การแยกและดัดแปลงโครงสร้างของออกซีเรสเวอราทรอลจากมะหาดเพื่อฤทธิ์ยับยั้งไทโรสิเนส

นายอาคม สอนสุทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเวท ภาควิชาเภสัชเวท
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-3820-6

ISOLATION AND STRUCTURE MODIFICATION OF OXYRESVERATROL FROM *ARTOCARPUS LAKOOCHA* FOR TYROSINASE INHIBITORY ACTIVITY

Mr. Acom Sornsute

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacognosy

Department of Pharmacognosy

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

ISBN 974-14-3820-6

Thesis Title	ISOLATION AND STRUCTURE MODIFICATION OF OXYRESVERATROL FROM *ARTOCARPUS LAKOOCHA* FOR TYROSINASE INHIBITORY ACTIVITY
By	Mr. Acom Sornsute
Field of study	Pharmacognosy
Thesis Advisor	Associate Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Sumphan Wongseripipatana, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Pornpen Pramyothin ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Ekarin Saifah, Ph.D.)

K. Likhit ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)

S. Wongseripipatana ..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Sumphan Wongseripipatana, Ph.D.)

..... Member

(Poonsakdi Ploypradith, Ph.D.)

Boonchoo Sritularak ..... Member

(Boonchoo Sritularak, Ph.D.)

อาคม สอนสุทธิ์ : การแยกและดัดแปลงโครงสร้างของออกซีเรสเวอราทรอลจากมะหาดเพื่อฤทธิ์ยับยั้งไทโรสิเนส. (ISOLATION AND STRUCTURE MODIFICATION OF OXYRESVERATROL FROM *ARTOCARPUS LAKOOCHA* FOR TYROSINASE INHIBITORY ACTIVITY) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. สัมพันธ์ วงศ์เสรีพิพัฒนา, จำนวนหน้า 194 หน้า. ISBN 974-14-3820-6.

สารออกซีเรสเวอราทรอล (2,4,3′,5′-tetrahydroxystilbene) เป็นสารหลักที่พบได้จากต้นมะหาด ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสที่แรง ในการศึกษาครั้งนี้ได้มุ่งไปยังการแยกและการดัดแปลงโครงสร้างของสารออกซีเรสเวอราทรอลเพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนส ในการแยกสารพบว่าการแยกด้วยอุปกรณ์ซอกเลต(soxhlet apparatus)และเอธานอลให้สารสกัดมากที่สุด และอลูมิเนียมออกไซด์เป็นสารดูดซับที่มีประสิทธิภาพดีในการแยกสารสกัด

ในครั้งนี้ได้พัฒนาการวิเคราะห์ที่ใช้รีเวอร์สเฟส เอชพีแอลซี จากการประเมินค่าความถูกต้อง ความแม่นยำ ความตรง ขอบจำกัดการตรวจวัด และขอบจำกัดการหาปริมาณ วิธีนี้ได้ใช้ในการหาปริมาณสารออกซีเราสเวอราทรอลจากสารสกัดพืชและปวกหาด ซึ่งผลเป็นที่น่าพอใจและน่าเชื่อถือ

ได้มีการเตรียมสารอนุพันธ์ขึ้นสิบสามอนุพันธ์ และได้ทดสอบฤทธิ์พบว่าสารที่เตรียมได้เกือบทั้งหมดสูญเสียฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ แต่ไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลแสดงฤทธิ์ที่แรงกว่าออกซีเรสเวอราทรอลและกรดโคจิคที่มีการใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์พบว่าสารไดไฮโดรออกซีเรสเวอราทรอลยับยั้งเอนไซม์แบบไม่แข่งขันซึ่งเหมือนกับออกซีเรสเวอราทรอล ในขณะที่กรดโคจิคยับยั้งเอนไซม์แบบผสม

นอกจากนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ในการเป็นพิษต่อเซลล์ของสารอนุพันธ์ที่ได้จากการเติมหมู่เมทอกซิลแทนที่หมู่ไฮดรอกซีต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB BC และ NCI พบว่าโครงสร้างแบบซิสของออกซีเรสเวอราทรอลที่เติมหมู่เมทอกซิลทั้งสี่หมู่แสดงฤทธิ์ยับยั้งที่แรงเมื่อเทียบกับอีลิปติซินและดอกซีรูบิซิน

สิ่งที่พบจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าออกซีเรสเวอราทรอลสามารถเป็นสารตั้งต้นที่ดีในการพัฒนาสารช่วยทำให้ผิวขาวและยาต้านมะเร็งต่อไป

ภาควิชา	เภสัชเวท	ลายมือชื่อนิสิต	
สาขาวิชา	เภสัชเวท	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2549	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

// # 4676608933: MAJOR PHARMACOGNOSY

KEY WORDS: OXYRESVERATROL/ TYROSINASE/ *ARTOCARPUS LAKOOCHA*/ WHITENING/ STILBENE/ CYTOTOXICITY

ACOM SORNSUTE : ISOLATION AND STRUCTURE MODIFICATION OF OXYRESVERATROL FROM *ARTOCARPUS LAKOOCHA* FOR TYROSINASE INHIBITORY ACTIVITY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KITTISAK LIKHITWITAYAWUID, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. SUMPHAN WONGSERIPIPATANA, Ph.D., 194 pp. ISBN 974-14-3820-6.

Oxyresveratrol (2,4,3′,5′-tetrahydroxystilbene), a major compound found in the heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. (Moraceae), has been known for its potent tyrosinase inhibitory activity. This study focused primarily on the isolation and structure modification of oxyresveratrol for tyrosinase inhibitory activity. For the isolation experiments, it was found that the EtOH-soxhlet extraction method gave the highest yield of crude oxyresveratrol, and Al_2O_3 was a good adsorbent for separation of the obtained extract.

An analytical method using reverse-phase high performance liquid chromatography was developed. The method was validated on the parameters for accuracy, precision, linearity, limit of detection and limit of quantitation. The method was used for quantitative determination of oxyresveratrol in plant extracts and Puag-Haad. The results were satisfactory and reliable.

Thirteen derivatives of oxyresveratrol have been prepared, and their anti-tyrosinase activity was determined. Almost all of the analogues prepared in this study were devoid of activity, but dihydrooxyresveratrol showed more potent activity than did the parent compound and kojic acid, a strong tyrosinase inhibitor widely used in cosmetic products. Kinetic studies on the enzyme indicated that dihydrooxyresveratrol had higher affinity to tyrosinase than the two compounds. Dihydrooxyresveratrol, similar to oxyresveratrol, showed non-competitive inhibition property while kojic acid was a mixed-type inhibitor.

Additionally, cytotoxicity studies were performed on the *O*-methylated compounds using KB, BC and NCI-H187 cancer cells. *Cis*-tetra-*O*-methylated oxyresveratrol showed strong cytotoxicity, with potency comparable to those of ellipticine and doxyrubicin.

The findings in this study suggest that oxyresveratrol could be a good source of starting material for the development of whitening agents and anticancer drugs.

Department of Pharmacognosy Student's signature Acom Sornsute

Field of study Pharmacognosy Advisor's signature K. Likhit

Academic year 2006 Co-advisor's signature S. Wongseripipatana

Acknowledgements

I wish to express my sincere gratitude and thanks to Associate Professor Dr. Kittisak Likhitwitayawuid, my thesis advisor and Associate Professor Dr. Sumphan Wongseripipatana, my thesis co-advisor, the present and the former Head of the Department of Pharmacognosy, respectively, for their close supervision, guidance, suggestions, supports and encouragements throughout the course of this study, as well as editing of this dissertation.

I am deeply indebted to Dr. Poonsakdi Ploypradith, Chulabhorn Research Institute and Professor Hiromitsu Takayama, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University for their guidance, suggestion and encouragement which has enabled me to carry out this work. Their precious instructions are not only confined to the scientific study but also expanded to the general concepts and arts of life. The kindness and devotion that I received will be long remembered.

I would like to thank Associate Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul, and Dr. Boonchoo Sritularak, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for providing facilities and advice regarding the anti-tyrosinase activity evaluation.

I would like to express my sincere thanks to the Departments of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for providing research facilities during my study.

I would also like to acknowledge the Graduate School of Chulalongkorn University for partial financial support.

Bioassay Research Facility of National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) is also gratefully acknowledged for cytotoxicity tests.

I wish to express my infinite gratitude to my friends for their love, understanding, assistance, and encouragement throughout this graduate study.

My final thank goes to my family. For all their love, understanding and support, there is no adequate way to express my gratitude.

CONTENTS

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

ABBREVIATIONS

BC	=	breast cancer cells
brs	=	broad singlet
^{o}C	=	degree celsius
^{13}C-NMR	=	carbon-13 nuclear magnetic resonance
$CDCl_3$	=	deuterated chloroform
$CHCl_3$	=	chloroform
cm	=	centimeter
COSY	=	correlation spectroscopy
δ	=	chemical shift
d	=	doublet
DMSO-d_6	=	deuterated dimethylsulphoxide
ESIMS	=	electrospray ionization mass spectrometry
EtOAc	=	ethyl acetate
ε	=	molar absorptivity
g	=	gram
^{1}H-NMR	=	proton nuclear magnetic resonance
HPLC	=	high performance liquid chromatography
Hz	=	hertz
IR	=	infrared

J	=	coupling constant
KB	=	human epidermoid carcinoma cells of the nasopharynx
L	=	liter
m	=	multiplet
$[M+H]^+$	=	protonated molecular ion
MHz	=	megahertz
µg	=	microgram
mg	=	milligram
µl	=	microliter
ml	=	milliliter
µm	=	micrometer
mm	=	millimeter
MeOH	=	methanol
nm	=	nanometer
NMR	=	nuclear magnetic resonance
NOESY	=	nuclear overhouser effect correlation spectroscopy
ppm	=	part per million
ppt	=	part per thousand
q	=	quartet
s	=	singlet
sp.	=	species

t	=	triplet
TLC	=	thin layer chromatography
UV	=	ultraviolet