



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพรรณไม้
ชนิดใหม่: บุหลงดอกแหลม

โดย ดร. รัชนาพร โชคชัยศิริ

มิถุนายน 2558

สัญญาเลขที่ MRG5680006

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพรรณไม้
ชนิดใหม่: บุษบงดอกแหลม

มหาวิทยาลัยพะเยา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5680006

ชื่อโครงการ: องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพรรณไม้ชนิดใหม่: บุหลงดอกแหลม

ชื่อนักวิจัย: ดร.รัชนาพร โชคชัยศิริ มหาวิทยาลัยพะเยา

E-mail Address: pam_2022@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 มิถุนายน 2556 ถึง 2 มิถุนายน 2558

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของบุหลงดอกแหลม (*Dasymaschalon acuminatum*) จากส่วนใบและกิ่งสามารถแยกสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ 7-*epi*-duguetine (1) และ 7-(*O*)-acetylduguetine (7) และรวมทั้งสารที่เคยพบมาแล้วอีกในกลุ่มแอลคาลอยด์ 1 ชนิด คือ dicentrinone (2) และในกลุ่มฟลาโวนอยด์ 5 ชนิด คือ quercetin 3,7-dimethyl ether 3'-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (3), galangin 5-methyl ether (3,7-dihydroxy-5-methoxyflavone) (4), 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (5), 3,5,7-trimethoxyflavone (6) และ (-)-epicatechin (8) ที่แยกได้จากใบและกิ่งของ *Dasymaschalon acuminatum* ซึ่งเป็นพืชชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานส่วนประกอบทางเคมีมาก่อน โครงสร้างของสารใหม่วิเคราะห์ได้จากเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีและโครงสร้างของสารที่เคยพบมาแล้วยืนยันได้จากการเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและข้อมูลทางกายภาพที่ได้กับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้แล้ว ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียพบว่า 7-(*O*)-acetylduguetine และ 7-*epi*-duguetine มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ค่า IC₅₀ 0.243 และ 0.385 μ g/ml, ตามลำดับ

คำหลัก: บุหลงดอกแหลม; แอลคาลอยด์; ฟลาโวนอยด์; ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

Abstract

Project Code: MRG5680006

Project Title: Chemical Constituents and Biological Activities of *Dasymaschalon acuminatum*, the New Plant Species

Investigator: Dr. Ratchanaporn Chokchaisiri

E-mail Address: pam_2022@hotmail.com

Project Period: 2 June 2013 to 2 June 2015

Phytochemical investigation of the leaves and twigs of *Dasymaschalon acuminatum* led to the isolation of two new aporphine alkaloid, 7-*epi*-duguetine (**1**) and 7-(*O*)-acetylduguetine (**7**) together with one known alkaloid, dicentrinone (**2**), and five known flavonoids, quercetin 3,7-dimethyl ether 3'-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (**3**), galangin 5-methyl ether (**4**), 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (**5**), 3,5,7-trimethoxyflavone (**6**) and (-)-epicatechin (**8**), were isolated from the leaves and twigs of *Dasymaschalon acuminatum*, a new plant species which has not been investigated phytochemically before. The structures of the new compounds were elucidated by spectroscopic techniques and the known compounds were identified by comparison of the spectroscopic and physical data with those of reported values. All isolates were evaluated for antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* strain K1 and 7-(*O*)-acetylduguetine and 7-*epi*-duguetine were found to exhibit potent activity with an IC₅₀ of 0.243 and 0.385 μ g/ml, respectively.

Keywords : *Dasymaschalon acuminatum*; alkaloid; flavonoid; antiplasmodial activity.

บทสรุปของโครงการ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ของพรรณไม้และสมุนไพรนานาชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และสรรพคุณทางยาที่น่าสนใจ จึงได้มีการศึกษารวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับพรรณไม้และสมุนไพรมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพรรณไม้และสมุนไพรหลายชนิดยังไม่ได้มีการศึกษาวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นเพื่อสร้างความแข็งแกร่งในการใช้ภูมิปัญญาโดยการมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์รับรองถึงประโยชน์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจากการค้นคว้าพบว่าพืชในสกุล *Dasymaschalon* มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพไม่มากนัก คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชชนิดหนึ่ง คือ บุหลงดอกแหลม (*Dasymaschalon acuminatum*) ซึ่งยังไม่มีผู้ทำการศึกษาวิจัย คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าเป็นการเร่งด่วนที่ควรจะได้มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเป็นข้อมูลเผยแพร่ให้นักศึกษาและบุคคลทั่วไปได้ทราบและเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อศึกษาวิธีการสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีของบุหลงดอกแหลม
- 2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การจัดเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อการสกัด

ทำการเก็บตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วนแยกออกจากกัน คือส่วนใบและกิ่งของต้นบุหลงดอกแหลม และนำไปตากให้แห้งโดยอากาศ จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดเพื่อความสะดวกในการสกัด ทำการสกัดพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมตามลำดับจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ คือ เฮกเซน (hexane) แล้วสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) และสุดท้ายเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง คือ เมทานอล ที่อุณหภูมิห้อง โดยวิธีการแยกรองสารละลายที่ได้แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) สารสกัดหยาบที่ได้จะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น ซึ่งจากผลการทดสอบดังกล่าวจะถูกนำมาพิจารณาว่าส่วนใดของพืชที่น่าสนใจนำมาศึกษาต่อไป

3.2 การสกัด

ทำการสกัดพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมตามลำดับจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ คือ เฮกเซน (hexane) แล้วสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) และสุดท้ายเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง คือ เมทานอล ที่อุณหภูมิห้อง โดยวิธีการแยกรองสารละลายที่ได้แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator)

จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้ ส่งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรีย การต้านเชื้อวัณโรค และทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (vero cell) เซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) พบว่าสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดเอทิลอะซีเตตมีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ได้ดี ดังนั้น นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ดังกล่าวไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยแยกส่วนสกัดหยาบเป็นส่วนย่อยด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี จนได้สารบริสุทธิ์แล้วนำมาหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

4. ผลการดำเนินงานของโครงการ

จากการสกัดสารจากใบและกิ่งของบวบหลวงดอกแหลม ได้สารสกัดหยาบ เฮกเซน เอทิลอะซีเตต และ เมทานอลตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แสดงน้ำหนักของสารสกัดจากใบและกิ่งบวบหลวงดอกแหลม

สารสกัดหยาบ	เฮกเซน	เอทิลอะซีเตต	เมทานอล
ใบ	129.7 กรัม	15.74 กรัม	30.6 กรัม
กิ่ง	98.78 กรัม	10.23 กรัม	12.34 กรัม

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด ได้แก่ ฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรีย ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อมาลาเรีย, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187)

สารสกัดหยาบ	ฤทธิ์การยับยั้ง เชื้อมาลาเรีย	ความเป็นพิษต่อเซลล์ (IC ₅₀ , µg/ml)		
	(IC ₅₀ , µg/ml)	มะเร็งในช่องปาก (KB)	มะเร็งเต้านม (MCF-7)	มะเร็งปอด (NCI-H187)
เฮกเซน (ใบ)	-	inactive	inactive	inactive
เอทิลอะซีเตต (ใบ)	3.29	23.39	inactive	inactive
เมทานอล (ใบ)	4.75	44.64	inactive	inactive
เฮกเซน (กิ่ง)	-	inactive	inactive	inactive
เอทิลอะซีเตต (กิ่ง)	4.48	inactive	inactive	inactive
เมทานอล (กิ่ง)	4.43	inactive	inactive	inactive
Mefloquine	0.0285	-	-	-
Ellipticine	-	1.20	NT	3.81
Tamoxifen	-	NT	8.23	NT

จากผลการทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวนำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยแยกส่วนสกัดหยาบเป็นส่วนย่อยด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี จนได้สารบริสุทธิ์แล้วนำมาหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

การแยกและหาสูตรโครงสร้างของสารจากสารสกัดหยาบ

ใบบุหลดดอกแหลม

สารสกัดเอทิลอะซีเตต

นำสารสกัดเอทิลอะซีเตต (15.0 กรัม) ทำการแยกออกเป็น fractions ต่างๆ ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (0.063-200 mm, Merck 1.07734) ใช้ตัวชะ (Eluent) เริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลอะซีเตต, เอทิลอะซีเตตถึงเมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์ (Eluates) ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) รวมกลุ่มส่วนที่ออกมาที่มีจุดของสาร (Spot) บน TLC คล้ายคลึงกันได้ 7 กลุ่ม

นำกลุ่มที่ 2 (247.6 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (80:20) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ 3,5,7-trimethoxyflavone (**6**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 131.1 มิลลิกรัม

นำกลุ่มที่ 3 (806.0 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (80:20) ได้ 4 กลุ่มย่อย (กลุ่มย่อย 3.1-3.4) นำกลุ่มย่อย 3.2 (338.9 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (**5**) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว น้ำหนัก 273.5 มิลลิกรัม นำกลุ่มย่อย 3.3 (411.3 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) เฮกเซน-เอทิลอะซีเตต (80:20) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ galangin 5-methyl ether (**4**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 68.0 มิลลิกรัม

นำกลุ่มที่ 7 (1.84 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) เฮกเซน-เอทิลอะซีเตต (80:20) จากนั้นตามด้วยคอลัมน์ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (20:80) ได้ 3 กลุ่มย่อย (กลุ่มย่อย 7.1-7.3) นำกลุ่มย่อย 7.2 มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (98:2) ได้ 3 กลุ่มย่อย (กลุ่มย่อย 7.2.1-7.2.3) นำกลุ่มย่อย 7.2.2 (723.0 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (80:20) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ dicentrinone (**2**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 7.1 มิลลิกรัม

สารสกัดเมทานอล

นำสารสกัดเมทานอล (30.0 กรัม) ทำการแยกออกเป็น fractions ต่างๆ ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (0.063-200 mm, Merck 1.07734) ใช้ตัวชะ (Eluent) เริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลอะซีเตท, เอทิลอะซีเตทถึงเมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์ (Eluates) ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) รวมกลุ่มส่วนที่ออกมาที่มีจุดของสาร (Spot) บน TLC คล้ายคลึงกันได้ 6 กลุ่ม

นำกลุ่มที่ 3 (3.45 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (80:20) ได้สาร 3 กลุ่มย่อย (กลุ่มย่อย 3.1-3.3) นำกลุ่มย่อย 3.3 (2.54 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (97:3) ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ galangin 5-methyl ether (4) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 321.4 มิลลิกรัม และ 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (5) 1.35 กรัม ซึ่งเคยแยกได้ในสารสกัดเอทิลอะซีเตท

นำกลุ่มที่ 5 (10.3 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (80:20) ได้ 3กลุ่มย่อย (กลุ่มย่อย 5.1-5.3) นำกลุ่มย่อย 5.2 (2.73 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำโดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (98:2) ได้ 4 กลุ่มย่อย (กลุ่มย่อย 5.2.1-5.2.4) นำกลุ่มย่อย 5.2.2 (51.5 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ silica reversphase RP-18 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-น้ำ (80:20) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ 7-*epi*-duguetine (1) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 46.8 มิลลิกรัม นำกลุ่มย่อย 5.2.4 (1.00 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ silica reversphase RP-18 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-น้ำ (80:20) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ quercetin 3,7-dimethyl ether 3'-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (3) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 7.3 มิลลิกรัม

กิ่งบุหลดดอกแหลม

สารสกัดเอทิลอะซีเตท

นำสารสกัดเอทิลอะซีเตท (10 กรัม) ทำการแยกออกเป็น fractions ต่างๆ ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (0.063-200 mm, Merck 1.07734) ใช้ตัวชะ (Eluent) เริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลอะซีเตท, เอทิลอะซีเตทถึงเมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์ (Eluates) ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) รวมกลุ่มส่วนที่ออกมาที่มีจุดของสาร (Spot) บน TLC คล้ายคลึงกันได้ 5 กลุ่ม

นำกลุ่มที่ 2 (839.2 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (100:1) จากนั้นตามด้วยคอลัมน์ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล 100% ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ galangin 5-methyl ether (4) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 220.5 มิลลิกรัม ซึ่งเคยแยกได้ในสารสกัดเอทิลอะซิเตทของส่วนใบ

นำกลุ่มที่ 3 (895.0 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล 100% ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (5) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว น้ำหนัก 154.5 มิลลิกรัม ซึ่งเคยแยกได้ในสารสกัดเอทิลอะซิเตทของส่วนใบ

นำกลุ่มที่ 5 (1.16 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล 100% จากนั้นตามด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (<0.063mm, Merck 1.07729) ใช้ตัวชะ (Eluent) ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (98:2) ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ dicentrinone (2) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ซึ่งเคยแยกได้ในสารสกัดเอทิลอะซิเตทของส่วนใบ และ 7-(O)-acetylduguetine (7) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 7.1 มิลลิกรัม

สารสกัดเมทานอล

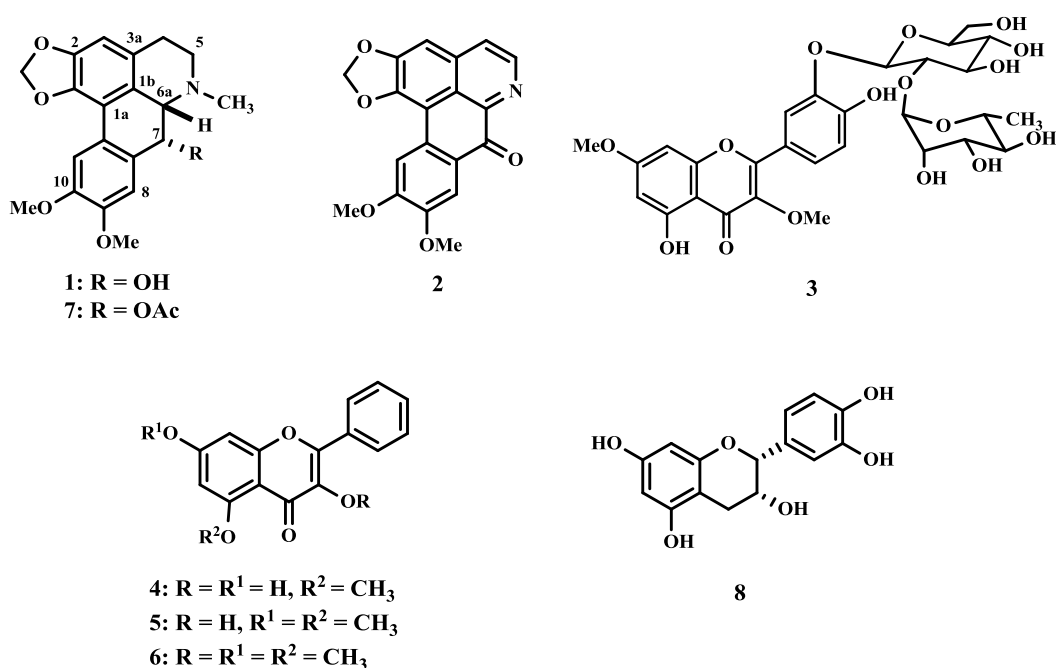
นำสารสกัดเมทานอล (12.0 กรัม) ทำการแยกออกเป็น fractions ต่างๆ ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล (0.063-200 mm, Merck 1.07734) ใช้ตัวชะ (Eluent) เริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลอะซิเตท, เอทิลอะซิเตทถึงเมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์ (Eluates) ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) รวมกลุ่มส่วนที่ออกมาที่มีจุดของสาร (Spot) บน TLC คล้ายคลึงกันได้ 6 กลุ่ม

นำกลุ่มที่ 2 (735.2 มิลลิกรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (80:20) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ (-)-epicatechin (8) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 13.5 มิลลิกรัม

นำกลุ่มที่ 3 (1.78 กรัม) มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) โดยใช้ sephadex LH-20 ใช้ตัวชะ (Eluent) เมทานอล 100% จากนั้นตามด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (recolumn chromatography, CC) ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ quercetin 3,7-dimethyl ether 3'-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (3) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 5.7 มิลลิกรัม และ 7-*epi*-duguetine (1) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 17.1 มิลลิกรัม ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิด เคยแยกได้ในสารสกัดเอทิลอะซิเตทของส่วนใบ

5. สรุปและอภิปรายผล

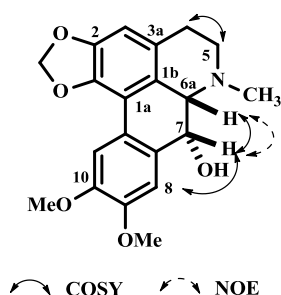
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของบุหลงดอกแหลม (*Dasymaschalon acuminatum*) จากส่วนใบและกิ่งสามารถแยกสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ 7-*epi*-duguetine (**1**) และ 7-(*O*)-acetylduguetine (**7**) และรวมทั้งสารที่เคยพบมาแล้วอีกในกลุ่มแอลคาลอยด์ 1 ชนิด คือ dicentrinone (**2**)¹ และในกลุ่มฟลาโวนอยด์ 5 ชนิด คือ quercetin 3,7-dimethyl ether 3'-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (**3**)², galangin 5-methyl ether (3,7-dihydroxy- 5-methoxyflavone) (**4**)³, 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (**5**)⁴, 3,5,7-trimethoxyflavone (**6**)⁵ และ (-)-epicatechin (**8**)⁶ ดังรูปภาพ 1 โครงสร้างของสารใหม่วิเคราะห์ได้จากเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีสำหรับโครงสร้างของสารที่เคยพบมาแล้วยืนยันได้จากการเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและข้อมูลทางกายภาพที่ได้กับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้แล้ว



รูป 1: โครงสร้างของสารที่แยกได้จากใบและกิ่งบุหลงแหลม

สารประกอบ **1** มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง มีค่าการหมุนระนาบแสงจำเพาะ $[\alpha]_D^{29}$ -46.6° (c = 0.59, CHCl₃) จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัมปรากฏแถบการดูดกลืนของหมู่ไฮดรอกซิลที่ 3440 cm⁻¹ จากข้อมูลแมสสเปกตรัมให้พิกัด molecular ion ที่ m/z 356.1447 [M + H]⁺ ใน HR ESI MS สเปกตรัม ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล C₂₀H₂₁NO₅ จากข้อมูล ¹H- และ ¹³C-NMR (ตาราง 2) พบสัญญาณ singlet ของหมู่ OCH₃ 2 หมู่ ที่ δ 3.91 เกิดการแทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 9 (δ_c 149.5) และ 10 (δ_c 148.9) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ singlet 2 สัญญาณ ของโปรตอน methylenedioxy ที่ δ 5.93 และ 6.09 และ สัญญาณ singlet 3 สัญญาณ ที่ δ 6.51, 6.95 และ 7.70 ของ H-3, H-8 และ H-11 ตามลำดับ สามารถยืนยันได้จากรูปแบบการแทนที่ของวงอะโรมาติก

จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซิล และ เมทิลที่เชื่อมต่อกับไนโตรเจน ที่ δ 5.01 และ 2.69 สารประกอบ **1** แสดงลักษณะเฉพาะของสารกลุ่ม aporphine alkaloid แบบ 1,2-methylenedioxy จากสัญญาณ carbinolic ที่ δ_{H} 4.87 (*d*, $J = 2.1$ Hz) ถูกแทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 7 ซึ่งจากข้อมูล $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY (รูป 2) H-7 มีความสัมพันธ์กับ H-6 และจากข้อมูล HMBC H-7 มีความสัมพันธ์กับ C-1b, C-6a, C-7a C-8 and C-11a (Table 1) การยืนยันสเตอริโอเคมีที่ C-6a พบว่ามีการจัดเรียงแบบ *R* จากข้อมูล circular dichroism (CD) ซึ่งมีค่า negative Cotton effect ที่ 242 nm นอกจากนี้ยังสังเกตได้จากค่าคงที่การคู่ควบซึ่งมีค่า $J_{6a,7} = 2.1$ Hz เป็นแบบซิส ที่แตกต่างจากทรานส์ ($J_{6a,7} = 12$ Hz) ในรูปไอโซเมอร์⁷ จากการยืนยันข้อมูล NOE พบว่า H-6a (δ_{H} 3.39) และ H-7 (δ_{H} 4.87) มีความสัมพันธ์ต่อกัน พบว่าการจัดเรียงตัวที่ C-7 เป็นแบบ *R* การยืนยันโครงสร้างได้จากการเปรียบเทียบ $^1\text{H-}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ (–)-duguetine จึงสรุปได้ว่า สารประกอบ **1** ที่ C-7 เป็น epimer ของ (–)-duguetine คือ 7-*epi*-duguetine



รูป 2: ข้อมูล COSY และ NOE ความสัมพันธ์ของสารประกอบ **1**

สารประกอบ **7** มีลักษณะเป็น amorphous สีเหลือง มีค่าการหมุนระนาบแสงจำเพาะ $[\alpha]_{\text{D}}^{29} -71.5^\circ$ ($c = 0.38$, CHCl_3) จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัมพบแถบการยืดของหมู่คาร์บอนิลที่ 1737 cm^{-1} จากข้อมูลแมสสเปกตรัมให้พิกัด molecular ion ที่ m/z 398.1578 $[\text{M} + \text{H}]^+$ ใน HR ESI MS สเปกตรัม ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{NO}_6$ จากข้อมูล $^1\text{H-}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ (ตาราง 3) ของ สารประกอบ **7** มีความคล้ายคลึงกับ 7-*epi*-duguetine (**1**) เป็นอย่างมาก แต่จุดที่แตกต่างกันพบว่า เกิดการแทนที่ของหมู่ acetyl ที่ตำแหน่ง 7 ของสาร **1** จึงสรุปได้ว่าสารประกอบ **7** คือ 7-(*O*)-acetylduguetine

ตาราง 2 ข้อมูล ^1H -, ^{13}C -NMR และ HMBC ของสาร 1 ใน CDCl_3

Position	7- <i>epi</i> -Duguetine (1)		
	^1H -NMR	^{13}C -NMR	HMBC
1	-	142.7	-
1a	-	115.8	-
1b	-	120.7	-
2	-	147.3	-
3	6.51 (s)	107.0	C-1, C-1b, C-2, C-4
3a	-	128.1	-
4	3.14 [*] , 2.66 [*]	26.3	C-1b, C-3a, C-5
5	3.21 [*] , 2.78 (dd, 10.4, 3.2)	53.2	C-3a, C-4, C-6a, N-CH ₃
6a	3.39 (br s)	66.4	C-1b, N-CH ₃
7	4.87 (d, 2.1)	65.2	C-1b, C-6a, C-7a, C-8, C-11a
7a	-	127.7	-
8	6.95 (s)	112.6	C-7, C-7a, 9-OCH ₃
9	-	149.5	-
10	-	148.9	-
11	7.70 (s)	110.8	C-1a, C-7a, C-11a, 10-OCH ₃
11a	-	123.0	-
N-CH ₃	2.69 (s)	43.2	C-5, C-6a
O-CH ₂ -O	6.09 (s), 5.93 (s)	100.8	C-1, C-2
9-OCH ₃	3.91 (s)	56.0	C-9
10-OCH ₃	3.91 (s)	55.9	C-10

*สัญญาณซ้อนทับกัน

ตาราง 3 ข้อมูล ^1H -, ^{13}C -NMR และ HMBC ของสาร 1 ใน CDCl_3

Position	7-(O)-Acetylduguetine (7)		
	^1H -NMR	^{13}C -NMR	HMBC
1	-	143.1	-
1a	-	115.2	-
1b	-	115.6	-
2	-	148.8	-
3	7.07 (s)	106.5	C-1, C-1b, C-2, C-4
3a	-	125.7	-
4	3.14*, 2.66*	26.1	C-1b, C-3a, C-5
5	3.21*, 2.80*	54.2	C-3a, C-4, C-6a, N-CH ₃
6a	6.31 (br s)	64.8	C-1b, N-CH ₃
7	7.24 (br s)	77.3	-
7a	-	123.4	-
8	7.07 (s)	113.1	C-7, C-9
9	-	150.4	-
10	-	148.8	-
11	7.70 (s)	110.3	C-1a, C-7a, C-11a, 10-OCH ₃
11a	-	122.5	-
N-CH ₃	3.11 (s)	42.0	C-5, C-6a
O-CH ₂ -O	6.17 (s), 6.02 (s)	100.5	C-1, C-2
9-OCH ₃	3.91 (s)	56.1	C-9
10-OCH ₃	3.92 (s)	55.8	C-10
7-OCOCH ₃	2.19 (s)	21.9	C-7OCOCH ₃
7-O $\underline{\text{C}}$ CH ₃	-	171.7	

*สัญญาณซ้อนทับกัน

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้ที่ทำทดสอบคือ ฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรีย ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อมาลาเรีย, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187)

สารสกัดหยาบ	ฤทธิ์การยับยั้ง เชื้อมาลาเรีย (IC ₅₀ , $\mu\text{g/ml}$)	ความเป็นพิษต่อเซลล์ (IC ₅₀ , $\mu\text{g/ml}$)		
		มะเร็งในช่องปาก (KB)	มะเร็งเต้านม (MCF-7)	มะเร็งปอด (NCI-H187)
7- <i>epi</i> -Duguetine (1)	0.385	7.54	15.37	inactive
Dicentrinone (2)	1.23	inactive	inactive	inactive
3,7-Dimethyl ether 3'-O- α - L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β - D-glucopyranoside (3)	inactive	inactive	inactive	inactive
Galangin 5-methyl ether (4)	3.12	inactive	inactive	inactive
5,7-Dimethoxy-3- hydroxyflavone (5)	5.07	inactive	inactive	inactive
3,5,7-Trimethoxyflavone (6)	inactive	inactive	inactive	inactive
7-(O)-Acetylduguetine (7)	0.243	26.81	inactive	5.71
(-)-Epicatechin (8)	inactive	inactive	inactive	inactive
Mefloquine	0.011	-	-	-
Ellipticine	-	1.20	NT	3.81
Tamoxifen	-	NT	8.23	NT

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียพบว่า สาร 7 และ 1 แสดงฤทธิ์สูงสุด (IC₅₀ 0.243 และ 0.385 $\mu\text{g/ml}$) ตามลำดับ ในขณะที่สาร 2, 4 และ 5 แสดงฤทธิ์ปานกลางที่ค่า IC₅₀ 1.23, 5.07 and 3.12 $\mu\text{g/ml}$ สาร 3, 6 และ 8 ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย เมื่อเทียบกับยามาตรฐาน (mefloquine) IC₅₀ 0.011 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสาร 1 แสดงฤทธิ์ได้สูงสุดในการต้านเซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) (IC₅₀ 7.54 $\mu\text{g/ml}$) และในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) (IC₅₀ 15.37 $\mu\text{g/ml}$) ตามด้วยสาร 7 ในการต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) (IC₅₀ 5.71 $\mu\text{g/ml}$)

เอกสารอ้างอิง

1. E.M.K. Wueratne, Y. Hatanaka, T. Kikuchi, Y. Tezuka and A.A.L. Gunatilaka (1996). A dioxoaporphine and other alkaloids of two Annonaceous plants of Sri Lanka, *Phytochemistry* **42**, 1703-1706.
2. A. Sinz, R. Matusch. T. Santisuk, S. Chaichana and V. Reutrakul (1998). Flavonol glycosides from *Dasymashalon sootepense*, *Phytochemistry* **47**, 1393-1396.
3. M. Nagy, V. Suchý, D. Uhrín, K. Ubik, M. BudéŠínský and D. GranĆai (1988). Constituents of propolis of Czechoslovak origin. V, *Chem. Papers* **42**, 691-696.
4. B.J. Compton, L. Larsen and R.T. Weavers (2001). Use of acyl substituents to favour 2,3-epoxidation of 5,7-dioxygenated flavones with dimethyldioxirane, *Tetrahedron* **67**, 718-726.
5. C.A. Buschi, A.B. Pomilio and E.G. Gros (1980). New methylated flavonoes from *Gomphrena martiana*, *Phytochemistry* **19**, 903-904.
6. S.J. Joo, H.J. Park, J.H. Park, J.G. Cho, J.H. Kang, T.S. Jeong, H. C. Kang, D.Y. Lee, H.S. Kim, S.Y. Byun and N.I. Baek (2014). Flavonoids from *Machilus japonica* stems and their inhibitory effects on LDL oxidation, *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 16418-16429.
7. D.B. Silva, E.C.O. Tulli, W.S. Garcez, E.A. Nascimento and J.M. Siqueira (2007). Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae), *J. Braz. Chem. Soc.* **18**, 1560-1565.

6. กิจกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

-

7. ปัญหาและอุปสรรค (ถ้ามี)

-

8. ความเห็นและข้อเสนอแนะ

-

9. ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ชื่อผู้แต่ง: Ratchanaporn Chokchaisiri, Waraluck Chaichompoo, Rattana
Chalermglin, and Apichart Suksamrarn

ชื่อเรื่อง: Potent Antiplasmodial Alkaloids and Flavonoids from *Dasymaschalon
acuminatum*

ชื่อวารสาร: Records of Natural Products

ปี: 2015, เล่มที่ 9:2, หน้า 243-246

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

โดยสาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา และนักวิจัยจากสถาบันอื่นๆ
จากผลการดำเนินงานโครงการองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของ
พรรณไม้ชนิดใหม่: บุหลงดอกแหลม ซึ่งโครงการนี้สามารถศึกษาการสกัด การ
แยกสารให้บริสุทธิ์และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อให้ได้องค์ความรู้ทางผลิตภัณฑ์
ธรรมชาติของพืชสกุล *Dasymaschalon* และให้นิสิตเคมีในรายวิชา สารผลิตภัณฑ์
ธรรมชาติและการศึกษาอิสระ มีทักษะด้านงานวิจัยด้านสมุนไพรเพื่อพัฒนาไปสู่
ความเป็นนักวิจัย

Supporting Information

Rec. Nat. Prod. 9:2 (2015) 243-246

Potent Antiplasmodial Alkaloids and Flavonoids from *Dasymaschalon acuminatum*

Ratchanaporn Chokchaisiri^{1*}, Waraluck Chaichompoo², Rattana
Chalermglin³, and Apichart Suksamrarn²

¹Department of Chemistry, School of Science, University of Phayao, Maeka, Muang,
Phayao 56000, Thailand

²Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of
Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand

³Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, and Alternative Medical
College, Chandrakasem Rajabhat University, Bangkok 10900, Thailand

Table of Contents	Page
Extraction and Isolation of Compounds 1-6 from the leaves of <i>D. acuminatum</i>	2
S1. ¹ H-NMR spectrum of 7- <i>epi</i> -duguetine (1) in CDCl ₃	3
S2. ¹³ C-NMR and DEPT 135 spectra of 7- <i>epi</i> -duguetine (1) in CDCl ₃	4
S3. COSY spectrum of 7- <i>epi</i> -duguetine (1) in CDCl ₃	4
S4. HMQC spectrum of 7- <i>epi</i> -duguetine (1) in CDCl ₃	5
S5. HMBC spectrum of 7- <i>epi</i> -duguetine (1) in CDCl ₃	5
S6. ¹ H-NMR spectrum of dicentrinone (2) in CDCl ₃	6
S7. ¹³ C-NMR and DEPT 135 spectra of dicentrinone (2) in CDCl ₃	6
S8. ¹ H-NMR spectrum of quercetin 3,7-dimethyl ether 3'- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (3) in DMSO- <i>d</i> ₆	7
S9. ¹³ C-NMR and DEPT 135 spectra of quercetin 3,7-dimethyl ether 3'- <i>O</i> - α -L- rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (3) in DMSO- <i>d</i> ₆	8
S10. ¹ H-NMR spectrum of galangin 5-methyl ether (4) in CDCl ₃	9

*Corresponding author: E- Mail: ratchanaporn.ch@up.ac.th; pam_2022@hotmail.com (R. Chokchaisiri)

Table of Contents	Page
S11. ¹³ C-NMR and DEPT 135 spectra of galangin 5-methyl ether (4) in CDCl ₃	9
S12. ¹ H-NMR spectrum of 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (5) in CDCl ₃	10
S13. ¹³ C-NMR and DEPT 135 spectra of 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (5) in CDCl ₃	10
S14. ¹ H-NMR spectrum of 3,5,7-trimethoxyflavone (6) in CDCl ₃	11
S15. ¹³ C-NMR and DEPT 135 spectra of 3,5,7-trimethoxyflavone (6) in CDCl ₃	11

Extraction and Isolation of the air-dried leaves of *D. acuminatum*

The air-dried leaves of *D. acuminatum* (1.0 kg) were pulverized and extracted successively with *n*-hexane, EtOAc and MeOH at room temperature. The filtered solution of each extraction was evaporated to dryness under reduced pressure at temperature 40-45 °C to give the hexane extract (129.7 g), the EtOAc extract (15.74 g) and the MeOH extract (30.6 g).

EtOAc extract

The EtOAc extract (15.0 g) was fractionated by column chromatography (Merck silica gel 60, 0.063-0.200 mm, 520 g), using a gradient solvent system of *n*-hexane, *n*-hexane-EtOAc and EtOAc with increasing amounts of the more polar solvent. The eluates were examined by TLC and 7 groups of eluting fractions were obtained.

Group 2 (247.6 mg) was separated on Sephadex LH-20 eluting with CH₂Cl₂-MeOH to afford 3,5,7-trimethoxyflavone (**6**) as pale yellow amorphous solid (131.1 mg).

Group 3 (806.0 mg) was separated by Sephadex LH-20 eluting with CH₂Cl₂-MeOH to give four fractions (fr.3.1-3.4). Fraction 3.2 (338.9 mg) was subjected to repeated column chromatography eluting under isocratic condition of CH₂Cl₂-MeOH (98:2) to yield 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (**5**) as white amorphous solid (273.5 mg). Fraction 3.3 (411.3 mg) was separated by column chromatography using by isocratic solvent system of *n*-hexane-EtOAc (80:20) to yield galangin 5-methyl ether (**4**) as pale yellow amorphous solid (68.0 mg).

Group 7 (1.84 g) was chromatographed and eluted under isocratic condition of *n*-hexane-EtOAc (80:20), followed by Sephadex LH-20 eluting with CH₂Cl₂-MeOH (20:80) to give three fractions (fr.7.1-7.3). Fraction 7.2 was chromatographed over silica gel and eluted under isocratic condition of CH₂Cl₂-MeOH (98:2) to afford 3 subfractions (fr.7.2.1- fr.7.2.3). Subfraction 7.2.2 (723.0 mg) was separated on Sephadex LH-20 eluting with CH₂Cl₂-MeOH (20:80) to yield dicentrinone (**2**) as pale yellow amorphous solid (7.1 mg).

MeOH extract

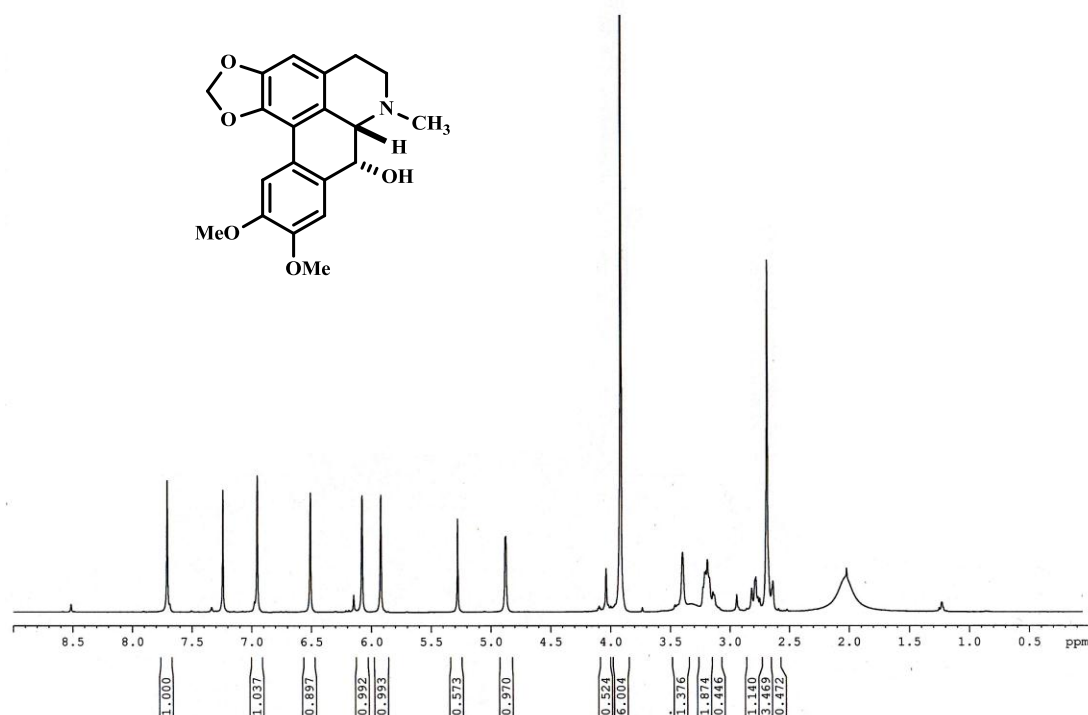
The MeOH extract (30.0 g) was fractionated by column chromatography (Merck silica gel 60, 0.063-0.200 mm, 520 g), using a gradient solvent system of *n*-hexane, *n*-hexane-EtOAc and EtOAc with increasing amounts of the more polar solvent. The eluates were examined by TLC and 6 groups of eluting fractions were obtained.

Group 3 (3.45 g) was separated on Sephadex LH-20 eluting with CH₂Cl₂-MeOH (20:80) to give three fractions (fr.3.1-3.3). Fraction 3.2 (2.54 mg) was subjected to repeated column chromatography eluting under isocratic condition of CH₂Cl₂-MeOH (97:3) to yield

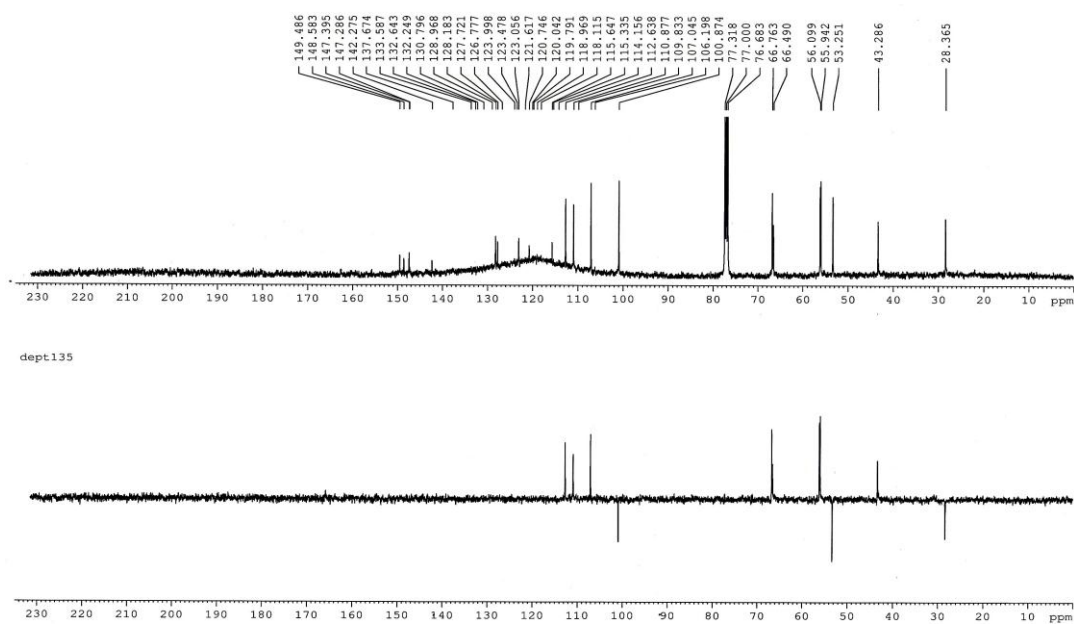
galangin 5-methyl ether (**4**) (321.4 mg) and 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (**5**) (1.35 g) similar to EtOAc extract.

Group 5 (10.3 g) was separated on Sephadex LH-20 eluting with CH₂Cl₂-MeOH (20:80) to give three subfractions (fr.5.1-5.3). Fraction 5.2 (2.73 g) was subjected to repeated column chromatography eluting under isocratic condition of CH₂Cl₂-MeOH (98:2) to give four subfractions (fr.5.2.1-5.2.4). Subfraction 5.2.2 (51.5 mg) was further purified by column chromatography over silica gel RP-18 with MeOH-H₂O (80:20) as eluting solvent to obtain 7-*epi*-duguetine (**1**) (46.8 mg). Subfraction 5.2.4 (1.00 g) was further purified by column chromatography over silica gel RP-18 with MeOH-H₂O (80:20) as eluting solvent to give quercetin 3,7-dimethyl ether 3'-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (**3**) as pale yellow amorphous solid (7.3 mg).

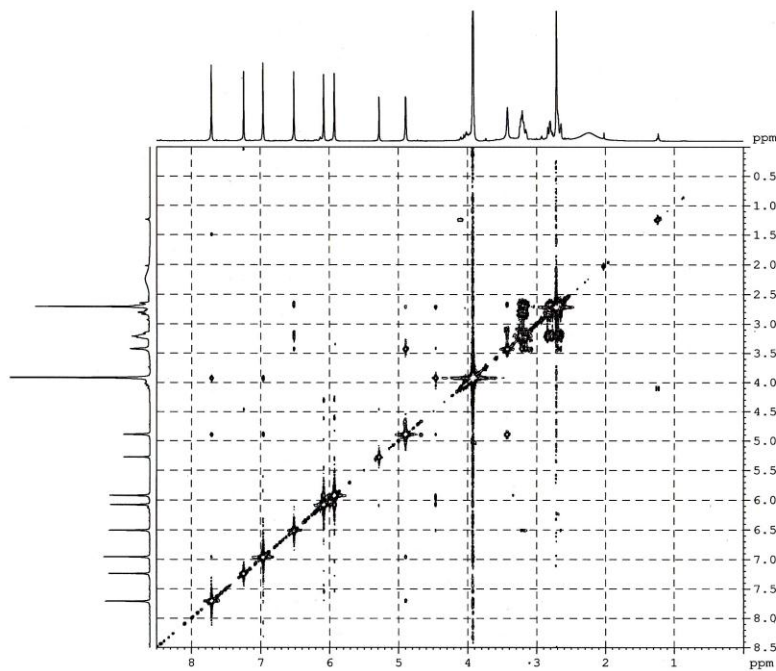
Compound 1: 7-*epi*-duguetine; Pale yellow amorphous solid; $[\alpha]_D^{32} -46.6^\circ$ (c 0.59, CHCl₃), IR $\nu_{\max}$ 3439, 1607, 1585, 1519, 1457, 1408, 1391, 1345, 1268, 1246, 1217, 1167, 1127, 1096, 1047, 1032, 969, 935 cm⁻¹; HRESIMS m/z : 356.1447 [M+H]⁺ (Calc. for C₂₀H₂₁NO₅, 356.1492).



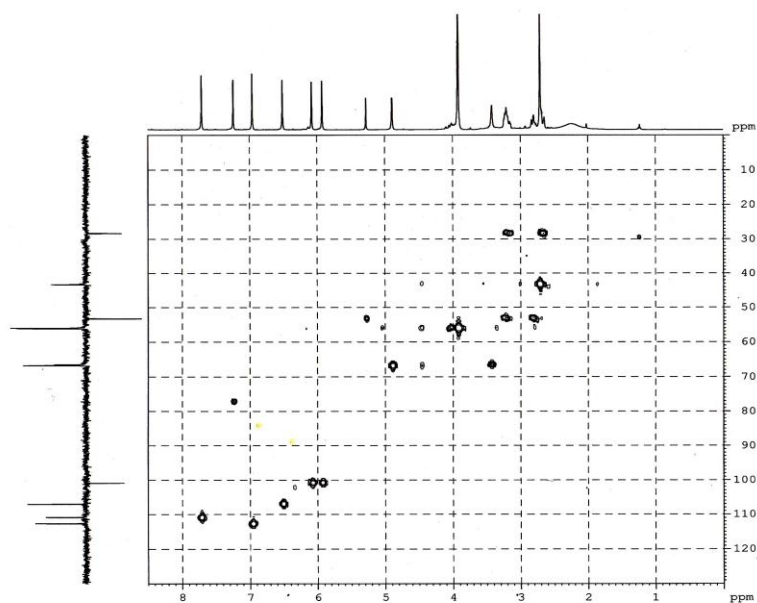
S1. ¹H-NMR spectrum of 7-*epi*-duguetine (**1**) in CDCl₃



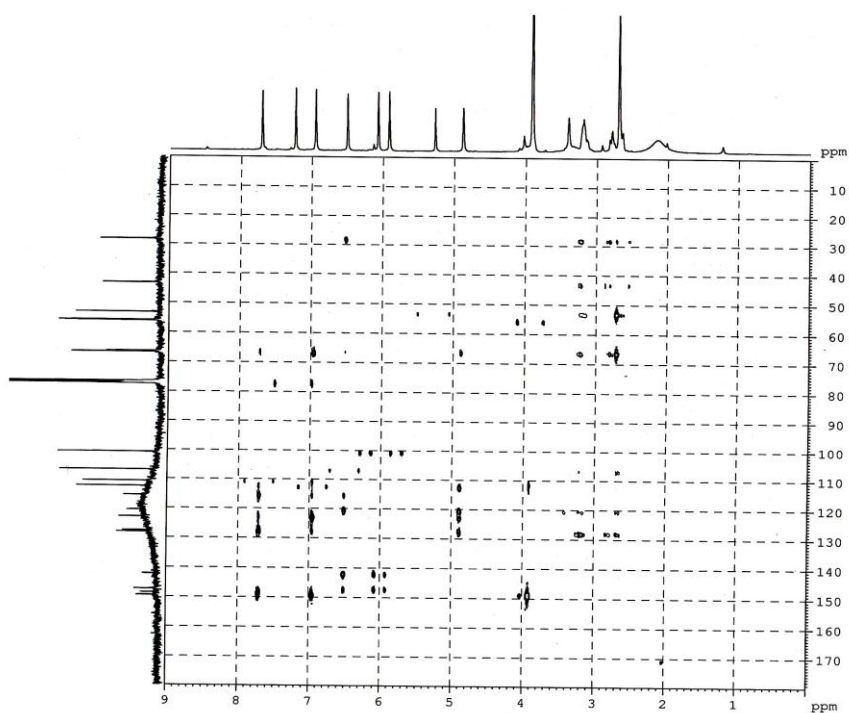
S2. ^{13}C -NMR and DEPT 135 spectra of 7-*epi*-duguetine (**1**) in CDCl_3



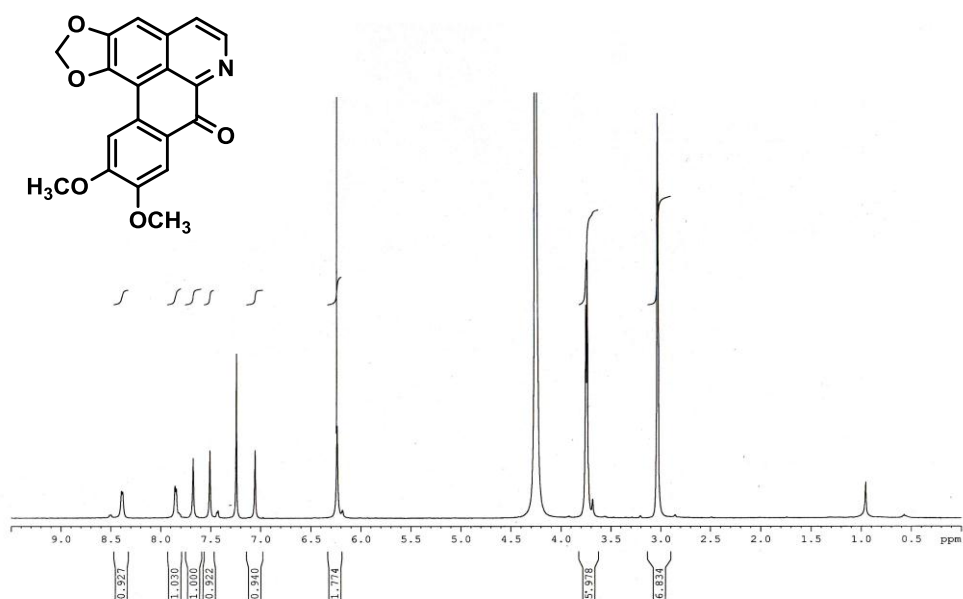
S3. COSY spectrum of 7-*epi*-duguetine (**1**) in CDCl_3



S4. HMQC spectrum of 7-*epi*-duguetine (**1**) in CDCl₃

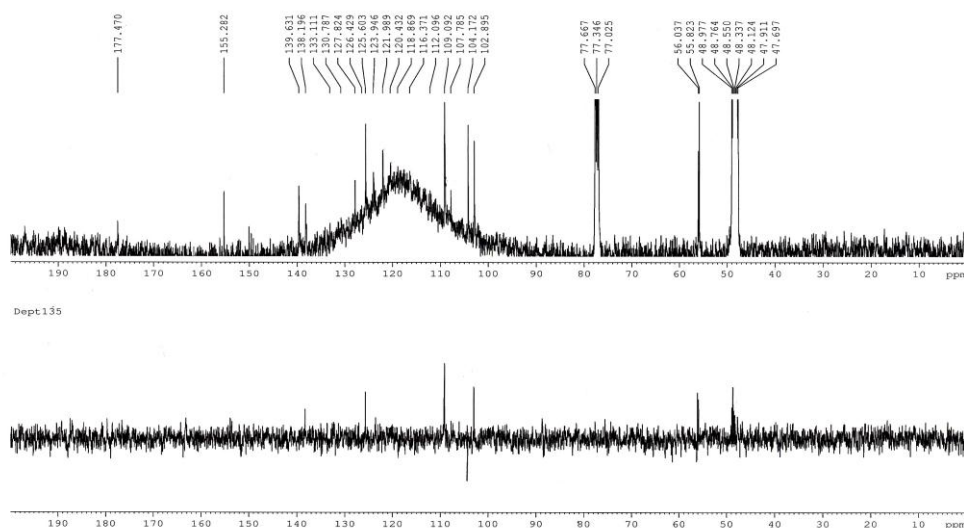


S5. HMBC spectrum of 7-*epi*-duguetine (**1**) in CDCl₃



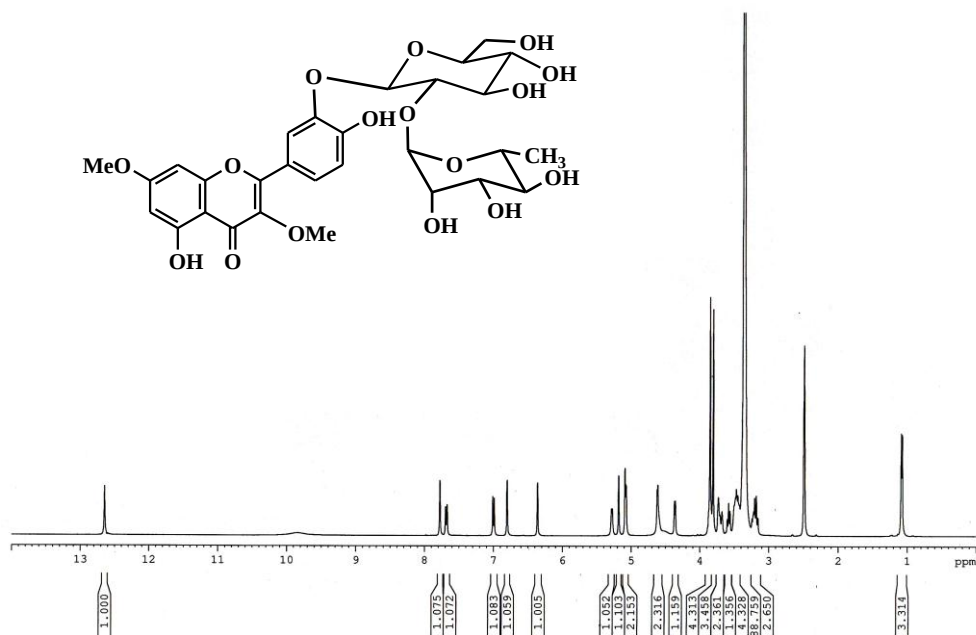
S6. ^1H -NMR spectrum of dicentrinone (**2**) in CDCl_3 +8 drops CD_3OD

Dicentrinone (2): ^1H -NMR (CDCl_3 +8 drops CD_3OD , 400 MHz), δ : 8.38 (1H, *d*, J = 4.8 Hz, H-5), 7.84 (1H, *d*, J = 4.8 Hz, H-4), 7.67 (1H, *s*, H-11), 7.50 (1H, *s*, H-8), 7.05 (1H, *s*, H-3), 6.23 (2H, *s*, O-CH₂-O), 3.75 (3H, *s*, 10-OCH₃), 3.73 (3H, *s*, 9-OCH₃).



