องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากนมแมวป่าและงำเงาะ

นางสาว ลลิตา วีระเสถียร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-3303-4

BIOACTIVE CHEMICAL CONSTITUENTS FROM *ELLIPEIOPSIS CHERREVENSIS* AND *STELECHOCARPUS CAULIFLORUS*

Miss Lalita Wirasathien

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-14-3303-4

Thesis Title	BIOACTIVE CHEMICAL CONSTITUENTS FROM *ELLIPEIOPSIS CHERREVENSIS* AND *STELECHOCARPUS CAULIFLORUS*
By	Miss Lalita Wirasathien
Field of Study	Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Thesis Advisor	Associate Professor Rutt Suttisri, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Thitima Pengsuparp, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Premyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Ekarin Saifah, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Rutt Suttisri, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Thitima Pengsuparp, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)

.....Member
(Varima Wongpanich, Ph.D.)

ลลิตา วีระเสถียร: องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากนมแมวป่าและงำเงาะ (BIOACTIVE CHEMICAL CONSTITUENTS FROM *ELLIPEIOPSIS CHERREVENSIS* AND *STELECHOCARPUS CAULIFLORUS*)
อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. รุทธ์ สุทธิศรี, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. ธิติมา เพ็งสุภาพ 290 หน้า.
ISBN 974-14-3303-4.

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากใบและต้นของนมแมวป่า (วงศ์ Annonaceae) สามารถแยกสารในกลุ่ม polyoxygenated cyclohexene จำนวน 3 ชนิด คือ ferrudiol, zeylenol และสารอนุพันธ์ชนิดใหม่ คือ ellipeiopsol D พร้อมกับ สารในกลุ่ม flavonoid glycoside จำนวน 2 ชนิด คือ tiliroside และ kaempferol-3-*O*-rutinoside รวมทั้งสารกลุ่ม chalcone ที่พบในธรรมชาติเป็นครั้งแรก คือ 2′,4′-dihydroxy-3′-(2-hydroxybenzyl)-6′-methoxychalcone และ สารในกลุ่ม alkaloid จำนวน 1 ชนิด คือ lanuginosine สำหรับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากใบและต้นของงำเงาะซึ่งเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งในวงศ์ Annonaceae สามารถแยกสารในกลุ่ม lignan จำนวน 4 ชนิด คือ galgravin, licarin A, acuminatin และสารผสมระหว่าง veraguensin และ galgravin ในอัตราส่วน 2:1 พบสารในกลุ่ม alkaloid จำนวน 4 ชนิด คือ aristolactam AII, piperolactam A, piperolactam D และ noraristolodione สารในกลุ่ม flavonoid จำนวน 2 ชนิด คือ engeletin และ astilbin นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่ม sesquiterpene จำนวน 1 ชนิด คือ spathulenol การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารทั้งหมดที่สกัดแยกได้โดยอาศัยการวิเคราะห์เชิงสเปคตรัมของ UV, IR, MS และ NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลของสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว พบว่า 2′,4′-dihydroxy-3′-(2-hydroxybenzyl)-6′-methoxychalcone, licarin A, piperolactam D แสดงฤทธิ์ต้านวัณโรค ฤทธิ์ต้านไวรัสเริม และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งสาร chalcone ชนิดนี้ยังสามารถแสดงฤทธิ์ต้านมาลาเรียด้วย และพบว่า acuminatin แสดงฤทธิ์ต้านวัณโรคและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ในขณะที่ galgravin แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและไวรัสเริม นอกจากนี้ tiliroside, kaempferol-3-*O*-rutinoside, ferrudiol และ zeylenol สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ lymphocyte ได้ และจากกระบวนการสกัดแยกสารโดยอ้างอิงฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า engeletin และ astilbin สามารถยับยั้งเอนไซม์ aldose reductase และยับยั้งการสร้าง Advance Glycation End Products ได้

สาขาวิชา เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ลายมือชื่อนิสิต.....ลลิตา วีระเสถียร.....
ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....รุทธ์ สุทธิศรี.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....ธิติมา เพ็งสุภาพ.....

4476963433:MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS
KEY WORD: *ELLIPEIOPSIS CHERREVENSIS/ STELECHOCARPUS CAULIFLORUS/* C-BENZYLATED CHALCONE/ CYCLOHEXENE/ LIGNANS/ ARISTOLACTAMS/ OXOAPORPHINES

LALITA WIRASATHIEN: BIOACTIVE CHEMICAL CONSTITUENTS FROM *ELLIPEIOPSIS CHERREVENSIS* AND *STELECHOCARPUS CAULIFLORUS.*
THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. RUTT SUTTISRI, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. THITIMA PENGSUPARP, Ph.D., 290 pp. ISBN 974-14-3303-4

Chemical investigation of the aerial parts of *Ellipeiopsis cherrevensis* R. E. Fr. (family Annonaceae) led to the isolation of three polyoxygenated cyclohexenes namely ferrudiol and zeylenol and a new derivative, ellipeiopsol D, along with two flavonoid glycosides, tiliroside and keampferol-3-*O*-rutinoside, as well as a new natural chalcone, 2′,4′-dihydroxy-3′-(2-hydroxybenzyl)-6′-methoxychalcone and one alkaloid, lanuginosine. From the leaves and stems of another annonaceous plant, *Stelechocarpus cauliflorus* R. E. Fr., four lignans namely galgravin, licarin A, acuminatin, and a 2:1 mixture of veraguensin and galgravin, four aporphine alkaloids which are aristolactam AII, piperolactams A and D and noraristolodione, two flavonoids namely engeletin and astilbin, together with one sesquiterpenoid, spathulenol, were isolated. The structure determination of these compounds was accomplished by spectroscopic methods, including UV, IR, MS and NMR, and comparison with previously reported data. 2′,4′-Dihydroxy-3′-(2-hydroxybenzyl)-6′-methoxychalcone, licarin A and piperolactam D exhibited antituberculosis, anti HSV-1 and cytotoxic activities, whereas the chalcone also showed antimalarial activity. Acuminatin displayed antituberculosis and cytotoxic activities, while galgravin exhibited antituberculosis and anti HSV-1 activities. Tiliroside, kaempferol-3-*O*-rutinoside, ferrudiol and zeylenol were all able to stimulate lymphocyte proliferation, whereas the latter two cyclohexenes also showed anti HSV-1 and antituberculosis activities. In addition, bioactivity-guided fractionation yielded engeletin and astilbin as inhibitors of aldose reductase enzyme and Advance Glycation End Products formation.

Field of study Pharmaceutical Chemistry	Student's signature Lalita Wirasathien
and Natural Products	Advisor's signature Rutt Suttisri
Academic year 2005	Co-advisor's signature T. Pengsuparp

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Rutt Suttisri of the Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. I greatly appreciate his valuable advice, kindness, patience, and constant encouragement throughout my research study.

I am very thankful to my thesis co-advisor, Associate Professor Dr. Thitima Pengsuparp of the Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for her help and valuable suggestions in several matters, especially on the lymphocyte proliferation experiment.

My appreciations are extended to Dr. Kazuko Kawanishi of Kobe Pharmaceutical University, for her kindness, hospitality and guidance during my research at Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Japan and to Dr. Hidenori Ueda for his advice and useful assistance on the evaluation of aldose reductase inhibitors.

I would like to thank all members of my thesis committee for their constructive suggestions and critical review of this thesis.

I am particularly indebted to the Thailand Research Fund (TRF) for financial support (grant no. PHD/0143/2544) through the 2001 Royal Golden Jubilee Ph.D. program and to Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University for financial suport.

I would also like to acknowledge a partial financial support by a grant from the Biodiversity Research and Training Program (BRT) and BIOTEC laboratories, NSTD, Thailand for the evaluation of antituberculosis, antimalarial, antiviral and anticancer activities. Miss Chompunuch Boonarkard of the Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University is also thanked for her help in the evaluation of lymphocyte proliferating stimulation.

On the personal side, I would like to thank previous/present graduate students and all staff members of the Department of Pharmaceutical Botany, Chulalongkorn University for their friendship, kind support and encouragement throughout the period of my study.

Finally, I would like to express my special, deepest appreciation to my family for their love, understanding and encouragement.

CONTENTS

Page

Page

Page

Page

LIST OF TABLES

Table **Page**

Table **Page**

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

LIST OF SCHEMES

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

$[\alpha]^{25}_{D}$	=	Specific rotation at 25° and sodium D line (589 nm)
α	=	Alpha
Acetone-d_6	=	Deuterated acetone
AGEs	=	Advanced glycation endproducts
AR	=	Aldose reductase
β	=	Beta
Bn	=	Benzyl
br	=	Broad (for NMR spectra)
BSA	=	Bovine serum albumin
Bu	=	Butyl
BuOH	=	Butanol
Bz	=	Benzoyl
c	=	Concentration
°C	=	Degree Celsius
calcd	=	Calculated
$CDCl_3$	=	Deuterated chloroform
CFU	=	Colony forming unit
$CHCl_3$	=	Chloroform
CH_2Cl_2	=	Dichloromethane
CIMS	=	Chemical ionization mass spectrometry
cm	=	Centimetre
cm^{-1}	=	Reciprocal centimeter (unit of wave number)
^{13}C NMR	=	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
Con A	=	Concanavalin A
2D NMR	=	Two dimensional Nuclear Magnetic Resonance
d	=	Doublet (for NMR spectra)
dd	=	Doublet of doublets (for NMR spectra)
ddd	=	Doublet of doublets of doublets (for NMR spectra)
DEPT	=	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
DMSO-d_6	=	Deuterated dimethyl sulfoxide

δ	=	Chemical shift
ε	=	Molar absorptivity
ED_{50}	=	Median effective dose
EIMS	=	Electron Impact Mass Spectrometry
ESIMS	=	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
ESITOFMS	=	Electrospray Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
EtOAc	=	Ethyl acetate
em.	=	emission
ex.	=	excitation
g	=	Gram
hr	=	Hour
^{1}H NMR	=	Proton Nuclear Magnetic Resonance
^{1}H-^{1}H COSY	=	Homonuclear (Proton-Proton) Correlation Spectroscopy
HMBC	=	^{1}H-detected Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	=	^{1}H-detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	=	High Pressure Liquid Chromatography
H_2O	=	Water
HREIMS	=	High Resolution Electron Impact Mass Spectrometry
HRESIMS	=	High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry
HSQC	=	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	=	Hertz
IC_{50}	=	Median Inhibitory Concentration
IR	=	Infrared Spectrum
J	=	Coupling constant
KBr	=	Potassium bromide
Kg	=	Kilogram
L	=	Liter
Me	=	Methyl
μg	=	Microgram
μg/ml	=	Microgram per milliliter
μCi	=	Micro
μl	=	Microliter
μM	=	Micromolar

λ_{max}	=	Wavelength at maximal absorption
ε	=	Molar absorptivity
$[M]^+$	=	Molecular ion
m	=	Metre
m	=	Multiplet (for NMR spectra)
$[M+H]^+$	=	Protonated molecular ion
MeOH	=	Methanol
mg	=	Milligram
MHz	=	Megahertz
MIC	=	Minimum inhibitory concentration
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimolar
mm	=	Millimeter
mp	=	Meling point
MS	=	Mass Spectrometry
MW	=	Molecular weight
m/z	=	Mass to charge ratio
NaCl	=	Sodium chloride
nm	=	Nanometer
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	=	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OBz	=	Benzoyloxy
OD	=	Optical Density
PBS	=	Phosphate Buffer Saline
Ph	=	Phenyl
ppm	=	Part-per-million
prep HPLC	=	Preparative High Pressure Liquid Chromatography
s	=	Singlet (for NMR spectra)
ν_{max}	=	Wave number at maximal absorption
rpm	=	round per minute
SI	=	Stimulation Index
SIMS	=	Secondary Ion Mass Spectrometry

TFA	=	Trifluoroacetic acid
THF	=	Tetrahydrofuran
TLC	=	Thin Layer Chromatography
UV	=	Ultraviolet