

Thesis Title Bioactive Compounds from *Diospyros ehretioides* Fruits

Author Miss Thitaree Theerachayanan

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacy)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Busaban Sirithunyalug Chairperson

Asst. Prof. Dr. Sirivipa Piyamongkol Member

Dr. Prasat Kittakoop Member

ABSTRACT

Infectious diseases are still a serious problem in developing countries including Thailand, therefore, careful screening for bioactive compounds from native plants against such microorganisms and parasites remains an important issue. In this study, fruits of *Diospyros ehretioides*, both fresh and dried, were used for isolation and identification of bioactive compounds. The processes were performed as follow: First, dried fruits were macerated with CH_2Cl_2 and evaporated under reduced pressure. Then, the obtained crude extract was separated by chromatographic technique and further purified by semi-preparative HPLC (reversed-phase, RP C_{18} column). It was thus eluted with $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ to obtain pure compounds. At last, each

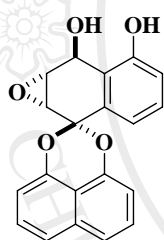
isolated compound was subsequently elucidated for its chemical structure by spectroscopic analyses.

The isolated compounds that were found from the dried fruits belonged to deoxypreussomerin derivatives, palmarumycin JC1 and JC2, two dimeric naphthoquinones, isodiospyrin and its new derivative isodiospyrol A. Normally, palmarumycins are more likely to be found as fungal metabolites rather than plant metabolites. In order to confirm that these two compounds are not plant metabolites, fresh and dried fruits were investigated in the same manner. The result suggested that deoxypreussomerin derivatives, palmarumycin JC1 and JC2 were not found in fresh fruits, therefore, symbiont fungal strains should only be specific to plant host, *Diospyros ehretioides*, and they could grow on the fruits during drying of the sample.

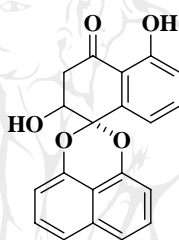
Biological activity tests of isolated compounds demonstrated that palmarumycin JC1 exhibited neither antitubercular, antifungal nor antimalarial activities whereas palmarumycin JC2 displayed antimalarial (IC_{50} 4.5 $\mu\text{g/mL}$), antifungal (IC_{50} 12.5 $\mu\text{g/mL}$) and antitubercular activities (MIC 6.25 $\mu\text{g/mL}$). Moreover, palmarumycin JC2 also showed cytotoxic effect at IC_{50} of 11.0 $\mu\text{g/mL}$ for NCI-H187 cell line. For the other groups of compounds isodiospyrol A and isodiospyrin, it was found that only isodiospyrol A demonstrated antimalarial and antitubercular activities at IC_{50} of 2.7 $\mu\text{g/mL}$ and MIC of 50 $\mu\text{g/mL}$, respectively. However, it was inactive against *Candida albican*.

Moreover, bioactive compounds from other *Diospyros* spp., i.e., *Diospyros rhodocalyx* and *Diospyros glandulosa* were isolated in the same manner as *Diospyros ehretioides*. However, they were evaluated for antimalarial and antitubercular activities only.

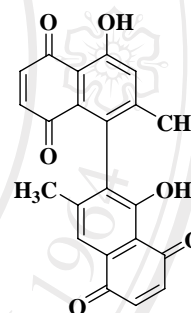
Four known compounds, lupeol, β -sitosterol, stigmasterol and diospyrin were isolated from woods of *Diospyros rhodocalyx* and *Diospyros glandulosa* and a triterpene, betulinaldehyde was obtained only from *Diospyros rhodocalyx*. Only lupeol, diospyrin and betulinaldehyde were subjected to antimalarial and antitubercular activity tests. Compound diospyrin displayed antimalarial (IC_{50} values of 3.29 $\mu\text{g/mL}$) and antitubercular activities (MIC values of 6.25 $\mu\text{g/mL}$) whereas betulinaldehyde exhibited antimalarial (IC_{50} values of 6.25 $\mu\text{g/mL}$) and antitubercular activities (MIC values of 25 $\mu\text{g/mL}$).



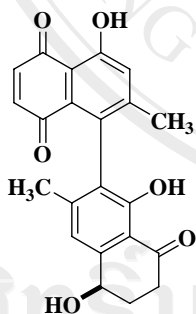
Palmarumycin JC1



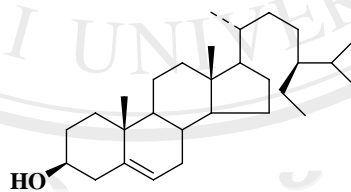
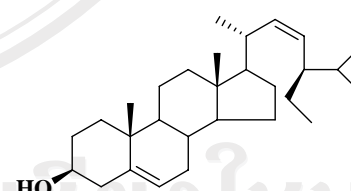
Palmarumycin JC2



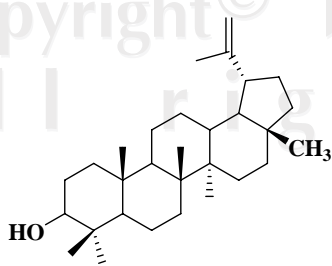
Isodiospyrin



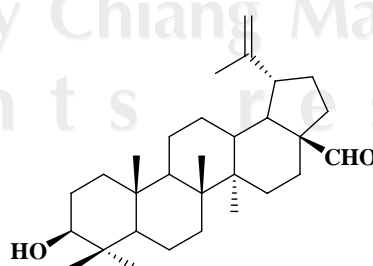
Isodiospyrol A

 β -sitosterol

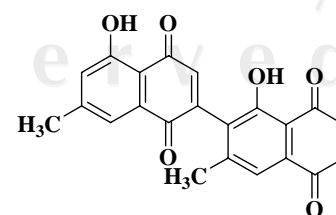
Stigmasterol



Lupeol



Betulinaldehyde



Diospyrin

ผลจากการตรวจเอกลักษณ์พบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้เป็นอนุพันธ์ของสารไดออกซีพรีอัสสัมเมอร์รินส์ (Deoxypreussome rinse) 2 ชนิดคือ พาลมารูมัยซิน เจซีหนึ่ง (Palmarumycin JC1) และ พาลมารูมัยซิน เจซีสอง (Palmarumycin JC2) นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มไดเมอร์ิกแนบ โควิโนนส์ (Dimeric naphtho quinones) อีก 2 ชนิด คือ ไอโซไดออกสปัยริน (Isodiospyrin) และสารอนุพันธ์ใหม่ ไอโซไดออกสปัยรอล เอ (Isodiospyrol A) อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารพาลมารูมัยซินที่พบโดยปกติจะเป็น **เมแทบอลิ**ของเชื้อรามากกว่าที่จะเป็น **เมแทบอลิ**ของพืช จึงได้ทำการพิสูจน์เพื่อยืนยันว่าสารพาลมารูมัยซินทั้งสองน่าจะเป็น **เมแทบอลิ**ของเชื้อราที่มักจะพบในผลแห้งของต้นลิ้นกวาง โดยได้ทำการศึกษาเปรียบ เทียบกับผลสดของลิ้นกวาง โดยวิธีการเดียวกันและพบว่า สารพาลมารูมัยซิน เจซีหนึ่ง และเจซีสองพบเฉพาะในผลแห้งเท่านั้นจึงคาดว่าสารทั้งสองจะเป็น **เมแทบอลิ**ของเชื้อราที่เจริญเติบโตอยู่ที่ผลลิ้นกวางขณะที่ผลเริ่มแห้ง

สารบริสุทธิ์แยกได้จากผลแห้งของลิ้นกวาง เมื่อนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลอง พบว่า สารกลุ่มไดออกซีพรีอัสสัมเมอร์รินส์ พาลมารูมัยซิน เจซีหนึ่ง (Palmarumycin JC1) ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ มัยโคแบคทีเรียม ทูโบคูโรซิส (*Mycobacterium tuberculosis*) H₃₇Ra เชื้อราแคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*) และเชื้อมาลาเรีย พลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม

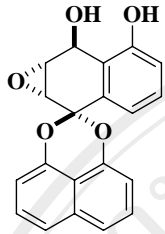
(*Plasmodium falciparum*) ในขณะที่สาร พาลมารูมัยซิน เจซีสอง (Palmarumycin JC2) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย เชื้อรา ด้วยค่า IC₅₀ 4.5, 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับและมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวัณโรคที่ใช้ในการทดลองด้วยค่า MIC 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (NCI-H 187) ได้ค่า IC₅₀ 11.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารกลุ่มไดเมอร์ิกแนบ โควิโนนส์ พบว่าเฉพาะสารไอโซไดออกสปัยรอล เอ (Isodiospyrol A) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย ด้วยค่า IC₅₀ 2.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคด้วย

ค่า MIC 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา แคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*) และเมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์(BC)ได้ค่า IC₅₀ 12.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารไอโซคัยออสพัยริน (Isodiospyrin) ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพใดๆเมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อมาลาเรีย เชื้อรา และเชื้อวัณโรค

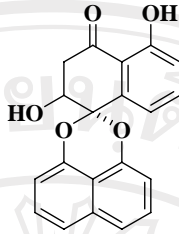
นอกจากการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลของลั่นทม (*Diospyros ehretioides*) แล้วยังได้แยกองค์ประกอบทางเคมีจากเนื้อไม้ของพืชตะโกนา (*Diospyros rhodocalyx*) และ กล้วยฤาษี (*Diospyros glandulosa*) ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับผลของลั่นทม (*Diospyros ehretioides*) แต่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเฉพาะการยับยั้งเชื้อมาลาเรียและเชื้อวัณโรคเท่านั้น

สารที่เป็นที่รู้จัก 4 ตัวคือ ลูปีออล (Lupeol) สารเบตาซิโตสเตอรอล (β -sitosterol) สติกมาสเทอร์อล (Stigmasterol) และสารไดออสพัยริน(Diospyrin) ถูกแยกจากเนื้อไม้ของตะโกนา (*Diospyros rhodocalyx*) และ กล้วยฤาษี (*Diospyros glandulosa*) ส่วน สารไตรเทอร์ปีนตัวหนึ่ง คือ สารเบทูลินอลดีไฮด์ (Betulinaldehyde) แยกได้จากพืชตะโกนา (*Diospyros rhodocalyx*) เท่านั้น จากการศึกษากฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารไดออสพัยริน(Diospyrin) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียด้วยค่า IC₅₀ 3.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค ด้วยค่า MIC 6.25 ไมโครกรัมต่อ

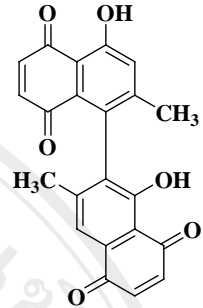
มิลลิลิตร ในขณะที่สารเบทูลินอลดีไฮด์ (Betulinaldehyde) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย ด้วยค่า IC₅₀ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค ด้วยค่า MIC 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



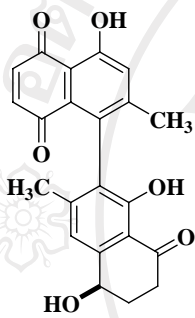
Palmarumycin JC1



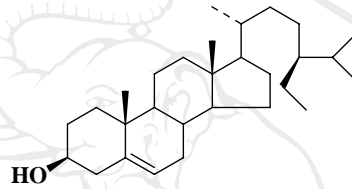
Palmarumycin JC2



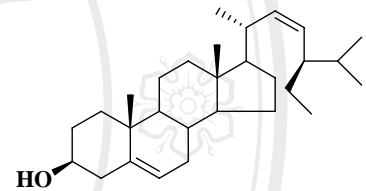
Isodiospyrin



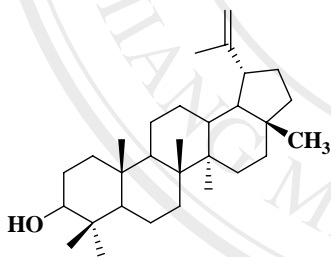
Isodiospyrol A



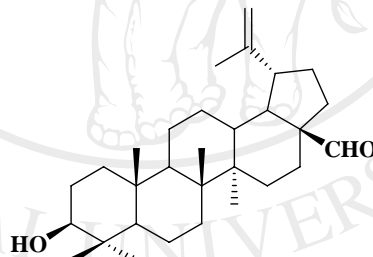
β -sitosterol



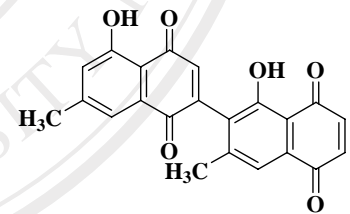
Stigmasterol



Lupeol



Betulinaldehyde



Diospyrin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved