

องค์ประกอบที่มีศักยภาพลดน้ำตาลในเลือดจากเห้ม

นางสาวนภาพรรณ พงษ์พวงเพชร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเวชเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5195-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

121484363

POTENTIAL HYPOGLYCEMIC CONSTITUENTS FROM *COSCINIUM*
FENESTRATUM

Miss Napapan Pongpoungphet

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biomedical Chemistry

Department of Biochemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-5195-8

Thesis Title POTENTIAL HYPOGLYCEMIC CONSTITUENTS FROM
COSGINIUM FENESTRATUM

By Miss Napapan Pongpoungphet

Field of Study Biomedical chemistry

Thesis Advisor Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.

Thesis Co-advisor Associate Professor Sukanya Jesadanont, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical sciences, Chulalongkorn University
in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master degree.

Boonyong Tantisira.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Nijsiri Ruangrunsi.....Chairman
(Associate Professor Nijsiri Ruangrunsi, Ph.D.)

Sunanta Pongsamart.....Thesis advisor
(Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.)

S. Jesadanont.....Thesis Co-advisor
(Associate Professor Sukanya Jesadanont, Ph.D.)

D. Meksuriyen.....Member
(Associate Professor Duangdeun Meksuriyen, Ph.D.)

Somlak Pongshompoo.....Member
(Associate Professor Somlak Pongshompoo, M.Sc.)

นภาพรรณ พงษ์พวงเพชร : องค์กรประกอบที่มีศักยภาพลดน้ำตาลในเลือดจากเห้ม
(POTENTIAL HYPOGLYCEMIC CONSTITUENTS FROM *COSCIINIUM*

FENESTRATUM) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สุนันท์ พงษ์สามารถ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม :
รศ.ดร. สุกัญญา เจษฎานนท์, 91 หน้า, ISBN 974-17-5195-8

จากการทดลองทำการละลายสารสกัดเห็บ (CE) จากส่วนลำต้นของเห้ม (*Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr.) ด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 0.016 กรัม/มิลลิลิตร แล้วทำการตกตะกอนด้วย กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 4 โมลาร์ จนค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย เท่ากับ 2 นำตะกอน (Cf) ที่ได้มาทำให้แห้ง และละลายด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นจึงทำการแยกสารโดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุ ซิลิกาเจล 60 โดยมี เมทานอล : น้ำ : 25% แอมโมเนีย ในอัตราส่วน 8 : 1 : 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากการทดลองสามารถแยกสาร Cf₂ และ Cf₃ ได้ จากนั้นจึงนำสาร Cf₂ มาตกผลึกด้วย เมทานอล (Cf₂-crystal)

การศึกษาแสดงให้เห็นผลการลดระดับน้ำตาลของสาร Cf₂-crystal และ Cf₃ โดยวิธี glucose tolerance test ในหนูขาวเพศผู้ พันธุ์ Wistar พบว่า ถ้าป้อนสารสกัด 1 ครั้ง ก่อนป้อนกลูโคส 30 นาที โดยขนาดของสาร Cf₂-crystal คือ 20 และ 60 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และขนาดของสาร Cf₃ คือ 20, 60 และ 180 มิลลิกรัม ต่อ 1 กิโลกรัม สามารถ ลดระดับน้ำตาลในเลือด คิดเป็นร้อยละ 15.16, 14.16, 16.37, 34.71 และ 34.02 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งป้อนน้ำกลั่น ที่ เวลา 30 นาที หลังจากป้อนสารละลายกลูโคส ขนาด 1 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ผลการลดระดับน้ำตาลของสาร Cf₂-crystal ไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่ให้ ส่วนผลของการลดระดับน้ำตาลของสาร Cf₃ เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณสาร แม้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างผลกับปริมาณสารไม่ได้ เป็นไปในลักษณะเส้นตรง เมื่อเพิ่มจาก 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็น 60 และ 180 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาโครงสร้างของสาร Cf₂-crystal และ Cf₃ โดยอาศัยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี สามารถสรุปได้ว่า สาร Cf₂-crystal คือ สาร jatrorrhizine และ สาร Cf₃ มี berberine เป็นองค์ประกอบหลัก

ภาควิชาชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต..... 

สาขาวิชา.....ชีวเวชเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ปีการศึกษา..... 2546.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

4376580633 : MAJOR BIOMEDICINAL CHEMISTRY

KEY WORDS: *COSCINIUM FENESTRATUM* /HYPOGLYCEMIC EFFECT

NAPAPAN PONGPOUNGPHET : POTENTIAL HYPOGLYCEMIC
CONSTITUENTS FROM *COSCINIUM FENESTRATUM*. THESIS


ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR SUNANTA PONGSAMART, Ph.D.

THESIS COADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR SUKANYA

JESADANONT, Ph.D. 91 pp. ISBN 974-17-5195-8

Dry powder extract from stems of *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. was dissolved in water at concentration 0.016 g/ml and treated with 4 M HCl to reach pH 2. The yellow precipitate (Cf) was separated and dried. The precipitate was dissolved in water (0.05 mg/ml) and applied on a silica gel 60 column, methanol : water : 25% NH₃ (8:1:1) was used as a mobile phase. Cf₂ and Cf₃ were separated. Cf₂ was crystallized in methanol.

Hypoglycemic effect of constituents of *Coscinium fenestratum* in normal male Wistar rats has been demonstrated. Cf₂-crystal fed at single doses of 20 and 60 mg/kg body weight and Cf₃ fed at single doses of 20, 60 and 180 mg/kg body weight significantly ($P < 0.05$) decreased blood glucose concentration at 30 min after feeding of glucose 1 g/kg body weight. Blood glucose levels decreased 15.16, 14.16, 16.37, 34.71 and 34.02%, respectively; as compared to the control group. Hypoglycemic activity of Cf₂-crystal is not dose-related while of Cf₃ is dose-dependent although not as a linear relationship. Structure analysis of Cf₂-crystal and Cf₃ using spectroscopy technique showed that Cf₂-crystal is jatrorrhizine, while the major component of Cf₃ is berberine.

Department.... Biochemistry.....Student's signature.....

Field of study... Biomedical Chemistry.....Advisor's signature.....

Academic Year..... 2003.....Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deepest appreciation and grateful thank to my thesis advisor, Associate Professor Sunanta Pongsamart of the Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for her excellent instruction encouragement and guidance throughout this study.

I wish to express my grateful thank to my thesis co-advisor, Associate Professor Sukanya Jesadanont of the Department of Biochemistry, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Institute Chandrakasem for her valuable advice and encouragement throughout this study.

I am very thankful Associate Professor Thatree Phadungcharoen, Department of Pharmacognosy and Associate Professor Rapepol Bavovada, Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their provided the authentic sample of Khamin Khrua.

I am very grateful to Associate Professor Nijsiri Ruangrunsi, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his advice where without his help, the investigation would have been impossible.

I would like to thank to my teachers and my friends at the Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University for kind and friendship.

Finally, I wish to express my infinite gratitude to my family for their love, understanding and encouragement throughout my life.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai).....	iv
ABSTRACT (English).....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER	
I GENERAL BACKGROUND.....	1
Introduction.....	1
Literature review.....	2
II MATERIALS & METHODS.....	44
Preparation of plant material.....	45
Animal model.....	48
III RESULTS & DISCUSSIONS.....	51
Macroscopic characterization of HAMM.....	51
Characterization of crude water extract.....	54
UV Spectra.....	57
Infrared Spectra.....	59
NMR Spectra.....	62
Mass spectrum.....	76

Hypoglycemic effect of *C. fenestratum* fraction in normal male

Wistar rates.....	78
IV CONCLUSION.....	81
REFERENCES.....	83
APPENDIX.....	89
VITAE.....	91

LISTS OF TABLES

Table	Page
1. Summary of ^1H - NMR data and assignments for Cf_2 -crystal.....	63
2. Summary of ^{13}C NMR data and assignments for Cf_2 -crystal.....	64
3. Summary of ^1H - NMR data and assignments for Cf_3 fraction.....	67
4. Summary of ^{13}C NMR data and assignments for Cf_3 , Berberine hemisulfate.....	68

LISTS OF FIGURES

Figure	Page
1. <i>Arcangelisia flava</i> (L.) Merr.....	4
2. Leaves of <i>Arcangelisia flava</i> (L.) Merr.....	5
3. Microscopic illustration of <i>Arcangelisia flava</i> (L.) Merr. leaf	6
4. Stem of <i>Arcangelisia flava</i> (L.) Merr.....	7
5. Microscopic characters of <i>Arcangelisia flava</i> (L.) Merr. stem.....	8
6. <i>Coscinium fenestratum</i> (Gaertn.) Colebr.....	11
7. Leaves of <i>Coscinium fenestratum</i> (Gaertn.) Colebr.....	12
8. Microscopic illustration of <i>Coscinium fenestratum</i> (Gaertn.) colebr. leaf	13
9. Stems of <i>Coscinium fenestratum</i> (Gaertn.) Colebr.	14
10. Microscopic characters of <i>Coscinium fenestratum</i> (Gaertn.)colebr. stem.....	15
11. <i>Coscinium blumeianum</i> Miers.....	17
12. <i>Fibraurea tinctoria</i> Lour.....	20
13. Leaves of <i>Fibraurea tinctoria</i> Lour.....	21
14. Microscopic illustration of <i>Fibraurea tinctoria</i> Lour. leaf.....	22
15. Stem of <i>Fibraurea tinctoria</i> Lour.....	23
16. Microscopic characters of <i>Fibraurea tinctoria</i> Lour. stem.....	24
17. Structure of Berberine.....	29
18. Structure of Palmatine.....	30
19. Structure of Jatrorrhizine.....	31
20. Structure of Columbamine	32
21. Structure of Dehydrocorydalmine.....	33
22. Structure of Magnoflorine	33
23. Structure of Thalifendine.....	34

LISTS OF FIGURES (Cont.)

Figure	Page
24. Structure of Crebanine.....	35
25. Structure of Homoaromaline.....	35
26. Structure of Limacine.....	36
27. Structure of Berberrubine.....	36
28. Structure of Canadine.....	37
29. Structure of Palmarin.....	37
30. Structure of Chasmanthin	38
31. Structure of β -Sitosterol	38
32. Structure of Stigmasteol.....	39
33. Leave and stem of HAMM.....	52
34. Microscopic character of HAMM leave.....	53
35. Crude water extract of HAMM.....	54
36. TLC System for separation of constituents of CE using different solvent systems 1-5.....	55
37. TLC pattern of Cf fractions.....	56
38. UV spectrum of Cf ₂ -crystal.....	57
39. UV spectrum of Cf ₃ fraction.....	58
40. UV spectrum of Berberine hemisulfate	58
41. IR spectrum of Cf ₂ -crystal in KBr.....	59
42. IR spectrum of Cf ₃ fraction in KBr.....	60
43. IR spectrum of Berberine hemisulfate in KBr	61
44. IR spectrum of Cf ₃ fraction and Berberine hemisulfate in KBr.....	61

LISTS OF FIGURES (Cont.)

Figure	Page
45. ^1H -NMR spectrum of Cf_2 -crystal in CD_3OD	65
46. ^{13}C -NMR Spectrum of Cf_2 -crystal in CD_3OD	66
47. ^1H -NMR Spectrum of Berberine hemisulfate in CD_3OD	69
48. ^1H -NMR Spectrum of Cf_3 fraction in CD_3OD	70
49. Comparison ^1H -NMR Spectrum of Berberine hemisulfate and Cf_3 fraction in CD_3OD	71
50. ^{13}C -NMR Spectrum of Berberine hemisulfate in CD_3OD	72
51. ^{13}C -NMR Spectrum of Cf_3 fraction in CD_3OD	73
52. Comparison ^{13}C -NMR Spectrum of Berberine hemisulfate and Cf_3 fraction in CD_3OD	74
53. Mass spectrum of Cf_2 -crystal.....	76
54. Mass spectrum of Cf_3 fraction.....	77
55. Effect of Cf_3 , Berberine hemisulfate and CE on blood glucose in normal Wistar rates; 3 hr-duration.....	79
56. Effect of Cf_2 -crystal and CE on blood glucose in normal Wistar rates; 3 hr- duration.....	80

ABBREVIATIONS

CE	=	Crude water extract
$^{\circ}\text{C}$	=	Degree Celsius
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
g	=	Gram
hr	=	Hour
kg	=	Kilogram
LD_{50}	=	50% Lethal dose
M	=	Molar
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
TLC	=	Thin layer chromatography
nM	=	Nanomolar
μg	=	Microgram