

สารประกอบแลบเดนกิ่งสังเคราะห์และการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง



นายดำรงค์ สมมิตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอินทรีย์ ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

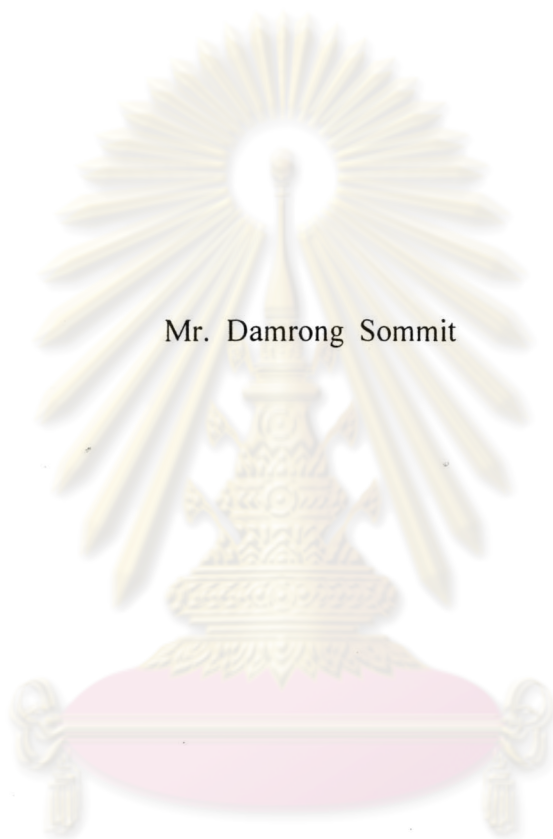
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2010-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 21039744

SEMI-SYNTHETIC LABDANE COMPOUNDS AND THEIR CYTOTOXICITY  
AGAINST CANCER CELL LINES



Mr. Damrong Sommit

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy in Organic Chemistry

Department of Chemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic year 2002

ISBN 974-17-2010-6



ดำรงค์ สมมิตร : สารประกอบแลบเดนกึ่งสังเคราะห์และการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง  
(Semi-Synthetic labdane compounds and their cytotoxicity against cancer cell lines).  
อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.โสภณ เรืองสำราญ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ศ.ดร.Tsutomu Ishikawa ; 114  
หน้า. ISBN 974-17-2010-6.

การดัดแปลงโครงสร้างของสารประกอบ labda-7,12(*E*),14-triene-17-oic acid (**14**) ซึ่งสกัด  
แยกจากเปลือกต้นเปลือกใหญ่ การดัดแปลงแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ดัดแปลงหมู่คาร์บอกซิลตำแหน่งที่ C-  
17 ส่วนที่ 2 สังเคราะห์สาร (+)-limonidilactone (**33**) โดยใช้สารประกอบแลบเดน **14** เป็นสารตั้งต้น  
และสามารถสังเคราะห์สารประกอบ **33** ได้ 22.3% yield โดยใช้ทั้งหมด 6 ขั้นตอน เริ่มจากการ  
ออกซิเดชัน โดยใช้ m-CPBA, H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub> และ Pb(OAc)<sub>4</sub> ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการออกซิเดชัน  
นำมาทำปฏิกิริยาแบบ Wittig reaction และ acidic hydrolysis ตามลำดับ นำสารประกอบแลบเดน และ  
สารประกอบแลบเดนที่ดัดแปลงไปทดสอบการเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งทั้งหมด 5 ชนิด และฤทธิ์ในการ  
ยับยั้ง Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase พบว่าสารประกอบ 12,17-dihydroxylabda-7,13(*E*)-diene (**54**) แสดงการ  
ยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (IC<sub>50</sub> = 0.6 µg/mL) และสารประกอบ labda-7,12(*E*),14-triene-17-  
ol (**13**) และสารประกอบ **14** แสดงการยับยั้ง Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (IC<sub>50</sub> = 9.0 x 10<sup>-5</sup>, 5.0 x 10<sup>-5</sup>  
ตามลำดับ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เคมี  
สาขาวิชา เคมี  
ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อนิติ..... Damrang Sommit  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4173808023 : MAJOR CHEMISTRY

KEYWORDS : CROTON OBLONGIFOLIUS / CYTOTOXIC / LABDANE

DAMRONG SOMMIT : THESIS TITLE SEMI-SYNTHETIC LABDANE  
COMPOUNDS AND THEIR CYTOTOXICITY AGAINST CANCER CELL  
LINES THESIS DISSERTATION : ASSOC. PROF. SOPHON ROENGSUMRAN,  
PH.D., THESIS CO-DISSERTATION : PROF. TSUTOMU ISHIKAWA, PH.D.,  
114 pp. ISBN 974-17-2010-6.

Chemical modifications of labda-7,12(*E*),14-triene-17-oic acid (**14**) isolated from the stem bark of *Croton oblongifolius* Roxb. were performed in two pathways : (1) transformation of the carboxyl group at C(17) position to its derivatives (2) conversion of **14** into (+)-limonidilactone (**33**), labdane diterpene bearing  $\gamma$ -butenolide and  $\delta$ -lactone system. (+)-Limonidilactone was successfully synthesized in 22.3% overall yield by utilizing a four-step sequence reactions entailing : (i) epoxidation with *m*-CPBA and successive oxidation with  $H_5IO_6$  ; (ii) further oxidation with  $Pb(OAc)_4$  in the presence of  $BF_3 \cdot OEt_2$  ; (iii) Wittig reaction and (iv) acidic hydrolysis yielded **33**. Compound **14** and the modified labdanes were evaluated against five human cancer cell lines as well as tested for biological activity on  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase assay. Among labdane diterpenes tested, 12,17-dihydroxylabda-7,13-(*E*)-diene (**54**) showed a significant cytotoxic activity, exhibiting  $IC_{50}$  value of 0.6  $\mu g/mL$  against gastric carcinoma cell lines and labda-7,12(*E*),14-triene-17-ol (**13**) and compound **14** showed strong inhibitory activity on  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase assay ( $IC_{50}$  values  $9.0 \times 10^{-5}$  and  $5.0 \times 10^{-5}$ , respectively).

Department

Chemistry

Student's signature.....

Field of Study

Organic Chemistry

Advisor's signature.....

Academic Year

2002

Co-advisor's signature.....

Damrong Sommit

Sophon Roengsumran

Tsutomu Ishikawa

## ACKNOWLEDGEMENT

The author is very appreciate the kindness of his advisors ; Associate Prof. Sophon Roengsumran, Ph.D., Co-advisor ; Prof. Tsutomu Ishikawa, Ph.D. for their assistance, care, invaluable guidance and constant encouragement through out this research work. Special gratitude is also expressed to Prof. Padet Sidisunthorn, Ph.D., the chairman, Prof. Udom Kokpol, Ph.D., Associate Prof. Apichart Suksumrarn, Ph.D., Associate Prof. Pipat Karntiang, Ph.D. and Associate Prof. Amorn Petsom, Ph.D., the committee of his dissertation.

The author thanks The Thailand Research Fund (RGJ-Ph.D. program) for scholarship and for providing 6 months scholarship to carry out this research in Department of Pharmaceutical Science, Chiba University, Japan. Appreciation was expressed to Prof. Ishikawa's group for the laboratory facilities for 6 months and the author thanks Dr. Kumamoto, T. and Dr. Watanabe, T. for kindness and care during his stay in Chiba University. The author would like to thank Mrs. Songchan Puthong for the test of cytotoxicity, Assoc. Prof. Kennett Jame Haller, Ph.D., Narongsuk Chaichit, Ph.D. for X-ray analysis and the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for research facilities.

Finally, a special thank to the author's family, my friends (doctor and master students) in Thailand and Japan and Dr. Khanitha Pudhom for her understand and moral support encouragement at all times.

## CONTENTS

	Page
Abstract (in Thai).....	iv
Abstract (in English).....	v
Acknowledgement.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	xi
List of Figures.....	xii
List of Abbreviations.....	xiv
<b>CHAPTER</b>	
<b>1. Introduction</b>	
1.1 Chemical Components of <i>Croton oblongifolius</i> Roxb.....	1
1.2 Cancer-Related Properties of labdanes.....	3
1.3 Chemical Transformation of Labdane-Type Diterpene from <i>C. oblongifolius</i> ...	7
<b>2. Experimental</b>	
2.1 Materials and Methods.....	12
2.2 Extraction and Isolations.....	12
2.3 Synthesizes.....	17
- Preparation of Labda-7,12( <i>E</i> ),14-triene-17-methyl Ester ( <b>47</b> ).....	17
- Preparation of 17-Acetyl labda-7,12( <i>E</i> ),14-triene ( <b>48</b> ).....	18
- Preparation of <i>N</i> -[( <i>S</i> )-1-Phenylethyl]-labda-7,12( <i>E</i> ),14-triene-7-amide ( <b>49</b> ).....	19

- Preparation of 4-Bromobenzyl Labda-7,12( <i>E</i> ),14-triene-17-oate ( <b>50</b> ).....	20
- Preparation of 13-Hydroxylabda-7,14-diene-17,12-olide ( <b>51</b> ).....	21
- Preparation of 15-Hydroxylabda-7,13( <i>E</i> )-diene-17,12-olide ( <b>52</b> ).....	21
- Preparation of Labda-7,13( <i>E</i> )-diene-olide ( <b>53</b> ).....	22
- Preparation of 12,17-Dihydroxylabda-7,13( <i>E</i> )-diene ( <b>54</b> ).....	23
- Preparation of 17-Hydroxylabda-13( <i>E</i> )-ene-12,17-epoxide ( <b>55</b> ).....	23
- Preparation of 12,17-Dihydroxylabda-13( <i>E</i> )-ene ( <b>56</b> ).....	23
- Preparation of 15-Acetoxyabda-7,13( <i>E</i> )-diene-17,12-olide ( <b>60</b> ).....	25
- Preparation of 15-Aldehydelabda-7,13( <i>E</i> )-diene-17,12-olide ( <b>64</b> ).....	26
- Preparation of 15-Methylester Labda-7,13( <i>E</i> )-diene-17,12-olide ( <b>65</b> ).....	26
- Preparation of 15- <i>t</i> -Butyldimethy Dimethyloxylabda-7,13( <i>E</i> )-diene -17,12-olide ( <b>62</b> ).....	27
- Preparation of 15,16-Diacetoxyabda-7,13( <i>E</i> )-diene-17,12-olide ( <b>66a</b> ).....	28
- Preparation of 15,16-Diacetoxyabda-7,13( <i>Z</i> )-diene-17,12-olide ( <b>66b</b> ).....	28
- Preparation of 15,16-Dihydroxylabda-7,13( <i>E</i> )-diene-17,12-olide ( <b>67a</b> ).....	29
- Preparation of 15,16-Dihydroxylabda-7,13( <i>Z</i> )-diene-17,12-olide ( <b>67b</b> ).....	29
- Preparation of 15-Acetoxy-16-benzoate Labda-7,13( <i>Z</i> )-diene- 17,12-olide ( <b>68a</b> ).....	29
- Preparation of 15-Acetoxy-16-benzoate Labda-7,13( <i>Z</i> )-diene- 17,12-olide ( <b>68b</b> ).....	29
- Preparation of 15-Hydroxy-16-benzoate Labda-7,13( <i>E</i> )-diene- 17,12-olide ( <b>69a</b> ).....	30
- Preparation of 15-Hydroxy-16-benzoate Labda-7,13( <i>Z</i> )-diene- 17,12-olide ( <b>69b</b> ).....	30



- Preparation of 13-Oxo-14,15-dinor-7-Labda-17,12-olide (72).....	31
- Preparation of 16-Acetoxy-13-oxo-14,15-dinor-7-labda-17,12-olide (73).....	32
- Preparation of Ethyl 16-Acetoxy labda-17,12-olide-7,13( <i>E</i> )-diene (74)....	33
- Preparation of Ethyl 16-Acetoxy labda-17,12-olide-7,13( <i>Z</i> )-diene (75)....	33
- Preparation of (-)-Limonidilactone (33).....	34
2.4 The Cytotoxicity test.....	35
2.5 The Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase Test.....	35
2.6 Preparation of Kidney Microsomes.....	36
2.7 Assay of Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase Activity.....	36

### 3. Results and discussions

3.1 The Stereochemistry of Labda-7,12( <i>E</i> ),14-triene-17-oic Acid.....	37
3.2 Isolation and a Preliminary Biological Activity Test of Labda-7,12( <i>E</i> ),14-triene-17-oic Acid (14).....	39
3.3 Chemical Transformation of <i>ent</i> -Labda-7,12( <i>E</i> ),14-triene-17-oic Acid (14).....	41
3.3.1 Modification of Carboxyl Group of Labdane 14.....	41
3.3.2 Synthesis of Limonidilactone (33).....	47
3.4 Biological Activity of Modified Labdane Diterpenes.....	63
3.4.1 Cytotoxic Activity of Labdane Diterpenes.....	63
3.4.2 The Inhibitory Effect of Modified Labdanes on Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase.....	66

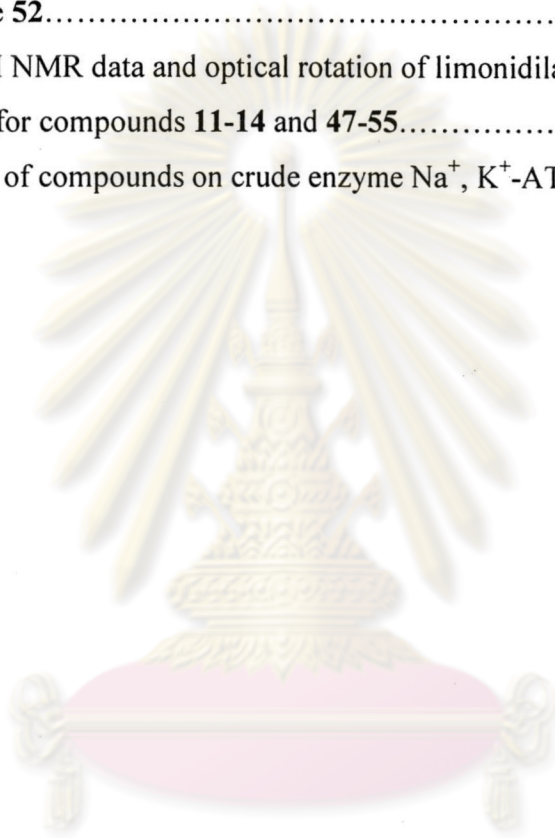
<b>4. Conclusions</b>	
4.1 Synthesis of (+)-Limonidilactone.....	68
4.2 The Cytotoxic Activity of Modified Labdanes.....	69
4.3 The Effect of Inhibitory with Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATpase.....	69
<b>References.....</b>	<b>70</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>75</b>
<b>Vita.....</b>	<b>114</b>



ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## List of Tables

Tables	Pages
3.1 Biological activities of diterpenes <b>11-14</b> .....	40
3.2 NOE experiment showing signal enhancement by irradiation at various protons of lactone <b>52</b> .....	45
3.3 Comparison of <sup>1</sup> H NMR data and optical rotation of limonidilactone.....	61
3.4 Cytotoxicity data for compounds <b>11-14</b> and <b>47-55</b> .....	64
3.5 Showed the effect of compounds on crude enzyme Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase.....	67



ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## List of Figures

Figures	Pages
6.1 The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>14</b> .....	76
6.2 The $^{13}\text{C}$ NMR spectral data of compound <b>14</b> .....	77
6.3 The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>47</b> .....	78
6.4 The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>48</b> .....	79
6.5 The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>48</b> .....	80
6.6 The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>49</b> .....	81
6.7 The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>49</b> .....	82
6.8 The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>50</b> .....	83
6.9 The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>50</b> .....	84
6.10 The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>51</b> .....	85
6.11 The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>51</b> .....	86
6.12 The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>52</b> .....	87
6.13 The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>52</b> .....	88
6.14 The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>53</b> .....	89
6.15 The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>53</b> .....	90
6.16 The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>54</b> .....	91
6.17 The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>54</b> .....	92
6.18 The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>55</b> .....	93
6.19 The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>55</b> .....	94
6.20 The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>56</b> .....	95
6.21 The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>56</b> .....	96
6.22 The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>60</b> .....	97

6.23	The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>60</b> .....	98
6.24	The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>62</b> .....	99
6.25	The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>64</b> .....	100
6.26	The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>65</b> .....	101
6.27	The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>65</b> .....	102
6.28	The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>66a</b> and <b>66b</b> .....	103
6.29	The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>66a</b> and <b>66b</b> .....	104
6.30	The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>67a</b> and <b>67b</b> .....	105
6.31	The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>68a</b> and <b>68b</b> .....	106
6.32	The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>69a</b> and <b>69b</b> .....	107
6.33	The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>72</b> .....	108
6.34	The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>72</b> .....	109
6.35	The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>73</b> .....	110
6.36	The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>74</b> .....	111
6.37	The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>75</b> .....	112
6.38	The $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>33</b> .....	113
6.39	The $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>33</b> .....	114

## List of Abbreviations

Ac	acetyl
aq	aqueous
bp	boiling point
br	broad
calcd	calculated
d	doublet
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
equiv	equivalent
Et <sub>2</sub> O	diethyl ether
EtOAc	ethyl acetate
<i>J</i>	coupling constant
LAH	lithium aluminium hydride
m	multiplet
m-CPBA	3-chloroperbenzoic acid
MeOH	methanol
mp	melting point
MS	molecular sieves
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear over Hauser effect
ph	phenyl

rt	room temperature
s	singlet
t	triplet
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
THF	tetrahydropyran
TLC	thin layer chromatography



ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย