre of the Thailand Institute of Scientific and Technological Research, and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1 was obtained from the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand. Minimum inhibition 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). Vancomycin and genta-

mycin were used as standard antibacterial agents.

## RESULTS AND DISCUSSION

Compound **1**,  $[\alpha]_D^{20} +55.7$  ( $\text{CDCl}_3$ ), was isolated as a white amorphous solid. ESI-TOF-MS gave a molecular ion peak  $[\text{M}]^+$  at  $m/z$  369.3510, consistent with a molecular formula of  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_4$ . The UV absorptions at  $\lambda_{\text{max}}$  228, 274, and 281 nm suggested the presence of a conjugated system in the molecule. The IR absorptions showed stretching frequency of carbonyl functionalities at 1740 (ester) and 1648 (amide)  $\text{cm}^{-1}$ . The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of **1** showed the presence of a NH ( $\delta$  6.42, br s), a monosubstituted benzene group [ $\delta$  7.71 (2H, br d,  $J = 7.6$  Hz, H-3'' and H-7''), 7.49 (1H, br t,  $J = 7.2$  Hz, H-5'') and 7.42 (2H, m, H-4'' and H-6'')], a 1,4-disubstituted benzene group [ $\delta$  7.32 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2' and H-6'), and 6.90 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3' and H-5')], a methoxyl group ( $\delta$  3.80, s, 4'-OMe), an oxymethine ( $\delta$  5.95, dd,  $J = 8.0, 4.4$  Hz, H-2) and methylene protons ( $\delta$  3.82, 2H, m, H-1). These signals were similar to the signals described previously for tembamide acetate isolated from *Piper guayranum* (Maxwell and Ramperad, 1989). The  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of **1** displayed the signals for a hexanoyl moiety (Kanokmedhakul et al., 2007) at  $\delta_{\text{H}}$  2.34 (t, 7.6 Hz, H-2'')/ $\delta_{\text{C}}$  34.5 (C-2''),  $\delta_{\text{H}}$  1.26 (m, H-3''')/ $\delta_{\text{C}}$  29.5 (C-3'''),  $\delta_{\text{H}}$  1.58 (m, H-3''')/ $\delta_{\text{C}}$  24.9 (C-3'''),  $\delta_{\text{H}}$  1.26 (m, H-4''')/ $\delta_{\text{C}}$  29.5 (C-4'''),  $\delta_{\text{H}}$  0.85 (t, 6.4 Hz, H-6''')/ $\delta_{\text{C}}$  14.1 (C-

6''') and C=O at  $\delta_{\text{C}}$  173.6 (C-1''') instead of the acetyl group of tembamide acetate [ $\delta_{\text{H}}$  2.12/ $\delta_{\text{C}}$  21.5 ( $\text{CH}_3$ ) and  $\delta_{\text{C}}$  172.0 (C=O)] (Maxwell and Ramperad, 1989). These data were suggested by COSY and HMBC correlations as shown in Fig. 2. The mass fragment ion at  $m/z$  254.1  $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2]^+$  confirmed the presence of hexanoyl moiety, which is placed on C-2 due to the correlations of H-2 ( $\delta$  5.95), H-2'' ( $\delta$  2.34) and H-3''' ( $\delta$  1.58) with C-1''' ( $\delta$  173.6) in HMBC spectrum. Therefore, the structure **1** was identified to be zanthorhetsamide (2-benzamido-1-(4-methoxyphenyl)ethylhexanoate). Zanthorhetsamide **1** was partially hydrolyzed with  $\text{K}_2\text{CO}_3$  to yield tembamide, which had a similar  $^1\text{H-NMR}$  spectrum and specific rotation ( $[\alpha]_D^{26} +45.2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) with synthetic *S*-(+)-tembamide ( $[\alpha]_D^{25} +56.9$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) (Kamal et al.,

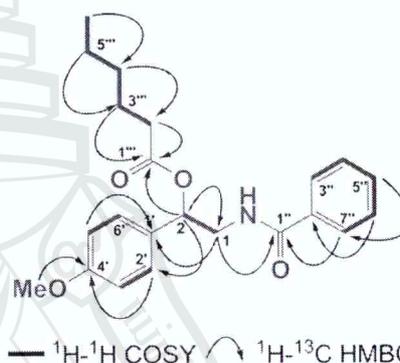


Fig. 2. Key HMBC correlations for zanthorhetsamide (**1**).

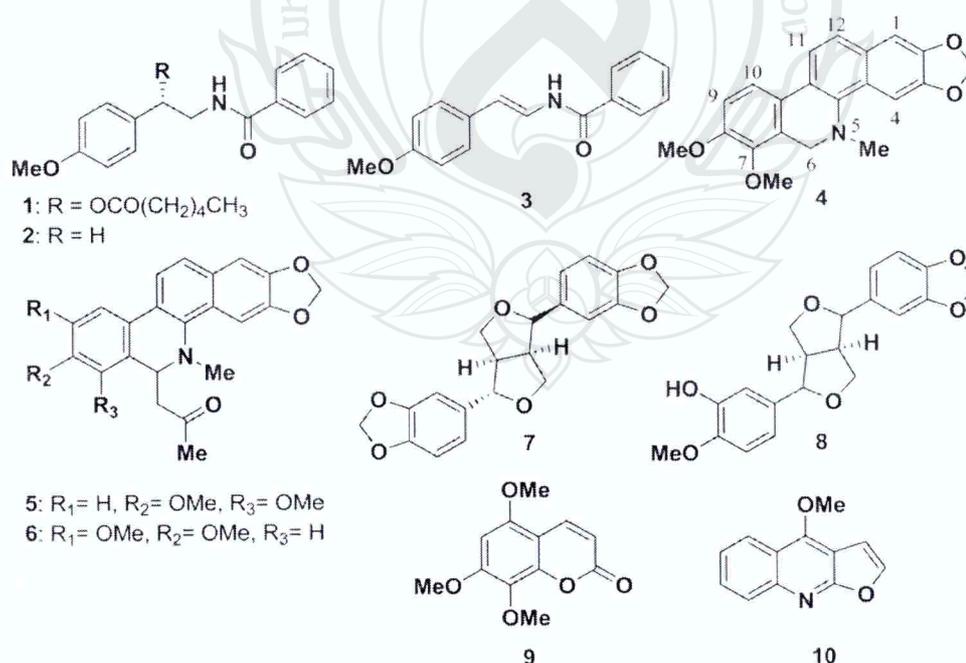


Fig. 1. Structures of compounds **1-10**.

2004). This result may imply that zanthorhetsamide should have the same configuration as synthetic *S*-(+)-tembamide. The absolute configuration of zanthorhetsamide was, therefore, proposed to be 2*S*-(+)-zanthorhetsamide.

All isolated compounds, except compound **6**, were evaluated for their antibacterial activity against both Gram-positive bacteria (*Staph.* and MRSA SK1) and Gram-negative bacteria (*S. typhimurium* and *E. coli*). The standard drugs were vancomycin (MIC = 1 and 0.25 µg/mL against MRSA SK1 and *Staph.*, respectively) and gentamicin (MIC = 0.25 and 0.125 µg/mL against *E. coli* and *S. typhimurium*, respectively). All isolates displayed weak activity against *S. typhimurium* with the same MIC value of 128 µg/mL, but were inactive against *Staph.* Only compound **4** showed strong activity against MRSA (MIC of 8 µg/mL), while the remaining compounds were inactive. Compound **4** also displayed moderate activity against *E. coli* (MIC = 16 µg/mL), whereas the rest of compounds were weakly active with the same MIC value of 128 µg/mL. It should be noted that the phenanthridine alkaloid **4** without substituent located at C-6 plays an important role in both Gram-positive and Gram-negative antibacterial activity.

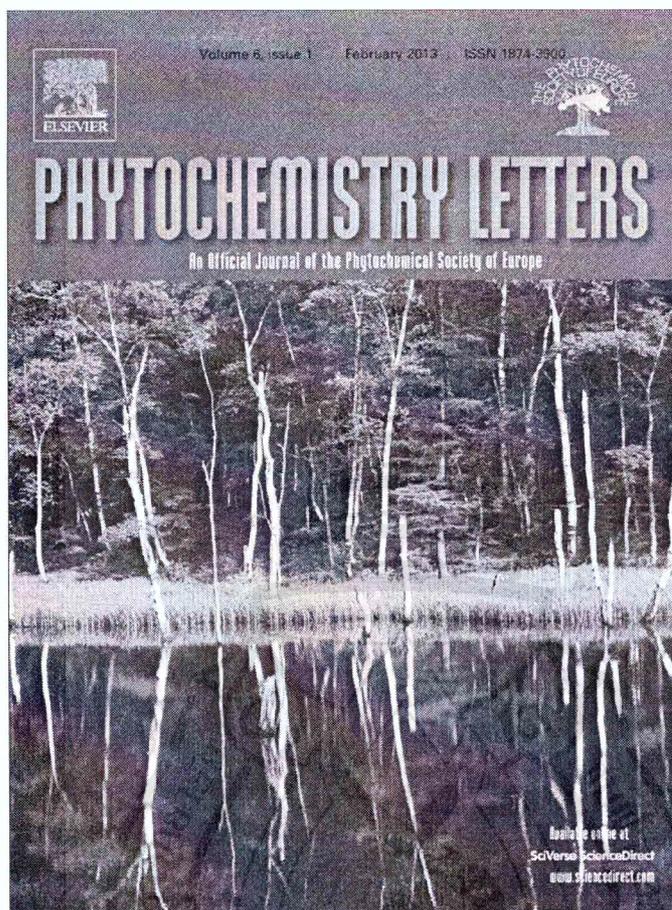
## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank National Research Council of Thailand (NRCT) for financial support. Mae Fah Luang University is also acknowledged for the graduate student research grant and laboratory facilities. We appreciate to Mr. Nitirat Chimnoi, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, for recording mass spectra.

## REFERENCES

- Chen, J. J., Lin, Y. H., Day, S. H., Hwang, T. L., and Chen, I. S., New benzenoids and anti-inflammatory constituents from *Zanthoxylum nitidum*. *Food Chem.*, 125, 282-287 (2011).
- Cheng, M. J., Lee, K. H., Tsai, I. L., and Chen, I. S., Two new sesquiterpenoids and anti-HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 5915-5920 (2005).
- CLSI, Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard M7-A4. <http://isoforlab.com/phocadownload/csl/M7-A7.pdf> (2006).
- Gunatilaka, A. A. L., Jasmin De Silva, A. M. Y., Sotheeswaran, S., and Tellederatne, L. M. V., Horsfieldin, a lignin and other constituents from *Horfieldia iryagedhi*. *Phytochemistry*, 21, 2719-2723 (1982).
- Kamal, A., Shaik, A. A., Sandbhor, M., and Malik, M. S., Chemoenzymatic synthesis of (*R*)- and (*S*)-tembamide, aegeline and denopamine by a one-pot lipase resolution protocol. *Tetrahedron Asymmetry*, 15, 3939-3944 (2004).
- Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., and Buayairaksa, M., Cytotoxic clerodane diterpenoids from fruits of *Casearia grewiiifolia*. *J. Nat. Prod.*, 70, 1122-1126 (2007).
- Ladino, O. J. P. and Suarez, L. E. C., Isoquinoline alkaloids of *Zanthoxylum quinduense* (Rutaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 38, 853-856 (2010).
- Martin, M. T., Rasoanaivo, L. H., and Raharisololalao, A., Phenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum madagascariense*. *Fitoterapia*, 76, 590-593 (2005).
- Maxwell, A. and Ramperad, D., β-Phenylethylamine-derived amides from *Piper guaranum*. *J. Nat. Prod.*, 52, 411-414 (1989).
- Nissanka, A. P. K., Karunaratne, V., Bandara, B. M. R., Kumar, V., Nakanishi, T., Nishi, M., Inada, A., Tillekeratne, L. M. V., Wijesundara, D. S. A., and Gunatilaka, A. A. L., Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. *Phytochemistry*, 56, 857-861 (2001).
- Smitinand, T., Thai Plant Names, Revised ed. Prachachon Co, Bangkok, (2001).
- Tanaka, H., Ahn, J. W., Katayama, M., Wada, K., Marumo, S., and Osaka, Y., Isolation of two ovicidal substances against two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, from *Skimmia repens* Nakai. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2189-2190 (1985).
- Vargas, F., Toledo, F. T., and Comasseto, J. V., *N*-Functionalized organolithium compounds via tellurium/lithium exchange reaction. *J. Braz. Chem. Soc.*, 21, 2072-2078 (2010).

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.

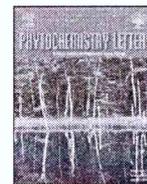
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Phytochemistry Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/phytol](http://www.elsevier.com/locate/phytol)Phenylpropanoid derivatives from *Clausena harmandiana* fruitsNisanu Maneerat<sup>a</sup>, Wong Phakhodee<sup>a</sup>, Thunwadee Ritthiwigrom<sup>b</sup>, Sarot Cheenpracha<sup>c</sup>,  
Sujawanna Deachathai<sup>a</sup>, Surat Laphookhieo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Natural Products Research Laboratory, School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100, Thailand  
<sup>b</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand  
<sup>c</sup>School of Science, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 August 2012

Received in revised form 28 September 2012

Accepted 12 October 2012

Available online 25 October 2012

## Keywords:

*Clausena harmandiana*

Phenylpropanoid

Harmandianone

Antibacterial

Rutaceae

## ABSTRACT

A new phenylpropanoid derivative, harmandianone (**1**), along with four known compounds: verimol B (**2**), (*E*)-3-(2-hydroxy-4-methoxy-phenyl)propanoate (**3**), (*E*)-methyl *p*-coumarate (**4**), and (*E*)-5-methoxy-2-(prop-1-enyl)phenol (**5**) was isolated from the acetone extract of *Clausena harmandiana* fruits. All structures were characterized by spectroscopic methods (UV, IR, NMR and ESI-TOF-MS). Compounds **1** and **3–5** demonstrated weak antibacterial activity against *Escherichia coli* TISTR 780, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, *Salmonella typhimurium* TISTR 292 and *S. aureus* TISTR1466, with MIC values between 64 and 128 µg/mL.

© 2012 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Clausena harmandiana* (Pierre) is small evergreen trees or shrubs which belong to the family Rutaceae. Several parts of this plant have been used as traditional medicines for the treatment of illnesses, stomach pains and headaches (Thongthoom et al., 2010). The young leaves of the plant are edible and are used as a vegetable in Thailand (Songsiang et al., 2011). Previous phytochemical investigations of *C. harmandiana* have revealed this plant contains a number of carbazole alkaloids and coumarins with interesting biological activities, including antimalaria, antituberculosis, antibacterial and cytotoxic effects (Thongthoom et al., 2010; Songsiang et al., 2011; Yenjai et al., 2000; Noipha et al., 2010; Maneerat et al., 2012a). In a continuation of our study of the bioactive metabolites of *Clausena* plants (Maneerat and Laphookhieo, 2010; Maneerat et al., 2011a,b, 2012b), we report herein the isolation and elucidation of the structure of a new (**1**) and four known phenylpropanoid derivatives (**2–5**) from *C. harmandiana* fruits. The antibacterial activities of these compounds against *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonella typhimurium* TISTR 292,

*Staphylococcus aureus* TISTR1466 and methicillin-resistant *S. aureus* SK1 (MRSA SK1) are also reported.

## 2. Results and discussion

Phytochemical investigation of the acetone extract of *C. harmandiana* fruits using chromatographic techniques led to the isolation and structural identification of a new phenylpropanoid (**1**), along with four known compounds: verimol B (**2**) (Sy and Brown, 1998), (*E*)-3-(2-hydroxy-4-methoxy-phenyl)propanoate (**3**) (Cordoba et al., 2007), (*E*)-methyl *p*-coumarate (**4**) (Muhammed et al., 2011), and (*E*)-5-methoxy-2-(prop-1-enyl)phenol (**5**) (Bottini et al., 1986) (Fig. 1). All isolates were characterized by spectroscopic methods and compared with those previously published data.

Harmandianone (**1**) was obtained as a white solid (mp 114–117 °C). It displayed a pseudomolecular ion peak at  $[M+Na]^+ m/z$  337.1046 (calcd 337.1052) in ESI-TOF-MS, corresponding to the molecular formula C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>. The UV spectrum displayed maximal absorption bands at λ<sub>max</sub> 201, 213, 267 and 272 nm, while the IR spectrum revealed the absorption bands of aryl ester (1689 cm<sup>-1</sup>) and aryl ketone (1712 cm<sup>-1</sup>) functional groups. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of **1** displayed the signals of a *p*-methoxybenzoyl unit at δ<sub>H</sub> 7.98 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3' and H-5')/δ<sub>C</sub> 131.9, δ<sub>H</sub> 6.95 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2' and H-6')/δ<sub>C</sub> 113.6, δ<sub>H</sub> 3.87 (3H, s, 1'-OMe)/δ<sub>C</sub> 55.5, δ<sub>C</sub> 122.0 (C-4') and δ<sub>C</sub> 163.6 (C-1') (Sy and Brown, 1998). The

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

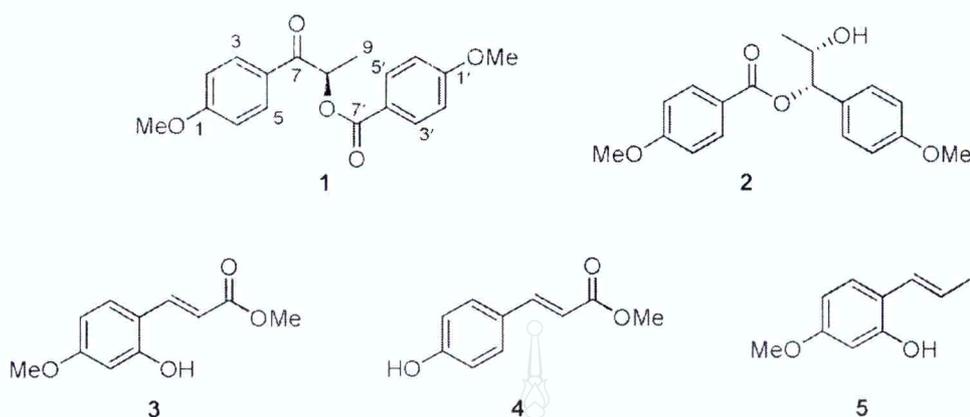


Fig. 1. Structures of phenylpropanoid derivatives from *C. harmandiana* fruits.

correlations between H-3'/H-5' ( $\delta_H$  7.98) with C-1' ( $\delta_C$  163.6) and C-7' ( $\delta_C$  165.9), and 1'-OMe ( $\delta_H$  3.87) with C-1' ( $\delta_C$  163.6) in the HMBC spectrum were also supported the *p*-methoxybenzoyl unit. Using a combination of COSY, HMQC and HMBC analyses, the signal of a *p*-methoxyphenyl-1-oxopropanone unit (phenylpropanoid derivative) was also observed in the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra at  $\delta_H$  7.80 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3 and H-5)/ $\delta_C$  130.9,  $\delta_H$  6.93 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2 and H-6)/ $\delta_C$  114.0,  $\delta_H$  6.15 (1H, q,  $J = 6.2$  Hz, H-8)/ $\delta_C$  71.3,  $\delta_H$  3.86 (3H, s, 1-OMe)/ $\delta_C$  55.4,  $\delta_H$  1.63 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz, H-9)/ $\delta_C$  17.3,  $\delta_C$  195.3 (C-7),  $\delta_C$  163.8 (C-1) and  $\delta_C$  127.4 (C-4). The important  $^2J$  and  $^3J$  HMBC correlations of the *p*-methoxyphenyl-1-propanone unit are summarized as: H-3/H-5 ( $\delta_H$  7.80) and H-9 ( $\delta_H$  1.63) with aryl ketone C-7 ( $\delta_C$  195.3), H-2/H-6 ( $\delta_H$  6.93) with C-4 ( $\delta_C$  127.4), and 1-OMe ( $\delta_H$  3.86) with C-1 ( $\delta_C$  163.8). Finally, the *p*-methoxyphenyl-1-propanone and *p*-methoxybenzoyl units were linked to each other via ester-linkage at C-8 and C-7', due to H-8 ( $\delta_H$  6.15) and H-3'/H-5' ( $\delta_H$  7.98) displaying cross peak  $^3J$  HMBC correlations with aryl ester C-7' ( $\delta_C$  165.9). The absolute configuration of harmandianone ( $[\alpha]_D^{27} = +60.3$ ,  $c = 0.014$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) at C-8 was determined as an *R* configuration by comparison with specific rotation of (2*S*)-hydroxy-1-phenyl-propanone ( $[\alpha]_D^{20} = -86$ ,  $c = 2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) (Kihumbu et al., 2002) and (2*R*)-hydroxy-1-phenyl-propanone ( $[\alpha]_D^{20} = +70$ ,  $c = 1.7$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) (Demir et al., 2001). Detailed assignments of the protons, carbons and HMBC correlations of harmandianone are summarized in Table 1.

The antibacterial activity of compounds **1** and **3–5** were evaluated in the strains MRSA SK1, *S. aureus* TISTR 1466, *E. coli* TISTR 780 and *S. typhimurium* TISTR 292. None of the compounds displayed significant antibacterial activity; all of the tested

compounds showed a weak antibacterial activity against both Gram-positive bacteria (MRSA SK1 and *S. aureus* TISTR 1466) and Gram-negative bacteria (*E. coli* TISTR 780 and *S. typhimurium* TISTR 292), with MIC values between 64 and 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 3. Experimental

#### 3.1. General

Specific rotations were determined using a Bellingham & Stanley ADP400 polarimeter. UV-vis spectra were recorded with a Perkin-Elmer UV-vis spectrophotometer. The IR spectra were recorded using a Perkin-Elmer FTS FT-IR spectrometer. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded with a 400 MHz Bruker spectrometer. Tetramethylsilane (TMS) was used as an internal reference. The ESI-TOF-MS data were generated using MicroTOF and a Bruker Daltonics mass spectrometer. Quick column chromatography (QCC) and column chromatography (CC) were performed using silica gel 60 H (Merck; 5–40  $\mu\text{m}$ ) and silica gel 100 (Merck; 63–200  $\mu\text{m}$ ), respectively. Plates pre-coated with silica gel 60 F<sub>254</sub> were used for analytical purposes.

#### 3.2. Plant material

*C. harmandiana* fruits were collected from Chiang Rai Province, northern Thailand, in July 2011. The plant was identified by Dr. Monthon Norsangsi and Mr. James Maxwell; a voucher specimen (number QBG 45334) has been deposited at the Herbarium Collection of Queen Sirikit Botanic Garden, Mae Rim, Chiang Mai, Thailand.

#### 3.3. Extraction and isolation

Fresh *C. harmandiana* fruits (4.07 kg) were successively extracted with acetone over a period of 3 days at room temperature. The crude extract (181.5 g) was subjected to QCC over silica gel using a gradient of hexanes–EtOAc (100% hexanes to 100% EtOAc) to provide six fractions (A–F). Fraction B (537.9 mg) was separated by CC with 30%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ –hexanes to afford compound **5** (4.2 mg). Compound **1** (2.2 mg) was obtained from fraction D (1.45 g) by Sephadex LH-20 after elution with 100% MeOH followed by repeated CC with 25% EtOAc–hexanes and 2% acetone–hexanes, respectively. Fraction E (7.05 g) was isolated by QCC with 10% EtOAc–hexanes and followed by Sephadex LH-20 and eluted with 100% MeOH to give four subfractions (E1–E4). Subfraction E2 (76.5 mg) was isolated by CC using 30% EtOAc–hexanes to afford four fractions (E2a–E2d).

Table 1  
NMR spectral data of harmandianone (**1**) in  $\text{CDCl}_3$  at 400 MHz.

Position	$\delta_H$ (mult., $J$ in Hz)	$\delta_C$	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )
1	–	163.8	–
2/6	6.93 (d, 8.4)	114.0	C-1, C-2 or C-6, C-4
3/5	7.80 (d, 8.4)	130.9	C-1, C-3 or C-5, C-7
4	–	127.4	–
7	–	195.3	–
8	6.15 (q, 6.2)	71.3	C-9, C-7'
9	1.63 (d, 6.2)	17.3	C-7, C-8
1'	–	163.6	–
2'/6'	6.95 (d, 8.4)	113.6	C-1', C-2' or C-6', C-4'
3'/5'	7.98 (d, 8.4)	131.9	C-1', C-3' or C-5', C-7'
4'	–	122.0	–
7'	–	165.9	–
1-OMe	3.86 (s)	55.4	C-1
1'-OMe	3.87 (s)	55.5	C-1'

Compounds **3** (30.9 mg) and **4** (2.0 mg) were derived from fractions E2b (128.6 mg) and E2c (9.7 mg), respectively, by CC using 2% acetone–hexanes and Sephadex-LH20 with 100% MeOH. Fraction E3 (1.37 g) was purified by QCC with 20% EtOAc–hexanes to 100% EtOAc followed by Sephadex LH-20 using 100% MeOH to afford compound **2** (1.1 mg).

### 3.1. Harmandianone (**1**)

White solid; mp 114–117 °C;  $[\alpha]_D^{27} = +60.3$  ( $c = 0.014$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); IR  $\lambda_{\text{max}}$  MeOH (nm) ( $\log \epsilon$ ): 201 (4.17), 213 (4.05), 267 (4.14), 272 (4.15); IR (neat)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  3350, 2925, 2853, 1712, 1689, 1603, 259. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data are summarized in Table 1; ESI-TOF-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  337.1046 (calcd for  $^{18}\text{H}_{18}\text{NaO}_5$ , 337.1052).

### 3.4. Antibacterial assay

*E. coli* TISTR 780, *S. typhimurium* TISTR 292 and *S. aureus* TISTR 466 were obtained from the Microbiological Resource, Center of the Thailand Institute of Scientific and Technological Research; ARSA SK1 was obtained from the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by a twofold serial dilution method using Mueller Hinton broth, according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (Wikler et al., 2006). The test substances were dissolved in DMSO. Vancomycin (MIC 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and gentamycin (MIC 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were used as standard positive control drugs.

### Acknowledgements

We would like to thank the Thailand Research Fund who provided scholarships to WM and SL through the Royal Golden Jubilee PhD program (Grant No. PHD/0006/2552), and also Mae Fah Luang University and the National Research Council of Thailand (NRCT) for financial support. We are thankful to Mr. N. Chimnoi, Chulabhorn Research Institute, for recording the mass spectrometry data.

### References

- Bottini, A.T., Dev, V., Garfagnoli, D.J., Mathela, C.S., Melkani, A.B., Angela, A., Sturm, N.S., 1986. Oxiranylphenyl esters from *Pimoinella diversifolia*. *Phytochemistry* 25, 207–211.
- Cordoba, R., Tormo, N.S., Medared, A.F., Plumet, J., 2007. Antiangiogenic versus cytotoxic activity in analogues of aeropylsinin-1. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 5300–5315.
- Demir, A.S., Pohl, M., Janzen, E., Muller, M., 2001. Enantioselective synthesis of hydroxy ketones through cleavage and formation of acyloin linkage. Enzymatic kinetic resolution via C–C bond cleavage. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (30), 633–635.
- Kihumbu, D., Stillger, T., Hummel, W., Liese, A., 2002. Enzymatic synthesis of all stereoisomers of 1-phenylpropane-1,2-diol. *Tetrahedron: Asymmetry* 13, 1069–1072.
- Maneerat, W., Laphookhieo, S., 2010. Antitumoral alkaloids from *Clausena lansium*. *Heterocycles* 81, 1261–1269.
- Maneerat, W., Ritthiwigrom, T., Cheenpracha, S., Prawat, U., Laphookhieo, S., 2011a. Clausenawallines A and B, two new dimeric carbazole alkaloids from the roots of *Clausena wallichii*. *Tetrahedron Lett.* 52, 3303–3305.
- Maneerat, W., Tha-in, S., Cheenpracha, S., Prawat, U., Laphookhieo, S., 2011b. New amides from the seeds of *Clausena lansium*. *J. Med. Plants Res.* 5, 2812–2815.
- Maneerat, W., Ritthiwigrom, T., Cheenpracha, S., Promgool, T., Yossathera, K., Deachathai, S., Phakhodee, W., Laphookhieo, S., 2012a. Bioactive carbazole alkaloids from *Clausena wallichii* roots. *J. Nat. Prod.* 75, 741–746.
- Maneerat, W., Phakhodee, W., Ritthiwigrom, T., Cheenpracha, S., Promgool, T., Yossathera, K., Deachathai, S., Laphookhieo, S., 2012b. Antibacterial carbazole alkaloids from *Clausena harmandiana* twigs. *Fitoterapia* 83, 1110–1114.
- Muhammed, S., Nasim, A., Naheed, R., Shaiq, A.M., Abdul, J., 2011. Isolation and characterization of secondary metabolites from *Plumeria obtuse*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 13, 1122–1127.
- Noipha, K., Thongthoom, T., Songsiang, U., Boonyarat, C., Yenjai, C., 2010. Carbazoles and coumarins from *Clausena harmandiana* stimulate glucose uptake in L6 myotubes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 90, e67–e71.
- Songsiang, U., Thongthoom, T., Boonyarat, C., Yenjai, C., 2011. Claurailas A–D, cytotoxic carbazole alkaloids from the roots of *Clausena harmandiana*. *J. Nat. Prod.* 74, 208–212.
- Sy, L.K., Brown, G.D., 1998. Novel phenylpropanoids and lignans from *Illicium verum*. *J. Nat. Prod.* 61, 987–992.
- Thongthoom, T., Songsiang, U., Phaosiri, C., Yenjai, C., 2010. Biological activity of chemical constituents from *Clausena harmandiana*. *Arch. Pharm. Res.* 33, 675–680.
- Wikler, M.A., Cockerill, F.R., Craig, W.A., Dudley, M.N., Eliopoulos, G.M., Hecht, D.W., Hindler, J.F., Low, D.E., Sheehan, D.J., Tenover, F.C., Turnidge, J.D., Weinstein, M.P., Zimmer, B.L., Ferraro, M.J., Swenson, J.M., 2006. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard M7–A7. Wayne, PA, USA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 27, No. 2.
- Yenjai, C., Sriprapont, S., Sriprajun, P., Kittakoop, P., Jintasirikul, A., Tanticharoen, M., Thebtaranonth, Y., 2000. Coumarins and carbazoles with antiplasmodial activity from *Clausena harmandiana*. *Planta Med.* 66, 277–279.

