สารที่มีฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อตับจากรางจืดและลูกใต้ใบ

นางสาวผกาภรณ์ เกตุมงคลสิทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเวท ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556

ANTI-HEPATOTOXIC SUBSTANCES FROM *THUNBERGIA LAURIFOLIA* AND *PHYLLANTHUS AMARUS*

Miss Pakabhorn Ketmongkhonsit

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmacognosy
Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Thesis Title	ANTI-HEPATOTOXIC SUBSTANCES FROM *THUNBERGIA LAURIFOLIA* AND *PHYLLANTHUS AMARUS*
By	Miss Pakabhorn Ketmongkhonsit
Field of Study	Pharmacognosy
Thesis Advisor	Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Police Captain Suchada Sukrong, Ph.D.

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

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Assistant Professor Rungpetch Sakulbumrungsil, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor

(Associate Professor Police Captain Suchada Sukrong, Ph.D.)

.....Examiner

(Associate Professor Boonchoo Sritularak, Ph.D.)

.....Examiner

(Associate Professor Surattana Amnuoypol, Ph.D.)

.....Examiner

(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)

.....External Examiner

(Prapai Wongsinkongman, Ph.D.)

ผกาภรณ์ เกตุมงคลสิทธิ์ : สารที่มีฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อตับจากรางจืดและลูกใต้ใบ. (ANTI-HEPATOTOXIC SUBSTANCES FROM *THUNBERGIA LAURIFOLIA* AND *PHYLLANTHUS AMARUS*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ภก. ดร.ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ร.ต.อ. หญิง ภญ. ดร.สุชาดา สุขหร่อง, 111 หน้า.

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากใบรางจืดสามารถแยกสารที่เคยมีรายงานแล้วในกลุ่มฟีนอลิก ได้ 2 ชนิด คือ กรดคาเฟอิก และกรดโรสมารินิก โดยทำการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยการวิเคราะห์เชิงสเปกตรัมจาก MS และ NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบจากข้อมูลที่เคยมีรายงานมาก่อน จากนั้นได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ของกรดโรสมารินิกที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอทานอล พบว่าการให้กรดโรสมารินิกก่อนเหนี่ยวนำด้วยเอทานอลเป็นเวลา 24 ชม.นั้น กรดโรสมารินิกแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอทานอลเป็นเวลา 6 และ 12 ชม. นอกจากนี้ยังทำการศึกษาเซลล์มะเร็งตับที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอทานอลก่อนหลังจากนั้นจึงได้รับกรดโรสมารินิก พบว่าเมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอทานอลก่อนเป็นเวลา 12 ชม. กรดโรสมารินิกแสดงการรอดของเซลล์เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอทานอล แสดงให้เห็นว่ากรดโรสมารินิกจากใบรางจืดเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อตับ

ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของต้นลูกใต้ใบ สามารถแยกสารที่เคยมีรายงานแล้วในกลุ่มลิกแนน คือ ฟิลแลนทิน และเมื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ของสารฟิลแลนทินที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอทานอล พบว่าการให้ฟิลแลนทินก่อนเป็นเวลา 24 ชม.นั้น ฟิลแลนทินแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเอทานอลเป็นเวลา 12 ชม. อีกทั้งยังพบว่าเมื่อได้รับเอทานอลก่อนเป็นเวลา 12 ชม. ฟิลแลนทินแสดงการรอดของเซลล์เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเอทานอล แสดงให้เห็นว่า ฟิลแลนทินจากต้นลูกใต้ใบเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านความเป็นพิษของเอทานอลต่อตับ นอกจากนี้ยังสามารถนำฟิลแลนทินมาใช้เป็นสารมาตรฐานในการตรวจสอบสมุนไพรลูกใต้ใบและใช้ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ทางการค้าจากสมุนไพรลูกใต้ใบ โดยใช้วิธี Thin Layer Chromatography Image Analysis เพื่อความถูกต้องและประสิทธิภาพของสมุนไพร

ภาควิชา	เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต	ผกาภรณ์ เกตุมงคลสิทธิ์
สาขาวิชา	เภสัชเวท	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	

4976959433 : MAJOR PHARMACOGNOSY
KEYWORDS: THUNBERGIA LAURIFOLIA / PHYLLANTHUS AMARUS / ANTI-HEPATOTOXIC / ETHANOL / HEPG2 CELLS / VALIDATION

PAKABHORN KETMONGKHONSIT: ANTI-HEPATOTOXIC SUBSTANCES FROM *THUNBERGIA LAURIFOLIA* AND *PHYLLANTHUS AMARUS*. ADVISOR: ASSOC. PROF. CHAIYO CHAICHANTIPYUTH, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. POL. CAPT.. SUCHADA SUKRONG, Ph.D., 111 pp.

Chemical investigation of *Thunbergia laurifolia* Linn. leaves (Family Acanthaceae) led to the isolation of two known phenolic compounds including, caffeic acid and rosmarinic acid. The chemical structures were determined by MS and NMR spectroscopic analyses and were compared with previously report data. In this study, anti-hepatotoxic activity of rosmarinic acid was investigated against ethanol-induced hepatotoxicity in HepG2 cell line. For the pretreatment study, rosmarinic acid exhibited protective effect on HepG2 cells induced by ethanol for 6 and 12 h. For the post-treatment study, HepG2 cells were treated with ethanol, and then with rosmarinic acid (1, 5, 10 μM). Rosmarinic acid showed significant increased cell viability of HepG2 cells treated with ethanol for 12 h. These results suggested the anti-hepatotoxic activity of rosmarinic acid against ethanol-induced HepG2 cells damage.

From the whole plant of *Phyllanthus amarus* Schum.&Thonn. (Euphorbiaceae) one known lignan compound, phyllanthin, was isolated. In the present study, anti-hepatotoxic activity of phyllanthin was investigated against ethanol-induced hepatotoxicity in HepG2 cell line. For the pretreatment study, the protective effect of phyllanthin was observed on HepG2 cells induced by ethanol for 12 h. For the post-treatment study phyllanthin showed significant increased cell viability of HepG2 cells treated with ethanol for 12 h. These results suggested the potential anti-hepatotoxic activity of phyllanthin against ethanol-induced toxicity causing HepG2 cells damage. Additionally, phyllanthin, was found to be a suitable biochemical marker for the assessment of *P. amarus* plant materials and commercial herbal drugs quality. A TLC-image analysis method using a computer software technology was developed and validated for the quantitation of phyllanthin in *P. amarus* plant materials and its commercial herbal drugs.

Department: Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany
Field of Study: Pharmacognosy
Academic Year: 2013

Student's Signature Pakabhorn Ketmongkhonsit
Advisor's Signature
Co-Advisor's Signature Suchada Sukr

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Chaiyo Chaichantipyuth and my thesis co-advisor, Associate Professor Police Captain Dr. Suchada Sukrong of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. I greatly appreciate their valuable advice, kindness, patience, and constant encouragement throughout my research study.

I am grateful for the financial support from the 90th anniversary of Chulalongkorn University fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund).

My appreciations are extended to Professor Dr. Hyeong-Kyu Lee, Dr. Hyuk-Hwan Song, Dr. Dong-Ho Jung and graduate students of the Natural Medicine Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) for their kindness, hospitality, and guidance during my research experience at KRIBB, Cheongwon, South Korea.

I would like to thank members of my thesis committee, including Professor Dr. Kittisak Likhitwitayawuid, Associate Professor Dr. Boonchoo Sritularak, Associate Professor Dr. Amorn Petsom, Associate Professor Dr. Surattana Amnuoypol, and Dr. Prapai Wongsinkongman for their critical review and constructive suggestions for this thesis.

I would also like to thank the Chulalongkorn University Drug and Health Products Innovation Promotion Center (CU-DHIP), the Pharmaceutical Research Instrument Center, for supplying instruments, and the PharmNet for supporting the computer software, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

I would like to thank Associate Professor Dr. Nijsiri Ruangrungsi, Dr. Chanida Palanuvej, College of Public Health Sciences, for their assistance in the validation part, Miss Thidarat Winitthana of the Department of Pharmacology and Physiology, Miss Nareerat Petpiroon of the Department of Biochemistry and Microbiology, and Mr. Chalermlat Suktap of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their assistance in the cell assay.

I am thankful to all staff members, and other graduate students of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their assistance, friendship, and kind support throughout the period of my study.

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

CONTENTS

Page

Page

Page

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

Page

Page

Page

LIST OF SCHEMES

Page

LIST OF ABBREVIATIONS

ADH	=	Alcohol dehydrogenase
ALD	=	Alcoholic Liver Disease
ALDH	=	Aldehyde dehydrogenase
α	=	Alpha
β	=	Beta
^{o}C	=	Degree Celsius
Calc	=	Calculate
CC	=	Column chromatography
CCl_4	=	Carbon tetrachloride
$CDCl_3$	=	Deuterated chloroform
CD_3OD	=	Deuterated methanol
$CHCl_3$	=	Chloroform
CH_2Cl_2	=	Dichloromethane
cm	=	Centimeter
cm^{-1}	=	Reciprocal centimeter (unit of wave number)
^{13}C NMR	=	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
CO_2	=	Carbondioxide
CYP2E1	=	Cytochrome P450 2E1
d	=	Doublet (for NMR spectra)
dd	=	Doublet of doublets (for NMR spectra)
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
δ	=	Chemical shift
ε	=	Molar absorptivity
ESI-MS	=	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
EtOH	=	Ethanol
EtOAc	=	Ethyl acetate

g	=	Gram
h	=	Hour
HepG2	=	Human liver carcinoma cell line
^{1}H NMR	=	Proton Nuclear Magnetic Resonance
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	=	High Performance Thin Layer Chromatography
HR	=	High Resolution
Hz	=	Hertz
J	=	Coupling constant
Kg	=	Kilogram
L	=	Liter
λ_{max}	=	Wavelength at maximal absorption
µg	=	Microgram
µg/ml	=	Microgram per milliliter
µl	=	Microliter
$[M]^+$	=	Molecular ion
$[M+H]^+$	=	Pseudomolecular ion
$[M+Na]^+$	=	Pseudomolecular ion
m	=	Multiplet (for NMR spectra)
MeOH	=	Methanol
mg	=	Milligram
MHz	=	Megahertz
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
MS	=	Mass Spectrometry
MW	=	Molecular weight
m/z	=	Mass to charge ratio

Na	=	Sodium
NADH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide
nm	=	Nanometer
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
PBS	=	Phosphate buffered saline
ppm	=	Part-per-million
ROS	=	Reactive Oxygen Species
s	=	Singlet (for NMR spectra)
TLC	=	Thin Layer Chromatography
TOF	=	Time of flight
UV	=	Ultraviolet