สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากฝักพุดทุ่ง *Holarrhena curtisii* และผลแตงแพะ *Gymnema griffithii*

นายสุพงษ์พันธ์ ศรีสุริฉัน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556

BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *Holarrhena curtisii* PODS AND *Gymnema griffithii* FRUITS

Mr. Suphongphan Srisurichan

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Chemistry
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Thesis Title	BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *Holarrhena curtisii* PODS AND *Gymnema griffithii* FRUITS
By	Mr. Suphongphan Srisurichan
Field of Study	Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Surachai Pornpakakul, Ph.D.

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

.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Surachai Pornpakakul, Ph.D.)

.....Examiner
(Associate Professor Somchai Pengprecha, Ph.D.)

.....Examiner
(Associate Professor Thumnoon Nhujak, Ph.D.)

.....External Examiner
(Professor Sophon Roengsumran, Ph.D.)

สุพงษ์พันธ์ ศรีสุริฉัน : สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากฝักพุดทุ่ง *Holarrhena curtisii* และผลแตงแพะ *Gymnema griffithii*. (BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *Holarrhena curtisii* PODS AND *Gymnema griffithii* FRUITS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.สุรชัย พรภคกุล , 252 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแตงแพะ *G. griffithii* และพุดทุ่ง *H. curtisii* ซึ่งทั้งคู่อยู่ในวงศ์ตีนเป็ด ในการแยกสารโดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีจากสารสกัดเมทานอลของผลแตงแพะ สามารถแยกสารใหม่ในกลุ่มของสเตอรอยด์ไกลโคไซด์ที่มีหมู่ออร์โธอะซิเตทบนโครงสร้างเพรกเนนสเตอรอยด์ได้ 8 สาร คือ gymnemogriffithoside A-H การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยวิธีการทางสเปกโทรสโกปี (1D, 2D NMR, HR-ESIMS และ FTIR) พบว่าสารที่แยกได้นั้นมีโครงสร้างในส่วนสเตอรอยด์อยู่ 2 ลักษณะ สาร gymnemogriffithoside A-F มีโครงสร้างสเตอรอยด์แบบ dihydrosarcostin-7,14,18-orthoacetate และสาร gymnemogriffithoside G และ H มีโครงสร้างสเตอรอยด์แบบ dihydrosarcostin-14,17,18-orthoacetate การพิสูจน์โครงสร้างสัมบูรณ์ส่วนสเตอรอยด์ของสาร gymnemogriffithoside A โดยวิธีการทางสเปกโทรสโกปีร่วมกับวิธีการของ Mosher พบว่าสารมีลักษณะโครงสร้างสัมบูรณ์แบบ 3*S**, 5*S**, 8*S**, 9*R**, 10*S**, 12*R**, 13*R**, 14*R**, 17*S**, 20*S** สารสเตอรอยด์ไกลโคไซด์ทั้งหมดที่แยกได้จากผลแตงแพะ มีน้ำตาลไตรแซ็กคาไรด์ 2 ลักษณะ คือ *O*-β-D-thevetopyranosyl-(1⟶4)-*O*-β-D-oleandropyranosyl-(1⟶4)-*O*-β-D-digitoxopyransyl และ *O*-β-D-thevetopyranosyl-(1⟶4)-*O*-β-D-canaropyranosyl-(1⟶4)-*O*-β-D-digitoxopyranosyl ต่อเข้ากับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของสเตอรอยด์ จากการนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด (มะเร็งเต้านม BT 474, มะเร็งปอด Chago, มะเร็งตับ Hep-G2, มะเร็งกระเพาะอาหาร KATO-III และ มะเร็งลำไส้ SW620) พบว่า สาร gymnemogriffithoside C และ F ที่มีหมู่ ทิกโกอิล แทนที่อยู่บนคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 20 ของสเตอรอยด์ แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเล็กน้อยในช่วงความเข้มข้น 40-70 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่สารตัวอื่นไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง แสดงให้เห็นว่าหมู่ทิกโกอิลมีความสัมพันธ์ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารในกลุ่ม สเตอรอย์ดไกลโคไซล์ นอกจากนี้ยังได้นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง เอมไซม์แอลฟากลูโคซิเดสโดยพบว่า สารที่แยกได้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอมไซม์แอลฟากลูโคซิเดส ในขณะที่สารสเตอรอยด์ ที่ได้จากการตัดสายน้ำตาลออกจาก gymnemogriffithoside A และ G จะมีฤทธิ์ในระดับปานกลาง แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างในส่วนของน้ำตาลจะส่งผลให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเอมไซม์แอลฟากลูโคซิเดสลดลง

ในการแยกสารจากฝักพุดทุ่ง สามารถแยกสารใหม่ในกลุ่มของไตรเทอร์ปีนอยด์ได้ 2 ชนิด คือ 3β-hydroxy-11α-hydroperoxyursan-12-en-28-oic acid และ 3β-hydroxy-11α-hydroperoxyolean-12-en-28-oic acid และสารที่มีการรายงานมาก่อน 12 ชนิดคือ squalene, α-amyrin acetate, β-amyrin acetate, lupeol acetate, lupeol, cycloeucalenol, 24-methylenepollinastanol, lanosta-7,24-dien-3β-ol, ursolic acid, oleanolic acid, (–)-catechin และ (–)-gallocatechin จากการนำสารที่แยกได้จากฝักพุดทุ่งไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอมไซม์แอลฟากลูโคซิเดสพบว่าสาร ursolic acid, oleanolic acid, 3β-hydroxy-11α-hydroperoxyursan-12-en-28-oic acid และ 3β-hydroxy-11α-hydroperoxyolean-12-en-28-oic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอมไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่ดี ในช่วงความเข้มข้น 10-80 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ acarbose (IC_{50} = 884.6 ไมโครโมลาร์)

ภาควิชา เคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เคมี ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2556

5172515223 : MAJOR CHEMISTRY
KEYWORDS: APOCYNACEAE / PREGNANE / STEROIDAL GLYCOSIDES / DIHYDROSARCOSTIN / ORTHOACETATE / MOSHER'S METHOD / TRITERPENOIDS / CYTOTOXICITY / GYMNEMA GRIFFITHII CRAIB / HOLARRHENA CURTISII KING & GAMBLE / ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITOR / FLAVANOL

SUPHONGPHAN SRISURICHAN: BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *Holarrhena curtisii* PODS AND *Gymnema griffithii* FRUITS. ADVISOR: ASSOC. PROF. SURACHAI PORNPAKAKUL, Ph.D., 252 pp.

In a phytochemical investigation of bioactive compounds from Apocynaceae family, *Gymnema griffithii* Craib. and *Holarrhena curtisii* King & Gamble. were selected to investigate their phytochemical components. The chromatographic separation of methanolic extract of *G. griffithii* fruits was performed and led to the isolation of 8 new pregnane-type steroidal glycosides substituted with orthoacetate groups, named gymnemogriffithoside A-H. Their structures were established by spectroscopic analysis (1D and 2D NMR, HR-ESIMS and FTIR). The steroidal skeleton of gymnemogriffithoside A-F was deduced to be a dihydrosarcostin-8,14,18-orthoacetate while the steroidal skeleton of gymnemogriffithoside G and H was deduced to be a dihydrosarcostin-14,17,18-orthoacetate. The absolute stereochemistry of the steroidal skeleton of gymnemogriffithoside A was established as 3*S**, 5*S**, 8*S**, 9*R**, 10*S**, 12*R**, 13*R**, 14*R**, 17*S**, 20*S** using both spectroscopic and Mosher's method. All eight steroidal glycosides isolated from *G. griffithii* fruits had two types of trisaccharide moieties, *O*-β-D-thevetopyranosyl-(1⟶4)-*O*-β-D-oleandropyranosyl-(1⟶4)-*O*-β-D-digitoxopyransyl and *O*-β-D-thevetopyranosyl-(1⟶4)-*O*-β-D-canaropyranosyl-(1⟶4)-*O*-β-D-digitoxopyranosyl at the C-3 of their aglycones. All compounds were evaluated for their in vitro cytotoxic effects against five human tumor cell lines (BT 474, Chago, Hep-G2, KATO-III and SW620). Gymnemogriffithoside C and F, containing a tigloyl moiety at C-20, showed a slight cytotoxicity against all tested cell lines in 40-70 μM range while the others were inactive at 100 μM, suggesting that the presence of the tigloyl moiety influenced the cytotoxic activity of the compounds in this type. In addition, the α-glucosidase inhibitory activity of all compounds was also tested. However, only aglycone of gymnemogriffithoside A and G showed moderate α-glucosidase inhibitory activity.

The pods of *H. curtisii* provided 2 new tritepenoids identified as 3β-hydroxy-11α-hydroperoxyursan-12-en-28-oic acid and 3β-hydroxy-11α-hydroperoxyolean-12-en-28-oic acid, along with 12 know compounds, squalene, α-amyrin acetate, β-amyrin acetate, lupeol acetate, lupeol, cycloeucalenol, 24-methylenepollinastanol, lanosta-7,24-dien-3β-ol, ursolic acid, oleanolic acid, (−)-catechin and (−)-gallocatechin. All compounds, except squalene, were evaluated for their α-glucosidase inhibitory activity. Among of them, ursolic acid, oleanolic acid, 3β-hydroxy-11α-hydroperoxyursan-12-en-28-oic acid and 3β-hydroxy-11α-hydroperoxyolean-12-en-28-oic acid, processed with pentacyclic triterpenoid acid skeleton showed significant α-glucosidase inhibitory activity in the range of 10-80 μM comparable to standard control acarbose (IC_{50} = 884.6 μM).

Department: Chemistry
Field of Study: Chemistry
Academic Year: 2013

Student's Signature Suphongphan Srisurichan
Advisor's Signature Surachai Pornpakakul

ACKNOWLEDGEMENTS

First and foremost, I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Surachai Pornpakakul, Department of Chemistry, Faculty of Scinece, Chulalongkorn Univesity, for his guidance, inspiration, suggestions, criticism and financial support throughout the course of my research and studies.

I would like to thank my thesis committee members, Assistant Professor Dr. Warinthorn Chavasiri, Professor Dr. Sophon Roengsumran, Associate Professor Dr. Somjai Pengpreecha and Associate Professor Dr. Thumnoon Nhujak, for all their discussion and guidance.

I also wish to thank Mrs. Songchan Puthong, Institute of Biotechnology and Genetic Engineering Chulalongkorn University, for cytotoxicity test.

I would like to give special thanks to Mr. Thanesuan Nuanyai, Mr. Thirawat Sirijindalert, Mr. Apiratt Thitimon, Mrs. Sunisa Suwancharoen and the members of Research Centre for Bioorganic Chemistry (RCBC), Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for their friendship, kindness, suggestion and encouragement.

Finally, I am so grateful to my family for their love, encouragement and understanding throughout my study.

CONTENTS

Page

Page

Page

Page

LIST OF TABLES

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES

LIST OF ABBREVIATIONS

$[\alpha]_D^{25}$	Specific rotation at 25 °C and using the wavelength of light at 589 nm (sodium D line) for the observation
δ	Chemical shift (NMR)
δ_C	Chemical shift of carbon (NMR)
δ_H	Chemical shift of proton (NMR)
λ_{max}	Wavelength of maximum absorption (UV)
μL	Microliter (s)
μg	Microgram (s)
μM	Micromolar
μm	Micrometer (s)
ν_{max}	Reciprocal wavelength at the highest signal in IR spectroscopy
°C	Degree Celsius
^{1}H NMR	Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
^{13}C NMR	Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy
2D NMR	Two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy
Ac	Acetyl
amu	Atomic mass unit
A_0	Absorbance of the control
A_1	Absorbance of the test sample
ATR-FTIR	Attenuated total reflectance-Fourier transformed infrared
$Ba(OH)_2$	Barium hydroxide
br	broad (NMR)
Bz	Benzyl
c	Concentration
calcd	Calculated
Can	Canarsoe

cat.	Catalyst
CC	Column chromatography
$CDCl_3$	Deuterated chloroform
CD_3OD	Deuterated methanol
$Ce(SO_4)_2$	Cerium(IV) sulfate
CH_2Cl_2	Dichloromethane
cm	Centimeter (s)
cm^{-1}	Unit of reciprocal wavelength (or wavenumber) in IR
COSY	Correlation spectroscopy (NMR)
d	Doublet (NMR)
D	Dextrorotatory rotation (turned clockwise of the plane of polarization)
D_2O	Deuterium oxide
dd	Doublet of doublet (NMR)
ddd	Doublet of doublet of doublet (NMR)
Dig	Digitoxose
DMF	*N*,*N*-dimethylformamide
DMFCl	Chloride-*N*,*N*-dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dq	Doublet of quartet (NMR)
dt	Doublet of triplet (NMR)
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethyl acetate
v/v	Volume per volume
g	Gram (s)
h	Hour (s)
H_2SO_4	Sulfuric acid
H_2O	Water
Hz	Hertz (s)

HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HRESIMS	High-resolution electrospray ionization mass spectrometry
HPLC	High-performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy
sp.	Species
sp^3	sp^3 hybridisation
MTPA	α-methoxy-α-trifluoromethylphenylacetic acid
MTPACl	α-methoxy-α-trifluoromethylphenylacetyl chloride
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration
J	Coupling constant
L	Liter (s)
L	Levorotatory rotation
lit	Literature
m	Multiplet (NMR)
m	Meter (s)
M	Molar
MeOH	Methanol
mg	Milligram (s)
MHz	Megahertz (s)
mm	Millimeter (s)
mM	Millimolar (s)
mmol	Millimole (s)
mp.	Melting point
m/z	Mass per charge ratio
$[M+H]^+$	Protonated molecule ion
$[M+Na]^+$	Pseudo-molecular ion
nm	Nanometer (s)

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	Ammonium molybdate
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
Ole	Oleandrose
PNPG	*p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside
ppm	Parts per million
q	Quartet (NMR)
qd	Quartet of doublet (NMR)
RP-18	Reverse phase C18 column
R	*Rectus* for right (configuration)
rt	Room temperature
s	Singlet (NMR)
S	*Sinister* for left (configuration)
t	Triplet (NMR)
td	Triplet of doublet (NMR)
Thv	Thevetose
Tig	Tigloyl
TLC	Thin layer chromatography
t_R	Retention time
U	Unit