



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การพัฒนาวิธีการสกัดแยกสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จากใบมะตูมและใบปอกระเจาโดยใช้โพลีเมอริกเรซิน

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพโรศิรศาลและคณะ

14 พฤษภาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การพัฒนาวิธีการสกัดแยกสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จากใบมะตูมและใบปอกระเจาโดยใช้โพลีเมอริกเรซิน

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพโรศิรศาล (หัวหน้าโครงการวิจัย)

นางสาวธัญชนก ปักษาสุข

ศาสตราจารย์ ดร. อุดม กักผล

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาจารย์ ดร. จงกลณี จงอร่ามเรือง

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อาจารย์ ดร. คณิต สุวรรณปริรักษ์ (นักวิจัยที่ปรึกษา)

ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพันธุศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเป็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนหลักจาก สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) (MRG5180158) รวมทั้งการสนับสนุนทางการเงินและวัสดุอุปกรณ์บางส่วนจาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ มูลนิธิโทรเรเพื่อการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ ประเทศไทย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5180158

ชื่อโครงการ: การพัฒนาวิธีการสกัดแยกสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จากใบมะตูมและใบปอกระเจาโดยใช้โพลิเมอร์เรซิน

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพริศร (หัวหน้าโครงการวิจัย)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: preecha.p@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 14 พฤษภาคม 2551 ถึง 15 พฤษภาคม 2553 (รวม 2 ปี)

สารยับยั้งเอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดส มีบทบาทสำคัญในการลดระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งส่งผลในการควบคุมโรคเบาหวาน ในการเสาะหาสารยับยั้งเอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดสจากสมุนไพร ได้สนใจศึกษามะตูม (*Aegle marmelos*) และ ปอกระเจา (*Corchorus olitorius*) เนื่องจากผลการศึกษาเบื้องต้น รวมทั้งมีประวัติเป็นที่รู้จักอย่างดี ในการรักษาโรคเบาหวาน จากการติดตามผลการยับยั้งเอนไซม์ร่วมกับการแยกให้บริสุทธิ์ (bioassay-guided isolation) พบสารชนิดใหม่ 3 ชนิดในสารสกัดใบมะตูม คือ anhydromarmeline (1), aegelinoside A (7) และ aegelinoside B (8). อย่างไรก็ตาม ในบรรดาสารที่แยกได้ทั้งหมดนั้น anhydroaegeline (2) มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ $35.8 \mu M$ สำหรับการศึกษาสารยับยั้งเอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดส จากใบปอกระเจา พบสารใหม่ 2 ชนิด ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavonol glycoside คือ corchoruside A (9) และ corchoruside B (10) สาร corchoruside A มีโครงสร้างเป็น kaempferol มีส่วนของ caffeic acid ต่อกับน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาล methyl glucuronate (MeGlcA) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ไม่ค่อยพบในธรรมชาติ corchoruside A มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดส โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ $0.18 mM$ ซึ่งดีกว่ายา acarbose ถึง 3 เท่า ดังนั้นการที่มีหมู่ caffeic acid ใน corchoruside A ช่วยทำให้การออกฤทธิ์ดีขึ้น นอกจากนี้ยังได้ศึกษาสมบัติของโพลิเมอร์เรซินการดูดซับสารสำคัญ จากสารสกัดใบมะตูมและใบปอกระเจา พบว่าโพลิเมอร์เรซินชนิด XAD-16 ให้ประสิทธิภาพการดูดซับดีที่สุด ด้วยค่า adsorption capacity, desorption capacity และ desorption ratio ที่สูงที่สุด

คำหลัก: เบาหวาน มะตูม ปอกระเจา เอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดส

Abstract

Project Code: MRG5180158

Project Title: Development in extraction and isolation of α -glucosidase inhibitors from leaves of *Aegle marmelos* and *Corchorus olitorius* using polymeric resin

Investigator: Assistant Professor Preecha Phuwapraisirisan

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

E-mail Address: preecha.p@chula.ac.th

Project Period: 14 May 2008-15 May 2010 (2 years)

α -Glucosidase inhibitor play an important role in effectively suppressing blood glucose level, thus controlling diabetes mellitus (DM). In our search for α -glucosidase inhibitors from medicinal plants, we have focused on *Aegle marmelos* and *Corchorus olitorius* as a result of preliminary screening and their long historic recognition as diabetes therapy. Bioassay-guided isolation of *A. marmelos* leave extract yielded three new compounds named anhydromarmeline (**1**), aegelinoside A (**7**) and aegelinoside B (**8**). Of isolated compounds, anhydroaegeline (**2**) revealed potent inhibition with IC_{50} value of 35.8 μ M. On the other hand, *C. olitorius* leave extract afforded two new flavonol glycosides named corchorusides A (**9**) and B (**10**). Corchoruside A comprises a kaempferol moiety connected with caffeic acid, glucose and a rare methyl glucuronate (MeGlcA). Corchoruside A inhibited α -glucosidase activity with an IC_{50} value of 0.18 mM, which is three-fold more active than that of the standard diabetes drug acarbose. The occurrence of a caffeoyl moiety in corchoruside A enhanced significantly its inhibitory effect toward α -glucosidase, compared to corchoruside B. We have envisioned to adsorption property of polymeric resin towards *A. marmelos* and *C. olitorius* extracts. XAD-16 revealed highest adsorption capacity, desorption capacity and desorption ratio.

Keywords: diabetes mellitus, *Aegle marmelos*, *Corchorus olitorius*, α -glucosidase

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เบาหวานเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบเมตาบอลิซึม เนื่องจากร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลไปใช้เป็นพลังงานได้ตามปกติทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น ในปัจจุบันพบว่าคนไทยเป็นโรคเบาหวานมากถึง 5% จากประชากรกว่า 60 ล้านคน ในขณะที่แนวโน้มของคนที่ป่วยเป็นโรคเบาหวานก็เพิ่มขึ้นทุกปี ยาที่ใช้รักษาโรคเบาหวานมีหลายชนิดแตกต่างกันตามกลไกการทำงาน ยาที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase เช่น Acarbose เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะช่วยลดการดูดซึมคาร์โบไฮเดรตทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง แต่เนื่องจากเบาหวานเป็นโรคที่ใช้เวลานานในการรักษา ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง ผู้ป่วยหลายคนจึงนิยมใช้สมุนไพรในการรักษาแทนการใช้ยาแผนปัจจุบัน สมุนไพรหลายชนิดมีศักยภาพในการรักษาเบาหวานได้เทียบเท่าหรือดีกว่ายาแผนปัจจุบันแต่ยังไม่มีการศึกษาอย่างเป็นระบบในการนำสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase มาใช้ ทั้งนี้มีอุปสรรคที่สำคัญคือ เทคนิคการสกัดแยกสารออกฤทธิ์เหล่านั้นซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารที่มีขั้วมาก (polar compound) เดิมมักจะแยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้ซิลิกาเจล ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ แต่เนื่องจากซิลิกาเจลมีความสามารถในการดูดซับสารที่มีขั้วมากได้ดี ทำให้สูญเสียปริมาณสารออกฤทธิ์ในขั้นตอนการแยกกว่า 50% ต่อมาจึงได้มีการใช้ซิลิกาเจลดัดแปร เช่น ODS ซึ่งช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามซิลิกาเจลดัดแปรเหล่านี้ก็มีราคาแพง ถ้าหากนำมาใช้แยกในระดับอุตสาหกรรมจะทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูง ปัจจุบันได้เริ่มมีการศึกษาการใช้โพลีเมอร์เรซิน ในการสกัดแยกสารที่มีขั้วมาก เนื่องจากมีข้อดีที่เหนือกว่าตัวดูดซับ 2 ประเภทแรกหลายประการ เช่น ราคาถูก สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง การใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะมีการใส่โพลีเมอร์เรซินลงในถังหมักเพื่อดูดซับสารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นซึ่งช่วยกระตุ้นการหลั่งสารออกมาเรื่อย ๆ ทำให้ได้ผลผลิตสูงกว่าวิธีการผลิตแบบเดิม ดังนั้นการพัฒนาวิธีการใช้โพลีเมอร์เรซินในการสกัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีขั้วมากจึงมีความเป็นไปได้ในทางอุตสาหกรรม

ในงานวิจัยนี้จะพัฒนาวิธีการใช้โพลีเมอร์เรซินให้เหมาะสมสำหรับการแยกสารยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ซึ่งมีขั้วมาก จากสมุนไพร 2 ชนิดคือ มะตูม (*Aegle marmelos*) และปอกระเจา (*Corchorus olitorius*) ซึ่งมียางงานการศึกษาในสัตว์ทดลองยืนยันว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ นอกจากนี้จะได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวด้วย

2. วัตถุประสงค์

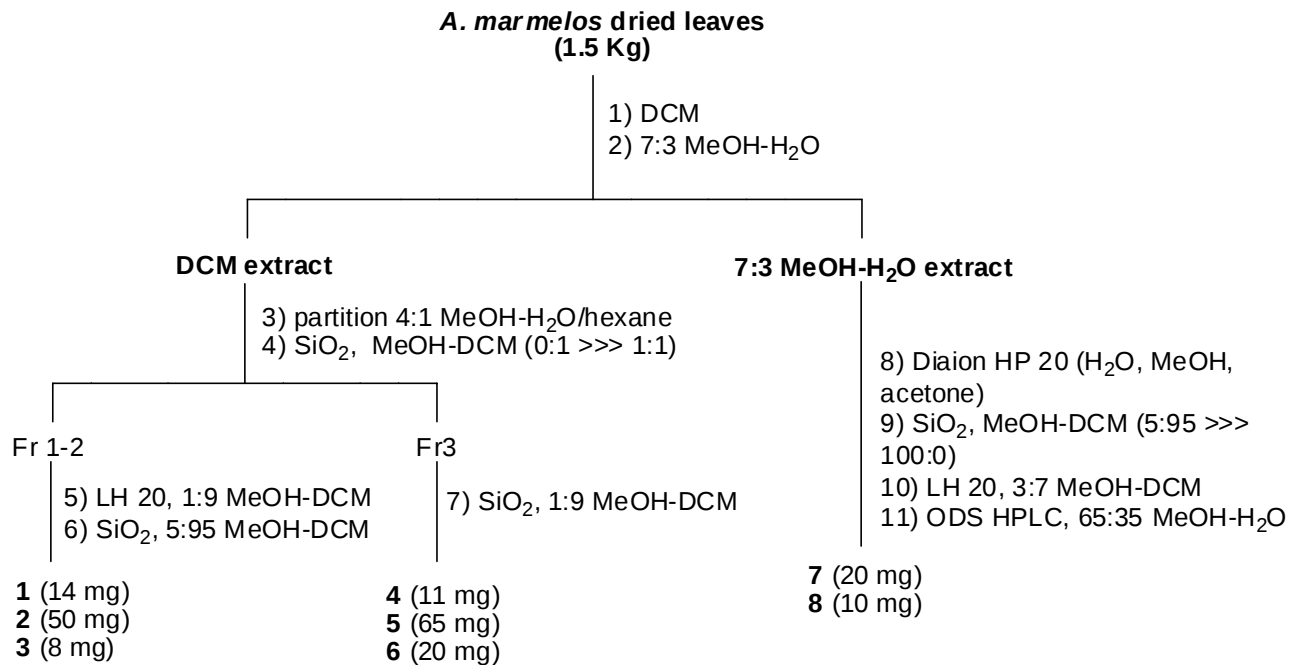
- 2.1 ศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จากใบมะตูมและปอกระเจา
- 2.2 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการแยกสารออกฤทธิ์ในข้อ 2.1 โดยการใช้ polymeric resin เช่น ชนิดของ polymeric resin และระบบตัวทำละลาย

3. ผลการวิจัย

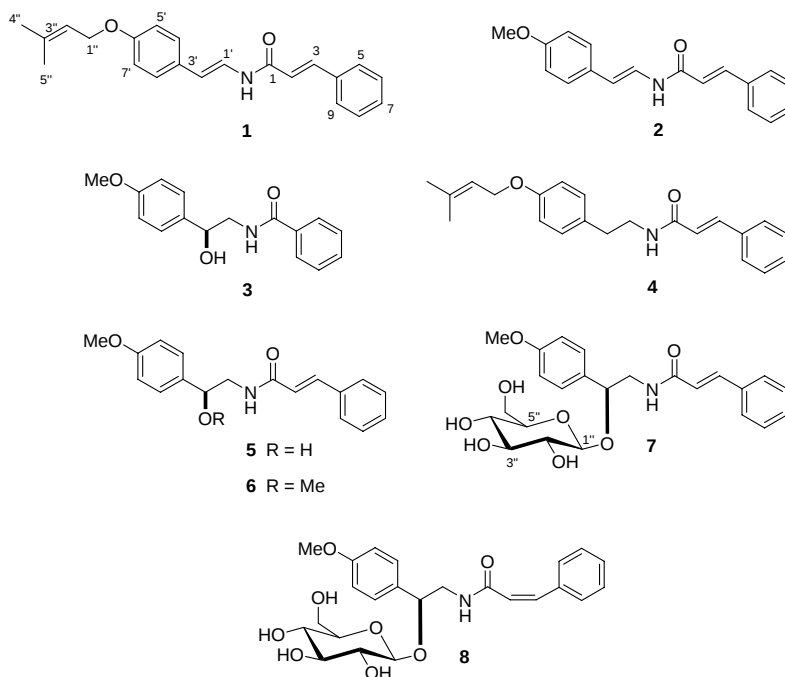
3.1 การศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จากใบมะตูม

การศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จากใบมะตูม ได้ดำเนินการโดยใช้หลักการ “bioassay-guided isolation” คือการแยกสารให้บริสุทธิ์ร่วมกับการติดตามฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นระยะ (แผนภาพ

ที่ 1) องค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ที่แยกได้เป็นสารในกลุ่ม phenyl ethyl cinnamide ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 8 ชนิด คือ anhydromarmeline (1), anhydroaegeline (2), (-)-tembamide (3), dehydromarmeline (4), (-)-aegeline (5), (-)-O-methylether aegeline (6), aeginoside A (7) และ aeginoside B (8) โดยมีโครงสร้างดังนี้



แผนภาพที่ 1 การสกัด แยกสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จากใบมะตูม

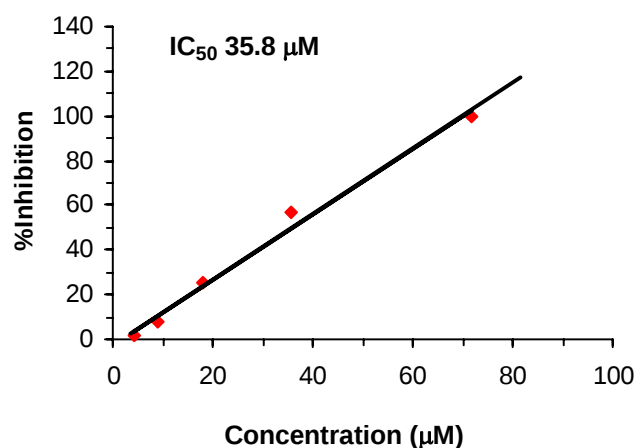


รูปที่ 1 โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะตูม

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ซึ่งได้ผลดังนี้

ตารางที่ 2 การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะตูม

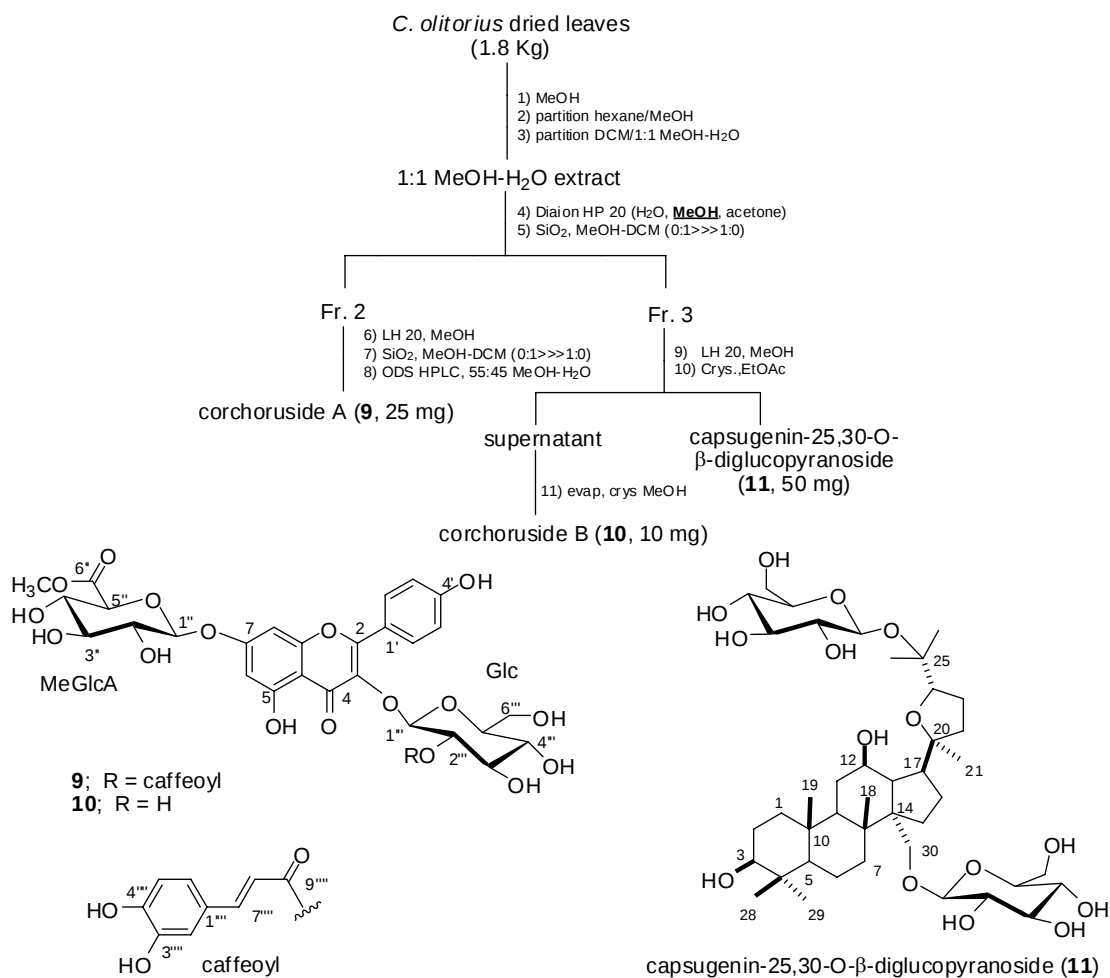
Compound	% Inhibition at various concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	10.0	5.0	2.5	1.25
1	30.1 $\pm$ 1.32	13.2 $\pm$ 0.25	8.1 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.05
2	56.5 $\pm$ 0.64	25.2 $\pm$ 0.91	7.5 $\pm$ 0.87	1.7 $\pm$ 0.11
3	13.5 $\pm$ 0.68	11.4 $\pm$ 0.60	7.8 $\pm$ 0.44	1.5 $\pm$ 0.13
4	19.7 $\pm$ 1.59	15.9 $\pm$ 1.05	NI	NI
5	36.0 $\pm$ 0.34	20.9 $\pm$ 1.40	11.2 $\pm$ 1.11	5.3 $\pm$ 0.77
6	12.6 $\pm$ 1.05	NI	NI	NI
7	17.6 $\pm$ 1.07	11.6 $\pm$ 0.51	6.1 $\pm$ 0.54	4.6 $\pm$ 0.99
8	8.8 $\pm$ 0.39	3.4 $\pm$ 0.59	NI	NI



ผลจากการแยกสารบริสุทธิ์ได้สารใหม่ 3 ชนิดที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน โดยให้ชื่อว่า anhydromarmeline (1), aegelinoside A (7) และ aegelinoside B (8) และผลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารที่แยกได้พบว่า anhydroaegeline (2) ออกฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุดที่สุดด้วยค่า IC₅₀ 35.8 μM

3.2 การศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จากใบปอกระเจา

การศึกษาศาสตร์ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จากใบปอกระเจา ได้ดำเนินการโดยใช้หลักการ bioassay-guided isolation เช่นเดียวกับการศึกษาศาสตร์จากใบมะตูม ทำการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีและพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ ดังแผนภาพที่ 2

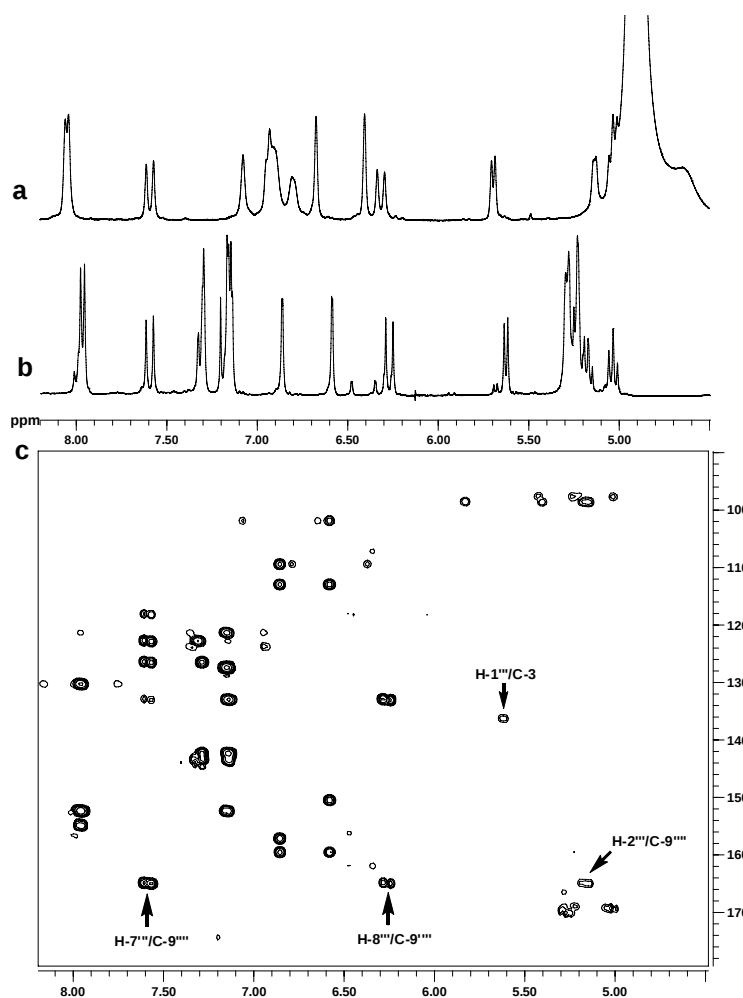


แผนภาพที่ 2 การสกัด แยกสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จากใบปอกระเจา

จากการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี และพิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี พบว่ามีสารใหม่ 2 ชนิดคือ corchoruside A (**9**) และ corchoruside B (**10**) ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดเป็นสารในกลุ่ม flavonol glycoside โดยมีส่วนของน้ำตาลคือ glucose และ methyl glucuronate (MeGlcA) ซึ่งน้ำตาลชนิดหลังนี้ ไม่ค่อยพบใน glycoside โดยทั่วไป การพิสูจน์ยืนยันโครงสร้างของ corchoruside A นอกจากจะใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปีแล้วยังต้องใช้วิธีการทางเคมี เนื่องจากสัญญาณ ^1H NMR ที่ไม่คมชัดทำให้ไม่ปรากฏข้อมูลการเชื่อมต่อระหว่าง anomeric proton กับส่วนของ flavonol ใน HMBC ภายหลังการเตรียมอนุพันธ์ acetate สัญญาณ ^1H NMR ของ corchoruside A nonacetate คมชัดขึ้นและบางสัญญาณมีการกระจายตัวดีขึ้นกว่าเดิมทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถระบุตำแหน่งของการเชื่อมต่อระหว่างน้ำตาลกับ flavonol ได้ (รูปที่ 2) นอกจากนี้ยังได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบปอกระเจา

Compound	α -Glucosidase inhibitory effect (IC ₅₀ , mM)
corchoruside A	0.18 $\pm$ 0.01
corchoruside B	0.72 $\pm$ 0.03
capsugenin-25,30-O- β - diglucopyranoside	1.42 $\pm$ 0.03
Acarbose*	0.62 $\pm$ 0.03
1-Deoxynojirimycin (DNJ)	0.17 $\pm$ 0.02



รูปที่ 2 NMR spectrum ของ corchoruside A และ corchoruside A nonaacetate: (a) ^1H NMR spectrum ของ corchoruside A ใน CD_3OD ; (b) ^1H NMR spectrum ของ corchoruside A nonaacetate ใน CDCl_3 และ (c) HMBC spectrum บางส่วนของ corchoruside A nonaacetate บริเวณที่ถูกครีซคือข้อมูลสำคัญบางจุดที่แสดงตำแหน่งการเชื่อมต่อระหว่างน้ำตาลกับ flavonol เช่น H-1''' กับ C-3 ซึ่งไม่ปรากฏใน HMBC spectrum ของ corchoruside A ใน CD_3OD

corchoruside A สามารถยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} 0.18 mM ซึ่งเทียบเท่ากับ 1-deoxynojirimycin (DNJ) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase และมีฤทธิ์ดีกว่า acarbose ซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวาน ถึง 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง corchoruside A และ corchoruside B ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavonoid glycoside กับ capsugenin-25,30-O- β -diglucopyranoside ซึ่งเป็นสารกลุ่ม triterpenoid glycoside พบว่า corchoruside A และ corchoruside B มีฤทธิ์ที่ดีกว่า เมื่อพิจารณาจากโครงสร้าง สารทั้งสองต่างกันที่หมู่ caffeoyl ในโครงสร้าง ข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าหมู่ดังกล่าวมีส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์

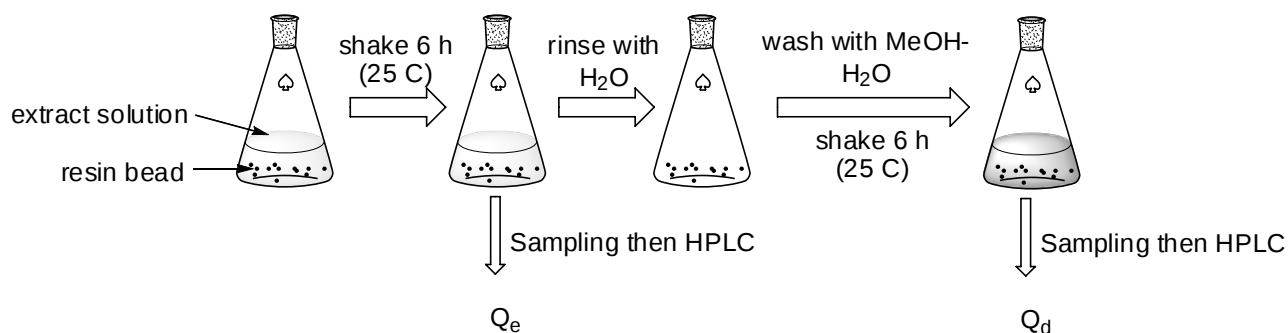
3.3 การศึกษาการดูดซับสารสำคัญจากใบมะตูมและใบปอกระเจาโดยใช้โพลีเมอร์เรซิน

การศึกษานี้เพื่อใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยก สำหรับ polymeric resin ที่จะใช้มีทั้งหมด 5 ชนิด คือ Diaion HP 20, XAD-4, XAD-7, XAD-16 และ XAD-1180 ซึ่งนิยมใช้ในการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยมีสมบัติดังสรุปไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สมบัติทางเคมีและกายภาพของ polymeric resin ที่ใช้ในการวิจัย

Trade name	Structure	Pore radius (Å)	Surface area (m ² /g)	Porosity (mL/g)	Particle size (mm)	Density (g/mL)
Diaion HP20	SDVB	260	500	1.30	0.25-0.84	1.01
XAD-7	acrylic	90	450	1.14	0.25-0.84	1.24
XAD-1180	SDVB	300	600	1.68	0.25-0.84	1.04
XAD-4	SDVB	50	725	0.98	0.25-0.84	1.08
XAD-16	SDVB	100	800	1.82	0.25-0.84	1.08

ประสิทธิภาพของโพลีเมอร์เรซินแต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัยหลัก คือ adsorption capacity (Q_e), desorption capacity (Q_d) และ desorptio ratio (D) โดยทั่วไป โพลีเมอร์เรซินที่ดีและมีประสิทธิภาพในการดูดซับ ควรมีค่าทั้ง 3 ที่สูง เพราะนอกจากจะดูดซับได้ดีแล้ว เมื่อชะล้างสารสำคัญออกจากเรซินควรสามารถชะล้างได้มาก (Q_d มาก) และเหลือตกค้างน้อยที่สุด (D มาก) การศึกษาประสิทธิภาพของโพลีเมอร์เรซินแต่ละชนิด สามารถสรุปได้ดังแผนภาพที่ 3



Adsorption capacity $Q_e = \frac{V_i(C_0 - C_e)}{W}$

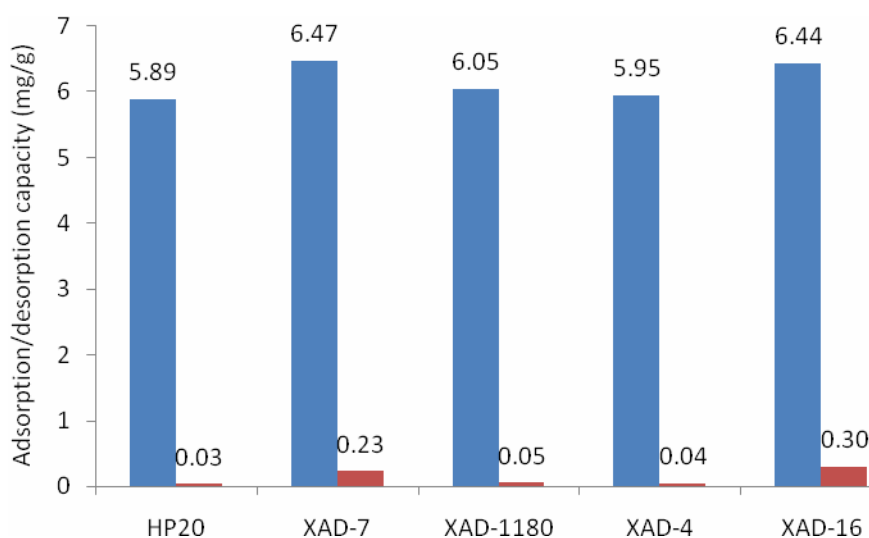
Desorption capacity $Q_d = \frac{V_d C_d}{W}$

Desorption ratio $D = \frac{C_d V_d}{V_i(C_0 - C_e)} \times 100$

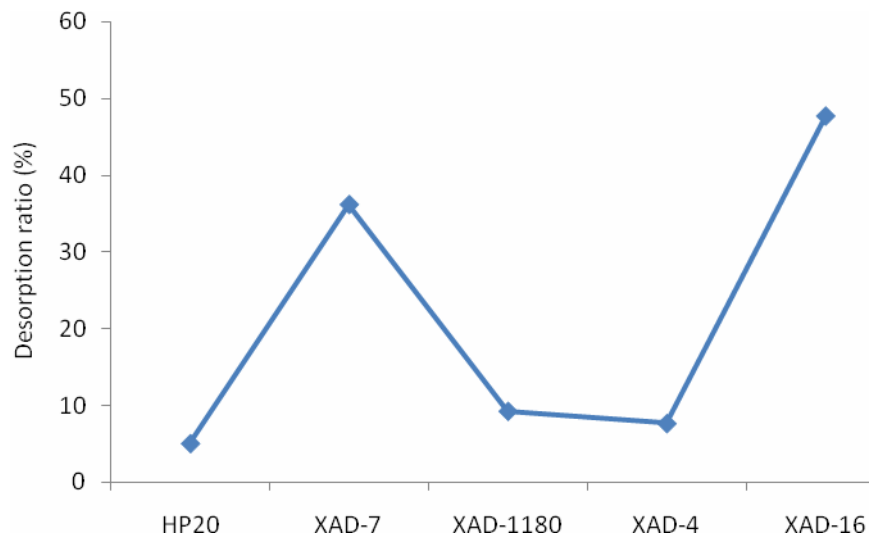
where V_i = initial volume of extract solution (mL)
 V_d = desorption volume of extract solution (mL)
 C_0 = initial concentration of extract solution (mg/mL)
 C_e = equilibrium concentration (after adsorption) of extract solution (mg/mL)
 C_d = desorption concentration of extract solution (mg/mL)
 W = weight of resin bead (g)

แผนภาพที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับของโพลิเมอริกเรซิน

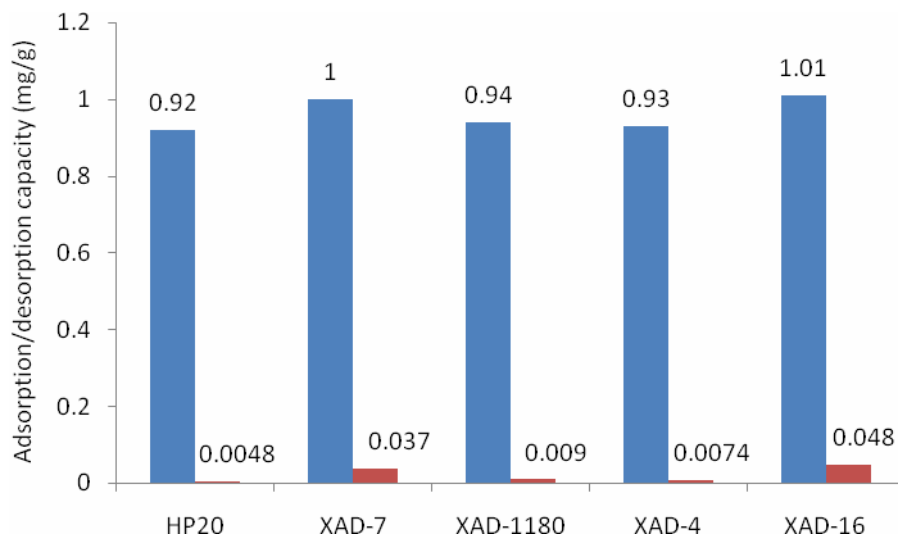
สำหรับสารสกัดจากใบมะตูม ได้เลือกศึกษาประสิทธิภาพของโพลิเมอริกเรซินแต่ละชนิด ในการดูดซับ aegelinoside A (7) และ aegelinoside B (8) ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่



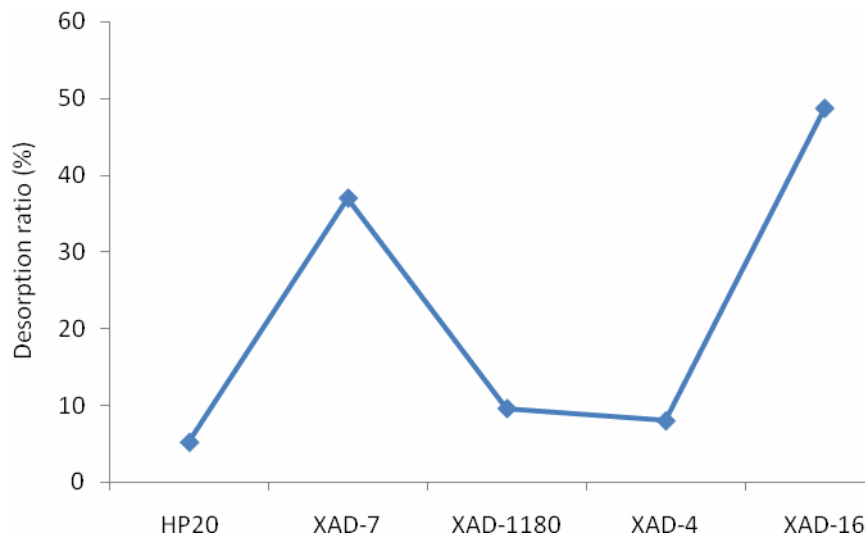
รูปที่ 3 ค่า adsorption capacity และ desorption capacity ของ aegelinoside A (7) บนโพลิเมอริกเรซินชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 4 ค่า desorption ration ของ aegelinoside A (7) บนโพลิเมอริกเรซินชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 5 ค่า adsorption capacity และ desorption capacity ของ aegelinoside B (8) บนโพลิเมอริกเรซินชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 6 ค่า desorption ration ของ aegelinoside B (8) บนโพลิเมอริกเรซินชนิดต่าง ๆ

จากการวิจัยพบว่า ในบรรดาโพลิเมอริกเรซินทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองนั้น XAD-16 มี adsorption capacity, desorption capacity และ Desorption ratio สูงที่สุด ต่อการดูดซับ aegelinoside A (7) และ aegelinoside B (8) ทั้งนี้อาจเกิดจาก XAD-16 มีพื้นที่ผิวสัมผัสมากที่สุด ($800 \text{ m}^2/\text{g}$) และ ความพรุนสูง (1.82 mL/g) ซึ่งเอื้ออำนวยให้สารตัวอย่างถูกดูดซับได้มาก อย่างไรก็ตาม XAD-16 ยังมี desorption ration ต่อ aegelinoside A (7) และ aegelinoside B (8) ค่อนข้างต่ำ คือ 47.7 และ 48.7 ตามลำดับ ซึ่งก็หมายความว่า ยังมีปริมาณสารตัวอย่างตกค้างอยู่ในโครงสร้างของเรซินค่อนข้างสูง

ส่วนการศึกษาประสิทธิภาพของโพลิเมอริกเรซินแต่ละชนิด ในการดูดซับสารสำคัญจากใบปอกระเจา ได้ดำเนินการเช่นเดียวกับการศึกษาในใบมะตูม อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารสกัดมีคลอโรฟิลล์ในปริมาณสูง ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณสารสำคัญในใบปอกระเจาได้

ผลงานจากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

การดำเนินโครงการวิจัยนี้มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ 2 เรื่อง คือ

1. **Phuwapraisirisan, P.**; Puksasook, T.; Jong-aramruang, J.; Kokpol, U. "Phenylethyl cinnamides: A new series of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aegle marmelos*" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4956-4958.
2. **Phuwapraisirisan, P.**; Puksasook, T.; Kokpol, U.; Suwanborirux, K. "Corchorusides A and B, new flavonol glycosides as α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Corchorus olitorius*" *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5864-5867.

ภาคผนวก



Phenylethyl cinnamides: A new series of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aegle marmelos*

Preecha Phuwapraisirisan^{a,*}, Thanchanok Puksasook^{a,b}, Jonkolnee Jong-aramruang^c, Udom Kokpol^a

^a Natural Products Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

^b Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^c Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20231, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 June 2008

Revised 8 August 2008

Accepted 11 August 2008

Available online 14 August 2008

Keywords:

Phenylethyl cinnamide

Aegle marmelos

Anhydromarmeline

Aegelinosides A

Aegelinosides B

α -Glucosidase

Diabetes mellitus

ABSTRACT

A series of phenylethyl cinnamides, which included new compounds named anhydromarmeline (**1**), aegelinosides A (**7**) and B (**8**), were isolated from *Aegle marmelos* leaves as α -glucosidase inhibitors. The structures of new compounds were characterized by spectroscopic data and chemical degradation. Of compounds isolated, anhydroaegeline (**2**) revealed the most potent inhibitory effect against α -glucosidase with IC_{50} value of 35.8 μ M. The present result also supports ethnopharmacological use of *A. marmelos* as a remedy for diabetes mellitus.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Type 2 diabetes mellitus affects approximately 215 million people worldwide. It is currently clear that aggressive control of hyperglycemia in patients with type 2 diabetes can attenuate the development of chronic complications such as retinopathy and nephropathy.¹ To date, therapy for type 2 diabetes relies mainly on several approaches intended to suppress the hyperglycemia, which include reducing gut glucose absorption.

Therefore inhibition of α -glucosidase, an enzyme catalyzing the cleavage of glycosidic bonds in oligosaccharides or glycoconjugates, is a method of choice to control elevated glucose level in blood. Although novel generations of α -glucosidase inhibitors have been consistently synthesized, those having multiple actions are greatly required. Recent investigations have reported the exceptional actions of α -glucosidase inhibitors from natural sources.² Prominent examples included aegeline, a hydroxyl amide alkaloid from *Aegle marmelos* leaves, which suppressed both blood glucose and plasma triglyceride levels.³

Aegle marmelos is typically known as 'bael' in India. It belongs to the family of Rutaceae, which is widely used in Indian Ayurvedic medicine for the treatment of diabetes mellitus. Despite several reports of its antihyperglycemic activity,⁴ the active principles have not been identified. In this Letter, we describe the isolation, characterization and glucosidase inhibitory effect of phenylethyl

cinnamides; three of which named anhydromarmeline (**1**), aegelinosides A (**7**) and B (**8**), are newly discovered (see Fig. 1).

The air-dried leaves of *A. marmelos*, collected in Nakornpatom in April 2006, were extracted with CH_2Cl_2 and 7:3 MeOH-H₂O using

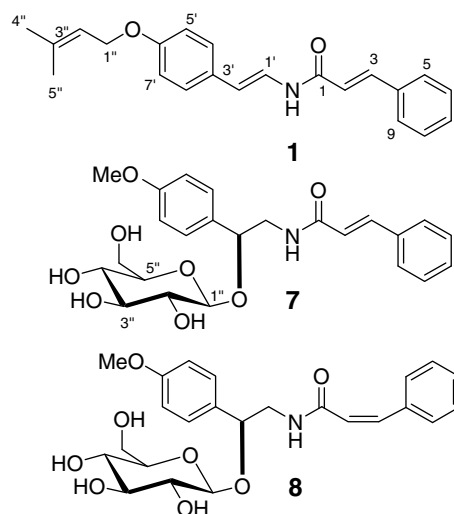


Figure 1. New metabolites isolated from *A. marmelos*.

* Corresponding author. Tel.: +662 218 7624; fax: +662 218 7598.

E-mail address: preecha.p@chula.ac.th (P. Phuwapraisirisan).

Soxhlet extractor. The CH_2Cl_2 extract was dissolved in 4:1 MeOH– H_2O and partitioned with hexane. The methanolic layer was chromatographed on silica gel using stepwise MeOH– CH_2Cl_2 (0:1, 5:95, 10:90, 20:80 and 50:50), yielding five major fractions. The combined fractions 1 and 2 were further purified on Sephadex LH-20 (1:9 MeOH– CH_2Cl_2) and silica gel (5:95 MeOH– CH_2Cl_2) to afford anhydromarmeline⁵ (**1**, 14 mg), anhydroaegeline (**2**, 50 mg), and (–)-tembamide (**3**, 8 mg). In addition, dehydromarmeline (**4**, 11 mg), (–)-aegeline (**5**, 65 mg), and (–)-O-methylether aegeline (**6**, 20 mg) were also obtained from fraction 3, on purification using silica gel (10:90 MeOH– CH_2Cl_2). The 7:3 MeOH– H_2O extract was loaded onto Diaion HP-20 and excessively eluted with H_2O , MeOH and acetone. The MeOH fraction was separated by VCC (stepwise 5:95, 10:90, 15:85, 50:50, 70:30 and 100:0 MeOH– CH_2Cl_2). The combined fractions eluted with 15:85 and 50:50 MeOH– CH_2Cl_2 were subsequently purified by Sephadex LH-20 (3:7 MeOH– CH_2Cl_2) followed by RPHPLC (ODS, 65:35 MeOH– H_2O , UV 254 nm) to furnished aegelinosides A (**7**, 20 mg, t_R 32.4 min) and B (**8**, 10 mg, t_R 27.1 min).

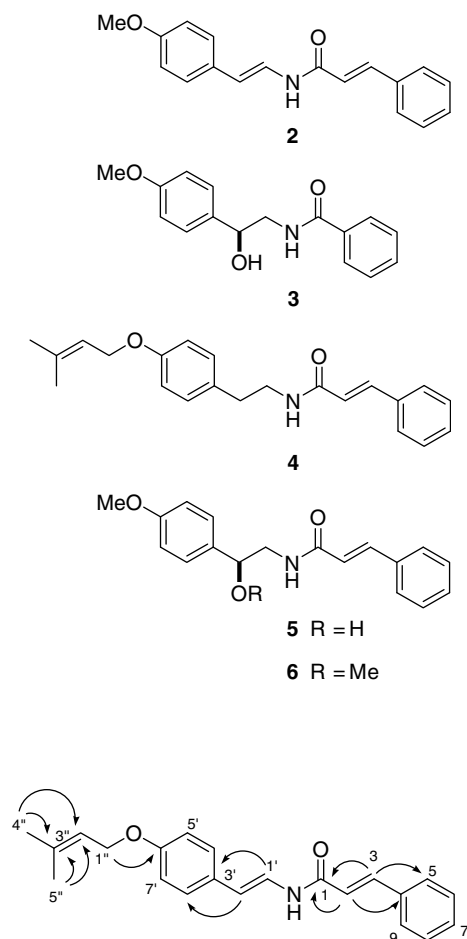


Figure 2. Selected HMBC correlations of **1**.

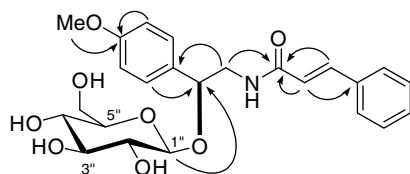


Figure 3. Selected HMBC correlations of **7**.

Table 1

^1H and ^{13}C NMR data for aegelinosides A (**7**, CD_3OD) and B (**8**, acetone- d_6)

Position	Aegelinoside A (7)		Aegelinoside B (8)	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	166.5		166.4	
2	120.5	6.65, d, 15.6	124.1	6.05, d, 12.8
3	140.5	7.50, d, 15.6	136.4	6.68, d, 12.8
4	135.4		135.9	
5, 9	127.5	7.57, m	129.8	7.68, m
6, 8	128.1	7.35, m	128.0	7.31, m
7	129.3	7.35, m	129.4	7.31, m
1'	46.0	3.57, d, 6.4	45.4	3.56, m
2'				3.38, m
2''	77.0	5.00, t, 6.4	77.9	4.89, dd, 7.6, 4.4
3'	130.0		131.3	
4', 8'	128.0	7.35, d, 8.8	128.2	7.37, d, 8.6
5', 7'	113.7	6.92, d, 8.8	113.5	6.89, d, 8.6
6'	159.6		159.4	
1''	99.5	4.12, d, 7.2	100.5	4.18, d, 7.2
2''	73.7	3.28, m	73.7	3.24, m
3''	76.3	3.23, m	76.8	3.27, m
4''	70.4	3.26, m	70.5	3.32, m
5''	76.6	3.09, m	76.3	3.18, m
6''	61.5	3.87, dd, 11.6, 2.0	62.0	3.65, m
		3.67, dd, 11.6, 5.6		3.84, m
OMe	54.1	3.78, s	54.4	3.78, s

Anhydromarmeline (**1**)⁶ was obtained as yellow needle. The molecular formula was established as $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_2$ by HRESIMS. The ^1H NMR spectrum displayed most signals in aromatic region (6.1–7.7), in addition to the upfield resonances that are ascribable to oxygenated prenyl moiety [δ_{H} 5.49 (m, 1H), 4.50 (d, $J = 6.8$ Hz), 1.80 and 1.74 (s, each 3H)].⁷ The ^{13}C NMR showed 22 signals, five of which were quaternary carbons which included resonance of

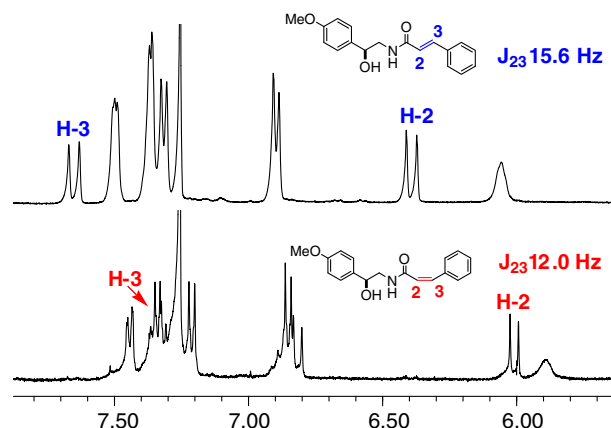


Figure 4. Partial ^1H NMR spectra of aglycones **5** (top) and **8a** (bottom) obtained from hydrolysis of **7** and **8**, respectively.

Table 2

α -Glucosidase inhibitory effect of isolated compounds

Compound	% Inhibition at various concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	10.0	5.0	2.5	1.25
1	30.1 ± 1.32	13.2 ± 0.25	8.1 ± 0.6	1.3 ± 0.05
2	56.5 ± 0.64	25.2 ± 0.91	7.5 ± 0.87	1.7 ± 0.11
3	13.5 ± 0.68	11.4 ± 0.60	7.8 ± 0.44	1.5 ± 0.13
4	19.7 ± 1.59	15.9 ± 1.05	NI	NI
5	36.0 ± 0.34	20.9 ± 1.40	11.2 ± 1.11	5.3 ± 0.77
6	12.6 ± 1.05	NI	NI	NI
7	17.6 ± 1.07	11.6 ± 0.51	6.1 ± 0.54	4.6 ± 0.99
8	8.8 ± 0.39	3.4 ± 0.59	NI	NI

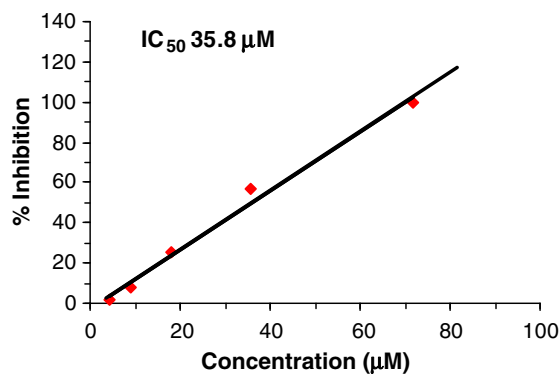


Figure 5. Inhibitory effect of anhydroaegeline (**2**) against α -glucosidase on hydrolysis of *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside.

amide (δ_C 162.7). Interpretation of 2D NMR resulted in the construction of two separated aromatic systems, which were connected through amide linkage. A monosubstituted benzene [δ_H 7.53 (2H) and 7.38 (3H)] was connected to *trans*-olefinic protons [δ_H 7.75 (d, J = 15.2 Hz) and 6.44 (d, J = 15.2 Hz)], which were in turn linked to amide carbon based on HMBC correlations from H-2 and H-3 to C-1. The other aromatic motif was assigned to a *para*-substituted benzene [δ_H 7.28 (d, J = 8.4 Hz, 2H) and 6.86 (d, J = 8.4 Hz, 2H)], which was accommodated by the oxygenated prenyl ($\text{Me}_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{O}-$) and ethyleneamine ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{NH}-$) moieties. A large coupling constant (14.4 Hz) of olefinic protons (H-1'' and H-2'') pointed out that they were *E*-oriented. Therefore the gross structure of anhydromarmeline (**1**) was depicted (see Fig. 2).

Aegelinoside A (**7**)⁸ was isolated from 7:3 MeOH–H₂O extract and displayed $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ion in HRESIMS at m/z 482.1781 that led to molecular formula of $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_8$. The ^1H NMR spectrum (Table 1) of **7** in CD_3OD showed signals of aromatic and olefinic protons in range of 6.6–7.6 (11H) and oxygenated methylenes and methines (δ_H 3.0–5.2, 10H). The ^{13}C NMR spectrum displayed 24 signals, which included resonance of amide (δ_C 166.5). The resonances of δ_H 7.57 (m, 2H), 7.50 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.35 (m, 3H), and 6.65 (d, J = 15.6 Hz, 1H) were ascribable to *trans*-cinnamide based on COSY and HMBC data. The signals at δ_H 7.35 (d, J = 8.8 Hz, 2H) and 6.92 (d, J = 8.8 Hz, 2H) were assigned to *p*-disubstituted benzene which was accommodated by methoxy group (δ_H 3.78 and δ_C 54.1) at C-6' and oxygenated ethyl amine moiety ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$) at C-3'. The HMBC cross peaks (Fig. 3) observed for H-2, H-3, and H-1' to C-1 indicated that these two separated aromatic systems were linked through amide bond. The remaining oxygenated methylenes and methines were assigned to β -D-glucose residue, which was attached to C-2' based on HMBC correlation from H-1'' (4.12, d, J = 7.2 Hz) to C-2'. Therefore overall structure of **7** was accomplished. The absolute configuration of C-2' was determined by chemical degradation. Hydrolysis of **7** in 1 M HCl under reflux yielded D-glucose and (–)-aegeline; the latter of which was identical in all respects, particularly optical rotation ($[\alpha]_D^{25}$ –27.6), to *R*-aegeline (lit. $[\alpha]_D^{25}$ –35.9)⁹.

Aegelinoside B (**8**)¹⁰ was isomeric to **7** as evidenced by a molecular formula of $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_8$. Although direct comparison of their ^1H and ^{13}C NMR spectra could not be made since they were recorded in different solvents, **8** revealed signals essentially identical to those of **7**. Significant difference observed by us was slightly up-field olefinic protons H-2 (6.05, d, J = 12.8 Hz) and H-3 (6.68, d, J = 12.8 Hz). A relative small coupling constant (J_{23} = 12.8 Hz) indicated that Δ^2 in **8** was *cis*-oriented instead of *trans*-oriented in **7**. The gross structure of **8** was subsequently confirmed by 2D NMR data. The absolute configuration of C-2' was also deduced by chemical degradation. Acid hydrolysis of **8** afforded D-glucose and corre-

sponding hydrolysate named aegeline B (**8a**, Fig. 4), whose minus sign of specific rotation ($[\alpha]_D^{26}$ –20.6) was reminiscent to that of a 2'-*R*-phenylethyl cinnamide.¹¹

Compounds **1**, **7** and **8** displayed slightly weak inhibition (30.1, 17.6 and 8.8%, respectively) against α -glucosidase, even at concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (see Table 2).¹² Of compounds isolated, anhydroaegeline (**2**) turned out to be the most potent inhibitor possessing IC_{50} value of 35.8 μM (Fig. 5).

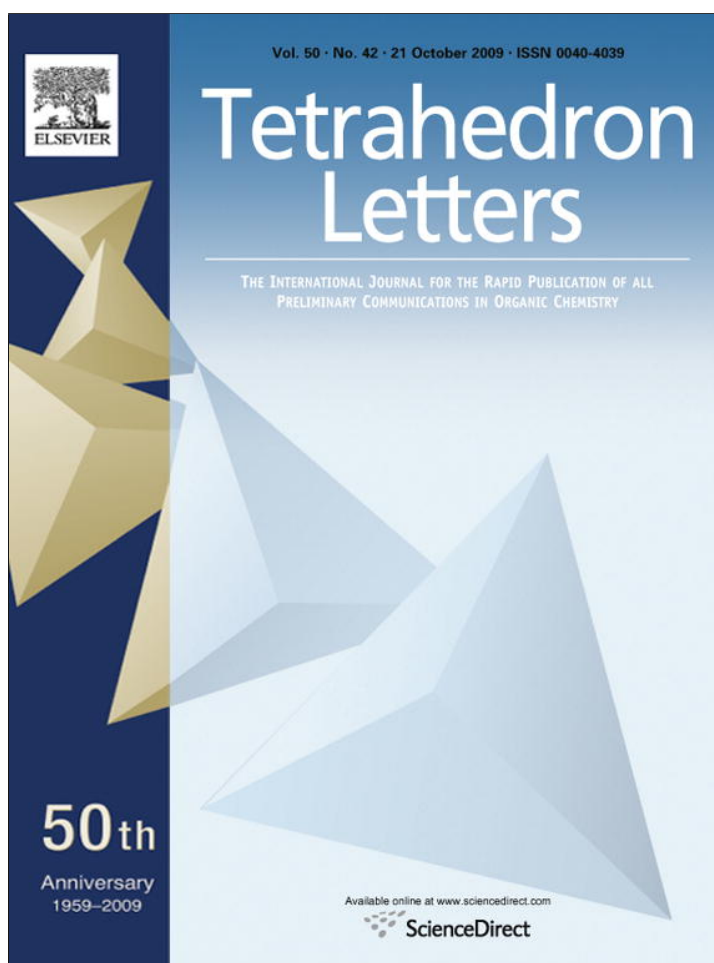
In summary, we have isolated a variety of phenylethyl cinnamides, which included anhydromarmeline (**1**), aegelinosides A (**7**) and B (**8**), as a novel type of α -glucosidase inhibitors. Although phenylethyl cinnamides have been commonly encountered in certain genus such as *Aegle*¹³ and *Hibiscus*,¹⁴ the presence of *cis*-cinnamide moiety in **8** is extraordinarily rare in Nature. Recently Narender et al. have demonstrated that aegeline (**5**), the related congener of **7** and **8**, could serve as a potential remedy for diabetes mellitus by suppressing blood glucose and plasma triglyceride levels. Therefore they are likely to deserve further development discovering new antidiabetes drugs having dual functions.

Acknowledgments

This work was financially supported by Thailand Research Fund (MRG5180158) and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (F-31-GS-ES13/28).

References and notes

- Moller, D. E. *Nature* **2001**, 414, 821.
- For comprehensive reviews of natural α -glucosidase inhibitors, see: (a) Melo, E. B.; Gomes, A. S.; Carvalho, I. *Tetrahedron* **2006**, 62, 10277; (b) Watson, A. A.; Fleet, G. W. J.; Asano, N.; Molyneux, R. J.; Nash, R. J. *Phytochemistry* **2001**, 56, 265.
- Narender, T.; Shweta, S.; Tiwari, P.; Reddy, K. P.; Khaliq, T.; Prathipati, P.; Puri, A.; Srivastava, A. K.; Chander, R.; Agarwal, S. C.; Raj, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 1808.
- For recent reports, see (a) Kesari, A. N.; Gupta, R. K.; Singh, S. K.; Diwakar, S.; Watal, G. J. *Ethnopharmacol.* **2006**, 107, 374; (b) Panda, S.; Kar, A. *Phytother. Res.* **2006**, 20, 1103; (c) Upadhyay, S.; Shanbhag, K. K.; Suneetha, G.; Naidu, M. B.; Upadhyay, S. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **2004**, 48, 476.
- Although several phenylethyl cinnamides have been isolated from *A. marmelos*, many of which have not been given the IUPAC or trivial names, for the sake of communication in this Letter, we adopted terms 'marmeline' for phenylethyl cinnamides having 6'-phenyloxy and 'aegeline' for those having 6'-methoxy.
- Anhydromarmeline (**1**): UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 277 (4.81), 333 (4.46); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.74 (3H, s, H-5''), 1.80 (3H, s, H-4''), 4.50 (2H, d, J = 6.8 Hz, H-1''), 5.49 (1H, m, H-3''), 6.14 (1H, d, J = 14.4 Hz, H-3'), 6.44 (1H, d, J = 15.2 Hz, H-2), 6.86 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-5' and H-7'), 7.28 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-4' and H-8'), 7.38 (3H, m, H-6, H-7 and H-8), 7.53 (3H, m, H-5, H-9 and H-1'), 7.75 (1H, d, J = 15.2 Hz, H-3); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 18.2 (C-5''), 25.8 (C-4''), 65.4 (C-1''), 113.2 (C-3'), 115.0 (C-5' and C-7'), 119.7 (C-2), 119.9 (C-2''), 126.7 (C-4' and C-8'), 128.0 (C-5 and C-9), 129.1 (C-6 and C-8), 130.1 (C-7), 132.4 (C-4), 137.5 (C-1'), 138.3 (C-3''), 143.8 (C-3), 158.1 (C-6'), 162.7 (C-1); HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 356.1623 (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_8\text{Na}$, 356.1626).
- Phuwapraisirisan, P.; Udomchotphruet, S.; Surapinit, S.; Tip-pyang, S. *Nat. Prod. Res.* **2006**, 20, 1332.
- Aegelinoside A (**7**): $[\alpha]_D^{25}$ –26.3 (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 274 (4.73); ^1H and ^{13}C NMR (see Table 1); HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 482.1781 (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_8\text{Na}$, 482.1791).
- Kamal, A.; Shaik, A. A.; Sandbhor, M.; Malik, M. S. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, 15, 3939.
- Aegelinoside B (**8**): $[\alpha]_D^{25}$ –33.3 (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 260 (4.43); ^1H and ^{13}C NMR (see Table 1); HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 482.1786 (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_8\text{Na}$, 482.1791).
- Optically pure phenylethyl amides having only one chiral secondary alcohol revealed different signs of specific rotation; (–) for *R* and (+) for *S* isomers. For certain instances, see Ref. 9.
- The inhibitory effects of isolated compounds were validated using previous protocol with slight modification. For detailed experiment, see: Schäfer, A.; Högger, P. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2007**, 77, 41.
- (a) Govindachari, T. R.; Premila, M. S. *Phytochemistry* **1983**, 22, 755; (b) Sharma, B. R.; Rattan, R. K.; Sharma, P. *Phytochemistry* **1981**, 20, 2606; (c) Manandhar, M. D.; Shobh, A.; Kapil, R. S.; Popli, S. P. *Phytochemistry* **1978**, 17, 1814; (d) Basu, D.; Sen, R. *Phytochemistry* **1974**, 13, 2329; (e) Shobh, A.; Kapil, R. S.; Popli, S. P. *Phytochemistry* **1973**, 12, 2071.
- Seca, A. M. L.; Silva, A. M. S.; Silvestre, A. J. D.; Cavaleiro, J. A. S.; Domingues, F. M. J.; Pascoal-Neto, C. *Phytochemistry* **2001**, 58, 1219.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tetlet

Corchorusides A and B, new flavonol glycosides as α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Corchorus olitorius*

Preecha Phuwapraisirisan^{a,*}, Thanchanok Puksasook^{a,b}, Udom Kokpol^{a,†}, Khanit Suwanborirux^c

^a Natural Products Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^b Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^c Center for Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi (BNPME), Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2009

Revised 14 July 2009

Accepted 7 August 2009

Available online 13 August 2009

ABSTRACT

Corchorus olitorius, a highly fibrous vegetable commonly known as moroheiya, has long been recognized for its hypoglycemic activity. Bioassay-guided fractionation of the leaf extract led to the isolation of two new flavonol glycosides named corchorusides A and B, in addition to a major component, capsugenin-25,30-O- β -diglucopyranoside. Corchoruside A comprises a kaempferol moiety connected with caffeic acid, glucose, and a rare methyl glucuronate (MeGlcA). The occurrence of a caffeoyl moiety in corchoruside A enhanced significantly its inhibitory effect toward α -glucosidase compared to that in corchoruside B.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Type 2 or non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) is a metabolic disorder characterized by insufficient use of insulin. NIDDM is often associated with obesity and develops when chronic overnutrition combines with genetic susceptibility. Recently, several clinical studies have demonstrated that modification of food intake, by consuming dietary fiber, significantly enhanced insulin secretion, inhibited glucosidase activity and delayed glucose absorption into the bloodstream.¹ Therefore, it is of interest to employ vegetables containing high dietary fiber as an alternative anti-diabetic food. In our search for α -glucosidase inhibitors from natural sources,^{2,3} we have focused on *Corchorus olitorius* due to its historic recognition as an antidiabetes remedy and potent inhibitory effect in our screening. *C. olitorius* (Tiliaceae family) is indigenous to Egypt and the Middle East, and its young leaves have been introduced to East Asia and Japan as a healthy vegetable, typically recognized as Moroheiya. Its health benefits have been reported in terms of antitumor promotion,⁴ antioxidant properties⁵ and antibacterial activity.⁶ Recently, Innami demonstrated that *C. olitorius* leaf extract significantly suppressed postprandial blood glucose level in rats and humans.⁷ In addition, both the diffusion rate of glucose and permeation rate of glucose in cultured Caco-2 cells were significantly reduced by the addition of leaf extract.⁷ To date, the active principles that are largely associated with the delayed absorption of glucose have not been identified. An attempt to characterize the active components in *C. olitorius* leaves using

α -glucosidase inhibition-guided fractionation resulted in the isolation of two new flavonol glycosides.

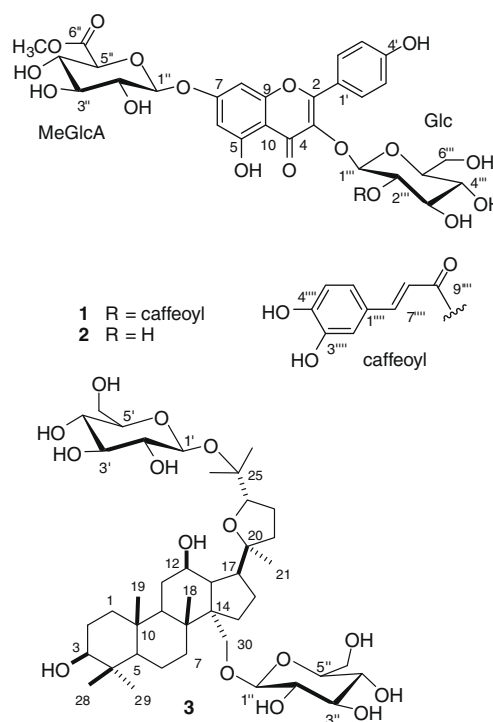


Figure 1.

* Corresponding author. Tel.: +662 218 7624; fax: +662 218 7598.

E-mail address: preecha.p@chula.ac.th (P. Phuwapraisirisan).

† Deceased author.

