

พุกฤษเคนีของเปลือกเดาและลักษณะทางogenesis ทางของชีวเอนท์



นายธนภัทร ทรงศักดิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทสาขาวิชาสหเวชศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาเภสัชเวช

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-033-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

工16454948

**Phytochemistry of Stem Bark and Pharmacognostic Specification of
Derris reticulata Craib**



Mr. Thanapat Songsak

**ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmacognosy

Graduate School
Chulalongkorn University

1995
ISBN 974-632-033-5



Thesis Title Phytochemistry of Stem Bark and Pharmacognostic Specification of *Derris reticulata* Craib
By Mr. Thanapat Songsak
Department Pharmacognosy
Thesis Advisor Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi, M.Sc. in Pharm.
Thesis Co-Advisor Assistant Professor Thatree Phadungcharoen, M.Sc. in Pharm.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfilment of the Requirements for the Master's Degree.

Thesis Committee

Santi Thoongsuwan Dean of Graduate School
(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Chaiyo Chaichantipyuth Chairman
(Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, M.Sc. in Pharm.)

Nijsiri Ruangrungsi Thesis Advisor
(Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi, M.Sc. in Pharm.)

ศูนย์วิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Thatree Phadungcharoen Thesis Co-Advisor
(Assistant Professor Thatree Phadungcharoen, M.Sc. in Pharm.)

Wanchai De-Eknamkul Member
(Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.)

B.K. Laddawan Member
(Associate Professor Laddawan Boonyaratanaekornkit, M.Sc. in Pharm.)



พิมพ์ดันฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ธนภักตร ทรงศักดิ : พฤกษ์เคมีของเปลือกเดาและลักษณะทางเภสัชเวทของชีวเอมเหโน (PHYTOCHEMISTRY OF STEM BARK AND PHARMACOGNOSTIC SPECIFICATION OF DERRIS RETICULATA CRAIB) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. นิจศิริ เว่องวงศ์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ชาตรี ผดุงเจริญ, 267 หน้า. ISBN 974-632-033-5

การศึกษาทางพฤกษ์เคมีของเปลือกเดาชีวเอมเหโน Derris reticulata Craib (Leguminosae) ได้ทำการแยกสารประกอบ 2 ชนิดจากสิ่งสกัดในเอทธานอล ได้แก่ lupinifolin ; (2S)-4',5-dihydroxy-8-(3"-methyl-2"-butenyl)-2",2"-dimethylpyrano [5".6"-g] flavanone และ lupilighteone ; 5,7,4'-trihydroxy -8-(3"-methyl-2"-butenyl) isoflavone ซึ่งเป็นสารที่มีการศึกษามากแล้ว การพิสูจน์ เอกลักษณ์และสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารทั้ง 2 ชนิดนี้พิสูจน์โดยการวิเคราะห์ข้อมูลจากสเปกตรัมของ UV, IR, MS และ NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลของสารที่ทราบสูตรโครงสร้างแล้ว พนว่าข้อมูลของ ^{13}C -NMR ที่เคยมีรายงานของ lupinifolin ความมีการหมุนกว้างแก้ไข และจากการศึกษาทางโคมากोgraphic จำแนง (Thin-layer chromatography) สามารถตรวจพบน้ำตาลซูโครสในสิ่งสกัดชั้นน้ำของพืชชนิดนี้

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะจำเพาะทางเภสัชเวท ได้แก่ ศึกษาการหาค่าคงที่จากใบ, ศึกษาลักษณะของผงสมุนไพร และการตรวจหากระสวนรังคเลช (Chromatographic patterns) ขององค์ประกอบทางเคมีของเดาโดยวิธีเอกมิติ (One-dimensional) และทวิมิติ (Two-dimensional) เพื่อเป็นแนวทางในการตรวจเอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรดังกล่าว

เนื่องจากตัวอย่างเดาชีวเอมเหโนที่เก็บมาทำการวิจัยนั้นมีลักษณะภายนอก และรสชาตไม่คล้ายเดิม กับชีวเอมไทยที่มีขายตามร้านขายยาแผนโบราณและผลจากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางโคมากอgraphic จำแนง พนว่าชีวเอมไทยจากแหล่งต่างๆ ดังกล่าวเป็นต้นชีวเอมเหโน

หุ้นส่วนที่ร่วมทุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชเวท
สาขาวิชา เภสัชเวท
ปีการศึกษา 2537

ลายมือชื่อนิสิต ชนเดช วงศ์สุวัฒนา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ดร. นิจศิริ เว่องวงศ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ. ชาตรี ผดุงเจริญ



C 675415 : MAJOR PHARMACOGNOSY

KEY WORD: DERRIS RETICULATA / LEGUMINOSAE / CHEMICAL CONSTITUENTS / PHARMACOGNOSTIC STUDY / STEM BARK

THANAPAT SONGSAK : PHYTOCHEMISTRY OF STEM BARK AND PHARMACOGNOSTIC SPECIFICATION OF DERRIS RETICULATA CRAIB. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. NIJSIRI RUANGRUNGSI, M.Sc. IN PHARM., THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. THATREE PHADUNGCHAROEN, M.Sc. IN PHARM. 267 pp. ISBN 974-632-033-5

The research work was emphasized on phytochemical and pharmacognostic studies of Derris reticulata Craib (Leguminosae). A known flavanone named lupinifolin ; (2S)-4',5-dihydroxy-8-(3"-methyl-2"-butenyl)-2",2"-dimethylpyrano [5".6"-g] flavanone and a known isoflavone named lupilighteone ; 5,7,4'-trihydroxy-8-(3" methyl-2"-butenyl) isoflavone were isolated from the ethanol extract of D. reticulata Craib stem bark. The identification and structure elucidation of the isolated compounds were executed by analyses of the UV, IR, MS, NMR spectral data, as well as comparison with the published values previously reported in the literatures and found that the ¹³C-NMR assignment of lupinifolin should be revised. The determination of free sugar in the aqueous portion of the D. reticulata Craib stem's extract revealed the presence of sucrose which may be the major sweetener of this plant.

Pharmacognostical specification was established by detailed studying of the quantitative values of leaf, microscopical study of powdered drug and chromatographic patterns of chemical constituents of stem both one-dimensional and two-dimensional TLC with a view to bring out the diagnostic characters of the drugs.

Identification for the corrected botanical origin of Cha-aem Thai by Thin-layer chromatographic patterns led to the conclusion that Cha-aem Thai samples which were commercially available in various local traditional drug distributors are Derris reticulata Craib, Cha-aem nua.

ภาควิชา..... เภสัชเวท
สาขาวิชา..... เภสัชเวท
ปีการศึกษา..... 2537

ลายมือชื่อนิสิต..... ณัฐพร วงศ์สกัด
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อรุณรัตน์ ใจดี
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... พญ. พูลบูลย์



Acknowledgements

The author wishes to express his grateful appreciation to his thesis advisor, Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his helpful guidance, suggestion, keen interest, continual encouragement and kindness throughout the research studies.

The author would like to acknowledge his sincere thanks to Assistant Professor Thatree Phadungcharoen of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for concern, kindly assistance and valuable advice.

The authour wishes to acknowledge their appreciations to Associate Professor Laddawan Boonyaratanaakornkit, Associate Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul, and Head of the Department of Pharmacognosy ; Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth for their kindnesses and helps.

The author is deeply grateful to Dr. Munekazu Iinuma and Dr. Toshiyuki Tanaka of the Department of Pharmacognosy, Gifu Pharmaceutical University, Japan, for their assistances in NMR, IR and MS experiments, and their valuable suggestions on the structure elucidation of the isolated compounds.

The author would like to thank all NMR-operators of the Scientific and Technological Research Equipment Center, Chulalongkorn University for their kindly support in DEPT experiments.

คุณย์วิทยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The author would like to acknowledge his appreciation to Professor Dr. Sasri Panyarajun for her encouragement, valuable advice, also for her cheerfulness and sympathy throughout.

The author is also gratefully indebted to his family for their love, understanding and financial suport.

Finally, the author's thanks are due to Chulalongkorn University Graduate School for granting his partial financial support (of fourteen thousand baht) to conduct this investigation.



CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai)	iv
ABSTRACT (English)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xiii
ABBREVIATIONS	xv
CHAPTER I	
INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II	
HISTORICAL.....	6
Part I Phytochemical study.....	6
The Chemistry of Genus <i>Derris</i>	6
Introduction to Flavonoids.....	15
Prenylated Flavonoids in Leguminosae	18
1. Isoflavonoids	18
1.1 Isoflavones.....	18
1.2 Isoflavanones.....	32
1.3 Rotenoids	36
1.4 Pterocarpans	46
1.5 Isoflavans	57
1.6 3-Arylcoumarins	62
1.7 3-Aryl-4-Hydroxycoumarins	63
1.8 Coumestans.....	65
1.9 Coumaronochromones	68
1.10 2-Arylbenzofurans	70
2. The Minor Flavonoids	71
2.1 Chalcones	71
2.2 Dihydrochalcones	83

2.3	Flavanones.....	84
2.4	Dihydroflavonols.....	100
3.	Flavones and Flavonols	103
4.	Flavans and Leucoanthocyanidins.....	104
5.	C-glycosylflavonoids.....	105
Biosynthesis.....		105
1.	Biosynthesis of Flavonoids	105
2.	Biosynthesis of Isoflavonoids	109
	Biogenetic Relationships Among the Isoflavonoids	110
Part II Pharmacognostic Specification		111
Leaf Measurements		111
1.	Palisade Ratio.....	111
2.	Stomatal Number and Stomatal Index	112
3.	Vein-Islet Number.....	115
4.	Veinlet Termination Number.....	117
Thin-Layer Chromatography (TLC).....		118
1.	Introduction to TLC	118
2.	History of TLC	119
3.	Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography.....	121
CHAPTER III		
EXPERIMENTAL.....		122
Part I Phytochemical Study		122
Source of Plant Material.....		122
General Techniques.....		122
1.	Analytical Thin-Layer Chromatography	122
2.	Column Chromatography (CC).....	123
3.	Gel Filtration Chromatography	123
4.	Spectroscopy.....	124
5.	Solvents	124
Extraction		124
Isolation of Chemical Substances.....		125
1.	Isolation of DR-1.....	125
2.	Isolation of DR-2	127
Physical and Spectroscopic Data of the Isolated Compounds		127
1.	Physical and Spectroscopic Data of DR-1.....	127

2.	Physical and Spectroscopic Data of DR-2.....	128
Part II Pharmacognostic Specification		129
Material and Method Used in Microscopic Investigation.....		129
1.	Experimental Procedure	129
2.	Method of Palisade Ratio Determination.....	129
3.	Method of Stomatal Number and Stomatal Index Determination	130
4.	Method of Vein-Islet Number Determination	130
5.	Method of Veinlet Termination Number Determination.....	131
Material and Technique Used in Determining the Thin-layer Chromatographic Pattern of Chemical Constituent		131
1.	Materials.....	131
2.	The Technique for Analytical Thin-layer Chromatography (TLC)	131
2.1	Method of Extraction	132
2.2	Solvent System for Two-Dimensional TLC	132
2.3	Method of Chamber Saturation.....	133
2.4	Method of Sample Application	133
2.5	Method of Development of the Chromatogram.....	133
2.6	Method of Detection	134
2.7	Recording of R _f Value and Colour.....	136
2.8	Coding of the Data	139
Material and Technique Used in Determining the Thin-layer Chromatographic Pattern of Cha-aem Thai from Various Local Traditional Drug Distributor.....		142
1.	Material.....	142
2.	Extraction.....	143
3.	The Technique for Analytical Thin-layer Chromatography.....	143
Material and Technique Used in Determining Thin-layer Chromatographic Pattern of Sugar.....		144
1.	Material	144
2.	Sample Application.....	144
3.	The Technique for Analytical Thin-layer Chromatography (TLC)	144
CHAPTER IV		
RESULT AND DISCUSSION.....		190

Part I Phytochemical Study	190
1. Structure Elucidation of DR-1	190
2. Structure Elucidation of DR-2	198
Part II Pharmacognostic Specification	202
Quantitative Value of Leaf of <i>Derris reticulata</i> Craib and <i>D. scandens</i> Benth.....	202
Microscopical Study of Powdered Drug Characteristic	203
1. The Microscopical Character of Powdered Stem of <i>Derris reticulata</i> Craib.....	203
2. The Microscopical Character of Powdered Stem of <i>Derris scandens</i> Benth.....	204
3. The Microscopical Character of Powdered Leaf of <i>Derris reticulata</i> Craib.....	206
4. The Macroscopical Character of Powdered Leaf of <i>Derris scandens</i> Benth.....	206
Two-Dimensional Thin-Layer Chromatographic Pattern of Chemical Constituent.....	208
Determining Thin-Layer Chromatographic Pattern of Cha-aem Thai from Various Local Traditional Drug Distributor.....	208
Determination of Thin-Layer Chromatographic Pattern of Sugar	209
CHAPTER V	210
CONCLUSION	210
REFERENCES.....	211
APPENDIX.....	235
VITA.....	267

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Chemical Constituents of <i>Derris</i> spp.....	6
2	Isoflavones.....	19
3	Isoflavanones.....	32
4	Rotenoids	38
5	Pterocarpans	47
6	Isoflavans	58
7	3-Arylcoumarins	63
8	3-Aryl-4-Hydroxycoumarins.....	64
9	Coumestans.....	65
10	Coumaronochromones	68
11	2-Arylbenzofurans	70
12	Chalcones	73
13	Dihydrochalcones	83
14	Flavanones.....	86
15	Dihydroflavonols.....	101
16	Flavones and Flavonols	103
17	Flavans and Leucoanthocyanidins	104
18	C-glycosylflavonoids.....	105
19	List of Enzymes Leading to Various Flavonoid Classes.....	109
20	The Combined Fractions from DR-EA Crude Extract	125
21	Solvent Systems Used in Column Chromatography of Fraction F-03	126
22	The Combined Fractions from DR-2 that was Purified Using a Column of Sephadex LH-20.....	127
23	Developing Solvent System for Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography	132

24	Data on Palisade Ratio Determination of <i>Derris reticulata</i> Craib.....	147
25	Data on Palisade Ratio Determination of <i>Derris scandens</i> Benth.....	148
26	Stomatal Number and Stomatal Index Determinations of <i>Derris reticulata</i> Craib.....	151
27	Stomatal Number and Stomatal Index Determinations of <i>Derris scandens</i> Benth.....	152
28	Vein-Islet Number Determination of <i>Derris reticulata</i> Craib	154
29	Vein-Islet Number Determination of <i>Derris scandens</i> Benth.....	155
30	Veinlet Termination Number Determination of <i>Derris reticulata</i> Craib	156
31	Veinlet Termination Number Determination of <i>Derris scandens</i> Benth....	157
32	Basic Plant Data of stem of <i>Derris reticulata</i> Craib.....	164
33	Basic Plant Data of stem of <i>Derris scandens</i> Benth.....	172
34	Proposed ^1H -NMR Assignment of DR-1.....	194
35	Proposed ^{13}C -NMR Assignments of DR-1.....	195
36	Proposed ^1H -NMR Assignment of DR-2.....	198
37	IR Spectrum Assignment of DR-2	199
38	^{13}C -NMR Assignment of DR-2.....	201
39	Data of Leaf Measurement	203
40	Comparison of the Organoleptic and Microscopic Character of Powdered Drug of <i>D. reticulata</i> Craib and <i>D. scandens</i> Benth.....	205
41	Comparison of the Organoleptic and Microscopic Character of Powdered Drug of <i>Derris reticulata</i> Craib and <i>D. scandens</i> Benth. Leaf.....	207

LIST OF FIGURES

Figure	Page	
1	Scheme illustrating the pathways to phenylalanine and acetyl-CoA, and the following reaction steps leading to the various flavonoids classes.	108
2	General scheme of isoflavanoid biosynthetic relationships	110
3	R _f GRID.....	138
4	Four upper epidermal cells with the underlying palisade cells in surface view.....	146
5	Lower epidermis of leaf of <i>Derris reticulata</i> Craib in surface view.....	149
6	Lower epidermis of leaf of <i>Derris scandens</i> Benth. in surface view.....	150
7	Vein-islets and veinlet terminations of leaves in surface view	153
8,10,12	Two-dimensional thin-layer chromatogram of stem of <i>Derris reticulata</i> Craib.....	158,160,162
9,11,13	Two-dimensional thin-layer chromatogram of stem of <i>Derris scandens</i> Benth.....	159,161,163
14	Powdered <i>Derris reticulata</i> Craib stem.....	180
15	Powdered <i>Derris scandens</i> Benth. stem	181
16	Powdered <i>Derris reticulata</i> Craib leaf	182
17	Powdered <i>Derris scandens</i> Benth. leaf	183
18-21	Thin-layer chromatogram of Cha-aem Thai which were purchased from various local traditional drug distributors (1-13) and compared with authentic sample (<i>Derris reticulata</i> Craib, Cha-aem nuea) (A)	184-189

22-23	Thin-layer chromatogram of aqueous portion (DR-W) of <i>Derris reticulata</i> Craib.....	188-189
24	Mass spectral fragmentation of DR-1	192
25	Mass spectral fragmentation of DR-2	200
26	<i>Derris reticulata</i> Craib.....	236
27	EI mass spectrum of DR-1	237
28	IR spectrum of DR-1	238
29	UV absorption spectrum of DR-1	239
30-30.3	^1H -NMR spectrum of DR-1 in acetone - d_6	240-243
31-31.1	^{13}C -NMR spectrum of DR-1 in acetone - d_6	244-245
32-32.2	^{13}C -NMR spectrum of DR-1 (DEPT)	246-248
33-33.2	HETCOR spectrum of DR-1 in acetone - d_6	249-251
34-34.5	HMBC spectrum of DR-1 in acetone - d_6	252-257
34.6-34.8	COLOC spectrum of DR-1 in acetone - d_6	258-260
35	EI mass spectrum of DR-2	261
36	Infrared absorption spectrum of DR-2	262
37-37.1	^1H -NMR spectrum of DR-2 in acetone - d_6	263-264
38-38.1	^{13}C -NMR spectrum of DR-2 in acetone - d_6	265-266

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

br	=	Broad (for NMR spectra)
br s	=	Broad singlet (for NMR spectra)
cm	=	Centimetre
°C	=	Degree Celsius
COLOC	=	Correlation spectroscopy via long range coupling
¹³ C-NMR	=	Carbon -13 nuclear magnetic resonance
d	=	Doublet (for NMR spectra)
dd	=	Doublet of doublets (for NMR spectra)
DEPT	=	Distortionless enhancement by polarization transfer
EIMS	=	Electron impact mass spectrum
g	=	Gram
Glc	=	Glucose
¹ H-NMR	=	Proton nuclear magnetic resonance
HPLC	=	High performance liquid chromatography
hR _f	=	Rate of flow in chromatography multiplied by 100
HETCOR	=	Heteronuclear chemical shift correlation
HMBC	=	Heteronuclear multiple bond connectivity
NMR	=	Nuclear magnetic resonance
NOESY	=	Nuclear overhauser effect spectroscopy
IR	=	Infrared
J	=	Coupling constant
kg	=	Kilogram
L	=	Litre
m	=	Multiplet
m.p.	=	Melting point
MS	=	Mass spectrum

M^+	=	Molecular ion
Me	=	Methyl group
MHz	=	Mega Hertz
λ_{max}	=	Maximum absorption wavelength
min	=	Minute
MW	=	Molecular weight
mg	=	milligram
ml	=	Millilitre
mm	=	Millimetre
m/z	=	Mass to charge ratio
No.	=	Number
nm	=	Nanometre
ppm	=	Part per million
s	=	Singlet (for NMR spectra)
sh	=	Shoulder
spp	=	Species
t	=	Triplet (for NMR spectra)
TLC	=	Thin layer chromatography
TMS	=	Tetramethylsilane
UV	=	Ultra Violet
δ	=	Chemical shift
ν_{max}	=	Wave number at maximum absorption

คุณย์วิทยารังษีย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย