



สัญญาเลขที่ RSA40-8-024

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การตรวจสอบเบื้องต้นของสารธรรมชาติจากสมุนไพรในท้องถิ่นภาคใต้
ที่มีผลต่อ T-cell Proliferation

โดย

รศ.ดร. สนั่น ศุภธีรสกุล ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

๕๖๐

เลขที่	RS201.E9 ๘3๖ 2544
Book No.	๕19๗50

บทคัดย่อ

- รหัสโครงการ : RSA40-8-0024
 ชื่อโครงการ : การตรวจสอบเบื้องต้นของสารธรรมชาติจากสมุนไพรในท้องถิ่นภาคใต้
 ที่มีผลต่อ T-cell Proliferation
 ชื่อนักวิจัย : รศ.ดร.สนั่น ศุภธีรสกุล
 E-mail Address : ssanan@ratree.psu.ac.th
 ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (15 กุมภาพันธ์ 2541 - 15 กุมภาพันธ์ 2544)

ได้ศึกษาสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบ ผลต่อการแบ่งตัวของ T-cell ของสารสกัดหยาบ และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ และจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ของสมุนไพรที่แพทย์แผนไทยภาคใต้ใช้เป็นยาบำรุงธาตุ ขับน้ำเหลืองเสีย และรักษาโรคผิวหนัง จำนวน 6 ชนิด คือ รากเหลือง (*Prismatomeris malayana* Ridd. Rubiaceae) ขันทองพยาบาท (*Suregada multiflorum* Baill. Euphorabiaceae) เถาเมะตูก (*Sphenodesme pentandra* Jack Symphoremataceae) ข้อนหมาแดง (*Ancistrocladus tectorius* Merr. Ancistrocladaceae) ถอบแถบน้ำ (*Connarus semidecandrus* Jack. Connaraceae) และเถาอีคุย (*Willughbeia firma* Bl. Apocynaceae) ทดสอบผลต่อการแบ่งตัวของ T-cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย phytohaeagglutinin (PHA) ซึ่งเป็น mutagen พบว่าสารสกัดหยาบด้วย n-hexane extract ของรากเหลือง ขันทองพยาบาท เถาเมะตูก ข้อนหมาแดง ถอบแถบน้ำ และเถาอีคุย มีค่า EC₅₀ เป็น 161.3, ผลไม้แน่นอน, 73.7, 139.8, 35.4 และ 154.4 µg/ml ตามลำดับ และ methanol extract มีค่า EC₅₀ เป็น 193.0, 268.8, 236.9, 144.0, stimulate cell proliferation และ 271.0 µg/ml ตามลำดับ ทำการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบโดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี และหาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยอาศัยข้อมูลด้านสเปกโตรสโคปี แยกได้ homorapanone และ bergenin จาก n-hexane extract และ methanol extract ของถอบแถบน้ำตามลำดับ lucidin- ω -methyl ether, rubiadin, rubiadin-1-methyl ether, rubiadin-1-methyl ether-3-O- β -primeveroside และ rubiadin-3-O- β -primeveroside แยกได้จาก methanol extract ของรากเหลือง 3-docosanoyl lupeol, lupeol และ 3-acetyl lupeol แยกได้จาก n-hexane extract ของเถาอีคุย β -amyrin และ mixture ของ stigmaterol & β -sitosterol (7:3) แยกได้จาก n-hexane extract ของเถาเมะตูก เมื่อนำสารเหล่านี้ไปทดสอบผลต่อการแบ่งตัวของ T-cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA พบว่า homorapanone, bergenin, 3-docosanoyl lupeol, lupeol, 3-acetyl lupeol, lucidin- ω -methyl ether, rubiadin และ rubiadin-1-methyl ether มีค่า EC₅₀ เป็น 20.2, 819.7, >1000, 478.9, 861.0, 76.8, 101.6 และ 170.2 µg/ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า homorapanone, lucidin- ω -methyl ether, rubiadin และ rubiadin-1-methyl ether เป็นสารที่มีฤทธิ์ค่อนข้างดีในการ

ยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA การศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษาต่อไปในอนาคต

Keywords : T-cell, medicinal plants, natural compounds, southern Thailand,
preliminary study

Abstract

Project Code	: RSA40-8-0024
Project Title	: Preliminary Study of Natural Compounds from Southern Thailand Medicinal Plants on T-cell Proliferation
Investigator	: Assoc. Prof. Sanan Subhadhirasakul, Ph.D.
E-mail Address	: ssanan@ratree.psu.ac.th
Project Period	: 3 years (15 February 1998 - 15 February 2001)

Chemical constituents, inhibitory effect on T-cell proliferation and scientific name classification of six Thai medicinal plants which have been widely used for element tonic, elimination of vitiated lymph and atopic dermatitis by the traditional doctors in southern Thailand were investigated. The plants were *Prismatomeris malayana* Ridd. (Rubiaceae), *Suregada multiflorum* Baill. (Euphorabiaceae), *Sphenodesme pentandra* Jack (Symphoremataceae), *Ancistrocladus tectorius* Merr. (Ancistrocladaceae), *Connarus semidecandrus* Jack. (Connaraceae) and *Willughbeia firma* Bl. (Apocynaceae). The inhibitory effect on T-cell proliferation was expressed as EC₅₀. The EC₅₀ of the n-hexane extracts of *Prismatomeris malayana*, *Suregada multiflorum*, *Sphenodesme pentandra*, *Ancistrocladus tectorius*, *Connarus semidecandrus* and *Willughbeia firma* were 161.3, uncertained result, 73.7, 139.8, 35.4 และ 154.4 µg/ml, respectively. And those of methanol extracts were 193.0, 268.8, 236.9, 144.0, stimulate cell proliferation and 271.0 µg/ml, respectively. By mean of chromatographic technique, homorapanone and bergenin were isolated from the n-hexane extract and methanol extract of *Connarus semidecandrus*, respectively. Lucidin- ω -methyl ether, rubiadin, rubiadin-1-methyl ether, rubiadin-1-methyl ether-3-O- β -primeveroside and rubiadin-3-O- β -primeveroside were isolated from the methanol extract of *Prismatomeris malayana*. 3-Docosanoyl lupeol, lupeol and 3-acetyl lupeol were isolated from the n-hexane extract of *Willughbeia firma*, β -amyrin and stigmaterol & β -sitosterol (7:3) were isolated from the n-hexane extract of *Sphenodesme pentandra*. The inhibitory effect on T-cell proliferation of the isolated compounds, homorapanone, bergenin, 3-docosanoyl lupeol, lupeol, 3-acetyl lupeol, lucidin- ω -methyl ether, rubiadin and rubiadin-1-methyl ether showed the EC₅₀ at 20.2, 819.7, >1000, 478.9, 861.0, 76.8, 101.6 และ 170.2 µg/ml, respectively. Among the isolated compounds, homorapanone, lucidin- ω -methyl ether, rubiadin and rubiadin-

1-methyl ether exhibited potent inhibitory effect and the mechanism of the activity is interesting for further investigation.

Keywords : T-cell, medicinal plants, natural compounds, southern Thailand,
preliminary study

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	I
กิตติกรรมประกาศ	III
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	IV
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	VI
สารบัญ	VIII
สารบัญตาราง	IX
เนื้อหางานวิจัย	
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	4
ผลการทดลอง	9
บทวิจารณ์และสรุป	19
เอกสารอ้างอิง	23
output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	27
ภาคผนวก	29
reprint	
manuscript	

สารบัญตาราง

	หน้า
Table 1 : ปริมาณของสารสกัดหยาบและ % yield เมื่อเทียบกับน้ำหนักพืชแห้ง	9
Table 2 : ปริมาณของสารบริสุทธิ์และ % yield เมื่อเทียบกับน้ำหนักของสารสกัดหยาบ	10
Table 3 : ^{13}C -NMR data (DMSO- d_6) for PM-1, PM-2 and PM-3	12
Table 4 : ^{13}C -NMR Data (CDCl_3) for NWF-1, NWF-2, NWF-3, synthesized 3-docosanoyl lupeol, lupeol and 3-acetyl lupeol.	14
Table 5 : ^{13}C -NMR Data (CDCl_3) for NPS-2, NPS-3, β -amyrin, stigmasterol and β -sitosterol	16
Table 6 : ผลของสารสกัดสมุนไพรและสารบริสุทธิ์ต่อการแบ่งตัวของ T-cell	18

บทนำ

ในปัจจุบันความเสื่อมโทรมทางด้านสภาพแวดล้อมมีเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ไม่ว่าจะเป็น น้ำ อากาศ และสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ จึงทำให้มีผู้ป่วยภูมิแพ้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (จากการรายงานของสถาบันโรคผิวหนัง พบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคผิวหนังที่เกิดจากการแพ้ (allergic dermatitis) มีจำนวนประมาณ 10-13 % ของผู้ป่วยโรคผิวหนังทั้งหมด) (ธวัชชัย, 2536) วิธีการที่นิยมและแพร่หลายในการบำบัดโรคภูมิแพ้ของผู้ป่วยเหล่านี้ก็คือ การบำบัดด้วยยาในกลุ่มยาแก้แพ้ (antihistamine) พร้อมทั้งแนะนำให้ผู้ป่วยหลีกเลี่ยงจากสิ่งที่แพ้ และแนะนำให้ออกกำลังกายสม่ำเสมอเพื่อให้ร่างกายมีความต้านทานเพิ่มขึ้น แต่ข้อแนะนำเหล่านี้มีข้อจำกัด กล่าวคือ ผู้ป่วยเองไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของแพทย์ผู้รักษาได้อย่างครบถ้วน เนื่องจากข้อจำกัดทางด้านการประกอบอาชีพ ที่อยู่อาศัย และอื่น ๆ ดังนั้นความสนใจทางด้านสารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulator / immunoregulator) หรือเป็นสารกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต้านโรคเพิ่มขึ้น (immunostimulants / immunopotentiators) จึงมีเพิ่มขึ้น เพื่อนำมาใช้ในการบำบัดโรคภูมิแพ้ นอกจากนี้แนวคิดในการใช้สารกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันโรคยังสามารถนำมาใช้ในการบำบัดโรคอื่น ๆ ได้อีกหลายชนิด เช่น โรคติดเชื้อเรื้อรัง โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยา โรคมะเร็ง โรคเอดส์ โรคไขข้ออักเสบ เป็นต้น โดยเฉพาะโรคมะเร็งและโรคเอดส์ซึ่งในขณะนี้ยังไม่มียวิธีการรักษาที่ดี **การบำบัดโดยใช้สารเคมี ซึ่งทำลายเซลล์มะเร็งมักจะมีผลต่อเซลล์อื่น ๆ ด้วย** หรือการใช้รังสีบำบัดก็มีอาการข้างเคียงที่ไม่ต้องการ (เอมอร, 2533)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมสมบูรณ์ มีทรัพยากรธรรมชาติมากมาย คนไทยรู้จักใช้สมุนไพรในท้องถิ่นมาบำบัดโรคภัยต่าง ๆ ตั้งแต่โบราณกาล แต่เนื่องจากในหลักการแพทย์แผนไทยโบราณ ไม่ได้มีการใช้คำว่า “โรคภูมิแพ้” ไว้ในตำรายา แต่มีการระบุโรคที่สามารถเทียบเคียงได้กับโรคภูมิแพ้ในปัจจุบันคือ โรคผิวหนัง ขับน้ำเหลืองเสีย หรือบำรุงธาตุ ดังนั้น **สมุนไพรกลุ่มหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคผิวหนัง ขับน้ำเหลืองเสีย หรือเป็นยาบำรุงธาตุ** จึงเป็นกลุ่มที่น่าสนใจและคาดว่าจะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน และสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันมักมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังตัวอย่างเช่น เหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus*, และ *A. illicifolius*) ซึ่งในตำรายาไทยนำมาใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนัง ขับน้ำเหลืองเสีย และจากการวิจัยพบว่ามีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันและมีผลต่อ mutagenicity ของเซลล์ (Rojanapo, 1990; Jongsuwat, 1981) นอกจากนี้แนวคิดในการรักษาโรคของการแพทย์แผนไทย รวมทั้งแพทย์แผนโบราณจะเป็นการรักษาโรคแบบองค์รวม การรักษาโรคหนึ่ง ๆ ต้องใช้ตัวยาในการรักษาหลายชนิด ประกอบด้วยตัวยาที่มีฤทธิ์ในการบำบัดโรคนั้นโดยตรง และตัวยาเสริมที่ช่วยกระตุ้นร่างกายให้มีภูมิคุ้มกันต้านโรคเพิ่มขึ้น ซึ่งตัวยาที่มีผลต่อภูมิคุ้มกันต้านทานเหล่านี้ **ส่วนใหญ่จะเป็นตัวยาที่มีสรรพคุณในการบำรุงธาตุ ขับน้ำเหลืองเสีย และรักษาโรคผิวหนัง** ดังนั้นการนำสมุนไพรท้องถิ่นที่มีสรรพคุณเหล่านี้มาทำการศึกษาวิจัย ทั้งองค์ประกอบของสารทางเคมี

(chemical constituents) และฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ โดยเฉพาะกับ สมุนไพรชนิดที่ยังไม่มีผู้ศึกษาวิจัยมาก่อน เป็นการค้นหาคำตอบใหม่ที่เกี่ยวข้องการพัฒนาประเทศ โดยเฉพาะถ้าสามารถค้นพบสารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันจากสมุนไพรไทย ซึ่งสามารถพัฒนาเป็น ผลิตภัณฑ์ทางการค้าในรูปแบบของ **health food** หรือ **ยารักษาโรค** ต่อไป

เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายมนุษย์ มีความสลับซับซ้อนสูง การศึกษาสมุนไพร หรือสารจากธรรมชาติที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันให้ครบวงจร เป็นสิ่งที่ค่อนข้างยาก และเสียค่าใช้จ่ายสูงต้องอาศัยความร่วมมือระหว่าง natural products chemists กับ immunologists อย่างใกล้ชิดและจริงจัง และเนื่องจากสมุนไพรชนิดหนึ่ง ๆ ประกอบด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก การที่จะนำสารเคมีทุกชนิดที่มีอยู่ในสมุนไพรชนิดนั้น ๆ มาตรวจสอบฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันอย่างครบวงจร ซึ่งมีการทดสอบในสัตว์ทดลองด้วย เป็นเรื่องที่ทำได้ยากและเสียค่าใช้จ่ายสูงมาก เนื่องจากไม่ทราบว่าสารชนิดใดมีฤทธิ์ จึงต้องนำสารทุกชนิดมาทดสอบอย่างครบวงจร ดังนั้นวิธีหนึ่งในการศึกษาฤทธิ์ของสารเคมีจากธรรมชาติที่เป็นที่นิยมปฏิบัติกันมาก และเป็นการลดความไม่คุ้มค่าของค่าใช้จ่ายที่จะเกิดขึ้น ก็คือ นำสารธรรมชาติเหล่านั้นมาตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นเสียก่อนด้วยวิธีใดวิธีหนึ่ง ซึ่งโดยปกติมักเป็นวิธีตรวจสอบแบบ *in vitro* test เนื่องจากเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่า และสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้จำนวนมากในการตรวจสอบแต่ละครั้ง แม้ว่าการตรวจสอบฤทธิ์ด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งแบบ *in vitro* test เหล่านี้ อาจจะทำให้ misleading ได้ กล่าวคือ อาจจะทำให้พลาดสารที่มีฤทธิ์ไปได้ เนื่องจากวิธีการตรวจสอบไม่ครอบคลุมทุกด้าน แต่ก็ **เป็นวิธีการที่เสียค่าใช้จ่ายน้อย และสามารถปฏิบัติได้** และเมื่อพบว่ามีสารใดที่ให้ positive test จึงค่อยนำสารนั้นมาศึกษาลึกลงไปในขั้นการหากลไกการออกฤทธิ์ของสาร

วิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นวิธีการตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารจากธรรมชาติที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน คือ **T-cell proliferation assay** โดยการเลี้ยง T-cell ร่วมกับสารสกัดจากธรรมชาติ และมี/ไม่มี สารมาตรฐานที่สามารถกระตุ้นให้เกิด T-cell proliferation ถ้าสารสกัดจากธรรมชาติชนิดใดมีผลยับยั้ง หรือเพิ่มการ proliferation ของ T-cell แสดงว่าสารชนิดนั้นมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน และมีคุณค่าเพียงพอที่จะศึกษาลึกลงไปในระดับกลไกการออกฤทธิ์

สมุนไพรไทยที่มีสรรพคุณในการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนัง ขับน้ำเหลืองเสีย และบำรุงธาตุ ที่นำมาใช้บ่อยโดยแพทย์แผนไทยในภาคใต้ ซึ่งคาดว่า มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน และสามารถตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธี T-cell proliferation assay มีจำนวน 6 ชนิด (นิรนาม, 2540) ดังนี้ คือ รากเหลือง (*Prismatomeris malayana*) ขันทองพยาบาท (*Gelonium multiflorum*) เถามะตุ๊ก, เถาอีคุย, ข้อนหมาแดง และถอบแถบน้ำ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารจากสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรค ผื่นผิวหนัง ขับน้ำเหลืองเสีย และบำรุงธาตุ

2. เพื่อตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธี T-cell proliferation assay ของสมุนไพรในท้องถิ่นภาคใต้ที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนัง ขับน้ำเหลืองเสีย และบำรุงธาตุ

3. เพื่อการเก็บรวบรวมสมุนไพรในท้องถิ่นภาคใต้ที่คาดว่าจะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันและจำแนกชื่อทางวิทยาศาสตร์ในสมุนไพรที่ยังไม่มีการจำแนกชื่อไว้

วิธีการทดลอง

วัสดุและสารเคมี

Acetone (Merck)
chloroform (Merck)
Ethyl acetate (Merck)
glacial acetic acid (Merck)
n-hexane (Merck)
iodine (Fluka)
methanol (Merck)
Phytohaemagglutinin (Sigma)
Reverse phase silica gel (RSiL C 18 HL 230-400 mesh, Chemie Uetikon)
RPMI (GibcoBRL)
Silica gel for column chromatography, 230-400 mesh ASTM (Merck)

เครื่องมือ

Nuclear Magnetic Resonance (VARIAN UNITY INOVA 500 MHz spectrometer)
Mass Spectrometer (JEOL JMS-HX 101A and JMS-20s spectrometers)
Ultraviolet-Visible Spectrometer (HEWLETT PACKARD 8452A diode array spectrophotometer)
Infrared Spectrometer (JASCO IR-810 infrared spectrometer)
Liquid Scintillation Counter (Beckman LS 6000 TA, USA)

การเก็บรวบรวมและจำแนกชื่อทางวิทยาศาสตร์

ทำการเก็บตัวอย่างสมุนไพรที่ได้มีการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนัง ขับน้ำเหลืองเสีย และบำรุงธาตุ ทั้ง 6 ชนิด ซึ่งได้แก่ รากเหลือง ขันทองพยาบาท เถามะดุก เถาอีคุด ข้อนหมาแดง และถอบแถบน้ำ มาจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ โดยการดูลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสมุนไพรแต่ละชนิด เช่นลักษณะของต้น ใบ ดอก และผล และเปรียบเทียบกับ herbarium ของพืชต่าง ๆ ที่ได้มีการรวบรวมและจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์เอาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในสมุนไพรชนิดที่ยังไม่มีการจำแนกชื่อไว้ ซึ่งได้แก่ เถามะดุก เถาอีคุด ข้อนหมาแดง และถอบแถบน้ำ ขณะเดียวกันก็สืบค้นข้อมูลการวิจัยของสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดนี้เมื่อได้ชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว ว่าแต่ละชนิดมีรายงานการวิจัยไว้อย่างไรบ้าง และชนิดใดที่ยังไม่มีรายงานการวิจัยที่น่าจะดำเนินการวิจัยต่อไปได้

การสกัด และการแยกสารให้บริสุทธิ์จากสมุนไพร

เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดมาอบแห้งและบดหยาบ ๆ ตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อ T-cell proliferation ของสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด โดยส่วนของสมุนไพรที่นำมาสกัดจะเป็นส่วนของสมุนไพรที่แพทย์แผนไทยนำมาใช้เป็นยา กล่าวคือ ตัวอย่างที่เป็นรากประกอบด้วย รากเหลือง และตัวอย่างที่เป็นลำต้นประกอบด้วย ขันทองพยาบาท เถามะดุก เถาอิกุย ฆ้อนหมาแดง และ กอบแถบน้ำ ทำการสกัดสารจากตัวอย่างสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด โดยการแช่ผงหยาบของสมุนไพรแต่ละชนิดด้วย n-hexane เป็นเวลา 5 วัน กรอง ระบายให้แห้ง กากของสมุนไพรแต่ละชนิดนำมาแช่ต่อด้วย n-hexane ทำการสกัดด้วย n-hexane อีก 4 ครั้ง รวมส่วนที่สกัดด้วย n-hexane แต่ละครั้งเข้าด้วยกัน เป็นสารสกัดหยาบด้วย n-hexane ของสมุนไพรแต่ละชนิด ผงหยาบของสมุนไพรแต่ละชนิดที่สกัดด้วย n-hexane ทั้ง 5 ครั้งแล้ว ผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำมาสกัดต่อด้วย methanol โดยแช่ใน methanol และทำการสกัดด้วยวิธีการเดียวกับที่สกัดด้วย n-hexane จนได้สารสกัดหยาบด้วย methanol

การแยกสารให้บริสุทธิ์จากกอบแถบน้ำ

สารสกัดหยาบด้วย n-hexane จากกอบแถบน้ำ 2.0 g นำมาแยกด้วย reverse phase silica gel (RSiL C18 HL 230-400 mesh, Chemie Uetikon) open column chromatography และใช้ methanol เป็น eluting solvent รวมสารละลายที่ออกจาก column เข้าด้วยกัน และระบายให้แห้ง สาร CS-1 (660 mg) ตกผลึกได้จากตัวทำละลายที่เป็นส่วนผสมระหว่าง n-hexane และ chloroform

สารสกัดหยาบด้วย methanol จากกอบแถบน้ำ 10.0 g นำมาแยกด้วย silica gel (SiO₂ 230-400 mesh ASTM, Merck) open column chromatography จากนั้น eluted column ด้วย 10% methanol/chloroform 1000 ml, 20% methanol/chloroform 6000 ml และ 30% methanol/chloroform 2000 ml รับ fraction ละ 75 ml fractions 14-72 (1820 mg) รวมเข้าด้วยกัน จากนั้นนำมาแยกต่อด้วย silica gel open column chromatography โดยใช้ 10% methanol/ethyl acetate เป็น eluting solvent และรับ fraction ละ 50 ml fractions ที่ 4-42 รวมเข้าด้วยกัน และทำการตกผลึกได้สาร CS-2 (321.2 mg) จาก methanol

การแยกสารให้บริสุทธิ์จากรากเหลือง

สารสกัดหยาบด้วย methanol จากรากเหลือง 10.08 g นำมาแยกด้วย silica gel (SiO₂ 230-400 mesh ASTM, Merck) open column chromatography จากนั้น eluted column ด้วย 2% methanol/chloroform 400 ml, 5% methanol/chloroform 400 ml, 10% methanol/chloroform 2600 ml, 20% methanol/chloroform 600 ml, 30% methanol/chloroform 600 ml, 50% methanol/chloroform 1100 ml, methanol 1800 ml และ 10% water/methanol 1800 ml รับ fraction ละ 75 ml fractions 10 (350.1 mg) นำ

มาแยกต่อด้วย silica gel open column chromatography โดยใช้ 5% methanol/chloroform เป็น eluting solvent โดยรับ fraction ละ 30 ml สาร PM-1 58.8 mg, PM-2 19.9 mg และ PM-3 19.1 mg แยกได้จาก fractions 10-13, 14-34 และ 35 ตามลำดับ

fraction 11 (252.4 mg) นำมาแยกต่อด้วย silica gel open column chromatography โดยใช้ 5% ethyl acetate/benzene เป็น eluting solvent โดยรับ fraction ละ 30 ml สาร PM-1 19.7 mg, PM-2 22.9 mg และ PM-3 23.7 mg แยกได้จาก fractions 6-9, 13-25 และ 32 ตามลำดับ

fraction 44-51 (589.9 mg) นำมาแยกต่อด้วย silica gel open column chromatography โดยใช้ 15% methanol/chloroform เป็น eluting solvent แยกได้สาร PM-8 9.6 mg จากนั้นนำ PM-8 มาแยกต่อด้วย RSiL C18 column chromatography โดยใช้ 10% water/ methanol เป็น eluting solvent แยกได้ PM-8 ODS-U2 (2 mg) และ PM-8 ODS-L (2 mg)

การแยกสารให้บริสุทธิ์จากเถาอิคูย

สารสกัดหยาบด้วย n-hexane จากเถาอิคูย 3.0 g นำมาแยกด้วย silica gel (SiO₂ 230-400 mesh ASTM, Merck) open column chromatography จากนั้น eluted column ด้วย 5% ethyl acetate/n-hexane 2000 ml, 10% ethyl acetate/n-hexane 1500 ml, 5% ethyl acetate/chloroform 1000 ml, 5% methanol/chloroform 1500 ml และ 20% methanol/chloroform 500 ml รับ fraction ละ 75 ml fractions 3-4 (1218 mg) นำมาแยกต่อด้วย silica gel open column chromatography โดยใช้ 1% ethyl acetate/n-hexane แยกได้สาร NWF-1 (844 mg), fraction 5 (175.3 mg) นำมาแยกต่อด้วย silica gel open column chromatography โดยใช้ 1.5% ethyl acetate/n-hexane แยกได้สาร NWF-2 (76.2 mg), fractions 21-23 (160 mg) นำมาแยกต่อด้วย preparative silica gel TLC โดยใช้ chloroform saturated with 25% ammonia water : ethyl acetate : n-hexane = 20:1:79 เป็น developing solvent จากนั้นนำมาแยกต่ออีกครั้งด้วย preparative SiO₂ TLC โดยใช้ benzene : ethyl acetate : n-hexane = 30:1.5:68.5 เป็น developing solvent แยกได้ NWF-3 (102 mg)

การแยกสารให้บริสุทธิ์จากเถามะตุก

สารสกัดหยาบด้วย n-hexane จากเถามะตุก 11.98 g นำมาแยกด้วย silica gel (SiO₂ 230-400 mesh ASTM, Merck) open column chromatography จากนั้น eluted column ด้วย 20% chloroform/n-hexane 500 ml, 30% chloroform/n-hexane 1500 ml, 50% chloroform/n-hexane 1500 ml, 70% chloroform/n-hexane 1000 ml, chloroform 1500 ml, 1% methanol/chloroform 1000 ml, 3% methanol/chloroform 1000 ml, 5% methanol/chloroform 1000 ml, 10% methanol/chloroform 500 ml, 20%

methanol/chloroform 1000 ml และ methanol 500 ml รับ fraction ละ 75 ml fractions 56-60 (307.7 mg) นำมาแยกต่อด้วย silica gel open column chromatography โดย 30% chloroform/n-hexane เป็น eluting solvent แยกได้สาร **NSP-1** (17.5 mg) และ **NSP-2** (51.0 mg), fraction 61-66 (949 mg) นำมาแยกต่อด้วย silica gel open column chromatography โดยใช้ 40% chloroform/n-hexane เป็น eluting solvent แยกได้สาร **NSP-1** (1.7 mg) และ **NSP-2** (22.7 mg), fraction 67-76 (1089 mg) นำมาแยกต่อด้วย silica gel open column chromatography โดยใช้ 50% chloroform/n-hexane เป็น eluting solvent แยกได้สาร **NSP-2** (613.6 mg), fraction 77-85 (464 mg) นำมาแยกต่อด้วย silica gel open column chromatography โดยใช้ 50% chloroform/n-hexane เป็น eluting solvent แยกได้สาร **NSP-2** (46.1 mg) และ **NSP-3** (120.6 mg), fraction 86-96 (428.1 mg) นำมาแยกต่อด้วย silica gel open column chromatography โดยใช้ 50% chloroform/n-hexane เป็น eluting solvent แยกได้สาร **NSP-3** (15.3 mg)

Preparation of docosanoyl chloride. Suspension of docosanoic acid (43 mg, 0.126 mmol) and thionyl chloride (0.6 ml, 8.23 mmol) was refluxed at 110-135 °C under argon gas for 3.5 hrs. After excess thionyl chloride was removed under reduced pressure, the residue was dissolved in dry CH₂Cl₂ (1.0 ml).

Condensation of lupeol and docosanoyl chloride. A solution of lupeol (5.3 mg, 0.012 mmol) in dry CH₂Cl₂, dry pyridine (5 ml, 0.012 mmol) and CH₂Cl₂ solution of docosanoyl chloride (0.15 ml, 0.019 mmol) were successively mixed together at 0 °C under argon. The mixture was stirred at room temperature for 16.5 hrs. Further dry pyridine (5ml, 0.012 mmol) and the CH₂Cl₂ solution of docosanoyl chloride (0.05 ml, 0.006 mmol) were added to the reaction mixture at 0 °C and then the mixture was stirred at room temperature for 1.5 hrs. The reaction mixture was diluted with CHCl₃ and cold water. The whole was extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous magnesium sulphate and evaporated to afford **synthesized 3-docosanoyl lupeol** (9.3 mg, y. quant.).

การตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อ T-cell proliferation

ตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อ T-cell proliferation ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่มีปริมาณเพียงพอต่อการทดสอบ ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

1. แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างเลือดในหลอดบรรจุ Heparin

2. นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง RPMI ที่ 37°C , $5\%\text{CO}_2$ และแบ่งเซลล์เพาะเลี้ยงเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 กระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวด้วยสารที่มีฤทธิ์เป็น ไมโตเจนโดยใช้ Phytohaeagglutinin (PHA) ร่วมกับสารสกัดจากพืชสมุนไพรเป็นเวลา 3 วัน ส่วนกลุ่มที่ 2 ไม่มีการกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวด้วย PHA แต่เป็นการเพาะเลี้ยงระหว่างสารสกัดกับเม็ดเลือดขาว และใช้การเพาะเลี้ยงระหว่างเม็ดเลือดขาวกับตัวทำละลายเป็น blank

3. ทำการตรวจวัดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์โดยอาศัย ^3H -thymidine incorporation

4. วิเคราะห์เปรียบเทียบหาค่า EC_{50} (ความเข้มข้นของสารที่มีผลต่อการแบ่งตัวของ T-cell 50%)

ผลการทดลอง

การเก็บรวบรวมและจำแนกชื่อทางวิทยาศาสตร์

ได้เก็บรวบรวมสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด จากป่าธรรมชาติในภาคใต้ของประเทศไทย จัดทำเป็น herbarium และเก็บไว้ในภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และได้จำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ของสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดไว้ดังนี้

รากเหลือง	: <i>Prismatomeris malayana</i> Ridd.	Rubiaceae
ชันทองพญาบาท	: <i>Suregada multiflorum</i> Baill.	Euphorabiaceae
เถามะดุก	: <i>Sphenodesme pentandra</i> Jack	Symphoremataceae
พื้หนมาแดง	: <i>Ancistrocladus tectorius</i> Merr.	Ancistrocladaceae
ถอบแถบน้ำ	: <i>Connarus semidecandrus</i> Jack.	Connaraceae
เถาอีคุด	: <i>Willughbeia firma</i> Bl.	Apocynaceae

การสกัดสารและการแยกสารให้บริสุทธิ์

1. สารสกัดหยาบ

Table 1: ปริมาณของสารสกัดหยาบและ % yield เมื่อเทียบกับน้ำหนักพืชแห้ง

ตัวอย่าง	น้ำหนักแห้ง (g)	n-hexane extract		methanol extract	
		น้ำหนัก (g)	% yield	น้ำหนัก (g)	% yield
รากเหลือง	1000	1.80	0.18	55.78	5.58
ชันทองพญาบาท	900	6.84	0.76	33.34	3.70
เถามะดุก	800	2.03	0.25	52.01	6.50
พื้หนมาแดง	600	0.55	0.09	68.44	11.41
ถอบแถบน้ำ	1000	10.35	1.04	119.94	11.99
เถาอีคุด	1100	14.30	13.0	105.71	9.61

2. สารบริสุทธิ์

Table 2: ปริมาณของสารบริสุทธิ์และ % yield เมื่อเทียบกับน้ำหนักของสารสกัดหยาบ

สมุนไพรร	สารสกัดหยาบ	สารบริสุทธิ์	น้ำหนัก (mg)	% yield
ถอบแถบน้ำ	n-hexane extract	homorapanone	660.0	33.60
	methanol extract	bergenin	321.2	3.21
รากเหลือง	methanol extract	lucidin-(O)-methyl ether	78.5	0.79
		rubiadin	42.8	0.43
		rubiadin-1-methyl ether	42.8	0.43
		rubiadin-1-methyl ether-3-O- β -primeveroside	2.0	0.02
		rubiadin-3-O- β -primeveroside	2.0	0.02
เถาอิกุย	n-hexane extract	3-docosanoyl lupeol	844.0	28.13
		lupeol	76.2	2.54
		3-acetyl lupeol	102.0	3.40
เถาตะดุก	n-hexane extract	β -amyrin	687.3	5.74
		stigmasterol & β -sitosterol (~7:3)	135.9	1.13

การหาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้หาได้โดยการเปรียบเทียบข้อมูลทางกายภาพ ทางเคมี และทาง spectroscopy ที่มีรายงานไว้ในวารสารทางวิชาการต่าง ๆ

CS-1 : ตกผลึกในรูป amorphous สีแดง

mp. 136.7-138 (uncorrect.). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) : 210 (3.96), 290 (4.26). EI-MS m/z (%) : 350 (M^+ , 3), 322 (57), 294 (13), 154 (100), 125 (17). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 7.67 (2H, s, 2OH), 6.0 (1H, s, H-6), 2.45 (2H, dd, $J = 7.93, 7.63$ Hz, H-1'), 1.47 (2H, quin., $J = 7.02$ Hz, H-2'), 1.25 (2H, m, H-14'), 0.88 (3H, t, $J = 6.71$ Hz, H-15'). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ 116.99 (C-3), 102.16 (C-6), 31.92 (C-13'), 29.35-29.67 (C-3' ~ C-12'), 27.93 (C-2'), 22.68 (C-14'), 22.52 (C-1'), 14.10 (C-15'). เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับที่มีรายงานไว้พบว่า เป็น homorapanone (Lund *et al.*, 1997) และมีสูตรทางเคมีเป็น $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4$

CS-1 : ตกผลึกในรูป prism ไม่มีสี จาก methanol

mp. 146.3-147.7 (uncorrect.). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) : 222 (4.21), 276 (3.96). EI-MS m/z (%) : 328 (M^+ , 34), 250 (2), 208 (100), 180 (19), 152 (18), 103 (10). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 7.07 (1H, s, H-7), 4.95 (1H, d, $J = 10.7$

Hz, H-10b), 4.05 (1H, dd, $J = 10.38, 9.47$ Hz, H-4a), 4.02 (1H, dd, $J = 11.60, 1.83$ Hz, H-11), 3.89 (3H, s, OMe), 3.80 (1H, dd, $J = 9.46, 8.55$ Hz, H-4), 3.68 (1H, dd, $J = 11.60, 1.53$ Hz, H-11), 3.65 (1H, dd, $J = 7.02, 1.83$ Hz, H-2), 3.42 (1H, dd, $J = 9.46, 8.54$ Hz, H-3). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ 165.76 (C-6), 152.35 (C-8), 149.44 (C-10), 142.27 (C-9), 119.43 (C-6a), 117.29 (C-10a), 111.04 (C-7), 83.04 (C-2), 81.42 (C-4a), 75.62 (C-4), 74.24 (C-10b), 71.89 (C-3), 62.65 (C-11), 60.89 (OMe). เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับที่มีรายงานไว้พบว่า เป็น bergenin (Mebe and Makuhunga, 1992; Taneyama *et al.*, 1983; Saijo *et al.*, 1990) และมีสูตรทางเคมีเป็น $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_9$

PM-1 : แยกได้ในรูป amorphous สีเหลือง

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm : 204, 246, 270. EI-MS m/z (%) : 284 (M^+ , 12), 269 (6), 252 (100), 224 (9), 196 (30), 168 (16), 149 (12), 139 (26). $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ 13.24 (1H, d, $J = 3.66$ Hz, OH-1), 8.20 (1H, d, $J = 7.63$ Hz, H-8), 8.14 (1H, d, $J = 6.71$ Hz, H-5), 7.92 (1H, dd, $J = 7.33, 7.32$ Hz, H-7), 7.88 (1H, dd, $J = 7.33, 7.32$ Hz, H-6), 7.26 (1H, s, H-4), 4.44 (2H, s, $-\text{CH}_2\text{O}$), 3.26 (3H, s, OMe). สำหรับข้อมูลทาง $^{13}\text{C-NMR}$ ดูได้จาก Table 3 เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับที่มีรายงานไว้พบว่า เป็น lucidin- O -methyl ether (Dej-adisai, 1997; Chang and Lee, 1984; Banthorpe and White, 1995; Itokawa *et al.*, 1983) และมีสูตรทางเคมีเป็น $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$

PM-2 : แยกได้ในรูป amorphous สีเหลือง

EI-MS m/z (%) : 254 (M^+ , 100), 238 (16), 226 (15), 197 (14), 181 (13), 152 (26), 139 (11), 115 (25). $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ 13.11 (1H, s, OH-1), 8.20 (1H, dd, $J = 7.33, 1.53$ Hz, H-8), 8.13 (1H, d, $J = 7.33$ Hz, H-5), 7.91 (1H, ddd, $J = 7.63, 7.32, 1.53$ Hz, H-7), 7.88 (1H, ddd, $J = 7.63, 7.32, 1.53$ Hz, H-6), 7.26 (1H, s, H-4), 2.07 (3H, s, CH_3). สำหรับข้อมูลทาง $^{13}\text{C-NMR}$ ดูได้จาก Table 3 เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับที่มีรายงานไว้พบว่า เป็น rubiadin (Dej-adisai, 1997; Chang and Lee, 1984; Banthorpe and White, 1995; Itokawa *et al.*, 1983) และมีสูตรทางเคมีเป็น $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$

PM-3 : แยกได้ในรูป amorphous สีเหลือง

EI-MS m/z (%) : 268 (M^+ , 68), 253 (79), 239 (53), 181 (36), 165 (41), 152 (52), 139 (33), 115 (37), 84 (82), 66 (100). $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) : δ

8.13 (1H, dd, $J = 7.63, 0.91$ Hz, H-8), 8.08 (1H, dd, $J = 7.63, 0.91$ Hz, H-5), 7.87 (1H, ddd, $J = 7.63, 7.32, 1.53$ Hz, H-7), 7.82 (1H, ddd, $J = 7.63, 7.32, 1.52$ Hz, H-6), 7.48 (1H, s, H-4), 3.78 (3H, s, OCH₃), 2.07 (3H, s, CH₃). สำหรับข้อมูลทาง ¹³C-NMR ดูได้จาก Table 3 เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับที่มีรายงานไว้พบว่า เป็น rubiadin-1-methyl ether (Dej-adisai, 1997; Chang and Lee, 1984; Banthorpe and White, 1995; Itokawa *et al.*, 1983) และมีสูตรทางเคมีเป็น C₁₆H₁₂O₄

Table 3 : ¹³C-NMR data (DMSO-*d*₆) for PM-1, PM-2 and PM-3

Carbon	PM-1	PM-2	PM-3	Carbon	PM-1	PM-2	PM-3
1	163.73	162.39	160.57	8a	133.93**	132.95	132.03
2	116.65	117.28	126.09	9	186.13	186.18	180.08
3	164.31	162.78	161.68	9a	108.93	108.91	117.81
4	107.68	107.31	109.00	10	181.80	181.75	182.57
4a	132.83	131.68	133.69	10a	133.04**	132.84	134.48
5	126.37	126.63	125.97	Ar-OCH ₃	-	-	60.54
6	134.47*	134.37	133.27	-CH ₂ O-	61.07	-	-
7	134.66*	134.47	134.46	OCH ₃	57.59	-	-
8	126.76	126.21	126.58	CH ₃	-	8.01	8.98

*, ** Assignment may be exchangeable within the same symbol.

PM-8 ODS-U2 : แยกได้ในรูป amorphous สีเหลือง

¹H-NMR (CD₃OD) : δ 8.24 (1H, dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, H-8), 8.22 (1H, dd, $J = 7.4, 1.4$ Hz, H-5), 7.84 (1H, ddd, $J = 8.0, 7.4, 1.4$ Hz, H-7), 7.79 (1H, ddd, $J = 7.4, 7.4, 1.4$ Hz, H-6), 7.84 (1H, s, H-4), 3.88 (3H, s, OCH₃), 2.33 (3H, s, CH₃). 5.17 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1'), 4.15 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-6'), 3.88 (1H, dd, $J = 11.0, 5.23$ Hz, H-6'), 4.27 (1H, d, $J = 7.15$ Hz, H-2'') เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับที่มีรายงานไว้พบว่า น่าจะเป็น rubiadin-1-methyl ether-3-O-β-primeveroside (Lu *et al.*, 1998; El-Emary and Backheet, 1998; El-Gamal *et al.*, 1996) และมีสูตรทางเคมีเป็น C₂₇H₃₀O₁₃

PM-8 ODS-L : แยกได้ในรูป amorphous สีเหลือง

¹H-NMR (CD₃OD) : δ 8.29 (1H, dd, $J = 7.15, 1.9$ Hz, H-8), 8.26 (1H, dd, $J = 7.15, 1.65$ Hz, H-5), 7.85 (1H, ddd, $J = 7.15, 7.15, 1.65$ Hz, H-7), 7.84 (1H, ddd, $J = 7.15, 7.15, 1.9$ Hz, H-6), 7.59 (1H, s, H-4), 2.25 (3H, s, CH₃). 5.15 (1H, d, $J = 7.42$ Hz, H-1'), 4.14 (1H, dd, $J = 11.0, 1.65$ Hz, H-6'), 3.88 (1H, dd, $J =$

11.27, 5.23 Hz, H-6'), 4.27 (1H, d, $J = 7.42$ Hz, H-2'') เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับที่มีรายงานไว้พบว่า น่าจะเป็น **rubiadin-3-O- β -primeveroside** (Lu *et al.*, 1998; El-Emary and Backheet, 1998; El-Gamal *et al.*, 1996) และมีสูตรทางเคมีเป็น $C_{26}H_{28}O_{13}$

NWF-1 : แยกได้ในรูป amorphous สีขาว

mp. 76.5~77.5 °C. $[\alpha]_D^{19} +26.6^\circ$ ($c = 0.56$, $CHCl_3$). IR (KBr) cm^{-1} : 2930, 2850, 1730, 1640, 1460, 1380, 1220, 1170, 1120, 980, 880, 720. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 4.69 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-29), 4.57 (1H, m, H-29), 4.47 (1H, dd, $J = 10.7, 5.5$ Hz, H-3), 2.38 (1H, ddd, $J = 11.3, 11.3, 5.8$ Hz, H-19), 1.68 (3H, s, H-30), 1.03 (3H, s, H-26), 0.94 (3H, s, H_3 -27), 0.85 (3H, s, H_3 -25), 0.84 (6H, s, H_3 -23 and H_3 -24), 0.79 (3H, s, H_3 -28), 2.28 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-2'). ^{13}C -NMR : see Table 4. HR-MS calcd for $C_{52}H_{92}O_2$: 748.7064. Found 748.7067. เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับที่มีรายงานไว้พบว่า เป็น **3-docosanoyl lupeol** (Razdan *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1983; Halim *et al.*, 1983; Sobrinho *et al.*, 1991) และมีสูตรทางเคมีเป็น $C_{52}H_{92}O_2$

NWF-2 : แยกได้ในรูป amorphous สีขาว

EI-MS m/z (%) : 426 (M^+ , 8), 315 (3), 257 (4), 218 (52), 189 (59), 149 (65), 121 (65), 95 (100), 69 (87). 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 4.69 (1H, d, $J = 2.14$ Hz, H-29), 4.57 (1H, br. s, H-29), 3.17 (1H, br. s, H-3), 2.38 (1H, ddd, $J = 11.29, 11.29, 6.11$ Hz, H-19), 1.68 (3H, s, H_3 -30), 1.03 (3H, s, H_3 -26), 0.97 (3H, s, H_3 -23), 0.94 (3H, s, H_3 -27), 0.83 (3H, s, H_3 -25), 0.79 (3H, s, H_3 -28), 0.76 (3H, s, H_3 -24). ^{13}C -NMR : see Table 4. เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับที่มีรายงานไว้พบว่า เป็น **lupeol** (Sholichin *et al.*, 1980; Shiojima *et al.*, 1994; Lin and Tome 1988; Reynolds *et al.*, 1986) และมีสูตรทางเคมีเป็น $C_{30}H_{50}O$

NWF-3 : แยกได้ในรูป amorphous สีขาว

EI-MS m/z (%) : 468 (M^+ , 7), 408 (1), 365 (6), 298 (1), 249 (4), 218 (42), 189 (77), 147 (37), 121 (81), 95 (100), 69 (66). 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 4.69 (1H, d, $J = 2.44$ Hz, H-29), 4.57 (1H, m, H-29), 4.47 (1H, dd, $J = 10.9, 5.8$ Hz, H-3), 2.38 (1H, ddd, $J = 10.99, 10.99, 5.8$ Hz, H-19), 1.68 (3H, d, $J = 0.61$ Hz, H_3 -30), 1.03 (3H, s, H_3 -26), 0.94 (3H, s, H_3 -27), 0.85 (3H, s, H_3 -25), 0.85 (3H, s, H_3 -23), 0.84 (3H, s, H_3 -24), 0.79 (3H, s, H_3 -28). ^{13}C -NMR : see Table 4. เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับที่มีรายงานไว้พบว่า เป็น **3-acetyl lupeol** (Solichin *et al.*,

1980; Shiojima *et al.*, 1994; Lin and Tome 1988; Reynolds *et al.*, 1986) และมีสูตรทางเคมีเป็น $C_{32}H_{52}O_2$

Synthesized 3-docosanoyl lupeol : White amorphous powder. $[\alpha]_D^{19} +28.6^\circ$ ($c = 0.315$, $CHCl_3$). 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 4.69 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-29), 4.57 (1H, m, H-29), 4.47 (1H, dd, $J = 10.7, 5.5$ Hz, H-3), 2.38 (1H, ddd, $J = 11.0, 11.0, 5.8$ Hz, H-19), 1.68 (3H, s, H-30), 1.03 (3H, s, H-26), 0.94 (3H, s, H-27), 0.85 (3H, s, H-25), 0.84 (6H, s, H-23 and H-24), 0.79 (3H, s, H-28), 2.29 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-2'). ^{13}C -NMR : see Table 4. FAB-MS (NBA) $C_{52}H_{92}O_2K$ ($M+K$) $^+$ = 787.

Table 4 : ^{13}C -NMR Data ($CDCl_3$) for NWF-1, NWF-2, NWF-3, synthesized 3-docosanoyl lupeol, lupeol and 3-acetyl lupeol.

Carbon	NWF-1	syn. 3-doc. lup.	NWF-2	lupeol	NWF-3	3-acet. lup.
1	38.37	38.37	38.70	38.7	38.37	38.38
2	23.74	23.74	27.41	27.5	23.70	23.71
3	80.60	80.60	78.99	79.0	80.96	80.97
4	37.83	37.83	38.85	38.9	37.79	37.79
5	55.37	55.37	55.29	55.3	55.37	55.37
6	18.20	18.20	18.31	18.3	18.19	18.20
7	34.20	34.20	34.27	34.3	34.19	34.20
8	40.84	40.84	40.82	40.9	40.84	40.85
9	50.33	50.33	50.43	50.5	50.33	50.34
10	37.08	37.08	37.16	37.2	37.07	37.08
11	20.93	20.93	20.92	21.0	20.93	20.94
12	25.09	25.09	25.19	25.2	25.08	25.10
13	38.03	38.03	38.04	38.1	38.03	38.04
14	42.82	42.82	42.82 ^a	42.9	42.81	42.82
15	27.43	27.43	27.41	27.5	27.42	27.42
16	35.56	35.56	35.57	35.6	35.56	35.57
17	42.99	42.99	42.99 ^a	43.0	42.99	43.00
18	48.28	48.28	48.00 ^b	48.0	48.27	48.28
19	48.00	48.00	48.29 ^b	48.3	48.00	48.00
20	150.96	150.97	150.98	150.9	150.98	150.97
21	29.82	29.82	29.84	29.9	29.82	29.83
22	39.99	39.99	39.99	40.0	39.99	39.99
23	27.96	27.96	27.98	28.0	27.94	27.95
24	16.57	16.57	15.36	15.3	16.49	16.50
25	16.17	16.17	16.11 ^c	16.1	16.18	16.17

Carbon	NWF-1	syn. 3-doc. lup.	NWF-2	lupeol	NWF-3	3-acet. lup.
26	15.97	15.97	15.97 ^a	16.0	15.97	15.97
27	14.51	14.51	14.54	14.6	14.50	14.51
28	17.99	17.99	17.99	18.0	17.99	18.00
29	109.34	109.34	109.31	109.3	109.34	109.35
30	19.28	19.28	19.30	19.3	19.28	19.28
1'	173.70	173.70	-	-	171.02	171.02
2'	34.86	34.86	-	-	21.33	21.33
3'	25.17	25.17	-	-	-	-
4'-20'	29.17-31.92	29.17-31.92	-	-	-	-
21'	22.69	22.69	-	-	-	-
22'	14.12	14.12	-	-	-	-

a, b, c = assignments may be reversed.

NSP-1 : แยกได้ในรูป amorphous สีขาว

ข้อมูลจาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงถึงการเป็นส่วนผสมของสารในกลุ่ม triterpenoid อย่างน้อย 2-3 ชนิด ยังหาสูตรโครงสร้างไม่ได้

NSP-2 : แยกได้ในรูป amorphous สีขาว

FAB-MS : 427 (M + H)⁺. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 5.18 (1H, dd, J = 3.84, 3.57 Hz, H-12), 3.22 (1H, ddd, J = 10.72, 6.05, 4.67 Hz, H-3), 1.14 (3H, s, H₃-28), 1.00 (3H, s, H₃-27), 0.97 (3H, s, H₃-23), 0.94 (3H, s, H₃-29), 0.86 (3H, s, H₃-26), 0.86 (3H, s, H₃-24), 0.82 (3H, s, H₃-25), 0.79 (3H, s, H₃-30). $^{13}\text{C-NMR}$: see Table 5. เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับที่มีรายงานไว้พบว่า เป็น β -**amyrin** (Seo *et al.*, 1975; Gaydou *et al.*, 1996; Matsunaga *et al.*, 1988) และมีสูตรทางเคมีเป็น C₃₀H₅₀O

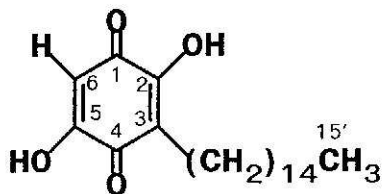
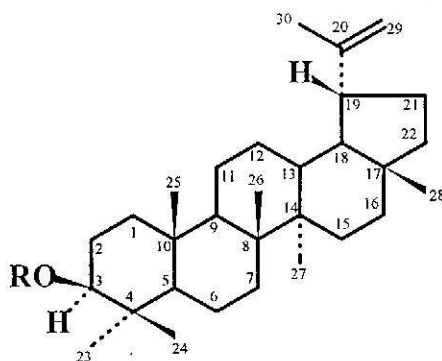
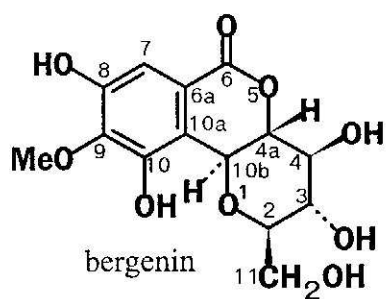
NSP-3 : แยกได้ในรูป amorphous สีขาว

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 5.35 (1H, d, J = 5.17 Hz, H-6), 5.15 (1H, dd, J = 15.22, 8.62 Hz, H-22), 5.02 (1H, dd, J = 15.09, 8.77 Hz, H-23), 3.52 (1H, m, H-3), 1.02 (3H, d, J = 6.75 Hz, H-21), 1.01 (3H, s, H₃-19), 0.85 (3H, d, J = 6.47 Hz, H₃-26), 0.81 (3H, d, J = 7.62 Hz, H₃-29), 0.80 (3H, d, J = 6.32 Hz, H₃-27), 0.70 (3H, s, H₃-18). $^{13}\text{C-NMR}$: see Table 5. เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับที่มีรายงานไว้พบว่า เป็นส่วนผสมระหว่าง **stigmasterol** (C₂₉H₄₈O) กับ β -**sitosterol** (C₂₉H₅₀O) ในสัดส่วนประมาณ 7:3 (Alam *et al.*, 1996; Ahmed *et al.*, 1992).

Table 5 : ^{13}C -NMR Data (CDCl_3) for NPS-2, NPS-3, β -amyrin, stigmasterol and β -sitosterol

carbon	NPS-2	β -amyrin	stigmasterol	β -sitosterol	NPS-3
1	38.5	38.6	37.06	37.36	37.25
2	27.0	26.9	31.64	31.90	31.65
3	78.9	79.0	71.77	71.77	71.80
4	38.7	38.8	41.50	42.29	42.30, 42.31
5	55.1	55.2	140.23	140.75	140.74
6	18.3	18.4	121.69	121.69	121.70
7	32.6	32.7	31.72	31.65	31.87, 31.87
8	39.7	39.8	31.95	31.93	31.89
9	47.6	47.6	50.10	50.13	50.15, 51.23
10	37.0	37.0	36.72	36.50	36.51
11	23.4	23.5	20.80	21.09	21.08, 21.06
12	121.7	121.7	39.59	39.78	39.67, 39.76
13	145.0	145.2	42.50	42.32	42.21, 42.21
14	41.7	41.7	56.67	56.77	56.86, 56.76
15	28.3	28.4	24.01	24.31	24.35, 24.30
16	26.2	26.2	28.55	28.26	28.91, 28.24
17	32.5	32.5	55.85	56.06	55.94, 56.04
18	47.2	47.2	11.61	11.86	12.04, 11.97
19	46.8	46.8	19.23	19.40	19.39
20	31.1	31.1	40.13	36.15	40.49, 36.14
21	34.8	34.7	20.48	18.79	21.06, 18.77
22	37.2	37.1	138.04	33.95	138.31, 33.94
23	28.1	28.1	129.15	26.07	129.26, 26.06
24	15.5	15.5	51.06	45.83	51.23, 45.82
25	15.5	15.6	32.00	29.16	31.65, 29.14
26	16.8	16.8	19.00	19.83	18.97, 19.81
27	26.0	26.0	21.21	19.04	21.21, 19.02
28	27.3	27.2	25.41	23.07	25.40, 23.05
29	33.2	33.3	12.00	11.99	12.04, 11.85
30	23.6	23.7	-	-	-

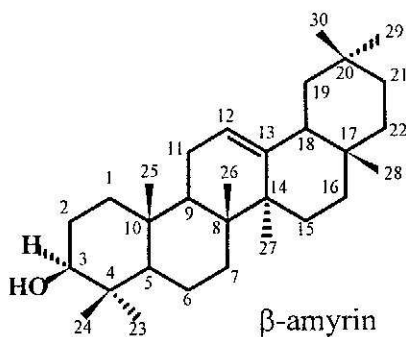
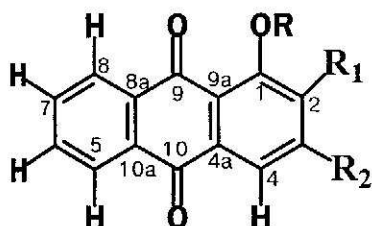
สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้



R = OCCH₂(CH₂)₁₉CH₃, docosanoyl lupeol

R = H, lupeol

R = OCCH₃, acetyl lupeol



R=H, R₁=CH₂OCH₃, R₂=OH; lucidin- ω -methyl ether

R=H, R₁=CH₃, R₂=OH; rubiadin

R=CH₃, R₁=CH₃, R₂=OH; rubiadin-1-methyl ether

R=CH₃, R₁=CH₃, R₂=O- β -prim.; rubiadin-1-methyl ether-3-O- β -primeveroside

R=H, R₁=CH₃, R₂=O- β -prim.; rubiadin-3-O- β -primeveroside

prim. = 6-O- β -D-xylopyranosyl-D-glucopyranosyl

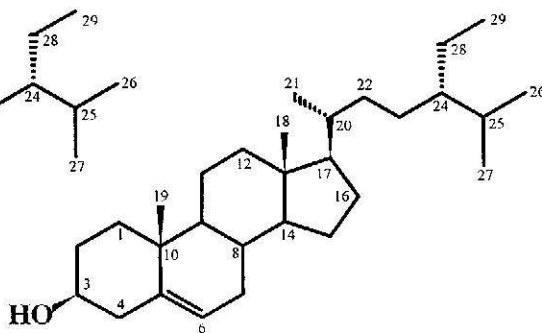
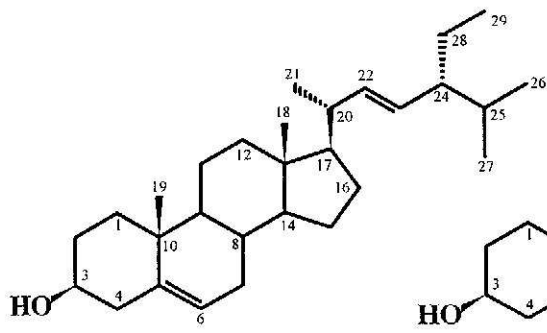


Table 6 : ผลของสารสกัดสมุนไพรและสารบริสุทธิ์ต่อการแบ่งตัวของ T-cell

ตัวอย่าง		EC ₅₀ (µg/ml)
สารสกัดหยาบ		
	รากเหลือง	n-hex. ext. MeOH ext.
ชั้นทองพยับบาท		
		n-hex. ext. MeOH ext.
เถามะตุ๊ก		
		n-hex. ext. MeOH ext.
เถาอีคู้ย		
		n-hex. ext. MeOH ext.
ช้อนหมาแดง		
		n-hex. ext. MeOH ext.
ถอบแถบน้ำ		
		n-hex. ext. MeOH ext.
สารบริสุทธิ์		
homoraponone		20.2
bergenin		819.7
3-docosanoyl lupeol		>1000
3-acetyl lupeol		861.0
lupeol		478.9
lucidin- O -methyl ether		76.8
rubiadin		101.6
rubiadin-1-methyl ether		170.2

บทวิจารณ์และสรุป

จากการวิจัย สามารถแยกสารได้ 2 ชนิด จากลำต้นถอบแถบน้ำ (*Connarus semidecandrus* Jack. Connaraceae) ซึ่งยังไม่พบรายงานการศึกษาสารเคมีจากพืชชนิดนี้มาก่อน สารเคมีที่แยกได้จากถอบแถบน้ำ คือ homorapanone และ bergenin และไม่พบรายงานการศึกษาฤทธิ์ต่อ T-cell proliferation ของสารสองชนิดนี้

แยกสารได้ 3 ชนิดจากลำต้นเถาอิคูย (*Willughbeia firma* Bl. Apocynaceae) สารที่แยกได้คือ 3-docosanoyl lupeol, lupeol และ 3-acetyl lupeol และแยกสารได้ 3 ชนิด จากลำต้นเถา มะตุก (*Sphenodesme pentandra* Jack. Symphoremataceae) โดยสารที่แยกได้คือ β -amyrin, stigmaterol และ β -sitosterol ในทำนองเดียวกัน ยังไม่พบรายงานการศึกษาสารเคมีจากพืชทั้งสองชนิดนี้มาก่อน

สามารถแยกสารได้ 5 ชนิดจากรากของต้นรากเหลือง (*Prismatomeris malayana* Ridd. Rubiaceae) คือ lucidin- ω -methyl ether, rubiadin, rubiadin-1-methyl ether, rubiadin-1-methyl ether-3-O- β -primeveroside และ rubiadin-3-O- β -primeveroside เคยมีรายงานการพบ rubiadin และ rubiadin-1-methyl ether มาก่อน (Dej-adisai, 1997) แต่สารที่เหลืออีก 3 ชนิดยังไม่พบรายงานว่ามีพบในพืชชนิดนี้

ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของ lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นด้วย mutagen ซึ่งเป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารจากธรรมชาติในการกด mutagenic activity ของ mutagen กำลังเป็นที่สนใจ และแพร่หลาย เนื่องจากมีแนวคิดที่ว่า สารที่มีฤทธิ์เหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็น immunosuppressant กับโรคที่เป็น autoimmune disease เช่น rheumatoid arthritis และ โรคอื่น ๆ ที่เป็นการอักเสบเรื้อรังที่เกิดจากภาวะภูมิคุ้มกันไวเกินไป เช่น โรคภูมิแพ้ บางชนิดเป็นต้น (You et al., 1998) ยิ่งสารจากธรรมชาติ หรือสมุนไพรใดที่ภาวะปกติไม่กระตุ้นหรือยับยั้งการแบ่งตัวของ lymphocyte แต่ในสภาวะที่มีสาร mutagen มากกระตุ้น กลับยับยั้งฤทธิ์กระตุ้นของ mutagen นั้น สารจากธรรมชาติ หรือสมุนไพรนั้นจะมีฤทธิ์ที่เรียกว่าเป็น immunomodulator และคาดว่าจะเป็นตัวยาที่ดีในการที่จะนำมาใช้รักษาโรคภูมิแพ้ต่าง ๆ เนื่องจากมีแนวคิดที่ว่า สมุนไพรเหล่านั้นสามารถปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายมนุษย์ ซึ่งสอดคล้องกับภูมิปัญญาของการแพทย์แผนไทยที่มีการนำสมุนไพรบางชนิดมาใช้เป็นยาบำรุงธาตุ และเป็นยาอายุวัฒนะ

จากการทดสอบผลต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell proliferation ที่ถูกกระตุ้นด้วย phytohaeagglutinin (PHA) ของสารสกัดหยาบ และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ พบว่า homorapanone จะมีผลในการยับยั้งการแบ่งตัวดีที่สุด คือมีค่า EC_{50} เท่ากับ 20.2 μ g/ml รองลงมาคือ lucidin- ω -methyl ether (EC_{50} = 76.8 μ g/ml) ซึ่งสอดคล้องกับผลต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell ของสารสกัดหยาบที่ให้สารบริสุทธิ์ของสารทั้ง 2 ชนิดนี้ คือ n-hexane extract ของถอบแถบ

น้ำ ($EC_{50} = 35.4 \mu\text{g/ml}$) และ methanol extract ของรากเหลือง ($EC_{50} = 193.0 \mu\text{g/ml}$) ตามลำดับ ในกรณีนี้จะเห็นได้ว่า สารบริสุทธิ์มีฤทธิ์แรงกว่าสารสกัดหยาบ

เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell proliferation ที่ถูกกระตุ้นด้วย phytohaeagglutinin (PHA) ของสารสกัดหยาบ และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ของสมุนไพรแต่ละชนิด และสารสกัดหยาบแต่ละส่วน พบว่า :-

1. สารสกัดหยาบด้วย n-hexane ของถอบแถบน้ำ ($EC_{50} = 35.4 \mu\text{g/ml}$) มีฤทธิ์อ่อนกว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ homorapanone ($EC_{50} = 20.2 \mu\text{g/ml}$) ซึ่งเป็นสารหลักที่แยกได้จากสารสกัดหยาบส่วนนี้

2. สารสกัดหยาบด้วย methanol ของถอบแถบน้ำ กลับมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของ T-cell ในขณะที่สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ bergenin แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวน้อย ($EC_{50} = 819.7 \mu\text{g/ml}$) ซึ่งค่อนข้างสอดคล้องกับฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ และคาดว่า มีสารอื่นที่อยู่ในสารสกัดหยาบด้วย methanol ของถอบแถบน้ำ ที่ไม่สามารถแยกได้ มีฤทธิ์เสริมฤทธิ์การกระตุ้นการแบ่งตัวของ T-cell ของ PHA เลยทำให้ฤทธิ์รวมของสารสกัดหยาบในส่วนนี้ออกมาเป็นฤทธิ์ของการกระตุ้นมากกว่าฤทธิ์ในการยับยั้ง

3. สารสกัดหยาบด้วย n-hexane ของเถาอิกุย ($EC_{50} = 154.4 \mu\text{g/ml}$) มีฤทธิ์ดีกว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ 3-docosanoyl lupeol ($EC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$), 3-acetyl lupeol ($EC_{50} = 861.0 \mu\text{g/ml}$) และ lupeol ($EC_{50} = 478.9 \mu\text{g/ml}$) โดยเฉพาะ 3-docosanoyl lupeol ซึ่งเป็นสารหลักที่แยกได้จากสารสกัดหยาบส่วนนี้ ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัว เป็นที่น่าสังเกตว่า ในบรรดาสารบริสุทธิ์ที่ได้ทั้ง 3 ชนิด สารที่มีขนาด molecule เล็กที่สุด (lupeol) จะให้ฤทธิ์ดีที่สุดในขณะที่สารที่มีขนาด molecule ใหญ่สุด จะให้ฤทธิ์อ่อนที่สุด หรือไม่มีฤทธิ์ เหตุที่เป็นเช่นนี้คาดว่า เกิดจากการตกตะกอนของสารบริสุทธิ์ในขณะที่น่าไป co-culture กับ T-cell เนื่องจาก media ที่ใช้เลี้ยง T-cell จะมีน้ำอยู่สูง และสารบริสุทธิ์เหล่านี้เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ ยังมีขนาดโมเลกุลโตเท่าใด ความสามารถในการละลายน้ำก็ยิ่งน้อยลงเท่านั้น ซึ่งเป็นเหตุผลที่พบว่าใน well ที่มี 3-docosanoyl lupeol จะเกิดการตกตะกอนมากที่สุด จึงทำให้สารตัวนี้มีฤทธิ์อ่อนที่สุด

4. สารสกัดหยาบด้วย methanol ของรากเหลือง ($EC_{50} = 193.0 \mu\text{g/ml}$) มีฤทธิ์อ่อนกว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ lucidin- ω -methyl ether ($EC_{50} = 76.8 \mu\text{g/ml}$), rubiadin ($EC_{50} = 101.6 \mu\text{g/ml}$) และ rubiadin-1-methyl ether ($EC_{50} = 170.2 \mu\text{g/ml}$) lucidin- ω -methyl ether ซึ่งเป็นสารหลักที่แยกได้จากสารสกัดหยาบส่วนนี้ เป็นสารที่ให้ฤทธิ์ดีที่สุด

เมื่อนำสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์เลี้ยงร่วมกับ T-cell โดยที่ไม่มีการเติม PHA ซึ่งเป็น mutagen พบว่า สารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์เหล่านี้ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของ T-cell อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าในภาวะปกติ สารจากสมุนไพรเหล่านี้ ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของ T-cell แต่เมื่อใดก็ตาม ที่มี mutagen มากกระตุ้นการแบ่งตัวของ T-cell สารเหล่านี้จะไปยับยั้งฤทธิ์กระตุ้นของ mutagen นั้น จากการวิจัยนี้ยังไม่สามารถระบุกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell ของสารเหล่านี้ได้ แต่ความเป็นไปได้ที่การออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell ที่ถูกกระตุ้น

ด้วย PHA ของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์เหล่านี้ โดยไปจับกับ PHA โดยตรง ซึ่งทำให้ PHA ไม่สามารถแสดงฤทธิ์เป็น mutagen ได้ ความเป็นไปได้และเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาวิจัยต่อไป

ยังไม่พบรายงานฤทธิ์ต่อ T-cell proliferation ของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ แต่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางด้านอื่น ๆ เช่น มีรายงานว่า β -amyrin และ lupeol มีฤทธิ์ในการต้านอักเสบในใบหูของหนูถีบจักรที่ถูกทำให้เกิดการอักเสบด้วย 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate ด้วยค่า ID_{50} เท่ากับ 0.4 และ 0.6 mg/ear ตามลำดับ (Akihisa *et al.*, 1996) มีรายงานว่า β -sitosterol มีฤทธิ์ในการต้านอักเสบ (Delporte *et al.*, 1998.) stigmasterol มีฤทธิ์ในการต้านอักเสบ และแก้ปวดในหนูถีบจักรที่ทำให้เกิดการปวด (nociception) ด้วย acetic acid และ formalin (Santos *et al.*, 1995) สารผสมระหว่าง β -sitosterol (66%) กับ stigmasterol (34%) ที่แยกได้จากเมล็ดสะตอ มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดในหนูขาว (Jamaluddin *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า β -sitosterol มีฤทธิ์เป็น antitumor promoting activity เมื่อทดสอบด้วยวิธี Epstein-Barr virus-early antigen (EBV-EA) activation in Raji cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate ซึ่งเป็น tumor promotor (Guevara *et al.*, 1999.) จะเห็นได้ว่าสารที่แพทย์แผนไทยภาคใต้มีการนำเอามาใช้ ซึ่งจากการวิจัยนี้พบว่ามีสาร β -amyrin, β -sitosterol และ stigmasterol และ เกาอิกุย ซึ่งจากการวิจัยพบว่ามีสาร lupeol มาใช้เป็นยาบำรุงธาตุ แก้ท้องเสีย และรักษาโรคผิวหนัง ก็คงมีความสอดคล้องกับสารเคมีที่พบ และรายงานฤทธิ์ในการเป็นยาด้านการอักเสบของสารเหล่านี้และฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell ที่ได้จากการวิจัยนี้ เนื่องจากความหมายของการเป็นยาบำรุงธาตุ แก้ท้องเสีย และรักษาโรคผิวหนัง ส่วนหนึ่งจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดการอักเสบในร่างกายมนุษย์

มีรายงานว่า rubiadin และ rubiadin-1-methyl ether มีฤทธิ์เป็น antimalarial (Likhitwitayawuid *et al.*, 1999) และ lucidin-O-methyl ether มีฤทธิ์ cytotoxic ต่อ KB cell (ED_{50} = 0.62 μ g/ml) (Chang and Lee, 1984) แต่ยังไม่พบรายงานของสารเหล่านี้ต่อการแบ่งตัวของ T-cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA การที่มันมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell อาจเนื่องมาจากตัวมันเองมีฤทธิ์ cytotoxic ต่อเซลล์มะเร็ง

มีการศึกษาพบว่า bergenin มีฤทธิ์เป็นป้องกันเซลล์ตับถูกทำลายด้วย carbon tetrachloride ในหนูขาว (Lim *et al.*, 2000) ป้องกันเซลล์ตับในหนูขาวที่ถูกทำลายด้วย galactosamine โดยยับยั้งการปลดปล่อยน้ำย่อย glutamic pyruvic transaminase และ sorbital dehydrogenase และยังมีผลไปเพิ่มการสังเคราะห์ RNA (Lim *et al.*, 2000) และยังมีการศึกษาที่แสดงว่าการที่ bergenin มีฤทธิ์ป้องกันการเป็นพิษต่อตับที่ทำให้ตับเป็นพิษด้วย carbon tetrachloride เป็นการออกฤทธิ์ผ่าน glutathione-mediated detoxication และด้านฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ (Kim *et al.*, 2000) นอกจากนี้ bergenin ยังมีฤทธิ์ต้านไวรัส HIV อีกด้วย ในการทดสอบแบบ *in vitro* (Piacente *et al.*, 1996) ดังนั้นจากการที่สาร bergenin มีฤทธิ์เหล่านี้ จึงเป็นการสอดคล้องกับการใช้ของแพทย์แผนไทยภาคใต้ที่นำถอบแถบนำมาใช้เป็นยาบำรุงธาตุที่มีความ

หมายในเชิงการเป็นยาอายุวัฒนะ แม้ว่าตัวสาร bergenin เองจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell ได้น้อยก็ตาม แต่การที่ตัวมันเองมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และป้องกันตับถูกทำลายโดยสารพิษอื่น ก็เป็นเหตุผลที่ดีในการใช้เป็นยาอายุวัฒนะได้

ยังไม่พบรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยาของ homorapanone แต่พบรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยาของสารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกัน และเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ได้แก่ embelin และ rapanone ซึ่งพบว่าเป็นพิษต่อปลา *Tilapia nilotica* (Gomez et al., 1989) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ardisianone A และ ardisianone B ซึ่งเป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับ homorapanone และเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน มีฤทธิ์เป็น 5-lipoxygenase inhibitor (Fukuyama et al., 1993) และจากการวิจัยนี้พบว่า homorapanone ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม quinone มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA การศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการที่จะศึกษาต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากสารตัวนี้เป็นสารหลักพบในปริมาณที่ค่อนข้างสูงจากส่วนสกัดด้วย n-hexane ของลำต้นถอบแถบน้ำ

จากการวิจัยเรื่องนี้สรุปได้ว่า มีสมุนไพรหลายชนิดที่ยังไม่มีรายงานการศึกษาค้นคว้าประกอบของสารเคมีจากสมุนไพรชนิดนั้นมาก่อน เช่น ถอบแถบน้ำ เถาอิคูย และ เถามะตุก และยังไม่พบรายงานฤทธิ์ต่อการแบ่งตัวของ T-cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ และจากฤทธิ์ดังกล่าวและจากข้อมูลการรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยาอื่น ๆ ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ พบว่าสอดคล้องกับการใช้สมุนไพรเหล่านั้นเป็นยาบำรุงธาตุ ยาอายุวัฒนะ ขับน้ำเหลืองเสีย และรักษาโรคผิวหนัง โดยแพทย์แผนไทยภาคใต้

เอกสารอ้างอิง

- ชัชชัย เชื้อประไพศิลป์. 2536. การรักษาโรคผิวหนังที่พบบ่อย แมนโปร คอมพิวเตอร์กราฟฟิค กรุงเทพฯ พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 1.
- นิรนาม. 2540. จากการสำรวจสมุนไพรร่วมกับแพทย์แผนไทยในเขตจังหวัดสงขลา สตูล ยะลา และปัตตานี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537-2540 จำนวน 5-6 ครั้ง
- เอมอร โสมนะพันธ์, นพมาศ สรรพคุณ, วิภา จิรัจรรย์ยากุล, และอ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2533. ยาจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ หน้า 156-175.
- Ahmed, W., Ahmad, Z. and Malik, A. 1992. Stigmaterol Galactoside from *Rhynchosia minima*, **Phytochemistry**, 31(11) : 4038-4039.
- Akihisa, T., Yakukawa, K., Oinuma, H., Kasahara, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaki, K. and Tamura, T. 1996. Triterpene Alcohols from the Flowers of Compositae and Their Anti-Inflammatory Effects, **Phytochemistry**, 43(6) : 1255-1260.
- Alam, M.S., Chopra, N., Ali, M. and Niwa, M. 1996. Oleanen and Stigmaterol Derivatives from *Ambroma augusta*, **Phytochemistry**, 41(4) : 1197-1200.
- Banthorpe, D.V. and White, J.J. 1995. Novel Anthraquinones from Undifferentiated Cell Cultures of *Galium verum*, **Phytochemistry**, 38(1) : 107-111.
- Chang, P. and Lee, K. 1984. Cytotoxic Antileukemic Anthraquinones from *Morinda parvifolia*, **Phytochemistry**, 23(8) : 1733-1736.
- Dej-adisai, S. 1997. Quinones from Roots of *Prismatomeris sessiliflora* and *Diospyros montana*, **Master Thesis**, Chulalongkorn University, pp. 56-59.
- Delporte, C., Backhouse, N., Negrete, R., Salinas, P., Rivas, P., Cassels, B.K. and San Feliciano, A. 1998. Antipyretic, Hypothermic and Anti-inflammatory Activities and Metabolites from *Solanum ligustrinum* Lood, **Phytotherapy Research**, 12(2) : 118-122.
- El-Emary, N.A. and Backheet, E.Y. 1998. Three Hydroxymethylanthraquinone Glycosides from *Rubia tinctorum*, **Phytochemistry**, 49(1) : 277-279.
- El-Garmal, A.A., Takeya, K., Itokawa, H., Halim, A.F., Amer, M.M., Saad, H.E.A. and Awad, S.A. 1996. Anthraquinones from the polar Fractions of *Galium sinaicum*, **Phytochemistry**, 42(4) : 1149-1155.
- Fukuyama, Y., Kiriya, Y., Okino, J., Kodama, M., Iwaki, H., Hosozawa, S. and Matsui, K. 1993. Naturally occurring 5-lipoxygenase inhibitor. II. Structures and syntheses of ardisianones A and B, and maesanin, akenyl-1,4-benzoquinones

- from the rhizome of *Ardisia japonica*, **Chem. Pharm. Bull.** 41(3) : 561-565.
- Gaydou, E.M., Faure, R. and Wollenweber, E. 1996. β -Amyrin Acetate Epoxide from *Canarina canariensis*, **Phytochemistry**, 42(4) : 1115-1118.
- Gomez, E., De La Cruz-Giron, O., De La Cruz, A.A., Joshi, B.S., Chittawong, V. and Miles, D.H. 1989. Toxicants from mangrove plants, V. Isolation of the piscicide, 2-hydroxy-5-methoxy-3-undecyl-1,4-benzoquinone (5-O-methylembelin) from *Aegiceras corniculatum*, **J. Nat. Prod.** 52(3) : 649-651.
- Guevara, A.P., Vargas, C., Sakurai, H., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Maoka, T., Kozuka, M., Ito, Y., Tokuda, H. and Nishino, H. 1999. An Antitumor Promotor from *Moringa oleifera*, **Mutation Research**, 440 : 181-188.
- Halim, A.F., Zaghoul, A.M., Ebaid, K.A. 1983. **Egypt. J. Pharm. Sci.**, 31 : 99-105.
- Itokawa, H., Mihara, K. and Takeya, K. 1983. Studies on a Novel Anthraquinone and Its Glycosides Isolated from *Rubia cordifolia* and *R. akane*, **Chem. Pharm. Bull.**, 31(7) : 2353-2358.
- Jamaluddin, F., Mohamed, S. and Lajis, M.N. 1994. Hypoglycemic effect of *Parkia speciosa* seeds due to the synergistic action of β -sitosterol and stigmasterol, **Food Chemistry**, 49(4) : 339-345.
- Jongsuwat, Y. 1981. "Antileukemic Activity of *Acanthus illicifolius*," **Master Thesis**, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, 151 pp.
- Kim, H., Lim, H., Chung, M. and Kim, Y. 2000. Antihepatotoxic activity of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated hepatocytes, **J. Ethnopharmacology**, 69 : 79-83.
- Likhitwitayawuid, K., Dej-adisai, S., Jongbunprasert, V. and Krungkrai, J. 1999. Antimalarials from *Stephania venosa*, *Prismatomeris sessiliflora*, *Diospyros montana* and *Murraya siamensis*, **Planta Med.**, 65 : 754-756.
- Lim, H., Kim, H., Choi, H., Oh, S. and Choi, J. 2000. Hepatoprotective effects of bergenin, a major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated rats, **J. Ethnopharmacology**, 72 : 469-474.
- Lim, H., Kim, H., Chung, M. and Kim, Y. 2000. Protective effects of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on D-galactosamine-intoxicated rat hepatocytes, **J. Ethnopharmacology**, 70 : 69-72.
- Lin, C. and Tome, W. 1988. Antihepatotoxic Principles of *Sambucus formosana*, **Planta Med.**, 54 : 223-224.

- Lu, Y., Xu, P., Chen, Z. and Liu, G. 1998. Anthraquinone Glycosides from *Rhynchotechum vestitum*, **Phytochemistry**, 49(4) : 1135-1137.
- Lund, A., Lemmich, J., Adersen, A. and Olsen, C.E. 1997. Benzoquinones from *Embelia angustifolia*, **Phytochemistry**, 44(4) : 679-681.
- Matsunaga, S., Tanaka, R. and Akagi, M. 1988. Triterpenoids from *Euphorbia maculata*, **Phytochemistry**, 27(2) : 1437-1438.
- Mebe, P.P. and Makuhunga, P. 1992. 11-(E)-p-Coumaric Acid Ester of Bergenin from *Peltophorum africanum*, **Phytochemistry**, 31(9) : 3286-3287.
- Piacente, S., Pizza, C., De Tommasi, N. and Mahmood, N. 1996. Constituents of *Ardisia japonica* and their in vitro anti-HIV activity, **J. Nat. Prod.** 59 : 565-569.
- Razdan, T.K., Kachroo, P.K., Qurishi, M.A., Kalla, A.K., Waight, E.S. 1996. **Phytochemistry**, 41: 1437-1438.
- Reynolds, W.F., McLean, S., Poplawski, J., Enriquez, R.G., Escobar, L.I. and Leon, I. 1986. **Tetrahedron**, 42(13) : 3419-3428.
- Rojanapo, W., Tepsuwan, A. and Siripong, P. 1990. "Mutagenicity and Antimutagenicity of Thai Medicinal Plants," **Basic Life Sci.**, 52, 447-452.
- Saijo, R., Nonaka, G. and Nishioka, I. 1990. Gallic Acid Esters of Bergenin and Norbergenin from *Mallotus japonicus*, **Phytochemistry**, 29(1) : 267-270.
- Santos, A.R.S., Niero, R., Filho, V.C., Yunes, R.A., Pizzolatti, M.G., Delle Monache, F. and Calixto, J.B. 1995. Antinociceptive Properties of Steroids Isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in Mivce, **Planta Med.**, 61(4) : 329-332.
- Schmidt, J., Lien, N.T., Khoi, N.H., Adam, G. 1983. **Phytochemistry**, 22 : 1032-1033.
- Seo, S., Tomita, Y. and Tori, K. 1975. Carbon-13 NMR Spectra of URS-12-Enes and Application to Structural Assignments of Components of *Isodon japonicus* HARA Tissue Cultures, **Tetrahedron Lett.**, 1 : 7-10.
- Shiojima, K., Suzuki, H., Kodera, N., Kubota, K., Tsushima, S., Ageta, H., Chang, H. and Chen, Y. 1994. Composite Constituent : Novel Triterpenoid, 17-Epi-Lupenyl Acetate, from Aerial Parts of *Ixeris chinensis*, **Chem. Pharm. Bull.**, 42(10) : 2193-2195.
- Sholichin, M., Yamasaki, K., Kasai, R. and Tanaka, O. 1980. ¹³C Nuclear Magnetic Resonance of Lupane-Type Triterpenoids, Lupeol, Betulin and Betulinic Acid, **Chem. Pharm. Bull.** 28(3) : 1006-1008.
- Sobrinho, D.C., Hauptli, M.B., Appolinario, E.V., Kollenz, C.L.M., De Carvalho, M.G., Braz-Filho, R. 1991. **J. Braz. Chem. Soc.**, 2 : 15-21.

Sritularak, B. 1998. Chemical Constituents of *Artocarpus lakoocha* and *A. Gomezianus*,
Master Thesis, Chulalongkorn University, pp. 77-78.

Taneyama, M., Yoshida, S., Kobayashi, M. and Hasegawa, M. 1983. Isolation of
Norbergenin from *Saxifraga stolonifera*, **Phytochemistry**, 22(4) : 1053-1054.

You, K.M., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. and Kim, H.P. 1998. Vitexicarpin, a
flavonoid from the fruits of *Vitex rotundifolia*, inhibits mouse lymphocyte proliferation
and growth of cell lines *in vitro*, **Planta Med.**, 64 : 546-550.

output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- 1) Subhadhirasakul, S., Takayama, H, Kitajima, M. and Aimi, N. 2000.
Triterpenoid from Thai Medicinal Plants, *Willughbeia firma*, Natural Medicines, 54(3):155-157.
- 2) Reanmongkol, W., Subhadhirasakul, S., Muneemonai, K., Nathong, K., Rangkla, G., Takayama, H. 2000. Antipyretic Activity of *Connarus semidecandrus* Extract in Rats, Songklanakarin J. Sci. Technol., 22(2): 191-198.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

-เชิงวิชาการ

การศึกษาถึงองค์ประกอบของสารเคมีในสมุนไพรที่ยังไม่มีรายงานของการศึกษาด้านนี้มาก่อนในสมุนไพรนั้น ๆ เป็นข้อมูลใหม่ที่นำมาใช้ในการเรียนการสอนสมุนไพรไทย แก่นักศึกษาเภสัชศาสตร์ เนื่องจากสมุนไพรเหล่านี้ แพทย์แผนไทยภาคใต้ได้มีการใช้รักษาผู้ป่วยตามปกติอยู่แล้ว

-การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่น ๆ ทั้งในและต่างประเทศ

เชื่อมโยงการวิจัยร่วมกับ Associate Prof. Hiromitsu Takayama, Chiba University, Japan โดยทางฝ่าย Assoc. Prof. Takayama จะเป็นผู้วัด NMR และ MS Spectra ส่วนตัวผู้วิจัยเองจะเป็นผู้วิเคราะห์และหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้ ออกความเห็นและวางแผนในการพิสูจน์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร

เชื่อมโยงการวิจัยร่วมกับ พญ. สุวิณา รัตนชัยวงศ์ ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โดยทางฝ่าย พญ. สุวิณา จะเป็นผู้ดูแลและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อ T-cell proliferation

3. ผลงานวิจัยที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ :-

- 1) Subhadhirasakul, S., Ratachaiwong, S., Noipa, S., Takayama, H., Kitajima, M. and Aimi, N. 2000. "Chemical and bio-activity investigation of Thai medicinal plant, *Willughbeia firma*", Proceeding of 18th Asain Congress of Pharmaceutical Sciences and 6th Pharmacy Australia Congress, Hilton Hotel Sydney, Sydney, Australia, 27-30 October, 2000, p. 50.
- 2) Subhadhirasakul, S., ., Takayama, H., Kitajima, M. and Aimi, N. 2000. 'Triterpenoids from *Willughbeia firma*', Preceeding of NRCT-JSPS

Core University System on Pharmaceutical Sciences, The Fifth Joint Seminar :
Natural Medicines, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand,
15-17 November, 2000, p. 117.

ภาคผนวก

reprint

1. Subhadhirasakul, S., Takayama, H, Kitajima, M. and Aimi, N. 2000. Triterpenoid from Thai Medicinal Plants, *Willughbeia firma*, Natural Medicines, 54(3):155-157.
2. Reanmongkol, W., Subhadhirasakul, S., Muneemonai, K., Nathong, K., Rangkla, G., Takayama, H. 2000. Antipyretic Activity of *Connarus semidecandrus* Extract in Rats, Songklanakarin J. Sci. Technol., 22(2): 191-198.

manuscript

1. Sanan Subhadhirasakul, Suvina Ratanachaiwong, Kusumarn Noipa, Songsri Kaewsuwan and Hiromitsu Takayama. 2001. Phytochemical and bio-activity investigations of *Prismatomeris malayana* and *Connarus semidecandrus*, **Pharmaceutical Biology**, .. :

Triterpenoids from Thai Medicinal Plant, *Willughbeia firma*

Sanan SUBHADHIRASAKUL,^{*a} Hiromitsu TAKAYAMA,^b Mariko KITAJIMA^b and Norio AIMI^b

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand.

^bFaculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Chiba, 263-8522, Japan.

(Received February 29, 2000)

From the stems of *Willughbeia firma* Bl., collected in southern Thailand, a fatty acid ester of a triterpenoid, 3-docosanoyl lupeol (**1**), was isolated as a major component along with lupeol and acetyl lupeol. The structure of **1** was determined by spectroscopic analysis and by synthesizing **1** from natural lupeol and docosanoyl chloride.

Keywords: triterpenoid, docosanoyl lupeol, *Willughbeia firma*, Apocynaceae

Introduction

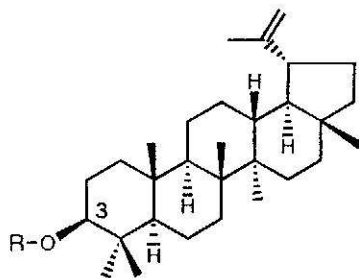
Willughbeia firma Bl. (Apocynaceae) is a woody climber of a Thai medicinal plant. The latex of the plant is used for dressing sores and as a smear on yaws. The stem is used in various mixtures as a remedy for dysentery, affection of the liver and yaws, with other herbs. The root is used internally as a remedy for jaundice, heartburn and dysentery.¹⁾ In addition, a stem decoction of the plant has also been widely used for the therapeutic treatment of exanthematous fever and atopic dermatitis by the traditional doctors in southern Thailand. Chemical investigation of this plant has not yet been reported.

Results and Discussion

From an *n*-hexane extract of the stems of *W. firma*, a triterpenoid, 3-docosanoyl lupeol (**1**), was isolated as a major component along with lupeol (**2**) and 3-acetyl lupeol (**3**). The structures of **2** and **3** were identified by the comparison of their physical and spectral data with those reported in the literature.^{2,3,4,5)}

Compound **1** was obtained as a white amorphous powder, $[\alpha]_D^{19} +26.6$ ($c = 0.56$, CHCl_3). The ¹H-NMR spectrum of **1** showed six tertiary methyls (δ 0.79-1.03), one isopropenyl group (δ 1.68, 3H, s; 4.69, 1H, d, $J =$

2.4 Hz; 4.57, 1H, m), and a methine proton (δ 4.47, 1H, dd, $J=10.7$ and 5.5 Hz) bearing an oxygen function, which constituted a characteristic feature of triterpenoid compounds. The ¹H-NMR spectra of **1** and lupeol acetate (**3**) were very similar except that **1** gave no acetyl signal (3H, s, δ 2.04) which **3** gave and, instead, showed signals at δ 2.28 (2H, t, $J=7.3$ Hz), at around δ 1.25 (ca. 38H, m), and at δ 0.88 (3H, t, $J=6.8$ Hz), suggesting the presence of a saturated long-chain alkane residue in **1**. The proton signal of H-3 in **3** (δ 4.47, 1H, dd) and the corresponding signal in **1** (δ 4.47, 1H, dd) were observed at the same position, indicating that compound **1** had an



- 1** : R = CO-CH₂(CH₂)₁₉CH₃, docosanoyl lupeol
2 : R = H, lupeol
3 : R = COCH₃, acetyl lupeol

ester function at the C-3 position. The ^{13}C -NMR signals caused by the triterpenoid moiety of the compounds **1** and **3**²⁾ were almost identical, suggesting that **1** had the lupeol skeleton. In addition, the carbon signals of an ester carbonyl observed at δ 173.70 ppm, of internal methylene carbons of straight-chain alkane at δ 22.69-34.86 ppm, and terminal methyl group at δ 14.12, showed that **1** should have a saturated long-chain fatty acid ester group.⁶⁾ The HR-MS of **1** showed a molecular ion (M)⁺ at m/z 748.7067 (100%) leading to the chemical formula $\text{C}_{52}\text{H}_{92}\text{O}_2$ indicating the possibility that the fatty acid was docosanoic acid [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$]. Esterification of lupeol (**2**) with docosanoyl chloride gave docosanoyl lupeol, whose spectroscopic data including ^1H - and ^{13}C -NMR, FAB-MS, and the optical rotation and TLC profiles were completely identical with those of the natural product **1**. Therefore, **1** was concluded to be 3-docosanoyl lupeol. Compound **1** has been isolated from nature as a mixture of esters composed of several fatty acids and lupeol.⁷⁾ However, this is the first report on the isolation of docosanoyl lupeol as a single natural product.

Experimental

The instruments used in this study were as follows; NMR spectra were recorded at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C on a JEOL JNM-GSX A500 spectrometer; optical rotation was measured on a JASCO DIP-140 polarimeter; MS were recorded on a JEOL JMS-HX 101 and a JMS-AM 20 spectrometers; IR spectrum was recorded on a JASCO IR-810 infrared spectrophotometer; TLC was performed on precoated Merck Silica Gel 60 GF₂₅₄ plates and the spots were detected under UV light. Column chromatography was carried out on Merck Silica gel 60, 230-400 mesh for flash chromatography. Abbreviations used are : singlet (s), doublet (d), multiplet (m).

Plant material Stems of *Willughbeia firma* Bl. (Apocynaceae) were collected in March 1998 in Songkhla Province, Thailand. The plant was identified by the comparison of the plant with the herbarium specimens in the PSU Herbarium (Specimen No.

0006231), Department of Biology, Faculty of Sciences, Prince of Songkla University. A voucher specimen of the plant material has been deposited at the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand.

Extraction and separation of triterpenoids

Dried coarsely powdered stems of *W. firma* (1100 g) were macerated with 3.0 L of *n*-hexane for four days and the mixture was then filtered. The residue was remacerated with *n*-hexane (3.0 L) and the extraction was repeated four times. The filtrates were combined and the solvent was evaporated off to give a *n*-hexane extract 14.2 g. The *n*-hexane extract (3.0 g) was introduced onto a silica gel column. The column was eluted with 5% AcOEt/*n*-hexane 2000 ml, 10% AcOEt/*n*-hexane 1500 ml, 5% AcOEt/ CHCl_3 1000 ml, 5% MeOH/ CHCl_3 1500 ml and 20% MeOH/ CHCl_3 500 ml, and the fractions (75 ml each) were collected. Fractions 3-4 were combined (1218 mg) and then subjected to a silica gel column chromatography eluting with 1% AcOEt/*n*-hexane to give compound **1** (844 mg). Fraction 5 (175.3 mg) was further purified by column chromatography using 1.5% AcOEt/*n*-hexane as eluting solvent to give compound **2** (76.2 mg). Fractions 21-23 were combined (160 mg), and purified first by preparative TLC using CHCl_3 saturated with 25% ammonia water:AcOEt:*n*-hexane (20:1:79) as developing solvent and then by preparative TLC using benzene:AcOEt:*n*-hexane (30:1.5:68.5) as developing solvent to give compound **3** (102 mg).

3-Docosanoyl lupeol (1) White amorphous powder. mp. 76.5 ~ 77.5°C, $[\alpha]_D^{19} +26.6^\circ$ ($c = 0.56$, CHCl_3). IR (KBr) cm^{-1} : 2930, 2850, 1730, 1640, 1460, 1380, 1220, 1170, 1120, 980, 880, 720. ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 4.69 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-29), 4.57 (1H, m, H-29), 4.47 (1H, dd, $J = 10.7, 5.5$ Hz, H-3), 2.38 (1H, ddd, $J = 11.3, 11.3, 5.8$ Hz, H-19), 1.68 (3H, s, H₃-30), 1.03 (3H, s, H₃-26), 0.94 (3H, s, H₃-27), 0.85 (3H, s, H₃-25), 0.84 (6H, s, H₃-23 and H₃-24), 0.79 (3H, s, H₃-28), 2.28 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H₂-2'), 0.88 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H₃-22'). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 38.37 (C-1), 23.74 (C-2), 80.60 (C-3), 37.83

(C-4), 55.37 (C-5), 18.20 (C-6), 34.20 (C-7), 40.84 (C-8), 50.33 (C-9), 37.08 (C-10), 20.93 (C-11), 25.09 (C-12), 38.03 (C-13), 42.82 (C-14), 27.43 (C-15), 35.56 (C-16), 42.99 (C-17), 48.28 (C-18), 48.00 (C-19), 150.96 (C-20), 29.82 (C-21), 39.99 (C-22), 27.96 (C-23), 16.57 (C-24), 16.17 (C-25), 15.97 (C-26), 14.51 (C-27), 17.99 (C-28), 109.34 (C-29), 19.28 (C-30), 173.70 (C-1'), 34.86 (C-2'), 25.17 (C-3'), 29.17-31.92 (C-4' ~ C-20'), 22.69 (C-21'), 14.12 (C-22'). HR-MS calcd for $C_{52}H_{92}O_2$; 748.7064. Found 748.7067.

Condensation of lupeol and docosanoyl chloride

Docosanoyl chloride (0.019 mmol) was freshly prepared from docosanoic acid and thionyl chloride and its CH_2Cl_2 solution was added to a solution of lupeol (5.3 mg, 0.012 mmol) in dry CH_2Cl_2 and dry pyridine (5 μ l, 0.012 mmol) at 0 °C under argon. The mixture was stirred at room temperature for 16.5 hr. Dry pyridine (5 μ l, 0.012 mmol) and a CH_2Cl_2 solution of docosanoyl chloride (0.006 mmol) were further added to the reaction mixture at 0°C and then the mixture was stirred at room temperature for 1.5 hr. The reaction mixture was diluted with $CHCl_3$ and cold water and the whole was extracted with $CHCl_3$. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, and the solvent was removed by evaporation. The residue was purified by SiO_2 column chromatography to afford 6.3 mg of 3-docosanoyl lupeol. $[\alpha]_D^{19} +28.6$ ($c = 0.315$, $CHCl_3$). The 1H - and ^{13}C -NMR, and MS spectra, and the TLC

profiles were identical with those of natural **1**.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Thailand Research Fund for financial support of this work.

References

- 1) Perry, L. M. (ed), "Medicinal Plants of East and Southeast Asia : Attributed Properties and Uses" The MIT Press, Massachusetts, 1980. p.32.
- 2) Sholichin, M., Yamasaki, K., Kasai, R., Tanaka, O., *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1006-1008 (1980).
- 3) Shiojima, K., Suzuki, H., Kodera, N., Kubota, K., Tsushima, S., Ageta, H., Chang, H., Chen, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 2193-2195 (1994).
- 4) Lin, C., Tome, W., *Planta Med.*, **54**, 223-224 (1988).
- 5) Reynolds, W. F., McLean, S., Poplawski, J., Enriquez, R.G., Escobar, L. I., Leon, I., *Tetrahedron*, **42**, 3419-3428 (1986).
- 6) Razdan, T. K., Kachroo, P. K., Qurishi, M. A., Kalla, A. K., Waight, E. S., *Phytochem.*, **41**, 1437-1438 (1996).
- 7) a) Schmidt, J., Lien, N. T., Khoi, N. H., Adam, G., *Phytochem.*, **22**, 1032-1033, (1983), b) Halim, A. F., Zaghoul, A. M., Ebaid, K. A., *Egypt. J. Pharm. Sci.*, **31**, 99-105, (1983), c) Sobrinho, D. C., Hauptli, M. B., Appolinario, E. V., Kollenz, C. L. M., De Carvalho, M. G., Braz-Filho, R., *J. Braz. Chem. Soc.*, **2**, 15-20, (1991).

Antipyretic activity of *Connarus semidecandrus* extract in rats

Wantana Reanmongkol¹, Sanan Subhadhirasakul²,
Kritawan Muneemonai³, Kaesorn Nathong³,
Gomol Rangkla³, and Hiromitsu Takayama⁴

Abstract

Reanmongkol, W., Subhadhirasakul, S., Muneemonai, K., Nathong, K.,
Rangkla, G., and Takayama, H.

Antipyretic activity of *Connarus semidecandrus* extract in experimental animals
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2000, 22(2) : 191-198

The effects of the methanol extract from the stem of *Connarus semidecandrus* Jack (*C. semidecandrus*) and its constituent, bergenin, on nociceptive response using writhing, hot plate and formalin tests in mice and the antipyretic activity in yeast-induced fever in rats, were examined. Oral administration of *C. semidecandrus* extract (100-400 mg/kg) dose dependently decreased the number of contortions and stretchings induced by acetic acid but not in the heat-induced pain and formalin test in mice. Bergenin (5-20 mg/kg, p.o.) also produced similar but less pronounced effect than the extract. The extract (100-400 mg/kg, p.o.), significantly attenuated fever while bergenin (10-20 mg/kg, p.o.) had no effect on pyrexia induced by yeast. These results suggest that the *C. semidecandrus* extract possesses antipyretic effect which supports its indication for relieving fever but not pain in folk medicine.

Key words : *Connarus semidecandrus*, bergenin, writhing test, antipyretic activity

¹Ph.D (Pharmacology) Asst. Prof., Department of Clinical Pharmacy, ²Ph.D (Chemistry of Natural Products) Asst. Prof., Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, ³Student of Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand, ⁴Ph.D. (Pharmaceutical Chemistry), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan.

Received, 15 September 1999 Accepted, 15 November 1999

บทคัดย่อ

วันทนา เจริญมงคล¹ สนั่น สุภธีรสกุล² กฤตวรรณ มณีโมไนย์³ เกษร ณ ทอง³
โกลม แรงกล้า¹ และ อิโรมิทชี ทากายามา⁴
ผลของสารสกัดจากลำต้นดออบแถบน้ำต่อการลดไข้ในหนูขาว
ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2543 22(2) : 191-198

ได้ทำการทดสอบผลทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเมทานอลจากลำต้นดออบแถบน้ำโดยสังเกตผลของสารสกัด และเบอร์จีนินซึ่งเป็นสารประกอบที่อยู่ในสารสกัดต่อการระงับปวดซึ่งเกิดจากกรดอะเซติก ความร้อน และฟอร์มัลลินในหนูถีบจักร และผลต่อการลดไข้ซึ่งเกิดจากการเหนียวหน้าโดยยีสต์ในหนูขาว เมื่อป้อนสารสกัดจากต้นดออบแถบน้ำ (100-400 มก./กก.) เข้าทางปากในหนูถีบจักร พบว่า สามารถลดจำนวนของการบิดและยึดของลำตัวเมื่อถูกกระตุ้นโดยกรดอะเซติก และผลของสารสกัดจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของสารสกัดที่ใช้ แต่ไม่มีผลต่อการทดสอบด้วยความร้อนและฟอร์มัลลิน เบอร์จีนิน (5-20 มก./กก.) ก็ให้ผลคล้ายกันแต่มีฤทธิ์น้อยกว่าสารสกัด สารสกัด (100-400 มก./กก.) สามารถลดไข้ได้อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่เบอร์จีนินไม่มีผลในการลดไข้ซึ่งเกิดจากการเหนียวหน้าโดยยีสต์ จากผลการทดลองนี้เสนอว่า สารสกัดจากต้นดออบแถบน้ำ มีฤทธิ์ลดไข้ ซึ่งสนับสนุนข้อบ่งชี้ของดออบแถบน้ำ ในการใช้เป็นยาพื้นบ้านสำหรับลดไข้ แต่ไม่มีฤทธิ์แก้ปวด

¹ภาควิชาเภสัชกรรมคลินิก ²ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ ³นักศึกษา ⁴คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112 ⁵คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยชิบะ ประเทศญี่ปุ่น

Connarus semidecandrus Jack (*C. semidecandrus*) is a woody climber, scandent or sarmentose shrub in the family of Connaraceae (Maxwell, 1986). This plant can also be found in Sumatra and Mergui (Ridley, 1922). It is known in local name as "Tob Tab" (Maxwell, 1986). The root decoction of *C. semidecandrus* has been used in folk medicine for treatment of fever (Ridley, 1922). In addition, the stem decoction of *C. semidecandrus* has also been used for various therapeutic treatments of fatigue, pain, and fever and used as laxative by traditional doctors in Songkhla province.

The methanol extract of *C. semidecandrus* has been found to contain bergenin, which is an isocoumarin compound (Robinson, 1980). Bergenin compounds can also be found in many plants and the pharmacological activities of some have been reported. The constituent of *Ardisia japonica*, bergenin, showed antitussive effect and *in vitro* weak anti-HIV activity (Anon, 1973; Piacente, 1996). The extract from *Flueggea microcarpa* also produced antiulcer and antifungal activities (Goel, et al., 1997;

Prithiviraj, et al., 1997). Furthermore, bergenin from the leaves of *Allophylus edulis* var. *edulis* and *gracilis* exhibited antihepatotoxic activity against carbon tetrachloride and galactosamine cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. (Hoffmann-Bohm, et al., 1992).

Although *C. semidecandrus* has been used for a long time as herbal medicine and some pharmacological actions of bergenin have been reported, no pharmacological studies have previously been conducted on analgesic and antipyretic actions of this plant. In the present study, in order to evaluate the potential existence of analgesic and antipyretic activities of the extract obtained from *C. semidecandrus*, we investigated the antinociceptive effects of the extract using the writhing, hot plate and formalin tests in mice, and its antipyretic activity on yeast-induced fever in rats.

Materials and Methods

Plant material

The stems of *Connarus semidecandrus*

Jack (Connaraceae) were collected in March, 1998, from Songkhla province, Thailand. The plant was identified by comparison with herbarium specimens in the PSU Herbarium (Specimen No. SN 182034), Department of Biology, Faculty of Sciences, Prince of Songkla University. A voucher specimen of plant material has been deposited in the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand.

Preparation of the extract from the stems of *Connarus semidecandrus*

The dried coarsely powdered stems of *C. semidecandrus* (800 g) were macerated with 5.0 l of n-hexane for four days and then filtered and evaporated to give a syrupy mass. The marc was remacerated with n-hexane (5.0 l) four times, filtered and evaporated. All syrupy masses were combined to give n-hexane extract 8.28 g. The marc was dried in open air and then was extracted with methanol using the same procedure as described above to give methanolic extract 95.95 g. The methanolic extract was used as the test extract. One gram of the extract was equivalent to 119.94 mg of dried powdered stems of *C. semidecandrus*. All doses were expressed in terms of dried crude extract (mg/kg body weight).

Isolation of bergenin

The methanolic extract of *C. semidecandrus* 10.01 g was introduced onto a silica gel (Merck, Germany; SiO₂, 230-400 mesh ASTM) column. The column was eluted with 10% methanol/chloroform (Merck, Germany) 1,000 ml, 20% methanol/chloroform 5,800 ml, 30% methanol/chloroform 1,800 ml, 50% methanol/chloroform 500 ml and methanol 2,800 ml. Fractions of 75 ml were collected. Fractions 15-77 were combined (1,942 mg) and then was introduced onto a silica gel column using 10% methanol/ethyl acetate as eluting solvent. Fractions of 50 ml were collected. Compound 1 (342.3 mg) was crystallized out by methanol from the fractions 3-9. The compound 1 was then identified as bergenin by comparison of its physical and spec-

tral data with those reported in the literature (Aiyar, et al., 1964; Saijo, et al., 1990).

Animals

All animals used in this study were obtained from the Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom, Thailand. Male Swiss mice of weight ranging from 28-38 g were used for all experiments except for yeast-induced fever test, in which male Wistar rats of weight ranging from 160-200 g were used. The rats were handled for 5-10 min daily for several days before experiments. The animals were housed for at least one week in the laboratory animal room prior to testing. Food and water were given *ad libitum* unless otherwise specified.

Acute toxicity

The 50% lethal dose of the *C. semidecandrus* extract was estimated by the up-and-down method in mice (Bruce, 1985). Doses were adjusted by a constant multiplicative factor; viz. 1.5, for this experiment. The dose for each successive animal was adjusted up or down depending on the previous outcome.

Antinociceptive activity

1. Writhing test

Writhing behaviour was tested, in which 0.6% acetic acid solution (10 ml/kg body weight) was injected intraperitoneally and the number of writhings and stretchings was counted over a 20-min period as previously reported (Koster et al., 1959; Hendershot & Forsaith, 1959). The plant extract (100, 200 and 400 mg/kg), bergenin (5, 10, 20 mg/kg), a reference analgesic drug aspirin (200 mg/kg) or control vehicle (0.5% CMC) was orally administered 30 min before acetic acid.

2. Hot plate test

The hot plate test was carried out according to the method described by Woolfe & MacDonald (1944). Mice were placed on a hot plate maintained at 55 °C ± 1 °C. Latency of nociceptive response such as licking, flicking of a hind limb or jumping was measured. Thirty

minutes after p.o. administration of the test agents except morphine (15 min after administration), the nociceptive response was measured every 15 min over a 60 min period. Morphine sulfate was injected subcutaneously. The cut-off time was 45 sec. Only the mice that showed nociceptive responses within 15 sec were used for the experiments.

3. Formalin test

Thirty minutes after administration of the *C. semidecandrus* extract (100, 200 and 400 mg/kg, p.o.), bergenin (5, 10, 20 mg/kg), aspirin (200 mg/kg, p.o.) or 0.5% CMC, 20 μ l of 2.5% formalin in saline was injected subcutaneously to a hindpaw of the mice. The time spent licking the injected paw was recorded and the data were expressed as total licking time in the early phase (0-5 min) and the late phase (15-30 min) after formalin injection (Hunskaar *et al.*, 1985).

Antipyretic activity

Antipyretic activity of drug was measured by slightly modifying the method described by Adams *et al.* (1968). Male Wistar rats were fasted overnight with water *ad lib* before the experiments. Pyrexia was induced by subcutaneously injecting 20% (w/v) brewer's yeast suspension (10 ml/kg) into the animals' dorsum region. Seventeen hours after the injection, the rectal temperature of each rat was measured using a digital thermometer (SK-1250MC, Sato Keiryoki Mfg. Co., Ltd., Japan). Only rats that showed an increase in temperature of at least 1°C were used for the experiments. Test agent or vehicle was administered orally and the temperature was measured at 1, 2, 3, 4 and 5 hr after drug administration.

Chemicals

The following drugs were used: morphine sulfate, brewer's yeast (AR grade, Sigma Chem. Co., St. Louis, U.S.A.), aspirin (AR grade, Srichand United Dispensary Co., Ltd., Bangkok, Thailand), sodium chloride (AR grade, Carlo Erba, Germany), acetic acid (AR grade, J.T.

Baker Inc., Phillipsburg, U.S.A.), silica gel (SiO₂ 230-400 mesh, ASTM, Merck KGsA, Germany), n-hexane, chloroform, methanol and ethyl acetate (AR grade, Merck KGsA, Germany). *C. semidecandrus* extract, bergenin and aspirin were suspended in 0.5% CMC solution, and administered orally in a constant volume (10 ml/kg for mice and 5 ml/kg for rats) 30 min before the experiments. Morphine sulfate was dissolved in 0.9% sodium chloride solution and administered subcutaneously. All drug solutions were prepared immediately before starting the experiments.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM and analyzed statistically using Student's t-test and paired t-test. A difference was considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Acute toxicity

In the acute toxicity test, signs of toxicity included lethargy, jerk, tachypnea and death. The LD50 value of intraperitoneally injected *C. semidecandrus* extract in mice was 0.63 g/kg.

Effects of *C. semidecandrus* on nociceptive responses

Writhing test

Oral administration of the *C. semidecandrus* (100-400 mg/kg) dose dependently attenuated the number of writhings and stretchings induced by intraperitoneal 0.6% acetic acid (Figure 1). Bergenin (5-20 mg/kg) also exhibited similar effect on inhibition of writhing. The reference drug aspirin (200 mg/kg) also produced significant protective effects towards the acetic acid-induced pain.

Hot plate test

The mean latency of nociceptive responses to thermal stimuli is summarized in Table 1. Neither the *C. semidecandrus* extract (100, 200 and 400 mg/kg, p.o.) nor bergenin (5, 10, 20 mg/kg, p.o.) significantly exerted protective effects on

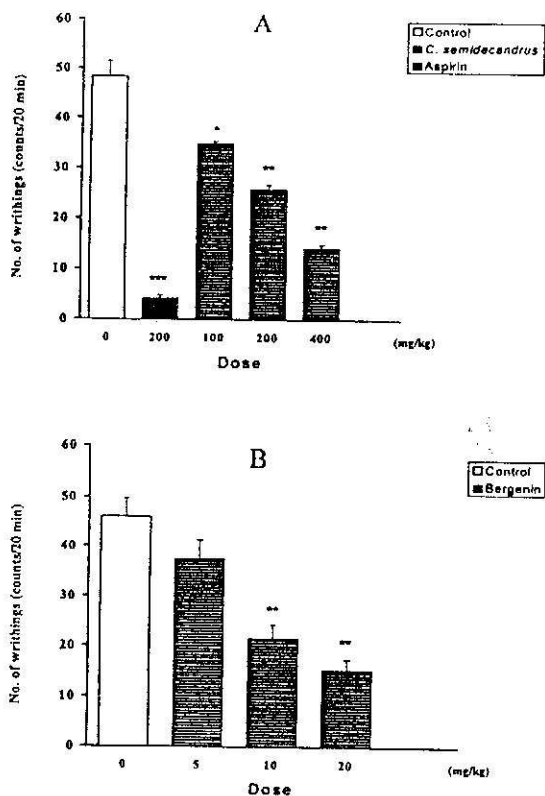


Figure 1 Effect of *C. semidecandrus* extract, aspirin (A) and bergenin (B) on acetic acid-induced writhing in mice.

Each column represents the mean \pm S.E.M. (n = 10)

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 compared to the control group (Student's t-test)

heat-induced pain in mice. Aspirin (200 mg/kg, p.o.) also had no effect in this test. By contrast, a centrally acting analgesic drug, morphine sulfate (10 mg/kg, s.c.) markedly increased pain latency.

Formalin test

Neither the *C. semidecandrus* extract nor bergenin decreased the licking activity on either phase of formalin-induced pain (Table 2). In contrast, the reference antinociceptive drug aspirin (200 mg/kg) and morphine sulfate (10 mg/kg) significantly reduced the licking activity

against both phases of formalin-induced nociception.

Effect of *C. semidecandrus* on yeast-induced fever in rats

The *C. semidecandrus* extract significantly reversed yeast-induced fever, while bergenin had no significant effect on pyrexia induced by yeast (Table 3). The reference drug aspirin also suppressed hyperthermia induced by yeast.

Discussion

The results demonstrate that the methanol extract obtained from the stem of *C. semidecandrus* attenuated nociceptive responses to chemical stimuli in the acetic acid-induced writhing but not in the formalin test in mice and gave a reduction in yeast-induced hyperthermia in rats. Bergenin, the constituent of the extract, also produced similar effect in writhing test but no effect on fever induced by yeast.

C. semidecandrus extract exerted protective action in the writhing test relatively similar to the reference peripheral analgesic compound, aspirin. Bergenin, the isocoumarin compound contained in the extract also showed the inhibitory effect but was less pronounced than those of the extract. Taking into account the yield of bergenin, 5 mg/kg bergenin which corresponds to approximately 147 mg/kg of the *C. semidecandrus* extract produced no significant effect in the analgesic test. According to these results, other active compounds in the extract should also be involved in these effects. This test is generally used for screening of antinociceptive effect (Koster *et al.*, 1959; Hendershot & Forsaith, 1959). Thus the extract and its components may possess analgesic action.

Thermic painful stimuli are known to be selective to centrally, but not peripherally, acting analgesic drugs (Chau, 1989). In the present study, morphine, a centrally acting analgesic drug, produced an inhibitory effect on the nociceptive response in this test, while the *C. semidecandrus* extract failed to affect the response. These findings,

Table 1. Effect of *C. semidecandrus* extract, bergenin, aspirin and morphine on nociceptive response induced by heat in mice.

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	Latency of nociceptive response (sec)			
		15	30	45	60 min
0.5% CMC	-	9.9 ± 0.6	9.5 ± 0.8	9.7 ± 1.1	9.9 ± 1.0
<i>C. semidecandrus</i>	100	9.9 ± 0.9	8.2 ± 0.7	8.9 ± 0.4	10.4 ± 1.2
	200	11.2 ± 0.7	10.6 ± 0.9	10.0 ± 0.9	11.0 ± 0.7
	400	9.8 ± 1.0	11.3 ± 1.2	9.3 ± 0.9	9.2 ± 0.8
	200	10.7 ± 0.8	10.9 ± 0.9	13.1 ± 0.8	10.5 ± 0.9
Morphine sulfate	10	21.6 ± 0.9**	28.3 ± 2.3**	15.0 ± 1.9*	12.2 ± 1.1
0.5% CMC	-	12.3 ± 1.5	8.7 ± 0.8	9.8 ± 0.6	10.1 ± 1.2
Bergenin	5	10.5 ± 1.0	12.1 ± 0.7	11.4 ± 1.4	11.5 ± 1.6
	10	8.5 ± 0.6	9.0 ± 0.5	11.8 ± 0.9	11.4 ± 0.7
	20	12.6 ± 1.0	10.8 ± 0.7	14.2 ± 1.7	14.8 ± 1.4

Beginning thirty min after oral administration of test agents (or 15 min after morphine injection, s.c), the nociceptive response was measured every 15 min over a 60-min period. Each datum represents the mean latency of nociceptive responses (sec) ± S.E.M. (n = 10) * p<0.05, ** p<0.01 compared with the control group (Student's t-test).

Table 2. Effect of *C. semidecandrus* extract, bergenin, aspirin and morphine on hindpaw licking in the formalin test in mice.

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	Early Phase (sec)	Late Phase (sec)
0.5% CMC	-	86.5 ± 9.8	178.2 ± 28.3
<i>C. semidecandrus</i>	100	74.7 ± 8.5	143.4 ± 34.6
	200	95.0 ± 12.2	181.8 ± 39.0
	400	78.1 ± 7.3	152.1 ± 31.7
	200	61.9 ± 6.9**	87.8 ± 30.2*
Morphine	10	2.8 ± 1.1***	0.0 ± 0.0***
0.5% CMC	-	86.2 ± 7.0	148.3 ± 21.2
Bergenin	5	84.9 ± 6.5	208.0 ± 27.3
	10	59.5 ± 7.4	117.4 ± 22.5
	20	73.5 ± 9.3	93.8 ± 10.8

Thirty min after test drug administration (p.o.), 2.5% formalin was sub-cutaneously injected to a hindpaw in a volume of 20 µl. Each datum represents the mean licking time ± S.E.M. from 10 mice in the early phase (0-5 min) and the late phase (15-30 min) after formalin injection. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared with the control group (Student's t-test).

therefore, suggest that the apparent antinociceptive action of the *C. semidecandrus* extract may be mediated through peripheral but not central mechanism(s). Bergenin also produced a similar activity profile to the extract.

Since the acetic acid-induced writhing is a sensitive model for nociceptive responses but

has poor specificity (Hendershot & Forsaith, 1959; Brittain *et al.*, 1963), another pain model, the formalin test, which assesses the way an animal responds to moderate, continuous pain generated by injured tissue (Tjolsen, 1992), was used. Unfortunately, the *C. semidecandrus* extract and bergenin had no significant effect on forma-

Table 3. Effect of *C. semidecandrus* extract, bergenin and aspirin on brewer's yeast-induced fever in rats.

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	Average rectal temperature (°C)					
		0	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr
0.5% CMC	-	36.8 + 0.2	36.7 + 0.3	36.3 + 0.3	36.4 + 0.2	36.4 + 0.4	36.6 + 0.3
<i>C. semidecandrus</i>	100	37.1 + 0.2	36.7 + 0.2	36.6 + 0.5	36.9 + 0.2	36.3 + 0.4*	36.0 + 0.2*
	200	37.3 + 0.4	36.8 + 0.2	36.2 + 0.4*	35.8 + 0.3*	36.3 + 0.3	35.7 + 0.2*
	400	36.8 + 0.3	36.2 + 0.2*	35.6 + 0.4	36.1 + 0.3	35.8 + 0.4*	35.7 + 0.2*
Aspirin	200	36.8 + 0.2	35.7 + 0.3*	35.4 + 0.3**	35.5 + 0.4**	35.4 + 0.4*	35.0 + 0.2**
Bergenin	10	37.4 + 0.3	36.3 + 0.7	36.7 + 0.5	36.6 + 0.5	36.2 + 0.5	36.5 + 0.4
	20	36.3 + 0.1	36.8 + 0.3	35.9 + 0.4	35.5 + 0.3	35.5 + 0.3	36.3 + 0.3

Twenty percent of yeast suspension was subcutaneously injected into the dorsum region of rats. Seventeen hours after injection, rectal temperature was measured (time 0) and then drugs were orally administered. The temperature was again measured at 1, 2, 3, 4 and 5 hr after drug administration. Each datum represents the mean rectal temperature (°C) \pm S.E.M. (n = 6) *p<0.05, **p<0.01 compared with the before test agent administration. (paired t-test).

lin-induced pain in mice. Thus, these results suggest that other actions of the extract may be involved in the reduction of the writhing behavior induced by acetic acid.

The *C. semidecandrus* extract suppressed fever but the effect was less pronounced than that of the reference drug, aspirin. In contrast, bergenin had no antipyretic activity on yeast-induced hyperthermia in rats. Some different compounds contained in the extract may be responsible for the antipyretic activity.

It seems that a sedative effect of *C. semidecandrus* extract could apparently account for the antinociceptive responses in the tests used in this study. However, this is unlikely, as both the extract and bergenin failed to modify pentobarbital-induced sleep (data not shown).

In conclusion, these results suggest that the *C. semidecandrus* extract possesses antipyretic effect, which supports the indication for use of *C. semidecandrus* to relieve fever but not pain in folk medicine. However, further investigations are needed to obtain more information on this plant.

Acknowledgment

The authors are grateful to The Thailand Research Fund, Faculty of Pharmaceutical Sciences

and Prince of Songkla University for financial support of this work.

References

- Adams, S.S., Hebborn, P. and Nicholson, J.S. 1968. Some aspects of the pharmacology of ibufenac, a non-steroidal anti-inflammatory agent. *J. Pharm. Pharmac.*, 20: 305-312.
- Aiyar, S.N., Jain, M.K., Krishnamusti, M. and Seshadri, T.R. 1964. Chemical components of the root of *Connarus monocarpus*. *Phytochemistry*, 3: 335-339.
- Anon 1973. Experimental studies in *Ardisia japonica* in treatment of chronic bronchitis. *Chin. Med. J.*, 53: 706-710.
- Brittain, R.T., Lehrer, D.N. and Spencer, P.S.J. 1963. Phenylquinone writhing test: Interpretation of data. *Nature*, 200: 895-896.
- Bruce, R.D. 1985. An up- and down procedure for acute toxicity testing. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 5: 151-157.
- Chau, T. 1989. Pharmacology methods in the control of inflammation. In: *Modern Methods in Pharmacology*, Vol. V, Alan. R. Liss., Inc., New York, pp. 195-212.
- Ferrini, R., Miragoli, G. and Taccardi, B. 1974. Neuropharmacological studies on SB 5833, a new psychotherapeutic agent of the benzodiazepine class. *Arzneim-Forsch.*, 24: 2029-2032.
- Goel, R.K., Maiti, R.N., Manickam, M. and Ray A.B. 1997. Antiulcer activity of naturally occurring

- pyranocoumarin and isocoumarins and their effect on prostanoid synthesis using human colonic mucosa. *Indian J. Exp. Biol.*, 35: 1080-1083.
- Hendershot, L.C. and Forsaith, J. 1959. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 125: 237-240.
- Hunnskaar, S., Fasmer, O.B. and Holc, K. 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Meth.*, 14: 69-76.
- Jahromi, M.A.F., Chansouria, J.P.N. and Ray, A.B. 1992. Hypolipidaemic activity in rats of bergenin, the major constituent of *Flueggea microcarpa*. *Phytotherapy Research*, 6: 180-183.
- Koster, R., Anderson, M. and de Beer, E.J. 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.*, 18: 412.
- Maxwell, J.F. 1986. Vascular Flora of Ko Hong Hill, Haad Yai district, Songkhla province, Thailand, Herbarium, Department of Biology, Faculty of Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand, p. 110.
- Piacente, S., Pizza, C., De-Tommasi, N. and Mahmood, N. 1996. Constituents of *Ardisia japonica* and their *in vitro* anti-HIV activity. *J. Nat. Prod.*, 59: 565-569.
- Prithiviraj, B., Singh, U.P., Manickam, M., Srivastava, J.S. and Ray, A.B. 1997. Antifungal activity of bergenin, a constituent of *Flueggea microcarpa*. *Plant Pathol.*, 46: 224-228.
- Ridley, H.N. 1922. The Flora of the Malay Peninsula. Vol. I, L. Reeve & Co., Ltd., Henrietta Street, Covent Garden, London, p. 546.
- Robinson, T. 1980. The organic constituents of higher plants: their chemistry and interrelationships. Cordus Press, Massachusetts, p. 64.
- Saijo, R., Nonaka, G. and Nishioka, I. 1990. Gallic acid esters of bergenin and norbergenin from *Mallotus japonicus*. *Phytochemistry*, 29: 267-270.
- Tjolsen, A., Berge, O-G., Hunnskaar, S., Rosland, J.H. and Holc, K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51: 5-17.
- Woolfe, G. and MacDonald, A.D. 1944. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 80: 300-330.

PHYTOCHEMICAL AND BIO-ACTIVITY INVESTIGATIONS OF *PRISMATOMERIS MALAYANA* AND *CONNARUS SEMIDECANDRUS*

Sanan Subhadhirasakul^{1*}, Suvina Ratanachaiwong², Kusumarn Noipa²,
Songsri Kaewsuwan¹ and Hiromitsu Takayama³

¹Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110 Thailand.

²Department of Biomedicine, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110 Thailand.

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, 263-8522 Japan.

ABSTRACT

Three anthraquinones were isolated from the roots of *Prismatomeris malayana*. They were lucidin- ω -methyl ether, rubiadin and rubiadin-1-methyl ether. Two compounds, homorapanone and bergenin were also isolated from the stems of *Connarus semidecandrus*. Antioxidative activity on DPPH radical scavenging, lethal effect on brine shrimp and inhibitory effect on T-cell proliferation of the n-hexane and methanolic extracts and the isolated compounds of the plants were conducted. Among the isolated compounds, homorapanone showed the highest inhibitory effect on T-cell proliferation.

Keyword: *Connarus semidecandrus*, *Prismatomeris malayana*, antioxidative activity, brine shrimp, cytotoxic, immunomodulation, lymphocyte.

Address correspondence to: Sanan Subhadhirasakul, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110 Thailand.

INTRODUCTION

Prismatomeris malayana Ridl. is a shrub in the family Rutaceae. It is widely found in southern Thailand. The roots of *P. malayana* with those of coconut palm and *Lowsonia inermis*, in decoction are used to treat bronchitis (Perry, 1980). *Connarus semidecandrus* Jack is a widely climber, scandent or sarmentose shrub in the family of Connaraceae (Maxwell, 1986). This plant can also be found in Sumatra and Mergui (Ridley, 1922). It is known in local name as "Tob Tab" (Maxwell, 1986). The root decoction of *C. semidecandrus* has been used in folk medicine for treatment of fever (Ridley, 1922). Its stem decoction has been used for various therapeutic treatment of fatigue, pain, fever and constipation by traditional doctors in southern Thailand. In addition, the stem decoction of *C. semidecandrus* and the root decoction of *P. malayana* have also been used for the therapeutic treatment of exanthematous fever and atopic dermatitis by traditional doctors in southern Thailand, Songkhla province.

Biological activity assay, such as antioxidative activity on DPPH scavenging assay, toxicity on brine shrimp lethality test and inhibition on T-cell proliferation of the plants and chemical investigation of *C. semidecandrus* have never been reported.

MATERIALS AND METHODS

Plant collections

The roots of *Prismatomeris malayana* Ridl. (Rutaceae) and the stems of *Connarus semidecandrus* Jack (Connaraceae) were collected in Songkhla Province, Thailand. The first and the second of plant materials were collected in March and January, 1998, respectively. The plants were identified by direct comparison with herbarium specimens in the PSU Herbarium, Department of Biology, Faculty of Sciences, Prince of Songkla University. Voucher specimens of plant materials have been deposited in the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand.

Preparation of plant extracts

The dried coarsely powdered roots of *P. malayana* (1000 g) were macerated with 5.0 L of n-hexane for five days and then filtered and evaporated to give a syrupy mass. The marc was remacerated with n-hexane (5.0 L) four times, filtered and evaporated. All syrupy masses were combined to give n-hexane extract 1.8 g. The marc was dried in open air and then was extracted with methanol using the same procedure as described above to give methanolic extract 55.8 g. The dried powdered stems of *C. semidecandrus* (1000 g) were extracted by the same procedure of that of *P. malayana* to give n-hexane extract 10.4 g and methanolic extract 119.9 g.

Isolation of pure compounds

The portion of crude methanolic extract of *P. malayana* 10.0 g was separated using silica gel (Merck, Germany; SiO₂ 230-400 mesh ASTM) column chromatography. The column was eluted with chloroform, proportions between chloroform and methanol by increasing the percentage of methanol and finally with methanol (Merck, Germany). Fractions of 75 ml were collected. Fraction 10 (2% methanol/chloroform eluted fraction) 350.1 mg was further separated by SiO₂ column chromatography using 10% n-hexane/chloroform 1000 ml, 5% methanol/chloroform 600 ml as eluting solvents. Compound **1** (81.2 mg) and compound **2** (48.0 mg) were crystallized out by methanol from the 10% n-hexane/chloroform and 5% methanol/chloroform fractions, respectively. Fraction 11 (5% methanol/chloroform eluted fraction) was further purified by SiO₂ column chromatography using n-hexane/chloroform/methanol (35:60:5) as eluting solvent. Compound **3** (46.1 mg) was crystallized out by methanol from the eluted fraction. Compound **1**, **2** and **3** were then identified as lucidin- ω -methyl ether, rubiadin and rubiadin-1-methyl ether, respectively, by comparison of their physical and spectral data with those reported in the literatures (Itokawa et al., 1983; Chang and Lee, 1984; Banthorpe and White, 1995; Dej-adisai, 1997).

The portion of crude n-hexane extract of *C. semidecandrus* 1.0 g was introduced to reversed phase silica gel (Chemie Uetikon; RSiL C18 HL 230-400 mesh) column chromatography using methanol as eluting solvent. Compound **4**

(330.0 mg) was crystallized out by a mixture of n-hexane and chloroform from the eluted fraction. The portion of crude methanolic extract of *C. semidecandrus* 10.0 g was roughly separated using SiO₂ column chromatography. The column was eluted with 10% methanol/chloroform 1000 ml, 20% methanol/chloroform 6000 ml and 30% methanol/chloroform 2000 ml. Fractions of 75 ml were collected. Fractions 14-72 were combined (1820 mg) and then was introduced onto a silica gel column using 10% methanol/ethyl acetate as eluting solvent. Fractions of 50 ml were collected. Compound 5 (321.2 mg) was crystallized out by methanol from the fractions 4-42. The compound 4 and 5 were then identified as homorapanone and bergenin, respectively, by comparison of their physical and spectral data with those reported in the literature (Lund *et al.*, 1997; Taneyama *et al.*, 1983; Saijo *et al.*, 1990).

DPPH radical scavenging assay

Samples for testing were prepared by dissolving in absolute ethanol (Merck, Germany). The concentrations of the tested samples were 400, 200, 100 and 50 µg / ml. Each concentration was tested in triplicate.

The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method is one of the methods used for testing of antioxidative activity (Yamasaki *et al.*, 1994). The scavenging activity of samples corresponds to the intensity of quenching DPPH as described by Hatano *et al.* (1989). A portion of sample solution was mixed with the same volume (500 µl) of 6 X 10⁻⁵ M DPPH (Fluka Chemika, Switzerland) in absolute ethanol in a vial and allowed to stand at room temperature for 30 minutes. The absorbance (A) was then measured at 520 nm. BHT (butylated hydroxy toluene), which is one of the well known antioxidants, was used for a positive control. The result was expressed as percentage inhibition, %inhibition = [(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] X100. EC₅₀ (effective concentration of sample at 50% inhibition) was obtained by linear regression analysis of dose-response curve which was plotted between %inhibition and concentration (µg/ml).

Brine shrimp lethality test (Meyer *et al.*, 1982; Solis *et al.*, 1993)

Brine shrimp eggs (*Artemia salina*) (INVE Group, Belgium) were hatched in a shallow rectangular dish (12 X 20 cm) filled with artificial sea water, which was prepared with a commercial salt mixture 40 g/l and distilled water, supplemented with 6 mg/l dried yeast. A plastic divider with several 2 mm holes was clamped in the dish to make two unequal compartments. The eggs (ca. 300 mg) were sprinkled into the larger compartment which was darkened, while the smaller compartment was illuminated. After 48 hours the phototropic nauplii were collected by pipette from the light side, having been separated by the divider from their shells.

Samples for testing were prepared by dissolving in artificial sea water. The concentrations of the tested samples were 2,000, 200 and 20 mg/ml.

A 100 µl aliquot of each concentration was transferred into the wells of 96-well microplate (Sero-Wel, U.K.) in triplicate. Control wells were set up using 100 µl of artificial sea water. A suspension of nauplii containing 10-15 organisms (100 µl) was added into each well and the covered plate incubated at room temperature (26-30 °C) for 24 hours. The plate was then examined under binocular microscope (X10) and the number of dead (non-mobile) nauplii in each well counted. A 100 µl aliquot of 10% formalin solution was then added to each well and after 15 minutes the total number of shrimps in each well was counted. The percentage deaths at each dose and

in control were determined. In cases where control deaths occurred, the data were corrected using Abbott's formula (Abbott, 1925); % deaths = [(test - control)/control] X100. LC₅₀ (lethal concentration at 50% effectiveness) values were then determined from the 24 hours count using the probit analysis method described by Finney (Finney, 1971).

Inhibitory effect on T-cell proliferation (Cho *et al.*, 1998)

Lymphocytes proliferation was measured by [³H]thymidine incorporation of heparinized peripheral blood lymphocytes, taken from healthy people. Cells were separated by centrifugation and cultures were established using 1 X 10⁶ cells/ml in RPMI (GibcoBRL, USA) medium containing 2 g/L sodium bicarbonate.

Lymphocytes were cultured in the wells of a microtitre culture plate (100 µl of cells/well) with 50 µl of phytohaemagglutinin : PHA (Sigma, USA) and 50 µl of each samples at different concentrations (10, 100, 200, 400, 800, 1000 µg/ml). Controls without added sample were used for each culture. The plate was then incubated at 37 °C in a 50% CO₂ incubator for 72 hr. [³H]Thymidine, 50 µl (conc. 5µCi/ml), was then added to each well and the plate incubated for a further 18 hr. Cells were harvested onto scintillant coated glass fibre filters (Merck, Germany) that were washed and dried at room temperature for 24 hr. The glass fiber discs were then placed into 2-ml vials and radioactive [³H]thymidine incorporation was measured in a β-counter (Beckman LS 6000 TA, USA). The result was expressed as percentage inhibition, %inhibition = [(cpm_{control} - cpm_{sample})/cpm_{control}] X100. EC₅₀ (effective concentration of sample at 50% inhibition) was obtained by linear regression analysis of dose-response curve which was plotted between %inhibition and concentration (µg/ml).

RESULT AND DISCUSSION

Three anthraquinones were isolated from *P. malayana*, lucidin-ω-methyl ether, rubiadin and rubiadin-1-methyl ether. The percentage yields of the isolated anthraquinones when compared with crude methanolic extract were 0.81%, 0.48% and 0.46%, respectively. Rubiadin and rubiadin-1-methyl ether had been reported to be isolated from the root of *P. malayana* (Lee, 1969). But, here lucidin-ω-methyl ether was the first report of the compound from the roots of this plant. Two compounds were isolated from the stems of *C. semidecandrus*, homorapanone (from n-hexane extract) and bergenin (from methanolic extract). The percentage yields of them when compared with crude extract were 33.00% and 3.21%, respectively. Here is the first report of the phytochemical study of this plant.

All isolated compounds showed non-antioxidative activity on DPPH scavenging assay (EC₅₀ >200 µg/ml), excepted homorapanone which showed weak activity corresponded to that of n-hexane extract of *C. semidecandrus*. Methanolic extract of *C. semidecandrus* was strong antioxidant. But, its isolated substance, bergenin showed no activity on antioxidation. The strong antioxidative activity of the methanolic extract was probably displayed by other un-isolated substance(s). Among the isolated compounds, lucidin-ω-methyl ether showed the most toxic effect to brine shrimp. Its LC₅₀ was 23.7 µg/ml, while rubiadin-1-methyl ether possessed lowest toxic effect (LC₅₀ = 505.4 µg/ml). The LC₅₀ on brine shrimp lethality test of the other

compounds was shown on Table 1. It has been reported (Meyer *et al.*, 1982) that crude extract which exhibit cytotoxic activity on brine shrimp lethality test at LC_{50} less than 30 $\mu\text{g/ml}$ are considered to possess anticancer, insecticidal activities or other cytotoxic effects. The crude extracts having LC_{50} more than 1000 $\mu\text{g/ml}$ are considered to be markedly non-active for these activities. Therefore, lucidin- ω -methyl ether, homorapanone and rubiadin having good cytotoxic effect on brine shrimp are very interesting for further investigation of their anticancer and insecticidal activities or other cytotoxic effects.

All isolated anthraquinones from the root of *P. malayana* showed inhibitory activity on T-cell proliferation. The inhibition effect on T-cell proliferation of these anthraquinones was comparable to cytotoxic effect on brine shrimp. Lucidin- ω -methyl ether showed the highest activity on both inhibition on T-cell proliferation and cytotoxic effect on brine shrimp, while those of rubiadin-1-methyl ether showed lowest activity. These anthraquinones had shown non-significant inhibition effect on the proliferation of non-mitogenic stimulating T-cell (data not shown).

The n-hexane extract of *C. semidecandrus* showed high inhibitory effect on T-cell proliferation ($EC_{50} = 35.4 \mu\text{g/ml}$), corresponded to that of its isolated compounds, homorapanone. And, among the isolated compounds, homorapanone also exhibited highest inhibitory effect on T-cell proliferation ($EC_{50} = 20.2 \mu\text{g/ml}$).

When the culture media without a mitogen (PHA), all crude extracts and isolated compounds showed non-significant inhibitory or promoting effects on the proliferation of T-cell, excepted the methanolic extract of *C. semidecandrus*. The extract stimulated the proliferation of T-cell both in with and without PHA. In the other hand, its isolated compound, bergenin exhibited low inhibitory effect on T-cell proliferation. Other substance(s) of the extract probably play a stimulating effect. The inhibitory effect on the mitogenic stimulating T-cell proliferation of both crude extracts and isolated compounds of these two medicinal plants may be of pharmacological important for use as an immuno-suppressant or other potential drug in clinical conditions related with autoimmune disease such as rheumatoid arthritis because lymphocytes in chronic inflammatory disease are already activated and under progress of proliferation. And, the inhibitory effect on T-cell proliferation of the medicinal plants are corresponded to the use for the treatment of exanthematous fever and atopic dermatitis by traditional doctors in southern Thailand.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to The Thailand Research Fund for financial support of this work.

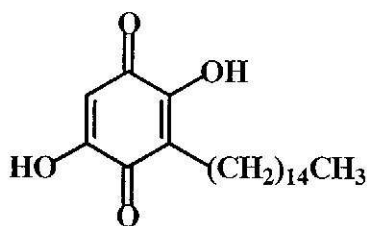
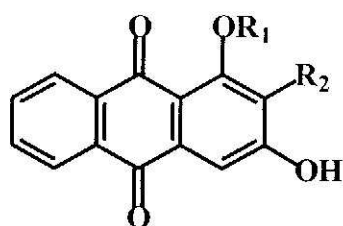
REFERENCES

- Abbott WS (1925): *J. Econ. omol.*, 18 : 265.
Banthorpe DV, White JJ (1995): Novel anthraquinones from undifferentiated cell cultures of *Galium verum*. *Phytochemistry* 38: 107-111.
Chang P, Lee KH (1984): Cytotoxic antileukemic anthraquinones from *Morinda parvifolia*. *Phytochemistry* 23: 1733-1736.

- Cho SM, Koshino H, Yu SH, Yoo ID (1998) : A mannofucogalactan, fomitellan A, with mitogenic effect from fruit bodies of *Fomitella fraxinea* (Imaz.). *Carbohydrate Polymers*, 37(1) : 13-18.
- Dej-adisai S (1997): Quinones from roots of *Prismatomeris sessiliflora* and *Diospyros montana*. 161 pp. Bangkok, Chulalongkorn University.
- Finney DJ (1971): 3rd ed., *Probit analysis*. London, Cambridge University Press.
- Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fugita Y, Yasuhara T, Okuda T (1989): Effect of the interaction of tannin with co-existing substance VI. Effect of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 2016-2021.
- Itokawa H, Mihara K, Takeya K (1983): Studies on a novel anthraquinone and its glycosides isolated from *Rubia cordifolia* and *R. akane*. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 2353-2358.
- Lee HH (1969): Coloring matter from *Prismatomeris malayana*. *Phytochemistry* 8: 501-503.
- Lund AK, Lemmich J, Adsersen A, Olsen CE (1997): Benzoquinones from *Embelia angustifolia*. *Phytochemistry* 44: 679-681.
- Maxwell JF (1986): In: Maxwell JF, 1st ed., *Vascular flora of Ko Hong Hill, Had Yai district, Songkhla province, Thailand*. Hat Yai, Herbarium, Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin JL (1982) : Brine Shrimp : A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45: 31-34.
- Perry LM (1980): In: Perry LM, 1st ed., *Medicinal plants of east and southeast asia : attributed properties and uses*. London, The MIT Press.
- Ridley HN (1922): In: Ridley HN, 1st ed., *The flora of the Malay Peninsula*. vol. I, London, L. Reeve & Co., Ltd.
- Saijo R, Nonaka G, Nishioka I (1990): Gallic acid esters of bergenin and norbergenin from *Mallotus japonicus*. *Phytochemistry* 25: 267-270.
- Solis PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD (1993): A microwell cytotoxic assay using *Artemia Salina* (brine shrimp). *Planta Med.* 59: 250-252.
- Taneyama M, Yoshida S, Kobayashi M, Hasegawa M (1983): Isolation of norbergenin from *Saxifraga stolonifera*. *Phytochemistry* 22: 1053-1054.
- Yamasaki K, Hashimoto A, Kokusenya Y, Miyamoto T, Sato T (1994): Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. *Chem. Pharm. Bull.* 42: 1663-1665.

Table 1. Effects of extracts from *P. malayana* and *C. semidecandrus* and their pure compounds on DPPH scavenging, brine shrimp lethality and T-cell proliferation assays.

Extrac / pure compound	DPPH scavenging assay EC ₅₀ (µg/ml)	Brine shrimp lethality test LC ₅₀ (µg/ml)	Inhibition on T-cell proliferation EC ₅₀ (µg/ml)
<i>P. malayana</i>			
n-hexane extract	>200	427.5	161.3
methanolic extract	>200	409.0	193.0
<i>C. semidecandrus</i>			
n-hexane extract	123.0	>1000	35.4
methanolic extract	5.3	>1000	stimulated
lucidin-ω-methyl ether	>200	23.7	76.8
rubiadin	>200	84.2	101.6
rubiadin-1-methyl ether	>200	505.4	170.2
homorapanone	113.9	54.3	20.2
bergenin	>200	258.8	819.7



R₁ = H, R₂ = CH₂OCH₃; lucidin-ω-methyl ether

R₁ = H, R₂ = CH₃; rubiadin

R₁ = R₂ = CH₃; rubiadin-1-methyl ether

homorapanone

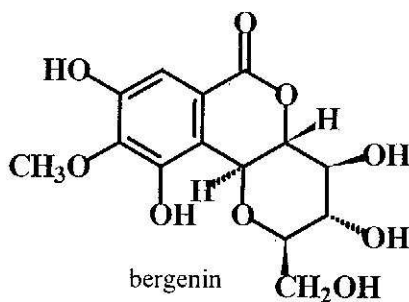


Figure 1