The dried leaves (1.8 kg) of *C. olitorius* were extracted with MeOH to afford a dark-green residue which was further partitioned with hexane and CH_2Cl_2 . The resulting aqueous MeOH extract was chromatographed on Diaion HP-20, which was successively eluted with H_2O , MeOH, and acetone. The active MeOH fraction was subsequently purified using Sephadex LH-20 (MeOH), silica gel chromatography (10:90 $\rightarrow$ 70:30 MeOH– CH_2Cl_2), and RP-HPLC (55:45 MeOH– H_2O) to yield two new flavonol glycosides named corchorusides A (**1**, 162 mg) and B (**2**, 51 mg), together with the major triterpenoid glycoside capsugenin-25,30-*O*- β -diglucopyranoside⁸ (**3**, 209 mg) (Fig. 1).

Corchoruside A (**1**)⁹ has the molecular formula $\text{C}_{37}\text{H}_{36}\text{O}_{20}$ as established by HRESIMS and NMR data. The UV spectrum of **1** exhibited absorptions [267 (3.68), 333 (3.77)] that were ascribable to the flavonol skeleton.¹⁰ The ^1H NMR spectrum of **1** (Fig. 2a), recorded in CD_3OD , contained proton resonances in aromatic and

glycosidic regions only, in addition to a methoxy signal [δ_{H} 3.64 (3H, s)]. Despite signal broadening around 6.6–7.1 ppm (Fig. 1a), two separate aromatic spin systems were established by COSY data and coupling constant analysis. The *meta*-coupled resonances [δ_{H} 6.38 (1H, br s, H-8) and 6.65 (1H, br s, H-6)] as well as the aromatic protons [δ_{H} 8.02 (2H, br d, $J = 8.6$ Hz, H-2' and H-6') and 6.91 (2H, overlapped, H-3' and H-5')] were assigned to rings A and B of the kaempferol unit, respectively. The *trans*-olefinic protons [δ_{H} 7.56 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7''') and 6.29 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8''')] in conjunction with an aromatic ABX spin system [δ_{H} 6.78 (1H, m, H-5'''), 6.90 (1H, m, H-6''') and 7.04 (1H, br s, H-2''')] were assigned to a caffeoyl moiety, as was evident from diagnostic HMBC cross peaks (H-2'''/C-7''', H-6'''/C-7''', H-7'''/C-9''', and H-8'''/C-9'''). In the glycosidic region, the anomeric resonances at δ_{H} 5.13/ δ_{C} 99.6 and δ_{H} 5.68/ δ_{C} 99.2 indicated the presence of two sugar residues. However, the identity of these units and glycosidic

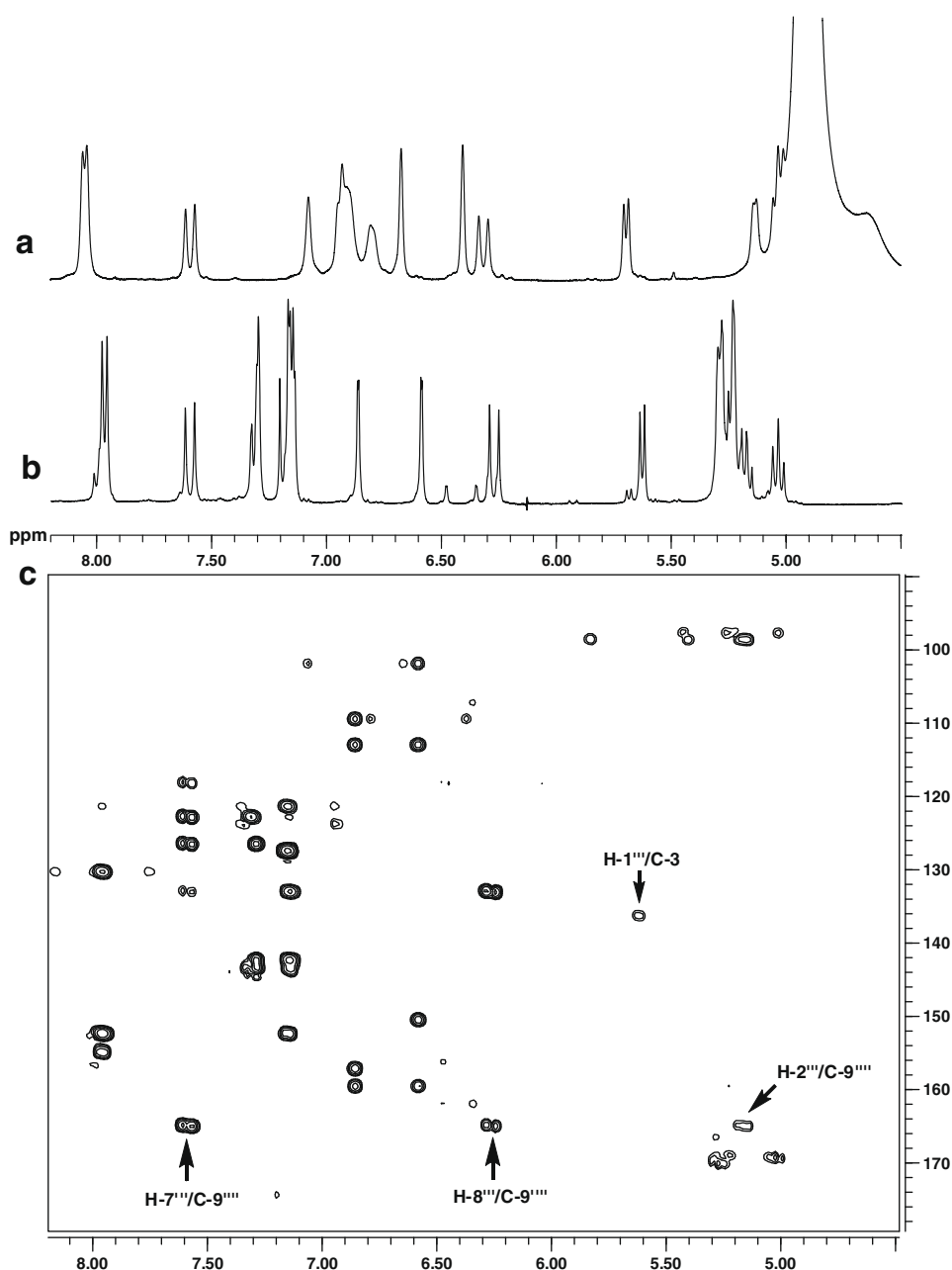


Figure 2. NMR spectra of corchoruside A (**1**) and its nonaacetate (**1a**). (a) ^1H NMR spectrum of **1** in CD_3OD , (b) ^1H NMR spectrum of **1a** in CDCl_3 , and (c) HMBC spectrum of **1a**. Particular diagnostic HMBC cross peaks are indicated by solid arrows.

Table 1

NMR data (400 MHz) of corchoruside A (**1**, CD₃OD) and its nonaacetate derivative (**1a**, CDCl₃)

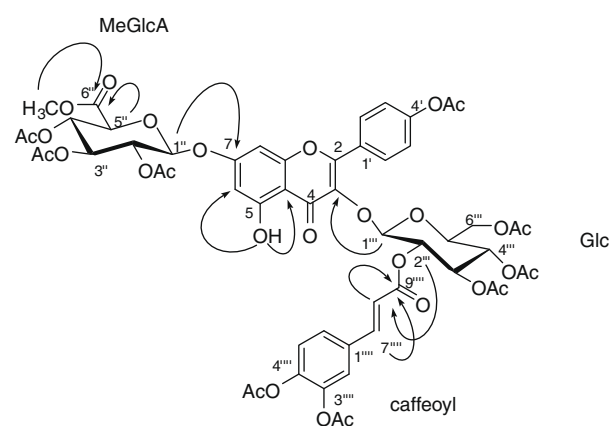
Position	1		1a^a	
	δ_C	δ_H , mult, <i>J</i> in Hz	δ_C	δ_H , mult, <i>J</i> in Hz
2	157.7		152.2	
3	133.8		136.0	
4	174.8		172.0	
5	156.4		157.3	
5-OH				12.39, s
6	94.2	6.65, br s	102.1	6.86, d, 2.0
7	162.6		159.6	
8	99.1	6.38, br s	109.6	6.59, d, 2.0
9	160.4		150.4	
10	106.4		113.5	
1'	120.7		121.4	
2', 6'	131.1	8.02, br d, 8.6	130.0	7.97, d, 8.4
3', 5'	115.0	6.91, m	121.5	7.17, d, 8.8
4'	160.4		155.0	
MeGlcA				
1''	99.6	5.13 ^b	98.1	5.29, d, 8.0
2''	70.2	3.40, m	68.2	5.06, m
3''	77.4	3.34, m	72.0	5.24, m
4''	71.6	3.62, m	68.8	5.30, m
5''	75.3	4.16, d, 9.2	72.8	4.23, d, 9.2
6''	169.4		166.0	
7''	49.5	3.64, s	53.0	3.68, s
Glc				
1'''	99.2	5.68, d, 8.0	99.2	5.98, d, 7.6
2'''	74.3	5.03, m	74.3	5.21, m
3'''	74.8	3.64, m	74.8	5.28, m
4'''	73.1	3.52, m	73.1	5.27, m
5'''	75.6	3.55, m	75.6	5.17, m
6'''	61.2	3.57, m	61.2	3.95, m
Caffeoyl				
1''''	126.5		132.9	4.02, m
2''''	114.1	7.04, br s	122.8	7.30, s
3''''	145.4		142.5	
4''''	148.4		143.9	
5''''	115.5	6.78, m	123.8	7.15, br s
6''''	122.0	6.90, m	126.3	7.32, br s
7''''	146.1	7.56, d, 16.0	144.0	7.59, d, 16.0
8''''	114.0	6.29, d, 16.0	118.1	6.27, d, 16.0
9''''	166.4		165.0	

^a The acetate signals resonated at: δ_H 2.34, 2.27, 2.24, 2.23, 1.99, 1.97, 1.94, 1.91, and 1.89; δ_C 21.2, 21.1, 21.0, 20.9, 20.6, 20.4 (4 × CH₃), 170.6, 170.3, 170.2, 169.7 (3 × C=O), 169.4, 169.2, and 169.0.

^b Overlapped with the signal for water.

linkages could not be confirmed due to the lack of diagnostic 2D NMR correlations. In fact, this problem has been encountered frequently in the case of samples dissolved in certain polar solvents such as CD₃OD and acetone-*d*₆, leading to signal broadening. We have demonstrated that acetylated glycosides produce sharper and better-separated signals than their parent congeners.¹¹ Thus **1** was acetylated using Ac₂O/pyridine, affording corchoruside A nonaacetate (**1a**)¹² in which all the hydroxy groups, except for 5-OH, were acetylated. Therefore, the complete structure of **1** was established as its acetylated derivative (Fig. 3).

Corchoruside A nonaacetate (**1a**) produced sharp and well-separated signals that allowed clear HMBs (Fig. 2b and c). Two sugar residues were identified by interpretation of the 2D NMR data along with analysis of ¹H–¹H coupling constants. Starting with the anomeric proton at δ_H 5.29, five contiguous methines were apparent. In the HMBC spectrum, H-5'' (δ_H 4.23) correlated with a carbon at δ_C 166.0 (C-6''), which was in turn coupled with a methoxy proton (δ_H 3.68), indicating that this sugar residue was glucose-derived and possessed a methyl carboxylate (Fig. 3). Therefore, this unit was assigned as methyl glucuronate (MeGlcA). In the same manner, the anomeric proton at δ_H 5.98 and its contiguous oxygenated protons were assigned to a glucose moiety (Glc).

**Figure 3.** Selected HMBCs of **1a**.

The glycosidic linkages were established by HMBC data analysis. MeGlcA was connected to C-7 of kaempferol through β -orientation as indicated by the HMBC between H-1'' and C-7 as well as the large coupling constant (8.0 Hz) for the anomeric proton. Similarly, the HMBC cross peak between H-1''' and C-3 and the large *J* value of 7.6 Hz suggested the connectivity of Glc to the aglycone via β -orientation. The caffeoyl moiety was attached at C-2''' of Glc as demonstrated by the HMBs between H-2'''/C-9''', H-7'''/C-9''' and H-8'''/C-9''', thus completing the structure of corchoruside A.

Corchoruside B (**2**)¹³ gave an [M+Na]⁺ ion at *m/z* 661.1375 in the HRESIMS spectrum, which corresponded to a molecular formula of C₂₈H₃₀O₁₇Na. The ¹H NMR spectrum of **2** (pyridine-*d*₅) was similar to that of **1** (CD₃OD) even though they were recorded in different solvents. Careful examination of the ¹H and ¹³C NMR spectra of **2** (Table 2) revealed the absence of olefinic protons and certain aromatic resonances. In the aromatic region, *m*-coupled protons [δ_H 7.13 (1H, d, *J* = 2.0 Hz) and 6.89 (1H, d,

Table 2

NMR data (400 MHz) of corchoruside B (**2**) in pyridine-*d*₅

Position	2	
	δ_C	δ_H , mult, <i>J</i> in Hz
2	156.4	
3	133.4	
4	173.8	
5	155.4	
6	93.5	7.13, d, 2.0
7	161.9	
8	98.7	6.89, d, 2.0
9	161.3	
10	105.6	
1'	120.5	
2', 6'	130.5	8.24, d, 8.8
3', 5'	114.8	7.28, d, 8.8
4'	160.4	
MeGlcA		
1''	100.2	4.82, d, 7.2
2''	73.1	4.52, m
3''	76.5	4.56, m
4''	71.5	4.71, m
5''	75.8	5.03, d, 9.6
6''	168.8	
7''	50.8	3.77, s
Glc		
1'''	102.2	5.20, d, 7.2
2'''	74.7	4.50, m
3'''	77.0	4.47, m
4'''	70.5	4.36, m
5'''	77.8	4.18, m
6'''	61.2	4.38, m
		4.52, m

Table 3
 α -Glucosidase inhibitory effects

Compound	α -Glucosidase inhibitory effect (IC ₅₀ , mM)
1	0.18 ± 0.01
2	0.72 ± 0.03
3	1.42 ± 0.03
Acarbose	0.62 ± 0.03
1-Deoxynojirimycin (DNJ)	0.17 ± 0.02

$J = 2.0$ Hz)] and *o*-coupled resonances [δ_{H} 8.24 (2H, d, $J = 8.8$ Hz) and 7.28 (2H, d, $J = 8.8$ Hz)] suggested that **2** possessed a kaempferol core structure. Two anomeric protons (δ_{H} 5.20 and 4.82) revealed an identical 2D NMR correlation pattern as observed in **1**, suggesting that **2** possibly comprised MeGlcA and Glc residues, which was further supported by acid hydrolysis. The difference in molecular mass of 162 amu ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$) in connection with the absence of the aforementioned resonances indicated that **2** was a decaffeoyl congener of **1**.

Corchoruside A (**1**) inhibited α -glucosidase activity with an IC₅₀ value of 0.18 mM, which is threefold more active than that of the standard diabetes drug acarbose and comparable to DNJ (Table 3). On the other hand, the congener **2** demonstrated significantly reduced inhibition (IC₅₀ 0.72 mM), suggesting that the caffeoyl moiety is critical in blocking enzyme function.

In summary, we have succeeded in identifying two new flavonol glycosides **1** and **2**, which display antidiabetic activity, from the leaf extract of *C. olitorius*. Corchoruside A comprises a kaempferol moiety connected to glucose and caffeoyl residues, in addition to a rare sugar, methyl glucuronate (MeGlcA).¹⁴ We also demonstrated that despite signal broadening and the lack of diagnostic 2D NMR correlations in the original spectra of **1**, the overall structure could be eventually established by transformation of **1** into its peracetylated derivative **1a**. Flavonol glycosides possessing 7-glucuronic acid are encountered only in particular species such as *Allium cepa*,¹⁵ *Tanacetum parthenium*,¹⁶ and *Tulipa gesneriana*.¹⁷ The markedly improved α -glucosidase inhibitory effect of **1** over that of **2** clearly pointed to the crucial role of the caffeoyl residue in blocking the enzyme function. Although a variety of compounds containing the caffeoyl moiety have been synthesized and validated for glucosidase inhibition,^{18,19} the nature of the interaction between the caffeoyl moiety and binding sites of the enzyme remains unknown.

Acknowledgments

This work was supported by the Thailand Research Fund (MRG5180158), the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (F-31-GS-ES13/28), TRF Master Research Grant, (MRG-WII505S005) and Science & Technology Research Grant from Thailand Toray Science Foundation (TTSF).

References and notes

- For leading reports on the association between dietary fiber and reduction in the incidence of diabetes, see: (a) Schulze, M. B.; Liu, S.; Rimm, E. B.; Manson, J. E.; Willett, W. C.; Hu, F. B. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 348–356; (b) Chandalia, M.; Garg, A.; Lutjohann, D.; Von Bergmann, K.; Grundy, S. M.; Brinkley, L. J. *N. Eng. J. Med.* **2000**, *342*, 1392–1398; (c) Meyer, K. A.; Kushi, L. H.; Jacobs, D. R., Jr.; Slavin, J.; Sellers, T. A.; Folsom, A. R. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 921–930; (d) Salmerón, J.; Manson, J. E.; Stampfer, M. J.; Colditz, G. A.; Wing, A. L.; Willett, W. C. *J. Am. Med. Ass.* **1997**, *277*, 472–477.
- Phuwapraisirisan, P.; Pukkasook, T.; Jong-aramruang, J.; Kokpol, U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4956–4958.
- Wacharasindhu, S.; Worawalai, W.; Rungprom, W.; Phuwapraisirisan, P. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2189–2192.
- Furumoto, T.; Wang, R.; Okazaki, K.; Hasan, A. F. M. F.; Ali, M. I.; Kondo, A.; Fukui, H. *Food Sci. Technol. Res.* **2002**, *8*, 239–243.
- Azuma, K.; Nakayama, M.; Koshioka, M.; Ippoushi, K.; Yamaguchi, Y.; Kohata, K.; Yamauchi, Y.; Ito, H.; Higashio, H. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3963–3966.
- Zakaria, Z. A.; Somchit, M. N.; Zaiton, H.; Mat Jais, A. M.; Sulaiman, M. R.; Farah, W. O.; Nazaratulmawarina, R.; Fatimah, C. A. *Int. J. Pharmacol.* **2006**, *2*, 213–215.
- Innam, S.; Ishida, H.; Nakamura, K.; Kondo, M.; Tabata, K.; Koguchi, T.; Shimizu, J.; Furusho, T. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2005**, *75*, 39–46.
- Quader, M. A.; Gray, A. I.; Waterman, P. G.; Lavaud, C.; Massiot, G.; Hasan, C. M.; Ahmed, M.-D. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 527–530.
- Corchoruside A (**1**): pale yellow powder; [α_{D}^{25} –88.7 (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 245 (3.64), 267 (3.68), 333 (3.77); positive HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 823.1715 (calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{36}\text{O}_{20}\text{Na}$, 823.1692); ¹H and ¹³C NMR (see Table 1).
- (a) Harborne, J. B. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*; Chapman & Hall: London, 1998, pp 77–79; (b) Markham, K. R. *Techniques in Flavonoid Identification*; Academic Press: London, 1982, pp 36–45.
- Phoopichayanun, C.; Phuwapraisirisan, P.; Tip-Pyang, S.; Jongaramruang, J. *Nat. Prod. Res.* **2008**, *22*, 1297–1303.
- Corchoruside A nonacetate (**1a**): white powder; [α_{D}^{25} –94.5 (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 255 (3.82), 284 (3.87), 357 (3.97); negative HRESIMS m/z [M–H][–] 1177.2755 (calcd for $\text{C}_{55}\text{H}_{53}\text{O}_{29}$, 1177.2751); ¹H and ¹³C NMR (see Table 1).
- Corchoruside B (**2**): pale yellow powder; [α_{D}^{25} –10.2 (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 265 (3.53), 346 (3.64); positive HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 661.1370 (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_{17}\text{Na}$, 661.1375); ¹H and ¹³C NMR (see Table 2).
- To confirm that the MeGlcA moiety in **1** and **2** is of natural origin, extraction of *C. olitorius* leaves using three different solvents (MeOH, EtOH, PrOH) was performed. The dried leaves (each ca. 5 g) were soaked in the solvents (2 × 300 mL) at room temperature for 2 d. The extracts were concentrated and partitioned with CH_2Cl_2 to remove chlorophyll and lipophilic residues. The resulting extract was analyzed by HPLC (5C18-AR-IIØ 4.6 × 250 mm, 55:45 MeOH–H₂O, flow rate 1.0 mL/min, UV 254 nm). The extracts obtained using MeOH, EtOH, and PrOH showed the presence of **1** (t_{R} 31.2 min) and **2** (t_{R} 28.4 min). For reports of flavonoids containing MeGlcA, see: (a) Yang, H.; Protiva, P.; Cui, B.; Ma, C.; Baggett, S.; Hequet, V.; Mori, S.; Weinstein, I. B.; Kennelly, E. J. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1501–1504; (b) Tezuka, Y.; Terazono, M.; Kusumoto, T. I.; Kawashima, Y.; Hatanaka, Y.; Kadota, S.; Hattori, M.; Namba, T.; Kikuchi, T.; Tanaka, K.; Supriyatna, S. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 408–417; (c) Allais, D. P.; Simon, A.; Bennini, B.; Chulia, A. J.; Kaoudji, M.; Christiane, D. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3099–3101; (d) Nawwar, M. A. M.; Souleman, A. M. A.; Buddrus, J.; Linscheid, M. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2347–2349.
- Urushibara, S.-I.; Kitayama, Y.; Watanabe, T.; Okuno, T.; Watarai, A.; Matsumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1213–1216.
- Williams, C. A.; Houlst, J. R.; Harborne, J. B.; Greenham, J.; Eagles, J. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 267–270.
- Budzianowski, J. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1679–1682.
- Ma, C.-M.; Hattori, M.; Daneshalab, M.; Wang, L. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6188–6194.
- Matsui, T.; Ebuchi, S.; Fukui, K.; Matsugano, K.; Terahara, N.; Matsumoto, K. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2004**, *68*, 2239–2246.