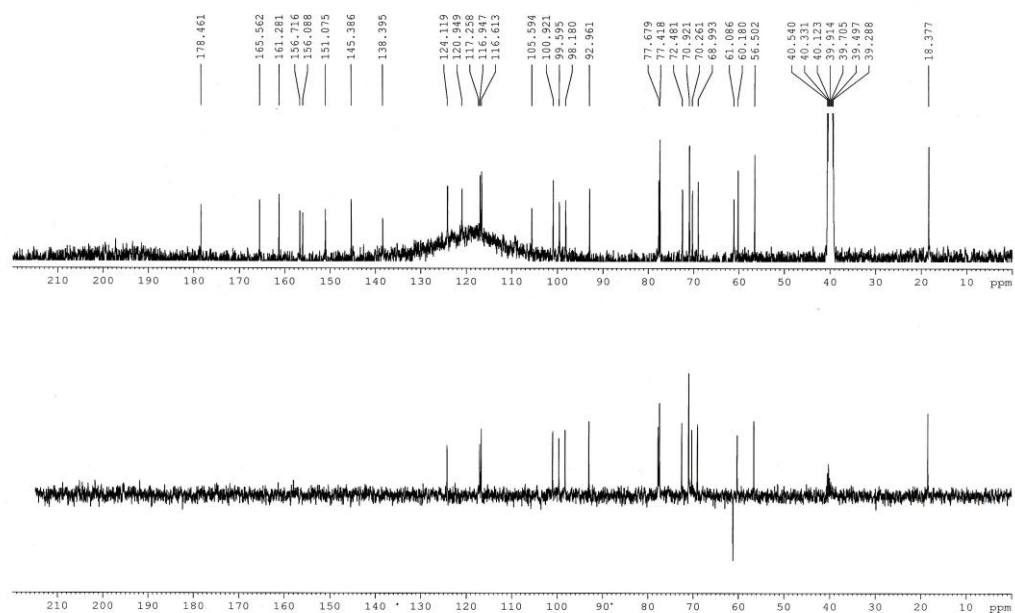
S7. ^{13}C -NMR and DEPT 135 spectra of dicentrinone (**2**) in CDCl_3 +8 drops CD_3OD

Dicentrinone (2): ^{13}C -NMR (CDCl_3 +8 drops CD_3OD , 100 MHz) δ 177.4 (C-7), 155.2 (C-10), 155.1 (C-1), 150.0 (C-6a), 149.5 (C-2), 149.1 (C-9), 139.6 (C-3a), 138.1 (C-5), 127.8 (C-11a), 125.6 (C-4), 123.9 (C-1a), 121.9 (C-1b), 109.0 (C-8), 109.0 (C-11), 107.7 (C-7a), 104.1 (O-CH₂-O), 102.8 (C-3), 56.0 (C-9OCH₃), 55.8 (C-10OCH₃).



S8. ^1H -NMR spectrum of quercetin 3,7-dimethyl ether 3'-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (**3**) in $\text{DMSO}-d_6$

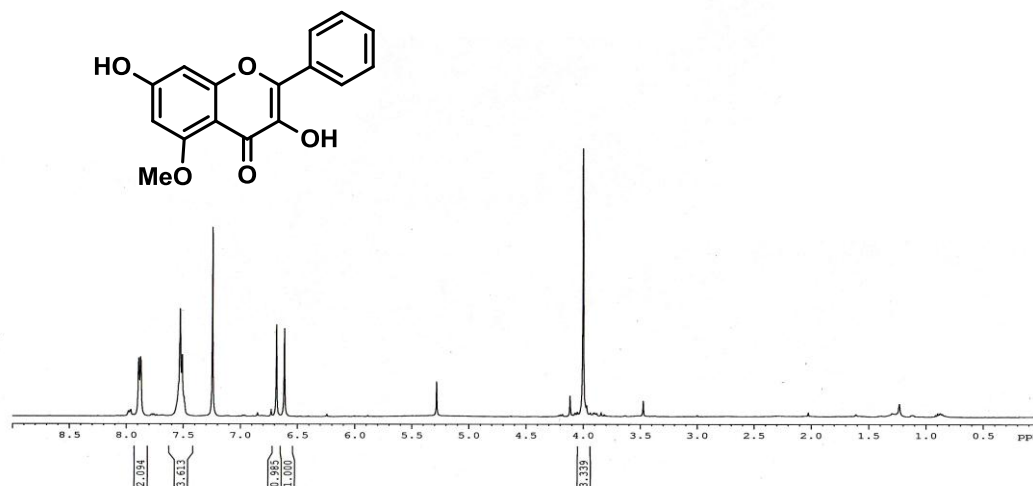
Quercetin 3,7-dimethyl ether 3'-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (3**):** ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz), δ : 12.6 (1H, br s, 5-OH), 7.77 (1H, s, H-2'), 7.68 (1H, d, J = 8.5, Hz, H-6'), 6.99 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.80 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-8), 6.36 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-6), 3.85 (3H, s, 7-OCH₃), 3.81 (3H, s, 3-OCH₃), glucose unit; 5.08 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-1''), 3.68 (1H, br s, H-6''b), 3.58 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-5''), 3.50 (1H, m, H-6''a), 3.47 (1H, m, H-2''), 3.47 (1H, m, H-3''), 3.22 (1H, m, H-4''), rhamnose unit; 5.18 (1H, s, H-1'''), 3.85 (1H, s, H-5'''), 3.73 (1H, m, H-2'''), 3.48 (1H, m, H-3'''), 3.18 (1H, m, H-4'''), 1.08 (1H, d, J = 5.9 Hz, H-6''').



S9. ^{13}C -NMR and DEPT 135 spectra of quercetin 3,7-dimethyl ether 3'-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (**3**) in $\text{DMSO}-d_6$

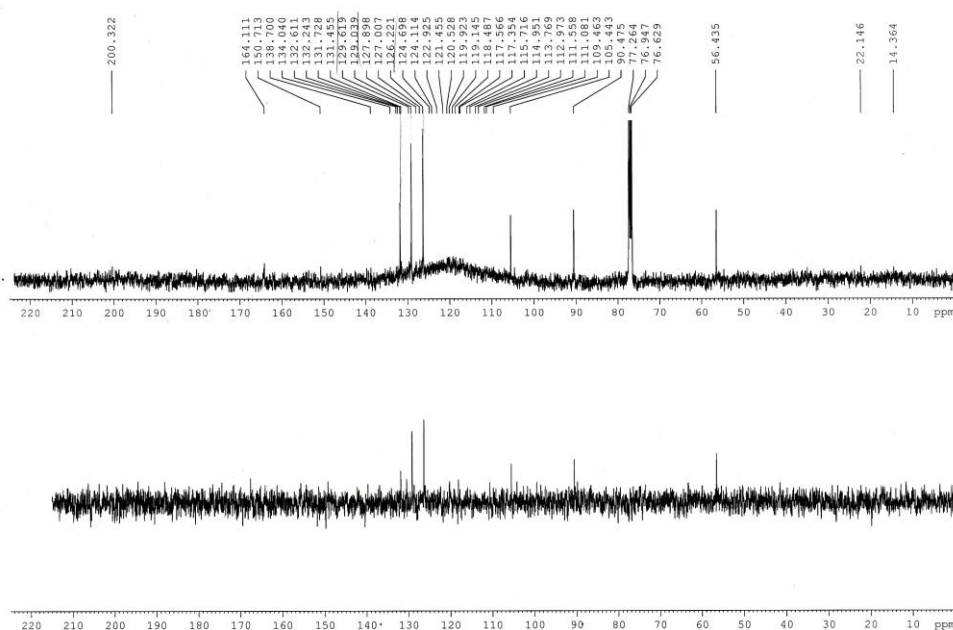
Quercetin 3,7-dimethyl ether 3'-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (3**):**

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 178.4 (C-4), 165.5 (C-7), 161.2 (C-5), 156.7 (C-9), 156.0 (C-2), 151.0 (C-4'), 145.3 (C-3'), 138.4 (C-3), 123.1 (C-6'), 120.9 (C-1'), 116.9 (C-2'), 116.6 (C-5'), 105.5 (C-10), 98.9 (C-8), 98.1 (C-6), 60.1 (C-3OCH₃), 56.5 (C-7OCH₃), glucose unit; 99.6 (C-1''), 77.6 (C-5''), 77.4 (C-2''), 77.4 (C-3''), 77.2 (C-4''), 61.0 (C-6''), rhamnose unit; 100.92 (C-1'''), 72.4 (C-4'''), 70.9 (C-2'''), 70.9 (C-3'''), 68.9 (C-5'''), 18.3 (C-6''').



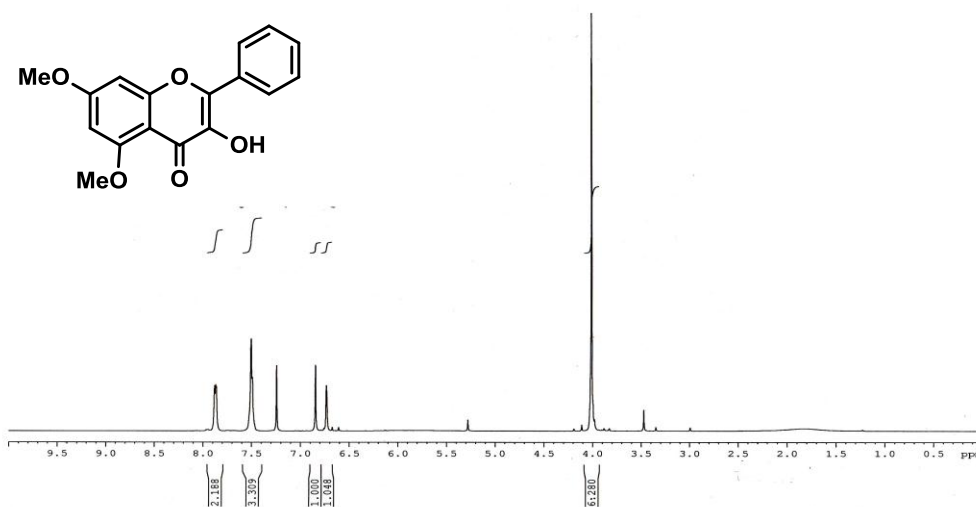
S10. ¹H-NMR spectrum of galangin 5-methyl ether (**4**) in CDCl₃

Galangin 5-methyl ether (4): ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz), δ: 7.88 (2H, *d*, *J* = 6.3 Hz, H-2', 6'), 7.51 (3H, *m*, H-3', 4', 5'), 6.72 (1H, *s*, H-8), 6.61 (1H, *s*, H-6), 3.96 (3H, *s*, 5-OCH₃).



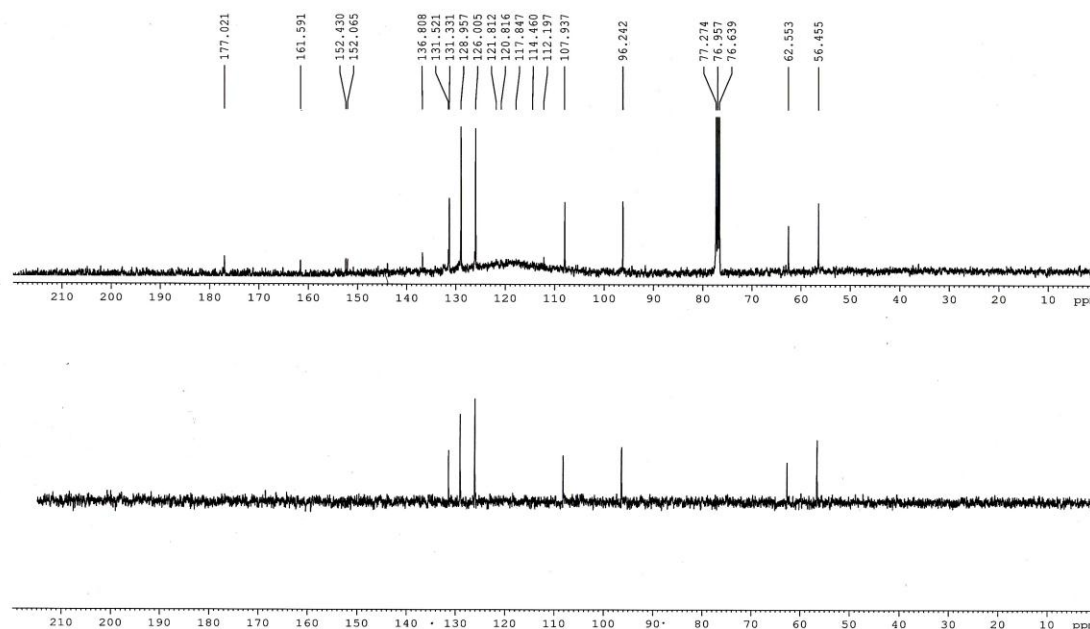
S11. ¹³C-NMR and DEPT 135 spectra of galangin 5-methyl ether (**4**) in CDCl₃

Galangin 5-methyl ether (4): ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz), δ: 183.0 (C-4), 168.0 (C-9), 164.1 (C-2), 153.1 (C-5), 150.7 (C-7), 136.8 (C-1'), 129.6 (C-4'), 129.0 (C-3', 5'), 126.2 (C-2', 6'), 106.5 (C-10), 105.4 (C-8), 90.4 (C-6), 56.4 (OCH₃, C-5).



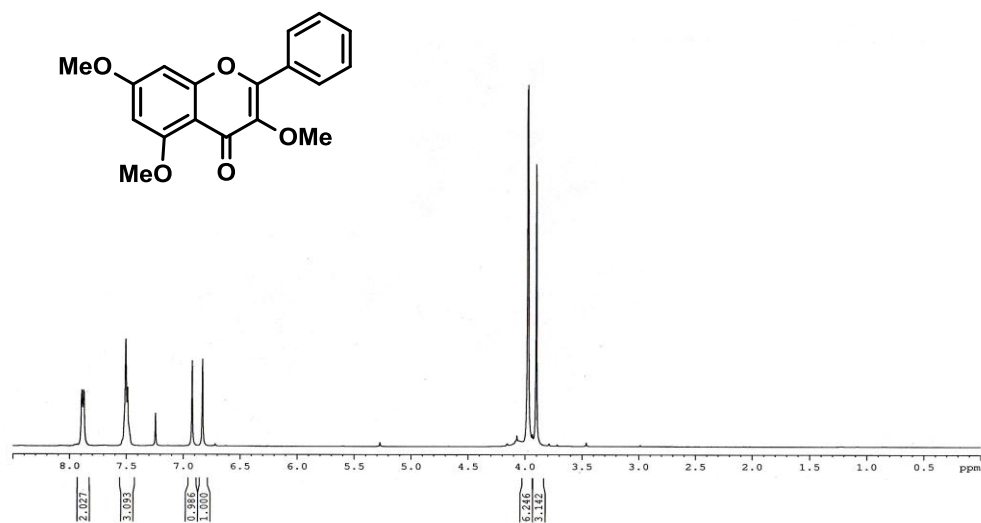
S12. ¹H-NMR spectrum of 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (5) in CDCl₃

5,7-Dimethoxy-3-hydroxyflavone (5): ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz), δ: 7.86 (2H, *dd*, *J* = 7.5, 2.8 Hz, H-2', 6'), 7.49 (3H, *m*, H-3', 4', 5'), 6.84 (1H, *s*, H-6), 6.73 (1H, *s*, H-8), 4.01 (3H, *s*, 7-OCH₃), 4.01 (3H, *s*, 5-OCH₃).



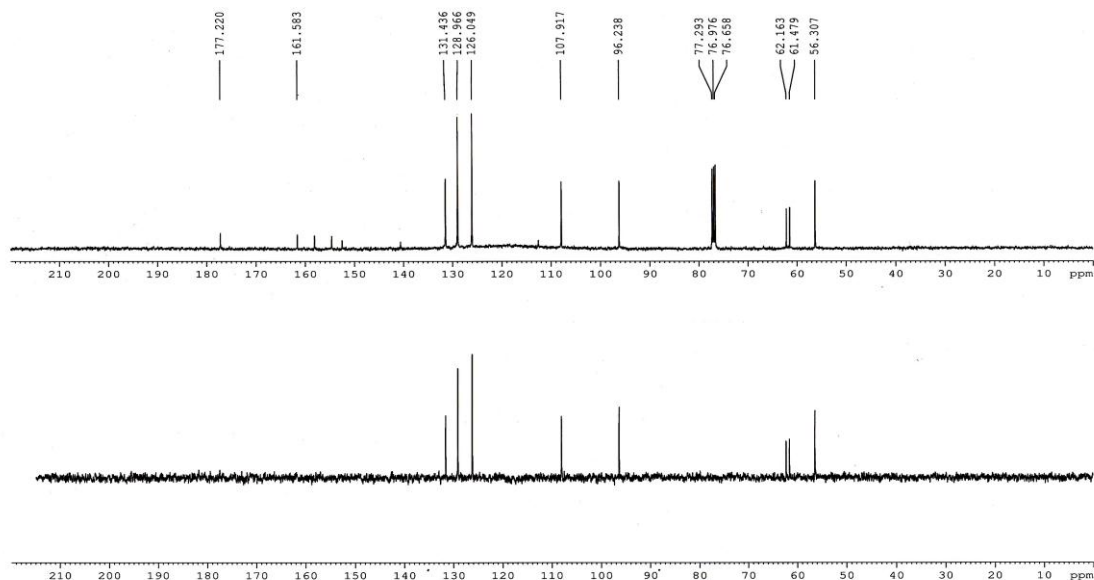
S13. ¹³C-NMR and DEPT 135 spectra of 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (5) in CDCl₃

5,7-Dimethoxy-3-hydroxyflavone (5): ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz), δ: 177.0 (C-4), 165.3 (C-9), 161.5 (C-2), 152.4 (C-5), 152.0 (C-7), 136.8 (C-1'), 131.3 (C-4'), 128.9 (C-3', 5'), 126.0 (C-2', 6'), 112.1 (C-10), 107.9 (C-8), 96.2 (C-6), 62.5 (OCH₃, C-5), 56.4 (OCH₃, C-7).



S14. ¹H-NMR spectrum of 3,5,7-trimethoxyflavone (**6**) in CDCl₃

3,5,7-Trimethoxyflavone (6): ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz), δ: 7.87 (2H, dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, H-2', 6'), 7.49 (3H, *m*, H-3',4',5'), 6.91 (1H, s, H-6), 6.82 (1H, s, H-8), 3.97 (3H, s, 7-OCH₃), 3.97 (3H, s, 5-OCH₃), 3.90 (3H, s, 3-OCH₃).



S15. ¹³C-NMR and DEPT 135 spectra of 3,5,7-trimethoxyflavone (**6**) in CDCl₃

3,5,7-Trimethoxyflavone (6): ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 177.2 (C-4), 161.5 (C-9), 158.2 (C-1'), 154.8 (C-7), 152.5 (C-2), 144.6 (C-5), 131.4 (C-4'), 128.9 (C-3',5'), 126.0 (C-2',6'), 112.9 (C-10), 109.9 (C-8), 96.2 (C-6), 62.1 (OCH₃, C-7), 61.4 (OCH₃, C-3), 56.3 (OCH₃, C-5).

Potent Antiplasmodial Alkaloids and Flavonoids from *Dasymaschalon acuminatum*

Ratchanaporn Chokchaisiri^{1*}, Waraluck Chaichompoo²,
Rattana Chalermglin³ and Apichart Suksamrarn²

¹Department of Chemistry, School of Science, University of Phayao, Maeka, Muang,
Phayao 56000, Thailand

²Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science,
Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand

³Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, and Alternative Medical College,
Chandrakasem Rajabhat University, Bangkok 10900, Thailand

(Received February 2, 2014; Revised June 1, 2014; Accepted August 26, 2014)

Abstract: A new aporphine alkaloid, 7-*epi*-duguetine (**1**) together with one known alkaloid, dicentrinone (**2**), and four known flavonoids, quercetin 3,7-dimethyl ether 3'-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (**3**), galangin 5-methyl ether (**4**), 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (**5**), and 3,5,7-trimethoxyflavone (**6**), were isolated from the leaves of *Dasymaschalon acuminatum*, a new plant species which has not been investigated phytochemically before. The structures of the isolated compounds were elucidated through extensive NMR spectroscopic analysis. All isolates were evaluated for antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* strain K1 and 7-*epi*-duguetine was found to exhibit potent activity with an IC₅₀ of 0.385 μ g/ml.

Keywords: *Dasymaschalon acuminatum*; Annonaceae; alkaloid; flavonoid; antiplasmodial activity.
© 2015 ACG Publications. All rights reserved.

1. Plant Source

Dasymaschalon acuminatum Jing Wang & R.M.K. Saunders (Annonaceae) is known in Thai as “Bu-rong Dok Laem” [1]. The leaves of this plant species were collected from Khao Yai National Park, Nakorn Ratchasima province, Thailand in August 2010 and the plant species was identified by Dr. Piya Chalermglin, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand. The voucher specimen (C. Phengklai 3272) is deposited at The Forest Herbarium, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Chatuchak, Bangkok, Thailand.

2. Previous Studies

Dasymaschalon is a genus which includes over 30 species distributed in South-East Asia, particularly in Thailand and Malaysia. In Thailand, 12 species have been reported; *D. acuminatum*, *D. angustifolium*, *D. dasymaschalum*, *D. echinatum*, *D. filipes*, *D. glaucum*, *D. grandiflorum*, *D. lomentaceum*, *D. macrocalyx*, *D. obtusipetalum*, *D. sootepense*, and *D. wallichii* [1]. The phytochemical investigations of various *Dasymaschalon* species revealed the presence of alkaloids [2], acetogenins [3], xanthonoids [4], and flavonoid glycosides [5]. Some of the compounds have shown promising

* Corresponding author: E- Mail: ratchanaporn.ch@up.ac.th; pam_2022@hotmail.com (R. Chokchaisiri)

cytotoxic activity [3,4]. Since *D. acuminatum* is recognized as a new species of *Dasymaschalon* [1], no phytochemical investigation of this plant species has been reported.

3. Present Study

The air-dried leaves of *D. acuminatum* (1.0 kg) were pulverized and extracted successively with *n*-hexane, EtOAc and MeOH at room temperature. The filtered solution of each extract was evaporated to dryness under reduced pressure at temperature 40–45 °C to give the hexane extract (129.7 g), the EtOAc extract (15.74 g) and the MeOH extract (30.6 g). The isolation details are shown in the supplementary material. Each of the extracts was purified by chromatographic techniques to yield a new aporphine alkaloid, 7-*epi*-duguetine (**1**), together with one known alkaloid, dicentrinone (**2**) [6], and four known flavonoids, quercetin 3,7-dimethyl ether 3'-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (**3**) [5], galangin 5-methyl ether (3,7-dihydroxy-5-methoxyflavone) (**4**) [7], 5,7-dimethoxy-3-hydroxyflavone (**5**) [8], and 3,5,7-trimethoxyflavone (**6**) [9] (Figure 1). The structure of the new compound was elucidated on the basis of spectroscopic analysis, and those of known compounds were identified by comparison of the spectroscopic data with those reported in the literature.

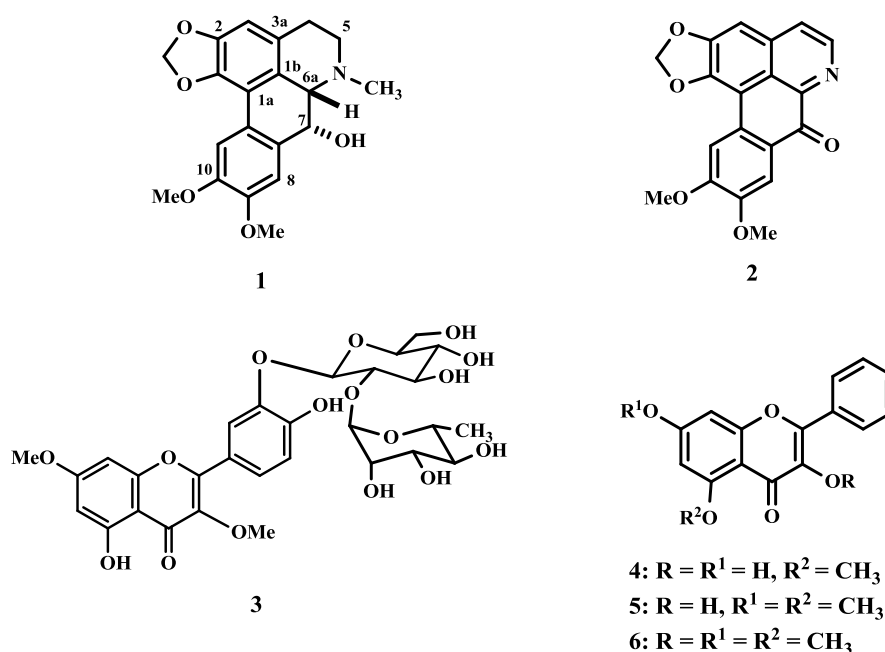


Figure 1. Structure of alkaloids (1-2) and flavonoids (3-6) isolated from *D. acuminatum*.

Compound **1** was obtained as a yellow amorphous solid. The HRESIMS showed a pseudo-molecular ion $[M + H]^+$ at m/z 356.1447 in accordance with the molecular formula $C_{20}H_{21}NO_5$. The 1H -NMR spectra showed a singlet corresponding to the protons of two OCH_3 groups at δ_H 3.91, which could be placed at C-9 and C-10 as evident from the HMBC correlations between 9- OCH_3 protons and C-9 (δ_C 149.5) and between 10- OCH_3 and C-10 (δ_C 148.9). Two singlets of the methylenedioxy protons were observed at δ_H 5.93 and 6.09. Three singlets at δ_H 6.51, 6.95 and 7.70 attributable to H-3, H-8 and H-11 respectively, confirmed the substitution patterns of the aromatic rings as shown. The hydroxyl proton and the N-linked methyl group appeared as singlet signals at δ_H 5.01 and 2.69. Compound **1** should therefore be an aporphine alkaloid having a 1,2-methylenedioxy and two methoxy groups. A carbinolic signal at δ_H 4.87 (d, $J = 2.1$ Hz) could be placed at C-7 from the 1H - 1H COSY correlations between H-7 and H-6a (Figure 2), and the HMBC correlations between H-7 and C-1b, C-6a, C-7a C-8 and C-11a (Table 1). The absolute configuration of the chiral center C-6a of **1** was established as *R* as determined from the circular dichroism (CD) curve, which showed a negative Cotton effect at 242 nm [10]. The small $J_{6a,7}$ of 2.1 Hz of **1** indicated the *cis*-relationship of H-6a and

H-7, which was characteristically different from that of the *trans* ($J = 12$ Hz) C-7 isomeric form [11]. This was further confirmed by the NOE enhancement of H-6a (δ_{H} 3.39) and H-7 (δ_{H} 4.87). The absolute configuration at C-7 was therefore established as *R*. These data, together with a comparison with those of (–)-duguetine, established the structure of compound **1** as the C-7 epimer of (–)-duguetine. Thus, compound **1** was named 7-*epi*-duguetine.

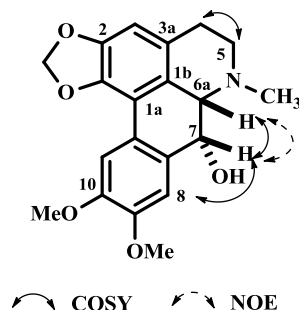


Figure 2. The COSY and NOE correlations of compound **1**.

Table 1. ^1H - and ^{13}C -NMR data of compound **1** (at 400 and 100 MHz, respectively, in CDCl_3)

Position	δ_{H} ppm, J (Hz)	δ_{C} ppm	HMBC
1	-	142.7	-
1a	-	115.8	-
1b	-	120.7	-
2	-	147.3	-
3	6.51 (s)	107.0	C-1; C-1b; C-2; C-4
3a	-	128.1	-
4	3.14*, 2.66*	26.3	C-1b; C-3a; C-5
5	3.21*, 2.78 (dd, 10.4, 3.2)	53.2	C-3a; C-4; C-6a; N-CH ₃
6a	3.39 (br s)	66.4	C-1b; N-CH ₃
7	4.87 (d, 2.1)	65.2	C-1b; C-6a; C-7a; C-8; C-11a
7a	-	127.7	-
8	6.95 (s)	112.6	C-7; C-7a; 9-OCH ₃
9	-	149.5	-
10	-	148.9	-
11	7.70 (s)	110.8	C-1a; C-7a; C-11a; 10-OCH ₃
11a	-	123.0	-
N-CH ₃	2.69 (s)	43.2	C-5; C-6a
O-CH ₂ -O	6.09 (s), 5.93 (s)	100.8	C-1; C-2
9-OCH ₃	3.91 (s)	56.0	C-9
10-OCH ₃	3.91 (s)	55.9	C-10

* partially overlapping signal

The antiparasmodial activity of all isolated compounds was determined *in vitro* against the chloroquine-resistant K1 strain of *Plasmodium falciparum* by using the microculture radioisotope method [12,13]. Compound **1** was the most active compound with an IC_{50} value of 0.385 $\mu\text{g}/\text{ml}$, while compounds **2**, **4** and **5** showed moderate to weak activity with respective IC_{50} values of 1.23, 5.07 and 3.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, whereas compounds **3** and **6** were inactive ($\text{IC}_{50} > 10$ $\mu\text{g}/\text{ml}$). The IC_{50} value of the standard drug mefloquine was 0.011 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Acknowledgments

This work was supported by The Thailand Research Fund (TRF), Office of the Higher Education Commission, and University of Phayao (grant no. MRG5680006). Partial supports from TRF (grant no. DBG5680006) and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) are gratefully acknowledged.

Supporting Information

Supporting Information accompanies this paper on <http://www.acgpubs.org/RNP>

References

- [1] J. Wang, P. Chalermglin and R.M.K. Saunders (2009). The genus *Dasymaschalon* (Annonaceae) in Thailand, *Systematic Botany*. **34**, 252-265.
- [2] A. Sinz, R. Matusch, L. Witte, T. Santisuk, S. Chaichana, V. Reutrakul and W. Wangcharoentrakul (1998). Alkaloids from *Dasymaschalon sootepense*, *Biochem. Syst. Ecol.* **26**, 933-934.
- [3] A. Sinz, R. Matusch, T. Kampchen, W. Fiedler, J. Schlunidt, T. Santisuk, S. Wangcharoentrakul, S. Chaichana and V. Reutrakul (1998). Novel acetogenins from the leaves of *Dasymaschalon sootepense*, *Helv. Chim. Acta*. **81**, 1608-1615.
- [4] V. Reutrakul, T. Santisuk, G. Noessner, J. Schmidt, B. Nickel, T. Klenner and S. Hose (2001). Isolation, preparation and anticancer activity of novel xanthone compounds from *Dasymaschalon sootepense*, *Eur. Pat. Appl.* EP 1065210 A1 20010103.
- [5] A. Sinz, R. Matusch, T. Santisuk, S. Chaichana and V. Reutrakul (1998). Flavonol glycosides from *Dasymaschalon sootepense*, *Phytochemistry*. **47**, 1393-1396.
- [6] E.M.K. Wueratne, Y. Hatanaka, T. Kikuchi, Y. Tezuka and A.A.L. Gunatilaka (1996). A dioxoaporphine and other alkaloids of two Annonaceous plants of Sri Lanka, *Phytochemistry*. **42**, 1703-1706.
- [7] M. Nagy, V. Suchý, D. Uhrin, K. Ubik, M. Buděšínský and D. Grančai (1988). Constituents of propolis of Czechoslovak origin. V, *Chem. Papers*. **42**, 691-696.
- [8] B.J. Compton, L. Larsen and R.T. Weavers (2001). Use of acyl substituents to favour 2,3-epoxidation of 5,7-dioxygenated flavones with dimethyldioxirane, *Tetrahedron*. **67**, 718-726.
- [9] C.A. Buschi, A.B. Pomilio and E.G. Gros (1980). New methylated flavonoids from *Gomphrena martiana*, *Phytochemistry*. **19**, 903-904.
- [10] B. Ringdahl, R.P.K. Chan, J.C. Craig, M.P. Cava and M. Shamma (1981). Circular dichroism of aporphines, *J. Nat. Prod.* **44**, 80-85.
- [11] D.B. Silva, E.C.O. Tulli, W.S. Garcez, E.A. Nascimento and J.M. Siqueira (2007). Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae), *J. Braz. Chem. Soc.* **18**, 1560-1565.
- [12] W. Trager and J.B. Jensen (1976). Human malaria parasites in continuous culture, *Science*. **193**, 673-675.
- [13] R.E. Desjardins, C.J. Canfield, J.D. Haynes and J.D. Chulay (1979). Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique, *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 710-718.

A C G
publications

© 2015 ACG Publications